

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Cristian Soldi

**Semi-síntese de derivados dos triterpenos α e β -amirina e síntese de
estirilpironas via arilação de Heck com sais de arenodiazônio**

Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em química da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo
Pizzolatti.

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

S684s Soldi, Cristian

Semi-síntese de derivados dos triterpenos α e β -amirina e síntese de estilipironas via arilação de Heck com sais de arenodiazônio [tese] Cristian Soldi; orientador, Moacir Geraldo Pizzolatti. - Florianópolis, SC 2011.
176 p.: il., grafs., tabs

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química

Inclui referências

1. Química. 2. Arilação de Heck. 3. Reações químicas.
I. Pizzolatti, Moacir Geraldo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Cristian Soldi

Semi-síntese de derivados dos triterpenos α e β -amirina e síntese de estirilpironas via arilação de Heck com sais de arenodiazônio

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de março de 2011.

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti,
Orientador - UFSC

Prof. Dr. Ademir F. Morel
UFSC

Prof. Dr. Andersson Barison
UFPR

Prof. Dr. Hugo Gallardo
UFSC

Prof.^a, Dr.^a Maique W. Biavatti
UFSC

Prof. Dr. José C. Gesser
Suplente - UFSC

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte de minha vida e que me ensinaram os caminhos, sejam eles os mais fáceis ou os mais difíceis, para chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Às vezes fico tentando imaginar como seriam as coisas hoje em minha vida se em algum momento no passado tivesse decidido por caminhos diferentes. Quando começo essa “viagem” logo percebo que a primeira das decisões que me trouxe até este mundo fascinante da Universidade foi a de meus pais. Seu Nelson e Dona Enelides. Sem ensino médio completo, mas ciente das dificuldades que seus filhos encontrariam na vida profissional, se esforçaram ao máximo para que pudessemos ter ao menos um diploma de ensino superior. Lembro que às vezes eles não podiam, mas deram um jeito até mesmo quando um tal de carcinoma resolveu aparecer e atrapalhar nossas vidas. Foi neste momento que a família (Soldis e não Soldis) assumiu seu papel mais importante e é por isso que agradeço de coração a todos os familiares que de alguma forma fizeram parte deste momento em nossas vidas.

Não me atrevo a citar nomes aqui, pois são tantos, mas agradeço a todos os amigos que me acompanharam durante o curso de graduação que sempre ajudaram na minha formação pela amizade e coleguismo. A todos os colegas de laboratório que tive em todo o período no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC pelas lições de vida e pelas lições de como aprender química. Uma lembrança especial ao grande amigo Luiz Gonzaga Verdi que não está mais entre nós, mas será lembrado para sempre por todos que o conheceram. Além disso, não poderia deixar de agradecer aos colegas e amigos do LASSO – UNICAMP os quais me receberam muito bem e não exitaram em momento algum em me ajudar com as dificuldades encontradas em nosso projeto.

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir Pizzolatti pela confiança e liberdade na execução dos projetos. Pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Professor Dr. Carlos Roque Duarte Correia do Instituto de Química da UNICAMP por ter me recebido em seu laboratório e proporcionado um excelente período de aprendizado em Química.

Um agradecimento especial aos grandes amigos Alexandra e Denys pelo apoio e carinho. Nossas missões foram cumpridas enquanto parceiros. De agora em diante, a vida se encarrega de nos levar para cima.

Aos Professores que aceitaram compor a banca desta tese, peço desculpas pelo trabalho ofertado em suas férias e agradeço por aceitarem o convite para avaliar nosso trabalho e pelas valiosas sugestões que melhoraram esta tese.

Ao grupo do Professor Dr. Carlos Leomar Zani e Dr. Susana Johann da Fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte – MG pelos ensaios de atividade antitumoral e leishmanicida dos derivados dos triterpenos α e β -amirina. Ao grupo da Professora Dr. Elaine Maria de Souza Fagundes da Fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte – MG pelos ensaios de atividade antitumoral dos derivados das estirilpironas.

Ao grupo do Professor Dr. Adair R. S. Santos do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensaios de atividade antinociceptiva.

Ao Professor Dr. Fabio da Silva Miranda da Universidade Federal Fluminense pela amizade e pela ajuda nos estudos teóricos com DFT.

Ao pessoal da Central de análises pela obtenção dos espectros de RMN e IV.

A Universidade Federal de Santa Catarina, ao Departamento de Química e ao Curso de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPQ e a Capes pelo apoio financeiro.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho relatamos a obtenção de derivados sintéticos de uma mistura dos triterpenos α e β -amirina, os quais foram avaliados quanto aos seus efeitos leishmanicida e citotóxico. Os derivados **31** e **45** exibiram efeito leishmanicida 5 vezes mais potente que a anfotericina B e os derivados **35** e **36** exibiram significativo efeito citotóxico contra células tumorais testadas. Além disso, foram realizados experimentos na tentativa de determinar o mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina. A segunda parte do trabalho trata de um estudo da relação entre a estrutura das estirilpironas naturais, previamente isoladas de *Polygala sabulosa*, e sua afinidade pelo sítio benzodiazepínico. O estudo foi realizado utilizando o funcional de densidade (DFT) como ferramenta teórica. Estes resultados nos orientaram no planejamento e síntese de análogos das estirilpironas naturais visando aumentar a afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Desta forma, foi desenvolvida uma nova metodologia, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Carlos R. D. Correia, da UNICAMP, via arilação de Heck com sais de arenodiazônio. Foram preparados 12 compostos diretamente através da reação de Heck-Matsuda e mais 5 compostos via reações de hidrogenação catalítica e demetilação dos adutos de Heck. Estes compostos não exibiram efeito tóxico em células tumorais na concentração de 50,0 μM .

Palavras-chave: Amirina, Estirilpironas, Reação de Heck-Matsuda.

ABSTRACT

In this work, we have been reporting the preparation of synthetic derivatives from a mixture of α e β -amyrin triterpenes which were evaluated in relation to their leishmanicidal and cytotoxic effects. The derivatives **31** and **45** showed leishmanicidal effect five times more potent than amphotericin B and derivatives **35** and **36** were the most potent against the tumor cell lines melanoma (UACC62), breast (MCF-7) and renal (TK-10). In addition, experiments were carried out with α e β -amyrin octanoate in an effort to find the antinociceptive mechanisms of action. The second part of this work, a structure-activity relationship of seven naturally occurring dihydrostyryl and styryl-2-pyrones, previously isolated from *Polygala sabulosa*, and their affinity to the benzodiazepine binding site were studied. To calculate the necessary parameters, DFT was used as theoretical tool. The results from this study have driven us to design other structures from those naturally occurring styryl-2-pyrone analogues, searching for compounds with higher affinity to the benzodiazepine binding site. A new methodology was then developed by Heck arylation, in collaboration with Professor Dr. Carlos Roque Duarte Correia from UNICAMP, using arenediazonium salts as arylating agents. Twelve compounds were synthesized directly from Heck-Matsuda reaction and five more compounds by catalytic hydrogenation and demethylation of Heck adducts. These compounds did not exhibit toxic effects in tumor cell lines Jurkat (lymphoid leukemia), HL60 (myeloid leukemia), MCF-7 (breast carcinoma) e HCT- 116 (rectal carcinoma) in the concentration of 50 μ M.

Keywords: Amyrin. Styrylpyrones. Heck-Matsuda Reaction.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Estruturas dos triterpenos α e β -amirina e derivados mais ativos ... | 20 |
| Figura 2 - diidroestiril-2-pironas (DSTs) e estiril-2-pironas (STYs) previamente isoladas de <i>Polygala sabulosa</i> A. W. Bennett. Na figura, o anel pirona foi denominado anel A e o anel aromático anel B | 22 |
| Figura 3 - Compostos isolados da planta kava-kava (<i>Piper methysticum</i>) | 53 |
| Figura 4 - Modelo do complexo receptor GABA _A | 56 |
| Figura 5 - Substancias agonistas do sítio benzodiazepínico e seus nomes comerciais..... | 57 |
| Figura 6 - Estruturas das estirilpironas com energia minimizada | 62 |
| Figura 7 - Confôrmeros e barreira de energia para rotação das estirilpironas (STY)..... | 63 |
| Figura 8 - Grupos semelhantes presente nas estruturas das estirilpironas e nos benzodiazepínicos e um exemplo de aproximação destas estruturas no sítio hipotético de um receptor | 67 |
| Figura 9 - LUMO da DST2, STY2, diazepam e flunitrazepam para comparação | 71 |
| Figura 10 - Compostos sintetizados análogos a kavaína..... | 95 |
| Figura 11 - Análogos da iangonina preparados a partir da olefina 108..... | 104 |

LISTA DE TABELAS



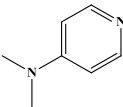
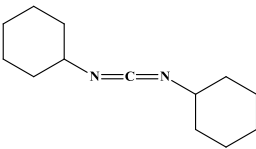
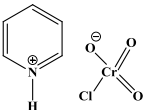

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 - Concentração efetiva (CE ₅₀) dos compostos mais ativos contra <i>Leishmania amazonensis</i> | 39 |
| Tabela 2 - Atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas | 40 |
| Tabela 3 - Resultados <i>In vivo</i> (obtidos do labirinto de cruz elevada) e <i>in vitro</i> (ensaios de “binding” com o sítio benzodiazepínico) para as diidroestiril-2-pironas (DSTs) e estiril-2-pironas (STYs). | 55 |
| Tabela 4 - Parâmetros calculados DST 1, 2, 3, STY 1, 2, 3 e 4, flunitrazepam (FNZ) e diazepam (DZP). | 64 |
| Tabela 5 - Resultados dos cálculos pelo funcional de densidade (DFT) para DSTs, STYs, flunitrazepam e diazepam em fase aquosa. | 69 |
| Tabela 6 - Resultados dos cálculos pelo funcional de densidade (DFT) para DSTs, STYs, flunitrazepam e diazepam em fase gasosa. | 70 |
| Tabela 7 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 4-metoxifenildiazônio. | 92 |
| Tabela 8 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 4-metoxifenildiazônio. | 93 |
| Tabela 9 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 3,4,5-trimetoxifenildiazônio. | 96 |
| Tabela 10 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina 2 com sal tetrafluorborato de 4-metoxifenildiazônio. | 103 |
| Tabela 11 - Percentual de proliferação frente às linhagens de células tumorais humanas Jurkat (leucemia linfóide), HL60 (leucemia mielóide), MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT- 116 (carcinoma colo-retal)..... | 111 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------------|---|
| DST 1 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona |
| DST 2 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxio-10-metoxidiidroestiril)-2-pirona |
| DST 3 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxio-10,14-dimetoxidiidroestiril)-2-pirona |
| STY 1 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona |
| STY 2 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxio-10-metoxiestiril)-2-pirona |
| STY 3 | 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxio-10,14-dimetoxiestiril)-2-pirona |
| STY 4 | 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona |
| DEPT | <i>do inglês:</i> Distortionless Enhanced Polarization Transfer |
| APT | <i>do inglês:</i> Attached Proton Test |
| PTB1B | Proteína Tirosina Fosfatase 1B |
| GABA | Neurotransmissor Ácido Gama AminoButírico |
| GABA_A | Tipo de receptor que consiste em um canal regulado por ligante seletivamente permeável aos íons cloreto |
| GABA_B | Receptor acoplado a proteína |
| DSTs | Diidroestirilpironas |
| STYs | Estirilpironas |
| SAR | Relação Estrutura-Atividade |
| DI₅₀ | Dose inibitória a 50% |
| UACC62 | Linhagem de Célula Tumoral de Melanoma |
| MCF7 | Linhagem de Célula Tumoral de Mama |
| TK10 | Linhagem de Célula Tumoral Renal |
| CE₅₀ | Concentração Efetiva a 50% |
| μM | Micro Molar |
| TRPV1 | Receptor de Potencial Transiente Vanilóide 1 |
| RMN de ¹H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| RMN de ¹³C | Ressonância Magnética Nuclear de Carbono |
| IV | Infravermelho |
| ccf | Cromatografia em camada fina |
| Rf | Fator de Retenção |
| ELISA | <i>Do inglês:</i> Enzyme-linked immunosorbent assay |
| DFT | Teoria do Funcional de Densidade |
| HOMO | Orbital Ocupado de mais Baixa Energia |
| LUMO | Orbital Desocupado de mai alta Energia |
| χ | eletronegatividade |
| I | potencial de ionização |
| A | afinidade eletrônica |
| ε_{HOMO} | Energia do Orbital Ocupado de mais Baixa Energia |
| ε_{LUMO} | Energia do Orbital Ocupado de mais Baixa Energia. |
| η | dureza química |

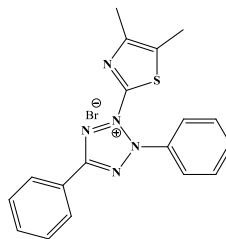
| | |
|---------------|---|
| ω | Índice eletrofílico |
| uma | Unidade de Massa Atômica |
| nt | Não Testado |
| HL60 | Linhagem de Célula Tumoral de Leucemia Mielóide |
| JURKAT | Linhagem de Célula Tumoral de Leucemia Linfóide |
| MCF7 | Linhagem de Célula Tumoral de Mama |
| HCT116 | Linhagem de Célula Tumoral de Carcinoma Retal |

LISTA DE ABREVIATURAS, NOMES E ESTRUTURAS QUÍMICAS

| Abreviatura | Nome | Estrutura química |
|-------------|-----------------------------------|---|
| Ac | Acetil |  |
| Ar | Aril (anel aromático substituído) |  |
| DMAP | 4-(N,N-dimetil)-aminopiridina |  |
| DCC | N,N'-Dicicloexilcarboxildiimida |  |
| PCC | Clorocromato de piridínio |  |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |  |

MTT

Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium



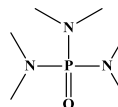
THF

Tetrahidrofurano



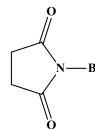
HMPA

Hexametilfosforamida



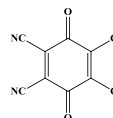
NBS

N-bromosuccinimida



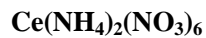
DDQ

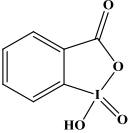
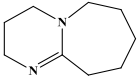
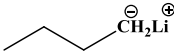
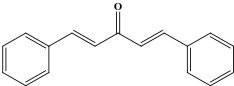
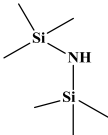
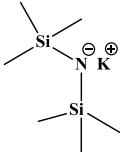
2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona



CAN

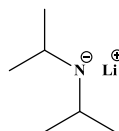
Nitrato cérico de amônio



| | | |
|----------------|---|---|
| IBX | Ácido iodoxibenzóico |  |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene |  |
| <i>n</i> -BuLi | n-Butil lítio |  |
| DBA (dba) | dibenzilidenoacetona |  |
| HMDS | 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano |  |
| KHMDS | <i>Bis</i> (trimetilsilil)amideto de potássio |  |

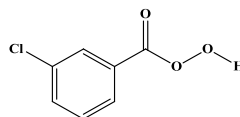
LDA

Diisopropilamideto de lítio



m-CPBA

Ácido *m*-cloroperbenzóico



SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 19 |
| OBJETIVOS GERAIS..... | 23 |
| CAPÍTULO 1. DERIVADOS SEMI-SINTÉTICOS DOS TRITERPENOS α E β-AMIRINA..... | 24 |
| 1.1. INTRODUÇÃO | 24 |
| 1.2. OBJETIVOS | 35 |
| 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 1.4. CONCLUSÃO | 44 |
| 1.5. PARTE EXPERIMENTAL..... | 45 |
| CAPÍTULO 2. RELAÇÃO ESTRUTURA-AATIVIDADE DE ESTIRILPIRONAS, ISOLADAS DE <i>POLYGALA SABULOSA</i> A. W. BENNET, FRENTE À AFINIDADE PELO SÍTIO BENZODIAZEPÍNICO | 52 |
| 2.1. INTRODUÇÃO | 52 |
| 2.2. OBJETIVOS | 60 |
| 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 2.4. CONCLUSÃO | 72 |
| 2.5. PARTE EXPERIMENTAL..... | 73 |
| CAPÍTULO 3. SÍNTESE DE COMPOSTOS ANSIOLÍTICOS UTILIZANDO ESTIRILPIRONAS ISOLADAS DE <i>POLYGALA SABULOSA</i> A. W. BENNETT COMO MODELO..... | 74 |
| 3.1. METODOLOGIAS SINTÉTICAS PARA A PREPARAÇÃO DE KAVALACTONAS | 74 |
| 3.2. OBJETIVOS | 89 |
| 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 90 |
| 3.4. CONCLUSÃO | 112 |
| 3.5. PARTE EXPERIMENTAL..... | 113 |
| REFERÊNCIAS | 140 |
| APÊNDICE A – ORBITAIS MOLECULARES DAS DIIDROESTIRIL, ESTIRILPIRONAS, DIAZEPAM E FLUNITRAZEPAM..... | 153 |
| APÊNDICE B – ESPECTROS SELECIONADOS DE RMN DE ¹H E ¹³C.... | 159 |

INTRODUÇÃO GERAL

As plantas vêm sendo utilizadas para a cura de doenças por milhares de anos. No entanto, elas somente se tornaram populares nas indústrias farmacêuticas recentemente devido aos avanços em relação às técnicas de isolamento, caracterização e avaliação dos efeitos biológicos.^{1,2} Atualmente, muitos dos fármacos encontrados no mercado são obtidos diretamente de uma fonte natural ou foram desenvolvidos a partir de uma substância originalmente obtida da natureza. Segundo Newman e Cragg (2007),³ entre todos os fármacos que ganharam mercado entre 1891 e 2006, a porcentagem destas substâncias que de alguma forma são originados a partir de produtos naturais ultrapassa 50%.

Nesse caminho, a química orgânica sintética exerce um importante papel nas indústrias farmacêuticas com a preparação de novos compostos bioativos, os quais podem ser derivados, análogos ou idênticos aos compostos naturais. Em geral, as reações biossintéticas, que são mediadas por enzimas levam a produção de compostos com estruturas químicas muito complexas devido, muitas vezes, ao fato de que estes compostos possuem um grande número de átomos e vários centros estereogênicos. Isso acaba tornando inviável a síntese destas substâncias para a comercialização já que o valor do produto final no mercado seria muito alto. No entanto, estas substâncias podem servir como base para a preparação de compostos biologicamente ativos onde pequenas modificações estruturais podem potencializar efeito biológico. Já os compostos naturais e análogos que possuem um esqueleto mais simples podem ser sintetizados em laboratório de forma mais efetiva e com a possibilidade de se obter maiores quantidades em massa, o que não se consegue com o isolamento direto da planta, sobretudo se forem compostos minoritários.

Os triterpenos estão entre as classes de produtos naturais que possuem uma imensa variedade de estruturas químicas diferentes. São compostos que apresentam um grande espectro de atividade biológica, porém nem sempre uma potência elevada.^{4,5,6} Substâncias mais ativas foram obtidas através de pequenas modificações estruturais que utilizam procedimentos simples e com bons rendimentos tornando-os interessante do ponto de vista industrial. Em sua maioria, os triterpenos são compostos policíclicos com 30 átomos de carbonos e cerca de 10 centros estereogênicos o que nem com os mais avançados métodos de química orgânica sintética é de todo satisfatório a preparação destes compostos para a comercialização em grande escala. Em trabalhos

Introdução Geral

previamente realizados por nosso grupo de pesquisa,^{7,8} foi relatado a preparação de 15 derivados de uma mistura dos triterpenos α e β -amirina (figura 1), obtida da resina de *Protium heptaphyllum* como uma mistura na proporção 1:2.⁹ Nesta ocasião, a atividade analgésica e antifúngica dos derivados foram avaliadas. O derivado formiato de α e β -amirina (figura 1), foi tão efetivo quanto fluconazol, fármaco comercialmente disponível, em inibir a adesão de *Candida albicans* nas células epiteliais bucal.⁸ O derivado octanoato de α e β -amirina (figura 1) exibiu uma importante atividade analgésica sendo 24180 vezes mais potente que a aspirina e 427 vezes mais potente que a morfina, no modelo de dor testado,⁷ e não produziu nenhuma alteração comportamental nos ratos.⁷ Estes importantes resultados instigam a determinar o mecanismo de ação do composto octanoato de α e β -amirina e também determinar a atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais. Nesse contexto faz-se necessário continuar os estudos com derivados dos triterpenos pentacíclicos α e β -amirina preparados anteriormente com o objetivo de ampliar o leque de atividades biológicas e encontrar promissores candidatos a fármacos.

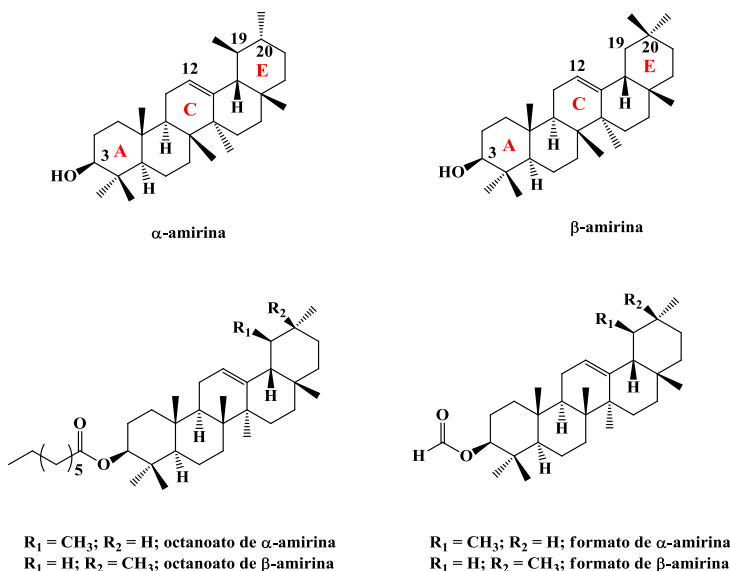


Figura 1 – Estruturas dos triterpenos α e β -amirina e derivados mais ativos

Introdução Geral

Inúmeras espécies de plantas utilizadas na medicina folclórica têm sido avaliadas quanto a sua atividade biológica através de várias parcerias firmadas com nosso grupo de pesquisa. Entre elas, está a espécie *Polygala sabulosa* onde estudos fitoquímicos e farmacológicos revelaram a presença de metabólitos secundários com efeitos biológicos promissores. A presença de cumarinas, diidroestirilpironas e estirilpironas foram recentemente descritas por Pizzolatti e colaboradores.^{10,11}

As estirilpironas isoladas de *Polygala sabulosa* possuem uma similaridade estrutural com as kavalactonas isoladas da planta kava-kava (*Piper methysticum*), uma espécie nativa das ilhas do Pacífico e que é extensivamente usada para o tratamento da ansiedade em todo mundo. Estudos têm mostrado suas propriedades tranquilizantes e ansiolíticas^{12,13} sendo estes efeitos atribuídos a presença das kavalactonas. No entanto, o uso desta espécie foi proibido em alguns países devido a uma suposta hepatotoxicidade relacionada ao consumo do chá desta planta. Neste contexto, colocamos a espécie *P. sabulosa* como uma planta de potencial atividade no sistema nervoso central e aplicação no tratamento de distúrbios de ansiedade. De fato, em trabalhos recentes publicados por nosso grupo envolvendo a espécie vegetal *P. sabulosa*, da qual foram isoladas e identificadas três diidroestirilpironas (DST1-DST3) e quatro estirilpironas (STY1-STY4)^{10,11} (fig. 2), relatamos uma importante ação central incluindo efeito ansiolítico, hipnosedativo e anticonvulsivante.¹⁴ Os compostos DST1 e STY4 foram os mais potentes exibindo efeito ansiolítico similar ao fármaco diazepam disponível comercialmente. Além disso, os compostos isolados inibiram a ligação de [³H]-flunitrazepam (fármaco que se liga ao sítio benzodiazepínico) indicando uma interação com o sítio benzodiazepínico do complexo receptor GABA_A.¹⁵

Em estudos toxicológicos dos extratos de *P. sabulosa* em camundongos, observando o protocolo padrão para toxicidade de plantas incluindo análises macroscópicas, microscópicas e bioquímicas após tratamento agudo e sub-cronico, não foram observadas nenhuma anomalia macroscópica nem alterações histopatológicas nos órgãos vitais. Além disso, não houve alterações dos parâmetros bioquímicos e tolerância ao efeito tipo ansiolítico ou efeito tóxico, sugerindo um bom nível de segurança para esta espécie.¹⁶ Isso eleva a importância destes compostos como possíveis candidatos a fármacos para o tratamento da ansiedade. Estes

Introdução Geral

modelos nos orientaram a síntese de novos análogos a estes produtos naturais focado na busca de compostos mais ativos e com menores níveis de toxicidade.

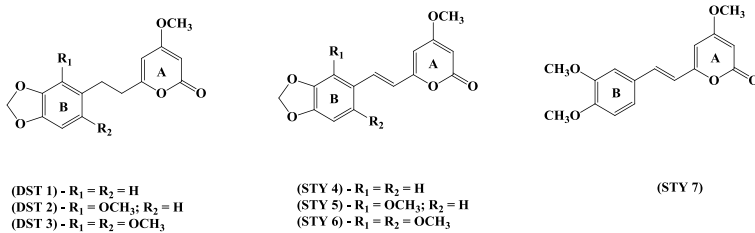


Figura 2 - Diidroestiril-2-pironas (DSTs) e estiril-2-pironas (STYs) previamente isoladas de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett. Na figura, o anel pirona foi denominado anel A e o anel aromático anel B

OBJETIVOS GERAIS

Em virtude dos resultados obtidos previamente pelo nosso grupo de pesquisa e colaboradores, os objetivos deste trabalho são:

Em relação aos derivados dos triterpenos α e β -amirina

- Preparar novos derivados da mistura de triterpenos α e β -amirina.
- Avaliar a atividade leishmanicida e citotóxica dos derivados de α e β -amirina.
- Avaliar o estudo do mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina e buscar e buscar as características estruturais responsáveis pelo efeito antinociceptivo.

Em relação aos compostos isolados de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett

- Determinar, através da teoria do funcional de densidade, os parâmetros eletrônicos e estéricos nas estruturas dos sete compostos naturais e de benzodiazepínicos conhecidos, que possam ser importantes para a afinidade com o sítio benzodiazepínico.
- Planejar e sintetizar análogos das sete estirilpironas naturais baseado no estudo da relação estrutura-atividade.

CAPÍTULO 1. Derivados semi-sintéticos dos triterpenos α e β -amirina

1.1. Introdução

Os triterpenos se apresentam como uma classe de compostos derivados biossinteticamente do esqualeno. Estas estruturas são baseadas na junção de seis unidades de isopreno levando a uma estrutura linear com 30 carbonos, o esqualeno. Este por sua vez sofre uma oxidação se transformando no 2,3-epoxiesqualeno que inicia uma série de ciclizações e rearranjos devido a migração de hidreto ou metila, mediados por enzimas, podendo resultar numa série de estruturas policíclicas com cerca de 10 centros estereogênicos.^{17,18} As diferentes estruturas possíveis com estes 30 átomos de carbono arranjados em 4 ou 5 ciclos com 5 ou 6 membros tornam a classe dos triterpenos uma das maiores e mais complexas, do ponto de vista estrutural, classes de metabolitos secundários. Os triterpenos pentacíclicos, são compostos caracterizados por exibir uma ampla faixa de atividades biológicas incluindo atividade anti-inflamatória,^{19,20,21,22,23} antitumoral,^{24,25,26,27,28} antibacteriana,²⁹ anti-alérgica,³⁰ antimalárica,³¹ antidiabetes,^{32,33} antinociceptiva,^{34,35,36} gastroprotetiva,²¹ hepatoprotetiva³⁷ e cardioprotetiva.^{38,39}

Os triterpenos pentacíclicos α e β -amirina possuem esqueleto do tipo ursano e oleanano, respectivamente. A única diferença entre estes dois compostos é o posicionamento de uma metila que na α -amirina está no carbono C19 e na β -amirina está no carbono C20 (ver figura 1). Apesar da semelhança estrutural, estes isômeros são facilmente diferenciados por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C avaliando os deslocamentos dos átomos de hidrogênio H12 e dos átomos de carbonos C12 e C13. No entanto, técnicas como DEPT ou APT, dão maior certeza já que α e β -amirina apresentam números diferentes de CH₂, CH e C quaternário.

Em virtude do grande número de centros estereogênicos e da complexa estrutura dos triterpenos policíclicos, a síntese total dos triterpenos pentacíclicos se mostra como um grande desafio. Existem poucos trabalhos na literatura que relatam a síntese enantioselectiva total de triterpenos⁴⁰ sendo que grandes avanços têm-se obtido na síntese de intermediários avançados.^{41,42,43,44}

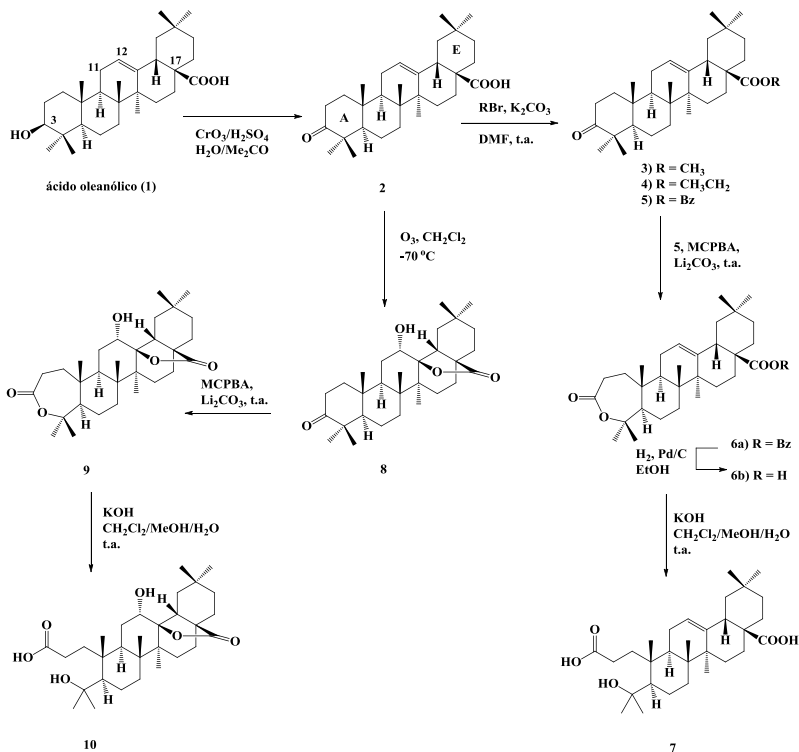
Desta forma, diante da dificuldade de obter derivados de triterpenos totalmente sintéticos, houve um aumento significativo no

Capítulo 1 - Introdução

número de trabalhos envolvendo a obtenção de compostos análogos aos triterpenos naturais. Esta é uma metodologia que apresenta a vantagem de aproveitar a complexa estrutura policíclica dos triterpenos, biosintetizados pelas plantas, para a obtenção de compostos com efeitos biológicos mais potentes.

As modificações estruturais nos esqueletos naturais do tipo oleanano e ursano normalmente se limitam aos anéis **A** e **C** e no carbono C17. Entre os trabalhos mais recentes, Qian e colaboradores (2010)⁴⁵ relataram a síntese de derivados do ácido oleanólico (**1**, esquema 1.1) visando a obtenção de inibidores da proteína tirosina fosfatase 1B (PTB1B) que regula a sinalização da insulina no organismo. A inibição desta enzima pode estar associada ao combate da diabetes e obesidade. O trabalho foi baseado em resultados previamente publicados³³ onde foi relatado um significativo efeito antidiabetes para derivados do ácido oleanólico principalmente para um composto hidroxilado em C12. Estudos de docking indicaram que os inibidores da **PTB1B** deveriam conter grupamentos polares na estrutura do ácido oleanólico. Inicialmente, o derivado 3-oxo do ácido oleanólico (**2**) foi preparado via oxidação utilizando reagente de Jones. A proteção do grupo ácido carboxílico em C17 a partir da esterificação com brometo de benzila e subsequente oxidação de Baeyer-Villiger levou a formação da ϵ -lactona **6a** e, após remoção do grupo benzil através de hidrogenação catalítica, à **6b**. Então, abertura da lactona com KOH e H₂O levou a formação do derivado **7** o qual possui dois grupamentos polares no anel **A** que são o ácido carboxílico e o OH livre mantendo a ligação dupla em C12-C13 intacta. Para a síntese de derivados ainda mais polares, outra rota com modificação na ligação dupla levou ao derivado de **7** hidroxilado em C12. Ozonólise do composto **2** levou a formação do 12 α ,13 β -diidroxido derivado o qual imediatamente cicliza formando a lactona **8**. Este por sua vez, foi convertido ao composto **10** via oxidação de Baeyer-Villiger conforme já descrito.

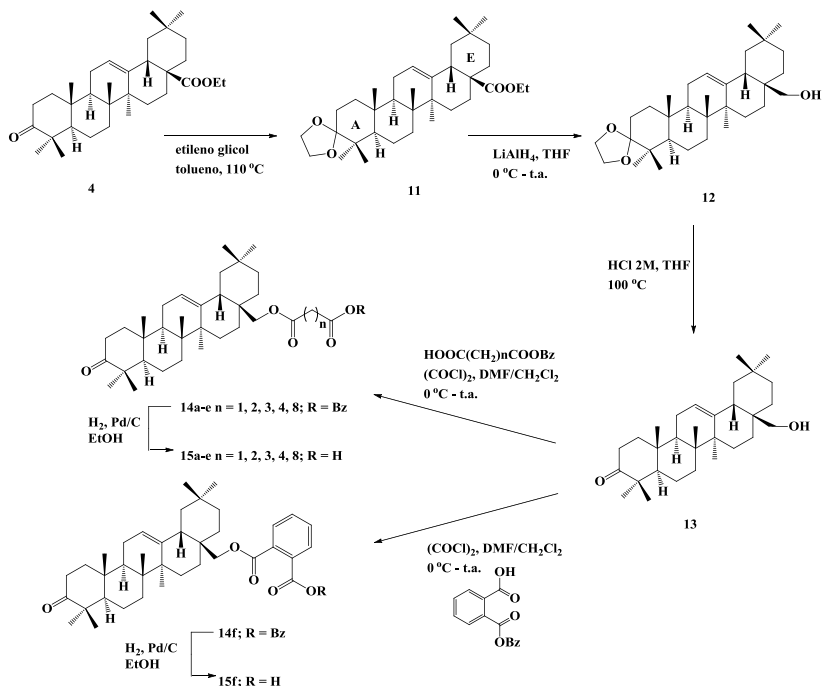
Capítulo 1 - Introdução



Esquema 1.1

Após a síntese dos derivados **6**, **7**, **9**, **10** e outros com modificação estrutural no anel **A**, e a fraca inibição da **PTB1B**, os autores perceberam que a integridade do anel **A** e da ligação dupla em C12-C13, poderia ser importante para a interação com a proteína receptora. Desta forma, os grupos polares que seriam importantes para a expressão da atividade biológica foram inseridos de outra forma (esquema 1.2). O grupo cetona do derivado **4** foi protegido na forma de acetal com etileno glicol seguida de redução do grupo ester com LiAlH_4 levando ao álcool primário **12**. Hidrólise do grupo protetor através de aquecimento em meio ácido, restaurando o grupo cetona, e esterificação utilizando cloreto de oxalila e os respectivos ácidos dicarboxílicos monoprotetidos com um grupo benzil levaram a formação dos derivados **14a-f**. Remoção do grupo benzil via hidrogenação catalítica formou os compostos **15a-f**.

Capítulo 1 - Introdução



Esquema 1.2

Como esperado, a inserção de grupos polares mantendo a integridade do anel **A** e da ligação dupla em C12-C13 melhoraram a inibição da **PTB1B**. Uma tendência importante na porcentagem de inibição da enzima foi observada para os derivados **14a-e** onde quanto menor o **n**, mais ativo foi o derivado. Isso poderia estar indicando que a distancia do grupo ácido terminal e o esqueleto do triterpeno é importante para a interação com a proteína. O derivado **15f** também exibiu uma alta porcentagem de inibição da **PTB1B**, e com CI_{50} de 3,12 μ M foi utilizado como modelo para os estudos de *docking*. As interações responsáveis pela estabilização do complexo e pelo reconhecimento do substrato, entre **15f** e a proteína, são principalmente as ligações hidrogênio formadas entre o grupo ácido carboxílico do triterpeno e os grupos OH livre de um resíduo de tirosina e grupo amino de um resíduo da lisina presentes na proteína. As interações apolares

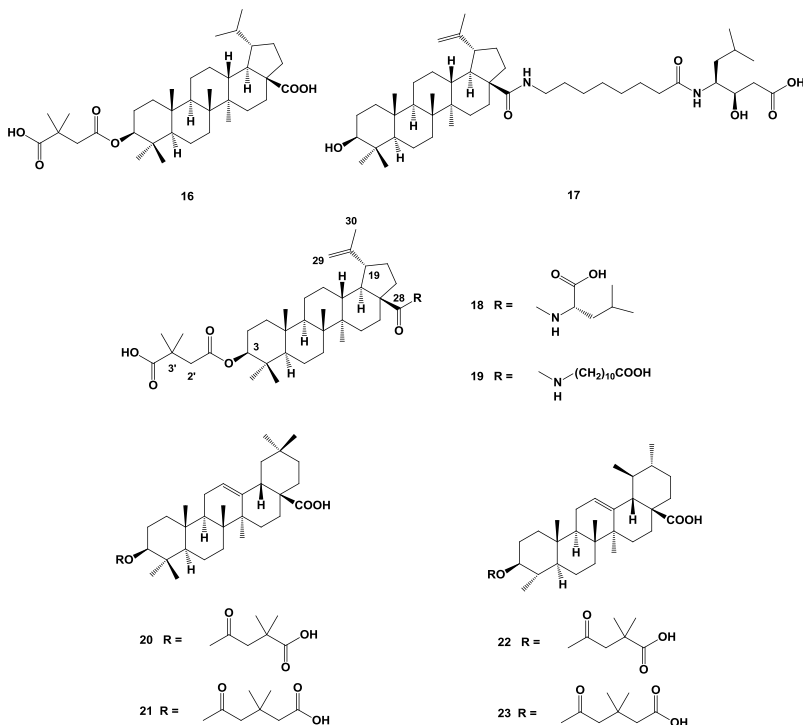
Capítulo 1 - Introdução

também assumem um papel importante e se mostraram críticas para a expressão da atividade biológica.

Em trabalhos previamente publicados,^{46,47,48,49,50,51} os autores relataram o isolamento e síntese de uma série de derivados dos triterpenos ácido betulínico, ácido oleanólico e ácido ursólico. Entre os compostos sintetizados, duas classes de derivados exibiram significativa atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (esquema 1.3). Em uma delas, os compostos foram 3-*O*-acilados com diferentes ácidos glutáricos e succínicos e na outra, o grupo ácido carboxílico foi substituído por amidas advindas de diferentes aminoácidos. Com base nestes resultados e visando a preparação de compostos ainda mais ativos, em 2006⁵² os autores descreveram o planejamento de novos derivados a partir de outros esqueletos de triterpenos, os quais possuem pequenas diferenças no arranjo dos anéis. A idéia é que a troca do esqueleto base pudesse potencializar o efeito antiviral, diminuir os efeitos citotóxicos, melhorar o perfil farmacológico e ainda obter mais informações sobre a relação estrutura-atividade. Neste contexto, para a discussão da relação estrutura-atividade, foram incluídos na série: os derivados do lupeol, que apesar de possuir o esqueleto igual ao do ácido betulínico, não contém o grupo ácido carboxílico; os ácidos ursólico e oleanólico por possuírem somente anel de seis membros ao invés do *anel-E* de cinco membros; o ácido moronico por possuir a ligação dupla em posição diferente do que o ácido oleanólico; e o ácido glicirretínico por possuir o grupo ácido carboxílico em C30 ao invés de C28 como nos outros triterpenos.

Desta forma os novos derivados (esquema 1.4) foram 3-*O*-acilados utilizando o anidrido 2,2-dimetilsuccínico e DMAP em piridina. As amidas foram sintetizadas após preparação do cloreto de ácido do triterpeno com cloreto de oxalila seguida de reação com os respectivos aminoácidos. Quando da presença do grupo hidroxila livre em C3, houve necessidade de acetilação seguida de reação para a formação da amida no ácido carboxílico, subsequente hidrólise do grupo acetil com KOH 2M a temperatura ambiente para, enfim, realizar a 3-*O*-acilação com o anidrido 2,2-dimetilsuccínico. Quando o grupo em C3 estava na forma ceto, foi reduzido utilizando NaBH₄ em MeOH a temperatura ambiente.

Capítulo 1 - Introdução

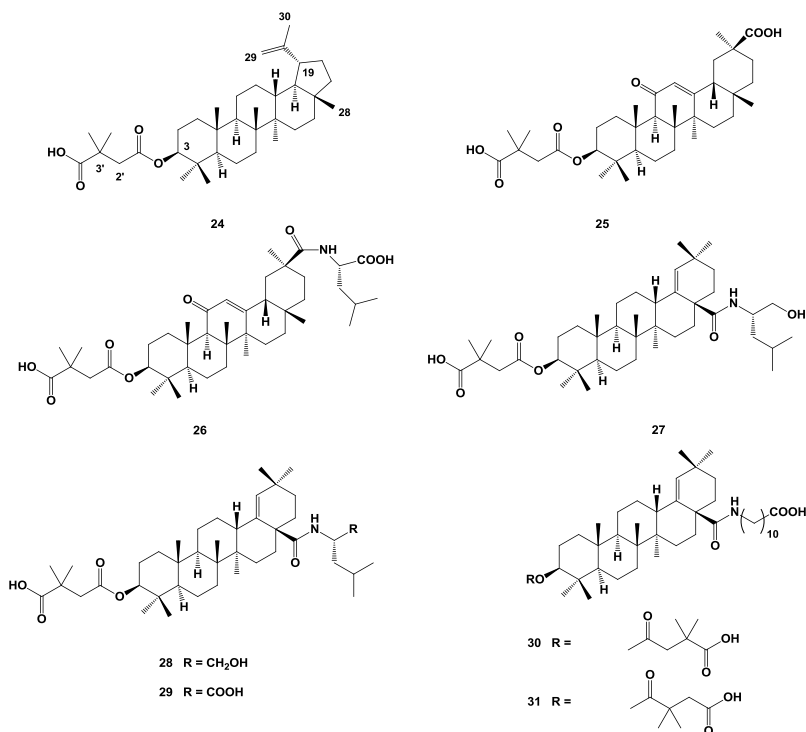


Esquema 1.3

Os novos derivados foram submetidos aos testes para a avaliação da atividade antiviral e estes resultados permitiram uma discussão da relação estrutura-atividade. Os compostos 3-*O*-acilados com anidrido 2,2-dimetilsuccínico foram mais ativos que os 3-*O*-acilados com o anidrido 3,3-dimetilglutárico confirmando a importância da cadeia lateral derivada do ácido succínico. Outro ponto importante foi a presença do grupo ácido carboxílico em C17, seja na sua forma livre ou na forma de amida, evidenciado pelo inferior efeito biológico encontrado para os derivados **24**, **25** e **26** em relação aos outros derivados. A explicação encontrada para este efeito é que a orientação do grupo carboxi para os triterpenos que o possuem em C28 é a oposta dos que possuem o grupo carboxi em C30. Isso limita a interação do composto com o receptor diminuindo assim a atividade biológica. No

Capítulo 1 - Introdução

entanto, a característica chave na estrutura dos triterpenos para expressar um alto nível de atividade antiviral, é a dupla substituição em C3 e em C28.

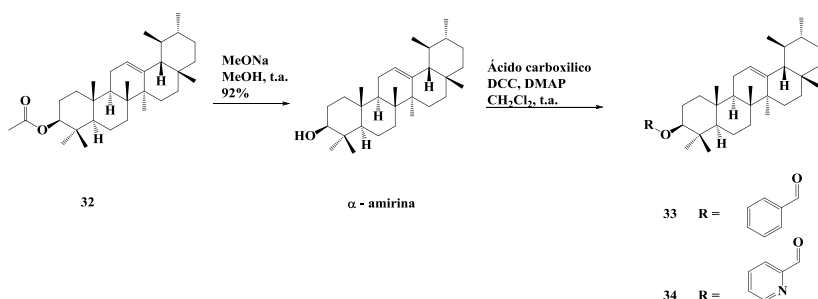


Esquema 1.4

Em relação aos triterpenos α e β -amirina, Narender e colaboradores (2009)⁵³ relataram o efeito antihiperlipidêmico de derivados do triterpene α -amirina. O composto isolado de *Ficus racemosa* foi o acetato de α -amirina que foi hidrolisado para a preparação de ésteres. Os derivados foram preparados através de acilação de α -amirina com os respectivos anidridos de ácidos carboxílicos utilizando DMAP em diclorometano. A síntese a partir dos ácidos carboxílicos foi conduzida com DCC e DMAP também em diclorometano. Entre os compostos sintetizados, poucos exibiram efeito

Capítulo 1 - Introdução

antihiperlglicêmico promissor. Os compostos mais ativos foram os ésteres **32**, **33** e **34** (esquema 1.5). Os autores relataram que o efeito retirador de elétrons dos grupos presentes no anel aromático em **33** e **34** é importante para o efeito biológico já que com grupos doadores de elétrons, o efeito antihiperlglicêmico foi inferior.



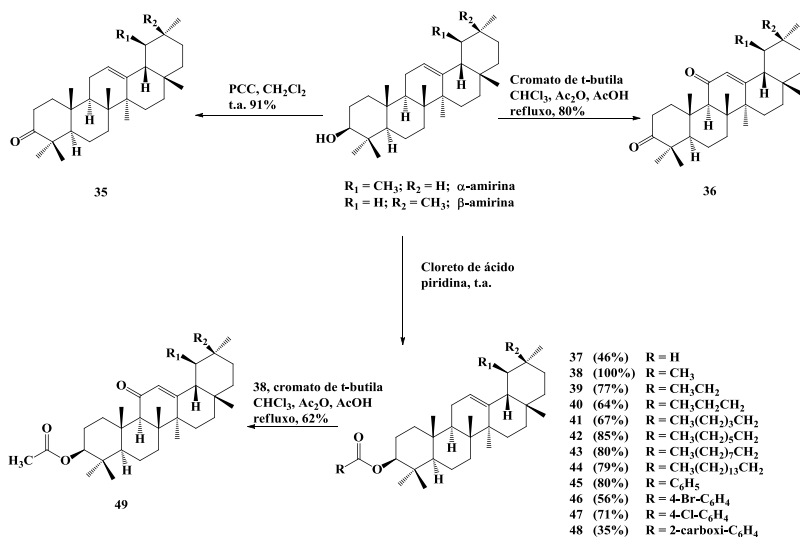
Esquema 1.5

Em trabalho previamente publicado pelo nosso grupo de pesquisa, relatamos a síntese de derivados dos triterpenos α e β -amirina. O nosso material de partida foi uma mistura de α e β -amirina na proporção 1:2 extraída da resina da planta *Protium heptaphyllum*.⁹ Quinze derivados foram sintetizados (esquema 1.6).⁵⁴ Os ésteres foram preparados a partir da mistura de α e β -amirina utilizando os cloretos de ácidos apropriados em piridina. A oxidação em C3 foi conduzida com PCC em CH₂Cl₂ e em C12 com cromato de *t*-butila. Os produtos foram caracterizados através de ressonância magnética nuclear de ¹H e a proporção de α e β foi determinada via cromatografia gasosa. Em todos os casos esta proporção se manteve a mesma em relação ao material de partida.

Os compostos foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antinociceptiva no modelo de dor induzida pelo ácido acético. No modelo farmacológico utilizado, todos os compostos testados exibiram atividade antinociceptiva superior ao fármaco comercialmente disponível aspirina embora a maioria deles foi inferior à mistura α e β -amirina. Os derivados propanoato de α e β -amirina **39**, hexanoato de α e β -amirina **41** e octanoato de α e β -amirina **42** exibiram significativa inibição das constrições abdominais e foram mais efetivos

Capítulo 1 - Introdução

que a morfina neste modelo de dor. O derivado octanoato de α e β -amirina **42** foi o mais ativo exibindo efeito 418 vezes maior que a morfina no modelo de dor testado. Em razão destes resultados, o efeito antinociceptivo do composto octanoato de α e β -amirina foi avaliado utilizando outros modelos. No modelo de resposta nociceptiva induzida pela formalina, o derivado **42** reduziu o comportamento de dor do animal na fase inflamatória do teste, porém não reduziu a resposta na fase neurogênica do teste. A administração por via oral também reduziu significativamente as contrações abdominais causadas pela injeção de ácido acético, mas ainda assim não foi mais eficiente que a resposta causada pela administração intraperitoneal. O forte efeito antinociceptivo exibido pelo derivado **42** em relação aos outros compostos sugere que a cadeia linear do ester seja de um tamanho ideal para a interação com uma bolsa lipofílica situada no receptor, como demonstrado pelo perfil clássico da correlação entre a atividade farmacológica e a propriedade físico-química $\log P$. No entanto, outros estudos são necessários para caracterizar o mecanismo de ação farmacológica deste derivado.



Esquema 1.6

Capítulo 1 - Introdução

Os compostos foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antinociceptiva no modelo de dor induzida pelo ácido acético. No modelo farmacológico utilizado, todos os compostos testados exibiram atividade antinociceptiva superior ao fármaco comercialmente disponível aspirina embora a maioria deles foi inferior à mistura α e β -amirina. Os derivados propanoato de α e β -amirina **39**, hexanoato de α e β -amirina **41** e octanoato de α e β -amirina **42** exibiram significativa inibição das contrações abdominais e foram mais efetivos que a morfina neste modelo de dor. O derivado octanoato de α e β -amirina **42** foi o mais ativo exibindo efeito 418 vezes maior que a morfina no modelo de dor testado. Em razão destes resultados, o efeito antinociceptivo do composto octanoato de α e β -amirina foi avaliado utilizando outros modelos. No modelo de resposta nociceptiva induzida pela formalina, o derivado **42** reduziu o comportamento de dor do animal na fase inflamatória do teste, porém não reduziu a resposta na fase neurogênica do teste. A administração por via oral também reduziu significativamente as contrações abdominais causadas pela injeção de ácido acético, mas ainda assim não foi mais eficiente que a resposta causada pela administração intraperitoneal. O forte efeito antinociceptivo exibido pelo derivado **42** em relação aos outros compostos sugere que a cadeia linear do ester seja de um tamanho ideal para a interação com uma bolsa lipofílica situada no receptor, como demonstrado pelo perfil clássico da correlação entre a atividade farmacológica e a propriedade físico-química $\log P$. No entanto, outros estudos são necessários para caracterizar o mecanismo de ação farmacológica deste derivado.

Em outro trabalho,⁸ foram descritos os resultados obtidos quando os compostos foram avaliados quanto a sua atividade antifúngica. A concentração inibitória mínima dos compostos foi determinada contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Dos compostos testados, os derivados formiato de α e β -amirina **37**, acetato de α e β -amirina **38** e decanoato de α e β -amirina **43**, inibiram todas as espécies de *Candida* testadas, em concentrações que vão de 66 a 862 nmol mL⁻¹. O derivado formiato de α e β -amirina **37** exibiu o melhor resultado para atividade antifúngica contra *C. albicans* o que levou a testar a sua capacidade de inibir a adesão desta espécie de *Candida* em células epiteliais bucal humanas. O derivado **37** inibiu a adesão de *C. albicans* nas células epiteliais bucal em 65,3%. Este resultado é comparado ao

Capítulo 1 - Introdução

fármaco fluconazol, que há muito tempo já está disponível comercialmente para o tratamento da candidíase oral, que apresentou porcentagem de inibição de 63,5%. A anfotericina B que também é um fármaco muito utilizado como antifúngico inibiu a adesão de *C. albicans* em 93,4%. Estes resultados obtidos com espécies oportunistas de *Candida* são interessantes, porque o fluconazol e a anfotericina B são amplamente usados na terapia de infecções por *Candida*. Contudo, *C. krusei* e *C. glabrata* tem uma alta propensão a desenvolver resistência a anfotericina B.⁵⁵

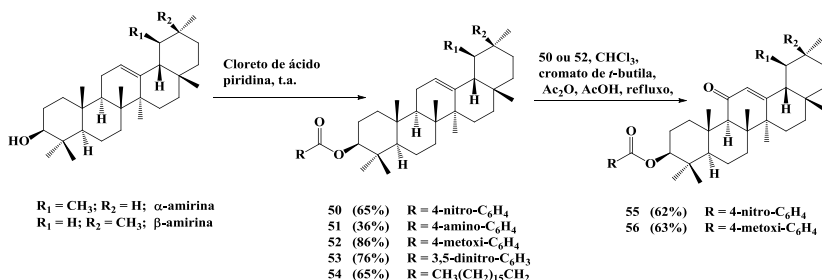
1.2. Objetivos

Em virtude dos resultados já obtidos para os derivados sintéticos da mistura de triterpenos α e β -amirina, os objetivos desta parte do trabalho são:

- Avaliar a atividade antileishmania contra *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliar a atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais.
- Avaliar o estudo do mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina (42) e buscar uma relação estrutura-atividade.

1.3. Resultados e discussão

Continuando os estudos com os derivados sintéticos da mistura de triterpenos α e β -amirina, os compostos foram submetidos aos ensaios para ampliar o leque de atividade biológica destes triterpenos. Além disso, foram determinados alguns parâmetros estruturais visando os estudos de relação estrutura-atividade. Nesta etapa do trabalho foi avaliada a atividade antileishmania, citotóxica e ainda a atividade antinociceptiva visando caracterizar o mecanismo de ação farmacológica. Dado a importância da presença destes grupos inseridos na estrutura de α e β -amirina, para os testes de atividade antileishmania e citotóxica, preparou-se mais sete compostos. Escolheram-se os derivados visando alterar os parâmetros eletrônicos e estéricos para um estudo da relação entre a estrutura dos compostos e o efeito biológico. A acilação do OH livre em C3 foi conduzida conforme metodologia previamente publicada por Mallavadhani e colaboradores (2004)⁵⁶ utilizando o respectivo ácido carboxílico, DCC e DMAP em diclorometano ou a partir dos respectivos cloretos de ácido em piridina. A oxidação alílica em C11 foi realizada conforme metodologia já publicada pelo nosso grupo⁵⁴ utilizando cromato de *t*-butila como agente oxidante, Ac₂O e AcOH em CHCl₃ (esquema 1.7).



Esquema 1.7

Capítulo 1 – Resultados e discussão

Apesar do esqueleto triterpenico ser de alta complexidade, possui poucos e bem característicos grupos funcionais que podem ser modificados o que facilita a caracterização dos produtos. Desta forma, caracterizaram-se os derivados através da análise dos espectros na região do infravermelho e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A principal mudança nos espectros de IV dos produtos é o aparecimento de bandas referentes às carbonilas de éster, cetona ou ambas, quando presentes, na região entre 1715 e 1740 cm^{-1} e o desaparecimento da banda referente ao estiramento OH na região entre 3200 e 3400 cm^{-1} . No espectro de RMN de ^1H dos produtos, observa-se principalmente o deslocamento do sinal atribuído ao H3 de ~3,20 ppm, observado no RMN de ^1H do material de partida, para ~4,5 ppm no acil derivado. Quando o carbono alílico C11 é oxidado levando a formação da cetona, a multiplicidade do sinal atribuído ao H12 muda de duplo duplete para singleto. Lembrando que o hidrogênio H12 da α -amirina é diferente do H12 da β -amirina aparecendo assim sempre dois sinais na região de 5,25 ppm.

Todos os derivados foram submetidos aos ensaios biológicos para avaliar a atividade antileishmania e citotóxica.

1.3.1. Atividade antileishmania

As leishmanioses são enfermidades provocadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidas através de mosquitos conhecidos como flebótomos. Dependendo da espécie do parasita, a leishmaniose pode produzir manifestações cutâneas, mucocutâneas e viscerais as quais podem ser fatais quando não tratadas.

Hoje, ainda não existe uma vacina contra leishmania. Além disso, houve um aumento na resistência aos fármacos existentes como anfotericina B e sais de antimônio pentavalente os quais exibem vários efeitos colaterais.⁵⁷ Em virtude da alta toxicidade associada aos fármacos já existentes, grandes esforços tem sido feitos em busca de novos compostos que possam agir como quimioterápicos no tratamento das leishmanioses.⁵⁸ É neste contexto que inserimos estes triterpenos os quais tem exibido interessantes propriedades farmacológicas incluindo atividade antileishmania.^{59,60}

Avaliou-se o efeito biológico, através de uma triagem inicial, de 21 derivados, mais a mistura de α e β -amirina, contra a forma amastigota de *Leishmania amazonensis* (cepa IFLA/BR/196/PH-8).⁶¹ Entre os compostos testados, 17 mostraram algum efeito tóxico contra

Leishmania amazonensis, sendo que os derivados hexanoato de α e β -amirina **41**, 3-oxo- α e β -amirina **35** e 3,11-dioxo- α e β -amirina **36** inibiram o crescimento dos parasitas entre 86 e 97% (figura 3).

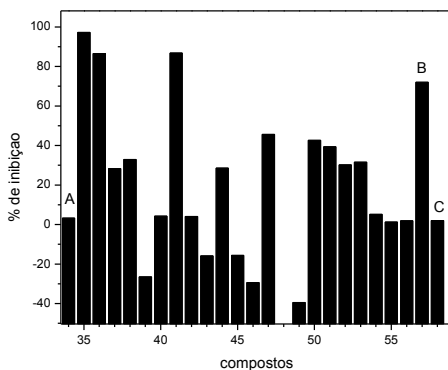


Figura 3 – Triagem da atividade antileishmaniana dos derivados de α e β -amirina contra *Leishmania amazonensis*. A) mistura de α e β -amirina. B) Anfotericina B. C) DMSO. Composto 48 não foi testado.

Embora estes resultados sejam apenas uma triagem inicial, os dados já nos permitem fazer algumas projeções referentes à relação estrutura-atividade. Os derivados **37 – 44** e **54** foram preparados visando avaliar o quanto uma mudança na lipofilicidade dos derivados pode afetar a potência do efeito biológico. Quanto maior a cadeia alquílica, mais lipofílico será o derivado. Surpreendentemente, entre os compostos testados, apenas o derivado hexanoato de α e β -amirina **41** exibiu efeito leishmanicida superior ao controle anfotericina B. Além disso, nenhuma tendência foi observada quando os resultados foram confrontados com o aumento da lipofilicidade sendo que alguns derivados como o propanoato de α e β -amirina e o decanoato de α e β -amirina estimularam o crescimento dos parasitas. Estes resultados podem indicar, como no caso da atividade antinociceptiva, um importante efeito hidrofóbico o qual implica que a estrutura deste derivado possui um equilíbrio apropriado entre a lipofobissidade e a lipossolubilidade. Os derivados benzoilados **45 – 47**, **50 – 53** e **55 - 56** foram preparados

Capítulo 1 – Resultados e discussão

visando avaliar os efeitos eletrônicos e estéricos na atividade leishmanicida. No entanto, novamente nenhuma tendência foi observada. Os derivados oxidados **35** e **36** foram os que, surpreendentemente exibiram a maior porcentagem de inibição do crescimento de *Leishmania amazonensis*.

A concentração efetiva para matar 50% dos parasitas (CE_{50}) foi determinada para os derivados mais ativos. Os três compostos testados exibiram atividade antileishmania. Os derivados **41** e **35** exibiram efeito aproximadamente 5 vezes mais potente que o fármaco utilizado como controle anfotericina B (tabela 1).

Tabela 1 - Concentração efetiva (CE_{50}) dos compostos mais ativos contra *Leishmania amazonensis*

| Compostos | Atividade Leishmanicida (μM) |
|----------------|-------------------------------------|
| 35 | 0,5 ($\pm 0,0$) |
| 36 | 44,3 ($\pm 17,1$) |
| 41 | 0,4 ($\pm 0,0$) |
| Anfotericina B | 2,2 |

1.3.2. Atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais

Em trabalho previamente publicado,⁶² relatamos a atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina*. O ensaio é de baixo custo e de fácil manuseio, não requerendo equipamentos especiais ou técnicas assépticas. Na ocasião, este ensaio foi utilizado como um triagem inicial para determinar a citotoxicidade dos 15 derivados de α e β -amirina sintetizados até aquele momento. Todos os derivados exibiram atividade citotóxica. No entanto a dose letal necessária para levar à morte 50 % (DI_{50}) das larvas não foi inferior ao controle utilizado $K_2Cr_2O_7$, sendo assim todos os derivados menos tóxicos que o controle. Apesar disso, essa suposta toxicidade dos derivados de α e β -amirina preocupa devido ao fato de vários compostos serem promissores candidatos a fármacos com efeito analgésico e antifúngico. Neste sentido, visando avaliar a atividade antitumoral, os derivados foram submetidos a ensaios contra linhagens de células tumorais humanas.

Capítulo 1 – Resultados e discussão

A atividade antitumoral de uma grande variedade de triterpenos já foi descrita,^{63,64,65,66,67,68,69} mas o que nos chamou a atenção foi a atividade relatada para o derivado 3-oxo do ácido oleanólico,⁷⁰ pela semelhança com os derivados de α e β -amirina. Desta forma, avaliou-se a capacidade dos compostos em inibir o crescimento das células tumorais de melanoma (UACC62), mama (MCF-7) e renal (TK-10).

O efeito antitumoral dos derivados de α e β -amirina foram determinados de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) utilizando o ensaio colorimétrico da sulfarodamina B em uma placa com 96 poços.⁷¹ A partir do triagem inicial, observou-se que a maioria dos compostos exibiu fraca atividade citotóxica frente às três células tumorais. Apenas os derivados 3-oxo- α e β -amirina **35** e 3,11-dioxo- α e β -amirina **36** exibiram significativo efeito citotóxico para todas as linhagens de células tumorais testadas. Então, determinou-se a concentração inibitória a 50% (CI₅₀) destes derivados mais ativos (tabela 2). Os derivados testados se mostraram ativos mas não tão potentes quanto os controles altamente tóxicos utilizados.

Tabela 2 - Atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais humanas

| Compostos | MCF-7 (μ M) | TK-10 (μ M) | UACC-62 (μ M) |
|------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 35 | 30,4 (\pm 4,3) | 47,1 (\pm 1,5) | 32,7(\pm 8,2) |
| 36 | 15,0 (\pm 3,2) | 44,1 (\pm 12,2) | nt |
| Etoposídeo | 0,03 | 0,40 | 1,40 |

nt = não testado

1.3.3. Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina 42

Em trabalho previamente publicado⁷², foi descrito ensaios visando entender o mecanismo de ação antinociceptiva da mistura de triterpenos α e β -amirina. Os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo de α e β -amirina possivelmente envolve o receptor vaniloide (TRPV1) ativando os canais de potássio e o receptor opióide bloqueando a entrega da substancia P. Quando pequenas modificações foram feitas na estrutura de α e β -amirina, observou-se um aumento significativo no efeito antinociceptivo, no modelo de dor induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético, para a maioria dos derivados, principalmente para o butanoato de α e β -amirina 40, hexanoato de α e β -amirina 41 e octanoato de α e β -amirina 42.⁵⁴ Destaque para o

Capítulo 1 – Resultados e discussão

derivado 42 o qual exibiu efeito antinociceptivo 418 vezes maior que a morfina no modelo de dor induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético. Agora, os esforços estão direcionados para entender o mecanismo de ação antinociceptiva deste derivado.

Uma série de ensaios farmacológicos foi realizada com o objetivo de caracterizar o mecanismo de ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina 42. De forma breve, estes ensaios normalmente consistem em administrar um agonista que induz a dor pela interação com um determinado receptor. Em seguida, é administrado o triterpeno ou um antagonista do mesmo receptor. No caso de uma inibição da dor induzida pelo agonista, indica que o composto teste possivelmente estaria interagindo com o mesmo receptor.

O presente estudo demonstrou que:

- (1) a administração do octanoato de α e β -amirina pela via intraperitoneal produziu efeito antinociceptivo marcante e dependente da dose nos modelos de nocicepção induzida pela capsaicina e glutamato administrados na pata de camundongos;
- (2) a administração sistêmica do octanoato de α e β -amirina reduziu a nocicepção induzida pela administração intratecal de glutamato, SP e capsaicina;
- (3) a administração intraplantar do octanoato de α e β -amirina ou de capsazepina reduziu a nocicepção pela administração intraplantar de capsaicina;

Dessa forma, foi investigado se a antinocicepção produzida pelo octanoato de α e β -amirina envolve a modulação dos receptores TRPV1 (receptor de potencial transiente vanilóide 1). Os receptores TRPV1 são encontrados tanto no sistema nervoso central, quanto no sistema nervoso periférico, e são envolvidos na transmissão, integração e modulação da sensação dolorosa. São ativados por uma variedade de compostos incluindo a capsaicina. A administração de capsazepina, um antagonista dos receptores TRPV1, assim como o octanoato de α e β -amirina provocaram antinocicepção indicando o envolvimento destes receptores.

- (4) o mecanismo pelo qual o octanoato de α e β -amirina causa o efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético parece não envolver a ação da proteína Gi/0 sensível a

Capítulo 1 – Resultados e discussão

toxina pertussis, nem dos sistemas, opióide serotoninérgico, α 2-adrenérgico e colinérgico;

O pré-tratamento dos animais com toxina pertussis, em dose capaz de inibir a proteína Gi/o e reverter parcialmente o efeito antinociceptivo da morfina, não foi capaz de alterar o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina no modelo do ácido acético em camundongos.

O efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, ao contrário da morfina, não foi revertido pela administração prévia do antagonista opióide não-seletivo, naloxona.

Os receptores α 2-adrenérgicos parecem não estar relacionados com o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina no modelo do ácido acético, uma vez que o pré-tratamento dos animais com ioimbina, um antagonista dos receptores α 2-adrenérgicos, não interferiu com o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, na dose em que reverteu o efeito antinociceptivo da clonidina.

O sistema colinérgico parece não estar envolvido com a ação antinociceptiva do octanoato de α e β -amirina, uma vez que a mecamilamina (antagonista seletivo dos receptores nicotínicos) e a atropina (antagonista seletivo dos receptores muscarínicos) não alteraram o efeito antinociceptivo do octanoato de α e β -amirina, nas doses que reverteram o efeito antinociceptivo dos agonistas específicos.

(6) a administração intraperitoneal do octanoato de α e β -amirina reduziu de maneira dependente da dose a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela bradicinina e pelo miristato de acetilforbol em ratos;

O fato que o octanoato de α e β -amirina exibiu efeito anti-hiperalgésico, tanto térmico quanto mecânico, somente em relação à bradicinina e ao miristato de acetilforbol pode explicar, ao menos parcialmente, a habilidade deste composto em interagir com a via da proteína quinase C. Esta sugestão é reforçada, pelo fato que a nocicepção causada pelo carragenina, formalina e ácido acético são sensíveis à inibidores da proteína quinase A e/ou da proteína quinase C.

(7) a administração do octanoato de α e β -amirina pela via intraperitoneal reduziu a nocicepção provocada pela injeção intraplantar de miristato de acetilforbol, mas não alterou a ativação da proteína quinase C;

Foi mostrado neste trabalho que a administração de miristato de acetilforbol na pata de animais provoca grande ativação da proteína

Capítulo 1 – Resultados e discussão

quinase C, observado pela sua translocação do citosol para a membrana celular. Além disso, o miristato de acetilforbol também provocou pronunciado efeito nociceptivo.^{73,74} O octanoato de α e β -amirina foi capaz de reduzir de forma significativa e dependente da dose a nocicepção gerada pelo miristato de acetilforbol, reforçando a sugestão de modulação entre o octanoato de α e β -amirina e a proteína quinase C.

No entanto, observou-se que o octanoato de α e β -amirina não causou diminuição na translocação da proteína quinase C (ϵ) do citosol para a membrana, o que descarta a possibilidade do composto estar reduzindo a nocicepção gerada pelo miristato de acetilforbol por inibição direta do subtipo de proteína quinase C avaliado. Um dos caminhos que a proteína quinase C (ϵ) modula a nocicepção é pela ativação dos receptores TRPV1. De fato, o efeito nociceptivo provocado pelo miristato de acetilforbol parece ser em grande parte gerado pela sensibilização dos receptores TRPV1.⁷⁵ Além disso, inibidores específicos para a proteína quinase C também reduzem a nocicepção gerada pelo miristato de acetilforbol.⁷³ Embora, o octanoato de α e β -amirina não tenha interferido especificamente com a ativação da proteína quinase C (ϵ), ele pode estar modulando outras proteínas quinases, como a proteína quinase C (γ) importante para a sensibilização do TRPV1 e do ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) ou outros membros da família da proteína quinase C.

Em resumo, o octanoato de α e β -amirina exerce efeito antinociceptivo rápido e de longa duração, bem como tem um perfil de resposta diretamente relacionado à dose, quando avaliados em modelos de nocicepção química em camundongos (ácido acético, capsaicina, glutamato e SP), bem como pronunciado efeito antihiperálgico (térmico e mecânico) em ratos. Interessantemente, o octanoato de α e β -amirina apresentou atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata e pleurisia induzidas pela carragenina, reduzindo a migração celular e a liberação de IL-1 β (interleucina-1 β). O mecanismo de ação para esses efeitos ainda não está totalmente elucidado, necessitando de mais estudos, contudo, o efeito parece não estar relacionado com a proteína Gi/o sensível a toxina pertussis, mecanismos opióides, serotoninérgicos, α 2-adrenérgicos e colinérgicos, mas envolve, porém, ao menos em parte, uma interação com as fibras sensíveis a capsaicina sem interferir diretamente com a proteína quinase C (ϵ).

1.4. Conclusão

Nesta parte do trabalho foram preparados mais 7 derivados dos triterpenos α e β -amirina. Foram obtidos principalmente derivados benzoilados com grupos substituintes fortemente retiradores de elétrons e fortemente doadores de elétrons para avaliar os parâmetros eletrônicos na expressão do efeito biológico. Os derivados foram preparados a partir dos respectivos cloretos de ácido e os rendimentos ficaram entre 36 e 72%.

A atividade leishmanicida e citotóxica destes 7 derivados mais os 15 derivados preparados previamente foi avaliada. Os derivados hexanoato de α e β -amirina (**41**), 3-oxo- α e β -amirina (**35**) e 3,11-dioxo- α e β -amirina (**36**) exibiram significativa atividade leishmanicida sendo que os derivados **35** e **41** foram mais potentes que anfotericina B. Os derivados 3-oxo- α e β -amirina (**35**) e 3,11-dioxo- α e β -amirina (**36**) exibiram significativo efeito citotóxico para todas as linhagens de células tumorais testadas com valores semelhantes aos controles utilizados etoposídeo e colchicina.

Em relação ao mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de α e β -amirina, o efeito antinociceptivo parece não estar relacionado com a proteína Gi/o sensível a toxina pertussis, mecanismos opióides, serotoninérgicos, α 2-adrenérgicos e colinérgicos, mas envolve, porém, ao menos em parte, uma interação com as fibras sensíveis a capsaicina sem interferir diretamente com a proteína quinase C (ϵ).

1.5. Parte experimental

A mistura de α e β -amirina, na proporção 1:2, foi obtida do breu branco (resina de *Protium Heptaphyllum*) com 41% de rendimento, e caracterizada conforme procedimentos descritos por Susunaga e colaboradores (2001).⁹ Os derivados de α e β -amirina **35** – **49** foram preparados conforme previamente relatado por Soldi e colaboradores (2008).⁷ Os ensaios farmacológicos visando entender o mecanismo de ação farmacológica do derivado octanoato de α e β -amirina **42** foram realizados conforme métodos descritos por Marcon e colaboradores (2009).⁷⁶

1.5.1. Materiais e métodos

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelho Bruker AC200 a 200 MHz para hidrogênio (RMN de ^1H) e 50 MHz para carbono-13 (RMN de ^{13}C) e em espectrômetro Varian Mercury Plus a 400 MHz para hidrogênio (RMN de ^1H) e a 100 MHz para carbono (RMN de ^{13}C).

Para o fracionamento cromatográfico em coluna foi utilizado sílica gel de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) da Merck. Para cromatografia em camada fina (ccf) foram utilizadas placas Alugram Sil G/UV₂₅₄ com 0,20 mm de espessura da Macherey-Nagel. Os compostos nas placas cromatográficas foram visualizados sob lâmpada de ultravioleta a 254 nm e por imersão das placas em anisaldeído sulfúrico e/ou solução de sulfato de cério 2N em ácido sulfúrico seguido de aquecimento da placa.

Os solventes utilizados para separações cromatográficas em coluna de sílica gel, em camada delgada e partição líquido/líquido não passaram por processos de purificação. Os solventes utilizados como meio de reações foram tratados quando necessário.

1.5.2. Procedimento geral para a preparação dos derivados 50, 53 e 54

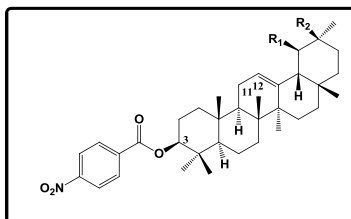
Os derivados de α e β -amirina **50**, **53** e **54** foram preparados conforme metodologia descrita por Mallavadhani e colaboradores (2004).⁵⁶ A uma solução de α e β -amirina (1,0 eq.) em CH_2Cl_2 foram adicionados o ácido carboxílico apropriado (2,0 eq.), a N,N' -diciclohexilcarbodiimida (DCC, 5,0 eq.) e a 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 5,0 eq.). O sistema foi mantido sob agitação, à temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^\circ\text{C}$), durante a noite (~ 18 hrs). A mistura reacional foi filtrada, o solvente foi evaporado sobre pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2) utilizando a mistura hexano: AcOEt (95:5 v:v) como eluente.

4-nitrobenzoato de α e β -amirina (50)

Obtido na forma de um sólido branco com rendimento de 65%. R_f : 0,65 (SiO_2 , hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1715 (C=O).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico do substrato), 4,21 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 8,20 (d, $J = 8,8$ Hz), 8,29 (d, $J = 8,8$ Hz).

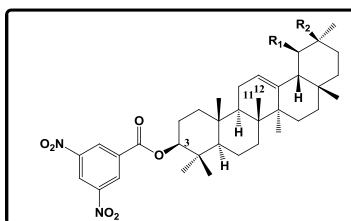


3,5-dinitrobenzoato de α e β -amirina (53)

Obtido na forma de um sólido branco com rendimento de 76%. R_f : 0,44 (SiO_2 , hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1725 (C=O).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico do substrato), 4,86 (m, H-3), 5,15 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 9,14 (singleto largo, 2H), 9,23 (singleto largo,).



octadecanoato de α e β -amirina (54)

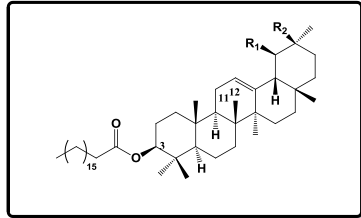
Obtido na forma de um sólido branco com 65% de rendimento. R_f : 0,73 (SiO₂, hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1715 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil

característico do substrato), 4,21 (m, H-3), 5,13 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,18 (m, H-12 do derivado de α -amirina).



1.5.3. Procedimento geral para a preparação dos derivados 51 e 52

Os compostos **51** e **52** foram preparados utilizando o procedimento descrito por Soldi e col. (2008).⁵⁴ Uma quantidade apropriada da mistura α e β -amirina foi dissolvida em piridina anidra e esta solução foi tratada com um excesso do cloreto de 4-amino ou 4-metoxibenzoila. O sistema reacional foi mantido sob refluxo até o substrato ser totalmente consumido. A formação dos produtos foi monitorada por cromatografia em camada fina (SiO₂) utilizando a mistura Hexano: AcOEt (90:10) como eluente. Então, uma solução aquosa com ácido clorídrico a pH \pm 2 foi adicionada. O produto bruto foi extraído com clorofórmio, lavado com solução saturada de NaHCO₃, seco sob Na₂SO₄ anidro e purificado usando cromatografia em coluna (SiO₂). O sistema de solvente utilizado como eluente foi a mistura Hexano: AcOEt (95:5 v:v) fornecendo os derivados benzoilados de α e β -amirina.

4-amino benzoato de α e β -amirina (51)

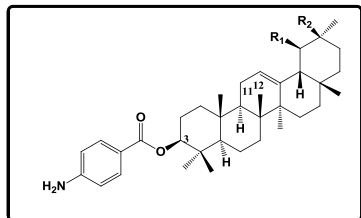
Obtido na forma de um sólido branco com rendimento de 36%. R_f : 0,28 (SiO₂, hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1722 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil

característico do substrato), 4,79 (m, H-3), 5,14 (m, H-12 do derivado de



Capítulo 1 – Parte experimental

β -amirina), 5,20 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 8,20 (d, $J = 7,6$ Hz), 8,29 (d, $J = 7,6$ Hz).

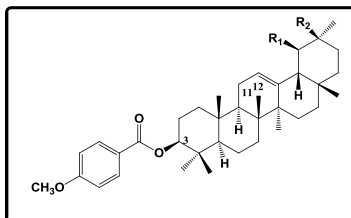
4-metoxibenzoato de α e β -amirina (52)

Obtido na forma de um sólido branco com rendimento de 86%. R_f : 0,47 (SiO₂, hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1712 (C=O).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)

$\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico do substrato), 3,86 (s, OCH₃), 4,71 (m, H-3), 5,14 (m, H-12 do derivado de β -amirina), 5,19 (m, H-12 do derivado de α -amirina), 6,92 (d, $J = 8,0$ Hz), 7,99 (d, $J = 8,0$ Hz).

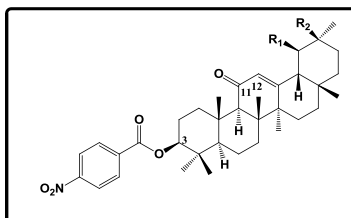


1.5.4. Procedimento para a preparação dos derivados 55 e 56

Os derivados **55** e **56** foram preparados através de oxidação, dos compostos **17** e **19** respectivamente, utilizando o reagente cromato de *t*-butila, de acordo com procedimento previamente descrito por Soldi e col. (2008).⁵⁴ O reagente cromato de *t*-butila foi preparado conforme procedimento descrito por Pinto e col. (1988).⁷⁷

p-nitrobenzoato de 11-oxo α e β -amirina (55)

A uma solução de 205,7 mg (0,439 mmol) do derivado **50** em CHCl₃, foram adicionados 9,01 mL (95,6 mmol) de anidrido acético, 18,20 mL (315,9 mmol) de ácido acético e 9,01 mL de cromato de *t*-butila recentemente preparado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por um período de 6 horas. Então, 130 mL de CHCl₃ foi adicionado e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de ácido oxálico 5%. A fase orgânica ainda foi lavada com NaHCO₃, seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando



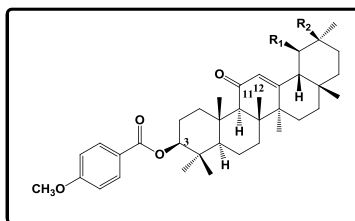
Capítulo 1 – Parte experimental

hexano como eluente. Foram obtidos 304,1 mg (62%) de um sólido amarelado. R_f : 0,20 (SiO₂, hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1721 (C=O, ester) e 1654 (C=O, cetona).
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) $\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico do substrato), 2,34 (s, H-9), 4,80 (m, H-3), 5,56 (s, H-12 do derivado de β -amirina), 5,61 (s, H-12 do derivado de α -amirina), 8,20 (d, $J = 8,0$ Hz), 8,35 (d, $J = 8,0$ Hz).

4-metoxibenzoato de 11-oxo α e β -amirina (56)

A uma solução de 199,2 mg (0,356 mmol) do derivado **52** em CHCl₃, foram adicionados 7,32 mL (77,5 mmol) de anidrido acético, 14,80 mL (259,0 mmol) de ácido acético e 7,32 mL de cromato de *t*-butila recentemente preparado. A mistura reacional foi mantida sob refluxo por



um período de 6 horas. Então, 130 mL de CHCl₃ foi adicionado e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa de ácido oxálico 5%. A fase orgânica ainda foi lavada com NaHCO₃, seca com MgSO₄ anidro e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando hexano como eluente. Foram obtidos 127,6 mg (63%) de um sólido amarelado. R_f : 0,20 (SiO₂, hexano/acetato de etila 95:5 v:v).

IV (pastilha de KBr): $\nu(\text{cm}^{-1})$: 1710 (C=O, ester) and 1663 (C=O, cetona).

RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) $\delta(\text{ppm})$: 0,80 – 2,20 (perfil característico do substrato), 2,39 (s, H-9), 3,86 (s, OCH₃), 4,73 (m, H-3), 5,55 (s, H-12 do derivado de β -amirina), 5,60 (s, H-12 do derivado de α -amirina). 6,92 (d, $J = 8,9$ Hz'), 8,00 (d, $J = 8,9$ Hz).

1.5.5. Atividade leishmanicida

Os ensaios para a determinação da atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG sob a coordenação do Professor Dr. Carlos leomar Zani.

Culturas axênicas da forma amastigota de *Leishmania amazonensis*, previamente caracterizadas por meio de eletroforese de

Capítulo 1 – Parte experimental

isoenzimas e depositadas no banco de cepas da Coleção de *Leishmania* do Centro de Referência em Tipagem de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, foram utilizadas para o ensaio, adotando-se o protocolo proposto por Callahan *et al.* (1997)⁷⁸ com algumas modificações. Amastigotas foram semeadas a 10^8 parasitos/mL e deixadas em meio apropriado, na presença ou não dos compostos em diferentes concentrações para cálculo da concentração inibitória mínima (IC₅₀) e fármacos controle. Após 72 horas, a atividade dos compostos testados sobre as amastigotas nos poços teste foi medida pelo método colorimétrico do MTT (Sigma/USA). A absorbância das soluções nos poços testes foi comparada com as absorbâncias dos controles com e sem drogas de referência (Anfotericina B). As substâncias foram consideradas ativas quando foram capazes de inibir acima de 70% a proliferação dos parasitas.

1.5.6. Atividade citotóxica

Os ensaios para a determinação da atividade citotóxica foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte-MG sob a coordenação do Professor Dr. Carlos leomar Zani.

As linhagens celulares utilizadas para a avaliação da potencial atividade anti-tumoral incluíram: melanoma (UACC62), mama (MCF-7) e renal (TK-10).

As suspensões das células foram utilizadas na concentração de 100.000 células/poço (placas de 96 poços). Todas foram incubadas por 24hs a 37°C, 5%CO₂ para estabilização. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias por 48h em atmosfera de 5%CO₂ e 100% de umidade, 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo a colchicina e o etoposídeo. Foi realizado um controle com o solvente (DMSO) na mesma concentração das amostras testes.

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan⁷¹ e permite avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. A metodologia utilizada foi descrita por Monks *et al.* (1991),⁷¹ com modificações. Resumidamente, faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço (contendo 200µL finais), 20µL de uma solução de MTT (2,5mg/mL). Após as 4 horas de incubação e formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado à

Capítulo 1 – Parte experimental

vácuo. A cada poço foram adicionados 200µL de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazam formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595.

1.5.7. Atividade antinociceptiva

Os ensaios para a determinação do mecanismo de ação antinociceptiva do derivado octanoato de a e b-amirina foram realizados sob a coordenação do Professor Dr. Adair Roberto Soares Santos do Departamento de Fisiologia da UFSC, conforme métodos descritos por Marcon e colaboradores (2009).⁷⁶

CAPÍTULO 2. Relação estrutura-atividade de estirilpironas, isoladas de *Polygala sabulosa* A. W. Bennet, frente à afinidade pelo sítio benzodiazepínico

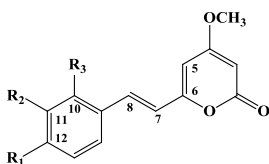
2.1. Introdução

As kavalactonas ou kavapironas são substâncias de estrutura química relativamente simples que se tornaram muito conhecidas da população em geral por estarem presentes nos extratos de kava-kava. A Kava-kava ou kava é o nome dado tanto a um arbusto proveniente das Ilhas do Pacífico, *Piper methysticum*, como a uma bebida psicoativa feita do rizoma desta espécie. Bebidas a base de kava-kava já vinham sendo utilizadas a milhares de anos em encontros sociais e cerimônias religiosas como um relaxante para alcançar um alto nível de consciência. Nos dias de hoje, a bebida também é utilizada contra a fadiga, para reduzir a ansiedade, como tranquilizante e antidepressivo buscando um bem estar físico e mental.^{12,79,13} Estudos clínicos duplo-cego mostraram que os extratos de kava são tão efetivos quanto à terapia benzodiazepínica utilizada no tratamento da ansiedade e ainda menos efeitos adversos foram detectados com essas preparações a base de kava-kava.^{80,81} A busca pelos constituintes responsáveis pelos efeitos biológicos do chá de kava iniciou há cerca de 160 anos. Uma série de aproximadamente 17 compostos (figura 10), conhecidos como kavapironas ou kavalactonas, foi isolada principalmente das raízes e rizomas e caracterizados como os constituintes ativos presentes no chá de kava. As estruturas destas kavalactonas diferem principalmente no padrão de substituição do anel aromático que pode apresentar metoxilas, hidroxilas ou o grupamento metilenodioxi e ainda nos pares de carbonos C5-C6 e C7-C8 que podem estar na forma saturada ou insaturada.

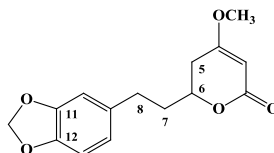
Recentemente, nosso grupo relatou resultados envolvendo a espécie vegetal *Polygala sabulosa*, da qual foram isoladas e identificadas três 6-diidroestiril-4-metoxi-2-pironas (**DST 1**, **DST 2** e **DST 3**) e quatro 6-estiril-4-metoxi-2-pironas (**STY 1**, **STY 2**, **STY 3** e **STY 4**; ver figura 2). Segundo os autores, para o isolamento destes compostos foram utilizados 623,0 g de planta fresca e a partir do extrato solúvel em acetato de etila (13,9 g), foram obtidas 26,0 mg da **DST 1**, 58,0 mg da **DST 2**, 43,0 mg da **DST 3**, 86,0 mg da **STY 1**, 50,0 mg da **STY 2** e 78 mg da **STY 4**. A partir do extrato solúvel em diclorometano (11,3 g) foi obtido 20,0 mg da **STY 3**.^{10,11} Em relação a massa de material vegetal fresco os rendimentos variaram entre 0,003 a 0,01 %. Embora o gênero *Polygala* seja conhecido pelo acúmulo de xantonas,

Capítulo 2 – Introdução

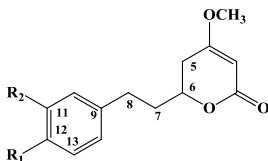
nenhum composto pertencente a esta classe foi isolado. Como consequência deste desvio na biogênese, proposto por Pizzolatti e colaboradores,¹¹ os extratos da espécie *Polygala sabulosa* não apresentam os mesmos efeitos biológicos que outras espécies do gênero. De fato, extratos e frações preparados a partir de *P. sabulosa*, exibiram significativa ação no sistema nervoso central em modelos de ansiedade e depressão. Um simples olhar para as estruturas das diidroestiril e estirilpironas isoladas da espécie *Polygala sabulosa*, é suficiente para observar uma semelhança com as estruturas das kavalactonas isoladas da espécie *Piper methysticum*. No entanto nenhuma relação foi encontrada entre as espécies *Polygala sabulosa* e *Piper methysticum*.



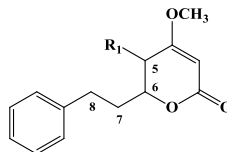
- 57) $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = H$ (iangonina)
 58) $R_1 = R_2 = R_3 = H$ (desmetoxi-iangonina)
 59) $R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = H$ (10-metoxi-iangonina)
 60) $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = H$ (11-metoxi-iangonina)
 61) $R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$ (11-hidroxi-iangonina)



- 62) (dihidrometisticina)
 63) Δ^{7-8} (metisticina)
 64) Δ^{5-6} (5,6-dehidrometisticina)



- 65) $R_1 = R_2 = H, \Delta^{7-8}$, (kavaina)
 66) $R_1 = R_2 = H$, (7,8-dihidro kavaina)
 67) $R_1 = OCH_3, R_2 = H$, (5,6-7,8-tetrahidroiangonina)
 68) $R_1 = OCH_3, R_2 = H, \Delta^{5-6}$, (7,8-dihidroiangonina)
 69) $R_1 = OCH_3, R_2 = H, \Delta^{7-8}$, (5,6-dihidroiangonina)
 70) $R_1 = R_2 = OCH_3$, (11,12-dimetoxidihidro kavaina)
 71) $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$, (11-hidroxi-12-metoxi-dihidro kavaina)



- 72) $R_1 = \beta-OH$ (7,8-dihidro-5-hidroxi kavaina)
 73) $R_1 = OH, \Delta^{7-8}$, (Hidroxi kavaina)

Figura 3 - Compostos isolados da planta kava-kava (*Piper methysticum*)

Capítulo 2 – Introdução

Então os compostos isolados também foram avaliados quanto aos seus efeitos no sistema nervoso central. Uma importante ação central incluindo efeito ansiolítico, hipnosedativo e anticonvulsivante dos compostos isolados foi detectada.¹⁴ Os compostos **DST1** e **STY4** foram os mais potentes exibindo efeito ansiolítico similar ao fármaco diazepam comercialmente disponível (ver tabela 3).

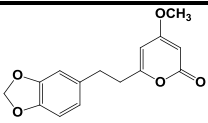
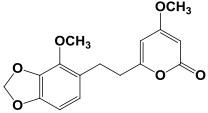
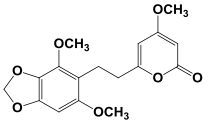
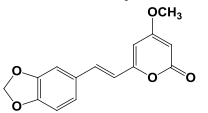
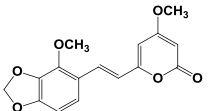
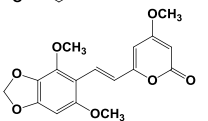
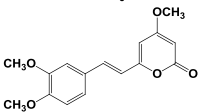
Além disso, experimentos de “binding” no sítio benzodiazepínico foram realizados com o objetivo de caracterizar o mecanismo de ação central destes compostos. Para estes ensaios foi utilizado o modelo de inibição da ligação do [³H]-flunitrazepam, fármaco que se liga fortemente ao sítio benzodiazepínico. Se a substância candidata a fármaco inibir essa ligação, significa que possui uma interação com o sítio benzodiazepínico. Os resultados mostraram que todas as estirilpironas foram capazes de inibir a ligação do [³H]-FNZ ao sítio benzodiazepínico, com diferentes potências indicando uma interação parcial com o sítio benzodiazepínico.

2.1.1. Ácido Gama-Aminobutírico (GABA) e receptores GABA

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é um dos mais importantes transmissores inibitórios do sistema nervoso central. Está envolvido na regulação do sono, convulsões e ansiedade.^{82,83,84,85,86} Atua em dois tipos distintos de receptores: o GABA_A, que consiste em um canal regulado por ligante, e o GABA_B que é um receptor acoplado a proteína G. Os receptores GABA_A possuem localização pós sináptica e medeiam a inibição pós sináptica rápida. O canal associado é seletivamente permeável a íons cloreto. O afluxo destes íons cloreto hiperpolariza a célula e reduz sua excitabilidade. O que se conhece até o momento sobre a estrutura dos receptores GABA_A é que são pentâmeros compostos de três subunidades diferentes (α , β , γ) que formam uma série de α -hélices em torno de um poro central, conhecido como canal iônico (figura 4).

Capítulo 2 – Introdução

Tabela 3 - Resultados In vivo (obtidos do labirinto de cruz elevada) e in vitro (ensaios de “binding” com o sítio benzodiazepínico) para as diidroestiril-2-pironas (DSTs) e estiril-2-pironas (STYs).

| Compostos | Estrutura | Resultados <i>In vivo</i> | Resultados <i>In vitro</i> |
|-----------|---|------------------------------|-------------------------------|
| DST 01 |  | 5 pmol | 100,0 μM |
| DST 02 |  | na | 41,7 μM |
| DST 03 |  | 0,3 fmol | 35,8 μM |
| STY 01 |  | 5 pmol | 90,3 μM |
| STY 02 |  | na | 31,0 μM |
| STY 03 |  | na | nt |
| STY 04 |  | 0,2 pmol | 70,0 μM |

^aOs procedimentos detalhados foram descritos por Duarte *e col.*¹⁵.
na – não ativo; nt – não testado.

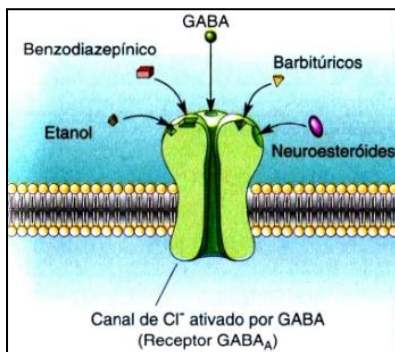


Figura 4 - Modelo do complexo receptor GABA_A

Os receptores GABA_A são alvos de vários fármacos importantes de ação central, em especial os benzodiazepínicos. Esta grande classe de compostos possui importantes efeitos sedativos e ansiolíticos potencializando os efeitos do GABA sobre os receptores GABA_A. Apesar do alto consumo destes fármacos, eles ainda apresentam alguns efeitos colaterais como sonolência, esgotamento mental, potencialização dos efeitos do etanol, amnésia, relaxamento muscular, dependência fisiológica e síndrome de abstinência.^{87,88,15,89,90,91}

Os benzodiazepínicos ligam-se com elevada afinidade ao sítio benzodiazepínico, que está inserido neste complexo receptor GABA_A. Os benzodiazepínicos sedativos, como o diazepam, são agonistas (potencializam a ação do GABA), enquanto os análogos convulsivantes, como o flumazenil são antagonistas. Alguns dos principais agonistas do sítio benzodiazepínicos com seus respectivos nomes comerciais e laboratório de origem estão apresentados na figura 5.⁹²

Capítulo 2 – Introdução

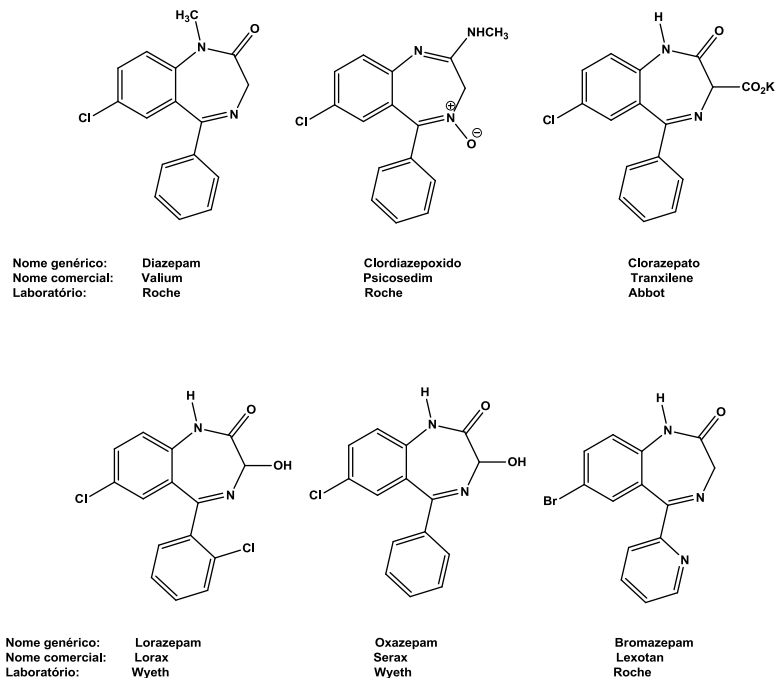


Figura 5 - Substâncias agonistas do sítio benzodiazepínico e seus nomes comerciais

Diante destes resultados, nosso interesse é encontrar as principais características destas estruturas (DSTs e STYs) que suportam os resultados experimentais e comparar com os já conhecidos benzodiazepínicos. Este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de novos análogos das estirilpironas naturais ainda mais ativos e mais específicos. Neste sentido, a relação entre a estrutura química destas substâncias naturais e o efeito farmacológico que elas produzem foram determinados utilizando cálculos computacionais.

Capítulo 2 – Introdução

2.1.2. Relação entre a estrutura química e atividade biológica

A elucidação dos fatores que influenciam os efeitos biológicos de substâncias de origem natural é muito importante para o design de novos fármacos com maior poder de ação. Se um determinado composto possui estrutura química similar a algum fármaco, poderá exibir efeito biológico ser mais ou menos potente e com ou sem efeitos colaterais. Estes estudos onde as atividades biológicas são estruturalmente relacionadas são chamados de relação estrutura-atividade (SAR). SARs podem ser utilizados para determinar as partes das estruturas, ou grupos farmacofóricos, responsáveis pelos efeitos biológicos.

As principais propriedades de uma estrutura que normalmente influenciam na atividade biológica são lipofilicidade, efeitos eletrônicos e efeitos estéricos (tamanho e forma da molécula). A determinação destes parâmetros se tornou possível nos últimos anos com o grande avanço das ferramentas teóricas que permitem a previsão de um número maior de parâmetros moleculares em um tempo muito menor.

2.1.3. A ferramenta teórica

A determinação dos parâmetros eletrônicos e moleculares necessários para descrever quimicamente um efeito biológico necessita de uma ferramenta adequada. Por sorte, a química computacional tem evoluído muito nos últimos anos e temos agora uma grande variedade de métodos à disposição para estudar tais parâmetros. Pode-se dizer que a teoria do funcional densidade (DFT) tem influenciado profundamente a evolução da química quântica durante os últimos 20 anos – o termo revolucionar seria mais apropriado. Baseado nos famosos teoremas de Hohenberg e Kohn, os métodos DFT oferecem uma grande vantagem para o desenvolvimento de estratégias computacionais, para obter informações sobre a energia, estrutura e propriedades de moléculas (e átomos), a um custo computacional mais barato comparado com os tradicionais métodos *ab initio*.⁹³ Os métodos DFT são excelentes para descrever o estado fundamental, e como resultado obtêm-se excelentes geometrias, frequências e relativa acurácia na energia. A teoria do funcional de densidade é uma descrição de um sistema atômico ou molecular em termos da densidade de elétrons.^{94,95,96}

O principal interesse é utilizar a teoria do funcional de densidade (DFT) para determinar parâmetros eletrônicos que possam

Capítulo 2 – Introdução

ajudar no estudo de relação entre a estrutura e a atividade biológica. De forma simples, estes parâmetros podem ser obtidos através das energias do HOMO e LUMO utilizando as equações 1 e 2:

$$(1) \quad \chi \cong \frac{I + A}{2} = -\frac{\epsilon_{\text{HOMO}} + \epsilon_{\text{LUMO}}}{2}$$

$$(2) \quad \eta \cong \frac{I - A}{2} = \frac{\epsilon_{\text{LUMO}} - \epsilon_{\text{HOMO}}}{2}$$

onde χ é a eletronegatividade, I é o potencial de ionização e A é a afinidade eletrônica. ϵ_{HOMO} e ϵ_{LUMO} são as energias dos orbitais ocupado de maior energia e desocupado de menor energia, respectivamente. Através da equação 2, calcula-se a dureza global utilizando a energia dos orbitais de fronteira. O quadrado da eletronegatividade (χ) dividido pela dureza química (η) resulta no índice de eletrofilicidade (eq. 3).

$$(3) \quad \omega = \chi^2/2\eta$$

onde o fator $1/2$ vem da definição da dureza química da equação 2. O cálculo do índice de eletrofilicidade foi apresentado primeiramente por Maynard e colaboradores (1998)⁹⁷ e recebeu a definição de “índice de eletrofilicidade” por Parr e colaboradores (1999).⁹⁸

2.2. Objetivos

- Determinar os principais parâmetros eletrônicos, utilizando o funcional de densidade (DFT), das estruturas químicas das estirilpironas.
- Buscar uma relação entre os parâmetros calculados e os resultados obtidos nos ensaios de “binding” no sítio benzodiazepínico.
- Comparar os parâmetros eletrônicos das estirilpironas com os parâmetros eletrônicos de benzodiazepínicos como Diazepam e Flunitrazepam visando encontrar características comuns.

2.3. Resultados e discussão

O estudo fitoquímico da espécie *Polygala sabulosa* resultou no isolamento de três 7,8-diidroestirilpironas (**DST1**, **DST2** e **DST3**) e quatro estirilpironas (**STY1**, **STY2**, **STY3** e **STY4**) conforme descrito por Pizzolatti e colaboradores (2000 e 2004).^{10,11} Os compostos foram avaliados quanto ao efeito no sistema nervoso central utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Os estudos *in vitro* sugerem uma interação parcial com o sítio benzodiazepínico uma vez que os compostos **DST2** e **03** e **STY1**, **02** e **04** foram capazes de deslocar a substância ³H-flunitrazepam (³H-FNZ) nos ensaios de “binding” com o sítio benzodiazepínico. Em razão destes resultados, nosso objetivo é entender como os grupos substituintes nas DSTs e STYs afetam a afinidade pelo sítio benzodiazepínico para encontrar os parâmetros estruturais que suportam os dados experimentais.

A principal diferença entre estes dois grupos de estruturas é a presença de uma ligação dupla entre os carbonos C7 e C8 no sistema STY formando assim um sistema conjugado do anel aromático (**B**) até o anel lactona (**A**). Portanto o esqueleto estrutural DST possui maior grau de liberdade com um aumento significativo do número de possíveis confôrmeros. Apesar disso, os efeitos biológicos não foram muito diferentes quando são comparadas as DSTs e STYs. Os compostos **DST1** e **STY1** foram os que exibiram a menor afinidade pelo sítio benzodiazepínico e os compostos **DST2** e **STY2** foram ativos exibindo efeito na mesma ordem de grandeza. Estes resultados indicam que a presença ou ausência da ligação dupla C7-C8 não é um fator essencial para a interação com o sítio benzodiazepínico.

Para visualizar as conformações espaciais mais estáveis, as energias das estruturas foram minimizadas utilizando o programa Hyperchem 8.0 (versão de avaliação).⁹⁹ Como já era esperado, a ausência da ligação dupla em C7-C8 nas diidroestirilpironas (DSTs) leva a uma preferência conformacional fora do plano (figura 6). Já para as estirilpironas, STYs, foram encontradas estruturas com preferência conformacional no plano ou levemente distorcida, principalmente no caso da **STY3**, devido à presença de uma metoxila no carbono C10. No caso das DSTs, estas estruturas podem assumir uma conformação favorável que pode ser similar as STYs quando conectadas ao sítio receptor. As barreiras de energia entre os confôrmeros das DSTs são muito baixas permitindo uma reorganização espacial da estrutura das DSTs no receptor. Desta forma, devido ao grande número de confôrmeros para as DSTs e sua importância secundária, decidiu-se

Capítulo 2 – Resultados e discussão

explorar apenas uma forma conformacional. As otimizações da geometria foram realizadas com os anéis **A** e **B** no mesmo plano.

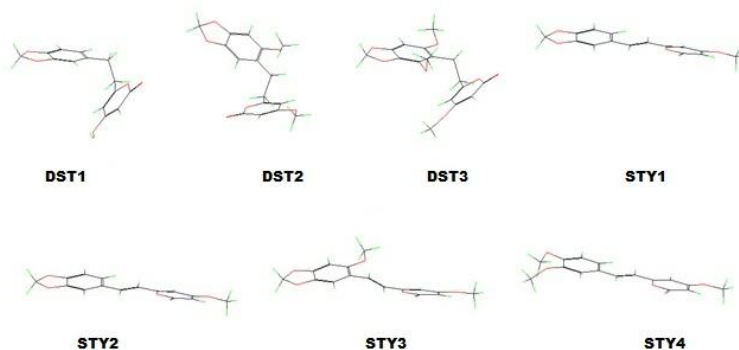


Figura 6 - Estruturas das estilipironas com energia minimizada

Para as estilipironas (STYs), embora tenham uma estrutura mais rígida, ainda é possível um grande número de confôrmeros. Então, decidiu-se calcular a barreira de energia entre os confôrmeros apenas com os anéis **A** e **B** no mesmo plano, os quais foram denominados confôrmero (i) e confôrmero (ii) (figura 7). As barreiras de energia entre (i) e (ii), calculadas em fase aquosa e fase gasosa, se encontraram em uma faixa relativamente pequena. Os valores absolutos da ΔE rotacional (kcal.mol^{-1}) são 2,12 (STY1), 2,05 (STY2), 1,21 (STY3) e 0,38 (STY4) em fase aquosa e 2,69 (STY1), 2,73 (STY2), 1,66 (STY3) e 0,69 (STY4) em fase gasosa. Os baixos valores de ΔE indicam a flexibilidade conformacional das moléculas permitindo a reorientação, se necessário, durante o processo de ligação com o receptor.

Capítulo 2 – Resultados e discussão

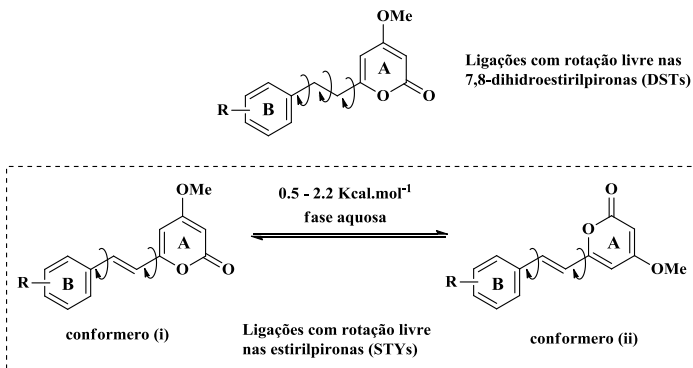


Figura 7 - conformeros e barreira de energia para rotação das estilpironas (STY)

Além disso, deve ser destacado que os grupamentos metil possuem rotação livre o que aumenta o número de possíveis conformeros. Para evitar este problema, as geometrias utilizadas foram as com menor impedimento estérico onde os grupos metil estão orientados para o lado oposto aos grupos mais volumosos.

Em relação aos ensaios de “binding” no sítio benzodiazepínico, uma relação direta entre o número de metoxilas e a afinidade pelo receptor foi encontrada. Para os compostos **DST1**, **02** e **03** e **STY1**, **02** e **03**, um aumento no número de metoxilas nas posições C10 e C14, aumenta a afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Esta tendência é aceitável uma vez que os oxigênios dos grupos metoxila podem agir como aceptores de ligação hidrogênio ajudando na interação com doadores de ligação hidrogênio presentes no sítio do receptor.

Além disso, a inserção de grupamentos metoxila pode alterar alguns parâmetros eletrônicos e topológicos como log P, volume molecular e refratividade molar os quais são importantes na interação com o receptor. Estes parâmetros foram calculados para os compostos naturais e para os fármacos comercialmente disponíveis diazepam e flunitrazepam para comparação (tabela 4).

Capítulo 2 – Resultados e discussão

Tabela 4 - parâmetros calculados DST 1, 2, 3, STY 1, 2, 3 e 4, flunitrazepam (FNZ) e diazepam (DZP).

| | <i>Parâmetros</i> | | | | |
|---------------|-------------------|-------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------|
| | Massa Molar (uma) | Log P | Volume molecular (Å ³) | Refratividade molar (Å ³) | Atividade (µM) |
| DST 01 | 274,27 | -1,29 | 785,23 | 77,24 | 100 |
| DST 02 | 304,30 | -2,29 | 843,04 | 83,61 | 41,7 |
| DST 03 | 334,33 | -3,28 | 911,49 | 89,99 | 35,8 |
| STY 01 | 272,26 | -1,41 | 771,64 | 78,20 | 90,3 |
| STY 02 | 302,28 | -2,40 | 841,30 | 84,57 | 31,0 |
| STY 03 | 332,31 | -3,40 | 914,36 | 90,95 | nt |
| STY 04 | 288,30 | -1,60 | 857,72 | 85,36 | 70,0 |
| FNZ | 313,29 | -0,25 | 826,92 | 89,45 | |
| DZP | 284,75 | 0,94 | 796,04 | 87,82 | 0,008 |

*Dados calculados utilizando QSAR do Hyperchem 8,0 (cópia de avaliação).⁹⁹
nt = não testado

A hidrofobicidade é um importante parâmetro que está diretamente relacionado à habilidade do composto ser absorvido, distribuído, transportado e excretado. A medida da hidrofobicidade pode ser representada pelos valores de log de P, o qual expressa a capacidade com que o composto se dissolverá no meio, passará através das membranas e alcançará os sítio ligante do receptor. Segundo os dados de log P mostrados na tabela 4, observou-se uma tendência para o grupo das diidroestirilprinas (DSTs) e uma tendência para o grupo da estirilpironas (STYs). Para os dois casos, o aumento no número de metoxilas diminui o Log P e aumenta a afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Os valores calculados de log P para os compostos naturais foram menores que os valores de log P para os padrões comerciais embora a afinidade pelo sítio benzodiazepínico foi maior para o fármaco comercialmente disponível diazepam. No entanto, para um ensaio de “binding”, os valores de Log P assumem uma importância secundária já que não há necessidade de absorção e transporte das substâncias. Aqui, cabe destacar que, apesar de não se observar uma correlação, os compostos naturais exibiram, nos ensaios *in vivo*, efeito ansiolítico mais pronunciado do que o fármaco diazepam. Comparando

Capítulo 2 – Resultados e discussão

o composto **DST1** com **DST3**, observou-se um log P menor para **DST3** o qual exibiu efeito ansiolítico superior nos ensaios *in vivo*. A substância **STY4**, com um Log P de -1,60 exibiu efeito ansiolítico superior a **STY1** que possui Log P calculado de -1,41. Surpreendentemente, **DST2** e **STY2** não exibiram efeito ansiolítico nos ensaios *in vivo* e **DST3** foi ativa na ordem de 0,3 fmol enquanto **STY3** não apresentou atividade ansiolítica neste modelo. Estes resultados deixam claro que existem outros parâmetros que podem estar influenciando o efeito ansiolítico. Desta forma decidiu-se calcular outros descritores visando encontrar uma característica que justifique a interação com o sítio benzodiazepínico. Com base na premissa de que uma boa interação com o receptor requer que o ligante tenha um tamanho ideal, o volume molecular dos compostos naturais, diazepam e flunitrazepam foram calculados. O aumento no número de metoxilas aumenta o volume molecular e assim aumenta a afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Os volumes moleculares dos padrões comerciais ficaram na faixa dos produtos naturais indicando que este é um bom parâmetro para ser levado em conta no planejamento de compostos que interagem no sítio benzodiazepínico. Outro descritor importante é a facilidade com que a molécula se ajusta ao receptor. Esse parâmetro pode ser expresso pelos valores calculados da refratividade molar. Para ambos os grupos de estruturas, DST e STY, aumentando o número de metoxilas, aumenta a refratividade molar o que indica uma maior capacidade de se ajustar à forma do receptor. Comparando-se os pares de estruturas (**DST 01 vs STY 01, ...**), notou-se uma refratividade molar levemente superior para o grupo STY os quais também possuem uma afinidade superior pelo sítio benzodiazepínico. De uma forma geral, os parâmetros calculados e acima descritos, estão próximos aos calculados para os padrões comerciais flunitrazepam e diazepam. A pequena diferença encontrada já era de certa forma esperada já que os compostos naturais só demonstraram uma interação parcial com o sítio benzodiazepínico. O objetivo aqui seria buscar uma tendência para que possamos entender a importância de cada grupo na interação com o receptor e após isso planejar estruturas que interagem mais fortemente com o sítio benzodiazepínico. Os parâmetros estudados até agora não nos dão informações suficientes para planejar a síntese de novos compostos. Desta forma decidiu-se continuar os estudos buscando as características do sítio receptor e comparando com as estruturas de compostos que já são conhecidos por interagir com o sítio benzodiazepínico.

Sabendo que as interações das estiripironas com o sítio benzodiazepínico são significantes, podemos determinar o quanto as

Capítulo 2 – Resultados e discussão

estruturas dos compostos naturais são consistentes com os grupos farmacóforos hipotéticos requeridos para o reconhecimento do receptor. Para explicar as interações entre ligantes e receptor, vários modelos de farmacóforos baseados em estudos da interação ligantes-sítio benzodiazepínico foram desenvolvidos. Como um exemplo, o modelo proposto por Zhang e colaboradores (1995)¹⁰⁰ pode ser utilizado para melhorar o entendimento em relação às interações ligante-receptor.¹⁰¹ Este modelo descreve uma série de requisitos para os ligantes apresentarem forte interação com o sítio benzodiazepínico. As interações entre ligantes e receptor ocorrem principalmente através de:

- a) um aceptor de ligação hidrogênio;
- b) um doador de ligação hidrogênio;
- c) um doador/aceptor de ligação hidrogênio;
- d) uma bolsa lipofílica;
- e) e sítios estericamente impedidos.

Este modelo foi desenvolvido utilizando uma grande série de ligantes com atividade ansiolítica e as principais características podem ser usadas para avaliar outros compostos que interagem com o sítio benzodiazepínico. Extrapolando este modelo para as diidroestirilpironas e estirilpironas, as interações poderiam estar ocorrendo através dos itens (a), (d) e (e) da mesma forma que os benzodiazepínicos o fazem.

Outro estudo comparativo da afinidade com o sítio benzodiazepínico para benzodiazepínicos e não-benzodiazepínicos revelou que todos os ligantes apresentam um anel aromático ou heteroaromático. Acredita-se que a presença destes anéis seja importante devido a interações do tipo “ π - π stacking” com resíduos de aminoácidos aromáticos e um grupo aceptor de próton que estaria no mesmo plano do anel aromático o qual interage com um resíduo de histidina no receptor. Estes requisitos também são cumpridos pelas estruturas dos compostos naturais (figura 8), indicando o potencial destes compostos para o tratamento da ansiedade. Esta comparação também confirma a importância do grupo 2-pirona para a expressão do efeito biológico.

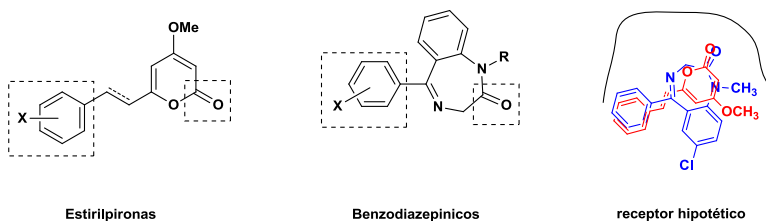


Figura 8 - Grupos semelhantes presente nas estruturas das estirilpironas e nos benzodiazepínicos e um exemplo de aproximação destas estruturas no sítio hipotético de um receptor

Estes modelos de farmacóforos nos levaram a estudar outros parâmetros visando avaliar as similaridades entre as estirilpironas (DSTs e STYs) e benzodiazepínicos. Baseado nos resultados dos volumes moleculares e considerando que os compostos naturais devem ter a mesmo tamanho de uma ponta a outra da molécula, calculou-se a distância entre os anéis **A** e **B** das DSTs e STYs e comparamos com os padrões comerciais diazepam e flunitrazepam. A distância média entre o oxigênio da carbonila ao centro do anel aromático foi 2,64 Å para todos os compostos naturais, sendo que para o diazepam foi 2,79 Å e para o flunitrazepam foi 2,78 Å. Esta diferença de aproximadamente 0,15 Å é devida ao anel de 7 membros dos padrões comerciais os quais possuem um maior diâmetro interno que o anel de 6 membros dos compostos naturais. Além disso, o anel de 7 membros não é planar como a pirona já que a conformação preferencial do grupo metileno do diazepam e flunitrazepam é fora do plano. Considerando que os ligantes podem interagir com o receptor através de interações iônicas e dipolo-dipolo, e/ou ligações hidrogênio e covalentes, esta diferença de 0,15 Å ainda permite a aproximação e interação de DSTs/STYs com o sítio benzodiazepínico, uma vez que o comprimento de ligações como O-H e H-H, por exemplo, são de 0,94 e 0,74 Å, respectivamente.

Visando investigar a relação entre a estrutura química e afinidade pelo sítio benzodiazepínico, calcularam-se alguns parâmetros como eletronegatividade (χ), dureza (η), potencial de ionização (I), afinidade eletrônica (A) e índice de eletrofilicidade (ω) (tabelas 5 e 6). Os resultados não mostraram nenhuma diferença significativa entre os cálculos em fase aquosa e fase gasosa em relação a ordem de energia. Além disso, a ordem de energia para os diferentes confôrmeros i e ii

também foram semelhantes. Quando comparamos separadamente os resultados obtidos para os compostos **DST1, 02 e 03** e para os compostos **STY1, 02, 03 e 04**, boas tendências foram encontradas. Dos parâmetros investigados, o índice de eletrofilicidade (ω) apresentou a melhor relação com a atividade biológica em ambas as fases aquosa e gasosa. A afinidade pelo sítio benzodiazepínico aumenta quando o índice de eletrofilicidade é menor. Por inspeção visual, conforme já mencionado, a afinidade pelo sítio benzodiazepínico aumenta para os compostos que possuem o grupo metileno dioxi (**DST1, 02 e 03** e **STY1, 02 e 03**) e grupos metoxila. Estes dados estão em concordância uma vez que o efeito doador de elétrons dos grupos metoxila reduz o índice de eletrofilicidade. Além disso, deve ser lembrado que o índice de eletrofilicidade é uma medida da mais baixa energia devido ao máximo fluxo de elétrons entre doador e receptor.⁹⁶ Então, pode-se assumir que a interação entre ligante e receptor será mais forte quando os orbitais dos ligantes permitirem maior fluxo de elétrons. De fato, quando consideramos os dois grupos de estruturas (DSTs e STYs) separadamente, a afinidade pelo sítio benzodiazepínico aumenta conforme o índice de eletrofilicidade diminui para cada grupo de estruturas.

O índice de eletrofilicidade leva em conta os parâmetros eletronegatividade e dureza química além do potencial de ionização e afinidade eletrônica de forma indireta. A diferença dos valores do índice de eletrofilicidade para as DSTs e STYs pode ser um resultado das diferenças da forma e energia dos orbitais de fronteira. Assim, as energias dos orbitais de fronteira, orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO) e orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO), também foram utilizadas como descritores para discutir as interações com o receptor. As energias do HOMO e LUMO também foram calculadas em fase aquosa e em fase gasosa. Estes parâmetros podem indicar a habilidade das moléculas em agir como aceptores de elétrons ou doadores de elétrons em uma interação de transferência de elétrons com o receptor (tabelas 5 e 6). O LUMO das DSTs são um pouco mais energéticos do que o LUMO das STYs e o HOMO das DSTs são menos energéticos. Essa diferença de energia resulta em um gap maior entre o HOMO e LUMO das DSTs o que já era esperado para estes sistemas. Um gap de energia maior entre HOMO-LUMO indica que os DSTs são mais duros que STYs, como o próprio valor calculado para a dureza nos informa na tabelas 5 e 6, o que poderia justificar a inferior afinidade das DSTs com o receptor em relação às STYs.

Tabela 5 - Resultados dos cálculos pelo funcional de densidade (DFT) para DSTs, STYs, flunitrazepam e diazepam em fase aquosa.

| Comp. | HOMO | LUMO | Gap | χ | η | I | A | ω | Atividade (μM) |
|------------------|-------|-------|------|--------|--------|------|------|----------|-----------------------------|
| FNZ(i) | -6,97 | -3,14 | 3,83 | 5,06 | 1,92 | 6,97 | 3,14 | 6,68 | - |
| FNZ(ii) | -6,98 | -3,15 | 3,83 | 5,06 | 1,91 | 6,98 | 3,15 | 6,70 | |
| DZP | -6,52 | -1,90 | 4,62 | 4,21 | 2,31 | 6,52 | 1,90 | 3,84 | 0,008 |
| DST1 | -5,84 | -1,43 | 4,41 | 3,64 | 2,20 | 5,84 | 1,43 | 3,00 | 100 |
| DST2 | -5,49 | -1,45 | 4,04 | 3,47 | 2,02 | 5,49 | 1,45 | 2,98 | 41,7 |
| DST3 | -5,58 | -1,42 | 4,16 | 3,50 | 2,08 | 5,58 | 1,42 | 2,94 | 35,8 |
| STY1 (i) | -5,69 | -2,29 | 3,41 | 3,99 | 1,70 | 5,69 | 2,29 | 4,69 | 90,3 |
| STY1 (ii) | -5,72 | -2,29 | 3,42 | 4,01 | 1,71 | 5,72 | 2,29 | 4,67 | |
| STY2 (i) | -5,46 | -2,18 | 3,28 | 3,82 | 1,64 | 5,46 | 2,18 | 4,47 | 31,0 |
| STY2 (ii) | -5,47 | -2,19 | 3,28 | 3,83 | 1,64 | 5,47 | 2,19 | 4,45 | |
| STY3 (i) | -5,47 | -2,15 | 3,32 | 3,81 | 1,66 | 5,47 | 2,15 | 4,44 | - |
| STY3 (ii) | -5,56 | -2,15 | 3,38 | 3,87 | 1,69 | 5,56 | 2,18 | 4,36 | |
| STY4 (i) | -5,70 | -2,26 | 3,45 | 3,98 | 1,72 | 5,70 | 2,26 | 4,59 | 70,0 |
| STY4 (ii) | -5,68 | -2,26 | 3,41 | 3,97 | 1,71 | 5,68 | 2,26 | 4,62 | |

(i) e (ii) são os dois conformeros mostrados na figura 7. Os valores de HOMO, LUMO, gap (HOMO – LUMO), χ , η , I , A e ω são expressos em eV.

Tabela 6 - Resultados dos cálculos pelo funcional de densidade (DFT) para DSTs, STYs, flunitrazepam e diazepam em fase gasosa.

| Comp. | HOMO | LUMO | Gap | χ | η | I | A | ω | atividade (μM) |
|------------------|-------|-------|------|--------|--------|------|------|----------|-----------------------------|
| FNZ(i) | -7,14 | -3,05 | 4,08 | 5,10 | 2,04 | 7,14 | 3,05 | 6,36 | - |
| FNZ(ii) | -7,19 | -3,13 | 4,07 | 5,16 | 2,03 | 7,19 | 3,13 | 6,55 | |
| DZP | -6,61 | -2,00 | 4,61 | 4,31 | 2,31 | 6,61 | 2,00 | 4,02 | 0,008 |
| DST1 | -6,03 | -1,39 | 4,63 | 3,71 | 2,32 | 6,03 | 1,39 | 2,97 | 100 |
| DST2 | -5,51 | -1,37 | 4,15 | 3,44 | 2,07 | 5,51 | 1,37 | 2,86 | 41,7 |
| DST3 | -5,67 | -1,17 | 4,50 | 3,42 | 2,25 | 5,67 | 1,17 | 2,60 | 35,8 |
| STY1 (i) | -5,75 | -2,27 | 3,48 | 4,01 | 1,74 | 5,75 | 2,27 | 4,63 | |
| STY1 (ii) | -5,70 | -2,34 | 3,47 | 4,07 | 1,73 | 5,80 | 2,34 | 4,78 | 90,3 |
| STY2 (i) | -5,45 | -2,04 | 3,41 | 3,75 | 1,70 | 5,45 | 2,04 | 4,12 | |
| STY2 (ii) | -5,50 | -2,10 | 3,39 | 3,80 | 1,70 | 5,50 | 2,10 | 4,26 | 31,0 |
| STY3 (i) | -5,35 | -1,89 | 3,47 | 3,62 | 1,73 | 5,35 | 1,89 | 3,78 | |
| STY3 (ii) | -5,46 | -2,00 | 3,46 | 3,73 | 1,73 | 5,46 | 2,00 | 4,03 | - |
| STY4 (i) | -5,66 | -2,20 | 3,45 | 3,93 | 1,73 | 5,66 | 2,20 | 4,47 | |
| STY4 (ii) | -5,64 | -2,22 | 3,42 | 3,93 | 1,71 | 5,64 | 2,22 | 4,51 | 70,0 |

(i) e (ii) são os dois conformêros mostrados na figura 7. Os valores de HOMO, LUMO, gap (HOMO – LUMO), χ , η , I , A e ω são expressos em eV.

Capítulo 2 – Resultados e discussão

Análise das formas dos orbitais moleculares mostrou uma diferença entre as diidroestiril e estirilpironas (ver apêndice I). As diidroestirilpironas apresentaram uma separação distinta entre HOMO e LUMO. O HOMO em DSTs está concentrado no anel **B** enquanto o LUMO está localizado principalmente no anel **A**. Nas estirilpironas, os orbitais de fronteira possuem diferentes formas e estão deslocalizados sobre os anéis **A** e **B** devido a conjugação intermediada pela ligação dupla em C7-C8. O HOMO no diazepam e flunitrazepam está localizado sobre os anéis conjugados de 6 e 7 membros, enquanto o LUMO está deslocalizado sobre toda a molécula no diazepam e sobre o anel de seis membros fundido com o de sete membros no flunitrazepam.

Estes orbitais, principalmente o LUMO do diazepam, foram mais semelhantes aos orbitais da STYs devido a deslocalização sobre toda a molécula. Ainda pode-se dizer que o LUMO das DSTs foi mais semelhante ao LUMO do flunitrazepam devido à localização em apenas uma parte da molécula. A figura 9 mostra as formas dos orbitais de fronteira para **DST2**, **STY2**, diazepam e flunitrazepam para comparação. As semelhanças dos compostos naturais com os padrões comerciais são importantes devido ao efeito agonista do diazepam e do flunitrazepam. Os valores semelhantes de eletronegatividade e afinidade eletrônica das DSTs, STYs, DZP e FNZ reforçam as semelhanças das formas dos orbitais e colocam estas estruturas na mesma ordem de reatividade na interação com o sítio benzodiazepínico.

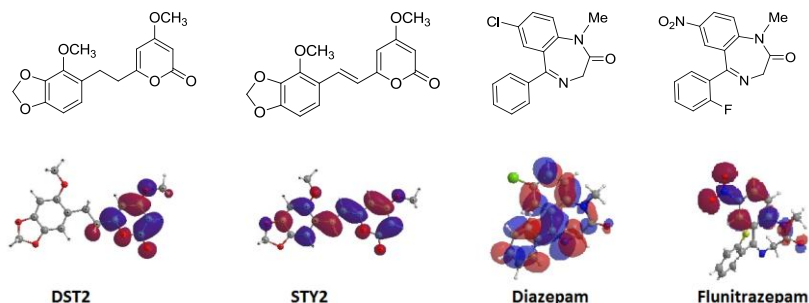


Figura 9 - LUMO da DST2, STY2, diazepam e flunitrazepam para comparação

2.4. Conclusão

Nesta parte do trabalho, foi descrito um estudo de relação estrutura-atividade entre os compostos naturais, isolados de *Polygala sabulosa*, e a afinidade com o sítio benzodiazepínico. Os resultados indicam algumas similaridades com as estruturas do diazepam e fluitrazepam, tais como a presença de um anel aromático e um heteroaromático, presença de grupos aceptores de ligação de hidrogênio, tamanho da molécula, forma e energia dos orbitais de fronteira desocupados de menor energia. Entre os parâmetros eletrônicos calculados, o que melhor descreveu uma relação entre a estrutura química e a afinidade pelo sítio benzodiazepínico foi o índice eletrofílico que diz respeito ao fluxo de elétrons entre ligante e receptor. Segundo estes resultados, quanto maior o número de grupos doadores de elétrons no anel aromático, menor será o índice eletrofílico e assim mais forte será a interação com o sítio benzodiazepínico.

Estes resultados se mostram como um interessante ponto de partida para o planejamento de novas substâncias com atividade ansiolítica e que atuam no sítio benzodiazepínico.

2.5. Parte experimental

Os cálculos foram realizados pelo Professor Dr. Fábio da Silva Miranda do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense – Niterói – RJ. Os parâmetros foram calculados no programa Gaussian 03W.¹⁰² O funcional de densidade híbrido (DFT/HF) B3LYP,¹⁰³ empregando o conjunto de bases (*basis set*) 6-31+G(d,p),^{104,105,106} foi utilizado para otimizar a geometria de todos os compostos naturais, diazepam e flunitrazepam, sendo que os confômeros foram selecionados conforme descrito nos resultados e discussão. Para estudar o comportamento das moléculas em solução foi utilizado o método PCM (*Polarizable Continuum Method*)¹⁰⁷ e os parâmetros mais importantes empregados foram: modelo de raio da esfera de solvatação UAKS e fator de escalonamento eletrostático de 1,20 e 1,35 para água e DMSO, respectivamente. Os demais parâmetros foram os padrões recomendados pelo programa. Os cálculos dos parâmetros Log P, volume molecular, polarizabilidade e refratividade molar foram efetuados utilizando a cópia de avaliação do Hyperchem, versão 8.0 (*hypercube*),⁹⁹ e as geometria otimizadas foram as mesmas dos cálculos do funcional de densidade (DFT).

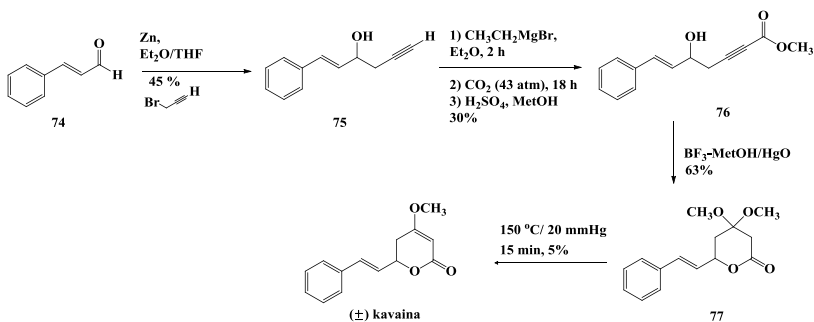
CAPÍTULO 3. Síntese de compostos ansiolíticos utilizando estirilpironas isoladas de *Polygala sabulosa* A. W. Bennett como modelo

3.1. Metodologias sintéticas para a preparação de kavalactonas

Diante dos importantes efeitos no sistema nervoso central e de uma suposta hepatotoxicidade já destacada neste texto, aumentaram nos últimos anos o número de metodologias sintéticas para a preparação das kavalactonas e análogos, em busca de substâncias mais ativas e menos tóxicas.

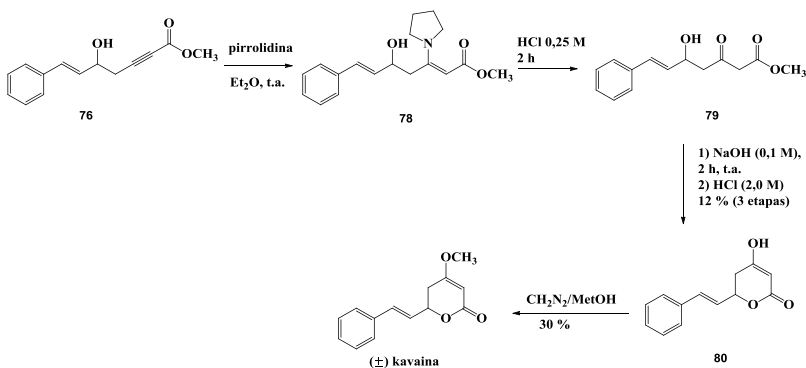
Um dos primeiros trabalhos relatando a preparação destes compostos, especialmente da kavaina em sua forma racêmica, foi publicado em 1950 por Fowler e Henbest¹⁰⁸ (esquema 3.1). Inicialmente, uma reação do tipo Reformatsky entre cinamaldeído **74** e brometo de propargila conduziu à formação do intermediário acetilênico em **75** com um rendimento de 45%. Em seguida, a carboxilação do carbono acetilênico **75** foi realizada através da reação entre o complexo de Grignard, formado pela adição de brometo de etilmagnésio ao acetileno **75**, e dióxido de carbono sob alta pressão. Subseqüente adição de metanol e ácido sulfúrico formou o derivado carboximetilado **76** com um rendimento de 30 % para as três etapas. O derivado ester metílico **76** foi então tratado com BF₃-MeOH/HgO catalítico formando a lactona dimetoxilada **77**. Segundo os autores, a última etapa onde eles necessitariam a eliminação de metanol para a formação do produto final foi a mais complicada e através de aquecimento a 150 °C eles obtiveram a (±)-kavaína com apenas 5 % de rendimento

Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.1

Os resultados não satisfatórios obtidos com esta metodologia levaram os autores a traçar uma nova rota utilizando o derivado ester metílico **76**, já preparado. A nova rota sintética (esquema 3.2) consiste na reação deste ester **76** com pirrolidina, formando a enamina **78**, seguida de hidrólise produzindo o beta-cetoéster **79**. O tratamento deste com NaOH hidrolisa o ester a ácido carboxílico, que em meio ácido sofre ciclização formando o sistema 6-estiril-4-hidroxi-2-pirona **80**. Metilação da hidroxila livre com diazometano em metanol levou a formação da (±)-kavaina com 30% em sua forma racêmica. Embora a nova rota de síntese tenha melhorado os resultados, eles ainda não foram satisfatórios.

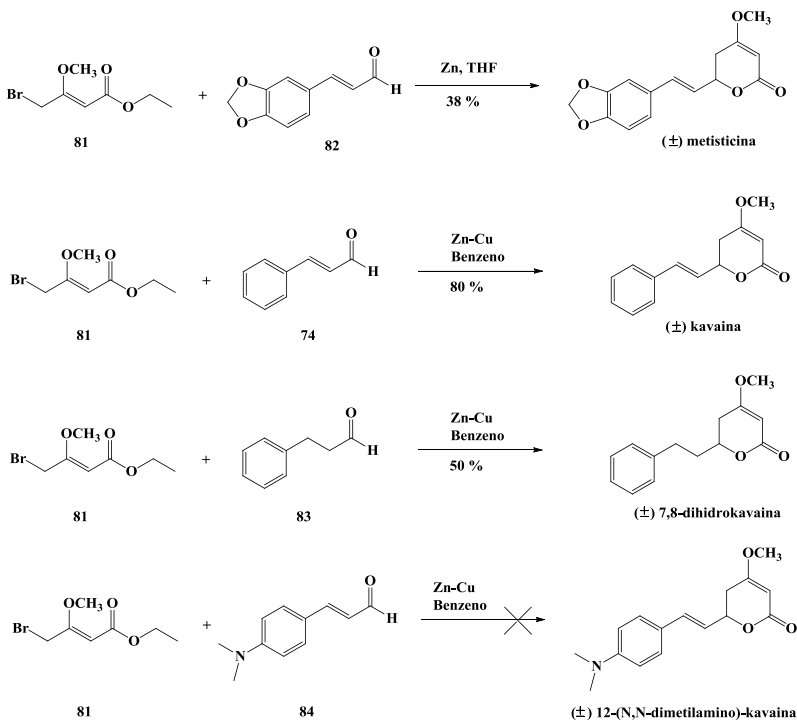


Esquema 3.2

Capítulo 3 - Introdução

Outra metodologia para a síntese de análogos da (\pm) kavaina e da (\pm) 7,8-diidro kavaina foi publicada em 1976 por Israili e Smisman.¹⁰⁹ Para a preparação destes compostos, os autores também utilizaram a condensação do tipo Reformatzky entre derivados do cinamaldeído e 4-bromoacetoacetato de etila na sua forma enol-eter metílico (esquema 3.3). Esta síntese direta de kavalactonas através da reação de Reformatzky, em sua forma original, já havia sido relatada por Khlos e colaboradores em 1959.¹¹⁰ Os autores descreveram a obtenção da (\pm) metisticina em 38% de rendimento, a partir da reação entre **81** e 3,4-metilenodioxicinamaldeído **82**. Devido ao baixo rendimento obtido, modificações foram feitas na metodologia na tentativa de obter as kavalactonas em rendimentos superiores. A diferença do trabalho de Khlos para o de Israili, é que este último utilizou o par Zn-Cu (95 % de Zn) ao invés de Zn para catalisar a reação. A partir desta metodologia, a (\pm) kavaina foi obtida em 80 % de rendimento e para a obtenção da 7,8-diidro kavaina a partir do diidro derivado do cinamaldeído **83** o rendimento foi de 50%. Quando os autores tentaram preparar a (\pm) 12-(*N,N*-dimetilamino)-kavaina a partir do 4-(*N,N*-dimetilamino)-cinamaldeído **84**, não foi observado formação do produto. Este problema foi contornado ao transformar o grupo *N,N*-dimetilamino em um átomo de nitrogênio quaternário utilizando éter clorometilmetílico. A reação de Reformatzky com este derivado formou o produto 12-(*N,N*-dimetilamino)-kavaina com 26,5 % de rendimento.

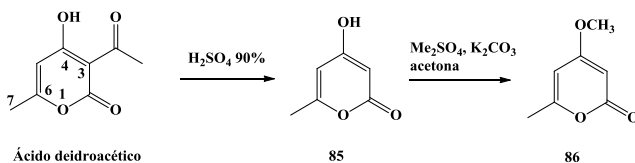
Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.3

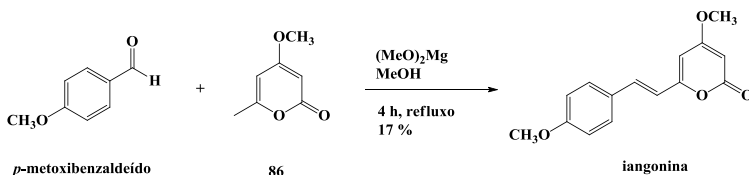
Além destas metodologias que partem do sistema estiril para construir o sistema 4-metoxi-2-pirona, outras rotas sintéticas partindo do sistema 2-pirona já foram relatadas na literatura. Nestes casos, a substância chave utilizada foi o ácido dehidroacético (3-acetil-4-hidroxi-6-metil-2-pirona) que é um conveniente material de partida para produtos com a estrutura δ -lactona uma vez que é disponível comercialmente.¹¹¹ Além disso, a fácil desacetilação levando ao composto **85** (esquema 3.4) e subsequente metilação do grupamento hidroxila com altos rendimentos levando ao enol éter **86**,^{112,113} tem aumentado o interesse no ácido dehidroacético devido aos inúmeros exemplos de produtos naturais que contém em sua estrutura este sistema 2-pirona.

Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.4

Em um trabalho publicado em 1960 por Bu'Lock e Smith,¹¹⁴ onde buscava-se confirmar a estrutura do produto natural iangonina isolada de *Piper methysticum*, os autores relataram a síntese deste produto natural através da reação entre 6-metil-4-metoxi-2-pirona **86** e *p*-metoxibenzaldeído utilizando dimetóxido de magnésio em metanol (esquema 3.5). O rendimento do produto após recristalização em metanol foi de 17 %.

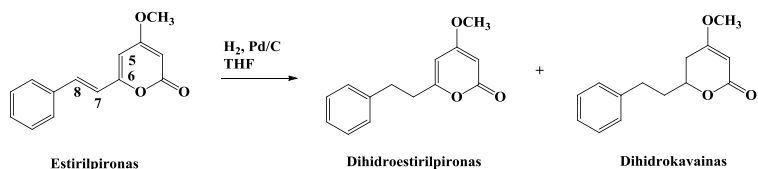


Esquema 3.5

O próprio grupo de Israili e Smissman (1976),¹⁰⁹ já citados no texto anteriormente, utilizou esta metodologia de Bu'Lock e Smith¹¹⁴ para a preparação dos derivados de estilripironas e diidroestirilpironas com a ligação dupla em C7 e C8 reduzida. Felizmente, os rendimentos foram mais altos e ficaram em 44% utilizando benzaldeído, 41,5% utilizando *p*-metoxibenzaldeído e 40% utilizando 4-(*N,N*-dimetilamino)-benzaldeído. Neste mesmo trabalho, o tratamento das estilripironas com Pd/C em THF e atmosfera de hidrogênio (esquema 3.6) resultou na redução das ligações duplas em C5-C6 e C7-C8 sendo que a ligação dupla em C7-C8 é reduzida mais rapidamente que a dupla em C5-C6. Esses resultados são importantes devido a possibilidade de preparar tanto as diidroestirilpironas quanto as diidrokvainas dependendo do

Capítulo 3 - Introdução

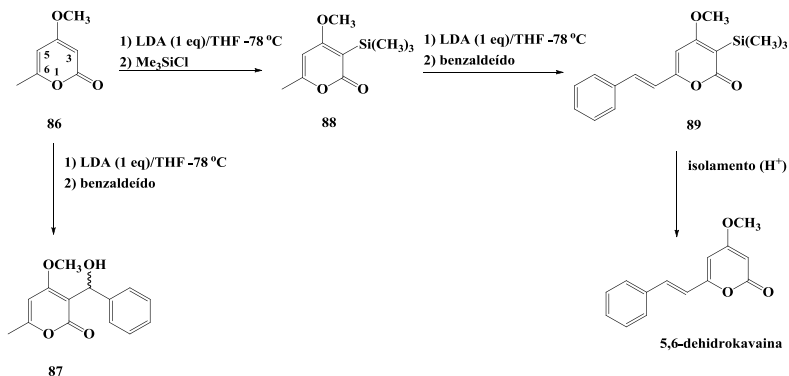
tempo de reação, da quantidade de paládio utilizada e da pressão de hidrogênio no sistema.¹⁰⁹



Esquema 3.6

Continuando no mesmo raciocínio para a preparação de estirilpironas utilizando o ânion de 6-metil-4-metoxi-2-pirona **86** para subsequente ataque sobre o carbono eletrofílico de um aldeído, outros trabalhos já foram publicados. Younis e colaboradores (2000),¹¹⁵ relataram a síntese da 5,6-dehidrokavaina e análogos através do ataque nucleofílico do carbono C7 de **86** ao carbono carbonílico de benzaldeídos (esquema 3.7). Para a formação do enolato, foi utilizado LDA como base em THF a -78 °C. Os resultados mostraram que após a formação do enolato, o carbono mais reativo para o ataque nucleofílico é o C3 resultando na formação do composto 3-benzilado **87**. A estratégia utilizada pelos autores para resolver este problema foi proteger o carbono C3 com trimetilsilano, formando o sililderivado **88**. Pela adição de mais um equivalente de LDA, seguida da adição de benzaldeído, a condensação ocorre no carbono C7 formando assim o derivado sililado da 5,6-dehidrokavaina **89**. O isolamento do produto em meio ácido remove o grupamento trimetilsilil e leva à formação da 5,6-dehidrokavaina. Ainda na tentativa de obter as estirilpironas por meio desta reação de condensação com **86** em apenas uma etapa, outras bases foram utilizadas. Paterson e Wallace, em 1994¹¹⁶ obtiveram com 82% de rendimento um produto de condensação no carbono C7 de **86** utilizando a base KN(SiMe₃)₂ (KHMDs) e um aldeído de interesse do grupo. Embora a eficiência desta reação não tenha sido testada para a síntese das estirilpironas, os resultados indicam que a utilização de uma base mais volumosa que LDA e *n*-BuLi possa impedir o ataque nucleofílico pelo carbono C3 após a formação do enolato.

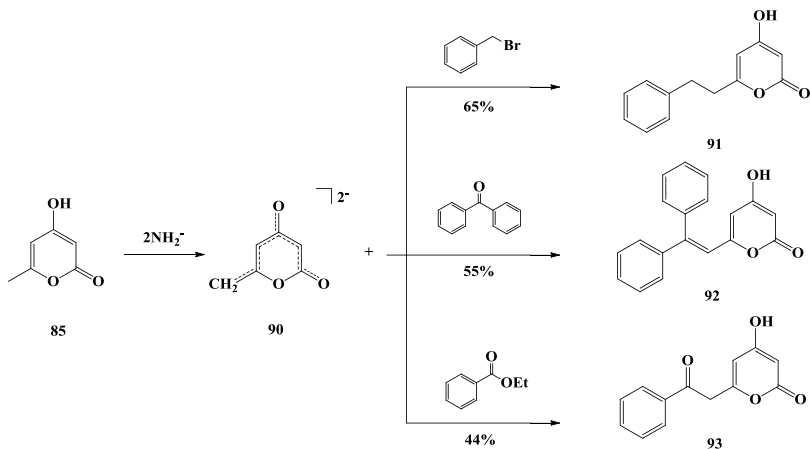
Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.7

Outra estratégia para a preparação dos compostos de nosso interesse é a utilização do diânion **90** do composto 6-metil-4-hidroxi-2-pirona **85** (esquema 3.8). Em um estudo realizado por Wachter e Harris (1970),¹¹⁷ o diânion **90** foi gerado com dois equivalentes de amideto de sódio em amônia líquida e foram tratados com brometo de benzila para a preparação de uma 7,8-diidroestirilpirona **91** com 65% de rendimento. Em outra reação o diânion foi tratado com benzofenona para a formação de um derivado diarilado **92** com 55% de rendimento, e o tratamento deste mesmo diânion com benzoato de metila resultou na formação do análogo 8-oxo da dehidrokavaina **93** com 44% de rendimento. Recentemente, Zhang e colaboradores (2007),¹¹⁸ também relataram a preparação de análogos das estirilpironas utilizando o diânion de **90** como material de partida. A base utilizada neste trabalho foi *n*-BuLi (2,6 eq) em uma mistura de THF/HMPA (6:1) como solvente à -78 °C. Para mostrar a eficiência da reação, foram utilizados como eletrófilos: haletos de alquila, haletos de arila, epóxidos, aldeído e cetonas. Com exceção das cetonas, cujos rendimentos ficaram em torno de 20%, os rendimentos ficaram entre 50 e 90%.

Capítulo 3 - Introdução



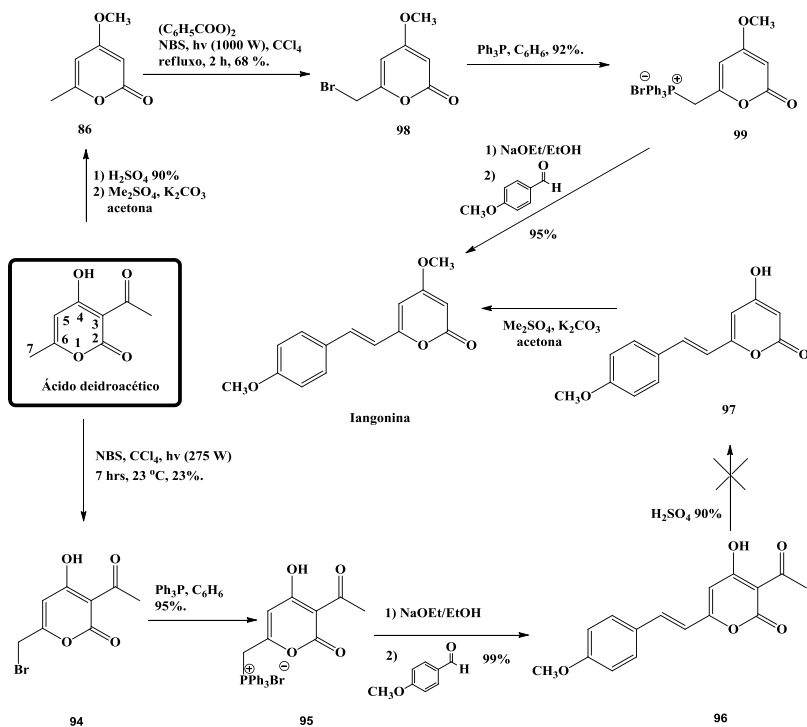
Esquema 3.8

Em 1970, Harris e colaboradores¹¹⁹ estudaram a funcionalização da metila presente em C6 no ácido deidroacético. Estes resultados levariam a uma rota alternativa para a preparação das estirilpironas (esquema 3.9). Neste trabalho, os autores relataram a possibilidade de bromação seletiva do ácido dehidroacético em 4 diferentes posições, dependendo das condições empregadas. Para a síntese da estirilpironas, o interesse está no derivado **94**, monobromado em C7, que foi obtido com apenas 23% de rendimento utilizando NBS (N-bromosuccinimida) em tetracloreto de carbono e uma lâmpada de 275 watts. Com esta metodologia de bromação do ácido dehidroacético, Bacardit e colaboradores (1982),¹²⁰ tentaram preparar a iangonina através da reação de Wittig entre o sal de trifenilfosfônio **95** e anisaldeído utilizando etóxido de sódio, em etanol, como base. O produto **96** da reação de Wittig foi obtido com um rendimento quase quantitativo mostrando a eficiência desta reação para a preparação desta classe de compostos. No entanto, não foi possível preparar a iangonina porque a deacetilação em ácido sulfúrico que levaria ao composto **97** não ocorreu para este sistema.

Em um trabalho publicado em 1974, Bloomer e colaboradores¹²¹ descreveram uma metodologia alternativa para a preparação da iangonina utilizando o ácido dehidroacético como material de partida (esquema 3.9). O grupo relatou a preparação do 6-

Capítulo 3 - Introdução

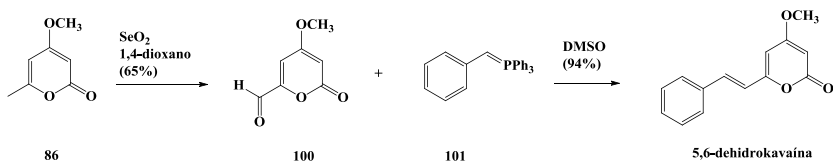
bromometil-4-metoxi-2-pirona **98** como produto majoritário utilizando NBS e peróxido de di-terc-butila, como iniciador de radical, em tetracloreto de carbono. No entanto, o rendimento não foi satisfatório. Pouco tempo depois, o grupo de Bacardit (1982)¹²⁰ estudou outras condições para esta reação de bromação e conseguiu melhorar a metodologia obtendo o derivado éter bromado na posição C-7 **98** com 68% de rendimento. O tratamento do produto bromado **98** com trifetilfosfina, levou a formação de **99**, e subsequente reação de Wittig com anisaldeído formou a iangonina com um rendimento de 95%. Em todas estas reações para a preparação das estililpironas tanto pela reação de Wittig quanto pela condensação utilizando dimetóxido de magnésio, nenhum comentário foi feito acerca da obtenção de uma razão dos estereoisômeros *E* e *Z* supondo assim que em ambos os métodos foram obtidos somente os isômeros na forma *E*.



Esquema 3.9

Capítulo 3 - Introdução

A funcionalização do carbono C7 tem sido alvo de muitos estudos para a obtenção de análogos da iangonina. Conforme já comentado acima, a reação de Wittig mostrou alta eficiência para a preparação da iangonina. Porém, a bromação alílica do carbono C7 é de difícil reprodutibilidade e a rota muitas vezes acaba não sendo viável. Com base nisso, estudos para encontrar outras formas de funcionalizar o carbono C7 foram realizados. Uma opção foi a oxidação do carbono alílico C7 à aldeído e obtenção da iangonina através de reação de Wittig utilizando o sal de trifenilfosfônio derivado de haletos de benzila. Esta metodologia foi utilizada por Suzuki e colaboradores em um trabalho publicado em 1975¹²². Para a oxidação da metila alílica foi utilizado dióxido de selênio em 1,4-dioxano obtendo o produto 6-formil-4-metoxi-2-pirona **100** com 65 % de rendimento. Subsequente reação do aldeído **100** com o ilídeo **101** em DMSO levou a obtenção da 5,6-dehidrokavaína com 94% de rendimento (esquema 3.10).

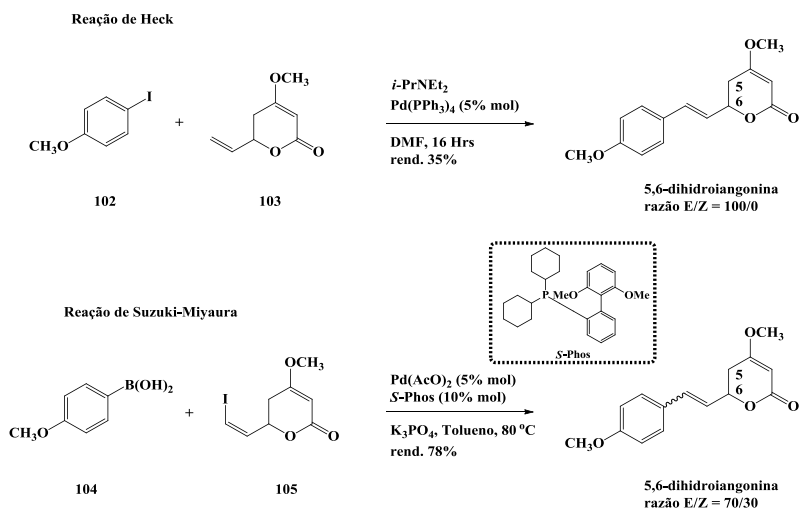


Esquema 3.10

Recentemente, novas estratégias vêm sendo utilizadas para a preparação destes compostos. Amaral e colaboradores (2008)¹²³ da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul relataram metodologias de acoplamento carbono-carbono através de reação de Heck e reação de Suzuki-Miyaura (esquema 3.11). Inicialmente, tentativa de preparar compostos como a 5,6-diidroiangonina via reação de Heck utilizando o haletos de arila **102** e a olefina **103**, com 5 a 10% mol do catalisador tetrakis-(trifenilfosfina) paládio (0) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) em DMF, levou a formação dos produtos desejados com rendimentos não satisfatórios aos quais variaram entre 35 e 40%. A mesma reação utilizando 10% mol do catalisador e aquecimento em microondas (150 °C com irradiação de 300 W) levou a formação dos produtos em 5,5 minutos com rendimentos que ficaram na

Capítulo 3 - Introdução

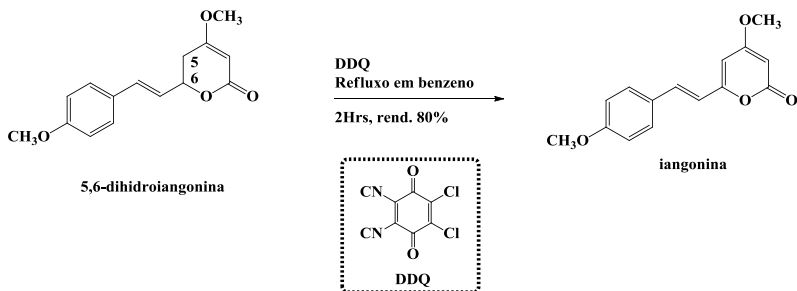
faixa de 42 a 46 %. Embora as condições com aquecimento em microondas levaram a uma diminuição no tempo de reação produzindo menos produtos laterais, os autores optaram por investir na reação de Suzuki-Miyaura. Para isso foi realizada a reação entre o derivado iodado **105**, na forma *Z* e o ácido borônico **104** utilizando acetato de paládio (II) (5% mol), o ligante *S*-Phos ([2-(2,6-dimetoxibifenil)diciclo-hexil-fosfina]) na presença de fosfato de potássio em tolueno a 80 °C. A partir desta metodologia, tanto a iangonina quanto outros análogos, foram obtidos com rendimentos satisfatórios os quais variaram de 73 a 78 %. No entanto, surpreendentemente, os compostos foram obtidos como uma mistura dos isômeros *E* e *Z*. Experimentos feitos pelos autores confirmam que a isomerização ocorre após a arilação do carbono halogenado e não há possibilidade de ocorrer a isomerização do material de partida.



Esquema 3.11

Como etapa final da preparação da iangonina, a substância 5,6-diidroiangonina foi submetida ao tratamento com 5,6-diciano-2,3-diclorobenzoquinona (DDQ) em benzeno anidro (esquema 3.12). O produto foi obtido com um rendimento de 80%.

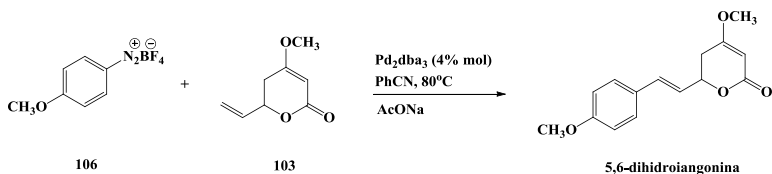
Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.12

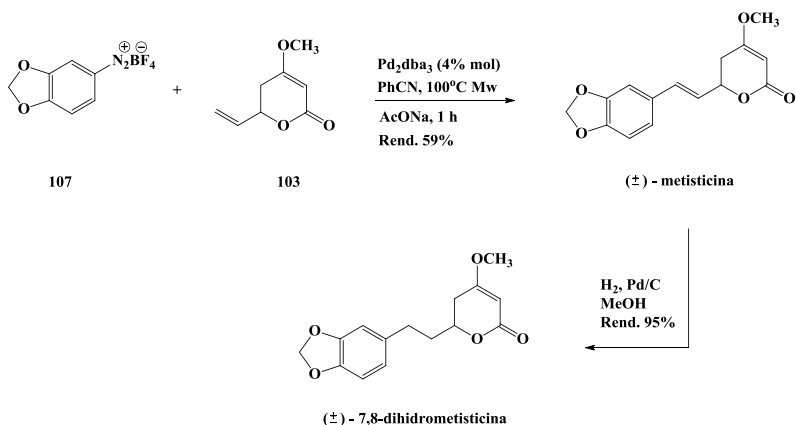
Apesar do baixo rendimento na obtenção dos produtos via reação de Heck e da modesta estereoseletividade via reação de Suzuki-Miyaura, os métodos são apresentados como um rápido acesso a derivados das kavalactonas. Neste sentido, um grupo de pesquisa do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) estudou a síntese destes derivados de kavalactonas utilizando a reação de Heck-Matsuda. Esta metodologia difere do acoplamento de Heck tradicional por utilizar sais de diazônios ao invés de iodetos de arila. Em um trabalho publicado em 2009, Moro e colaboradores¹²⁴ relataram fácil acesso a estrutura da iangonina (esquema 3.13) através do tratamento da olefina **103** com tetrafluorborato de 4-metoxifenildiazônio **106**, Pd₂(dba)₃ (4% mol) como catalisador, acetato de sódio como base e aquecimento (80 °C) em benzonitrila por 5 horas. Nestas condições, o produto 5,6-diidroiangonina foi obtido com um rendimento de 68%. As condições para a obtenção deste mesmo produto também foram otimizadas para a reação com aquecimento em microondas. Os parâmetros ótimos encontrados foram os mesmos que os da reação sob aquecimento convencional sendo que houve uma diminuição do tempo de 5 para 0,5 horas e um aumento do rendimento de 68 para 85 %. Não foi relatado o isolamento de nenhum produto na forma Z mostrando a alta estereoseletividade da reação de Heck-Matsuda para a síntese de derivados de kavalactonas. Para finalizar a síntese da iangonina, a 5,6-diidroiangonina foi submetida ao tratamento com DDQ em benzeno anidro para fornecer o produto com um rendimento de 85%.

Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.13

Para estender o escopo da metodologia, os autores ainda relataram a síntese de mais dois derivados de kavalactonas: a metisticina e a diidrometisticina, ambos na forma racêmica (esquema 3.14). O aduto de Heck-Matsuda foi obtido através da reação entre o sal tetrafluorborato de 3,4-metilenodioxifenildiazônio **107** e a olefina **103** sob as mesmas condições utilizadas na síntese da iangonina, com excessão de uma maior temperatura e maior tempo de reação. A (\pm)-metisticina foi isolada com 59% de rendimento. Subsequente redução da ligação dupla em C7 e C8 com H_2 e Pd/C em metanol resultou na obtenção da (\pm)-7,8-diidrometisticina com 95% de rendimento após isolamento.

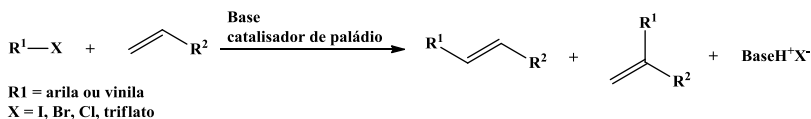


Esquema 3.14

Capítulo 3 - Introdução

3.1.1. A reação de Heck com sais de arenodiazônio

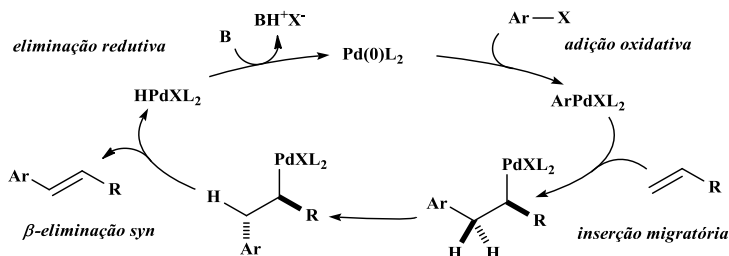
A reação de Heck se apresenta como uma das ferramentas mais amplamente utilizadas na formação de ligações carbono-carbono em síntese orgânica. Normalmente é utilizada para a arilação ou vinilação de uma ligação dupla pelo uso de haletos de arila ou vinila na presença de base e catalisador de paládio (esquema 3.15).¹²⁵



Esquema 3.15

Um mecanismo para estas reações, catalisadas por Pd(AcO)₂ associados com ligantes de fosfina, foi proposto em 1974 por Heck e Dieck. O ciclo catalítico para a reação de arilação de Heck apresenta quatro etapas principais: adição oxidativa, inserção migratória ou carbopaladação, β-eliminação *syn* e eliminação redutiva (esquema 3.16). O primeiro passo do ciclo catalítico é a adição oxidativa onde o paládio se insere entre a ligação H-X ocorrendo assim a oxidação do paládio passando de 0 para +2. Esta etapa obedece a ordem de reatividade ArI > ArBr >> ArCl. A adição oxidativa leva a formação de um sistema σ-arilpaládio(II), *trans*-ArPdXL₂, o qual coordena com o alceno após a dissociação de uma fosfina (L) e segue com uma *inserção syn* no alceno. Após esta etapa de inserção migratória, em sistemas acíclicos, ocorre uma rotação na ligação C-C deixando um hidrogênio β *syn* em relação ao paládio. Dessa forma, acontecem a β-eliminação *syn* de hidropaládio e a formação do aduto de Heck. Por fim, a eliminação redutiva é a etapa em que uma base ou o próprio solvente promove a abstração de um próton da espécie HPdXL₂, levando à redução da espécie de Pd(II) a Pd(0) e regenerando a espécie ativa de paládio ao ciclo catalítico.

Capítulo 3 - Introdução



Esquema 3.16

Menos conhecidos que os haletos e triflatos estão os sais de arenodiazônio os quais também atuam como eletrófilos e conseguem coordenar com o paládio na etapa de adição oxidativa do ciclo catalítico. Os primeiros exemplos da utilização dos sais de arenodiazônio em reações de Heck foram relatados por Matsuda em 1977. As reações de Heck empregando sais de arenodiazônio não exigem o uso de base e fosfinas como ligantes para estabilizar o paládio, conseqüentemente as reações podem ser realizadas em condições aeróbicas, utilizando solventes não anidros, tornando o processo experimental mais simples. Sais de diazônio também são mais eficientes, fornecendo os produtos arilados mais rapidamente, além de serem, em geral, mais baratos, por serem obtidos diretamente pela diazotização de anilinas. A sua eficiência e a velocidade da reação estão relacionadas com a facilidade com que o paládio realiza adição oxidativa na ligação C-N₂ gerando espécies de paládio catiônicas, altamente reativas, durante o ciclo catalítico. Conseqüentemente, as reações podem ser efetuadas em temperaturas mais brandas.

3.2. Objetivos

- Planejar a síntese de compostos baseado na relação estrutura-atividade das estirilpironas e a afinidade com o sítio benzodiazepínico.
- Sintetizar os compostos planejados visando confirmar as tendências encontradas no estudo da relação estrutura—atividade.

3.3. Resultados e discussão

No capítulo 2, relatamos a determinação de alguns parâmetros eletrônicos que foram comparados aos parâmetros de dois benzodiazepínicos disponíveis comercialmente, diazepam e flunitrazepam. As principais conclusões estão resumidas abaixo:

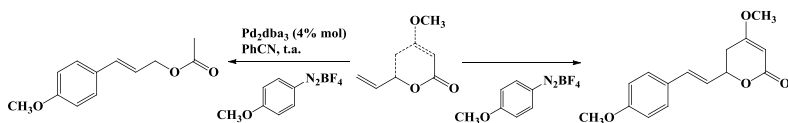
- Foram isolados dois grupos de estruturas, as DSTs e as STYs, onde a principal diferença é a presença/ausência da ligação dupla entre os carbonos C7 e C8. Os efeitos biológicos, no modelo estudado, para ambos os grupos ficaram na mesma ordem indicando que a presença ou ausência da ligação dupla não é de suma importância para a interação com o receptor.
- Foi observada uma relação direta entre o número de metoxilas e afinidade pelo sítio benzodiazepínico. Quanto maior o número de metoxilas, grupos doadores de elétrons, maior foi a interação entre os ligantes e o receptor. Estes dados estão de acordo com o índice de eletrofilicidade uma vez que este índice indica a energia mais baixa devido ao máximo fluxo de elétrons entre doador e aceptor. Neste sentido, grupos doadores de elétrons como metoxilas deixam o ligante mais rico em elétrons o que facilita o fluxo entre ligante e receptor diminuindo o índice de eletrofilicidade.
- A distância entre a carbonila e anel aromático no diazepam e nas estirilpironas são semelhantes indicando que as estirilpironas podem se ajustar ao sítio benzodiazepínico de forma semelhante ao diazepam.

Com base nestes resultados planejou-se a síntese de alguns compostos-chave com o objetivo de confirmar as conclusões descritas acima. Dentre os métodos de preparação de estirilpironas citados na revisão bibliográfica, o que se mostrou mais promissor foi a metodologia descrita por Moro e colaboradores¹²⁴ da Universidade Estadual de Campinas. Desta forma, após solicitação de período sandwich junto ao CNPq, os compostos foram preparados no Laboratório de Síntese de Substâncias Orgânicas (LASSO) coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia.

Em um trabalho já publicado por Correia e colaboradores,¹²⁴ foi desenvolvido uma nova metodologia para a arilação de acetatos alílicos utilizando a reação de Heck com sais de arenodiazônio (esquema 3.17). Excelentes resultados foram obtidos na síntese dos alcoóis cinâmicos

Capítulo 3 – Resultados e discussão

acetilados com rendimentos que vão de 68 a 96%. Além disso, a metodologia apresentou excelente régio e estereoseletividade. Com o intuito de aplicar esta nova metodologia na síntese de produtos naturais, notou-se uma certa semelhança entre os acetatos alílicos e o sistema lactônico necessário para a síntese de kavalactonas. Acreditou-se que as arilações no “acetato alílico cíclico” (lactona de seis membros) pudessem ocorrer com o mesmo sucesso que o “acetato alílico alifático”. Inicialmente, as condições utilizadas para a síntese das kavalactonas foram as mesmas, apenas com pequenas modificações, utilizadas na síntese dos álcoois alílicos acetilados.



Esquema 3.17

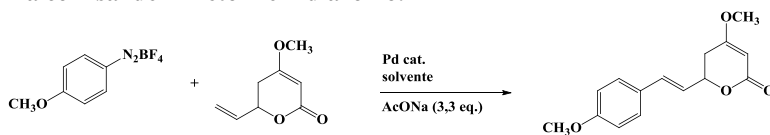
A tabela 8 apresenta as condições testadas para a síntese da 12-metoxikavaína. Como fonte de paládio foram testados $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$.dba e $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ (com atmosfera de CO para reduzir Pd^{2+} a Pd^0) e como solvente benzonitrila e acetonitrila os quais foram as combinações com resultados mais positivos. A partir de reações a temperatura ambiente o produto foi obtido com rendimentos baixos e longos tempos de reação. Rendimentos superiores foram obtidos com aquecimento convencional a $80\text{ }^\circ\text{C}$ e aquecimento em micro-ondas a $80\text{ }^\circ\text{C}$ o qual levou a formação do produto em apenas 30 minutos. Um teste em MeOH, sem AcONa, foi realizado mas não foi observada a formação do produto. O melhor resultado alcançado foi utilizando PhCN como solvente e $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$.dba (4% mol) como catalisador (registro 5). No entanto, também cabe aqui ressaltar o resultado obtido utilizando essas mesmas condições com aquecimento convencional na bancada (registro 4) na qual o produto foi obtido com 68 % de rendimento.

A partir destes resultados, tentou-se aplicar a melhor condição obtida até agora sob aquecimento convencional (registro 4 – tab. 8) para a síntese de derivados da iangonina. Embora o melhor rendimento fosse utilizando aquecimento em micro-ondas (registro 5 – tab. 7), optou-se por trabalhar com aquecimento convencional na bancada visando um aumento na escala da reação para a obtenção dos produtos de interesse.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

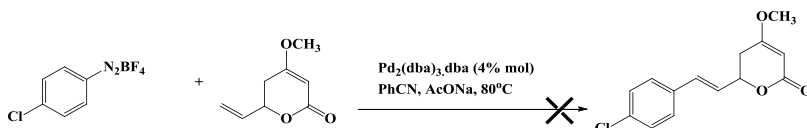
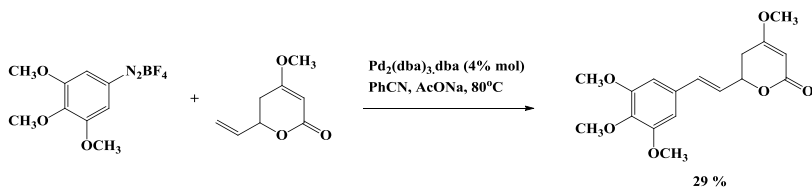
Surpreendentemente, não foi obtido o mesmo sucesso quando o sal tetrafluorborato de 3,4,5-trimetoxifenildiazônio e o sal tetrafluorborato de 4-clorofenildiazônio foram empregados. O composto trimetoxilado foi obtido em apenas 29 % de rendimento e o derivado 12-cloro foi obtido com rendimentos irrisórios impossibilitando o isolamento por técnicas cromatográficas convencionais já que o material de partida e o produto possuem o mesmo Rf (esquema 3.18).

Tabela 7 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 4-metoxifenildiazônio.



| | Catalisador [% mol] | solvente | T (°C) | Tempo (h) | Rend. (%) |
|----------------|---|----------|-----------------------------|--------------|--------------|
| 1 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 25 | 12 | 30 |
| 2 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | PhCN | 25 | 12 | 20 |
| 3 ^a | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 80 | 12 | Nr |
| 4 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 | 5 | 68 |
| 5 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 (<i>M_w</i>) | 0,5 | 85 |
| 6 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | MeCN | 80 (<i>M_w</i>) | 0,5 | 60 |
| 7 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | PhCN | 80 (<i>M_w</i>) | 0,5 | 41 |

^aNão foi utilizado base. (*M_w*) = aquecimento em micro-ondas. Nr = não reagiu.



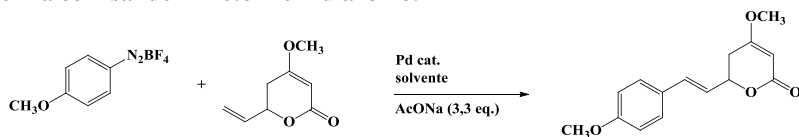
Esquema 3.18

Capítulo 3 – Resultados e discussão

Diante destes resultados foi necessário estudar um pouco mais a reação de Heck-Matsuda com o sal de 4-metoxifenildiazônio para encontrar um condição que possa ser expandida para a síntese de estililpironas utilizando tanto sais de fenildiazônio ricos em elétrons quanto pobres em elétrons.

Baseado nos primeiros resultados obtido pelo grupo (tabela 8) realizou-se pequenas modificações nas condições já testadas o que resultou na obtenção dos produtos com rendimentos moderados a bons (tabela 9). O melhor resultado foi obtido ao trocar o catalisador para acetato de paládio e o solvente para acetonitrila. Nestas condições, o produto foi obtido em 75 % de rendimento. Na tentativa de adicionar outro solvente que também pudesse se coordenar e estabilizar o paládio, foi adicionado acetato de etila em uma mistura 1:1 v:v (registro 4 – tab 9). No entanto, apesar do resultado ser satisfatório, não foi superior ao da registro 2 (registro 4 – tab 9). Um teste com aquecimento em micro-ondas (registro 3 – tab 9) também foi realizado, mas o rendimento não foi superior ao obtido sob aquecimento convencional (registro 2 – tab 9). Este resultado não foi surpreendente uma vez que já foram observados rendimentos inferiores quando reações foram conduzidas em aquecimento no micro-ondas sob atmosfera de CO.

Tabela 8 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 4-metoxifenildiazônio.



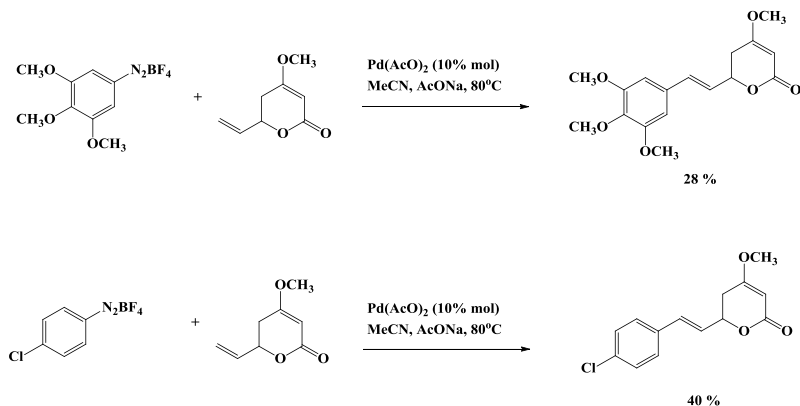
| | Catalisador [% mol] | solvente | T (°C) | t (h) | Rend. (%) |
|----------------|---|------------------|------------------|-------|--------------|
| 1 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 | 3 | 23 |
| 2 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | MeCN | 80 | 3 | 75 |
| 3 ^a | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | MeCN | 80 _{Mw} | 0,5 | 50 |
| 4 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | MeCN/AcOEt (1:1) | 80 | 3 | 60 |

(M_w) = aquecimento em micro-ondas.

Utilizando as mesmas condições testadas no registro 2, verificou-se o potencial desta metodologia para a preparação dos derivados trimetoxilado e clorado (esquema 3.19). Em relação ao produto trimetoxilado, não houve melhora no rendimento. Porém, o

Capítulo 3 – Resultados e discussão

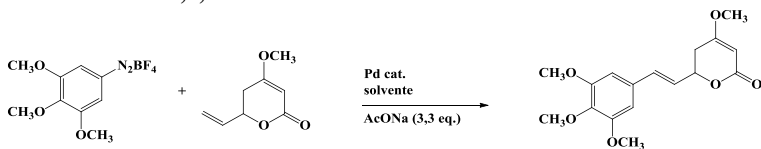
derivado clorado foi obtido com 40% de rendimento. Embora o rendimento tenha sido apenas moderado, o resultado foi animador já que possibilitava a expansão da metodologia para a preparação dos produtos derivados de sais de fenildiazônio com grupos retiradores de elétrons.



Esquema 3.19

Considerando a condição apresentada no registro 2 (tabela 9) satisfatória para a reação de Heck, essa metodologia foi estendida para outros sais de diazônio visando a síntese das estililpironas de interesse (figura 11). Com exceção do derivado 12-metoxilado, todos os outros compostos foram obtidos com baixos rendimentos. A tendência esperada para os derivados halogenados não foi observada. Normalmente, os rendimentos das reações de Heck com sais de fenildiazônio halogenados decresce na ordem $F > Cl > Br > I$. Era esperado um rendimento superior para o derivado fluorado já que o derivado clorado foi obtido com 40% de rendimento. O que pode ter ocorrido é a formação de outros produtos devido à alta temperatura utilizada e a susceptibilidade dos derivados fluorados sofrerem reações de substituição nucleofílica aromática. Estes produtos laterais não foram isolados, mas observou-se por cromatografia em camada fina a presença de inúmeras outras manchas além das manchas referentes ao produto e ao material de partida. Decidiu-se por não realizar a reação com o sal de 4-iodofenildiazônio com base no baixo rendimento já obtido com o sal 4-bromofenildiazônio.

Tabela 9 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina com sal de 3,4,5-trimetoxifenildiazônio.



| | Catalisador [% mol] | solvente | T (°C) | t (h) | Rend. (%) |
|-----------------|---|------------------|-----------------------------|----------|--------------|
| 1 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 | 3,0 | 29 |
| 2 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 (<i>M_w</i>) | 1,0 | 60 |
| 3 ^a | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | MeCN | 80 | 3,0 | 28 |
| 4 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | MeCN/AcOEt (1:1) | 25 | 3,0 | 15 |
| 5 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | THF | 80 | 3,0 | 20 |
| 6 | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 80 | 3,0 | 32 |
| 7 | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 60 | 5,0 | 14 |
| 8 ^a | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 60 | 5,0 | 39 |
| 9 ^a | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 60 (<i>M_w</i>) | 0,5 | 34 |
| 10 ^a | Pd(AcO) ₂ [10,0] | EtOH | 75 | 5,0 | 40 |
| 11 | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeCN/MeOH (3:1) | 80 | 3,0 | 26 |

(*M_w*) = aquecimento em micro-ondas. ^aNestas registros foi utilizado a base 2,6-di-terc-butil-4-metilpiridina (3,3 eq) como base ao invés de AcONa.

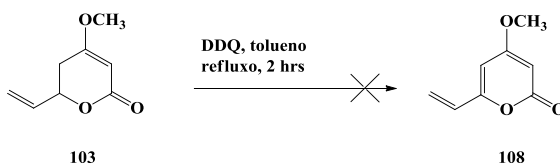


Esquema 3.20

Como mostrado anteriormente, os resultados não foram satisfatórios para a obtenção das estilpironas via reação de Heck utilizando sais de arenodiazônio contendo grupos retiradores de elétrons e também sais de arenodiazônio ricos em elétrons. Dessa forma, nossa atenção se dirigiu para a obtenção da olefina **108** com a ligação C5-C6 oxidada. Acredita-se que a olefina **108** teria uma maior reatividade,

Capítulo 3 – Resultados e discussão

devido a sua conjugação estendida, assemelhando-se à reatividade de estirenos. A reatividade dos estirenos frente à reação de Heck com sais de diazônio já foi estudada pelo grupo do Professor Correia.¹²⁶ Inicialmente, tentou-se preparar a olefina **108** a partir da olefina **103** utilizando DDQ e refluxo em tolueno (esquema 3.21). No entanto, o produto desejado não foi obtido nem utilizando refluxo com aquecimento convencional, e nem com aquecimento em micro-ondas a 120 °C. Outros oxidantes também foram utilizados como CAN, IBX, MnO₂, DBU e *t*-ButOK sendo que em nenhum dos casos houve a formação do produto.

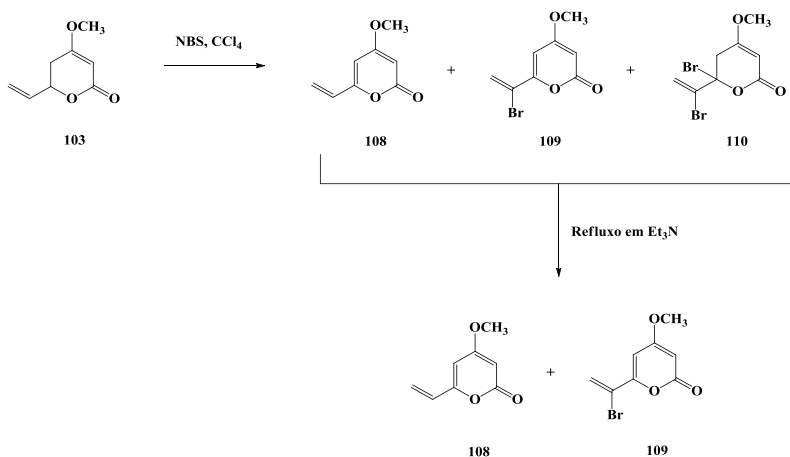


Esquema 3.21

Frente a esses resultados negativos para a obtenção da olefina **108**, tentou-se a reação de bromação de **103**, seguida da eliminação de bromo para formar a ligação dupla entre os carbonos C5 e C6 (esquema 3.22). As reações foram conduzidas em CCl₄ à temperatura ambiente e à 80 °C, com aquecimento convencional e em micro-ondas, e ainda com 1,0 e 2,0 equivalentes de NBS. Em alguns casos, o produto bruto da reação de bromação foi refluxado em trietilamina para forçar a desidroalogenação de algum produto mono halogenado existente. De uma forma geral, no bruto das reações observou-se a presença de 3 produtos mais o material de partida. As reações foram acompanhadas por CCD e CG-EM e como os Rfs são muito próximos, a separação de todos os compostos ficou inviável. Em todas as reações, o produto monobromado **109** no carbono C7 e o material de partida **103** foram os compostos majoritários. Desta forma, o produto **109** foi o único isolado e caracterizado por RMN ¹H. A estrutura do produto dibromado **110** foi proposta com base na ordem de estabilidade de radicais. Por CG-EM, sempre foi observado a presença do material de partida **103**, da olefina **108**, do produto monobromado **109** e do produto dibromado **110**. Após refluxo com Et₃N, o composto dibromado **110** desaparecia e a proporção

Capítulo 3 – Resultados e discussão

do composto monobromado **109** sempre aumentava quando comparado à proporção do material de partida **103** e da olefina **108**. Diante da obtenção destes três compostos, acredita-se que o primeiro átomo de bromo deve entrar em C6 sendo que uma parte deste produto sofre outra bromação levando a formação de **110** e a outra parte sofre a desidrohalogenação formando a olefina **109**. Devido à baixa conversão da olefina **103** na olefina **108** e também a dificuldade no isolamento, optou-se por avaliar outras formas para chegar ao produto de interesse.

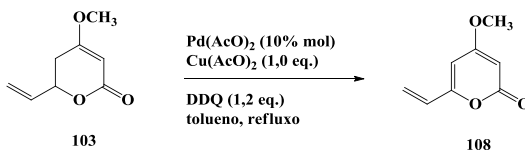


Esquema 3.22

Agora nossa atenção se voltou para a desidrogenação utilizando paládio como agente oxidante. Na primeira tentativa, a reação foi conduzida com Pd/C em PhCN, mas a formação do produto não foi observada. Em um segundo momento, foi utilizado também Pd(AcO)₂ catalítico e Cu(AcO)₂ em quantidades estequiométricas e ambos não levaram a formação do produto desejado. Somente foi observado a formação do produto quando utilizou-se uma benzoquinona, como co-catalisador orgânico, junto com Pd(AcO)₂ catalítico (10% mol) e Cu(AcO)₂ estequiométrico. No entanto, o produto foi formado em rendimento irrisório e só foi observado por CG-EM. Acredita-se que a obtenção da olefina **108** utilizando Pd(AcO)₂ ainda pode ser melhorada

Capítulo 3 – Resultados e discussão

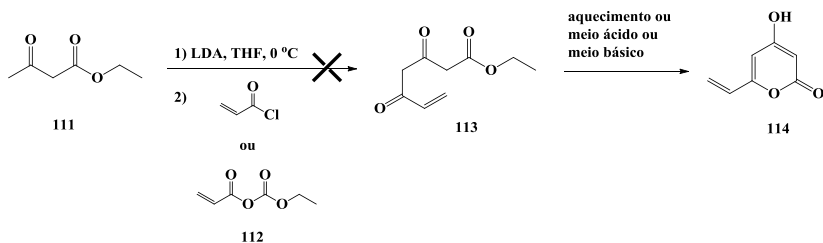
com um pouco mais de estudos. Mas em razão do curto tempo para encontrar uma solução novos métodos foram avaliados (esquema 3.23).



Esquema 3.23

Como não foi encontrado uma rota viável para obter a olefina **108** a partir da olefina **103**, tentou-se construir o anel pirona utilizando cloreto de acrilóila e acetoacetato de etila (esquema 3.24). O primeiro problema desta metodologia surgiu já na compra do cloreto de acrilóila que apesar de ser comercial, o prazo de entrega é muito alto (9 meses – o transporte é via marítima). A facilidade com que o material polimeriza também não permitiria a compra de uma grande quantidade do cloreto de ácido. Desta forma o cloreto de acrilóila foi preparado utilizando o ácido acrílico e cloreto de tionila. A princípio, houve formação do cloreto de ácido devido a grande quantidade de gás HCl liberado. No entanto, ao tentar destilar o cloreto de acrilóila, houve a formação de um resíduo denso e viscoso, que provavelmente é produto de polimerização. Nova tentativa utilizando ácido acrílico, cloreto de benzoíla e hidroquinona como inibidor de polimerização levou ao isolamento do produto com um rendimento de apenas 34%. Nova tentativa de inserir o grupamento acrilóil no acetoacetato de etila foi conduzida através da reação do anidrido misto **112** com o diânion do acetoacetato de etila. Porém, o produto também não foi isolado neste caso.

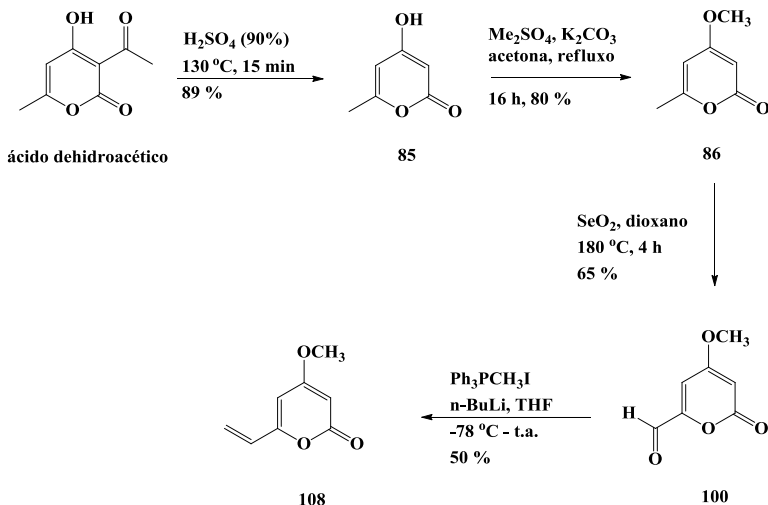
Capítulo 3 – Resultados e discussão



Esquema 3.24

Novamente, nossa estratégia foi alterada e uma nova rota sintética foi avaliada (esquema 3.25) a partir do ácido dehidroacético. O ácido foi desacetilado utilizando aquecimento em uma solução de H_2SO_4 90% formando o composto 6-metil-4-hidroxi-2-pirona **85**. Este por sua vez foi submetido a reação de metilação com dimetilsulfato e carbonato de potássio em acetona para a obtenção do composto 6 metil-4-metoxi-2-pirona **86**, o qual já é disponível comercialmente. Oxidação do carbono alílico utilizando SeO_2 em dioxano a 180°C para a formação do aldeído **100** e subsequente reação de Wittig com iodeto de metiltrifenilfosfônio utilizando $n\text{-BuLi}$ como base levou a formação da olefina **108** com 65 e 50 % para a etapa de oxidação e olefinação de Wittig, respectivamente.

Capítulo 3 – Resultados e discussão



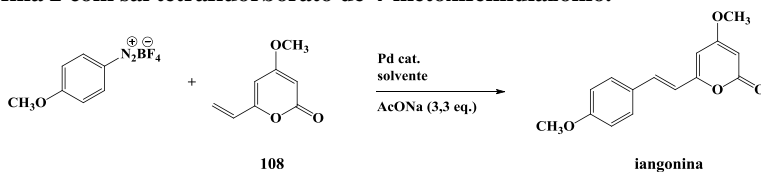
Esquema 3.25

Com a olefina **108** em mãos, optou-se por encontrar uma condição ótima para a síntese da iangonina. Uma melhora significativa foi observada quando comparamos os resultados da tabela 10 com os resultados obtidos para a olefina **103**. Baseado em estudos realizados anteriormente, manteve-se o AcONa como base e Pd(AcO)₂ ou Pd₂(dba)₃.dba como catalisadores. Foram utilizados como solventes PhCN, MeCN e MeOH os quais levaram aos melhores resultados nas reações para a obtenção dos análogos do resveratrol¹²⁶ e iangonina a partir da olefina **103**¹²⁴. Apenas dois níveis de temperatura foram utilizados sendo que para todos os casos em que as reações foram conduzidas a temperatura ambiente, observou-se a presença de uma grande parte do material de partida. Dessa forma, os tempos de reação foram fixados em 1,0 hora, com base nas reações conduzidas a 80 °C, já que observou-se, por CCD, o consumo total da olefina entre 20 – 30 minutos dependendo das condições empregadas. Assim, decidiu-se manter a reação durante 1,0 hora para garantir que todo o material de partida fosse consumido. Várias combinações foram avaliadas entre solventes, catalisadores e temperatura sendo que os resultados para a obtenção dos produtos da reação de Heck a partir da olefina **108** foram muito superiores aos produtos obtidos a partir da olefina **103**. Para se ter

Capítulo 3 – Resultados e discussão

uma idéia, o melhor resultado obtido para a reação de Heck com a olefina **103** (75% de rendimento) foi utilizando a combinação Pd(AcO)₂ (10% mol), MeCN a 80 °C durante 3,0 horas. Nestas mesmas condições (registro 10 – tabela 11), com exceção da carga de paládio que foi reduzida pela metade, a iangonina foi isolada com um rendimento de 96 % em 1,0 hora de reação. Nenhuma outra combinação foi superior às da registro 10. Quando o solvente foi trocado para PhCN e MeOH (registros 7 e 3) os rendimentos caíram para 90 e 59 %, respectivamente. Um resultado significativo foi obtido quando se conduziu a reação, a 80 °C, sob aquecimento em micro-ondas (registro 6) sendo que um rendimento de 65 % foi obtido com apenas 5,0 minutos de reação. Como os rendimentos para as reações de Heck foram significativos utilizando tanto a PhCN como a MeCN em combinação com Pd(AcO)₂, optou-se por diminuir a carga de paládio. Quando foi utilizado 3 % mol de catalisador (registros 8 e 11), o rendimento caiu para a faixa de 85 % para os dois solventes. A diminuição da quantidade de catalisador para 1 % mol, levou a formação do aduto de Heck em apenas 25 % de rendimento (registro 9) utilizando PhCN como solvente. Apesar de os rendimentos se mostrarem inferiores com 3% de catalisador, ainda são rendimentos bons e muito significantes já que foram superiores aos rendimentos obtidos com a olefina **103** que apresentava rendimentos modestos levando 10 % de catalisador. A estereoquímica dos produtos foi avaliada por RMN de ¹H sendo que somente a presença do isômero com a ligação dupla em C7-C8 na forma *E* foi observada. A caracterização do isômero *E* foi determinada através das constantes de acoplamento (*J* = 16,25 Hz) entre os átomos de hidrogênio H7 e H8 da iangonina.

Tabela 10 - Triagem das condições de reação para arilação de Heck da olefina **2** com sal tetrafluorborato de 4-metoxifenildiazônio.



| | 108 | iangonina | | | |
|------------|---|-----------|------------------|-------------|-----------|
| | Catalisador [% mol] | solvente | T (°C) | Tempo (hrs) | Rend. (%) |
| 1 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | PhCN | 25 | 1,0 | 47 |
| 2 | Pd(AcO) ₂ /CO [10,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 89 |
| 3 | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeOH | 80 | 1,0 | 59 |
| 4 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 25 | 1,0 | 19 |
| 5 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 77 |
| 6 | Pd ₂ (dba) ₃ .dba [4,0] | PhCN | 80 (<i>Mw</i>) | 5,0 min | 65 |
| 7 | Pd(AcO) ₂ [5,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 90 |
| 8 | Pd(AcO) ₂ [3,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 83 |
| 9 | Pd(AcO) ₂ [1,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 25 |
| 10 | Pd(AcO) ₂ [5,0] | MeCN | 80 | 1,0 | 96 |
| 11 | Pd(AcO) ₂ [3,0] | MeCN | 80 | 1,0 | 85 |
| 12* | Pd(AcO) ₂ [10,0] | MeCN | 25 | 1,0 | - |
| 13 | Pd ₂ (dba) ₃ .CHCl ₃ [4,0] | PhCN | 80 | 1,0 | 88 |

*Produto não isolado devido a baixa conversão do material de partida no produto (avaliado por CG-EM)

De posse de uma condição considerada ideal (registro 10), a metodologia foi estendida para a preparação de outros produtos naturais e análogos da iangonina (figura 12). De uma forma geral, todos os produtos preparados a partir de anilinas com substituintes doadores de elétrons no anel aromático foram obtidos com bons rendimentos. Apenas o derivado hidroxilado foi obtido com um rendimento abaixo do esperado já que o grupo hidroxil estaria ajudando a estabilizar o sal de diazônio. No entanto, um possível acoplamento do tipo azo, o qual ocorreria após a formação do aduto de Heck, poderia estar consumindo o sal de diazônio e diminuindo o rendimento da arilação na olefina **108**. De fato, observou-se por CCD a presença de algumas manchas coloridas o que poderia ser um indício da formação destes tipos de compostos, os quais não foram caracterizados devido à pequena massa obtida.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

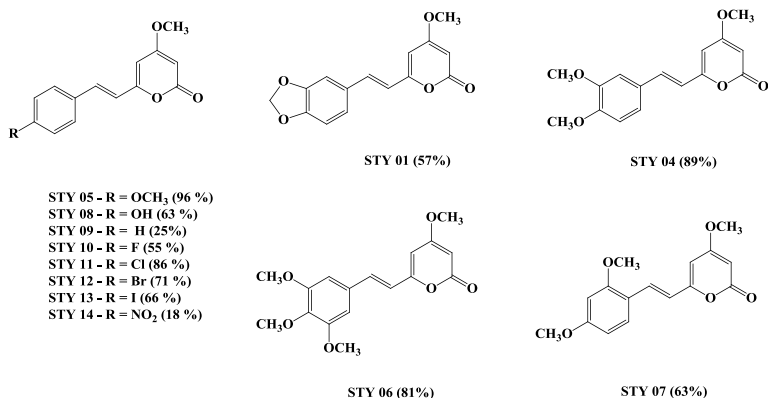


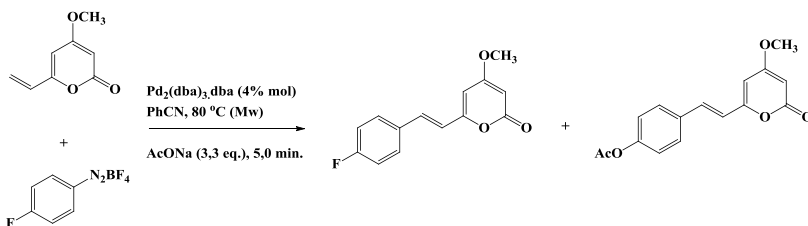
Figura 11 - Análogos da iangonina preparados a partir da olefina 108

Para a síntese da 5,6-dehidrokavaína, foram empregadas as mesmas condições descritas acima, com a diferença que a reação foi conduzida a temperatura ambiente. Esse cuidado em baixar a temperatura vem da experiência do grupo com a baixa estabilidade do tetrafluorborato de fenildiazônio que degrada facilmente a temperaturas superiores a ambiente. Infelizmente a conversão do material de partida no produto foi muito baixa e o produto não pode ser isolado. Uma nova reação foi conduzida utilizando 10 % de catalisador, a temperatura ambiente, visando aumentar a velocidade da reação de Heck na tentativa de que o produto seja formado antes da degradação do sal de diazônio. No entanto, a mudança não surtiu efeito significativo e uma mistura do material de partida mais produto foi isolada. Esta mistura foi avaliada por RMN de ¹H e foi observado a presença de 25% de produto em relação ao material de partida. Outro teste com 10% de catalisador à 80 °C foi realizado mas o produto não foi obtido em rendimentos superiores sendo que a mesma mistura foi isolada.

A metodologia desenvolvida foi também eficiente na síntese dos análogos halogenados da iangonina. Os rendimentos para os produtos isolados foram 55, 86, 71 e 66 % para os análogos 12-F, 12-Cl, 12-Br e 12-I-iangonina, respectivamente. Surpreendentemente, o análogo fluorado foi obtido com rendimento inferior ao esperado utilizando as condições estabelecidas. Nesta reação foi observada a formação de um produto lateral resultado da substituição do flúor ou pelo acetato, utilizado como base, ou pelo ataque nucleofílico pelo

Capítulo 3 – Resultados e discussão

átomo de nitrogênio da acetonitrila formando a acetamida correspondente (esquema 3.26). A substituição pelo acetato seria a mais provável já que a formação da amida, pelo ataque da MeCN, necessitaria de um meio aquoso. Então, uma nova reação foi conduzida utilizando PhCN como solvente e Pd₂(dba)₃.dba (10% mol) como catalisador. A reação foi conduzida sob aquecimento em micro-ondas durante 5,0 minutos visando a diminuição do tempo de reação e assim mantendo o aduto de Heck menos tempo em contato com o meio reacional. Novamente, observou-se a formação do mesmo produto lateral com um rendimento de 5 % sendo que o aduto de Heck foi isolado com rendimento de 55 %. Este resultado confirma a substituição do átomo de flúor pelo acetato formando o derivado 12-acetoxi-iangonina.

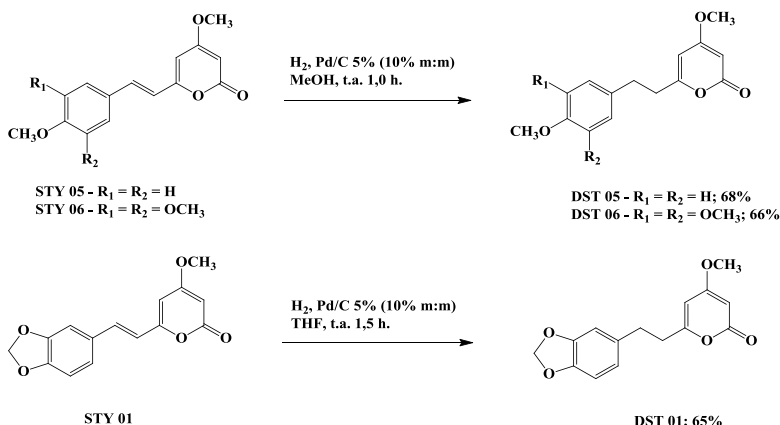


Esquema 3.26

Conforme a discussão previamente realizada a despeito da relação entre a estrutura química das estililpironas naturais, isoladas de *Polygala sabulosa*, e o efeito ansiolítico apresentado, foram observadas algumas tendências as quais ainda necessitam de confirmação. Uma delas é a confirmação de que a presença ou ausência da ligação dupla nos carbonos C7-C8 não é fundamental para a interação com o sítio benzodiazepínico uma vez que os pares **DST1** e **STY4**, **DST2** e **STY05** apresentaram os mesmos níveis de interação com o receptor no modelo estudado. Dessa forma, decidiu-se por preparar alguns derivados com a ligação dupla em C7-C8 reduzida através de hidrogenação catalítica utilizando Pd/C em metanol (esquema 3.27). Foram hidrogenados os compostos iangonina, 11,13-dimetoxi-iangonina e 3,4-metilenodioxi-5,6-dehidrokavaína. Inicialmente, foi utilizado metanol como solvente para todas as reações. No entanto, para a hidrogenação do 3,4-metilenodioxo-5,6-dehidrokavaína, observou-se a presença de uma

Capítulo 3 – Resultados e discussão

grande quantidade, em relação ao produto, de um produto lateral que não foi caracterizado. Segundo trabalho previamente publicado, a hidrogenação em metanol, para alguns casos, pode levar a formação dos derivados do ácido kavaico. Dessa forma, a hidrogenação do 3,4-metilenodioxil-5,6-dehidrokavaína foi conduzida em THF e após 1,5 horas todo o material de partida havia sido consumido e o produto obtido em 65% de rendimento.

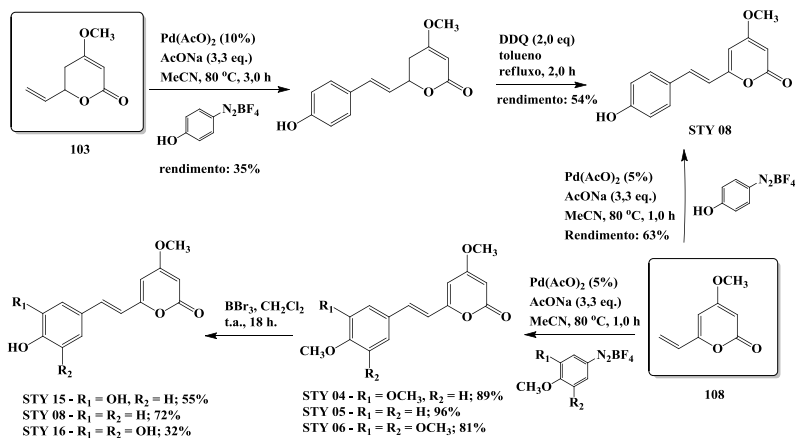


Esquema 3.27

Além disso, é necessário confirmar que a diminuição do índice de eletrofilicidade poderia levar a um aumento na interação das estilipironas com o sítio benzodiazepínico. Para tanto, decidiu-se preparar derivados com grupamentos hidroxila no anel aromático os quais apresentam um efeito doador de elétrons superior às metoxilas presentes nos compostos naturais. Inicialmente, a preparação deste tipo de compostos foi visualizada a partir da reação de Heck utilizando sais de diazônio que já possuíam os grupos hidroxila livre no anel aromático (esquema 3.28). A partir da reação da olefina **103** com o sal tetrafluorborato de 4-hidroxifenildiazônio, o aduto de Heck foi obtido com 35% de rendimento. Subsequente tratamento deste aduto com DDQ e refluxo em tolueno levou a formação do derivado da iangonina 12-hidroxilado com 54% de rendimento. Quando o mesmo derivado hidroxilado foi preparado a partir da reação da olefina **108** com o sal tetrafluorborato de 4-hidroxifenildiazônio, o aduto de Heck foi obtido com 63% de rendimento. A obtenção dos compostos hidroxilados a

Capítulo 3 – Resultados e discussão

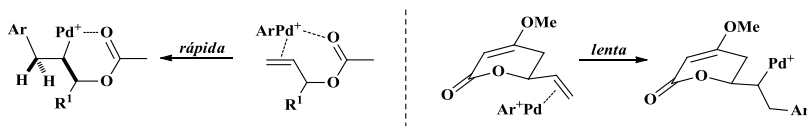
partir da olefina **103** apresentou-se como uma boa alternativa. No entanto, a dificuldade em adquirir outras anilinas hidroxiladas, seja pela via comercial ou sintética, e os bons resultados alcançados para os adutos de Heck da olefina **103** utilizando sais de diazônio com grupos metoxila no anel, nos levou a traçar outra rota para a obtenção destes compostos. Assim os compostos metoxilados iangonina, 11-metoxi-iangonina e 11,13-dimetoxi-iangonina foram submetidos ao tratamento com BBr_3 em CH_2Cl_2 anidro, a temperatura ambiente, para a desmetilação das metoxilas presentes no anel aromático. Apesar das reações com dois ou três metoxilas serem mais rápidas do que a desmetilação da iangonina, todas elas foram deixadas durante 18 horas. O melhor resultado foi obtido para a desmetilação da iangonina a qual foi isolada com 72% de rendimento. Apesar de os rendimentos para a desmetilação da 11-metoxi-iangonina e da 11,13-dimetoxi-iangonina serem baixos, a obtenção dos correspondentes compostos hidroxilados será de grande valia para avaliar o efeito biológico e verificar a tendência observada pelo estudo teórico.



Esquema 3.28

Uma importante observação foi a significativa diferença de reatividade entre as olefinas **103** e **108**. Inicialmente, imaginou-se que a olefina **103** pudesse ser arilada com a mesma eficiência que os acetatos alílicos devido à semelhança estrutural. No entanto, os resultados

mostraram que estas olefinas não se comportam da mesma forma. A possibilidade do paládio se coordenar simultaneamente com a ligação dupla, na etapa de inserção migratória, e com a carbonila do grupo acetila é fundamental para a alta reatividade e seletividade desta arilação de Heck com os acetatos alílicos. Como no caso da olefina **103** o sistema cíclico e rígido não permite essa aproximação, e então a coordenação do paládio com a carbonila, acaba reagindo como se fosse uma ligação dupla isolada a qual também não apresentaria uma alta reatividade (esquema 3.29).



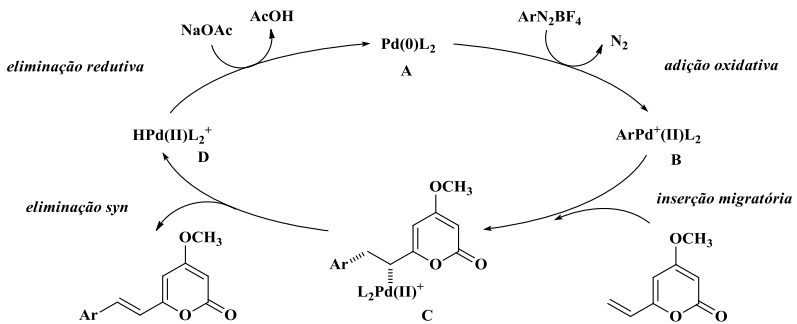
Esquema 3.29

A partir dos resultados obtidos, percebeu-se que a olefina **103** era mais semelhante aos estirenos que aos acetatos alílicos. Para torná-la mais semelhante e talvez tão reativa quanto os estirenos, precisávamos de um sistema todo conjugado. De fato, após a obtenção da olefina **108**, houve uma significativa melhora nos rendimentos para a obtenção dos adutos de Heck. O ciclo catalítico proposto para a reação de Heck utilizando sais de diazônio inicia-se pela adição oxidativa da espécie de paládio zero **A** ao sal de diazônio, onde um complexo catiônico de paládio **B** é formado, pela extrusão de nitrogênio. Em seguida, a olefina se coordena a esse complexo catiônico de paládio, com o qual posteriormente ocorre a etapa de inserção migratória com formação da ligação C-C e da ligação C-Pd (intermediário **C**). Após, uma eliminação *syn* de hidreto de paládio resulta na formação do aduto de Heck e do hidropaládio **D**, que por reação com o acetato de sódio, regenera a espécie de paládio zero **A** ao meio reacional (esquema 3.30).

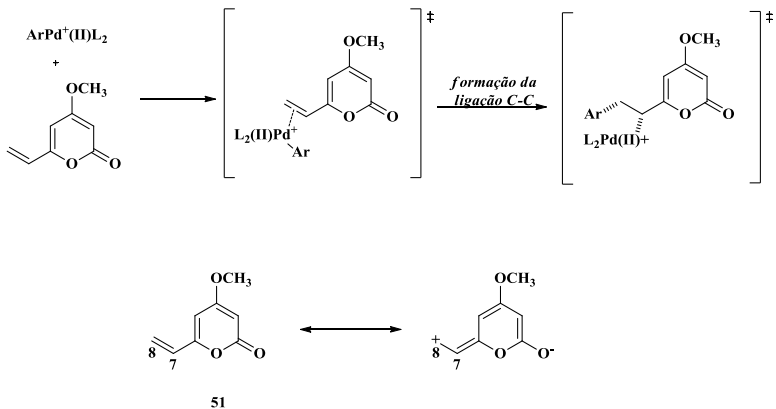
Acredita-se que a etapa lenta da reação de Heck com sais de diazônio seja a inserção migratória, onde ocorre a formação da ligação C-C (esquema 3.31). Nessa etapa, o grupo arila se liga ao carbono terminal da dupla ligação e o paládio se liga ao carbono interno da dupla ligação. Conseqüentemente, quanto menor a densidade de elétrons no carbono terminal da dupla ligação, menor seria a barreira energética para a formação da nova ligação C-C. Essa seria uma possível

Capítulo 3 – Resultados e discussão

explicação para a diferença de reatividade encontrada para as duas olefinas estudadas nesse trabalho, uma vez que o carbono C8 da olefina **108** apresenta menor densidade eletrônica que o carbono C7 da olefina **103**. Esse maior caráter positivo do carbono C7 na olefina **108** é consequência da conjugação do sistema que atinge desde o carbono C8 até o oxigênio da carbonila. Esses resultados vão ao encontro daqueles já obtidos com estirenos contendo grupos retiradores de elétrons, os quais são excelentes substratos para a arilação de Heck, uma vez que a carbonila comporta-se como um grupo retirador de elétrons.



Esquema 3.30



Esquema 3.31

Capítulo 3 – Resultados e discussão

Em virtude dos relatos na literatura que descrevem uma possível atividade citotóxica para as kavalactonas,^{127,128,129,130,131,132} contra células tumorais hepáticas, pulmonares, leucêmicas e mamárias, foi avaliada a atividade antitumoral das estirilpironas sintetizadas neste trabalho frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas. As linhagens celulares utilizadas para a avaliação da potencial atividade antitumoral incluíram: HL60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia linfóide), MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT - 116 (carcinoma colorretal). Inicialmente a triagem foi realizada na concentração de 10 μ M, como não houve atividade citotóxica, foram realizados novos experimentos a 50 μ M. Devido à baixa solubilidade dos compostos, a concentração máxima de DMSO nestes experimentos foi de 0,25% e já apresentou citotoxicidade em torno de 20%, em comparação ao controle de células (CC) mantidas somente com o meio de cultura. Como controle positivo, foi utilizado a cisplatina (Cis) a 50 μ M (tabela 12).

Para análise dos dados, foi calculado o percentual de proliferação em relação ao controle DMSO (tabela 3.5). Os compostos naturais isolados de *Polygala sabulosa* **DST1**, **02** e **03** e **STY3** e **04** também foram submetidos aos testes. Os compostos **STY12** e **STY13** não foram testados, pois foram preparados após o envio da primeira leva de amostras. Os resultados demonstram que os compostos não apresentam potencial antitumoral. Além disso, os compostos testados apresentam uma atividade estimulatória da proliferação celular.

A diferença mais marcante entre as estruturas das estirilpironas tóxicas para as sintetizadas neste trabalho é a presença da metoxila em C4 do anel 2-pirona. Além disso, algumas das estirilpironas tóxicas apresentam hidroxilas livres ou protegidas em C7 e C8. Estes resultados, apesar de ser negativos, são interessantes já que estamos buscando fármacos ansiolíticos com baixo potencial tóxico.

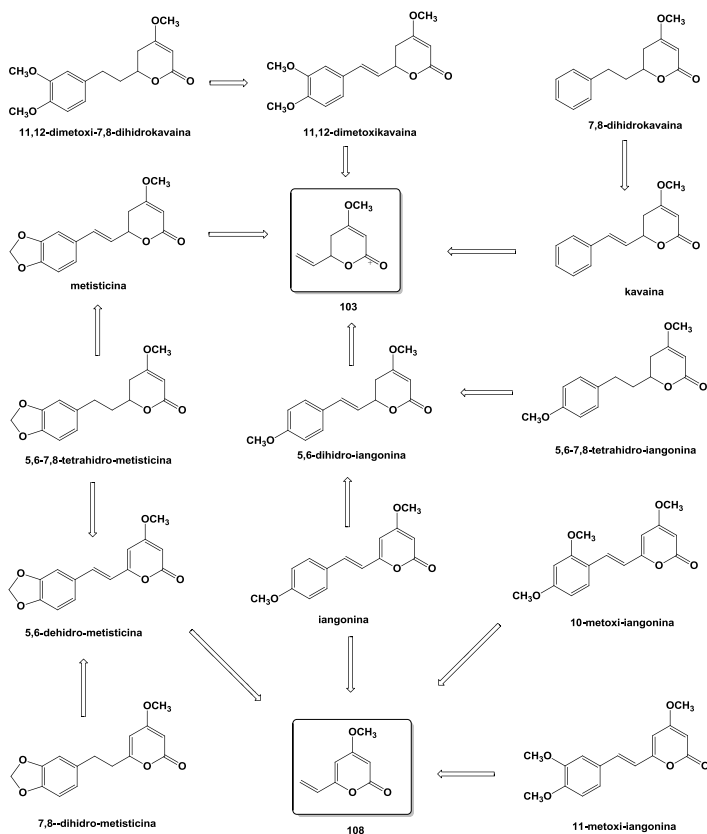
Tabela 11 - Percentual de proliferação frente às linhagens de células tumorais humanas Jurkat (leucemia linfóide), HL60 (leucemia mielóide), MCF-7 (carcinoma mamário) e HCT- 116 (carcinoma colo-retal).

| Compostos | JURKAT (%) | HL60 (%) | MCF-7 (%) | HCT-116 (%) |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------|--------------------|
| DST 01 | 160,93 (± 14,36) | 143,86 (± 26,96) | 126,20 (± 4,92) | 112,76 (± 0,12) |
| DST 02 | 135,83 (± 1,43) | 129,44 (± 7,19) | 113,50 (± 16,23) | 107,62 (± 2,09) |
| DST 03 | 124,60 (± 15,21) | 111,84 (± 7,64) | 109,42 (± 5,04) | 112,46 (± 2,59) |
| DST 05 | 142,14 (± 15,08) | 116,13 (± 0,01) | 118,41 (± 17,96) | 106,47 (± 1,94) |
| DST 06 | 152,29 (± 16,48) | 116,64 (± 2,01) | 115,30 (± 6,74) | 109,73 (± 1,91) |
| STY3 | 134,28 (± 25,36) | 98,29 (± 39,89) | 101,12 (± 28,50) | 102,99 (± 11,67) |
| STY4 | 156,73 (± 10,37) | 143,43 (± 6,02) | 126,21 (± 0,69) | 131,97 (± 1,18) |
| STY05 | 123,30 (± 3,03) | 104,98 (± 3,32) | 97,04 (± 4,87) | 101,22 (± 0,74) |
| STY06 | 134,15 (± 17,59) | 112,52 (± 9,93) | 102,06 (± 3,36) | 105,01 (± 1,79) |
| STY07 | 115,28 (± 38,41) | 112,38 (± 1,75) | 106,41 (± 4,79) | 108,97 (± 12,81) |
| STY08 | 99,08 (± 4,39) | 104,41 (± 3,18) | 101,06 (± 5,46) | 91,65 (± 4,48) |
| STY09 | 152,78 (± 29,59) | 142,12 (± 17,45) | 120,87 (± 7,44) | 119,57 (± 0,36) |
| STY10 | 130,10 (± 1,01) | 135,15 (± 37,41) | 103,56 (± 1,83) | 105,64 (± 5,76) |
| STY11 | 134,90 (± 15,03) | 123,09 (± 0,66) | 113,61 (± 9,04) | 123,83 (± 0,54) |
| STY14 | 99,99 (± 1,85) | 105,55 (± 26,68) | 92,00 (± 12,93) | 97,86 (± 2,00) |
| STY15 | 137,20 (± 24,74) | 111,41 (± 17,19) | 98,29 (± 4,38) | 109,20 (± 1,57) |
| DMSO | 100,00 (± 0,00) | 100,00 (± 0,00) | 100,00 (± 0,00) | 100,00 (± 0,00) |
| CIS ^a | 36,38 (± 3,72) | 45,52 (± 30,86) | 58,51 (± 18,37) | 86,54 (± 19,86) |
| C.C. ^b | 124,70 (± 9,24) | 116,36 (± 2,63) | 96,56 (± 34,32) | 116,56 (± 9,94) |

*Valores obtidos referentes à média do percentual da proliferação celular calculada em relação ao controle DMSO, realizada em dois experimentos independentes em triplicata. ^aCisplatina. ^bControle de células.

3.4. Conclusão

O estudo da reação de Heck com as olefinas **103** e **108** permitiu o desenvolvimento de uma metodologia altamente regio- e estereosseletiva uma vez que só ocorreu arilação no carbono terminal da olefina e somente o isômero *E* foi obtido. Os rendimentos para a obtenção dos adutos de Heck a partir da olefina **108** foram superiores aos adutos de Heck obtidos a partir da olefina **103**. A metodologia desenvolvida para estas duas olefinas permitiram, ou abriram caminho para a síntese de um grande número de derivados das kavalactonas naturais isoladas da espécie vegetal *Polygala sabulosa* (esquema 3.32).



Esquema 3.32

3.5. Parte experimental

3.5.1. Métodos e equipamentos gerais

As reações sensíveis à umidade foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio (99,99 %). A vidraria foi seca em estufa a 140 °C por um período de 1 hora antes do uso e, posteriormente, foi resfriada em dessecador contendo sílica gel.

Tetraidrofurano (THF) foi pré-seco através de refluxo com hidreto de cálcio, sob atmosfera de nitrogênio e destilado sob sódio metálico e benzofenona (indicador) momentos antes do uso. O tolueno foi tratado com sódio metálico sob atmosfera inerte antes do uso. Diclorometano, *i*-propanol e acetonitrila foram tratados com hidreto de cálcio sob atmosfera inerte e destilados antes da reação. A diisopropilamina foi refluxada com hidreto de cálcio por 1 hora, destilada e estocada sob atmosfera de nitrogênio com algumas pastilhas de NaOH. O acetoacetato de etila foi destilado sob pressão reduzida (2,0 mmHg) a 30 °C e estocado sob atmosfera de nitrogênio. A acetona foi tratada com drierite (CaSO₄) por um período de 12 horas e então destilada e estocada sob atmosfera inerte. O metanol foi tratado com dimetóxido de magnésio ((MeO)₂Mg), destilado e estocado sob atmosfera de nitrogênio. A solução de *n*-BuLi foi titulada em THF seco com *i*-propanol seco, utilizando-se 1,10-fenantrolina como indicador. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR 16 PC utilizando-se pastilhas comprimidas de brometo de potássio anidro e em espectrofotômetro X que utiliza o método de refletância total atenuada (ATR) em filme.

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelho Bruker AC200, operando a 4,7 Tesla observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 200,13 e 50,61 MHz, respectivamente, e em aparelho Varian Mercury Plus operando a 9,4 Tesla, observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 399,74 e 100,00 MHz, respectivamente. Os espectros obtidos na UNICAMP foram realizados em espectrômetro Bruker operando a 5,8 Tesla observando os núcleos de ¹H e ¹³C a 250 e 62,5 MHz, respectivamente.

Os espectros de massas foram obtidos em equipamento CG-EM 5975C “with triple-axis detector” da Agilent.

Para o fracionamento cromatográfico em coluna foi utilizando sílica gel de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) da Merck. Para cromatografia flash foi utilizado sílica gel com granulação 0,040 – 0,063

Capítulo 3 – Parte experimental

mm (230 – 400 mesh). Para cromatografia em camada fina (CCD) foram utilizadas placas Alugram Sil G/UV₂₅₄ com 0.20 mm de espessura da Macherey-Nagel. Os compostos nas placas cromatográficas foram visualizados sob lâmpada de ultravioleta a 254 nm e por imersão das placas em anisaldeído sulfúrico e/ou solução de sulfato de cério 2N em ácido sulfúrico e/ou em solução de vanilina em etanol e ácido sulfúrico (3,0 g de vanilina + 50 mL de etanol + 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado) seguido de aquecimento da placa.

Os solventes utilizados para separações cromatográficas em coluna de sílica gel, em camada delgada e partição líquido/líquido foram de qualidade PA e não passaram por processos de purificação adicional ou secagem. Os reagentes e solventes utilizados como meio de reações passaram por processos de secagem quando necessário.

3.5.2. Procedimento geral para a preparação dos sais de arenodiazônio

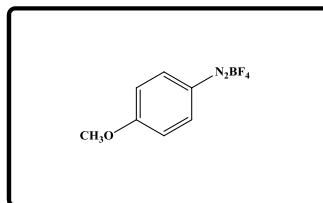
Em um béquer contendo a anilina (1,0 eq.) em água, na proporção de 2,5 mmol/mL, foi adicionado à temperatura ambiente, 15,4 mL de uma solução 48% de HBF₄ (2,0 eq. de HBF₄). Após 15 minutos de agitação, a solução foi resfriada e mantida entre 0 e -5°C. Nesta faixa de temperatura e sob agitação magnética, ou com bastão de vidro se necessário, foi adicionado lentamente uma solução aquosa de NaNO₂ (2,0 eq.) na concentração de 10 mmol/mL. Após o término da adição desta solução, o sistema foi mantido sob agitação por mais 15 minutos. Então foi adicionado lentamente ácido sulfâmico (1,5 eq.) para destruir o excedente de NaNO₂. O produto bruto foi filtrado e o resíduo sólido foi lavado com uma solução aquosa gelada de NaBF₄ (2,0 eq.) sob concentração de 5 mmol/mL. Este resíduo foi dissolvido em uma quantidade mínima de acetona a temperatura ambiente e precipitado com a adição de éter etílico gelado. O sólido foi filtrado e re-submetido a esta precipitação até que o sólido ficasse branco indicando um alto grau de pureza. Para a cristalização deste sal o sólido branco foi redissolvido em uma quantidade mínima de acetona e em seguida foi adicionado éter etílico gelado até turvar a solução a qual foi deixada em repouso no freezer durante 20 minutos. O produto foi filtrado e seco em alto vácuo sob proteção da luz e estocado em geladeira.

Tetrafluorborato de 4-metoxifenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 72,0 % de rendimento, que funde entre 139,0 – 140,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3107, 2262, 1581, 1285, 1055.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 4,16 (3H, s), 7,53 (2H, d, $J = 9,2$ Hz), 8,76 (2H, d, $J = 9,2$ Hz).

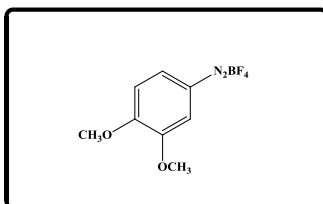


Tetrafluorborato de 3,4-dimetoxifenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino prateado, com 50,0 % de rendimento, que se decompõem entre 104,0 – 105,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3121, 2249, 1569, 1513, 1295, 1057,0.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 4,99 (3H, s), 4,18 (3H, s), 7,58 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 8,23 (1H, d, $J = 2,5$ Hz), 8,57 (1H, dd, $J = 2,5$ e 9,0 Hz).

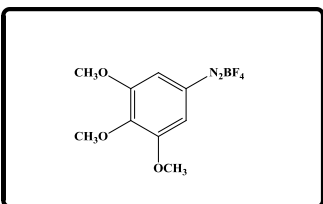


Tetrafluorborato de 3,4,5-trimetoxifenildiazônio

Foi obtido como um sólido de coloração levemente amarelada, com rendimento de 54,0 %, que se decompõe entre 111 e 112 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3107, 2278, 1587, 1426, 1129, 1027.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 4,00 (6H, s), 4,15 (3H, s), 8,21 (2H, s).

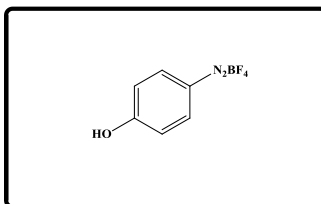


Tetrafluorborato de 4-hidroxifenildiazônio

Foi obtido como um sólido de coloração amarelada, com rendimento de 35%, que se decompõe em 130 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 2192, 1593, 1052.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 6,83 (2H, d, J = 9,5 Hz), 8,15 (2H, d, J = 9,5 Hz).

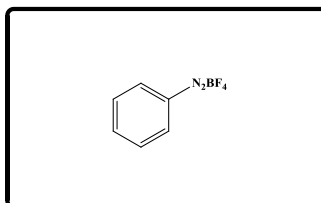


Tetrafluorborato de fenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com rendimento de 67,0 %, que funde entre 104,0 e 105,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 3107, 2296, 1571, 1462, 1311, 1053.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, acetona - *d*₆) δ (ppm) = 8,10 (2H, t, J = 7,8 Hz), 8,40 (1H, t largo, J = 7,5 e 7,8 Hz), 8,85 (2H, d largo, J = 7,8 Hz).

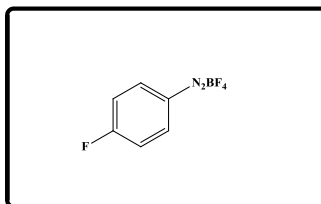


Tetrafluorborato de 4-fluorfenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 60,0 % de rendimento, que funde entre 158,8 – 160,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 3117, 2296, 1579, 1249, 1066, 1082, 849.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, acetona - *d*₆) δ (ppm) = 7,89 (2H, dd, J = 8,0 e 9,3 Hz), 8,99 (2H, dd, J = 4,5 e 9,3 Hz).

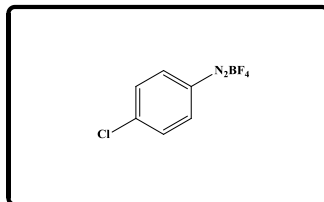


Tetrafluorborato de 4-clorofenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 82,0 % de rendimento, que funde entre 119,8 – 121,5 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3109, 2293, 1564, 1054, 839.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 8,15 (2H, d, J = 9,3 Hz), 8,87 (2H, d, J = 9,3 Hz).

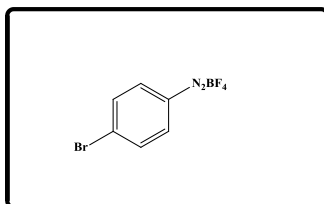


Tetrafluorborato de 4-bromofenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 71,0 % de rendimento, que funde entre 122,0 – 123,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3105, 2291, 1556, 1037, 833.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 8,30 (2H, d, J = 9,3 Hz), 8,75 (2H, d, J = 9,3 Hz).

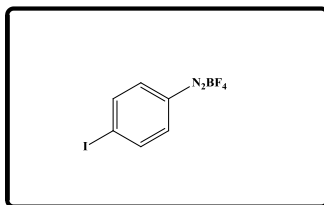


Tetrafluorborato de 4-iodofenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 55,0 % de rendimento, que funde entre 115,0 – 116,0 °C.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 3099, 2284, 1548, 1053, 833.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona – d_6) δ (ppm) = 8,53 (4H, s largo).

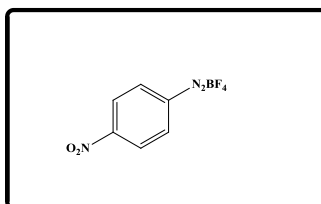


Tetrafluorborato de 4-nitrofenildiazônio

Foi obtido como um sólido cristalino branco, com 65,0 % de rendimento, que se decompõem entre 144,0 – 145,0 °C.

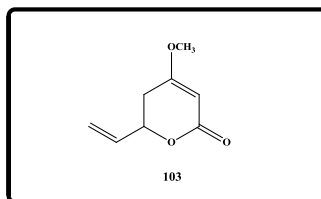
Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 3117, 2308, 1541, 1359, 1317, 1045,0, 865, 743.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, acetona – d₆) δ (ppm) = 8,86 (2H, d, *J* = 9,3 Hz), 8,19 (2H, d, *J* = 9,3 Hz).



3.5.3. Procedimento para a preparação da olefina 103

Em um balão de 500 mL contendo 30,0 mL (21,66 g, 214,5 mmol) de diisopropilamina e 50 mL de THF a 0 °C e sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado 133,4 mL (214,5 mmol) de *n*-butil lítio (1,60 M). O sistema foi mantido sob agitação a 0 °C durante 45 minutos e então foi adicionado, com o auxílio de um adicionador automático, 11,6 mL (11,93 g, 91,7 mmol) de acetoacetato de etila sob uma vazão de 0,320 mL/min. Após o término desta adição, a solução de coloração avermelhada foi mantida sob agitação por mais 15 minutos quando foi adicionado 6,34 mL (5,31 g, 94,9 mmol) de acroleína, previamente destilada. O sistema reacional foi mantido sob agitação a 0 °C durante 30 minutos e então foi adicionado 200,0 mL de água gelada mantendo a agitação por mais 1,0 hora. Foi adicionado 200,0 mL de éter etílico e a fase orgânica foi separada e descartada. A fase aquosa foi acidificada com solução de ácido clorídrico 6,0 M até alcançar pH aproximadamente 1, a solução fica amarelada. O produto bruto foi extraído com CH₂Cl₂ (3 x 100,0 mL) e a fase orgânica foi lavada com solução aquosa saturada de NaCl (1 x 100 mL), seca com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado e seco sob alto vácuo rendendo 10,19 g de um óleo de coloração amarelada. Após injeção no CG/EM, foi observado apenas um pico no cromatograma de íons totais.



Este óleo, sem mais purificações, foi dissolvido em 200,0 mL de acetona anidra. Então foram adicionados 48,13 g (348,8 mmol) de K₂CO₃ anidro e 33,11 mL (43,94 g, 348,8 mmol) de sulfato de dimetila. O sistema foi mantido sob agitação, em atmosfera de nitrogênio, a

Capítulo 3 – Parte experimental

temperatura ambiente durante 18 horas. Após esse período, o meio reacional foi diluído com 200,0 mL de AcOEt e filtrado. A fase orgânica foi lavada com solução 1,0 M de ácido clorídrico (3 x 100 mL) e com solução aquosa saturada de NaCl (1 x 100 mL). O solvente da fase orgânica foi seco com sulfato de sódio anidro e evaporado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por cromatografia em coluna flash utilizando a mistura hexano/acetato de etila (na proporção 70/30 v:v) como eluente. Foram obtidos 4,25 g (58,6 % nas 2 etapas) de um óleo incolor que se solidificou ao ser estocado no freezer.

Foi obtido um sólido branco com ponto de fusão entre 46 e 47 °C e $R_f = 0,26$ (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração roxa ao revelar na vanilina.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 1708 (C=O), 1624, 1383, 1228, 1033.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 2,45 (1H, dd, $J = 5,1$ e 17,1 Hz), 2,56 (1H, ddd, $J = 1,3, 10,1$ e 17,1 Hz), 3,73 (3H, s, -OCH₃), 4,50 – 4,70 (1H, m), 5,13 (1H, d, $J = 1,3$ Hz), 5,26 (1H, dt, $J = 1,3$ e 10,4 Hz), 5,39 (1H, dt, $J = 1,3$ e 17,1 Hz), 5,92 (1H, ddd, $J = 5,7, 10,4$ e 17,1 Hz).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 32,8; 56,1; 75,8; 90,5; 118,0; 134,7; 166,8; 172,3.

Espectro de massas (m/z): 153,1 (M⁺); 125,0; 110,1 (100 %); 98,0; 79,0; 68,0; 55,0.

3.5.4. Procedimento geral para a preparação das kavalactonas |

Obtenção das kavalactonas utilizando Pd₂(dba)₃.dba

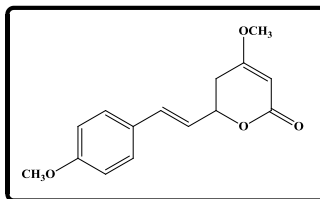
Em um tubo ou balão foram adicionados o acetato de sódio (3,3 eq), o Pd₂(dba)₃.dba (4% mol), a olefina (1,0 eq.) dissolvida em benzonitrila e o sal de diazônio (1,5 eq.). O meio reacional foi inserido em banho de óleo à temperatura desejada e mantido sob agitação nesta temperatura até o consumo do sal de diazônio. O produto bruto foi filtrado em uma cama de celite e purificado em cromatografia flash utilizando primeiramente a mistura hexano : acetato de etila (90:10) como eluente para retirar a benzonitrila e após, uma mistura hexano/acetato de etila em proporção adequada para eluir o produto desejado.

Obtenção das kavalactonas utilizando Pd(AcO)₂/CO

Em um tubo ou balão foram adicionados o acetato de sódio (3,3 eq), o Pd(AcO)₂ e a olefina (1 eq). O sistema foi fechado com um septo e a atmosfera de ar foi trocada por atmosfera de monóxido de carbono (CO). Então foi adicionado o solvente e o sistema foi deixado sob agitação a temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida, o sistema foi aberto e o sal de diazônio (1,2 eq.) foi rapidamente adicionado ao meio reacional. O sistema foi fechado novamente e o experimento foi conduzido sob atmosfera de CO usando uma bexiga de borracha. O sistema reacional foi inserido em um banho de óleo em temperatura desejada e deixado sob agitação até o consumo total do sal de diazônio. O produto bruto foi filtrado em uma cama de celite e purificado em cromatografia flash utilizando uma mistura hexano/acetato de etila em proporção adequada para eluir o produto desejado.

12-metoxikavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 12-metoxikavaína, foram utilizados 270,6 mg (3,3 mmol) de acetato de sódio, 22,5 mg (10% mol) de Pd(AcO)₂, 154,0 mg (1,0 mmol) da olefina, 3,3 mL de acetonitrila e 332,7 mg (1,5 mmol) do tetrafluorborato de *p*-metoxifenildiazônio. Foram obtidos 195,5 mg (75,0%) de um sólido branco com ponto de fusão 122 – 123 °C e R_f = 0,25 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração azul-esverdeada ao revelar na vanilina.



Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 1704 (C=O), 1623, 1512, 1248, 1225.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2,50 (1H, dd, *J* = 4,4 e 17,1 Hz), 2,65 (1H, ddd, *J* = 1,3, 10,7 e 17,1 Hz), 3,75 (3H, s, OCH₃), 3,80 (3H, s, OCH₃), 4,90 – 5,10 (1H, m), 5,17 (1H, d, *J* = 1,3 Hz), 6,12 (1H, dd, *J* = 6,6 e 16,1 Hz), 6,66 (1H, d, *J* = 16,1 Hz), 6,86 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,32 (2H, d, *J* = 8,5 Hz).

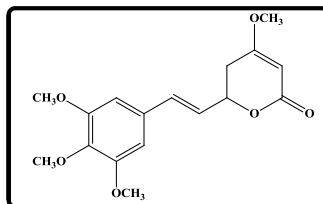
Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 33,4; 55,3; 56,1; 76,2; 90,5; 114,2 (2C); 123,2; 127,8 (2C); 128,4; 132,8; 159,7; 166,9; 172,4.

Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro de massas (m/z): 260,1 (M+); 232,1; 216,1; 201,0; 185,1; 161,0; 134,0 (100%); 121,0; 98,0; 68,0; 44,0; 32,0.

11,12,13-trimetoxikavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 11,12,13-trimetoxikavaína foram utilizados 1,773 g (21,6 mmol) de acetato de sódio, 249,5 mg (4% mol) de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, 1,0 g (6,49 mmol) da olefina em 7 mL de benzonitrila e 2,095 g (7,44 mmol) do tetrafluorborato de 3,4,5-



trimetoxifenildiazônio. Foram obtidos 414,3 mg (29%) de um sólido de coloração amarelada com ponto de fusão 119,0 – 120 °C e $R_f = 0,17$ (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração azul-esverdeada ao revelar na vanilina.

Espectro IV (filme): ν (cm^{-1}): 1704 (C=O), 1624, 1241, 1223, 1127.

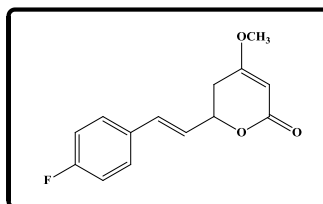
Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 2,55 (1H, dd, $J = 4,7$ e 16,1 Hz), 2,67 (1H, ddd, $J = 1,0, 10,4$ e 17,1 Hz), 3,78 (3H, s, OCH_3), 3,85 (3H, s, OCH_3), 3,88 (6H, s, 2x $-\text{OCH}_3$), 5,00 – 5,10 (1H, m), 5,20 (1H, d, $J = 1,0$ Hz), 6,18 (1H, dd, $J = 6,3$ e 15,8 Hz), 6,62 (2H, s), 6,66 (1H, d, 15,8 Hz).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 33,3; 56,1; 56,1; 60,9; 75,00; 90,5; 103,7; 125,0; 131,4; 133,0; 138,3; 153,4; 166,7; 172,3.

Espectro de massas (m/z): 320,1 (M+); 194,1; 181,1 (100%); 151,1; 136,0; 125,0; 91,0; 68,0; 55,0.

12-fluorkavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 12-fluorkavaína foram utilizados 270,6 mg (3,3 mmol) de acetato de sódio, 22,5 mg (10% mol) de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$, 154,0 mg (1,0 mmol) da olefina 1 em 3,3 mL de acetonitrila e 314,7 mg (1,5 mmol) do tetrafluorborato



Capítulo 3 – Parte experimental

de 4-fluorfenildiazônio. A reação foi conduzida em atmosfera de CO. Foram obtidos 60,3 mg (41%) de um sólido cristalino branco com ponto de fusão na faixa 189,7 – 191,2 °C e Rf = 0,26 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração roxa ao revelar na vanilina.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1699 (C=O), 1622, 1509, 1390, 1229.

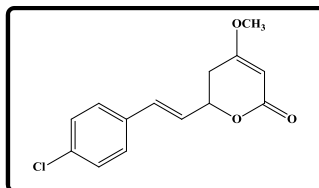
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2,53 (1H, dd, J = 4,8 e 17,0), 2,66 (1H, ddd, J = 1,0, 10,5 e 17,3 Hz), 3,77 (3H, s, -OCH₃), 5,00 – 5,10 (1H, m), 5,20 (1H, d, J = 1,0 Hz), 6,17 (1H, dd, J = 6,3 e 15,8 Hz), 6,70 (1H, d, J = 15,8 Hz), 7,02 (2H, t, J = 8,8 Hz), 7,36 (2H, dd, J = 5,3 e 8,8 Hz).

Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 33,3; 56,1; 75,7; 90,5; 115,6 (d, J = 21.9 Hz); 125,2 (d, J = 2.5 Hz); 128,3 (d, J = 8.1 Hz); 131,9 (d, J = 3.1 Hz); 13,0; 162,7 (d, J = 246.2 Hz); 166,6; 172,2.

Espectro de massas (m/z): 248,0 (M+); 220,0; 204,0; 146,0; 133,0; 122,0; 109,0; 98 (100%); 68,0.

12-clorokavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 12-clorokavaína foram utilizados 811,8 mg (9,9 mmol) de acetato de sódio, 67,5 mg (10% mol) de Pd(AcO)₂, 462,0 mg (3,0 mmol) da olefina em 9,9 mL de acetonitrila e 1,017 g (4,5 mmol) do tetrafluorborato de 4-clorofenildiazônio. A reação foi conduzida em atmosfera de CO. Foram obtidos 301,1 mg (40%) de um sólido cristalino branco com ponto de fusão 179,3 – 180,1 °C e Rf = 0,25 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração roxa ao revelar na vanilina.



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1695 (C=O), 1622, 1385, 1230.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2,54 (1H, dd, J = 17,0 e 4,7 Hz), 2,67 (1H, ddd, J = 17,0, 10,2 e 1,0 Hz), 3,77 (3H, s), 5,00-5,10 (m, 1H), 5,20 (1H, d, J = 1,0 Hz), 6,23 (1H, dd, J = 16,0 e 6,0 Hz), 6,72 (1H, dd, J = 16,0 e 1,0 Hz), 7,31 (4H, s).

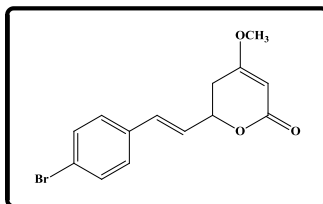
Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 33,2; 56,1; 75,6; 90,6; 126,1; 127,9; 128,9; 131,9; 134,0; 134,2; 166,6; 172,2.

Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro de massas (m/z): 264,0 (M+); 236,0; 165,0; 152,0; 138; 125,0; 111,0; 98 (100%); 68,0.

12-bromokavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 12-bromokavaína foram utilizados 270,0 mg (3,3 mmol) de acetato de sódio, 22,5 mg (10% mol) de Pd(AcO)₂, 154,0 mg (1,0 mmol) da olefina em 3,3 mL de acetonitrila e 406,2 mg (1,5 mmol) do tetrafluorborato



de 4-bromofenildiazônio. A reação foi conduzida em atmosfera de CO. Foram obtidos 33,0 mg (10 %) de sólido cristalino que funde a 165,2 – 166,4 °C. Rf = 0,25 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração azul-esverdeada ao revelar na vanilina.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 1699 (C=O), 1624, 1385, 1230.

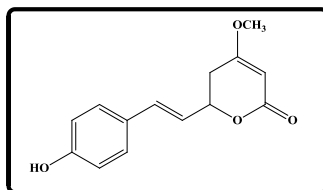
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2,52 (1H, dd, *J* = 4,7 e 17,1 Hz), 2,64 (1H, ddd, *J* = 1,0, 10,4 e 17,1 Hz), 3,75 (3H, s, -OCH₃), 5,00 – 5,10 (1H, m), 5,15 (1H, d, 1,3 Hz), 6,23 (1H, dd, *J* = 6,0 e 16,1 Hz), 6,67 (1H, d, *J* = 16,1 Hz), 7,24 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,44 (1H, d, *J* = 8,5 Hz).

Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 33,2; 56,2; 75,6; 90,6; 122,2; 126,3; 128,23; 131,8; 131,9; 134,7; 166,5; 172,2.

Espectro de massas (m/z): 309,9 (M+); 307,9; 282,0; 280,0; 265,9; 263,9; 183,9; 181,9; 170,9; 168,9; 140,9; 128,0 98,0 (100%); 68,0.

12-hidroxikavaína

Em um procedimento típico para a síntese da 12-hidroxikavaína foram utilizados 783,0 mg (9,5 mmol) de acetato de sódio, 64,9 mg (10% mol) de Pd(AcO)₂, 445,0 mg (2,9 mmol) da olefina em 12,5 mL de acetonitrila e 721,6 mg (3,47 mmol) do



tetrafluorborato de 4-hidroxifenildiazônio. A reação foi conduzida em

Capítulo 3 – Parte experimental

atmosfera de CO. Foram obtidos 267,4 mg (38 %) de um amarelo que se decompõe a 205 °C. Rf = 0,21 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração azul-esverdeada ao revelar na vanilina.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 3235, 1686 (C=O), 1615, 1385, 1256, 1230.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, acetona-*d*₆) δ (ppm) = 2,55 (1H, dd, *J* = 17,1 e 4,7 Hz), 2,68 (1H, ddd, *J* = 17,1, 10,4 e 1,3 Hz), 3,80 (3H, s, -OCH₃), 5,00 – 5,10 (1H, m), 5,15 (1H, d, 1,3 Hz), 6,20 (1H, dd, *J* = 16,1 e 6,6 Hz), 6,68 (1H, d, *J* = 16,1 Hz), 6,82 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,33 (1H, d, *J* = 8,5 Hz), 8,53 (1H, sl).

Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 33,0; 55,7; 76,1; 90,1; 115,5; 123,4; 127,76; 128,1; 132,5; 157,7; 165,6; 172,5.

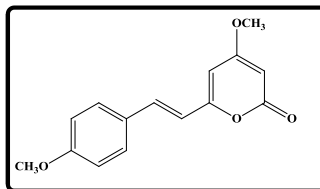
Espectro de massas (m/z): 288,1 (M⁺); 246,1; 201,1; 140,0; 120,1 (100%); 107,1; 98,0; 68,0.

3.5.5. Procedimento geral para a preparação das estilpironas através da oxidação utilizando DDQ

Em um sistema equipado com um condensador para refluxo e sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados o substrato (1,0 eq) dissolvido em tolueno anidro e em seguida o DDQ (Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona). O meio reacional foi mantido sob agitação a 90 °C durante 2 horas. Então, o bruto reacional foi filtrado em uma cama de celite a qual foi lavada com AcOEt. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado através de cromatografia flash utilizando uma mistura de hexano : AcOEt adequada como eluente.

Iangonina

Em um procedimento típico para a síntese da iangonina foram utilizados 154,1 mg (0,59 mmol) da 12-metoxikavaína dissolvida em 10 mL de tolueno anidro e 269,2 mg (1,18 mmol) de DDQ. O sistema foi mantido sob agitação a 90 °C durante 2 horas. Então,



o bruto reacional foi filtrado em uma cama de celite a qual foi lavada com AcOEt. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado através

Capítulo 3 – Parte experimental

de cromatografia flash utilizando uma mistura de hexano : AcOEt (50:50 v:v) como eluente. Foram obtidos 146,5 mg (95,2 %) de um sólido de coloração amarelada com ponto de fusão 152 - 153 °C e Rf = 0,37 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração esverdeada ao revelar na vanilina.

Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 1714 (C=O), 1551; 1255.

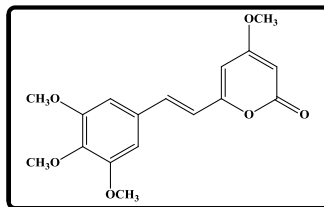
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,80 e 3,82 (6H, 2CH₃O-), 5,45 (1H, d, J = 2,2 Hz), 5,88 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,43 (1H, d, J = 16,3 Hz), 6,88 (2H, d, J = 8,5 Hz), 7,43-7,48 (m, 3H).

Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 55,4; 55,9; 88,3; 100,5; 114,4; 116,4; 128,0; 129,0; 135,4; 159,1; 160,7; 164,2; 171,2.

Espectro de massas (m/z): 258,1 (M+ e 100%); 230,1; 215,1; 187,0; 144,0; 115,1; 69,0.

11,13-dimetoxi-iangonina

Em um procedimento típico para a síntese da 11,13-dimetoxi-iangonina foram utilizados 540,9 mg (1,70 mmol) da 11, 12, 13-trimetoxikavaina dissolvida em 10 mL de tolueno anidro e 764,4 mg (3,90 mmol) de DDQ. O sistema foi mantido sob agitação a 90 °C durante 2 horas. Então, o bruto reacional foi filtrado em uma cama de celite a qual foi lavada com AcOEt. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado através de cromatografia flash utilizando uma mistura de hexano : AcOEt (40:60 v:v) como eluente. Foram obtidos 221,9 mg (41%) de um sólido de coloração amarelada que se decompõe a 185° e Rf = 0,17 (utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração esverdeada ao revelar na vanilina.



Espectro IV (filme): ν (cm⁻¹): 1705 (C=O), 1550, 1252, 1126.

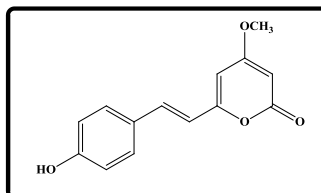
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,83 (3H, s, -OCH₃), 3,87 (3H, s, -OCH₃), 3,90 (6H, s, 2x -OCH₃), 5,50 (1H, d, J = 2,2 Hz), 5,95 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,48 (1H, d, J = 16,1 Hz), 6,73 (2H, s), 6,42 (1H, d, J = 16,1 Hz).

Espectro RMN de ¹³C (50,0 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) = 56,4 (2C); 56,9; 60,6; 89,1; 101,5; 105,6; 119,3; 131,2; 135,0; 139,2; 153,6; 158,9; 163,1; 171,3.

Espectro de massas (m/z): 318,1 (100%, M+), 303, 243, 148, 69.

12-hidroxi-5,6-dehidrokavaina

Em um procedimento típico para a síntese da 12-hidroxi-5,6-diidrokovaina foram utilizados 186,6 mg (0,76 mmol) da 12-hidroxikavalactona dissolvida em 7 mL de tolueno anidro e 344,0 mg (1,52 mmol) de DDQ. O sistema foi mantido sob agitação a 90 °C durante 2 horas.



Então, o bruto reacional foi filtrado em uma cama de celite a qual foi lavada com AcOEt. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado através de cromatografia flash utilizando uma mistura de hexano : AcOEt (40:60 v:v) como eluente. Foram obtidos 102,3 mg (54%) de um sólido branco com ponto de fusão 159 -160 °C e Rf 0,23 utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente.

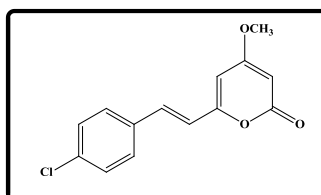
Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 3231, 1694 (C=O), 1547, 1454, 1252, 1033

Espectro RMN de ¹H (200 MHz, DMSO – d₆) δ (ppm) = 3,82 (3H, s, OCH₃), 5,59 (1H, d, *J* = 1,74 Hz), 6,22 (1H, d, *J* = 1,7 Hz), 6,77 (1H, d, *J* = 16,5 Hz), 6,78 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,24 (1H, d, *J* = 16,1 Hz), 7,52 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 9,91 (1H, s largo)

Espectro RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO – d₆) δ (ppm) = 56,8; 88,6; 100,6; 116,3; 116,6; 126,7; 129,8; 134,9; 159,4 (2C); 163,2; 171,5.

12-cloro-5,6-dehidrokavaina

Em um procedimento típico para a síntese da 12-cloro-5,6-diidrokovaina foram utilizados 226,3 mg (0,85 mmol) da 12-clorokavaina dissolvida em 7 mL de tolueno anidro e 388,0 mg (1,71 mmol) de DDQ. O sistema foi mantido sob agitação a 90 °C durante 2 horas.



Então, o bruto reacional foi filtrado em uma cama de celite a qual foi lavada com AcOEt. O solvente foi evaporado e o resíduo foi purificado através de cromatografia flash utilizando uma mistura de hexano : AcOEt (40:60 v:v) como eluente. Foram obtidos 210,0 mg (93,0 %) de um sólido branco com ponto de fusão 159 -160 °C e Rf = 0,48

Capítulo 3 – Parte experimental

(utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente) apresentando coloração roxa ao revelar na vanilina.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1715 (C=O), 1552, 1252, 822.

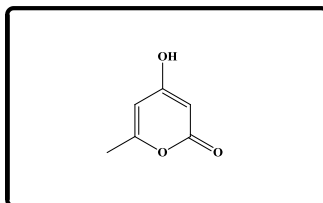
Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3,80 (3H, s, -OCH₃), 5,48 (1H, d, J = 2,2 Hz), 5,92 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,51 (1H, d, J = 16,1 Hz), 7,28 – 7,43 (5H, m).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 55,9; 89,0; 101,6; 119,1; 128,5; 129,1; 133,7; 134,3; 135,2; 158,2; 163,8; 170,9.

Espectro de massas (m/z): 261,1 (100%, M⁺); 234,1; 191,0; 128,1; 101,8.

3.5.6. Procedimento para a preparação da 6-metil-4-hidroxi-2-pirona

Em um erlenmeyer, 10,72 g (0,63 mol) de ácido dehidroacético foram dissolvidos em 34,0 g de uma solução aquosa de H₂SO₄ a 90% (H₂SO₄ : H₂O 9:1). A mistura foi aquecida até alcançar 130 °C e foi mantida sob agitação nesta temperatura durante 15 minutos. Então, á mistura reacional, foi adicionado aproximadamente 40,0 g de gelo onde houve a precipitação de um sólido que foi coletado por filtração á vácuo. O sólido foi lavado (3x 10 mL) com água gelada resultando na obtenção de 7,17 g (89,0 %) de um sólido branco com ponto de fusão entre 175,5 e 177,2 °C.



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1713 (C=O), 1663, 1625, 1583, 1307, 1259.

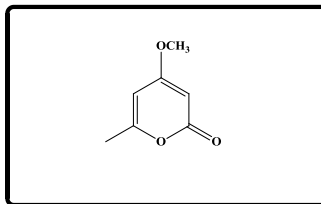
Espectro RMN de ^1H (250 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 2,13 (3H, s), 5,18 (1H, d, J = 1,5 Hz), 5,93 (1H, d, J = 1,5 Hz), 11,56 (1H, s).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) = 19,4; 88,1; 100,2; 163,3, 163,9; 170,5.

Espectro de massas (m/z): 126,0 (M⁺); 111,0; 98,1; 85,0; 69,0 (100%); 55,1.

3.5.7. Procedimento para a preparação da 6-metil-4-metoxi-2-pirona

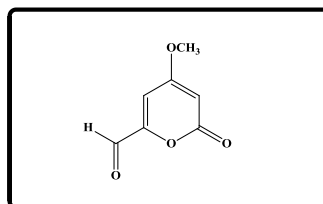
Em um balão de duas bocas equipado com condensador de refluxo, foi adicionado, sob atmosfera de nitrogênio, 31,2 g (226,2 mmol) de carbonato de potássio anidro, 150,0 mL de acetona anidra e 6,5 g (51,58 mmol) de sulfato de dimetila. O sistema foi aquecido a 80 °C e uma solução de 5,0 g (39,7 mmol) do 6-metil-4-hidroxi-2-pirona em 30 mL de acetona foi lentamente adicionada. A mistura reacional foi deixada sob refluxo e agitação durante a noite. Após resfriar e filtrar, o solvente foi evaporado sob vácuo e o produto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna utilizando a mistura hexano : acetato de etila (1:1 v:v) como eluente. Foram obtidos 4,45 g (80 %) de um sólido cristalino branco com ponto de fusão 84,0 – 84,5 °C e Rf 0,45 utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente.



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1717 (C=O), 1651, 1568, 1253.
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2,18 (3H, s), 3,77 (3H, s, -OCH₃), 5,37 (1H, d, *J* = 2,2 Hz), 5,75 (1H, d, *J* = 2,2 Hz).
Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 19,7; 55,7; 87,2; 100,3; 161,9; 164,9; 171,2.
Espectro de massas (m/z): 140,0 (M+); 125,0; 112,0 (100%); 69,0;

3.5.8. Procedimento para a preparação da 6-formil-4-metoxi-2-pirona

Em um tubo selado, sob atmosfera de argônio, foi adicionado 280,0 mg (2,0 mmol) da 6-metil-4-metoxi-2-pirona, 1,110 g (10,0 mmol) do SeO₂, recentemente tratado, e 12,0 mL de dioxano anidro. O tubo foi mergulhado em banho de silicone e a temperatura do banho foi elevada até alcançar 180 °C na qual foi mantida sob forte agitação durante 3,0 horas. Então, o sistema foi resfriado até a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada em papel filtro para remover os resíduos sólidos de selênio que ainda foram



Capítulo 3 – Parte experimental

lavados com AcOEt. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado em cromatografia em coluna utilizando a mistura hexano: AcOEt (1:1 v:v) como eluente. Foram obtidos 202,0 mg (65,0%) de um sólido levemente amarelado

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1731 (C=O), 1697, 1568, 1256, 1000, 933.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) = 3,88 (3H, s, -OCH₃), 5,76 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,69 (1H, d, J = 2,3 Hz), 9,43 (1H, s).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm) = 57,6; 95,1; 113,1; 154,2; 161,7; 169,5; 184,8.

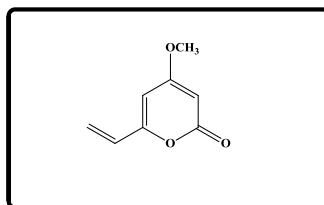
Espectro de massas (m/z): 154,0 (M⁺); 125,0 (100%); 69,0.

3.5.9. Procedimento para a preparação da olefina 108

Em um balão de 250,0 mL, sob atmosfera de argônio, contendo 50,0 mL de THF anidro a 0 °C, foi adicionado 1,69 g (4,18 mmol) de iodeto de metiltrifenilfosfônio e 2,92 mL (4,18 mmol) de *n*-Butil lítio (1,43 M) recentemente titulado. Ao final da adição da base, a solução ficou fortemente amarelada. O sistema foi deixado sob agitação durante 30,0 minutos e então a temperatura foi baixada à -78 °C, com banho de CO₂ e acetona. Então, uma solução contendo 322,1 mg (2,09 mmol) do 6-formil-4-metoxi-2-pirona em 50,0 mL de THF anidro foi canulada em aproximadamente 20,0 minutos. A solução passou de amarela para azul e foi deixada sob agitação, mergulhada no banho, até alcançar 0 °C (~4,0 horas). A reação foi finalizada com a adição de 15,0 mL de uma solução de NaCl saturada. O produto bruto foi extraído com AcOEt (3x 15,0 mL) e a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna utilizando a mistura hexano : AcOEt (1:1 v:v) como eluente. Foram obtidos 162,2 mg (51 %) de um sólido branco.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1716 (C=O), 1561, 1253, 731.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,81 (3H, s, -OCH₃), 5,48 (1H, d, J = 2,3 Hz), 5,53 (1H, dd, J = 1,8 e 9,8 Hz), 5,87 (1H, d, J = 2,3 Hz), 6,13 (1H, dd, J = 1,8 e 17,3 Hz), 6,25 (1H, dd, J = 9,8 e 17,3 Hz).



Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 55,9; 89,4; 101,4; 121,6; 128,0; 158,1; 163,8; 170;8.

Espectro de massas (m/z): 152,0 (M+); 124,1 (100%); 95,0; 81,0; 69,0.

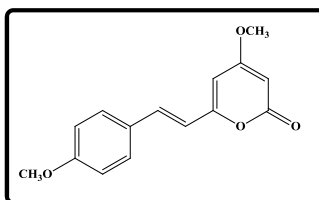
3.5.10. Procedimento geral para a preparação das estirilpironas utilizando a olefina 108

Os procedimentos para a obtenção das estirilpironas utilizando a olefina 2 seguem os mesmo protocolos da preparação dos derivados da kavaína utilizando a olefina 1 e que estão descritos nos itens 5.4.1 e 5.4.2.

Iangonina

A iangonina foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 35,0 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-metoxifenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa , 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{ACO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram obtidos 32,4 mg (96,0 %) de produto.

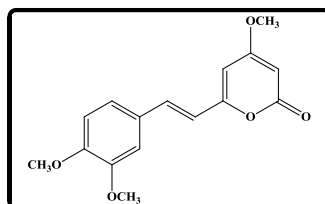
A caracterização da iangonina foi apresentada no item 5.5.1.



11-metoxi-iangonina

A 11-metoxi-iangonina foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 50,3 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 3,4-dimetoxifenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa , 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{ACO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram obtidos 33,7 mg (89,0 %) de um sólido amarelo com ponto de fusão 158,0 159,0 e Rf 0,20 utilizando hexano : acetato de etila (1 : 1) como eluente.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1710 (C=O), 1635, 1546, 1255.



Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3,82 (3H, s, - OCH_3), 3,90 e 3,92 (6H, 2s, - OCH_3), 5,46 (1H, s largo), 5,90 (1H, s largo), 6,43 (1H, d, $J = 15,9$ Hz), 6,87 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 7,02 (1H, s), 7,08 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 7,44 (1H, d, $J = 15,9$ Hz).

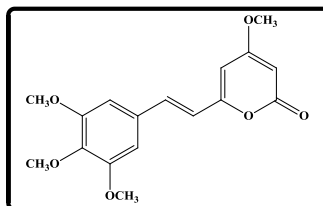
Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 55,9 (2C); 55,99; 88,4; 100,5; 109,3; 111,2; 116,52; 121,6; 128,2; 135,7; 149,2; 150,4; 159,0; 164,1; 171,2.

Espectro de massas (m/z): 288,0 (M^+ e 100%); 245,0; 217,0; 189,0; 151,0; 115,0; 69,0.

11,13-dimetoxi-iangonina

A 11,13-dimetoxi-iangonina foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 55,6 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 3,4,5-trimetoxifenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa , 2,9 mg (10% mol) de $\text{Pd}(\text{ACO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram obtidos 33,9 mg (81,0 %) de um sólido amarelo.

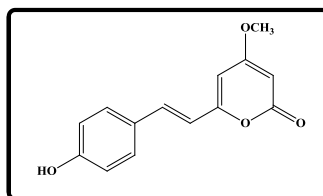
A caracterização da 11,13-dimetoxi-iangonina foi apresentada no item **5.5.2**.



12-hidroxi-5,6-dehidrokavaína

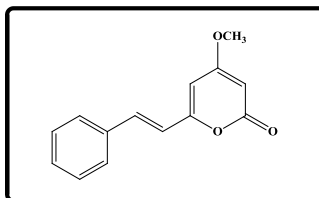
A 12-hidroxi-5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 32,8 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-hidroxifenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa , 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{ACO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram obtidos 20,3 mg (63,0 %) de um sólido amarelo.

A caracterização da 12-hidroxi-5,6-dehidrokavaína foi apresentada no item **5.5.3**.



5,6-dehidrokavaína

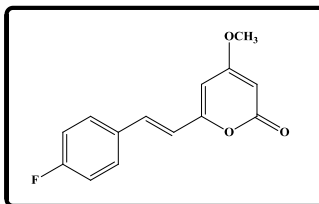
A 5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 38,3 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de fenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa, 2,9 mg (10% mol) de Pd(ACO)₂ e 0,5 mL de MeCN. Foram isolados 30,0 mg de uma mistura contendo o material de partida mais o produto na proporção de 3 : 1 (determinado por ¹H RMN).



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1714 (C=O), 1641, 1553, 1253.
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,83 (3H, s, -OCH₃), 5,50 (1H, d, *J* = 2,10 Hz), 5,94 (1H, d, *J* = 2,1 Hz), 6,58 (1H, d, *J* = 16,1 Hz), 7,32 – 7,42 (3H, m), 7,47 – 7,55 (3H, m).
Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 55,9; 88,8; 101,3; 118,6; 127,4; 128,9; 129,4; 135,2; 135,7; 158,6; 164,0; 171,0.
Espectro de massas (*m/z*): 228,1 (M⁺ e 100%); 211,0; 200,1; 185,0; 157,1; 141,0; 129,1; 115,0 103,0; 77,0; 69,0.

12-fluor-5,6-dehidrokavaína

A 12-fluor-5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 42,0 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-fluorfenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa, 6,0 mg (4% mol) de Pd₂(dba)₃.dba e 0,5 mL de PhCN. Foram isolados 17,8 mg de um



sólido branco com ponto de fusão na faixa 134,3 – 135 °C e R_f = 0,26 utilizando a mistura hexano : AcOEt (1 : 1 v:v) como eluente.
Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1721 (C=O), 1645, 1555, 1157.
Espectro RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 3,83 (3H, s, -OCH₃), 5,50 (1H, d, *J* = 2,0 Hz), 5,94 (1H, d, *J* = 2,0 Hz), 6,48 (1H, d, *J* = 16,0 Hz), 7,07 (1H, t, *J* = 8,8 Hz), 7,43 – 7,50 (3H, m).
Espectro RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 55,9; 88,9; 101,3 (d, *J* = 0,9 Hz), 116,0 (d, *J* = 21,8 Hz); 118,4 (d, *J* = 2,5 Hz); 129,2 (d, *J*

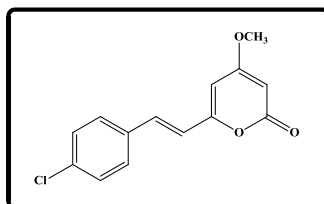
Capítulo 3 – Parte experimental

= 8,3 Hz), 131,5 (d, $J = 3,5$ Hz), 134,5 (d, $J = 1,00$ Hz); 158,5 (d, $J = 0,87$ Hz); 163,3 (d, $J = 249,0$ Hz); 163,9; 171,0.

Espectro de massas (m/z): 246,1 (M^+ e 100%); 218,0; 203,1; 174,9; 146,9; 101,0; 69,0.

12-cloro-5,6-dehidrokavaína

A 12-cloro-5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 45,2 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-clorofenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa, 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram isolados 28,26 mg (89%)

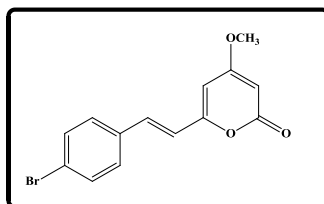


de um sólido branco com ponto de fusão na faixa 151,2 - 152 °C e $R_f = 0,26$ utilizando a mistura hexano : AcOEt (1 : 1 v:v) como eluente.

A caracterização da 12-cloro-5,6-dehidrokavaína foi apresentada no item 5.5.4.

12-bromo-5,6-dehidrokavaína

A 12-bromo-5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 42,7 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-bromofenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa, 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ e 0,5 mL de MeCN. Foram



isolados 28,8 mg (71%) de um sólido branco com ponto de fusão na faixa 158,2 – 159,0 °C e $R_f = 0,26$ utilizando a mistura hexano : AcOEt (1 : 1 v:v) como eluente.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1728 (C=O), 1641, 1557, 1252.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3,83 (3H, s, -OCH₃), 5,50 (1H, d, $J = 2,00$ Hz), 5,94 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,57 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,34 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,42 (1H, d, $J = 16,0$ Hz), 7,49 (1H, d, $J = 8,5$ Hz).

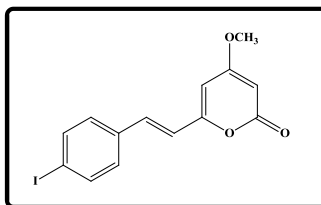
Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 56,0; 89,0; 101,7; 119,2; 123,5; 128,8; 132,1; 134,1; 134,4; 158,2; 163,8; 170,7.

Espectro de massas (m/z): 308 (M+ e 100%); 306 (M+ e 100%), 280,0; 278; 234,9; 236,9; 128,0 102,0 69,0.

12-iodo-5,6-dehidrokavaína

A 12-iodo-5,6-dehidrokavaína foi preparada utilizando 20 mg (0,13 mmol) da olefina **108**, 63,5 mg (0,20 mmol) do tetrafluorborato de 4-iodofenildiazônio, 35,6 mg (0,43 mmol) de AcONa , 1,4 mg (5% mol) de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$ e 0,5 mL de MeCN . Foram isolados 30,7 mg (66 %) de um sólido branco com $R_f = 0,26$ utilizando a mistura hexano : AcOEt (1 : 1 v:v) como eluente.



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1726 ($\text{C}=\text{O}$), 1640, 1412, 1252, 1153

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 3,83 (3H, s, - OCH_3), 5,50 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 5,95 (1H, d, $J = 2,0$ Hz), 6,56 (1H, d, $J = 15,8$ Hz), 7,21 (1H, d, $J = 8,5$ Hz), 7,40 (1H, d, $J = 15,8$ Hz), 7,70 (1H, d, $J = 8,5$ Hz).

Espectro RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 56,0; 89,1; 95,3; 101,8; 119,3; 128,9; 134,5; 134,7; 138,1; 158,2; 163,8; 170,9.

Espectro de massas (m/z): 353,9 (M+ e 100%); 325,9; 282,9; 156,0; 128,0; 102,0; 69,0.

3.5.11. Procedimento geral para a preparação das diidroestirilpironas através da hidrogenação catalítica utilizando Pd/C (5%)

Em um recipiente adequado sob atmosfera de nitrogênio foram adicionados o Pd/C 5% (10% m/m em relação ao substrato) e o metanol ou THF. Então a atmosfera foi trocada por hidrogênio e em seguida foi adicionado o substrato. O sistema foi deixado sob forte agitação até o consumo total do material de partida. O consumo do material de partida foi monitorado por ccd utilizando hexano : AcOEt (50:50 v:v) como eluente a qual foi revelada em luz a 254 nm. Após o termino da reação,

Capítulo 3 – Parte experimental

o sistema foi aberto e rapidamente filtrado em uma cama de celite para retirar o paládio do meio reacional.

7,8-diidro-iangonina

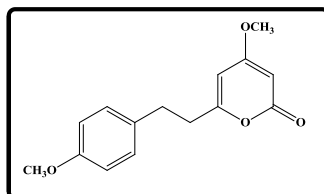
Em um procedimento típico para a síntese da 7,8-diidroiangonina foram utilizados 202,4 mg (0,77 mmol) do substrato, 20,0 mg (10% m:m) de Pd/C 5%, 10 mL de metanol e atmosfera de nitrogênio sob pressão exercida através de uma bexiga de borracha. O sistema foi mantido sob forte agitação a temperatura ambiente até o consumo total do substrato (70 minutos). O produto foi purificado por recristalização em acetato de etila e lavagem dos cristais com éter dietílico. Foram obtidos 137,7 mg (67,5 %) de um sólido na forma de cristais incolores com ponto de fusão 101 - 102 °C.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 1709 (C=O), 1566, 1513, 1246, 1034.

Espectro RMN de ¹H (250 MHz, acetona-d₆) δ (ppm) = 2,70 – 2,76 (2H, m), 2,86 – 2,92 (2H, m encoberto pela água na acetona), 3,75 (3H, s, -OCH₃), 3,82 (3H, s, -OCH₃), 5,40 (1H, d, *J* = 2,2 Hz), 5,85 (1H, d, *J* = 2,2 Hz), 6,84 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 7,16 (2H, d, *J* = 8,5 Hz).

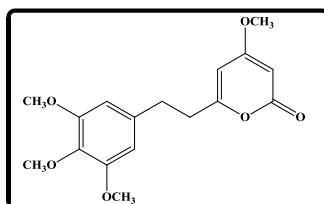
Espectro RMN de ¹³C (62,5 MHz, acetona-d₆) δ (ppm) = 31,6; 35,1; 54,5; 55,6; 87,1; 99,6; 113,7 (2C); 129,3 (2C); 132,1; 158, 3; 163,4; 164,6; 171,0.

Espectro de massas (m/z): 260,1 (M⁺); 134,0; 121,1(100%); 91,0;



7,8-diidro-11,13-dimetoxi-iangonina

Em um procedimento típico para a síntese da 7,8-diidro-11,13-dimetoxi-iangonina foram utilizados 116,0 mg (0,36 mmol) do substrato, 12,0 mg (10% m:m) de Pd/C 5%, 10 mL de metanol e atmosfera de nitrogênio sob pressão exercida através de uma bexiga de



Capítulo 3 – Parte experimental

borracha. O sistema foi mantido sob forte agitação a temperatura ambiente até o consumo total do substrato (90 minutos). O produto foi purificado por recristalização em acetato de etila e lavagem dos cristais com éter dietílico. Foram obtidos 77,4 mg (66,3 %).

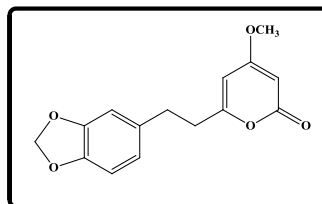
Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1704 (C=O).

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, acetona- d_6) δ (ppm) = 2,73 – 2,80 (2H, m), 2,86 – 2,93 (2H, m), 3,68 (3H, s, -OCH₃), 3,79 (6H, s, 2x -OCH₃), 3,83 (3H, s, -OCH₃), 5,40 (1H, d, J = 2,2 Hz), 5,87 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,57 (2H, s).

Espectro de massas (m/z): 320,1 (M⁺); 181,0(100%); 125,0; 69,0.

7,8-diidro-11,12-metilenodioxi-iangonina

Para a síntese da 7,8-diidro-11,12-metilenodioxi-iangonina foram utilizados 41,0 mg (0,18 mmol) do substrato, 10,0 mg (20 % m:m) de Pd/C 5%, 20,0 mL de THF e atmosfera de hidrogênio sob pressão exercida através de uma bexiga de borracha. O sistema



foi mantido sob forte agitação a temperatura ambiente até o consumo total do substrato (60 minutos). O produto foi purificado cromatografia em coluna utilizando hexano : AcOEt (1:1 v:v) como eluente. Foram obtidos 26,0 mg (65,0 %) de um sólido na forma de cristais incolores com ponto de fusão 101 - 102 °C.

Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm^{-1}): 1709 (C=O), 1648, 1568, 1491, 1241, 1033.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 2,69 (2H, t largo, J = 8,25, 7,0 Hz), 2,89 (2H, t largo, J = 8,3 e 7,0 Hz), 3,78 (3H, s, -OCH₃), 5,40 (1H, d, J = 1,75 Hz), 5,71 (1H, d, 1,75 Hz), 5,92 (2H, s), 6,59 – 6,65 (2H, m), 6,71 (1H, d, J = 8,00 Hz).

Espectro RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3) δ (ppm) = 32,55; 35,70; 55,78; 87,68; 100,58; 100,85; 108,28; 108,63; 121,16; 133,58; 146,03; 147,69; 164,18; 164,84; 171,09.

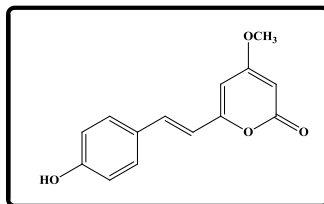
Espectro de massas (m/z): 274,0 (M⁺); 135,0 (100%).

3.5.12. *Procedimento para a demetilação das estilirpironas com BBr₃*

Em um balão de duas bocas contendo o material de partida (1,0 eq.) em diclorometano anidro, sob atmosfera de nitrogênio e a uma temperatura de -30 °C, foi adicionado uma solução 2,9 M de tribrometo de boro (BBr₃, 3,0 eq. para cada hidroxila) em diclorometano. Permitiu-se que o sistema (mergulhada no banho de etilenoglicol e gelo seco) atingisse vagarosamente a temperatura ambiente, a qual foi mantida agitação durante a noite. Então, a temperatura do sistema foi baixada novamente para -30 °C e foi adicionado metanol a mesma temperatura para eliminar o excesso de BBr₃. O meio reacional foi deixado sob agitação por mais 10 minutos onde ocorreu a precipitação de um sólido que foi filtrado e seco sob vácuo.

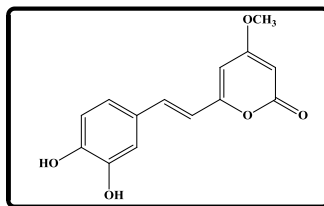
12-hidroxi-5,6-deidrokaivaína

Foi preparado conforme procedimento descrito no item 5.12 utilizando 30,0 mg (0,116 mmol) de iangonina em 5,0 mL de diclorometano anidro e 0,12 mL da solução (2,9 M, 0,348 mmol) de BBr₃ em diclorometano. Foram obtidos 20,3 mg (24,0 %) de um sólido de coloração amarelada. Os dados experimentais foram descritos no item 5.5.3.



11, 12-diidroxi-5,6-deidrokaivaína

Foi preparado conforme procedimento descrito no item 5.12 utilizando 340,0 mg (1,180 mmol) de 11-metoxiangonina em 40,0 mL de diclorometano anidro e 2,44 mL da solução (2,9 M, 7,080 mmol) de BBr₃ em diclorometano. Foram obtidos 168,7 mg (55,0 %) de um sólido de coloração amarelada. Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 3260 (O-H), 1698 (C=O).

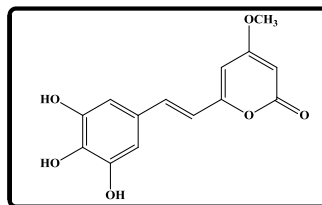


Capítulo 3 – Parte experimental

Espectro RMN de ^1H (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) = 3,80 (3H, s, -OCH₃), 5,57 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,24 (1H, d, J = 2,2 Hz), 6,65 (1H, d, J = 16,0 Hz), 6,74 (1H, d, J = 8,2 Hz), 6,92 (1H, dd, J = 2,2 e 8,2 Hz), 7,00 (1H, d, J = 2,2 Hz), 7,13 (1H, d, J = 16,0 Hz).

11, 12, 13-trihidroxi-5,6-deidrokaivaína

Foi preparado conforme procedimento descrito no item 5.12 utilizando 30,0 mg (1,180 mmol) de 11-metoxi-iangonina em 40,0 mL de diclorometano anidro e 2,44 mL da solução (2,9 M, 7,080 mmol) de BBr₃ em diclorometano. Foram obtidos 8,5 mg (32 %) de um sólido de coloração amarelada



Espectro IV (pastilha de KBr): ν (cm⁻¹): 3231 (O-H), 2958 (=C-H), 1694 (C=O), 1547, 1454, 1252.

Espectro RMN de ^1H (250 MHz, CD₃OD) δ (ppm) = 3,87 (3H, s, -OCH₃), 5,56 (1H, d, J = 2,21 Hz), 6,13 (1H, d, J = 2,21 Hz), 6,54 (1H, d, J = 15,80 Hz), 6,60 (2H, s), 6,22 (1H, d, J = 15,80 Hz).

3.5.13. Atividade Citotóxica em células leucêmicas (mielóide e linfóide), tumor mamário e colorretal

As soluções estoque das amostras foram preparadas em DMSO na concentração de 20mM. Uma sonda de ultra-som foi empregada para ajudar na dissolução ou suspensão das mesmas. Para os ensaios com células, foi preparada inicialmente uma solução de uso a 500 μM . Deste modo as concentrações finais dos compostos nos ensaios de triagem foram de 50 μM , com uma concentração final de DMSO a 0,25%.

As linhagens celulares utilizadas para a avaliação da potencial atividade anti-tumoral incluíram: HL60 (leucemia mielóide), Jurkat (leucemia linfóide), MCF-7 (carcinoma mamário), HCT- (carcinoma colo-retal).

De forma breve, as suspensões de células Jurkat e HCT-116 foram utilizadas na concentração de 100.000 células/poço (placas de 96 poços), para a linhagem HL60 utilizou-se a concentração de 50.000 células/poço e por último, utilizou-se a concentração de 40.000 células/poço para a linhagem MCF-7. Todas foram incubadas por 24hs a

37°C, 5%CO₂ para estabilização. Após estabilização, todas as células foram incubadas com as substâncias por 48h em atmosfera de 5%CO₂ e 100% de umidade, 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se como controle positivo a cisplatina, composto já utilizado na terapia anti-câncer. Foi realizado um controle com o solvente (DMSO) na mesma concentração das amostras testes. A proliferação e viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio de MTT, descrito a seguir.

Como nenhuma amostra apresentou atividade significativa com inibição da proliferação celular superior a 50% não foram submetidas à determinação da concentração inibitória de 50% do crescimento (CI₅₀).

3.5.14. Avaliação de viabilidade e proliferação celular pelo ensaio de MTT

O ensaio para avaliação de viabilidade e proliferação celular é baseado na redução metabólica do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) a formazan⁷¹ e permite avaliar tanto a proliferação quanto a viabilidade celular. A metodologia utilizada foi descrita por Monks et al. (1991)⁷¹, com modificações. Resumidamente, faltando 4 horas para o final do período de incubação das culturas, foram adicionados a cada poço (contendo 200µL finais), 20µL de uma solução de MTT (2,5mg/mL). Após as 4 horas de incubação e formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado à vácuo. A cada poço foram adicionados 200µL de uma solução de HCl 0,04M em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelas células viáveis, as placas foram lidas em leitor de ELISA a um comprimento de onda de 595.

REFERÊNCIAS

- [1] Buss, A. D. C., B.; Waig, R. D.; Natural products as leads for new pharmaceuticals. In: Abraham, D. J. *Burguer's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Wiley-interscience, 1, 1998. p. 860-900.
- [2] Patrick, G.; Spencer, J. *An introduction to medicinal chemistry*: Oxford University Press Oxford, 1995.
- [3] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p.461-477, 2007.
- [4] Honda, T.; Gribble, G. W.; Suh, N.; Finlay, H. J.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Favalaro, F. G.; Wang, Y. P.; Sporn, M. B. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring a as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 9, p.1866-1877, 2000.
- [5] Honda, T.; Rounds, B. V.; Bore, L.; Finlay, H. J.; Favalaro, F. G.; Suh, N.; Wang, Y. P.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W. Synthetic oleanane and ursane triterpenoids with modified rings A and C: A series of highly active inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 22, p.4233-4246, 2000.
- [6] Honda, T.; Janosik, T.; Honda, Y.; Han, J.; Liby, K. T.; Williams, C. R.; Couch, R. D.; Anderson, A. C.; Sporn, M. B.; Gribble, G. W. Design, synthesis, and biological evaluation of biotin conjugates of 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9(11)-dien-28-oic acid for the isolation of the protein targets. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 20, p.4923-4932, 2004.
- [7] Soldi, C.; Pizzolatti, M. G.; Luiz, A. P.; Marcon, R.; Meotti, F. C.; Miotto, L. A.; Santos, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 6, p.3377-3386, 2008.
- [8] Johann, S.; Soldi, C.; Lyon, J. P.; Pizzolatti, M. G.; Resende, M. A. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of candida albicans adhesion to human epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, v. 45, n. 2, p.148-153, 2007.
- [9] Susunaga, G. S.; Siani, A. C.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Delle Monache, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, v. 72, n. 6, p.709-711, 2001.
- [10] Pizzolatti, M. G.; Luciano, C.; Monache, F. D. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa*. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p.819-822, 2000.

Referências bibliográficas

- [11] Pizzolatti, M. G.; Cunha, A.; Pereira, W. S.; Delle Monache, F. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n. 6, p.603-606, 2004.
- [12] Bilia, A. R.; Gallori, S.; Vincieri, F. F. Kava-kava and anxiety: Growing knowledge about the efficacy and safety. *Life Sciences*, v. 70, n. 22, p.2581-2597, 2002.
- [13] Rex, A.; Morgenstern, E.; Fink, H. Anxiolytic-like effects of kava-kava in the elevated plus maze test-a comparison with diazepam. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 26, n. 5, p.855-860, 2002.
- [14] Duarte, F. S.; Duzzioni, M.; Mendes, B. G.; Pizzolatti, M. G.; De Lima, T. C. M. Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 86, n. 1, p.150-161, 2007.
- [15] Duarte, F. S.; Marder, M.; Hoeller, A. A.; Duzzioni, M.; Mendes, B. G.; Pizzolatti, M. G.; De Lima, T. C. M. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: In vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. *Psychopharmacology*, v. 197, n. 3, p.351-360, 2008.
- [16] Duarte, F. S. Participação das diidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas nas ações centrais do tipo-benzodiazepínicas da planta *Polygala sabulosa* A. W. Bennett (Polygalaceae) em roedores. (PhD). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2007
- [17] Cseke, L. J.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B.; Warber, S. L.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L. Natural products from plants: Taylor & Francis, 2006.
- [18] Dewick, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach: John Wiley & Sons, 2002.
- [19] Tewtrakul, S.; Tansakul, P.; Daengrot, C.; Ponglimanont, C.; Karalai, C. Anti-inflammatory principles from *Heritiera littoralis* bark. *Phytomedicine*, v. 17, n. 11, p.851-855, 2010.
- [20] Huang, L. J.; Gao, W. Y.; Li, X.; Zhao, W. S.; Huang, L. Q.; Liu, C. X. Evaluation of the in vivo anti-inflammatory effects of extracts from *Pyrus bretschneideri* rehd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 16, p.8983-8988, 2010.
- [21] Oliveira, F. A.; Vieira-Junior, G. M.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Florencio, M. G.; Lima, R. C. P.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N.

Referências bibliográficas

Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, v. 49, n. 2, p.105-111, 2004.

[22] Medeiros, R.; Otuki, M. F.; Avellar, M. C. W.; Calixto, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, v. 559, n. 2-3, p.227-235, 2007.

[23] Otuki, M. F.; Vieira-Lima, F.; Malheiros, K.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, v. 507, n. 1-3, p.253-259, 2005.

[24] Cheng, J. J.; Zhang, L. J.; Cheng, H. L.; Chiou, C. T.; Lee, I. J.; Kuo, Y. H. Cytotoxic hexacyclic triterpene acids from *Euscaphis japonica*. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 10, p.1655-1658, 2010.

[25] Yelani, T.; Hussein, A. A.; Meyer, J. J. M. Isolation and identification of poisonous triterpenoids from *Elaeodendron croceum*. *Natural Product Research*, v. 24, n. 15, p.1418-1425, 2010.

[26] Cheng, C. R.; Yue, Q. X.; Wu, Z. Y.; Song, X. Y.; Tao, S. J.; Wu, X. H.; Xu, P. P.; Liu, X. A.; Guan, S. H.; Guo, D. A. Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, v. 71, n. 13, p.1579-1585, 2010.

[27] Ukiya, M.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Suzuki, H.; Mukainaka, T.; Ichiishi, E.; Yasukawa, K.; Kasahara, Y.; Nishino, H. Constituents of compositae plants iii. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible *Chrysanthemum* flowers. *Cancer Letters*, v. 177, n. 1, p.7-12, 2002.

[28] Akihisa, T.; Tokuda, H.; Ichiishi, E.; Mukainaka, T.; Toriumi, M.; Ukiya, M.; Yasukawa, K.; Nishino, H. Anti-tumor promoting effects of multiflorane-type triterpenoids and cytotoxic activity of karounidiol against human cancer cell lines. *Cancer Letters*, v. 173, n. 1, p.9-14, 2001.

[29] Katerere, D. R.; Gray, A. I.; Nash, R. J.; Waigh, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from african Combretaceae. *Phytochemistry*, v. 63, n. 1, p.81-88, 2003.

[30] Oliveira, F. A.; Lima, R. C. P.; Cordeiro, W. M.; Vieira, G. M.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. Pentacyclic triterpenoids, α and β -amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 78, n. 4, p.719-725, 2004.

Referências bibliográficas

- [31] Ramalhete, C.; Lopes, D.; Mulhovo, S.; Molnar, J.; Rosario, V. E.; Ferreira, M. J. U. New antimalarials with a triterpenic scaffold from *Momordica balsamina*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 14, p.5254-5260, 2010.
- [32] Guerrero-Analco, J. A.; Martineau, L.; Saleem, A.; Madiraju, P.; Muhammad, A.; Durst, T.; Haddad, P.; Arnason, J. T. Bioassay-guided isolation of the antidiabetic principle from *Sorbus decora* (rosaceae) used traditionally by the eeyou istchee cree first nations. *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 9, p.1519-1523, 2010.
- [33] Ali, M. S.; Jahangir, M.; Ul Hussan, S. S.; Choudhary, M. I. Inhibition of α -glucosidase by oleanolic acid and its synthetic derivatives. *Phytochemistry*, v. 60, n. 3, p.295-299, 2002.
- [34] Bahadir, O.; Citoglu, G. S.; Smejkal, K.; Dall'acqua, S.; Ozbek, H.; Cvacka, J.; Zemlicka, M. Analgesic compounds from *Scorzonera latifolia* (fishch and mey.) dc. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 131, n. 1, p.83-87, 2010.
- [35] Otuki, M. F.; Ferreira, J.; Lima, F. V.; Meyre-Silva, C.; Malheiros, N.; Muller, L. A.; Cani, G. S.; Santos, A. R. S.; Yunes, R. A.; Calixto, J. O. B. Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: Evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 313, n. 1, p.310-318, 2005.
- [36] Lima-Junior, R. C. P.; Oliveira, F. A.; Gurgel, L. A.; Cavalcante, I. J. M.; Santos, K. A.; Campos, D. A.; Vale, C. A. L.; Silva, R. M.; Chaves, M. H.; Rao, V. S. N.; Santos, F. A. Attenuation of visceral nociception by α - and β -amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. *Planta Medica*, v. 72, n. 1, p.34-39, 2006.
- [37] Oliveira, F. A.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Lima, R. C. P.; Silva, R. M.; Maia, J. L.; Brito, G.; Santos, F. A.; Rao, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (aubl.) march. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, n. 1-2, p.103-108, 2005.
- [38] Guillamon, E.; Garcia-Lafuente, A.; Lozano, M.; D'arrigo, M.; Rostagno, M. A.; Villares, A.; Martinez, J. A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, v. 81, n. 7, p.715-723, 2010.
- [39] Pawar, R. S.; Bhutani, K. K. Effect of oleanane triterpenoids from *Terminalia arjuna* - a cardioprotective drug on the process of respiratory oxyburst. *Phytomedicine*, v. 12, n. 5, p.391-393, 2005.

Referências bibliográficas

- [40] Surendra, K.; Corey, E. J. A short enantioselective total synthesis of the fundamental pentacyclic triterpene lupeol. *Journal of the American Chemical Society*, v. 131, n. 39, p.13928-13929, 2009.
- [41] Jung, M. E.; Duclos, B. A. Synthetic approach to analogues of betulinic acid. *Tetrahedron*, v. 62, n. 40, p.9321-9334, 2006.
- [42] Ireland, R. E. Total synthesis of an unsymmetrical pentacyclic triterpene. DI-germanicol. *Journal of the American Chemical Society*, v. 92, n. 19, p.5743-5746, 1970.
- [43] Ireland, R. E.; Lipinski, C. A.; Kowalski, C. J.; Tilley, J. W.; Walba, D. M. Total synthesis of DI-shionone, a tetracyclic triterpene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 96, n. 10, p.3333-3335, 1974.
- [44] Dutcher, J. S.; Macmillan, J. G.; Heathcock, C. H. Pentacyclic triterpene synthesis. 5. Synthesis of optically pure ring AB precursors. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 41, n. 16, p.2663-2669, 1976.
- [45] Qian, S.; Li, H.; Chen, Y.; Zhang, W.; Yang, S.; Wu, Y. Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *Journal of Natural Products*, v. 11, n. 73, p.1743-1750, 2010.
- [46] Sun, I. C.; Chen, C. H.; Kashiwada, Y.; Wu, J. H.; Wang, H. K.; Lee, K. H. Anti-aids agents 49. Synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 19, p.4271-4275, 2002.
- [47] Sun, I. C.; Wang, H. K.; Kashiwada, Y.; Shen, J. K.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Yang, L. M.; Lee, K. H. Anti-aids agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 23, p.4648-4657, 1998.
- [48] Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C. H.; Garrett, P. E.; Lee, K. H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 5, p.1016-1017, 1996.
- [49] Kashiwada, Y.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Fujioka, T.; Kilgore, N. R.; Wild, C. T.; Allaway, G. P.; Lee, K.-H. 3-*o*-glutaryl-dihydrobetulin and related monoacyl derivatives as potent anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 23, p.5851-5853, 2004.
- [50] Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. 3,28-di-*o*-(dimethylsuccinyl)-betulin isomers as anti-HIV agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 2, p.183-185, 2001.

Referências bibliográficas

- [51] Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. Anti-aids agents--xxvii. Synthesis and anti-hiv activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 12, p.2133-2143, 1997.
- [52] Yu, D.; Sakurai, Y.; Chen, C.-H.; Chang, F.-R.; Huang, L.; Kashiwada, Y.; Lee, K.-H. Anti-aids agents 69. Moronic acid and other triterpene derivatives as novel potent anti-hiv agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 18, p.5462-5469, 2006.
- [53] Narender, T.; Khaliq, T.; Singh, A. B.; Joshi, M. D.; Mishra, P.; Chaturvedi, J. P.; Srivastava, A. K.; Maurya, R.; Agarwal, S. C. Synthesis of α -amyrin derivatives and their in vivo antihyperglycemic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 3, p.1215-1222, 2009.
- [54] Soldi, C.; Pizzolatti, M. G.; Luiz, A. P.; Marcon, R.; Meotti, F. C.; Mioto, L. A.; Santos, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 6, p.3377-3386, 2008.
- [55] Sanglard, D.; Odds, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: Molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases*, v. 2, n. 8, p.507-507, 2002.
- [56] Mallavadhani, U. V.; Mahapatra, A.; Jamil, K.; Reddy, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-*o*-lipophilic chains. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 10, p.1576-1579, 2004.
- [57] Lebrun, M.; Grenier, L.; Gourde, P.; Bergeron, M. G.; Labrecque, G.; Beauchamp, D. Nephrotoxicity of amphotericin B in rats: Effects of the time of administration. *Life Sciences*, v. 58, n. 11, p.869-876, 1996.
- [58] Suryawanshi, S. N.; Chandra, N.; Kumar, P.; Porwal, J.; Gupta, S. Chemotherapy of leishmaniasis part-VIII: Synthesis and bioevaluation of novel chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 11, p.2473-2478, 2008.
- [59] Sauvain, M.; Kunesch, N.; Poisson, J.; Gantier, J. C.; Gayral, P.; Dedet, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (dilleniaceae). *Phytotherapy Research*, v. 10, n. 1, p.1-4, 1996.
- [60] Rocha, L. G.; Almeida, J.; Macedo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, n. 6-7, p.514-535, 2005.
- [61] Campos, F. F.; Rosa, L. H.; Cota, B. B.; Caligiorme, R. B.; Rabello, A. L. T.; Alves, T. M. A.; Rosa, C. A.; Zani, C. L. Leishmanicidal metabolites from

Referências bibliográficas

Cochliobolus sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *Plas Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 12, p.348, 2008.

[62] Soldi, C. Derivados sintéticos dos triterpenos α e β -amirina e avaliação das propriedades analgésicas e antifúngicas (Dissertação de Mestrado). Florianópolis: Universidade federal de Santa Catarina, 2007

[63] Essaady, D.; Simon, A.; Ollier, M.; Maurizis, J. C.; Chulia, A. J.; Delage, C. Inhibitory effect of ursolic acid on B16 proliferation through cell cycle arrest. *Cancer Letters*, v. 106, n. 2, p.193-197, 1996.

[64] Hsu, H. Y.; Yang, J. J.; Lin, C. C. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Letters*, v. 111, n. 1-2, p.7-13, 1997.

[65] Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinotova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 10, p.3447-3454, 2005.

[66] Sarek, J.; Kvasnica, M.; Urban, M.; Klinot, J.; Hajduch, M. Correlation of cytotoxic activity of betulinines and their hydroxy analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 19, p.4196-4200, 2005.

[67] Rao, G.; Kondaiah, P.; Singh, S. K.; Ravanan, P.; Sporn, M. B. Chemical modifications of natural triterpenes-glycyrrhetic and boswellic acids: Evaluation of their biological activity. *Tetrahedron*, v. 64, n. 51, p.11541-11548, 2008.

[68] Parra-Delgado, H.; Compadre, C. M.; Ramirez-Apan, T.; Munoz-Fambuena, M. J.; Compadre, R. L.; Ostrosky-Wegman, P.; Martinez-Vazquez, M. Synthesis and comparative molecular field analysis (COMFA) of argentatin B derivatives as growth inhibitors of human cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 6, p.1889-1901, 2006.

[69] Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3- β -*o*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 18, p.6144-6157, 2007.

[70] Huang, D.; Ding, Y.; Li, Y.; Zhang, W. M.; Fang, W. S.; Chen, X. G. Anti-tumor activity of a 3-oxo derivative of oleanolic acid. *Cancer Letters*, v. 233, n. 2, p.289-296, 2006.

[71] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigrowloff, A.; Graygoodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 11, p.757-766, 1991.

Referências bibliográficas

- [72] Oliveira, F. A.; Costa, C. L. S.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Cavalcante, Í. J. M.; Lima, A. F.; Lima, J. R. C. P.; Silva, R. M.; Campos, A. R.; Santos, F. A.; Rao, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, v. 77, n. 23, p.2942-2952, 2005.
- [73] Ferreira, J.; Triches, K. M.; Medeiros, R.; Calixto, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. *Pain*, v. 117, n. 1-2, p.171-181, 2005.
- [74] Meotti, F. C.; Luiz, A. P.; Pizzolatti, M. G.; Kassuya, C. A. L.; Calixto, J. B.; Santos, A. R. S. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: Evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 316, n. 2, p.789-796, 2006.
- [75] Bolcskei, K.; Helyes, Z.; Szabo, A.; Sandor, K.; Elekes, K.; Nemeth, J.; Almási, R.; Pinter, E.; Petho, G.; Szolcsanyi, J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain*, v. 117, n. 3, p.368-376, 2005.
- [76] Marcon, R.; Luiz, A. P.; Werner, M. F. D.; Freitas, C. S.; Baggio, C. H.; Do Nascimento, F. P.; Soldi, C.; Pizzolatti, M. G.; Santos, A. R. S. Evidence of trpv1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate. *Brain Research*, v. 1295, n., p.76-88, 2009.
- [77] Pinto, A. C.; Pereira, A. L.; Kelecom, A.; Porreca, L. M.; Ribeiro, N. M.; Barnes, R. A. Oxidation of terpenoid compounds with tert-butyl chromate. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, n. 12, p.4689-4692, 1988.
- [78] Callahan, H. L.; Portal, A. C.; Devereaux, R.; Groggl, M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, n. 4, p.818-822, 1997.
- [79] Bilia, A. R.; Gallori, S.; Vincieri, F. F. St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*, v. 70, n. 26, p.3077-3096, 2002.
- [80] Pittler, M. H.; Ernst, E. Efficacy of kava extract for treating anxiety: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, v. 20, n. 1, p.84-89, 2000.
- [81] Volz, H. P.; Kieser, M. Kava-kava extract WS 1490 versus placebo in anxiety disorders - a randomized placebo-controlled 25-week outpatient trial. *Pharmacopsychiatry*, v. 30, n. 01, p.1-5. 1997.

Referências bibliográficas

- [82] Ananthan, S.; Clayton, S. D.; Ealick, S. E.; Wong, G.; Evoniuk, G. E.; Skolnick, P. Synthesis and structure-activity-relationships of 3,5-disubstituted 4,5-dihydro-6h-imidazo [1,5-a] [1,4] benzodiazepin-6-ones at diazepam-sensitive and diazepam-insensitive benzodiazepine receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, n. 4, p.479-490, 1993.
- [83] Maryanoff, B. E.; Ho, W.; Mccomsey, D. F.; Reitz, A. B.; Grous, P. P.; Nortey, S. O.; Shank, R. P.; Dubinsky, B.; Taylor, R. J.; Gardocki, J. F. Potential anxiolytic agents - pyrido [1,2-a] benzimidazoles - a new structural class of ligands for the benzodiazepine binding-site on GABA_(A) receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, n. 1, p.16-20, 1995.
- [84] Falco, J. L.; Pique, M.; Gonzalez, M.; Buira, I.; Mendez, E.; Terencio, J.; Perez, C.; Princep, M.; Palomer, A.; Guglietta, A. Synthesis, pharmacology and molecular modeling of n-substituted 2-phenyl-indoles and benzimidazoles as potent GABA_(A) agonists. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n., p.985-990, 2006.
- [85] Crestani, F.; Mohler, H.; Rudolph, U. Anxiolytic-like action of diazepam: Mediated by GABA_(A) receptors containing the α -2 subunit - response from crestani et al. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 8, p.403-403, 2001.
- [86] Rudolph, U.; Crestani, F.; Mohler, H. GABA_(A) receptor subtypes: Dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 22, n. 4, p.188-194, 2001.
- [87] Huang, Q.; He, X. H.; Ma, C. R.; Liu, R. Y.; Yu, S.; Dayer, C. A.; Wenger, G. R.; Mckernan, R.; Cook, J. M. Pharmacophore/receptor models for GABA_(A)/BzR subtypes (α 1 β 3 γ 2, α 5 β 3 γ 2, and α 6 β 3 γ 2) via a comprehensive ligand-mapping approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 1, p.71-95, 2000.
- [88] Costanzo, A.; Guerrini, G.; Ciciani, G.; Bruni, F.; Costagli, C.; Selleri, S.; Besnard, F.; Costa, B.; Martini, C.; Malmberg-Aiello, P. Benzodiazepine receptor ligands. 7. Synthesis and pharmacological evaluation of new 3-esters of the 8-chloropyrazolo [5,1-c] [1,2,4] benzotriazine 5-oxide. 3-(2-thienylmethoxycarbonyl) derivative: An anxiolytic agent in rodents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 26, p.5710-5720, 2002.
- [89] Reynolds, D. S. The value of genetic and pharmacological approaches to understanding the complexities of GABA_(A) receptor subtype functions: The anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 90, n. 1, p.37-42, 2008.
- [90] Ngo, A. S. Y.; Anthony, C. R.; Samuel, M.; Wong, E.; Ponampalam, R. Should a benzodiazepine antagonist be used in unconscious patients presenting to the emergency department? *Resuscitation*, v. 74, n. 1, p.27-37, 2007.

Referências bibliográficas

- [91] Whiting, P. J. GABA_(A) receptors: A viable target for novel anxiolytics? *Current Opinion in Pharmacology*, v. 6, n. 1, p.24-29, 2006.
- [92] Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; Moore, P. *Farmacologia*. 5ª edição, p.246-256, 2001.
- [93] Miranda, F. D. S. Desenvolvimento e estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-fenantrolina e seus complexos de ferro(II) (Tese de Doutorado). Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2008
- [94] De Proft, F.; Geerlings, P.; Liu, S.; Parr, R. G. Variational calculation of the global hardness and the Fukui function via an approximation of the hardness kernel. *Polish Journal of Chemistry*, v. 72, n. 7, p.1737-1746, 1998.
- [95] De Proft, F.; Geerlings, P. Conceptual and computational DFT in the study of aromaticity. *Chemical Reviews*, v. 101, n. 5, p.1451-1464, 2001.
- [96] Geerlings, P.; De Proft, F.; Langenaeker, W. Conceptual Density Functional Theory. *Chemical Reviews*, v. 103, n. 5, p.1793-1873, 2003.
- [97] Maynard, A. T.; Huang, M.; Rice, W. G.; Covell, D. G. Reactivity of the HIV-1 nucleocapsid protein p7 zinc finger domains from the perspective of density-functional theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 20, p.11578-11583, 1998.
- [98] Parr, R. G.; Von Szentpaly, L.; Liu, S. B. Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, v. 121, n. 9, p.1922-1924, 1999.
- [99] Hyperchem 8.0 to windows, evaluation copy. Hypercube, I. 2010.
- [100] Zhang, W.; Koehler, K. F.; Zhang, P.; Cook, J. M. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. *Drug Des Discov*, v. 12, n. 3, p.193-248, 1995.
- [101] Zhang, P. W.; Zhang, W. J.; Liu, R. Y.; Harris, B.; Skolnick, P.; Cook, J. M. Synthesis of novel imidazobenzodiazepines as probes of the pharmacophore for diazepam-insensitive GABA_(A) receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 38, n. 10, p.1679-1688, 1995.
- [102] Frisch, M. J. Gaussian 03, revision e.01. Gaussian, I. Wallingford CT 2004.
- [103] Becke, A. D. Density-functional thermochemistry .3. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*, v. 98, n. 7, p.5648-5652, 1993.

Referências bibliográficas

- [104] Ditchfie.R; Hehre, W. J.; Pople, J. A. Self-consistent molecular-orbital methods .9. Extended gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *Journal of Chemical Physics*, v. 54, n. 2, p.724-728, 1971.
- [105] Wolinski, K.; Sadlej, A. J. Self-consistent perturbation-theory - open-shell states in perturbation-dependent non-orthogonal basis-sets. *Molecular Physics*, v. 41, n. 6, p.1419-1430, 1980.
- [106] Wolinski, K.; Hinton, J. F.; Pulay, P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical-shift calculations. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 23, p.8251-8260. 1990.
- [107] Miertus, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum - a direct utilization of *ab initio* molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chemical Physics*, v. 55, n. 1, p.117-129, 1981.
- [108] Fowler, E. M. F.; Henbest, H. B. Researches on acetylenic compounds .25. Synthesis of (+/-)-kawain. *Journal of the Chemical Society*, v. Dec., p.3642-3645, 1950.
- [109] Israili, Z. H.; Smissman, E. E. Synthesis of kavain, dihydrokavain, and analogs. *Journal of Organic Chemistry*, v. 41, n. 26, p.4070-4074, 1976.
- [110] Klohs, M. W.; Keller, F.; Williams, R. E. *Piper methysticum* Forst .2. The synthesis of DL-methysticin and DL-dihydromethysticin. *Journal of Organic Chemistry*, v. 24, n. 11, p.1829-1830, 1959.
- [111] Demarch, P.; Morenomanas, M.; Casado, J.; Pleixats, R.; Roca, J. L.; Trius, A. The reactivity of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone towards aliphatic saturated and alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 21, n. 1, p.85-89, 1984.
- [112] Nagawade, R. R.; Khanna, V. V.; Bhagwat, S. S.; Shinde, D. B. Synthesis of new series of 1-aryl-1,4-dihydro-4-oxo-6-methyl pyridazine-3-carboxylic acid as potential antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 40, n. 12, p.1325-1330, 2005.
- [113] Collie, J. N. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, v. 59, n. 1891.
- [114] Bulock, J. D.; Smith, H. G. Pyrones .1. Methyl ethers of tautomeric hydroxypyrones and the structure of yangonin. *Journal of the Chemical Society*, v., n. FEB, p.502-506, 1960.
- [115] Younis, Y. M.; Al-Shihry, S. S. Triacetic acid lactone methyl ether as a natural products synthon. *Australian Journal of Chemistry*, v. 53, n. 7, p.589-591, 2000.

Referências bibliográficas

- [116] Paterson, I.; Wallace, D. J. Anti aldol reactions of lactate-derived ketones: Application to the total synthesis of (-)-ACRL toxin IIIB. *Tetrahedron Letters*, v. 35, n. 50, p.9477-9480, 1994.
- [117] Wachter, M. P.; Harris, T. M. Condensations at the 6[α]-position of triacetic lactone via the dianion. *Tetrahedron*, v. 26, n. 7, p.1685-1694, 1970.
- [118] Zhang, X. J.; Mclaughlin, M.; Munoz, R. L. P.; Hsung, R. P.; Wang, J.; Swidorski, J. Syntheses of 2-pyrones via electrophilic substitutions at C7 of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone through mono- or dianion formation. *Synthesis-Stuttgart*, v., n. 5, p.749-753, 2007.
- [119] Harris, T. M.; Harris, C. M.; Brush, C. K. Bromination of dehydroacetic acid. *Journal of Organic Chemistry*, v. 35, n. 5, p.1329-1333, 1970.
- [120] Bacardit, R.; Morenomanas, M.; Pleixats, R. Functionalization at C-5 and at the C-6 methyl-group of 4-methoxy-6-methyl-2-pyrone. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, v. 19, n. 1, p.157-160, 1982.
- [121] Bloomer, J. L.; Zaidi, S. M. H.; Strupcze.Jt; Brosz, C. S.; Gudzyk, L. A. New polyketide synthon. *Journal of Organic Chemistry*, v. 39, n. 24, p.3615-3616, 1974.
- [122] Suzuki, E.; Hamajima, R.; Inoue, S. Facile synthesis of 6-conjugated 2-pyrones. *Synthesis-Stuttgart*, v., n. 3, p.192-194, 1975.
- [123] Amaral, P. A.; Gouault, N.; Le Roch, M.; Eifler-Lima, V. L.; David, M. Towards synthesis of kavalactone derivatives. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 47, p.6607-6609, 2008.
- [124] Moro, A. V.; Cardoso, F. S. P.; Correia, C. R. D. Highly regio- and stereoselective heck reaction of allylic esters with arenediazonium salts: Application to the synthesis of kavalactones. *Organic Letters*, v. 11, n. 16, p.3642-3645, 2009.
- [125] Roglans, A.; Pla-Quintana, A.; Moreno-Mañas, M. Diazonium salts as substrates in palladium-catalyzed cross-coupling reactions. *Chemical Reviews*, v. 106, n. 11, p.4622-4643, 2006.
- [126] Moro, A. V.; Cardoso, F. S. P.; Correia, C. R. D. Heck arylation of styrenes with arenediazonium salts: Short, efficient, and stereoselective synthesis of resveratrol, DMU-212, and analogues. *Tetrahedron Letters*, v. 49, n. 39, p.5668-5671, 2008.
- [127] Tantithanaporn, S.; Wattanapiromsakul, C.; Itharat, A.; Keawpradub, N. Cytotoxic activity of acetogenins and styryl lactones isolated from *goniothalamus undulatus* ridl. Root extracts against a lung cancer cell line (COR-L23). *Phytomedicine*, v. In Press, 2010. Doi: 10.1016/j.phymed.2010.10.010

Referências bibliográficas

- [128] Tian, Z.; Chen, S.; Zhang, Y.; Huang, M.; Shi, L.; Huang, F.; Fong, C.; Yang, M.; Xiao, P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine*, v. 13, n. 3, p.181-186, 2006.
- [129] Dumitrescu, L.; Mai Huong, D. T.; Van Hung, N.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D. Synthesis and cytotoxic activity of fluorinated analogues of goniothalamus lactones. Impact of fluorine on oxidative processes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 7, p.3213-3218, 2010.
- [130] De Fátima, Â.; Kohn, L. K.; De Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 3, p.622-631, 2006.
- [131] De Fátima, Â.; Kohn, L. K.; Antônio, M. A.; De Carvalho, J. E.; Pilli, R. A. (R)-goniothalamine: Total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 8, p.2927-2933, 2005.
- [132] Kasaplar, P.; Yilmazer, Ö.; Çagır, A. 6-bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: Asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 1, p.311-318, 2009.

APÊNDICE A – ORBITAIS MOLECULARES DAS
DIIDROESTIRIL, ESTIRILPIRONAS, DIAZEPAM E
FLUNITRAZEPAM

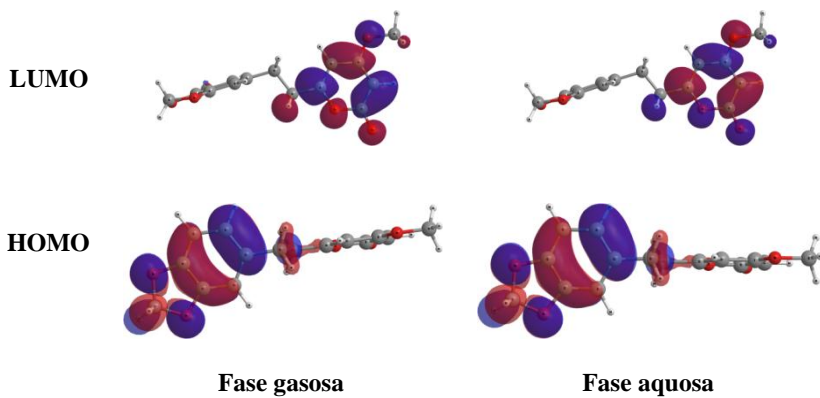


Figura 13 - Orbitais moleculares para DST 01

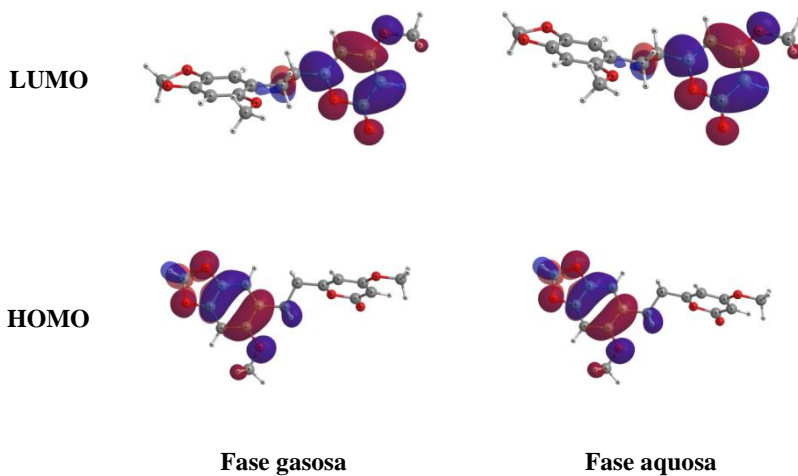


Figura 14 - Orbitais moleculares para DST 02.

Apêndice A

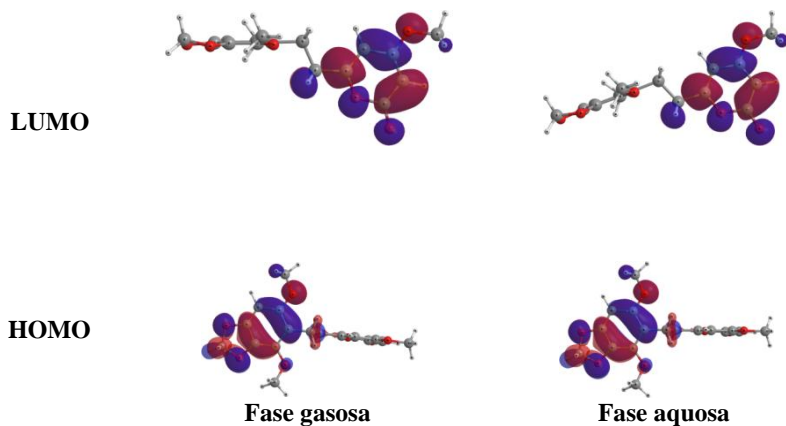


Figura 15 - Orbitais moleculares para DST 03.

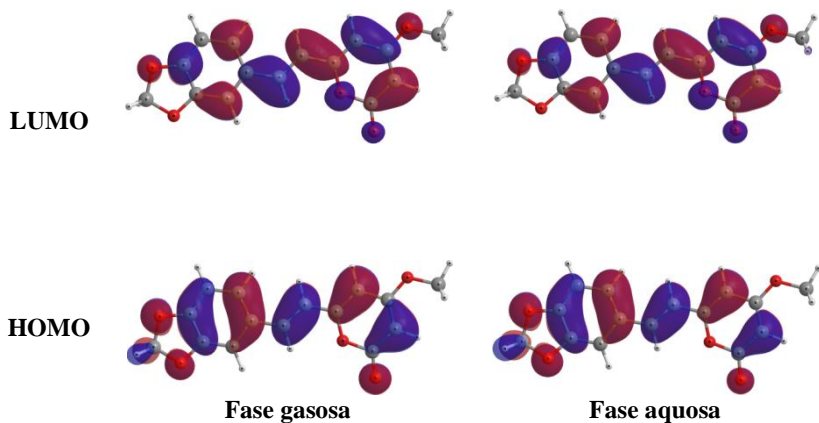


Figura 16 - Orbitais moleculares para STY 01, conformero mais estável.

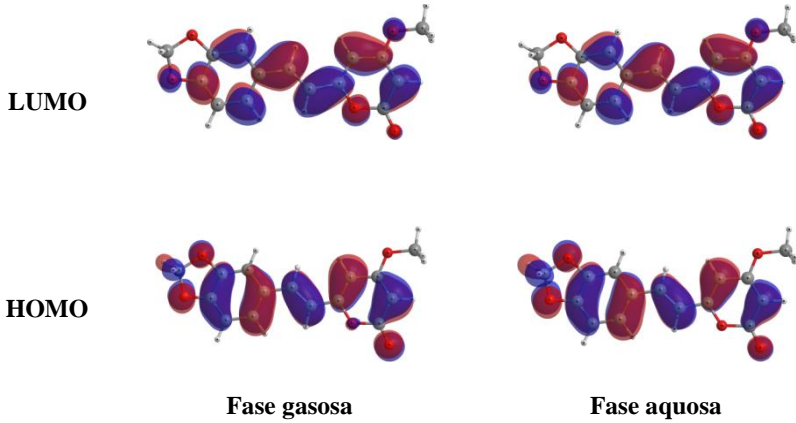


Figura 17 - Orbitais moleculares para STY 01, confôrmero menos estável.

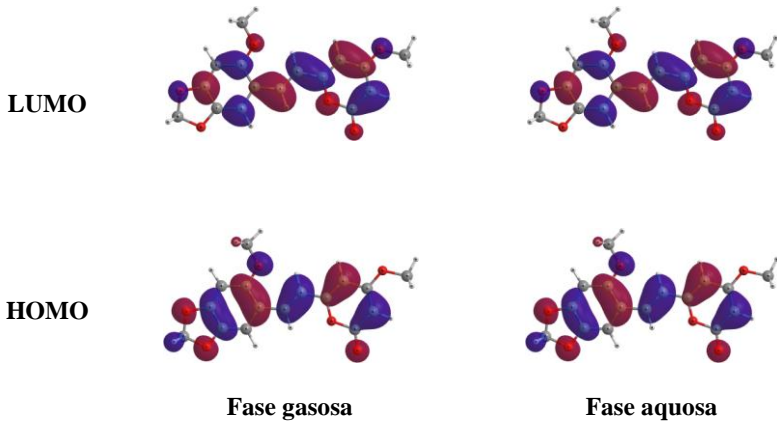


Figura 18 - Orbitais moleculares para STY 02, confôrmero mais estável.

Apêndice A

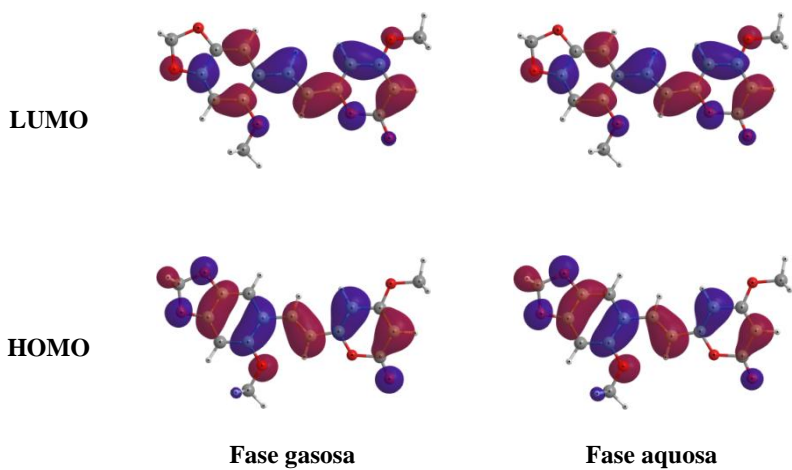


Figura 12 - Orbitais moleculares para STY 02, confôrmero menos estável.

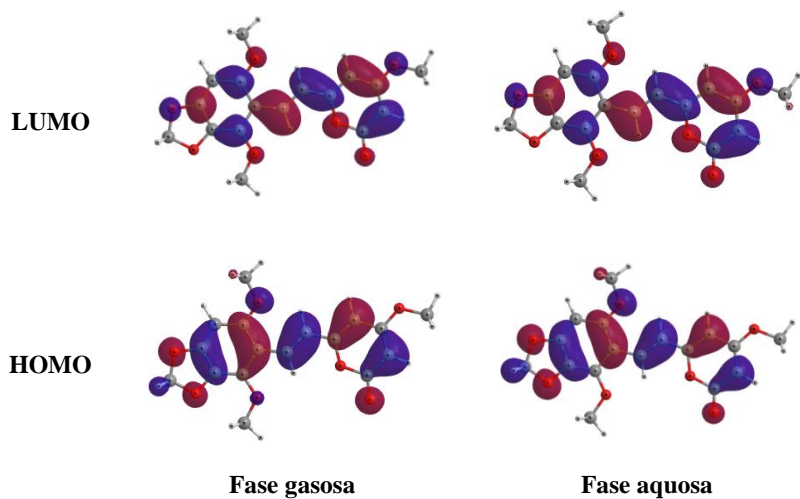


Figura 20 - Orbitais moleculares para STY 03, confôrmero mais estável.

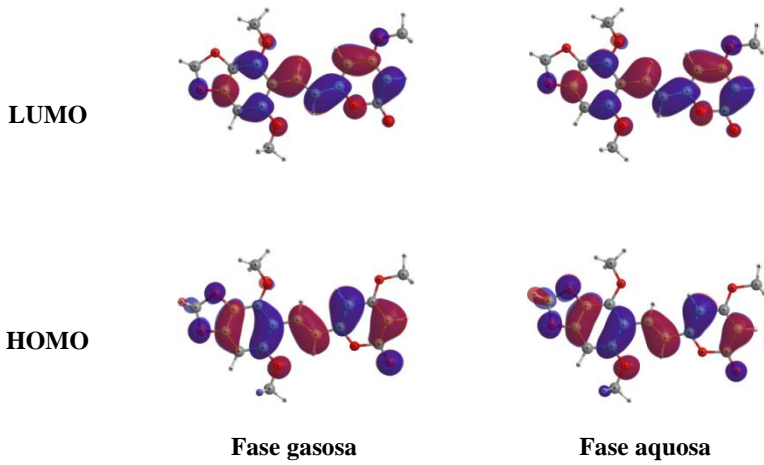


Figura 21 - Orbitais moleculares para STY 03, conformero menos estável.

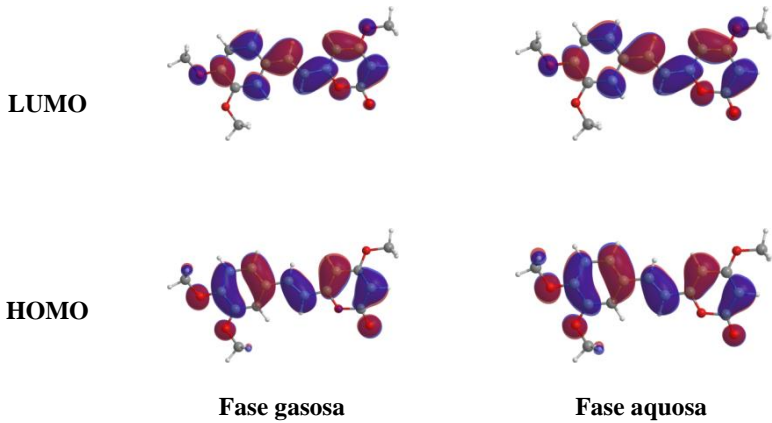


Figura 22 - Orbitais moleculares para STY 04, conformero mais estável.

Apêndice A

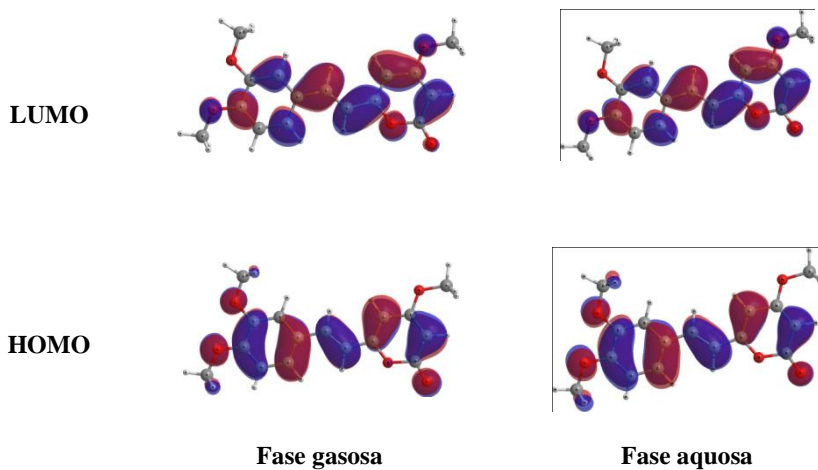


Figura 23 - Orbitais moleculares para STY 04, conformero menos estável.

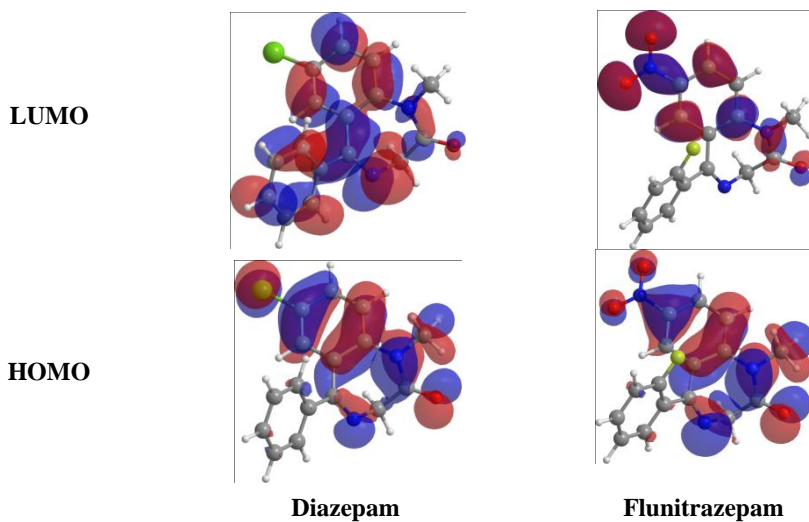


Figura 24 - Orbitais moleculares para Diazepam e Flunitrazepam em fase aquosa.

Apêndice B

APÊNDICE B – ESPECTROS SELECIONADOS DE RMN DE ^1H E ^{13}C

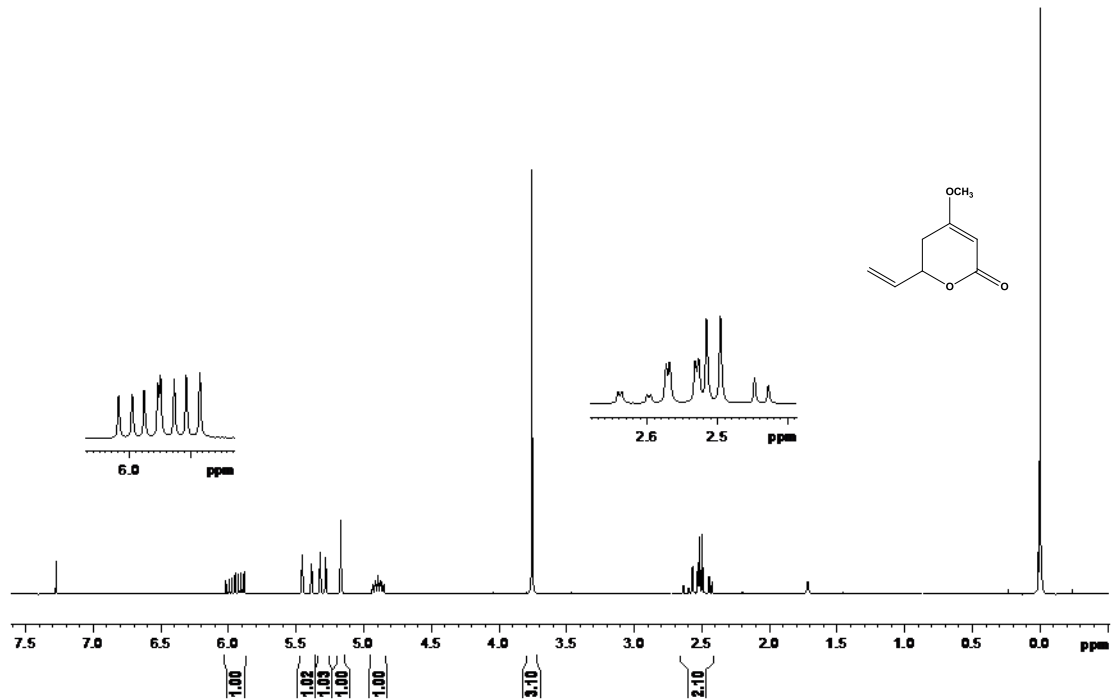


Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H da olefina 103 em CDCl_3 (250 MHz).

Apêndice B

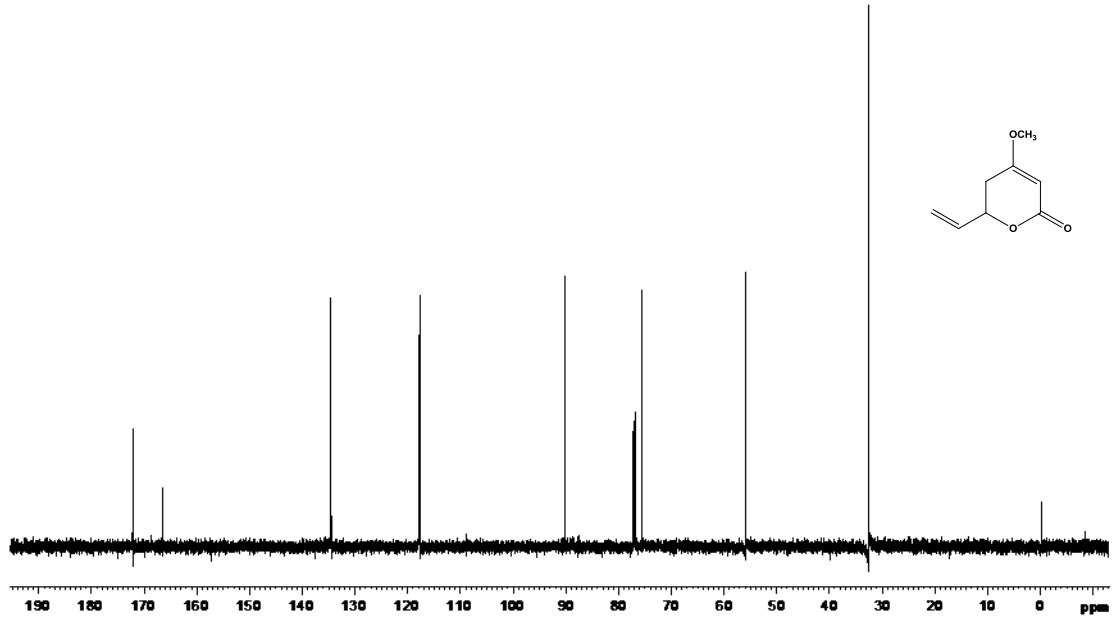


Figura 26 - Espectro RMN de ^{13}C da olefina 103 em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

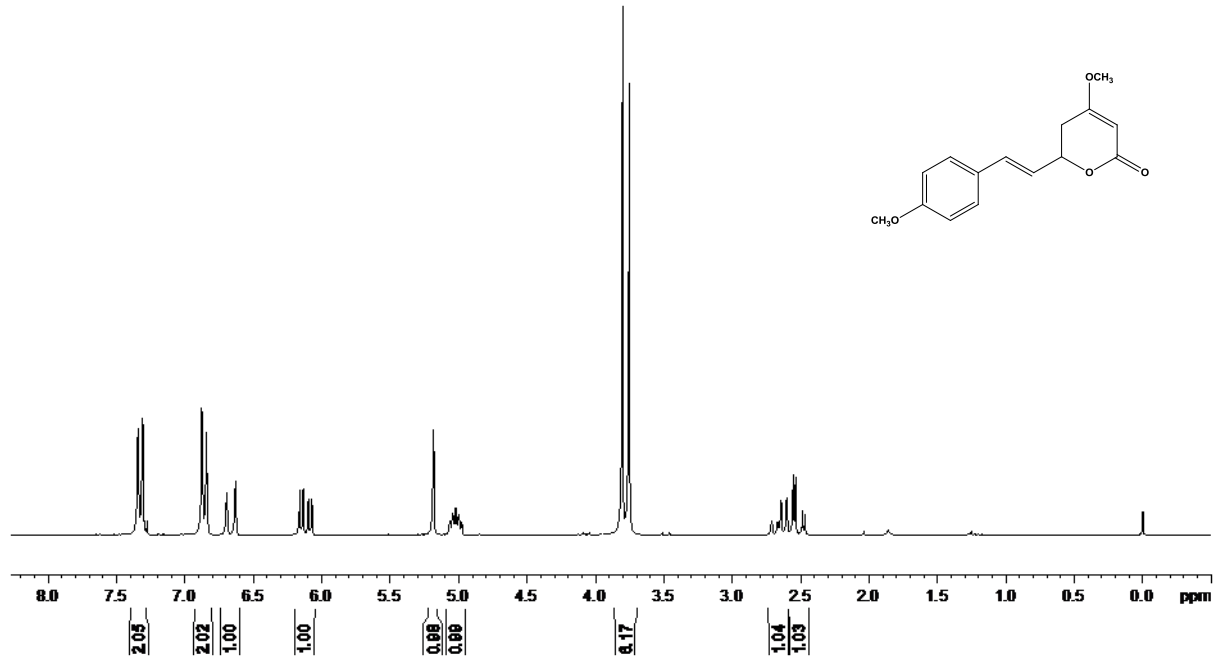


Figura 13 - Espectro de RMN de ¹H do composto 12-metoxikavaina em CDCl₃ (250 MHz).

Apêndice B

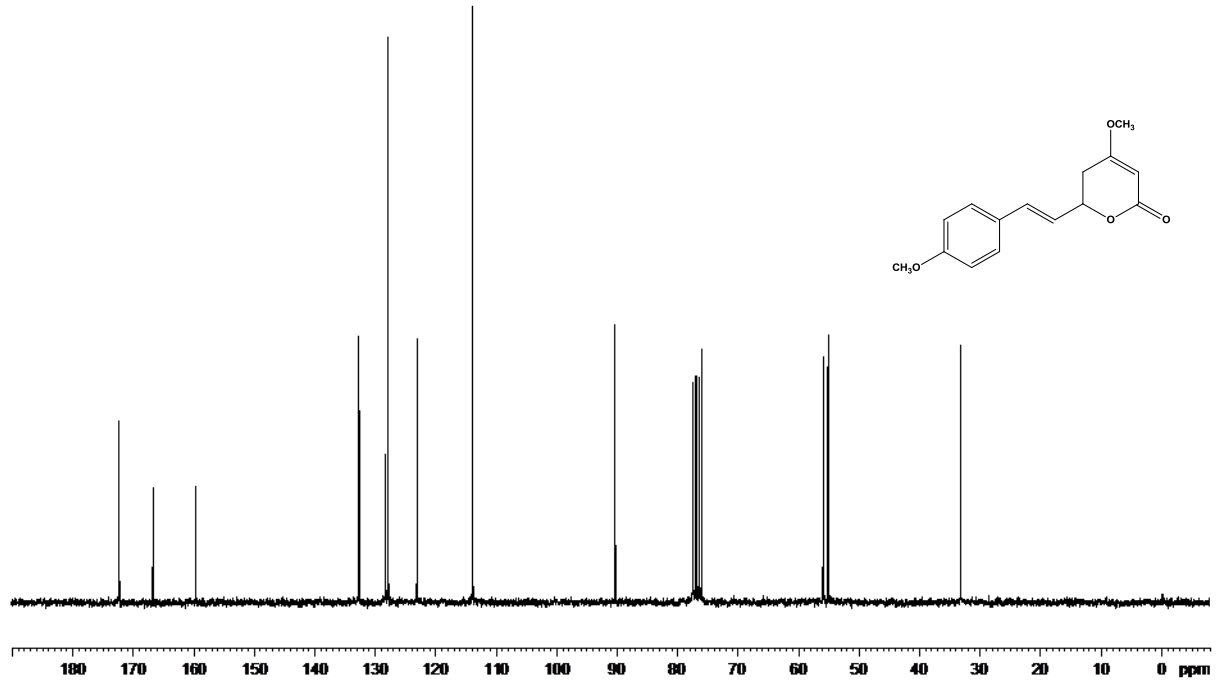


Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12-metoxikavaina em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

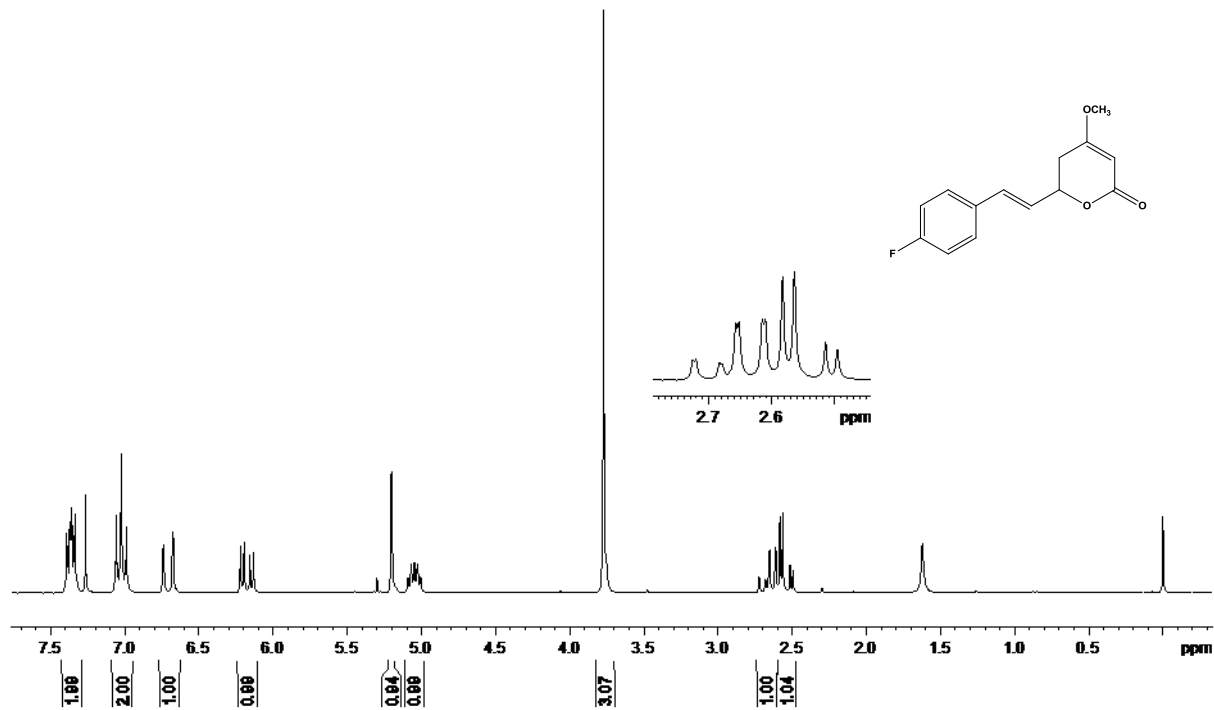


Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H do composto 12-fluorkavaina em CDCl_3 (250 MHz).

Apêndice B

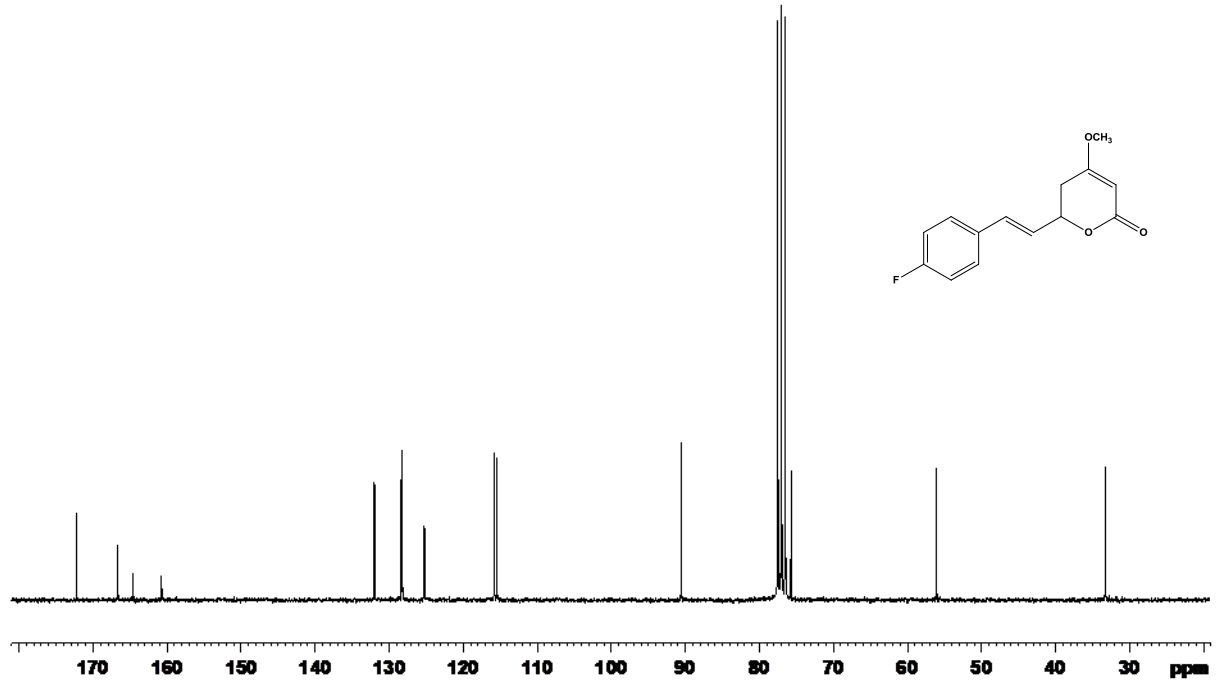


Figura 30 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 12-fluorkavaina em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

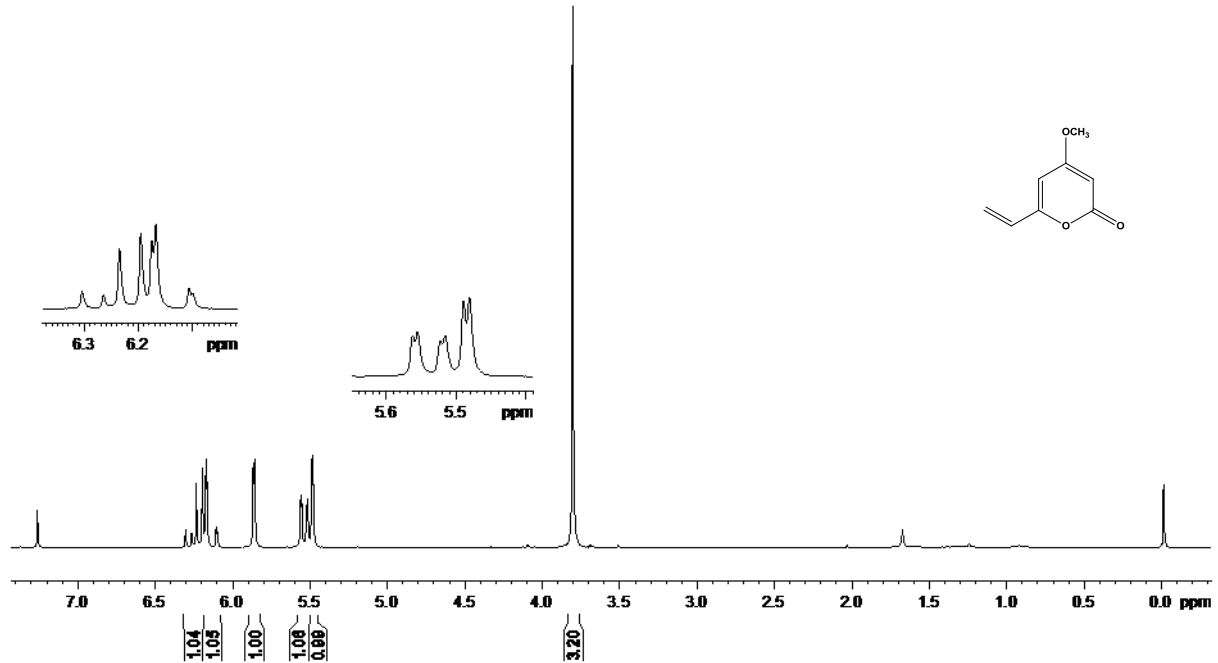


Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H da olefina 108 em CDCl_3 (250 MHz).

Apêndice B

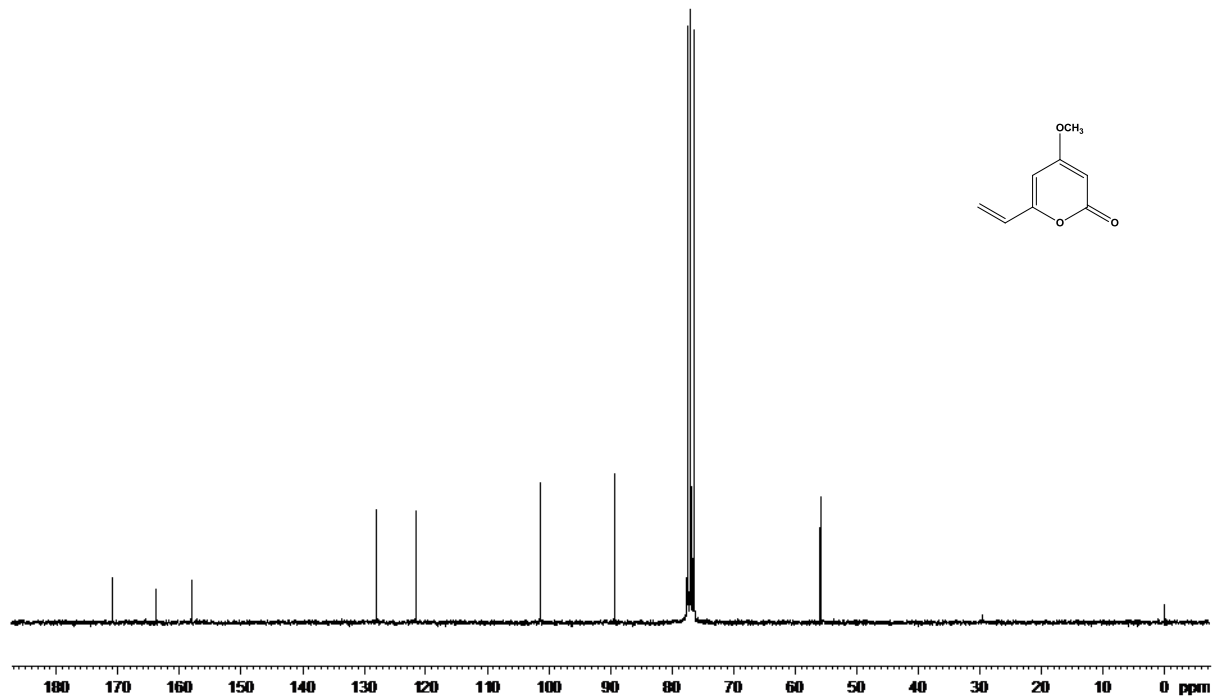


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C da olefina 108 em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

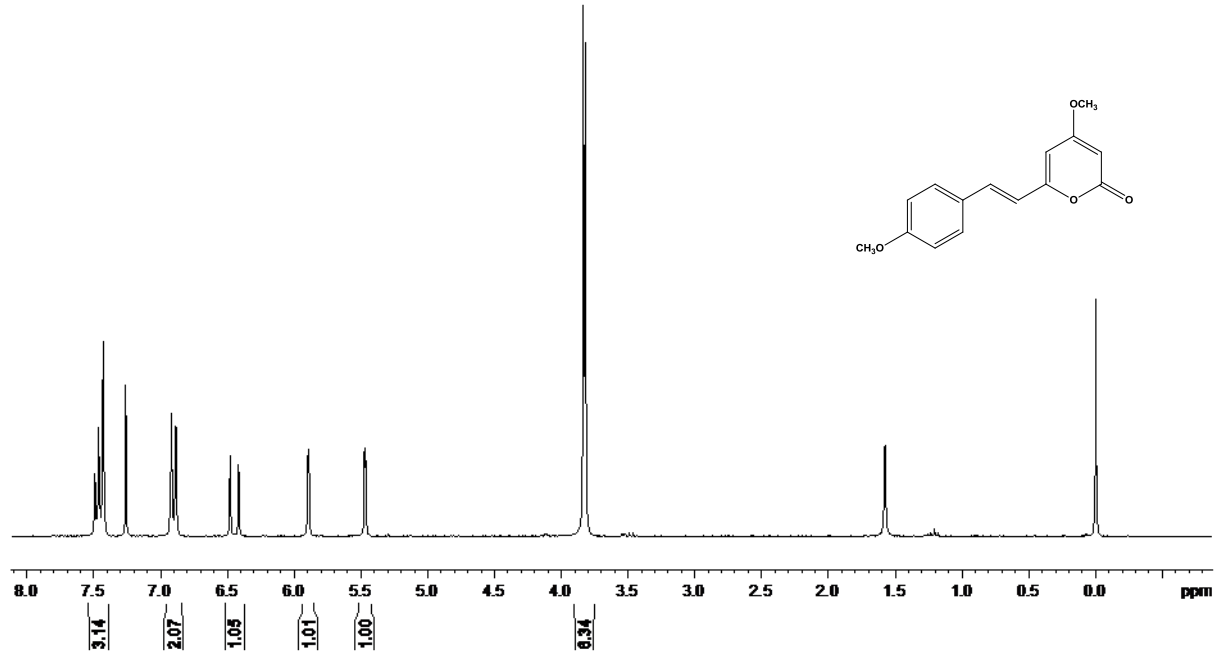


Figura 33 - Espectro de RMN de ¹H do composto STY 05 em CDCl₃ (250 MHz).

Apêndice B

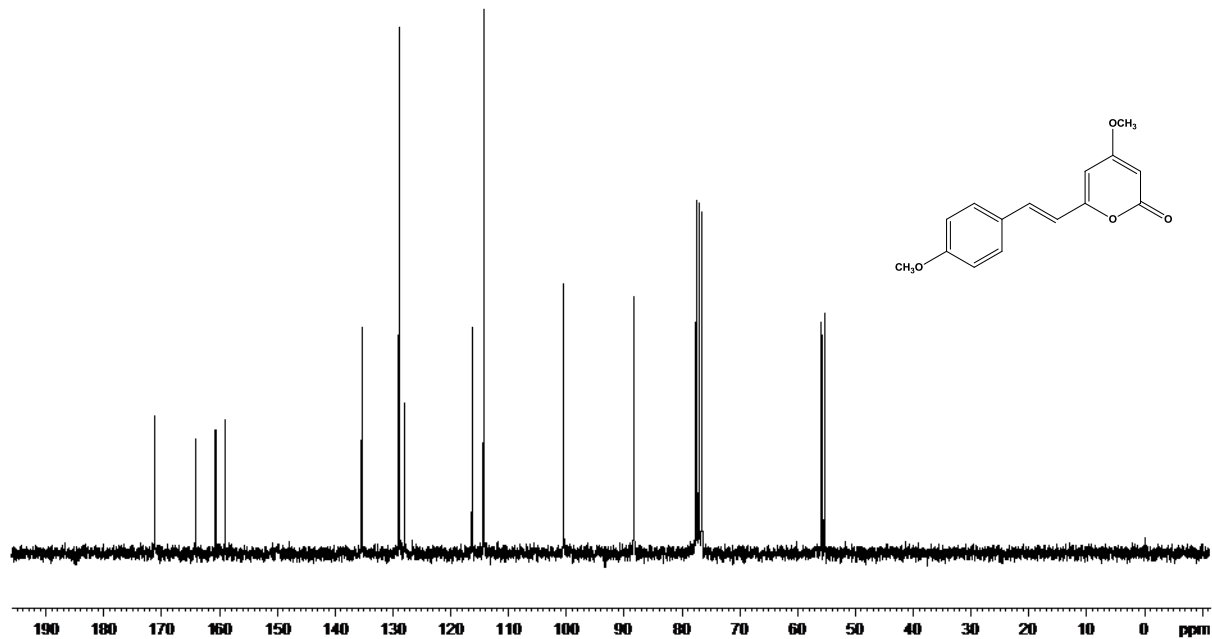


Figura 34 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto STY 05 em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

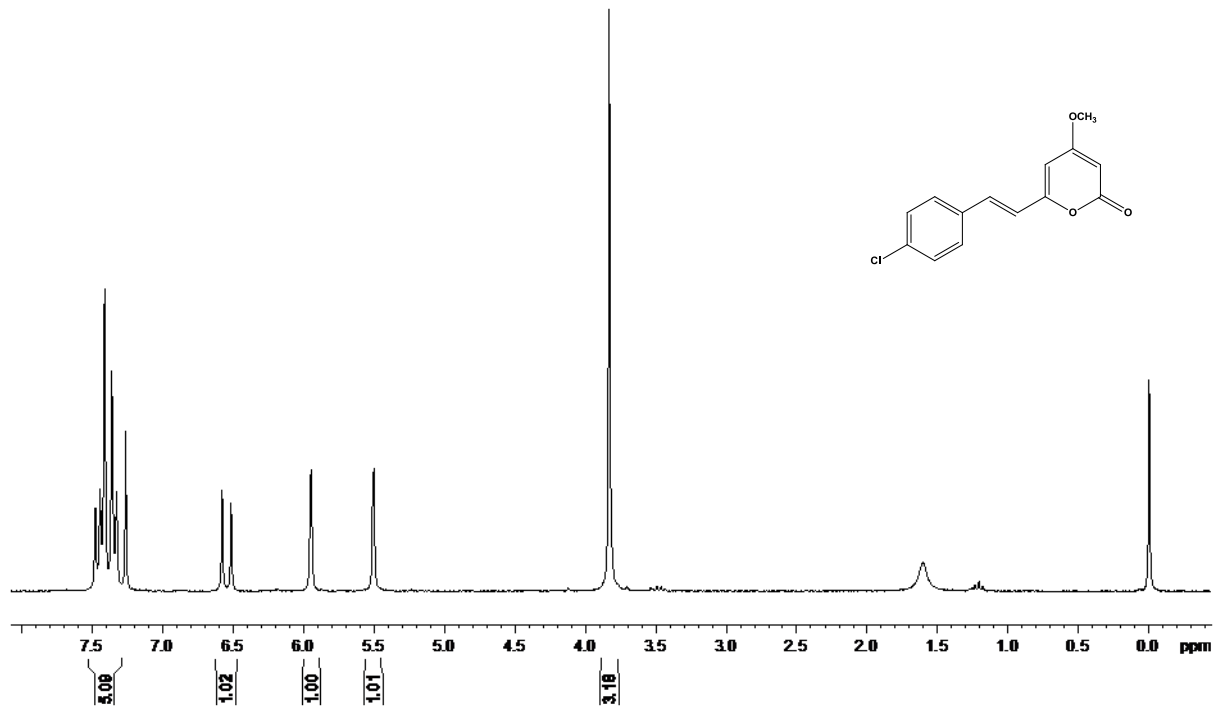


Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H do composto STY 11 em CDCl_3 (250 MHz).

Apêndice B

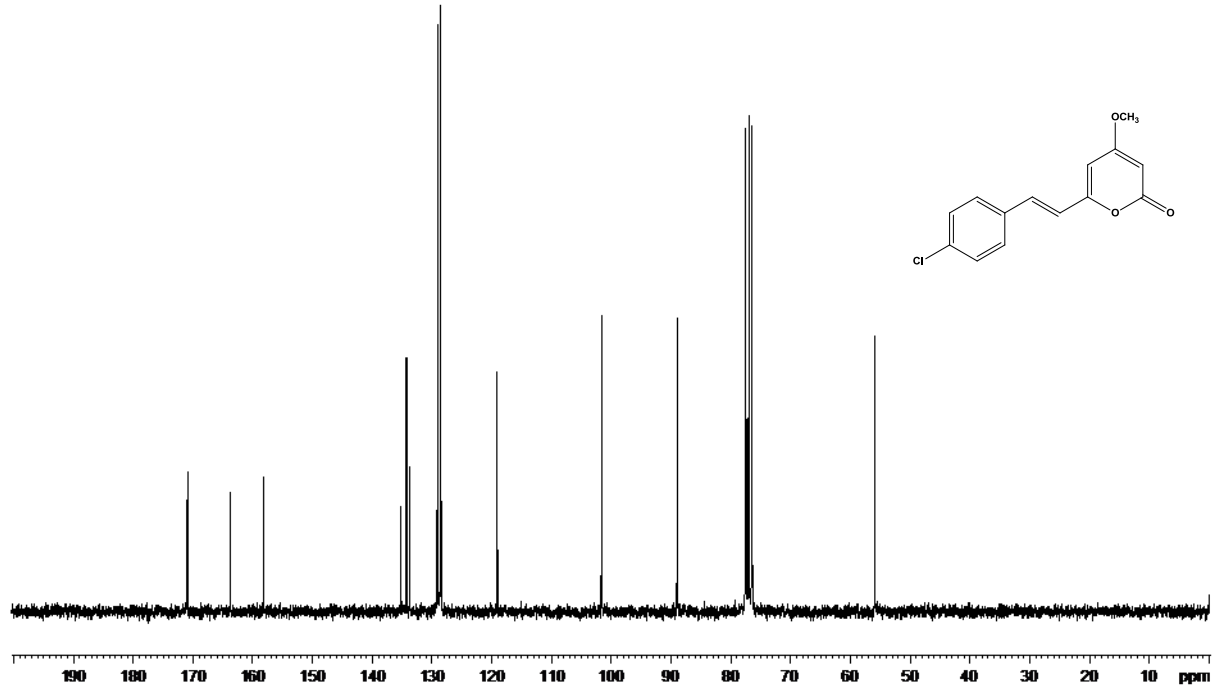


Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto STY 11 em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

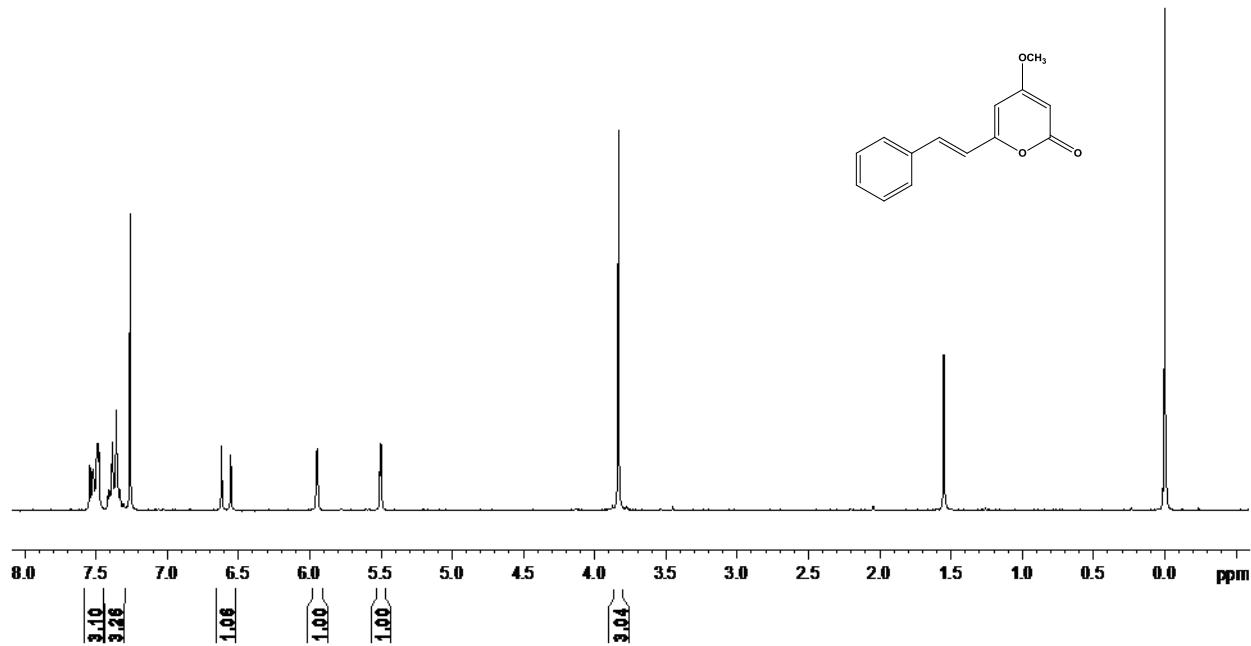


Figura 37 - Espectro de RMN de ¹H do composto STY 09 em CDCl₃ (250 MHz).

Apêndice B

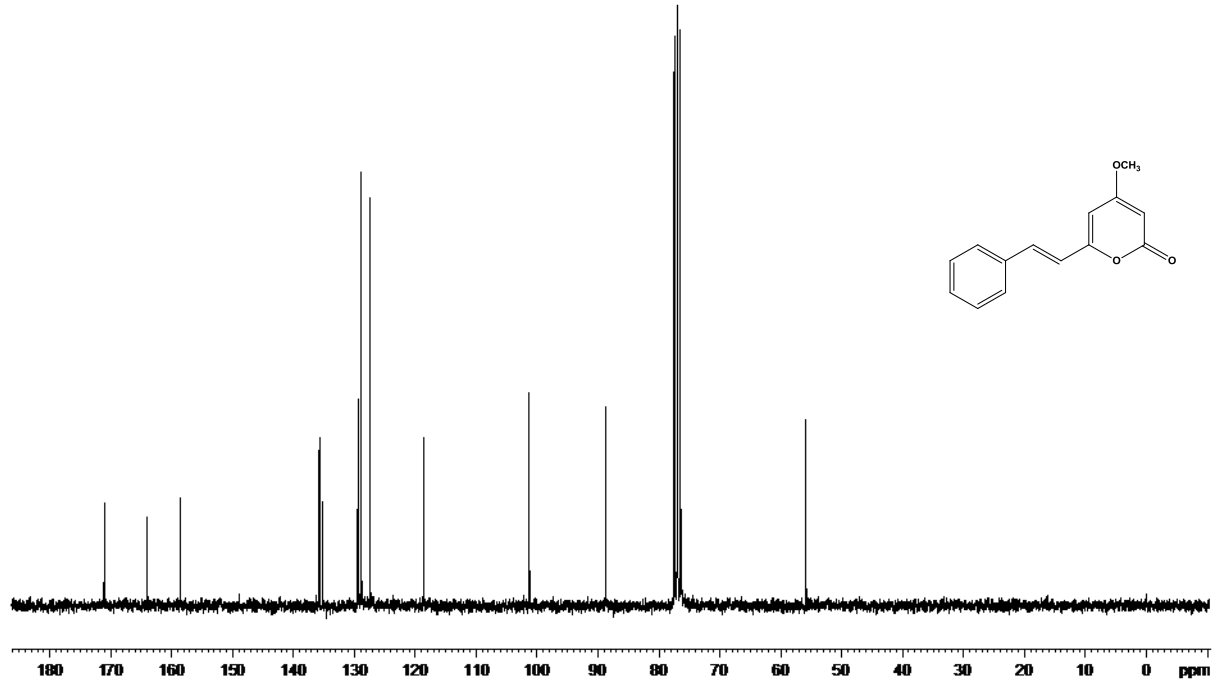


Figura 38 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto STY 09 em CDCl_3 (62,5 MHz).

Apêndice B

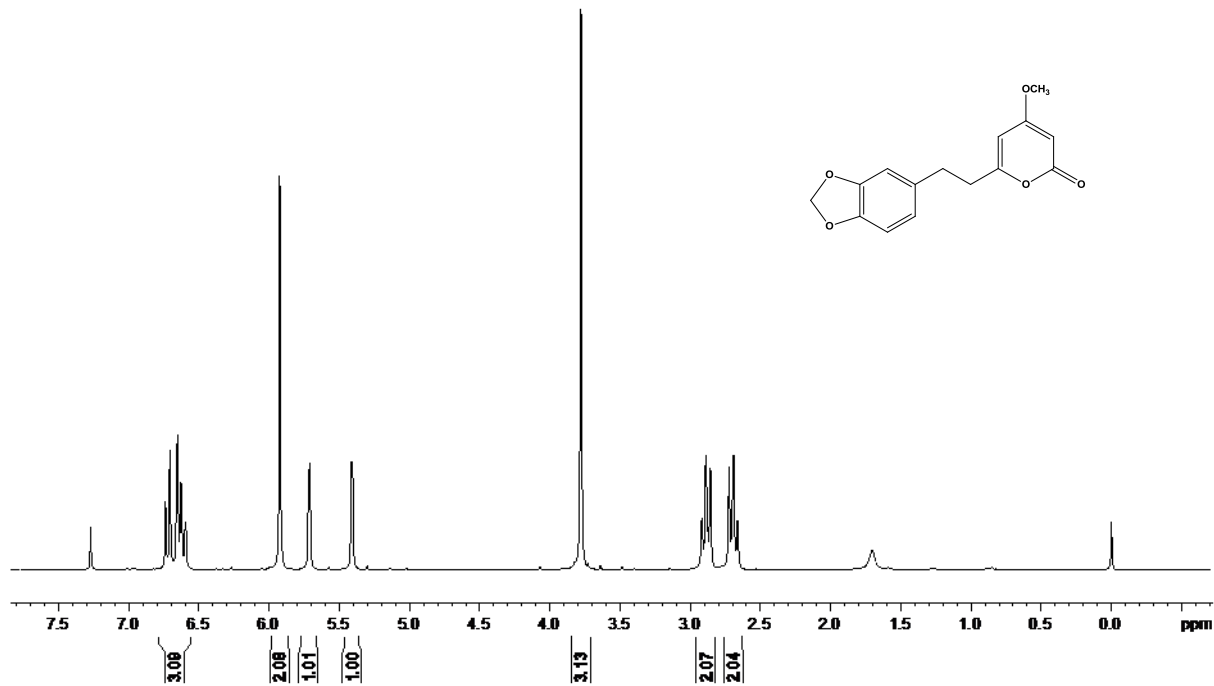


Figura 39 - Espectro de RMN de ¹H do composto STY 01 em CDCl₃ (250 MHz).

Apêndice B

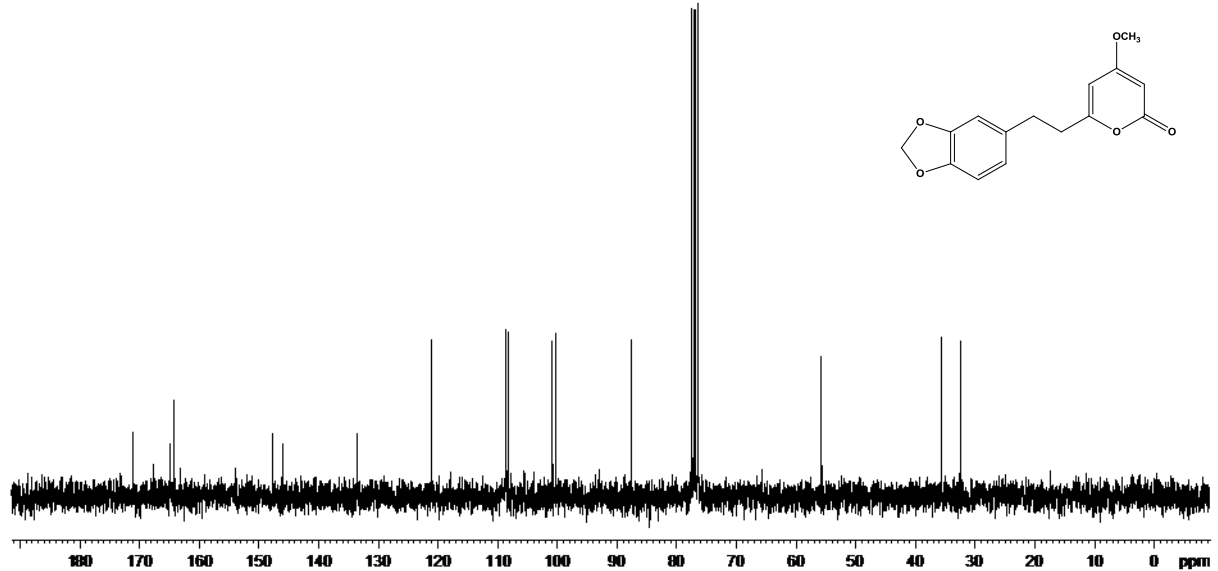


Figura 40 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto STY O1 em CDCl_3 (62,5 MHz)