UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas

Rodrigo Brito de Mello

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Rodrigo Brito de Mello

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Ribeirão Preto
2014

MELLO, R.B.	Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas		MESTRADO FCFRPUSP 2014
-------------	--	--	------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Mello, Rodrigo Brito de.

Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas. Ribeirão Preto, 2014. 53 p.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Emery, Flavio da Silva

1. Afidicolina. 2. Naftoquinonas. 3. Ácido cafeico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: MELLO, Rodrigo Brito de.

Título do trabalho: Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Há momentos em que você se pega perdido, sem direção, pensando se é realmente capaz de desempenhar o papel que lhe é proposto, ou se realmente pertence ao meio onde você se encontra. Dedico esse trabalho ao Prof. Dr. Flavio Emery pela orientação dada, pela confiança passada e principalmente pela amizade construída.

Agradecimentos

À minha família

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery pela dedicação empenhada no projeto e em minha formação e pelo espaço cedido para os encontros comemorativos do laboratório.

À CAPES pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

À FAPESP e o INCT_if pelo financiamento de projetos do QHETEM.

Aos amigos do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal, Lucas Rezende, Fernando Fumagali, Paulo Eliandro, Shaiani Gil, Márcia Franco, Miguel Menezes, Douglas Gonçalves, Felícia Ito, Pedro Moraes e Luciana Coitinho, pela colaboração, diversão e bom ambiente de laboratório, em especial Gabriela Bianchi pelo esforço empenhado em me ajudar em meu projeto e participação ativa em minha própria formação.

Ao técnico Murilo Helder de Paula pela contribuição no laboratório durante os experimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP pelo apoio e disponibilização de laboratório.

"A ciência não pode resolver o mistério final da natureza. E isto porque, em última análise, somos parte do mistério que tentamos resolver".

Max Planck

RESUMO

Mello, R. B. **Produção de biblioteca de compostos derivados de produtos naturais: Síntese e estudo de atividades biológicas**. 2014.53p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O presente trabalho trata da semissíntese de análogos de importantes compostos líderes (afidicolina, lausona, lapachol e CAPE) utilizando técnicas de química medicinal como bioisosterismo, adição de grupamento funcional e simplificação molecular. Dessa forma foi possível obter uma biblioteca de análogos racionais, visando a manipulação de parâmetros físico-químicos e estruturais, para fins de bioprospecção. Foram desenvolvidos derivados de afidicolina mais lipofílicos, por meio da acilação das hidroxilas presentes na estrutura química deste terpeno. Tentativas de formação de bioisósteros, sais e de ésteres fosfato das hidroxinaftoquinonas naturais – lapachol e lausona, foram realizadas visando avaliar a influência do pKa sobre a atividade deste tipo de moléculas, bem como aumentar hidrossolubilidade. Neste caso, foram observadas reações paralelas, como um rearranjo molecular para a formação de aminonaftoquinonas, no estudo da cicloadição de azida de sódio com grupos cianos. Ademais, foi estudado o efeito da simplificação molecular de CAPE (fenetil éster do ácido cafeico), visando entender os requisitos estruturais de atividade antitumoral desta classe de compostos. Neste trabalho, foram obtidas 14 moléculas e testadas para diferentes atividades biológicas. Derivados naftoquinoidais se mostraram ativos frente à inibição de DHODH em ensaio sobre a enzima e também em ensaio celular. Adicionalmente, análogos simplificados do CAPE apresentaram alta atividade antitumoral, com segurança, em comparação ao controle 5-fluorouracila.

Palavras chave: Produtos naturais, Afidicolina, Naftoquinonas, Fenetil éster do ácido cafeico, bioisosterismo, simplificação molecular.

ABSTRACT

Mello, R. B. **Production of library of compounds derived from natural products: Synthesis and study of biological activities.** 2014.53f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The present study aimed the semi-synthesis of analogues from important lead compounds (aphidicolin, lausone, lapachol and CAPE) by using medicinal chemistry strategies, such as bioisosterism, addition of functional groups and molecular simplification. Thus, we obtained a library of rational analogues, aiming the manipulation of physicochemical and structural parameters with bioprospecting purposes. We developed more lipophilic aphidicolin derivatives by acylation of the hydroxyl groups present in the structure of this terpene. Attempts towards the development of phosphate salts bioisosters from the hydroxynaftoquinones lapachol and lausone in order to evaluate the influence the pKa in the biological activity of these class compounds as well as to increase the water solubility. In this last case, we observed parallel reactions, as a molecular rearrangement for the formation of the aminonaftoquinones during the study of cycloaddition with cyanides and azides. In addition, we studied the effects of molecular simplification of CAPE (caffeic acid phenethyl ester), to better understand the structural requirements for antitumoral activity of this class of compounds. In the present work we obtained 14 molecules which were also tested for different biological activities. Naftoquinoidais derivatives showed inhibition activity on enzymatic essay on DHODH and on cellular essay. Moreover, simplified molecules from CAPE showed high antitumoral activity and safety in comparison to the control 5- fluorouracil.

Keywords: Natural products, Aphidicolin, Naftoquinones, Caffeic acid phenethyl ester, Bioisosterism, Molecular simplification.

Lista de Figuras

Figura 1: Processo evolutivo para a descoberta de fármacos naturais.	2
Figura 2: Gráficos (ponto e linha; colunas) ilustrando valor médio de cada propriedade nos dois grupos de fármacos.	3
Figura 3: mudanças nas propriedades físico-químicas entre uma molécula precursora de origem natural e o fármaco desenvolvido a partir desse precursor.	4
Figura 4: gráfico percentual de parâmetros clássicos de Lipinski para fármacos semissintéticos.	5
Figura 5: Gráfico percentual de parâmetros “não-Lipinski” para fármacos semissintéticos.	6
Figura 6: Representação estrutural de afidicolina 1.	7
Figura 7: Estrutura molecular do glicinato de afidicolina.	7
Figura 8: Quinonas usadas em tratamentos antitumorais.	10
Figura 9: Fórmula estrutural das quinonas objeto de estudo.	10
Figura 10: Fórmula molecular do ácido cafeico.	11
Figura 11: Estrutura molecular do fenetil éster do ácido cafeico.	11
Figura 12: % de supressão relativa a média de proliferação de células CD4 ⁺	37

LISTA DE ESQUEMAS:

Esquema 1: metabolização de 1 por enzimas hepáticas do tipo citocromo P ₄₅₀ .	8
Esquema 2: Esquema geral da formação de derivados acilados de 1 .	12
Esquema 3: Obtenção de derivados tetrazóis a partir de 2 e 3 .	13
Esquema 4: Éster análogo do ácido cafeico análogo ao CAPE.	13
Esquema 5: Esterificação planejadas para afidicolina.	15
Esquema 6: Mecanismo geral de esterificação de álcoois utilizando DMAP.	16
Esquema 7: Análise retrossintética para obtenção de derivados tetrazóis.	16
Esquema 8: Mecanismo de formação de anéis tetrazóis: Cicloadição 1,3 dipolar.	17
Esquema 9: Esquema de obtenção de análogos do ácido cafeico esterificados.	17
Esquema 10: Esquema reacional para a obtenção do derivado acilado de 6 .	18
Esquema 11: Acilação de 1 utilizando cloreto de ciclohexanocarbonila gerando derivado 7 .	19
Esquema 12: Acilação de 1 utilizando anidrido propiônico.	20
Esquema 13: acilação de 1 utilizando anidrido butírico.	21
Esquema 14: Moléculas presentes na mistura resultante da esterificação de 1 .	23
Esquema 15: Esquema reacional da formação de 10 .	24
Esquema 16: Condições reacionais para obtenção de derivado iodoacetoneitrila de 3 .	25
Esquema 17: tentativa de obtenção do derivado tetrazol.	26
Esquema 18: Mecanismo de aminação de quinonas por azidas.	26
Esquema 19: Retrossíntese de rota alternativa para obtenção de 12 .	27
Esquema 20: Tentativa de formação do anel tetrazol halogenado.	27
Esquema 21: Esquema reacional da formação de 14 .	28
Esquema 22: Formação inesperada de derivado aminado.	28
Esquema 23: Hipótese mecanística de formação de derivado aminado.	30
Esquema 24: Esquema reacional da formação de 28 .	31
Esquema 25: Esquema reacional da formação de 29 .	31
Esquema 26: Esquema reacional da obtenção de 31 .	32
Esquema 27: Esquema reacional da formação de 21 .	33
Esquema 28: Esquema reacional da formação de 22 .	34
Esquema 29: Esquema reacional da formação de 23 .	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	9
Tabela 2	36
Tabela 3	37
Tabela 4	38

INDICE

INTRODUÇÃO	1
Produtos naturais	1
Afidicolina	7
Quinonas	9
Ácido cafeico e derivados do fenetil	11
OBJETIVOS	12
Objetivo geral	12
Objetivos específicos	12
MATERIAIS E MÉTODOS	14
Materiais	14
Métodos	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
Derivados afidicolanos esterificados	18
Derivados Quinoidais	24
Derivados do ácido cafeico análogos ao CAPE	32
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	36
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
EXPERIMENTAL	46
APÊNDICE	54

INTRODUÇÃO

Produtos naturais

Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica tem realocado recursos de pesquisas em desenvolvimento de novos fármacos envolvendo produtos naturais para novos projetos envolvendo síntese combinatória de pequenas moléculas atrelada à *high throughput screening*. Nesse mesmo período, o número de novas entidades químicas chegando ao mercado entrou em declínio, porém, mostrando sinais de recuperação no período de 2010 - 2013 ⁽¹⁻⁷⁾.

Descoberta, isolamento e desenvolvimento de fármacos baseados em produtos naturais são, contudo, excepcionalmente desafiadores, requerendo uma abordagem multidisciplinar. Exemplos desses desafios incluem a dificuldade no isolamento de constituintes ativos, variabilidade inerente das fontes de produtos naturais, incompatibilidade dos extratos brutos com as técnicas de *high throughput screening*, altos números de falsos negativos e falsos positivos, disponibilidade de fonte de material para manufatura dos eventuais fármacos e a discussão sobre a posse dos bio-materiais e fonte dessas moléculas ^(1, 3, 4, 5, 8, 9).

Impulsionada pela seleção natural, a natureza levou quase três bilhões de anos criando sua biblioteca de pequenas moléculas ativas. O processo evolutivo culminou em vasta complexidade e diversidade funcional da biblioteca de produtos naturais, consequência da rotina de incontáveis *high throughput screenings* para gerar “bibliotecas combinatórias naturais” ⁽⁶⁾ que serão sempre superiores a qualquer biblioteca de pequenas moléculas preparadas por uma equipe de cientistas ^(1,9).

Por esta razão, os produtos naturais são reconhecidamente uma das mais abundantes fontes de diversidade química disponível ⁽¹⁰⁾ e representam a mais importante estratégia de descoberta de fármacos a partir de pequenas moléculas ⁽⁹⁾. Cerca de 60% dos 1073 dos novos fármacos aprovados entre 1981 e 2010 são produtos naturais, derivados de produtos naturais ou análogos sintéticos de produtos naturais ⁽⁶⁾.

O processo de descoberta de novos fármacos envolvendo produtos naturais se dá através de caminhos distintos, que incluem o uso de extratos brutos como fármacos, uso do produto natural isolado como fármaco, uso de produtos naturais semissintéticos visando melhorias farmacocinéticas de um produto natural com atividade prévia, o uso de esqueletos de produtos naturais como inspiração para desenvolvimento de análogos sintéticos (Figura 1) ⁽¹¹⁾. Esse processo evolutivo é bem representado pela evolução dos opióides da fonte natural aos derivados de última geração.

Figura 1: Processo evolutivo para a descoberta de fármacos naturais.

Se por um lado a questão estrutural é historicamente o aspecto mais fundamental na química medicinal de produtos naturais, recentemente o perfil físico-químico de fármacos naturais e ganhou importância e onde é possível destacar dois

grupos bem característicos: um primeiro grupo, representado pelas moléculas que estão em concordância com a “regra dos cinco” de Lipinski e um segundo grupo, representado pelo grupo de moléculas que não se enquadram nessa regra (Figura 2). Contudo, mesmo as moléculas que não seguem as regras de Lipinski apresentam lipofilicidade ($\text{Log}P$) e grupos doadores de ligação de hidrogênio dentro dos parâmetros estabelecidos por Lipinski, destacando a importância desses parâmetros na predição de biodisponibilidade de produtos naturais ^(12, 13).

Figura 2: Gráficos ilustrando valor médio de cada propriedade nos dois grupos de fármacos citados. $\text{Log}P$: lipofilicidade calculada; Hd: grupos doadores de ligação de hidrogênio; Ha: grupos aceptores de ligação de hidrogênio; Rot: ligações rotacionáveis; PSA: área de superfície polar (TPSA: área topológica de superfície polar); Ap: átomos pesados; Ce: centros estereogênicos.

Lipinski na Pfizer foi o primeiro a descrever guias de parâmetros físico-químicos para o desenvolvimento de novos compostos baseado em análises estatísticas de um grupo de fármacos pré-determinados. Em sua “Regra dos cinco” ele afirma que, peso molecular ≤ 500 , $\text{Log}P \leq 5$, grupos doadores de ligação de hidrogênio < 5 e grupos aceptores de ligação de hidrogênio < 10 são desejáveis para que as moléculas possuam alta biodisponibilidade por via oral por absorção passiva ⁽¹³⁾. Adicionalmente, Veber *et al.* na SmithKline Beecham mostrou que, restringindo o número de ligações rotacionáveis < 10 e área total de superfície polar $< 140 \text{ \AA}^2$ também são aumentadas as chances das moléculas apresentarem boa biodisponibilidade oral ⁽¹⁴⁾. Mais recentemente, Lovering na Wyeth/Pfizer concluiu

que a fração de carbonos sp^3 é um bom indicativo de solubilidade e promiscuidade. A fração sp^3 tem mostrado um aumento de incidência entre os novos compostos descobertos e também fármacos em geral a uma média de 0.43 para fármacos que surgiram no período entre 2005 – 2009 ⁽¹⁵⁾. Leeson na AstraZeneca destaca um outro parâmetro, a diferença numérica entre o número de carbonos aromáticos e o número de carbonos hibridizados sp^3 . A se destacar, parâmetros como peso molecular, grupos doadores de ligação de hidrogênio numero de ligações rotacionáveis e relação entre carbonos aromáticos e carbonos sp^3 hibridizados se mantêm relativamente invariáveis, sugerindo que os químicos medicinais tendem a manter essas quatro propriedades independentemente da classe do alvo ⁽¹⁶⁾.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado à análise das propriedades físico-químicas de fármacos naturais. Em uma recente análise, é possível identificar que fármacos semissintéticos apresentam características especiais que delineiam o desenvolvimento mais racional (Figura 3).

Figura 3: mudanças nas propriedades físico-químicas entre uma molécula precursora de origem natural e o fármaco desenvolvido a partir desse precursor.

A análise dos fármacos semi-sintéticos identifica 5 parâmetros físico-químicos que devem ser preferivelmente mantidos ou melhorados: XLogP (lipofilicidade

calculada), grupos doadores de ligação de hidrogênio, número de ligações rotacionáveis fração *sp*³ e relação entre carbonos aromáticos e carbonos *sp*³ hibridizados. Para os três primeiros parâmetros, os valores são semelhantes às orientações recomendadas para biodisponibilidade oral. Interessantemente, as análises de propriedades do tipo fármaco de Leeson, mesmo possuindo uma perspectiva muito diferente, também apontam para a importância do Log*P*, grupos doadores de ligação de hidrogênio, e relação entre carbonos aromáticos e carbonos *sp*³ como propriedades que os químicos medicinais têm buscado manter ao longo dos anos, durante a fase de otimização de compostos líderes. Dados com fármacos semissintéticos mostram conclusões semelhantes, contudo, uma característica especial de produtos naturais é a abundância de características stereoquímicas e isso reflete em um aumento dos valores de parâmetros como fração de carbonos *sp*³ e relação entre carbonos aromáticos e carbonos *sp*³, apresentando-se muito superiores às observadas em compostos sintéticos (Figuras 4 – 5) ⁽¹¹⁾.

Figura 4: gráfico percentual de parâmetros clássicos de Lipinski para fármacos semissintéticos, para cada parâmetro, o valor correspondente a 80% é notado, pontos de dados são codificados por cor: azul = administração oral, vermelho = administração não oral.

Figura 5: Gráfico percentual de parâmetros “não-Lipinski” para fármacos semissintéticos. Para cada parâmetro o valor correspondente a 80 % é notado. Pontos de dados são codificados por cores: azul = administração oral, vermelho = administração não oral.

Dados como esses evidenciam a importância dos produtos naturais na busca de novos candidatos a fármacos e a importância de parâmetros físico-químicos como filtros para o desenvolvimento de produtos inovadores derivados de produtos naturais. E calcado nesses conceitos o presente trabalho lançou mão de estratégias como semissíntese, bioisosterismo e produção de derivados sintéticos análogos de produtos naturais com reconhecidas atividades biológicas objetivando desenvolver uma biblioteca de compostos com variadas características moleculares. Os produtos naturais protótipos utilizados neste trabalho são descritos a seguir.

Afidicolina

Terpenóides constituem um dos mais diversos grupos de produtos naturais⁽¹⁷⁾. Dentro desse grupo molecular destaca-se a afidicolina **1** (Figura 6), descrita por Brundret *et al.* em 1972 como inibidora do crescimento de Herpes simplex tipo I foi isolada de culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola*. A **1** também foi atribuída atividades imunossupressora e antiparasitária^(18, 19).

Figura 6: Representação estrutural de afidicolina **1**.

Considerada um composto líder, **1** foi utilizada em uma série de programas de descoberta de fármacos culminando no desenvolvimento do composto semissintético glicinato de afidicolina, um antitumoral, que avançou até as fases clínicas mais avançadas de estudos com fármacos na década de 80 (**Figura 7**).

Figura 7: Estrutura molecular do glicinato de afidicolina.

Afidicolina **1** é descrita na literatura como inibidora reversível da enzima DNA polimerase α , mecanismo de ação que seria responsável pela atividade citotóxica perante linhagens de células cancerígenas diversas ⁽²⁰⁾ e ainda tem sido testada como agente antiparasitário contra *Trypanosoma spp.*, *Entamoeba histolítica*, *Trypanosoma spp.* e *Leishmania spp.*⁽¹⁸⁾.

A dose tóxica em camundongos é bem alta (60 mg/Kg de peso corporal) indicando uma ampla janela farmacológica⁽¹⁸⁾, contudo, seu uso *in vivo* mostra-se inviável devido à baixa lipofilicidade e rápida metabolização por oxidação da hidroxila ligada à posição C-3, gerando o metabólito 3-cetoafidicolina (Esquema 1), cuja atividade biológica é de cerca de 10% de **1**. ^(21, 22, 23).

Esquema 1: metabolização de **1** por enzimas hepáticas do tipo citocromo P₄₅₀.

Santos *et al.*, em artigo de revisão sobre afidicolina analisa parâmetros físico-químicos de **1**, e os compara com parâmetros médios de análogos obtidos por biotransformação e por semissíntese, e conclui que as duas classes de compostos apresentam valores médios de XLogP e peso molecular maiores em comparação a **1**, enquanto observa-se a diminuição da área topológica de superfície polar e grupos doadores de ligação de hidrogênio. Nenhuma alteração significativa é observada quanto aos grupos aceptores de ligação de hidrogênio e ligações rotacionáveis. Esses valores mostram que as transformações químicas de **1** tentem a produzir compostos mais lipofílicos e de maior peso molecular ⁽¹⁹⁾ (Tabela 1).

Propriedade	1	Produtos de biotransformação	Produtos de semissíntese
XLogP	1.12	2.63	3.27
DH	4	2.83	1.77
AH	4	4.75	3.8
PM	338.48	389	364.6
TASP	80.9	79.57	63.06
LR	2	2.5	2.28

XLogP: lipofilicidade calculada; DH: Doador de ligação de hidrogênio; AH: aceptor de ligação de hidrogênio; PM: peso molecular; TASP: Área de superfície polar total; LR: n° de ligações rotacionáveis.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas de afidicolina e seus análogos.

Considerando estas informações, neste trabalho a afidicolina **1** será utilizada como material de partida para desenvolvimento de uma biblioteca de compostos lipofílicos, explorando a reatividade química das hidroxilas deste terpeno.

Quinonas

Quinonas e seus derivados são encontrados em uma ampla variedade de produtos naturais, candidatos a fármacos e fármacos consolidados. Constituem uma classe de compostos que apresentam uma ampla gama de atividades biológicas, dentre as quais se destacam as atividades carcinogênicas, imunomodulatórias, antimicrobianas e antiparasitárias. ⁽²²⁾

Alguns importantes fármacos utilizados no tratamento antitumoral apresentam o fragmento quinoidal em suas estruturas, como é o caso de daunorubicina, doxorubicina e mitomicina (Figura 8).

Figura 8: Quinonas usadas em tratamentos antitumorais.

O uso clínico de daunorubicina e doxorubicina vem se expandindo. Destes, a daunorubicina é usada principalmente no tratamento de leucemias enquanto doxorubicina possui um amplo espectro de atividade anticâncer abrangendo uma ampla variedade de tumores sólidos assim como leucemias. ^(25, 26)

Apesar de muitas naftoquinonas apresentarem atividades biológicas, citotoxicidade e biodisponibilidade são fatores limitantes do emprego desses compostos em esquemas terapêuticos, evidenciando a necessidade de pesquisas voltadas à adequação desses parâmetros. Mecanicamente, as atividades biológicas de 1,4-naftoquinonas estão relacionadas à formação de espécies reativas de oxigênio, alquilação de DNA e proteínas, bem como a inibição de receptores diversos caracterizando promiscuidade dessa classe de compostos. ⁽²⁷⁻³³⁾ Estes fatores estão relacionados também à citotoxicidade e baixa inespecificidade destes compostos.

Neste contexto, as 1,4-naftoquinonas naturais lausona **2** e lapachol **3** (Figura 9) serão utilizadas como material de partida para desenvolvimento de uma biblioteca de compostos semi-sintéticos inéditos para futuros ensaios de atividade. Estes dois protótipos naturais são descritos em literatura como versáteis química e biologicamente e permitem estudar a influencia das modificações estruturais sobre o perfil biológico desses compostos ⁽³⁴⁾.

Figura 9: Fórmula estrutural das quinonas objeto de estudo.

Ácido cafeico e derivado fenetil éster (CAPE)

Estudos preliminares de extratos e óleos vegetais relacionam derivados do ácido cafeico **4** (Figura 10) à atividade antitumoral ⁽³⁵⁻³⁶⁾. Através de um mecanismo de interferência no ciclo celular possivelmente por consequência da inibição da via do NF-κB ⁽³⁷⁾.

4- Ácido cafeico

Figura 10: Fórmula molecular do ácido cafeico

Pouco se sabe sobre a química medicinal de derivados de ácido cafeico **4**, porém muito se tem discutido sobre as hipóteses antioxidante e a capacidade de reagir com nucleófilos endógenos, via formação de aduto de Michael, como responsáveis pela atividade antitumoral. Um análogo bastante conhecido de **4** é o fenetil éster do ácido caféico (CAPE) **5**, derivado mais lipofílico presente no própolis vermelho, que apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, inibitória de crescimento tumoral, bem como, regulador de metástase e de invasão tumoral por regular metaloproteinases de matriz ⁽³⁸⁾. O CAPE **5** tem sido um interessante objeto de estudo para a produção de análogos do ácido cafeico **4** para futuros estudos de atividade biológica ⁽³⁹⁻⁴³⁾ (Figura 11).

5- Fenetil éster do ácido cafeico

Figura 11: Estrutura molecular do fenetil éster do ácido cafeico.

A partir destas informações, **5** será utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novos análogos, para avaliação dos requisitos estruturais para atividade antitumoral.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolvimento de biblioteca de análogos de produtos naturais por meio de diferentes abordagens como semissíntese, bioisosterismo e simplificação molecular para fins de estudos e bioprospecção.

Objetivos específicos

Afidicolina

Verificar a influência do aumento da lipofilicidade na atividade biológica através da produção de derivados semissintéticos de afidicolina acilados nas posições C-17 e C-18. (Esquema 2).

Esquema 2: Esquema geral da formação de derivados acilados de **1**.

Naftoquinonas:

Avaliar o impacto nas atividades biológicas causado pelo aumento da área de superfície polar, número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio mantendo o

perfil de pka através de derivados bioisósteros das naftoquinonas **2** e **3** substituídos por tetrazol. (Esquema 3).

Esquema 3: Obtenção de derivados tetrazóis a partir de **2** e **3**.

Derivados do ácido cafeico análogos ao CAPE:

Estudar o perfil de atividade biológica da aplicação da estratégia de simplificação molecular na produção de análogos do CAPE (Esquema 4).

Esquema 4: Éster análogo do ácido cafeico análogo ao CAPE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Equipamentos Analíticos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN de ^1H) foram registrados à 300 e 500 MHz em espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados à 75 e 125 MHz em espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente, no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo na Universidade de São Paulo. Os valores de deslocamento químicos (δ) estão relatados em partes por milhão (ppm), utilizando-se como referência o tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades dos sinais estão apresentadas entre parênteses (s=simpleto, d=duplete, t=triplete, q=quarteto, dd=duplo duplete, m=multiplete), utilizando como padrão interno, os valores de constante de acoplamento (J) são dados em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos a partir da integral relativa.

As análises de espectrometria de massas por IES-EM (Espectrometria de massas utilizando ionização por eletrospray) foram realizadas em aparelho modelo ultrOTOFQ-IES-TOF Mass Spectrometer, da Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA

As análises de absorção no infravermelho foram realizadas em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 1600-FT, em celas de KBr para líquidos (filme).

Equipamentos

Abaixo é apresentada a descrição dos equipamentos utilizados durante procedimentos sintéticos.

- Balança analítica Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Medidor de Ponto de fusão: Marconi MA 381
- Bomba de alto vácuo E2M5 (Edwards)
- Agitador magnético: IKA C-MAG H57

- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215

Solventes e Reagentes:

Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, como descritos em literatura. Os solventes utilizados na extração e síntese foram adequadamente separados e enviados para o centro de tratamento de resíduos. Os reagentes foram obtidos através da Sigma-Aldrich Brasil.

Métodos

Afidicolanos:

Os derivados afidicolanos foram planejados para serem obtidos através de esterificações utilizando cloretos de ácidos (cloreto de ciclohexanocarbonila e cloreto de acetila) e os anidridos butírico e propiônico em piridina e dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador de reação, gerando os derivados **6**, **7**, **8** e **9**, respectivamente (Esquema 5).

Esquema 5: Esterificação planejadas para afidicolina.

Apesar dos reagentes para esterificação serem diferentes entre si os mecanismos são basicamente os mesmos, em ambas é usado dimetilaminopiridina

(DMAP), um catalizador de esterificação que apresenta uma reatividade mais acentuada comparado à função álcool. Em um primeiro momento é DMAP que promove o ataque à carbonila, tanto do anidrido quanto do cloreto de ácido gerando, assim, o intermediário que sofrerá o ataque dos elétrons do oxigênio da função álcool resultando no éster planejado e reconstituição do catalisador (Esquema 6).

Esquema 6: Mecanismo geral de esterificação de álcoois utilizando DMAP.

Naftoquinonas

Para a formação dos derivados de naftoquinonas foi planejado a síntese de intermediários substituídos com grupamento ciano, para posterior formação do anel tetrazol, como ilustrado no esquema retrosintético a seguir (Esquema 7).

Esquema 7: Análise retrosintética para obtenção de derivados tetrazóis.

Para a obtenção de **12** e **13** foi planejado um primeiro passo reacional, uma alquilação em meio básico utilizando iodoacetnitrila gerando o intermediário cianado **10** e **11**. Para a formação dos derivados tetrazóis **12** e **13** utilizou-se do método de cicloadição 1,3 dipolar com azida de sódio (Esquema 8).

Esquema 8: Mecanismo de formação de anéis tetrazóis: Cicloadição 1,3 dipolar.

Derivados do ácido cafeico análogos ao CAPE

Para a obtenção dos análogos **21**, **22** e **23** foram feitas esterificações utilizando bromo metil benzeno **17** em meio básico e refluxo com três diferentes ácidos carboxílicos, o ácido 3 - metoxifenil acético **18**, ácido 3,4 - dihidroxifenilacético **19** e ácido 4 - metoxifenil acético **20** (Esquema 9).

Esquema 9: Esquema de obtenção de análogos do ácido cafeico esterificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Derivados afidicolanos esterificados.

Na primeira reação da série foi utilizado cloreto de acetila e dimetil amino piridina (DMAP), em piridina para a obtenção do derivado **6** (Esquema 10). Passadas 6 horas do início da reação foi verificado, por meio de cromatografia de camada delgada (CCD), o consumo total do produto de partida e a formação de um novo produto majoritário que foi isolado por coluna cromatográfica de sílica gel.

Esquema 10: Esquema reacional para a obtenção do derivado acilado de **6**.

O espectro de massas de ionização por eletro spray (IES-EM) apresenta pico característico do íon molecular protonado $[M+H]^+$: 423,2729 (massa calculada de $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_6$ $[M+H]^+$: 423,2741), indicando a obtenção do derivado di-substituído [ANEXO 1].

O experimento espectroscópico de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C , porém, traz evidências da presença de uma mistura de duas moléculas que não foi possível detectar por meio de CCD. Neste espectro observa-se a presença quatro sinais com deslocamentos químicos δ 171,81; δ 171,46; δ 171,44 e δ 171,25 ppm referentes a quatro carbonilas diferentes em uma região do espectro onde seria esperado observar apenas dois, caso a amostra estivesse pura. A ocorrência de sinais duplicados por todo o espectro corrobora a evidência de mistura de produtos [ANEXO 2].

Outras evidências da presença de mistura podem ser observadas no espectro de RMN de ^1H , sinais em δ 1,00 (s, 3H) δ 0,98 (s, 3H) δ 0,92 (s, 3H) δ 0,90 (s, 3H) ppm são referentes a quatro em uma região do espectro onde esperávamos a presença de apenas duas, metilas essas que corresponderiam às metilas pertencentes ao material de partida C-19 e C-20. Adicionalmente, o espectro de RMN de ^1H apresenta três sinais muito próximos, três simpletos sobrepostos em δ 2,10 (s, 3H), δ 2,09 (s, 3H) e δ 2,08 (s, 3H) ppm referentes às metilas introduzidas no processo de acilação, bastantes desblindadas devido à proximidade com as carbonilas substituídas em C-3 e C-17 [ANEXO 3].

A segunda acilação conduzida foi utilizando cloreto de ciclohexanocarbonila, sob catálise de DMAP, em piridina. Ao término de 7 horas foi verificado em CCD o consumo total do produto de partida e formação de um produto majoritário que foi isolado em coluna cromatográfica de sílica gel (Esquema 11).

Esquema 11: Acilação de **1** utilizando cloreto de ciclohexanocarbonila gerando derivado **7**.

O espectro de IES-EM apresenta o pico característico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 559,3974 (massa calculada $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 559,3993) indicando a formação de espécie di-substituída **7** e um pico em 541,3871 indicando a perda de uma hidroxila [ANEXO 4].

Contudo, como ocorrido no caso anterior, o espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ 181,60, δ 176,51, δ 176,42 e δ 176,27 ppm que correspondem à presença de quatro carbonilas na amostra, e não duas conforme

esperado. A presença de vários sinais duplicados pelo espectro reforça as evidências da presença de mistura de produtos [ANEXO 5].

Há evidências da presença de mistura de produtos também no espectro de RMN de ^1H . A se observar, os sinais em δ 0,99 (s, 3H), δ 0,95 (s, 3H), δ 0,92 (s, 3H) e δ 0,87 (s, 3H) ppm referentes a quatro metilas em uma região onde seria esperado encontrar apenas duas [ANEXO 6].

A terceira esterificação foi feita utilizando uma solução de afidicolina, anidrido propiônico e DMAP, em piridina. A reação foi mantida “*overnight*” resultando na formação de um produto majoritário e consumo total do produto de partida, posteriormente isolado em coluna cromatográfica de sílica gel (Esquema 12).

Esquema 12: Acilação de 1 utilizando anidrido propiônico.

O espectro de IES-EM do produto isolado apresenta o pico característico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$: 451,3057 (massa calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 451,3054) confirmando a presença da espécie di-substituída [ANEXO 8].

Contudo, assim como nos casos anteriores, os estudos de ressonância magnética nuclear da amostra indicam a presença de uma mistura de produtos. O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinais em δ 174,99, δ 174,82, δ 174,79 e δ

174,49 referentes a quatro carbonilas e novamente vários sinais duplicados por todo o espectro indicando a presença de mistura de dois produtos [ANEXO 9].

O espectro de RMN de ^1H também apresenta indícios de formação de mistura de produtos evidenciada pelos sinais em δ 0,94 (s, 3H), δ 0,91 (s, 3H), δ 0,87 (s, 3H) e δ 0,84 (s, 3H) ppm referentes a quatro metilas na amostra analisada em uma região do espectro onde seriam esperadas apenas duas metilas que correspondem aquelas já existentes na molécula da afidicolina. Observa-se também um sinal multipeto por volta de δ 1,08 ppm que seriam referentes às metilas introduzidas na esterificação, entretanto, este sinal não está bem definido por se apresentarem em uma região mais povoada do espectro dificultando sua atribuição [ANEXO 10]. Vale ainda ressaltar a comparação desses sinais com o espectro de RMN de ^1H da espécie acilada por cloreto de acetila [ANEXO 3], nota-se um aumento da blindagem das metilas introduzidas pelo processo de acilação, devido ao distanciamento dessas metilas da carbonila, o que reforça a atribuição do multipeto em questão às metilas introduzidas pela acilação.

A última esterificação conduzida foi utilizando anidrido butírico e DMAP em uma solução de afidicolina em piridina. A reação foi mantida por seis horas quando foi observado, por meio de CCD, o consumo do material de partida e formação de um produto majoritário que foi então isolado por coluna cromatográfica (Esquema 13).

Esquema 13: acilação de **1** utilizando anidrido butírico.

O espectro de IES-EM de uma amostra do produto isolado apresenta pico característico do íon molecular protonado $[M+H]^+$: 479,3343 (calculado para $C_{28}H_{46}O_6$ $[M+H]^+$: 479,3367) confirmando a presença de uma espécie di-substituída [ANEXO 11].

Como apresentado nos casos anteriores os estudos de RMN apontam novamente a presença de mistura de produtos. O espectro de RMN de ^{13}C da amostra apresenta sinais com deslocamentos químicos em δ 174,24, δ 174,03, δ 174,01 e δ 173,81 ppm indicando a presença de quatro carbonilas na amostra analisada. Adicionalmente, os sinais que aparecem duplicados por todo o espectro reforça a teoria de que se trata de uma mistura de produtos [ANEXO 12].

O espectro de RMN de 1H apresenta agora um sinal multipeto em δ 0,94 ppm que corresponde à sobreposição das metilas preexistentes na estrutura do material de partida **1** às metilas introduzidas pela esterificação, que agora, por estarem mais distantes das carbonilas, apresentam deslocamento químico semelhante às primeiras, ocasionando a sobreposição dos sinais [ANEXO 13].

Hipótese para a mistura de produtos.

Para esta hipótese foi tomada como base de discussão a primeira acilação utilizando cloreto de acetila (Esquema 10), que pode ser aplicada às outras esterificações, haja vista que apresentaram comportamento semelhante, simplificando, assim a discussão.

Com base nos experimentos de IES-EM é possível afirmar que não houve formação de material tri-substituído, descartando essa possibilidade. O sinal de maior abundância desse espectro é referente a material di-substituído e a material di-substituído com perda de hidroxila indicando a presença apenas de material di-substituído nas amostras analisadas [ANEXO 1], levando a discussão identificação dos regioisômeros formados. Foi então proposta uma hipótese de mistura de duas moléculas, a primeira seria a estrutura planejada para a reação, com substituição em C-17 e C-18 **6**, e uma segunda molécula com substituição em C-17 e C-3 **16** (Esquema 14).

O espectro RMN de ^{13}C traz indícios dessa mistura, os sinais δ 171,46 e δ 171,44 ppm seriam referentes as substituições em C-17 nas duas moléculas propostas devido ao deslocamento químico quase idêntico dessas duas carbonilas e aos sinais δ 171,80 e δ 171,25 ppm referentes às carbonilas substituídas em C-3 na estrutura **6** e C-18 na estrutura **16**. Adicionalmente é possível verificar nesse espectro o desaparecimento do sinal correspondente ao C-17 que antes da acilação possuía deslocamento químico em δ 67,8 ppm indicando que em ambas moléculas houve acilação nesta posição. Todavia, o sinal referente ao C-18, com deslocamento químico em δ 71,1 ppm ainda é observável indicando que essa posição não foi totalmente acilada.

O espectro de RMN de ^1H dessa amostra corrobora a hipótese, dessa mistura em específico. Os sinais em δ 2,10 (s, 3H), δ 2,09 (s, 3H) e δ 2,08 (s, 3H) ppm são sinais referentes à três metilas diferentes, bastante desprotegidas pela proximidade da carbonila, fruto da substituição em C-17 em ambas estruturas, C-18 em **6** e C-3 em **24**, (note que poderíamos deduzir um material tri-substituído aqui mas essa hipótese é refutada pelo espectro IES-EM) e finalmente a observação dos sinais em δ 1,00 (s, 3H) δ 0,98 (s, 3H) δ 0,92 (s, 3H) δ 0,90 (s, 3H) ppm gerados pelas metilas C-19 e C-20 de ambas moléculas. Cabe ressaltar, que mesmo após exaustivas tentativas de separação dos isômeros, não foi possível obter nenhuma amostra pura, indicando que a polaridade dos compostos é muito semelhante.

Esquema 14: Moléculas presentes na mistura resultante da esterificação de **1**.

Derivados quinoidais.

Visando a semi-síntese dos derivados naftoquinônicos **12** e **13** foi elaborada uma rota sintética que passaria pela formação de derivados cianos substituídos para posterior formação do derivado tetrazólico.

O primeiro experimento conduzido foi a formação do derivado **10** através de alquilação de **2** para a obtenção do derivado do tipo acetonitrila **10** (Esquema 15). Para tal, foram testadas diversas condições variando solvente, a base e a temperatura reacional buscando otimizar condições reacionais. Ao utilizar DMF como solvente, na presença de K_2CO_3 em refluxo, foi possível observar por CCD a formação de um novo produto e consumo total de **2** que foi então isolado em coluna cromatográfica de gel de sílica. Os dados espectroscópicos confirmam a formação do composto desejado **10** com 95% de rendimento.

Esquema 15: Esquema reacional da formação de **10**.

No espectro de RMN de ^1H é observado um sinal em δ 4,89 ppm (s, 2H), referente ao grupo metileno presente na estrutura proposta **10**. Adicionalmente, observa-se os sinais em δ 8,21 (m, 2H) e em δ 7,78 (m, 2H) atribuídos aos hidrogênios do anel aromático e um sinal em δ 6,33 (s, 1H) referente ao hidrogênio ligado diretamente ao anel naftoquinônico [ANEXO 14].

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta um sinal em δ 112,84 ppm correspondente ao carbono do grupo nitrila e um sinal em δ 53,43 ppm que corresponde ao grupo metileno. O espectro de IES-EM apresenta o pico característico do íon molecular protonado em $[M+H]^+$: 214,0511 (calculado para $C_{12}H_7NO_3$ $[M + H]^+$: 214,0499) confirmando a estrutura de **10** [ANEXOS 15, 16].

Uma vez definida a metodologia de alquilação de naftoquinonas utilizando iodoacetonitrila as mesmas condições reacionais foram aplicadas ao lapachol, **3** (Esquema 16). A metodologia mostrou-se aplicável também a essa naftoquinona apresentando um rendimento de 75%.

Esquema 16: Condições reacionais para obtenção de derivado iodoacetnitrila de **3**.

É observado no espectro de RMN de ^1H um sinal em δ 5,21 (s, 2H) referente ao metileno do grupo acetnitrila adicionado à **3**. Estão presentes também os sinais das metilas em δ 1,79 (s, 3H) e em δ 1,68 (s, 3H) e do metileno da cadeia isoprenila ligada ao núcleo naftoquinônico em δ 3,35 (d, 2H) [ANEXO 17].

A reação de substituição também pode ser confirmada pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C . O sinal em δ 57,2 ppm corresponde ao metileno, mais desblindado, devido à proximidade ao oxigênio, em comparação ao segundo metileno existente na estrutura molecular proposta com deslocamento químico em δ 25,9 ppm [ANEXO 18].

O espectro IES-EM apresenta pico característico do íon molecular sodiado [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 304,0930 (massa calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3 = [\text{M} + \text{Na}^+]: 304,0944$) [ANEXOS 19].

Para a formação do anel tetrazol foi utilizada, em um primeiro momento o método clássico de formação de anéis tetrazóis descrito por Sharpless e Demko ⁽⁴⁴⁾. Este método consiste na reação do composto com grupo ciano com azida de sódio, na presença de brometo de zinco como catalisador, em refluxo com água. Tal metodologia foi aplicada utilizando o derivado **10** por ser de mais fácil obtenção em comparação ao derivado **11**. A reação apresentou formação de vários produtos, porém, um deles majoritário. Em análise de CGMS não foi constatada a formação do

produto desejado, mas sim a formação de um composto amino substituído, como ilustrado no esquema 17 [ANEXO 20].

Esquema 17: tentativa de obtenção do derivado tetrazol.

Esses resultados se alinham com resultados obtidos por Coladouros *et al.* que reportam a aminação de naftoquinonas utilizando azida de sódio com bons rendimentos de acordo com o seguinte mecanismo (Esquema 18) ⁽⁴⁵⁾

Esquema 18: Mecanismo de aminação de quinonas por azidas.

Frente esses resultados foi elaborada uma rota alternativa para a obtenção do derivado tetrazol. Essa rota consiste em formar o anel tetrazol separadamente para posterior substituição na naftoquinona desejada, como representado no esquema 19.

Esquema 19: Retrossíntese de rota alternativa para obtenção de **12**.

O primeiro passo dessa rota foi a formação do anel tetrazol em 2-bromo acetonitrila (esquema 20) onde foi utilizado 1,1 equivalente de azida de sódio, 1 equivalente de brometo de zinco em refluxo de água. A reação foi mantida por 24 horas, porém, não observada a formação de nenhum composto.

Esquema 20: Tentativa de formação do anel tetrazol halogenado.

Com o término do prazo para a conclusão do projeto as tentativas de obtenção do derivado tetrazol foram interrompidas, porém, os conhecimentos adquiridos servirão de base para futuros projetos.

O terceiro experimento foi realizado visando a obtenção de *2-cloronaftaleno-1,4-diona* **14** a partir de **2**. Para a síntese de **14** foi empregada uma metodologia clássica de substituição da hidroxila por cloro utilizando refluxo de cloreto de tionila por 24 horas (Esquema 21). A reação forneceu vários produtos, porém, um deles em maior quantidade, que foi isolado por coluna cromatográfica de sílica gel. A obtenção do produto de interesse foi confirmada pelos dados espectroscópicos com 85% rendimento.

Observa-se no espectro de RMN de ^1H da amostra um sinal em δ 7,23 (s, 1H) referente ao hidrogênio ligado ao núcleo naftoquinônico, na posição C-3 e três sinais com deslocamentos químicos entre δ 7,70 e δ 8,20 ppm pertencentes aos hidrogênios do anel aromático [ANEXO 21].

No espectro de RMN de ^{13}C , observa-se o sinal em δ 146 ppm, correspondente ao carbono quaternário ligado ao cloro na posição C-2, mais desblindado devido ao efeito mesomérico do sistema conjugado e indutivo, por ligação com o cloro [ANEXO 22].

O espectro de massas por impacto de elétrons (IE-EM) oferece, também, evidências da formação de **14**, além da observação do pico íon molecular em m/z 192 correspondente à massa calculada para a molécula planejada é possível observar também um pico com cerca de um terço da intensidade do pico do íon molecular, característica do isótopo do átomo de cloro. A fragmentação corresponde à perda do cloro [$M - \text{Cl}$]: 157 (Esquema 14) [ANEXOS 23].

Esquema 21: Esquema reacional da formação de **14**.

Visando o estudo de metodologias eficientes para de substituição de quinonas halogenadas por sais de ciano, foram realizadas tentativas de cianação de 2,3-dicloronaftaleno-1,4-diona **24** na presença de cianeto de cobre em DMF (Esquema 22) .

Esquema 22: Formação inesperada de derivado aminado.

Foi observada por CCD a formação de vários produtos, dois deles majoritários e consumo total de **24**. Entretanto, os dados espectroscópicos de CGMS não confirmam a formação da cianonaftoquinona planejada **25**, mas sim a formação de uma naftoquinona substituída por um grupo metilamino **26** e de uma naftoquinona substituída por um grupo dimetilamina **27**.

Além do resultado inesperado uma segunda peculiaridade acompanha essa reação. Ao se tentar isolar os produtos formados em coluna cromatográfica é perfeitamente visível, através da coluna, a separação desses dois produtos, o composto dimetilado apresenta coloração vermelha, mais apolar e elui em mistura de solventes mais apolar (5% acetato de etila em hexano) pela coluna, e o composto monometilado, de coloração alaranjada, mais polar, elui em gradiente de mais alta polaridade (10% acetato em hexano). Ao recolher as frações e analisá-las em CCD o composto monometilado apresenta-se puro, porém o composto dimetilado apresenta-se como uma mistura de derivado mono e dimetilado. O processo de separação foi feito em triplicata apresentando sempre o mesmo resultado. A impossibilidade de se obter uma amostra pura do composto dimetilado comprometeu as análises de RMN do mesmo, porém, foi possível detectá-lo em experimento de CGMS. Tentando esclarecer o observado nesta reação, foi realizada uma metodologia sem a presença de cianeto de cobre, apenas 1,4-dicloronaftoquinona e DMF em refluxo. Neste caso, foi observado o mesmo comportamento e produtos formados. Os dados espectroscópicos de RMN confirmam a obtenção da amina secundária monometilada.

O espectro de RMN de ^1H apresenta um sinal em δ 3,44 ppm (s, 3H) referente à metila ligada à amina primária, os sinais entre δ 7,6 ppm e δ 8,15 ppm são referentes aos hidrogênios ligados ao anel benzênico [ANEXO 24].

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta sinal característico de metila ligada a nitrogênio em δ 32, 7 ppm e um sinal em δ 159, 2 ppm referente ao carbono do núcleo naftoquinônico ao qual a metilamina está ligada [ANEXO 25].

O espectro de IE-EM do composto apresenta o pico do íon molecular em m/z 221 e constata-se a presença do átomo de cloro na estrutura por meio da observação do pico m/z 223 com cerca de 1/3 da intensidade do pico atribuído ao íon molecular, referente ao íon molecular substituído pelo isótopo mais pesado do cloro. Observa-se também a fragmentação da molécula e perda do átomo de cloro em m/z 186. O produto dimetilado foi identificado através de análise de CGMS da mistura. [ANEXOS 26].

Em busca de uma resposta plausível, para o resultado da reação e com base na publicação de Ding *et al.* ⁽⁴⁶⁾ que descreve algumas reações onde o DMF participa como um bloco de construção de moléculas orgânicas, foi levantada uma hipótese de aminação da naftoquinona pelo DMF, usado como solvente através do mecanismo reacional descrito a seguir (Esquema 23).

Esquema 23: Hipótese mecanística de formação de derivado aminado.

De acordo com segundo objetivo, foram realizadas modificações nas quinonas visando o aumento de hidrossolubilidade das quinonas, para futuros testes biológicos. Foram planejadas duas moléculas, a primeira delas foi a formação de um sal do lapachol **3**, o lapachonato de sódio **28**. O procedimento envolve a adição à uma solução de lapachol em diclorometano 1,0 equivalente de hidróxido de sódio em temperatura ambiente. Ao final de 30 minutos o produto de interesse precipita no meio reacional e é então filtrado em funil de Büchner e lavado com diclorometano para retirar eventuais resquícios de **3** (Esquema 24).

O espectro de massas IES-EM confirma a obtenção da molécula planejada apresentando o pico do íon molecular sodiado $[M+Na]^+$: 265,0862 (Massa calculada para $C_{15}H_{13}NaO_3 = [M+H]^+$: 265,0841) apresentando um rendimento de 97% [ANEXO 27]. Considerando que o espectro de massas no modo positivo é obtido em meio contendo ácido acético, isso justifica a observação da massa do lapachol sodiado.

Esquema 24: Esquema reacional da formação de **28**.

A segunda molécula sintetizada com o intuito de aumento da hidrosolubilidade foi o derivado fosfato de dietila **29** (Esquema 25) derivado de lapachol **3**. A reação passa por uma primeira etapa de desprotonação em baixa temperatura por cerca de 30 minutos utilizando hidreto de sódio para posterior adição do clorofosfato de dietila. Após a adição do cloro fosfato de dietila a reação foi deixada em temperatura ambiente *overnight* produzindo um produto majoritário que foi isolado em coluna cromatográfica de sílica gel. Os dados espectroscópicos do produto isolado confirma a obtenção da estrutura planejada com 60% de rendimento.

Esquema 25: Esquema reacional da formação de **29**.

O espectro de RMN de ^{13}C apresenta dois sinais adicionais em δ 16,30 e em δ 16,22 ppm relacionados aos carbonos metilênicos do grupamento fosfato adicionado. São observados ainda os sinais em δ 23,83 e δ 18,15 ppm referentes às metilas da cadeia isoprenila, bem como um sinal em δ 25,87 ppm referente ao carbono metilênico da cadeia isoprenila [ANEXO 29].

O espectro de RMN de ^1H corroboram a sugestão da estrutura de **30**. O sinal em δ 4,39 (m, 4H) ppm, é referente aos hidrogênios metilênicos do grupamento fosfato, mais desblindados devido ao efeito indutivo ocasionado pela proximidade com o átomo de oxigênio, um sinal em δ 1,42 (m, 6H) resultado da sobreposição de

dois tripletos referentes aos hidrogênios metilênicos do grupamento fosfato, e dois sinais em δ 1,78 (s, 3H) e δ 1,67 (s, 3H) relacionados aos hidrogênios metilênicos pertencentes à estrutura de **3** [ANEXO 29].

No experimento de espectrometria de massas IES-EM observa-se o pico do íon molecular protonado $[M+H] = 379,1332$ (massa calculada para $C_{19}H_{23}O_6P$ $[M+H] = 379,1305$) confirmando a obtenção do produto planejado [ANEXO 30].

Na tentativa de obter os derivados hidrossolúveis de lapachol foram realizadas tentativas de hidrólise do grupo dietilfosfato do composto **29**, visando a obtenção do derivado dihidrogenofosfato **30**. Entretanto, os métodos utilizados forneceram uma mistura complexa de produtos. Novas estratégias serão testadas para estudar a formação de **30** de forma eficaz.

Derivados do ácido cafeico análogos ao CAPE.

Empregando a estratégia de simplificação molecular, foi planejada a síntese de **21** a partir uma esterificação do ácido 3-metoxifenil acético utilizando brometo de benzila em meio básico de MeOH em refluxo (Esquema 26), para formação de uma análogo do CAPE.

Este método levou ao consumo total do material de partida, entretanto forneceu o derivado éster metílico, em 87% de rendimento.

Esquema 26: Esquema reacional da obtenção de **31**.

A estrutura de **31** foi confirmada por experimentos de RMN. O espectro de RMN de ^1H da amostra apresenta sinais em δ 3,72 (s, 3H) e em δ 3,62 (s, 3H) referentes às metilas presentes na estrutura proposta e um sinal em δ 3,53 (s, 2H) relativo aos hidrogênios metilênicos [ANEXO 31]. O espectro de RMN de ^{13}C confirma a estrutura apresentando sinais em δ 55,31 e em δ 52,29 referentes às metilas, sendo a última referente à metila adicionada pela alquilação [ANEXO 32].

Uma segunda metodologia visando a obtenção de **18**, envolveu a modificação do solvente e da base utilizados no método anterior por DMF e NaHCO_3 , respectivamente. Foi observado o total consumo e formação de um produto majoritário em 3 horas de reação, quando esta foi interrompida e o produto majoritário isolado em coluna cromatográfica de gel de sílica. Os experimentos de RMN confirmam a obtenção da molécula planejada com 77% de rendimento (Esquema 27).

Esquema 27: Esquema reacional da formação de **21**.

O espectro de RMN de ^1H de **18** apresenta um sinal em δ 5,07 (s, 2H) ppm correspondente aos hidrogênios metilênicos de C-1'. Outros sinais em destaque são o simpleto em δ 3,71 (s, 3H) ppm que corresponde à metoxila e o simpleto em δ 3,58 (s, 2H) ppm originado pela presença dos hidrogênios metilênicos em C-2 [ANEXO 33].

O espectro RMN de ^{13}C também apresenta evidências da formação do composto planejado pelo aparecimento do sinal de deslocamento químico δ 66,77 ppm que corresponde ao carbono do grupo metileno C-1', além dos sinais em δ 128,67, δ 128,37 e δ 128,29 ppm que correspondem ao grupo fenil [ANEXO 34].

Definida a metodologia de esterificação, outros dois ácidos carboxílicos foram utilizados para obtenção de novos análogos simplificados de CAPE.

Primeiramente, foi utilizado o ácido 3,4-dihidroxifenilacético **19**, em reação com 1,2 equivalentes de brometo de benzila e 1 equivalente de carbonato de sódio, em refluxo de DMF por 3 horas. A reação forneceu o produto majoritário **22**, que foi isolado em coluna cromatográfica de gel de sílica com 70% de rendimento (Esquema 28).

Esquema 28: Esquema reacional da formação de **22**.

O espectro de RMN de ^1H confirma a obtenção da estrutura planejada. O sinal com deslocamento químico em δ 5,08 (s, 2H) ppm é referente ao hidrogênio metilênico em C-2. O sinal em δ 3,51 (s, 2H) corresponde aos hidrogênios metilênicos de C-1' enquanto os sinais com deslocamento químico entre δ 6,5 e δ 6,7 ppm correspondem aos hidrogênios do ciclo aromático tri-substituído [ANEXO 35].

Para formação do último análogo planejado, o composto **23**, foi utilizado o ácido 4-hidroxifenil acético, em reação com 1,2 equivalentes de brometo de benzila, em meio básico sob refluxo de DMF. Após 3 horas foi observada a formação do produto que foi isolado em coluna cromatográfica, com 73% de rendimento (Esquema 29).

Esquema 29: Esquema reacional da formação de **23**

O espectro de RMN de ^1H confirma a obtenção do produto planejado, o sinal em δ 5,14 (s, 2H) é correspondente aos hidrogênios metilênicos em C-2, o sinal em

δ 2,19 (s, 2H) referente aos hidrogênios metilênicos em C-1'. Ademais, os sinais com deslocamento químico entre δ 6,75 e δ 7,14 ppm são referentes aos hidrogênios aromáticos do anel que contém a hidroxila substituída [ANEXO 36].

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Foram desenvolvido testes de ensaios de inibição enzimática frente à enzima DHODH, nesse ensaio ficou evidenciado que o composto **11** apresenta bons valores de inibição (Tabela 2).

Composto	Concentração (μ M)	Inibição (%)	IC ₅₀
11	500	96	2,45 $\pm$ 0,03
10	500	46	-
26	250	69.2	79,44 $\pm$ 0,4
14	250	54.4	2,45 $\pm$ 0,03

Tabela 2: Valores de porcentagem de inibição da enzima DHODH de *Schistosoma* frente a alguns compostos testados.

Dada a reconhecida atividade de lapachol **3** e hidroxiquinonas sobre DHODH ⁽⁴⁷⁾ humana, o sal de lapachol **28** foi estudado em ensaio celular, quanto à capacidade de inibir a proliferação de células CD4⁺, comparando com os efeitos da Leflunomida. Este efeito imunossupressor é, em muito, relacionado à capacidade de inibição de DHODH humano, visto que esta enzima está envolvida em biossíntese de pirimidinas, que participa da regulação imunológica. É possível notar que o **3** apresentou atividade imunossupressora maior que a leflunomida, entretanto, mais estudos devem ser realizados envolvendo o metabólito ativo da leflunomida, a teriflunomida. (Figura 12)

Figura 12: % de supressão relativa a média de proliferação de células CD4⁺

Em paralelo, a biblioteca de compostos foi enviada ao Prof. Marcelo Castilho da UFBA, para triagem de inibidores da biossíntese de carotenóides em *S. aureus*, por meio da técnica da difusão em disco de papel (Tabela 3). Neste caso, os mesmos compostos 26 e 14 se mostraram ativos, porém, aparentemente, por mecanismos de atividade antibiótica distintos, visto que o composto **14** apresenta halo de indicação de inibição de biossíntese de carotenóides, o que representa um alvo interessante para esta classe de moléculas.

Composto	Inibição de crescimento (mm)	Inibição da biossíntese de Carotenóides (mm)
26	10	20
14	24	Halo branco em torno do halo de inibição de crescimento indicando inibição da biossíntese.

Tabela 3: Triagem de inibidores da biossíntese de carotenóides em *S. aureus* através da técnica da difusão em disco de papel.

A avaliação da eficácia da estratégia de simplificação molecular dos análogos do CAPE, os compostos 21, 22 e 23, foi realizada por meio da análise da atividade antitumoral destes compostos, realizados pela Prof^a Dr^a Marianna Vieira Sobral Castello Branco da UFPB. Utilizando o modelo de tumor ascítico de Ehrlich, é possível destacar o composto 21, que apresentou uma alta atividade frente ao tumor

estudado com relativamente baixa citotoxicidade, em comparação ao composto controle 5-fluorouracila (Tabela 4). Estes resultados mostram a eficácia desta estratégia e indicam novos rumos para o desenvolvimento de novos compostos protótipo para atividade antitumoral. Ensaios de mecanismo de ação ainda devem ser realizados.

Grupos	Parâmetros		
	Massa tumoral (em g)	Volume tumoral (em mL)	Viabilidade celular (10 ⁶ células/ mL)
%-fluorouracila (Controle)	9,58±1,81	8,58±1,65	113,40±24,31
21	0,0± 0,0 ***	0,0± 0,0 ***	12,85±10,26 ⁺
22	3,93± 0,43	2,33±0,85 **	162,00±33,32
23	5,78± 1,74	4,18±1,53	130,70±73,15

Tabela 4: Efeitos do tratamento de doses repetidas (9 dias) com o **21**, **22**, **23** (50 mg/Kg, i.p.) nos parâmetros celulares de camundongos.

CONCLUSÃO

De forma geral, o trabalho se mostrou eficiente na produção de uma biblioteca de compostos derivados de produtos naturais. Foram desenvolvidos 14 compostos. Entretanto, muitas das estratégias planejadas não funcionaram de acordo com o previsto, seja pela formação de mistura de compostos regioisômeros ou pela formação de reações paralelas que levaram à formação de novos compostos não previstos.

O trabalho utilizando afidicolina **1** como composto protótipo, visando a geração de análogos lipofílicos, ainda que fornecendo os produtos desejados, mostrou-se bastante complexa nas etapas de purificação. Os métodos convencionais foram suficientes para isolarmos o composto da mistura reacional, porém, técnicas mais eficientes de separação de produtos são necessárias para separar os isômeros formados.

As reações utilizando naftoquinonas forneceram compostos de interesse para estudos da química medicinal desta classe de compostos, como por exemplo o composto **11**, que apresentou valores de IC₅₀ promissores frente à enzima DHODH. No entanto, estudos de cicloadição para a formação do anel tetrazol foi frustrada, sugerindo que métodos alternativos para esta reação devem ser estudados. Por outro lado, a obtenção inesperada do derivado **26**, a partir de uma reação com DMF, também é um ponto que poderá ser investigado futuramente explorando a reatividade de quinonas sob essas condições.

As esterificações para formação de derivados simplificados análogos ao CAPE, renderam moléculas bioativas, com destaque para **21** que mostrou um bom desempenho em ensaio de antitumoral. A simplificação molecular também tornou possível a observação de que o sistema α,β -conjugado não é de essencial importância para a atividade biológica do CAPE, ao menos no sistema estudado.

Estes resultados indicam a importância dos produtos naturais como fonte de diversidade estrutural e de estudos de reatividade química, abrindo caminhos para novos projetos de metodologia sintética e de química medicinal.

REFERÊNCIAS

1. RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; *et al.*, Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechno*, v.20, p.522, 2002.
2. GANESAN, A.; The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Bio*, v.12, p.306, 2008.
3. HARVEY, A.L.; Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today*, v.13, p.894–901, 2008.
4. WALSH, C.T.; FISCHBACH, M.A.; Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J Am Chem Soc*, v.132, p.2469–93, 2010.
5. KINGSTON, D.G.; Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J Nat Prod*, v.74, p.496–511, 2011.
6. CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*, v.1830, p.3670–95, 2013.
7. MULLARD, A.; 2013 FDA drug approvals, *nature reviews*, v.13, p. 85, 2014.
8. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, v.109, p.69–75, 2001.
9. APPENDINO, G.; POLLASTRO, F.; FONTANA, G.; Natural products drug discovery. *Comprehensive natural products chemistry*, v. 3, p. 205–36, 2010.
10. KOEHN, F.E.; CARTER, G.T.; Rediscovering natural products as a source of new drugs, *Discov Med*, v.5, p.159–64, 2005.

11. Dados não publicados.

12. GANESAN, A.; The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 12, p.306, 2008.

13 LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v.23, p.3–25, 1997.

14 VEBER, D. F., JOHNSON, S. R., CHENG, H.Y., SMITH, B. R., WARD, K. W. & KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* V.45, p.2615-2623, 2002.

15. LOVERING, F.; Escape from flatland 2: complexity and promiscuity. *Med. Chem. Commun.* V.4, p.515-519, 2010.

16 LEESON, P. D.; ST-GALLAY, S. A.; The influence of the 'organizational factor' on compound quality in drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.* v.10, p.749–765, 2011.

17. AJIKUMAR, P.K.; TYO, K.; CARLSEN, S.; MUCHA, O.; PHON, T.H.; STEPHANOPOULOS, G.; Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol. Pharm*, v.5, p.167-190, 2008.

18. KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; BERTELS, S.; SIEMS, K.; Antileishmanial activities of aphidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, n.1, p. 288-292, 2000.

19. SANTOS, G. B.; ALMEIDA, M. O.; CARDOSO, I. A.; MANFRIM, V.; CHAGAS, F. O.; TOLEDO, J. S.; PINZAN, C. C.; DE ARAUJO, A. S.; CRUZ, A. K.; PUPO, M. T.; EMERY, F. S.; The Semisynthetic Landscape of Aphidicolin: Inspiration Towards Leishmanicidal Compounds. *J. Braz. Chem. Soc.*, V. 00, p.1-15, 2014.

20. LOPES, A. A.; PUPO, M. T.; Biosynthesis of Aphidicolin Proceeds via the Mevalonate Pathway in the Endophytic Fungus *Nigrospora sphaerica*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 22, n. 1, p. 80-85, 2011.
21. MICHAELIS, M.; ZIMMER, A.; HANDJOU, N.; CINATL, J.; CINATL, J.J.; Increased systemic efficacy of aphidicolin encapsulated in liposomes. *Oncol. Rep.*, v.13, p.157-160, 2005.
22. GALLO, M. B. C.; CHAGAS, F. O.; ALMEIDA, M. O.; MACEDO, C. C.; CAVALCANTI, B. C.; BARROS, F. W. A.; DE MORAES, M. O.; COSTALOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; BASTOS, J. K.; PUPO, M. T.; Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *J. Basic Microbiol.*, v.49, p.142-151, 2009.
23. EDELSON, R. E.; GORYCKI, P. D.; MACDONALDS, T. L.; The mechanism of aphidicolin bioinactivation by rat liver in *vitro* systems. *Xenobiotica*, v.20, n.3, p.273-287, 1990.
24. LEZAMA-DÁVILA, C. M.; ISAAC-MÁRQUEZ, A. P.; KAPADIA, G.; OWENS, K.; OGHUMU, S.; BEVERLEY, S.; SATOSKA, A. R.; Leishmanicidal Activity of Two Naphthoquinones against *Leishmania donovani*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.35, n.10, p.1761-1764, 2012.
25. ASCHE, C.; Antitumour quinones, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v.5, p.449, 2005.
26. GOLDIN, A.; VENDITTI, J.M.; MACDONALD, J.S.; MUGGIAN, F.M.; HENRY, J.E.; DEVITA, V.T.; Current results of the screening program at the division of cancer treatment, National Cancer Institute. *European Journal of Cancer*, v.17, p.129, 1981.
27. PINTO, A.V.; DE CASTRO, S.L.; The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. *Molecules*, v.14, p.4570-4590, 2009.

28. SALAS, C.O.; FAUNDEZ, M.; MORELLO, A.; MAYA, J.D.; TAPIA, R.A.; Natural and synthetic naphthoquinones active against *Trypanosoma cruzi*: an initial step towards new drugs for Chagas disease. *Curr Med Chem*, v.18 p.144–161, 2011.
29. KROHN, K.; HUSSAIN, H.; VIQAR, U.A.; GHULAM, A.M.; GREEN, I.R.; Lapachol: An Overview. *Arkivoc Special Issue Reviews and Accounts*. p.145-171, 2007.
30. MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G.; Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, v.112, p.2-16, 1992.
31. WU, H.Q.; HUANG, Z.S.; BU, X.Z.; SHEN, Y.D.; ZHANG, Z.L.; *et al.*; The molecular mechanisms involved in the cytotoxicity of alkannin derivatives. *Eur J Med Chem.*, v.40, p.1341–1345, 2005.
32. TURRENS, J.F.; Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med*, v.25, p. 211–220, 2004.
33. BOLOGNESI, M.L.; LIZZI, F.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; CAVALLI, A.; Synthesis of a small library of 2-phenoxy-1,4-naphthoquinone and 2-phenoxy-1,4-anthraquinone derivatives bearing anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity. *Bioorg Med Chem Lett.*, v.18, p.2272-2276, 2008.
34. EPIFANO, F.; GENOVESE, S.; FIORITO, S.; MATHIEU, V. KISS, R.; Lapachol and its congeners as anticancer agents: a review, *Phytochem Rev*, v.13, p.17 2014.
35. HASSAN, S. B. *et al.* Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF-kappaB signalling. *Anticancer Res*, v. 30, n. 6, p. 1911-9, 2010.

36. HUANG, M. T. et al. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res*, v. 48, n. 21, p. 5941-6, 1988.
37. CHUNG, T. W. et al.; Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J*, v. 18, n. 14, p. 1670-81, 2004.
38. DE, P.; BALTAS, M.; BEDOS-BELVAL; F.; Cinnamic Acid Derivatives as Anticancer Agents-A Review. *Current Medicinal Chemistry*, v.18, p.1672-1703, 2011.
39. OMENE, C.; KALAC, M.; WU, J.; MARCHI, E.; FRENKEL, K.; O'CONNOR, O. A.; Propolis and its Active Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), Modulate Breast Cancer Therapeutic Targets via an Epigenetically Mediated Mechanism of Action. *J Cancer Sci. Ther.*, v.5, p.334, 2013.
40. KUO, H. C. et al.; Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, v. 234, n. 2, p. 199-208, 2006.
41. LEE, Y. et al.; Caffeic acid phenethyl ester-mediated Nrf2 activation and I κ B kinase inhibition are involved in NF κ B inhibitory effect: structural analysis for NF κ B inhibition. *Eur J Pharmacol*, v. 643, n. 1, p. 21-8, 2010.
42. LIAO, H. F. et al.; Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *J Agric Food Chem*, v. 51, n. 27, p. 7907-12, 2003.
43. WU, J. et al.; Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Lett*, v. 308, n. 1, p. 43-53, 2011.
44. DEMKO, Z. P.; SHARPLESS, K. B.; Preparation of 5-Substituted 1H-Tetrazoles from Nitriles in Water. *J. Org. Chem.*, v.66, p.7945–7950, 2001.

45. COULADOUROUROS, E. A.; PLYTA, Z. F.; HAROUTOUNIAN, S.A.; Efficient Synthesis of Aminonaphthoquinones and Azidobenzohydroquinones: Mechanistic Considerations of the Reaction of Hydrazoic Acid with Quinones. An Overview. *J. Org. Chem.*, v.62, p.6-10,1997.
46. DING, S.; JIAO, N.; N,N-Dimethylformamide: A Multipurpose Building Block. *Angew. Chem. Int.*, v.51, p.1 – 13, 2012.
47. KNECHT, W.; HENSELING, J.; LOFFLER, M.; Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid. *Chem. Biol. Interact.* v.124, p.61–76, 2000.

EXPERIMENTAL

((3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-3,9-dihidroxi-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[a]naftaleno-4,9-diil)bis(metileno) diacetato.

Massa: 422.2668

Em balão previamente seco e protegido por tubo secante de cloreto de cálcio foram dissolvidos 50 mg (0,15 mmol) de afidicolina em 10 ml de piridina. Em seguida foram adicionados, 26 μ l (0,36mmol) de cloreto de acetila e 1 mg (0,0075 mmol; 5% eq) de DMAP. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente e agitação constante 6 horas, quando foi verificado o consumo total do material de partida por CCD. O solvente, então, foi evaporado em rotaevaporador e o produto purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (fase móvel 1:1 Hex/AcOEt) com 70% de rendimento. Espectroscopia de massas de alta resolução IES-EM calculado para $C_{24}H_{38}O_6$ [M+H]: 423,2741, verificado: 423,2739.

((3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-3,9-dihidroxi-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[a]naftaleno-4,9-diil)bis(metileno) diciclohexanecarboxilato.

Em balão previamente seco e protegido por tubo secante de cloreto de cálcio foram dissolvidos 50 mg (0,15 mmol) de afidicolina em 10 ml de piridina. Em seguida foram adicionados, 41 μ l (0,31mmol) de cloreto de ciclohexanocarbonila e 1 mg (0,0075 mmol; 5% eq) de DMAP. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente e agitação constante por 17 horas. Ao término da reação, verificado por CCD, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto purificado em coluna cromatográfica flash de gel de sílica (fase móvel 2,3:1 hex/AcOEt) com 73% de rendimento. Espectroscopia de massas de alta resolução IES-EM calculado para $C_{34}H_{54}O_6$ [M+H]: 559,3993, encontrado: 559,3974.

((3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-3,9-dihidroxi-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[a]naftaleno-4,9-diil)bis(metileno) dipropionato.

Massa: 450,2981

Em balão previamente seco e protegido por tubo secante de cloreto de cálcio foram dissolvidos 50 mg (0,15 mmol) de afidicolina foram dissolvidos em 10 ml de piridina seca. Em seguida foram adicionados, 45 μ l (0,35mmol) de anidrido propiônico e 1 mg (0,0075 mmol; 5% eq) de DMAP. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente e agitação constante overnight (14 horas). Verificou-se então, através de CCD, o completo consumo do material de partida e formação do produto. O solvente então foi evaporado em rotaevaporador e o produto purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (fase móvel 1:1 Hex/AcOEt) com 87% de rendimento. Espectroscopia de massas de alta resolução IES-EM calculado para $C_{26}H_{42}O_6$ [M+H]: 451,3054, encontrado 451, 3057.

((3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-3,9-dihidroxi-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[a]naftaleno-4,9-diil)bis(metileno) dibutirato.

Massa: 478,3294

Em balão previamente seco e protegido por tubo secante de cloreto de cálcio foram dissolvidos 50 mg (0,15 mmol) de afidicolina em 10 ml de piridina. Em seguida foram adicionados, 57 μ l (0,35mmol) de anidrido butírico e 1 mg (0,0075 mmol; 5% eq) de DMAP. O meio reacional foi mantido em temperatura ambiente e agitação constante por 5 horas. Ao término da reação, verificada por CCD, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (fase móvel 6:1 Hex/AcOEt) com 74% de rendimento. Espectroscopia de massas de alta resolução IES-EM calculado para $C_{28}H_{46}O_6$ [M+H]: 479, 3367, encontrado: 479,3343.

2-((1,4-dioxo-1,4-diidronaftaleno-2-il)oxi)acetonitrila

Massa: 213,0426

138 mg (1 mmol) de carbonato de potássio (K_2CO_3), foram adicionados a 20 ml de DMF em agitação constante e a temperatura elevada à 50°C. Após 20 min, 174 mg (1 mmol) de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona foi adicionado a mistura sob agitação constante. Após 20 min acrescentou-se 181 μ L (2,5 mmol) de iodoacetonitrila (ICH_2CN) à mistura reacional. O meio foi mantido sob essas condições por 4 horas. Ao término da reação evaporou-se o solvente em rotaevaporador, foi efetuada uma

partição com solução de NaHCO_3 e acetato de sódio. Em seguida a fase orgânica foi deixada em repouso com sulfato de magnésio (MgSO_4) por 30 minutos, filtrado e rotaevaporador. O produto foi purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (fase móvel 9:1 Hex/AcOEt) com rendimento de 93%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.12 (m, 2H), 7.78 (m, 2H), 6.33(s, 1H), 4.89 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 184.04, 178.99, 157.12, 134.89, 134.04, 131.78, 130.92, 127.05, 126.61, 112.84, 112.17, 77.16, 53.43. IES-EM calculado M + H: 214,0499, experimental: 214,0511.

2-((3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il)oxi)acetonitrila.

Massa: 281,1052

82,3 mg (0,597 mmol) de carbonato de potássio (K_2CO_3), foram adicionados a 20 ml de DMF à 50 °C e agitação constante. Após 20 min, 144,6 mg (0,597 mmol) de 2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona foi adicionado à mistura. Após 20 min acrescentou-se 108 μL (1,493 mmol) de iodoacetonitrila (ICH_2CN) à mistura reacional que foi mantida sob essas condições por 4 horas. Ao término da reação evaporou-se o solvente em rotaevaporador, foi efetuada uma partição com solução de NaHCO_3 e acetato de sódio. Em seguida a fase orgânica foi deixada em repouso com sulfato de magnésio (MgSO_4) por 30 minutos, filtrado e rotaevaporado. O produto foi purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (fase móvel 9:1 Hex/AcOEt) com 75% de rendimento. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07 (m, 2H), 7.73 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 5.10 (m, 1H), 3.35 (d, $J = 8\text{Hz}$, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.68 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 184.64, 181.44, 153.46, 137.12, 134.85, 134.49, 133.81, 131.94, 131.07, 126.72, 126.45, 119.09, 115.07, 77.16, 57.20, 25.92, 23.40, 18.16. IES-EM massa calculada M + Na = 304,0944, experimental: 304,0930.

2-cloronaftaleno-1,4-diona.

Massa: 191,9978

Foi adicionada a 25 ml de cloreto de tionila, 1 g (5,742 mmol) de *2-hidroxi-1,4-naftoquinona*. Então o meio reacional foi aquecido até 90°C sob agitação e sistema de refluxo, por 48h. Após o término da reação (consumo de *2-hidroxi-1,4-naftoquinona*). A reação foi esfriada à temperatura ambiente e vertida lentamente em 200 ml de água em banho de gelo e agitação, formando um precipitado marrom. O precipitado formado foi extraído com clorofórmio, a fase orgânica resultante foi então lavada com solução aquosa de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO₃), deixada em repouso com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtrada e rota-evaporada. A purificação do produto foi feita em coluna cromatográfica de sílica gel (13:1 Hex/AcOEt) com rendimento de 85%. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (m, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.79 (m, 2H), 7.23 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 182.84, 178.12, 146.47, 136.06, 134.66, 134.30, 131.88, 131.42, 127.67, 126.91, 77.16. LRMS calculado M⁺: 191.99, experimental: 192.

2-cloro-3-(metilamino)naftaleno-1,4-diona.

Massa: 221,0244

500 mg (2,2 mmol) de *2,3-dicloro-1,4-naftoquinona* foi adicionada a 20 ml de DMF. Após a adição a solução foi mantida sob agitação constante a 145°C por 6h. Após o término da reação o DMF foi evaporado em rotaevaporador e o produto purificado em coluna cromatográfica flash de sílica gel (19:1 Hex/AcOEt) com 30% de rendimento. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (m, 1H), 8.03 (m, 1H), 7.72 (dt, *J* = 6.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.62(dt, *J* = 6.1 Hz, 1.4 Hz, 1H), 3.44 (s, 1H) ¹³C NMR (101 MHz,

CDCl_3) δ 180.65, 177.07, 159.29, 144.99, 135.11, 132.89, 132.55, 129.83, 126.98, 126.92, 77.16, 32.71. Massa LRMS calculado M^+ : 221,0244, experimental: 221.

sodio 3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-olato

Lapachol 0,2 mmol (50 mg) e 0,2 mmol (8 mg) de NaOH foram dissolvidos em diclorometano e mantidos em agitação e temperatura ambiente por 30 min, ao término desse tempo o produto precipitado é filtrado em funil de Büchner e lavado utilizando diclorometano. Rendimento de 97%.

diel (3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il) fosfato

Massa exata: 378.1232

0,2 mmol (50 mg) de lapachol e 0,6 mmol (24 mg) NaH foi dissolvido em THF seco em atmosfera de N_2 e em banho de gelo. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. Terminado esse tempo foi adicionado 1,6 mmol (276,08 mg; 232 μl) de clorofosfato de dietila. O sistema foi novamente colocado sob atmosfera de N_2 e mantido em agitação overnight.

Ao final da reação o solvente foi evaporado em pressão reduzida e isolado em coluna cromatográfica com 60% de rendimento.

benzil 2-(3-metoxifenil)acetato

Massa Exata: 256,1099

Em 5 ml de DMF foi dissolvido 50 mg (0,30 mmol) de ácido 3-metóxfenil acético e a temperatura do meio reacional foi elevada à temperatura de refluxo. Em seguida foi adicionado 25,2 mg (0,30 mmol) de NaHCO_3 e 42,8 μl (0,36 mmol) de Brometo de benzila. A reação foi mantida por 3 horas quando foi verificado por CCD o consumo total do produto de partida e formação do novo produto que foi isolado em coluna cromatográfica de sílica gel com 77% de rendimento.

Metil 2-(3-metoxifenil)acetato

Massa Exata: 180,0786

Em 3 ml de MeOH foi dissolvido 50 mg (0,30 mmol) de ácido 3-metóxfenil acético e a temperatura do meio reacional foi elevada à temperatura de refluxo. Em seguida foi adicionado 14,5 mg (0,36 mmol) de NaOH e 86 μl (0,72 mmol) de Brometo de benzila. A reação foi mantida por 3 horas quando foi observado por CCD o consumo do produto de partida e formação do novo produto que foi isolado utilizando coluna cromatográfica de sílica gel com 50% de rendimento.

benzil 2-(3,4-dihidroxifenil)acetato

Em 5 ml de DMF foi dissolvido 77,4 mg (0,30 mmol) de ácido 3,4 - dihidroxifenilacético e a temperatura do meio reacional foi elevada à temperatura de refluxo. Em seguida foi adicionado 25,2 mg (0,30 mmol) de NaHCO_3 e 42,8 μl (0,36 mmol) de Brometo de benzila. A reação foi mantida por 3 horas quando foi verificado por CCD o consumo total do produto de partida e formação do novo produto que foi isolado em coluna cromatográfica de sílica gel com 70% de rendimento.

benzil 2-(4-hidroxifenil)acetato

Em 5 ml de DMF foi dissolvido 72,6 mg (0,30 mmol) de ácido 4 - hidroxifenilacético e a temperatura do meio reacional foi elevada à temperatura de refluxo. Em seguida foi adicionado 25,2 mg (0,30 mmol) de NaHCO_3 e 42,8 μl (0,36 mmol) de Brometo de benzila. A reação foi mantida por 3 horas quando foi verificado por CCD o consumo total do produto de partida e formação do novo produto que foi isolado em coluna cromatográfica de sílica gel com 70% de rendimento.

APÊNDICEAnexo 1- Massas IES-EM de **6**

ANEXO 2: Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C de **6**.

ANEXO 3: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **6**.

ANEXO 4: Espectro de massas IES-EM de 7.

ANEXO 5: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C de 7.

ANEXO 6: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **7**.

ANEXO 8: Espectro de massas IES-EM de **8**.

ANEXO 9: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C de **8**.

ANEXO 10: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **8**.

ANEXO 11: Espectro de Massas IES-EM de **9**.

ANEXO 12: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C de **9**.

ANEXO 13: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **9**.

ANEXO 14: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **10**.

ANEXO 15: Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C de **10**.

ANEXO 16: Espectro de Massas ESI-EM de **10**.

ANEXO 17: Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H de 11.

ANEXO 18: Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C de 11.

ANEXO 19: Espectro de massas IES-EM de 11.

ANEXO 20: Espectro de massas IE-EM da tentativa de formação do derivado substituído por tetrazol.

Anexo 21: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^1H de **14**.

ANEXO 22: Espectro de ressonância magnética nuclear de **14**.

ANEXO 23: Espectro de massas IE-EM de **14**.

ANEXO 24: Espectro de ressonância magnética nuclear de RMN 1H de **26**.

ANEXO 25: Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C de **26**.

Anexo 26: Espectro de massas IE-EM de **26**.

ANEXO 27: Espectro de massas IES-EM de **28**.

ANEXO 28: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C de **29**.

ANEXO 29: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN 1H de **29**.

ANEXO 30: Espectro de massas IES-EM de **29**.

ANEXO 31: Espetro de ressonância magnética nuclear RMN 1H de **31**.

ANEXO 32: Espectro de ressonância magnética nuclear ^{13}C de **31**.

ANEXO 33: Espectro de ressonância magnética nuclear ^1H de **21**.

ANEXO 34: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN ^{13}C de **21**,

ANEXO 35: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN 1H de **22**.

ANEXO 36: Espectro de ressonância magnética nuclear RMN 1H de **23**.