UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

**Síntese e Aplicações Estratégicas de
Neurotoxinas
Produzidas por Cianobactérias**

Sidnei Moura e Silva

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Ernani Pinto

São Paulo
2009

Sidnei Moura e Silva

**Síntese e Aplicações Estratégicas de Neurotoxinas
Produzidas por Cianobactérias**

Comissão Julgadora
da
Tese para a obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ernani Pinto
Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, Abril de 2009

Síntese e Aplicações Estratégicas de
Neurotoxinas
Produzidas por Cianobactérias

Sidnei Moura e Silva

Abril de 2009

“... the art and science of total synthesis of the twentieth century, one is left with awe at its accomplishments and power...”

“As a practitioner of the art, one is filled with overwhelming pride to be part of such attractive and vigorous endeavors and apprehensive in being responsible for conveying its true meaning and value to society...”

E. J. Corey

Prof. Harvard University

Prêmio Nobel em Química em 1990 por suas contribuições no desenvolvimento de teorias e metodologias em síntese orgânica.

“A synthetic chemist, like an art and science of constructing the molecules of nature in the laboratory, may wish to exploit the opportunity that a challenging molecular architecture presents for the discovery and invention of new synthetic strategies and methods to be used in a wider range of applications.”

K. C. Nicolaou

Prof. University of California

A Deus, pela vida e persistência de nunca desistir...

A meus pais, pelas pessoas de bom coração que são por estarem sempre comigo em todos os momentos, pelos ensinamentos e incentivos...

A meus irmãos, que certamente são e serão meus melhores amigos para toda a vida...

Ao Prof. Dr. Ernani Pinto, que foi e continuará sendo um grande amigo. Agradeço muito por ter estado comigo durante toda esta etapa, seus ensinamentos ficarão para sempre, obrigado por sempre acreditar...

Ao Prof. Dr. Cláudio Martin, que é um grande amigo que esteve comigo desde minha iniciação científica e com certeza estará durante toda minha carreira científica....

A todos os amigos que passaram pelo laboratório, Fabiana, Felipe, Stella, Vanessa, Vinicius, Ariane, Regiane, Humberto, Paula, Meron e Raphael em especial a quatro meninas que estiveram sempre comigo Fabyana, Vania, Sara e Mariah...

Aos meus amigos do Solar que foram minha família durante este período, Tiago, Thiago, Fabriciano, Daniel, Ricardo, Enio, André, aos ex moradores, Rodrigo, George, Renato, Rafael, Mauricio... Além da tia Jandira... Se não fosse por estas pessoas e esta casa certamente tudo seria muito mais difícil, obrigado mesmo....

Aos amigos e funcionários do bloco 13B, em especial a dona Luzia e Dalva e ao Ângelo...

Aos Professores Mauricio Yonamine e Tânia Marcourakis, que estiveram sempre presentes...

A Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro aos projetos do laboratório, inclusive este...

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter concedido suporte financeiro durante este período...

Ao Prof. Dr. Bernard Luckas pela oportunidade de estágio em Jena-De...

A todas as outras pessoas que passaram pela minha vida durante este período, as quais não foram citadas aqui, mas que foram muito importantes.

Silva, Sidnei: Síntese e Aplicações Estratégicas de Neurotoxinas Produzidas Por Cianobactérias.

As cianobactérias apresentam distribuição variada e podem ocorrer desde as regiões frias do ártico até os trópicos, em corpos d'água doce e no ambiente marinho. Algumas espécies de cianobactérias produzem compostos com conhecida toxicidade, podendo causar efeitos deletérios em seres humanos e animais. Entre estes compostos estão os com atividade neurotóxica devido aos mais variados mecanismos de ação. O objetivo geral deste projeto é a obtenção por via sintética de algumas neurotoxinas e variantes, entre elas a β -N-metil-L-alanina (*L*-BMAA), anatoxina-a e anatoxina-a(s), bem como algumas aplicações.

Para a *L*-BMAA, foi buscada a determinação de rotas sintéticas viáveis para a obtenção deste aminoácido modificado sob a forma racêmica e enantiomericamente pura, além de um possível produto cíclico que pode ser gerado naturalmente a partir da *L*-BMAA. Algumas rotas estratégicas foram determinadas com êxito para a síntese destes compostos. Entre as aplicações dos produtos obtidos podem ser citados: (i) a determinação de um método analítico para a determinação deste aminoácido por RMN de ^1H ; (ii) um método analítico por LC-MS utilizando D_3 -*L*-BMAA como padrão interno e (iii) a indicação de um possível mecanismo de neurotoxicidade ligado a neurodegeneração via um intermediário produzido naturalmente do equilíbrio entre *L*-BMAA e íons bicarbonato.

Duas rotas sintéticas estratégicas foram traçadas para a anatoxina-a. Na primeira, que não foi bem sucedida, partiu-se de um biciclo já formado e em sua etapa chave deveria ocorrer à expansão de um anel tropânico que conduziria ao biciclo 1:2:4. Na segunda, tentou-se a síntese a partir de uma molécula extremamente simples, o 1,5-ciclooctadieno, e após cinco passos reacionais obteve-se a síntese total da anatoxina-a sob a forma racêmica. A etapa mais importante para essa rota foi a ciclização utilizando-se paládio divalente. Entre as possíveis aplicações dos produtos obtidos sugere-se: (i) o desenvolvimento de um método analítico por LC-MS utilizando D_3 -anatoxina-a como padrão interno e (ii) ensaios biológicos com os análogos para se determinar potencial agonista, antagonista ou agonista parcial de receptores nicotínicos para esses compostos.

A anatoxina-a(s) apresentou um grande desafio para a sua síntese total. Por se tratar de um organofosforado com uma parte alquílica heterocíclica, buscou-se primeiramente a sua síntese parcial. Assim, foi possível a síntese da guanidina cíclica sob a forma racêmica e quiral, além da obtenção de alguns compostos análogos inéditos. Para a síntese da *N*-hidroxiguanidina cíclica traçou-se duas diferentes rotas, uma enantioseletiva, partindo do aminoácido asparagina, e outra racêmica, com a utilização de álcool benzílico como material de partida. No entanto, apesar da produção de intermediários e análogos, não foi possível a obtenção do produto final. Entre as aplicações dos produtos sintéticos obtidos estão: (i) o desenvolvimento e validação de um método analítico para a quantificação indireta de anatoxina-a(s) utilizando a *N*-hidroxiguanidina cíclica como padrão e (ii) a utilização destes intermediários sintéticos em ensaios para se determinar os mecanismos de ação tóxicos, especialmente como inibidores de colinesterases.

Palavras chaves: cianobactérias, toxinas, anatoxina, N-beta-metil-aminoalanina, síntese orgânica.

Silva, Sidnei: Synthesis and Strategic Applications of Some Neurotoxins Produce for Cyanobacteria.

Cyanobacteria are aquatic and photosynthetic organisms that can be present in cold areas, such as the Arctic, as well as in tropical waters, in both marine and freshwater environment. They are important species for aquatic life and terrestrial ecosystems since they are on the base of the food web. However, some cyanobacterial species can produce toxic secondary metabolites that have deleterious effects for animals and human. These toxic metabolites are also called cyanotoxins and show different mechanisms of action ranging from hepatotoxic to neurotoxic effects. The aim of this study is the organic synthesis of some common neurotoxins, including some analogues, such as β -N-methyl-L-alanine (*L*-BMAA), anatoxin-a and anatoxin-a(s). Moreover, focus was given for some possible application of these compounds, especially as analytical standards for water monitoring.

Some synthetic routes were carried out in order to produce *L*-BMAA in both racemic and enantiomerically pure forms. Also, it was synthesized a possible cyclic analogue that may be formed *in vivo* from *L*-BMAA. The racemate and the pure *L*-BMAA were successfully obtained. Some possible application of these compounds were suggested: (i) the development of an analytical method based on ^1H NMR analyses for the determination of *L*-BMAA in environmental and biological samples; (ii) the development of an analytical method based on LC-MS for the determination of *L*-BMAA, using D_3 -*L*-BMAA as an internal standard, in different matrices and (iii) the indication of a cyclic derivative formed *in vivo* that can be involved in the neurotoxicity of *L*-BMAA.

Two strategies were planned in order to produce anatoxin-a. The first one was not successful and was started by using the bicyclic precursor. The crucial step was the expansion of tropanic ring to produce the 1:2:4 bicyclic anatoxin-a precursor. The second strategy was initiated with the 1,5 cyclooctadiene and after five reaction steps anatoxin-a was finally synthesized in its racemic form. The most important step for this route was the use of palladium. Similar applications were suggested for anatoxin-a: (i) the development of an analytical method based on LC-MS for the determination of anatoxin-a using D_3 -anatoxin-a as an internal standard in different matrices and (ii) the screening of anatoxin-a and analogues in bioassays based on nicotinic receptors in order to determine their agonistic and antagonistic mechanism of action.

The total synthesis of anatoxin-a(s) is still a challenge. This cyanotoxin is a natural organophosphate with an alkylic heterocyclic chain. Therefore, the first step was the production of the cyclic guanidine in both racemic and enantiomerically pure forms. Some cyclic guanidine derivatives were prepared via asparagine and/or benzilic alcohol. However, anatoxin-a(s) was not achieved. The use of the cyclic guanidine can be recommended for: (i) the development of an analytical method based on LC-MS for the indirect determination of anatoxin-a(s) using its alkylic chain as a standard after sample alkalization and (ii) the screening of anatoxin-a(s) derivatives in cholinesterase assays to determine their toxicity and mechanisms of action.

Key words: cyanobacterias, toxins, anatoxin, N- β -methyl-aminoalanine, organic synthesis.

Figura 1. Estrutura química da cilindroespermopsina	2
Figura 2. Estruturas químicas das neurotoxinas conhecidas	3
Figura 3. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente à BMAA sinteticamente obtida	9
Figura 4. Espectro de RMN de ^1H referente à BMAA sinteticamente obtida	10
Figura 5. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao composto 10 obtido por via sintética	15
Figura 6. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> para o produto da reação de <i>N</i> -metilação	16
Figura 7. Espectro de massas no modo MS^2 para o produto 16 obtido por via sintética	16
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H referente ao composto 29a obtido por via sintética	22
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C referente ao composto 29a obtido por via sintética	22
Figura 10. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> para o produto da reação da BMAA com uréia e óxido de zinco	25
Figura 11. Espectro de massas no modo MS^2 para o produto 38 obtido por via sintética	27
Figura 12. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> para o produto da reação de <i>N</i> -carbonilação do composto 38	28
Figura 13. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> para o produto da reação em um passo da para a possível formação da guanidina cíclica	28
Figura 14. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> para a guanidina cíclica 45 obtida sinteticamente a partir do procedimento em 5 passos descrito no Esquema 20.	30
Figura 15. Espectro de massas A) no modo MS^2 para o íon com m/z 145 e B) no modo MS^3 para o íon com m/z 99.1 referente ao produto 45 .	30
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H para o produto 45 obtido sinteticamente, utilizando CD_3CN como solvente. Os δ em ppm com relação ao TMS (0 ppm).	31
Figura 17. Demonstração do conceito de qRMN. A figura traz uma comparação entre as técnicas cromatográficas tradicionalmente utilizadas em análises químicas e a técnica espectrométrica (qRMN), adaptado de Pauli.	34
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de <i>p</i> -nitrofenilalanina (padrão interno)	35
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno em uma amostra de floração. Para esta análise foram adicionados BMAA e PI.	37
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno em uma amostra de cérebro de camundongos Balb/c. Para esta análise foram adicionados BMAA e PI.	38
Figura 21. Curva de calibração obtida para o método de determinação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno por RMN de ^1H	39
Figura 22. Estrutura química da D_3 -BMAA obtida por via sintética	41
Figura 23. Estruturas químicas da BMAA, <i>adduto</i> de BMAA e íons carbonato e do neurotransmissor glutamato	43

- Figura 24.** Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de determinação do possível equilíbrio entre BMAA e íons carbonato. Para esta foi utilizada uma concentração de 5:1 de carbonato com relação à BMAA 45
- Figura 25.** Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de determinação do possível equilíbrio entre BMAA e íons carbonato. Para esta foi utilizada uma concentração de 10:1 de carbonato com relação à BMAA 46
- Figura 26.** Espectro de massas no modo MS² referente ao íon com *m/z* 145 obtido durante o experimento de equilíbrio (40°C, 1h sob agitação) onde foi utilizado uma concentração 10 vezes superior de íons bicarbonato em relação a BMAA. No canto superior esquerdo esta representado um espectro de massas no modo MS² para o íon com *m/z* 145 referente a guanidina cíclica obtida sinteticamente. No canto inferior esquerdo esta representado a possível fragmentação sob ionização com *elektrospray* deste composto pela perda de COOH gerando o íon com *m/z* 99.1. 47
- Figura 27.** Espectros de RMN de ¹H comparativos A) para a guanidina cíclica 45 obtida sinteticamente e B) para o equilíbrio determinado por Nunn e O'Brien¹²⁶ entre BMAA e íons bicarbonato. Estes experimentos foram realizados em diferentes condições, como por exemplo, de solvente CD₃CN e D₂O respectivamente. Para os espectros plotados em B) o autor utilizou diferentes concentrações de bicarbonato em relação a BMAA. 48
- Figura 28.** Energias determinadas por cálculos semi-empíricos do tipo AM1 em *ab initio* Hartree-Fock com um nível de teoria de 6-31G para o equilíbrio entre a BMAA e íons carbonato 48
- Figura 29.** Energias determinadas por cálculos semi-empíricos do tipo AM1 em *ab initio* Hartree-Fock com um nível de teoria de 6-31G para o equilíbrio entre a BMAA e íons carbonato. Estruturas químicas em 3D 49
- Figura 30.** Estruturas químicas de alguns agonistas de receptores ionotrópicos conhecidos. Em destaque as similaridades com o possível intermediário cíclico gerado entre a BMAA e íons carbonato 50
- Figura 31.** A) Sistema pré-determinado de ligação dipolar do tipo “três pontas” para o glutamato no respectivo sítio receptor. B) Equilíbrio dipolar para o possível ciclo gerado da reação entre a BMAA e íons carbonato 50
- Figura 32.** Domínio externo do receptor ionotrópico do tipo NMDA, A) com os aminoácidos proteicos evidenciados e B) no formato 3D. 51
- Figura 33.** Estruturas químicas da anatoxina-a e homoanatoxina-a 55
- Figura 34.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de hidrólise do composto 46 62
- Figura 35.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de esterificação do composto 80 63
- Figura 36.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de formação da cetona 81, através da reação apresentada no Esquema 34 65
- Figura 37.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da primeira etapa para a formação do produto 81 através da reação apresentada no Esquema 35 66
- Figura 38.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de formação da β-lactama 86 74
- Figura 39.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de N-proteção da β-lactama 86 75
- Figura 40.** Espectro de massas no modo MS² do íon com *m/z* 252.0 referente a N-Boc-β-lactama 91 obtida por via sintética 75

- Figura 41.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de abertura da lactona através de uma reação de Grignard, formação do produto **109a** 76
- Figura 42.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de N-desproteção com ácido trifluoroacético, formação do produto **110a** 76
- Figura 43.** Espectro de massas no modo MS² do íon com *m/z* 168 referente a amino cetona **110a** obtida por via sintética 77
- Figura 44.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II que leva a formação do **60** sob a condição 10 apresentada na Tabela 5 82
- Figura 45.** Expansão do espectro de massas, *m/z* 150-185 referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II, que leva a formação do produto **60** sob a condição 7 apresentada na Tabela 5 82
- Figura 46.** Expansões dos espectros de massas, *m/z* 165-170 referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II, que leva a formação do produto **60** sob as condições 1-5 apresentadas na Tabela 5 83
- Figura 47.** Espectro de massas no modo MS² do íon com *m/z* 166.1 referente a anatoxina-a **60** obtida por via sintética 83
- Figura 48.** Tentativa de purificação da anatoxina-a através de cromatografia líquida de alta eficiência com análise de UV/Visível a um λ de 230nm. No espectro de massas representado no canto superior direito, podemos confirmar a presença da anatoxina-a após coleta do pico e antes do processo de evaporação do solvente. 85
- Figura 49.** A) Espectro de massas no modo MS² para o íon com *m/z* 180.1 referente a homoanatoxina-a obtida por via sintética. B) Caminho da fragmentação em *electrospray* para esta molécula. Esta segue o previamente determinado para a anatoxina-a. 86
- Figura 50.** A) Espectro de massas no modo MS² para o íon com *m/z* 169.1 referente a D₃-anatoxina-a obtida por via sintética. B) Caminho da fragmentação em *electrospray* para esta molécula. Esta segue o previamente determinado para a anatoxina-a. 87
- Figura 51.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de esterificação que conduz a formação do **105** 89
- Figura 52.** Espectro de massas no modo MS² do íon com *m/z* 183.9 referente a ester **105** obtido por via sintética 90
- Figura 53.** Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II que conduz a formação da metoxianatoxina-a **108** 91
- Figura 54.** Espectro de massas no modo MS² do íon com *m/z* 181.9 referente a metoxianatoxina-a **108** obtido por via sintética 92
- Figura 55.** Representação do processo normal de polarização/repolarização em um sistema colinérgico. O neurotransmissor ao ligar-se ao receptor conduz a uma abertura dos canais iônicos. Após, o mesmo é retirado do sítio através de uma reação de hidrólise conduzida pela acetilcolinesterase. 96
- Figura 56.** Representação do processo de polarização/repolarização em um sistema colinérgico quando em presença de anatoxina-a. Esta se liga ao receptor de forma irreversível, ou seja, não é hidrolisada pela acetil colinesterase conduzindo assim a um fluxo iônico contínuo. 97
- Figura 57.** Estrutura química da anatoxina-a(s), o único organofosforado natural conhecido. 102
- Figura 58.** Estruturas químicas de dois importantes produtos naturais que possuem guanidinas cíclicas como parte 104

Figura 59. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de transformação do ácido acetoamidoacrílico na amina 131 através de uma adição de Michael	107
Figura 60. Espectro de massas no modo MS ² do íon com <i>m/z</i> 105.2 referente ao composto 132 obtido por via sintética	108
Figura 61. Espectro de massas no modo MS ² do íon com <i>m/z</i> 284.3 referente ao composto 133 obtido por via sintética	108
Figura 62. Espectro de RMN de ¹ H referente ao composto 138 sinteticamente obtido	110
Figura 63. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de N-proteção para a formação do composto 139	113
Figura 64. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de formação da amida 140 através da reação do dimetil amina com o ácido 139	114
Figura 65. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de redução seletiva com Red/Al para a formação do composto 140	114
Figura 66. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de hidrólise do intermediário 161 para a formação do composto 150	119
Figura 67. Espectro de RMN de ¹ H referente ao composto 152 sinteticamente obtido	120
Figura 68. Espectro de massas no modo <i>Scan</i> referente ao produto da reação de hidrólise do intermediário 152 para a formação da diamina 153	131
Figura 69. Espectro de massas no modo MS ² do íon com <i>m/z</i> 346.1 referente ao composto 153 obtido por via sintética	131
Figura 70. Representação do processo de polarização/repolarização em um sistema colinérgico quando em presença de anatoxina-a(s). Esta se liga a enzima acetilcolinesterase inibindo a ação de hidrólise desta conduzindo assim a um fluxo iônico contínuo, pela permanência do neurotransmissor acetilcolina (não hidrolisado) no sítio de ação	124
Esquema 1. Procedimento sintético realizado por Vega & Bell. ²² para a formação da BMAA	8
Esquema 2. Procedimento sintético apresentado por Mirzayanova e col. ²⁹ com intuito de formação da diamina 7	8
Esquema 3. Análise retrosintética para a produção da <i>L</i> -BMAA a partir da <i>L</i> -asparagina.	12
Esquema 4. Proposta de síntese para a produção da <i>L</i> -BMAA a partir da <i>L</i> -asparagina	12
Esquema 5. Mecanismo proposto para a reação química de transformação de Hofmann	13
Esquema 6. Reação de <i>N</i> -trimetilação obtida por Iyengar & Bhattacharya	15
Esquema 7. Mistura de produtos obtidos através da tentativa de <i>N</i> -metilação seletiva do composto 15 através de adaptação do procedimento apresentado por Iyengar & Bhattacharya	16
Esquema 8. Análise retrossintética para obtenção da <i>L</i> -BMAA a partir da <i>L</i> -serina	18
Esquema 9. Metodologia utilizada por Ratemi & Venderas ³⁷ para a reação de abertura da lactona 20	19
Esquema 10. Procedimento realizado por Schneider e col. ⁴⁰ com a intenção da obtenção de teluretos e selenetos a partir da lactona 23	19

Esquema 11. Processo “ <i>in situ</i> ” proposto para a síntese em um passo da amina 29	20
Esquema 12. Esquema final dos compostos obtidos através do procedimento em apenas um passo determinado por Moura e Pinto.	20
Esquema 13. Mecanismo proposto para as reações sob condições de Mitsunobu onde são utilizados DEAD e trifenilfosfina sob condições controladas	21
Esquema 14. Possível retrossíntese da uréia cíclica a partir da <i>L</i> -BMAA.	24
Esquema 15. Esquema reacional promovido por Kim e Varma, ⁴⁹ com a intenção de formação do composto 32	25
Esquema 16. Resultado do primeiro procedimento testado em busca da uréia cíclica com a utilização de ZnO como catalisador	25
Esquema 17. Reação realizada por Provencal e col. ⁵⁰ com a intenção de obtenção do composto 37 .	26
Esquema 18. Reação de <i>O</i> -proteção para a formação do aminoéster 33 a partir do aminoácido 32 .	26
Esquema 19. Reação com a intenção de formação do produto 39 a partir do composto 38 .	27
Esquema 20. Procedimento proposto para a síntese da uréia cíclica a partir da <i>N</i> -Cbz-asparagina 40 .	29
Esquema 21. Equilíbrio químico entre <i>L</i> -BMAA e seu <i>adduto</i> formado pela adição de íons carbanium.	44
Esquema 22. Possível equilíbrio químico entre <i>L</i> -BMAA e íon carbanium gerando o ácido 1-metil-2-oxoimidazolidina-1-carboxílico como produto.	47
Esquema 23. Procedimento sintético promovido por Campbell e col. com a intenção de obter o produto 48 após uma reação de ciclo expansão	56
Esquema 24. Procedimento sintético apresentado por Wiseman & Lee. ¹¹² onde foi obtida a <i>N</i> -metil-anatoxina-a 48 .	57
Esquema 25. Ciclização intramolecular apresentada por Danheiser e col. para a obtenção do composto 53 .	58
Esquema 26. Procedimento sintético apresentado por Bates e Rapaport para a obtenção da anatoxina-a 60 através de uma ciclização intramolecular de imínio.	58
Esquema 27. Síntese conduzida por Tufariello e col. ¹¹⁷ para a síntese da anatoxina-a onde o passo chave é uma cicloadição de uma nitrona.	59
Esquema 28. Procedimento de metátese de eninos apresentada por Mori e col. ¹¹⁸ com intuito de formação da <i>N</i> -Ts-anatoxina-a	59
Esquema 29. Procedimento apresentado por Wegg e col. para a síntese da anatoxina, onde o passo chave é uma ciclo expansão do intermediário 73 .	61
Esquema 30. Análise retrosintética para a síntese da anatoxina-a 60 a partir do cloridrato de metil-3-(benzoiloxi)8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato 46 .	61
Esquema 31. Procedimento de hidrólise do material de partida 46 .	62
Esquema 32. Processo de esterificação do intermediário 79 através de reação de álcool metílico em meio ácido.	63

- Esquema 33.** Mecanismo proposto para substituição nucleofílica em uma reação de N-metilação para a formação de cetonas a partir de ésteres ou ácidos carboxílicos. 63
- Esquema 34.** Procedimento testado para a formação da cetona **81** a partir do ester **80** 64
- Esquema 35.** Possível rota sintética para a formação da cetona **81** passando pelo aldeído intermediário **82**. 65
- Esquema 36.** Possível procedimento sintético para a obtenção da cetona **81** a partir do ácido carboxílico **79** passando pelo intermediário formado pelo mesmo com *N,O*-dimetilidroxilamina. 67
- Esquema 37.** Resumo dos procedimentos sintéticos para uma possível síntese da anatoxina-a testados, onde o passo chave seria uma ciclo expansão. 68
- Esquema 38.** Análise retrosintética para a formação da anatoxina-a a partir do 1,5-ciclooctadieno. 68
- Esquema 39.** Estratégia sintética utilizada por Parsons e col.¹²⁴ para a obtenção da anatoxina-a a partir do 1,5-ciclooctadieno. 69
- Esquema 40.** Procedimento mais recente apresentado por Parson e col.¹²⁵ para a síntese da anatoxina-a a partir de 1,5-ciclooctadieno. 70
- Esquema 41.** Procedimento apresentado por Oh e col.¹²⁶ para a síntese do composto **98** a partir de uma ciclização intramolecular catalisada por Pd-II. 70
- Esquema 42.** Procedimento seguido por Trost & Oslob.¹²⁷ para a síntese da N-Ts-metoxianatoxina-a **104**. 71
- Esquema 43.** Procedimento sintético aplicado por Ho & Zinurova.¹²⁸ para a síntese da metoxianatoxina-a **108** a partir de 1,5-ciclooctadieno. 72
- Esquema 44.** Rota sintética proposta para a síntese da anatoxina-a e análogos a partir de 1,5-ciclooctadieno onde o passo chave é uma ciclização catalisada por Pd-II. 73
- Esquema 45.** Mecanismo catalítico genérico para reações catalisadas com espécie de Pd-II 78
- Esquema 46.** Procedimento catalítico aplicado por Tsuitsui e col. para a síntese do produto **113** utilizando espécies de Pd-II. 79
- Esquema 47.** Procedimento catalítico apresentado por Hegedus e col. para a síntese do produto **115** utilizando PdCl₂(MeCN)₂ 79
- Esquema 48.** Procedimento de ciclização demonstrado por Van Benthem e col. para a obtenção do produto **117**. 80
- Esquema 49.** Diversos compostos obtidos por reações catalíticas com Pd-II por Larock e col. Aqui percebemos a diversidade de compostos os quais são suscetíveis a essa espécie de reação catalítica. 80
- Esquema 50.** Fragmentação para anatoxina-a sob condições de ESI-MS proposta por Furey e col.¹³⁶ 84
- Esquema 51.** Mecanismo proposto para a reação catalizada por Pd-II para a síntese da anatoxina-a a partir do aminoéster **110**. 89
- Esquema 52.** Síntese do aminoéster **105** a partir da lactona **86** através de uma adição nucleofílica a carbonila. 90
- Esquema 53.** Síntese proposta para o biciclo **108** através de ciclização intramolecular catalisada por espécies de Pd-II. 90
- Esquema 54.** Possíveis compostos análogos da anatoxina-a gerados a partir do ester bicíclico **108**. 92

Esquema 55. Análise retrosintética para a síntese da anatoxina-a(s) a partir da parte alquilica (guanidina cíclica) e da parte fosforada.	104
Esquema 56. Procedimento realizado por Schreiber e col. para a síntese da guanidina cíclica 127 .	105
Esquema 57. Rota sintética determinada por Isobe e col. para a formação do produto 130	106
Esquema 58. Procedimento aplicado no intuito de obtenção da <i>N-Ts</i> -guanidina 133 a partir do ácido acetoamidoacrilico 1 .	106
Esquema 59. Transformação possível para a geração da parte alquilica sob a forma racêmica da anatoxina-a(s).	109
Esquema 60. Rota para a obtenção do composto 138 a partir da <i>N</i> -Fmoc-asparagina 135 .	109
Esquema 61. Reavaliação da análise retrossintética visando a síntese da anatoxina-a(s) a partir da <i>N</i> -hidroxiguanidina cíclica.	111
Esquema 62. Proposta de Síntese enantioseletiva para o composto 147 a partir da <i>L</i> -asparagina	112
Esquema 63. Transformação do <i>N</i> -protegido aminoácido 139 na amida 140 através de uma reação de substituição nucleofílica.	113
Esquema 64. Proposta sintética para o composto 147 sob a forma racêmica a partir do álcool benzílico 148 .	114
Esquema 65. Procedimento sintético para a obtenção da hidroxiftalimida 149 partindo da ftalimida 158	117
Esquema 66. Procedimento sintético alternativo para a síntese da hidroxiftamida 149 a partir do anidrido ftálico 160 .	117
Esquema 67. Procedimento de sintético para a formação da hidroxilamina 150 partindo do álcool benzílico 148 .	118
Esquema 68. Síntese do composto da hidroxiftalimida 150 baseado no método de Bonaccorsi & Giorgi. ²⁰⁴ onde o material de partida é cloreto de benzila 162 .	118
Esquema 69. Possível processo de hidrólise básica da anatoxina-a(s) gerando a <i>N</i> -hidroxiftalimida 147 .	123
Tabela 1. Dados da otimização do procedimento de síntese da <i>D,L</i> -BMAA a partir do ácido acetoamidoacrilico 1 .	10
Tabela 2. Efeito dos solventes na preparação de <i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -A ₂ pr segundo Waki e col.	14
Tabela 3. Otimização da reação de mono-metilação da diamina 15 .	17
Tabela 4. Parâmetros de validação do Método por RMN de ¹ H para a determinação de BMAA.	40
Tabela 5. Condições utilizadas para a otimização do processo de ciclização para a obtenção da anatoxina-a através de uma ciclização intramolecular sob catalise com Pd-II.	81

Tabela 6. Condições utilizadas para a otimização do processo de síntese do biciclo **108** através de uma ciclização intramolecular sob catalise com Pd-II. 91

Tabela 7. Associação entre os dados mais relevantes em relação à contaminação por anatoxina-a e os respectivos métodos utilizados para detecção. 94

L-BMAA: β -*N*-metil-*L*-alanina
BMAA: β -*N*-metil-*D,L*-alanina
NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato
BOC: tert-butildicarbonato
ESI-MS: espectrometria de massa com ionização por *eletrospray*
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
CG: cromatografia gasosa
DAP: ácido diaminopropionico
Cbz: benzilcloroformiato
TFA: ácido trifluoracético
RMN: ressonância magnética nuclear
TMS: tetrametilsilano
DMF: dimetilformamida
ACN: acetonitrila
THF: tetrahydrofurano
DCM: diclorometano
DEAD: dietilidrazodicarboxilato
DCC: dicitlocarboxidiamina
qRMN: ressonância magnética nuclear quantitativa
CE: eletroforese capilar
CCD: cromatografia em camada delgada
UV: ultravioleta
IR: infravermelho
Fmoc: 9-fluorenilmetil cloroformiato
SPE: extração em fase sólida

Código (Tese)	Estrutura química	Nomenclatura (iupac)	Referência*
1		Ácido 2-acetoamidoacrilico	22
2		Ácido 2-acetoamido-3-(metilamino)propionico	22
3		Ácido 2-amino-3-(metilamino)propanoico <i>D,L</i> -BMAA	22
8		Ácido (R)-2,4-diamino-4-oxobutanoico	28
9		Ácido (R)-4-amino-2-(benziloxycarbonilamino)-4-oxobutanóico	28
10		Ácido (R)-3-amino-2-(benziloxycarbonilamino)propanóico	29,30
16*		Ácido (R)-2-(benziloxycarbonilamino)-3-(metilamino) propanóico	-
17**		Ácido (R)-2-(benziloxycarbonilamino)-3-(dimetiamino)propanóico	-
18**		(R)-2-(benziloxycarbonilamino)-2-carboxi- <i>N,N,N</i> -trimetiletanaminium	-
27		Ácido (R)-2-(benziloxycarbonilamino)-3-hidroxiopropanóico	39
28		(R)-benzil-2-oxooxetano-3-il-carbamato	39
29 a-h***		Ácido (R)-2-amino-3-(benziloxycarbonil(alquil)amino)propanóico	-

38		2-amino-3-(metilamino)propionato de metila	48
39**		2-(metoxicarbonylamino)-3-(metilamino)propionato de metila	-
40		Ácido (R)-4-amino-2-(benziloxycarbonylamino)-4-oxobutanóico	49
41		Ácido (R)-3-(benziloxycarbonyl)-2-oxoimidazolidina-4-carboxílico	49
42		(R)-1-benzil-5-metil-2-oxoimidazolidina-1,5-dicarboxilato	49
43		(R)-1-benzil-5-metil-3-metil-2-oxoimidazolidina-1,5-dicarboxilato	49
44		Ácido (R)-3-(benziloxycarbonyl)-1-metil-2-oxoimidazolidina-4-carboxílico	-
45		Ácido (R)-1-metil-2-oxoimidazolidina-4-carboxílico	-
46****		3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-metilcarboxilato	109
79		Ácido 8-metil-8-azadicyclo[3.2.1]oct-2-ene-2-carboxílico	109
80		8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-metilcarboxilato	109

81**		1-(8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-en-2-il)etanona	109
82**		8-metil-8-azadibociclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carbaldeído	-
86		(Z)-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona	127
91		(Z)-tert-butyl-10-oxo-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-eno-9-carboxilato	126
109 a-d		(Z)-tert-butyl-8-acetilciclooct-4-alquilcarbamato R= Me (a), D ₃ C (b), Etil (c), CD ₂ CD ₃ (d).	126
110 a-d		(Z)-1-(8-aminociclooct-4-enil)-alquinona R= Me (a), D ₃ C (b), Etil (c), CD ₂ CD ₃ (d).	126
60 111 b-d		(E)-1-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-en-2-il)alquinona R= Me (a), D ₃ C (b), Etil (c), CD ₂ CD ₃ (d).	126
105		(Z)-8-aminociclooct-4-ene-metilcarboxilato	127
108		(E)-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-2-metilcarboxilato	127
131		Ácido 2-acetamido-3-aminopropanóico	-
132		Ácido 2,3-diaminopropanóico	190,191
133		Ácido 2-(tosilamino)imidazolidina-4-carboxílico	-

135		Ácido (R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)carboxilamino)-4-amino-4-oxobutanóico	194
136		Ácido (R)-2-(((9H-fluoren-9-yl)metoxi)carbonilamino)-3-aminopropanóico	29,30
139		Ácido (R)-10,10-dimetil-3,8-dioxo-1-fenil-2,9-dioxa-4,7-diazaundecano-5-carboxílico	-
140		(R)-10,10-dimetil-3,8-dioxo-1-fenil-2,9-dioxa-4,7-diazaundecano-5-dimetilamida	-
141		(S)-3-(dimetilamino)-2-(3-fenilpropanamido)-tert-butilpropilcarbamato	-
149		2-hidroxiisoindolina-1,3-diona	201
150		O-benzilidroxilamina	202
152		2-(2-(beniloxiamino)etil)isoindolina-1,3-diona	200
153		2-benziloxiamino)etanamina	200
154		N-(1-(benziloxi)imidazolidin-2-ilideno)-4-metilbenzenosulfonamida	-
161		2-(benziloxi)isoindolina-1,3-diona	200

* Para detalhes da metodologia aplicada verifique o capítulo MATERIAIS E METODOS ** compostos não isolados, sintetizados como misturas; ***uma série de oito diferentes compostos foram sintetizados; ****composto purificado por recristalização para futuro uso como material de partida.

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras, Esquemas e Tabelas	v
Siglas e Abreviaturas	xiii
Lista de compostos sintetizados	xiv
Sumário	xviii
Introdução e objetivos gerais	1
 <i>Capítulo 1. L-BMAA – Um aminoácido natural modificado com atuação em doenças neurodegenerativas</i>	 4
1.1 – Estratégias sintéticas	6
1.1.1 – Síntese racêmica	7
1.1.2 – Síntese quiral	11
1.1.3 – Síntese de um intermediário cíclico	23
1.2 – Aplicações estratégicas	31
1.2.1 – Determinação analítica através de RMN de ¹ H	32
1.2.2 – Determinação analítica através de LC-MS utilizando D ₃ -BMAA	40
1.2.3 – Sugestão de um possível mecanismo de ação neurotóxicos	41
 <i>Capítulo 2. Anatoxina-a e Homoanatoxina-a – Alcalóides agonista nicotínicos não seletivo extremamente tóxico</i>	 53
2.1 – Estratégias sintéticas	56
2.1.1 – Síntese via expansão de anéis tropanicos	60
2.1.2 – Síntese via ciclização intramolecular	68
2.1.3 – Síntese da metoxianatoxina-a	89
2.2 – Aplicações estratégicas	93
2.2.1 – Determinação analítica através de LC-MS utilizando D ₃ -anatoxina-a	93
2.2.2 – Mecanismo de ação tóxico e possíveis aplicações como fármacos	95
 <i>Capítulo 3. Anatoxina-a(s) – O único organofosforado natural conhecido, um potente inibidor irreversível da acetilcolinesterase</i>	 101
3.1 – Estratégias sintéticas	103
3.1.1 – Síntese de guanidina cíclica sob a forma racêmica e quiral	104

3.1.2 – Síntese da <i>N</i> -hidroxiguanidina cíclica a partir <i>L</i> -asparagina	111
3.1.3 – Síntese da <i>N</i> -hidroxiguanidina cíclica a partir do álcool benzílico	115
3.2 – Aplicações estratégicas	122
3.2.1 – Determinação analítica indireta usando um intermediário padrão interno	122
3.2.2 – Mecanismo de ação tóxico	123
Conclusões	125
Materiais e Métodos	128
Anexo 1: Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado	149
Anexo 2: Documento informando a cedência de amostra de intorpecente pelo instituto de criminalística de São Paulo	152
Anexo 3. Artigo publicado One-pot synthesis of <i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -BMAA and derivatives from <i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -serine	154
Anexo 4. Artigo aceito para publicação ¹ H NMR determination of β - <i>N</i> -methylamino- <i>L</i> -alanine (<i>L</i> -BMAA) in environmental and biological samples	158
Anexo 5. Artigo publicado Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina- <i>a</i> e seus análogos	165
Anexo 6. Artigo em fase de conclusão Synthesis of anatoxina- <i>a</i> and homoanatoxina- <i>a</i> in five steps, game over	172
Anexo 7. Artigo em fase de conclusão Pd-catalyzed synthesis of Methyl 9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-carboxylate as scaffold for futures agonists nAChR	176
Anexo 8. Artigo submetido para a publicação Synthesis of cyclic guanidines intermediate of anatoxin- <i>a</i> (<i>s</i>) in both racemic and enantiomeric pure forms	181

Referências

- As Referências seguem no rodapé das páginas seguindo a ordem em que aparecem no texto. Este formato está de acordo com as regras da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) para a localização das mesmas.

Aspectos Gerais

A grande complexidade ecológica e a evolução durante os milhares de anos de vida terrestre fizeram com que as algas existissem sob uma variada quantidade de espécies com uma ampla distribuição entre os ecossistemas marinhos e de água doce. As cianobactérias, assim como as macroalgas são de grande importância para a vida aquática e ecossistemas terrestres como organismos fotossintetizantes.¹ Algumas, possuem um importante papel no ciclo de nutrientes devido a sua inerente capacidade em fixar nitrogênio atmosférico, deixando-o amplamente disponível para outros organismos.²

As algas produzem diversos compostos como resultado do seu metabolismo secundário. Estes possuem potencial aplicação em áreas cosméticas e farmacêuticas. Estas aplicações são as mais variadas, sendo determinadas como possíveis antibióticos, antioxidantes, antiinflamatórios, fotoprotetores, entre outras.^{3,4}

Por outro lado, compostos com conhecida capacidade tóxica para humanos e animais em geral também podem ser produzidos.⁵ Um exemplo, é a toxina alcalóide hepatotóxica a qual tem sua estrutura química representada na **Figura 1**. Essa molécula, conhecida comumente como cilindroespermopsina pode ser isolada a partir de culturas de *Cylindrospermum raciborskii*.⁶ O composto tóxico citado só foi identificado após a contaminação acidental de aborígenes da Austrália, os quais apresentaram hepatointerite aguda e falência renal.⁷

¹ Foram, J.; Bronsnan, T.; Connor, M.; Delfino, J.; DePinto, J.; Dickson, K.; Humphrey, H.; Novotny, V.; Smith, R. Sobsey, M.; Stehman, S. *Environ Monit Assess* **2000**, 62, 147-167.

² Harvel, C. D.; Kim, K.; Burkholder, J. M.; Colwell, R. R.; Epstein, P. R.; Grimes, D. J.; Hofmann, E. E.; Lipp, E. K.; Osterhaus, A. D.; Overstreet, R. M.; Porter, J. W.; Smith, G. W.; Vasta, G. R. *Science*, **1999**, 285, 1505-1510.

³ Dunlap, W. C.; Yamamoto, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* **1995**, 112B, 105-114.

⁴ Dunlap, W. C.; Chalker, B. F.; Bandaranayake, W. M.; Wuwon, J. J. *Int. J. Cosmetic Scienc.* **1998**, 20, 41-51.

⁵ (a) Pitois, S.; Jackson, M. H.; Wood, B. J. B. *J. Environ. Health*. **2001**, 64, 25-32; (b) Karner, D. A.; Standridge, A. J. H.; Harrington, G. W.; Bamum, R. P. *J. Am. Water Works Ass.* **2001**, 93, 72-81; (c) Zagatto, P. A.; Aragão, M. A.; Carvalho, M. C.; Souza, R. C. R. *CETESB Série Manuais – 14*, **1997**.

⁶ Burjaa, A. M.; Banaigsb, B.; Abou-Mansour, E.; Burgessd, J. G.; Wright; P. C. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 46, 9347-9377.

⁷ Lagos, N.; Onodera H.; Zagatto, P. A.; Andrinolo, D.; Azevedo, S. M.; Oschima, Y. *Toxicon*, **1999**, 37 (10), 1359-1373.

Figura 1. Estrutura química da cilindroespermopsina

No Brasil há vários relatos de florações de cianobactérias ocorridas em águas doces em razão do aumento de nutrientes ocasionados principalmente por processos poluidores. O crescimento acelerado das cianobactérias, conhecido como eutrofização, pode acarretar graves problemas de saúde pública. O mais trágico incidente relacionado à cianotoxinas ocorreu na cidade de Caruaru-PE (açude Tabocas) onde houve um grande número de pessoas intoxicadas (por microcitas). Assim, vários pacientes que realizavam hemodiálise no Hospital de Caruaru vieram a óbito.⁸

Os mecanismos de toxicidade promovidos por esses metabolitos são os mais diversos podendo ser hepatotóxicos, neurotóxicos, dermatotóxicos ou promotores da inibição da síntese de proteínas.¹⁰ Os principais gêneros produtores de cianotoxinas são *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* e *Cylindrospermopsis*.⁹ No grupo das neurotoxinas podemos considerar: a) saxitoxinas e seus análogos, potentes inibidores seletivos dos canais de sódio e potássio;¹⁰ b) anatoxina-*a(s)*, um organofosforado natural que age como inibidor irreversível da acetilcolinesterase;¹¹ c) anatoxina-*a* e seu análogo etilado (homoanatoxina-*a*), os quais são potentes agonistas nicotínicos não seletivos do neurotransmissor acetilcolina,¹² e d) β -*N*-metil-*L*-alanina (*L*-BMAA), um aminoácido modificado que está associado a

⁸ (a) Domingos, P.; Rubim, T. K.; Molica, R. J. R.; Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W. *Environ. Toxicol.* **1999**, 14, 31; (b) Sant'Ana, C. L.; Azevedo, M. T. D. *Nova Hedwigia* **2000**, 71, 359; (c) Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M.; *J. Appl. Phycol.* **1994**, 6, 261; (d) Jochimsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J. S.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E.; Antunes, M. B.; De Melho Filho, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S.; Azevedo, S. M.; Jarvis, W. R. N.; *Engli. J. Med.* **1998**, 26, 873; (e) Pouria, S.; Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R. L.; Barreto, V. T. S.; Ward, C. J.; Preiser, W.; Poon, G. K.; Neild, G. H.; Codd, G. A.; *Lancet* **1997**, 352, 21.

⁹ (a) Codd, G. A.; *Water Sci. Technol.* **1995**, 32, 149; (b) Quilliam, M. A.; *J. AOAC Int.* **1999**, 82, 773; (c) Carmichael, W. W.; *Sci. Am.* **1994**, 270.

¹⁰ Catterall, W. *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, 20, 15.

¹¹ Mahmood, N. A.; Carmichael, W. W.; *Toxicon* **1987**, 25, 1221.

¹² Thomas, P.; Stephens, M.; Wilkie, G.; Amar, M.; Lunt, G. G.; Whiting, T.; Gallagher, P.; Pereira, E.; Alkondon, M.; Albuquerque, E. X.; Wonnacott, S. *J. Neurochem.* **1993**, 60, 6, 2308-2311.

doenças neurodegenerativas.¹³ As respectivas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Estruturas químicas das neurotoxinas conhecidas.

Entretanto, um fato preocupante é a dificuldade de obtenção de padrões analíticos destes compostos. Na maioria dos casos estes são obtidos via extração de cianobactérias produtoras. No entanto estas moléculas formam misturas complexas com outras de características físico-químicas similares, o que dificulta a separação.¹⁴

Objetivos Gerais

Desta forma, metodologias sintéticas viáveis para a produção destas toxinas e seus análogos se tornam uma alternativa. A grande vantagem do estudo de novas rotas de síntese é a preparação de uma quantidade maior dos compostos com alto grau de pureza.

Os objetivos gerais desse projeto são: a avaliação e produção de rotas sintéticas viáveis para a síntese total e/ou parcial de três neurotoxinas produzidas por cianobactérias. Entre elas a L-BMAA, Anatoxina-a e a Anatoxina-a(s) além de alguns análogos de interesse. Os produtos de síntese podem ser utilizados tanto no desenvolvimento de métodos de identificação, quanto em testes toxicológicos os quais devem servir para completa elucidação dos respectivos mecanismos de ação.

¹³ (a) Montine, T. J.; Li, K.; Perl, D. P.; Galasko, D. *Neurology* **2005**, 65(5), 768; (b) Banack, S. A.; Cox, P. A. *Neurology* **2003**, 61(3), 387.

¹⁴ Chorus, I.; Bartram, J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management*, **1999**, 416 pp.

Capítulo 1.

*L-BMAA – Um amino ácido modificado
com participação em doenças neurodegenerativas*

A β -*N*-metilamino-*L*-alanina (*L*-BMAA) é apontada como potente agonista de receptores de glutamato do tipo NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato).¹⁵ Sua neurotoxicidade se dá principalmente através de um mecanismo excitotóxico que ocorre por consequência de uma elevação dos níveis de cálcio e bicarbonato intracelular. Outros possíveis mecanismos neurotóxicos têm sido recentemente reportados, como por exemplo, ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo mGluR5, que agem através de uma cascata de sinalização para abertura de canais iônicos, ou ainda através da indução de estresse oxidativo.¹⁶

Esse aminoácido não protéico foi identificado como o produto do metabolismo secundário de algumas plantas, como a espécie Guam cicade (*Cycas micronesica*). Recentemente, a presença da *L*-BMAA foi confirmada em amostras provenientes de várias espécies de cianobactérias, principalmente no gênero *Nostoc*.¹⁷

Como objetivos específicos para a BMAA prevemos:

- Deteminação de um procedimento sintético viável para a obtenção deste aminoácido sob a forma racêmica;
- Determinação de um procedimento sintético viável para a obtenção deste composto sob a forma enantiomericamente pura;
- Determinação de possíveis métodos analíticos para os compostos sintetizados usando RMN, HPLC-MS e CG-MS;
- Possíveis ensaios toxicológicos para a *L*-BMAA e análogos os quais possam esclarecer os controversos dados apresentados na literatura para este composto.

¹⁵ (a) Brownson, D. M.; Mabry, T. J.; Leslie, S. W.; *J. of Ethnopharmacology* **2002**, 82(2-3), 159; (b) Andersson, H.; Lindqvist, E.; Olson, L. *Neuroreport* **1997**, 8(8), 1813.

¹⁶ Lobner, D.; Piana, P. M. T.; Salous, A. K.; Peoples, R. W. *Neurobiology of Disease* **2007**, 25, 360–366.

¹⁷ Cox, P. A.; Banack, S. A.; Murch, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 13380.

1.1. Estratégias sintéticas

Fato comum e relevante em estruturas químicas de aminoácidos é a presença de centros quirais. Assim, houve a necessidade de decidirmos por uma rota sintética capaz de gerar o composto como mistura racêmica (50% de *D* e 50% *L*) ou pela obtenção deste composto sob a forma enantiomericamente pura (*D* ou *E*).

A síntese enantioseletiva possui uma inegável relevância. Um bom exemplo disto foi o recente problema causado pela droga sintética talidomida[®].¹⁸ Neste caso, somente um dos enantiômeros era responsável pela função terapêutica, enquanto o outro possui atividade tóxica. No entanto, esse medicamento foi produzido e comercializado sob a forma racêmica, o que gerou graves problemas teratogênicos tardiamente elucidados.

A necessidade de resolução quiral depende da aplicação que será dada ao produto. Assim, uma molécula cujo objetivo é a utilização como padrão interno em um método analítico cromatográfico (*HPLC* ou *CG*), associado a um identificador de massas, não necessita de resolução quiral. Por outro lado, um composto cujo objetivo é ser avaliado quanto a atividade em sistemas biológicos necessita de resolução quiral, já que normalmente os sítios de ação possuem configurações ávidas a identificar essa característica.

Um dos grandes objetivos em síntese orgânica é a otimização de uma metodologia conhecida que conduza a uma molécula específica. Assim, rotas sintéticas capazes de formar produtos com resolução quiral são normalmente menos viáveis. Isso ocorre porque essas metodologias são mais trabalhosas (necessitam de mais tempo, possuem um maior número de passos reacionais, etc) e economicamente mais caras (precisam de reagentes específicos que ajam como indutores quirais, reagentes iniciais mais caros, consomem mais reagentes, etc). Portanto, não existe um procedimento sintético ideal para uma molécula específica, sendo todos os procedimentos passíveis de serem melhorados.

¹⁸ (a) Aleksandrov, P. N.; Bogdanova, V. A.; Chernukh, A. M. Federation proceedings. Translation supplement; selected translations from medical-related science **1966**, 25(5), 910-2; (b) Hauck, R. S.; Nau, H. Toxicology letters **1989**, 49(1), 41-8.

A relação entre processos hábeis em gerar resolução quiral e produtos naturais é muito próxima, devido à grande maioria dos compostos naturais possuírem assimetria. Ainda, rotas sintéticas para a produção de aminoácidos são difíceis, devido principalmente as características físico-químicas dos produtos formados.

Um exemplo claro disso foi o processo determinado por Gopin e col.¹⁹ para a produção do mono-metilado amino *N*-Boc-*L*-BMAA como um intermediário para a síntese total de alguns fármacos. Estes autores utilizaram DAP(*Boc*-*L*-2,4-diaminopropiônico) como material de partida em um procedimento em três passos reacionais com um baixo rendimento global.

Outros métodos alternativos para a obtenção de aminoácidos modificados têm sido propostos nos últimos anos. Pelo uso de *L*-serina, Chhabra e col.²⁰ reportaram uma síntese eficiente via formação de uma oxazolidina em um procedimento complexo, o qual, após oxidação com reagente de Jones conduziu à formação de um aminoácido *N*-protegido sem controle estereoquímico. Em outro método, a transformação da *L*-asparagina utilizando iodobenzeno diacetato produziu, via rearranjo de Hoffmann, o produto *N*-Cbz-3-diamino-*L*-alanina.²¹ Neste caso, o uso de reagentes caros e a necessidade de uma complexa *N*-alquilação conduziu à uma mistura de isômeros de posição tornando o método inviável.

Dessa forma, buscamos procedimentos “viáveis” avaliando as possíveis rotas sintéticas para BMAA e derivados sob a forma racêmica e enantiomericamente pura.

1.1.1 – Síntese racêmica

O primeiro método sintético para a produção da BMAA foi o desenvolvido por Vega & Bell em 1967.²² Nesse procedimento, o autor utiliza ácido acetoamidoacrílico como material de partida conforme apresentado no Esquema 1.

¹⁹ Gopin, A.; Raderb, C.; Shabat, Doron. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1853–1858.

²⁰ Chhabra, S. R.; Mahajan, A.; Chan, W. C. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4017–4029

²¹ Andruszkiewicz, R.; Walkowiak, A. *Org. Preparations Procedures Int.* **2001**, 33, 379–381.

²² Vega, A.; Bell, E. A. *Phytochemistry* **1967**, 6, 759-762.

i. CH_3NH_2 30% em água (50mL para 5g de **1**), 40°C , 72h; ii. HCl 2M (25mL), 2h.

Esquema 1. Procedimento sintético realizado por Vega & Bell²² para a formação da BMAA

Assim, na primeira etapa ocorre uma adição do tipo Michael.²³ Para este procedimento o autor necessita de 72h mantendo a mistura sob constante agitação a uma temperatura de 40°C . Este intermediário formado (**2**), que já tinha sua síntese reportada²⁴ não foi isolado, sendo utilizado logo em seguida no próximo passo reacional. Nesse ocorre uma hidrólise sob condição fortemente ácida. O produto gerado após o segundo passo foi a BMAA sob a forma racêmica com um rendimento de 71%. Para a purificação, foi determinado que após a evaporação do excesso de ácido clorídrico e água o composto formado foi recristalizado em álcool aquoso.

Com o objetivo de obtenção da forma racêmica desse aminoácido modificado (BMAA), Mirzayanova e col.²⁵ partiram de um aminoéster *N*-protegido e através de uma substituição nucleofílica do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$,²³ obtiveram um intermediário passível de ser transformado no composto desejado, conforme apresentado no Esquema 2.

Esquema 2. Procedimento sintético apresentado por Mirzayanova e col.²⁹ com intuito de formação da diamina **7**

Esse intermediário **6** foi *N*-desprotegido e posteriormente hidrolisado com ácido clorídrico para gerar o aminoácido desejado, além de outros derivados.

²³ Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Química orgânica - Vol 2*, 2005, 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos.

²⁴ Eiger, I. F.; Greenstein, J. P. *Arch. Biochem.* **1948**, 19, 467.

²⁵ Mirzayanova, M. N.; Medvedeva, I. V.; Fedulova, I. E.; Egorov, Ts. A.; Khorlin, A. Ya. *Seriya himicheskaya* **1976**, (7), 1603-1608.

Depois desta previa avaliação, elegemos o método de Vega & Bell²⁴ para ser reproduzido no laboratório com possíveis otimizações do procedimento em questão. Dessa forma, obtivemos êxito na formação da BMAA logo nos primeiros testes. Esse procedimento está descrito no capítulo **Materiais e Métodos** (bem como todos os processos sintéticos apresentados nesse trabalho). O produto obtido foi avaliado por espectrometria de massas utilizando *eletrospray* como método de ionização (Figura 3). No modo *scan* se observa o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z de 119.1, além de outros pequenos sinais. O sinal com m/z 102.1 é resultado de uma ionização na fonte do íon com m/z 119.1 sendo referente ao $[M - OH]^+$. Isso foi comprovado quando realizado um experimento no modo MS^2 do íon *quase-molecular*.

Figura 3. Espectro de massas no modo *Scan* referente à BMAA sinteticamente obtida.

Este produto foi avaliado ainda por Ressonância Magnética Nuclear utilizando o núcleo do hidrogênio para a análise (RMN de 1H). Aqui podemos verificar concordância entre os sinais esperados e os apresentados experimentalmente (Figura 4). Deslocamentos químicos δ (em ppm), desdobramentos, integrações e constantes de acoplamentos J (**H1** 2,66, singleto (*s*), 1H; **H2** 3,30, dubelto de dubleto (*dd*), 2H, J_{HH} 7,2 Hz; **H3** 3,88, (*dd*), 1H, J_{HH} 7,1 Hz), estão de acordo com o esperado para essa molécula.

Figura 4. Espectro de RMN de ^1H referente à BMAA sinteticamente obtida.

Na Tabela 1 temos a comparação entre o procedimento anteriormente relatado²² e algumas modificações nas condições reacionais testadas. Vale lembrar que o reagente metil amina adicionado em solução aquosa é extremamente volátil, o que inviabiliza o aumento de temperatura durante o processo, sendo essa uma variável não passível de otimização.

Tabela 1. Dados da otimização do procedimento de síntese da BMAA a partir do ácido acetoamidoacrilico **1**

Método original

tempo (h)	temperatura (°C)	[] reagente 1 ^a	[] reagente 2 ^b	rendimento (%) ^c
72	40	0,038 mol (1)	0,483 mol (≈13)	82
Otimização				
48	40	1	13	40
48	40	1	20	42
96	40	1	13	84

^a ácido α -acetoamidoacrilico; ^b metilamina; ^c rendimento do produto final, após a etapa de hidrólise.

A partir dos dados mostrados na Tabela 1 podemos observar que variando o tempo reacional e a concentração não obtivemos o resultado esperado. Este deveria ser um acréscimo no rendimento final da reação. Dessa forma, mantivemos as condições originais apresentada por Vega e Bell considerando as mesmas ideais para a síntese deste composto.²²

1.1.2 – Síntese quiral

A determinação de um procedimento viável para síntese deste composto sob forma enantiomérica pura (L-BMAA) também faz parte dos nossos objetivos. Para isto faz-se necessário uma previa avaliação de possíveis estratégias a serem utilizadas.

A síntese de compostos providos de centros quirais, como os aminoácidos, pode ser realizada através de duas vias:

- **Durante o processo** – Um centro quiral pode ser definido no decorrer da rota sintética, através de transformações induzidas por catalisadores os quais levam a formação de um determinado enantiômero preferencialmente, ou ainda através de reações induzidas por enzimas;

- **No início do processo** – Podemos iniciar um método a partir de um composto com um centro quiral resolvido. Para isto, este composto de partida deve manter a mesma configuração durante todas as etapas sintéticas até a geração do produto.

Na primeira via (*durante o processo*) estão normalmente os métodos com os maiores custos. Isso é devido ao alto valor comercial de indutores quirais capazes de gerar um excesso enantiomérico. Ainda, esses reagentes são extremamente seletivos, o que gera um maior tempo de otimização deste procedimento. Com relação às reações estereoespecíficas induzidas por enzimas, existe a necessidade de uma estrutura laboratorial específica para os procedimentos, com equipamento e métodos característicos. Todavia, também se tratam de reações bem específicas, algumas enzimas funcionam apenas para uma espécie de transformação, também precisando de um longo período de tempo para o processo de otimização.

O primeiro método apresentado na literatura para a síntese da *L*-BMAA foi desenvolvido também por Vega & Bell²⁶ através de indução enzimática. Para isso os mesmos, realizaram uma hidrólise seletiva no segundo passo reacional, Esquema 1. Esse mesmo método de síntese foi utilizado como base por outros pesquisadores com objetivo de obtenção de ¹⁵N-*L*-BMAA.²⁷ Após isto, nenhum outro método enantioseletivo para a síntese deste composto foi apresentado.

Dessa forma, resolvemos iniciar nossas tentativas com o propósito da síntese enantioseletiva da *L*-BMAA a partir de uma molécula com centro quiral resolvido. Em uma primeira tentativa partimos para uma possível transformação do aminoácido *L*-asparagina na molécula alvo, conforme o Esquema 3 para a retrosíntese.

Esquema 3. Análise retrosintética para a produção da *L*-BMAA a partir da *L*-asparagina.

Assim, propomos a seguinte sequência de transformações apresentada no Esquema 4 para a obtenção do nosso objetivo.

Esquema 4. Proposta de síntese para a produção da *L*-BMAA a partir da *L*-asparagina

²⁶ Vega, A.; Bell, E. A.; Nunn, P. B. *Phytochemistry* **1968**, 6, 1885-1887.

²⁷ Yulin, H.; Herman, Z. *J. of Lab. Comp. and Radioph.* **1990**, 28(5), 581-6.

Assim, o procedimento inicial foi uma *N*-proteção com benzilcloroformiato, uma reação bem conhecida e que não gerou grandes problemas. Seguimos para isto o que havia sido descrito por Zhang e col.²⁸ O intermediário **9** foi obtido com bom rendimento e grau de pureza, confirmado por determinação do seu ponto de fusão (163°C) e por espectrometria de massas.

Seguindo nossa proposta, no próximo passo se previa que uma transformação redutiva do tipo *Hoffmann* a qual deveria ser induzida por um reagente de iodo trivalente $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$ capaz de conduzir ao produto **10**.

Procedimentos com reagentes de iodo trivalente são bem conhecidos na literatura e amplamente utilizados com os mais variados objetivos. Trabalhos referentes à transformação de *N*-Cbz-*L*-asparagina (**9**) em ácido *N*-Cbz-3-amino-*L*-propiónico (**10**) apresentados na literatura se equivalem, com pequenas variações em termos dos solventes utilizados. O mecanismo dessa reação passa pela formação de um intermediário gerado após um ataque nucleofílico do nitrogênio da amida sobre o iodo eletrofílico.²⁹ Assim ocorre uma transformação do tipo *Hofmann* pela eliminação do bom grupo de saída conforme indicado no Esquema 5.

Esquema 5. Mecanismo proposto para a reação química de transformação de Hoffmann.

Waki e col.³⁰ em um interessante estudo metodológico, avaliaram a referida transformação com relação aos efeitos dos solventes, conforme Tabela 2.

²⁸ Zhang, Z.; Van Aerschot, A.; Hendrix, C.; Busson, R.; David, F.; Sandrab, P. Herdewijn, P. *Tetrahedron* **2000**, 56, 2513–2522.

²⁹ Yamamoto, Y.; Yatagai, H.; Maruyama, K. *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 10, 1746.

³⁰ Waki, M.; Kitajima, Y.; Izumiya, N. *Synthesis* **1981**, 266.

Tabela 2. Efeito dos solventes na preparação de N-Cbz-L-A₂pr segundo Waki e col.

Solvente (v/v)	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)
Dioxano/água 1:1	24	42
DMF/ACN/água 1:1:1	24	57
DMF/água 1:1	24	62
DMF/água 1:1 ^a	2	63

^a adicionado piridina (2eq).

Assim, buscamos repetir essa transformação seguindo estes dados previamente determinados. No entanto, após algumas tentativas com algum êxito, os baixos rendimentos (abaixo do apresentado na literatura) nos fizeram buscar alternativas. Dessa forma, chegamos até o método proposto por Zhang e col.³¹ que tem algumas diferenças em relação ao método anterior, como por exemplo a não utilização de base além do modo de purificação. Aqui, também obtivemos o produto desejado, no entanto com um rendimento ainda menor do que no primeiro método testado ($\geq 10\%$).

Alternativamente testamos outra metodologia, modificando a mistura de solventes utilizada (água e DMF 1:1). Mesmo sendo apenas uma pequena quantidade de DMF (8mL) tivemos problemas devido à baixa volatilidade do mesmo (ponto de ebulição= 154°C a 760 Torr). Esse fato dificultou a evaporação e conseqüentemente a purificação do produto de reação. Por este motivo, houve a necessidade de certo aquecimento mesmo sob vácuo para a evaporação do solvente, o que deve ter ocasionado uma possível quebra ou polimerização do produto de síntese. Novamente obtivemos o produto, da mesma forma com baixo rendimento e com alguns outros compostos não identificados como sub-produtos.

Independente da metodologia o produto foi obtido em pequenas quantidades. Na Figura 5 podemos confirmar a obtenção do composto **10** a partir de seu espectro de ESI-MS no modo *full scan*, onde vemos o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z 239 com grande intensidade.

³¹ Zhang, L-h.; Kauffman, G. S.; Pesti, J. A.; Yin, J. J. *Org. Chem.* **1997**, 62, 6918-6920

Figura 5. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao composto **10** obtido por via sintética

Mesmo com todas as dificuldades decidimos dar continuidade ao processo com a pequena quantidade de produto **10** obtido na transformação anterior.

Na próxima etapa o intermediário **10** deveria sofrer uma *N*-metilação (Esquema 4). São muitas as possibilidades para essa espécie de reação. Assim, testamos o mais comum buscando a necessária *N*-monometilação seletiva. Para isso, utilizamos o procedimento determinado por Iyengar & Bhattacharya,³² que obtiveram um sal quartenário de amônio a partir da reação de uma fenilalanina com vários equivalentes de iodo metano como agente metilante, conforme Esquema 6.

Esquema 6. Reação de *N*-trimetilação obtida por Iyengar & Bhattacharya.³⁴

Testamos algumas modificações nas condições apresentadas pelos autores acima mencionados com intuito de obter uma *N*-monometilação seletiva. O Esquema 7 indica a mistura de produtos, (di,tri)mono-*N*-metilados (**16**, **17**, **18**), obtidos mesmo utilizando apenas 1 equivalente do agente metilante (iodometano) em relação ao aminoácido protegido **15**.

³² Iyengar, R. R.; Bhattacharya, P. K. *Indian Journal of Chemistry, Section A* **1989**, 28A(6), 445-451.

Esquema 7. Mistura de produtos obtidos através da tentativa de N-metilação seletiva do composto **15** através de adaptação do procedimento apresentado por Iyengar & Bhattacharya.³²

Esse resultado foi avaliado por ESI-MS, conforme Figura 6. Assim é possível identificar a presença dos íons *quase-moleculares* [M + H]⁺ referentes a mistura dos compostos **15** *m/z* 238.9; **16** *m/z* 253.1; **17** *m/z* 267.1 e **18** *m/z* 281.9. Neste mesmo espectro percebe-se uma maior quantidade do composto trimetilado **18** em comparação aos demais componentes da mistura.

Figura 6. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de N-metilação.

Com o objetivo da confirmação estrutural do íon 253.1 referente ao composto **16** este foi submetido ao modo MS², Figura 7. Aqui temos os íons [M – OH + H]⁺ com *m/z* 235.9; [M – COOH + H]⁺ com *m/z* 208.1 e o [C₇H₇]⁺ com *m/z* 91 que fazem parte da ionização do composto isolado. Esses dados sevem para comprovar a formação do produto resultado de uma mono-N-metilação.

Figura 7. Espectro de massas no modo MS² para o produto **16** obtido por via sintética.

Após estes primeiros resultados, outras condições foram avaliadas para esta reação. Assim, buscamos agentes metilantes alternativos para aplicarmos nesta espécie de metodologia como, por exemplo, dimetil sulfato³³ e dimetil carbonato.³⁴ Em testes preliminares, estes reagentes também conduziram a misturas de produtos.

Considerando que as moléculas possuem estabilidades parecidas quando induzidas ao equipamento de massas com ionização por *eletrospray*, utilizamos o espectro no modo *full scan* para avaliar as relações dos produtos formados pelo tamanho relativo dos picos. A Tabela 3 indica as proporções dos produtos dessas tentativas de otimização do processo de N-monometilação.

Tabela 3. Otimização da reação de mono-metilação da diamina **15**.

1 eq. de agente metilante; temperatura ambiente (25°C); 2 horas.

Reação	Agente metilante	Base	solvente	15 (%) ^a	16 (%) ^a	17 (%) ^a	18 (%) ^a
1	CH ₃ I	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	58	21	14	7
2	CH ₃ SO ₃ H	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	71	16	11	2
3	(CH ₃ O) ₂ CO	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	51	28	12	9
4	CH ₃ I	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	40	38	12	10
5	CH ₃ SO ₃ H	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	65	21	10	4
6	(CH ₃ O) ₂ CO	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	60	31	7	2

2 eq. de agente metilante; temperatura ambiente (25°C); 2 horas.

7	CH ₃ I	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	25	44	11	20
8	CH ₃ SO ₃ H	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	35	31	14	20
9	(CH ₃ O) ₂ CO	K ₂ CO ₃	CH ₃ OH	30	38	14	18
10	CH ₃ I	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	20	51	18	11
11	CH ₃ SO ₃ H	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	34	43	15	8
12	(CH ₃ O) ₂ CO	(Et) ₃ N	CH ₃ CN	36	48	8	8

^a os números são referentes ao Esquema 7, onde o composto **15** representa o material de partida, **16** o produto de mono-N-metilação, **17** o produto de di-N-metilação enquanto o **18** representa o produto de tri-N-metilação.

³³ Huber, V. J.; Arroll, T. W.; Lum, C.; Goodman, B. A.; Nakanishi, H. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43(38), 6729-6733.

³⁴ (a) Selva, M.; Tundo, P. *Tetrahedron Letters* **2003**, 44, 8139-8142; (b) Selva, M.; Tundo, P.; Perosa, A.; Dall'Acqua, F. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2771-2777.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 3, é possível verificar que mudanças de agente metilante, bem como a base e o solvente, influenciam nas quantidades de produtos formados. Ao aumentar a quantidade de agente metilante (2eq) em relação ao material de partida (1eq), percebemos dados promissores. Por exemplo, na reação 10 obtivemos mais de 50% de produto de mono-*N*-metilação.

No entanto, a presença de mistura de compostos com propriedades físico-químicas semelhantes (principalmente entre os compostos **16** e **17**), dificultaram uma possível separação dos mesmos. Dos métodos apresentados na literatura como o de Grieco & Bahsas,³⁵ que utilizam um intermediário aminoácido ligado a um ciclopentadieno que sofre uma mono-*N*-metilação seletiva, ou o trabalho de Laplante & Hall,³⁶ que usa um sistema em fase sólida com a utilização de uma resina para o mesmo fim, são muito complexos e utilizam reagentes caros indisponíveis no laboratório. Após este fator limitante, baixo rendimento (no processo de rearranjo de *Hoffmann*, Esquema 5), além das misturas obtidas na fase seguinte (mono-*N*-metilação), nos fez procurar rotas sintéticas alternativas para a obtenção seletiva da L-BMAA.

Encontramos uma interessante metodologia para a funcionalização de aminoácidos que faz uso de uma lactona gerada a partir da Serina como intermediária sintética conforme o Esquema 8 para a retrosíntese.

Esquema 8. Análise retrossintética para obtenção da L-BMAA a partir da L-serina

O uso destes derivados de β -lactonas em síntese orgânica é funcional e amplamente empregado principalmente para a produção de aminoácidos modificados. Essa aplicação foi confirmada por Ratemi & Venderas,³⁷ que utilizaram nucleófilos fracos como trimetilsilanos para a obtenção de boa regioseletividade nessa espécie de reação em condições reacionais moderadas. Avaliando o método, percebemos que uma

³⁵ Grieco, P. A.; Bahsas, A. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5746-5749

³⁶ Laplante, C.; Hall, D. G. *Org. Lett.*, **2001**, 3, 10, 1487-1490.

³⁷ Ratemi, E. S.; Vederas, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7605-7608.

formação seletiva do aminoácido em relação à amida só foi obtida quando o autor utilizou THF e ACN como solventes, mantendo a temperatura em 20°C, Esquema 9.

Esquema 9. Metodologia utilizada por Ratemi & Venderas³⁷ para a reação de abertura da lactona 20

Recentemente, Schneider e col.³⁸ também utilizaram essa espécie de intermediário para a obtenção de aminoácidos substituídos com selênio e telúrio conforme Esquema 10.

Esquema 10. Procedimento realizado por Schneider e col.⁴⁰ com a intenção da obtenção de teluretos e selenetos a partir da lactona 23

Na mesma linha, Arnol e col.³⁹ já haviam realizado a abertura dessas lactonas utilizando amônia além de outros poderosos nucleófilos, como os metóxidos que reagem em ambos os carbonos eletrofílicos, o que gera uma mistura de compostos. Assim como o trabalho citado no Esquema 9,³⁷ modificações nas condições reacionais conduzem a uma inversão na proporção dos produtos amida/amina. As dificuldades para

³⁸ Schneider, A.; Rodrigues, O. E. D.; Paixão, M. W.; Appelt, H. R.; Braga, A. L.; Wessjohann, L. A. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1019–1021.

³⁹ Arnol, L. D.; Kalantar, T. H.; Vederas, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7105–7109.

a realização desse procedimento são principalmente devido à necessidade de condições extremamente controladas, já que a lactona precursora é muito reativa. Dessa forma, qualquer agente nucleofílico como água, por exemplo, pode conduzir a reação de adição eletrofílica que culmina na abertura da mesma. Ainda, outro problema com o método clássico de Mitsunobu é a purificação do produto, já que é formado como subproduto o dietilidrazodicarboxilato (a partir do DEAD). Este subproduto possui uma polaridade parecida com a lactona dificultando a sua separação do produto através de coluna cromatográfica. Em razão disto, testamos a formação da lactona “*in situ*”, ou seja, sem ser isolada, sendo submetida à segunda etapa da reação no mesmo frasco. Desta forma, esse procedimento poderia conduzir a obtenção de vários compostos pela simples modificação da alquilamina utilizada, Esquema 11.

Esquema 11. Processo “*in situ*” proposto para a síntese em um passo da amina **29**

Esse procedimento em “*one-pot*” gerou os produtos desejados, com a regioseletividade esperada. Isso ocorreu em condições reacionais moderadas principalmente de temperatura (0°C). No Esquema 12 apresentamos o resultado final, para este processo com a formação do produto de adição no carbono 3, ou seja, somente aminoácidos foram observados (**29 a-h**). Ainda, faz parte das condições moderadas a facilidade de adição das aminas na forma gasosa, por arraste com gás inerte (nitrogênio), já que todas possuem volatilidade suficiente para isso.

Esquema 12. Esquema final dos compostos obtidos através do procedimento em apenas um passo determinado por Moura e Pinto (Anexo 3).

O mecanismo para essa reação foi proposto por Ramer e col.⁴⁰ Este indicava a formação de um bom grupo de saída pela associação de uma trifenilfosfina “ativada” pelo dietilazodicarboxilato com hidroxila do ácido. Posteriormente, segundo o autor, deve ocorrer uma reação intramolecular com oxigênio da cadeia lateral que conduz a eliminação de óxido de trifenilfosfina e a formação da lactona, conforme apresentado no Esquema 13. Esse mecanismo é controverso. Recentemente Schenk e col.⁴¹ indicaram a formação de um possível intermediário cíclico para essa espécie de reação através de cálculos de densidade funcional.

Esquema 13. Mecanismo proposto para reações sob condições de Mitsunobu onde são utilizados DEAD e trifenilfosfina sob condições controladas

Com a possibilidade de formação de mistura de compostos (aminoácido/amida) como visto na revisão de literatura, procuramos um método de análise capaz de diferenciar os possíveis isômeros de posição formados. Análises de massas, por exemplo, não é uma boa opção, pois os produtos formados são isóbaros. Enquanto isso através de RMN de ^1H também não foi possível diferenciar estes possíveis compostos, já que os deslocamentos químicos provenientes dos sinais dos hidrogênios são muito parecidos (Figura 8).

⁴⁰ Ramer, S. E.; Moore, R. N.; Vederas, J. C. *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 706-713.

⁴¹ Schenk, S.; Weston, J.; Anders, E. *J. Ame. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12566-12576.

Figura 8. Espectro de RMN de ^1H referente ao composto **29a** obtido por via sintética.

A saída para esse problema foi à utilização de RMN de ^{13}C . Esta técnica é suficientemente sensível e capaz de diferenciar os sinais provenientes de um carbono carboxílico de um aminoácido (170-175 ppm) em relação a um carbono proveniente da carbonila de uma amida (163-167 ppm), Figura 9.

Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C referente ao composto **29a** obtido por via sintética.

Assim, podemos observar no espectro de RMN de ^{13}C do composto **29a** um sinal em torno de 171.5 ppm que pode ser atribuído como proveniente do carbono carbonílico de aminoácido. A partir desse espectro também podemos descartar a possibilidade de formação de mistura de compostos (amida/aminoácido). Isto é devido à ausência do sinal de um carbono carbonílico de amida.

Em conclusão, uma das vantagens deste procedimento é a retenção da estereoquímica a partir do material de partida. Assim, este método em um único passo conduziu aos produtos em bons rendimentos (68-81%). Se compararmos nossos rendimentos com o anteriormente reportado na literatura, por exemplo, para o composto **29a** obtivemos 78% em um passo, enquanto Ratemi & Venderas³⁷ obtiveram cerca de 70% em dois passos para a mesma molécula. Ainda, nosso método foi capaz de gerar uma série grande de compostos, sendo alguns ainda inéditos na literatura. Esse procedimento modificado gerou um artigo recentemente publicado, onde há todos os dados experimentais referentes às moléculas sintetizadas (Anexo 3).⁴²

Com esse método capaz de gerar a *L*-BMAA além de alguns análogos e o outro anteriormente citado baseado no procedimento de Vega & Bell²² capaz de gerar o produto sob a forma racêmica encerramos nossa busca por procedimentos sintéticos viáveis para a obtenção de *L*-BMAA e BMAA com o êxito desejado.

1.1.3. Síntese de um intermediário cíclico

Dando continuidade a pesquisa com a molécula de BMAA, buscamos estudar a produção sintética da uréia cíclica possivelmente formada em condições de equilíbrio desta molécula em meio básico. Acreditamos também, que a mesma é formada em condições fisiológicas através da reação desse aminoácido modificado com dióxido de carbono, conforme análise retrossintética apresentada no Esquema 14.

⁴² Moura, S.; Pinto, E. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2325-2327.

Esquema 14. Possível retrossíntese da uréia cíclica a partir da L-BMAA.

O objetivo da síntese deste composto relaciona-se com uma possível capacidade neurotóxica do mesmo. Mesmo sem dados experimentais que indicam isto, podemos ver algumas semelhanças com agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato já conhecidos.⁴³ Assim, prevemos uma série de experimentos os quais devem indicar a capacidade tóxica desta molécula como um possível mimetizador de receptores ionotrópicos. Dessa forma, poderíamos esclarecer os dados controversos que existem em torno da neurotoxicidade da L-BMAA.⁴⁴ Uma discussão mais aprofundada sobre a neurotoxicidade da L-BMAA bem como de uma possível neurotoxicidade da imidazolidina formada estão descritas mais a frente, onde comentamos as aplicações dos produtos de síntese obtidos.

Os métodos convencionais usados na preparação de uréias cíclicas, são baseadas em ciclizações de 1,2-diaminas com fosgênio⁴⁵ ou através de uma carbonilação oxidativa.⁴⁶ Entretanto, a grande toxicidade do fosgênio associado à indisponibilidade de mercado desse reagente, bem como a possibilidade de polimerização e explosão neste método de carbonilação oxidativa nos incentivaram a buscar novos procedimentos para esta síntese.

Um método ecologicamente correto e com amplo escopo descrito recentemente na literatura produz imidazolidinas diferentes, ciclizadas sob catalise com óxido de zinco e energia de microondas, Esquema 15.⁴⁷

⁴³ Watkins, J. C. *Biochemical Society Transactions*, **2000**, 28, 4, 297-310.

⁴⁴ Papapetropoulos, S. *Neurochemistry International* **2007**, 50, 998-1003.

⁴⁵ (a) Boon, W. R. *J. Chem. Soc.* 1947, 307; (b) Hayward, R. J.; Meth-Cohn, O. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 212-214; (c) Maclaren, J. A. *Aust. J. Chem.* **1977**, 30, 455-461.

⁴⁶ Qian, F.; McCusker, J. E.; Zhang, Y.; Main, A. D.; Chlebowsky, M.; Kokka, M.; McElwee-White, L. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4086-4092.

⁴⁷ Kim, Y. J.; Varma, R. S. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7205-7208.

i. ZnO, DMF, microondas, 10 min.

Esquema 15. Esquema reacional promovido por Kim e Varma,⁴⁹ com a intenção de formação do composto **32**

Como não possuíamos equipamento de microondas apropriado para síntese, realizamos alguns testes utilizando várias condições de aquecimento (25 – 100°C por até 10 horas). Isso só foi possível pela utilização de um solvente com alto ponto de ebulição. No entanto, somente foi possível observar a formação de um intermediário não cíclico como apresentado no Esquema 16, em diferentes proporções em relação ao material de partida.

i. ZnO, CO(NH₂)₂, 25-100°C, 2-10h.

Esquema 16. Resultado do primeiro procedimento testado em busca da uréia cíclica com a utilização de ZnO como catalisador

A formação do intermediário **34** (Esquema 16), bem como a manutenção de parte do material de partida foi identificada por espectrometria de massas como podemos verificar na Figura 10, onde [M + H]⁺ possui uma *m/z* de 161.8 u.m.a.

Figura 10. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação da BMAA com uréia e óxido de zinco

De acordo com os testes realizados, nem sob a condição mais drástica (10 horas a 100°C) conseguimos induzir a formação do produto. Cabe resaltar que além da energia de microondas o autor utilizava-se de altas pressões para obter o composto desejado.

Buscando novas alternativas chegamos ao trabalho de Provencal e col.⁴⁸ o qual utilizou etilcloroformiato para ciclização de uma diamino piridina conforme Esquema 17.

Esquema 17. Reação realizada por Provencal e col.⁴⁸ com a intenção de obtenção do composto **37**.

Em razão do nosso reagente de partida ser diferente do usado no trabalho anteriormente descrito, foi necessário uma etapa a mais em nossa rota. Aqui, em um primeiro estágio buscamos uma previa *O*-proteção do ácido carboxílico, já que esse poderia competir com a amina pela reação com o cloroformiato gerando uma mistura de produtos. O Esquema 18 demonstra essa reação de proteção.

Esquema 18. Reação de *O*-proteção para a formação do aminoéster **38** a partir do aminoácido **33**.

Avaliamos o produto formado por espectrometria de massas. Na Figura 11 verificamos o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ desse composto com m/z 133 no modo MS^2 , a partir do mesmo são gerados os íons $[M - NH_2]^+$ com m/z 116.2; $[M - OMe]^+$ com m/z 102.3; e $[M - COOMe]^+$ com m/z 73.3.

⁴⁸ Provencal, D. P.; Gesenberg, K. D.; Wang, H.; Escobar, C.; Wong, H.; Brown, M. A.; Staab, A. J.; Pendri, Y. R. *Org. Proc. Res. & Develop.* **2004**, 8, 903-908.

Figura 11. Espectro de massas no modo MS² para o produto **38** obtido por via sintética

Posteriormente, ao produto **38** foi adicionado etilcloroformiato e novamente aquecido sob condição de refluxo para que ocorresse a formação da amida **39** conforme Esquema 19.

i. ACN, refluxo, 2h.

Esquema 19. Reação com a intenção de formação do produto **39** a partir do composto **38**.

A molécula **39** também foi analisada por espectrometria de massas, Figura 12. Nesse espectro no modo *full scan* percebemos a formação do produto através do seu íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z 191.0. No entanto, também existe uma grande quantidade do éster de partida com m/z 133.1, como foi avaliado anteriormente. Se considerarmos que as moléculas possuem uma mesma estabilidade nas condições utilizadas durante a análise, podemos inferir que a formação do produto não passou de 20% de acordo com as intensidades dos sinais no espectro da Figura 12.

Figura 12. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de *N*-carbonilação do composto **38**

Mesmo após otimizar as condições reacionais de tempo e temperatura não obtivemos um maior rendimento para este procedimento.

Dessa forma mudamos a estratégia para esta transformação. Buscamos gerar o produto cíclico desejado em um único passo a partir do éster **38** (Esquema 14). Para isso, em um mesmo balão de reação foram adicionados o éster da L-BMAA, etilcloroformiato e a base *tert*-butóxido de potássio, com THF como solvente.

Através desse procedimento, obtivemos pequena quantidade da uréia cíclica desejada já hidrolizada, fato esse que pode ser confirmado pelo espectro de massas no modo *full scan* presente na Figura 13. Aqui observamos o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z 145, além do referente ao material de partida (m/z 133.1) bem como o ester intermediário (m/z 191).

Figura 13. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação em um passo da para a possível formação da guanidina cíclica.

Após esse resultado tentamos uma série de otimizações para essa reação, principalmente modificando a base utilizada e as condições de tempo e temperatura, sem obter os resultados desejados.

Buscando alternativas, chegamos até um procedimento recente que produz algumas imidazolidinas parecidas com a que estamos buscando a partir de uma asparagina *N*-protegida.⁴⁹ Assim, através de pequenas modificações na rota sintética demonstrada por Doyle e Colyer propusemos a metodologia definida no Esquema 20 a qual deverá conduzir a guanidina alvo **45**.

⁴⁹ Doyle, M. P.; Colyer, J. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 3601–3604.

Esquema 20. Procedimento proposto para a síntese imidazolidina a partir da N-Cbz-asparagina **40**.

Trata-se de um procedimento com maior número de passos reacionais, no entanto, com a grande vantagem de possibilitar a obtenção do produto sob a forma enantiomericamente pura.

Na primeira etapa, ocorreu uma interessante reação de ciclização através de um rearranjo de Hofmann conduzido por bromo em meio fortemente básico. Depois de vários testes, verificamos a necessidade de estrita equimolaridade entre o aminoácido protegido (material de partida) **40** e o bromo usado como reagente. Um pequeno excesso de bromo leva a formação de subprodutos os quais dificultam a purificação do produto. Assim, após o procedimento de síntese, o produto foi obtido como um sólido branco com um bom rendimento de 72%.

Posteriormente, este composto **41** passou por um processo de esterificação do ácido carboxílico lateral com intuito de proteger o mesmo para as próximas etapas. Para esta reação usamos o método clássico de esterificação utilizando cloreto de tionila em meio alcoólico. Este procedimento não causou nenhum problema, produzindo o produto **42** com um rendimento de 92%. Para a produção do composto **43** utilizamos iodometano como agente metilante. O produto foi obtido como um sólido de cor branca com ponto de fusão de 142°C.

Nas duas etapas posteriores foram realizadas *N*- e *O*-desproteções respectivamente. Aqui a maior dificuldade foi a procedimento de *N*-desproteção sendo para isto necessário a utilização de paládio sob carbono em um processo de redução. O inédito produto **45** foi obtido sob a forma de cloridrato como um sólido branco com

ponto de fusão de 156°C após recristalização com álcool etílico aquoso. A Figura 14 mostra o espectro de massas no modo *full scan* para o produto **45**. Aqui vemos o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com massa de 145.0 com boa intensidade.

Figura 14. Espectro de massas no modo *Scan* para a imidazolidina **45** obtida sinteticamente a partir do procedimento em 5 passos descrito no Esquema 20.

Para confirmar a estrutura química do produto, analisamos o mesmo no modo MS^2 e MS^3 também por espectrometria de massas. No modo MS^2 verificamos apenas a presença do íon com m/z 99.1 referente ao $[M - COOH]^+$ muito intenso devido a sua grande estabilidade. Seleccionando este íon e fragmentando o mesmo no modo MS^3 verificamos a perda esperada de CO formando o íon $[M - COOH - CO]^+$ com m/z 71.1 e com m/z 57.3 referente ao íon $[C_3H_7N]^+$.

Figura 15. Espectro de massas A) no modo MS^2 para o íon com m/z 145 e B) no modo MS^3 para o íon com m/z 99.1 referente ao produto **45**.

O espectro de RMN de 1H presente na Figura 16 também indica a estrutura química do produto **45**. Aqui vemos os sinais referentes aos hidrogênios H1-H3 com os deslocamentos químicos (δ em ppm em relação ao TMS 0) e integrações de acordo com o esperado para esta molécula.

Figura 16. Espectro de RMN de ¹H para o produto **45** obtido sinteticamente, utilizando CD₃CN como solvente. Os δ em ppm com relação ao TMS (0 ppm).

Assim, após varias tentativas obtivemos a imidazolidina por via sintética de forma enantiomericamente pura através de uma rota em cinco passos reacionais com um rendimento global de 26%. Através desta metodologia podemos obter ambos os enantiomeros além de alguns análogos que possam ser de interesse.

1.2 – Aplicações estratégicas

De acordo com nossos objetivos, algumas aplicações para os produtos obtidos sinteticamente foram buscadas. Entre essas, principalmente como padrões internos em métodos analíticos os quais são de grande importância no controle de qualidade de mananciais de água potável. Ainda, avaliações do mecanismo de ação tóxica e/ou de algumas atividades farmacológicas foram estudadas.

1.2.1 – Determinação analítica através de RMN de ¹H

O aminoácido modificado β-N-metilamino-L-alanina foi recentemente detectado em altas concentrações em tecidos encefalicos de pacientes canadenses com ALS/PDC (*Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-*

Dementia Complex).⁵⁰ A L-BMAA é biosintetizada por algumas espécies de cianobactérias principalmente do gênero *Nostoc ssp.*⁵¹ e supostamente se acumula em tecidos vivos e é associada a proteínas através de processos de biomagnificação.⁵² Por esse risco eminente há a necessidade de avaliação de possíveis contaminações através dessa molécula simples. Entre nossos objetivos esta a produção de um método de análise com boa especificidade para a quantificação da BMAA.

Alguns métodos analíticos específicos para este composto têm sido descritos na literatura. Por exemplo, Kisby e col.⁵³ desenvolveram um procedimento utilizando HPLC para a determinação deste aminoácido em tecidos de plantas e animais. Nesse processo a L-BMAA foi derivatizada com 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) com intuito de produção de um intermediário fluorescente e estável capaz de ser detectado. Pan e col.⁵⁴ avaliaram L-BMAA e outros aminoácidos não protéicos a partir de sementes de *cicad* utilizando *N*-etoxicarbonil etilesteres derivados em um método por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas. Mais recentemente, Guo e col.⁵⁵ também analisaram esse composto por CG-Ms depois de uma derivatização com etilcloroformiato.

Para a avaliação quantitativa de um determinado composto podemos lançar mão das mais variadas metodologias analíticas as quais relacionam-se de forma direta com as características da molécula. Estas têm surgido para os mais diversos fins e sido melhoradas com o passar dos anos.⁵⁶ Entre elas podemos destacar a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A história de sucesso dessa técnica, nas mais diversas áreas, iniciou em 1945 com o descobrimento do fenômeno em sólidos por Purcell,⁵⁷ Bloch⁵⁸ e seus respectivos colaboradores. Nos anos posteriores foram identificadas algumas características da técnica que a tornou atrativa principalmente para aplicações em

⁵⁰ Murch S. J., Cox P. A., Banack S. A., Steele J. C., Sacks O.W. *Acta Neurol. Scand.* **2004**, 110 (4), 267–269.

⁵¹ Cox, P. A.; Banack, S. A.; Murch, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100 (23), 13380–13383.

⁵² Cox, P. A.; Banack, S. A.; Murch, S. J.; Rasmussen, U.; Tien, G.; Bidigare, R. R.; Metcalf, J. S.; Morrison, L. F.; Codd, G. A.; Bergman, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, 102 (14), 5074–5078.

⁵³ Kisby, G. E.; Roy, D. N.; Spencer, P. S. *J. Neurosci. Methods*, **1988**, 26 (1), 45–54.

⁵⁴ Pan, M.; Mabry, T. J.; Cao, P.; Moini, M. *J. Chromatogr. A*. **1997**, 787 (1,2), 288–294.

⁵⁵ Guo, T.; Geis, S.; Hedman, C.; Arndt, M.; Krick, W.; Sonzogni, W. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2007**, 18 (5), 817–825.

⁵⁶ Harris, D. C. *Quantitative chemical analysis* **1995**, Ed New York. US. 4. ed. 837 p.

⁵⁷ Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37–38.

⁵⁸ Bloch, F.; Hansen, W. W.; Packard, M. *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127.

química.⁵⁹ Nos dias de hoje, RMN em solução possui um importante papel principalmente na determinação estrutural e em procedimentos de análise quantitativas, os quais podem variar principalmente em relação às dimensões,⁶⁰ gradientes⁶¹ e pulsos⁶² utilizados.

Em particular, o conceito de qRMN (RMN quantitativo) oferece algumas vantagens em relação aos métodos cromatográficos tradicionais utilizados em análises quantitativas (HPLC e CG). Em particular, estas técnicas cromatográficas dividem um ângulo comum de visão buscando distinguir o analito das impurezas, servindo assim para o isolamento e quantificação. Enquanto isso, qRMN é um sistema integrado de ambos os níveis moleculares, ou seja, um método baseado em ressonância que além de quantificação traz informações estruturais (de acordo principalmente com deslocamento químico, acoplamento e multiplicidade dos sinais). Assim, através do mesmo é possível analisar estruturalmente tanto o analito como as impurezas presentes em uma amostra. Na Figura 17, adaptada de Pauli⁶³ podemos ter uma visão mais avançada do conceito de qRMN.

Figura 17. Demonstração do conceito de qRMN. A figura traz uma comparação entre as técnicas cromatográficas tradicionalmente utilizadas em análises químicas e a técnica espectrométrica (qRMN), adaptado de Pauli⁶³

⁵⁹ (a) Emsley, J. W.; Feeney, J. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrom.* **1995**, 28, 1-9; (b) Shoolery, J. N. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrom.* **1995**, 28, 37-52.

⁶⁰ Martin, G.; Crouch, R. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1-70.

⁶¹ Kay, L. E. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, 63, 277-299.

⁶² Berger, S. *Prog. Nucl. Magn. Res. Spectrom.* **1997**, 30, 137-156.

⁶³ Pauli, G. F. *Phytochem. Anal.* **2001**, 12, 28-42.

A utilidade do RMN para análises quantitativas de misturas complexas é bastante conhecida e incluem contaminantes em água,⁶⁴ agroquímicos,⁶⁵ compostos farmacêuticos⁶⁶ e drogas em geral. Quantificação de produtos naturais através de RMN como anatoxina-*a* tem sido interessante por causa das características do método.⁶⁷ Entre essas, podemos destacar principalmente a não necessidade de derivatização, a preservação da amostra analisada e a sensibilidade a micrograma de amostra. Outras toxinas como saxitoxinas (PSP, paralytic selfish poisoning), ácido domoico, ácido okadaico tem sido avaliados simultaneamente através de RMN de ^1H utilizando-se calibração externa.⁶⁸

Assim, buscamos a aplicação de RMN para a quantificação da BMAA. Para isso, utilizamos o produto sintetizado no laboratório como padrão analítico em um método por RMN de ^1H capaz de detectar possíveis contaminações por esse composto em diferentes matrizes. Para isso, *p*-nitrofenilalanina foi utilizada como padrão interno e extração em fase sólida (SPE) como método de concentração da amostra.

O método mostrou-se sensível para a quantificação de pequenas quantidades de L-BMAA e preciso devido à característica da integração do sinal do ^1H RMN. Como pode ser observado na Figura 18, a integração dos sinais dos prótons N-CH₃ da L-BMAA, com δ de 2.74 ppm, são diretamente proporcionais aos prótons Ph-H₂ do *p*-nitrofenilalanina (padrão interno) com δ de 7.54 ppm.

⁶⁴ Fulton, D. B.; Sayer, B. G.; Bain, A. D.; Malle, H. V. *Anal. Chem.* **1992**, 64, 349-353.

⁶⁵ Maniara, G.; Rajammorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. W. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4921-4928.

⁶⁶ Göger, N. G.; Parlattan, H. K.; Basan, H.; Kerkkan, A.; Özden, T. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 685-689.

⁶⁷ Dagnino, D.; Schripsema, J. *Toxicon* **2005**, 46, 236-240.

⁶⁸ Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3123-3131.

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de p-nitrofenilalanina (padrão interno)

Procedimentos analíticos por RMN de ^1H necessitam a utilização de solvente deuterado (para que não ocorra interferência dos spins magnéticos dos prótons do solvente), sendo necessário que nem o mínimo resíduo de solvente não deuterado influencie na análise.

Por se tratar de uma molécula altamente polar, em nossa metodologia utilizamos D_2O como solvente. Cabe ressaltar que H_2O residual possui um sinal com δ (deslocamento químico) de 4.70 ppm. Assim, os sinais escolhidos para a quantificação, referentes à BMAA e ao padrão interno, com δ de 2.71 e 7.06 ppm respectivamente possuem uma boa distância desse sinal residual que poderia causar uma interfência na análise.

O padrão interno utilizado por nós foi o aminoácido 4-nitro-*D,L*-fenilalanina, o qual foi escolhido por possuir certas características necessárias para esse propósito. Trata-se de um composto facilmente disponível, relativamente barato, com baixa

volatilidade, solúvel nos mesmos solventes do analito e principalmente possui propriedades físico-químicas similares à L-BMAA sendo passível de ser extraído na mesma fração.

Dentre outras precauções específicas a serem adotadas neste tipo de técnica analítica, está a determinação de um tempo de reciclo adequado (tempo entre os pulsos de rádio frequência) necessário para um completo relaxamento da excitação dos spins magnéticos.⁶⁹ Nesse caso, foi utilizado um tempo de reciclo de 10s, mais do que suficiente para o relaxamento desta espécie de núcleos analisados de ambas as moléculas. Ainda, foi utilizado um espectro com 10 ppm e 16 k de resolução para minimizar qualquer erro de deslocamento. Informações detalhadas sobre o método estão colocadas no capítulo material e métodos.

Nessa espécie de procedimento quantitativo a informação sobre a integração é um pré-requisito incondicional para uma análise correta. Alguns autores indicam um erro geral estimado de integração de 2-4%.⁷⁰ Porém com a evolução dos softwares, equipamentos e metodologias de processamento, tal como a correção automática da linha base, o processo de integração não pode ser mais considerado um problema. É preconizado que este tipo de erro não deve ultrapassar 1% e depende em grande parte do operador. No nosso caso, o processo de integração foi exaustivamente repetido com ampliações do espectro com o intuito de não possuímos erros dessa espécie.

Na Figura 19 podemos ver um espectro de RMN de ¹H obtido para uma amostra de água onde foram adicionadas soluções padrão do analito e o padrão interno com uma concentração pré-determinada de 50µg/mL de ambos. Assim verificamos que a integração dos sinais está conforme o esperado para essa situação. A extração em fase sólida (SPE) foi muito importante para eliminar certos interferentes possivelmente presentes em amostras ambientais, as quais poderiam possuir sinais que sobrepujam os escolhidos para a quantificação.

⁶⁹ Claridge, T. D. W. In: *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 1999, ed. Pergamon Press, Oxford.

⁷⁰ Günther H. *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*, 1995, 2nd Edn. Wiley: Chichester.

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno em uma amostra de floração. Para esta análise foram adicionados BMAA e PI.

Já no espectro apresentado na Figura 20 podemos observar a análise de cérebro de rato onde também foi adicionado uma concentração de 100 e 20 $\mu\text{g/mL}$ para o PI e a BMAA respectivamente. Podemos verificar uma boa especificidade, estando os sinais com uma boa separação e sem interferentes. A relação entre as integrações dos sinais também estão de acordo com o esperado.

Figura 20. Espectro de RMN de ^1H demonstrativo da avaliação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno em uma amostra de cérebro de camundongos Balb/c. Para esta análise foram adicionados BMAA e PI

Com relação ao limite de detecção, o método foi capaz de identificar 5 µg/mL, sendo este um valor abaixo do que o menor valor de concentração encontrado em sementes de *cycad* (1.161 µg/g), por exemplo.⁵¹ Da mesma forma, certos morcegos (*Pteropus mariannus*) que consomem os cocos produzidos pela mesma palmeira e que posteriormente são consumidos pelos nativos da ilha de Chamorro em certos rituais, acumulam em média 3.556 µg/g de *L*-BMAA.⁵⁰ Ainda, tem sido reportada a presença de *L*-BMAA, sob a forma livre, em algas do gênero *Nostoc ssp.* Numa concentração de 1.243 µg/g.⁵² Assim, esse método associado a extração em fase sólida é um procedimento analítico útil na identificação e quantificação de *L*-BMAA em amostras biológicas e ambientais.

A curva de calibração, Figura 21 foi linear na faixa de concentração de 10-100 µg/mL. A equação da reta foi $Y = 0,0866X - 0,5949$, e o coeficiente de regressão linear

$r^2 = 0,9868$, onde Y e X representam a razão entre a integração dos sinais dos picos (composto/padrão interno) e a concentração correspondente de cada calibrador, respectivamente.

Figura 21. Curva de calibração obtida para o método de determinação quantitativa de BMAA com a utilização de padrão interno por RMN de ^1H

Os parâmetros de validação do método (LD, LQ, precisão inter e intra ensaio e recuperação) para a determinação de *L*-BMAA por RMN de ^1H são apresentados na Tabela 4. O método apresentou boa linearidade na concentração testada (10-100 $\mu\text{g/mL}$). A precisão varia levemente indicando que a reprodutibilidade do método é aceitável na faixa de concentração estudada ($\text{CV} < 8.5\%$). Boa sensibilidade também foi obtida para esse analito ($\text{LD} = 10 \mu\text{g/mL}$).

O método desenvolvido pode ser usado tanto para a quantificação da *L*-BMAA como para certificação de padrões analíticos desse composto. Ainda, outros aminoácidos podem ser quantificados através dessa mesma metodologia analítica com as vantagens elucidadas anteriormente.

Um manuscrito referente a esse procedimento analítico foi recentemente aceito para a publicação (Anexo 4).

Tabela 4. Parâmetros de validação do Método por RMN de ^1H para a determinação de BMAA

	<i>D,L</i> -BMAA
LD ($\mu\text{g/ml}$)	10
LQ ($\mu\text{g/ml}$)	5
Recuperação (%)	
C1	98
C2	107
C3	108
Precisão intra ensaio (%)	
C1	6,29
C2	4,63
C3	5,43
Precisão inter ensaio(%)	
C1	8,42
C2	6,14
C3	7,98

1.2.2 – Determinação analítica através de LC-MS utilizando D_3 -*D,L*-BMAA

De acordo com os propósitos de aplicação dos compostos obtidos sinteticamente, um possível método analítico para a determinação desse importante aminoácido utilizando cromatografia líquida de alta eficiência associada a um analisador de massas foi iniciado. A inovação desta metodologia

relacionada com os outros trabalhos já reportados na literatura os quais fazem uso dessa mesma técnica analítica é a utilização da inédita D_3 -BMAA sintética como padrão interno.

A partir do método determinado por Vega & Bell²² e otimizado em nosso laboratório (capítulo 1.1.1) para a síntese da BMAA sob a forma racêmica (Esquema 1) chegamos ao aminoácido isotopicamente marcado (D_3 -BMAA), Figura 22. Isso foi possível pela utilização da D_3 -metilamina sob a forma gasosa.

Figura 22. Estrutura química da D_3 -BMAA obtida por via sintética.

Padrões internos marcados isotopicamente são considerados ideais em análises cromatográficas associadas a análise de massas, pois além de possuírem propriedades físico-químicas quase idênticas ao analito, ainda possuem uma diferença de massa capaz de diferenciar os mesmos. Esse método deve ser concluído em breve.

1.2.3 – Sugestão de um possível mecanismo de ação neurotóxico

Existe uma grande controvérsia com relação a importância dos fatores genéticos versus os ambientais em doenças neurodegenerativas. Em geral, estes são considerados complementares. Com algumas exceções, como nos casos de algumas formas de doenças neurodegenerativas transmitidas por mutações hereditárias.⁷¹ Na grande maioria dos casos parecem ter uma etiologia multifactorial, onde a susceptibilidade genética pode conferir uma maior vulnerabilidade a riscos ambientais.⁷² Alguns metabolitos secundários de certas plantas têm sido identificados como potencialmente tóxicos, sendo considerados fatores de risco. Palmeiras do gênero

⁷¹ Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A.; Pike, B.; Root, H., Rubenstein, J.; Boyer, R.; Stenroos, E. S.; Chandrasekharappa, S.; Athanassiadou, A.; Papapetropoulos, T.; Johnson, W. G.; Lazzarini, A. M.; Duvoisin, R. C.; Di Iorio, G.; Golbe, L. I.; Nussbaum, R. L.; *Science* **1997**, 276, 2045–2047.

⁷² Papapetropoulos, S.; Mash, D.C. *Ann. Neurol.* **2005**, 57, 605–606.

Cycad ssp. produzem alguns compostos considerados neurotóxicos através de diversos mecanismos de ação.⁷³ A primeira associação entre uma possível neurotoxicidade e os produtos provenientes do gênero *Cycad ssp* foi formulada já na década de 50.⁷⁴

Entre esses compostos, um aminoácido tem sido alvo de vários estudos.⁴⁴ Trata-se da L-BMAA, a qual foi recentemente indicada como sendo produzida por algumas cianobactérias de diversas espécies.⁵⁰⁻⁵² Esse aminoácido modificado começou a ser relacionado com efeitos neurotóxicos após a descoberta de uma significativa incidência de doenças neurodegenerativas do tipo ALS/PDC (Esclerose Amiotrófica Lateral / Parkinson) em uma pequena ilha do pacífico norte.⁷⁵ Buscando uma explicação para este fato, possíveis fatores genéticos foram avaliados extensivamente, o que não conduziu a nenhum resultado conclusivo.⁷⁶ Logo associou-se a dieta dos nativos, baseada em sementes de uma palmeira muito comum nessa ilha do gênero *Cycad ssp.* as quais eram consumidas sob a forma de farinha.⁷⁷ Desde então vários estudos tem sido reportados para possibilitar o esclarecimento dessas hipóteses.

Em um dos primeiros estudos Spencer e col.⁷⁸ administraram L-BMAA em primatas produzindo nos animais uma toxicidade que foi logo associada a modelos neurodegenerativos já conhecidos. Aqui vale lembrar que doenças neurodegenerativas normalmente possuem curso crônico, necessitando longos períodos de latência, o que dificulta estudos a respeito. Esse trabalho foi logo questionado por outros autores⁷⁹ que afirmavam que a concentração deste composto na dieta dos nativos era muito menor do que o reportado nos estudos com primatas anteriormente citado. Dessa forma indicavam ser necessário a ingestão de cerca de 1500kg de farinha processada proveniente de sementes de *Cycad* durante um período de 12 semanas.

Após esses primeiros estudos, outros foram conduzidos sempre mantendo certa controvérsia. Durante o período da década de 80 essa hipótese foi praticamente esquecida, sem novas conclusões a respeito. No início do século 21, no entanto a mesma

⁷³ Spencer, P. S.; Ludolph, A. C.; Kisby, G. E. *Environ. Res.* **1993**, 62, 106–113.

⁷⁴ Mulder, D.; Kurland, L.; Iriate, L. *US Armed Forces Med.* **1954**, 5, 1724–39.

⁷⁵ Reed, D.; Labarthe, D.; Chen, K. M.; Stallones, R.; *Am. J. Epidemiol.* **1987**, 125, 92–100.

⁷⁶ Reed, D. M.; Brody, J. A. *Am. J. Epidemiol.* **1975**, 101, 287–30.

⁷⁷ Whiting, M. G. *Econ. Bot.* **1963**, 17, 271–302.

⁷⁸ Spencer, P. S.; Nunn, P. B.; Hugon, J.; Ludolph, A. C.; Ross, S. M.; Roy, D. N.; Robertson, R. C.; *Science* **1987**, 237, 517–522.

⁷⁹ (a) Duncan, M. W.; Steele, J. C.; Kopin, I. J.; Markey, S. P.; *Neurology* **1990**, 40, 767–772. (b) Kisby, G. E.; Ellison, M.; Spencer, P. S. *Neurology*, **1992**, 42, 1336–1340.

voltou com novas descobertas.⁸⁰ Entre os novos dados, destacamos a comprovação da biomagnificação deste composto.⁵² Dessa forma, esse aminoácido é capaz de ligar-se a outras proteínas sendo conduzido através da cadeia alimentar até chegar ao homem.⁵⁰ Segundo Banack e col.⁵² a L-BMAA sob a forma associada a outras proteínas atinge o nível trófico superior (homem) com uma concentração cerca de 87 vezes maior quando relacionado ao mesmo aminoácido sob a forma livre. Ainda, veio à tona recentemente o fato de os nativos da ilha se alimentarem durante certos rituais de morcegos (*Pteropus mariannus*), os quais acumulam em média 3.556µg/g L-BMAA devido a sua dieta baseada nos cocos da palmeira cycad.⁵¹

Os mecanismos de ação deste composto são diversos. Em um estudo recente Lobner e col.⁸¹ indicaram quem além de agonista do neurotransmissor glutamato (mecanismo mais cogitado) e por consequência ativador dos receptores ionotrópicos do tipo NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato), essa molécula pode também ser ativadora dos receptores metabotrópicos do tipo mGluR5, também levando a abertura de canais iônicos via proteína G. Ainda, podem induzir morte celular através de aumento do stress oxidativo intracelular. Recentemente, Rao e col.⁸² encontraram que L-BMAA a uma baixa concentração de 30µM induz a uma seletiva perda de neurônios motores em culturas de neurônios da medula espinhal.

A proposta mais antiga e consistente sobre a ação deste aminoácido relaciona a BMAA como ativadora dos receptores ionotrópicos por ser um agonista de glutamato. Dessa forma ocorre um excesso de cálcio e bicarbonato intracelular levando à célula a morte por apoptose.⁸³ Esse mecanismo é associado também à formação de um possível *adduto* de BMAA e carbonato desse composto o que o tornaria ainda mais similar ao neurotransmissor glutamato, conforme podemos avaliar na Figura 23.

Figura 23. Estruturas químicas da BMAA, *adduto* de BMAA e íons carbonato e do neurotransmissor glutamato

⁸⁰ Ince, P. G.; Codd, G. A. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **2005**, 31, 345-353.

⁸¹ Lobner, D.; Pian, P. M. T.; Salous, A. K.; Peoples, R. W. *Neurobiology of Disease* **2007**, 25, 360-366.

⁸² Rao, S. D.; Banack, S.A.; Cox, P.A.; Weiss, J. H. *Exp. Neurol.* **2006**, 201, 244-252.

⁸³ Weiss, J.H., Koh, J.Y., Choi, D.W., *Brain Res.* **1989**, 497, 64-71.

Este equilíbrio tem sido amplamente estudado. Assim, através de cálculos quantitativos com α,β -aminoácidos, Martin⁸⁴ determinou que cerca de 86% destes estariam sob a forma α -amino desprotonada, enquanto 14% seria desprotonada no β -amino grupo em presença de base. Em trabalho posterior, foi comprovado que para L-BMAA os dois grupamentos aminos se comportam como desprotonados.⁸⁵

Mais recentemente Nunn & O'Brien⁸⁶ determinaram através de RMN de ^1H e posteriormente Myeres & Nelson⁸⁷ através da técnica de RMN de ^{13}C os equilíbrios para a formação desse intermediário NCOOH-BMAA . Ambos os autores simularam condições de pH e temperatura fisiológicas. Assim, através dos deslocamentos químicos associados as constantes de acoplamento dos sinais apresentados os mesmos chegaram à conclusão de que ocorreria um deslocamento de equilíbrio em direção a formação do *adduto* com íons carbonium nas referidas condições, Esquema 21.

Esquema 21. Equilíbrio químico entre L-BMAA e seu *adduto* formado pela adição de íons carbanium.

Nunn & O'Brien⁸⁶ associaram a diferentes rotâmetros alguns sinais que inesperadamente aparecem em seus espectros. É interessante que esses sinais “estranhos” já aparecem em experimentos com concentrações de bicarbonato menores que os encontrado *in vivo* (5mM). Em sua conclusão, o autor sugeriu uma possível formação de outros compostos e indicou a necessidade de futuros estudos para a avaliação dos mesmos.

Por outro lado, Myeres & Nelson⁸⁷ utilizaram solução aquosa de dióxido de carbono associado à técnica de RMN de ^{13}C para a avaliação deste equilíbrio. O autor correlacionou as integrações dos sinais com a formação de $\alpha\text{-NCO}_2\text{-BMAA}$ e $\beta\text{-NCO}_2\text{-BMAA}$, chegando à conclusão que 22 e 9% seriam as concentrações dos mesmos

⁸⁴ Martin, R. B. in: *Metal Ions in Biological Systems*, 1979, vol. 9 capítulo por: Sigel, H. *Amino Acids and Derivatives as Ambidentate Ligands*, pp.1-39, ed. Dekker, New York; (b) Sayer, T. L.; Rabenstein, D. L. *Can. J. Chem.* **1976**54, 3392-3397.

⁸⁵ Brookes, G.; Pettit, L. D. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1976**, 42-46.

⁸⁶ Nunn, P. B.; O'Brien, P. *FEBS Lett.* **1989**, 251, 1,2, 31-35.

⁸⁷ Myers, T. G.; Nelson, S. D. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18, 10193-10195.

respectivamente. Comparando-se os dois estudos verificamos que esse equilíbrio é muito dependente das condições em que são determinados. Assim, quando o sistema possui energia (temperatura) o mesmo é deslocado em direção ao β -adduto. Em ambos os estudos alguns sinais indeterminados pelos seus autores aparecem nos espectros de RMN.

Experimentalmente avaliamos o mesmo equilíbrio utilizando espectrometria de Massas com ionização por *eletrospray*. Assim, 500 μ L de uma solução de 1mg/mL de BMAA (0.05g; 0.42 mmois; 1eq) foram adicionadas a soluções contendo bicarbonato de sódio nas proporções de 5:1 (0.18g; 2.11 mmois; 5eq) e 10:1 (0.35g; 4.22; 10eq) em relação ao aminoácido em 7.5 mL de água deionizada. Essas soluções foram agitadas por 1h a uma temperatura de 40°C. Após esse período uma pequena alíquota de cada solução foi retirada (10 μ L) e injetada diretamente no espectrômetro de massas.

No espectro de massas modo *full scan* da Figura 24, com bicarbonato de sódio a uma concentração 5 vezes maior do que a de BMAA, depois de 1 hora verificamos uma ampla formação do composto de NCOOH-BMAA com íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ m/z 163. Além do sinal m/z 119 o qual é referente ao íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ da BMAA, existe também um pequeno íon com m/z de 145.

Figura 24. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de determinação do possível equilíbrio entre BMAA e íons carbonato. Para esta foi utilizada uma concentração de 5:1 de carbonato com relação à BMAA

Na Figura 25 verificamos o espectro de massas no modo *scan* para o experimento onde a concentração de bicarbonato foi de 10:1 em relação à BMAA. Aqui, os mesmos íons anteriormente citados podem ser observados, com diferenças em suas intensidades. Assim, o íon m/z 119.2 diminui de intensidade enquanto o íon com m/z 145 aumentou de intensidade.

Figura 25. Espectro de massas no modo *Scan* para o produto da reação de determinação do possível equilíbrio entre BMAA e íons carbonato. Para esta foi utilizada uma concentração de 10:1 de carbonato com relação à BMAA.

Ainda, avaliamos o íon com m/z 145 no modo MS^2 , como esta representado na Figura 26. Sob as condições utilizadas para isto, a fragmentação gera o íon com m/z 99.2 $[M - COOH]^+$ muito estável. Para facilitar a comparação, em destaque na mesma Figura no canto superior esquerdo vemos um espectro de massas da guanidina cíclica obtida sinteticamente conforme apresentado no capítulo 1.1.3. Guardadas as devidas diferenças entre as metodologias utilizadas para a ionização, o que pode ser visto na diferença entre as intensidades dos sinais, percebemos que em ambos os casos (equilíbrio entre BMAA - íons bicarbonato e BMAA cíclica obtida sinteticamente) temos a mesma fragmentação, perdendo $COOH$ em ambos os casos. Desta forma, podemos indicar que a reação entre BMAA e íons bicarbonato conduzem sim a molécula cíclica.

Figura 26. Espectro de massas no modo MS² referente ao íon com m/z 145 obtido durante o experimento de equilíbrio (40°C, 1h sob agitação) onde foi utilizado uma concentração 10 vezes superior de íons bicarbonato em relação a BMAA. No canto superior esquerdo esta representado um espectro de massas no modo MS² para o íon com m/z 145 referente a guanidina cíclica obtida sinteticamente. No canto inferior esquerdo esta representado a possível fragmentação sob ionização com *electrospray* deste composto pela perda de COOH gerando o íon com m/z 99.1.

De acordo com esses resultados imaginamos que a partir desse equilíbrio deve ser formado uma guanidina cíclica conforme colocado no Esquema 22.

Esquema 22. Possível equilíbrio químico entre L-BMAA e íon carbanium gerando o ácido 1-metil-2-oxoimidazolidina-1-carboxílico como produto.

A formação desse composto cíclico também explicaria os sinais inesperados observados nos experimentos de RMN de ¹H e ¹³C nos trabalhos comentados anteriormente.^{86,87} Na Figura 27 podemos fazer uma comparação direta entre os espectros de RMN de ¹H referentes da BMAA cíclica (A) obtida sinteticamente e o determinado por Nunn e O'Brien em seu experimento de equilíbrio citado antes (B).⁸⁶ No terceiro espectro plotado por estes autores (de baixo para cima, Espectro B, Figura 27) os mesmos utilizaram condições similares as utilizadas no experimento de equilíbrio

realizado por nós. Aqui podemos ver sinais com deslocamentos químicos, desdobramentos e constantes de acoplamentos muito similares. Estes dados confirmam que esta molécula cíclica faz parte do equilíbrio químico entre BMAA e íons carbonato.

Figura 27. Espectros de RMN de ^1H comparativos **A)** para a guanidina cíclica **45** obtida sinteticamente e **B)** para o equilíbrio determinado por Nunn e O'Brien¹²⁶ entre BMAA e íons bicarbonato. Estes experimentos foram realizados em diferentes condições, como por exemplo, de solvente CD_3CN e D_2O respectivamente. Para os espectros plotados em **B)** o autor utilizou diferentes concentrações de bicarbonato em relação a BMAA.

Enquanto isso alguns cálculos de minimização de energia utilizando método semi-empírico do tipo AM1 (Austin Model) e cálculos de energia de ponto único (Single Point energy) em *ab initio* Hartree-Fock com nível de teoria 6-31G* para o composto inicial (*L*-BMAA) e final (*L*-BMAA cíclica) além dos possíveis intermediários foram realizados, Figura 28.

Figura 28. Energias determinadas por cálculos semi-empíricos do tipo AM1 em *ab initio* Hartree-Fock com um nível de teoria de 6-31G para o equilíbrio entre a BMAA e íons carbonato.

Estes dados de energia das moléculas corroboram para a possibilidade deste equilíbrio conduzir até o produto de ciclização já que o mesmo é energeticamente favorável. Uma análise mais aprofundada desses dados, com a avaliação das respectivas energias de estado de transição faz-se necessária a fim de evidenciar essas conclusões. A Figura 29 demonstra o mesmo equilíbrio apresentando as moléculas em sua estrutura conformacional mais estável em 3D.

Figura 29. Energias determinadas por cálculos semi-empíricos do tipo AM1 em *ab initio* Hartree-Fock com um nível de teoria de 6-31G para o equilíbrio entre a BMAA e íons carbonato. Estruturas químicas em 3D.

Quando observamos outros aminoácidos naturais excitatórios conhecidos, (ácido kainico), ou sintéticos (AMPA) vemos que estes são capazes de mimetizar a ação do glutamato junto aos receptores ionotrópicos.⁸⁸ Na Figura 30 percebemos algumas semelhanças como a presença de ciclos de 5 membros, ácidos carboxílicos a uma ou duas ligações de átomos de nitrogênios fazendo parte ou não da estrutura dos ciclos.

⁸⁸ Watkins, J. C. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 4, 297-310.

Figura 30. Estruturas químicas de alguns agonistas de receptores ionotrópicos conhecidos. Em destaque as similaridades com o possível intermediário cíclico gerado entre a BMAA e íons carbonato.

Enquanto isso, desde a década de 60 é considerada a teoria de que os receptores de glutamato possuem uma relação direta com um sistema de ligação de três pontas “three-point system” como o apresentado na Figura 31.⁸⁹

Figura 31. A) Sistema pré-determinado de ligação dipolar do tipo “três pontas” para o glutamato no respectivo sítio receptor. B) Equilíbrio dipolar para o possível ciclo gerado da reação entre a BMAA e íons carbonato.

Aqui podemos perceber que a ligação entre o receptor e o neurotransmissor deve ocorrer entre os dipolos dos mesmos. Quando consideramos o possível ciclo formado pela BMAA em seu equilíbrio (Esquema 21), percebemos a mesma característica dipolar. Ainda comparando-se esse composto com os demais comprovadamente receptores excitatórios (Figura 26) verificamos semelhanças que vão bem além de serem ciclos de cinco membros, como por exemplo, a predisposição de uma carbonila

⁸⁹ Curtis, D. R.; Watkins, J. C. *J. Neurochem.* **1960**, 6, 117-141.

no ciclo ligada diretamente a uma amina (ácido quisqualico), além de ácidos carboxílicos ligados diretamente ao ciclo (ACPD), entre outras.

Na Figura 32 podemos visualizar o domínio do receptor do tipo NMDA recentemente determinado na forma 3D e também com os aminoácidos evidenciados.⁹⁰

Figura 32. Domínio externo do receptor ionotrópico do tipo NMDA, A) com os aminoácidos protéicos evidenciados e B) no formato 3D.

Mais recentemente um sistema de screening virtual para uma série de 135.000 compostos entre agonistas, agonistas parciais e antagonistas de receptores do tipo

⁹⁰ Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. *Prot. Eng.* **1995**, 8, 127–134.

NMDA foram avaliados por Tikhonova e col.⁹¹ Entre os compostos, vários sistemas cíclicos e alicíclicos foram testados e curiosamente a possível *L*-BMAA cíclica não consta.

Testes em culturas de neurônios, bem como outras técnicas *in vitro*, além de teste *in vivo* indicaram a real capacidade tóxica desta guanidina cíclica. Além disso, a verificação do possível agonismo dessa molécula através de métodos de modelagem molecular (em silico) também faz parte de nossos objetivos futuros.

Desta forma, determinamos experimentalmente a formação da guanidina cíclica gerada a partir do equilíbrio entre BMAA e íons bicarbonato em condições fisiológicas. Em um próximo passo, a indicação da toxicidade de composto (capacidade de agonismo do neurotransmissor glutamato), servirá para eliminar as controvérsias que giram em torno da neurotoxicidade da BMAA.

⁹¹ Tikhonova, I. G.; Baskin, I. I.; Palyulin, V. A.; Zefirov, N. S. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2004**, 53, 6, 1335-1344.

Capítulo 2.

*Anatoxina-a e Homoanatoxina-a –
Alcalóides agonista nicotínicos não seletivos extremamente tóxicos*

Anatoxina-a, 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno, é um potente alcalóide cuja massa molecular e pKa são 165 u.m.a. e 9.4, respectivamente.⁹² Esses primeiros relatos da presença desta toxina surgiram em 1878, sem ainda se conhecer sua estrutura. Quase um século depois, em 1977, sua estrutura química elucidada com auxílio de experimentos de Raios-X (Figura 33) por Devlin e col.⁹³ Posteriormente, observou-se que ela age como bloqueador neuromuscular depolarizante pós-sináptico. Sua DL₅₀ é ~200 µg/Kg de massa corpórea i.p. em rato.⁹⁴ Esta toxina é principalmente produzida pelas espécies: *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Cylindrospermum spp.*⁹⁵

Alguns incidentes tóxicológicos relacionados com a anatoxina-a causaram fatalidades e incluem morte de gado na Finlândia⁹⁶ e cachorros na Escócia,⁹⁷ e na Irlanda.⁹⁸ Embora, até o momento não haja casos de morte em humanos relacionados com a anatoxina-a, existem riscos. Outros relatos envolvendo cianobactérias produtoras de anatoxina (como a *Anabaena flos-aquae*) levaram a doenças gastrointestinais agudas, dermatite alérgica e mal-estar geral.⁹⁹

Seu análogo etilado, a homoanatoxina-a, foi isolada pela primeira vez de uma cultura de *Planktothrix (Oscillatoria) formosa* NIVA-CYA 92,¹⁰⁰ determinando-se que a sua toxicidade é similar a anatoxina-a,¹⁰¹ Figura 33.

⁹² Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. J.; *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1301.

⁹³ Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R.; Hunter, N. R.; Pike, R. K.; Stavric, B. *Can. J. Chem.* **1977**, 55(8), 1367-71.

⁹⁴ Carmichael, W. W. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, 72, 445.

⁹⁵ Rapala, J.; Iahili, K.; Sivonen, K.; Niemelae, S. I.; *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, 19, 423

⁹⁶ Sivonen, K.; Niemela, S.; Niemi, R.; Lepisto, L.; Luoma, H.; Rasanen, L.; *Hidrobiologia* **1990**, 190, 267.

⁹⁷ Edwards, C.; Beattie, K. A.; Scrimgeour, C. M.; Codd, G. A.; *Toxicon* **1992**, 30, 1165.

⁹⁸ James, K. J.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A. *12th European Symposium on Animal, Plant and Microbial toxin, Basal, Switzerland*, **1997**.

⁹⁹ Harada, K.; Kimura, Y.; Ogawa, K.; Suzuki, M.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W.; *Toxicon* **1989**, 27, 1289.

¹⁰⁰ Skulberg, O. M.; Carmichael, W. W.; Andersen, R. A.; Matsunaga, S.; Skulberg, R. *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, 11, 321.

¹⁰¹ Aas, P.; Eriksen, S.; Kolderup, J.; Lundy, P.; Haugen, J-E.; Skulberg, O. M.; Fonnum, F.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1996**, 2, 223.

Figura 33. Estruturas químicas da anatoxina-a e homoanatoxina-a

A anatoxina-a e seu análogo agem como potentes agonistas nicotínicos, tendo sido comprovado que impedem irreversivelmente a repolarização de receptores nicotínicos colinérgicos.¹⁰² Foi sugerido que a ativação do receptor nicotínico subsináptico resulta um constante fluxo de sódio (Na^+), produzindo uma despolarização local para abrir a maioria dos canais desse íon. A célula posterior pode amplificar a resposta, ativando mais canais de cálcio.¹⁰³ Há um bloqueio da neurotransmissão decorrente desta despolarização, que em dose suficientemente alta, pode conduzir à paralisia, asfixia e morte.¹⁰⁴ Os sintomas observados poucos minutos após alguns animais terem sido expostos à anatoxina-a por via oral (administração de água doce contaminada) foram fasciculação muscular, convulsões e morte por parada respiratória.¹⁰⁵

Os objetivos para a anatoxina-a são:

- Desenvolver e/ou otimizar métodos sintéticos viáveis para a obtenção dessa molécula além de alguns análogos;
- Aplicação dos produtos sinteticamente obtidos em metodologias analíticas bem como possíveis avaliações farmacológicas e toxicológicas;

¹⁰² Skulberg, O. M.; Carmichael, W. W.; Andersen, R. A.; Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Skulberg, R.; *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, *11*, 321.

¹⁰³ Soliakov, L.; Gallegher, T.; Wonnacot, S.; *Neuropharmacology* **1975**, *34*, 1535.

¹⁰⁴ (a) Carmichael, W. W.; Biggs, D. F.; Gorham, P. R.; *Science* **1975**, *187*, 542; (b) Carmichael, W. W.; *Asv. Botan. Res.* **1997**, *27*, 211.

¹⁰⁵ Carmichael, W. W.; Ownby, C. L.; Odell, G.V. *Freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) toxins, natural toxins, Pharmacology and Therapeutics*, ed. Pergamon Press: Oxford, **1989**, p. 3.

2.1 – Estratégias sintéticas

Vários métodos para a produção por via sintética da anatoxina-a e alguns análogos têm sido descritos durante os últimos anos (Anexo 5),¹⁰⁶ podendo-se inclusive afirmar que é uma das moléculas naturais mais sintetizadas nos últimos 30 anos. A importância toxicológica dessa molécula, associada às possíveis aplicações farmacológicas da mesma e alguns análogos, motivou essa busca por procedimentos sintéticos viáveis no decorrer das últimas três décadas. Em razão das suas características como agonista nicotínico a anatoxina-a é um excelente padrão para o estudo do mecanismo desse receptor neuromuscular.¹⁰⁷ Análogos modificados têm sido desenvolvidos para fazer parte de novas drogas as quais podem, por exemplo, ter efeito em doenças neurodegenerativas como Alzheimer.¹⁰⁸

No primeiro procedimento sintético Campbell e col.¹⁰⁹ ainda em 1977, utilizaram-se de energia fotoquímica para a promover uma ciclo expansão em um tropano. Dessa forma foi possível a síntese da anatoxina-a a partir de outra molécula bem conhecida, a cocaína (Esquema 23). Apesar de ser o procedimento sintético mais antigo, ainda é um dos mais concisos, ou seja, possui um pequeno número de passos reacionais e um bom rendimento global.

Esquema 23. Procedimento sintético promovido por Campbell e col. com a intenção de obter o produto **48** após uma reação de ciclo expansão

¹⁰⁶ Rodriguez, V.; Moura, S.; Braga, R. C.; Pereira, C. M. P.; Pinto, E. *Quim. Nova*, **2006**, 29, 6, 1365-1371.

¹⁰⁷ Feuerbach, D.; Lingenhoebl, K.; Dobbins, P.; Mosbacher, J.; Corbett, N.; Nozulak, J.; Hoyer, D. *Neuropharmacology* **2005**, 48(2), 215-227.

¹⁰⁸ Mulholland, G. K.; Zheng, Q-H.; Carlson, K. A.; Dreesen, J. R. *Book of Abstracts, 216th ACS National Meeting, Boston* **1998**, 23-27.

¹⁰⁹ Campbell, H. F.; Edwards, O. E.; Kolt, R. *Can. J. Chem.* **1977**, 55, 1372.

Posteriormente, várias rotas sintéticas foram propostas fato corroborado em um artigo de revisão publicado em 1996.¹¹⁰ Essa revisão é composta por aproximadamente vinte métodos diferentes sendo divididos em cinco grupos. Aqui descrevemos de forma sucinta as principais contribuições colocadas nesse artigo de revisão:

- Expansão de anéis tropânicos – Como discutido anteriormente, esse foi o primeiro procedimento apresentado para a síntese total da anatoxina-a (Esquema 23)¹⁸. O produto foi obtido após oito passos reacionais, com um rendimento global de aproximadamente 4,3%, sendo ainda hoje considerado um dos procedimentos que requer um menor número de passos reacionais.

- Ciclização de ciclooctenos – Trata-se de um método bastante comum para a construção da biciclo cetona desejada.¹¹¹ Esta ciclização intramolecular, normalmente utiliza a capacidade nucleofílica do nitrogênio associada a um forte oxidante capaz de induzir essa reação, Esquema 24.

Esquema 24. Procedimento sintético apresentado por Wiseman & Lee.¹¹² onde foi obtida a N-metilanatoxina-a **48**.

Danheiser e col.¹¹² propuseram uma rota sintética semelhante, através da mesma técnica de ciclização após uma expansão de um cicloheptano para a formação do biciclo objetivado (Esquema 25).

¹¹⁰ Mansell, H. L. *Tetrahedron* **1996**, 52(17), 6025-61.

¹¹¹ Wiseman, J. R.; Lee, S. Y. *J. Org. Chem.* **1986**, 51(13), 2485-7.

¹¹² Danheiser, R. L.; Morin, J. M. Jr.; Salaski, E. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107(26), 8066-73.

Esquema 25. Ciclização intramolecular apresentada por Danheiser e col. para a obtenção do composto **53**.

- Ciclização de imíniuns – Bates & Rapoport¹¹³ obtiveram a anatoxina-a a partir da reação de um sal de imíniun o qual foi gerado por uma descarboxilação de Lewis induzida por ácido, conforme apresentado no Esquema 26. Neste procedimento, uma ciclização intramolecular após uma forte oxidação também conduziu ao biciclo. Esse procedimento gerou o composto **60** (anatoxina-a) após doze passos reacionais. Assim também, esse autor descreveu a síntese de uma ampla gama de análogos relacionados usando o mesmo processo. Melching e col.¹¹⁴ e mais recentemente Somfai e col.¹¹⁵ fizeram uso de procedimentos semelhantes para a obtenção do mesmo composto.

Esquema 26. Procedimento sintético apresentado por Bates e Rapoport para a obtenção da anatoxina-a **60** através de uma ciclização intramolecular de imínius.

- Cicloadição de nitronas – Uma elegante rota foi desenvolvida por Tufariello e col.¹¹⁶ usando a cicloadição de uma nitrona para produzir o produto **60**. Este processo passa por uma primeira redução de uma ligação N-O e subsequentemente a elaboração de uma nova ligação N-O conduz a síntese total da anatoxina-a, conforme Esquema 27.

¹¹³ Bates, H. A.; Rapoport, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101(5), 1259-65.

¹¹⁴ Melching, K. H.; Hiemstra, H.; Klaver, W. J.; Speckamp, W. N. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27(39), 4799-802.

¹¹⁵ Somfai, P.; Ahman, J. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33(26), 3791-4.

¹¹⁶ Tufariello, J. J.; Meckler, H.; Senaratne, K. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106(25), 7979-80.

Esquema 27. Síntese conduzida por Tufariello e col.¹¹⁷ para a síntese da anatoxina-a onde o passo chave uma cicloadição de uma nitrona.

Após 1996, várias outras possíveis rotas sintéticas foram propostas, além das otimizações dos procedimentos anteriormente citados. Entre os novos destacam-se os baseados em metátese de eninos. Uma série de artigos recentes tem usado esta técnica a partir de diferentes materiais de partida para a obtenção da anatoxina-a. Um exemplo, é o trabalho descrito por Mori e col.¹¹⁷ (Esquema 28). Outros trabalhos têm sido relatados usando o mesmo método variando apenas os catalisadores que induzem a ciclização.¹¹⁸

Esquema 28. Procedimento de metátese de eninos apresentada por Mori e col.¹¹⁸ com intuito de formação da N-Ts-anatoxina-a

¹¹⁷ Mori, M.; Tomita, T.; Kita Y.; Kitamura, T. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 4397–4399.

¹¹⁸ (a) Brenneman, J. B.; Machauer R.; Martin, S. F. *Tetrahedron* **2004**, 60, 7301–7314; (b) Brenneman, J. B.; Martin, S. F. *Organic Lett.* **2004**, 6, 1329–1331.

Após uma avaliação das vantagens e desvantagens de cada procedimento resolvemos optar por duas diferentes rotas de síntese para uma possível obtenção da anatoxina-a além de alguns análogos.

2.1.1 – Síntese via expansão de anéis tropânicos

Dentre todos os métodos apresentados na literatura, a síntese onde o passo chave é uma expansão de anel tropanico em um biciclo já formado foi considerada possível de ser repetida e/ou otimizada. Uma das necessidades em síntese total é a avaliação de uma rota como um todo, verificando desde os reagentes necessários até os possíveis problemas de cada estágio. Obviamente não se consegue prever todos os desafios, sendo que possíveis interrupções em um procedimento por um ou outro motivo são comuns. Nossa escolha por esse caminho foi por considerarmos o mesmo além de viável passível de ser melhorado gerando o produto desejado.

Esse método teve um desdobramento recente onde Wegg e col.¹¹⁹ determinaram a síntese da forma enantioseletivamente pura da (+)anatoxina-a **60** a partir do cloreto de (-)-cocaína **46**. Esses autores utilizaram oito passos para esse processo sintético com um ótimo rendimento global de 20%. Os estágios mais importantes foram a expansão efetiva do anel (+)-2-tropinona **73** para o 9-azabicyclo[4.2.1]nanona **74** com TMSCHN₂/Al(CH₃)₃, a introdução de um grupamento cetona na cadeia lateral desse biciclo **75** a partir de reação do correspondente enol **77** sob condições reacionais de Heck, e por fim a geração do composto **78**, Esquema 29.

¹¹⁹ Wegge, T.; Schwarz, S.; Seitz, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1405-1410.

Esquema 29. Procedimento apresentado por Wegg e col. para a síntese da anatoxina, onde o passo chave é uma ciclo expansão do intermediário **73**.

Comparando estes dois procedimentos, onde o passo chave é a expansão dos anéis tropanicos específicos, percebemos pequenas diferenças nas estratégias adotadas pelos autores. No primeiro, desenvolvido em 1977,¹¹⁰ um sal de iodo foi utilizado para essa expansão mantendo a cadeia lateral intacta (ácido carboxílico gerado da hidrólise da cocaína). Após, a abertura do ciclopropano intermediário formado **47** foi induzida através de energia de luz UV, Esquema 23. Enquanto isso, Wegg e col.¹²⁰ preocuparam-se primeiro com a expansão anelar. Essa foi obtida através de uma elegante estratégia onde ocorre um rearranjo induzido por um ácido de Lewis ($\text{TMSCHN}_2/\text{Al}(\text{CH}_3)_3$), sendo a cadeia lateral construída em etapas posteriores.

Observando estes detalhes, achamos mais coerente lançar mão de uma estratégia mais próxima do trabalho produzido por Campbell e col.¹¹⁰ Assim sendo, foi testado o procedimento descrito no Esquema 30 para a retrossíntese. As principais diferenças sugeridas por nós para uma modificada metodologia são: construção da cadeia lateral (cetona) logo após a hidrólise do material de partida e expansão anelar através da formação de um ciclopropano induzido por diodo metano.

Esquema 30. Análise retrosintética para a síntese da anatoxina-a **60** a partir do cloridrato de metil-3-(benzoiloxi)8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato **46**.

Outro motivo que nós fez acreditar nesse procedimento sintético foi um convênio firmado com o Instituto de Perícia do Estado de São Paulo (Anexo 2). Através desse obtivemos cerca de 2g do nosso material de partida **46** (Esquema 30), com um elevado grau de pureza $\geq 95\%$ após purificação por recristalização (determinado por LC-MS).

Este composto **46** foi hidrolizado na primeira etapa. Esta reação ocorreu sob condições ácidas, 50mL de ácido clorídrico concentrado (37% em água), além de aquecimento sob condição de refluxo (100°C) conforme apresentado Esquema 31.

Esquema 31. Procedimento de hidrólise do material de partida **46**.

A partir desse processo, o composto **79** foi obtido com rendimento $\geq 94\%$. No espectro de ESI-MS no modo *full scan* apresentado na Figura 34 é possível observar o íon $[M + H]^+$ com m/z 168.1 com grande pureza.

Figura 34. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de hidrólise do composto **46**.

Na próxima etapa, o objetivo foi à produção do éster **80**. Para isso, ácido clorídrico gasoso foi borbulhado continuamente por arraste com auxílio de um gás inerte (nitrogênio) em uma solução do composto **79** em metanol. Essa solução foi aquecida a 60°C durante um período de 5h. Um condensador de refluxo foi adaptado ao sistema para que o solvente não evaporasse (Esquema 32).

Esquema 32. Processo de esterificação do intermediário **79** através de reação de álcool metílico em meio ácido.

Decorrido o tempo, o solvente presente no balão foi evaporado e o produto obtido analisado por espectrometria de massas. Na Figura 35 é apresentado um espectro obtido no modo *full scan* onde podemos observar a presença majoritária do íon $[M + H]^+$ com m/z 181.9, enquanto uma quantidade mínima do material de partida aparece com m/z 167.9.

Figura 35. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de esterificação do composto **80**.

Para a formação da cadeia lateral (metil cetona) algumas opções foram avaliadas. Na literatura descreve-se a formação de cetonas a partir de ácidos **79** ou ésteres **80**. Ambos os procedimentos apresentam alto grau de dificuldade. Para esse estágio, deve ocorrer um processo de substituição nucleofílica a carbonila.²³ Considerando o carbono carbonílico como agente eletrofílico necessitamos de *synthons* com cargas parciais negativas para promover essa espécie de reação, conforme apresentado no Esquema 33.

R = alquil, aril; R₁ = H, OR; R₂ = Li, Mg

Esquema 33. Mecanismo proposto para substituição nucleofílica em uma reação de *N*-metilação para a formação de cetonas a partir de ésteres ou ácidos carboxílicos.

Por definição “carbanions” são espécies orgânicas com uma carga negativa concentrada sob átomos de carbono.¹²⁰ A facilidade de formação de carbanions aumenta com caráter “s” da hibridização do carbono. Em contrapartida, ânions alquila são menos estáveis quanto menos substituídos. Carbanions alquílicos normalmente são compostos organometálicos. Dentre esses, os principais são os de lítio que possuem maior caráter dipolar (nucleófilos “duros”), ou ainda os formados por metais como cobre ou magnésio que são mais covalentes (nucleófilos “moles”). Desta forma, avaliamos as duas possibilidades entre os organometálicos para realizar esse papel nucleofílico.

Iniciamos testando o mesmo procedimento já realizado por Campbell e col.¹¹⁰ onde o éster **80** é tratado com hidróxido de lítio em uma primeira etapa e posteriormente reage com metilítio (carbanion) usando 1,2-dimetoxietano como solvente, sob atmosfera inerte de nitrogênio, conforme apresentado no Esquema 33.

i. MeOH, LiOH.H₂O, refluxo, 2h; ii. 1,2-dimetoxietano, sob N₂, CH₃Li 1.8M em etér, 5h, t.a.

Esquema 34. Procedimento testado para a formação da cetona **81** a partir do ester **80**

O produto da reação foi avaliado através de espectrometria de massas como apresentado na Figura 36. Podemos observar dois picos com grande intensidade, um deles com m/z 166.1 que corresponde ao produto objetivado **81**. Enquanto isso, o fragmento com m/z 182.1 é referente a um subproduto formado a partir da adição de duas moléculas de agente nucleofílico à carbonila (um álcool). Essa mistura foi avaliada por RMN de ¹H confirmando a presença desses compostos. Assim, através dos deslocamentos químicos percebemos que além do produto desejado **81** foi obtido o subproduto (álcool) em grande quantidade. Ainda, existe uma pequena quantidade de material de partida (éster **80**).

¹²⁰ Führhop, J.; Li, G. *Organic Synthesis: Concepts, Methods, Starting Materials* **2003** Ed: John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Figura 36. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de formação da cetona **81**, através da reação apresentada no Esquema 34.

Algumas variações nas condições reacionais foram testadas sem a devida obtenção do composto **81** como componente majoritário. A presença de mistura de produtos indica que para este passo existe a necessidade de grande controle das condições reacionais (equivalentes de reagentes, atmosfera inerte, etc). Ainda, algumas tentativas de separar a cetona **81**, do álcool (subproduto) e também do éster **80** (material de partida) através de coluna cromatográfica foram feitas sem o devido sucesso.

Alguns outros processos são amplamente utilizados para esta espécie de reação. Buscando alternativas chegamos até os conhecidos reagentes Grignard.²³ Tratam-se de compostos organometálicos de magnésio os quais são utilizados nos mais diversos procedimentos sintéticos. Cetonas são obtidas a partir da reação de reagentes de Grignard com ácidos carboxílicos e/ou ésteres. Em alguns casos existe a necessidade de síntese de outros intermediários com intuito de posterior seletividade na formação da cetona (sem o problema da formação de subprodutos verificada no procedimento anterior).

Por esse caminho, avaliamos a possibilidade de formação do aldeído intermediário **82** e a partir dessa cetona **81**, conforme Esquema 35.

Esquema 35. Possível rota sintética para a formação da cetona **81** passando pelo aldeído intermediário **82**.

Para a formação do aldeído, seguimos o procedimento de Chandrasekhar e col.¹²¹ que em seu amplo trabalho com vários ácidos gera seletivamente os respectivos aldeídos utilizando tetrametilsilano (TMS). A partir do TMS o autor forma um silano ester intermediário, que depois é reduzido com hidreto de *di-iso*-butilaluminio (DIBAL).

Após a realização do processo com o ácido **79**, observamos a manutenção de parte do material de partida (m/z 167.9), uma pequena quantidade do aldeído desejado **82** (m/z 152.1) e ainda um subproduto (álcool) proveniente da adição de dois hidrogênios a carbonila (m/z 154.1) no espectro de massas presente na Figura 37 podemos avaliar esta mistura de produtos. Na tentativa de melhorar o método, modificamos as condições (quantidades dos reagentes, temperatura e o tempo). Com isso, ao invés do produto desejado, o subproduto (álcool) foi o composto que sempre apareceu em maior quantidade. Ainda, alguns métodos de separação também foram testados sem o devido êxito.

Figura 37. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da primeira etapa para a formação do produto **81** através da reação apresentada no Esquema 35

Em uma última tentativa, buscamos um intermediário que por si só induziria à produção seletiva da cetona desejada. É conhecido que *N*-metoxi-*N*-metilamidas se combinam com reagentes de Grignard ou compostos de organolitio especialmente em THF para formar cetonas.¹²² Significativamente, estas reações não produzem álcoois terciários mesmo usando excesso de agentes alquilantes (compostos organometálicos), e não são requeridas condições experimentais estritas para o sucesso do processo como nos outros métodos avaliados anteriormente. O Esquema 36 apresenta o processo realizado, sendo a formação do intermediário cíclico **84**, muito estável pela quelação metálica, o passo chave para a indução da seletividade na formação dos produtos.

¹²¹ Chandrasekhar, S.; Kumarm M, S.; Muralidhar, B. *Tetrahedron lett.* **1998**, 39, 909-910.

¹²² Nahm, S.; Weinreb, S. M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 39, 3815-3818.

i. EtOH, $\text{CH}_3\text{NHOCH}_3$, 0°C depois t.a. por 2h; ii. Py; ii. CH_3MgCl

Esquema 36. Possível procedimento sintético para a obtenção da cetona **81** a partir do ácido carboxílico **79** passando pelo intermediário formado pelo mesmo com *N,O*-dimetilidroxilamina.

.Provavelmente em razão de algum impedimento estérico por parte do biciclo sobre o ataque nucleofílico (necessário para a formação da amida), o produto **83** não foi obtido durante nossos primeiros testes.

Depois dessas várias tentativas, obtivemos compostos **83** em pequenas quantidades, sempre em misturas com outros diversos produtos. Aqui, uma completa otimização do método faz-se necessária para que enfim tenhamos o êxito desejado. No entanto, isso demandaria bastante tempo, e ainda sofremos com a falta de material de partida (**46**). Após esses vários processos relatados aqui o composto inicial que recebemos a partir do convênio citado anteriormente acabou. Em uma segunda remessa, este mesmo material se encontrava contaminado com outros compostos (caféina, estimulantes, etc) os quais possuem propriedades físico-químicas similares o que dificultou uma possível separação cromatográfica dos mesmos.

Estes problemas fizeram com que buscássemos alternativas para a síntese da anatoxina-a. O Esquema 37 resume todos os procedimentos testados a fim de conduzir a síntese de um intermediário passível de ser transformado na anatoxina-a através de expansão anelar de tropanos.

Esquema 37. Resumo dos procedimentos sintéticos para uma possível síntese da anatoxina-a testados, onde o passo chave seria uma ciclo expansão.

2.1.2 – Síntese via ciclização intramolecular

Em busca de um método viável e conciso para a síntese da anatoxina-a avaliamos os procedimentos onde o passo chave é uma ciclização intramolecular que utiliza a capacidade nucleofílica do nitrogênio. Assim, nosso objetivo aqui foi a produção da anatoxina-a partindo de uma molécula extremamente simples e amplamente disponível, o 1,5-ciclooctadieno (Esquema 38).

Esquema 38. Análise retrosintética para a formação da anatoxina-a a partir do 1,5-ciclooctadieno

Como o relatado anteriormente (2.1), Danheiser e col.¹¹³ (1985) seguido de Wiseman e col.¹¹³ (1986) foram os primeiros a obter êxito na formação da anatoxina-a e/ou intermediários usando este tipo de procedimento.

Posteriormente, Parsons e col.¹²³ indicaram um procedimento sintético eficiente partindo do vinil ciclooctano **85** que, em reação com cloreto de sulfonila era capaz de produzir lactama **86**. Esta, após alguns estágios sofreu uma abertura do anel β -lactâmico induzido por metilítio e na sequência uma posterior ciclização intramolecular forneceu o composto **88**, sendo este último propício a gerar a toxina desejada **60**, conforme apresentado no Esquema 39. A vantagem desse procedimento é a possibilidade de utilizar maiores quantidades de materiais de partida.

¹²³ Parsons, P. J.; Camp, N. P.; Underwood, J. M.; Harvey, D. M. *Tetrahedron* **1996**, 52, 11637-11642.

i. CSI, Na₂CO₃, DCM, 0°C; ii. NaOH, DCM, Bu₄NHSO₄, BrPh; iii. MCPBA, DCM, t.a.; iv. CH₃Li, THF, -25 °C; v. H₂, 10% Pd/C, MeOH, Boc₂O; vi. Ph₃P, I₂, imidazol, DCM, t.a.; vii. Bu₃SnH, AIBN, PhCH₃, refluxo; viii. NaH, THF, MeOH, t.a., TBDMSCl, Et₃N, -15°C; ix. Pd(OAc)₂, MeCN, t.a., ou PhSeCl, THF, -78 °C, MCPBA; x. TFA, DCM

Esquema 39. Estratgia sinttica utilizada por Parsons e col.¹²⁴ para a obteno da anatoxina-a a partir do 1,5-ciclooctadieno.

Aqui, cabe ressaltar que mesmo possibilitando o uso de grandes quantidades de reagentes esse procedimento no muito eficiente e pouco conciso. Para a obteno do produto o autor faz uso de dez passos reacionais com um rendimento global de cerca 6.56%.

O mesmo autor, em trabalho mais recente, utilizou a mesma β -lactama **91** como material de partida, Esquema 40.¹²⁴ Nesta etapa, mais do que a otimizao, o objetivo foi obter diferentes anlogos. Isto foi conseguido pela utilizao de diferentes reagentes de Grignard para a abertura da β -lactama. Na seqncia o autor induziu a formao de uma dupla ligao atravs de reagentes de selnio. Posteriormente, o composto **93** aps uma seqncia de passos foi transformado no intermedirio **94**, o qual passvel de ser transformado em anatoxina-a **60**, bem como seus anlogos. O principal problema aqui o baixo rendimento global do processo sinttico ($\leq 10\%$).¹²⁴

Esquema 40. Procedimento mais recente apresentado por Parson e col.¹²⁵ para a sntese da anatoxina-a a partir de 1,5-ciclooctadieno

¹²⁴ Parsons, P. J.; Camp, N. P.; Edwards, N.; Sumoreeah, L. R. *Tetrahedron* **1999**, 56(2), 309-315.

Após isso, uma nova rota sintética para a preparação de mistura racêmica de anatoxina-a foi apresentada com algumas modificações.¹²⁵ Esse procedimento foi o primeiro a utilizar uma aminocarbonilação intramolecular catalisada por paládio capaz de gerar a mistura de compostos **96** e **97** (Esquema 41). A amina vinílica **95** sofreu a ciclização intramolecular catalisada por paládio. Depois de alguns procedimentos este biciclo **97** foi transformado na amida **98** que, em mais três passos gerou a anatoxina-a **60**. A grande quantidade de passos reacionais necessários nessa rota sintética (14) torna a mesma inviável. Ainda, em um dos estágios é gerado mistura de produtos (passo i, reação de ciclização). Estes fatores fazem com que esse procedimento um baixo rendimento global (menor que 5%).

Esquema 41. Procedimento apresentado por Oh e col.¹²⁶ para a síntese do composto **98** a partir de uma ciclização intramolecular catalisada por Pd-II

Trost & Oslob¹²⁶ utilizaram diferentes catalisadores de paládio para esta espécie de ciclização. O passo fundamental no procedimento apresentado por esses autores é a adição de Michael, que gera o biciclo **104**. Esta reação é catalisada por um dímero de paládio que conduz à formação do produto (**104**) de forma enantiomericamente pura (Esquema 42). A grande vantagem desse método é o bom rendimento global da sequência reacional, atingindo algo em torno de 15%. Ao mesmo tempo, o alto custo deste catalizador de paládio torna o método caro e praticamente inviável em grandes quantidades. Outros catalisadores de paládio foram testados pelo mesmo autor a fim de verificar a enantioseletividade dessas específicas reações de ciclização.

¹²⁵ Oh, C-Y.; Kim, K-S.; Ham, W-H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 2133-2136.

¹²⁶ Trost, B. M.; Oslob, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 3057.

i. TsNHBoc, Ph_3P , DIAD, PhH, t.a.; ii. $\text{PhCH}=\text{Ru}(\text{Cl})_2[(\text{C}_6\text{H}_{11})_3\text{P}]_2$, PhCH₃, refluxo;
 iii. CHBr_3 , KOC_4H_9 -t, C_5H_{12} , -15°C ; iv. 1. AgOAc , HOAc, refluxo; 2. $(\text{Boc})_2\text{O}$, DMAP, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, CH_2Cl_2 ; v. 1. K_2CO_3 , CH_3OH , t.a.; 2. Ph_3P , HOAc, DIAD, PhH, t.a.; vi. CO , CH_3OH , 5% $(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Pd}$, $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, DMPU, 100°C ; vii. 1. K_2CO_3 , CH_3OH , t.a.; 2. $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{Li}$, THF, -78°C , ClCO_2CH_3 ; 3. $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$, CH_2Cl_2 , t.a.; viii. 2.5% $(\text{dba})_3\text{Pd}_2\text{CHCl}_3$; ix. 1. LiOH , H_2O , MeOH; 2. $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 ; 3. $(\text{CH}_3)_3\text{Al}$, AlCl_3 ; x. $\text{Na}(\text{Hg})$, Na_2HPO_4 ;

Esquema 42. Procedimento seguido por Trost & Oslob.¹²⁷ para a síntese da N-Ts-metoxianatoxina-a **104**

Mais recentemente, Ho & Zinurova¹²⁷ fizeram uso de 1,5-ciclooctadieno como material de partida, o qual reagiu com um equivalente de clorosulfonil isocianato (CSI) gerando a lactona intermediária **86** (Esquema 43). Em reações posteriores este composto intermediário sofre abertura do anel lactâmico gerando o aminoéster **105**, que sob condições catalíticas gera o intermediário bicyclico **108**.

i. DCM, CSI; ii. HCl gás, MeOH; iii. CuCl_2 , PdCl_2 , NaCl, HCl, 60°C , 6h.

Esquema 43. Procedimento sintético aplicado por Ho & Zinurova.¹²⁸ para a síntese da metoxianatoxina-a **108** a partir de 1,5-ciclooctadieno.

¹²⁷ Ho, T-L.; Zinurova, E. *Helvetica Chimica Acta* **2006**, 89(1), 134-137.

Para o último passo desta metodologia, que em apenas quatro procedimentos conduz ao interessante intermediário **108**, os autores utilizaram um catalisador simples de paládio divalente. Diferente de outros métodos, o material de partida **105** já possuía uma insaturação (utilizada na ciclização intramolecular). Esta sofre uma migração, que segundo os autores passa por um possível equilíbrio entre os intermediários **106** e **107**. Este fato é possível devido a uma maior estabilidade que os sistemas α,β -insaturados possuem. Desta forma, o equilíbrio anteriormente citado conduz ao produto final **108**. O que nos chamou a atenção nesta rota é a não necessidade de produção desta insaturação interna ao biciclo. Como podemos observar na revisão bibliográfica apresentada, a formação de uma dupla ligação nesse sistema complexo não é nada fácil, necessitando vários passos reacionais, como fez Parsons e col.¹²⁴ Ainda, em outra metodologia o mesmo autor utiliza intermediários tóxicos de selênio para esse fim.¹²⁵

Assim, em busca de um método viável, principalmente com número pequeno de etapas e bom rendimento global, para a produção da anatoxina-a, chegamos a proposta apresentada no Esquema 44, onde o objetivo é a obtenção do produto em apenas cinco passos reacionais, a partir do 1,5-ciclooctadieno **85**. Ainda, se o procedimento ocorrer da forma que imaginamos será possível obter importantes análogos como a homoanatoxina-a e moléculas isotopicamente marcadas através da mesma rota.

Esquema 44. Rota sintética proposta para a síntese da anatoxina-a e análogos a partir de 1,5-ciclooctadieno onde o passo chave é uma ciclização catalisada por Pd-II.

Deste modo, iniciamos o procedimento proposto pela produção da β -lactama **86** a partir da reação de 1,5-ciclooctadieno com clorosulfonyl isocianato (CSI). Para isto avaliamos alguns métodos recentemente apresentados que possuem esse mesmo fim. Um dos problemas encontrado aqui foi à alta reatividade do CSI, o qual é bastante eletrofílico, reagindo fortemente (às vezes violentamente) com agentes nucleofílicos como a água, por exemplo.

O primeiro procedimento avaliado por nós com esse fim, foi o mesmo utilizado por Ho & Zinurova.¹²⁷ Estes autores faziam uso diclorometano como solvente e carbonato de potássio como base em uma técnica conduzida a temperatura ambiente. Quando tentamos reproduzir este método em nosso laboratório chegamos a um rendimento de apenas 15%, após a purificação do produto por coluna cromatográfica com sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano e acetato de etila (8:2) como eluentes. Depois de algumas tentativas não obtivemos rendimentos superiores a esse através deste procedimento.

Alternativamente, chegamos a metodologia apresentada por Besada e col.¹²⁸ onde éter etílico anidro foi utilizado como solvente para a formação da β -lactama. A diferença aqui é que originalmente o autor utiliza 1,3-ciclopentadieno como material de partida. Assim, adaptamos o método para 1,5-ciclooctadieno. Todavia, obtivemos um produto com um bom rendimento, 52%, em comparação a outros artigos reportados que fazem a síntese do mesmo composto **86** os quais relatam rendimentos entre 40 a 48%.¹²⁹

A análise deste produto por espectrometria de massas é mostrada no espectro da Figura 38. No modo *full scan* temos o íon m/z 152.0 $[M + H]^+$ referente a β -lactama **86**. Enquanto isso, o íon m/z 107.2 refere-se a uma ionização do íon quase-molecular $[M - CONH_2]^+$, e o íon m/z 303 é referente ao dímero $[M + M + H]^+$. Estes dados obtidos foram confirmados por ESI-MS/MS.

¹²⁸ Besada, P.; Gonzáles-Moa, M. J.; Téran, C.; Santana, L.; Uriarte, E. *Synthesis* **2002**, 2445-2449.

¹²⁹ (a) Tanaka, M.; Oba, M.; Ichiki, T.; Suemune, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49(9) 1178-1181; (b) Malplass, J. R.; Tweddle, N. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 874-884.

Figura 38. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de formação da β -lactama **86**.

Dando continuidade ao procedimento proposto, partimos para a *N*-proteção da referida lactama obtida no processo anterior com Boc-anidrido. Para essa reação juntamos *di-tert*-butildicarbonato (BOC), o composto **86** e dimetilamino piridina (DMAP) que foi usada como base. A reação procedeu normalmente e após purificação em coluna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura éter de petróleo/éter etílico como fase móvel numa proporção de 3:7, chegamos ao produto **91**. Este foi obtido com um rendimento de 75%, um pouco acima do que o reportado na literatura.¹²⁶ Este produto também foi avaliado por espectrometria de massas. Na Figura 39 observamos o espectro proveniente dessa análise no modo *full scan*, onde íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ m/z 251.9 é um dos mais intensos.

Figura 39. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de *N*-proteção da β -lactama **86**.

No espectro no modo MS^2 referente ao íon m/z 251.9 verificamos a presença de um sinal intenso com m/z 195.8 $[M - O(CH_3)_3]^+$, Figura 40. Outros íons que aparecem no modo *full scan*, Figura 39, são também resultantes de uma ionização na fonte do íon m/z 251.9, como por exemplo, o com m/z 151.8 referente à $[M - COO(CH_3)_3]^+$. Os mesmos não aparecem no espectro MS^2 (Figura 36) devido a baixa energia de ionização aplicada no equipamento, além da grande estabilidade do íon com m/z 195.8.

Figura 40. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 252.0 referente à *N*-Boc- β -lactama **91** obtida por via sintética.

Na etapa seguinte, procedemos à reação de abertura do anel lactâmico do intermediário **91** para a formação do composto **109a**. Esse método também necessita de condições extremamente controladas, principalmente com relação a agentes nucleofílicos, entre esses o mais comum é a água. Assim, utilizamos atmosfera inerte (N₂), solvente anidro (THF), além de temperatura controlada (-78°C). Ainda, houve a necessidade de um controle extremo das quantidades dos reagentes para não ocorrer reações de sobre-adição de reagente de Grignard na correspondente carbonila. Após purificação do mesmo (por coluna cromatográfica com sílica gel como fase estacionária e a mistura éter de petróleo/éter etílico na proporção de 3:2 como fase móvel) obtivemos o produto desejado com um bom rendimento, 79%. No espectro de massas da Figura 41 verificamos que o composto **109a** foi obtido com alto grau de pureza. O íon referente à $[M + H]^+$ m/z 268.0 está presente com boa intensidade. Enquanto isso, os outros íons que aparecem neste espectro de massas obtido no modo *full scan* são referentes à ionização do íon *quase-molecular* na fonte. Assim, o íon m/z 211.9 é referente à $[M - (CH_3)_3 + H]^+$, enquanto o íon m/z 195.8 é referente ao $[M - O(CH_3)_3 + H]^+$ e o íon com m/z 167.9 é referente a $[M - O(CH_3)_3]^+$. Isto foi comprovado por análise do íon *quase-molecular* (m/z 268.0) no modo MS². Ainda, esse composto foi também avaliado através de seu ponto de fusão, sendo este igual a 85°C, dado que está de acordo com o reportado na literatura.¹²⁶ A fusão completa e definitiva foi indicativa do alto grau de pureza do composto.

Figura 41. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de abertura da lactona através de uma reação de Grignard, formação do produto **109a**.

Na etapa seguinte foi realizada uma *N*-desproteção. Esta ocorreu através da adição de ácido trifluoracético (TFA) a uma solução composto **109a** em diclorometano. A mistura foi agitada por 2h a 0°C. Após evaporação do solvente, do excesso de ácido, bem como do subproduto formado (álcool *tert*-butílico), obtivemos o produto desejado **110a** com ótimo grau de pureza, conforme podemos comprovar no espectro de massas apresentado na Figura 42.

Figura 42. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de *N*-desproteção com ácido trifluoracético, formação do produto **110a**.

No espectro de massas no modo MS^2 do íon m/z 168.1 encontramos alguns fragmentos que nos ajudam a confirmar a estrutura da molécula, Figura 43, como por exemplo, o íon m/z 150.1, referente à $[M - NH_2]^+$.

Figura 43. Espectro de massas no modo MS^2 do íon com m/z 168 referente à amino cetona **110a** obtida por via sintética.

Chegando a este importante intermediário **110a**, conforme planejado anteriormente (Esquema 44), partimos para a etapa final. Esta seria a reação de ciclização intramolecular que esperávamos que nos conduzisse a síntese total da anatoxina-a.

Para esta reação prevíamos as maiores dificuldades da rota de síntese o que nos levaria a uma possível necessidade de otimização desse processo. Essa espécie de ciclização intramolecular já foi realizada algumas vezes como vimos na breve revisão de literatura. No entanto, para esse sistema (partindo do composto **109a**) não existem tentativas descritas na literatura. Sendo assim, buscamos primeiro as condições para que a reação aconteça e depois tratamos de obter as condições ideais (otimização) para esse processo.

A química inserida nesta metodologia de oxidação/ciclização está diretamente ligada a espécie de Pd(II). Esses compostos reagem com espécies ricas em elétrons tais como oleofinas, alquinos e arenos. Uma das maiores utilidades de processos catalíticos baseados em Pd(II) é que esta espécie se combina de forma rápida e reversivelmente com “doadores de elétrons” tais como compostos insaturados, os quais sofrem subsequente ataque nucleófilico. Assim, reações catalisadas por paládio onde ocorre uma adição oxidativa seguida de uma eliminação redutiva são métodos poderosos para a produção de compostos cíclicos.¹³⁰

Baseado no já descrito para essa espécie de reação, o Esquema 45 indica o ciclo catalítico que passa a espécie de Pd(II) quando este reage com oleofinas. Aqui, vários produtos são formados dependendo das condições reacionais adotadas. Ainda, faz-se necessário um sistema eficiente de reoxidação para a continuidade do processo requerido. Desta forma, as possibilidades para este processo são as mais variadas possíveis, podendo ser modificadas de acordo com a finalidade.

¹³⁰ Zeni, G.; Larock, R. C. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2285.

Esquema 45. Mecanismo catalítico genérico para reações catalisadas com espécie de Pd-II.

Nosso primeiro teste foi baseado no mesmo método apresentado por Ho & Zinurova¹²⁸ para a formação do biciclo intermediário **108** (Esquema 43). Neste caso os autores utilizaram PdCl₂ sob condições ácidas, com um sistema reoxidante contendo CuCl₂ e NaCl. No entanto não observamos a formação do composto desejado.

Alguns detalhes do procedimento aplicado são interessantes e requerem avaliação. Tratar-se de uma catalise ácida, sendo que o material de partida em questão possui uma amina primária, ou seja, contém hidrogênios ácidos. Ainda, o autor supracitado¹²⁸ utiliza como agente reoxidante um composto metálico a base de cobre. Isso é desaconselhável já que temos a presença de um nitrogênio primário nesse sistema complexo (**110a**). A razão para isto vem da grande capacidade de compostos nitrogenados como esse formarem complexos estáveis quelados com cobre. Se isso ocorresse aqui, acarretaria em uma grande diminuição da capacidade nucleofílica do mesmo. Dessa forma, decidimos avaliar outros procedimentos que fazem uso de espécies divalentes de paládio para fins de promoção de compostos cíclicos. Para isso, modificações do sistema reoxidante e a utilização de um modelo que faz uso de base ao invés de ácido fizeram parte de nossos primeiros testes.

Existe uma grande variedade de condições para ciclizações como esta. Por exemplo, Tsuitsui e col.¹³¹ utilizaram acetato de paládio Pd(OAc)₂ como catalisador, trietilamina (Et₃N) como base e trifetilfosfina (Ph₃P) associada ao solvente dimetilformamida (DMF) como responsáveis pela reoxidação, Esquema 46. O pirrol

¹³¹ Tsuitsui, H.; Kitamura, M.; Narasaka, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, 606-607.

113 foi obtido através de uma adição oxidativa com uma posterior eliminação e com rendimento de 40%.

Esquema 46. Procedimento catalítico aplicado por Tsuitsui e col. para a síntese do produto **113** utilizando espécies de Pd-II.

Enquanto isso, o composto **115** foi obtido por uma reação semelhante utilizando cloreto de paládio complexado com acetonitrila PdCl₂(MeCN)₂ como catalisador, THF como solvente, carbonato de sódio (Na₂CO₃) como base e um sistema reoxidante composto por cloreto de lítio (LiCl) e Benzoquinona (Bq). Esta mistura foi aquecida a uma temperatura de 110°C durante um período de 4h. O autor obteve um excelente rendimento, 93%, para o produto da reação presente no Esquema 47.¹³²

Esquema 47. Procedimento catalítico apresentado por Hegedus e col. para a síntese do produto **115** utilizando PdCl₂(MeCN)₂

Para realização da ciclização intramolecular, Van Benthem e col.¹³³ testaram algumas amidas e derivados (Esquema 48). Percebemos a utilização de acetato de paládio como catalisador, enquanto a atmosfera oxidante foi composta pelo próprio solvente DMSO (dimetil sulfoxido) associado a oxigênio gasoso (O₂). A graduação de rendimento foi associada pelo autor à diferença de reatividade (capacidade nucleofílica) do nitrogênio de acordo com o substituinte. Outro dado interessante desse procedimento é que podemos perceber uma migração da insaturação da posição 2 para a posição 3 após a eliminação.

¹³² Hegedus, L. S.; Allen, G. F.; Oslen, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 3583-3587.

¹³³ Van Benthem, R. A. T. M.; Hiemstra, H.; Longarela, G. R.; Speckamp, W. N. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9281-9284.

Esquema 48. Procedimento de ciclização demonstrado por Van Benthem e col. para a obtenção do produto **117**.

No mesmo caminho, os heterociclos **119**, **121**, **123**, **125** foram obtidos a partir de um sistema reoxidante composto por DMSO associado ao oxigênio e acetato de sódio (NaOAc).¹³⁴ Os produtos foram gerados com diferentes rendimentos, o que indica uma relação direta entre a estrutura molecular (impedimento estérico, nucleofilicidade, etc) e a formação dos compostos, Esquema 49. Notamos que principalmente o impedimento estérico tem uma grande influência na formação do sistema π -olefínico relatado anteriormente (Esquema 45), o que impossibilita a reação de adição intramolecular nucleofílica. O menor rendimento para a formação do composto **125**, em relação aos demais (Esquema 49) é um indício.

Esquema 49. Diversos compostos obtidos por reações catalíticas com Pd-II por Larock e col. Aqui percebemos a diversidade de compostos os quais são suscetíveis a essa espécie de reação catalítica.

Após esta breve revisão, voltamos ao nosso objetivo (síntese do composto **60**, Esquema 45) procedendo às modificações que achamos coerente para essa ciclização catalítica/oxidativa. Assim, obtivemos resultados positivos na otimização deste processo de síntese partindo do intermediário acíclico **110a**. Entre as modificações,

¹³⁴ Larock, R. C.; Hightower, T. R.; Hasvold, L. A.; Peterson, K. P.; *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 3584-3585.

foram avaliados diferentes sistemas de reoxidação, além de solventes e bases. A Tabela 5 apresenta os resultados para esta otimização, onde o produto **60** foi obtido em diferentes quantidades em comparação ao material de partida (**110a**) o qual em nenhum processo reagiu completamente.

Tabela 5. Condições utilizadas para a otimização do processo de ciclização para a obtenção da anatoxina-a através de uma ciclização intramolecular sob catalise com Pd-II.

Condição ^a	Catalisador ^b	Solvente ^c	Base ^d	Aditivo ^e	60 (%)	110a (%)
1	Pd(OAc) ₂	DMSO	Na ₂ CO ₃	O ₂ /NaOAc	32	68
2	Pd(OAc) ₂	DMSO	Et ₃ N	NaOAc	42	58
3	Pd(OAc) ₂	DMSO	Et ₃ N	O ₂ /NaOAc	92	08
4	Pd(OAc) ₂	DMF	Et ₃ N	O ₂ /NaOAc	35	65
5	Pd(OAc) ₂	THF	Na ₂ CO ₃	O ₂ /NaOAc	15	85
6	Pd(OAc) ₂	THF	Et ₃ N	O ₂ /NaOAc	18	82
7	PdCl ₂	DMSO	Na ₂ CO ₃	O ₂ /NaCl	30	70
8	PdCl ₂	DMSO	Et ₃ N	NaOAc	32	68
9	PdCl ₂	DMSO	Et ₃ N	O ₂ /NaCl	70	30
10	PdCl ₂	THF	Na ₂ CO ₃	O ₂ /NaCl	20	80
11	PdCl ₂	THF	Et ₃ N	O ₂ /NaCl	18	83

^a foram mantidos constantes durante esses primeiros testes: temperatura (40°C); tempo (6h); 0.25mmols (0.041g) de **110a**; ^b10mol% de catalisador (0,0056g); ^c 3 mL; ^d 0.25mmols; ^e quando utilizado sistema com O₂, o mesmo foi adicionado com auxílio de reservatórios externos os quais mantiveram a pressão interna de O₂ a 1 atm, enquanto os demais aditivos foram adicionados na proporção de 1eq:1eq em relação ao material de partida (**110a**), ou seja 0.25 mmols.

A quantificação dos produtos foi realizada diretamente a partir da proporção dos sinais apresentados nos espectros de massas. Estas análises foram realizadas por infusão direta com ionização por *eletrospray* (ESI-Ms). Isto só é possível se considerarmos os dois componentes da mistura (**60** e **110a**) como apresentando a mesma estabilidade nas condições do equipamento.

No espectro de massas *full scan* apresentado na Figura 44 podemos visualizar o produto da reação sob a condição 10 (Tabela 5). Para isso foi retirada uma alíquota de 10µL diretamente do frasco de reação depois de complementada as condições apresentadas na Tabela 5. Assim essa análise/quantificação foi realizada sem prévias purificações. Na Figura 40, observamos cerca de 20% da intensidade do íon *m/z* 166.1

referente ao *quase-molecular* $[M + H]^+$ da anatoxina em relação ao íon m/z 168.1, referente do material de partida $[M + H]^+$ **110a**.

Figura 44. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II que leva a formação do **60** sob a condição 10 apresentada na Tabela 5.

Para uma melhor avaliação/quantificação dos produtos os espectros foram ampliados como o apresentado na Figura 45 para a condição 7 da Tabela 5. De acordo com a intensidade dos íons para essa condição existe cerca de 30% do íon m/z 166.1 em relação a 70% do íon m/z 168.1.

Figura 45. Expansão do espectro de massas, m/z 150-185 referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II, que leva a formação do produto **60** sob a condição 7 apresentada na Tabela 5.

Na Figura 46 plotamos os resultados das 5 primeiras condições testadas e apresentadas na Tabela 5. Aqui percebemos as diferenças de intensidades dos íons avaliados.

Figura 46. Expansões dos espectros de massas, m/z 165-170 referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II, que leva a formação do produto **60** sob as condições 1-5 apresentadas na Tabela 5.

Depois desta série de testes (Tabela 5) concluímos que o procedimento em que anatoxina-a foi o produto majoritário (92%) em relação ao material de partida (8%), foi o ideal.

Para a confirmação da estrutura molecular do produto usamos espectro de massas no modo MS² como o colocado na Figura 47. Neste foi possível uma avaliação do íon com m/z 166.1, o qual gera certas fragmentações que são responsáveis pelos íons com m/z 149.1, 131.2, 108.3 e 91.4.

Figura 47. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 166.1 referente a anatoxina-a **60** obtida por via sintética.

Estes mesmos íons têm sido descritos em alguns trabalhos envolvendo identificação da anatoxina-a por LC-MS com o mesmo processo de ionização (*eletrospray*). Furey e col.¹³⁵ apresentaram uma suposta teoria para a fragmentação desta molécula, Esquema 50. Observamos que os mesmos íons que aparecem no espectro MS² para o íon m/z 166, Figura 47.

Esquema 50. Fragmentação para anatoxina-a sob condições de ESI-MS proposta por Furey e col.¹³⁶

¹³⁵ Furey, A.; Crowley, J.; Lehane, M.; James, K. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 583–588.

Ainda, com intuito de melhorar o procedimento, outras importantes avaliações foram realizadas. Na primeira aumentamos a quantidade de material de partida **110a** para 2 mmols (0,334 g). Neste caso o procedimento se mostrou reprodutível. Portanto o método determinado é passível de produzir maiores quantidades de produto em um mesmo procedimento.

Ainda, um processo de purificação por HPLC utilizando uma coluna semi preparativa C18 e acetonitrila/água (1:1) como fases estacionária e móvel respectivamente e adição de 0,1% de ácido fórmico foi determinado, Figura 48. Para isto, utilizamos um comprimento de onda de 230nm, além de condição isocrática de solvente. O pico com tempo de retenção de 19.08 min representa a anatoxina-a como podemos confirmar no espectro de massas ao lado. No entanto, este método não foi útil a nós. Após a coleta e evaporação do solvente referente ao pico da anatoxina-a o composto sofreu uma degradação indeterminada não possibilitando o isolamento desta.

Figura 48. Tentativa de purificação da anatoxina-a através de cromatografia líquida de alta eficiência com análise de UV/Visível a um λ de 230nm. No espectro de massas representado no canto superior direito, podemos confirmar a presença da anatoxina-a após coleta do pico e antes do processo de evaporação do solvente.

Em contrapartida em outro processo de purificação tivemos melhores resultados. Este passa pela transformação da anatoxina-a obtida sinteticamente em cloridrato. Para isto, após o termino do procedimento de síntese previamente

determinado, a solução foi filtrada e ao filtrado foram adicionados 5mL de acetato de etila saturado com ácido clorídrico gasoso. Esta nova solução formada foi agitada por 2h a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a mistura de solventes foi evaporada sob vácuo e o resíduo foi dissolvido em 5 mL de água. Esta mistura foi extraída com éter etílico ($3 \times 20\text{mL}$). A fase aquosa foi novamente evaporada e o que restou passou por um processo de recristalização em álcool etílico aquoso. O produto teve seu ponto de fusão determinado (158°C) o que esteve de acordo com o indicado na literatura. Este foi obtido com o bom rendimento de 58%.

Assim considerando as cinco etapas, a rota desenvolvida é capaz de gerar um rendimento global de aproximadamente 21% estando entre os procedimentos mais eficientes entre os relatados para a síntese da anatoxina-a. Ainda, este é certamente entre todos, o capaz de produzir a anatoxina-a em um menor número de passos reacionais (mais conciso). Essa rota sintética desenvolvida deve ser submetida em breve à publicação (Anexo 6).

Para a produção da homoanatoxina-a **110b**, procedemos a uma modificação no passo de abertura da β -lactama **91** (formação da cetona), reagindo à mesma com cloreto de etilmagnésio ao invés de cloreto de metilmagnésio (Esquema 44). Assim, obtivemos a etilcetona **109b**, a qual passou pelo mesmo processo de *N*-desproteção sendo posteriormente foi ciclizada pelo mesmo método anteriormente otimizado. A Figura 49 apresenta o espectro de massas no modo MS^2 para o íon *quase-molecular* $[\text{M} + \text{H}]^+$ com m/z 180.1 referente a homoanatoxina-a. Aqui percebemos a mesma seqüência de fragmentação que o determinado anteriormente para a anatoxina-a, com adição da massa de uma metila em alguns íons. Isto esta de acordo com o esperado, já que as estruturas químicas são muito parecidas. Assim, confirmamos a obtenção da homoanatoxina-a.

Figura 49. A) Espectro de massas no modo MS² para o íon com m/z 180.1 referente a homoanatoxina-a obtida por via sintética. B) Caminho da fragmentação em *eletrospray* para esta molécula. Esta segue o previamente determinado para a anatoxina-a.

Os inéditos análogos deuterados dessas toxinas (D₃-anatoxina-a e D₅-homoanatoxina-a) são possíveis de serem obtidos através da mesma rota. Assim obtivemos para a D₃-anatoxina-a usando para isto o reagente de Grignard CD₃MgCl comercialmente disponível no passo de abertura da lactona **91** (Esquema 44). Após, usamos o mesmo procedimento previamente determinado para a síntese do produto de interesse. A Figura 50 mostra o espectro de massas no modo MS² para o íon com m/z 169.1 referente a D₃-anatoxina-a. Enquanto isto, a confirmação da estrutura química da molécula pode ser feita pela fragmentação apresentada pelo íon, que esta de acordo com o determinado anteriormente para a anatoxina-a adicionado de 3 u.m.a. para alguns fragmentos. Para a D₅-homoanatoxina não existe o reagente comercial CD₃CD₂MgCl e por conseqüência existe a necessidade de produzir o mesmo. No entanto não tivemos tempo hábil para isto.

Figura 50. A) Espectro de massas no modo MS² para o íon com m/z 169.1 referente a D₃-anatoxina-a obtida por via sintética. B) Caminho da fragmentação em *eletrospray* para esta molécula. Esta segue o previamente determinado para a anatoxina-a.

Explorando o método de síntese a partir das ferramentas disponíveis no laboratório sugerimos um possível mecanismo para a reação de ciclização, Esquema 51. Isto ocorreu quando identificamos um intermediário com m/z 312.9 quando avaliamos uma pequena alíquota (5 μ L) retirada do frasco de reação 30 min após o início do processo. Esta foi infundida diretamente no espectrômetro de massas sendo ionizada por *eletrospray*.

Esquema 51. Mecanismo proposto para a reação catalizada por Pd-II para a síntese da anatoxina-a a partir do aminoéster **110**.

Associamos este a um *adduto* de sódio de um possível intermediário de paládio divalente o qual deve estar presente no equilíbrio que conduz ao produto. Assim podemos justificar a migração da dupla ligação que conduz a anatoxina-a. Outro dado que nos faz acreditar na existência desse intermediário é o fato de que os sinais presentes nos espectro de massas poderem ser correlacionado com a razão isotópica do átomo de paládio. Assim podemos justificar a migração da dupla ligação indicada por Ho e Zinurova¹⁰⁷ para essa espécie de ciclização intramolecular.

2.1.3 – Síntese da metoxianatoxina-a

A pós conclusão da síntese da anatoxina-a, partimos para a produção de outros compostos análogos através do mesmo procedimento. Isto, além de possibilitar a síntese de interessantes moléculas, com possíveis interesses farmacológicos, evidenciaria a funcionalidade do nosso método. A etoxi-anatoxina-a pode ser considerada um excelente intermediário para a síntese de outros compostos, já que grupamentos ésteres podem sofrer uma série de transformações.

Este composto já havia sido anteriormente sintetizado por Ho & Zinurova.¹⁰⁷ A diferença do método adotado por esses autores quando comparado ao procedimento desenvolvido no laboratório é a técnica que conduz ao biciclo.

Para iniciar foi necessária a síntese do éster **105** a partir da β -lactama **86** conforme Esquema 52.

Esquema 52. Síntese do aminoéster **105** a partir da lactona **86** através de uma adição nucleofílica a carbonila

Um bom rendimento foi obtido para síntese do composto **105**. Este ainda possui um alto grau de pureza, como pode ser observado no espectro de massas da Figura 51, onde o íon $[M + H]^+$ m/z 183.8 está em quantidade majoritária.

Figura 51. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de esterificação que conduz a formação do **105**.

A estrutura do composto foi confirmada através do espectro de massas no modo MS^2 do íon m/z 183.9, Figura 52. Aqui observamos algumas fragmentações esperadas

para essa molécula, como por exemplo, os íons m/z 166.8 e 151.9 referentes à $[M - NH_3]^+$ e $[M - HOCH_3]^+$, respectivamente.

Figura 52. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 183.9 referente a ester **105** obtido por via sintética

Em um próximo estágio, o aminoéster **105** foi conduzido ao ciclo **108**, Esquema 53. Para essa etapa, testamos primeiramente o mesmo método de ciclização determinado por Ho & Zinurova.

Esquema 53. Síntese proposta para o biciclo **108** através de ciclização intramolecular catalisada por espécies de Pd-II

Por esta rota o produto **108** foi obtido com um rendimento inferior a 10%. Vale relembrar as possíveis dificuldades previstas anteriormente por nós para um método que faz uso de uma catalise ácida associado a um sistema reoxidado composto de $CuCl_2$ para a ciclização de uma molécula que contém uma amina primária.

Além de avaliar as mesmas condições determinadas para a formação da anatoxina-a, algumas variações com intuito de otimizar o processo sintético para o biciclo **108** foram testadas. Os detalhes dessa otimização estão colocados na Tabela 6.

Tabela 6. Condições utilizadas para a otimização do processo de síntese do biciclo **108** através de uma ciclização intramolecular sob catalise com Pd-II.

Condição ^a	Pd (10mmol%)	Solvente	Aditivo (1 eq)	Base	Rendimento (%) ^b
1	Pd(OAc) ₂	DMSO	NaOAc	N(Et) ₃	40
2	PdCl ₂	DMSO	NaCl	N(Et) ₃	10
3	Pd(OAc) ₂	THF	NaOAc	Na ₂ CO ₃	22
4	Pd(OAc) ₂	DMSO	O ₂ ^c /NaOAc	N(Et) ₃	64

^aEm todas as condições as reações foram conduzidas a 60°C por 6h com uma quantidade inicial do composto **86** de 0.5 mmol.; ^bApós a purificação; ^cA 1atm.

Verificamos, portanto uma concordância entre o procedimento determinado como ideal para a síntese da anatoxina-a **60** (condição 3, Tabela 5) e o indicado para o composto **108** (condição 4, Tabela 6).

Segundo Ho & Zinurova,¹²⁷ para este procedimento o produto foi obtido com um rendimento de 40%, o que esta em desacordo com o verificado em nosso laboratório para a síntese desse composto através do método desenvolvido por eles. Obtivemos um bom rendimento através deste procedimento, 64%.

A molécula obtida foi avaliada por ESI-MS como podemos verificar na Figura 53. Faz-se notória a presença dos íons *m/z* 181.9 e 183.9, referentes aos compostos **105** e **108**, respectivamente. No entanto, o pico do composto **108** é muito mais intenso.

Figura 53. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de ciclização com Pd-II que conduz a formação da metoxianatoxina-a **108**.

O rendimento global referente à combinação dos três passos reacionais (partindo-se do 1,5-ciclooctadieno) foi de 48%, o que ainda é maior que o relatado anteriormente para apenas o passo da ciclização.¹²⁸

Na Figura 54, podemos avaliar um espectro de massas MS² para o íon *m/z* 181.9, o qual confirma a estrutura do composto **108**. O íon com *m/z* 149.9 refere-se à

$[M - OCH_3]^+$, o íon com m/z 121.9 ao $[M - COOCH_3]^+$ e o íon com m/z 105.0 ao $[M - COOCH_3 - NH_3]^+$.

Figura 54. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 181.9 referente a metoxianatoxina-a **108** obtido por via sintética

O composto **108** é um excelente precursor para outros produtos, os quais podem ser importantes na pesquisa sobre toxicidade/capacidade farmacológica dessa família de alcalóides. No Esquema 54 propomos algumas transformações viáveis somente à cadeia lateral, a qual pode ser considerada precursora para a formação de outros compostos. A síntese deste composto, bem como dos possíveis derivados fazem parte de um artigo em fase de conclusão (Anexo 7).

Esquema 54. Possíveis compostos análogos da anatoxina-a gerados a partir do ester bicíclico **108**.

2.2 – Aplicações estratégicas

2.2.1 – Determinação analítica através de LC-MS utilizando D₃-anatoxina-a

Devido a sua importância toxicológica como relatado anteriormente vários métodos tem sido utilizados para detectar anatoxina-a a partir de diferentes matrizes (água, florações de cianobactéria, culturas, etc). Por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC),¹³⁶ cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE),¹³⁷ cromatografia em camada delgada (CCD),¹³⁸ cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS),¹³⁹ cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (GC-ECD),¹⁴⁰ cromatografia em fase gasosa associada à espectrometria de massa (GC-MS).¹⁴¹

Os métodos cromatográficos associados aos mais diversos analisadores são os preferidos para a identificação dessa toxina. A Tabela 7 apresenta a relação dos principais casos de contaminação/identificação com o método cromatográfico utilizado.

¹³⁶ Harada, K.; Kimura, Y.; Ogawa, K.; Suzuki, M.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W. *Toxicon* **1989**, 27(12), 1289-1296.

¹³⁷ Al-Layl, K.; Poo, G. K.; Codd, G. A. *J. Microbiol. Methods*. **1988**, 7(6), 251-257.

¹³⁸ Ojanpera, I.; Vuori, E.; Himberg, K.; Waris, M.; Niinivaara, K. *Analyst* **1991**, 116(3), 265-7.

¹³⁹ Poon, G. K.; Griggs, L. J.; Edwards, C.; Beattie, K. A.; Codd, G. A. *J. Chromatogr. A* **1993**, 628(2), 215-23.

¹⁴⁰ Stevens, D. K.; Krieger, R. I. *Journal of Analytical Toxicology* **1988**, 12(3), 126-31.

¹⁴¹ (a) Smith, R. A.; Lewis, D. *Veterinary and Human Toxicology* **1987**, 29(2), 153-4; (b) Himberg, K. *Journal of Chromatography* **1989**, 481, 358-62.

Tabela 7. Associação entre os dados mais relevantes em relação à contaminação por anatoxina-a e os respectivos métodos utilizados para detecção.

País	Ano	Episódio (mortes)	Método de detecção	Concentração de anatoxina-a	Referência
EUA	1981	cachorros	CG/EDC	2.5 µg/mg	¹⁴²
Finlândia	1985/87	vacas	HPLC/MS	12-4360 µg/g	¹⁴³
Escócia	1990/91	cachorros	HPLC/DAD	n.r.	¹⁴⁴
Japão	1991	n.r.	LC/MS	0.3-16 µg/g	¹⁴⁵
Itália	1987/90	n.r.	HPLC,	100 µg/g	¹⁴⁶
	2000/01		CG/MS		
Irlanda	1992/95	cachorros	HPLC/FL,	2-444 µg/g	¹⁴⁷
	2003		CG/MS,	24 µg/L	
			LC/MS		
Korea	1992/93	n.r.	HPLC/DAD	400-1200 µg/g	¹⁴⁸
Alemanha	1995/97	n.r.	CG/MS	0.01-6.4 µg/L	¹⁴⁹
Canadá	1985	Morcegos	CG/MS	n.r.	¹⁵⁰
N.	1998/00	cachorros	HPLC	n.r.	¹⁵¹
Zelândia					
Kenia	2001/02	flamingos	HPLC/PDA	10-18 µg/g	¹⁵²
Polônia	2001	n.r.	n.r.	n.r.	¹⁵³
Espanha	2002/05	n.r.	HPLC/DAD	n.r.	¹⁵⁴
França	2003/05	cachorros	HPLC/UV/MS	8000 µg/g	¹⁵⁵
			ESI/MS		
Nigéria	2005	n.r.	CG/MS	n.r.	¹⁵⁶

¹⁴² Juday, R. E.; Keller, E. J.; Horpestad, A. *The water environment: algal toxins and health*. New York. U.S.A., **1981**, ed. Plenum Press.

¹⁴³ (a) Sivonen, K.; Himberg, K.; Luukkainen, R.; Poon, G. K.; Codd, G. A.; *Toxic Assess* **1989**, 4:339-52; (b) Sivonen, K.; Niemelä, S. I.; Niemi, R. M.; Luoma, T. H. *Hydrobiologia* **1990**, 190(3), 267-75.

¹⁴⁴ Edwards, C.; Beattie, K. A.; Scrimgeour, C. M.; Codd, G. A. *Toxicon* **1992**, 30(10), 11175.

¹⁴⁵ (a) Harada, K.-I.; Nagai, H.; Suzuki, M.; Park, H.; Watanabe, M. F.; *Tetrahedron* **1993**, 49(41), 9251-60; (b) Park, H. D.; Watanabe, M. F.; Harada, K.; Nagai, H.; Watanabe, M.; *Nat. Toxins* **1993**, 1(6), 353-60.

¹⁴⁶ (a) Bruno, M.; Barbini, D. A.; Serse, A. P.; Ioppolo, A. *Toxicon* **1994**, 32(3), 369-73; (b) Viaggiu, E.; Melchiorre, S.; Volpi, F.; Di Corcia, A.; Garibaldi, L. *Environ. Toxicol.* **2004**, 19(3), 191-7.

¹⁴⁷ (a) James, K. J. I. R.; Sherlock, M. A.; Stack, M. *Toxicon* **1997**, 35(6), 963-71; (b) Furey, A.; Crowley, J.; Lehane, M.; James, K. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 583-8; (c) Furey, A.; Crowley, J.; Shuilleabhain, A. N.; Skulberg, O. M.; James, K. J. *Toxicon* **2003**, 41, 297, 303.

¹⁴⁸ Park, H. D.; Kim, B.; Kim, E.; Okino, T. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1998**, 13, 225-34.

¹⁴⁹ Bumke-Vogt, C.; Mailahn, W.; Rotard, W.; Chorus, I. *Phycologia* **1996**, 35(6), 51-6.

¹⁵⁰ Sivonen, K. In: Botana L. M. editor. *Pharmacology, physiology, and detection. Seafood and freshwater toxins*, **2000**, New York, U.S.A.; ed. Marcel Dekker, p. 567-581.

¹⁵¹ Hamill, K. D. *J. Mar. Freshw. Res.* **2001**, 35, 1057-9.

¹⁵² (a) Ballot, B.; Pflugmacher, W.; Kotut, K.; Krienitz, L. *Limnologia* **2003**, 33, 2-9; (b) Ballot, A.; Krienitz, L.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Metcalf, J.; Codd, G. A. *J. Plankton Res.* **2004**, 26(8), 925-35.

¹⁵³ Mazur, H.; Plinski, M. *Oceanologia* **2003**, 45(1), 305-16.

¹⁵⁴ Carrasco, D.; Moreno, E.; Paniagua, T.; de Hoyos, C.; Wormer, L.; Sanchis, D.; Cirés, S.; Martín-del-Pozo, D.; Codd, G. A.; Quesada, A. *J. Phycol.* **2007**, 43, 1120-1125.

¹⁵⁵ Gugger, M.; Lenoir, S.; Berger, C.; Ledreux, A.; Druart, J.; Humbert, J-F. *Toxicon* **2005**, 45, 919-28; (b) Cadel-Six, S.; Peyraud-Thomas, C.; Brient, L.; de Marsac, N. T.; Rippka, R.; Méjean, A. *App. Environ. Micro.* **2007**, 7605-7614.

¹⁵⁶ Odokuma, L. O.; Isirima, J. C. *African Journal of Biotechnology* **2007**, 6 (20), 2375-2385.

Mais recentemente, técnicas cromatográficas associadas a poderosos analisadores de massas têm sido amplamente aplicadas para a identificação dessa importante neurotoxina. Dentre os trabalhos mais recentes está o de Araújo e col.¹⁵⁷ que desenvolveram um método por espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo (MALDI – TOF – MS) capaz de analisar simultaneamente anatoxina-a e homoanatoxina a partir de cepas liofilizadas de algas do gênero *Oscillatoria ssp.*

Enquanto isso, moléculas isotopicamente marcadas com átomos estáveis são considerados os padrões internos ideais para esses métodos analíticos avaliados por massas. O processo sintético desenvolvido e discutido anteriormente para a síntese da anatoxina-a e análogos, onde o passo principal foi uma ciclização intramolecular, possibilitou a síntese inédita da *D*₃-anatoxina-a. Assim, a produção de um método analítico por LC-MS utilizando esta molécula como padrão interno foi iniciado devendo ser logo concluído. Este método vai facilitar muito a identificação desta toxina em possíveis manciais contaminados.

2.2.2 – Mecanismo de ação tóxico e possíveis aplicações farmacológicas

A anatoxina-a interfere na transmissão do impulso nervoso através das sinapses químicas presentes nos vertebrados. Durante os últimos 30 anos vários estudos foram conduzidos com intuito de entendimento desse mecanismo de ação.¹⁵⁸

As sinapses químicas são mediadas por neurotransmissores, entre esses a acetilcolina é um dos mais importantes. O sistema colinérgico, que usa acetilcolina com mensageiro químico, esta presente tanto no sistema nervoso central (SNC) bem como no sistema nervoso periférico (SNP). São dois os tipos de receptores de acetilcolina: os

¹⁵⁷ Araoz, R.; Guerineau, V.; Rippka, R.; Palibroda, N.; Herdman, M.; Laprevote, O.; von Doehren, H.; Tandeau de Marsac, N.; Erhard, M. *Toxicon* **2008**, 51(7), 1308-1315.

¹⁵⁸ (a) Aracava, Y.; Deshpande, S. S.; Swanson, K. L.; Rapoport, H.; Wonnacott, S.; Albuquerque, E. X. *FEBS Lett.* **1987**, 222(1), 63–70; (b) Aracava, Y.; Swanson, K. L.; Rozental, R.; Albuquerque, E. X. *Structure-activity relationships of (+) anatoxin-a derivatives and enantiomers of nicotine on the peripheral and central nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. Em: Lunt G. G. *Molecular Basis of Drugs and Pesticide Action*. **1988**, ed. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division) p. 157-184; (c) Wonnacott, S.; Swanson, K. L.; Albuquerque, E. X.; Huby, N. J. S.; Thompson, P. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43(3), 419–23; (d) Thomas, P.; Stephens, M.; Wilkie, G.; Amar, M.; Lunt, G. G.; Whiting, P. *J Neurochem.* **1993**, 60, 2308-11.

nicotínicos (nAChR) e os muscarínicos (mAChR). Enquanto os receptores do tipo nAChR estão presentes principalmente no SNP sobre a junção neuromuscular, sistema autônomo glanglionar e em alguns neurônios do SNC, os mAChR são encontrados em ambos SNC e SNP, no coração, em músculos lisos e sistema glandular.¹⁵⁹

A acetilcolina produzida pelos neurônios é liberada na fenda sináptica ligando-se aos seus respectivos receptores (mAChR e nAChR). Uma vez ligada ao receptor a acetilcolina promove a abertura dos canais iônicos correspondentes gerando uma despolarização (saída de íons K^+ e a entrada de Na^+) no interior da célula neural através de sua membrana. Em um evento posterior extremamente rápido, esse transmissor é removido do sitio de ação através de uma reação de hidrólise conduzida pela enzima acetilcolinesterase. Este fato gera um novo fechamento dos canais, repolarização, Figura 55.

Figura 55. Representação do processo normal de polarização/repolarização em um sistema colinérgico. O neurotransmissor ao ligar-se ao receptor conduz a uma abertura dos canais iônicos. Após, o mesmo é retirado do sitio através de uma reação de hidrólise conduzida pela acetilcolinesterase.

A anatoxina-a é uma agonista competitivo dos receptores colinérgicos competindo assim com a acetilcolina pelos receptores nicotínicos e muscarínicos.¹⁶⁰ De fato, a anatoxina-a é mais potente que a acetilcolina na capacidade de estimular os receptores nicotínicos, devido a grande afinidade dessa toxina pelos sítios específicos

¹⁵⁹ Sá, P. C. *Sistema colinérgico*. Em: Guimarães, S.; Moura, D.; Silva, S.; *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de farmacologia e farmacoterapia*. 2005, ed. Porto Editora; Portugal. p. 217–44.

¹⁶⁰ (a) Aronstam R. S.; Witkop, B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78(7), 4639-43; (b) Dar, D. E.; Zinder, O. *Gen. Pharmacol.* **1998**, 31(5), 737-40; (c) Campos, F.; Duran, R.; Vidal, L.; Faro, L. R. F.; Alfonso, M. *Neurochem. Res.* **2006**, 31, 491-501.

destes receptores.¹⁶¹ Diferente da acetilcolina, a anatoxina-a uma vez ligada ao sítio do receptor não é passível de hidrólise pela acetilcolinesterase. Isso conduz a estímulos sobrepostos. Em razão da super estimulação dos músculos respiratórios, os mesmos se mantêm contraídos levando à morte devido à falência do sistema respiratório. Este mecanismo está descrito na Figura 56.

No sistema adrenérgico, a anatoxina-a estimula a secreção de catecolaminas (dopamina, adrenalina e noradrenalina) que são neurotransmissores com inúmeros efeitos tanto no SNC e SNP.¹⁶²

Figura 56. Representação do processo de despolarização/repolarização em um sistema colinérgico quando em presença de anatoxina-a. Esta se liga ao receptor de forma irreversível, ou seja, não é hidrolisada pela acetil colinesterase conduzindo assim a um fluxo iônico contínuo.

Duas importantes informações sobre a ação da anatoxina-a devem ser levadas em consideração. A primeira é que, como essa molécula possui uma menor afinidade pelos receptores muscarínicos a sua ação no SNC é relativamente diminuída, sendo necessárias concentrações 5 a 10 vezes maiores para termos o mesmo efeito do que no SNP.^{159a} Isso está relacionado com a existência de diferentes subtipos dessas espécies de receptores nos sistemas centrais e periféricos.^{159c-d}

¹⁶¹ (a) Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. *J. Méd. Chem.* **1985**, 28, 1301-9; (b) Swanson, K. L.; Allen, C. N.; Aronstam, R. S.; Rapoport, H.; Albuquerque, E. X. *Mol. Pharmacol.* **1986**, 29, 250-7.

¹⁶² (a) Soliakov, L.; Gallagher, T.; Wonnacott, S. *Neuropharmacology* **1995**, 34(11), 1535-41. (b) Molloy, L.; Wonnacott, S.; Gallagher, T.; Brough, P. A.; Livett, B. G. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 289(3), 447-53; (c) Guimarães, S. *Sistema adrenérgico*. Em: Guimarães, S.; Moura, D.; Silva, S. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. Manual de farmacologia e farmacoterapia*. **2005**, Ed. Porto Editora, Portugal, p. 245-278.

Enquanto isso, o outro enantiômero (-)anatoxina-a, também foi avaliado em relação a sua atividade, sendo evidenciado que possui uma potência até 150 vezes menor do que seu isômero dextrógino. Isso indica a capacidade dos sítios receptores de reconhecer os diferentes enantiômeros, ou seja, os mesmos são enantioseletivos.^{162a-b}

A busca por compostos farmacologicamente ativos sejam eles agonistas, antagonistas ou agonistas parciais de um receptor específico passa por uma série de requisitos. Faz-se necessário primeiramente entender o funcionamento do respectivo sítio de ação. Receptores nicotínicos são formados por uma série de subunidades que estão inseridas no sarcolema da placa motora e no axolema neural do sistema sensorial. Estes possuem a forma pentamérica em uma série de subunidades com diferentes configurações expressas no esqueleto muscular ($\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ , ϵ), neurônios ($\alpha 2$ - $\alpha 7$, $\beta 2$ - $\beta 4$) e no sistema epitelial sensorial ($\alpha 9$, $\alpha 10$) dos mamíferos.¹⁶³

Uma ação modulada específica sobre uma destas unidades oferece uma oportunidade terapêutica atrativa para diversas funções controladas pelo sistema nervoso. Por exemplo, algumas moléculas como a própria nicotina se liga a quase todos os subtipos de receptores nicotínicos (exceto as subunidades $\alpha 9$, $\alpha 10$) com diferentes potências.¹⁶⁴ A busca por novos fármacos incluem a descoberta de moléculas seletivas a um tipo de subunidade. Em alguns casos, essa seletividade pode ser considerada inapropriada como, por exemplo, no caso dos subtipos $\alpha 7$ e $\beta 2$ os quais têm seus efeitos relacionados à neuroproteção.¹⁶⁵ Alguns subtipos de receptores nicotínicos são menos abundantes e de localização mais restrita o que pode oferecer uma maior seletividade tendo assim um efeito mais disperso.

As aplicações de possíveis moduladores nicotínicos são diversas como, por exemplo, em doenças psiquiátricas como Esquizofrenia onde é sabido que receptores nAChRs $\alpha 7$ tem seu número reduzido o que tem uma relação direta com um déficit sensorial bem como cognitivo.¹⁶⁶ Nesse caso, um agonista seletivo para essa espécie de

¹⁶³ Lukas, R. J.; Changeux, J. P.; Le Novère, N.; Albuquerque, E. X.; Balfour, D. J.; Berg, D. K.; Bertrand, D.; Chiappinelli, V. A.; Clarke, P. B.; Collins, A. C.; Dani, J. A.; Grady, S. R.; Kellar, K. J.; Lindstrom, J. M.; Marks, M. J.; Quirk, M.; Taylor, P. W.; Wonnacott, S. *Pharm.Rev.* **1999**, 51(2), 397-401.

¹⁶⁴ Gomez-Casati, M. E.; Fuchs, P. A.; Elgoyhen, A. B.; Katz, E. *J. Physiol.* **2005**, 566(1), 103-118.

¹⁶⁵ (a) Nakamizo, T.; Kawamata, J.; Yamashita, H.; Kanki, R.; Kihara, T.; Sawada, H.; Akaike, A.; Shimohama, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 330(4), 1285-1289; (b) Stevens, T. R.; Krueger, S. R.; Fitzsimonds, R. M.; Picciotto, M. R. *J. Neurosci.* **2003**, 23(31), 10093-10099.

¹⁶⁶ (a) Leonard, S.; Gault, J.; Hopkins, J.; Logel, J.; Vianzon, R.; Short, M.; Drebing, C.; Berger, R.; Venn, D.; Sirota, P.; Zerbe, G.; Olincy, A.; Ross, R. G.; Adler, L. E.; Freedman, R. *Arch. Gen. Psych.* **2002**, 59(12), 1085-1096; (b) Newhouse, Paul, A.; Potter, A.; Singh, A. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2004**, 4(1), 36-46.

receptor poderia ser utilizado para tratar esse problema. Dentre outras aplicações já conhecidas de moduladores nicotínicos está o efeito protetor da nicotina sobre os sintomas da doença de Parkinson¹⁶⁷ e o controle da dor. Há 70 anos atrás já havia sido descrita a atividade antinoceptiva da nicotina em animais. A não utilização deste composto com essa finalidade é relacionado com o pequeno tempo de meia vida do mesmo. A epibatidina é um composto natural com comprovada atividade antinoceptiva.¹⁶⁸ No entanto, possui sérios efeitos colaterais pelas interações não seletivas com diversos subtipos de receptores nicotínicos, sendo que a analgesia é atribuída aos receptores $\alpha 4\beta 2$, entre outros subtipos que também possuem a mesma ação.¹⁶⁹

Um dos desafios dos pesquisadores é a relação entre a eficácia clínica e a ativação ou inibição dos receptores nicotínicos. Desta maneira, produtos naturais como a anatoxina-a podem ser interessantes protótipos na busca de novas substâncias com atividade medicinal. Nesse sentido, um híbrido entre a epibatidina e a anatoxina-a foi sintetizado no final da década de 90¹⁷⁰ e posteriormente avaliado, chegando-se a conclusão que ele age como agonista parcial do subtipo $\alpha 4\beta 2$ dos nAChR.¹⁷¹

Com os avanços de técnicas analíticas e da química computacional essa busca por novas moléculas ativas ganhou poderosas ferramentas. Recentemente foi determinado o domínio extracelular da subunidade $\alpha 7$ dos receptores nAChR.¹⁷² Gohdek e col.¹⁷³ avaliaram possíveis agonistas seletivos do subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ através de QSAR 3D. Nesse trabalho, algumas modificações estruturais foram relacionadas com a atividade dos respectivos compostos. Desta maneira, a síntese e descoberta de possíveis aplicações dos análogos da anatoxina-a como moduladores nicotínicos, tem atraído um grande interesse da comunidade científica.

¹⁶⁷ (a) Quik, M. *Trends Neurosci.* **2004** 27, 561-568; (b) Simon, L.; Chouinard, S.; Blanchet, P.; Masson, H.; Soland, V.; Beuter, A.; Bedard, M-A. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psych.* **2004**, 28(1), 31-9.

¹⁶⁸ Daly, J.; Garraffo, H. M.; Spande, T. F.; Decker, M. W.; Sullivan, J. P.; Williams, M. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17(2), 131-5.

¹⁶⁹ Marubio, L. M.; del Mar, A-J. M.; Cordero-Erausquin, M.; Lena C.; Le Novère, N.; de Kerchove, d'E. A.; Huchet, M.; Damaj, M. I.; Changeux, J. P. *Nature* **1999**, 398(6730), 805-10; (b) Bannon, A. W.; Decker, M. W.; Holladay, M. W.; Curzon, P.; Donnelly-Roberts, D.; Puttfarcken, P. S.; Bitner, R. S.; Diaz, A.; Dickenson, A. H.; Porsolt, R. D.; Williams, M.; Arneric, S. P. *Science* **1998**, 279(5347), 77-81.

¹⁷⁰ Wright, E.; Gallagher, T.; Sharples, C. G. V.; Wonnacott, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 22, 2867-2870.

¹⁷¹ Sharples, C. G. V.; Kaiser, S.; Soliakov, L.; Marks, M. J.; Collins, A. C.; Washburn, M.; Wright, E.; Spencer, J. A.; Gallagher, T.; Whiteaker, P.; Wonnacott, S. *J. Neurosci.* **2000**, 20(8), 2783-2791.

¹⁷² Brejc, K.; van Dijk, W. J.; Klaassen, R. V.; Schuurmans, M.; van Der Oost, J.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. *Nature* **2001**, 411(6835), 269-76.

¹⁷³ Gohlke, H.; Schwarz, S. Gündisch, D.; Tilotta, M. C.; Weber, A.; Wegge, T.; Seitz, G. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2031-2048.

Dentre os compostos já sintetizados no laboratório, bem como os que ainda podem ser produzidos a partir das rotas sintéticas determinadas por nós, alguns podem ter aplicações terapêuticas no tratamento de problemas associados ao sistema colinérgico. Ainda desenvolvimento cognitivo, memória e aprendizado podem ser beneficiados por possíveis drogas com ação a esse nível.¹⁷⁴

No campo da farmacologia aplicada, artigos recentes têm indicado que a nicotina e a anatoxina-a podem conduzir a uma dessensibilização dos receptores nicotínicos.¹⁷⁵ Em razão da sua elevada toxicidade aguda estudos de toxicidade crônica da anatoxina-a não são muito frequentes. Dessa forma, não é difícil imaginar que exposições humanas a pequenas quantidades desse composto em um balneário público contaminado, por exemplo, poderia levar a efeitos colinérgicos crônicos. Ainda, com um nitrogênio muito ativo (nitrogênio secundário, cabeça de ponte), essa molécula tem uma estrutura apta a combinar-se com material genético e possivelmente possua uma ação mutagênica com efeitos ainda não determinados. Portanto, estudos toxicológicos a longo prazo são necessários e os produtos sintetizados neste trabalho (anatoxina-a, homoanatoxina-a e seus análogos) podem ser usados nos mesmos.

¹⁷⁴ (a) Levin, E. *Psychopharmacology*, **1992**, 108, 417–421; (b) Buccafusco, J. J.; Jackson, W. J. *Neurobiol. Aging*, **1991**, 12, 233–238; (c) Decker, M. W.; Majchrzak, M. J.; Anderson, D. J. *Brain Res.* **1992**, 572, 281–285

¹⁷⁵ MacPhail, R. C.; Farmer, J. D.; Jarema, K. A. *Toxicology* **2007**, 234, 83–89.

Capítulo 3.

Anatoxina-a(s) –

*O único organofosforado natural conhecido,
um potente inibidor irreversível da acetilcolinesterase*

As neurotoxinas formam um dos maiores grupos de toxinas provenientes de cianobacterias. Elas são produzidas por vários gêneros que vivem tanto em água doce como salobras, sendo responsáveis por vários episódios de morte entre animais selvagens bem como domésticos.¹⁷⁶

A anatoxina-a(s) faz parte desse grupo sendo uma das menos comuns entre elas. O primeiro relato da presença dessa toxina ocorreu no final da década de 70 em um episódio em que alguns animais domésticos morreram. Um fato que chamou a atenção dos pesquisadores na época foi a característica comum de salivação entre os animais mortos.¹⁷⁷ Após isso, logo associou-se essas fatalidades a ação da anatoxina-a a qual já era um conhecido alcalóide tóxico proveniente das mesmas espécies de cianobactérias. A partir deste fato esse organofosforado foi denominado como anatoxina-a(s) onde o “s” fazia menção à salivação. Quase uma década após, a investigação sobre essa molécula se intensificou com a morte de mais uma série de animais nos Estados Unidos.¹⁷⁸ Enfim, essa toxina teve sua estrutura elucidada em 1989 por Carmichael e col.¹⁷⁹ os quais foram hábeis até em definir a variação enantimomérica presente naturalmente, Figura 57. Assim, foi determinada a estrutura química do único organofosforado natural conhecido até hoje o qual é estruturalmente muito diferente da anatoxina-a e seus análogos.

Figura 57. Estrutura química da anatoxina-a(s), o único organofosforado natural conhecido

Trata-se de um éster metílico da *N*-hidroxiguanidina fosfato o qual possui uma massa molecular 252 u.m.a. A anatoxina-a(s) é produzida por algumas cepas de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii*.¹⁸⁰ Este composto age da mesma forma que um inseticida organofosforado sintético inibindo a enzima

¹⁷⁶ Falconer, I. R.: Cyanobacterial Toxins of Drinking Water Supplies, CRC Press, Boca Raton, FL., **2005**.

¹⁷⁷ Carmichael, W. W.; Gorham, P. R. *Mitt. int. Verein. theor. angew. Lärtnol.* **1978**, 21, 285.

¹⁷⁸ Mahmood, N. A.; Carmichael, W. W. *Toxicon* **1987**, 25, 1221-1227.

¹⁷⁹ Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Niemczura, W. P.; Carmichael, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 8021-8023.

¹⁸⁰ Onodera, H.; Oshima, Y.; Henriksen, P.; Yasumoto, T. *Toxicon* **1997**, 35, 1645.

acetilcolinesterase.¹⁸¹ Através desse bloqueio a acetilcolina se mantém no sítio de ação dos receptores colinérgicos não havendo o processo de repolarização. Assim, ocorre um influxo continuado de íons e por consequência uma continua geração de potenciais os quais conduzem a célula a exaustão. A anatoxina-a(s) apresenta uma alta toxicidade aguda com uma DL₅₀ de 20µg/kg de massa corpórea em camundongos.¹⁸²

Rotas sintéticas viáveis para a produção dessa molécula, a qual ainda tem sua síntese total inédita, podem resultar na produção de padrões analíticos para métodos mais consistentes de análise. Ainda, pode ser útil na avaliação de seu caráter tóxico já que seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado. Assim, a síntese total ou mesmo parcial dessa importante molécula, poderá ser associada a várias possíveis aplicações.

Para a anatoxina-a(s) temos como objetivos:

- A síntese parcial e/ou total deste composto, sob a forma enantiomericamente pura e/ou racêmica;
- A aplicação dos produtos de síntese na identificação das diferenças entre os mecanismo de ação tóxico deste produto natural e dos outros organofosforados sintéticos conhecidos.
- A aplicação destes produtos de síntese na produção de um método analítico direto, usando como padrão interno a própria anatoxina-a(s), ou indireto, pelo uso de um possível produto de hidrólise com este intuito.

3.1 – Estratégias sintéticas

Durante esse período algumas alternativas para o objetivo da síntese total dessa toxina foram avaliadas e testadas. É necessário salientar que por se tratar de uma molécula com um alto grau de polaridade, um possível método de extração a partir de cepas produtoras é extremamente difícil. Ainda, esse composto é muito labil devido à presença do grupamento fosfonato o qual é facilmente hidrolisável.

¹⁸¹ (a) James, K.; Furey, A.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A.; Twohig, M.; Caudwell, B. F.; Skulberg O. M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 798, 147; (b) Carmichael, W. W.; Mahmood, N. A.; Hyde, E. G. Em: *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*; Hall, S.; Strichart, G., eds.; **1990**, American Chemical Society: Washington.

¹⁸² Onodera, H.; Oshima, Y.; Henriksen, P.; Yasumoto, T. *Toxicon* **1997**, 35, 1645;

Essas características tornam uma futura rota sintética extremamente valiosa, solucionando principalmente os problemas de falta de padrão analítico.

3.1.1 – Síntese de guanidina cíclica sob a forma racêmica e quiral

Em uma primeira avaliação estrutural propomos o seguinte esquema retrosintético conforme demonstrado no Esquema 55. De ordem prática, podemos subdividir a molécula na parte orgânica heterocíclica e na parte fosforada. Dessa forma nosso primeiro objetivo foi à síntese da parte alquímica (guanidina cíclica).

Esquema 55. Análise retrosintética para a síntese da anatoxina-a(s) a partir da parte alquímica (guanidina cíclica) e da parte fosforada.

Guanidinas cíclicas tem atraído considerável atenção em anos recentes devido a sua presença em um grande número de produtos naturais com interessantes atividades farmacológicas e toxicológicas. Moléculas como a dibromofaquelina,¹⁸³ e a potente neurotoxina conhecida como saxitoxina¹⁸⁴ apresentam esse heterociclo entre sua complexa estrutura carbônica, Figura 58.

Figura 58. Estruturas químicas de dois importantes produtos naturais que possuem guanidinas cíclicas como parte

¹⁸³ Sharma, G.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, 42(25), 4118-24.

¹⁸⁴ Pavlik, J. W.; Kwong, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7914.

Suas propriedades estão relacionadas à sua grande capacidade de formarem ligações de hidrogênio estáveis através do nitrogênio imínico. Um exemplo são os compostos usados com inibidores do fator Xa de coagulação.¹⁸⁵ Ainda, guanidinas cíclicas quirais possuem importantes aplicações como catalisadores em processos assimétricos de síntese,¹⁸⁶ sendo também utilizados como superbases quirais para a métodos sintéticos.¹⁸⁷ A presença de um centro quiral é uma característica que deve ser levada em consideração na estrutura desse heterociclo. É indiscutível a importância dos procedimentos sintéticos capazes de gerar compostos enantiomericamente puros e os ganhos que a síntese orgânica teve quando dominou essa característica (Veja discussão 1.1).¹⁸

Assim, procedimentos capazes de gerar a molécula sob a forma enantiomericamente pura ou racêmica foram testados.

Segundo o discutido anteriormente, guanidinas cíclicas possuem grande importância em alguns campos de aplicação. Devido a isso, alguns procedimentos sintéticos capazes de produzir esses compostos têm sido apresentados na literatura. Dessa forma, esses heterociclos podem ser formados a partir do ácido *D,L*- α,β -aminopropionico que em solução aquosa reagem com bromo cianeto em meio básico conforme Esquema 56.¹⁸⁸ Nesta metodologia o grande problema toxicidade do bromo cianeto o que torna o método muito perigoso.

i. CNBr, H₂O, Ph 7.4

Esquema 56. Procedimento realizado por Schreiber e col. para a síntese da guanidina cíclica **127**

Em um procedimento bem mais recente, algumas iminoimidazolidinas foram sintetizadas a partir da reação de 1,2-diaminas com tioureias, Esquema 57.¹⁸⁹ Aqui, uma

¹⁸⁵ (a) Pinto, D. J.; Qiao, J. X.; Gungor, T.; Lam, P. Y. S.; Li, Y.-L. U.S. Patent 2,004,209,863; (b) Devadas, B.; Ruminski, P.; Rogers, T.; Nagarajan, S.; Malecha, J. Patent WO 2004060376; (c) Imoto, M.; Akabane, M.; Tani, Y.; Iwanami, T. Patent EP 1176141.

¹⁸⁶ Isobe, T.; Fukuda, K.; Ishikawa, T. *Tetrahedron Asymmetry*, **1998**, 9, 1729-1735.

¹⁸⁷ (a) Iyer, M. S.; Gigstad, K. M.; Namdev, N. D.; Lipton, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4910-4911; (b) Corey, E. J.; Grogan, M. *J. Org. Lett.* **1999**, 1, 157-160.

¹⁸⁸ Schreiber, J.; Witkop, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 2441-2445.

¹⁸⁹ Isobe, T.; Fukuda, K.; Tokunaga, T.; Seki, H.; Yamaguchi, K.; Ishikawa, T. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7774-7778.

base orgânica (triethylamina) foi utilizada. Essa condição transcorreu a uma temperatura de 60°C para induzir a transformação do intermediário **129** no produto **130**.

Esquema 57. Rota sintética determinada por Isobe e col. para a formação do produto **130**

Utilizando procedimentos de síntese combinatorial e em fase sólida Archarya e col.¹⁹⁰ seguido de Vvedensky e col.¹⁹¹ obtiveram vários análogos dessas guanidinas cíclicas.

Após essa breve revisão da literatura, nossos testes iniciaram por uma possível rota de síntese para o composto ácido 2-(tosilimino)imidazolidina-4-carboxílico **133**, Esquema 58, o qual é apto a ser transformado na desejada guanidina cíclica (Esquema 55).

Esquema 58. Procedimento aplicado no intuito de obtenção da *N-Ts*-guanidina **133** a partir do ácido acetoamidoacrilico **1**.

Para isso partimos do ácido acetoamidoacrilico **1**, o qual foi dissolvido em 50mL de uma solução de hidróxido de amônia 37% aquecido a 40°C por 72h. O intermediário **131** foi avaliado por espectrometria de massas conforme apresentado na Figura 59. Nesse espectro além do íon *quase-molecular* com *m/z* 147 percebemos alguns outros que são referentes à ionização dessa molécula na fonte. Por exemplo, o com *m/z* 129.9 é referente ao íon [M – OH + H]⁺. Isso foi confirmado por fragmentação do íon *quase-molecular* no modo MS². O composto **131** foi obtido com um ótimo rendimento de 94%.

¹⁹⁰ Acharya, A. N.; Ostresh, J. M.; Houghten, R. A. *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 578-589.

¹⁹¹ Vvedensky, V. Y.; Rogovoy, B. V.; Kiselyov, A. S.; Ivachtchenko, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 8699-8703.

Figura 59. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de transformação do ácido acetoamidoacrilico na amina **131** através de uma adição de Michael.

Dando sequência ao procedimento, no próximo estágio o composto **131** foi hidrolisado utilizando para isso uma solução fortemente ácida (10mL de HCl 37% em água). Foi gerando o ácido 2,3-diaminopropionico **132**, uma molécula muito interessante e amplamente utilizada como intermediário em outras rotas sintéticas devido a sua grande funcionalidade.

Para exemplificar a importância do composto **132** avaliamos o processo determinado por Strazzolini e col.,¹⁹² que obtiveram o mesmo composto em quatro passos reacionais com um rendimento global de 22%. Em outro trabalho recente, *N*-arilsulfonil aziridinas reagiram com isocianatos quirais e uma hidrólise do intermediário imidazolidinico conduziu ao diaminoacido com diferentes razões diastoisoméricas e bons rendimentos ($\approx 60\%$).¹⁹³

Em nosso processo o rendimento para estas duas primeiras etapas foi de aproximadamente 86%. A Figura 60 mostra o espectro de massas já no modo MS^2 para o íon com m/z 105.2 referente ao *quase-molecular* $[M + H]^+$ do composto sintetizado. A estrutura química da molécula pode ser confirmada pelas quebras aqui apresentada, como por exemplo, os íons com m/z 88.2 e 59.1 que são referentes aos $[M - OH + H]^+$ e $[M - COOH]^+$ respectivamente. O composto **132** foi purificado por recristalização utilizando uma mistura de éter etílico/álcool etílico na proporção de 9:1.

¹⁹² Strazzolini, P.; Dall'Arche, M. G.; Zossi, M.; Pavler, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4710–4716.

¹⁹³ Nadir, U. K.; Krishna, R. V. Singh, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 479–482.

Figura 60. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 105.2 referente ao composto **132** obtido por via sintética

Em uma próxima etapa, o composto **132** foi transformado na *N-Ts*-guaninida **133**. Este procedimento foi baseado no apresentado por Rapoport & Rodricks.¹⁹⁴ Assim, utilizando a imina *Ts*-NC(SCH₃)₂ como reagente, chegamos ao composto cíclico com um bom rendimento de 75%.

A Figura 61 mostra o espectro de massas no modo MS² onde foi selecionado o íon *quase-molecular* com m/z 284.3. Aqui podemos verificar a presença de quebras esperadas, como por exemplo, as que formam os íons com m/z 266.1, 238.1 e 91.1 referentes à $[M - OH]^+$, $[M - COOH]^+$ e $[C_7H_7]^+$ respectivamente. Estes dados serviram para confirma a estrutura da molécula.

Figura 61. Espectro de massas no modo MS² do íon com m/z 284.3 referente ao composto **133** obtido por via sintética.

¹⁹⁴ Rapoport, H.; Rodricks, J. V. *J. Org. Chem.* **1971**, 36(1), 46-48.

Dessa forma, esse produto **133** (Esquema 57) foi gerado com o ótimo rendimento global de 69% em três passos reacionais o que indica a grande viabilidade desse procedimento para a formação desse importante intermediário.

Uma seqüência de passos reacionais que incluem a transformação do ácido carboxílico em uma dimetil amida seguida por uma redução seletiva dessa amida utilizando Red-Al e ainda uma *N-Ts*-desproteção devem conduzir ao produto **134** o qual é a parte alquilica da anatoxina-a(s) conforme demonstrado no Esquema 59.

Esquema 59. Transformação possível para a geração da parte alquilica sob a forma racêmica da anatoxina-a(s).

Seguindo, outro objetivo foi à formação do mesmo composto sob a forma enantiomericamente pura através de um procedimento capaz de gerar ambos os enantiômeros de acordo com os materiais de partida utilizados. No Esquema 60 podemos verificar a rota traçada para cumprir esse objetivo.

Esquema 60. Rota para a obtenção do composto **138** a partir da *N*-Fmoc-asparagina **135**.

Este procedimento teve como base o desenvolvido por Charmichael e col.¹⁸⁰ em um trabalho que serviu para a determinação estrutural da própria anatoxina-a(s). Algumas modificações foram feitas com intuito de otimizarmos o processo de síntese para a obtenção do Produto **138**. Assim, partimos da *N*-Fmoc-asparagina **135** a qual reagiu com composto de iodo trivalente sendo conduzida através de uma transformação de Hoffmann ao produto **136**. Este procedimento havia sido discutido anteriormente (síntese da *L*-BMAA, 1.1.1). Mesmo com rendimento abaixo de 50% para esse estágio

prossequimos com o processo devido à previsão de bom desempenho das etapas subseqüentes o que nos conduziria a um bom rendimento global.

Na próxima etapa foi realizada uma *N*-desproteção¹⁹⁵ em meio básico que gerou o ácido 2,3-*L*-diaminopropionico **137**, com um rendimento de 93%. No passo seguinte o mesmo procedimento de ciclização adotado antes para a molécula sob a forma racêmica com *N*-*Ts*-ditiometilimina foi realizado gerando o composto **138**. Na Figura 62 temos o espectro de RMN de ¹H referente ao ácido 2-(tosilimino)imidazolina-4-carboxílico **138**. Podemos avaliar a existência dos sinais esperados para essa molécula, assim como a metila ligada ao sistema aromático com δ 2.27 ppm (3H); os hidrogênios ligados ao carbono da guanidina com δ 3.78 (2H) e 4.14 (1H) ppm; bem como os dois dubletos característicos de sistemas aromáticos 1,4-substituídos com δ 7.30 e 7.88 ppm.

Figura 62. Espectro de RMN de ¹H referente ao composto **138** sinteticamente obtido.

Até aqui determinamos dois possíveis caminhos para a obtenção da importante guanidina cíclica **138** a qual pode ser um intermediário na síntese total da anatoxina-a(s). Esses procedimentos são capazes ainda de gerar outros derivados sob a forma racêmica e enantiomericamente pura pela simples modificação dos reagentes utilizados. Ainda, para a síntese do composto **138**, o mesmo foi obtido com rendimentos de 28% em quatro passos reacionais e 69% em três passos reacionais sob a enantiomericamente

¹⁹⁵ Zvilichovsky, G.; Gurvich, V. *Tetrahedron*, **1997**, 53(12), 4457-4468.

pura e racêmica respectivamente. Essa síntese parcial desses possíveis intermediários para a formação da anatoxina-a(s) foi recentemente submetido a publicação (Anexo 8).

3.1.2 – Síntese da *N*-hidroxiguanidina cíclica a partir *L*-asparagina

Entre nossos objetivos esta a síntese de outro possível intermediário para a síntese total da anatoxina-a(s). Reavaliando nossa estratégia retrosintética, imaginamos necessário à formação da hidroxilamina (função orgânica onde existe uma ligação entre nitrogênio e oxigênio) associado ao heterociclo (guanidina).

A formação de uma ligação entre um átomo de nitrogênio e um de oxigênio não é um fato muito trivial. Nesse caminho, nosso objetivo passou a ser a síntese da inédita 5-((dimetilamino)metil)-2-iminoimidazolidina-1-ol. Isso possibilitaria a formação de uma possível ligação com a parte fosforada para a etapa final. Vale ressaltar que átomos de fósforo-V possuem grande afinidade por átomos de oxigênio, Esquema 61.

Esquema 61. Reavaliação da análise retróssintética visando à síntese da anatoxina-a(s) a partir da *N*-hidroxiguanidina cíclica.

Dessa forma, em um primeiro momento traçamos a seguinte rota para a produção enantioseletiva desse importante intermediário **147**, Esquema 62.

Esquema 62. Proposta de Síntese enantioselectiva para o composto **147** a partir da *L*-asparagina

Os dois primeiros passos desse processo já haviam sido realizados durante um dos procedimentos testados para a produção da *L*-BMAA (veja 1.1.2). Sobre esses, cabe a ressalva que enquanto a reação que conduz ao produto **9** (uma *N*-proteção) gera o produto com ótimo rendimento (93%) a reação subsequente que leva ao produto **10** (transformação de Hoffmann através de um reagente trivalente de iodo) possui um rendimento ruim, abaixo de 50%, o que já havia sido reportado anteriormente. Mesmo com esse percalço resolvemos investir nessa rota sintética.

Na etapa subsequente realizamos uma *N*-proteção agora com *di-tert*-butildicarbonato (BOC). Esse processo promoveu a formação do composto **139** com o bom rendimento de 72%. No espectro de massas no modo *scan* apresentado na Figura 63 podemos observar a presença do íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ com m/z 339.1 bastante intenso. Após um processo de purificação por recristalização utilizando uma mistura de acetato de etila/éter etílico/éter de petróleo na proporção de 3:2:2 o composto foi obtido como um

sólido branco com um ponto de fusão de 140-142°C o que está de acordo com o reportado na literatura.¹⁹⁶

Figura 63. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de N-proteção para a formação do composto **139**.

Seguindo, o intermediário **139** foi transformado na amida **140**, Esquema 63. Para isso utilizamos o procedimento descrito por Anderson e col.,¹⁹⁷ onde em uma primeira etapa forma-se um éster intermediário com *N*-hidroxisuccinimida. Este é transformado na amida **140** com auxílio de um indutor eletrofílico (DCC), Esquema 63. O produto **140** foi obtido com um rendimento de 55% a partir do ácido **139**.

i. Dioxano, DCC, 0°C 30min, t.a. 15h; ii. Eter etílico, $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$, 30min t.a.

Esquema 63. Transformação do *N*-protegido aminoácido **139** na amida **140** através de uma reação de substituição nucleofílica.

Esse produto foi confirmado através de espectrometria de massas conforme podemos avaliar na Figura 64. Aqui além do íon *quase-molecular* $[\text{M} + \text{H}]^+$ com m/z 366.5 seu *adduto* de sódio $[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$ e alguns produtos de ionização na fonte como o $[\text{M} - \text{COO}(\text{CH}_3)_3 + \text{H}]^+$ com m/z 388.5 e 266.5 respectivamente são observados.

¹⁹⁶ Shinagawa, S. *J. Med. Chem.* **1987**, 30(8), 1458-63.

¹⁹⁷ Anderson, G. W.; Zimmerman, J. E.; Callahan, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86(9), 1839-42.

Figura 64. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de formação da amida **140** através da reação do dimetil amina com o ácido **139**.

Após isso, buscamos a síntese da amina **141** (Esquema 62) através de uma redução seletiva com auxílio de um hidreto complexo de alumínio conhecido como Red-Al. Para isso utilizamos o método determinado por Cannon e col.¹⁹⁸ Este autor havia utilizado esta técnica em uma seletiva redução de amidas terciárias como parte de um procedimento para a síntese de algumas quinolinas. Recentemente, o mesmo procedimento foi utilizado com o mesmo intuito e com bons resultados para a produção de aminas quirais.¹⁹⁹

Depois de algumas tentativas onde foram modificadas as condições de temperatura, tempo e equivalentes dos reagentes obtivemos somente uma pequena quantidade do produto desejado conforme pode ser observado na Figura 65. Aqui um pequeno íon com m/z 352.3 representa o produto. Alguns dos outros íons como os com m/z 178.9 e 76.2 são referentes ao agente redutor. Outros, no entanto não foram identificados, provavelmente correspondendo a possíveis subprodutos provenientes dessa reação.

Figura 65. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de redução seletiva com Red/Al para a formação do composto **141**.

¹⁹⁸ Cannon, J. G.; Amoo, V. E.; Long, J. P.; Bhatnagar, R. K.; Flynn, J. R. *J. Med. Chem.* **1986**, 29(12), 2529-34.

¹⁹⁹ Voight, E. A.; Bodenstein, M. S.; Ikemoto, N.; Kress, M. H. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1717-1720.

Aqui podemos relacionar esse insucesso com um possível impedimento estérico proveniente dos grandes grupamentos de proteção que cercam a amida. Algumas tentativas para purificação desse produto através de coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e a mistura hexano/acetato de etila em várias testadas. No entanto, a quantidade de produto era muito pequena o que impossibilitou essa separação. É necessária a otimização dessa etapa para continuidade dessa rota.

Avaliando toda a metodologia sintética (Esquema 62) verificamos que se trata de processo com número elevado de estágios. Ainda, alguns dos mesmos apresentam graves problemas. Um exemplo claro disso é a transformação da amida **9** na amina **10** a qual apresenta um baixo rendimento. Em um procedimento de síntese total, a quantidade de material de partida é um fato limitante.

Dessa forma, apesar de ainda imaginar esta proposta viável, é necessário uma nova otimização das etapas realizadas de síntese e purificação, dando a possibilidade de continuidade. Isto demanda principalmente tempo.

3.1.3 – Síntese da *N*-hidroxiguanidina cíclica a partir do álcool benzílico

Devido ao nosso grande interesse neste intermediário, buscamos um método alternativo para a produção do 5-((dimetilamino)metil)-2-iminoimidazolidina-1-ol **147**. Vasculhando a literatura chegamos a um artigo recente, aonde após algumas etapas os autores obtinham algumas guanidinas cíclicas similares a objetivada por nós a partir do álcool benzílico.²⁰⁰ Sugerimos o seguinte método o qual possibilitaria a síntese do produto **147** sob a forma racêmica, Esquema 64.

²⁰⁰ Alanine, A.; Bourson, A.; Büttelmann, B.; Gill, R.; Heitz, M-P.; Mutel, V.; Pinard, E.; Trube, G.; Wyler, R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003, 13, 3155-3159.

Esquema 64. Proposta sintética para o composto **147** sob a forma racêmica a partir do álcool benzílico **148**.

Iniciando o processo deveríamos testar a síntese da hidroxilamina **150**, a partir do álcool benzílico **148** e hidroxiftalimida **149**. Enquanto o álcool benzílico foi obtido comercialmente a partir da Sigma-Aldrich[®], foi necessário à síntese da hidroxiftalimida **149**. Esse intermediário, apesar de disponível comercialmente demoraria um longo período para ser importado. Buscamos um procedimento capaz de produzir o intermediário **149** a partir de reagentes disponíveis em nosso laboratório.

Uma primeira metodologia baseada no trabalho de Einhorn & Einhorn²⁰¹ foi testada para a produção desse composto. Este deveria ser realizado em duas etapas, conforme Esquema 65. A primeira ocorreu da forma prevista. Aqui realizamos uma *N*-proteção que gerou um sólido com um rendimento de 93%. Este foi avaliado apenas por seu ponto de fusão estando de acordo com a literatura (95°C).²⁰²

Na etapa posterior deveria ocorrer uma reação de substituição a partir do produto anteriormente obtido. Aqui tivemos alguns problemas já que a hidroxilamina disponível no laboratório estava sob a forma de cloridrato, enquanto a usada no procedimento seguido deveria estar sob a forma de base livre. Dessa forma mesmo tornando o meio básico não chegamos ao produto final.

²⁰¹ Einhorn, C.; Einhorn, J.; Marcadal-Abadi, C. *Synthetic Communications*. **2001**, 31(5), 741-748;

Esquema 65. Procedimento sintético para a obtenção da hidroxifthalimida **149** partindo da ftalimida **158**

Alternativamente, chegamos ao recente trabalho de Sugamoto e col.²⁰² que logo foi testado. Nesse procedimento o autor determinou a síntese do mesmo produto **149** a partir da reação de anidrido ftálico com cloridrato de hidroxilamina utilizando energia de microondas para esse propósito, Esquema 66.

Esquema 66. Procedimento sintético alternativo para a síntese da hidroxiftamida **149** a partir do anidrido ftálico **160**.

Como não possuímos o referido equipamento específico para síntese orgânica, modificamos o método com a utilização de um agitador/aquecedor magnético. Conseguimos manter a temperatura a 60°C. A reação permaneceu até que todo o anidrido ftálico fosse consumido (6h). O produto foi obtido como um sólido branco com bom rendimento (72%) e com grande pureza em apenas um passo reacional. O mesmo foi avaliado através de seu ponto de fusão o qual foi de 236°C, coerente com o apresentado na literatura.²⁰³

De posse da hidroxifthalimida **149**, a reagimos com álcool benzílico **148** com intuito de obter a benzilidroxilamina **150**. Essa reação foi conduzida sob condições de Mitsunobu em atmosfera inerte. Na primeira etapa o intermediário **161** deveria ser formado, Esquema 67. No entanto, depois de uma série de análises, massas, RMN e ponto de fusão, concluímos que o intermediário **161** não havia sido obtido.

²⁰² Sugamoto, K.; Matsushita, Y.; Kameda, Y.; Suzuki, M.; Matsui, T. *Synth. Commun.* **2005**, 35, 67-70.

Esquema 67. Procedimento de sintético para a formação da hidroxilamina **150** partindo do álcool benzílico **148**.

Novamente buscando alternativas chegamos a um método que usa reação bifásica com transferência para obtenção do mesmo produto desejado por nós.²⁰³

Assim, o testamos utilizando fluoreto de tetrabutílamônio (Bu_4NHF) como transferidor de fase. O sistema foi composto de uma fase aquosa, mantida em meio básico (NaHCO_3), e uma fase orgânica, diclorometano. Diferente da metodologia anterior, ao invés de álcool benzílico usamos cloreto de benzila além da hidroxifitalimida obtida sinteticamente, conforme Esquema 68.

Esquema 68. Síntese do composto da hidroxifitalimida **150** baseado no método de Bonaccorsi & Giorgi.²⁰⁴ onde o material de partida é cloreto de benzila **162**.

Aqui verificamos a formação do intermediário **161** sob forma de cloridrato como um sólido branco. Esse composto, obtido com um rendimento de 82%, foi utilizado na etapa posterior sem previa purificação. Na sequência, foi necessária uma reação de hidrólise sob meio fortemente ácido (mistura ácido acético ácido clorídrico 10mL 3:1). Este processo gerou o produto **150** com um rendimento de 45%. O mesmo foi obtido com boa pureza, como um sólido branco com ponto de fusão de 215°C , o que esta de acordo com a literatura.²⁰⁴ A fusão completa em uma etapa é uma boa indicação da pureza.

²⁰³ Bonaccorsi, F.; Giorgi, R. *Synthetic Communications*. **1997**, 27(7), 1143-1147

²⁰⁴ Jestin, E.; Bultel-Rivière, K.; Faivre-Chauvet, A.; Barbet, J.; Loussouarn, A.; Gestin, J. *Tetrahedron Letters*. **2006**, 47, 6869-6873.

Na Figura 66 temos o espectro de massas obtido no modo *scan* para o produto dessa reação. Aqui vemos o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z 124.2 proveniente do composto **150**.

Figura 66. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de hidrólise do intermediário **161** para a formação do composto **150**.

Na etapa posterior, a uma solução de cloridrato de benzilidroxilamina **150** obtido anteriormente em DMF (5mL) em meio básico (NaHCO_3) foi adicionada a diona **151** (Esquema 64). Essa solução foi mantida sob forte aquecimento (80°C) durante 8h. O produto **152** foi obtido sob a forma de um sólido amarelo com um rendimento de 58%. Por tratar-se de um composto inédito buscamos uma completa caracterização estrutural desse composto. Na primeira análise avaliamos seu ponto de fusão, que foi de 55°C . Na Figura 67 podemos visualizar o espectro de RMN de ^1H para esse produto. Aqui temos os sinais dos prótons aromáticos com $\delta \approx 7$ ppm, os prótons referentes aos $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ com δ 3.66 e 4.01 ppm, enquanto o sinal referente ao OCH_2Ph aparece com um δ 4.60 ppm. Estes deslocamentos químicos (δ) são diretamente relacionados ao sinal do TMS (0 ppm). As integrações dos sinais (após transformata de Fourier), desdobramentos dos sinais (multiplicidade) bem como as constantes de acoplamento (J) estão de acordo como o esperado para essa molécula.

Figura 68. Espectro de massas no modo *Scan* referente ao produto da reação de hidrólise do intermediário **152** para a formação da diamina **153**.

Seguindo, o produto **153** foi logo testado no próximo procedimento reacional, com a intenção da formação da guanidina cíclica **154**. Para isso seguimos o procedimento determinado por Rodricks & Rapoport²⁰⁵ com algumas modificações coerentes. Chegamos ao produto desejado após extração com solvente orgânico. Aqui um grande problema foi o rendimento desse procedimento, o qual não passou de 10% após purificação. Para esse método é necessária nova otimização.

Apesar dos problemas com o rendimento, foi possível a identificação do produto através de espectrometria de massas. Na Figura 69 vemos o espectro referente ao produto no modo MS^2 onde foi selecionado o íon *quase-molecular* $[M + H]^+$ com m/z de 346.1. Podemos verificar fragmentações esperadas como a que gera o íon com m/z 241 a qual é referente a $[M - OCH_2Ph + H]^+$.

Figura 69. Espectro de massas no modo MS^2 do íon com m/z 346.1 referente ao composto **154** obtido por via sintética.

Uma completa caracterização deste heterociclo é necessária, já que se trata de um composto inédito. Isso ainda não foi realizado pela quantidade insuficiente de produto obtido.

²⁰⁵ Rapoport, H.; Rodricks, J. V. J. Org. Chem. **1971**, 36(1), 46-48.

Até esse momento foram otimizadas as quatro primeiras etapas (sem contar a produção da hidroxiftalimida **149**) com um rendimento global de 9.2%. O último processo (formação da guanidina **153**) necessita de mais alguns testes com a finalidade de aumentar esse rendimento de apenas 10%. Um dos grandes problemas de procedimentos de síntese total em vários passos para uma molécula, é a necessidade de sempre estar produzindo os materiais de partida para possibilitar a continuidade da rota, devido as grandes perdas em otimizações dos processos posteriores.

No entanto, observando o Esquema 64 percebemos que estamos a três e quatro passos reacionais dos nossos objetivos, o intermediário **147** e a anatoxina-a(s) respectivamente, ambos inéditos, sob a forma racêmica. Assim, a continuidade deste trabalho deverá produzir estes importantes compostos.

3.2 – Aplicações estratégicas

3.2.1 – Possível determinação analítica indireta usando um intermediário padrão interno

Durante as últimas décadas, vários relatos de mortes de animais domésticos bem como animais selvagens tem sido relacionados à presença deste composto organofosforado.²⁰⁶ Por outro lado, existe muita dificuldade para a avaliação/quantificação dessa toxina, principalmente devido a sua estrutura química. Os métodos analíticos apresentados até o momento fazem uso da sua característica biológica mais marcante, a inibição da acetilcolinesterase. Elétrodos sensíveis a inibição dessa enzima fazem à verificação de possíveis contaminações.²⁰⁷ No entanto baixas sensibilidade e especificidade tornam essa metodologia analítica não muito confiável. Por consequência, padrões internos sinteticamente produzidos viabilizariam outros métodos para a indentificação desta toxina.

²⁰⁶ Edwards, C., Beattie, K. A., Scrimgeour, C. M., Codd, G. A. *Toxicon* **1992**, 30, 1165–117; (b) Mahmood, N. A., Carmichael, W. W., *Toxicon* **1986**, 24, 425–434; (c) Gunn, G. J., Rafferty, A. G., Rafferty, G. C., Cockburn, N. *Vet. Record* **1992**, 130, 301–302; (d) Onodera, H., Oshima, Y., Henriksen, P., Yasumoto, T., *Toxicon* **1997**, 35, 1645–1648.

²⁰⁷ Villatte, F.; Schulze, H.; Schmid, R. D.; Bachmann, T. T. *Anal Bioanal Chem* **2002**, 372, 322–326; (b) Devic, E.; Li, D.; Dauta, A.; Henriksen, P.; Codd, G. A.; Marty, J-L.; Fournier, D. *Appl. Environmen. Microbiol.* **2002**, 4102–4106.

Uma possível aplicação para os produtos sintéticos testados até aqui e que devem ser concluídos em breve, seria a determinação de um possível método para qualificação/quantificação de forma indireta. Para isso, poderíamos utilizar o estável intermediário 5-((dimetilamino)metil)-2-iminoimidazolidina-1-ol **147** como padrão interno. No Esquema 69 observamos, o comportamento da anatoxina-a(s) em meio básico. Esta molécula é rapidamente hidrolisada gerando como produto a guanidina **147**. Dessa forma, um processo de abertura da amostra em meio básico poderia ser gerado o intermediário **147**, sendo o mesmo passível de ser avaliado. Uma metodologia como essa deve ser testada se a síntese do composto **147** seguir.

Esquema 69. Possível processo de hidrólise básica da anatoxina-a(s) gerando a *N*-hidroxiftalimida **147**.

3.2.2. – Mecanismo de ação tóxico

*E*ste composto age como um inseticida organofosforado sintético, sendo considerado o único da série inibidor irreversível de acetilcolinesterase de ocorrência natural conhecido.¹⁸³

Pelo processo normal de contração/relaxamento muscular, o neurotransmissor acetilcolina se liga ao receptor ocasionando à abertura dos canais iônicos. Após um breve período de tempo, a acetilcolina é retirada do sítio de ação através de uma ação de hidrólise pela enzima acetilcolinesterase. Na presença desta toxina, ocorre a inibição da liberação da enzima acetilcolinesterase. Desta forma, não há retirada da acetilcolina do sítio de ação, a repolarização não ocorre e por consequência o receptor é continuamente estimulado, Figura 70.

Figura 70. Representação do processo de polarização/repolarização em um sistema colinérgico quando em presença de anatoxina-a(s). Esta se liga a enzima acetilcolinesterase inibindo a ação de hidrólise desta conduzindo assim a um fluxo iônico contínuo, pela permanência do neurotransmissor acetilcolina (não hidrolisado) no sítio de ação.

Cook e col.,²⁰⁸ na década de 80, fizeram uma comparação da capacidade de inibição entre a anatoxina-a(s), inseticidas sintéticos inibidores reversíveis (carbamatos) e irreversíveis (organofosforados). Os resultados obtidos sugeriram uma capacidade inibitória da anatoxina-a(s) comparável com o paraoxon (inseticida organofosforado). Mais recentemente Parris e col.²⁰⁹ verificaram que a capacidade inibitória dessa toxina, bem como de organofosforados sintéticos tem relação direta com a dose. Além disso, em experimentos com animais (administração via oral e intraperitoneal) foi verificado que essa toxina é incapaz de inibir a acetilcolinesterase cerebral, concluindo-se, portanto, que ela não atravessa a barreira hematoencefálica. Por essa razão, foi também sugerido para anatoxina-a(s) pouca tendência a bioacumulação e baixa permanência em células adiposas e membranas celulares. Além disso, esse composto é muito mais solúvel em água que os organofosforados sintéticos.

Alguns detalhes sobre o mecanismo de ação da anatoxina-a(s) permanecem obscuros, como por exemplo, o fato de ser um inibidor irreversível da acetilcolinesterase. Uma das aplicações sugeridas visa avaliar a relação entre a parte alquílica da molécula e sua capacidade de inibição enzimática irreversível. Assim, poderíamos elucidar o princípio desse mecanismo de ação diferenciado quando comparado com outros organofosforados sintéticos conhecidos.

²⁰⁸ (a) Cook, W. O.; Beasley, V. R.; Dahlem, A. M.; Dellinger, J. A.; Harlin, K. S.; Carmichael, W. W.; *Toxicon* **1988**, 26, 750; (b) <http://www.aims.gov.au/> arnat, acessada em Junho **2005**.

²⁰⁹ Parris, J. T.; Carmichael, W. W.; Jones, S. B. *Angewan. Limn.* **2001**, 27(5), 3082-3085.

*P*artindo dos objetivos sugeridos para esse projeto chegamos até este momento com algumas propostas concluídas, e outras que devem ser continuadas.

L-BMAA

- Um método para a produção sintética sob a forma racêmica foi reproduzido e otimizado. Este procedimento foi ainda capaz de gerar uma inédita D₃-D,L-BMAA;
- Uma rota sintética foi determinada, concluída e já publicada para a síntese deste mesmo aminoácido sob a forma enantiomericamente pura. Este procedimento ainda gerou uma série de análogos *N*-alquilados com boa pureza;
- Dois diferentes procedimentos foram testados sem êxito. Enquanto isto, um terceiro foi concluído com êxito para a produção de um possível intermediário cíclico da BMAA;
- Um método por RMN de ¹H para a análise de BMAA foi criado e concluído. Para isso, utilizamos como padrão este aminoácido sob a forma racêmica obtido sinteticamente. Este método pode servir para analisar outros aminoácidos, bem para certificação de amostras de acordo com suas características;
- Um método analítico por LC-MS o qual utiliza como padrão a D₃-D,L-BMAA sintetizada por nós, esta em fase inicial (determinação dos limites de detecção e quantificação) devendo ser logo concluído;

- Um possível mecanismo neurotóxico para um intermediário cíclico deste aminoácido vem sendo avaliado. Para isso, análises de espectrometria de massas e alguns cálculos *em silico* foram conduzidos com a finalidade de avaliar esse equilíbrio químico. Nossos resultados indicam a formação deste composto cíclico quando a BMAA está em presença de íons carbonato. Em continuidade, testes que possibilitarão a verificação da neurotoxicidade deste composto serão conduzidos;

Anatoxina-a e Homoanatoxina-a

- Um procedimento sintético, onde o passo principal seria uma expansão anelar, foi iniciado sendo concluído sem o devido êxito. Entre as principais razões para isto estão à falta de material de partida e a dificuldade de obtenção sintética de alguns intermediários;

- Um procedimento sintético, que faz uso de uma ciclização intramolecular catalisada por uma espécie de paládio-II, foi criado e concluído. A partir desse método conseguimos produzir também a homoanatoxina-a bem como a D₃-anatoxina-a.

- Utilizando o mesmo método (baseado na ciclização intramolecular via catalise com paládio) produzimos a metoxianatoxina-a. Esta molécula é um interessante intermediário capaz de gerar outros diversos derivados;

- Em continuidade, a partir das molécula D₃-anatoxina-a, um método analítico por LC-MS deve ser criado;

- Em continuidade, alguns testes toxicológicos, bem como algumas avaliações da capacidade farmacológica da anatoxina-a e análogos devem ser conduzidos;

Anatoxina-a(s)

- A síntese da parte alquílica (guanidina cíclica) dessa toxina sob a forma racêmica e enantiomericamente pura através de dois diferentes procedimentos foram concluídos;

- Um método sintético proposto para a síntese enantiomérica da *N*-hidroxiguanidina gerada a partir da *L*-asparagina foi conduzido até o sexto estágio. Para a continuidade do mesmo, faz-se necessário à otimização de alguns processos chave com intuito de aumentar o rendimento de algumas reações específicas;

- Um procedimento capaz de gerar a *N*-hidroxiguanidina sob a forma racêmica a partir de álcool benzílico foi iniciado e conduzido até o quinto estágio. Para a continuidade deste trabalho faz-se necessária a otimização de algumas etapas;

- Em continuidade, após a conclusão da síntese de *N*-hidroxiguanidina, a mesma deve ser utilizada como padrão interno em um método analítico indireto. Outros produtos sintéticos devem servir de interessantes protótipos em avaliação do mecanismo de ação tóxico desta molécula.

A interação entre a síntese química, que possibilitou a criação e/ou melhoramento de alguns procedimentos, com as estratégicas aplicações dos devidos produtos, gerou e continuará gerando importantes conclusões a respeito desses compostos neurotóxicos oriundos de cianobactérias.

I. Equipamentos diversos

- Banho de ultra-som UNIQUE[®] Modelo USC700;
- Ressonância Magnética Nuclear de ¹H Bruker[®] (Karls-ruhe, Germany) DPX 300, o qual opera a uma frequência de 300.1 Mhz para o núcleo de hidrogênio; de ¹³C operando a uma frequência de 75.1 Mhz para esse núcleo, O deslocamento químico foi apresentado em ppm em relação ao padrão de TMS (como 0 ppm). Os solventes utilizados foram DMSO, CDCl₃, ODCD₃ e D₂O;
- Sistema a vácuo para extração em fase sólida (Supelco[®]);
- Centrífuga Eppendorf[®] 5804R;
- Tubos de RMN Norell XR-55 de 5 mm (Norell, Landisville, NJ, USA);
- Agitador de tubos – Vórtex;
- Agitadores e aquecedores Fisaton[®];
- Mantas de aquecimento Fisaton[®];
- LC-MS - Bruker[®] (Karls-ruhe, Germany) equipado com ionizador por eletrospray;
- Equipamento de Análise elementar Perkin-Elmer[®] CHN 2400, associado a um equipamento de espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) Spectro Ciros CCD. Dessa forma foram determinadas as quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio, as quais foram indicadas como percentagens;
- Rota evaporador Tecnal[®] modelo R200;
- Equipamento de determinação de ponto de fusão marca Tecnal[®] modelo PFIII, utilizando capilar de vidro e ainda termômetro 0-300°C de imersão;
- Balança semi-analítica;
- Balança analítica;
- Vidrarias para síntese mais comuns (com diversas graduações volumétricas) – balão de fundo redondo; erlenmayer; béqueres; kitassato; provetas; condensadores de refluxo; aparelhos de destilação; aparelho para purificação de solventes (munido de refluxador e destilador); seringas;
- Barras magnéticas.

II. Reagentes

Todos os reagentes utilizados como material de partida nos procedimentos sintéticos e ainda solventes especiais (incluindo solventes deuterados usados nas análises por RMN) foram adquiridos da Aldrich[®] Chem. Co. (Milwaukee, WI, USA) e normalmente foram utilizados sem prévias purificações. Outros solventes grau analítico foram adquiridos da Vetec[®] e utilizados, quando necessário, com purificações prévias.

III. Processos sintéticos

1. Síntese do ácido α -amino- β -metilaminopropionico (D,L-BMAA), (3) – ácido α -acetoamidoacrilico (5g) foi dissolvido em 50 mL de uma solução aproximadamente 30% de aquosa metilamina. Essa solução foi mantida a 40°C por 72h. O excesso de

amina foi removida sob pressão reduzida a temperatura ambiente. O resíduo foi então aquecido por 2h com solução de HCl 2M ($\approx 25\text{mL}$) e após essa solução foi novamente seca sob pressão reduzida. O que restou após a evaporação foi recristalizado com álcool etílico aquoso. O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco com um ponto de fusão de $165\text{-}167^\circ\text{C}$ com um rendimento de 82%. ESI-MS (m/z): $119.3\text{ }[M+H]^+$, $102.3\text{ }[M-OH+H]^+$, $88.5\text{ }[M-NCH_3]^+$.

2. Síntese da N-Cbz-L-asparagina (9) – A uma solução de 6.05g (40 mmois) de *L*-asparagina em 100mL de uma solução de Na_2CO_3 10% em água foram adicionados 56mL de 1,4-dioxano e 6.9mL (48 mmol) de benzil cloroformiato a 0°C . A reação foi colocada sob agitação com auxílio de um agitador magnético e mantida a temperatura ambiente durante a noite (8h). Decorrido esse tempo, foram adicionados mais 300mL de água, sendo a mistura extraída com éter etílico (3 x 100mL). A fase aquosa foi acidificada com HCl 2N em água e um precipitado branco se formou. O mesmo foi filtrado e lavado várias vezes com éter etílico. Esse composto foi obtido com considerável pureza (ponto de fusão = 163°C) e bom rendimento (84%). Esse composto foi utilizado sem futuras purificações. ESI-MS (m/z): $266.9\text{ }[M+H]^+$, $250.1\text{ }[M-OH+H]^+$, $222.9\text{ }[M-\text{COOH}+H]^+$, $176.1\text{ }[M-\text{CH}_2\text{Ph}+H]^+$, $132.1\text{ }[M-\text{NCOOCH}_2\text{Ph}+H]^+$, $91.3\text{ }[C_7H_7]^+$

3. Síntese do ácido N-Cbz-3-amino-L-propionico (10) – Em um balão de fundo redondo de 100mL foi adicionado 0.938g (3.5eq) do amino ácido protegido 9 e uma mistura de solventes composta por 24mL de ACN, 24mL de acetato de etila e 12mL de água. Posteriormente 2.150g (5eq) de $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$ foi adicionado sob forte agitação. Mantida a temperatura ambiente por mais 30 min, acrescentou-se 1mL de piridina, permanecendo assim sob agitação, a temperatura ambiente por mais 3 horas. Decorrido esse tempo os solventes foram evaporados sob pressão reduzida, sendo o resíduo solubilizado em 5mL de água e extraído com éter etílico (3 x 30mL). A fase aquosa foi novamente evaporada e ao que restou no recipiente foi adicionado 5mL de etanol e uma quantidade de éter suficiente para a precipitação de um sólido branco, o qual é o produto da reação. Após várias tentativas, o rendimento desta reação nunca ultrapassou 50%. Ponto de fusão = $228\text{-}230^\circ\text{C}$. ESI-MS (m/z): $238.9\text{ }[M+H]^+$, $222.1\text{ }[M-OH+H]^+$, $194.1\text{ }[M-\text{COOH}+H]^+$, $148.1\text{ }[M-\text{CH}_2\text{Ph}+H]^+$, $108.1\text{ }[M-\text{NCOOCH}_2\text{Ph}+H]^+$, $91.3\text{ }[C_7H_7]^+$.

4. Síntese do ácido N-Cbz-3-amino-L-propionico (10) procedimento alternativo – A uma solução de *N*-Cbz-*L*-alanina 0.938g (3.5eq) em acetato de etila (24mL), ACN

(24mL) e água (12mL) foram adicionadas 2.150g (5eq) de $\text{PhI}(\text{OCOCF}_3)_2$ a 0°C e sob agitação. A reação permaneceu assim por mais 30 mim, sendo posteriormente conduzida à temperatura ambiente e dessa forma ficou por mais 4h. Decorrido esse tempo a mistura foi gelada a 5°C e o produto precipitado foi filtrado, lavado com 10 mL de acetato de etila e seco a vácuo para gerar o composto desejado. O rendimento para este procedimento foi de 12%.

5. síntese da mistura do ácido *N*-Cbz-3-(mono,di,tri)metilamino-*L*-propionico (16, 17, 18) – A uma solução do composto 10 (0.238g, 1eq) em 5ml de metanol foi adicionado 0.141g (1eq) de iodo metano e ainda 0.140g de carbonato de potássio (1eq) a 0°C e sob agitação. A mistura foi mantida a essa temperatura por 30mim. Posteriormente foi permitido alcançar a temperatura ambiente (25°C) e mantida assim por mais 1h. Então os produtos foram avaliados sem previa purificação por ESI-MS.

6. Síntese do ácido *N*-Cbz-3-alkilamina(dialquil)-*L*-propionico utilizando as condições de Mitsunobu (17) – A trifenilfosfina (6.4 g, 2.44 mmol) seca sob vácuo por 72h pela ação P_2O_5 foi colocada a -78°C em THF anidro (100mL) sob atmosfera de nitrogênio. Após, foi adicionado lentamente e sob agitação o dimetilazodicarboxilato (3.57 g, 24.4 mmol) durante 10mim. Uma solução de *N*-Cbz-serina em 100mL de THF anidro foi adicionado após 30mim da primeira adição. A mistura foi agitada a -78°C por 20mim e posteriormente foi lentamente conduzido à temperatura ambiente. Dessa forma, foi mantida por mais 90mim. Para a etapa posterior, uma alíquota dessa solução foi mantida a 0°C e sob agitação, e lentamente foi borbulhada por arraste de nitrogênio a amina de interesse (**a-h**) a um fluxo de 0.3mL/mim. Essa condição foi mantida por 30mim, sendo posteriormente o solvente evaporado sob vácuo. O produto **29 a-h** foi separado dos demais subprodutos por coluna cromatográfica. Por fim o produto foi recristalizado em uma mistura de metanol e éter etílico. Os rendimentos, grau de pureza e constantes físico-químicas foram determinadas para cada produto individualmente. Para detalhes experimentais veja Anexo 3. ESI-MS (m/z): **29a**: $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 252.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 208.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29b**: 289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 266.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 222.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29c**: 303 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 280.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 263 $[\text{M}-\text{OH}+\text{H}]^+$, 236.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29d**: 317 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 294.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 250.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29e**: 303 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 280.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 263 $[\text{M}-\text{OH}+\text{H}]^+$, 236.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29f**: 317 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 295.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 238.9 $[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29g**: 289 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 266.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 222.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$; **29h**: 317 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 294.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 280.9 $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$, 91.3 $[\text{PhCH}_2]^+$.

7. Síntese do ácido 3-(metilamino)-2-ureidopropanoico (34) com óxido de zinco – Uma mistura de uréia (0.6g 10mmol), diamina 33 (1.18g, 10mmol), ZnO (0.06g, 0.73 mmol) e DMF (5 mL) foram colocados em um balão de fundo redondo com capacidade de 50mL, munido de um condensador de refluxo. Essa mistura foi agitada sob aquecimento de 25-100°C por 2-10h. Depois do tempo programado, a mistura retornou a temperatura ambiente e o ZnO foi retirado da solução por filtração. Após isso, o solvente foi evaporado e os produtos avaliados por espectrometria de massas através de infusão direta.

8. Síntese do metil-2-amino-3(metilamino)propionato (38) – A uma solução do composto 33 em 10 mL de metanol foi borbulhado HCl por arraste com auxílio do gás inerte, nitrogênio. Manteve-se a adição de HCl gasoso nesse sistema munido de um condensador de refluxo a uma temperatura de 60°C por 2h. Após o tempo ser percorrido, o solvente foi evaporado a vácuo e o produto, o qual se apresentou como um óleo amarelado foi analisado por ESI-MS (m/z): 133.1 $[M + H]^+$, 116.2 $[M - NH_2]^+$, 102.3 $[M - OMe]^+$, 73.3 $[M - COOMe]^+$. O rendimento para essa reação foi quantitativo (100%).

9. Síntese do 2-(metoxicarboilamino)-3-(metilamino)propionato (39) – A uma solução do composto 38 (1 mmol, 0.132g) em 10 mL de ACN foi adicionado 0.0945g (1mmol) de etilcloroformiato sob forte agitação e a uma temperatura de 0°C. Após 30min, essa solução foi colocada a uma temperatura de 80°C e assim manteve-se por 2h. Posteriormente o solvente foi evaporado a vácuo e o produto da reação avaliado por ESI-MS (m/z): 162.0 $[M+H]^+$, 102.0 $[M - OH + H]^+$, 74.0 $[M - COOH + H]^+$.

10. Tentativa de síntese em um passo do composto ácido 1-metil-2-oxoimidazolidina-4-carboxi (45) – Em modificação ao procedimento 9, 1 equivalente

de base, *tert*-butoxido de potássio (1 mmol, 0.112g) foi adicionado a solução de 1 eq do composto **38** e 1 eq. de hexilcloroformiato em 10 mL de ACN. Essa solução foi aquecida por 6h a 100°C. Depois de percorrido esse tempo a mesma foi novamente conduzida à temperatura ambiente sendo posteriormente o solvente evaporado a vácuo. Os produtos foram analisados por ESI-MS.

11. Síntese da N-Cbz-2-oxoimidazolidina-3-ácidocarboxílico (41) - Em um balão de 250 mL foi adicionado 1,320 g de hidróxido de sódio (33 mmois) e 50mL de água sob constante agitação. Esse sistema foi colocado a 0°C (banho de gelo) e manteve-se essa solução sob continua agitação. Bromo 0,7 mL (11 mmois; d= 3.11g/mL) foi adicionado com auxílio de um funil de adição sob um período de 10 minutos, no funil de adição foi colocado também cerca de 20 mL de água destilada sobre o bromo para evitar a evaporação do bromo durante a adição. Esta mistura deve possuir uma cor amarelo claro. Então 2,266 g de N-CBz-L-Asparagina **40** (10 mmois) sólido foram adicionados lentamente a mistura bromo/hidroxido ainda sob banho de gelo. Passado mais 30 minutos a 0°C, o mesmo foi retirado e a mistura passou a temperatura ambiente gerando uma solução sem cor a qual foi aquecida a 55°C por 3 horas. Decorrido esse tempo, a mistura foi novamente resfriada a temperatura ambiente e extraída com éter etílico (2 × 50 mL), essa extração foi feita de forma cuidadosa e lenta pois gera uma grande pressão. A fase aquosa resultante foi acidificada com HCl 6 M até pH 1. Um precipitado branco foi formado, sendo esta mistura mantida a 4°C overnight. O sólido formado foi filtrado, seco sob vácuo gerando o produto desejado com um rendimento de 72%. ESI-MS (*m/z*): 265.1 [M + H]⁺, 247.1 [M – OH]⁺, 173.1 [M – PhCH₂]⁺.

12. Síntese da N-Cbz-2-oxoimidazolidina-3-metilcarboxilato (42) - Em um balão de 50mL foi feita uma solução do composto **41** (2.112 g, 8 mmois) em 2mL de metanol. A essa solução foi adicionado cuidadosamente cloreto de tionila SOCl₂ 0,428 mL (6 mmois, d= 1.64 g/mL) gota a gota a temperatura ambiente. Essa solução foi agitada por 24h a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, o solvente foi evaporado restando um pó branco. Este resíduo foi dissolvido em diclorometano (50 mL) e esta solução foi lavada com bicarbonato de sódio NaHCO₃ (5% em 20 mL de água). As fases foram separadas, sendo a orgânica seca com sulfato de magnésio MgSO₄, filtrada e concentrada sob vácuo para render o produto com a forma de um óleo amarelado. ESI-MS (*m/z*): 279.1 [M + H]⁺, 247.1 [M – OCH₃]⁺, 219.1 [M – COOCH₃]⁺, 187.1 [M – PhCH₂]⁺, 171.1 [M – PhCH₂O]⁺.

13. Síntese da N-Cbz-2-oxoimidazolidina-5-metil-3-metilcarboxilato (43) - Em um balão de 50 ml foi adicionado 1.56g do composto **42** (6 mmois), 1.65g de K_2CO_3 (12 mmois) em 20 mL de acetona 20 p.a. Essa mistura foi colocada sob agitação e posteriormente 1.75mL de iodo metano (2.68 g, 19 mmois, $d=2.28$) foram adicionados. A mesma foi mantida a temperatura ambiente sob agitação durante 48h. Decorrido esse tempo, a parte insolúvel foi filtrada e o filtrado foi concentrado a vácuo. Este resíduo foi dissolvido em 20 mL de acetato de etila e posteriormente lavado com solução saturada de NaCl (20 mL). Separadas as fases, a orgânica foi seca com sulfato de magnésio e concentrada a vácuo novamente. O produto formado foi um sólido branco com ponto de fusão de $142^\circ C$. ESI-MS (m/z): 293.1 $[M + H]^+$, 261.1 $[M - OCH_3]^+$, 233.1 $[M - COOCH_3]^+$, 201.1 $[M - PhCH_2]^+$.

14. Síntese da oxoimidazolidina-5-N-metil-3-metilcarboxilato (44) - Em um balão de fundo redondo de 50mL foi feita uma solução do composto **43** (1.46g, 5mmois) em 20mL de metanol p.a. sendo adicionado 5% Pd/C (200 mg, 0.1% Pd). A esta mistura, mantida sob constante agitação a temperatura ambiente, foi adicionado hidrogênio H_2 a pressão ambiente. A mesma foi mantida sob atmosfera de hidrogênio com auxilio de reservatórios externos e sob forte agitação por 4h. Depois, 30 mL de diclorometano foi adicionado e a solução foi filtrada sob Celite (para tirar os resíduos sólidos). Uma solução sem cor obtida após esta filtração foi concentrada a vácuo para render um óleo. Este resíduo foi purificado com auxilio de coluna cromatográfica com sílica em uma mistura acetato/hexano (1:1). Um sólido de coloração branca foi formado com ponto de fusão de $82-83^\circ C$. ESI-MS (m/z): 159.1 $[M + H]^+$, 127.1 $[M - OCH_3]^+$, 99.1 $[M - COOCH_3]^+$.

15. Síntese do ácido 2-oxoimidazolidina-5-N-metil -3-carboxi (45) - A 0.316g (2mmois) do composto **44** colocado em um balão de 25 mL de fundo redondo foi

adicionado 2mL de uma solução de HCl 2N em água. A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 2h. Decorrido este tempo, a mesma foi extraída com éter etílico ($3 \times 10\text{mL}$), sendo a fase aquosa evaporada sob vácuo para gerar o produto **6** sob a forma de um sólido com coloração amarelada. Este resíduo foi recristalizado com álcool etílico aquoso para gerar um sólido branco com um ponto de fusão de 156°C . ESI-MS (m/z): 145.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 99.1 $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$; MS^3 ($\text{M} = m/z$ 99.1): 99.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 71.1 $[\text{M} - \text{CO}]^+$, 57.3 $[\text{C}_3\text{H}_7\text{N}]^+$. ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN , ppm) δ H3, 2.95 (3H, s); H2, 3.52 (1H, dd, $J = 4.8$ Hz), H1, 3.71 (1H, dd, $J = 6.3$ Hz); H2' 4.02 (1H, dd, $J = 4.8$ Hz).

16. Síntese do ácido 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carboxílico (79) – Em um balão de fundo redondo de 100mL de capacidade foi adicionada 2g do composto **46** purificado através de recristalização, o qual foi mantido a 0°C e sob agitação magnética. Nesse recipiente foram adicionados 100mL de ácido clorídrico concentrado (37%). Essa mistura foi aquecida a aproximadamente 100°C (temperatura de refluxo) por 24h. Depois a mesma foi resfriada até a temperatura ambiente sendo adicionado mais 200mL de água. Então essa solução foi extraída com éter etílico ($2 \times 200\text{mL}$), para ser retirado o ácido benzóico (subproduto). A fase aquosa foi evaporada sob pressão reduzida gerando o composto hidrolizado desejado. A recristalização foi feita com etanol. O produto foi avaliado pelo seu ponto de fusão o qual esteve de acordo com a literatura. $239\text{--}244^{\circ}\text{C}$. ESI-MS (m/z): 168.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 151.1 $[\text{M} - \text{OH} + \text{H}]^+$, 123.1 $[\text{M} - \text{COOH} + \text{H}]^+$.

17. Síntese do metil 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carboxilato (80) – A uma solução de cerca de 1.2g do composto **79** em 50mL de metanol foi borbulhado por arraste HCl anidro. Essa mistura foi realizada a 0°C e sob agitação, assim permaneceu por mais 1h. Decorrido esse período a solução foi aquecida por 5h a 60°C com a utilização de um condensador de refluxo, sendo posteriormente mantido à temperatura ambiente por mais duas horas. Depois desse tempo o solvente foi evaporado a vácuo e o produto purificado por destilação também a vácuo a uma pressão de 0.5 torr e uma temperatura de 55°C . O produto foi avaliado por ESI-MS (m/z): 181.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 151.1 $[\text{M} - \text{OMe} + \text{H}]^+$, 123.1 $[\text{M} - \text{COOMe} + \text{H}]^+$.

18. Procedimento testado para a obtenção da 1-(8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octa-2-em-2-il)etanona (81) – A uma solução de 1 g de destilado metil ester (**80**) em 10mL de 5% de água em metanol foi adicionado 500 mg de hidróxido de lítio monoidratado. Essa solução sob agitação foi mantida à temperatura de refluxo (65°C) por 2h. Após esse período o solvente foi removido e o sólido seco sob vácuo. Depois de 24h sob vácuo, sob atmosfera de nitrogênio a esse sal formado foi adicionado 20mL de 1,2-dimetoxietano anidro. Essa solução foi mantida a 0°C e uma quantidade equivalente de metil lítio (1.8M em éter etílico) foi lentamente adicionada. Essa mistura foi agitada por mais 5h, mantida a temperatura controlada (0°C). Após esse período o solvente foi evaporado a pressão reduzida e ao produto foi adicionado a uma solução 2N de ácido clorídrico gelado em 50mL de éter etílico. Essa nova solução foi agitada dessa forma por mais 2h. Então, as fases foram separadas e a aquosa foi basificada com solução de bicarbonato 1M até pH se comportar como 8. Essa foi extraída com diclorometano (3 × 50mL). As fases orgânicas combinadas foram secas, filtradas e evaporadas sob vácuo. O produto referente a esse procedimento foi avaliado por ESI-MS.

19. Síntese do 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carbaldeído (82) – O ácido **79** (0.061 mg, 0.36 mmoi) foi dissolvido em diclorometano e essa solução foi colocada a 0°C. Posteriormente foi adicionado trietilamina (0.049mL, 0.36mmois) e essa solução foi mantida a 0°C e sob agitação por mais 30min. Então, a temperatura foi reduzida para -78°C e com auxílio de uma seringa foi adicionado DIBAL-H (0.358mL de uma solução 1M em THF, 0.36mmois). Essa nova solução foi mantida a temperatura controlada (-78°C) por mais 30min. Após esse período cloreto de metil magnésio (reagente de Grignard) foi lentamente adicionado (0.36mmois, 0.119mL de uma solução 3M em THF). Depois de 30min temperatura controlada (-78°C) e sob forte agitação, a solução foi permitida igualar-se a temperatura ambiente. Então, foi lentamente adicionada uma solução de Rochele a 20% em água (10mL). Depois de 30min sob agitação as fases foram separadas e a fase orgânica seca com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente foi evaporado sob vácuo. O produto foi analisado por ESI-MS.

20. Síntese do N-metoxi-8-dimetil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-2-eno-2-carboxamida (83) – 0.167g (1mmol) do ácido **79** em uma solução de etanol foi adicionado 0.095g

(1mmol) de cloridrato de *N,O*-dimetilhidroxilamina a 0°C sob forte agitação. Posteriormente, ainda a 0°C, foram adicionados 0.1mL de piridina. Essa mistura permaneceu dessa forma por mais 1h. Então o solvente foi evaporado a vácuo. Ao resíduo foi adicionado 20mL de uma solução 20% de cloreto de sódio. Essa solução foi extraída com solvente orgânico (3 × 20mL de diclorometano). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada novamente sob vácuo. Os produtos foram avaliados por ESI-MS.

21. Síntese da 9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-en-10-ona (86) – A uma solução de frescamente destilado 1,5-ciclooctadieno **85** (1.08g, 10mmois) em 100mL de éter etílico anidro a -60°C e sob forte agitação foi adicionado com auxílio de um funil de adição gota a gota uma solução de clorosulfonil isocianato (0.71g, 5mmois) em 20mL de éter etílico anidro. Depois de 2h dessa forma a solução foi permitida a chegar a 0°C sendo assim tratada com uma solução 25% de sulfito de sódio em água, sendo essa adicionada lentamente e ainda sob forte agitação. Após toda a solução ser adicionada, a mistura foi agitada por mais 30min a temperatura ambiente, sendo posteriormente adicionado solução de KOH 10% em água até o pH se comportar como 8. Essa mistura foi agitada por mais 30min sendo posteriormente as fases separadas. A fase aquosa foi extraída com solvente orgânico (3 × 30mL de diclorometano). Todas as fases orgânicas combinadas (inclusive a primeira em THF) foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob vácuo. Esse produto foi purificado através de coluna cromatográfica com sílica gel como fase estacionária e a mistura de hexano:acetato (8:2) como fase móvel. O produto foi analisado por ESI-MS (m/z): 303 $[M + M + H]^+$, 152.0 $[M + H]^+$, 107.2 $[M - CONH_2]^+$, 123.1 $[M - COOH + H]^+$.

22. Síntese do *tert*-butil-10-oxo-9-azabicyclo[6.2.0]dec-4-ene-9-carboxilato (91) – A uma solução da correspondente lactama **86** (1.51g, 10mmois) em acetonitrila (50mL) a 0°C e sob agitação foi adicionado Boc-anidrido (4.15g, 20mmois) e ainda DMAP (0.24g, 2mmois). Depois de 30min essa solução foi permitida alcançar 25°C (temperatura ambiente) e assim permaneceu sob agitação por 8h. Percorrido esse tempo, a solução foi extraída com diclorometano (3 × 30mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com 50mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e teve o solvente evaporado sob vácuo. Esse resíduo foi purificado por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e a mistura de éter de petróleo/éter etílico na proporção de 3:7. O produto foi avaliado através de ESI-MS (m/z): 251.9 $[M + H]^+$, 195.8 $[M - O(CH_3)_3]^+$.

a) CH₃; b) CH₃CH₂; c) CD₃; d) CD₃CD₂

23. Síntese do *tert*-butil-8-metil(alquil)cicloocta-4-enilcarbamato (109 a-d) – A um balão de fundo redondo de 100 mL de capacidade, munido de três saídas seladas previamente saturado com nitrogênio e sob atmosfera de nitrogênio foi adicionada a β -lactama **91** (2.51g, 10mmois) em 50mL de THF anidro a uma temperatura de -78°C. Com auxílio de um funil de adição uma solução cloreto de metil magnésio (0.74g, 10mmois) a uma concentração de 3M em éter etílico foi adicionada lentamente. A solução foi mantida a -78°C sob forte agitação durante 2h. Depois desse período foi permitida a temperatura alcançar a 25°C sendo rapidamente adicionado uma solução de cloreto de amônio saturada (20mL) em água. Mais 50mL de éter foi adicionado e as fases separadas com auxílio de um funil de separação. A fase orgânica foi novamente lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob vácuo. O resíduo foi purificado usando coluna cromatográfica com fase estacionária de sílica gel e fase móvel contendo éter de petróleo/éter etílico numa proporção de 3/2. O produto foi gerado com um rendimento de 79% com na forma de um sólido branco com um ponto de fusão de 83-85°C, o que esta de acordo com a literatura. Ainda, o mesmo foi avaliado por ESI-MS (m/z): **109a**: 268.0 [M + H]⁺, 211.9 [M – (CH₃)₃ + H]⁺, 195.8 [M – O(CH₃)₃]⁺, 167.9 [M – COO(CH₃)₃]⁺; **109b**: 282.1 [M + H]⁺, 225.1 [M – (CH₃)₃ + H]⁺, 208.1 [M – O(CH₃)₃]⁺, 181.1 [M – COO(CH₃)₃]⁺; **109c**: 271.1 [M + H]⁺, 214.9 [M – (CH₃)₃ + H]⁺, 198.8 [M – O(CH₃)₃]⁺, 170.9 [M – COO(CH₃)₃]⁺.

a) CH₃; b) CH₃CH₂; c) CD₃; d) CD₃CD₂

24. Síntese do 1(8-aminociclooct-4-enil)eta(alquil)nona (110 a-d) – A uma solução do composto **109 a-d** (0.835g, 5 mmois para 109a) em 2mL de diclorometano sob agitação e a 0°C de temperatura foi adicionado 0.5mL de ácido trifluoroacético (TFA). Essa solução permaneceu a 0°C e sob agitação durante um período de 2h. Posteriormente, o solvente, o excesso de ácido e ainda o álcool *tert*-butilico formado como subproduto foram evaporados sob vácuo. O produto resultante teve rendimento quantitativo e apresentou um alto grau de pureza conforme análise de massas. **110a**: 168.1 [M + H]⁺; 150.1 [M – NH₂]⁺; **110b**: 182.1 [M + H]⁺; 165.1 [M – NH₂]⁺; **110c**: 171.1 [M + H]⁺; 153.1 [M – NH₂]⁺;

25. Síntese proposta por Ho e Zinurova para 1-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-2-il)eta(alquil)ona – a uma solução do intermediário amino ester **110 a-d** (1mmol, 1eq) em metanol (1mL) foi adicionado uma solução contendo PdCl₂ (0.005M), CuCl₂ (0.01M), NaCl (0.1M) e HCl (0.2M) em metanol (1mL). Essa solução foi aquecida a 60°C por 6h. Após esse tempo, a mesma foi conduzida a temperatura ambiente e extraída com diclorometano (2 × 10mL). Então a fase aquosa foi basificada com solução de NaOH até o pH se comportar como 8 e novamente extraída com diclorometano (2 × 10mL). A combinação das ultimas fases orgânicas (após pH da fase aquosa se tornar básico) foram combinadas, secas com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob vácuo. O produto foi purificado por coluna cromatográfica usando sílica gel como fase estacionária e uma mistura de hexano:acetato como fase móvel

26. Síntese 1-(9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno-2-il)eta(alquil)ona – Em um balão de fundo redondo de 50mL de capacidade e munido de 3 saídas previamente saturado com oxigênio (O₂) e sob atmosfera de oxigênio (com auxilio de reservatórios externos) a pressão ambiente foi adicionada uma solução do intermediário amino ester **110 a-d** (1mmol, 1eq) em DMSO (2mL). Com auxilio de uma seringa foi adicionado uma solução de Pd(OAc)₂ (0.1mmol), NaOAc (1mmol), N(Et)₃ (0.1M), em 1mL de DMSO. Essa solução foi aquecida a 60°C por 6h. Após esse tempo, foi conduzida a temperatura ambiente, sendo o sólido remanescente filtrado e então o produto permaneceu nessa solução e foi separada em HPLC utilizando coluna preparativa onde a fase estacionária foi composta por C18 e a fase móvel uma mistura de acetonitrila e água. Os produtos foram analisados por espectrometria de massas. ESI-MS (*m/z*): **60**: 166.1 [M + H]⁺; 149.1 [M – NH]⁺; 131.2 [M – NH – CO]⁺; 108.3 [C₈H₁₁]⁺; **111b**: 180.1 [M + H]⁺; 164.1 [M – NH]⁺; 131.2 [M – NH – CO]⁺; 108.3 [C₈H₁₁]⁺; **111c**: 169.1 [M + H]⁺; 152.1 [M – NH]⁺; 131.2 [M – NH – CO]⁺; 108.3 [C₈H₁₁]⁺.

27. Síntese do metil-8-aminociclooct-4-enecarboxilato (105) – Em uma solução do composto **86** (1.51g, 10mmois) em metanol anidro (30mL), foi borbulhado por arraste de nitrogênio HCl gasoso durante 5h sendo a solução resultante mantida a uma temperatura de 60°C e sob agitação. A esse sistema foi conectado um condensador de refluxo para evitar a completa evaporação do solvente. Após esse período o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O produto foi obtido com boa pureza, analisado por ESI-MS (*m/z*): 183.9 [M + H]⁺, 166.8 [M – NH₂]⁺, 151.9 [M – HOCH₃]⁺.

28. Síntese do ácido 2-acetoamido-3-propionico (131) – Para esse procedimento o ácido 2-acetoamido-3-aminopropionico (1.5g) foi dissolvido em 50mL de uma solução de hidróxido de amônio a uma concentração de 37%. Essa mistura permaneceu sob forte agitação a uma temperatura de 40°C por 72h. Decorrido esse período o excesso de amina foi removida sob vácuo. O produto foi analisado por ESI-MS (m/z): 147.1 $[M + H]^+$, 129.9 $[M - OH + H]^+$, 116.1 $[M - NH_2]^+$. Este apresentou boa pureza e foi utilizado sem prévias purificações no procedimento seguinte. O rendimento dessa reação foi de 94%.

29. Síntese do ácido D,L-2,3-diaminopropionico (132) – A uma solução do previamente produzido composto **131** (1g) em 1mL de água, foi adicionado 25mL de uma solução de HCl a uma concentração de 2M também em água. Essa mistura permaneceu sob forte agitação durante um período de 2h. Decorrido esse tempo o solvente foi evaporado sob vácuo e o produto recristalizado com álcool etílico aquoso gerando um sólido branco com um rendimento de 98%. O mesmo teve seu ponto de fusão verificado (225-227°C) estando de acordo com a literatura. Ainda, esse produto foi avaliado por ESI-MS (m/z): 105.2 $[M + H]^+$, 88.2 $[M - OH + H]^+$, 59.1 $[M - COOH]^+$.

30. Síntese do ácido 2-(tosilimino)imidazolidina-4-carboxílico (133) – 0.312g (3mmois) do composto **132** foram dissolvidos em 5mL de água formando uma solução. A essa sob forte agitação foi adicionado 10mL de uma solução de NaOH a uma concentração de 1M também em água. Posteriormente, 0.813g (3mmois) de *S,S*-dimetil-*N*-tosiliminoditiocarbonimidato em 2 mL de etanol foi também adicionado. Essa mistura foi aquecida sob temperatura de refluxo (80°C) durante um período de 15h. Percorrido esse tempo, o solvente foi evaporado até que restasse cerca de 1/3 do original (cerca de 5mL). Essa solução final foi mantida a temperatura de 0°C e o produto foi precipitado sob a forma de um sólido branco o qual foi filtrado e analiado por ESI-MS, RMN de 1H e ^{13}C . 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 2.33 (3H, s); 3.68 (2H, dd, $J^1 = 7.2$ Hz), 4.04 (1H, dd, $J^1 = 7.8$ Hz); 7.21 (2H, d, $J = 8.0$ Hz); 7.83 (2H, d, $J = 7.3$ Hz); ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm) δ 20.4, 57.3, 61.8, 125.1 (2C), 127.0 (2C), 134.2, 143.7, 143.9, 165.9; ESI-MS (m/z): 284 $[M + H]^+$, 238 $[M - COOH]^+$, 155 $[SO_2PhCH_3]^+$, 91.2 $[PhCH_3]^+$.

31. Síntese do ácido *N*-Fmoc-3-amino-*L*-propionico (136) – O procedimento utilizado aqui foi o mesmo determinado para o produto **10**, veja a descrição do procedimento 3 dessa série. O produto foi avaliado por ESI-MS e apresentou um rendimento de 48%.

32. Síntese do ácido *L*-2,3-diaminopropionico (137) – A uma solução do produto **136**, 0.312g (3mmois) em 5mL de etanol foi adicionado 0.228g (3mmois) de dietilamina. A mesma permaneceu sob agitação a temperatura ambiente (25°C) por 5h. Posteriormente o solvente foi evaporado produzindo o produto 137 com um rendimento de 98% verificado após purificação por recristalização com álcool etílico aquoso. Esse foi analisado por seu ponto de fusão (227°C), ESI-MS e RMN de ^1H .

33. Síntese da *N*-Cbz-*L*-asparagina (9) – A uma solução de 6,05 g (40 mmols) de *L*-asparagina em 100mL de solução 10 % de carbonato de sódio foi acidificado com 56mL de 1,4-dioxano e 6.9mL (48mmols) de Benzil cloroformiato a 0°C. A reação permaneceu sob forte agitação durante um período de 8h. Posteriormente foram adicionados mais 300mL de H_2O . A mistura foi extraída com solvente orgânico ($3 \times 50\text{mL}$). Depois, a fase aquosa foi acidificada com 20mL de uma solução de HCl 2N em água e um precipitado branco foi formado. Esse precipitado foi filtrado e foi extensivamente lavado com éter dietílico rendendo o composto desejado. O mesmo foi avaliado por seu ponto de fusão, 168°C.

34. Síntese do ácido *N*-Cbz,Boc-2,3-diamino-*L*-propionico (139) – 0.476g (2mmols) da amina **10** e bicarbonato de sódio 0.168g (2mmols) foram dissolvidos em 10mL de água e essa solução foi mantida sob forte agitação. A mesma foi gelada a 5°C e Boc-anidrido (1.5 eq) foi lentamente adicionado em uma solução contendo 5mL de 1,4-dioxano. A mistura resultante foi mantida a 0°C e agitada por 1 hora desta forma. Posteriormente foi permitido a mesma chegar a temperatura ambiente. Essa foi mantida dessa forma durante um período de 8h. A água foi então adicionada e a fase aquosa foi

extraída com acetato de etila ($2 \times 20\text{mL}$). A fase orgânica foi ainda lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio. As fases aquosas foram acidificadas até chegarem a pH 1 com solução de HCl 10 % e então extraída novamente com acetato de etila ($3 \times 10\text{mL}$). As fases orgânicas (primeira e segunda extração) combinadas foram secas com sulfato de magnésio e concentradas a vácuo. O produto foi purificado por recristalização com uma mistura de acetato de etila/éter/éter de petróleo (1:3:3) o que gerou um sólido branco, com um rendimento de 72%. O mesmo foi analisado através de seu ponto de fusão, $140\text{-}142^\circ\text{C}$, o que está de acordo com a literatura.

35. Síntese *N*-Cbz,Boc-2,3-diamino-*N,N*-dimetilpropanamida (140) – A 0.338g (1mmol) do composto **139** em 10mL de 1,4-dioxano a 0°C foi adicionado *N*-hidroxisuccinimida (0.115g, 1mmol) e posteriormente diciclocarboxicicloexanoamina (DCC) (0.226g, 1mmol). Essa solução foi mantida a essa temperatura e sob agitação por 10min. Depois a mesma permaneceu a temperatura ambiente e sob continua agitação por mais 15h. Decorrido esse período foi adicionado uma solução de Me_2NH (0.044g, 1mmol) em 5mL de éter etílico, sendo essa solução agitada por mais 30 min a temperatura ambiente. Após esse período uma solução de HCl 0.5M em água foi adicionada até o sistema chegar a pH 6. Após, a mesma foi extraída com diclorometano ($3 \times 15\text{mL}$). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob vácuo para gerar o produto desejado com um rendimento de 55%. O produto foi analisado por ESI-MS (m/z): $388.5[\text{M} + \text{Na} + \text{H}]^+$, $366.5[\text{M} + \text{H}]^+$, $266.5[\text{M} - \text{COO}(\text{CH}_3)_3 + \text{H}]^+$.

36. Síntese *N*-Cbz,Boc-2,3-diamino-*N,N*-dimetilpropano (141) – Uma solução de 0.365g do composto **140** em 10mL de THF foi gelada a $< 5^\circ\text{C}$ e mantida sob forte agitação. Então Red-Al (0.33 mL, 1.1 mmois) foi adicionado gota a gota não sendo permitido que a temperatura da solução ultrapassasse 20°C . Após completa adição, uma solução clara foi formada e aquecida a 40°C durante um período de 14 h. Decorrido esse tempo, a solução foi gelada a $< 5^\circ\text{C}$ e uma solução de NaOH em água a uma concentração de 1M foi adicionada lentamente, mantendo a temperatura abaixo de 25°C até que o pH se comportasse como 8. Após isso, a mesma foi agitada por mais 20 min a temperatura ambiente (25°C). Então se adicionou cerca de 30mL de hexano sendo as fases separadas com auxílio de um funil de separação. A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaOH 1N ($2 \times 10\text{mL}$), seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada a vácuo. O produto foi analisado por ESI-MS (m/z): $352.3[\text{M} + \text{H}]^+$, $295.1[\text{M} - (\text{CH}_3)_3\text{C}]^+$, $261.1[\text{M} - \text{PhCH}_2]^+$, $252.1[\text{M} - \text{COOC}(\text{CH}_3)_3]^+$.

37. Síntese da *N*-Boc-ftalimida (159) - A uma suspensão de ftalimida comercial **158** (1,47g; 10mmol) em 5mL de acetonitrila anidra sob agitação e a temperatura ambiente foi adicionado di-*tert*-butildicarbonato (Boc_2O) (2,29g, 1,5mmol), seguido de dimetilaminopiridina (DMAP) (0,12g, 1mmol). Após a completa adição houve uma rápida eliminação de gás carbônico acompanhada da progressiva dissolução da ftalimida. Após trinta minutos de agitação a temperatura ambiente, obteve-se uma solução homogênea. O andamento da reação foi acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se diclorometano e acetato de etila (9:1) como sistema solvente. O mesmo indicou que após 4h não existia mais do composto **158**, sendo considerado o tempo final da reação. Então foi removido o solvente sob vácuo e o sólido restante foi recristalizado com uma mistura de solventes composta de hexano e acetato de etila (9:1), gerando o produto com um rendimento de 95%. O produto foi avaliado por seu ponto de fusão o qual foi de 95°C, o que esta de acordo com a literatura.

38. Síntese da hidroxiftalimida (149) – A 1,235g (5mmois) do composto **159** em 5mL de acetonitrila e 5mL de água a temperatura ambiente foi adicionado 0,361g (5,2mmois) de cloridrato de hidroxilamina. Aqui deveria ser observada uma coloração laranja que indicaria o prosseguimento do processo reacional o que não ocorreu. Mesmo com adição de base não foi verificada a continuidade da reação. A mistura foi continuamente avaliada por CCD sem observarmos consumo do material de partida. Depois de 24h uma pequena alíquota foi analisada por espectrometria de massas sem a indicação da formação do produto. Algumas modificações nas condições reacionais (base utilizada, quantidades de reagentes, tempo e temperatura) foram feitas sem a obtenção do êxito na síntese do produto desejado.

39. Síntese da hidroxiftalimida (149) a partir do anidrido ftálico – A um balão de fundo redondo de 50mL de capacidade foi adicionado uma mistura de anidrido ftálico (386mg, 2mmol), cloridrato de hidroxilamina (278mg, 4mmol), piridina (1,58g, 20mmol) e ainda 10mL de acetonitrila. Essa solução foi aquecida por 6h a 60°C, até que todo o anidrido ftálico dissolvesse. Decorrido esse tempo o solvente e o excesso de piridina foram removidos a vácuo. O resíduo foi resfriado a 0°C e adicionou-se 10mL de ácido clorídrico em solução aquosa a uma concentração de 1M. Um precipitado

branco formado e logo filtrado, lavado com água (10mL) e seco sob vácuo resultando no composto desejado. O produto foi obtido com 72% de rendimento sendo avaliado apenas por seu ponto de fusão (172°C). O mesmo foi utilizado na próxima etapa sem prévias purificações.

40. Síntese do intermediário 2-(benziloxy)ftalimida – O álcool benzílico (0,27mL; 2,14mmois) foi dissolvido em 30mL de clorofórmio anidro sob atmosfera de nitrogênio. Posteriormente foi adicionado trifenilfosfina (PPh₃) (1,12g; 4,3mmois) e hidroxiftalimida (0,7g; 4,3mmois). A mistura foi agitada a temperatura ambiente até a dissolução de todos os componentes. Então diisopropilazodicarboxilato (DIAD) (0,67mL; 4,3mmol) foi adicionado à mistura que foi agitada por 15h a temperatura ambiente (25°C). O produto foi purificado por coluna cromatográfica onde sílica gel foi usada como fase móvel e uma mistura contendo clorofórmio e acetato de etila (1:1) como eluente. Após a obtenção deste composto, a segunda parte da reação foi realizada. As alíquotas obtidas após o processo de purificação foram avaliadas por espectrometria de massas e RMN de ¹H onde concluímos que o produto não foi formado. Alguns testes para otimização do método foram avaliados sem o êxito desejado.

41. Síntese do intermediário 2-(benziloxy)ftalimida – Sob vigorosa agitação, foi feita uma mistura entre NaHCO₃ (62g; 0,919mmol), água (1000mL), cloreto de metileno (500mL), fluoreto de tetrabutilamônio (Bu₄NHF) (12,5g; 0,0368mol) e cloreto de benzila (51,3g; 0,405mol). Após a dissolução de todos os componentes, a hidroxiftalimida (60g; 0,368mol) foi adicionada lentamente usando-se um funil de adição. Posteriormente a solução foi aquecida a 80°C e assim mantida durante um período de 2h. Decorrido esse tempo, a mistura foi transferida para um funil de separação onde foi adicionado mais 100mL de diclorometano. A fase aquosa foi extraída com diclorometano (2 × 100mL). Então as fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução aquosa de NaHCO₃ 5% (2 × 200mL), solução aquosa de ácido clorídrico 0,05% (2 × 200mL), solução aquosa de NaHCO₃ novamente (200mL) e por ultimo apenas água (200mL). Depois disso, a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob vácuo. O produto formou-se como um sólido branco com um rendimento de 82%, que foi usado sem previa purificação na etapa subsequente.

42. Síntese do cloridrato de *O*-benzilhidroxilamina (150) – Uma mistura da 2-(benziloxy)ftalimida (30g; 0,118mol), ácido acético (100mL) e ácido clorídrico (35mL) foi aquecida a temperatura de refluxo por 90min. Decorrido o tempo, o solvente foi evaporado sob vácuo e ao sólido restante foram adicionados 200mL de água. Essa suspensão foi alcalinizada sob forte agitação a uma temperatura de 0°C com a adição de solução aquosa de NaOH 10%. A mistura foi extraída com diclorometano (3 × 150mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e o solvente foi concentrado a um volume de 100mL. Nesta solução foi borbulhado ácido clorídrico gasoso, por arraste utilizando gás nitrogênio para esse fim, sob continua agitação até a saturação da solução. Um sólido branco formado foi decantado, posteriormente filtrado lavado com diclorometano (15mL) e seco sob vácuo. Esse produto teve um rendimento de 45% e o mesmo foi avaliado por seu ponto de fusão (215°C) o qual esteve de acordo com a literatura. Foi ainda analisado por ESI-MS (m/z): 124.2 $[M + H]^+$, 91.1 $[C_7H_7]^+$.

43. Síntese do 2-(2-(benziloxiamino)etil)isoindolina-1,3-diona (152) - 0.3 g (2mmois) do **150** foi colocado em um balão de fundo redondo juntamente com 0.24g (4mmois) de $NaHCO_3$. Então foi adicionado 0.508g (2mmois) de 2-bromoetilftalimida e 15mL de dimetilformamida (DMF). A reação foi mantida sob agitação a uma temperatura de 80°C durante 8h. Decorrido o tempo, o solvente foi evaporado a vácuo restando um sólido amarelo. Então 100mL de água foram adicionados o produto foi extraído com diclorometano (3 × 100mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente evaporado sob vácuo novamente. O produto foi obtido com um rendimento de 58% na forma de um sólido amarelo. Por se tratar de um composto inédito uma completa caracterização estrutural foi necessária. Aqui, em uma primeira avaliação foi verificado seu ponto de fusão o qual foi de 55°C de acordo com a literatura.

44. Síntese do 2-(benziloxi)etanamina (153) – 0.552g (2mmois) do composto **152** foi dissolvido em 50mL de etanol puro e colocado sob agitação. Posteriormente, foi adicionado 1g (20mmois) de hidrazina monohidratada. Essa mistura foi agitada e aquecida a uma temperatura de 65°C durante 8h. Decorrido o tempo, a solução foi resfriada a 0°C o que levou a formação de um precipitado branco. O sólido foi filtrado e lavado com etanol. O filtrado foi concentrado a vácuo gerando o um resíduo sólido. O mesmo foi purificado por coluna cromatográfica utilizando sílica gel como fase estacionária e um sistema solvente composto de hexano/acetato de etila. O produto foi eluído quando a mistura de solventes atingiu 1:1. O rendimento após a purificação foi de 43%. O mesmo foi analisado por ESI-MS (m/z): 167.1 $[M + H]^+$, 150.1 $[M - NH_2]^+$, 91.1 $[C_7H_7]^+$.

45. Síntese do dimetil-*N*-tosiliminoditiocarbonimidato (154) – 0.324g (2mmois) do composto **153** foram dissolvidos em 5mL de água sendo essa solução colocada sob agitação. Posteriormente, 14mL de uma solução de NaOH com uma concentração de 1M foram adicionados. Decorrido 30min foi adicionado 0.69g (2.5mmois) de Ts-NC(SCH₃)₂. A solução formada foi aquecida a 80°C durante um período de 4h. Decorrido esse tempo foi permitido a solução voltar a temperatura ambiente (25°C) sendo posteriormente filtrada. O filtrado foi evaporado sob vácuo até obtermos um volume aproximado de 5mL. A esse foi adicionado 30mL de água e a solução foi extraída com diclorometano (3 × 20mL). As fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtrada e evaporada sob vácuo para gerar o produto **154** com um rendimento de 10%. ESI-MS (m/z): 346.1 $[M + H]^+$, 241.0 $[M - OCH_2Ph + H]^+$.

IV. Outros Procedimentos

IV.I. Procedimento para identificação e quantificação de *L*-BMAA por RMN de ¹H em amostras biológicas.

Foram recolhidas alíquotas de 300mg de cérebro congelado de camundongos e para precipitar as proteínas foi usado 1mL de uma solução 0,1N de ácido tricloroacético em água. Estas amostras foram submetidas a ultra-som por 5 minutos e depois

centrifugadas por 10 minutos, com rotação de 6.9g e à 4°C. O sobrenadante foi recolhido e submetido à extração em fase sólida seguido da análise por RMN de ^1H , conforme método descrito no relatório parcial. Este procedimento é capaz de determinar somente a *L*-BMAA livre.

Para a determinação de *L*-BMAA associada à proteína é necessário reagir às proteínas precipitadas pelo procedimento anterior com ácido clorídrico 6M em temperatura constante (100°C) por 24 horas.

IV.II Amostras biológicas (métodos analíticos para BMAA)

Cérebros de camundongos Balb/c foram obtidos do biotério do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e submetidos a análise posteriormente a abertura da amostra segundo procedimento descrito

IV.III. Soluções-padrão (métodos analíticos para BMMA)

1mg do padrão de *L*-BMAA foi dissolvido em água MiliQ[®] e estocado em geladeira à 4°C. A solução de padrão interno (4-nitro-*DL*-fenilalanina) de concentração 1mg/mL também foi preparada em água MiliQ[®].

IV.IV. Detalhes da instrumentação para o método para BMAA por RMN de ^1H

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos em um equipamento Bruker[®] (Karls-Ruhe, Alemanha) modelo DPX 300 utilizando um probe multinuclear de 5mm operando a 300.13 MHz a uma temperatura de 25°C. Os deslocamentos químicos foram reportados em ppm em relação a uma escala onde o solvente residual foi o padrão (4.86 ppm para H_2O) sendo esse sinal manualmente calibrado. Os espectros foram obtidos sob as seguintes condições: pulso de $\pi/2$ foi determinado usando amostra padrão de D_6 -acetona como referência; a aquisição foi obtida usando o modo *zero-go* do espectrômetro (comando ZG, Bruker[®]) sendo a mesma obtida com um pulso excitatório de $\pi/6$; o tempo de relaxação depois da aquisição (RD/D1) foi ajustado de acordo com o tempo de aquisição (AQ) para uma completa relação uma condição de $2.66.t_1$ (padrão AQ. RD= 5.3s); para a aquisição foi usada uma janela de 32K pontos com um tamanho aproximado de 10ppm, o que rendeu uma resolução digital de 0.3Hz, ou melhor. Os FIDs (*Free Induction Decay*) foram multiplicados por uma função exponencial (largura da linha fator de 2.0Hz) antes da transformada de Fourier. O processamento dos dados foi feito *offline* com o programa Top Spin (Bruker[®], Karls-Ruhe, Alemanha, 2006). A correção da Fase foi feita interativamente em uma sub-rotina usando duas regiões de expansão ambas terminando depois da correção padrão do espectro completo. A solução contendo BMAA foi determinada depois da perfeita integração dos sinais bem separados de $\text{N}(\text{CH}_3)$ a 2.71 ppm (singleto, 3H) e para 4-nitrofenil-alanina *HArH* a 7.06 ppm (doubleto, 2H). Para a identificação dos analitos, os sinais foram selecionados e integrados pelo programa computacional Top Spin[®]. A escolha dos sinais usados para a quantificação da BMAA e PI foi feita baseada na ausência de *overlapping* bem como pelas suas maiores intensidade (de acordo com o numero de prótons que representa) o que conduziu a um maior limite de detecção. A taxa das suas razões entre os prótons selecionados da BMAA e do PI foram usadas para a quantificação.

IV.V. Purificação do metil 3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]octano-2-carboxilato (46) – A aproximadamente 2 gramas do composto **46** foi adicionado cerca de 1g de bicarbonato de sódio em solução com 10 mL de água. Após um período de cerca de 2h sob agitação, essa solução foi extraída 3 vezes com cerca de 50 mL de éter etílico. Essas fases orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio anidro e filtrada. Posteriormente, com auxílio de um aparato especial de vidro foi borbulhada a essa solução HCl gasoso anidro por arraste de nitrogênio. Dessa forma, formou-se novamente o cloridrato do composto **46** o qual é insolúvel em solvente orgânico e por consequência precipitou sob a forma de um sólido branco. Assim, após nova filtração o produto foi recolhido e completamente seco sob vácuo. Após foi medido seu ponto de fusão estando de acordo com o relatado na literatura 195°C.

IV.VI. Determinação de espectrometria de massas por Infusão direta (DIP) - As determinações por Espectrometria de Massas por infusão direta (*direct infusion probe*, DIP) foram realizadas em um equipamento de cromatografia líquida acoplado a um analisador de massas com analisador do tipo IonTrap LC-MSⁿ (*Bruker Daltonics – Modelo HCT Plus*). A ionização foi realizada por *eletrospray* (spray de elétrons). Foram obtidas as *m/z* as quais foram relacionadas com o íon *quase-molecular*, bem como algumas quebras características. A mistura acetonitrila/água 1:1 0,1% ácido fórmico foi utilizada como solvente. Dessa forma, as amostras foram determinadas no modo positivo. As análises foram feitas em triplicata.

IV.VII. Processo de purificação de solventes mais utilizados.

Para alguns processos específicos houve a necessidade de purificação de alguns solventes com o objetivo principal de torná-los anidridos (sem água).

- **THF (tetraidrofurano) ou Éter Etilico** – Esse solvente sofre um pré-tratamento com hidróxido de potássio. Em 1L de solvente foram adicionadas 10g de sal, sendo os dois agitados durante 24h a temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado mais 10g de sal sendo essa suspensão aquecida de acordo com a temperatura de ebulição dos respectivos solvente em um sistema munido de um condensador de refluxo e pérolas de ebulição (para evitar a formação de bolhas no interior do sistema) por mais 12h. Decorrido esse tempo, o mesmo foi separado do sal por destilação. A seguir ao destilado foram adicionados pequenos pedaços de sódio metálico finamente dividido (para aumentar a superfície de contato) e ainda o indicador benzofenona, o qual reage com o excesso de sódio metálico dando uma coloração azul característica ao solvente seco. Aqui, de acordo com a necessidade o solvente foi destilado e novamente adicionado sódio até a completa extração da água presente. Após completo o processo, o solvente permaneceu no interior desse sistema no qual é possível destilar ou apenas refluxar o mesmo sob atmosfera de nitrogênio. Assim, o solvente pode ser utilizado durante algumas semanas até que haja a indicação (manter a cor azul escuro) de que o mesmo ainda permaneça anidro.

- **Diclorometano ou Clorofórmio** – Esse solvente sofre um pré-tratamento com cloreto de cálcio anidro. Assim, para 1L de solvente foi adicionado cerca de 12g de sal sendo essa suspensão agitada a temperatura ambiente por 24h. Após esse período, o solvente foi filtrado e ao mesmo adicionado pentóxido de fósforo (cerca de 10g) sendo adicionada a essa suspensão pérolas de ebulição, as quais dificultam a formação de bolhas no interior do sistema. Esse sistema complexo foi aquecido de acordo com a

respectiva temperatura de ebulição do solvente a ser tratado em um sistema munido de um condensador de refluxo por 24h. Decorrido esse tempo, o mesmo foi destilado sob atmosfera de nitrogênio sendo posteriormente colocado em um recipiente previamente flambado. Ainda pequenos sistemas conhecidos como “peneiras moleculares” as quais são hábeis em adsorver qualquer resíduo de água foram adicionadas ao solvente. Esse solvente foi mantido em local seco utilizado durante no máximo três semanas. O mesmo foi sempre retirado do frasco com auxílio de seringas sendo adicionado sempre uma pressão negativa de um gás inerte para impedir que qualquer resíduo de água entre no mesmo durante esse processo.

- **Álcool Metílico ou Etilico** – A cerca de 1L desse solvente é adicionado cerca de 3g de magnésio metálico previamente ativado (tratado com solução de HCl 2M) e seco. Ainda, uma pequena quantidade (cerca de 50mg) de iodo também foi adicionado a esse sistema. Essa suspensão foi aquecida a temperatura de refluxo de acordo com a temperatura de ebulição do respectivo solvente em um sistema munido de um condensador de refluxo. Pequenas quantidades de iodo foram adicionadas quando do desaparecimento da cor marrom avermelhada da suspensão. Quando a cor indicadora for mantida durante algumas horas o solvente pode ser destilado e armazenado em um frasco previamente flambado. Esse deve ser selado com septo de borracha. O mesmo pode ser utilizado durante um máximo de três semanas, sendo retirado do frasco com auxílio de seringa de vidro previamente flambada, sempre sendo adicionado uma pressão negativa de um gás inerte para impedir que qualquer resíduo de água entre no mesmo durante esse processo.

Anexo 1.

Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado/Doutorado

Anexo 2.

*Documento informando a cedência de amostra de intorpecente pelo instituto
de criminalística de São Paulo*

Anexo 3. Artigo publicado

*One-pot synthesis of N-Cbz-L-BMAA and derivatives from
N-Cbz-L-serine*

Anexo 4. Artigo aceito para publicação

*^1H NMR determination of β -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) in
environmental and biological samples*

Anexo 5. Artigo publicado

Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos

Anexo 6. Artigo em fase de conclusão

Synthesis of anatoxina-a and homoanatoxina-a in five steps, game over

Anexo 7. Artigo em fase de conclusão

Pd-catalyzed synthesis of Methyl 9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene-carboxylate as scaffold for futures agonists nAChR

Anexo 8. Artigo submetido para a publicação
Synthesis of cyclic guanidines intermediate of anatoxin-a(s)
in both racemic and enantiomeric pure forms