



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Maria Ester de Sá Barreto Barros

***Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade
Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da
Combretastatina A-4.***

Recife

2015

Maria Ester de Sá Barreto Barros*

***Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade
Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da
Combretastatina A-4.***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química (DQF-UFPE), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Química.

*Bolsista CNPq

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Menezes (DQF-UFPE)

Recife

2015

Catálogo na fonte
Bibliotecária Joana D'Arc Leão Salvador CRB 4-572

B277e Barros, Maria Ester de Sá Barreto.
Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)- massoiactona e da combretastatina A-4 / Maria Ester de Sá Barreto Barros. – 2015.
128 f.: fig., tab.

Orientador: Paulo Henrique Menezes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental. Recife, 2015.
Inclui referências e apêndice.

1. Química orgânica. 2. Compostos bioativos. 3. Boro. I. Menezes, Paulo Henrique (Orientador). II. Título.

547

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2016-45

MARIA ESTER DE SÁ BARRETO BARROS

Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovado em: 31/04/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Paulo Henrique Menezes da Silva (Orientador)
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ricardo Oliveira da Silva
Departamento de Química Fundamental
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Dimas José da Paz Lima
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas

Prof^o. Dr. José Maurício dos Santos Filho
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Sebastião José de Melo
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

*Ao meu marido, pais e irmãos, que
sempre apoiaram minha carreira
acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Agradecer é demonstrar gratidão com as pessoas que foram essenciais nesta caminhada. Assim, primeiramente agradeço aos meus pais por sempre se esforçarem para oferecer a mim e meus irmãos uma educação de qualidade que me permitiu chegar até aqui. Por sempre apoiarem as minhas decisões, e me darem suporte durante todo o período de estudos. Agradeço ao meu marido pelo companheirismo e apoio durante todos os anos de pós-graduação, e por compreender a minha ausência. Aos meus irmãos, por serem meus amigos presentes sempre levantando minha autoestima.

Agradeço ao meu orientador, Paulo Henrique Menezes da Silva, por me aceitar em seu laboratório durante estes sete anos. Obrigada por todos os ensinamentos, pelo esforço em tornar possível a realização deste trabalho, pela paciência e compreensão. A todos os alunos(as) que passaram pelo Laboratório de Orgânica Aplicada durante o período em que estive lá, obrigada pelo coleguismo e amizade. Agradeço principalmente a Juliano Carlo Rufino de Freitas, por toda colaboração estabelecida no laboratório e pela amizade que construímos nestes anos.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos, LMS e LESO, pelos empréstimos de materiais recorrentes, e pelas conversas amistosas. Agradeço principalmente a Denilson, Jadson, Pedro, Thiago e Gilson.

Aos amigos irmãos que a vida acadêmica me proporcionou: Jéssica, Diego, Dayvson e Luciana, muito obrigada por estarem ao meu lado e me apoiarem sempre.

Aos funcionários da Central Analítica, sempre dispostos a facilitar nossas pesquisas. Agradeço principalmente a Eliete e Abene, vocês são excelentes como pessoas e profissionais. Muito obrigada pelo apoio durante todos esses anos. À Patrícia e Maurílio, secretários da pós-graduação em química, obrigada por estarem sempre dispostos a resolver os problemas recorrentes.

Aos professores do DQF que contribuíram, direta e indiretamente, na minha formação acadêmica. Agradeço também aos colaboradores deste trabalho, professoras Gardênia e Terezinha, e o Dr. Carlos Henrique.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

*Cada pessoa deve trabalhar para o
seu aperfeiçoamento e, ao mesmo
tempo, participar da
responsabilidade coletiva por toda a
humanidade.”*

Marie Curie

*“Agradeço todas as dificuldades que
enfrentei; não fosse por elas, eu não
teria saído do lugar. As facilidades
nos impedem de caminhar. Mesmo
as críticas nos auxiliam muito.”*

Chico Xavier

*“Quem traz no corpo a marca Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria (...)
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida”*

Milton Nascimento

RESUMO

A primeira parte deste trabalho envolveu o estudo de *docking* molecular, a síntese, e a avaliação das atividades antitumorais e anti-inflamatórias de δ -lactonas α,β -insaturadas, análogos estruturais da (-)-Massoialactona, produto natural com conhecida atividade farmacológica. O alvo biológico selecionado para o estudo de *docking* foi a CRM-1, e tal estudo revelou o potencial biológico dos análogos propostos. Estes análogos foram sintetizados em rendimentos que variaram entre 65-75%, e as suas atividades antitumoral e anti-inflamatória foram avaliadas, sendo que um deles mostrou-se bastante promissor. Estudos posteriores de *docking* molecular da lactona mais promissora revelou que, apesar dos isômeros *R* e *S* assumirem diferentes encaixes no sítio ativo da CRM-1, não há diferença significativa na energia de ligação entre esses isômeros e o alvo molecular estudado. A segunda etapa deste trabalho envolveu o estudo de *docking* molecular, a síntese, e a avaliação da atividade antitumoral de *Z*-estilbenos, análogos da Combretastatina A-4 (CA-4). O alvo biológico selecionado para o estudo de *docking* molecular foi o domínio da colchicina na tubulina. Os cálculos teóricos dos análogos estruturais propostos revelaram que seis desses compostos apresentam diferenças significativas nos valores de energia de ligação quando comparados com o valor teórico calculado para a CA-4, ou seja, teoricamente seriam mais ativos que o produto natural. Dos análogos selecionados a partir do *docking* molecular, dois foram sintetizados em bons rendimentos empregando-se como precursores teluretos vinílicos e organotrifluoroboratos de potássio. A posterior avaliação da atividade antitumoral dos compostos sintetizados revelou que os resultados obtidos estavam em concordância com o previsto no estudo teórico.

Palavras chave: *Docking* molecular, Atividade antitumoral, δ -lactonas α,β -insaturadas, Combretastatina A-4, *Z*-estilbenos.

ABSTRACT

The first part of this work involved the study of molecular docking, synthesis, and the evaluation of anti-tumor and anti-inflammatory activities of α,β -unsaturated δ -lactones, structural analogues of (-)-Massoialactone, a natural product with known pharmacological activity. The biological target selected for the docking study was the CRM-1 and this study revealed the biological potential of the proposed analogues. These analogues were synthesized in yields ranging from 65-75%, and its anti-tumor and anti-inflammatory activities were evaluated, being one of them very promising. Further studies of molecular docking using the most promising lactone revealed that despite the *R* and *S* isomers take different fittings in the active site of CRM-1, there is no significant difference in binding energy between these isomers and the molecular target studied. The second step of this work involved the study of molecular docking, synthesis, and evaluation of antitumor activity of *Z*-stilbenes, analogues of combretastatin A-4. The biological target selected for the study of molecular docking was the domain of colchicine in tubulin. Theoretical calculations of the proposed structural analogues revealed that six of these compounds shown significant differences in binding energy values compared to the theoretical values calculated for the CA-4, ie, theoretically, the proposed compounds would be more active than the natural product. From the selected analogs proposed by molecular docking, two were synthesized in good yields employing vinyl tellurides and potassium organotrifluoroborates as precursors. Further evaluation of the antitumor activity of the synthesized compounds showed that the results were in agreement with the theoretical study.

Key-words: Molecular docking, Anti-tumoral activity, α,β -unsaturated δ -lactones, Combretastatin A-4, *Z*-stilbenes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Sendo, IND, investigação de um novo candidato a fármaco (da sigla inglesa, <i>investigational new drug</i>); ADME – Tox, propriedades farmacocinéticas/toxicidade: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção.	18
Figura 2: Produtos naturais que contém uma unidade δ -lactona α,β -insaturada.	21
Figura 3: Estratégia sintética empregada por Boger e colaboradores para a síntese da fostriecina.	22
Figura 4: Estratégia sintética empregada por O'Doherty e colaboradores para a síntese da fostriecina.	23
Figura 5: Estratégia sintética empregada por Ramachandran e colaboradores para a síntese da goniotalamina.	24
Figura 6: Estratégia sintética empregada por Yadav e colaboradores para a síntese da goniotalamina.	25
Figura 7: Estrutura química da leptomicina B.	28
Figura 8: Estratégia sintética para a preparação de δ -lactonas α,β -insaturadas.	30
Figura 9: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) dos teluretos obtidos de acordo com o Esquema 6.	31
Figura 10: Espectro RMN ¹²⁵ Te (94.6 MHz, CDCl ₃) dos teluretos obtidos de acordo com o Esquema 6.	32
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 5b .	33
Figura 12: Escala de Intensidade do Percentual de Inibição do Crescimento Celular (IC%).	35
Figura 13: Estruturas químicas dos isômeros R-5b e S-5b .	39
Figura 14: Interações moleculares entre a R-5b e a CRM-1.	39
Figura 15: Interações moleculares entre a S-5b e a CRM-1.	40
Figura 16: Estruturas químicas das combretastatinas obtidas a partir da <i>C. caffrum</i> e seus respectivos rendimentos de isolamento.	47
Figura 17: Estrutura da Combretastatina A-4.	48
Figura 18: Estrutura química da CA-4 e da CA-4P.	51

Figura 19: Identificação dos anéis A e B da CA-4.	51
Figura 20: Exemplos de análogos estruturais da CA-4 e seus respectivos valores de IC ₅₀ para a linhagem de células tumorais MCF-7.	53
Figura 21: Estruturas químicas da CA-4 e de seus análogos estruturais propostos.	57
Figura 22: Imagem ilustrativa do encaixe do composto 6f no sítio ativo da tubulina.	59
Figura 23: Designações anéis A e B dos Z-estilbenos.	59
Figura 24: Análise retrossintética proposta para obtenção dos Z estilbenos 6e-j .	64
Figura 25: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 7b .	65
Figura 26: Espectro de RMN ¹²⁵ Te (126 MHz, CDCl ₃) do composto 7b .	66
Figura 27: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 8d .	67
Figura 28: (a) espectro de RMN ¹⁹ F (376 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) e (b) ¹¹ B (128 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 8d .	67
Figura 29: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) do composto 6i .	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de energias de ligação obtidos para a (-)-massoialactona e seus análogos estruturais.	29
Tabela 2: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras e respectivo desvio (SD) em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL.	35
Tabela 3: Valores de IC ₅₀ para a (-)-massoialactona 1 e seus análogos 5a-e frente a cinco linhagens de células tumorais.	36
Tabela 4: Percentual de viabilidade celular de macrófagos murinos tratados com as δ-lactonas α,β-insaturadas 5b-e .	42
Tabela 5: Efeito das δ-lactonas α,β-insaturadas 5b e 5c sobre a produção de NO por macrófagos murinos estimulados com LPS.	43
Tabela 6: Efeito das δ-lactonas α,β-insaturadas 5b e 5c sobre os níveis de TNF-α em macrófagos murinos estimulados por LPS.	44
Tabela 7: Resultados obtidos no estudo de docking molecular para a CA-4 e seus análogos sugeridos 6a-k .	58
Tabela 8: Percentual de Inibição de Crescimento Celular (IC%) dos análogos 6a-d , 6f e 6i , em três linhagens de células tumorais na dose única de 25 µg/mL.	71
Tabela 9: Valores de IC ₅₀ obtidos para os Z estilbenos 6f e 6i frente a três linhagens de células tumorais.	72

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

HWE – Horner-Wadsworth-Emmons	sl – simpleto largo
CRM-1 – Região de Manutenção Cromossômica I	d – duplete
CA-4 – combretastatina A-4	dd – duplo duplete
RMN – Ressonância Magnética Nuclear	ddd – duplete de duplete de duplete
GC/MS – <i>Gas Chromatography/ Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrômetro de Massas)	t – tripleto
HRMS – <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrômetro de Massas de Alta Resolução)	dt – duplo tripleto
EI – <i>Electron impact</i> (Impacto de Elétrons)	q – quarteto
ESI – <i>Electron Spray Ionization</i> (Ionização por Spray de Elétrons)	qui – quinteto
IC₅₀ – Máxima concentração inibitória a 50% da população	sex – sexteto
$\Delta G_{\text{ligação}}$ – Variação da energia livre de ligação	m – multiplete
p.e. – Ponto de ebulição	MHz – Megahertz
p.f. – Ponto de fusão	LYS – Lisina
v_{max} – Estiramento máximo	CYS – Cisteína
δ – Deslocamento químico	MET – Metionina
J – Constante de acoplamento	MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolio
s – simpleto	TIPSCI – Cloreto de triisopropilsilano
	BAIB – bis-acetóxi-iodobenzeno
	TEMPO – 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-ilóxi

Sumário

Introdução	16
Capítulo 1: δ-Lactonas α,β Insaturadas	
1. Introdução	21
2. Objetivos	27
3. Resultados e Discussão	
3.1. <i>Docking</i> Molecular	28
3.2. Síntese dos Análogos Estruturais	30
3.3. Atividade Antitumoral	34
3.4. Atividade Anti-inflamatória	41
4. Conclusões	46
Capítulo 2: Z-Estilbenos	
1. Introdução	47
2. Objetivos	55
3. Resultados e Discussão	
3.1. <i>Docking</i> Molecular	56
3.2. Síntese dos Análogos Seleccionados	63
3.3. Atividade Antitumoral	70
4. Conclusões	73
5. Perspectivas	74
Capítulo 3: Procedimentos Experimentais	
1. Aspectos Gerais	75
2. δ -Lactonas α,β Insaturadas	
2.1. <i>Docking</i> Molecular	76
2.2. Sínteses	
2.2.1. Preparação do ditelureto de dibutila	77
2.2.2. Preparação do tri-isopropil(prop-2-iniloxi)-silano 3	77
2.2.3. Preparação do (Z)-(3-(butiltalanil)aliloxi)-tri-isopropil-silano 4	78
2.2.4. Procedimento geral para a síntese das δ -Lactonas α,β -Insaturadas 5a-e	79

2.3. Atividade Antitumoral_____	83
2.4. Atividade Anti-inflamatória_____	84
3. Z-Estilbenos	
3.1. Docking Molecular_____	85
3.2. Sínteses	
3.2.1. Síntese dos teluretos vinílicos 7a e 7b _____	86
3.2.2. Preparação do 3,4,5-trimetóxi-feniltifluoroborato de potássio 8a _____	88
3.2.3. Procedimento geral para a síntese dos organotrifluoroboratos de potássio 8b , 8d e 8e _____	89
3.2.4. Procedimento geral para a síntese dos organotrifluoroboratos de potássio 8c e 8f _____	90
3.2.5. Procedimento geral para a síntese dos estilbenos 6f e 6i _____	91
3.3. Atividade Antitumoral_____	93
Referências_____	94
Apêndice – Espectros Seleccionados_____	106

INTRODUÇÃO

Registros das primeiras civilizações que habitaram a terra já relatavam a utilização de fontes naturais como recurso terapêutico. A utilização das plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), a maconha (*Cannabis sativa*), a babosa (*Aloe vera*), na cura de doenças, inicialmente no Egito e depois em outras regiões do mundo foi o grande marco do desenvolvimento da terapêutica moderna. Porém, somente no século XIX, com o advento do isolamento do alcalóide morfina por Friedrich Sertuner (1806) foi iniciada a busca por princípios ativos de plantas, resultando nos primeiros medicamentos dos moldes atuais (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008).

O marco inicial da indústria farmacêutica mundial ocorreu em 1839 quando foi realizada a primeira modificação estrutural de um princípio ativo na busca por um melhor resultado terapêutico. A salicina, analgésico e antitérmico isolada do salgueiro-branco (*Salix alba*) por Rafaele Piria em 1829, foi modificada para o ácido salicílico, utilizado no tratamento de artrite reumatoide. Posteriormente, em 1897, Felix Hoffman sintetizou, a partir do ácido salicílico, o ácido acetil salicílico (aspirina), dando origem a famosa e poderosa indústria farmacêutica alemã, e a primeira patente a que se tem conhecimento nesta área (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008).

Um dos pesquisadores que mais colaborou para o desenvolvimento da indústria farmacêutica foi Paul Erlich, prêmio Nobel em 1908, que estabeleceu o conceito acerca do mecanismo de ação dos medicamentos (*Corpora Non Agunt Nisi Fixati* – uma substância química não é eficaz a menos que seja capaz de ligar-se a um sítio específico). Além disso, foi o responsável pela aplicação dos primeiros protocolos de avaliação da eficácia de um medicamento quando acompanhou os efeitos causados pelo Salvarsan, desenvolvido por ele a partir de modificações estruturais em compostos denominados arsenobenzenos, no tratamento da sífilis em clínicas da Alemanha (KAWANO, PEREIRA, *et al.*, 2006).

Com o advento das Guerras Mundiais e os avanços tecnológicos alcançados, a indústria farmacêutica obteve grande avanço em todo o mundo, e novos medicamentos foram desenvolvidos. Porém, a falta de fiscalização na aplicação dos mesmos levou a acidentes históricos, como a morte de mais de 100 crianças nos Estados Unidos por envenenamento após o uso de um elixir de sulfonamida que continha 72% de dietilenoglicol como veículo. Este caso resultou na elaboração dos princípios básicos dos testes clínicos para novos medicamentos por Ceiling e Cannon (1938) (KAWANO, PEREIRA, *et al.*, 2006). A partir de então, foram estabelecidos os conceitos sobre a utilização de voluntários em estudos clínicos, e criados os comitês de ética em pesquisa clínica.

Como resultado destas iniciativas foi criada, nos Estados Unidos, a FDA (Food and Drug Administration) que analisava os medicamentos quanto ao grau de pureza e padrão de qualidade. Posteriormente, a imperícia na utilização da talidomida, levou a FDA a estabelecer em 1962 que o fabricante de um novo medicamento deve provar não só sua eficácia, mas principalmente a sua segurança, antes de seu uso clínico ou de sua propaganda (TAVARES, 2009).

Estas catástrofes farmacêuticas foram responsáveis pela abordagem utilizada atualmente no desenvolvimento de um novo fármaco. Sendo assim, para que uma nova molécula, um fármaco em potencial, seja introduzida no mercado como um novo medicamento, são necessários de dez a quinze anos de pesquisas envolvendo profissionais de diversas áreas do conhecimento como biólogos, químicos, farmacêuticos, médicos, e investimentos que variam entre US\$ 500 milhões e US\$ 1 bilhão (TAVARES, 2009). Tais estudos são realizados para assegurar a população quanto ao uso de novos medicamentos, para evitar que novas catástrofes ocorram, e seguem as etapas descritas na Figura 1 abaixo.

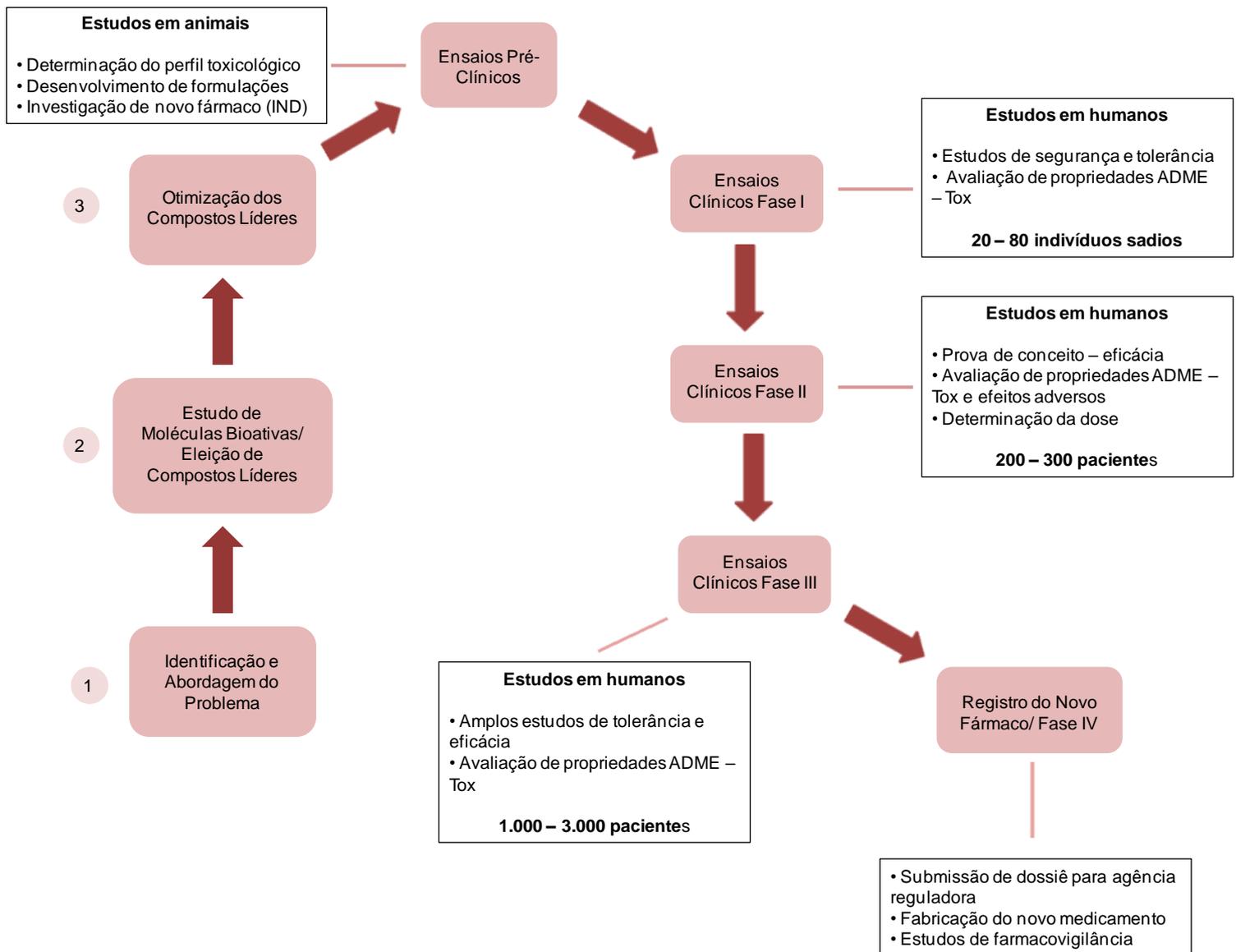


Figura 1: Etapas envolvidas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Sendo, IND, investigação de um novo candidato a fármaco (da sigla inglesa, *investigational new drug*); ADME – Tox, propriedades farmacocinéticas/toxicidade: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (DIAS, DESSOY, *et al.*, 2013).

Na figura acima, os itens numerados de 1 a 3 correspondem as seguintes atividades:

1 Um alvo molecular é eleito, e moléculas pequenas são avaliadas quanto suas capacidades de modular a atividade do alvo macromolecular selecionado. Tais moléculas bioativas são advindas de produtos naturais ou sintéticos e podem ser selecionadas a partir de triagens reais (*in vivo*) ou virtuais (*in silico*), ou ainda através de planejamento racional (GUIDO, OLIVA e ANDRICOPULO, 2012).

2 As moléculas que apresentam baixa afinidade com o alvo molecular são aperfeiçoadas para atender propriedades como toxicidade, afinidade, seletividade, absorção; e os compostos que melhor atendem as propriedades são eleitos como compostos líderes para etapas posteriores de otimização molecular (GUIDO, OLIVA e ANDRICOPULO, 2012).

3 Considerada como uma das etapas-chave do processo, os compostos líderes são avaliados quanto suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, com o objetivo de descobrir novas entidades químicas com elevado potencial de desenvolvimento clínico (GUIDO, OLIVA e ANDRICOPULO, 2012).

Nas três etapas descritas é possível inferir o uso de métodos computacionais na previsão de moléculas bioativas, no estudo da interação molécula e alvo molecular, no aperfeiçoamento da estrutura molecular de compostos com baixa afinidade, entre outros. Dentre os métodos computacionais utilizados como ferramentas no desenvolvimento de novos fármacos podemos citar o estudo das relações entre estrutura e atividade (SAR – *structure-activity relationships*), o estudo das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR – *quantitative structure-activity relationships*), e a investigação das possíveis orientações que uma determinada molécula pode assumir no interior do sítio ativo de um biorreceptor (*docking* molecular) (GUIDO, OLIVA e ANDRICOPULO, 2012).

No caso do *docking* molecular, possíveis moléculas bioativas são testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo. Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado. Dessa forma, a molécula que apresentar menor quantidade de energia necessária para se ligar ao sítio ativo, será aquela que, teoricamente, apresentará melhor resultado de atividade biológica.

Desse modo, esta ferramenta permite que diversas estruturas moleculares de possíveis compostos bioativos sejam testadas a fim de obter um *screening* virtual, em que aquelas que se apresentarem como mais promissoras passam para as etapas de síntese e avaliação de suas atividades biológicas, acelerando a fase inicial do desenvolvimento de um novo fármaco e evitando o trabalho desnecessário de síntese e avaliação biológica de estruturas não promissoras.

Sob este aspecto, tendo em vista que de cada 30.000 moléculas estudadas, 20.000 (66,7%) entram na fase de estudos pré-clínicos, 200 (0,67%) passam para a fase I de estudos clínicos, 40 (0,13%) entram na fase II, 12 (0,04%) seguem para a fase III, 09 (0,027%) são aprovadas pelos órgãos regulatórios, e apenas 01 (0,003%) satisfaz o mercado, trazendo retorno para a indústria que a desenvolveu, a busca por novos compostos bioativos nunca cessa (KAWANO, PEREIRA, *et al.*, 2006).

Assim, no presente trabalho foi desenvolvido um estudo multidisciplinar de possíveis moléculas bioativas pertencentes a duas classes de compostos, δ -lactonas α,β -insaturadas e *Z*-estilbenos. Foram sugeridos análogos estruturais de produtos naturais com atividades biológicas estabelecidas, que foram submetidos a um *screening* virtual, seguido da síntese e avaliação biológica dos compostos líderes.

Capítulo 1: δ -lactonas α,β -insaturadas

1. Introdução

Alguns produtos naturais com interesse medicinal isolados de diversas fontes apresentam como unidade estrutural uma δ -lactona α,β -insaturada. Esses compostos possuem diferentes complexidades estruturais, e apresentam grande variedade de atividades biológicas. Dentre eles, podem-se destacar a fostriecina, a citostatina, a leptomicina B, a goniotalamina e a massoiolactona (Figura 2).

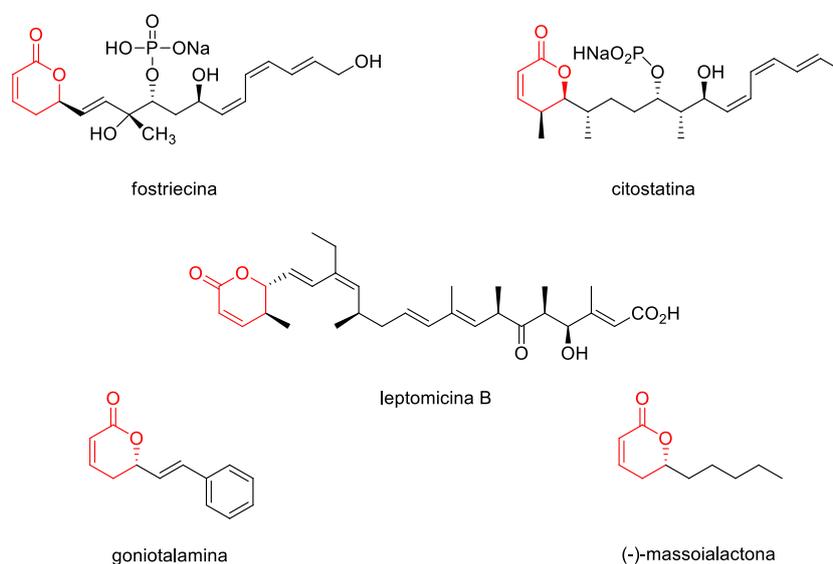


Figura 2: Produtos naturais que contém uma unidade δ -lactona α,β -insaturada.

Estudos de relação estrutura/atividade baseados nesses compostos revelaram que a unidade δ -lactona α,β -insaturada é uma parte importante nas diferentes atividades biológicas exibidas por eles, devido a ser um aceptor de Michael em potencial para os resíduos nucleofílicos de aminoácidos presentes em receptores naturais, permitindo que os mesmos se liguem a uma enzima alvo (KUMAR e NAIDU, 2006).

As fosfatases são enzimas que desempenham um papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos. Sua função é catalisar a desfosforilação de grupamentos hidroxila presentes na cadeia lateral de aminoácidos. A proteína-fosfatase 2A (PP2A) é a serina/treonina fosfatase

mais importante, e desempenha um papel relevante em diversas funções celulares, como o crescimento e mobilidade celular, e replicação. Devido a importância destes processos em diversas patologias e na tentativa de compreender os mecanismos nos quais a etapa de fosforilação pode afetar uma célula, surgiu a necessidade da busca e desenvolvimento de compostos que possam inibir seletivamente proteínas-fosfatase.

A Fostriecina foi isolada de subespécies de *Streptomyces pulveraceus* (TUNAC, GRAHAM e DOBSON, 1983) e demonstrou um elevado potencial de inibição das proteínas-fosfatase 1 (PP1), 2A (PP2A) e 4 (PP4) com valores de IC_{50} de 45 μ M, 1,5 nM e 3,0 nM, respectivamente (CHENG, BALCZON, *et al.*, 1998). Apesar destas características, fatores referentes a estabilidade fizeram com que os testes clínicos com a Fostriecina fossem somente até a Fase I (quando são realizados ensaios para estabelecer um programa de tratamento que possa vir a ser bem sucedido, e uma lista preliminar dos efeitos colaterais graves) (DE JONG, MULDER, *et al.*, 1999).

Diversos grupos, empregando as mais diferentes metodologias realizaram a síntese total da fostriecina (CHAVEZ e JACOBSEN, 2001), (WANG e KOBAYASHI, 2002), (TROST, FREDERIKSEN, *et al.*, 2005) e (SARKAR, WANZALA, *et al.*, 2009), sendo a primeira síntese realizada por Boger e colaboradores (BOGER, ICHIKAWA e ZHONG, 2001). A estratégia sintética empregada encontra-se resumida na Figura 3.

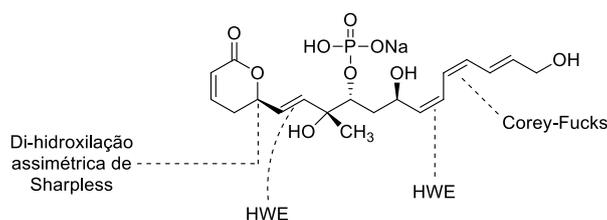


Figura 3: Estratégia sintética empregada por Boger e colaboradores para a síntese da fostriecina.

O produto natural desejado foi obtido em um baixo rendimento global após 25 etapas reacionais, confirmando a estereoquímica e configuração absoluta anteriormente atribuída ao produto natural.

Mais recentemente, O'Doherty e Gao realizaram a síntese da fostriecina em 24 etapas e em um rendimento global de 0,09%. A estratégia empregada é mostrada na Figura 4 (GAO e O'DOHERTY, 2010).

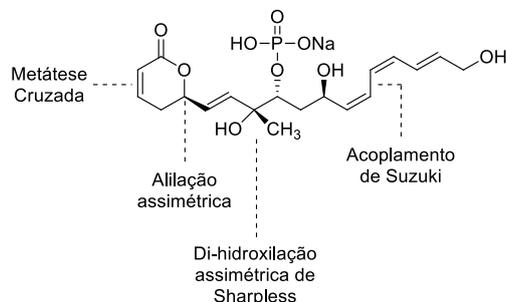


Figura 4: Estratégia sintética empregada por O'Doherty e colaboradores para a síntese da fostriecina.

Apesar de ser um produto natural com importante atividade biológica, os rendimentos globais apresentados nas sínteses totais descritas e a baixa estabilidade de sua estrutura observada nos testes clínicos, são pontos que estimulam a busca por outros produtos naturais de estrutura molecular mais simples que a fostriecina e que possam apresentar atividades biológicas iguais ou melhores que a mesma.

Neste contexto pode-se destacar a goniotalamina, um produto natural isolado de plantas do gênero *Cryptocarya* (Laureaceae) (CAVALHEIRO e YOSHIDA, 2000), *Bryonopsis* (Cucurbitaceae) (MOSADDIK, HAUGE e ERASHID, 2000) e *Goniothalamus* (Annonaceae) (JEWERS, DAVIS, *et al.*, 1972), (SAM, SEW-YEU, *et al.*, 1987) e (LAN, CHANG, *et al.*, 2003), e que possui diversas atividades biológicas como: atividade antimicrobiana (MOSADDIK e HAUGE, 2003); imunossupressora; anti-inflamatória (TANAKA, YOICHI, *et al.*, 2001); larvicida (KABIR, KHAN e MOSADDIK, 2003); além de citotoxicidade *in vitro* em diferentes linhagens de tumores, como carcinomas de mama, ovário, e leucemia, apresentando como mecanismo de ação a indução de apoptose (AZIMATHOL, *et al.*, 1998 e 2003).

Alguns mecanismos de ação podem ser descritos para agentes antitumorais, dentre eles: a morte celular por apoptose, também chamado de suicídio celular programado; mecanismo onde células desnecessárias ou defeituosas são eliminadas (KAUFMANN, 1997); e/ou a necrose (KERR,

WYLLIE e CURRIE, 1972), que tem a célula como vítima, onde o alvo principal são as organelas do citoplasma e o núcleo não sofre alterações significativas. Resumidamente, ao contrário do que ocorre na necrose, na apoptose a célula participa da sua própria destruição e este processo está intrinsecamente relacionado a substâncias químicas que possam desencadear o processo. Logo, ao apresentar tal característica, a síntese total da goniotalamina se torna interessante não somente pelo fato de ser uma molécula estruturalmente simples quando comparada com outros antitumorais, mas também por seu modo de atuação mais seletivo.

Desse modo, diversas estratégias sintéticas para a obtenção da goniotalamina foram descritas baseadas em reações envolvendo, por exemplo, enzimas ou microorganismos, reduções e adições assimétricas, e a utilização de substratos quirais (DE FÁTIMA, *et al.*, 2003 e 2005), (SABITHA, SUDHAKAR e YADAV, 2006) e (HARSH e O'DOHERTY, 2009).

Uma das primeiras sínteses descritas para a goniotalamina foi baseada em uma reação de alilação assimétrica empregando-se reagentes de boro (REDDY, BROWN e RAMACHANDRAN, 2001). O produto desejado foi obtido em um rendimento global de 42% após cinco etapas reacionais. A formação da δ -lactona α,β -insaturada foi realizada a partir da utilização de reagentes de Grubbs (Figura 5) (NGUYEN, *et al.*, 1992 e 1993).

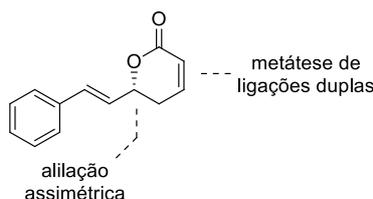


Figura 5: Estratégia sintética empregada por Ramachandran e colaboradores para a síntese da goniotalamina.

Mais recentemente, Yadav e colaboradores empregaram uma estratégia que envolveu uma reação do tipo aldol assimétrica para a introdução do centro estereogênico, além das reações de Horner–Wadsworth–Emmons e metátese de ligações duplas nas etapas principais (Figura 6) (YADAV, BHUNIA, *et al.*, 2013).

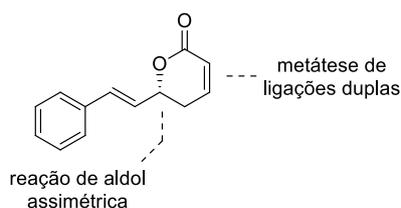


Figura 6: Estratégia sintética empregada por Yadav e colaboradores para a síntese da goniotalamina.

Empregando-se esta estratégia, a goniotalamina foi obtida em um rendimento global de 43% após cinco etapas reacionais. Vale salientar que estas cinco etapas não incluem a preparação dos precursores para a reação aldol assimétrica.

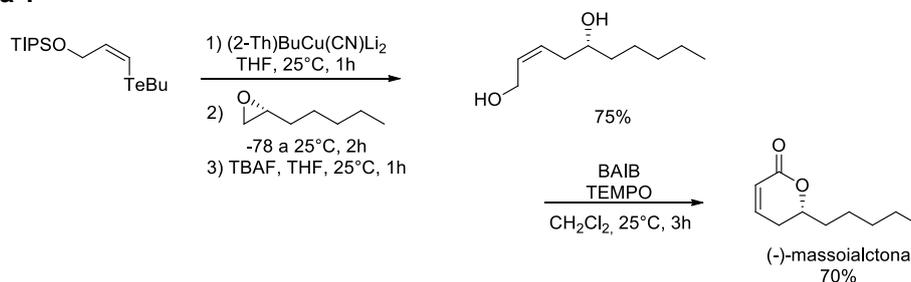
Dentro do contexto de busca por alvos sintéticos de estrutura molecular simples, nosso grupo de pesquisa demonstrou interesse na síntese da (-)-massoialactona, uma vez que possíveis atividades farmacológicas poderiam ser exibidas por este composto, pois o mesmo possui uma δ -lactona α,β -insaturada como unidade estrutural.

A massoialactona foi isolada pela primeira vez das cascas da planta *Cryptocarya massoy* através do processo de hidrodestilação (ABE, 1937). Posteriormente, a lactona foi identificada como componente do óleo essencial de *Magellanica Baccharis* (SIMONSEN, RIEDEL, *et al.*, 2009), *Isolona cooperi* (BOTI, KOUKOUA, *et al.*, 2005) e *Aeollanthus suaveolens* (LUPE, LEMES, *et al.*, 2007). Sendo que na última, a lactona atua como substância de defesa contra duas espécies de formigas do gênero *Camponotus* (LLOYD, SCHMUFF e HEFETZ, 1984) e (CAVILL, CLARK e WHITFIELD, 1968). A massoialactona demonstrou ainda causar irritação na pele e provocar paralisia sistólica nos músculos cardíacos de rãs. Mais recentemente, um grupo brasileiro descreveu o isolamento e o estudo da atividade antimicrobiana da massoialactona contra uma coleção de onze micro-organismos, incluindo sete bactérias e quatro leveduras (SIMIONATTO, PORTO, *et al.*, 2007).

A estratégia desenvolvida por nosso grupo baseou-se, diferentemente dos demais métodos para a síntese de uma δ -lactona α,β -insaturada que utilizam metátese de ligações duplas, na utilização de um telureto vinílico para

a introdução da dupla ligação com estereoquímica *Z* presente no produto natural (Esquema 1) (OLIVEIRA, FREITAS, *et al.*, 2011).

Esquema 1



Empregando-se esta estratégia, a (-)-massoialactona foi obtida em um rendimento global de 52%, sendo este o mais elevado até o momento descrito na literatura.

Com os exemplos citados até então, pode ser observado que a síntese de moléculas com estruturas relativamente simples é uma vertente importante na busca por compostos que possam reproduzir com sucesso os elementos essenciais responsáveis pela atividade biológica de produtos naturais mais complexos, como aqueles descritos na Figura 2. Sendo assim, o sucesso da estratégia sintética descrita no Esquema 1 motivou nosso grupo a realizar a síntese de análogos estruturais da (-)-massoialactona ainda mais simples, e que pudessem ser obtidos a partir de reagentes comerciais.

2. Objetivos

▪ **Objetivo Geral**

Aplicação de reagentes de telúrio na síntese de compostos com atividade biológica/ farmacológica.

▪ **Objetivos Específicos**

- i. Realizar estudo de *docking* molecular de análogos estruturais da (-)-massoialactona;
- ii. Sintetizar as δ -lactonas α,β -insaturadas sugeridas;
- iii. Submeter os compostos sintetizados a estudos de atividade antitumoral e anti-inflamatória.

3. Resultados e Discussão

3.1. Docking Molecular

A CRM-1, região de manutenção cromossômica I, é uma proteína de exportação nuclear responsável pelo transporte de um grande número de proteínas e alvos quimioterápicos (KALID, WARSHAVIAK, *et al.*, 2012). Esta característica faz com que a CRM-1 seja um dos alvos moleculares mais importantes no desenvolvimento de novos inibidores que possam reproduzir toxinas naturais como, por exemplo, a leptomicina B (Figura 7). Tal produto natural é um potente inibidor da exportação nuclear de proteínas, e seu modo de ação envolve sua ligação à CRM-1 através de sua porção δ -lactona α,β -insaturada (KUDO, WOLFF, *et al.*, 1998).

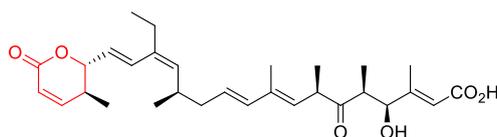
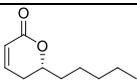
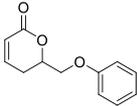
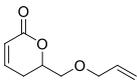
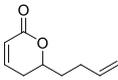
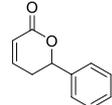


Figura 7: Estrutura química da leptomicina B.

Desse modo, a CRM-1 foi o alvo biológico escolhido para o estudo de *docking* molecular da (-)-massoialactona e de seus análogos estruturais propostos (**5a-e**). Para tanto, a estrutura da CRM-1 foi obtida do *Research Collaboratory of Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB 4HAT), e os cálculos foram realizados em colaboração com o Doutor Carlos Henrique B. da Cruz. Os resultados obtidos para as energias de ligação entre a (-)-massoialactona, e seus análogos estruturais, e a CRM-1 estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de energias de ligação obtidos para a (-)-massoialactona e seus análogos estruturais.

	Composto	$\Delta G_{\text{ligação}} \text{ calculado}$ (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{ligação}} \text{ análogo} - \Delta G_{\text{ligação}}(1)$ (kcal/mol)
1	1 	-6,42	-
2	5a 	-5,61	+0,81
3	5b 	-7,72	-1,30
4	5c 	-7,25	-0,83
5	5d 	-5,61	+0,81
6	5e 	-7,21	-0,79

Da Tabela 1, se os resultados obtidos para os compostos **1** e **5a** (linhas 1 e 2) forem comparados, observa-se que o encurtamento da cadeia alquílica lateral implica em um aumento da energia de ligação à CRM-1. Este dado sustenta a hipótese de que a cadeia lateral desempenha um fator importante no reconhecimento molecular. Além disso, a introdução de uma cadeia lateral insaturada (Tabela 1, linha 5) não causa nenhum efeito na energia de ligação. Contudo, a adição de um heteroátomo na cadeia lateral (Tabela 1, linha 4) aumenta a interação da molécula com o sítio ativo da CRM-1, e a energia de ligação diminui significativamente.

Quando a cadeia lateral é composta por um anel aromático, como pode ser observado nos compostos **5b** e **5e**, também se observa um aumento na interação das moléculas com o sítio ativo da CRM-1 causando uma diminuição na quantidade de energia necessária para ocorrer a ligação (Tabela 1, linhas 3 e 6).

Dentre os compostos analisados, o **5b** foi o que proporcionou um complexo CRM1/ lactona mais estável, apresentando energia de ligação igual a -7,72 kcal/mol.

A quantidade de energia necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo molecular reflete na atividade biológica desta molécula, pois quanto mais fácil for a interação entre o composto e o alvo, ou seja, quanto mais estável for o complexo formado, menor será a energia necessária para que esta interação ocorra. Sendo assim, quando comparados os resultados obtidos para os análogos estruturais e para a (-)-massoialactona tem-se que, aqueles que apresentaram energias de ligação menores que a do produto natural, ou seja, que mostraram valores maiores em módulo serão, teoricamente, mais ativos que a (-)-massoialactona, pois se ligarão mais facilmente ao alvo molecular. Desse modo, espera-se que os análogos **5b**, **5c** e **5e**, apresentem melhores resultados de atividade biológica quando comparados com os resultados obtidos para a (-)-massoialactona.

Ao finalizar esta etapa do trabalho, foi dado prosseguimento ao mesmo partindo para a etapa de síntese dos análogos estruturais propostos.

3.2. Síntese dos Análogos Estruturais

A estratégia utilizada para a síntese das δ -lactonas α,β -insaturadas análogas da (-)-massoialactona foi baseada na mesma estratégia descrita no Esquema 1, na qual um telureto vinílico foi utilizado como precursor (Figura 8).

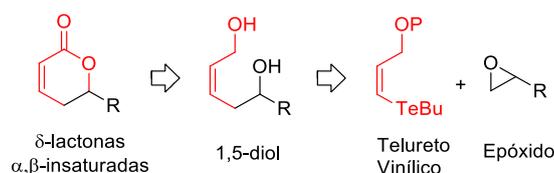
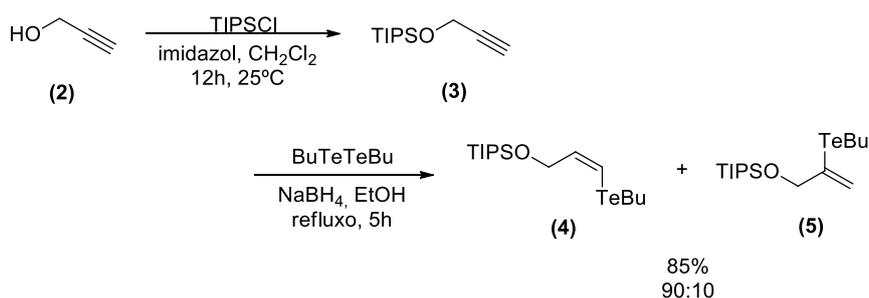


Figura 8: Estratégia sintética para a preparação de δ -lactonas α,β -insaturadas.

O telureto vinílico foi utilizado para instalar a dupla ligação *Z* existente na lactona, e o mesmo foi preparado através da conversão do álcool propargílico em seu derivado de silício a partir da reação com TIPSCI (CUNICO e BEDELL, 1980). Em seguida foi submetido a uma reação de hidroteluração, que resultou no telureto vinílico desejado em um rendimento de 85% na forma de uma mistura de regioisômeros (Esquema 2).

Esquema 2



A utilização do grupamento volumoso TIPS como grupo régio-dirigente já foi descrita por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA, PALMEIRA, *et al.*, 2010), sendo possível determinar a proporção dos regioisômeros obtidos através de cromatografia gasosa ou RMN ^1H e ^{125}Te (FREITAS, PALMEIRA, *et al.*, 2012).

No espectro de RMN ^1H (Figura 9), pode-se observar que os sinais apresentados estão de acordo com a estrutura proposta. Os sinais entre δ 0,9 – 1,1 correspondem aos hidrogênios dos grupamentos TIPS; aqueles entre δ 1,3 – 2,6 representam os prótons alquílicos das butilas; e os sinais entre δ 4,2 – 4,4 correspondem aos hidrogênios dos grupos CH_2 e CH_2' , respectivamente. Os sinais que caracterizam os hidrogênios vinílicos H_a e H_b surgem como dois duplos tripletos entre δ 6,3 – 6,7, com $J = 9,9$ e $4,9$ Hz, característico de alquenos com configuração *Z*; e os prótons geminais H_a' e H_b' aparecem como dois tripletos em δ 6,2 e δ 5,5, respectivamente, ambos com $J = 3,0$ Hz.

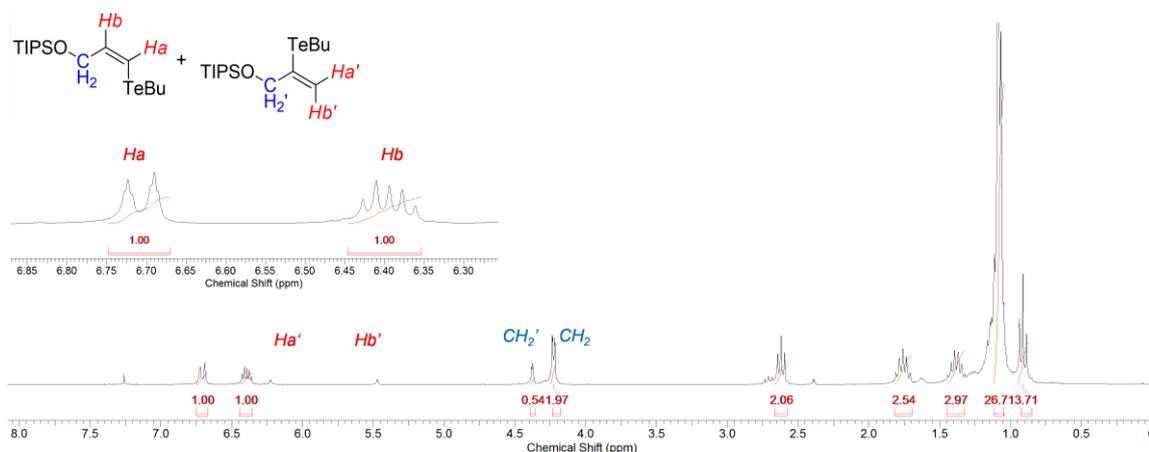


Figura 9: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) dos teluretos obtidos de acordo com o Esquema 6.

No espectro de RMN¹²⁵Te (Figura 10), podem ser observados dois sinais em aproximadamente δ 280 e 370 que correspondem ao telureto *Z* e seu regioisômero, respectivamente.

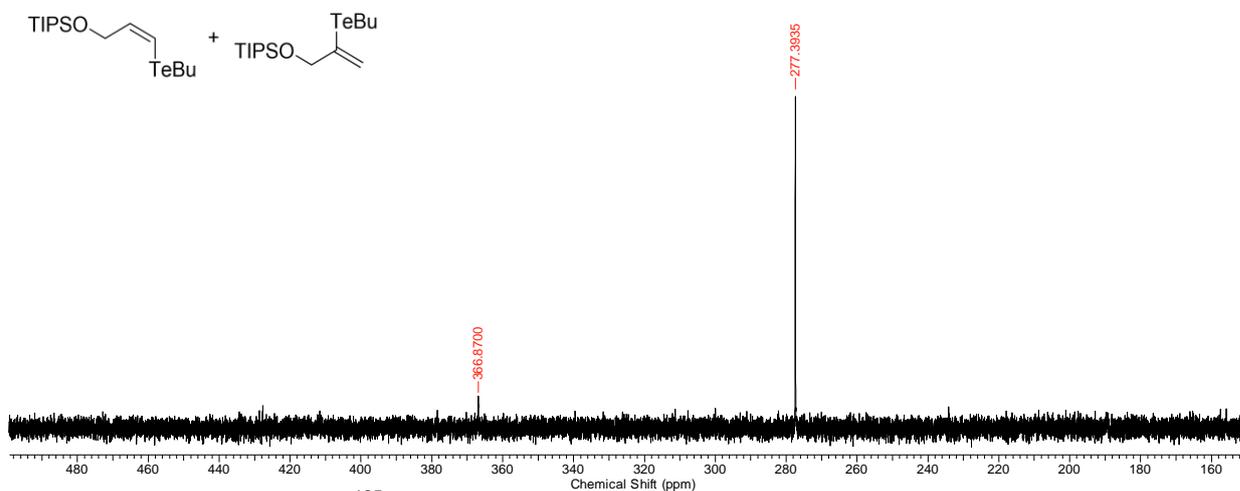
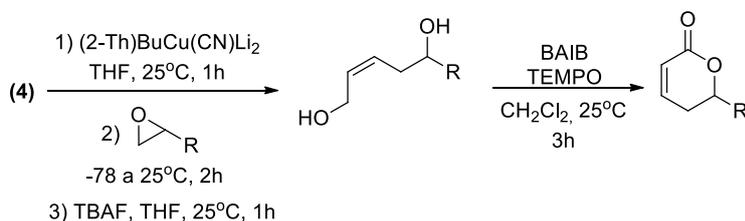


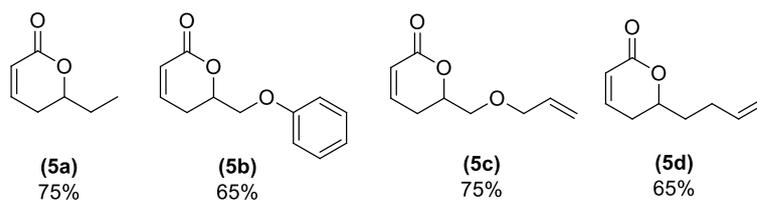
Figura 10: Espectro RMN¹²⁵Te (94.6 MHz, CDCl₃) dos teluretos obtidos de acordo com o Esquema 6.

O telureto **4** foi então submetido a uma sequência de reações desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa para levar a cinco δ -lactonas α,β -insaturadas contendo diferentes cadeias laterais, a depender do epóxido empregado na síntese (OLIVEIRA, FREITAS, *et al.*, 2011). A sequência sintética é mostrada no Esquema 3, e os rendimentos apresentados referem-se aos rendimentos globais obtidos após quatro etapas sintéticas.

Esquema 3



Exemplos sintetizados:



Os compostos obtidos foram caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C , e os espectros estão de acordo com as estruturas propostas. Como exemplo, será discutido o espectro de RMN ^1H do composto **5b** (Figura 11).

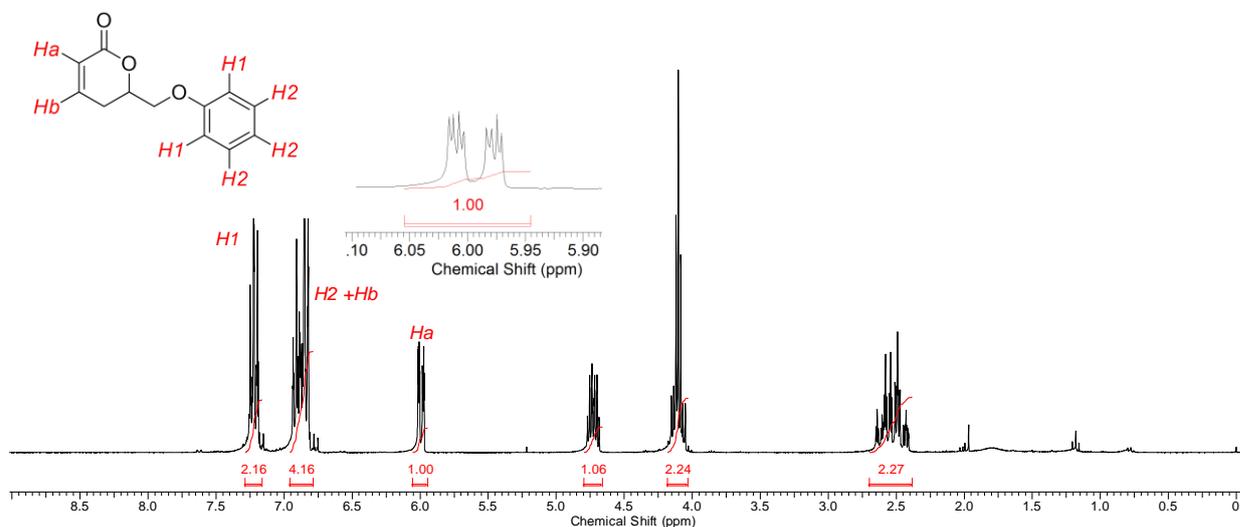
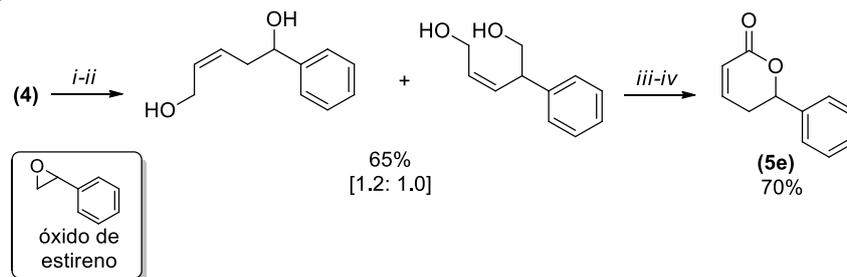


Figura 11: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5b**.

O espectro obtido corresponde a estrutura proposta, e nele observamos, dentre outros sinais, um multipletto entre δ 7,30 – 7,15 referente aos prótons aromáticos **H1**; outro multipletto entre 6,94 – 6,92 que corresponde aos hidrogênios aromáticos **H2** e ao hidrogênio vinílico **Hb**; e um sinal em δ 6,0 na forma de *ddd*, com $J = 9,6; 3,9$ e $2,2$ Hz, referente ao próton vinílico **Ha**. As constantes de acoplamento encontradas para o hidrogênio **Ha** são características de ligações duplas com estereoquímica *Z*.

Em todos os casos, as lactonas obtidas foram resultantes exclusivamente do ataque do cianocuprato vinílico ao átomo de carbono menos substituído do epóxido. A única exceção ocorreu quando o óxido de estireno foi utilizado. Neste caso, uma mistura de dióis regioisoméricos foi obtida em uma proporção de 1,2:1. Os mesmos puderam ser isolados e, posteriormente, submetidos a etapa de oxidação para levar as lactonas desejadas (Esquema 4).

Esquema 4



Reagentes e condições: **(i)** (2-Th)BuCu(CN)Li₂, THF, 25°C, 1 h; então óxido de estireno, -78 a 25°C, 2h; **(ii)** TBAF, THF, 25°C, 3 h; **(iii)** separação cromatográfica; **(iv)** BAIB, TEMPO, CH₂Cl₂, 25°C, 3h.

Os análogos sintetizados nesta etapa do trabalho, e a (-)-massoialactona previamente sintetizada pelo nosso grupo de pesquisa, foram submetidos a avaliação de suas atividades antitumorais. Quanto à avaliação da atividade anti-inflamatória, participaram deste estudo apenas alguns dos análogos sintetizados como será mostrado nas próximas seções.

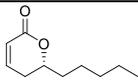
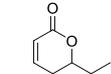
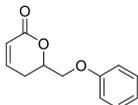
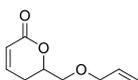
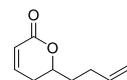
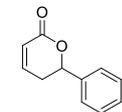
3.3. Atividade Antitumoral

É conhecido da literatura que diferentes linhagens de células tumorais apresentam diferentes sensibilidades quando expostas a um composto citotóxico. Desse modo, nesta etapa do trabalho, realizada em colaboração com a professora Gardênia C. G. Militão da Universidade Federal de Pernambuco, a (-)-massoialactona, previamente sintetizada por nosso grupo, e seus análogos **5a-e** foram submetidas à análise de citotoxicidade pelo método MTT. Tal método é o mesmo utilizado pelo programa de *screening* do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, e corresponde a uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente em células metabolicamente ativas (BERRIDGE, TAN, *et al.*, 1996).

Inicialmente foi realizado um *screening* inicial em que as lactonas sintetizadas neste trabalho e a (-)-massoialactona foram testadas em três linhagens de células tumorais, **HT-29** (adenocarcinoma humano de cólon), **MCF-7** (adenocarcinoma humano de mama), e **NCI-H292** (carcinoma humano

de pulmão), a uma concentração constante de 25 µg/mL. Os resultados obtidos no *screening* inicial, dispostos na Tabela 2 abaixo, foram avaliados de acordo com uma escala de intensidade que define o grau de citotoxicidade dos compostos testados, como ilustrado na Figura 12.

Tabela 2: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras e respectivo desvio (SD) em três linhagens tumorais testadas na dose única de 25 µg/mL.

			MCF-7 (IC%)	SD	NCI-H292 (IC%)	SD	HT-29 (IC%)	SD
1	1		69,0	2,9	70,2	0,9	74,2	0,1
2	5a		24,4	7,5	38,9	0	53,5	3,7
3	5b		71,9	0,5	72,3	0,4	78,6	0,8
4	5c		72,5	1,9	70,0	1,7	74,2	0,3
5	5d		36,3	3,1	60,3	3,9	21,1	12,2
6	5e		68,7	1,7	74,8	0,9	78,9	1,1

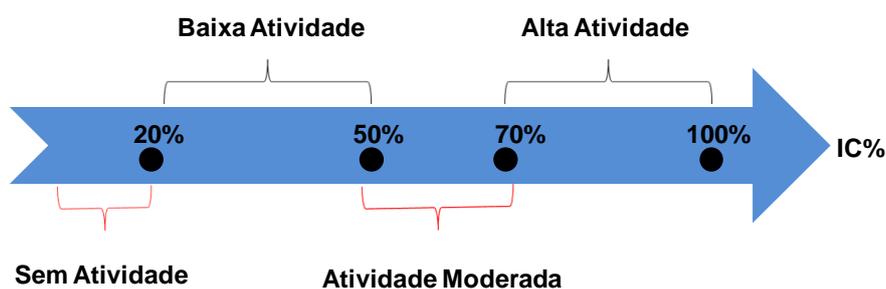


Figura 12: Escala de Intensidade do Percentual de Inibição do Crescimento Celular (IC%).

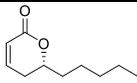
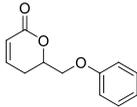
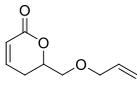
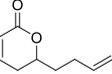
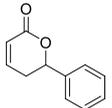
De acordo com a escala de intensidade, os compostos considerados promissores são aqueles que apresentam alta atividade (IC% entre 70-100%). Desse modo, dentre os compostos testados observamos que as lactonas **5a** e **5d** não são consideradas promissoras e, portanto, não

participaram dos testes para determinação dos valores de IC_{50} . Em contrapartida, os compostos **1**, **5b**, **5c** e **5e**, apresentaram bons resultados de IC_{50} , sendo assim classificados para a etapa de determinação de seus valores de IC_{50} .

Aqui, podemos observar a coerência com os resultados do *docking* molecular que indicou os compostos **5a** e **5d** como aqueles que, teoricamente, apresentariam menor atividade biológica em comparação com os outros compostos sugeridos.

Nesta segunda etapa, tendo em vista os bons resultados de IC_{50} , foram testadas além das linhagens já citadas mais duas linhagens de células tumorais: **HL-60** (leucemia pró-mielocítica) e **K562** (leucemia eritromieloblastóide). Os valores de IC_{50} obtidos estão descritos na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Valores de IC_{50} para a (-)-massoialactona **1** e seus análogos **5a-e** frente a cinco linhagens de células tumorais.

			IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
			MCF-7	NCI-H292	HT-29	HL-60	K562
1	1		60,0	11,3	22,6	16,0	20,2
2	5a		>100	>100	>100	NT	NT
3	5b		22,5	0,8	4,4	5,4	2,9
4	5c		44,6	16,6	18,4	25,5	50,0
5	5d		>100	>100	>100	NT	NT
6	5e		22,9	9,1	10,9	13,2	8,9
7	DOX ^a		0,34	0,02	NT	0,03	0,26

^aDoxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo; NT, não testada.

O valor de IC_{50} representa a quantidade de composto necessária para inibir o crescimento de 50% da população de células tumorais. Assim, quanto

menor for o valor de IC_{50} , mais ativo será o composto, pois apenas uma pequena quantidade dele é necessária para inibir o crescimento de 50% da população.

Dessa forma, ao observar a Tabela 3, é possível verificar que a (-)-massoialactona exibiu citotoxicidade moderada frente as linhagens testadas (Tabela 3, linha 1), sendo mais ativa nas linhagens **NCI-H292** e **HL-60**. Os resultados obtidos para os compostos **5a** e **5d** (Tabela 3, linhas 2 e 5) mostram que nenhuma atividade antiproliferativa foi observada. Tais resultados dão suporte à hipótese de que a cadeia lateral tem um papel fundamental na etapa de reconhecimento celular. Em um estudo semelhante, o mesmo comportamento foi observado para análogos da fostriecina, onde a redução da cadeia lateral levou a um decréscimo na atividade antiproliferativa (BUCK, HARDOUIN, *et al.*, 2003).

No caso da citostatina, é conhecido que a presença do trieno na cadeia lateral não é essencial para a inibição *in vitro* (BIALY e WALDMANN, 2003). Em analogia, os derivados **5c** e **5d** que possuem uma ligação dupla terminal foram testados, mas somente **5c** exibiu uma citotoxicidade moderada, talvez indicando que a presença de um átomo eletronegativo na cadeia lateral poderia aumentar o potencial citotóxico quando comparado com o composto **5d** (Tabela 3, linhas 4 e 5).

A partir da análise da estrutura da goniotalamina, pode-se observar, comparativamente, que os análogos com a cadeia lateral flexível apresentaram somente uma citotoxicidade moderada. A presença de uma cadeia lateral flexível talvez seja a responsável pelos resultados moderados obtidos até o momento.

Desse modo, nossa atenção foi voltada para os análogos **5b** e **5e** (Tabela 3, linha 3 e 6), que possuem um anel aromático em suas cadeias laterais. De maneira satisfatória o análogo **5b** exibiu boa citotoxicidade contra as linhagens **NCI-H292** e **K562**, enquanto o análogo **5e** apresentou atividade moderada para estas mesmas linhagens de células tumorais. Tais resultados compõem os melhores valores de IC_{50} pra o estudo realizado, levantando a hipótese de que uma cadeia lateral rígida seja responsável pela a atividade de δ -lactonas α,β -insaturadas.

Vale salientar que dentre as linhagens estudadas a **HL-60** (leucemia pró-mielocítica), e a **K562** (leucemia eritromieloblastóide), são tumores líquidos, logo, a interação droga/tumor é facilitada quando comparada à mesma interação com tumores sólidos. Desse modo, um composto que apresenta um baixo valor de IC_{50} contra um tumor sólido, ou seja, uma alta citotoxicidade, pode ser considerado bastante efetivo, pois consegue quebrar a barreira física existente.

Sob este aspecto, pode-se destacar o composto **5b** que, dentre os análogos testados, apresentou os menores valores de IC_{50} tanto para um tumor sólido (**NCI-H292**) quanto para um tumor líquido (**K562**), mostrando ser o análogo mais citotóxico.

Um provável questionamento feito pelo leitor é: por que foram testadas as misturas racêmicas das lactonas e não seus enantiômeros puros separadamente? Tal questionamento pode ser respondido em duas partes: primeiramente, epóxidos quirais possuem alto valor monetário o que impossibilitou suas aquisições para realização da síntese dos respectivos análogos enantiomericamente puros; e a síntese assimétrica destes compostos, em alguns casos, é um procedimento que envolve diversas etapas sintéticas. Em segundo lugar porque estudos recentes indicaram que não há diferença significativa na citotoxicidade entre enantiômeros puros de δ -lactonas α,β -insaturadas (DE FÁTIMA, *et al.*, 2005 e 2006).

Para comprovar que não há diferença significativa na citotoxicidade entre os enantiômeros dos compostos sintetizados, foi realizado um estudo de *docking* molecular, novamente em colaboração com o Dr. Carlos Henrique B. da Cruz, com os enantiômeros *R* e *S* daquele análogo que apresentou melhor atividade antitumoral (**5b**) e o alvo biológico CRM-1.

O estudo de *docking* molecular para as lactonas **R-5b** e **S-5b** (Figura 13) confirmou nossas suspeitas de que seus padrões de ligação a CRM-1 não dependem da estereoquímica da molécula.

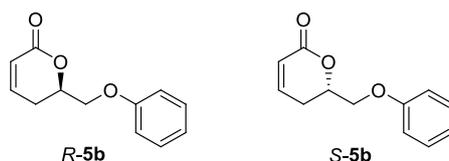


Figura 13: Estruturas químicas dos isômeros *R-5b* e *S-5b*.

A ligação entre a lactona *R-5b* e a CRM-1 ocorre inicialmente por duas interações moleculares: o oxigênio carbonílico da lactona interage com os aminoácidos LYS548 e LYS579 da proteína, e o oxigênio do anel lactônico interage com a LYS579, posicionando a dupla ligação do anel, ou seja, o aceptor de Michael, a uma distância de 3,65 Å da CYS539 (Figura 14). A interação observada para o anel lactônico da *R-5b* é a mesma observada quando se estuda a relação da leptomicina B com a CRM-1.

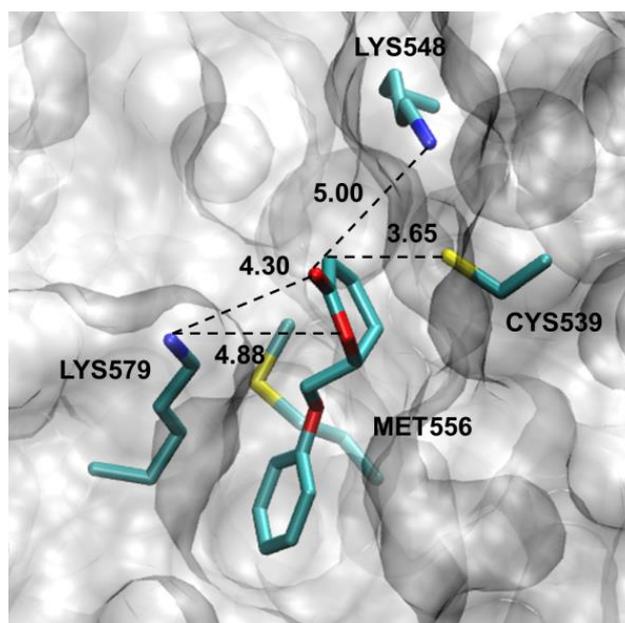


Figura 14: Interações moleculares entre a *R-5b* e a CRM-1.

Já a interação entre a lactona *S-5b* e a CRM-1 ocorre com seu encaixe na região hidrofóbica da proteína, com os dois átomos de oxigênio do anel lactônico direcionados para o interior da cavidade, e o anel aromático acomodado na região hidrofóbica da MET556, posicionando assim a dupla ligação do anel a uma distância de 3,66 Å da CYS539, e resultando na perda das interações com os aminoácidos LYS548 e LYS579 observadas para a *R-5b* (Figura 15).

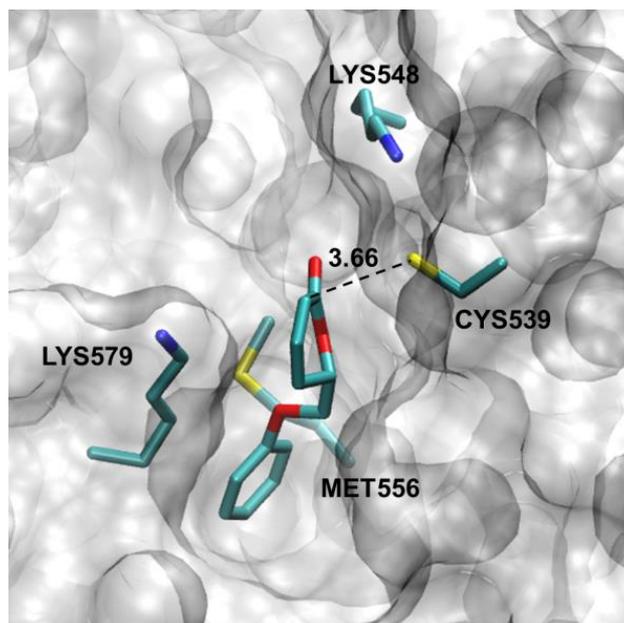


Figura 15: Interações moleculares entre a **S-5b** e a CRM-1.

Desse modo, é possível observar que a forma como os isômeros **R-5b** e **S-5b** se encaixam à CRM-1 é diferente, porém eles se ligam igualmente a esta proteína através da interação entre a dupla ligação aceptora de Michael do anel lactônico e o aminoácido CYS539, havendo uma diferença de apenas 0,01 Å no tamanho da ligação.

Com o estudo de *docking* molecular também foi possível calcular a provável energia de ligação requerida para que a molécula estudada se ligue ao alvo molecular. Desse modo, quando a interação entre um determinado alvo biológico e diferentes moléculas é comparada, aquela que gerar menor energia de ligação será referente à molécula que, teoricamente, apresentará melhor atividade biológica. Para o sistema estudado, a diferença entre as energias de ligação para a **R-5b** e a **S-5b** na cavidade da CRM-1 foi de, aproximadamente, 0,2 kcal/mol. Tal diferença indica que, provavelmente, os respectivos enantiômeros apresentarão atividades biológicas semelhantes, justificando o fato dos testes de atividade antitumoral das δ -lactonas α,β -insaturadas sintetizadas terem sido realizados apenas com suas misturas racêmicas.

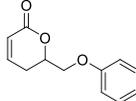
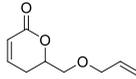
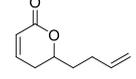
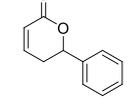
3.4. Atividade Anti-inflamatória

Após o estudo da atividade antitumoral e, tendo em vista o potencial anti-inflamatório de produtos naturais com porção δ -lactona α,β -insaturada, realizou-se um estudo com alguns dos análogos sintetizados a fim de avaliar tal propriedade. Os análogos foram selecionados tendo em vista a disponibilidade de composto. Inicialmente, tais compostos (**5b-e**) foram submetidos a um *screening* para determinar suas toxicidades *in vitro*. Aqueles que apresentaram baixa toxicidade foram testados quanto suas possíveis atividades anti-inflamatórias. Tais ensaios foram realizados *in vitro* em macrófagos peritoneais murinos (células intestinais de camundongos) estimulados por LPS (lipopolissacarídeos). Estes estudos foram realizados em colaboração com a professora Teresinha Gonçalves da Silva no Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

É descrito na literatura que endotoxinas bacterianas como, por exemplo, os LPS (NAGY, KONCZ, *et al.*, 2010) e (TAKACS, CZAKO, *et al.*, 2002), ativam os macrófagos que conduzem a produção de óxido nítrico (NO), um importante mediador pró-inflamatório associado com a ativação dos linfócitos T (TIWARI, DWIVEDI e KAKKAR, 2010). LPS promovem a ativação do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B, fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (ARAGÃO-FILHO, MOREIRA, *et al.*, 2009)) em macrófagos, estimulando a produção de NO e citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, pode-se associar reduções dos níveis de NO à inibição da ativação da NF- κ B, que regula a inibição da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e de genes relacionados com a produção de citocinas (LEE, JUNG, *et al.*, 2012).

Assim, realizou-se inicialmente o estudo da toxicidade dos análogos **5b-e**, através do método MTT, a fim de evitar a utilização de doses tóxicas nos testes de atividade anti-inflamatória. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Percentual de viabilidade celular de macrófagos murinos tratados com as δ -lactonas α,β -insaturadas **5b-e**.

		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)				
		3,1	6,2	12,5	25,0	
1	5b		93	47,3	0	0
2	5c		100	77,2	51,1	7,7
3	5d		57	45,4	19,7	2,5
4	5e		34,5	30,9	1,0	7,4

Os resultados obtidos estão apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=12$).

Na Tabela 4 temos que os análogos selecionados foram testados em quatro concentrações diferentes (3,1; 6,2; 12,5 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$), e os resultados obtidos correspondem ao percentual de células vivas após os testes. Sendo assim, quanto maior for o percentual obtido, menos tóxico é o composto testado para uma dada concentração.

Dessa forma, podemos observar na Tabela 4 que à medida que a concentração utilizada aumenta, também há um aumento na toxicidade dos compostos testados, ou seja, diminui o percentual de células vivas após os testes. Dentre os análogos testados temos que as lactonas **5b** e **5c** apresentaram maior percentual de células vivas quando testadas na concentração de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4, linhas 1 e 2). Assim, tais condições foram selecionadas para os próximos ensaios (lactonas **5b** e **5c** na concentração de 3,1 $\mu\text{g/mL}$).

O passo seguinte foi avaliar a atividade anti-inflamatória das lactonas selecionadas a partir do efeito causado pelas mesmas sobre a produção de NO por macrófagos murinos estimulados por LPS. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5 abaixo. O tratamento estatístico dos dados foi feito através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste Newman-Keuls com intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância. Foram avaliados os níveis de

NO nos macrófagos não inflamados (Tabela 5, linha 1), nos macrófagos com o estimulador de inflamação (Tabela 5, linha 2), e nos macrófagos com o estimulador de inflamação e tratados com as lactonas **5b** e **5c** (Tabela 5, linhas 3 e 4).

Tabela 5: Efeito das δ -lactonas α,β -insaturadas **5b** e **5c** sobre a produção de NO por macrófagos murinos estimulados com LPS.

		Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	NO (μM)
1	controle	-	$2,8 \pm 0,13$
2	LPS	1,0	$19,2 \pm 0,06^*$
3	5b	3,1	$5,2 \pm 0,04^*$
4	5c	3,1	$2,7 \pm 0,05^*$

Os resultados obtidos estão apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

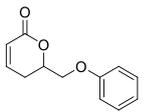
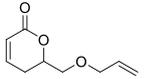
Na Tabela 5, o valor obtido para a concentração de NO sob o efeito do composto testado deve ser o mais próximo possível do valor observado para o controle, pois o composto testado terá reduzido o nível de NO à valores comparados ao da célula não inflamada, caracterizando sua ação anti-inflamatória.

Os resultados obtidos na Tabela 5 informam que a produção de NO na célula não inflamada (linha 1) é de $2,8\mu\text{M}$, e que esta produção aumenta para $19,2\mu\text{M}$ quando as células de macrófagos murinos são inflamadas com LPS (linha 2). Quando as células inflamadas são tratadas com os compostos **5b** e **5c** (linhas 3 e 4) a uma concentração de $3,1\mu\text{g/mL}$, os níveis de produção de NO são reduzidos a $5,2$ e $2,7\mu\text{M}$, respectivamente, indicando que esses compostos possuem atividade anti-inflamatória e que seus mecanismos de ação são, pelo menos parcialmente, devido a regulação da produção de NO.

Dentre os compostos testados, aquele que causou uma redução na produção dos níveis de NO comparáveis à produção observada nas células não inflamadas (controle), e que assim pode ser considerado o mais ativo nesse teste, foi a lactona **5c**.

Outro teste de avaliação anti-inflamatória com os compostos **5b** e **5c** a uma concentração de 3,1 $\mu\text{g/mL}$ foi realizado. Neste teste foram avaliados os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α , largamente relacionada com a produção de NO induzido por LPS (TER STEEDE, VAN DER VEN, *et al.*, 1998). Assim, a redução dos níveis de NO também pode ser atribuída à redução dos níveis de TNF- α . A Tabela 6 mostra os efeitos das lactonas **5b** e **5c** sobre a produção de TNF- α por macrófagos murinos estimulados com LPS (Tabela 6, linhas 3 e 4), não estimulados (Tabela 6, linha 1), e apenas com o estimulador de inflamação (Tabela 6, linha 2).

Tabela 6: Efeito das δ -lactonas α,β -insaturadas **5b** e **5c** sobre os níveis de TNF- α em macrófagos murinos estimulados por LPS.

		Concentração ($\mu\text{g/mL}$) TNF- α (pg/mL)	
1	controle	-	57,5 \pm 5,9
2	LPS	1,0	274,4 \pm 10,6*
3	5b 	3,1	112,4 \pm 9,8*
4	5c 	3,1	210,0 \pm 7,7*

Os resultados obtidos estão apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. *Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

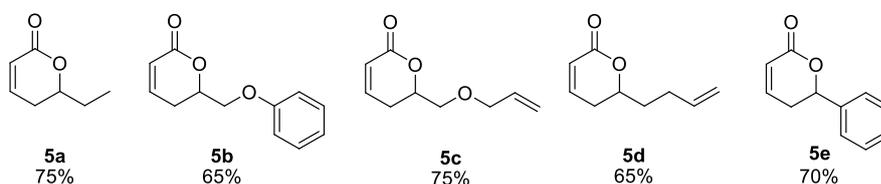
Na Tabela 6, pode ser observado que a produção de TNF- α nas células não inflamadas (linha 1) é igual a 57,5 pg/mL, e que esta produção aumenta para 274,4 pg/mL quando as células são inflamadas com LPS (linha 2). Quando as células inflamadas são então tratadas com os análogos **5b** e **5c** (linhas 3 e 4) a uma concentração de 3,1 $\mu\text{g/mL}$, os níveis de produção de TNF- α são reduzidos para 112,4 e 210,0 pg/mL respectivamente. Estes resultados indicam que a atividade anti-inflamatória dos compostos testados também se deve à redução dos níveis de NO a partir da redução dos níveis de TNF- α , e que a lactona que promoveu maior redução dos níveis de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS foi a **5b**.

Assim, pode-se inferir que o mecanismo de ação anti-inflamatória da

lactona **5b** é devido principalmente à redução dos níveis de TNF- α nas células inflamadas, enquanto que para a lactona **5c** é devido principalmente à redução dos níveis de NO.

4. Conclusões

- ✓ As estruturas moleculares dos análogos sugeridos e da (-)-Massoialactona foram submetidos ao estudo de *docking* molecular tendo como alvo biológico a CRM-1. Os compostos **5b**, **5c** e **5e** obtiveram valores de energia de ligação menores que o produto natural, indicando que, teoricamente, apresentariam melhores atividades biológicas que a (-)-Massoialactona.
- ✓ Cinco δ -lactonas α,β -insaturadas foram sintetizadas em rendimentos moderados que variaram entre 65-75%.



- ✓ Todos os compostos sintetizados, e a (-)-massoialactona, previamente sintetizada pelo nosso grupo de pesquisa, foram submetidos a estudos de atividade antitumoral e anti-inflamatória, sendo o composto **5b** o que apresentou melhor resultado quanto a atividade antitumoral, e os compostos **5b** e **5c** quanto a atividade anti-inflamatória.
- ✓ Os resultados obtidos para atividade antitumoral estão de acordo com a previsão feita pelo estudo de *docking* molecular que indicava que o análogo **5b** seria mais ativo que os outros análogos e que a (-)-massoialactona.
- ✓ Os cálculos de *docking* molecular revelaram que não há diferença significativa na energia de ligação entre os isômeros *R*-**5b** e *S*-**5b** no alvo molecular CRM-1, o que indica que tais compostos apresentariam atividades biológicas semelhantes, e justifica a utilização das misturas racêmicas das δ -lactonas α,β -insaturadas nos estudos de atividade antitumoral.
- ✓ Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho foram publicados no *journal* de circulação internacional *European Journal of Medicinal Chemistry* (*Eur. J. Med Chem.* **2014**, 76, 291).

Capítulo 2: Z-estilbenos

1. Introdução

Entre as décadas de 1970 e 1990, Pettit e colaboradores desenvolveram uma série de estudos baseados na inibição do crescimento de células cancerígenas a partir da utilização dos componentes constituintes da árvore sul-africana *Combretum caffrum*, uma espécie pertencente à família *Combretaceae*. Tradicionalmente, árvores e arbustos pertencentes a esta família são utilizados em práticas medicinais na África e na Índia, no tratamento de infecções respiratórias, hepatite, malária, câncer uterino, lepra, disenteria, entre outros exemplos. Tais estudos levaram ao isolamento e determinação estrutural de vários compostos bioativos, dentre eles, uma série de estruturas denominadas de combretastatinas (Figura 16) (PETTIT, SINGH, *et al.*, 1995).

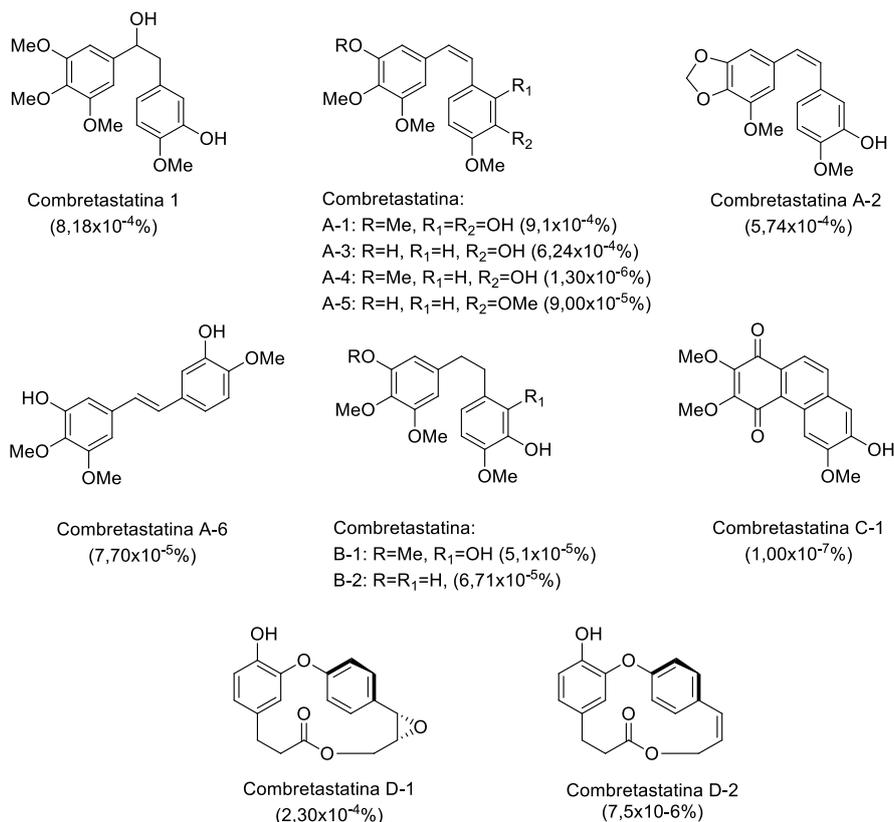


Figura 16: Estruturas químicas das combretastatinas obtidas a partir da *C. caffrum* e seus respectivos rendimentos de isolamento (PETTIT, *et al.*, 1982, 1987 e 1988) e (SINGH, *et al.*, 1989 e 1990).

Dentre as combretastatinas isoladas, pode-se destacar a Combretastatina A-4 (CA-4) (Figura 17), o produto natural de menor peso molecular que inibe a polimerização da tubulina ligando-se ao mesmo domínio da proteína que provoca a polimerização (DUAN, CAI, *et al.*, 2007).

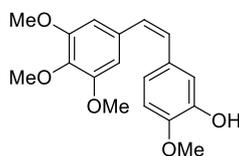


Figura 17: Estrutura da Combretastatina A-4.

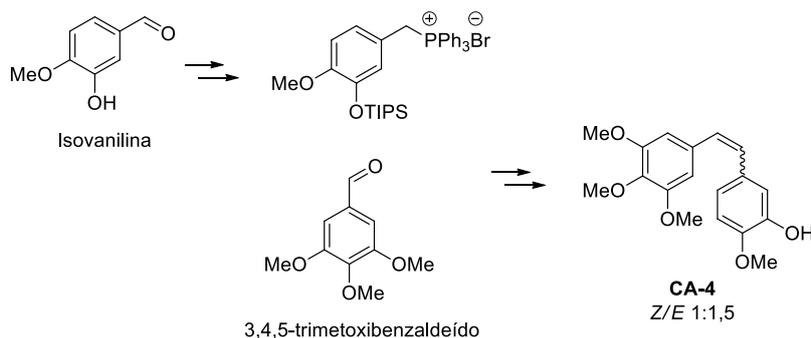
A tubulina, por sua vez, é um importante alvo no tratamento do câncer e possui um papel fundamental na formação do fuso mitótico, que promove a separação física dos cromossomos durante a mitose (KUMAR, SAPRA, *et al.*, 2012).

O crescimento de um tumor sólido depende do desenvolvimento de uma vasculatura (disposição dos vasos sanguíneos) para que sejam supridas as necessidades de oxigênio, nutrientes, entre outros. Desse modo, se o leito vascular que se desenvolveu no interior da massa tumoral for quebrado, então o crescimento do tumor será significativamente prejudicado. Assim, quando ocorre a interrupção da polimerização da tubulina, também ocorre a interrupção da formação da vasculatura tumoral, promovendo então um bloqueio no crescimento celular (TRON, PIRALI, *et al.*, 2006).

Diante de tal importância biológica, diversos grupos de pesquisa se aplicaram em realizar a síntese total da CA-4. Estilbenos podem ser usualmente preparados a partir de dois tipos de reações: reação de Wittig, e condensação de Perkin. Na primeira, pode ser obtida uma mistura entre os isômeros *Z* e *E*. Já na reação de Perkin o isômero *Z* predomina, porém é necessária a utilização de temperaturas elevadas na etapa de descarboxilação para que o produto final seja obtido (LUPATTELLI, D'AURIA, *et al.*, 2009).

A primeira síntese total da CA-4, foi descrita em 1995 pelo mesmo grupo que a isolou (PETTIT, SINGH, *et al.*, 1995). A etapa-chave baseou-se em uma reação de Wittig entre um sal de fosfônio obtido a partir da isovanilina e o 3,4,5-trimetoxibenzaldeído (Esquema 5).

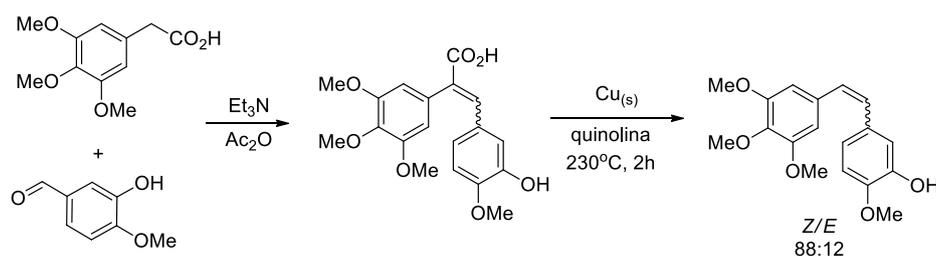
Esquema 5



O método não se mostrou estereosseletivo, uma vez que foi obtida uma mistura de isômeros *Z* e *E* na proporção de 1:1,5; e não se mostrou eficiente, obtendo-se a CA-4 em rendimento global de 19% ao final de sete etapas reacionais.

Em 2001, McGown e colaboradores descreveram a síntese da CA-4 a partir da reação de condensação de Perkin entre o ácido 3,4,5-trimetóxi-fenil-acético e o 3-hidróxi-4-metóxi-benzaldeído, levando a CA-4 com 72% de rendimento e uma razão de 88:12 entre os isômeros *Z/E* (Esquema 6) (GAUKROGER, HADFIELD, *et al.*, 2001).

Esquema 6

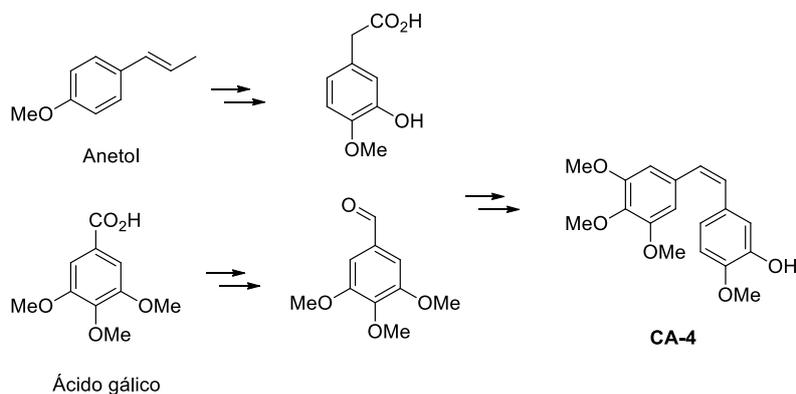


Apesar desta metodologia resultar no produto desejado em apenas duas etapas reacionais, para obtê-lo é necessário o emprego de temperaturas elevadas (230°C) na etapa final de descarboxilação.

Em 2011, um grupo de pesquisa chinês descreveu a síntese da CA-4, também utilizando a condensação de Perkin, a partir da reação entre o (*E*)-1-

metóxi-4(prop-1-enil) benzeno (comumente chamado de anetol), composto base da biomassa do anis estrelado chinês, disponível de forma abundante e sustentável naquele país, e o 3,4,5-trimetóxi-benzaldeído, derivado da *gallnut* chinesa, um fruto que muito se assemelha com uma noz (CHEN, ZOU, *et al.*, 2011). Os autores afirmaram que tal metodologia é um exemplo da obtenção de compostos bioativos de forma verde e que possibilita a sua produção em larga escala. Contudo, apesar de utilizarem materiais de partida sustentáveis, ainda foi necessário o uso de solventes orgânicos tóxicos e condições especiais, como temperaturas elevadas e atmosfera inerte. O isômero Z da CA-4 foi obtido exclusivamente ao final de seis etapas reacionais, com um rendimento de 70% (Esquema 7).

Esquema 7



Devido à baixa solubilidade em água da CA-4, um pró-fármaco de fosfato (CA-4P, Figura 18) mais solúvel, foi sintetizado para o desenvolvimento de estudos *in vitro* e *in vivo*. Atualmente, a CA-4P encontra-se em fase de ensaios clínicos para o tratamento, dentre outros, do carcinoma anaplásico de tireóide, uma das formas mais agressivas deste câncer que rapidamente atinge órgãos à distância, como os pulmões, os ossos e o fígado, e corresponde a 2% dos casos de carcinoma de tireóide (JIN, QI, *et al.*, 2011).

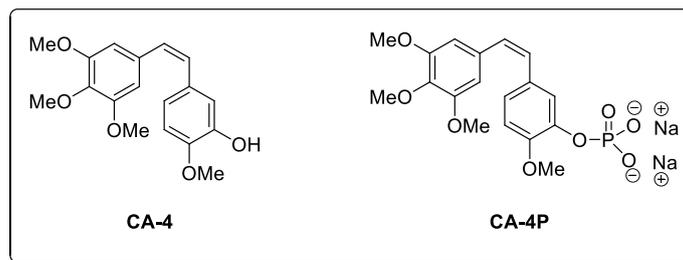


Figura 18: Estrutura química da CA-4 e da CA-4P.

Dessa forma, tendo em vista seu baixo peso molecular e sua elevada efetividade na inibição da polimerização da tubulina, diversos grupos na área de química orgânica sintética e medicinal vem se dedicando a síntese de derivados estruturais da CA-4 que apresentem resultados similares, ou melhores, que a mesma quando se trata de sua atividade biológica. Para tanto, muitos deles se basearam em estudos de estrutura-atividade, que ao longo dos anos se concentraram em modificações no anel **A**, no anel **B**, e na dupla ligação entre os anéis **A** e **B**, da CA-4 (Figura 19).

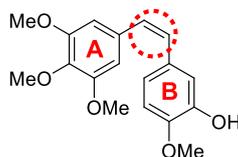


Figura 19: Identificação dos anéis **A** e **B** da CA-4.

Com relação ao anel **A**, por muito tempo foi sugerido que a presença das três metoxilas fosse crucial para as características citotóxicas e inibitória da polimerização da tubulina da CA-4 (TRON, PIRALI, *et al.*, 2006). Contudo diversas modificações estruturais feitas no anel **A**, como por exemplo, a substituição dos grupos metoxila por grupos de maior natureza lipofílica (MAYA, PEREZ-MELERO, *et al.*, 2005), ou por três metilas (GAUKROGER, HADFIELD, *et al.*, 2003), ou ainda substituições da metoxila na posição *meta* por um átomo de flúor (PETTIT, MINARDI, *et al.*, 2005), promoveram resultados positivos e negativos, tanto na citotoxicidade da molécula quanto na sua resposta à inibição da polimerização da tubulina. Desse modo, não se pode afirmar que os grupos metoxila do anel **A** sejam de fundamental importância para a atividade da CA-4.

Historicamente, ao supor que as metoxilas do anel **A** seriam cruciais para a atividade da CA-4, o anel **B** foi visto como a única porção da molécula passível de modificações para que compostos mais potentes fossem sintetizados. Desse modo, de forma geral, o anel **B** sofreu substituições em três diferentes vertentes: (i) anéis aromáticos substituídos; (ii) anéis aromáticos não substituídos; (iii) anéis heterocíclicos. Tais estudos levaram a algumas conclusões acerca da constituição deste anel: (i) para uma boa citotoxicidade a posição *para* deve ser ocupada por uma metoxila; (ii) a posição *meta* pode ser substituída por grupos doadores ou retiradores de elétrons desde que não excedam o tamanho do grupo original (hidroxila) desta posição (TRON, PIRALI, *et al.*, 2006).

Com relação à dupla ligação de configuração *Z* que une os anéis **A** e **B**, pode-se dizer que esta é de fundamental importância para a citotoxicidade da CA-4, haja vista que o isômero *Z* possui significativamente maior atividade que o isômero *E*. Além disso, a citotoxicidade do isômero *E* pode estar relacionada a sua isomerização ao isômero *Z* durante os testes de atividade. Acredita-se que a dupla ligação *Z* seja responsável pela colocação dos anéis **A** e **B** a uma distância apropriada dando ao composto uma angulação adequada para maximizar a interação entre o mesmo e o alvo biológico (TRON, PIRALI, *et al.*, 2006). Logo, pode-se concluir que a configuração *Z* da dupla ligação é de extrema importância para a citotoxicidade da CA-4. Dessa forma, análogos dessa molécula devem manter esta configuração para apresentarem bons resultados de atividades citotóxicas e de inibição da polimerização da tubulina.

Assim, ao longo das duas últimas décadas, foram descritos centenas de análogos estruturais da CA-4 dos mais variados tipos, com as mais variadas modificações nos anéis **A** e **B**, e na dupla ligação que os une. Para muitos desses análogos foram realizados testes de atividade antitumoral, anti-inflamatória, testes para avaliar suas eficácias na inibição da polimerização da tubulina, entre outros. De forma ilustrativa e comparativa foram selecionados alguns exemplos desses análogos (Figura 20), obtidos a partir das mais variadas metodologias sintéticas, e seus valores de IC₅₀ para a linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7).

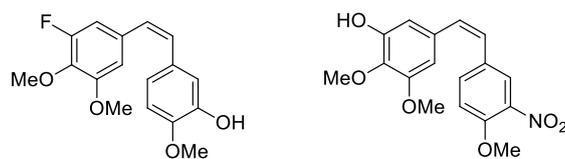
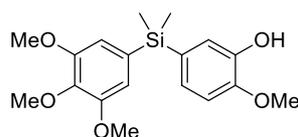
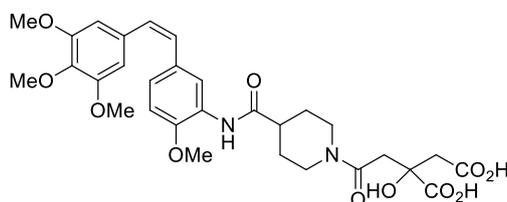
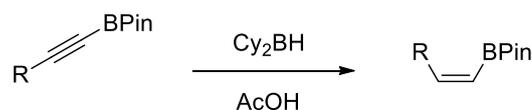
 $IC_{50} < 0,0027 \mu\text{g/mL}$ $IC_{50} = 0,49 \mu\text{g/mL}$ *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1450. $IC_{50} = 0,017 \mu\text{g/mL}$ *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7381 $IC_{50} = 12,366 \mu\text{g/mL}$ *Anti-Cancer Drugs* **2015**, *26*, 148

Figura 20: Exemplos de análogos estruturais da CA-4 e seus respectivos valores de IC_{50} para a linhagem de células tumorais MCF-7.

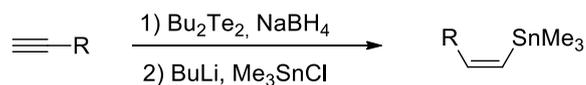
Nas últimas décadas a utilização de espécies de paládio como catalizador em reações de acoplamento cruzado impulsionou a pesquisa nessa área tanto no âmbito acadêmico como industrial (KUMADA, 1980). A grande vantagem do uso de paládio em reações deste tipo está na viabilidade de formação de ligações C-C a partir de precursores mais simples, tolerando vários grupos funcionais, e em condições suaves (MIYAURA e SUZUKI, 1995).

Dentre as metodologias desenvolvidas para reações de acoplamento cruzado catalisado por paládio podemos destacar a reação de Stille, em que o grupo eletrofílico utilizado é um organoestanho, e a reação de Suzuki-Miyaura, onde o eletrófilo usado é um organoboro. Precursores de organoestanho e organoboro com dupla ligação *Z* podem ser aplicados em reações de acoplamento que visam à manutenção da mesma. No Esquema 8 a seguir estão exemplificadas algumas metodologias recentes para obtenção dos precursores citados.

Esquema 8



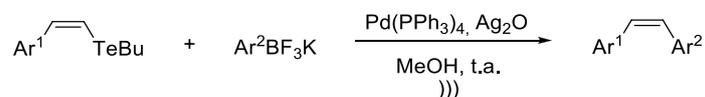
Molander, G. A.; Ellis, N. M. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 6841.



Mirzayans, P. M.; Pouwer, R. H.; Williams, C. M. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3861.

Entretanto, tendo em vista o interesse do nosso grupo de pesquisa na aplicação de reagentes de telúrio e boro como precursores na síntese de análogos estruturais de produtos naturais, podemos citar a metodologia desenvolvida por Stefani e colaboradores em que tais compostos são utilizados na síntese de *Z*-estilbenos a partir do acoplamento cruzado do tipo Suzuki (Esquema 9) (CELLA e STEFANI, 2006).

Esquema 9



Em tal trabalho, foram sintetizados oito estilbenos de configuração *Z*, sem mistura de enantiômeros, em rendimentos que variaram de 60% a 82% empregando-se tal estratégia.

Diante da importância biológica da CA-4 e da possibilidade de obtenção de novos análogos estruturais, empregando-se como estratégia a utilização de teluretos vinílicos e organotrifluoroboratos de potássio, metodologias comumente utilizadas em nosso grupo de pesquisa, optou-se por desenvolver estudos para a síntese e posterior avaliação das possíveis atividades biológicas de tais análogos.

2. Objetivos

▪ **Objetivo Geral**

Aplicação de reagentes de telúrio e boro na síntese de estilbenos de configuração *Z* análogos da CA-4.

▪ **Objetivos Específicos**

- i. Realizar estudo de *docking* molecular de estruturas análogas a CA-4 propostas de acordo com a disponibilidade de reagentes comerciais no laboratório;
- ii. Sintetizar as moléculas selecionadas no estudo de *docking* molecular;
- iii. Avaliar a atividade antitumoral dos análogos sintetizados.

3. Resultados e Discussão

3.1. *Docking* Molecular

Nesta etapa do trabalho foram realizados cálculos de *docking* para onze análogos estruturais da CA-4 sugeridos de acordo com a disponibilidade de reagentes comerciais em nosso laboratório de pesquisa. O alvo biológico selecionado para o estudo foi a tubulina, e o sítio ativo em que as moléculas sugeridas foram encaixadas foi o mesmo descrito para a colchicina, também descrita como um potente inibidor da polimerização da tubulina (JIN, QI, *et al.*, 2011). A estrutura da tubulina foi obtida no *Research Collaboratory of Structural Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB 4HAT), e o estudo *docking* foi realizado novamente em colaboração com Dr. Carlos Henrique B. da Cruz.

Os análogos sugeridos indicam modificações apenas nos anéis **A** e **B** da CA-4, não havendo modificações na configuração e nos substituintes da dupla ligação que os une (Figura 21).

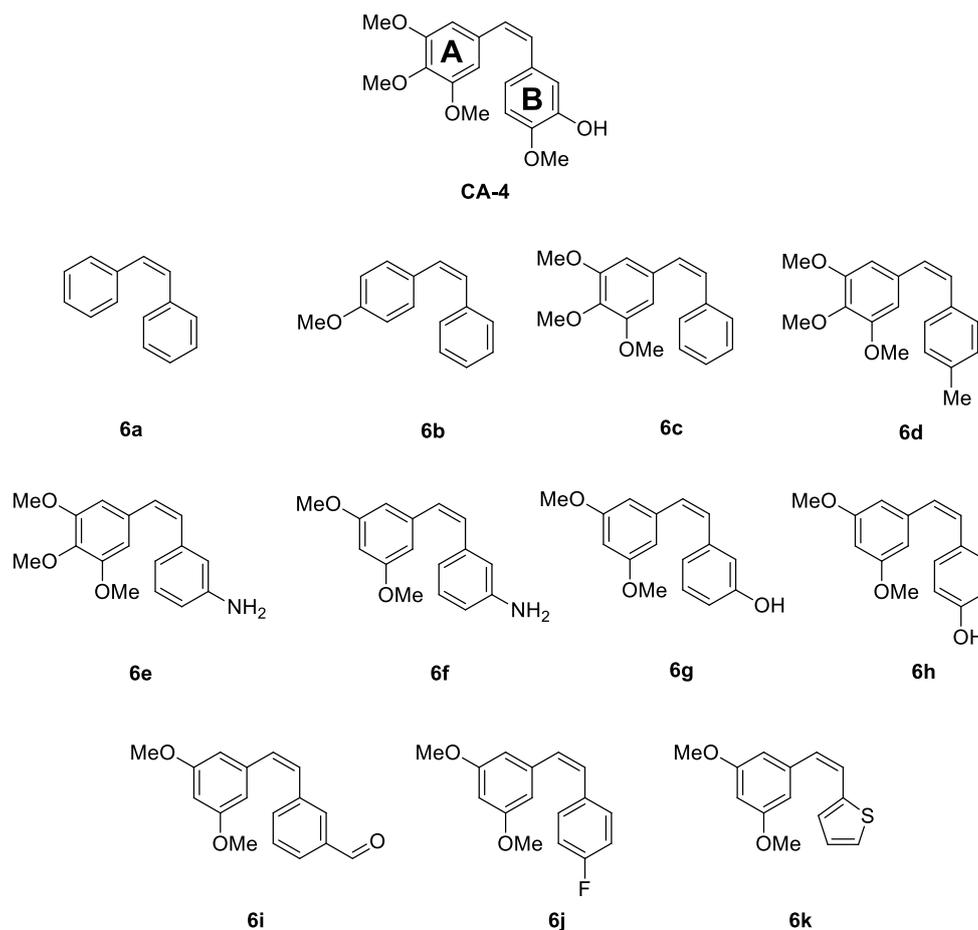
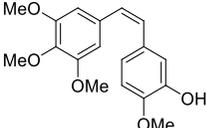
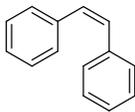
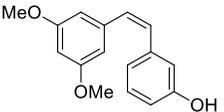
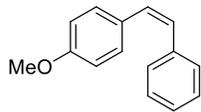
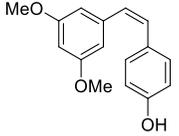
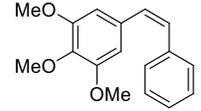
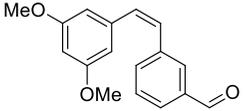
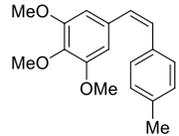
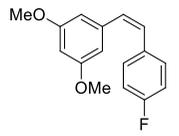
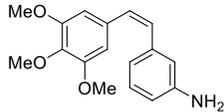
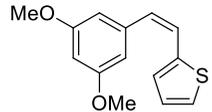
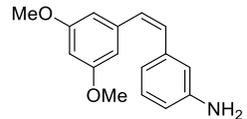


Figura 21: Estruturas químicas da CA-4 e de seus análogos estruturais propostos.

Inicialmente calculou-se a energia de ligação necessária para que a CA-4 se encaixasse ao domínio da colchicina na tubulina. O valor obtido foi de $\Delta G_{\text{ligação}} = -6,70$ kcal/mol. Como dito anteriormente, quanto menor a energia de ligação necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo biológico, mais fácil ocorrerá seu encaixe e assim, teoricamente, melhor será a atividade biológica desse composto.

Os valores de energia de ligação obtidos através dos cálculos de *docking* molecular para os compostos sugeridos estão descritos na Tabela 7, e na Figura 22 temos, de maneira ilustrativa como ocorre o encaixe do composto **6f** no domínio da colchicina na tubulina.

Tabela 7: Resultados obtidos no estudo de docking molecular para a CA-4 e seus análogos sugeridos **6a-k**.

$\Delta G_{\text{ligação}}$ calculado (kcal/mol)	Análogo	$\Delta G_{\text{ligação}}$ calculado (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{ligação CA-4}}$ - $\Delta G_{\text{ligação}}$ análogo (kcal/mol)	Análogo	$\Delta G_{\text{ligação}}$ calculado (kcal/mol)	$\Delta G_{\text{ligação CA-4}}$ - $\Delta G_{\text{ligação}}$ análogo (kcal/mol)
 CA-4	 6a	-5,35	+1,35	 6g	-7,93	-1,23
	 6b	-5,99	+0,71	 6h	-7,17	-0,47
	 6c	-6,69	+0,01	 6i	-7,27	-0,57
	 6d	-7,04	-0,34	 6j	-7,19	-0,49
	 6e	-7,97	-1,27	 6k	-6,76	-0,06
	 6f	-7,39	-0,69			

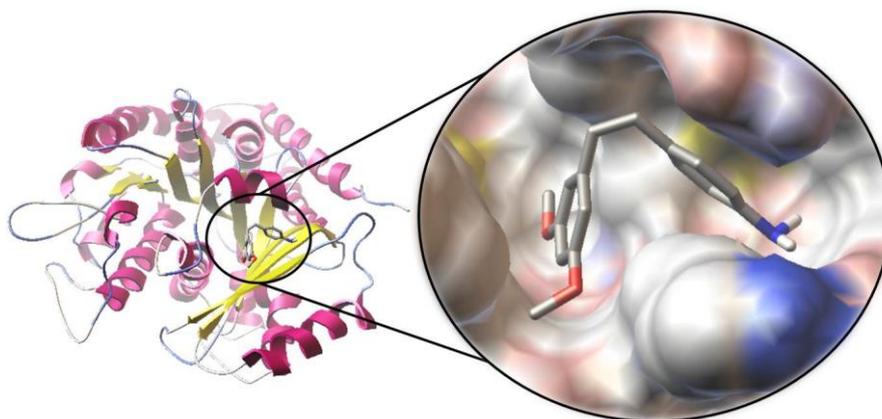


Figura 22: Imagem ilustrativa do encaixe do composto **6f** no sítio ativo da tubulina.

De acordo com a Tabela 7, os compostos que apresentaram valores negativos de $\Delta G_{\text{ligação CA-4}} - \Delta G_{\text{ligação análogo}}$ necessitam de menos energia para se ligarem ao sítio ativo da proteína alvo e, portanto, teoricamente seriam mais ativos que este produto natural. Dessa forma, os resultados de docking molecular indicam que os *Z* estilbenos **6a** e **6b** seriam menos ativos que a CA-4, os análogos **6c** e **6k** apresentariam atividades semelhantes a CA-4, e os compostos **6d-j** seriam mais ativos que a CA-4.

Considere a seguinte designação dos anéis dos *Z*-estilbenos sugeridos para as observações a seguir:

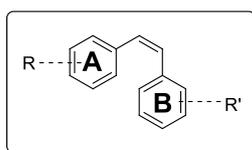
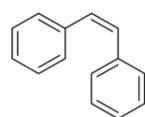
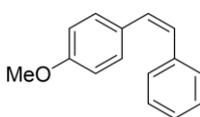
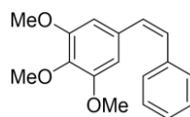
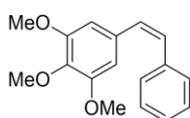
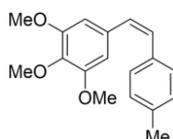
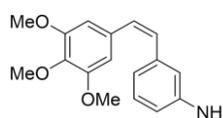


Figura 23: Designações anéis **A** e **B** dos *Z*-estilbenos.

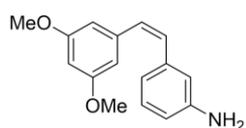
Podemos dividir os análogos propostos em três grupos de acordo com os substituintes nos anéis **A** e **B**, são eles:

▪ **Grupo 1: Análogos 6a-c.****6a**
-5,35 kcal/mol**6b**
-5,99 kcal/mol**6c**
-6,69 kcal/mol

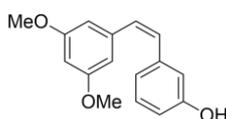
Neste grupo temos que no análogo **6a** não há nenhum substituinte nos anéis **A** e **B**, enquanto que nos compostos **6b** e **6c** o número de grupos metoxila aumenta no anel **A**, e a configuração do anel **B** é mantida. Observamos neste grupo que o aumento de grupos metoxila no anel **A** acarreta uma redução no valor da energia de ligação calculada, confirmando a hipótese de que a presença de grupos metoxila no anel **A** é um fator importante para a atividade destes compostos.

▪ **Grupo 2: Análogos 6c-6e.****6c**
-6,69 kcal/mol**6d**
-7,04 kcal/mol**6e**
-7,97 kcal/mol

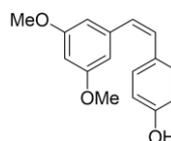
Neste grupo temos a manutenção dos grupos metoxilas no anel **A** e uma variação nos substituintes do anel **B**. Observamos que a inclusão de substituintes no anel **B** (análogos **6d** e **6e**) provoca uma redução nas energias de ligação calculadas, contudo a presença de um substituinte na posição *meta* causou uma redução significativa na energia de ligação ao sítio ativo da proteína quando comparado a um substituinte na posição *para*.

▪ **Grupo 3: Análogos 6f-k.**

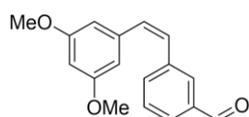
6f
-7,39 kcal/mol



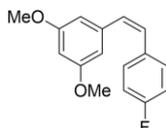
6g
-7,93 kcal/mol



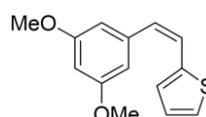
6h
-7,17 kcal/mol



6i
-7,27 kcal/mol



6j
-7,19 kcal/mol



6k
-6,76 kcal/mol

Neste grupo, manteve-se a configuração do anel **A**, com duas metoxilas nas posições 3 e 5, e modificado os substituintes, e posições dos mesmos, no anel **B**. Aqui, foi considerada a hipótese de que a presença das três metoxilas no anel **A** não teria importância crucial para a atividade dos estilbenos análogos da CA-4. Algumas conclusões podem ser feitas acerca dos resultados das energias de ligação calculadas para este grupo, são elas:

- A presença de grupos doadores (NH₂, OH) e retirador (CHO) na posição *meta* (compostos **6f**, **6g** e **6i**) resultaram em menores energias de ligação, quando comparados à energia calculada para a CA-4;
- Estudos de estrutura-atividade indicaram que a substituição do grupo OH na posição *meta* do anel **B** poderia resultar em compostos mais ativos que a CA-4 (TRON, PIRALI, *et al.*, 2006). Quando os resultados de *docking* molecular para os compostos **6f**, **6g** e **6i** foram considerados, foi possível confirmar tal hipótese, pois seus valores de energia de ligação obtidos foram menores que o calculado para a CA-4. Contudo, para os compostos em questão, a presença do grupo OH continua resultando em valores inferiores de energia de ligação [$(\Delta G_{\text{ligação}6g} - \Delta G_{\text{ligação}6f} = (-7,93 \text{ kcal/mol}) - (-7,39 \text{ kcal/mol}) = -0,54 \text{ kcal/mol}$; $(\Delta G_{\text{ligação}6g} - \Delta G_{\text{ligação}6i} = (-7,97 \text{ kcal/mol}) - (-7,27 \text{ kcal/mol}) = -0,70 \text{ kcal/mol}$)];
- Tais estudos de estrutura-atividade também sugeriram que esta

substituição não é positiva quando a hidroxila é substituída por grupos mais volumosos. Esta hipótese foi confirmada quando os compostos **6g** e **6i** foram comparados;

- O efeito eletrônico do substituinte no anel aromático também foi avaliado. A presença de um grupo doador (OH, **6h**) e um retirador de elétrons (F, **6j**) na posição *para* do anel **B** não resultou numa diferença significativa no *docking* molecular ($\Delta G_{\text{ligação6k}} - \Delta G_{\text{ligação6j}} = (-7,19 \text{ kcal/mol}) - (-7,17 \text{ kcal/mol}) = -0,02 \text{ kcal/mol}$).
- A substituição do anel **B** por um anel heteroaromático (**6k**) não resultou em um aumento da energia de ligação quando comparado com os demais compostos estudados, e também não apresentou uma redução significativa na energia de ligação quando comparado com o valor calculado para a CA-4.

Com as considerações feitas até agora, e considerando os compostos **6e**, **6f** e **6g** os quais, segundo o estudo de *docking* seriam os mais ativos dentre os análogos sugeridos, tem-se:

- Os resultados obtidos para os análogos **6e** e **6f**, nos quais a configuração do anel **B** foi mantida e o número de grupos metoxila no anel **A** foi reduzido, seria contraditório a hipótese de que a presença de três metoxilas no anel **A** não seria fundamental para a atividade.
- Quando os compostos **6e** e **6g** nos quais um grupo metoxila no anel **A** foi removido e o substituinte do anel **B** foi alterado (NH₂ *versus* OH) foram comparados, não foi observada uma diferença significativa nos valores calculados de energia de ligação ($\Delta G_{\text{ligação6e}} - \Delta G_{\text{ligação6g}} = (-7,97 \text{ kcal/mol}) - (-7,93 \text{ kcal/mol}) = -0,04 \text{ kcal/mol}$). Assim, foi confirmada que a presença das três metoxilas no anel **A** não seria fundamental para a manutenção da atividade do análogo.

Dessa forma, o estudo teórico de *docking* molecular realizado para os compostos sugeridos confirmaram as hipóteses divulgadas anteriormente na literatura para estudos de estrutura-atividade de análogos da CA-4.

Assim, ao considerarmos que os resultados obtidos nos testes de atividades biológicas para as δ -lactonas α,β -insaturadas corroboraram com os resultados obtidos no estudo teórico de *docking* molecular, nesta etapa do trabalho decidimos sintetizar apenas aqueles análogos que apresentaram diferenças significativas nos valores calculados de energia de ligação e que, dessa forma, seriam mais ativos que a CA-4. Então, os análogos selecionados para a etapa de síntese foram **6d-j**.

3.2. Síntese dos Análogos Selecionados

Nesta etapa do trabalho foram dedicados esforços para sintetizar os compostos selecionados a partir do estudo de *docking*. Para tanto, a estratégia sintética utilizada foi baseada na metodologia descrita por Stefani e colaboradores (CELLA e STEFANI, 2006). Contudo, considerando um estudo metodológico realizado em nosso laboratório pela então aluna de doutorado Natércia Maria Miranda Bezerra (BEZERRA, 2011), aplicou-se uma modificação do óxido de prata empregado na metodologia original (Ag_2O). Os resultados apresentados indicaram que o uso de Ag_2CO_3 leva aos produtos de acoplamento sem a obtenção de uma mistura entre os isômeros *Z* e *E*.

É importante salientar que a metodologia descrita por Stefani é bastante versátil uma vez que os substituintes presentes nos anéis aromáticos **A** e **B** podem estar presentes nos teluretos vinílicos ou nos ariltrifluoroboratos de potássio a serem empregados. A análise restrossintética para os análogos da CA-4 selecionados através do estudo de *docking* molecular encontra-se descrita na Figura 24.

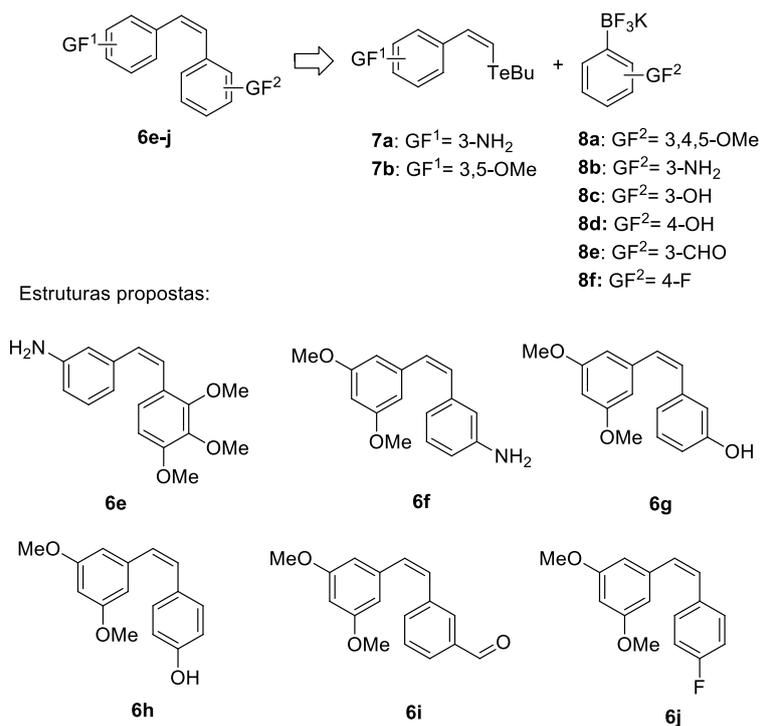
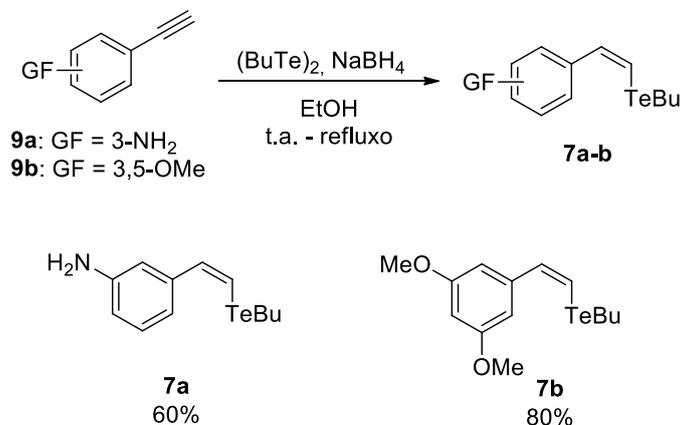


Figura 24: Análise retróssintética proposta para obtenção dos Z estilbenos **6e-j**.

O composto **6d**, não incluído na análise retróssintética acima, foi previamente sintetizado em nosso grupo de pesquisa, e portanto, sua síntese não será abordada neste trabalho (BEZERRA, 2011).

Os teluretos vinílicos **7a-b** foram obtidos a partir da reação de hidroteluração dos alquinos correspondentes, disponíveis comercialmente, empregando-se o ditelureto de dibutila, conforme descrito na literatura (Esquema 10) (OLIVEIRA, PALMEIRA, *et al.*, 2010).

Esquema 10



Os teluretos sintetizados foram caracterizados por GC-MS, RMN ¹H, ¹³C

e ^{125}Te , e os dados obtidos estão de acordo com as estruturas propostas.

Como exemplo temos o espectro de RMN ^1H do composto **7b** (Figura 25). Observamos que os sinais obtidos estão de acordo com a estrutura proposta, e podemos destacar o simpleto em δ 3,8 referente aos seis hidrogênios dos grupos metoxilas, e os dupletos em δ 7,0 e 7,3 referentes aos prótons vinílicos *Ha* e *Hb*, respectivamente. A constante de acoplamento calculada para tais dupletos foi de 10,7 Hz, característica de duplas ligações de configuração *Z*.

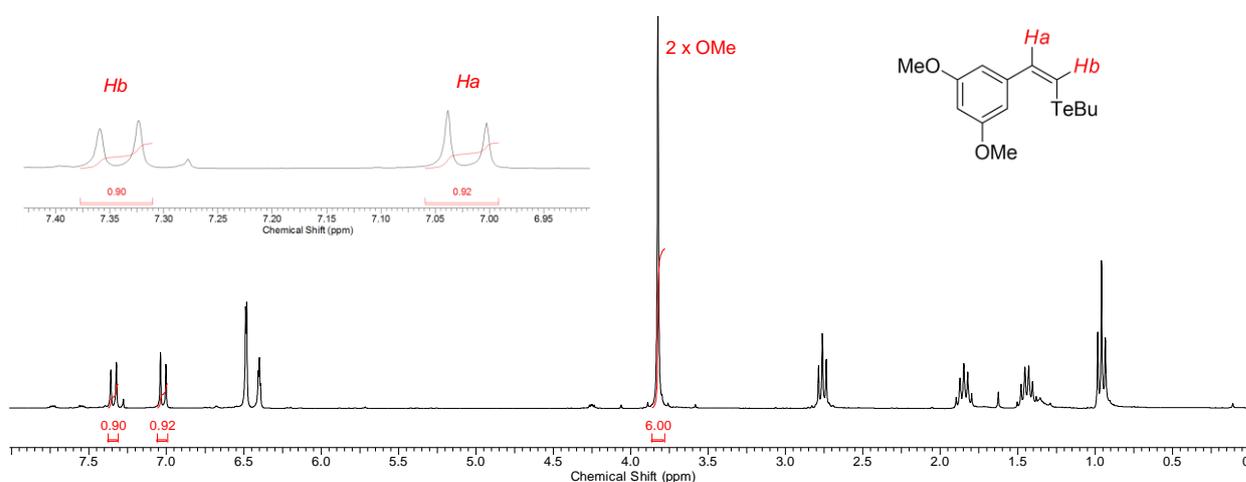


Figura 25: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **7b**.

No espectro de RMN ^{125}Te (Figura 26) é possível observar apenas um sinal em aproximadamente δ 337, indicativo da formação de um único composto, o telureto vinílico de configuração *Z*, como evidenciado anteriormente pelo espectro de RMN ^1H .

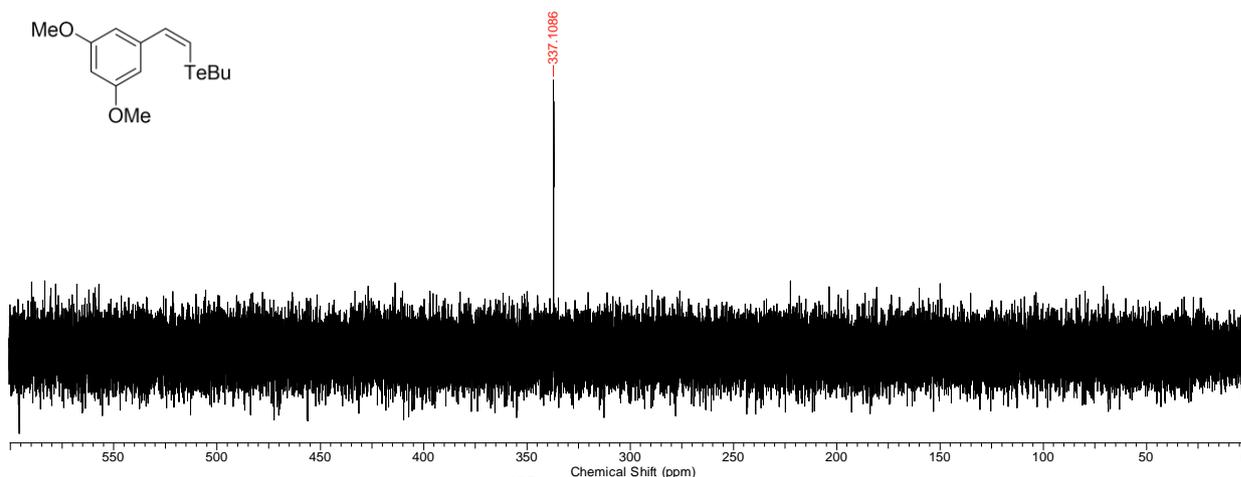
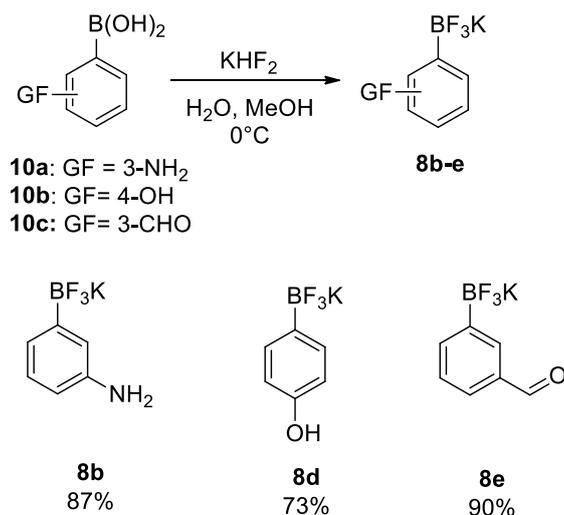


Figura 26: Espectro de RMN ^{125}Te (126 MHz, CDCl_3) do composto **7b**.

Os organotrifluoroboratos de potássio **8b**, **8d** e **8e**, foram sintetizados seguindo a metodologia descrita por Vedejs e colaboradores a partir dos seus respectivos ácidos borônicos, obtidos comercialmente (Esquema 11) (VEDEJS, FIELDS, *et al.*, 1999).

Esquema 11



Os trifluoroboratos de potássio arílicos foram obtidos em bons rendimentos e caracterizados por RMN ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{11}B , e os dados obtidos estão de acordo com as estruturas propostas. Para exemplificar, serão discutidos os espectros obtidos para o composto **8d**.

No espectro de RMN ^1H do composto **8d** (Figura 27) é possível observar dois dupletos com $J = 7,8$ Hz referentes aos prótons aromáticos **Ha** (δ 7,10) e **Hb** (δ 6,50), além de um singletto largo em δ 8,54 referente ao grupo hidroxila na posição *para*. Os outros sinais observados são referentes aos solventes

utilizados na recristalização do composto e na aquisição do espectro (GOTTLIEB, KOTLYAR e NUDELMAN, 1997). Tais solventes foram posteriormente removidos em bomba de alto vácuo antes da aplicação do produto nas reações posteriores.

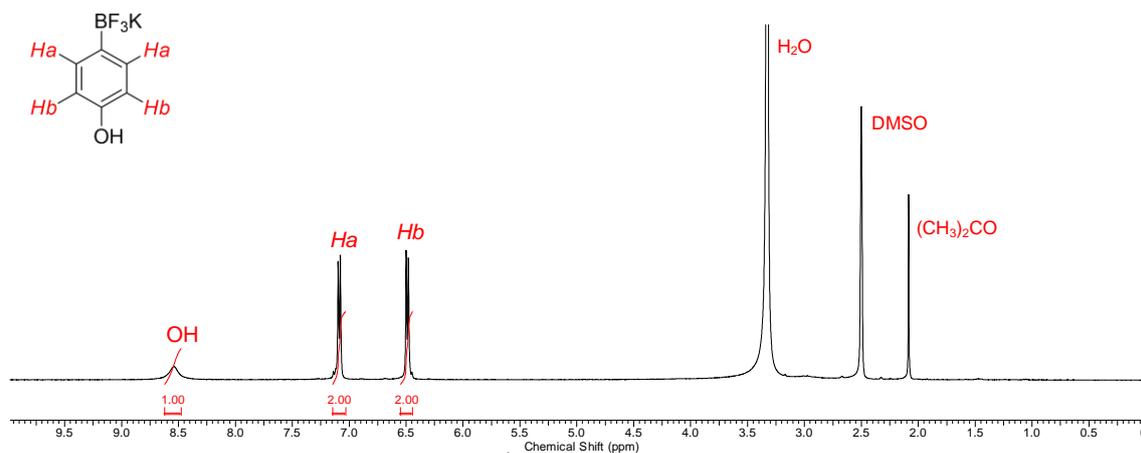


Figura 27: Espectro de RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **8d**.

Na Figura 28 (a) e (b) são mostrados os espectros de RMN ¹⁹F e ¹¹B, respectivamente. O sinal referente aos átomos de flúor presentes na molécula aparece em δ -138, enquanto o sinal referente ao átomo de boro aparece em δ 8,1.

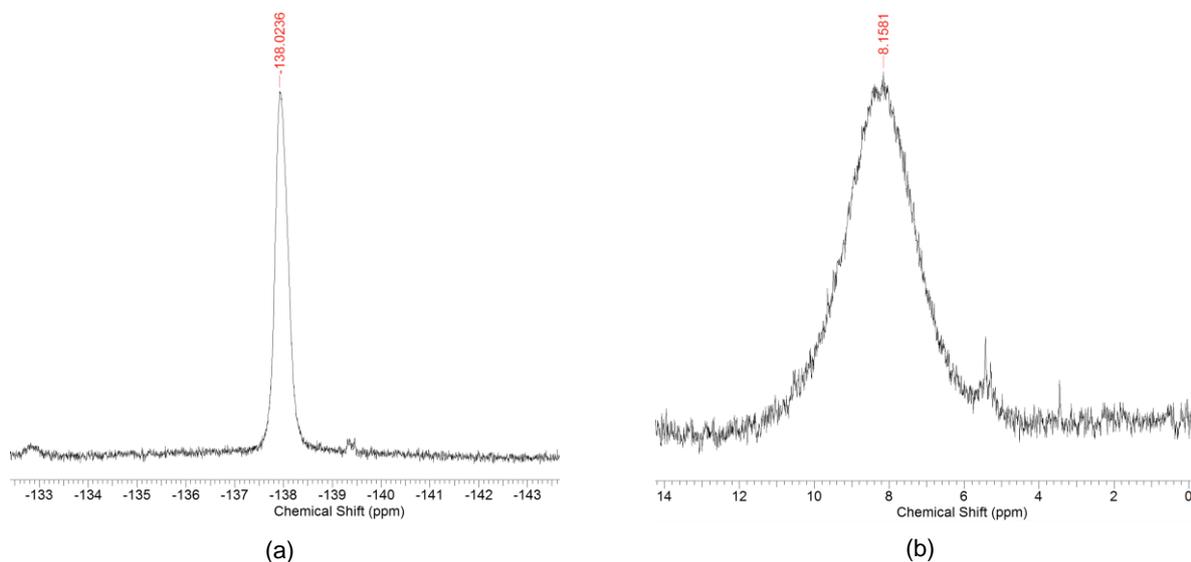
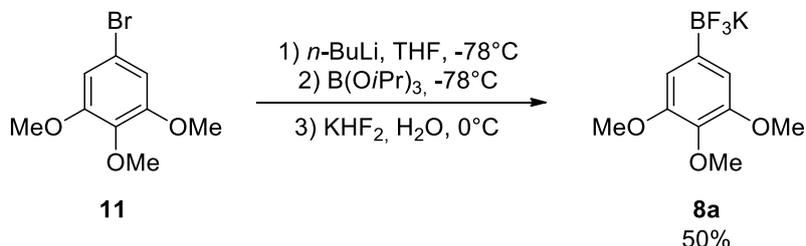


Figura 28: (a) espectro de RMN ¹⁹F (376 MHz, DMSO-*d*₆) e (b) ¹¹B (128 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **8d**.

Para a síntese do ariltrifluoroborato de potássio **8a**, foi utilizada uma metodologia baseada na reação de troca lítio/halogênio do brometo de 3,4,5-

trimetóxi-benzeno, obtido comercialmente, seguido da adição de triisopropilborato e KHF_2 (Esquema 12) (BROWN, 1997), (BROWN e ZAIDLEWICK, 2001) e (SUZUKI e BROWN, 2003).

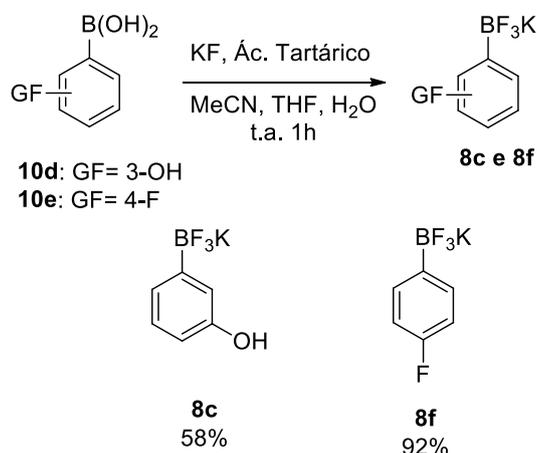
Esquema 12



Empregando-se esta metodologia, o composto **8a** foi obtido com rendimento de 50% sendo também caracterizado através de RMN ^1H , ^{13}C , ^{11}B e ^{19}F .

Já os ariltrifluoroboratos de potássio **8b** e **8f** foram obtidos a partir da metodologia descrita por Lennox e Lloyd-Jones (Esquema 13) na qual o ácido borônico foi convertido ao trifluoroborato de potássio correspondente a partir da utilização de fluoreto de potássio, seguido da adição de um ácido suave, neste caso o ácido *L*-(+)-tartárico (LENNOX e LLOYD-JONES, 2012).

Esquema 13

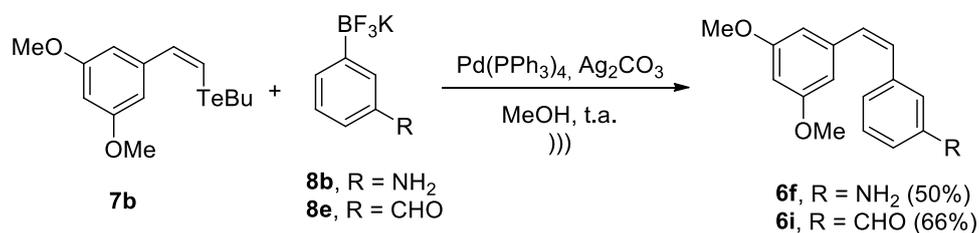


Após obtenção dos materiais de partida necessários foram realizadas tentativas para a síntese dos compostos propostos **6e-j**. A metodologia foi baseada na reação de acoplamento, sendo utilizado o $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ como catalisador.

Dois resultados distintos foram observados nesta etapa do trabalho. A reação para a síntese dos análogos **6f** e **6i** levou aos compostos desejados em

bons rendimentos após purificação através de cromatografia em coluna (Esquema 14).

Esquema 14



Os compostos **6f** e **6i** foram devidamente caracterizados por RMN ¹H e ¹³C e os sinais obtidos estão de acordo com as estruturas propostas. No espectro de RMN ¹H do composto **6i**, podem ser destacados os dois dupletos em δ 7,5 e 7,7 com $J = 7,4$ Hz, referentes aos hidrogênios vinílicos *Ha* e *Hb*, respectivamente. O valor obtido para esta a constante de acoplamento é característico de prótons em configuração *Z*, o que confirma a manutenção da configuração da dupla ligação do telureto vinílico após a reação de acoplamento. Além disso, podem ser observados dois simpletos em δ 3,6 e 9,9 referentes aos hidrogênios dos grupos metoxila presentes no anel **A**, e ao hidrogênio do grupo -CHO, presente no anel **B**, respectivamente (Figura 29).

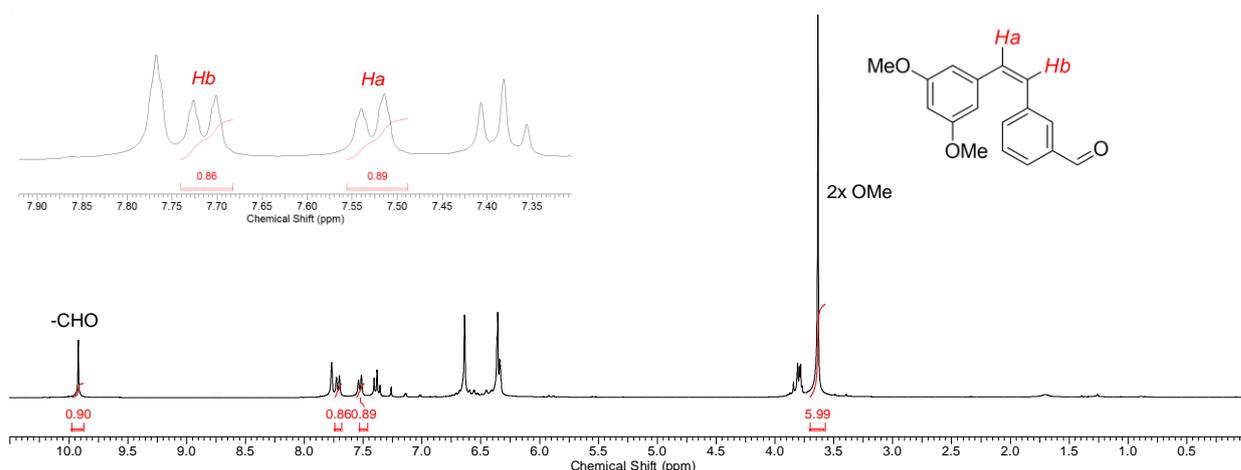
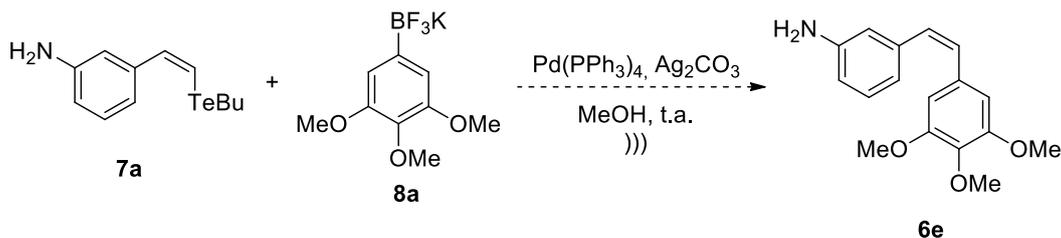


Figura 29: Espectro de RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **6i**.

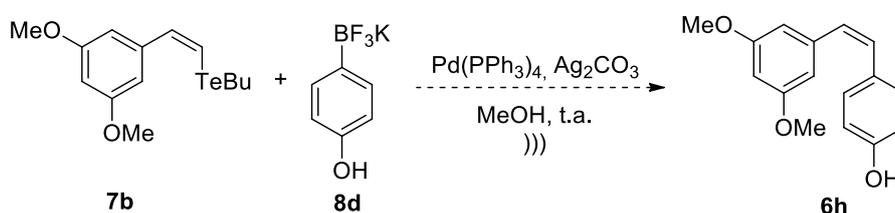
Quando as mesmas condições reacionais foram aplicadas ao telureto vinílico **7a** e o trifluoroborato arílico **8a**, a reação não levou ao derivado proposto **6e**, mas a uma mistura complexa de produtos (Esquema 15).

Esquema 15



O mesmo foi observado quando o telureto vinílico **7b** e o trifluoroborato arílico **8d** foram empregados, onde o derivado proposto **6h** não foi obtido, mas uma mistura complexa de produtos (Esquema 16).

Esquema 16

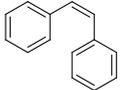
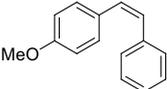
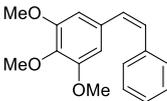
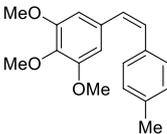
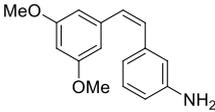
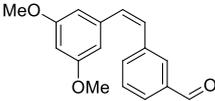


Mesmo não sendo possível obter todos os análogos selecionados para a síntese, foi dado prosseguimento ao trabalho realizando o estudo da atividade antitumoral dos *Z* estilbenos sintetizados.

3.3. Atividade Antitumoral

Os *Z* estilbenos **6f** e **6i** foram submetidos ao estudo de suas atividades citotóxicas frente a três linhagens de células tumorais: **HL-60** (leucemia pró-mielocítica), **HT-29** (adenocarcinoma humano de cólon) e **NCI-H292** (carcinoma humano de pulmão). Da mesma forma que para as δ -lactonas α,β -insaturadas, este estudo foi realizado em colaboração com a professora Gardênia C. G. Militão. O método utilizado foi o de MTT, e um *screening* inicial a uma concentração constante de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi realizado com o intuito de avaliar as percentagens de inibição para cada linhagem de células. Na Tabela 8 abaixo, encontram-se os resultados obtidos para os compostos **6f** e **6i**, além dos obtidos anteriormente por nosso grupo de pesquisa para os compostos **6a-d** a título de comparação (BEZERRA, 2011).

Tabela 8: Percentual de Inibição de Crescimento Celular (IC%) dos análogos **6a-d**, **6f** e **6i**, em três linhagens de células tumorais na dose única de 25 µg/mL.

	Análogos	IC% Linhagens Testadas		
		HT-29	NCI-H292	HL-60
6a		49,4 ± 4,8	58,7 ± 1,1	N.T.
6b		42,1 ± 1,3	46,7 ± 7,1	N.T.
6c		58,3 ± 0,5	46,6 ± 4,5	N.T.
6d		85,2 ± 0,2	77,2 ± 0,9	N.T.
6f		-	45,1 ± 2,9	73,3 ± 7,0
6i		-	47,7 ± 0,9	90,9 ± 0,6

*N.T.: Não Testado

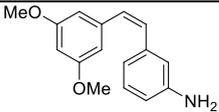
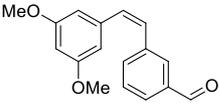
Os resultados obtidos no *screening* inicial foram avaliados de acordo com a escala de intensidade que define o grau de citotoxicidade dos compostos testados, assim como feito no Capítulo 1 para as δ -lactonas α,β -insaturadas (Figura 12).

Na escala de intensidade, os compostos considerados promissores são aqueles que apresentam alta atividade (IC% entre 70-100%). De acordo com os resultados de *docking* molecular apresentados na Tabela 7, tem-se que, dentre as estruturas sugeridas, os compostos menos ativos seriam **6a-c**, e os mais ativos seriam **6d-k**. Esta tendência teórica também foi observada no resultado experimental, uma vez que os compostos **6a-c** apresentam percentuais de inibição baixos e moderados, e os compostos **6d**, **6f** e **6i** apresentam altos percentuais de inibição em algumas das linhagens testadas,

sendo assim classificados como promissores.

Dessa forma, o estudo de atividade antitumoral dos compostos sintetizados neste trabalho continuou com a determinação de seus valores de IC_{50} (Tabela 9).

Tabela 9: Valores de IC_{50} obtidos para os *Z* estilbenos **6f** e **6i** frente a três linhagens de células tumorais.

Análogos	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	HL-60	HT-29	NCI-H292
6f 	0,2	>25	>25
6h 	1,9	>25	>25
DOX ^a	0,02	0,4	0,01

^aDoxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo.

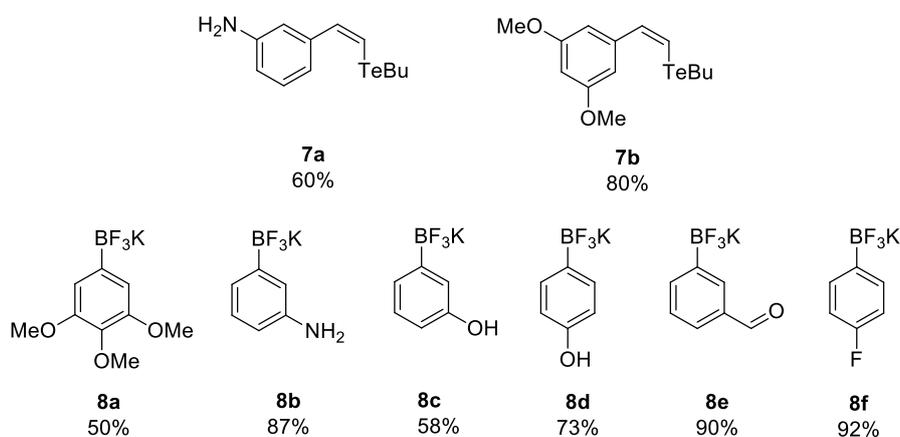
Os resultados obtidos indicaram que os *Z* estilbenos testados não tiveram atividades citotóxicas efetivas frente às linhagens de tumores sólidos (**HT-29** e **NCI-H292**), indicando que estes compostos são mais agressivos frente a linhagens de tumores líquidos (**HL-60**), apresentando excelentes valores de IC_{50} .

Em uma análise comparativa destes resultados com os obtidos no estudo de *docking* molecular, pode-se observar que os dados estão em consonância. O estudo teórico indicou um valor de energia de ligação ao sítio ativo da tubulina para o composto **6f** igual a -7,39 kcal/mol, e para o composto **6i** igual a -7,27 kcal/mol. Desse modo, teoricamente, o análogo **6f** da CA-4 seria mais ativo que o análogo **6i**, pois se ligaria mais facilmente ao domínio colchicina na tubulina. Este fato foi comprovado experimentalmente para uma das linhagens de células tumorais testadas, mostrando que o composto **6f** é mais ativo que o **6i** frente às células de leucemia pró-mielocítica (**HL-60**).

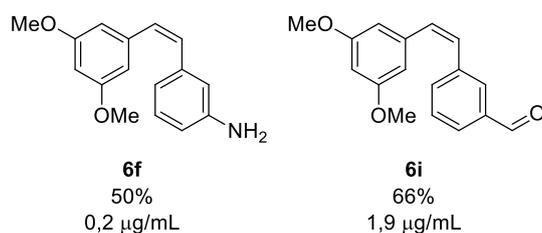
Assim, os resultados obtidos para os análogos sintetizados neste trabalho são satisfatórios, e demonstram a aplicabilidade do estudo multidisciplinar na busca por novos compostos bioativos.

4. Conclusões

- ✓ As estruturas moleculares dos análogos sugeridos e da CA-4 foram submetidas ao estudo de *docking* molecular tendo como alvo biológico a tubulina. Os compostos **6d-k** obtiveram valores de energia de ligação menores quando comparados com o produto natural, indicando que, teoricamente, apresentariam melhores atividades biológicas que a CA-4.
- ✓ Os materiais de partida necessários para a reação de acoplamento cruzado, teluretos vinílicos e ariltrifluoroboratos de potássio, foram sintetizados em rendimentos que variaram de moderados a excelentes.



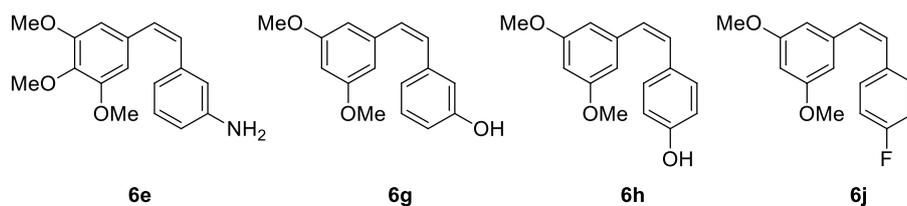
- ✓ Dos sete análogos selecionados para síntese, dois foram obtidos em bons rendimentos e submetidos a testes de atividade antitumoral.



- ✓ Os estilbenos **6f** e **6i** sintetizados neste trabalho são inéditos, não tendo suas estruturas descritas na literatura até o presente momento.
- ✓ Os resultados obtidos para atividade antitumoral estão de acordo com a previsão feita pelo estudo de *docking* molecular que indicava que o análogo **6f** seria mais ativo dentre os compostos testados.

5. Perspectivas

- ✓ Realizar a síntese dos *Z*-estilbenos **6e**, **6g**, **6h** e **6j** para a posterior avaliação de suas atividades antitumorais, e comparação do resultado experimental com o teórico;



- ✓ Submeter o estudo dos análogos da CA-4 a um *journal* de circulação internacional indexado.

Capítulo 3: Procedimentos Experimentais

1. Aspectos Gerais

A vidraria utilizada, quando necessário, foi flambada sob fluxo de argônio seco. Os solventes usados nas reações e colunas cromatográficas foram purificados antes de serem utilizados; o THF foi seco a partir de sua destilação sob sódio metálico; o CH_2Cl_2 foi seco a partir de sua destilação sob CaH_2 ; a concentração do $n\text{-BuLi}$, quando necessária, foi determinada através de titulação com isopropanol utilizando 1,10-fenantrolina como indicador; todos os reagentes comerciais foram usados do mesmo modo como foram entregues.

Purificações através de cromatografia em coluna foram realizadas utilizando-se sílica-gel Merck (230-400 mesh) [Aldrich ou Merck]; as análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas de sílica-gel GF Analtech ou placas GF Merck e, para suas visualizações, as placas foram colocadas sob luz ultravioleta, ou mergulhadas em solução vanilina.

Os espectros de RMN ^1H (300 e 400 MHz), ^{13}C (75 ou 100 MHz), ^{19}F (376 MHz), e ^{11}B (128 MHz) foram registrados em um aparelho Varian UNITY PLUS ou Varian UNMRS; os deslocamentos químicos são expressos em partes por milhão (ppm) relativos ao pico residual do solvente utilizado na aquisição. No caso dos espectros de RMN ^{11}B (128 MHz), ^{19}F (376 MHz) e ^{125}Te (94 MHz), os espectros foram calibrados utilizando, respectivamente, $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (0.0 ppm), $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (0.0 ppm) e difenil ditelureto (422,0 ppm) como referência externa. As constantes de acoplamento (J) são descritas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no aparelho Shimadzu QP-5050A (70 eV) utilizando hélio 5,0 como gás de arraste e uma coluna DB-5 (30m x 0,25 μm); os espectros de massas de alta resolução foram obtidos no equipamento Bruker Micro Tof Ic Bruker Daltonics. Os espectros de infravermelho foram registrados no espectrômetro Bruker IFS 66 e as amostras foram preparadas como filmes finos ou pastilhas de KBr.

Os equipamentos citados acima se encontram na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, com exceção do equipamento de massas de alta resolução que se

encontra na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

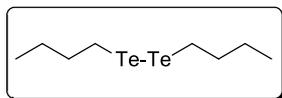
2. δ -Lactonas α,β -Insaturadas

2.1. *Docking* Molecular:

A estrutura cristalográfica da CRM1-RAN complexada com o inibidor foi obtida do *Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank* (PDB 4HAT) (SUN, CARRASCO, *et al.*, 2013). Os ligantes e moléculas de água foram retirados do arquivo PDB. Todos os cálculos de encaixe molecular foram executados com o pacote de programas do AutoDockTools 4.2 (ADT) (MORRIS, HUEY, *et al.*, 2009). Inicialmente, a estrutura molecular dos ligantes foi construída através do programa Gauss View 4.1 (DENNINGTON, KEITH e MILLAM, 2009) e otimizada usando o modelo semi-empírico AM1 (DEWAR, ZOEIBISH, *et al.*, 1985). A carga atômica do modelo Gasteiger (GESTEIGER e MARSILI, 1980), os tipos de átomos e a flexibilidade do ligante foram determinados usando o conjunto de parâmetros padrão do programa ADT, no qual foi permitido torcer apenas a ligação que conecta os anéis aromáticos. Os mapas de energia eletrostática, afinidade atômica específica e desolvatação, necessárias para o cálculo de *docking*, foram calculadas usando o programa Autogrid 4.2, com centro do grid em -39,174; 72,955 e 29,907 Å, dimensões iguais a 19,50 x 15,75 x 15,75 Å, e espaçamento de 0,375 Å. Cinquenta populações, cada uma com 2,5 milhões de avaliações, foram obtidas usando o Algoritmo Genético de minimização da energia e o programa Autodock 4.2.

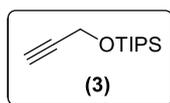
2.2. Sínteses

2.2.1. Preparação do ditelureto de dibutila:



A um balão de fundo redondo (250 mL) sob atmosfera de argônio contendo Te^0 (39 mmol, 5,0 g), previamente ativado em estufa a 100 °C, foi adicionado THF seco (100 mL). A solução foi resfriada a 0 °C, e então *n*-BuLi (45 mmol, 18 mL de uma solução 2,5 M em hexano) foi adicionado lentamente, gota a gota. Após esta adição o banho de gelo foi removido e a mistura reacional foi agitada durante 1h à temperatura ambiente. Decorrido este tempo adicionou-se lentamente uma solução saturada de NH_4Cl (25 mL) e a mistura reacional foi agitada por mais 2h em contato com o ar. Após este período a mistura bifásica foi separada e a fase orgânica obtida foi extraída com acetato de etila (2x10 mL) e lavada com uma solução saturada de NaCl (25 mL). Os extratos orgânicos reunidos foram secos sob MgSO_4 , filtrados e concentrados sob vácuo. O produto desejado foi obtido, sem posterior purificação, como um óleo avermelhado em um rendimento de 13,0 g (90%). IV (filme fino, cm^{-1}) ν_{max} 2955, 2921, 2868, 1457, 1175; RMN^1H (300 MHz, CDCl_3), δ 3,10 (t, 4H, $2\times\text{CH}_2$, $J=7,8$ Hz), 1,80-1,60 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 1,46-1,30 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 0,92 (t, 6H, $2\times\text{CH}_3$, $J=7,5$ Hz); RMN^{13}C (75 MHz, CDCl_3), δ 35,6; 24,5; 13,3; 4,2; $\text{RMN}^{125}\text{Te}$ (94,6 MHz, CDCl_3), δ 127,8; CG/EM m/z (Intensidade relativa %) 373 [M^+] (3), 315 (4), 257 (6), 57 (100), 55 (24), 41 (78), 39 (22).

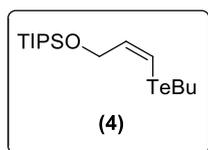
2.2.2. Preparação do tri-isopropil(prop-2-iniloxi)-silano (3):



Em um balão de fundo redondo seco e sob atmosfera de argônio foi adicionado CH_2Cl_2 destilado (30 mL), imidazol (1,70 g, 25 mmol), e álcool propargílico (2, 0,56 g, 0,58 mL, 10 mmol). Após a mistura reacional ser resfriada a 0°C, TIPSCI (2,30 g, 2,55 mL, 12 mmol) foi adicionado lentamente. Ao término da adição a temperatura reacional foi aumentada à ambiente, e a mistura foi

deixada sob agitação e atmosfera de argônio por 12h. A mistura reacional foi então diluída com CH_2Cl_2 (20 mL), e a reação foi interrompida adicionando-se água (20 mL). A mistura bifásica foi separada, e a fase orgânica obtida foi lavada com uma solução 3% de HCl (10 mL), solução saturada de NaHCO_3 (20 mL), e água (10 mL). Os extratos orgânicos reunidos foram secos sob MgSO_4 , filtrados e concentrados sob vácuo. O produto bruto obtido foi então submetido a purificação através de destilação sob vácuo (p.e. 110°C , 20 mmHg), levando ao éter de silício (**3**) como um óleo incolor em um rendimento de 2,0 g (95%). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 4,37 (d, $J = 2,4$ Hz, 2 H, CH_2), 2,38 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, CCH), 1,11-1,04 (m, 3 H, 3 x CH, 18 H, 6 x CH_3); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 81,4 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 72,5 ($\text{CH}\equiv\text{CCH}_2$), 51,7 (CH_2), 17,8 (6 x CH_3), 11,9 (3 x CH).

2.2.3. Preparação do (*Z*)-(3-(butiltalanil)aliloxi)-tri-isopropil-silano (**4**):



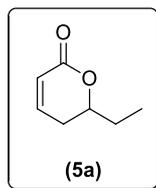
Em um sistema composto de um balão de duas bocas de fundo redondo e um condensador de refluxo sob atmosfera de argônio, diluiu-se (**3**) (2,0 g, 9,5 mmol) em etanol absoluto (20 mL). Acrescentou-se a solução ditelureto de dibutila (1,75 g, 4,75 mmol), e pequenas porções de NaBH_4 até que a coloração avermelhada da solução (característico do BuTeTeBu) se tornasse amarelada (indicativo da presença do ânion butil-teluroolato). Quando a coloração amarelada se manteve constante, a mistura reacional foi aquecida sob refluxo, e o andamento da reação foi acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD). Após consumo total do material de partida, aproximadamente 5h de reação, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, e a reação foi interrompida adicionando-se uma solução saturada de NaHCO_3 (20 mL) e acetato de etila (20 mL). A fase orgânica foi isolada e lavada com H_2O (50 mL) e solução saturada de NaCl (50 mL). Os extratos orgânicos reunidos foram secos sob MgSO_4 , filtrados e concentrados sob vácuo. O produto bruto foi submetido à purificação em coluna cromatográfica utilizando apenas hexano como eluente, levando ao composto (**4**) na forma de

um óleo amarelado em um rendimento de 3,2 g (85%). IV (pastilha de KBr, cm^{-1}) ν_{max} 2941, 2865, 1462, 1095, 918; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,72 (dt, $J = 9,9$ Hz, 4,9 Hz, 1 H, TeCH=CH), 6,39 (dt, $J = 9,9$ Hz, 4,9 Hz, 1 H, TeCH=CH), 4,22 (d, $J = 4,9$ Hz, 2 H, CH=CHCH₂), 2,6 (t, $J = 7,6$ Hz, 2 H, CH₂), 1,80-1,71 (m, 2 H, CH₂), 1,41-1,34 (m, 2 H, CH₂), 1,20-1,07 (m, 3 H, 3 x CH, 18 H, 6 x CH₃), 0,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 3 H, CH₃); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 138,1 (TeCH=CH), 102,1 (TeCH=CH), 65,7 (CH=CHCH₂), 34,0 (CH₂), 24,9 (CH₂), 17,9 (6 x CHCH₃), 17,8 (CH₂), 13,3 (CH₃), 11,9 (3 x CHCH₃); RMN ^{125}Te (94,6 MHz, CDCl_3) δ 366,9; 277,4; CGMS (EI, Rel. Int. %) m/z 400 ($[\text{M}^+]$, 6), 357 (83), 245 (41), 227 (12), 213 (29), 169 (100), 157 (24), 127 (60), 87 (10), 57 (7); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₁₆H₃₄OSiTe $[\text{M} + \text{H}]^+$, 401,1519; encontrado 400,9330.

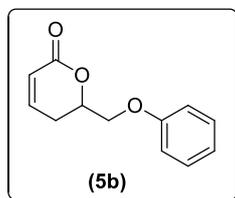
2.2.4. Procedimento geral para a síntese das δ -Lactonas α,β -Insaturadas **5a-e**:

Em um balão adicionou-se THF seco (10 mL) e tiofeno destilado (1,05 g, 12,5 mmol). Esta solução foi resfriada à -78°C e $n\text{-BuLi}$ em hexano (1,40 M, 9,0 mL, 12,5 mmol) foi adicionado lentamente, gota a gota. A mistura amarelada resultante foi aquecida à -40°C e mantida a esta temperatura por 20 minutos, quando foi então transferida via cânula para um segundo frasco contendo uma suspensão de CuCN (0,89 g, 10 mmol) em THF resfriada à -78°C . Ao completar a transferência, o sistema foi aquecido a 0°C e a mistura foi mantida a esta temperatura por 5 minutos, ou até total dissolução, quando foi reestabelecida a temperatura de -78°C . Um segundo equivalente de $n\text{-BuLi}$ em hexano (1,40 M, 7,10 mL, 10 mmol) foi adicionado lentamente, gota a gota. Após 15 minutos à -78°C , a mistura foi novamente aquecida a 0°C e o telureto vinílico (**4**) (4,20 g, 10,5 mmol), dissolvido em THF (10 mL), foi adicionado. A temperatura da mistura reacional foi elevada a ambiente, e mantida sob agitação por 1h. Após este período, a mistura foi novamente resfriada à -78°C , e o epóxido apropriado (10 mmol), dissolvido em THF (10 mL) foi adicionado. A mistura reacional foi aquecida mais uma vez a 0°C , e mantida a esta temperatura por 3h. Depois foi aquecida a temperatura ambiente e mantida sob agitação por mais 1h. Ao final deste período, baixou-se a temperatura para -78°C e adicionou-se uma solução 9:1 de solução saturada de NH₄Cl e solução

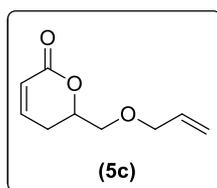
saturada de NH_4OH . A mistura foi agitada por mais 15 minutos, enquanto sua temperatura atingiu a ambiente. Após esse período, a mistura foi extraída com Acetato de etila (2 x 60 mL), e a fase orgânica obtida foi lavada com solução saturada de NaCl (2 x 100 mL), seca sob MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi então dissolvido em THF (5 mL), e TBAF (10 mL, solução 1 M em THF, 10 mmol) foi adicionado lentamente. A mistura reacional foi mantida sob agitação e temperatura ambiente e o andamento da reação foi acompanhado por CCD. Ao observar o consumo total do material de partida, a reação foi interrompida adicionando-se uma solução saturada de NH_4Cl (10 mL). A fase aquosa foi extraída com Acetato de etila, e as fases orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução saturada de NaCl , secas sob MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel, utilizando um sistema 1:1 hexano/Acetato de etila para levar aos 1,5-dióis correspondentes. Após purificação, os 1,5-dióis (2,5 mmol, 1 equiv.) foram transferidos para um balão de fundo redondo e diluídos em CH_2Cl_2 (30 mL). Adicionou-se BAIB (2,5 g, 7,7 mmol, 3 equiv.) e TEMPO (0,08 g, 20 mol%), e a mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente. Após todo material de partida ser consumido, aproximadamente 3h de agitação, a reação foi interrompida adicionando-se uma solução saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 mL), e extraída com CH_2Cl_2 (2 x 25 mL). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com soluções saturadas de NaHCO_3 (10 mL), NH_4Cl (10 mL) e NaCl (2 x 50 mL), secos sob MgSO_4 , filtrados e concentrados a vácuo. O produto bruto foi purificado por coluna cromatográfica em sílica gel usando soluções que variaram em proporções entre 100:0 a 90:10 (hexano/Acetato de etila) para levar as δ -lactonas α,β -insaturadas **5a-e**.

6-etil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5a):

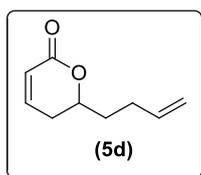
Isolado como um óleo incolor, 0,24 g (75%); IV (filme fino, cm^{-1}) ν_{max} 1714 (C=O), 1251, 1036, 865; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,87 (ddd, $J = 9,6; 5,1; 3,3$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 6,02 (dt, $J = 9,6; 1,5$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 4,39-4,30 (m, 1 H, CH), 2,34-2,29 (m, 2 H, CH=CHCH₂), 1,85-1,64 (m, 2 H, CH₂), 1,00 (t, $J = 7,2$ Hz, 3 H, CH₃); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 164,6 (C=O), 145,1 (CH=CH), 121,3 (CH=CH), 79,1 (CH₂CHO), 28,8 (CH₂), 27,8 (CH₂), 9,2 (CH₃); CGMS (EI, Rel. Int. %) m/z 126 ([M⁺], 2), 97 (72), 69 (28), 68 (100), 41 (33), 40 (21); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₇H₁₀O₂Na [M + Na]⁺, 149,0579; encontrado 149,0230.

6-(fenóximetil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5b):

Isolado como um sólido branco, 0,33 g (65%); p.f. 80-82°C; IV (pastilha de KBr, cm^{-1}) ν_{max} 1721 (C=O), 1599, 1495, 1386, 1238, 1087, 1044, 812, 756; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,30-7,15 (m, 2 H, 2 x Ar-CH), 6,94- 6,82 (m, 3 H, 3 x Ar-CH, 1 H, CH=CHCH₂), 6,04 (ddd, $J = 9,6; 3,9; 2,2$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 4,77-4,68 (m, 1 H, CH), 4,15-4,05 (m, 2 H, CH₂), 2,65-2,41 (m, 2 H, CH=CHCH₂); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,4 (C=O), 158,0 (Cq-Ar), 144,8 (CH=CH), 129,5 (2 x CH-Ar), 121,3 (CH=CH), 121,1 (CH-Ar), 114,4 (CH-Ar), 75,5 (CH₂CHO), 68,3 (CH₂O-Ar), 26,1 (CH₂), CGMS (EI, Rel. Int. %) m/z 204 ([M⁺], 43), 111 (28), 110 (36), 107 (24), 97 (100), 94 (33), 83 (15), 81 (16), 79 (17), 77 (67), 69 (56), 55 (25), 43 (70), 41 (59); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₁₂H₁₂O₃Na [M + Na]⁺, 227,0684; encontrado 227,0672.

6-(alilóximetil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5c):

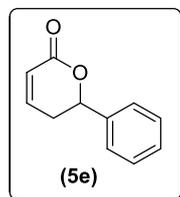
Isolado como um óleo incolor, 0,31 g (75%); IV (filme fino, cm^{-1}) ν_{max} 3524, 3079, 2914, 2867, 1722 (C=O), 1423, 1249, 130, 1051, 848, 663; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,89 (ddd, $J = 9,6; 6,0; 2,7$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 5,97 (ddd, $J = 9,6; 2,4; 0,9$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 5,92-5,79 (m, 1 H, CH=CH₂), 5,28-5,14 (m, 2 H, CH=CH₂), 4,60-4,51 (m, 1 H, CH), 4,03 (dt, $J = 5,7; 1,2$ Hz, 2 H, CH₂CH=CH₂), 3,62 (d, $J = 4,5$ Hz, 2 H, CH₂), 2,59-2,31 (m, 1 H, CH=CHCH₂), 2,32-2,43 (m, 1 H, CH=CHCH₂); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 163,7 (C=O), 145,0 (CH=CH), 134,0 (CH=CH₂), 120,9 (CH=CH), 117,4 (CH=CH₂), 76,5 (CHOCH₂OCH₂), 72,4 (CH₂CHCH₂), 70,6 (CH₂CHO), 25,9 (CH=CHCH₂); CGMS (EI, Rel. Int. %) m/z 169 ([M+1], 1), 154 (46), 126 (68), 97 (34), 81 (13), 69 (74), 55 (30), 43 (90), 41 (86), 40 (37); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₉H₁₂O₃Na [M + Na]⁺, 191,0684; encontrado 191,0680.

6-(but-3-enil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5d):

Isolado como um óleo incolor, 0,25 g (65%); IV (filme fino, cm^{-1}) ν_{max} 1716 (C=O), 1388, 1065, 1039, 996, 955, 864, 817; RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 6,89 (ddd, $J = 9,6; 5,1; 3,9$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 6,03 (dt, $J = 9,6; 1,8$ Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 5,86-5,73 (m, 1 H, CH=CH₂), 5,10-4,98 (m, 2 H, CH=CH₂), 4,48-4,39 (m, 1 H, CH), 2,36-2,21 (m, 4 H, 2 x CH₂); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 164,5 (C=O), 145,0 (CH=CH), 137,1 (CH=CH₂), 121,4 (CH=CH), 115,6 (CH=CH₂), 77,1 (CH₂CHO), 33,9 (CH₂CHO), 29,3 (CH₂), 28,8 (CH₂); CGMS (EI, Rel. Int. %) m/z 152 ([M⁺], 1), 110 (17), 97 (85), 69 (53), 68 (100), 67 (52), 55

(34), 42 (20), 41 (79), 40 (34); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₉H₁₂O₂Na [M + Na]⁺, 175,0735; encontrado 175,0729.

6-fenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5e):



Isolado como um óleo incolor, 0,31 g (70%); IV (filme fino, cm⁻¹) ν_{\max} 1722 (C=O), 1454, 1382, 1246, 1061, 1022, 816, 760, 699; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,45-7,33 (m, 5 H, 5 x Ar-CH), 6,98 (ddd, *J* = 10,0; 5,6; 3,2 Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 6,14 (ddd, *J* = 10,0; 2,4; 1,2 Hz, 1 H, CH=CHCH₂), 5,44 (dd, *J* = 10,8; 5,2 Hz, 1 H, CH), 2,66-2,61 (m, 2 H, CH₂); RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 164,1 (C=O), 144,9 (CH=CH), 138,4 (C_q-Ar), 128,7 (2 x CH-Ar), 128,6 (2 x Ar-CH), 126,0 (Ar-CH), 121,7 (CH=CH), 79,2 (CH₂CHO), 31,6 (CH₂); CGMS (EI, Rel. Int. %) *m/z* 174 ([M⁺], 17), 128 (5), 105 (9), 77 (16), 68 (100), 51 (14); HRMS (ESI, MeOH:H₂O) calculado para C₁₁H₁₀O₂Na [M + Na]⁺, 197,0579; encontrado 197,0575.

2.3. Atividade Antitumoral:

As atividades antitumorais das δ -lactonas α,β -insaturadas **5a-e** foram estudadas nas seguintes linhagens de células tumorais: **HT-29** (adenocarcinoma humano de cólon), **NCI-H292** (carcinoma humano de pulmão), **MCF-7** (adenocarcinoma humano de mama), **HL-60** (leucemia pró-mielocítica) e **K562** (leucemia eritromieloblastóide). Tais linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

O método utilizado na avaliação da citotoxicidade das amostras foi baseado no ensaio de conversão do sal MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromide), disponível para compra na Sigma Aldrich Co.,

em azul de formazan. Para todos os experimentos as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (10^5 células/mL para células aderentes, ou $3,0 \times 10^5$ células/mL para leucemias). Os compostos testados, em concentrações que variaram entre 0,1-25 $\mu\text{g/mL}$, dissolvidos em DMSO 0,1%, foram adicionados em cada poço e incubados por um total de 72h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Os grupos de controle receberam a mesma quantidade de DMSO. Após 69h de incubação, 25 μL de MTT (5,0 mg/mL) foi adicionado a cada poço e, após mais 3h de incubação, o produto da conversão do MTT foi dissolvido em 100 μL de DMSO, e a absorbância foi medida em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

Os valores de IC_{50} e seus intervalos de 95% de confiança para dois diferentes experimentos foram obtidos por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA).

2.4. Atividade Anti-inflamatória:

Quatro camundongos balb/c (6 a 10 semanas) receberam, por via intraperitoneal, 3,0 mL de tioglicolato de sódio 3%. Após 72h os animais foram sacrificados em câmara de CO_2 e o exsudato peritoneal coletado através da lavagem da cavidade com 5,0 mL de PBS gelado estéril. A viabilidade celular foi determinada por meio do corante azul de tripan e a suspensão celular foi cultivada na concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL, em meio RPMI 1640 estéril contendo 10% de soro fetal bovino, suplementado com 1,0% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL e estreptomicina 250 mg/mL) e 1,0% de L-glutamina 200 Mm. A suspensão foi plaqueada em placa de cultura de 96 poços e incubada por 2h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, as células não aderentes foram descartadas, e as δ -lactonas α, β -insaturadas **5b-e** (3,1-25 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas aos macrófagos aderidos na placa na presença de LPS (1,0 $\mu\text{g/mL}$). O controle consistiu apenas na célula nativa. Após 24h de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o sobrenadante foi coletado para análises posteriores dos níveis de nitrito e citocina, e a viabilidade celular avaliada através do ensaio MTT. Para a avaliação da

citotoxicidade dos compostos, 20 μL de uma solução de MTT (5,0 mg/mL) foi adicionada a cada poço por 4h. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO, e sua absorvância foi medida a 550 nm, utilizando um leitor de microplacas. A citotoxicidade foi calculada como uma percentagem de células mortas através da fórmula: $(1 - [\text{absorvância dos poços experimentais}/\text{absorvância dos poços de controle}]) \times 100\%$. Cada concentração foi testada em quadruplicata. Os compostos que apresentaram viabilidade celular acima de 90% (**5b** e **5c**) foram utilizados para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*.

Determinação da produção de NO:

O nitrito presente no sobrenadante da cultura de macrófagos e no exsudato peritoneal foram utilizados como indicadores da produção de NO. Para isto, 50 μL do reagente de Griess foram adicionados ao mesmo volume das amostras em 96 poços de placas de microtitulação, e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorvância das placas foi determinada a 540 nm utilizando um leitor de microplaca, e as concentrações de nitrito foram determinadas por comparação com uma curva padrão de nitrito de sódio.

Avaliação dos níveis de TNF- α :

Os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no sobrenadante da cultura de macrófagos foram determinados utilizando kits comerciais específicos para ratos (eBioscience, San Diego, Califórnia, USA), seguindo-se as instruções dos fabricantes.

3. Z-Estilbenos

3.1. Docking Molecular:

As coordenadas atômicas de uma das subunidades da proteína Tubulina complexada com o inibidor colchicina foram obtidas do Research Collaboratory of Structure Bioinformatics Protein Data Bank (código do PDB 1SA0) (JIN, QI,

et al., 2011). As moléculas de água cristalográfica e o inibidor foram removidos. Todos os átomos de hidrogênio polares foram adicionados, os modelos de cargas atômica Gasteiger (GESTEIGER e MARSILI, 1980) assinalados e os tipos de átomos do campo de força foram determinados usando a interface gráfica do AutoDockTools 4.2 (ADT) (MORRIS, HUEY, *et al.*, 2009) **Erro! Indicador não definido..** A coordenada atômica da Tubulina tratada foi salva no formato requerido pelo autogrid4. Uma malha de pontos centrada no sítio de ligação (118,921; 89,718; e 5,941 Å e espaçamento de 0,375 Å) com dimensões compatíveis com o tamanho dos ligantes (9 x 13,5 x 9,75) foi construída, e os mapas afinidades calculados com Autogrid 4.2.

Todos as estruturas dos Z-estilbenos foram modeladas com o GaussView 4.1 (DENNINGTON, KEITH e MILLAM, 2009) e otimizadas usando o modelo semi-empírico Austin Model 1 (AM1) com o Gaussian 09 (DEWAR, ZOEIBISH, *et al.*, 1985). As cargas atômicas do modelo Gasteiger foram assinaladas e os átomos não polares incorporados dentro da abordagem do united atom. A flexibilidade do ligante foi definida usando o conjunto de parâmetros padrão do ADT. A coordenada atômica dos ligantes foi salva no formato requerido pelo autodock. Finalmente, cinquenta populações cada uma com 2,5 milhões de avaliações foram calculadas usando o Algoritmo Genético de minimização da energia com Autodock 4.2 (MORRIS, HUEY, *et al.*, 2009).

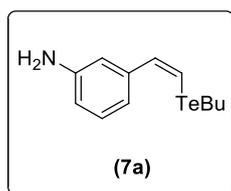
3.2. Sínteses

3.2.1. Síntese dos teluretos vinílicos **7a** e **7b**:

A um sistema composto de um balão de duas bocas de fundo redondo conectado a um condensador de refluxo sob atmosfera de argônio, dilui-se o acetileno apropriado (0,23 g, 2,0 mmol do 3-etinil-anilina; 0,86 g, 5,3 mmol do 1-etinil-3,5-dimetóxi-benzeno) em etanol absoluto (50 mL). Acrescentou-se à mistura reacional ditelureto de dibutila (0,36 g, 1,0 mmol; 1,24 g, 2,65 mmol), e pequenas porções de NaBH₄ até que a coloração avermelhada da solução (característico do BuTeTeBu) se tornasse amarelada (indicativo da presença do ânion butilteluroolato). Quando a coloração amarelada se manteve constante, aqueceu-se a mistura reacional à temperatura de refluxo por 5h, ou o tempo

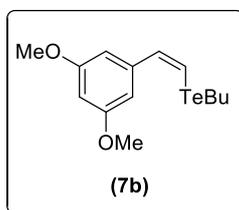
necessário para que todo o material de partida fosse consumido (CCD). A mistura foi então resfriada à temperatura ambiente, e a reação interrompida adicionando-se uma solução saturada de NaHCO_3 (200 mL) e Acetato de etila (200 mL). A fase orgânica foi isolada e lavada com H_2O (500 mL) e solução saturada de NaCl (500 mL), seca sob MgSO_4 , filtrada e concentrada sob vácuo. O produto bruto foi submetido à purificação em coluna cromatográfica com sílica gel utilizando um sistema 90:10 (Hexano/Acetato de etila) como eluente.

(Z)-3-(2-(butiltelanyl)vinil) anilina (7a):



Isolado como um óleo amarelado 0,36g (60%); RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7,24-7,21 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H, $\text{TeCH}=\text{CH}$), 7,11-7,07 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-CH), 6,89-6,86 (d, $J = 11,2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CHTe}$), 6,66-6,64 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar-CH), 3,79 (sl, 2H, NH_2), 2,67-2,63 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, TeCH_2), 1,78-1,71 (qui, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH_2), 1,37-1,29 (sex, $J = 7,6$ Hz, 2H, CH_2), 0,87-0,84 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, CH_3); RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 146,34; 140,02; 136,84; 129,19; 117,87; 114,15; 113,89; 105,14; 33,87; 24,86; 13,36; 8,92; RMN ^{125}Te (126 MHz, CDCl_3) δ 340,58.

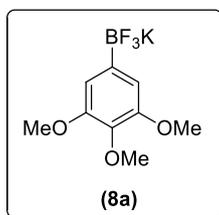
(Z)-butil(3,5-dimetóxi-estiril) telano (7b):



Isolado como um óleo amarelado 1,48g (80%); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,3(d, $J = 10,71$ Hz, 1H, $\text{TeCH}=\text{CH}$), 7,0 (d, $J = 10,71$ Hz, 1H, $\text{TeCH}=\text{CH}$), 6,5 (d, $J = 2,19$ Hz, 2H, 2 x Ar-CH), 6,4 (t, $J = 2,19$, 1H, Ar-CH), 3,8 (s, 6H, 2 x OCH_3), 2,7 (t, $J = 7,41$ Hz, 2H, TeCH_2), 1,8 (qui, $J = 7,41$ Hz, 2H, CH_2), 1,4 (sex, $J = 7,41$ Hz, 2H, CH_2), 0,9 (t, $J = 7,41$ Hz, 3H, CH_3); RMN ^{13}C (75 MHz,

CDCl_3) δ 60,7 (2 x OCH_3), 141,0 ($\text{TeCH}=\text{CH}$), 136,6 ($\text{TeCH}=\text{CH}$), 106,2 (2 x Ar-CH), 105,3 (2 x Ar-OCH_3), 99,9 (Ar-CH), 55,3 ($\text{Ar-CH}=\text{CH}$), 33,8 (CH_2), 24,8 (CH_2), 13,3 (CH_2), 9,0 (CH_3); RMN ^{125}Te (126 MHz, CDCl_3) δ 337,11.

3.2.2. Preparação do 3,4,5-trimetóxi-feniltifluoroborato de potássio (8a):

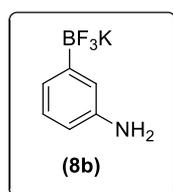


A um balão de fundo redondo seco, sob atmosfera de argônio, contendo uma solução de 5-bromo-1,2,3-trimetóxi-benzeno (1,24 g, 5,0 mmol) em THF (30 mL) a -78°C , adicionou-se *n*-BuLi em hexano (1,60 M, 3,8 mL, 6,0 mmol) lentamente, gota a gota. A mistura reacional foi mantida na mesma temperatura sob agitação por 15 minutos, quando triisopropilborato (1,13 g, 1,38 mL, 6,0 mmol) foi adicionado também lentamente, gota a gota. Depois de concluída a adição, elevou-se a temperatura da mistura reacional para 0°C , e manteve-se a agitação por mais 30 minutos. Passado este período, adicionou-se uma solução de KHF_2 (3,75 g, 48 mmol) em H_2O (5,0 mL). A mistura foi mantida sob agitação por mais 20 minutos a 0°C quando a temperatura foi elevada à ambiente e deixada sob agitação por mais 30 minutos. Após este período, a mistura foi concentrada sob vácuo, e o sólido residual extraído com quatro porções de uma solução 80:20 (acetona/metanol). Os extratos orgânicos combinados foram concentrados até próximo ao ponto de saturação e então, éter etílico foi adicionado até que não fosse mais observada precipitação. O precipitado foi coletado, lavado com duas porções de éter etílico e seco sob alto vácuo durante 12 h levando ao produto desejado na forma de um sólido branco (0,69 g, 50%). RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6,75 (s, 2H, 2 x Ar-CH), 3,74 (s, 6H, 2 x OMe), 3,64 (s, 3H, OMe); RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 223,28 ($\text{Ar-BF}_3\text{K}$), 151,52 (2 x OMe), 135,44 (OMe), 108,03 (2 x Ar-CH), 59,71 (2 x Ar-OMe), 55,42 (Ar-OMe); RMN ^{19}F (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -139,4; RMN ^{11}B (96 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ -16,3.

3.2.3. Procedimento geral para a síntese dos organotrifluoroboratos de potássio **8b**, **8d** e **8e**:

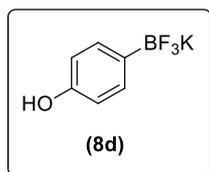
A uma solução do ácido borônico apropriado (8,0 mmol) em metanol (30,0 mL) foi adicionada lentamente, gota a gota, uma solução de KHF_2 (2,35 g, 30,0 mmol) em H_2O (7,0 mL) utilizando-se um funil de adição. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos. Após este período, a mistura foi concentrada sob vácuo. O sólido residual foi extraído com quatro porções de uma solução 80:20 (acetona/metanol). Os extratos orgânicos combinados foram concentrados até próximo ao ponto de saturação e então, éter etílico foi adicionado até que não fosse mais observada precipitação. O precipitado foi coletado, lavado com duas porções de éter etílico e seco sob alto vácuo durante 12 h para levar ao produto desejado.

3-amino-feniltrifluoroborato de potássio (**8b**):



Isolado como um sólido esverdeado 0,46 g (87%); RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 6,85-6,78 (m, 3H), 6,39-6,38 (d, $J=7,2$ Hz, 1H), 2,91 (sl, 2H, NH_2); RMN ^{13}C (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 146,68 (Ar- NH_2), 127,34 (CH), 121,67 (CH), 119,14 (CH), 112, 51 (CH); RMN ^{19}F (376 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ -138,79; RMN ^{11}B (128 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7,89.

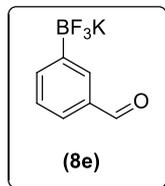
4-hidróxi-feniltrifluoroborato de potássio (**8d**):



Isolado como um sólido rosa 0,77g (73%); RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,10 (d, $J=7,8$ Hz, 2H, 2 x Ar-CH), 6,50 (d, $J=7,8$ Hz, 2H, 2 x Ar-CH); RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 127,23 (Ar- BF_3K), 120,82 (2 x Ar-CH), 118,93 (2 x Ar-CH),

111,92 (Ar-OH); RMN ^{19}F (376 MHz, DMSO- d_6) δ -138,01; RMN ^{11}B (128 MHz, DMSO- d_6) δ 8,15.

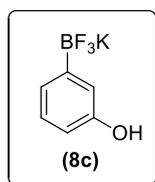
3-formil-feniltrifluoroborato de potássio (8e):



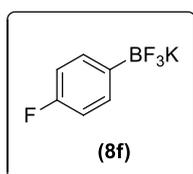
Isolado como um sólido branco 0,95 g (90%); RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,96 (s, 1H, CHO), 7,90 (s, 1H, Ar-CH), 7,70 (d, $J=6,9$ Hz, 1H, Ar-CH), 7,63 (dt, $J=7,5; 1,5$ Hz, 1H, Ar-CH), 7,35 (t, $J=7,5$ Hz, 1H, Ar-CH); RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 195,0 (CHO), 150,3 (Ar-CHO), 138,4 (Ar-BF $_3$ K), 135,1 (Ar-CH), 133,4 (Ar-CH), 127,7 (Ar-CH), 127,2 (Ar-CH); RMN ^{19}F (282 MHz, DMSO- d_6) δ -140,12; RMN ^{11}B (96 MHz, DMSO- d_6) δ 7,38.

3.2.4. Procedimento geral para a síntese dos organotrifluoroboratos de potássio **8c** e **8f**:

A um balão de fundo redondo contendo uma suspensão do ácido borônico correspondente (1,0 mmol) em acetonitrila (4,0 mL), foi adicionado KF (4,0 mmol, 232 mg) em H $_2$ O (0,4 mL). Enquanto isso, uma solução de ácido *L*-(+)-tartárico (2,05 mmol, 308 mg) em THF (1,5 mL) foi preparada a partir do aquecimento e agitação moderada desses componentes. Esta solução foi então adicionada lentamente, gota a gota, à solução contendo o ácido borônico. A solução foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por aproximadamente 1h, ou até que todo material de partida fosse consumido (CCD). A mistura reacional foi então diluída com mais MeCN (1,0 mL), filtrada, e o sólido remanescente no balão é lavado novamente com MeCN (3 x 5,0 mL). O filtrado foi concentrado sob vácuo, e seco em bomba de alto vácuo para levar ao produto desejado.

3-hidróxi-feniltrifluoroborato de potássio (8c):

Isolado como um sólido branco 0,12g (58%); (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8,50 (s, 1H), 6,89 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,79 (d, J = 12 Hz, 1H), 6,44 (d, J = 9,6, 1H); RMN 13 C (100 MHz, DMSO- d_6) δ 158,84; 130,93; 129,46; 126,19; 122,30; 114,27; RMN 19 F (376 MHz, DMSO- d_6) δ -138,95; RMN 11 B (128 MHz, DMSO- d_6) δ 5,33.

4-flúor-feniltrifluoroborato de potássio (8f):

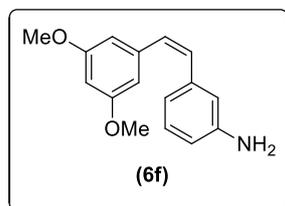
Isolado como um sólido branco 0,186g (92%); RMN 1 H (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,32 (dd, J = 9,0 6,0 Hz, 2H), 6,87 (dd, J = 9,0 e 8,7 Hz, 2H); RMN 13 C (75 MHz, DMSO- d_6) δ 162,94 (Ar-F), 133,18; 113,23; RMN 19 F (283 MHz, DMSO- d_6) δ -118,61 (s, 1F), -139,98 (sl, 3F); RMN 11 B (96 MHz, DMSO- d_6) δ 2,89.

3.2.5. Procedimento geral para a síntese dos estilbenos 6f e 6i:

A um tubo de ensaio contendo uma suspensão do telureto vinílico (0,5 mmol) e o organotrifluoroborato de potássio (0,6 mmol) apropriados, em MeOH seco (5,0 mL), adicionou-se AgCO_3 (168 mg, 1,0 mmol) e $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (43,14 mg, 0,04 mmol). A mistura foi mantida em banho de ultrassom a temperatura ambiente até que todo material de partida fosse consumido (CCD). Após este período, a mistura foi passada por uma coluna contendo sílica gel/ celite/ sílica gel, com Acetato de etila, para que o excesso de paládio fosse removido. O solvente foi evaporado sob vácuo, e o produto bruto foi então diluído em CH_2Cl_2 e lavado com uma solução saturada de NH_4Cl (2 x 10 mL). Os extratos orgânicos reunidos foram secos sob MgSO_4 , filtrados, e o solvente removido sob pressão

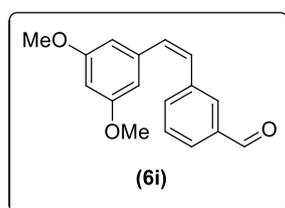
reduzida. A purificação do produto bruto foi feita em coluna cromatográfica com sílica gel utilizando sistemas de solvente que variaram entre 90:10 – 70:30 (Hexano/Acetato de etila), para levar ao produto desejado.

(Z)-3-(3,5-dimetóxiestiril)anilina (6f):



Isolado como um óleo amarelado 31,88 mg (50%); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 7,06-7,01 (t, $J= 7,7$ Hz, 1H), 6,70-6,68 (d, $J= 7,4$ Hz, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,56 (d, $J= 6,0$ Hz, 1H), 6,52-6,49 (d, $J= 8,2$ Hz, 2H), 6,44 (d, $J= 1,9$ Hz, 2H), 6,32-6,30 (t, $J= 2,2$ Hz, 1H), 3,65 (s, 6H, 2 x OMe), 3,57 (sl, 2H, NH_2); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 159,39 (Ar- NH_2), 145,18; 138,08; 137,29; 129,85; 128,96; 128,09; 118,39; 114,35; 113,04; 105,75; 98,90; 54,18 (2 x OMe).

(Z)-3-(3,5-dimetóxiestiril)benzaldeído (6h):



Isolado como um óleo amarelado 44,22 mg (66%); RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ 9,92 (s, 1H, CHO), 7,77 (s, 1H, Ar-CH), 7,73-7,70 (d, $J= 7,4$ Hz, 1H, CH=CH), 7,54-7,51 (d, $J= 7,4$ Hz, 1H, CH=CH), 7,41-7,36 (t, $J= 7,4; 7,7$ Hz, 1H, Ar-CH), 6,64 (s, 2H, Ar-CH), 6,36 (d, $J=1,9$ Hz, 2H, Ar-CH), 6,34 (d, $J= 1,9$ Hz, 2H, Ar-CH), 3,64 (s, 6H, 2x OMe); RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 192,20 (CHO); 160,72; 138,39; 138,23; 136,50; 134,94; 131,87; 130,67; 129,03; 128,83; 128,09; 106,72; 100,08; 55,21 (2 x OMe).

3.3. Atividade Antitumoral:

As atividades antitumorais dos estilbenos **6f** e **6i** foram estudadas nas linhagens de células cancerígenas **HL-60** (leucemia pró-mielocítica), **HT-29** (adenocarcinoma humano de cólon) e **NCI-H292** (carcinoma humano de pulmão), e a metodologia aplicada para esta etapa do trabalho foi é idêntica à descrita no item **2.3** deste capítulo.

Referências

ABE, S. J. Studies on the essential oil of "Massoi" (I). **The Chemical Society of Japan**, 58, 246-247, **1937**.

ARAGÃO-FILHO, W. C.; MOREIRA, J.; de OIVEIRA-JÚNIOR, E. B.; REHDER, J.; BUSTAMANTE, J.; CASANOVA, J.-L.; NEWBURGER, P.; Condino-Neto, A. Papel do fator nuclear kappa B (NF-κB) na expressão do gene NCF1 em leucócitos de indivíduos normais, e pacientes com doença granulomatosa crônica, displasia ectodérmica anidrótica, ou com defeitos no eixo IL-12/23-IFN-γ. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, 32, 48-53, **2009**.

AZIMAHTOL, H. L. P.; STANLASS, J.; DIN, L. B. **Anticancer Research**, 18, 1739, **1998**.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4, 14-19, **1996**.

Bezerra, N. M. M. Estudo Metodológico da Reação de Hidroteluração de Alquinos Aromáticos: Aplicação na Síntese da Combretastatina A-4 e Compostos Análogos. **Exame de Qualificação**, Recife, **2011**.

BIALY, L.; WALDMANN, H. Synthesis and biological evaluation of cytostatin analogues. **Chemical Communication**, 15, 1872-1873, **2003**.

BOGER, D. L.; ICHIKAWA, S.; ZHONG, W. Total Synthesis of Fostriecin (CI-920). **Journal of the American Chemical Society**, 123, 4161-4167, **2001**.

BOTI, J. B., KOUKOUA, G., N'GUESSAN, T. Y., MUSELLI, A., BERNARDINI, A. F., CASANOVA, J. Composition of the leaf, stem bark and root bark oils of *Isolona cooperi* investigated by GC (retention index), GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy. **Phytochemical Analysis**, 16, 357-363, **2005**.

BROWN, H. C. Organic Synthesis Via Boranes. **Aldrich Chemical**: Milwaukee, WI, Vol. 1, **1997**.

BROWN, H. C.; ZADLEWICZ, M. Organic Syntheses Via Boranes. **Aldrich Chemical**: Milwaukee, WI, Vol. 2, **2001**.

BUCK, S. B.; HARDOUIN, C.; ICHIKAWA, S.; SOENEN, D. R.; GAUSS, C.-M.; HWANG, I.; SWINGLE, M. R.; BONNESS, K. M.; HONKANEN, R. E.; BOGER, D. L. Fundamental Role of the Fostriecin Unsaturated Lactone and Implications for Selective Protein Phosphatase Inhibition. **Journal of the American Chemical Society**, 125, 15694-15695, **2003**.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Méd. Bahia**, 78 (Suplemento 1), 98-106, **2008**.

CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M. 6-[ω -arylalkenyl]-5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, 53, 811-819, **2000**.

CAVILL, G. W. K., CLARK, D. V., WHITFIELD, F. B. Insect venoms, attractants, and repellents. XI. Massoilactone from two species of formicine ants, and some observations on constituents of the bark oil of *Cryptocarya massoia*. **Australian Journal of Chemistry**, 21, 2819-2823, **1968**.

CELLA, R.; STEFANI, H. A. Ultrasound-assisted synthesis of *Z* and *E* stilbenes by Suzuki cross-coupling reactions of organotellurides with potassium organotrifluoroborate salts. **Tetrahedron**, 62, 5656-5662, **2006**.

CHAVEZ, D. E.; JACOBSEN, E. N. Total Synthesis of Fostriecin (CI-920). **Angewandte Chemie International Edition**, 40, 3667-3670, **2001**.

CHEN, Y.; ZOU, Y.; SUN, H.-Y.; LIU, X.-K.; XIAO, C.-F.; SUN, J.; HE, S.-J.; LI, J. Practical and Green Synthesis of Combretastatin A-4 and Its Prodrug CA4P

Using Renewable Biomass-Based Starting Materials. **Synthesis**, 2, 217-222, **2011**.

CHENG, A.; BALCZON, R.; ZUO, Z.; KOONS, J. S.; WALSH, A. H.; HONKANEN, R. E. Fostriecin-mediated G₂-M-phase Growth Arrest Correlates with Abnormal Centrosome Replication, the Formation of Aberrant Mitotic Spindles, and the Inhibition of Serine/Threonine Protein Phosphatase Activity. **Cancer Research**, 58, 3611-3619, **1998**.

CUNICO, R. F.; BEDELL, L. The triisopropylsilyl group as a hydroxyl-protecting function. **Journal of Organic Chemistry**, 45, 4797-4798, **1980**.

DE FÁTIMA, A.; PILLI, R. A. Enantioselective approach to the asymmetric synthesis of (6R)-hydroxymethyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one. A formal synthesis of (R)-argentilactone and total synthesis of (R)-goniothalamine. **Arkivoc**, 10, 118-126, **2003**.

DE FÁTIMA, A.; KOHN, L. K.; ANTONIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. (R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 13, 2927-, **2005**.

DE FÁTIMA, A.; KOHN, L. K.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 14, 622-, **2006**.

DE JONG, R. S.; MULDER, N. H.; UGES, D. R. A.; SLEIJFER, D. T.; HOPPENER, F. J. P.; GROEN, H. J. M.; WILLEMSE, H. B.; VAN DER GRAAF, W. T.; DE VRIES, E. G. E. **Brazilian Journal of Cancer**, 79, 882, **1999**.

DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. GaussView, Version 4.1, Semichem Inc., Shawnee Mission KS, **2009**.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBSH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, 107, 3902-3909, **1985**.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; GUIDO, R. V.C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Doenças Tropicais Negligenciadas: Uma Nova Era de Desafios e Oportunidades. **Química Nova**, 36, 1552-1556, **2013**.

DREWES, S. E.; HORN, M. M.; SHAW, R. S. α -Pyrones and their derivatives from two *Cryptocarya* species. **Phytochemistry**, 40, 321-323, **1995**.

DUAN, J.-X.; CAI, X.; MENG, F.; LAN, L.; HART, C.; MATTEUCCI, M. Potent Antitubulin Tumor Cell Cytotoxins Based on 3-Aroyl Indazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, 50, 1001-1006, **2007**.

FREITAS, J. C. R.; PALMEIRA, D. J.; OLIVEIRA, R. A.; MENEZES, P. H.; SILVA, R. O. Differentiation and assignment of vinyl telluride regioisomers by ^1H - ^{125}Te gHMBC. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 50, 481-487, **2012**.

GAO, D.; O'DOHERTY, G. A. Total Synthesis of Fostriecin: Via a Regio- and Stereoselective Polyene Hydration, Oxidation, and Hydroboration Sequence. **Organic Letters**, 12, 3752-3755, **2010**.

GAUKROGER, K.; HADFIELD, J. A.; HEPWORTH, L. A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. Novel Syntheses of Cis and Trans Isomers of Combretastatin A-4. **Journal of Organic Chemistry**, 66, 8135-8138, **2001**.

GAUKROGER, K.; HADFIELD, J. A.; LAWRENCE, N. J.; NOLAN, S.; MCGOWN, A. T. Structural requirements for the interaction of combretastatins with tubulin: how important is the trimethoxy unit? **Organic and Biomolecular Chemistry**, 1, 3033-3037, **2003**.

GESTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, 36, 3219-3228, **1980**.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, 62, 7512-7515, **1997**.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPULO, A. D. Structure- and ligand-based drug design approaches for neglected tropical diseases. **Pure and Applied Chemistry**, 84, 1857-1866, **2012**.

HARSH, P.; O'DOHERTY, G. A. De novo asymmetric syntheses of (+)-goniothalamine, (+)-goniothalamine oxide, and 7,8-bis-*epi*-goniothalamine using asymmetric allylations. **Tetrahedron**, 65, 5051-5055, **2009**.

HLUBUCEK, J. R.; ROBERTSON, A. V. (+)-(5S)- δ -Lactone of 5-hydroxy-7-phenylhepta-2,6-dienoic acid, a natural product from *Cryptocarya caloneura* (Scheff.) Kostermans. **Australian Journal of Chemistry**, 20, 2199-2206, **1967**.

JEWERS, K.; DAVIS, J. B.; DOUGAN, J.; MANHCADA, A. H. Goniothalamine and its distribution in four *Goniothalamus* species. **Phytochemistry**, 11, 2025-2030, **1972**.

JIN, Y.; QI, P.; WANG, Z.; SHEN, Q.; WANG, J.; ZHANG, W.; SONG, H. 3D-QSAR Study of Combretastatin A-4 Analogs Based on Molecular Docking. **Molecules**, 16, 6684-6700, **2011**.

KABIR, K. E.; KHAN, A. R.; MOSADDIK, M. A. Goniothalamine – a potent mosquito larvicide from *Bryonopsis laciniosa* L. **Journal of Applied Entomology**, 127, 112-, **2003**.

KALID, O.; WARSHAVIAK, D. T.; SHECHTER, S.; SHERMAN, W.; SHACHAM, S. Consensus Induced Fit Docking (cIFD): methodology, validation, and

application to the discovery of novel Crm1 inhibitors. **Journal Computer-Aided Molecular Design**, 26, 1217-1228, 2012.

KAUFMANN, S. H. Apoptosis – Pharmacological Implications and Therapeutic Opportunities, **Ed. Academic Press**, San Diego, p. 614, 1997.

KAWANO, D. F.; PEREIRA, L. R. L.; UETA, J. M.; DE FREITAS, O. Acidentes com os medicamentos: como minimizá-los? **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 42, 487-495, 2006.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, 26, 239-257, 1972.

KUDO, N.; WOLFF, B.; SEKIMOTO, T.; SCHREINER, E. P.; YONEDA, Y.; YANAGIDA, M.; HORINOUCHE, S.; YOSHIDA, M. Leptomycin B Inhibition of Signal-Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1. **Experimental Cell Research**, 242, 540-547, 1998.

KUMADA, M. Nickel and palladium complex catalyzed cross-coupling reactions of organometallic reagents with organic halides. **Pure and Applied Chemistry**, 52, 669-679, 1980.

KUMAR, P.; NAIDU, S. V. Enantio- and Diastereocontrolled Total Synthesis of (+)-Boronolide. **Journal of Organic Chemistry**, 71, 3935-3941, 2006.

KUMAR, S.; SAPRA, S.; KUMAR, R.; GUPTA, M. K.; KOUL, S.; KOUR, T.; SAXENA, A. K.; SURI, O. P.; DHAR, K. L. Synthesis of combretastatin analogs: evaluation of in vitro anticancer activity and molecular docking studies. **Medicinal Chemistry Research**, 21, 3720-3729, 2012.

LAN, Y. H.; CHANG, F. R.; YU, J. H.; YANG, Y. L.; CHANG, Y. L.; LEE, S. J.; WU, Y. C. Cytotoxic Styrylpyrones from *Goniothalamus amuyon*. **Journal of Natural Products**, 66, 487-490, 2003.

LEE, A. T. C.; AZIMATHOL, H. L. P. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 36, 269, **2003**.

LEE, T. H.; JUNG, M.; BANG, M.-H.; CHUNG, D. K.; KIM J. Inhibitory effects of a spinasterol glycoside on lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and proinflammatory cytokines via down-regulating MAP kinase pathways and NF- κ B activation in RAW264.7 macrophage cells. **International Immunopharmacology**, 13, 264-270, **2012**.

LENNOX, A. J. J.; LLOYD-JONES, G. C. Preparation of Organotrifluoroborate Salts: Precipitations-Driven Equilibrium under Non-Etching Conditions. **Angewandte Chemie International Edition**, 51, 9385-9388, **2012**.

LLOYD, H. A., SCHMUFF, N. R., HEFETZ, A. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 78, 687, **1984**.

LUPATTELLI, P.; D'AURIA, M.; DI BLASIO, N.; LENTE, F. A Novel Approach to Combretastatins: From *trans*-Epoxide to CA-4 and Its Dioxolane Derivative. **European Journal of Organic Chemistry**, 1, 141-145, **2009**.

LUPE, F. A., LEMES, A. C., AUGUSTO, F., BARATA, L. E. S. Fragrant Lactones in the Steam Distillation Residue of *Aeollanthus suaveolens* Mart. ex Spreng and Analysis by HS—SPME. **Journal of Essential Oil Research**, 19, 271-272, **2007**.

MAYA, A. B.; PÉREZ-MELERO, C.; MATEO, C.; ALONSO, D.; FERNÁNDEZ, J. L.; GAJATE, C.; MOLLINEDO, F.; PELÁEZ, R.; CABALLERO, E.; MEDARDE, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety. **Journal of Medicinal Chemistry**, 48, 556-568, **2005**.

MIYAURA, N.; SUZUKI, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. **Chemical Reviews**, 95, 2457-2483, **1995**.

MOSADDIK, M. A.; HAUGE, M. E.; RASHID, M. A. Goniiothalamine from *Bryonopsis laciniosa* Linn (Cucurbitaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 28, 1039-1040, **2000**.

MOSADDIK, M. A.; HAUGE, M. E. Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniiothalamine isolated from *Bryonopsis laciniosa*. **Phytotherapy Research**, 17, 1155-1157, **2003**.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OSLON, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, 30, 2785-2791, **2009**.

NAGY, G.; KONCZ, A.; TELARICO, T.; FERNANDEZ, D.; ÉRSEK, B.; BUZÁS, E.; PERL, A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, 12, 210-215, **2010**.

NGUYEN, S. T.; JOHNSON, L. K.; GRUBBS, R. H.; ZILLER, J. W. Ring-opening metathesis polymerization (ROMP) of norbornene by a Group VIII carbene complex in protic media. **Journal of the American Chemical Society**, 114, 3974-3975, **1992**.

NGUYEN, S. T.; ZILLER, W.; GRUBBS, R. H. Syntheses and activities of new single-component, ruthenium-based olefin metathesis catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, 115, 9858-9859, **1993**.

OLIVEIRA, J. M.; PALMEIRA, D. J.; COMASSETO, J. V.; MENEZES, P. H. Influence of Different Protecting Groups on the Regioselectivity of the Hydrotelluration Reaction of Hydroxy Alkynes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21, 362-366, **2010**.

OLIVEIRA, J. M.; FREITAS, J. C. R.; COMASSETO, J. V.; MENEZES, P. H. Synthesis of substituted α,β -unsaturated δ -lactones from vinyl tellurides.

Tetrahedron, 67, 3003-3009, **2011**.

PETTIT, G. R.; CRAGG, G. M.; HERALD, D. L.; SCHMIDT, J. M. LOHAVANIJAYA, P. Isolation and structure of combretastatin. **Canadian Journal of Chemistry**, 60, 1374-1376, **1982**.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin A-2, A-3, and B-2. **Canadian Journal of Chemistry**, 65, 2390-2396, **1987**.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M. L.; HAMEL, E.; SCHMIDT, J. M. Isolation, Structure, and Synthesis of Combretastatins A-1 and B-1, Potent New Inhibitors of Microtubule Assembly, Derived from Combretum caffrum. **Journal of Natural Products**, 50, 119-131, **1987**.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; NIVEN, M. L. Antineoplastic agents. 160. Isolation and structure of combretastatin D-1: a cell growth inhibitory macrocyclic lactone from Combretum caffrum. **Journal of the American Chemical Society**, 110, 8539-8540, **1988**.

PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; BOYD, M. R.; HAMEL, E.; PETTIT, R. K.; SCHMIDT, J. M.; HOGAN, F. Antineoplastic Agents. 291. Isolation and Synthesis of Combretastatins A-4, A-5, and A-6. **Journal of Medicinal Chemistry**, 38, 1666-1672, **1995**.

PETTIT, G. R.; MINARDI, M. D.; ROSENBERG, H. J.; HAMEL, E.; BIBBY, M. C.; MARTIN, S. W.; JUNG, M. K.; PETTIT, R. K.; CUTHBERTSON, T. J.; CHAPUIS, J.-C. Antineoplastic Agents. 509. Synthesis of Fluorcombstatin Phosphate and Related 3-Halostilbenes. **Journal of Natural Products**, 68, 1450-1458, **2005**.

REDDY, M. V. R.; BROWN, H. C.; RAMACHANDRAN, P. V. Asymmetric allylboration for the synthesis of β -hydroxy- δ -lactone unit of statin drug analogs.

Journal of Organometallic Chemistry, 624, 239-243, **2001**.

SABITHA, G.; SUDHAKAR, K.; YADAV, J. S. Application of the Cosford cross-coupling protocol for the stereoselective synthesis of (*R*)-(+)-goniothalamine, (*R*)-(+)-kavain and (*S*)-(+)-7,8-dihydrokavain. **Tetrahedron Letters**, 47, 8599-8602, **2006**.

SAM, T. W.; SEW-YEU, C.; MATSJEH, S.; GAN, E. K.; RAZAK, D.; MOHAMED, A. L. Goniothalamine oxide: An embryotoxic compound from *goniothalamus macrophyllus* (annonaceae). **Tetrahedron Letters**, 28, 2541-2544, **1987**.

SARKAR, S.; WANZALA, E.; SHIBAHARA, S.; TAKAHASHI, K.; ISHIHARA, J.; HATAKEYAMA, S. Enantio- and stereoselective route to the phoslactomycin family of antibiotics: formal synthesis of (+)-fostriecin and (+)-phoslactomycin B. **Chemical Communications**, 39, 5907-5909, **2009**.

SIMIONATTO, E.; PORTO, C.; STUKER, C. Z.; DALCOL, I. I.; DA SILVA, U. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Aeolanthus suaveolens* Mart. ex Spreng. **Química Nova**, 30, 1923-1925, **2007**.

SIMONSEN, H. T., RIEDEL, C., GADE, L. B., JEBJERG, C. P., GUZMAN, A., MOLGAARD, P. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Leaf Essential Oil of *Baccharis magellanica* (Lam.) Pers. and *Baccharis elaeoides* Remy From Chile. **Journal of Essential Oil Research**, 21, 377-380, **2009**.

SINGH, S. B.; PETTIT, G. R. Antineoplastic agents. 166. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin C-1. **Journal of Organic Chemistry**, 54, 4105-4114, **1989**.

SINGH, S. B.; PETTIT, G. R. Antineoplastic agents. 206. Structure of the cytostatic macrocyclic lactone combretastatin D-2. **Journal of Organic Chemistry**, 55, 2797-2800, **1990**.

SUN, Q.; CARRASCO, Y. P.; HU, Y.; GUO, X.; MIRZAEI, H.; MACMILLAN, J.; CHOOK, Y. M. Nuclear export inhibition through covalent conjugation and hydrolysis of Leptomycin B by CRM1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 110, 1303-1308, **2013**.

SUZUKI, A.; BROWN, H. C. Organic Syntheses Via Boranes. **Aldrich Chemical**: Milwaukee, WI, Vol. 3, **2003**.

TAKACS, T.; CZAKO, L.; MORSCHL, E.; LASZLO, F.; TISZLAVICZ, L.; RAKONCZAY, Z.; LONOVICS, J. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis. **Pancreas**, 25, 277-282, **2002**.

TANAKA, S.; YOICHI, S.; AO, L.; MATSUMOTO, M.; MORIMOTO, K.; AKIMOTO, N.; HONDA, G.; TABATA, M.; OSHIMA, T.; MASUDA, T.; ASMAWI, M. Z. B.; ISMAIL, Z.; YUSOF, S. M.; DIN, L. B.; SAID, I. M. Potential immunosuppressive and anti-inflammatory activities of Malaysian medicinal plants characterized by reduced cell surface expression of cell adhesion molecules. **Phytotherapy Research**, 15, 681-686, **2001**.

TAVARES, L. C. Planejamento e desenvolvimento de novos fármacos: os primeiros passos do Brasil. **Pharmacia Brasileira**, Março/ Abril p. 11-16, **2009**.

TER STEEGE, J. C. A.; VAN DE VEN, M. W. C. M.; FORGET, P. Ph.; BROUCKAERT, P.; BUURMAN, W. A. The Role of Endogenous IFN- γ , TNF- α and IL-10 in LPS-induced nitric oxide release in a mouse model. **Cytokine**, 10, 115-123, **1998**.

TIWARI, M.; DWIVEDI, U. N.; KAKKAR, P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D. Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, 48, 2913-2919, **2010**.

TRON, G. C.; PIRALI, T.; SORBA, G.; PAGLIAI, F.; BUSACCA, S.; GENAZZANI, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, 49, 3033-3044, **2006**.

TROST, B. M.; FREDERIKSEN, M. U.; PAPIILLON, J. P. N.; HARRINGTON, P. E.; SHIN, S.; SHIREMAN, B. T. Dinuclear Asymmetric Zn Aldol Additions: Formal Asymmetric Synthesis of Fostriecin. **Journal of the American Chemical Society**, 127, 3666-3667, **2005**.

TUNAC, J. B.; GRAHAM, B. D.; DOBSON, W. E. Antibiotics CL 1565-A, -B and -T salts useful as antimicrobial and antitumor agentes. **Journal of Antibiotics**, 36, 1595-1600, **1983**.

VEDEJS, E.; FIELDS, S. C.; HAYASHI, R.; HITCHCOCK, S. R.; POWELL, D. R.; SCHRIMPF, M. R. Asymmetric Memory at Labile, Stereogenic Boron: Enolate Alkylation of Oxazaborolidinones. **Journal of the American Chemical Society**, 121, 2460-2470, **1999**.

WANG, Y. G.; KOBAYASHI, Y. Formal Total Synthesis of Fostriecin. **Organic Letters**, 4, 4615-4618, **2002**.

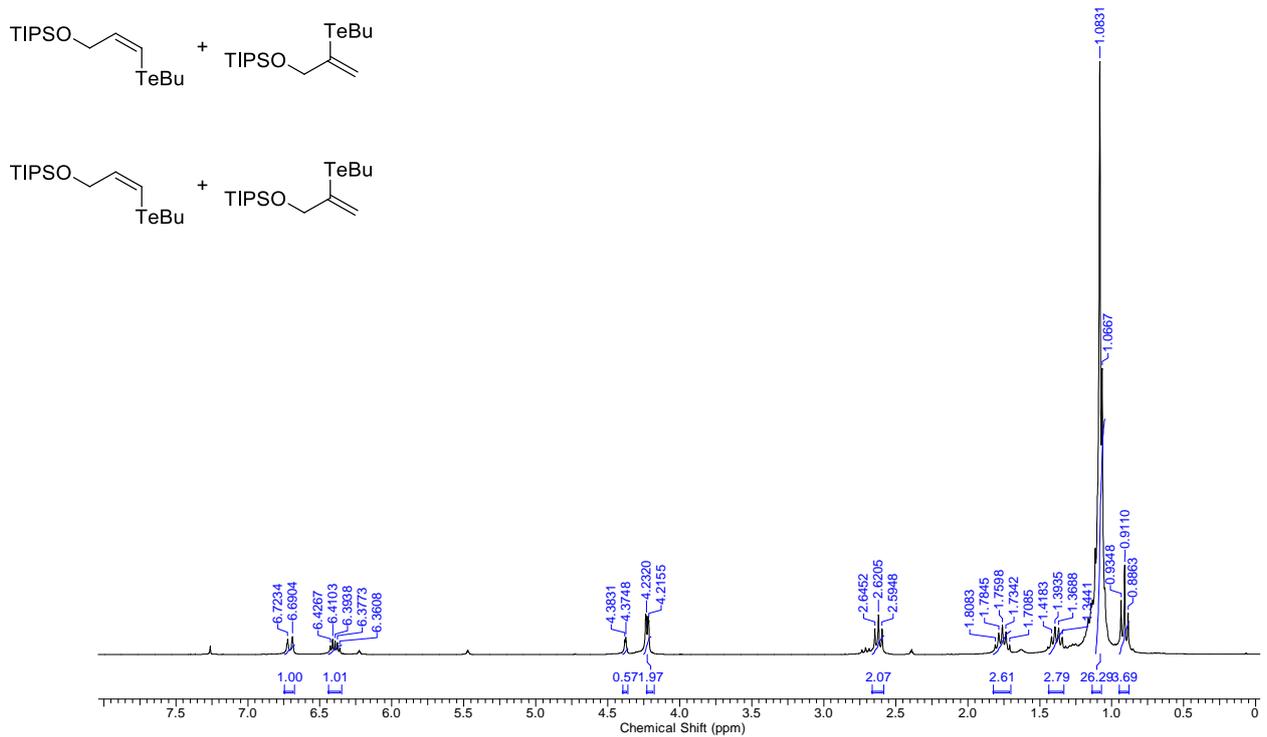
YADAV, J. S.; BHUNIA, D-C.; GANGANNA, B.; SINGH, V. K. First stereoselective total synthesis of cryptomoscatone E1 and synthesis of (+)-goniothalamine via an asymmetric acetate aldol reaction. **RSC Advances**, 3, 5254–5260, **2013**.

Apêndice – Espectros Seleccionados

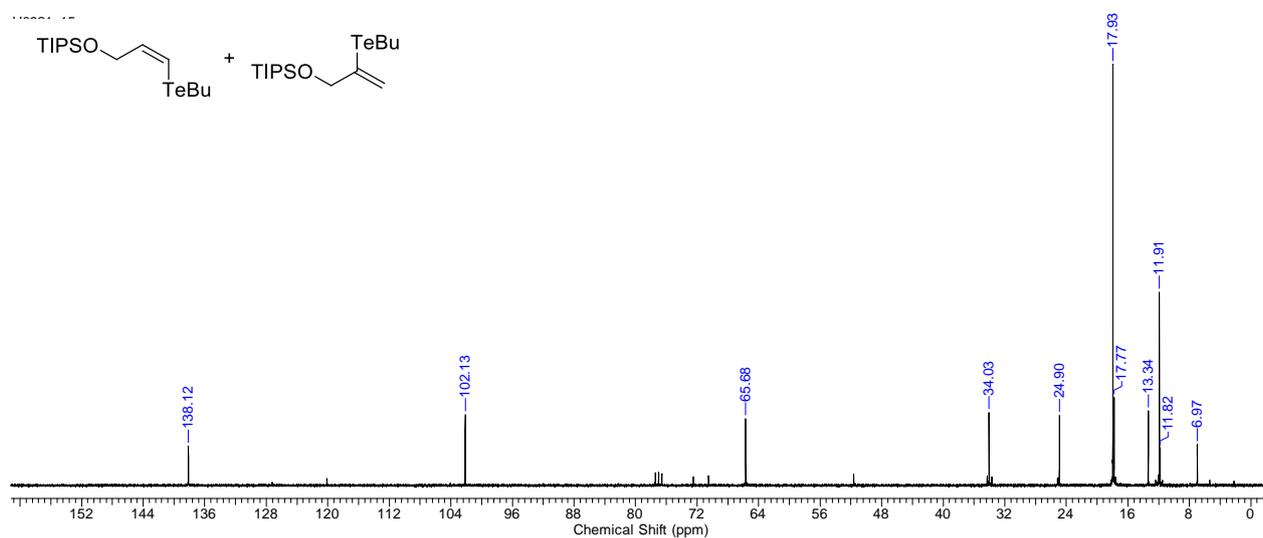
1. δ -Lactonas α,β -Insaturadas

1.1. (Z)-(3-(butiltalanil)aliloxi)-tri-isopropil-silano (4)

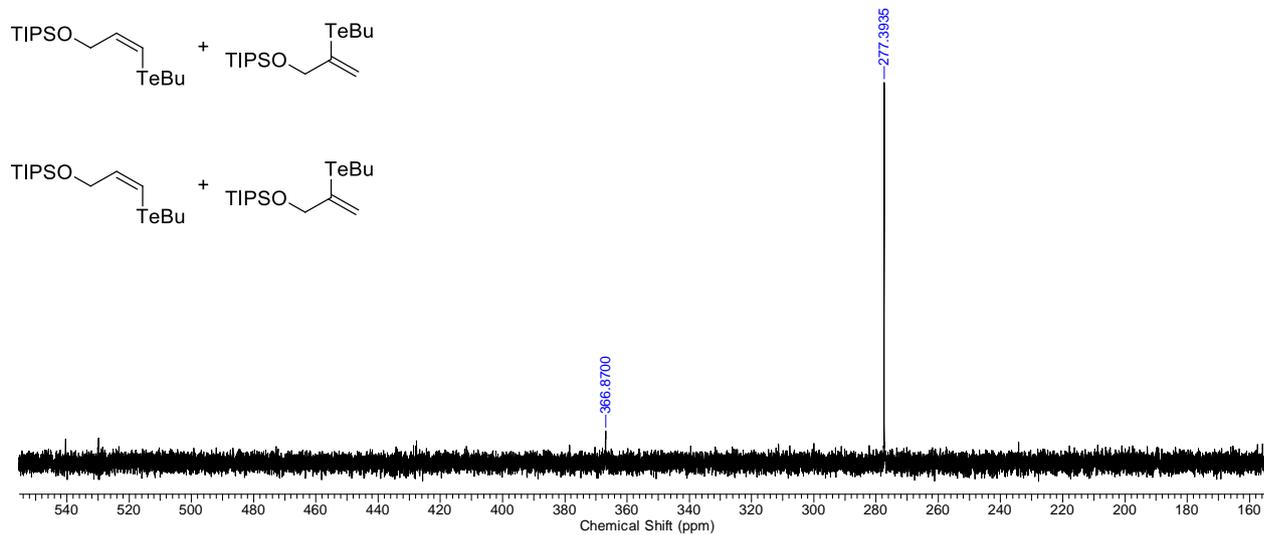
- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)



- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)

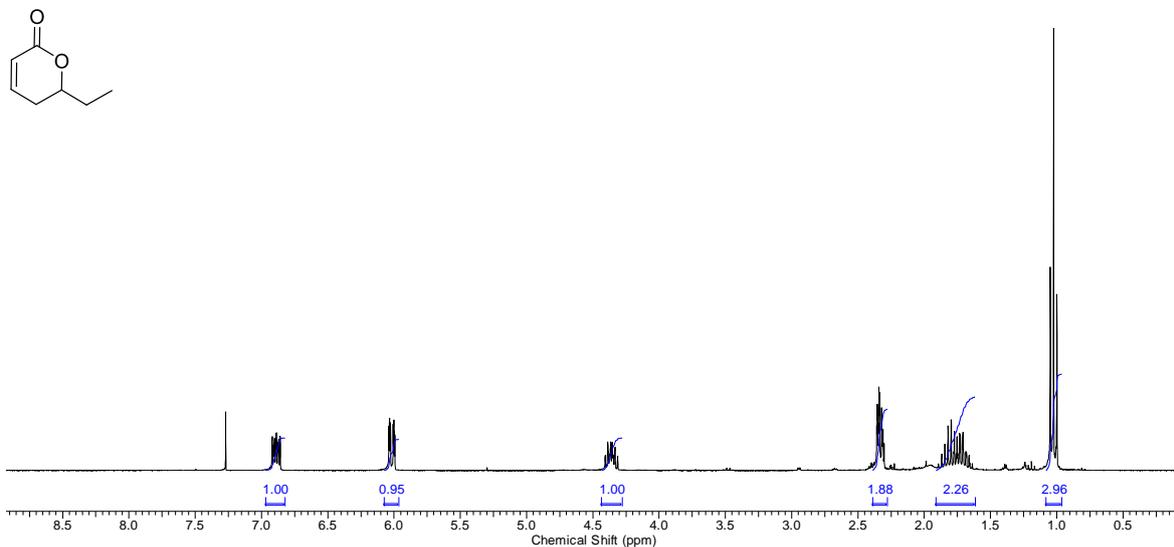


- RMN ^{125}Te (94.6 MHz, CDCl_3)

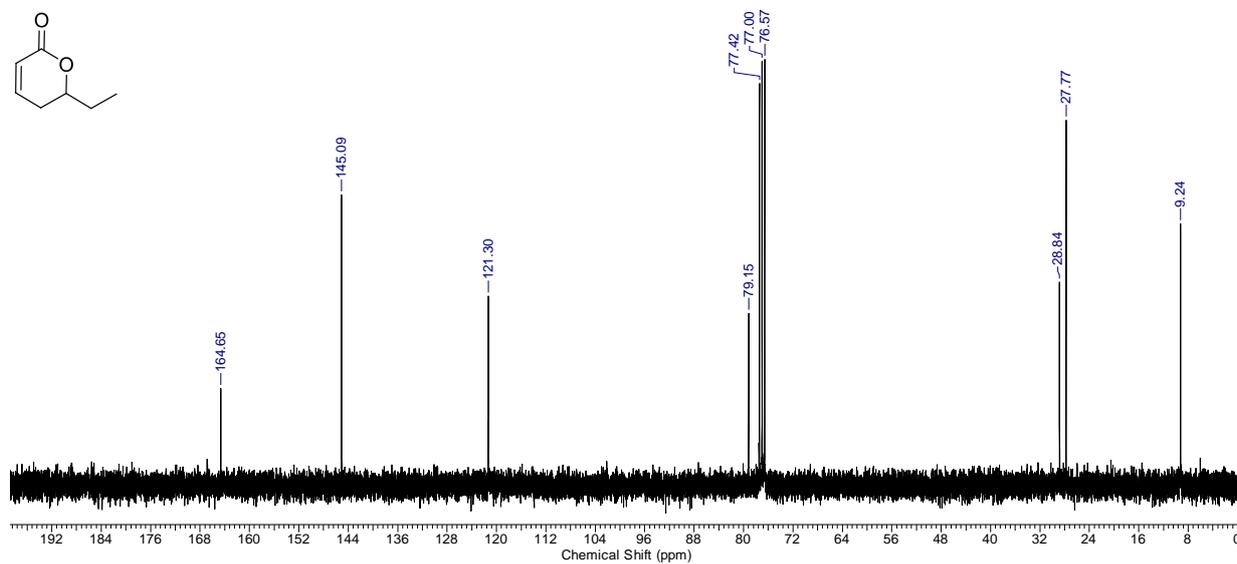


1.2. 6-etil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5a)

- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

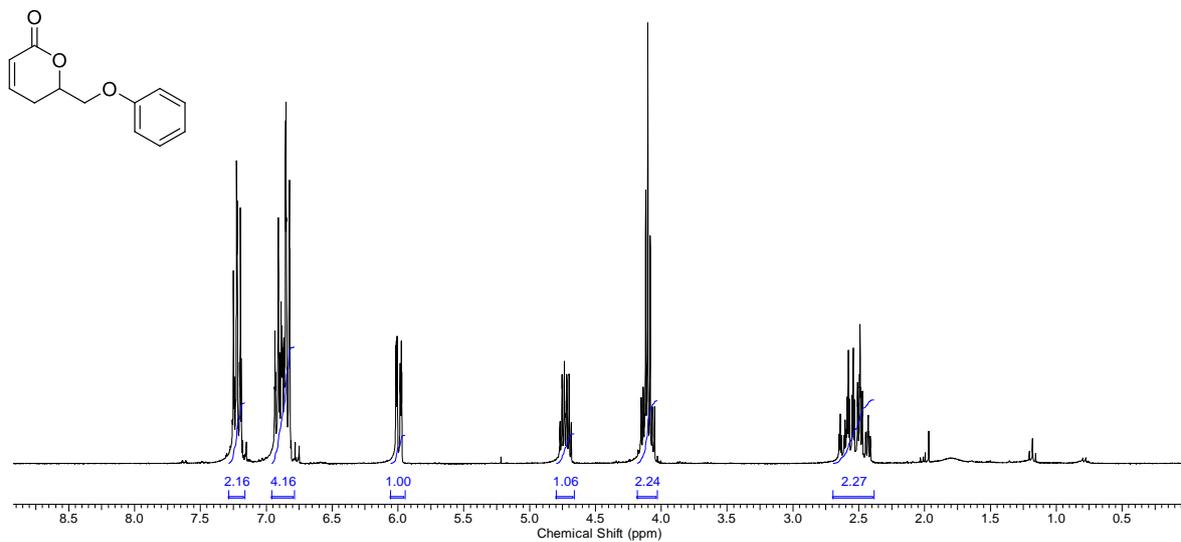


- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)

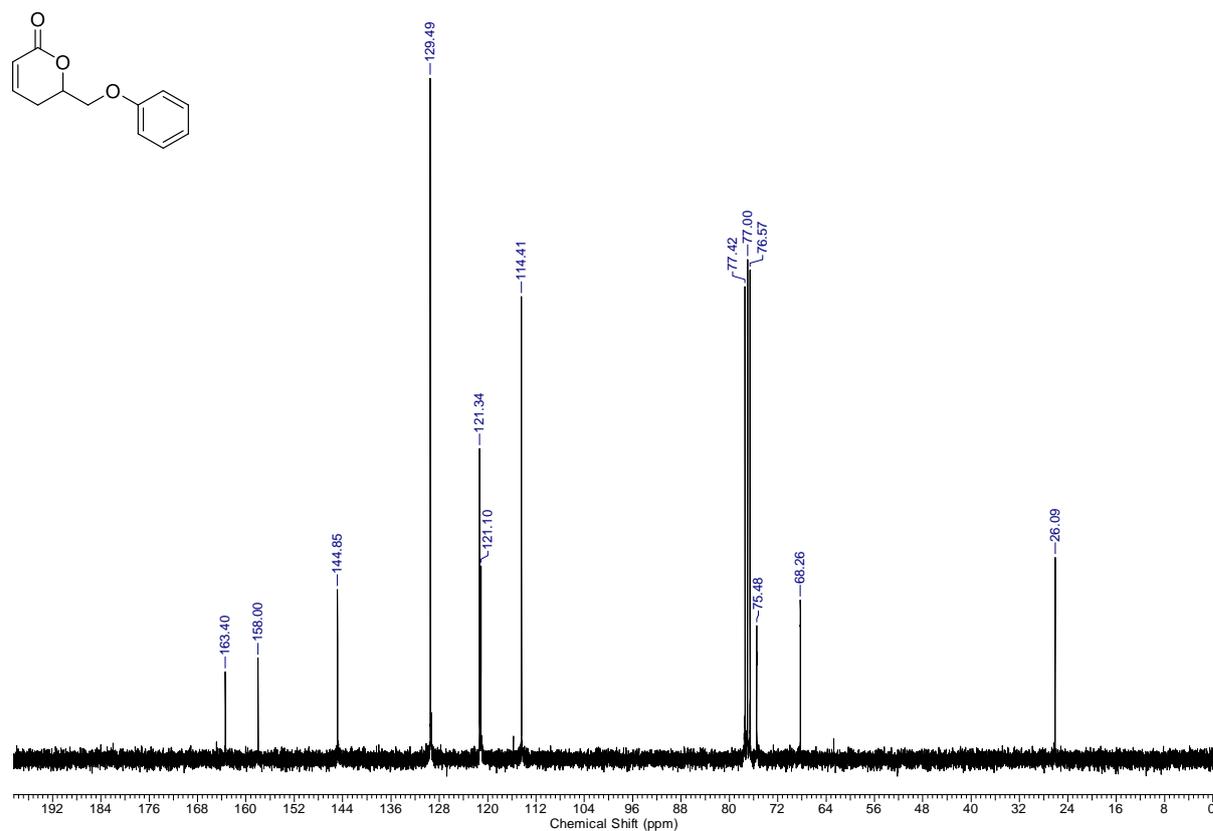


1.3. 6-(fenoximetil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5b)

- RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

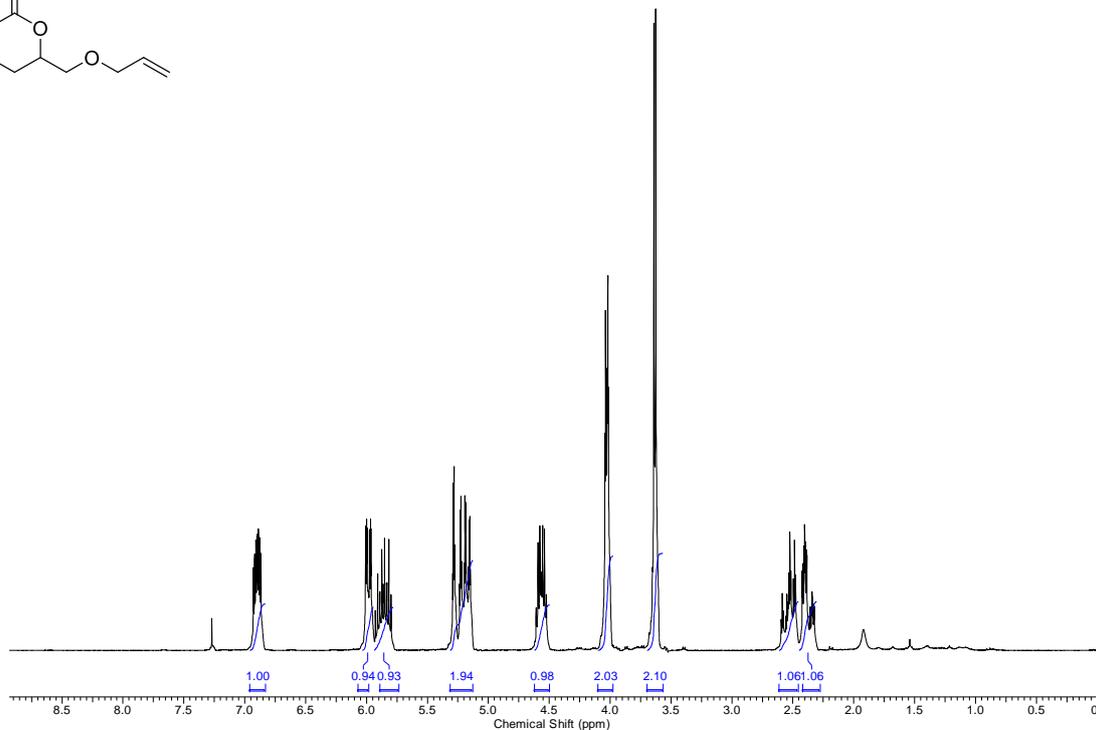
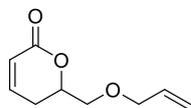


- RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

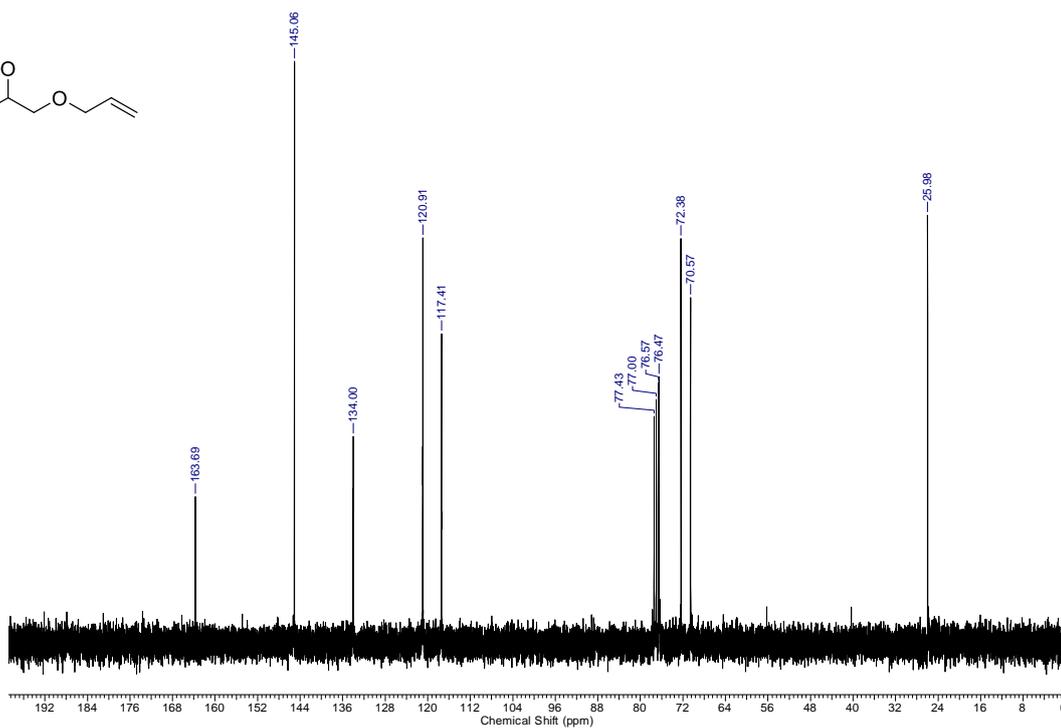
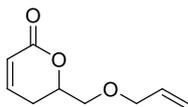


1.4. 6-(aliloximetil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5c)

- RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

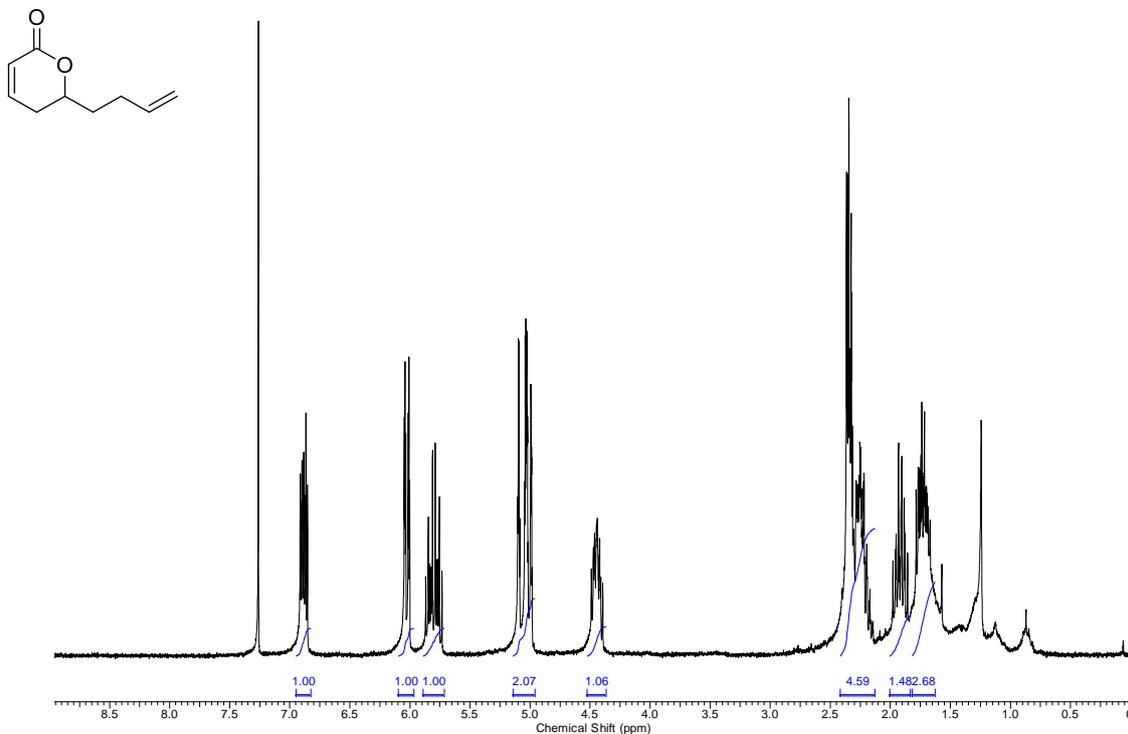


- RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

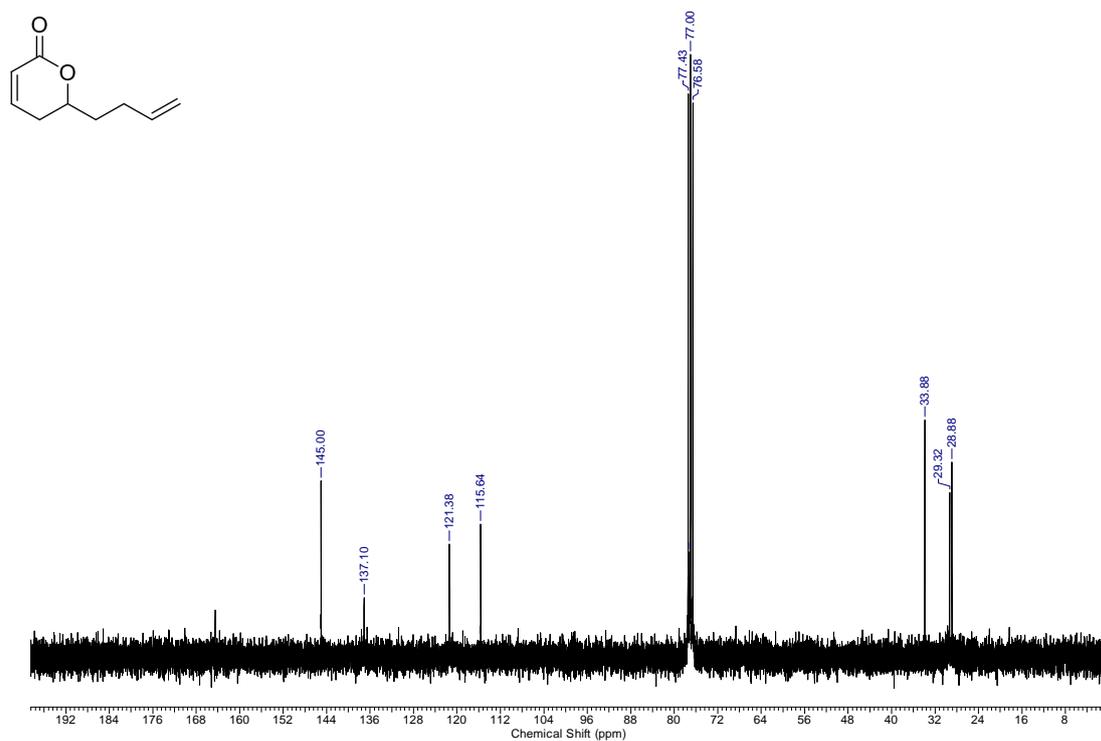


1.5. 6-(but-3-enil)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (5d)

- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)

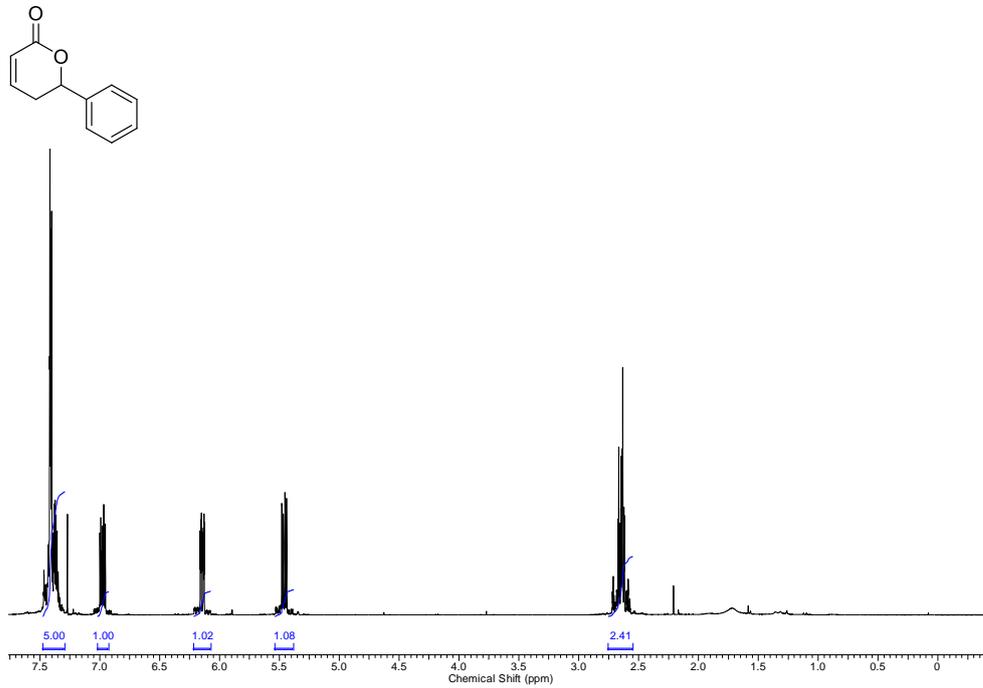


- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)

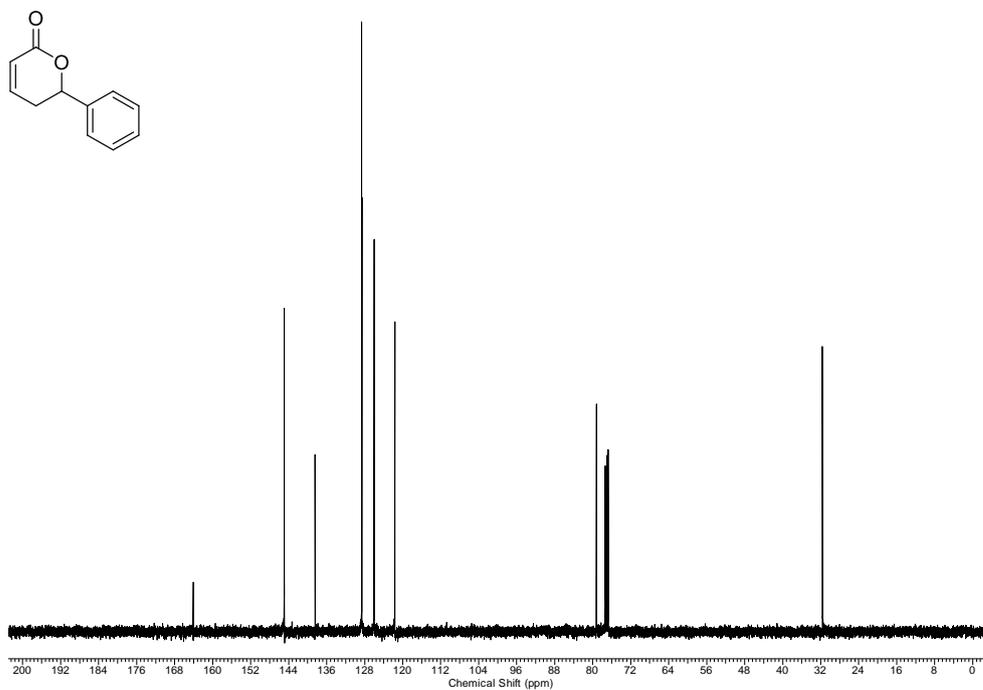


1.6. 6-fenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-one (5e)

- RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3)



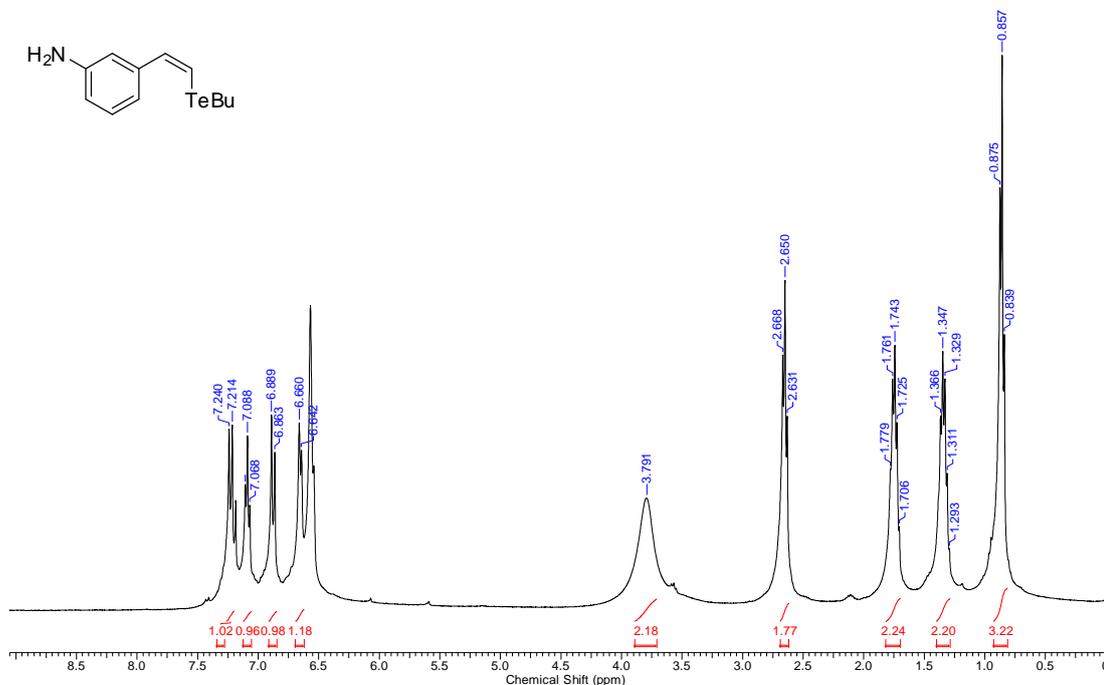
- RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3)



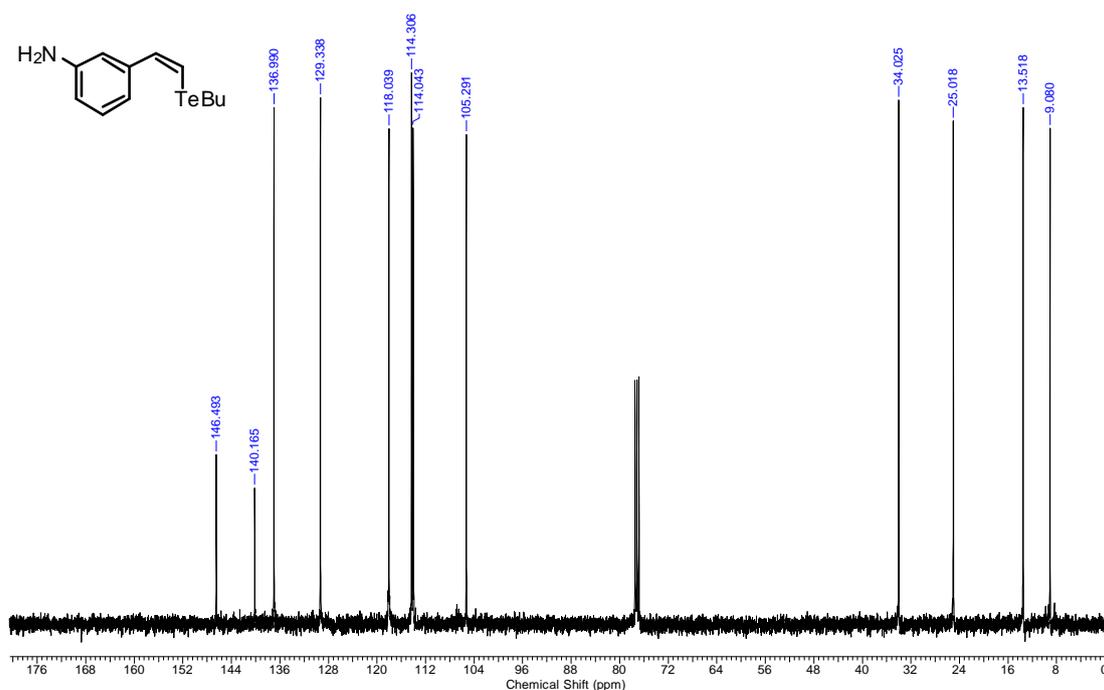
2. Z-estilbenos

2.1. (Z)-3-(2-(butiltelanil)vinil) anilina (7a)

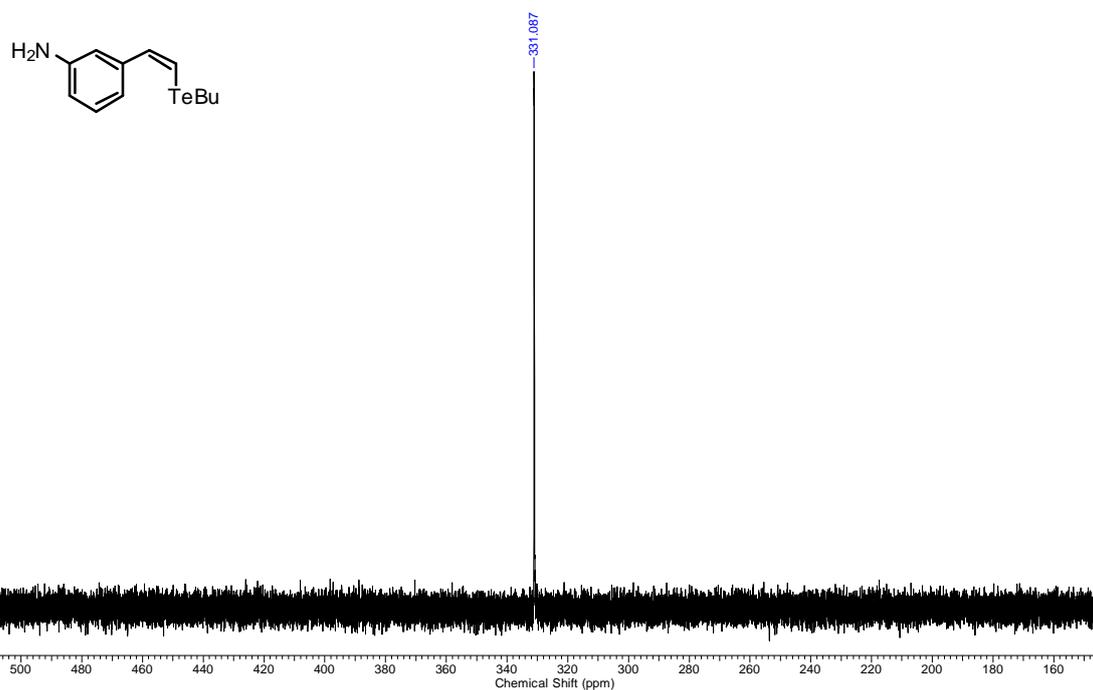
- RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3)



- RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

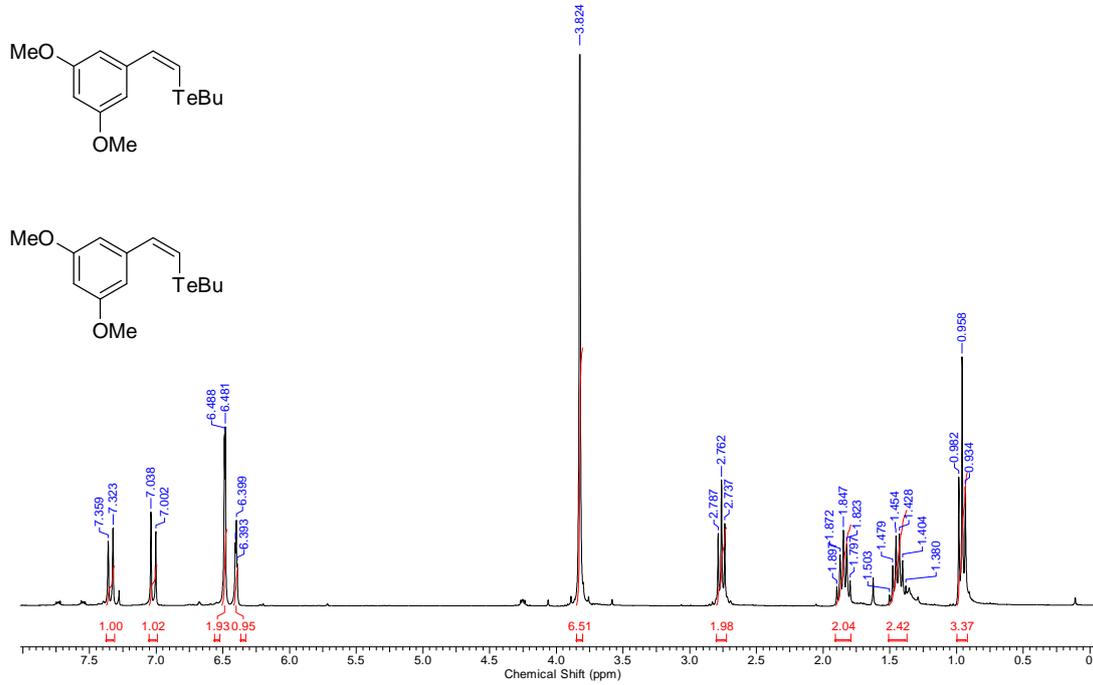


- RMN ^{125}Te (126 MHz, CDCl_3)

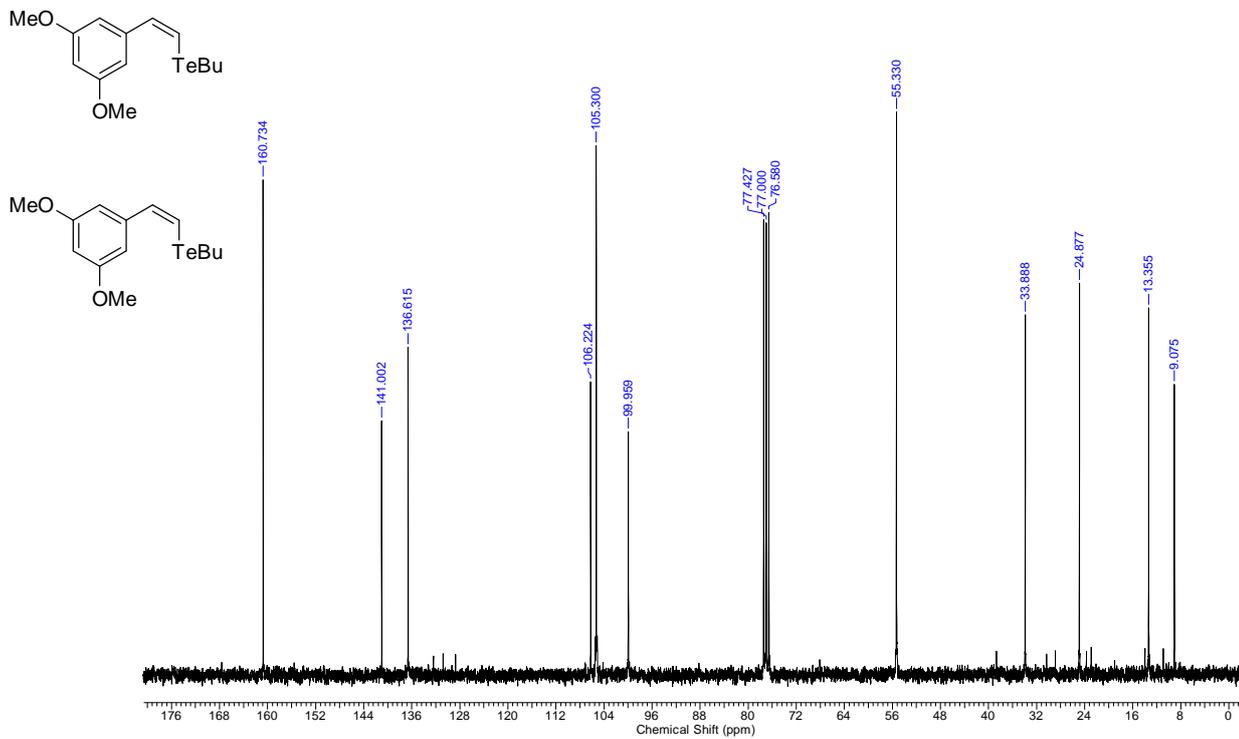


2.2. (Z)-butil(3,5-dimetóxi-estiril) telano (7b)

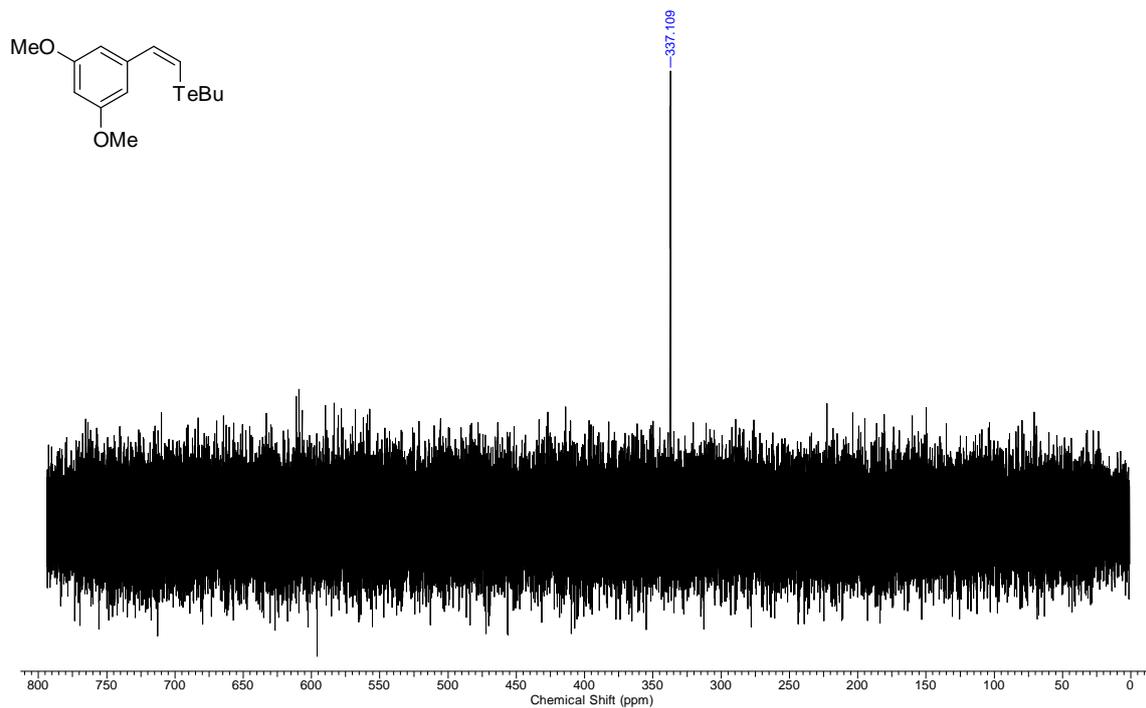
- RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



- RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

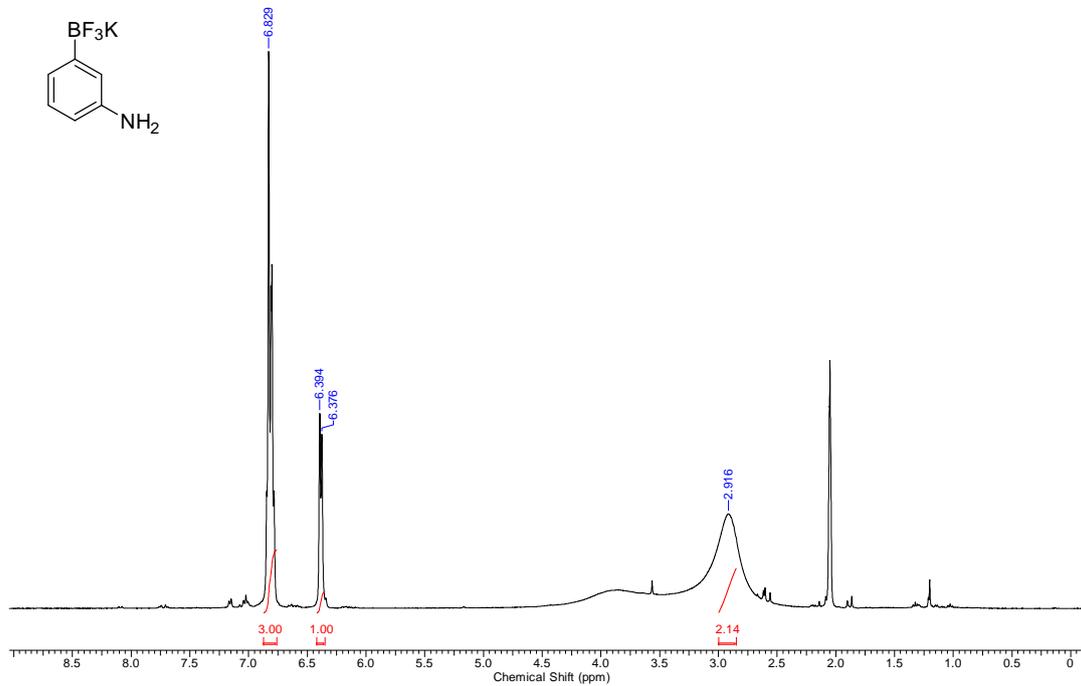


- RMN ^{125}Te (126 MHz, CDCl_3)

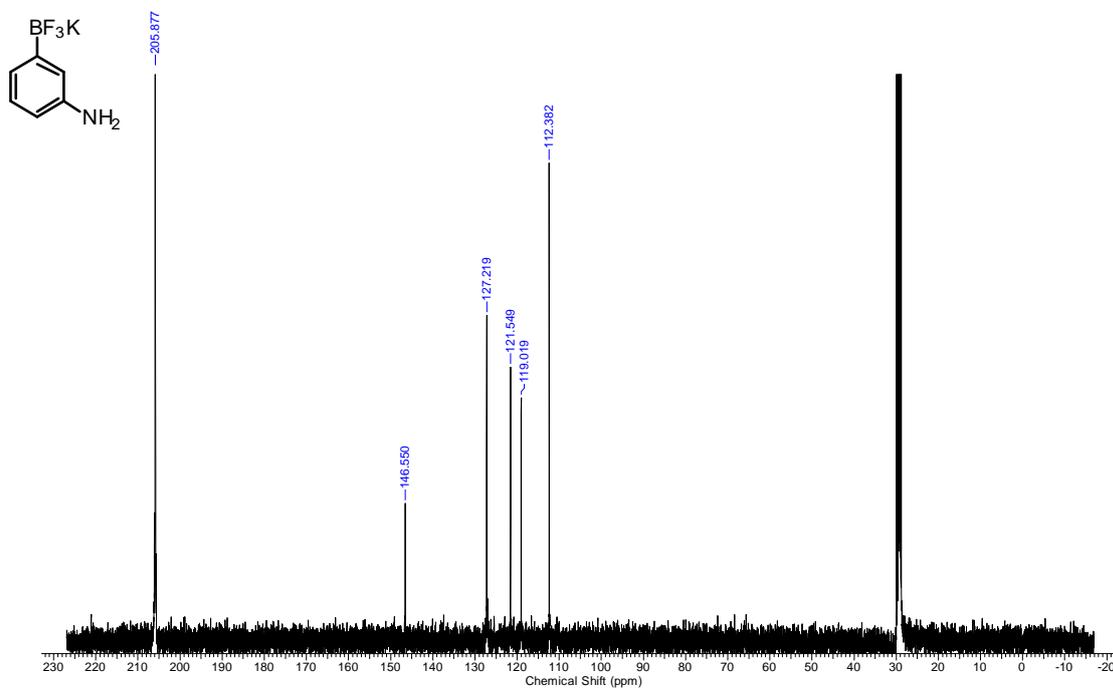


2.3. 3-amino-feniltrifluoroborato de potássio (8b)

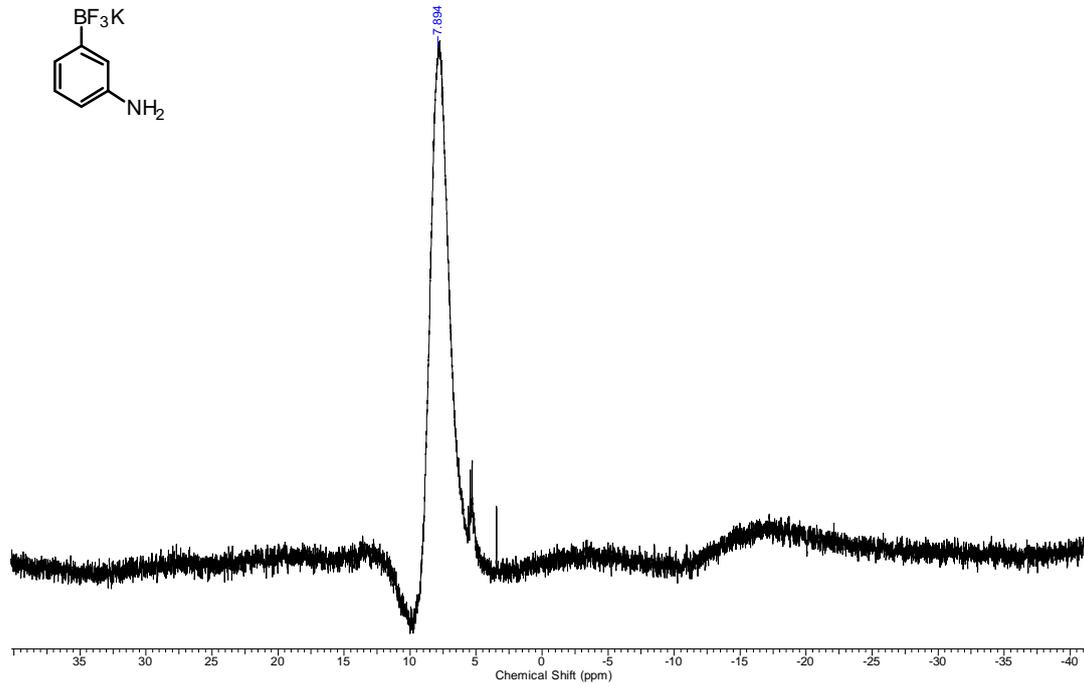
- RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



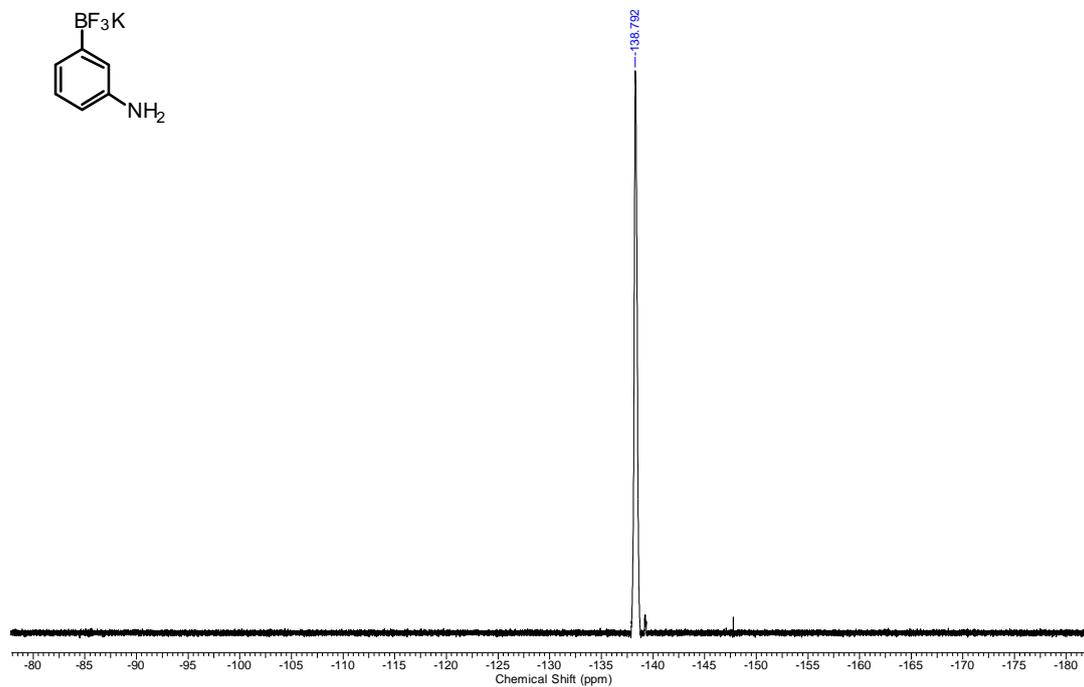
- RMN ^{13}C (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)



- RMN ^{11}B (128 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

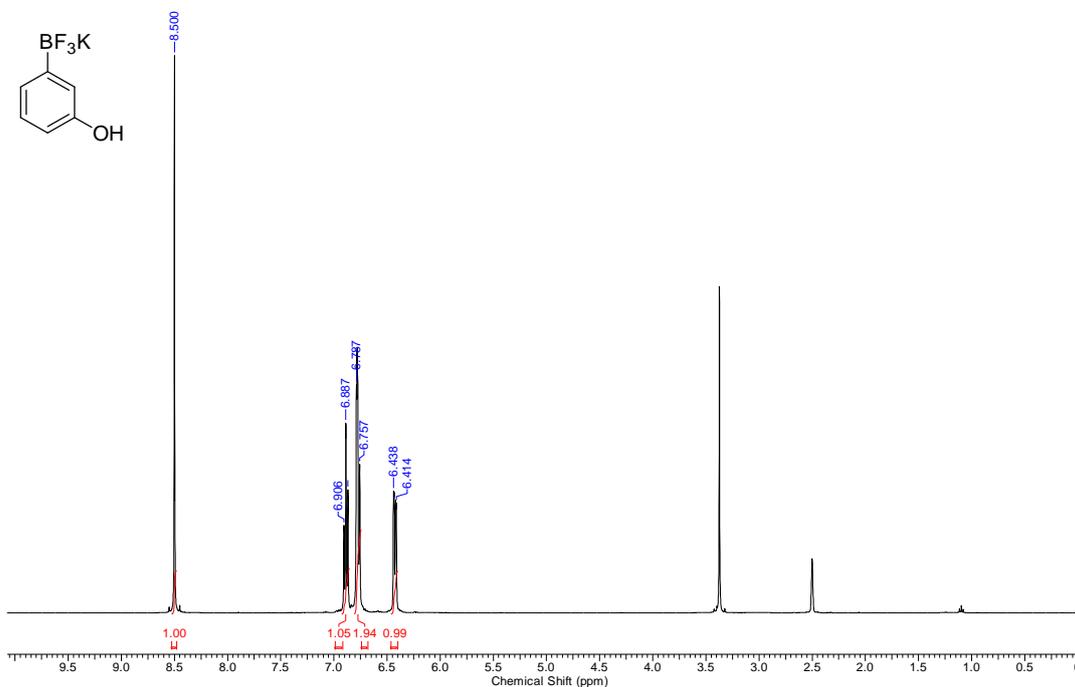


- RMN ^{19}F (376 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)

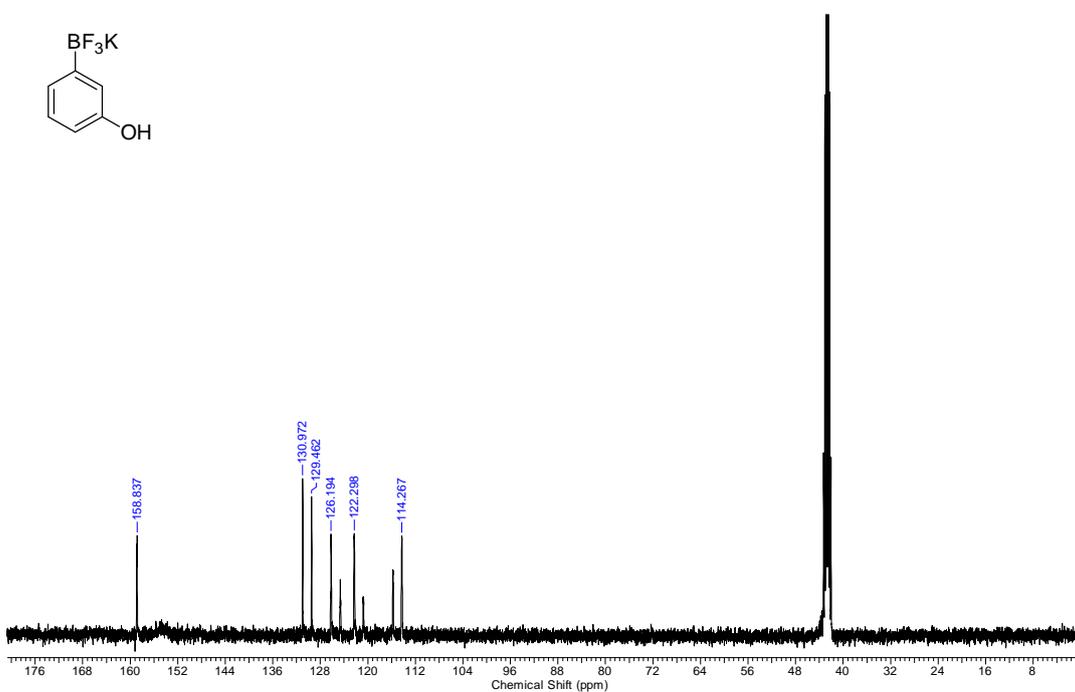


2.4. 3-hidróxi-feniltrifluoroborato de potássio (**8c**)

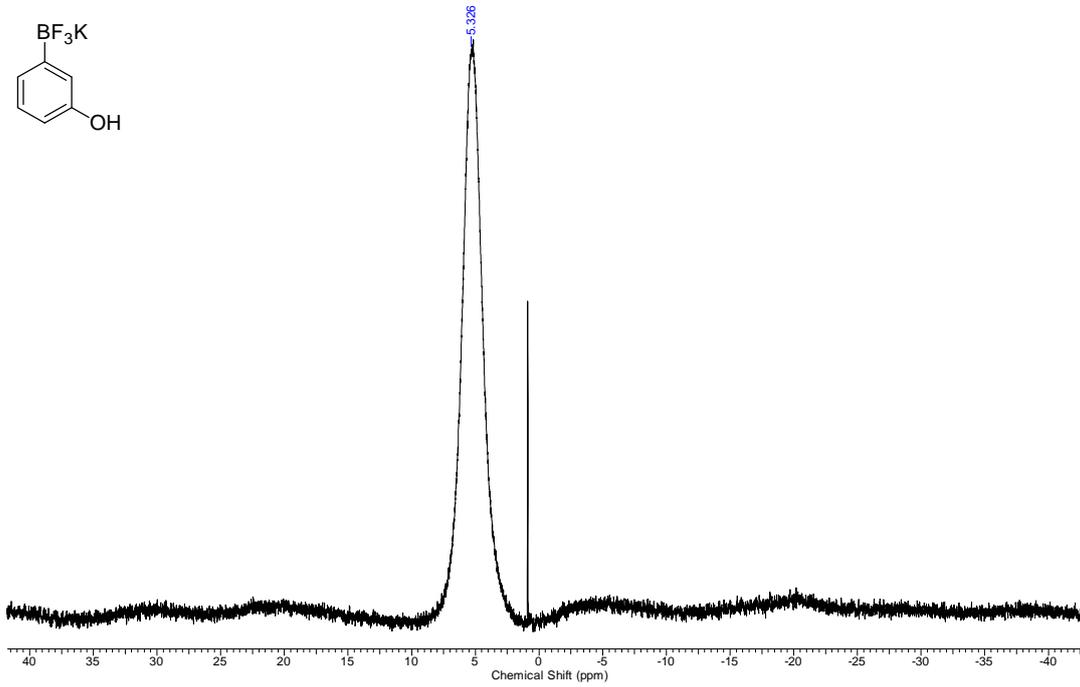
- RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d^6)



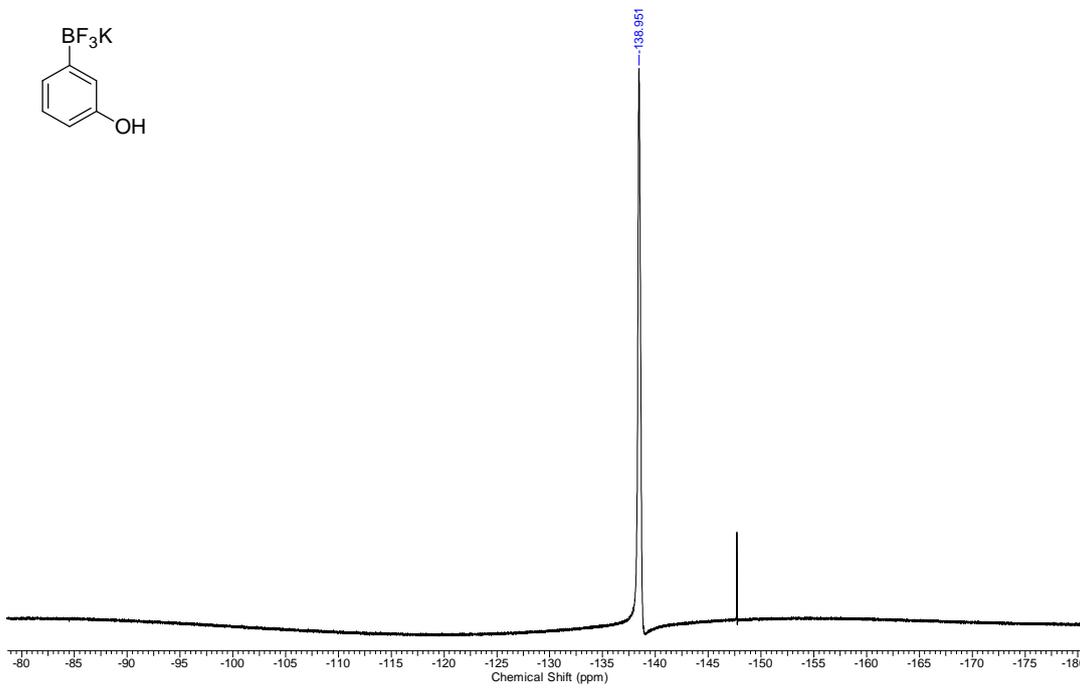
- RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d^6)



- RMN ^{11}B (128 MHz, $\text{DMSO-}d^6$)

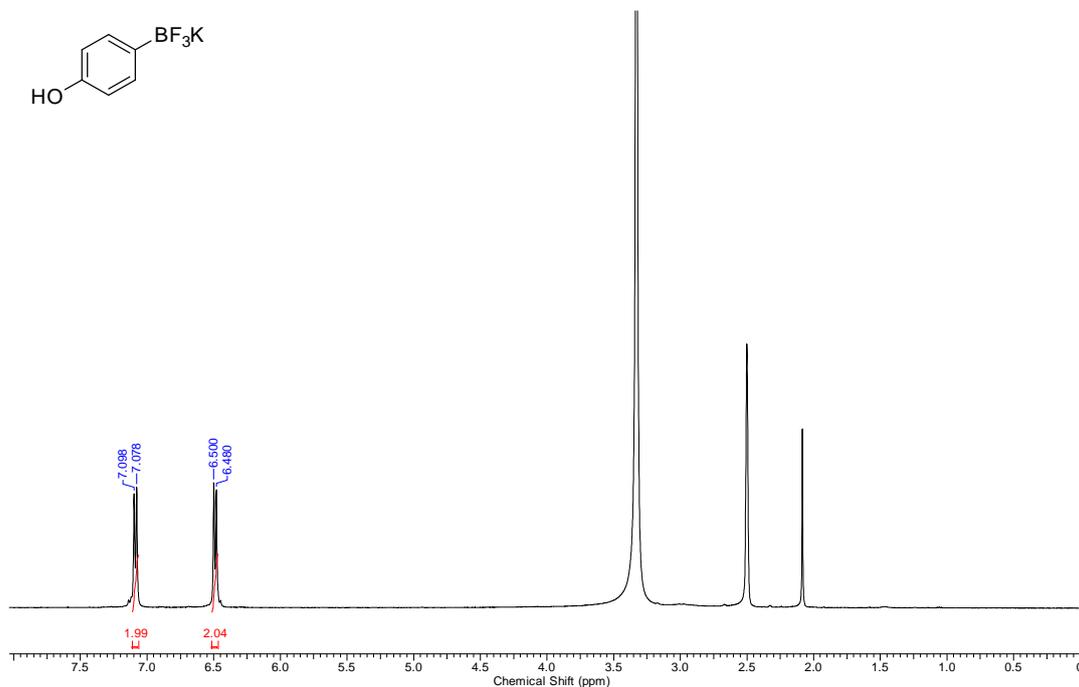


- RMN ^{19}F (376 MHz, $\text{DMSO-}d^6$)

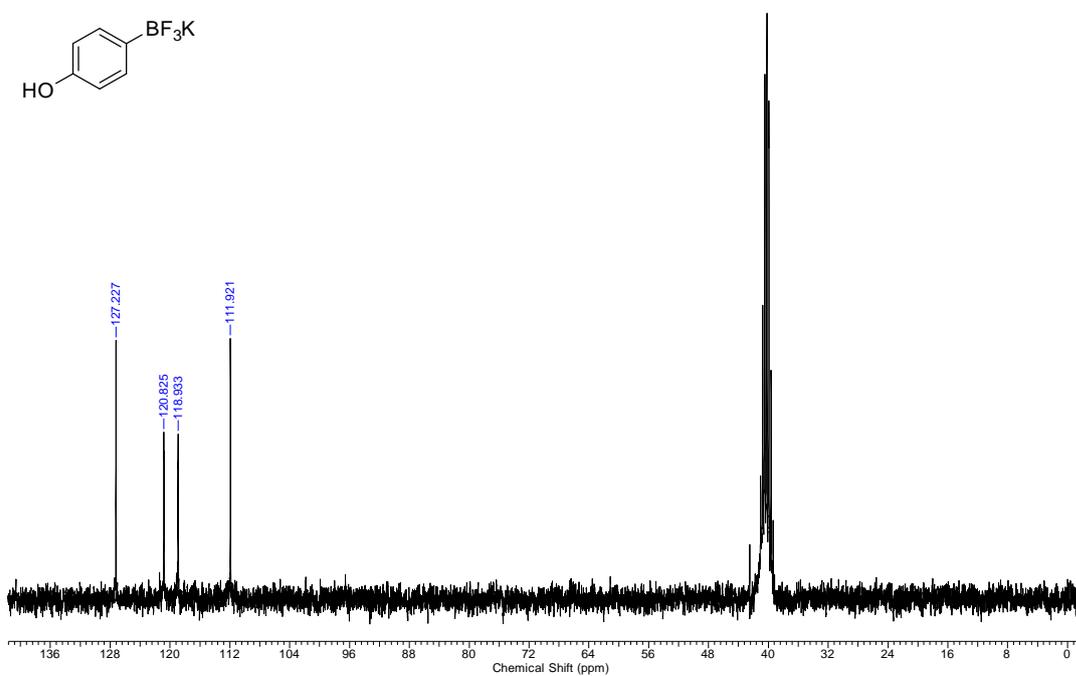


2.5. 4-hidróxi-feniltrifluoroborato de potássio (8d)

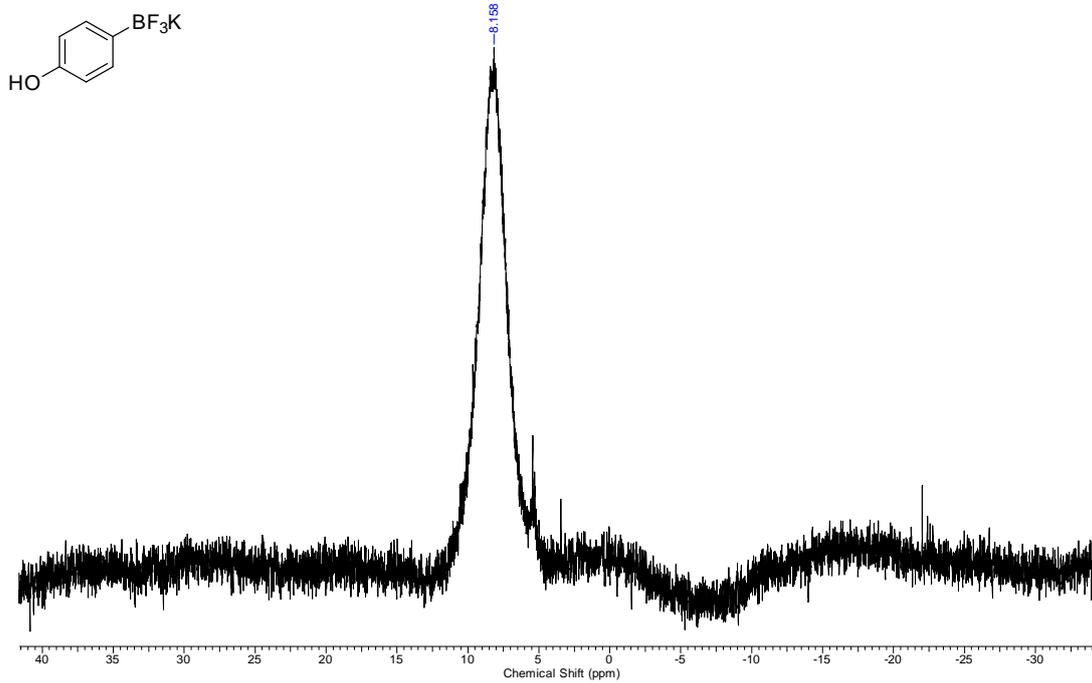
- RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d^6$)



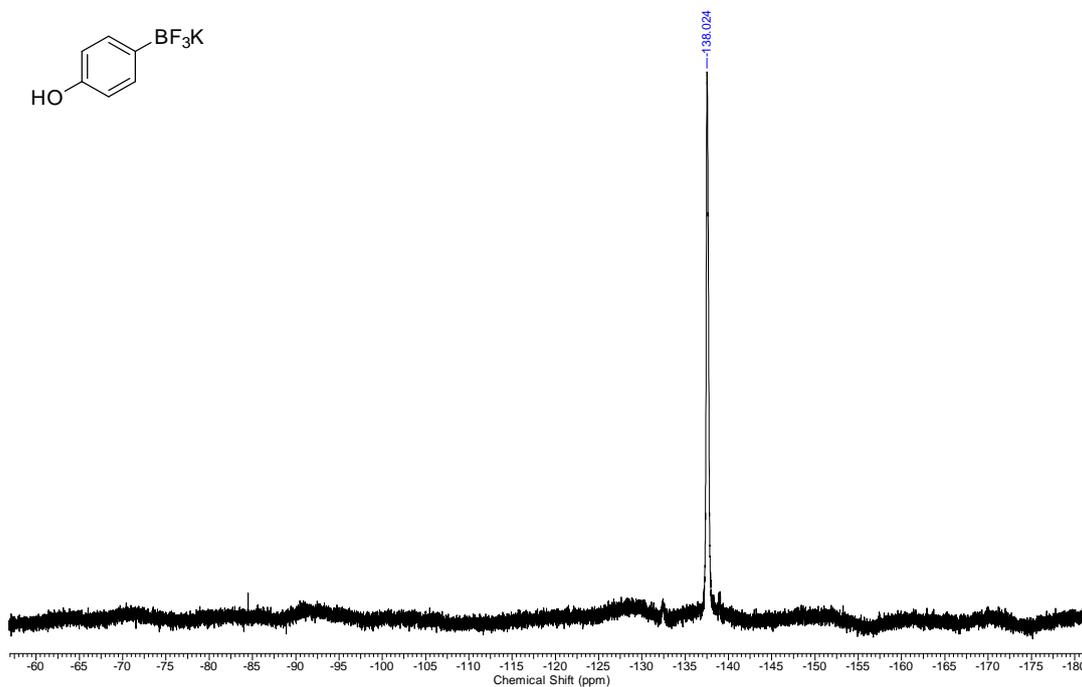
- RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d^6$)



- RMN ^{11}B (128 MHz, $\text{DMSO-}d^6$)

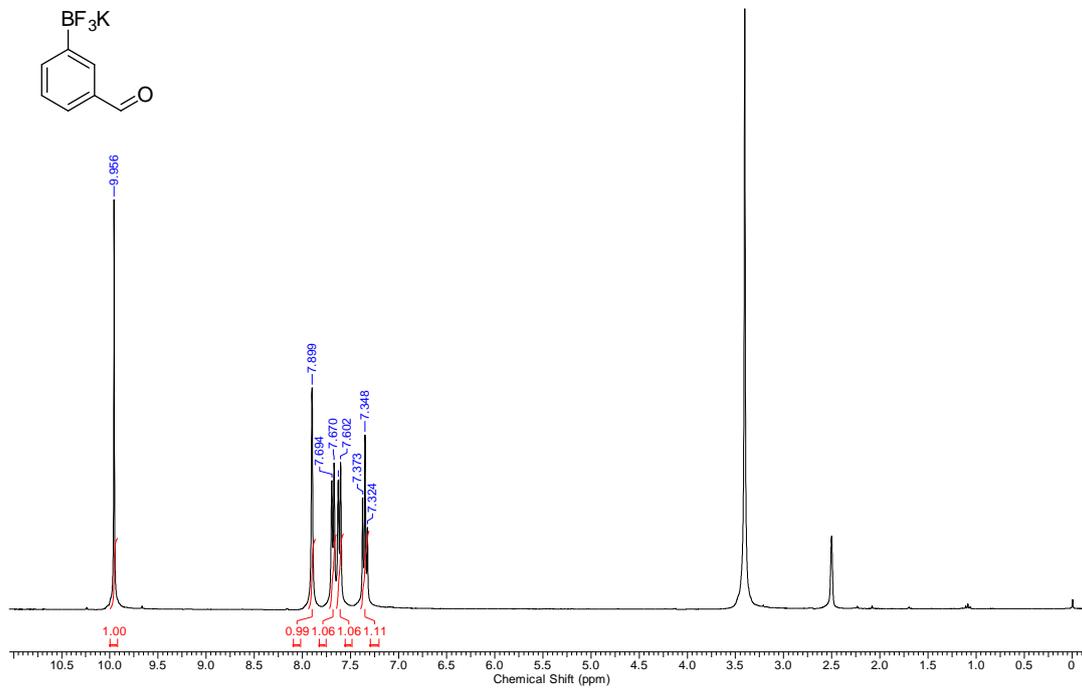


- RMN ^{19}F (376 MHz, $\text{DMSO-}d^6$)

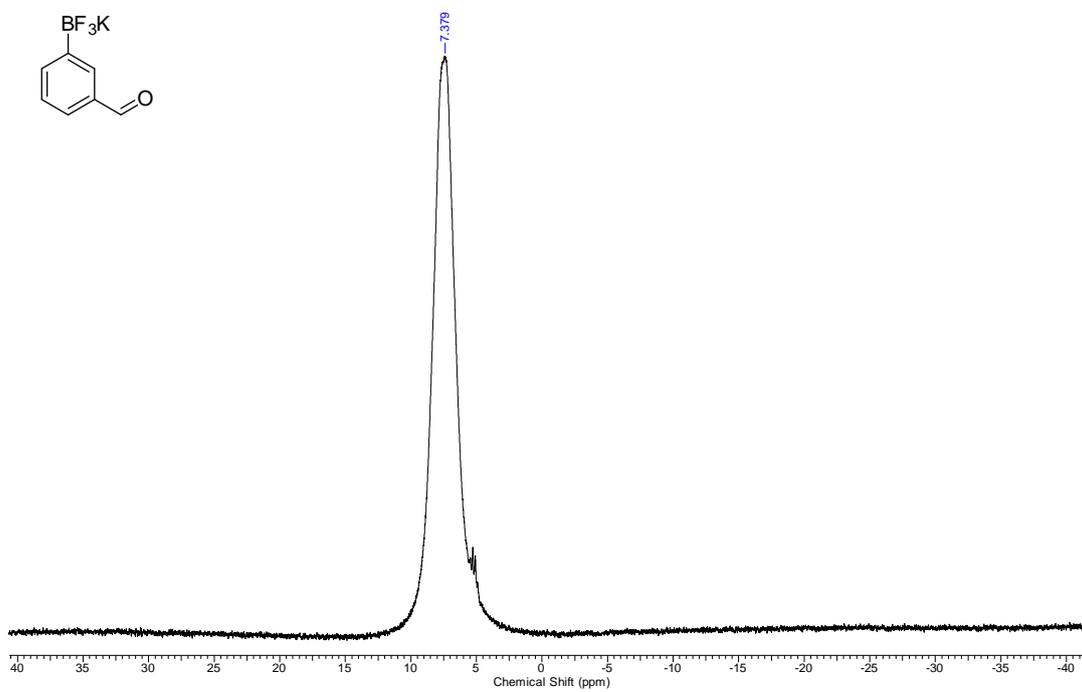


2.6. 3-formil-feniltrifluoroborato de potássio (8e)

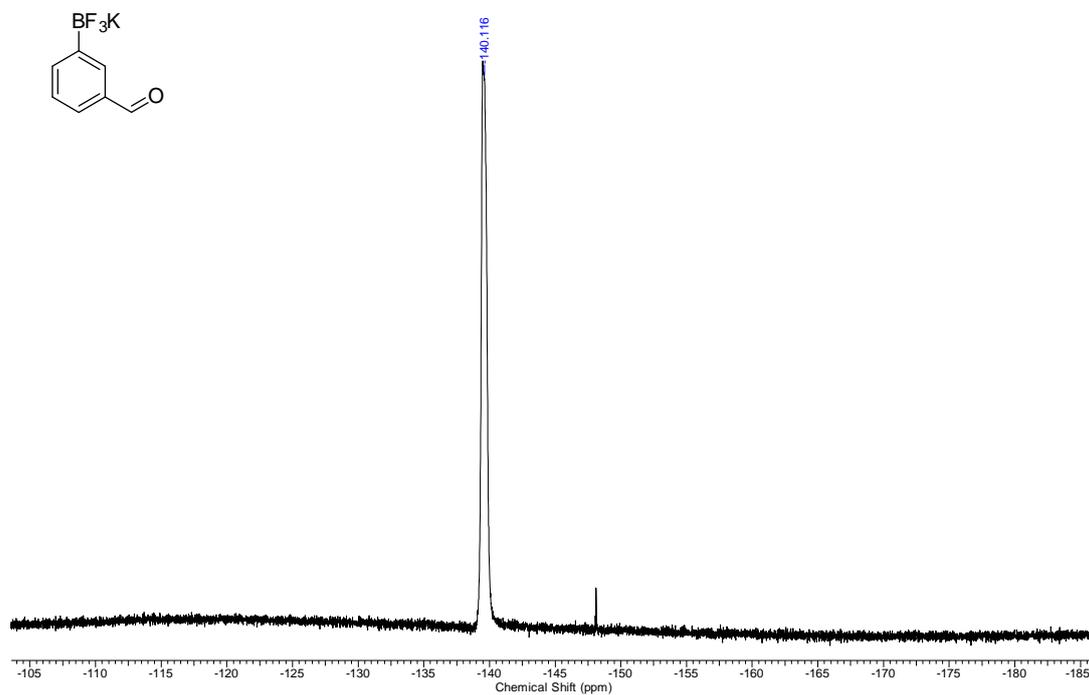
- RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6)



- RMN ^{11}B (96 MHz, DMSO- d_6)

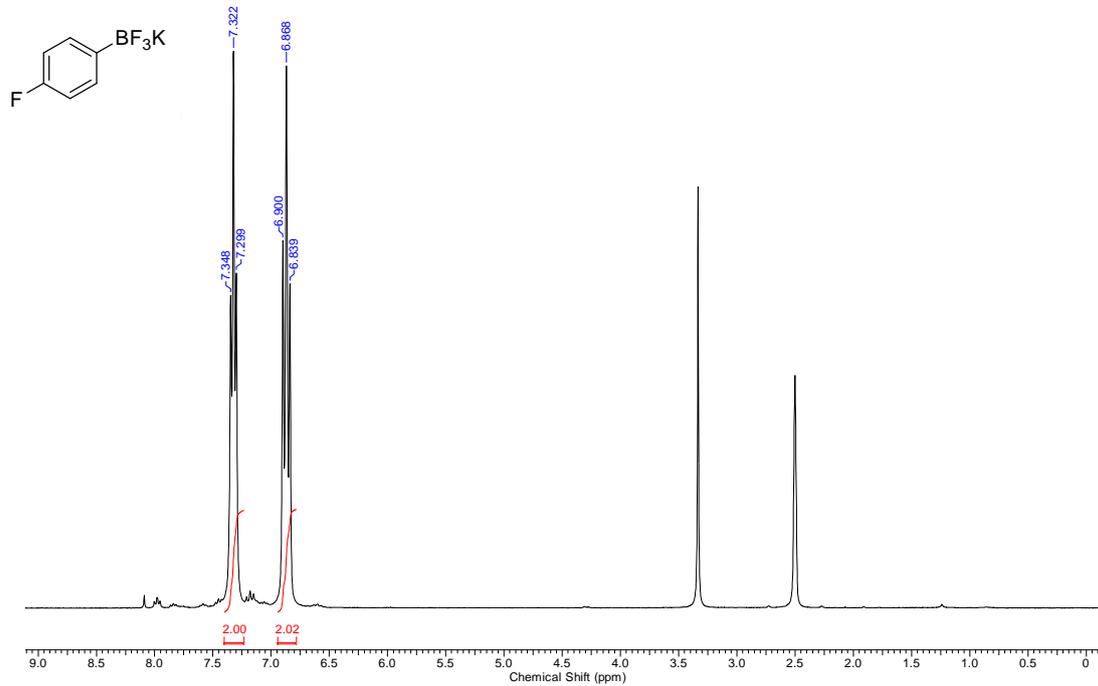


- RMN ^{19}F (282 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

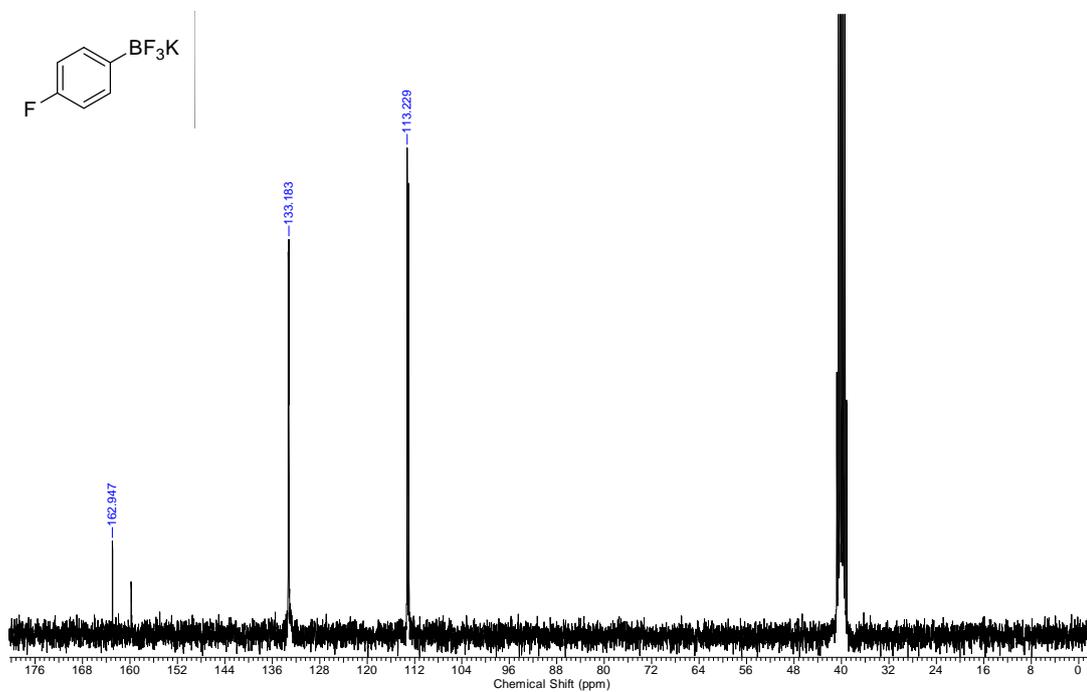


2.7. 4-flúor-feniltrifluorborato de potássio (8f)

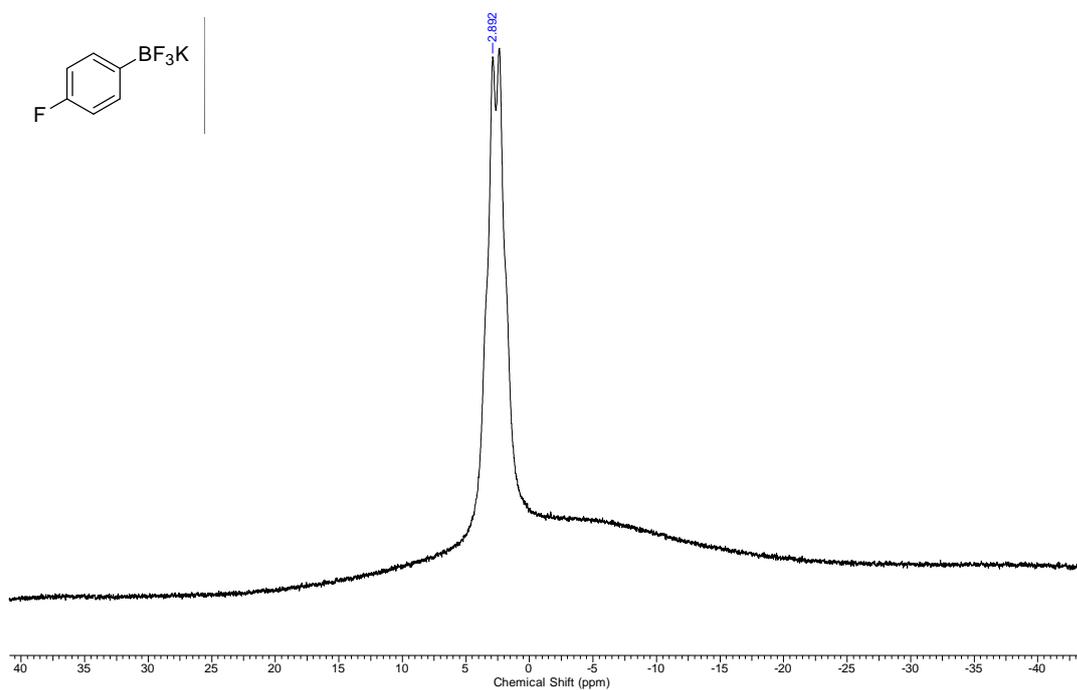
- RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6)



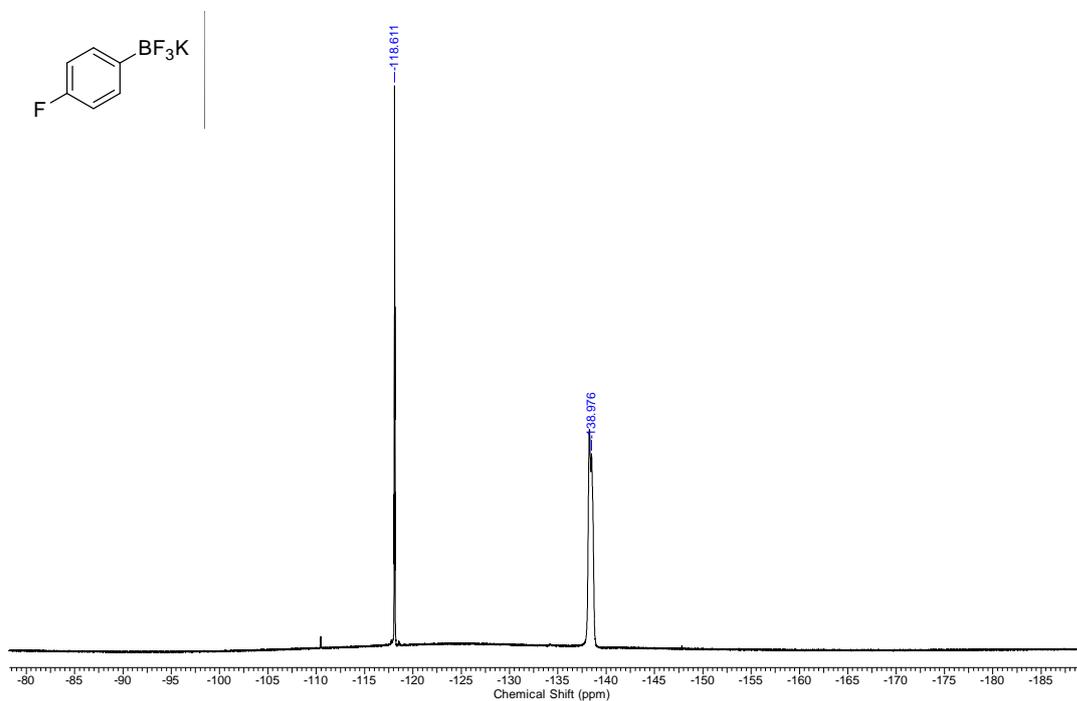
- RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6)



- RMN ^{11}B (96 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

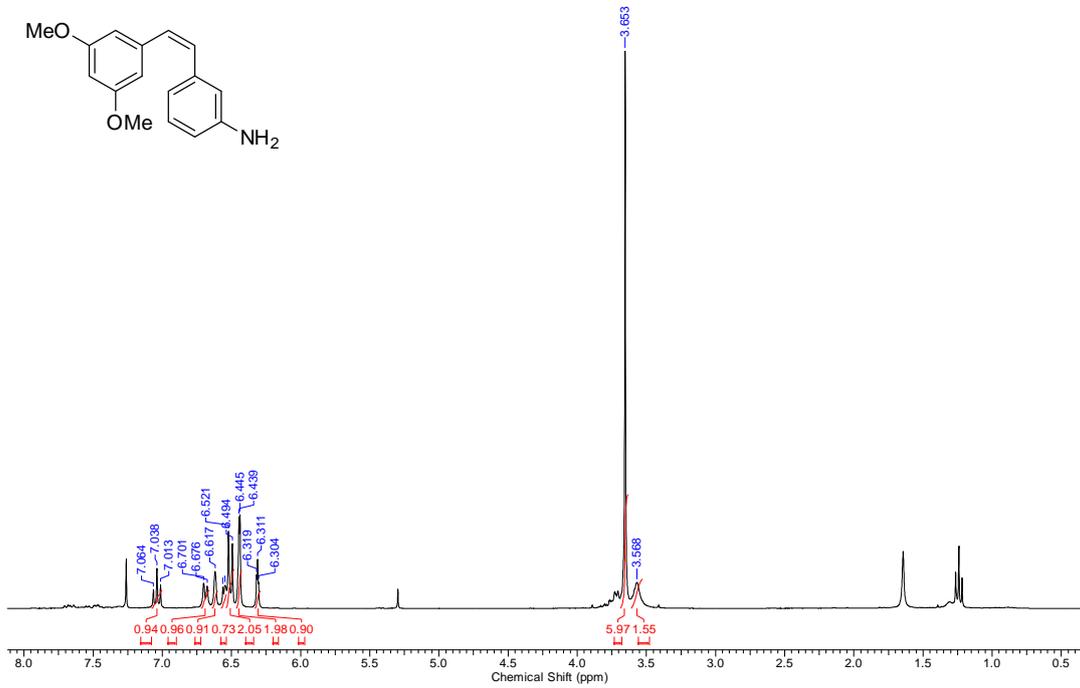


- RMN ^{19}F (283 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

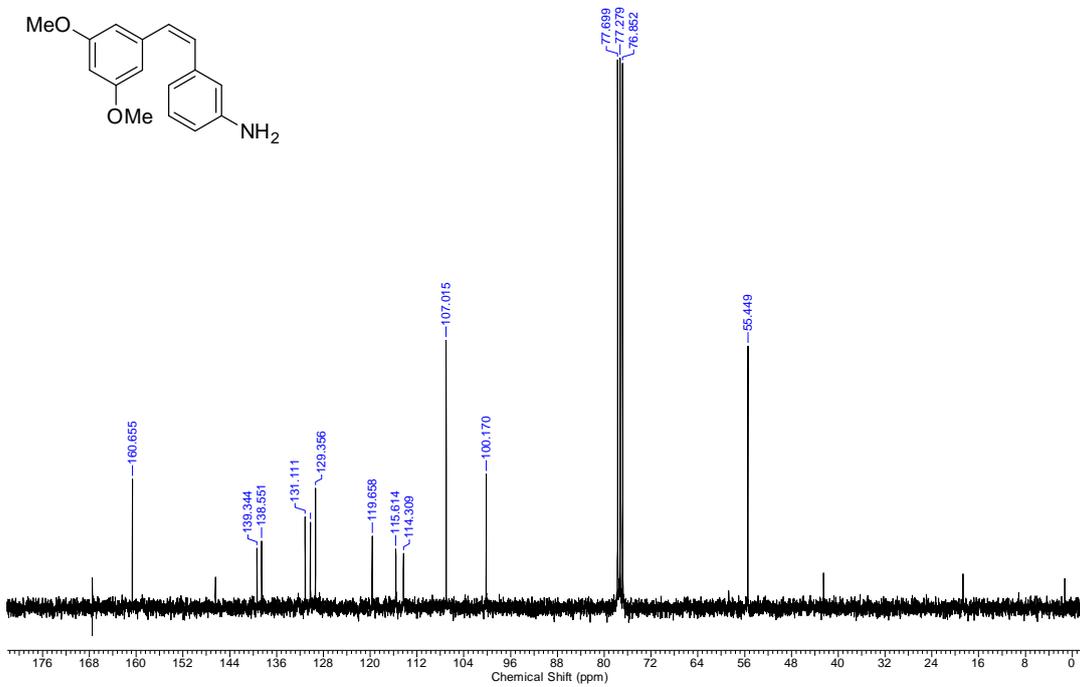


2.8. (Z)-3-(3,5-dimetóxiestiril)anilina (6f)

- RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)

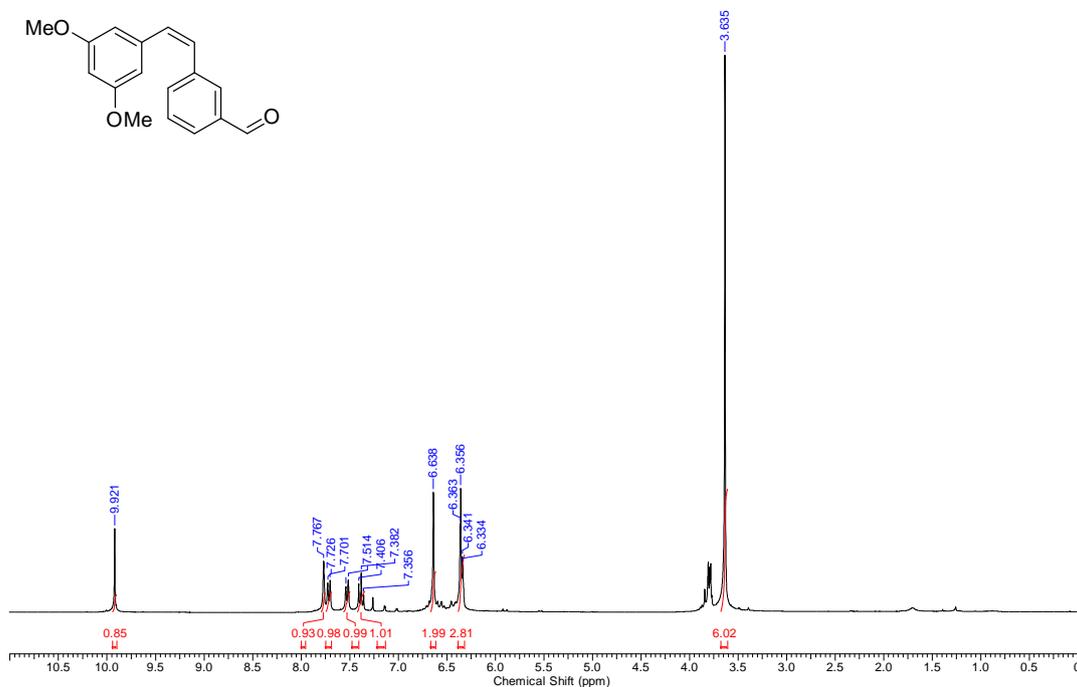


- RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)



2.9. (Z)-3-(3,5-dimetóxiestiril)benzaldeído (6h)

- RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃)



- RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃)

