

## Tentativas de sintetizar um derivado trimérico da pristimerina com potencial atividade contra células cancerosas

 <https://doi.org/10.56238/sevened2024.003-056>

### Josana Pereira dos Santos

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química  
E-mail: Josanaithinga@hotmail.com

E-mail: a.s.miranda@hotmail.com

### Sidney Augusto Vieira-Filho

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto,  
Departamento de Farmácia  
E-mail: bibo@ufop.edu.br

### Rafael César Gonçalves Pereira

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química  
E-mail: rcgope@hotmail.com

### Lucienir Duarte Pães

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química  
E-mail: lucienir@ufmg.br

### Victor Hugo dos Santos

Estudante de Graduação em Química  
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto,  
Departamento de Química  
E-mail: victor.santos1@aluno.ufop.edu.br

### Grasiely Faria de Sousa

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química  
E-mail: grasielysousa@ufmg.br

### Leonardo César de Moraes

Doutorado em Química  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química  
E-mail: leonardo@ufop.gmail.com

### Rute Cunha Figueiredo

Doutorado em Ciências Farmacêuticas  
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto,  
Departamento de Química  
E-mail: rute@ufop.edu.br

### Amanda Silva de Miranda

Doutorado em Química Orgânica  
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Química

## RESUMO

Pristimerina apresenta um potencial significativo como agente terapêutico, destacando-se pela sua atividade contra diversas células cancerosas humanas. Supõe-se que o trímico da pristimerina potencialize a força e a seletividade das interações entre a pristimerina e o DNA, por meio de um efeito multivalente. Diante disso, para sintetizar o trímico da pristimerina, foi planejado uma rota sintética com várias etapas. A primeira etapa, envolveu a obtenção do produto 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etan-1-ol (**R1**), via reação SN<sub>2</sub>, com rendimento de 53%. O composto N-(terc-butoxil-carbonil)-tris-(hidroximetil)aminometano (**R2**), com o grupo amino protegido com terc-butoxil carbamato foi obtido com rendimento de 87% e o trialcino, N-(terc-butoxil-carbonil)-tris-(propargil)metilaminometano (**R3**), com rendimento de 43%. Apesar do êxito nas sínteses dos compostos **R1**, **R2** e **R3**, foram empregadas diversas metodologias na transesterificação entre a pristimerina e **R1** para obtenção do produto pristimerinoato de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi) (**R4**), incluindo a hidrólise química e enzimática da pristimerina como uma rota alternativa. No entanto, nenhuma das tentativas obteve sucesso, evidenciando a notável resistência do carbono C-29 da pristimerina a essas reações.

**Palavras-chave:** *Salacia crassifolia*, Celastraceae, Triterpeno Quinonametídeo, Reação de Transesterificação.

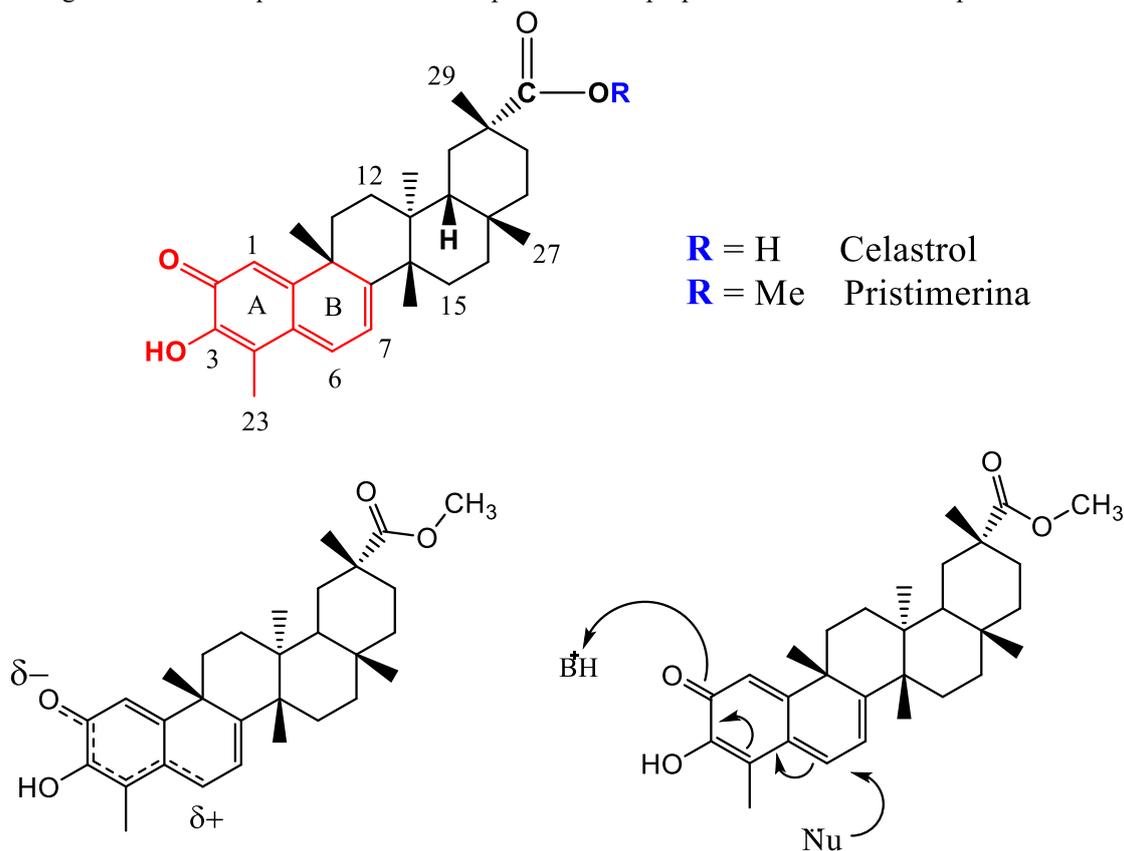
## 1 INTRODUÇÃO

Câncer é um termo coletivo para um grupo de doenças caracterizadas pela perda do controle do crescimento e divisão celular, levando a um tumor primário que invade e destrói tecidos adjacentes e pode gerar metástases. É responsável por aproximadamente 14,5% de todas as mortes no mundo, com sua incidência aumentando devido ao envelhecimento da população na maioria dos países (Avendaño e Menéndez, 2015; Kubczak et al., 2021). Apesar da rápida evolução dos métodos de diagnóstico e terapêuticos, as metástases e a resistência às drogas administradas são os principais obstáculos para o sucesso do tratamento. Uma das alternativas de tratamento envolve o uso de quimioterapia (Huang et al., 2016; Kubczak et al., 2021). Nesse contexto, substâncias químicas obtidas de fontes naturais representam uma alternativa promissora para a obtenção de novos compostos anticancerígenos (Huang et al., 2021). Eles podem exibir potencial anticâncer semelhante, geralmente com efeitos colaterais reduzidos. Foi relatado que compostos naturais obtidos de plantas, por exemplo, polifenóis, flavonoides, estilbenos, carotenoides e acetogeninas, podem ser eficazes contra células cancerígenas *in vitro* e *in vivo* (Huang et al., 2016; Kubczak et al., 2021). Vários resultados publicados indicam a atividade de compostos naturais na expressão de proteínas por sua influência em fatores de transcrição. Eles também podem estar envolvidos em alterações na resposta celular, sinalização celular e modificações epigenéticas (Huang et al., 2016; Huang et al., 2021; Kubczak et al., 2021). Dentre os compostos naturais atualmente em estudo, destaca-se a pristimerina.

A pristimerina é um triterpeno quinonametídeo, considerado um dos marcadores taxonômicos de espécies da família Celastraceae, comumente isolada de suas raízes. Os quinonametídeos consistem de cinco anéis de seis membros, com um grupo carbonila no carbono C-2, um grupo hidroxila no carbono C-3 e um sistema insaturado envolvendo os anéis A e B (Corsino et al., 2000). Além disso, o carbono C-6 de tais compostos apresenta caráter eletrofílico. Os primeiros compostos descritos para esta classe são celastrol e a pristimerina (Figura 1), que foram isolados de *Tripterygium wilfordii* Hook, *Celastrus scandens* L. e *Pristimera indica* (Gunatilaka, 1996). E, em 2020, Dos Santos e colaboradores isolaram a pristimerina do extrato hexano/éter etílico obtido das raízes de *Salacia crassifolia* em quantidade significativa (5 g), constituindo o principal composto desse extrato (10%) (Dos Santos et al., 2020).

Desde seu isolamento em 1951 e elucidação estrutural em 1954, diferentes atividades biológicas têm sido atribuídas à pristimerina (Kulkarni e Shah, 1954). Entre essas atividades estão os anti-inflamatórios (Kim, Park e Kim, 2013; Zhao et al., 2020), antioxidante (Shaaban et al., 2018), antimalárico (Figueiredo et al., 1998), antibacteriano (López, de León e Moujir, 2011) e antitumoral (Yousef et al., 2016; Yousef et al., 2017; Lee et al., 2018; Cevatemre, et al., 2018; Zhao et al., 2019; Li et al., 2019; Chen et al., 2021; Al-Tamimi et al., 2022).

Figura 1: Estrutura química do celastrol e pristimerina e propriedades eletrofilicas da pristimerina.



Fonte: Dos Santos et al., 2024.

A atividade citotóxica observada em diversas linhagens tumorais foi relacionada ao fato da pristimerina apresentar atividade antiproliferativa envolvendo apoptose ou morte celular programada (Li et al., 2019), autofagia (Cevatemre, et al., 2018), e inibição de vias de sinalização como fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) (Tu et al., 2018), Akt (proteína quinase B, PKB) (Park e Kim, 2018), modulação das vias de sinalização MAPK (Al-Tamimi et al., 2022), entre outras. Observou-se que o uso de pristimerina juntamente com taxol (paclitaxel), um diterpeno tetracíclico isolado da casca de *Taxus brevifolia* Nutt. (Família Taxaceae), induz o processo de autofagia em células humanas de câncer de mama através da regulação ERK1/2 (Lee et al., 2018). Um sistema de nano-entrega constituído por micela nano-herbácea modificada por ácido fólico foi desenvolvido para a liberação simultânea de pristimerina e paclitaxel para aumentar a quimiossensibilidade de neoplasias malignas, tais como o câncer de pulmão de células não pequenas (CPNPC), no qual a pristimerina poderia aumentar sinergicamente a inibição do crescimento da célula cancerosa A549, induzida pelo paclitaxel (Chen et al., 2022).

Já se sabe que, em geral, os quinonametídeos reagem com as bases nitrogenadas do DNA por alquilação. A eletrofilicidade do carbono 6 da pristimerina pode ser responsável por sua propriedade como antitumoral, visto que permite sua reação como doador do grupo alquila em reações de alquilação do DNA (Figura 1). Sabe-se que essas reações podem levar à depuração desse ácido nucleico e,

consequentemente, à inviabilidade celular (Yang et al., 2008; Toteva e Richard, 2011). Assim, é possível que a pristimerina tenha atividade antitumoral, pois é capaz de alquilar o DNA de células tumorais.

Os agentes alquilantes podem ser definidos como compostos capazes de ligar covalentemente um grupo alquila a uma biomolécula em condições fisiológicas (Hall e Tilby, 1992). Os agentes alquilantes do DNA interagem com as células em repouso ou em processo de proliferação em qualquer fase do ciclo celular, sendo mais citotóxicos durante as fases G1 e S tardias.

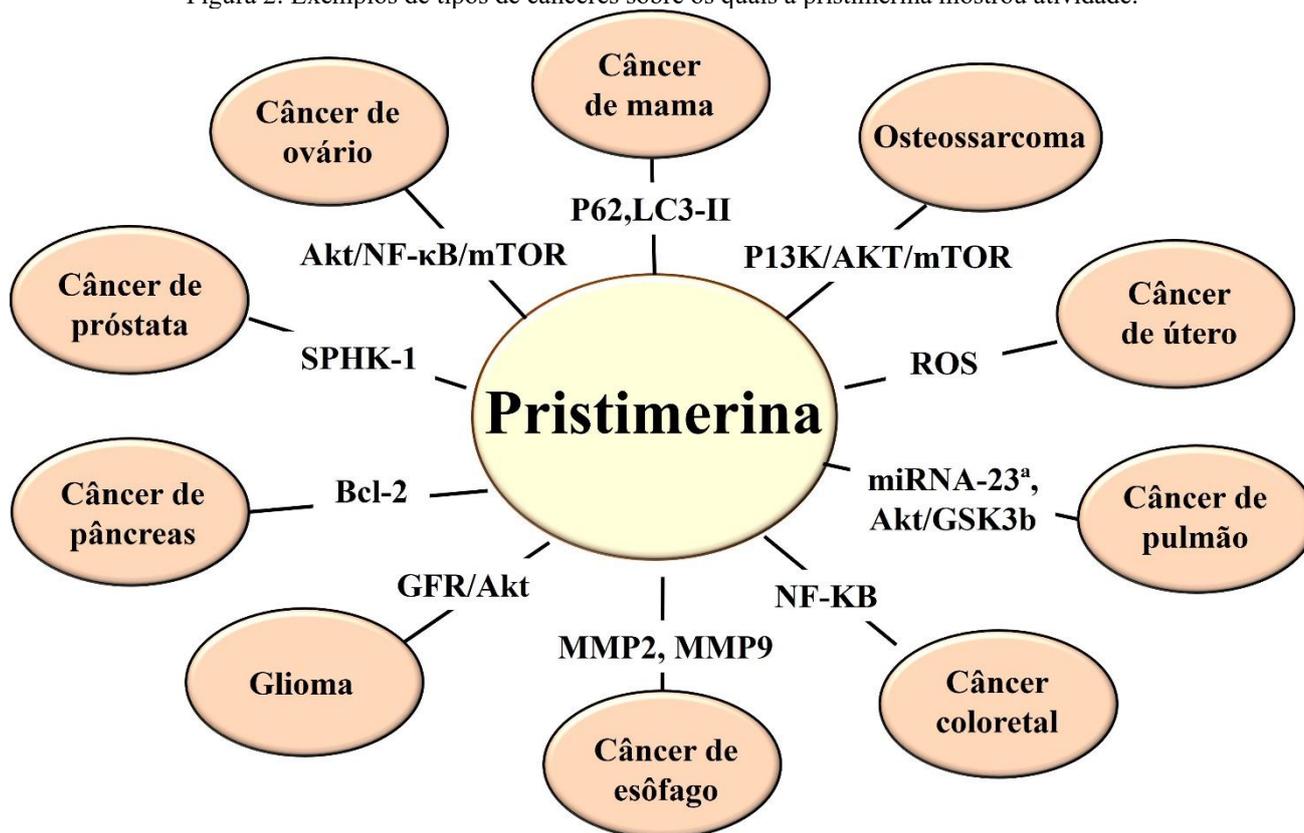
Há mais de sessenta anos, agentes alquilantes têm sido utilizados para o tratamento do câncer e novos agentes dessa classe de medicamentos têm sido desenvolvidos (Hall e Tilby, 1992; Lossos et al., 2019). Esses agentes atuam durante todas as fases do ciclo celular, diretamente no DNA, geralmente alquilando os resíduos de N-7-guanina, levando à ruptura dos filamentos do DNA, o que resulta em um pareamento anormal de bases, inibição da divisão celular e morte celular (Lossos et al., 2019).

A pristimerina é um agente alquilante que se liga covalentemente ao DNA, induzindo apoptose por diferentes vias de sinalização em linhagens de células cancerosas humanas no pâncreas (Deeb et al., 2014), glia (Yan et al., 2013), próstata (Liu et al., 2015), cólon/reto (Yousef et al., 2016), melanoma (Zhang et al., 2017), mama (Xie et al., 2016; Lee et al., 2018; Zhao et al., 2019), pele (Al-Tamimi et al., 2022), esôfago (Huang et al., 2019), cavidade oral (Wu et al., 2019), pulmão (Zhang et al., 2019) e ovário (Gao et al., 2014) (Figura 2).

Devido aos efeitos farmacológicos promissores observados, os mecanismos celulares e moleculares de ação do quinonametídeo pristimerina têm sido estudados na terapia do câncer (Li et al., 2019; Chen et al., 2021). Os quinonametídeos são aceptores de Michael, portanto, são compostos eletrofilicos capazes de promover alquilação e reticulação do DNA (Wang et al., 2017; Minard et al., 2019). No entanto, o potencial mutagênico desses agentes alquilantes ainda não é totalmente investigado.

A formação do aduto de quinonametídeos com a base nitrogenada do DNA pode contribuir para a elucidação do mecanismo de alquilação deste ácido nucleico e serve de modelo para o desenvolvimento de novos quinonametídeos com propriedade alquilante e potencial atividade antitumoral.

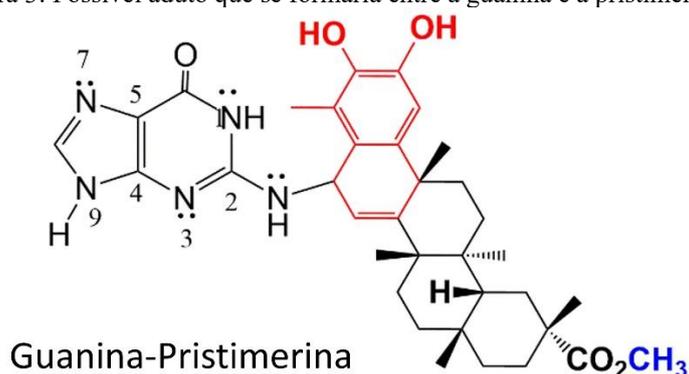
Figura 2: Exemplos de tipos de cânceres sobre os quais a pristimerina mostrou atividade.



Fonte: Dos Santos et al., 2024.

Assim, com base nos resultados encontrados por Zhou *et al* (2011), supõe-se que a pristimerina também forme um aduto com guanina, contribuindo para estabelecer um possível mecanismo que explique o alto potencial anticancerígeno da pristimerina (Figura 3).

Figura 3: Possível aduto que se formaria entre a guanina e a pristimerina.



Fonte: (Dos Santos et al., 2024).

Neste contexto, um trimero de pristimerina pode causar um aumento na força e seletividade das interações pristimerin-DNA através de um efeito de multivalência. A multivalência está envolvida em uma grande diversidade de interações biológicas, devido às múltiplas interações existentes entre pares de ligantes e receptores específicos. O uso de interações multivalentes representa uma boa

ferramenta para a obtenção de compostos supramoleculares, o que permite a formação de uma ligação covalente forte e reversível, aumentando significativamente a seletividade da ligação quando comparada às ligações monovalentes (Dubacheva et al., 2017; Myung et al., 2018).

Tendo em vista o exposto e a quantidade significativa de pristimerina isolada de *Salacia crassifolia* G.Don., planta da família Celastraceae (Dos Santos et al., 2020), a rota sintética mostrada na Figura 3 foi proposta para obtenção de um trimero da pristimerina. As unidades de pristimerina com espaçador oligoetilenoglicol azídico seriam introduzidas no triquinóide ramificado por meio da química do clique. Posteriormente, pretendeu-se investigar a possível formação do aduto com bases nitrogenadas do DNA. Para isso, o trimero da pristimerina seria conectado a uma resina apropriada e a capacidade de alquilação seria avaliada na presença de guanina, por exemplo.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi obter um trimero da pristimerina previamente isolado por Dos Santos et al., (2020), a fim de avaliar a formação de adutos com bases nitrogenadas do DNA de células cancerosas (Figura 4).

Figura 4: Resumo da obtenção do trimer de pristimerina a partir de raízes de *Salacia crassifolia* visando sua interação com o DNA de células cancerígenas.

*Salacia crassifolia*



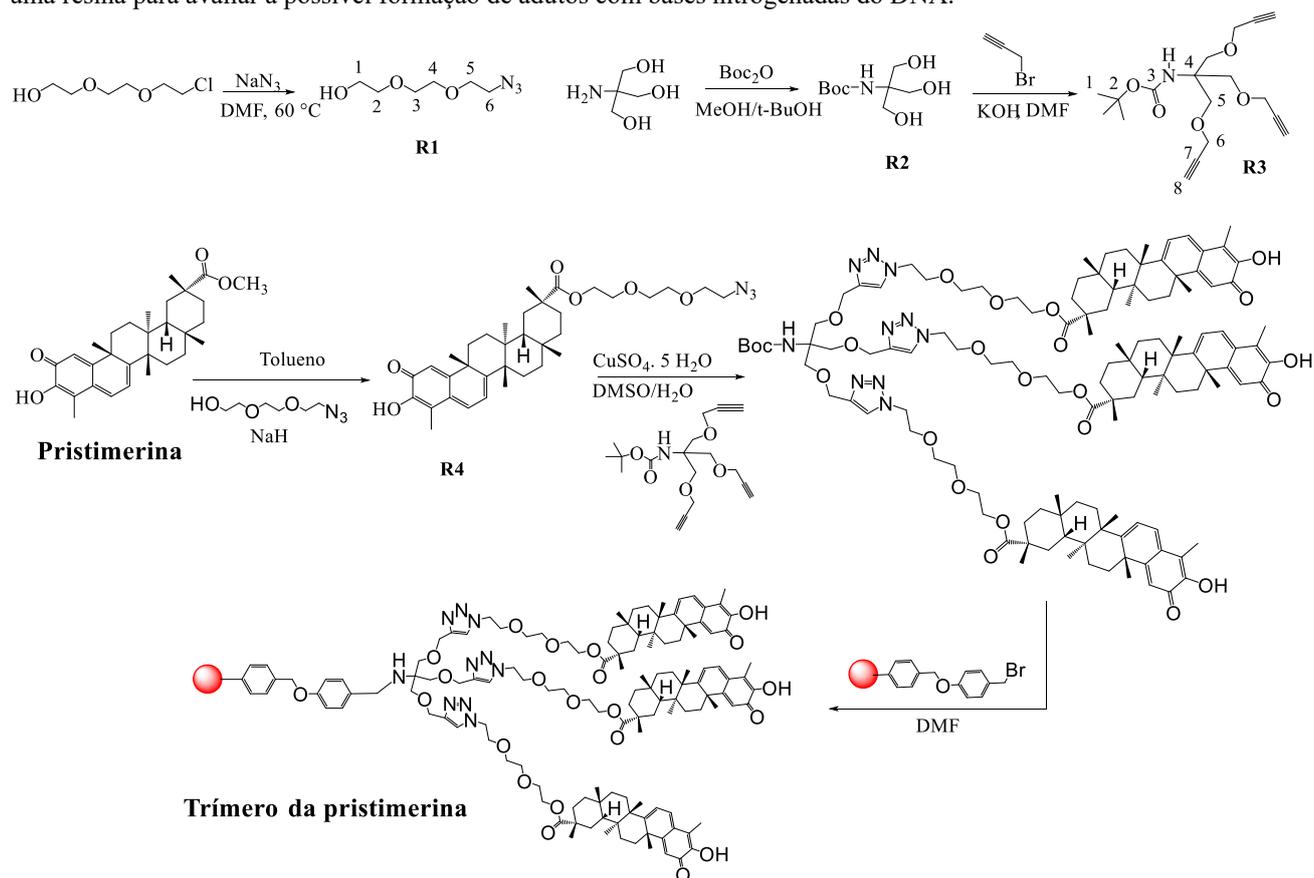
Raízes



Fonte: De autoria própria.

Para atingir esse objetivo, as seguintes etapas foram planejadas para sintetizar: a) o álcool 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etano-1-ol (**R1**), b) o *N*-(*tert*-butoxil-carbonil)-tris-(hidroximetil)aminometano (**R2**), c) o *N*-(*tert*-butoxil-carbonil)-tris-((propargyl)methyl)-aminomethane (**R3**), d) o 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxyethyl pristimerinoate (**R4**) e e) realizar uma reação química de clique entre **R3** e **R4** (Figura 5).

Figura 5: Rota sintética proposta para obtenção do trímtero pristimerina. A bola vermelha corresponde a uma conexão com uma resina para avaliar a possível formação de adutos com bases nitrogenadas do DNA.



Fonte: (Dos Santos et al., 2024).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Os processos de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizados com sílica gel 60 G (7 g/15 mL de água) em placa de vidro de 0,25 mm de espessura previamente ativada a  $100^\circ\text{C}$ . As placas cromatográficas foram reveladas por pulverização de solução (1:1) de ácido perclórico a 3% em água com vanilina a 1% em etanol (Court e Iwu, 1980; Wagner e Bladt, 1996). A cromatografia em coluna (CC) foi realizada com sílica gel 60, utilizando-se um eluente apropriado. Compostos com pureza adequada foram submetidos à espectrometria de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Os pontos de fusão dos compostos foram determinados utilizando-se o equipamento digital MQAPF-302 da Microquímica Equipamentos Ltda. Os espectros no infravermelho dos compostos, a  $\sim 1\%$  de KBr, foram registrados em um espectrômetro IR IR-408 da Shimadzu. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  foram registrados em 400 e 100 MHz, respectivamente, usando um Espectrômetro AVANCE Brüker DRX400 e  $\text{CDCl}_3$  ou DMSO foram usados como solvente. As atribuições dos deslocamentos químicos foram registradas em ppm ( $\delta$ ) utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna ( $\delta_{\text{H}} = \delta_{\text{C}} = 0$ ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registrados em Hertz (Hz) (Dos Santos et al., 2024).

## 2.2 PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE

A síntese de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etan-1-ol (**R1**) (Figura 4) foi realizada de acordo com Wallat *et al.* (2017). Em um frasco de reação de 125 mL, 5,2 g de azida sódica (29,7 mmol), 15 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) e 2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etanol (862  $\mu$ L, 5,9 mmol) foram adicionados. A mistura foi mantida a 60 °C, com agitação magnética constante. Após 48 horas, a azida foi filtrada e 30 mL de solução de água-diclorometano 1:1 foram adicionados à mistura. Em seguida, a mistura foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi lavada (2 x 15 mL) com água destilada. Após secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtração, 15 mL de etanol foram adicionados, e o solvente foi removido em evaporador rotativo. O resíduo obtido foi purificado através de sílica gel CC eluída com acetato de etila. O produto **R1** (555,0 mg) foi isolado com rendimento de 53 %.

**R1** (2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etano-1-ol): Fórmula molecular: C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, massa molar: 175,1 g mol<sup>-1</sup>. Aparência: óleo amarelo. **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ <sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição: 2,0 (s, 1H, H-6); 2,53 (s, 1H, H-6), 3,41 (t, 2 H, J=5,1 Hz, H-5), 3,62 (dd, 2 H, J=5,4 e 4,5 Hz, H-2), 3,68 (s, 4H, H-3 e H-4) e 3,74 (t, 2 H, J= 4,5 Hz, H-1). **RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$ <sub>C</sub> (ppm): 50,71 (CH<sub>2</sub>, C-6), 61,74 (CH<sub>2</sub>, C-1), 70,03 (CH<sub>2</sub>, C-4), 70,39 (CH<sub>2</sub>, C-2), 70,69 (CH<sub>2</sub>, C-5) e 72,60 (CH<sub>2</sub>, C-3) (Dos Santos et al., 2024).

A síntese de *N*-(*tert*-butoxil-carbonil)-tris-(hidroximetil)-aminometano (**R2**) (Figura 4) foi realizada de acordo com Segura *et al.*, (2001). Em um frasco de reação de 50 mL, 1g de tris(hidroximetil)-aminometano foi adicionado a uma mistura de MeOH:*t*-BuOH (1:1). Uma solução de dicarbonato de *tert*-butoxila, dissolvido em *t*-BuOH, foi então gotejado na mistura. Até o término da adição desta solução, a mistura reacional foi mantida em baixa temperatura, utilizando-se banho de gelo. Após 20 horas de reação, o solvente foi removido em evaporador rotativo. Ao resíduo obtido foi adicionado acetato de etila resfriado, que induziu a formação de um sólido branco, que foi filtrado a vácuo levando à obtenção do **R2** (1,58 g) com rendimento de 87 %.

**R2** (N-(*tert*-butoxil-carbonil)-tris-(hidroximetil)aminometano): Fórmula molecular: C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>. Massa molar: 221,25 g mol<sup>-1</sup>. Aparência: Sólido branco. **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO,  $\delta$ <sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição: 1,37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>, H-1); 3,52 (s, 6H, CH<sub>2</sub>, H-5) e 5,77 (s, 1H, NH). **RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO):  $\delta$ <sub>C</sub> (ppm): 28,23 (CH<sub>3</sub>, C-1), 60,25 (CH<sub>2</sub>, C-5), 60,42 (C), 77,84 (C-2) e 155,03 (C-3) (Dos Santos et al., 2024).

A síntese de *N*-(*tert*-butoxil-carbonil)-tris-((propargil)-metil)aminometano (**R3**) (Figura 4) foi realizada de acordo com Segura *et al.*, (2001). Num balão de fundo redondo de 100 ml, resfriado em banho de gelo, 0,5 g de **R2** dissolvido em 6 mL de DMF e 1,46 mL de brometo de propargila (80 % em tolueno). KOH pó (951 mg) foi adicionado em pequenas porções durante 15

minutos. A reação foi mantida sob atmosfera inerte de argônio a 35 °C por 24 horas. Após esse tempo, foram adicionados 10 mL de acetato de etila (AcOEt). A mistura foi transferida para um funil de separação, extraída com 40 mL de AcOEt e lavada com água destilada (3 x 30 mL). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrado e o solvente foi removido em evaporador rotativo. O resíduo foi purificado por sílica gel CC usando uma mistura de hexano-AcOEt (9:1) como eluente. O composto **R3** (315,0 mg) foi isolado com rendimento de 42 %.

**R3** (*N*-(*terc*-butoxil-carbonil)-tris-((propargil)metil)-aminometano): Fórmula molecular: C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub>. Massa molar: 335,40 g mol<sup>-1</sup>. Aparência: óleo amarelado. **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub> (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição: 1,43 (s, 9H, H-1), 2,42 (t, 3H, *J* = 2,4 Hz, H-8), 3,79 (s, 6H, H-5), 4,16 (d, 6H, *J* = 2,4 Hz, H-6) e 4,93 (s, 1H). **RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> (ppm): 28,35 (CH<sub>3</sub>, C-1), 58,09 (CH<sub>2</sub>, C-6), 58,67 (C, C-2), 68,93 (CH<sub>2</sub>, C-5), 74,56 (CH, C-8), 79,63 (C, C-7) e 154,79 (C, C-3) (Dos Santos et al., 2024).

Para sintetizar o derivado **R4** (2-(2-azidoetoxi)pristimerinoato de etoxietila) (Figura 5) através da transesterificação, inicialmente seguimos o método descrito por Koval et al (2008), e posteriormente adotamos a abordagem descrita por Chavan et al (2004).

Para a primeira tentativa de transesterificação, inspirada no método de Koval et al (2008), foi empregado um aparelho de Soxhlet preenchido com peneira molecular 4A e tolueno anidro. Em um balão de fundo redondo de duas bocas, de 100 mL, foram adicionados 100 mg de pristimerina com 20 mL de tolueno anidro. Nesta solução, uma mistura pré-preparada contendo 15 mg de NaH, 10 mL de tolueno anidro e 49 mg de **R1** foi adicionada lentamente. A reação foi mantida a 100 °C e após 24 horas foi processada. A reação foi monitorada por CCD e o composto desejado não foi obtido.

Posteriormente, tentou-se a transesterificação seguindo o procedimento descrito por Chavan et al (2004). Em um frasco de fundo redondo de 50 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados pristimerina (100 mg), **R1** (44 mg), iodo (8 mg) e 10 mL de tolueno. A reação foi mantida a 115-120 °C em banho de glicerina, por 4 horas. Após esse período, observou-se por CCD que o material de partida ainda estava no meio reacional. A condição de reação foi então mantida por mais 4 horas, mas ainda assim nenhuma mudança significativa foi observada. Após o resfriamento, a mistura foi lavada com uma solução de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e, em seguida, com uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente removido em evaporador rotativo. A CCD foi realizada e observou-se que nenhum produto foi formado.

Portanto, uma alternativa para obtenção de **R4** foi tentar a hidrólise da pristimerina para obtenção de celastrol (Figura 1) e posterior esterificação deste composto com **R1**. A reação de hidrólise utilizada para obter celastrol a partir de pristimerina foi realizada utilizando o método relatado por Camelio, Johnson e Siegel, (2015). Em um balão de fundo redondo de 100 mL, foram adicionados 200 mg de pristimerina, 75 mL de 1,4-dioxano:água (1:1) e 450 mg de KOH. A reação foi mantida a

100 °C por 4 horas em banho de óleo. Após resfriamento lento até atingir a temperatura ambiente, o meio reacional foi então acidificado com tampão fosfato (pH 2). Após a adição de 100 mL de AcOEt, a mistura foi transferida para um funil de separação, e 150 mL de tampão fosfato (pH 2) foram adicionados. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente removido em evaporador rotativo. Foi realizada a CCD e observou-se que não houve formação do celastrol esperado.

Outra tentativa de obtenção de celastrol foi realizada utilizando métodos de hidrólise enzimática adaptados daquele descrito por Ciuffreda, Casati e Santaniello (2000). As enzimas testadas foram: Lipases A e B de *Candida antarctica* (CAL-A e CAL-B, respectivamente), lipase de *Burkholderia cepacea* (PCL), lipase de *Rhizomucor miehei* (RMIM) e protease alfa-quimotripsina. Todas as lipases foram utilizadas como biocatalisadores comerciais imobilizados, enquanto a alfa-quimotripsina foi utilizada como extrato bruto. Os métodos **de A a E** foram testados.

**Método A:** Em um balão de fundo redondo de 10 mL, foram adicionados 50 mg de pristimerina, 3,60 mL de éter terc-butil-metílico, 120 µL de água destilada e 5 mg de lipase imobilizada (PCL, RMIM, CAL-A ou CAL-B). A reação foi realizada à temperatura ambiente sob suave agitação magnética. A reação foi monitorada por CCD e nenhum produto foi observado dentro de 72 horas após o início da reação. Novas tentativas foram conduzidas em condições análogas, com variações introduzidas na escolha do solvente. Utilizando 3,0 mL de éter terc-butil-metílico e 600 µL de água destilada, não houve formação do produto celastrol. Para a enzima CAL-B, o procedimento também foi realizado com tolueno em vez de éter terc-butil-metílico. Nenhuma formação de celastrol foi observada dentro de 3 horas após o início da reação.

**Método B:** Em um frasco de fundo redondo de 10 mL contendo 50 mg de pristimerina, 1,4 mL de éter terc-butil-metílico, 3,6 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e 4 mg de CAL-B foram adicionados. A reação foi mantida a 30 °C, sob agitação constante em mesa de agitação orbital (300 rpm) por 72 horas. Em seguida, HCl foi adicionado até atingir pH 3-4, e a mistura foi submetida à extração com acetato de etila (2 x 5 mL). A análise por CCD de ambas as fases não revelou formação de celastrol.

**Método C:** Em um balão de fundo redondo de 10 mL, foram adicionados 50 mg de pristimerina, 2,3 mL de THF e 0,1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,2) e 12,5 mg de alfa-quimotripsina. A mistura foi mantida a 38 °C sob agitação (300 rpm) por 72 horas. Em seguida, a fase aquosa foi tratada com HCl até pH 3-4 e extraída com acetato de etila (2 x 4,0 mL). Não houve formação do esperado celastrol.

**Método D:** Em um balão de fundo redondo de 10 mL, foram adicionados 50 mg de pristimerina, 2,3 mL de tolueno, 0,1 mL de água e 9 mg de CAL-B. A reação foi mantida a 70 °C sob agitação magnética por 72 horas. A extração foi realizada com acetato de etila (2 x 4,0 mL). E a fase

aquosa foi acidificada até pH 3-4, em seguida foi extraída com acetato de etila (2 x 4,0 mL). A análise por CCD indicou que não houve formação do celastrol.

**Método E:** Em um frasco de fundo redondo de 10 mL, foram adicionados 50 mg de pristimerina, 5,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,5) e 12,5 mg de quimotripsina. A reação foi mantida a 38 °C sob agitação (300 rpm). Após 72 horas, a reação foi extraída com acetato de etila (2 x 4,0 mL) e a fase aquosa foi acidificada em pH 3-4. Em seguida, foi extraído com acetato de etila (2 x 4,0 mL). Pela CCD observou-se que não houve formação do celastrol.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pristimerina é o principal metabólito isolado do extrato hexânico/éter etílico das raízes de *Salacia crassifolia*, sendo obtido 5 g, equivalente a 10% do extrato bruto (Dos Santos et al., 2020). Devido a esta disponibilidade, o objetivo deste trabalho foi obter um trímico da pristimerina, a partir da rota de síntese apresentada na Figura 3, utilizando os derivados **R1** a **R4**, e comprovar que este trímico formaria adutos com bases nitrogenadas do DNA por alquilação.

O composto 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etano-1-ol (**R1**) foi obtido por meio da reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN<sub>2</sub>). A reação foi monitorada por CCD e, após 48 horas, observou-se que o material de partida já havia sido consumido. Após elaboração e purificação por CC obteve-se o 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etano-1-ol (**R1**) com rendimento de 53 %, na forma de óleo amarelo claro solúvel em clorofórmio e com R<sub>f</sub> menor que o material de partida. A estrutura de **R1** foi confirmada através de dados espectrais de IV e RMN. No espectro de IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) de **R1**, a banda de absorção a 2110 cm<sup>-1</sup> é característica de estiramento do grupo azida e a banda larga a 3423 cm<sup>-1</sup> foi atribuída ao estiramento O-H do grupo hidroxila alcoólica. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), dois tripletos foram observados em δ<sub>H</sub> 3,41 (t, 2H, J=5,1 Hz, H-5) e em δ<sub>H</sub> 3,74 (t, 2H, J=4,5 Hz, H-1). Dois singletos largos foram observados em δ<sub>H</sub> 2,00 (sl, 1H, H-6) e 2,53 (sl, 1H, H-6) e foram atribuídos aos átomos de hidrogênio mais blindados, que estão ligados ao átomo de carbono que contém o grupo azida. Nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT-135 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), seis sinais atribuídos aos carbonos de metileno foram observados em δ<sub>C</sub> 50,71 (C-6), 61,74 (C-1), 70,03 (C-5), 70,39 (C-4), 70,69 (C-2) e 72,60 (C-3), confirmando a estrutura **R1** (Dos Santos et al., 2024).

A proteção do grupo amino de **R1** com carbamato de terc-butoxila (Boc) levou ao composto N-(terc-butoxil-carbonil)-tris-(hidroximetil)-aminometano (**R2**) como sólido branco, com rendimento de 87 % e ponto de fusão de 144-149 °C. O espectro de IV (KBr, cm<sup>-1</sup>) de **R2** mostrou uma banda de absorção em 3306 cm<sup>-1</sup>, característica de estiramentos hidroxila e também em 1679 cm<sup>-1</sup> correspondente ao estiramento da ligação C=O do carbamato carbonila. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) de **R2** mostrou um singlete em δ<sub>H</sub> 1,37 (s, 9H, CH<sub>3</sub>, H-1) atribuído aos átomos de hidrogênio do grupo terc-butoxila de Boc. O singlete em δ<sub>H</sub> 3,52 (6H) foi atribuído a átomos de

hidrogênio de carbono metilênico (H-5). O sinal amplo observado em  $\delta_H$  5,77 foi atribuído ao hidrogênio de N-H. O sinal em  $\delta_C$  28,23 no espectro de RMN de  $^{13}C$  (100 MHz, DMSO) de **R2** foi atribuído ao carbono metílico (C-1). Os sinais de carbono em  $\delta_C$  60,25 e  $\delta_C$  60,42 foram atribuídos aos três átomos de carbono metilênico (C-5) e os sinais em  $\delta_C$  77,84 (C-2) e em  $\delta_C$  155,03 (C-3) foram atribuídos a átomos de carbono não hidrogenados (Dos Santos et al., 2024).

O composto *N*-(terc-butoxil-carbonil)-tris-((propargil)metil)-aminometano (**R3**) foi obtido por meio da reação  $SN_2$  entre **R2** e brometo de propargila. A reação foi monitorada por CCD, na qual uma coloração bem definida foi observada após revelação com solução de  $KMnO_4$  indicando a presença do grupo alquino. Após purificação, utilizando-se CC de sílica gel, obteve-se o produto **R3** na forma de óleo amarelo com rendimento de 42%. O espectro de IV (KBr,  $cm^{-1}$ ) de **R3** apresentou bandas de absorção em  $1715\ cm^{-1}$ , correspondendo a estiramento carbonílico, em  $2118\ cm^{-1}$  característico de estiramento da ligação  $C\equiv C$  e em  $3294\ cm^{-1}$  atribuído ao estiramento C-H do alquino terminal. O espectro de RMN de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) de **R3** mostrou um tripleto em  $\delta_H$  2,40 (t, 3H,  $J=2,4\ Hz$ ) associado ao átomo de hidrogênio de alcino terminal (H-8) e um duplete em  $\delta_H$  4,16 (d, 6H,  $J=2,4\ Hz$ ) atribuído aos átomos de hidrogênio metilênico (H-6) da cadeia propargílica. Os espectros de RMN de  $^{13}C$  e DEPT-135 (100 MHz,  $CDCl_3$ ) permitiram atribuir os sinais em  $\delta_C$  74,56 (CH) ao carbono C-8 e os sinais em  $\delta_C$  79,63 (C-7) e  $\delta_C$  154,79 (C-3) ao carbono não hidrogenado. O sinal em  $\delta_C$  58,09 (C-6) foi atribuído aos átomos de carbono metilênico da cadeia propargílica (Dos Santos et al., 2024).

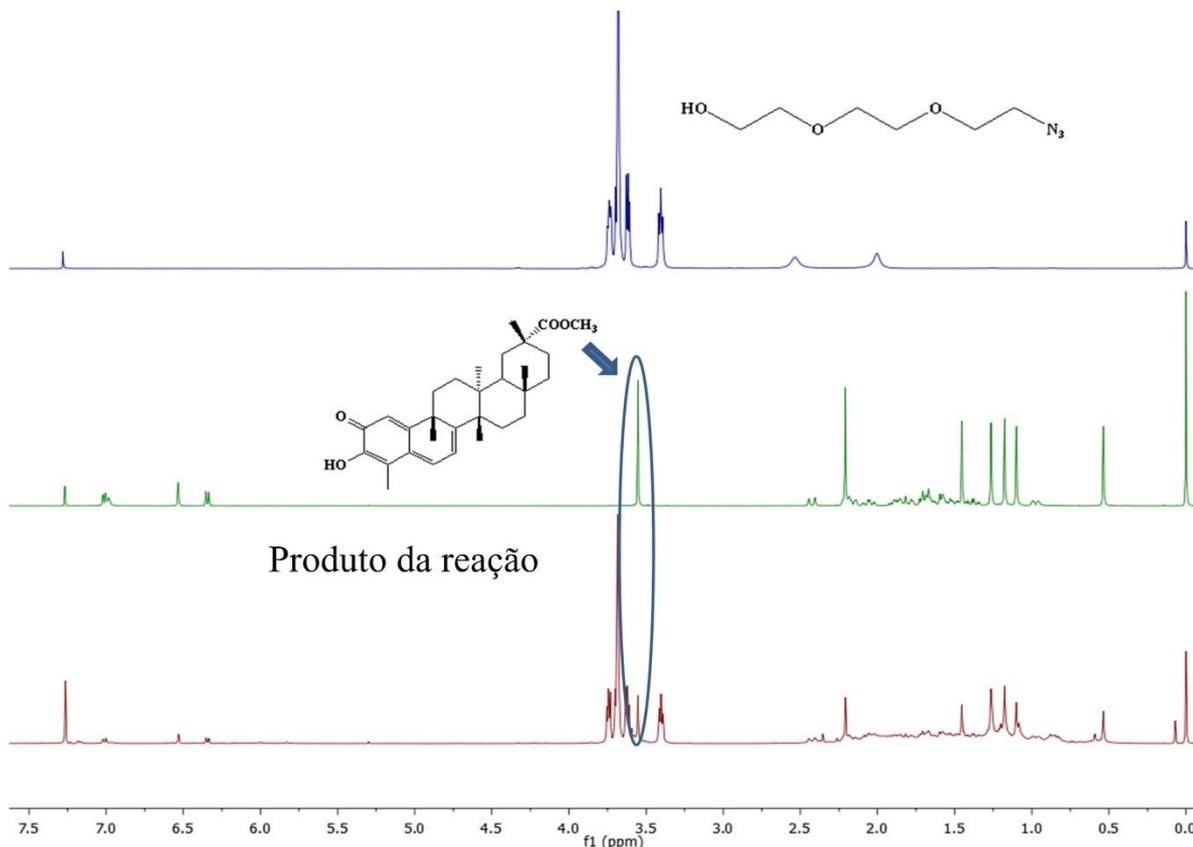
Em relação à transesterificação da pristimerina visando a obtenção do 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxietil pristimerinoato (**R4**), foram realizadas duas tentativas de reação. A primeira tentativa foi uma adaptação do método de transesterificação descrito por Koval *et al.*, (2008). A reação foi realizada a  $100\ ^\circ C$  sob agitação e monitorada por CCD. No entanto, o material de partida não havia sido consumido após 24 h. Com base no espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 6) do material obtido após o processo de elaboração da reação, concluiu-se que não houve formação do produto desejado.

O singlete a  $\delta_H$  3,55 (Figura 6) correspondente aos átomos de hidrogênio do éster metílico indicou que a pristimerina permaneceu sem reação nas condições de reação adotadas. Por esta razão, uma segunda tentativa foi realizada para obter o composto **R4** usando o método de transesterificação descrito por Chavan *et al.*, (2004), em que o iodo é utilizado como catalisador. A reação foi cuidadosamente monitorada por CCD, mas o produto desejado não foi obtido.

Dada a incapacidade de obter diretamente o composto **R4** através da transesterificação, uma abordagem alternativa foi considerada, envolvendo a hidrólise da pristimerina para produzir celastrol, seguida de esterificação. Vale ressaltar que o celastrol não foi isolado de *S. crassifolia*. Existem vários relatos de modificações no carbono C-29 do celastrol (Shan et al., 2017; Xu et al., 2019). A primeira tentativa de obtenção de celastrol a partir de pristimerina seguiu a metodologia descrita por Camelio,

Johnson e Siegel, (2015), empregando KOH seguido de tampão fosfato (pH 2) para acidificar o meio reacional. A reação foi monitorada por CCD e não foi observada formação de produtos após 4 horas.

Figura 6: Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) dos espectros de R1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de R1 (Em cima), pristimerina (meio) e do produto da reação (abaixo).



Fonte: (Dos Santos et al., 2024).

Outras tentativas de hidrolisar a pristimerina usando biocatalisadores também foram realizadas. Quatro diferentes lipases imobilizadas, incluindo a lipase B imobilizada de *Candida antarctica*, bem como a protease alfa-quimotripsina, foram empregadas em condições variadas, tais como diferentes solventes, temperaturas e tempos de reação. No entanto, todas as tentativas de converter pristimerina em celastrol não tiveram sucesso (Dos Santos et al., 2024).

Efeitos estéricos podem explicar a estabilidade da pristimerina em direção à transesterificação e hidrólise alcalina comum aqui descrita. De fato, a taxa de hidrólise do éster em sistemas alicíclicos de seis membros tem sido relatada como sendo menor quando a carbonila ocupa uma posição axial em comparação com a posição equatorial, possivelmente devido ao grande obstáculo estérico imposto pelo estado de transição tetraédrico intermediário associado ao resultado da reação (Burden et al., 1980; Bekkum et al., 2010). A taxa de reação é menor quando uma conformação axial é favorecida, por exemplo, pela presença de um substituinte adicional sobre o carbono que contém a porção carbonila,

e ainda menor em sistemas rígidos com conformação "travada", como arcabouços policíclicos semelhantes a decalinas (Spencer et al., 1968; Burden et al., 1980). Um exemplo marcante é o éster metílico do ácido podocárpico, no qual o grupo carbometoxi axial mostrou ser estável sob condições catalisadas por bases e outros processos hidrolíticos (Wenkert e Jackson, 1958).

Embora a hidrólise de ésteres estericamente impedidos possa ser obtida sob condições adversas, os métodos adequados para hidrólise de pristimerina são limitados devido à presença de grupos funcionais lábeis (Spencer et al., 1968; Wenkert e Jackson, 1958; Bekkum et al., 2010; Krief e Kremer, 2010; Camelio, Johnson e Siegel, 2015;).

Hidrólise catalisada por lipases conhecidas por apresentarem ampla abrangência, como a CAL-B (Bornscheuer e Kazlauskas, 2006)., também foi tentada. O uso de enzimas geralmente permite catálise sob condições leves e reações seletivas. Infelizmente, a pristimerina mostrou ser um substrato particularmente desafiador para as enzimas selecionadas, provavelmente devido ao volume e ao fato de que o grupo carbometoxi está ligado a um centro quaternário.

Apesar da rápida evolução dos métodos diagnósticos e terapêuticos, as metástases e a resistência aos medicamentos administrados representam obstáculos para a efetividade e o sucesso do tratamento. Além do desafio do diagnóstico precoce e de estratégias terapêuticas adequadas para aumentar as chances de o paciente responder positivamente ao tratamento e aumentar sua expectativa de vida, há a questão dos efeitos colaterais da quimioterapia (Kubczak et al., 2021).

Devido à sua grande diversidade química, os produtos naturais continuam a ser extensivamente investigados como potenciais compostos anticancerígenos. Os esforços dos pesquisadores em fitoquímica, farmacologia e outras áreas da ciência têm proporcionado avanços substanciais, fornecendo compostos para uso clínico e abrindo novas oportunidades terapêuticas. No entanto, muitos desafios em oncologia ainda permanecem pela frente (Huang et al., 2021). Neste cenário, a realização de novas tentativas de síntese do trimero da pristimerina utilizando técnicas e equipamentos mais avançados, visando a sua interação com o DNA de células cancerosas é considerada promissora.

#### 4 CONCLUSÃO

A rota sintética utilizada para a obtenção do trimero da pristimerina levou à obtenção de três intermediários. A primeira etapa da rota, relacionada à obtenção do produto **R1**, via reação  $SN_2$ , foi realizada com rendimento de 53%. O produto com o grupo amina protegido com Boc, composto **R2**, foi obtido com rendimento de 87%, e o trialquino **R3** foi obtido com rendimento de 43%. Várias metodologias foram empregadas na tentativa de transesterificar a pristimerina com **R1** para obtenção do produto desejado **R4**. Estas abordagens incluíram hidrólise química e enzimática da pristimerina, seguida de esterificação como uma rota alternativa. No entanto, nenhum desses métodos se mostrou bem-sucedido, ressaltando a notável resistência do carbono C-29 em pristimerina a reações de hidrólise



e transesterificação, provavelmente devido ao impedimento estérico. A obtenção do trimero da pristimerina para sua interação com o DNA de células cancerosas é importante e sugere-se que outros métodos e condições de reação continuem a ser investigados.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).



## REFERÊNCIAS

Al-Tamimi M, Khan AQ, Anver R, Ahmad F, M Mateo J, Raza SS, Alam M, Buddenkotte J, Steinhoff M, Uddin S. Pristimerin mediated anticancer effects and sensitization of human skin cancer cells through modulation of MAPK signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 156: 113950. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113950.

Bekkum, H.; Buurmans, H.; Wepster, B.; van Wijk, Marit. Ester hydrolysis in concentrated sulfuric acid. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, 2010, 88. 301-306. Doi. 10.1002/recl.19690880307.

Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Chemistry: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2° Ed. John Wiley and Sons. 2006. 355p. doi.org/10.1002/3527607544

Burden, A. G.; Chapman, N. B.; Shorter, J.; Kenneth, J.; Toyne, K. J.; Wilson, L. M. Conformation and reactivity. Part 9. Kinetics of the acid- or base-catalysed methanolysis of the methyl esters of trans-decalin- or cyclohexane-carboxylic acid and related acids. The validity of Taft's method for the separation of polar, steric, and resonance effects. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1980, 1212-1218.

Camelio, A. M.; Johnson, T. C.; Siegel, D. Total Synthesis of Celastrol, Development of a Platform to Access Celastroid Natural Products. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 37(37): 11864-11867. doi: 10.1021/jacs.5b06261.

Cevatemre, B.; Erkisa, M.; Aztopal, N.; Karakas, D.; Alper, P.; Tsimplouli, C.; Sereti, E.; Dimas, K.; Armutak, E. I. I.; Gurevin, E. G.; Uvez, A.; Morif, M.; Berardozi, S.; Ingallina, C.; D'Acquarica, I.; Botta, B.; Ozpolat, B.; Ulukaya, E. A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells *in vitro* and xenografts *in vivo* through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. *Pharmacological Research*, 2018, 129:500-514. doi: 10.1016/j.phrs.2017.11.027.

Chavan, S. P.; Kale, R. R.; Shivasankar, K.; Chandake, S. I.; Benjamin, S. B. A Simple and Efficient Method for Transesterification of  $\beta$ -Ketoesters Catalyzed by Iodine. *Cheminformatics*, 2004, 35. doi: 10.1002/chin.200414069.

Chen C, Du S, Zhong W, Liu K, Qu L, Chu F, Yang J, Han X. Accurate delivery of pristimerin and paclitaxel by folic acid-linked nano-micelles for enhancing chemosensitivity in cancer therapy. *Nano Convergence*, 2022, 9(1): 52. doi: 10.1186/s40580-022-00343-5.

Chen RZ, Yang F, Zhang M, Sun ZG, Zhang N. Cellular and Molecular Mechanisms of Pristimerin in Cancer Therapy: Recent Advances. *Frontiers in Oncology*, 2021, 11: 671548. doi: 10.3389/fonc.2021.671548.

Ciuffreda, P.; Casati, S.; Santaniello, E. Regioselective hydrolysis of diacetoxynaphthalenes catalyzed by *Pseudomonas* sp. lipase in an organic solvent. *Tetrahedron*, 2000, 56(2): 317-321. doi.org/10.1016/S0040-4020(99)01000-5

Corsino, J.; Carvalho, P. R. F.; Kato, M. J.; Latorre, L. R.; Oliveira, O. M. M.F.; Araujo, A. R.; Bolzani, V. S.; França, S. C.; Pereira, A. M. S.; Furlan, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. *Phytochemistry*, 2000, 55, 741-748. doi: 10.1016/s0031-9422(00)00285-5.

Court, W. E.; Iwu, M. M. Chromogenic reactions of *Rauwolfia* alkaloids after separation by thin-layer



chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1980, 187, 199-207. doi.org/10.1016/S0021-9673(00)87886-3

Deeb, D.; Gao, X.; Liu, Y. B.; Pindolia, K.; Gautam, S. C. Pristimerin, a quinonemethide triterpenoid, induces apoptosis in pancreatic cancer cells through the inhibition of pro-survival Akt/NF- $\kappa$ B/mTOR signaling proteins and anti-apoptotic Bcl-2. *International Journal of Oncology*, 2014, 44(5): 1707-1715. doi: 10.3892/ijo.2014.2325.

Dos Santos, J. P., Oliveira, W. X. C., Vieira-Filho, S. A., Pereira, R. C. G., Souza, G. F. de, Gouveia, V. A., Sabino, A. de P., Evangelista, F. C. G., Takahashi, J. A., Moura, M. A. F., Almeida, F. B., Duarte, L. P. Phytochemical and Biological Studies of Constituents from Roots of *Salacia crassifolia* (Celastraceae). *Química Nova*, 2020. 43(5), 558–567. doi.org/10.21577/0100-4042.20170520

Dos Santos, J. P., Pereira, R. C. G., dos Santos, V. H., de Moraes, L. C., de Miranda, A. S., Vieira-Filho, S. A., Duarte, L. P., de Sousa, G. F., & Figueiredo, R. C. Attempts to synthesize a trimeric derivative of pristimerin with potential activity against cancer cells. *Revista Contemporânea*, 2024, 4(1): 3299–3325. doi.org/10.56083/RCV4N1-186

Dubacheva, G. V.; Araya-Calles, C.; Volbeda, A. G.; Fairhead, M.; Codée, J.; Howarth, M.; Richter, R. P. Controlling Multivalent Binding through Surface Chemistry: Model Study on Streptavidin. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 39(11): 4157-4167. doi: 10.1021/jacs.7b00540.

Figueiredo, J. N.; Răz, B.; Séquin, U. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with *in vitro* antimalarial activity. *Journal of Natural Products*, 1998, 26; 61(6), 718-723. doi: 10.1021/np9704157.

Gao, X.; Liu, Y.; Deeb, D.; Arbab, A. S.; Gautam, S. C. Anticancer activity of pristimerin in ovarian carcinoma cells is mediated through the inhibition of prosurvival Akt/NF- $\kappa$ B/mTOR signaling. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 2014, 10(4): 275-83.

Gunatilaka A.A.L. Triterpenoid Quinonemethides and Related Compounds (Celastrolids). pp. 2–114. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer; Vienna, Austria, 1996.

Hall, A. G.; Tilby, M. J. Mechanisms of action of, and modes of resistance to, alkylating agents used in the treatment of haematological malignancies. *Blood Reviews*, 1992, 6(3), 163-173. doi: 10.1016/0268-960x(92)90028-o.

Huang, P.; Sun, L. Y.; Zhang, Y. Q. A Hopeful Natural Product, Pristimerin, Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Autophagy in Esophageal Cancer Cells. *Analytical Cellular Pathology*, 2019, 2019: 6127169. doi: 10.1155/2019/6127169.

Kim, H. J.; Park, G. M.; Kim, J. K. Anti-inflammatory effect of pristimerin on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in murine macrophages. *Archives of Pharmacal Research*, 2013, 36, 495-500. doi: 10.1007/s12272-013-0054-1.

Koval, L. I.; Dzyuba, V. I.; Ilnitska, O. L.; Pekhnyo, V. I. Efficient transesterification of ethyl acetoacetate with higher alcohols without catalysts. *Tetrahedron Letters*, 2008, 49(10): 1645-1647. doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.01.018

Krief, A.; Kremer, A. Synthesis of Alkali Metal Carboxylates and Carboxylic Acids Using “Wet” and “Anhydrous” Alkali Metal Hydroxides. *Chemical Reviews*, 2010, 110(8): 4772 –4819. doi.org/10.1021/cr9003506

Kulkarni, A. B.; Shah, R. C. Structure of Pristimerin. *Nature*, 1954, 173: 1237–1238.

doi.org/10.1038/1731237b0

Lee Y, Na J, Lee MS, Cha EY, Sul JY, Park JB, Lee JS. Combination of pristimerin and paclitaxel additively induces autophagy in human breast cancer cells via ERK1/2 regulation. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(5): 4281-4288. doi: 10.3892/mmr.2018.9488.

Li. JJ, Yan YY, Sun HM, Liu Y, Su CY, Chen HB, Zhang JY. Anti-Cancer Effects of Pristimerin and the Mechanisms: A Critical Review. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 12; 10:746. doi: 10.3389/fphar.2019.00746.

Liu, Y. B.; Gao, X.; Deeb, D.; Pindolia, K.; Gautam, S. C. Role of telomerase in anticancer activity of pristimerin in prostate cancer cells. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 2015, 11(1): 41-49.

López, M. R.; de León, L.; Moujir, L. Antibacterial properties of Phenolic triterpenoids against *Staphylococcus epidermidis*. *Planta Medica*, 2011, 77(7), 726-729. doi: 10.1055/s-0030-1250500.

Lossos, C.; Liu, Y.; Kolb, K. E.; Christie, A. L.; Van Scoyk, A.; Prakadan, S. M.; Shigemori, K.; Stevenson, K. E.; Morrow, S.; Plana, O. D.; Fraser, C.; Jones, K. L.; Liu, H.; Pallasch, C. P.; Modiste, R.; Nguyen, Q.; Craig, J. W.; Morgan, E. A.; Vega, F.; Aster, J. C.; Sarosiek, K. A.; Shalek, A. K.; Hemann, M. T.; Weinstock, D. M. Mechanisms of Lymphoma Clearance Induced by High-Dose Alkylating Agents. *Cancer Discovery*, 2019, 9(7), 944-961. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1393.

Minard, A.; Liano, D.; Wang, X.; di Antonio, M. The unexplored potential of quinone methides in chemical biology. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2019, 27(12): 2298-2305. doi: 10.1016/j.bmc.2019.04.001.

Myung, J. H.; Eblan, M. J.; Caster, J. M.; Park, S. J.; Poellmann, M. J.; Wang, K.; Tam, K. A.; Miller, S. M.; Shen, C.; Chen, R. C.; Zhang, T.; Tepper, J. E.; Chera, B. S.; Wang, A. Z.; Hong, S. Multivalent Binding and Biomimetic Cell Rolling Improves the Sensitivity and Specificity of Circulating Tumor Cell Capture. *Clinical Cancer Research*, 2018, 24(11): 2539-2547. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3078.

Park, J. H.; Kim, J. K. Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer. *Phytomedicine*, 2018, 42, 164-171. doi: 10.1016/j.phymed.2018.03.033.

Segura M, Sansone F, Casnati A, Ungaro R. Synthesis of Lower Rim Polyhydroxylated Calix[4]arenes. *Synthesis-Stuttgart*. 2001, 2105-2112. 10.1055/s-2001-18065.

Shaaban, A. A.; El-Kashef, D. H.; Hamed, M. F.; El-Agamy, D. S. Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, 2018, 59, 31-39. doi: 10.1016/j.intimp.2018.03.033.

Shan, W. G.; Wang, H. G.; Chen, Y.; Wu, R.; Wen, Y. T.; Zhang, L. W.; Ying, Y. M.; Wang, J. W.; Zhan, Z. J. Synthesis of 3- and 29-substituted celastrol derivatives and structure-activity relationship studies of their cytotoxic activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2017, 27(15): 3450-3453. doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.083

Spencer, T. A.; Friary, R. J.; Schmiegel, W. W.; Simeone, J. F.; Watt, D. S. Synthesis of podocarpic acid. *Journal of Organic Chemistry*. 1968, 33: 719-726. doi.org/10.1021/jo01266a050

Toteva, M. M.; Richard, J. P. The Generation and Reactions of Quinone Methides. *Advances in*



Physical Organic Chemistry 2011, 45, 39-91. doi: 10.1016/B978-0-12-386047-7.00002-3.

Tu, Y.; Tan, F.; Zhou, J.; Pan, J. Pristimerin targeting NF- $\kappa$ B pathway inhibits proliferation, migration, and invasion in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Cell Biochemistry and Function*, 2018, 36(4), 228-240. doi: 10.1002/cbf.3335.

Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, New York, 1996.

Wallat, J. D.; Czapar, A. E.; Wang, C.; Wen, A. M.; Wek, K. S.; Yu, X.; Steinmetz, N. F.; Pokorski, J. K. Optical and Magnetic Resonance Imaging Using Fluorous Colloidal Nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2017, 18(1): 103-112. doi: 10.1021/acs.biomac.6b01389.

Wang, Y.; Fan, H.; Balakrishnan, K.; Lin, Z.; Cao, S.; Chen, W.; Fan, Y.; Guthrie, Q. A.; Sun, H.; Teske, K. A.; Gandhi, V.; Arnold, L. A.; Peng, X. Hydrogen peroxide activated quinone methide precursors with enhanced DNA cross-linking capability and cytotoxicity towards cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 133: 197-207. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.041.

Wenkert, E.; Jackson, B. G. Partial Degradation and Reconstitution of Podocarpic Acid. A Novel Method of Hydrolysis of Highly Sterically Hindered Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 1958, 80(1): 217-219. doi.org/10.1021/ja01534a055

Wu, H.; Li, L.; Ai, Z.; Yin, J.; Chen, L. Pristimerin induces apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells via G1 phase arrest and MAPK/Erk1/2 and Akt signaling inhibition. *Oncology Letters*, 2019, 17(3): 3017-3025. doi: 10.3892/ol.2019.9903.

Xie, G.; Yu, X.; Liang, H.; Chen, J.; Tang, X.; Wu, S.; Liao, C. Pristimerin overcomes adriamycin resistance in breast cancer cells through suppressing Akt signaling. *Oncology Letters*, 2016, 11(5): 3111-3116. doi: 10.3892/ol.2016.4335.

Xu, M.; Li, N.; Zhao, Z.; Shi, Z.; Sun, J.; Chen, L. Design, synthesis and anti-tumor evaluation of novel celastrol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 174(15): 265-276. doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.050

Yan, Y. Y.; Bai, J. P.; Xie, Y.; Yu, J. Z.; Ma, C. G. The triterpenoid pristimerin induces U87 glioma cell apoptosis through reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *Oncology Letters*. 2013, 5(1): 242-248. doi: 10.3892/ol.2012.982.

Yang, H.; Landis-Piwowar, K. R.; Lu, D.; Yuan, P.; Li, L.; Reddy, G. P.; Yuan, X.; Dou, Q. P. Pristimerin induces apoptosis by targeting the proteasome in prostate cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 103(1), 234-44. doi: 10.1002/jcb.21399.

Yousef BA, Hassan HM, Guerram M, Hamdi AM, Wang B, Zhang LY, Jiang ZZ. Pristimerin inhibits proliferation, migration and invasion, and induces apoptosis in HCT-116 colorectal cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 79: 112-9. doi: 10.1016/j.biopha.2016.02.003.

Yousef BA, Hassan HM, Zhang LY, Jiang ZZ. Anticancer Potential and Molecular Targets of Pristimerin: A Mini-Review. *Current Cancer Drug Targets*, 2017, 17(2): 100-108. doi: 10.2174/1568009616666160112105824.

Zhang, B.; Zhang, J.; Pan, J. Pristimerin effectively inhibits the malignant phenotypes of uveal melanoma cells by targeting NF- $\kappa$ B pathway. *International Journal of Oncology*, 2017, 51(3): 887-898. doi: 10.3892/ijo.2017.4079.



Zhang, Y.; Wang, J.; Hui, B.; Sun, W.; Li, B.; Shi, F.; Che, S.; Chai, L.; Song, L. Pristimerin enhances the effect of cisplatin by inhibiting the miR-23a/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway and suppressing autophagy in lung cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(3): 1382-1394. doi: 10.3892/ijmm.2019.4057.

Zhao, Q.; Liu, Y.; Zhong, J.; Bi, Y.; Liu, Y.; Ren, Z.; Li, X.; Jia, J.; Yu, M.; Yu, X. Pristimerin induces apoptosis and autophagy via activation of ROS/ASK1/JNK pathway in human breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Cell Death Discovery*, 2019, 5, 125. doi: 10.1038/s41420-019-0208-0

Zhao Q, Bi Y, Zhong J, Ren Z, Liu Y, Jia J, Yu M, Tan Y, Zhang Q, Yu X. Pristimerin suppresses colorectal cancer through inhibiting inflammatory responses and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2020, 386: 114813. doi: 10.1016/j.taap.2019.114813.

Zhou, Q.; Qu, Y.; Mangrum, J. B.; Wang, X. DNA alkylation with N-Methylquinolinium quinone methide to N2-dG adducts resulting in extensive stops in primer extension with DNA polymerases and subsequent suppression of GFP expression in A549 cells. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(3): 402-11. doi: 10.1021/tx100351c.