



GUSTAVO CLARO MONTEIRO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS
ESTRUTURAS DA MACROLACTONA DA MIGRASTATINA**

CAMPINAS, 2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GUSTAVO CLARO MONTEIRO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS ESTRUTURAIIS DA
MACROLACTONA DA MIGRASTATINA**

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS DIAS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM QUÍMICA
NA ÁREA DE QUÍMICA ORGÂNICA.**

***ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR GUSTAVO CLARO MONTEIRO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. LUIZ CARLOS DIAS.***

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

M764s Monteiro, Gustavo Claro (1988-).
Síntese e avaliação farmacológica de análogos estruturais da macrolactona da migrastatina / Gustavo Claro Monteiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Luiz Carlos Dias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Migrastatina. 2. Isomigrastatina. 3. Câncer. 4. Metástase. I. Dias, Luiz Carlos. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Synthesis and pharmacological evaluation of structural analogues of the macrolactone of migrastatin

Palavras-chave em inglês:

Migrastatin
Isomigrastatin
Cancer
Metastasis

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Luiz Carlos Dias [Orientador]
Antonio Carlos Joussef
Cláudio Francisco Tormena

Data de defesa: 27/07/2012

Programa de pós-graduação: Química

"Estes são tempos em que um gênio desejaria viver. Não é na calma tranqüila da vida, ou no repouso de uma pacífica situação que os grandes caracteres são formados. Grandes necessidades invocam nossas maiores virtudes."

(Abigail Adams)

Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Carlos, Sônia e Marisa (madrasta), aos meus irmãos Adriano e Murilo, avós Izabel, José e Aparecida e ao meu filho João Vitor, com muito carinho.

Agradecimentos

- ❖ Aos meus pais, Antônio Carlos, Sônia e Marisa (madrasta), por toda dedicação e apoio incondicional em todas as etapas de minha vida.
- ❖ Aos meus irmãos Adriano e Murilo, por estarem sempre ao meu lado. Obrigado.
- ❖ Aos meus avós, Izabel, José Maria e Aparecida por todo amor e apoio ao longo destes anos. Amo vocês.
- ❖ Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Dias pela oportunidade de trabalho em seu grupo de pesquisas, por participar da minha formação, sempre em um ambiente agradável e salutar.
- ❖ A minha namorada Isabela por todo amor, carinho e sorrisos nas horas difíceis dessa caminhada. Amo você!
- ❖ Aos amigos de Jaboticabal: Thiago, Saulo, Felipe, Mariana, Maíra, Giovanna e Marcela pela longa amizade durante todos esses anos, pela parceria nos “roles sussas” e carinho. Obrigado!
- ❖ Ao Professor Adriano Andricopulo e ao seu grupo de pesquisa pela realização dos ensaios biológicos.
- ❖ Aos amigos de Campinas, pela convivência e amizade: Ellen, Emilio, Suzane, Marco, Danilo, Carla, Marco Dessoy, Thiago, Ricardo, Paula, Lui e Lucas.
- ❖ Aos amigos que já não estão mais no grupo: Fernanda, Giovanni, Adriano, Leila e Ygor.
- ❖ Ao Robson por todas as análises e ajuda dentro do laboratório.
- ❖ Agradeço especialmente ao meu filho João Vitor, que apesar da distância está presente todos os dias em meu coração e pensamentos. Te amo demais!
- ❖ Ao Prof. Dr. Marcus Sá, e ex-colegas de laboratório (em especial Lidiane Méier) por todos os ensinamentos nos meus primeiros tempos de laboratório.
- ❖ Aos técnicos deste instituto, Anderson, Sonia, Paula e Rita por todas as análises realizadas.
- ❖ Ao instituto de química pela infra-estrutura e suporte técnico.
- ❖ A Capes pelo auxílio financeiro.

Curriculum Vitae

GUSTAVO CLARO MONTEIRO

Endereço acadêmico

Instituto de Química – Unicamp

Laboratório - 366 D

Caixa Postal – 6154 – CEP 13083-790

Email: Gustavo.monteiro@iqm.unicamp.br

Formação Acadêmica

2010 – 2012 Mestrado em Química Orgânica

Departamento de Química Orgânica – IQ – Unicamp

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Dias

Projeto: Síntese e avaliação farmacológica de análogos estruturais da macrolactona da migrastatina

2006 – 2010 Bacharelado e Licenciatura em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

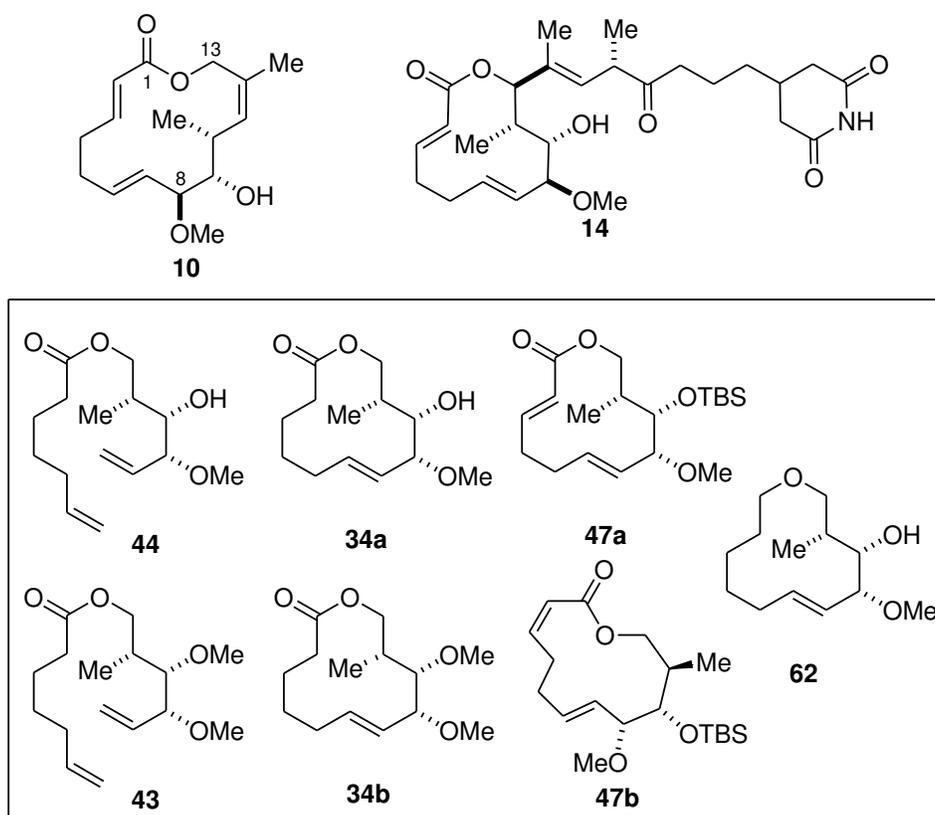
Publicações em periódicos

- MONTEIRO G. C.; MEIER L.; BALDISERRA R. A. M.; SÁ, M. M. Simple Method for Fast Deprotection of Nucleosides by Triethylamine-Catalyzed Methanolysis of Acetates in Aqueous Medium; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, Vo. 21, No. 5, 859-866.
- MONTEIRO G. C.; MORÉS S.; SANTOS F.; S.; CARASEK E.; WELZ Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF; *Talanta*, 85, **2011**, 2681-2685.
- MONTEIRO G. C.; DIAS L. C.; AMARANTE G. W.; CONEGERO L. S.; FINELLI F. G. Stereoselective synthesis of analogs of the macrolactone of isomigrastatin; *Tetrahedron Letters*, 53, **2012**, 707-709.

Resumo

SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ANÁLOGOS ESTRUTURAIS DA MACROLACTONA DA MIGRASTATINA. A macrolactona da migrastatina **10** é um composto que apresenta alta atividade de inibição de migração de células tumorais *in vitro* dentre os compostos da família da migrastatina.

Em 2002, Licari e colaboradores relataram um novo composto chamado de isomigrastatina **14**, onde alguns anos depois, Shen e colaboradores relataram que este composto faz parte da mesma rota biossintética da migrastatina. Sendo assim, este trabalho relata a síntese das macrolactonas **34a**, **34b**, **47a** e **47b**, sendo essas epímeras em C8, análogas da macrolactona da isomigrastatina **14**, assim como a síntese dos ésteres **43**, **44** e do éter **62**. Todos os compostos preparados neste estudo são ainda inéditos na literatura.

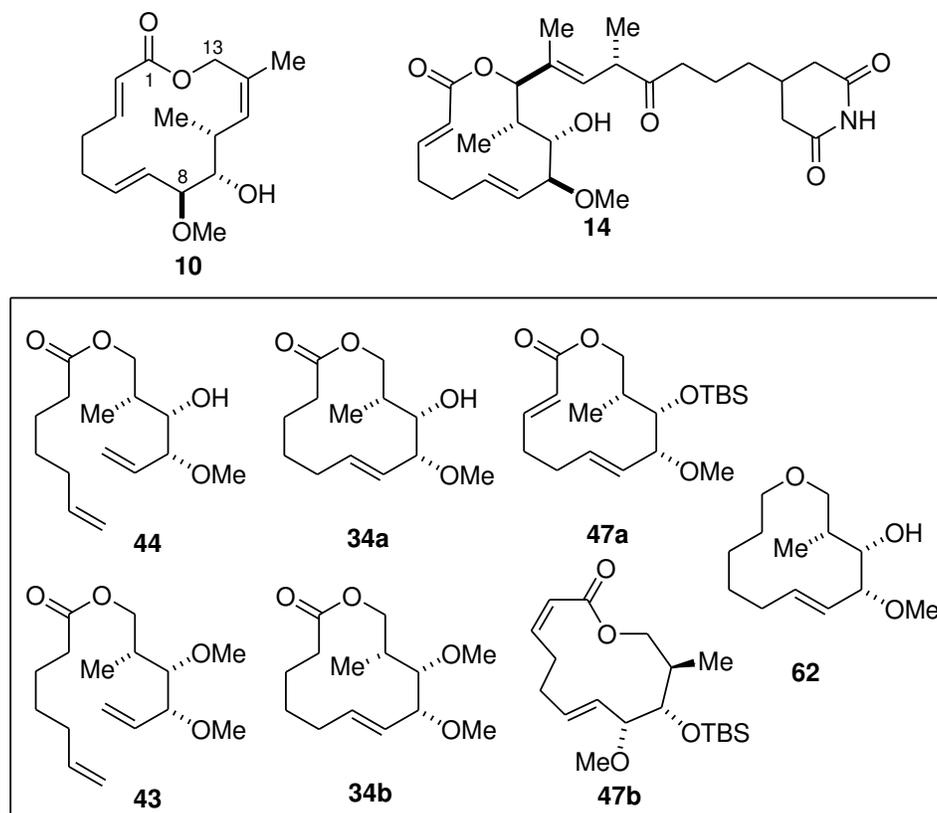


Paralelamente, em colaboração com o grupo do Professor Adriano Andricopulo, do IF/USP de São Carlos, foram realizados testes de avaliação biológica de diversos compostos sintetizados neste trabalho com o intuito de gerar novas substâncias químicas bioativas candidatas a novos fármacos no tratamento do câncer de mama.

Abstract

SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF STRUCTURAL ANALOGUES OF THE MIGRASTATIN MACROLACTONE. The macrolactone of migrastatin (**10**) belongs to a family of compounds showing high inhibitory activity of tumor cell migration *in vitro*.

In 2002, Licari and coworkers isolated a novel, related compound they called isomigrastatin (**14**). Some years later, Shen and coworkers observed that this compound in reality originates from the same biosynthetic pathway as migrastatin. Herein, we describe the synthesis of C8-epimeric analogues of isomigrastatin macrolactones: **34a**, **34b**, **47a**, and **47b**; as well as the synthesis of open chain esters **43**, **44**, and the macrolactone-related cyclic ether **62**. All compounds prepared in this work are undescribed.



In collaboration with Professor Andricopulo's group (IF/USP, São Carlos), most of the synthesized compounds were biologically evaluated towards their cell migration inhibitory activity.

Índice

Lista de Abreviaturas	xiii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Figuras	xv
Lista de Esquemas	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer	1
1.2 Microtúbulos: um alvo macromolecular	2
1.3 Promotores de polimerização e despolimerização da tubulina	5
1.4 Migrastatina e análogos	7
1.5 Rotas sintéticas para migrastatina e análogos	8
1.5.1 Síntese de Danishefsky e colaboradores	8
1.5.2 Migrastatina, isomigrastatina e dorrigocinas	10
1.5.3 Síntese de Dias e colaboradores	13
1.6 Migrastatina e suas propriedades	16
1.6.1 O processo de metástase	16
1.6.2 Migrastatina e análogos: modo de ação	18
2. OBJETIVOS	22
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
3.1 Planejamento sintético para obtenção de análogos da macrolactona da isomigrastatina (14)	23
3.2 Preparação do fragmento C7-C11	24
3.3 Etapas otimizadas para a rota proposta	28
3.4 Acoplamento entre os fragmentos C1-C6 e C7-C11	29
4. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA: INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR	33
4.1 Ensaio Wound Healing	34
4.2 Preparo das Células	34
4.3 Incubação dos compostos	35
4.4 Análise dos resultados	35
5. SÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS	38
5.1 Síntese do epímero em C8	38
5.2 Síntese do éter cíclico	45
6. DETERMINAÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA RELATIVA: lactona 21a	47
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
8. PARTE EXPERIMENTAL	51
8.1 Reagentes e Solventes	51
8.2 Métodos Cromatográficos	51
8.3 Análises espectrofotométricas	52
8.4 Procedimentos e caracterizações	52
9. ESPECTROS	65

Lista de abreviaturas

AcOEt: acetado de etila
CSA: (\pm) 10-canforsulfônico
DCC: *N,N*- dicioexilcarbodiimida
DDQ: 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DIBAL-H: hidreto de di-*i*-butilaluminio
DIPEA: di-*i*-propiletilamina
DMAP: *N,N*-dimetil-4-aminopiridina
DMF: *N,N*-dimetilformamida
DMP: periodinana de Dess-Martin
DMSO: dimetilsulfóxido
***ds*:** diastereosseletividade
Et: etil
Hex: hexano
HRMS: espectro de massas de alta resolução
HWE: Horner-Wadsworth-Emmons
IC₅₀: concentração requerida para inibir 50% de um dado processo biológico
IV: infra-vermelho
Me: metil
MOM: metoximetano
NMO: *N*-metilmorfolina-*N*-óxido
NOESY/NOE: efeito nuclear Overhauser
PMB: *p*-metoxibenzil
RCM: reação de metátese de olefinas de fechamento de anel
RMN: ressonância magnética nuclear
TBS: *t*-butildimetilsilil
TBDPS: *t*-butildifenilsilil
TFA: ácido trifluoracético
THF: tetraidrofurano
TMS: trimetilsilano
TPAP: perrutenato de tetrapropilamônio
LDA: amideto de di-*i*-propilalumínio
LiHMDS: bis(trimetilsilil)amideto de lítio

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular <i>wound healing</i> (células de câncer de mama humano da linhagem MDA-MB-231).	36
Tabela 2. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular <i>wound healing</i> (células de câncer de próstata humano da linhagem DU-145).	36
Tabela 3. Inibição de migração de células de cancro pulmonar pelo éter 57 (IC50 em μM).	44
Tabela 4. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular <i>wound healing</i> (células de câncer de mama humano da linhagem MDA-MB-231).	47

Lista de Figuras

Figura 1 – Estruturas químicas de alguns fármacos utilizados no tratamento do câncer.	3
Figura 2 – Esquema para o dímero de α e β -tubulina. Cada monômero consiste dos domínios de ligação a nucleotídeos (amarelo), de interação com ligantes (azul), e de ligação a proteínas associadas (magenta). O taxol, fármaco com potente ação antitumoral, é mostrado em rosa na cavidade da alça M da β -tubulina.	4
Figura 3 – Representação das interações intermoleculares do taxol na cavidade hidrofóbica da alça M no monômero de β -tubulina.	5
Figura 4 – Estrutura da migrastatina (1).	7
Figura 5 – Compostos com maior atividade anti-metástase.	10
Figura 6 – Compostos presentes na rota biossintética da isomigrastatina (14).	10
Figura 7 – Fragmento C1-C13 da 2,3-diidrodrigocina A (15).	12
Figura 8 – Composto análogo à dorigocina A com potente atividade anti-metástase.	12
Figura 9 – Representação esquemática de migração celular.	17
Figura 10 – Compostos analisados frente a células 4T1.	18
Figura 11 – Inibição da formação de lamelipodia por 11 e 30 .	19
Figura 12 – Proteína fascina de <i>H. Sapiens</i> .	19
Figura 13 – Macrocetona (31) e macrocetona-biotina (32).	20
Figura 14 – Raios-X da macrocetona (31) no sítio ativo da proteína fascina.	21
Figura 15 – Estruturas de Danishefsky e Chen.	21
Figura 16 – Análogos da macrolactona da isomigrastatina (14).	22
Figura 17 – Compostos com grande potencial obtidos pela rota sintética do grupo.	23
Figura 18 – A – Placa de 24 poços com células confluentes representadas com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. B – Construção da fenda na monocamada celular com fenda representada com aumento de 400 vezes em microscópio óptico.	35

Figura 19 – Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes em 0 h e 22 h após a incubação e fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto 43 .	37
Figura 20 – Fotomicrografias dos ensaios realizados de inibição para o composto 43 .	37
Figura 21 – Macrolactona da isomigrastatina (14) e epímero em C8 45 .	38
Figura 22 – Macrolactona da migrastatina (10) e epímero em C8 saturado 11a .	39
Figura 23 – Compostos obtidos neste trabalho análogos da isomigrastatina (14).	49
Figura 24 – Possíveis alvos sintéticos análogos da isomigrastatina (14).	50

Lista de Esquemas

Esquema 1. Síntese da macrolactona 2 .	8
Esquema 2. Rearranjo sigmatrópico [3,3] de 14 para 1 .	11
Esquema 3. Síntese da macrolactona 10 .	13
Esquema 4. Síntese da macrolactona 11a .	15
Esquema 5. Análise retrossintética para a obtenção da macrolactona 34a .	24
Esquema 6. Preparação da lactona 37 .	25
Esquema 7. Abertura da lactona 37 .	25
Esquema 8. Proteção do diol 38 .	26
Esquema 9. Preparação da olefina 27 .	26
Esquema 10. Produto de migração do grupamento TBS.	26
Esquema 11. Mecanismo de formação do composto 26a .	27
Esquema 12. Preparação do álcool primário 36 .	27
Esquema 13. Otimização da redução para lactona 37 .	28
Esquema 14. Otimização para olefinação do aldeído 40 .	29
Esquema 15. Esterificação do álcool primário 36 .	29
Esquema 16. Formação da macrolactona 42 .	30
Esquema 17. Mecanismo geral para RCM.	31
Esquema 18. Formação da macrolactona 42 sob condições otimizadas.	31
Esquema 19. Formação da macrolactona 34a .	32
Esquema 20. Preparação do éster dimetoxilado 43 .	32
Esquema 21. Preparação da macrolactona 34b .	33
Esquema 22. Preparação do éster 46 .	38
Esquema 23. Tentativa de obtenção da macrolactona 47 .	39
Esquema 24. Tentativa de obtenção da macrolactona 48 .	39
Esquema 25. Síntese total da isomigrastatina (14).	40
Esquema 26. Tentativa de inserção do grupo PhSe no éster 41 avançado.	40
Esquema 27. Preparação do ácido 52 .	41
Esquema 28. Preparação do éster 53 .	41
Esquema 29. Preparação da macrolactona 54 .	42

Esquema 30. Formação das macrolactonas 47a e 47b .	42
Esquema 31. Preparação de análogos da migrastatina (1).	43
Esquema 32. Análogos funcionais da macrolactona da migrastatina (1).	44
Esquema 33. Preparação do éter 59 .	45
Esquema 34. Preparação do triflato 58 .	45
Esquema 35. Preparação do éter cíclico 61 .	46
Esquema 36. Preparação do éter cíclico 62 análogo da macrolactona 34a .	46
Esquema 37. Intermediário chave 21a .	47
Esquema 38. Determinação inicial da estereoquímica da lactona.	48
Esquema 39. Rota sintética anteriormente estudada.	48
Esquema 40. Intermediários comparados para determinação da estereoquímica.	48
Esquema 41. Formação das lactonas 21 e 21a .	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é a denominação para um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento e multiplicação descontrolados de células malignas, capazes de invadir estruturas próximas e se espalharem em diversas regiões do organismo. Estas células malignas deixam de responder aos mecanismos de controle e defesa do organismo, duplicando-se continuamente e desordenadamente para criar os tumores. O câncer pode ser causado por fatores internos (e.g.; mutações inerentes, hormônios, condições imunológicas) e externos (e.g.; tabaco, substâncias químicas, radiação, alimentação, agentes infecciosos), sendo que ambos os fatores podem atuar simultaneamente ou seqüencialmente para a iniciação ou promoção da carcinogênese. A proliferação celular anormal é associada a alterações genéticas em etapas chave de regulação do ciclo celular. Na maioria dos tumores, os mecanismos de regulação são desarranjados, de maneira que a proliferação celular ocorre de maneira independente aos fatores mitogênicos externos.^{1,2}

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), aproximadamente 600 mil novos casos de câncer são diagnosticados no Brasil a cada ano, sendo a segunda maior causa de morte por doença no país.³

Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico precoce de câncer podem ser curados utilizando medidas locais, como a cirurgia ou a radioterapia. No restante dos casos, entretanto, há o desenvolvimento precoce de micrometástases, sendo necessária uma abordagem sistêmica concomitante.^{1,2} O câncer é fundamentalmente uma doença genética, quando o processo neoplásico se instala, a célula mãe transmite às células filhas durante o ciclo de divisão celular, as características neoplásicas obtidas por alteração no DNA. Desta forma, o interrompimento do ciclo de divisão celular torna-se um importante alvo no tratamento do câncer.

¹ NCI, National Cancer Institute, U.S. National Institutes of Health, (2007), *Comprehensive Cancer Information*. <http://www.cancer.gov>. (Acessado em 06/2012).

² ACS, American Cancer Society (2007), *Cancer Facts & Figures*, <http://www.cancer.org>.

³ Estimativa 2006 – Incidência de Câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br>.

Vários fármacos são disponíveis para a terapia do câncer, atuando através de mecanismos moleculares complexos. Diversos alvos macromoleculares importantes podem ser modulados pela ação de moléculas pequenas (fármacos), reduzindo os processos malignos de crescimento e multiplicação desordenada, além da invasão e migração celular.

Alguns exemplos podem ser citados, como o fármaco análogo de pirimidina, fluorouracila, que atua como inibidor da enzima timidilato sintase, interferindo na síntese de DNA; o fármaco sunitinib, inibidor de tirosina quinase, sendo esta responsável pelo processo conhecido como angiogênese ou vascularização dos tecidos, que promove carregamento de nutrientes para células cancerosas e o fármaco de origem natural paclitaxel[®], que interfere hipersensibilizando a estrutura dos microtúbulos através da ligação à proteína tubulina; entre outros.

1.2 Microtúbulos: um alvo macromolecular

A alteração freqüente no ciclo das células tumorais tem levado à identificação de etapas relacionadas à inibição da multiplicação celular (mitose) e ao estudo de alvos macromoleculares importantes para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia do câncer. As células malignas freqüentemente perdem a regulação da divisão celular na fase G₁ e, por isso, pequenas moléculas capazes de regular a fase G₂ apresentam particular interesse. Até o momento, entretanto, a maioria das substâncias com propriedades antimitóticas identificadas interage com os componentes dos microtúbulos, particularmente com a proteína heterodimérica tubulina, interferindo na formação do fuso mitótico durante as etapas de divisão celular. A tubulina permanece como a única proteína associada à formação do fuso mitótico que é alvo macromolecular de agentes terapêuticos aprovados para o tratamento de diversos tipos de câncer, como o taxol (paclitaxel[®]), o taxotere (docetaxel[®]), a vincristina (oncovin[®]) e a vimblastina (velbe[®]) (Figura 1).^{1,4,5,6,7}

⁴ Frense, D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1233.

⁵ Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; Mc Gown, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**.

⁶ Xia S.; Kenesky, C. S.; Rucker, P. V.; Smith, A. B.; Orr, G. A.; Horwitz, S. B. A. *Biochem.* **2006**, *45*, 11762.

⁷ Miles, D. C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 627.

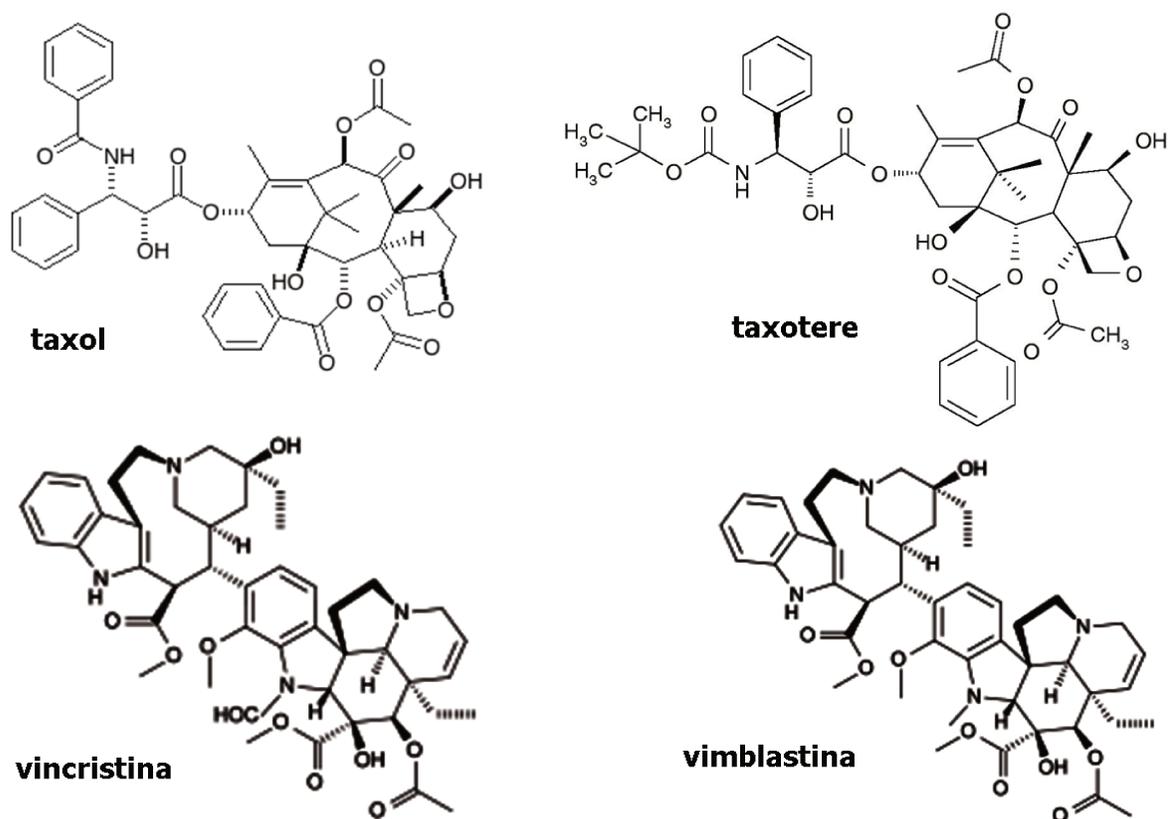


Figura 1 – Estruturas químicas de alguns fármacos utilizados no tratamento do câncer.

Os microtúbulos são polímeros dinâmicos de tubulina, componentes da estrutura celular que estão envolvidos nos processos de comunicação intracelular e divisão das células eucarióticas. A tubulina é um heterodímero formado por duas subunidades, α e β . A guanosina trifosfato (GTP) se liga a ambas as subunidades. A subunidade β também se liga à guanosina difosfato (GDP), quando GTP é hidrolisado para a adição de mais uma subunidade heterodimérica ao microtúbulo (Figura 2). Os monômeros possuem estruturas similares, exceto em algumas regiões de alças, e apresentam domínios de ligação a nucleotídeos (n-terminal), de interação com ligantes (intermediário) e de ligação a proteínas associadas MAPs (microtubule associated proteins) com o processo de polimerização (C-terminal).^{8,9}

⁸Keskin, O.; Durell, S. R.; Bahar, I.; Jernigan, R. L.; Covell, D. G. *J. Biophys.* **2002**, *83*, 663.

⁹Kerssemakers, J. W.; Munteanu, E. L.; Laan, L.; Noetzel, T. L.; Janson, M. E.; Dogterom, M. *Nature* **2006**, *442*, 709.

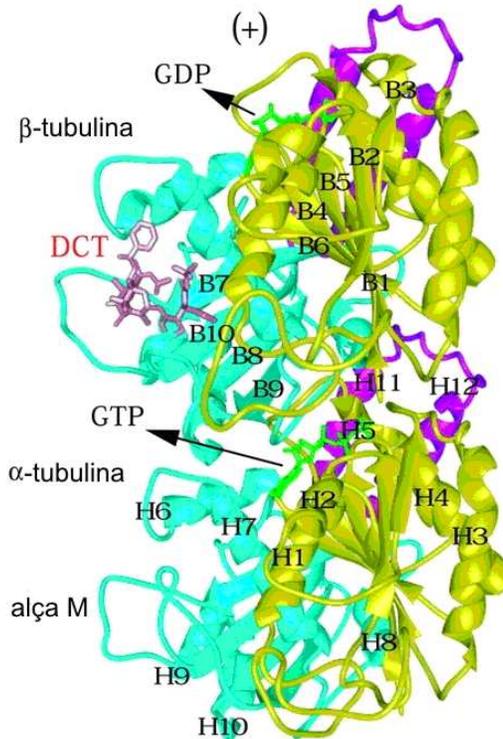


Figura 2 – Esquema para o dímero de α e β -tubulina. Cada monômero consiste dos domínios de ligação a nucleotídeos (amarelo), de interação com ligantes (azul), e de ligação a proteínas associadas (magenta). O taxol, fármaco com potente ação antitumoral, é mostrado em rosa na cavidade da alça M da β -tubulina.⁸

A dinâmica dos microtúbulos é definida por fases de polimerização e despolimerização, que podem ser reguladas, já que a uma das extremidades (+) dessas estruturas polares podem ser adicionadas subunidades diméricas e à extremidade oposta (\square) há perda de subunidades quando a estrutura não está estabilizada. O monômero de β -tubulina corresponde à extremidade (+) dos microtúbulos, onde ocorrem polimerização e despolimerização com o próximo dímero, enquanto a α -tubulina constitui o término (\square).^{8,9} A supressão da dinâmica dos microtúbulos perturba a formação do eixo mitótico, interrompendo o ciclo celular na transição metáfase-anáfase, eventualmente resultando em apoptose.^{10,11}

¹⁰ Jordan, M. A.; Wendell, K.; Gardiner, S.; Derry, W. B.; Copp, H.; Wilson L. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 816.

¹¹ Bergstralh, D. T.; Ting, J. P. *Cancer Treat. Rev.* **2006**, *32*, 166.

1.3 Promotores de polimerização e despolimerização da tubulina

O mecanismo de ação do taxol e do taxotere inclui a ligação à subunidade β -tubulina (Figura 2), a estabilização dos microtúbulos e a interferência com a função normal da tubulina na formação do fuso mitótico efetivo, desencadeando a interrupção do processo de mitose celular, levando a apoptose. Vários estudos indicam que a estabilização dos microtúbulos é favorecida pela ligação desses compostos na cavidade da alça M através do aumento das interações laterais entre protofilamentos (Figura 3).^{6-8,10-15}

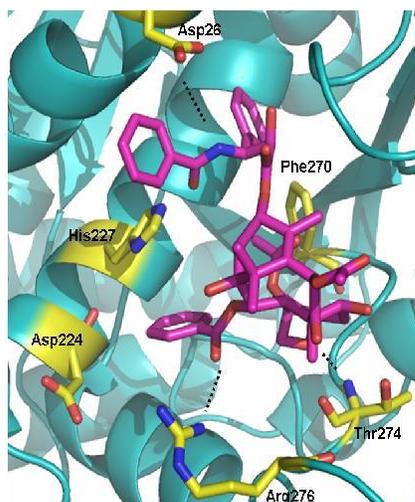


Figura 3 – Representação das interações intermoleculares do taxol na cavidade hidrofóbica da alça M no monômero de β -tubulina.

O taxol e o taxotere são os compostos mais estudados da classe dos taxanos. O taxol é um éster isolado em pequenas quantidades do teixo ocidental (*Taxus brevifolia*) e do teixo europeu (*Taxus baccata*).

O taxotere é obtido por semi-síntese a partir da 10-deacetilbacatina III, precursor da biossíntese vegetal encontrado no teixo europeu.^{5,7} Embora estejam entre os mais eficazes agentes quimioterápicos, os taxanos são suscetíveis a vários mecanismos de

¹² Lowe, J.; Li, H.; Downing, K. H.; Nogales E. *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045.

¹³ Ter Haar, E.; Kowalski, R. J.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Longley, R. E.; Gunasekera, S. P.; Rosenkranz, H. S.; Day, B. W. *Biochemistry* **1996**, *35*, 243.

¹⁴ Minguéz, J. M.; Giuliano, K. A.; Balachandran, R.; Madiraju, C.; Curran, D. P.; Day, B. W. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 1305.

¹⁵ Jung, W. H.; Harrison, C.; Shin, Y.; Fournier, J. H.; Balachandran, R.; Raccor, B. S.; Sikorski, R. P.; Vogt, A.; Curran, D. P.; Day, B. W. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2951.

resistência, incluindo a redução da afinidade pela β -tubulina mutada e a expulsão da célula pela glicoproteína-P; além de estarem associados a efeitos adversos graves, como neutropenia, neurotoxicidade e cardiopatias. Outro aspecto limitante é a baixa solubilidade em água destes compostos, que resulta em sua administração na forma injetável.

Em contrapartida, os alcalóides da vinca como vincristina e vimblastina (Figura 1) exercem os seus efeitos citotóxicos despolimerizando os microtúbulos, aumentando assim a *pool* de tubulina solúvel. À concentrações subestequiométricas (menos de uma molécula de fármaco por cada molécula de tubulina), estes compostos afetam a dinâmica dos microtúbulos sem causar despolimerização. Acredita-se que os complexos tubulina-alcalóides da vinca e os alcalóides da vinca livres ligam-se às extremidades dos microtúbulos, reduzindo a sua capacidade de crescer e encurtar. À concentrações superiores, estes compostos ligam-se estequiometricamente às subunidades α e β de tubulina na fase S do ciclo celular e, em consequência, a tubulina não pode polimerizar, originando estruturas não microtubulares, os protofilamentos espirais ou agregados paracrystalinos.¹⁶

A exposição de uma célula em divisão com estas drogas causa o desaparecimento rápido do fuso mitótico, indicando que o equilíbrio químico é mantido através da troca constante de subunidades entre os microtúbulos do fuso e a *pool* de tubulina livre. Como o rompimento temporário dos microtúbulos do fuso mata preferencialmente muitas células que se dividem de forma anormal, drogas antimitóticas como a vimblastina e vincristina, são amplamente utilizadas no tratamento do cancro. A neurotoxicidade, que normalmente se manifesta como neuropatia periférica ou autonômica, é uma característica do tratamento com os alcalóides da vinca, sendo mais acentuada para a vincristina (efeito limitante da dose).¹⁷

Todos esses fatores têm impulsionado as pesquisas por candidatos a novos fármacos que atuem por mecanismos similares, mas com propriedades terapêuticas

¹⁶Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/alcvinca/alcvinca_ficheiros/page0002.htm (Acessado em 06/2012).

¹⁷ Medicamentos Antineoplásicos e Imunomoduladores, <http://www.infarmed.pt/prontuario/navegavalores.php?id=462> (Acessado em 06/2012).

otimizadas, sejam estes análogos do taxol, vimblastina, ou originados a partir de uma nova diversidade química.

1.4 Migrastatina e análogos

A migrastatina **1** é um produto natural isolado de culturas de *Streptomyces* sp. MK929-43F1, proveniente de amostras coletadas do solo de Atami-shi, no Japão, por Imoto e colaboradores em 2000 (Figura 4).^{18a,b} Pesquisadores da Kosan Biosciences demonstraram em 2002, que culturas de *Streptomyces platensis* também produzem o composto migrastatina.¹⁹

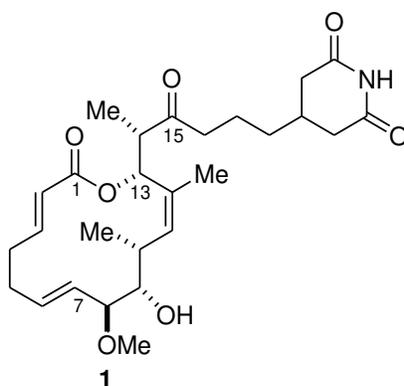


Figura 4 – Estrutura da migrastatina (**1**).

A migrastatina apresenta um bom efeito inibitório de migração de células tumorais humanas, importantíssimo para o tratamento de metástase tumoral ($IC_{50} = 29 \mu\text{M}$ em células 4T₁). Apesar de significantes avanços relacionados aos aspectos fundamentais do câncer, a metástase continua sendo a causa predominante na maioria dos casos de morte de pacientes. Devido à mobilidade e à fusão de células vivas serem pontos elementares no complexo fenômeno de metástase, pequenas moléculas que possam modular o reposicionamento destas células tumorais são de grande interesse.

¹⁸ (a) Nakae, K.; Yoshimoto, Y.; Sawa, T.; Homma, Y.; Hamada, M.; Takeuchi, T.; Imoto, M. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1130; (b) Nakae, K.; Yoshimoto, Y.; Ueda, M.; Sawa, T.; Takahashi, Y.; Naganawa, H.; Takeuchi, T.; Imoto, M. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1228.

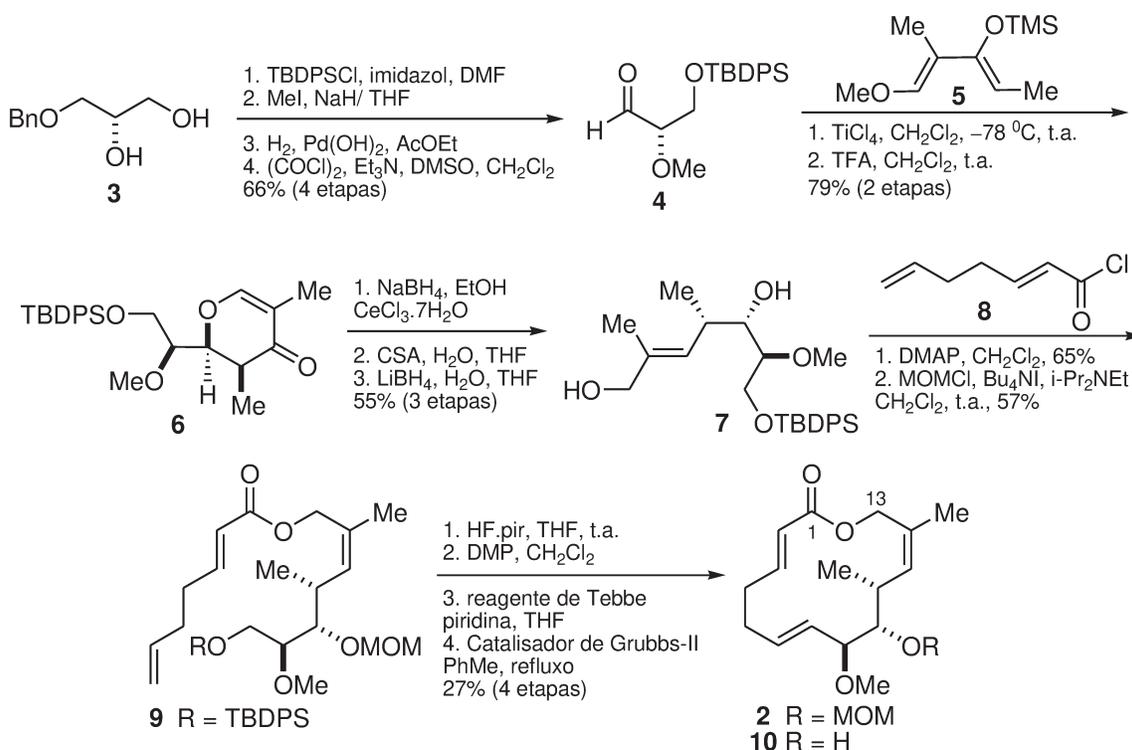
¹⁹ Woo, E. J.; Starks, C. M.; Carney, J. R.; Arslanian, R.; Cadapan, L.; Zavala, S.; Licari, P. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 141.

Essa propriedade específica de inibição torna a migrastatina um alvo importante para síntese total e parcial.²⁰

1.5 Rotas sintéticas para migrastatina e análogos

1.5.1 Síntese de Danishefsky e colaboradores

Em 2002, o grupo do professor Danishefsky relatou a primeira síntese de compostos pertencentes à família da migrastatina, a partir da obtenção da macrolactona **2**, correspondente ao fragmento C1-C13 (Esquema 1).²¹



Esquema 1. Síntese da macrolactona **2**.

A rota sintética teve início com a obtenção do aldeído **4** a partir das reações de proteção, metilação, hidrogenólise e oxidação do diol **3**. Em seguida, o aldeído foi submetido a reação hetero-Diels-Alder com o dieno **5**, catalisada por ácido de Lewis; seguida por reação de ciclização em ácido trifluoracético, fornecendo a diidropirano **6**

²⁰ Takemoto, Y.; Nakae, K.; Kawatani, M.; Takahashi, Y.; Naganawa, H.; Imoto, M. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 1104.

²¹ Gaul, C.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9039.

em 79% de rendimento e já com os três centros estereogênicos presentes na macrolactona.

Redução nas condições de Luche, posterior tratamento com ácido canforsulfônico e redução com boroidreto de sódio, forneceu o diol **7** em 55% de rendimento para as três etapas. Na seqüência, o diol **7** foi acoplado ao cloreto de ácido **8** via reação de acilação seletiva da hidroxila primária na presença de DCC e DMAP (Esterificação de Steglich), seguida pela proteção da hidroxila secundária com o grupo MOM, fornecendo assim o composto avançado **9** em 37% de rendimento.

Finalmente, este intermediário foi submetido à reação de desproteção seletiva do grupo TBDPS primário com HF-piridina. Após oxidação com DMP, olefinação de Tebbe e metátese de olefinas na presença de catalisador de Grubbs II 20mol%, a macrolactona **2** foi obtida em 27% de rendimento para 4 etapas.

Esta síntese descrita por Danishefsky e colaboradores, envolveu 15 etapas com um rendimento global de 4%, sendo que após remoção do grupo MOM, a macrolactona da migrastatina **10** foi obtida.

Posteriormente, o mesmo grupo empenhou-se em incorporar a cadeia lateral contendo o anel glutarimida à macrolactona, sendo que em 2003, publicaram a primeira síntese total da migrastatina. Desde então, o grupo do professor Danishefsky vem realizando estudos de estrutura-atividade com o objetivo de potencializar a atividade anticancerígena desse composto.²² Em 2004, o grupo apresentou uma nova rota sintética para obtenção da macrolactona da migrastatina **10** em 13 etapas e 3% de rendimento global, além da obtenção de diversos análogos estruturais da migrastatina (**1**), assim como de sua macrolactona **10**.^{23a,b}

Dentre os compostos já sintetizados por Danishefsky e colaboradores, os que exibiram os menores valores de IC₅₀ em ensaios em câmaras de migração de células 4T₁ foram as macrolatonas **10** e **11** (Figura 5).²⁴

²² Gaul, C.; Njardarson, J. T.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6042.

²³ (a) Gaul, C.; Njardarson, J. T.; Shan, D.; Dorn, D. C.; Wu, K.; Tong, W. P.; Huang, X.; Moore, M. A. S.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11326; (b) Gaul, C.; Njardarson, J. T.; Shan, D.; M. A. S.; Danishefsky, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1038.

²⁴ Shan, D.; Chen, L.; Njardarson, J. T.; Gaul, C.; Ma, X.; Danishefsky, S. J.; Huang, X. *Proc. Nat. Acad. Scien.* **2005**, *102*, 3772.

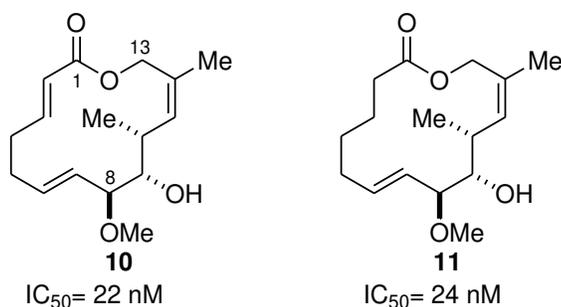


Figura 5 – Compostos com maior atividade anti-metástase.

1.5.2 Migrastatina, isomigrastatina e dorrigocinas

Em 2002, Licari e colaboradores também relataram que culturas de *S. platensis*, além de produzirem migrastatina (**1**), produzem as dorrigocinas A (**12**) e B (**13**) e um novo composto chamado de isomigrastatina (**14**) (Figura 6).¹⁹ Alguns anos depois, Shen e colaboradores relataram que os produtos naturais **1**, **12**, **13** e a 13-*epi*-dorrigocina A (**15**) são metabólitos da isomigrastatina (**14**) e fazem parte da mesma rota biossintética.^{25a,b}

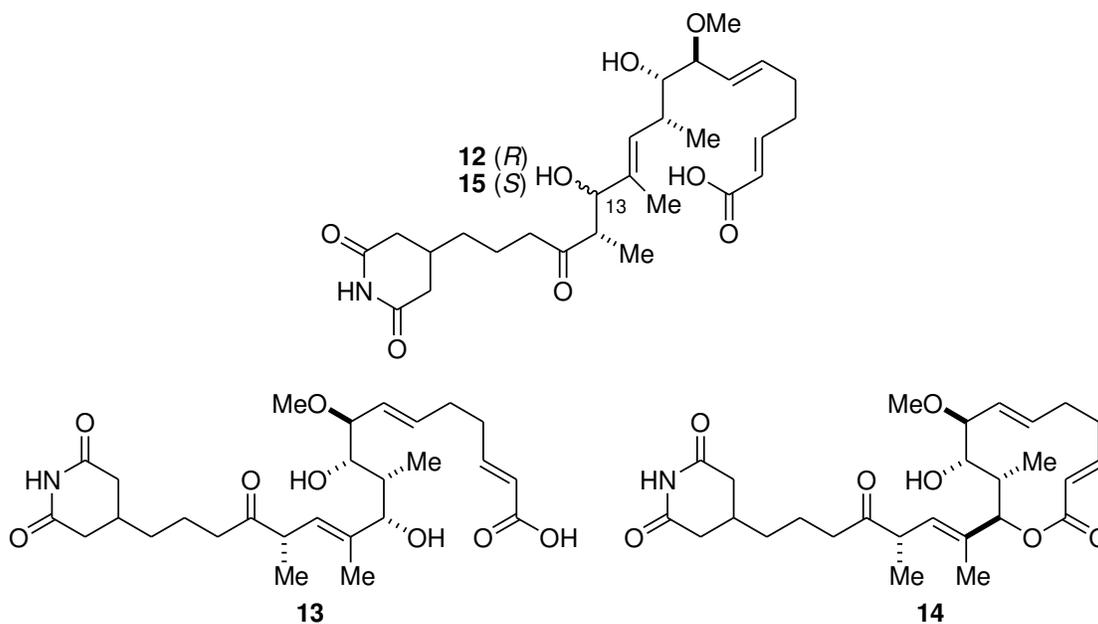
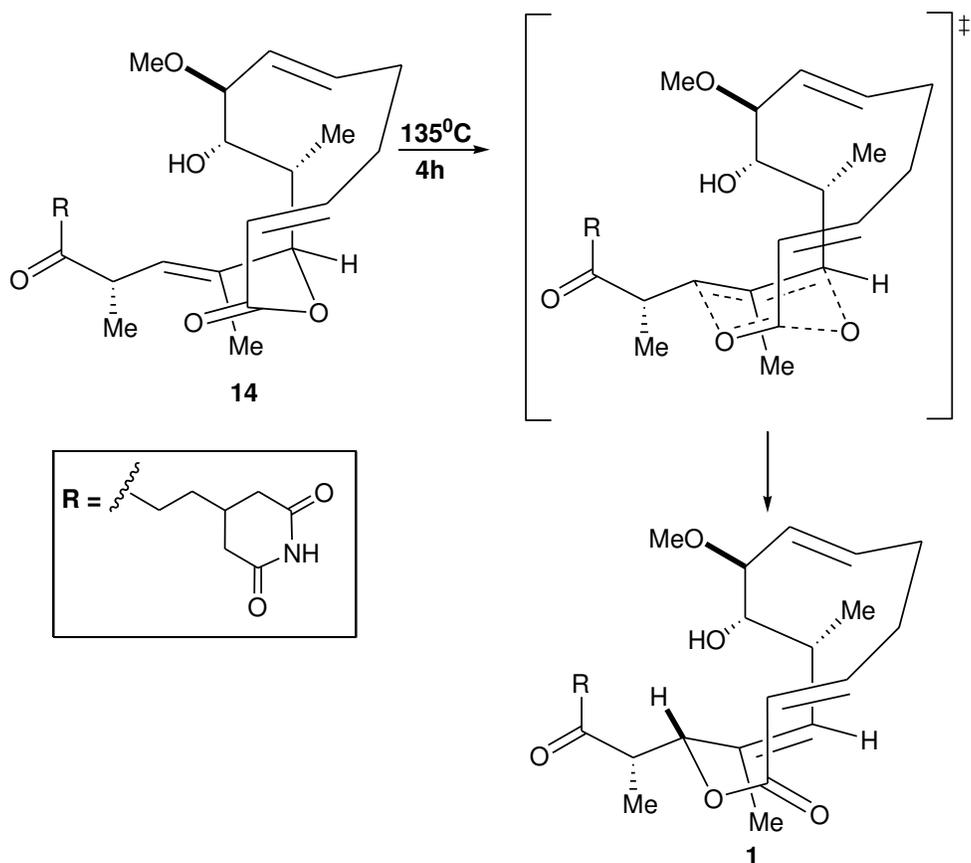


Figura 6 – Compostos presentes na rota biossintética da isomigrastatina (**14**).

²⁵ (a) Ju, J.; Lim, S.; Jiang, H.; Shen, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1622; (b) Ju, J.; Seo, J.; Her, Y.; Lim, S.; Shen, B. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5183.

Neste mesmo ano, Shen e colaboradores observaram que a isomigrastatina (**14**), quando aquecida a 135 °C produz migrastatina (**1**), e sugeriram que esta reação procede via um rearranjo sigmatrópico [3,3], uma vez que a expansão do anel ocorre com regio- e enantioespecificidade (Esquema 2).²⁶



Esquema 2. Rearranjo sigmatrópico [3,3] de **14** para **1**.

Com as descobertas realizadas pelos grupos do professores Shen e Licari, assim como os trabalhos do grupo do professor Danishefsky, diversos outros envolvendo a migrastatina (**1**) foram sendo realizados durante os anos que se seguiram.

Em 2005, Le Brazidec e colaboradores publicaram a síntese de um fragmento avançado da dorrigocina A (**16**) (Figura 7).²⁷

²⁶ Ju, J.; Lim, S.; Jiang, H.; Seo, J.; Her, Y.; Shen, B. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5865.

²⁷ Le Brazidec, J.; Gilson III, C. A.; Boehm, M. F. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8212.

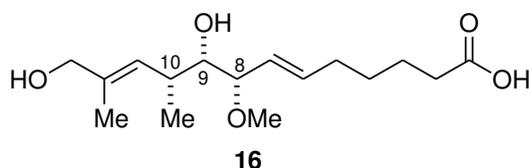


Figura 7 – Fragmento C1-C13 da 2,3-diidrodorrigocina A (**15**).

Já em 2006, Iqbal e colaboradores publicaram uma nova síntese da macrolactona **10**²⁸ e Cossy e Reymond publicaram novas sínteses totais da migrastatina (**1**),²⁹ sendo que em 2007 o grupo de Cossy publicou uma nova síntese da macrolactona **10** utilizando intermediários da síntese total anteriormente publicada.³⁰

Neste mesmo ano, Danishefsky e colaboradores publicaram a primeira síntese da isomigrastatina (**14**);³¹ já em 2008, Murphy e colaboradores relataram as sínteses de novos derivados da migrastatina (**1**) e da dorrigocina A (**12**) e testaram suas atividades frente a células de tumores gástricos. Dentre os compostos testados, o composto **17** (Figura 8) demonstrou uma potente inibição de migração destes tumores ($IC_{50} = 32$ nM), indicando que análogos das dorrigocinas também são potentes agentes anti-metástase e que devem ser avaliados em paralelo aos análogos da migrastatina (**1**), considerando que estes compostos podem apresentar semelhantes modos de ação.^{32a,b}

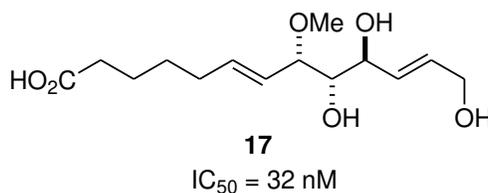


Figura 8 – Composto análogo à dorrigocina A com potente atividade anti-metástase.

²⁸ Baba, V. S.; Das, P.; Mukkantib, K.; Iqbal, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6083.

²⁹ Reymond, S.; Cossy, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *21*, 4800.

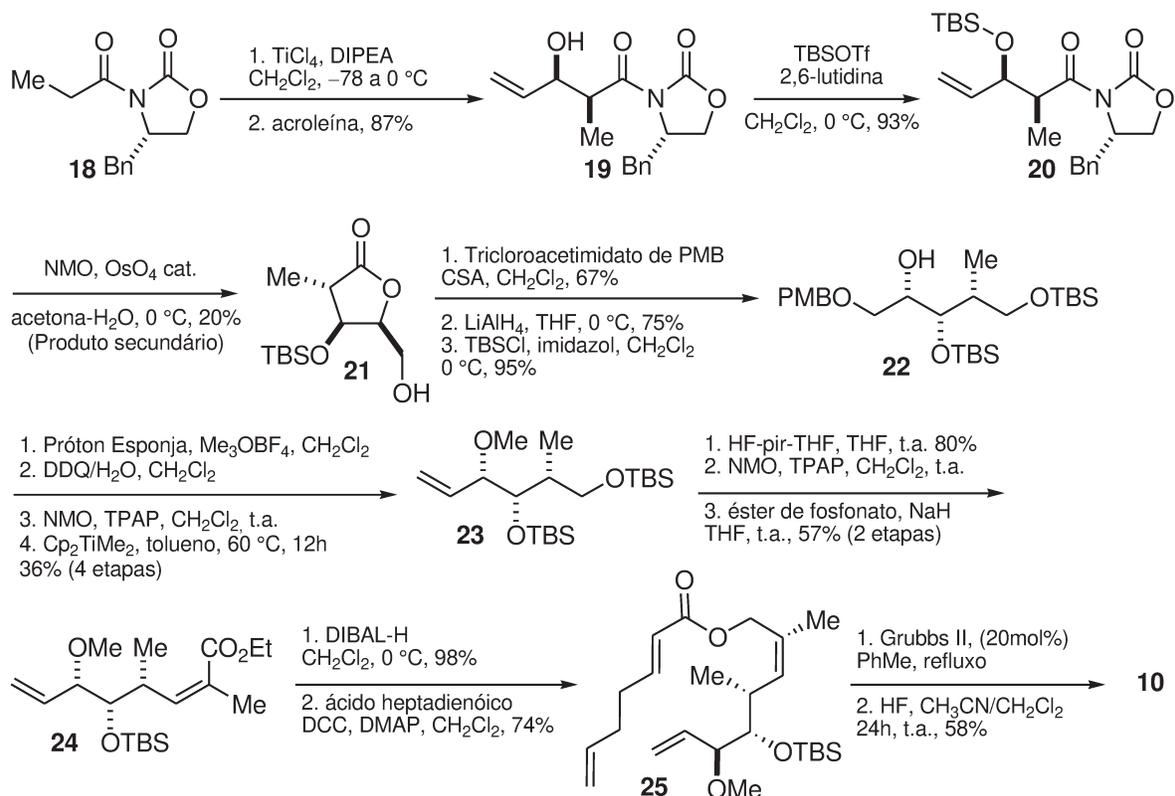
³⁰ Reymond, S.; Cossy, J. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5918.

³¹ Krauss, I. J.; Mandal, M.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5576.

³² (a) Anquetin, G.; Rawe, S.; McMahon, K.; Murphy, E. P.; Murphy, P. V. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1592;
(b) Anquetin, G.; Horgan, G.; Rawe, S.; Murray, D.; Madden, A.; MacMathuna, P.; Doran, P.; Murphy, P. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1953.

1.5.3 Síntese de Dias e colaboradores

Em 2010, Dias e colaboradores relataram uma nova estratégia sintética para preparação da macrolactona da migrastatina (**10**), onde o produto foi obtido em 17 etapas com rendimento global de 0,1% (Esquema 3).³³



Esquema 3. Síntese da macrolactona **10**.

A síntese da macrolactona da isomigrastatina (**10**) inicia com a obtenção da lactona **21** a partir da reação aldólica entre a acroleína e o enolato de titânio da oxazolidinona (*S*)-(+)-**18**, fornecendo o aduto de aldol **19** em 87% de rendimento e diastereosseletividade maior que 95:05 para o aduto Evans (Esquema 3). Esta reação foi seguida pela proteção da hidroxila primária em C9 com TBSOTf, levando ao éter de silício **20** em 93% de rendimento. O composto **20** foi submetido à condição de dihidroxilação, utilizando NMO e quantidade catalítica de OsO_4 , fornecendo a lactona **21** em 20% de rendimento como produto secundário.

³³ Dias, L. C.; Finelli, F. G.; Conegero, L. S.; Krogh, R.; Andricopulo, A. D. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6748.

Seguindo a estratégia, proteção da hidroxila primária de **21** com o grupo PMB, abertura da lactona com LiAlH_4 a temperatura ambiente, seguido da proteção da hidroxila primária com TBSCl, forneceu o composto **22** em 48% de rendimento para 3 etapas.

Na seqüência, foi realizada a metilação da hidroxila secundária de **22** com próton esponja e Me_3OBF_4 , seguida por desproteção da hidroxila primária com DDQ/ H_2O . Oxidação com TPAP e NMO, conduziu à formação de um aldeído, que por sua vez foi utilizado diretamente na etapa seguinte nas condições de Petasis, fornecendo a olefina **23** em 36% de rendimento para 4 etapas (Esquema 3).

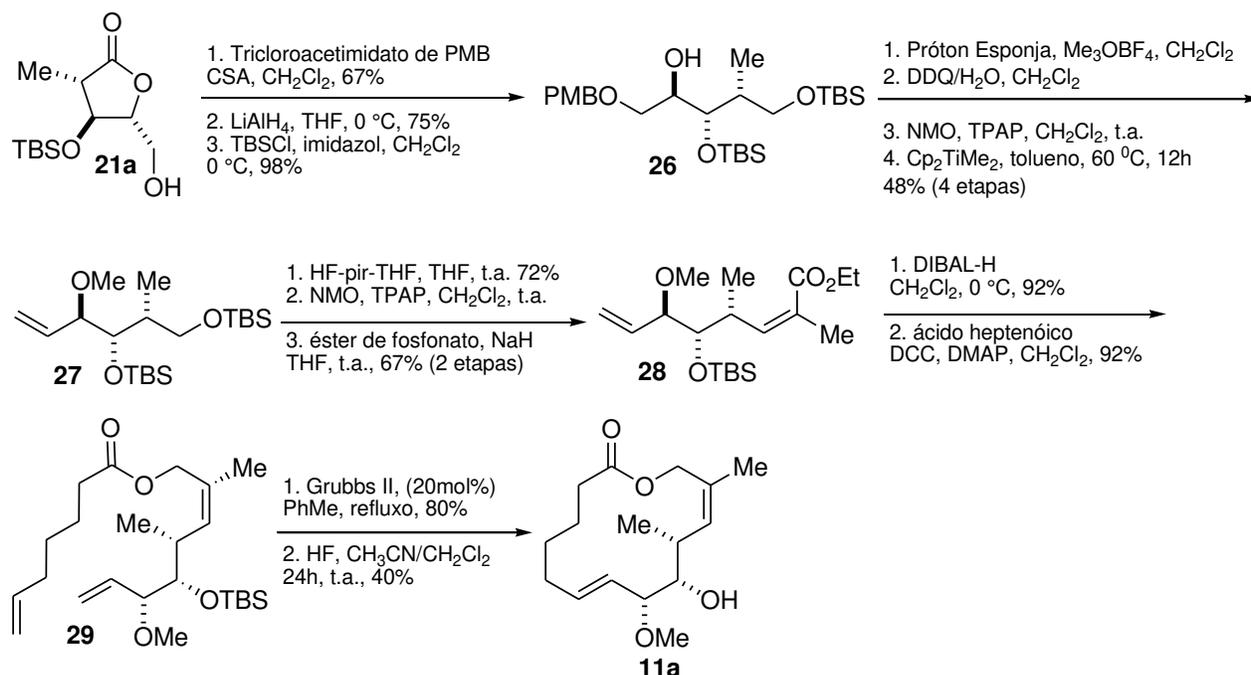
A próxima etapa envolveu desproteção da hidroxila primária da olefina **23** com HF-piridina-THF, seguido da reação de oxidação com TPAP e NMO conduzindo a um aldeído que, por sua vez, foi submetido à reação de HWE com o éster de fosfonato, fornecendo o éster α,β -insaturado **24** em 57% de rendimento para duas etapas. Finalmente, o éster **24** foi reduzido na presença de DIBAL-H e submetido à reação de esterificação com o ácido 2,6-heptadienóico na presença de DCC e DMAP, fornecendo o éster **25**. Reação de metátese de olefinas utilizando o catalisador de Grubbs de 2^a geração em 20 mol%, seguido pela reação de desproteção da hidroxila secundária com HF em $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, forneceu a macrolactona **10** em 58% de rendimento (Esquema 3).

Após a obtenção da macrolactona **10**, os autores deram continuidade ao trabalho, onde prepararam a macrolactona **11a**, epímera em C8 da macrolactona **11** a partir da lactona **21a**, epímera em C8 da lactona **21**, sendo este o produto principal obtido na reação de dihidroxilação do composto **20**, na rota descrita anteriormente pelo grupo (Esquema 4).

Inicialmente, realizaram a proteção da hidroxila primária de **21a** com o grupo PMB, abertura da lactona com LiAlH_4 a temperatura ambiente, seguido da proteção da hidroxila primária com TBSCl, fornecendo o composto **26** em 48% de rendimento para 3 etapas.

Na seqüência, foi realizada metilação da hidroxila secundária de **26** com Me_3OBF_4 e próton esponja, seguida por desproteção da hidroxila primária com DDQ/ H_2O . Oxidação com TPAP e NMO conduziu a formação de um aldeído, que por

sua vez foi utilizado diretamente na etapa seguinte, nas condições de Petasis, fornecendo a olefina **27** em 48% de rendimento para 4 etapas (Esquema 4).



Esquema 4. Síntese da macrolactona **11a**.

Com a olefina **27** em mãos, os autores realizaram a desproteção da hidroxila primária com HF-piridina-THF, seguido da reação de oxidação com TPAP e NMO, conduzindo a um aldeído, que por sua vez, foi submetido à reação de HWE com o éster de fosfonato, fornecendo o éster α,β -insaturado **28** em 67% de rendimento para duas etapas. Finalmente, o éster **28** foi reduzido na presença de DIBAL-H e submetido à reação de esterificação com o ácido 6-heptenóico na presença de DCC e DMAP, conduzindo ao éster **29**. Este foi submetido à reação de metátese de olefinas utilizando o catalisador de Grubbs de 2ª geração em 20 mol%, seguido pela reação de desproteção da hidroxila secundária com HF em CH₃CN/CH₂Cl₂, fornecendo a macrolactona **11a** em 40% de rendimento para esta etapa. Através desta seqüência, a macrolactona **11a** foi sintetizada após 17 etapas e em rendimento global de 2% (Esquema 4).

Após a síntese, Dias e colaboradores submeteram os compostos obtidos a testes de Wound-Healing (cicatrização) frente a linhagens de células MDA-MB-231 de

carcinoma de mama humano, onde obtiveram resultados excelentes para a macrolactona **11a**, que apresentou um IC₅₀ de 14 nM para inibição de migração.

1.6 Migrastatina e suas propriedades

Em 2000, os primeiros estudos de atividade biológica para a migrastatina **1** foram realizados por Imoto e colaboradores,^{18a} utilizando o modelo de *Wound-Healing* (modelo de cicatrização *in vitro*). Frente a células tumorais de esôfago humano da linhagem EC17, a migrastatina **1** apresentou um efeito de inibição de migração completo com uma concentração de 30 µL/mL de meio de cultura.

Posteriormente, outros ensaios foram realizados por Danishefsky e colaboradores como, por exemplo, *Boyden chamber*, ou ensaio em câmara de migração, revelando um IC₅₀ de 29 µM frente a células 4T1 (células tumorais de mama em ratos, que mimetizam células de câncer de mama humano).^{23a}

Novos alvos que possuam propriedade de inibição de migração de células tumorais e são passivos de intervir no complexo processo de metástase, tem recebido grande atenção nos últimos anos. Estes compõem uma nova categoria de substâncias que podem ser utilizadas nos tratamentos para carcinomas, que tradicionalmente utilizam agentes terapêuticos com altas propriedades citotóxicas, causando desta forma inúmeros efeitos colaterais indesejados para os pacientes.

1.6.1 O processo de metástase

O câncer é um termo genérico utilizado por um largo grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo e é caracterizado pelo crescimento e multiplicação descontrolados de células anormais do organismo. Frequentemente, estas células cancerosas desprendem-se do tumor, locomovem-se através do sistema circulatório e invadem tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, onde passam a crescer desordenadamente e substituem o tecido sadio, em um processo conhecido como metástase, principal responsável pela morte de pacientes com câncer.³⁴

³⁴ World Health Organization (WHO), Cancer. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 06/2012.

A metástase consiste essencialmente num processo de migração celular, onde algumas células tumorais migram de um tumor inicial para o sistema circulatório, seguido pela colonização de sítios secundários, onde as células tumorais se ligam a outras células e proliferam.³⁵

A migração celular, por sua vez, consiste num processo cíclico com várias etapas, e está envolvida em uma variedade de fenômenos biológicos. Como exemplos, podemos citar sua participação fundamental no desenvolvimento embrionário, a contribuição no reparo e regeneração de tecidos e renovação da pele. Além disso, a migração celular também dirige a progressão de doenças como o câncer, a retardação mental, arteriosclerose e artrites.^{36a,b}

A migração inicia-se quando a célula responde a um sinal externo através da polarização morfológica, onde diferenças entre a parte frontal e traseira da célula são observadas, e estende-se a uma protusão na direção do movimento. Uma importante consequência da polarização é a formação de lamelipodia e filopodia (saliências formadas na membrana plasmática e que diferem pelo formato) na parte frontal da célula. Este fenômeno é seguido então por funções de adesão para estabilizar a protusão, através da união à matriz extracelular e servem como pontos de tração para a migração. Uma contração então move o corpo da célula adiante e rompe a aderência com a parte traseira (Figura 9).

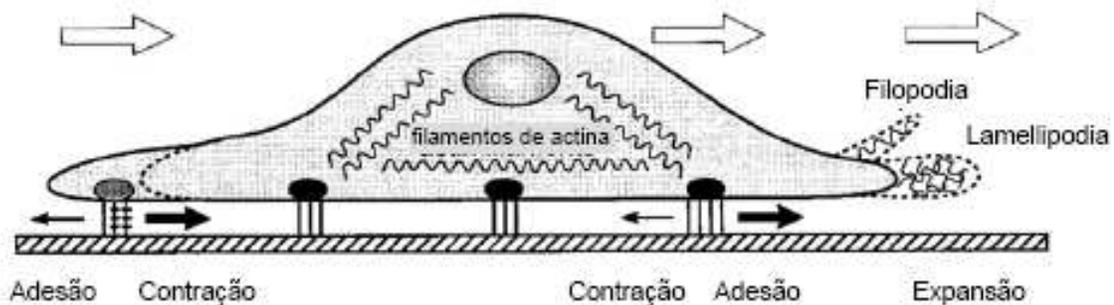


Figura 9 – Representação esquemática de migração celular.

³⁵ Woodhouse, E. C.; Chuaqui, R. F.; Liotta, L. A. *Cancer* **1997**, *80*, 1529.

³⁶ (a) Lauffenburger, D. A.; Horwitz, A. F. *Cell* **1996**, *84*, 359; (b) Ridley, A. J.; Schwartz, M. A.; Burridge, K.; Firtel, G.; Ginsberg, M. H.; Borisy, G.; Parsons, J. T.; Horwitz, A. R. *Science* **2003**, *302*, 1704.

A proliferação celular anormal é associada a alterações genéticas em etapas chave de regulação do ciclo celular. Na maioria dos tumores, os mecanismos de regulação são desarranjados de maneira que a proliferação celular ocorre independente dos fatores mitogênicos externos.^{1,2} Diversos alvos macromoleculares importantes podem ser modulados pela ação de moléculas pequenas (fármacos), reduzindo os processos malignos de crescimento e multiplicação desordenada, além da invasão e migração celular.

1.6.2 Migrastatina e análogos: modo de ação

Em 2005, o grupo do professor Danishefsky apresentou um trabalho sobre um possível modo de ação para a migrastatina **1** e seus análogos, frente a inibição de migração de células tumorais.²⁴ Com o objetivo de obter uma melhor compreensão dos aspectos envolvidos nesse processo, foram investigados os efeitos dos análogos **11** e **30** (Figura 10) no citoesqueleto da actina e em microtúbulos de células da linhagem 4T1.

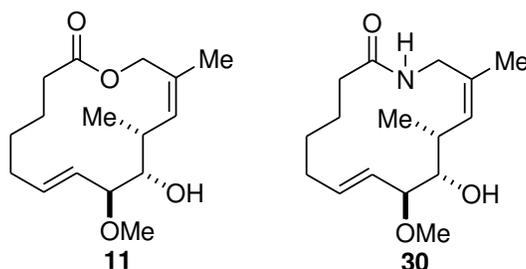


Figura 10 – Compostos analisados frente a células 4T1.

As células foram cultivadas em placas contendo meio de cultura (A), meio de cultura + soro fetal bovino (B), meio de cultura + soro fetal bovino + o composto **11** (C) e meio de cultura + soro fetal bovino + o composto **30** (D); sendo em seguida lesionadas (Figuras 11 A-D). Após encubação por 30h, polímeros de actina foram corados e as placas foram observadas em microscópio fluorescente.

Na figura 11 B, pode-se observar que a adição de soro às células tumorais 4T1 induziu à formação de lamelipodia. Nas figuras 11 C e D, pode-se observar que o pré-tratamento destas células com **11** e **30** impediu a formação de lamelipodia.

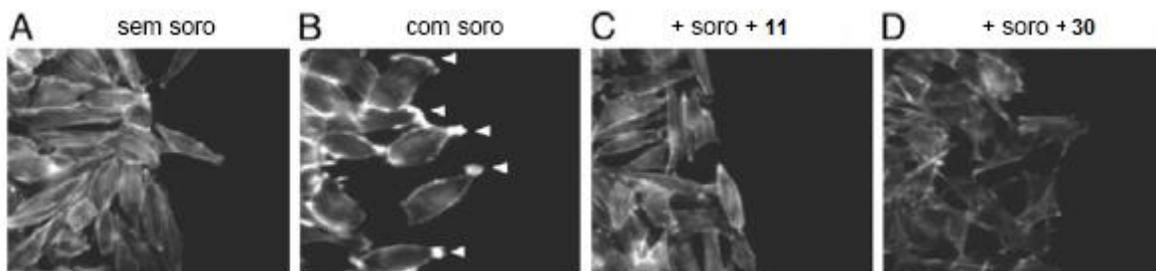


Figura 11 – Inibição da formação de lamelipodia por **11** e **30**.

Devido à formação de lamelipodia ser controlada pela proteína GTPase Rac, eles também examinaram os efeitos desses compostos em ensaios de ativação dessa proteína e observaram que o pré-tratamento das células com os compostos **11** e **30** bloqueou a ativação da proteína induzida pelo soro e reduziu significativamente sua atividade normal. Estes resultados sugerem que o modo de ação destes compostos análogos à migrastatina **1** envolve o bloqueio da proteína GTPase Rac, seguido pela interrupção da formação de lamelipodia, uma das etapas iniciais no processo de migração celular.

Outro possível alvo para a ação da migrastatina **1** e seus análogos frente a inibição de migração celular, é a proteína fascina (Figura 12).³⁷

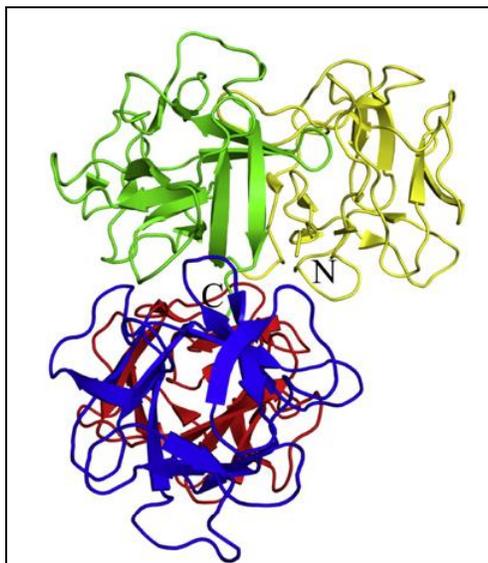


Figura 12 – Proteína fascina de *H. Sapiens*.

³⁷ Almo, S. C.; Bathe, M.; Sedeh, R. S.; Fedorov, A. A.; Fedorov, E. V.; Ono, S.; Matsumura, F. *J. Mol. Biol.* **2010**, *400*, 589.

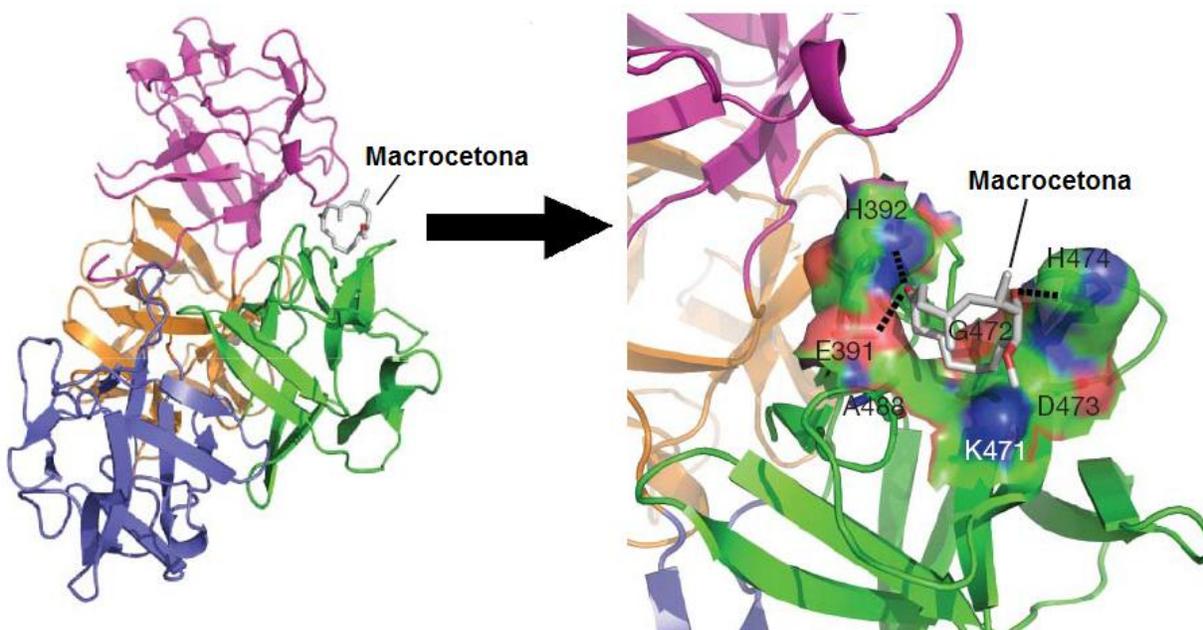
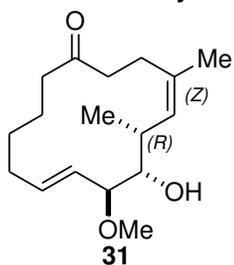


Figura 14 – Raios-X da macrocetona (**31**) no sítio ativo da proteína fascina.

Entretanto, no mesmo ano, Danishefsky e colaboradores publicaram um trabalho questionando a veracidade das imagens de raios-X do complexo entre macrocetona-fascina, anteriormente publicado pelo grupo de Chen. O grupo de Danishefsky, baseado em seus estudos realizados a partir de técnicas de raios-X e ressonância magnética nuclear (NOE e NOESY), alegou que o composto previsto para infusão nos experimentos de Chen, na verdade, era o estereoisômero da macrocetona **31** (Figura 15).³⁹

Estrutura da macrocetona de estudos divulgados por Danishefsky



Estrutura da macrocetona de estudos cristalograficos realizados por Chen.

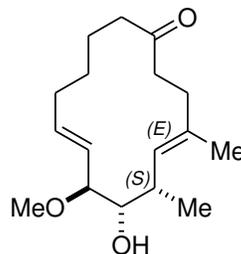


Figura 15 – Estruturas de Danishefsky e Chen.

³⁹ Gaul, C.; Njardarson, J. T.; Nagorny, P.; Krauss, I.; Perez, L.; Yang, G.; Ouerfelli, O.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3873.

Após os fatos ocorridos, Chen e colaboradores emitiram uma nota oficial de correção sobre seus estudos realizados alegando que os dados cristalográficos publicados não se apresentavam robustos, desta forma, não sendo conclusivos seus estudos do complexo macrocetona-fascina.³⁸ Com isso, estudos relacionados a forma de interação entre a migrastatina **1** e seus análogos com o sítio ativo da proteína fascina ainda continuam em aberto, sendo este um campo interessante para pesquisa, pois tal entendimento possibilita um avanço significativo na síntese de novos alvos.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho consistiu em investigar uma rota sintética curta e eficiente para a síntese e avaliação biológica de substâncias químicas bioativas derivadas da macrolactona da isomigrastatina (**14**), tendo como base a rota sintética desenvolvida por nosso grupo (Figura 16).³³ Paralelamente, em colaboração com o grupo do Prof. Adriano Andricopulo, do IF/USP de São Carlos, teve-se por objetivo realizar ensaios de avaliação biológica de diversos compostos sintetizados neste trabalho visando à geração de novas substâncias químicas bioativas candidatas a novos fármacos no tratamento do câncer.

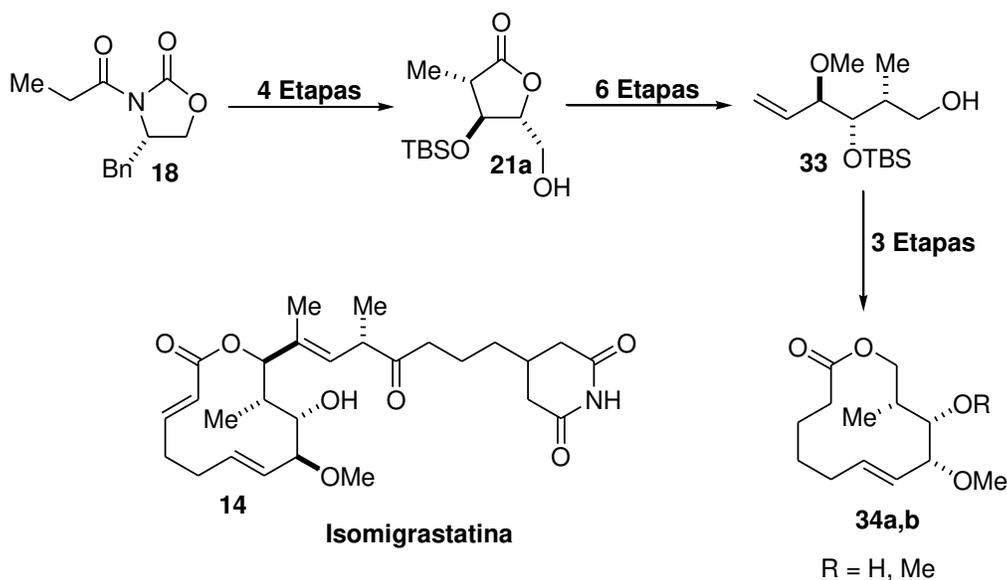


Figura 16 – Análogos da macrolactona da isomigrastatina (**14**).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Planejamento sintético para obtenção de análogos da macrolactona da isomigrastatina (14)

Os trabalhos iniciaram tendo como base a rota sintética desenvolvida pelo grupo,³³ onde neste mesmo trabalho foram obtidos dois análogos da migrastatina (1) com potencial inibitório superior ao produto natural de origem, sendo estes a macrolactona **11a** e o análogo aberto **35**, ambos epímeros em C8 (Figura 17).

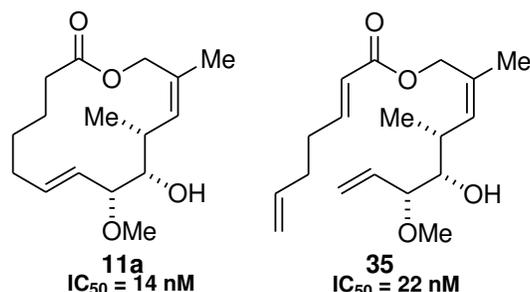
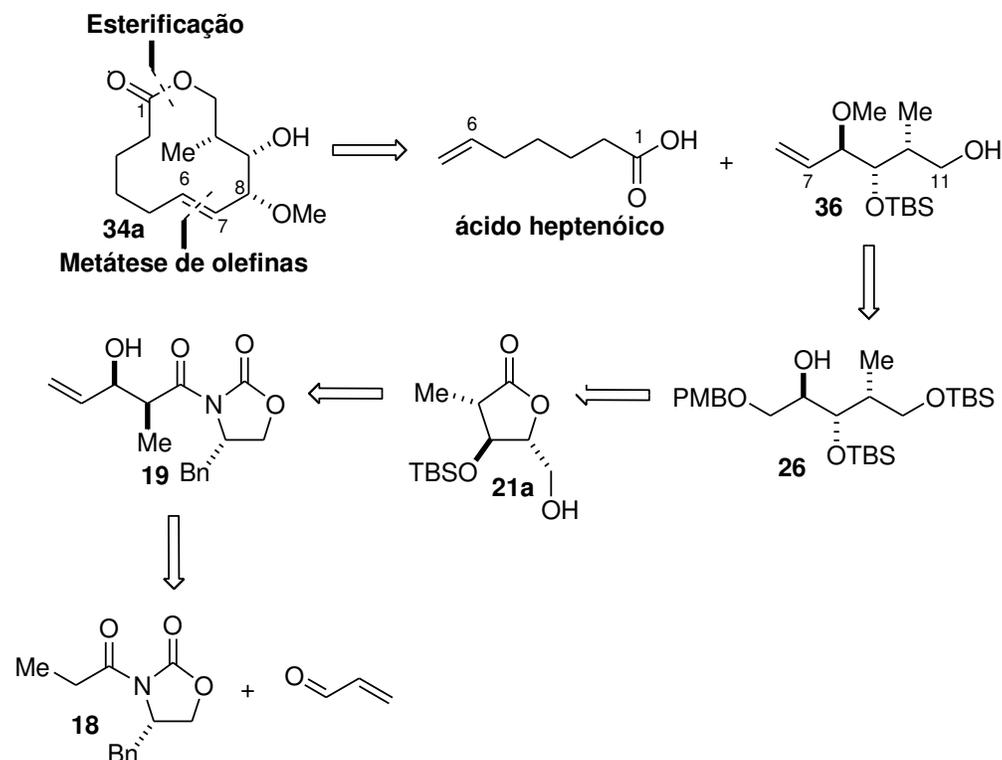


Figura 17 – Compostos com grande potencial obtidos pela rota sintética do grupo.

A análise retrosintética demonstra que as ligações C1-O e C6-C7 da macrolactona **34a** podem ser clivadas, levando ao álcool **36** (fragmento C7-C11) e ao ácido heptenóico (fragmento C1-C6), conectados pela reação de esterificação de Steglich seguida pela reação de metátese de olefinas. O ácido heptenóico pode ser obtido de fontes comerciais. O álcool **36** pode ser obtido a partir do intermediário **26** por uma reação de metilação na presença de próton esponja, seguido da desproteção com DDQ e oxidação da hidroxila primária com NMO e TPAP e reação nas condições de Wittig.

Por sua vez, o intermediário **26** pode ser preparado a partir de uma reação de redução da lactona **21a**, seguida da proteção da hidroxila primária com o tricloroacetimidato de PMB. A lactona **21a** pode ser obtida pela reação de dihidroxilação do aduto de aldol **19**, que deriva das reações entre o auxiliar quiral de Evans **18** e acroleína (Esquema 5).

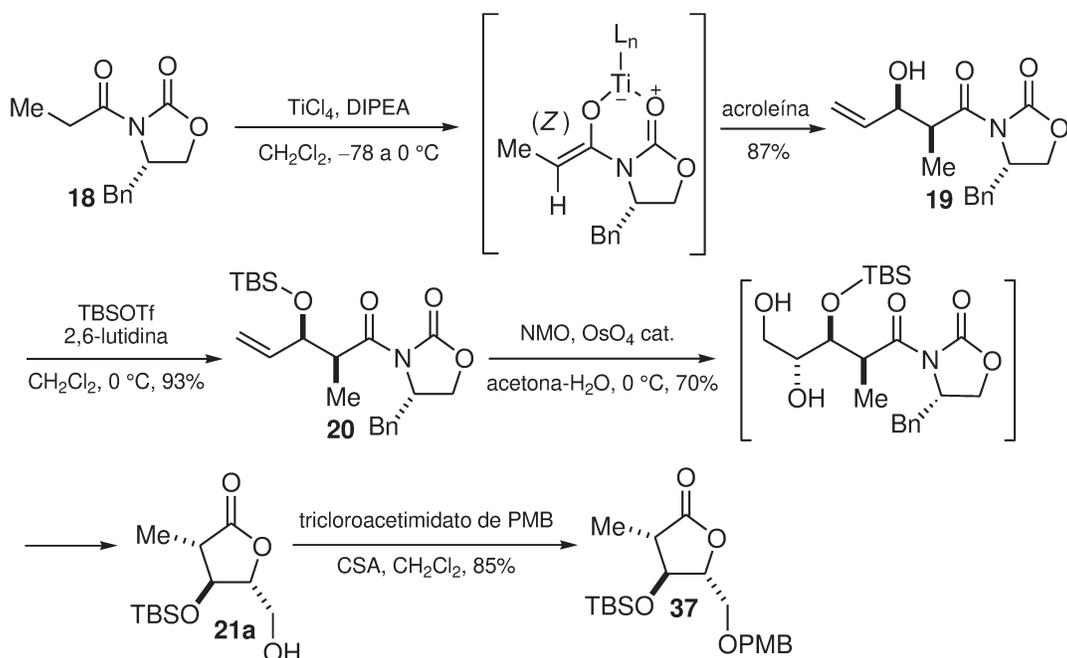


Esquema 5. Análise retrossintética para a obtenção da macrolactona **34a**.

3.2 Preparação do fragmento C7-C11

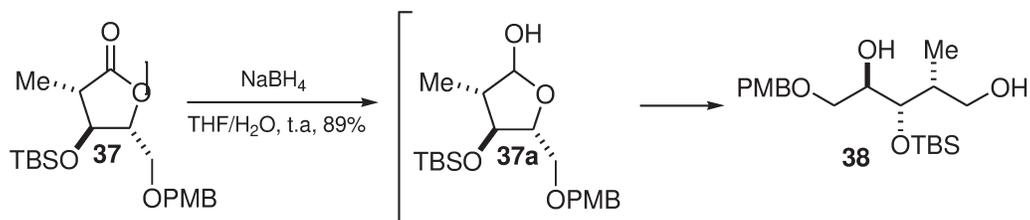
A preparação deste fragmento inicia-se com a obtenção da lactona a partir da reação aldólica entre a acroleína e o enolato de titânio da oxazolidinona (*S*)-(+)-**18**, fornecendo o aduto de aldol **19** em 87% de rendimento e diastereosseletividade maior que 95:05 para o aduto Evans.

Esta reação foi seguida pela proteção da hidroxila secundária em C9 com TBSOTf, levando ao éter de silício **20** em 93% de rendimento.³³ O composto **20** foi submetido à condição de dihidroxilação, utilizando NMO e quantidade catalítica de OsO₄, fornecendo a lactona **21a** em 70% de rendimento e ds > 95:05. Seguindo a estratégia, a proteção da hidroxila primária de **21a** com o grupo PMB conduziu à lactona **37**, em 85% de rendimento (Esquema 6).



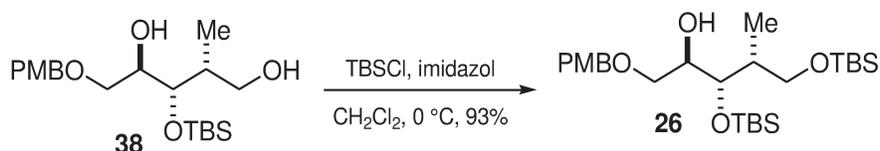
Esquema 6.Preparação da lactona **37**.

Posteriormente, redução da lactona **37** com NaBH_4 a temperatura ambiente, forneceu o diol **38** em 89% de rendimento (Esquema 7). Vale ressaltar que nestas condições experimentais foi isolado o lactol **37a** proveniente da transferência de um hidreto (10% do rendimento total). Entretanto, o lactol isolado foi posteriormente submetido às condições de redução, fornecendo o diol **38** em 89% de rendimento.



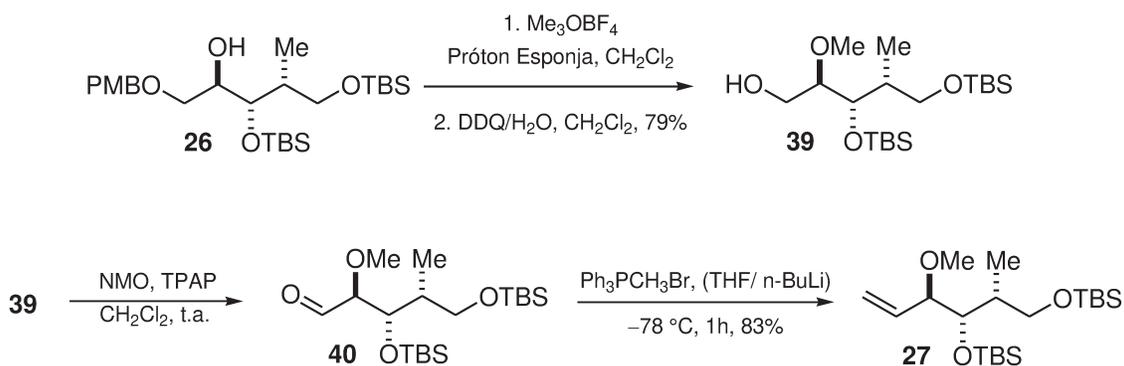
Esquema 7. Abertura da lactona **37**.

A hidroxila primária foi então protegida com TBSCl fornecendo o composto **26** em 93% de rendimento (Esquema 8).



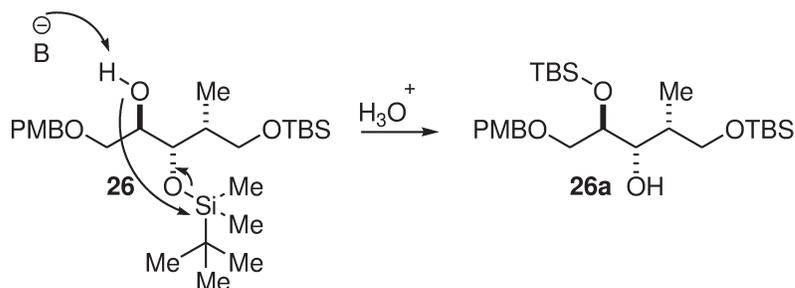
Esquema 8. Proteção do diol **38**.

Metilação da hidroxila secundária do álcool **26**, seguida por desproteção da hidroxila primária com DDQ/H₂O levou a formação do álcool primário **39** em 79% de rendimento em duas etapas (Esquema 9). Oxidação do álcool **39** com TPAP e NMO conduziu a formação do aldeído **40**, que por sua vez foi utilizado diretamente na etapa seguinte sem prévia purificação. Assim, tratamento de **40** nas condições de Wittig com Ph₃PCH₃Br levou à olefina **27** em 83% de rendimento (Esquema 9).



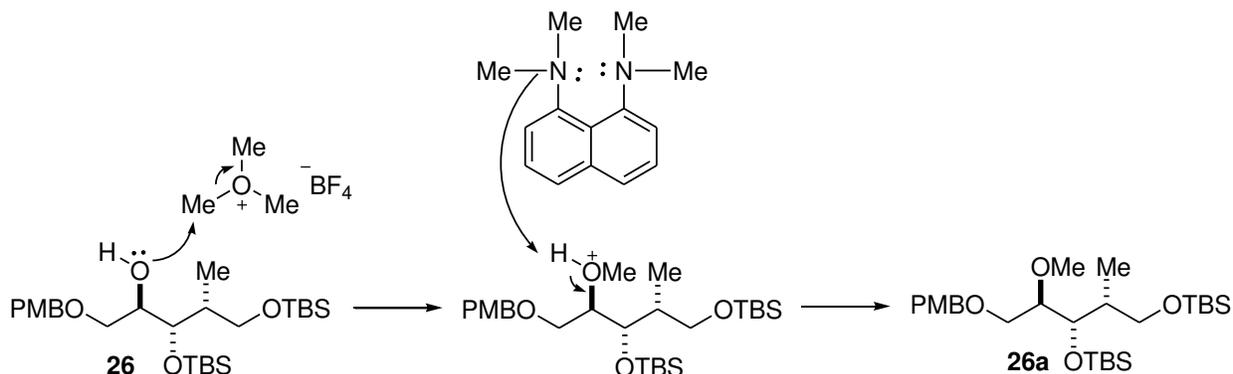
Esquema 9. Preparação da olefina **27**.

Quando a reação de metilação acima foi realizada utilizando-se MeI e NaH, foi observado a formação do produto **26a**, proveniente da migração do grupamento TBS (Esquema 10). Esta migração deve ocorrer devido à formação de um intermediário alcóxido, produzido pela abstração do próton da hidroxila livre em **26** pela base.



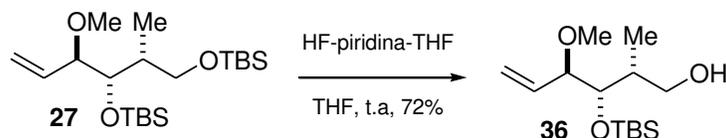
Esquema 10. Produto de migração do grupamento TBS.

Quando tetrafluorborato de trimetiloxônio e próton esponja foram utilizados, devido à alta reatividade do agente metilante e à característica da base, que embora relativamente forte (pKa do ácido conjugado = 12,1) absorve prótons lentamente, não havendo formação do intermediário alcóxido indesejado, houve apenas a formação do produto de O-metilação **26a** (Esquema 11).



Esquema 11. Mecanismo de formação do composto **26a**.

A olefina **27** foi tratada na sequência com HF-piridina para fornecer o álcool primário **36** em 72% de rendimento (Esquema 12).



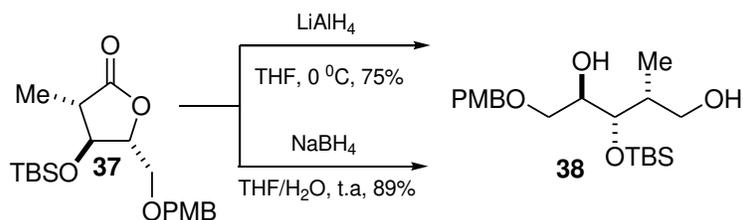
Esquema 12. Preparação do álcool primário **36**.

Vale ressaltar que o álcool primário **36** (fragmento C7-C11) foi preparado anteriormente em nosso grupo para a síntese da macrolactona da migrastatina (**1**). Entretanto, algumas etapas foram modificadas no presente estudo a fim de aperfeiçoar a rota sintética proposta. Os dados espectrais para este composto, bem como para os intermediários mencionados anteriormente estão em acordo com os dados descritos por nosso grupo de pesquisa.³³

3.3 Etapas otimizadas para a rota proposta

Durante o desenvolvimento dos estudos, houve a necessidade de otimização de duas etapas da rota proposta, sendo estas, etapas determinantes para a continuidade do trabalho com objetivo de obter metodologias que proporcionem bons rendimentos e um trabalho experimental mais robusto.

A primeira etapa otimizada foi a redução da lactona **37** para formação do diol **38**, que, anteriormente, era realizada utilizando-se LiAlH_4 como agente redutor a $0\text{ }^\circ\text{C}$. O rendimento para essa reação era de 75%, sendo que após vários testes, foi estabelecida uma condição otimizada onde foi usado NaBH_4 como agente redutor, à temperatura ambiente, sendo esta uma condição mais branda, além de conduzir a um aumento no rendimento para 89% (Esquema 13).

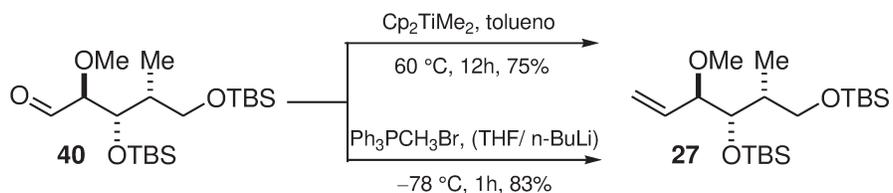


Esquema 13. Otimização da redução para lactona **37**.

A segunda etapa otimizada foi a reação de olefinação do aldeído **40** para formação da olefina **27**, que, anteriormente, era realizada utilizando-se o reagente de Petasis (Cp_2TiMe_2).

O reagente de Petasis é preparado a partir da reação entre Cp_2TiCl_2 e MeLi em éter anidro. Este reagente é relativamente estável por alguns dias frente a O_2 e H_2O , quando conservado em tolueno ou THF no escuro e sobre refrigeração, mas é facilmente degradado na forma sólida quando exposto a luz, o que torna seu uso algo pouco atrativo. O reagente olefinante, o carbenóide, é preparado *in situ* pelo aquecimento do reagente de Petasis em tolueno, a aproximadamente $60\text{ }^\circ\text{C}$.

Tendo o reagente de Petasis essas características pouco atrativas, a condição de olefinação do aldeído **40**, foi modificada onde então optou-se pela aplicação das condições de Wittig, sendo esta uma metodologia simples, eficiente e robusta em termos de escala, onde o reagente ($\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$) é altamente estável. (Esquema 14).

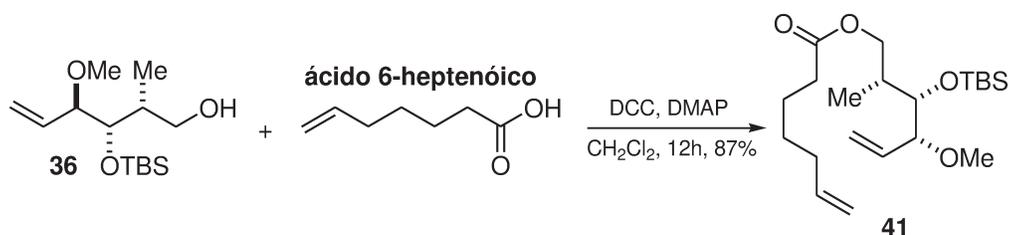


Esquema 14. Otimização para olefinação do aldeído **40**.

Nas condições de Petasis a reação era realizada á 60 °C por 12h fornecendo o produto em 75% de rendimento, sendo que quando a condição de Wittig foi aplicada, o tempo reacional foi de 1h a -78 °C onde a olefina foi obtida com 83% de rendimento.

3.4 Acoplamento entre os fragmentos C1-C6 e C7-C11

Com os dois fragmentos em mãos, foram iniciados os estudos de acoplamento, onde a condição de esterificação de Steglich foi aplicada utilizando-se DCC e DMAP como reagentes, conduzindo ao éster **41** em 87% de rendimento após 12h de reação (Esquema 15).

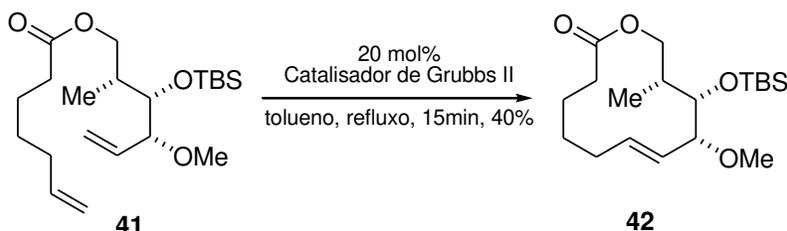


Esquema 15. Esterificação do álcool primário **36**.

A formação do éster **41** foi devidamente evidenciada pela análise de seus espectros na região do infravermelho, de RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro no infravermelho observou-se o aparecimento de uma banda de absorção intensa correspondente ao estiramento da ligação C=O em 1731 cm^{-1} , característica do grupo carbonila de éster.

No espectro de RMN de ^1H observa-se o deslocamento dos sinais de absorção correspondentes aos hidrogênios metilênicos, presentes anteriormente no álcool **36**. No espectro de RMN de ^{13}C , observou-se o aparecimento de um sinal de absorção em 173,6 ppm, característico do carbono carbonílico de éster.

Dando continuidade, o éster **41** foi submetido às condições de metátese de olefinas, sendo tratado com 20 mol% de catalisador de Grubbs 2^a geração, em refluxo com tolueno por 15 minutos, de acordo com a metodologia descrita anteriormente pelo grupo,³³ onde após purificação foi obtido 40% de rendimento para o produto desejado (Esquema 16).



Esquema 16. Formação da macrolactona **42**.

Há relatos na literatura que o tempo reacional, a temperatura, assim como a concentração na qual a reação é feita, são fatores importantíssimos para um bom rendimento e seletividade neste tipo de transformação química.⁴⁰

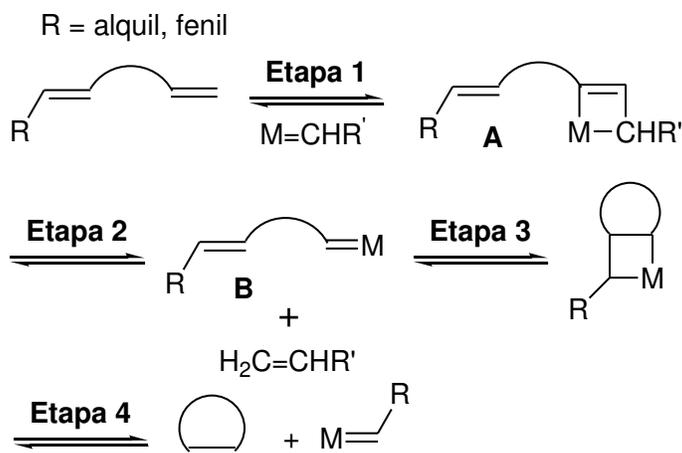
Em 2003, Grubbs e colaboradores⁴¹ publicaram um artigo relacionando alguns importantes pontos na seletividade e reatividade de olefinas em reações de metátese. Segundo os autores, modificações nas propriedades estéricas ou eletrônicas da olefina como, por exemplo, modificação de grupos protetores, são frequentemente suficientes para alterar a reatividade destas. Metáteses eficientes ocorrem quando todos os componentes da reação são prontamente acessíveis ao complexo metalcarbeno, e reações que levam a produtos indesejados, como os homodímeros das olefinas de partida comumente formados, são evitados.

A reação de metátese consiste basicamente na troca de ligações covalentes entre duas olefinas ou uma olefina e um alcino, e se refere a uma redistribuição do esqueleto carbônico, no qual duas ligações duplas carbono-carbono são rearranjadas na presença de um catalisador metal-carbono. A reação entre duas olefinas distintas recebe o nome de metátese cruzada (CM – cross metathesis) e sua versão intramolecular é chamada de metátese de fechamento de anel (RCM – ring closing metathesis).

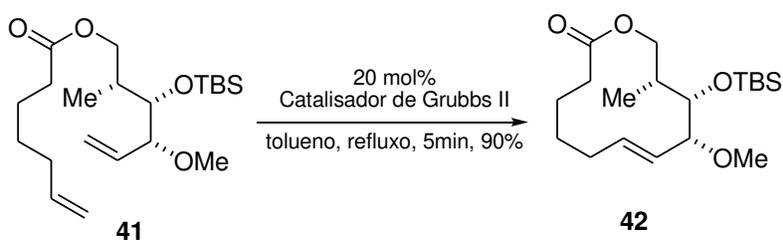
⁴⁰ Hong, S. H.; Day, M. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7414.

⁴¹ Chatterjee, A. K.; Choi, T.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360.

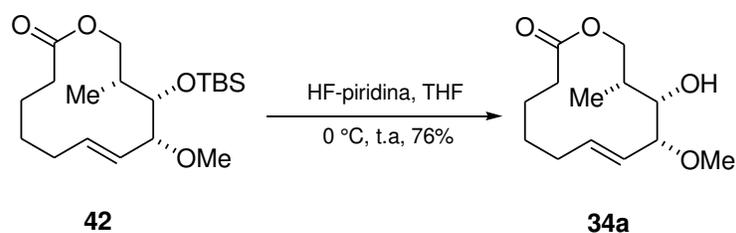
O mecanismo mais aceito para a reação de fechamento de anel é iniciado com uma etapa de cicloadição [2+2] entre o complexo metalcarbeno e a olefina terminal menos substituída do substrato, para produzir o intermediário metalaciclobutano **A**; onde numa segunda etapa há uma cicloreversão [2+2] fornecendo então, um novo complexo metalcarbeno **B** e uma olefina. Após mais uma série de cicloadição e cicloreversão, etapas 3 e 4, ocorre a formação do cicloalceno desejado (Esquema 17).



Frente a esses resultados na reação de metátese de olefinas para o éster **41**, houve então a necessidade de otimização para dar continuidade à rota sintética proposta. Após diversas condições reacionais testadas, modificando-se os parâmetros de temperatura, tempo e concentração reacional, foi obtida uma condição ótima que forneceu a macrolactona **42** de forma seletiva para a estereoquímica (*E*), em excelentes rendimentos (90%), utilizando o catalisador de Grubbs de 2^a geração em 20 mol% após 5 minutos de reação, sendo empregado tolueno como solvente em refluxo (Esquema 18).



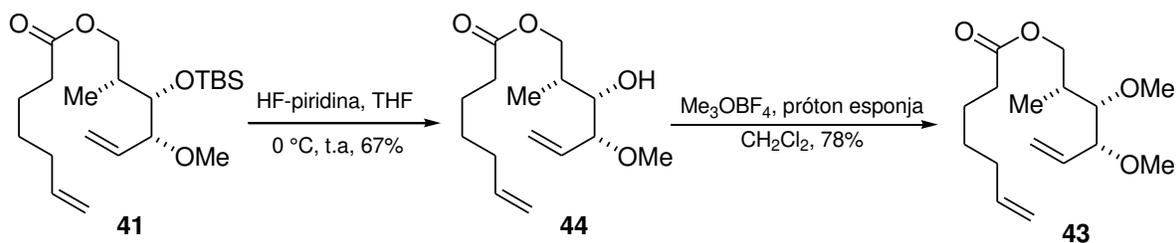
Finalmente, a última etapa consistiu na desproteção do grupamento sililado, realizada utilizando-se solução de HF-piridina em THF à 0 °C, seguido do tratamento com MeOTMS. O uso de MeOTMS é devido ao fato da alta afinidade entre Si e F gerar uma eliminação de fluoreto do meio reacional de maneira branda e eficiente, obtendo-se assim o análogo da macrolactona da isomigrastatina **14** em 76% de rendimento (Esquema 19).



Esquema 19. Formação da macrolactona **34a**.

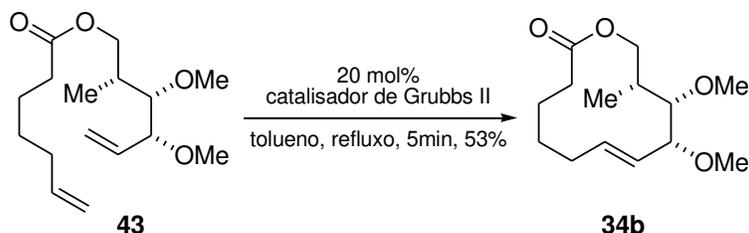
Baseado nos estudos realizados pelo grupo de Grubbs,^{40,41} procurando observar de que forma os substituintes laterais do éster **41** influenciam em termos de reatividade perante a reação de metátese e até mesmo objetivando obter novos compostos que possuam atividade biológica de interesse, optou-se pela preparação dos análogos dimetoxilados **43** e **34b** (Esquema 20 e 21).

A rota teve início a partir do éster **41**, onde o mesmo foi submetido à reação de desproteção do grupo sililado, utilizando-se solução de HF-piridina em THF à 0 °C, seguido do tratamento com MeOTMS, obtendo assim o éster **44** em 67% de rendimento. Em seguida, o composto **44** foi submetido à reação de metilação com próton esponja e Me₃OBf₄ em CH₂Cl₂ como solvente, fornecendo o éster dimetoxilado **43** em 78% de rendimento (Esquema 20).



Esquema 20. Preparação do éster dimetoxilado **43**.

Com o éster dimetoxilado **43** em mãos, foi então empregada a condição de metátese de olefinas, utilizando o catalisador de Grubbs de 2^a geração em 20 mol% fornecendo a macrolactona **34b** em 51% de rendimento (Esquema 21).



Esquema 21. Preparação da macrolactona **34b**.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que a troca do grupo protetor sililado pelo grupo metoxila em C9, promoveu uma queda no rendimento para obtenção da macrolactona **34b** via reação de metátese. Tal fato pode ser atribuído a uma provável variação conformacional desfavorável do éster **43** em relação ao éster **41**, contribuindo negativamente para a reação de metátese, onde desta forma há uma queda na eficiência do processo.

4. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA: INIBIÇÃO DE MIGRAÇÃO CELULAR

Em 2007, iniciamos um projeto em colaboração com o grupo do Prof. Adriano Andricopulo, do IF/USP de São Carlos. O objetivo geral deste projeto de pesquisas é a geração de novas substâncias químicas bioativas candidatas a novos fármacos no tratamento do câncer de mama. A partir da parceria estabelecida neste projeto pretende-se viabilizar, por meio da utilização de técnicas modernas em química medicinal e síntese orgânica planejada, a geração de novos compostos com valor farmacêutico para futuro desenvolvimento clínico, através do planejamento, síntese e avaliação biológica de diversas substâncias químicas.

Além disso, espera-se, com os resultados obtidos, a abertura de novas possibilidades para produção de novos medicamentos com tecnologia 100% nacional, incentivando o desenvolvimento da área de P&D de fármacos no Brasil. Sendo assim, para esta etapa de testes, foram selecionados os ésteres **43** e **44** e seus respectivos análogos cíclicos **34a** e **34b**.

4.1 Ensaio Wound Healing:

O ensaio de migração celular empregando o modelo *wound healing* ou modelo de cicatrização *in vitro* consiste num método de avaliação semi-quantitativo, utilizado normalmente como um método de triagem e bastante útil na seleção de concentrações apropriadas para a determinação dos valores de IC50 através do teste de migração celular.

4.2 Preparo das Células:

A linhagem celular MDA-MB-231 utilizada é proveniente de carcinoma humano derivado da metástase pleural decorrente de neoplasia mamária, assim como a linhagem DU-145 proveniente de carcinoma de próstata humana, ambas possuindo alto poder de migração e invasão.⁴² A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio de cultura DMEM (modified Dulbecco's Minimum Medium – Cultilab), e a linhagem DU-145 em meio RPMI 1640 (Royal Park Memorial Institute). Para a estocagem em nitrogênio líquido, as células foram congeladas em soro fetal bovino (SFB, estéril, Cultilab), contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura e 10% SFB. Após a cultura se tornar confluenta, foi realizada uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando assim uma fenda na camada de células (Figura 18). A cultura foi lavada três vezes com meio de cultura (sem soro) para a retirada completa de resíduos celulares (debris) da fenda formada.

⁴² Stevanatto, K. B.; “*Identificação de novos inibidores da migração celular em células de câncer de mama e próstata*”, Programa de Pós-Graduação em Física- Dissertação de Mestrado - USP, São Carlos, **2008**, orientador: Prof. Adriano Andricopulo.

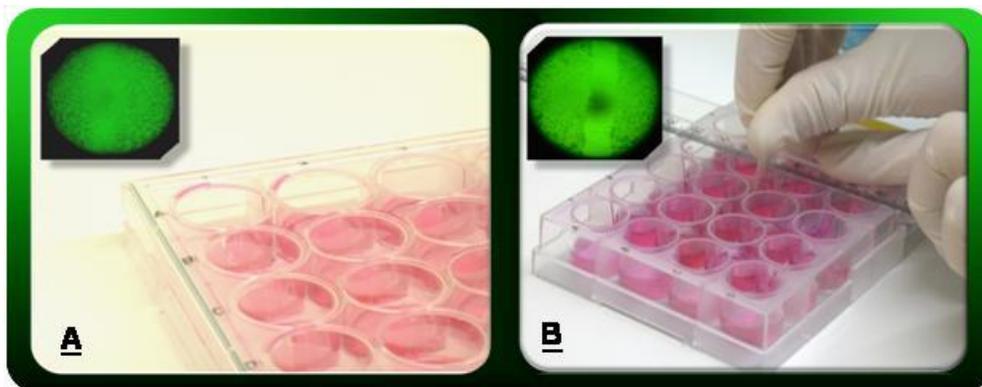


Figura 18 – A – Placa de 24 poços com células confluentes representadas com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. B – Construção da fenda na monocamada celular com fenda representada com aumento de 400 vezes em microscópio óptico.

4.3 Incubação dos compostos:

Os compostos foram diluídos em 1 mL de meio com soro em concentrações variáveis, e essas soluções são depositadas nos poços da placa de cultura, sendo também utilizados um branco e um padrão (Colchicina) todos feitos em triplicata. O sistema foi fotografado digitalmente em um microscópio invertido (magnificado 4 vezes). Imagens fotográficas foram capturadas no início do experimento (tempo de 0 h) e após a incubação das células a 37°C em 5% CO₂ por 22 h, sendo monitoradas até 72 h. Esse tempo é necessário para que as células migrem e permitam uma avaliação do fechamento da fenda realizada.

4.4 Análise dos resultados:

A partir da análise das fendas contendo os compostos selecionados em comparativo com o padrão colchicina, para as duas linhagens de células tumorais (Tabelas 1 e 2), pode-se estimar a faixa apropriada para as variações de concentração no ensaio de migração celular. A vantagem é clara desse método de avaliação em comparação aos ensaios em câmaras de migração celular que apresentam custos operacionais e financeiros bem mais significativos.

Tabela 1. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular *wound healing* (células de câncer de mama humano da linhagem MDA-MB-231).

CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO (µm)	INIBIÇÃO (%)
Colchicina	1	80
34a	1	zero
44	1	zero
34b	1	zero
43	1	zero

Tabela 2. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular *wound healing* (células de câncer de próstata humano da linhagem DU-145).

CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO (µm)	INIBIÇÃO (%)
Colchicina	1	85 ± 1
34a	1	10 ± 4
44	1	36 ± 0,5
34b	1	26 ± 3
43	1	40 ± 2

Com base nos dados obtidos acima, é possível observar que os compostos selecionados não apresentaram eficiência quanto à inibição de migração de células de câncer de mama humano da linhagem MDA-MB-231, em comparativo com o padrão colchicina. Para células de câncer de próstata humano da linhagem DU-145, tais compostos mostraram-se pouco eficientes, apresentando um valor máximo de até 40% de inibição para o éster **43**.

As imagens obtidas do experimento em 0 h e 22 h foram avaliadas medindo-se a área da fenda em cada poço, através do software de manipulação de imagens *Image J*. Após a obtenção das áreas, o cálculo da porcentagem de inibição apresentada pelo composto **43** foi realizado utilizando-se a fórmula representada nas figuras 19 e 20.

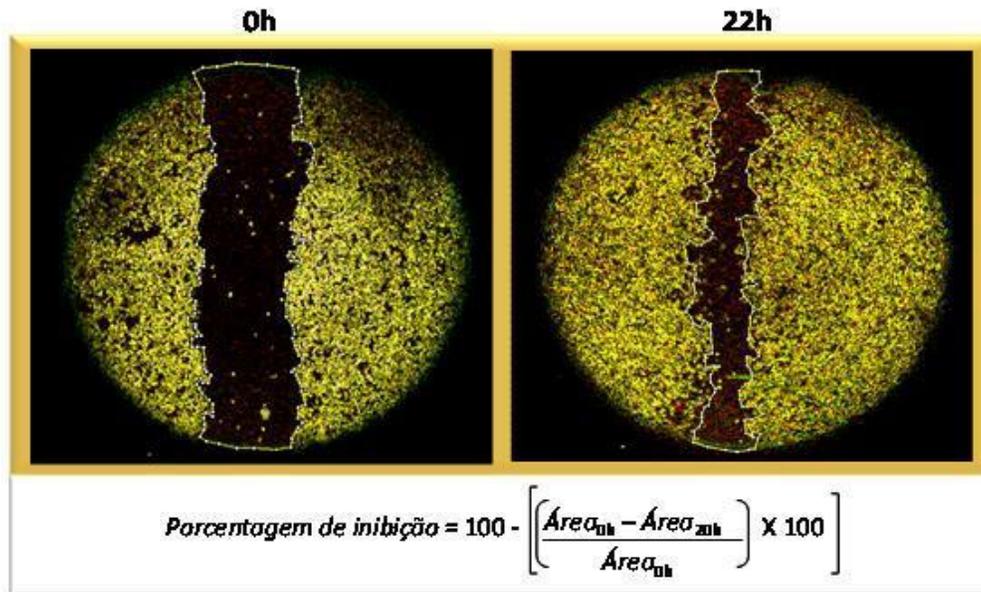


Figura 19 – Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes em 0 h e 22 h após a incubação e fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto **43**.

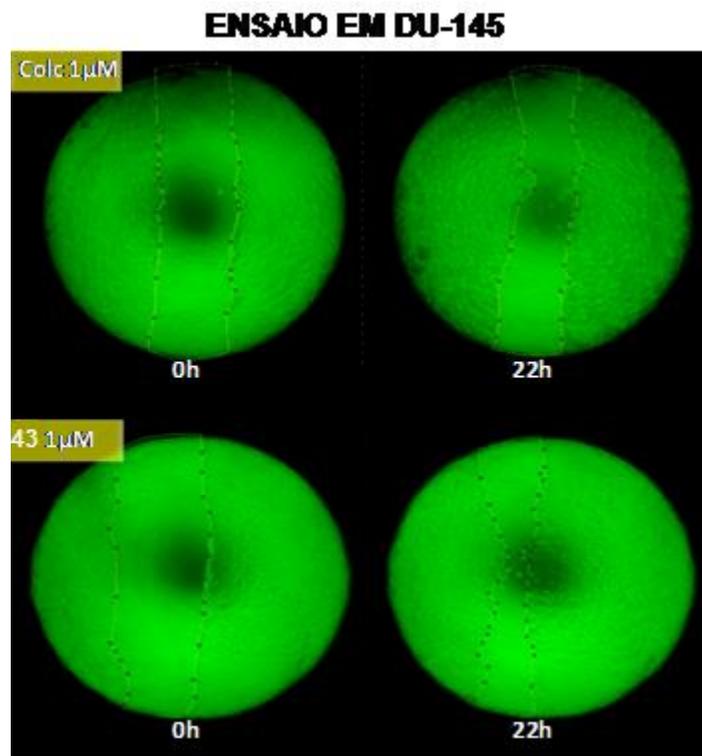


Figura 20 – Fotomicrografias dos ensaios realizados de inibição para o composto **43**.

5. SÍNTESE DE NOVOS ANÁLOGOS

Com base nos resultados pouco satisfatórios de atividade biológica para os compostos **43**, **44**, **34a** e **34b** decidimos dar continuidade ao trabalho com o objetivo de obter novas substâncias com potencial inibitório. Como alternativa, propusemos a síntese do epímero em C8 da macrolactona da isomigrastatina **14**. Diferentemente dos compostos **34a** e **34b**, este análogo possui uma insaturação entre C2 e C3 (Figura 21).

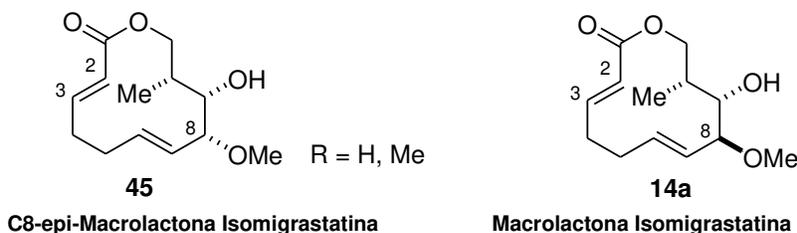
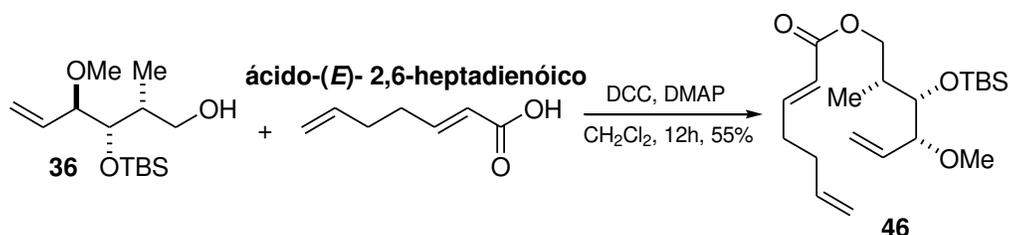


Figura 21 – Macrolactona da isomigrastatina (**14**) e epímero em C8 **45**.

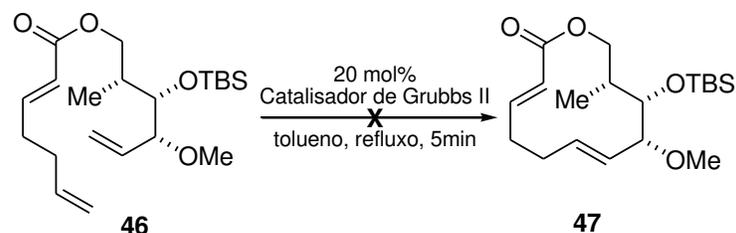
5.1 Síntese do epímero em C8:

A síntese do epímero em C8 da macrolactona da isomigrastatina (**14**) foi realizada seguindo a mesma rota sintética até a obtenção do intermediário avançado **36**, sendo que o mesmo foi então submetido à reação de esterificação com o ácido 2,6-heptadienóico, na presença de DCC e DMAP, conduzindo ao éster **46** em 55% de rendimento (Esquema 22).



Esquema 22. Preparação do éster **46**.

A próxima etapa envolveu a reação de metátese de olefinas em **46** utilizando o catalisador de Grubbs de 2ª geração em 20 mol%. No entanto, após 5 minutos de reação, não foi observada a formação do produto esperado (Esquema 23).



Esquema 23. Tentativa de obtenção da macrolactona **47**.

Em 2010, Dias e colaboradores³³ descreveram uma rota sintética para obtenção da macrolactona da migrastatina **10**, assim como a síntese do epímero em C8 saturado **11a** com rendimentos de 44% e 40% para a reação de metátese, respectivamente (Figura 22).

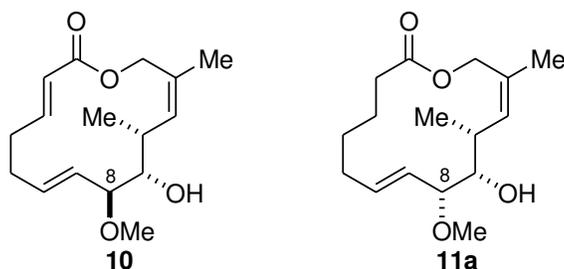


Figura 22 – Macrolactona da migrastatina (**10**) e epímero em C8 saturado **11a**.

Entretanto, para a síntese do epímero em C8 **48**, a partir do éster **35a**, os resultados não foram satisfatórios, sendo que não foi observada formação de produto após reação de metátese de olefinas (Esquema 24)

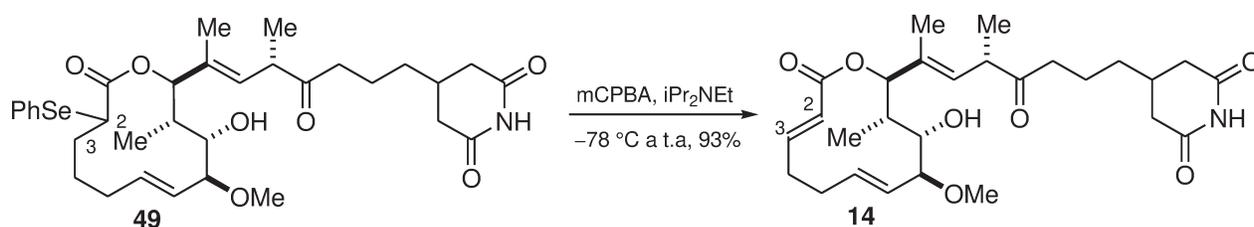


Esquema 24. Tentativa de obtenção da macrolactona **48**.

Segundo os autores, uma justificativa para isso seria a possibilidade de competição entre processos de metátese, uma vez que a molécula possui outras duplas ligações uma em C11-C12 e outra em C2-C3. Não obstante o padrão de substituição, a

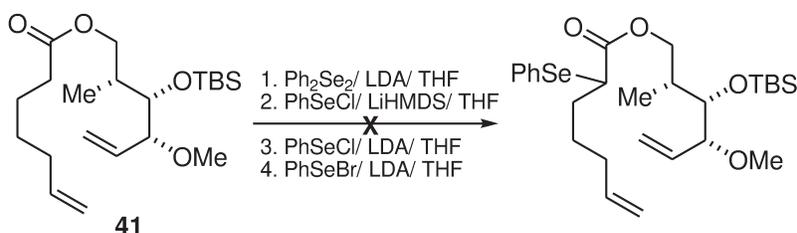
demanda estérea do substrato, o tamanho do anel a ser formado e a presença de heteroátomos coordenantes têm grande influência nos resultados.⁴³ Por essa perspectiva e sendo esses compostos metabólitos da isomigrastatina **14**, pertencentes a mesma rota biosintética, podemos entender o por quê da não obtenção da macrolactona **47** pela rota proposta.^{25a,b}

Entretanto, em 2007, Danishefsky e colaboradores³¹ apresentaram uma rota sintética para a isomigrastatina **14**, onde a dupla ligação entre C2-C3 era obtida somente após a reação de metátese de olefinas, a partir da eliminação de um grupamento PhSe, inserido no carbono C2 em posição alfa à carbonila da respectiva macrolactona **49** precursora (Esquema 25).



Esquema 25. Síntese total da isomigrastatina (**14**).

Pensando nisso, decidimos optar pela tentativa de inserção do grupo PhSe no carbono C2 do éster avançado **41**, com subsequente eliminação do grupamento PhSe, obtendo assim, a macrolactona desejada. Diversas condições reacionais foram testadas: Ph₂Se₂/LDA/THF; PhSeCl/LiHMDS/THF; PhSeCl/LDA/THF; PhSeBr/LDA/THF, porém, nenhum resultado satisfatório foi obtido, sempre com recuperação do éster **41** de partida (Esquema 26).

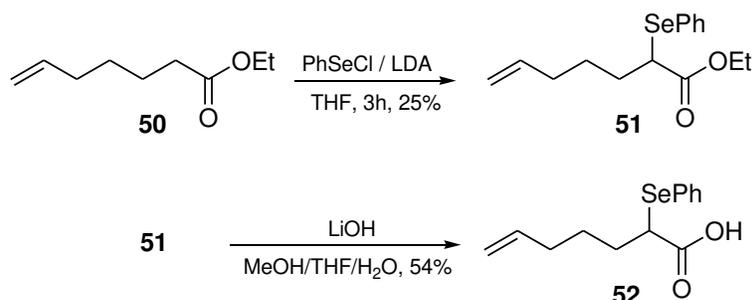


Esquema 26. Tentativa de inserção do grupo PhSe no éster **41** avançado.

⁴³ Finelli, F. G.; "Síntese da macrolactona da migrastatina e análogo. Sínteses e aplicações de novos substratos em reações de RCAM catalisadas por [Mo].", Programa de Pós-Graduação em Química- Tese de Doutorado- Unicamp, Campinas, **2009**, orientador: Prof. Luiz Carlos Dias.

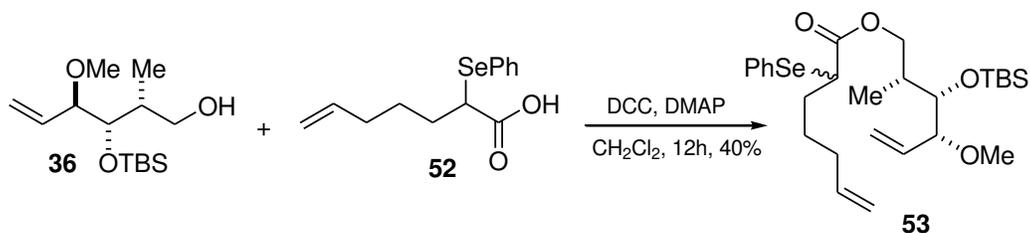
A tentativa anterior haveria de ser a forma mais rápida e prática de obtenção do intermediário avançado possuindo o grupo PhSe na posição alfa. Decidimos, então, optar por uma rota mais longa, porém, com maior probabilidade de êxito.

Essa rota teve início reagindo-se o éster alifático **50** com PhSeCl e LDA em THF como solvente, conduzindo ao composto **51** em 25% de rendimento, ainda não otimizado. Na seqüência, o éster **51** foi submetido à reação de hidrólise básica com LiOH em MeOH/THF/H₂O (2:1:2), fornecendo o ácido **52** em 54% de rendimento (Esquema 27).



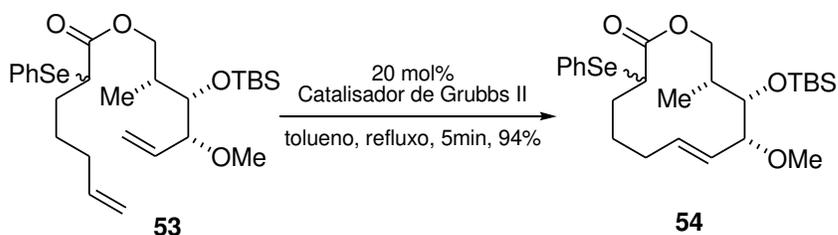
Esquema 27. Preparação do ácido **52**.

Finalmente, com o ácido **52** em mãos, realizamos a reação de esterificação com o intermediário avançado **36** na presença de DCC e DMAP, conduzindo ao éster **53** em 40% de rendimento (Esquema 28).



Esquema 28. Preparação do éster **53**.

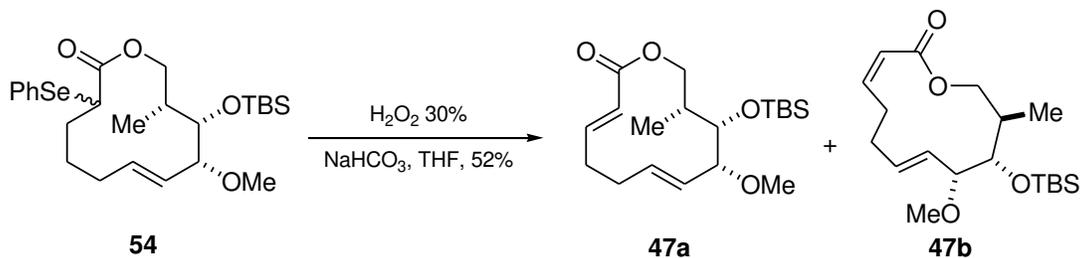
Após obtenção do éster avançado **53**, o mesmo foi então submetido à reação de metátese de olefinas, utilizando o catalisador de Grubbs de 2^a geração em 20 mol%, fornecendo a macrolactona **54** em 94% de rendimento, após 5 min de reação em tolueno como solvente em refluxo (Esquema 29).



Esquema 29. Preparação da macrolactona **54**.

Subseqüente purificação por coluna cromatográfica levou à obtenção de dois produtos com uma razão de 1:1, sendo estes os epímeros em C2 da macrolactona **54**, que foram diferenciados pela análise dos espectros de RMN de ^1H . A estereoquímica relativa para estes isômeros não foi determinada, pois, para os fins desejados isso não seria relevante.

A seguir, realizamos uma desselenização oxidativa da macrolactona **54** para formação da insaturação entre os carbonos C2-C3, reagindo-a com H_2O_2 30%, em meio básico, com NaHCO_3 , sendo THF empregado como solvente, formando assim a macrolactona **47** desejada em 52% de rendimento. Entretanto, após análise do espectro de RMN de ^1H , observamos a formação dos isômeros *Z* e *E*, com uma razão aparente de 1:1 entre os isômeros, sendo que não foi possível determinar exatamente a proporção por RMN, devido às sobreposições de sinais no espectro de RMN ^1H (Esquema 30).



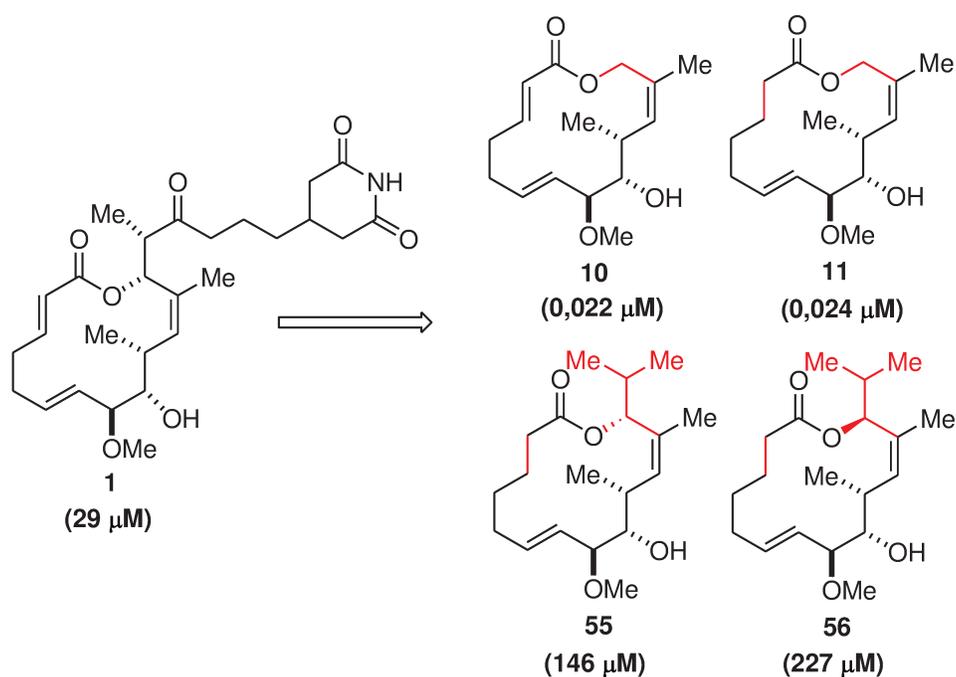
Esquema 30. Formação das macrolactonas **47a** e **47b**.

As condições para separação desses isômeros até o momento não foram estabelecidas, porém, poderão ser estudadas visando a obtenção com alto grau de pureza desses compostos para posterior desproteção do grupo siliado, seguido de avaliação biológica.

Dando continuidade ao estudo, resolvemos investigar um pouco mais de que forma os grupos substituintes, assim como as funcionalizações desses macrocompostos influenciam diretamente ou não, tanto no caráter sintético como de atividade.

Em 2011, Danishefsky⁴⁴ e colaboradores realizaram um estudo onde a partir da síntese de vários derivados da migrastatina **1**, puderam entender e avaliar a estabilidade e viabilidade biológica, promovendo assim um melhor entendimento quanto a síntese e aplicabilidade dessa família de compostos.

Os pesquisadores iniciaram o estudo com a preparação de análogos mais simples da macrolactona da migrastatina **1**, onde perceberam que tais compostos apresentaram níveis de inibição mais elevados do que o composto natural **1** (Esquema 31).



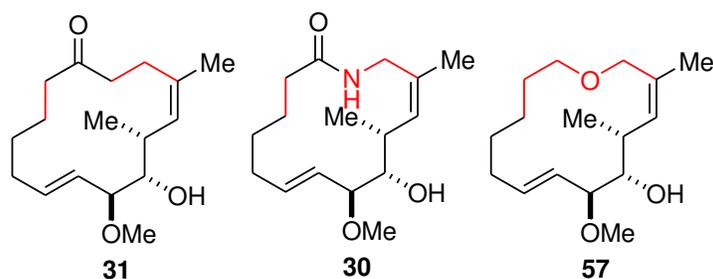
Esquema 31. Preparação de análogos da migrastatina (**1**).

Curiosamente, foi observado que tanto a funcionalidade NH da cadeia lateral no grupo glutarimida, assim como a insaturação em C2-C3 no anel das macrolactonas,

⁴⁴ Danishefsky, S. J.; Lecomte, N.; Njardarson, J. T.; Nagorny, P.; Yang, G.; Downey, R.; Ouerfelli, O.; Moore, M. A. S. *Proc. Nat. Acad. Scien.* **2011**, *108*, 15074.

não são relevantes perante a atividade desses compostos, pois tanto o produto **10**, como o produto **11** saturado em C2-C3, apresentaram atividade superior ao composto **1** e muito próxima entre eles. No entanto, tais compostos apresentaram facilidade em sofrer hidrólise o que limitou o entusiasmo dos autores. Pensando nisso, os autores prepararam os compostos **55** e **56**, que possuem um grupo isopropil no carbono C13, mostrando maior estabilidade hidrolítica. Porém, a atividade desses compostos mostrou-se muito inferior até mesmo ao produto natural **1**.

À luz desses resultados, os autores buscaram resolver a problemática perante a instabilidade da funcionalidade “lactona”, onde foram preparados 3 novos compostos: macrocetona **31**, a macrolactama **30** e o éter cíclico **57**, sendo que os três compostos foram submetidos a testes biológicos e apresentaram resultados satisfatórios, além de alta estabilidade e viabilidade sintética (Esquema 32).



Esquema 32. Análogos funcionais da macrolactona da migrastatina (**1**).

Sendo assim, realizaram uma gama de testes *in vivo*, para avaliar as perspectivas terapêuticas dos compostos preparados perante a migrastatina **1**, onde observaram que o composto **57** mostrou ser o mais promissor para o tratamento de diversos tipos de carcinomas, como por exemplo o de pulmão (Tabela 3).

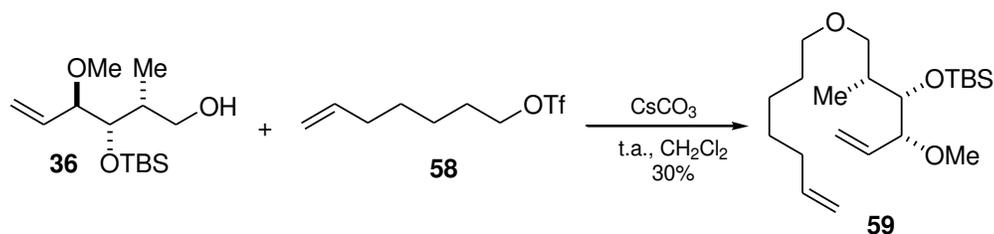
Tabela 3. Inibição de migração de células de cancro pulmonar pelo éter **57** (IC₅₀ em μM).

Linhagem de Células	Composto 45
A549	1,93 ± 0,41
H1975	1,51 ± 0,69
H299	8,20 ± 1,75

Com base nos dados observados acima obtidos pelo grupo do professor Danishefsky, resolvemos preparar análogos que possam apresentar maior atividade, derivados das macrolactonas já obtidas nesse trabalho.

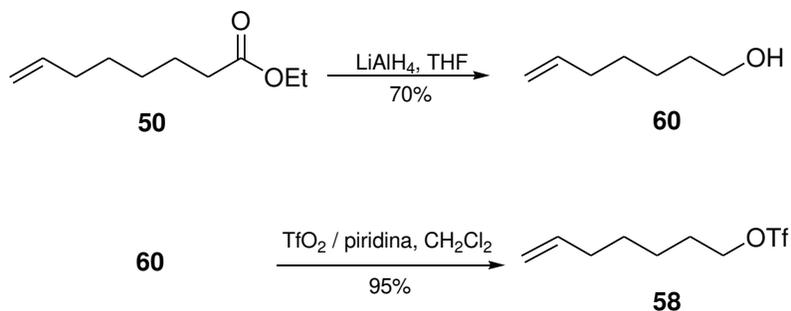
5.2 Síntese do éter cíclico

A síntese do éter cíclico foi realizada seguindo a mesma rota sintética até a obtenção do intermediário avançado **36**, sendo que o mesmo foi então submetido à reação de eterificação com o triflato **58**, na presença de Cs_2CO_3 e CH_2Cl_2 como solvente, conduzindo ao éter **59** em 30% de rendimento (Esquema 33).



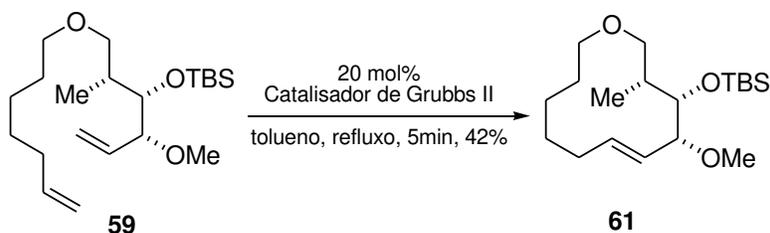
Esquema 33. Preparação do éter **59**.

A obtenção do triflato **58** teve início com a redução do éster **50** com LiAlH_4 em THF, fornecendo o respectivo álcool **60** em 70% de rendimento, seguido da reação com Tf_2O /piridina em CH_2Cl_2 , obtendo o respectivo triflato em 95% de rendimento (Esquema 34).



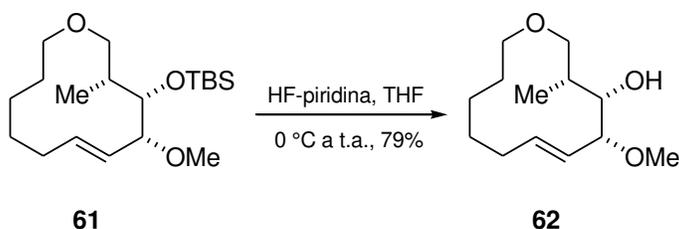
Esquema 34. Preparação do triflato **58**.

A próxima etapa envolveu a reação de metátese de olefinas em **59**, utilizando o catalisador de Grubbs de 2ª geração em 20 mol% para obtenção do éter cíclico **61**, em 42% de rendimento (Esquema 35).



Esquema 35. Preparação do éter cíclico **61**.

Finalmente, a última etapa consistiu na desproteção do grupamento sililado, realizada utilizando-se solução de HF-piridina em THF à 0 °C, onde obteve-se o éter cíclico **62**, análogo da macrolactona **34a** em 79% de rendimento. A partir da análise do espectro de RMN de ¹H de **62** observou-se a perda dos sinais na região de 0,9 ppm referentes aos hidrogênios do grupamento sililado, após a reação de desproteção (Esquema 36).



Esquema 36. Preparação do éter cíclico **62** análogo da macrolactona **34a**.

O composto **62** foi então enviado ao grupo do Prof. Adriano Andricopulo no Instituto de Física da USP de São Carlos, para teste de cicatrização *in vitro*, com a linhagem MDA-MB-231, proveniente de carcinoma humano de mama que possui alto poder de migração e invasão.⁴²

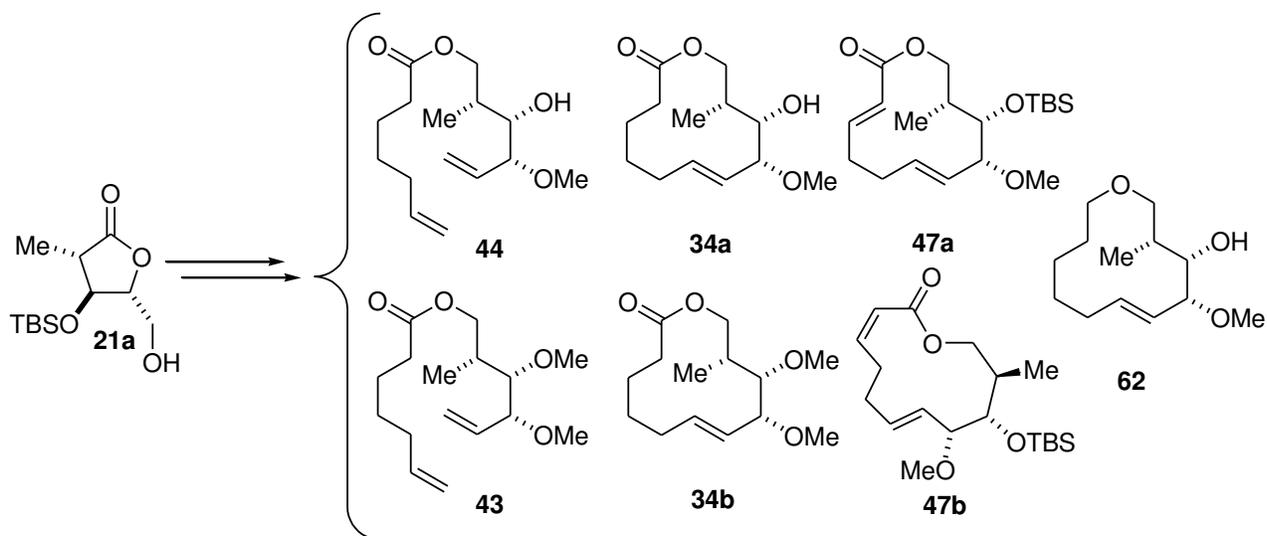
As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (modified Dulbecco's Minimum Medium – Cultilab), e para a estocagem em nitrogênio líquido, foram congeladas em soro fetal bovino (SFB, estéril, Cultilab), contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Os procedimentos experimentais de preparo das células, assim como o de incubação do composto **62**, foram idênticos aos aplicados para os compostos **34a**, **34b**, **43** e **44**, onde a partir da análise dos resultados, o éter cíclico mostrou-se totalmente ineficiente no processo de inibição (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado da avaliação dos compostos no ensaio celular *wound healing* (células de câncer de mama humano da linhagem MDA-MB-231).

CÓDIGO	CONCENTRAÇÃO (µm)	INIBIÇÃO (%)
Colchicina	1	66 ± 1
62	10	zero

6. DETERMINAÇÃO DA ESTEREOQUÍMICA RELATIVA: lactona 21a

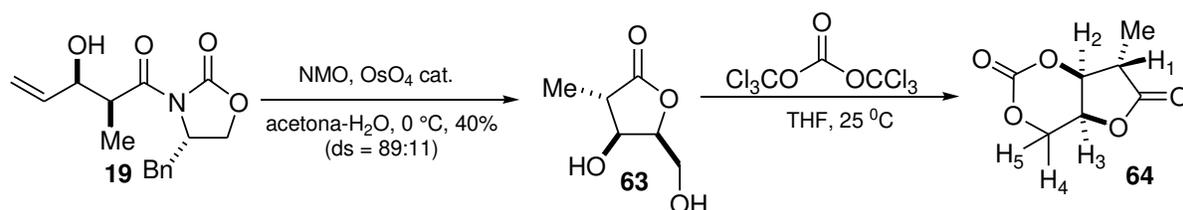
A lactona **21a** é um intermediário chave em nossa rota sintética, pois apresenta os três centros estereogênicos presentes em nossos alvos, as macrolactonas **34a**, **34b**, **47a**, **47b**, o éter cíclico **62** e os ésteres alifáticos **43** e **44** (Esquema 37).



Esquema 37. Intermediário chave **21a**.

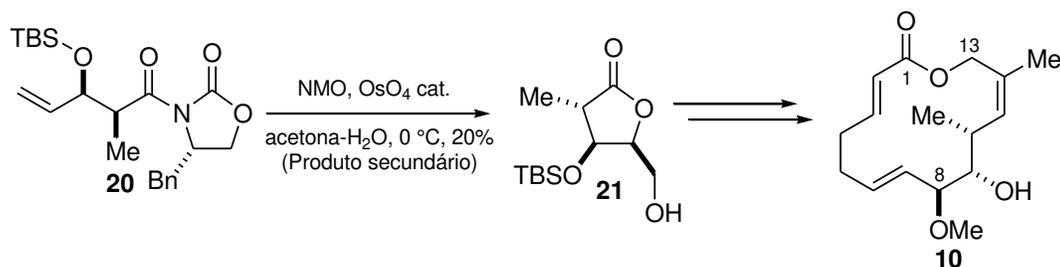
Em 2006, nosso grupo realizou um estudo onde uma série de lactonas de 5 membros foram sintetizadas, sendo estas similares a lactona **63**, a partir das reações de dihidroxilação com OsO₄ catalítico e NMO de olefinas quirais com alta

diastereosseletividade.⁴⁵ Essas lactonas tiveram suas estereoquímicas determinadas por análise de dados de RMN ¹H do biciclo **64** (Esquema 38).



Esquema 38. Determinação inicial da estereoquímica da lactona.

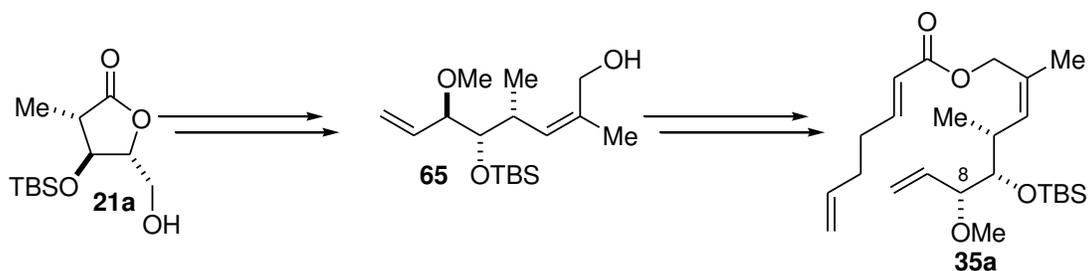
De acordo com este estudo, acreditava-se que a lactona **21**, que possui o centro em C8 com configuração S, era obtida como produto principal na reação de dihidroxilação do aduto **20**. A princípio, esta metodologia poderia ser aplicada na síntese da macrolactona da migrastatina **10** (Esquema 39).



Esquema 39. Rota sintética anteriormente estudada.

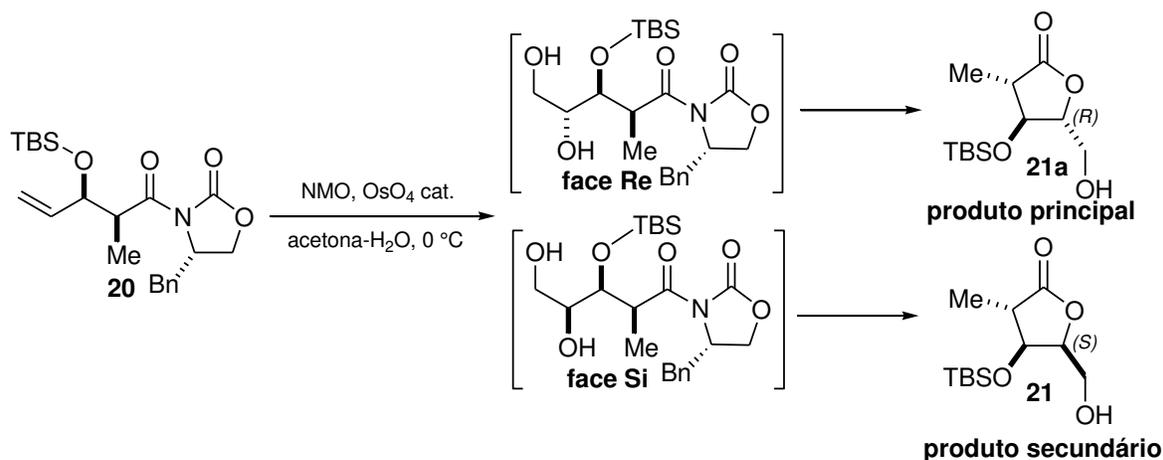
Porém, em 2009, o grupo realizou um novo estudo onde foram comparados dados de RMN e $[\alpha]_D$ dos intermediários **35a** e **65** obtidos neste trabalho a partir da lactona **21a** principal, com os dados dos compostos descritos por Danishefsky e colaboradores. A comparação entre os dados para estes compostos, sugeriu que os compostos preparados neste trabalho eram diastereoisômeros dos compostos da literatura (Esquema 40).⁴³

⁴⁵ Dias, L. C.; de Castro, I. B. D.; Steil, L. J.; Augusto, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 213.



Esquema 40. Intermediários comparados para determinação da estereoquímica.

De acordo com estes resultados, concluiu-se que a reação de dihidroxilação do aduto de aldol **20** acontece através da aproximação preferencial do reagente de ósmio pela face *Re* do substrato, oposto aos grupos OTBS e Me vizinhos à olefina, fornecendo a lactona **21a**, com o centro em C8 *R*, como produto principal (Esquema 41). Em reações com escalas de até 5 mmol, a lactona **21a** é obtida como único produto, já em escalas maiores que 15 mmol, a lactona **21** também é obtida juntamente com a lactona **21a**.



Esquema 41. Formação das lactonas **21** e **21a**.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi apresentada a síntese de análogos da macrolactona da isomigrastatina **14**, onde foram preparados 2 ésteres alifáticos, 4 macrolactonas e 1 éter cíclico, sendo todos inéditos (Figura 22).

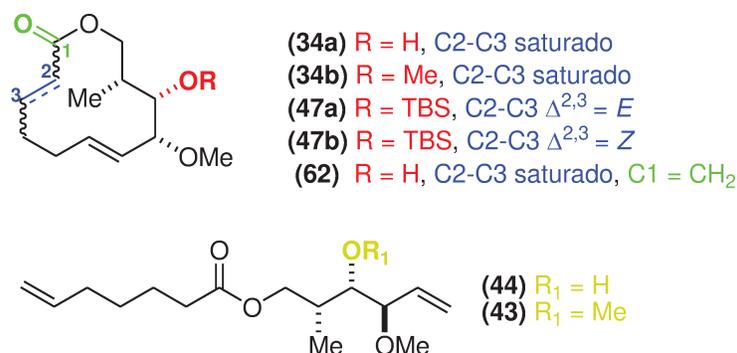


Figura 23 – Compostos obtidos neste trabalho análogos da isomigrastatina (14).

A síntese destes compostos foi realizada em 9 etapas para o composto **44**; 10 para o composto **43**; 11 etapas para o composto **34a**; 12 para o composto **34b** e 13 etapas para os compostos **47a**, **47b** e **62**, sendo que todos os produtos foram obtidos com rendimentos globais em torno de 3%.

Parte deste trabalho foi publicada no periódico *Tetrahedron Letters* em 2012,⁴⁶ em um trabalho intitulado *Stereoselective synthesis of analogs of the macrolactone of isomigrastatin*, onde foi apresentada uma rota sintética eficiente para preparação dos análogos **34a**, **34b**, **43** e **44**. Contudo, a preparação dos compostos **47a**, **47b** e **62**, que ainda estavam sendo estudados, não foi descrita neste trabalho. Este trabalho ainda possibilita a preparação de mais análogos destes compostos com o objetivo de obter novas substâncias para submeter aos testes de cicatrização *in vitro*, sendo que desta forma poderemos ter uma maior compreensão do potencial desta família de compostos (Figura 23).

⁴⁶ Dias, L. C.; Monteiro, G. C.; Finelli, F. G.; Conegero, L. S.; Amarante, G. W. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 707.

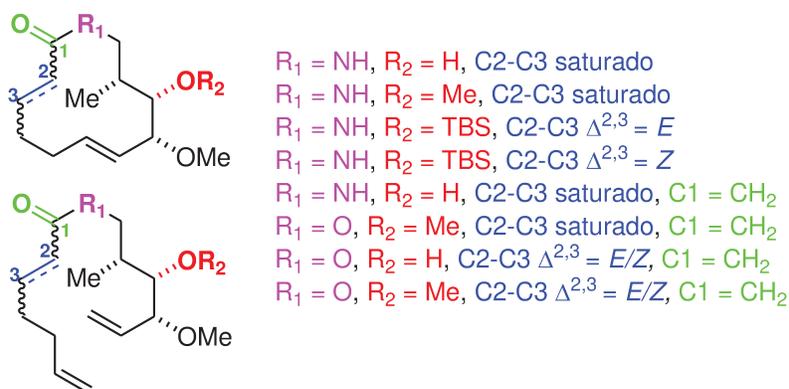


Figura 24 – Possíveis alvos sintéticos análogos da isomigrastatina (14).

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Reagentes e Solventes:

As reações envolvendo condição anidra foram realizadas sob atmosfera de argônio, em vidraria previamente flambada. Diisopropiletilamina, 2,6-lutidina, piridina, tolueno e diclorometano foram tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso. Tetrahydrofurano e éter dietílico foram tratados com sódio metálico e benzofenona e destilados imediatamente antes do uso. Acroleína, cloreto de propionila, ácido trifílico e tetracloreto de titânio foram destilados imediatamente antes do uso. Peneira molecular foi ativada a 100 °C por 6 horas. Os demais reagentes foram utilizados sem prévio tratamento.

8.2 Métodos Cromatográficos:

As cromatografias de adsorção em coluna (cromatografia *flash*) foram realizadas utilizando-se sílica-gel (230-400 mesh, Acros). Os eluentes empregados estão descritos nos procedimentos experimentais. As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas utilizando-se placas obtidas a partir de cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A visualização se deu através de luz ultravioleta (254 nm) e/ou através de revelação com solução etanólica de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento.

8.3 Análises espectrométricas:

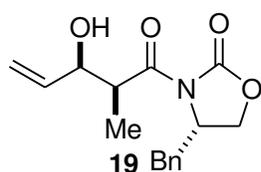
Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono desacoplado (RMN de ^{13}C) foram obtidos nos aparelhos MHz, Varian Inova 500 MHz, Bruker 250 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados pelo sinal de clorofórmio e benzeno deuterados (7,26 e 7,15 ppm, respectivamente, para RMN de ^1H e 77,0 e 128,0 ppm, respectivamente, para RMN de ^{13}C). A multiplicidade dos sinais dos hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H foi indicada segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), t (triplete), tl (triplete largo), q (quarteto), qt (quintuplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), dt (duplo triplete), e m (multiplete).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um aparelho Perkin-Elmer 1600 FTIR, com as frequências de absorção sendo expressas em cm^{-1} . Os ângulos de desvio do plano da luz polarizada (α) foram observados nos Polarímetros Carl Zeiss Jene Polamat A (lâmpada de Hg) e LEP (lâmpada de sódio), utilizando celas de 1 cm, sendo descritos como segue: $[\alpha]_D$ (c (g/100mL), solvente). Os espectros de massa de alta resolução foram realizados utilizando o aparelho q-Tof da Waters (Micromass).

8.4 Procedimentos e caracterizações:

Todos os intermediários obtidos até o composto **36** do presente estudo, foram preparados anteriormente pelo grupo, sendo assim, seus dados de caracterização por RMN ^1H , RMN ^{13}C , $[\alpha]_D^{20}$, IV e HRMS estão de acordo com os descritos na literatura.^{33,43}

(S)-4-benzil-3-((2S,3R)-3-hidroxi-2-metilpent-4-enil)oxazolidin-2-ona (**19**)

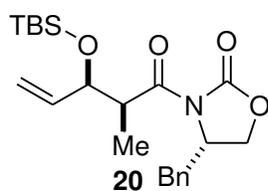


Uma solução da oxazolidinona **18** (580 mg; 2,48 mmol) em 25 mL de CH_2Cl_2 foi resfriada à $0\text{ }^\circ\text{C}$ sob fluxo de argônio e tratada, gota a gota, com TiCl_4 (0,29 mL; 2,61 mmol) previamente destilado. À

suspensão amarela resultante foi então adicionada DIPEA (1,08 mL; 6,20 mmol). A solução marrom avermelhada foi mantida sob agitação magnética à 0 °C por 1 hora. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada a -78 °C e acroleína (0,25 mL; 3,72 mmol) previamente destilada foi adicionada gota a gota. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética a -78 °C por 1 hora e em seguida foi levada a 0 °C e agitada por 12 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de solução aquosa saturada de NH₄Cl, filtrada através de celite, seguida por separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi submetida à extração com CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), as fases orgânicas combinadas foram lavadas com soluções aquosas saturadas de NaHCO₃ e NaCl, secas com MgSO₄ anidro e concentradas. Purificação por coluna cromatográfica *flash* (20% AcOEt/hexano) forneceu 624,2 mg do aduto de aldol **19** como um sólido branco em 87% de rendimento.

Rf 0,27 (40% AcOEt/hexano).

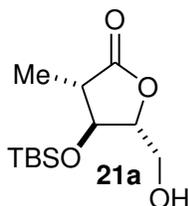
**(R)-4-benzil-3-((2R,3S)-3-(*t*-butildimetilsililoxi)-2-metilpent-4-enoil)oxazolidin-2-ona
(20)**



A uma solução do aduto de aldol **19** (100,0 mg; 0,34 mmol) em 3 mL de CH₂Cl₂, adicionou-se 2,6-lutidina (0,05 mL; 0,40 mmol), mantendo-se a temperatura a 0 °C. Em seguida, adicionou-se à mistura, TBSOTf (0,09 mL; 0,37 mmol). Após 1h, a reação foi finalizada com a adição de 8 mL de H₂O, seguida por extração com éter etílico (3 x 5 mL). O extrato orgânico foi lavado com 3 mL de solução aquosa de HCl 1% gelado, 3 mL de solução aquosa saturada de NaHCO₃ e 3 mL de solução aquosa saturada de NaCl. O extrato orgânico foi então seco com MgSO₄ anidro e concentrado em rotaevaporador. O produto foi purificado por cromatografia *flash* (10% de AcOEt/hexano) fornecendo 127,6 mg do aduto de aldol protegido **20** em 93% de rendimento como um óleo incolor.

Rf 0,64 (30% AcOEt/hexano).

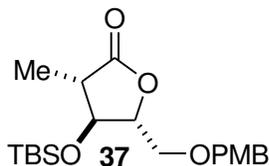
**(3S,4S,5R)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(hidroximetil)-3-metil-diidrofuran-2(3H)-ona
(21a)**



A uma solução de NMO (1,17 g; 10,0 mmol) em 50 mL de acetona:água (8:1) a 0 °C foi adicionada uma solução 0,2 M de OsO₄ (2 mL; 0,4 mmol). Após 5 minutos de agitação, uma solução da olefina **20** (2,02 g; 5,00 mmol) em 5 mL de acetona foi adicionada à solução via cânula. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 10 horas a temperatura ambiente e então foi finalizada com a adição de 10 mL de uma solução de Na₂S₂O₅ 45% (m/V), permanecendo em agitação por mais 40 minutos. Transcorrido este período, a mistura reacional foi filtrada, e em seguida, o solvente foi evaporado, seguida por extração com acetato de etila (3 x 10 mL). O extrato orgânico foi então lavado com 15 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seco com MgSO₄ anidro e concentrado. Purificação através de cromatografia *flash* (50% de AcOEt/hexano) forneceu 911,4 mg de **23a** como um óleo incolor em 70% de rendimento.

Rf 0,58 (30% AcOEt/hexano).

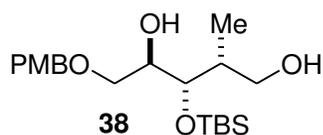
**(3S,4S,5R)-4-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(4-metoxibenziloxi)-3-metilciclopentano-na
(37)**



A uma solução da lactona **23a** (2,0 g; 9,58 mmol) em 48 mL de CH₂Cl₂ foi adicionado tricloroacetimidato de *p*-metoxibenzila (3,25 g; 11,55 mmol) e ácido canforsulfônico (62,0 mg; 0,27 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 12 h. Transcorrido este período, a reação foi finalizada e lavada com 20 mL de solução aquosa saturada de NaHCO₃, 15 mL de solução aquosa saturada de NaCl e 15 mL de água destilada. As fases orgânicas combinadas foram secas com MgSO₄ anidro e concentradas. Purificação através de cromatografia *flash* (20% AcOEt/hexano) forneceu 2,5 g do éter de PMB **37** como um óleo amarelo em 85% de rendimento.

Rf 0,50 (20% AcOEt/hexano).

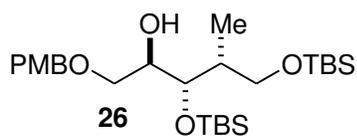
(2*R*,3*S*,4*R*)-3-(*t*-butildimetilsililoxi)-5-(4-metoxibenziloxi)-2-metilpentano-1,4-diol (38)



A uma solução da lactona **37** (2,1 g; 5,52 mmol) em 37 mL de THF e 4,0 mL de H₂O à temperatura ambiente, foi adicionado NaBH₄ (1,25 g; 33,1 mmol). Após 2 horas, a reação foi finalizada com a adição de 130 mL de éter e 14 mL de HCl 1%. Levou-se a 0 °C e adicionou-se 13 mL de ácido acético agitando a mistura por 30 min. Após esse tempo, a mistura foi extraída com éter etílico (3 x 20 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas com MgSO₄ anidro e concentradas em rotaevaporador. Purificação através de cromatografia *flash* (40% AcOEt/hexano) forneceu 1,89 g do diol **38** em 89% de rendimento como um óleo incolor.

Rf 0,30 (40% AcOEt/hexano).

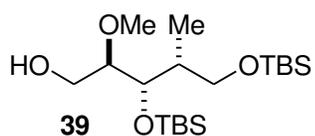
(2*S*,3*S*,4*R*)-3,5-bis(*t*-butildimetilsililoxi)-1-(4-metoxibenziloxi)-4-metilpentan-2-ol (26)



A uma solução do diol **38** (850,0 mg; 2,21 mmol) em 23 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C foi adicionado imidazol (241,7 mg; 3,54 mmol) e TBSCl (437,3 mg; 2,87 mmol). Após 1h, a reação foi finalizada com a adição de 20 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seguida por extração com CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). O extrato orgânico combinado foi seco com MgSO₄ anidro e concentrado. Purificação através de cromatografia *flash* (20% AcOEt/hexano) forneceu 950 mg do éter de silício **26** em 93% de rendimento como um óleo incolor.

Rf 0,61 (40% AcOEt/hexano).

(2*S*,3*S*,4*R*)-3,5-bis(*t*-butildimetilsililoxi)-2-metoxi-4-metilpentan-1-ol (39)

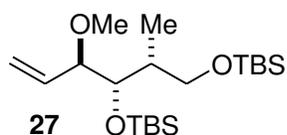


A uma solução do álcool **26** (930,0 mg; 1,87 mmol) em 47 mL de CH₂Cl₂, a temperatura ambiente sob atmosfera de argônio e no escuro, foi adicionado próton esponja (794,7 mg; 3,74 mmol) e Me₃OBF₄ (467,1 mg; 3,27 mmol). Após 12 h de reação no escuro, a reação foi finalizada com a adição de 25 mL de HCl 1% gelado, seguida por extração com éter etílico (3 x 30 mL). O extrato orgânico combinado foi filtrado em sílica, seco com MgSO₄ e evaporado sob vácuo.

O bruto reacional foi diluído em 20 mL de CH₂Cl₂ e 1,0 mL de H₂O, seguido pela adição de DDQ (510,0 mg; 1,87 mmol) a temperatura ambiente. Após 2 horas, lavou-se a mistura reacional com 20 mL de solução aquosa saturada de NaHCO₃ e 10 mL de solução aquosa saturada de NaCl, seguido pela extração com CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). As fases orgânicas reunidas foram secas com MgSO₄ anidro e concentradas em rotaevaporador. O produto foi purificado através de cromatografia *flash* (20% AcOEt/hexano) fornecendo 580 mg do álcool **39** em 79% de rendimento.

Rf 0,53 (20% AcOEt/hexano).

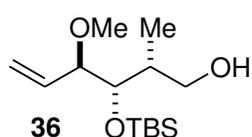
(2*R*,3*S*,4*R*)-1,2-bis(*t*-butildimetilsililoxi)-4-metoxi-2-metilex-5-eno (**27**)



A uma solução do álcool **39** (570,0 mg; 1,45 mmol) em 29 mL de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, agitadas previamente com peneira molecular em pó por 15 minutos, foi adicionado NMO (254,8 mg; 2,17 mmol). Após 15 minutos, TPAP (26,3 mg; 0,0725 mmol) foi adicionado à mistura reacional e esta foi mantida por agitação por 30 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi filtrada em sílica e evaporada sob vácuo. A uma suspensão de Ph₃PCH₃Br (2,59 g; 7,24 mmol) em 6,27 mL de THF a 0 °C, foi adicionado 4,0 mL de *n*-BuLi 1,6 M lentamente. A solução foi levada a temperatura ambiente e em seguida à □78 °C. O aldeído, sem prévia purificação, foi diluído em 7,0 mL de THF e sob atmosfera de argônio, foi adicionado lentamente à solução. A mistura foi elevada a temperatura ambiente e mantida em agitação por 1 hora, sendo finalizada com adição de 28 mL de solução aquosa saturada de NH₄Cl. A mistura foi extraída 3 vezes com acetato de etila, evaporada a vácuo e o produto purificado através de cromatografia *flash* (20% AcOEt/hexano) fornecendo 454,0 mg do produto **27** em 83% de rendimento.

Rf 0,74 (20% AcOEt/hexano).

(2*R*,3*S*,4*R*)-3-(*t*-butildimetilsililoxi)-4-metoxi-2-metilex-5-en-1-ol (**36**)

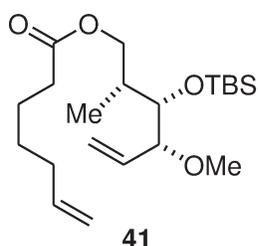


A uma solução do éter de silício **27** (200 mg; 0,53 mmol) em 2 mL de THF a 0 °C em frasco de polietileno, adicionou-se 5,0 mL de solução estoque de HF-piridina (1 mL de HF-piridina, 4 mL de piridina e 5 mL de THF). A reação foi mantida sob agitação por 12 h a temperatura

ambiente e após esse tempo, diluiu-se a mistura reacional em 12 mL de éter etílico e adicionou-se NaHCO_3 em pó até a mistura reacional alcançar pH 7, deixando-se sob agitação por 10 min. A mistura resultante foi filtrada e evaporada sob vácuo fornecendo 104,3 mg do álcool **36** como um óleo incolor em 71% de rendimento após purificação por cromatografia *flash* (40% AcOEt/hexano).

Rf 0,25 (20% AcOEt/hexano).

(2*R*,3*S*,4*R*)-3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-4-metoxi-2-metilhex-5-en-1-il-hept-6-enoato (41)



41

A uma solução do ácido 6-heptenóico (33,3 mg; 0,26 mmol) em 2 mL de CH_2Cl_2 adicionou-se, sob atmosfera de argônio, DCC (54,0 mg; 0,26 mmol) e DMAP (8,0 mg; 0,06 mmol) a temperatura ambiente. Por meio de uma cânula, adicionou-se o álcool **36** (36 mg; 0,13 mmol) em 1 mL de CH_2Cl_2 . Após agitação por 12 h, evaporou-se o solvente e o material foi submetido à purificação

através de cromatografia em coluna (20% AcOEt/hexano) fornecendo 40,5 mg do éster **41** em 87% de rendimento.

Rf 0,85 (10% AcOEt/hexano).

RMN ^1H (CDCl_3 , 250 MHz): δ (ppm) 0,04 (s, 3H); 0,05 (s, 3H); 0,89 (s, 9 H); 0,93 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H); 1,48 - 1,35 (m, 2H); 1,69 - 1,57 (m, 2H); 2,12 - 2,01 (m, 2H); 2,43 - 2,21 (m, 2 H); 3,23 (s, 3H); 3,48 - 3,38 (m, 1H); 3,76 - 3,73 (m, 1H); 3,97 - 3,91 (m, 2H); 5,32 - 4,93 (m, 4H); 5,87 - 5,65 (m, 2H).

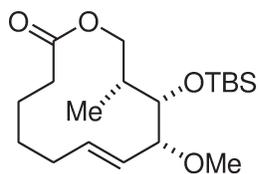
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 62,5 MHz): δ (ppm) -4,7; -3,5; 11,5; 18,5; 24,4; 25,8; 26,1; 28,3; 33,4; 34,2; 35,3; 56,0; 66,7; 74,2; 84,9; 114,7; 119,4; 135,9; 138,4; 173,6.

$[\alpha]_D^{20}$ -46 (c 1,3; CHCl_3).

IV (filme, cm^{-1}): 3055, 2955, 2930, 2857, 1731, 1640, 1471, 1422, 1266, 1097, 1005, 930, 741.

HRMS calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Si}$ [M^+]: 384,2696; encontrado 384,2764.

(9R,10S,11R,E)-10-((tert-butildimetilsilil)oxi)-9-metoxi-11-metiloxaciclododec-7-en-2-ona (42)



42

A uma solução do éster **41** (25,0 mg; 0,06 mmol) em 250 mL de tolueno, foi adicionado o catalisador de Grubbs 2.^a geração (11,0 mg; 0,012 mmol) e o sistema reacional foi agitado sob refluxo durante 3 minutos. Após este tempo, a mistura reacional foi levada à -78 °C e filtrada em uma coluna de sílica com CH₂Cl₂ como

solvente. Após purificação por cromatografia *flash* (40% de AcOEt/hexano) 21,1 mg da macrolactona **42** foi obtida em 90% de rendimento.

Rf 0,46 (5% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,07 (s, 3H); 0,10 (s, 3H); 0,91 (s, 9H); 0,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H); 1,51 – 1,40 (m, 1H); 1,79 – 1,62 (m, 3H); 2,39 – 1,94 (m, 5H); 3,29 (s, 1H); 3,44 (dd, *J* = 7,7, 11,2 Hz, 1H); 3,71 (dd, *J* = 1,3, 4,7 Hz, 1H); 3,77 (d, *J* = 6,9 Hz, 1H); 4,47 (dd, *J* = 2,8, 11,2 Hz, 1H); 5,37 (dd, *J* = 6,9, 16,0, 1H); 5,62 (dt, *J* = 6,9, 16,0, 1H).

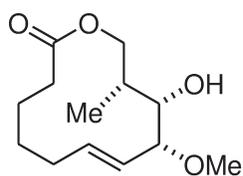
RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) -4,8; -4,1; 13,7; 18,2; 22,9; 25,9; 28,5; 29,6; 34,5; 57,2; 65,8; 78,0; 85,4; 130,1; 133,5; 173,5.

[α]_D²⁰ -13 (*c* 0,7; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3019, 2955, 2930, 2857, 1723, 1252, 1107, 1007, 838, 768, 669.

HRMS calculada para C₁₉H₃₆O₄Si [M⁺]: 356,2383, encontrado 356,2461.

(9R,10S,11R,E)-10-hidroxi-9-metoxi-11-metiloxaciclododec-7-en-2-ona (34a)



34a

A uma solução da lactona **42** (21,1 mg; 0,06 mmol), a 0 °C em 2,16 mL de THF anidro, foi adicionado 1,6 mL de solução de HF-piridina lentamente e em seguida, a mistura foi elevada a temperatura ambiente e agitada durante 24 horas. Após este tempo, foi adicionado 1,96 mL de MeOTMS a 0 °C e a mistura reacional foi

agitada por 10 minutos. Após purificação por cromatografia *flash* (40% de AcOEt/hexano), 10,9 mg da macrolactona **34a** desprotegida foi obtida em 76% de rendimento.

Rf 0,56 (40% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) 1,02 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H); 1,82 – 1,64 (m, 3H); 2,35 – 2,00 (m, 6H); 3,28 (s, 1H); 3,49 (dd, *J* = 9,0, 11,5 Hz, 1H); 3,61 (dt, *J* = 2,7; 6,7 Hz, 1H); 3,84 (dd, *J* = 2,7, 8,3 Hz, 1H); 4,40 (dd, *J* = 2,7, 11,5 Hz, 1H); 5,42 (DDT, *J* = 1,5, 8,3, 16,0 Hz, 1H); 5,82 (dddd *J* = 0,8, 5,5, 8,3, 16,0 Hz, 1H).

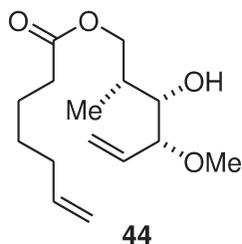
RMN ¹³C (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) 13,7; 23,3; 29,1; 30,0; 34,0; 34,4; 56,3; 66,7; 76,9; 84,8; 127,8; 136,9; 173,5.

[α]_D²⁰ -50 (*c* 1,0; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3488, 3025, 2984, 2934, 2880, 1725, 1448, 1266, 1146, 757, 741.

HRMS calculada para C₁₃H₂₂O₄ [M⁺]: 242,1518, encontrado 242,1596.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3-hidroxy-4-methoxy-2-methylhex-5-en-1-yl hept-6-enoate (44)



A uma solução do éster **41** (70,0 mg; 0,18 mmol) em 7,0 mL de THF anidro a 0 °C foi adicionado 1,6 mL de solução HF-piridina lentamente e a mistura reacional foi mantida sob agitação durante 24 h a temperatura ambiente. Na seqüência, foram adicionados 6,5 mL de MeOTMS a 0°C e a mistura foi agitada por 10 minutos. Os solventes foram removidos a pressão reduzida e o bruto reacional foi purificado por cromatografia *flash* (40% AcOEt/hexano) fornecendo 33,0 mg do éster **44** em 67% de rendimento.

R_f 0.10 (5% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,95 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 1,68 – 1,34 (m, 4 H); 2,09 – 2,01 (m, 4H); 2,30 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H); 3,27 (s, 3H); 3,61 – 3,50 (m, 2H); 4,13 – 3,93 (m, 2H); 5,02 – 4,91 (m, 2H); 5,40 – 5,29 (m, 2H); 5,85 – 5,67 (m, 2H).

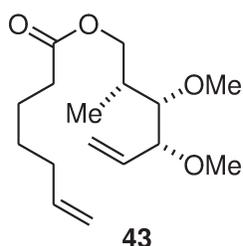
¹³C NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) 10,8; 24,4; 28,3; 33,3; 33,8; 34,1; 56,4; 66,6; 72,4; 83,8; 114,7; 120,5; 135,3; 138,3; 173,8.

[α]_D²⁰ -21 (*c* 0,7; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3498, 3078, 2979, 2934, 2825, 1726, 1265, 1216, 758, 704.

HRMS calculada para C₁₅H₂₆O₄ [M⁺]: 270,1831, encontrada 270,1909.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3,4-dimetoxi-2-metilhex-5-en-1-il hept-6-enoato (**43**)



43

A uma solução do éster **44** (21,3 mg; 0,09 mmol) em 2,5 mL de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, sob atmosfera de argônio e no escuro, foi adicionado próton esponja (38,0 mg; 0,178 mmol) e Me₃OBF₄ (23,0 mg; 0,155 mmol). Após 12 h de reação no escuro, a reação foi finalizada com a adição de 1,2 mL de HCl 1% gelado, seguida por extração com etílico (3 x 5 mL). O extrato orgânico combinado foi filtrado em sílica, seco com MgSO₄ e evaporado sob pressão reduzida. O bruto reacional foi purificado por cromatografia *flash* (30% AcOEt/hexano) fornecendo 12,0 mg do éster **43** in 78% de rendimento.

Rf 0.70 (20% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,92 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 1,47 – 1,35 (m, 2 H); 1,70 – 1,58 (m, 2H); 2,10 – 2,01 (m, 2H); 2,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H); 3,17 (dd, *J* = 3,5, 6,7 Hz, 1H); 3,26 (s, 3H); 3,38 (s, 3H); 3,58 – 3,52 (m, 1H); 3,99 (d, *J* = 6,7 Hz, 2H); 5,03 – 4,91 (m, 2H); 5,35 – 5,26 (m, 2H); 5,86 – 5,70 (m, 2H).

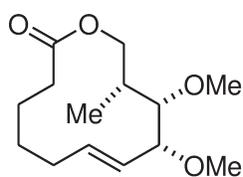
¹³C NMR (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) 11,0; 24,5; 28,3; 33,3; 34,1; 34,2; 56,4; 60,5; 66,6; 83,1; 83,2; 114,7; 119,1; 136,1; 138,4; 173,7.

[α]_D²⁰ -27 (*c* 1,2; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3078, 2978, 2933, 2824, 1734, 1463, 1110, 704, 664.

HRMS calculada para C₁₆H₂₈O₄ [M⁺]: 284,1988, encontrado 284,2066.

(9*R*,10*S*,11*R*,*E*)-9,10-dimetoxi-11-metiloxaciclodec-7-en-2-ona (**34b**)



34b

A uma solução do éster **43** (10,0 mg; 0,04 mmol) em 137 mL de tolueno foi adicionado o catalisador de Grubbs 2.^a geração (6,0 mg; 0,006 mmol) e o sistema reacional foi agitado sob refluxo durante 3 minutos. Após este tempo, a mistura reacional foi levada a -78 °C e filtrada em uma coluna de sílica com CH₂Cl₂. Após purificação por cromatografia *flash* (30% de AcOEt/hexano) 4,6 mg da macrolactona **34b** foram obtidas em 51% de rendimento.

Rf 0.80 (30% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 1,02 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H); 2,42 – 1,61 (m, 6H); 3,13 (dd, *J* = 1,8, 5,1, 1H); 3,32 – 3,24 (m, 1H); 3,30 (s, 3H); 3,48 – 3,41 (m, 1H); 3,46 (s, 3H); 3,55 – 3,50 (m, 1H); 4,05 – 4,02 (m, 1H); 4,45 (dd, *J* = 2,8, 11,2 Hz, 1H); 5,38 (dd, *J* = 6,9, 16,0, 1H); 5,71 – 5,58 (m, 1H).

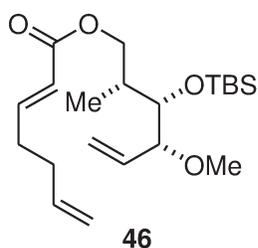
RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) 13,6; 22,8; 28,3; 29,5; 32,9; 34,6; 57,2; 58,4; 66,6; 81,4; 87,0; 130,5; 133,3; 173,5.

[α]_D²⁰ -47 (c 0,45; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3054, 2984, 2933, 1725, 1448, 1265, 1102, 1050, 740, 704.

HRMS calculada para C₁₄H₂₄O₄Si [M⁺]: 256,1675, encontrado 256,1572.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-4-metoxi-2-metilhex-5-en-1-il-hept-2,6-dienoato (46)



A uma solução do ácido 2,6-heptadienóico (220,0 mg; 1,72 mmol) em 130,0 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se sob atmosfera de argônio, DCC (196,0 mg; 0,94 mmol) e DMAP (53,0 mg; 0,43 mmol) a temperatura ambiente. Por meio de uma cânula, adicionou-se o álcool **36** (240,0 mg; 0,86 mmol) em 70,0 mL de CH₂Cl₂. Após agitação por 12 h, evaporou-se o solvente e o material foi submetido a purificação através de cromatografia em coluna (20% AcOEt/hexano) fornecendo 178,0 mg do éster **46** em 55% de rendimento.

R_f 0,95 (10% AcOEt/hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,02 (s, 3H); 0,04 (s, 3H); 0,87 (s, 9 H); 0,93 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 2,34 - 2,13 (m, 5H); 3,23 (s, 3H); 3,44 – 3,39 (m, 1H); 3,78 – 3,75 (m, 1H); 4,07 – 3,92 (m, 2H); 5,32 - 4,98 (m, 4H); 5,87 - 5,66 (m, 3H); 7,00 – 6,89 (m, 1H).

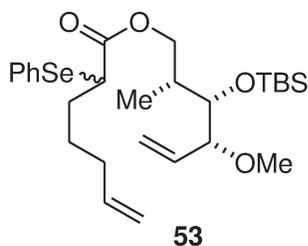
RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) -4,6; -3,4; 11,5; 18,5; 24,4; 26,1; 31,5; 32,1; 35,4; 56,0; 66,7; 74,2; 84,9; 115,5; 119,4; 121,7; 135,9; 137,1; 148,3; 166,6.

[α]_D²⁰ -25 (c 0,45; CHCl₃).

IV (filme, cm⁻¹): 3053, 2955, 2930, 2857, 1719, 1655, 1471, 1422, 1266, 1097, 1005, 930, 740.

HRMS calculada para C₂₁H₃₈O₄Si [M⁺]: 382,2539; encontrado 382,2672.

(2*R*,3*S*,4*R*)-3-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-4-metoxi-2-metilhex-5-en-1-il-2-fenilseleneto-hept-6-enoato (53**)**



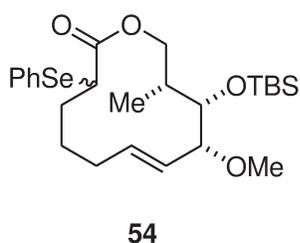
A uma solução do ácido 2-fenilseleneto-6-heptenóico (46,0 mg; 0,165 mmol) em 4,7 mL de CH₂Cl₂ adicionou-se, sob atmosfera de argônio, DCC (89,0 mg; 0,43 mmol) e DMAP (32,0 mg; 0,28 mmol) a temperatura ambiente. Por meio de uma cânula, adicionou-se o álcool **36** (80,0 mg; 0,28 mmol) em 2,3 mL de CH₂Cl₂. Após agitação por 12 h, evaporou-se o solvente e o

material foi submetido a purificação através de cromatografia em coluna (20% AcOEt/hexano) fornecendo 33,0 mg do éster **53** em 40% de rendimento.

Rf 0,59 (3% AcOEt/hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,01 (s, 3H); 0,03 (s, 3H); 0,87 (s, 9 H); 0,90 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 2,08 - 1,40 (m, 8H); 3,22 (s, 3H); 3,45 - 3,39 (m, 1H); 3,61 - 3,59 (m, 1H); 3,69 - 3,63 (m, 1H); 3,96 - 3,92 (m, 1H); 5,00 - 4,91 (m, 2H); 5,31 - 5,19 (m, 2H); 5,79 - 5,66 (m, 2H); 7,29 - 7,27 (m, 3H); 7,60 - 7,56 (m, 2H).

(9*R*,10*S*,11*R*,*E*)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-9-metoxi-11-metiloxaciclododec-2-fenilseleneto-7-en-2-ona (54**)**



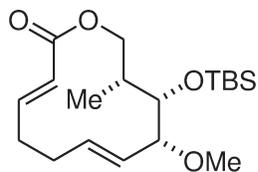
A uma solução do éster **53** (33,0 mg; 0,06 mmol) em 235,0 mL de tolueno foi adicionado o catalisador de Grubbs de 2^a geração (11,0 mg; 0,01 mmol) e o sistema reacional foi agitado sob refluxo durante 3 minutos. Após este tempo, a mistura reacional foi levada a -78 °C e filtrada em uma coluna de sílica com CH₂Cl₂.

Após purificação por cromatografia *flash* (30% de AcOEt/hexano) 30,1 mg da macrolactona **54** foi obtida em 94% de rendimento.

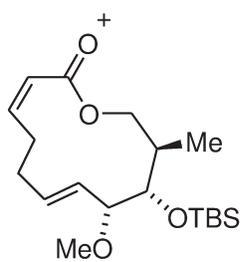
Rf 0.66 (3% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,10 (s, 3H); 0,12 (s, 3H); 0,91 (s, 9 H); 1,10 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 2,11 - 1,58 (m, 7H); 3,32 (s, 3H); 3,55 - 3,46 (m, 2H); 3,65 - 3,64 (m, 1H); 3,85 - 3,67 (m, 1H); 4,47 - 4,42 (m, 1H); 5,41 - 4,31 (m, 1H); 5,68 - 5,56 (m, 1H); 7,31 - 7,27 (m, 3H); 7,59 - 7,55 (m, 2H).

(9*R*,10*S*,11*R*,)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-9-metoxi-11-metil-*E,E*-oxaciclododec-2,7-dien-2-ona (47a) + (9*R*,10*S*,11*R*,)-10-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)-9-metoxi-11-metil-*Z,E*-oxaciclododec-2,7-dien-2-ona (47b)



47a



47b

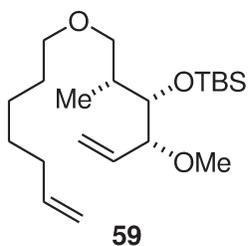
A uma solução da lactona **54** (30,1 mg; 0,062 mmol) em 2,0 mL de THF a 0 °C, foi adicionado NaHCO₃ e H₂O₂ 30%. A mistura reacional foi agitada por 12h a temperatura ambiente e finalizada com adição de 3,0 mL de éter e 1 mL de solução aquosa saturada de NaCl. Após purificação por cromatografia *flash* (30% de AcOEt/hexano) 13,3 mg da mistura das macrolactonas **47a** e **47b** 52% de rendimento.

Rf 0,64 (5% AcOEt/hexano).

¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,11 – 0,06 (m, 12H); 0,90 (s, 9H); 0,91 (s, 9H); 1,10 – 0,98 (m, 6H); 2,38 – 1,79 (m, 8H); 3,10 – 2,88 (m, 2H); 3,25 (s, 3H); 3,32 (s, 3H); 3,75 – 3,42 (m, 6H); 4,57 –

4,42 (m, 4H); 5,70 – 5,39 (m, 4H); 7,84 (s, 1H); 8,00 (s, 1H).

((2*R*,3*S*,4*R*)-1-(hept-6-eniloxi)-4-metoxi-2-metilhex-5-en-3-iloxi)(*tert* butil) dimetilsilano (59)



59

Em um balão contendo Cs₂O₃ (136,00 mg; 0,42 mmol), foi adicionado uma solução do triflato **58** (472,0 mg; 1,68 mmol) em 3,0 mL de CH₂Cl₂. Em seguida, adicionou-se sob atmosfera de argônio, uma solução do álcool **36** (118,0 mg; 0,42 mmol) em 3,0 mL de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente. Após agitação por 12 h, evaporou-se o solvente e o material foi submetido a purificação através de

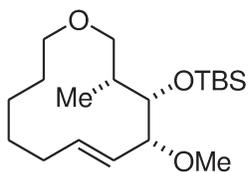
cromatografia em coluna (5% AcOEt/hexano), fornecendo 38,5 mg do éster **59** em 30% de rendimento.

Rf 0,75 (5% AcOEt/hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,03 (s, 3H); 0,06 (s, 3H); 0,87 (s, 9H); 0,90 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 1,59 - 1,17 (m, 5H); 1,99 – 2,08 (m, 3H); 3,80 - 3,18 (m, 10H); 5,28 – 4,91 (m, 4H); 5,88 - 5,67 (m, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 62,5 MHz): δ (ppm) -4,6; -3,5; 11,8; 18,4; 25,7; 26,1; 28,7; 29,6; 33,7; 36,0; 56,0; 70,8; 73,7; 74,5; 85,2; 114,2; 118,9; 136,2; 139,0.

((2R,3S,4R)-ciclo-1-(hept-6-eniloxi)-4-metoxi-2-metilhex-3-iloxi)(tert butil) dimetilsilano (61)



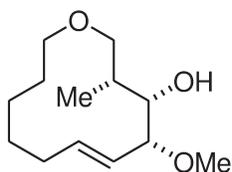
61

A uma solução do éter **59** (13,0 mg; 0,035 mmol) em 135,0 mL de tolueno, foi adicionado o catalisador de Grubbs 2.^a geração (6,0 mg; 0,006 mmol) e o sistema reacional foi agitado sob refluxo durante 3 minutos. Após este tempo, a mistura reacional foi levada à -78 °C e filtrada em uma coluna de sílica gel com CH₂Cl₂. Após purificação por cromatografia *flash* (40% de AcOEt/hexano) 5,0 mg do éter cíclico **61** foi obtido em 42% de rendimento.

Rf 0,53 (10% AcOEt/hexano).

RMN ¹H (CDCl₃, 250 MHz): δ (ppm) 0,07 (s, 3H); 0,10 (s, 3H); 0,91 (s, 9H); 0,95 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 2,16 - 1,24 (m, 9H); 3,37 - 3,23 (m, 7H); 3,89 - 3,78 (m, 2H); 5,65 - 5,36 (m, 2H).

((2R,3S,4R)-ciclo-1-(hept-6-eniloxi)-4-metoxi-2-metilhex-3-hidroxi) éter (62)



62

Ao éter cíclico **61** (5,0 mg; 0,015 mmol) a 0 °C em 0,55 mL de THF anidro, foi adicionado 0,13 mL de solução HF-piridina lentamente. Em seguida, a mistura foi elevada a temperatura ambiente e agitada durante 24 horas. Após este tempo, foi adicionado 0,50 mL de MeOTMS a 0 °C e a mistura reacional foi agitada por 10 minutos. Após purificação por cromatografia *flash* (40% de AcOEt/hexano), 3,0 mg do éter cíclico **62** desprotegido foi obtido em 79% de rendimento.

Rf 0,65 (40% AcOEt/hexano).

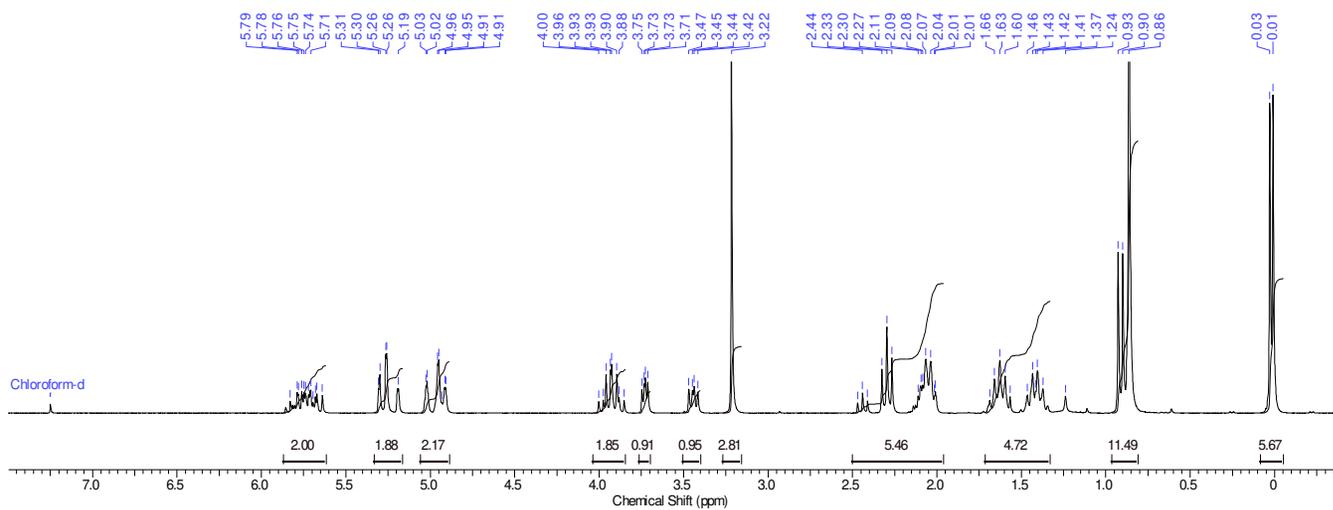
RMN ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ (ppm) 0,94 - 0,86 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H); 1,49 - 1,29 (m, 3H); 2,35 - 1,99 (m, 5H); 3,00 - 2,98 (m, 1H); 3,45 - 3,28 (m, 8H); 3,80 - 3,75 (m, 2H); 5,50 - 5,46 (m, 1H); 5,67 - 5,62 (m, 1H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz): δ (ppm) 13,5; 21,0; 24,4; 26,5; 30,6; 35,1; 56,0; 68,2; 73,2; 77,5; 83,1; 129,0; 133,1.

9. ESPECTROS

GCM-74

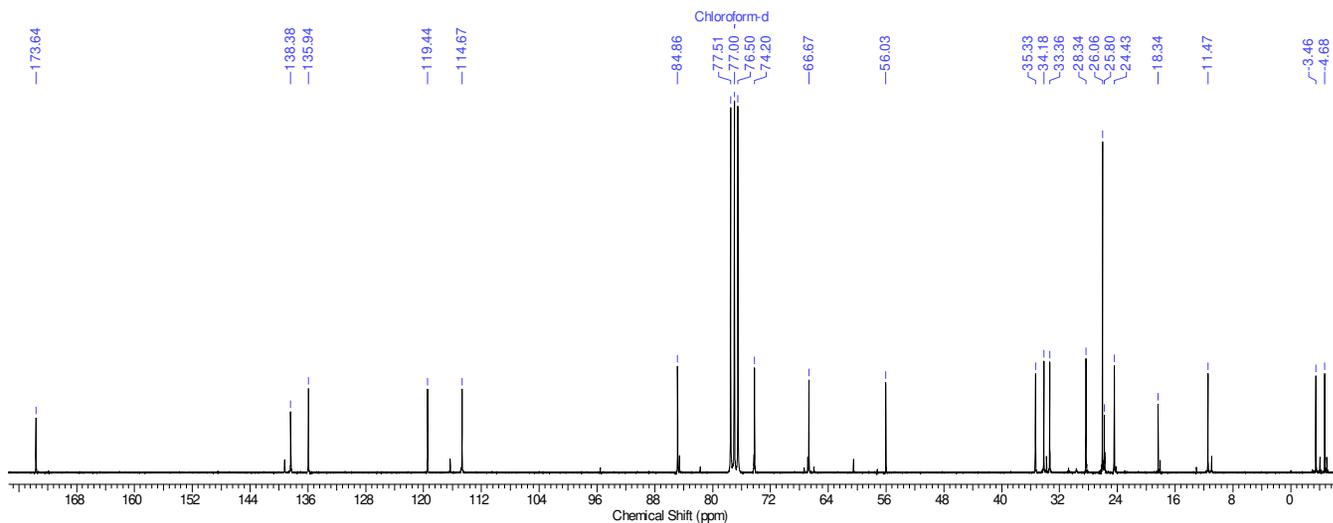
Acquisition Time (sec)	3.1654	Date	21 Jul 2011 17:39:38	Frequency (MHz)	250.13
File Name	\nmrsparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2011/mai11\data/Luiz Carlos\nmr\mai28gcmH1_001001r			Points Count	32768
Nucleus	¹ H	Number of Transients	12	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160



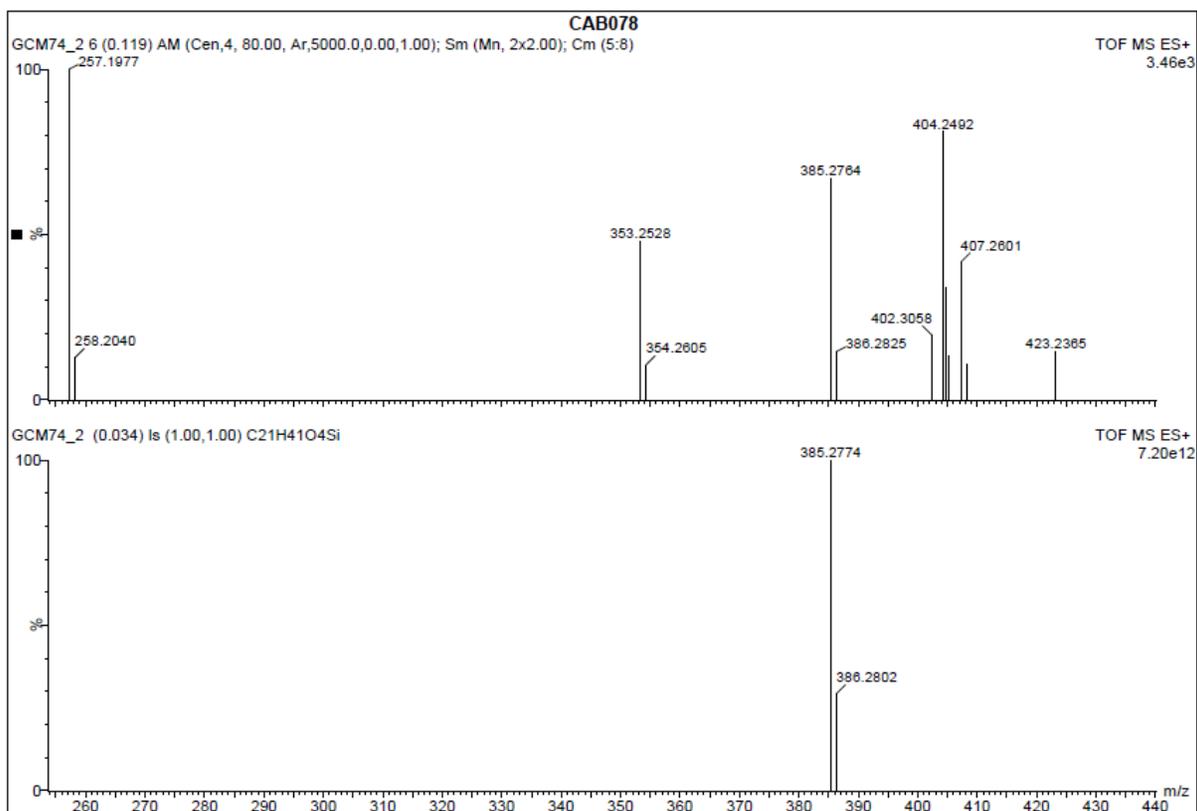
Anexo 0: Espectro de RMN ¹H de **41** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-74

Acquisition Time (sec)	0.5439	Date	21 Jul 2011 17:24:20	Frequency (MHz)	62.90
File Name	\nmrsparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2010/out10\data/Luiz Carlos\nmr\out18gwaC_001001r			Points Count	32768
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	16000	Original Points Count	8192
Pulse Sequence	zpgg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24
				Temperature (degree C)	25.160



Anexo 1: Espectro de RMN ¹³C de **41** (CDCl₃, 75 MHz).



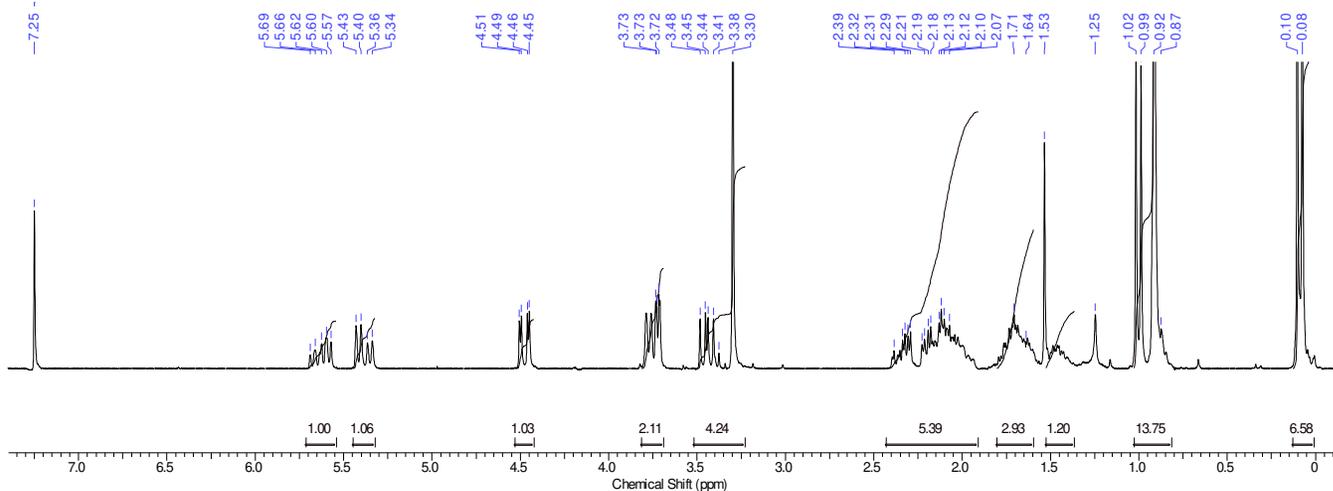
Anexo 2: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de 41.

GCM-82

Gustavo GCM-82 CDCI3 ago04gcmH

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	Gustavo GCM-82 CDCI3 ago04gcmH		Date	04 Aug 2011 18:58:36	
File Name	\nmr\sparc.igcm.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\ago11\data\Luz Carlos\nmr\ago04gcmH_001001r				Frequency (MHz)	250.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	32	Original Points Count	16384	Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98	Temperature (degree C)	25.160

Chloroform-d

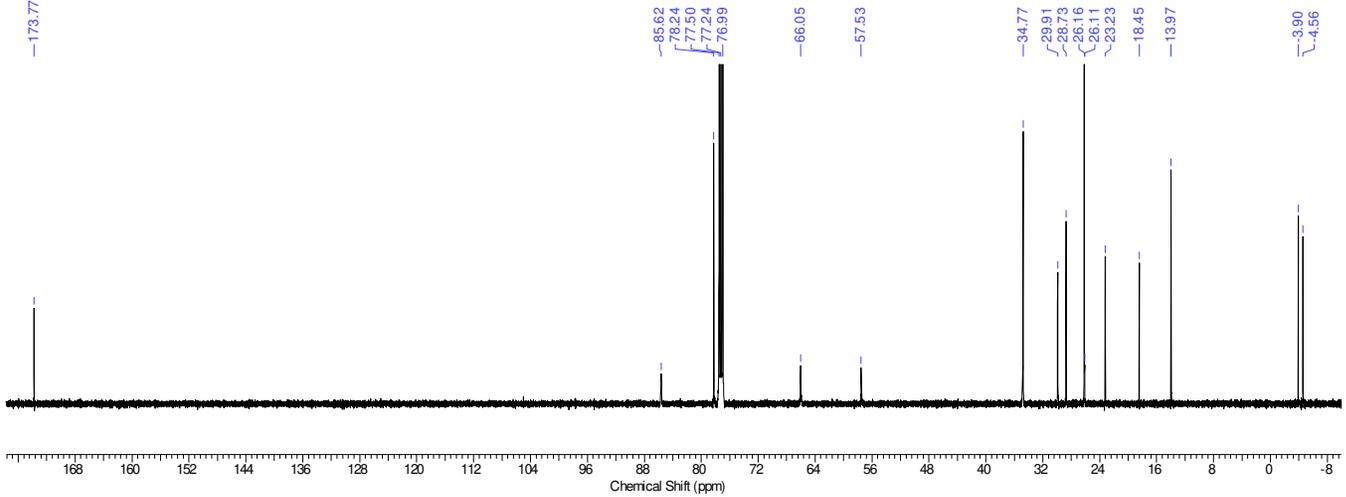


Anexo 3: Espectro de RMN ¹H de 42 (CDCl₃, 250 MHz).

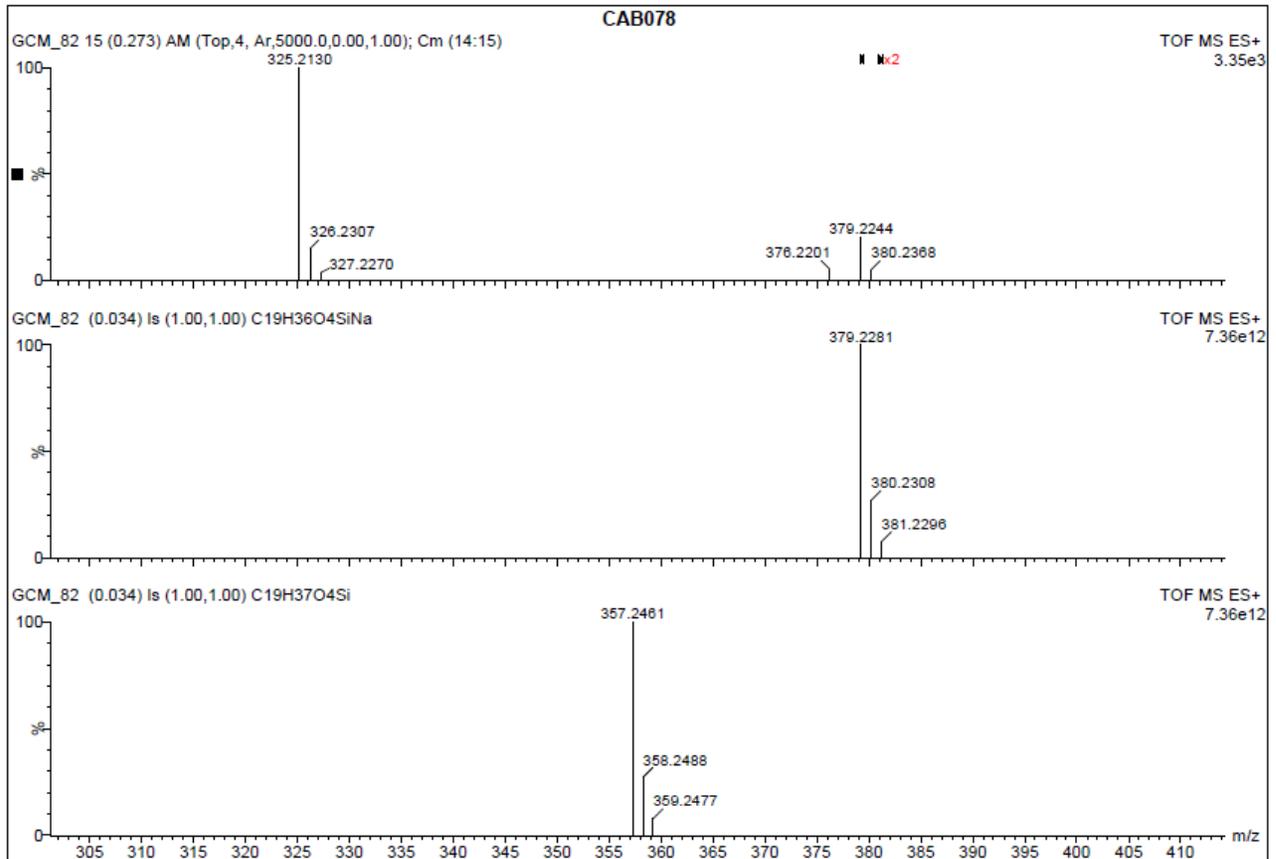
GCM-82

Gustavo GCM-82 cdcl3/bbsw ago09gcmC

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Gustavo GCM-82 cdcl3/bbsw ago09gcmC	Date	Aug 9 2011
File Name	\nmr\sparc.igmp.unicamp.br\spectros\inovat\2011\ago\1\ago09gcmC			Frequency (MHz)	125.71
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	5000	Original Points Count	39230
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-D	Points Count	65536
Temperature (degree C)	24.600			Sweep Width (Hz)	30165.91



Anexo 4: Espectro de RMN ¹³C de 42 (CDCl₃, 125 MHz).

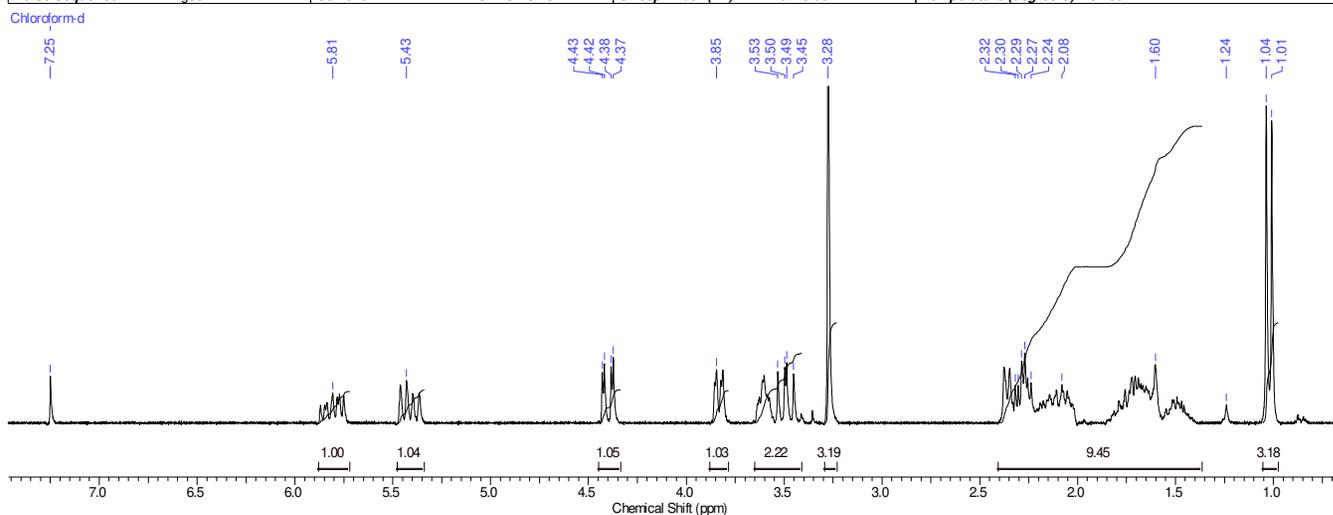


Anexo 5: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de 42.

GCM-85

GCM-85_agosto27_ago27gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	GCM-85 agosto27_ago27gcmH1	Date	27 Aug 2011 15:04:08
File Name	\nmr\sparc.iqm.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\ago11\data\Luz Carlos\nmr\ago27gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	1H	Number of Transients	15	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	25.160

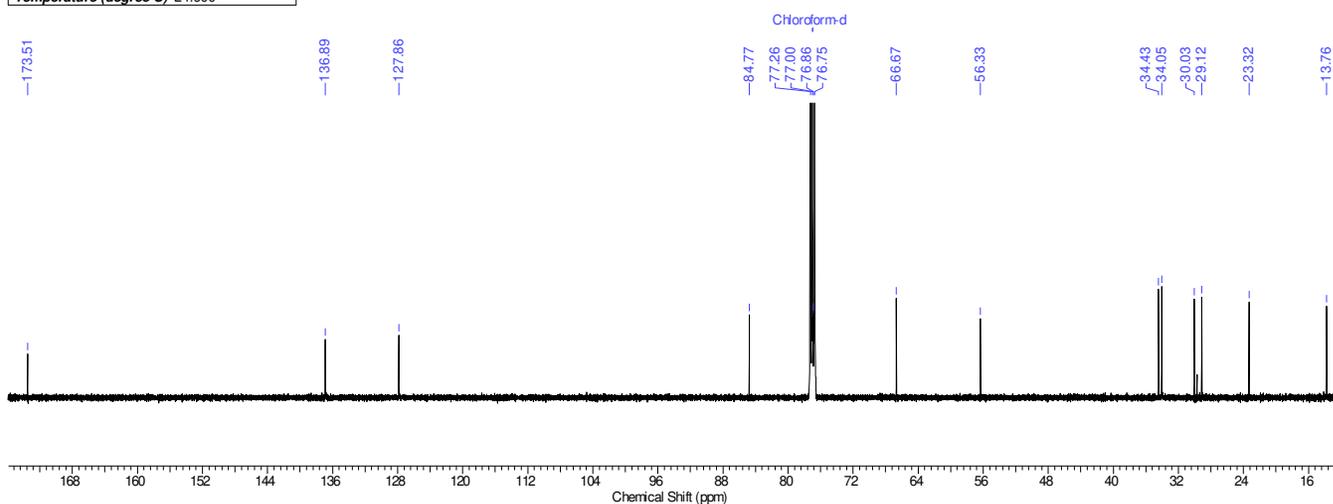


Anexo 6: Espectro de RMN ¹H de **34a** (CDCl₃, 250 MHz).

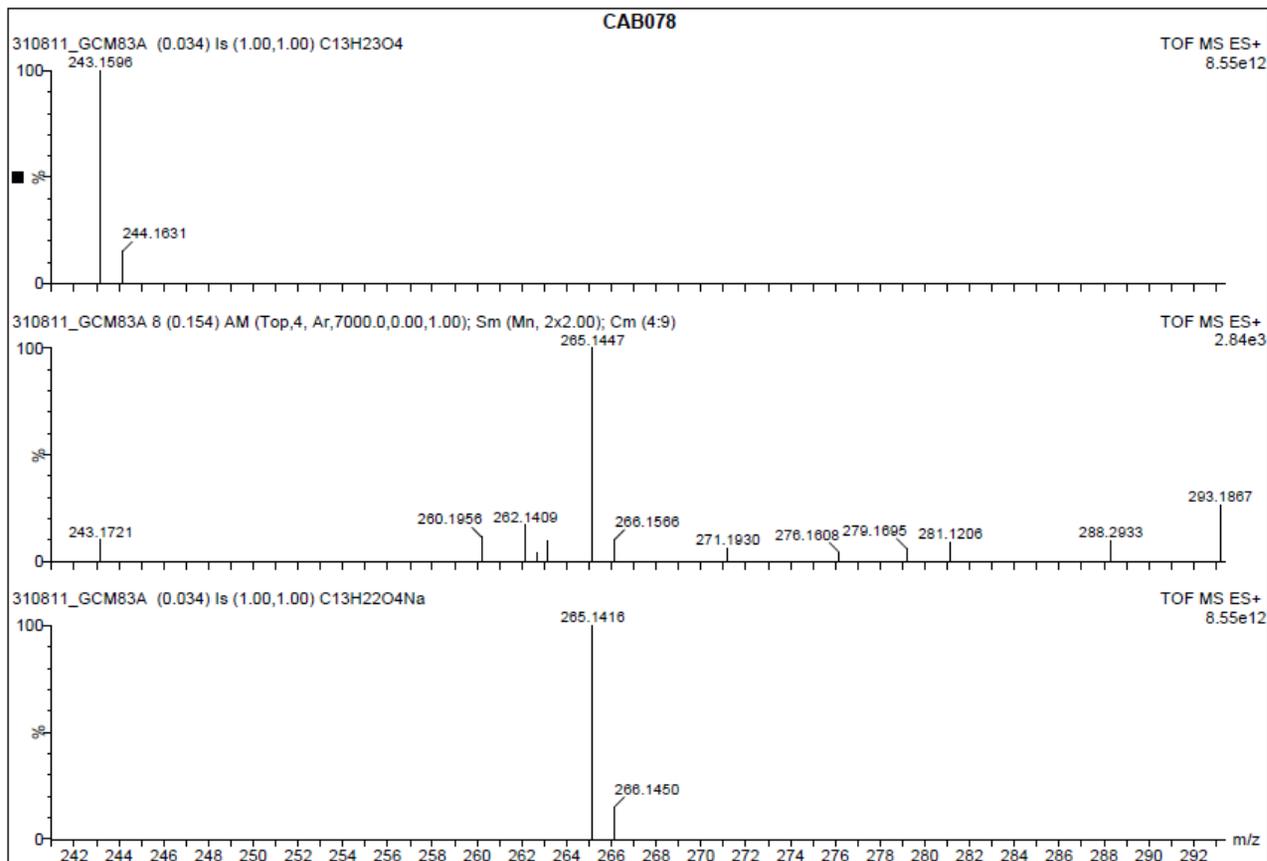
GCM-83

Gustavo "GCM-83A" cdcl3/bbsw ago22gcmC

Acquisition Time (sec)	1.3005	Comment	Gustavo "GCM-83A" cdcl3/bbsw ago22gcmC	Date	Aug 23 2011
File Name	\nmr\sparc.iqm.unicamp.br\espectros\inovat\2011\ago11\ago22gcmC			Frequency (MHz)	125.71
Nucleus	13C	Number of Transients	25000	Original Points Count	39230
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	30165.91
Temperature (degree C)	24.600				



Anexo 7: Espectro de RMN ¹³C de **34a** (CDCl₃, 125 MHz).

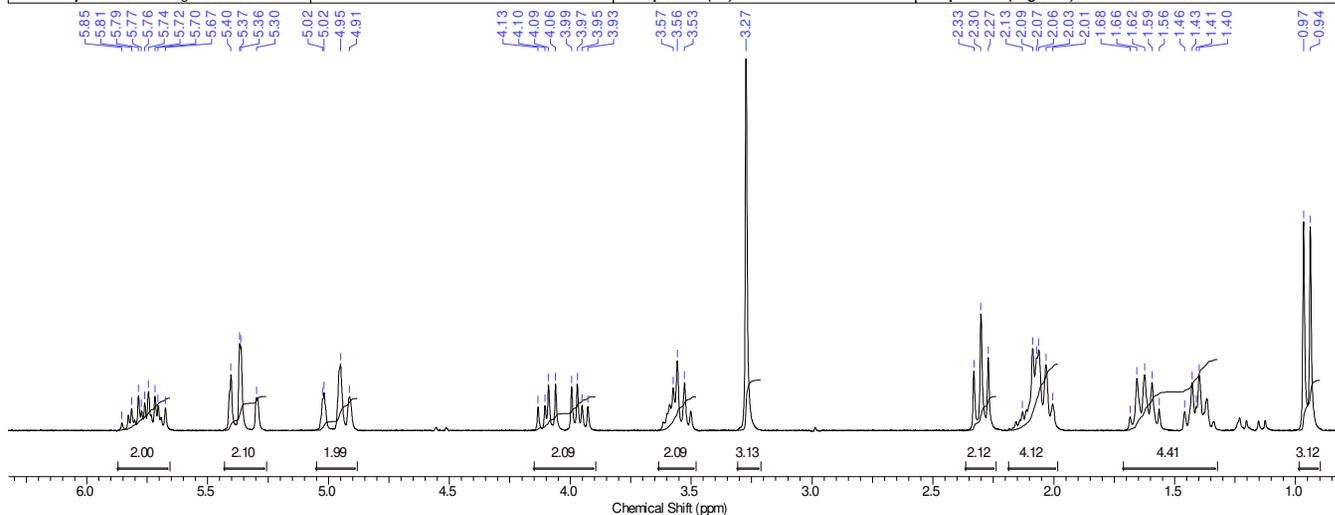


Anexo 8: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de **34a**.

GCM-86

GCM-86_agosto28_ago28gcmH1

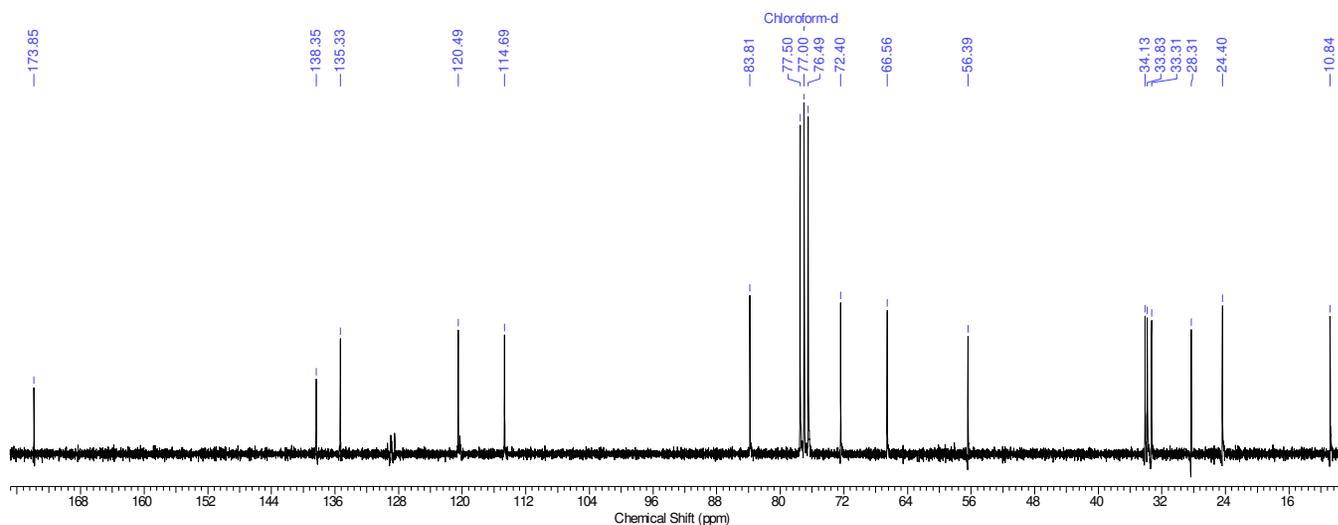
Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	GCM-86_agosto28_ago28gcmH1	Date	28 Aug 2011 19:27:00
File Name	\\nmrparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2011/ago11\data/Luiz_Carlos/nmr/ago28gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	15	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160



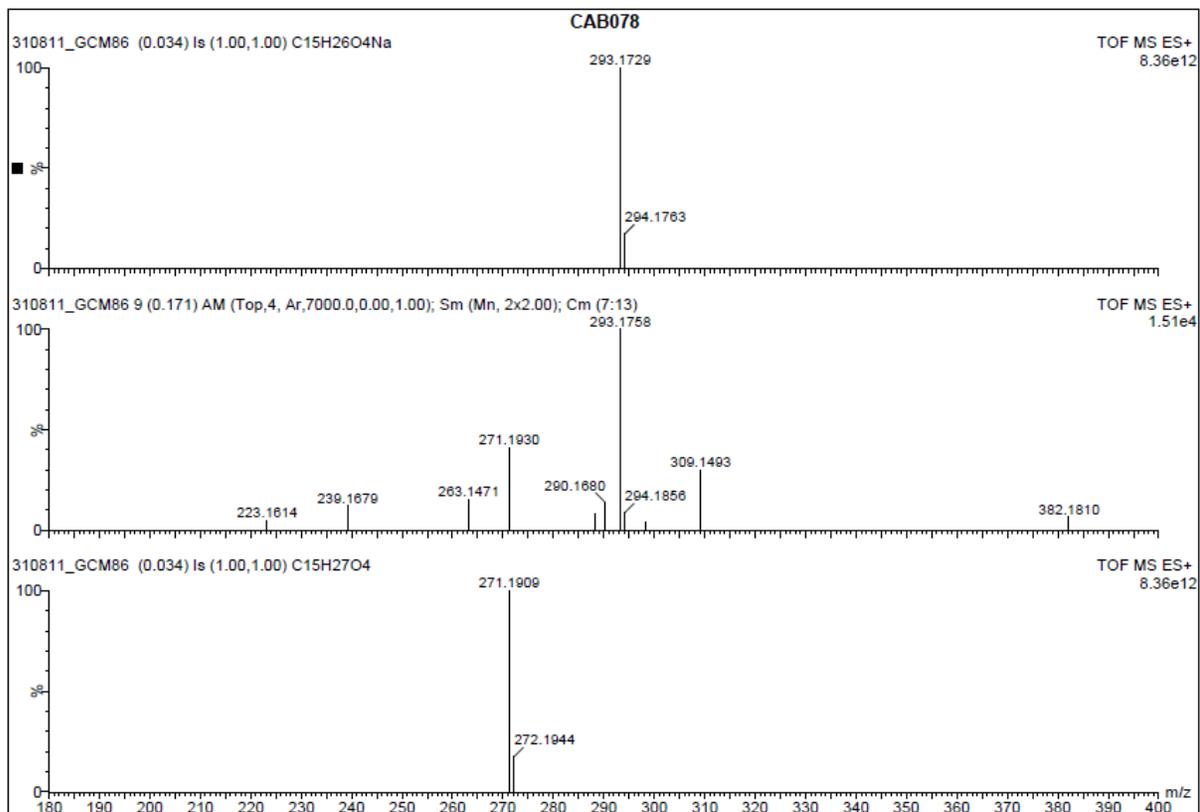
Anexo 9: Espectro de RMN ¹H de **44** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-86

Acquisition Time (sec)	0.5439	Date	28 Aug 2011 20:12:40				
File Name	\nmr\parc.igq.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\ago11\data\Luiz Carlos\nmr\ago28gcmC1_002001r		Frequency (MHz)	62.90			
Nucleus	13C	Number of Transients	700	Original Points Count	8192	Points Count	32768
Pulse Sequence	zpgg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24	Temperature (degree C)	25.160



Anexo 10: Espectro de RMN ^{13}C de **44** (CDCl_3 , 62,5 MHz).

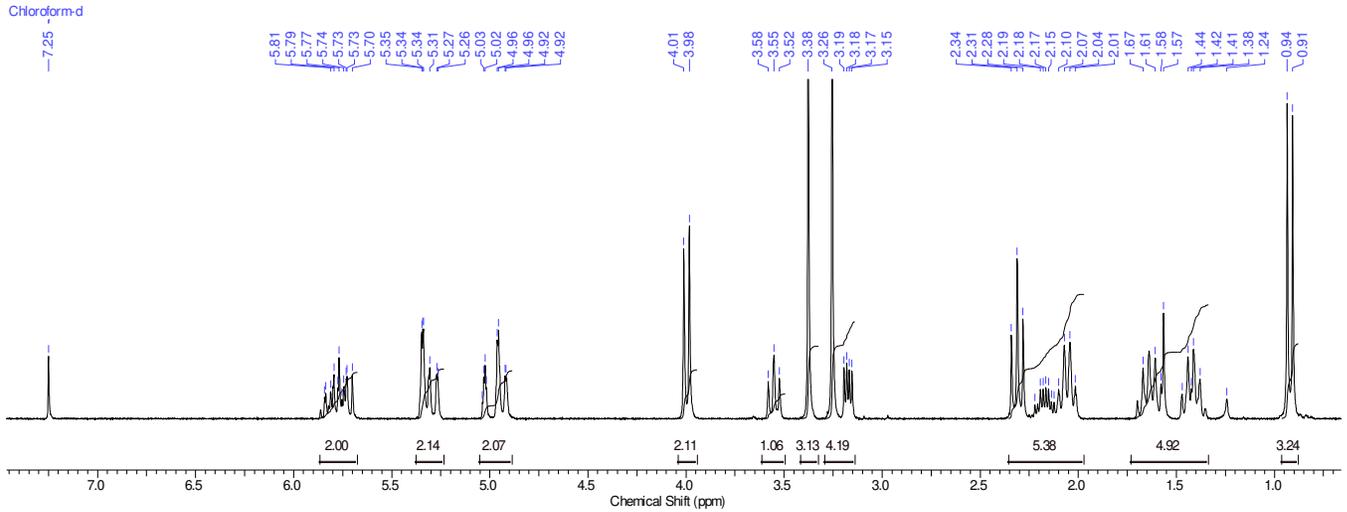


Anexo 11: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de **44**.

GCM-87

GCM-87_agosto30_ago30gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	GCM-87_agosto30_ago30gcmH1	Date	30 Aug 2011 15:00:10
File Name	\nmr\sparc.iqm.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\ago11\data\Luiz Carlos\nmr\ago30gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	¹ H	Number of Transients	50	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	25.160

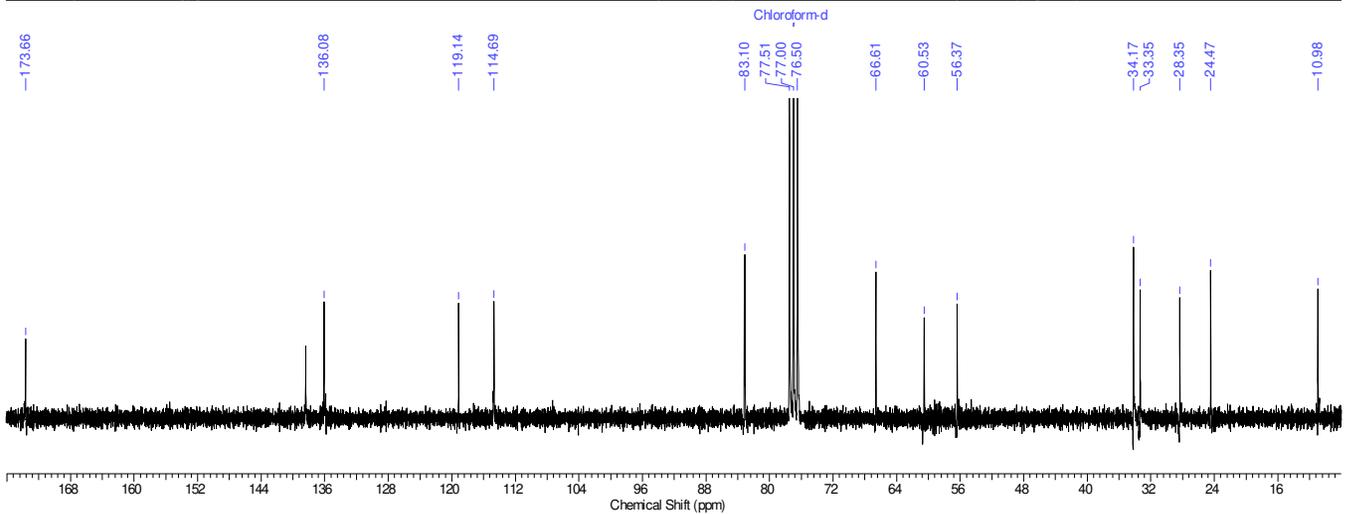


Anexo 12: Espectro de RMN ¹H de 43 (CDCl₃, 250 MHz).

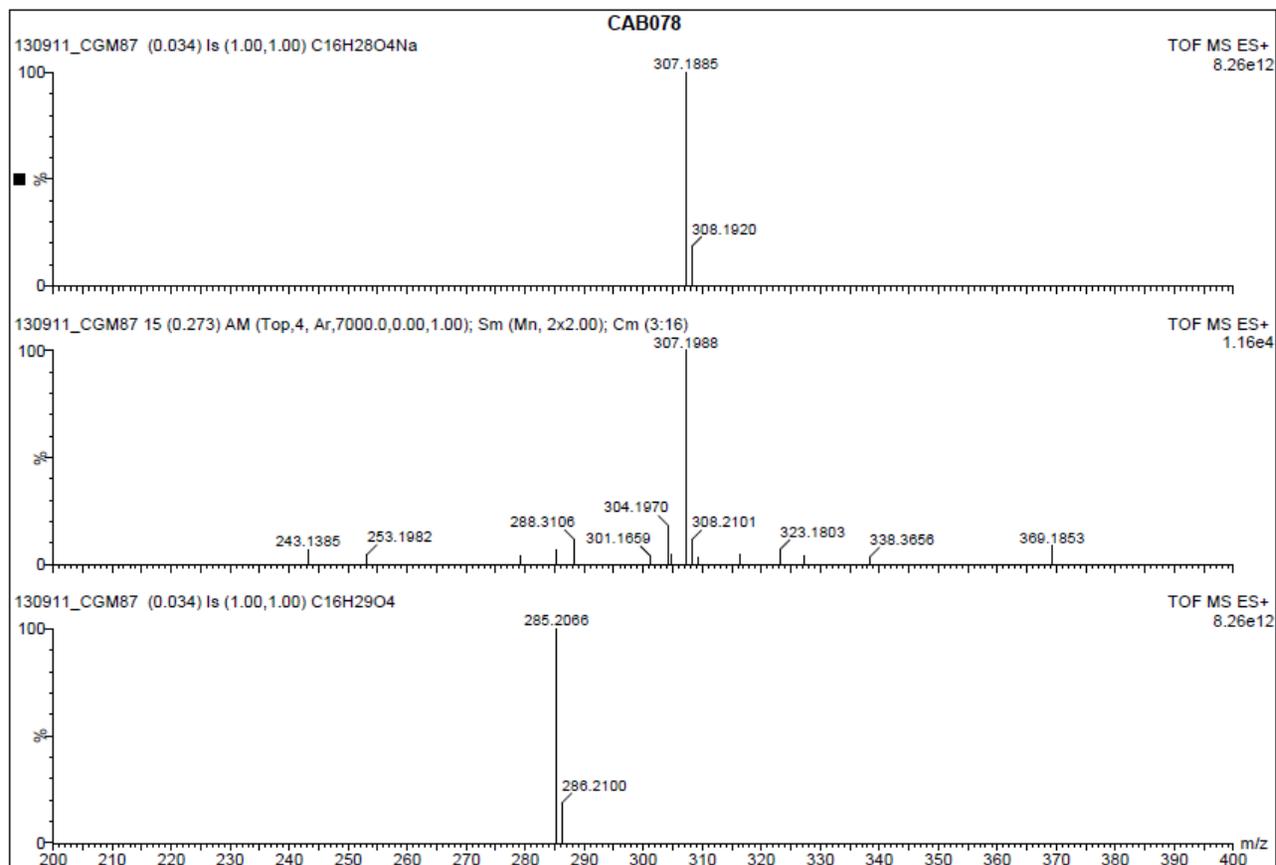
GCM-87

GCM-87_agosto30_ago30gcmC1

Acquisition Time (sec)	0.5439	Comment	GCM-87_agosto30_ago30gcmC1	Date	30 Aug 2011 19:12:20
File Name	\nmr\sparc.iqm.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\ago11\data\Luiz Carlos\nmr\ago30gcmC1_001001r			Frequency (MHz)	62.90
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	1173	Original Points Count	8192
Pulse Sequence	zpgg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	25.160



Anexo 13: Espectro de RMN ¹³C de 43 (CDCl₃, 62,5 MHz).

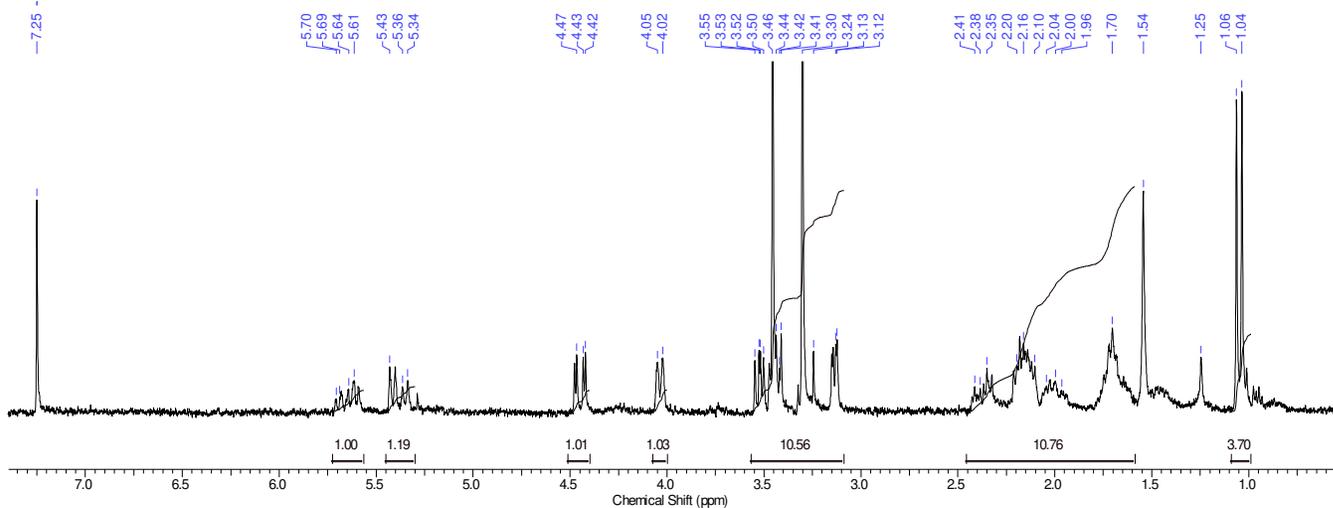


Anexo 14: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de 43.

GCM-89

Acquisition Time (sec)	3.1654	Date	02 Sep 2011 19:37:12	Frequency (MHz)	250.13
File Name	\nmr\sparc.iqm.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\set11\data\Luiz Carlos\nmr\set02gcm\H3_001001r			Points Count	32768
Nucleus	¹ H	Number of Transients	150	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160

Chloroform-d

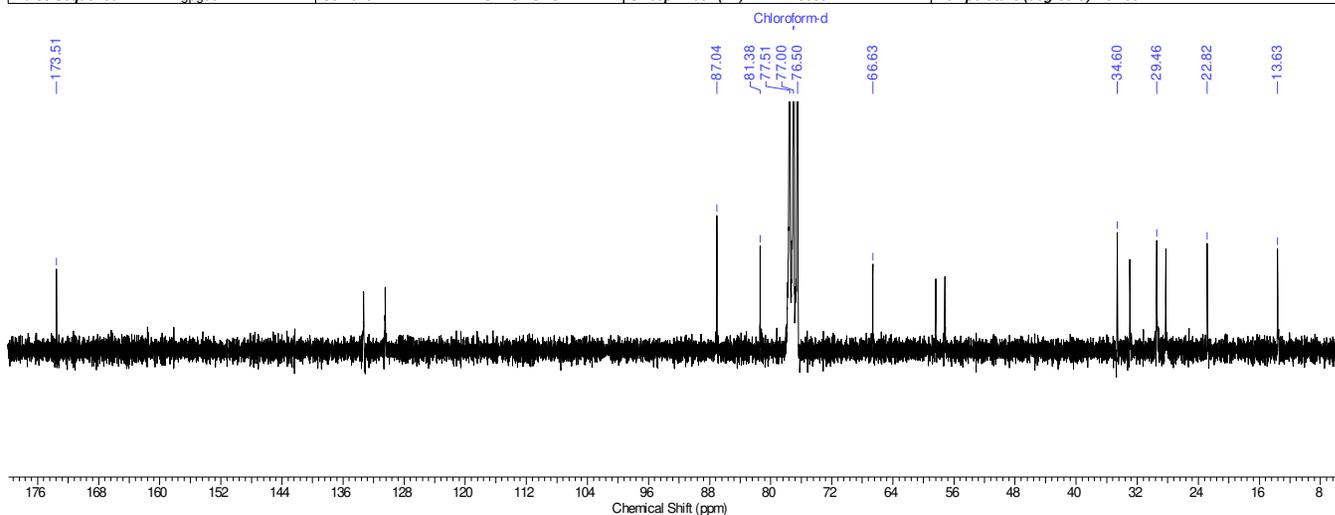


Anexo 15: Espectro de RMN ¹H de 34b (CDCl₃, 250 MHz).

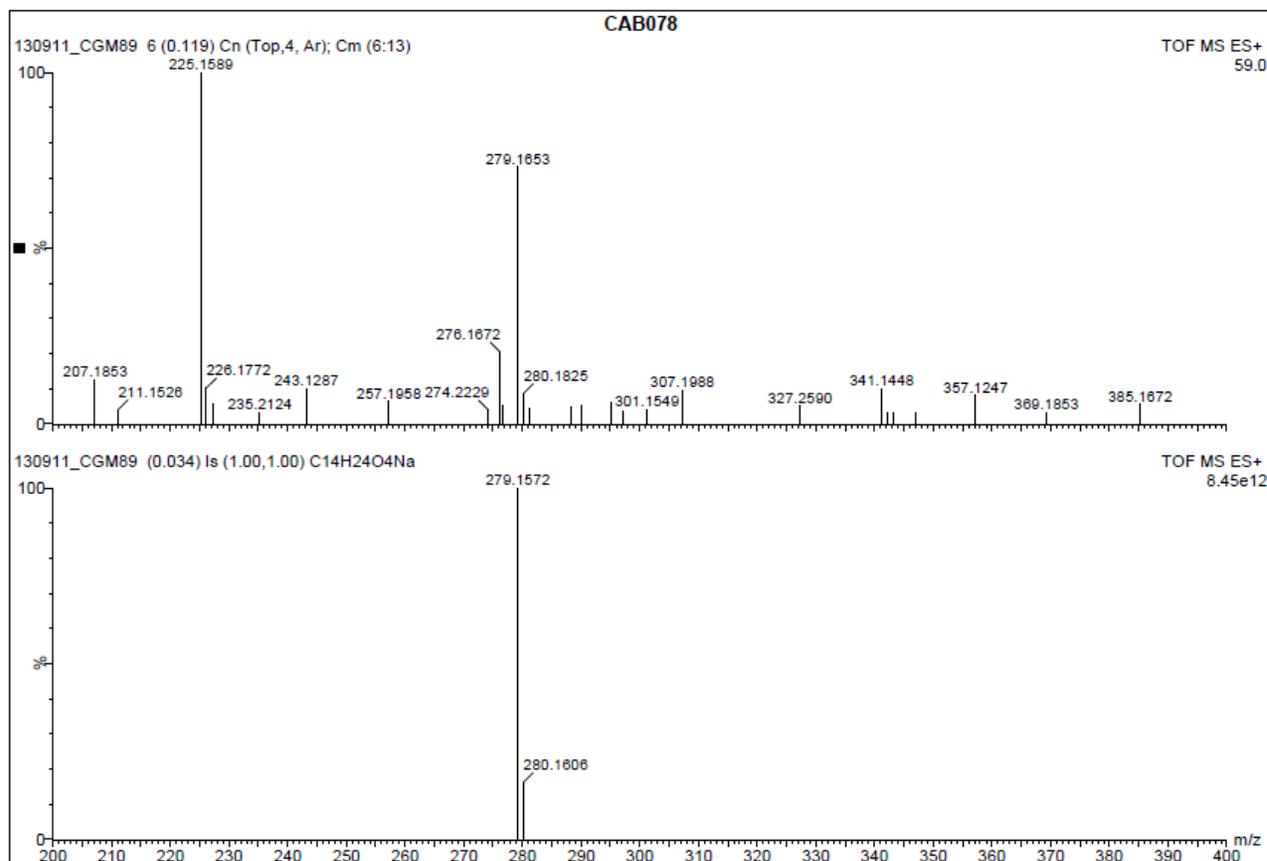
GCM-89

GCM-89_setembro04_set04gcmC13

Acquisition Time (sec)	0.5439	Comment	GCM-89_setembro04_set04gcmC13	Date	04 Sep 2011 18:35:02
File Name	\nmrsparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2011/set11\data/Luiz Carlos\nmr\set04gcmC13_001001r			Frequency (MHz)	62.90
Nucleus	¹³ C	Number of Transients	20000	Original Points Count	8192
Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24
				Points Count	32768
				Temperature (degree C)	25.160



Anexo 16: Espectro de RMN ¹³C de **34b** (CDCl₃, 62,5 MHz).

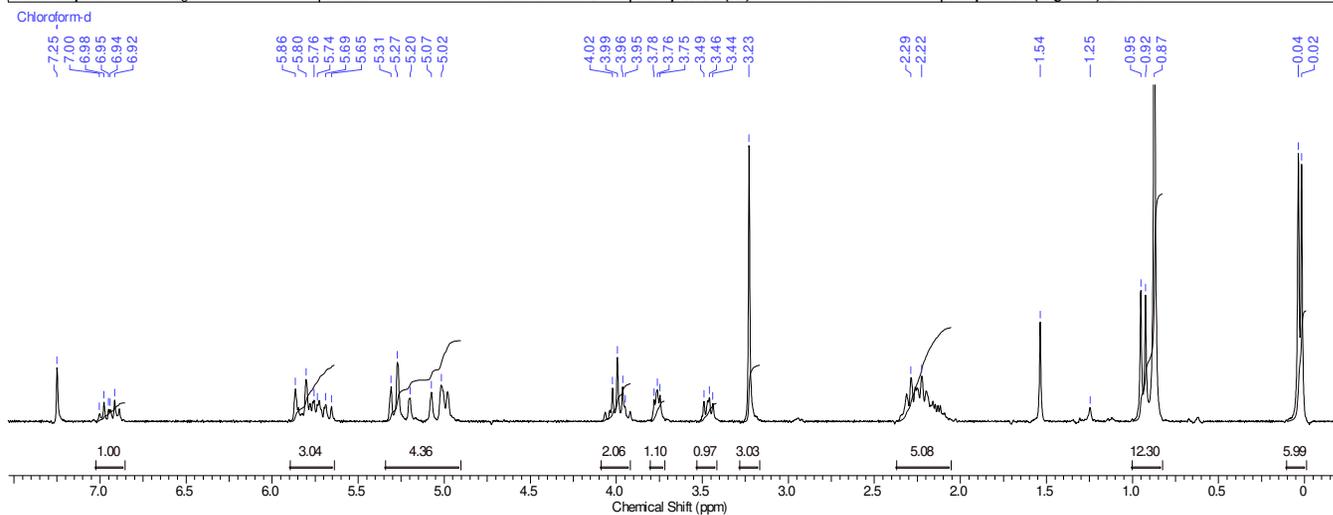


Anexo 17: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de **34b**.

GCM-88

GCM-88_setembro02_set02gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	GCM-88_setembro02_set02gcmH1		Date	02 Sep 2011 22:11:12
File Name	\nmr\sparc.igmp.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\set11\data\Luiz Carlos\nmr\set02gcmH1\set02gcmH1_001000fid			Frequency (MHz)	250.13	
Nucleus	1H	Number of Transients	30	Original Points Count	16384	
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98	
				Temperature (degree C)	25.160	

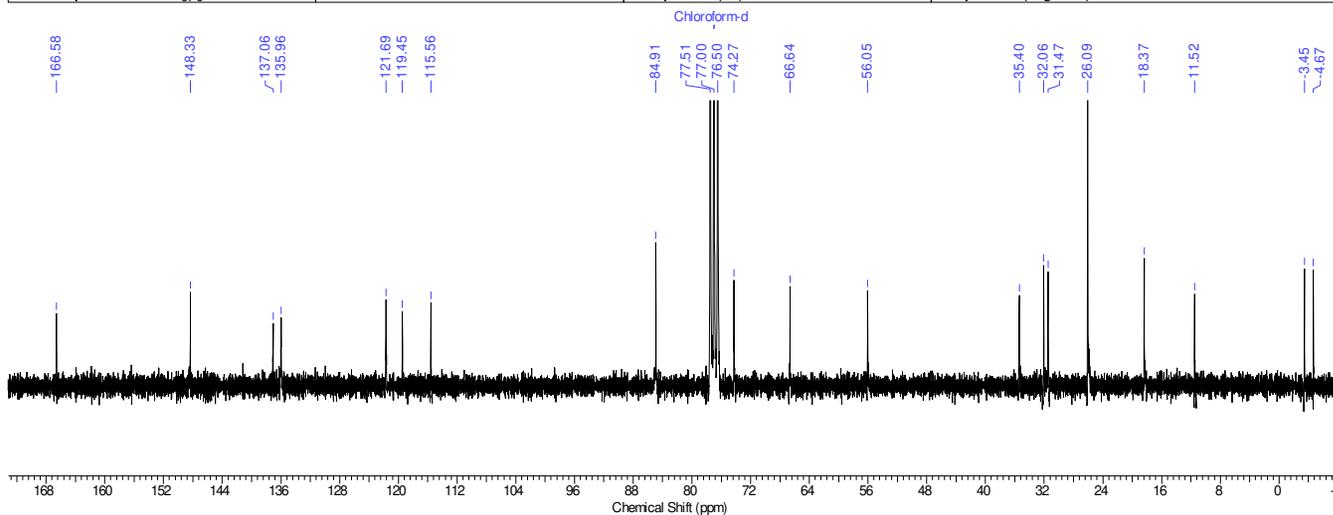


Anexo 18: Espectro de RMN ¹H de 46 (CDCl₃, 250 MHz).

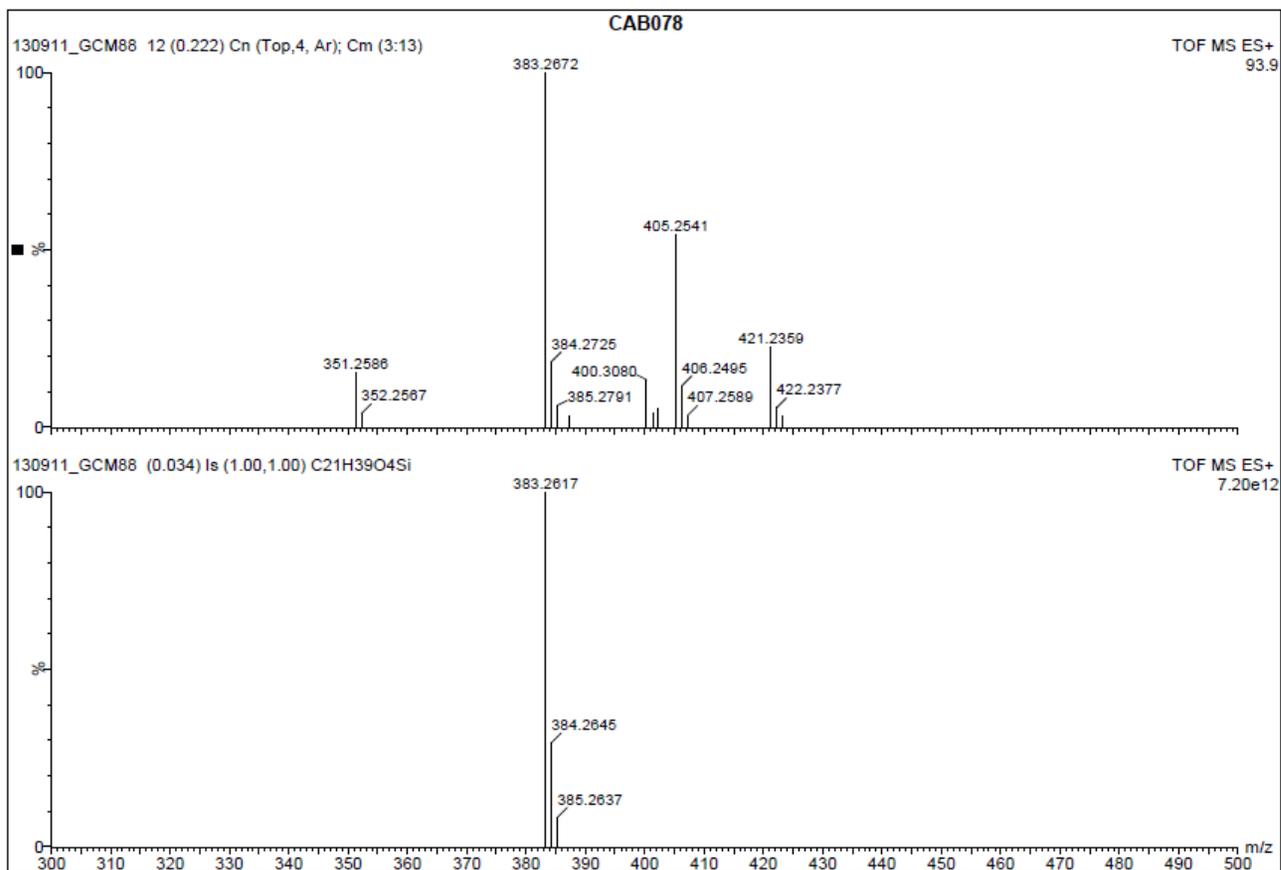
GCM-88

GCM-88_setembro03_set03gcmC13

Acquisition Time (sec)	0.5439	Comment	GCM-88_setembro03_set03gcmC13		Date	03 Sep 2011 23:36:14
File Name	\nmr\sparc.igmp.unicamp.br\espectros\bruker250\2011\set11\data\Luiz Carlos\nmr\set03gcmC13_001001r			Frequency (MHz)	62.90	
Nucleus	13C	Number of Transients	10000	Original Points Count	8192	
Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24	
				Temperature (degree C)	25.160	



Anexo 19: Espectro de RMN ¹³C de 46 (CDCl₃, 62,5 MHz).

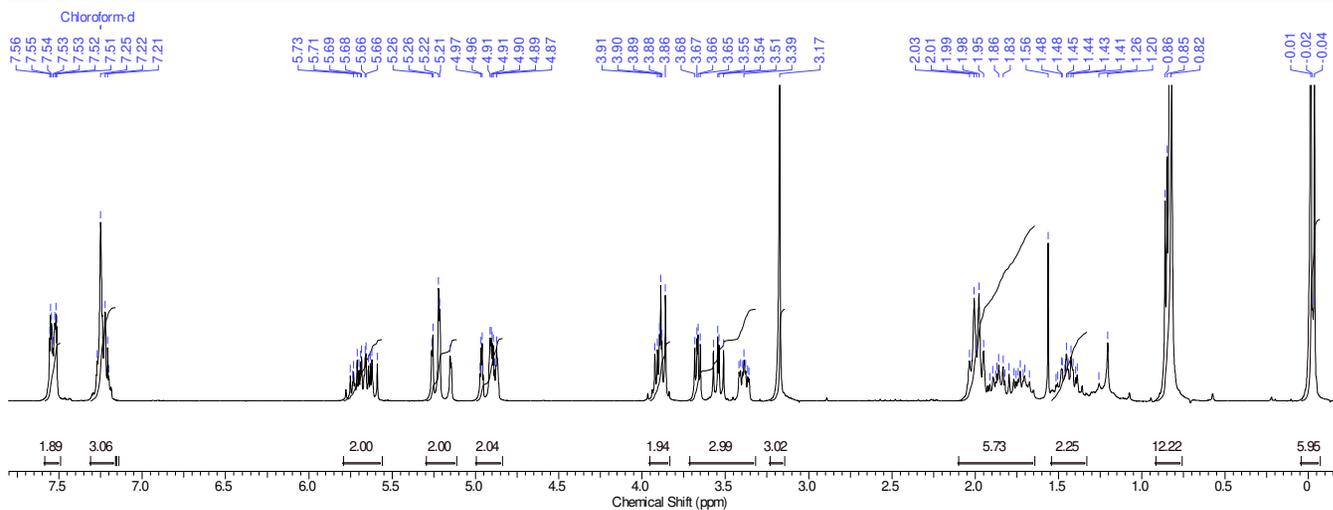


Anexo 20: Espectro de massas de alta resolução (HRMS) de 46.

GCM-117

GCM-117_Gustavo_fevereiro13_fev13gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	GCM-117 Gustavo_fevereiro13_fev13gcmH1	Date	13 Feb 2012 12:59:50
File Name	\nmr\sparc.igcm.unicamp.br\espectros\bruker250\2012\fev12\data\Luiz Carlos\nmr\fev13gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160

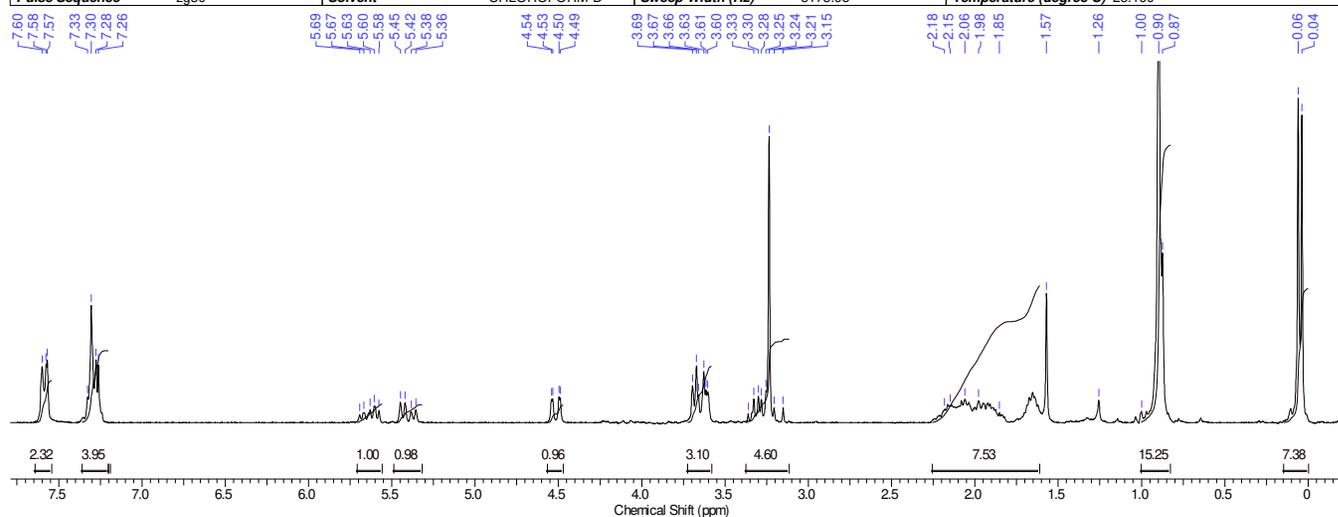


Anexo 21: Espectro de RMN ¹H de 53 (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-118

Gustavo_GCM-118A_CDCI3_250MHz_fev14gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	Gustavo GCM-118A CDCl3 250MHz fev14gcmH1	Date	14 Feb 2012 11:00:12
File Name	\nmrsparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2012/fev12\data/Luiz Carlos\nmr/fev14gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160

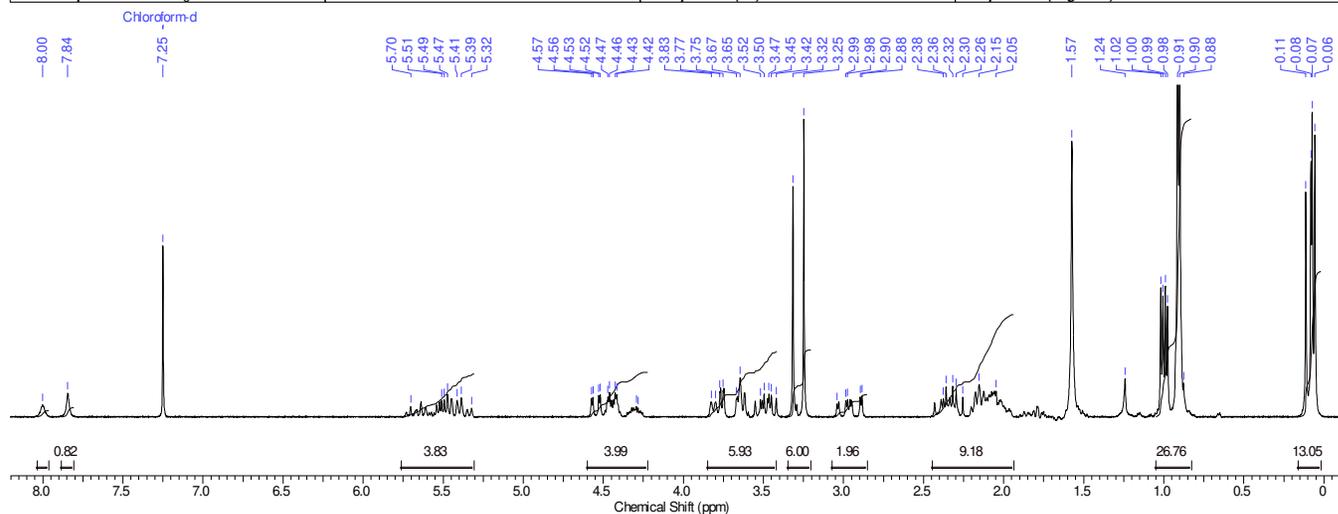


Anexo 22: Espectro de RMN ¹H de **54** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-119

Gustavo - JGCM119B1 - CDCl3 - 250 MHz - fev16gcmH1

Acquisition Time (sec)	3.1654	Comment	Gustavo - JGCM119B1 - CDCl3 - 250 MHz - fev16gcmH1	Date	16 Feb 2012 17:22:06
File Name	\nmrsparc.iqm.unicamp.br/espectros/bruker250/2012/fev12\data/Luiz Carlos\nmr/fev16gcmH1_001001r			Frequency (MHz)	250.13
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160

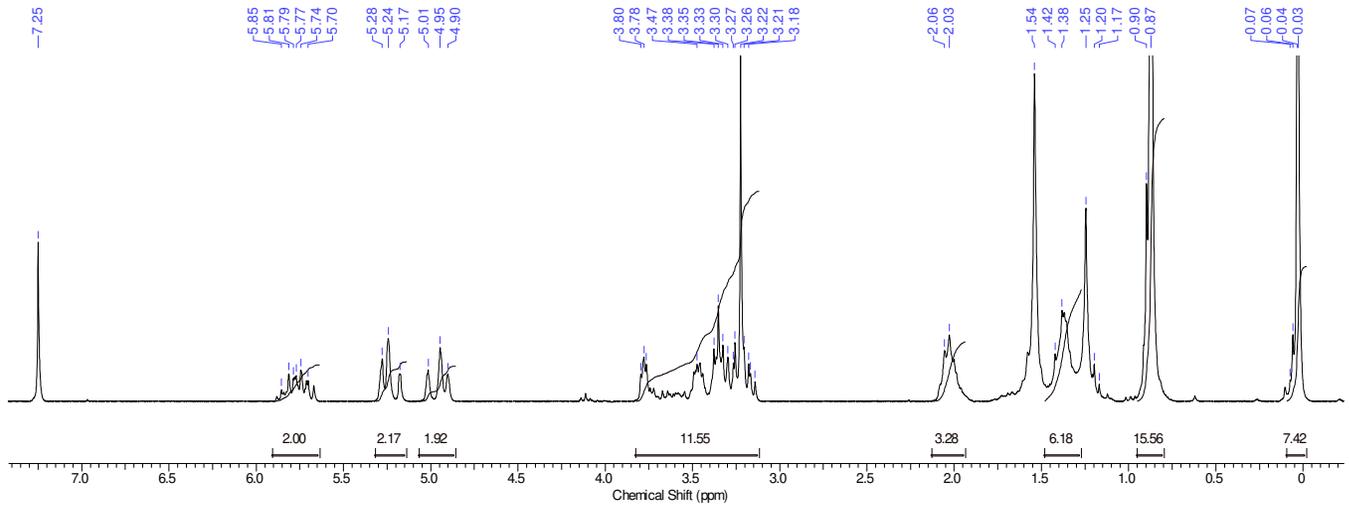


Anexo 23: Espectro de RMN ¹H de **47b** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-123

Acquisition Time (sec)	3.1654	Date	14 Jun 2012 23:33:36	Frequency (MHz)	250.13
File Name	\nmr\sparc.igq.unicamp.br\espectros\bruker250\2012\jun12\data\Luiz Carlos\nmr\jun14gcmH4_001001r			Points Count	32768
Nucleus	1H	Number of Transients	100	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160

Chloroform-d



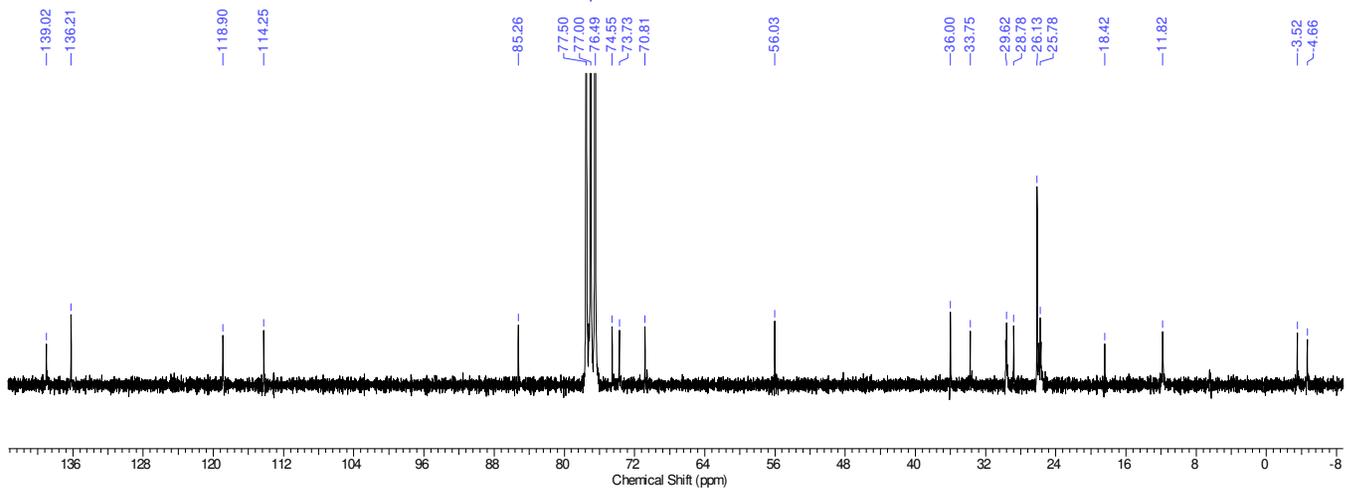
Anexo 24: Espectro de RMN ¹H de **59** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-123

Gustavo_GCM-123_CDCl3_250mHZ_jun14gcmC13

Acquisition Time (sec)	0.5439	Comment	Gustavo_GCM-123_CDCl3_250mHZ_jun14gcmC13	Date	15 Jun 2012 07:16:18
File Name	\nmr\sparc.igq.unicamp.br\espectros\bruker250\2012\jun12\data\Luiz Carlos\nmr\jun14gcmC13_002001r			Frequency (MHz)	62.90
Nucleus	13C	Number of Transients	7531	Original Points Count	8192
Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	15060.24
				Temperature (degree C)	25.160

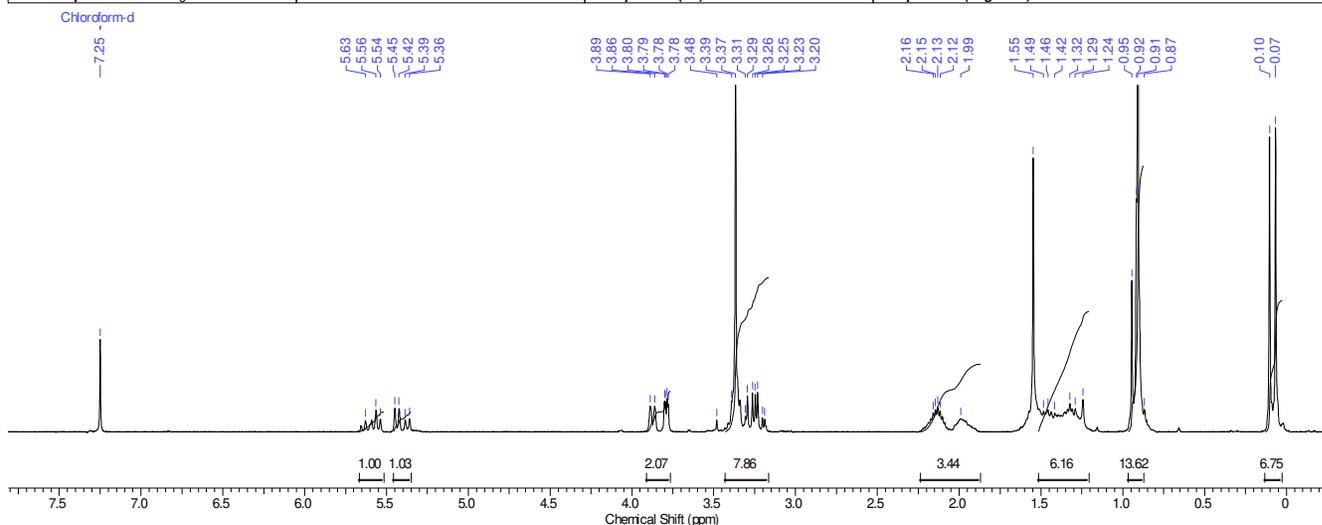
Chloroform-d



Anexo 25: Espectro de RMN ¹³C de **59** (CDCl₃, 62,5 MHz).

GCM-112

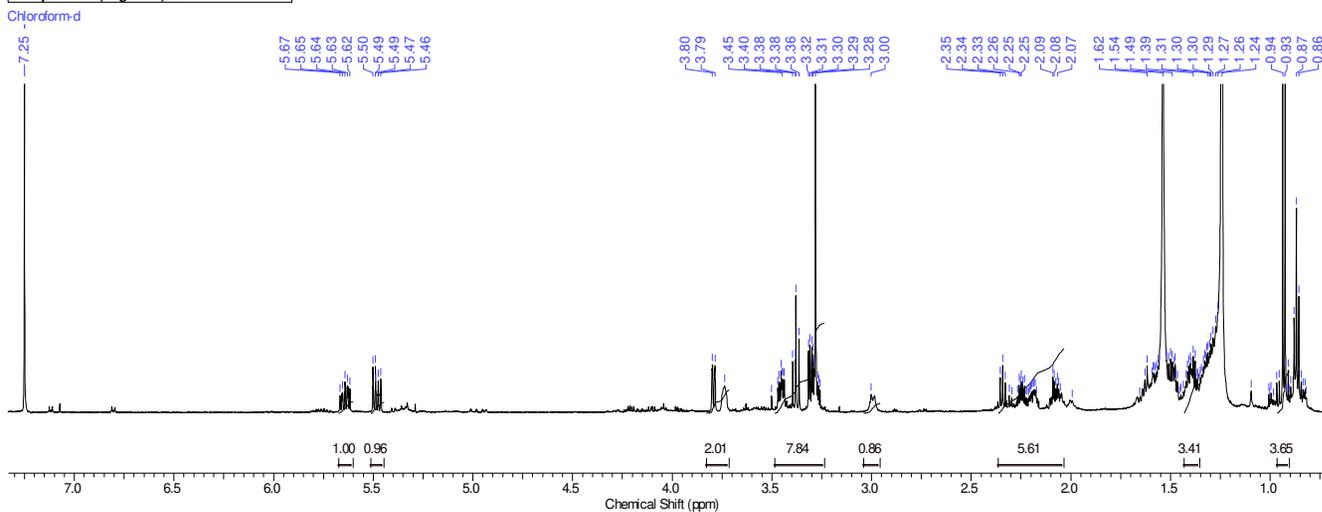
Acquisition Time (sec)	3.1654	Date	01 Feb 2012 16:29:08	Frequency (MHz)	250.13
File Name	\nmr\parc.iqm.unicamp.br\espectros\bruker250\2012\fev12\data\Luiz Carlos\nmr\fev01gcmH1_001001r			Points Count	32768
Nucleus	1H	Number of Transients	50	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	5175.98
				Temperature (degree C)	25.160



Anexo 26: Espectro de RMN ¹H de **61** (CDCl₃, 250 MHz).

GCM-113

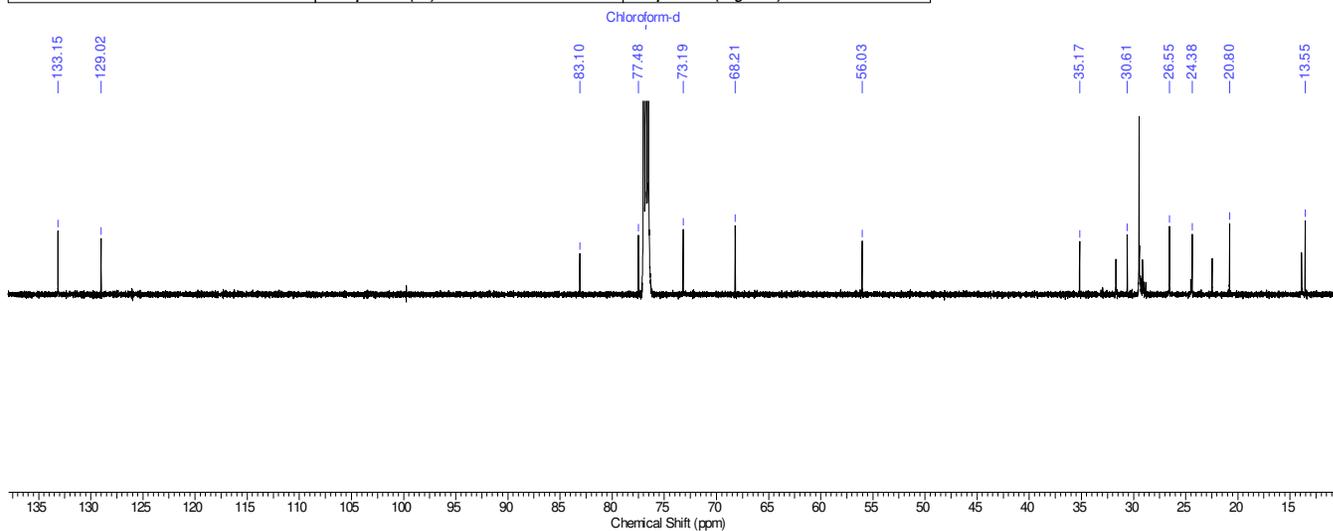
Acquisition Time (sec)	2.6564	Date	10 Feb 2012 10:13:08	Frequency (MHz)	600.17
File Name	\nmr\parc.iqm.unicamp.br\espectros\avance600\2012\fev12\Luiz Carlos\fev08gcmH1_002001r			Points Count	65536
Nucleus	1H	Number of Transients	32	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	12335.53
Temperature (degree C)	25.141				



Anexo 27: Espectro de RMN ¹H de **62** (CDCl₃, 600 MHz).

GCM-113

Acquisition Time (sec) 0.4544	Date 12 Feb 2012 12:01:04			Frequency (MHz) 150.93
File Name \\nmrparc.iqm.unicamp.br/espectros/avance600.2012/fev12/Luiz Carlos/fev10gcmC1/fev10gcmC1_004000fid				Pulse Sequence zgpg30
Nucleus 13C	Original Points Count 16384	Points Count 65536		
Solvent CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz) 36057.69	Temperature (degree C) 25.152		



Anexo 28: Espectro de RMN ¹³C de **62** (CDCl₃, 150 MHz).