



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

**SÍNTESE DE COMPOSTOS DERIVADOS
DE AGLICONAS TRITERPÊNICAS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA**

TESE DE DOUTORADO

Gloria Narjara Santos da Silva

**Porto Alegre, RS, Brasil
2014**

GLORIA NARJARA SANTOS DA SILVA

**SÍNTESE DE COMPOSTOS DERIVADOS
DE AGLICONAS TRITERPÊNICAS COM POTENCIAL
ATIVIDADE ANTIMALÁRICA**

**Tese apresentada por Gloria Narjara Santos da
Silva à Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial do Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para a obtenção do TÍTULO DE DOUTOR.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Regina da Silva Garcia

**Porto Alegre, RS, Brasil
2014**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.02.2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Aline Rigon Zimmer

Universidade de Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Universidade de São Paulo (USP/SP)

Prof^a. Dr^a. Tiana Tasca

Universidade de Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Santos da Silva, Gloria Narjara
Síntese de compostos derivados de agliconas
triterpênicas com potencial atividade antimalárica
/ Gloria Narjara Santos da Silva. -- 2014.
215 f.

Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.
Coorientadora: Célia Regina da Silva Garcia.

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

1. Ácido betulínico. 2. Ácido ursólico. 3.
Derivados semissintéticos. 4. Plasmodium falciparum.
5. Mecanismo de ação. I. Baggio Gnoatto, Simone
Cristina, orient. II. da Silva Garcia, Célia Regina,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecárias Responsáveis:

Heloísa do Canto Canabarro

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira

Claudia da Silva Gonçalves

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A avaliação biológica dos compostos foi realizada no laboratório de Biologia Celular e Molecular de *Plasmodium*, no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP/SP); no Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Rutgers, The State University of New Jersey e no Laboratório de Bioecologia de Insetos no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Rondônia (UNIR).

O auxílio financeiro durante o período do doutorado foi através de bolsa de estudos CAPES e do programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE/CAPES).

Dedicatória

Às aproximadamente 207 milhões de pessoas que sofrem anualmente com a
doença malária.

Aos meus pais, Nereu e Fatima, pelo constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Nereu, Fatima, Roseane e João Victor. Sem vocês seria impossível enfrentar qualquer desafio. Eu amo muito vocês.

À minha irmã, Roseane, pela amizade e companhia indispensável na minha vida.

Ao meu irmão, João Victor, em quem sempre encontro um lugar de alegria e boas risadas. Pessoas como você fazem o mundo valer à pena.

À Prof^a. Dr^a. Simone Cristina Baggio Gnoatto, pelo excelente trabalho como minha orientadora e por me mostrar que a ciência pode ser vivida de uma forma leve e prazerosa.

À Prof^a. Dr^a. Célia Regina da Silva Garcia, pela co-orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Andrew Philip Thomas, pela atenção, contribuição e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, em um estágio sanduíche que me proporcionou crescimento profissional.

À colega Adrine M. Innocente, pela amizade sem a qual eu realmente não teria chegado até aqui. Muito obrigada por ter sido um ombro amigo em todos os momentos difíceis que quase me fizeram desistir deste meu objetivo.

Aos colegas do laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (UFRGS), que de alguma maneira contribuíram e incentivaram o meu trabalho. Em especial as minhas colegas Nicole Garcia Maria e Francine dos Santos pela paciência e auxílio nas exaustivas horas de trabalho. Também às colegas, Denise Diedrich e Laura Vieira, pelas conversas, respeito e carinho imensamente preciosos.

Aos queridos colegas Alexandre Budu, Bruna Koresch, Bruno Cunha, Desirée Schuck, Eduardo Alves, Fernanda Koyama, Julio Garcia, Laura Cruz, Lucas Borges, Miriam Moraes, Myna Nakabashi, Wania Lima, Abhinay Sharma e Pratibha Gaur do laboratório de Biologia Celular e Molecular de *Plasmodium* (USP/SP) pela receptividade e transmissão de conhecimentos para que o meu trabalho fosse desenvolvido da melhor maneira. Todos vocês direta ou indiretamente foram importantes para que este período fosse tão especial. Muito obrigada.

A todos os colegas da Rutgers, The State University of New Jersey pela receptividade e paciência. Em especial a colega Dr^a. Paula Barlett pela orientação e disponibilidade em ajudar na minha adaptação nos EUA.

Aos demais professores e colegas colaboradores deste trabalho, Prof^a. Dr. Grace Gosmann, Prof. Dr. Flávio Emery, Prof. Dr. Alexandre Almeida e Frances Trindade, cada um foi de suma importância para o resultado final desta tese.

Aos professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Em especial a Prof^a. Dr^a. Tiana Tasca pela disciplina ministrada que despertou o meu interesse no mundo dos parasitos. Parabéns por ser esta excelente profissional e pessoa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A CAPES e Programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE/CAPES), pelo recurso financeiro.

À minha primeira orientadora – Prof^a. Dr^a. Berta Heinzmann – e seus orientandos, com quem aprendi os meus primeiros passos na ciência, os quais eu sempre carregarei comigo.

A todos que de alguma maneira contribuíram e incentivaram a elaboração desta tese.

A você leitor pelo interesse no meu trabalho.

Epígrafe

*“Spirit lead me where my trust is without borders
Let me walk upon the waters
Wherever You would call me
Take me deeper than my feet could ever wander
And my faith will be made stronger
In the presence of my Savior*

*I will call upon Your Name
Keep my eyes above the waves
My soul will rest in Your embrace
I am Yours and You are mine”*

Oceans (Where feet may fail)
Hillsong United
(Joel Houston / Matt Crocker / Salomon Ligthelm)

RESUMO

Tese de Doutorado
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

SÍNTESE DE COMPOSTOS DERIVADOS DE AGLICONAS TRITERPÊNICAS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIMALÁRICA

DOUTORANDA: GLORIA NARJARA SANTOS DA SILVA
ORIENTADORA: PROF^(A) DR. SIMONE CRISTINA BAGGIO GNOATTO
CO-ORIENTADORA: PROF^(A) DR. CÉLIA REGINA DA SILVA GARCIA
Local e Data da Defesa: Porto Alegre, 28 de fevereiro de 2014.

A malária é uma doença infecciosa importante em países tropicais. A transmissão ocorre através da picada da fêmea do mosquito *Anopheles* que libera a forma esporozoítos de espécies de *Plasmodium*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 627 mil mortes ocorrem anualmente. São complicadores desta situação a crescente resistência das espécies de *Plasmodium* aos antimaláricos de uso convencional, o difícil controle do mosquito transmissor devido a falta de um inseticida eficaz e ausência de uma vacina. Considerando este panorama novos fármacos necessitam ser desenvolvidos que atendam aos requisitos de rápida eficácia, mínima toxicidade e baixo custo. Nosso grupo de pesquisa tem buscado a obtenção de novos antimaláricos através da modificação estrutural de compostos de origem natural. Como resultado foram obtidos derivados piperazínicos do triterpeno ácido ursólico (AU) através de farmacomodulação em C-28, com atividade frente a cepa cloroquina (CQ)-resistente FcB1 de *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 80$ nM, superior à da CQ ($IC_{50} = 130$ nM)). Visando dar continuidade na busca de novos compostos antimaláricos, este trabalho objetivou a obtenção dos triterpenos ácido betulínico (AB) e AU, seguido de modificação nas posições C-3 e C-28 para avaliação da atividade antimalárica. Assim, foram obtidas duas séries de derivados (série AB e série AU) totalizando 18 moléculas inéditas que possuem em C-3 substituintes ésteres com variações no tamanho e ramificação da cadeia de carbonos e presença de grupos com diferente eletronegatividade e polaridade. Seis novos derivados piperazínicos também foram sintetizados. Todos os compostos obtidos tiveram a sua atividade antimalárica testada frente à cepa CQ-sensível 3D7 de *P. falciparum*, seguida da análise da relação estrutura-atividade (REA). Os derivados **1e**, **1f** e **2e** apresentaram boa atividade com $IC_{50} = 5$, 8 e 7 μ M, respectivamente, sendo que cinco derivados piperazínicos apresentaram excelente atividade com IC_{50} na faixa de 1 – 0,316 μ M. Estes derivados quando avaliados quanto à citotoxicidade *in vitro*, frente à célula de rim

embrionário humano (HEK293T), mostraram-se não citotóxicos ou com baixa citotoxicidade nas concentrações testadas. Com base nestes resultados passamos a investigar o mecanismo de ação, uma vez que até este momento poucos estudos foram desenvolvidos para este tipo de estrutura triterpênica. Três diferentes mecanismos de ação foram avaliados levando em consideração mecanismos de fármacos disponíveis no mercado para o tratamento da malária. São eles, colapso do potencial de membrana mitocondrial (mecanismo de ação da atovaquona) e inibição da formação da β -hematina (mecanismo de ação da CQ), além da avaliação na modulação na via de sinalização do Ca^{2+} por se tratar de um importante íon na fisiologia do parasito. Os derivados testados mostraram não atuar nos mecanismos envolvendo membrana mitocondrial e β -hematina. Porém, os primeiros resultados em trofozoítos isolados indicaram que a via de sinalização do Ca^{2+} pode estar envolvida no mecanismo de ação dos derivados piperazínicos. Ensaio mais detalhado, em parasitos mantidos em hemácias, na via de sinalização do Ca^{2+} foram realizados para os derivados piperazínicos aqui descritos e outros dois derivados piperazínicos com excelente atividade antimalárica sintetizados pelo nosso grupo. Estes resultados comprovaram o mecanismo de ação destes compostos envolvendo a desregulação da homeostasia do Ca^{2+} liberado de compartimento ácido, mecanismo proposto para a cloroquina e nigericina.

Palavras-chave: Malária, *Plasmodium*, citotoxicidade, Ca^{2+} , potencial de membrana mitocondrial, β -hematina, ácido betulínico, ácido ursólico, derivados semissintéticos.

ABSTRACT

PhD's Degree Thesis
Program Post-Graduate in Pharmaceutical Science
Federal University of Rio Grande do Sul

SYNTHESIS OF COMPOUNDS TRITERPENOIDS AGLICON DERIVATIVES WITH ANTIMALARIAL ACTIVITY POTENTIAL

AUTHOR: GLORIA NARJARA SANTOS DA SILVA

SUPERVISOR: PROF^(A) DR SIMONE CRISTINA BAGGIO GNOATTO

CO-SUPERVISOR: PROF^(A) DR. CÉLIA REGINA DA SILVA GARCIA

Place and Date of the Defense: Porto Alegre, February 28th, 2014.

Malaria is an infection disease important in tropical countries. The transmission happens through the bite of *Anopheles* female that release the sporozoites stage of the *Plasmodium* species. According to World Health Organization (WHO) around 627 mil deaths happen annually. Complicating this situation is the resistance increase of the *Plasmodium* species to antimalarials in conventional use, the hard mosquito control due the lack of an effective insecticide and a vaccine. Considering this panorama new medicines need being developed that fulfill the requirements of rapid efficacy, minimal toxicity and low cost. Our research group has sought the obtaining of new antimalarials through the structural modification of the compounds from natural source. As results were obtained the piperazines derivatives of the triterpene ursolic acid (UA) through the pharmacomodulation in C-28, with activity against the chloroquine (CQ)-resistance FcB1 of *Plasmodium falciparum* ($IC_{50} = 80$ nM higher than CQ ($IC_{50} = 130$ nM)). Aiming to continue the search of new antimalarial compounds, this present work aimed to obtaining of triterpenes betulinic acid (BA) and UA, following the modification at the positions C-3 and C-28 to evaluate the antimalarial activity. Then, two series of derivatives (series BA and UA) totaling 18 new compounds with C-3 ester substituent with variations in the size and branching of the carbon and the presence of groups with different electronegativity and polarity chain were obtained. Six new piperazines derivatives also were synthesized. All compounds obtained had the antimalarial activity tested against the CQ-sensitive 3D7 of *P. falciparum*, following the analysis of the structure-activity relationship (SAR). The derivatives **1e**, **1f** and **2e** displayed good activity with $IC_{50} = 5$, 8 and 7 μ M, respectively, and five piperazine derivatives showed excellent activity with IC_{50} in the range of 1 – 0.316 μ M. These derivatives when evaluated the cytotoxicity *in vitro*, against the mammalian cells (HEK293T), showed no cytotoxic or with low cytotoxicity at the concentration tested. Based on these results we investigated the action mechanism, since so far few studies have been developed for this type of triterpene structure. Three different action mechanisms were evaluated considering the

mechanism of medicines available to malaria treatment. These are, effects on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (action mechanism of atovaquone) and inhibition of β -hematin formation (action mechanism of CQ), also the evaluation in the modulation of signaling Ca^{2+} pathway since it is an important ion in the physiology of the parasite. The derivatives tested did not act in the mechanism involving mitochondrial membrane and β -hematin. However the first results in isolated trophozoites indicated that the signaling of Ca^{2+} pathway may be involved in the mechanism of action of the piperazine derivatives. More detailed tests, in parasites kept in RBC, in the Ca^{2+} pathway were performed to the piperazine derivatives here described and others two piperazine derivatives with excellent antimalarial activity synthesized by our group. These results confirmed the mechanism of action of these compounds involving the deregulation of homeostasis Ca^{2+} released from acid compartment, mechanism proposed to chloroquine and nigericin.

Key-words: Malaria, *Plasmodium*, cytotoxicity, Ca^{2+} , mitochondrial membrane potential, β -hematin, betulinic acid, ursolic acid, semisynthetic derivatives.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS CAPÍTULO I

- Figure 1.** The schematic life cycle of Malaria in humans and in the *Anopheles* mosquito 37
- Figure 2.** Antimalarials: Structure of cinchona alkaloids (quinine **1**, cinchonidine **2**, quinidine **3**, cinchonine **4**), compounds related to quinine (chloroquine **5**, hydroxychloroquine **6**, mefloquine **7**, primaquine **8**) and artemisinin and its derivatives (artemisinin **9**, dihydroartemisinin **10**, sodium artesunate **11**, artemether **12** and arteether **13**). 39
- Figure 3.** Lipinsky physicochemical properties calculated for each class of terpenes. Mean and standard deviation are shown as black lines. 79
- Figure 4.** Non-Lipinsky physicochemical properties calculated for each class of terpenes. Mean and standard deviation are shown as black lines. 80

FIGURAS CAPÍTULO II

- Figure 1.** Betulinic (**BA**) and ursolic (**UA**) acids. 92
- Figure 2.** Semisynthetic derivatives of series **BA** and **UA**. NS: Not synthesized. 93
- Figure 3 Effect of derivatives on $\Delta\Psi_m$.** Representative histograms showing the effect of higher concentration (25 μM) of derivatives **1e** (**3C**), **1f** (**3D**) and **2e** (**3E**) on $\Delta\Psi_m$ by FACS analysis. Negative control (**3B**) for the fluorescence intensity of parasites in the presence of 2 nM DiOC₆(3) without any added inhibitors and with protonophore CCCP (5 μM) (**3A**). 98

FIGURAS CAPÍTULO III

- Figure 1.** The synthesis of piperazine derivatives of betulinic acid (**BA**). Reagent and reaction conditions: **I** (anhydride, pyridine, DMAP, 1 hour, rt); **II** (Boc₂O, MeOH, 48 hours, rt); **III** (1. ClCOCOCl, 3 hours, rt, 2. Et₃N, 24 hours, rt); **IV** (TFA 10%, CH₂Cl₂, 3 hours, rt). 128
- Figure 2.** Ca²⁺ is involved (**A** and **C**) in the action mechanism of **4a** derivative in *P. falciparum*. 130

Representative traces of Fluo4-AM (green fluorescence Ca^{2+} indicator) change over time by addition of **4a** (100 μM) and thapsigargin (THG) (10 μM) in *P. falciparum* (**A**). Note that there is no Ca^{2+} increase after addition of methanol (0.05%) (**B**). (**C**) Bar graph analyses of Ca^{2+} concentration in *P. falciparum* Fluo4-AM labeled isolated parasites (10^8 cells/mL) after addition of **4a** (100 μM) (2.34 a.u. \pm 0.134, n=7, $p=0.0011$) in *P. falciparum*. p values were calculated by comparison with methanol (0.05%) data (1.458 a.u. \pm 0.057, n=4). Bar graphs represent means \pm standard deviation. The fluorescence was measured continuously (acquisition rate: every 0.5 seconds).

Figure 3. Absence of extracellular Ca^{2+} did not abolish the derivative **4a** intracellular Ca^{2+} rise in *P. falciparum*. Representative traces of Fluo4-AM (green fluorescence Ca^{2+} indicator) change over time by addition of compounds **4a** (100 μM) and THG (10 μM) in *P. falciparum* isolated parasites resuspended in buffer M without Ca^{2+} and incubated with EGTA (1 mM). Traces represent means \pm standard deviation. The fluorescence was measured continuously (acquisition rate: every 0.5 seconds). 131

Figure 4. Collapses mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Representative histograms show the effect of higher concentrations (25 μM) of derivatives **4a** (**A**) on $\Delta\Psi_m$ by FC analysis. Control stands (**B**) for the fluorescence intensity of parasites in the presence of 2 nM DiOC₆(3) without any added inhibitors and with protonophore CCCP (5 μM) (**C**). 132

FIGURAS CAPÍTULO IV

Figure 1. Structures of the betulinic and ursolic acids derivatives. The derivatives **1a**, **1b**, **2a** and **2b** are the modifications of the compounds **1e** and **2e** displayed by Silva et al. [12]. **1c** and **2c** was found by Innocente et al. [11] and synthesized again for this study. 151

Figure 2. Screening of the test derivatives (concentration at 10 μM) that release Ca^{2+} from mammalian cells and iRBCs. 153

Figure 3. Single cell Ca^{2+} imaging assay in the *P. falciparum*. 155

FIGURAS DISCUSSÃO

Figura 1. Derivados piperazínicos do **AB**. 169

Figura 2. Derivados piperazínicos dos triterpenos **AB** e **AU**. 171

LISTA DE TABELAS

TABELAS CAPÍTULO I

Table 1. Structure of monoterpenes 14-16 .	41
Table 2. Structure of sesquiterpenes 17-52 .	42
Table 3. Structure of diterpenes 53-75 .	50
Table 4. Structure of triterpenes 76-111 .	56
Table 5. Structure of semisynthetic terpenes 112-152 .	67

TABELAS CAPÍTULO II

Table 1. Anti-malarial activity of isolated and synthesized compounds against CQ-sensitive <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7	97
Table 2 Inhibition of β -haematin formation.	99

TABELA CAPÍTULO III

Table 1 <i>In vitro</i> anti-malarial activity (IC ₅₀) of BA and derivatives 4a and 4b in CQ-sensitive <i>P. falciparum</i> 3D7 strain. Cytotoxicity and selectivity index (SI) of derivative 4a in HEK293T cells.	129
---	-----

TABELA CAPÍTULO IV

Table 1. Anti-malarial activity and cytotoxic assay of compounds 1a-b and 2a-b . The results are representative of three independent experiments (n = 3) in duplicate.	152
---	-----

TABELA DISCUSSÃO

Tabela 1 - Derivados das séries AB e AU .	171
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AB	Ácido betulínico
AM	Artemeter
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ART	Artemisinina
AS	Artesunato
AU	Ácido ursólico
C	Carbono
Ca²⁺	Íon Cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CL₅₀	Concentração Letal 50%
CL₉₀	Concentração Letal 90%
CH₂Cl₂	Diclorometano
CQ	Cloroquina
g	Gramas
H	Hidrogênio
HR-EI-MS	High Resolution Electron Ionization Mass Spectra
IC₅₀	Inhibitory Concentration in 50%
IV	Infravermelho
LC₅₀	Lethal Concentration in 50%
LC₉₀	Lethal Concentration in 90%
M	Molar
mg	Miligramas
MQ	Mefloquina
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Partes por milhão
QN	Quinina
REA	Relação estrutura-atividade

RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1
WHO	World Health Organization
δ	Delta (deslocamento químico)
<i>ΔΨ_m</i>	Potencial elétrico da membrana mitocondrial

APÊNDICES

APÊNDICE I –

TRITERPENES FROM NATURAL SOURCE AND MODIFIED BY SEMISYNTHESIS EFFECTIVENESS AGAINST LARVAL AND ADULT STAGES OF *Anopheles darlingi* AND *Aedes aegypti*

Gloria Narjara Santos da Silva¹, Frances Tatiana Tavares Trindade², Francine dos Santos¹, Grace Gosmann¹, Alexandre Almeida e Silva², Simone Cristina Baggio Gnoatto^{1*}

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Insect Bioecology Laboratory, Department of Biology, Federal University of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5451, Fax: +55 51 3308 5313; e-mail address: simone.gnoatto@ufrgs.br

A ser submetido ao *Chemosphere*. Fator de Impacto: 3.137

APÊNDICE II -

Resumo dos artigos publicados durante o período de doutorado.

- 1) Innocente, Adrine; Silva, Gloria; Cruz, Laura; Moraes, Miriam; Nakabashi, Myna; Sonnet, Pascal; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. *Molecules*, v. 17, p. 12003-14, 2012.
- 2) Barros, Muriel; Innocente, Adrine; Silva, Gloria; Duarte, Mariana; Vunda, Sita; Tasca, Tiana. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. *Revista Liberato (Novo Hamburgo)*, v. 13, p. 1-25, 2012.
- 3) De Oliveira, Marcela; Innocente, Adrine; Pereira, Andrea; Dias, Daiane; Oliveira, Elder; Barreto, Fabiano; Freitas, Fernando; Meirelles, Gabriela; Silva, Gloria; Machado, Jaison; Bidone, Juliana; Andrade, Juliana; Schwingel, Liege; Muller, Liz; Pinto, Paula; Bernardi, Raquel; Kaise, Samuel; Souza, Tiago; Gnoatto, Simone. Semi-síntese: Uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IX p. 62, 2012.

APÊNDICE III -

Principais resumos publicados durante o período de doutorado

- 1) Silva, Gloria; Trindade, Frances; Santos, Francine; Gosmann, Grace; Silva, Alexandre; Gnoatto, Simone. Discovery of new chemicals from natural source effectiveness against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti*: Larvicidal/adulticidal activity of the betulinic and ursolic acids. In: Drug Discovery & Therapy World Congress, Boston, MA, 2013.
- 2) Silva, Gloria; Cruz, Laura; Nakabashi, Myna; Schuck, Desirée; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Ca²⁺ homeostasis as a potential drug target against malaria parasite: Action mechanism of betulinic acid derivative. In: Drug Discovery & Therapy World Congress, Boston, MA, 2013.
- 3) Silva, Gloria; Innocente, Adrine; Schuck, Desirée; Nakabashi, Myna; Maria, Nicole; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Effect of synthetic betulinic acid derivatives on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in *Plasmodium falciparum* strains. In: International Congress on Natural Products Research, New York, NY, 2012.

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract	12
Lista de Figuras	14
Lista de Tabelas	16
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	18
Apêndices.....	20
Sumário	24
1 Introdução	27
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo Geral	31
2.1.1 Objetivos Específicos.....	31
3 Artigos Científicos	32
3.1 CAPÍTULO I	34
3.2 CAPÍTULO II	88
3.3 CAPÍTULO III	118
3.4 CAPÍTULO IV	144
4 Discussão Geral	164
5 Conclusão	167
6 Referências Bibliográficas	171
Apêndices	
Apêndice I	180
Apêndice II	199
Apêndice III	208

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a malária é endêmica em 106 países, afetando assim aproximadamente metade da população mundial. Os números exatos são desconhecidos, porém o último relatório mundial da malária mostrou entorno de 207 milhões de casos e 627 mil mortes. No continente Africano a doença é mais devastadora registrando 90% das mortes e 80% dos casos. Dos casos registrados em 2012 na América Latina 52% ocorrem no Brasil, sendo que do total das 108 mortes 59% tem incidência no Brasil, principalmente nos estados do norte (WHO, 2013).

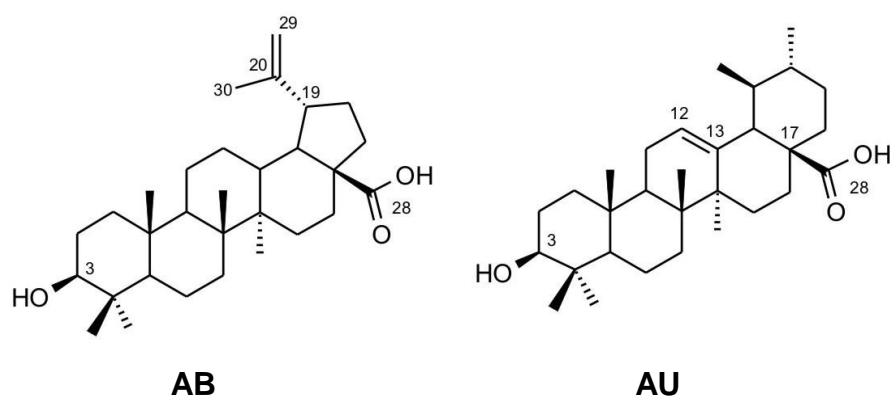
As espécies do gênero *Plasmodium* são agentes etiológicos da malária, sendo que em humanos cinco são conhecidas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malarie*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium knowlesi*. As manifestações mais severas da doença, ou seja, com as formas mais virulentas são causadas por *P. falciparum*, estando relacionado com 91% dos casos mundiais. No Brasil a maioria dos casos é resultante da infecção por *P. vivax* (85%) (WHO, 2013).

Como fonte alternativa de compostos antimaláricos destaca-se os produtos naturais, que tanto possibilitaram como inspiraram os medicamentos atualmente disponíveis. Neste sentido, a semissíntese tem demonstrado ser uma ferramenta bastante importante, pois através desta a atividade dos protótipos de origem natural pode ser modulada e otimizada. Como exemplo de compostos de origem natural e derivados semissintético com elevado potencial antimalárico podemos citar a quinina (QN) e compostos relacionados, como cloroquina (CQ) e mefloquina (MF). Outro fármaco de suma importância é a lactona sesquiterpênica artemisinina (ART) isolado e identificado na década de 70 a partir dos extratos da planta *Artemisia annua* (Liu et al., 2006). Tal estrutura sesquiterpênica foi modificada resultando nos derivados artesunato (AS) e artemeter (AM), que vêm desempenhando importante papel na terapia da malária (Kayser and Kiderlen, 2003; White, 2008; WHO 2013).

Dentre os maiores obstáculos no tratamento da malária estão a resistência do *Plasmodium* aos fármacos disponíveis no mercado, bem como a elevada toxicidade dos mesmos. Assim, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novos e eficazes antimaláricos, especialmente com mecanismo de ação inovador (Velasco Junior et al., 2011). Outros obstáculos estão na indisponibilidade de uma vacina (Dell'agli et al., 2012), bem como na resistência do mosquito *Anopheles*, transmissor

desta doença, ao inseticida DDT (diclorodifeniltricloreto) dificultando assim o controle da disseminação da doença (Greenwood and Mutabingwa, 2002).

Tendo em vista esta problemática, pesquisas referentes ao desenvolvimento de novos compostos com potencial antimalárico são extremamente necessárias. Em 2008, nosso grupo de pesquisa relatou sete novos derivados piperazínicos do ácido ursólico (**AU**) com modificação estrutural na posição C-28, com significativa atividade antimalárica (IC_{50} 78 - 167 nM). Os resultados obtidos foram bastante relevantes, visto que um dos compostos, N-{3-[(4-(3-(4-Hidroxibenzil)amino)propil)piperazinil]propil}-3-O-acetilursolamida, (IC_{50} = 80 nM) apresentou atividade antimalárica até mesmo superior à da CQ (IC_{50} = 130 nM) frente à cepa FcB1 (CQ-resistente) (Gnoatto et al., 2008). Ainda em relação ao triterpeno **AU**, a literatura relata a redução da proliferação de *P. falciparum in vitro* frente às cepas 3D7 (IC_{50} = 15,12 μ g/mL), W2 (IC_{50} = 18,10 μ g/mL), K1 (IC_{50} = 36,5 μ g/mL) e T9-96 (IC_{50} = 28,0 μ g/mL) e supressão da parasitemia (96,9%; dose: 60 mg/kg/dia) em testes *in vivo* frente *P. berghei* (Steele et al., 1999; Traore-Keita et al., 2000). Outro importante triterpeno é o ácido betulínico (**AB**), que em ensaios *in vitro* frente à cepa de *P. falciparum* CQ-sensível (3D7) (IC_{50} 18 μ M) mostrou-se como um promissor composto antimalárico (Innocente et al., 2012; da Silva et al., 2013).



Diante dos resultados obtidos pelo nosso grupo e os relatos disponíveis na literatura, este trabalho engloba pesquisa referente aos triterpenos **AB** e **AU**. Para tanto trabalhamos na obtenção de novos derivados semissintéticos destes triterpenos com modificações nas posições C-3 e C-28 com o objetivo de potencializar sua atividade frente ao *P. falciparum*. Também avaliamos a citotoxicidade e o mecanismo de ação dos derivados mais ativos.

Desta forma, o presente trabalho está dividido em quatro capítulos, apresentados na forma de artigos. No CAPÍTULO I elaboramos uma revisão da literatura abordando os seguintes tópicos: malária, terpenos e derivados semissintéticos com atividade antimalárica avaliada e propriedades físico-químicas. Neste capítulo temos o intuito de mostrar o potencial da classe dos terpenos frente ao *Plasmodium*, enfatizando a importância da química medicinal para a otimização da atividade desta classe de derivados. Esta revisão será submetida para *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. No CAPÍTULO II descrevemos duas séries de derivados (série **AB** e série **AU**) e a avaliação da atividade antimalárica seguida da análise da citotoxicidade e mecanismo de ação (colapso do potencial de membrana mitocondrial e inibição da formação da β -hematina) dos derivados com boa atividade. Os resultados obtidos foram publicados na Revista *Malaria Journal*, v. 12, 2013. No CAPÍTULO III mostramos dois novos derivados piperazínicos do **AB** bem como a avaliação da atividade antimalárica, citotoxicidade e mecanismo de ação (ação na via de sinalização do Ca^{2+} , colapso do potencial de membrana mitocondrial e inibição da formação da β -hematina). Os resultados obtidos foram compilados na forma de manuscrito científico e submetidos para *Tropical Medicine and International Health Journal*. No CAPÍTULO IV temos uma continuação do estudo apresentado no CAPÍTULO II e de trabalho publicado pelo nosso grupo (Innocente et al., 2012). Os dois derivados mais ativos apresentados no CAPÍTULO II foram modificados em C-28, obtendo-se assim quatro novos derivados piperazínicos. Estes derivados tiveram a atividade antimalárica, citotoxicidade, e mecanismo de ação na via de sinalização do Ca^{2+} avaliados, juntamente com os mais ativos reportados por Innocente e colaboradores (2012). Para o mecanismo de ação, diferentemente do experimento descrito no capítulo III e por Innocente e colaboradores (2012), parasitos assincronicos foram avaliados nos eritrócitos, a fim de simular o ambiente parasitário mais próximo da realidade, com investigação do compartimento pelo qual o Ca^{2+} foi liberado. O manuscrito será submetido para *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Parte importante dos resultados obtidos no período de doutorado foi compilada na forma de artigo e está disposta no APÊNDICE I onde mostramos a avaliação da atividade larvicida e adulticida para *An. darlingi* e *A. aegypti* dos **AB** e **AU** e seus derivados modificados em C-3. Após a finalização dos experimentos será submetido para a revista *Chemosphere*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter através de semissíntese derivados dos triterpenos ácido betulínico (**AB**) e ácido ursólico (**AU**) visando à obtenção de compostos inovadores para o combate da malária.

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Isolar os triterpenos **AB** e **AU** a partir de fontes naturais, cascas de *Platanus acerifolia* e cascas dos frutos de *Malus domestica*, respectivamente.

→ Obter através de semissíntese novos derivados do **AB** e do **AU**.

→ Avaliar a atividade antimalárica dos derivados frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7.

→ Estudar a atividade antimalárica avaliando a relação estrutura-atividade (REA).

→ Realizar ensaios de citotoxicidade dos derivados mais ativos frente às células de rim embrionário humano HEK293T.

→ Investigar o mecanismo de ação dos derivados mais promissores utilizando ensaios biológicos.

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 CAPÍTULO I

MEDICINAL CHEMISTRY AS A TOOL FOR THE OPTIMIZATION OF NATURAL ANTIMALARIAL COMPOUNDS: EMPHASIS ON THE TERPENE CLASS

G.N.S. Silva¹, L.C.D. Rezende², F.S. Emery², G. Gosmann¹, S.C.B. Gnoatto^{1*}

¹*Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy School, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil.*

²*Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy School, USP-RP, Av. Do Café, s/nº, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil.*

*Address correspondence to this author: E-mail: simone.gnoatto@ufrgs.br
Tel.: +55 51 3308 5451; Fax: +55 51 3308 5313

A ser submetido para *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Fator de Impacto: 2.86

MEDICINAL CHEMISTRY AS A TOOL FOR THE OPTIMIZATION OF NATURAL ANTIMALARIAL COMPOUNDS: EMPHASIS ON THE TERPENE CLASS

G.N.S. Silva¹, L.C.D. Rezende², F.S. Emery², G. Gosmann¹, S.C.B. Gnoatto^{1*}

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Pharmacy School, UFRGS, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil.

²Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmacy School, USP-RP, Av. Do Café, s/nº, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil.

*Address correspondence to this author: E-mail: simone.gnoatto@ufrgs.br
Tel.: +55 51 3308 5451; Fax: +55 51 3308 5313

Abstract: Medicinal chemistry has sought to develop, design, identify and prepare the potential of biologically active compounds, showing their mechanism of action at the molecular level and determining structure-activity relationships. In this sense, many compounds have been developed with greater activity against etiological agents of different diseases. Natural product-derived compounds have played a major role in drug discovery, often as prototypes to obtain more active semisynthetic derivatives. Antimalarial pharmacotherapy is a significant example of plant-derived medicines, such as quinine and artemisinin. Unfortunately, the resistance of *Plasmodium* strains has created an urgent need for new drugs. This disease is one of the most important tropical diseases since more than 40% of the world population is at risk. This review highlights studies on terpenes and their semisynthetic derivatives from natural sources with antimalarial activity reported in the literature during eleven years (2002 – 2013). A total of 138 compounds are found among terpenes and their semisynthetic derivatives. Also here the druglikeness is discussed of the addressed terpenes based on seven well established properties.

Keywords: Medicinal chemistry, malaria, antimalarial, resistance, terpenes, semisynthesis.

Justificativa:

Manuscrito excluído será submetido para periódico da área.

3.2 CAPÍTULO II

TWO SERIES OF NEW SEMISYNTHETIC TRITERPENE DERIVATIVES: DIFFERENCES IN ANTI-MALARIAL ACTIVITY, CYTOTOXICITY AND MECHANISM OF ACTION

Silva, G.N.S.¹; Maria, N.R.G.¹; Schuck, D.C.²; Cruz, L.N.²; Moraes, M.S.²; Nakabashi, M.²; Gosmann, G.¹; Graebin, C.³; Garcia, C.R.S.²; Gnoatto, S.C.B.^{1*}

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

² *Plasmodium* Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo 05508-900, Brazil

³ Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica 23897/000, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5451, Fax: +55 51 3308 5313;

E-Mail address: simone.gnoatto@ufrgs.br

Malaria Journal 2013, 12:89

Fator de Impacto: 3.40

Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action

Gloria NS da Silva^{1,2}

Email: glorianarjara@yahoo.com.br

Nicole RG Maria¹

Email: nicole_garcia90@hotmail.com

Desirée C Schuck²

Email: desireeschuck@gmail.com

Laura N Cruz²

Email: laurancruz@gmail.com

Miriam S de Moraes²

Email: miradun@yahoo.com.br

Myna Nakabashi²

Email: mnakab@ib.usp.br

Cedric Graebin³

Email: cedric.graebin@gmail.com

Grace Gosmann¹

Email: grace.gosmann@ufrgs.br

Célia RS Garcia²

Email: cgarcia@usp.br

Simone CB Gnoatto^{1*}

* Corresponding author

Email: simone.gnoatto@ufrgs.br

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

² Plasmodium Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo 05508-900, Brazil

³ Department of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica 23897/000, Brazil

Abstract

Background

The discovery and development of anti-malarial compounds of plant origin and semisynthetic derivatives thereof, such as quinine (QN) and chloroquine (CQ), has highlighted the importance of these compounds in the treatment of malaria. Ursolic acid analogues bearing an acetyl group at C-3 have demonstrated significant anti-malarial activity. With this in mind, two new series of betulinic acid (BA) and ursolic acid (UA) derivatives with ester groups at C-3 were synthesized in an attempt to improve anti-malarial activity, reduce cytotoxicity, and search for new targets. *In vitro* activity against CQ-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7 and an evaluation of cytotoxicity in a mammalian cell line (HEK293T) are reported. Furthermore, two possible mechanisms of action of anti-malarial compounds have been evaluated: effects on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and inhibition of β -haematin formation.

Results

Among the 18 derivatives synthesized, those having shorter side chains were most effective against CQ-sensitive *P. falciparum* 3D7, and were non-cytotoxic. These derivatives were three to five times more active than BA and UA. A DiOC₆(3) $\Delta\Psi_m$ assay showed that mitochondria are not involved in their mechanism of action. Inhibition of β -haematin formation by the active derivatives was weaker than with CQ. Compounds of the BA series were generally more active against *P. falciparum* 3D7 than those of the UA series.

Conclusions

Three new anti-malarial prototypes were obtained from natural sources through an easy and relatively inexpensive synthesis. They represent an alternative for new lead compounds for anti-malarial chemotherapy.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, Anti-malarial, Mitochondrial membrane potential, β -haematin, Betulinic acid, Ursolic acid, Semisynthesis.

Justificativa:

Artigo excluído já foi publicado em periódico da área.

3.3 CAPÍTULO III

INVESTIGATION OF THE ANTI-MALARIAL ACTIVITY, CITOTOXICITY AND ACTION MECHANISM OF PIPERAZINE DERIVATIVES OF THE BETULINIC ACID

Gloria N. S. Silva^{1,2}, Desirée C. Schuck², Laura N. Cruz², Miriam S. Moraes², Myna Nakabashi², Grace Gosmann¹, Célia R. S. Garcia² and Simone C. B. Gnoatto¹

¹Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²*Plasmodium* Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author. E-Mail address: glorianarjara@yahoo.com.br

Submetido ao *Tropical Medicine and International Health Journal*. Fator de Impacto: 2.93

Investigation of anti-malarial activity, cytotoxicity and action mechanism of piperazine derivatives of betulinic acid

Gloria N. S. Silva^{1,2}, Desirée C. Schuck², Laura N. Cruz², Miriam S. Moraes², Myna Nakabashi², Grace Gosmann¹, Célia R. S. Garcia² and Simone C. B. Gnoatto¹

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² *Plasmodium* Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

Objectives: To semisynthesize piperazine derivatives of betulinic acid to evaluate anti-malarial activity, cytotoxicity and action mechanism.

Methods: Plant material, isolation and semisynthetic route were handled in accordance with Innocente *et al.* 2012 and da Silva *et al.* 2013. The new derivatives (**4a** and **4b**) were evaluated against the CQ-sensitive *Plasmodium falciparum* 3D7 strain by flow cytometry (FC) using YOYO-1 as stain. Cytotoxicity of **4a** was performed with HEK293T cells for 24 and 48 hours by MTT assay. The capability of compound **4a** to modulate Ca²⁺ in the trophozoite stage was investigated. The trophozoites were stained with Fluo4-AM and analyzed by spectrofluorimetry. Effect on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was performed for **4a** by FC with DiOC₆(3) as stain. For β -hematin assay **4a** was incubated for 24 hours with reagents such as hemin and the fluorescence was measured by Flex Station at absorbance 405 nm.

Results: Anti-malarial activity of **4a** and **4b** were IC₅₀ = 1 and 4 μ M, respectively. Compound **4a** displayed cytotoxicity with IC₅₀ = 69 and 29 μ M to 24 and 48 hours, respectively. Typical rise in cytosolic Ca²⁺ after addition of **4a** was observed. Mitochondrion is one of those Ca²⁺ compartment in the malaria parasite and the effect of **4a** on $\Delta\Psi_m$ was verified showing that **4a** did not act on this compartment. Action mechanism for **4a**, inhibition of β -hematin formation (17%), was lower than CQ treatment (83%; IC₅₀ = 3 mM).

Conclusion: Compound **4a** showed excellent anti-malarial activity and its action mechanism is involved in Ca^{2+} pathway(s).

Keywords: Betulinic acid, piperazine, triterpene derivative, malaria, *Plasmodium falciparum*, action mechanism.

Justificativa:

Manuscrito excluído submetido para periódico da área.

3.4 CAPÍTULO IV

ANTI-MALARIAL ACTIVITY, CYTOTOXICITY OF TRITERPENES DERIVATIVES AND MECHANISM OF ACTION BY DISRUPTING ION HOMEOSTASIS IN *Plasmodium falciparum*

Gloria N. S. da Silva^{1,2}, Francine dos Santos¹, Grace Gosmann¹, Andrew P. Thomas², Simone C. B. Gnoatto¹, Paula J. Barlett^{2*}

¹Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Department of Pharmacology and Physiology, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, New Jersey, USA.

*Corresponding author. Email: paulajbartlett@gmail.com

A ser submetido ao *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Fator de Impacto: 3.89

Anti-malarial activity, cytotoxicity of triterpenes derivatives and mechanism of action by disrupting ion homeostasis in *Plasmodium falciparum*

Gloria N. S. da Silva^{1,2}, Francine dos Santos¹, Grace Gosmann¹, Andrew P. Thomas², Simone C. B. Gnoatto¹, Paula J. Barlett^{2*}

*Corresponding author. Email: paulajbartlett@gmail.com

¹Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Department of Pharmacology and Physiology, Rutgers, The State University of New Jersey, Newark, New Jersey, USA.

Malaria continues to putting half of the world's population in risk, being one of the major public health problems in tropical countries. The concern is related with resistance strains that increase the needed of new anti-malarial drugs and the understanding of the mechanism of action to anti-malarials available. In this way, Innocente et al. 2012 found betulinic and ursolic acid derivatives, **1c** and **2c**, that showed IC₅₀ 220 and 175 nM, respectively, against the *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. Derivative **2c** had the mechanism of action proposed in Ca²⁺ pathway. Also da Silva et al. 2013 had described eighteen new betulinic and ursolic acid derivatives, two of those with good anti-malarial activity. In continue we had modified these derivatives with good activity at C-28, resulting in new compounds, **1a**, **1b**, **2a** and **2b**. Then anti-malarial activity was evaluated against the *P. falciparum* 3D7. Derivatives **1b** (IC₅₀ 339 nM), **2a** (IC₅₀ 316 nM) and **2b** (IC₅₀ 631 nM), which displayed activity in nanomolar range and had the cytotoxic estimated using HEK293T cells. The ursolic acid derivatives, **2a** (IC₅₀ 64 μM) and **2b** (IC₅₀ 24 μM), showed lower cytotoxicity than betulinic acid derivative, **1b** (IC₅₀ 3 μM). The investigation of action mechanism began with the plate reader assay showing the Ca²⁺ release from iRBC by action of **1b**, **1c**, **2b** and **2c**. Although derivative **1b** had the best result it was not chose to next experiment (single cell Ca²⁺ imaging assay) since it also released Ca²⁺ from HEK293T cells. Then the **1c** and **2c** derivatives were chosen to evaluate in the single cell Ca²⁺ imaging assay to find the information of

which compartment the Ca^{2+} released comes. We found that these triterpenes derivatives have action mechanism that involves Ca^{2+} pathway from the same compartment (acidic compartments) of chloroquine and nigericin.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, anti-malarial, calcium, betulinic acid, ursolic acid, semisynthesis, mechanism of action.

Justificativa:

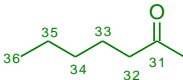
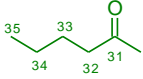
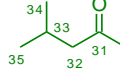
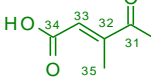
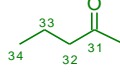

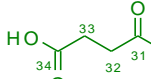


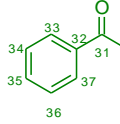
Manuscrito excluído será submetido para periódico da área.

4 DISCUSSÃO GERAL

Terpenos são compostos com diversas atividades biológicas descritas (Paduch et al., 2007). No CAPÍTULO I expomos várias pesquisas que têm mostrado a propriedade antiplasmódica dos derivados terpênicos frente às várias cepas de *P. falciparum* sensíveis ou resistentes aos fármacos em uso corrente, principalmente a CQ. Neste capítulo mostramos fármacos antimaláricos como a artemisinina que é um exemplo bem sucedido pertencente à classe dos terpenos (White, 2008). Também expomos a atual problemática da resistência das cepas de *Plasmodium* aos fármacos disponíveis (Mita et al., 2009), o que dificulta o tratamento eficaz contra a malária. Assim novos compostos ativos frente a estas cepas resistentes são urgentemente requeridos, visto o elevado percentual de mortalidade ainda causado pela malária (WHO, 2013). Neste capítulo mostramos um total de 138 terpenos de fonte natural ou semissintéticos, como compostos com potencial atividade antimalárica. Nesta revisão buscamos compostos disponíveis na literatura a partir do ano de 2002.

No CAPÍTULO II mostramos a obtenção dos triterpenos **AB** e **AU** a partir das cascas de *P. acerifolia* e cascas do fruto de *M. domestica*, respectivamente, com bons rendimentos (2% para **AB** e 2.8% para **AU**). As modificações estruturais ocorreram através de farmacomodulação em C-3, totalizando dezoito derivados, com caráter inovador devido à diversidade dos substituintes inseridos na posição C-3 (Tabela 1).

Tabela 1 - Derivados das séries AB e AU.

R	Série AB	Série AU
         	<p data-bbox="715 689 754 723">1a</p> <p data-bbox="715 801 754 835">1b</p> <p data-bbox="715 943 754 976">1c</p> <p data-bbox="715 1048 754 1081">1d</p> <p data-bbox="715 1178 754 1211">1e</p> <p data-bbox="715 1283 754 1317">1f</p> <p data-bbox="715 1413 754 1447">1g</p> <p data-bbox="715 1529 754 1563">1h</p> <p data-bbox="715 1659 754 1693">1i</p> <p data-bbox="715 1809 754 1843">—</p>	<p data-bbox="1102 689 1142 723">2a</p> <p data-bbox="1102 801 1142 835">2b</p> <p data-bbox="1102 943 1142 976">2c</p> <p data-bbox="1102 1070 1142 1104">—</p> <p data-bbox="1102 1178 1142 1211">2e</p> <p data-bbox="1102 1283 1142 1317">2f</p> <p data-bbox="1102 1413 1142 1447">2g</p> <p data-bbox="1102 1529 1142 1563">2h</p> <p data-bbox="1102 1659 1142 1693">2i</p> <p data-bbox="1102 1794 1142 1827">2j</p>

A elucidação estrutural, dos derivados das séries **AB** e **AU**, foi realizada através dos espectros de IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , HR-EI-MS e análise elementar. No espectro de RMN de ^1H do **AB** foram observados dois simpletes em δ 4,50 ppm sugerindo a presença de um grupo isoprenila (H-29). No espectro de RMN de ^1H do **AU** foi observado um tripleto em δ 5,40 ppm atribuído aos hidrogênios da dupla ligação entre os C-12 e C-13. Ambos os triterpenos apresentaram um *dd* em δ 3,05 ppm sugerindo a presença de H-3. No espectro de infravermelho podemos destacar a presença de uma banda intensa adicional na região de 1700 - 1780 cm^{-1} correspondente ao C=O do grupo éster em C-3 para todos os derivados. Os derivados obtidos apresentam no RMN de ^1H os mesmos sinais de isoprenila (para a série **AB**) e da dupla ligação entre C-12 e C-13 (para a série **AU**) que as moléculas precursoras, no entanto H-3 mudou δ para valor próximo de 4,50 ppm caracterizando a esterificação. A diversidade dos substituintes em C-3 gerou espectros peculiares, como para os derivados **1i** e **2i** que possuem três átomos de flúor para os quais não foi observado o sinal em δ 2,5 ppm atribuído ao H-32. Tal sinal também não foi observado nos derivados **1d** e **2j**. O derivado **1d** mostrou um sinal em δ 5,16 ppm do H-33 atribuído a presença de dupla ligação e ácido carboxílico ligado em C-3. O derivado **2j** possui um anel aromático, por esta razão foram observados os sinais em δ 7,19 e 7,98 ppm. Para os derivados contendo dois átomos de cloro (**1h** e **2h**) (CHCl_2) um simpleto em δ 5,86 ppm foi observado. Em relação aos espectros de RMN de ^{13}C primeiramente destacamos sinais sugerindo a presença do ácido carboxílico e éster observados na faixa de δ 170-182 ppm para todos os derivados. Os sinais da isoprenila do **AB** foram observados em δ 109 (C-29) e δ 150 (C-20) ppm, enquanto que C-12 e C-13 do **AU** foram observados em δ 125 e 135 ppm, respectivamente. Os derivados **1g**, **1d** e **2g** geraram espectros com um sinal a mais na faixa de δ 170-182 ppm, devido a adição de um segundo ácido carboxílico na molécula. Os derivados **1h** e **2h** com cloro mostraram sinal próximo de δ 65 ppm atribuído ao C-3. O derivado **2j** mostrou sinais entre δ 128-132 ppm sugerindo a presença de anel aromático. O peso molecular de todos os compostos foram calculados e comparados com seus respectivos dados obtidos por espectrometria de massas de alta resolução (HR-EI-MS) e a análise elementar foi

realizada para os derivados com modificação em C-3 contendo o átomo de cloro na molécula.

Ainda no CAPÍTULO II mostramos que as modificações estruturais dos derivados do **AB** e **AU** em C-3 possibilitaram a determinação da importância do grupo hidroxila e de grupos inseridos nesta posição. Em pesquisa anterior, nosso grupo mostrou que a conversão da hidroxila em éster para o **AU** potencializou a atividade deste triterpeno frente à cepa CQ-resistente de *P. falciparum* FcB1 com redução do valor de IC₅₀ de 52,93 µM para 24,93 µM (Gnoatto et al., 2008). Porém, nenhuma investigação havia sido realizada para verificar a influência de diferentes substituintes nesta posição. Assim, utilizamos anidridos comerciais que resultaram em derivados com diferentes tamanhos e ramificações de cadeia lateral, presença de um segundo grupo ácido carboxílico na molécula, anel aromático e halogênios. Todos os compostos foram testados frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7. Três destes derivados, **1e**, **1f** e **2e**, apresentaram boa atividade antimalárica com IC₅₀ = 5, 8 e 7 µM, respectivamente. Observamos que quanto menor a cadeia lateral, nos derivados destas séries, a atividade antimalárica é favorecida passando de moderadamente ativo (**AB**) ou inativo (**AU**) para boa atividade. Porém a presença de anel aromático, halogênios e ácido carboxílico resultaram em uma redução na atividade. Levando em consideração a importância de um caráter não tóxico para antimaláricos, realizamos a avaliação da citotoxicidade dos derivados mais ativos (**1e**, **1f** e **2e**) frente às células embrionárias de mamíferos HEK293T. Os derivados mostraram-se não citotóxicos nas concentrações testadas até 100 µM. Em relação ao mecanismo de ação foram selecionados experimentos para verificar se estes derivados atuam com o mesmo mecanismo de ação de importantes fármacos antimaláricos. Como o mecanismo de ação da atovaquona, através da despolarização do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Estes compostos não mostraram ter a atividade antimalárica envolvida com este mecanismo de ação nas concentrações até 25 µM. Outro importante mecanismo de ação descrito para fármacos antimaláricos, em especial para a CQ, é a inibição da formação da β -hematina. Com base nesta constatação e nos resultados descritos por GNOATTO e colaboradores (2008) e MULLIÉ e colaboradores (2010) para derivados triterpênicos que atuam na via de detoxificação da β -hematina, decidimos

avaliar se estes derivados inibem a formação de β -hematina *in vitro*. Porém a percentagem de inibição da formação de β -hematina *in vitro* foi menor que o controle CQ (83% de inibição na concentração máxima testada, 20 mM; IC_{50} = 3 mM).

No CAPÍTULO III dois novos derivados (**4a** e **4b**) piperazínicos do **AB** foram apresentados, figura 1. A discussão referente aos espectros dos derivados piperazínicos do **AB** encontra-se no CAPÍTULO III.

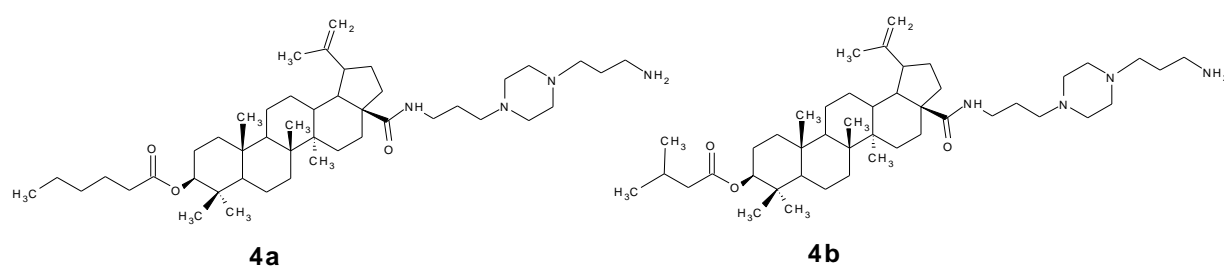


Figura 1: Derivados piperazínicos do **AB**.

Tais derivados foram obtidos tendo em vista os derivados piperazínicos do **AU**, obtidos em prévios estudos pelo nosso grupo, com atividade antimalárica na faixa de nanomolar frente às cepas resistente e sensível à CQ de *P. falciparum* (Gnoatto et al., 2008; Innocente et al., 2012). Em relação aos derivados piperazínicos do **AB**, observamos que a presença da piperazina potencializa a ação, sendo que o derivado **4a** apresentou-se mais ativo que seu precursor, com IC_{50} = 1 μ M. Este derivado foi avaliado quanto a sua citotoxicidade frente às células HEK293T com período de incubação de 24 e 48 horas, sendo que os valores de SI foram de 69 e 29, respectivamente. Com este resultado foi possível observar que o grupamento mais volumoso na posição C-3 auxilia na redução da citotoxicidade nos derivados piperazínicos. Este resultado é interessante principalmente para os derivados piperazínicos do **AB**, pois quando derivados piperazínicos com grupo acetila em C-3 foram avaliados uma tolerável citotoxicidade foi apresentada (IC_{50} = 4 μ M) (Innocente et al., 2012). Assim observamos que a citotoxicidade pode ser diminuída com a inserção de um grupamento em C-3 mais

volumoso. Desta forma, iniciamos a investigação do mecanismo de ação do derivado piperazínico do **AB 4a** através da análise da capacidade destes compostos (concentração de 100 μM) modularem o Ca^{2+} na fase de trofozoíto. Os resultados indicaram que a via de sinalização do Ca^{2+} esta envolvida no mecanismo de ação dos compostos. Devido ao fato de que a concentração intracelular do Ca^{2+} pode ser modulada através da mitocôndria também verificamos um possível efeito do derivado **4a** (concentração até 25 μM) no potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Constatamos que a mitocôndria não esta envolvida no mecanismo de ação do derivado **4a**. Também para este derivado foi avaliada a capacidade de inibição da formação da β -hematina. No entanto, o derivado **4a** mostrou fraca interação com a β -hematina com percentagem de inibição de 17% na mais alta concentração testada (20 mM) sendo abaixo do controle CQ (83% de inibição na mais alta concentração testada, 20 mM; IC_{50} = 3 mM).

No CAPÍTULO IV apresentamos uma continuação do estudo desenvolvido no CAPÍTULO II e de trabalho recentemente publicado pelo nosso grupo (Innocente et al., 2012). Neste capítulo mostramos a semissíntese de derivados piperazínicos dos **AB** e **AU** a partir dos derivados do CAPÍTULO II que apresentaram boa atividade antimalárica (**1e** e **2e**, IC_{50} 5 e 7 μM , respectivamente). Estes derivados foram modificados em C-28 através de reação com grupamento amínico. Quatro novos derivados (figura 2) foram obtidos e a análise dos picos diagnósticos referente aos espectros destes derivados piperazínicos do **AB** e **AU** consiste na mesma discussão realizada para os derivados dos CAPÍTULOS II e III. A avaliação quanto à atividade antimalárica foi realizada frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7.

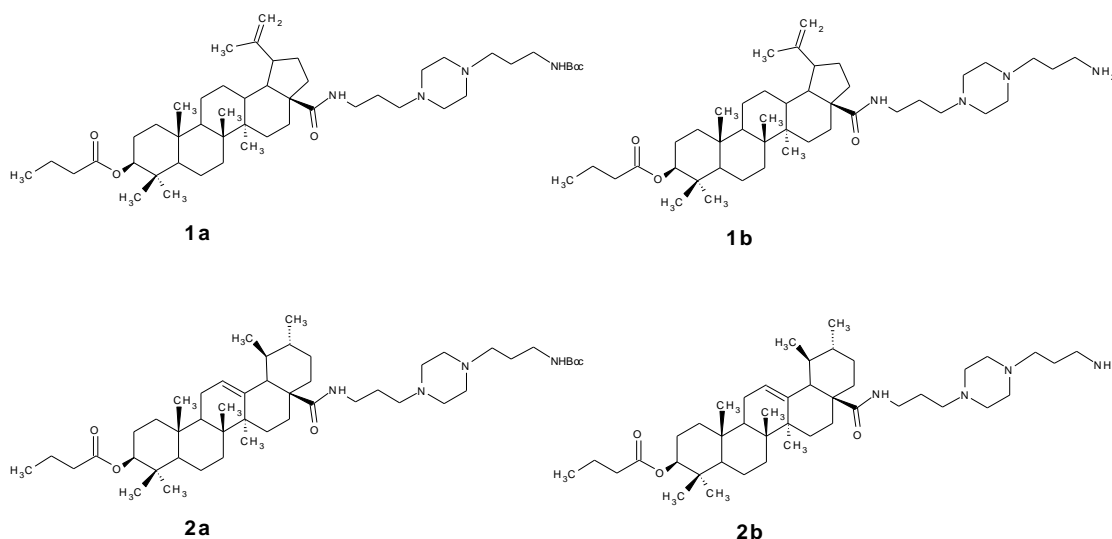


Figura 2. Derivados piperazínicos dos triterpenos **AB** e **AU**.

Todos os derivados apresentaram excelente atividade antimalárica sendo que os derivados **1b**, **2a** e **2b** foram selecionados para avaliação da citotoxicidade devido ao IC_{50} na faixa de nanomolar, IC_{50} 339, 316 e 631 nM, respectivamente. Em relação à citotoxicidade os derivados piperazínicos dos **AU** mostraram-se menos citotóxicos que o derivado piperazínico do **AB**. Na sequência os derivados **1b**, **2a** e **2b**, bem como os derivados **1c** e **2c**, recentemente publicados por Innocente e colaboradores (2012), tiveram o mecanismo de ação avaliado na via de sinalização do Ca^{2+} . A liberação de Ca^{2+} foi avaliada em células HEK293T, hemácias e hemácias parasitadas. O derivado **1b** provocou a liberação de Ca^{2+} tanto nas hemácias parasitadas quanto nas células HEK293T, podendo ser um mecanismo comum em outras células e não apenas para *P. falciparum*. Os derivados mais promissores foram **1c** e **2c** devido à liberação de Ca^{2+} em células parasitadas e a manutenção do Ca^{2+} em células humanas. Os resultados apresentados para o mecanismo de ação na via de sinalização do Ca^{2+} indicam que derivados piperazínicos dos **AB** e **AU** apresentam atividade antimalárica através desta via com liberação do Ca^{2+} a partir do compartimento ácido como para a cloroquina e nigericina.

Desta maneira, nossos resultados apontam que derivados triterpênicos são potentes agentes antimaláricos e não citotóxicos ou com baixa citotoxicidade. Além disto, os derivados piperazínicos possuem um mecanismo de ação provavelmente envolvendo a liberação de Ca^{2+} do compartimento ácido. Nenhum dos derivados

obtidos parece possuir o mecanismo de ação dos antimaláricos comercializados como atovaquona e cloroquina.

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os derivados dos triterpenos **AB** e **AU** constituem-se em compostos com elevado potencial antimalárico frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7. Os derivados quando modificados apenas em C-3 mostraram-se não citotóxicos. Em relação aos derivados piperazínicos a citotoxicidade apresentada foi baixa mostrando a importância da modificação em C-3 para este resultado. O mecanismo de ação dos derivados mais ativos aponta para uma atuação na via de sinalização do Ca^{2+} a partir do compartimento ácido. De forma geral os dados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- 1) As cascas de *Platanus acerifolia* e cascas da maçã (*Malus domestica*) são fontes dos triterpenos **AB** e **AU**, respectivamente, com bons rendimentos.
- 2) A partir de modificações estruturais dos triterpenos **AB** e **AU** nas posições C-3 e C-28 foram obtidos um total de vinte e quatro compostos semissintéticos inéditos.
- 3) Os derivados modificados em C-3 foram avaliados frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7 sendo que três (**1e**, **1f** e **2e**) apresentaram boa atividade antimalárica. A partir deste resultado foi possível concluir que quando **AB** e **AU** têm a hidroxila substituída por grupamentos menos volumosos obtem-se derivados mais ativos.
- 4) Cinco dos compostos piperazínicos com modificação em C-3 e C-28, também avaliados frente à cepa CQ-sensível de *P. falciparum* 3D7, apresentaram excelente atividade antimalárica. O grupamento piperazínico nestes derivados resultou em compostos com atividade antimalárica na faixa de nanomolar.
- 5) Nos ensaios de citotoxicidade dos derivados mais ativos, frente às células de rim embrionário humano (HEK293T), foi observado que estes compostos não são citotóxicos ou apresentam baixa citotoxicidade.

- 6) Os derivados modificados em C-3 (**1e**, **1f** e **2e**) tiveram mecanismo de ação avaliado em relação ao colapso do potencial de membrana mitocondrial e inibição da formação da β -hematina, os quais estão envolvidos na atividade antimalárica dos fármacos atovaquona e cloroquina, respectivamente. Os resultados apontaram que estes derivados não atuam através destes mecanismos.
- 7) Os derivados piperazínicos dos triterpenos **AB** e **AU** apresentaram mecanismo de ação na via de sinalização do Ca^{2+} .
- 8) O derivado piperazínico **4a** quando avaliado a ação no colapso do potencial de membrana mitocondrial e inibição da formação da β -hematina não teve atuação nesta via.
- 9) Os derivados piperazínicos **1c** e **2c** liberam Ca^{2+} provavelmente a partir do compartimento ácido parasitário.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- da Silva GN. et al. Two series of new semisynthetic triterpene derivatives: differences in anti-malarial activity, cytotoxicity and mechanism of action. **Malar J** 12:89, 2013.
- Dell'agli, M. et al. Anti-plasmodial and insecticidal activities of the essential oils of aromatic plants growing in the Mediterranean area. **Malar J.**, v. 11, p. 219, 2012.
- Gnoatto, S. C. et al. 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. **Bioorg Med Chem.**, v. 16, p. 771-782, 2008.
- Greenwood, B.; Mutabingwa, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, 2002.
- Kayser, O.; Kiderlen, A. F. Delivery strategies for antiparasitics. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 12, 197-207, 2003.
- Liu, C.; Zhao, Y.; Wang, Y. Artemisinin: current state and perspectives for biotechnological production of an antimalarial drug. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 72, p. 11-20, 2006.
- Mita, T.; Tanabe, K.; Kita, K. Spread and evolution of *Plasmodium falciparum* drug resistance. **Parasitol Int.**, v. 58, p. 201-209, 2009.

- Mullie, C. et al. Inhibitory effect of ursolic acid derivatives on hydrogen peroxide- and glutathione-mediated degradation of hemin: a possible additional mechanism of action for antimalarial activity. **Exp Parasitol.**, v. 125, p. 202-207, 2010.
- Paduch, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**., v. 55, p. 315-327, 2007.
- Ricci, C. G. et al. Molecular dynamics of DNA: comparison of force fields and terminal nucleotide definitions. **J Phys Chem B.**, v. 114, p. 9882-9893, 2010.
- Steele, J. C. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of betulinic acid as an antimalarial. **Phytother Res.**, v. 13, p. 115-119, 1999.
- Traore-Keita, F. et al. Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. **Phytother Res.**, v. 14, p. 45-47, 2000.
- Velasco Junior, W. T. et al. Synthesis and antimalarial activity of thioetherhydroxyethylsulfonamides, potential aspartyl protease inhibitors, Part 3. **Eur J Med Chem.**, v. 46, p. 5688-5693, 2011.
- White, N. J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. **Science**, v. 320, p. 330-334, 2008.
- World Malaria Report, World Health Organization, Geneva, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/index.html> Acesso em: 16 de janeiro de 2013.

APÊNDICE I -**TRITERPENES FROM NATURAL SOURCE AND MODIFIED BY SEMISYNTHESIS EFFECTIVENESS AGAINST LARVAL AND ADULT STAGES OF *Anopheles darlingi* AND *Aedes aegypti***

Gloria Narjara Santos da Silva¹, Frances Tatiana Tavares Trindade², Francine dos Santos¹, Grace Gosmann¹, Alexandre Almeida e Silva², Simone Cristina Baggio Gnoatto^{1*}

¹ Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Insect Bioecology Laboratory, Department of Biology, Federal University of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5451, Fax: +55 51 3308 5313; e-mail address: simone.gnoatto@ufrgs.br

A ser submetido ao *Chemosphere*. Fator de Impacto: 3.137

Triterpenes from natural source and modified by semi synthesis effectiveness against larval and adult stages of *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti*

Gloria Narjara Santos da Silva¹, Frances Tatiana Tavares Trindade², Francine dos Santos¹, Grace Gosmann¹, Alexandre Almeida e Silva², Simone Cristina Baggio Gnoatto^{1*}

¹Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Insect Bioecology Laboratory, Department of Biology, Federal University of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 5451, Fax: +55 51 3308 5313; e-mail address: simone.gnoatto@ufrgs.br

Abstract: Malaria and dengue remain being a concern insect transmitted diseases around the world, with Africa and Latin American countries carrying the greatest burden. Malaria is transmitted by anopheline mosquito, and annually accounts around 207 million clinical cases, while dengue principally comes from the vector *Aedes aegypti*, and infects annually 50-100 million. Therefore *Anopheles* and *Aedes* vector control methods are needed for current malaria and dengue eradication efforts. The insecticide resistance has contributed of the needed of new compounds for mosquito control, which must be cost effective, practical and accessible. Whereas natural sources have been an alternate to obtain larvicide and insecticide, the aim of this research was to evaluate of triterpenes betulinic (**BA**) and ursolic (**UA**) acids and their derivatives against the larval and adult stages of *Anopheles darlingi* and *A. aegypti*. Thus **BA**, **UA** and one total of ten derivatives modified at C-3 position have been evaluated. Larvicidal assay contained 25 larvae up to 3^o- 4^o instar of both mosquitoes. For the adulticidal assay, the compounds were added with the feeding of the 25 female mosquitoes (3-5 life days) of the each species. The concentrations used were from 100 to 10 ppm and ETOH 1% as a control with 24-96 hours of treatment. The best result to *An. darlingi* was found for **BA** with value of LC₅₀ 15 ppm in larvicidal and adulticidal assays. All compounds tested against *A. aegypti*

displayed good activity, highlighting **UA** with LC₅₀ of 4 ppm in larvicidal assay and derivatives **1d** and **2d** with 80 and 76% of larval mortality at 100 ppm (96 h). From this data we indicate that these triterpenes and their derivatives are promising as a larvicide and insecticide control.

Keywords: Malaria, dengue, *Anopheles darlingi*, *Aedes aegypti*, betulinic acid, ursolic acid, derivatives, larvicidal and adulticidal assays.

Justificativa:

Manuscrito excluído será submetido para periódico da área.

APÊNDICE II -

Resumo dos artigos publicados durante o período de doutorado.

- 1) Innocente, Adrine; Silva, Gloria; Cruz, Laura; Moraes, Miriam; Nakabashi, Myna; Sonnet, Pascal; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues. *Molecules*, v. 17, p. 12003-14, 2012.

Article

Synthesis and Antiplasmodial Activity of Betulinic Acid and Ursolic Acid Analogues

Adrine M. Innocente¹, Gloria N. S. Silva¹, Laura Nogueira Cruz², Miriam S. Moraes², Myna Nakabashi², Pascal Sonnet³, Grace Gosmann¹, Célia R. S. Garcia² and Simone C. B. Gnoatto^{1,*}

¹ Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil; E-Mails: a_innocente@yahoo.com.br (A.M.I.); glorianarjara@yahoo.com.br (G.N.S.S.); grace.gosmann@ufrgs.br (G.G.)

² Laboratório de Biologia Celular e Molecular de *Plasmodium*, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, USP. Rua do Matão, travessa 14, 321, São Paulo 05508-900, SP, Brazil; E-Mails: lauracruz@gmail.com (L.N.C.); miradun@yahoo.com.br (M.S.M.); mnakab@ib.usp.br (M.N.); cgarcia@usp.br (C.R.S.G.)

³ Laboratoire des Glucides, FRE CNRS 3517, UFR de Pharmacie Université de Picardie Jules Verne1, Rue des Louvels, 80037 Amiens cedex 1, France

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: simone.gnoatto@ufrgs.br; Tel.: +55-51-3308-5451; Fax: +55-51-3308-5313.

Received: 17 September 2012; in revised form: 24 September 2012 / Accepted: 7 October 2012 /

Published: 12 October 2012

Abstract: More than 40% of the World population is at risk of contracting malaria, which affects primarily poor populations in tropical and subtropical areas. Antimalarial pharmacotherapy has utilised plant-derived products such as quinine and artemisinin as well as their derivatives. However, worldwide use of these antimalarials has caused the spread of resistant parasites, resulting in increased malaria morbidity and mortality. Considering that the literature has demonstrated the antimalarial potential of triterpenes, specially betulinic acid (**1**) and ursolic acid (**2**), this study investigated the antimalarial activity against *P. falciparum* chloroquine-sensitive 3D7 strain of some new derivatives of **1** and **2** with modifications at C-3 and C-28. The antiplasmodial study employed flow cytometry and spectrofluorimetric analyses using YOYO-1, dihydroethidium and Fluo4/AM for staining. Among the six analogues obtained, compounds **1c** and **2c** showed excellent activity (IC₅₀ = 220 and 175 nM, respectively) while **1a** and **b** demonstrated good

activity ($IC_{50} = 4$ and $5 \mu\text{M}$, respectively). After cytotoxicity evaluation against HEK293T cells, **1a** was not toxic, while **1c** and **2c** showed IC_{50} of $4 \mu\text{M}$ and a selectivity index (SI) value of 18 and 23, respectively. Moreover, compound **2c**, which presents the best antiplasmodial activity, is involved in the calcium-regulated pathway(s).

Keywords: triterpenes; betulinic acid; ursolic acid; malaria; *P. falciparum*; cytotoxicity; calcium

- 2) Barros, Muriel; Innocente, Adrine; Silva, Gloria; Duarte, Mariana; Vunda, Sita; Tasca, Tiana. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. Revista Liberato (Novo Hamburgo), v. 13, p. 1-25, 2012.

Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp.

Muriel Primon de Barros¹
Adrine Maria Innocente²
Gloria Narjara Santos da Silva³
Mariana Duarte⁴
Sita Luvangadio Lukoki Vunda⁵
Tiana Tasca⁶

Resumo

Trypanosoma cruzi, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. apresentam mecanismos de patogenicidade que contribuem para a sobrevivência intracelular. O objetivo desta revisão é discutir os mecanismos patogênicos envolvidos na relação parasito-hospedeiro. Cada um desses protozoários possui mecanismos específicos para invasão, formação do vacúolo parasitóforo, desenvolvimento, obtenção de nutrientes e evasão do sistema imune. Dentre os fatores moleculares que contribuem para a virulência e patogenicidade destacam-se as mucinas, a glicoproteína 160 e a cruzipaina para o *T. cruzi*; os lipofosfoglicanos e a glicoproteína de superfície principal para a *Leishmania* spp.; as proteínas das roptrias (ROP) e as proteínas quinases para o *Toxoplasma gondii* e as proteínas ROP, a proteína ligante de eritrócitos, o antígeno PfEMP1 (do inglês *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1) e a hemozoína para os *Plasmodium* spp. Os mecanismos descritos fornecem informações que contribuem para o entendimento dos processos patogênicos, assim como para descoberta de alvos terapêuticos e o planejamento de novos fármacos e métodos diagnósticos.

Palavras-chave: Protozoários intracelulares. Mecanismos de patogenicidade. Relação parasito-hospedeiro.

Abstract

Trypanosoma cruzi, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. present pathogenic mechanisms that contribute to the intracellular survival. The aim of this review is to discuss the pathogenic mechanisms involved in the host-parasite relationship. Each of these protozoa has specific mechanisms for invasion, parasitophorous vacuole formation, development, acquisition of nutrients and evasion of the immune system. Among the molecular factors that contribute to the virulence and pathogenicity can stand out the mucins, the glycoprotein 160 and the cruzipain for *T. cruzi*; the lipophosphoglicans and the major surface glycoprotein for *Leishmania* spp.; the rhoptry proteins (ROP) and the kinases proteins for *Toxoplasma gondii* and the ROP proteins, the erythrocyte binding protein, the PfEMP1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1) antigen and the hemozoin for *Plasmodium* spp. The described mechanisms provide information that contributes to the understanding of the pathogenic process as well as for the discovery of therapeutic targets and the design of new drugs and diagnostic methods.

Keywords: Intracellular protozoa. Pathogenic mechanisms. Host-parasite relationship.

- 3) De Oliveira, Marcela; Innocente, Adrine; Pereira, Andrea; Dias, Daiane; Oliveira, Elder; Barreto, Fabiano; Freitas, Fernando; Meirelles, Gabriela; Silva, Gloria; Machado, Jaison; Bidone, Juliana; Andrade, Juliana; Schwingel, Liege; Muller, Liz; Pinto, Paula; Bernardi, Raquel; Kaise, Samuel; Souza, Tiago; Gnoatto, Simone. Semi-síntese: Uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. Revista Eletrônica de Farmácia, v. IX p. 62, 2012.



SEMI-SÍNTESE: UMA SOLUÇÃO PARA PROBLEMAS FARMACOLÓGICOS DE PRODUTOS NATURAIS

Marcella Herbstrith de Oliveira¹, Adrine Maria Innocente¹, Andrea Garcia PEREIRA¹, Daiane de Oliveira Dias¹, Elder Gonçalves de Oliveira¹, Fabiano Barreto¹, Fernando Araújo de Freitas¹, Gabriela de Carvalho Meirelles¹, Gloria Narjara Santos da Silva¹, Jaison Carlosso Machado¹, Juliana Bidone¹, Juliana Maria de Mello Andrade¹, Liege Schwingel¹, Liz Giardi Müller¹, Paula Santos Pinto¹, Raquel Martini Bernardi¹, Samuel Kaiser¹, Tiago Tasso de Souza¹, Simone Cristina Baggio Gnoatto^{2*}

¹ Discente do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Professora da disciplina de Química Farmacêutica, UFRGS. Departamento de Produção de Matéria-prima. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, sala 708, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência: simone.gnoatto@ufrgs.br

Recebido em 24/10/2011, Aceito em 23/02/2012.

ABSTRACT: Natural products are the most important source of antitumor and anti-infective agents, at the same time, they can have problems related to their physicochemical parameters resulting in poor pharmacokinetic. Semi-synthesis promotes structural changes which can improve activity and pharmacokinetic properties and decreases toxicity. The aim of this review is demonstrate the importance of semi-synthesis to obtain new drugs as antineoplastics (ixabepilone, temsirolimus, everolimus, vinflunine and trabectine), antimicrobials (telavancin, oritavancin,

Oliveira, M. H. Innocente, A. M. Pereira, A. G. Dias, D. O. Oliveira, E. G. Barreto, F. Freitas, F. A. Meirelles, G. C. Silva, G. N.F Machado, J. G. Bidone, J. Andrade, J. M. M. Schiwingel, L. Müller, L. G. Pinto, P. S. Bernardi, R. M. Kaiser, S. Souza, T. T. Gnoato, S. *Revista Eletrônica de Farmácia* Vol. IX (1), 62 – 88, 2012.

tigeciclina, dalbavancin and telitromicina) and antifungals (anidulafungina and micafungina).

KEY WORDS: Natural products, semi-synthesis, new drugs.

APÊNDICE III -

Principais resumos publicados durante o período de doutorado.

- 1) Silva, Gloria; Trindade, Frances; Santos, Francine; Gosmann, Grace; Silva, Alexandre; Gnoatto, Simone. Discovery of new chemicals from natural source effectiveness against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti*: Larvicidal/adulticidal activity of the betulinic and ursolic acids. In: Drug Discovery & Therapy World Congress, Boston, MA, 2013.

- 2) Silva, Gloria; Cruz, Laura; Nakabashi, Myna; Schuck, Desirée; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Ca²⁺ homeostasis as a potential drug target against malaria parasite: Action mechanism of betulinic acid derivative. In: Drug Discovery & Therapy World Congress, Boston, MA, 2013.



Drug Discovery & Therapy World Congress 2013

June 3 - 6, 2013, Boston, MA, USA

Abstracts

John B. Hynes Veterans
Memorial Convention Center
Boston, MA, USA
June 3 - 6, 2013

www.ddtwc.com



PO-35

Track: Anti-Infectives

DISCOVERY OF NEW CHEMICALS FROM NATURAL SOURCE EFFECTIVENESS AGAINST ANOPHELES DARLING AND AEDES AEGYPTI: LARVICIDAL/ADULTICIDAL ACTIVITY OF THE BETULINIC AND URSOLIC ACIDS.**G.N.S. Silva¹, F.T.T. Trindade², F. Santos¹, G. Gosmann¹, A.A. Silva² and S.C.B. Gnoatto¹**¹*Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; E-mail: glorianajara@yahoo.com.br*²*Insect Bioecology Laboratory, Department of Biology, Federal University of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, Brazil*

Mosquito-transmitted diseases have resulted in many deaths. Malaria has been transmitted from anopheline vector mosquito, and annually accounts for some 216 million clinical cases, while dengue principally comes from the vector *Aedes aegypti*, and infects annually 50-100 million. The high incidences of malaria and dengue have occurred because the insects in generally develop resistance to a variety of insecticides available. As a result, the research to discover compounds to control insects can contribute to the decrease of these incidences. We obtained the triterpenes, betulinic acid (BA) and ursolic acid (UA), from barks of *Platanus acerifolia* and peel of *Malus domestica*, respectively (Silva *et al.* 2013). The larvicidal assay contained 25 larvae up to 3^o- 4^o instar of *A. aegypti* and *A. darling* species. For the adulticidal assay, the compounds were added with the feeding of the adults and contained 25 female mosquitos (3-5 life days) of the each species. Firstly this study provides evidence for the use of these triterpenes for fighting the malaria and dengue vector, highlighting BA against *A. darling* and UA against *A. aegypti* (Table 1). Thus, structural modifications in the BA and UA have been done aiming to overcome the problem of insecticide resistance.

Table 1. Lethal Concentration (LC₅₀ and LC₉₀)^a in ppm of the BA and UA Against *A. darlingi* and *A. aegypti*

Compounds	<i>A. darlingi</i> Larval Stage		<i>A. darlingi</i> Adulticidal Stage		<i>A. aegypti</i> Larval Stage		<i>A. aegypti</i> Adulticidal Stage	
	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₅₀	LC ₉₀	LC ₅₀	LC ₉₀
Betulinic acid	15	67	15	94	32	123	42	137
Ursolic acid	22	106	24	113	16	90	17	99

^aBoth assays were evaluated in five concentrations between 10-100 ppm and a control (ETOH 1%), five replicates for each concentration, n= 3, 24-96 hours.

REFERENCE[1] Silva *et al. Malaria Journal* 2013, 12: 89.

PO-36*Track: Anti-Infectives***Ca²⁺ HOMEOSTASIS AS A POTENTIAL DRUG TARGET AGAINST MALARIA PARASITE: ACTION MECHANISM OF BETULINIC ACID DERIVATIVE.****G.N.S. Silva¹, L.C. Nogueira², M. Nakabashi², D.C. Schuck², C.R.S. Garcia², G. Gosmann¹ and S.C.B. Gnoatto¹**¹*Phytochemistry and Organic Synthesis Laboratory, School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; E-mail: glorianarjara@yahoo.com.br*²*Plasmodium Molecular and Cellular Biology Laboratory, Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo, Brazil.*

Species of *Plasmodium* are etiological agents of malaria, a parasitic disease with complex life cycle. Ca²⁺ homeostasis mechanism in the malaria parasites has been investigated as potential drug target. The maintenance of Ca²⁺ homeostasis in *Plasmodium* sp. is crucial for regulation of signaling processes during invasion, maturation and division. We obtained betulinic acid (BA) from barks of *Platanus acerifolia* and modified at C-3 and C-28 positions and *in vitro* antimalarial assay display excellent activity on *Plasmodium falciparum* 3D7 strain. The capacity to modulate Ca²⁺ was evaluated at concentration of the 100 µM and 10 µM for Thapsigargin (positive control) with Fluo4-AM as stain. Methanol (0.05%) was negative control. Recently, our group showed an ursolic acid derivative with action mechanism possibly involving Ca²⁺ pathway(s) (Innocente *et al.* 2012). After addition of BA derivative and Thapsigargin was observed the typical rise in cytosolic Ca²⁺ in isolated parasites but not observed after addition of methanol. In this manner, we are performing others experiments in intact parasites within of the RBC and to identify the source of Ca²⁺ released. From previous reports of our group and in present results, we can conclude that triterpene derivatives are potent antimalarial prototype that disrupts *Plasmodium* Ca²⁺ homeostasis.

REFERENCE

- [1] Innocente *et al.*, *Molecules* 2012: 17.
-

- 3) Silva, Gloria; Innocente, Adrine; Schuck, Desirée; Nakabashi, Myna; Maria, Nicole; Gosmann, Grace; Garcia, Célia; Gnoatto, Simone. Effect of synthetic betulinic acid derivatives on mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in *Plasmodium falciparum* strains. In: International Congress on Natural Products Research, New York, NY, 2012.



Planta Medica

Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research

11
Volume 78
August 2012
Page 1027–1310

8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF

28th July–1st August 2012, New York City, USA

Abstracts

Chairmen:
Guy T. Carter
Edward J. Kennelly

Issue Editor:
Mark O'Neil-Johnson

Official Organ of the
Society for Medicinal
Plant and Natural
Product Research

[www.thieme-connect.com/
ejournals](http://www.thieme-connect.com/ejournals)
[www.thieme.de/
fz/plantamedica](http://www.thieme.de/fz/plantamedica)

This journal is indexed
in Current Contents/
Life Sciences, Science
Citation Index, MEDLINE,
EMBASE and SCOPUS.

Planta Med ISSN 0032-0943

Georg Thieme Verlag KG, Postfach 30 11 20, 70451 Stuttgart
E 271804 PVS, DPA, vertigat beahle Planta Med 11/2012



Thieme

PD12

Effect of synthetic betulinic acid derivatives on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in *Plasmodium falciparum* strains

Silva GNS¹, Innocente AM¹, Schuck DC², Nakabashi M²,
Maria NRG¹, Gosmann G¹, Garcia CRS², Gnoatto SCB¹

¹School of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS; ²Department of Physiology, São Paulo University, São Paulo, SP

Malaria is caused by a protozoan parasite, and the most virulent agent in humans is *P. falciparum*. Since the energy metabolism of *Plasmodium* is quite different from that of the mammalian host, the energy-transducing enzymes of the parasite are promising anti-malarial drug targets. Furthermore, due the importance of the *Plasmodium* mitochondria to many physiological activities, such as the metabolism of molecules and Ca^{2+} homeostasis, it has been validated as a drug target. In this work, we obtained betulinic acid (BA), a triterpene, from barks of *Platanus acerifolia*, and the modification at C-3 resulted in ten compounds. These derivatives were evaluated against the chloroquine-sensitive strain (3D7) of *P. falciparum*. The action mechanism of the derivatives **1** (IC_{50} 4 μM) and **2** (IC_{50} 8 μM) was investigated through the evaluation of $\Delta\Psi_m$ using a technique described by Srivastava et al (1997). Only **1** had a collapse in $\Delta\Psi_m$ at IC_{50} 2 mM and showed a displacement histogram indicating the dissipation of $\Delta\Psi_m$. Our data showed that BA derivatives can be used as agents against the malaria protozoan, and the investigation of the action mechanism of these compounds can support the design and development of more potent derivatives.

