



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica**

Dissertação de Mestrado

***SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS
FURÂNICOS DA GONIOTALAMINA***

Cilene Marquissolo

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M348s Marquissolo, Cilene.
Síntese e atividade biológica de análogos furânicos da
goniotalamina / Cilene Marquissolo. -- Campinas, SP: [s.n],
2009.

Orientador: Ronaldo Aloise Pilli.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Goniotalamina. 2. Análogos furânicos. 3. Síntese
catalítica assimétrica. 4. Atividade biológica. I. Pilli, Ronaldo
Aloise. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: Synthesis and biological activity of furan analogues of goniotalamin

Palavras-chaves em inglês: Goniotalamin, Furan analogues, Catalytic asymmetric synthesis,
Biological activity

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof. Ronaldo Aloise Pilli (orientador), Prof. Dr. Eliezer Jesus de Lacerda
Barreiro (FF-UFRJ), Profa. Dra. Lúcia Helena Brito Baptistella (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 07/07/2009

**“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é "muito" pra ser insignificante.”**

Charles Chaplin

**"O valor das coisas não está
no tempo em que elas duram,
mas na intensidade em que
acontecem. Por isso existem
momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis"**

Fernando Pessoa

**“A estrutura química
inacessível representa para o
químico: o mesmo que a
montanha sem escalar, o rio
sem cartografar, a tela sem
pintar...”**

Robert Woodward

Dedico esta dissertação,

**À minha querida família:
Pai, Mãe, Silvana, Dirceu, Ana Júlia e Luiz Gustavo.
Ao meu namorado Manoel**

Agradecimentos

Agradeço, acima de tudo, a Deus por ter me dado sabedoria para que esse trabalho fosse realizado.

Gostaria de agradecer a minha família pelo apoio e dedicação em todas as horas. Aos meus pais, Alexandrina e Oreste, por estarem sempre do meu lado me incentivando e se dedicando para que eu tivesse uma boa formação. A minha irmã Silvana, meu cunhado Dirceu e meus sobrinhos Ana Júlia e Luiz Gustavo por estarem sempre presentes nessa minha trajetória. Ao meu namorado Manoel, meu amor, companheiro e porto seguro.

Ao Professor Pilli, agradeço pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa desde janeiro de 2004 e pela confiança depositada em minha pessoa para a realização deste e de outros trabalhos. Obrigada por compartilhar um pouco de sua competência e sabedoria que contribuíram para a minha formação.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratório. Da velha guarda: Andréa, Leila e Mayra (minhas vizinhas de bancada, companheiras e conselheiras); Ângelo (pelo incentivo e aprendizado desde a iniciação científica); Betinho, Luiz (Galáctico), Niltão, Gustavo (Gustaviiiito) e Diogo (companheiros dos cafezinhos e sempre dispostos a ajudar e a conversar). Da nova geração: Manoel, Ilton e Léo (amigos para todas as horas), Roberta, Lucas (Silva & Silva, como ele diz: meu aprendiz), Vanessa Caixeta, Vanessa Gonçalves, Rosimeire, Tiago, Valquírio, Renan, Aline e Caio.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos: LASSO e LSPNF agradeço pela amizade e companheirismo, em especial: Angélica (uma pessoa especial), Marla, Patrícia P., Laura (Galáctica), Júlio, Marcelão, Patrícia R., Juliana, Bruno, Rodrigo, Giovanni e Kristerson.

Ao CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP), em especial ao Prof. João Ernesto de Carvalho, Débora Vendramini e Ana Lúcia Ruiz pelos ensaios de atividade antiproliferativa, além das discussões acerca deste assunto.

Ao Prof. Sérgio de Albuquerque do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, pelos bioensaios de atividade tripanocida e leishmanicida.

Aos membros da banca pelos comentários e sugestões.

Aos professores: Carlos Roque, Fernando Coelho, Wanda Almeida e Lúcia Baptistella, agradeço por terem contribuído para minha formação.

Agradeço ao professor Fábio Gozzo e ao Alexandre F. Gomes (Sir, ex-companheiro de grupo) pelas análises de EMAR.

Não posso deixar de agradecer às minhas eternas amigas de graduação e companheiras de viagem: Camila, Laila e Luciana Hinoue.

Meus agradecimentos aos técnicos: Edson, D. Gilda, Soninha, Paula, Anderson, Tiago e Claudinha por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Instituto de Química (IQ-UNICAMP) pela infra-estrutura indispensável para a realização deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida (05/03255-3).

A você que prestigia com sua leitura o meu trabalho...

ENFIM..., A TODOS O MEU MUITO OBRIGADA!!!

Cilene Marquissolo

Súmula Curricular

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Mestrado em Química Orgânica**

Mar/2006 – Jul/2009 - Desenvolvimento do projeto de mestrado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo: 05/03255-3

- **Licenciatura em Química**

Jan/2002 - Dez/ 2007 - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

- **Bacharelado em Química**

Jan/2002 - Dez/ 2005 - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

- *Iniciação científica* (Jan/2004 - Dez/ 2005) sob a orientação do Prof. Dr. Ronaldo Aloise Pilli e com apoio financeiro da FAPESP. Processo: 04/10896-2. Projeto intitulado: “Síntese e Avaliação da Citotoxicidade da Epoxigoniotalamina, Goniodiol e Compostos Relacionados”.

ATIVIDADES ATUAIS

- Professora responsável pelas disciplinas de Química (teoria e prática) do curso de Farmácia da Faculdade de Americana (FAM) (Jan/2008-presente).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Participação em 5 cursos de curta duração e 8 eventos/congressos desde 2005.

PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS INDEXADOS

- **Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*.** de Fátima, A.; Marquissolo, C.; de Albuquerque, S.; Carraro-Abrahão, A. A., Pilli, R. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1210.

- **Asymmetric total synthesis and antiproliferative activity of goniothalamine oxide isomers.** Marquissolo, C.; de Fátima, A.; Kohn, L. K.; Ruiz, A, L. T. G.; de Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorg. Chem.* **2009**, *37*, 52.

TRABALHOS EM EVENTOS

1. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R. A. **Sínteses totais da goniotalamina, epoxigoniotalamina e de seus respectivos isômeros.** Trabalho apresentado na forma de pôster na 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2005. Poços de Caldas, MG.

2. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R. A.; KOHN, L. K. ; ANTONIO, M. A. ; CARVALHO, J. E. **Atividade antiproliferativa da epoxigoniotalamina, isoeoxigoniotalamina e de seus respectivos enantiômeros em células tumorais humanas.** Trabalho apresentado na forma de pôster na 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas, MG.
3. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R. A.; KOHN, L. K. ; CARVALHO, J. E. . **Cytotoxic Activity and Total Synthesis of Goniotalamin Oxide.** Trabalho apresentado na forma de pôster no 11th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2005, Canela, RS.
4. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R. A.; KOHN, L. K. ; ANTONIO, M. A.; CARVALHO, J. E. **Epoxigoniotalamina e Seus Isômeros: Síntese Total e Atividade Antiproliferativa em Células Tumorais Humanas.** Trabalho apresentado na forma de pôster no XIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, UNICAMP, 2005.
5. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R. A.; ALBUQUERQUE, S.; CARRARO-ABRAHÃO, A. **Atividade Tripanocida de Diidropiranos contra a forma Tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.** Trabalho apresentado na forma de pôster na 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia, SP (*Trabalho também apresentado oralmente na sessão Coordenada de Química Medicinal*).
6. MARQUISSOLO, C.; FATIMA, A.; PILLI, R.A.; KOHN, L. K. ; CARVALHO, J. E. **Catalytic Asymmetric Synthesis and Pharmacological Evaluation of Dihydropyranones.** I Reunión Latinoamericana de Química Medicinal, 2007, Montivideo, Uruguai.
7. MARQUISSOLO, C.; PILLI, R. A.; RUIZ, A. T. R.; CARVALHO, J. E; SELLANES, D.; SERRA, G. **Synthesis and Cytotoxic activity of (R)-(+)- and (S)-(-)-5-nitrofuranotalamin.** Trabalho apresentado na forma de pôster no 12th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 2007, Itapema, SC.
8. MARQUISSOLO, C.; PILLI, R. A.; de ALBUQUERQUE, S.; ESPERANDIM, V. R. **A new synthetic dihydropyranone: (R)-(+)- and (S)-(-)-5-nitrofuranotalamin: a potent tripanocidal agent.** Trabalho apresentado na forma de pôster no 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas, PE.
9. MARQUISSOLO, C.; LIRA, L. M.; VENDRAMINI COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E; PILLI, R. A. **Atividade antiproliferativa de (R)-(+)- e (S)-(-)-naftogoniotalamina.** Trabalho apresentado na forma de pôster na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.
10. MARQUISSOLO, C.; VENDRAMINI COSTA, D. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E; PILLI, R. A. **Avaliação da citotoxicidade da (R)- e (S)-goniotalamina.** Trabalho apresentado na forma de pôster na 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009, Fortaleza, CE.

SÍNTESE E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE ANÁLOGOS FURÂNICOS DA GONIOTALAMINA

Resumo. Este trabalho tem como objetivo preparar análogos furânicos da goniotalamina **31**, **32** e **33** em suas duas formas enantioméricas, utilizando-se a alilação catalítica e assimétrica nas condições de Keck e a reação de metátese de olefinas para fechamento de anel. Estes análogos foram obtidos em bons rendimentos e excelentes razões enantioméricas. Estes novos compostos foram submetidos a testes de atividade antiproliferativa frente a nove linhagens de células tumorais e a bioensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* e contra a forma promastigota de *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis*. No que diz respeito à atividade antiproliferativa, exceto para as linhagens de melanoma e cólon, os compostos testados apresentaram maior potência do que o controle positivo, doxorrubicina. Adicionalmente, os compostos **31**, **32** e **33** mostraram-se mais ativos que a goniotalamina (**1**), exceto para as linhagens de mama e ovário. Os bioensaios de citotoxicidade com células não infectadas (LLC-MK₂) mostraram que os compostos apresentaram baixa citotoxicidade. Com relação à atividade tripanocida, embora o composto (S)-**31** tenha se apresentado como o composto mais ativo, mostrou alta citotoxicidade em células não-infectadas. (S)-**32** é o composto que apresenta atividade mais interessante contra *T. cruzi*, além do menor valor de citotoxicidade e alto índice de segurança. Para a atividade leishmanicida, o análogo (S)-**31** apresentou-se como o composto mais ativo para ambas as espécies de *Leishmania*, mostrando-se cerca de 6,5 vezes mais ativo que o controle positivo para *Leishmania brasiliensis* e cerca de 14,6 vezes para *Leishmania major*. Os ensaios de citotoxicidade revelaram valores de concentração superiores aos valores de IC₅₀, indicando baixa toxicidade. Para *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania major*, (R)-**31** e (S)-**31** mostraram-se como os compostos mais ativos e apresentaram bons índices de segurança. O análogo **33** não apresentou atividade expressiva em nenhum dos testes realizados indicando que a presença do grupo nitro ligado ao anel furânico é de grande importância para as atividades biológicas avaliadas.

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF FURAN ANALOGUES OF GONIOTHALAMIN

Abstract. This work describes the preparation of furan analogues of goniiothalamine (compounds **31**, **32** and **33**) in both enantiomeric forms through the utilization of Keck asymmetric allylation and ring-closing metathesis reaction. These analogues were prepared in good overall yield and excellent enantiomeric ratio. These novel compounds were evaluated as antiproliferative agents against a panel of nine cancer cell lines and *in vitro* bioassays against the tripomastigote form of *Trypanosoma cruzi* and promastigote form of *Leishmania major* and *Leishmania brasiliensis*. Compounds **31-33** were more potent than the positive control (doxorubicin) in the antiproliferative experiments, except for melanoma and colon cancer cells. Additionally compounds **31-33** were more active than goniiothalamine (**1**), except for breast and ovary cancer cells. Regarding their tripanocidal activity, compound (S)-**31** was shown to be very toxic to non-infected cells despite its being highly active. Compound (S)-**32** was the most promising one against *T. cruzi* due to its low toxicity and high insurance level. As to the leishmanicidal activity, the analogue (S)-**31** was shown to be the most active for both *Leishmania* species investigated being 6,5 times more active than the positive control for *Leishmania brasiliensis* and about 14,6 times for *Leishmania major*, The cytotoxicity assays revealed low toxicity against non-infected cells. For *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania major* (R)-**31** and (S)-**31** were shown to be more active one and also displayed the best insurance level. Analogue **33** did not display any significant biological activity in our assays indicating that the nitrofuranyl moiety is very important for the biological activities investigated.

ÍNDICE

Lista de Tabelas	xvii
Lista de Figuras	xviii
Lista de Esquemas	xx
Lista de Abreviaturas	xxi
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	15
3. Resultados e Discussão.....	16
3.1 – Parte 1: Metodologia sintética.....	16
3.1.1 – Síntese.....	16
3.1.2 - Determinação da Configuração Absoluta.....	29
3.1.3 - Determinação da Razão Enantiomérica.....	38
3.2 – Parte 2: Avaliação da Atividade Biológica.....	40
3.2.1 - Avaliação da Atividade Antiproliferativa.....	40
3.2.2 - Avaliação da Atividade Tripanocida.....	47
3.2.3 - Avaliação da Atividade Leishmanicida.....	53
4. Conclusões.....	61
5. Parte Experimental.....	63
5.1 Instrumentação.....	63
5.2 Reações realizadas, compostos preparados e caracterizações.....	64
5.2.1 Preparação do (<i>E</i>)-3-(5-nitrofurano-2-il)acrilaldeído (47).....	64
5.2.2 Reação de alilação racêmica para a síntese do (<i>E</i>)-1-(5-nitrofurano-2-il)hexa-1,5-dien-3-ol (48).....	64
5.2.3 Preparação do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-(<i>E</i>)-1-(5-nitrofurano-2-il)hexa-1,5-dien-3-ol (48).....	65
5.2.4 Preparação do Acrilato (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-(<i>E</i>)-1-(5-nitrofurano-2-il)hexa-1,5-dien-3-il (49).....	66
5.2.5 Preparação do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-(<i>E</i>)-6-(2-(5-nitrofurano-2-il)vinil)-5,6- diidropiran-2-ona ou (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- nitrofuranotalamina (31).....	66
5.2.6 Preparação do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-1-(5-nitrofurano-2-il)-3-buten-1-ol (50).....	67
5.2.7 Preparação do Acrilato (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)-1-(5-nitrofurano-2-il)-3-butenil (51).....	68

5.2.8	Preparação do (<i>R</i>)-e (<i>S</i>)-6-(5-nitrofurano-2-il)-5,6-di-hidropirano-2-ona (32).....	68
5.2.9	Preparação do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- (<i>E</i>)-1-(furano-2-il)hexa-1,5-dieno-3-ol (53).....	69
5.2.10	Preparação do Acrilato (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- (<i>E</i>)-1-(furano-2-il)hexa-1,5-dieno-3-il (54).....	70
5.2.11	Preparação do (<i>R</i>)- e (<i>S</i>)- (<i>E</i>)-6-(2-(furano-2-il)vinil)-5,6-di-hidropirano-2-ona (33).....	70
5.2.12	Preparação dos ésteres de Mosher 56 , 57 e 58	71
6.	Anexos.....	72
6.1	Anexo 1 – Espectros.....	72
6.2	Anexo 2 - Bioensaio de atividade antiproliferativa em células tumorais humanas..	88
6.3	Anexo 3 - Bioensaio de atividade tripanocida.....	92
6.4	Anexo 4 - Bioensaio de atividade leishmanicida.....	92
6.5	Anexo 5 - Bioensaio de citotoxicidade.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de IC ₅₀ (μM) ^a para a atividade antiproliferativa dos compostos (R)- e (S)-1 e 20-27 em células tumorais humanas.....	09
Tabela 2: Valores de IC ₅₀ para diidropiranoas naturais e não-naturais para <i>T. cruzi</i> (forma tripomastigota).....	11
Tabela 3: Citotoxicidade e valores de TGI (μM) para os compostos (R)- e (S)- 1, 31, 32, 33 e Doxorubicina.....	44
Tabela 4: Índice de segurança, citotoxicidade e atividade tripanocida de (R)- e (S)- 31, 32 e 33 contra a forma tripomastigota do <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Tabela 5: Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> e suas manifestações clínicas...	57
Tabela 6: Índice de segurança, citotoxicidade e atividade Leishmanicida de (R)- e (S)-31, 32 e 33 contra a forma promastigota de <i>Leishmania brasiliensis</i> e <i>Leishmania major</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de 5,6-diidropiran-2-onas de ocorrência natural.....	01
Figura 2: Análogos 20-27 sintetizados para a identificação dos grupos farmacofóricos da (S)-goniotalamina (1).....	08
Figura 3: Grupos farmacofóricos na estrutura da goniotalamina (1) sobre células de tumor renal.....	10
Figura 4: Estruturas químicas dos compostos testados contra a forma tripomastigota do <i>t. cruzi</i>	11
Figura 5: Estrutura da vincristina.....	13
Figura 6: Compostos a serem sintetizados neste trabalho.....	15
Figura 7: Alvos sintéticos deste trabalho.....	16
Figura 8: Estrutura dos compostos <i>p</i> -fluoro-goniotalamina (26), <i>p</i> -nitro-goniotalamina (27) e dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas: Benzonidazol (34) e Nifurtimox (35).....	17
Figura 9: Modelo de Corey para o estado de transição em reações de alilação de Keck, utilizando (<i>R</i>)-BINOL.....	20
Figura 10: Estruturas dos catalisadores de Grubbs de primeira e segunda geração....	27
Figura 11: Modelo de Mosher para a determinação da configuração de alcoóis secundários.....	30
Figura 12: Principais confôrmers dos ésteres de MTPA (obtido a partir do álcool de configuração <i>R</i>) segundo o modelo de Riguera.....	31
Figura 13: Comparação do modelo de Mosher e do modelo de Riguera.....	32
Figura 14: Modelo de Mosher aplicado aos ésteres 56a e 56b	34
Figura 15: Modelo de Riguera aplicado aos ésteres 56a e 56b	34
Figura 16: Modelo de Mosher aplicado aos ésteres 57a e 57b provenientes de 50 ; e para os ésteres 58a e 58b , provenientes de 53	36
Figura 17: Modelo de Riguera aplicado aos ésteres 57a e 57b provenientes de 50 ; e para os ésteres 58a e 58b , provenientes de 53	36
Figura 18: Espectro de RMN de ¹⁹ F (235,35 MHz, CDCl ₃) para (<i>R/S,R</i>)- 56 e (<i>S,R</i>)- 56 . ..	38

Figura 19: Espectro de RMN de ^{19}F (235,35 MHz, CDCl_3) para (R/S,R)- 57 e (S,R)- 57	39
Figura 20: Espectro de RMN de ^{19}F (235,35 MHz, CDCl_3) para (R/S*,R)- 58 e (R,R)- 58 . *Mistura enantiomericamente enriquecida.....	39
Figura 21: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira.....	40
Figura 22: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (R)- 31 e (S)- 31	42
Figura 23: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (R)- 32 e (S)- 32	42
Figura 24: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (R)- 33 e (S)- 33	43
Figura 25: “Mean Graph” dos valores de TGI para (R)- e (S)- 31 , 32 e 33 e doxorubicina.....	46
Figura 26: Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
Figura 27: Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	55
Figura 28: Estrutura dos fármacos utilizados na terapia contra Leishmania.....	58

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Rota de síntese para a (<i>R</i>)-goniotalamina (1).....	04
Esquema 2: Síntese total da (<i>R</i>)-goniotalamina (<i>R</i>)- 1 segundo Quitschalle e colaboradores.....	05
Esquema 3: Síntese total da (<i>R</i>)-goniotalamina (1) segundo O'Doherty e colaboradores.....	06
Esquema 4: Reação de alilação de aldeídos com alitributilestanana nas condições desenvolvidas por Keck e colaboradores e a estrutura da possível espécie cataliticamente ativa durante a reação, o complexo (<i>R,R</i>)- 36	19
Esquema 5: Mecanismo para formação de composto alilado 44	19
Esquema 6 : Rota de síntese para a (<i>R</i>)- 31 e (<i>S</i>)- 31	21
Esquema 7: Preparação de (<i>R</i>)- 32 e (<i>S</i>)- 32	23
Esquema 8: Preparação de (<i>R</i>)- 33 e (<i>S</i>)- 33	25
Esquema 9: Mecanismo geral para a reação de metátese de olefinas para fechamento de anel.....	28
Esquema 10: Alilação racêmica para obtenção de 48 , 50 e 53	29
Esquema 11: Mecanismo geral da reação para obtenção do éster de Mosher a partir do (<i>R</i>)- ou (<i>S</i>)-MTPA.....	33
Esquema 12: Ésteres de Mosher sintetizados a partir de 48	33
Esquema 13: Ésteres de Mosher sintetizados a partir de 50 e 53	35

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{25}$: rotação específica

^{13}C -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13

^{19}F -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de flúor 19

^1H -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio

786-0: linhagem tumoral de célula de rim

Å: Angstroms

BINOL: binaftol

BIPHEP: bisfenilfosfina

CC: cromatografia em coluna

CC_{50} : citotoxicidade

CCD: cromatografia em camada delgada

CG: cromatografia gasosa

DCC: dicloexilcarbodiimida

DMAP: dimetilaminopiridina

DOX: Doxorubicina

EMAR: espectrometria de massas de alta resolução

ESI: ionização por eletrospray

GI_{50} : concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

HT-29: linhagem tumoral de célula de cólon

I.V.: infravermelho

IC_{50} : concentração responsável por 50% de inibição do crescimento celular

J : constante de acoplamento

K562: linhagem tumoral de célula de leucemia

LC_{50} : concentração necessária para matar 50% das células

LLC-MK₂: células de rim de macaco

MCF-7: linhagem tumoral de célula de mama

MTPA: ácido α -metóxi- α -trifluormetil- α -fenilacético

NCI: National Cancer Institute

NCI-486: linhagem tumoral de célula de pulmão
NCI-ADR: linhagem tumoral de célula de ovário resistente
OMS: Organização Mundial de Saúde
OVCAR-3: linhagem tumoral de célula de ovário
PCO-3: linhagem tumoral de célula de próstata
PM: peneira molecular
PPTS: *para*-toluenossulfonato de piridínio
QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships
RCM: Ring Close Methatesis
S.O.D: enzima superóxido dismutase
SAR: Structure-Activity Relationships (relação estrutura atividade)
Si: índice de segurança para ensaios biológicos
TGI: concentração mínima que causa a inibição total do crescimento.
UACC-62: linhagem tumoral de célula de melanona
UV_{254nm}: luz ultravioleta 254nm
δ: deslocamento químico
Δδ: diferença entre os deslocamentos químicos

1. INTRODUÇÃO

As δ -lactonas- α,β -insaturadas substituídas compõem uma importante classe de produtos naturais com propriedades bioativas. Estes compostos que apresentam o esqueleto 5,6-diidropiran-2-ona, têm sido alvo de estudos mais avançados e pesquisas mais detalhadas no que diz respeito à exploração de suas respectivas atividades biológicas.¹ Muitas dessas lactonas de origem natural e não-natural são conhecidas por suas atividades citotóxicas, antileucêmicas, por induzirem apoptose, por inibirem HIV-proteases e por outras atividades biológicas relevantes.^{1b)} A característica estrutural, da cadeia lateral, dessa classe de compostos é muito variável. A figura 1 apresenta a estrutura de algumas dessas piranonas de ocorrência natural.

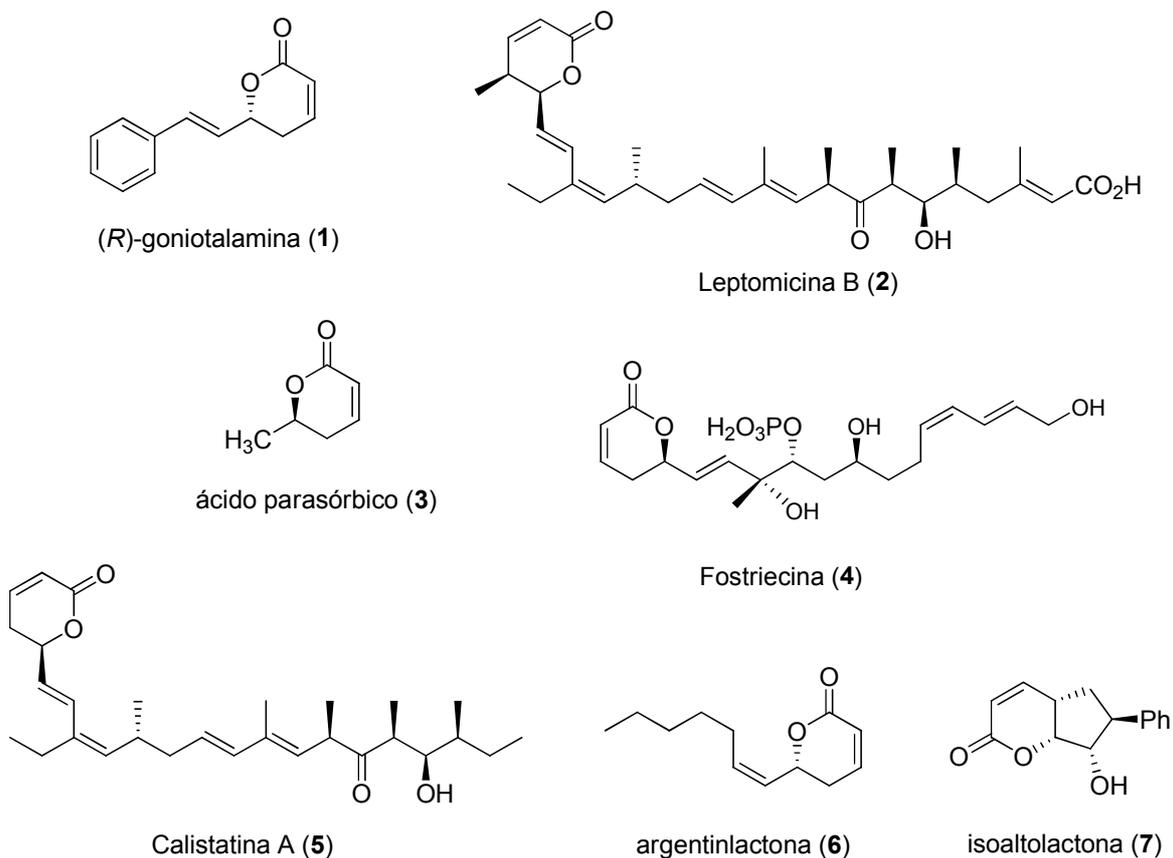


Figura 1: Exemplos de 5,6-diidropiran-2-onas de ocorrência natural.^{1c)}

¹ a) Harris, J. M.; O'Doherty, G. A. *Tetrahedron* **2006**, 57, 5161. b) Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J.; Falomir, E. *Tetrahedron* **2007**, 63, 2929. c) Boucard, V.; Broustal, G.; Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 22, 225.

O núcleo farmacofórico dessas diidropiranonas é a lactona α,β -insaturada, que age comoceptor de Michael frente a resíduos de proteínas em meio biológico. Alguns grupos de pesquisa descreveram a importância desse grupo farmacofórico. Kobayashi e colaboradores realizaram testes de SAR com a calistatina A (**5**) e análogos que apresentavam a lactona saturada, os resultados mostraram um grande decréscimo na atividade contra células KB (células tumorais de carcinoma de boca). De maneira semelhante, análogos saturados e adutos de Michael nitrados da leptomicina (**2**) mostraram um grande decréscimo na atividade contra células HeLa (câncer de medula). Boger e colaboradores ensaiaram análogos da fostriecina (**4**), cuja dupla conjugada fora reduzida, e observaram uma atividade antitumoral 200 vezes menor do que a própria fostriecina (**4**).²

A goniotalamina (**1**) é um exemplo de δ -lactona- α,β -insaturada estruturalmente simples que tem sido alvo de estudos em nosso grupo de pesquisa e cuja configuração natural foi estabelecida como sendo 6*R*.³ A goniotalamina (**1**) pertence a classe das estiril lactonas, um grupo de metabólitos secundários do gênero *Goniothalamus* e foi isolada pela primeira vez em 1961, a partir de folhas secas de *Cryptocarya caloneura*⁴ e, posteriormente, de *Cryptocarya moschata*,⁵ *Bryonopsis laciniosa*⁶ e de várias outras espécies de *Goniothalamus*.⁷

Dentre as principais atividades biológicas apresentadas pelas estiril lactonas, podemos destacar a atividade antiproliferativa,⁸ inseticida,⁹ antimicrobiana,¹⁰ larvicida,¹¹

² Marshall, J. A.; Mikowski, A. M.; Bourbeau, M. P.; Schaaf, G. M.; Valeriote, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16*, 320.

³ a) Meyer, H. H., *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 484. b) Honda, T., Kametani, T., Kanai, K., Tatsuzaki, Y., Tsubuki, M. *J. Chem Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 1733.

⁴ Hlubucek, J.R.; Robertson, A. V; *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 2199.

⁵ Cavalheiro, A. J.; Yoshida, M. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 811.

⁶ Kabir, K. E.; Khan, A. R.; Mosaddik, M. A. *J. Appl. Ent.* **2003**, *127*, 112.

⁷ a) Blázquez, M. A.; Bermejo, A.; Zafra-Polo, M. C.; Cortes, D. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 161. b) Ahmad, F. B.; Tukol, W. A.; Omar, S.; Sharif, A. M. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2430. c) El-Zayat, A. E.; Ferrigni, N. R.; McCloud, T. G.; McKenzie, A. T.; Byrn, S. R.; Cassady, J. M.; Chang, C.; McLaughlin, J. L. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 955. d) Jewers, K.; Blunden, G.; Wetchapinan, S.; Dougan, J.; Manchada, A. H.; Davis, J. B.; Kyi, A. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2025. e) Goh, S. H.; Ee, G. C. L.; Chuah, C. H.; Wei, C. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 199.

⁸ a) Fang, X. -P.; Anderson, J. E.; Chang, C-J.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1034. b) Fang, X. -P.; Anderson, J. E.; Chang, C-J.; McLaughlin, J. L. *Tetrahedron.* **1991**, *47*, 9751. c) Peris, E.; Estornell, E.; Cabedo, N.; Cortes, D.; Bermejo, A. *Phytochemistry.* **2000**, *54*, 311. d) Xu, C. V.; He, J. H. *J Asian Nat. Prod. Res.* **1999**, *2*, 1. e) Alkofahi, A.; Ma, W-W.; McKenzie, A. T.; Byrn, S. R.; McLaughlin, J. L. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1371.

antiinflamatória¹² e tripanocida.¹³ Apesar de estudos terem sido realizados a fim de elucidar os mecanismos de ação destes metabólitos, até o momento, pouco se conhece sobre o modo de ação destes compostos a nível celular.

As primeiras evidências do possível mecanismo de ação antiproliferativa da (*R*)-goniotalamina (**1**) vieram do desencadeamento da apoptose como demonstrado em células leucêmicas da linhagem Jurkat¹⁴ e HL-60.¹⁵ A indução da apoptose tem sido associada à perda do potencial de membrana mitocondrial,¹⁶ ativação de caspases, liberação de citocromo C^{14,17} além de fragmentação de DNA.¹⁷

Recentemente foi realizado um estudo em nosso laboratório para a investigação da ação das duas formas enantioméricas da goniotalamina (**1**) sobre a atividade e expressão da NO sintase (NOS) bem como a expressão de proteínas específicas envolvidas na apoptose e autofagia de células de câncer renal. Os resultados indicaram que a atividade antiproliferativa dos dois enantiômeros apresentava vias de sinalização de morte diferentes, a (*S*)-goniotalamina induziu a morte celular por via autofágica ao passo que a (*R*)-goniotalamina (**1**) por via apoptótica.¹⁸

Uma especial atenção tem sido dada a esta classe de compostos no que diz respeito às suas atividades antiproliferativas e propriedades antitumorais. Em geral, os efeitos citotóxicos observados para muitas estiril lactonas têm se mostrado seletivos contra algumas linhagens de células normais. Até 1999, 30 estiril lactonas foram relatadas na

⁹ Londershausen, M. Leicht, W.; Lieb, F.; Moeschler, H.; Weiss, H. *Pest. Sci.* **1991**, *33*, 427.

¹⁰ a) Khan, M. R.; Komine, K.; Omoloso, A. D. *Fitoterapia* **1998**, *69*, 367. b) Khan, M. R.; Komine, K.; Omoloso, A. D. *Phar. Biol.* **1999**, *37*, 340.

¹¹ a) Ee, G. C. L.; Lee, H. L.; Goh, S. H. *Nat. Prod. Lett.* **1999**, *13*, 137. b) Goh, S. H.; Ee, G. C. L.; Chuah, C. H.; Wei, C. *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 199.

¹² Tanaka, S.; Yoichi, S.; Ao, L.; Matumoto, M.; Morimoto, K.; Akimoto, N.; Honda, G.; Tsubuki, M.; Kanai, K.; Nagase, H.; Honda, T. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2493.

¹³ de Fátima, A.; Marquissolo, C.; de Albuquerque, S.; Carraro-Abrahão, A. A.; Pilli, R. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 1210.

¹⁴ Inayat-Hussain, S. H.; Osman, A. B.; Din, L. B.; Ali, A. M.; Snowden, R. T.; MacFarlane, M.; Cain, K. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 379.

¹⁵ Inayata-Hussain, S.; Osman, A. B.; Din, L. D.; Taniguchi, N. *Toxic. Lett.* **2002**, *131*, 153.

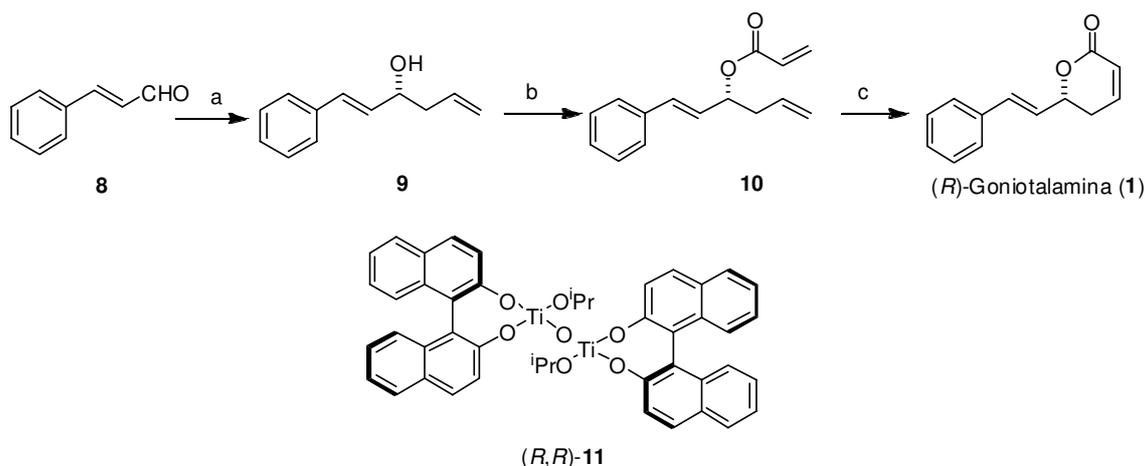
¹⁶ Inayat-Hussain, S. H.; Annuar, B. O.; Din, L. B.; Ali, A. M.; Ross, D. *Toxicol. Vitro* **2003**, *17*, 433.

¹⁷ Lee, A. T. C.; Azimahtol, H. L. P.; Tan, A. N. *Cancer Cell International* **2003**, *3*:16.

¹⁸ de Fátima, Â.; Zambuzzi, W. F.; Modolo, L. V.; Tarsitano, C. A. B.; Gadelha, F. R.; Hyslop, S.; de Carvalho, J. E.; Salgado, I.; Ferreira, C. V.; Pilli, R. A. *Chemico-Biological Interactions*, **2008**, *178*, 143.

literatura e atualmente 90 (incluindo os análogos sintéticos) já foram obtidos e eventualmente testados contra células de câncer.¹⁹

Em função do seu potencial biológico, várias abordagens para a síntese da forma natural e não-natural da goniotalamina estão descritas na literatura. Nosso grupo descreveu a síntese total da (*R*)-goniotalamina (**1**)²⁰ empregando-se como etapas-chaves a alilação assimétrica catalítica, desenvolvida por Maruoka e colaboradores,²¹ e a reação de metátese de olefinas para fechamento de anéis.²² (Esquema 1)



Condições: a) (*R,R*)-**11** [(*R,R*)-BINOL (10 mol%), Ti(OⁱPr)₄ (15 mol%), TiCl₄ (5 mol%), Ag₂O (10 mol%)], alitributilestanho (1.1. equiv.), CH₂Cl₂, -20°C, 24 h (78%; 96% ee); b) cloreto de acrilóila (1.8 equiv.), Et₃N (3.6 equiv.), CH₂Cl₂, 0°C (80%); c) (Pcy₃)₂Cl₂Ru=CHPh (10mol%), CH₂Cl₂ (98%).

Esquema 1: Rota de síntese para a (*R*)-goniotalamina (**1**)

Desta forma a (*R*)-goniotalamina **1** foi obtida em 3 etapas e 61% de rendimento total a partir do *trans*-cinamaldeído **8**.²⁰

Muitas abordagens de síntese total da (*R*)- e (*S*)-goniotalamina (**1**) estão descritas na literatura e, de uma maneira geral, a configuração absoluta da diidropiranona é estabelecida empregando-se material de partida quiral²³, boranas quirais²⁴, reduções

¹⁹ de Fatima, A.; Modolo, L. V.; Conegero, L. S.; Pilli, R. A.; Ferreira, C. V.; Kohn, L. K.; de Carvalho, J. E. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3371.

²⁰ de Fátima, A.; Pilli, R. A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8721.

²¹ Hanawa, H.; Hashimoto, T.; Maruoka, R. D.; Zhang, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1708.

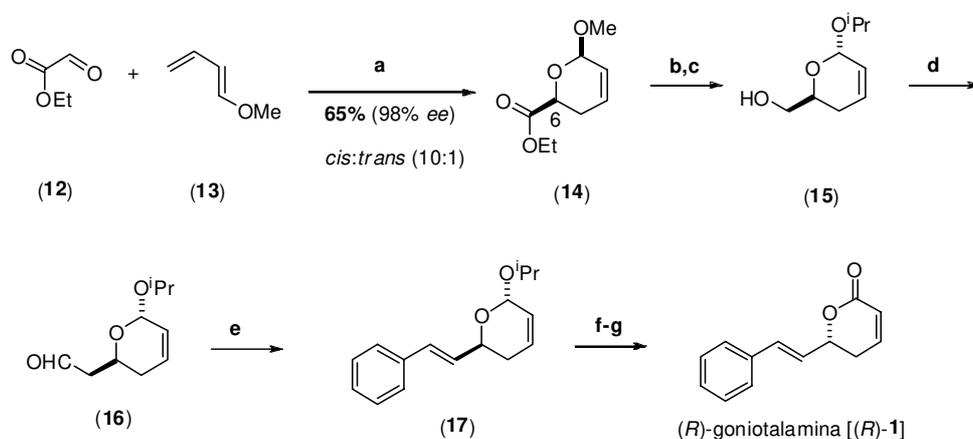
²² Grubbs, R. H.; Chang, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4413

²³ a) O'Connor, B.; Just, G. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 5201. b) Rahman, S. S.; Wakefield, B. J.; Roberts, S. M.; Dowle, M. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 303. c) Tsubuki, M.; Kanai, K.; Honda, T. *Heterocycles*, **1993**, *35*, 281.

²⁴ a) Reddy, M. V. R.; Brown, H. C.; Ramachandran, P. V. *J. Organomet. Chem.*, **2001**, *624*, 239. b) Sato, M.; Sunami, S.; Sugita, Y.; Kaneko, C. *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 839. c) Ramachandran, P. V.; Reddy, M. V. R.; Brown, H. C. *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 583.

assimétricas de compostos carbonílicos promovida por microorganismos ou enzimas²⁵, resolução química ou enzimática de álcoois²⁶ sendo poucos métodos químicos catalíticos e assimétricos.²⁷

Quitschalle e colaboradores²⁷ descreveram a síntese total da (*R*)-goniotalamina [(*R*)-**1**] empregando-se uma reação de hetero Diels-Alder (HDA) assimétrica entre o glioxilato de etila (**12**) e 1-metoxi-1,3-butadieno (**13**), promovida pelo sistema catalítico Ti(O^{*i*}Pr)₄ e (*R*)-BINOL, como etapa-chave para a formação do núcleo da diidropiranona. Desta forma, a diidropiranona **14** foi obtida em bom rendimento (65%) em, boa razão *cis:trans* (10:1) e ótimo excesso enantiomérico (98%) (Esquema 2).



Reagentes e condições: **a**) (*R*)-BINOL (25 mol%), CH₂Cl₂, Ti(O^{*i*}Pr)₄; **b**) LiAlH₄, Et₂O, 0 °C; **c**) ^{*i*}PrOH, PPTS; **d**) oxidação de Swern (77% para as 3 etapas); **e**) C₆H₅CH₂P(^{*n*}Bu)₃Br, KO^{*t*}Bu (79%); **f**) PPTS, acetona, H₂O; **g**) MnO₂, CH₂Cl₂ (60% para as duas etapas).

Esquema 2: Síntese total da (*R*)-goniotalamina [(*R*)-**1**] segundo Quitschalle e colaboradores.²⁷

²⁵ a) Bennett, F.; Knight, D. W. *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 4625. b) Bennett, F.; Knight, D. W.; Fenton, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1991**, 519. c) Job, A.; Wolberg, M.; Müller, M.; Enders, D. *Synlett*, **2001**, 1796. d) Henkel, B.; Kunath, A.; Schick, H. *Liebigs. Ann. Chem.*, **1992**, 809.

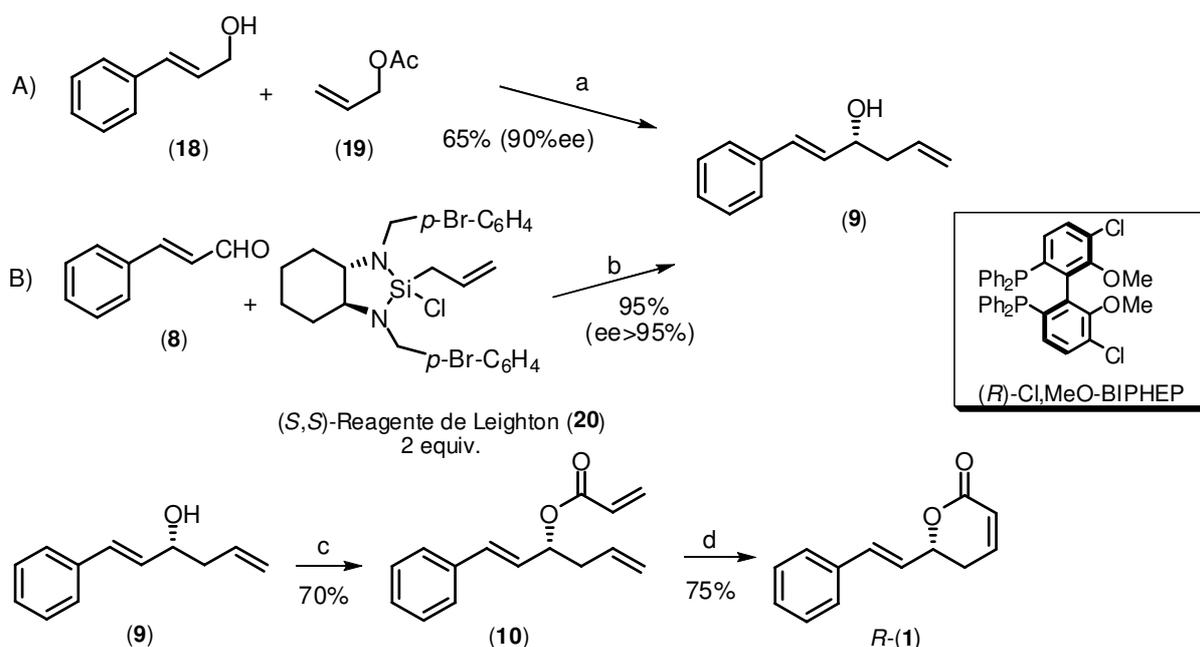
²⁶ a) Liu, Z. Y.; Ji, J. X.; Li, B. G. *J. Chem. Res. (S)*, **2004**, *1*, 61. b) Honda, T.; Kametani, T.; Kanai, K.; Tatsuzaki, Y.; Tsubuki, M. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1*, **1990**, 1733 c) Sundby, E.; Perk, L.; Anthonsen, T.; Aasen, A. J.; Hansen, T. V. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 521. d) Fuganti, C.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Sarra, A.; Servi, S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 1135. e) Gruttadauria, M.; Meo, P. L.; Noto, R. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 83.

²⁷ Quitschalle, M.; Christmann, M.; Bhatt, U.; Kalesse, M. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 1263.

Para sínteses da forma racêmica da goniotalamina (1) ver: a) Chidambaram, N.; Satyanarayana, K.; Chandrasekaran, S. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2429. b) Fournier, L.; Kociński, P.; Pons, J. M. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1659. c) Fuganti, C.; Pedrocchi-Fantoni, G.; Sarra, A.; Servi, S. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 1135.

Embora se tenha obtido a diidropiranona **14** de maneira eficiente, se fez necessária a sua conversão ao correspondente diidropirano **15** de forma a evitar a epimerização observada no C6 na etapa de olefinação quando empregou-se o aldeído que apresenta o grupo OMe em C6. A mudança de configuração da posição anomérica previne a racemização do aldeído **16** durante a reação de Wittig por dificultar a desprotonação em C6 devido às interações 1,3-diaxiais. A conversão do aldeído **16** à (*R*)-goniotalamina [(*R*)-**1**] se deu através da sua olefinação de Wittig seguida pela hidrólise do acetal resultante e subsequente oxidação com dióxido de manganês (MnO₂). A (*R*)-goniotalamina [(*R*)-**1**] foi sintetizada em 7 etapas, 23% de rendimento total e 98% de excesso enantiomérico a partir do glioxilato de etila (**12**) e do 1-metoxi-1,3-butadieno (**13**).²⁷

A síntese assimétrica mais recente descrita para a goniotalamina (**1**) é relatada por O'Doherty e colaboradores²⁸ e, emprega dois métodos de alilação assimétrica para a instalação do centro assimétrico presente na estrutura.



Reagente e condições: a) [Ir(cod)Cl]₂ (3%); (*R*)-Cl,MeO-BIPHEP (6%); CsCO₃ (25%); ácido *m*-nitrobenzóico; 100°C, 1 dia. b) CH₂Cl₂; -20°C, 2 dias. c) DCC, DMAP, ácido acrílico; d) (Pcy₃)₂Cl₂Ru=CHPh (11%), CH₂Cl₂.

Esquema 3: Síntese total da (*R*)-goniotalamina (**1**) segundo O'Doherty e colaboradores.

²⁸ Harsh, P.; O'Doherty, G. A.; *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 5051.

O método A emprega a alilação desenvolvida por Krische, em que o álcool cinâmico (**18**) reage com acetato de alila (**19**) na presença de um reagente de irídio, carbonato de cézio e do indutor quiral em quantidades catalíticas. Já o método B, emprega a alilação do *trans*-cinamaldeído (**8**) com o reagente de Leighton (**20**), fornecendo o álcool alílico (**9**) em 95% de rendimento e ee>95%. Os dois métodos de alilação compartilham as duas últimas etapas que envolvem acilação na presença de ácido acrílico e reação de metátese de olefinas para fechamento de anel.

A abordagem sintética para a obtenção da (*R*)-goniotalamina (**1**) desenvolvida em nosso grupo de pesquisa apresenta algumas vantagens frente às propostas apresentadas anteriormente, uma vez que, se trata de uma síntese curta e emprega um método catalítico e assimétrico. A metodologia desenvolvida por O'Doherty e colaboradores (método A), embora seja catalítica e assimétrica, emprega condições reacionais mais severas. As vantagens apresentadas pela nossa metodologia representam um importante avanço para que os estudos de atividade biológica e do mecanismo de ação desta estiril lactona e de seus análogos, uma vez que nossa rota sintética permite obter a (*R*)-goniotalamina (**1**) em quantidades apreciáveis.

Recentemente, nosso grupo descreveu, em conjunto com o doutorando Ângelo de Fátima, os resultados relativos à atividade antiproliferativa da (*R*)- e (*S*)-goniotalamina (**1**) e alguns derivados.^{20,29,30,31} De posse de uma estratégia altamente eficiente para a síntese dos dois enantiômeros da goniotalamina (**1**), a obtenção dos análogos pôde ser facilmente alcançada pela variação do aldeído de partida (estruturalmente similar ao *trans*-cinamaldeído (**8**)). Os oito análogos foram escolhidos (Figura 2) de forma a se obter a identificação dos grupos farmacofóricos da (*S*)-goniotalamina (**1**), uma vez que esta se apresentou significativamente mais ativa (ca. de 1600 vezes) do que a sua forma natural (enantiômero *R*) em ensaios de citotoxicidade contra a linhagem de células de câncer

²⁹ de Fátima, A.; Kohn, L. K.; Antonio, M. A.; de Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 2927;

³⁰ de Fátima, A. *Goniotalamina, Epoxigoniotalamina, Argentilactona e Derivados: Sínteses Totais e Atividades Antiproliferativas contra Células Tumerais Humanas*, Tese de Doutorado, **2005**, Instituto de Química Unicamp..

³¹ de Fátima, A.; Kohn, L. K.; de Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 622.

renal (786-0). Os compostos de **20-27** foram obtidos em bons rendimentos e excelentes excessos enantioméricos.²⁹

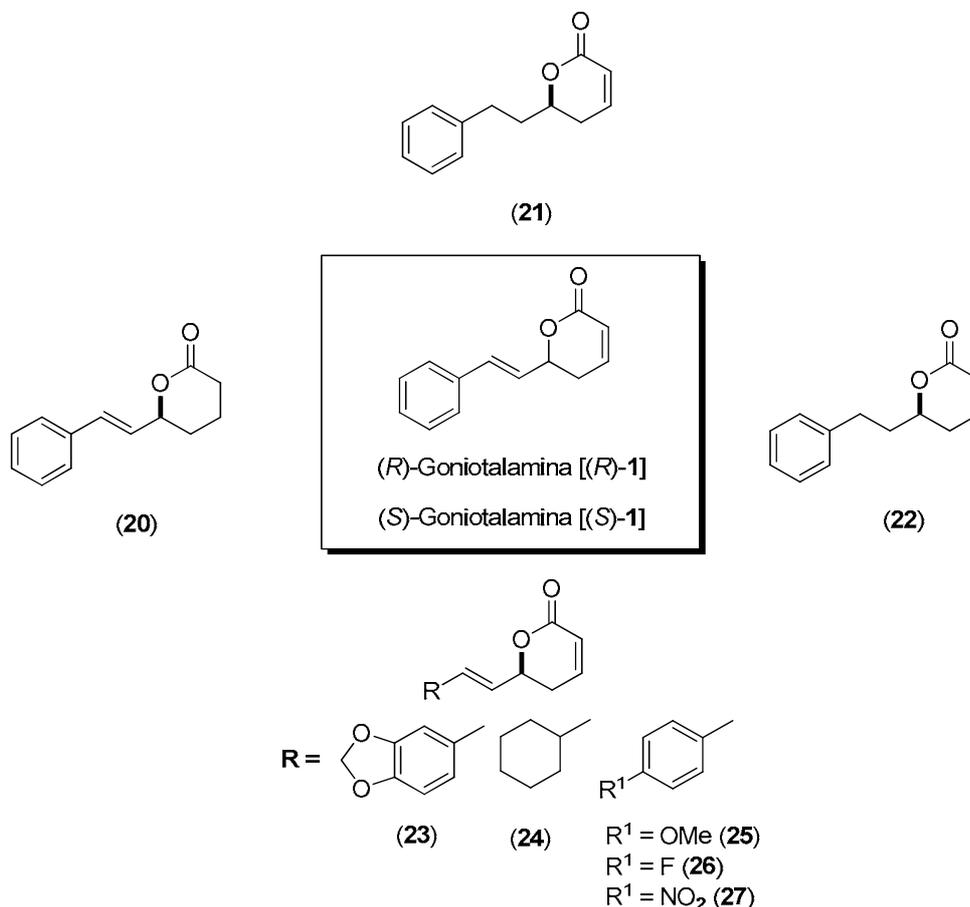


Figura 2: Análogos **20-27** sintetizados para a identificação dos grupos farmacofóricos da (*S*)-goniotalamina (**1**).

A atividade antiproliferativa destes compostos foi avaliada para as seguintes linhagens de células tumorais: melanona (UACC-62), mama (MCF-7), rim (786-0), ovário resistente (NCI-ADR), pulmão (NCI-486), próstata (PCO-3), ovário (OVCAR-3) e cólon (HT-29). A Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas (CPQBA-UNICAMP). Os valores foram expressos em função do IC₅₀ (μM) e estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (μM)^a para a atividade antiproliferativa dos compostos (*R*)- e (*S*)-**1** e **20-27** em células tumorais humanas.

Compostos	Linhagem Celular (IC ₅₀ , μmol/L) ^a							
	UACC.62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-460	PCO-3	OVCAR-3	HT-29
(R)-1	17,4	10,5	2,3	6,4	6,4	>100	39,0	11,2
(S)-1	27,6	9,4	23,5	0,004	14,6	24,3	17,0	22,5
20	5,5	12,5	0,1	19,0	11,0	ND	3,5	8,5
21	23,7	20,0	6,0	20,8	18,3	20,8	16,3	28,7
22	ND	ND	ND	ND	ND	ND	>100	1,9
23	26,8	40,1	23,7	31,9	38,1	21,7	24,6	23,7
24	2,4	4,8	19,4	0,005	16,5	15,5	1,5	ND
25	5,9	6,5	0,004	7,4	16,9	14,8	20,8	28,2
26	23,8	14,4	18,7	9,6	53,2	24,6	26,1	34,8
27	13,0	16,5	11,2	2,2	27,3	26,5	9,4	9,4
Dox	9,8	3,3	48,7	>100	1,8	18,6	11,7	5,3

ND = Não pode ser determinado dentro da faixa de concentrações utilizadas. ^aA concentração que provoca 50% da inibição do crescimento celular (IC₅₀), dado em μM, foi determinada a partir de análises de regressão linear utilizando-se GraphPad Prism software ($r^2 > 0,9$). Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

A partir dos valores de IC₅₀ (μM), pôde-se tirar algumas conclusões a respeito da influência estrutural na atividade antiproliferativa da série *S* dos derivados da goniotalamina sobre a linhagem renal (786-0). Foi evidenciada a importância da insaturação do anel pirano e a insaturação do núcleo estirênico, além disso, a configuração *S* da lactona amplia significativamente a atividade antiproliferativa do composto *S*-(**1**) sobre a linhagem renal. Grupos doadores ou retiradores no anel aromático diminuem a potência do composto, já a substituição do anel aromático por um anel cicloexânico não afetaria a potência observada.

Ao longo desse estudo, puderam-se mapear os grupos farmacofóricos essenciais para a atividade citotóxica dessa classe de substâncias como representado na Figura 3.

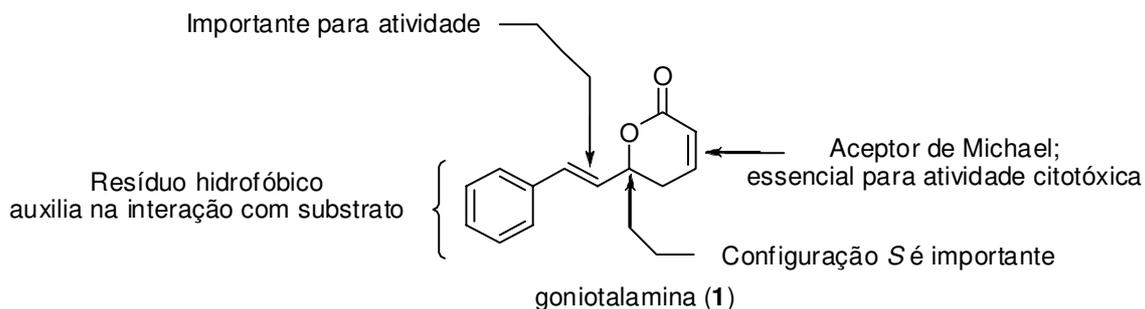


Figura 3: Grupos farmacofóricos na estrutura da goniotalamina (1) sobre células de tumor renal.²⁹

Um método muito usado e recompensador para otimizar a atividade de compostos são as mudanças estruturais procurando introduzir grupos que conferem uma maior ou menor hidrofobicidade, ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo posteriormente a aplicação de algum método de correlação entre a estrutura química e a atividade biológica, que pode ser tanto qualitativa como quantitativa (SAR e QSAR).³²

Um conjunto de dezesseis substâncias análogas ou derivadas da goniotalamina (1), também preparadas em nosso laboratório, foi avaliado quanto a sua atividade tripanocida contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os bioensaios foram realizados em amostras de sangue, cuja forma circulante neste meio é a tripomastigota e a mais vulnerável aos agentes tripanocidas. Estrategicamente, é interessante que se avalie primeiro a atividade de candidatos a agentes tripanocidas nesta forma, pois se eles forem ineficazes para a forma tripomastigota não valerá a pena testar para as demais formas, pois estas se encontram alojadas dentro das células e, nesta situação, a barreira oferecida pela membrana celular diminuirá ainda mais a atividade tripanocida.

As diidropiranonas testadas estão apresentadas na figura a seguir.

³² Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. *Quim. Nova* **1998**, *21*, 99.

Introdução

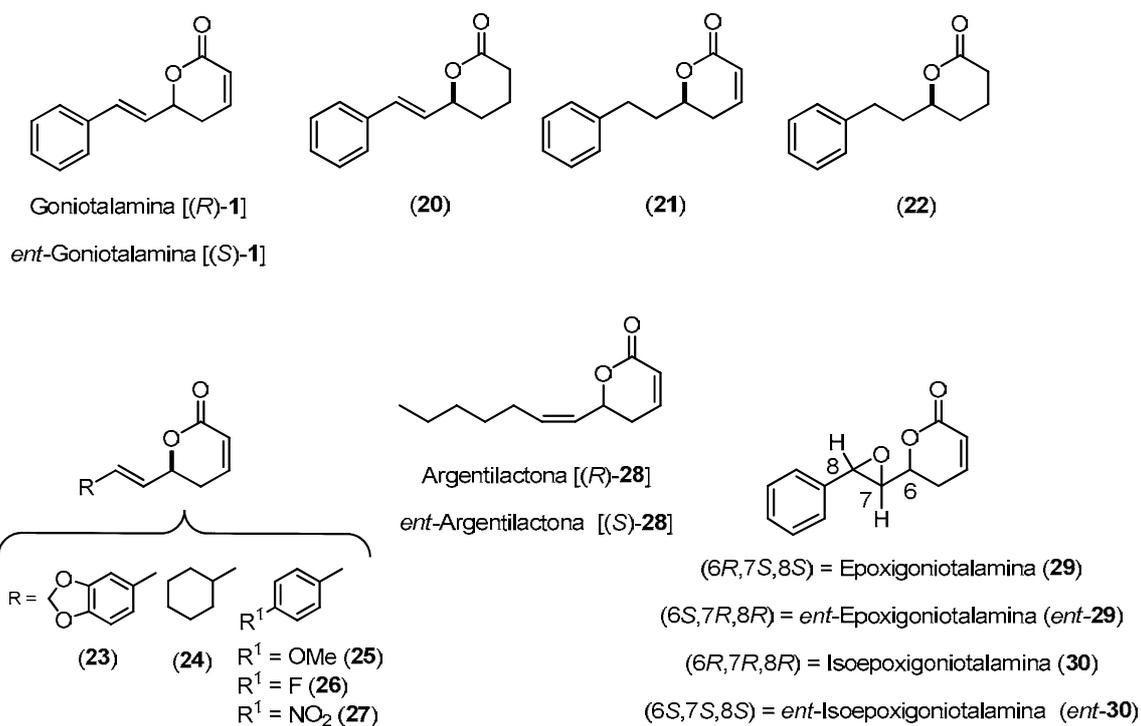


Figura 4: Estruturas químicas dos compostos testados contra a forma tripomastigota do *T. cruzi*.

Os respectivos valores de IC₅₀ (mM) estão mostrados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de IC₅₀ para dihidropirranonas naturais e não-naturais para *T. cruzi* (forma tripomastigota)^a.

Composto	IC ₅₀ (mM) ^b	Composto	IC ₅₀ (mM) ^b
1	1,30	26	0,12
(S)-1	0,35	27	0,09
20	0,21	28	0,94
21	0,91	(S)-28	0,47
22	0,19	29	0,41
23	2,39	<i>ent</i> -29	1,50
24	0,22	30	0,25
25	6,27	<i>ent</i> -30	0,26

^aControle positivo – violeta-de-genciana a 250 µg/mL (IC₅₀ = 0,08 mM); controle negativo – sangue infectado + DMSO.

^bConcentração que promove a lise de 50% das formas de *T. cruzi* circulantes no sangue.

Os análogos **26** e **27** se mostraram como os compostos mais ativos com valores de IC_{50} (0,12 e 0,09mM, respectivamente) próximos ao da violeta-de-genciana ($IC_{50}=0,08mM$) utilizada como controle positivo. A goniotalamina não-natural [(*S*)-**1**] se mostrou três vezes mais potente do que a sua forma natural [(*R*)-**1**]. Da mesma maneira, a argetilactona não natural [(*S*)-**28**, $IC_{50}=0,47mM$] também se mostrou mais potente que sua forma natural [(*R*)-**28**, $IC_{50}=0,94mM$]. O epóxido **29** se mostrou mais potente do que seu estereoisômero *ent*-**29**. Os resultados revelaram a importância da configuração absoluta do centro estereogênico presente na posição 6 do anel diidropirânico e da presença de substituintes retiradores de elétrons na posição *para* do anel benzênico para aumentar a atividade tripanocida desta classe de substâncias.

Os análogos mais ativos, **26** e **27**, foram testados contra células (LLC-MK₂) não infectadas para a avaliação de suas respectivas citotoxicidades. Os resultados foram muito animadores, pois os valores de IC_{50} foram 1,38 e 4,89mM para **26** e **27**, respectivamente, bastante superiores aos valores de IC_{50} (0,12 e 0,09mM, respectivamente) observados contra a forma tripomastigota do *T. cruzi* (Tabela 2). Estes resultados mostram que é preciso uma grande quantidade destes compostos para que os mesmos sejam tóxicos às células sadias quando comparadas com a quantidade necessária para eliminar as formas livres do *Trypanosoma cruzi*.

Frente a esses resultados, o desenvolvimento de novos compostos biologicamente ativos tem se mostrado essencial na luta contra diversos tipos de doenças. Os híbridos de produtos naturais aparecem como uma estratégia para ampliar a coleção de candidatos a fármacos através da combinação de fragmentos de ocorrência natural. A alta diversidade e a possibilidade de combinar as atividades inerentes de cada produto natural podem apresentar vantagens sobre a química combinatória, onde apesar do grande número de compostos acessíveis, a diversidade estrutural proporcionada por essa estratégia é limitada. Desta forma, o desenvolvimento de novos híbridos de uma forma racional é de grande valia para ampliar o espaço químico de estruturas para avaliação biológica.³³ É indiscutível a importância dos produtos naturais como fonte inspiradora para a síntese de novos compostos. Conhecidos como “lead compounds”, os produtos naturais que apresentam uma atividade biológica interessante se tornam alvos de modificação e

³³ Tietze, L.F.; Bell, H. P.; Chandrasekhar, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3996.

possível acoplamento com outras estruturas para a síntese de híbridos de produtos naturais. Esta metodologia também é adotada, de maneira sábia pela natureza.³³

A vincristina é um exemplo de híbrido de ocorrência natural. Usada no tratamento de leucemia em crianças, a vincristina (Figura 5) é um híbrido entre a vindolina (um alcalóide indólico do subgrupo das *Aspidorsperma*) e catarantina (um alcalóide indólico do subgrupo *Iboga*).³³ A vimblastina e a vitamina E, entre outros, também fazem parte dessa categoria de compostos híbridos. É interessante destacar que, em muitos casos, nem sempre os fragmentos isolados apresentam uma atividade biológica interessante ou pronunciada, às vezes nem mesmo parecida. O grande diferencial está relacionado justamente à possibilidade de potencializar uma atividade já conhecida ou até mesmo demonstrar e desempenhar uma nova aplicação antes desconhecida.

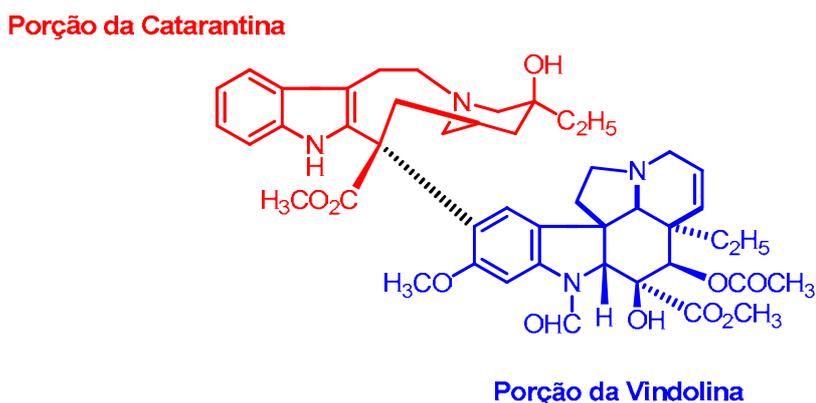


Figura 5: Estrutura da vincristina.

Compostos biologicamente ativos como a goniotalamina (1), com grupos farmacofóricos já determinados por estudos de SAR, são interessantes alvos de variação estrutural, uma vez que estes novos compostos podem vir a demonstrar uma atividade biológica mais expressiva. Exemplos recentes e de grande importância comercial ilustram a forte presença de compostos derivados de produtos naturais, muitos destes já estão em circulação no mercado e outros se encontram em fase de testes pré-clínicos.³⁴ Partindo dessa premissa nosso grupo de pesquisa tem mostrado esforços na síntese de compostos

³⁴ Wilson, R. M.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8329.

que apresentam estrutura análoga a da goniotalamina (**1**) a fim de realizar testes de atividade biológica contra células de câncer e células infectadas com *Trypanosoma cruzi*.

De posse de uma rota sintética curta e consideravelmente eficiente para um produto biologicamente ativo é possível realizar a modificação molecular e a síntese de novos análogos da goniotalamina (**1**).

2. OBJETIVOS

Com base nos estudos de atividade biológica que já foram realizados em nosso laboratório,³⁰ o presente estudo tem como objetivo preparar análogos heterocíclicos da goniotalamina (**1**). Estes novos compostos de natureza furânica serão sintetizados nas suas versões assimétricas utilizando uma metodologia catalítica desenvolvida em nosso laboratório. Nossa metodologia emprega uma rota de síntese curta e consideravelmente eficiente para a obtenção desses análogos em quantidades apreciáveis. Os compostos a serem sintetizados estão mostrados na Figura 6.

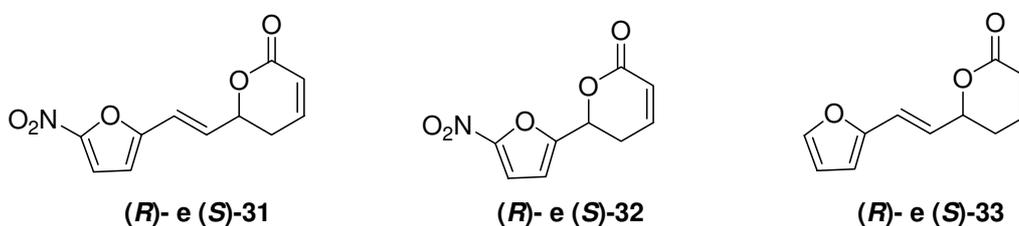


Figura 6: Compostos a serem sintetizados neste trabalho.

Estes compostos serão submetidos a teste de atividade antiproliferativa contra células tumorais humanas: leucemia, ovário, rim, próstata, cólon, pulmão, mama, ovário resistente e melanoma em colaboração com o Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA-UNICAMP). Em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque (Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- USP) realizaremos bioensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* e contra a forma promastigota de *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis*.

A partir dos resultados de atividade biológica poderemos analisar a importância do anel furânico bem como tecer outras observações relevantes inerentes a estrutura dos compostos testados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PARTE: 1 METODOLOGIA SÍNTÉTICA

3.1.1 - SÍNTESE

Em nosso trabalho, a idéia de sintetizar **31**, **32** e **33** reside no fato de preparar análogos não mais de natureza estirênica, mas sim com outro sistema aromático que pudesse de certa forma ser interessante para os futuros testes de atividade. A idéia de manter o esqueleto da diidropirano reside no fato de que muitos estudos atribuem os efeitos farmacológicos desse sistema à presença de uma dupla conjugada nesta lactona que age como um aceptor de Michael em sistemas biológicos.³⁵

O anel furânico foi escolhido como o novo sistema aromático, em razão de não ter sido relatado nenhum análogo de goniotalamina (1) que compartilhasse dessa natureza heterocíclica. Esta estratégia utilizada por nós é conhecida como bioisosterismo, que é uma ferramenta muito utilizada pelos químicos medicinais para a modificação racional de um composto protótipo, visando dessa maneira melhorar a afinidade, a eficácia e a especificidade bem como melhorar as qualidades farmacocinéticas e físico-químicas. A substituição de um anel benzênico por um anel furânico representa um caso de bioisosterismo clássico pela equivalência de anéis, segundo as exigências preconizadas pelas definições de Grimm e Erlenmeyer.³⁶

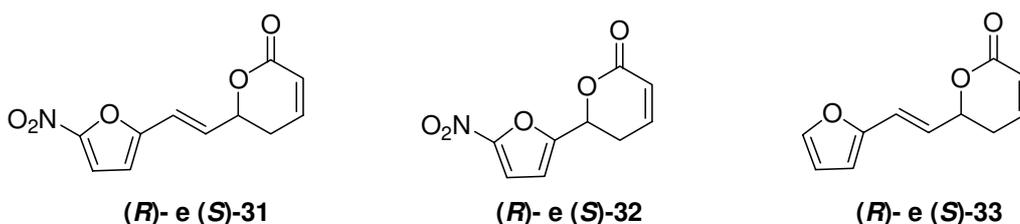


Figura 7: Alvos sintéticos deste trabalho.

³⁵a) Boucard, V.; Broustal, G.; Campagne, J. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *22*, 225. b) Marco, J. A.; Carda, M.; Murga, J.; Falomir, E. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2929. c) de Fátima, A; Kohn, L. K.; de Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 622. d) de Fátima, A; Modolo, L. V; Conegero, L. S. Pilli, R. A. Ferreira, C. V.; Kohn, L. K.; de Carvalho, J. E. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3371.

³⁶a) Patani, G.A., LaVoie, E.J. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147. b) Lima, L. M. Barreiro, E. J. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 23. c) Barreiro, E.J., Fraga, C.A.M. *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 1ª Ed. Art-Med Ltda, Porto Alegre, RS, **2001**, 166.

Estudos anteriores mostraram a potencialidade de dois análogos da goniotalamina (*p*-fluoro-goniotalamina (**26**) e *p*-nitro-goniotalamina (**27**), contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*, ($IC_{50}=0,12$ e $0,09mM$, respectivamente) com valores de IC_{50} muito próximos ao do controle positivo (violeta de genciana $IC_{50}=0,08mM$).¹³ O tratamento da Doença de Chagas conta hoje, na prática, com apenas dois medicamentos: o Benzonidazol (**30**) e o Nifurtimox (**31**), marcas de propriedade de Roche e Bayer, respectivamente. Porém, estes medicamentos apresentam severos efeitos colaterais e suas eficiências dependem da susceptibilidade das diferentes populações do parasita.³⁷ Em virtude destes obstáculos e dos resultados surpreendentes obtidos para os compostos **22** e **23** a busca por novos agentes tripanocidas se torna indispensável e os processos de modificação molecular são promissores.

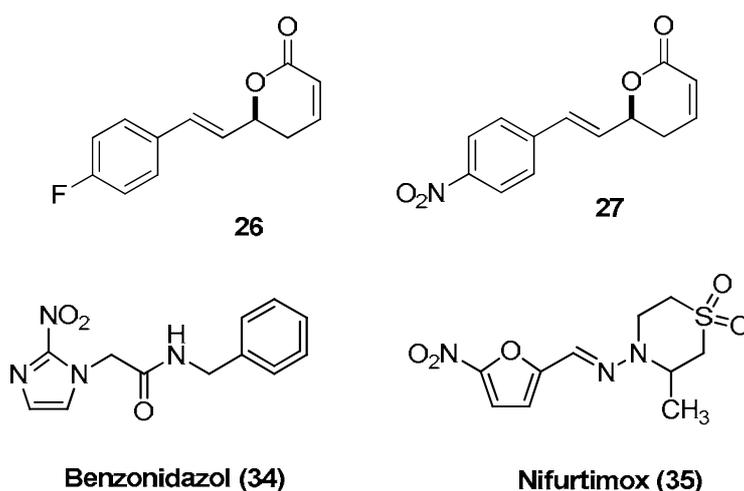


Figura 8: Estrutura dos compostos *p*-fluoro-goniotalamina (**26**), *p*-nitro-goniotalamina (**27**) e dos fármacos utilizados contra a doença de Chagas: Benznidazol (**34**) e Nifurtimox (**35**).

Após observar a potencialidade das diidropiranos **26** e **27** nos propusemos a realizar a síntese de novos análogos que apresentam a porção 5,6-diidropiran-2-ona e possui a porção 5-nitro-furano presente no Nifurtimox, já reconhecida como essencial para a atividade anti *T. cruzi*. A síntese de híbridos de produtos naturais tem aparecido como um

³⁷ Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 690.

dos principais avanços para a área de síntese orgânica e garante o acesso a uma inextinguível variedade de novas estruturas. Estes novos compostos podem apresentar atividades biológicas mais pronunciadas, ou até mesmo diferentes das atividades dos compostos de origem.

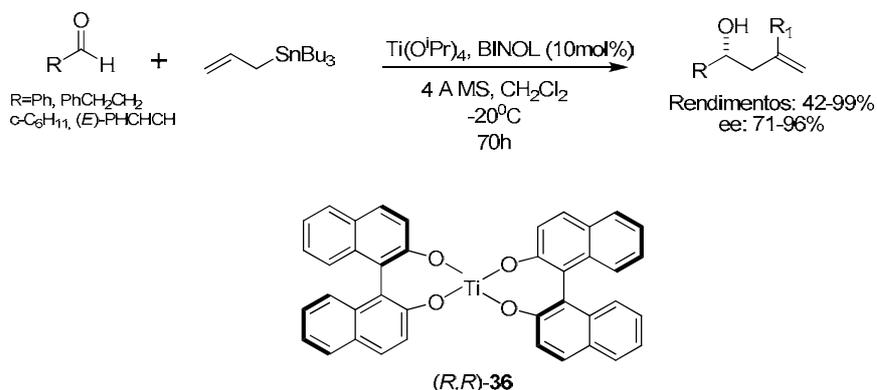
Estes novos análogos **31**, **32** e **33**, podem ser classificados como estruturas híbridas, pois apresentam a combinação de fragmentos oriundos da goniotalamina (**1**) e Nifurtimox (**35**) cujas atividades já são conhecidas. Como híbridos estes compostos podem vir a apresentar atividade anti *T. cruzi* mais pronunciada que os análogos **26** e **27** ou até mesmo uma atividade diferente para a qual foram inicialmente projetados, como por exemplo, atividade antiproliferativa em células tumorais humanas e atividade leishmanicida. Diante dessas perspectivas, é necessária uma rota sintética curta e eficiente para a obtenção dos compostos de maneira rápida e em quantidades suficientes para a realização dos ensaios e ainda, que forneça os mesmos em sua forma enantiomericamente pura, já que apresentam um centro estereogênico.

A estratégia utilizada para a síntese do composto **31**, **32** e **33** está baseada na rota sintética adotada para a goniotalamina (**1**). No entanto, a metodologia aplicada à etapa de alilação catalítica assimétrica foi a desenvolvida por Keck e colaboradores³⁸ e não a alilação de Maruoka e colaboradores²¹, uma vez que estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa também mostraram excessos enantioméricos excelentes nas condições de Keck. Além disso, a parte operacional para a execução desta reação nas condições de Maruoka é de maior complexidade.

Keck e colaboradores descreveram a adição de alilestanana a aldeídos catalisada pelo complexo (*R,R*)-**36**, obtendo-se os respectivos álcoois homoalílicos em rendimentos moderados a excelentes e níveis de enantiosseletividade na faixa de 71-96%. O processo descrito por Keck emprega quantidades catalíticas de $Ti(O^iPr)_4$ e de (*R*)-BINOL (Esquema 4).³⁸ Com relação à estrutura do catalisador de Keck, alguns estudos têm apontado para a formação de um composto dimérico.³⁹

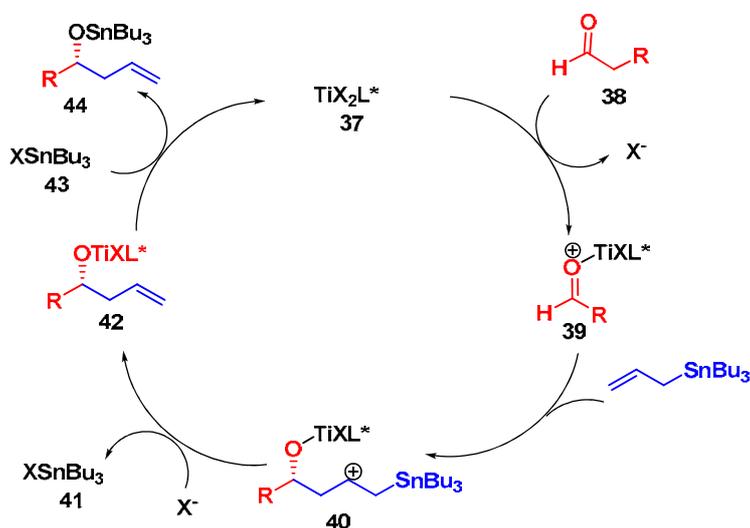
³⁸ Keck, G.E.; Tarbet, K.H.; Geraci, L.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8467.; b) Keck, G.E.; Geraci, L.S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7827.

³⁹ Hu, Q-S.; Vitharana, D.; Zheng, X-F.; Wu, C.; Kwan, C. M. S.; Pu, L. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8370. b) Corey, E. J.; Lee, T. W. *Chem. Commun.* **2001**, 1321.



Esquema 4: Reação de alilação de aldeídos com alitributilestanana nas condições desenvolvidas por Keck e colaboradores e a estrutura da possível espécie cataliticamente ativa durante a reação, o complexo (R,R)-36.³⁹

O mecanismo exato para a reação de alilação assimétrica não é completamente entendido. Entretanto, acredita-se que a carbonila ativada do aldeído sofra um ataque nucleofílico da alitributilestanana. Após a perda do grupo tributilestanho, ocorre a formação de um alcóxido homolalílico de titânio (IV). Subsequentemente, o ácido de Lewis é regenerado através de uma reação de transmetalção (Esquema 5).⁴⁰



Esquema 5: Mecanismo para formação de composto alilado 44.⁴¹

⁴⁰ a) Keck, G. E.; Krishnamurthy, D.; Grier, M. C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6543. b) Faller, J. W.; Sams, D. W. I.; Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1217. c) Denmark, S. E.; Hosoi, S. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 5133.

⁴¹ Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic Applications of Named Reactants in Organic Synthesis*. **2005**, 236, Elsevier Academic Press.

Corey e colaboradores,^{39b} propõem um modelo em analogia a estudos cristalográficos, que explica a enantiosseletividade de reações de aldeídos catalisadas por ácido de Lewis. Nesse modelo há uma ligação de hidrogênio, não clássica, entre o hidrogênio do aldeído e o oxigênio do indutor quiral (BINOL). A alilestanana provavelmente transfere o grupo alila para o Ti(IV) enquanto que o grupo Bu_3Sn se liga ao oxigênio do BINOL, causando a dissociação desse oxigênio do Ti. A estrutura a seguir (Figura 9) mostra a indução de quiralidade para o álcool homoalílico formado a partir do benzaldeído e permite concluir que o centro *S* é formado com o uso do (*S*)-BINOL, assim como o álcool *R* é formado na presença de (*R*)-BINOL, quando o grupo alila é de prioridade inferior ao do grupo ligado à carbonila do aldeído, de acordo com a prioridade de Cahn-Ingold-Prelog.

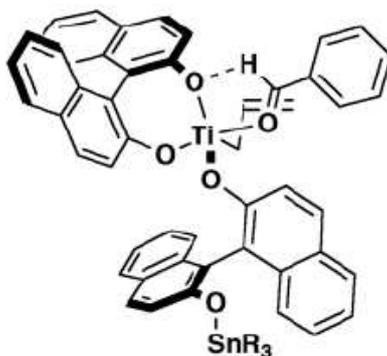
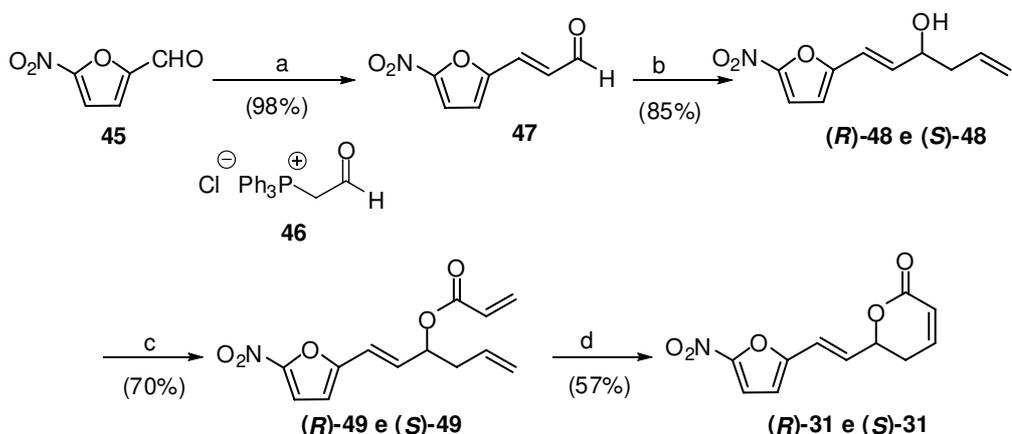


Figura 9: Modelo de Corey para o estado de transição em reações de alilação de Keck, utilizando (*R*)-BINOL.

A síntese do composto **31** inicia-se por uma reação de Wittig entre o 5-nitro-2-furaldeído **45**, disponível comercialmente, e o ílideo de fósforo gerado a partir de **46**, seguido de alilação assimétrica nas condições descritas por Keck³⁸ para obtenção do álcool homoalílico **48** em 85% de rendimento (Esquema 6). O intermediário **48**, por sua vez, foi submetido a uma reação de esterificação utilizando cloreto de acrilóila fornecendo o acrilato **49** em 70% de rendimento. Finalmente, o intermediário **49** foi submetido a uma reação de metátese de olefinas para fechamento de anel utilizando o catalisador de Grubbs de primeira geração fornecendo a lactona em 57% de rendimento. Ambos os enantiômeros da 5-nitrofuranotalamina (*R*)-**31** e (*S*)-**31** foram sintetizados em 4 etapas e 33% de rendimento global (Esquema 6).



Condições: a) cloreto de formilmetiltrifenilfosfônio (**14**), Et₃N, tolueno, refluxo. b) (R)- ou (S)-BINOL (10 mol%), Ti(OⁱPr)₄, alitributilestanana, CH₂Cl₂, PM 4Å, -20 °C, 60h. c) cloreto de acríloila, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C. d) (Pcy₃)₂Cl₂Ru=CHPh (10 mol%), CH₂Cl₂.

Esquema 6 : Rota de síntese para (R)-31 e (S)-31.

O espectro de I.V. do intermediário **47** obtido em 98% de rendimento, apresenta uma banda em 2741 cm⁻¹ referente aos estiramentos simétrico e assimétrico da ligação C-H do grupo formila e uma banda em 1630cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação C=C. No espectro de RMN de ¹H dois dubletos na região de δ 7,35 (*J*=3,6Hz) e δ 6,90 (*J*=3,6Hz) correspondem aos hidrogênios aromáticos. Os hidrogênios olefínicos aparecem como um dubleto em δ 7,23 (*J*=16,2Hz) e um duplo dubleto em δ 6,85 (*J*=16,2 e 7,2Hz). Este último acopla com o hidrogênio do aldeído que aparece em δ 9,69 como um dubleto (*J*=7,2Hz). No espectro de RMN de ¹³C pudemos observar 7 sinais, o mais desprotegido deles refere-se ao carbono da carbonila (δ 191,7 ppm), os carbonos aromáticos aparecem em δ 152,6; 151,8; 116,6; 112,9 ppm e os sinais em δ 134,5; 130,8 ppm são referente aos carbonos da dupla alifática.

O espectro de IV do álcool **48** apresentou uma banda em 3440cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação OH. No espectro de RMN de ¹H dois dubletos na região de δ 7,30 (*J*=3,75Hz) e δ 6,43 (*J*=3,75Hz) correspondem aos hidrogênios aromáticos. Os dois duplos dubletos que aparecem em δ 6,63 (*J*=15,9 e 4,2Hz) e δ 6,52 (*J*=15,9 e 1,05Hz) correspondem aos dois hidrogênios *trans* da dupla interna. Já os três hidrogênios da dupla terminal aparecem como um multipeto em δ 5,25-5,16 (2H) e δ 5,90-5,74 (1H). O hidrogênio ligado ao carbono carbinólico aparece como um multipeto na faixa de δ 4,45-

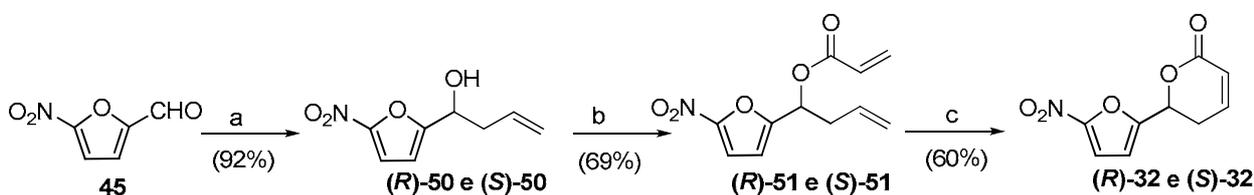
4,38. Um multiplete em δ 2,49-2,28 corresponde aos dois hidrogênios diastereotópicos do grupo metilênico. Já o singlete largo em δ 2,03 corresponde ao hidrogênio da hidroxila. No espectro de RMN de ^{13}C aparecem 10 sinais condizentes com a estrutura proposta. Os carbonos aromáticos aparecem em δ 155,1; 151,2; 116,1; 110,3 ppm. Os carbonos do grupamento alila estão em δ 138,3 e 113,9 ppm; em δ 133,2 e 119,3 ppm foram encontrados os carbonos referentes à dupla *trans*. Os sinais referentes aos carbonos carbinólico e diasterotópico, aparecem em região mais protegida, respectivamente em δ 70,2 e 41,5 ppm.

A formação do éster **49** foi evidenciada pelo aparecimento de uma banda em 1723cm^{-1} no espectro de infravermelho correspondente ao estiramento da ligação C=O da carbonila e o correspondente desaparecimento da banda referente a hidroxila presente no álcool **48**. O espectro de RMN de ^1H apresenta-se bastante complexo em virtude da presença de muitos hidrogênios olefínicos. Os hidrogênios aromáticos aparecem como dois dubletos em δ 7,30 ($J=3,75\text{Hz}$) e δ 6,45 ($J=3,75\text{Hz}$). Os hidrogênios da dupla *trans* se apresentam como duplo dubleto δ 6,53 ($J=16,0$; 6,5 Hz) e δ 6,44 ($J=16,0$; 0,5 Hz). O hidrogênio ligado ao carbono carbinólico aparece como um duplo duplo dubleto em δ 5,55 ($J=12,5$; 6,5; 1 Hz). Os três hidrogênios da porção acrilóila aparecem como duplo dubletos em δ 6,45 (17,0; 1,25 Hz); δ 6,15 ($J=17,0$; 10,5 Hz); δ 5,89 ($J=10,5$; 1,25 Hz); enquanto os três hidrogênios do grupo alila aparecem como um multiplete em δ 5,18-5,12 (2H) e como um duplo duplo tripleto ($J=17,0$; 10,5; 6,25 Hz) em δ 5,77. O sinal que se apresenta como um tripleto em δ 2,53 ($J=6,5$ Hz) corresponde aos hidrogênios diastereotópicos do grupo metilênico do éster **49**. No espectro de RMN de ^{13}C aparecem 13 sinais correspondentes aos carbonos da estrutura. O sinal mais desprotegido em δ 165,1 ppm refere-se ao carbono da carbonila. Os outros 10 carbonos de hibridização sp^2 aparecem entre δ 154,2 e 110,9 ppm. Abaixo de 100 ppm aparecem os sinais referentes aos carbonos de hibridização sp^3 , carbinólico e diasterotópico em δ 72,6 e 38,6 ppm, respectivamente.

O espectro de I.V. de **31** apresentou uma banda em 1710cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O. No espectro de RMN de ^1H , pôde-se observar com clareza a multiplicidade dos sinais. Os dubletos em δ 7,31 e δ 6,49 ($J=3,75\text{Hz}$) referem-se aos hidrogênios aromáticos. Os hidrogênios da dupla exocíclica aparecem como dois duplos dubletos em δ 6,57 ($J=15,9$; 4,8Hz) e em δ 6,65 ($J=15,9$; 1,1 Hz). O hidrogênio carbinólico

aparece em δ 5,16 como um duplo duplo dubleto ($J=10,5; 4,8; 1,1\text{Hz}$). Os hidrogênios metilênicos diastereotópicos aparecem como sinais bem claros sendo possível até distingui-los, aquele que se encontra na orientação pseudo equatorial aparece em δ 2,63 como um dubleto de tripleto de dubleto ($J=18,6; 4,9; 0,9\text{Hz}$), o que se encontra na orientação pseudo axial em δ 2,48 como um duplo duplo tripleto ($J=18,6; 10,5; 2,4\text{Hz}$). O hidrogênio da lactona α a carbonila aparece em δ 6,10 como um duplo duplo dubleto ($J=9,7; 2,4; 0,9\text{Hz}$), já o hidrogênio β aparece em δ 6,93 como um duplo duplo dubleto ($J=9,7; 5,1; 2,8\text{Hz}$). No espectro de RMN de ^{13}C apareceram 11 sinais, dentre eles o mais desprotegido (δ 163,1 ppm) refere-se à carbonila do anel diidropirânico e os mais protegidos (δ 75,9 e 29,5 ppm) aos carbonos carbinólico e diasterotópico, respectivamente. Os sinais referentes aos carbonos aromáticos aparecem em δ 153,8; 151,5; 113,6 e 111,6 ppm. Em δ 144,3 e 121,6 ppm aparecem os sinais referentes aos carbonos da dupla endocíclica, já os carbonos da dupla exocíclica encontram-se em δ 131,4 e 118,2 ppm. A análise de EMAR para o composto **31** apresentou uma relação m/z de $[\text{M}+\text{H}]^+ = 236,0522$ com um erro de 15,6ppm em relação ao valor calculado ($[\text{M}+\text{H}]^+ = 236,0559$).

A síntese do análogo **32** iniciou-se pela alilação enantiosseletiva nas condições de Keck, do 5-nitro-2-furaldeído **45**, levando a formação do álcool homoalílico **50** em 92% de rendimento. O álcool **50** foi submetido às condições de acilação levando à formação do acrilato **51** em 69% de rendimento, que por sua vez foi submetido às condições de metátese de olefinas para fechamento de anel utilizando o catalisador de Grubbs de segunda geração fornecido a diidropiranona em 60% de rendimento. O rendimento global desta reação foi de 38% para três etapas (Esquema 7).



Condições: **a)** (*R*)- ou (*S*)-BINOL (10mol%), $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, aliltributilestanana, CH_2Cl_2 , PM 4Å, -20°C , 60h. **b)** cloreto de acrilóila, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C . **c)** Catalisador de Grubbs de Segunda Geração (10 mol%), CH_2Cl_2 .

Esquema 7: Preparação de **(R)-32** e **(S)-32**.

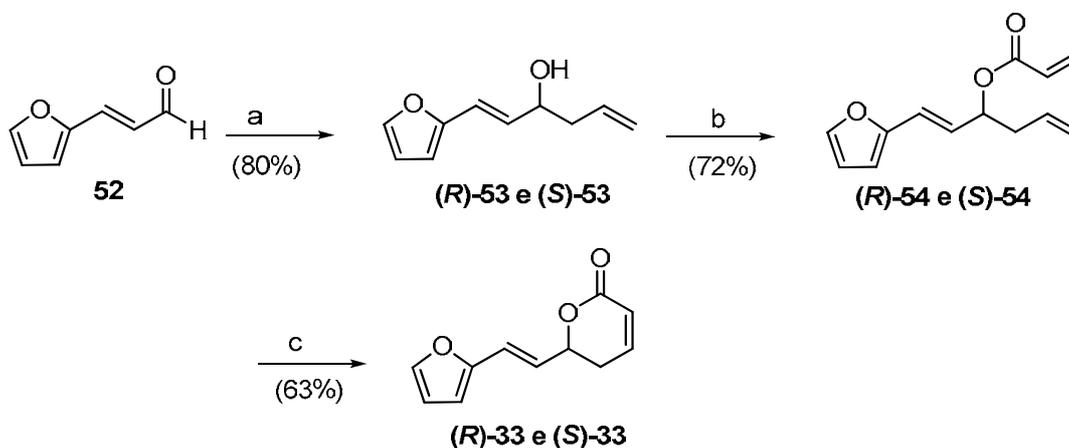
A formação do álcool **50** foi evidenciada pelo espectro de IV pelo aparecimento da banda em 3414 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH. A estrutura do composto **50** foi confirmada por espectro de RMN de ^1H , os hidrogênios aromáticos aparecem δ 7,28 e δ 6,53, respectivamente, como um dubleto ($J=3,7\text{ Hz}$) e um duplo dubleto ($J=3,7$ e $0,7\text{ Hz}$). Os hidrogênios alílicos se mostram como multipletos δ 5,87-5,71 (1H) e δ 5,27-5,18 (2H). O hidrogênio ligado ao carbono carbinólico está em δ 4,84 e o seu sinal corresponde a um duplo dubleto ($J=7,3$ e $5,2\text{ Hz}$). Os hidrogênios diastereotópicos aparecem como um multipletos na região de δ 2,75-2,55. O singletos largo em 2,31 corresponde ao hidrogênio da hidroxila. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar 8 sinais, os mais protegidos (que aparecem em δ 66,8 e 39,9 ppm) correspondem aos carbonos carbinólico e diastereotópicos. Os carbonos aromáticos aparecem em δ 159,8; 151,7; 112,5 e 109,5 ppm, já os carbonos alílicos apareceram em 132,1; 119,9 ppm.

O espectro de IV do acrilato **51** apresentou uma banda em 1724 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O da carbonila e conseqüente desaparecimento da banda referente a hidroxila. O espectro de RMN ^1H para o intermediário **51** mostrou dois dubletos em δ 7,25 e δ 6,57 ($J=3,65\text{ Hz}$) correspondentes aos hidrogênios aromáticos. O sinal que aparece como duplo dubleto em δ 6,45 ($J=17,2$; $1,42\text{ Hz}$) e como um duplo dubleto em δ 5,89 ($J=10,3$; $1,42\text{ Hz}$) correspondem aos hidrogênios terminais da dupla do grupo acila, o hidrogênio vizinho se apresenta como um duplo dubleto em δ 6,12 ($J=17,2$; $10,3\text{ Hz}$). Em δ 5,95 aparece o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico como um triplo ($J=6,9\text{ Hz}$). Os três hidrogênios da porção alila se mostram como um duplo duplo triplo em δ 5,70 ($J=17,2$; $10,3$; $6,9\text{ Hz}$) e como um multipletos na faixa de δ 5,20-5,09 (2H). Os hidrogênios diastereotópicos aparecem em δ 2,78 como triplo triplo ($J=6,9$; $1,42\text{ Hz}$). No espectro de RMN de ^{13}C aparecem 11 sinais, os carbonos de hibridização sp^3 são os mais protegidos em δ 67,6 e 36,7 ppm e referem-se aos carbonos carbinólico e diastereotópicos, respectivamente. O sinal mais desprotegido em δ 164,8 ppm refere-se ao carbono da carbonila. Os outros sinais referem-se aos demais outros carbonos de hibridização sp^2 .

A obtenção do composto **32** foi evidenciada pelo espectro de IV pelo aparecimento da banda em 1729 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O da lactona. No espectro de RMN de ^1H pudemos observar que os hidrogênios aromáticos em δ 7,31 e δ 6,70 apresentam-se como um dubleto ($J=3,6\text{ Hz}$) e como um duplo dubleto ($J=3,6$; $0,7\text{ Hz}$). O

hidrogênio carbinólico aparece como um duplo duplo dubleto em δ 6,13 ($J=9,8; 1,42; 0,7\text{Hz}$). O hidrogênio β a carbonila está em δ 6,98 e se mostra com um duplo duplo dubleto ($J=9,8; 5,2; 3,5\text{ Hz}$), já o hidrogênio α se apresenta como um duplo dubleto em δ 5,58 ($J=9,8; 5,2\text{ Hz}$). Os hidrogênios diastereotópicos aparecem como um multiplete na faixa de δ 3,02-2,80. No espectro de RMN de ^{13}C é possível observar o carbono da carbonila em δ 161,8 ppm. Os outros 6 carbonos de hibridização sp^2 estão entre δ 153,5 e 111,5 ppm. Os carbonos carbinólico e diastereotópico aparecem em δ 71,8 e 27,6 ppm, respectivamente. A análise de EMAR para o composto **32** apresentou uma relação m/z de $[\text{M}+\text{H}]^+ = 210,0437$ com um erro de 16,2ppm em relação ao valor calculado ($[\text{M}+\text{H}]^+=210,0408$).

A síntese do composto **33** se deu de forma análoga à síntese do composto **31**. A alilação do furanilacroleína comercial **52** levou a formação do respectivo álcool homoalílico **53** em 80% de rendimento. O éster **54** foi obtido a partir de **53** via esterificação utilizando-se cloreto de acrilóila e Et_3N em 72% de rendimento. O produto acilado **54** foi submetido à condição de metátese de olefinas para fechamento de anel utilizando o catalisador de Grubbs fornecendo a lactona em 63% de rendimento. O rendimento global desta reação foi de 36% para três etapas (Esquema 8).



Condições: **a**) (*R*)- ou (*S*)-BINOL (10mol%), $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$, aliltributilestanana, CH_2Cl_2 , PM 4Å, -20°C , 60h. **b**) cloreto de acrilóila, Et_3N , CH_2Cl_2 , 0°C . **c**) $(\text{Pcy}_3)_2\text{Cl}_2\text{Ru}=\text{CHPh}$ (10 mol%), CH_2Cl_2 .

Esquema 8: Preparação de (*R*)-**33** e (*S*)-**33**.

A formação do intermediário **53** foi evidenciada pelo espectro de IV pela presença de uma banda em 3377 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação OH. No espectro de RMN de ^1H , podemos notar a presença dos hidrogênios aromáticos em δ 7,33 como um dubleto ($J=1,5\text{ Hz}$), δ 6,36 como um duplo dubleto ($J=3,3; 1,5\text{ Hz}$) e δ 6,22 como um dubleto ($J=3,3\text{ Hz}$). Os hidrogênios da dupla *trans* aparecem como duplo dubletos em δ 6,44 ($J=15,8; 1,5\text{ Hz}$) e em δ 6,18 ($J=15,8; 5,9\text{ Hz}$). O duplo duplo dubleto que aparece em δ 6,82 ($J=17,0; 3,4; 7,2\text{ Hz}$) refere-se a um dos hidrogênios da dupla do grupo alila, os outros dois hidrogênios se mostram como um multipletos na região de δ 5,10-5,1. O hidrogênio ligado ao carbono carbinólico aparece em δ 4,32-4,27 como um multipletos. Os hidrogênios carbinólicos se mostram como um multipletos em δ 2,45-2,31. O singletos largo em δ 2,11 corresponde ao hidrogênio da hidroxila. No espectro de RMN de ^{13}C , aparecem 10 sinais, os de hibridização sp^2 estão entre δ 152,3 e 108,1 ppm. Já os carbonos de hibridização sp^3 são os mais protegidos e referem-se ao carbonos carbinólico e diastereotópico (δ 71,2 e 42,0 ppm).

A estrutura de **54** foi confirmada pela análise do espectro de infravermelho que mostra o desaparecimento da banda referente ao estiramento da ligação OH e o aparecimento de uma banda referente a ligação C=O em 1724 cm^{-1} de RMN de ^1H . Os hidrogênios aromáticos aparecem em δ 7,34; 6,36 e 6,26 como um dubleto ($J=1,7\text{ Hz}$), um duplo dubleto ($J=3,3; 1,7\text{ Hz}$) e um dubleto ($J=3,3\text{ Hz}$), respectivamente. Os hidrogênios da dupla interna aparecem em δ 6,45 como um dubleto ($J=15,8\text{ Hz}$) e em δ 6,12 como um duplo dubleto ($J=15,8; 7,0\text{ Hz}$). Os duplos dubletos em δ 6,43 ($J=17,3; 1,6\text{ Hz}$); δ 6,14 ($J=17,3; 10,3\text{ Hz}$) e δ 5,83 ($J=10,3; 1,6\text{ Hz}$), referem-se aos hidrogênios do grupo acila. O hidrogênio ligado ao carbono carbinólico se apresenta como um duplo duplo dubleto em δ 5,51 ($J=13,2; 7,0; 0,9\text{ Hz}$). Os hidrogênios da porção alila aparecem como multipletos em δ 5,87-5,08 e 5,18-5,08 (2H). Os hidrogênios diastereotópicos se mostram como um multipletos em δ 2,54-2,48. O espectro de RMN de ^{13}C mostra 13 sinais condizentes com os 13 carbonos presentes na estrutura. O sinal mais desprotegido (δ 165,4 ppm) refere-se ao carbono da carbonila. Já os sinais mais protegidos (δ 73,5 e 39,0 ppm) correspondem aos carbonos carbinólico e diastereotópico. Os outros 10 sinais correspondem aos demais carbonos de hibridização sp^2 .

O espectro de IV para o composto **33** apresentou uma banda em 1720 cm^{-1} referente ao estiramento C=O da carbonila da lactona. No espectro de RMN de ^1H pôde-se observar os hidrogênios aromáticos em δ 7,37 como um dubleto ($J=1,7\text{Hz}$), δ 6,38 como um duplo dubleto ($J=3,3; 1,7\text{Hz}$) e um dubleto em δ 6,30 ($J=3,3\text{ Hz}$). Os hidrogênios da dupla *trans* aparecem como dois duplo dubletos em δ 6,55 ($J=15,7; 1,25\text{ Hz}$) e δ 6,19 ($J=15,7; 6,0\text{ Hz}$). O duplo triplo dubleto em δ 5,07 ($J= 9,3; 6,0; 1,25\text{ Hz}$) refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico. O hidrogênio α à carbonila se apresenta como um duplo tripleto em δ 6,07 ($J=9,85; 1,6\text{ Hz}$), já o hidrogênio β aparece em δ 6,91 como um duplo duplo dubleto ($J=9,85; 5,05; 3,3\text{ Hz}$). Os hidrogênios diastereotópicos se mostram como um multipletto em δ 2,60-2,41. O espectro de RMN de ^{13}C mostra 11 sinais condizentes com a estrutura proposta para o composto. Em δ 163,8 aparece o carbono da carbonila, os outros carbonos de hibridização sp^2 aparecem entre δ 151,4 a 109,6 ppm. Os carbonos de hibridização sp^3 aparecem mais protegidos e referem-se aos carbonos carbinólico e diastereotópico (δ 77,3 e 29,9 ppm). A análise de EMAR para o composto **33** apresentou uma relação m/z de $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 213,0576$ com um erro de 22ppm em relação ao valor calculado ($[\text{M}+\text{Na}]^+=213,0528$).

É interessante notar que para a preparação de (*R*)-**32** e (*S*)-**32** foi necessária a utilização do catalisador de Grubbs de segunda geração, pois durante o acompanhamento da reação com o catalisador de primeira geração, nem traços de produto foi observado. A estrutura destes dois catalisadores está apresentada na figura a seguir.

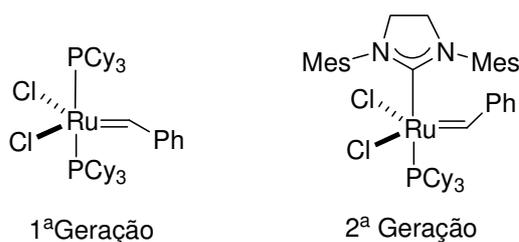
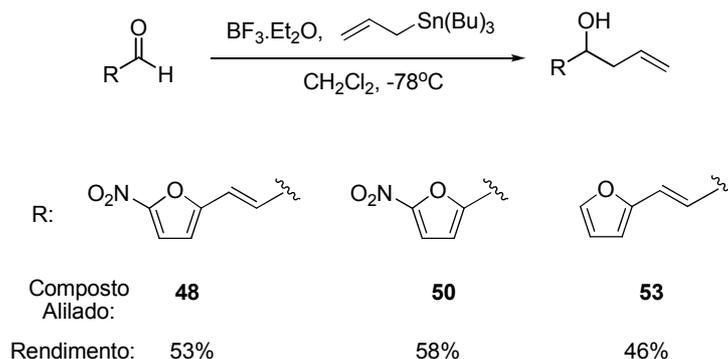


Figura 10: Estruturas dos catalisadores de Grubbs de primeira e segunda geração.

A maior reatividade do catalisador de Grubbs de segunda geração está relacionada a presença de ligantes δ -doadores, como carbenos *N*-heterociclos, este grupo ajuda a

etapa de alilação catalítica é a responsável pela instalação do único centro estereogênico presente nas moléculas propostas. Logo, a versão racêmica para a síntese de **31**, **32** e **33** foi efetuada utilizando-se aliltributilestanana e $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ em CH_2Cl_2 . Os rendimentos foram de 53%, 58% e 46%, respectivamente para **48**, **50** e **53**, conforme o esquema a seguir.



Esquema 10: Alilação racêmica para obtenção de **48**, **50** e **53**.

3.1.2 - DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA

Todos os métodos baseados em RMN para a determinação da configuração absoluta requerem a transformação de um substrato quiral em duas diferentes espécies que podem ser diferenciadas por espectroscopia de RMN.⁴⁵ Em 1969, Mosher⁴⁶ mostrou que ésteres derivados de alcoóis enantiomericamente puros com ambas as formas (*R*)- ou (*S*)- do ácido α -metóxi- α -trifluormetil- α -fenilacético (MTPA) apresentam diferentes deslocamentos químicos (δ) em RMN.⁴⁷ Mosher propôs um modelo para correlacionar a diferença entre os deslocamentos químicos ($\Delta\delta$) observados para os ésteres com a configuração absoluta dos respectivos alcoóis. Segundo Mosher, em solução, a conformação assumida pelos ésteres **55 a-d** (Figura 11) é aquela em que o hidrogênio metínico, a carbonila e o grupo CF_3 encontram-se coplanares, assim a determinação da configuração absoluta poderia ser realizada através da derivatização de um único enantiômero do álcool com ambas as

⁴⁵ Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17.

⁴⁶ Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 2543.

⁴⁷ a) Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *24*, 512. b) Ohtami, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4093.

formas do MTPA ou pela derivatização de cada um dos enantiômeros dos alcoóis com MTPA enantiomericamente puro.

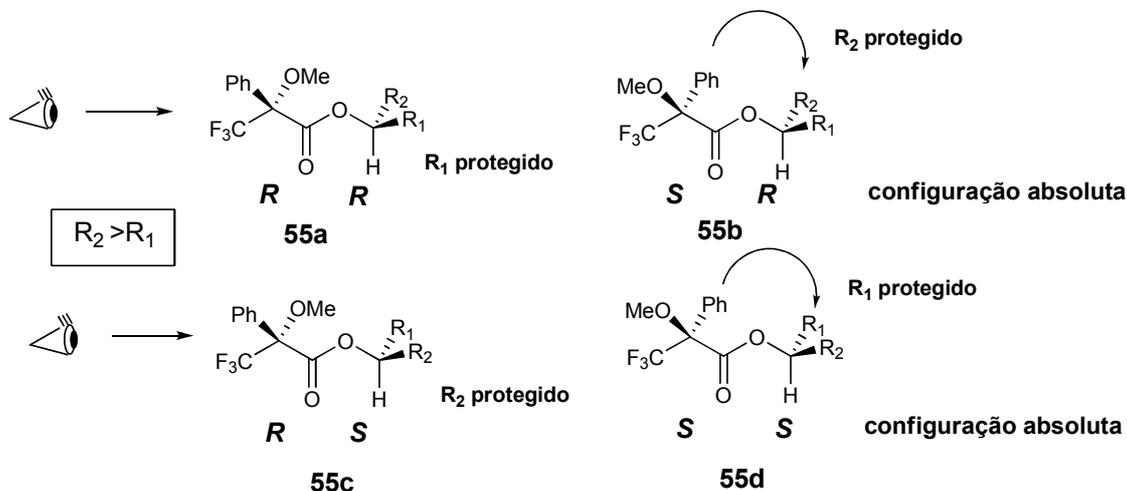


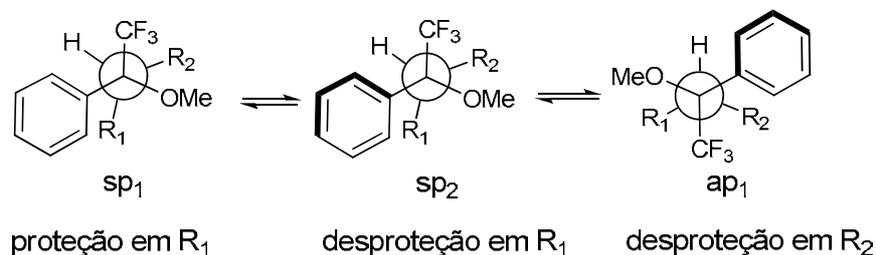
Figura 11: Modelo de Mosher para a determinação da configuração de alcoóis secundários.

Através do efeito anisotrópico do grupo fenila α -carbonila o modelo proposto por Mosher explica a diferença de deslocamentos químicos (proteção dos grupos R_1 e R_2) em RMN de ^1H . Exemplificando, nos ésteres diastereoisoméricos **55b** e **55d** derivados do (*S*)-MTPA os grupos R_2 e R_1 encontram-se mais protegidos, respectivamente, e assumindo a ordem de prioridade de Cahn-Ingold-Prelog ($R_2 > R_1$), a configuração absoluta dos alcoóis precursores de **55b** e **55d** pode ser determinada como sendo *R* e *S*, respectivamente.

Riguera e colaboradores através de ensaios empíricos propuseram três conformações preferenciais para os ésteres de MTPA, que diferem na orientação do grupo fenila.^{45, 48, 49} Assim, as conformações sp_1 , sp_2 e ap_1 devem ser consideradas para análise do efeito anisotrópico do grupo fenila.

⁴⁸ Latypov, S. H.; Seco, J. M. Quiñoá, E.; Riguera, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8569.

Éster obtido a partir do álcool de configuração *R* com (*R*)-MTPA



Éster obtido a partir do álcool de configuração *R* com (*S*)-MTPA

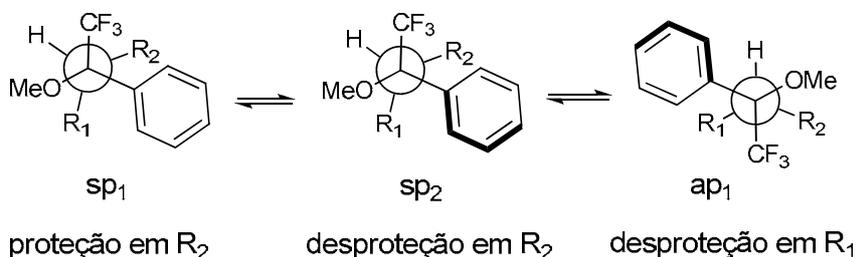


Figura 12: Principais confôrmeros dos ésteres de MTPA (obtido a partir do álcool de configuração *R*) segundo o modelo de Riguera.⁴⁵

Enquanto o efeito anisotrópico de proteção e desproteção do anel aromático nos confôrmeros sp_1 e sp_2 são cancelados mutuamente, no confôrmero ap_1 é de desproteção em R_2 e poderá ser observado no espectro de RMN de ^1H . Tendo em vista que nos ésteres de MTPA o confôrmero ap_1 predomina, o substituinte R_2 é mais desprotegido quando se utiliza o (*R*)-MTPA, enquanto que o substituinte R_1 é mais desprotegido quando se utiliza o (*S*)-MTPA.^{45, 48,49}

O modelo empírico proposto por Riguera é concordante como o modelo de Mosher no que se refere ao resultado final observado no espectro de ^1H -RMN, embora estejam amparados em conformações distintas, como mostrado a seguir.

⁴⁹ Barreiros, M. L.; David, J. M.; David, J. P. *Quím. Nova* **2005**, *28*, no. 6, 1061

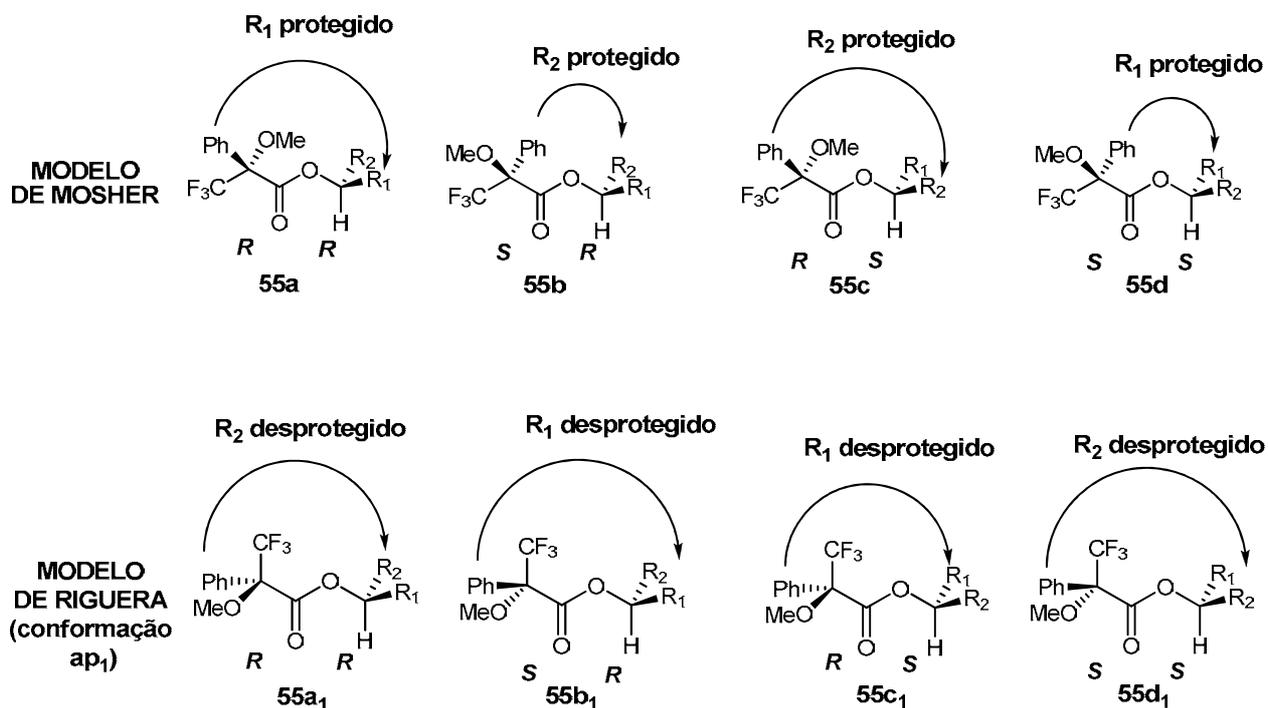
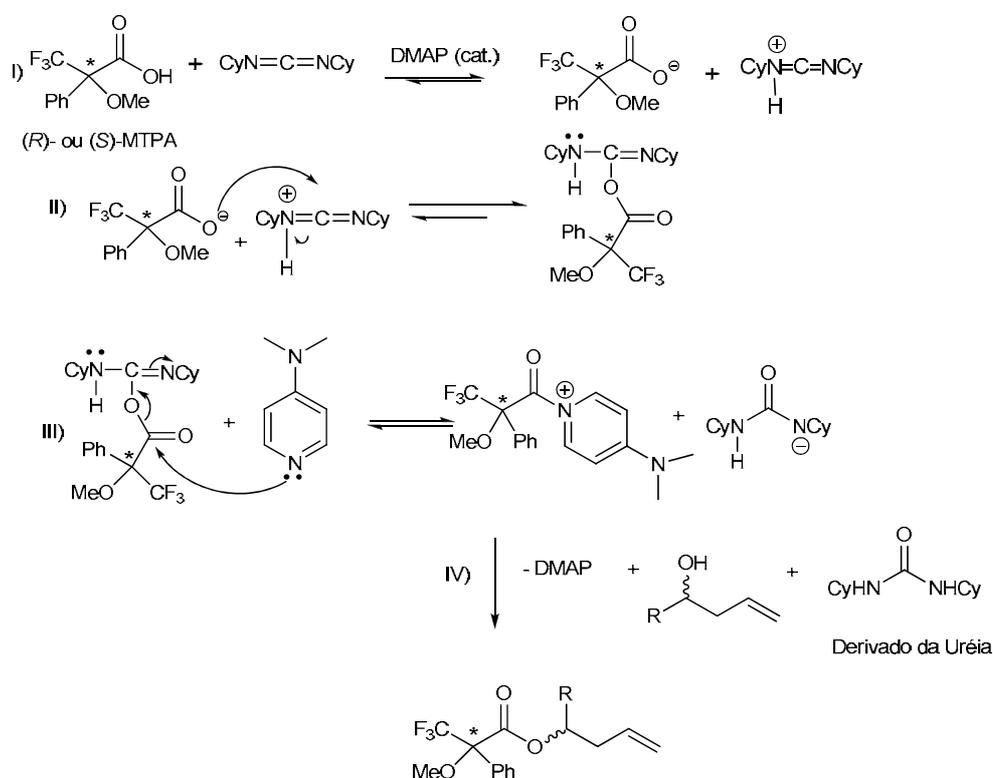


Figura 13: Comparação do modelo de Mosher e do modelo de Riguera.

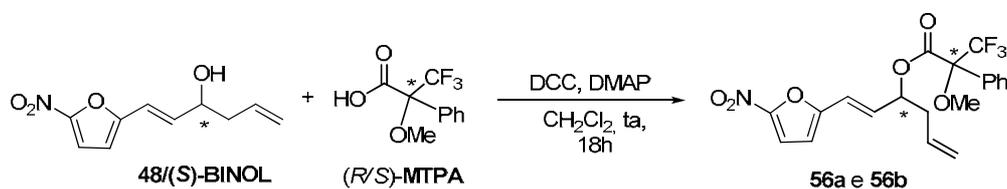
Para a obtenção dos ésteres de Mosher a partir do ácido (*R*)- ou (*S*)-MTPA empregou-se DCC como agente desidratante, sendo este convertido a um derivado da uréia ao final do processo.⁵⁰ O DMAP além de agir como base promove a formação do sal de piridínio intermediário que sofre ataque nucleofílico pelo álcool secundário.

⁵⁰ March, J. *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1985, p. 349.



Esquema 11: Mecanismo geral da reação para obtenção do éster de Mosher a partir do (*R*)- ou (*S*)-MTPA.

A determinação da configuração absoluta foi primeiramente realizada para o álcool **48** precursor da síntese de **31**. Inicialmente preparamos os ésteres de Mosher **56a** e **56b** a partir de **48** (obtido a partir do (*S*)-BINOL) fazendo o uso do (*R*)-MTPA e (*S*)-MTPA, na presença de DCC e DMAP.



Álcoois	Ácido de Mosher	Ésteres de Mosher	Rendimento
48/(<i>S</i>)-BINOL	(<i>R</i>)-MTPA	56a	55%
48/(<i>S</i>)-BINOL	(<i>S</i>)-MTPA	56b	51%

Esquema 12: Ésteres de Mosher sintetizados a partir de **48**.

Analisando-se o espectro de ^1H -RMN dos ésteres **56a** e **56b**, pôde-se observar o deslocamento do hidrogênio da dupla hexocíclica vizinho ao centro carbinólico. O deslocamento desse hidrogênio, Ha, apareceu em δ 6,44 para o éster **56a** e em δ 6,51 para o éster **56b**. Segundo o modelo proposto por Mosher, esses valores relativos de deslocamento químico são concordantes para as conformações mostradas abaixo, onde o centro estereogênico gerado a partir da reação com (*S*)-BINOL forneceu o centro de configuração absoluta *S*, uma vez que a maior proteção observada para Ha em **56a** é resultado de efeito anisotrópico de proteção do grupo fenila sobre o hidrogênio vinílico Ha. Essa conclusão também pôde ser alcançada aplicando-se o modelo de Riguera, uma vez que o efeito anisotrópico do grupo fenila desprotege o hidrogênio Ha em **56b** (Figura 15).

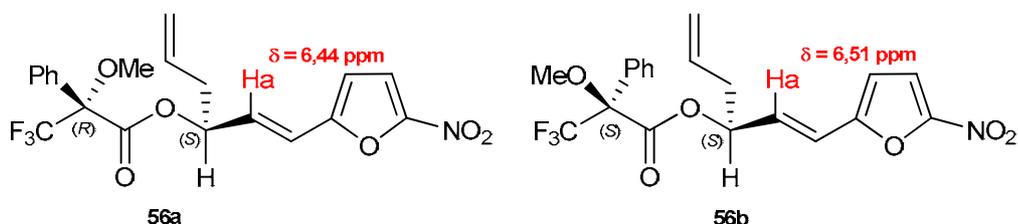


Figura 14: Modelo de Mosher aplicado aos ésteres **56a** e **56b**.

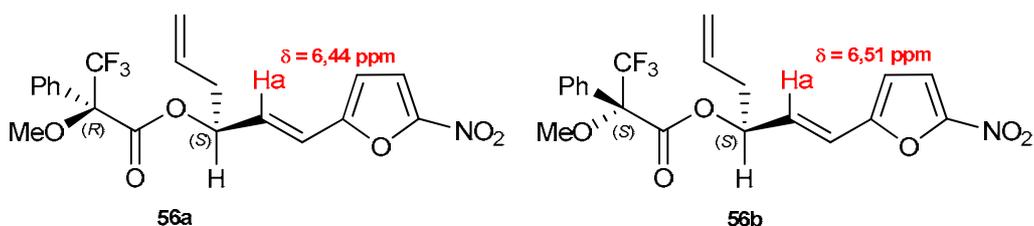
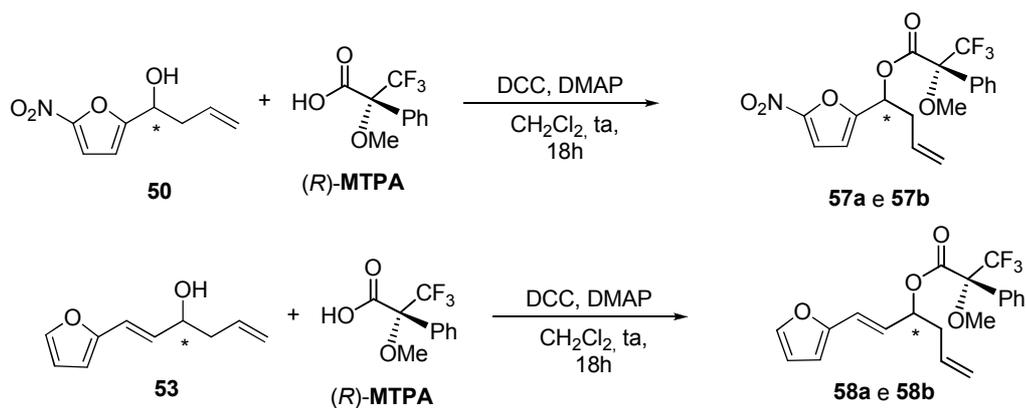


Figura 15: Modelo de Riguera aplicado aos ésteres **56a** e **56b**.

O uso do (*S*)-BINOL como indutor quiral, nas condições de alilação de Keck, forneceu, neste caso, o centro de configuração *S* para o álcool homoalílico correspondente.

Para a determinação da configuração absoluta dos álcoois **50** e **53**, foi realizada a síntese dos respectivos ésteres de Mosher (**57a** e **57b**) e (**58a** e **58b**) de acordo com o esquema mostrado a seguir.

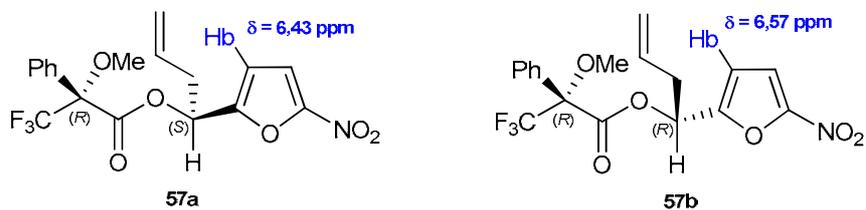


Álcoois	Ésteres de Mosher	Rendimento
50/(R)-BINOL	57a	57%
50/(S)-BINOL	57b	58%
53/(R)-BINOL	58a	50%
53/(S)-BINOL	58b	50%

Esquema 13: Ésteres de Mosher sintetizados a partir de **50** e **53**.

A figura a seguir mostra os valores de deslocamento químico para os ésteres de Mosher que foram obtidos a partir de **50** (**57a** e **57b**) e **53** (**58a** e **58b**), precursores da síntese dos compostos **32** e **33**. Vale ressaltar que estes quatro últimos ésteres foram obtidos a partir do (R)-MTPA.

Ésteres obtidos a partir de **50**:



Ésteres obtidos a partir de **53**:

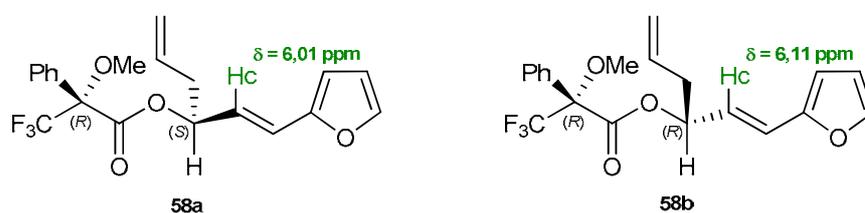
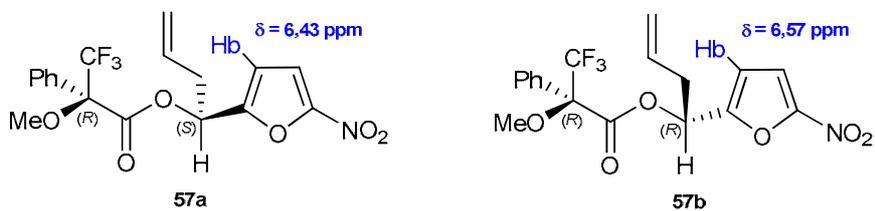


Figura 16: Modelo de Mosher aplicado aos ésteres **57a** e **57b** provenientes de **50**; e para os ésteres **58a** e **58b**, provenientes de **53**.



Ésteres obtidos a partir de **53**:

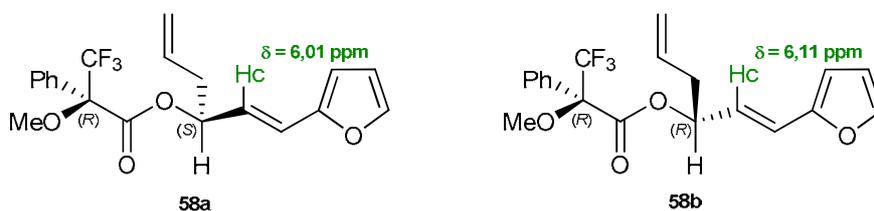


Figura 17: Modelo de Riguera aplicado aos ésteres **57a** e **57b** provenientes de **50**; e para os ésteres **58a** e **58b**, provenientes de **53**.

A aplicação do modelo de Mosher para o composto **32**, representado pelos ésteres **57a** e **57b**, podemos notar uma concordância com relação aos deslocamentos dos hidrogênios H_b quando assumimos a mesma configuração do BINOL e do centro estereogênico gerado durante a alilação. Quando utilizamos (*S*)-BINOL observa-se que o efeito anisotrópico da fenila protege o hidrogênio H_b no éster **57a** quando comparado ao mesmo hidrogênio do éster **57b**, obtido a partir do (*R*)-BINOL.

Essa mesma analogia pode ser aplicada para o composto **33** representado pelos ésteres **58a** e **58b**.

Para reiterar nossas conclusões a aplicação do modelo de Mosher são confirmadas aplicando-se o modelo de Riguera para os compostos **32** e **33** representados pelos ésteres **57** e **58** (Figura 17). Aplicando-se o modelo de Riguera aos ésteres **57a** e **57b**, observou-se que o deslocamento de H_b ocorre em δ 6,43 para o éster **57a** e em δ 6,57 para o éster **57b**. Esses valores relativos estão concordantes com a configuração absoluta *S* gerada quando (*S*)-BINOL foi empregado. De maneira análoga, é possível chegar as mesmas conclusões para os ésteres **58a** e **58b**.

Após a determinação da configuração absoluta do álcool alílico **48**, precursor da síntese do composto **31**, pudemos fazer uma analogia para os álcoois **50** e **53**, precursores da síntese dos análogos **32** e **33**, uma vez que todos estes álcoois homoalílicos possuem o mesmo padrão de prioridades na substituição do centro estereogênico. Essas evidências nos permitiram concluir que a reação de alilação promovida com (*R*)-BINOL leva a um álcool alílico, cujo centro estereogênico apresenta configuração absoluta *R*, ao passo que a utilização de (*S*)-BINOL fornece o respectivo álcool de configuração absoluta *S*.

Essas observações só vêm confirmar o que já fora observado em trabalhos anteriormente realizados no grupo, em que o centro estereogênico da goniotalamina (**1**) apresentava a mesma configuração do BINOL utilizado na reação de alilação.^{30,51} Além disso, esses resultados também estão concordantes com o modelo proposto por Corey e colaboradores.^{39b}

⁵¹ Salvador, M. B. *Estudos Visando a Elucidação Estrutural de uma diidro-2H-piranona Natural*. Dissertação de Mestrado, **2007**, Instituto de Química-Unicamp.

3.1.3 - DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ENANTIOMÉRICA

Métodos analíticos como Ressonância Magnética Nuclear e cromatografia com fases estacionárias quirais tem sido utilizados para medir a composição enantiomérica de uma maneira mais precisa e eficiente do que uma análise polarimétrica.⁵² Os métodos utilizando CG e HPLC quiral, após algumas tentativas e variações das condições experimentais, não forneceram resultados satisfatórios. A determinação da razão enantiomérica foi realizada através do espectro de ¹⁹F-RMN após derivatização utilizando o ácido de Mosher para obtenção dos respectivos ésteres.

Foi obtido o espectro de ¹⁹F-RMN para os derivados **56**, **57** e **58**, correspondentes aos ésteres de Mosher dos compostos **31**, **32** e **33**. As derivatizações foram feitas utilizando sempre o mesmo ácido (*R*)-MTPA tanto para a versão racêmica quanto para um dos enantiômeros obtidos a partir da síntese assimétrica. As figuras a seguir mostram os espectros de ¹⁹F-RMN.

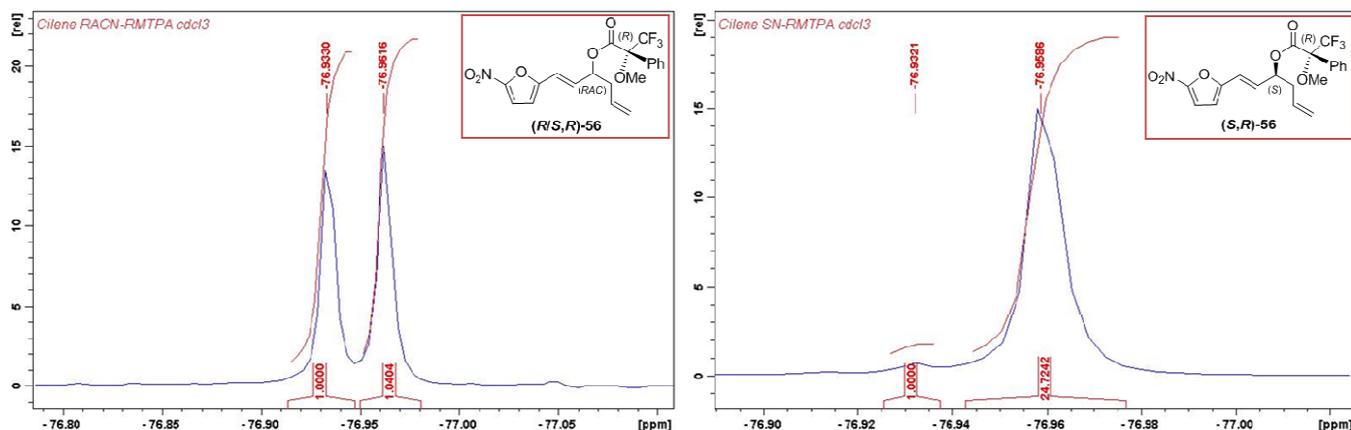


Figura 18: Espectro de RMN de ¹⁹F (235,35 MHz, CDCl₃) para (*R/S,R*)-**56** e (*S,R*)-**56**.

⁵² Gawley, R. E. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2411.

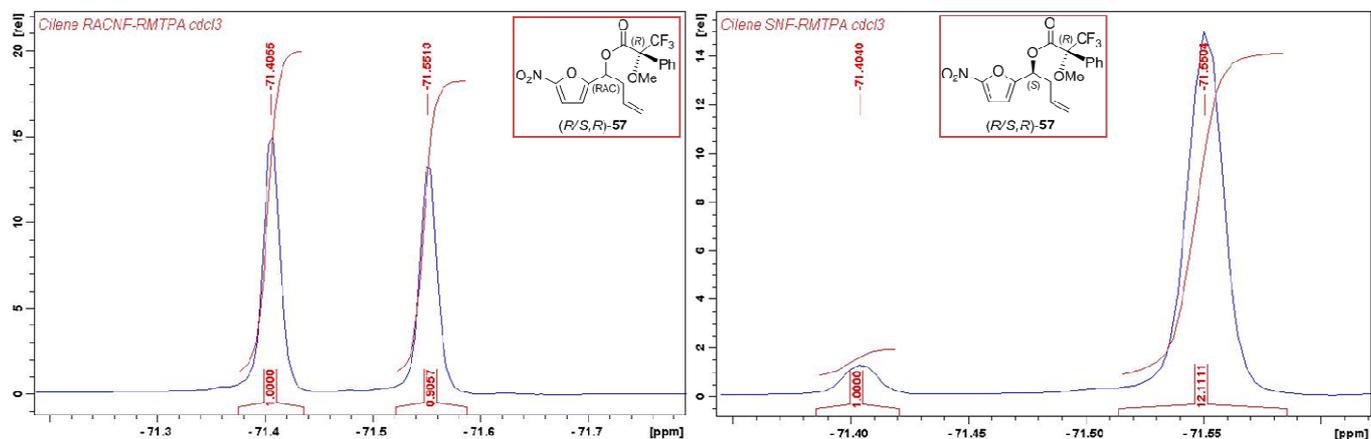


Figura 19: Espectro de RMN de ^{19}F (235,35 MHz, CDCl_3) para $(R/S,R)$ -57 e (S,R) -57.

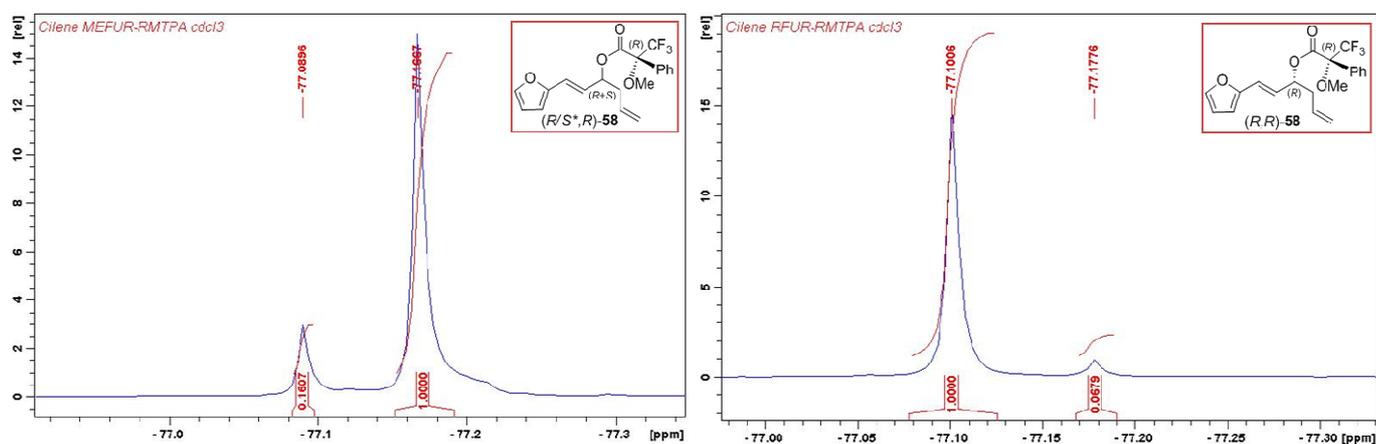


Figura 20: Espectro de RMN de ^{19}F (235,35 MHz, CDCl_3) para $(R/S^*,R)$ -58 e (R,R) -58.

*Mistura enantiomericamente enriquecida.

Com base nas integrações pudemos observar que a razão enantiomérica foi de 96:4 para o composto **31** (representado pelos ésteres de Mosher $(R/S,R)$ -56 e (S,R) -56). Para o composto **32** (representado pelos ésteres de Mosher $(R/S,R)$ -57 e (S,R) -57) a razão enantiomérica é de 92:8. Já a razão enantiomérica do análogo **33** (representado pelos ésteres de Mosher $(R/S^*,R)$ -58 e (S,R) -58) é de 94:6.

3.2 PARTE: 2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.2.1- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Câncer é a definição geral para um grupo de mais de 100 doenças que têm em comum um crescimento desordenado e nocivo de um grupo de células. A célula cancerígena se forma a partir de uma mutação genética de uma célula normal. As células doentes (geneticamente alteradas) adquirem características peculiares que as tornam deletérias ao organismo.⁵³

Do total de 58 milhões de mortes por diversas causas no mundo em 2005, o câncer foi responsável por 7,6 milhões (13%). As diferenças regionais quanto às causas de morte são bastante expressivas no Brasil. Fazendo um balanço geral, as neoplasias são a terceira maior causa de morte no país (superadas apenas pelas doenças do aparelho circulatório e pelas causas externas / violência) e espera-se que no meio do século 21 o câncer já seja a principal causa de morte. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer.⁵⁴

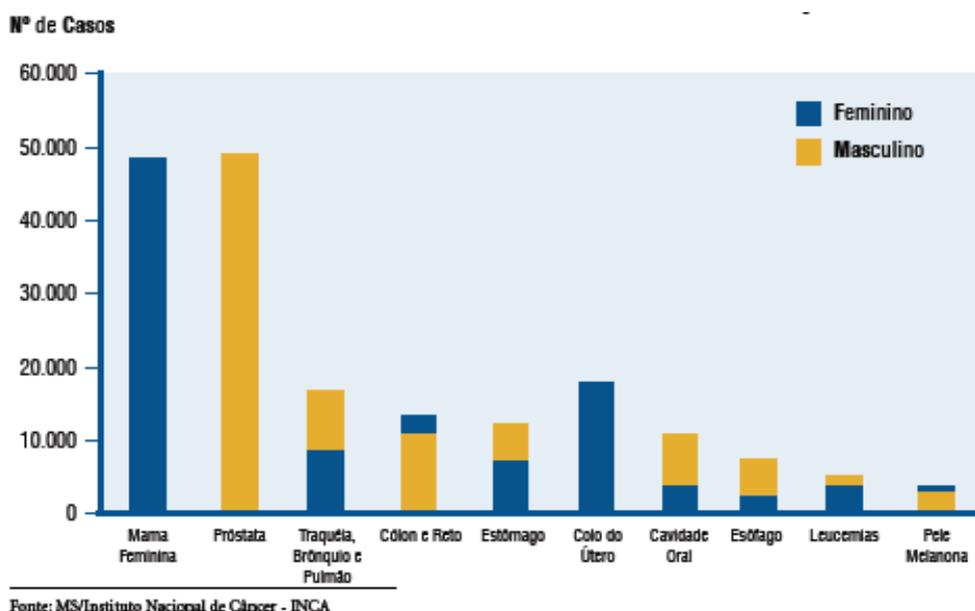


Figura 21: Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira.

⁵³ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*, **2000**, *100*, 57.

⁵⁴ Site oficial do Instituto Nacional do Câncer – INCA. Disponível em: www.inca.com.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf. Acessado em 16/04/2009.

O avanço da ciência e da tecnologia possibilitou a melhoria dos meios de diagnóstico e de tratamento que, aliada ao desenvolvimento sócio-econômico, contribuiu para um declínio das taxas de mortalidade por enfermidades controláveis. Os motivos que levam ao crescimento da incidência do câncer são o aumento da expectativa de vida da população em geral, associada à maior exposição a fatores de risco.⁵⁴

Em vista dos dados apresentados, a busca por diagnósticos mais precisos bem como compostos mais eficientes ao combate destas neoplasias tem sido de grande valia.

As estatísticas mostram que 61% das drogas anticâncer (antineoplásicas) aprovadas na década de 90, são originadas ou derivadas de produtos naturais.⁵⁵ A importância dos produtos naturais na busca de novas drogas contra o câncer vem justificar nosso interesse na avaliação da citotoxicidade de compostos de origem natural e de análogos que também possam inibir o crescimento de células tumorais humanas.

Nosso interesse neste trabalho é ampliar os estudos referentes aos testes de atividade antiproliferativa de análogos da goniotalamina (**1**), e dessa maneira, explorar a influência de anéis furânicos na presença ou não de grupos nitro.

Dessa maneira os compostos **31**, **32** e **33**, nas suas duas formas enantioméricas, bem como a (*R*)- e (*S*)- goniotalamina (**1**) foram submetidos a testes *in vitro* visando avaliar a atividade antiproliferativa para as seguintes linhagens de células tumorais humanas: melanoma (UACC.62), mama (MCF-7), rim (786-0), ovário resistente (NCI-ADR/RES), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-03), cólon (HT-29) e leucemia (K562). Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Dr. João Ernesto de Carvalho (CPQBA-UNICAMP). A proliferação celular foi determinada através do ensaio colorimétrico com sulforodamina B⁵⁶ e a doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. As concentrações empregadas variaram entre 0,250-250 µg/mL, e a porcentagem de crescimento foi determinada após 48h do tratamento das células.

Os resultados referentes às atividades antiproliferativas destes compostos são mostrados nas Figuras 22-24, e são apresentados na forma de curvas de concentração *versus* porcentagem de crescimento.

⁵⁵ Viegas Jr, C.; Bolzani, V.; Barreiro, E. J. *Quim. Nova*, **2006**, *29*, N°2, 326.

⁵⁶ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Can. Inst.* **1990**, *82*, 1107.

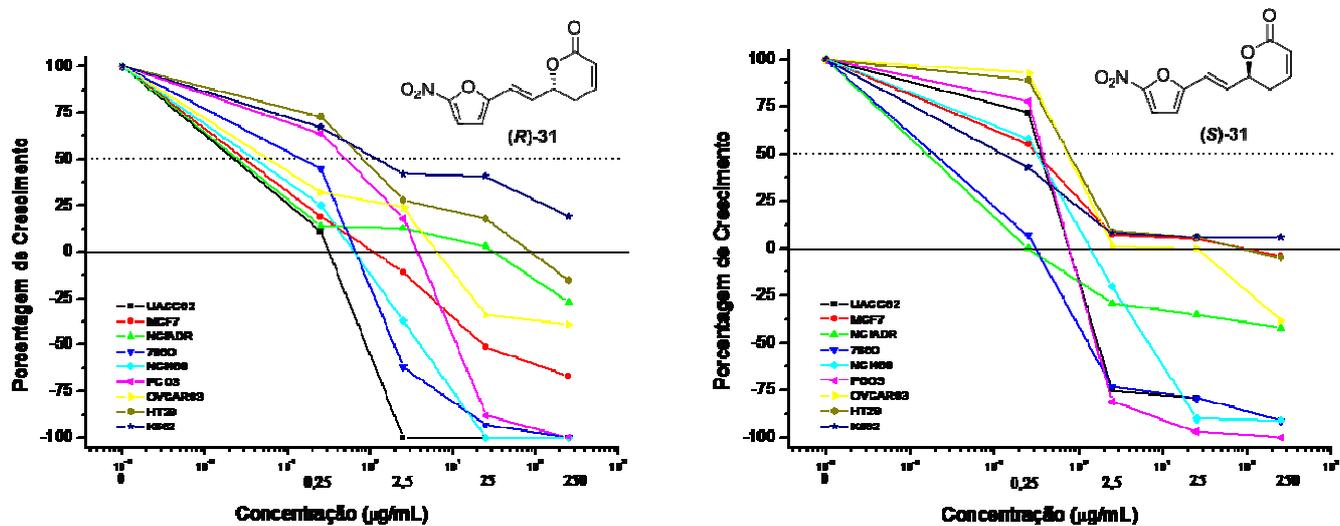


Figura 22: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (R)-31 e (S)-31.

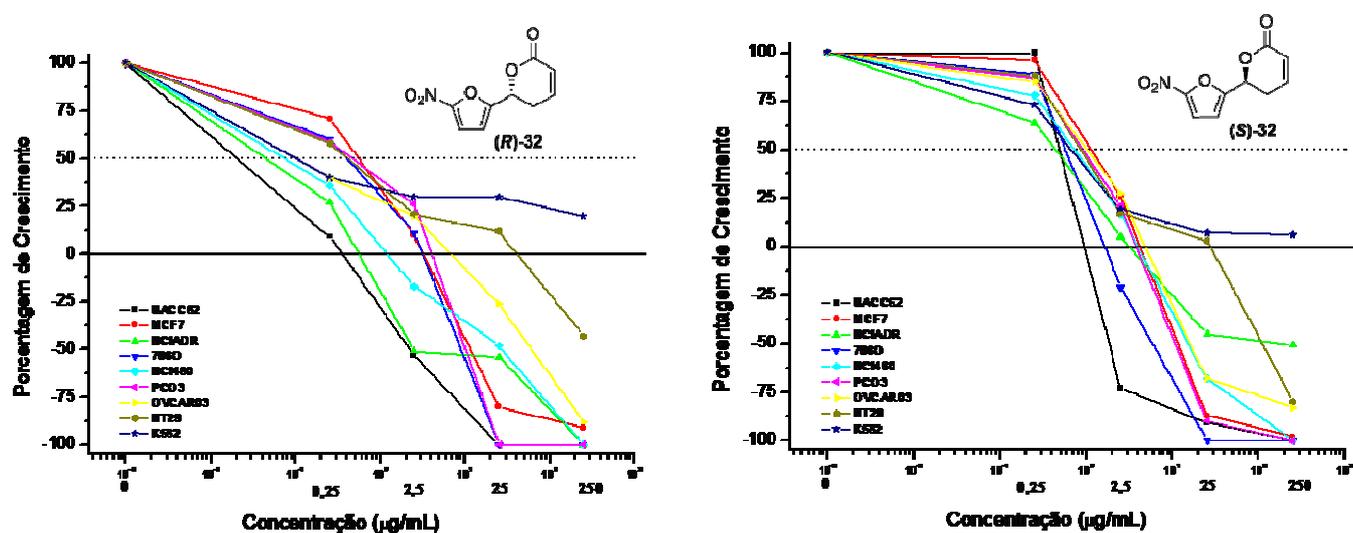


Figura 23: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (R)-32 e (S)-32.

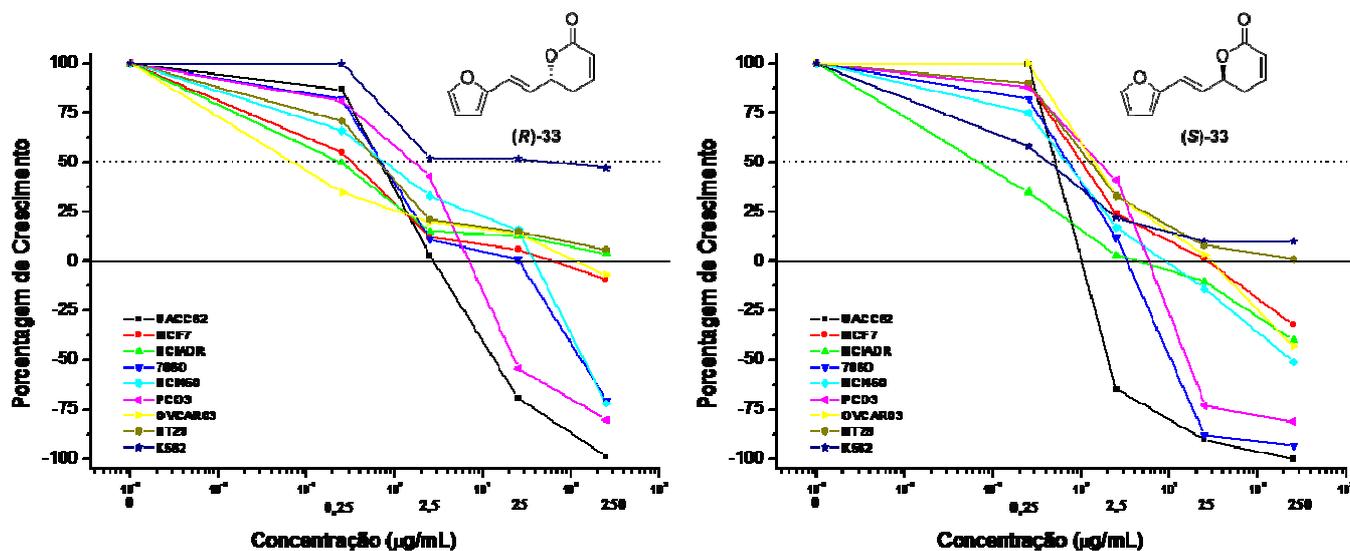


Figura 24: Porcentagem de crescimento de células de câncer humano após 48 h na presença de diferentes concentrações de (*R*)-33 e (*S*)-33.

Os gráficos das Figuras 22, 23 e 24 mostram de uma maneira simplificada a curva dose-resposta dos compostos (*R*)- e (*S*)-31, 32 e 33 frente a nove linhagens de células tumorais humanas. Os valores positivos de crescimento celular entre 0 e 100%, em relação ao eixo y, correspondem à atividade citostática, enquanto os valores negativos à atividade citocida.

Para facilitar a análise dos dados, três parâmetros podem ser calculados para cada linhagem celular. O GI_{50} é o valor que expressa a concentração necessária para inibir em 50% o crescimento de cada linhagem celular. O TGI é o valor que representa a concentração mínima que causa a inibição total do crescimento e o LC_{50} reflete a concentração necessária para matar 50% das células.⁵⁷ Esses novos parâmetros estão sendo utilizados recentemente pelo NCI (National Cancer Institute) e podem ser obtidos por uma leitura direta dos gráficos de curva dose-resposta. Estudos realizados anteriormente pelo grupo expressavam os valores de atividade como IC_{50} (concentração responsável por 50% de inibição do crescimento celular)³¹, que era obtido por uma regressão linear dos valores obtidos para cada concentração. Com esta mudança, o valor

⁵⁷ Holbeck, S. L. *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*, 785.

de TGI é o que expressa melhor os resultados para o tipo de estudo que estamos realizando (estudo de SAR), além disso, é o parâmetro mais representativo para o experimento como um todo e é aquele que apresenta o menor erro.

A Tabela 3 apresenta os valores de TGI (μM) para os compostos testados. Os valores de TGI não puderam ser calculados para a linhagem de leucemia K562 (curva apresentada nas Figuras 22, 23 e 24), pois o seu perfil não permite que tais valores sejam lidos. Paralelamente, foi avaliada a citotoxicidade destes compostos em células não infectadas (fibroblasto da linhagem LLC-MK₂), estes bioensaios de citotoxicidade, foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

Tabela 3: Citotoxicidade e valores de TGI (μM) para os compostos (*R*)- e (*S*)- **1**, **31**, **32**, **33** e Doxorrubicina.

Compostos	Linhagem Celular (TGI, μM)								Citotoxicidade CC ₅₀ (μM) ^a
	UACC.62	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	
(<i>R</i>)-1	8,3	2,5	4,0	14,0	7,0	4,0	5,5	11,5	-
(<i>S</i>)-1	24,0	11,0	1,3	21,5	25,5	18,5	14,5	35,0	-
(<i>R</i>)-31	1,1	5,1	52,4	2,7	2,5	12,3	26,0	>200	34,1
(<i>S</i>)-31	3,3	>200	1,0	1,2	5,9	3,2	73,7	>200	33,3
(<i>R</i>)-32	1,7	13,4	2,9	11,2	6,5	15,1	20,0	>100	n/c ^b
(<i>S</i>)-32	7,3	17,5	12,5	8,9	12,4	16,1	21,6	56,8	n/c ^b
(<i>R</i>)-33	15,6	>200	>500	58,4	92,6	35,7	>300	>500	n/c ^b
(<i>S</i>)-33	8,2	>100	16,7	15,5	59,4	28,0	>100	>500	625,0
Doxo	0,2	31,1	32,1	16,9	2,5	32,3	25,4	9,2	-

^a Valores de citotoxicidade (CC₅₀) em células LLC-MK₂ (rim de macaco) (controle positivo – Triton X-100 20%; controle negativo – meio infectado + 1% de DMSO)

^b n/c: não citotóxico

Os valores de inibição total do crescimento obtidos mostram que na maioria das linhagens testadas, exceto na de mama e ovário, os compostos **31**, **32** e **33** são mais ativos que a goniotalamina (**1**).

Exceto para as linhagens de melanoma e cólon, os compostos testados apresentaram maior potência do que o controle positivo, a doxorrubicina, sendo que, essa potência chega a ser 32 vezes maior em alguns casos.

Pode-se observar que os compostos (*R*)- e (*S*)- **33** não apresentaram valores de TGI tão expressivos quando comparados aos compostos **31** e **32**. Isso nos permite inferir que a presença do grupo nitro neste tipo de sistema é de fundamental importância para a atividade antiproliferativa. Alguns estudos já revelam a importância dos nitrocompostos na terapia antineoplásica, principalmente no tratamento de tumores sólidos contendo áreas com hipóxia, resultantes de vascularização insuficiente destes tecidos. O ambiente de baixa concentração de oxigênio intracelular permite a biorredução dos nitrocompostos e subsequente formação de radicais livres; este fator provém base para a atividade citotóxica seletiva de células em hipóxia.⁵⁸

Com relação aos compostos **31** e **32**, (*R*)- e (*S*)- **31** se mostraram mais ativos que os dois enantiômeros de **32** para a maioria das linhagens testadas. A respeito disso podemos constatar que a dupla ligação exocíclica, que atua como espaçador biológico, parece ter respeitável importância para a atividade antiproliferativa.

A existência do grupo nitro aliado à presença da dupla exocíclica se mostraram essenciais para a atividade antiproliferativa para esta classe de compostos.

A partir dos bioensaios de citotoxicidade dos compostos **31**, **32** e **33** pudemos observar que os compostos que apresentaram atividades apreciáveis para as linhagens tumorais apresentaram valores de TGI inferiores aos valores de CC₅₀ indicando baixa citotoxicidade.

Paull e colaboradores⁵⁷ desenvolveram o “Mean Graph” como um modo fácil de visualizar os resultados de todas as linhagens de uma única vez. O “Mean Graph”, mostrado a seguir (Figura 25), foi gerado a partir de uma diferença entre a média dos valores de TGI de todas as linhagens e o valor de TGI para a linhagem que está sendo analisada. A linha média deste gráfico representa a média dos valores de TGI calculado para todas as linhagens; quando as barras se deslocam para a direita estão as linhagens que necessitam de concentrações menores do composto para serem inibidas totalmente, portanto mais sensíveis à esses compostos, e quando as barras deslocam-se para a esquerda, as linhagens necessitam de doses maiores para serem inibidas totalmente, portanto mais resistentes aos compostos, ou seja, estão sendo visualizadas células

⁵⁸ Paula, F. R.; Serrano, S. H. P.; Tavares, L. C. *Quim. Nova*, **2009**, vol.32, 1013.

menos sensíveis.⁵⁹ Além disso, o “Mean Graph”, mostra para qual linhagem a droga que está sendo analisada é mais seletiva, mas não expressa a sua potência.

A figura a seguir mostra o Mean Graph para os valores de TGI para todos os compostos testados, além da doxorrubicina que é utilizada como controle positivo.

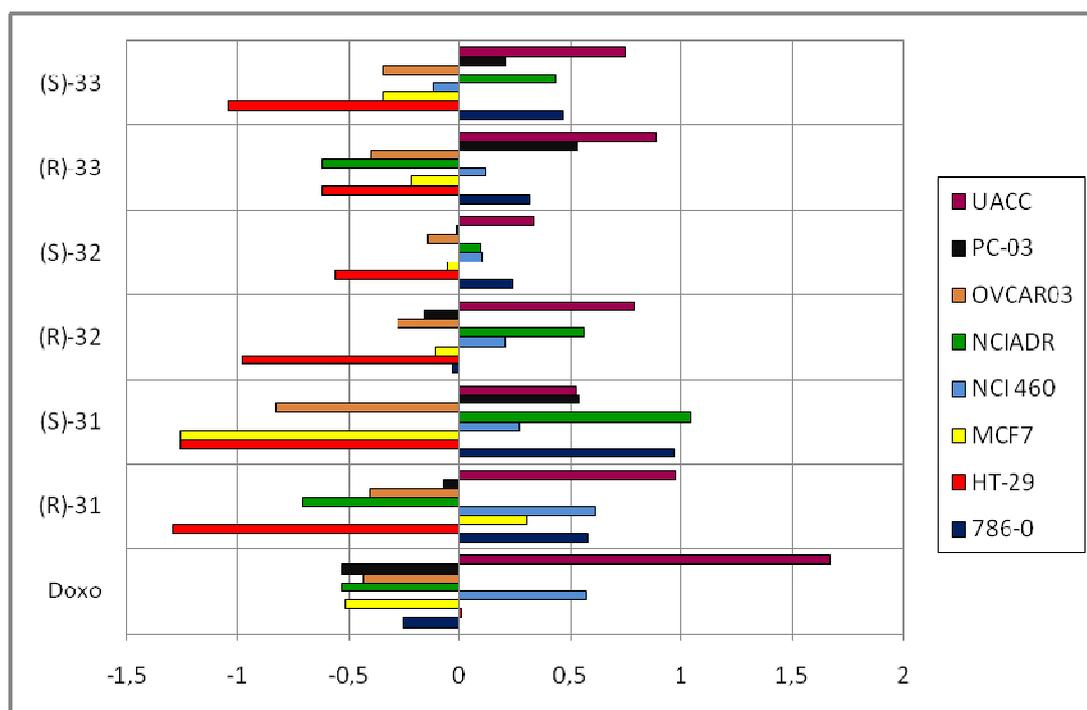


Figura 25: “Mean Graph” dos valores de TGI para (*R*)- e (*S*)-**31**, **32** e **33** e doxorrubicina.

O “Mean Graph” dos valores de TGI mostra que a linhagem de mama (MCF-7) se mostrou sensível apenas para o composto (*R*)-**31**.

As linhagens UACC-62 (melanoma) e NCI-H460 (pulmão) são as mais sensíveis a todos os compostos, indicando que talvez o grupo essencial para o mecanismo de ação nessas linhagens esteja presente em todos os compostos testados.

Salvo o controle positivo, o composto mais seletivo foi o (*R*)-**32**, seletivo apenas para três linhagens, pulmão (NCI-H460), ovário resistente (NCI-ADR/RES) e melanoma (UACC-62).

⁵⁹ Holbeck, S. L. *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*, 785.

3.2.2- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA

A doença de Chagas foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas e resulta da infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que pertence à família Trypanosomatidae (ordem Kinetoplastida).⁶⁰ A doença está distribuída pelas Américas e já é considerada endêmica na América Latina, afetando mais de 20 milhões de pessoas, com mais de 100 milhões expostas a situações de risco e causando a morte de 400 mil pessoas por ano.^{61, 62} No Brasil, por volta de 5 a 6 milhões de pessoas estão infectadas, sendo que 300 mil dos infectados estão localizados no Estado de São Paulo.⁶³

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário responsável pela transmissão da doença e o inseto transmissor é popularmente conhecido como barbeiro, chupão entre outros. Cerca de 10 espécies vivem muito próximas ao ambiente humano ou são totalmente domiciliadas, sendo as responsáveis pela transmissão do parasita e pela manutenção do ciclo doméstico de transmissão.⁶⁴

Os barbeiros adquirem o *T. cruzi* ao ingerir sangue de animais infectados, ao sugar (muito raramente) o conteúdo intestinal de outro barbeiro infectado ou ao se alimentar de fezes infectadas de outro barbeiro (coprofagia). O barbeiro transmite o parasita para o homem (e outros vertebrados) pelas fezes, geralmente após se alimentar de sangue, que podem invadir o organismo e iniciar a infecção se entrar em contato com mucosas (dos olhos, do nariz e da boca, por exemplo) ou com alguma área lesada da pele (um arranhão causado quando a pessoa picada se coça ou um pequeno ferimento, por exemplo). A infestação também pode ser por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou por via placentária.⁶⁴

A doença no homem tem duas etapas distintas. A inicial – a fase aguda – tem curta duração (semanas) e é caracterizada por elevada parasitemia e um estado febril (muitas vezes não aparente). A esta se segue a fase crônica, quando o parasita se reproduz

⁶⁰ Hoare, C. A.; Wallace, F. G. *Nature* **1996**, 244, 69.

⁶¹ Andrade, Z. A. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **1999**, 94, 71.

⁶² Krauth-Siegel, R. L.; Bauer, H.; Schirmer, R. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 690.

⁶³ Canesin, M. F.; Barreto, A. C. P. *Rev. Soc. Card. Est. São Paulo*, **1997**, 7, 233.

⁶⁴ Dias, J. C. P.; Romanha, A. J. *Ciência Hoje*, jul **2005**, 34, nº 217, 32.

continuamente, em baixos números, causando danos irreversíveis em órgãos como o sistema nervoso e o coração.⁶⁴

O tratamento da doença de Chagas conta hoje, na prática, com apenas dois medicamentos: o Benzonidazol (cujos direitos e tecnologia de fabricação foram doados, em 2003, ao governo brasileiro pela indústria farmacêutica suíça Roche) e outro, disponível na América Latina, o Nifurtimox (Bayer), mas atualmente não se encontram disponíveis comercialmente no Brasil. Nenhum destes compostos é ideal porque: (i) não são ativos durante a fase crônica da doença e apresentam sérios efeitos colaterais, (ii) requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica, (iii) há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas, (iv) populações de parasitos resistentes a ambos compostos têm sido relatadas, (v) apresentam alto custo, e (vi) não há formulações pediátricas, apesar do fato de que crianças até 12 anos possuem maiores chances de se beneficiarem com o tratamento por não apresentarem ainda a sintomatologia crônica da doença. Ambos compostos têm sido principalmente utilizados no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, nos quais se observam resultados positivos, principalmente em crianças (≤ 15 anos), calculando-se um percentual médio de cura em torno de 80%, no tratamento de infecções congênitas, transplantes de órgãos de doadores infectados, quadros de re-agudização de paciente imunossuprimidos. E apesar da maioria dos estudos revelar uma baixa eficiência destes fármacos durante a terapia de pacientes crônicos, avaliações recentes têm sugerido o tratamento de modo a retardar ou mesmo evitar a evolução da doença crônica.^{64, 65}

A infecção de 25 pessoas por *Trypanosoma cruzi*, em Santa Catarina em 2005, com três mortes, chamou a atenção de todo o país para a doença de Chagas. O surto representou mais uma comprovação de que a doença, que atinge milhões de brasileiros, também pode ser transmitida por via oral, já que todos os pacientes infectaram-se ao ingerir caldo de cana contaminado possivelmente pela moagem, com a cana, de um barbeiro infectado vindo da mata próxima. A doença pode ser prevenida principalmente pelo controle do inseto transmissor, o barbeiro, e pela seleção de doadores em bancos de

⁶⁴ Site oficial da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz. Disponível em: www.fiocruz.com.br/chagas. Acessado em 29/04/2009.

sangue. Embora possa ser curada, em geral no início, a doença de Chagas ainda é endêmica em muitas áreas do interior do país, exigindo pesquisas sobre novas drogas contra o *T. cruzi* e novas formas de combater o barbeiro.⁶⁴

Antes de apresentar os resultados obtidos, é de grande valia esclarecer quais são as formas apresentadas por *T. cruzi* no seu ciclo de vida.

Resumidamente, um vetor (inseto triatomíneo) infectado, suga o sangue e deposita fezes infestadas com formas tripomastigotas metacíclicas próximas da picada. Geralmente ao se coçar os tripomastigotas penetram em mucosas, ferimentos ou a solução de continuidade promovida pela picada do inseto e invadem células de vários tipos, onde se transformam em amastigotas. Os amastigotas se dividem por fissão binária, atingindo números como 500 em cada célula, que incha formando um "pseudocisto". A maioria dessas formas se transforma em formas tripomastigotas, as quais auxiliam na arrebentação da célula já fragilizada, por apresentarem intensa movimentação. Os tripomastigotas são então liberados na circulação sangüínea, por onde vão infectar novas células e assim por diante. O parasita nunca se reproduz no sangue. Novo inseto transmissor então pica os doentes, e suga tripomastigotas presentes na corrente sanguínea. Os tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino do inseto, multiplicando-se intensivamente. Alguns desses transformam-se em tripomastigotas novamente e são expulsos com as fezes pelo inseto quando este pica outro indivíduo. O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* está apresentado na figura 26.

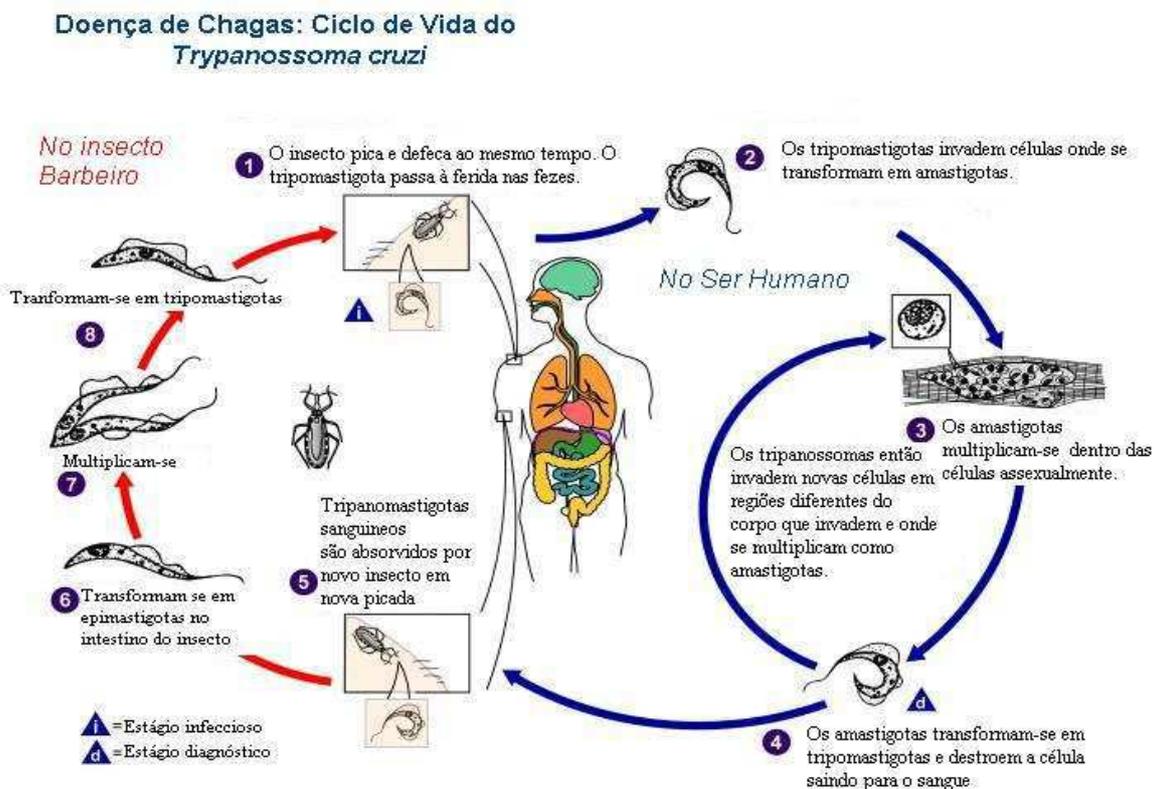


Figura 26: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.⁶⁶

Os bioensaios foram realizados em amostras contendo formas tripomastigotas, por ser essa uma forma que não apresenta multiplicação e é obtida em grandes quantidades em meios de cultura celular, sendo então ideal para a triagem de novos candidatos a fármacos. Estrategicamente, é interessante que se avalie primeiro a atividade de candidatos a agentes tripanocidas nesta forma e, em caso de apresentarem atividade biológica significativa, torna-se mais viável a avaliação sobre a forma intracelular do parasito (amastigota).

É de extrema importância lembrar que o parasita não se reproduz no sangue e sim dentro das células dos hospedeiros. Isto quer dizer que apenas a determinação de atividade sobre uma das formas apresentadas pelo parasito no seu ciclo biológico não determina a efetividade da substância sobre a evolução clínica da doença de Chagas, pois as formas do parasita que ainda se reproduzem estarão viáveis no interior das células.

⁶⁶ Retirado do site oficial da CDC (Centers of Disease Control and Prevention). Disponível em: <http://www.cdc.gov/chagas/>. Acessado em 14/05/2009.

Sendo assim, se um determinado composto apresenta atividade tripanocida apenas para a forma tripomastigota, ele não será um fármaco efetivo para tratar esta doença.

A eficácia do tratamento para doenças causadas por microorganismos está relacionada a vários fatores, a citar: i) período entre a contaminação e o diagnóstico (quando mais curto for este intervalo melhor); ii) tipo de parasita (algumas espécies do gênero *Trypanosoma* determinam patologias mais severas do que os outros); iii) o agente tripanocida empregado e a correta utilização do mesmo (se não houver a correta utilização do tripanocida, como por exemplo, utilização em um intervalo de tempo inferior ao recomendado, pode-se observar o aparecimento de parasitas resistentes ao tripanocida utilizado). De fato, a existência de quimioterápicos com atividades tripanocidas é limitada e insatisfatória e a busca por novos compostos que possam ser vez mais eficiente para garantir a sobrevivência do homem deve ter espaço garantido e reservado nas pesquisas científicas.⁶⁷

Visando a busca por novos quimioterápicos, foi avaliada a atividade tripanocida das duas formas enantioméricas dos compostos **31**, **32** e **33**.

Estes seis compostos químicos obtidos por via sintética foram avaliados em ensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Paralelamente, foi avaliada a citotoxicidade destes compostos em células não infectadas (fibroblasto da linhagem LLC-MK₂). Estes bioensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

Os resultados dos bioensaios para a atividade tripanocida e de citotoxicidade estão apresentados na Tabela 4.

⁶⁷ Keiser, J.; Stich, A.; Burri, C. *Trends Parasitol.* **2001**, 17,42.

Tabela 4: Índice de segurança, citotoxicidade e atividade tripanocida de (*R*)- e (*S*)-**31**, **32** e **33** contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi*.

	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Citotoxicidade	Índice de segurança
Substância	IC ₅₀ (μM) ^a	CC ₅₀ (μM) ^b	Si=(CC ₅₀ /IC ₅₀) ^d
(<i>R</i>)- 31	2,8x10 ³	34,1	0,012
(<i>S</i>)- 31	36,6	33,3	0,90
(<i>R</i>)- 32	3,8x10 ⁴	n/c ^c	3,8x10 ⁴
(<i>S</i>)- 32	858,1	n/c ^c	858,1
(<i>R</i>)- 33	2,2x10 ³	n/c ^c	2,2x10 ³
(<i>S</i>)- 33	5,9x10 ⁴	625,0	0,010

Controle positivo – violeta-de-genciana a 250 μg/mL (IC₅₀ = 80 μM);

Controle negativo – sangue infectado + DMSO;

^aConcentração que promove a lise de 50% das formas de *Trypanosoma cruzi* circulantes no sangue.

^b Valores de citotoxicidade (CC₅₀) em células LLC-MK₂ (rim de macaco) (controle positivo – Triton X-100 20%; controle negativo – meio infectado + 1% de DMSO)

^c n/c: não citotóxico

^d Si: Índice de segurança

O composto (*S*)-**31** apresentou um valor de IC₅₀ 76 vezes menor que o (*R*)-**31**, além disso, mostrou-se quase 2,2 vezes mais ativo do que a substância utilizada como controle positivo (violeta de genciana). O composto (*S*)-**32** se mostrou 44 vezes mais ativo que o seu respectivo enantiômero. Já o composto (*S*)-**33**, não apresentou uma atividade significativa se comparada com os análogos (*S*)-**31** e (*S*)-**32**, além disso, o isômero (*R*)-**33** se mostrou mais ativo que o seu respectivo enantiômero (*S*)-**33**. No entanto, (*R*)-**33** e (*R*)-**31** apresentam atividade tripanocida na mesma ordem de grandeza.

Esses resultados nos permite inferir que a configuração *S* da lactona aliada a presença do grupo nitro se mostram essenciais para uma atividade expressiva contra *T. cruzi*.

Estudos revelam que a presença do grupo nitro se mostra essencial para a atividade contra *T. cruzi*. A atividade dos nitrocompostos está relacionada a formação de um nitro radical aniônico (R-NO₂⁻) gerado no processo de redução enzimática, que reage com o O₂ presente no meio, levando a formação do radical O₂⁻. Este radical, por sua vez, sofre ação

de enzimas como a superóxido dismutase, S.O.D., formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) que são tóxicas para as células do parasita.⁵⁸

O composto (S)-**31** se apresentou como o composto mais ativo contra *T. cruzi*, no entanto, sua citotoxicidade é inferior ao valor de IC₅₀ sugerindo alta citotoxicidade. O composto que apresenta atividade mais interessante e o menor valor de citotoxicidade é o (S)-**32**.

Além disso, pôde-se calcular o índice de segurança (Si) destes compostos, cujo cálculo é determinado pela relação $Si = CC_{50}/IC_{50}$. Estes valores estão apresentados na tabela 4. Valores abaixo e próximos de 1 correspondem a compostos pouco seguros e seletivos. (S)-**32** é o composto que apresenta atividade mais interessante e o menor valor de citotoxicidade, além disso, um alto índice de segurança.

3.2.3 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres, sendo causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial de saúde (OMS) há 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de infecção, sendo que existem cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e surgem anualmente mais 2 milhões de novos casos. No Brasil são registrados cerca de 26 mil novos casos por ano. Por esses motivos, a OMS considera a doença entre as seis parasitoses de maior importância mundial.⁶⁸

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organismos unicelulares que pertencem à Ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, somando cerca de 25 espécies distintas, algumas de grande interesse para a parasitologia médica.⁶⁹ Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico do tipo digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, os quais são os responsáveis pela transmissão do parasito.⁶⁹ Assim, durante o seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Leishmania*

⁶⁸ Pontin, K.; da Silva Filho, A. A.; Santos, F. F.; Silva, M. L. A.; Cunha, W. R.; Nanayakkara, N. P. D.; Bastos, J. K. Albuquerque, S. *Parasit. Res.* **2008**, *103*,487.

⁶⁹ Neves, D. P. *Parasitologia Dinâmica* **2003**, Ed. Atheneu, 79-112.

podem se apresentar sob duas diferentes formas: os amastigotas e os promastigotas. As leishmanioses se caracterizam pelo parasitismo intracelular a partir da picada do vetor flebotomíneo infectado com as formas promastigotas de *Leishmania*.⁷⁰

Quando o inseto vetor, hematófago da Família Phlebotominae (dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) pica o indivíduo ou o animal parasitado, retira junto ao sangue os parasitos. O alimento juntamente com as formas amastigotas são envolvidos pela matriz peritrófica, uma membrana quitinosa secretada pelas células epiteliais do intestino do inseto. Após 4-5 dias depois do repasto infectante, as formas amastigotas se transformam em promastigotas.⁷¹ Essas formas promastigotas multiplicam por divisão binária, sendo diferenciadas dependendo do tempo de infecção e do lugar onde se encontram. O último estágio de desenvolvimento das promastigotas é a forma promastigota metacíclica, forma infectante para os mamíferos.^{70 b)}

Durante um novo repasto sanguíneo, as fêmeas dos insetos vetores inoculam as formas promastigotas metacíclicas nos hospedeiros vertebrados.^{70 b)} Após a interiorização do parasito, a forma promastigota se diferencia em amastigota, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido encontrado no compartimento vacuolar por onde é interiorizado.⁷² Após sucessivas multiplicações das amastigotas, a célula hospedeira se rompe liberando estas formas que irão infectar novos macrófagos (Figura 27).⁷³

⁷⁰ a) Laison R.; Shaw, J. J. *Ciência e Cultura*, **1992**, 44, 94. b) Bates, P. A.; *Internat. J. Parasit.*, **2007**, 37,1097. c) Desjeux, P. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2001**, 95, 239.

⁷¹ a) Chang, K. P.; Chaudhuri, G.; Fong, D. *Annual Review of Microbiology*, **1990**, 44, 499. b) Sacks, D.; Kamhawi, S. *Annual Review of Microbiology*, **2001**, 55, 453.

⁷² Ashford, R. W.; Bates, P. A. *Leishmaniasis on the old World*. Em: FEG Cox, Kreier, J. P e Wakelin, D. *Microbiology and Microbial infection*. Oxford University Press, New York. **1998**, 215.

⁷³ Horta, M. F. *Trends in Microbiology*, **1997**, 9, 363.

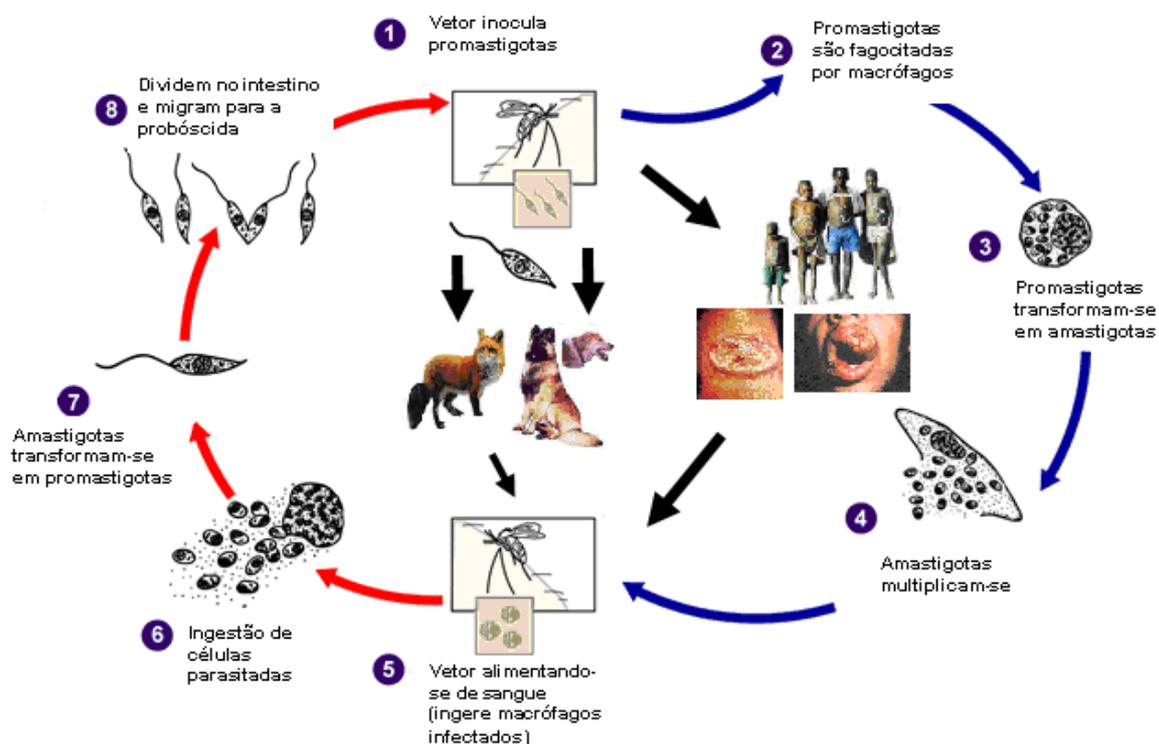


Figura 27: Ciclo biológico da *Leishmania sp.*⁷⁴

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é a principal fonte da infecção humana, com transmissão peridoméstica e doméstica efetuada principalmente pelo vetor *Lutzomyia longipalpis*.⁷⁵ A infecção canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem. No ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*).

Existem três grupos de *Leishmania* que são classificados em diferentes subgêneros, *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* e *Leishmania (Sauroleishmania)*. Essa

⁷⁴ Adaptado do site oficial da CDC (Centers of Disease Control and Prevention). Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm. Acessado em 14/05/2009.

⁷⁵ Laison, R.; Ishikawa, E. A. Y.; Silveira, F. T. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2002, 96, 630..

variação depende dos hospedeiros e de qual parte do intestino do flebotomíneo foi colonizada pelos parasitos.^{70 b), 76}

Apesar de apenas algumas espécies de *Leishmania* serem responsáveis pela maioria dos casos humanos, uma das características marcantes deste gênero é a diversidade das manifestações clínicas. A patogênese da leishmaniose, suas manifestações clínicas e o curso da infecção são dependentes de complexas interações entre a agressividade característica das diferentes espécies de gênero e a resposta imunológica mediada por células do hospedeiro.⁷⁷

Segundo estudos,⁷² as leishmanioses podem ser classificadas como: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Leishmaniose Visceral ou Calazar (crescimento anormal de baço e fígado) e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC). Dentro da classe de LTA encontram-se as formas de leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutaneomucosa recidivas das leishmanioses (Tabela 5).

⁷⁶ Sanf'janova, V. M. *Classification the genus Leishmania Ross 1903*. Em: The Leishmaniasis. Protozoology, parte 7. Academy of Sciences.USSR. All Union Society of protozoologists: Leningrad. Capítulo 11, **1992**, 95.

⁷⁷ a) Grimaldi, G. Jr.; Tesh, R. B. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implication for future research. *Clinical Microbiology Review*, **1993**, 6, 230. b) Laison, R.; Shaw, J. J *New world Leishmaniasis-The neotropical Leishmania species*. Em: FEG Cox, Kreier J. P.; Wakelin, D (eds). Microbiology and microbial infection. Oxford University Press, New York. **1998**, 215.

Tabela 5: Classificação das espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.⁷⁸

Espécie	Doença
Subgênero <i>Leishmania</i>	
Complexo <i>L. donovani</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	visceral
Complexo <i>L. aethiopica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) aethiopica</i>	cutânea difusa
<i>Leishmania (Leishmania) garnhami</i>	cutânea
Complexo <i>L. major</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	cutânea
Complexo <i>L. tropica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	cutânea/visceral
Complexo <i>L. mexicana</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	cutânea/mucosa/visceral
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) pifanoi</i>	cutânea
Subgênero <i>Viannia</i>	
Complexo <i>L. braziliensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	cutânea/mucosa
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) colombienseis</i>	cutânea/mucosa
Complexo <i>L. guyanensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	cutânea
Complexo não especificado	
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	cutânea

⁷⁸ Laison, R.; Shaw, J. J. *Evolution, classification and geographical distribution*. The leishmaniasis in biology and medicine. Em: Peters, W.; Kellick-Kendrick, R. Florida: Academic, 1987, 1, 1.

A escolha do tratamento depende da espécie do parasito, da sensibilidade aos fármacos, do tipo e estágio da doença e do estado imunológico do paciente. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos indicados para o tratamento de todas as leishmanioses, sendo que nos casos de falha aos tratamentos com os antimoniais pentavalentes, os fármacos utilizados como segunda escolha no tratamento das leishmanioses são a anfotericina B e a pentamidina. No entanto, o uso dessas drogas deve ser feito sob vigilância, em serviços especializados e com o paciente hospitalizado. Além disso, os pacientes podem apresentar alguns efeitos colaterais.⁷⁹ No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde⁷⁹⁻⁸⁰ baseia-se, principalmente, no antimonial pentavalente (Glucantime). Entretanto, todos os medicamentos utilizados na terapia possuem muitos efeitos colaterais devido a sua toxicidade.

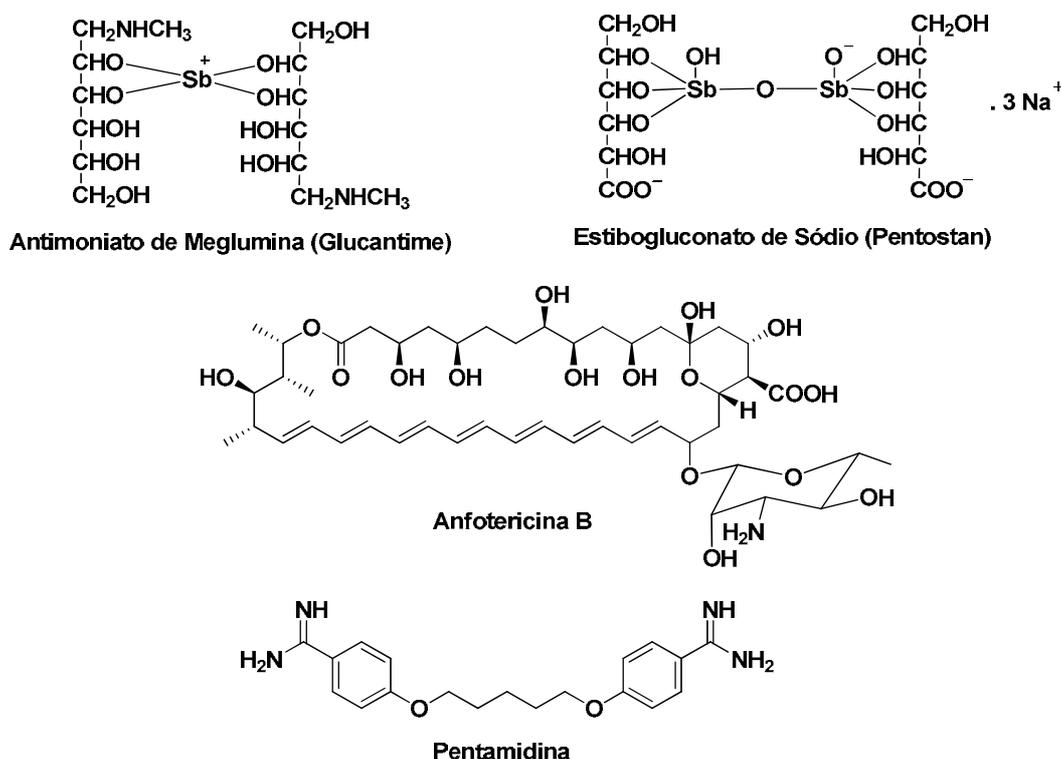


Figura 28: Estrutura dos fármacos utilizados na terapia contra Leishmania.⁸¹

⁷⁹ MS/Guia de Vigilância Epidemiológica. *Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA*. Em: Guia de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 5^a edição. **1998**

⁸⁰ MS/FUNASA. *Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral*. Em: Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 2^a edição (maio/2002), 27.

⁸¹ Adaptado de: a) Balaña-Fouce, R.; Reguera, R. M. Cubria, J. C.; Ordóñez, D. *Gen. Pharmacology*, **1998**, 30, 435. b) Croft, S. L.; Coombs, G. H. *Trends in Parasitology*, **2003**, 19, 502.

Além das diferentes drogas disponíveis para terapêutica das leishmanioses, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de se obter medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente. Embora, atualmente, haja vários compostos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, nenhum é efetivo na erradicação da doença, seja por limitações do próprio medicamento, seja devido ao custo, toxicidade ou mesmo pela resistência dos parasitos. Sendo assim, vários pesquisadores têm buscado desenvolver novos compostos que tenham ação sobre o parasito ou potencialize a resposta imune do hospedeiro.

Com base nesses dados, resolvemos avaliar *in vitro* a atividade dos compostos (*R*)- e (*S*)-**31**, **32** e **33** sobre a forma promastigota de *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis*, além disso, foi avaliada a citotoxicidade destes compostos em células não infectadas (LLC-MK₂). Estes bioensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

Tabela 6: Índice de segurança, citotoxicidade e atividade Leishmanicida de (*R*)- e (*S*)-**31**, **32** e **33** contra a forma promastigota de *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania major*.

<i>Leishmania brasiliensis</i>				<i>Leishmania major</i>			
Substância	IC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M) ^b	Si=(CC ₅₀ /IC ₅₀) ^d	Substância	IC ₅₀ (μ M) ^a	CC ₅₀ (μ M) ^b	Si=(CC ₅₀ /IC ₅₀) ^d
(R)-31	2,8	34,1	12,1	(R)-31	3,5	34,1	9,74
(S)-31	1,6	33,3	20,8	(S)-31	0,72	33,3	46,25
(R)-32	5,8	n/c ^c	5,8	(R)-32	10,5	n/c ^c	10,5
(S)-32	19,9	n/c ^c	19,9	(S)-32	10,0	n/c ^c	10,0
(R)-33	inativo	n/c ^c	-	(R)-33	751,4	n/c ^c	751,4
(S)-33	inativo	625,0	-	(S)-33	80,85	625,0	7,73

Para *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania major*:

Controle positivo – anfotericina B – IC₅₀ = 10,5 ± 0,3 μ M; Controle negativo – meio infectado + 1% de DMSO

^aConcentração que promove a lise de 50% das formas promastigota.

^b Valores de citotoxicidade (CC₅₀) em células LLC-MK₂ (rim de macaco) (controle positivo – Triton X-100 20%; controle negativo – meio infectado + 1% de DMSO)

^c n/c: não citotóxico

^d Si: Índice de segurança

Com base nos resultados, pudemos observar que os compostos (*R*)- e (*S*)-**33** não apresentaram valores de IC₅₀ satisfatórios para nenhuma das espécies de *Leishmania* quando comparados ao controle positivo.

O análogo (*S*)-**31** se apresentou como o composto mais ativo para ambas as espécies de *Leishmania*, mostrando-se cerca de 6,5 vezes mais ativo que o controle positivo para *Leishmania brasiliensis* e cerca de 14,6 vezes para *Leishmania major*. Além disso, para ambas as espécies de *Leishmania* (*S*)-**31** se mostrou mais ativo que o seu respectivo enantiômero.

Para o composto **32**, ambos os enantiômeros apresentaram valores de IC₅₀ bem próximos aos valores da anfotericina B. Já para *Leishmania brasiliensis*, (*R*)-**32** mostrou-se cerca de 3 vezes mais ativo que (*S*)-**32** e quase 2 vezes mais ativo que o controle positivo.

Pudemos notar que os compostos que apresentaram atividade tanto para *Leishmania brasiliensis* quanto para *Leishmania major* continham o grupo nitro ligado ao anel furânico, nos fornecendo indícios de que a presença deste grupo seja de grande importância para a atividade leishmanicida.

Os ensaios de citotoxicidade dos compostos **31**, **32** e **33**, revelam valores de concentração superiores aos valores de IC₅₀.

Assim, pôde-se calcular o índice de segurança (Si) destes compostos, cujo cálculo é $Si = CC_{50}/IC_{50}$. Estes valores estão mostrados na tabela 6. Quanto maior for o valor de Si, mais seguro e seletivo é o composto. Para *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania major* (*R*)-**31** e (*S*)-**31** foram os mais ativos e apresentaram bons índices de segurança.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizamos a síntese de três novos análogos heterocíclicos da goniotalamina (**1**). A estrutura química dos compostos **31**, **32** e **33** apresenta o anel furânico e o núcleo da diidropiranona. O composto **31** foi sintetizado nas suas duas formas enantioméricas a partir do aldeído **45** em quatro etapas e 33% de rendimento global. Os compostos **32** e **33**, também foram sintetizados nas duas formas enantioméricas, em três etapas utilizando a alilação assimétrica de Keck e metátese de olefinas como etapas chaves. Os rendimentos foram de 38% e 36%, respectivamente.

As configurações absolutas de **31**, **32** e **33** foram determinadas por comparação dos deslocamentos químicos no espectro de ^1H -RMN após esterificação dos respectivos alcoóis racêmicos e dos enantiomericamente puros com (*R*)-MTPA ou (*S*)-MTPA. Para o nosso sistema, pudemos observar que na reação de alilação o (*R*)-BINOL fornece um álcool de configuração *R*, assim o (*S*)-BINOL fornece o produto alilado de configuração *S*.

A razão enantiomérica de **31**, **32** e **33**, foi determinada por ^{19}F -RMN utilizando a derivatização com o ácido de Mosher ((*R*)-MTPA) com os respectivos alcoóis homoalíficos. Os valores obtidos foram de **96:4**; **92:8** e **94:6**, respectivamente.

Estes novos compostos foram submetidos a testes de atividade biológica, uma vez que podem apresentar atividades mais pronunciadas ou até mesmo diferentes das atividades dos análogos já existentes e por isso, foram submetidos a testes de atividade antiproliferativa frente a 9 linhagens de células tumorais e a bioensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota do *Trypanosoma cruzi* e contra a forma promastigota de *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis*, cuja colaboração foi realizada junto a outras instituições.

No que diz respeito à atividade antiproliferativa, exceto para as linhagens de melanoma e cólon, os compostos testados apresentaram maior potência do que o controle positivo, a doxorrubicina, sendo que, essa potência chega a ser 32 vezes maior em alguns casos. Além disso, os compostos **31**, **32** e **33** se mostraram mais ativos que a goniotalamina (**1**), exceto para as linhagens de mama e ovário. Os bioensaios de citotoxicidade dos compostos **31**, **32** e **33** sob células não infectadas (LLC-MK₂) mostram que os compostos que apresentaram atividades apreciáveis para as linhagens tumorais apresentaram valores de IC₅₀ inferiores aos valores de CC₅₀ indicando baixa citotoxicidade.

Com relação à atividade tripanocida, os compostos (S)-**31** e (S)-**32** merecem destaque. (S)-**31** apresentou um valor de IC₅₀ 76 vezes menor que o (R)-**31**, e se mostrou quase 2,2 vezes mais ativo do que a droga utilizada como controle positivo (violeta de genciana). O composto (S)-**32** se mostrou 44 vezes mais ativo que o seu respectivo enantiômero. Embora o composto (S)-**31** tenha se apresentado como o composto mais ativo contra *T. cruzi*, no entanto, sua citotoxicidade é inferior ao valor de IC₅₀ sugerindo alta toxicidade. O composto que apresenta atividade mais interessante e o menor valor de citotoxicidade e com alto índice de segurança é o (S)-**32** (IC₅₀=0,86mM).

Para a atividade leishmanicida o análogo (S)-**31** se apresentou como o composto mais ativo para ambas as espécies de *Leishmania*, mostrando-se cerca de 6,5 vezes mais ativo que o controle positivo para *Leishmania brasiliensis* e cerca de 14,6 vezes para *Leishmania major*. Os ensaios de citotoxicidade dos compostos **31**, **32** e **33**, revelam valores de concentração superiores aos valores de IC₅₀, indicando baixa toxicidade. Para *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania major* (R)-**31** e (S)-**31** se mostraram como os compostos mais ativos e apresentaram bons índices de segurança.

O análogo **33** não apresentou atividade expressiva para nenhum dos testes realizados, indicando que a presença do grupo nitro ligado ao anel furânico seja de grande importância para as atividades biológicas avaliadas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Instrumentação

Os solventes comerciais utilizados foram previamente tratados e destilados. A trietilamina (Et_3N) e o diclorometano (CH_2Cl_2) foram destilados sob hidreto de cálcio imediatamente antes do uso. Tolueno e tetraidrofurano (THF) foram previamente destilados na presença de fitas de sódio metálico, o $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ foi destilado e armazenado sob peneira molecular previamente ativada. A alilestanana foi preparada antes do uso conforme procedimento descrito na literatura.⁸² Os demais reagentes foram obtidos de fornecedores especializados e não tiveram purificação prévia, salvo algumas exceções devidamente especificadas.

As separações cromatográficas foram efetuadas com sílica gel Aldrich (70-230 mesh e 230-400 mesh). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica foram reveladas em luz $\text{UV}_{254\text{nm}}$ e/ou por imersão em solução de permanganato de potássio, ácido fosfomolibdico (15% em etanol) ou *p*-anisaldeído, seguida de aquecimento.

Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C foram obtidos em aparelhos Varian Gemini 300, Bruker 250 e Inova 500 MHz. Os espectros de RMN de ^{19}F foram obtidos no aparelho Bruker 250MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm; tendo como padrão interno tetrametilsilano ou clorofórmio deuterado e indicando o número de hidrogênios, a multiplicidade (s, singleto; d, dubleto; dd, duplo dubleto; dq, duplo quarteto; ddd, duplo duplo dubleto; dqd, duplo quádruplo dubleto; t, tripleto; q, quarteto; quint, quinteto; sext, sexteto; sept, septeto; m, multipletto; l, largo) e a constante de acoplamento (J) em Hertz.

Os espectros de infravermelho (I.V.) foram obtidos em aparelho Nicolet Impact 410, com as freqüências de absorção expressas em cm^{-1} , utilizando-se cela de NaCl para filme ou pastilha de KBr.

Os dados de rotação óptica foram obtidos em um aparelho Perkin Elmer 341, utilizando lâmpada de sódio.

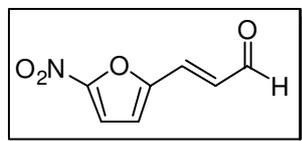
Os pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Electrothermal 9100, com um termômetro não aferido.

⁸² von Gyldenfeldt. F.; Marton, D.; Tagliavini, G. *Organometallics*, **1994**, *13*, 906.

As análises de massas de alta resolução foram realizadas no aparelho: Waters Q-TOF Premier. Os parâmetros são mostrados a seguir: a) ionização: ESI, modo positivo (V+); b) voltagem do Capilar: 3,5 kV; c) voltagem do Cone: 30 V; d) fluxo do Capilar: 1 a 5 microlitros/min. As amostras foram injetadas em H₂O/MeOH 1:1 (ou H₂O/MeCN 1:1) com 0,1% de ácido fórmico. A calibração foi feita com H₃PO₄ 0,05% em H₂O/MeCN 1:1.

5.2. Reações realizadas, compostos preparados e caracterizações

5.2.1 Preparação do (*E*)-3-(5-nitrofurano-2-il)acrilaldeído (**47**):



dissolvidos 1,62g (4,75mmol) do cloreto de formilmetiltrifenilfosfônio em 23,5mL de tolueno, em seguida acrescentou-se 0,8mL de trietilamina, a mistura permaneceu sob agitação por 10 minutos a temperatura de refluxo quando canulou-se 0,5mL (4,75mmol) do aldeído **45** dissolvido em 16mL de tolueno. Esta nova mistura permaneceu sob agitação por 1 hora a temperatura de refluxo. O solvente foi evaporado e o bruto purificado por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando uma mistura de 3:2 de hexano/acetato como eluente. O produto foi obtido em 98% de rendimento.

Aspecto Físico: Sólido amarelo palha.

Ponto de Fusão: 115,4-115,8°C

IV (pastilha de KBr): 2831; 2742; 1680; 1630; 1552; 1471; 1350; 1254; 1111; 1014; 982cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 9,69 (d, 1H, *J*=7,2Hz); 7,35 (d, 1H, *J*=3,6Hz); 7,23 (d, 1H, *J*=16,2Hz); 6,90 (d, 1H, *J*=3,6Hz); 6,85 (dd, 1H, *J*=16,2 e 7,2Hz)

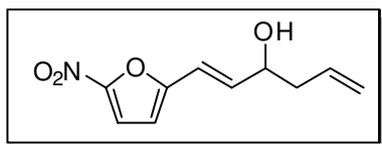
RMN-¹³C (62,5MHz, CDCl₃): δ191,7; 152,6; 151,8; 134,5; 130,8; 116,6; 112,9.

5.2.2 Reação de alilação racêmica para a síntese do (*E*)-1-(5-nitrofuran-2-il)hexa-1,5-

dien-3-ol (48**):** A mistura formada por 100mg do aldeído **47** (0,60mmol) e 6 mL de diclorometano foi resfriada a -78⁰C com o auxílio de banho de etanol e gelo seco. Adicionou-se 115 μL (0,72mmol) de BF₃.Et₂O e em seguida 280 μL (0,90 mmol) de alilestanana gota a gota. A reação foi acompanhada por CCD e o tratamento requer a adição de 40 mL de diclorometano e 20 mL de água, a fase orgânica foi separada e a fase

aquosa foi extraída com diclorometano (3x80mL). As fases orgânicas foram reunidas e secas com Mg₂SO₄. O produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila 4:1 e obtido em 53% de rendimento.

5.2.3 Preparação do (*R*)- e (*S*)-(*E*)-1-(5-nitrofuran-2il)hexa-1,5-dien-3-ol (**48**):



solução de 80,2 mg (0,280 mmol) de (*R*)- ou (*S*)-BINOL em 2,80 mL de CH₂Cl₂ sob agitação, adicionou-se peneira molecular 4 Å (pulverizada e ativada em forno a 120°C por vários dias). À suspensão resultante adicionou-se 83,5µL (0,280 mmol) de tetraisopropóxido de titânio a temperatura ambiente. Nessa etapa a solução ficou com coloração laranja-avermelhada. Aqueceu-se a reação até temperatura de refluxo que permaneceu por 1 h, tornando-se agora vermelha-amarronzada. Em seguida, resfriou-se a mistura reacional até temperatura ambiente e uma solução de 510,0 mg (2,82 mmol) do aldeído **47** em 0,5 mL de CH₂Cl₂ por meio de uma cânula. Após 5 min de agitação a reação foi resfriada a -78 °C e adicionou-se 1,06 mL (3,38 mmol) de aliltributilestanana; após isso a mistura foi posta, sob agitação a -20°C por 60 h. Transcorrido este período a mistura reacional foi tratada com 30mL de solução saturada de NaHCO₃ e 30mL de CH₂Cl₂. A fase orgânica foi separada e a fase aquosa foi extraída com 3 porções de 30mL de CH₂Cl₂. As fases orgânicas foram reunidas e secas com MgSO₄ anidro, o solvente foi evaporado e o bruto reacional foi purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano:acetato de etila (4:1). O produto **48** foi obtido em 85% após purificação.

Aspecto Físico: óleo amarelo

IV (filme): 3440; 1568; 1507; 1479; 1388; 1352; 1017; 963 cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,30 (d, 1H, *J*=3,75Hz); 6,63 (dd, 1H, *J*=15,9; 4,2 Hz); 6,52(dd, 1H, *J*=15,9; 1,05 Hz); 6,43 (d, 1H, *J*=3,75 Hz); 5,90-5,74 (m, 1H); 5,25-5,16 (m, 2H); 4,45-4,38 (m, 1H); 2,49-2,28 (m, 2H); 2,03 (sl, 1H).

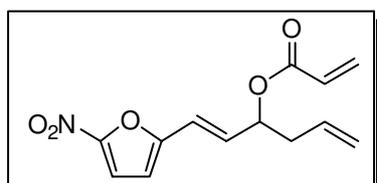
RMN-¹³C (62,5MHz, CDCl₃): δ 155,1; 151,2; 138,3; 133,2; 119,3; 116,1; 113,9; 110,3; 70,2; 41,5.

Isômero *R*: [α]_D²⁵ = +143 (c 0,8; CHCl₃)

Isômero *S*: [α]_D²⁵ = -149 (c 0,8; CHCl₃)

EMAR (TOF MS EI) m/z calculado para $[M^+]=209,0688$, encontrado=209,0690.
 Erro=1ppm

5.2.4 Preparação do Acrilato (*R*)- e (*S*)-(*E*)-1-(5-nitrofurano-2-il)hexa-1,5-dien-3-il (49):



A uma solução de 548,0 mg (2,46 mmol) do álcool **48** em 2,5 mL de CH_2Cl_2 a 0 °C, adicionou-se, 0,36 mL (4,44 mmol) de cloreto de acrilóila. Sob banho de gelo 1,25 mL (8,87 mmol) de Et_3N foram adicionadas gota a gota. O sistema foi aquecido até temperatura ambiente e após 2h a reação foi extraída com 10mL de solução saturada de NH_4Cl e 10mL de CH_2Cl_2 . A fase orgânica foi separada e a aquosa foi extraída com (3 X 10 mL) de CH_2Cl_2 . As fases orgânicas foram secas com MgSO_4 anidro, filtradas e concentradas. O produto foi purificado por CC com sílica *flash*, utilizando uma mistura de hexano:acetato 4:1. O produto **49** foi obtido em 70% de rendimento.

Aspecto Físico: óleo amarelo

IV (filme): 2917; 1723; 1515; 1486; 1405; 1356; 1237; 1263; 1184 cm^{-1} .

RMN-¹H (300MHz, CDCl_3): δ 7,30 (d, 1H, $J=3,75$ Hz); 6,53 (dd, 1H, $J=16,0$; 6,5 Hz); 6,45(dd, 1H, $J=17,0$; 1,25 Hz); 6,45 (d, 1H, $J=3,75$ Hz); 6,44 (dd, 1H, $J=16,0$; 0,5 Hz); 6,15 (dd, 1H, $J=17,0$; 10,5 Hz); 5,89 (dd, 1H, $J=10,5$; 1,25 Hz); 5,77 (ddt, 1H, $J=17,0$; 10,5; 6,25 Hz); 5,55 (ddd, 1H, $J=12,5$; 6,5; 1 Hz); 5,18-5,12 (m, 2H); 2,53 (t, 2H, $J=6,5$ Hz).

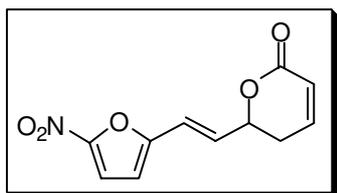
RMN-¹³C (75MHz, CDCl_3): δ 165,1; 154,2; 151,4; 133,5; 132,1; 131,5; 128,1; 118,9; 118,3; 113,5; 110,9; 72,6; 38,6.

Isômero *R*: $[\alpha]_D^{25} = +91$ (c 0,8; CHCl_3)

Isômero *S*: $[\alpha]_D^{25} = -92$ (c 0,8; CHCl_3)

EMAR (TOF MS ESI+) m/z calculado para $[M+\text{Na}]^+=286,0692$, encontrado=286,0724 .
 Erro=11,2ppm

5.2.5 Preparação do (*R*)- e (*S*)-(*E*)-6-(2-(5-nitrofurano-2-il)vinil)-5,6-diidropiran-2-ona ou (*R*)- e (*S*)- nitrofurantalamina (31):



Uma solução de 236,5mg (0,997mmol) do acrilato **49** em 100mL de CH_2Cl_2 foi submetida a temperatura de refluxo. Posteriormente foram adicionados 82mg (0,099mmol ou 10 mol%) de uma solução

do catalisador de Grubbs de 1ª geração (dicloreto de bis(tricicloexilfosfina)benzilideno de rutênio) em 25mL de CH₂Cl₂. A mistura reacional ficou sob aquecimento por 4 horas. Após esse período o sistema foi resfriado, o bruto foi evaporado e purificado por cromatografia em coluna utilizando uma mistura de hexano: acetato de etila 3:2. O produto foi obtido em 57% de rendimento.

Aspecto Físico: sólido amarelo

Ponto de Fusão: 104^o-105^oC

IV (pastilha de KBr): 2977; 2929; 2867; 1710; 1595; 1519; 1483; 1352; 1240; 1085; 1020; 963; 812cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,31 (d, 1H, *J*=3,75Hz); 6,93 (ddd, 1H, *J*=9,75; 5,1; 2,85Hz); 6,65 (dd, 1H, *J*=15,9; 1,1 Hz); 6,57 (dd, 1H, *J*=15,9; 4,8 Hz); 6,49 (d, 1H, *J*=3,75 Hz); 6,10 (ddd, 1H, *J*=9,75; 2,4; 0,9 Hz); 5,16 (dtd, 1H, *J*=10,5; 4,8; 1,1 Hz); 2,63 (dtd, 1H, *J*=18,6; 4,95; 0,9 Hz); 2,48 (ddt, 1H, *J*=18,6; 10,5; 2,4 Hz).

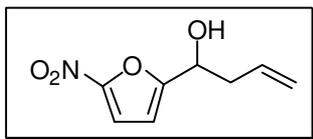
RMN-¹³C (125MHz, CDCl₃): δ 163,1; 153,8; 151,5; 144,3; 131,4; 121,6; 118,2; 113,6; 111,6; 75,9; 29,5.

Isômero *R*: [α]_D²⁵ = +193 (c 1,0; CHCl₃)

Isômero *S*: [α]_D²⁵ = -192 (c 1,0; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ESI+) m/z calculado para [M+H]⁺=236,0559, encontrado=236,0522 .
Erro=15,6ppm

5.2.6 Preparação do (*R*)- e (*S*)-1-(5-nitrofurano-2il)-3-buten-1-ol (50): A síntese de **50** na



sua forma racêmica foi realizado utilizando-se o mesmo procedimento descrito para **48**. O produto (*R*)- e (*S*)- **50** foi obtido utilizando a alilação assimétrica nas condições de Keck utilizando o mesmo procedimento descrito para a síntese de **48**. O produto

50 foi obtido em 92% após uma purificação por CC utilizando-se uma eluente uma mistura de hexano:acetato 4:1.

Aspecto físico: óleo amarronzado

IV (filme): 3414; 2920; 1645; 1584; 1533; 1357; 1242; 1018; 927 cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,28 (d, 1H, *J*=3,67Hz); 6,53 (dd, 1H, *J*=3,67; 0,75 Hz); 5,87-5,71 (m, 1H); 5,27-5,18 (m, 2H); 4,84 (dd, 1H, *J*=7,35; 5,25 Hz); 2,75-2,55 (m, 2H); 2,31 (sl, 1H).

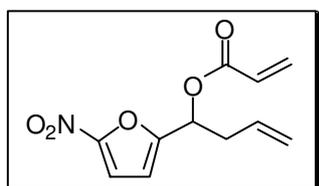
RMN-¹³C (62,5MHz, CDCl₃): δ 159,8; 151,7; 132,1; 119,9; 112,5; 109,5; 66,8; 39,9.

Isômero R: [α]_D²⁵ = +76 (c 1,0; CHCl₃)

Isômero S: [α]_D²⁵ = -76 (c 1,0; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ESI+) *m/z* calculado para [M+H]⁺=184,0610, encontrado=184,0603. Erro=3,80ppm

5.2.7 Preparação do Acrilato (*R*)- e (*S*)-1-(5-nitrofuran-2-il)-3-butenil (**51**):



51 foi obtido utilizando o mesmo procedimento para a síntese de **49** e fora obtido em 69% de rendimento após purificação por CC utilizando uma mistura de hexano:acetato 9:1.

Aspecto físico: óleo amarelo palha

IV (filme): 2920; 1724; 1631; 1592; 1533; 1514; 1396; 1356; 1252; 1176; 1020; 979 cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,25 (d, 1H, *J*=3,65Hz); 6,57 (d, 1H, *J*=3,65 Hz); 6,45 (dd, 1H, *J*=17,2; 1,42 Hz); 6,12 (dd, 1H, *J*=17,2; 10,3 Hz); 5,95 (d, 1H, *J*=6,9 Hz); 5,89 (dd, 1H, *J*=10,3; 1,42 Hz); 5,70 (ddt, 1H, *J*=17,2; 10,3; 6,9 Hz); 5,20-5,09 (m, 2H); 2,78 (tt, 2H, *J*=6,9; 1,42 Hz).

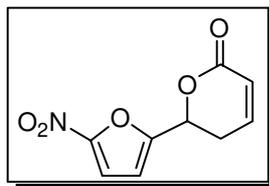
RMN-¹³C (62,5MHz, CDCl₃): δ 164,8; 152,2; 151,8; 132,3; 131,2; 127,5; 119,5; 112,0; 111,7; 67,6; 36,7.

Isômero R: [α]_D²⁵ = +148 (c 1,0; CHCl₃)

Isômero S: [α]_D²⁵ = -149 (c 1,0; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ESI+) *m/z* calculado para [M+H]⁺=238,0715, encontrado=238,0741. Erro=10,9ppm

5.2.8 Preparação do (*R*)-e (*S*)-6-(5-nitrofuran-2-il)-5,6-di-hidropiran-2-ona (**32**):



o composto **32** foi preparado a partir do composto **51** de acordo como o procedimento previamente descrito para a obtenção de **31**. No entanto, neste caso foi necessário o uso do catalisador de Grubbs

de 2ª geração. O rendimento foi de 60% após purificação por CC utilizando hexano:acetato como eluente na proporção de 1:1.

Aspecto físico: sólido amarelo palha

Ponto de fusão: 66,8^o-67,7^oC

IV (pastilha de KBr): 2926; 1729; 1535; 1505; 1391; 1370; 1351; 1243; 1215; 1152; 1023; 960 cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,31 (d, 1H, *J*=3,6Hz); 6,98 (ddd, 1H, *J*=9,8; 5,2; 3,5 Hz); 6,70 (dd, 1H, *J*=3,6; 0,7 Hz); 6,13 (ddd, 1H, *J*=9,8; 1,42; 0,7 Hz); 5,58 (dd, 1H, *J*=9,8; 5,2 Hz); 3,02-2,80 (m, 2H).

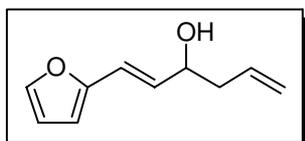
RMN-¹³C (62,5MHz, CDCl₃): δ 161,8; 153,5; 152,0; 143,9; 121,6; 112,0; 111,5; 71,8; 27,6.

Isômero *R*: [α]_D²⁵ = +149 (c 0,7; CHCl₃)

Isômero *S*: [α]_D²⁵ = -151 (c 0,7; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ESI+) m/z calculado para [M+H]⁺=210,0408, encontrado=210,0437
Erro=16,2ppm

5.2.9 Preparação do (*R*)- e (*S*)- (*E*)-1-(furan-2-il)hexa-1,5-dien-3-ol (**53**):



na sua forma racêmica foi realizado utilizando-se o mesmo procedimento descrito para **48**. O produto (*R*)- e (*S*)- **53** foi obtido utilizando a alilação assimétrica nas condições de Keck utilizando o mesmo procedimento descrito para a síntese de **48**, utilizando o aldeído **52**. O produto **53** foi obtido em 80% após uma purificação por CC utilizando-se como eluente uma mistura de hexano:acetato 4:1.

Aspecto físico: óleo amarelo

IV (filme): 3377; 2914; 1643; 1550; 1491; 1429; 1254; 1147; 1011; 964 cm⁻¹.

RMN-¹H (250MHz, CDCl₃): δ 7,33 (d, 1H, *J*=1,5Hz); 6,44 (dd, 1H, *J*=15,8; 1,5 Hz); 6,36 (dd, 1H, *J*=3,3; 1,5 Hz); 6,22 (d, 1H, *J*=3,3 Hz); 6,18 (dd, 1H, *J*=15,8; 5,9 Hz); 6,82 (ddt, 1H, *J*=17,0; 3,4; 7,2 Hz); 5,10-5,13 (m, 2H); 4,32-4,27 (m, 1H); 2,45-2,31 (m, 2H); 2,11 (sl, 1H).

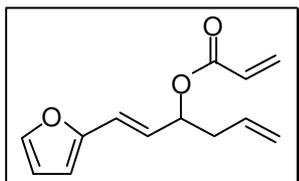
RMN-¹³C (52,5MHz, CDCl₃): δ 152,3; 141,9; 134,0; 130,2; 118,5; 118,4; 111,3; 108,1; 71,2; 42,0.

Isômero *R*: [α]_D²⁵ = +31 (c 1,0; CHCl₃)

Isômero S: $[\alpha]_D^{25} = -31$ (c 1,0; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ESI+) m/z calculado para $[M+H-H_2O]^+ = 147,0809$, encontrado = 147,0826
 Erro = 10,8 ppm

5.2.10 Preparação do Acrilato (R)- e (S)- (E)-1-(furan-2-il)hexa-1,5-dien-3-il (54): O



produto **54** foi obtido utilizando o mesmo procedimento para a síntese de **49** e fora obtido em 72% de rendimento após purificação por CC utilizando uma mistura de hexano:acetato 7:3.

Aspecto físico: óleo amarelo

IV (filme): 2924; 1724; 1637; 1406; 1267; 1190; 1047; 968 cm⁻¹.

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,34 (d, 1H, *J* = 1,7 Hz); 6,45 (d, 1H, *J* = 15,8 Hz); 6,43 (dd, 1H, *J* = 1,6; 17,3 Hz); 6,36 (dd, 1H, *J* = 3,3; 1,7 Hz); 6,26 (d, 1H, *J* = 3,3 Hz); 6,14 (dd, 1H, *J* = 17,3; 10,3 Hz); 6,12 (dd, 1H, *J* = 15,8; 7,0 Hz); 5,87-5,71 (m, 1H); 5,83 (dd, 1H, *J* = 10,3; 1,6 Hz); 5,51 (ddd, 1H, *J* = 13,2; 7,0; 0,9 Hz); 5,18-5,08 (m, 2H); 2,54-2,48 (m, 2H).

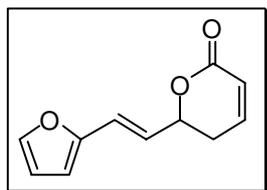
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 165,4; 151,8; 142,2; 132,9; 130,8; 128,6; 125,4; 120,8; 118,2; 111,3; 108,9; 73,5; 39,0.

Isômero R: $[\alpha]_D^{25} = +53$ (c 1,0; CHCl₃)

Isômero S: $[\alpha]_D^{25} = -54$ (c 1,0; CHCl₃)

EMAR (TOF MS ES+) m/z calculado para $[M+Na]^+ = 241,0841$, encontrado = 241,0841
 Erro = 0 ppm

5.2.11 Preparação do (R)- e (S)- (E)-6-(2-(furan-2-il)vinil)-5,6-di-hidropiran-2-ona (33):



O composto **33** foi preparado a partir do composto **54** de acordo como o procedimento previamente descrito para a obtenção de **31**. O rendimento foi de 63% após purificação por CC utilizando hexano:acetato como eluente na proporção de 1:1.

Aspecto físico: óleo amarronzado

IV (filme): 2902; 1720; 1383; 1248; 1147; 1059; 1016; 962 cm⁻¹.

RMN-¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,37 (d, 1H, *J* = 1,7 Hz); 6,91 (ddd, 1H, *J* = 3,3; 5,05; 9,85 Hz); 6,55 (dd, 1H, *J* = 15,7; 1,25 Hz); 6,38 (dd, 1H, *J* = 3,3; 1,7 Hz); 6,30 (d, 1H, *J* = 3,3 Hz); 6,19

Experimental

(dd, 1H, $J=15,7$; 6,0 Hz); 6,07 (dt, 1H, $J=1,6$; 9,85 Hz); 5,07 (dtd, 1H, $J= 9,3$; 6,0; 1,25 Hz); 2,60-2,41 (m, 2H).

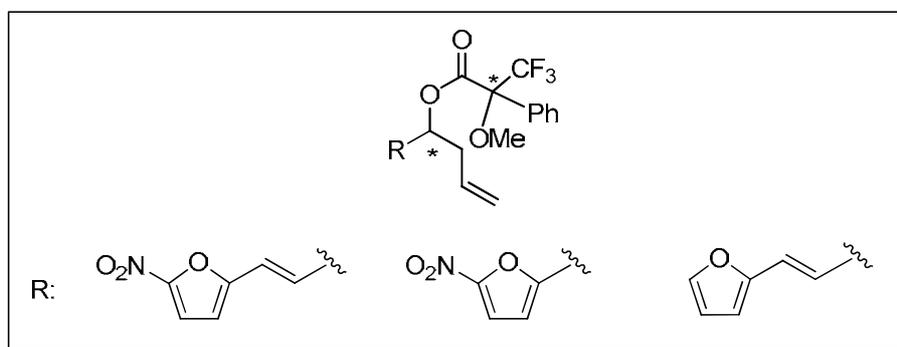
RMN- ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3): δ 163,8; 151,4; 144,5; 142,6; 123,8; 121,6; 121,0; 111,5; 109,6; 77,3; 29,9.

Isômero *R*: $[\alpha]_D^{25} = +133$ (c 1,0; CHCl_3)

Isômero *S*: $[\alpha]_D^{25} = -132$ (c 1,0; CHCl_3)

EMAR (TOF MS ES+) m/z calculado para $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 213,0528$, encontrado = 213,0576
Erro = 22ppm

5.2.12 Preparação dos ésteres de Mosher



A um balão previamente flambado e sob atmosfera de argônio adicionou-se o respectivo álcool (**48**, **50** ou **53**) (20 mg; 0.1 mmol), 0.3 mL de CH_2Cl_2 seco, DCC (20 mg; 0.092 mmol), DMAP (ponta de espátula) e o (*R*)-MTPA ou (*S*)-MTPA (30 mg; 0.1 mmol). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por cerca de 18h, posteriormente foi diluída em CH_2Cl_2 (2 mL) e tratada com 1 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 . A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 3 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos, secos sob MgSO_4 e concentrados à vácuo. O produto bruto de reação foi submetido à análise de RMN de ^1H e ^{19}F sem prévia purificação. Os rendimentos ficaram na faixa de 50%.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO 1: ESPECTROS

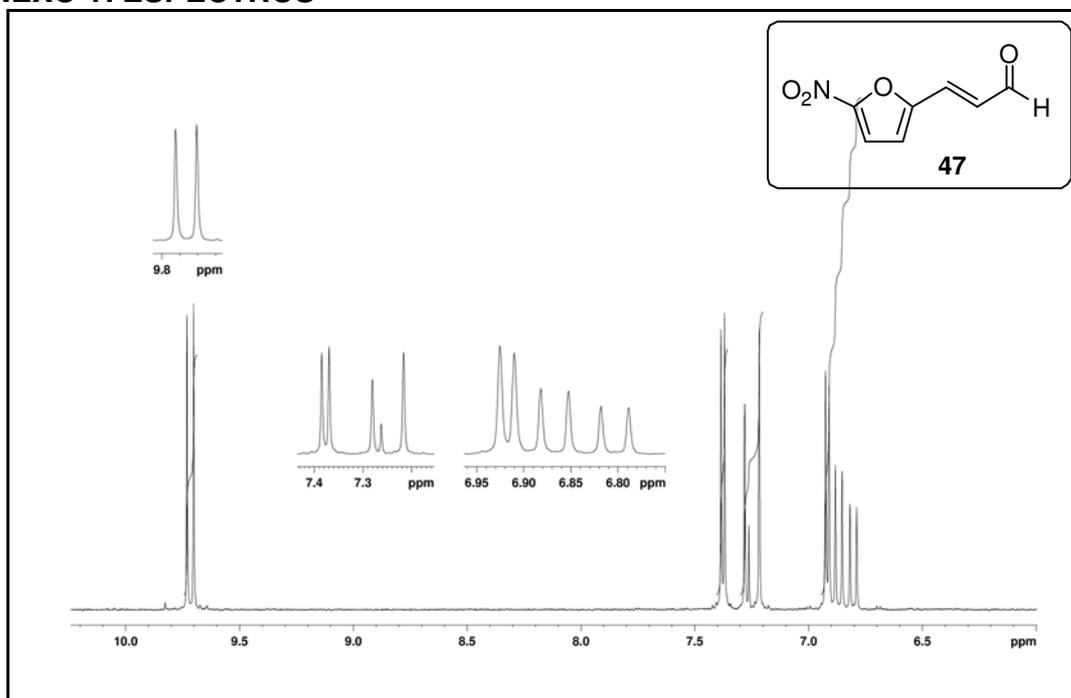


Figura A1: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (47).

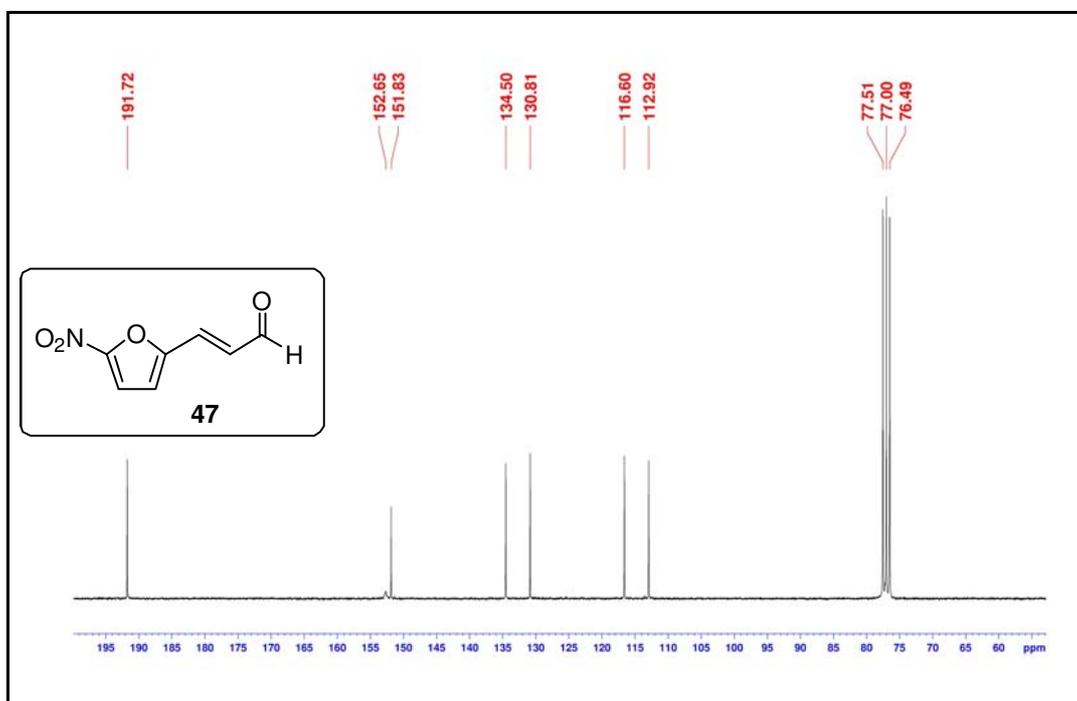


Figura A2: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (47).

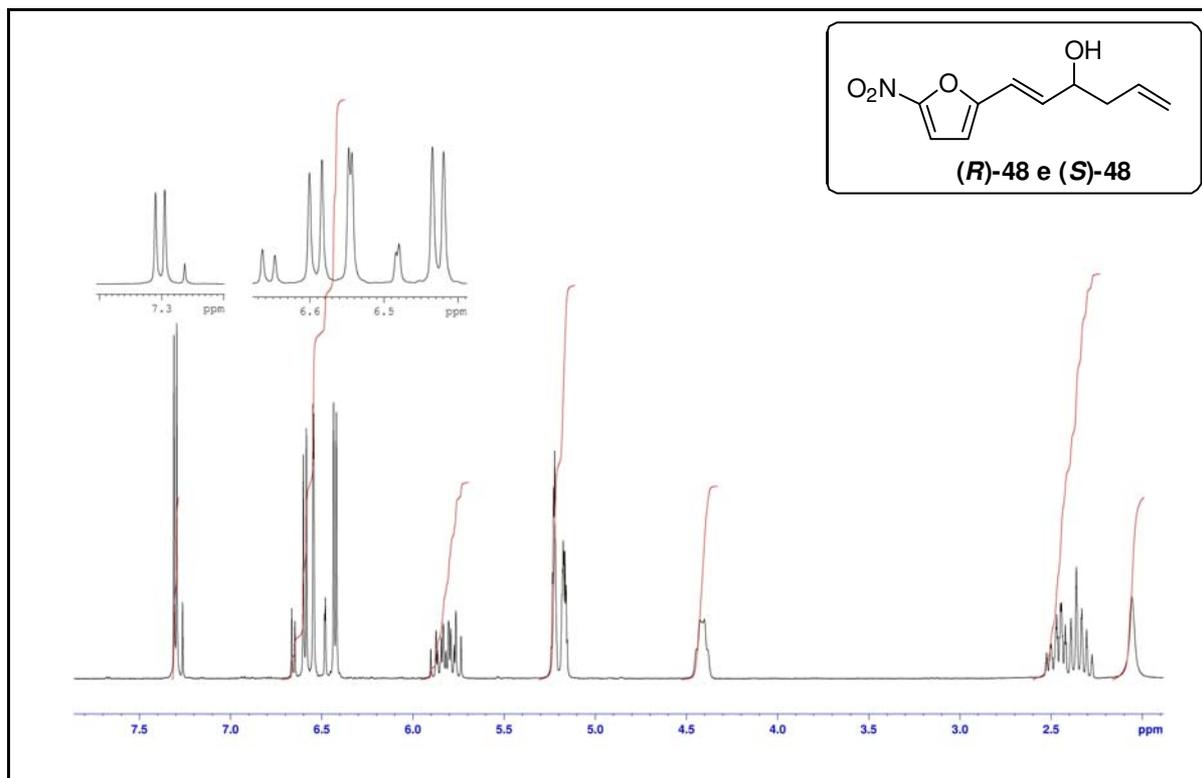


Figura A3: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (48).

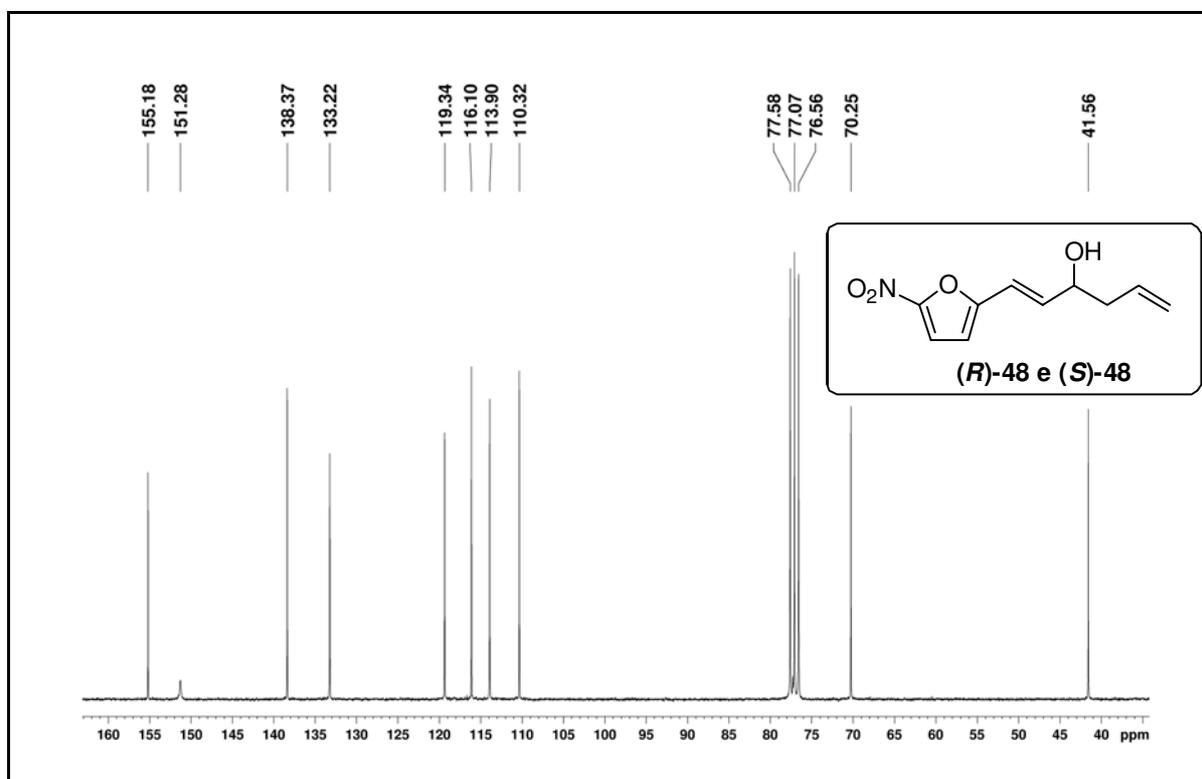


Figura A4: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (48).

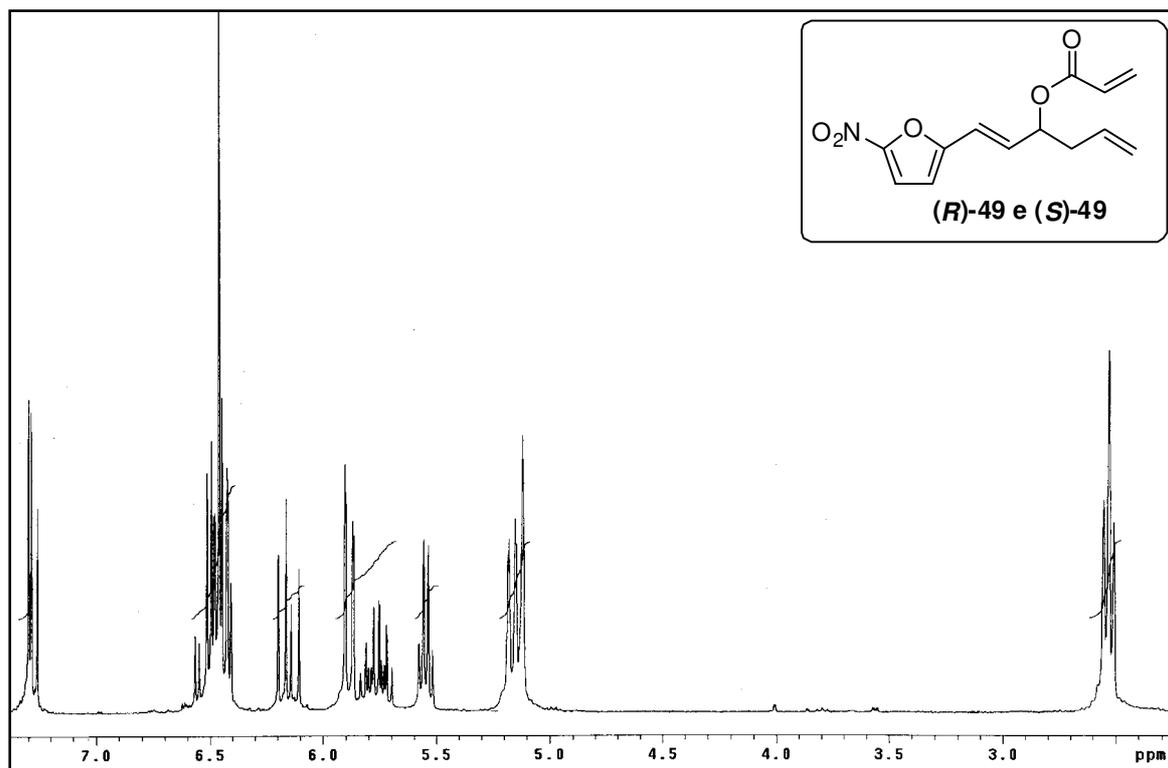


Figura A5: Espectro de RMN de ¹H(300MHz, CDCl₃) do composto (49).

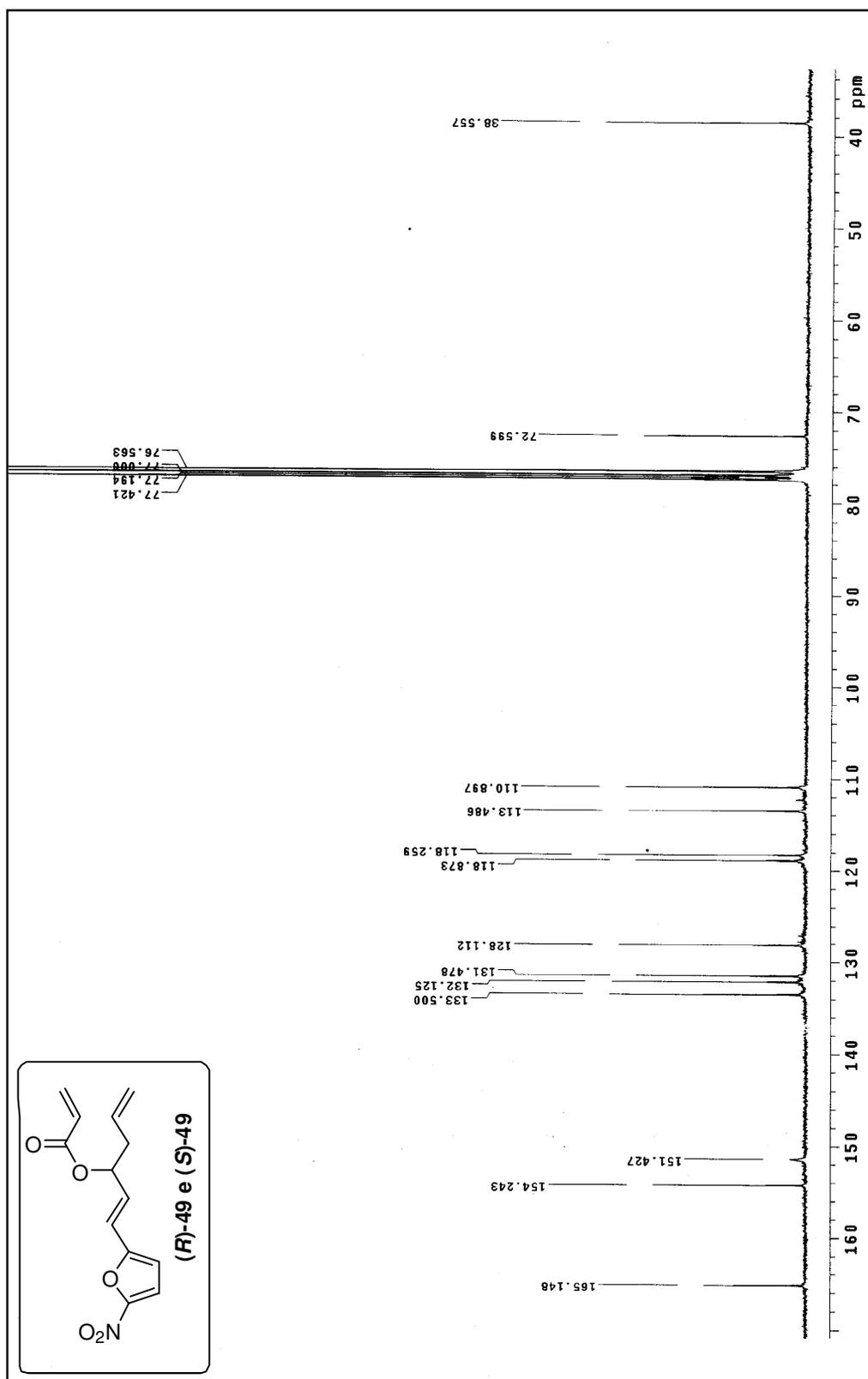


Figura A6: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (49).

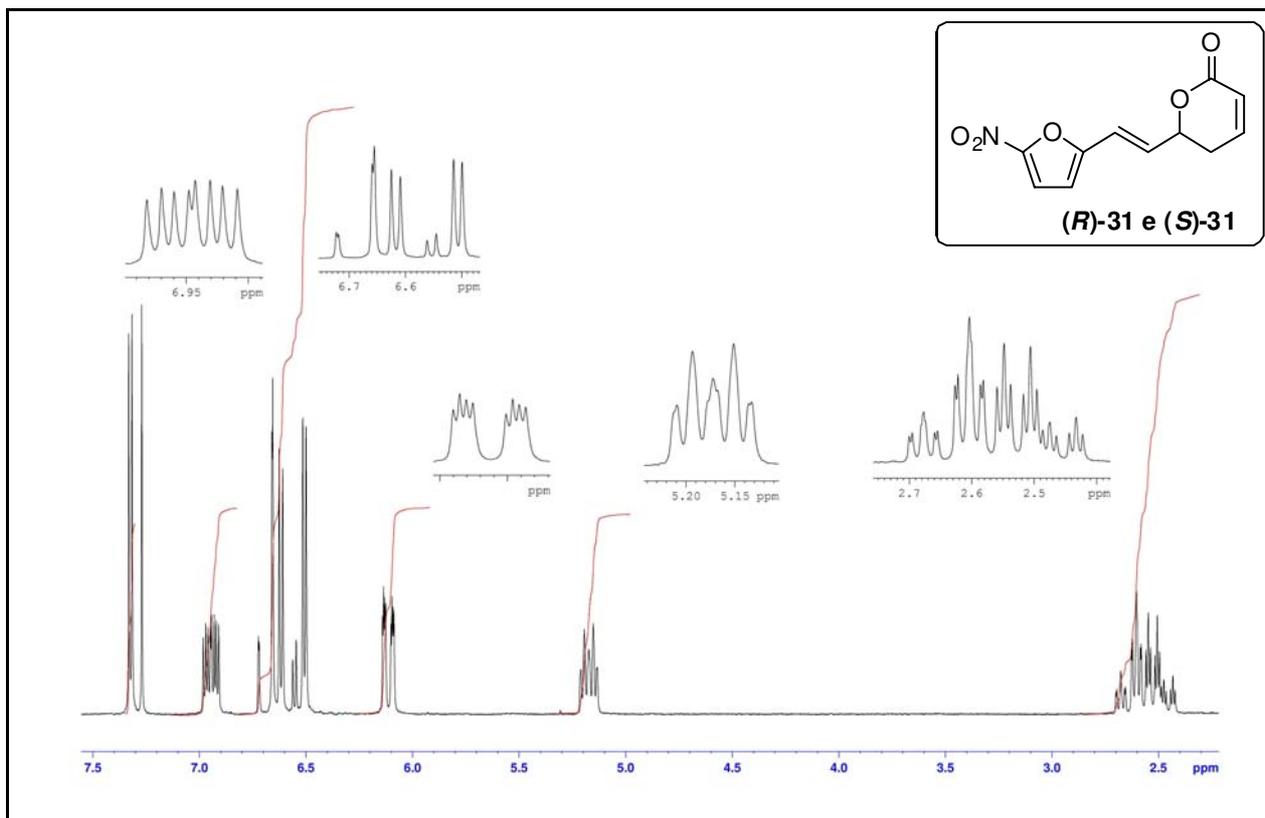


Figura A7: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (31).

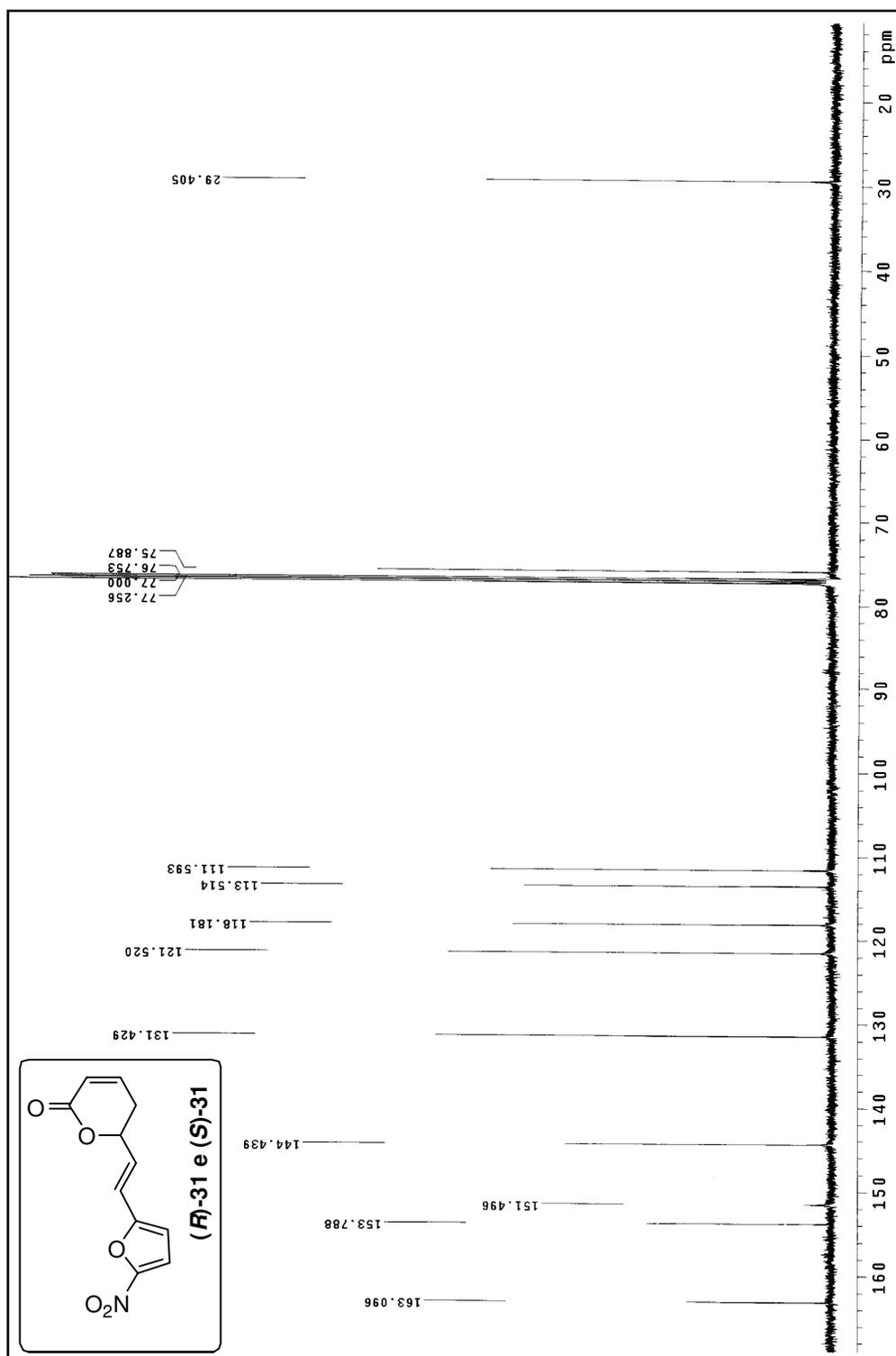


Figura A8: Espectro de RMN de ^{13}C (125MHz, CDCl_3) do composto (31).

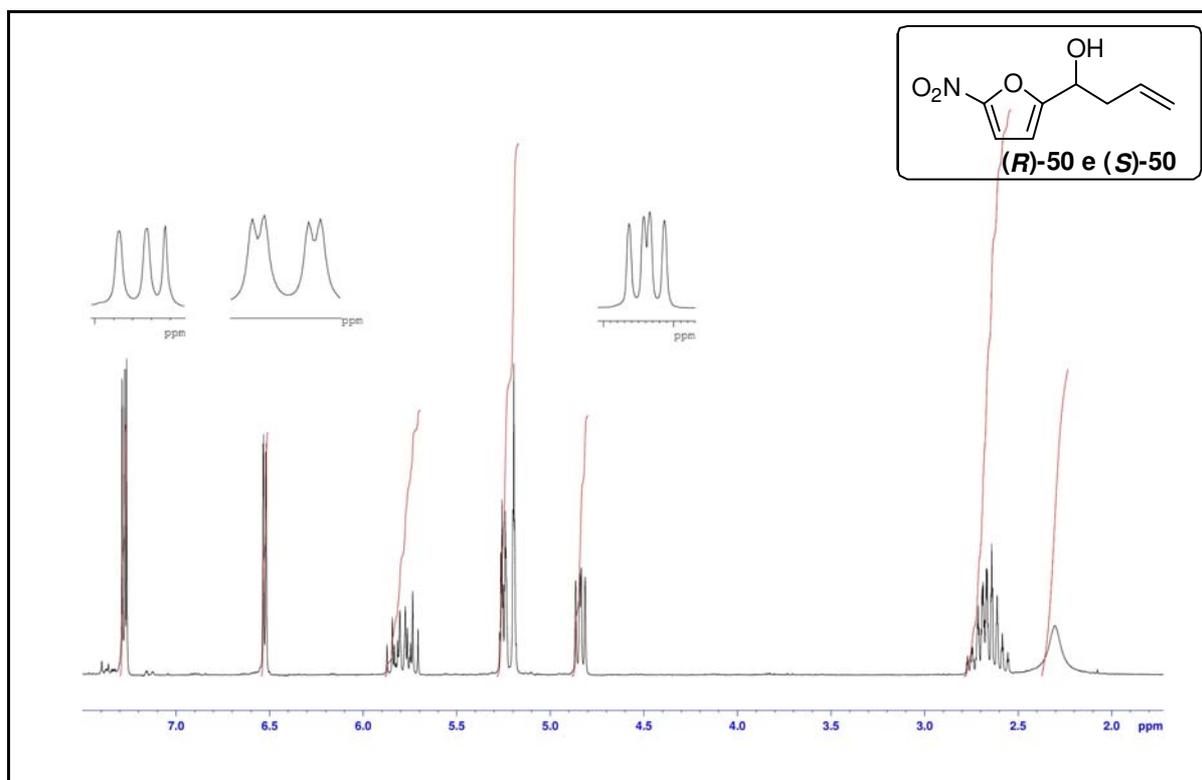


Figura A9: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (50).

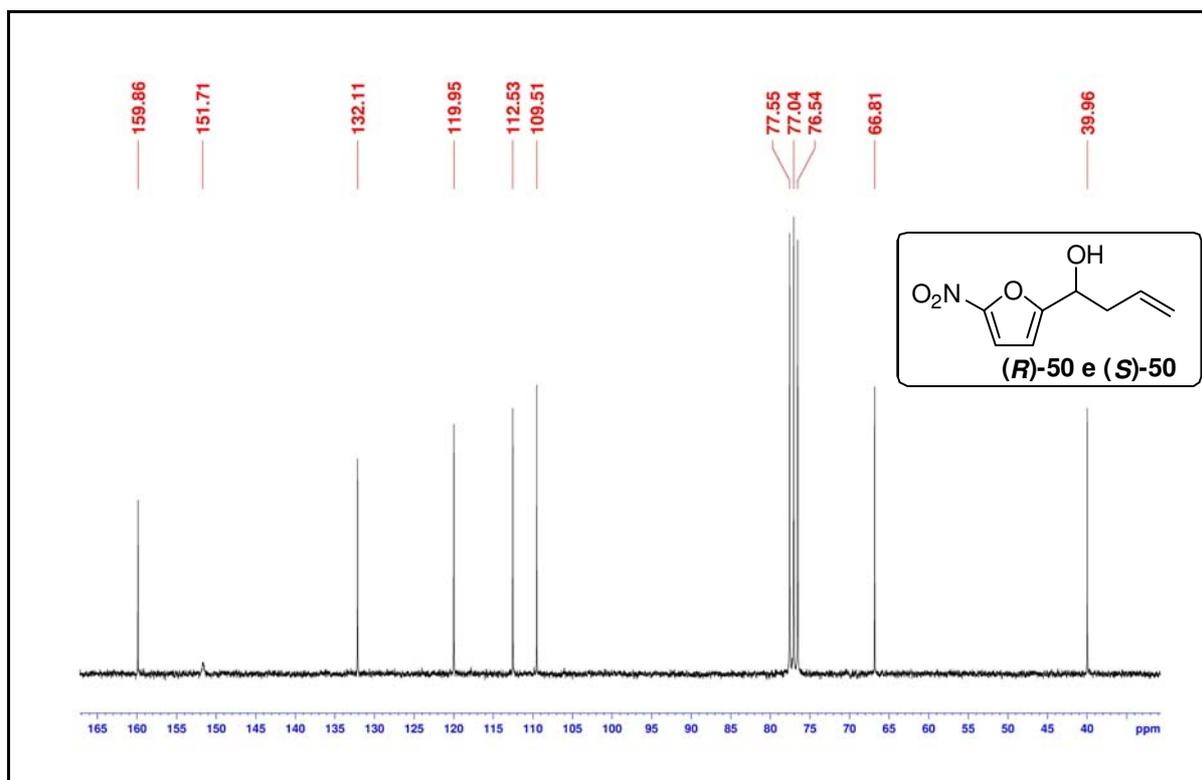


Figura A10: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (50).

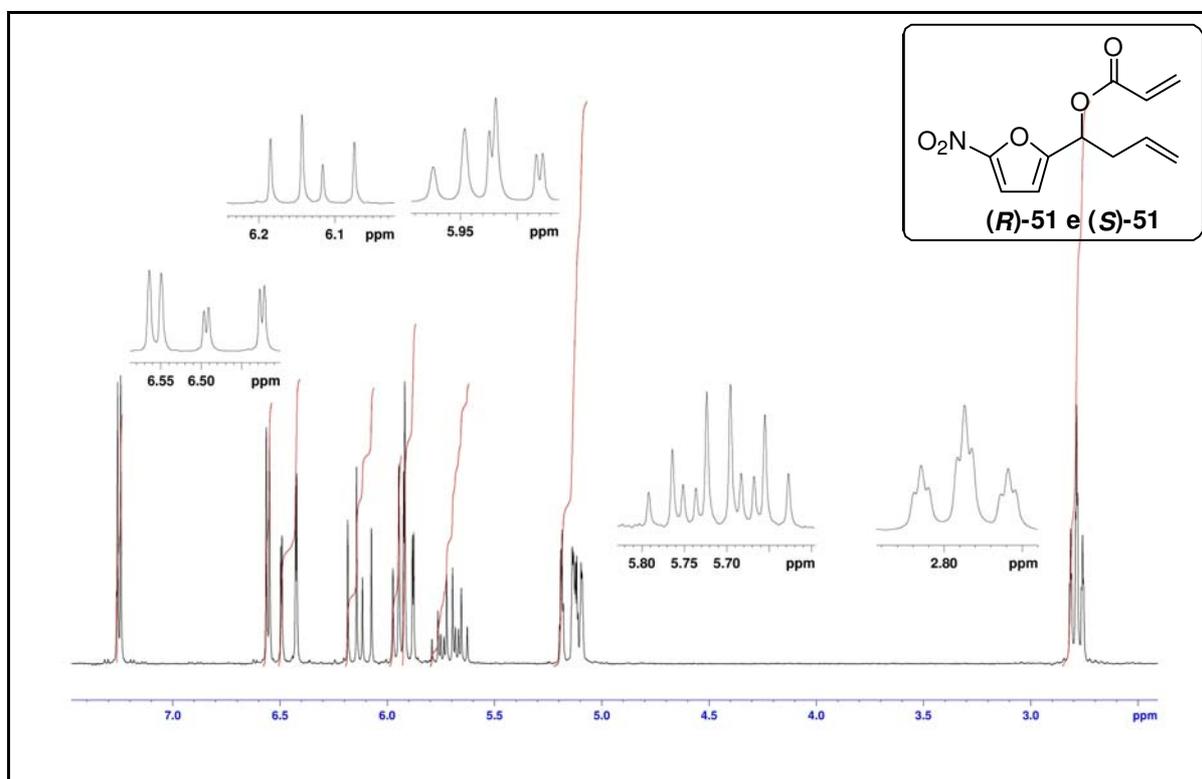


Figura A11: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (51).

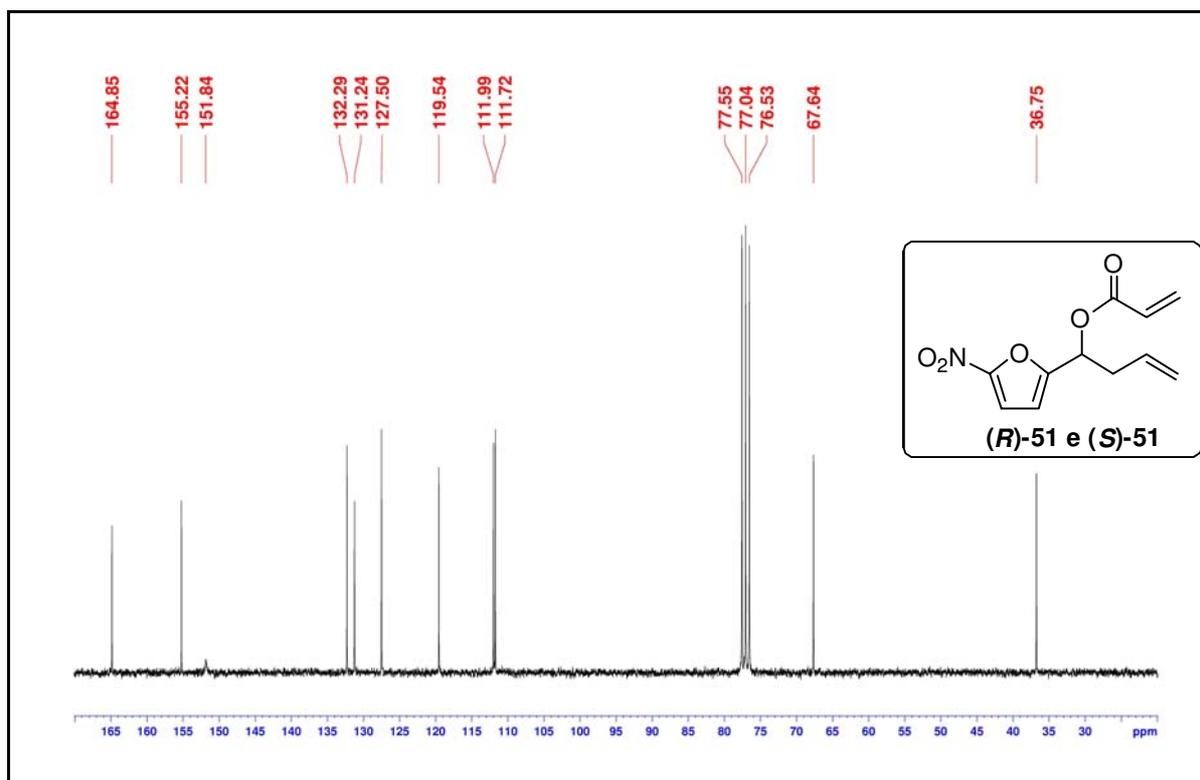


Figura A12: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (51).

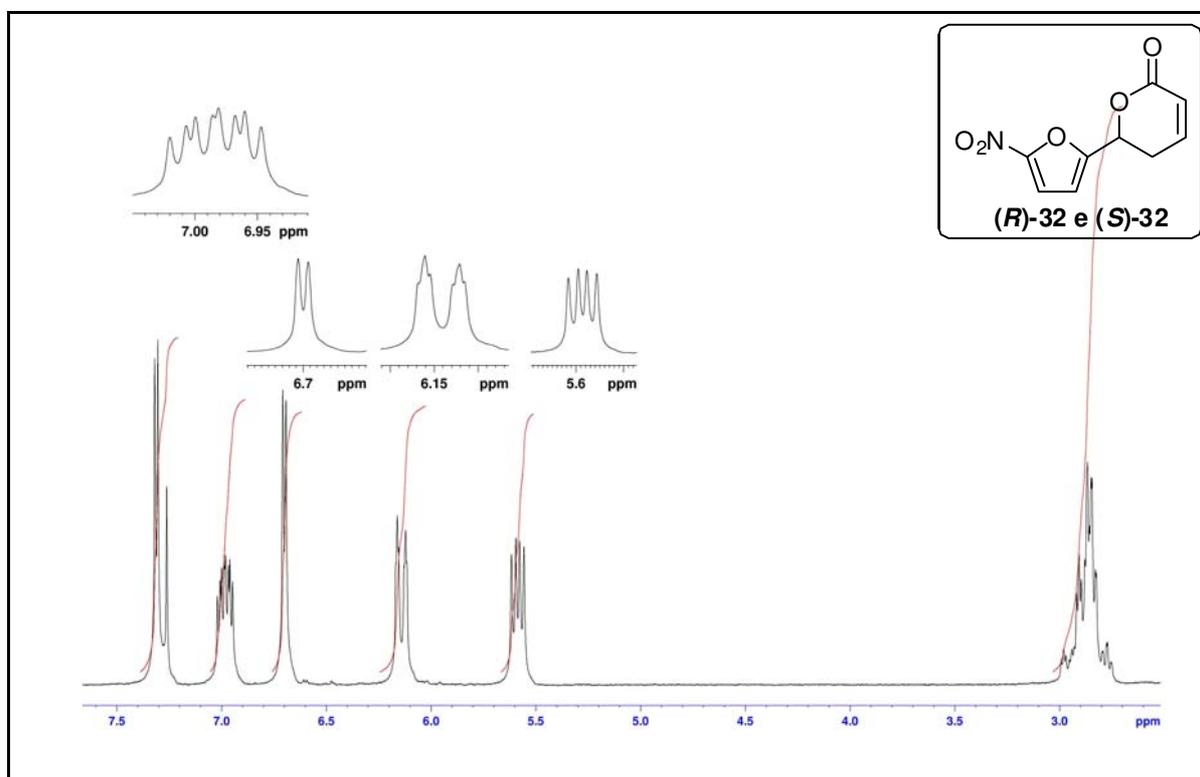


Figura A13: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (32).

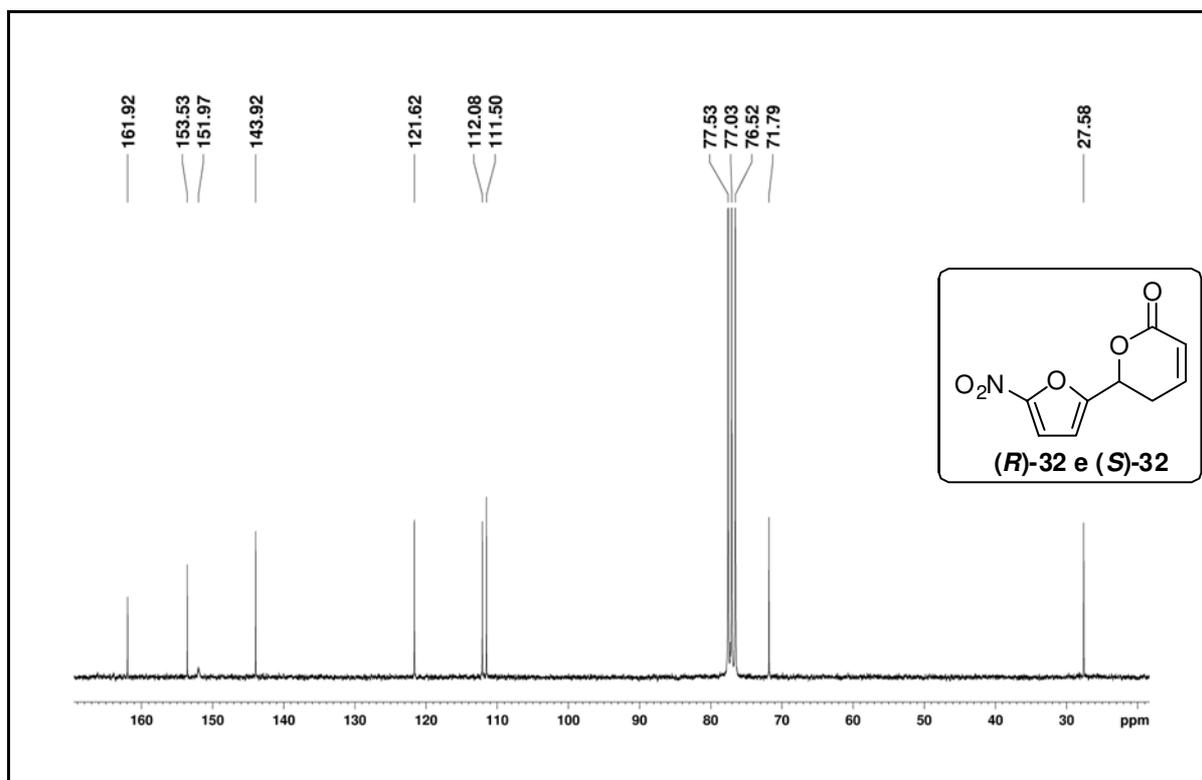


Figura A14: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (32).

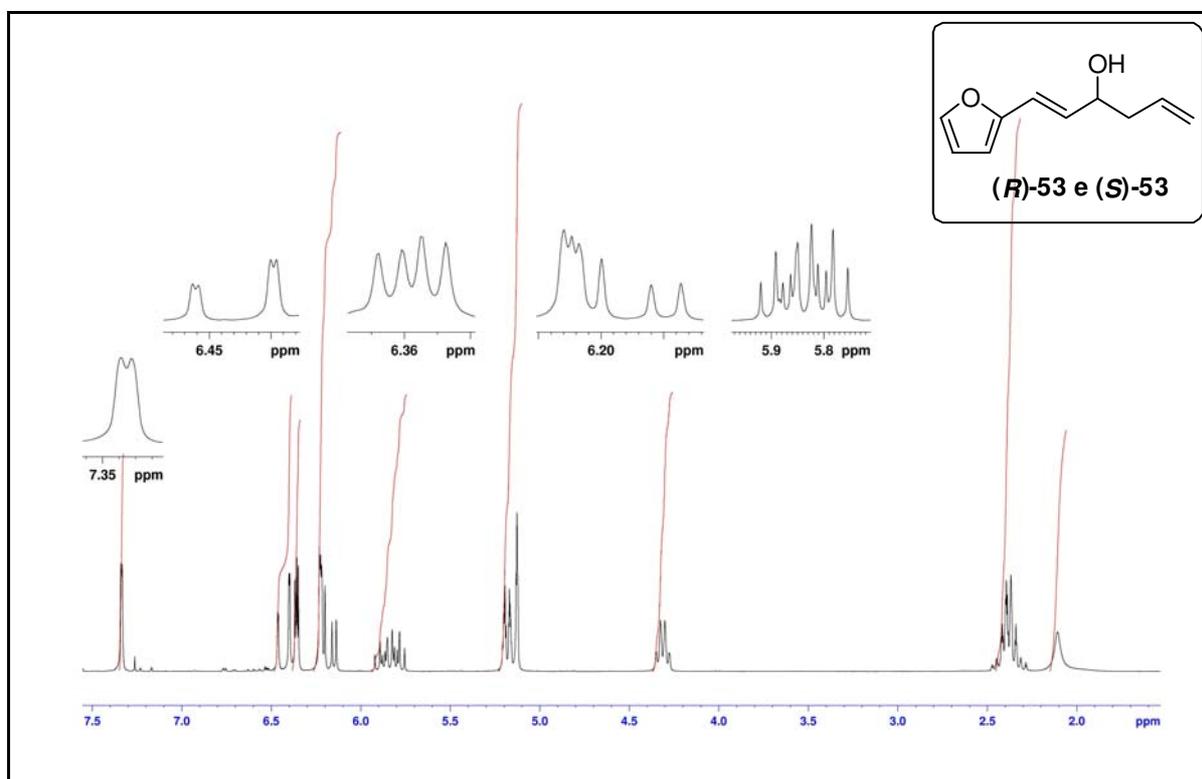


Figura A15: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (53).

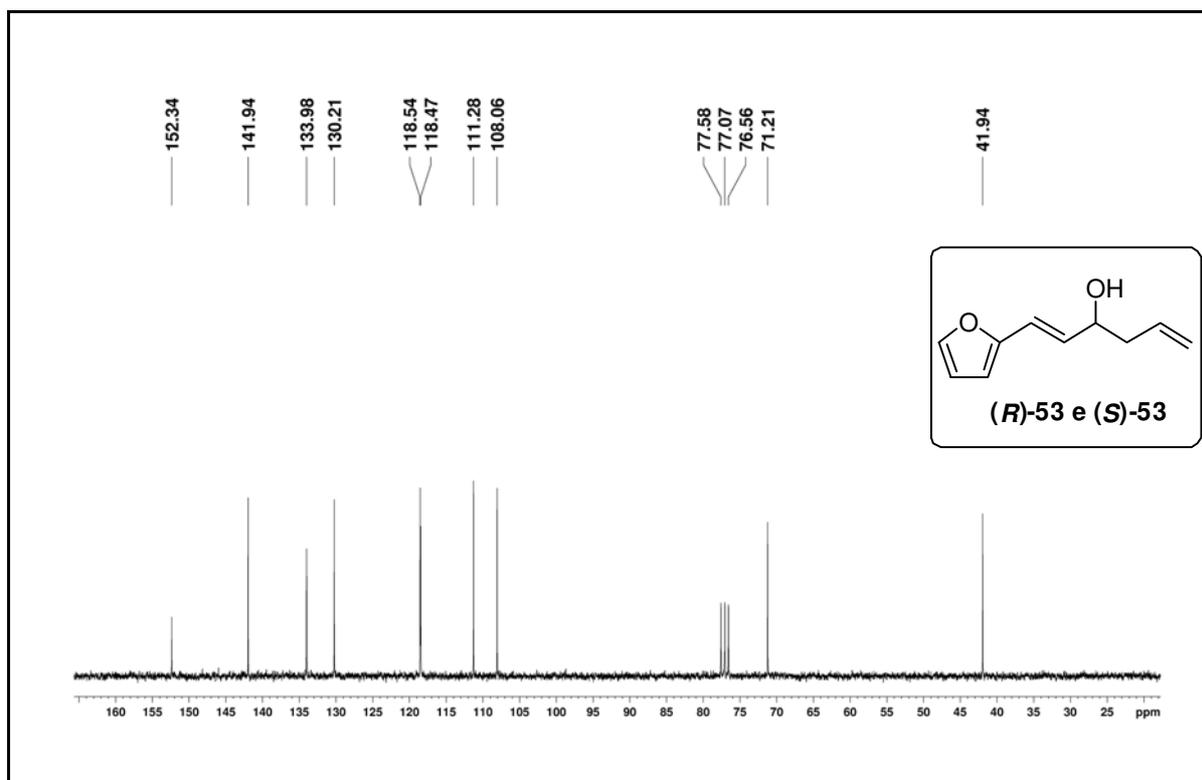


Figura A16: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (53).

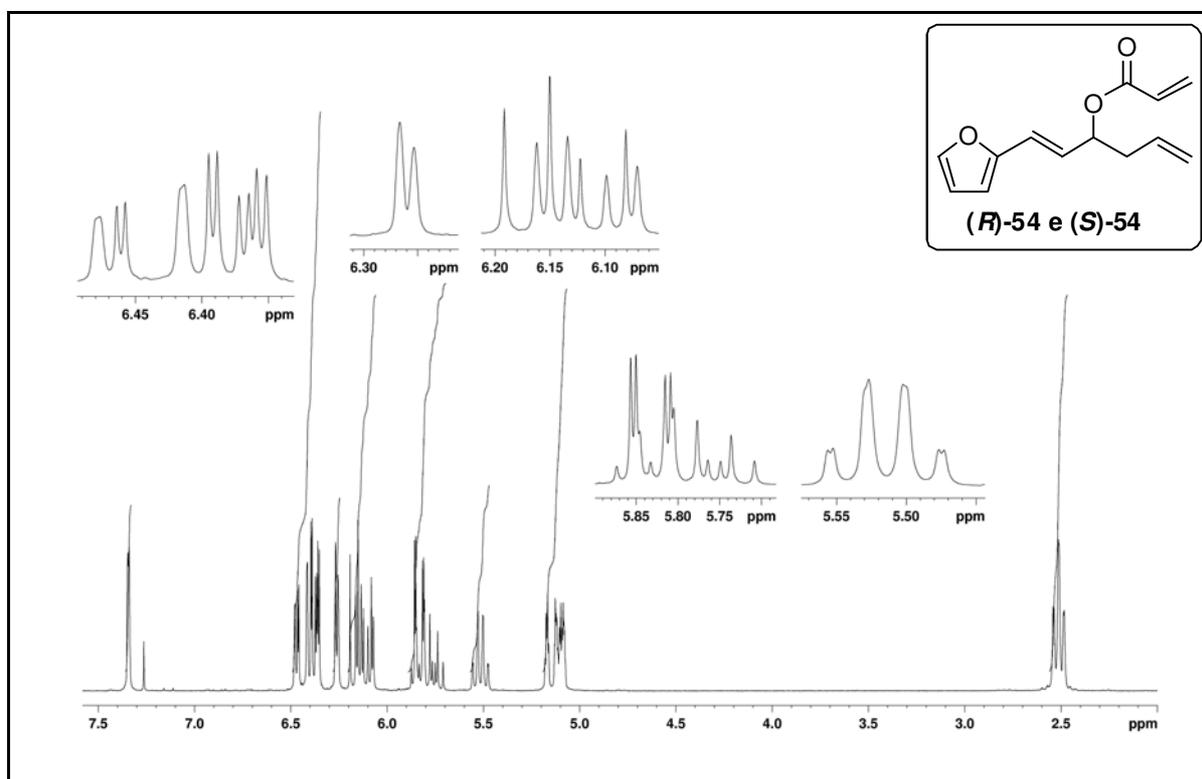


Figura A17: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (54).

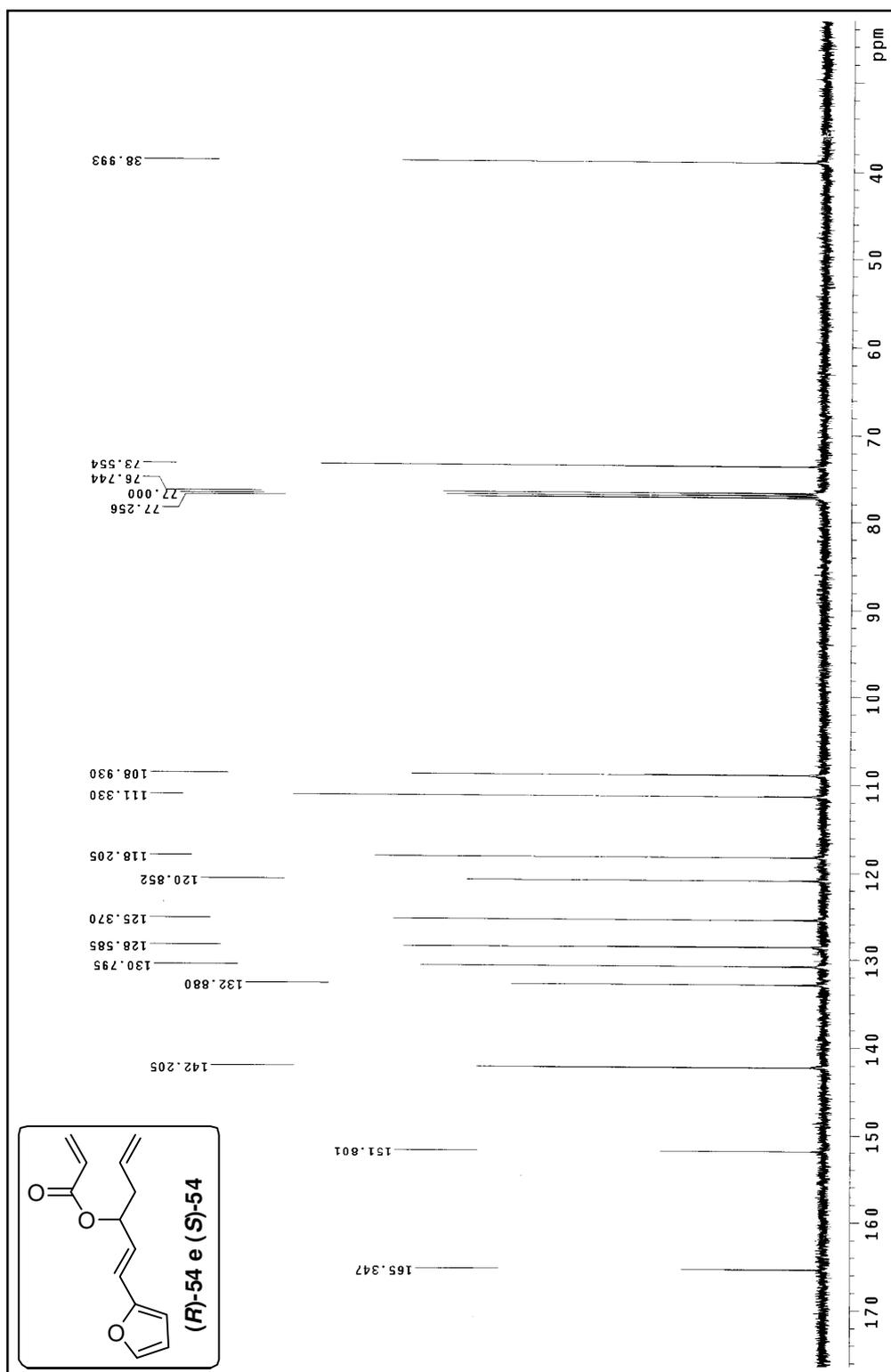


Figura A18: Espectro de RMN de ^{13}C (125MHz, CDCl_3) do composto (54).

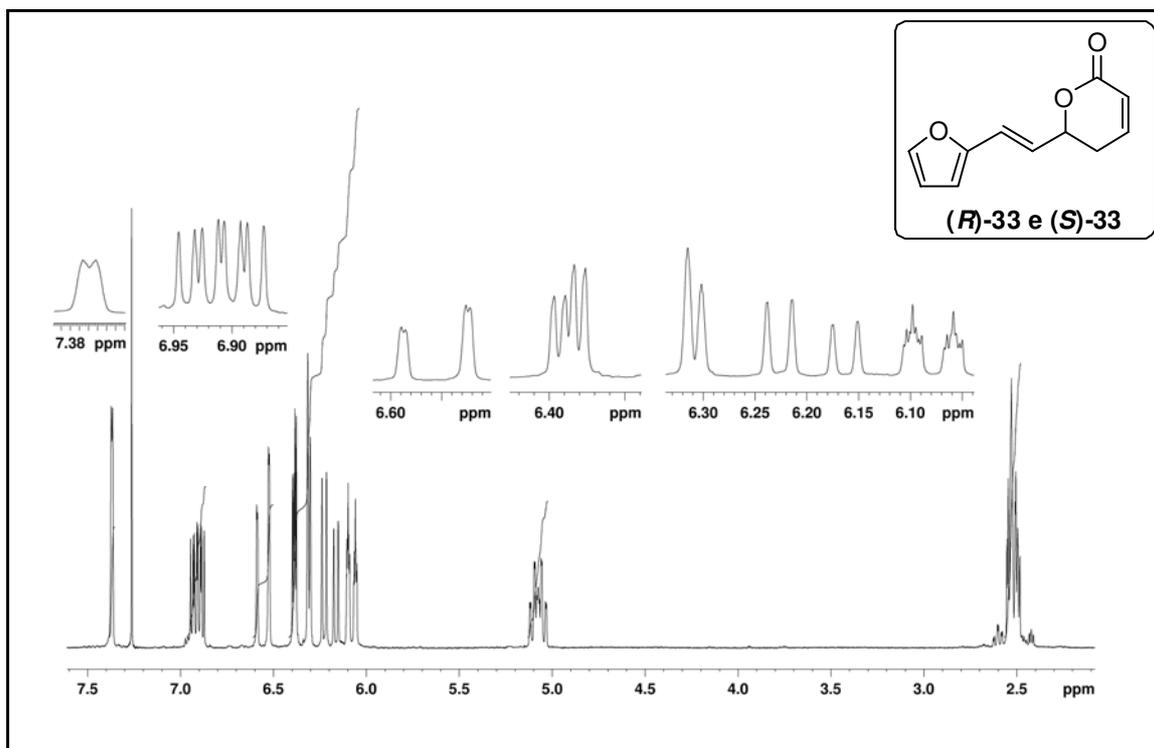


Figura A19: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (33).

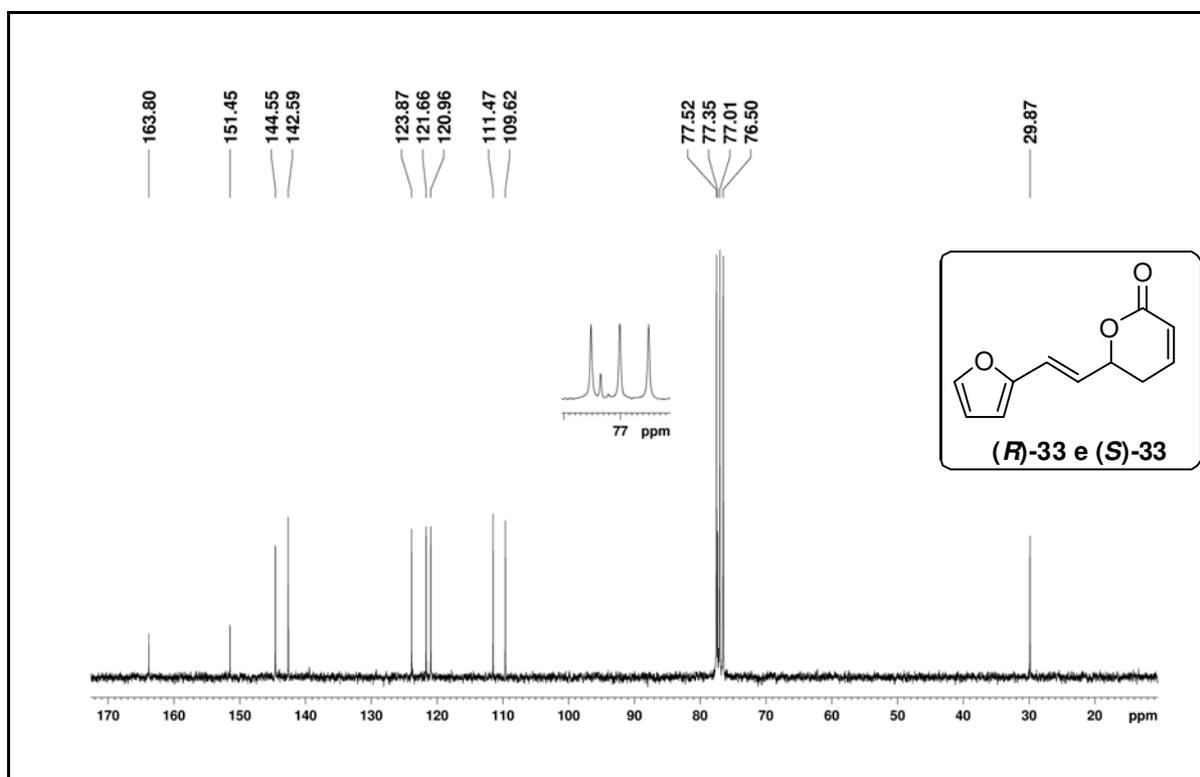


Figura A20: Espectro de RMN de ^{13}C (62,5MHz, CDCl_3) do composto (33).

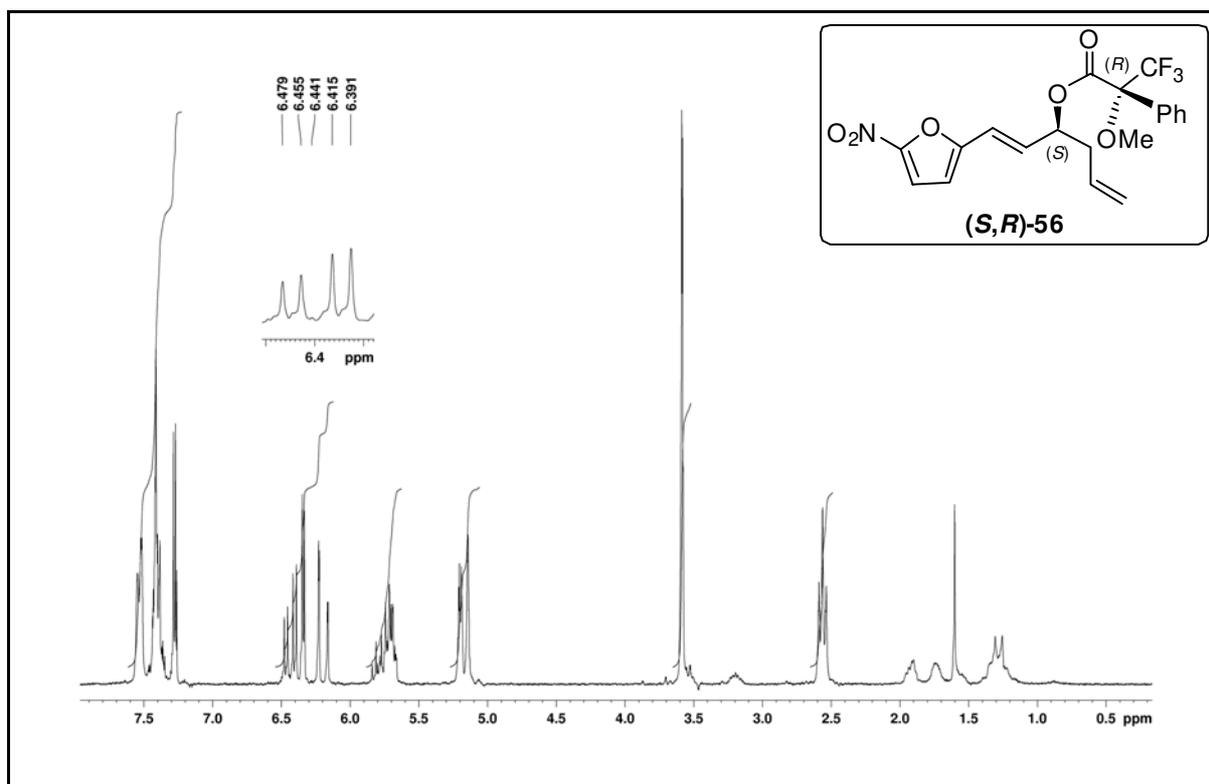


Figura A21: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (S,R)-56.

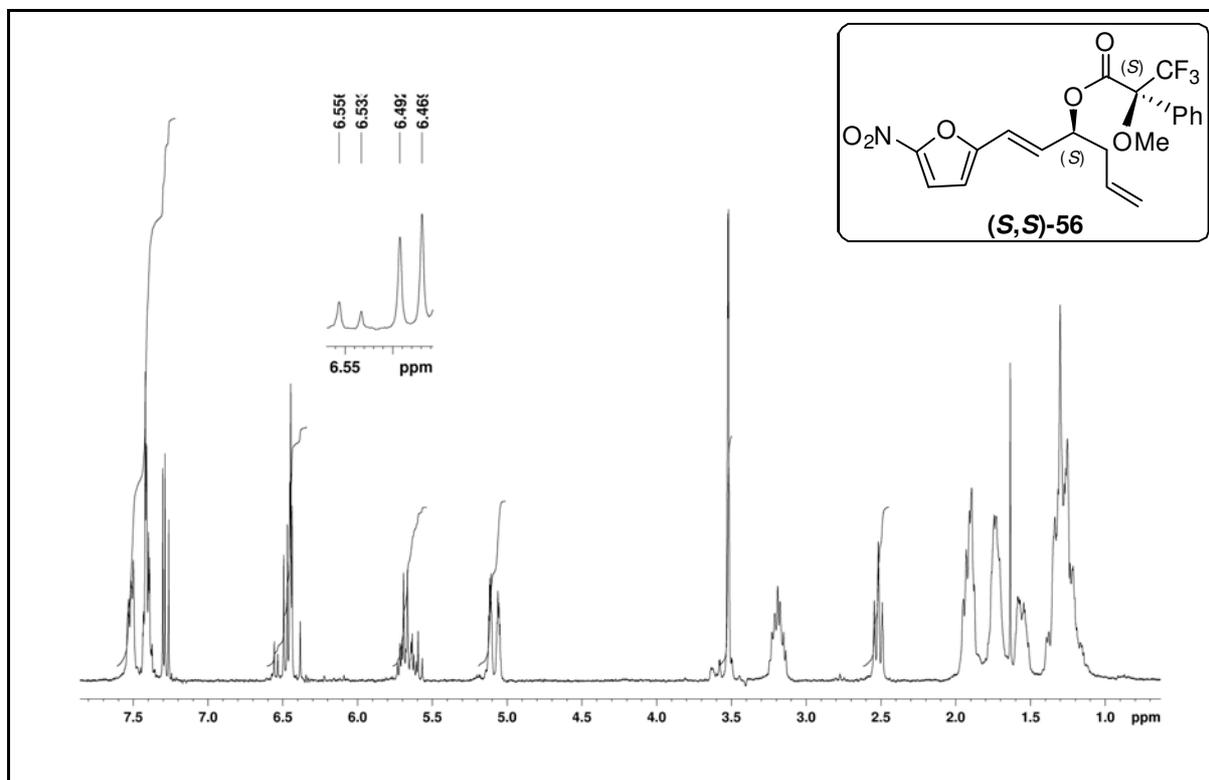


Figura A22: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (S,S)-56.

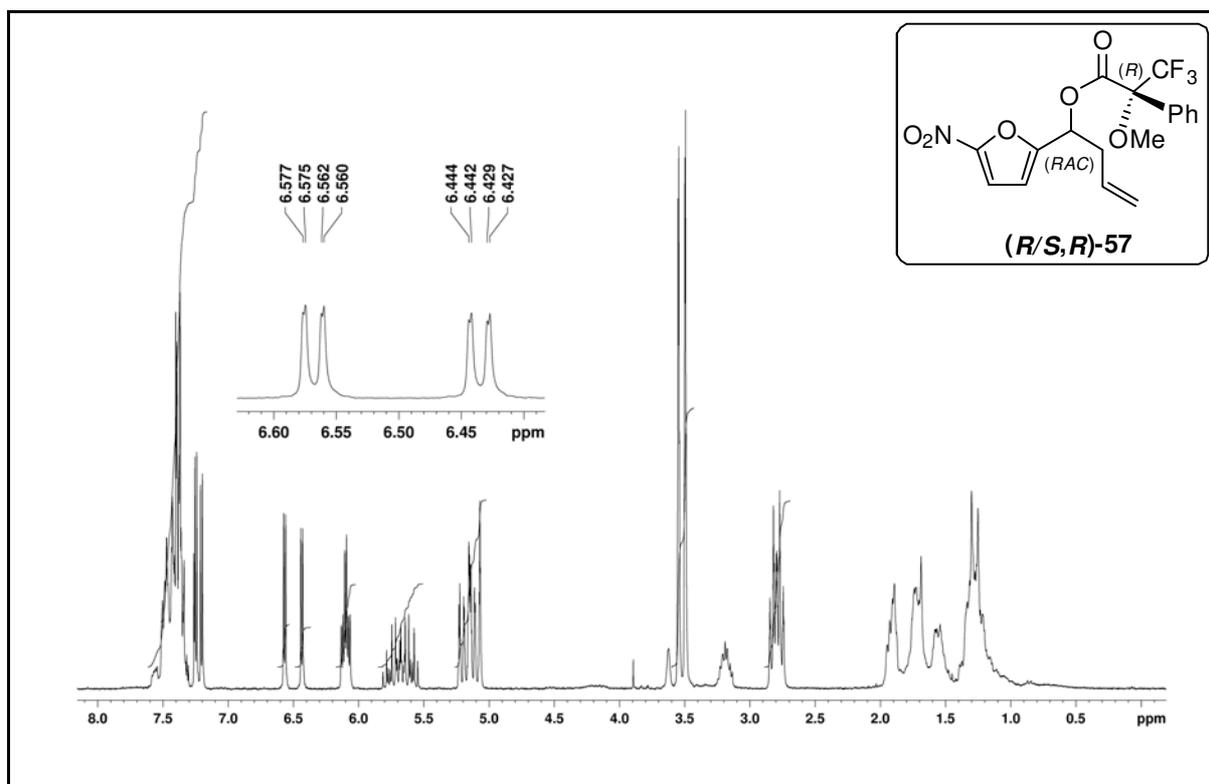


Figura A23: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto **(S/R,R)-57**.

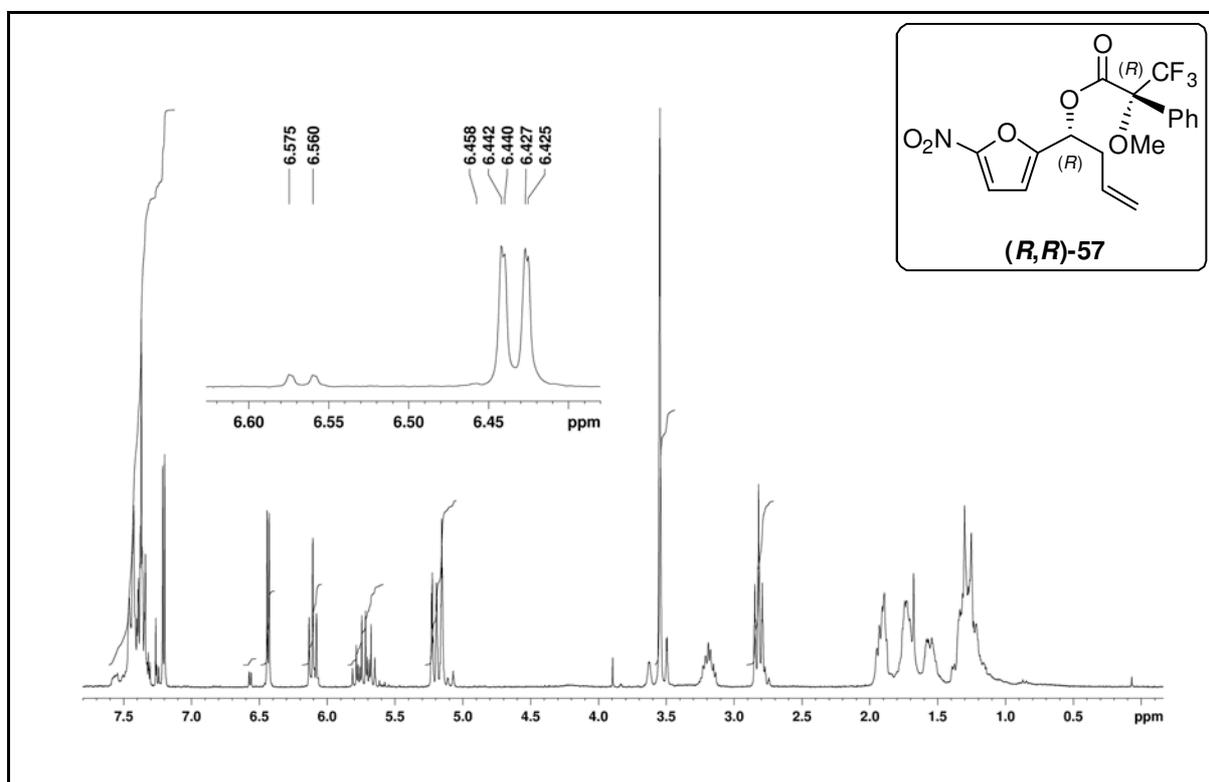


Figura A24: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto **(R,R)-57**.

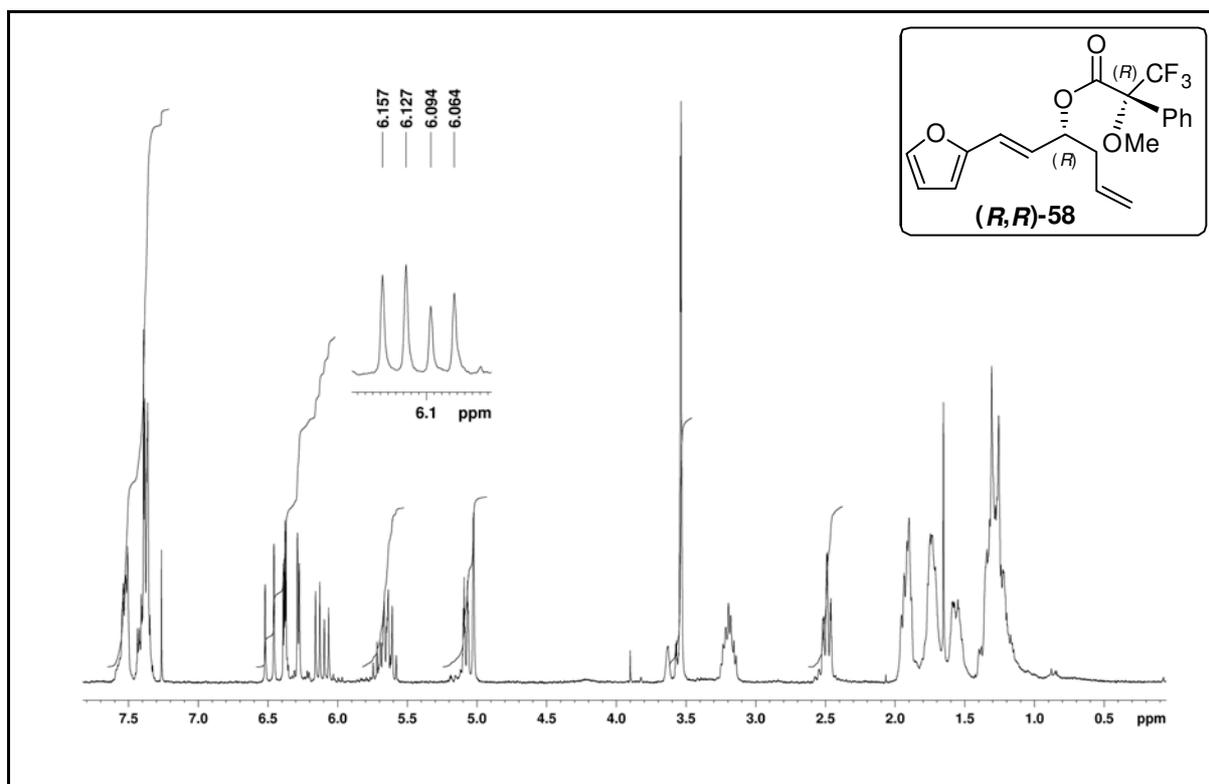


Figura A25: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (R,R) -58).

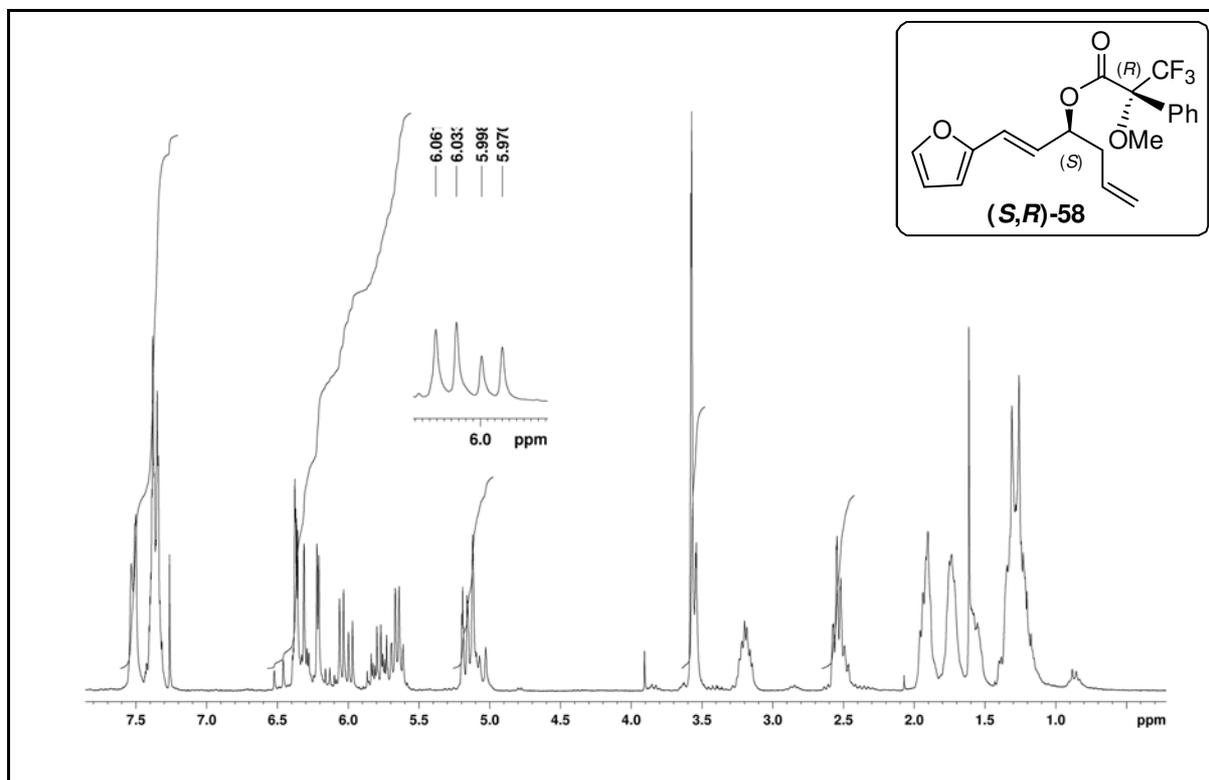


Figura A26: Espectro de RMN de ^1H (250MHz, CDCl_3) do composto (S,R) -58).

6.2 ANEXO 2 – BIOENSAIO DE ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA EM CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS⁸³

A2.1. Células

As linhagens celulares cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA, e utilizadas na triagem da atividade antiproliferativa estão relacionadas na tabela 2. Estas serão cultivadas em meio de cultura [RPMI-1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB)]. Todos os procedimentos descritos abaixo, serão realizados sob condições estéreis.

A2.1.1. Descongelamento celular

Como todas as linhagens celulares foram enviadas congeladas para o laboratório, o primeiro passo a ser realizado será o descongelamento das células e a propagação das mesmas. Estas células serão fotografadas para uma avaliação geral de sua morfologia.

O criotubo que contém as células será mantido à temperatura ambiente para descongelamento sendo seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL. O volume será completado para 10 mL com RPMI/SFB. O tubo será centrifugado a 2000 rpm e 4 °C por 4 minutos. O sobrenadante será aspirado e o “pellet celular” será ressuscitado cuidadosamente para evitar a formação de grumos com 5 mL de RPMI/SFB. A solução celular será transferida para frascos de 25cm² (T25) com 5 mL de RPMI-1640 /SFB e incubada a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100 % de umidade.

A2.1.2. Congelamento celular

As células da suspensão a ser congelada serão contadas e transferidas para um tubo de centrífuga de 50 mL. O tubo será centrifugado a 4 °C e 2000 rpm por 4 minutos, o sobrenadante será aspirado e o “pellet celular” ressuscitado em RPMI/SFB acrescidos de 10% de glicerol a 4°C, resultando numa suspensão de concentração final equivalente a 1 x 10⁶ cel/mL. O frasco será mantido a 4 °C e 1 mL da suspensão celular será transferido

⁸³ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Can. Inst.* **1990**, *82*, 1107.

para criotubos rotulados que serão armazenados na fase gasosa do nitrogênio líquido por 24 horas. Após este período, os criotubos serão submersos no nitrogênio líquido.

A2.2. Repiques Celulares

A2.2.1. Células em Suspensão

Um volume previamente determinado será retirado do frasco de manutenção e transferido para outro frasco, sendo completado o volume para 5 mL no caso de frascos de culturas de 25 cm² (T25) e 10 ml para os frascos de 75 cm² (T75). A diluição utilizada será dependente das características de cada linhagem celular ou ainda dos objetivos dos experimentos a serem realizados. Estes frascos serão incubados a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

A2.2.2. Células aderidas

Quando a monocamada celular atingir cerca de 80% de confluência, estas serão repicadas, sendo mantidos sempre dois frascos de cada linhagem celular. Para estas células cujo crescimento ocorre em monocamada, será necessário a tripsinização, ou seja, o desprendimento das mesmas do frasco através de ação enzimática.

Após a aspiração do meio de cultura, serão adicionados 0,5 mL de tampão de Hank's banhando toda a monocamada celular por 10 vezes consecutivas. Este líquido será aspirado e então adicionado 0,5 mL de tripsina a 37 °C. O frasco será incubado de 25 a 30 segundos. Quando as células se desprenderem da parede do frasco de cultura, este será banhado com RPMI/SFB. A partir deste ponto, quando as células se apresentam em suspensão, será utilizado o mesmo procedimento do item A.2.1

Tabela A2.1. Linhagens celulares utilizadas nos ensaios antiproliferativo.

<i>Tipo celular</i>	<i>Designação</i>	<i>Tipo de cultura</i>
Ovário	OVCAR03	Aderida
Renal	786-0	Aderida
Próstata	PCO.3	Aderida
Cólon	HT-29	Aderida
Pulmão	NCI 460	Aderida
Mama	MCF-7	Aderida
Ovário resistente	NCI.ADR	Aderida
Melanoma	UACC.62	Aderida

A2.2.3. Contagem celular

Com as células em suspensão, os frascos serão agitados delicadamente e uma alíquota será retirada e colocada na Câmara de Neubauer para contagem. Os quatro quadrantes externos serão contados e determinados a média aritmética. Este valor será multiplicado pelo fator de correção da câmara, equivalente a 104, estipulando assim o quanto de células e meio de cultura deverá ser inoculado nas placas de 96 compartimentos para a avaliação da atividade antiproliferativa.

A2.3. Ensaio para a determinação da atividade antiproliferativa dos compostos

Serão plaqueados 100 µL de células, em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação em placas de 96 compartimentos. Estas serão incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Para cada linhagem será utilizada um número estipulado de placas, além da placa T0 (Placa Controle), dependendo da quantidade de células obtidas na contagem.

A2.3.1. Diluição das amostras

As amostras serão diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 1g/mL resultando em soluções estoques. Estas soluções serão diluídas 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina. Serão adicionados 100µL do extrato a ser testado nas placas de 96 compartimentos, exceto na T0, nas doses de 0,25; 2,5; 25; 250 µg/ml, sendo realizada no mesmo momento, a fixação e posterior leitura da placa T0, determinando assim a quantidade de células presentes no momento em que os extratos foram colocados. As

demais placas serão incubadas por 48 horas. Após este período, serão realizadas as leituras pelo ensaio do SRB.

A2.3.2. Ensaio de SRB

As placas de 96 compartimentos serão centrifugadas pôr 3 minutos a 2000 rpm, e serão fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético a 50% (TCA) para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas serão incubadas por 1 hora a 4 °C. Após esse tempo, serão submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Estas placas serão mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Em seguida, as placas serão coradas pela adição de 50µL de SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 %. Estas serão incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Após esse período, as placas serão lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1%. O resíduo da solução de lavagem será removido e as placas serão novamente secas à temperatura ambiente.

O corante ligado às proteínas celulares será solubilizado com uma solução de Trizma Base na concentração de 10µM e pH 10,5 por 5 minutos em ultra-som. A leitura espectrofotométrica da absorbância será realizada em 560 nm em um leitor de microplacas.

A2.3.3. Análise dos resultados

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células + amostras descontando-se seus respectivos brancos (compartimentos contendo apenas amostra) e a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T_A > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_A \geq T_0 < T_1 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0) / (T_1 - T_0)]$

Se $T_A < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0) / T_1]$

Onde:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorvância do branco de células

T_0 = absorvância do controle de células na placa T_0 .

Com esses valores, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste, tendo-se como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina. Os valores abaixo de 50 e acima de zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), sendo que os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI – total growth inhibition). Os valores negativos (abaixo de zero) representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células (aferida pela absorvância no final do experimento), nesse caso, é menor do que o que iniciou o experimento (absorvância do T_0).

Para as amostras foram contruídos os mean Graphs que evidenciam quais linhagens são mais e menos sensíveis à amostra testada. Para tanto os valores de TGI de cada linhagem foram expressos em \log_{10} , calculou-se a média dos \log_{10} dos valores de TGI para cada amostra e posteriormente foram subtraídos da média os valores de TGI obtidos para cada uma das linhagens celulares. Essa diferença foi expressa graficamente (gráfico de barras), mostrando quais linhagens celulares foram mais ou menos sensíveis à amostra testada. Além disso, o perfil de cada amostra foi comparado ao perfil obtido para a doxorrubicina, quimioterápico cujo mecanismo de ação já é conhecido.

Esse procedimento se baseia no programa COMPARE desenvolvido pelo NCI, que se fundamenta na hipótese de que compostos que possuam mecanismos de ação similares tendem a apresentar padrões similares de inibição de crescimento dos diferentes tipos celulares.⁸⁴

6.3 ANEXO 3 – BIOENSAIO DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Os ensaios foram realizados conforme descrito por Buckner et al.⁸⁵(1996). Em placas de 96 poços. Formas tripomastigotas da cepa CL B5, obtidas de cultivo em RPMI 1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal inativado e solução de antibióticos (estreptomomicina e penicilina), foram adicionadas (1×10^6 /poço) e incubadas com as

⁸⁴ Holbeck, S. L. *Eur. J. Cancer*, **2004**, *40*, 785. b) Shoemaker, R.H. *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, *6*, 813.

⁸⁵ Buckner, F. S; Verlinde, C. L; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Washington, v. *40*, n. 11, **1996**. p. 2592-2597

substâncias nas concentrações finais de 0,5; 2,0; 8,0 e 32 μM por 24 horas, a 37°C. Após este período, 50 μL da solução (400 μM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) de *Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside* (CPRG - SIGMA) foi adicionado em cada poço e a placa incubada por mais 4h a 37°C. A reação colorimétrica foi quantificada a 595 nm (OD) e os resultados expressos em porcentagem de atividade (AA%), relativa aos poços controles, da seguinte forma:

$$\%AA = 100 - (\text{OD dos poços tratados} / \text{OD do controle negativo}) \times 100$$

Como controle foi utilizado o DMSO, solvente utilizado para a solubilização das substâncias na mesma proporção (controle negativo). Os ensaios foram realizados em triplicata e os respectivos controles de fármaco (meio com as substâncias nas mesmas concentrações foram subtraídos de todos os resultados).

6.3.1 Análise dos dados

Para análise dos resultados deste trabalho, assim como para os cálculos matemáticos envolvidos nos estudos, foi utilizado o programa GraphPad Prism 4.02. A partir do programa foram construídas as curvas sigmoidais dose-resposta, onde foram calculados os valores de IC_{50} , a porcentagem de lise e o desvio padrão dos valores obtidos pela atividade das substâncias.

6.4 ANEXO 4 – BIOENSAIO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Os ensaios leishmanicidas foram realizados com formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*, que foram cultivadas a 22 °C, em meio 199 (LGC) suplementado com 5% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina. As formas promastigotas ($1 \times 10^7/\text{mL}$), obtidas do cultivo em fase logaritmica de crescimento foram colocadas em placas de 96 poços a 22° C, onde as várias concentrações das substâncias (0,5, 2, 8 e 32 μM) foram adicionadas, sendo as amostras avaliadas após 24 horas. Após esse período, 100 μL do material incubado foram retirados e adicionados 20 μl da solução de resazurina 3mM (SIGMA), sendo a placa incubada por 5 horas a 37°C. Após esse período o material foi submetido a leitura de absorvância em leitora de microplacas (SUNRISE – Tecan) a um comprimento de onda de 570nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE).

6.5 ANEXO 5 – BIOENSAIO DE AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A ação citotóxica das substâncias foi avaliada pelo método de MTT, o qual é usado para avaliar *in vitro* a atividade metabólica ou viabilidade de células de cultura. O método é baseado na redução do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] a formazam.⁸⁶

Em microplacas de 96 poços, células LLC-MK2 (5x10⁵ células/poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de soro bovino fetal (Cultilab), 25 UI/mL penicilinae, 25 µg/mL estreptomicina e 10 µg/mL ciporfloxacina. As substâncias foram adicionadas nas concentrações de 0,5; 2; 8; 32 µM e a placa incubada por 24h em estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

Após este período as células foram incubadas com MTT (5 mg/mL) por 4h, onde então 100 µL de isopropanol-ácido foi adicionado. A placa foi mantida a temperatura ambiente até que os cristais formados fossem dissolvidos e a leitura realizada em espectrofotômetro (Tecan) a 570 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Como controle positivo utilizamos 10 µL de Triton X-100 20% e, como controle negativo solução fisiológica com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

A porcentagem de citotoxicidade foi determinada pela a seguinte formula:

$$\% \text{ citotoxicidade} = 1 - [(Y - N) / (N - P)] * 100$$

onde: Y= leitura da densidade óptica dos poços com células e diferentes concentrações das substâncias; N= leitura da densidade óptica dos poços com células; P= leitura da densidade óptica dos poços com células e Triton X-100. A dose citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

⁸⁶ Sieuwerts, A. M.; Klijn, J. G.; Peters H. A.; Foerkens, J. A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, Berlin **1995**, 33, n. 11, p. 813.