UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Semi-síntese de derivados da afidicolina: Busca por novos
protótipos leishmanicidas**

Gabriela Bianchi dos Santos

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Semi-síntese de derivados da afidicolina: Busca por novos
protótipos leishmanicidas**

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(a): Gabriela Bianchi dos
Santos

Orientador(a): Flavio da Silva Emery

Ribeirão Preto
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Santos, Gabriela Bianchi.

Semi-síntese de derivados da afidicolina: Busca por novos protótipos leishmanicidas. Ribeirão Preto, 2012.
71 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. Semi-síntese, 3. Leishmaniose

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriela Bianchi dos Santos

Semi-síntese de derivados da afidicolina: Busca por novos protótipos leishmanicidas

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(a): Flavio da Silva Emery

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery por ter sido fonte inesgotável de incentivo e motivação durante a realização deste projeto e ser inspiração à minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery pela enorme dedicação e entusiasmo durante o desenvolvimento deste projeto.

À FAPESP pela bolsa concedida e financiamento do projeto.

A CAPES e CNPQ pelo financiamento de projetos no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal.

Ao INBEQMeDI- Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas, INCT onde este projeto está inserido.

À Prof. Dr. Mônica T. Pupo pela colaboração no projeto e pela orientação no início do mestrado.

À Prof. Dr. Angela K. Cruz pela realização dos ensaios leishmanicidas.

À aluna de iniciação científica Iara Aimê Cardoso, pelo envolvimento e persistência singulares.

Ao aluno iniciação científica Paulo Eliandro da Silva Júnior, pela ajuda desde ingresso no mestrado até a elaboração da dissertação.

À Dr. Adriana Lopes, pelas contribuições durante o desenvolvimento deste projeto.

Ao Dr. Ricardo Vessechi, pelos estudos computacionais envolvendo a afidicolina.

Aos técnicos Murilo Helder de Paula e Áurea Donizette Lanchote pela enorme contribuição durante os experimentos.

Aos técnicos Vinicius e Tomás pela realização das análises de RMN e ESI-MS.

À minha família.

Aos amigos, pelos aprendizados na vida e na Arte.

À Brigitte pela companhia adorável.

Aos amigos do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal pelos ensinamentos, caronas e amizade.

EPÍGRAFE

“Camarão que dorme a onda leva.”

Provérbio popular espanhol

RESUMO

Santos, G.B. **Semi-síntese de derivados da afidicolina: Busca por novos protótipos leishmanicidas.** 2012 - Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O presente trabalho aborda a transformação semi-sintética de afidicolina visando a criação de uma biblioteca de compostos para fins de ensaios de atividade sobre espécies de *Leishmania* spp. Recentemente, estudos demonstraram a alta atividade da afidicolina, um diterpeno tetracíclico produzido pelo fungo *Nigrospora sphaerica*, frente ao protozoário *Leishmania major*. Apesar do promissor potencial leishmanicida, a afidicolina apresenta propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético inadequado para terapêutica. Considerando que abordagens semi-sintéticas são comuns na busca de novos protótipos para doenças negligenciadas e na otimização de propriedades farmacocinéticas, foram desenvolvidas metodologias diversas de transformação de grupo funcional, alquilação e acilação da afidicolina a fim de avaliar os requisitos estruturais para atividade leishmanicida. Um estudo preliminar computacional foi realizado para determinação de cargas atômicas e potencial eletrostático da afidicolina, que forneceu informações valiosas sobre a reatividade química desta molécula, úteis para o planejamento de futuras modificações envolvendo este protótipo. No total, foram sintetizados dez compostos, sendo sete inéditos, que foram testados contra espécies de *L. major* e *L. braziliensis*. A avaliação leishmanicida dos compostos sintetizados demonstrou seletividade do derivado do tipo oxima contra a espécie *L. braziliensis*, epidemiologicamente importante no Brasil. A partir dos dados da avaliação biológica foi possível propor, de forma preliminar, requisitos estruturais para a atividade leishmanicida da afidicolina e de seus derivados semi-sintéticos.

Palavras-chave: Afidicolina, Semi-síntese, Leishmaniose.

ABSTRACT

Santos, G.B. **Semi-synthesis of aphidicolin derivatives: The search for new leishmanicidal prototypes.** 2012 - Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

This work presents the use of semisynthetic approach to create a library of compounds from the lead compound aphidicolin for biological assays against *Leishmania* spp. Recently, studies have shown high activity of aphidicolin, a secondary metabolite from the fungus *Nigrospora sphaerica*, against the protozoan *Leishmania major*. Despite the promising leishmanicidal potential, aphidicolin presents physico-chemical and pharmacokinetic profile unsuitable for therapy. As the semi-synthetic approach is widely used in the search for new prototypes for neglected diseases, new methodologies have been developed for functional group transformation, alkylation and acylation of aphidicolin. A preliminary computational study was conducted to determine the atomic charges and electrostatic potential of aphidicolin, which provided valuable information on the chemical reactivity of this molecule, useful for planning future changes involving this prototype. Ten compounds were synthesized; seven of them are unpublished, which have been tested against different species of the protozoa *Leishmania* spp. The preliminary evaluation of the synthesized compounds showed leishmanicidal selectivity of the compound oxime against *L. brasiliensis* specie, which has a notorious occurrence in Brazil. We have proposed a preliminary perspective of the structural requirements for the leishmanicidal activity of aphidicolin and its semisynthetic derivatives based on the biological essays.

Keywords: Aphidicolin, Semi-synthesis, Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de derivados semi-sintéticos de 1 com propriedades leishmanicidas.....	3
Figura 2 - Distribuição mundial da Leishmaniose tegumentar (esquerda) e visceral (direita); As áreas endêmicas estão em vermelho de acordo com a Organização Mundial de Saúde ¹² ...	4
Figura 3 - Ciclo Biológico da <i>Leishmania sp.</i> , mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (forma amastigosta) e vetor (tripomastigota); Adaptado de ¹⁸ .	6
Figura 4 - Fármacos utilizados no tratamento de Leishmanioses e respectivos custos para tratamento da leishmaniose visceral ²⁰	7
Figura 5 - Fármacos semi-sintéticos recentes no mercado.....	9
Figura 6- Planejamento da modificação isostérica da afidicolina.	12
Figura 7- Representação do planejamento das alquilações de 1	13
Figura 8 - Representação esquemática das acilações da afidicolina.....	13
Figura 9- Representação das interações intramoleculares da afidicolina.	34
Figura 10 - Derivados protegidos do álcool 2,4,5 trimetoxibenzílico, L-mentol, lapachol e álcool benzílico.....	35
Figura 11- Cargas atômicas obtidas empregando como sistema solvente MeOH	40
Figura 12- Mapa do potencial eletrostático molecular (MEP). Regiões vermelhas são nucleofílicas (regem ataque de um eletrófilo, regiões básicas), regiões azuis são regiões eletrofílicas (regem ataque de um nucleófilo, região ácida).	41
Figura 13 - Representação das regiões HOMO e LUMO de 1	41
Figura 14 – Valores de citotoxicidade CE ₅₀ em µM em culturas de macrófagos dos compostos 1 (esquerda) e 6 (direita).	47
Figura 15 – Curva dose resposta de 1 em culturas de <i>L</i>	48
Figura 16 – Curva dose resposta de 6	48
Figura 17 – Curva dose resposta de 1 em culturas de.....	49
Figura 18 – Curva dose resposta de 6 em culturas de <i>L</i>	49
Figura 19 – Curva dose resposta de 2 em culturas de.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Casos confirmados de Leishmaniose tegumentar e visceral, letalidade e óbitos da Leishmaniose visceral. Fonte: DATASUS, 2010	4
Tabela 2– Tipo de reação, número de ocorrências, e porcentagem de modificações semi-sintéticas envolvendo a afidicolina.	43
Tabela 3- Resultados dos ensaios biológicos em culturas de <i>L.brasiliensis</i> e <i>L.major</i> – Expressos em capacidade efetiva de 50% de atividade antiparasitária.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxiribunulcleico

CCDC: Cromatografia em camada delgada comparativa

CYP: Citocromo P₄₅₀

d: dubleto

dd: duplo-dubleto

DMAP: Dimetilaminopiridina

DMF: Dimetilformamida

FAPESP: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

HCl: Ácido clorídrico

IES-EM: Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray

LC: Leishmaniose cutânea

LV: Leishmaniose visceral

LT: Leishmaniose tegumentar

m: multiplete

MTT: metil-tiazol-tetrazolium

m/z: Relação massa carga

PCM: Modelo de polarizabilidade

ppm: Partes por milhão

q: quarteto

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

s: singleto

sl: singleto largo

t: tripleto

TBAF: Fluoreto de tetrabutylamônio

TBDMSCl: Cloreto de *tert*-butildimetilsilano

THF: Tetrahidrofurano

δ: Deslocamento químico

(t_{1/2}): Tempo de meia vida

LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS

2

4

5

6

7

10

11

12

13

23

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	v
LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS	vi
SUMÁRIO.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Materiais	13
3.2 Métodos	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Síntese de isósteros da afidicolina	27
4.2 Síntese de derivados alquilados da afidicolina	32
4.4 Acilação.....	37
4.5 Estudos teórico preliminar da Reatividade Química de 1	39
4.6 Estudo das reações envolvendo 1, descritas na literatura.....	42
4.7 Avaliação da atividade biológica.....	46
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
7. ANEXOS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Afidicolina

Caracterizada pelo esqueleto biciclo-octano nos anéis C/D, a afidicolina **1** foi isolada pela primeira vez de culturas do fungo *Cephalosporium aphidicola* em 1972, sendo identificada como um diterpeno polihidroxiado tetracíclico¹.

O fungo endofítico *Nigrospora sphaerica* também foi identificado como um profícuo produtor de **1**, em associação com a Asteraceae *Smallanthus sonchifolius*, popularmente conhecida como Yacón. A relação simbiótica envolvida entre a planta e o fungo ainda não foi de todo esclarecida, sendo apontada como um mutualismo, onde a planta fornece abrigo e alimento e, em contrapartida, o fungo produz metabólitos responsáveis pela proteção contra patógenos à planta².

A obtenção de **1** a partir de *Nigrospora sphaerica* inicia-se com o isolamento do fungo presente na raiz e caule do Yacón, seguido de cultivo por vinte dias deste microorganismo em meio arroz, do qual é possível obter o diterpeno a partir do extrato etanólico².

Em relação à biossíntese, um estudo recente revelou que a produção das cadeias isoprênicas deste diterpeno ocorre através da via do mevalonato (via terpenoídica clássica) no fungo *Nigrospora sphaerica*³. Como proposta mecanística de formação de **1**, como ocorre em outros terpenos, as reações procedem via ataque nucleofílico cabeça-cauda da unidade pirofosfato de isopentenila ao pirofosfato de dimetilalila, seguido de rearranjos carbocatiônicos e etapas de oxidação mediadas por enzimas citocromo P₄₅₀ (CYP-P450) (Esquema 1).

Esquema 1 - Mecanismo biossintético para formação de afidicolina³

Diversos estudos demonstraram a atividade farmacológica de **1** contra vírus de ácido desoxirribonucleico (ADN) e sobre diferentes linhagens de células tumorais, sem apresentar toxicidade para as células humanas^{4,5}.

Seu mecanismo de ação envolve a inibição altamente competitiva da enzima ADN polimerase α e, conseqüentemente, a inibição da replicação celular, explicando, portanto, a ausência de efeito em células não proliferativas⁶⁻⁸.

Nesta época, **1** despontou como potencial candidato a fármaco antineoplásico e antiviral. Entretanto, devido às propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, seu emprego como alternativa aos fármacos antitumorais ficou limitado. Particularmente, o derivado hidrossolúvel 17-glicinato-afidicolina chegou a avançar às fases de estudos clínicos de fármacos, porém, o rápido metabolismo hepático provoca a bioinativação da molécula, com perda da sua atividade sobre a enzima ADN polimerase α , inviabilizando sua aplicação terapêutica.

A bioinativação é consequência da oxidação de **1** à 3-oxo-afidicolina **2**, em processo metabólico atribuído às enzimas constitutivas do sistema citocromo P-450 (Esquema 2). Esta é a principal rota de biotransformação de **1**⁹.

Esquema 2 - Representação esquemática da bioinativação de **1**

Apesar de não ter alcançado o *status* de fármaco, **1** continua sendo uma molécula valiosa para estudos de ciclo celular, sendo alvo de estudos e uma importante ferramenta em pesquisas de replicação de células eucarióticas e de síntese de ADN³.

Além do potencial antitumoral, **1** e seus derivados semi-sintéticos (Figura 1) foram identificados em testes *in vitro* como novos protótipos com potencial leishmanicida¹⁰. Derivados semi-sintéticos, baseados na reatividade química das hidroxilas, apresentaram o mesmo perfil de atividade biológica para as diferentes formas e espécies de *Leishmania* spp. (Figura 1)¹¹. Entretanto, suas propriedades farmacocinéticas persistem como limitantes para seu emprego.

Figura 1 - Exemplos de derivados semissintéticos de **1** com propriedades leishmanicidas.

1.2 Leishmanioses

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção pelas diferentes espécies de *Leishmania* spp. Atualmente, a doença é endêmica em 98 países,

destacadamente em países em desenvolvimento (Figura 2), apresentando prevalência de 12 milhões de indivíduos infectados e ainda uma incidência anual de 2 milhões de novos casos das diferentes manifestações clínicas, sendo 500.000 da forma visceral (LV) e 1,5 milhão da forma tegumentar (LT)¹². Números estes subestimados em função da deficiência de notificação compulsória em 48 dos países endêmicos.

Figura 2 - Distribuição mundial da Leishmaniose tegumentar (esquerda) e visceral (direita); As áreas endêmicas estão em vermelho de acordo com a Organização Mundial de Saúde ¹².

A realidade brasileira, divulgada pelo Sistema Único de Saúde, é alarmante, com incidência de aproximadamente 25 mil casos anuais, dentre Leishmaniose visceral e cutânea, e de 219 óbitos confirmados em 2010 (Tabela 1)¹³.

Tabela 1 – Casos confirmados de Leishmaniose tegumentar e visceral, letalidade e óbitos da Leishmaniose visceral. Fonte: ¹³.

Ano	Leishmaniose tegumentar	Leishmaniose visceral	Letalidade	Óbitos
2000	33.720	4.858	3,2	155
2001	26.636	2.549	6,6	169
2002	28.361	2.450	7,6	186
2003	30.814	2.971	8,5	254
2004	28.737	3.580	8,2	295
2005	26.685	3.597	7,8	280
2006	22.397	3.651	7,2	262
2007	21.407	3.604	4,7	170
2008	19.992	3.852	5,6	216
2009	21.824	3.693	5,8	216
2010	21.981	3.526	6,2	219

Globalmente, observa-se um aumento alarmante no número de casos das leishmanioses, diferentemente do que ocorre no Brasil, onde a redução é paulatina. Se por um lado essa informação é otimista, por outro é importante considerar que o número de óbitos por leishmaniose visceral tem aumentado em nosso país¹³.

Geograficamente, as leishmanioses têm se expandido para além dos seus ectópicos naturais, principalmente devido às alterações ambientais provocadas pelo homem, aumentando sua exposição aos vetores¹⁴. Provavelmente, este fato está correlacionado ao aumento global da incidência da doença.

Adicionalmente, a emergência da doença deve-se também aos inúmeros casos de pacientes imunodeprimidos, seja pelo uso de medicamentos imunossupressores ou por infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A co-infecção *Leishmania* spp./HIV é considerada uma doença emergente genuína, especialmente no sudoeste europeu, onde 25-70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos estão relacionados à infecção pelo HIV¹⁰.

1.3 Biologia do parasita

A leishmaniose humana é provocada por espécies de protozoário dimórficos do gênero *Leishmania* e família Trypanosomatidae. Dentre as espécies patogênicas, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *L.* (V.) *shawii*, *L.* (L.) *amazonensis* e *L.* (L.) *chagasi* apresentam maior importância no Brasil^{13,15}. Os insetos da subfamília Phlebotominae são os únicos vetores das várias espécies de *Leishmania* spp., sendo os de gênero *Plebothomus*, vetor na Europa, África e Ásia, enquanto os de gênero *Lutzomyia*, nas Américas¹⁶.

No ciclo biológico do parasita, há duas formas evolutivas bem definidas: as amastigostas e promastigotas. Os promastigotos extracelulares livres, que vivem no trato gastrointestinal e na saliva do inseto vetor, são injetados no hospedeiro mamífero, onde são fagocitados pelos monócitos tissulares e por células dendríticas, transformando-se nas formas amastigotas (Figura 3)¹⁷.

Figura 3 - Ciclo Biológico da *Leishmania* sp., mostrando sua passagem pelo hospedeiro vertebrado (forma amastigota) e vetor (tripomastigota); Adaptado de ¹⁸.

Foram descritos como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres e domésticos¹⁹.

1.3 Manifestações e tratamento de Leishmaniose

A manifestação da doença, localizada ou sistêmica, é dependente das espécies ou subespécies do parasita infectante, da distribuição dos macrófagos infectados e especialmente da resposta imune do hospedeiro.

Outro fármaco aplicado terapeuticamente é o antibiótico Anfotericina B, que apresenta capacidade de inibir a síntese do ergosterol, abundante na célula parasitária, causando desequilíbrio eletrolítico da célula e morte¹⁷, sendo usado somente naqueles casos de terapias mal sucedidas com os antimônios pentavalentes, devido a sua alta toxicidade e dificuldades de administração²¹.

Estudos recentes demonstraram a eficácia da miltefosina, fármaco antineoplásico, contra a forma visceral da leishmaniose. A miltefosina promove a inibição da alquil-acil-CoA aciltransferase da *L.donovani*¹⁷. Apesar do seu alto percentual de cura (94% dos pacientes testados), a miltefosina possui alta teratogenicidade, excluindo mulheres em idade fértil do tratamento²¹.

A Paromomicina, antibiótico aminoglicosídeo, apresenta alta afinidade pela subunidade 30S de ribossomos, e desta forma, inibe o crescimento de bactérias causando prematuridade e erros na tradução do ácido ribonucleico (ARN) mensageiro. De forma semelhante atua nas células parasitárias, afetando a síntese de ácidos nucleicos. Apesar do alto percentual de cura (90%) em casos de leishmaniose visceral, apresenta baixa biodisponibilidade oral, limitando seu emprego terapêutico²¹.

A Pentamidina (Pentam®), uma diamidina aromática, é utilizada no tratamento da leishmaniose visceral em casos de resistência aos antimônios. Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, no entanto, sugere-se que a pentamidina iniba a enzima topoisomerase II, afetando a biossíntese da poliamina, causando a inibição da cadeia respiratória. Entretanto, nota-se rápido desenvolvimento de resistência do parasita a este fármaco, apresentando redução de 22% da eficácia logo após início do tratamento¹⁷.

O contexto acima demonstra a importância do investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida. Essa premissa se torna ainda mais emergente no Brasil, ainda mais se for considerada a dependência tecnológica aos insumos farmacêuticos desenvolvidos por indústrias farmoquímicas estrangeiras²², e principalmente, a incipiência no processo de inovação e pesquisa em insumos de importância farmacêutica, que em muito é direcionada às universidades e instituições públicas de pesquisa.

1.5 Fármacos Semi-sintéticos

Dentre as estratégias para a descoberta de novos fármacos, a exploração químico-medicinal de produtos naturais continua sendo bastante aplicada. O uso de produtos naturais como fonte de metabólitos bioativos representa aproximadamente metade dos fármacos

aprovados entre 1981 e 2007. Desse total, 23% foram obtidos por meio de modificação semi-sintética. Esses dados demonstram o potencial da biodiversidade aliada aos conhecimentos de química medicinal para investigação de novas entidades químicas. A figura 5 apresenta exemplos recentes de fármacos semi-sintéticos²³.

Figura 5 - Fármacos semi-sintéticos recentes no mercado.

Dentre as vantagens do uso de produtos naturais como protótipos para obtenção de novos fármacos destacam-se a inovação, a diversidade estrutural e a possibilidade de obtenção de derivados semi-sintéticos bioativos, baseado em planejamento racional mediados pela metodologias clássicas ou computacionais de química medicinal²⁴. Muitos destes compostos naturais, no entanto, têm propriedades físico-químicas ou estruturais inadequadas, tais como baixa solubilidade, lipofilicidade inapropriada ou baixa estabilidade química.

Dessa forma, o uso de estratégias clássicas de química medicinal, como bioisosterismo²⁵, latenciação²⁶ ou homologação química²⁷, mediados pela exploração semi-sintética de produtos naturais, podem modular as propriedades físico-químicas e estruturais de uma molécula para alcançar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico desejado²³.

A estratégia de bioisosterismo, muito empregada no desenvolvimento de fármacos, é baseada na substituição de um átomo ou grupo de átomos com as mesmas características estereo-eletrônicas, obedecendo ao princípio de Langmuir (1919), em que considera isostéros os substituintes com a mesma valência²⁵. Os bioisósteros são caracterizados, portanto, como moléculas contendo substituição isostérica e com resposta biológica similar ao protótipo. As finalidades do bioisosterismo incluem o aumento da seletividade, diminuição de efeitos colaterais e de toxicidade e aprimoramento de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas. Por exemplo, a substituição do átomo de flúor pelo grupo metila no desenvolvimento do celecoxibe, provocou uma redução de 63 vezes do tempo de meia vida ($t_{1/2}$), sem alterar o perfil farmacológico, viabilizando o emprego terapêutico deste padrão estrutural²⁸ (Esquema 3).

Esquema 3 - Representação de substituição bioisotérica no planejamento do celecoxibe .

O emprego da estratégia de latenciação com intuito de aprimorar características farmacocinéticas, biofarmacêuticas e propriedades físico-química de protótipos, viabilizou a aplicação terapêutica de diversos fármacos. A obtenção de pró-fármacos fornece alternativas às limitações do composto líder como inadequação à formulação, baixa distribuição do fármaco ao tecido/órgão alvo, baixa hidrossolubilidade, instabilidade química, reduzida absorção oral ou rápida metabolização²⁹. Os pró-fármacos são, portanto, derivados biorreversíveis do composto líder, que após metabolização química ou enzimática *in vivo* é liberado na forma ativa original²⁴. Dentre várias opções disponíveis no mercado, o éster benzoato do antibiótico metronidazol é exemplar. O metronidazol apresenta baixa lipossolubilidade na sua forma livre, característica que dificulta seu emprego na forma tópica

de administração. Para contornar tal dificuldade, a derivatização ao éster benzoato, promove o aumento da biodisponibilidade pela mesma via de administração, e a ação de estearases hepáticas garante a liberação do metronidazol livre no alvo terapêutico (Esquema 4)³⁰.

Esquema 4 - Representação esquemática de metabolismo do pró-fármaco do metronidazol.

O processo de obtenção de derivados de moléculas ativas por meio do alongamento de cadeias de grupos alquil permite alterar os valores de pKa, lipofilicidade (LogP), aspectos eletrônicos, e a avaliação do efeito estérico na interação de compostos bioativos com seu alvo terapêutico²⁷. Esta estratégia, denominada homologação química, é caracterizada pela modificação de éteres ou alteração do grupo funcional álcool, e é amplamente utilizada no aprimoramento de compostos com baixa biodisponibilidade alterando o balanço entre hidrossolubilidade/lipofilicidade. O arteéter é um exemplo desta estratégia, em que foi realizada introdução de grupo $-\text{CH}_2$ no éter metílico do arteméter, ambos antimaláricos semi-sintéticos, disponíveis no mercado, derivados da artemisinina (Esquema 5).

Esquema 5 - Representação esquemática da homologação do arteméter para obtenção do arteéter.

Considerando todo o contexto acima apresentado, este trabalho é inspirado nas estratégias clássicas de química-medicinal para gerar novos derivados semi-sintéticos de **1**, explorando seu perfil farmacológico para gerar uma biblioteca de compostos a serem testados quanto à atividade leishmanicida.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a reatividade química de **1**, visando o desenvolvimento de uma biblioteca de compostos análogos para fins de bioprospecção de atividade leishmanicida e do estabelecimento de relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos promissores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

De maneira específica, o objetivo é estudar reações de **1** e avaliar a atividade biológica dos compostos semi-sintéticos, inspirados por estratégias clássicas de química medicinal, como delineado a seguir:

2.2.1 Semi-síntese e avaliação leishmanicida de isósteros aminados de 1: transformação de grupo funcional, visando a alteração do grupo álcool (C-3) de **1** ao grupamento amino, visando manter semelhança estrutural, perfil de interações intermoleculares e a redução de metabolismo indesejável (Figura 6).

Figura 6- Planejamento da modificação isostérica da afidicolina.

2.2.2 Semi-síntese e avaliação leishmanicida de éteres lipofílicos derivados de 1: modificação do grupo funcional álcool (C-3) de **1** aos éteres homólogos, visando verificar a influência da alteração da lipofilicidade e de interações intermoleculares sobre a atividade leishmanicida (Figura 7), inspirado na estratégia de homologação química.

Figura 7- Representação do planejamento das alquilações de 1.

2.2.3 Semi-síntese e avaliação leishmanicida de ésteres derivados de 1: acilação das hidroxilas livres de **1** (Figura 8), visando avaliar a influência de alteração de lipofilicidade, tamanho e interações inter-moleculares sobre a atividade leishmanicida, inspirado na estratégia de latenciação de fármacos.

Figura 8 - Representação esquemática das acilações da afidicolina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Aparelhagem analítica

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN ^1H) foram registrados à 300 e 500 MHz em espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente, na Universidade de São Paulo. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (RMN ^{13}C) foram registrados à 75 e 125 MHz em espectrômetro BRUKER(R) - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente, 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=singlete, d=dublete, t=triplete, q=quarteto, dd=duplo dublete, 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 (Ionização por *Electrospray*) foram realizadas em aparelho modelo ultrOTOFQ - ESI-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).

3.1.2 Aparelhagem laboratorial e vidrarias

- Sistema purificador de água em osmose reversa 0510 LX (Gehaka)
- Colunas para cromatografia (Vidrolabor)
- Tubos de RMN 17,5 cm, 5 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich)
- Agitador magnético: Corning PC-320
- Balança analítica Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S
- Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150
- Evaporador rotatório: Büchi RE-121
- Evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215
- Ponto de fusão: Marconi MA 381
- Bomba de alto vácuo E2M5 (Edwards)

3.1.3 Solventes

Solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados, conforme métodos usuais descritos na literatura³¹. Os solventes utilizados nos processos de extração e síntese foram devidamente separados e encaminhados para o centro de tratamento de resíduos.

3.2 Métodos

3.2.1 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises de CCDC foram realizadas em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄-MERCK® cortadas em tamanhos adequados (2 cm X 5 cm). As amostras foram

solubilizadas em solventes apropriados e aplicadas nas placas por meio de capilares de vidro. As placas foram eluídas com diferentes sistemas de fases móveis e as manchas referentes aos produtos foram reveladas por meio de solução de Vanilina Sulfúrica 1%.

3.2.2 Cromatografia Líquida “clássica”

Cromatografia realizada em coluna de vidro, empacotada com sílica gel 60 Å (70 – 230 mesh/Sigma Aldrich Brasil Ltda) e diferentes sistemas eluentes.

3.2.3 Cromatografia Líquida “Flash”

Cromatografia realizada em coluna de vidro com adaptação para entrada de ar comprimido. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 Å (230-400 Mesh/ Sigma Aldrich Brasil Ltda) e diferentes sistemas eluentes.

3.2.4 Avaliação Leishmanicida

O método colorimétrico envolvendo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium ou simplesmente metil-tiazol-tetrazolium (MTT) é aplicado em células promastigotas de espécies do gênero *Leishmania* e se baseia na capacidade das enzimas mitocondriais de células parasitárias em reduzir o sal tetrazolium, presente no meio, em um composto de coloração roxa (formazan) (Esquema 6), com absorção máxima em 492 nm³². Nesse sentido, o método avalia a viabilidade celular, sendo um método indireto de avaliação da lise da célula parasitária. Os ensaios foram realizados no laboratório da Professora. Dra. Ângela K. Cruz (FMRP-USP), como parte das atividades propostas no INCT-INBEQMEDI (Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas), coordenado pelo Professor Dr. Richard Charles Garratt, do IFSC-USP. A fim de preparar os inóculos, foi realizado descongelamento das linhagens de *Leishmania major* e *L. braziliensis* a serem testadas. Em seguida, foram colocadas em tubo tipo *falcon* contendo meio de cultura M199. Os tubos foram submetidos à centrifugação por 10 minutos à 2000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o conteúdo restante transferido para recipiente contendo meio de cultura M199, onde foram mantidos por mais três dias. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, quando se observou a curva ideal de crescimento dos parasitas. O inóculo foi preparado utilizando-se meio *Schneider* completo (contendo soro fetal bovino) como meio de cultura, a fim de se obter concentração final igual a 200.000 parasitas/mL de

inóculo. Foram transferidos 800 μL de inóculo para tubo tipo *ependorf* e em seguida realizadas diluições decimais seriadas a partir do primeiro tubo. Preparou-se um controle positivo (tubo contendo apenas o meio de cultura sem parasitas) e controle negativo (contendo o parasita sem o composto a ser testado). 200 μL do conteúdo do tubo *ependorf* foram transferidos para placa de ELIZA contendo 96 poços, em triplicatas, e mantidos incubados por 3 e 4 dias, para linhagens de *L. major* e *L. braziliensis*, respectivamente. Ao final deste procedimento, foram adicionados 100 μL de MTT, na concentração 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ em cada poço. Após 4 horas de incubação a 37°C em estufa, centrifugou-se durante 5 minutos à 3000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado solubilizado em 100 μL de DMSO em cada poço. Realizou-se a leitura em leitor de ELIZA, à 495nm para construção da curva dose *versus* resposta³².

Esquema 6 - Representação esquemática da redução do MTT *in vitro*.

3.2.5 Estudo computacional de reatividade química de 1

Com o intuito de se investigar, de forma preliminar, a reatividade de **1** frente às reações com eletrófilos/nucleófilos, foi realizada análise conformacional aplicando-se método de mecânica molecular. O conformero de menor energia foi submetido à otimização da geometria empregando-se o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)³³, através do programa *Gaussian* 03. Os efeitos relacionados ao sistema solvente (metanol) foram considerados empregando-se o modelo da polarizabilidade contínua (PCM)³⁴. Esses estudos foram realizados em colaboração com o Dr. Ricardo Vessecchi (FCFRP-USP).

3.2.6 Revisão sistemática da literatura

A revisão de reações envolvendo a modificação de **1** levou em consideração apenas os processos que continham descrição experimental das condições reacionais. A revisão foi

realizada por meio da ferramenta *Scifinder* para busca em banco de dados de *Chemical Abstracts Services* (CAS), sem aplicação de quaisquer filtros.

3.2.6 Modificações semi-sintéticas da Afidicolina

3.2.5.1 Síntese de isósteros

2-([[(1*R*,2*R*,5*S*,6*S*,7*S*,10*R*,12*S*,13*S*)-13-[[*tert*-butildimetilsilil)oxi]metil]-5,13-dihidroxi-2,6-dimetiltetraciclo[10.3.1.0¹,10.0²,7]hexadecan-6-il]metoxi)dimetilsilil)-2-metilpropilidina, **4**

A uma mistura de piridina (10 ml) e trietilamina (1,14 mmol, 159µl), sob agitação à temperatura ambiente, foram adicionados DMAP (0,4 mmol, 49mg) e **1** (1,0 mmol, 338mg). À solução foi adicionado TBDMSCl (4,4 mmol, 664mg). A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 19h. Após consumo total de **1**, observada por cromatografia em camada delgada, a mistura reacional foi vertida em solução de NaHCO₃ 1M (15 ml) e extraída com acetato de etila. A fase orgânica foi evaporada sob pressão reduzida e o resíduo sólido foi purificado por cromatografia líquida “clássica” de gel de sílica, utilizando acetato de etila:hexano (1:4/v:v), como sistema eluente, para fornecer o sólido branco **4** com 77 % de rendimento.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ(ppm): 3,62 (sl, 1H), 3,53 (d, 1H, J= 10,0 Hz), 3,43 (d, 1H, J=10,0 Hz), 3,32 (m, 1H, J= 10,0 Hz), 3,31 (d, 1H, J= 9,5 Hz), 2,41 (dl, 1H, J=12,0 Hz), 2,15 (m, 2H), δ 2,10 (m, 1H), 2,09 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,86 (m, 1H), 1,85 (m, 1H), 1,79 (m, 1H), 1,69 (m, 1H), 1,65 (m, 1H), 1,58 (m, 1H), 1,56 (m, 1H), 1,33 (m, 2H), 1,24 (m, 1H), 0,84 (m, 1H), 0,69 (s, 3H), 0,96 (s, 3H), 0,91 (s, 9H), 0,89 (s, 9H), 0,08 (s, 3H), δ 0,06 (s,

3H), 0,04 (s, 6H), **IV** (**KBr**) $\tilde{\nu}$ Máx (cm⁻¹): 3496, 2953, 2928, 2855, 1253, 1068, 778. **PF**: 117-121°C. **EM** (**IE**, **35 eV**) m/z : 548 (M-18;0,67%); 421 (M-145; 35,1%)

2-([[(1*R*,2*R*,6*S*,7*S*,10*R*,12*S*,13*S*)-13-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]metil]-13-hidroxi-2,6-dimetil-5-oxotetraciclo[10.3.1.0¹.10.0²,7]hexadecan-6-il]metoxi)dimetilsilil)-2-metilpropilidina, **5**

A uma suspensão de acetato de sódio (86 mg, 1,03 mmol) em diclorometano (20mL), sob agitação, foi adicionado o composto **3** (330 mg, 0,61 mmol) e PCC (276 mg, 1,26 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente, por 32 horas, e protegida de umidade com tubo secante de CaCl₂ acoplado ao sistema reacional. A mistura reacional foi filtrada em funil de Buchner e lavada com éter etílico. O filtrado foi submetido a uma segunda filtração em coluna (1,0 x14 cm), utilizando florissil (4g) e sulfato de sódio anidro (1g) como agentes adsorventes. O produto desejado foi purificado por cromatografia líquida “flash” em coluna de gel de sílica utilizando acetato de etila:hexano (8,5:1,5/ v:v), fornecendo um sólido branco com rendimento de 78%.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm):3,62 (d, 1H, J= 8,5 Hz), 3,46 (d, 1H, J=10 Hz), 3,37 (d, 1H J= 9,5 Hz), 3,37 (d, 1H J= 9,0), 2,39 (m, 1H), 2,06 (m, 2H), 2,06 (sl, 1H), 1,95 (d, 1H, J= 11,0 Hz), 1,87 (m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,80 (m, 1H), 1,71 (m, 2H), 1,71 (m, 1H), 1,58 (m, 2H), 1,52 (m, 1H), 1,33 (m, 2H), 1,34 (m, 2H), 1,27 (m, 1H), 0,98 (s, 3H), 0,92 (s, 9H), 0,87 (s, 3H), 0,09 (s, 9H), 0,08 (s, 6H), 0,03 (s, 3H), 0,01 (s, 3H). **IV** (**ATR**) $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹): 3496, 2956, 2926, 2856, 1696, 1465, 1257, 1088, 1060, 853, 783, 668 cm⁻¹. **PF**: 115-117°C. **EM** (**70 eV**, **EI**) m/z : 549 (M-15, 0,2%).

[(1R,2R,6S,7S,10R,12S,13S)-13-hidroxi-6,13-bis(hidroximetil)-6-metil-5-oxotetraciclo[10.3.1.01,10.02,7]hexadecan-2-il]metil, 2

Em balão de vidro previamente seco, foi adicionado o composto **5** (0,45 mmol, 257 mg) em tetrahidrofurano seco (20mL). Após completa solubilização do produto, foi adicionado à solução o Fluoreto de tetra-butil amônio (3,30 mmol, 862,9 mg). A reação foi mantida por quatro horas, quando foi observado o consumo completo do produto de partida, por meio de CCDC. A mistura reacional foi vertida em água, extraída com acetato de etila e o solvente foi removido sob pressão reduzida. A purificação do produto desejado foi realizada por cromatografia líquida “clássica” de gel de sílica, utilizando eluente metanol:acetato de etila (1:10/v:v), fornecendo um sólido branco com 95% de rendimento.

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 3,70 (d, 1H, $J=10$ Hz), 3,49 (d, 1H, $J=10$ Hz), 3,39 (t, 2H, $J=10$ Hz), 2,69 (m, 1H), 2,36 (m, 2H), 2,22 (m, 1H), 2,19 (s, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,55 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,37 (m, 2H), 1,26 (m, 2H), 1,19 (s, 3H), 1,02 (s, 3H); **RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz)** δ (ppm) 213,7; 73,0; 66,1; 53,5; 52,2; 50,5; 48,9; 48,8; 46,3; 45,6; 44,7; 44,3; 41,0; 38,6; 32,9; 31,5; 29,4; 26,8; 24,4; 22,3. **IV (KBr)** $\tilde{\nu}$ máx. (cm^{-1}): 3393, 2946, 1690, 1037. **IES-EM:** calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{32}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 337,2379, encontrado: 337,2373. **PF:** 136-138°C.

[(1R,2R,5Z,6R,7S,10R,12S,13S)-13-hidroxi-5-(hidroxi-imino)-6,13-bis(hidroxi-metill)-6-metiltetraciclo[10.3.1.01,10.02,7]hexadecan-2-il] metil, 6

A uma solução de piridina e etanol (7:3/v:v), foi adicionado o composto **2** (62 mg, 0,1839 mmol), acetato de sódio (36 mg, 0,43 mmol), trietilamina (2 ml, 14,3 mmol) e cloridrato de hidroxilamina (32,8 mg, 0,472 mmol). A reação foi mantida por 24 horas, à 70°C sob atmosfera de argônio e agitação constante. Ao fim da reação, observado por meio de CCDC, os solventes foram destilados sob pressão reduzida, e o sólido formado foi solubilizado em acetato de etila e lavado com água (três vezes). A purificação foi realizada por meio de cromatografia líquida “flash” em coluna de gel de sílica, utilizando metanol:acetato de etila (1:10/v:v) como sistema de eluição, fornecendo um sólido branco com 60% de rendimento.

RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 8,47 (s, 1H), 5,07 (s, 1H), 4,28 (m, 2H), 3,83 (m, 1H), 3,13 (m, 3H), 2,64 (d, 3H $J = 2,63$), 2,18 (m, 3H), 2,04 (m, 1H), 1,82 (m, 4H), 1,67 (m, 6H), 1,33 (s, 5H), 1,20 (m, 6H), 0,97 (m, 2H), 0,68 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (300 MHz, CD_3OD):** δ (ppm) 162,4, 73,4, 69,6, 67,7, 49,0, 48,2, 44,4, 41,1, 38,6, 32,8, 31,2, 30,4, 28,0, 26,4, 25,1, 24,6, 20,9, 20,6, 18,3, 14,5. **IV (KBr)** $\tilde{\nu}$ máx. (cm^{-1}): 3420, 2923, 1653, 1090, 1027. **IES-EM:** calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 352,2488, encontrado: 352,2482. **PF:** 210°C.

(2*S*,4*aS*,4*bS*,6*aR*,8*S*,9*S*,11*aR*,11*bR*)-9-hidroxi-9-(hidroximetil)-4*a*,11*b*-dimetiltetradecahidro-4*H*-8,11*a*-metanociclohepta[5,6]nafto[2,1-*d*][1,3,2]dioxatina 2-óxido, **7**

A um balão de vidro previamente seco, contendo afidicolina (25 mg, 0,07 mmol) foi adicionado cloreto de tionila recém tratado (1 mL, 14,1 mmol). A reação foi mantida aquecida

à 70°C por 2 horas, sob atmosfera de argônio. O solvente foi destilado sob pressão reduzida e o resíduo formado solubilizado em acetato de etila e lavado com água. O produto desejado foi purificado por cromatografia líquida em coluna “clássica” de gel de sílica, utilizando acetato de etila:hexano (1:1/v:v) como sistema de eluição, fornecendo um sólido branco com rendimento de 48%.

RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD): δ (ppm) 4,85 (sl,1H), 4,29 (d, J=15), 3,77 (d, J=15), ,42 (d, J=15), 3,31 (d, J=15), 2,68 (dd, J=3 e J=15), 2,09 (m), 1,07 (s), 0,87 (s). **RMN de ^{13}C (125 MHz, CD_3OD):** δ (ppm) 75,8, 75,5, 68,7, 63,8, 60,3, 42,4, 41,4, 40,8, 38,4, 34,6, 33,7, 32,2, 28,8, 27,927,7, 25,7, 24,6, 23,6, 17,7 16,0. **IV (KBr)** $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): 2947, 1465, 1193, 968, 860, 795, 775, 722, 653 cm^{-1} . **IES-EM (m/z):** calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 407,1863, encontrado: 407,1912. **PF:** 169-172°C.

3.2.5.2 Método geral de síntese de análogos alquilados

A uma solução do composto **4** (100mg, 0,186mmol) em DMF (10 mL) foi adicionado hidreto de sódio (18 mg, 0,78mmol) e iodeto de n-butila (28 μl , 0,25mmol). A reação foi mantida sob refluxo e agitação por 24h, quando foi observado o consumo completo do material de partida, por meio de cromatografia em camada delgada. O solvente foi destilado sob pressão reduzida, o sólido formado solubilizado em acetato de etila e lavado com solução saturada de cloreto de amônio, água, e solução saturada de cloreto de sódio consecutivamente. Os produtos da reação foram purificados por cromatografia líquida em coluna “clássica” de gel de sílica, utilizando acetato de etila:hexano (1:1/v:v) como sistema de eluição .

(3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-9-(butoximetil)-4-(hidroximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-methanociclohepta[a]naphthaleno-3,9-diol, 10

A uma solução do composto **4** (100mg, 0,186mmol) em DMF (10 mL) foi adicionado hidreto de sódio (18 mg, 0,78 mmol) e iodeto de n-butila (28μl, 0,25 mmol), fornecendo o produto desejado com rendimento de 56%.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 3,51 (sl, 1H), 3,34 (m, 1H), 3,38 (m, 1H), 3,03 (d, 1H $J=9,3$), 2,31 (dd, 1H, $J=3,3$ e $J=11,9$), 0,87 (s, 3H), 0,82 (t, 3H $J=7,4$), 0,64 (s, 3H). **RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3):** δ (ppm) 79,9, 76,4, 75,0, 71,6, 68,4, 49,5, 41,5, 41,2, 40,3, 40,2, 34,2, 33,2, 31,8, 31,7, 28,8, 27,3, 26,9, 26,0, 25,0, 23,4, 19,7, 18,4, 15,5, 14,1. **IV (ATR) $\tilde{\nu}$ máx (cm^{-1}):** 3491, 2930, 2860, 1700, 1458, 1104. **IES-EM (m/z):** calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 417,2975, encontrado: 417,3049.

(3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-9-(etoximetil)-4-(hidroximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-methanociclohepta[a]naftaleno-3,9-diol, 11

(3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-4,9-bis(etoximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-methanociclohepta[a]naftaleno-3,9-diol, 12

A uma solução do composto **4** (200mg, 0,372mmol) em DMF (10 mL) foi adicionado hidreto de sódio (37 mg, 1,56mmol) e iodeto de etila (40µl, 0,5mmol) fornecendo os compostos **11** e **12** em 6,8 e 3,7% de rendimento, respectivamente.

11

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 79,5, 76,3, 75,0, 68,4, 67,2, 49,4, 41,4, 41,1, 40,2, 40,2, 34,4, 33,2, 31,7, 28,8, 27,3, 26,9, 26,0, 25,0, 23,3, 18,4, 15,5, 15,3. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$:** 3,63 (sl, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,50 (m, 2H), 3,45 (m, 2H), 3,12 (d, 1H, $J=9,3$), 2,38 (dd, 1H, $J=11,5$ e $J=$), 2,18 (t, 1H, $J=6,3$), 2,10 (dt, 1H $J=2,3$ e $J=13,3$), 1,59 (dd, 1H $J=14,6$ e $J=3,1$), 1,20 (t, 3H, $J=7,3$), 0,97 (s, 3H), 0,92 (m, 2H), 0,75 (s, 3H). **IES-EM:** calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 389,2662, encontrado: 389,2674

12

RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$: 78,2, 74,9, 74,8, 72,6, 65,9, 65,8, 47,9, 40,8, 39,7, 39,0, 38,8, 33,0, 31,7, 30,4, 27,6, 26,0, 25,5, 24,7, 23,6, 22,0, 17,1, 14,1, 14,0, 13,9. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) $\delta(\text{ppm})$:** 3,55 (sl, 1H), 3,46 (q, 3H), 3,42 (m, 1H), 3,36 (m, 1H, $J=3,31$), 3,30 (d, 1H, $J=3,22$), 3,10 (d, 1H, $J=3,11$), 3,04 (d, 1H $J=3,05$), 2,32 (dd, 1H), 2,06 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,59 (m, 1H), 1,49 (m, 1H), 1,32 (m, 5H), 1,18 (s, 3H), 1,12 (q, 7H), 0,89 (s, 4H), 0,83 (m, 2H), 0,68 (s, 3H). **ESI-MS:** calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 417,2977, encontrado: 417,2972

(3*S*,4*S*,4*aS*,6*aR*,8*S*,9*S*,11*aR*,11*bR*)-4-(hidroximetil)-9-(metoximetil)-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[*a*]naftaleno-3,9-diol, **13**

A uma solução do composto **4** (50 mg, 0,15 mmol) e hidreto de sódio (6mg, 0,15 mmol) em dimetilformamida (5 mL), foi adicionado iodeto de metila (9,42µl, 0,15 mmol). O produto foi purificado por cromatografia líquida “clássica” de gel de sílica, utilizando eluente acetato de

etila:hexano (1:1/v:v), fornecendo o composto **13** com 6% de rendimento. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)** δ (ppm): 3,54 (sl, 1H), 3,30 (s, 3H), 3,26 (s, 3H), 3,21 (d, 1H $J=3,20$), 3,10 (d, 1H $J=3,09$), 3,02 (d, 1H $J=3,01$), 2,29 (dd, 1H), 1,59 (m, 1H), 0,89 (s, 4H), 0,68 (s, 3H). **IES-EM (m/z)**: calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 389,2662, encontrado: 389,2674.

3.5.2.3 Acilação

((3S,4S,4aS,6aR,8S,9S,11aR,11bR)-3,9-dihidroxi-4,11b-dimetiltetradecahidro-8,11a-metanociclohepta[a]naftaleno-4,9-diil)bis(metileno) dibenzoato, 23

Uma mistura de afidicolina (20 mg, 0,05mmol) em piridina (5mL) foi adicionado DMAP (5mg, 0,04 mmol) e cloreto de benzoíla (36 μL , 0,06 mmol). A reação foi mantida por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação constante. Após consumo total do material de partida observado por CCDC, o solvente foi destilado sob pressão reduzida e o resíduo formado lavado com hexano (três vezes). O resíduo sólido foi secado em bomba de alto vácuo, fornecendo o composto **23** em 75 % de rendimento.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz): δ (ppm) 169,8, 144,0, 143,1, 133,1, 129,9, 126,5, 106,7, 76,7, 74,1, 71,4, 70,4, 49,0, 41,7, 40,5, 40,0, 39,7, 33,4, 32,6, 31,5, 28,3, 26,8, 26,7, 26,5, 24,5, 23,0, 17,7, 15,0. **IES-EM (m/z)**: calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 569,2874, encontrado: 569,2877.

3.6 Reações envolvendo o álcool 2,4,5 trimetóxiбенzeno

tert-butildimetil(2,4,5-trimetoxiphenoxi)silano, 14

A um balão previamente seco, foram adicionados álcool 2,4,5 trimetóxiбенzeno (396 mg, 2 mmol), TBDMSCl (330 mg, 2,2 mmol) e imidazol (408 mg, 6 mmol), em diclorometano tratado. A reação foi mantida por 4 horas com tubo secante de CaCl_2 , quando foi observada por CCDC a completa conversão do produto de partida. O solvente foi destilado sob pressão reduzida, solubilizado em acetato de etila e lavado com água. O produto foi purificado por cromatografia líquida “clássica” de gel de sílica, eluído em hexano: acetato de etila (9:1 v:v), fornecendo o composto **14** em 96% de rendimento.

RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 7,08 (s, 1H), 6,51 (s, 1H), 4,73 (s, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,81 (s, 3H), 0,97 (s, 9H), 0,12 (s, 6H). **IES-EM:** calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{SiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$:335,1649, encontrado: 335,1651.

1,2,5-trimetoxi-3-(2,4,5-trimetoxibenzil)benzeno, 22

A uma solução do composto **14** (596 mg, 2 mmol) em DMF (10 mL) foi adicionado hidreto de sódio (80 mg, 2 mmol) e mantida por 16 horas, em temperatura ambiente e constante agitação. Ao fim da reação, observado por CCDC, o solvente foi destilado sob pressão reduzida e o composto purificado por meio de cromatográfica líquida “flash”, utilizando eluente hexano:acetato de etila (1:1/v:v), fornecendo sólido branco com 90% de rendimento.

¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 6,78 (s, 2H), 6,66 (s, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,96 (s, 2H), 3,93 (s, 6H), 3,87 (s, 6H). **IES-EM:** calculado para C₁₉H₂₄O₆Na IES-EM [M+Na]⁺: 371,1471, encontrado: 371,1477.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de isósteros da afidicolina

Diante dos objetivos supracitados, foram realizadas diferentes estratégias a fim de se obter o análogo aminado **3**, através de substituição isostérica na posição C-3 de **1** (Esquema 7).

Esquema 7 - Rotas sintéticas adotadas para obtenção do derivado aminado.

O objetivo principal da substituição na posição C-3 de **1** foi desenvolver um análogo com características estéreo-eletrônicas semelhantes, mas que fosse menos susceptível ao metabolismo hepático¹¹. Por isso, planejou-se a substituição isostérica de álcool à amina **3**, conhecendo a maior estabilidade do substituinte amina (-NH₂) frente às isoformas do sistema CYP-P₄₅₀³⁵. Além disso, como o fagolisossoma infectado apresenta caráter ácido, com valores de pH entre 4,5 e 6,0³⁶, derivados aminados, encontrar-se-iam em maior concentração

da forma protonada, o que dificultaria sua difusão através das membranas, mantendo-se no interior do fagolisossoma, promovendo sua ação leishmanicida.

Seguindo o planejamento sintético, uma primeira abordagem visou à obtenção do derivado oxidado **2**, para posterior formação da oxima **6**, cuja redução forneceria o derivado aminado **3**. Para tal, primeiramente foi realizada a proteção das hidroxilas primárias, segundo método clássico³⁷, em bons rendimentos (77%) e com regioselectividade desejada, observada pela presença dos sinais singletos em δ 0,80 (6H), δ 0,06 (3H), δ 0,08(3H), δ 0,88 (9H) e δ 0,90 (9H), referentes às metilas dos grupos de proteção introduzidos em C-17 e C-18, caracterizando a estrutura do composto **4** (ANEXO 3).

O derivado diprotetido **4** foi então submetido à oxidação com cloro-cromato de piridina (PCC)³⁸, para fornecer o derivado **5**, com a carbonila na posição C-3 em 78% de rendimento. Em comparação ao espectro de RMN ^1H de **1**, a ausência do sinal singlete em δ 3,61, referente ao hidrogênio na posição C-3, e o aparecimento do sinal no espectro de RMN ^{13}C em δ 217,8, típico de carbono de carbonila sugerem a formação do composto desejado (ANEXOS 4 e 5). Além disso, a banda de absorção característica de carbonila no espectro de infravermelho em 1696 cm^{-1} (ANEXO 6), confirma a oxidação de **4** ao composto **5**.

Para dar prosseguimento à síntese, a partir de **5** foram testados dois métodos de desproteção das hidroxilas primárias. No primeiro, foi utilizado HCl em etanol³⁹, porém o baixo rendimento (50%) não permitiu dar continuidade à síntese. Diante disso o método de desproteção com fluoreto de tetrabutilamônio (TBAF) foi testado em tetrahydrofurano (THF), a partir do qual foi obtido o composto **2**, em 95% de rendimento. O desaparecimento dos sinais singletos referentes aos hidrogênios metílicos do grupo de proteção no espectro de RMN ^1H (ANEXO 7), sugere a formação do composto desejado, confirmado por EIS-EM com formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 337,2373 e pelo espectro de infravermelho com a manutenção da banda de carbonila em 1690 cm^{-1} (ANEXO 7 e 8).

A partir de **2**, foram adotadas diferentes estratégias para obtenção do derivado aminado **3**. A primeira metodologia sintética envolveu a formação da oxima **6** a partir da reação de **2** com o cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) em excesso⁴⁰. A obtenção de **6** com 60% de rendimento, foi confirmada pela presença de sinal em δ 8,47 no espectro de RMN ^1H , correspondente ao hidrogênio da função oxima ($\text{C}=\text{N}-\text{OH}$), e pelo sinal δ 162,4 no espectro de RMN ^{13}C referente ao carbono ($\text{C}=\text{N}-\text{OH}$) (ANEXOS 9 e 10). O espectro IES-EM confirma a formação de **6**, na sua forma protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$: 352,2482.

Além disso, foi testada a formação de **6** a partir do composto **5**, sob as mesmas condições anteriores (Esquema 8), porém sem êxito, reafirmando a importância do efeito estérico nas reações com estes derivados.

Esquema 8 - Representação esquemática da tentativa de obtenção do derivado oxima a partir do composto **5**.

Após formação da oxima **6**, a sucessiva redução à amina **3** foi testada sob diferentes metodologias. Inicialmente, foi testada hidrogenação catalítica utilizando paládio sob carbono (Esquema 9), porém, este método não se mostrou eficaz para a redução de **6**. Uma hipótese para ineficácia desta estratégia pode ser o impedimento estérico causado pela metila na posição C-19, impossibilitando a adsorção da molécula à superfície catalítica. Em reações de hidrogenação catalítica é necessária a interação dos orbitais π e π^* da molécula com os orbitais aceptores e doadores do metal, onde há também o hidrogênio adsorvido, para que haja, então, a transferência dos hidrogênios à face do substituinte ligado ao metal, caracterizando adição do tipo *syn*⁴¹. Ainda na tentativa de reduzir **6**, foi utilizado hidreto de lítio e alumínio em piridina, entretanto, sem sucesso (Esquema 9). A baixa solubilidade da afidicolina em solventes orgânicos foi fator limitante para emprego de diferentes metodologias visando os derivados propostos, sendo empregada a piridina como solvente na maior parte das reações. Outros solventes, como o DMF e misturas de etanol e piridina também foram testados, porém resultando em rendimentos moderados, fruto da parcial solubilidade da afidicolina nestes solventes.

Esquema 9 - Representação esquemática das tentativas de redução da oxima ao derivado aminado **3**

Em função do insucesso na redução da oxima **6**, foi testada uma estratégia alternativa para obtenção do derivado aminado **3**, envolvendo métodos de aminação redutiva a partir da cetona **2**. Na primeira condição foi utilizada benzilamina e ácido para-tolueno sulfônico, em benzeno, para formação da imina correspondente (Esquema 10), da qual se planejava utilizar óxido de platina para posterior redução⁴². Entretanto, a imina esperada não foi formada, e uma possível hipótese é o impedimento estérico da molécula na posição C-3, dificultando a adição de grupos de volumosos como o caso da benzilamina. Na segunda condição foi utilizado acetato de amônio, recristalizado e seco para o uso, e cianoborohidreto de sódio em metanol⁴³ e, de acordo com a análise de infravermelho realizada, sugere-se a formação do composto desejado pelo desaparecimento da banda de absorção característica de carbonila em 1693 cm^{-1} (ANEXO 11). A banda de absorção de amina característica não pode ser observada claramente devido à presença das bandas de álcool também presentes na molécula. Entretanto, devido aos baixos rendimentos obtidos e dificuldade de isolamento, não foi possível identificar o produto de forma definitiva.

Esquema 10 - Representação esquemática das tentativas de aminação redutiva de **2**

Ainda assim, outras rotas para substituição do álcool pelo grupo amino foram testadas. Dentre elas, a transformação de grupo funcional álcool em cloreto, utilizando cloreto de tionila em excesso, para posterior substituição com amônia líquida ou azida de sódio, visando à formação de **3**. Entretanto, a reação com cloreto de tionila forneceu o sulfito cíclico **7**, sugerido com base no espectro de IES-EM pela formação do aduto característico $[M+Na]^+ = 407,1912$. O espectro de RMN 1H de **7** apresenta pequenas alterações no deslocamento dos sinais de hidrogênio e de carbono, sendo muito semelhante ao espectro de **1** (ANEXO 12 e 13). A formação do sulfito não é esperada nas condições utilizadas, conforme descrição da literatura que relaciona sua formação às condições anidras e presença de base⁴⁴. Neste caso, ocorre a formação do intermediário **8** (Esquema 11), comum ao mecanismo de halogenação esperado, porém, na segunda etapa, onde deveria ocorrer o ataque nucleofílico do íon cloreto ao carbono C-18, ocorre um segundo ataque nucleofílico intramolecular da hidroxila na posição C-3 ao átomo de enxofre ligado ao carbono em C-18. Mesmo considerando que o composto formado não fora o planejado, prosseguimos à rota para obtenção do derivado aminado, agora utilizando azida de sódio para reagir com **7**, para posterior redução à amina⁴⁵. Entretanto, apesar do aparecimento das bandas em 1100 e 2250 cm^{-1} , referente ao grupo funcional azida, no espectro de infravermelho, sugerindo a formação do composto desejado, foi observada a formação de uma mistura de compostos, sob a forma de traços, impossibilitando sua completa elucidação.

Esquema 11 - Proposta mecanística de formação de **7** na presença de cloreto de tionila.

Outra metodologia adotada para a obtenção do composto aminado **3** envolveu a reação de **4** com cloreto de para-toluenossulfonila (Esquema 12), com objetivo de tosilar a posição C-3, para posterior substituição por azida, e subsequente redução à amina. Entretanto, o composto tosilado **9** não foi obtido na condição testada, muito possivelmente devido à presença do éter silil-terc-butilíco na posição C-18, causando impedimento estérico à entrada do grupo tosil.

Esquema 12 - Representação esquemática da tentativa de formação do derivado tosilado.

4.2 Síntese de derivados alquilados da afidicolina

Com objetivo de avaliar as consequências do aumento da lipofilicidade e de aspectos conformacionais sob a atividade biológica de **1**, foi planejada uma série de alquilações, por meio da síntese de Williamson, utilizando NaH e haletos de alquila de tamanhos de cadeia variados para alquilação de hidroxilas⁴⁶ via reação do tipo SN_2 .

Visando alquilar seletivamente o álcool secundário (C-3), conforme explicado anteriormente, foram realizadas reações empregando o composto **4** frente a iodetos de n-butila, etila e metila, nas quais foi possível obter os derivados mono-butilado **10**, mono-etilado **11** e di-etilado **12**, além do derivado di-metilado **13**.

Na reação entre **4** e iodeto de n-butila foi formado o derivado mono-butilado **10**. Entretanto, ao contrário do produto esperado, alquilado na posição C-3, foi obtido um derivado alquilado na hidroxila primária na posição C-17 ou C-18, como sugerido pelo espectro de 1H RMN (ANEXO 14) que apresentou os sinais δ 0,91 (t, 5H) referente aos hidrogênios metílicos e os sinais δ 3,13 e δ 3,34, referentes aos hidrogênios metilênicos do grupo n-butila introduzido na molécula, confirmado pelo espectro de ^{13}C contendo 24 sinais,

em relação ao espectro de **1** com 20 sinais (ANEXO 15 e 16). Além disso, foi verificado a desproteção, devido ao desaparecimento dos sinais dos hidrogênio metílicos δ 0,89 (s, 9H), δ 0,90 (s, 9H), δ 0,04 (s, 3H), δ 0,06 (s, 3H), δ 0,08 (s, 3H), δ 0,09 (s, 6H). O espectro IES-EM confirma a formação de **10**, com a formação do aduto característico $[M+Na]^+ = 417,3049$.

Na reação com iodeto de etila o comportamento reacional observado foi o mesmo daquele da reação com iodeto de n-butila, muito embora, para este caso, fora obtida uma mistura de derivados mono-etilado **11** e di-etilado **12**.

O composto mono-etilado **11** apresentou os sinais em δ 79,5 e δ 15,3 no espectro de RMN ^{13}C , referentes a um metileno e à metila, respectivamente, que sugerem a entrada do grupo etila. No espectro de RMN 1H , nota-se a presença de sinais δ 3,13 (d, 1H) e δ 3,51 (m, 1H), antes inexistentes no espectro da afidicolina, atribuídos aos hidrogênios metilênicos e do sinal em δ 1,22 (t, 3H) referente aos hidrogênios metílicos do grupo etila introduzido e pela presença de 22 carbonos no espectro de RMN ^{13}C (ANEXOS 17, 18 e 19). A obtenção do composto mono-etilado foi confirmada pela formação do aduto $[M+Na]^+ = 389,2674$ no espectro IES-EM. Neste caso, não é possível confirmar a posição exata de alquilação, entretanto, conforme discutido a seguir, em função da reatividade química conhecida para **1**, espera-se a alquilação preferencial em C-17.

O derivado di-etilado **12** apresentou sinais no espectro de RMN ^{13}C referentes aos grupos etila introduzidos δ 78,2, δ 74,9, δ 14,0 e δ 13,9. O espectro de 1H RMN de **12** apresenta sinais na região dos hidrogênios carbinólicos, δ 3,44 (q, 3H) e δ 3,42 (m, 1H), que antes eram inexistentes, referentes aos hidrogênios metilênicos introduzidos (ANEXOS 20, 21 e 22). O composto foi confirmado por IES-EM, fornecendo valor do aduto $[M+Na]^+ = 417,2972$.

Na reação com iodeto de metila sob as mesmas condições realizadas para obtenção dos derivados alquilados supracitados, foi obtido o derivado dimetilado **13**, sugerido com base no espectro de RMN 1H , que apresentou os sinais referentes as metilas δ 3,30 e δ 3,26 (ANEXO 23) e confirmado pelo espectro de IES-EM com aduto característico $[M+Na]^+ 389,2674$.

Apesar da necessidade de análises detalhadas para determinar a posição exata de entrada do grupo etila e n-butila, nota-se preferência reacional na hidroxila da posição C-17 em relação à posição C-18 em reações envolvendo afidicolina **1**⁴⁷.

Dentre as possíveis explicações para esse fato, existe a possibilidade de interação intramolecular de hidrogênio da hidroxila na posição C-3 e da C-18, formando um pseudo-anel de seis membros, bastante estável, o que dificulta a reação na posição C-18. A hidroxila

na posição C-17 também pode formar anel por interação intramolecular com a hidroxila na posição C-16, entretanto, o anel espiro formado, de cinco membros é considerado menos estável do que o anel citado anteriormente, como observado na figura 9. Além disso, a presença da metila na posição C-19 pode promover impedimento estérico para o ataque na posição C-18, favorecendo o ataque na posição C-17.

Figura 9- Representação das interações intramoleculares da afidicolina.

Apesar da relativa estabilidade do grupo de proteção utilizado (TBDMSCl) frente a bases, foi observada a desproteção das hidroxilas primárias, possivelmente pelo ataque nucleofílico do hidreto ao silício⁴⁸, formando alcóxidos reativos frente aos haletos de alquila. A clivagem do éter de TBDMS pode ser observada em reduções com emprego de hidreto de sódio, em casos onde haja emprego de aditivos como triamida de ácido hexametilfosfórico (HMPA) ou N,N'-dimetilpropilenourea (DMPU)⁴⁹. Apesar de não terem sido utilizados aditivos nas reações de alquilação, as condições reacionais empregadas, como tempo de reação e temperaturas mais elevadas (70°C), possivelmente favoreceram a desproteção das hidroxilas primárias, possibilitando o ataque ao eletrófilo (Esquema 13).

Esquema 13 - Mecanismo da reação de formação dos derivados alquilados de **1**, exemplificado pela formação de **12**.

A presença do grupo de proteção contendo átomo de silício de alguma forma favorece a reação de alquilação, uma vez que com o emprego de **1**, sob as mesmas condições reacionais, não foi observada formação dos derivados alquilados, com recuperação completa do material de partida.

Considerando o ineditismo desta metodologia “one-pot” de eterificação de álcoois protegidos sob a forma de éteres de silício, foram realizadas, sob as mesmas condições acima descritas, reações de alquilação utilizando outros compostos naturais e sintéticos como o L-mentol (terpeno) e lapachol (quinona), e os álcoois benzílicos e 2,4,5 trimetoxibenzílico para verificar a generalidade do método.

Primeiramente, foi realizada a proteção dos compostos supracitados, utilizando o método clássico de proteção de álcoois com TBDMSCl e imidazol, do qual foram obtidos os derivados protegidos destes compostos (Figura 10), confirmados por métodos espectroscópicos.

Figura 10 - Derivados protegidos do álcool 2,4,5 trimetoxibenzílico, L-mentol, lapachol e álcool benzílico.

Em seguida, foram realizadas as reações de alquilação, segundo o método geral adotado para reação com **4**. Surpreendentemente, foi observado que as reações de alquilação dos derivados protegidos **15**, **16** e **17** não ocorreram, recuperando-se os produtos de partida. Por outro lado, de forma inesperada, a reação de alquilação do álcool 2,4,5 trimetoxibenzeno protegido **14** (ANEXO 26) forneceu o dímero **22**, ainda não descrito na literatura, cujo mecanismo de reação sugerido envolve o acoplamento C-C (Esquema 14). Entretanto, a sugestão mecanística é complexa e deve envolver a formação de dois intermediários distintos, cujo acoplamento leva a formação do dímero. Em uma primeira etapa, ocorre a clivagem do éter de silício, formando os carbocátions **18** e **19**. Concomitantemente, ocorre a desprotonação do metileno para formar o carbânion **20**, e consequente ciclização para formar

21. O intermediário **21** sofre um rearranjo tipo *retro-brook*, para fornecer o carbânion que se liga ao carbocátion **19** e formar o dímero **22**, sugerido com base no espectro de RMN ^1H que apresenta os sinais δ 6,78 (s, 2H), 6,66 (s, 2H), referente aos hidrogênios aromáticos, e com integrais relativas com o dobro de hidrogênios esperados, bem como os hidrogênios metílicos dos grupos metóxi, 3,99 (s, 6H), 3,93 (s, 6H), 3,87 (s, 6H). A formação do composto **22** foi confirmada por **IES-EM** calculado para IES-EM $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 371,1471, encontrado: IES-EM $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 371,1477 (ANEXO 27).

Posteriormente, esta reação foi repetida, sem a adição do iodeto de n-butila, a fim de avaliar a formação do dímero apenas na presença de base, e a formação do mesmo composto foi confirmada pelos dados espectroscópicos acima descritos. Apesar disso, o método descrito para afidicolina não foi geral para outros compostos hidroxilados e, mesmo para o composto **14**, o mecanismo e a reatividade parecem seguir outra via.

Esquema 14 - Proposta mecanística de formação do dímero a partir do Álcool trimetoxi benzeno tratado com NaH .

Assim, conclui-se que as reações de alquilação da afidicolina empregando método clássico de eterificação de álcoois apresentaram baixos rendimentos, mostrando a baixa reatividade deste composto frente a bases. As reações ocorreram em sítios não esperados

(hidroxila em C-17 e C-18), visto que estes grupos estavam protegidos sob a forma de éter de silício.

4.4 Acilação

A semi-síntese de ésteres de **1** foi realizada com sucesso em trabalhos anteriores, empregando-se anidridos diversos^{38,50}. Assim, a fim de estudar a reatividade química e obter análogos com diferentes grupos acila, planejou-se a síntese do benzoato de **1**, com objetivo de aumentar a lipossolubilidade e o volume deste composto líder.

A esterificação de **1** foi realizada segundo metodologia clássica para esterificação de produtos naturais⁵¹, empregando p-dimetilamino piridina (DMAP) e cloreto de benzoíla, em piridina como solvente. A reação ocorreu rapidamente (1 hora), diferentemente dos outros métodos aplicados para **1**, e forneceu o derivado esterificado **23** em 75% de rendimento (Esquema 15).

Esquema 15 - Reação de esterificação da afidicolina com cloreto de benzoíla

A estrutura do composto **23** foi sugerida com base no espectro de RMN ¹³C (ANEXO 24), devido à presença dos sinais referentes à carboxila (δ 169,8) e aos carbonos aromáticos, (δ 144,0, 143,1, 133,1, 129,9, 126,5 e 106,7) e confirmada pelo espectro de IES-EM com formação do aduto $[M+Na]^+$:569,2877.

A formação do éster benzoato ocorre através de um mecanismo de substituição nucleofílica, via SN_2 , das hidroxilas primárias em C-17 e C-18 de **1** na carboxila do intermediário íon benzoil piridinium⁵² (Esquema 16). Em seguida, ocorre abstração do próton

das hidroxilas pelo cloreto, grupo de saída na etapa de formação do intermediário benzoil piridinium, e, por fim, a formação do éster di-benzoato **23**. Conforme esperado, a reação ocorreu nas posições menos impedidas estericamente.

Diferentemente das reações de alquilação, em que foram empregadas condições mais drásticas, com refluxo e 24 horas de tempo reacional, a obtenção do derivado acilado **23** mostrou-se rápida e com completa conversão da afidicolina, o que demonstra maior reatividade deste composto frente a este tipo de eletrófilos e sob esta condição reacional, visto que, diferentemente da reação de alquilação, não ocorre uma etapa inicial de desprotonação para posterior ataque nucleofílico.

Apesar de aparentemente puro, com formação de cristais durante a secagem em bomba de alto vácuo e pela eluição de apenas uma mancha na CCDC, o derivado **23** ainda apresentava resíduos de cloreto de tionila que interferiu nas análises espectroscópicas. O espectro de RNM ^1H apresenta sinais na região dos hidrogênios aromáticos com valores de integrais relativas incompatíveis com a formação do composto sugerido **23** (ANEXO 25). Neste sentido, o espectro de RMN ^{13}C foi analisado desconsiderando os sinais $\delta 170,6$, $133,3$, $130,0$, $128,4$, $129,7$, que, de acordo com base de dados espectroscópicos para compostos orgânicos, seriam referentes ao cloreto de tionila⁵³.

Esquema 16 - Proposta mecanística para formação do benzoil afidicolano **23**.

4.5 Estudos teórico preliminar da Reatividade Química de **1**

Em função das dificuldades metodológicas encontradas e do insucesso na formação dos produtos planejados, foi realizado um estudo preliminar teórico computacional, que fornecesse informações para justificar a baixa reatividade de **1** e derivados frente a bases e agentes redutores. Considerando que este não foi o escopo do trabalho, as informações aqui apresentadas servem para nortear futuras metodologias e são apresentadas de maneira geral, identificando pontos-chave, coerentes com os resultados experimentais encontrados.

Assim, com o intuito de se investigar a reatividade de **1** frente a reações com eletrófilos/nucleófilos foi realizada uma análise conformacional aplicando-se mecânica molecular. O confômero de menor energia foi submetido à otimização da geometria empregando-se o modelo B3LYP/6-31+G(d,p)³³ utilizando o programa Gaussian 03⁵⁴. Os efeitos relacionados ao sistema solvente (metanol) foram considerados empregando-se o

modelo da polarizabilidade contínua PCM³⁴. Esses estudos foram realizados em colaboração com o Dr. Ricardo Vessecchi (FCFRP-USP).

Pela análise das cargas atômicas (Figura 11) é possível sugerir que os sítios mais nucleofílicos são os átomos de oxigênio, sendo C(17)-OH, o mais reativo frente ao ataque de um eletrófilo. Nota-se, experimentalmente, que a posição C(17)-OH apresenta maior reatividade, considerando as reações de acetilação e proteção com TBDMSCl, o que corrobora com a distribuição de cargas atômicas do esquema anterior, que sugere que o sítio com maior eletrofilicidade é o da hidroxila em C-17, posto conter o átomo de oxigênio com maior densidade eletrônica na molécula de **1**.

Figura 11- Cargas atômicas obtidas empregando como sistema solvente MeOH

Em concordância, o átomo de hidrogênio dessa hidroxila é o sítio mais eletrofílico (ácido).

O potencial eletrostático mostra o grau com que uma carga puntiforme pode ser atraída/ repelida em uma dada região molecular, ilustrado na Figura 12.

Figura 12- Mapa do potencial eletrostático molecular (MEP). Regiões vermelhas são nucleofílicas (regem ataque de um eletrófilo, regiões básicas), regiões azuis são regiões eletrofílicas (regem ataque de um nucleófilo, região ácida).

A baixa reatividade frente ao ataque de um nucleófilo, pode estar relacionada à baixa afinidade eletrônica (0,07 eV), a qual pode ser observada pela baixa densidade do LUMO. Outro fator pode ser observado pela análise do potencial eletrostático, que indica uma maior concentração de regiões nucleofílicas e, portanto, maior potencial em sofrer reações com aproximação de um eletrófilo (nucleofílicas) do que com nucleófilos. Essa afirmação explica, portanto, os altos rendimentos das reações de proteção de **1** com TBDMSCl, a reação de oxidação com PCC e a de formação de oxima e de esterificação, uma vez que são substituições eletrofílicas em sítios reativos (hidroxilas em C-17, C-18, C-3). Por outro lado, nas reações de formação de éteres, utilizando iodetos de alquila de cadeias variadas e hidreto de sódio, observam-se rendimentos insatisfatórios, corroborando com a hipótese de que ataques nucleofílicos não são favorecidos nessa molécula.

Figura 13 - Representação das regiões HOMO e LUMO de **1**.

4.6 Estudo das reações envolvendo **1, descritas na literatura**

Com o intuito de aprofundar ainda mais o estudo de reatividade química de **1**, foi realizada uma revisão sistemática das reações semi-sintéticas deste terpeno, a fim avaliar a fidedignidade dos dados obtidos no estudo computacional e correlacionando aos resultados experimentais obtidos neste trabalho.

Tabela 2– Tipo de reação, número de ocorrências, e porcentagem de modificações semi-sintéticas envolvendo a afidicolina.

<i>Tipo de Reação</i>	<i>Ocorrências</i>	<i>% Total</i>	<i>Subtipo</i>	<i>Posição Carbono/Anel</i>	<i>Referências</i>
Acilação e processos relacionados	23	24,2%	Acetilação: 5	C-3, C-17, C-18	1, 3, 4, 5, 6, 7
			Crotonação: 1	C-17	1
			Tosilação: 8	C-17	2, 4
			Succínico: 1	C-17	5
			Outros: 8	C-3, C-17, C-16, C-18	4, 7
Oxidação	21	22,1%	Pfitzner-Moffatt: 6	C-17, C-18	1, 2, 4
			Corey-Schmidt: 4	C-3	1, 2, 4
			Jones: 6	C-3, C-16, C-17	1, 2, 5, 7
			Catalítica: 1	C-3, C-17	2
			Ácido periódico: 3	C-16	2, 5, 7
			Baeyer- Villiger: 1	C-16, C-17	7
Redução	6	6,3%	Catalítica: 3	C-18, C-2	2, 5
			Hidretos: 1	C-3	2, 7
			Wolff-Kishner: 2	C-16	7
Proteção	15	15,7%	Acetonido: 8	C-3, C-16, C-17, C-18	1, 2, 7
			TBDMSCl: 3	C-17, C-18	1, 2, 4
			MOM: 1	C-16	1
			MEM: 2	C-3, C-16, C-18	1
			Etilenodioxo: 1	C-16, C-17	7
Desproteção	5	5,2%			1, 2, 4, 7
Formação ligação C-C	6	6,3%	Grignard: 3	C-16, C-3	1, 2, 4
			Organo-lítio: 3	C-17	4
Transformação de grupo funcional	2	2,1%	Álcool a azido	C-17	4
			Álcool a tioéter	C-18	7

Desidratação	4	4,2%		C-3, C-15, C-16	1, 7
Eliminação redutiva	5	5,2%		C-17, C-18	1, 2, 7
Clivagem de anel	4	4,2%		D, A	2, 7
Heterociclização	4	4,2%	Epoxidação: 4	C-3, C-16, C-17, C-18	4, 7
Total	95	100			

1⁵⁵; 2⁵⁶; 3⁴⁷; 4³⁸; 5⁵⁰; 6⁵⁷; 7⁵⁸.

A revisão bibliográfica de reações envolvendo **1** indica que a molécula é muito pouco explorada quimicamente, ao contrário do observado para ensaios biológicos e farmacológicos, amplamente estudados. Desta forma, foi possível avaliar os tipos de modificações mais frequentes e correlacionar com as informações obtidas no estudo computacional prévio.

Observou-se a partir dos dados obtidos que a maior parte das reações envolve acilação e modificações relacionadas das hidroxilas de **1** (24,2% das ocorrências), sendo que a substituição na posição da hidroxila em C-17 mostrou-se presente em todas as acilações. Mecanicamente, estas reações envolvem o ataque nucleofílico da hidroxila ao eletrófilo do meio reacional utilizado. É importante destacar que para todos os casos a hidroxila em C-17 se mostrou reativa. Fazendo um paralelo com o estudo computacional, a hidroxila na posição C-17 mostrou-se a mais nucleofílica no estudo de distribuição de cargas atômicas, ou seja, mais reativa frente a eletrófilos, corroborando com os dados da literatura. Esse tipo de reação foi realizado com sucesso neste trabalho, indicando coerência com o estudo teórico e a observação da literatura

Outra classe de reações comuns para **1** são as reações de oxidação. Vários métodos são empregados sendo que métodos mais brandos, como Pfitzner-Moffat, promovem formação de aldeídos nas posições C-17 e C-18. O emprego de métodos mais drásticos, como o método de Jones, além da oxidação nas posições supracitadas, pode levar à oxidação em C-3. O tratamento de **1** com ácido periódico, com prévia proteção das hidroxilas nas posições C-3 e C-18, leva à oxidação da hidroxila na posição C-16, formando a cetona correspondente. A reação de oxidação também foi realizada com sucesso neste trabalho. Estas informações corroboram com o estudo de potencial eletrostático de **1**, que atribui às hidroxilas nas posições C-17 e C-18, seguidas de C-16 e C-3 como sendo regiões mais nucleofílicas na molécula.

Reações de alquilação e halogenação envolvendo **1** não são descritas na literatura, o que demonstra a importância das reações realizadas no presente trabalho para a compreensão da reatividade química deste terpeno. Nota-se que as reações de substituição envolvem apenas o ataque eletrofílico na molécula de **1**, como as reações de proteção e acilação. Algumas reações, como a Reação de Grignard, reafirmam os dados obtidos nos estudos computacionais de cargas atômicas, visto que ocorrem com derivados oxidados de **1**. Além disso, reações que envolvem uma etapa preliminar de desprotonação de **1** também não são descritas na literatura, sendo necessária formação de intermediário susceptível a reações com bases. A formação de derivado substituído com grupo azido na posição C-17, não foi reduzido como esperado,

possivelmente devido á dificuldade de empregar redução catalítica ou com hidretos nesta posição, para molécula semelhante a **1**.

Apesar do potencial terapêutico de **1**, poucos são os estudos envolvendo sua reatividade química, que pudessem explorar a derivatização deste terpeno à análogos, gerando informações para estudos de relação entre a estrutura química e atividade biológica.

A síntese total dessa molécula foi abordada em diferentes rotas e mecanismos, apesar do desafio sintético⁵⁹⁻⁶³, porém, novos derivados semi-sintéticos não foram obtidos nas últimas décadas.

Portanto, os estudos de reatividade química realizados no presente trabalho com obtenção de derivados inéditos de **1**, aliados ao estudo computacional de cargas atômicas, fornecem informações valiosas para o planejamento de futuras modificações da afidicolina.

4.7 Avaliação da atividade biológica

Os resultados biológicos preliminares (Tabela 3, Figura 14 e 15) em culturas de *Leishmania braziliensis* e *L. major* confirmaram a atividade da afidicolina **1** em espécies de *Leishmania* spp., como descrito em artigos anteriores^{10,11}, e demonstraram pela primeira vez, a atividade frente a *L. braziliensis*. O composto diprotetido **4** e a cetona **2**, conforme descrito na literatura, não apresentaram atividade leishmanicida^{9,11}.

A oxima **6** apresentou atividade similar a **1**, o que pode fornecer algumas informações preliminares sobre a relação entre a estrutura e a atividade leishmanicida deste composto. A presença de carbono com hibridização sp^2 na posição C-3 não elimina a atividade biológica como poderia ser concluído da perda da atividade do composto **2**. Além disso, a presença de átomo de hidrogênio ligado a átomo eletronegativo parece ser essencial para atividade, sugerindo a relação entre uma possível interação de hidrogênio e a atividade biológica, como visto nos compostos **1** e **6**.

Tabela 3- Resultados dos ensaios biológicos em culturas de *L.braziliensis* e *L.major* – Expressos em capacidade efetiva de 50% de atividade antiparasitária.
X= Ensaios não realizado, - = Não apresentou atividade

Composto	EC ₅₀ (μM) (<i>L. braziliensis</i>)	EC ₅₀ (μM) (<i>L.major</i>)	EC ₅₀ (μM) (<i>L.chagasi</i>)	Início de diluição
1	0,21	0,20	0,57	5μM
4	X	6309,57	X	5μM

2	156,0	-	-	5 μ M
6	0,53	-	-	5 μ M
Controle: G-418	0,007	0,4 x10 ⁻⁵	0,007	5 μ M

Nota-se, entretanto, a necessidade de se investigar a atividade dos compostos sintetizados contra a forma intracelular (amastigota) do parasita. Assim, será possível avaliar a capacidade dos compostos em atravessar as membranas da célula e inibir o crescimento da forma evolutiva presente no homem infectado, como descrito no ciclo de vida do parasita (Figura 3). Ensaios *in vivo* seriam interessantes para avaliar a biodisponibilidade dos análogos sintetizados, e sua capacidade de alcançar as células infectadas seletivamente²⁹.

Figura 14 – Valores de citotoxicidade CE₅₀ em μ M em culturas de macrófagos dos compostos **1** (esquerda) e **6** (direita).

Figura 15 – Curva dose resposta de **1** em culturas de *L. braziliensis*

Figura 16 – Curva dose resposta de **6** em culturas de *L. braziliensis*

Figura 17 – Curva dose resposta de **2** em culturas de *L. braziliensis*

Figura 17 – Curva dose resposta de **1** em culturas de *L. chagasi*

Figura 18 – Curva dose resposta de **6** em culturas de *L. chagasi*

Figura 19 – Curva dose resposta de **2** em culturas de *L. chagasi*

Nota-se que o composto **1** apresenta alta atividade contra *L. braziliensis* (0,2 μ M) e *L. major* (0,57 μ M), sem apresentar alta toxicidade em macrófagos. De forma similar, o composto **6** apresenta baixo valor de CE₅₀ contra linhagens de *L. braziliensis* (0,53 μ M), entretanto, sem apresentar atividade contra *L. chagasi*. Pode-se especular, portanto, que diferentes espécies apresentem mecanismos distintos de inibição por **1** e derivados, o que justificaria a inibição seletiva de **6** em linhagens de *L. braziliensis*. É importante salientar que a espécie *L. braziliensis* é o principal agente etiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil, espécie disseminada também por toda América Latina, por isso, de grande importância epidemiológica¹³. Assim, estudos com este protótipo, visando compreender as bases moleculares da inibição seletiva desta espécie, fornecem informações importantes sobre os requisitos estruturais para esta atividade, além de ser uma possível ferramenta para identificação de um alvo terapêutico exclusivo desta espécie. Dentre as vantagens do emprego de antibióticos espécie-específico, é a menor ocorrência de resistência cruzada com as outras espécies do gênero devido ao uso recorrente.

Apesar de **1** apresentar melhor atividade em relação ao derivado **6** frente a espécie *L. braziliensis*, nota-se melhor índice terapêutico do composto **6**, uma vez que sua citotoxicidade em macrófagos é de aproximadamente 3 vezes menor que a afidicolina. Sendo assim, o derivado **6** apresenta valor de EC₅₀ compatível com a de um composto líder (CE₅₀ ≤ 10 μ M) para *Leishmania* spp., entretanto, com melhor perfil terapêutico que seu produto natural de origem⁶⁴, sendo um candidato a protótipo leishmanicida.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho envolveu a semi-síntese de derivados da afidicolina para o desenvolvimento de uma biblioteca de compostos para fins de avaliação biológica e estabelecimento de padrão estrutural para atividade leishmanicida destes compostos. Nesse sentido, foram realizadas modificações na estrutura do composto protótipo, e foram obtidos 10 compostos, sendo 7 deles inéditos.

Apesar das diversas tentativas, não foi possível obter o derivado aminado **3**, em função da dificuldade de derivados de afidicolina reagirem em condições redutivas, conforme analisado pela literatura e pelas informações teóricas preliminares obtidas neste trabalho. A baixa reatividade de **1** também foi proeminente, sob as condições de eterificação de Williamson, e ao contrário do esperado foram obtidos derivados nas posições C-17 e C-18, mas não na posição C-3, como planejado. É importante considerar que a reação envolveu a eterificação direta de hidroxilas protegidas na forma de éteres de silício, e apesar do método não ser geral para outras moléculas, este relato é inédito na literatura.

Por outro lado, reações do tipo acilação, são comuns na literatura e se mostraram úteis na obtenção de éster e derivado sulfito neste trabalho.

A reatividade química de **1** frente a nucleófilos pode ser explicada pela baixa afinidade eletrônica e pela maior concentração de regiões nucleofílicas na molécula, justificando os baixos rendimentos das reações de alquilação, redução e substituição nucleofílica.

A revisão sistemática das reações semi-sintéticas envolvendo a afidicolina revelam a importância do presente trabalho para a exploração químico medicinal deste protótipo leishmanicida, visto os poucos estudos de síntese química descritos na literatura.

Quanto a atividade biológica, apesar de nem todos os compostos terem sido avaliados quanto às suas atividades leishmanicidas, foi observado que o composto **6** apresentou atividade próxima de **1**, com menor citotoxicidade. Apesar do composto **2** ser inativo, as informações obtidas indicam que a presença de carbono com hibridização sp^2 , na posição C-3, não exclui a atividade leishmanicida, como observado em **6**, o que sugere que a extensão da ponte de hidrogênio aceptora de hidrogênio parece ser essencial à atividade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brundret K, Dalziel W, Hesp B. X-ray crystallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: A tetracyclic Diterpenoid Containing a New Ring System. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications*. 1972 :1027-1028.
2. Gallo MBC, Chagas FO, Almeida MO, Macedo CC, Cavalcanti BC, Barros FW a, et al. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products. *Journal of basic microbiology*. 2009; 49(2):142-51.
3. Lopes A A., Pupo MT. Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2011; 22(1):80-85.
4. Bucknall R A, Moores H, Simms R, Hesp B. Antiviral effects of aphidicolin, a new antibiotic produced by *Cephalosporium aphidicola*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1973 Sep;4(3):294-8.
5. Spadari S, Focher F, Kuenzle C, Corey EJ, Myers a G, Hardt N, et al. In vivo distribution and activity of aphidicolin on dividing and quiescent cells. *Antiviral research*. 1985;5(2):93-101.
6. Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M, Oguro M, Nagano H, Mano Y. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature*. 1978;275(5679):458-60.
7. Huberman J a. New views of the biochemistry of eucaryotic DNA replication revealed by aphidicolin, an unusual inhibitor of DNA polymerase α . *Cell*. 1981 Mar;23(3):647-8.
8. Spadari S, Sala F, Pedrali-noy G. Aphidicolin : a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. *DNA Repair*. 1982; 29-32.
9. Edelson RE, Gorycki PD, MacDonald TL. The mechanism of aphidicolin bioinactivation by rat liver in vitro systems. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 1990; 20(3):273-87.
10. Kayser O. Nanosuspensions for the formulation of aphidicolin to improve drug targeting effects against leishmania infected macrophages. *International journal of pharmaceutics*. 2000 10;196(2):253-6.
11. Kayser O, Kiderlen AF, Bertels S. Antileishmanial Activities of Aphidicolin and Its Semisynthetic Derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45(1):288-292.
12. WHO. Control of the leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*. 2010 Jan;(949):xii-xiii, 1-186.

13. DATASUS [Internet]. *Departamento de Informática do SUS*. 2010 [citado 25Jan 2012]; Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>.
14. Shaw J. The leishmaniasis-survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):541-7. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17899628>
15. Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International journal for parasitology*. 2000; 30(12-13):1269-81.
16. de Almeida MC, Vilhena V, Barral a, Barral-Netto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003 Oct;98(7):861-70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762510>
17. Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis : Drug resistance and natural products. *Cancer Research*. 2008; 22:277-286.
18. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews Microbiology*. 2011; 11;9(8):604-615.
19. Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1989; 41(6):687-725.
20. WHO. Costs of medicines in current use for the treatment of leishmaniasis. 2010. [citado em 23 Jan 2012]; Disponível em: www.who.int/leishmaniasis
21. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. 2003 ; 19(11):208-508.
22. Vieira VMM, Ohayon P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D Innovation for pharmaceuticals and drugs: state of the art in Brazil and R&D policies. 2006;60-82.
23. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of natural products*. 2007;70(3):461-77.
24. Barreiro EJ, Bolzani V. Biodiversidade: Fonte Potencial para descoberta de fármacos. . *Química Nova*,. 2009;32(3):679-688.
25. Lima LM, Barreiro EJ. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current medicinal chemistry [Internet]*. 2005;12(1):23-49.
26. Chin CM, Ferreira EI, O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos. *Química Nova*, 22(1) (1999):75-84.
27. Nogrady T, Weaver D. Medicinal Chemistry: a molecular and biochemical approach. Oxford University Press, Inc.; 1988.

28. Meanwell N a. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. *Journal of medicinal chemistry*. 2011 Apr 28;54(8):2529-91.
29. Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Järvinen T, et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(3):255-70.
30. Bowden K, Izadi J. Short communication P r o d r u g s - P a r t 2 . Acylbenzoateesters of metronidazo l. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;13:995-1000.
31. Armarego WLF, Chai CLL. Purification of Laboratory Chemicals. 5th ed. Elsevier Inc.
32. Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology international*. 2005;54(2):119-22.
33. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*. 1993;98(7):5648.
34. Miertuš S, Tomasi J. Approximate evaluations of the electrostatic free energy and internal energy changes in solution processes. *Chemical Physics*. 1981;65(2):239–245.
35. Blagg, J. Structural alerts for toxicity. *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*, 2010.
36. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and Tempeture in Development of *Leishmania* parasites. *Ann. Rev. Microb*. 1994; 48:449-470.
37. Greene, Wuts. Protective groups in organic synthesis 4ed, 2007 - Greene & Wuts.
38. Ratcliffe A (inventor). Homocyclic derivaties -US5039710. Aug, 13, 1991.
39. Czajkowska D, Morzycki JW, Santillan R, Siergiejczyk L. Synthesis of “glycospirostanes” via ring-closing metathesis. *Steroids*. 2009; 74(13-14):1073-9.
40. Tremblay MR, Lescarbeau A, Grogan MJ, Tan E, Lin G, Austad BC, et al. Discovery of a potent and orally active hedgehog pathway antagonist (IPI-926). *Journal of medicinal chemistry*. 2009;52(14):4400-18.
41. Carey F, Sundberg R. Advanced Organic Chemistry - Structure and Mechanisms. Springer; 5a edição, 2002.
42. Copinga S, Cor T, Alan G. 2-Amido-8-methoxytetralins: A Series of Nonindolic Melatonin-like Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1993;:2891-2898.
43. Rohacova J, Marin ML, Martínez-Romero A, O'Connor J-E, Gomez-Lechon MJ, Donato MT, et al. Synthesis of new, UV-photoactive dansyl derivatives for flow cytometric studies on bile acid uptake. *Organic & biomolecular chemistry*. 2009;7(23):4973-80.

44. Hardacre C, Messina I, Migaud ME, Ness K a., Norman SE. 1,2-Cyclic sulfite and sulfate furanoside diesters: improved syntheses and stability. *Tetrahedron*. 2009;65(32):6341-6347.
45. Cakmak M, Mayer P, Trauner D. An efficient synthesis of loline alkaloids. *Nature chemistry*. 2011;3(7):543-5.
46. Shimizu H, Shimizu K, Kubodera N, Mikami T, Tsuzaki K, Suwa H. Industrial Synthesis of Maxacalcitol , the Antihyperparathyroidism and Antipsoriatic Vitamin D 3 Analogue Exhibiting Low Calcemic Activity Abstract . *Organic Process Research & Development*. 2005;2(4).
47. Ratcliffe A (inventor). Aphidicolane derivatives, their preparation and pharmaceutical compositions comprising them. European Patent 0112603B2. 18.03.1992
48. Glushka JN, Perlin a S. Formation of disaccharides related to heparin and heparan sulfate by chemical modification of maltose. *Carbohydrate research*. 1990;19;205:305-21.
49. Britain G, Press P, Shekhani MS, Khan KM, Mahmood K. + iO NaH / HMPA. *Tetrahedron*. 1988;:6161-6162.
50. Borrow A, Broadbent D, Carter S, Evans G, Hemming H, B H (inventor). Anti-viral Compounds. US 3761512.13.09.1973.
51. Geoffroy P, Ressault B, Marchioni E, Miesch M. Synthesis of Hoodigogenin A, aglycone of natural appetite suppressant glycosteroids extracted from Hoodia gordonii. *Steroids*. 2011;76(7):702-8.
52. Fersht AR, Jencks WP. The Acetylpyridinium Ion Intermediate in Pyridine-Catalyzed Hydrolysis and Acyl Transfer Reactions of Acetic Anhydride. Observation, Kinetics, Structure-Reactivity Correlations, and Effects of Concentrated Salt Solutions. *Journal of the American Chemical Society*. 1970;2286(9):5432-5442.
53. Yamaji T, Saito T, Hayamizu K, Yanagisawa, M Yamamoto O. Spectral Database for Organic Compounds SDB. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*. [Citado em 23 Jan 2012]. Disponível em: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng
54. Gaussian 03, Revision C.02, Frisch, M. J. *et al*. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
55. Hiranuma S, Shimizu T, Yoshioka H. Chemical Modification of Aphidicolin and the inhibitory effects of ots derivatives on DNA polymerase alpha in vitro. *Chem. Pharm. Bull*. 1987;(4):1641-1644.
56. Gordon JF, Hanson JR, Jarvisa AG, Ratcliffeb AH, Pharmaceuticals ICI, Park A, et al. Oxidation of Aphidicolin and Its Conversion into 19-Noraphidicolan-I. *J Chem Soc Perkin Trans I*. 1992; 18-21.

57. Arabshahi L, Brown N, Khan N, Wright G. Nucleic Acids Research Inhibition of DNA polymerase alpha by aphidicolin derivatives. *Nucleic Acids Research*. 1988;16(11):5107-5113.
58. Dalziel W, Hesp B, Stevenson KM. The Structure and Absolute configuration of the antibiotic aphidicolin: a tetracyclic diterpenoid containing a new ring system. *J.C.S Perkin Trans I*. 1973;(5):2841-2851.
59. Rizzo CJ, Smith AB, Chemical TM. A New End Game for Aphidicolin. *Tetrahedron Letters*. 1988;29(23):2793-2796.
60. Rizzo CJ, Smith AB. Aphidicolin Synthetic Studies: A Stereocontrolled End Game. *J.C.S Perkin Trans. I*. 1991;(4): 969-979.
61. Trost, I PT Nishimura, BM Yamamoto, Y, K, Mcelvain. Stereospecific Total Synthesis of Aphidicolin. *Journal of the American Society*. 1979;1330-1332.
62. Deslongchamps P. Total Asymmetric Synthesis of the Aphidicolin Derivative Using Tandem Transannular Diels – Alder / Aldol Reactions Guillaume Be. *Tetrahedron*. 2000;(1):1972-1974.
63. Toyota M, Sasaki M, Ihara M. Diastereoselective Formal Total Synthesis of the DNA Polymerase Inhibitor , Aphidicolin , Using and Intramolecular Diels – Alder. *Organic Letters*. 2003;(5):1193-1195.

7. ANEXOS

ANEXO 1- Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) da Afidicolina (1)

ANEXO 2 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) da Afidicolina (1)

ANEXO 3 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 4

ANEXO 4 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 5

ANEXO 5 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 5

ANEXO 6 - Espectro de Infravermelho (KBr) do derivado 5

ANEXO 7 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 2

ANEXO 8 – Espectro de infravermelho (KBr) do derivado 2

ANEXO 9 - Espectro de RMN ¹H (CD₃OD, 500 MHz) do derivado 6

ANEXO 10 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) do derivado 6

ANEXO 12 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do derivado 7

ANEXO 13 - Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CD_3OD) do derivado 7

ANEXO 14 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 10

ANEXO 15 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 10

ANEXO 16 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 10

ANEXO 17 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 11

ANEXO 18 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 11 **ANEXO 19 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 11**

ANEXO 20- Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 12

ANEXO 21 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 12

ANEXO 22 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) do derivado 12

ANEXO 23 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 13

ANEXO 24 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 125 MHz) do composto 23 e cloreto de tionila

ANEXO 25 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) do composto 23 e cloreto de tionila

ANEXO 26 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 14

ANEXO 27 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 22