



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Bufadienolídeos da secreção cutânea de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) - Isolamento, caracterização, modificações químicas e avaliação das atividades biológicas.

GERALDINO SILVA ANDRADE CUNHA FILHO

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Maria Lucilia dos Santos


Brasília
Julho, 2010

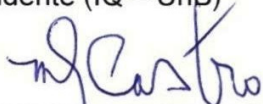


Universidade de Brasília – Instituto de Química

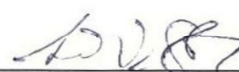
COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Tese de Doutorado do aluno Geraldino Silva Andrade Cunha Filho, intitulada “**BUFADIENOLÍDEOS DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE RHINELLA SCHNEIDERI (ANURA: BUFONIDAE) – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, MODIFICAÇÕES QUÍMICAS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**”, apresentada no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília em 20 de JULHO de 2010.


Prof.^a. Dr.^a Maria Lucilia dos Santos
Presidente (IQ – UnB)


Prof.^a. Dr.^a. Mariana de Souza Castro
Membro Titular (IB - UnB)


Prof.^a. Dr.^a Maria Márcia Murta
Membro Titular (IQ – UnB)


Prof. Dr. Luis Eduardo M. Quintas
Membro Titular (UFRJ)


Prof. Dr. Rafael Oliveira Rocha
Membro Titular (IQ - UnB)

Brasília, 20 de julho de 2010.

✉ Caixa Postal 4478 - CEP: 70904-970 - Brasília - DF - BRASIL
☎ (061) 3107-3805 Fax: (061) 3273-4149
🌐 www.unb.br/iq/pg posgiq@unb.br



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Bufadienolídeos da secreção cutânea de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae) - Isolamento, caracterização, modificações químicas e avaliação das atividades biológicas.

GERALDINO SILVA ANDRADE CUNHA FILHO

*Tese apresentada ao Instituto de Química (UnB)
como pré-requisito para a obtenção do título de
Doutor em Química.*

Orientadora: Prof^a. Maria Lucilia dos Santos

Área de concentração: Química Orgânica

Brasília, 20 de Julho de 2010

*Aos meus queridos pais, Geraldino e Maria Ilma
e aos meus estimados irmãos Alan Ricardo,
Mailma e Geilma pelo carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

- Este trabalho foi realizado no Laboratório de Transformação de Moléculas Orgânicas (LITMO) do Instituto de Química da Universidade de Brasília, sob a orientação da Professora Maria Lucilia dos Santos a quem expresse sinceros agradecimentos pela oportunidade de experimentar a Química, pelo carinho e orientação acadêmica, apoio financeiro e técnico que foram fundamentais para a realização deste trabalho.
- Aos professores Luís Eduardo M. Quintas (UFRJ), Mariana Castro (IB-UnB), Maria Márcia Murta (IQ-UnB), Rafael Oliveira Rocha (IQ-UnB) e Inês Sabioni Resck (IQ-UnB) que cordialmente aceitaram participar da banca examinadora e ofereceram valiosas sugestões.
- À Prof^a. Inês Sabioni Resck pela amizade, pelo carinho e pela inestimável contribuição para o domínio das técnicas espectrométricas.
- Aos professores Maria Márcia Murta e Peter Bakuzis pelas sugestões durante a realização desse trabalho, e a este último, em especial, pela contribuição na fase de revisão do artigo científico publicado na revista *Toxicon* (EUA).
- Aos meus familiares e amigos pessoais, em especial aos meus tios Edson Duarte e Maria Telma Bezerra pelo total apoio e carinho.
- Aos professores Cláudia do Ó Pessoa e Manoel Moraes e ao Dr. Bruno Munim do Laboratório de Oncologia Experimental (UFC) por conduzir os estudos das atividades antitumorais, imunomodulatórias e hemolíticas dos bufadienólídeos e derivados.
- Aos professores François Noël e Luís Eduardo Quintas do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular (Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ) por conduzir os estudos da atividade Na⁺/K⁺-ATPase dos bufadienólídeos e derivados.
- Aos professores Elisabeth Schwartz (IB-UnB) e Natan Maciel (IB-UFG) pela doação de secreções glandulares de *Rhinella schneideri*.
- Aos demais professores, amigos, funcionários e colegas do Instituto de Química (IQ-UnB) e Instituto de Biologia (IB-UnB), pela amizade e participação direta ou indireta na realização deste trabalho.
- À FINEP- Projeto CTINFRA 970/01.
- A CAPES e DDP-UnB pelo apoio financeiro ao longo do curso.

RESUMO

A secreção cutânea de diferentes espécies de sapos constitui em uma fonte rica de bufadienólídeos, os quais exibem interessante diversidade estrutural e inúmeras propriedades biofarmacológicas. Neste trabalho, foi realizado o isolamento de bufadienólídeos do veneno do sapo *Rhinella schneideri* incluindo a marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), helebrigenina (**23**), a atípica 20*S*,21*R*-epoximarinobufagina (**62**), além da 19-hidroxitelocinobufagina (**63**) e o amplamente distribuído fitoesteróide β -sitosterol (**19**). Dos bufadienólídeos naturais, foram preparados os seguintes derivados: 3 β -acetóxi-marinobufagina (**64**), 3 β -acetóxi-bufalina (**65**), 3 β -acetóxi-telocinobufagina (**66**), 3 β -acetóxi-20*S*,21*R*-epoximarinobufagina (**67**), 3 β ,5 β -diacetóxi-marinobufagina (**68**), 3 β ,5 β ,14 β -triacetóxi-telocinobufagina (**69**) e 3 β ,14 β -diacetóxi-bufalina (**70**), pela proteção das hidroxilas nos compostos **20** a **22** e **62**; 20*R*,21*S*-epoximarinobufagina (**71**), 20,21-epoxitelocinobufagina (**72**) e 20,21-epoxibufalina (**73**), pelo tratamento dos compostos **20** a **22** com Fe(acac)₃-H₂O₂; 3-oxo-marinobufagina (**74**), pela oxidação de **20** com PCC; 3-*O*-formil-marinobufagina (**75**), 3-*O*-formil-telocinobufagina (**76**), 3-*O*-formil-bufalina (**77**) e 3-*O*-formil-20*S*,21*R*-epoximarinobufagina (**78**) por meio da formilação de **20**, **21**, **22** e **63** com ácido fórmico; 14 α -*H*-15-oxo-3 β ,5 β -dihidróxi-bufa-20,21-dienolídeo (**79**) e 14 β -*H*-15-oxo-3 β ,5 β -dihidróxi-bufa-20,21-dienolídeo (**80**), pela abertura do epóxido com ácido perclórico em **20**, além de 3-oxo-5 β -hidróxi-14 β ,15 β -20,21-diepóxibufa-16,22-dienolídeo (**83**) pelo tratamento de **20** com CrO₃-ácido acético. A caracterização estrutural de outros subprodutos derivados encontra-se em processamento e será detalhada oportunamente. A avaliação citotóxica dos compostos naturais **19** a **23**, **62** e **63** e seus derivados **64** a **67** exibiram de moderada a intensa atividade contra as linhagens de células tumorais HL-60, SF-295, MDA-MB-435 e HCT-8. Linfócitos sanguíneos periféricos (PBLs) foram suscetíveis à ação tóxica dos compostos testados, os quais, no entanto, não produziram hemólise em eritrócitos de ratos. O ensaio de inibição de Na⁺/K⁺-ATPase demonstrou que a telocinobufagina (**21**) e a bufalina (**22**) apresentaram maior afinidade às subunidades α 2 e α 3 da enzima isolada do hemisfério cerebral de rato, quando comparado à marinobufagina (**20**). No ensaio com a isoenzima da bomba de sódio α 1 β foi observado efeito aditivo na combinação ouabaína/marinobufagina e ouabaína/telocinobufagina.

ABSTRACT

Glandular secretions of toad species are an important source of bufadienolides, which exhibit interesting structural diversity and several biopharmacological properties. Here in it is described the isolation of bufadienolides from the Brazilian toad *Rhinella schneideri* parotoid glands secretion, including: marinobufagin (**20**), telocinobufagin (**21**), bufalin (**22**), hellebrigenin (**23**), the atypical 20*S*,21*R*-epoxymarinobufagin (**62**), 19-hydroxytelocinobufagin (**63**), besides the widespread steroid β -sitosterol (**19**). From natural bufadienolides were prepared the following derivatives: 3 β -acetoxy-marinobufagin (**64**), 3 β -acetoxy-bufalin (**65**), 3 β -acetoxy-telocinobufagin (**66**), 3 β -acetoxy-20*S*,21*R*-epoxymarinobufagin (**67**), 3 β ,5 β -diacetoxy-marinobufagin (**68**), 3 β ,5 β ,14 β -triacetoxytelocinobufagin (**69**), and 3 β ,14 β -diacetoxy-bufalin (**70**) by protection of hydroxyl at compounds **20** to **22**, and **62**; 20*R*,21*S*-epoxymarinobufagin (**71**), 20,21-epoxytelocinobufagin (**72**), and 20,21-epoxybufalin (**73**) by treatment of compounds **20** to **22** with Fe(acac)₃-H₂O₂; 3-oxo-marinobufagin (**74**) by oxidation of compound **20** with PCC; 3-*O*-formyl-marinobufagin (**75**) by formylation of compound **20** with formic acid; 14 α -*H*-15-oxo-3 β ,5 β -dihydroxy-bufa-20,21-dienolide (**79**) and 14 β -*H*-15-oxo-3 β ,5 β -dihydroxy-bufa-20,21-dienolide (**80**) by epoxide opening with perchloric acid at compound **20**, and 3-oxo-5 β -hydroxy-14 β ,15 β -20,21-diepoxi-bufa-16,22-dienolide (**83**) by treatment of **20** with acetic acid-CrO₃. The structural characterization of other byproducts derivatives are undergoing and will be detailed in due course. The cytotoxic evaluation showed that natural compounds **19** to **23**, **62**, and **63** and their derivatives **64** to **67** exhibited moderate to strong activity against human HL-60, SF-295, MDA-MB-435, and HCT-8 cancer cell strains. Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were vulnerable to the toxic action of tested compounds, which however did not promote hemolysis of mouse erythrocytes. The Na⁺/⁺K-ATPase inhibitory assay demonstrates that telocinobufagin (**21**) and bufalin (**22**) showed more affinity to α 2 and α 3 subunits of the enzyme from rat cerebral hemisphere when compared to the marinobufagina (**20**). On the inhibition of human Na⁺/K⁺-ATPase α 1 β 1 isoenzyme, additive effect was observed from the combination ouabain/marinobufagin as well as ouabain/telocinobufagin.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	VII
Lista de Figuras e Esquemas	VIII
1. Introdução	1
1.1. Animais como fonte extraordinária de fármacos	1
1.2. A importância da secreção de pele dos anfíbios	6
1.3. Classes de compostos presentes na secreção de pele de anfíbios	9
1.4. Bufadienólídeos	13
2. Objetivos	30
3. Resultados e Discussão	31
3.1. Isolamento, caracterização e modificações químicas de bufadienólídeos isolados de <i>Rhinella schneideri</i>	32
3.2. Estudo das atividades biológicas de bufadienólídeos naturais de <i>Rhinella schneideri</i> e seus derivados	54
4. Conclusões	62
5. Perspectivas	65
6. Parte Experimental	67
7. Referências bibliográficas	80
Anexos	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados analíticos dos compostos naturais isolados de <i>R. schneideri</i> .	34
Tabela 2. Dados de RMN ¹ H (300 MHz) dos bufadienólídeos isolados de <i>R. schneideri</i> .	38
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C (75 Hz) dos compostos naturais isolados de <i>R. Schneideri</i> .	40
Tabela 4. Derivados monoacetilados 64 a 67 e dados analíticos experimentais.	41
Tabela 5. Dados de RMN ¹ H (300 MHz) e ¹³ C (75 MHz) dos compostos monoacetilados.	42
Tabela 6. Dados de RMN ¹ H comparativos entre os diastereoisômeros 20 <i>S</i> ,21 <i>R</i> -epoxibufadienólídeos.	47
Tabela 7. Dados de RMN ¹ H dos compostos formilados.	50
Tabela 8. Dados de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) dos compostos produzidos a partir da abertura do epóxido na marinobufagina (20).	52
Tabela 9. Atividade citotóxica dos bufadienólídeos isolados do veneno do sapo <i>Rhinella schneideri</i> .	55
Tabela 10. Atividade citotóxica dos derivados acetilados.	56
Tabela 11. Potência inibitória dos bufadienólídeos sobre a atividade NKA de diferentes tecidos.	60
Tabela 12. Avaliação da atividade inibitória de diferentes glicosídeos cardíacos em combinação com bufadienólídeos contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase de rim humano.	61

LISTA DE FIGURAS, ESQUEMAS E FLUXOGRAMAS

- Figura 1.** Alcalóides tóxicos homobatracotoxina (1) e batracotoxina (2) isolados das aves *Pitouhi dicrous* e *Ifrita kowaldi*. 3
- Figura 2.** Inibidor da enzima conversora de angiotensina (ACE) I, Captopril® (3). 4
- Figura 3.** Aminoesteróide anfifílico antitumoral e bactericida esqualamina (4), isolado do tubarão *Squalus acanthias*. 5
- Figura 4.** Alcalóides com potente atividade analgésica encontrados em anuros: tetrodotoxina (5), epibatidina (6) e samandarina (7). 6
- Figura 5.** (A) Exemplar do sapo cururu *Rhinella schneideri* evidenciando a glândula parotóide (retângulo vermelho). (B) Corte frontal e lateral da glândula parotóide exibindo a secreção (Fotos: cortesia do Prof. Antonio Sebben, IB-UnB). 8
- Figura 6.** Rota Biosintética das principais amins biogênicas isoladas de pele de anfíbios. 10
- Figura 7.** Exemplo de alcalóides antimicrobianos e antifúngicos isolados de anfíbios. 11
- Figura 8.** Exemplos de esteróides isolados de sapos bufonídeos. A numeração observada na marinobufagina (20) refere-se aos átomos de carbono na estrutura dos bufadienólídeos. 15
- Figura 9.** Esteróides cardiotônicos ouabaína (28) e digitoxina (29), isolados de *Digitalis purpurea* e *Strophantus gratus*. 16
- Esquema 1.** Rota sintética para a produção de um bufadienólídeo a partir do esteróide 3β-acetóxi-5-androsten-17-ona (30). 19
- Esquema 2.** Síntese parcial da telocinobufagina (21), descrita por Pettit e Kamano. 19
- Esquema 3.** Exemplo da conversão de digitoxina (45) na resibufogenina (25) e bufalina (22). 21
- Esquema 4.** Derivados produzidos a partir da resibufogenina (25) e do seu isômero (51) por meio de catálise ácida. 22
- Esquema 5.** Formação de 20,21-epoxibufadienólídeos citotóxicos para células tumorais. 22
- Figura 10.** Efeitos dos substituintes nos bufadienólídeos relacionados à inibição do crescimento das células tumorais. A estrutura da bufalina (22) foi tomada como base. 28
- Figura 11.** Compostos antitumorais não tóxicos derivados da helebrina (58). 29

Fluxograma 1. Obtenção fracionamento, caracterização, modificação química e avaliação da atividade biológica dos componentes do veneno de <i>R. schneideri</i> .	32
Figura 12. Compostos isolados do veneno do sapo <i>R. schneideri</i> .	34
Figura 13. Espectro de RMN ¹ H da marinobufagina (20) mostrando absorções características. *Dados espectrais obtidos de Kamano e colaboradores. ^{55b}	37
Figura 14. Espectro de RMN ¹³ C da marinobufagina (20) com absorções características (Dados espectrais referenciados de Kamano e colaboradores)	39
Figura 15. Ampliação dos espectros de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃), comparando sinais dos hidrogênios carbinólicos da marinobufagina (20 , A) e marinobufagina 3-acetato (64 , B) e mostrando o sinal dos hidrogênios da metila do grupo acetato em 64 (C).	43
Figura 16. Ampliação dos espectros de RMN ¹ H dos compostos 3,5-diacetato de marinobufagina (68 ,A), 3,5,14-triacetato de telocinobufagina (69 , B) e 3,14-diacetato de bufalina (70 , C), mostrando os singletos referentes aos grupos acetilas.	45
Esquema 6. Produção de derivados poli-acetilados com anidrido acético na presença de perclorato de magnésio.	44
Esquema 7. Produção de 20,21-epoxibufadienólídeos a partir da marinobufagina (20).	46
Esquema 8. Produção de 20,21-epoxibufadienólídeos e compostos relacionados.	48
Esquema 9. Formação da 3-oxo-marinobufagina (74).	48
Figura 17. Sinal correspondente à carbonila da 3-oxo-marinobufagina (74).	49
Esquema 10. Preparação de 3-O-formil bufadienólídeos.	49
Figura 18. Ampliação do sinal correspondente ao hidrogênio do grupo formil na telocinobufagina 3-formiato (76).	50
Esquema 11. Abertura de epóxido na marinobufagina (20) com ácido perclórico.	51
Esquema 12. Tratamento da marinobufagina (20) com ácido acético glacial na presença de Cr ₂ O ₃ .	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 Animais como fonte extraordinária de fármacos

Há milênios, animais produtores de toxinas naturais fazem parte do folclore, da medicina tradicional e, até mesmo, da culinária de diversas civilizações ao redor do mundo.¹ Mesmo diante do potencial perigo de intoxicação,² o homem mostrou-se eficiente em suas inter-relações com animais tóxicos. Como resultado, diversas toxinas vêm representando na atualidade uma extraordinária ferramenta para a saúde humana, auxiliando, por exemplo, no entendimento de diversos processos fisiológicos ou patofisiológicos e na geração de inovações farmacológicas.³ Estudos sobre a composição química e sobre a farmacologia de secreções, extratos e substâncias isoladas de animais revelam seu potencial terapêutico.¹

O Brasil detém uma biodiversidade faunística e botânica, terrestre ou marinha, grande parte ainda não explorada em diversos aspectos, evidenciando um imenso potencial para a exploração de produtos naturais disponíveis. Como uma área multidisciplinar e em franca expansão, a Química dos Produtos Naturais no Brasil pode avançar no que se refere ao desenvolvimento de produtos terapêuticos, incluindo aqueles de origem animal.¹

No aspecto da pesquisa básica e aplicada, estudiosos envolvidos com a fitoquímica e metodologias analíticas, ecologia química, síntese, biossíntese e/ou biotransformação, biotecnologias, quimiosistemática, química de microrganismos, produtos naturais marinhos e análises relacionadas às suas atividades biológicas estão engajados em buscar uma aplicação para as substâncias descobertas.⁴ No aspecto econômico/comercial, a exploração dos produtos naturais já conhecidos e a descoberta de novas substâncias químicas ou novos produtos podem ajudar a desenvolver os diversos setores médico/farmacêutico e áreas correlatas. A preservação de costumes, folclores e da medicina popular, que é bem mais difundida para plantas medicinais, pode levar ao desenvolvimento sustentável para populações que se utilizam dos diversos produtos de origem animal. Além do mais, política e educação ambiental

¹ Costa-Neto E. M. *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2005**, *77*, 33.

² Isbister, G. K.; Kiernan, M. C. *Lancet Neurol.*, **2005**, *4*, 219.

³ Rejandra, W.; Armugam, A.; Jeyasseelan, K. *Toxicon*, **2004**, *44*, 1.

⁴ Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. *Química Nova*, **2002**, *25*, 45.

podem incentivar o desenvolvimento de estratégias protetoras da biodiversidade para que esta não seja explorada indevidamente levando ao esgotamento da matéria-prima ou a desequilíbrios ambientais.

Animais de diferentes *taxa* são biossintetizadores ou agregadores de substâncias tóxicas que possuem efeitos fisiológicos ou comportamentais para outros organismos e são utilizadas para diversos fins: defesa contra predadores, como feromônios, combate a microrganismos patogênicos, disputa química por espaço com outros organismos competidores ou interação simbiótica, além da manutenção da própria fisiologia.⁵ Muitas dessas substâncias já foram destinadas para o desenvolvimento de alguns fármacos ou possuem alguma potencialidade para o uso medicinal. Para exemplificar, alguns animais que contêm toxinas e secreções tóxicas são mostrados a seguir, destacando a importância destes para a Toxinologia e áreas correlatas.

Ornitorrincos (Ornithorhynchidae) e équidnas (Tachyglossidae) são mamíferos que vivem principalmente na Austrália e possuem um par móvel de esporões nos membros posteriores que é inoculador de peçonha. Esses animais estão envolvidos em ataques a homens e animais conferindo forte edema no local da ferroada e dor intensa nos casos relatados.⁶ No que se refere à sua composição, a peçonha do ornitorrinco *Platypus anatinus* evidencia atividades proteolíticas e de hialuronidases, semelhantes às apresentadas por peçonhas de serpentes.⁷ Do animal também já foram identificados polipeptídeos tipo defensinas (sem atividade antimicrobiana, usualmente observada para essa classe de compostos), peptídeos natriuréticos, que causam relaxamento de músculo liso, edema e liberação de histamina em mastócitos. Isomerasas, fatores de crescimento de nervos e proteínas formadoras de canais iônicos também já foram relatados para esses animais.⁸

⁵ a) Daly, J. W.; Secunda, S. I.; Garrafo, H. M.; Spande, T. F.; Wisnieski, A.; Cover Jr, J. F. *Toxicon*, **1994**, *32*, 657; b) Toledo, R. C.; Jared, C. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *111*, 1; c) Harbone, J. B. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 509; d) Zimmer, R. K.; Butman, C. A. *Chem. Bull.* **2000**, *198*, 168; e) Pukala, A. L.; Bowie, H. J.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. *J. Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 368

⁶ Calaby, J. H.; In: *Venomous Animals and their Venoms*; Bucherl, W.; Buckley, E. E.; Delofeu, V., eds., Academic Press: New York, **1968**, cap. 1.

⁷ Plater, G.; Martin, R. L.; Milburn, P. J. *Toxicon*, **1995**, *33*, 157.

⁸ a) Plater, G.; Martin, R. L.; Milburn, P. J. *Toxicon*, **1998**, *36*, 847; b) Torres, A. M.; Wang, X. H.; Fletcher, J. I.; Alewood, D.; Alewood, P. F.; Smith, R.; Simpson, R. J.; Nicholson, G. M.; Sutherland, S. K.; Gallagher, C. H.; King, G. F.; Kuchel, P. W. *Biochem. J.*, **1999**, *341*, 785; c) Kourie, J. I., *J. Membrane Biol.*, **1999**, *172*, 37; d) Torres, A. M.; Tsampazi, M.; Tsampazi, C.; Kennett, E. C.; Belov, K.; Geraghty, D. P.; Bansal, P. S.; Alewood, P. F.; Kuchel, P. W. *FEBS Letters*, **2006**, *580*, 1587; e) Koh, J. M. S.; Bansal, P. S.; Torres, A. M.; Kuchel, P. W. *Austral. J. Zool.*, **2009**, *57*, 203.

convencionais para doenças como esclerose múltipla, epilepsia e analgesia.¹³ A descoberta do hipotensivo peptídico bradicinina e dos peptídeos potencializadores de bradicinina no veneno da serpente *Botrops jaracaca* por Rocha e Silva e colaboradores¹⁴ culminou nos estudos que renderam o desenvolvimento do amplamente utilizado medicamento anti-hipertensivo Captopril® (**3**, Figura 2), inibidor da metaloproteinase endotelial ACE (enzima conversora de angiotensina I). Uma vez inibida, a ACE não converte angiotensina I na potente vasoconstritora angiotensina II e também não degrada o peptídeo hipotensor bradicinina, evitando o quadro de hipertensão.¹⁵ Bradicinina e peptídeos relacionados já foram encontrados na secreção de pele de alguns anfíbios. Como uma fonte diferente, a descoberta de novas moléculas dessa classe em anfíbios pode gerar estudos para o desenvolvimento de fármacos anti-hipertensivos com efeitos farmacológicos seletivos.^{16,5e}

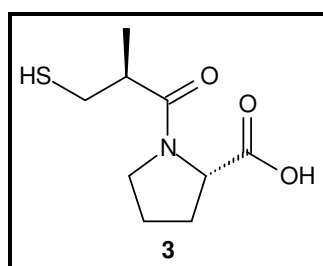


Figura 2. Inibidor da enzima conversora de angiotensina (ACE) I, Captopril® (**3**).

Do grupo dos esteróides, o aminoesteróide anfifílico com atividades antiangiogênica e bactericida esqualamina (**4**, Figura 3), isolado do tubarão *Squalus acanthias* (Condriacties, Squalidae), estimulou a síntese de análogos que estão sendo cotados como fármacos para o tratamento de tumores sólidos e como bactericidas.¹⁷

¹³ a) Livett, B. G., Sandal, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Satkunanathan, N., Khalil, Z. *Toxicol.*, **2006**, *48*, 810; b) Mortari, M. R., Cunha A. O. S., Ferreira L. B., Santos, W. F. *Pharmacol. Therap.*, **2007**, *114*, 171; c) Mirshafiey, M. *Neuropharmacology*, **2007**, *53*, 353.

¹⁴ a) Rocha e Silva, M.; Beraldo, W. T.; Rosenfeld, G.; *Am. J. Phys.* **1949**, *156*, 261; b) Ferrera, S. H., *Brit. J. Pharmacol.* **1965**, *24*, 163; c) Ferreira, S. R.; Bartelt, D. C.; Greene, L. J. *Biochemistry*, **1970**, *9*, 2583.

¹⁵ a) Ondetti, M. A.; Cushman, D. V.; *In* Soffer, R. L. (Ed.) Wiley, New York, **1981**, 165, citado em Hyashi, M A. F.; Camargo, A. C. M. *Toxicol.*, **2005**, *45*, 1163.

¹⁶ a) O'Rourke, M.; Chen, T.; Hirst, D. G.; Rao, P.; Shaw, C. *Regul. Pept.*, **2004**, *121*, 65.

¹⁷ a) Moore, K. S.; Wehrli, S.; Roder, H.; Rogers, M.; Forrest, J. N.; Mccrimmon, D.; Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 1354; b) Kikuchi, K.; Bernard, E. M.; Sadownic, A.; Regen, S. L.; Armstrong, D. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1997**, *41*, 1433; c) Herbst, R. S.; Hammond, L. A.; Carbone, D. P.; Tran, H. T.; Holroyd, K. J.; Desai, A.; Williams, J. I.; Bekele, B. N.; Hait, H.; Allgood, V.; Solomon, S.; Schiller, J. H. *Clinic. Canc. Res.*, **2003**, *9*, 4108; d) Sills, A. K.; Williams, J. I.; Tyler, B. M.; Epstein, D.

Também com atividades antitumorais e bactericidas, esteróides hidroxilados, com características anfifílicas, chamados bufadienolídeos são comumente encontrados em sapos da família Bufonidae.¹⁸

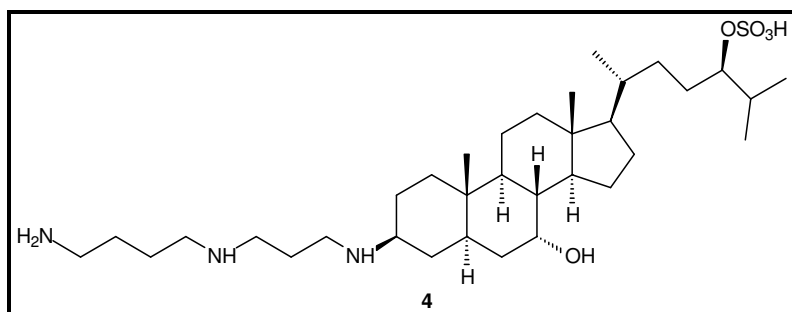


Figura 3. Aminoesteróide anfifílico antitumoral e bactericida esqualamina (**4**), isolado do tubarão *Squalus acanthias*.

Adicionalmente, o alcalóide guanidínico tetrodotoxina (**5**), descoberto em peixes Tetraodontidae (baiacu) e também isolado em vários outros animais, incluindo anfíbios como *Brachycephalus ephippium* (Anura, Brachycephalidae),¹⁹ possui um grande interesse médico devido a sua capacidade de bloquear canais iônicos. A tetrodotoxina é utilizada, pela WEX Pharmaceuticals Inc., como composto guia para a produção de medicamentos para analgesia em pacientes com câncer avançado que sofrem com intensas dores, para tratamento de detoxificação em toxicod dependentes e para anestesia.²⁰ Outro alcalóide, como a epibatidina (**6**), isolado de anfíbio colombiano *Epipedobates tricolor* (Anura, Dendrobatidae) tem sido utilizado como guia para o desenvolvimento de fármacos antinociceptivos (Figura 4).²¹

S.; Sipos, E. P.; Davis, J. D.; McLane, M. P.; Pitchford, S.; Cheshire, K.; Cannon, F. H.; Kinney, W. A.; Chao, T. L.; Donowitz, M.; Lattera, J.; Zasloff, M.; Brem, H. *Cancer Res.*, **1998**, *58*, 2784.

¹⁸ a) Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5447; b) Cunha-Filho, G. A.; Schwartz, C. A.; Resck, I. S.; Murta, M. M.; Lemos, S. S.; Castro, M. S.; Kyaw, C.; Pires Jr, O. P.; Leite, J. R. S.; Bloch Jr, C. E Schwartz, E. F. *Toxicol.*, **2005**, *45*, 777.

¹⁹ a) Tsuda, K.; Kawamura, M.; Zasshi, Y. *J. Pharm. Soc. Japan*, **1952**, *72*, 771; b) Pires Jr., O. R.; Sebben, A.; Schwartz, E.F.; Largura, S. W. R.; Bloch, C.; Morales, R. A. V.; Schwartz, C. A. *Toxicol.*, **2002**, *40*, 761;

²⁰ a) Marcil, J.; Walczac, J. S.; Guindon, J.; Ngoc, A. H.; Lu, S.; Beaulieu, P. *Brit. J. Anaesth.*; **2006**, *96*, 761; b) <http://www.wexpharma.com/products/index.htm>, acessado em 05 de abril de 2010.

²¹ a) Spande, T. F.; Garraffo, H. M.; Edwards, M. W.; Yeh, H. J. C.; Pannell, L.; Daly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3475; b) Bannon, A. W.; Decker, M. W.; Holladay, M. W.; Curzon, P.; Donnelly-Roberts, D.; Puttfarcken, P. S.; Bitner, R. S.; Diaz, A.; Dickenson, A. H.; Porsolt, R. D.; Williams, M.; Arneric, S. P. *Science*, **1998**, *279*, 77.

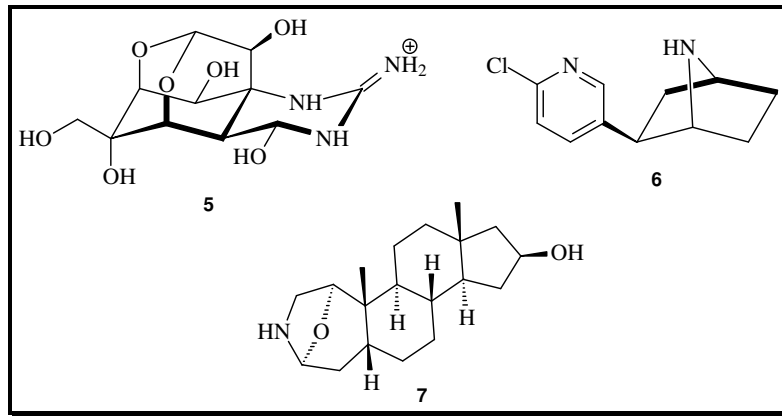


Figura 4. Alcalóides com potente atividade analgésica encontrados em anuros: tetrodotoxina (5), epibatidina (6) e samandarina (7).

Ao mostrar as diferentes classes de compostos acima e algumas de suas atividades biológicas, chama-se a atenção para que diferentes grupos de animais possuam substâncias quimicamente semelhantes, podendo, entretanto, apresentar uma farmacologia também semelhante ou distinta. Nesse cenário, os anfíbios se destacam como sendo uma fonte rica de compostos de diversas classes químicas com uma grande potencialidade terapêutica uma vez que vários compostos isolados destes estão sendo utilizados como guias (*lead compounds*) para o desenvolvimento de fármacos.

1.2 A importância das secreções de pele dos anfíbios

Dentre os vertebrados, os anfíbios (derivado do grego *amphibios*, que significa “vivendo uma vida dupla”) possuem adaptações morfológicas e fisiológicas, os quais permitem que esses animais habitem e explorem os ambientes terrestres e aquáticos.^{22,5b} Filogeneticamente, a classe Amphibia é agrupada em três ordens:

- a) ***Gymnophiona***: são animais subterrâneos ápodas, conhecidos popularmente por cobra-cega ou, mais corretamente, cecílias. Este grupo possui cerca de 180 espécies distribuídas pelo planeta, exceto na Oceania e Austrália.²³ Um exemplo é a espécie *Siphonops paulensis* Boettger, encontrada no Brasil e que contém

²² Lazarus, L. H., Attila, M. *Prog. Neurobio.*, 1993, 41, 473.

²³ Frost, D. R. 2010. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 20 de abril de 2010.

em sua secreção de pele uma toxina hemolítica (hemolisina). Em eritrócitos de *Rhinella schneideri* (formalmente *Bufo paracnemis*), a hemolisina forma canais iônicos dependentes de voltagem, possivelmente provocando cardiotoxicidade indireta devido à liberação maciça de íons K⁺ no sangue.²⁴

b) **Caudata**: são animais aquáticos ou terrestres que apresentam caudas e são representados pelas salamandras e tritões. Existe cerca de 600 espécies distribuídas pela Europa, Ásia, África do Norte e Américas.²³ Muitos desses animais são extremamente tóxicos devido à presença de alcalóides. Tetrodotoxina (5, Figura 4, p. 6) e derivados são encontrados na secreção de pele do tritão *Cynops ensicauda* Hallowell (Salamandridae) e samandarina (7, Figura 4, p. 6) ocorre na salamandra *Salamandra salamandra terrestris* Eiselt (Salamandridae).²⁵

c) **Anura**: abrange a maioria dos anfíbios conhecidos e são popularmente denominados de sapos, rãs e pererecas. Os anuros são cosmopolitas e existem 5858 espécies, dentre os quais se destaca a família Bufonidae com 550 espécies. Nesta família são encontrados os sapos verdadeiros, mais conhecidos no Brasil como sapos cururus, dentre os quais se destacam os gêneros *Rhinella* (86 espécies) e *Bufo* (17 espécies).²³ As secreções de pele dos anuros são ricas em compostos de diversas classes químicas e apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas.²⁶

A pele dos anfíbios é um órgão multifuncional, morfologicamente e bioquimicamente adaptada para desempenhar funções fisiológicas e ecológicas. São encontrados dois tipos histologicamente distintos e especializados de glândulas: as mucosas e serosas. As glândulas mucosas estão distribuídas por todo o corpo e são importantes para a respiração, controle da temperatura e osmolaridade. As serosas (glândulas de veneno), de origem epitelial, sintetizam e armazenam substâncias que são utilizadas na defesa contra predadores e microrganismos patogênicos.^{26,5b} Na

²⁴ a) Schwartz, E. N. F.; Schwartz, C. A.; Sebben, A.; Largura, S. W. R.; Mendes, E. G. *Toxicon*, **1999**, 37, 47; b) Schwartz, E. F.; Stucchi-Zucchi, A.; Schwartz, C. A.; Salomão, L. C. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, 36, 1279.

²⁵ a) Yasumoto T.; Yotsu, M.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2344; b) Mebs, D.; Pogoda, W. *Toxicon*, **2005**, 45, 603.

²⁶ Erspamer, V. **1994**, In: Heatwole, H.; Barthalmus, G. T.; Heatwole, A.Y. ed. *Amphibian Biology*, **1994**.

Figura 5, observa-se um exemplar de um sapo cururu da espécie *Rhinella schneideri* Chaparro, Pramuk e Gluesenkamp e perspectivas de uma glândula parotóide (do tipo serosa) com diversas seções contendo veneno fresco. Em geral, a liberação do conteúdo das glândulas nos anfíbios é provocada por regulação nervosa em situações de estresse ou constrição mecânica causada pela ofensiva de algum predador.²⁷

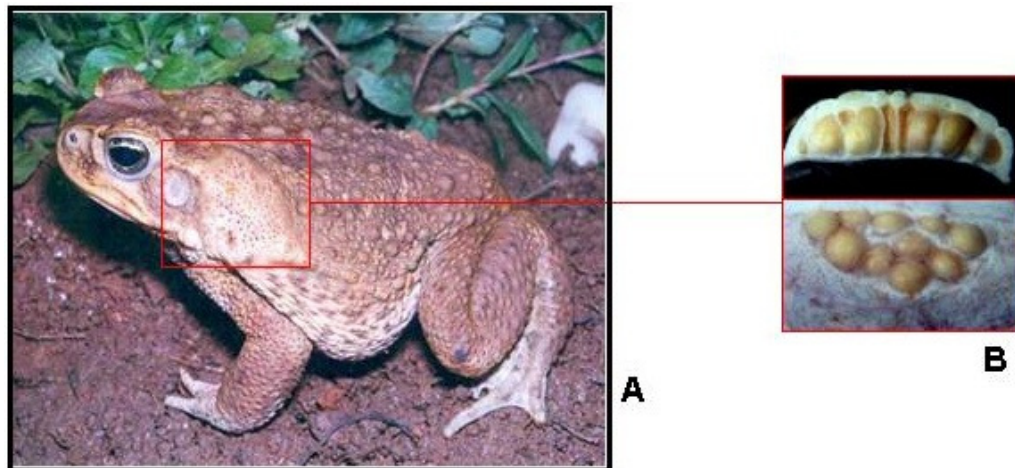


Figura 5. (A) Exemplar do sapo cururu *Rhinella schneideri* evidenciando a glândula parotóide (retângulo vermelho). (B) Corte frontal e lateral da glândula parotóide exibindo a secreção (Fotos: cortesia do Prof. Antonio Sebben, IB-UnB).

Barthalmus (1994)²⁷ perfaz um panorama sobre alguns mecanismos antipredatórios e como os componentes químicos da secreção cutânea atuam durante a defesa de um anfíbio. O anfíbio aquático *Xenopus leavis* (Pipidae) foi utilizado como modelo para os estudos antipredatórios contra seus principais predadores (serpentes aquáticas *Noredia sipedon*). A secreção cutânea de *X. leavis* – rica em neuropeptídeos, aminas biogênicas e endopeptídeos – provoca respostas que evitam sua captura. São respostas do tipo escape que induzem no predador disquinesias orofaciais e retardo da captura, pois a diminuição dos movimentos da língua e do uso dos sensores químicos vomeronasais atrapalham a localização da presa, a diminuição de comportamento agressivo durante a captura e a indução de saciedade.

Algumas civilizações têm usado anfíbios como parte de seus afazeres cotidianos. Em alguns países sul-americanos, as secreções de pele de muitos anfíbios são usadas por culturas indígenas nas suas atividades diárias como caça, pesca e rituais religiosos. Com zarabatanas, cujos dardos são embebidos com veneno de *Phylobates*

²⁷ Barthalmus, G. T. In: Heatwole, H.; Barthalmus, G. T.; Heatwole, A.Y. ed. *Amphibian Biology*, 1994.

terribilis, índios colombianos caçam aves e primatas arborícolas. Na Amazônia, o veneno de *Phylomedusa bicolor* é utilizado para amenizar indisposições gástricas provocadas pela ingestão de comida e bebida alcoólica.²⁸ Chamada de Ch'an Su na China e Senso no Japão, uma preparação galênica obtida a partir do veneno seco de sapos da família Bufonidae, há séculos é utilizada no combate a afecções cardíacas, tumores e no alívio de febres e dores.²⁹ Mais recentemente, as propriedades antibióticas e cicatrizantes observadas na pele da rã-touro (*Rana catesbeiana*) culminou no desenvolvimento de um curativo biológico que é utilizado no Hospital Regional de Brasília (HRAN) para o tratamento de pacientes com queimaduras graves.³⁰ As propriedades biofarmacológicas exibidas pela utilização folclórica e medicinal das secreções de inúmeras espécies de anfíbios ou produtos oriundos da pele resultam da ação de substâncias químicas presentes nesses animais.

1.3 Classes de compostos presentes nas secreções de pele de anfíbios

As principais classes de substâncias com importância farmacológica encontradas nas secreções de pele dos anfíbios são as amins, alcalóides, peptídeos, proteínas e esteróides. Também são encontrados ácidos graxos que desempenham atividades fundamentais para o animal.

Aminas biogênicas

Aminas biogênicas já foram isoladas em diversas famílias de anfíbios, mais comumente, em espécies de sapos da família Bufonidae. Essas substâncias podem ser reunidas em três grupos principais de acordo com o aminoácido precursor (Figura 6).²⁶

- i. **Indolalquilaminas** ou **aminas indólicas** derivadas da hidroxilação enzimática, seguido da descarboxilação do *L*-triptofano (**8**), gerando serotonina (5-

²⁸ a) Clark, B. T. *Biol. Biol. Rev.*, **1997**, 72, 365; b) Sebben, a.; Schwartz, C. A.; Cruz, J. S. *Ciência Hoje*, **1993**, 15, 25

²⁹ Steyn, P. S. e Heerden, F.V. *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, 15, 397.

³⁰ Oliveira, C. R. **2002**. *Biologia Animal - Dissertação de Mestrado*, Universidade de Brasília-DF

hidroxitriptamina, **9**). *N*-Metilações sucessivas da serotonina geram a bufotenina (5-hidróxi-*N,N*-dimetilserotonina, **10**).

ii. **Imidazolalquilaminas** ou **aminas imidazólicas** produzidas pela descarboxilação da histidina (**11**), produzindo histamina (**12**). Uma *N*-metilação da histamina seguida de ciclização gera a espinaceamina (**13**).

iii. **Monohidroxfenilalquilaminas** e **dihidroxfenilalquilaminas (catecolaminas)** ambas tendo como precursora a fenilalanina (**14**). Uma *meta*-hidroxilação, seguido da descarboxilação e *N*-metilações sucessivas da fenilalanina geram a leptodactilina (**15**). Duas hidroxilações, seguido da descarboxilação e três *N*-metilações sucessivas da fenilalanina gera a epinefrina (adrenalina, **16**).

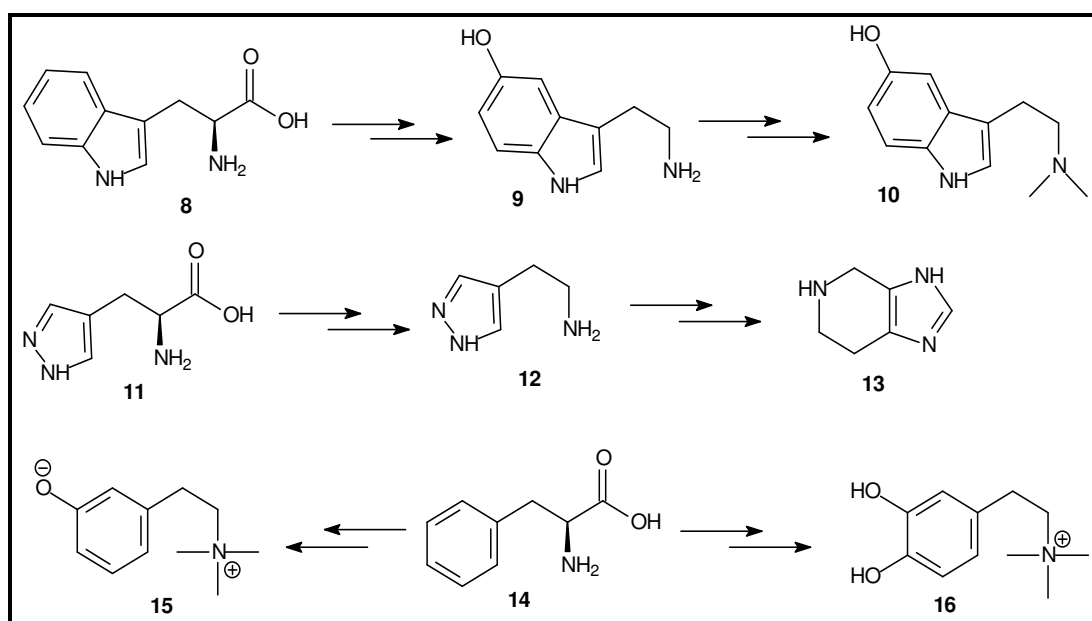


Figura 6. Rota Biosintética das principais aminas biogênicas isoladas de pele de anfíbios.

Alcalóides

Em geral, alcalóides são bloqueadores de canais iônicos neuronais do sistema nervoso central e periférico e do sistema muscular, muitos deles extremamente tóxicos enquanto que outros são atóxicos. Existe uma série de evidências indicando que a maioria dos alcalóides encontrados nos anfíbios é adquirida por meio da dieta ou

produzida por bactérias instaladas no sistema digestivo, que posteriormente são bioacumulados nas glândulas da pele e diversos órgãos.³¹

Daly e colaboradores mencionam que a partir da secreção de pele de diversos anfíbios já foram descobertos mais de 800 alcalóides lipossolúveis, os quais foram classificados por Espamer²⁶ em oito classes distintas, de onde se destacam os alcalóides da classe das batracotoxinas (compostos **1** e **2**, Figura 1, p. 3), além do aminoperidroquinazolínico tetrodotoxina (**5**), o piridínico epibatidina (**6**) e samandarina (**7**), ilustrados na Figura 4 (página 6). Em adição à inibição de canais iônicos, alcalóides isolados de anfíbios, como exemplos a *cis*-2-metil-6-*trans*-*n*-undecacilpiperidina (**17**) e pulmiliotoxina (**18**), possuem atividade bactericida e antifúngica (Figura 7).^{32,26}

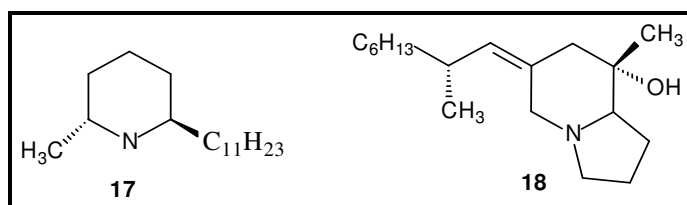


Figura 7. Exemplo de alcalóides antimicrobianos e antifúngicos isolados de anfíbios.

Peptídeos e proteínas

De modo geral, peptídeos e proteínas encontradas nas secreções cutâneas dos anfíbios anuros são as entidades químicas mais estudadas, principalmente os peptídeos antimicrobianos. Estes possuem atividades farmacológicas distintas e apresentam analogia com diversos peptídeos e hormônios encontrados em mamíferos. Peptídeos e proteínas desempenham importantes funções fisiológicas como neuromoduladores, neurotransmissores e agentes neuroendócrinos, além de serem importantes ferramentas contra predadores e do sistema imune inato, atuando como neurotoxinas semelhantes às dendrotoxinas de serpentes, vasoconstritores, miotoxinas, edematogênicos, antivirais, inibidores de proteases ou detergentes de

³¹ a) Saporito, R. A.; Garraffo, H. M.; Donnelly, M. A.; Edwards, A. L.; Longino, J. T.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Am. Soc.*, **2004**, *101*, 8045; b) Saporito, R. A.; Donnelly, M. A.; Norton, R. A.; Garraffo, H. M.; Spand, T. F.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Am. Soc. USA*, **2007**, *104*, 8885.

³² a) Daly, J. W.; Spand, T. F.; Garraffo, H. M. *J. Nat. Prod.*, 2005, **68**, 1556; b) Mcfoy, C.; Danosus, D.; Sandit, R.; Jones, T. H.; Garrafo, H. M.; Spande, T. F.; Daly, J. W. *Z. Naturforsch.*, **2005**, *60c*, 932.

membrana celular de bactérias (bactericidas), citotóxicos para células tumorais, protozoários e fungos,^{33,26} bem como peptídeos opióides e neuropeptídeos.³⁴

Vários estudos demonstram que peptídeos catiônicos são excelentes protótipos para o desenvolvimento de fármacos. A justificativa para isto é que inúmeros agentes infecciosos já possuem requerimentos moleculares (modificações genéticas por mutação ou aquisição de material genético externo) que conferem resistência à maioria dos antibióticos comercializados. Existem exemplos de medicamentos produzidos a partir de peptídeos antimicrobianos, como o pexiganan MSI-78, um peptídeo antimicrobiano de vinte e dois resíduos de aminoácidos, análogo à magainina, empregado contra infecções polimicrobicas. Adicionalmente, foram recentemente desenvolvidos peptídeos sintéticos bactericidas, análogos da atóxica e moderadamente antibacteriana pseudina-2 (GLNALKKVFQGIHAEAIKLINNHVQ-OH).³⁵

Outra importante propriedade farmacológica das toxinas isoladas de anfíbios que está sendo amplamente investigada é a antinocicepção (analgesia e anestesia) e atuação como agentes anticonvulsivantes. Juntamente com epibatidina (**8**) e tetrodotoxina (**9**, Figura 4, p. 6), os peptídeos opióides – dermorfina (Y(D)AFGYPS-NH₂) e deltorfina, (Y(D)AFDYPS-NH₂) – e a ceruleína (EDYTGWMDF-NH₂), encontrados em diversas espécies de anfíbios, estão sendo estudados para o desenvolvimento de fármacos antinociceptivos. Devido a problemas associados com a alta toxicidade desses compostos e sua biodisponibilidade, análogos da dermorfina e deltorfina que possuem alta permeabilidade à barreira hemato-encefálica estão sendo avaliados.³ A partir da antiviral e citotóxica ribonuclease (RNAse) ranpirnase, isolada de oócitos de anfíbios do gênero *Rana*, a Onconase[®] foi desenvolvida como um efetivo antitumoral

³³ a) Lazarus, L. H., Attila, M. *Prog. Neurobio.*, **1993**, *41*, 473; b) Zhao, y.; Jina, Y.; Wei, S. S.; Lee, Y. H. Zhang, Y. *Toxicol.*, **2005**, *46*, 635; c) Kawasaki, H.; Isaacson, T.; Iwamuro, S.; Conlon, J. M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2003**, *312*, 1082;

³⁴ a) Barra, D., Mignogna, G., Simmaco, M., Pucci, P., Severini, C., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Erspamer, V. *Peptides*, **1994**, *15*, 199; b) Melchiorri, P.; Negri, L. *Gen. Pharmac.*, **1996**, *27*, 1099; c) Negri, L.; Melchiorri, P. e Lattanzi, R. *Peptides*, **2000**, *21*, 1639; d) Barra, D., Mignogna, G., Simmaco, M., Pucci, P., Severini, C., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Erspamer, V. *Peptides*, **1994**, *15*, 199; e) Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri-Erspamer, G.; Negri, L.; Corsi, R.; Severini, C.; Barra, D.; Simmaco, M. Kreil, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, *86*, 5188; f) Labuz, D.; Chocyk, A.; Wedzony, K.; Toth, G. e Przewlocka, B. *Life Sci.*, **2003**, *73*, 403; g) Pukala, A. L.; Bowie, H. J.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. *J. Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 368.

³⁵ a) Fuchs, P. C.; Barry, A. L.; Brown, S. D. *Ant. Ag. Chemother.*, **1998**, *42*, 1213; b) Ge, Y.; Macdonald, D. L.; Holroyd, K. J.; Thornsberry, C.; Wexler, H.; Zasloff, M. *Antimic. Ag. Chem.*, **1999**, *43*, 782; c) Pál, T.; Sonnevend, A.; Galadari, S.; Conlon, J. M. *Regul. Pept.*, **2005**, *129*, 85.

contra várias linhagens de células e encontra-se em estudos de triagem para uso medicinal.³⁶

Esteróides

Em adição às aminas biogênicas, o veneno de sapos bufonídeos contém esteróides, tais como colesterol, β -sitosterol e, mais expressivamente, bufadienolídeos e bufotoxinas.^{5b,26} Estes dois últimos grupos possuem grande significância para a fisiologia, defesa e combate a microrganismos, enquanto que a presença de β -sitosterol pode estar envolvida com a imunidade inata desses animais contra células tumorais.

Todas as espécies de anfíbios são produtoras de toxinas e muitas delas são farmacologicamente ativas para invertebrados ou vertebrados. O largo espectro de atividades observadas nas suas toxinas tem despertado interesse em pesquisas, o que culminou na descoberta de diversas classes de compostos. Diante da grande biodiversidade de anfíbios no planeta, animais ainda não catalogados e quimicamente não explorados possuem um grande potencial na geração de novidades que podem incrementar a coleção de compostos biologicamente ativos. Além disso, pesquisas podem ser endereçadas para a descoberta de novos mecanismos de ação fisiológica para receptores biológicos, aumentar o conhecimento do sistema imunológico inato dos anfíbios e conduzir ao desenvolvimento racional de fármacos.

Como foco principal do presente estudo, os bufadienolídeos serão abordados nas próximas seções de forma mais detalhada.

1.4 Bufadienolídeos

Diversidade, ocorrência e estrutura química dos bufadienolídeos

O estudo sistemático de bufadienolídeos de origem animal tomou corpo a partir da descoberta de inúmeros desses compostos no Ch'an Su (Venenum Bufonis), uma preparação galênica utilizada na medicina tradicional chinesa. O Ch'an su tem origem

³⁶ a) Ardelt, W.; Mikulski, S. M.; Shogen, K. *J. Biol. Chem.*, **1991**, *266*, 245; b) Saxena, S. K.; Gravell, M.; Wu, Y.N.; Mikulski S. M.; Shogen, K.; Ardelt, W.; Youle, R. J. *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 20783; c) Alfacell Corporation. *Drugs Res. Develop.*, **2007**, *8*, 120.

no veneno das glândulas do sapo *B. bufo gargarizans* e *B. melanostictus* e o seu principal efeito farmacológico é o inotropismo positivo, que gera um aumento na força de contração no músculo cardíaco, devido à interação de esteróides cardiotônicos com a Na⁺/K⁺-ATPase.³⁷ A partir daí, inúmeros bufadienolídeos foram descobertos em anfíbios da família Bufonidae – que compreende os gêneros *Rhinella*, *Bufo*, *Atelopus*, *Ansonia*, *Lephtophryne* e *Pedostipes*.^{38a} Vale ressaltar que bufonídeos do gênero *Melanophryniscus* não possuem tais tipos de compostos.^{38b}

Além dos anfíbios, bufadienolídeos são acumulados em glândulas nurchais de serpentes (*Rhabdophis tigrinus*, Colubridae), como resultado da aquisição de compostos por meio da sua dieta baseada em sapos.^{39c} Em artrópodes, compostos desta classe foram isolados de fireflies (*Photinus pyralis*, *P. ignites* e *P. marginellus*, Lampiridae).⁴⁰

Plantas que contêm bufadienolídeos são importantes produtos da medicina tradicional de países africanos e asiáticos e, em contrapartida aos seus efeitos terapêuticos, algumas delas estão relacionadas com intoxicações graves dos seus usuários. Bufadienolídeos e seus glicosídeos de origem vegetal são isolados em espécies das famílias Crassulaceae, Hyacinthaceae, Iridaceae, Melianthaceae, Ranunculaceae e Santalaecae. A raiz da planta medicinal *Bersama abyssinica* (Melianthaceae) contém bufadienolídeos com atividade bactericida contra *Bacillus subtilis*.⁴¹ *Kalanchoe gracilis* (Crassulaceae), utilizada pela medicina chinesa contra inflamações, contém bufadienolídeos citotóxicos para células tumorais e antiproliferativos anti-HIV.⁴² Adicionalmente, a planta tóxica *Urginea lydenburgensis* (Hyacinthaceae), que também contém bufadienolídeos, é ingerida para o tratamento de asma e coceiras na pele.⁴³ Steyn e Heerden compilam registros mostrando que na África do Sul e Austrália plantas contendo bufadienolídeos são responsáveis por elevados índices de mortalidade em humanos e bovinos.²⁹

³⁷ Cruz, J.S.; Matsuda, H. *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 239, 223.

³⁸ a) Daly, J. W.; Noimai, N.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.; Wilham, J. M.; Garraffo, H. M.; Kaneko, T.; Spande, T. F.; Nimit, Y.; Nabhitabhata, J.; Chan-Ard, T. *Toxicol.*, **2004**, 44, 805; b) Mebs, D.; Pogoda, W.; Maneyro, R.; Kwet, A. *Toxicol.*, **2007**, 46, 641.

³⁹ a) Krenn, L.; Koop, B. *Phytochemistry*, **1998**, 48, 1; b) Steyn, P. S.; Heerden, F. V. X. *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, 15, 397; c) Hutchinson, D.A.; Mori, A.; Savitzky, A.H.; Burghardt, G.M.; Wu, X.; Meinwald, J.; Schroeder, F.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 2265.

⁴⁰ Eisner, T.; Wiemer, D.F.; Haynes, L.W.; Meinwald, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, 75, 905;

⁴¹ Wu, P.-L.; Hsu, Y.-L.; Wu, T.-S.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 5207.

⁴² Taniguchi, M.; Kubo, I. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1539.

⁴³ Crouch, N.R.; Toit, K.; Mulholland, D.A.; Drewes, S.E. *Phytochemistry*, **2006**, 67, 2140.

Estruturalmente, bufadienólídeos são esteróides polidroxilados com 24 carbonos caracterizado por uma lactona di-insaturada (α -pirona localizada em C-17) e ainda metilas angulares entre as junções dos anéis A/B e C/D. Ligada ao C-3 dos bufadienólídeos ocorre uma hidroxila e, quando esta se encontra esterificada com suberoil-arginina, metacrilato, succinil, palmitoil e outros ésteres, caracterizam-se as bufotoxinas. Destacam-se, na Figura 8, o β -sitosterol (**19**) e os bufadienólídeos marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), helebrigenina (**23**), bufotalina (**24**), resibufogenina (**25**), cinobufagina (**26**) e a bufotoxina marinobufotoxina (**27**).

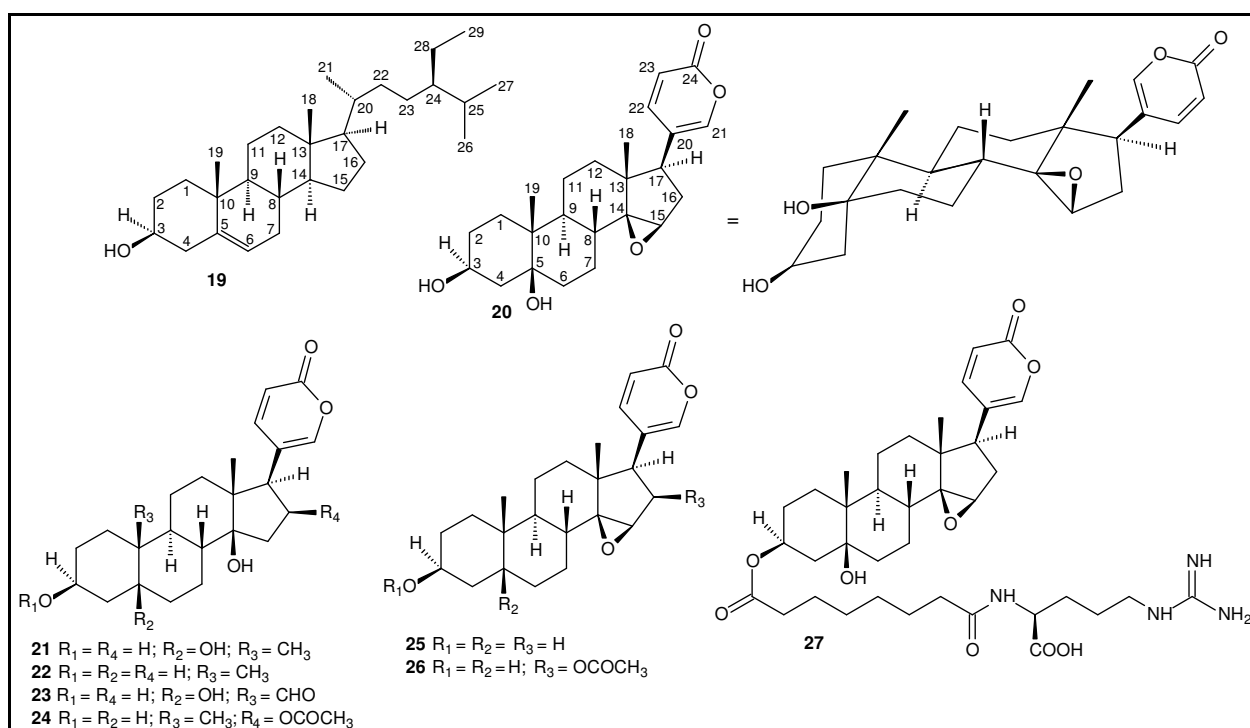


Figura 8. Exemplos de esteróides isolados de sapos bufonídeos. A numeração observada na marinobufagina (**20**) refere-se aos átomos de carbono na estrutura dos bufadienólídeos.

Nas junções do núcleo peridrofenantreno dessa classe de compostos, a estereoquímica obedece às orientações A/B *cis*, B/C *trans* e C/D *cis*, o que confere aos bufadienólídeos um *set* estruturalmente distinto de anéis em relação a outros sistemas esteroidais. Com esta estereoquímica, os bufadienólídeos mantêm sua principal característica em atividade biológica, a interação dos bufadienólídeos com a enzima Na^+/K^+ -ATPase, atividade semelhante aos esteróides cardiotônicos do tipo digitálicos,

exemplificados pela ouabaína (**28**) e digitoxina (**29**), isolados de *Digitalis purpurea* e *Strophantus gratus*, respectivamente (Figura 9).^{39a,b,44}

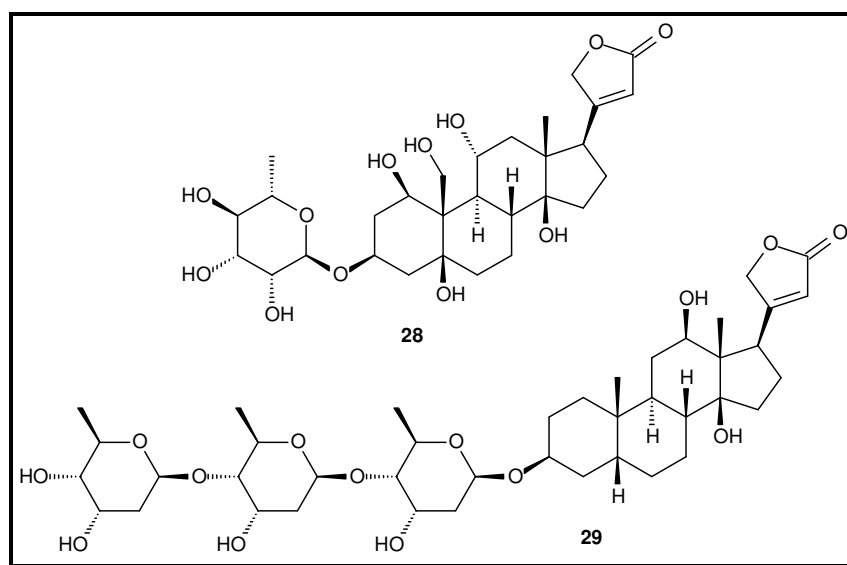


Figura 9. Esteróides cardiotônicos (**28**) e digitoxina (**29**), isolados de *Digitalis purpurea* e *Strophantus gratus*.

Isolamento de bufadienólídeos a partir da secreção glandular de anfíbios.

Como visto na acima, a diversidade estrutural dos bufadienólídeos em sapos bufonídeos parece ser extensa. Diversas técnicas cromatográficas são utilizadas para isolar os componentes do veneno em quantidade suficiente para caracterização química dos compostos presentes em uma determinada espécie.

Após partição ou tratamento com solventes orgânicos, bufadienólídeos e bufotoxinas têm sido isolados de fontes naturais por meio de métodos cromatográficos clássicos ou colunas cromatográficas rápidas (*dry flash*). Usualmente, a cromatografia em coluna é realizada em sílica-gel e Sephadex[®]-LH 20. Alguns trabalhos utilizaram óxido de alumínio ácido, básico ou neutro para o isolamento de inúmeros bufadienólídeos sintéticos e compostos relacionados. Do veneno de *Pseudepidalia viridis*, *B. melanostictus*, e do extrato de Ch'an Su, bufadienólídeos e suberoil ésteres foram isolados por cromatografia em coluna clássica⁴⁵ ou em coluna *dry-flash*,⁴⁶ ambas

⁴⁴ Zhao, y.; Jina, Y.; Wei, S. S.; Lee, Y. H. Zhang, Y. *Toxicon*, **2005**, *46*, 635.

⁴⁵ a) Verpoorte, R.; Phan, Q. K., Svendsen, A. B. *J. Nat. Prod.*, **1980**, *43*, 347; b) Shimada, K.; Ishii, N.; Nambara, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, *34*, 3454; c) Shimada, K., Sato, Y., Nambara, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, *35*, 2300.

usando sílica gel 60. Óxido de alumínio neutro foi usado para o isolamento de bufadienólídeos de frutos secos de *Bersama abyssinica*.⁴⁷

Técnicas cromatográficas instrumentais também têm sido empregadas com sucesso. Diversos bufadienólídeos foram isolados com alta pureza, ou apenas separados, por meio da técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um ou mais passos. CLAE de fase reversa foi utilizada para analisar o perfil cromatográfico de bufadienólídeos e bufotoxinas de espécies do gênero *Bufo*, do veneno e dos ovários de *Rhinella marinus*,⁴⁸ além do veneno de cinco diferentes espécies da Tailândia.³⁸ Por similar procedimento, marinobufagina (**20**) e telocinobufagina (**21**) foram isolados de *Rhinella rubescens*.^{18b}

Biossíntese, semi-sínteses e modificações químicas de bufadienólídeos

Fortes evidências indicam que os bufadienólídeos são biosintetizados em bufonídeos a partir do metabolismo do colesterol. Experimentos com [1,2-³H] colesterol e [21-¹⁴C] coprostanol, além de 3-hidroxicolanatos tritiados em *Rhinella arenarum* (formalmente *Bufo arenarum*), *R. schneideri* (formalmente *B. paracnemis*) e *R. marinus* (formalmente *B. marinus*) demonstraram que o colesterol é utilizado pelas glândulas de veneno do animal para a biossíntese de bufadienólídeos. Acredita-se que sua origem é provavelmente no fígado, de onde é transportado até as glândulas com o auxílio de lipoproteínas plasmáticas, e que nos mamíferos, os bufadienólídeos são sintetizados no córtex adrenal a partir do colesterol.⁴⁹

Estudos visando à síntese de diversos bufadienólídeos tiveram um lugar de destaque entre as décadas de 1960 e 1980, em grande parte, devido à necessidade de adquirir esteróides farmacologicamente importantes em quantidades consideráveis para a realização de testes biológicos. Em função da sua complexidade (anéis cumulados, estereocentros, etc) a síntese total de esteróides apresenta-se como um

⁴⁶ Kamano, Y.; Yamamoto, H.; Hatayama, K.; Tanaka, Y.; Shinohara, M.; Komatsu, M. *Tetrahedron Lett*, **1968**, 9, 5669.

⁴⁷ Kupchan, S. M.; Moniot, J. L.; Sigel, C. W.; Hemingway, R. J. *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 2611.

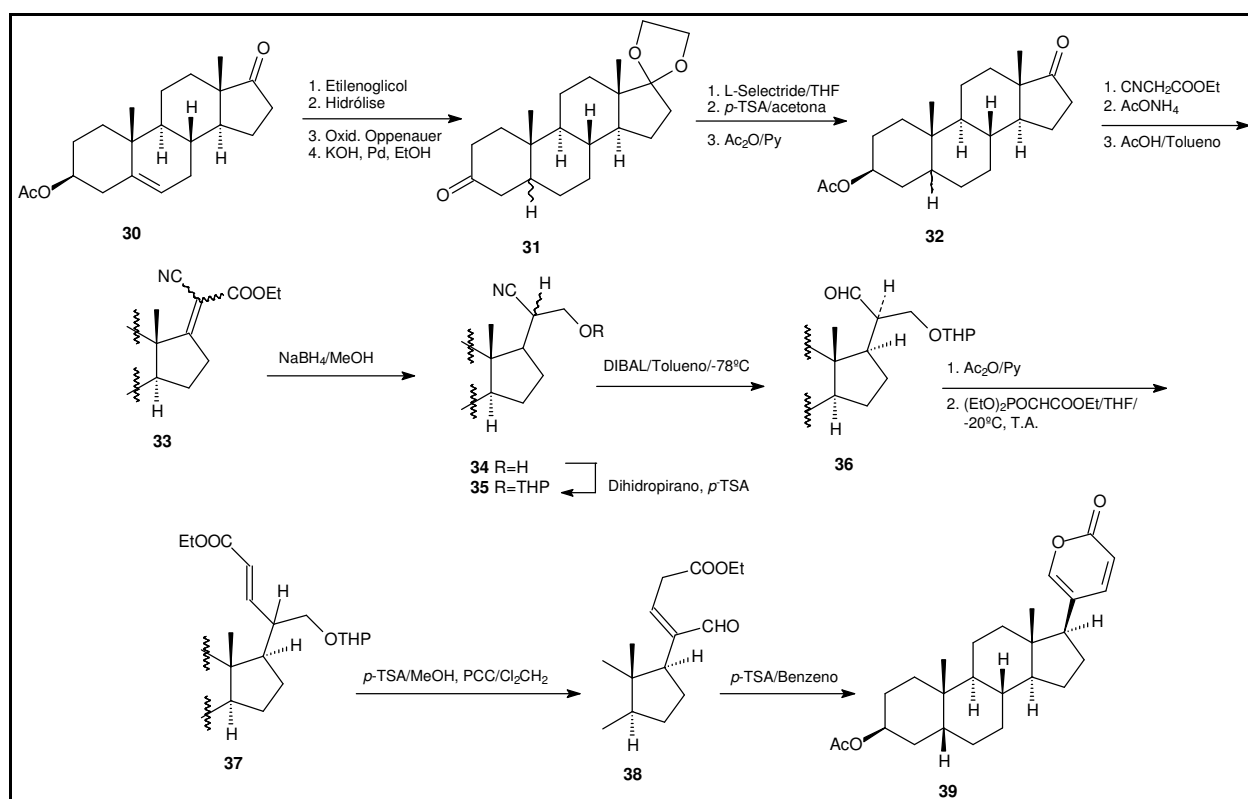
⁴⁸ a) Shimada, K.; Sato Y.; Nambara T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 2300; b) Matsukawa, M.; Mukai, T.; Akizawa, T.; Miyatake, S.; Yoshioka, M.; Morris, J. F.; Butler-Jr, V. P. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1476; c) Gao, H.; Zehl, M.; Leitner, A.; Wu, X.; Wang, Z.; Kopp, B. *J. Ethnopharm.*, **2010**, in press, doi:10.1016/j.jep.2010.07.017.

⁴⁹ a) Santa-Coloma. T. A.; Garraffo, H. M.; Pignataro, O. P.; Charreau, E. H.; Gros, E. G.; *Steroids*, **1984**, 44, 11; b) Osuch, V.; Chen, C. *Biochem. Pharmacol.*, **1969**, 44, 1803; c) Garraffo, H. M.; Gros, E. G. *Steroids*, **1986**, 48, 251; d) Dmitrieva, R.I.; Bagrov, A.Y.; Lalli, E.; Sassone-Corsi, P.; Stocco, D.M.; Doris, P.A. *Hypertension*, **2000**, 36, 442.

desafio para muitos grupos de pesquisa. Diversas rotas, notadamente as de interesse comercial, utilizam esteróides naturais abundantes como matéria-prima e, por meio de sínteses parciais, produzem os bufadienólídeos desejados ou chegam a intermediários que possibilitem outras rotas sintéticas mais eficientes. Algumas sínteses foram estudadas a partir de cardenólídeos, colano e, propriamente, de bufadienólídeos já conhecidos. Dentre as propostas sintéticas mostradas a seguir, algumas modificações estruturais adotadas foram utilizadas no planejamento dos derivados de bufadienólídeos envolvidos neste estudo.

A partir da 3β -acetóxi-5-androsten-17-ona (**30**, Esquema 1), foi possível sintetizar bufadienólídeos e cardenólídeos via um intermediário comum (**36**). O composto **30** foi transformado em uma dicetona monoprotetida (**31**) pela reação com etilenoglicol, seguido de hidrólise do grupo acetato, oxidação de Oppenauer e hidrogenação catalítica com paládio na presença de hidróxido de potássio. A carbonila no composto **31** foi, então, reduzida a uma hidroxila com L-selectride e o seu grupo cetal foi hidrolisado com ácido *p*-toluenossulfônico, formando uma hidroxicetona que, após acetilação, transformou-se no composto **32**. A condensação de **32** com cianoacetato de etila na presença de acetato de amônio, seguida de tratamento com ácido acético em tolueno, rendeu a mistura de isômeros **33**, que reduzido com boridreto de sódio em metanol, formou o álcool **34**. Neste último, a proteção do grupo hidroxila foi feita com éter tetraidropiranil (THP), formando **35**, o qual foi reduzido com DIBALH em tolueno, para gerar o intermediário **36**. A acetilação de **36**, seguida do tratamento com um lídeo preparado a partir de fosfonoacetato de trietila e hidreto de sódio gerou o composto **37**. Após remoção do grupo protetor THP de **37**, o álcool formado foi oxidado com clorocromato de piridínio (PCC) para dar o aldeído **38**. Finalmente, por aquecimento do composto **38** com benzeno na presença de ácido *p*-toluenossulfônico foi gerado o bufadienólídeo **39** (Esquema 1).⁵⁰

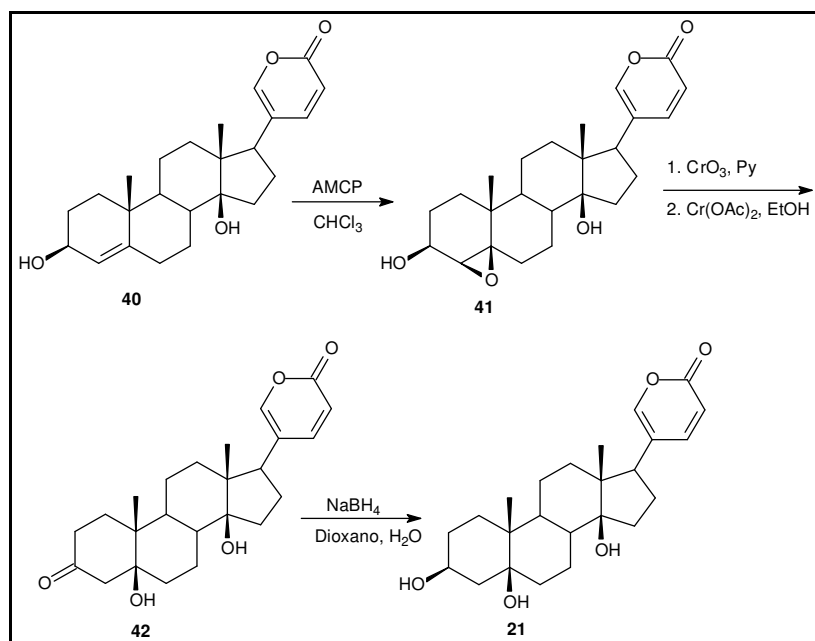
⁵⁰ Kabat, M. M.; Kurek, A.; Wicha, J. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 4248.



Esquema 1. Rota sintética para a produção de um bufadienólídeo a partir do esteróide 3β-acetóxi-5-androsten-17-ona (**30**).

Para a preparação da telocinobufagina (**21**), Pettit e Kamano utilizaram a cilarenina (**40**) como material de partida, a qual pela rota sintética empregada inicialmente foi convertida ao 4,5-epóxi-bufadienólídeo (**41**) por tratamento com ácido *m*-cloroperbenzóico. Este último teve o grupo 3-hidróxi oxidado com trióxido de cromo e o 4,5-epóxido reduzido com acetato de cromo (II) resultando na formação da telocinobufagona (**42**). Pelo tratamento de **42** com boridreto de sódio em dioxano foram produzidos a telocinobufagina (**21**) e seu enantiômero (Esquema 2).⁵¹

⁵¹ a) Pettit, G. R.; Kamano, Y. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2632; b) Pettit, G. R.; Kamano, Y. *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 3003.

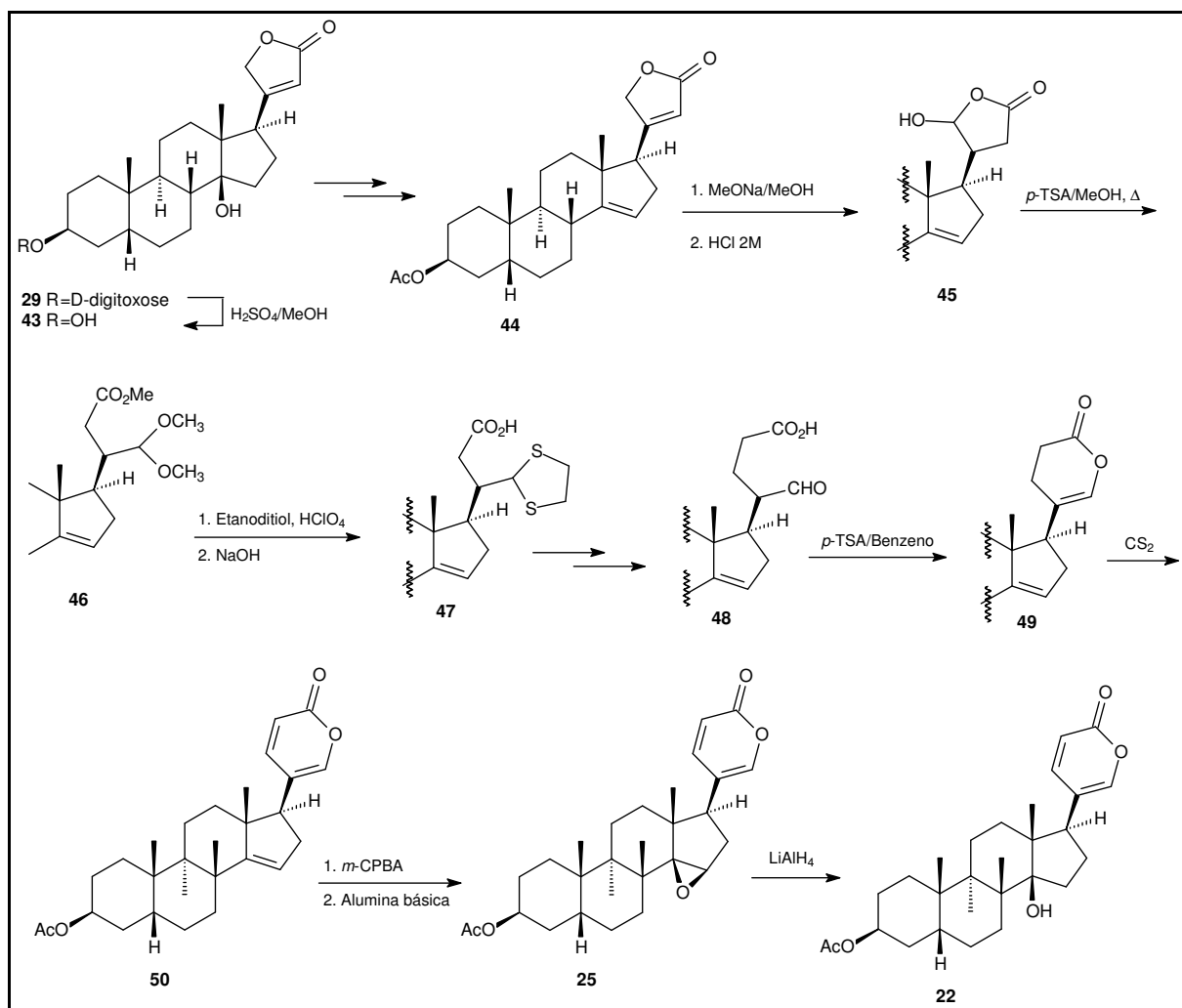


Esquema 2. Síntese parcial da telocinobufagina (**21**), descrita por Pettit e Kamano.⁵¹

A partir do cardenolídeo digoxina (**29**), os bufadienolídeos ciralenina (**40**), bufalina (**22**) e resibufogenina (**25**) foram produzidos. A seqüência sintética envolveu a hidrólise da digtoxina (**29**) com ácido sulfúrico 1*N* em metanol, produzindo a digitoxigenina (**43**), que em seguida foi acetilada e desidratada para gerar 14-desidrodigitoxigenina 3-acetato (**44**).⁵² Subsequentemente, o tratamento de **44** com metóxido de sódio em metanol, seguido de acidificação, formou o lactol **45**. A metanólise deste, com ácido *p*-toluenossulfônico em metanol, produziu o acetal metiléster **46**, que protegido com um etilenotioacetal, seguido de uma saponificação e acidificação, forneceu o ácido carboxílico **47**. Este último, após uma seqüência de etapas intermediárias, incluindo tratamento com diazometano, rendeu o aldeído **48** cuja ciclização enólica, usando ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador, formou a enol lactona **49**. A desidrogenação de **49** com dissulfeto de carbono produziu o acetato de 14-desidrobufalina (**50**) que, por tratamento com ácido *m*-cloroperbenzóico seguido de uma saponificação com alumina básica, gerou a resibufogenina (**25**). Uma redução seletiva e cuidadosa da resibufogenina (**25**) com hidreto de lítio e alumínio foi empregada para a sua conversão em bufalina (**22**, Esquema 3).⁵³

⁵² Pettit, G. R.; Kasturi, T. R.; Knight, J. C.; Oocolowitz, J. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 1404.

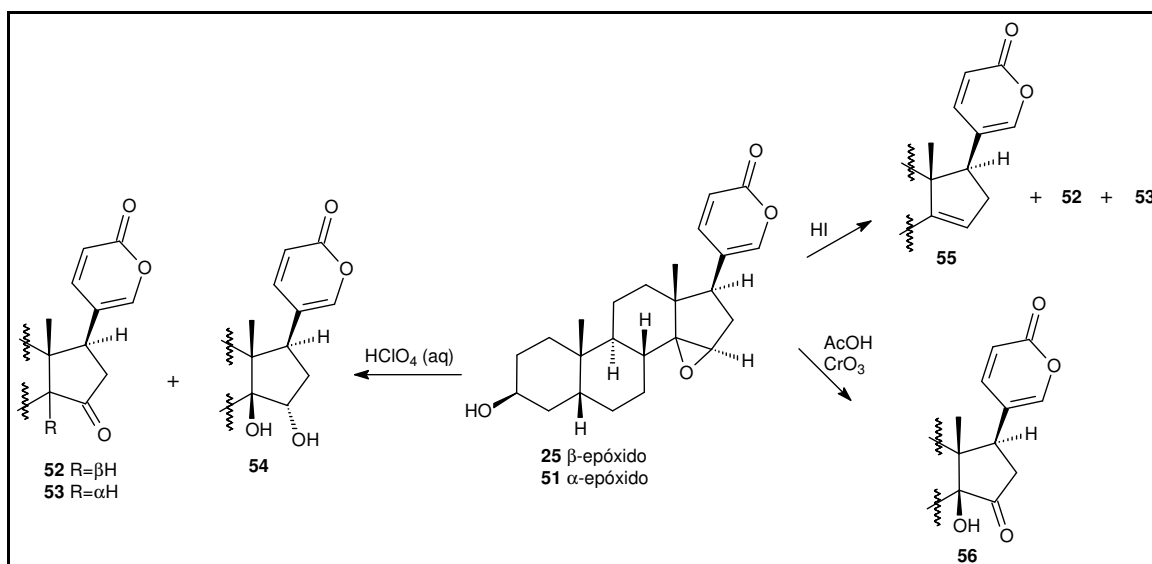
⁵³ Pettit, G. R.; Houghton, L. E.; Knight, J. C.; Bruschweiler, F. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 2895.



Esquema 3. Exemplo da conversão da digitoxina (**29**) na resibufogenina (**25**) e bufalina (**22**).

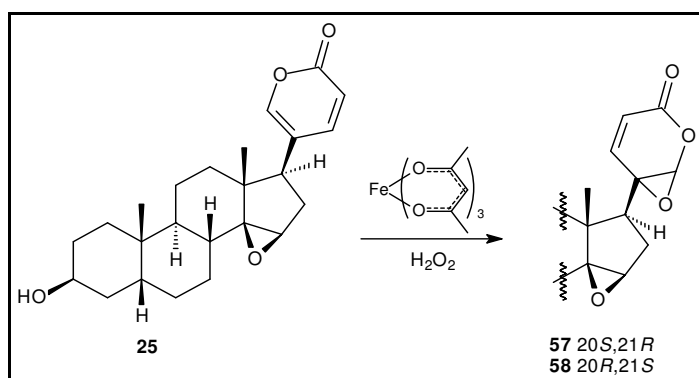
Além das sínteses de bufadienólídeos, transformações químicas interessantes foram realizadas por meio da catálise ácida de bufadienólídeos com ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido perclórico ou ácido acético.⁵⁴ A catálise ácida dos compostos resibufogenina (**25**) ou de seu isômero (**51**) com ácido perclórico em acetona promoveu a abertura dos seus epóxidos para a formação de 14 α -artebufogenina (**52**), em maior rendimento, além de 14 β -artebufogenina (**53**) e o diálcool 15 α -hidroxibufalina (**54**). Por tratamento com ácido iodídrico em clorofórmio e acetona, os compostos **25** e **51** foram transformados no composto Δ^{14} -desidrobufalina (**55**), juntamente com os análogos **53** e **54**. Adicionalmente, o tratamento do composto **51** com ácido acético na presença de trióxido de cromo produziu a 14 β -hidróxi-cetona **56**, como mostrado no Esquema 4.

⁵⁴ a) Kamano, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 1711; b) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Bruschweiler, F.; Brown, P. *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 3736; c) Kamano, Y.; Kumon, S.; Arai, T.; Komatsu, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, *21*, 1960; d) Kamano, Y.; Pettit, G. R. *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 1973; e) Kamano, Y.; Pettit, G. R. *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, *21*, 895.



Esquema 4. Derivados produzidos a partir da resibufogenina (**25**) e do seu isômero (**51**) via catálise ácida.

Uma série de interessantes derivados da resibufogenina foi produzida com a epoxidação da lactona, o principal farmacóforo que confere as atividades biológicas a essa classe de compostos (Esquema 5). A oxidação da resibufogenina (**25**) foi realizada por meio do seu tratamento com tris(acetilacetato) de ferro III [Fe(acac)₃] e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), rendendo uma mistura dos diastereoisômeros 20*S*,21*R*-epoxiresifufogenina (**57**) e 20*R*,21*S*-epoxiresifufogenina (**58**), ambos já tendo sido isolados do Ch'an Su e com atividade antitumoral contra a linhagem de células MH-60 maior do que o seu bufadienólídeo precursor **25**.⁵⁵



Esquema 5. Formação de 20,21-epoxibufadienólídeos citotóxicos para células tumorais.

⁵⁵ a) Nogawa, T.; Kamano, Y.; Yamashita, A.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1148; b) Kamano, Y.; Nogawa, T.; Yamashita, A.; Hayashi, M.; Inoue, M.; Drasar, P.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1001.

Na busca de novas moléculas com propriedades farmacológicas interessantes, a década de 2000 destacou-se por utilizar a transformação enzimática microbológica (biotransformação) para a síntese de novos bufadienólídeos com atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais. Inúmeras transformações de bufadienólídeos foram realizadas por culturas de células vegetais, de fungos e bactérias na formação de derivados quimicamente inviáveis de produzir pelas rotas sintéticas usuais.

Quando incubado com uma cultura do fungo filamentosso *Mucor polymorphosporus*, resibufogenina (**25**) foi metabolizada em vinte e dois compostos, dentre os quais quinze são novos. Os produtos consistiram de derivados mono- e dihidroxilados em diversas posições (C-1 β , C-5, C-7 α , C-7 β , C-12 α , C-12 β e C-16 α), muitos destes inéditos dentre os bufadienólídeos conhecidos.⁵⁶ Produtos originados de epimerização, produzindo uma α -hidroxila, e desidrogenação, acarretando em uma oxidação à carbonila em C-3, que contém usualmente uma β -hidroxila, também foram observados. Produtos de epimerização em C-3 além de mono e dihidroxilação nas posições C-4, C-11 e C-12 foram observados quando resibufagenina (**25**) e bufalina (**22**) foram incubados com os fungos *Fusarium solani* e *Syncephalastrum racemosum*.⁵⁷

A biotransformação da cinobufagina (**26**) e bufalina (**22**) foi realizada por incubação com culturas de células vegetais de *Platycodon grandiflorus* e *Catharanthus roseus*. Como resultado, os produtos adquiridos da cinobufagina consistiram de compostos glicosilados nas posições C-3 ou C-16, epimerizados ou desidrogenados na posição C-3. A partir da bufalina, além da formação de um 3 α -epímero da telocinobufagina (**21**), o 3-*epi*-3-*O*- β -D-glicosídeo da bufalina foi produzido.⁵⁸

A produção de novos bufadienólídeos, seja por sínteses parciais, modificações químicas ou biotransformações, fornece suporte para estudos sobre a relação estrutura-atividade desta classe de compostos. Visto que as propriedades farmacológicas de bufadienólídeos são diversificadas e que algumas delas demonstram um perfil tóxico para esses compostos, a produção de derivados apresenta-se como uma ferramenta importante para a busca de compostos com características estruturais que favorecem a manutenção de um perfil biológico desejável como, por exemplo, as propriedades antitumorais, sem toxicidade para

⁵⁶ Ye, M., Han, J., An, D., Tu, G., Guo, D. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8947.

⁵⁷ a) Ma, X.-C.; Xin, X.-L.; Liu, K.-X.; Han, J.; Guo, D.-A. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1268; b) Ma, X.-C.; Zheng, J.; Guo, D.-A. *Enz. Mic. Tech.*, **2007**, *40*, 1585.

⁵⁸ a) Zhao, J.; Guan, S. H.; Chen, X. B.; Wang, W.; Ye, M.; Guo, D. A. *Chin. Chem. Lett.*, **2007**, *18*, 1316; b) Ye, M.; Dai, J.; Guo, H.; Cui, Y.; Guo, D. A. *Tet. Lett.*, **2002**, *43*, 8535.

células eucariotas. Além disso, atividades inéditas podem ser avaliadas, visando à descoberta de novas aplicações biofarmacológicas de bufadienolídeos ou análogos.

A importância fisiológica dos bufadienolídeos e suas atividades biológicas

Os esteróides cardiotônicos compõem uma classe de compostos que se caracterizam por interagir com a principal proteína transportadora das células eucariotas, a bomba de sódio (Na^+/K^+ -ATPase). Estas bombas são proteínas enzimáticas de membrana plasmática pertencentes à família das ATPases do tipo P e conservadas em vertebrados, invertebrados e protozoários.⁵⁹ A bomba funciona como um transportador eletrogênico de íons Na^+ e K^+ entre os meios extracelular e intracelular, mantendo o potencial de membrana das células, fundamental para o funcionamento celular. Algumas funções da enzima são: transportes de nutrientes e aminoácidos acoplados ao Na^+ , balanço osmótico, regulação do volume celular, manutenção e restauração do potencial de repouso de membrana em células excitáveis. Em insuficiência cardíaca, glicosídeos cardiotônicos são indicados⁶⁰ e o mecanismo terapêutico desses esteróides é que a interação dos esteróides cardiotônicos com Na^+/K^+ -ATPase provoca o aumento na concentração de íons sódio ($[\text{Na}^+]$) intracelular. Este aumento na $[\text{Na}^+]$ causa um aumento intracelular secundário de íons cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]$), *via* troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, no retículo sarcoplasmático. O acréscimo resultante da absorção de $[\text{Ca}^{2+}]$ pelo retículo sarcoplasmático causa o aumento da força de contração do miocárdio, aliviando os sintomas das cardiopatias.

Acredita-se que esteróides do tipo digitálicos podem desempenhar papel hormonal como moduladores do sistema nervoso e cardiovascular ou estão envolvidos com quadros fisiopatológicos da hipertensão. Foram detectados níveis elevados de marinobufagina (**20**) em estados de hipertensão, doenças cardíacas e em pacientes com falha renal.^{61a,b,c} A resibufogenina (**25**), por outro lado, é conhecida por diminuir hipertensão em modelos animais durante quadros de pré-eclâmpsia.^{62a} Kashkin e

⁵⁹ a) Supratman, U.; Fujita, T.; Akiyama, K.; Hayashi, H. *Phytochem.*, **2001**, *58*, 311; b) Almeida-Amaral, E. E.; Caruso-Neves, C.; Lara, L. S.; Pinheiro, C. M.; Meyer-Fernandes, J. R. *Exp. Parasit.*, **2006**, *116*, 419; c) Bagrov, A. Y.; Shapiro, J. I.; Fedovora, O. V. *Pharm. Rev.*, **2009**, *61*, 9.

⁶⁰ Wasserstrom, J. A.; Aisprut, G. L. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2005**, *289*, H1781.

⁶¹ a) Fedorova, O. V.; Kolodkin, N. I.; Agalakova, N. I.; Lakatta, E. G.; Bagrov, A. Y. *Hypertension*. **2001**, *37*, 462; b) Fedorova, O. V.; Talan, M.; Agalakova, N. I.; Lakatta, E. G.; Bagrov. *Circulation*, **2002**, *105*, 1122; c) Kennedy, D. J., Vetteth, S., Periyasamy, S. M.; Kanj, M.; Fedorova, L.; Khouri, S.; Kahaleh, M. B.; Xie, Z.; Malhotra, D.; Kolodkin, N. I.; Lakatta, E. G.; Fedorova, O. V.; Bagrov, A.Y.; Shapiro, J. I. *Hypertension*, **2006**, *47*, 488.

colaboradores demonstraram que a marinobufagina (**20**) também pode estar relacionada com a dependência ao etanol, pois o bufadienolídeo atenuou a busca pelo álcool via interação com a Na⁺/K⁺-ATPase no córtex cerebral de modelos animais.^{62b}

Devido à modulação da Na⁺/K⁺-ATPase, os bufadienolídeos e bufotoxinas provavelmente possuem uma importância fisiológica fundamental para homeostase da pele e de alguns órgãos de bufonídeos, em condições normais e em quadros de estresse osmótico. Lichtstein e colaboradores⁶³ demonstraram que em *Pseudepidalia viridis*, compostos do tipo digitálicos estão presentes na maioria dos tecidos dos animais analisados, tendo as maiores concentrações (ordem de 1.10³ nmol.g⁻¹ de tecido) na pele dorsal e ventral, e com concentrações relativamente altas (ordem de 1.10 nmol.g⁻¹ de tecido) no plasma, cérebro e em vários outros órgãos e tecidos. De acordo com os pesquisadores, os níveis das substâncias variam em prazos curtos (dias) e longos (meses ou estações do ano), em condições hipertônicas. Um choque osmótico, em curto prazo, aumentou em três vezes a concentração de compostos digitálicos no cérebro dos animais testados. Em longo prazo, ocorreu um aumento de 180% desses compostos na pele (em cinco semanas) e um aumento nas concentrações dos compostos no cérebro durante o verão local. Assim, pode-se observar que a grande concentração de compostos digitálicos nos anfíbios estudados não provoca toxicidade para os animais, demonstrando que, além das funções fisiológicas, estes compostos contribuem para a sua defesa contra predadores.

Diante dos papéis funcionais atribuídos aos compostos digitálicos em anfíbios, a diversidade estrutural dos bufadienolídeos nas secreções glandulares de sapos também pode ser fundamental para a sobrevivência desses animais. Comumente, análises qualitativas e quantitativas de perfis cromatográficos são realizadas com secreções glandulares de diversas espécies de sapos e do Ch'an Su. Associado a isso, a caracterização estrutural de bufadienolídeos, com o auxílio da ressonância magnética nuclear (RMN) e técnicas complementares, têm promovido a descoberta de novos compostos. Assim, a certeza de que a composição do veneno sofre pequenas variações entre indivíduos da mesma espécie torna-se cada vez mais evidente.

Técnicas refinadas usando cromatografia líquida de ultraperformance (UPLC) e a aquisição de perfis de fragmentação por espectrometria de massa já foram utilizadas

⁶² a) Vu, H., Ianosi-Irimie, M.; Danchuk, S.; Rabon, E.; Nogawa, T.; Kamano, O.; Pettit, G. R.; Wiese, T.; Puschett, J. B. *Exp Biol Med*, **2006** *231*, 215; b) Kashkin, V. A.; Bagrov, A. Y.; Fedovora, O. V.; Bagrov, Y. Y.; Agalakova, N. I.; Patkina, N. A.; Zvartau, E. E. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2002**, *12*, 217.

⁶³ Lichtstein, D.; Gati, I.; Haver, E.; Katz, U. *Life Science.*, **1992**, *51*, 119.

para a identificação de bufadienolídeos. Nesse contexto, do extrato de *Bufo bufo gargarizans*, um total de trinta e nove bufadienolídeos foram identificados, onde dezenove deles são conhecidos e vinte compostos, dentre eles oito estereoisômeros, são possivelmente novos, apontando a grande diversidade desses compostos em um único animal.⁶⁴ Hayes e colaboradores acreditam que a diversidade de bufadienolídeos em *Rhinella marinus* seja promovida pela biotransformação *in situ* de bufadienolídeos e bufotoxinas por bactérias simbiontes presentes nas glândulas parotóides e ovários. Para testar essa hipótese, a marinobufagina (**20**, Figura 8, p. 15) foi tratada com uma cultura da bactéria *Comonas testosteroni* (isolada da glândula parotóide), resultando na produção de diversos derivados. Considerando que uma secreção tóxica contendo diferentes bufadienolídeos pode antagonizar diferentes isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase, a probabilidade de um predador ser mais susceptível a esta secreção é grande. Assim, inúmeras espécies de sapos possuindo uma microbiota diversificada podem apresentar maiores chances de sobrevivência e maior sucesso em um ambiente hostil.⁶⁵

Os bufadienolídeos estão entre os principais compostos estudados pela intensa atividade inibitória de células tumorais. Hashimoto e colaboradores viram que a bufalina (**22**, Figura 8, p. 16) é eficiente em inibir a Topoisomerase II (Topo II), enzima responsável pela estabilização do complexo de clivagem do DNA e alvo de inúmeras drogas antitumorais. A inibição da Topo II promove a fragmentação do DNA, um atributo importante para apoptose das células tumorais.⁶⁶

Outro uso potencial de bufadienolídeos no tratamento do câncer é o combate indireto da caquexia, uma patologia provocada pela excessiva produção da interleucina-6 (IL-6) e que atinge pacientes com câncer, produzindo uma redução da resposta aos tratamentos quimioterápicos, baixa no peso corporal, podendo levar à morte. Um derivado 3-*O*-formilado da 20*R*,21*S*-resibufogenina (**58**, Esquema 5, p. 22) atua de maneira específica como um antagonista da IL-6, além de outras doenças causadas pela excessiva produção de IL-6, tais como doenças neurodegenerativas e artrite reumatóide,⁶⁷ apresentando potenciais clínicos.⁶⁸

⁶⁴ Liu, Y.; Xiao, Y.; Xue, X.; Zang, X.; Liang, X. *Rapid. Commun. Mass. Spectr.*, **2010**, *24*, 667.

⁶⁵ Hayes, R. A.; Piggot, A. M.; Dalle, K.; Capon, R. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 1790.

⁶⁶ Hashimoto, S.; Jing, Y.; Kawazoe, N.; Masuda, Y.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y.; Nakaya, K. *Leuk. Res.* **1997**, *21*, 875.

⁶⁷ a) Hayashi, M.; Rho, M.-C.; Fukami, A.; Enomoto, A.; Nonaka, S.; Sekiguchi, Y.; Yanagisawa, T.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Kamano, Y.; Komiyama, K.; *J. Pharm. Exp. Therap.* **2002**, *303*, 104; b) Enomoto, A.; Rho, M.-C.; Fukami, A.; Hiraku, O.; Komiyama, K.; Hayashi, M. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **2004**, *323*, 1096.

Em estudo recente, Nasu e colaboradores propuseram a utilização de bufalina (22) como um agente terapêutico no tratamento da endometriose, uma doença que provoca a proliferação exacerbada do tecido endometrial. A bufalina é capaz de produzir apoptose nas células desse tecido de forma célula-específica, em um mecanismo diferente do que acontece com o processo apoptótico de diversas células tumorais. Dessa forma, o bufadienolídeo pode representar um candidato específico no tratamento de endometriose. A bufalina ainda exerce um efeito inibitório de células endoteliais da aorta em bovinos o que pode evitar a formação de redes de irrigação sanguínea que nutrem inúmeros tumores sólidos.⁶⁹

Relação estrutura-atividade dos bufadienolídeos

Para entender como a atividade biológica de bufadienolídeos é afetada pela conformação das moléculas ou pelos grupos substituintes, diversos estudos da relação entre estrutura e atividade (*Structure-Activity Relationship*, SAR) foram propostos. Tendo como atributo principal o baixo índice terapêutico dos bufadienolídeos, inúmeras modificações químicas foram realizadas na produção de derivados com o intuito de diminuir o efeito tóxico.

Por meio de estudos QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) Kamano e colaboradores analisaram as características estruturais tridimensionais comuns aos bufadienolídeos e cardenolídeos com respeito à atividade contra células tumorais. Por esta técnica, informações importantes a cerca dos substituintes funcionais que possam melhorar o perfil farmacológico dos bufadienolídeos são obtidas. Neste contexto, a presença de compostos mais potentes ou menos tóxicos para eucariotos podem auxiliar no desenho novas drogas. A Figura 10 exemplifica as principais regiões que apresentam modificações, com respeito a grupos funcionais e a configuração de bufadienolídeos, e quais seus efeitos quanto à inibição de diferentes células tumorais, como células de carcinoma primário de fígado humano resistentes a colchicinas

⁶⁸ Kino, T.; Boos, T. L.; Sulima, A.; Siegel, E. M.; Gold, P. W.; Rice, K. C.; Chrousos, G. P. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2007**, *120*, 437.

⁶⁹ a) Lee, D. Y.; Yasuda, M.; Yamamoto, T.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. *Life Sciences*, **1997**, *60*, 127; b) Nasu, K.; Nishida, M.; Ueda, T.; Takai, N.; Bing, S.; Narahara, H.; Miyakawa, I. *Mol. Human Rep.*, **2005**, *11*, 817.

(PLC/PRF/5),^{70a} células de câncer gástrico humano e carcinoma cervical humano.^{70b} As principais características que melhoram o perfil farmacológico são a presença da lactona (α -pirona), hidroxilação nas posições C-14 β , C-11 α e C-12 α , presença de um aldeído na posição C-19 e conformações entre os anéis A/B *cis*, B/C *trans* e C/D *cis*.

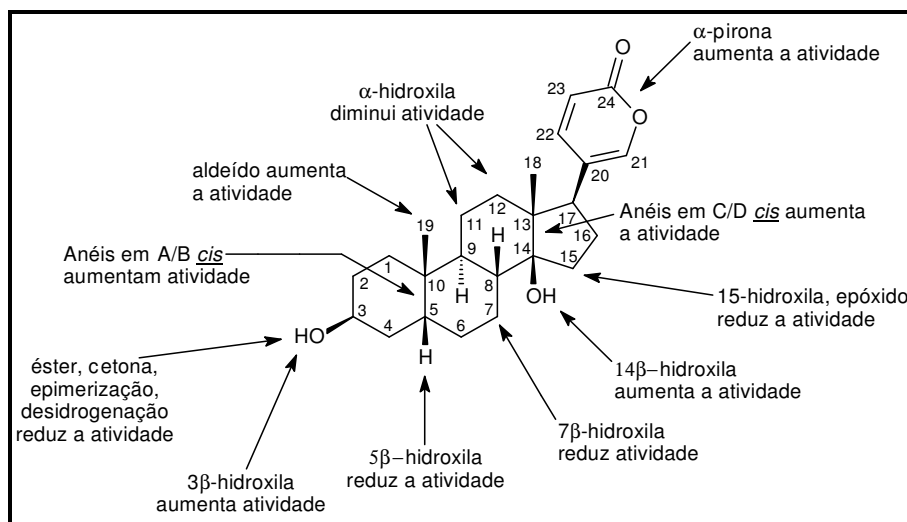


Figura 10. Efeitos dos substituintes nos bufadienólídeos relacionados à inibição do crescimento de diferentes células tumorais. A estrutura da bufalina (**22**) foi tomada como base.

Terness e colaboradores^{71a} analisaram a atividade tóxica de derivados de bufadienólídeos em células T (imunossupressão), para verificar o potencial desses derivados com eventuais fármacos sem efeitos colaterais indesejados. Dentre eles, foram avaliados os compostos **60** e **61** (Figura 11), além da marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), resibufogenina (**25**) e derivados. Verificando os requerimentos estruturais que indicam a atividade imunorregulatória, a falta da lactona reduz drasticamente os efeitos imunotóxicos dos bufadienólídeos (compostos **60** e **61**). Um grupo oxirano entre as posições 14 e 17 (marinobufagina e resibufogenina) faz decrescer moderadamente a atividade imunossupressória em relação aos compostos que contém 14-OH (ex. telocinobufagina). Derivados 3-*O*-acetatos e diacetatos decrescem a atividade moderadamente em relação a seus precursores e 3-*O*-hemisuberatos, 3-*O*-formiatos, 3 α -azido e 3 α -amino apresentam efeitos citotóxicos muito inferiores em relação aos compostos naturais. Daniel e colaboradores^{71b}

⁷⁰ a) Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5440; b) Ye, M., Qu, G.; Guo, H.; Guo, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, *91*, 87.

⁷¹ a) Terness, P.; Navolan, D.; Duffer, C.; Kopp, B.; Opelz, G. *Int. Immunopharm.* **2001**, *1*, 119; b) Daniel D.; Süsal, C.; Kopp, B.; Opelz, G.; Terness, P. *Int. Immunopharm.* **2003**, *3*, 1791.

testaram a atividade inibitória dos compostos **60** e **61** contra tumores de linfoblastos e viram que esses compostos apresentaram considerável atividade apoptótica com a diminuição da atividade cardiotoxicidade desejada.

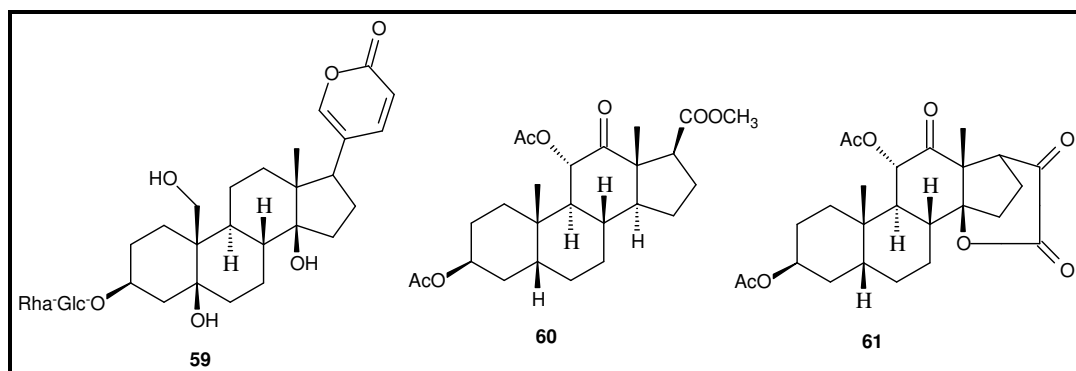


Figura 11. Compostos antitumorais não tóxicos derivados do bufadienólídeo helebrina (**58**).

Adicionalmente, Kamano e colaboradores^{72d} testaram a atividade antiviral de 34 bufadienólídeos naturais e derivados, correlacionando essa atividade ao índice terapêutico dos compostos. Paula e colaboradores realizaram um estudo sobre a interação entre glicosídeos cardíacos e a Na^+/K^+ -ATPase, por meio de um modelo de relação tridimensional. Manunta e colaboradores^{72e} levantaram evidências de que a atividade hipertensiógênica da ouabaína (**28**, Figura 9, página 16) e alguns derivados glicosilados dependem da configuração do núcleo esteroidal das moléculas e pode ter um mecanismo de ação independente da Na^+/K^+ -ATPase.

Além da citotoxicidade para células tumorais e imunológicas, bufadienólídeos e derivados já foram analisados quanto a estudos de relações estrutura-atividade para as atividades cardiotônica, anestésica, inseticida e inibitória da enzima Na^+/K^+ -ATPase.^{72a,b,c} Neste campo, novos horizontes podem ser alcançados quanto ao emprego de bufadienólídeos como fármacos, ou melhor, quanto à utilização destes para o desenho de análogos que possuam requerimentos estruturais que os capacitem como fármacos. Notadamente, um entendimento mais aprofundado do mecanismo de ação de compostos esteroidais possuindo um grupo lactônico está sendo adquirido.

⁷² a) Imai, S., Murase, H., Katori, M., Okada, M., Shigei, T. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1965**, 15, 62; b) Shimada, K., Ohishi, K., Fukunaga, H., Ro, J. S., Nambara, T. *J. Pharmacobiodyn.*, **1985**, 8, 1054; c) Shimada, K., Ishii, N., Ohishi, K., Ro, J.S., Nambara, T. *J. Pharmacobiodyn.* **1986**, 9, 755; d) Kamano, Y., Satoh, N., Nakayoshi, H., Pettit G.R., Smith, C.R. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, 36, 326; e) Manunta, P.; Hamilton, B. P.; Hamlyn, J. M. *Hypert.* **2001**, 37, 472.

2. OBJETIVOS

Como visto na parte introdutória, a secreção de pele dos anfíbios é uma extraordinária fonte de compostos farmacologicamente ativos, tais como peptídeos, alcalóides, aminas biogênicas, proteínas e esteróides. Tais moléculas são cruciais para a sobrevivência desses animais porque desempenham funções fisiológicas e são utilizadas como armas para de defesa contra predadores, microrganismos patogênicos e para sua própria fisiologia. Os compostos ativos mais freqüentes do veneno de sapos bufonídeos são aminas biogênicas, bufotoxinas e bufadienólídeos. Vários estudos indicam que os bufadienólídeos apresentam a capacidade de interagir com a bomba de sódio (Na^+/K^+ -ATPase) além de exibirem intensa atividade inibitória de crescimento de inúmeras linhagens de células tumorais por apoptose. Porém, devido à toxicidade dos bufadienólídeos, a sua utilização terapêutica é limitada. Assim, modificações químicas em bufadienólídeos naturais para a produção de derivados torna-se interessante para identificar os requerimentos estruturais que mantêm o perfil citotóxico dos compostos em células tumorais, apresentando baixa toxicidade para células normais. Anfíbios do gênero *Rhinella* são abundantes em vários biomas do Brasil, porém pouco explorado do ponto de vista da composição esteroideal da sua secreção cutânea, o que torna a espécie *Rhinella schneideri* um excelente modelo para o estudo de bufadienólídeos. Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo:

- I. Isolamento e caracterização química de bufadienólídeos do veneno de *Rhinella schneideri* (Anura: Bufonidae).
 - II. Realização das seguintes modificações químicas nos bufadienólídeos isolados:
 - proteção dos grupos hidroxilas secundários e terciários para produção de derivados acetilados;
 - formação de epóxido no anel α -pirona;
 - formilação e a oxidação da 3β -OH e
 - abertura de epóxido.
- Ensaios biológicos para avaliar a inibição de crescimento de células tumorais e inibição de diferentes isoformas da enzima Na^+/K^+ -ATPase dos compostos naturais e alguns derivados para futuras análises de relações estrutura-atividade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

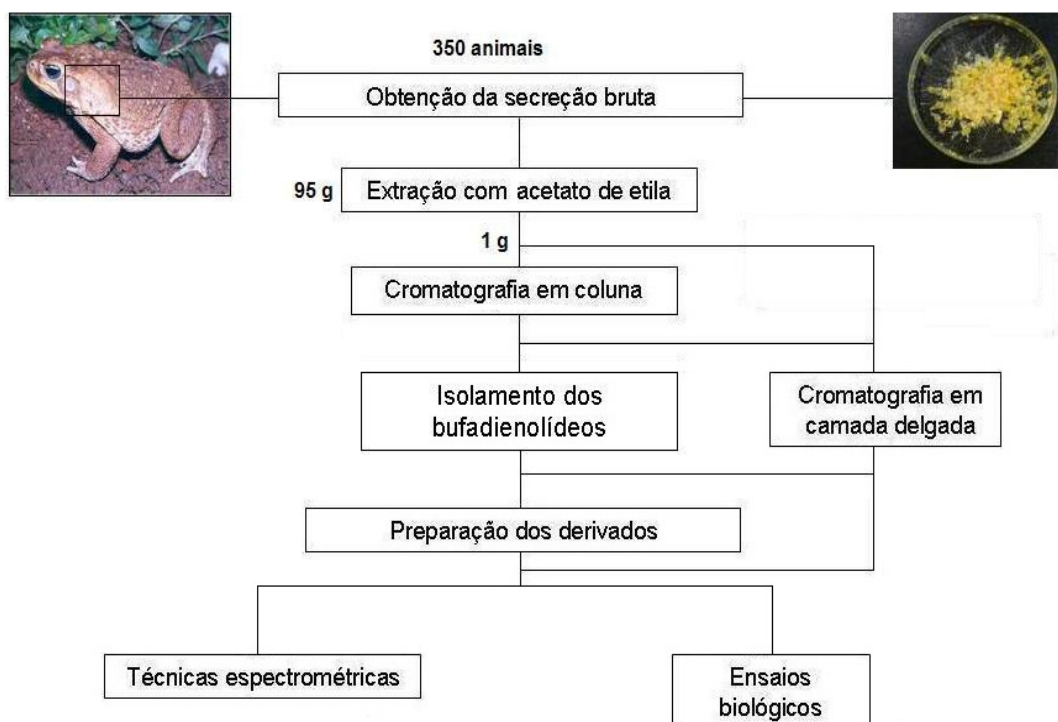
Para efeito didático, os resultados e discussão do presente estudo serão apresentados em duas seções especiais, denominadas:

- 3.1. Isolamento, caracterização e modificações químicas de bufadienólídeos isolados do veneno de *Rhinella schneideri*
- 3.2. Estudo das atividades biológicas de bufadienólídeos naturais do veneno de *Rhinella schneideri* e seus derivados

3.1. Isolamento, caracterização e modificações químicas de bufadienolídeos isolados do veneno de *Rhinella schneideri*

Isolamento dos constituintes do veneno

Com o objetivo de obter bufadienolídeos em quantidade suficiente para a produção de derivados esteroidais e avaliação das atividades biológicas, adquiriu-se, por compressão da glândula parotóide, o veneno de 350 espécimes do sapo *Rhinella schneideri*, sob a autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA-097/06, processo 02010.000832/04-74) Os animais capturados foram soltos no local de captura, de forma a evitar futuros impactos ambientais na anfíbiofauna da região. Após a desidratação e pulverização do veneno fresco, 95 g do veneno foram obtidos. A extração do veneno com acetato de etila, à temperatura ambiente, seguida da evaporação do solvente a vácuo, em evaporador rotativo, um sólido amorfo e amarronzado (9g) foi adquirido. Porções de cerca de 1 g foram cromatografados em coluna *dry-flash* com óxido de alumínio neutro (alumina). Destas foram isolados os bufadienolídeos, os quais foram caracterizados por métodos físico-químicos e espectrométricos, modificados quimicamente e submetidos a ensaios biológicos (Fluxograma 1).



Fluxograma 1. Obtenção, fracionamento, caracterização, modificação química e avaliação da atividade biológica dos componentes do veneno de *R. schneideri*.

A obtenção de uma variedade de bufadienolídeos, a partir de diferentes espécies de bufonídeos e plantas, requer uma série de etapas que podem utilizar técnicas cromatográficas combinadas. Desta forma, a cromatografia em coluna clássica, principalmente utilizando sílica-gel 60, seguida de cromatografia em camada delgada preparativa ou cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna C-18 de fase reversa,⁷³ é comumente utilizada para a obtenção de bufadienolídeos do Ch'an su. Cunha-Filho e colaboradores^{18a} purificaram por CLAE de fase reversa a marinobufagina (**20**) e a telocinobufagina (**21**) do sapo endêmico do cerrado *Rhinella rubescens*. Na literatura, existem registros da utilização de colunas de óxido de alumínio neutro para purificar intermediários esteroidais durante a síntese de bufadienolídeos⁷⁴ e para isolar bufadienolídeos vegetais.⁴⁹

Neste trabalho, com o objetivo de acumular uma quantidade considerável de esteróides para dar seguimento aos objetivos do projeto, optou-se pelo ajuste dos métodos cromatográficos supracitados. As técnicas para obtenção do veneno e para o seu processamento inicial foram adaptadas de Cunha-Filho e colaboradores,^{18a} enquanto que o fracionamento do extrato foi realizado por cromatografia em coluna. O isolamento por técnica de cromatografia *dry-flash* com alumina neutra rendeu os compostos **19** a **23**, a maioria como cristais incolores. As frações impuras contendo compostos com fatores de retenção próximos foram combinadas e submetidas a uma segunda coluna cromatográfica clássica em sílica-gel. Desta forma, foram isolados os compostos **62**, **63** e **R.sch 7**, além de uma quantidade adicional do composto **20**. Os dados analíticos dos compostos isolados encontram-se na Tabela 1.

Como veremos em detalhes na próxima seção, os compostos isolados do veneno de *R. schneideri* foram identificados como marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), helebrigenina (**23**) e o conhecido fitosterol β -sitosterol (**19**). Os dados espectrais dos compostos **62** e **63** sugerem que o primeiro seja um raro bufenolídeo denominado 20S,21R-epoximarinobufagina e o segundo, reconhecido como 19-hidróxi-telocinobufagina. Quanto ao composto **R.sch 7**, a análise dos espectros ainda está em curso para a total caracterização do composto, mas evidências indicam de que este seja um análogo do composto **63**. As estruturas dos compostos isolados são mostradas na Figura 12.

⁷³ a) Nogawa, T.; Kamano, Y.; Yamashita, A.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1148; b) Kaneko, T.; Spande, T. S.; Minit, Y.; Nabhitabha, J.; Chan-Ard, T. *Toxicon*, **2004**, *44*, 805;

⁷⁴ Pettit, G. R.; Kasturi, T. R.; Knight, J. C.; Jaeggi, K. A. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 1410.

Tabela 1. Dados analíticos dos compostos naturais isolados do veneno de *R. schneideri*.

Compostos	Dados analíticos					
	Fases móveis (v/v) ^a	Massa (mg)	Rendimentos (%) ^b	R_f^c	Pontos de fusão (°C)	
					Experimental ^d	Literatura
19	4:1	28	2,3	0,64	142-144	142-143 ^e
20	3:2	705	58,7	0,21	215-217	223-225 ^{51b}
21	1:1	116	9,7	0,16	166-170	160-170 ^{51a}
22	7:3	72	6,0	0,37	231-234	221-242 ⁵³
23	1:1	22	1,8	0,13	154-160	150-175 ^e
62	3:2	23	1,9	0,27	181-187	-
63	2:3	12	1,0	0,10	-	-
R.sch 7	2:3	9	0,75	0,08	-	-

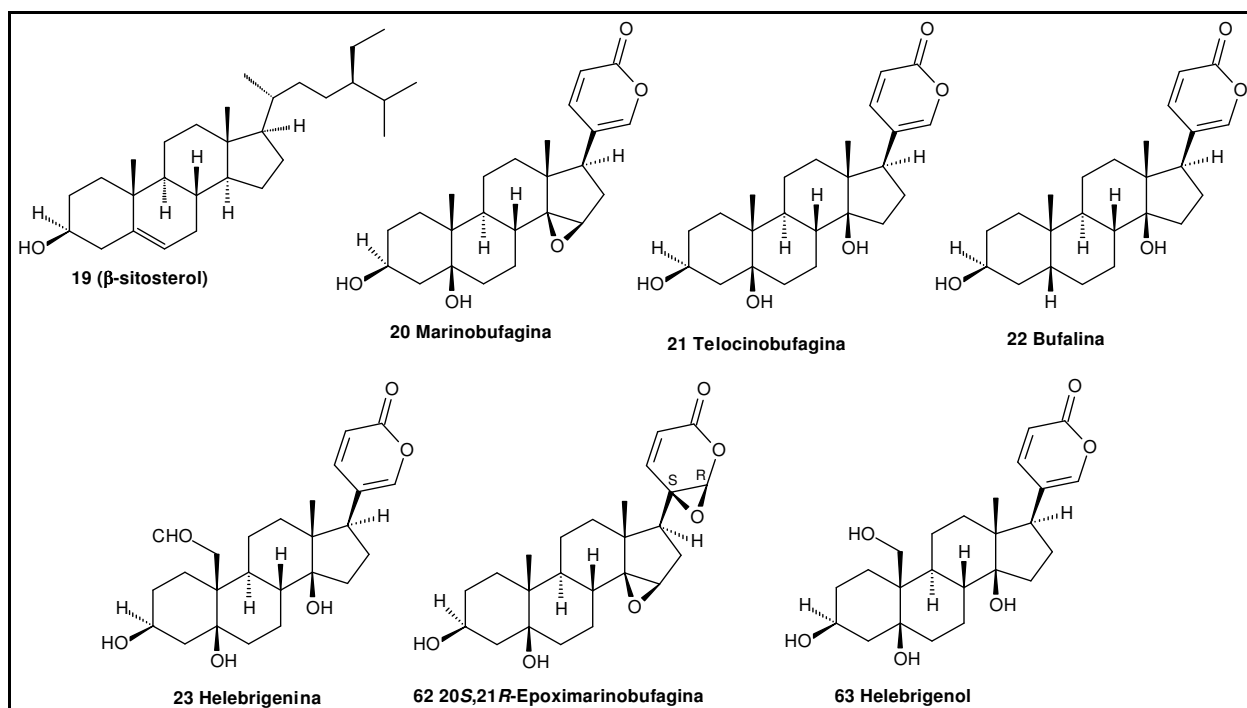
^aSistema de solvente utilizado nas cromatografias em coluna consistiu gradientes de hexano-acetato de etila (v,v).

^bO rendimento dos compostos foi calculado baseado na massa de 1,2 g do veneno seco.

^cFatores de retenção (R_f) obtidos através de CCD em placas de alumínio (sílica-gel 60, 0.2 mm, UV₂₅₄), eluídos com hexano-acetato de etila 1:9 (v:v).

^dPontos de fusão não corrigidos.

^eDados coletados da base de dados SciFinder Scholar 2007.

**Figura 12.** Compostos isolados do veneno do sapo *R. schneideri*.

A utilização de cromatografia em coluna do tipo *dry-flash* com óxido de alumínio, ainda uma técnica pouco utilizada para isolamento de bufadienolídeos, mostrou-se um método eficaz para a obtenção dos compostos do veneno do animal *Rhinella schneideri*. A cromatografia clássica em coluna de sílica-gel, apesar das desvantagens em relação à coluna *dry flash*, mostrou-se necessária e eficiente para isolar os

bufadienólídeos **62**, **63** e **R.sch 7** que apresentaram fatores de retenção (*R_f*) muito próximos. Esta última metodologia também foi utilizada para separar o extrato bruto do veneno de *R. schneideri*, sob condições semelhantes às utilizadas na cromatografia em coluna *dry flash* abordada acima, resultando no isolamento dos compostos **19** a **23**.

Caracterização espectroscópica dos compostos naturais

Como observado na seção Parte Experimental, técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C , unidimensionais e bidimensionais, e de espectrometria de infravermelho foram utilizadas para a determinação estrutural dos compostos isolados e dos derivados obtidos. Os deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos naturais **19** a **23**, **62** e **63** foram confirmados por experimentos COSY, HMBC, HMQC APT e DEPT. Os dados espectrais destes compostos estão de acordo com registros previamente reportados.^{75a-f} Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HMQC e HMBC e infravermelho dos constituintes isolados do veneno do animal em estudo são mostrados nos Anexos 1 a 41 (Páginas 87-127).

De forma geral, os espectros de RMN ^1H dos bufadienólídeos isolados do veneno de *R. Schneideri* apresentaram dois singletos com valores que variam entre δ 0,56 e 1,03, referentes aos grupos de metilas angulares localizados nas posições 18 e 19 do esqueleto esteroidal. Os anéis α -pirona dos bufadienólídeos foram reconhecidos por um dubleto com δ 7,2 (H-21), um dubleto com δ 6,3 (H-23) e um duplo dubleto com δ 7,8 (H-22). Os hidrogênios carbinólicos (H-3 α) apresentaram-se como multipletos com deslocamentos químicos entre δ 4,1-4,2. Sinais típicos em forma de singletos com δ 3,51 (**20**) e 3,53 (**62**) correspondem ao H-15 α do grupo oxirano. Os H-17 α dos compostos **20** a **23**, **63** e **R.sch 7** apresentaram deslocamentos químicos entre δ 2,46 e 2,61. A Figura 13 apresenta um exemplo ilustrativo de um espectro de RMN ^1H de um bufadienólídeo, onde a marinobufagina (**20**) foi utilizada como modelo. Devido à existência do grupo epóxido entre nas posições C-20 e C-21, o composto **62**

⁷⁵ a) Verpoorte, R.; Phan, Q. K.; Svendsen, A. B. *J. Nat. Prod.*, **1980**, *43*, 347; b) Della Greca, M.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1430; c) Akizawa, T.; Mukai, T.; Matsukawa, M.; Yoshioka, M.; Morris, J. F.; Butler-Jr, V. P. *Chem Pharm Bull.*, **1994**, *42*, 754; d) Kamao, Y.; Nogawa, T.; Yamashita, A.; Hayashi, M.; Inoue, M.; Drasar, P.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1001; e) Komiyama, Y.; Dong, X. H.; Nishimura, N.; Masaki, H.; Yoshida, M.; Masuda, M.; Takahashi, H. *Clin. Biochem.*, **2005**, *38*, 36; f) Tempone, A. G.; Pimenta, D. C.; Lebrun, I.; Sartorelli, P.; Taniwaki, N. N.; de Andrade-Jr, H. F.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C. *Toxicon*, **2008**, *52*, 13.

apresentou um singlete à δ 5,29 referente ao H-21.^{78d} Helebrigenina (**23**) mostrou um singlete à δ 10,06, relacionado a um hidrogênio do grupo aldeído na posição C-19 deste composto. A presença de dubletos em δ 4,25 e 3,55 (**63**) e δ 4,23 e 3,81 (**R.sch 7**), sugeriram a existência de dois hidrogênios diastereotópicos típicos de bufadienolídeos hidroxilados em C-19. Na Tabela 2 são apresentados os principais deslocamentos químicos de RMN ¹H dos compostos isolados, mostrando os diferentes valores nos sinais dos hidrogênios em razão dos grupos funcionais que caracterizam cada composto.

Os espectros de RMN ¹³C dos compostos de **20** a **23**, **62**, **63** e **R.sch 7** apresentaram os sinais dos 19 carbonos do esqueleto esteroidal e dos 5 carbonos do anel lactônico. No geral, sinais em torno de δ 69,0 (C-3) e 79,0 (C-5) e 86,0 (C-14) caracterizam a presença de hidroxilas nas posições indicadas, exceto para bufalina (**22**) que, devido à presença de hidrogênio apenas, apresentou um valor δ 35,9 para C-5. Sinais típicos a δ 59,7 e 59,8 correspondem ao hidrogênio em C-15 para os compostos **20** e **62**, respectivamente. No composto **62**, os sinais de C-20 e C-21 apresentaram valores δ de 56,4 e 84,5, respectivamente, devido à presença do grupo oxirano nestas posições. Um sinal no espectro de RMN ¹³C a δ 69,4 parecem indicar a presença de uma hidroxila ligada a um grupo metileno no composto **R.sch 7**, podendo se tratar de um derivado hidroxilado de **63**. Análises espectroscópicas adicionais estão em curso para a identificação deste último. Um espectro de RMN ¹³C da marinobufagina (**20**) foi utilizado como modelo para ilustrar os padrões espectrais de um bufadienolídeo típico. Como esperado, o espectro de RMN ¹³C do composto **19** (β -sitosterol) apresentou 29 sinais e o espectro de RMN ¹H evidenciou dois singletos a δ 1,00 (19-CH₃), 0,67 (18-CH₃), um dubleto a δ 5,34 referente ao hidrogênio vinílico em C-6 além de um multiplete entre δ 3,48-3,57 correspondente ao hidrogênio carbinólico em C-3. A ausência de sinais referentes aos hidrogênios típicos de anéis lactônicos indicaram se tratar de um esteróide. Os principais deslocamentos químicos de RMN ¹³C dos compostos isolados são apresentados na Tabela 3.

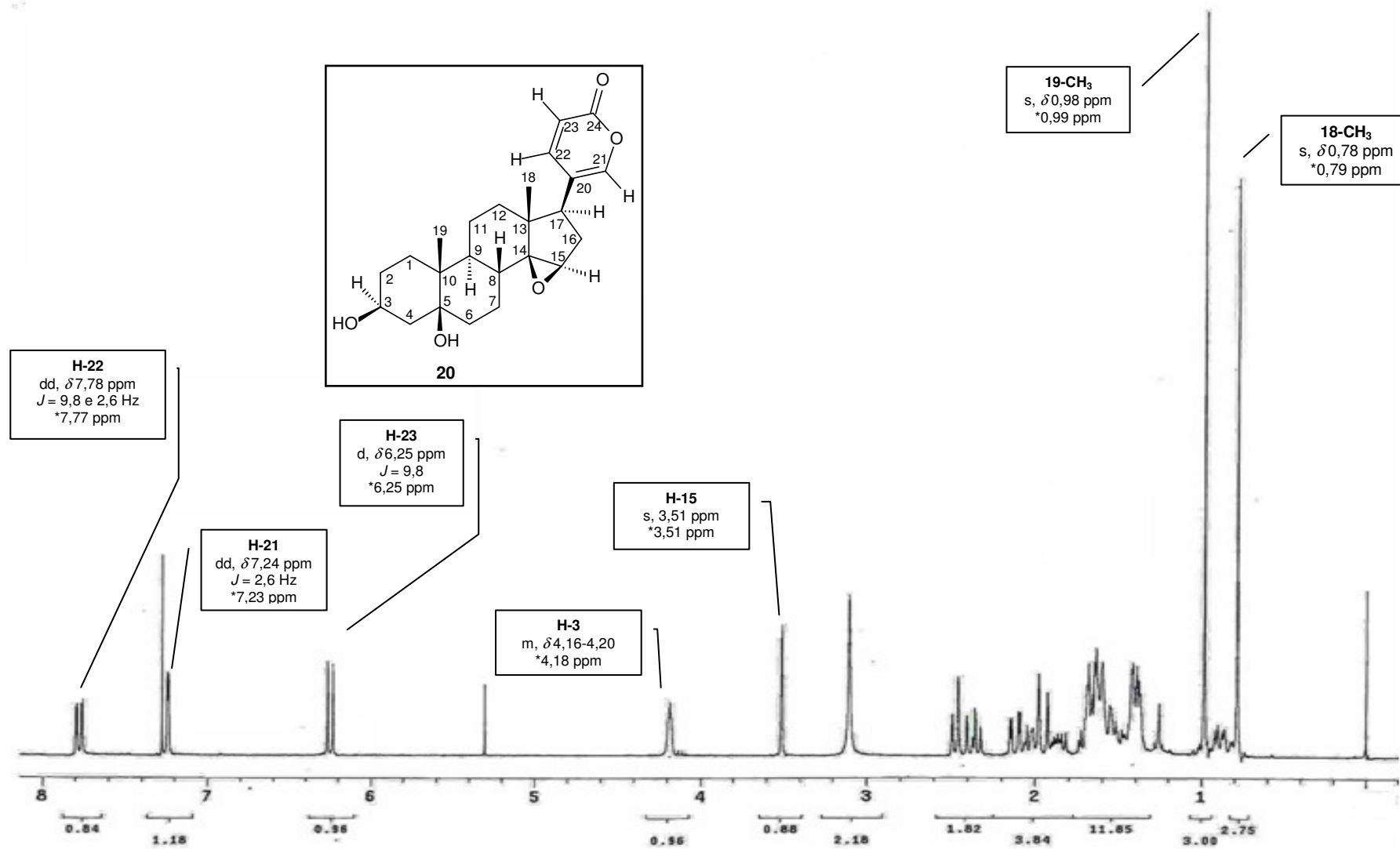
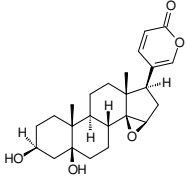
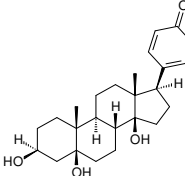
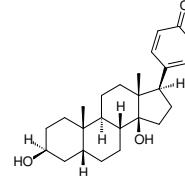
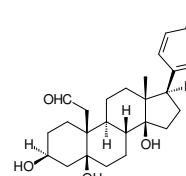
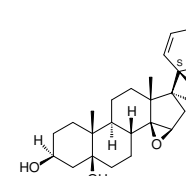
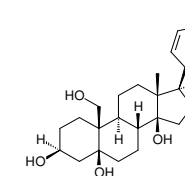


Figura 13. Espectro de RMN ¹H da marinobufagina (20) mostrando absorções características. *Dados espectrais obtidos de Kamano e colaboradores^{55b}

Tabela 2. Dados de RMN ¹H (300 MHz) dos bufadienolídeos isolados do veneno de *R. Schneideri*.*

H							R.sch 7
	20	21	22	23	62	63	
3	4,16-4,20 (m)	4,14-4,20 (m)	4,12-4,16 (m)	4,12-4,16 (m)	4,14-4,20 (m)	4,08-4,12 (m)	4,06-4,13(m)
15	3,51 (s)	NV [#]	NV [#]	NV [#]	3,53 (s)	NV [#]	NV [#]
17	2,47, d (10,3)	2,46, dd (9,8 e 6,0)	2,47, dd (9,5 e 6,2)	2,54, dd (9,5 e 6,6)	2,24, dd (6,5 e 2,4)	2,55, dd (9,5 e 6,1)	2,61, dd (9,1 e 6,1)
18-Me	0,78 (s)	0,69 (s)	0,70 (s)	0,68 (s)	0,95 (s)	0,70 (s)	0,74 (s)
19-Me	0,98 (s)	0,92 (s)	0,95 (s)	10,06 (s, CHO)	1,00 (s)	3,55, d (11,2) 4,25, d (11,2)	3,81, d (11,0) 4,23, d (11,0)
21	7,24, d (2,6)	7,25, d (2,5)	7,24, d (2,6)	7,42, d (2,4)	5,29, d (0,9)	7,42, d (2,5)	7,44, d (2,4)
22	7,78, dd (9,8 e 2,6))	7,83, dd (9,7 e 2,6)	7,86, dd (9,7 e 2,6))	7,98, dd (9,7 e 2,6)	7,91, dd (10,3 e 0,9)	7,98, dd (9,7 e 2,6)	7,94, dd (9,8 e 2,5)
23	6,25, d (9,8)	6,25, d (9,7)	6,27, d (9,7)	6,27, d (9,7)	6,03, d (10,3)	6,28, d (9,7)	6,28, d (9,7)

*Dados de deslocamentos químicos, α , em ppm; multiplicidade e constante de acoplamento (J , em Hz). Solventes utilizados: CDCl_3 (compostos **20** a **22** e **62**), $\text{DMSO}-d_6$ (compostos **23**, **63** e **R.sch 7**).

[#]NV = Não visualizado (sobreposição de sinais).

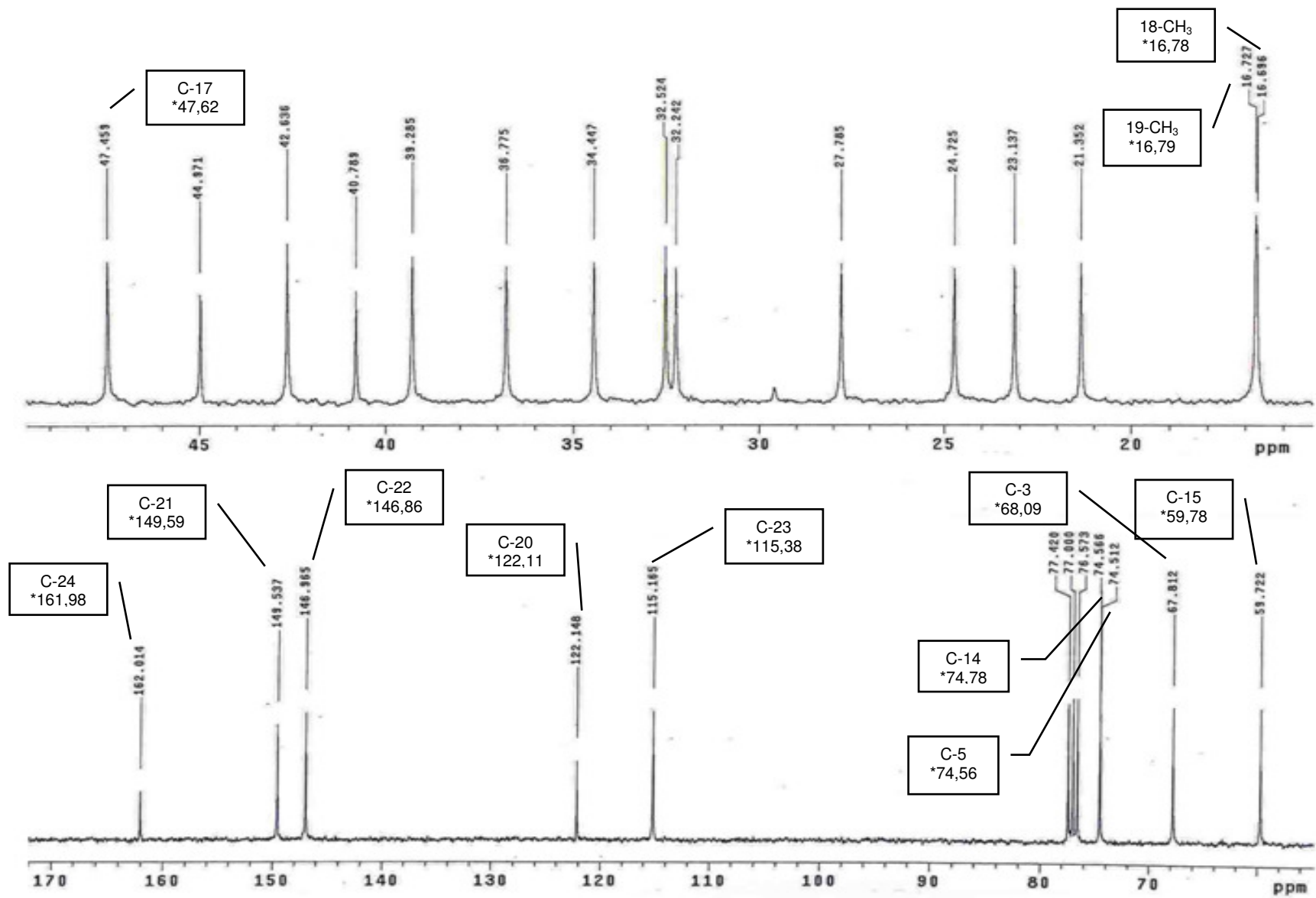
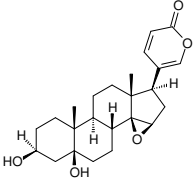
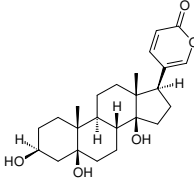
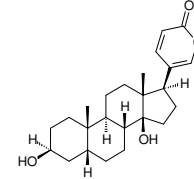
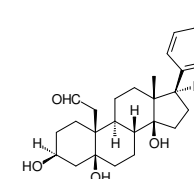
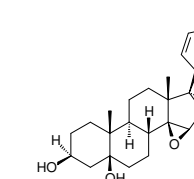
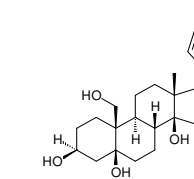


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C da marinobufagina (20) com absorções características (*Dados espectrais referenciados de Kamano e colaboradores).^{55b}

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C (75 Hz) dos compostos naturais isolados do veneno de *R. Schneideri*.*

							R.sch 7
C	20	21	22	23	62	63	
3	67,8	68,0	66,8	68,0	67,9	68,8	69,0
5	74,5	74,7	35,9	75,8	74,5	78,8	78,7
10	40,8	40,6	35,6	56,2	40,8	43,6	44,7
14	74,6	85,2	85,4	85,6	75,1	86,1	85,4
15	59,7	32,6	32,7	32,3	59,8	32,8	33,0
16	32,2	28,6	28,7	29,7	32,2	29,7	29,7
17	47,5	51,0	51,2	52,0	51,4	52,0	51,8
18-Me	16,7	16,4	16,5	17,1	16,1	17,2	18,4
19-Me	16,7	16,7	23,7	210,1	16,7	65,9	65,8
20	122,1	122,6	122,7	124,9	56,4	124,9	124,4
21	149,5	148,5	149,5	150,5	84,5	150,5	150,6
22	147,0	146,8	146,9	68,0	147,1	149,3	149,1
23	115,2	115,3	115,2	75,8	121,4	115,5	115,5
24	162,0	162,5	162,5	56,2	159,8	164,8	164,7

*Dados de deslocamentos químicos, δ , em ppm. Solventes utilizados: CDCl_3 (compostos **20** a **22** e **62**), $\text{DMSO}-d_6$ (compostos **23**, **63** e **R.sch 7**).

Modificações químicas dos bufadienólídeos e caracterização espectroscópica dos derivados

As modificações químicas nos compostos isolados do veneno de *R. schneideri* foram realizadas para obtenção de derivados, com objetivo de analisar comparativamente os efeitos destes sobre os sistemas biológicos. Até o presente momento, foram realizadas as seguintes modificações: a) proteção dos grupos hidroxilas secundários dos compostos **20** a **22** e **62**; b) proteção dos grupos hidroxilas terciários dos compostos **20** a **22**; c) formação de epóxido no anel lactônico dos compostos **20** a **22**, d) formilação e a oxidação da 3β -OH marinobufagina (**20**). Adicionalmente, foram realizadas a abertura do anel $14\beta,15\beta$ -epóxido do composto **20**. Nas próximas seções serão discutidos os efeitos produzidos por alguns derivados sobre o crescimento de células tumorais e sobre a enzima transmembrana Na^+/K^+ -APTase.

Os grupos 3β -OH de bufadienólídeos são comumente derivatizados com um grupo acetila no decorrer de uma rota sintética para protegê-los de reações colaterais sobre os mesmos. Como visto na parte introdutória, a substituição de grupos hidroxilas de bufadienólídeos por grupos acetilas provoca alterações no perfil biológico desta classe de compostos, incluindo os efeitos tóxicos. Como possíveis farmacóforos, os grupos hidroxilas de bufadienólídeos podem ser protegidos com grupos acetila que podem modificar o perfil farmacológico dos derivados. Com base nessas premissas, os compostos **20**, **21**, **22** e **62** foram tratados com anidrido acético em piridina, resultando na formação dos compostos **64**, **65**, **66** e **67**, respectivamente, todos com rendimentos superiores a 90% (Esquema 6). A Tabela 4 agrupa os dados analíticos destes compostos.

Tabela 4. Derivados monoacetilados **64** a **67** e dados analíticos experimentais.

Compostos	Dados analíticos			
	Rendimento (%) ^a	R_f^b	Pontos de fusão (°C)	
			Experimental	Literatura
64	95	0,40	178-183	198-216 ^{51b}
65	96	0,21	246-250	261-266 ^c
66	94	0,57	230-236	226-236 ^c
67	94	0,49	148-151	-

^aO rendimento dos compostos referem-se ao procedimento de acetilação.

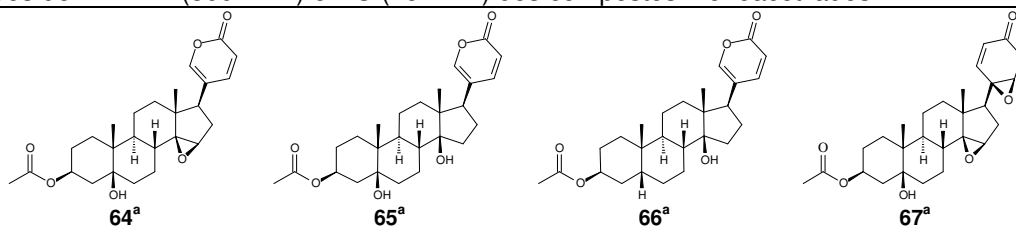
^bFatores de retenção (R_f) obtidos através de CCD em placas de alumínio (sílica-gel 60, 0.2 mm, UV₂₅₄), eluídos com hexano-acetato de etila 1:9 (v:v).

^cDados coletados da base de dados SciFinder Scholar 2007.

Como nos precursores, os espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos compostos acetilados **64** a **67** apresentaram valores semelhantes para os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos. Porém, os deslocamentos químicos dos grupos carbinólicos (H-3 α) foram registrados como multipletos a δ 5,22-5,29, 5,23-5,27, 5,05-5,10 e 5,20-5,26 para os compostos acetilados **64**, **65**, **66** e **67**, respectivamente, devido à presença do grupo acetil, os quais também mostraram sinais adicionais com valores à δ 2,07 (**64**), 2,09 (**65** e **67**) e 2,05 (**66**). A título de ilustração, a Figura 15 mostra a expansão dos sinais dos hidrogênios do grupo acetil (singlete, δ 2,07) e carbonólico em C-3 (multiplete, δ 5,22-5,29) observados para a marinobufagina acetato (**64**), comparando com o sinal do hidrogênio carbinólico (multiplete, 4,16-4,20) observado para marinobufagina (**20**). Os demais derivados monoacetilados apresentaram o mesmo comportamento em relação aos seus precursores.

Nos espectros de RMN ^{13}C dos compostos **64** a **67**, devido à presença do grupo acetila, os valores dos deslocamentos químicos de C-3, mostraram valores em torno de δ 71,0. Para o grupo acetila foram observados dois sinais em torno de δ 169,0 e 21,0, correspondentes às porções acila e metila, respectivamente. A Tabela 5 mostra os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos que evidenciam a formação dos compostos monoacetilados acima. Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C e infravermelho dos derivados monoacetilados em estudo são mostrados nos Anexos 42 a 53 (Páginas 128 - 139).

Tabela 5. Dados de RMN ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz) dos compostos monoacetilados.

Núcleo				
	δ em ppm (multiplicidade)			
H				
3α	5,22-5,29 (m)	5,23-5,27 (m)	5,05-5,10 (m)	5,20-5,26 (m)
COCH₃	2,07 (s)	2,09 (s)	2,05 (s)	2,09 (s)
C				
3	71,0	71,2	70,3	71,1
COCH₃	169,2	169,4	170,7	169,4
COCH₃	21,1	21,5	21,5	20,8

*Dados de deslocamentos químicos, δ , em ppm. Solvente utilizado: CDCl_3

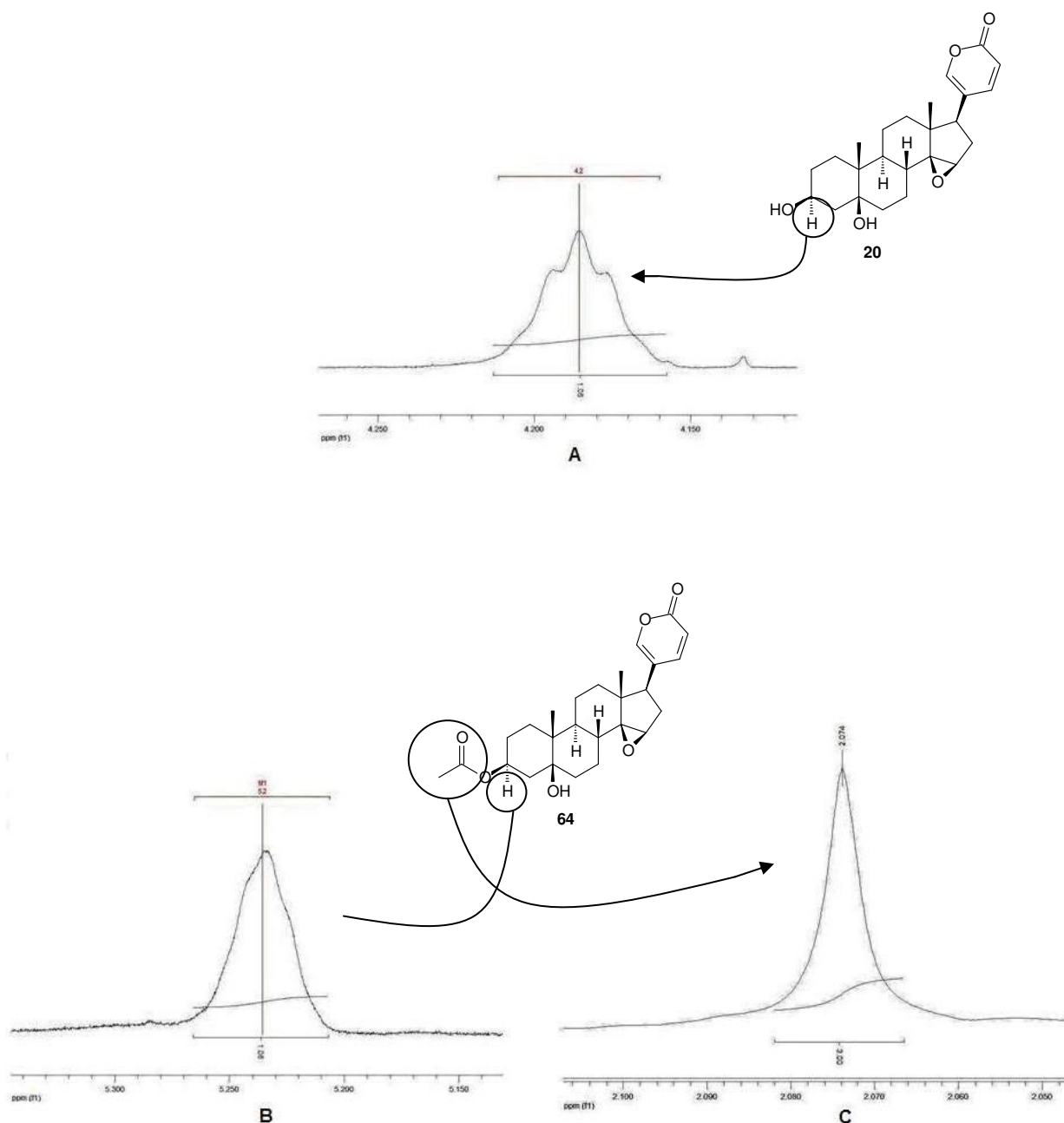
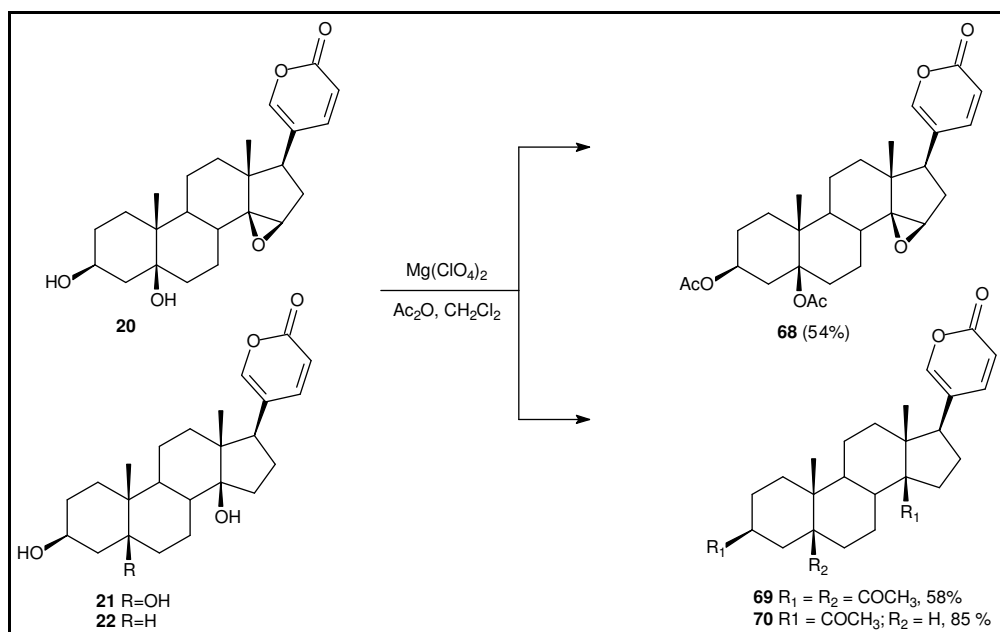


Figura 15. Ampliação dos espectros de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), comparando os sinais dos hidrogênios carbinólicos da marinobufagina (**20**, A) e marinobufagina 3-acetato (**64**, B) e mostrando o sinal dos hidrogênios da metila do grupo acetato em **64** (C).

Como observado no Esquema 6, adicionalmente, as hidroxilas secundárias e terciárias presentes nos compostos **20** ($3\beta\text{-OH}$ e $5\beta\text{-OH}$), **21** ($3\beta\text{-OH}$, $5\beta\text{-OH}$ e $14\beta\text{-OH}$) e **22** ($3\beta\text{-OH}$ e $14\beta\text{-OH}$) foram acetiladas com anidrido acético em diclorometano, utilizando perclorato de magnésio [$\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$] como catalisador. Como resultado, a partir dos compostos **68**, **69** e **70** foram produzidos os derivados diacetilados **68** e **70** e o triacetilado **69**.



Esquema 6. Produção de derivados poli-acetilados com anidrido acético na presença de perclorato de magnésio.

A proteção de grupos hidroxila com anidrido acético e piridina em bufadienólídeos não ocorre em hidroxilas terciárias devido ao impedimento estéreo. A acetilação de bufadienólídeos com perclorato de magnésio apresentou-se como um procedimento vantajoso em relação ao protocolo clássico, pois a acetilação das hidroxilas secundárias e terciárias foi realizada em uma etapa única. De acordo com relatos da literatura, a coordenação do Mg(ClO₄)₂ com o anidrido acético leva a um estado de transição de seis membros mais susceptível ao ataque nucleofílico das hidroxilas encontradas nos bufadienólídeos.⁷⁶

A Figura 16 mostra as expansões nas regiões onde são encontrados os sinais referentes aos grupos acetila dos compostos produzidos. Os espectros de RMN ¹H dos referidos compostos são mostrados nos Anexos 54 a 56 (Páginas 140 - 142).

⁷⁶ Chakraborti, A.S.; Sharma, L.; Gulhane, R.; Shivane. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7661.

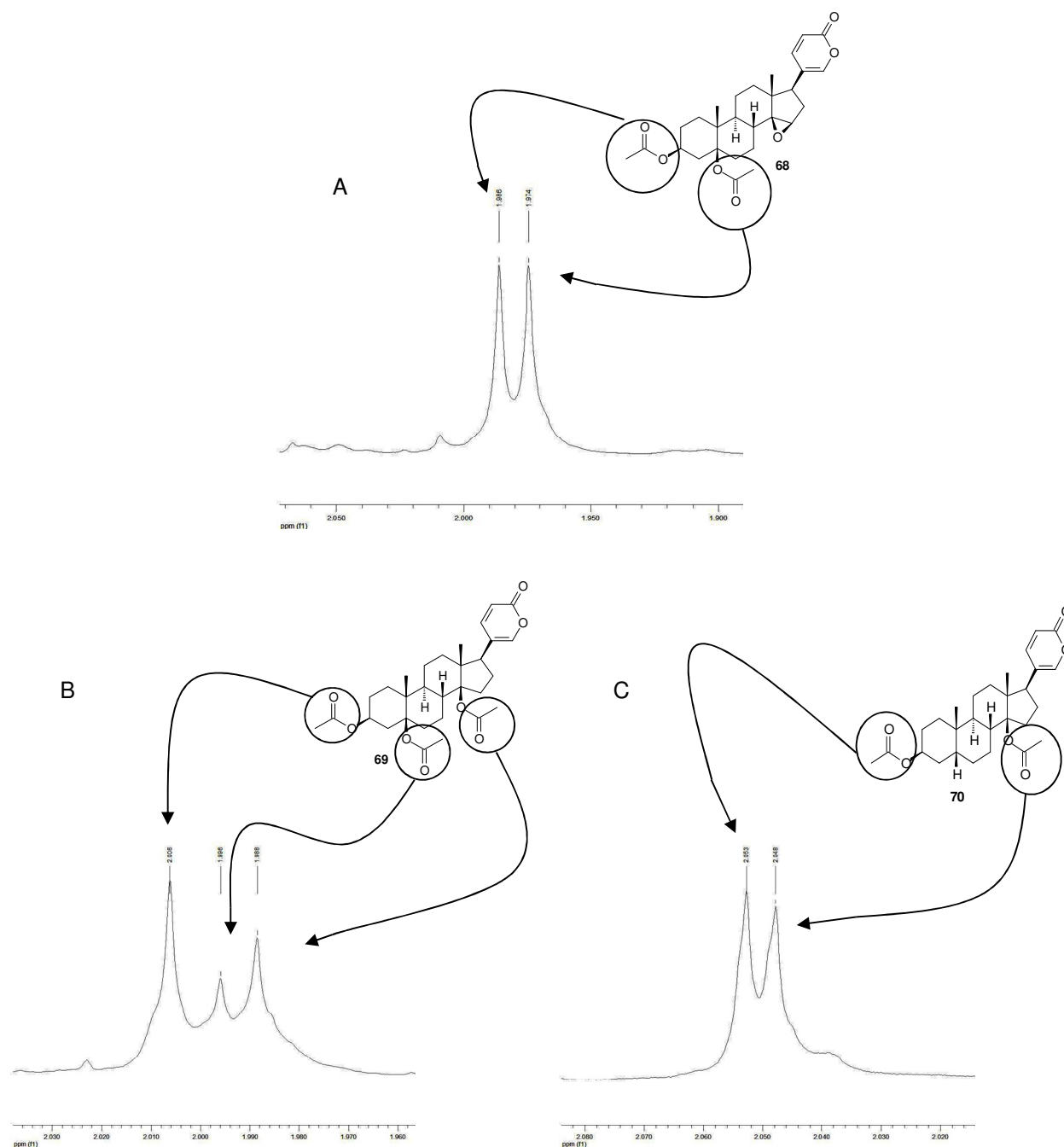
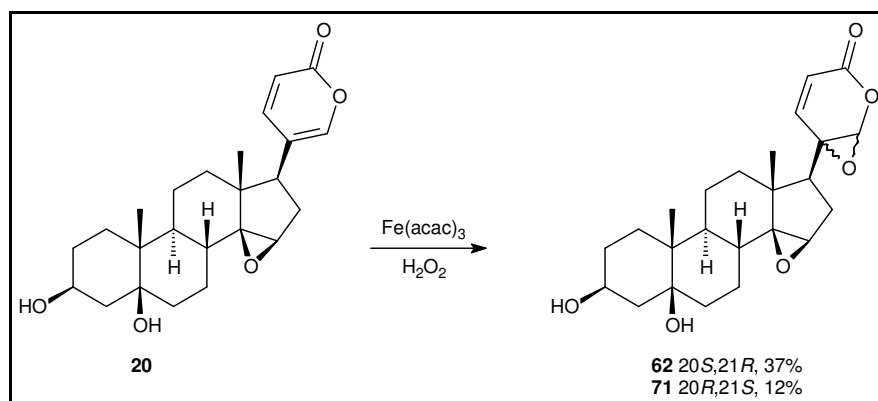


Figura 16. Ampliação dos espectros de RMN ^1H dos compostos 3,5-diacetato de marinobufagina (**68**, A), 3,5,14-triacetato de telocinobufagina (**69**, B) e 3,14-diacetato de bufalina (**70**, C), mostrando os singletos referentes aos grupos acetilas.

Paralelamente, foram realizadas reações químicas visando à formação de epóxido no anel lactônico dos compostos **20** a **22** para formação dos correspondentes 20,21-epoxibufadienólídeos. Assim, a marinobufagina (**20**) foi tratada com peróxido de hidrogênio e $\text{Fe}(\text{acac})_3$ e a mistura reacional foi cromatografada em coluna de sílica-gel, de onde foram isolados os compostos **62** e **71** (Esquema 7).



Esquema 7. Produção de 20,21-epoxibufenolídeos a partir da marinobufagina (**20**).

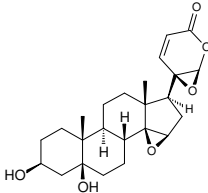
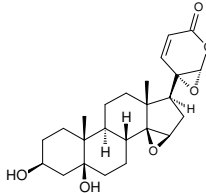
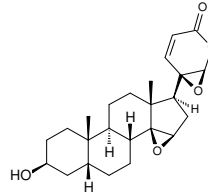
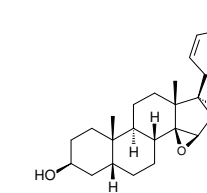
O primeiro composto apresentou dados espectrais idênticos aos do bufenolídeo **62** isolado do veneno de *R. schneideri*, confirmando a sua identidade como sendo a 20*S*,21*R*-epoxymarinobufagina. Os dados espectrais de obtidos para o composto **71** sugerem tratar do 20*R*,21*S*-epoximarinobufagina. Considerando que o procedimento usado para epoxidação é tipicamente não estereoseletivo, as evidências espectroscópicas corroboram para elucidação estrutural do diastereoisômero 20*R*,21*S*-epoxymarinobufagina (**71**). Na Tabela 6 são mostrados os valores dos deslocamentos químicos RMN ¹H observados para compostos da série de 20,21-epoxiresibufogenina (**62** e **71**), comparados com os dados dos compostos **57** e **58** registrados por Kamano e colaboradores.^{55b}

20,21-Epoxibufenolídeos foram previamente isolados do Ch'an Su e apresentaram efeito antagonista para interleucina-6 e perfil citotóxico interessante para células de leucemia murina e de células tumorais humanas de carcinoma epidemióide oral, carcinoma de nasofaringe, leucemia mielocítica, pâncreas, adenocarcinoma de mama, glioblastoma de sistema nervoso central, pulmão, cólon e próstata.⁵⁵

Conforme descrito no Esquema 8, adicionalmente, foi realizada uma tentativa de produzir 20,21-epoxibufenolídeos a partir da telocinobufagina (**21**) e da bufalina (**22**), com o tratamento destes compostos com Fe(acac)₃ e peróxido de hidrogênio (Esquema 9). O produto isolado por cromatografia em coluna de sílica-gel da mistura reacional obtida a partir de **21** encontra-se sob investigação. A princípio, o espectro de APT do produto indica tratar-se de uma mistura de substâncias, onde se verificou o desaparecimento dos picos a δ 122,6 (C-20) e 148,5 (C-21) característicos da pirona e aparecimento de sinais com deslocamentos químicos a δ 85,4, 56,9, 147,8, 121,2 e 160,2 que sugerem uma correlação com os carbonos 21, 20, 22, 23 e 24 de 20,21-

epoxibufadienólídeos, a semelhança do ocorrido com a epoxidação da marinobufagina (**20**). Possivelmente, essa mistura de compostos contém 20,21-epoxitelocinobufagina (**72**) como uma mistura de diastereoisômeros.

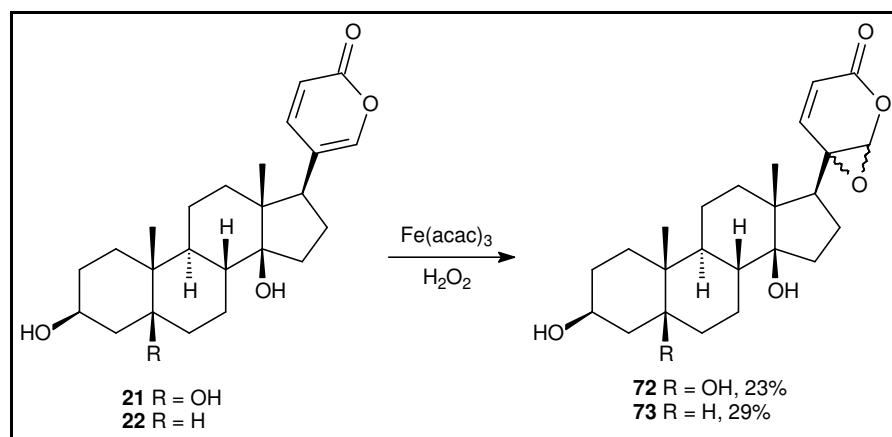
Tabela 6. Dados de RMN ^1H comparativos entre os diastereoisômeros 20*S*,21*R*-epoxibufadienólídeos.
 δ em ppm, multiplicidade (*J* em Hz)

H	 62^a	 71^a	 57^b	 58^b
3α	4,15-4,20, m	4,09-4,14m	4,13 brt (2,3)	4,13 brt (2,3)
15α	3,54 s	3,47s	3,56 s	3,45 s
16α	2,26 2H	2,20 2H	2,27 (2H)	2,08 (2H)
18-Me	1,02 s	0,95s	1,02 s	1,18 s
19-Me	0,98 s	0,91s	0,99 s	1,00 s
21	5,30 d (1,2)	5,23 d (1,1)	5,30 s	5,40 s
22	7,92 d (10,5)	7,85 d (10,3)	7,93 d (10,5)	7,69 brd (7,3)
23	6,04 d (10,2)	5,97 d (10,3)	6,03 d (10,5)	6,06 d (10,1)

^aSolvente utilizado: CDCl_3 .

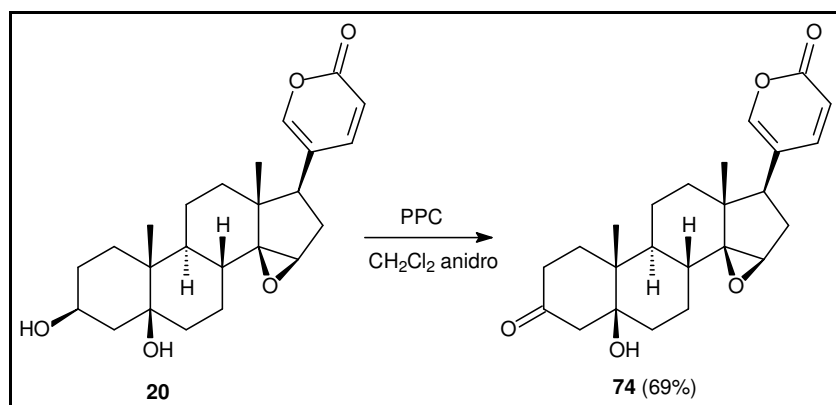
^bReferências espectrais obtidas de Kamano e colaboradores^{55b}

De forma semelhante, o tratamento da bufalina (**22**) com peróxido de hidrogênio e $\text{Fe}(\text{acac})_3$ rendeu uma mistura de compostos. A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dessa mistura identifica presença da matéria-prima (**22**) e dos 20,21-epoxibufadienólídeos correspondentes (**73**), ou seja, sinais a δ 7,82 (dd, $J = 1,0$ e 10,2), 6,02 (d, $J = 10,2$) e 5,35 (d, $J = 1,0$) característicos dos hidrogênios da epóxi-lactona e sinais a δ 57 e a δ 83 e 85 que indicam a presença do grupo oxirano entre as posições 20 e 21. Visando a completa elucidação dos produtos dessas reações, uma segunda tentativa para a formação dos 20,21-epoxibufadienólídeos **72** e **73** com padrão de pureza adequado para aquisição dos espectros está em curso. Os espectros dos produtos obtidos nas reações de epoxidação da marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**) e da bufalina (**22**) são apresentados nos Anexos 57 a 61 (Páginas 143-147).



Esquema 8. Produção de 20,21-epoxibufadienólídeos e compostos relacionados.

Por meio do tratamento oxidativo da marinobufagina com PCC em diclorometano anidro (Esquema 9), a 3-oxo-marinobufagina (**74**) foi preparada com rendimento 69% e caracterizada por espectroscopia de RMN ^1H , ^{13}C e infravermelho (Anexos 62 a 64, Páginas 148-150). No espectro de RMN ^1H observou-se o desaparecimento do multiplete a δ 4,16-4,20, referentes ao hidrogênio carbinólico em C-3 da matéria-prima. O espectro de APT evidenciou um sinal a δ 210,8 que corresponde ao grupo carbonila formado na posição C-3 (Figura 17).



Esquema 9. Formação da 3-oxo-marinobufagina (**74**).

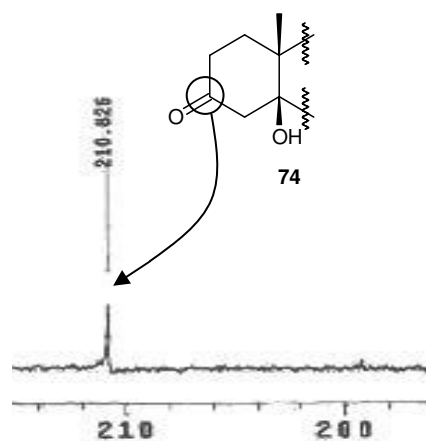
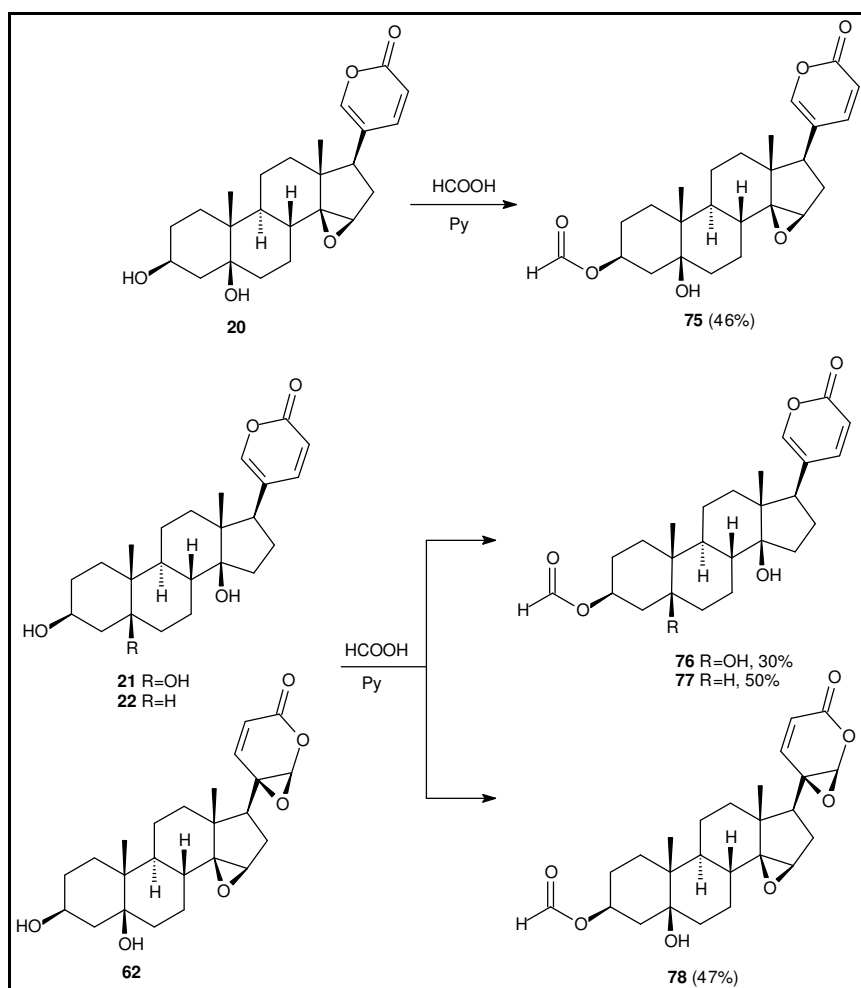


Figura 17. Sinal correspondente à carbonila da 3-oxo-marinobufagina (**74**).

A formilação da marinobufagina (**20**) foi realizada por tratamento com ácido fórmico para a produção 3-formiato correspondente (**75**, Esquema 10).



Esquema 10. Preparação de 3-O-formil bufadienólídeos.

No espectro de RMN ^1H do composto **75** observou-se um multipletto a δ 5,40-5,42, identificado como sendo o $3\alpha\text{-H}$, e um singletto a δ 8,10 do grupo formila. A formilação da telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**) e da $20S,21R$ -epoximarínobufagina (**62**) foi realizada em condições semelhantes às descritas acima, obtendo-se os respectivos compostos formilados **76**, **77** e **78**. A Tabela 7 mostra os deslocamentos químicos de hidrogênios e carbonos que evidenciam a formilação dos compostos em estudo e na Figura 18 encontra-se evidenciado o sinal correspondente ao hidrogênio do grupo formil no 3-formiato de telocinobufagina (**76**).

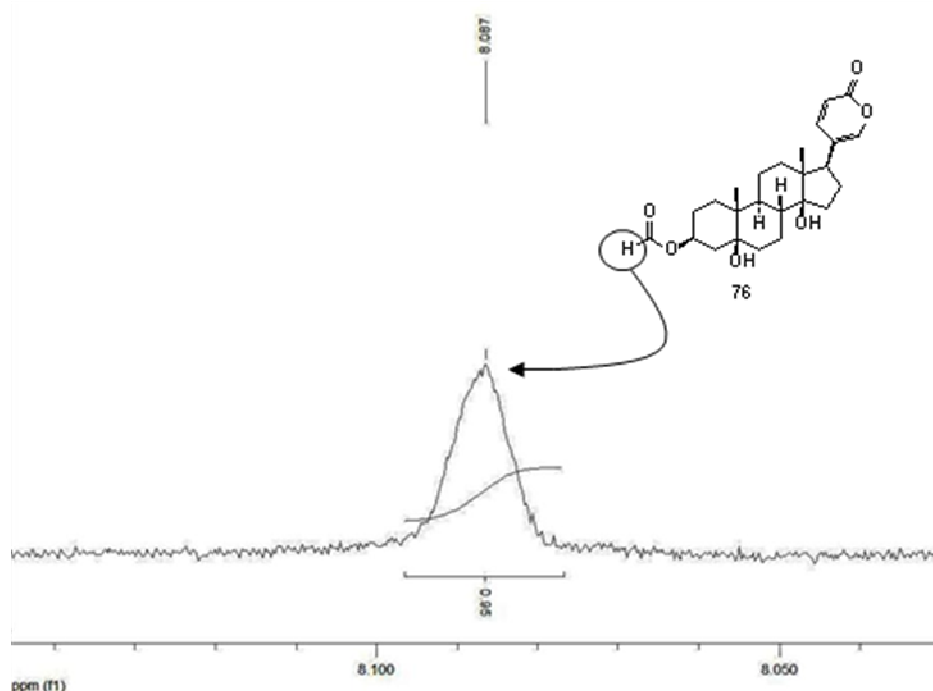


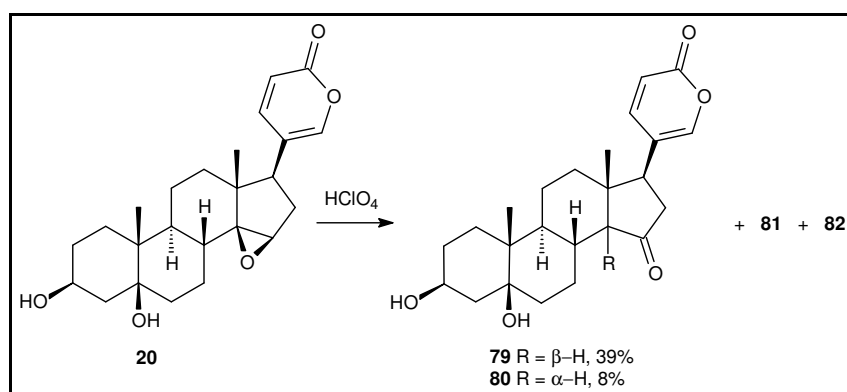
Figura 18. Ampliação do sinal correspondente ao hidrogênio do grupo formil na telocinobufagina 3-formiato (**76**).

Tabela 7. Dados de RMN ^1H dos compostos formilados.

H				
	75	76	77	78
	δ em ppm (multiplicidade)			
3α	5,39-5,41 (m)	5,38-5,42 (m)	5,21-5,26 (m)	5,37-5,41 (m)
CHO	8,07 (s)	8,09 (s)	8,06 (s)	8,08 (s)

Os espectros dos produtos das reações de formilação são apresentados nos Anexos 65 a 68 (Páginas 151-154). Derivados de bufadienólídeos naturais ou sintéticos contendo um grupo formiato com propriedades antitumorais^{55a,b} e antagonistas de interleucina 6^{67,68} já foram previamente descritos.

Com o propósito de se investigar a abertura do grupo epóxido entre os carbonos C-14 e C-15 dos bufadienólídeos, marinobufagina (**20**) foi tratada com ácido perclórico 72%, quantidade catalítica, para gerar o composto **79** (14 α -H), em maior rendimento, acompanhado do isômero **80** (14 β -H) e dois outros subprodutos denominados de **81**, **82** (Esquema 11). Dados da literatura revelam que os epímeros 14 α -H-15-oxo- e 14 β -H-15-oxo-isômeros e 14 β ,15 α -álcoois⁵⁷ e uma série de bufa-8,20,22-trienólídeos⁷⁷ foram obtidos por tratamento de bufadienólídeos com ácido perclórico 72%, catálise ácida.




Esquema 11. Abertura de epóxido na marinobufagina (**20**) com ácido perclórico.

A análise do espectro de RMN ¹H do composto **79** evidencia sinais a δ 7,32 (d), 7,26 (dd) e 6,35 (d) referentes aos hidrogênios H-21, H-22 e H-23, um multiplete a δ 4,14-4,19 corresponde ao hidrogênio carbinólico em C-3, enquanto que os dois singletos a δ 0,96 e 0,64 correspondem às metilas angulares em C-19 e C-18, respectivamente. Os dados espectrais do composto **79** são consistentes com o 14 α -H-15-oxo-3 β ,5 β -dihidróxi-bufo-20,21-dienólídeo. Quanto à análise dos espectros do composto **80** foram evidenciados sinais a δ 7,27 (d), 7,20 (dd) e 6,35 (d) referentes aos hidrogênios H-21, H-22 e H-23, um multiplete entre δ 4,16-4,20 característico do 3 α -H e dois singletos a δ 0,93 e 0,89 correspondentes às metilas angulares em C-19 e C-18. Esses dados sugerem que o composto **80** é consistente com o 14 β -H-15-oxo-3 β ,5 β -dihidróxi-bufo-20,21-dienólídeo. O assinalamento dos carbonos do composto **79** foi

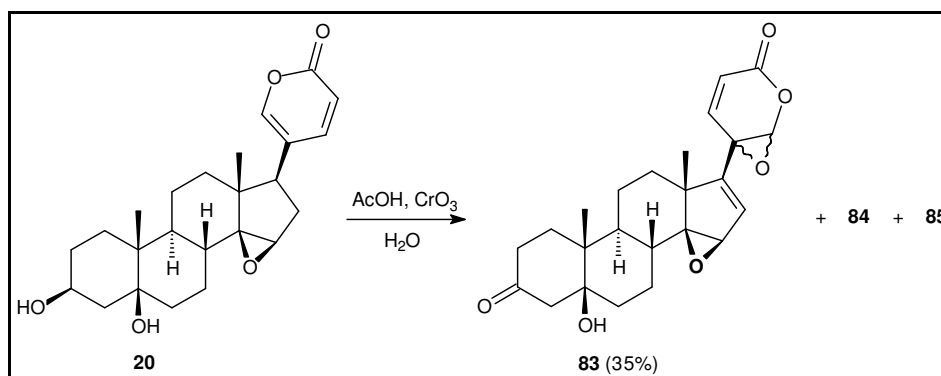
⁷⁷ Kamano, Y.; Pettir, G. R.; Brown, P.; Inoue, M. *Tetrahedron*, **1975**, 31, 2359.

realizado tomando como referência o assinalamento dos carbonos da marinobufagina (**20**). No espectro de APT do composto **79**, observou-se a presença de um sinal a δ 212,9 referente ao grupo carbonila em C-15, acompanhada da ausência do sinal a δ 59,7 observado em **20**. Os carbonos do anel lactônico foram assinalados a δ 161,7 (C-24), 149,3 (CH-21), 144,5 (CH-22), 116,3 (CH-23) e 116,2 (C-20), enquanto que o carbono C-3 apresentou um sinal à δ 68,1. Observou-se também o aparecimento de um sinal a δ 65,3 que indica a substituição do grupo 14β -OH pelo 14α -H. O espectro de RMN ^1H dos compostos **81** e **82** evidencia a ausência dos sinais a δ 4,16-4,20 característicos de hidrogênios carbinólicos em C-3, sugerindo a oxidação nessa posição para gerar um 3-oxo-bufadienolídeo, devido às condições reacionais oxidativa promovida pelo ácido perclórico. A Tabela 8 mostra os deslocamentos químicos de hidrogênios carbonos que evidenciam a abertura do grupo epóxi na marinobufagina (**20**). Espectros adicionais de HMQC, HMBC, g-COSY e APT estão sendo adquiridos para completa identificação dos compostos **81** e **82**. Os espectros de RMN ^1H dos derivados **79** a **82** são mostrados nos Anexos 69 a 75 (Páginas 155-161).

Tabela 8. Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos compostos produzidos a partir da abertura do epóxido na marinobufagina (**20**).

H		
	δ em ppm, multiplicidade (<i>J</i> em Hz)	
3α	4,16-4,20, s	4,14-4,19, s
18-CH₃	0,89, s	0,64, s
19-CH₃	0,93, s	0,96, s
21	7,27, d (3,0)	7,32, d (2,6)
22	7,20, dd (9,7 e 2,7)	7,26, dd (9,7 e 2,7)
23	6,35, d (9,6)	6,35, d (9,6)

O tratamento da marinobufagina (**20**) foi realizado com ácido acético na presença de trióxido de crômio, como previamente observado,^{54b} O resultado foi a produção dos compostos **83**, **84** e **85** (Esquema 12).



Esquema 12. Tratamento da marinobufagina (**20**) com ácido acético glacial na presença de Cr_2O_3 .

A análise do espectro de RMN ^1H do composto **83** indica sinais a δ 7,90, 6,05 e 5,30 correspondentes de hidrogênios H-22, H-23 e H-21 de 20,21-epoxibufenolídeos. Um duplete a δ 5,74 sugere a presença de um hidrogênio vinílico na posição C-16.^{54b} Foi observado a falta do sinal entre δ 4,16-4,20 referente ao hidrogênio carbinólico 3α -H, sugerindo sua oxidação. Os singletos a δ 1,21 e 1,07 referem-se às metilas angulares 19- CH_3 e 18- CH_3 . Os dados espectrais observados no composto **83** são consistentes com o 3-oxo-5 β -hidróxi-14 β ,15 β -20,21-diepóxi-bufa-16,22-dienolídeo. A análise do espectro de RMN ^1H dos compostos **84** e **85** foram observados os sinais característicos do anel lactônico, do hidrogênio H-15 adjacente ao oxirano, porém a falta do multiplete entre δ 4,16-4,20 referente ao 3α -H sugere a presença de um grupo carbonila em C-3. A presença do sinal a δ 5,71 pode indicar um hidrogênio vinílico, o que não é observado para o composto **86**. Espectros adicionais de HMBC, HMQC e APT estão sendo adquiridos para a identificação dos compostos **84** e **85**. Os espectros de RMN ^1H dos derivados **83** a **85** são mostrados nos Anexos 76 a 78 (Páginas 162-164).

3.2. Estudo das atividades biológicas de bufadienolídeos naturais do veneno de *Rhinella schneideri* e seus derivados

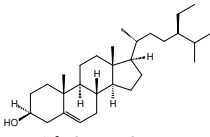
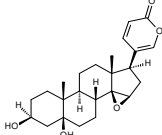
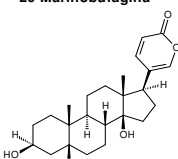
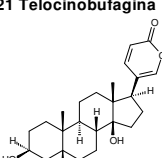
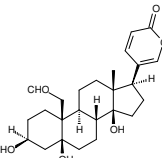
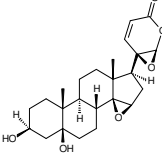
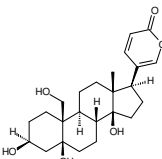
Avaliação da atividade inibitória de células tumorais

Em colaboração com o Laboratório de Oncologia Experimental (LOE-UFC, Fortaleza,-CE), sitosterol (**19**), marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), helebrigenina (**23**), 20S,21R-epoximarinobufagina (**62**), 19-hidroxitelocinobufagina (**63**), marinobufagina 3-acetato (**64**), telocinobufagina 3-acetato (**65**), bufalina 3-acetato (**66**) e epoximarinobufagina 3-acetato (**67**) foram avaliados quanto à atividade antitumoral contra as células MDA-MB435 (mama), HL60 (leucemia), HCT-8 (cólon) e SF295 (sistema nervoso), atividade citotóxica para linfócitos sanguíneos periféricos (PBLs) e para eritrócitos humanos. As concentrações inibitórias dos compostos testados para as células tumorais e para PBLs são mostradas na Tabela 9 e 10.

Bufadienolídeos originados de secreções de anfíbios são bem definidos quanto às atividades antitumorais contra diversas linhagens tumorais. A presença de compostos antitumorais no veneno do sapo estudado pode estar relacionada com a sua imunidade inata. As altas concentrações inibitórias das células tumorais observadas para os compostos testados podem incentivar estudos mais aprofundados acerca do mecanismo de ação antitumoral dos esteróides bem como agregar uma grande importância para esses compostos no que se refere ao desenvolvimento de fármacos a partir de análogos antitumorais. Bufadienolídeos e compostos derivados têm sido objeto de inúmeros ensaios biológicos. Mais expressivamente, bufadienolídeos têm sido avaliados quanto à capacidade de inibir uma variedade de células tumorais, como observado na parte introdutória. Adicionalmente, β -sitosterol demonstrou promover apoptose em células de câncer de mama MDA-MB-231.⁷⁸ A atividade antitumoral de bufadienolídeos pode ser comparada com atividade semelhante para glicosídeos cardíacos e alguns de seus análogos que apresentam citotoxicidade contra células de adenocarcinoma renal TK-10, adenocarcinoma de mama MCF-7, melanoma maligno UACC-62 e de leucemia mielógena crônica K-562.

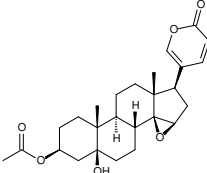
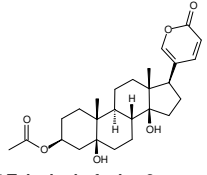
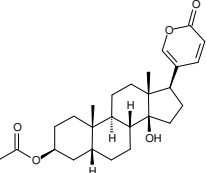
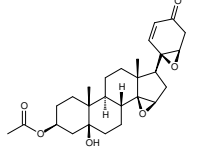
⁷⁸ Awad, A.B.; Chinnam, M.; Fink, C.S.; Bradford, P.G. *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 747.

Tabela 9. Atividade citotóxica dos bufadienólídeos isolados do veneno do sapo *Rhinella schneideri*.

Composto	Linhagem celular IC ₅₀ (μM)				
	HL-60	HCT-8	SF295	MDA-MB435	PBLs
 19 β-sitosterol	0,0009	NT	0,0007	0,002	NT
 20 Marinobufagina	1,70	1,07	1,07	3,52	0,42
 21 Telocinobufagina	0,06	0,06	0,03	0,11	0,05
 22 Bufalina	0,002	0,005	0,002	0,013	0,01
 23 Helebrigenina	0,05	0,03	0,03	0,16	0,03
 62 20S,21R	0,41	0,77	0,60	1,15	0,37
 63 Helebrigenol	0,12	1,12	1,31	3,22	NT
Doxo	0,04	0,02	0,44	0,88	0,33

NT: Não testado.

Tabela 10. Atividade citotóxica dos derivados acetilados.

Composto	Linhagem celular IC ₅₀ (μM)				
	HL-60	HCT-8	SF295	MDA-MB435	PBLs
 64 Marinobufagina 3-acetato	0,23	0,16	0,11	0,86	1,73
 65 Telocinobufagina 3-acetato	0,02	0,04	0,009	0,007	0,02
 66 Bufalina 3-acetato	0,09	0,10	0,06	0,18	0,06
 67 20S,21R-epoximarínobufagina 3-acetato	0,11	1,20	1,02	2,94	2,88
Doxo	0,04	0,02	0,44	0,88	0,33

Registros indicam que as concentrações citotóxicas dos cardonólídeos são similares às concentrações comumente encontradas no plasma de pacientes com doenças cardíacas.^{79a} Adicionalmente, após estudar o efeito de compostos digitálicos sobre a enzima Na⁺/K⁺ATPase de células tumorais MDA-MB-435s, Kometiani e colaboradores sugeriram que os digitálicos possuem um grande potencial terapêutico para o tratamento de câncer de mama.^{79b} Devido ao fato que os bufadienólídeos são semelhantes em estrutura e atividades farmacológicas aos glicosídeos cardíacos antitumorais, investigações a cerca dos mecanismos de ação citotóxica dos compostos estudados neste trabalho podem gerar novas perspectivas de conhecimento nessa área.

A avaliação da citotoxicidade dos bufadienólídeos e derivados evidenciou que todos os compostos exibiram uma significativa inibição do crescimento das células

⁷⁹ a) López-Lázaro, M.; Pastor, N.; Azrak, S.S.; Ayuso, M.J.; Austin, C.A.; Cortes, F. *J. Nat. Prod.*, **2005**, 68, 1642; b) Kometiani, P.; Liu, L.; Askari, A. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, 67, 929;

tumorais testadas a concentrações micro-, nano- ou sub-nanomolar (Veja IC₅₀, Tabela 10 e 11). No geral, β -sitosterol (**19**) apresentou a maior atividade inibitória para as linhagens celulares testadas. Entre os bufadienólídeos naturais, a bufalina (**22**) mostrou a maior atividade inibitória, enquanto que a marinobufagina (**20**) demonstrou a menor, porém ainda potente inibição do crescimento das linhagens celulares. O composto **63** apresentou concentrações inibitórias semelhantes às observadas para o composto **20**, exceto para a linhagem HL-60, cujo crescimento foi inibido a concentrações submicromolares. Há uma correlação entre as estruturas e a potência inibitória dos compostos naturais. Compostos contendo grupos 14β -OH são mais ativos que os compostos apresentando o grupo $14\beta,15\beta$ -epóxido. 19-Hidroxitelocinobufagina (**63**) teve a menor citotoxicidade entre os compostos com 14β -OH e intensamente inferior que seu congênere 19-oxo-telocinobufagina (helebrigenina, **23**). Adicionalmente, a presença do grupo 5β -H (composto **22**) parece ser um dos pré-requisitos para a sua potente atividade.

Em relação aos seus precursores, a atividade inibitória da telocinobufagina 3-acetato (**65**) decresceu para todas as linhagens celulares testadas. Bufalina 3-acetato (**66**) também exibiu atividade reduzida contra as células testadas, exceto para MDA-MB435. Registros prévios demonstraram que um comportamento similar foi descrito para helebrigenina 3-acetato, bufalina 3-acetato (**66**) e resibufogenina 3-acetato.⁸⁰ Marinobufagina 3-acetato (**64**) e 20*S*,21*R*-epoxymarinobufagina (**62**) exibiram maior atividade comparados com a marinobufagina (**20**). Em relação à susceptibilidade das linhagens celulares aos compostos testados, a linhagem MDA-MB-435 apresentou a maior resistência (3,5 vezes em média, comparando com as outras linhagens celulares).

Os bufadienólídeos e seus derivados demonstraram um significativo efeito citotóxico contra os linfócitos periféricos sangüíneos (PBLs). Observou-se que os compostos que continham o grupo 14β -OH foram mais tóxicos que aqueles com um grupo epóxido a C-14 e C-15. Os compostos acetilados **64** a **67** demonstraram menor atividade inibitória a PBLs que seus precursores, em particular o epóxido **67** que foi 8 vezes menos tóxico. Esses dados sugerem que tanto o grupo acetila e um epóxido adicional podem desempenhar um papel importante na modulação do perfil citotóxico dos bufadienólídeos. De acordo com registros prévios, a presença do epóxido, grupos

⁸⁰ Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; T, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5440; Wu, P.-L.; Hsu, Y.-L.; Wu, T.-S.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5207.

3 β -acetato e abertura do anel lactônico diminuiu os efeitos tóxicos dos bufadienólídeos, mantendo as suas propriedades inibitórias contra células tumorais.⁷⁴

Para verificar se as substâncias inibiam o crescimento das células através do rompimento de membrana plasmática, os compostos **19 a 23**, **62** e **64 a 67** foram testados quanto a sua habilidade para induzir lise em membrana de eritrócitos de camundongos. Como nenhum deles exibiu atividade hemolítica, assumiu-se que o mecanismo de ação envolvido com o perfil citotóxico dos compostos testados não se procedia através do rompimento membrana. A avaliação da atividade homolítica dos compostos acima contra eritrócitos humanos será realizada no devido curso.

Estudos preliminares acerca da viabilidade celular e indução de apoptose provocada pela helebrigenina (**23**) foram realizados, mostrando que o composto exibiu alta citotoxicidade contra a linhagem tumoral HL-60, sem dano ao DNA. Além disso, análises morfológicas das células tratadas com o composto mostraram uma diminuição na viabilidade celular, tais como volume reduzido, cromatina condensada, fragmentação nuclear e aparência de corpos apoptóticos. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) não foi observada após tratamento das células com **23**, não relacionando a citotoxicidade do composto com danos oxidativos. Esses fatos sugerem que helebrigenina apresenta um promissor potencial antitumoral, merecendo investigações mais aprofundadas.

A avaliação da citotoxicidade dos compostos **19 a 23**, **62** e **64 a 67** para linhagens de células tumorais foi divulgada em periódico indexado pela CAPES e congressos nacionais e internacionais.⁸¹ Esforços para expandir os estudos sobre os mecanismos de inibição de crescimento para esses compostos contra as células tumorais MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (colo), HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma) estão em curso.

⁸¹ Cunha-Filho, G.A.; Resck, I. S.; Cavalcante, B. C.; Pessoa, C. Ó.; Moraes, M. O.; Ferreira, J. R. O.; Rodrigues, F. A. R.; Santos, M. L. *Toxicon*, **2010**, doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.021; Cunha-Filho, G. S. A.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. O.; Costa-Lotufo, I.; Cavalcanti, B. C.; Resck, I. S.; Santos, M. L. *In: 6th International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto-SP*; Soares, B. M.; Rodrigues, F. A. R.; Cavalcanti, B. C.; Cunha-Filho, G. S. A.; Resck, I. S.; Santos, M. L.; Costa-Lotufo, I. V.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. O. *In: 7th International Congress of Pharmaceutical Science, 2009, Ribeirão Preto-SP*; Cunha-Filho, G. A.; Cavalcanti, B. C.; Ferreira, J. R. O.; Resck, I. S.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. Ó.; Rodrigues, F. A. R.; dos Santos, M. L. *In: 32ª Reunião Anual da SBQ, 2009, Fortaleza-CE*;

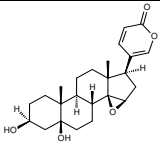
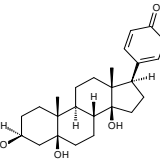
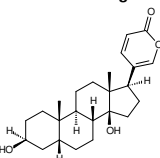

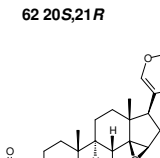
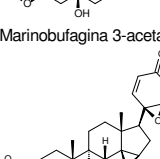
Avaliação da atividade inibitória de isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase

Em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. François Noel e Prof. Dr. Luis Eduardo Quintas (Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular, ICB-CCS-UFRJ, Rio de Janeiro-RJ), marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), 20S,21R-epoximarínobufagina (**62**), marinobufagina 3-acetato (**64**) e 20S,21R-epoximarínobufagina 3-acetato (**67**) foram avaliados quanto à inibição de diferentes isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase.

Os compostos **20**, **21** e **22** foram submetidos à avaliação farmacológica em preparação purificada de hemisférios cerebrais (HC) de rato, de acordo com Noël e Goldfraind,⁸² utilizando como controle positivo a ouabaína. Os resultados indicaram que a bufalina e a telocinobufagina possuem maior afinidade à enzima Na⁺/K⁺-ATPase do que a marinobufagina. Isso pode indicar uma maior seletividade da telocinobufagina e da bufalina para as isoformas α_2 e α_3 encontradas nos hemisférios cerebrais de rato. Adicionalmente, os mesmos compostos foram analisados quanto a habilidade de estimular uma nova via de transdução de sinais (Na⁺/K⁺-ATPase-Src-EGFR-Ras-ERK), comparando com a atividade inibitória dos compostos na Na⁺/K⁺-ATPase. Como resultado, telocinobufagina e bufalina apresentaram, em relação à marinobufagina, maior habilidade de ativar a via de transdução de sinais em concentrações menores àquelas necessárias para inibir a Na⁺/K⁺-ATPase. A avaliação da atividade inibitória da enzima Na⁺/K⁺-ATPase pelos compostos **62**, **64** a **67** estão em curso. Porém, resultados preliminares já indicam que, a presença do segundo grupo epóxido na posição C-20,21 no composto **62** reduziu a potência em relação à **20** para o rim humano e HC de rato. Em contra partida, a presença do grupo acetóxi no derivado acetilado de **62** (composto **67**) diminui a atividade inibitória em relação ao seu precursor para ambos os modelos farmacológicos ensaiados. Os dados dos ensaios de inibição de diferentes isoformas da Na⁺/K⁺-ATPase encontram-se registrados na Tabela 11.

⁸² Noël, F.; Godfraind, T. *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, 33, 47.

Tabela 11. Potência inibitória dos bufadienólídeos sobre a atividade NKA de diferentes tecidos.

Composto	Linhagem celular IC ₅₀ (μM)		
	Rim de rato	Hemisfério cerebral de rato	Rim humano
 20 Marinobufagina	>100	0,85	0,75
 21 Telocinobufagina	26	0,037	0,045
 22 Bufalina	64	0,056	0,030
 62 20S,21R	-	9,63	8,95
 64 Marinobufagina 3-acetato	-	1,36	0,84
 67 20S,21R-epoximarínobufagina 3-acetato	-	1,56	1,57
Ouabaína		0,034	0,068

Marinobufagina (**20**) e telocinobufagina (**21**) foram avaliados quanto a capacidade de interagirem sinergicamente com os glicosídeos cardíacos ouabaína e digoxina na inibição da Na⁺/K⁺-ATPase de hemisfério cerebral humano, que contém predominantemente a isoforma α1β1. Como resultado, foi observado um efeito aditivo na inibição na isoforma em questão, levantando a hipótese do efeito sinérgico entre glicosídeos cardíacos e bufadienólídeos endógenos ou durante o tratamento de falha

cardíaca (Tabela 12). Estes resultados foram divulgados em periódico indexado pela CAPES e congressos nacionais e internacionais.⁸³

Tabela 12. Avaliação da atividade inibitória de diferentes glicosídeos cardíacos em combinação com bufadienólídeos contra Na⁺/K⁺-ATPase de rim humano.

Compostos	IC ₅₀ (nM)	
	Experimental	Teórico
Marinobufagina (20)	1144 ± 160	-
Telocinobufagina (21)	44,2 ± 4,3	-
Ouabaína (28)	63,4 ± 2,9	-
Digoxina (29)	289 ± 23	-
28 + 29	172 ± 45	171 ± 2
20 + 29	425 ± 37	425 ± 37
21 + 29	117 ± 9	100 ± 0,1

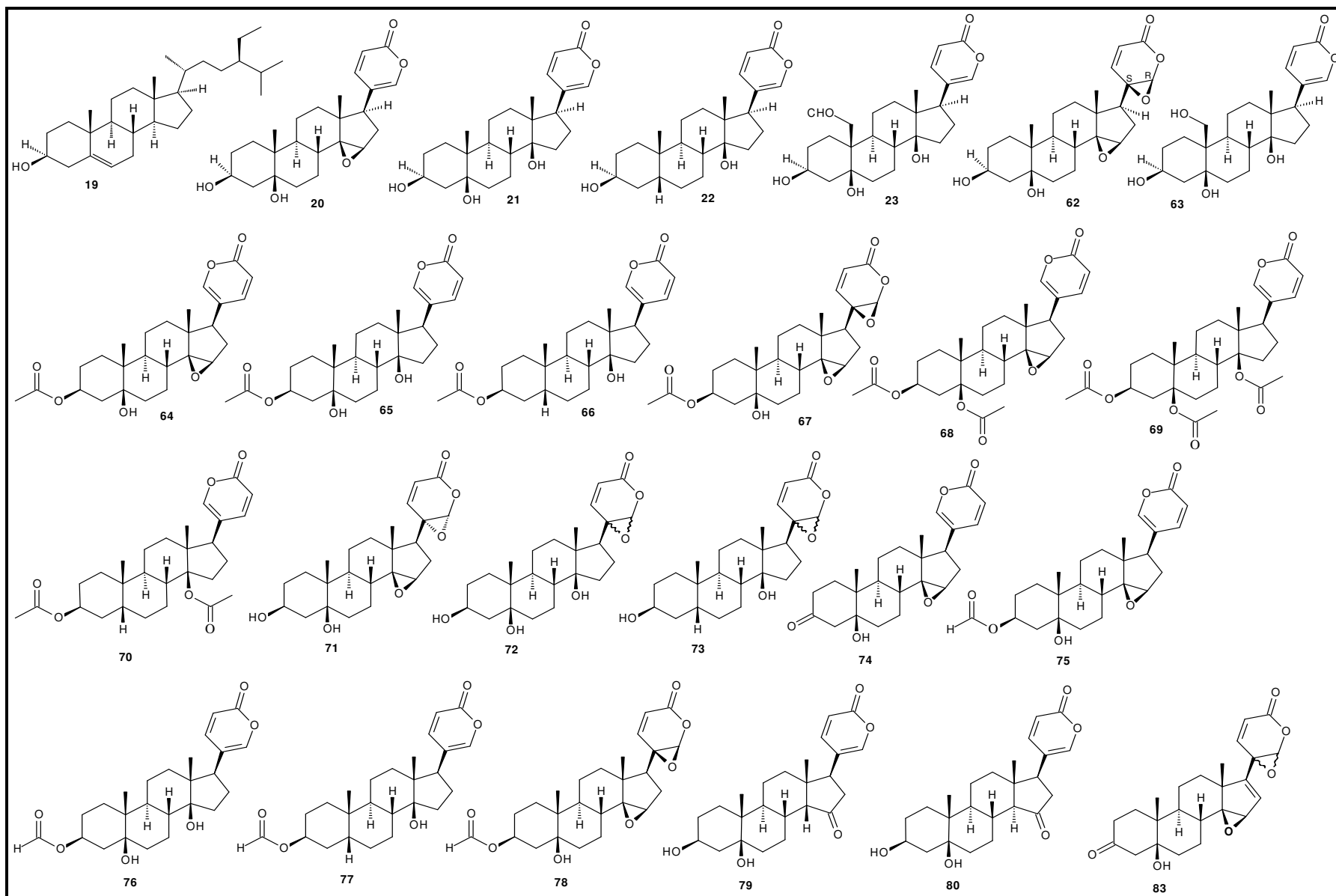
Fazendo um comparativo entre a atividade citotóxica para as células tumorais e as atividades inibitórias contra as isoformas de Na⁺/K⁺-ATPase dos compostos testados, os bufadienólídeos e derivados acetilados com grupos epóxidos (compostos **20**, **62**, **64** e **67**) apresentaram um interessante perfil farmacológico. Observou-se que 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**62**), marinobufagina acetato (**64**) e 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina acetato (**67**) apresentaram maior potência citotóxica para as células tumorais testadas, em relação à marinobufagina (**20**). Por outro lado, os mesmos compostos (**62**, **64** e **67**) apresentaram menor potência de inibição da Na⁺/K⁺-ATPase, em relação à marinobufagina, tanto para as isoformas de hemisfério cerebral de rato quanto para as isoformas de rim humano. Estes dados preliminares mostraram que os derivados acetilados e o 20,21-epóxido da marinobufagina apresentaram um perfil farmacológico melhorado quanto ao perfil citotóxico para células utilizadas. Para a comprovação destes resultados, estudos de relação estrutura atividade (SAR) serão realizados no devido curso.

⁸³ Touza N. A.; Poças, E. S.; Quintas, L. E. M.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic steroids on human kidney Na⁺/K⁺-ATPase. *Life Sciences*, submetido em 05/05/2010; Cunha Filho, G. A.; Quintas, L. E. M.; Noel, F.; Touza N. A.; Schwartz, E. F.; Resck, I. S.; dos Santos, M. L. *In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2009, Fortaleza; Touza N. A.; Poças, E. S.; Quintas, L. E. M.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F. *In: 41^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, 2009, Ribeirão Preto-SP; Amaral, L. S.; Figueira, R.; Bezerra, M. A.; Loureiro-Tomaz, E.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F.; Quintas, L. E. M. *In: 41^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, 2009, Ribeirão Preto-SP.

5. CONCLUSÕES

A presente tese versou sobre a importância dos anfíbios no cenário da Química dos Produtos Naturais no Brasil, em especial quanto ao estudo da composição esteroidal do veneno do sapo *Rhinella Schneideri*. Os principais esteróides encontrados no animal em estudo são os bufadienolídeos, uma classe de compostos conhecida pela atividade biológica semelhante aos glicosídeos cardiotônicos, os quais são inibidores específicos da enzima transmembrana Na^+/K^+ -ATPase. O objetivo de estudar bufadienolídeos do veneno de *Rhinella schneideri* e o aproveitamento destes compostos para a obtenção de uma série de derivados com atividades antitumorais foi atingido, como observado nos itens abaixo:

- foram isolados os seguintes componentes do veneno de *R. schneideri*: β -sitosterol (**19**), marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**), bufalina (**22**), helebrigenina (**23**), 20*S*,21*R*-epoximarinobufagina (**62**) e helebrigenol (**63**) e a partir destes foram produzidos e caracterizados derivados monoacetilados, poliacetilados, 20,21-epoxibufadienolídeos, 3- e 15-oxo-bufadienolídeos e 3-*O*-formiatos de bufadienolídeos, muitos deles possivelmente não registrados na literatura, de acordo com as bases consultadas (Quadro 1);
- os procedimentos usados nas modificações químicas mostraram-se bastante eficientes. Comparado à acetilação clássica, a utilização de perclorato de magnésio para a catálise proteção de hidroxilas secundárias e terciárias provou ser um método alternativo para obtenção de diferentes padrões de bufadienolídeos acetilados, o que permitirá a avaliação das atividades biológicas entre bufadienolídeos mono-, poliacetilados e seus precursores;
- o assinalamento espectroscópico dos precursores, subprodutos e produtos principais envolvidos neste trabalho será de suma importância para estudiosos no campo da química de produtos naturais e química semi-sintéticas relacionada aos bufadienolídeos;



Quadro 1. Compostos isolados do veneno de *R. schneideri* (19 a 23, 62 e 63) e derivados produzidos (64 a 83).

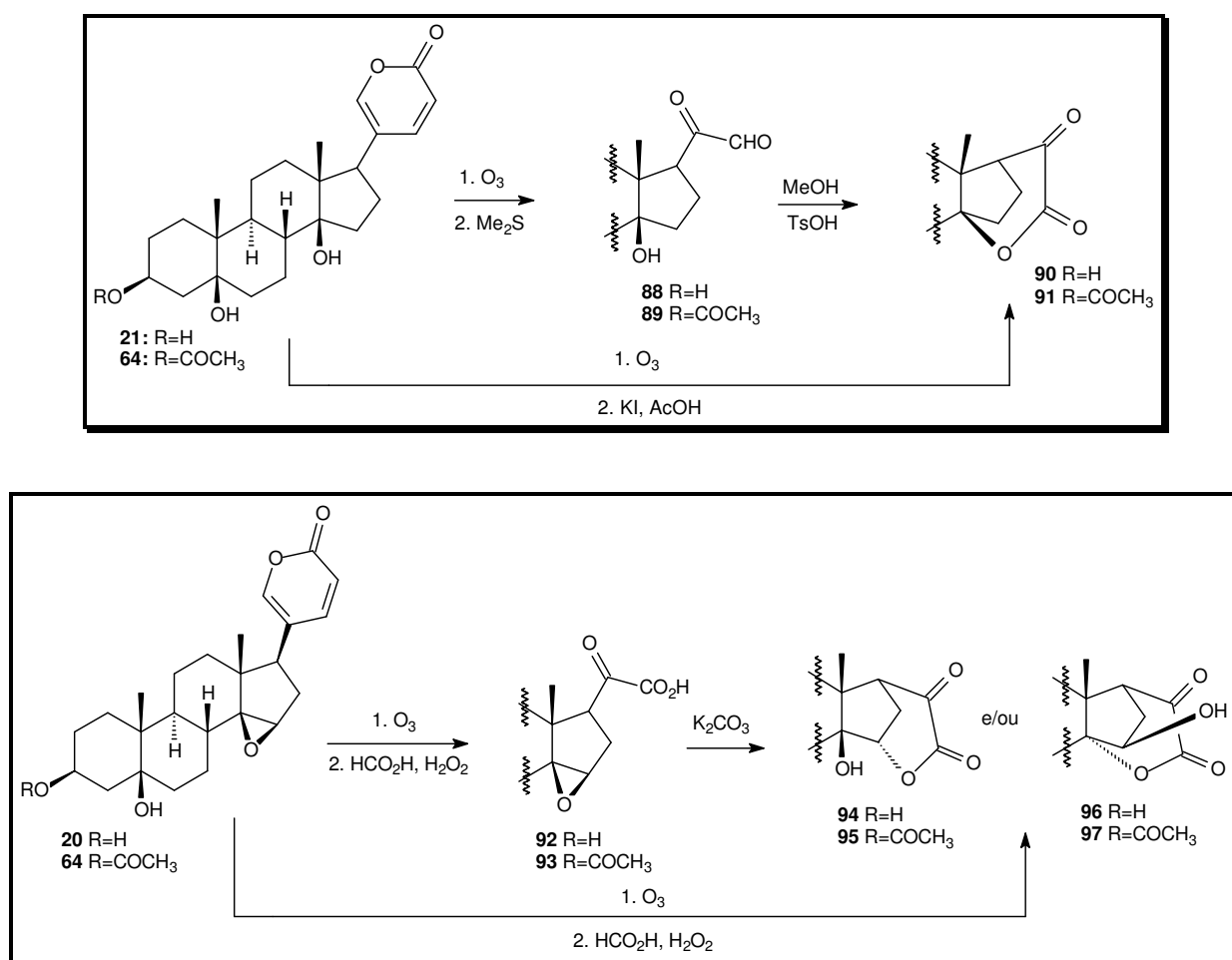
- os compostos naturais e seus derivados exibiram potente atividade antitumoral para as linhagens de células tumorais MDA-MB435 (mama), HL60 (leucemia), HCT-8 (côlon) e SF295 (sistema nervoso). Os compostos monoacetilados 3-acetato de marinobufagina (**64**), 3-acetato de telocinobufagina (**65**), 3-acetato de bufalina (**66**) e 3-acetato de 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**67**) também demonstraram potente atividade inibitória de crescimento das mesmas linhagens celulares. A acetilação e a epoxidação da marinobufagina (**20**) modificaram o perfil antitumoral desta, onde estes derivados apresentaram maior citotoxicidade contra as linhagens de células tumorais;
- os ensaios de inibição de Na⁺/K⁺-ATPase demonstraram que telocinobufagina (**21**) e bufalina (**22**) exibiram maior potência inibitória que marinobufagina (**20**), representando um grande potencial para novos estudos quanto à atividade inibitória para diferentes isoformas da enzima. Os compostos **20** e **21** demonstraram efeito aditivo para a inibição da referida enzima, quando preparados em combinação com os glicosídeos cardíacos ouabaína (**28**) e digoxina (**29**). A interação dos bufadienólídeos com a Na⁺/K⁺-ATPase mostra a importância desses compostos como ferramentas para estudos fisiológicos e patofisiológicos dos sistemas cardiovascular, nervoso e endócrino. Ainda como inibidores da referida enzima, os bufadienólídeos podem contribuir como protótipos para o desenvolvimento de fármacos contra inúmeras linhagens de células tumorais já que estes compostos têm a habilidade de promover apoptose celular.

Do ponto de vista de produção de materiais bibliográfico, a partir desses estudos foram gerados os seguintes resultados: uma publicação em periódico internacional, sete comunicações em congressos e um artigo foi submetido para publicação em periódico internacional. Um novo artigo abordando os estudos espectroscópicos dos derivados de bufadienólídeos produzidos e a avaliação das atividades citotóxicas para células tumorais será submetido para publicação.

6. PERSPECTIVAS

Tendo em vista o seguimento dos estudos dos bufadienólídeos isolados do veneno de *R. schneideri* e dos derivados produzidos, as seguintes etapas serão realizadas:

- clivagens oxidativas na marinobufagina (**20**), telocinobufagina (**21**) e seus derivados acetilados, *via* procedimento clássico de ozonólise, seguida de tratamento oxidativo ou redutivo para produção de intermediários carbonilados **88**, **89**, **90** e **91**. Estes últimos serão submetidos a condições ácidas ou básicas para formação das lactonas correspondentes **92** a **97** (Esquema 13).



Esquema 13. Clivagem oxidativa do anel α -pirona e lactinização nos bufadienólídeo **20** e **21**.

- análises adicionais de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e infravermelho para a caracterização dos derivados ainda não identificados.

- avaliação das atividades inibitória de crescimento de células tumorais e de diferentes isoformas da enzima Na⁺/K⁺-ATPase para os derivados produzidos e ainda não testados.

Os resultados promissores obtidos com a espécie *R. schneideri* e o interesse crescente nesse campo de pesquisa tendem a estimular o estudo do perfil cromatográfico de bufadienólídeos de 19 espécies de sapos bufonídeos visando o estabelecimento de implicações filogenéticas e, posteriormente, estudo químico e farmacológico dos seus constituintes.

7. PARTE EXPERIMENTAL

Extração e processamento do veneno

A secreção das glândulas parotóides (extrato cru) foi obtida de 360 espécimes de *R. schneideri* (sapo cururu) capturados em Brasília, Distrito Federal e Bacabal, Maranhão. Após a extração do veneno, os animais foram soltos no local de captura. O veneno foi obtido por pressão manual, coletado em placas de Petri (Fluxograma 1, página 32). Após desidratado em dissecador sob vácuo, o veneno seco (95,10 g) foi pulverizado massa, extraído com acetato de etila por três vezes (300 mL), com intervalos de uma semana, e concentrado em rotaevaporador sob vácuo fornecendo um resíduo marrom e amorfo (9,0 g).

Isolamento dos compostos

Alíquotas com cerca de 1,2 g do extrato foram fracionadas por cromatografia em coluna *dry-flash* utilizando óxido de alumina neutro (70 g, 230 mesh, Merck, Ø 15 cm x 3.3 cm). A coluna foi eluída com um gradiente de solvente constituído de hexano e acetato de etila, variando-se a concentração de acetato de etila em 5%. Frações de 20 mL foram coletadas e monitoradas por CCD em placas pré-fabricadas de sílica-gel Merck (F₂₅₄/0,2 mm x 2,5 cm x 5,0 cm), eluídas com hexano – acetato de etila 3:7 e reveladas com uma solução vanilina sulfúrica a 3% ou solução aquosa de permanganato de potássio 2%, sob aquecimento. Algumas frações que continham mais de um composto foram combinadas, concentradas e o resíduo foi submetido a uma segunda separação por cromatografia em coluna *dry-flash* com sílica gel 60 (26g, 230 - 400 Mesh, Merck, Ø 15 cm x 3.3 cm).

Caracterização dos compostos naturais

As amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada em placas pré-fabricadas de sílica-gel Merck (F₂₅₄/0,2 mm x 2,5 cm x 5,0 cm), eluídas com hexano – acetato de etila 3:7 e reveladas com uma solução vanilina sulfúrica a 3% ou solução aquosa de permanganato de potássio 2%, sob aquecimento. Os pontos de Fusão foram determinados no bloco de Köfler e apresentados sem correção. Os espectros de

infravermelho (IV) foram registrados em um espectrômetro Bomem Hartmann & Braun (MB – 100), utilizando pastilhas de KBr, com valores expressos em cm^{-1} . Os experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C foram registrados em um espectrômetro Mercury plus Varian (7.05 T), usando CDCl_3 ou $\text{DMSO}-d_6$ como solventes de dissolução das amostras e TMS como referência. Os deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C foram registrados em partes por milhão (ppm) relativos ao TMS. Os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio dos compostos isolados e dos derivados obtidos foram confirmados por experimentos de HMQC, HMBC, COSY, DEPT e APT.

β -Sitosterol (**19**). $R_f = 0,64$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 142-144; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$): 3745, 1635, 1465, 1377, 1056; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 5,34 (1H, d, $J = 5,2$ Hz, H-6), 3,48-3,57 (1H, m, H-3), 0,92 (3H, dd, $J = 6,6$ e $2,1$ Hz, H-21), 0,87 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, H-29), 0,80 (3H, d, $J = 2,7$ Hz, H-26), 1,00 (3H, s, 19- CH_3), 0,67 (3H, s, 18- CH_3); RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 37,2 (C-1), 31,6 (C-2), 71,7 (C-3), 42,2 (C-4), 140,7 (C-5), 121,6 (C-6), 31,9 (C-7), 31,9 (C-8), 50,1 (C-9), 36,5 (C-10), 21,1 (C-11), 39,7 (C-12), 42,3 (C-13), 56,7 (C-14), 24,3 (C-15), 28,2 (C-16), 56,1 (C-17), 11,8 (C-18), 19,4 (C-19), 36,2 (C-20), 18,8 (C-21), 33,9 (C-22), 26,0 (C-23), 45,8 (C-24), 29,1 (C-25), 19,8 (C-26), 19,0 (C-27), 23,0 (C-28), 11,9 (C-29).

Marinobufagina (**20**). $R_f = 0,21$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 215-217; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$): 3326, 1736, 1636, 1540, 1258; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,78 (1H, dd, $J = 9,8$ e $2,6$ Hz, H-22), 7,24 (1H, d, $J = 2,6$ Hz, H-21), 6,25 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, H-23), 4,16-4,20 (1H, m, H-3), 3,51 (1H, s, H-15), 2,47 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-17), 0,98 (3H, s, 19- CH_3), 0,78 (3H, s, 18- CH_3); RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 24,7 (C-1), 27,8 (C-2), 67,8 (C-3), 36,8 (C-4), 74,5 (C-5), 34,4 (C-6), 23,1 (C-7), 32,5 (C-8), 42,6 (C-9), 40,8 (C-10), 21,3 (C-11), 39,3 (C-12), 45,0 (C-13), 74,6 (C-14), 59,7 (C-15), 32,2 (C-16), 47,5 (C-17), 16,7 (C-18), 16,7 (C-10), 122,1 (C-20), 149,5 (C-21), 147,0 (C-22), 115,2 (C-23), 162,0 (C-24).

Telecinobufagina (**21**): $R_f = 0,16$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 166-170; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}} \text{cm}^{-1}$): 3438, 1707, 1633, 1540, 1243; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,83 (1H, dd, $J = 9,7$ e $2,6$ Hz, H-22), 7,22 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 6,25 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-23), 4,14-4,20 (1H, m, H-3), 2,46 (1H, dd, $J = 9,8$, $6,0$ Hz, H-17), 0,92 (3H, s, 19-

CH₃), 0,69 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 24,8 (C-1), 27,8 (C-2), 68,0 (C-3), 36,8 (C-4), 74,7 (C-5), 35,2 (C-6), 23,7 (C-7), 41,3 (C-8), 39,2 (C-9), 40,6 (C-10), 21,7 (C-11), 40,9 (C-12), 48,2 (C-3), 85,2 (C-14), 32,6 (C-15), 28,6 (C-16), 51,0 (C-17), 16,4 (C-18), 16,7 (C-19), 122,6 (C-20), 148,5 (C-21), 146,8 (C-22), 115,3 (C-23), 162,5 (C-24).

Bufalina (**22**). *R_f* = 0,37 (hexano-acetato, 1:9, v:v); *p.f.*: 231-234; FT-IV (KBr, ν_{máx} cm⁻¹): 3451, 1723, 1635, 1541, 1244; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,86 (1H, dd, *J* = 9,7 e 2,6 Hz, H-22), 7,24 (1H, d, *J* = 2,6 Hz, H-21), 6,27 (1H, d, *J* = 9,7 Hz, H-23), 4,12-4,16 (1H, m, H-3), 2,47 (1H, dd, *J* = 6,2 e 9,5, H-17), 0,95 (3H, s, 19-CH₃), 0,70 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 29,6 (C-1), 27,8 (C-2), 66,8 (C-3), 33,2 (C-4), 35,9 (C-5), 26,5 (C-6), 21,4 (C-7), 42,3 (C-8), 35,3 (C-9), 35,6 (C-10), 21,4 (C-11), 40,9 (C-12), 48,3 (C-13), 85,4 (C-14), 32,7 (C-15), 28,7 (C-16), 51,2 (C-17), 16,5 (C-18), 23,7 (C-19), 122,7 (C-20), 149,5 (C-21), 146,9 (C-22), 115,2 (C-23), 162,5 (C-24).

Helebrigenina (**23**). *R_f* = 0,13 (hexano-acetato, 1:9, v:v); *p.f.*: 154-160; FT-IV (KBr, ν_{máx} cm⁻¹): 3439, 1716, 1635, 1543, 1249; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 10,06 (1H, s, 19-CHO), 7,98 (1H, dd, *J* = 9,7 e 2,6 Hz, H-22), 7,42 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-21), 6,27 (1H, d, *J* = 9,7 Hz, H-22), 4,12-4,16 (1H, m, H-3), 2,54 (1H, dd, *J* = 9,5, 6,6 Hz, H-17), 0,68 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 18,5 (C-1), 27,6 (C-2), 68,0 (C-3), 37,4 (C-4), 75,8 (C-5), 38,6 (C-6), 25,2 (C-7), 43,0 (C-8), 40,6 (C-9), 56,2 (C-10), 23,5 (C-11), 41,5 (C-12), 49,5 (C-13), 85,6 (C-14), 32,3 (C-15), 29,7 (C-16), 52,0 (C-17), 17,1 (C-18), 210,1 (C-19), 124,9 (C-20), 150,5 (C-21), 149,3 (C-22), 115,4 (C-23), 164,7 (C-24).

20*S*,21*R*-Epoximarinobufagina (**62**). *R_f* = 0,27 (hexano-acetato, 1:9, v:v); *p.f.*: 181-187; FT-IV (KBr, ν_{máx} cm⁻¹): 3467, 3430, 1740, 1639, 1534, 1124; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,91 (1H, dd, *J* = 10,3 e 0,9 Hz, H-22), 6,03 (1H, d, *J* = 10,3 Hz, H-23), 5,29 (1H, d, *J* = 0,9 Hz, H-21), 4,14-4,20 (1H, m, H-3), 3,53 (1H, s, H-15), 2,26 (2H, *J* = 2,0 e 7,00 Hz, H-16), 1,00 (3H, s, 19-CH₃), 0,95 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 24,7 (C-1), 27,8 (C-2), 67,9 (C-3), 36,7 (C-4), 74,5 (C-5), 34,4 (C-6), 23,1 (C-7), 32,2 (C-8), 42,5 (C-9), 40,8 (C-10), 20,9 (C-11), 39,6 (C-12), 43,8 (C-13),

75,1 (C-14), 59,8 (C-15), 32,2 (C-16), 51,4 (C-17), 16,1 (C-18), 16,7 (C-19), 56,4 (C-20), 84,5 (C-21), 147,1 (C-22), 121,4 (C-23), 159,8 (C-24).

Helebrigenol (**63**). $R_f = 0,10$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,98 (1H, dd, $J = 9,7$ e $2,6$ Hz, H-22), 7,42 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 6,28 (1H, d, $J = 9,7$ Hz, H-23), 4,25 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-19), 4,8-4,12 (1H, m, H-3), 3,55 (1H, d, $J = 11,2$ Hz, H-19), 2,55 (1H, dd, $J = 9,5$, e $6,1$ Hz, H-17), 0,70 (s, 18- CH_3); RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 20,1 (C-1), 28,2 (C-2), 68,8 (C-3), 37,9 (C-4), 78,8 (C-5), 36,7 (C-6), 25,0 (C-7), 41,8 (C-8), 40,1 (C-9), 43,6 (C-10), 23,0 (C-11), 42,1 (C-12), 86,1 (C-14), 32,8 (C-15), 29,7 (C-16), 52,1 (C-17), 17,2 (C-18), 65,9 (C-19), 124,9 (C-20), 150,5 (C-21), 149,3 (C-22), 115,5 (C-23), 164,8 (C-24).

R.sch 7. $R_f = 0,08$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,94 (dd, $J = 9,8$ e $2,5$ Hz, H-22), 7,44 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-21), 6,28 (d, $J = 9,67$ Hz, H-23), 4,23 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-19), 3,81 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-19), 2,61 (1H, dd, $J = 9,1$ e $6,1$ Hz, H-17), 0,74 (s, 18- CH_3); RMN ^{13}C (75,46 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 24,8 (C-1), 69,0 (C-3), 38,3 (C-4), 78,7 (C-5), 36,7 (C-6), 24,8 (C-7), 41,2 (C-8), 44,7 (C-10), 21,8 (C-11), 85,4 (C-14), 33,0 (C-15), 29,7 (C-16), 51,8 (C-17), 18,4 (C-18), 65,8 (C-19), 124,4 (C-20), 150,6 (C-21), 149,1 (C-22), 115,5 (C-23), 164,7 (C-24).

Modificações químicas dos bufadienólídeos

As modificações compreenderam as seguintes categorias: a) proteção dos grupos hidroxilas secundários dos compostos **20** a **22** e **62**; b) proteção dos grupos hidroxilas terciários dos compostos **20** a **22**; c) abertura do anel 14 β ,15 β -epóxido do composto **20** e d) formação de epóxido no anel lactônico dos compostos **20** a **22**. Adicionalmente, foram feitas a formilação e a oxidação da 3 β -OH marinobufagina (**20**). A caracterização estrutural dos derivados obtidos foi realizada por meio e técnicas espectroscópicas como relatado na seção anterior.

Procedimento geral para a obtenção dos bufadienólídeos monoacetilados.

Bufadienólídeo (0,3-0,1 mmol) foi tratado com anidrido acético (0,6-1,2 mL) e piridina (0,8-1,6 mL) por 24 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi vertida em

água com gelo e extraída com diclorometano por três vezes. Os extratos combinados foram concentrados a um terço do volume e lavados com ácido clorídrico a 5%, salmoura e secos com Na₂SO₄. Após evaporação do solvente, o resíduo foi recristalizado com acetona e hexano, fornecendo os compostos **64** (95%), **65** (96%), **66** (94%) e **67** (94%).

3-Acetato de marinobufagina (**64**). $R_f = 0,40$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 178-183; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3326, 1736, 1636, 1540, 1258; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,78 (1H, dd, $J = 9,8$ e 2,6 Hz, H-22), 7,24 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 6,25 (1H, d, $J = 9,8$ Hz, H-23), 5,22-5,29 (1H, m, H-3), 3,52 (1H, s, H-15), 2,48 (1H, d, $J = 10,2$ Hz, H-17), 2,10 (3H, s, 3-COCH₃) 0,97 (3H, s, 19-CH₃), e 0,71 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 24,2 (C-1), 25,1 (C-2), 71,0 (C-3), 34,9 (C-4), 72,9 (C-5), 33,3 (C-6), 23,0 (C-7), 32,3 (C-8), 42,4 (C-9), 40,6 (C-10), 21,3 (C-11), 39,0 (C-12), 44,8 (C-13), 74,3 (C-14), 59,7 (C-15), 32,0 (C-16), 47,2 (C-17), 16,5 (C-18), 16,6 (C-19), 121,9 (C-20), 149,4 (C-21), 146,8 (C-22), 115,0 (C-23), 161,8 (C-24), 169,2 (3-COCH₃), 21,1(3-COCH₃).

3-Acetato de telocinobufagina (**65**). $R_f = 0,21$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 246-250; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3451, 1723, 1635, 1541, 1244; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7.82 (1H, dd, $J = 9.7$ e 2.6 Hz, H-22), 7.23 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-21), 6.27 (3H, d, $J = 9.7$ Hz, H-23), 5.23-5.27 (1H, m, H-3), 2.47 (1H, dd, $J = 9.6$ e 6.3 Hz, H-17), 2.09 (3H, s, 3-COCH₃), 0.96 (1H, s, 19-CH₃) e 0.70 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 24,4 (C-1), 25,4 (C-2), 71,2 (C-3), 34,1 (C-4), 73,2 (C-5), 35,1 (C-6), 23,8 (C-7), 41,3 (C-8), 39,2 (C-9), 40,6 (C-10), 21,7 (C-11), 40,8 (C-12), 48,1 (C-13), 85,3 (C-14), 32,7 (C-15), 28,6 (C-16), 51,0 (C-17), 16,4 (C-18), 16,7 (C-19), 122,5 (C-20), 148,5 (C-21), 146,6 (C-22), 115,4 (C-23), 162,3 (C-24), 169,4 (3-COCH₃), 21,5 (3-COCH₃).

3-Acetato de bufalina (**66**). $R_f = 0,57$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); $p.f.$: 230-236; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3438, 1707, 1633, 1540, 1243; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7.84 (1H, dd, $J = 9.7$ e 2.6 Hz, H-22), 7.23 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-21), 6.26 (1H, d, $J = 9.7$ Hz, H-23), 5.05-5.10 (1H, m, H-3), 2.46 (1H, dd, $J = 9.52$ e 6.23 Hz, H-17), 2.05 (3H, s, 3-COCH₃), 0.95 (3H, s, 19-CH₃) e 0.70 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ

em ppm): 29,7 (C-1), 28,7 (C-2), 70,3 (C-3), 32,7 (C-4), 36,7 (C-5), 26,3 (C-6), 21,4 (C-7), 42,3 (C-8), 35,1 (C-9), 35,8 (C-10), 21,3 (C-11), 40,8 (C-12), 48,3 (C-13), 85,3 (C-14), 32,7 (C-15), 28,7 (C-16), 51,2 (C-17), 16,5 (C-18), 23,7 (C-19), 122,6 (C-20), 148,5 (C-21), 146,7 (C-22), 115,3 (C-23), 162,4 (C-24), 170,7 (3-COCH₃), 21,5 (3-COCH₃).

3-Acetato de 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**67**). $R_f = 0,49$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); *p.f.*: 148-151; FT-IV (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹): 3439, 1716, 1635, 1543, 1249; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7.91 (1H, dd, $J = 10.3$ e 1.1 Hz, H-22), 5.30 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-21), 6.03 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-23), 5.20-5.26 (1H, m, H-3), 3.55 (1H, s, H-15), 2.25 (2H, $J = 2.5$ e 6.9 Hz, H-17), 2.09 (3H, s, 3-COCH₃), 1.03 (3H, s, 19-CH₃) e 1.00 (3H, s, 18-CH₃); RMN ¹³C (75,46 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 24,3 (C-1), 25,2 (C-2), 71,1 (C-3), 35,1 (C-4), 73,0 (C-5), 33,4 (C-6), 23,1 (C-7), 32,1 (C-8), 42,5 (C-9), 40,7 (C-10), 21,4 (C-11), 39,5 (C-12), 43,7 (C-13), 75,0 (C-14), 59,8 (C-15), 32,1 (C-16), 51,4 (C-17), 16,0 (C-18), 16,7 (C-19), 56,4 (C-20), 84,4 (C-21), 147,7 (C-22), 121,4 (C-23), 159,8 (C-24), 169,4 (3-COCH₃), 20,8 (3-COCH₃).

Procedimento geral para a obtenção dos bufadienólídeos poliacetilados.

Bufadienólídeo (cerca de 0,2 mmol), em diclorometano (5 mL), foi tratado com perclorato de magnésio anidro (0,3 mg, 0,2 mmol%), anidrido acético (1 mL) por duas horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi extraída com diclorometano, lavada com salmoura e neutralizada com sulfito de sódio. A fase orgânica foi lavada novamente com salmoura, seca com sulfato de sódio e concentrada à pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado em coluna dry-flash (sílica gel, 230-400 mesh), resultando na eluição dos compostos **68** (54%), **69** (58%) e **70** (85%).

3,5-diacetato Marinobufagina (**68**). $R_f = 0,53$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,30 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H-21), 7,24 (1H, dd, $J = 9,6$ e $2,6$ Hz, H-22), 6,31 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-23), 5,08-5,13 (1H, m, H-3), 3,81 (1H, d, $J = 6,5$ Hz, H-15), 2,92 (1H, td, $J = 2,1$ e $15,9$ Hz, H-15) 1,99, 1,97 (3H, s, 3-COCH₃ e 5-COCH₃), 0,98 (s, 19-CH₃), 0,61 (s, 18-CH₃).

Telocinobufagina 3,5,14-triacetato (**69**). $R_f = 0,64$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,32 (d, $J = 2,7$ Hz, H-21), 7,27 (dd, $J = 9,9$ e $2,9$ Hz, H-

22), 6,29 (dd, $J = 8,6$ Hz, H-23), 5,09-5,14 (m, H-3), 2,01, 2,00 e 1,99 (s, 3-, 5- e 14-COCH₃), 1,00 (s, 19-CH₃), 0,71 (s, 18-CH₃).

Bufalina 3,14-diacetato (**70**). $R_f = 0,72$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,32 (d, $J = 2,8$ Hz, H-21), 7,28 (dd, $J = 6,3, 3,0$ Hz, 1H), 6,29 (dd, $J = 9,5$ e $3,8$, H-23), 5,03-5,13 (m, H-3), 2,05 e 2,04 (s, 3- e 14-COCH₃), 0,98 (s, 19-CH₃), 0,85 (s, 19-CH₃).

Procedimento geral para a obtenção de 20,21-epoxibufadienólídeos

Bufadienólídeo (0,2 mmol) e tris(acetilacetato)Fe III (160 mg) foi dissolvido em acetonitrila (7 mL) e, sob banho de gelo, peróxido de hidrogênio 30% (0,7 mL) foi adicionado gota-à-gota. A mistura reacional foi mantida sob agitação contínua por doze horas à temperatura ambiente, onde sulfito de sódio foi adicionado. Após filtração, a mistura reacional foi extraída com diclorometano e a fase orgânica lavada com HCl 5%, salmoura, seca com sulfato de sódio e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi cromatografado em sílica gel (230-400 mesh) com gradiente de hexano/acetato de etila para render os compostos **62** (32%), **71** (20%), **72** (23%) e **73** (29%).

20*R*,21*S*-Epoximarínobufagina (**71**). $R_f = 0,42$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm): 7,85 (1H, dd, $J = 10,3$ e $1,1$ Hz, H-22), 5,23 (1H, d, $J = 1,1$ Hz, H-21), 5,97 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-23), 4,09-4,14 (1H, m, H-3), 3,47 (1H, s, H-15), 2,20 (2H, $J = 2,5$ e $6,9$ Hz, H-17), 0,95 (3H, s, 18-CH₃) e 0,91 (3H, s, 19-CH₃).

Preparação de 3-Oxo-5 β -hidróxi-14 β ,15 β -epóxi-bufa-20,21-enolídeo (**74**)

Marínobufagina (**20**, 64,1 mg, 0,16 mmol) em 2,5 mL de diclorometano anidro foi adicionada a uma solução de PCC (90 mg, 0,42 mmol) em 2,5 mL de diclorometano anidro. A mistura reacional foi mantida em agitação, sob atmosfera de nitrogênio e temperatura ambiente, até que toda a matéria-prima fosse consumida (2h). Ao final desse tempo, 1,0 g de sílica-gel foi adicionado à mistura reacional e a suspensão foi filtrada. O filtrado foi lavado sucessivamente com bissulfito de sódio 15% e salmoura. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, concentrada em rotaevaporador, para fornecer um óleo viscoso, que cromatografado em sílica-gel, eluído com hexano –

acetato de etila (1:1) para fornecer 42,3 mg (0,11 mmol, 69%) de 3-oxo-marinobufagina (marinobufagona) **74**. $R_f = 0,40$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); IV (Filme) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3.455, 3.019, 2.930, 1.716, 1.635, 1.538, 1.448, 1.215, 756 e 668; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): RMN ^{13}C (75,46 Hz, CDCl_3 , δ em ppm): 30,8 (C-1), 49,1 (C-2), 210,8 (C-3), 37,2 (C-4), 77,8 (C-5), 35,2 (C-6), 23,7 (C-7), 32,6 (C-8), 43,1 (C-9), 40,4 (C-10), 21,5 (C-11), 39,1 (C-12), 45,0 (C-13), 74,3 (C-14), 59,7 (C-15), 32,2 (C-16), 47,4 (C-17), 15,9 (C-18), 16,7 (C-19), 122,0 (C-20), 149,6 (C-21), 146,8 (C-22), 115,3 (C-23), 161,9 (C-24).

Procedimento geral para a obtenção de 3-O-formil-bufadienolídeos.

Bufadienolídeo (0,01-0,05 mmol) foi tratado com ácido fórmico concentrado (1,2 mL) e piridina (1 mL) por 24 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi diluída diclorometano (20 mL) lavada com ácido clorídrico a 5%, salmoura e seco com Na_2SO_4 . Após evaporação do solvente, o resíduo foi cromatografado em coluna de sílica-gel, fornecendo 19 mg de marinobufagina 3-formiato (**75**, 46%), 12 mg de telocinobufagina 3-formiato (**76**, 30%), 21 mg de bufalina 3-formiato (**77**, 50%) e 9 mg de 20S,21R-epoximarinobufagina formiato (**78**, 47%).

3-Formiato de telocinobufagina (**76**). $R_f = 0,32$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,82 (dd, $J = 9,8$ e 2,6 Hz, H-22), 7,23 (d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 6,27 (d, $J = 9,7$, H-23), 5,40 (s, H-3), 0,97 (s, 19- CH_3), 0,71 (s, 18- CH_3), 8,09 (s, 3- CHO).

3-Formiato de bufalina (**77**). $R_f = 0,66$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,84 (dd, $J = 9,7$ e 2,6 Hz, H-22), 7,23 (d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 6,26 (d, $J = 9,7$ Hz, H-23), 5,21-5,26 (m, H-3), 2,46 (dd, $J = 9,5$ e 6,3 Hz, H-17), 0,95 (s, 19- CH_3), 0,70 (s, 18- CH_3), 8,06 (s, 3- CHO); RMN ^{13}C (75,46 Hz, CDCl_3 , δ em ppm): 30,4 (C-1), 30,3 (C-2), 70,5 (C-3), 32,7 (C-4), 36,7 (C-5), 26,3 (C-6), 21,4 (C-7), 42,3 (C-8), 35,9 (C-9), 35,1 (C-10), 21,3 (C-11), 40,8 (C-12), 48,3 (C-13), 85,3 (C-14), 32,7 (C-15), 28,7 (C-16), 51,2 (C-17), 16,5 (C-18), 23,7 (C-19), 122,6 (C-20), 148,5 (C-21), 146,8 (C-22), 115,3 (C-23), 162,4 (C-24), 160,8 (3- CHO).

3-Formiato de 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**78**). $R_f = 0,57$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,91 (dd, $J = 10,3$ e $1,8$ Hz, H-22), 6,05 (dd, $J = 10,3$ e $3,7$ Hz, H-23), 5,74 (s, H-21), 5,41-5,37 (m, H-3), 3,54 (d, $J = 9,0$ Hz, H-15), 1,02 (s, 1H), 1,00 (s, 1H), 8,08 (s, 1H).

Abertura do epóxido da marinobufagina (**20**)

Marinobufagina (**20**, 230 mg, 0,27 mmol) dissolvida em acetona (6 mL) foi tratada com ácido perclórico 70% (0,1 mL) por 2 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi vertida em água com gelo e extraída com diclorometano. O extrato foi lavado com salmoura e a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo (219 mg) foi cromatografado em coluna de sílica-gel (70-230 mesh) com hexano/acetato de etila eluiu os compostos **79** (89 mg, 39%), **80** (18 mg, 8%), **81** (11 mg, 5,0 %) e **82** (16 mg, 7,0%).

Composto **79**. $R_f = 0,34$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,32 (d, $J = 2,6$ Hz, H-21), 7,26 (dd, $J = 9,7$ e $2,7$ Hz, H-22), 6,35 (d, $J = 9,6$ Hz, H-23), 4,14-4,19 (s, H-3), 0,96 (s, 19- CH_3), 0,64 (s, 18- CH_3); RMN ^{13}C (75,46 Hz, CDCl_3 , δ em ppm): 25,3 (C-1), 28,0 (C-2), 68,1 (C-3), 37,3 (C-4), 75,0 (C-5), 35,3 (C-6), 27,1 (C-7), 31,8 (C-8), 43,5 (C-9), 41,0 (C-10), 20,9 (C-11), 38,8 (C-12), 43,5 (C-13), 65,3 (C-14), 221,9 (C-15), 37,6 (C-16), 46,6 (C-17), 14,0 (C-18), 17,3 (C-19), 116,2 (C-20), 149,3 (C-21), 144,5 (C-22), 116,3 (C-23), 161,7 (C-24).

Composto **80**. $R_f = 0,42$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,27 (d, $J = 3,0$ Hz, H-21), 7,20 (dd, $J = 9,7$ e $2,7$ Hz, H-22), 6,35 (d, $J = 9,6$ Hz, H-23), 4,16-4,20 (s, H-3), 0,93 (s, 19- CH_3), 0,89 (s, 18- CH_3).

Composto **81**. $R_f = 0,66$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,33 (d, $J = 2,5$ Hz, H-21), 7,27 (dd, $J = 9,8$ e $2,5$ Hz, H-22), 6,35 (d, $J = 9,5$ Hz, H-23), 5,93 (dd, $J = 9,9$, $2,0$ Hz, 1H), 5,40 (dd, $J = 5,0$, $3,0$ Hz, 1H), 0,95 (s, 19- CH_3), 0,68 (s, 18- CH_3).

Composto **82**. $R_f = 0,47$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,32 (d, $J = 2,6$ Hz, H-21), 7,27 (dd, $J = 9,6$, $2,7$ Hz, H-22), 6,34 (dd, $J = 9,6$ Hz, H-23), 5,37 (dd, $J = 7,29$, $1,83$ Hz, 1H), 1,00 (s, 19- CH_3), 0,65 (s, 18- CH_3).

Tratamento da marinobufagina (20) com trióxido de crômio em ácido acético.

Marinobufagina (**20**, 80 mg, 0,2 mmol) em ácido acético (1,8 mL) foi adicionada a uma solução composta por ácido acético (0,2 mL), água (0,2 mL) e trióxido de crômio (20 mg). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente por 2 h onde, então, o excesso de trióxido de crômio foi reduzido pela adição de metanol. A mistura foi diluída em água e extraída com diclorometano (3x 10 mL). Os extratos combinados foram reduzidos à metade, onde foram lavados com bicarbonato de sódio, salmoura e secos com sulfato de sódio. A fase orgânica (82 mg) foi concentrada e o resíduo cromatografado em coluna de sílica-gel com hexano-acetato de etila, rendo os compostos **83** (28 mg, 35 %), **84** (9 mg, 11 %) e **85** (11 mg, 14 %).

Composto **83**. $R_f = 0,47$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,90 (dd, $J = 10,3, 1,2$ Hz, H-22), 6,05 (d, $J = 10,3$ Hz, H-23), 5,74 (d, $J = 1,4$ Hz, H-16), 5,30 (d, $J = 1,15$ Hz, H-21), 3,52 (s, H-15), 1,21 (s, 19- CH_3), 1,07 (s, 18- CH_3)

Composto **84**. $R_f = 0,62$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,74 (dd, $J = 9,78, 2,65$ Hz, H-22), 7,23 (dd, $J = 2,60, 0,90$ Hz, H-21), 6,23 (dd, $J = 9,75, 1,01$ Hz, H-23), 5,72 (d, $J = 0,66$ Hz, 1H), 5,28 (s, 1H), 3,47 (s, H-15), 1,20 (s, 19- CH_3), 0,81 (s, 18- CH_3).

Composto **85**. $R_f = 0,40$ (hexano-acetato, 1:9, v:v); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm): 7,75 (dd, $J = 9,71, 2,56$ Hz, H-22), 7,24 (d, $J = 2,40$ Hz, H-21), 6,24 (dd, $J = 9,75, 0,98$ Hz, H-23), 5,28 (s, 1H), 3,53 (s, H-15), 1,02 (s, 19- CH_3), 0,80 (s, 18- CH_3).

Avaliação da citotoxicidade

Linhagens celulares e meio de cultura

Linhagens celulares humanas de MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (colón), HL60 (leucemia) e SF295 (glioblastoma) foram todas obtidas de Mercy Children's Hospital (U.S.A.). As células foram mantidas, à 37°C sob atmosfera de CO_2 5%, em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino 10%, 2 nM de glutamina, 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de penicilina, 100 mg. mL^{-1} de estreptomicina. As células foram diluídas no meio completo

um dia antes de cada experimento, exceto para as células HL-60 que foram diluídas no mesmo dia do experimento. Sangue heparinizado (de doador saudável, não fumante, não medicado há pelo menos 15 dias antes da amostragem) foi coletado e linfócitos sanguíneos periféricos (PBLs) foram isolados pelo método padrão de centrifugação gradiente-densidade, em Histopaque-1077. PBLs foram lavadas e ressuspensas, à 37°C e sob atmosfera de CO₂, em meio RPMI 1640 suplementado em soro fetal bovino 20 %, 2 mM de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 100 mg.mL⁻¹ de estreptomicina. Fitoemaglutinina (2%) foi adicionado ao início da cultura e, após 24 h, as células foram tratadas com os compostos a serem testados.

Inibição da proliferação celular

PBLs e as células tumorais foram quantificadas quanto à capacidade de reduzir o corante amarelo brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiozolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) ao formazan púrpura.⁸⁴ Para os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços em concentrações de 4.10⁵ (PBLs), 1.10⁵ (HL60, SF295 e MDAMB435) e 7.10⁴ (HCT-8) células.mL⁻¹ em 0,2 mL de meio de cultura por poço. Após 24h, as amostras (0,0002 to 5 mg.mL⁻¹), dissolvidas em DMSO (0,1%), foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 h. DMSO (0,1%) e doxorubicina (Doxolem®, 0,016 a 18,39 mM) foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Em seguida, as placas foram centrifugadas e então o meio foi substituído por meio fresco (150 µL) contendo MTT à 0.5 mg.mL⁻¹. Três horas mais tarde, o produto MTT formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida usando um leitor multiplaca (Beckman Coulter® DTX-880). O efeito inibitório foi quantificado como a porcentagem da absorbância do corante controle reduzido à 595 nm. O CI₅₀ e seus intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por regressão não-linear usando o programa GRAPHPAD (Intuitive Software for Science, San Diego, CA).

Danos ao DNA e formação de espécies reativas de oxigênio

Para avaliar a potencial citotoxicidade dos bufadienólídeos, helebrigenina foi testada contra células de leucemia promielocítica humana (HL-60). A citotoxicidade foi avaliada

⁸⁴ Mosman, T. J. *Immunol. Methods*, **1983**, *16*, 55.

pelo método MTT após 24 h de exposição. A viabilidade celular e a indução de apoptose da helebrigenina foram observadas pelas alterações morfológicas das células tratadas utilizando o ensaio de coloração laranja de acridina/brometo de etídeo/hematoxilina-eosina. Estudos por citometria de fluxo foram conduzidos para determinar o envolvimento da helebrigenina com formação de espécies reativas de oxigênio durante a indução de apoptose. Adicionalmente, o ensaio Comet foi realizado para o efeito da substância testada na integridade do DNA das células HL-60.

Atividade Hemolítica

O ensaio hemolítico dos compostos foi realizado em placas de 96 poços, segundo o método previamente descrito.⁸⁵ Uma suspensão de eritrócitos (camundongos Swiss) foi preparada usando sangue (0,8 a 1,0 mL por animal) coletado do plexo reto-orbital, onde foi lavado duas vezes com solução salina contendo 10 mM de CaCl₂. Cada poço recebeu 50 µL de solução a 0,85% de NaCl contendo 10 mM CaCl₂. O primeiro poço representou o controle negativo (DMSO 1%). NO Segundo poço, 50 µL da substância teste e (1 mg mL⁻¹) e 50 µL de DMSO (1%) foram adicionados. Os compostos foram testados à concentração de que variaram de 1,56 a 50 µg.mL⁻¹. Os compostos foram diluídos seriadamente com NaCl 0.85% até o décimo primeiro poço na mesma linha. O último poço recebeu 50 µL Triton X-100 0.2% (em salina) para obter 100% de hemólise (controle positivo). Cada poço então recebeu 100 µL de uma suspensão a 2% de eritrócitos de camundongo em salina contendo CaCl₂ 10 mM. Após incubação, à temperatura ambiente por 1 h e centrifugação, o supernadante foi transferido para uma nova placa e a hemoglobina liberada foi medida usando uma leitora multiplaca (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada) a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

⁸⁵ Berlink, R. G. S.; Ogawa, C. A.; Almeida, A. M. P.; Andrade, M. A. S.; Malpezi, E. L. A.; Costa, L. V.; Hadju, E. M.; Freitas, J. C. *Com. Biochem. Physio., C, Toxicol.*, **1996**, 115, 155.

Avaliação da atividade Inibitória da Na⁺/K⁺-ATPase

Preparação membranar de tecidos de mamíferos

Os homogenatos dos tecidos foram preparados como previamente descrito.⁸⁶ Os rins e cérebros foram mantidos a 4°C durante todas as etapas do procedimento. Os órgãos foram homogeneizados em um Potter com solução de sacarose tamponada (sacarose-HOM), na proporção de 3 mL.g⁻¹ de tecido. O homogeneizado foi então submetido a tratamento caotrópico, o qual consistiu em incubação na presença de altas concentrações de KI (4%) sob agitação constante por 1 h, na proporção de 1:1. Em seguida foi adicionada água deionizada gelada na proporção de 1,5 mL/mL de homogeneizado. Esta suspensão foi submetida a três centrifugações de 1 h a 100.000g sendo os dois primeiros sedimentos ressuspensos em sacarose-HOM e o último ressuspensão em sacarose-DOC, na proporção de 10 mL.g⁻¹ de tecido, permanecendo em freezer a -18 °C, durante uma noite. Após este período, o homogeneizado foi descongelado à temperatura ambiente e submetido a centrifugações diferenciais. Os sedimentos finais foram ressuspensos em 0,5 e 0,2 mL.g⁻¹ de tecido.

Inibição da Atividade Na⁺/K⁺-ATPase

Foram realizadas curvas de inibição com concentrações crescentes de bufadienólídeos em preparações membranares de rim de rato (isoforma $\alpha 1/\beta 1$) e de hemisférios cerebrais de rato, como previamente descrito.⁸⁷ A reação se iniciou pela adição da enzima em meio contendo NaCl 87,6mM, KCl 3mM, MgCl₂ 3mM, ATPNa₂ 1,2 mM, EGTA 1mM, Azida 10mM e tampão maleato-Tris 20mM (pH 7,4 37°C) e foi finalizada pela adição da solução de Fiske & Subbarow gelada. A leitura da reação colorimétrica foi feita em espectrofotômetro à 650 nm.

⁸⁶ Lopez, L. B.; Quintas, L. E. M.; Noël, F. *Comp. Biochem. Physiol., A, Mol. Integr. Physiol.*, **2002**, *131*, 323.

⁸⁷ Poças, E. S. C.; Touza, N. A.; da Silva, A. J. M.; Costa, P. R. R.; Noel, F. *Life Sciences*, **2007**, *81*, 1199.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa-Neto E. M. *Ann. Braz. Acad. Sci.* **2005**, *77*, 33.
2. Isbister, G. K.; Kiernan, M. C. *Lancet Neurol.*, **2005**, *4*, 219.
3. Rejandra, W.; Armugam, A.; Jeyasseelan, K. *Toxicon*, **2004**, *44*, 1.
4. Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. *Química Nova*, **2002**, *25*, 45.
5. a) Daly, J. W.; Secunda, S. I.; Garrafo, H. M.; Spande, T. F.; Wisnieski, A.; Cover Jr, J. F. *Toxicon*, **1994**, *32*, 657; b) Toledo, R. C.; Jared, C. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, *111*, 1; c) Harbone, J. B. *Nat. Prod. Rep.*, **1999**, *16*, 509; d) Zimmer, R. K.; Butman, C. A. *Chem. Bull.* **2000**, *198*, 168; e) Pukala, A. L.; Bowie, H. J.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. J. *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 368
6. Calaby, J. H.; In: *Venomous Animals and their Venoms*; Bucherl, W.; Buckley, E. E.; Delofeu, V., eds., Academic Press: New York, **1968**, cap. 1.
7. Plater, G.; Martin, R. L.; Milburn, P. J. *Toxicon*, **1995**, *33*, 157.
8. a) Plater, G.; Martin, R. L.; Milburn, P. J. *Toxicon*, **1998**, *36*, 847; b) Torres, A. M.; Wang, X. H.; Fletcher, J. I.; Alewood, D.; Alewood, P. F.; Smith, R.; Simpson, R. J.; Nicholson, G. M.; Sutherland, S. K.; Gallagher, C. H.; King, G. F.; Kuchel, P. W. *Biochem. J.*, **1999**, *341*, 785; c) Kourie, J. I., *J. Membrane Biol.*, **1999**, *172*, 37; d) Torres, A. M.; Tsampazi, M.; Tsampazi, C.; Kennett, E. C.; Belov, K.; Geraghty, D. P.; Bansal, P. S., Alewood, P. F.; Kuchel, P. W. *FEBS Letters*, **2006**, *580*, 1587; e) Koh, J. M. S.; Bansal, P. S.; Torres, A. M.; Kuchel, P. W. *Austral. J. Zool.*, **2009**, *57*, 203.
9. Kita, M.; Nakamura, Y.; Okumura, Y.; Ohdachi, S. D.; Oba, Y.; Yoshikuni, M.; Kido, H.; Uemura D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 7542.
10. a) Datta, G.; Tu, a. T. *J. Peptide Res.*, **1997**, *50*, 443; b) Aminetzach Y. T.; Srouji, J. R.; Kong, C. Y.; Hoekstra, H. E. *Curr. Biol.*, **2009**, *19*, 1925.
11. a) Dumbacher, J. P.; Beehler, B. M.; Spande, T. F.; Garrafo, H. M.; Daly, J. W. *Science*, **1992**, *258*, 799; b) Daly, J. W.; Secunda, S. I.; Garrafo, H. M.; Spande, T. F.; Wisnieski, A.; Cover Jr, J. F. *Toxicon*, **1994**, *32*, 657; c) Dumbacher, J. P.; Spande, T. F.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 12970.
12. a) Dumbacher, J. P.; Wako, A.; Derrickson, S. R.; Samuelson, A.; Spande, T. F.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 15857; b) Jønsson, K. A.; Bowie, R. C. K.; Norman, J. A.; Christidis, L.; Fjeldså, J. *Bioll. Lett.*, **2008**, *4*, 71.
13. a) Livett, B. G., Sandal, D. W., Keays, D., Down, J., Gayler, K. R., Satkunanathan, N., Khalil, Z. *Toxicon*, **2006**, *48*, 810; b) Mortari, M. R., Cunha A. O. S., Ferreira L. B., Santos, W. F. *Pharmacol. Therap.*, **2007**, *114*, 171; c) Mirshafiey, M. *Neuropharmacology*, **2007**, *53*, 353.
14. a) Rocha e Silva, M.; Beraldo, W. T.; Rosenfeld, G.; *Am. J. Phys.* **1949**, *156*, 261; b) Ferrera, S. H., *Brit. J. Pharmacol.* **1965**, *24*, 163; c) Ferreira, S. R.; Bartelt, D. C.; Greene, L. J. *Biochemistry*, **1970**, *9*, 2583.
15. a) Ondetti, M. A.; Cushman, D. V.; In Soffer, R. L. (Ed.) Wiley, New York, **1981**, 165, citado em Hyashi, M A. F.; Camargo, A. C. M. *Toxicon*, **2005**, *45*, 1163.
16. a) O'Rourke, M.; Chen, T.; Hirst, D. G.; Rao, P.; Shaw, C. *Regul. Pept.*, **2004**, *121*, 65.
17. a) Moore, K. S.; Wehrli, S.; Roder, H.; Rogers, M.; Forrest, J. N.; Mccrimmon, D.; Zasloff, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 1354; b) Kikuchi, K.; Bernard, E. M.; Sadowic, A.; Regen, S. L.; Armstrong, D. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **1997**, *41*, 1433; c) Herbst, R. S.; Hammond, L. A.; Carbone, D. P.; Tran, H. T.; Holroyd, K. J.; Desai, A.; Williams, J. I.; Bekele, B. N.; Hait, H.; Allgood, V.; Solomon, S.; Schiller, J.

- H. *Clinic. Canc. Res.*, **2003**, 9, 4108; d) Sills, A. K.; Williams, J. I.; Tyler, B. M.; Epstein, D. S.; Sipos, E. P.; Davis, J. D.; McLane, M. P.; Pitchford, S.; Cheshire, K.; Cannon, F. H.; Kinney, W. A.; Chao, T. L.; Donowitz, M.; Latterra, J.; Zasloff, M.; Brem, H. *Cancer Res.*, **1998**, 58, 2784.
18. a) Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem*, **2002**, 45, 5447; b) Cunha-Filho, G. A.; Schwartz, C. A.; Resck, I. S.; Murta, M. M.; Lemos, S. S.; Castro, M. S.; Kyaw, C.; Pires Jr, O. P.; Leite, J. R. S.; Bloch Jr, C. E Schwartz, E. F. *Toxicon*, **2005**, 45, 777.
19. a) Tsuda, K.; Kawamura, M.; Zasshi, Y. *J. Pharm. Soc. Japan*, **1952**, 72, 771; b) Pires Jr., O. R.; Sebben, A.; Schwartz, E.F.; Largura, S. W. R.; Bloch, C.; Morales, R. A. V.; Schwartz, C. A. *Toxicon*, **2002**, 40, 761;
20. a) Marcil, J.; Walczac, J. S.; Guindon, J.; Ngoc, A. H.; Lu, S.; Beaulieu, P. *Brit. J. Anaesth.*; **2006**, 96, 761; b) <http://www.wexpharma.com/products/index.htm>, acessado em 05 de abril de 2010.
21. a) Spande, T. F.; Garraffo, H. M.; Edwards, M. W.; Yeh, H. J. C.; Pannell, L.; Daly, J. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3475; b) Bannon, A. W.; Decker, M. W.; Holladay, M. W.; Curzon, P.; Donnelly-Roberts, D.; Puttfarcken, P. S.; Bitner, R. S.; Diaz, A.; Dickenson, A. H.; Porsolt, R. D.; Williams, M.; Arneric, S. P. *Science*, **1998**, 279, 77.
22. Lazarus, L. H., Attila, M. *Prog. Neurobio.*, 1993, 41, 473.
23. Frost, D. R. 2010. Amphibian species of the world: an online reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA. Acessado em 20 de abril de 2010.
24. a) Schwartz, E. N. F.; Schwartz, C. A.; Sebben, A.; Largura, S. W. R.; Mendes, E. G. *Toxicon*, **1999**, 37, 47; b) Schwartz, E. F.; Stucchi-Zucchi, A.; Schwartz, C. A.; Salomão, L. C. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **2003**, 36, 1279.
25. a) Yasumoto T.; Yotsu, M.; Murata, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 2344; b) Mebs, D.; Pogoda, W. *Toxicon*, **2005**, 45, 603.
26. Erspamer, V. **1994**, In: Heatwole, H.; Barthalmus, G. T.; Heatwole, A.Y. ed. *Amphibian Biology*, **1994**.
27. Barthalmus, G. T. In: Heatwole, H.; Barthalmus, G. T.; Heatwole, A.Y. ed. *Amphibian Biology*, **1994**.
28. a) Clark, B. T. *Biol. Biol. Rev.*, **1997**, 72, 365; b) Sebben, a.; Schwartz, C. A.; Cruz, J. S. *Ciência Hoje*, **1993**, 15, 25
29. Steyn, P. S. e Heerden, F.V. *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, 15, 397.
30. Oliveira, C. R. **2002**. Biologia Animal - Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília-DF
31. a) Saporito, R. A.; Garraffo, H. M.; Donnelly, M. A.; Edwards, A. L.; Longino, J. T.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Am. Soc.*, **2004**, 101, 8045; b) Saporito, R. A.; Donnelly, M. A.; Norton, R. A.; Garraffo, H. M.; Spand, T. F.; Daly, J. W. *Proc. Natl. Am. Soc. USA*, **2007**, 104, 8885.
32. a) Daly, J. W.; Spand, T. F.; Garraffo, H. M. *J. Nat. Prod.*, 2005, **68**, 1556; b) Mcfoy, C.; Danosus, D.; Sandit, R.; Jones, T. H.; Garrafo, H. M.; Spande, T. F.; Daly, J. W. *Z. Naturforsch.*, **2005**, 60c, 932.
33. a) Lazarus, L. H., Attila, M. *Prog. Neurobio.*, **1993**, 41, 473; b) Zhao, y.; Jina, Y.; Wei, S. S.; Lee, Y. H. Zhang, Y. *Toxicon*, **2005**, 46, 635; c) Kawasaki, H. ;Isaacson, T.; Iwamuro, S.; Conlon, J. M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **2003**, 312, 1082;

34. a) Barra, D., Mignogna, G., Simmaco, M., Pucci, P., Severini, C., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Erspamer, V. *Peptides*, **1994**, 15, 199; b) Melchiorri, P.; Negri, L. *Gen. Pharmac.*, **1996** 27, 1099; c) Negri, L.; Melchiorri, P. e Lattanzi, R. *Peptides*, **2000**, 21, 1639; d) Barra, D., Mignogna, G., Simmaco, M., Pucci, P., Severini, C., Falconieri-Erspamer, G., Negri, L., Erspamer, V. *Peptides*, **1994**, 15, 199; e) Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri-Erspamer, G.; Negri, L.; Corsi, R.; Severini, C.; Barra, D.; Simmaco, M. Kreil, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 5188; f) Labuz, D.; Chocyk, A.; Wedzony, K.; Toth, G. e Przewlocka, B. *Life Sci.*, **2003**, 73, 403; g) Pukala, A. L.; Bowie, H. J.; Maselli, V. M.; Musgrave, I. F.; Tyler, M. *J. Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 368.
35. a) Fuchs, P. C.; Barry, A. L.; Brown, S. D. *Ant. Ag. Chemother.*, **1998**, 42, 1213; b) Ge, Y.; Macdonald, D. L.; Holroyd, K. J.; Thornsberry, C.; Wexler, H.; Zasloff, M. *Antimic. Ag. Chem.*, **1999**, 43, 782; c) Pál, T.; Sonnevend, A.; Galadari, S.; Conlon, J. M. *Regul. Pept.*, **2005**, 129, 85.
36. a) Ardelt, W.; Mikulski, S. M.; Shogen, K. *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 245; b) Saxena, S. K.; Gravell, M.; Wu, Y.N.; Mikulski S. M.; Shogen, K.; Ardelt, W.; Youle, R. J. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 20783; c) Alfacell Corporation. *Drugs Res. Develop.*, **2007**, 8, 120.
37. Cruz, J.S.; Matsuda, H. *Eur. J. Pharmacol.*, **1993**, 239, 223.
38. a) Daly, J. W.; Noimai, N.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.; Wilham, J. M.; Garraffo, H. M.; Kaneko, T.; Spande, T. F.; Nimit, Y.; Nabhitabhata, J.; Chan-Ard, T. *Toxicon*, **2004**, 44, 805; b) Mebs, D.; Pogoda, W.; Maneyro, R.; Kwet, A. *Toxicon*, **2007**, 46, 641.
39. a) Krenn, L.; Koop, B. *Phytochemistry*, **1998**, 48, 1; b) Steyn, P. S.; Heerden, F. V. X. *Nat. Prod. Rep.*, **1998**, 15, 397; c) Hutchinson, D.A.; Mori, A.; Savitzky, A.H.; Burghardt, G.M.; Wu, X.; Meinwald, J.; Schroeder, F.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2007**, 104, 2265.
40. Eisner, T., Wiemer, D.F., Haynes, L.W., Meinwald, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1978**, 75, 905;
41. Wu, P.-L.; Hsu, Y.-L., Wu, T.-S., Bastow, K. F.; Lee, K.-H. *Org. Lett.*, **2006**, 8, 5207.
42. Taniguchi, M.; Kubo, I. *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1539.
43. Crouch, N.R., Toit, K., Mulholland, D.A., Drewes, S.E. *Phytochemistry*, **2006**, 67, 2140.
44. Zhao, y.; Jina, Y.; Wei, S. S.; Lee, Y. H. Zhang, Y. *Toxicon*, **2005**, 46, 635.
45. a) Verpoorte, R.; Phan, Q. K., Svendsen, A. B. *J. Nat. Prod.*, **1980**, 43, 347; b) Shimada, K.; Ishii, N.; Nambara, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1986**, 34, 3454; c) Shimada, K., Sato, Y., Nambara, T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 2300.
46. Kamano, Y.; Yamamoto, H.; Hatayama, K.; Tanaka, Y.; Shinohara, M.; Komatsu, M. *Tetrahedron Lett*, **1968**, 9, 5669.
47. Kupchan, S. M., Moniot, J. L., Sigel, C. W., Hemingway, R. J. *J. Org. Chem.*, **1971**, 36, 2611.
48. a) Shimada, K.; Sato Y.; Nambara T. *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, 35, 2300; b) Matsukawa, M.; Mukai, T., Akizawa, T.; Miyatake, S.; Yoshioka, M.; Morris, J. F.; Butler-Jr, V. P. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1476; c) Gao, H.; Zehl, M.; Leitner, A.; Wu, X.; Wang, Z.; Kopp, B. *J. Ethnopharm.*, **2010**, in press, doi:10.1016/j.jep.2010.07.017.
49. a) Santa-Coloma. T. A.; Garraffo, H. M.; Pignataro, O. P.; Charreau, E. H.; Gros, E. G.; *Steroids*, **1984**, 44, 11; b) Osuch, V.; Chen, C. *Biochem. Pharmacol.*, **1969**, 44, 1803; c) Garrafo, H. M.; Gros, E. G. *Steroids*, **1986**, 48, 251; d) Dmitrieva, R.I.; Bagrov, A.Y.; Lalli, E.; Sassone-Corsi, P.; Stocco, D.M.; Doris, P.A. *Hypertension*, **2000**, 36, 442.

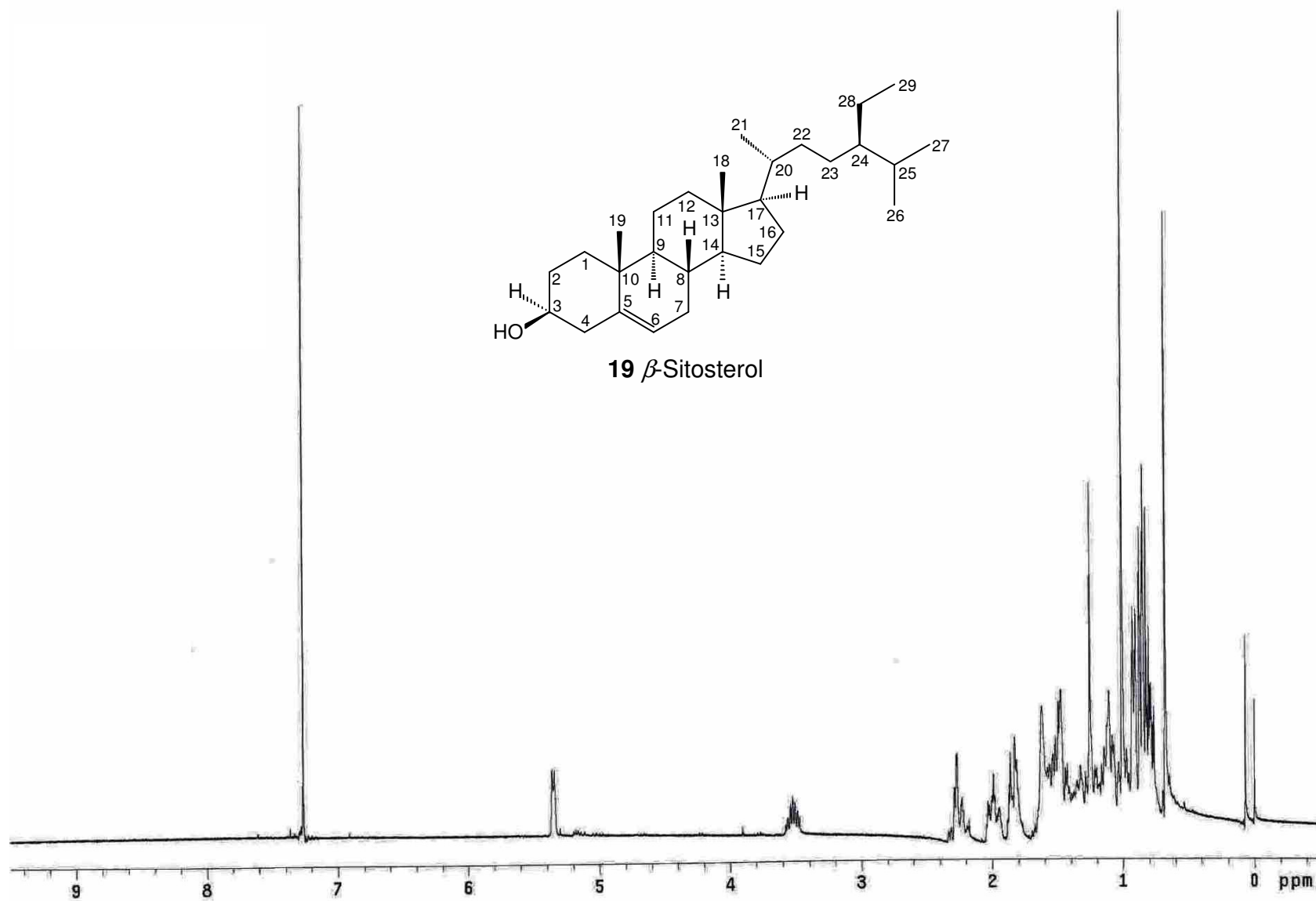
50. Kabat, M. M.; Kurek, A.; Wicha, J. *J. Org. Chem.*, **1983**, *48*, 4248.
51. a) Pettit, G. R.; Kamano, Y. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2632; b) Pettit, G. R.; Kamano, Y. *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 3003.
52. Pettit, G. R.; Kasturi, T. R.; Knight, J. C.; Occolowitz, J. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 1404.
53. Pettit, G. R.; Houghton, L. E.; Knight, J. C.; Bruschiweiler, F. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 2895.
54. a) Kamano, Y. *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, *17*, 1711; b) Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Bruschiweiller, F.; Brown, P. *J. Org. Chem.*, **1971**, *36*, 3736; c) Kamano, Y.; Kumon, S.; Arai, T.; Komatsu, M. *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, *21*, 1960; d) Kamano, Y.; Pettit, G. R. *Can. J. Chem.*, **1973**, *51*, 1973; e) Kamano, Y.; Pettit, G. R. *Chem. Pharm. Bull.*, **1973**, *21*, 895.
55. a) Nogawa, T.; Kamano, Y.; Yamashita, A.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1148; b) Kamano, Y.; Nogawa, T.; Yamashita, A.; Hayashi, M.; Inoue, M.; Drasar, P.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1001.
56. Ye, M., Han, J., An, D., Tu, G., Guo, D. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8947.
57. a) Ma, X.-C.; Xin, X.-L.; Liu, K.-X.; Han, J.; Guo, D.-A. *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1268; b) Ma, X.-C.; Zheng, J.; Guo, D.-A. *Enz. Mic. Tech.*, **2007**, *40*, 1585.
58. a) Zhao, J.; Guan, S. H.; Chen, X. B.; Wang, W.; Ye, M.; Guo, D. A. *Chin. Chem. Lett.*, **2007**, *18*, 1316; b) Ye, M.; Dai, J.; Guo, H.; Cui, Y.; Guo, D. A. *Tet. Lett.*, **2002**, *43*, 8535.
59. a) Supratman, U.; Fujita, T.; Akiyama, K.; Hayashi, H. *Phytochem.*, **2001**, *58*, 311; b) Almeida-Amaral, E. E.; Caruso-Neves, C.; Lara, L. S.; Pinheiro, C. M.; Meyer-Fernandes, J. R. *Exp. Parasit.*, **2006**, *116*, 419; c) Bagrov, A. Y.; Shapiro, J. I.; Fedovora, O. V. *Pharm. Rev.*, **2009**, *61*, 9.
60. Wasserstrom, J. A.; Aisprut, G. L. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2005**, *289*, H1781.
61. a) Fedorova, O. V.; Kolodkin, N. I.; Agalakova, N. I.; Lakatta, E. G.; Bagrov, A. Y. *Hypertension*. **2001**, *37*, 462; b) Fedorova, O. V.; Talan, M.; Agalakova, N. I.; Lakatta, E. G.; Bagrov. *Circulation*, **2002**, *105*, 1122; c) Kennedy, D. J., Vetteth, S., Periyasamy, S. M.; Kanj, M.; Fedorova, L.; Khouri, S.; Kahaleh, M. B.; Xie, Z.; Malhotra, D.; Kolodkin, N. I.; Lakatta, E. G.; Fedorova, O. V.; Bagrov, A.Y.; Shapiro, J. I. *Hypertension*, **2006**, *47*, 488.
62. a) Vu, H., Ianosi-Irimie, M.; Danchuk, S.; Rabon, E.; Nogawa, T.; Kamano, O.; Pettit, G. R.; Wiese, T.; puschett, J. B. *Exp Biol Med*, **2006** *231*, 215; b) Kashkin, V. A.; Bagrov, A. Y.; Fedovora, O. V.; Bagrov, Y. Y.; Agalakova, N. I.; Patkina, N. A.; Zvartau, E. E. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **2002**, *12*, 217.
63. Lichtstein, D.; Gati, I.; Haver, E.; Katz, U. *Life Science.*, **1992**, *51*, 119.
64. Liu, Y.; Xiao, Y.; Xue, X.; Zang, X.; Liang, X. *Rapid. Commun. Mass. Spectr.*, **2010**, *24*, 667.
65. Hayes, R. A.; Piggot, A. M.; Dalle, K.; Capon, R. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 1790.
66. Hashimoto, S.; Jing, Y.; Kawazoe, N.; Masuda, Y.; Nakajo, S.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y; Nakaya, K. *Leuk. Res.* **1997**, *21*, 875.
67. a) Hayashi, M.; Rho, M.-C.; Fukami, A.; Enomoto, A.; Nonaka, S.; Sekiguchi, Y.; Yanagisawa, T.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Kamano, Y.; Komiyama, K.; *J. Pharm. Exp. Therap.* **2002**, *303*, 104; b) Enomoto, A.; Rho, M.-C.; Fukami, A.; Hiraku, O.; Komiyama, K.; Hayashi, M. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **2004**, *323*, 1096.
68. Kino, T.; Boos, T. L.; Sulima, A.; Siegel, E. M.; Gold, P. W.; Rice, K. C.; Chrousos, G. P. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2007**, *120*, 437.

69. a) Lee, D. Y.; Yasuda, M.; Yamamoto, T.; Yoshida, T.; Kuroiwa, Y. *Life Sciences*, **1997**, *60*, 127; b) Nasu, K.; Nishida, M.; Ueda, T.; Takai, N.; Bing, S.; Narahara, H.; Miyakawa, I. *Mol. Human Rep.*, **2005**, *11*, 817.
70. a) Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem*, **2002**, *45*, 5440; b) Ye, M., Qu, G.; Guo, H.; Guo, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2004**, *91*, 87.
71. a) Terness, P.; Navolan, D.; Dufter, C.; Kopp, B.; Opelz, G. *Int. Immunopharm.* **2001**, *1*, 119; b) Daniel D.; Süsal, C.; Kopp, B.; Opelz, G.; Terness, P. *Int. Immunopharm.* **2003**, *3*, 1791.
72. a) Imai, S., Murase, H., Katori, M., Okada, M., Shigei, T. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1965**, *15*, 62; b) Shimada, K., Ohishi, K., Fukunaga, H., Ro, J. S., Nambara, T. *J. Pharmacobiodyn.*, **1985**, *8*, 1054; c) Shimada, K., Ishii, N., Ohishi, K., Ro, J.S., Nambara, T. *J. Pharmacobiodyn.* **1986**, *9*, 755; d) Kamano, Y., Satoh, N., Nakayoshi, H., Pettit G.R., Smith, C.R. *Chem. Pharm. Bull.*, **1988**, *36*, 326; e) Manunta, P.; Hamilton, B. P.; Hamlyn, J. M. *Hypert.* **2001**, *37*, 472.
73. a) Nogawa, T.; Kamano, Y.; Yamashita, A.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 1148; b) Kaneko, T.; Spande, T. S.; Minit, Y.; Nabhitabha, J.; Chan-Ard, T. *Toxicon*, **2004**, *44*, 805;
74. Pettit, G. R.; Kasturi, T. R.; Knight, J. C ; Jaeggi, K. A. *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 1410.
75. a) Verpoorte, R.; Phan, Q. K.; Svendsen, A. B. *J. Nat. Prod.*, **1980**, *43*, 347; b) Della Greca, M.; Monaco, P.; Previtera, L. *J. Nat. Prod.*, **1990**, *53*, 1430; c) Akizawa, T.; Mukai, T.; Matsukawa, M.; Yoshioka, M.; Morris, J. F.; Butler-Jr, V. P. *Chem Pharm Bull.*, **1994**, *42*, 754; d) Kamano, Y.; Nogawa, T.; Yamashita, A.; Hayashi, M.; Inoue, M.; Drasar, P.; Pettit, G. R. *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1001; e) Komiyama, Y.; Dong, X. H.; Nishimura, N.; Masaki, H.; Yoshica, M.; Masuda, M.; Takahashi, H. *Clin. Biochem.*, **2005**, *38*, 36; f) Tempone, A. G.; Pimenta, D. C.; Lebrun, I.; Sartorelli, P.; Taniwaki, N. N.; de Andrade-Jr, H. F.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C. *Toxicon*, **2008**, *52*, 13.
76. Chakraborti, A.S.; Sharma, L.; Gulhane, R.; Shivane. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 7661.
77. Kamano, Y.; Pettir, G. R.; Brown, P.; Inoue, M. *Tetrahedron*, **1975**, *31*, 2359.
78. Awad, A.B.; Chinnam, M.; Fink, C.S.; Bradford, P.G. *Phytomedicine*, **2007**, *14*, 747.
79. a) López-Lázaro, M.; Pastor, N.; Azrak, S.S.; Ayuso, M.J.; Austin, C.A.; Cortes, F. *J. Nat. Prod.*, **2005**, *68*, 1642; b) Kometiani, P.; Liu, L.; Askari, A. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, *67*, 929;
80. Kamano, Y.; Yamashita, A.; Nogawa, T.; Morita, H.; T, K.; Itokawa, H.; Segawa, T.; Yukita, A.; Saito, K.; Katsuyama, M.; Pettit G. R. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 5440; Wu, P.-L.; Hsu, Y.-L.; Wu, T.-S.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H. *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5207.
81. Cunha-Filho, G.A.; Resck, I. S.; Cavalcante, B. C.; Pessoa, C. Ó.; Moraes, M. O.; Ferreira, J. R. O.; Rodrigues, F. A. R.; Santos, M. L. *Toxicon*, **2010**, doi:10.1016/j.toxicon.2010.03.021; Cunha-Filho, G. S. A.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. O.; Costa-Lotufo, I.; Cavalcanti, B. C.; Resck, I. S.; Santos, M. L. *In: 6th International Congress of Pharmaceutical Science, 2007, Ribeirão Preto-SP*; Soares, B. M.; Rodrigues, F. A. R.; Cavalcanti, B. C.; Cunha-Filho, G. S. A.; Resck, I. S.; Santos, M. L.; Costa-Lotufo, I. V.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. O. *In: 7th International Congress of Pharmaceutical Science, 2009, Ribeirão Preto-SP*; Cunha-Filho, G. A.; Cavalcanti, B. C.; Ferreira, J R. O.; Resck, I. S.; Moraes, M. O.; Pessoa, C. Ó.; Rodrigues, F. A. R.; dos Santos, M. L. *In: 32ª Reunião Anual da SBQ, 2009, Fortaleza-CE*;
82. Noel, F.; Godfraind, T. *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, *33*, 47.
83. Touza N. A.; Poças, E. S.; Quintas, L. E. M.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F. Inhibitory effect of combinations of digoxin and endogenous cardiotonic

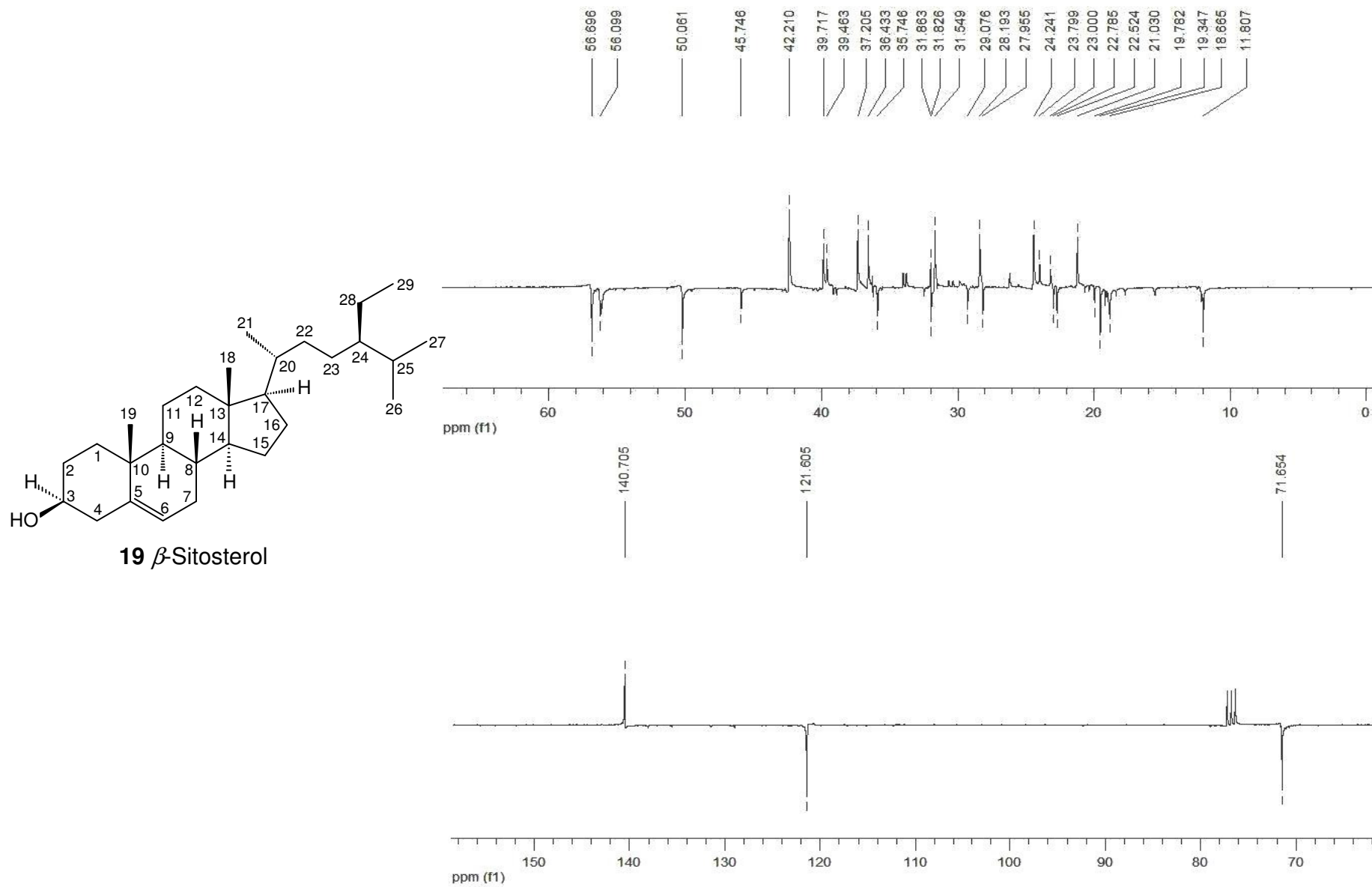
- steroids on human kidney Na⁺/K⁺-ATPase. *Life Sciences*, submetido em 05/05/2010; Cunha Filho, G. A.; Quintas, L. E. M.; Noel, F.; Touza N. A.; Schwartz, E. F.; Resck, I. S.; dos Santos, M. L. *In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2009, Fortaleza; Touza N. A.; Poças, E. S.; Quintas, L. E. M.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F. *In: 41^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, 2009, Ribeirão Preto-SP; Amaral, L. S.; Figueira, R.; Bezerra, M. A.; Loureiro-Tomaz, E.; Cunha Filho, G. A.; dos Santos, M. L.; Noel, F.; Quintas, L. E. M. *In: 41^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental*, 2009, Ribeirão Preto-SP.
84. Mosman, T. J. *Immunol. Methods*, **1983**, *16*, 55.
85. Berlink, R. G. S.; Ogawa, C. A.; Almeida, A. M. P.; Andrade, M. A. S.; Malpezi, E. L. A.; Costa, L. V.; Hadju, E. M.; Freitas, J. C. *Com. Biochem. Physiol., C, Toxicol.*, **1996**, *115*, 155.
86. Lopez, L. B.; Quintas, L. E. M.; Noël, F. *Comp. Biochem. Physiol., A, Mol. Integr. Physiol.*, **2002**, *131*, 323.
87. Poças, E. S. C.; Touza, N. A.; da Silva, A. J. M.; Costa, P. R. R.; Noel, F. *Life Sciences*, **2007**, *81*, 1199.

ANEXOS

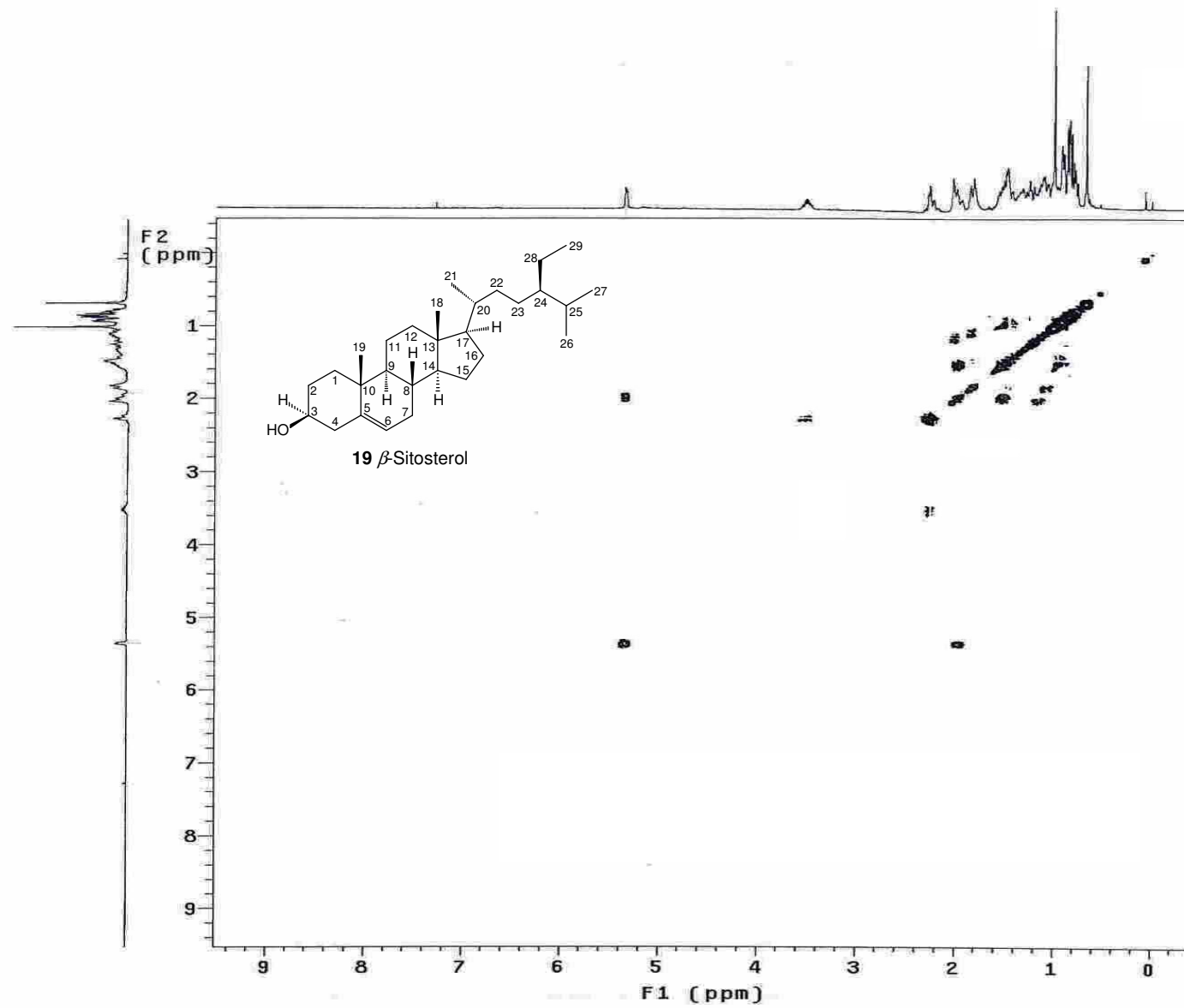
Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da β -sitosterol (19).



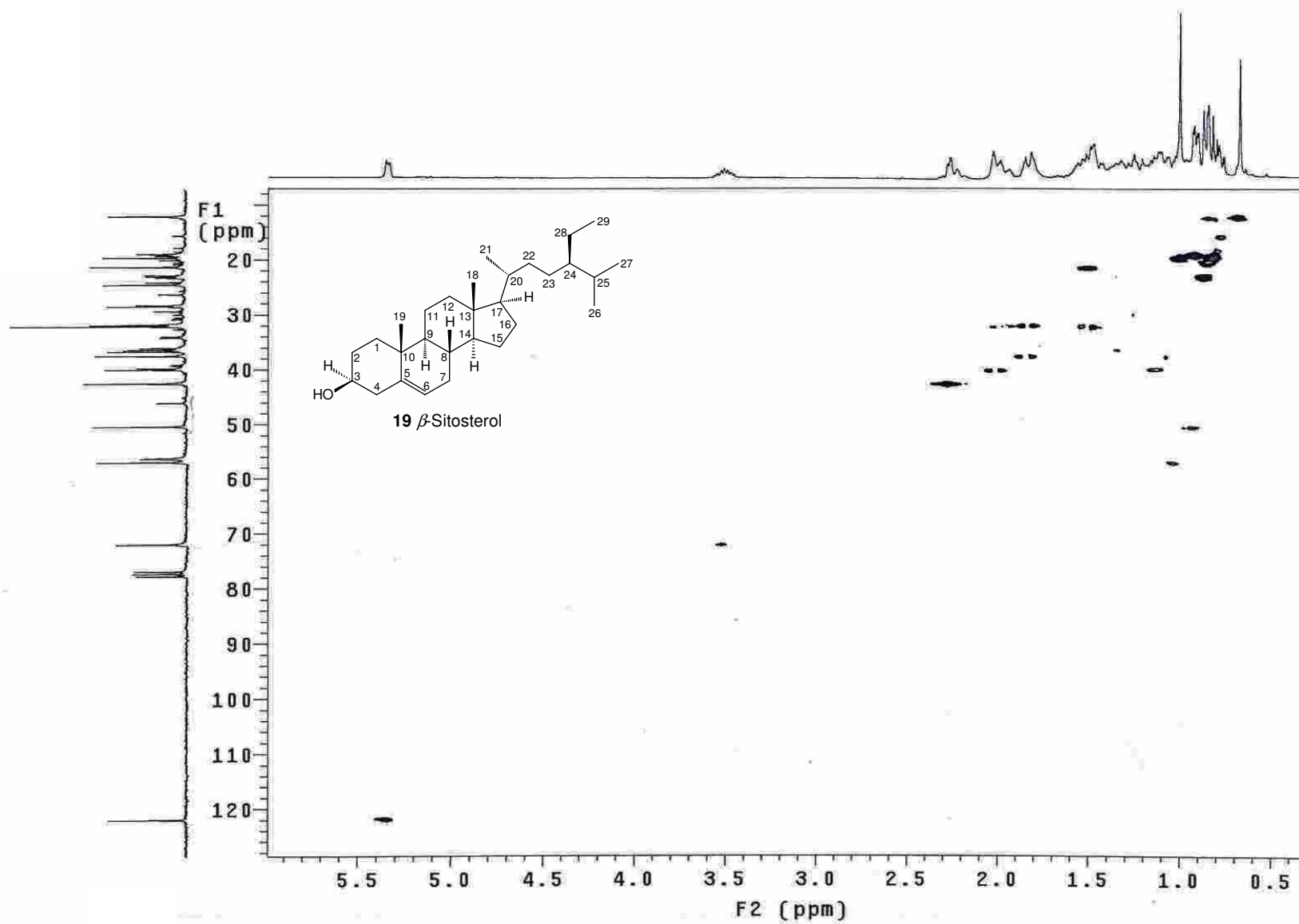
Anexo 2. Espectro de APT (75 MHz, CDCl₃) da β -sitosterol (**19**).



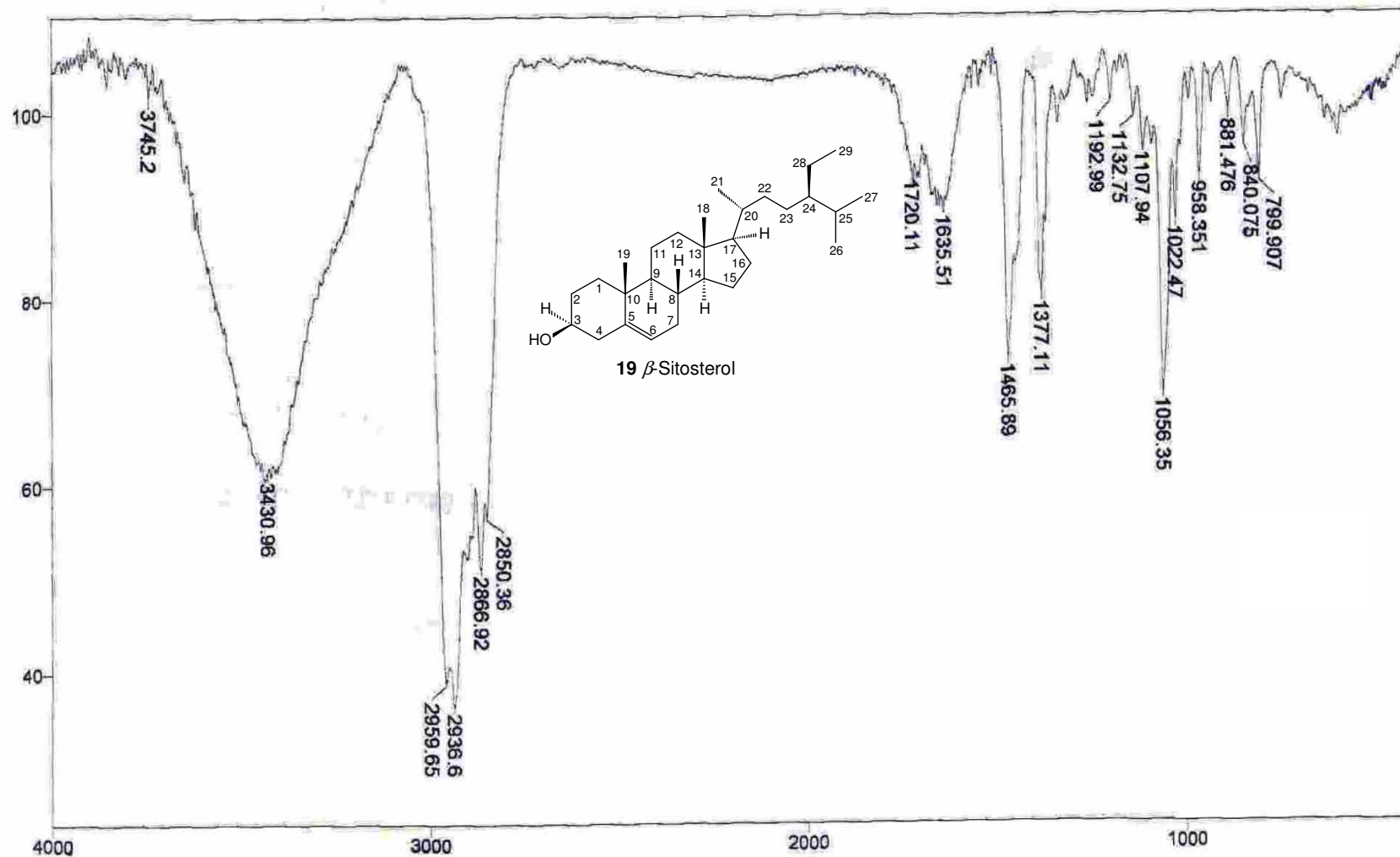
Anexo 3. Espectro de Cosy do β -sitosterol (19).



Anexo 4. Espectro bidimensional de HMQC de β -sitosterol (19).

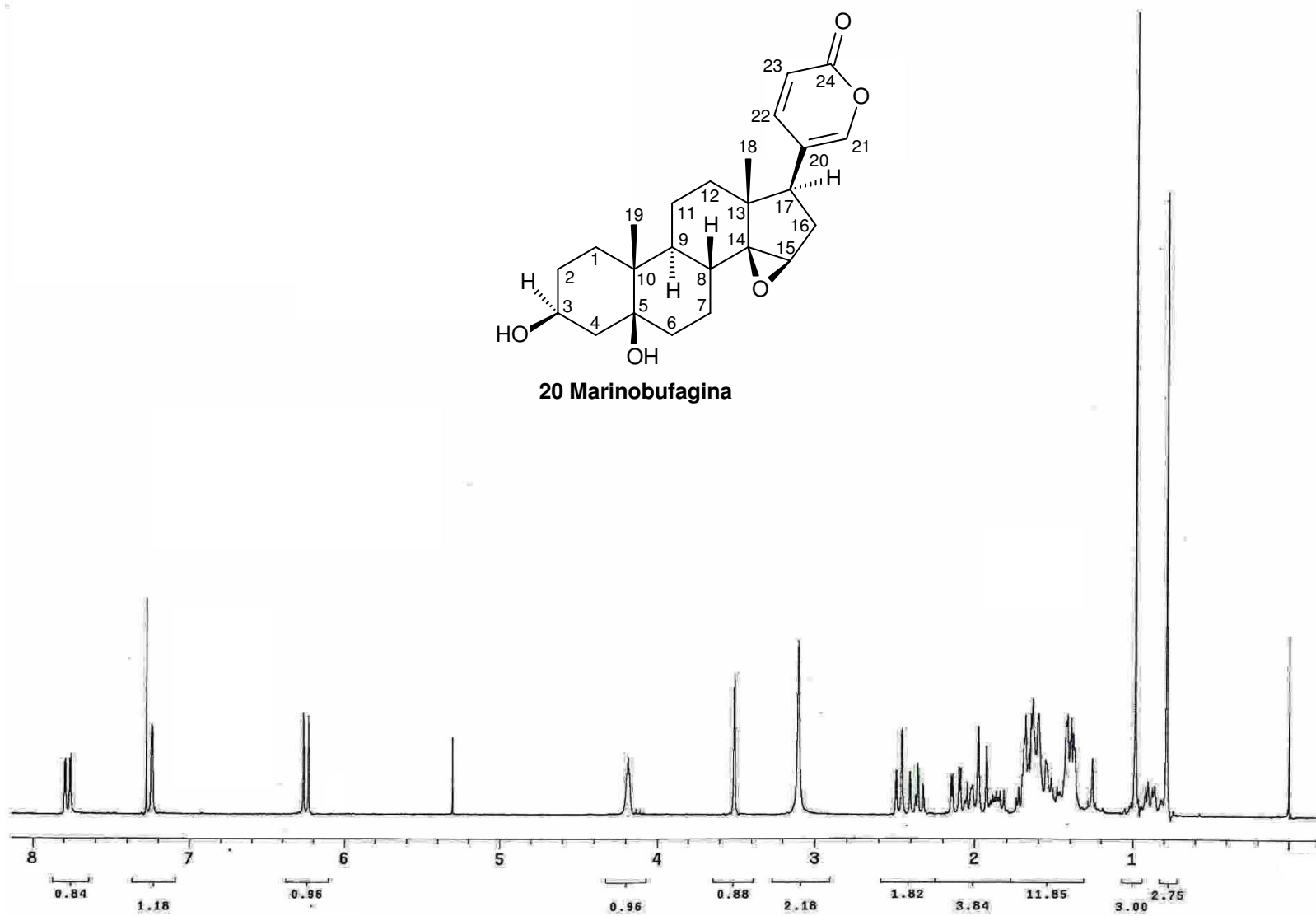


Anexo 5. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) do β -sitosterol (19).

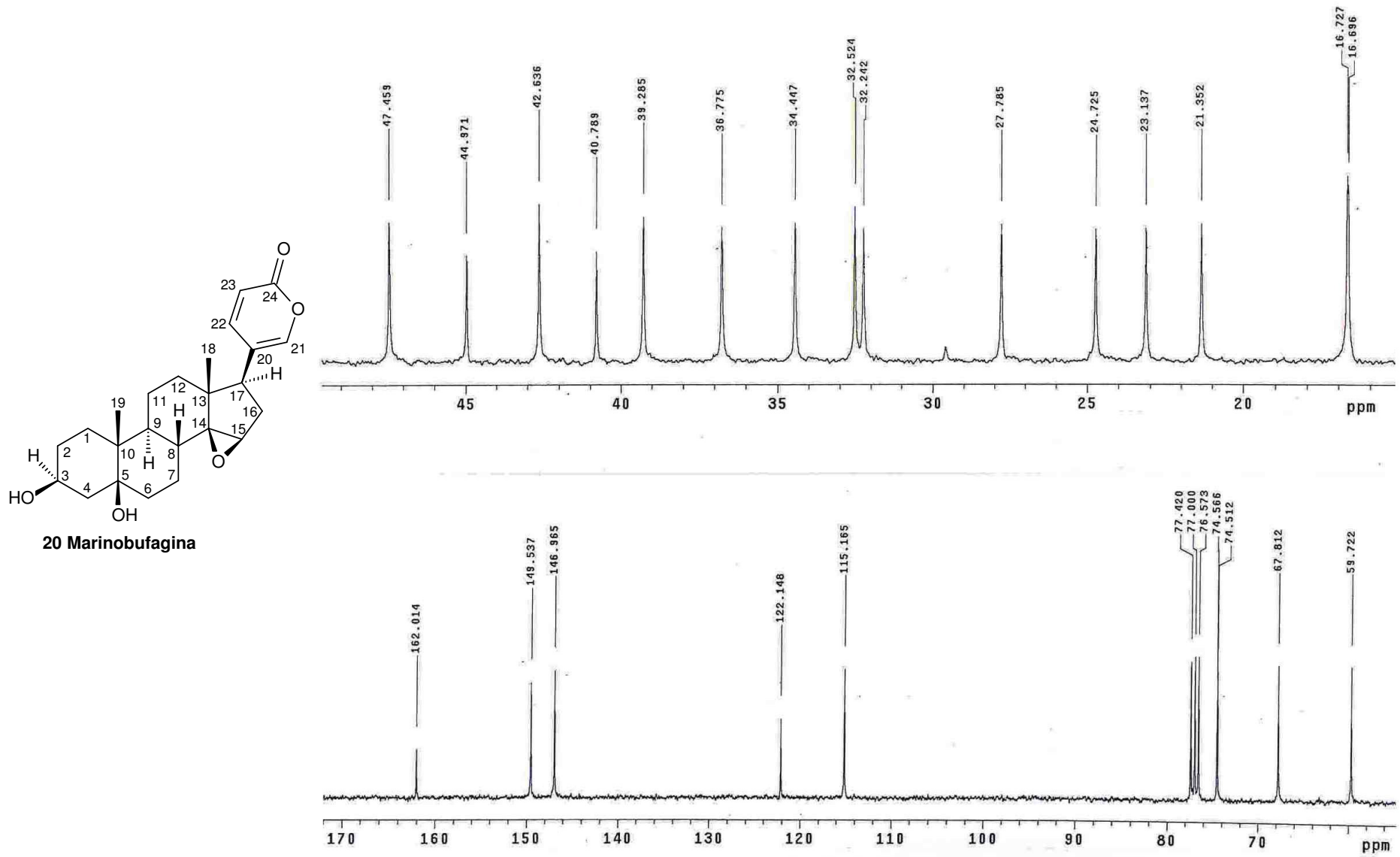


Transmittance / Wavenumber (cm^{-1})

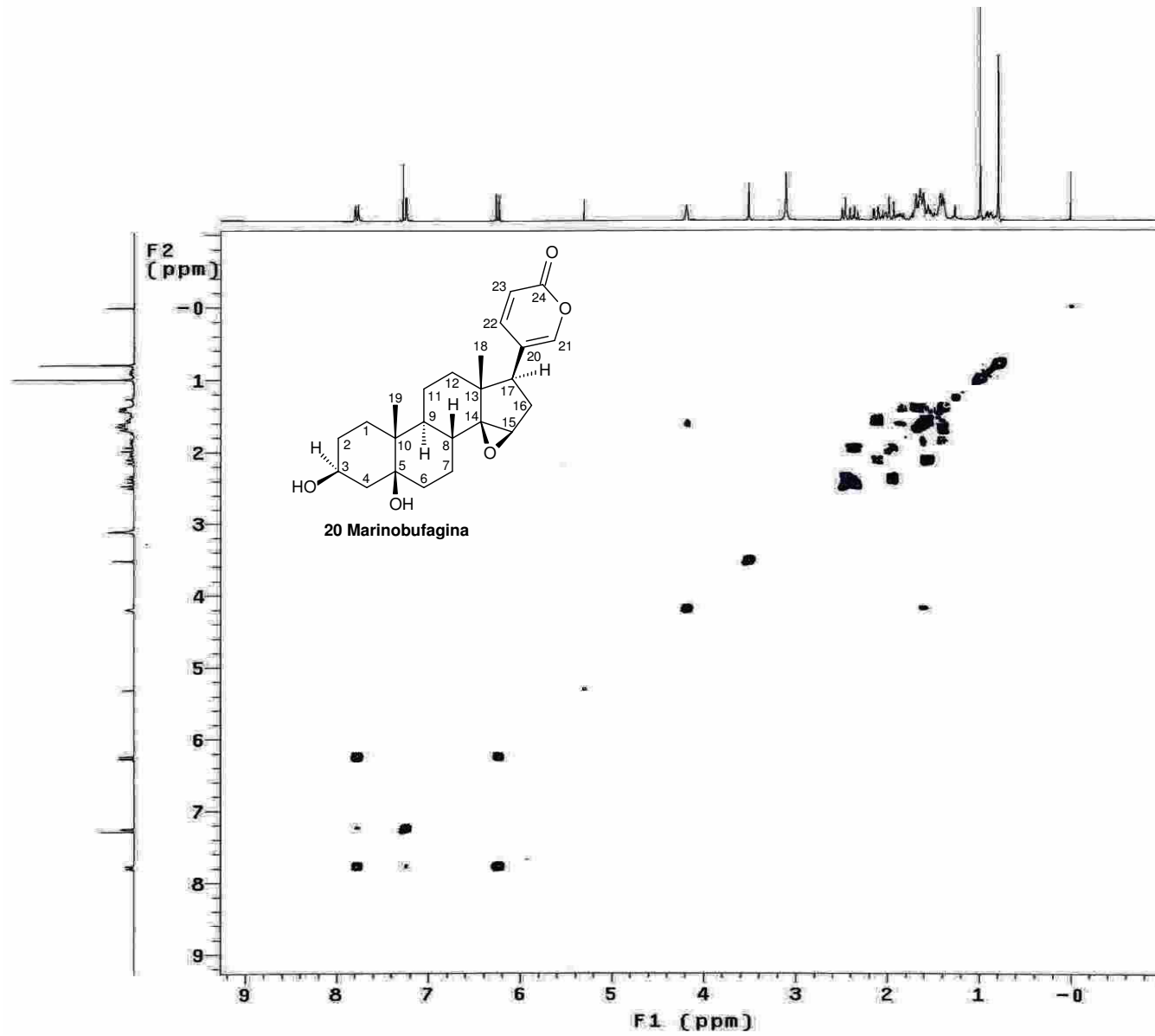
Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da Marinobufagina (**20**).



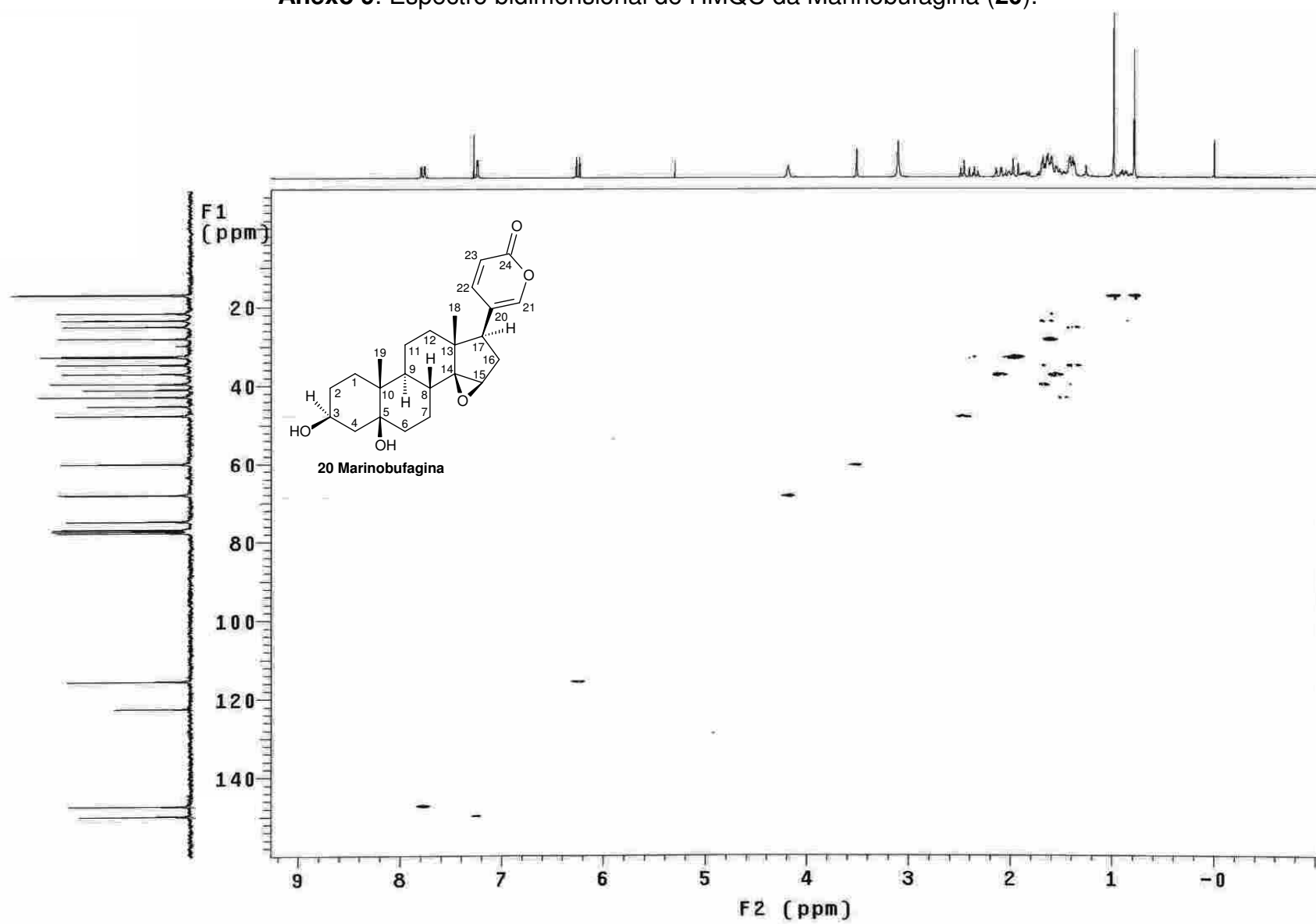
Anexo 7. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da Marinobufagina (**20**).



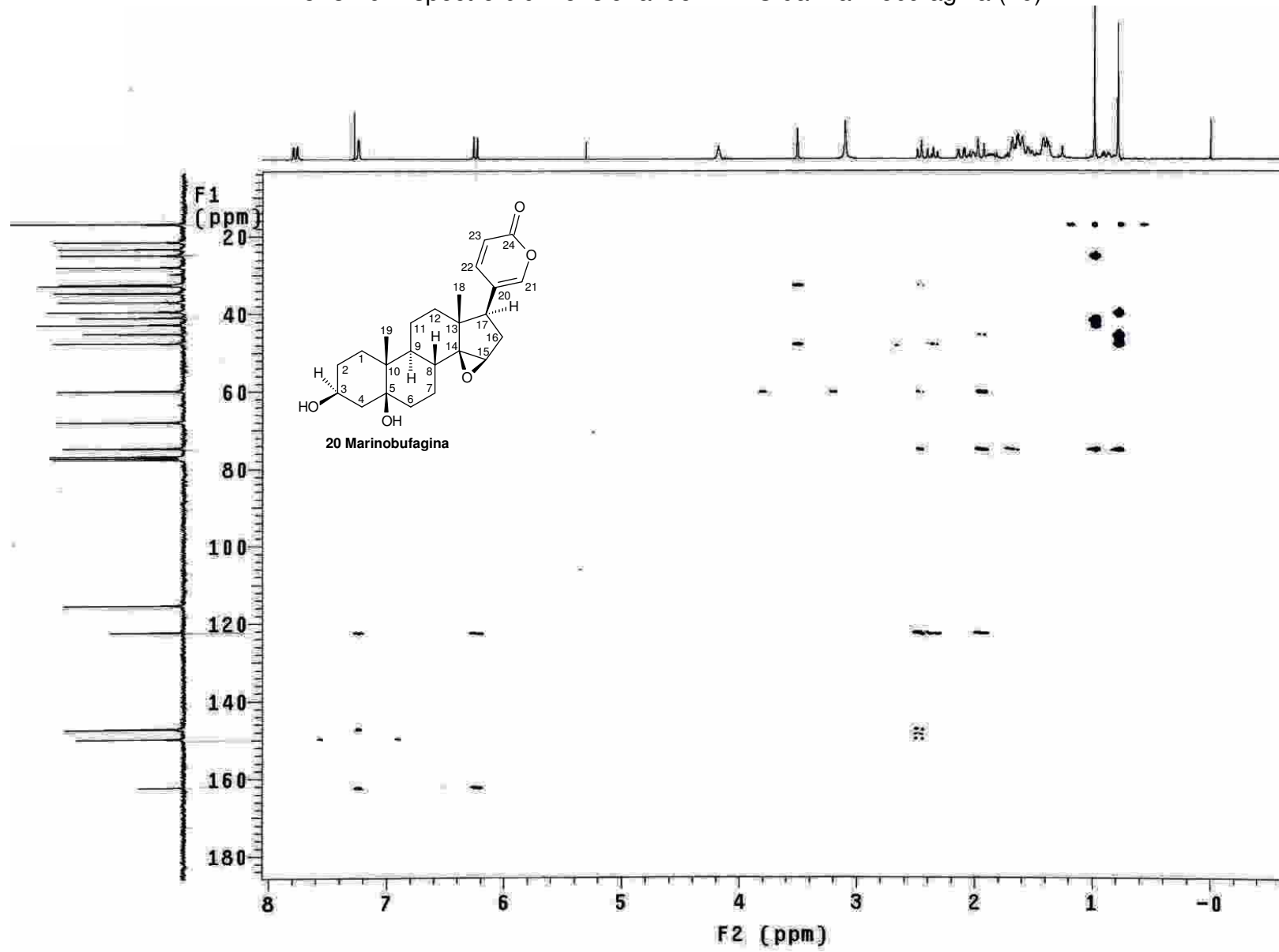
Anexo 8. Espectro bidimensional de Cosy da Marinobufagina (20).



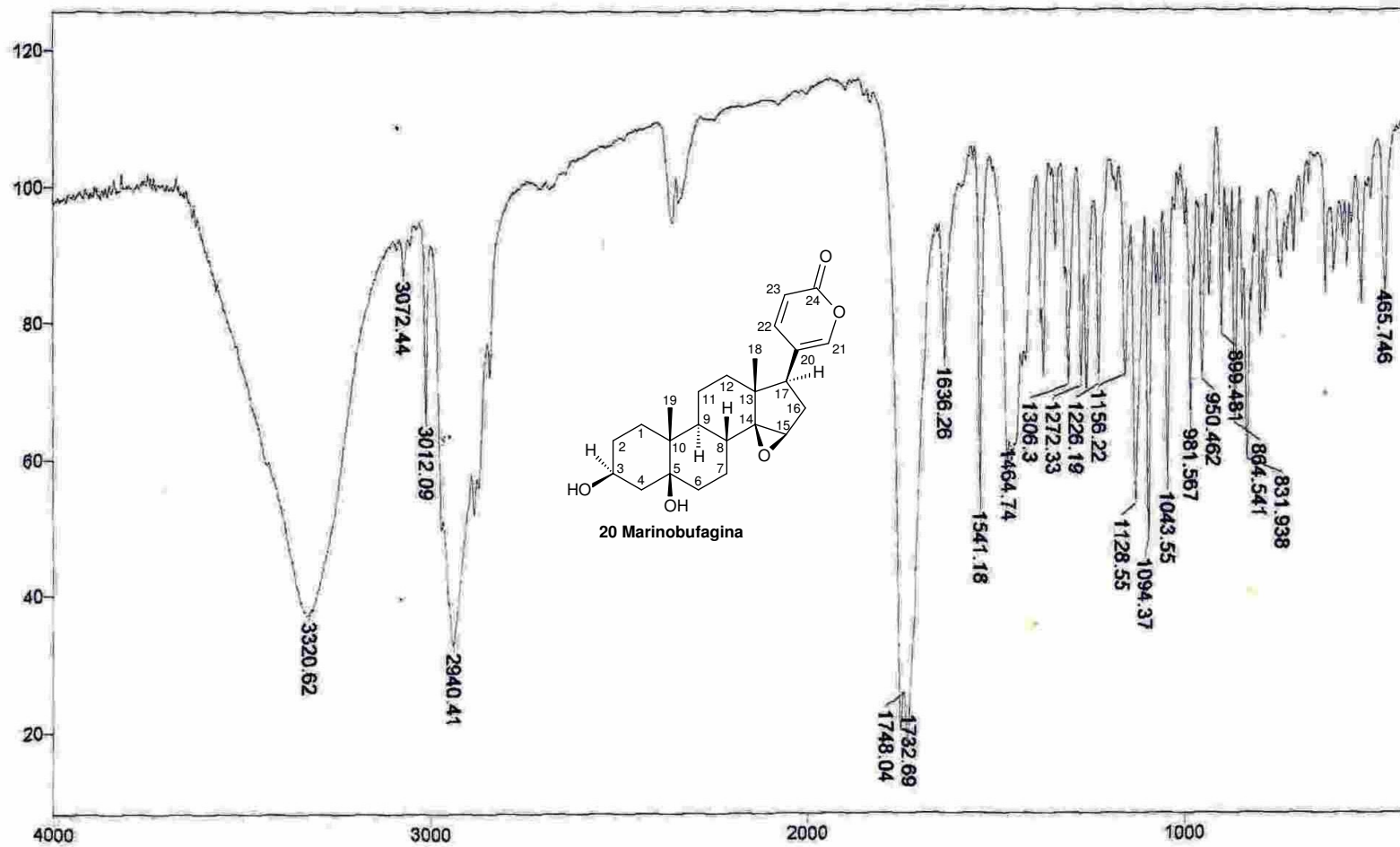
Anexo 9. Espectro bidimensional de HMQC da Marinobufagina (20).



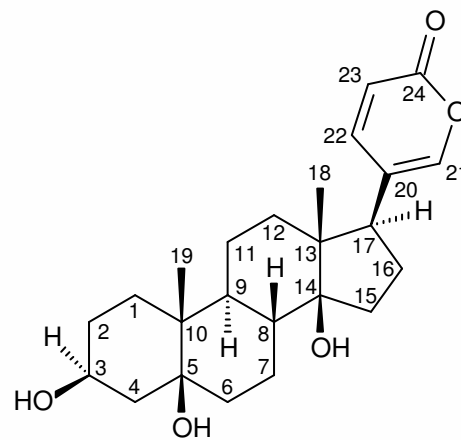
Anexo 10. Espectro bidimensional de HMBC da Marinobufagina (20).



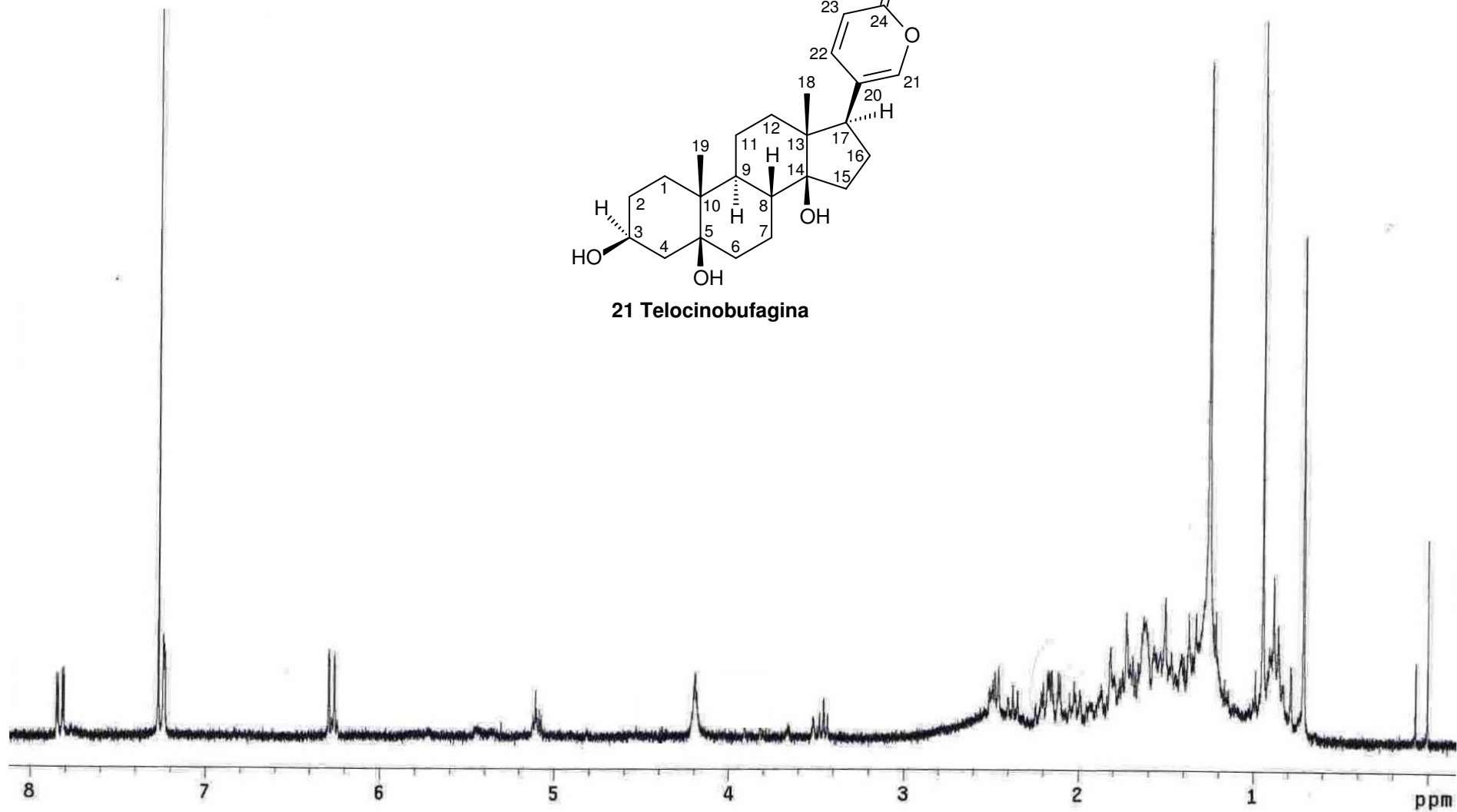
Anexo 11. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{m\acute{a}x}}$ cm^{-1}) da Marinobufagina (20).



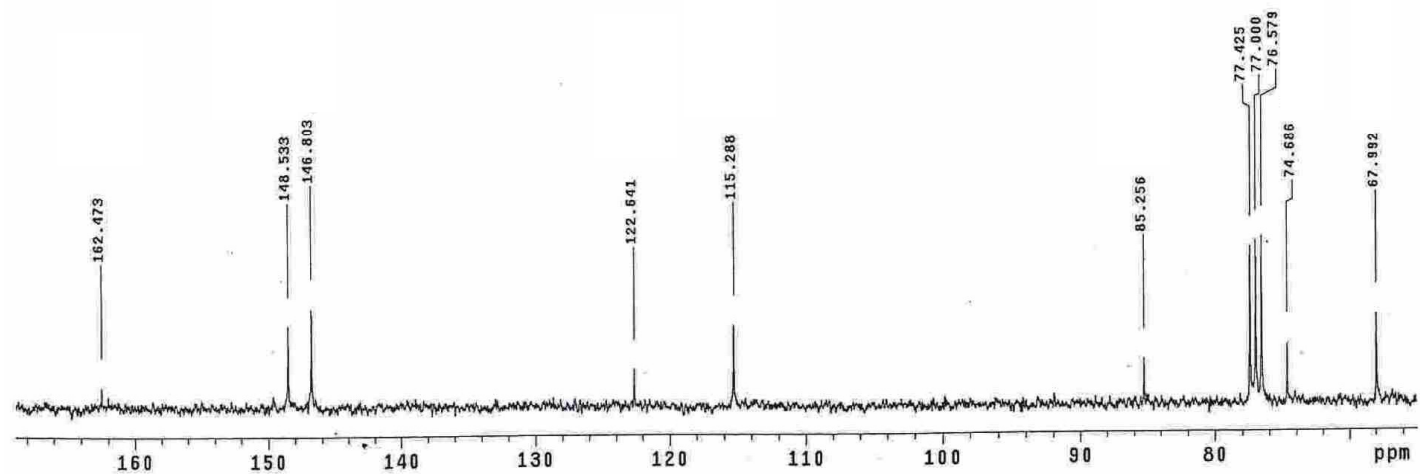
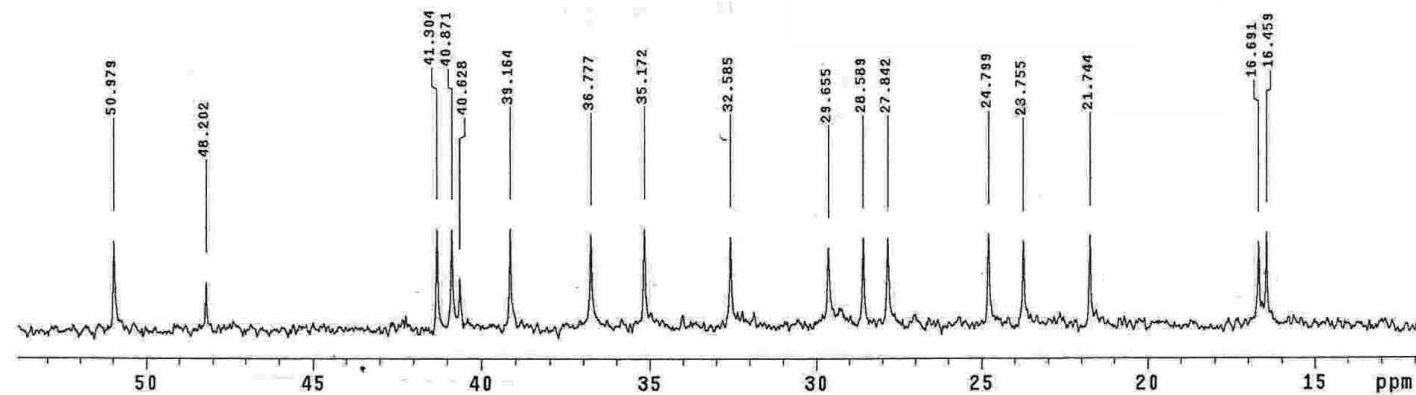
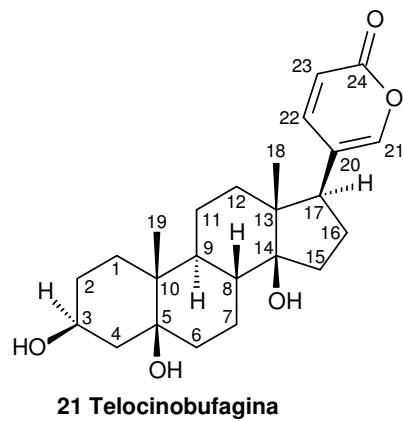
Anexo 12. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da Telocinobufagina (**21**).



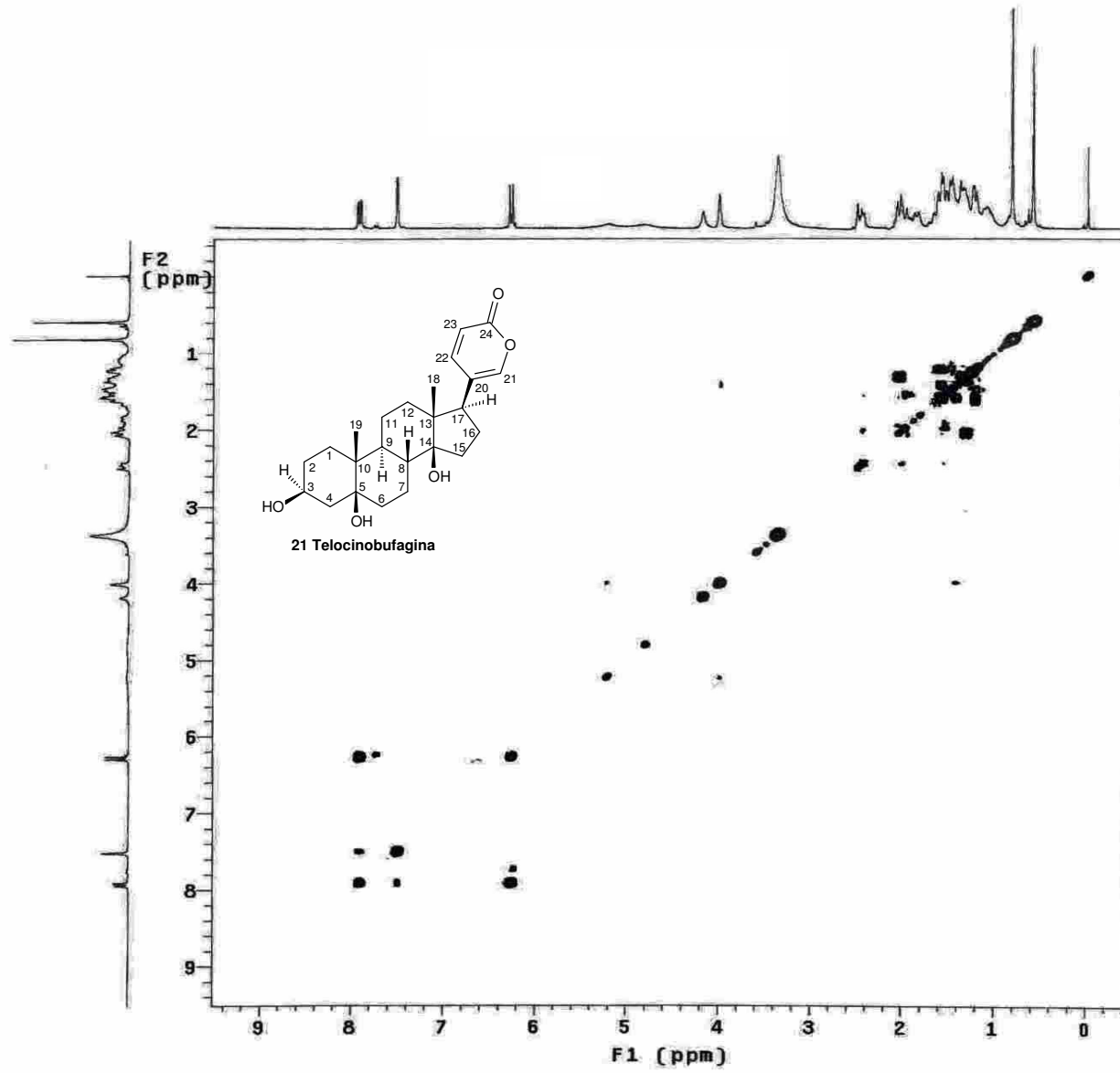
21 Telocinobufagina



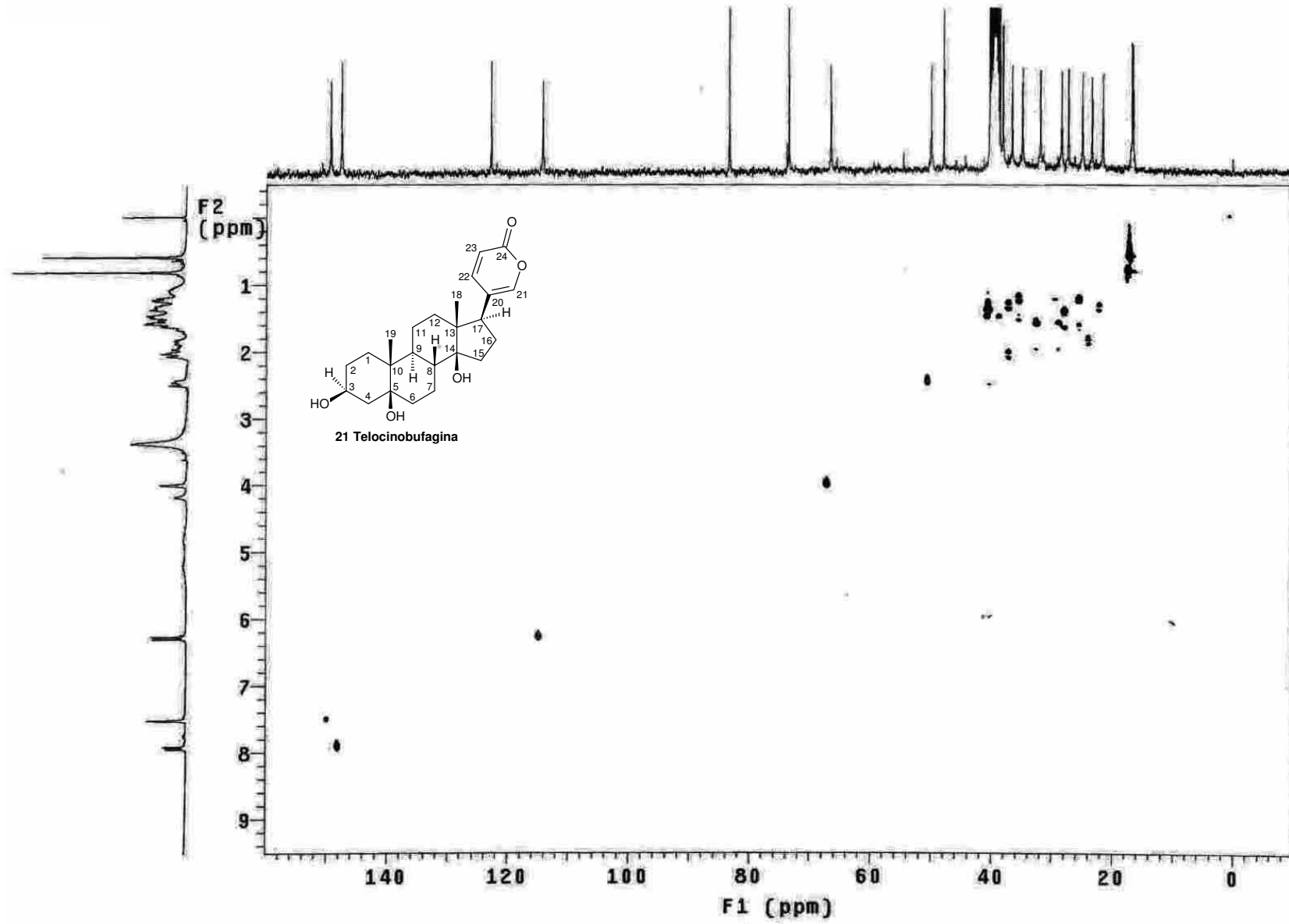
Anexo 13. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da Telocinobufagina (**21**).



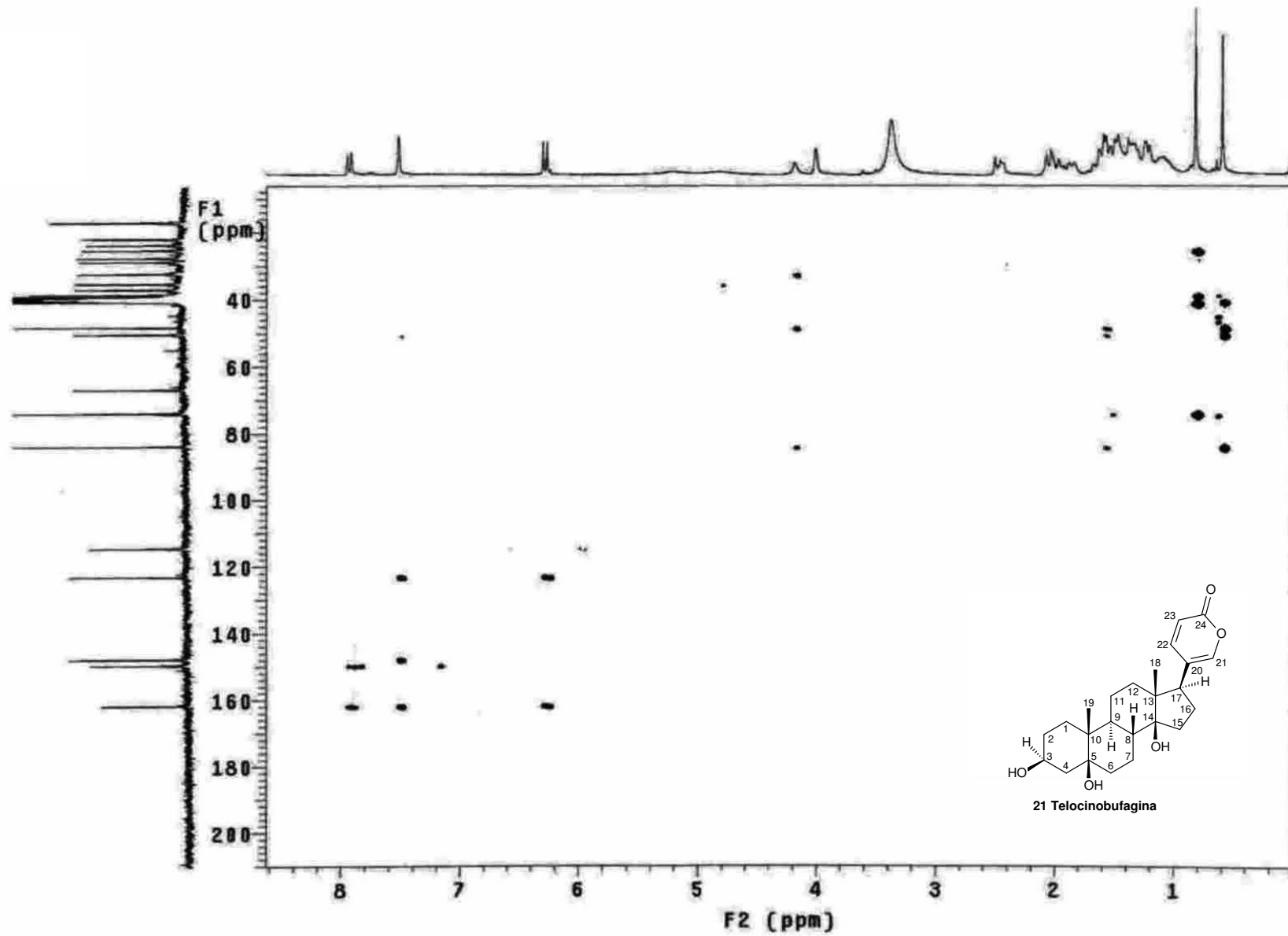
Anexo 14. Espectro de Cosy da Telocinobufagina (21).



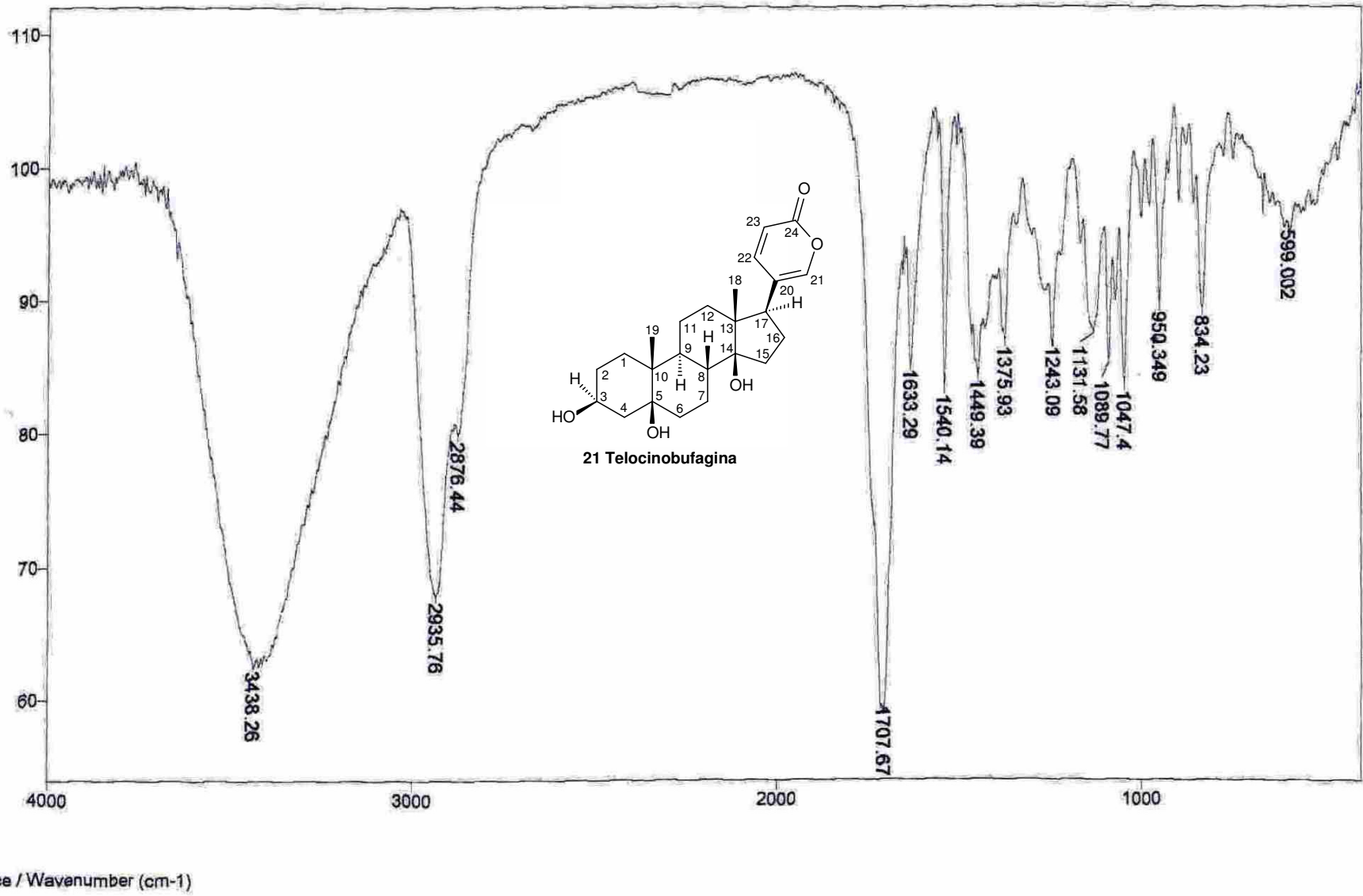
Anexo 15. Espectro de HMQC da Telocinobufagina (21).



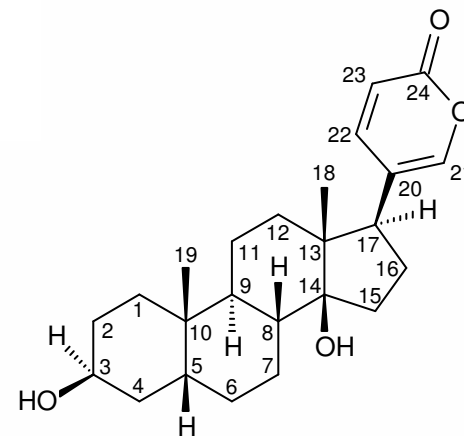
Anexo 16. Espectro de HMBC da Telocinobufagina (21).



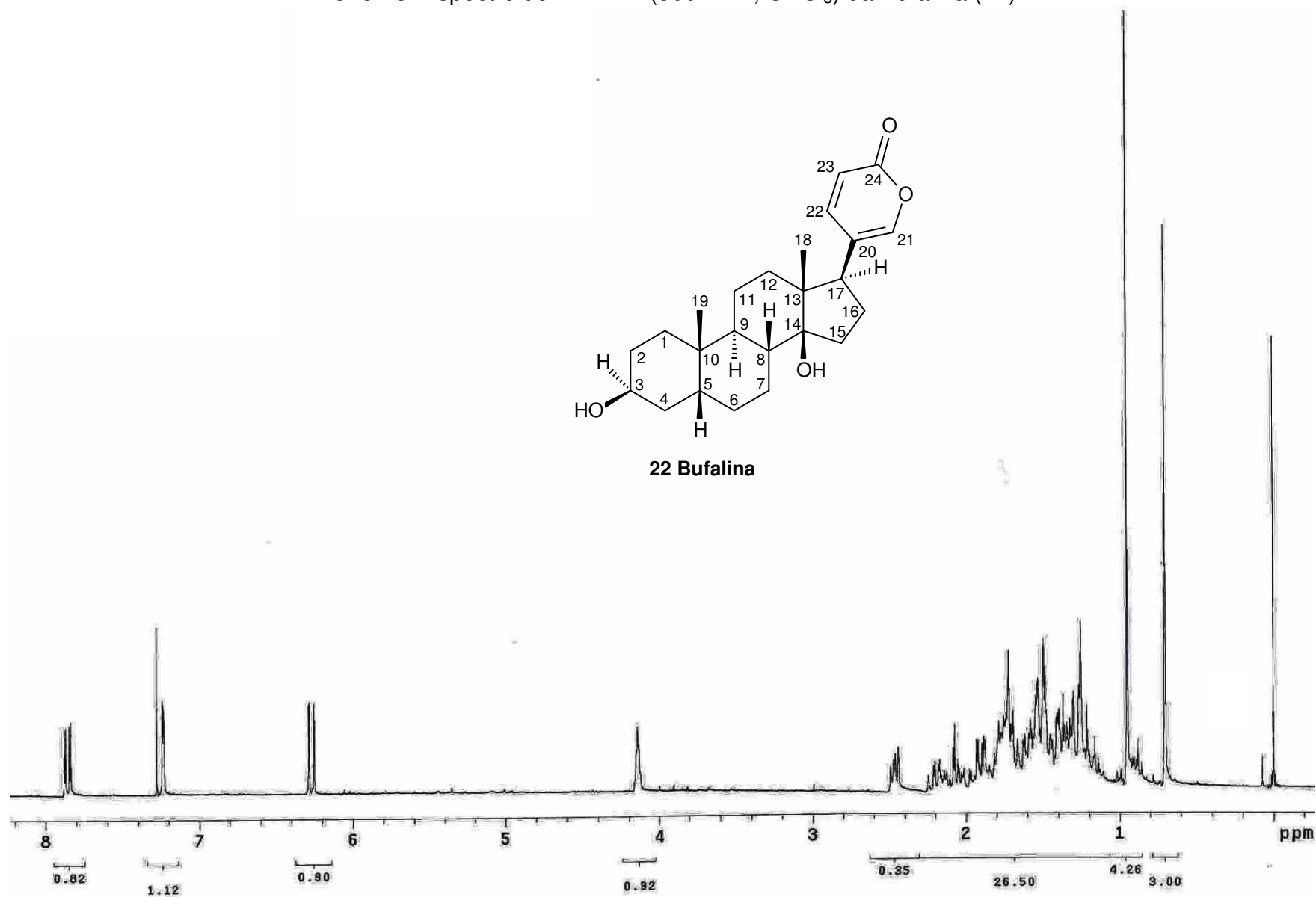
Anexo 17. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da Telocinobufagina (21).



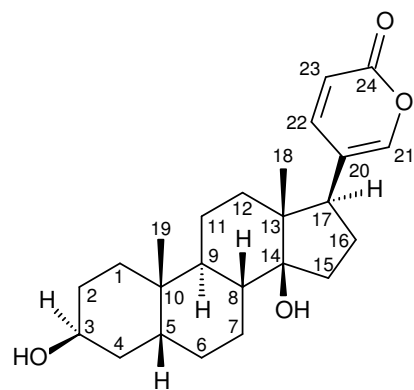
Anexo 18. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da Bufalina (**22**).



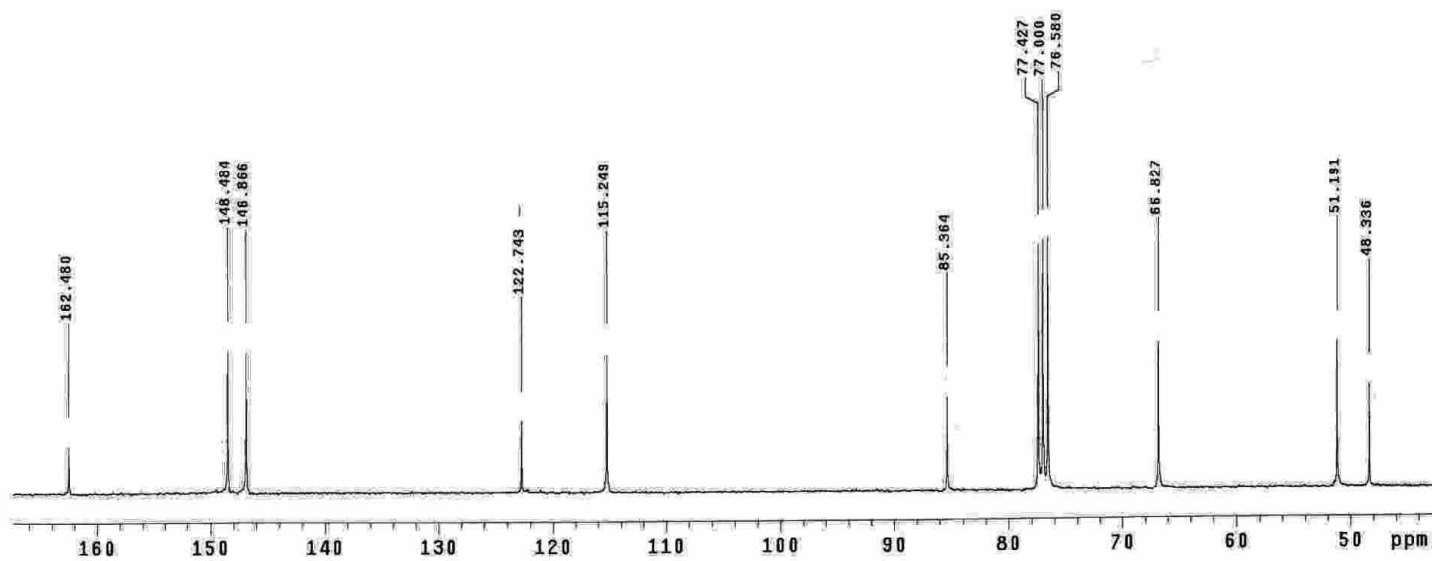
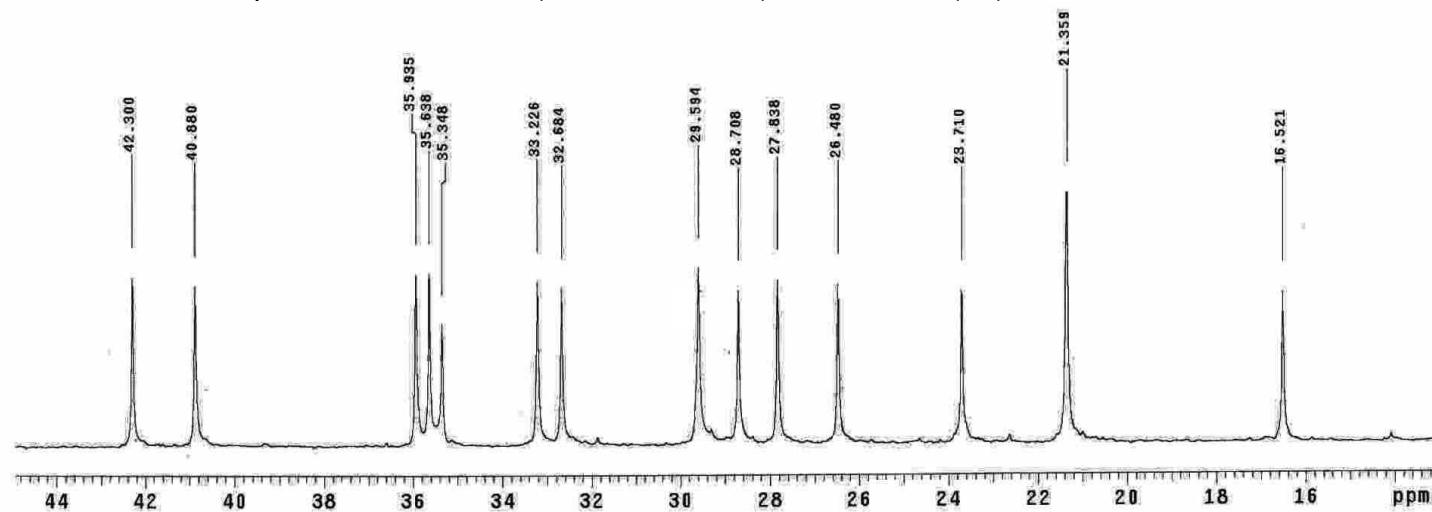
22 Bufalina



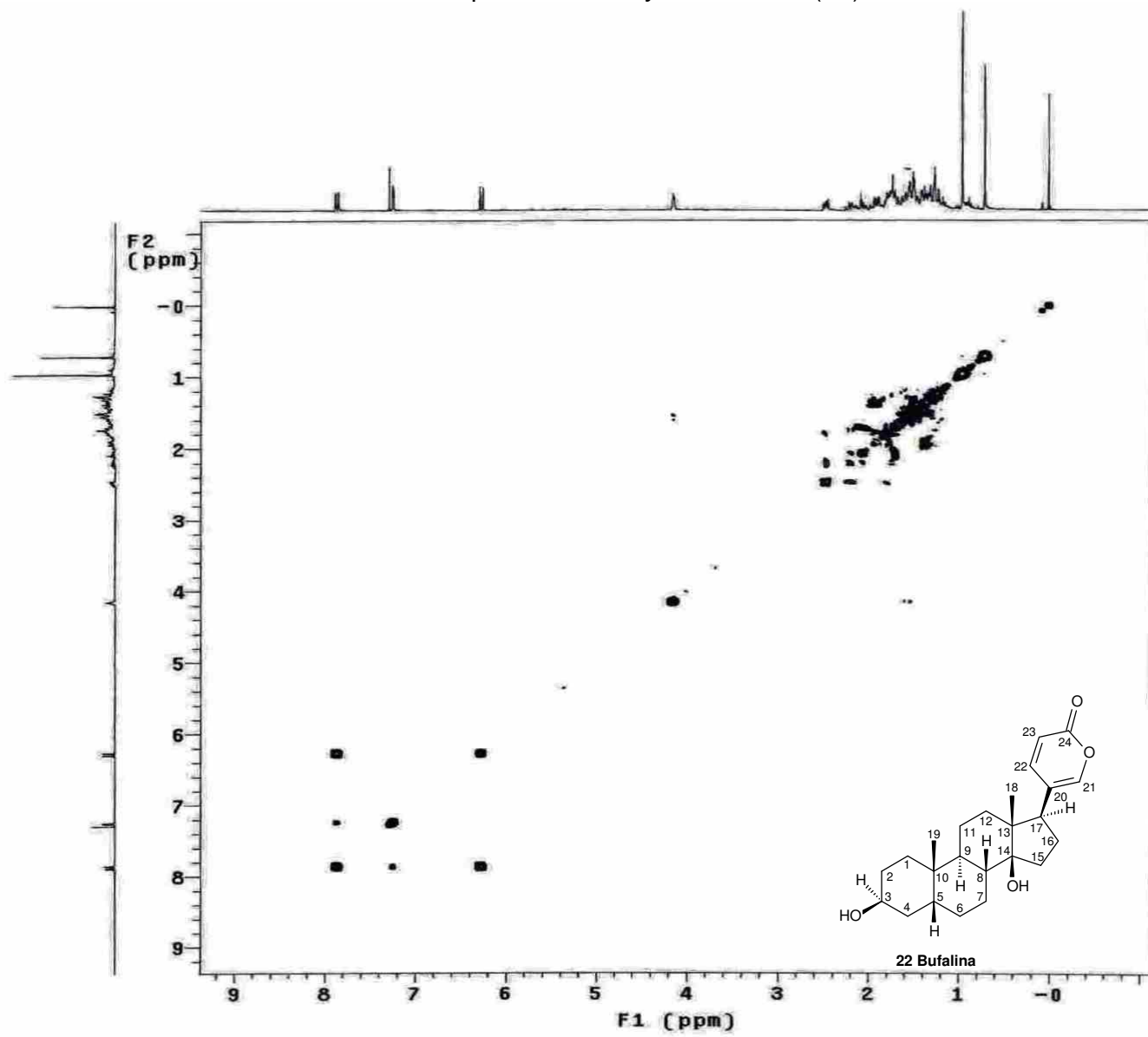
Anexo 19. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da Bufalina (22).



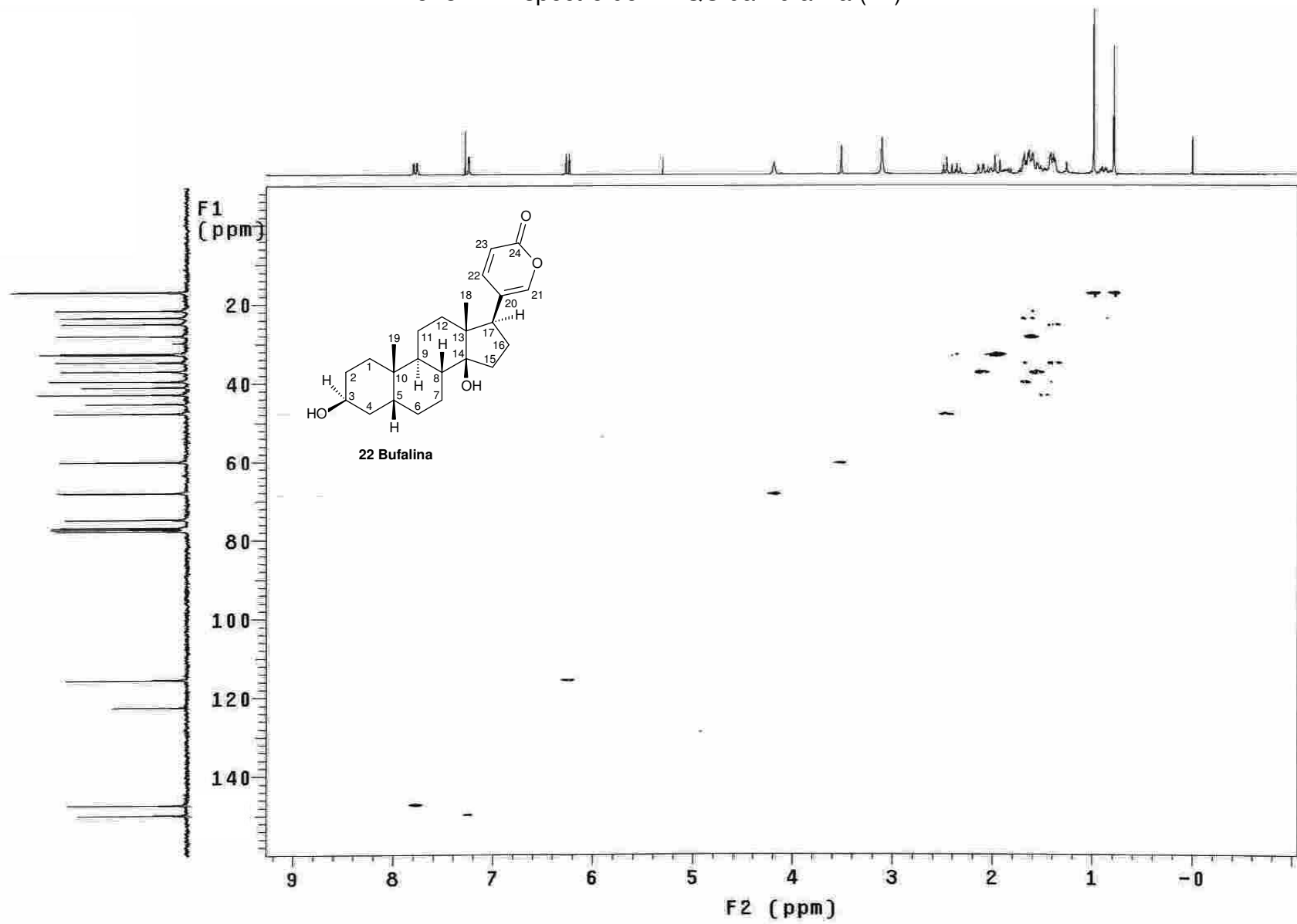
22 Bufalina



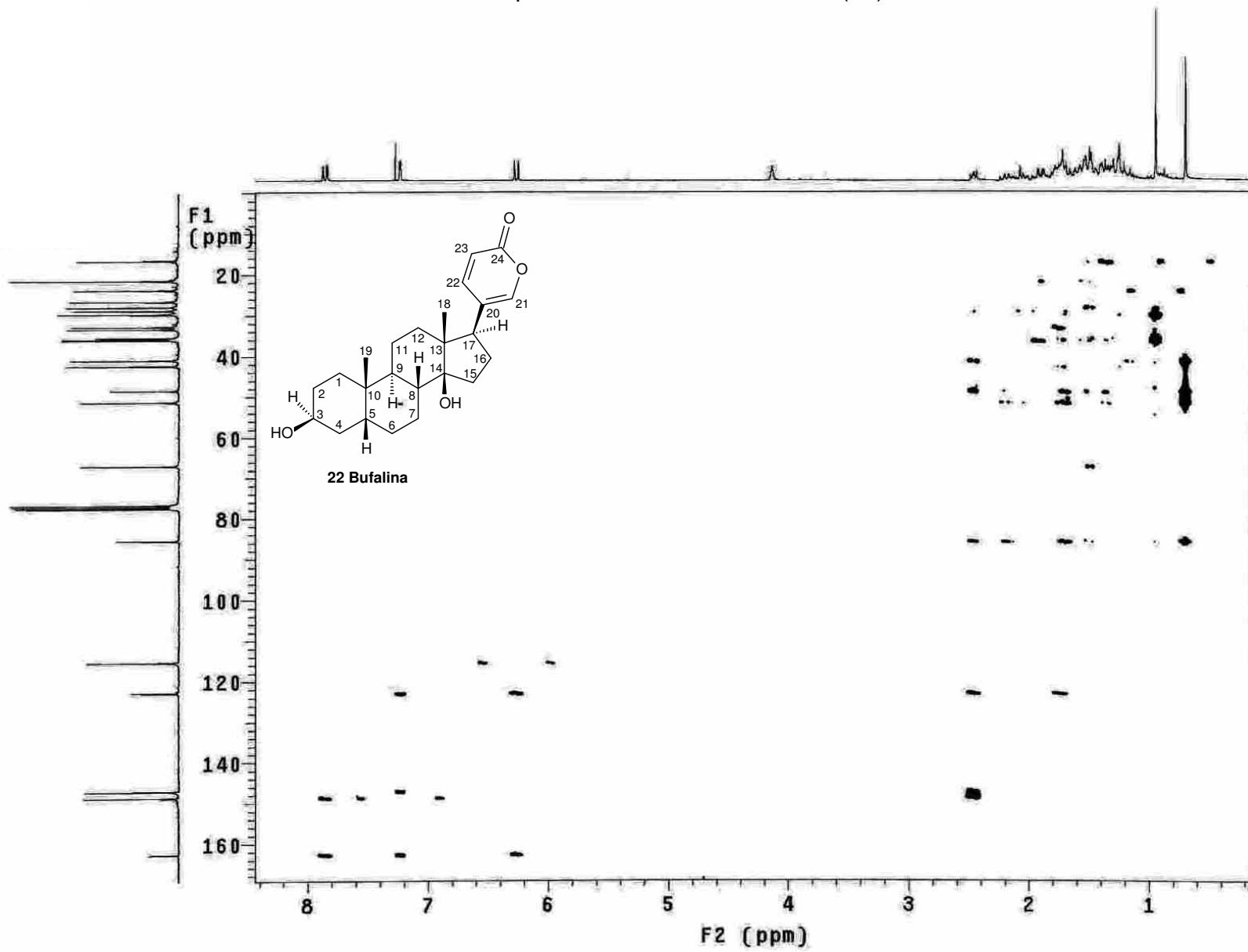
Anexo 20. Espectro de Cosy da Bufalina (22).



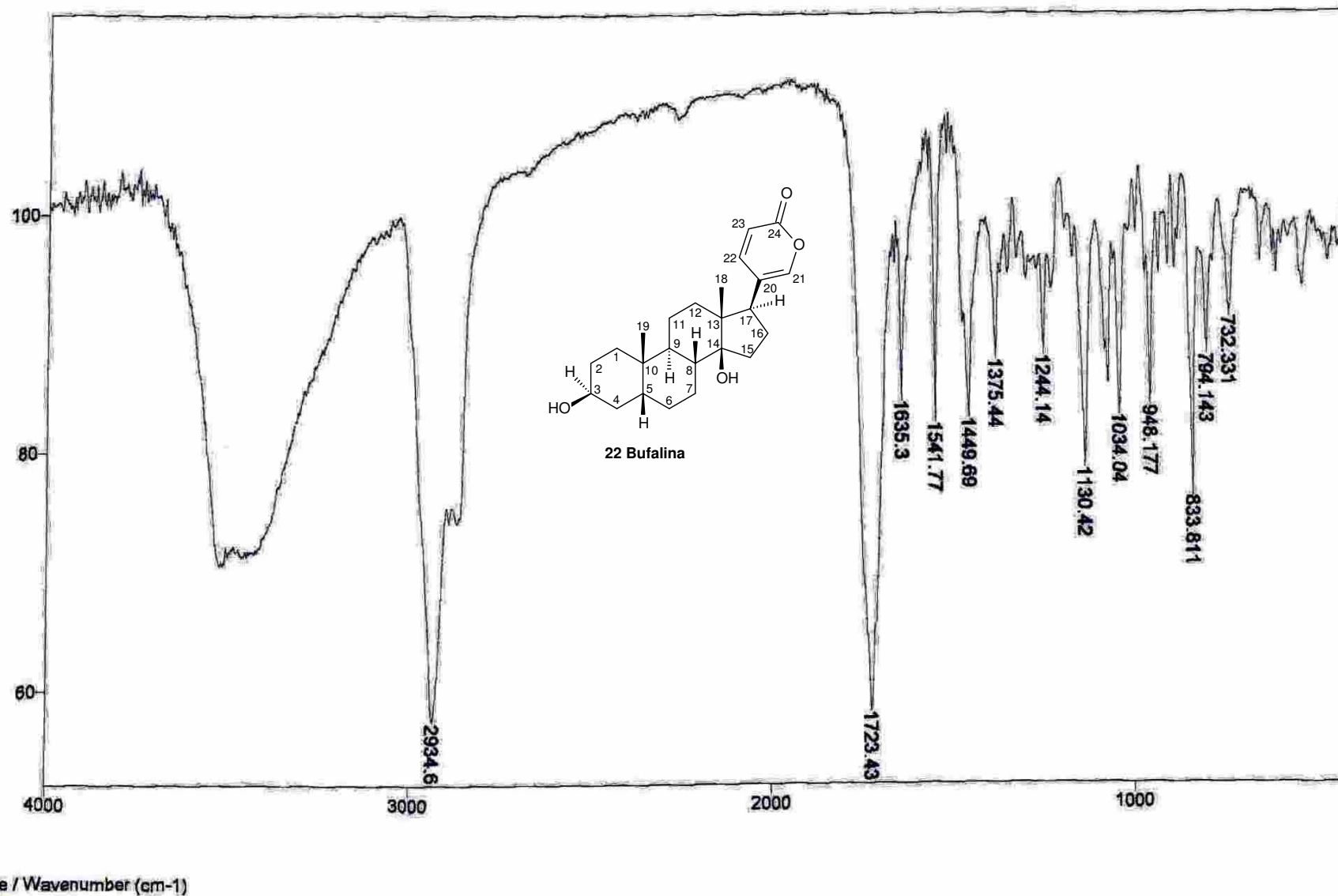
Anexo 21. Espectro de HMQC da Bufalina (22).



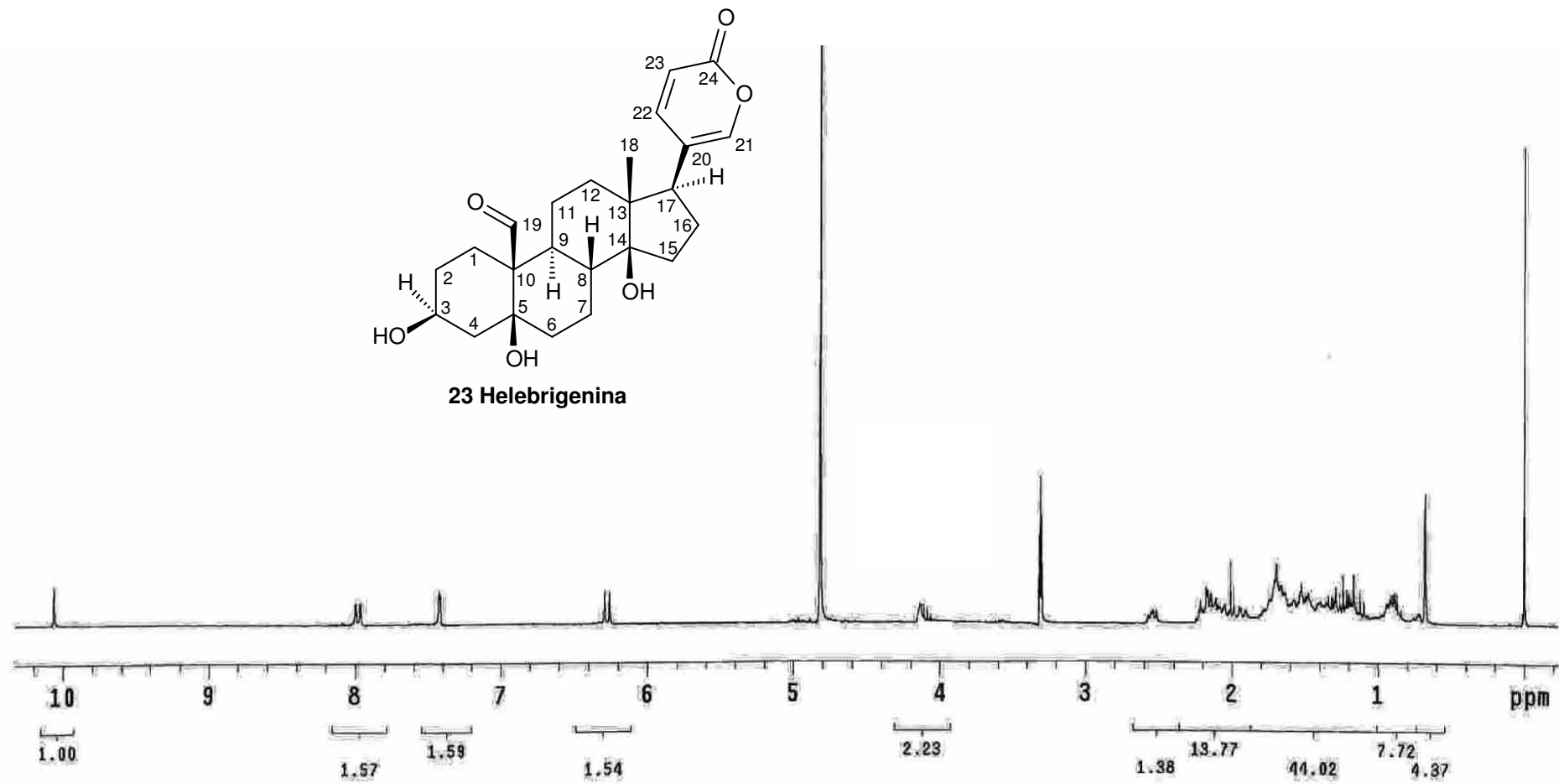
Anexo 22. Espectro de HMBC da Bufalina (22).



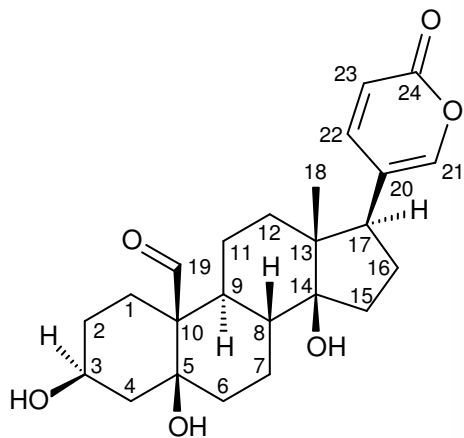
Anexo 23. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da Bufalina (22).



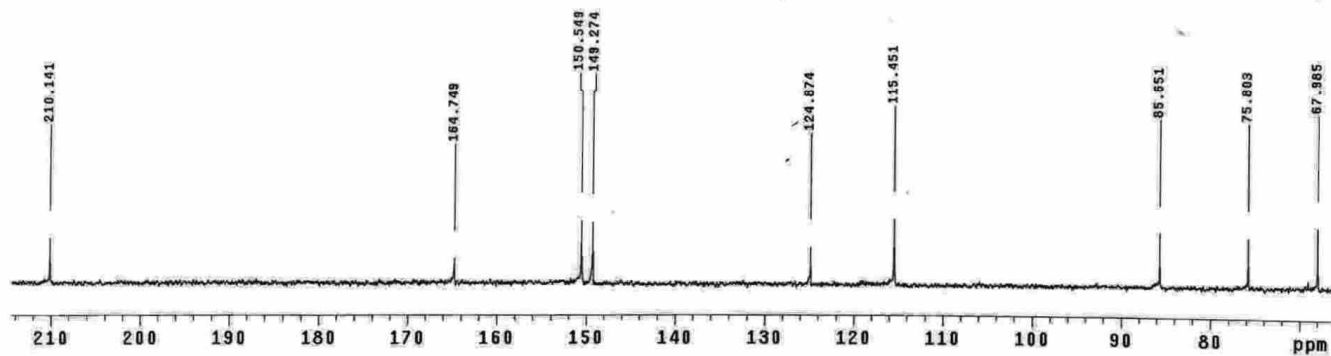
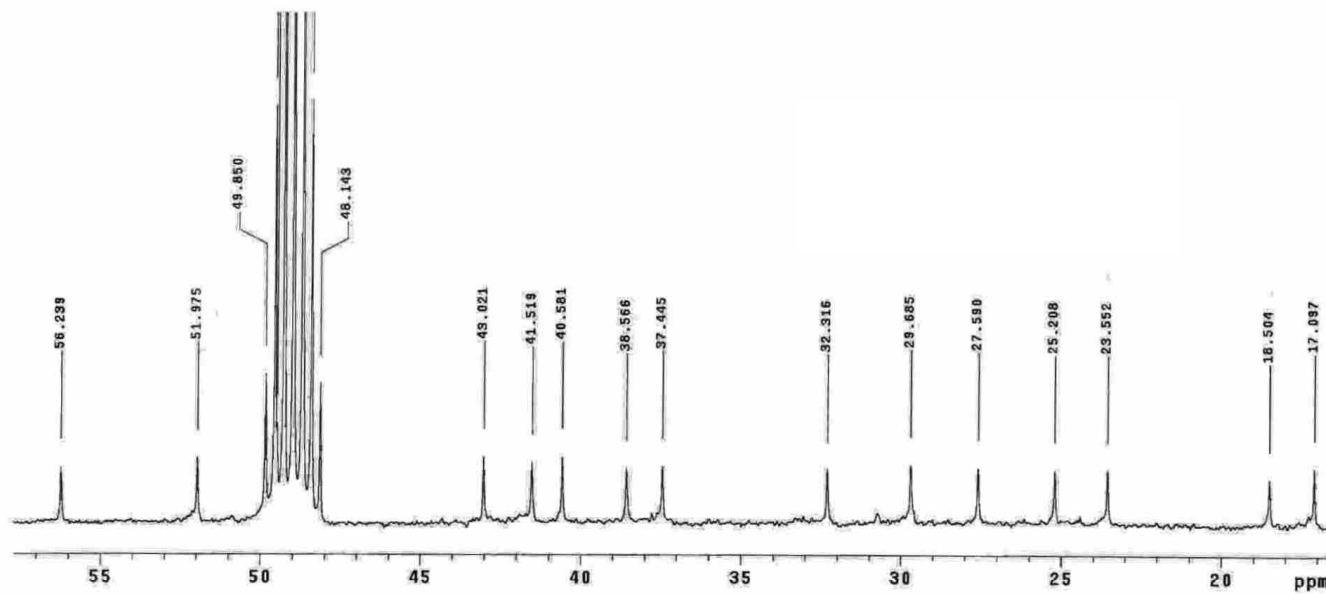
Anexo 24. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da Helebrigenina (**23**).



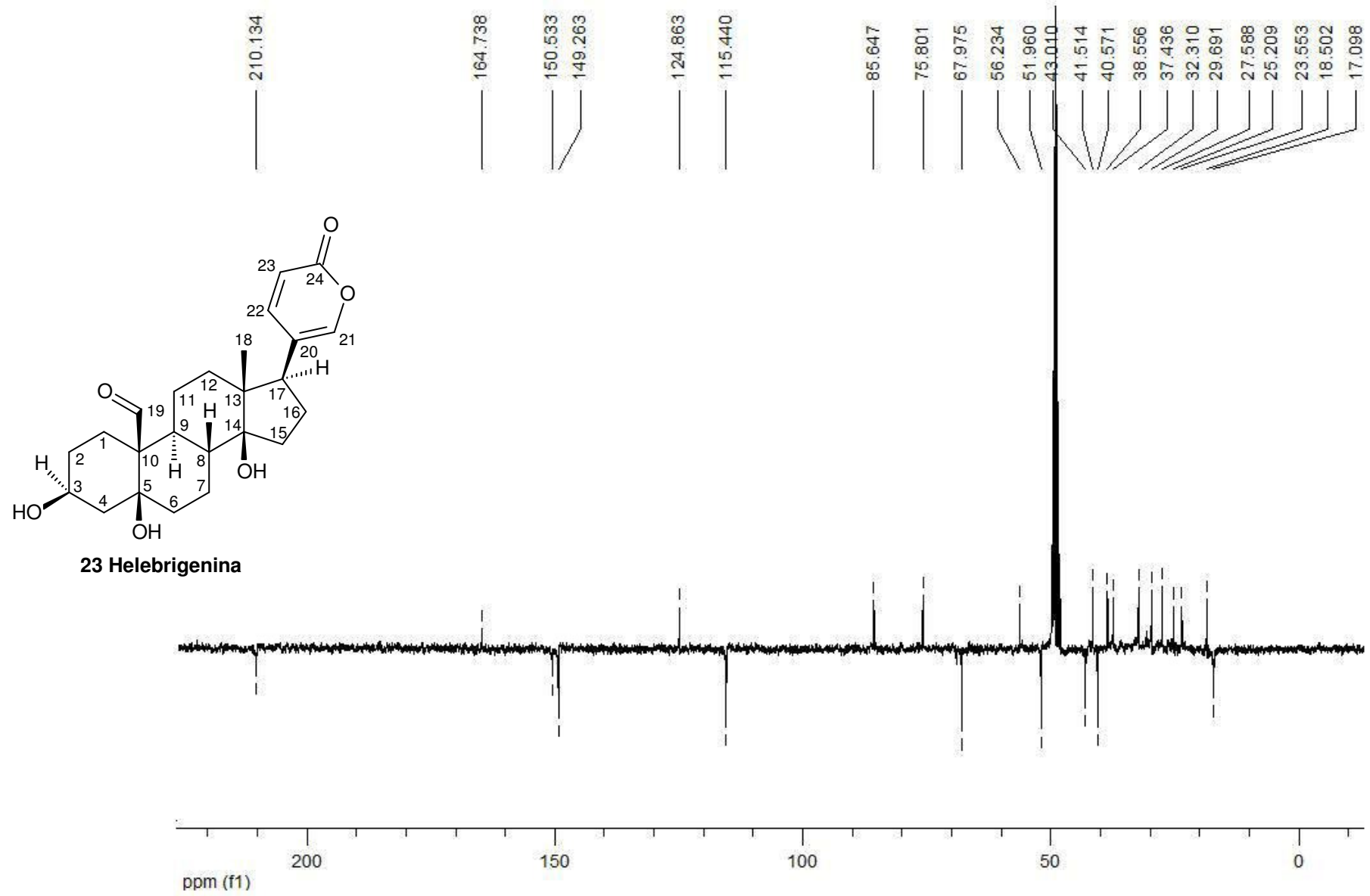
Anexo 25. Espectro de RMN ^{13}C (75 Hz, $\text{DMSO}-d_6$) da Helebrigenina (**23**).



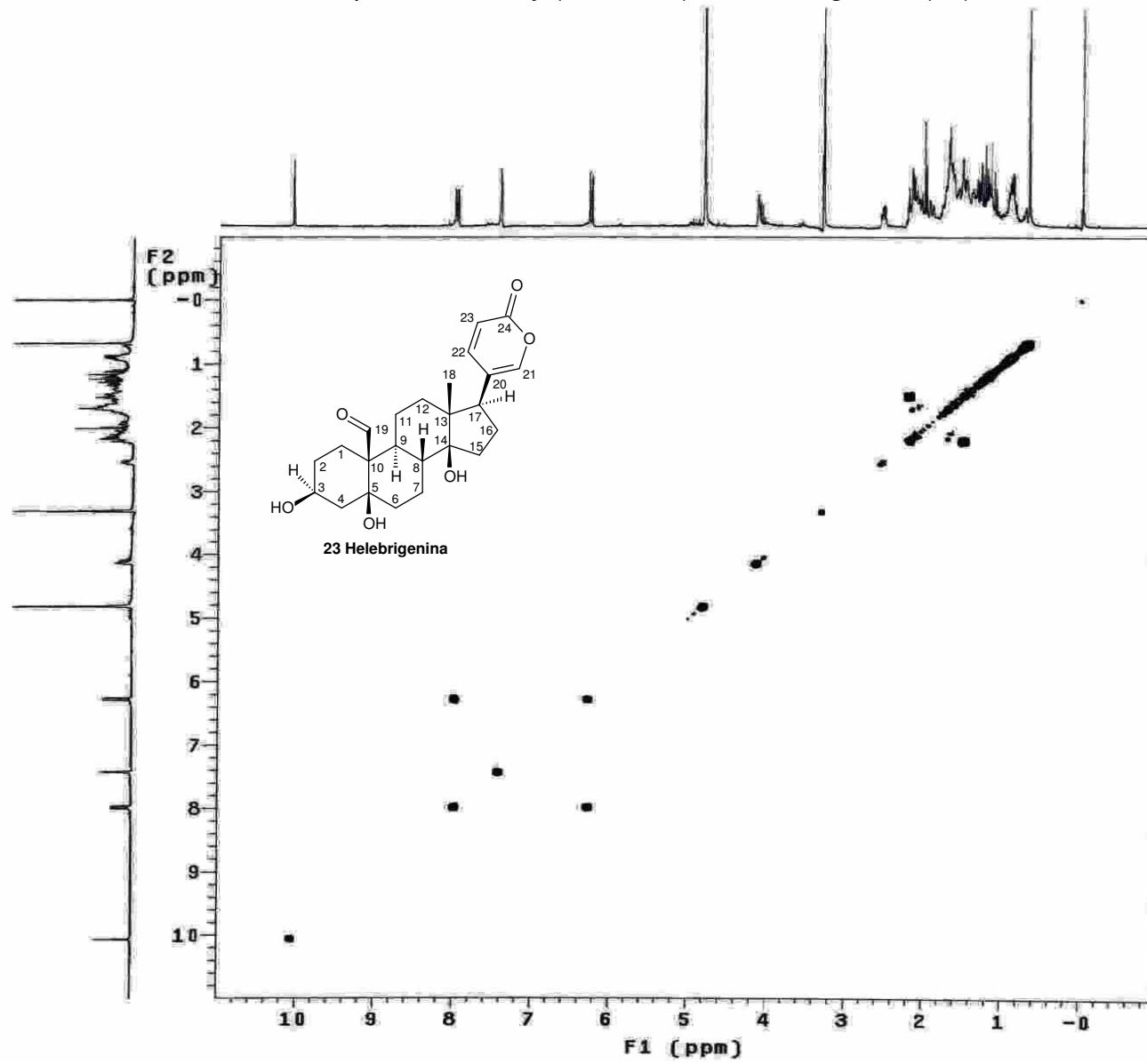
23 Helebrigenina



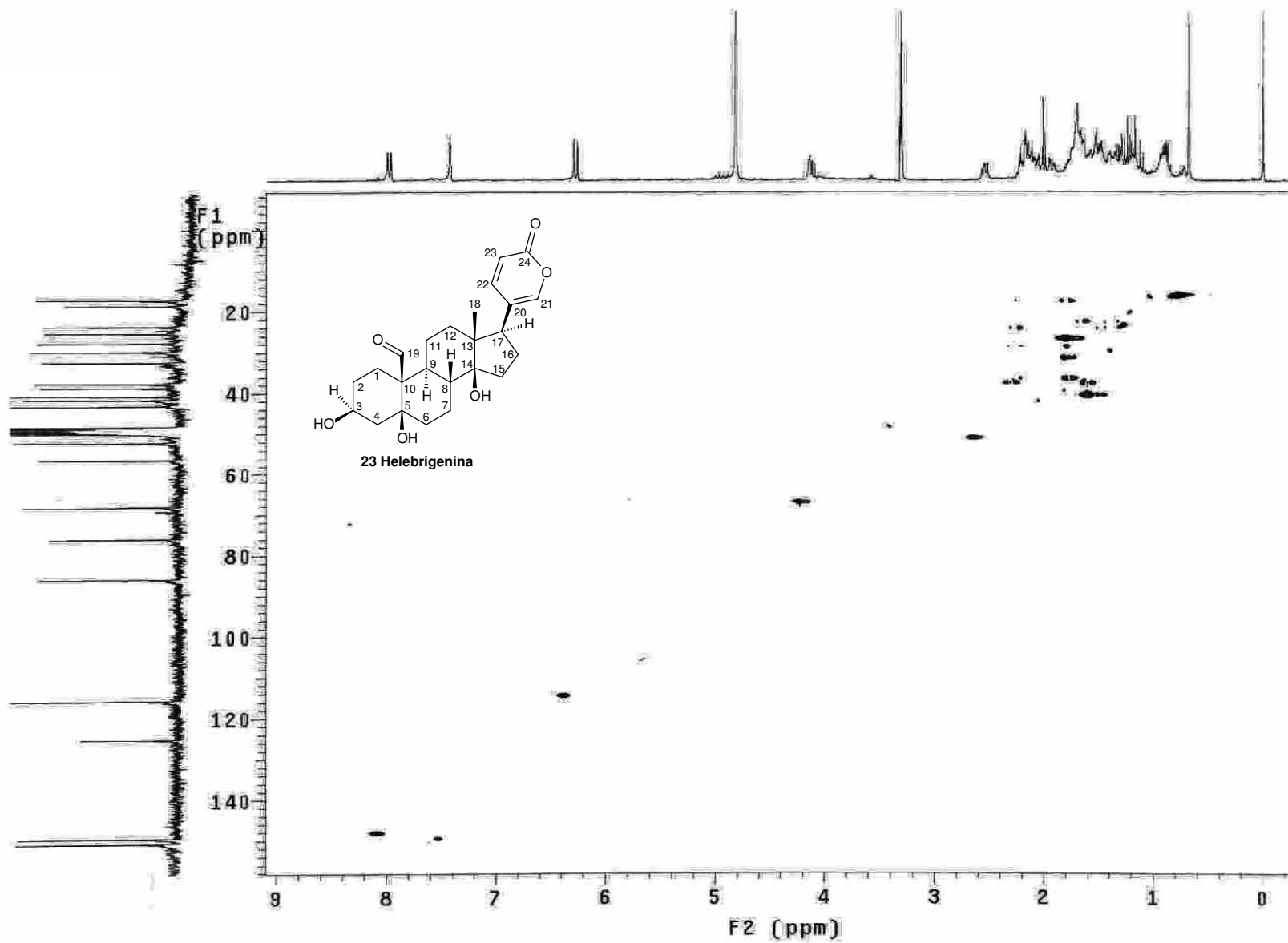
Anexo 26. Espectro de APT (75 MHz, DMSO-d₆) da Helebrigenina (23).



Anexo 27. Espectro de Cosy (DMSO.*d*₆) da Helebrigenina (23).



Anexo 28. Espectro de HMQC (DMSO- d_6) da Helebrigenina (23).



Anexo 29. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da helebrigenina (**23**).

File # 3: HBG

Mode= 2 (Mid-IR)

28/10/2009 11:57

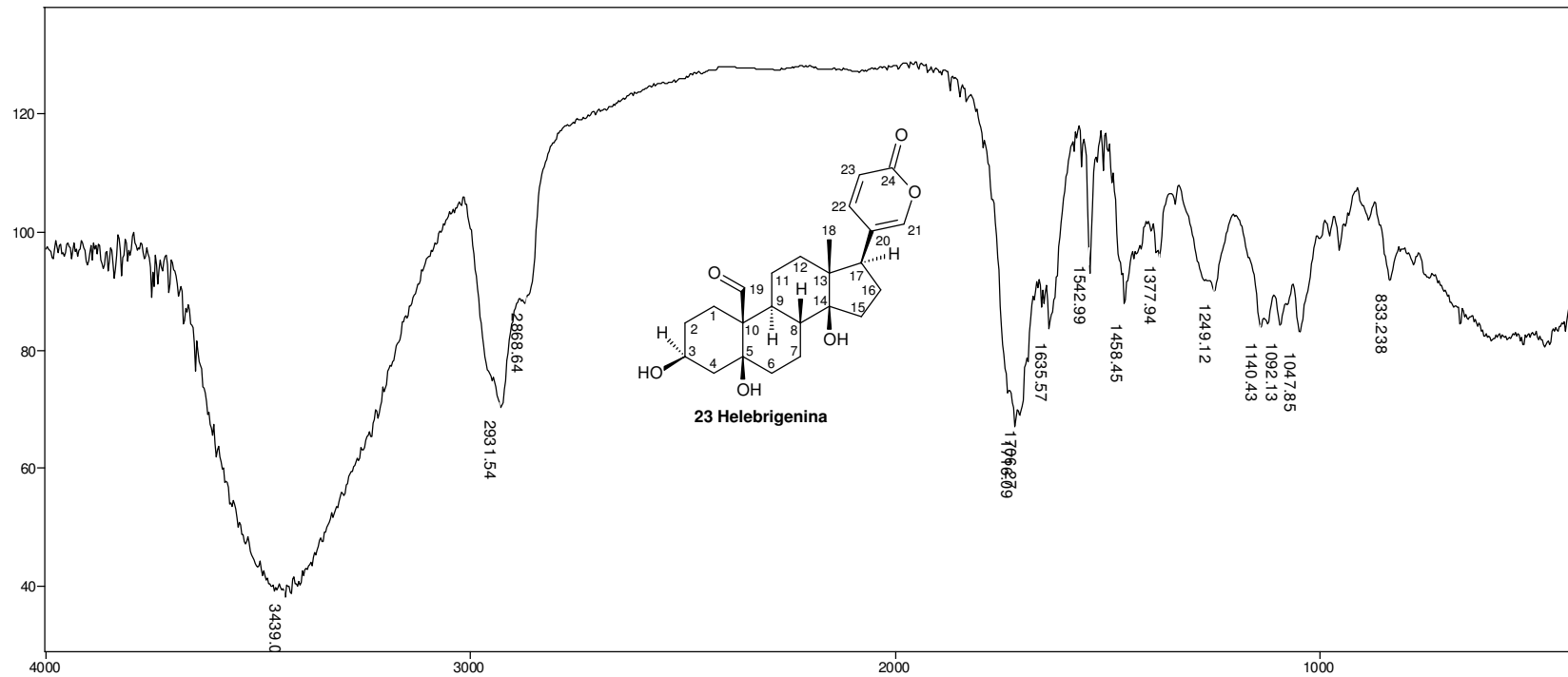
Sample Description: KBr - Dino

Scans= 10 21 scans/min

Res=4 cm^{-1}

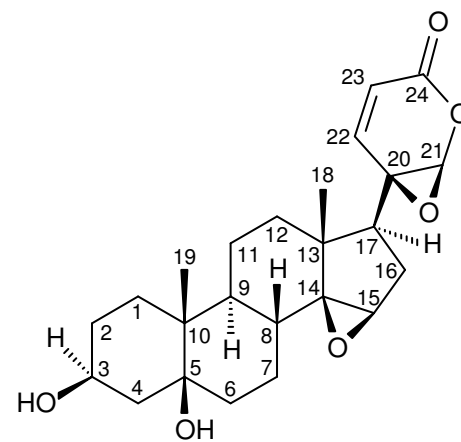
Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x

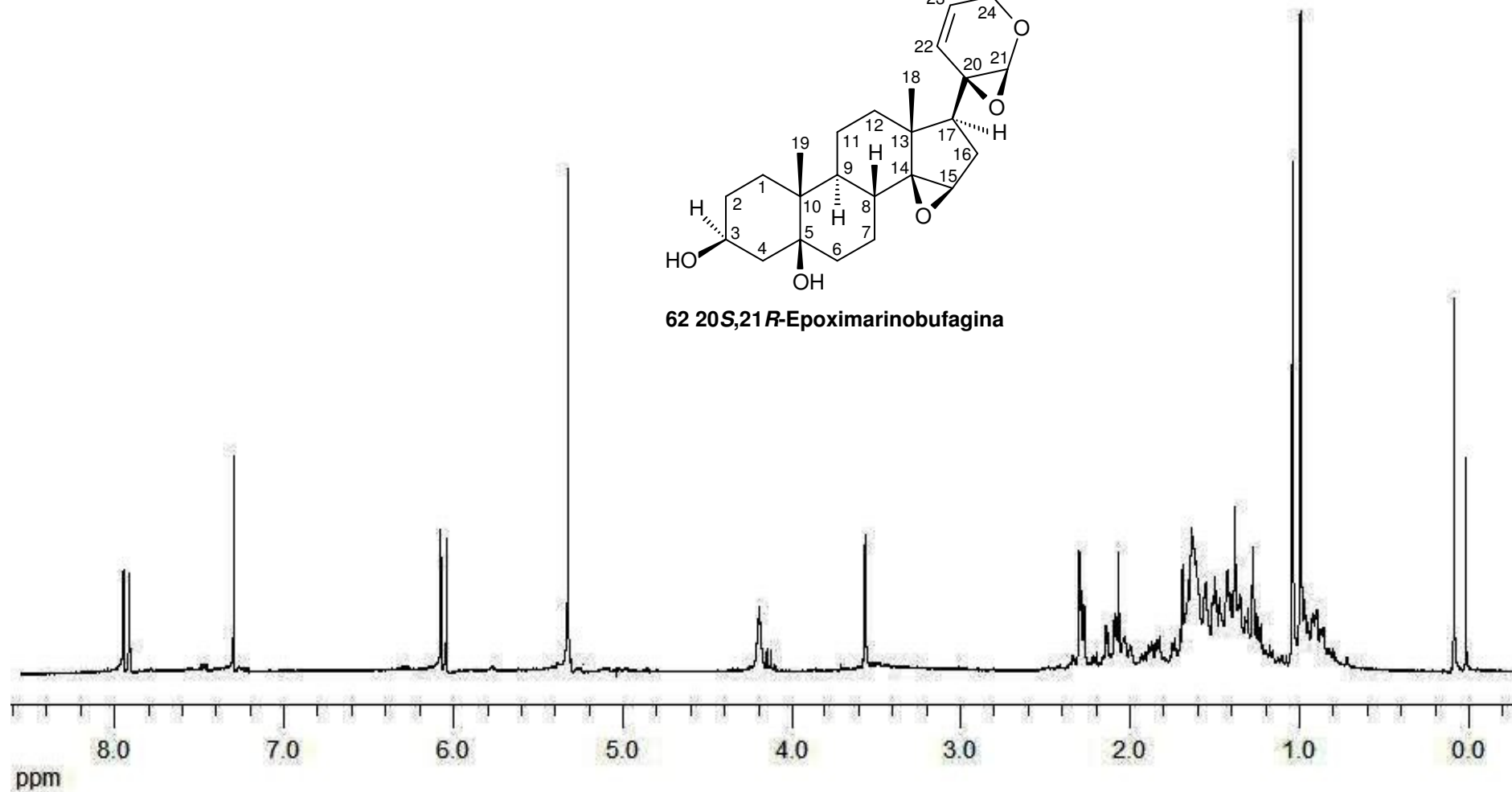


Transmittance / Wavenumber (cm^{-1})

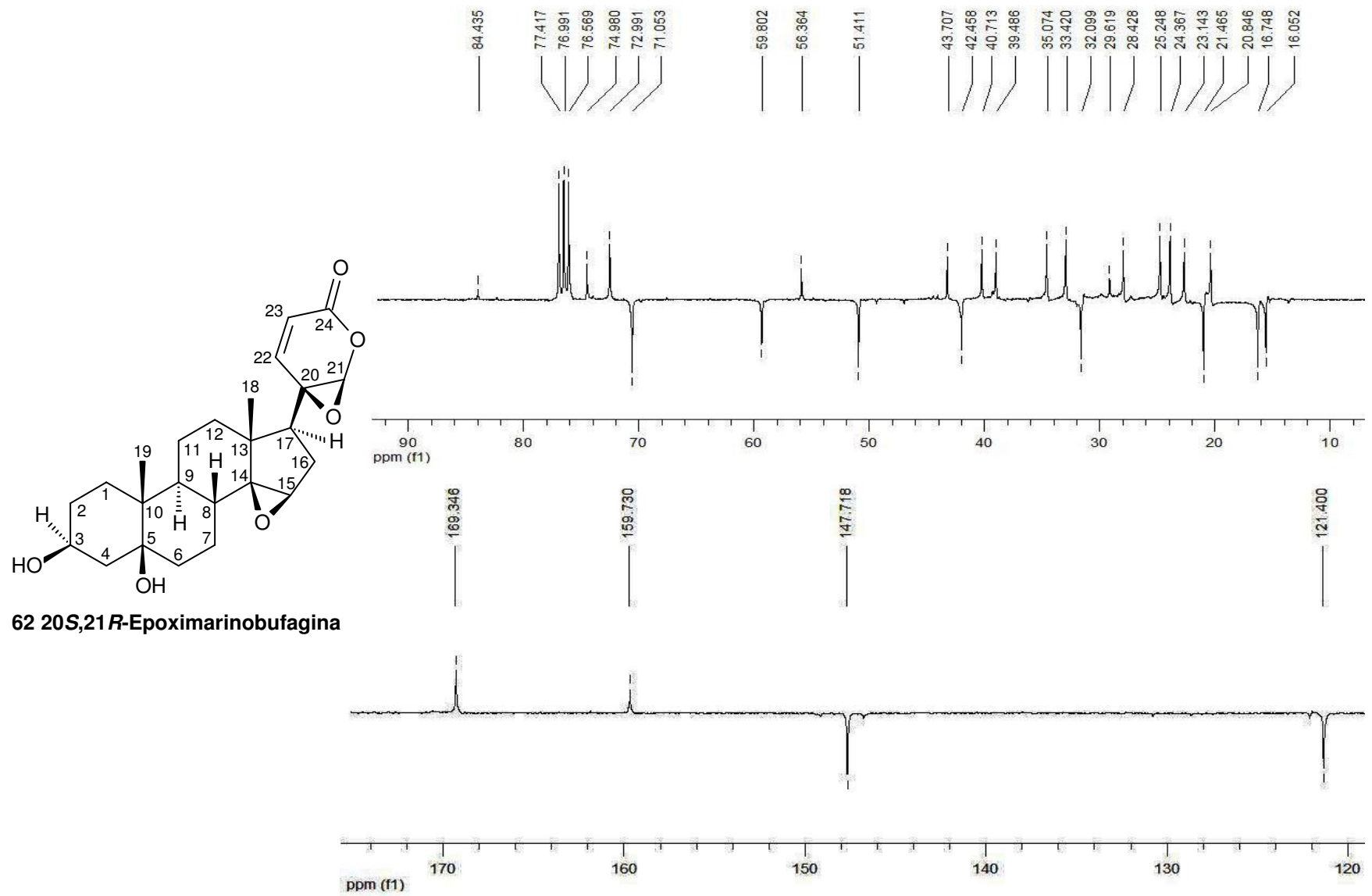
Anexo 30. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 20*S*,21*R*-Epoximarínobufagina (**62**).



62 20*S*,21*R*-Epoximarínobufagina



Anexo 31. Espectro de APT (75 MHz, CDCl_3) da 20*S*,21*R*-Epoximarínobufagina (**62**).



Anexo 32. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**62**).

File # 1 : EMBG

Mode= 2 (Mid-IR)

28/10/2009 11:52

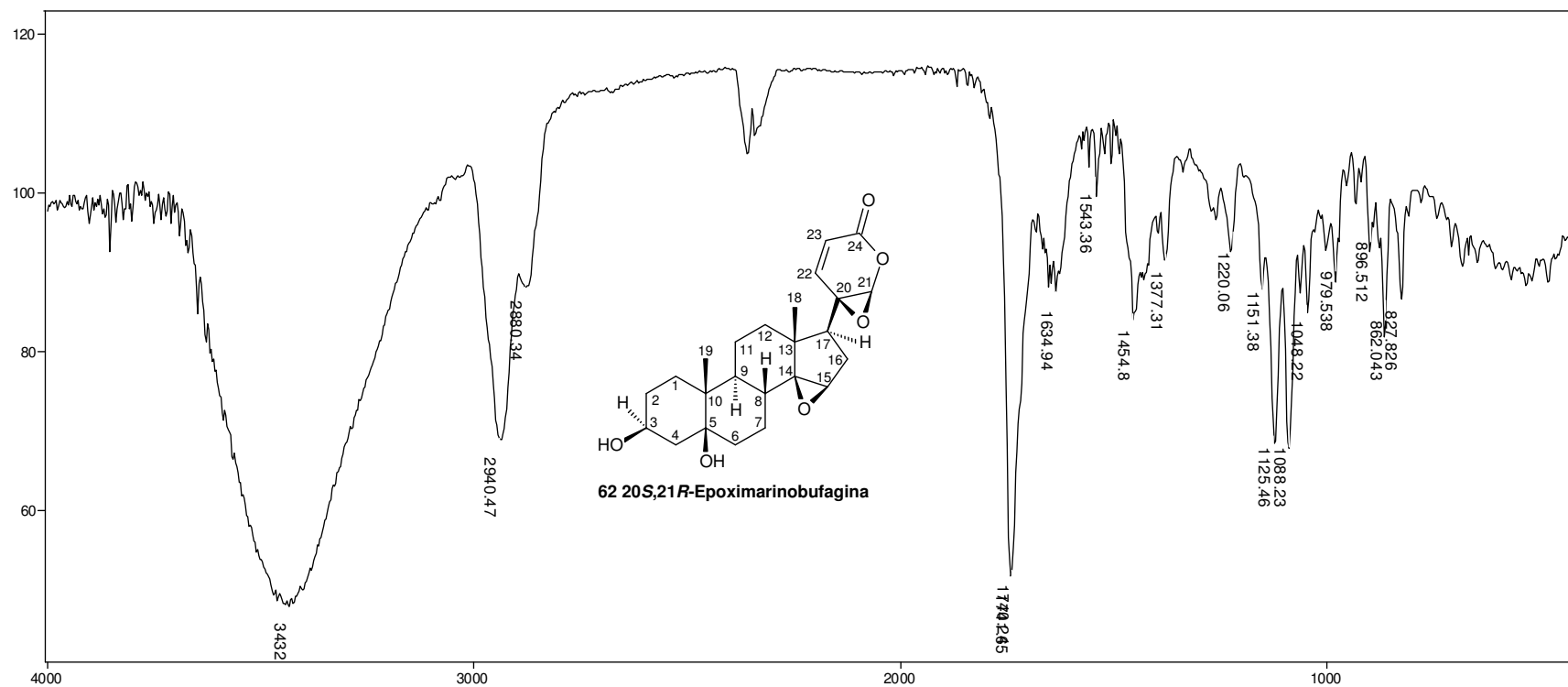
Sample Description: KBr - Dino

Scans= 10 21 scans/min

Res=4 cm^{-1}

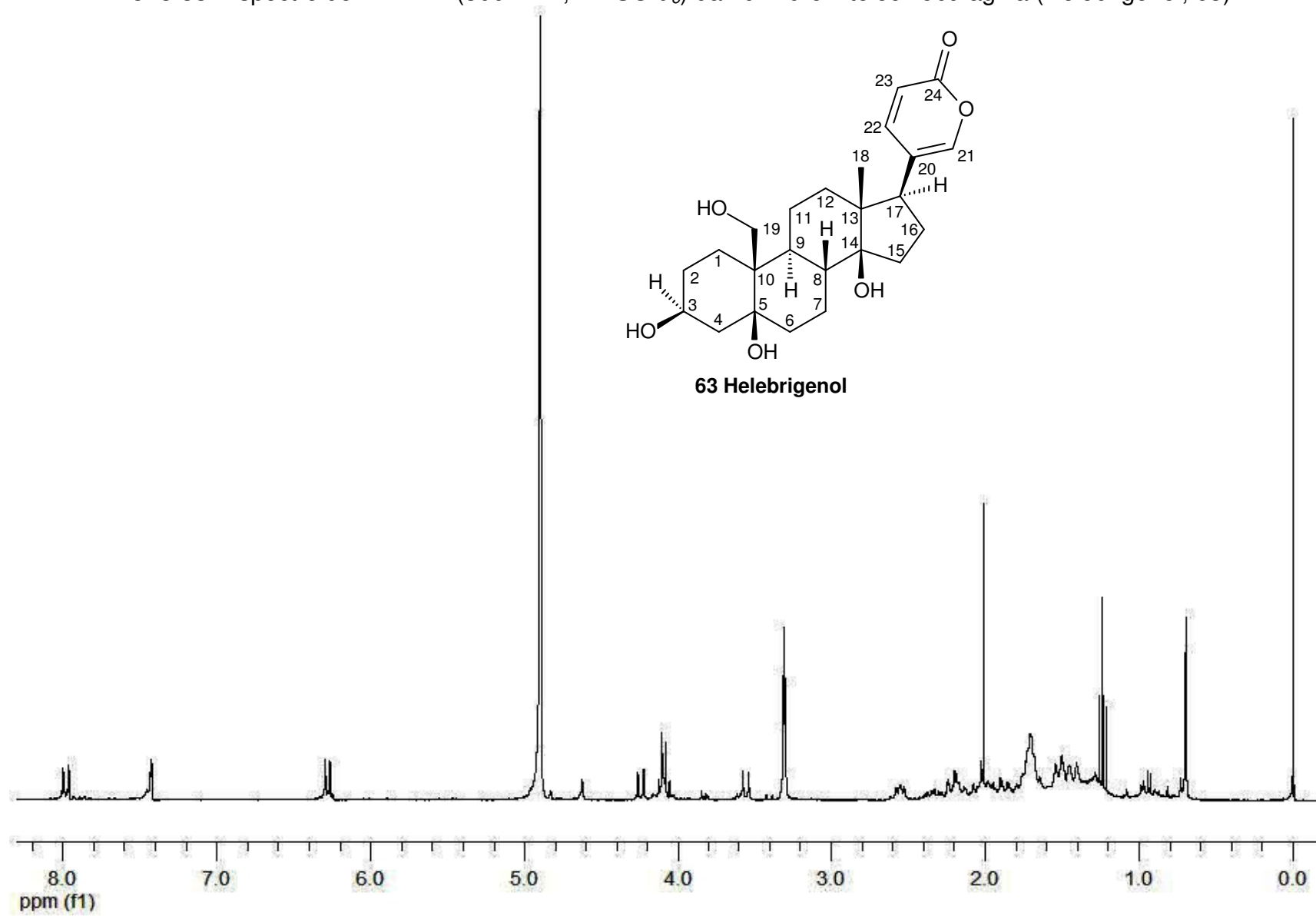
Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x

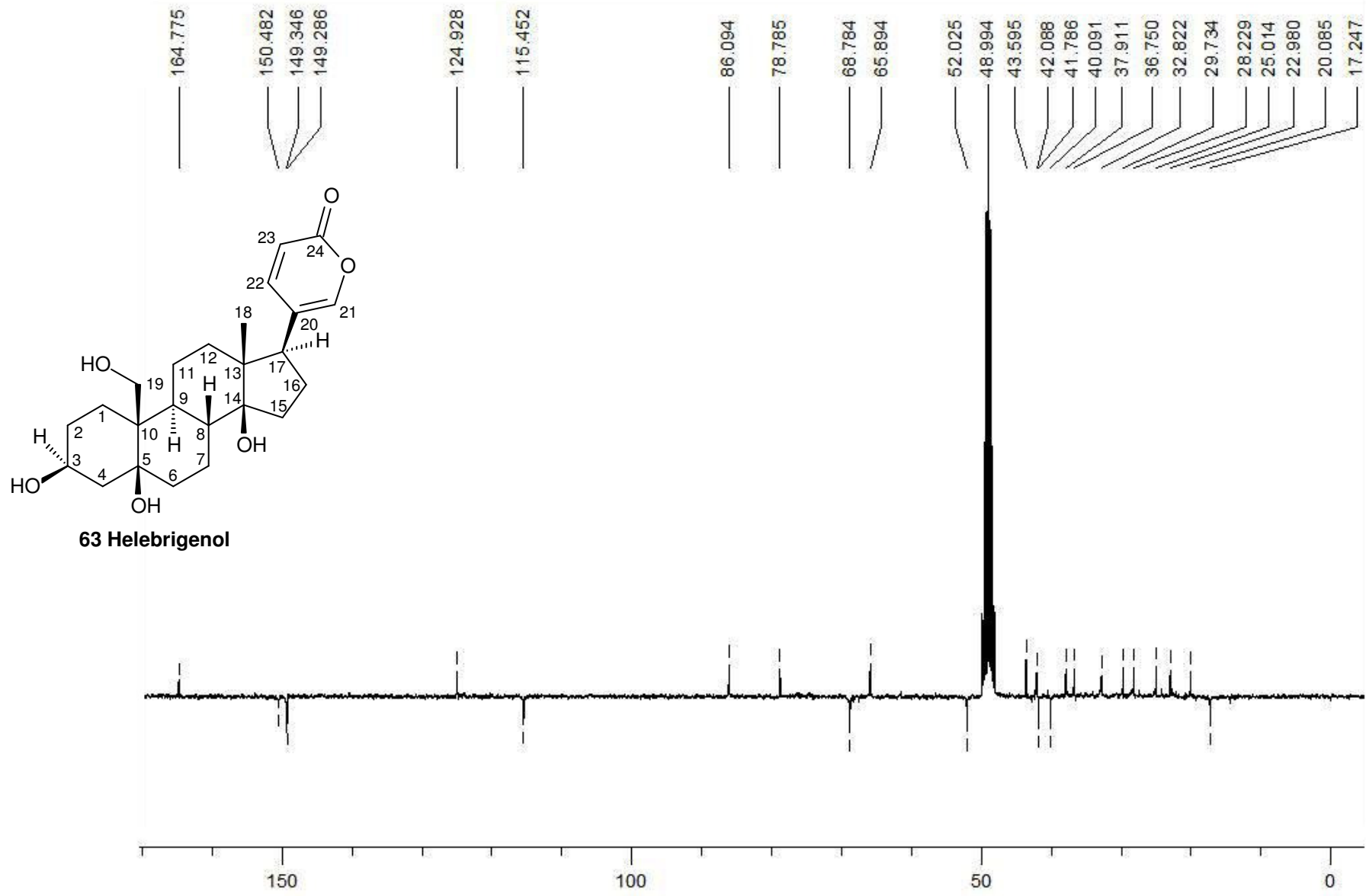


Transmittance / Wavenumber (cm^{-1})

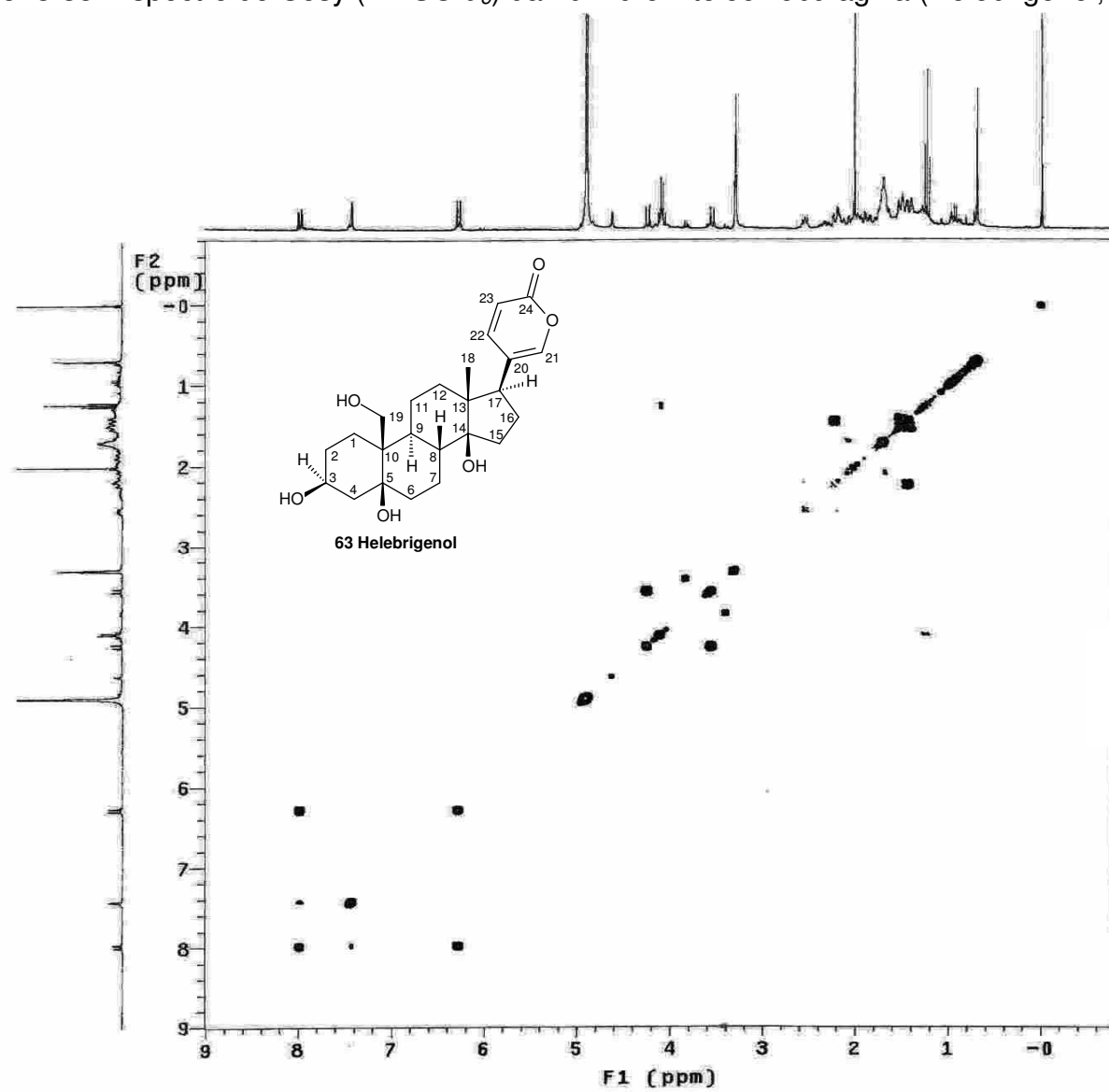
Anexo 33. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da 19-Hidróxi-telocinobufagina (Helebrigenol, **63**).



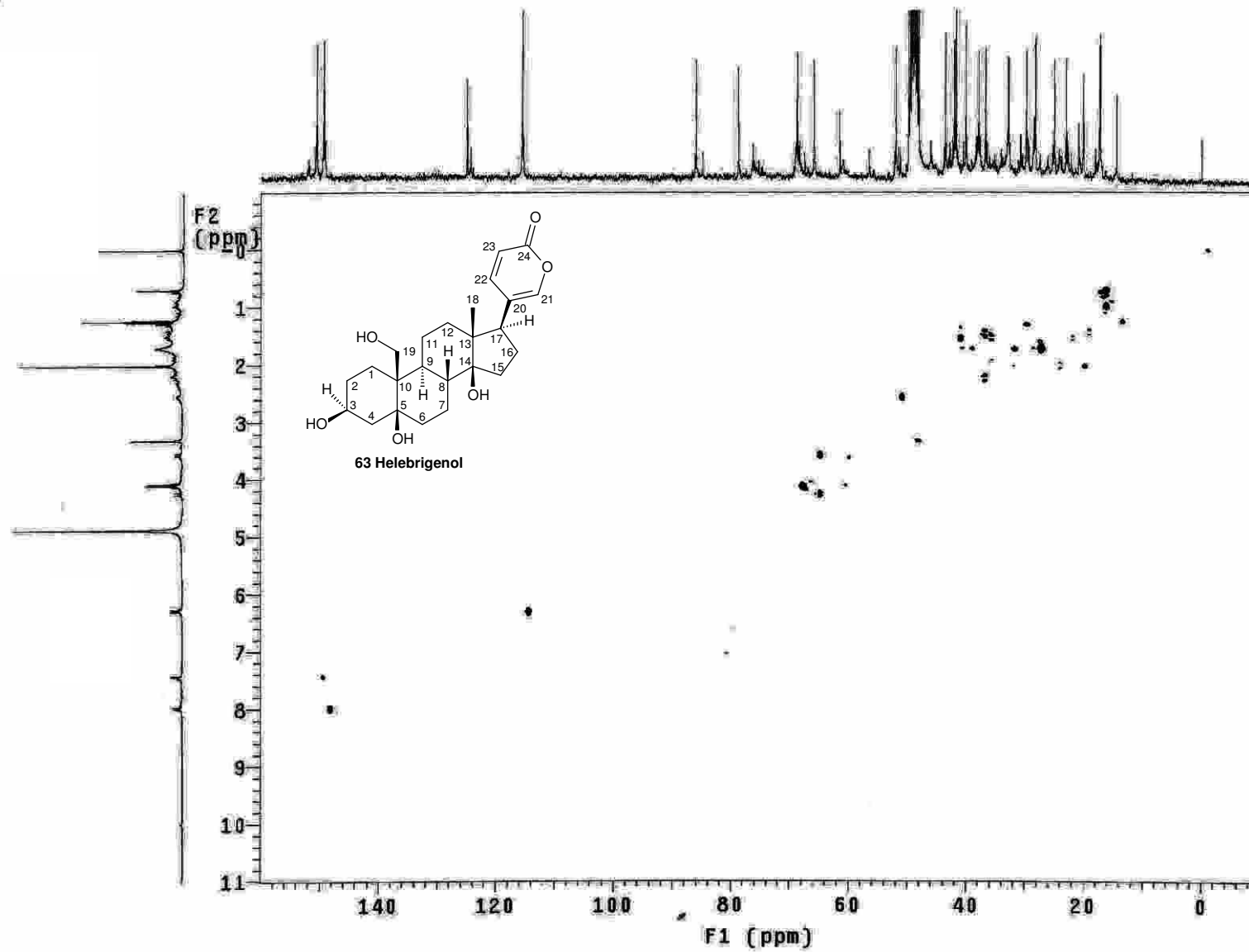
Anexo 34. Espectro de APT (75 MHz, DMSO.D₂O) da 19-hidróxi-telocinobufagina (Helebrigenol, **63**).



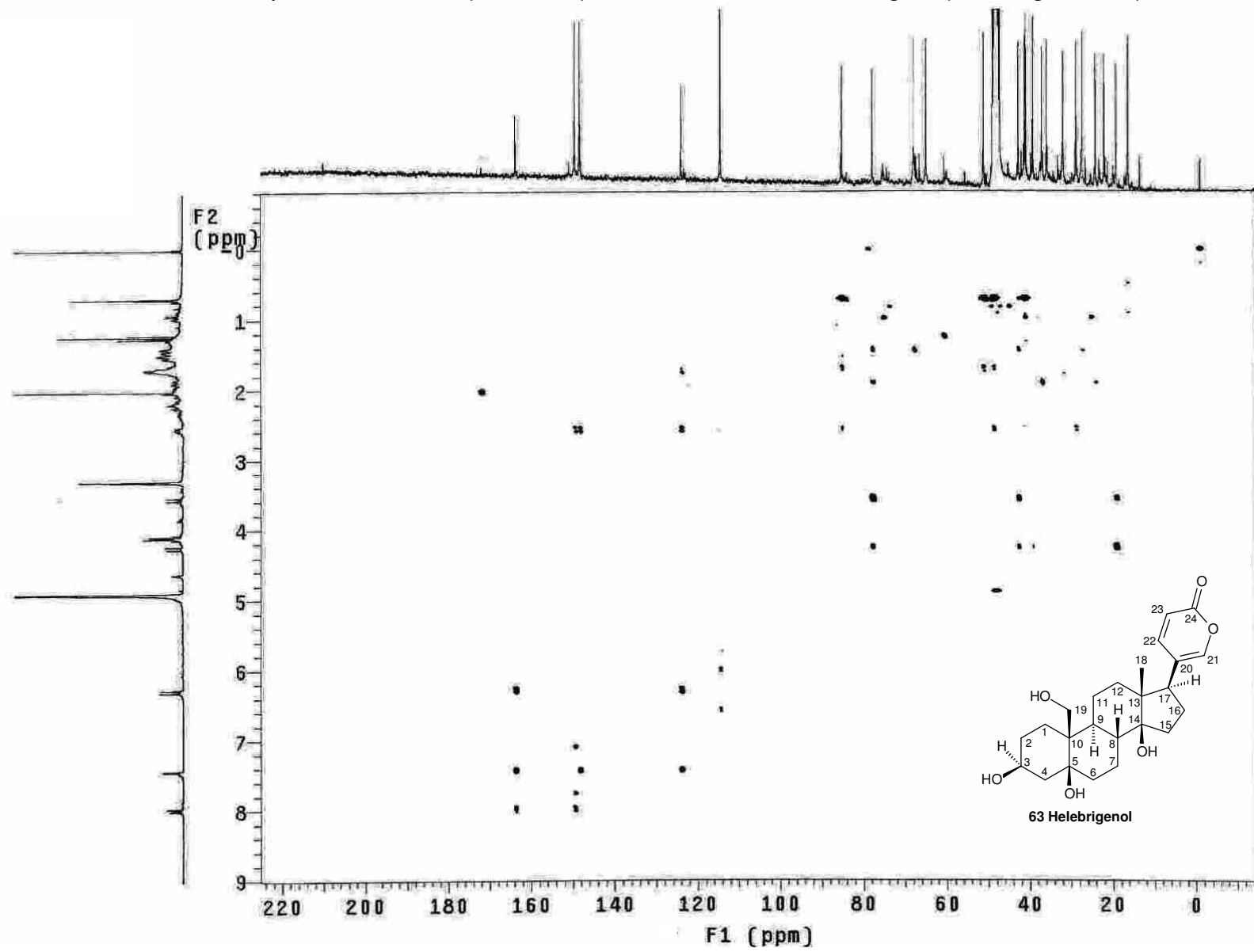
Anexo 35. Espectro de Cosy (DMSO.*d*₆) da 19-hidróxi-telocinobufagina (Helebrigenol, **63**).



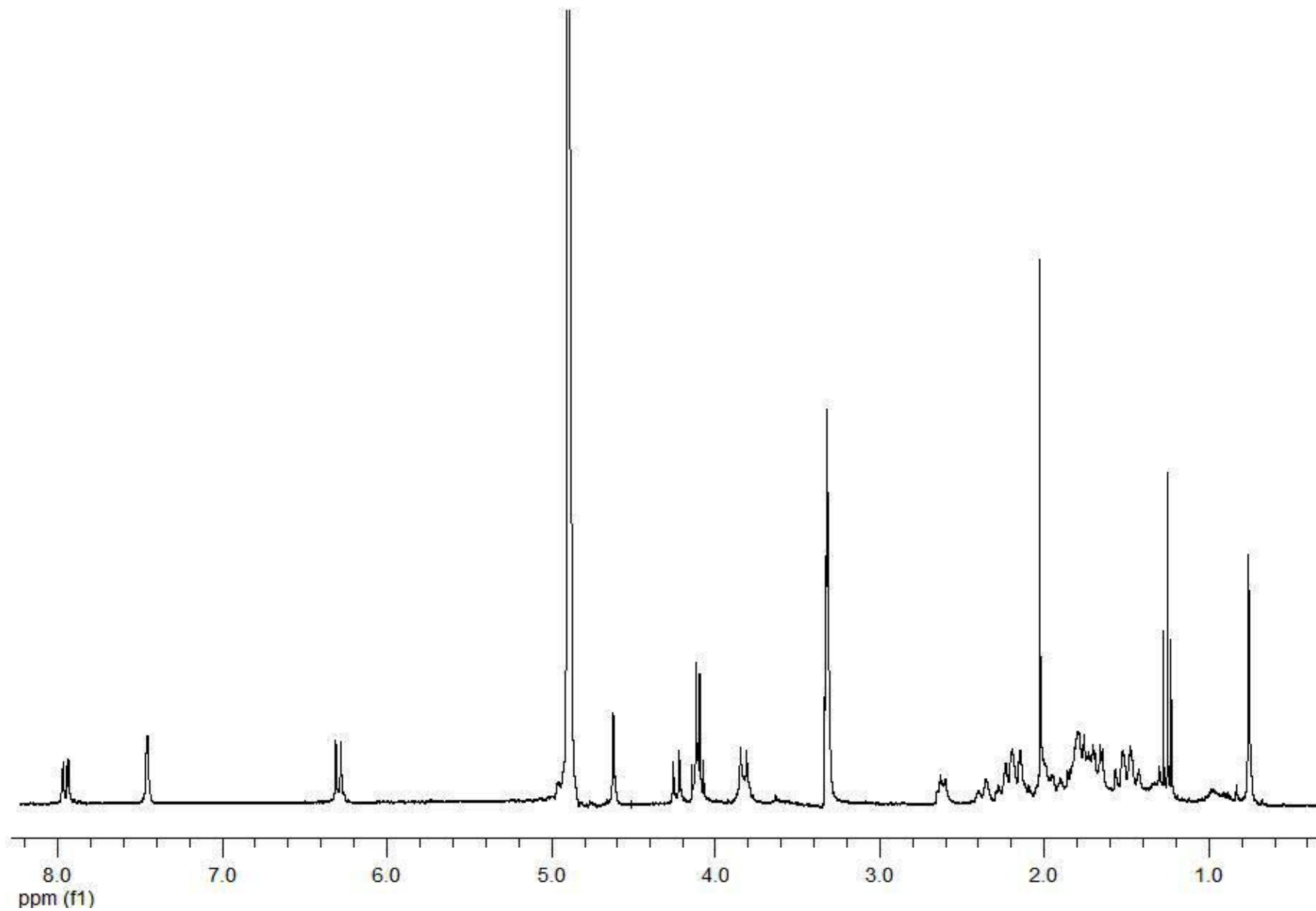
Anexo 36. Espectro de HMQC (DMSO- d_6) da 19-hidróxi-telocinobufagina (Helebrigenol, **63**).



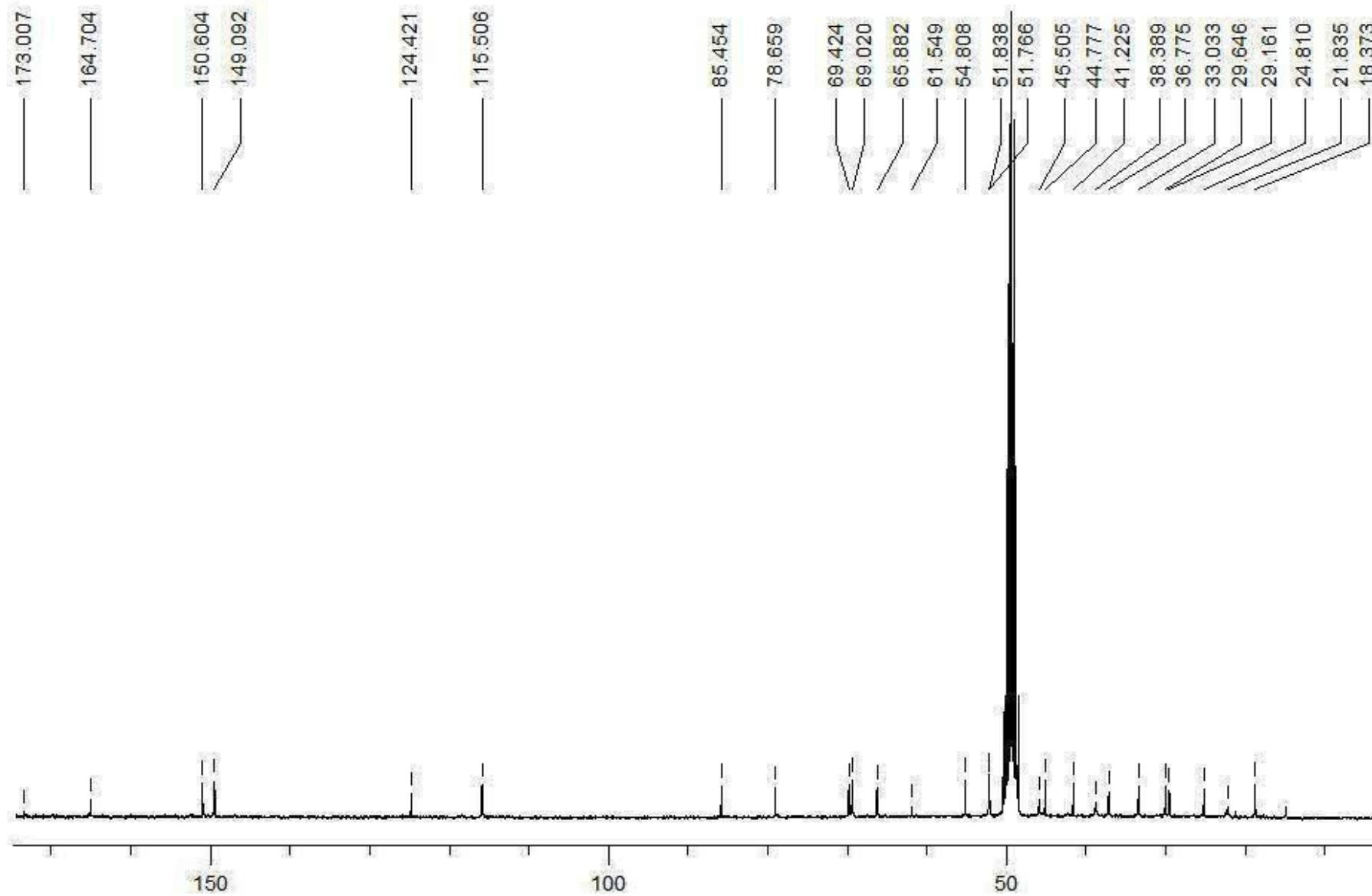
Anexo 37. Espectro de HMBC (DMSO- d_6) da 19-hidróxi-telocinobufagina (Helebrigenol, **63**).



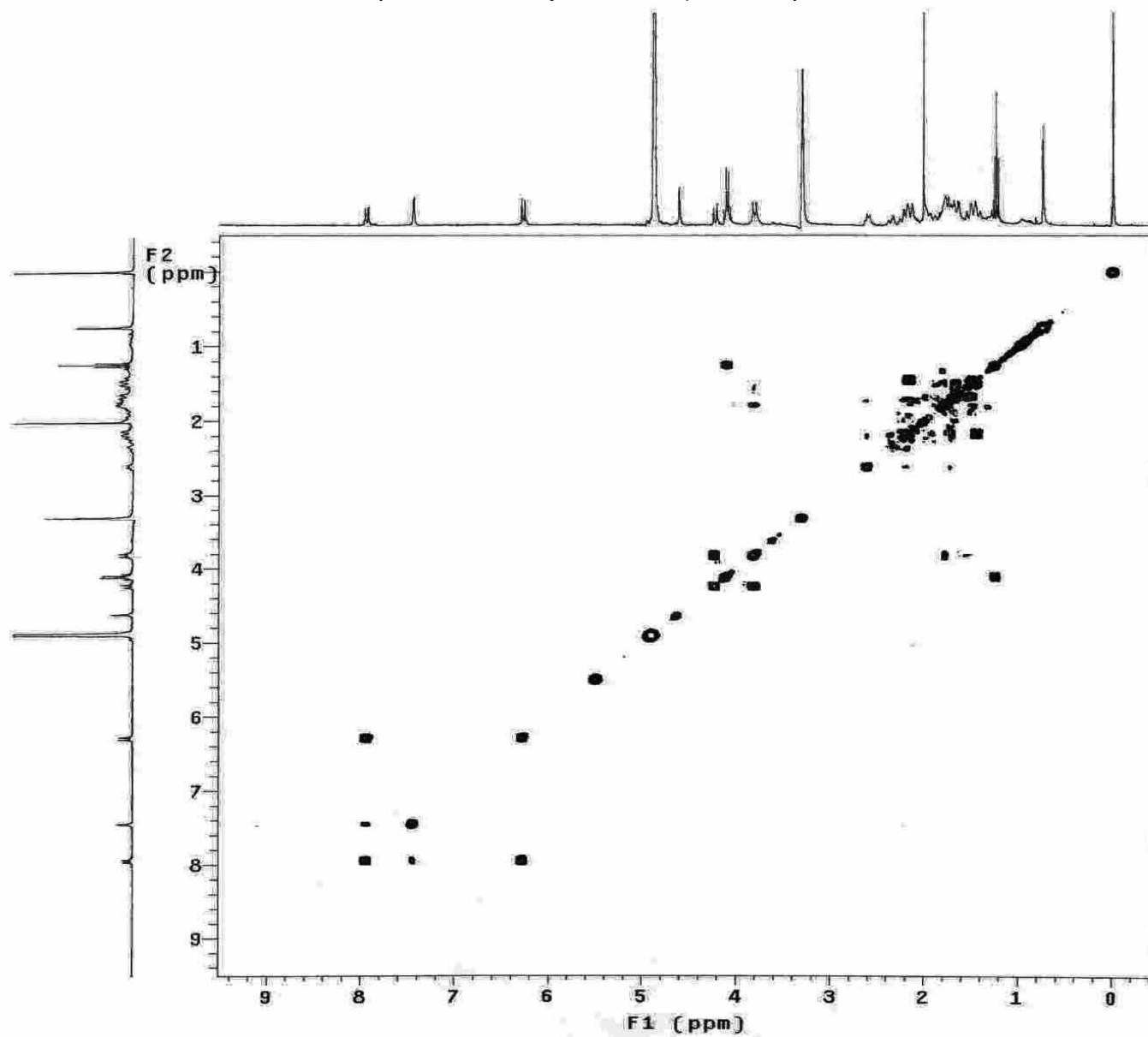
Anexo 38. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **R.sch 7**.



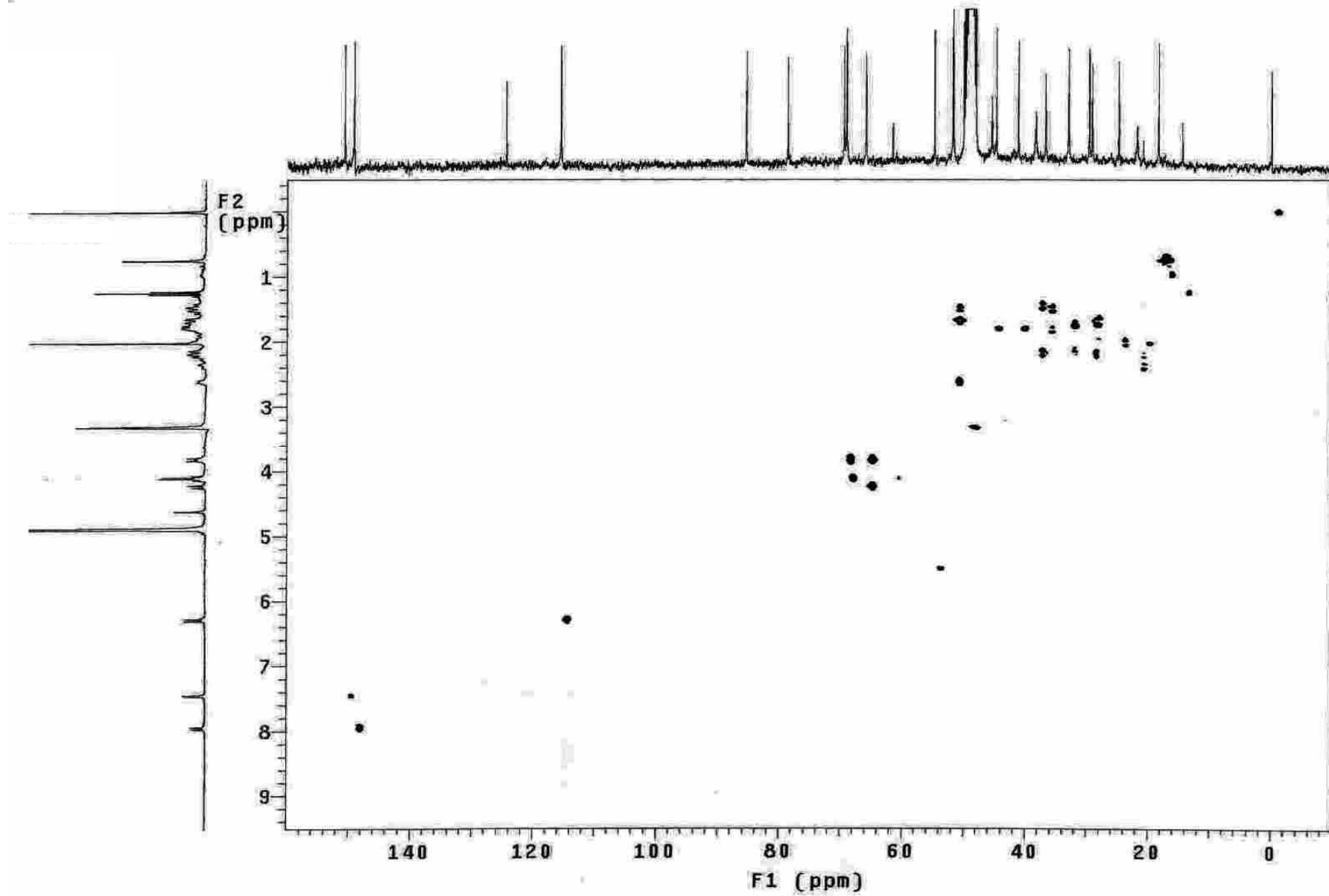
Anexo 39. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **R.sch 7**.



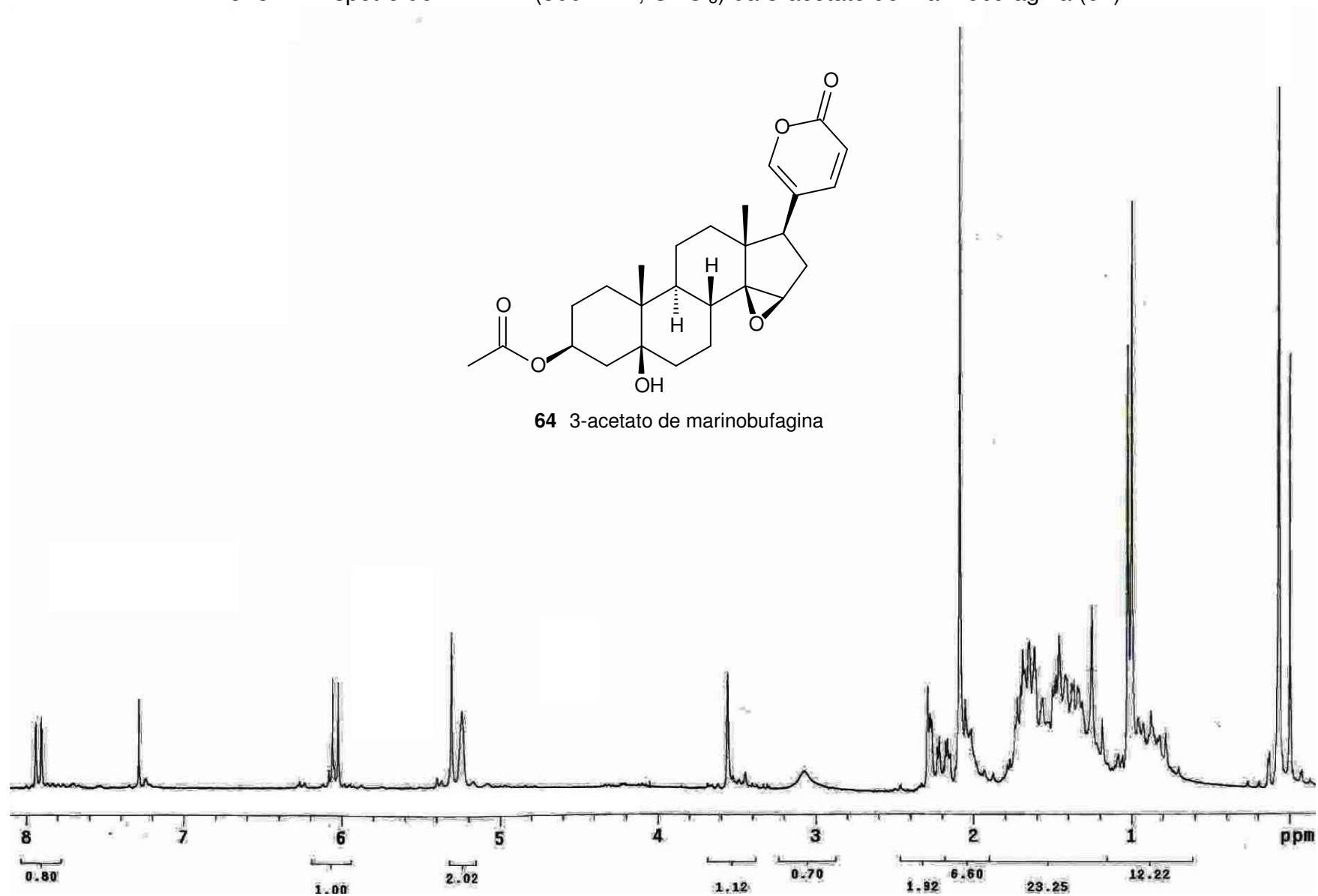
Anexo 40. Espectro de Cosy DMSO. d_6 do composto R.sch 7.



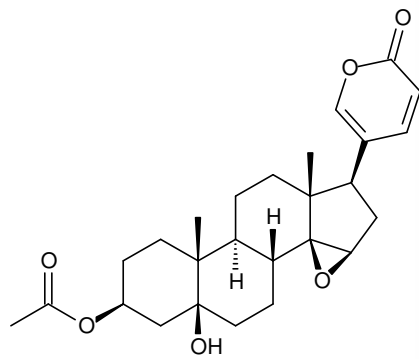
Anexo 41. Espectro de HMQC DMSO- d_6) do composto R.sch 7.



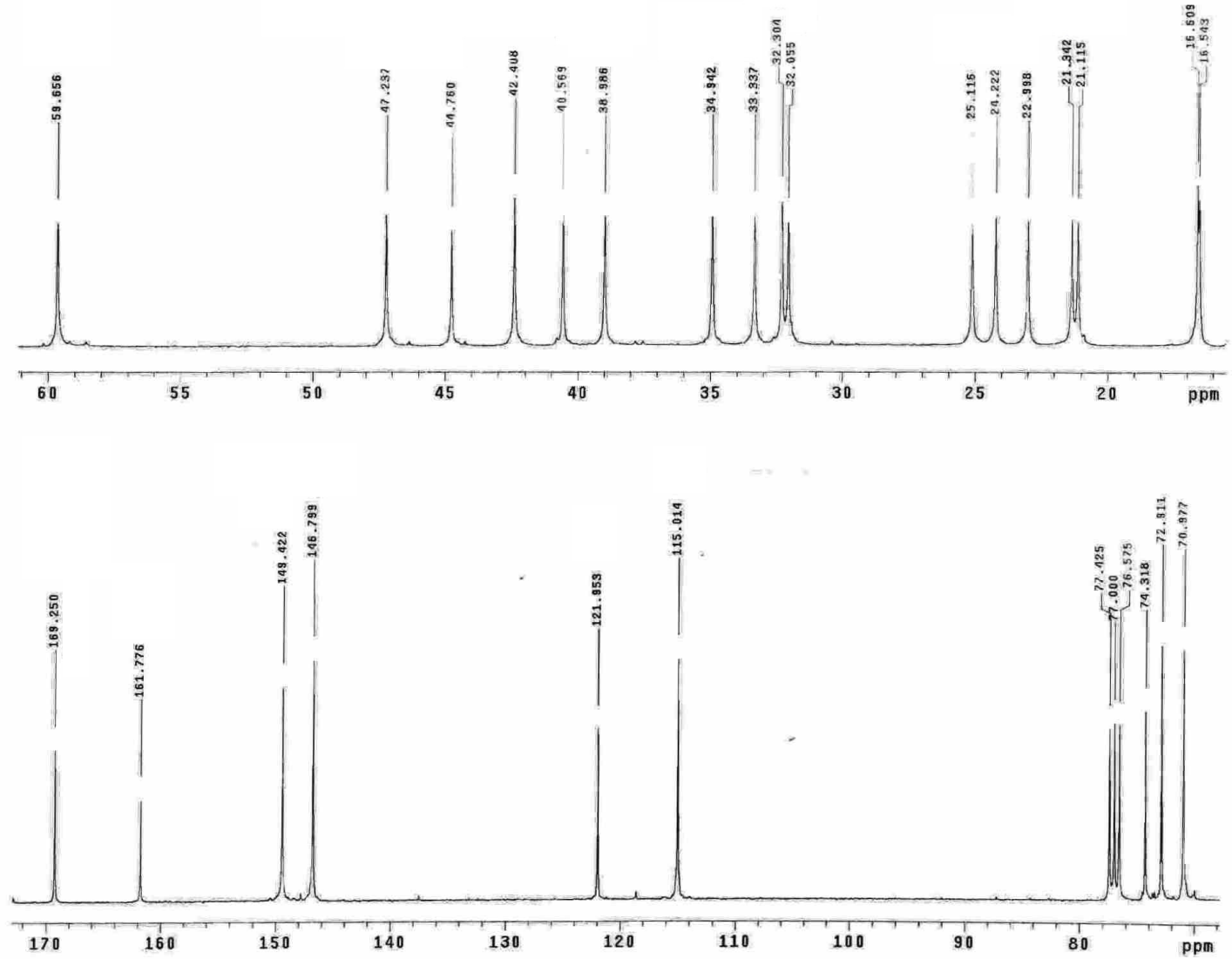
Anexo 42. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de marinobufagina (**64**).



Anexo 43. Espetro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de marinobufagina (**64**).



64 3-acetato de marinobufagina



Anexo 44. Espetro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da 3-acetato de marinobufagina (**64**).

File # 1 : ACMBG

Mode= 2 (Mid-IR)

20/10/2009 16:38

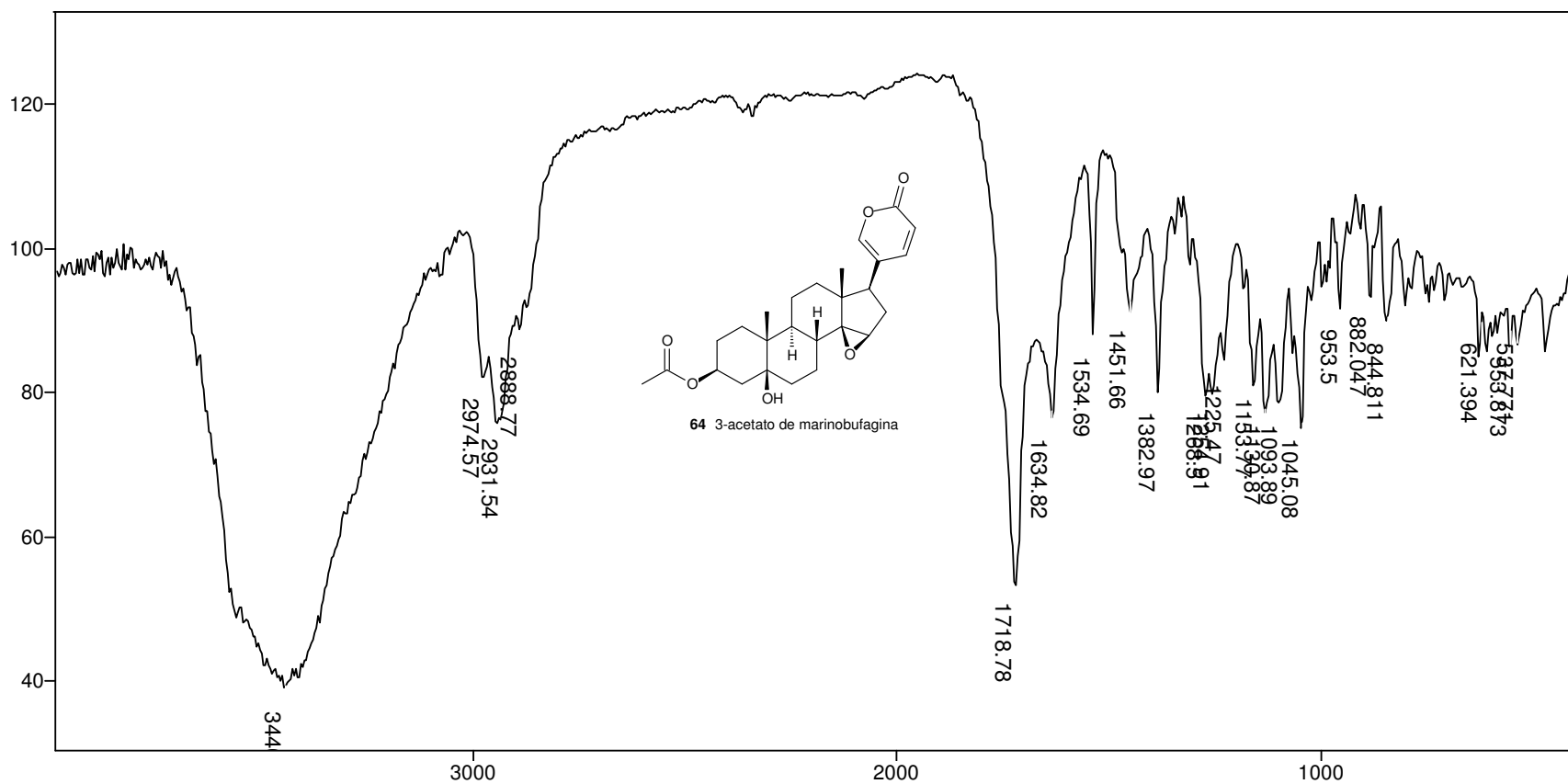
Sample Description: KBr

Scans= 10 22 scans/min

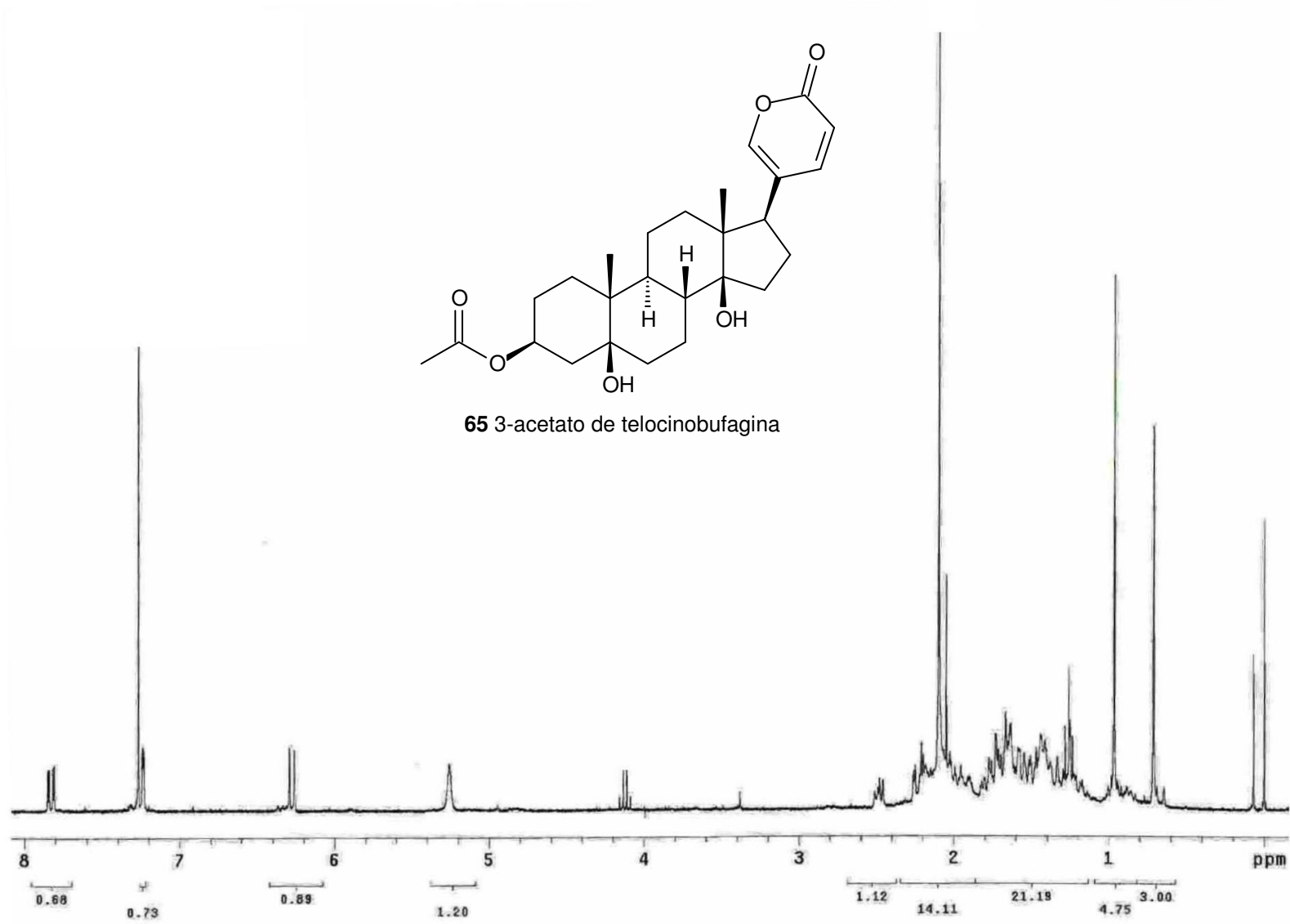
Res=4 cm^{-1}

Apod= Cosine

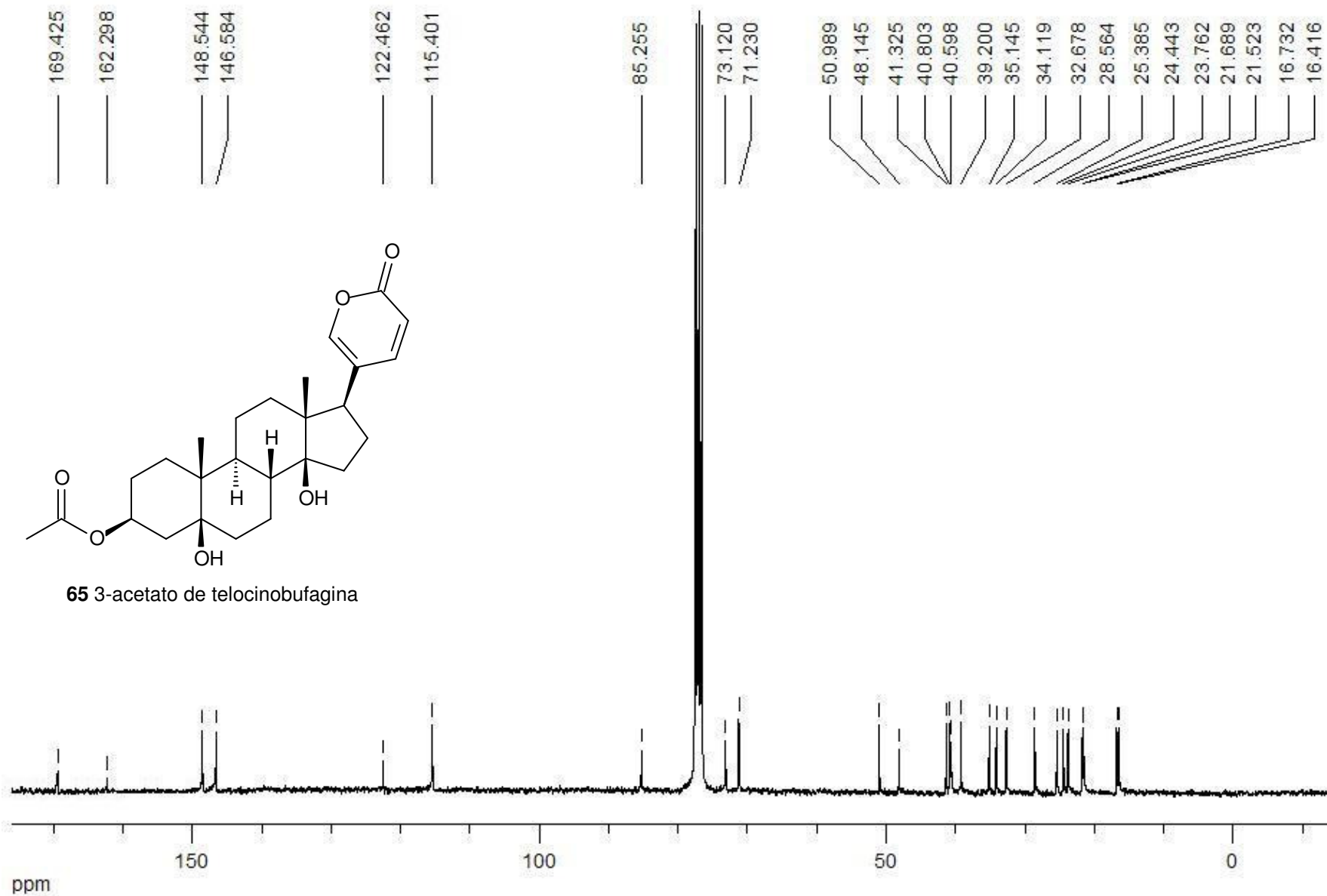
Zero Filling= 1 x



Anexo 45. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de telocinobufagina (**65**).

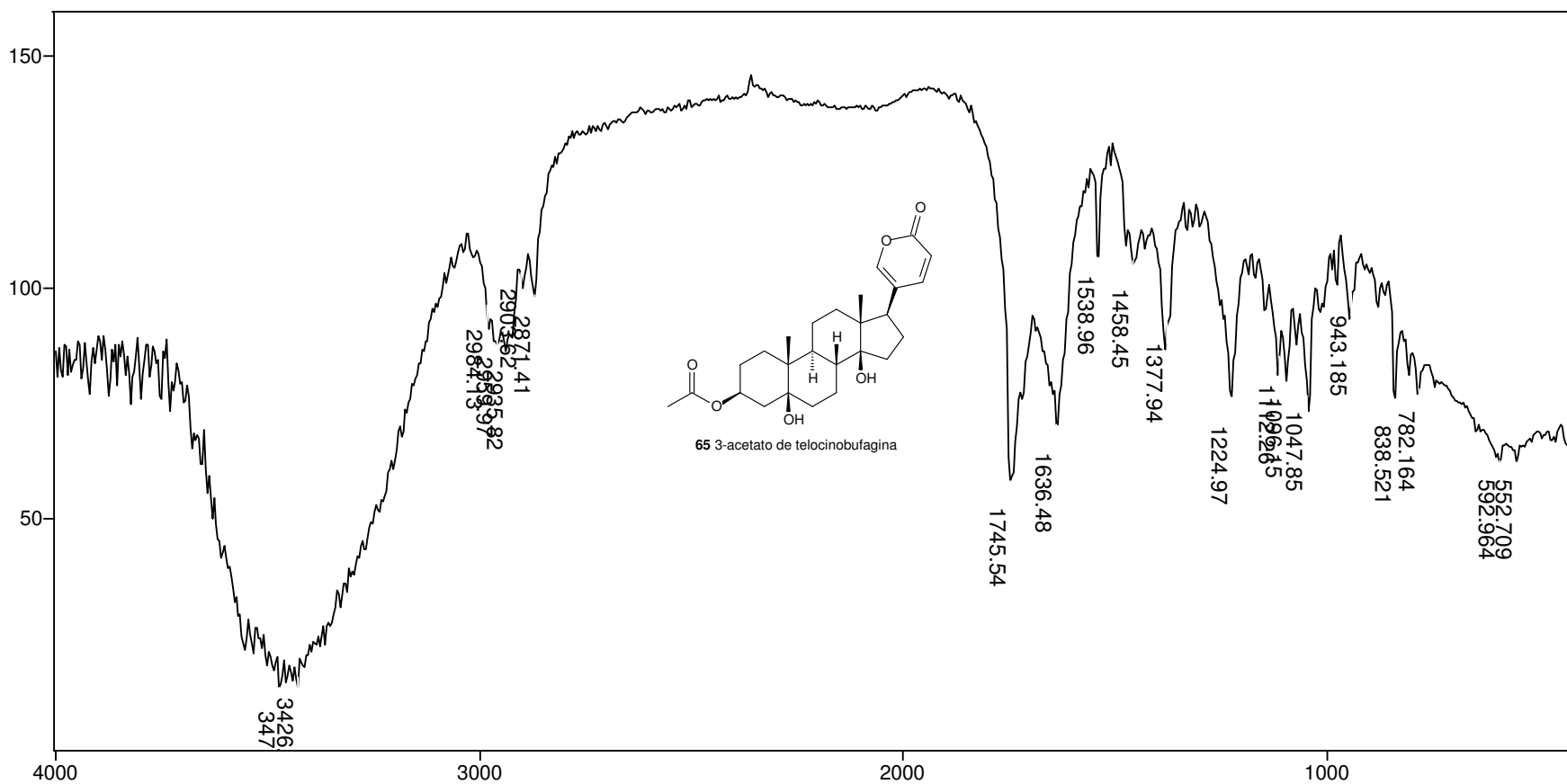


Anexo 46. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de telocinobufagina (**65**).

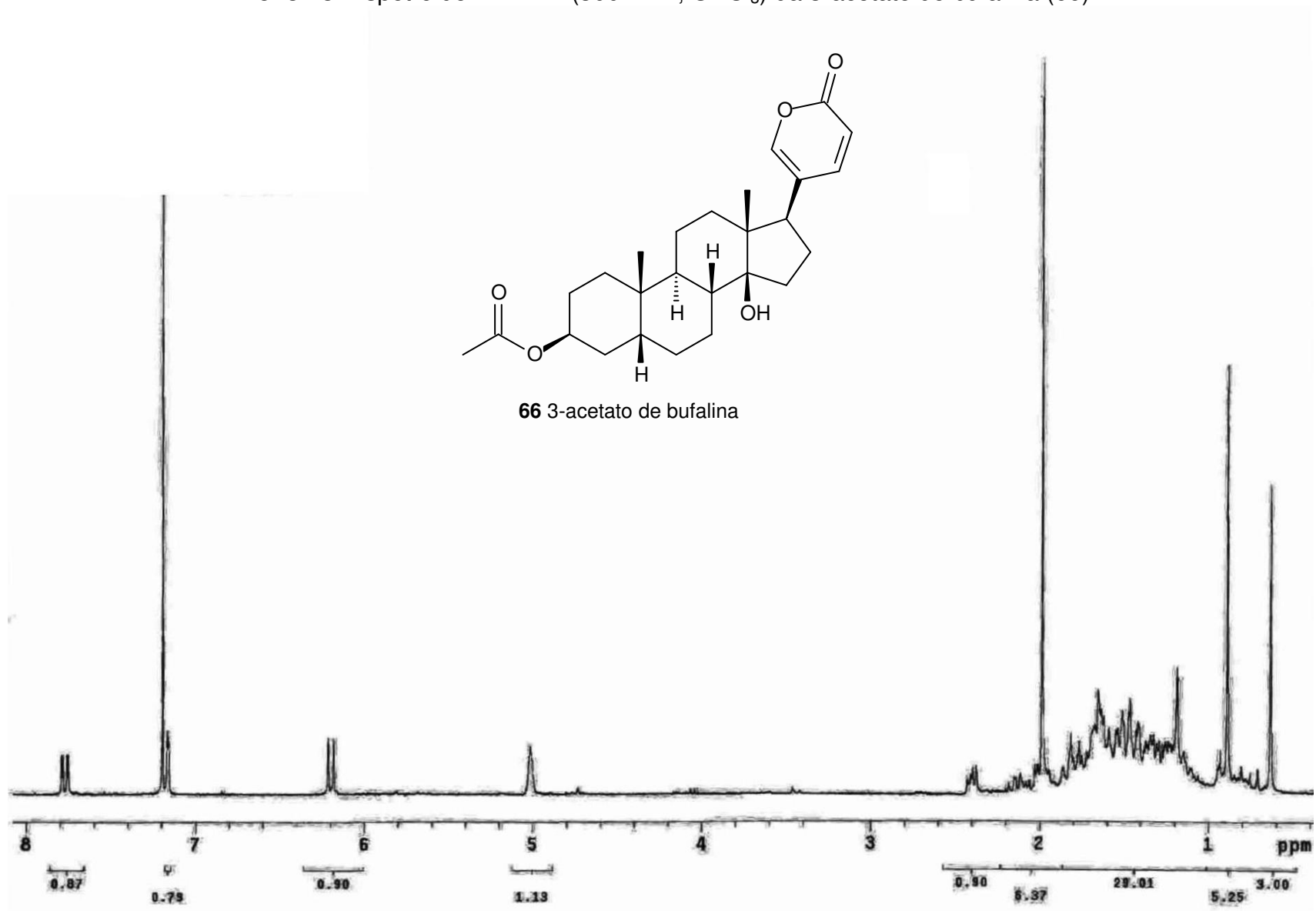


Anexo 47. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da 3-acetato de telocinobufagina (65).

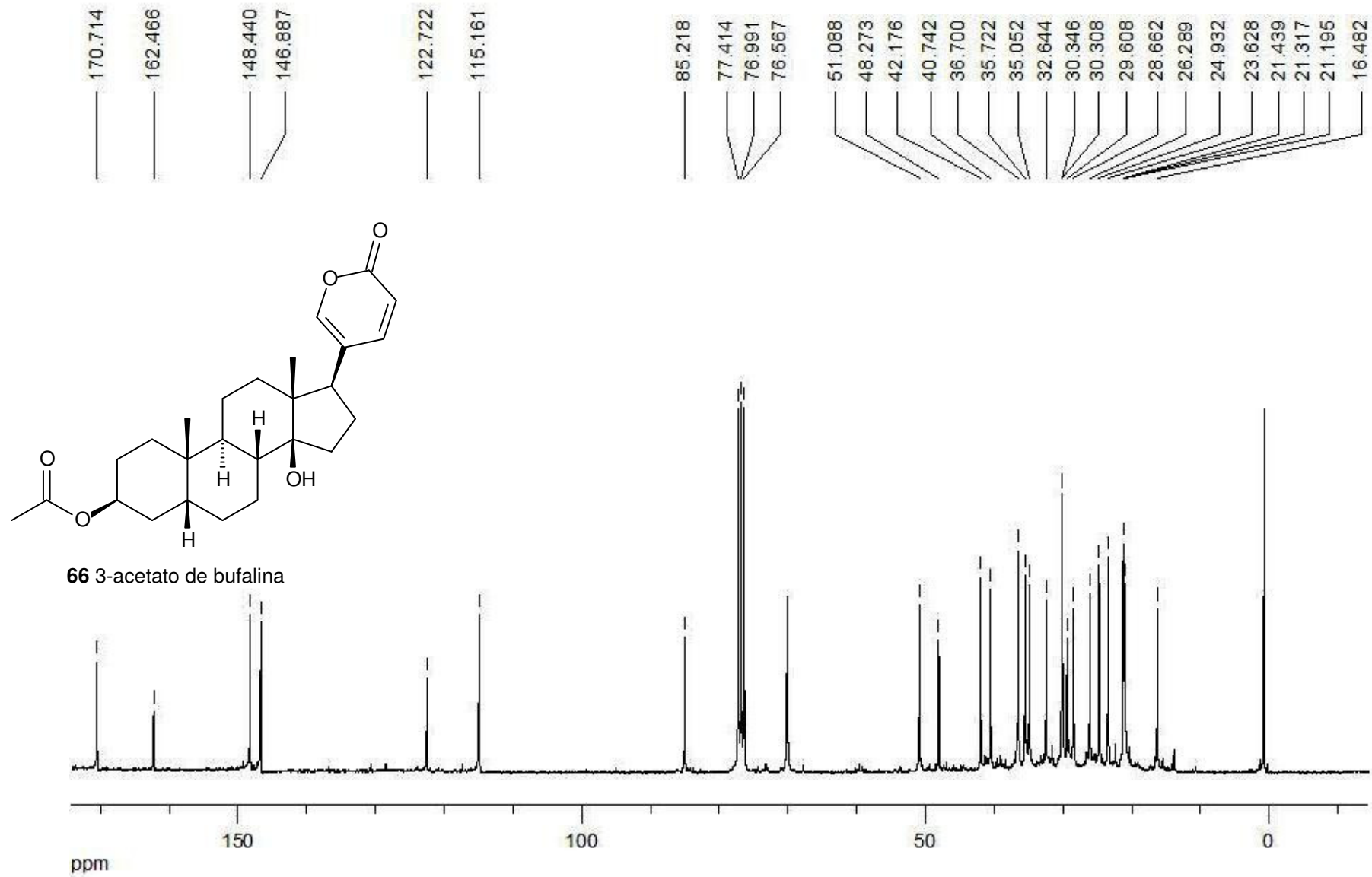
File # 3 : ACTTCB Mode= 2 (Mid-IR) 20/10/2009 16:45
Sample Description: KBr
Scans= 10 21 scans/min Res=4 cm^{-1} Apod= Cosine Zero Filling= 1 x



Anexo 48. Espetro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de bufalina (**66**).



Anexo 49. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de bufalina (**66**).



Anexo 50. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da 3-acetato de bufalina (66).

File # 2 : ACTBFL

Mode= 2 (Mid-IR)

20/10/2009 15:42

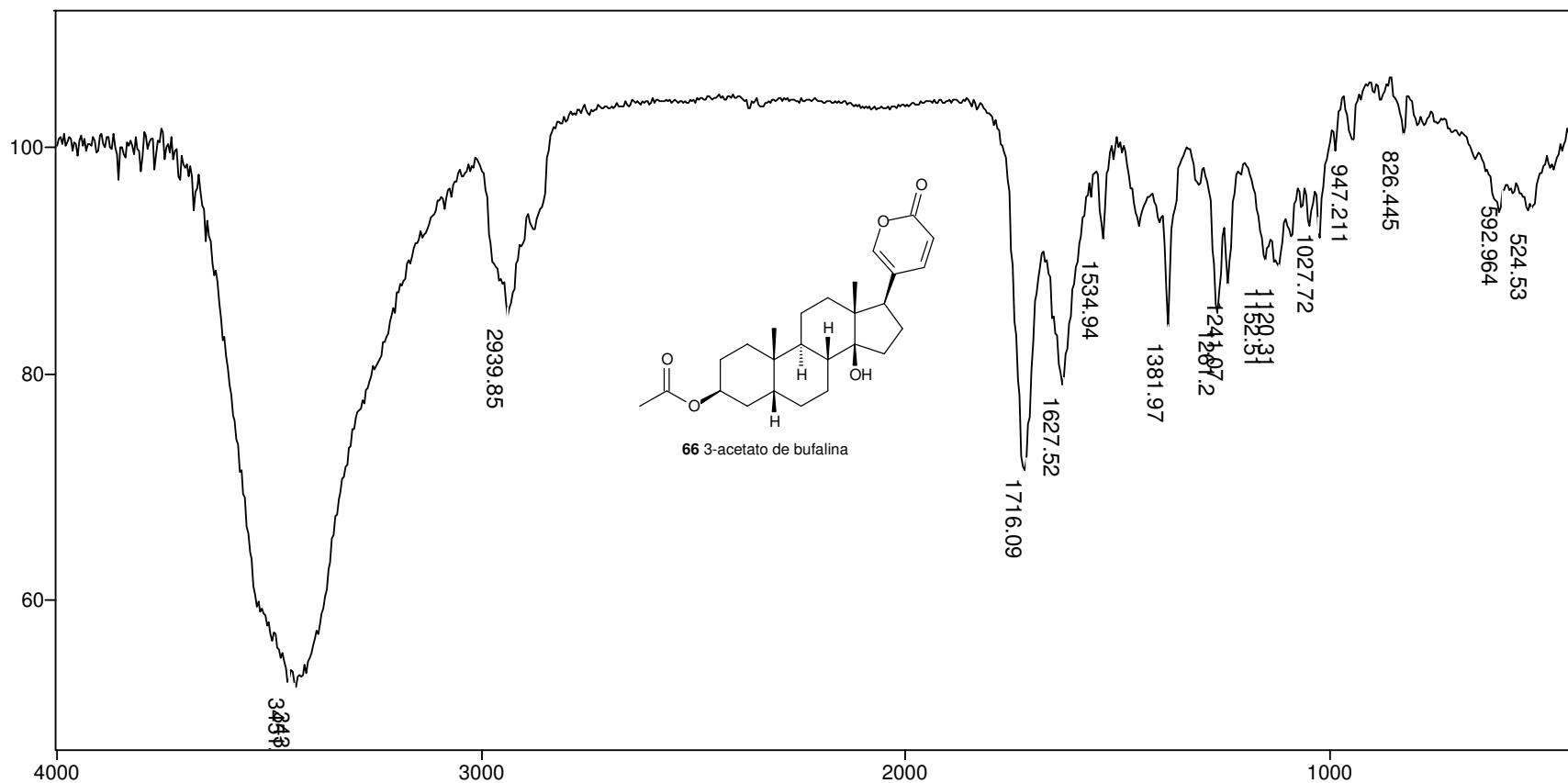
Sample Description: KBr

Scans= 10 22 scans/min

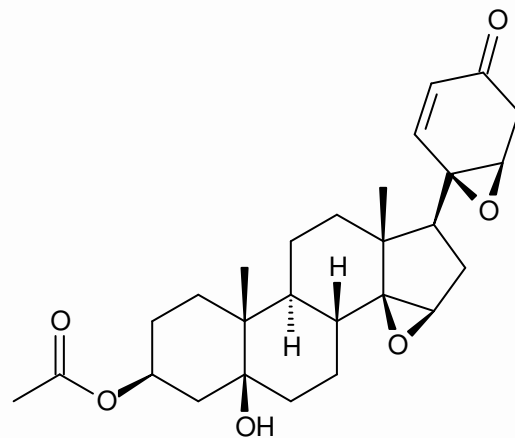
Res=4 cm^{-1}

Apod= Cosine

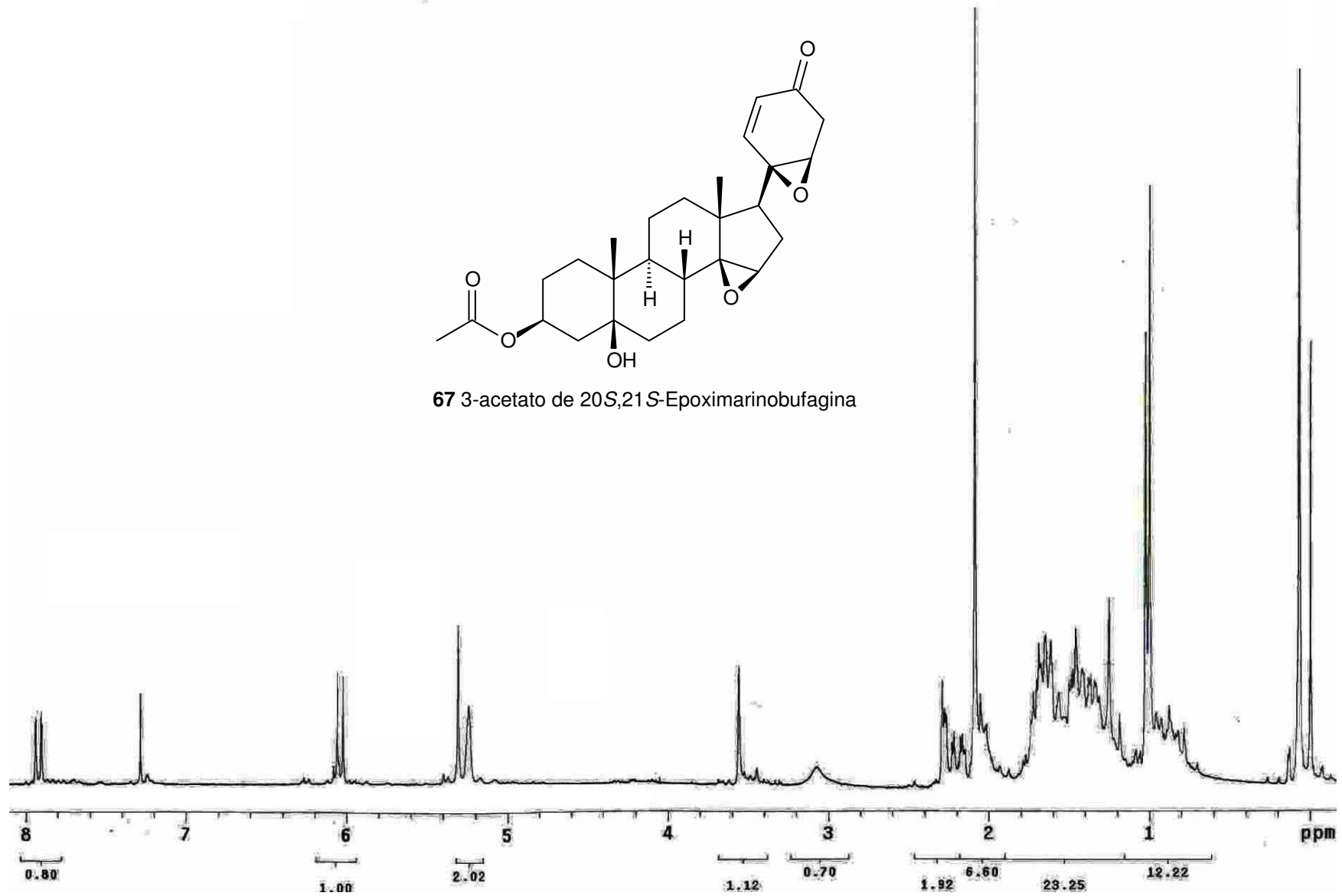
Zero Filling= 1 x



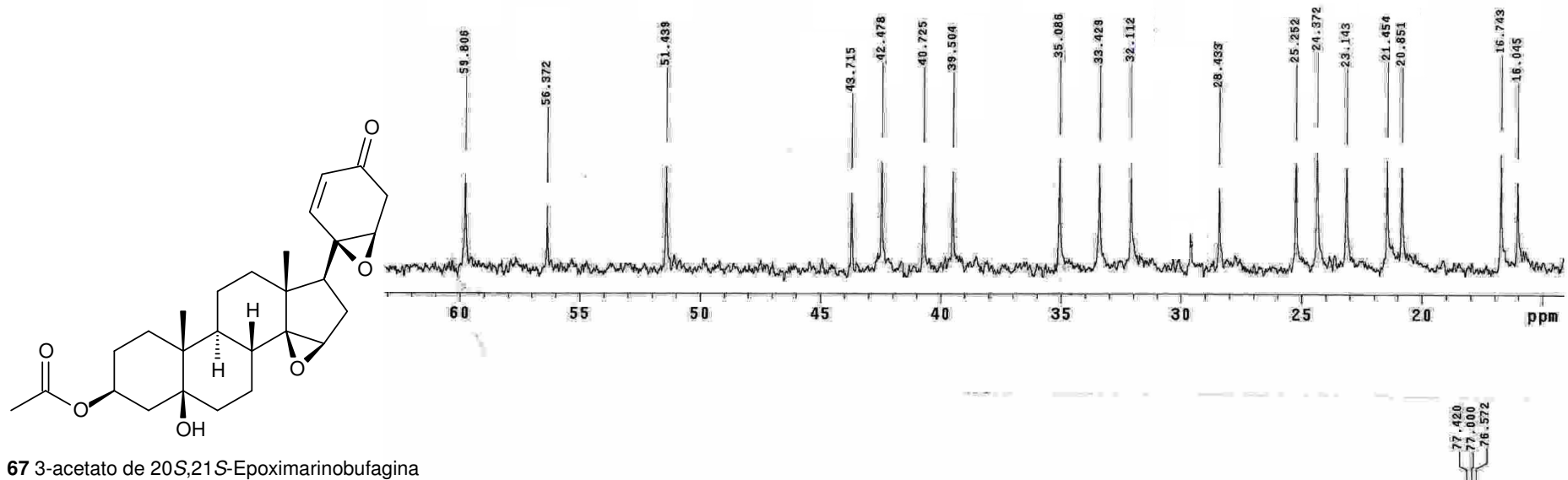
Anexo 51. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de 20*R*,21*S*-epoximarínobufagina (67).



67 3-acetato de 20*S*,21*S*-Epoximarinobufagina



Anexo 52. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) da 3-acetato de 20*R*,21*S*-epoximarínobufagina (67).



Anexo 53. Espectro de infravermelho (KBr, $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1}) da 3-acetato de 20*R*,21*S*-epoximarínobufagina (**67**).

File # 2 : ACTEMBG

Mode= 2 (Mid-IR)

23/10/2009 14:55

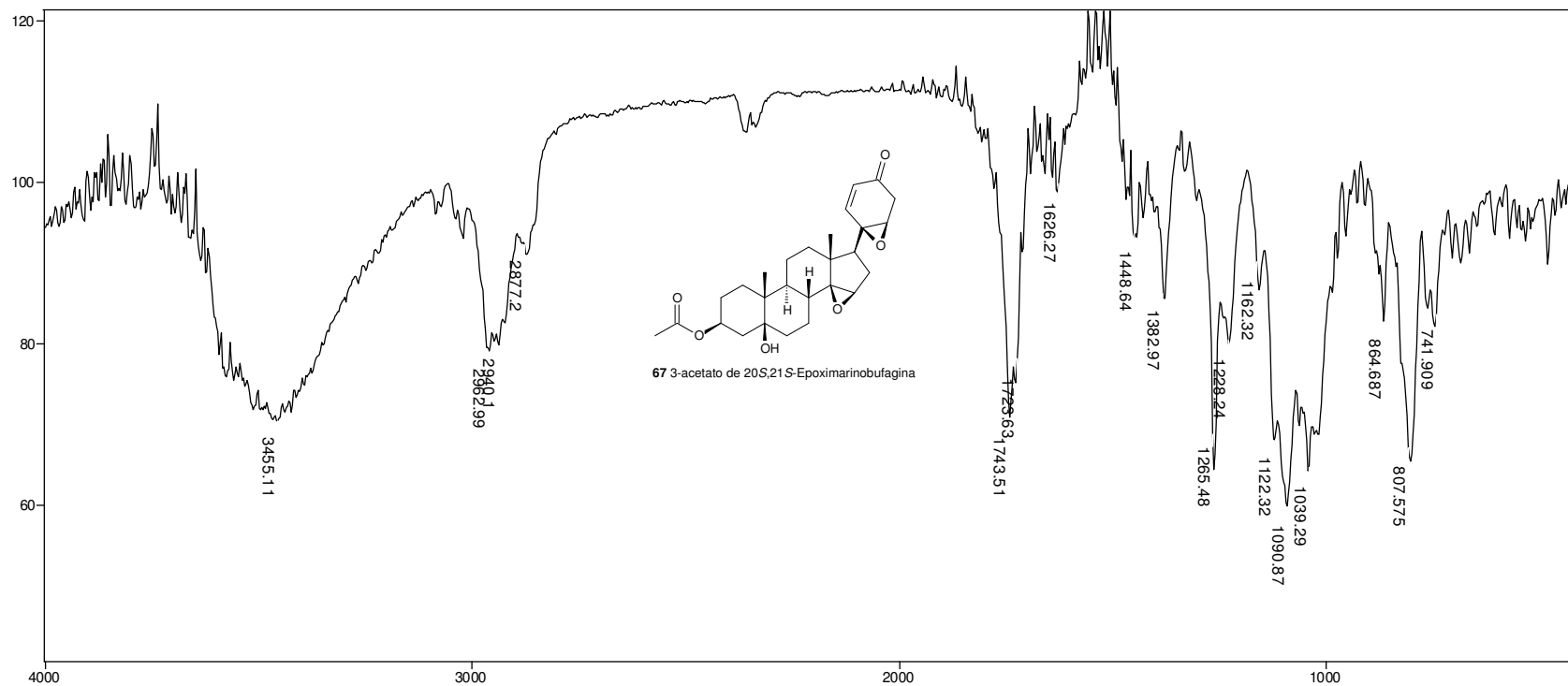
Sample Description: KBr -

Scans= 10 21 scans/min

Res=4 cm^{-1}

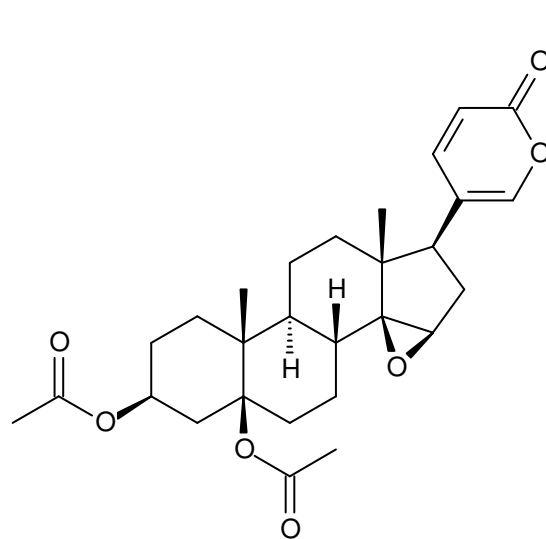
Apod= Cosine

Zero Filling= 1 x

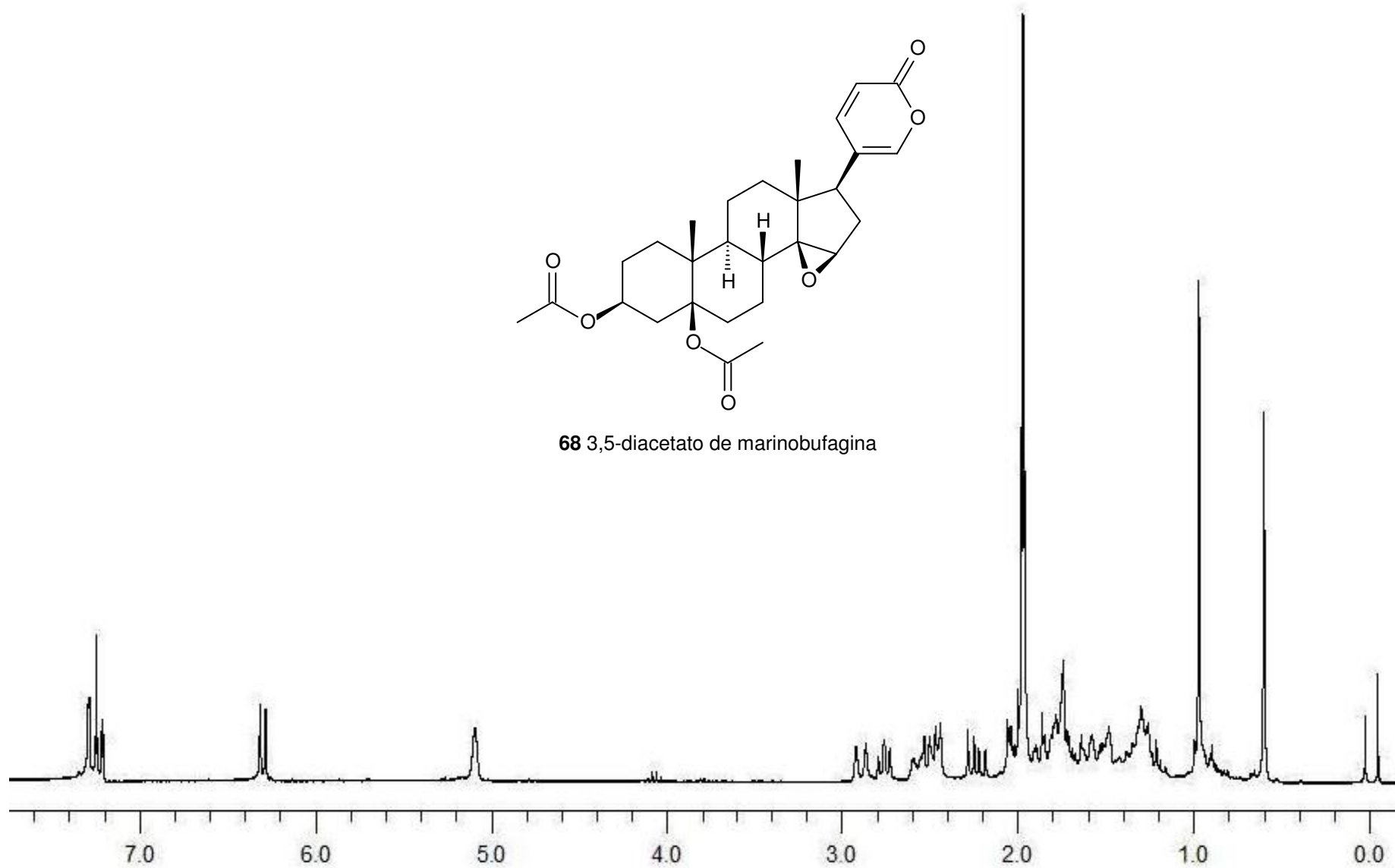


Transmittance / Wavenumber (cm^{-1})

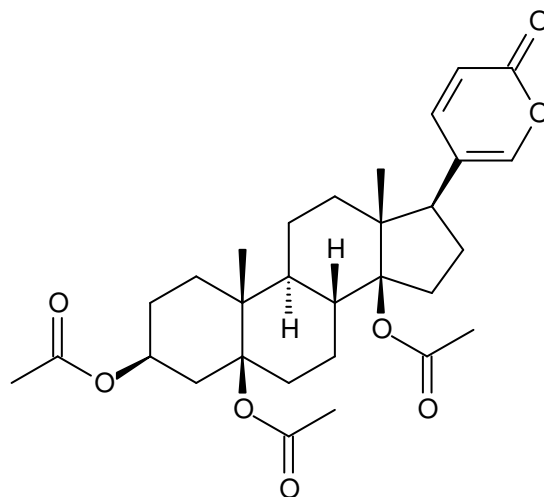
Anexo 54. Espetro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3,5-diacetato de marinobufagina (**68**).



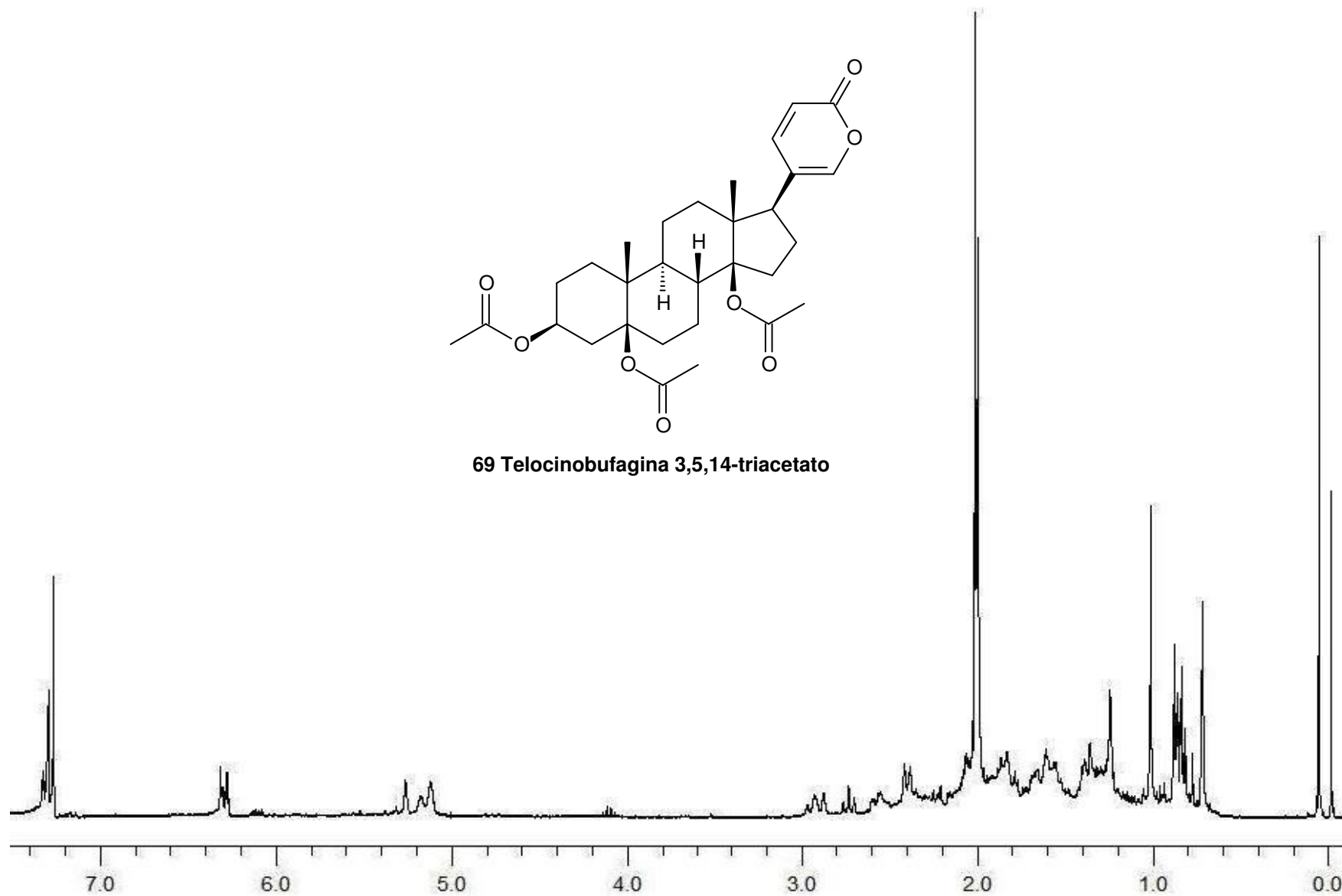
68 3,5-diacetato de marinobufagina



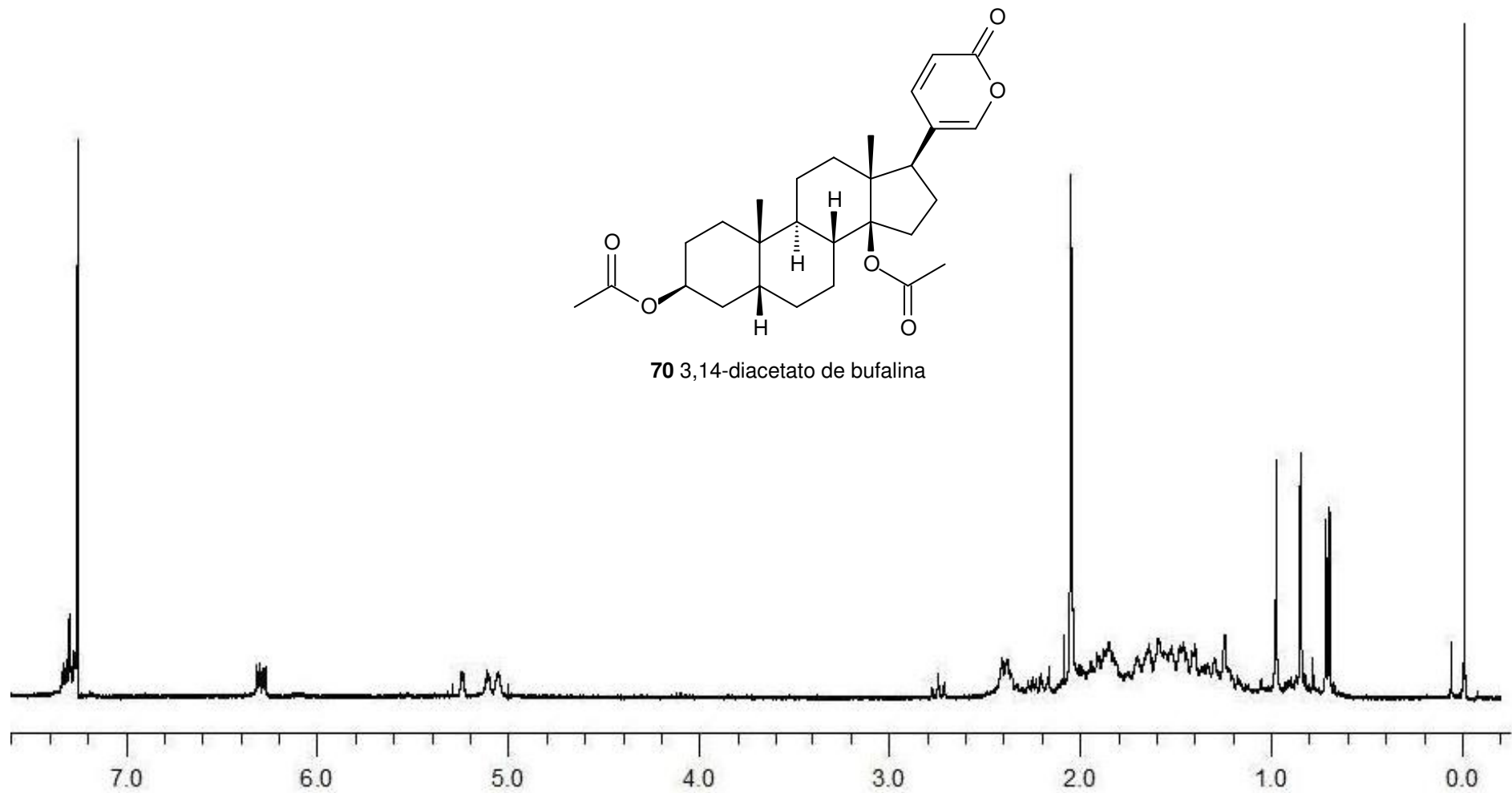
Anexo 55. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3,5,14-triacetato de telocinobufagina (**69**).



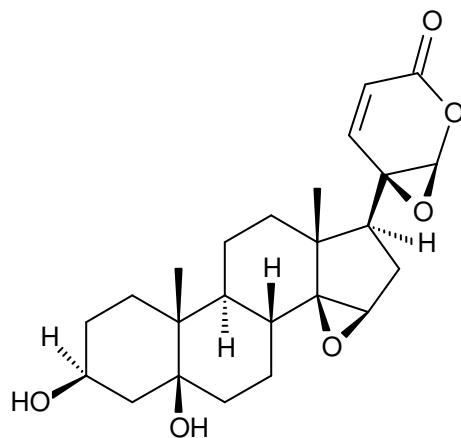
69 Telocinobufagina 3,5,14-triacetato



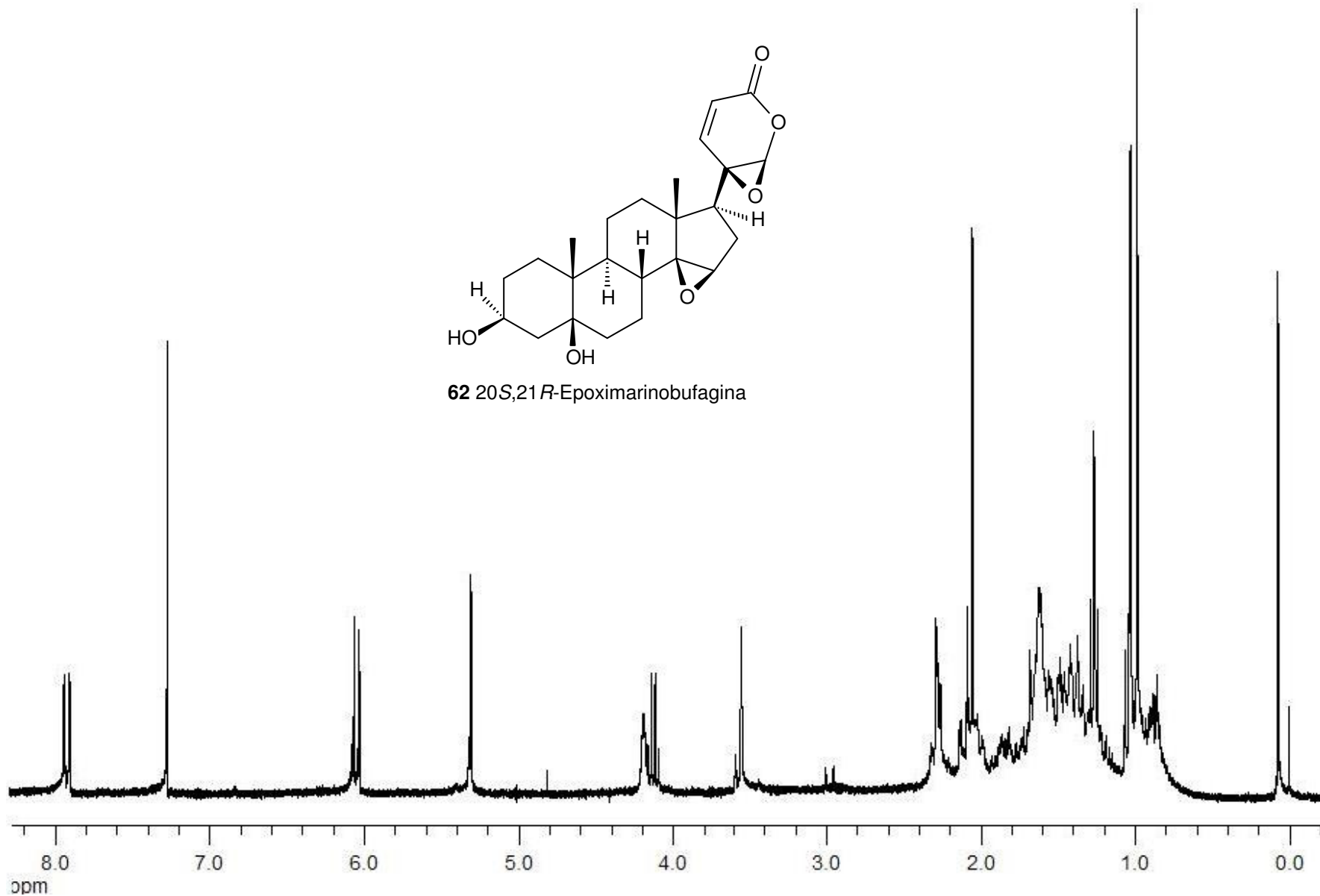
Anexo 56. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3,14-diacetato de bufalina (70).



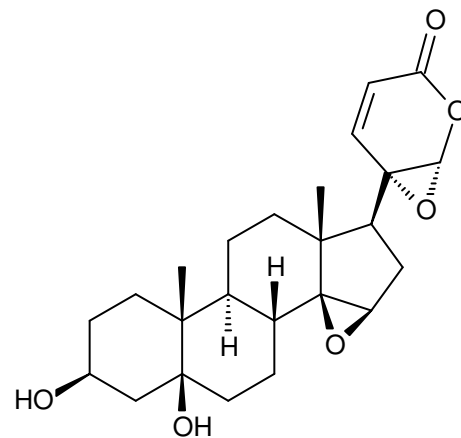
Anexo 57. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**62**) sintética.



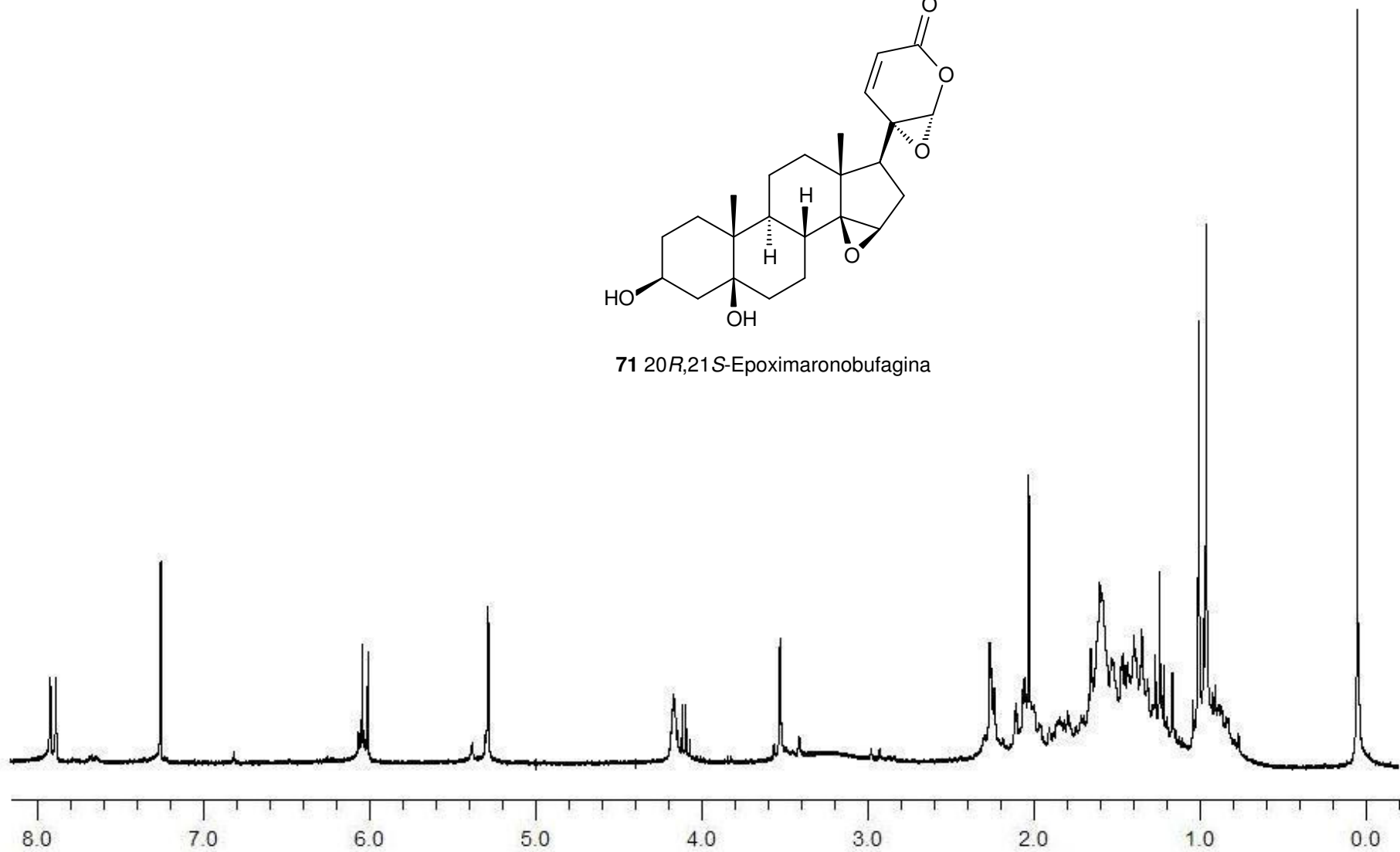
62 20*S*,21*R*-Epoximarínobufagina



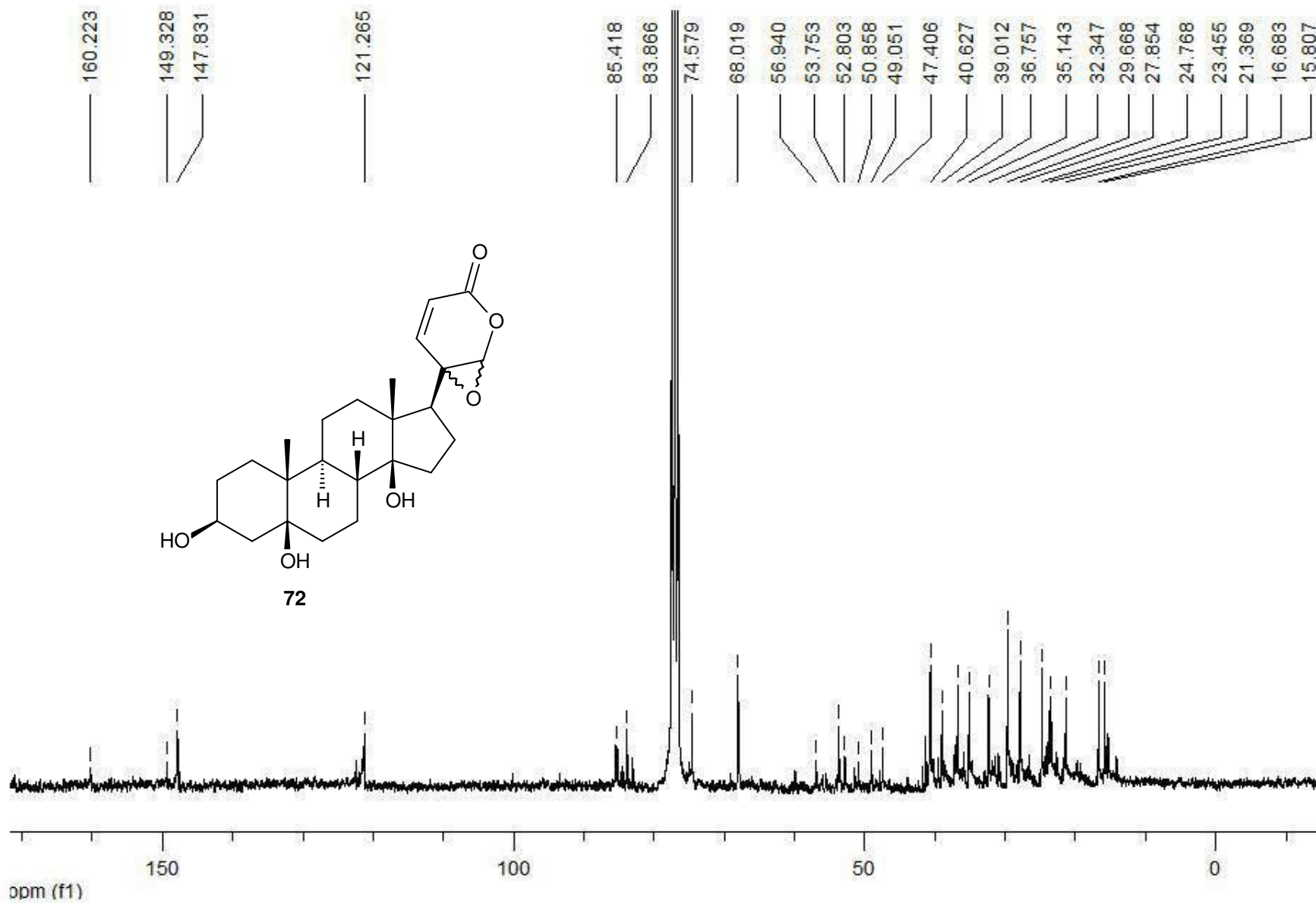
Anexo 58. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 20*R*,21*S*-epoximarínobufagina (**71**).



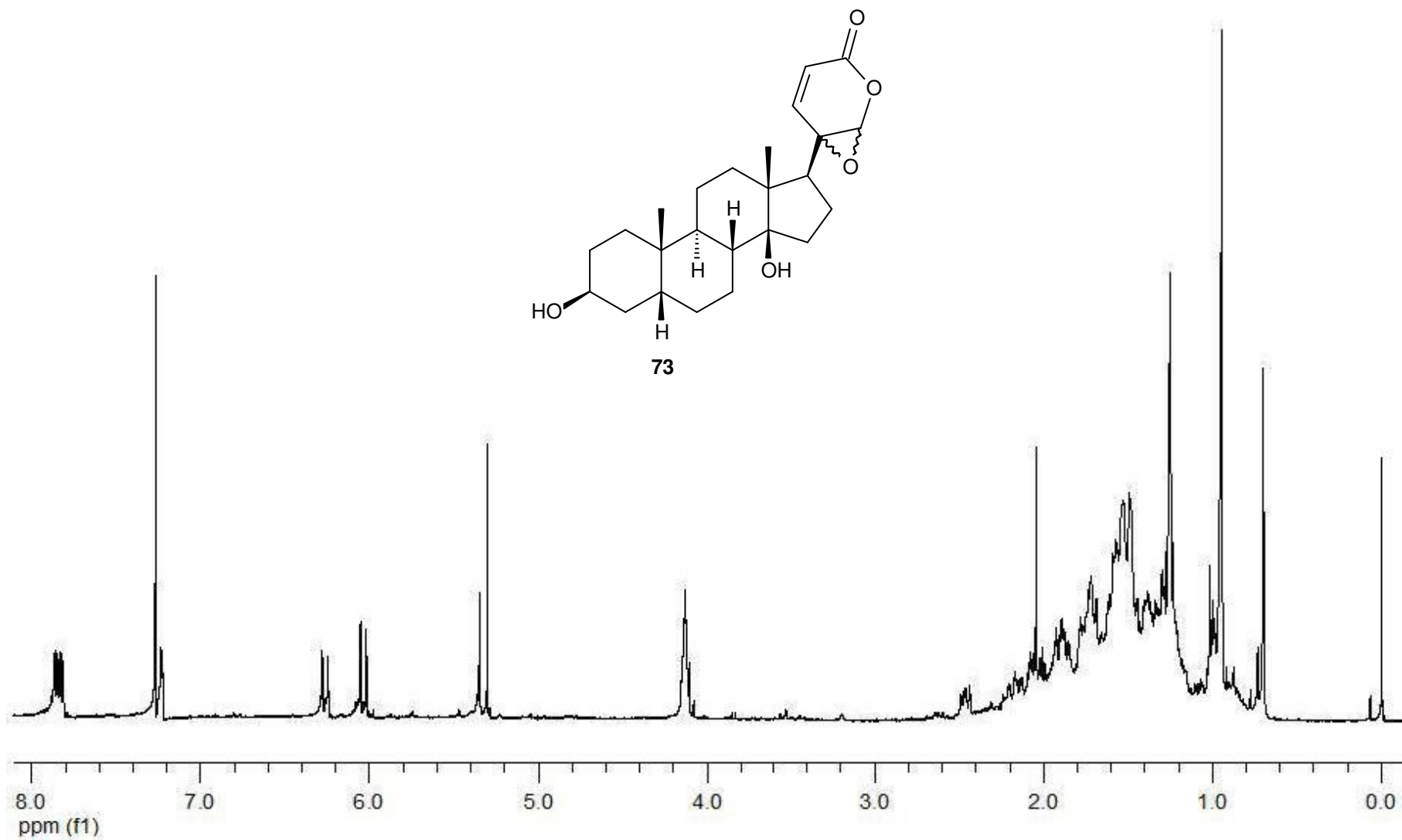
71 20*R*,21*S*-Epoximarínobufagina



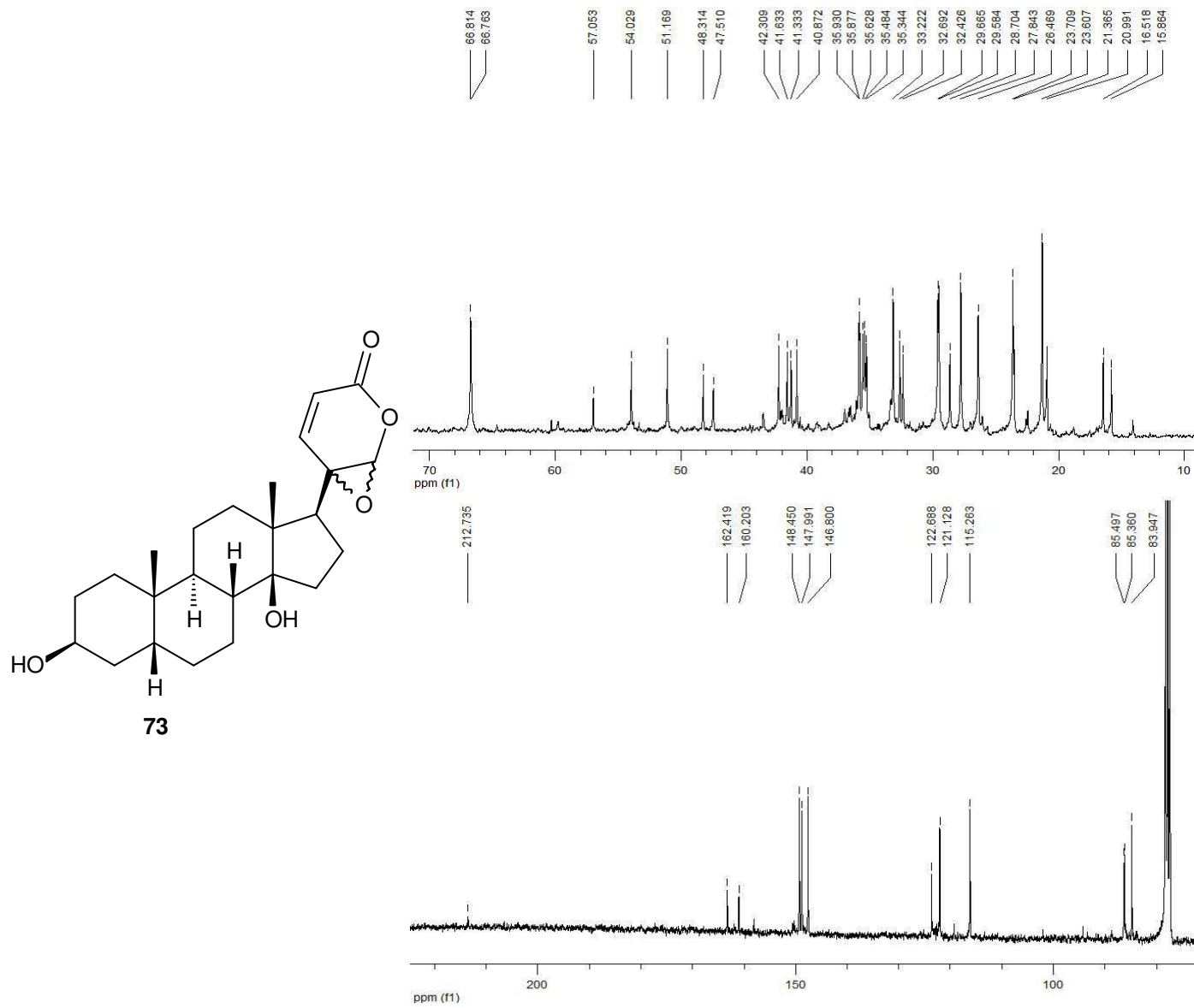
Anexo 59. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **72**.



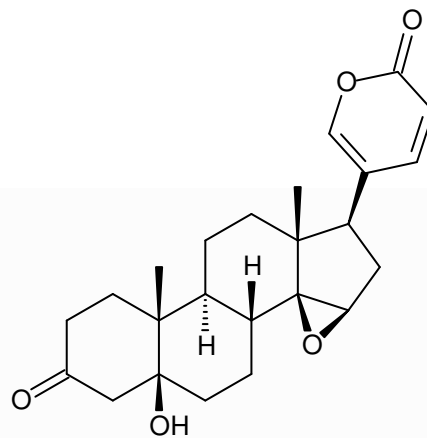
Anexo 60. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **73**.



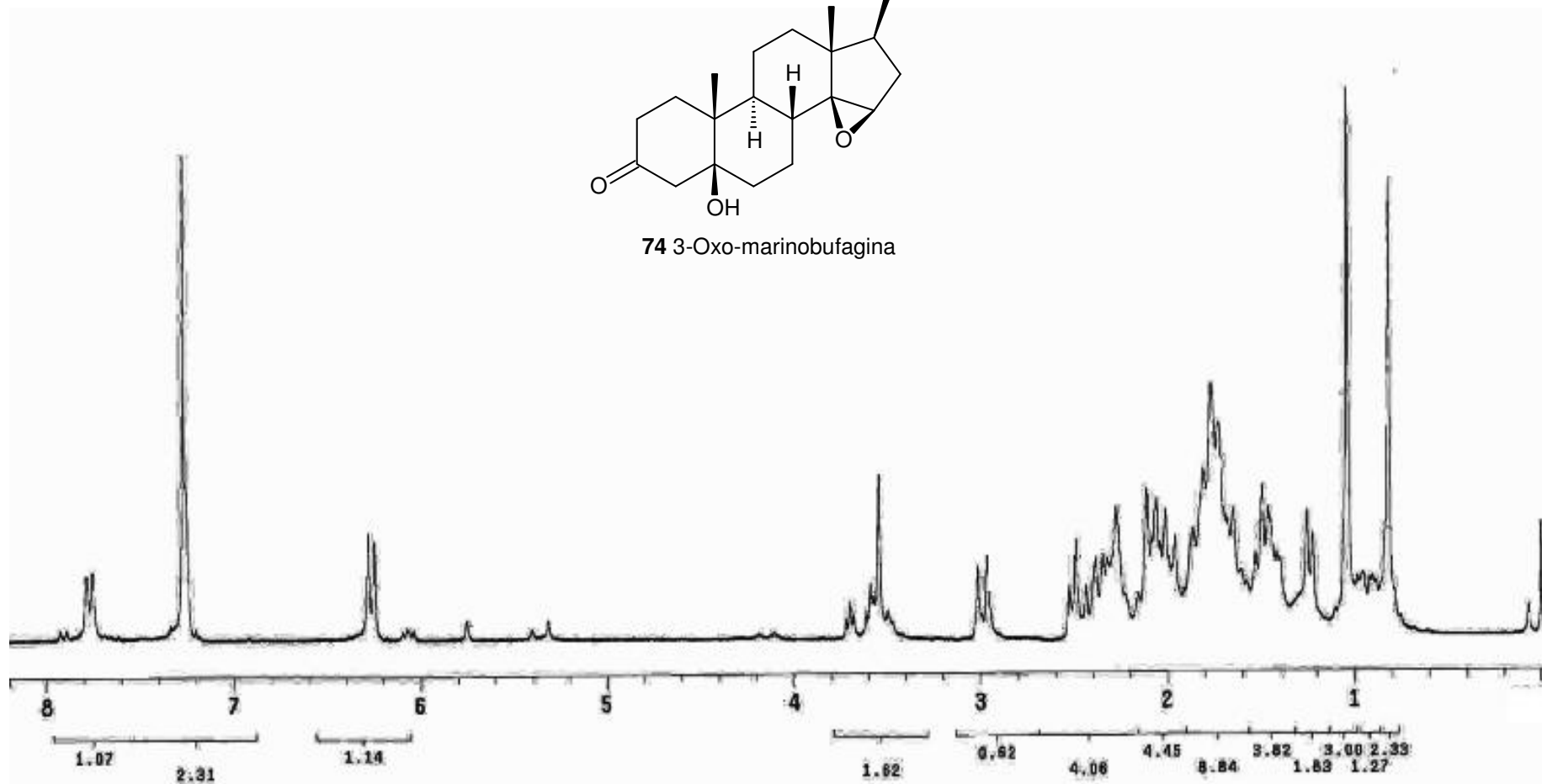
Anexo 61. Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **73**.



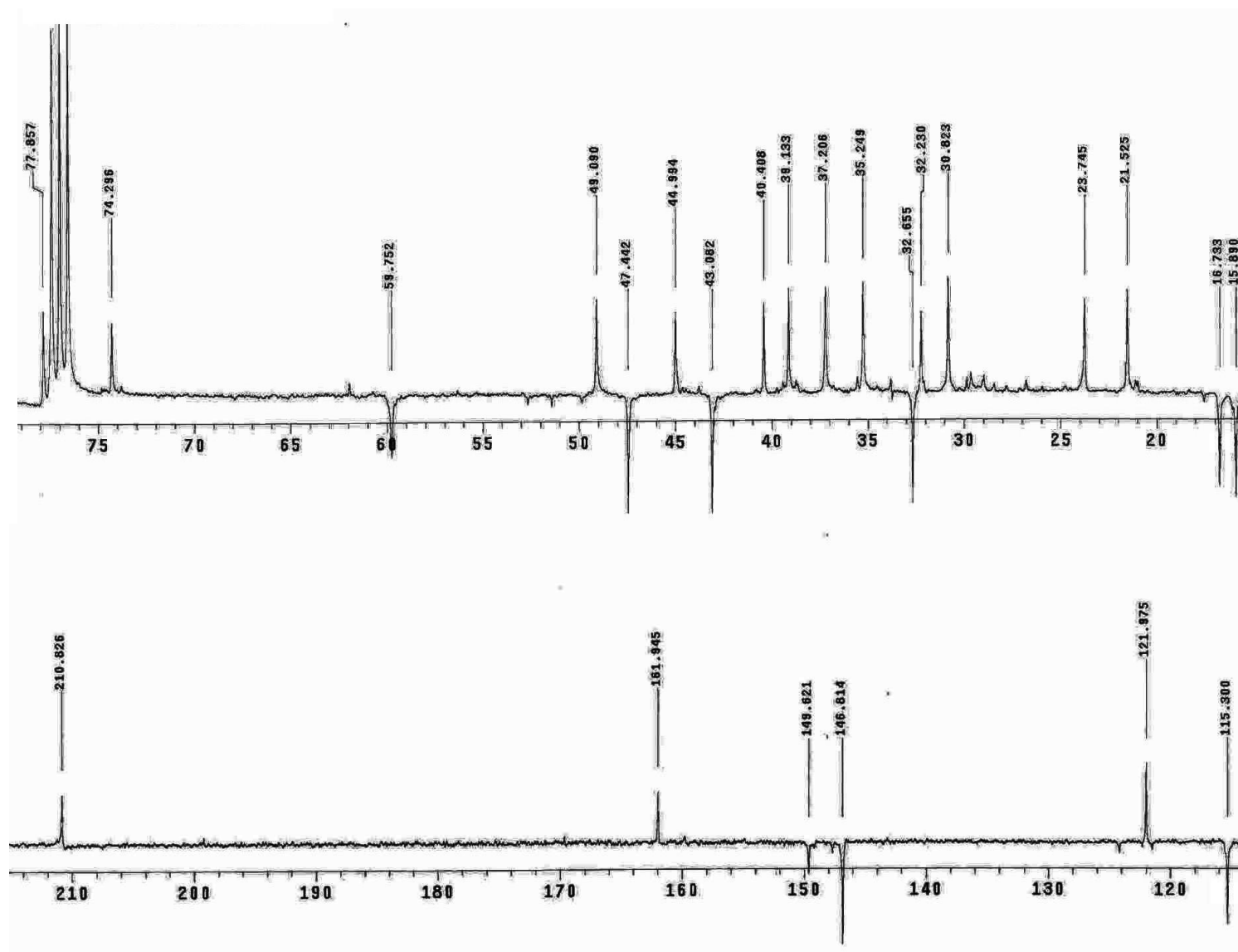
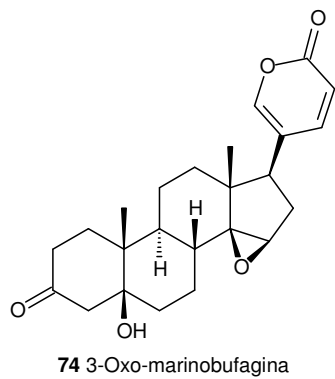
Anexo 62. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-oxo-marinobufagina (74).



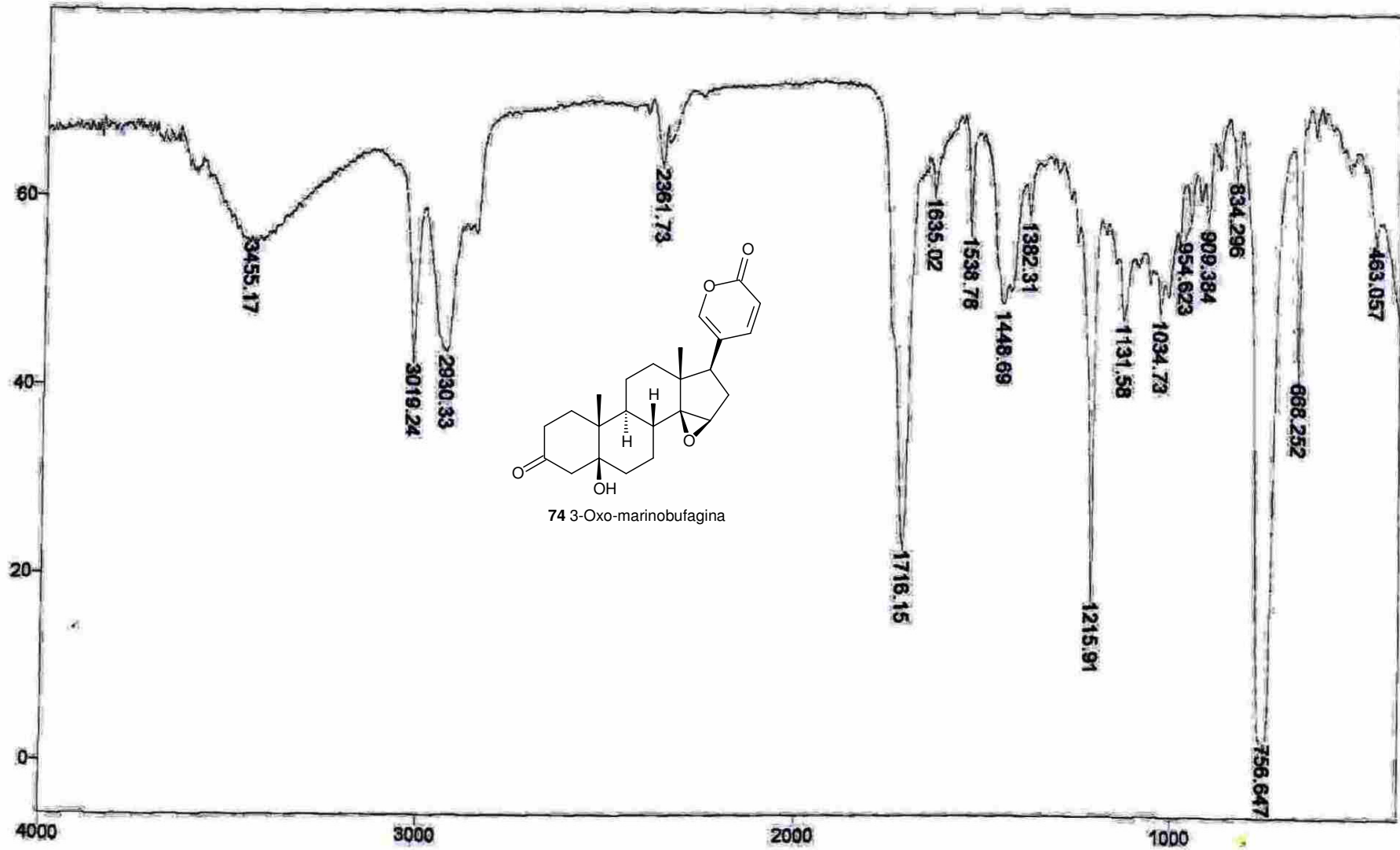
74 3-Oxo-marinobufagina



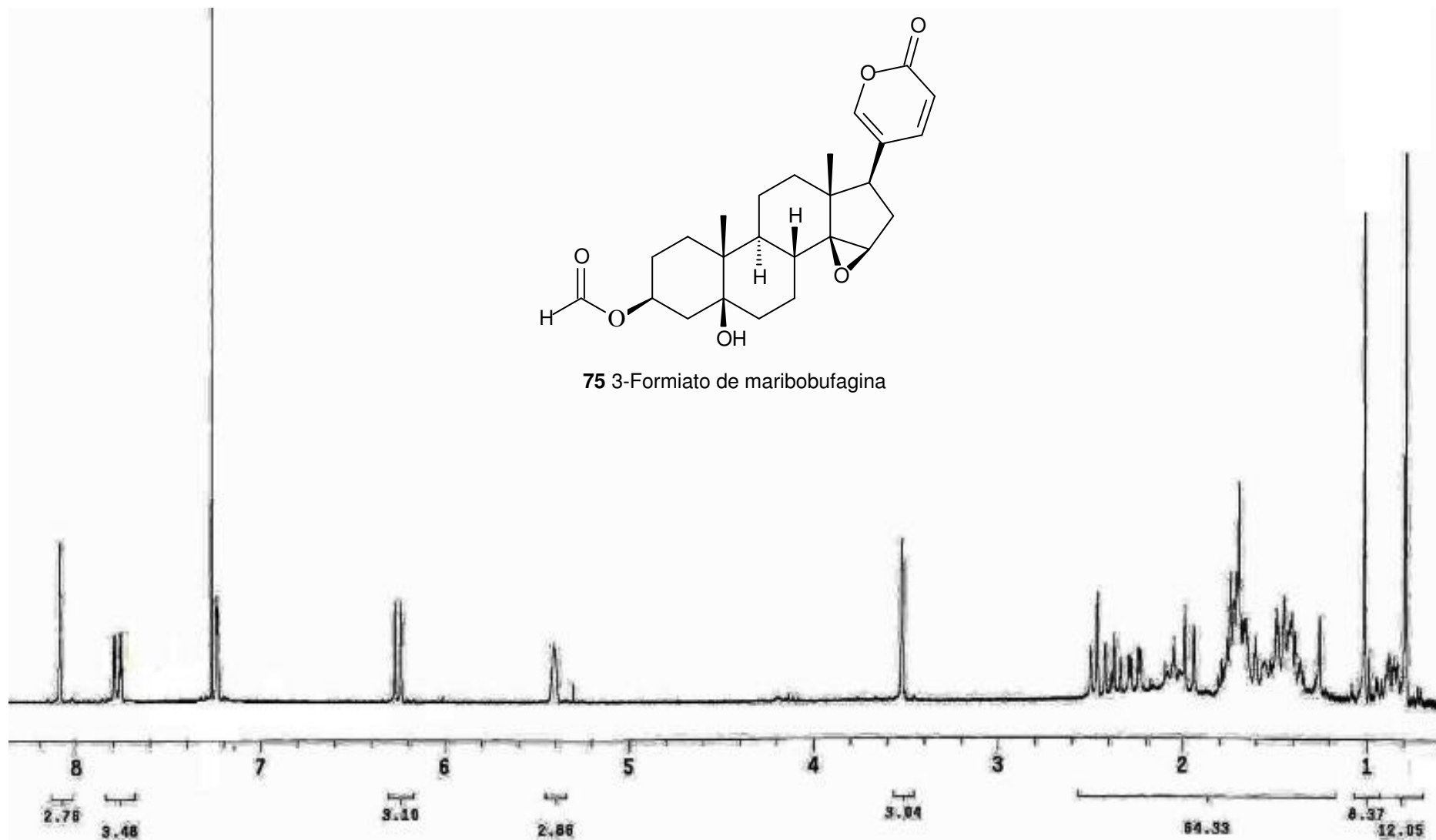
Anexo 63. Espectro de APT (75 MHz, CDCl₃) da 3-Oxo-marino bufagina (74).



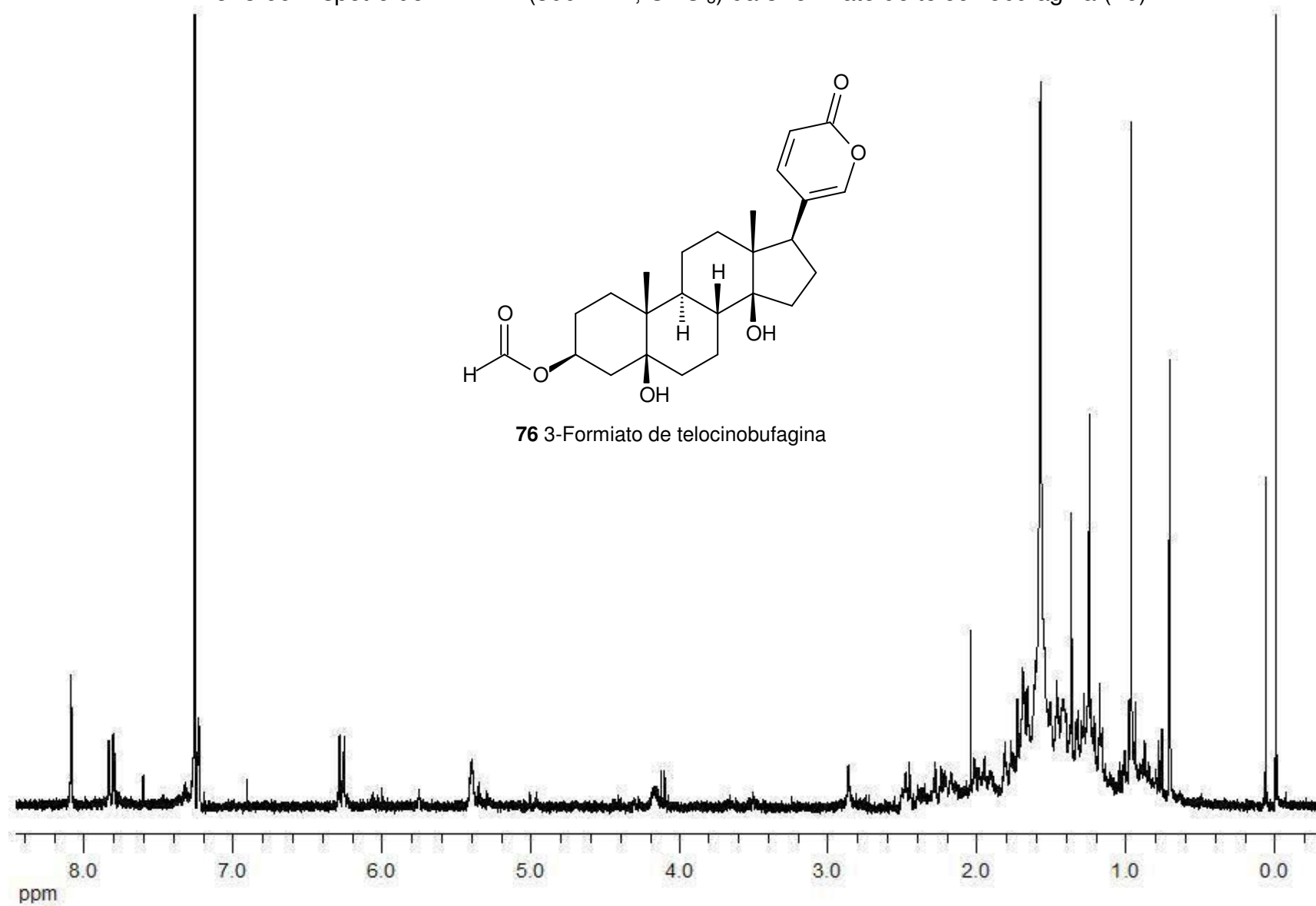
Anexo 64. Espectro de infravermelho da 3-oxo-marinobufagina (74).



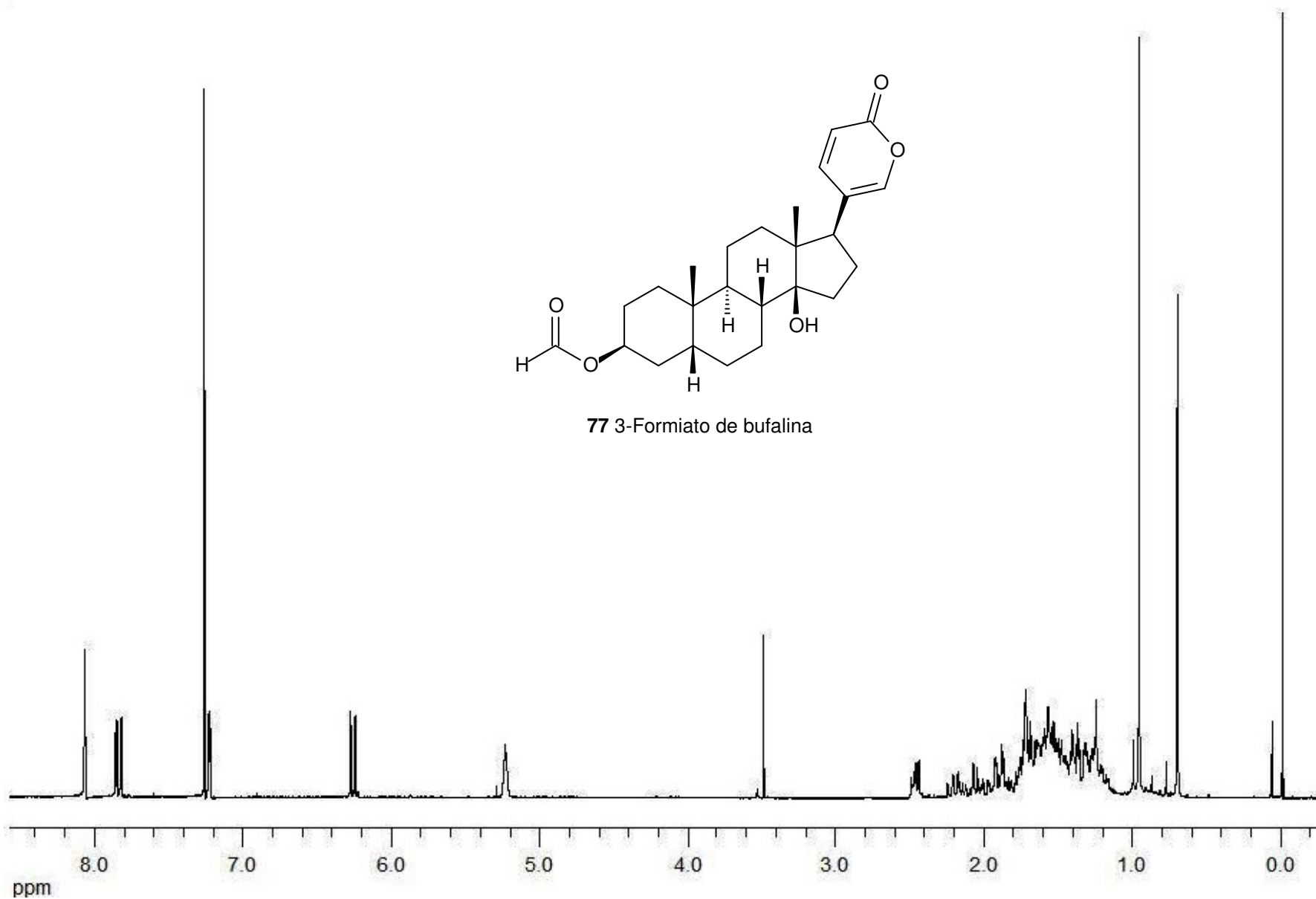
Anexo 65. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-formiato de marinobufagina (75).



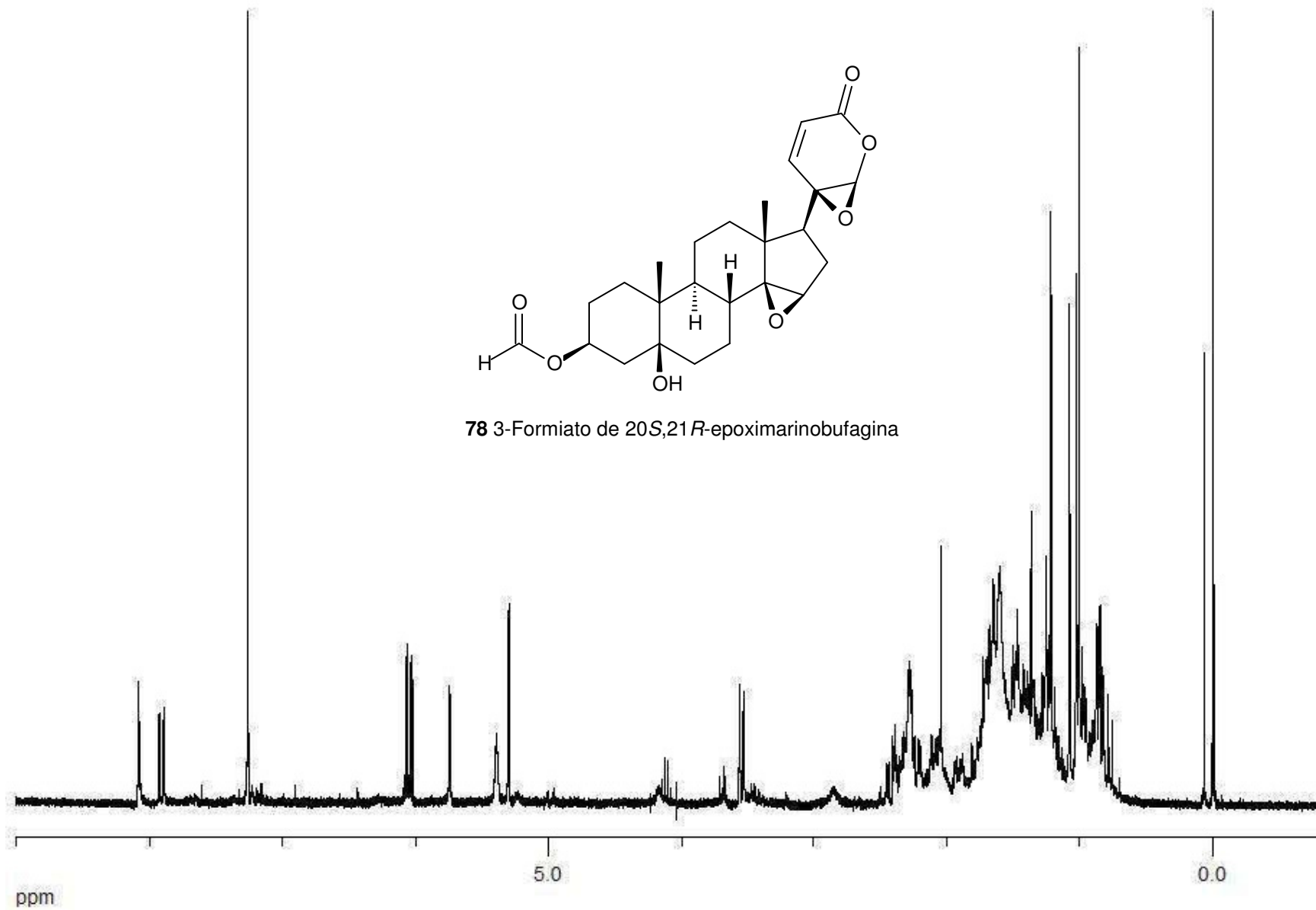
Anexo 66. Espetro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-formiato de telocinobufagina (**76**).



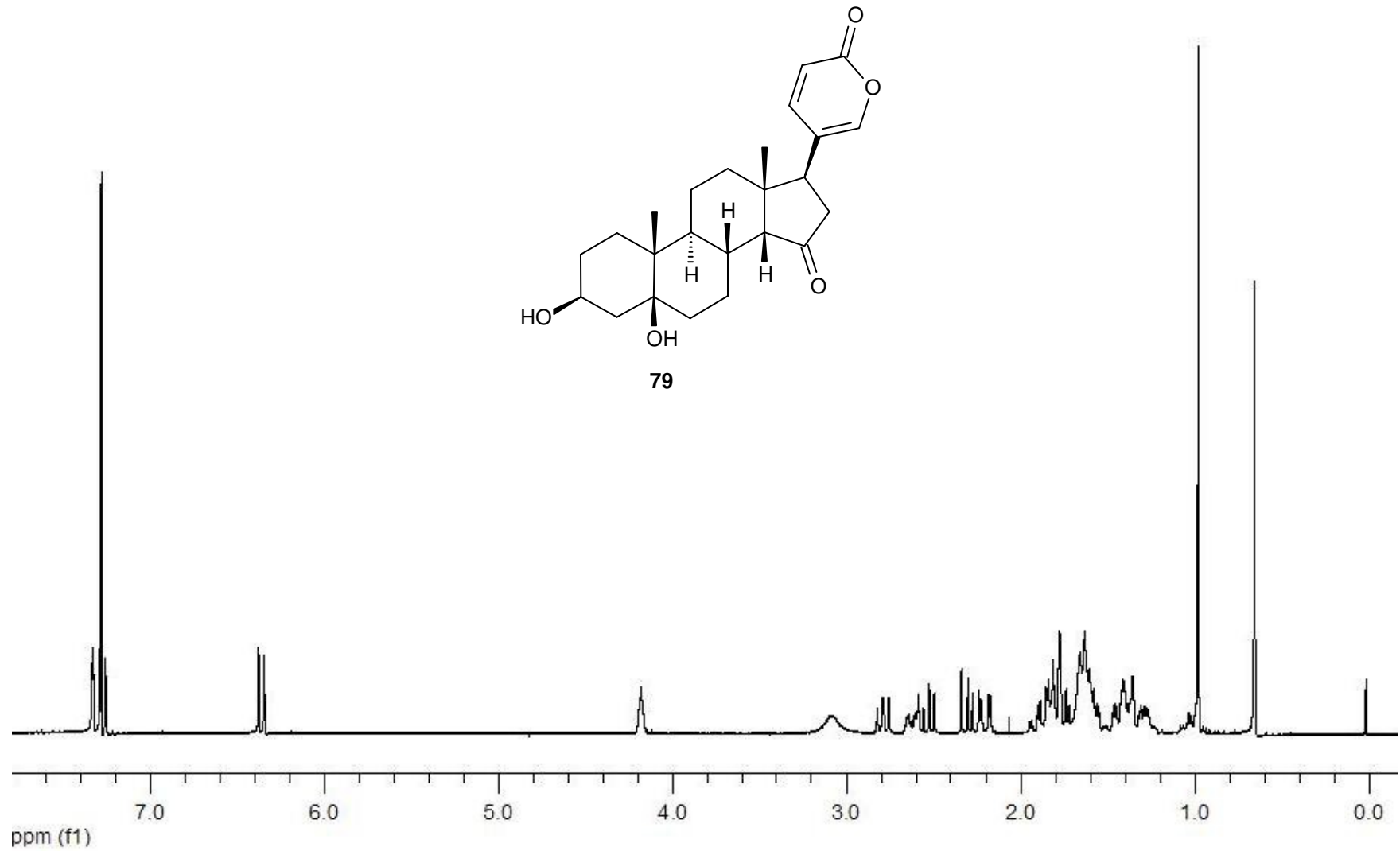
Anexo 67. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-formiato de bufalina (**77**).



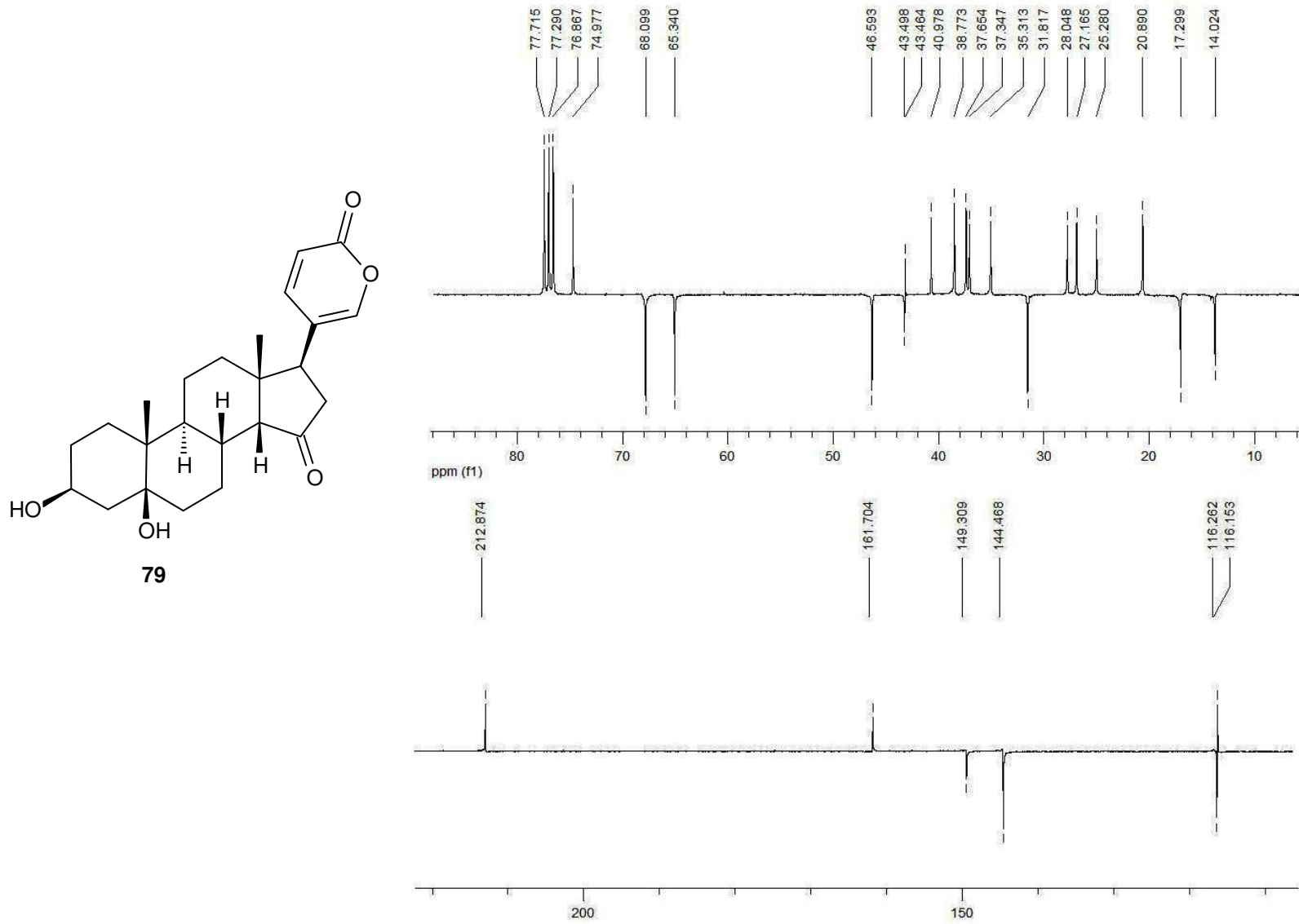
Anexo 68. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) da 3-formiato de 20*S*,21*R*-epoximarínobufagina (**78**)



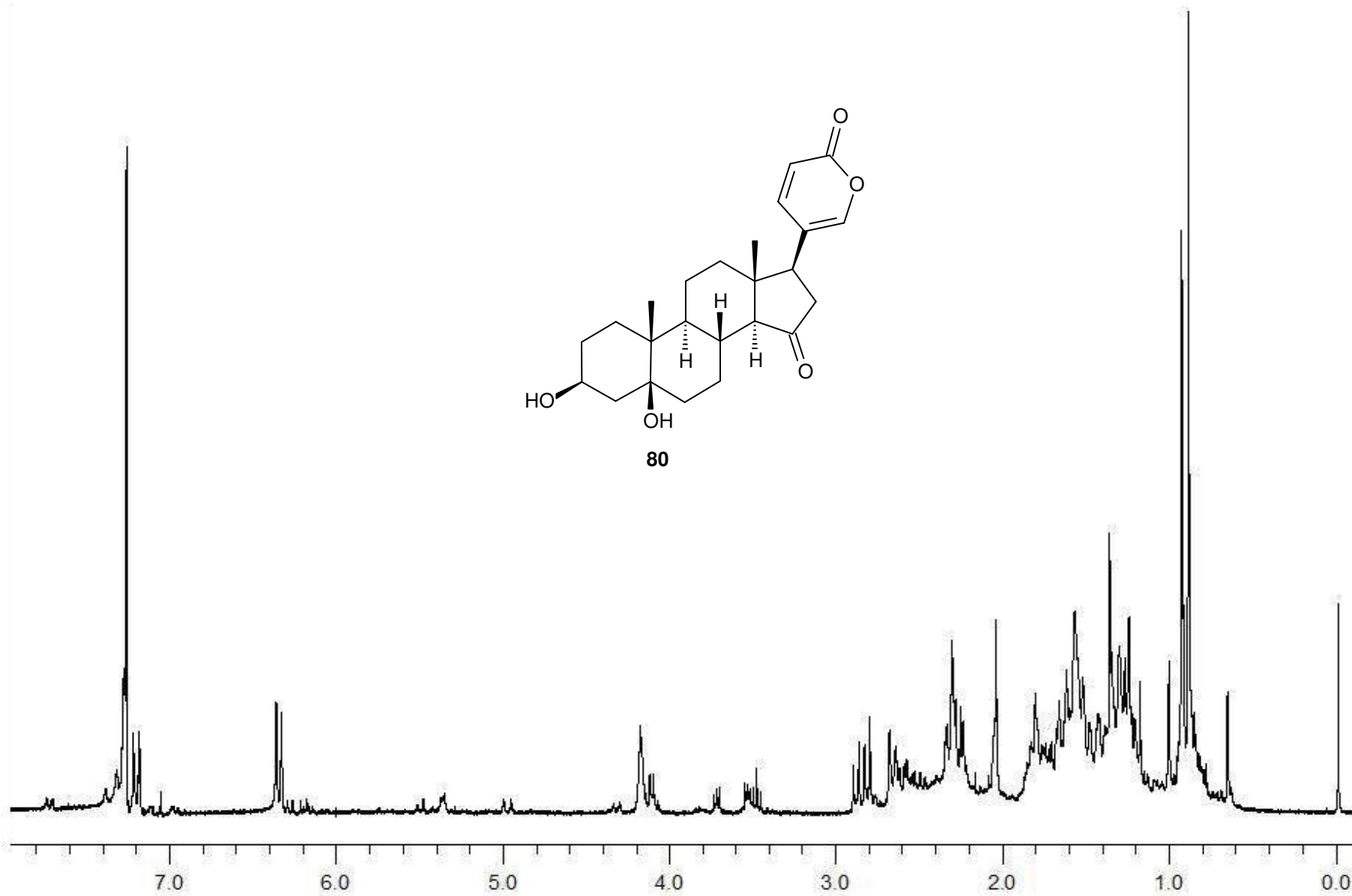
Anexo 69. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **79**.



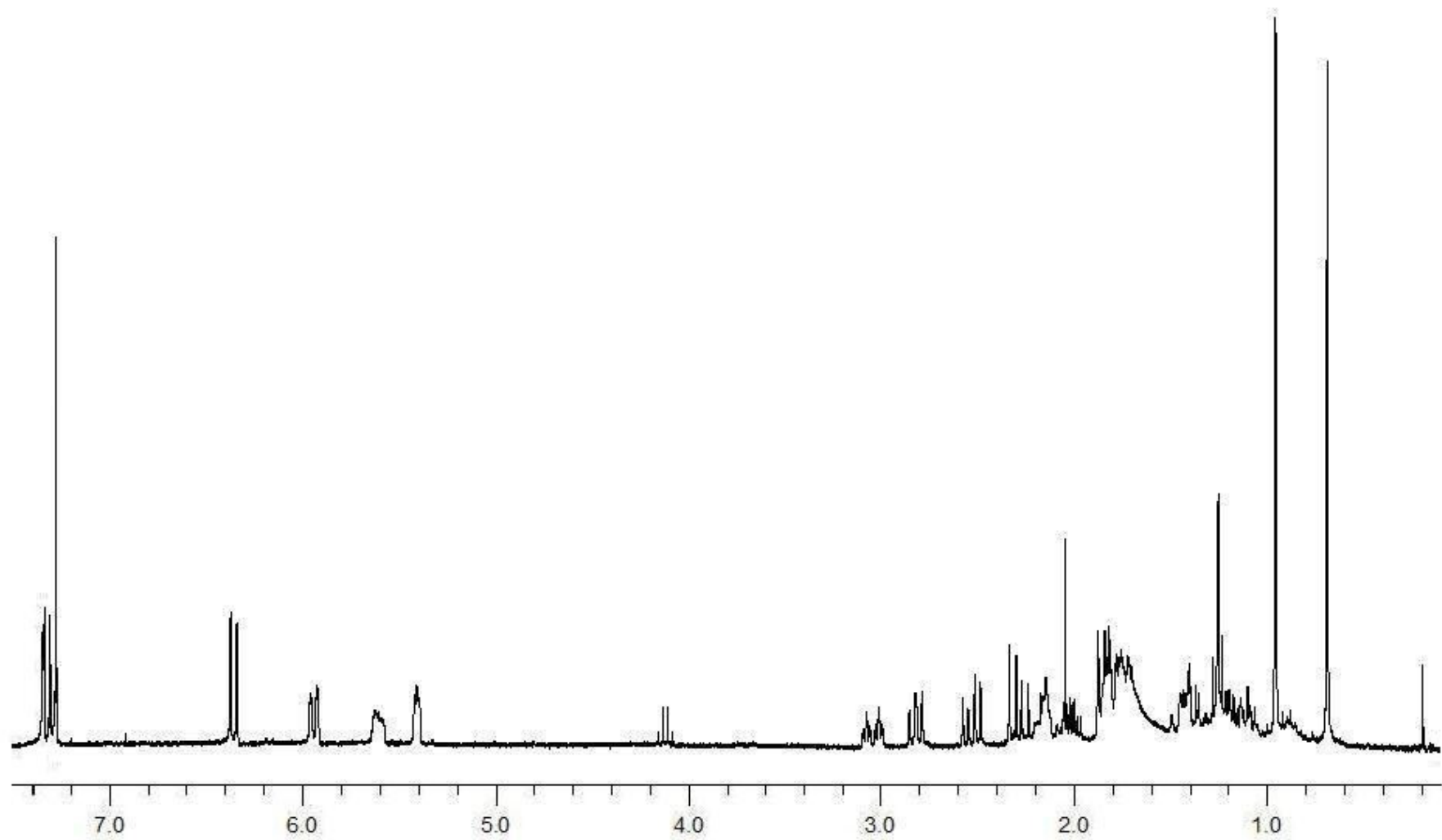
Anexo 70. Espectro de APT (75 MHz, CDCl₃) do composto 79.



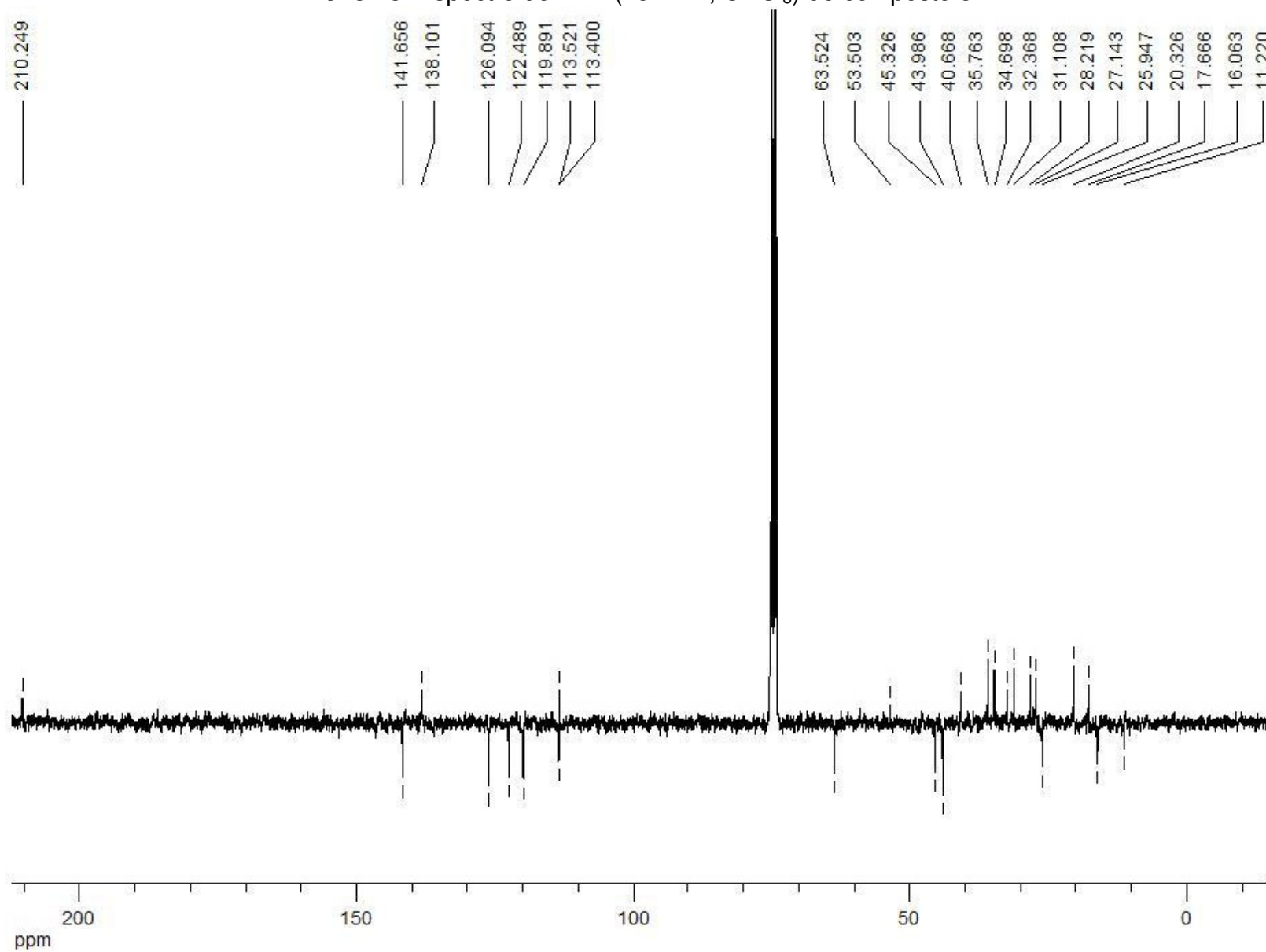
Anexo 71. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **80**.



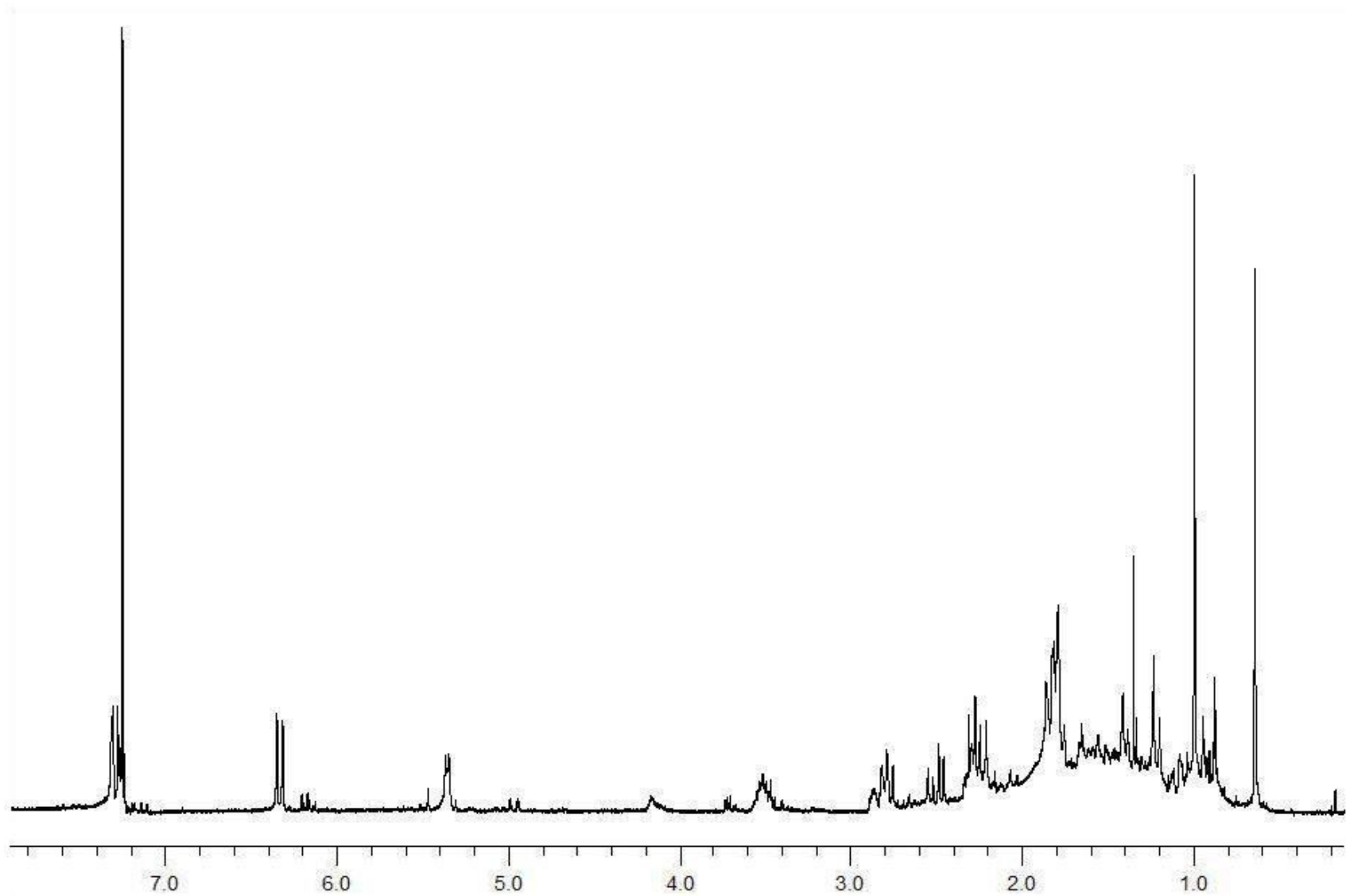
Anexo 72. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **81**.



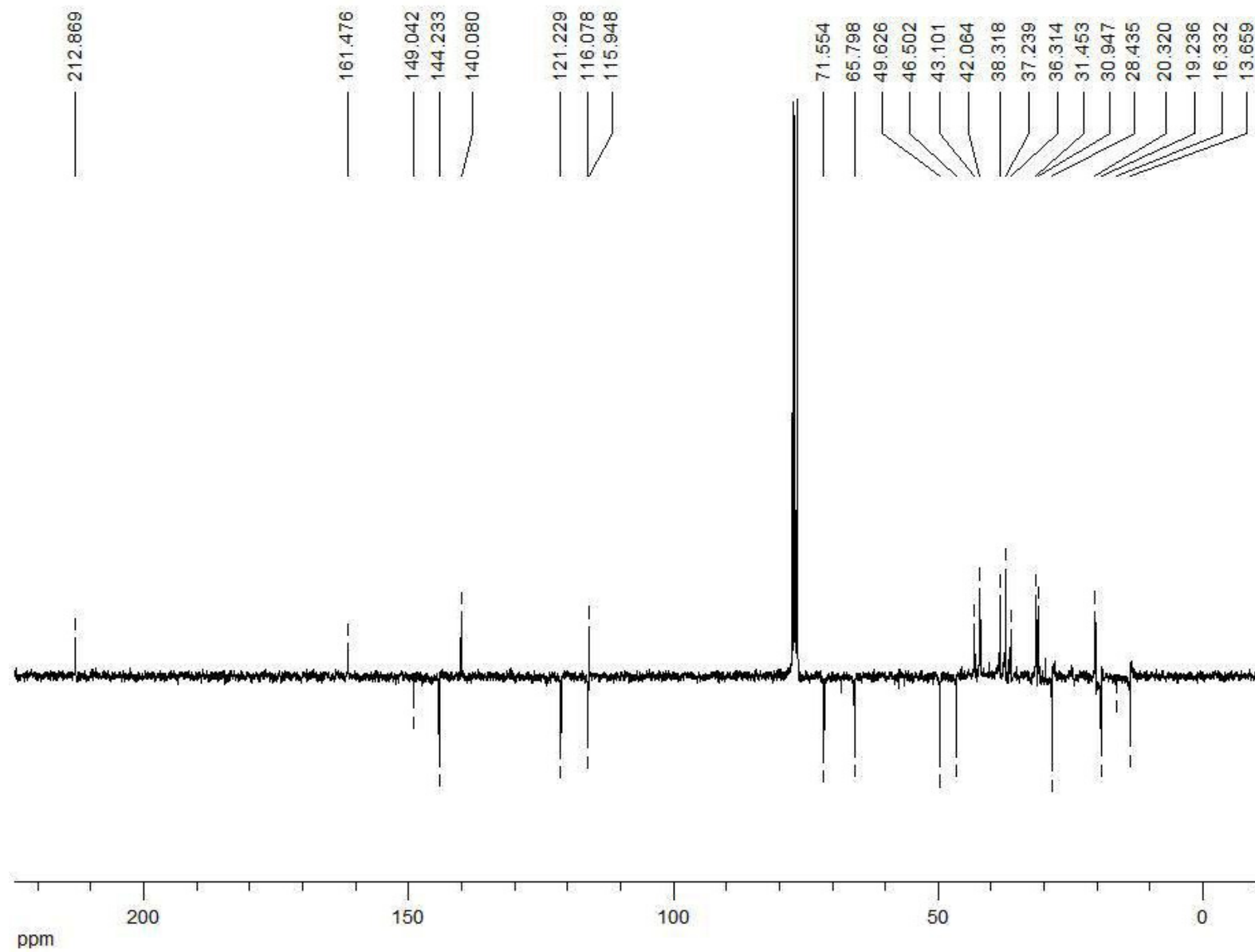
Anexo 73. Espectro de APT (75 MHz, CDCl_3) do composto **81**.



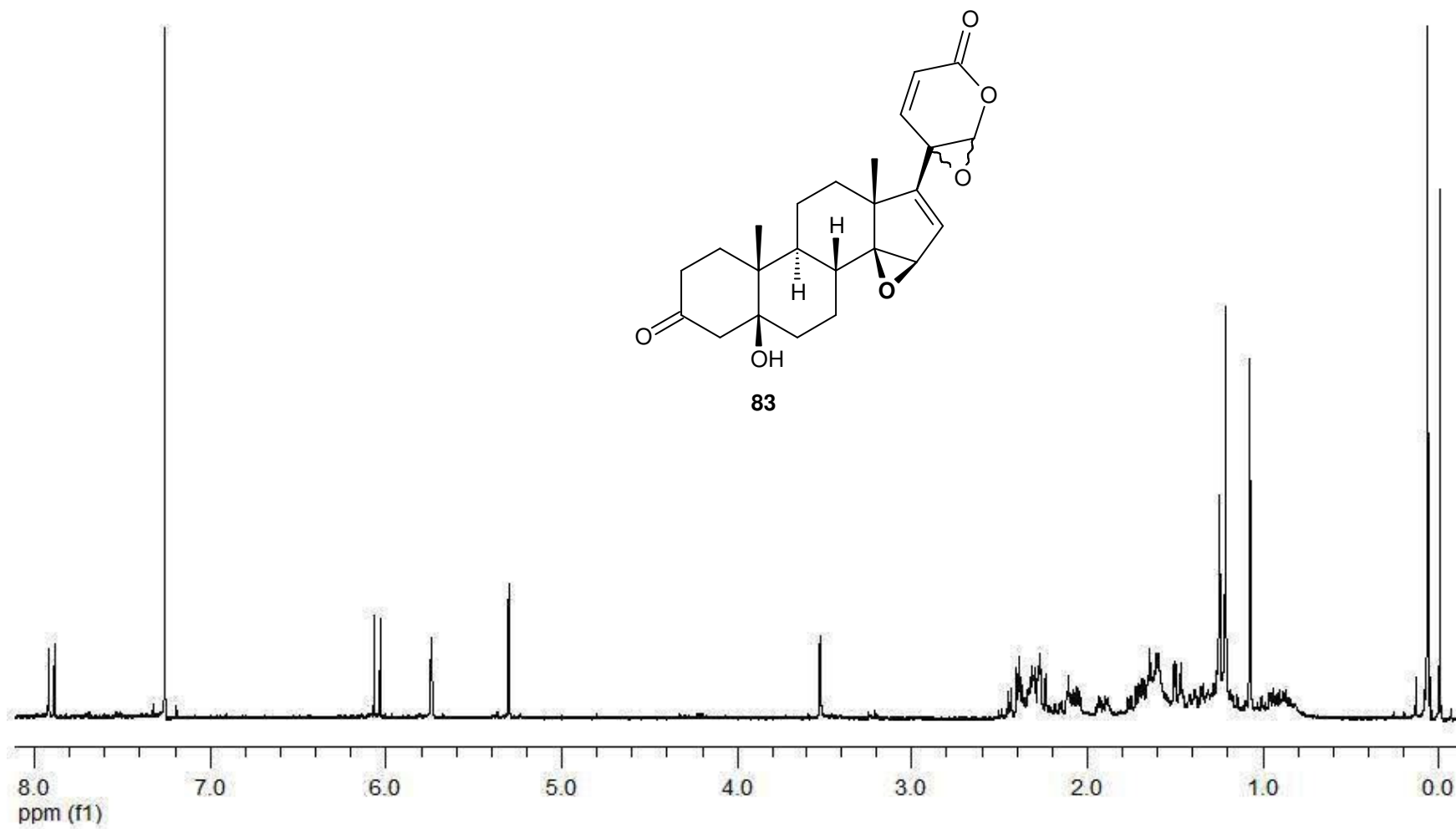
Anexo 74. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **82**.



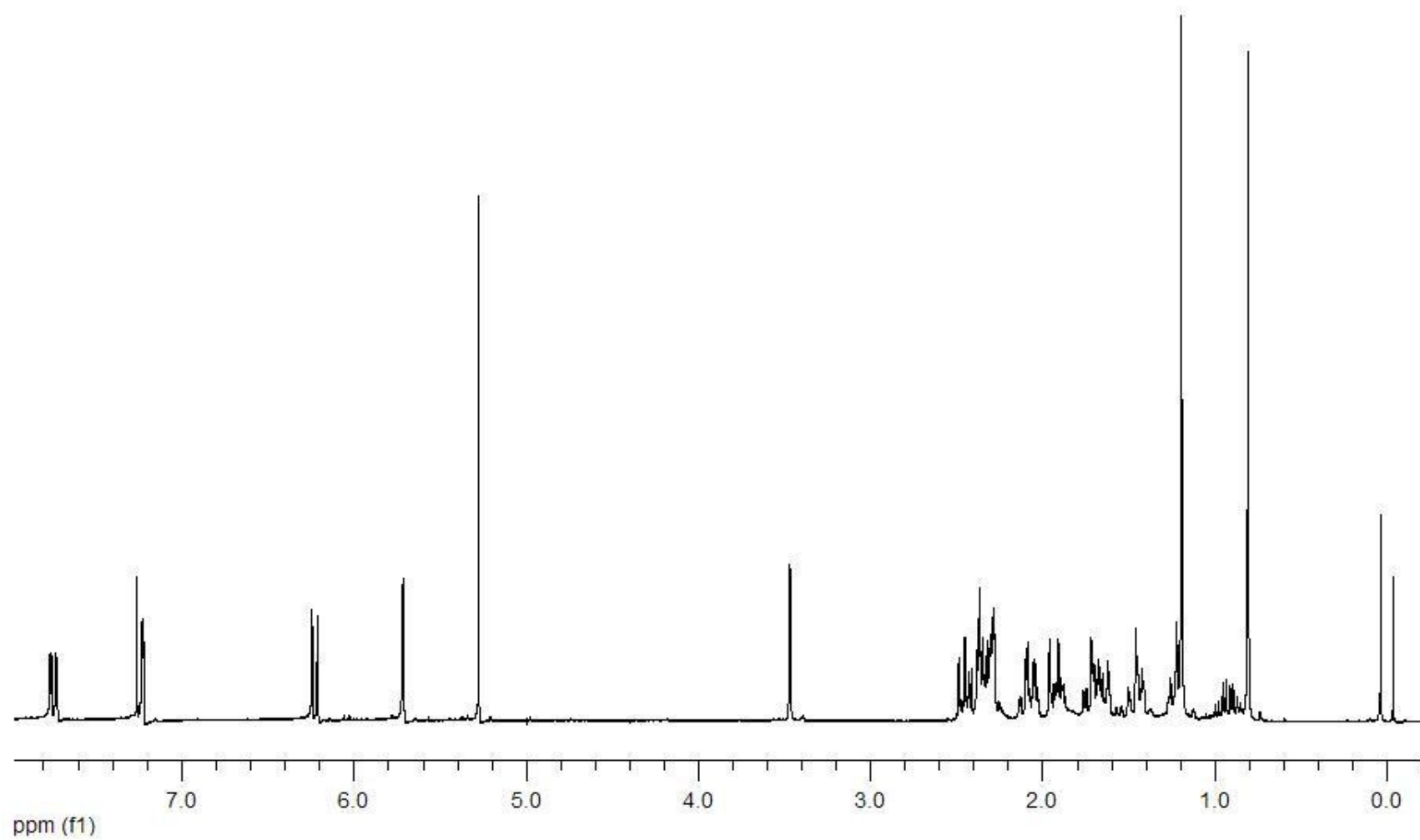
Anexo 75. Espectro de APT (75 MHz, CDCl_3) do composto **82**.



Anexo 76. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) do composto **83**.



Anexo 77. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) do composto **84**.



Anexo 78. Espectro de ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) do composto **85**.

