



Universidade Federal do Rio de Janeiro - *Campus Macaé*



**ESTUDOS VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DA LQB 118, UMA SUBSTÂNCIA COM  
ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E ANTIPARASITÁRIA**

Lorena Moreira Sigiliano

02 de agosto de 2013

Lorena Moreira Sigiliano

**ESTUDOS VISANDO A OTIMIZAÇÃO DA SÍNTESE DA LQB 118, UMA SUBSTÂNCIA COM  
ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA E ANTIPARASITÁRIA**

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Chaquip Daher Netto

02 de agosto de 2013

## Sumário

Lista de Figuras .....	4
Lista de Tabelas .....	5
Lista de Esquemas .....	6
Lista de gráficos.....	7
Lista de abreviações .....	8
Resumo.....	9
Introdução.....	10
1.1 LQB-118 .....	10
1.2 ASPECTOS SINTÉTICOS DA LQB-118 .....	20
Justificativa.....	27
Objetivos .....	28
Materiais e Métodos.....	29
Resultados e Discussão .....	31
Conclusões .....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	42
Referências bibliográficas .....	44

## Lista de Figuras

Figura 1: Representação das estruturas LQB-118 (1) e seus precursores. ....	10
Figura 2: Apoptose da LMC K562 (a) e Lucena-1 (b) induzida pela LQB-118 (1), determinado através do ensaio de Anexina V usando citometria de fluxo. Adaptado de Maia e colaboradores, 2011. ....	16
Figura 3: Novos compostos sintetizados por Buarque e colaboradores, 2011. ....	19
Figura 4: Reação de oxa-Heck usando olefinas ricas (13 e 14) e pobre (3) em elétrons. Adaptado de Buarque e colaboradores, 2010. ....	25
Figura 5: Espectro de RMN <sup>1</sup> H de 3 impuro (a) e espectro do ácido fenilborônico (20) (b). ....	34
Figura 6: Cromatograma de 3 puro. ....	36
Figura 7: Cromatograma de 3 bruto. ....	37
Figura 8: Representação dos hidrogênios característicos da LQB-118 (1). ....	39

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados dos estudos de atividade antineoplásica da LQB-118 (1). Adaptado de Netto e colaboradores, 2010. Resultados apresentados em $\mu\text{M}$ . .....	14
Tabela 2: Comparação da viabilidade da linhagem Kasumi-1 (LMA) frente à incubação com LQB-118 (1) e idarubicina em diferentes concentrações no período de 72 horas. Adaptado de Reis e colaboradores, 2013. ....	15
Tabela 3: Resultados dos estudos de inibição do crescimento de linhagens celulares de câncer de pulmão frente à presença da LQB-118 (1). Dados apresentados de $\text{IC}_{50}$ em $\mu\text{M}$ . Adaptado de Netto e colaboradores, 2010. ....	16
Tabela 4: Atividade antineoplásica de 1, das novas pterocarpanoquinonas e aza-pterocarpanoquinona (9) frente à diferentes linhagens celulares. Dados apresentados de $\text{IC}_{50}$ . Adaptado de Buarque e colaboradores 2011. ....	19
Tabela 5: Rendimentos obtidos a partir das reações realizadas por Buarque e colaboradores, 2010 entre olefinas e <i>o</i> -iodofenol (2) na presença e ausência de $\text{PPh}_3$ .....	25
Tabela 6: Condições reacionais para síntese da LQB-118 (1).....	38

## Lista de Esquemas

Esquema 1: Representação da hibridização molecular entre o lapachol (5), a LQB-79 (6) e a kalafungina (7) originando a LQB-118 (1). .....	11
Esquema 2: Ciclo redox induzido por quinonas. Adaptado de da Silva e colaboradores, 2003. ....	12
Esquema 3: Via metabólica da kalafungina (7). .....	13
Esquema 4: Representação das etapas do ciclo catalítico da Reação de Heck. Adaptado de Beletskaya e colaboradores, 2000.....	22
Esquema 5: Representação da primeira síntese de pterocarpanos a partir da reação de oxi-arilação do cromeno (10). Adaptado de Horino e colaboradores, 1976. ....	22
Esquema 6: Proposta de mecanismo da oxi-arilação catalisada por Pd por Kiss (2003) e Larock (1998). Adaptado de Kiss e colaboradores, 2003.....	23
Esquema 7: Síntese inicial da pterocarpanoquinona LQB-118 (1). Adaptado de Netto, 2007.....	24
Esquema 8: Mecanismo da reação de oxa-Heck. Adaptado de Buarque e colaboradores, 2010. ....	26
Esquema 9: Análise retrossintética da LQB-118 (1). .....	29
Esquema 10: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 em acetona e 1,2 eq. de 2, na ausência de PPh <sub>3</sub> . ....	31
Esquema 11: Representação da síntese do cromenoquinona (3). ....	32
Esquema 12: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 usando 3 impuro.....	32
Esquema 13: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 em acetona usando 3 puro.....	33
Esquema 14: Proposta mecanística da interferência do ácido fenilborônico na reação de oxa-Heck através da reação de Suzuki. ....	35
Esquema 15: Representação da síntese do cromenoquinona (3) com elevado padrão de pureza.....	35
Esquema 16: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 em acetona usando 3 com elevado padrão de pureza.....	36
Esquema 17: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 em acetona usando 3 bruto.....	37
Esquema 18: Reação de oxa-Heck para obtenção de 1 em MIC.....	38

## Lista de gráficos

Gráfico 1: Efeito da LQB-118 (1) frente a produção de TNF- $\alpha$ por PBMC humano estimulados com LPS (Netto e colaboradores, 2010).....	17
Gráfico 2: Quantificação da formação de ERO por <i>L. amazonensis</i> promastigotas incubadas com LQB-118 (1) (Ribeiro e colaboradores, 2013). ....	18
Gráfico 3: Determinação da redução da lesão e da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> promastigota tratados com 1 oral e intraperitonealmente (Cunha – Jr. e colaboradores, 2011). ....	18
Gráfico 4: Índice de infecção do <i>Toxoplasma gondii</i> , que interagiu com células LLC-MK2 após tratamento com diferentes concentrações de 1 durante 24 e 48 h. * Significativamente diferente em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) após 24 h de tratamento. # Significativamente diferente em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), após 48 horas de tratamento (Portes e colaboradores, 2012). ....	20

### **Lista de abreviações**

CCD - Cromatografia de Camada Delgada

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

ESI-MS - Ionização Eletrospray acoplado a Espectrômetro de Massas

IAP - Proteínas Inibidoras de Apoptose

INCA - Instituto Nacional de Câncer

LLA - Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

LPS - Lipopolissacarídeo

LQB - Laboratório de Química Bioorgânica

MDR - *Mult Drug Resistent*

MIC - Metil-isobutilcetona

PBMC - Células Mononucleares do Sangue Periférico

PHA - Mitógeno Fitohemaglutinina

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral



## Resumo

A LQB 118 (**1**) é uma pterocarpanoquinona, que foi desenhada a partir da hibridização molecular entre as estruturas de um pterocarpano natural com ação antitumoral, o Lapachol, uma naftoquinona natural com ação antineoplásica e a kalafungina, um antibiótico, no Laboratório de Química Bioorgânica (LQB) no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ. Através de um rigoroso processo de triagem, entre diversas pterocarpanoquinonas que foram sintetizadas no LQB, esta se mostrou a mais promissora frente a estudos farmacológicos de ação antineoplásica, antiinflamatória e antiparasitária em diversos laboratórios da UFRJ e outras universidades do Brasil e do exterior. O objetivo deste estudo é a otimização do processo sintético de **1**. Utilizamos uma metodologia já previamente descrita por Netto (2007) que envolve reações catalíticas de oxa-Heck entre o *o*-iodofenol (comercial), e o cromenoquinona, sintetizado a partir da lausona em laboratório. Anteriormente, a síntese de **1** utilizava acetona como solvente e tri-fenilfosfina (P(Ph)<sub>3</sub> - ligante), 32 horas de refluxo para obter o produto com 41% de rendimento, sendo a metodologia de purificação a partir de coluna cromatográfica a qual além de demorada, consome grande quantidade de reagente.

Conseguimos aumentar o rendimento final para até 57,7% considerando a mudança do solvente e utilização do cromenoquinona puro, reduzimos o tempo reacional em até 32 vezes usando apenas 1,2 eq. de *o*-iodofenol.

**Palavras-chave:** LQB-118, reação de oxa-Heck, cromenoquinona.

## Introdução

### 1.1 LQB-118

A LQB-118 (1) é uma pterocarpanoquinona que foi sintetizada inicialmente no Laboratório de Química Bioorgânica (LQB), no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) através de uma reação de oxiarilação de Heck entre o *orto*-iodofenol (2) e a cromenoquinona (3) que é derivada da lausona (4) (Figura 1; Netto, 2007; Netto, 2010).

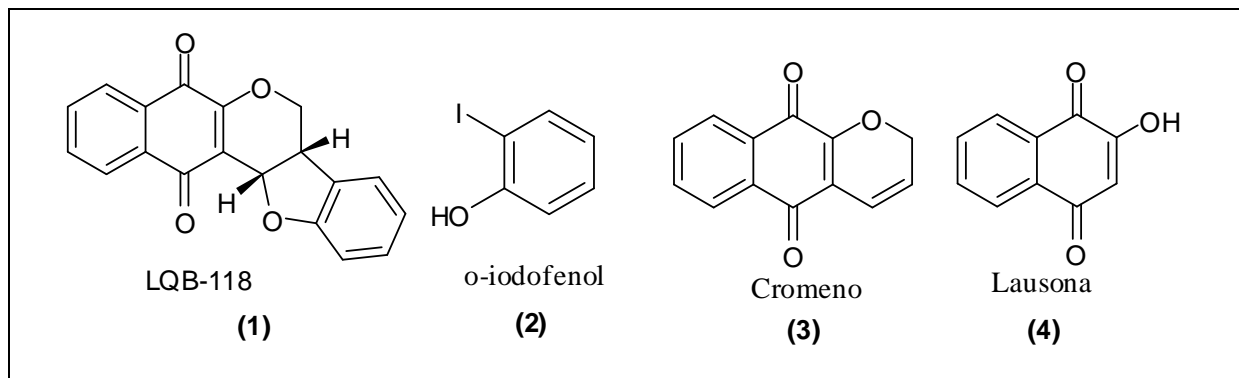
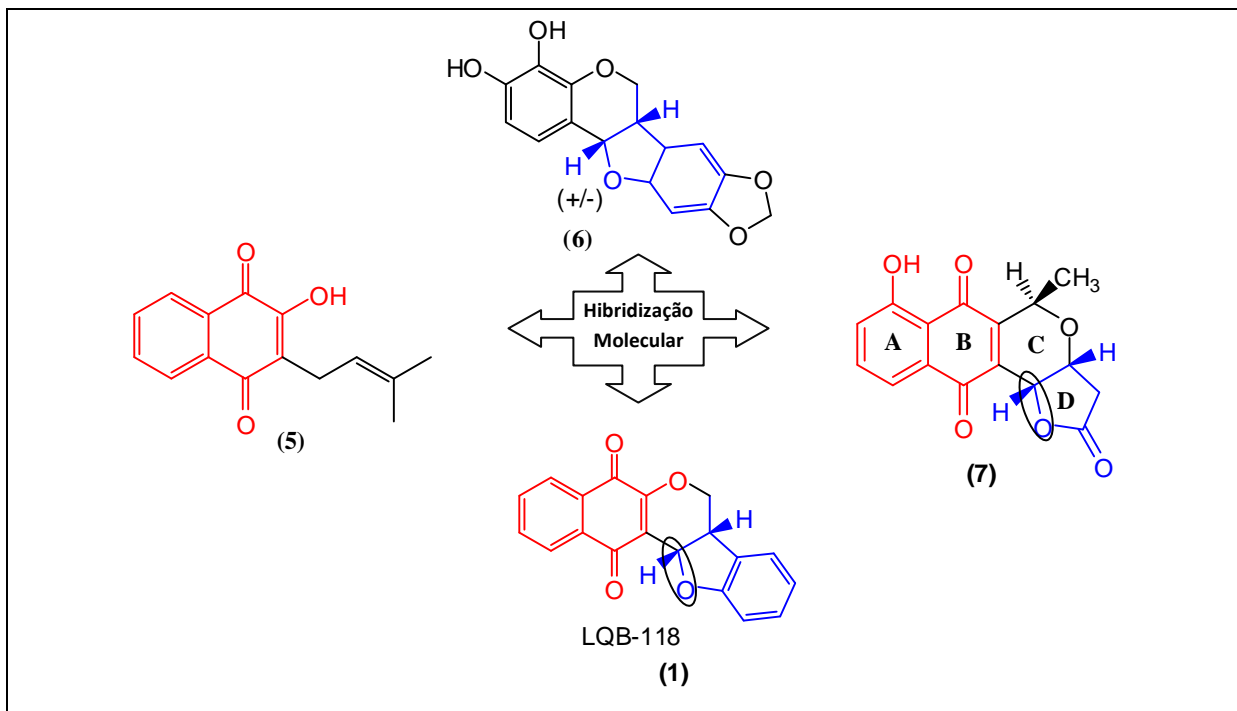


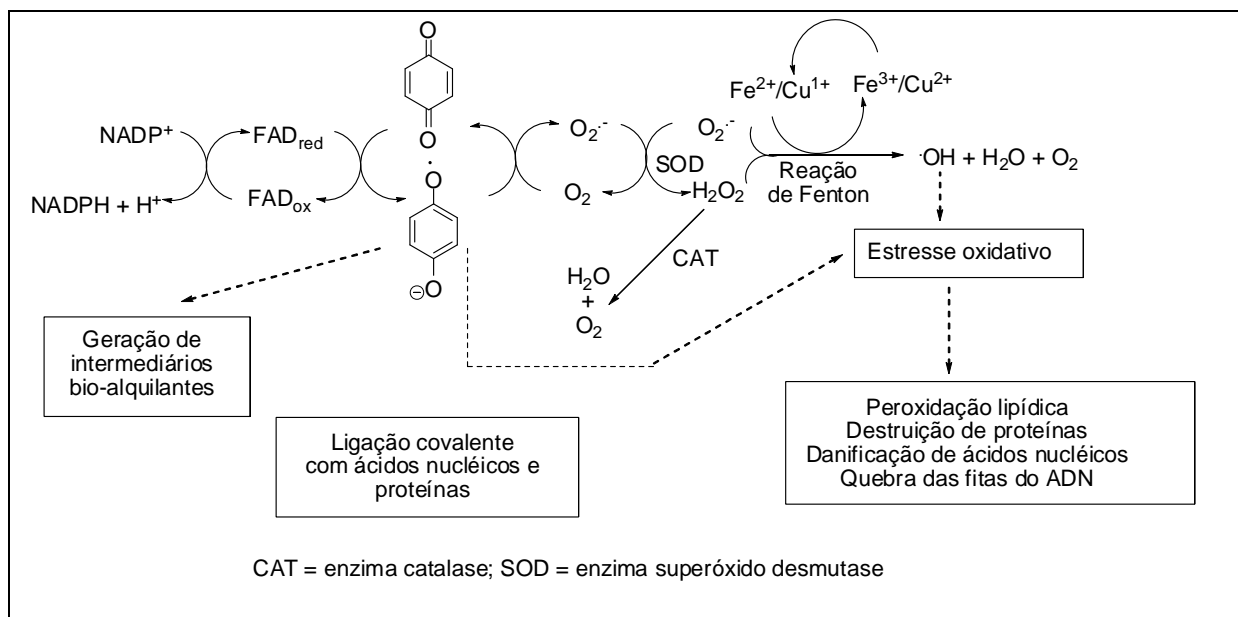
Figura 1: Representação das estruturas LQB-118 (1) e seus precursores.

Esta substância foi desenhada a partir da hibridização molecular entre o lapachol (5) (da Silva e colaboradores, 2002) e a LQB-79 (6), um pterocarpano natural catecólico (Chaudhuri e colaboradores, 1995; da Silva e colaboradores, 2004). Em adição foi observado que seu esqueleto era análogo estrutural da piranonaftoquinona kalafungina (7) (Brimble e colaboradores, 2000; Netto e colaboradores, 2010), compartilhando características incluindo presença do núcleo naftoquinona e ligação C-O no anel D (Esquema 1).



Esquema 1: Representação da hibridização molecular entre o lapachol (5), a LQB-79 (6) e a kalafungina (7) originando a LQB-118 (1).

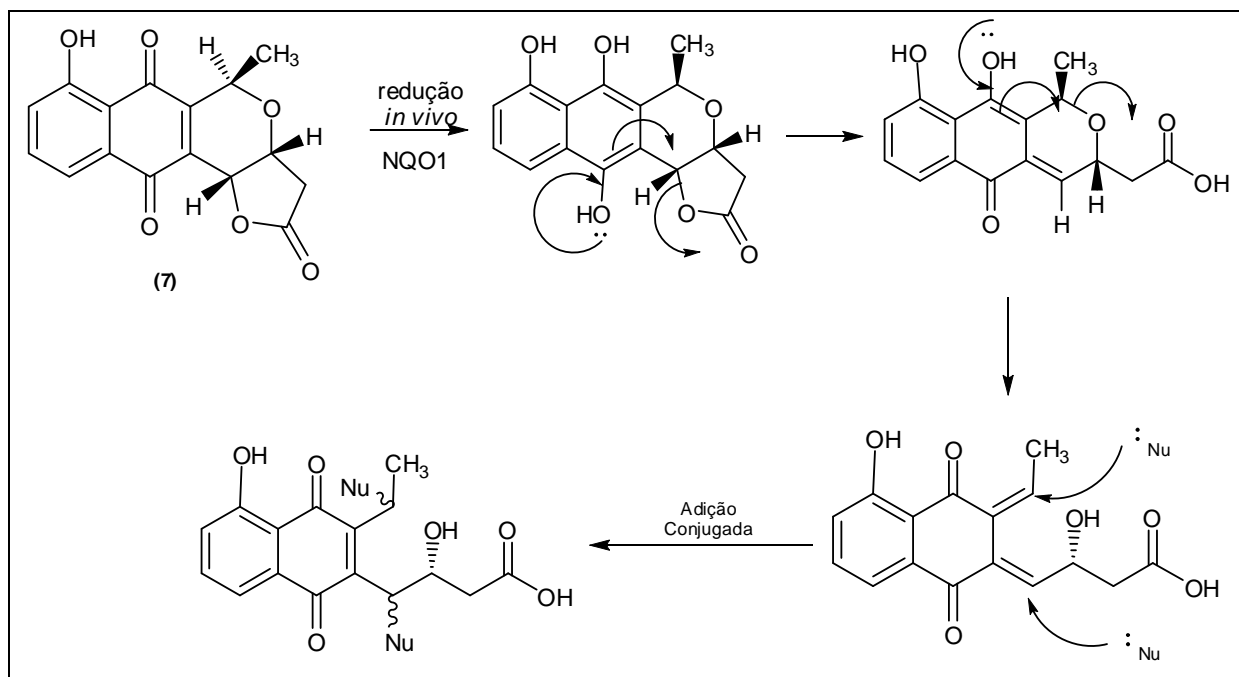
O lapachol (5) é uma naftoquinona isolado do cerne da árvore argentina *Tabebuia avellanedae* Lor. Bignoniácea que pode ser considerado um dos principais representantes do grupo das quinonas. Também pode ser encontrado em outras diversas famílias (de Souza, 2007), sua estrutura química foi estabelecida em 1896 e em 1927 foi sintetizada por Fieser (Costa, M. C. C. D., 2002). Diversas atividades biológicas já foram descritas para o lapachol como ações antimicrobiana, antifúngica e antineoplásica (de Souza, 2007). Ele age induzindo o estresse oxidativo através da formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio ( $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (da Silva e colaboradores, 2003 – Esquema 2).



Esquema 2: Ciclo redox induzido por quinonas. Adaptado de da Silva e colaboradores, 2003.

Já o pterocarpano catecólico (+)-3,4-diidróxi-8,9-metilenodioxipterocarpano (**6**, Esquema 1), é um produto natural que foi isolado em 1995 por Chaudhuri e colaboradores das flores de *Petalostemon purpureus* Rydb., uma Leguminosae encontrada nos Estados Unidos, eles demonstraram também o estudo da atividade *in vitro* frente ao ensaio DNA *strand-scission* (cisão da fita de DNA) e citotoxicidez para linhagem de célula tumoral KB ( $DE_{50} = 3,0 \mu\text{M}$ ) (Chaudhuri e colaboradores, 1995). O pterocarpano catecólico **6** já foi sintetizado, na forma de um racemato, no LQB-NPPN-UFRJ (Netto, 2003; da Silva, 2004).

A kalafungina (**7** – Esquema 1) é um agente antimicrobiano obtido a partir do caldo de cultura do *Streptomyces tanashiensis* isolado do solo (Brimble e colaboradores, 2000). Foi proposto por Brimble e colaboradores em 2000 (Esquema 3) que **7** atua como um antibiótico através do mecanismo semelhante ao sugerido para a mitomicina-C, sendo ativado após a redução através da enzima NAD(P)H quinona-oxidoreductase 1 (NQO1). A hidroquinona resultante sofre um rearranjo estrutural fornecendo um aceptor de Michael, que reage com nucleófilos essenciais da célula (Brimble e colaboradores, 2000).



Esquema 3: Via metabólica da kalafungina (7).

Por ser uma quinona, a LQB-118 (1) pode atuar através da indução do estresse oxidativo assim como a sua semelhança estrutural com 7 sugere que o mecanismo de ação da mesma poderia envolver uma ativação por biorredução, especialmente nas células que são resistentes ao estresse oxidativo.

A pterocarpanoquinona LQB-118 (1) foi testada frente às linhagens celulares de leucemia mielóide crônica (LMC): K562 (linhagem de leucemia mielóide - resistentes ao estresse oxidativo, alto teor de catalase) e Lucena-1 (derivada da K562 - também muito resistente ao estresse oxidativo, possui alto teor de catalase), considerada *Mult Drug Resistant* (MDR) por superexpressar transportadores ABC (ABCB1 - Pgp, glicoproteína-P), proteína transportadora responsável pela remoção de xenobióticos das células; HL-60 (linhagem de leucemia pró-mielocítica, sensível ao estresse oxidativo) e linhagens de leucemia linfóide Daudi (sensível ao estresse oxidativo); Raji (sensível ao estresse oxidativo) e Jurkat (linhagem de linfócitos T leucêmicos, leucemia linfoblástica aguda - LLA - com superexpressão de Bcl-2, uma proteína antioxidante, protege contra o estresse oxidativo) (Tabela 1; Salustiano, 2008; Netto, 2009; Netto, 2010). Como os resultados de 1 frente aos testes de inibição do crescimento de células tumorais foram muito satisfatórios, foi necessário fazer a avaliação frente à células mononucleares do sangue periférico humano ativadas pelo mitógeno fitohemaglutinina (PHA - PBMC\*) para efeito de segurança e seletividade da molécula. Pode-se observar que a concentração mínima necessária para inibir em 50% (IC<sub>50</sub>) o

desenvolvimento dos linfócitos é maior que 20  $\mu\text{M}$  de **1** levando a conclusão que esta é uma molécula seletiva para as células tumorais e segura para as células saudáveis. O efeito antineoplásico de **1** nas linhagens HL-60, Raji, Daudi pode ser associado ao estresse oxidativo, pois estas são linhagens sensíveis a agentes oxidantes (Netto e colaboradores, 2010). No entanto, as linhagens celulares Jurkat, K562 e Lucena-1 são resistentes ao estresse oxidativo e, pelo menos, nesses casos, um mecanismo de ação alternativo deve estar em funcionamento, podendo ser semelhante ao mecanismo da kalafungina (**7**) já que compartilham de semelhanças estruturais (Esquema 1) (Salustiano e colaboradores, 2010).

Tabela 1: Resultados dos estudos de atividade antineoplásica da LQB-118 (**1**). Adaptado de Netto e colaboradores, 2010. Resultados apresentados em  $\mu\text{M}$ .

Pterocarpanoquinona	K562	Lucena-1	HL60	Daudi	Raji	Jukart	PBMC*
LQB-118 ( <b>1</b> )	1,67	2,75	2,00	3,10	3,32	6,77	>20

\*ativado com PHA

Devido aos resultados obtidos frente aos estudos com células de leucemia mielóide crônica anteriormente apresentados (Tabela 1), fez-se o estudo frente à linhagem de leucemia mielóide aguda (LMA) - doença que resulta em acúmulo de células blásticas granulocítica ou monocítica com graus variáveis de diferenciação. Em 2013 Reis e colaboradores apresentaram dados de inibição de crescimento de células Kasumi-1, uma LMA, frente ao tratamento com **1**. A idarubicina é o fármaco referência usado na clínica, no entanto, a resposta à terapia de LMA depende de diversas características como idade, número de glóbulos brancos no sangue, estado do paciente e citogenética, e esse tratamento pode estar associado ao mecanismo de quimiorresistência por MDR. Foi visto que a LQB-118 (**1**) foi altamente eficaz na indução da apoptose em células Kasumi-1 em comparação com a idarubicina, como mostrado na Tabela 2, após 72 horas de incubação apesar da redução da variabilidade celular ter sido aproximada (**1** na concentração de 9.0  $\mu\text{M}$  foi marcadamente maior que 70% e já com idarubicina, 5.0  $\mu\text{M}$  foi 80%), a concentração de 5.0  $\mu\text{M}$  de idarubicina é tóxica para pacientes pois atinge o limite superior do pico plasmático aceitável (Reis e colaboradores, 2013).

Tabela 2: Comparação da viabilidade da linhagem Kasumi-1 (LMA) frente à incubação com LQB-118 (**1**) e idarubicina em diferentes concentrações no período de 72 horas. Adaptado de Reis e colaboradores, 2013.

<i>[<math>\mu</math>M]</i>	<b>1.5</b>	<b>3.0</b>	<b>6.0</b>	<b>9.0</b>
<b>LQB-118 (<b>1</b>)</b>	10%	<20%	40%	>70%
<i>[<math>\mu</math>M]</i>	<b>0.01</b>	<b>0.1</b>	<b>1.0</b>	<b>5.0</b>
<b>Idarubicina</b>	<5%	10%	40%	80%

Para saber como é o mecanismo de ação que leva as células leucêmicas à morte foi feito um estudo por Bacelar e colaboradores em 2012, que analisaram o processo de morte celular induzida por **1** em linhagens K562 (LMC) e Jurkat (LLA). O mecanismo de ação proposto para **1** é a redução pela enzima NQO1 que atua na mitocôndria reduzindo ubiquinona em hidroquinona, impedindo a formação de semiquinonas (ERO – espécie reativa de oxigênio) para formar um agente alquilante de DNA (Belinsky e colaboradores, 1993; Dinkova-Kostova e colaboradores, 2010; Netto e colaboradores, 2010), já que a maioria das células cancerosas a expressam. No entanto foi observado citotoxicidade em ambas as linhagens, mesmo Jurkat não expressando NQO1. Para confirmação do estudo utilizou-se um inibidor da NQO1, dicumarol, que não reduziu a citotoxicidade, esses resultados indicaram que o mecanismo de ação de **1** não envolve apenas alquilação de DNA. Sabe-se que a presença de cálcio intracelular pode induzir o processo de apoptose (Sun e colaboradores, 2011), foi observado por Bacelar e colaboradores (2012) que os níveis de cálcio intracelular para as duas linhagens foram elevados independente da concentração de **1**. Esse aumento levou à despolarização mitocondrial apenas na linhagem K562 que apresentou também níveis mais expressivos de ERO após o tratamento com **1**. A superexpressão de Bcl-2 confere resistência ao estresse oxidativo nas células Jurkat, tornando-as mais resistentes quando comparadas com a K562 (Bacelar e colaboradores, 2012).

Concluiu-se que **1**, pode afetar as células tumorais por diferentes mecanismos que levam ao processo de apoptose, permitindo que a LQB-118 (**1**) ultrapasse os mecanismos de resistência de células tumorais (Bacelar e colaboradores, 2012).

Além das células leucêmicas, **1** também mostrou-se ativa frente a linhagens celulares de câncer de pulmão GLC-4, A549 e H460 apresentando IC<sub>50</sub> inferiores a 15% (Tabela 3), o que é característico, pois sabe-se que o câncer de pulmão é um dos tipos mais resistentes e difíceis

de se tratar (Netto e colaboradores, 2010). Uma ressalva importante é que as linhagens GLC-4 e A549 apresentam expressão da proteína MRP-1 que é um fenótipo de MDR.

Tabela 3: Resultados dos estudos de inibição do crescimento de linhagens celulares de câncer de pulmão frente à presença da LQB-118 (**1**). Dados apresentados de IC<sub>50</sub> em µM.

Adaptado de Netto e colaboradores, 2010.

Linhagem celular	A549	H460	GLC-4
LQB-118 ( <b>1</b> )	11,21	12,86	5,17

Maia e colaboradores em 2011 estudaram os mecanismos pelos quais a LQB-118 (**1**) estaria atuando frente às células de LMC coletadas de pacientes do INCA (Instituto Nacional de Câncer) K562 (sensível à quimioterapia com Vincristina) e Lucena-1 (resistente), para a compreensão da resposta ao tratamento de células com fenótipo MDR, já que o tratamento com o imantinibe (medicamento referência na clínica) estaria gerando resistência. O estudo mostrou que **1** foi capaz de inibir a expressão de Pgp, das proteínas inibidoras de apoptose (IAP) survivina e XIAP. Estas proteínas deixaram de ativar as caspases específicas levando então à apoptose. A Figura 2 mostra que 3.0 µM de **1** induziu 70% das células K562 em 48 h de incubação, já para Lucena-1, pouco menos de 50% foi levado à apoptose. Esses resultados sugerem que as IAP e inibição da Pgp pode ser um caminho alvo da LQB-118 (**1**).

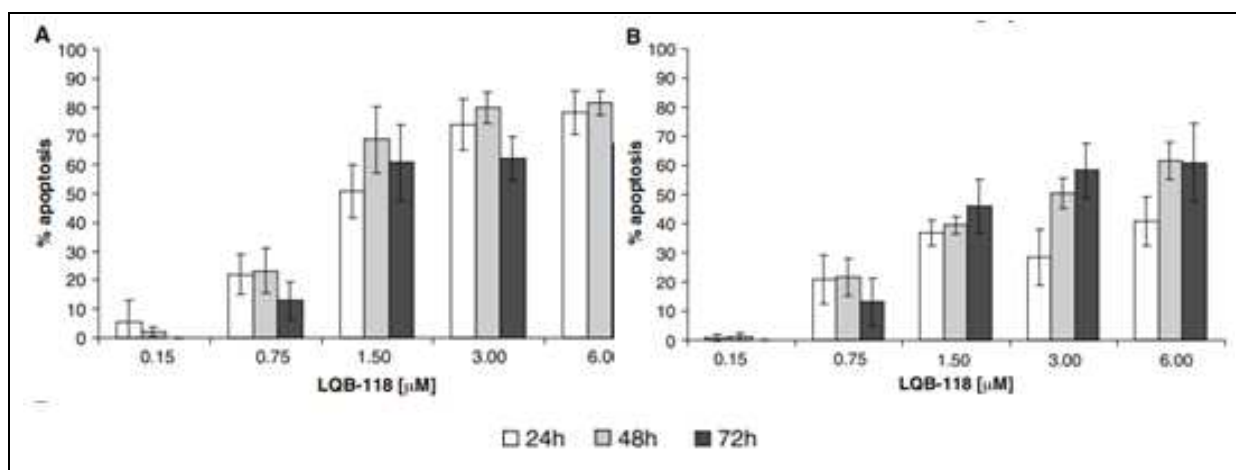


Figura 2: Apoptose da LMC K562 (a) e Lucena-1 (b) induzida pela LQB-118 (**1**), determinado através do ensaio de Anexina V usando citometria de fluxo. Adaptado de Maia e colaboradores, 2011.

Netto e colaboradores (2010) avaliaram se **1** seria capaz de modular a produção de TNF-α (fator de necrose tumoral), uma enzima pró-inflamatória que pode atuar como promotor



endógeno de tumores já que o microambiente neoplásico está cheio dessas enzimas e citocinas que podem ser impulsionadas com o crescimento do tumor. Sendo assim incubaram PBMC humano com LPS (lipopolissacarídeo) que é um potente estimulador da cascata da inflamação e adicionou-se diferentes concentrações de **1** num período de 2 horas, em seguida, foram medidos os níveis de produção de TNF- $\alpha$ . Uma redução significativa de TNF- $\alpha$  foi observada quando os PBMC's tratados com LPS foram incubados com uma concentração de 25  $\mu$ M de **1**. Além disso a maior concentração testada (100  $\mu$ M) foi capaz de inibir praticamente 100% da liberação de TNF- $\alpha$  quando comparado com o PBMC/LPS tratado com o veículo como mostrado no gráfico 1 (Netto e colaboradores, 2010).

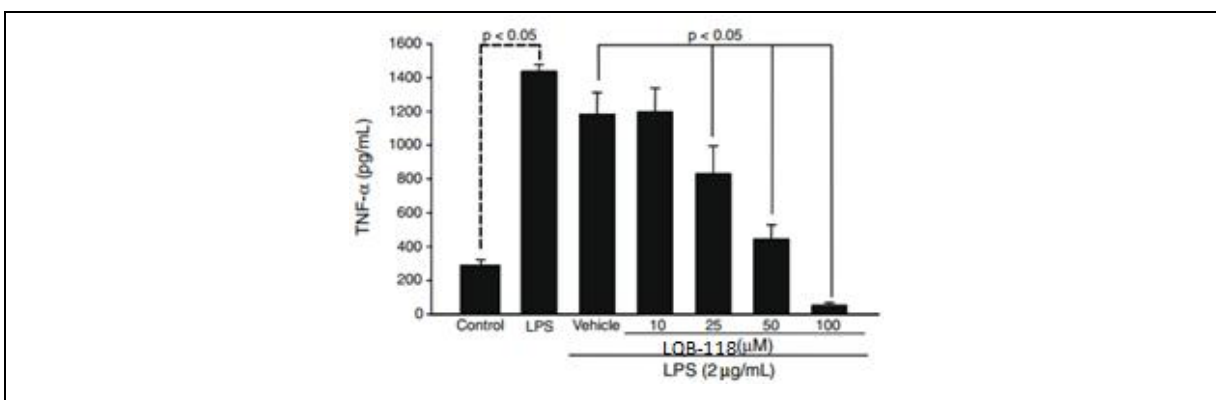


Gráfico 1: Efeito da LQB-118 (**1**) frente a produção de TNF- $\alpha$  por PBMC humano estimulados com LPS (Netto e colaboradores, 2010).

As quinonas apresentaram, em diversos estudos, variados perfis biológicos entre os quais se destacam as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais (citotoxicidade) e inibidoras de sistemas celulares reparadores (da Silva e colaboradores, 2003), elas são bem conhecidas por induzirem formação de ERO em sistemas biológicos (Handa, 1975), por isso Ribeiro e colaboradores (2013) estudaram o mecanismo de morte celular de *L. amazonensis* promastigota induzido por **1**. O gráfico 2 apresenta a formação de ERO pelos parasitas incubados de acordo com o aumento da concentração de **1** que foi medido nas primeiras horas de tratamento, foi visto que **1** provocou estresse oxidativo, sugerindo que este evento é um dos mecanismos que leva à morte do mesmo já que a produção excessiva de ERO já foi relatada como um ponto de partida para a morte programada de células (Sen N. e colaboradores, 2004).

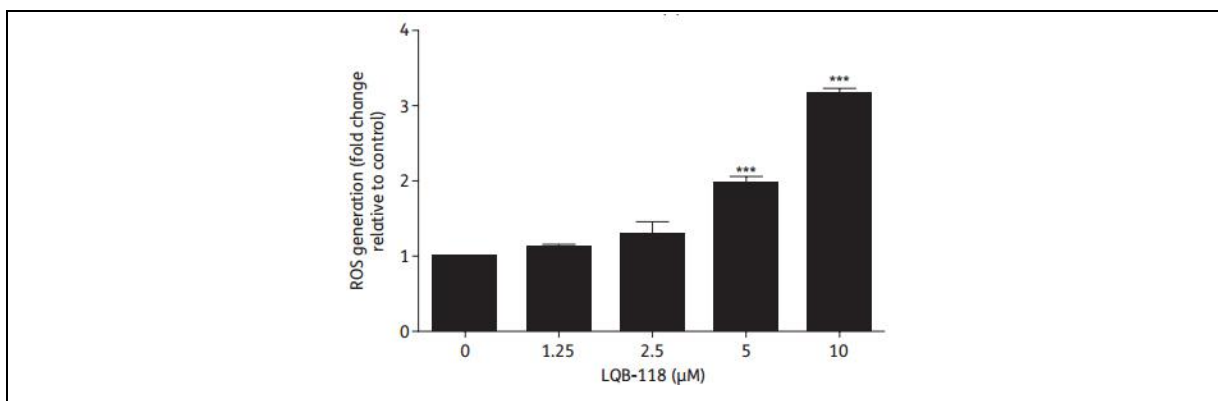


Gráfico 2: Quantificação da formação de ERO por *L. amazonensis* promastigotas incubadas com LQB-118 (**1**) (Ribeiro e colaboradores, 2013).

Cunha – Jr e colaboradores (2011) estudaram a atividade biológica da LQB-118 (**1**) frente à inibição do desenvolvimento e tratamento de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) promastigota, foi visto que **1** é eficaz contra a infecção por este parasita, pois além reduzir o desenvolvimento de lesões na pele dos camundongos quando administrada local ou sistematicamente, reduz também a carga parasitária (Cunha – Jr. e colaboradores, 2011), dados apresentados no gráfico 3.

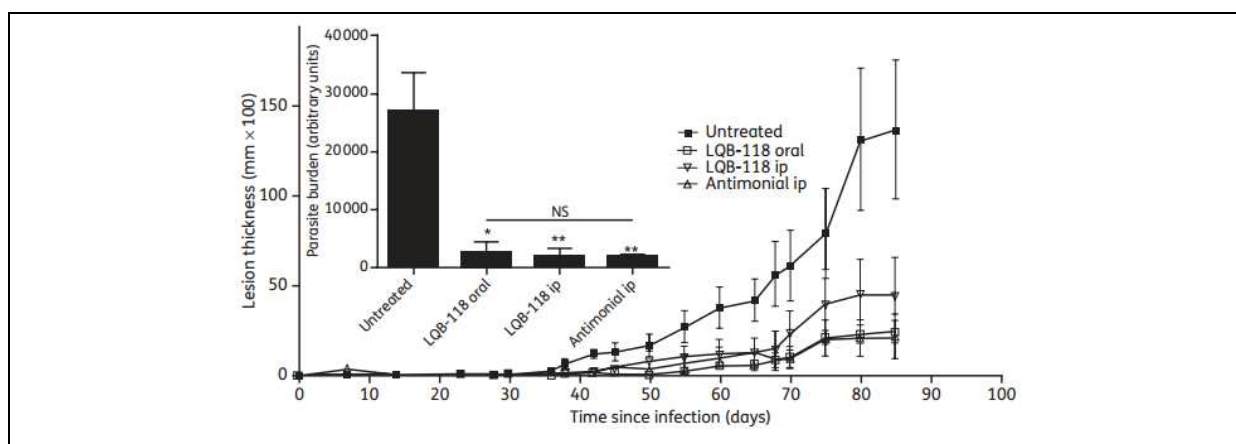


Gráfico 3: Determinação da redução da lesão e da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* promastigota tratados com **1** oral e intraperitonealmente (Cunha – Jr. e colaboradores, 2011).

Com o objetivo de investigar quais as características estruturais necessárias para a ação antineoplásica e leishmanicida, Buarque e colaboradores (2011) prepararam novos compostos análogos da LQB-118 (**1**). A Figura 3 apresenta alguns dos compostos sintetizados. Adicionaram grupos retiradores e puxadores de elétrons ao anel E (**8a** = OMe, **8b** = CO<sub>2</sub>Me, **8c** = NO<sub>2</sub>, **8d** = CHO e OMe), uma vez que a clivagem da ligação C-O no anel D (Figura 3) poderia estar envolvida no mecanismo de bioativação redutiva. Desta forma os

grupos retiradores poderiam facilitar esta via. Sintetizaram o aza-pterocarpanoquinona (**9**) com intenção de avaliar o quão importante é a ligação C-O no anel D (Figura 2) onde o oxigênio foi substituído pelo grupo N-Ts devido à estabilização por ressonância fornecida por um grupo sulfona, a ligação C-N pode também atuar como um grupo de saída razoável, tal como a ligação C-O em (**1**), e, portanto, seria esperado que **9** facilitasse a ativação da via redutiva. A Tabela 4 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> encontrados na avaliação da atividade de **1**, **8a-d** e **9** frente à K562 e HL-60, bem como linhagem de câncer de cólon (HCT-8), glioblastoma (SF-295) e melanoma (MDA-MB435), a doxorubicina, antibiótico da família das antraciclina, muito usado na quimioterapia do câncer, foi usada como controle (Buarque e colaboradores, 2011).

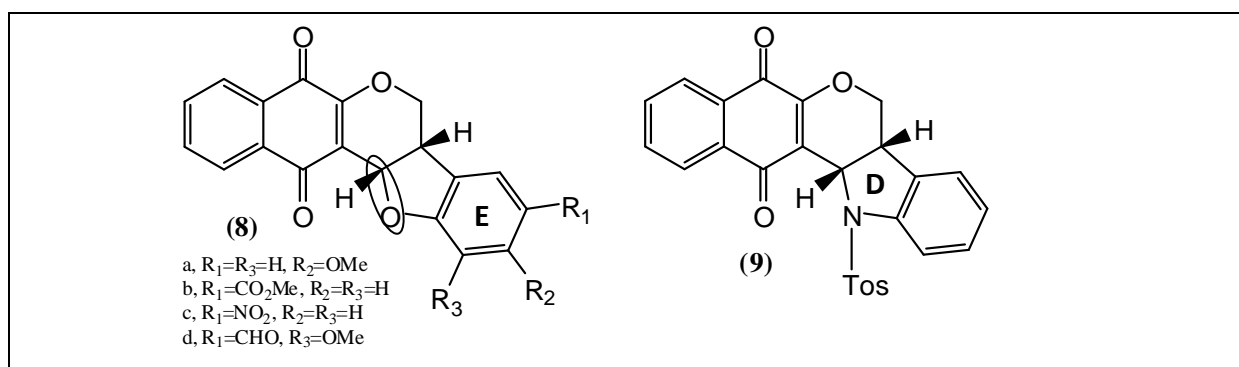


Figura 3: Novos compostos sintetizados por Buarque e colaboradores, 2011.

Tabela 4: Atividade antineoplásica de **1**, das novas pterocarpanoquinonas e aza-pterocarpanoquinona (**9**) frente à diferentes linhagens celulares. Dados apresentados de IC<sub>50</sub>. Adaptado de Buarque e colaboradores 2011.

Pterocarpanoquinona	HL-60	K562	HCT-8	SF-295	MDA-MB435
<b>1</b>	1.3	1.67	2.6	3.6	2.3
<b>8a</b>	3.5	3.3	10.4	17.7	11.4
<b>8b</b>	4.1	8.0	>13	>13	>13
<b>8c</b>	6.3	3.48	8.3	8.9	17.4
<b>8d</b>	3.0	13.5	6.0	7.4	10.7
<b>9</b>	7.4	5.5	0.6	3.9	0.4
<b>Doxorrubicina</b>	0.04	1.67	0.02	ND	0.96

Os resultados mostram claramente que **1** apresentou potentes resultados antineoplásicos quando comparados com **8a-d** e **9**, exceto para HCT-8 e MDA-MB435 onde **9** foi mais eficaz (Buarque e colaboradores, 2011).

Portes e colaboradores em 2012 testaram a eficácia de **1** contra a proliferação *in vitro* de *Toxoplasma gondii* taquizoita. O estudo foi feito avaliando células fibroblásticas LLC-MK2 de rins de macaco Rhesus infectadas por cepas taquizoítas de *T. gondii* retirados da cavidade intraperitoneal de camundongos Swiss. A LQB-118 (**1**) foi adicionada em diferentes concentrações nas células infectadas e deixaram agir por 24 e 48 horas, após este tempo foi analisado o índice de proliferação pelo exame do número total de parasitas em 100 células infectadas. O acompanhamento em células não infectadas também foi realizado para efeito comparativo, usando 10  $\mu$ M. Ficou demonstrado no gráfico 4 que **1** foi capaz de reduzir o crescimento do *T. gondii* e houve uma estabilização do índice de infecção após o tratamento com concentrações a partir de 2,5  $\mu$ M. A viabilidade das células tratadas foi superior a 98%. Um valor IC<sub>50</sub> de 2,5  $\mu$ M foi observado. Além disso, **1** não afetou o crescimento das células não infectadas e impediu a diferenciação do parasita para a forma bradizoíta, além de causar lesão ao parasita, portanto, pode se tornar um novo candidato a fármaco eficaz contra a toxoplasmose (Portes e colaboradores, 2012).

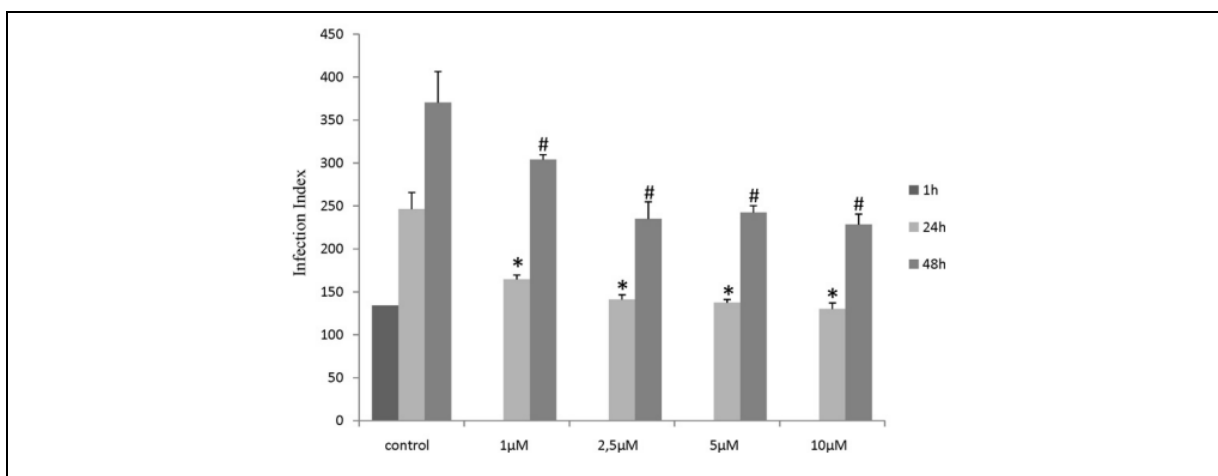


Gráfico 4: Índice de infecção do *Toxoplasma gondii*, que interagiu com células LLC-MK2 após tratamento com diferentes concentrações de **1** durante 24 e 48 h. \* Significativamente diferente em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ) após 24 h de tratamento. # Significativamente diferente em relação ao controle ( $p \leq 0,05$ ), após 48 horas de tratamento (Portes e colaboradores, 2012).

## 1.2 ASPECTOS SINTÉTICOS DA LQB-118

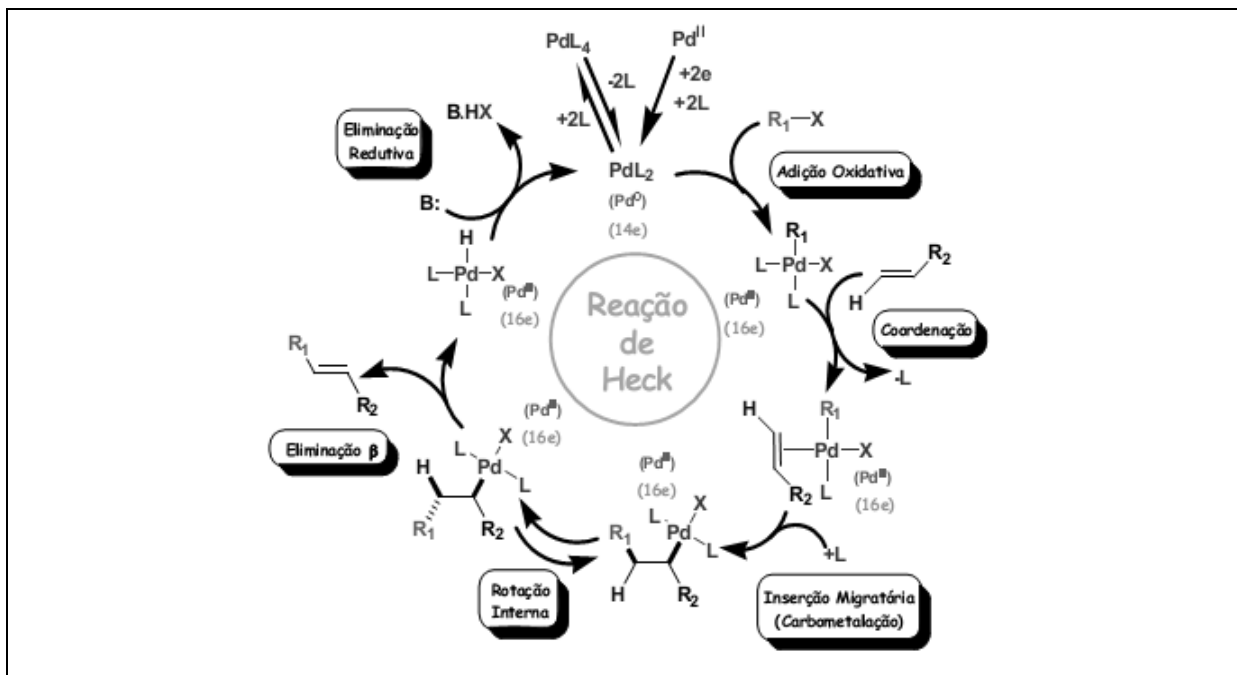
Apesar da LQB-118 (**1**) ser uma molécula muito promissora do ponto de vista farmacológico, sua síntese apresenta muitas limitações.

Formar ligações carbono-carbono (C-C) é o maior desafio na síntese orgânica (Smith, 1994) e é a etapa chave para a síntese de várias substâncias orgânicas, com isso possui aplicabilidade

industrial e tecnológica (Herrmann e colaboradores, 2000). A reação de Heck é um processo muito usado em síntese orgânica (Negishi, 1999), consiste numa ferramenta que utiliza complexos organometálicos como mediadores da reação (Schwartz e colaboradores, 1980), em especial os complexos organometálicos de paládio (Beletskaya e colaboradores, 2000). Consiste na arilação ou vinilação de olefinas, na presença de complexos de paládio e uma base (Beletskaya e colaboradores, 2000 e Tsuji e colaboradores, 1995). O emprego de ligantes a fim de estabilizar os complexos de paládio formados como as fosfinas eram muito utilizadas (Negishi, 2002; Tsuji e colaboradores, 1995; Amatore e colaboradores, 1992 e Knowles e colaboradores, 2007).

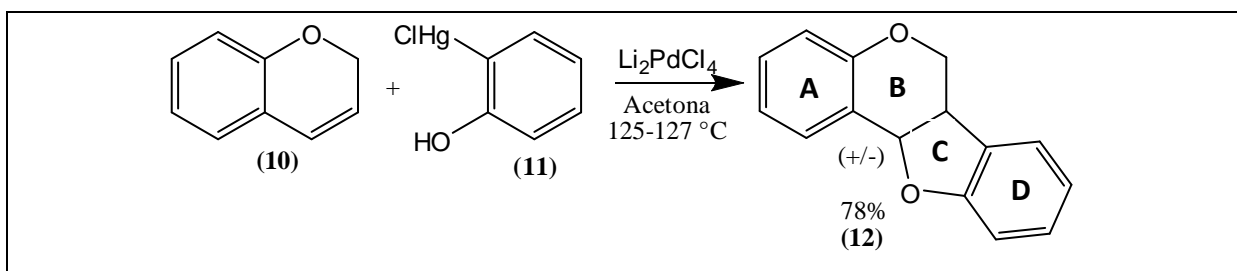
O ciclo catalítico (Esquema 4) envolve quatro etapas definidas e várias intermediárias:

- Primeiramente é gerada a espécie ativa do catalisador de paládio (Pd(0)), ocorre a adição oxidativa do substrato eletrofílico RX na espécie ativa de Pd(0), gerando o aduto  $RPdL_2X$  (Negishi, 2002; Tsuji e colaboradores, 1995; Knowles e colaboradores, 2007 e Amatore e colaboradores, 1999).
- Segundo, liberação de um sítio de ligação (L ou X), e subsequente coordenação da olefina resultando num complexo- $\pi$  que pode ser neutro ou positivamente carregado, dependendo de qual tipo de ligante foi liberado previamente para coordenação da olefina.
- Em terceiro, ocorre uma inserção syn (carbopaladação), provavelmente via um mecanismo concertado e estado de transição de quatro centros, resultando na geração de um complexo instável  $\sigma$ -organopaládio, é nesta etapa que é determinada a regioquímica do produto da reação (Negishi, 2002; Tsuji e colaboradores, 1995; Knowles e colaboradores, 2007) e;
- Em quarto, um hidrogênio  $\beta$  torna-se acessível através de uma rotação interna, colocando-se numa posição syn ao metal, este perde um ligante gerando agora um sítio de coordenação para que ocorra a eliminação  $\beta$  de hidreto seguida da liberação do produto de acoplamento de Heck e hidreto de paládio (Beletskaya, 2000; Negishi, 2002; Tsuji e colaboradores, 1995; Knowles e colaboradores, 2007 e Amatore e colaboradores, 1999).
- Por último, é necessário uma base para a reciclagem do hidreto de paládio (Pd(II)) à espécie ativa (Pd(0)) para reinício do ciclo catalítico (Negishi, 2002; Tsuji e colaboradores, 1995; Knowles e colaboradores, 2007 - Esquema 4).



Esquema 4: Representação das etapas do ciclo catalítico da Reação de Heck. Adaptado de Beletskaya e colaboradores, 2000.

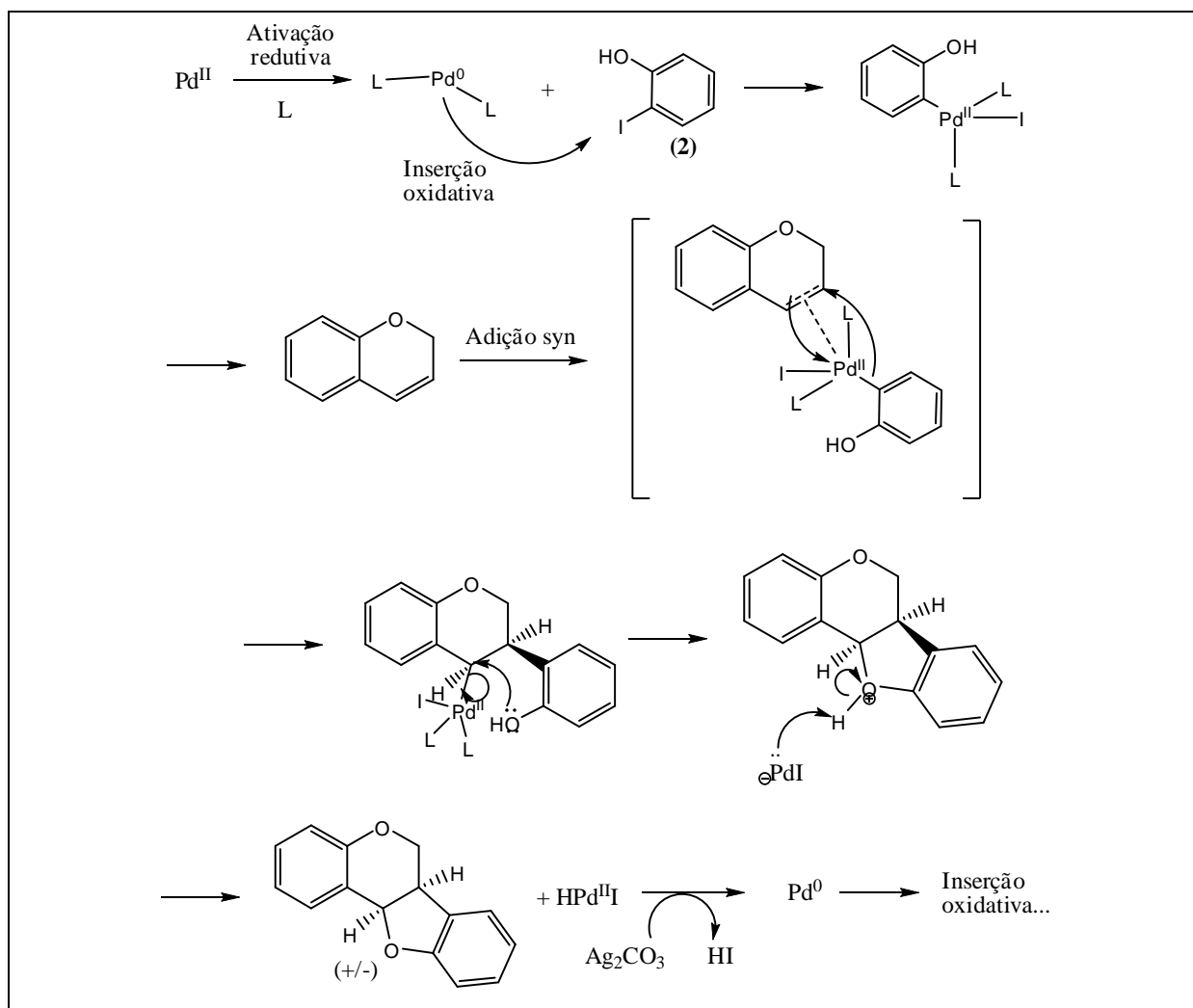
Horino e colaboradores em 1976 descreveram pela primeira vez a preparação de pterocarpanos a partir da reação de oxi-arilação de cromenos sintetizados num só passo através da reação de 2H-cromeno (**10**) com *o*-cloro-mercuriofenol (**11**), em quantidades estequiométricas de cloro-paladato de lítio transformando *o*-mercuriofenóis oxigenados em *o*-paládiofenóis através de uma troca de mercúrio por paládio em temperatura ambiente, essa reação permite a introdução de diferentes radicais aromáticos oxigenados no anel D (Esquema 5).



Esquema 5: Representação da primeira síntese de pterocarpanos a partir da reação de oxi-arilação do cromeno (**10**). Adaptado de Horino e colaboradores, 1976.

Kiss (2003) e Larock (1998) e seus respectivos colaboradores descreveram protocolos para a síntese de pterocarpanos por reações de oxi-arilação de Heck (Esquema 6) utilizando cromenos e hidronaftalenos como olefinas, *o*-iodofenóis no lugar de *o*-mercúriofenóis, que são tóxicos, esta substituição permitiu diminuir consideravelmente a quantidade de sal de

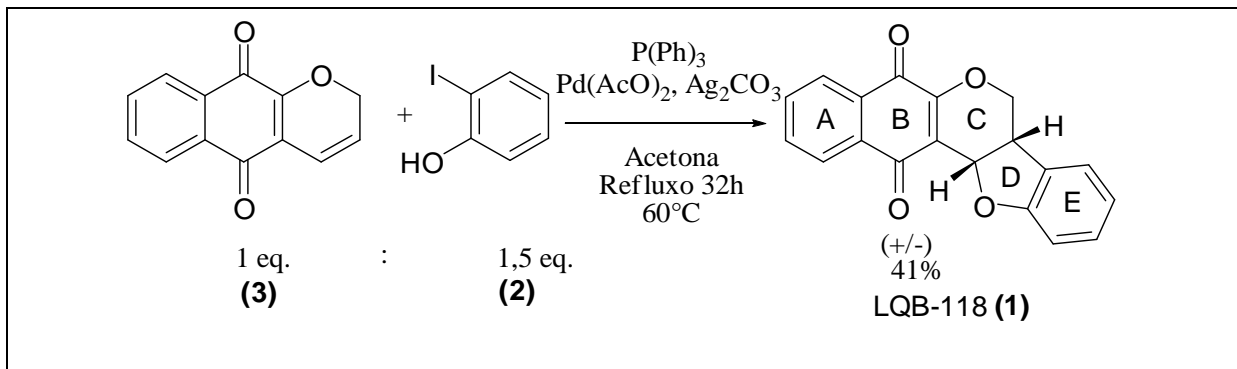
paládio (II), que é muito caro, de 100mol% para 10mol% na presença de PPh<sub>3</sub> e Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em acetona. Realizaram vários experimentos com utilização de diferentes catalizadores como acetato de paládio (Pd(OAc)<sub>2</sub>), cloreto de paládio (PdCl<sub>2</sub>) e *bis*-benzonitrila cloreto de paládio (Pd(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) em quantidades catalíticas, a reação com Pd(OAc)<sub>2</sub> representou o melhor rendimento. Nenhuma das moléculas sintetizadas por Kiss e Larock foram biologicamente ativas.



Esquema 6: Proposta de mecanismo da oxi-arilação catalisada por Pd por Kiss (2003) e Larock (1998). Adaptado de Kiss e colaboradores, 2003.

O LQB começou a estudar a síntese de pterocarpanos a partir dos protocolos de Kiss (2003) e Larock (1998). A síntese de **1** foi inicialmente realizada sob condições catalíticas desenvolvidas por Kiss e colaboradores (2003), sendo assim, Netto em 2007 realizou a reação de oxiarilação catalítica usando 0,75 mmol do o-iodofenol (**2**), 0,5 mmol do cromeno (**3**), 1,5 mmol de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 mol% de PPh<sub>3</sub> (trifenilfosfina) e 10 mol% de Pd(OAc)<sub>2</sub> em acetona, essa mistura foi submetida a 32 h de refluxo dando origem à LQB-118 (**1** - Esquema

7), o rendimento foi de 41%, quando suprimida a  $PPh_3$  (ligante que estabiliza o complexo de paládio), a reação apresentou rendimento de 40% (Netto, 2007; Netto, 2010), esta é uma síntese muito dispendiosa.



Esquema 7: Síntese inicial da pterocarpanoquinona LQB-118 (1). Adaptado de Netto, 2007.

A reação de oxi-arilação catalisada por  $Pd(OAc)_2$  foi estudada por Buarque e colaboradores (2010) com o objetivo de entender melhor o mecanismo desta reação, reagiram olefinas doadoras (13 e 14) e retiradoras (3) em elétrons, já que consideraram que as olefinas ricas em elétrons reagiriam mais rapidamente do que as pobres sob condições favoráveis ao mecanismo, com *o*-iodofenóis (2a-d) usando  $Ag_2CO_3$  como base em acetona na presença e ausência de  $PPh_3$  (Figura 4) e essas reações foram monitoradas por ESI-MS (ionização eletrospray acoplado a espectrômetro de massas) e seus intermediários e produtos foram caracterizados por ESI-MS/MS.



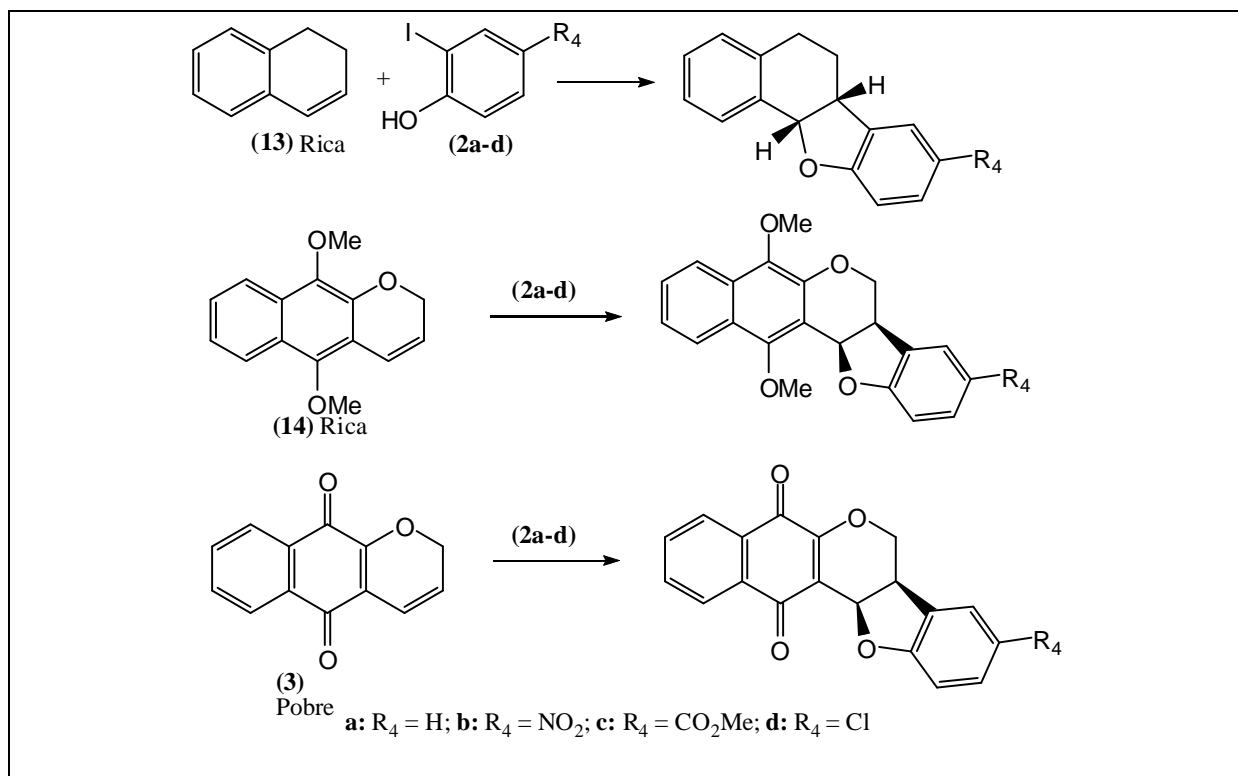


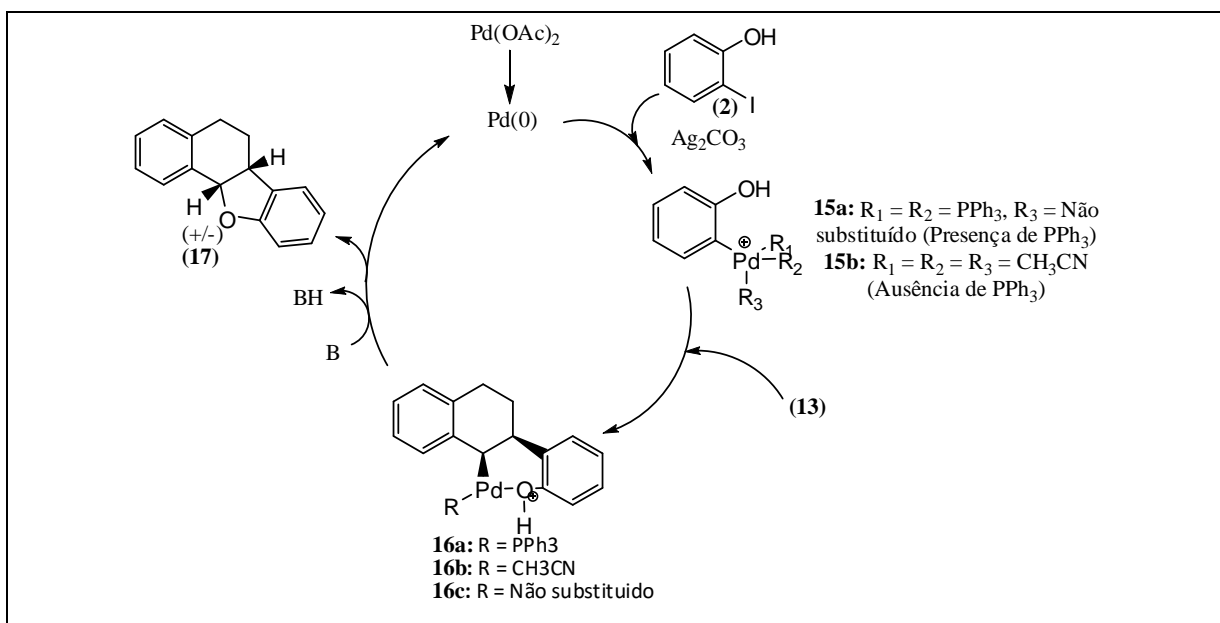
Figura 4: Reação de oxa-Heck usando olefinas ricas (**13** e **14**) e pobre (**3**) em elétrons. Adaptado de Buarque e colaboradores, 2010.

A Tabela 5 mostra o rendimento obtido após as reações de **13**, **14** e **3** com *o*-iodofenol (**2a**) em acetona, sob refluxo, na presença de 10 mol% de Pd(OAc)<sub>2</sub>, 3 equivalentes de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> na presença e ausência de PPh<sub>3</sub>. A energia do HOMO mede o caráter elétron-doador de um composto, portanto quanto maior a energia do HOMO, maior sua capacidade elétron-doadora, os valores de HOMO de **13** e **14** são maiores do que de **3**. As olefinas ricas em elétrons (**13** e **14**) ofereceram melhores rendimentos frente a **3** (pobre) (Buarque e colaboradores, 2010). É interessante observar que a presença de PPh<sub>3</sub> na reação com **3** não favoreceu o rendimento da reação, e esta é a reação que consiste o esqueleto da LQB-118 (**1**), portanto a fosfina é dispensável na reação de oxi-arilação de Heck para obtenção de **1**.

Tabela 5: Rendimentos obtidos a partir das reações realizadas por Buarque e colaboradores, 2010 entre olefinas e *o*-iodofenol (**2**) na presença e ausência de PPh<sub>3</sub>.

Olefina	HOMO (eV)	PPh <sub>3</sub>	Rendimento
<b>13</b>	-7,95	0,2 equiv.	45%
<b>13</b>		-	50%
<b>14</b>	-7,43	0,2 equiv.	50%
<b>14</b>		-	45%
<b>3</b>	-8,64	0,2 equiv.	36%
<b>3</b>		-	40%

Na oxirilação intermolecular de olefinas, adutos *cis* são obtidos. O Esquema 8 representa uma proposta mecanística para a reação de oxirilação de Heck apresentada por Buarque e colaboradores (2010) feita a partir do acompanhamento das reações por ESI-MS onde interceptaram o intermediário (**16**) na presença de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$  e caracterizada por ESI-MS/MS. O primeiro passo é a adição oxidativa de Pd(0) ao **2** levando à espécies catiônicas **15a-b**, que são formados na presença ou ausência de  $\text{PPh}_3$ , respectivamente. Estes são submetidos à carbopaladação regioseletiva da ligação dupla da olefina **13**, obtendo-se o intermediário paladaciclo **16a-c**. A anti  $\beta$ -eliminação do PdH é desfavorável para **16** logo haverá eliminação redutiva de Pd e a formação de uma ligação éter produzindo o aduto **17** e regenerando o Pd(0) catalítico.



Esquema 8: Mecanismo da reação de oxa-Heck. Adaptado de Buarque e colaboradores, 2010.

### **Justificativa**

Devido ao seu excelente perfil biológico, a demanda por ensaios farmacológicos *in vivo* vem aumentando a cada ano, de modo que atingimos um estágio em que se faz necessária a síntese em larga escala da LQB-118 (**1**). A atual metodologia de síntese de **1** não é eficiente, pois além de ser muito dispendiosa, não permite uma síntese em larga escala já que utiliza grandes quantidades de reagentes e solventes, na sua purificação, oferecendo também rendimentos moderados, além de ser necessário tempos reacionais muito longos. Por isso este estudo foi realizado na tentativa de otimizar sua síntese e reduzir custos.

## **Objetivos**

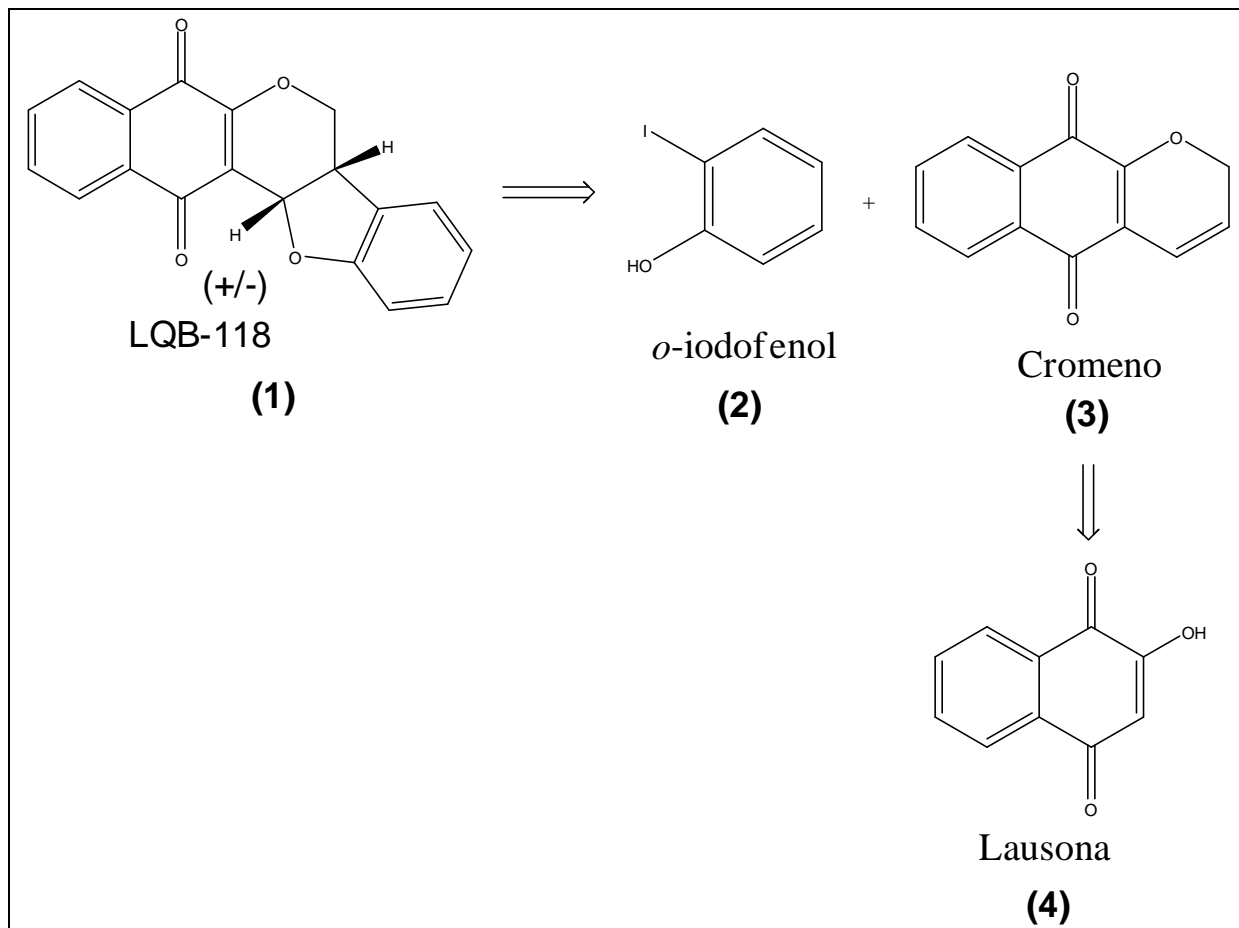
O presente trabalho teve como objetivos estudos visando a otimização no processo sintético da LQB-118 (**1**), uma pterocarpanoquinona com interessante perfil biológico, que faz necessária sua síntese em larga escala.

Portanto fez-se o estudo avaliando as seguintes variáveis na reação de oxa-Heck:

- Utilização de diferentes solventes;
- Tentativa de reduzir o tempo reacional;
- Tentativa de reduzir o consumo de eluente para purificação de **1**.

### Materiais e Métodos

A metodologia empregada para a obtenção da molécula-alvo (**1**) se deu por reações catalíticas de oxa-Heck entre o *o*-iodofenol (**2**) que é obtido comercialmente, e o cromeno (**3**) que por sua vez é sintetizado a partir da lausona (**4**) em laboratório, a análise retrossintética de **1** está representada no Esquema 9.



Esquema 9: Análise retrossintética da LQB-118 (**1**).

As reações de oxa-Heck, utilizando-se quantidades estequiométricas de Pd(OAc)<sub>2</sub>, foram realizadas sob atmosfera inerte de nitrogênio (N<sub>2</sub>). A acetona e a metil-isobutil cetona (MIC) foram utilizadas sem qualquer necessidade de tratamento prévio.

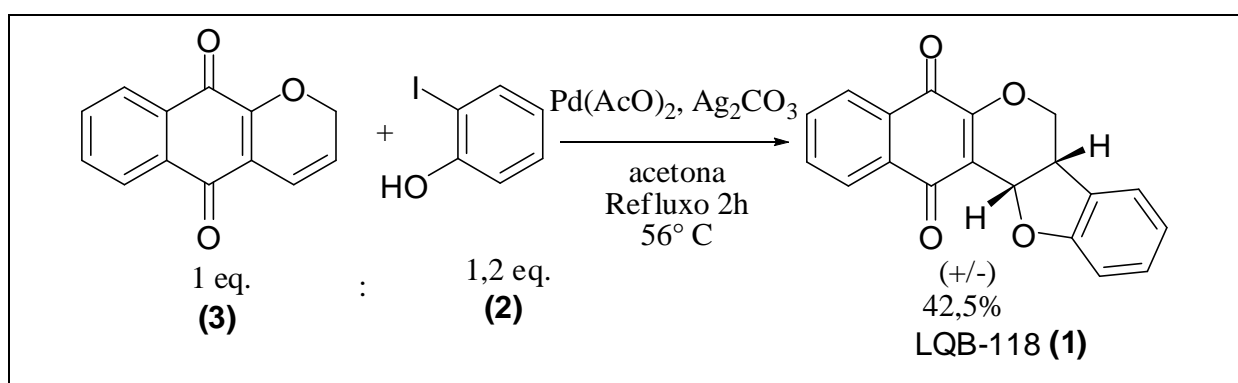
As separações cromatográficas do tipo “flash” foram realizadas em colunas onde a fase estacionária foi gel de sílica Merck (Silica Flash F60) de granulação 40 – 63 nm. As reações assim como as separações cromatográficas foram monitoradas com uso de CCD (cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F254 de dimensões variáveis conforme a necessidade), a análise da cromatofolha foi feita com irradiação de luz ultravioleta λ= 254 nm. Os eluentes utilizados foram hexano e acetato de etila numa proporção de 7:3.

As análises de espectrometria de massas por impacto de elétrons (EMIE) foram realizadas em aparelho de cromatografia gasosa Shimadzu 2010 acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu MS A, em sistema VG alto spec, utilizando a técnica de impacto em 70 eV.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) foram obtidos em aparelhos Varian Instruments 300 e 500 MHz em  $\text{CDCl}_3$ . Os deslocamentos químicos foram medidos em unidades adimensionais ( $\delta$ ) que representa parte por milhão da frequência aplicada, sendo as áreas relativas dos picos de absorção obtidas por integração eletrônica. As multiplicidades nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  referentes a cada absorção são expressas como: sinal simples (s), sinal duplo (d), sinal triplo (t), sinal quádruplo (q), duplo sinal duplo (dd), duplo sinal duplo duplo (ddd) e sinal múltiplo (m).

### Resultados e Discussão

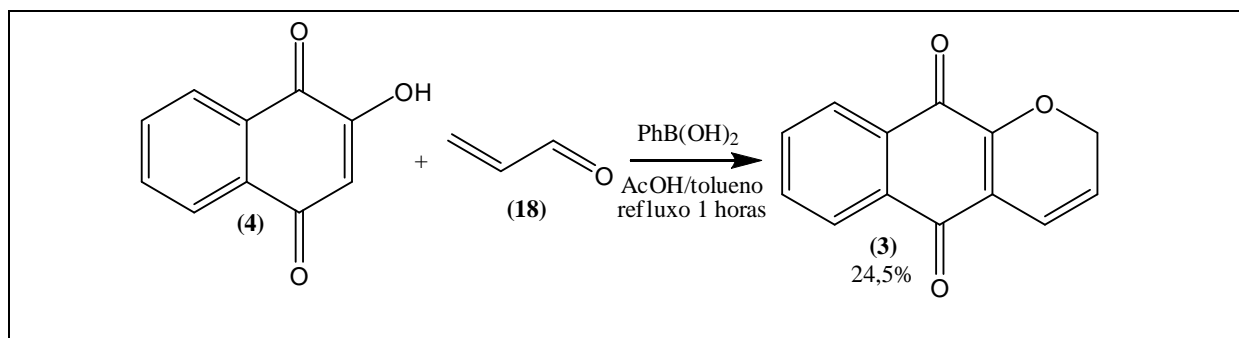
Netto em 2007 realizou a reação de oxa-Heck em que a proporção entre **3** (dupla ligação deficiente em elétrons) e **2** foi de 1 : 1,5 equivalente respectivamente. Foram necessárias 32 horas de reação em refluxo para que **3** fosse totalmente consumido, essa avaliação foi feita através de cromatografia de camada delgada (CCD). Após purificação por coluna cromatográfica **1** foi obtido em 41% de rendimento (Esquema 4). Esta metodologia utiliza quantidades catalíticas de Pd(OAc)<sub>2</sub>, apresenta uma rota sintética envolvendo duas etapas. Foi feita a reprodução da reação de oxa-Heck nas mesmas condições iniciais, alterando as quantidades dos reagentes com o acompanhamento da reação de hora em hora através de CCD para determinar o tempo real da reação, foi visto que 1,2 eq. de **2**, na presença de 3 eq. de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 10 mol% de Pd(AcO)<sub>2</sub> em acetona (P.E. 56° C), a reação terminou em 2 horas e após purificação do produto obteve-se o rendimento de 49,5% (Esquema 10).



Esquema 10: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** em acetona e 1,2 eq. de **2**, na ausência de PPh<sub>3</sub>.

A substância limitante da reação é o cromenoquinona (**3**), pois sua polaridade muito se assemelha a do produto, e dificultaria sua purificação posteriormente por cromatografia em coluna, portanto o tempo de reação se deu a partir do momento em que **3** foi totalmente consumido.

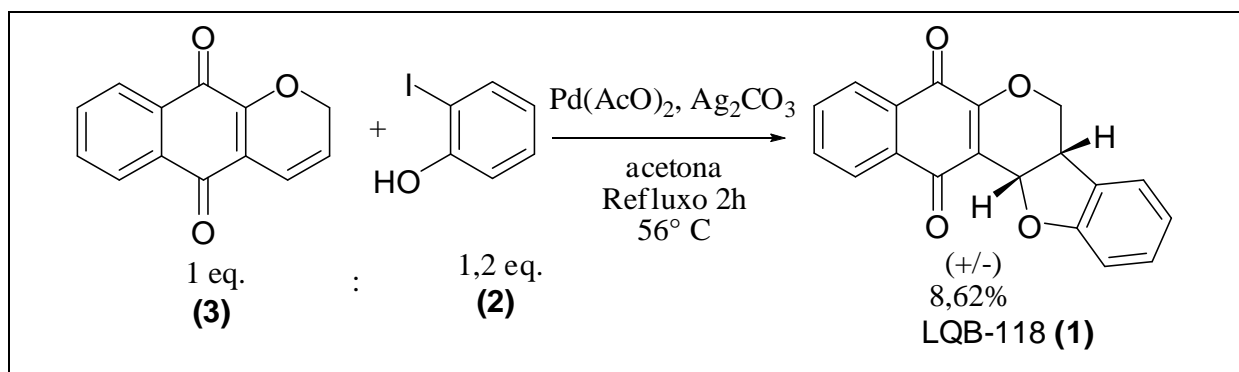
A reação para obtenção de **3** (Esquema 11) é um dos pontos críticos para obter a LQB-118 (**1**). O cromenoquinona (**3**) foi obtido através da reação entre lausona (**4**), acroleína (**18**), ácido fenilborônico e ácido acético glacial em tolueno sob refluxo por 1 hora. A formação do produto foi monitorada por CCD até que toda a lausona fosse consumida. O rendimento desta reação foi de 24,5%.



Esquema 11: Representação da síntese do cromenoquinona **(3)**.

Muitas reações para formação de **3** foram realizadas sem alteração nas condições reacionais, obtendo-se vários lotes do mesmo, assim que fosse purificado era imediatamente acondicionado sob refrigeração. À medida que as reações de oxa-Heck eram realizadas para obtenção de **1**, fazia-se a troca dos lotes de **3** de acordo com a necessidade da quantidade do reagente.

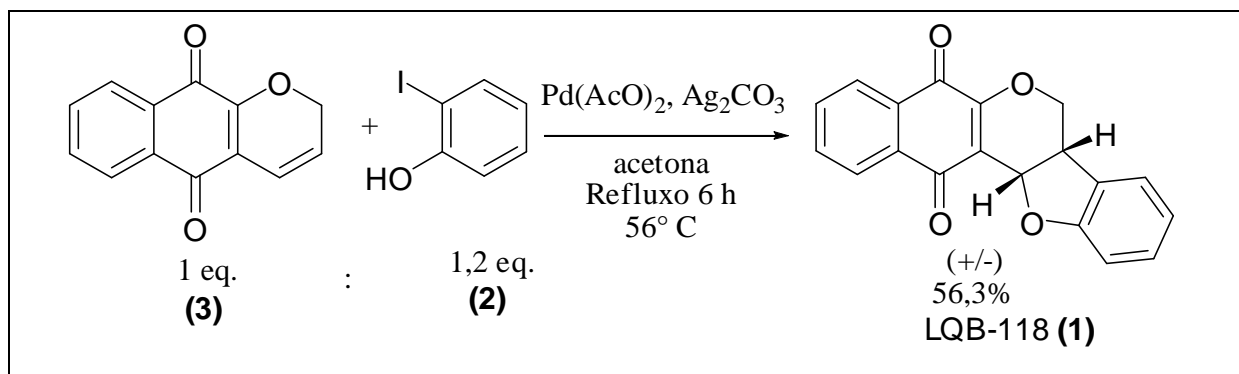
Após algumas semanas outra reação foi feita para obter **1**, usando as mesmas condições reacionais mencionadas anteriormente com um segundo lote de **3**. A reação se deu em 2 horas, assim como no primeiro experimento, porém o rendimento caiu para 8,6% (Esquema 12).



Esquema 12: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** usando **3** impuro.

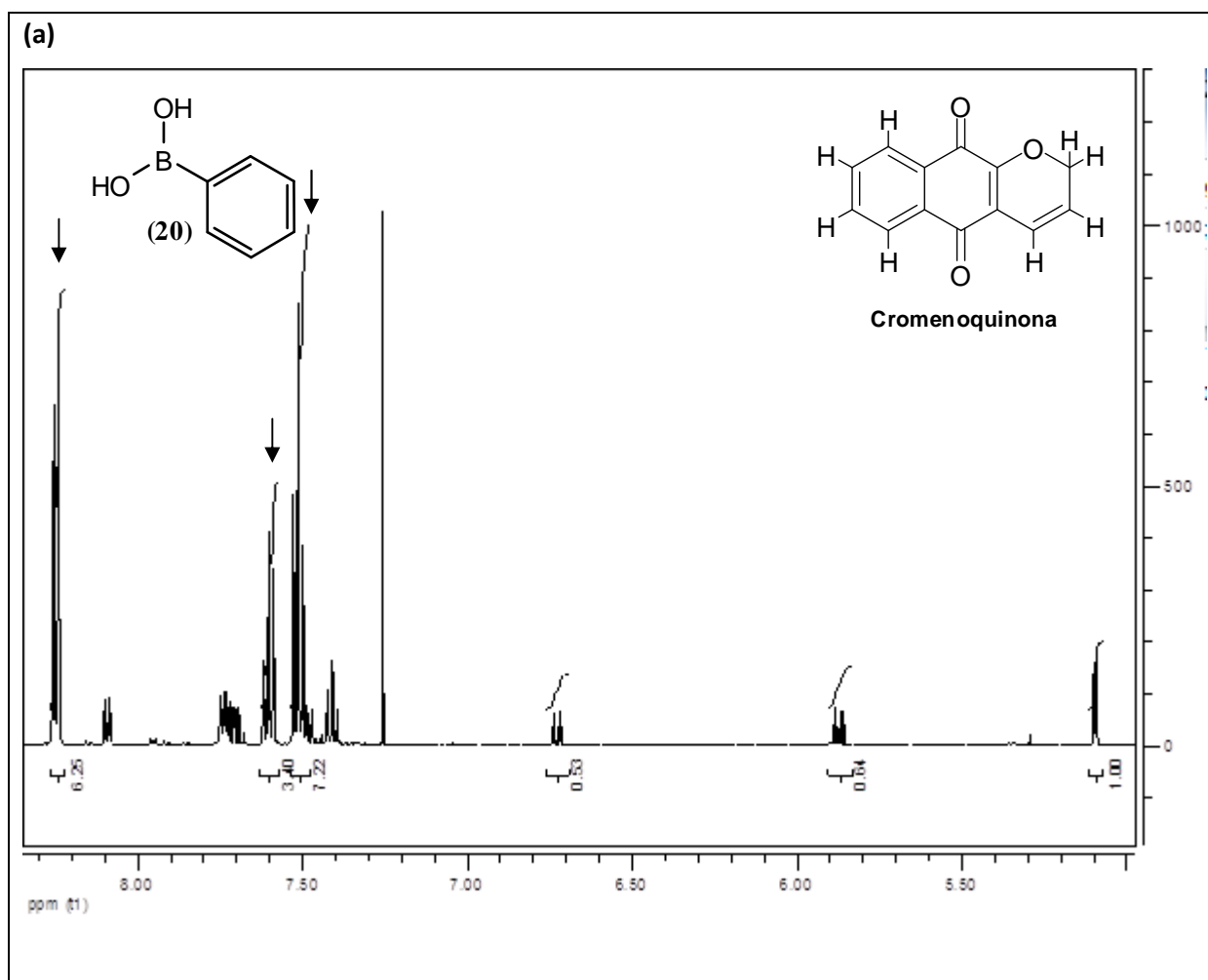
Foi observado que as reações de acoplamento (oxa-Heck) apresentaram variações bruscas de rendimentos, de 8,6% à 49,5%. Na tentativa de encontrar o fator variante foram feitas reações com critério de comparação, alterou-se o fabricante da base ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ), porém o rendimento continuou em torno de 8%, então se alterou o lote do **3** em uma nova tentativa, este foi purificado com maior cuidado, e desta vez foi necessário um tempo reacional de 6 horas em refluxo e o rendimento alcançado foi de 56,3% (Esquema 13).





Esquema 13: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** em acetona usando **3** puro.

Ao fazer a observação comparativa dos lotes de **3** foi visto que o lote do experimento de 8,62% continha algumas partículas esbranquiçadas, foi analisado em RMN <sup>1</sup>H e detectado presença de ácido fenilborônico que por sua vez poderia estar interferindo na reação de oxa-Heck. A Figura 5a apresenta o espectro de RMN<sup>1</sup>H de **3** impuro e a 5b apresenta o espectro do ácido fenil borônico (**20**) assim pode-se comparar os dados e observar a presença de contaminação.



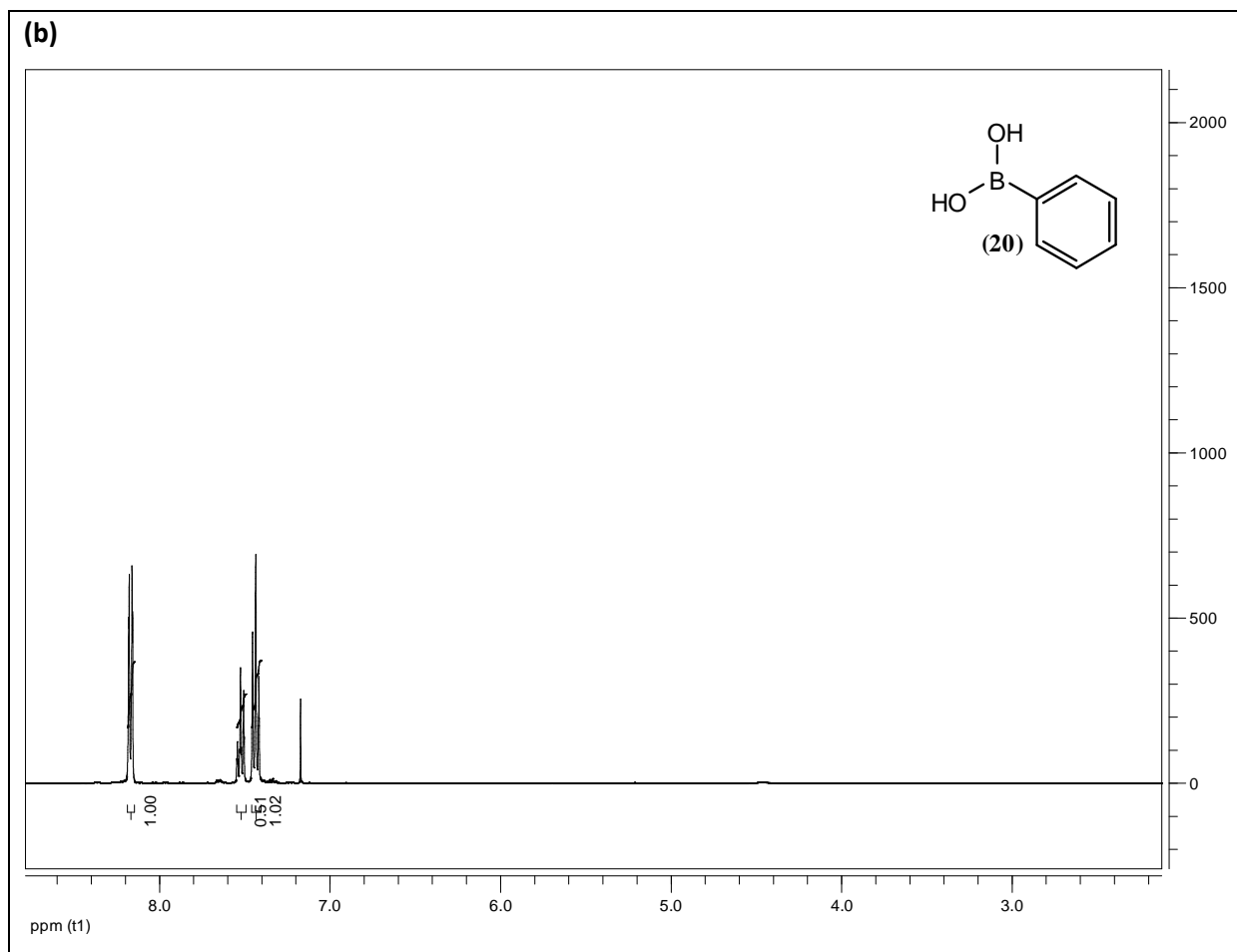
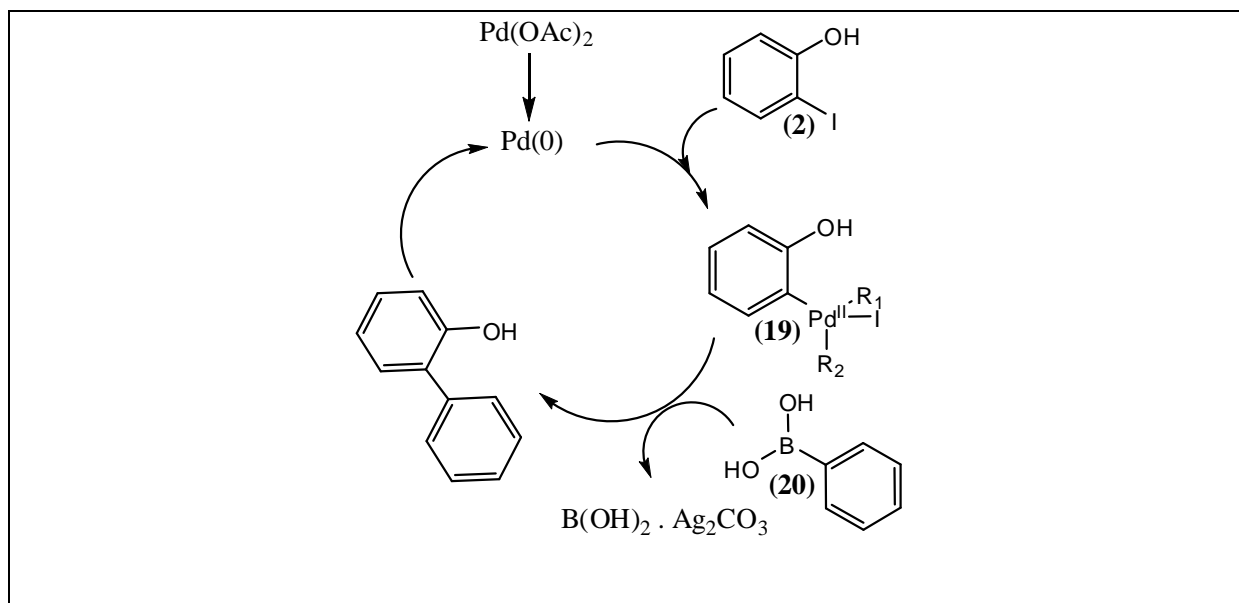


Figura 5: Espectro de RMN $^1\text{H}$  de **3** impuro (a) e espectro do ácido fenilborônico (20) (b).

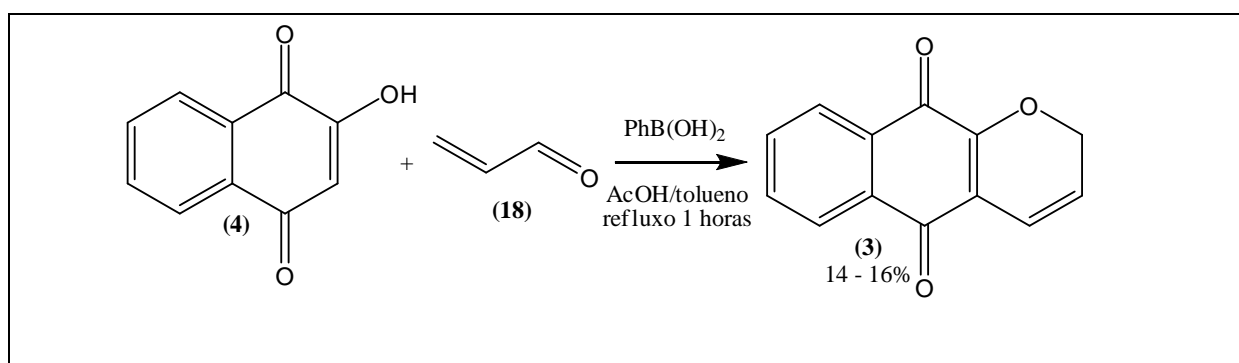
Através da integração dos sinais do espectro 5a pôde-se observar que no produto impuro havia maior quantidade de ácido fenilborônico (20) do que cromenoquinona (3).

Uma proposta para a interferência do excesso do ácido fenilborônico (20) no rendimento final da reação de oxa-Heck seria a reação do mesmo com o organo-paládio (19) formado na reação de acoplamento para obtenção de **1** através de uma possível reação de Suzuki que consiste em acoplamento cruzado de boranos ou ácidos borônicos e ésteres com haletos orgânicos ou sais de diazônio (Miyaura e colaboradores, 1995), o Esquema 14 apresenta uma proposta mecanística para esta possível interferência.



Esquema 14: Proposta mecanística da interferência do ácido fenilborônico na reação de oxa-Heck através da reação de Suzuki.

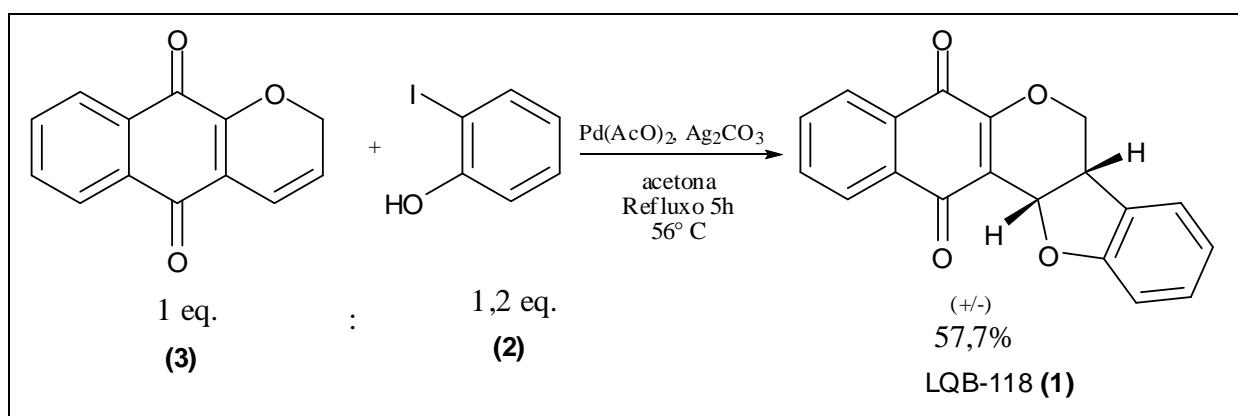
Os resultados destas reações mostram que o cromenoquinona (**3**) é crítico, pois devido sua instabilidade após algum tempo de estocagem o mesmo se decompõe e para se obter um produto com grau de pureza satisfatório é necessário o uso de grande quantidade de eluente na coluna cromatográfica (1,5 L de uma mistura de Hex:AcOEt 5% para 1 g de **3** bruto), o rendimento alcançável é muito baixo, varia de 14 a 16% (Esquema 15) e a quantidade de produto que se perde na coluna devido a dificuldade da separação do ácido fenil borônico é muito grande, portanto a síntese e purificação do **3** ainda é uma limitação para a síntese da LQB-118 (**1**).



Esquema 15: Representação da síntese do cromenoquinona (**3**) com elevado padrão de pureza.

Foi feita outra reação de oxa-Heck (Esquema 16) nas mesmas condições apresentadas no Esquema 11, porém desta vez utilizando o cromenoquinona puro (Figura 6), o

acompanhamento de hora em hora foi feito por CCD, observou-se que a reação terminou em 5 horas e após purificação do produto obteve-se o rendimento de 57,7% (Esquema 16).



Esquema 16: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** em acetona usando **3** com elevado padrão de pureza.

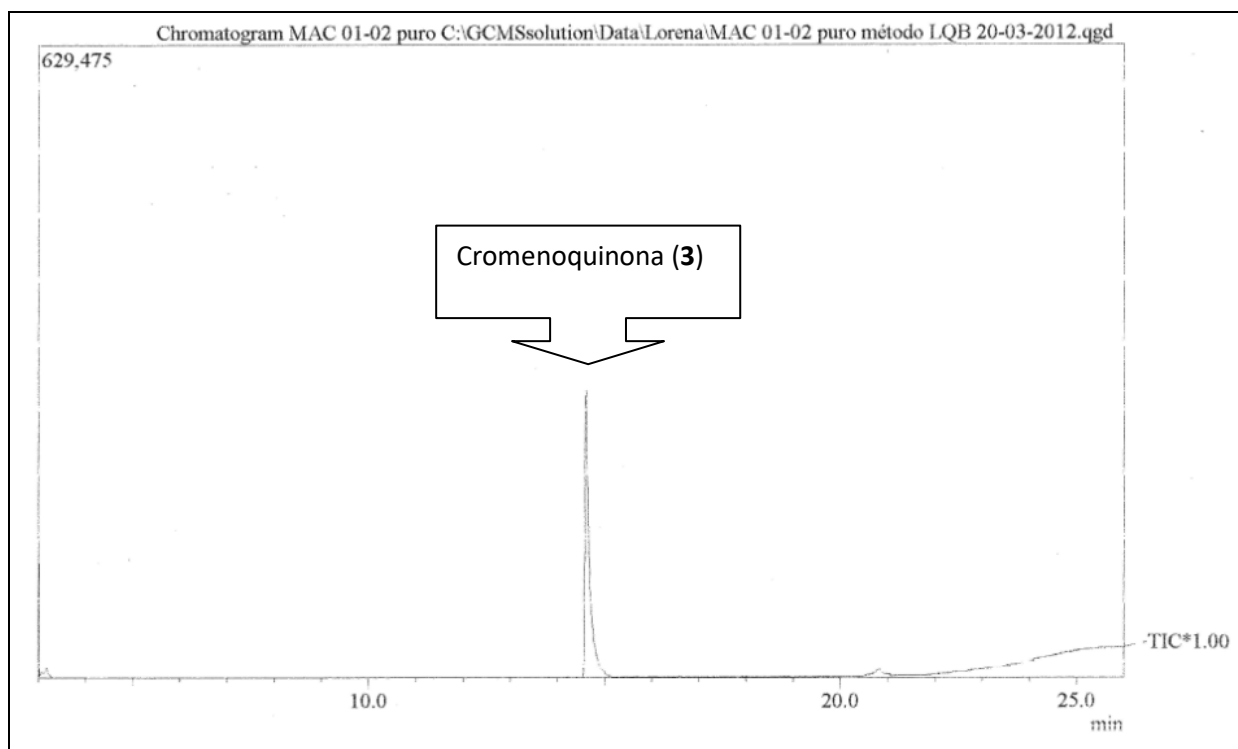
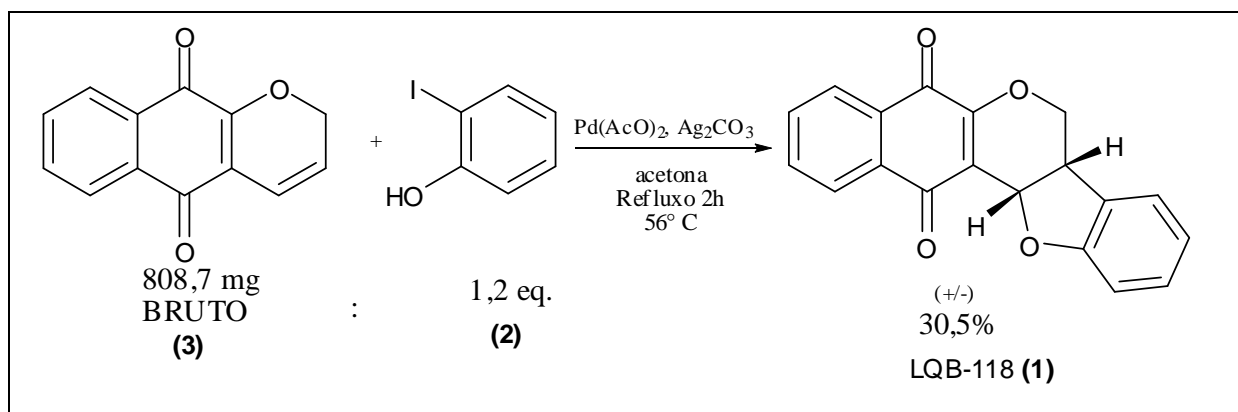


Figura 6: Cromatograma de **3** puro.

A atual metodologia de purificação envolve submeter o material bruto reacional em coluna cromatográfica. Apesar de eficiente, este método consome grande quantidade de eluentes e tem longa duração.

Uma reação de oxa-Heck foi feita usando o **3** bruto, em acetona, na tentativa de reduzir os gastos com solventes na coluna cromatográfica, após 2 h em refluxo a reação terminou, porém para a purificação da **1** foi necessário gasto maior com solvente em comparação com

a reação que utiliza **3** puro e o rendimento caiu consideravelmente (30,57% - Esquema 17 – Figura 7).



Esquema 17: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** em acetona usando **3** bruto.

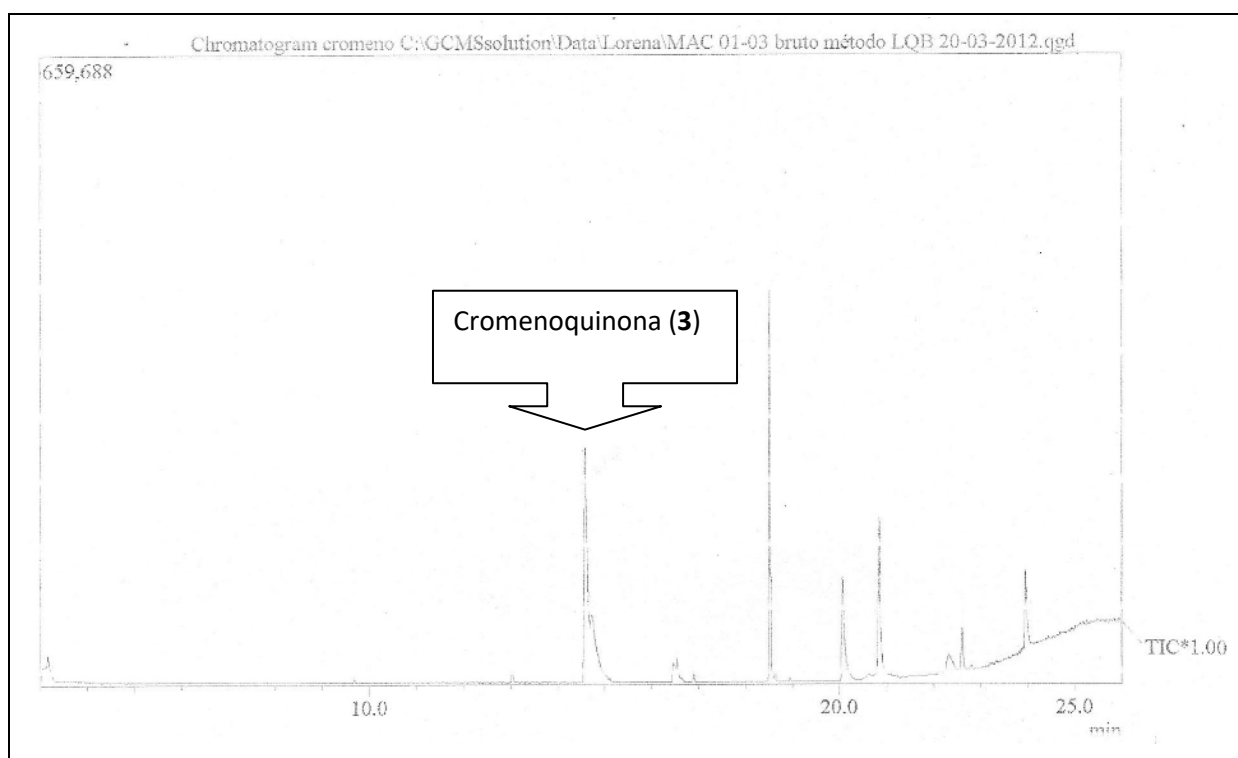
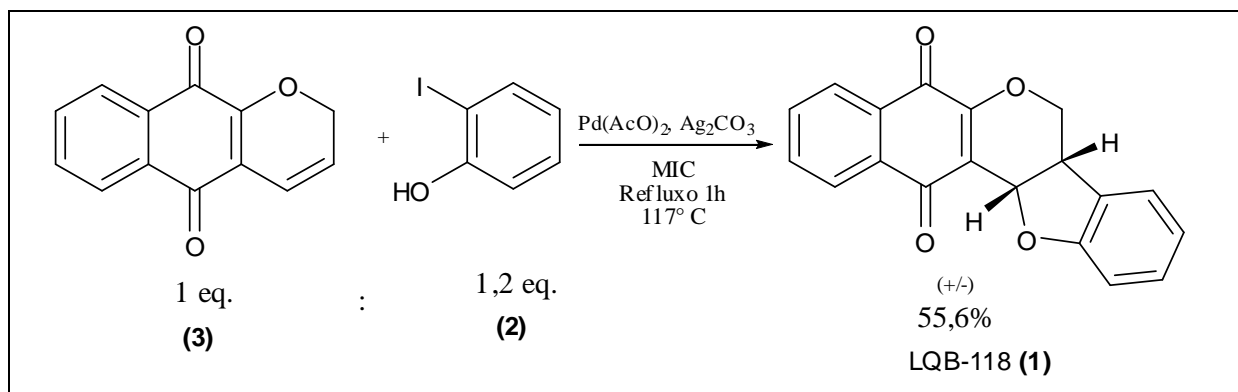


Figura 7: Cromatograma de **3** bruto.

Outro estudo foi feito para tentar reduzir o tempo reacional usando como solvente a metil-isobutilcetona (MIC) que tem ponto de ebulição mais alto que a acetona, 116,2° C, portanto possibilitou a realização da reação numa temperatura mais elevada, desta forma em apenas 1 hora o **3** foi totalmente consumido e o rendimento alcançado foi de 55,6% (Esquema 18).



Esquema 18: Reação de oxa-Heck para obtenção de **1** em MIC.

Os resultados obtidos nas reações com melhores rendimentos estão expressos na Tabela 6, entrada 1, que representa as condições reacionais do Esquema 17 e entrada 2 o Esquema 18, o decaimento do rendimento não se mostrou significativo sendo considerados equivalentes.

Tabela 6: Condições reacionais para síntese da LQB-118 (**1**).

ENTRADA	<b>2</b>	<b>3</b>	Ag <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Pd(AcO) <sub>2</sub>	SOLV.	TEMP.	TEMPO	REND.
1	1,2 eq.	1 eq.	3 eq	10mol%	Acetona	56°C	5 h	57,7 %
2	1,2 eq.	1 eq.	3 eq	10 mol%	MIC*	117°C	1 h	55,6 %

\*MIC: Metil-isobutilcetona

Após purificação por cromatografia em coluna cromatográfica, o produto foi submetido à análise pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear de H<sup>1</sup> apresentando os sinais característicos de um esqueleto pterocarpânico (seção de espectros). O hidrogênio 6a se apresenta como um multipeto devido ao seu acoplamento com seus 3 hidrogênios vizinhos com três constantes de acoplamento diferentes. O hidrogênio 11a é caracterizado por um dubleto (6,69 Hz) pois faz acoplamento com o hidrogênio 6a. Já os dois hidrogênios chamados de 6 se apresentam como um duplo-dubleto (11,08 e 5,03 Hz) e tripleto (11,08 Hz). Apesar de serem átomos de hidrogênio geminais, eles estão em ambientes químicos diferentes justificando deste modo os deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos distintos (Figura 8).

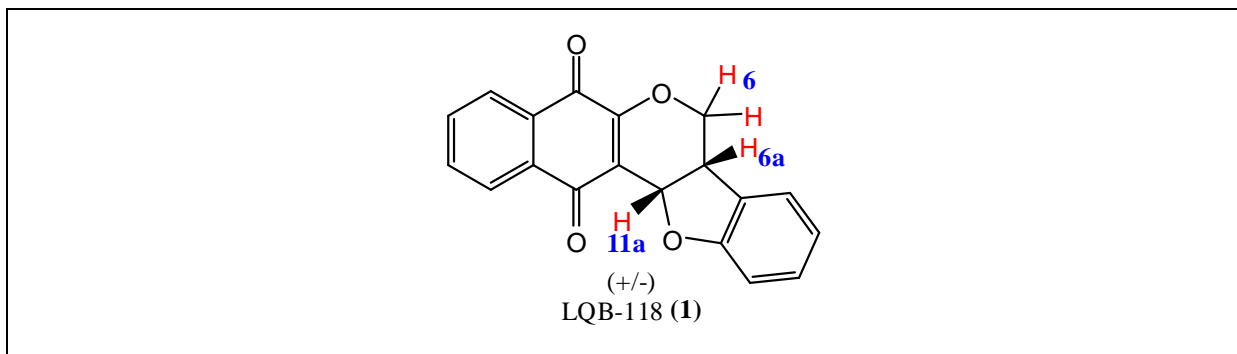


Figura 8: Representação dos hidrogênios característicos da LQB-118 (1).

Neste trabalho, a síntese da LQB-118 (1) foi otimizada a partir da troca de solvente e utilização de um cromenoquinona (3) puro, onde com o aumento da temperatura foi possível reduzir o tempo da reação e na ausência de excessos de ácido fenil borônico foi possível a obtenção de rendimentos mais elevados quando comparados com os resultados de Netto (2007).

Ainda em comparação com os resultados de Netto (2007), conseguiu-se realizar a síntese do cromenoquinona (3) utilizando quantidade quase 7 vezes menor de acroleína (resultados não apresentados), que é um reagente de elevado custo e controlado pelo Exército, e as reações de oxa-Heck foram concentradas, usando menores quantidades de solvente de 50 para 18 mL na escala de 0,5 mmol do cromeno.

## **Conclusões**

Os estudos realizados geraram um grande avanço nas reações de oxa-Heck visto que o tempo de reação reduziu de 32 h com utilização de  $P(Ph)_3$  para 1h sem o ligante apenas fazendo alteração do solvente, além disso o rendimento foi de 41% para 55,66%.

Mais estudos estão sendo realizados para ver a possibilidade de síntese em larga escala, o ajuste no tempo reacional está em andamento, reações de acoplamento utilizando outros catalisadores serão estudadas e serão testados a redução da quantidade de  $Ag_2CO_3$  já que é um reagente com preço elevado, assim reduziria o custo da reação. Além disso se faz necessário testes utilizando solventes com maiores pontos de ebulição, haja visto que o tempo reacional com a acetona ( $56^\circ C$ ) é de 5 h, já com a MIC ( $116,2^\circ C$ ) é de apenas 1 h.

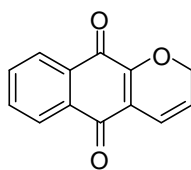


## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foram realizados estudos com outras condições reacionais usando polietilenoglicóis e obtivemos excelentes resultados para a reação de oxa-Heck para formação da LQB-118 (**1**), estes resultados serão incluídos na patente já existente, portanto achamos prudente não mostrarmos estes resultados neste trabalho.

## SEÇÃO EXPERIMENTAL

### Síntese da cromenoquinona (3)

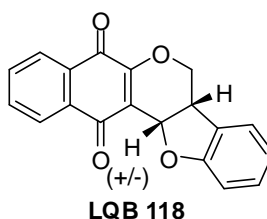


Chemical Formula: C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>  
Exact Mass: 212

Uma solução de lausona (1,0 g; 5,74 mmol), acroleína (2,00 mL; 28,34 mmol), ácido fenil borônico (0,74 g; 5,74 mmol) e ácido acético glacial (2,64 mL) em tolueno (20,0 mL) foi refluxada por 1 hora. A formação do produto foi monitorada por CCD. A mistura reacional foi concentrada a vácuo, dissolvida em acetato de etila, lavada sucessivamente com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de NaCl, seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o solvente evaporado. O material bruto foi purificado em coluna cromatográfica (AcOEt/Hexano 5:95) fornecendo um sólido vermelho (169,5 mg; 16% de rendimento), pf = 215–2170C.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 5,1 (dd; J = 3,5; 2,0 Hz; 2H); 5,87 (dt; J = 10,0; 3,5 Hz; 1H); 6,72 (dt; J = 10,0; 2,0 Hz; 1H); 7,48–8,27 (m, 4H).

### Síntese da LQB-118 (1) com acetona

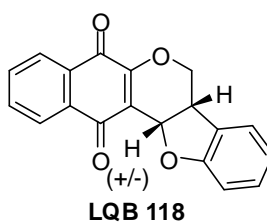


À uma solução em agitação do cromeno quinona (106,0 mg; 0,5 mmol) em acetona (18 mL), foram adicionados 132,0 mg (0,6 mmol) de o-iodofenol, 411 mg (1,5 mmol) de Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e 11,2 mg (0,05 mmol) de Pd(OAc)<sub>2</sub> (10 mol %). A mistura reacional foi refluxada por 5 h. Após este tempo, a análise por CCD indicou a formação de um produto ligeiramente mais polar que o cromenoquinona (3). A mistura reacional foi concentrada a vácuo, dissolvida em acetato de etila e filtrada em celite. Em seguida lavada com solução saturada de NaCl e seca sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório fornecendo 197,8 mg de um óleo de cor escura. O produto foi purificado por coluna cromatográfica

(AcOEt/Hexano 5:95; 1,7 L) fornecendo 87,7 mg; 0,36 mmol (57,7% de rendimento) de um sólido amarelo. pf: 145°C, m/z 304.

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ 7,36 (10H; m); 6,79 (1H; d; J= 8,61 Hz); 6,49 (1H; d; J= 2,84 Hz); 6,29 (1H; dd; J= 8,61; 2,84 Hz); 5,11 (2H; s); 5,06 (2H; s).

### Síntese da LQB-118 (1) com MIC



À uma solução em agitação do cromenoquinona (**3**) (106 mg; 0,5 mmol) em metil-isobutilcetona (11 mL), foram adicionados 132 mg (0,6 mmols) de o-iodofenol, 411 mg (1,5 mmols) de  $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ , e 11,2 mg (0,05 mmols) de  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (10 mol %). A mistura reacional foi refluxada por 1 h. Após este tempo, a análise por CCD indicou a formação de um produto ligeiramente mais polar que o **3**. A mistura reacional foi concentrada a vácuo, dissolvida em acetato de etila foi filtrada em celite. Em seguida lavada com solução saturada de NaCl e seca sob sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado em evaporador rotatório fornecendo 186,5 mg de um óleo de cor escura. O produto foi purificado por coluna cromatográfica (AcOEt/Hexano 5:95; 1,9 L) fornecendo 84,6 mg; 0,35 mmol (55,66% de rendimento) de um sólido amarelo. pf: 145°C, m/z 304.

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ 7,36 (10H; m); 6,79 (1H; d; J= 8,61 Hz); 6,49 (1H; d; J= 2,84 Hz); 6,29 (1H; dd; J= 8,61; 2,84 Hz); 5,11 (2H; s); 5,06 (2H; s).

## Referências bibliográficas

AMATORE, C.; JUTAND, A. Mechanistic and kinetic studies of palladium catalytic systems. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 576, n. 1 – 2, p. 254 - 278, 1999.

AMATORE, C.; JUTAND, A.; M'BARKI, M.A. Evidence of the formation of zerovalent palladium from Pd(OAc)<sub>2</sub> and triphenylphosphine. *Organometallics*, v. 11, n. 9, p. 3009 - 3013, 1992.

BACELAR, T. S., DA SILVA, A. J., COSTA, P. R. R., RUMJANEK, V. M. The pterocarpanquinone LQB 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. *Anti-Cancer Drugs*, v. 00, n. 00, p. 1 – 11, 2012.

BELESTSKAYA, I.P.; CHEPRAKOV, A. V. The Heck Reaction as a Sharpening Stone of Palladium Catalysis. *Chemical Reviews*, v. 100, n. 8, p. 3009 - 3066, 2000.

BELINSKY, M.; JAISWAL, A. K. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 12, n. 2, p. 103 - 117, 1993.

BRIMBLE, M. A.; NAIRNA, M. R. Reductive thioalkylation of a pyranonaphthoquinone. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, p. 317 - 322, 2000.

BUARQUE, C. D., PINHO, V. D., VAZ, B. G., EBERLIN, M. N., DA SILVA, A. J. M., COSTA, P. R. R., Palladium-catalyzed oxyarylation of olefins using silver carbonate as the base. Probing the mechanism by electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 695, p. 2062 – 2067, 2010.

BUARQUE, C. D.; MILITÃO, G. C.G.; LIMA, D. J. B.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R. Pterocarpanquinones, aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis, antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 6885 - 6891, 2011.

CHAUDHURI, S. K.; HUANG, L.; FULLAS, F.; BROWN, D. M.; WANI, M. C.; WALL, M. E.; TUCKER, J. C.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORN, A. D. Isolation and Structure Identification of an Active DNA Strand-Scission Agent, (+)-3,4-di-hydroxy-8,9-Methylenedioxypterocarpan. *J. Nat. Prod.*, v. 58, n. 12, p. 1966 - 1969, 1995.

COSTA, M. C. C. D. Aspectos farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): atividades antimicrobiana, citotóxica e antitumoral. *Tese de Doutorado* – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, p. 124, 2002.

CUNHA-JR., E. F., PACIENZA-LIMA, W., RIBEIRO, G. A., NETTO, C. D., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., DA SILVA, A. J. M., COSTA, P. R. R., ROSSI-BERGMANN, B., TORRES-SANTOS, E. C. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*, v. 66, p. 1555 – 1559, 2011.

DA SILVA, A. J. M., BUARQUE, C. D., BRITO, F. V., AURELIAN, L., MACEDO, L. F., MALKAS, L. H., HICKEY, R. J., LOPES, D. V. S., NOEL, F., MURAKAMI, Y. L. B., SILVA, N. M. V., MELO, P. A., CARUSO, R. R. B., CASTRO, N. G., COSTA, P. R. R. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New (+/-) 1,4-Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 10, p. 2731 – 2738, 2002.

DA SILVA, A. J. M.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R. The first synthesis of (±)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan, an antitumoral agent and its coumestan derivative. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 15, n. 6, p. 979 - 981, 2004.

DA SILVA, M. N., F; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados; *Quim. Nova*, v. 26, n. 3, p. 407 - 416, 2003.

DE MEIJERE, A.; MEYER, F.E. Fine Feathers Make Fine Birds: The Heck Reaction in Modern Garb. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 33 (23-24), p. 2379 - 2411, 1995.

DE SOUZA, P. P. Naftoquinonas Naturais a partir do Lapachol e seu epóxido – Ciclização Eletrofílica com sais de tálio III e abertura do epóxido em meio básico. *Dissertação de Mestrado* – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ, p. 7, 2007.

DIEDERICH, F.; STANG, P. J. *Book review: Metal-catalyzed cross-coupling reactions*. Ed.1, New York: Wiley-VCH, Weinheim, v. 12, n. 12, p. 878, 1998.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. NAD(P)H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidante enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. *Arch Biochem Biophys*, v. 501, p. 116–123, 2010.

HERRMANN, W. A.; BOHM, V. P. W.; REISINGER, C-P. Introduction to Homogeneous Catalysis: Carbon-Carbon Bond Formation Catalyzed by a Defined Palladium Complex. *Journal of Chemical Education*, v. 77, n. 1, p. 92, 2000.

KISS, L.; KURTAN, T.; ANTUS, S.; BRUNNER, H. Further insight into the mechanism of Heck oxyarylation in the presence of chiral ligands. *Arkivoc*, p. 69 – 76, 2003.

KNOWLES, J.P.; WHITING, A. The Heck-Mizoroki cross-coupling reaction: a mechanistic perspective. *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 31 – 44, 2007.

LAROCK, R. C.; YANG, H.; PACE, P.; NARAYANAN, K.; RUSSELL, C. E.; CACCHI, S.; FABRIZI, G. Synthesis of oxygen heterocycles via Pd-catalyzed cross-coupling of unsaturated phenols and vinylic halides or triflates. *Tetrahedron*, v. 54, p. 7343 – 7356, 1998.

MAIA, R. C., VASCONCELOS, F. C., BACELAR, T. S., SALUSTIANO, E. J., AS SILVA, L. F. R., PEREIRA, D. L., MOELLMAN-COELHO, A., NETTO, C. D., DA SILVA, A. J., RUMJANEK, V. M., COSTA, P. R. R. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs*, v. 29 p. 1143 – 1155, 2011.

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chemical Review*, v. 95, n. 7, p. 2457 – 2483, 1995.

NEGISHI, E. A profile of Professor Richard F. Heck: Discovery of the Heck reaction. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 576, n. 1 - 2, p. XV-XVI, 1999.

NEGISHI, E. *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Synthesis*. v. 1 – 2, John Wiley & Sons, Inc. 3313, 2002.

NETTO, C. D. A Primeira Síntese do (+)-3,4-diidroxi-8,9-metilenodioxipterocarpano e seu derivado cumestano. *Dissertação de Mestrado* - Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2003.

NETTO, C. D. Síntese de Pterocarpanos e Pterocarpanoquinonas: Substâncias com Promissora Atividade Antineoplásica, Antimalárica e Antileishmanial. *Tese de Doutorado* – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 2007.

NETTO, C. D.; DA SILVA, A. J. M.; SALUSTIANO, E. J. S.; BACELAR, T. S.; RIÇA, I. G.; CAVALCANTE, M. C. M.; RUMJANEK, V. M.; COSTA, P. R. R. New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- $\alpha$  modulation in human PBMC cells. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 18, p. 1610 – 1616, 2010.

NETTO, C. D.; SANTOS, E. S. J.; CASTRO, C. P.; DA SILVA, A. J. M.; RUMJANEK, V. M.; COSTA, P. R. R. (+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: Cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 920 – 925, 2009.

PORTES, J. A.; NETTO, C. D.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; DAMATTA, R. A.; DOS SANTOS, T. A. T.; DE SOUZA W.; SEABRA, S. H. A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. *Veterinary Parasitology*, v. 186, n. 3 - 4, p. 261 – 269, 2012.

REIS, F. R. S., DE FARIA, F. C. C., CASTRO, C. P., DE SOUZA, P. S., VASCONCELOS, F. C., BELLO, R. D., DA SILVA, A. J., COSTA, P. R. R., MAIA, R. C. The Therapeutical Potential of a Novel Pterocarpanquinone LQB-118 to Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 13, p. 341 – 351, 2013.

RIBEIRO, G. A., CUNHA-JR., E. F., PINHEIRO, R. O., DA-SILVA, S. A. G., CANTO-CAVALHEIRO, M. M., DA SILVA, A. J. M., COSTA, P. R. R., NETTO, C. D., MELO, R. C. N., ALMEIDA-AMARAL, E. E., TORRES-SANTOS, E. C., LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother*, v. 68, p. 789 – 799, 2013.

SALUSTIANO, E. J. S. *Dissertação de Mestrado* – Instituto de Bioquímica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro, **2008**.

SALUSTIANO, E. J. S.; NETTO, C. D.; FERNANDES, R. F.; DA SILVA, A. J. M.; BACELAR, T. S.; CASTRO, C. P.; BUARQUE, C. D.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M.; COSTA, P. R. R. Comparison of cytotoxic effect of lapachol, alpha-lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest. New Drugs*, v. 28, p. 139 – 144, 2010.

SCHWARTZ, J.; LABINGER, J. A. Patterns in organometallic chemistry with application in organic synthesis. *Journal of Chemical Education*, v. 57, n. 3, p. 170 – 175, 1980.

SEN, N.; DAS, B. B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; TRIPATH, G.; BANDYOPADHYAY, S.; RAKSHIT, S.; SEN, T.; MAJUMDER, H. K. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ*, v. 11, p. 924 – 36, 2004.

SMITH, M. B. *Organic synthesis*. 1 ed. Mcgeaw-Hill International Editions, 1994.

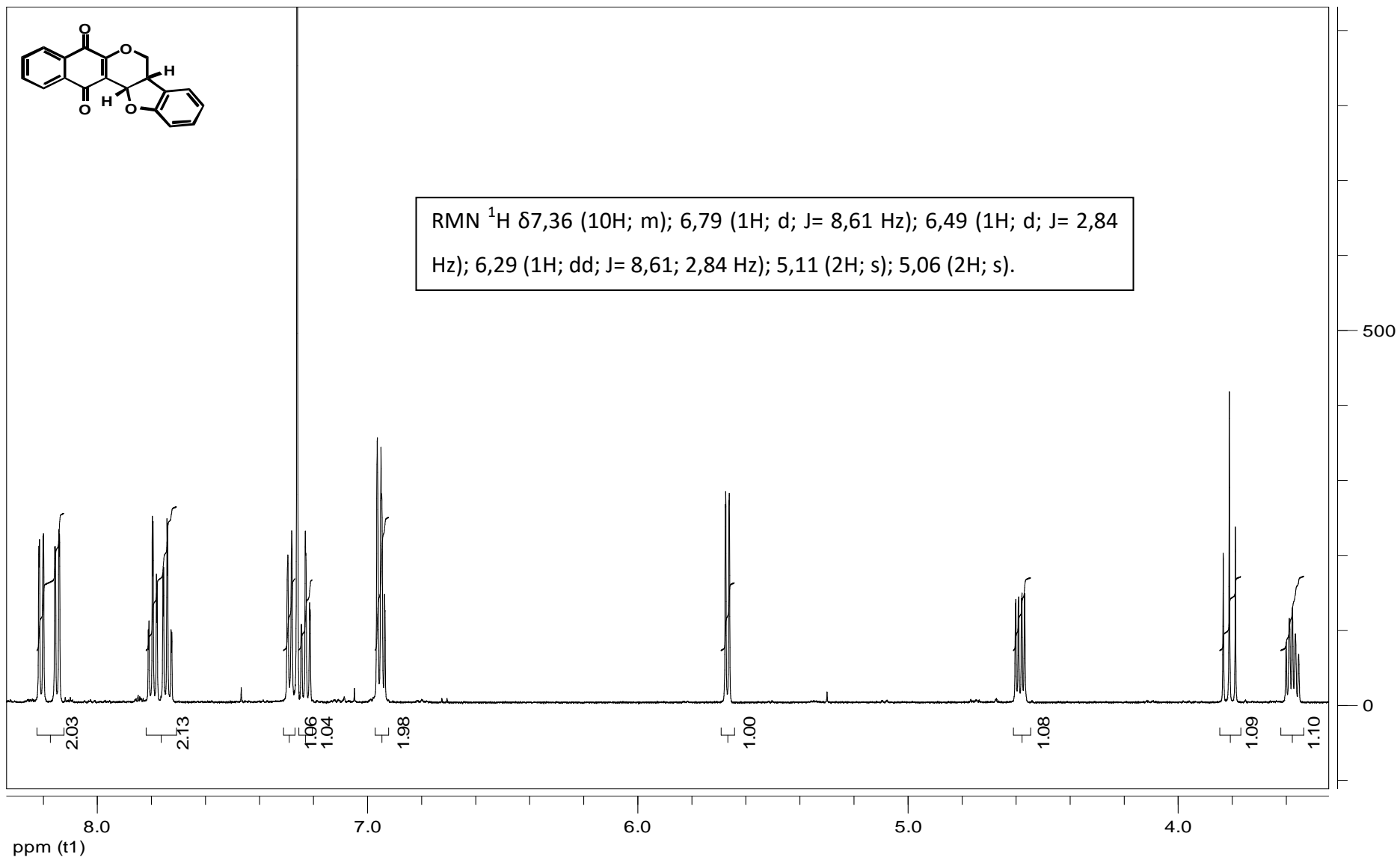
Sun S, Li W, Zhang H, Zha L, Xue Y, Wu X, et al. Requirement for store-operated calcium entry in sodium butyrate-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Biosci Rep*, v. 32, p. 83 - 90, 2011.

TSUJI, V. J. Palladium Reagents and Catalysts Innovations in Organic Synthesis. *JOHN WILEY & SONS*, 1995. v. 108, n. 18, p. 2291. September 1996.

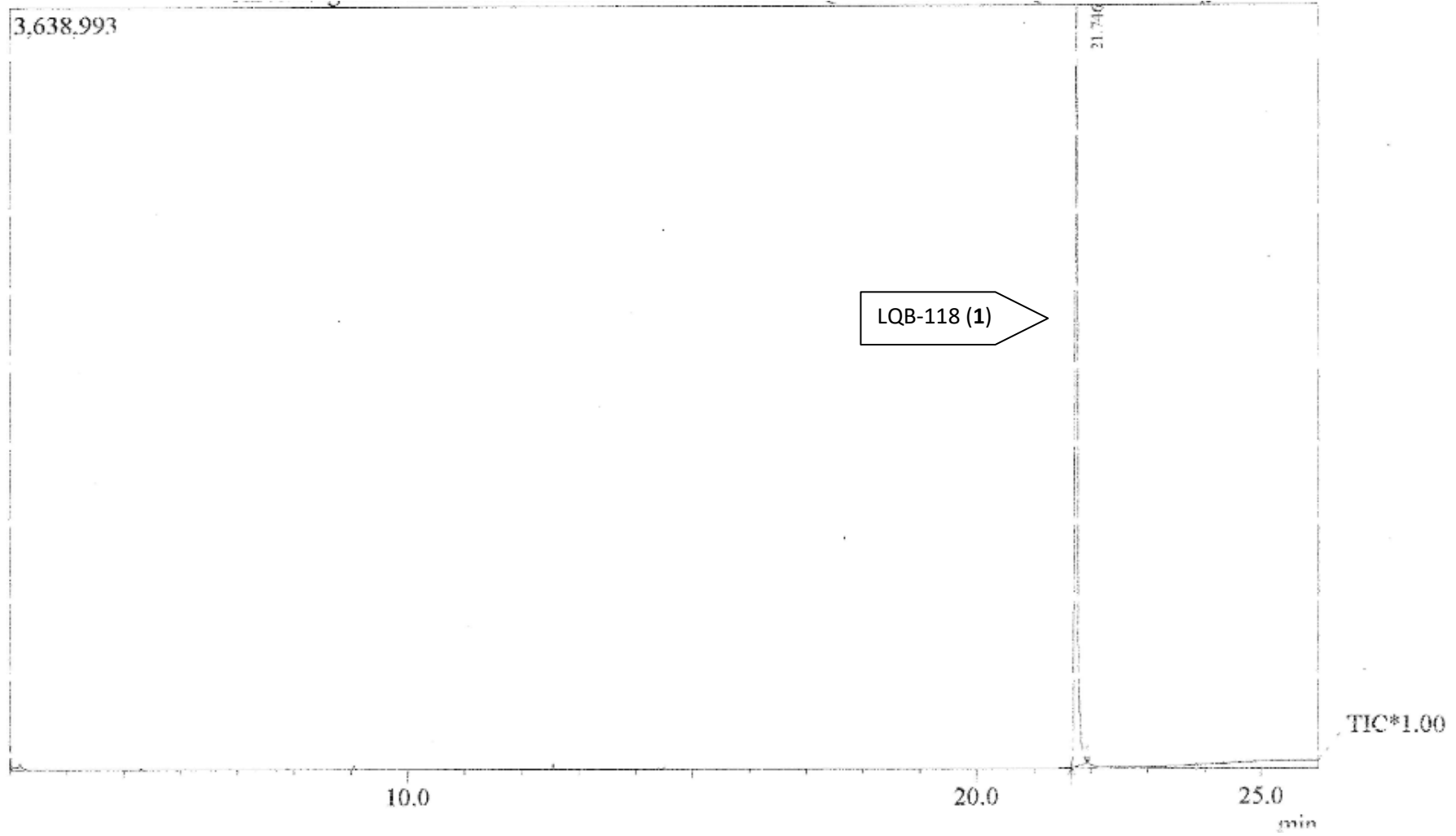


SEÇÃO DE ESPECTROS

Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da LQB-118 (1)



Cromatograma CG-MS da LQB-118 (1)



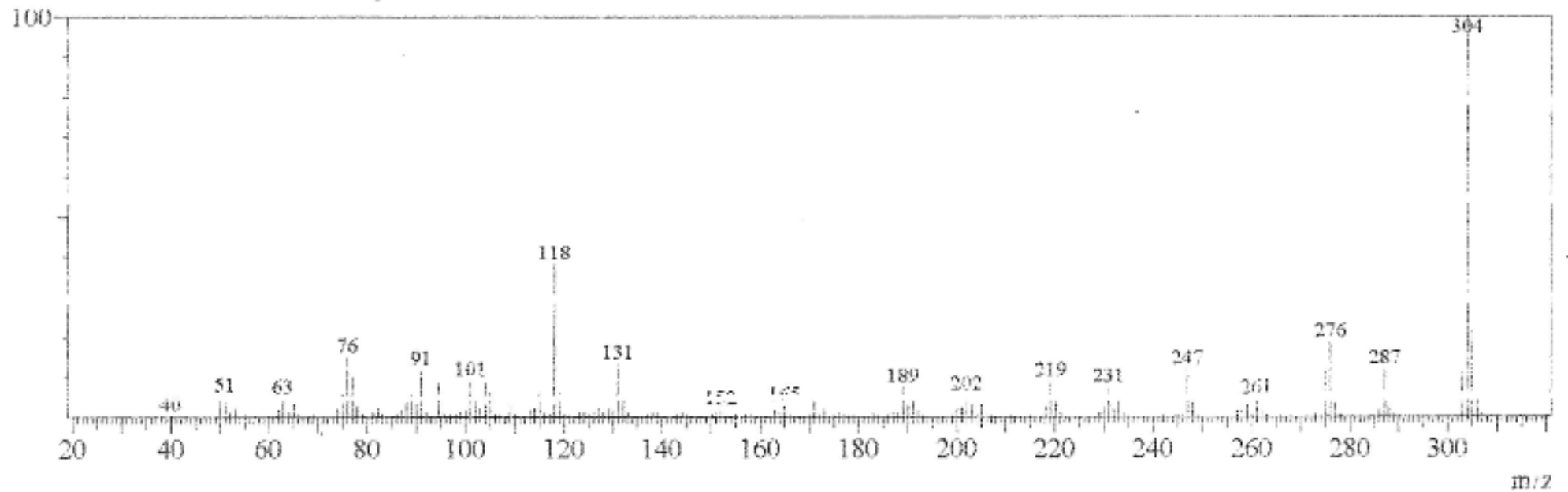
**Espectro MS da LQB-118 (1)**

Peak#:1 R.Time:21.7(Scan#:2251)

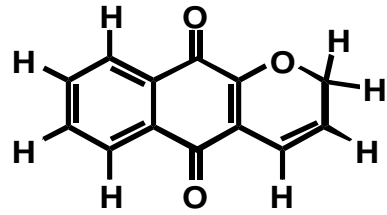
MassPeaks:179

RawMode:Averaged 21.7-21.8(2250-2252)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

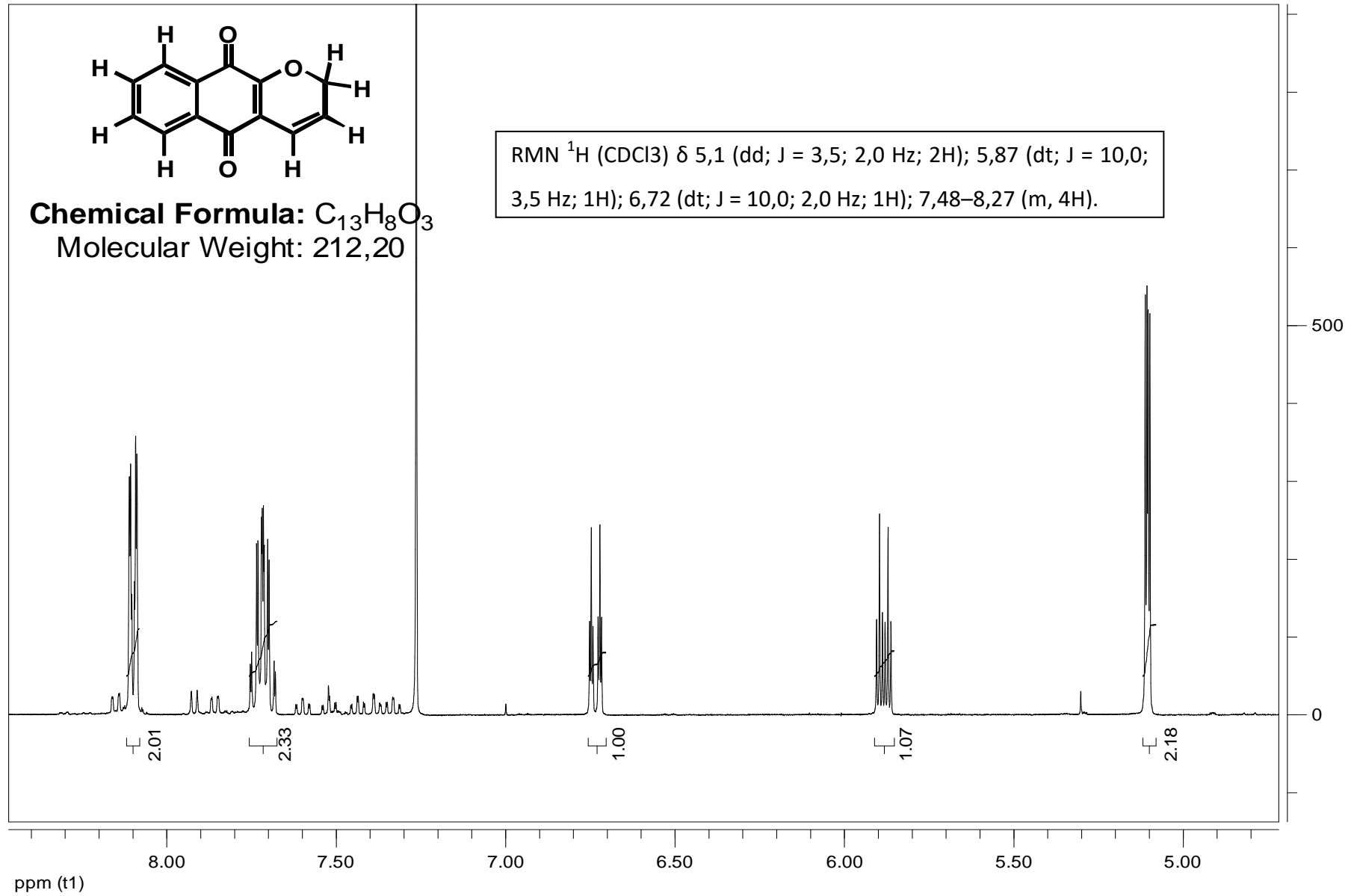


Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cromenoquinona (3)

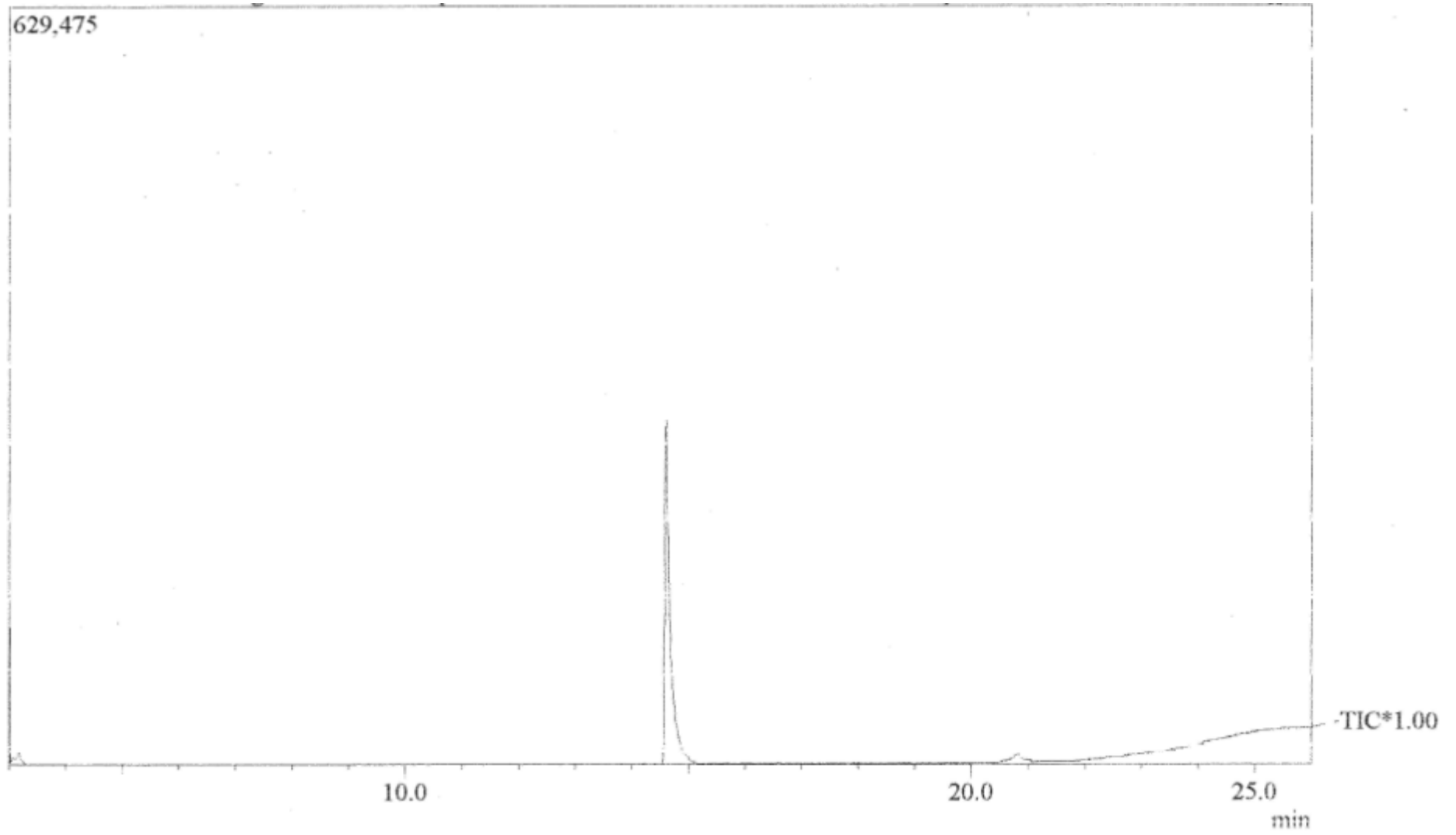


**Chemical Formula:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>  
**Molecular Weight:** 212,20

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ 5,1 (dd; J = 3,5; 2,0 Hz; 2H); 5,87 (dt; J = 10,0; 3,5 Hz; 1H); 6,72 (dt; J = 10,0; 2,0 Hz; 1H); 7,48–8,27 (m, 4H).



Cromatograma CG-MS dacromenoquinona (3)



### Espectro MS dacromenoquina (3)

