



Universidade Federal do ABC



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

TAÍS ACÁSSIA MENEZES

**Síntese de Novos Captadores de Spin Baseados em
Aminoácidos**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM QUÍMICA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

TAÍS ACÁSSIA MENEZES

**Síntese de Novos Captadores de Spin Baseados em
Aminoácidos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC para obtenção do Título de Bacharel em Química
Orientador: Prof. Dr. Artur Franz Keppler

Santo André
Março / 2013

Conteúdo

I - Resumo	2
II - Introdução	3
II. 1. Radicais livres	3
II. 2. Captadores de radicais livres – nitronas	4
II. 3. Captadores de spin direcionados ao meio biológico	5
III – Objetivos	6
IV – Procedimentos Experimentais	7
IV. 1. Química	7
IV. 2. Celular	9
V – Resultados e Discussão	12
V. 1. Química	12
V.1.1 Testes iniciais: sistema oxidante e metodologias para a síntese das iminas	12
V.1.2 Síntese das Nitronas	15
V.1.3 Derivatização das nitronas via catálise de transferência de fase	17
V.1.4 Teste de viabilidade celular	19
VI – Conclusões	21
VII - Referências	22

LISTA DE ABREVIATURAS

4-POBN	- α -(4-piridil-1-oxido)-N-t-butilnitrona
ATCC	- American Type Culture Collection
ATP	- Adenosina Trifosfato
DBNBS	- 3,5-dibromo-4-nitrobenzeno sulfonila
DMPO	- 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Deoxyribonucleic Acid
EDTA	- Ethylenedinitrilotetraacetic Acid
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
HRMS	- High Resolution Mass Spectrometry
NAD ⁺	- Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	- Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto
PBN	- Phenyl <i>N</i> -t-butylnitrona
PBS	- Phosphate Buffered Saline System
ppm	- Partes por milhão
R _f	- Retention Factor
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
rpm	- Rotações por minuto
SCA	- Soro de Cavalo
SFB	- Soro Fetal Bovino
THF	- Tetrahidrofurano
TLC	- Thin Layer Chromatography
UHP	- Urea Hydrogen Peroxide

I - Resumo

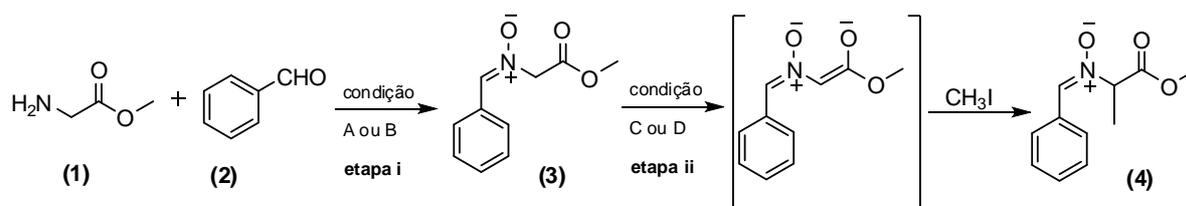
As nitronas são compostos altamente reativos e versáteis, podendo participar de uma grande variedade de reações, por exemplo, atuando como eletrófilo frente a diferentes espécies organometálicas,ⁱ como um reagente chave em reações de cicloadição 1,3 dipolar,ⁱⁱ além da captação de espécies radicalares. Nitronas podem ser reduzidas e oxidadas em uma grande variedade de produtos, e o estudo desta química é essencial para o entendimento de como radicais artefatos são gerados a partir destes compostos.ⁱⁱⁱ

Os objetivos deste trabalho foram centrados na síntese e caracterização de nitronas derivadas de aminoácidos. Foram feitos testes de conceito *in vitro* com a molécula sintetizada usando linhagens celulares para determinar a viabilidade de usar nitronas para fins terapêuticos.

Foram testadas 2 rotas de condições para a síntese da nitrona **(3)** (etapa i, Esquema 1), produto derivado da glicina. Usando a condição reacional B obteve-se **(3)** com um maior rendimento isolado. O controle reacional foi feito por TLC e o produto obtido caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C e espectrometria de massas. Visando a síntese de uma biblioteca de nitronas inéditas, utilizaram-se duas condições para a formação do aza-enolato (etapa ii, Esquema 1). Foram feitos estudos qualitativos de morte celular com **(3)**, comparando seu poder de proteção celular com o PBN (α -fenil-t-butilnitrona), que é uma nitrona controle.

Por não usar solvente o emprego da condição A na etapa i (Esquema 1) é ambientalmente interessante, porém demanda otimização. Usando a condição B, obteve-se um rendimento melhor (25%). Usando um sistema de transferência de fase (condição D), com um sal de amônio quaternário, detectamos por espectrometria de massas o composto **(4)**. Porém ainda não foi possível isolá-lo do meio reacional. A otimização dessas etapas estão em curso em nosso laboratório.

As condições sintéticas mostraram-se promissoras e continuam em curso os testes para a melhoria dos rendimentos isolados dos produtos. Com os testes celulares, verificou-se que a nitrona sintetizada **(3)** tem uma capacidade de proteção similar ao PBN e baixa toxicidade.



Esquema 1: Condições Reacionais: A – sem solvente, sem aquecimento, alto vácuo (0,01 atm), 12h, então MeReO₃, H₂O₂, 12h; B – Et₃N, CH₂Cl₂, MgSO₄, 18h, então MeReO₃, H₂O₂, 12h; C – K⁺Bu⁻O⁻, THF, -20°C, então CH₃I; D – solução 50% KOH e tolueno 1:1, catalisador (10 mol %), CH₃I, 8h.

II - Introdução

II. 1. Radicais livres

Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação dos mesmos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, e para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, processo no qual estes iniciarão uma cadeia de reações, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares.

A principal fonte de radicais livres em sistemas biológicos é a molécula de oxigênio, que, no entanto, é fundamental para o metabolismo celular e para a produção de energia. Sendo assim, a mais abundante fonte endógena geradora são as mitocôndrias (que usam cerca de 90% do oxigênio usado pelo corpo humano) onde o oxigênio é reduzido em etapas sequenciais para produzir água. Ou seja, ele participa da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, onde é reduzido pelo citocromo oxidase em água e o NADH é oxidado a NAD⁺, para que haja a produção de ATP. Para a completa redução de uma molécula de oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna. Entretanto, 1 a 2% desses elétrons são perdidos durante o transporte, levando a formação de superóxido (O₂⁻) e subsequentemente a outras numerosas espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxila (OH[·]).

Espécies radicais como o radical superóxido (O₂⁻), radical hidroperoxila (HO₂[·]), radical hidroxila (OH[·]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) são responsáveis por ocasionar lesões biológicas como: inativação de várias proteínas (enzimas e proteínas de membrana celular) e inativação ou mutação do DNA. Sendo assim, existe a necessidade para o desenvolvimento de compostos captadores desses radicais livres em sistemas biológicos.^{iv}

II. 2. Captadores de radicais livres – nitronas

Os captadores de spin mais utilizados possuem em geral o grupamento nitrona ou nitroso, sendo que somente as nitronas detectam radicais centrados no oxigênio, como superóxido e radicais hidroxil à temperatura ambiente.^{iii,v} Ambos compostos, nitronas e nitrosos, reagem covalentemente com um grande número de radicais livres para produzirem o aduto nitróxido ($N^{\cdot}O$). Com captadores do tipo nitrona, o radical captado é ligado ao carbono α , e o núcleo presente neste radical captado está longe do nitrogênio do grupo nitróxido formado. Na Figura 1 são mostrados alguns captadores, além do DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido), o DBNBS (3,5-dibromo-4-nitrobenzeno sulfonila) e o 4-POBN [α -(4-piridil-1 oxido)-N-t-butilnitrona], com seus respectivos adutos radicalares.ⁱⁱⁱ

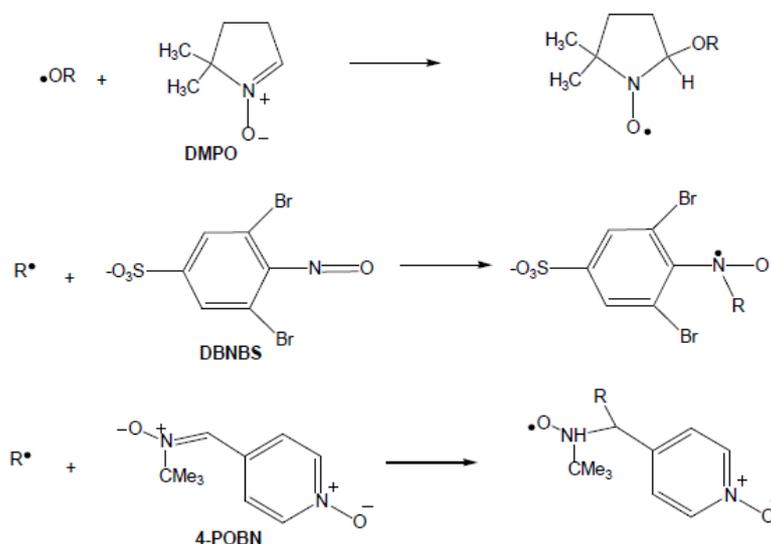


Figura 1: Estruturas e adutos de alguns captadores de spin mais utilizados em pesquisa.

As nitronas são compostos altamente reativos, podendo participar de uma grande variedade de reações, como por exemplo, atuando como eletrófilo frente a diferentes espécies organometálicas,ⁱ como um reagente chave em reações de cicloadição 1,3 dipolar,ⁱⁱ além da captação de espécies radicalares. Nitronas podem ser reduzidas e oxidadas em uma grande variedade de produtos, e o estudo desta química é essencial para o entendimento de como radicais artefatos são gerados a partir destes compostos.ⁱⁱⁱ

II. 3. Captadores de spin direcionados ao meio biológico

É proposto que compostos captadores de spin podem ser utilizados no tratamento de diversos tipos de doenças, incluindo as desencadeadas por isquemia, infecções, inflamações, exposição à radiação ou compostos citotóxicos, assim como processos naturais de envelhecimento.^{vi} O acidente vascular cerebral isquêmico é uma das principais causas de morte, ficando atrás das doenças cardíacas e câncer, e é a principal causa de incapacidade em adultos nos países desenvolvidos.^{vii} De maneira geral, quando tecidos oxigenados sofrem danos, em muitos casos permanentes, ocorre uma isquemia e em seguida ocorre a reperfusão.^{viii} O cérebro é um órgão altamente susceptível a esse processo. Certas áreas do cérebro, por exemplo, a medula espinhal e o hipocampo são as mais afetadas. Dessa maneira, danos neurodegenerativos estão intimamente ligados a processos relativos a um desbalanceamento na geração/quench de espécies radicalares endógenas. Uma vez determinados os parâmetros e alvos, a próxima etapa é desenvolver novas drogas para o tratamento de doenças relevantes, como o Alzheimer e Parkinson, que afetam severamente a população mundial, uma vez que a expectativa de vida vem aumentando consideravelmente ao longo das décadas. A cura e/ou tratamento dessas doenças é de suma importância, uma vez que os efeitos dessas doenças afetam não só o paciente, mas principalmente sua família e o círculo de relacionamento direto, impactando em um caos social nunca antes experimentado.^{vii}

Nitronas foram originalmente desenvolvidas como agentes captadores de radicais livres e duas décadas depois, as nitronas foram descobertas como agentes protetores do sistema biológico do estresse oxidativo. Elas têm sido testadas como agentes terapêuticos para disfunções neurais e sistêmicas incluindo a arteroesclerose, acidente vascular cerebral e doença de Alzheimer. Por exemplo, a N-tert-Butyl- α -Phenylnitrone (PBN), a nitrona mais amplamente investigada, mostrou-se favorável em aliviar os danos da isquemia cerebral em um modelo roedor.^{vii} Tendo em vista a aplicação direta dessas descobertas em produtos para a cura ou tratamento profilático, o retorno de capital seria muito interessante, pois a idade da população mundial está aumentando e o número de doentes está crescendo.

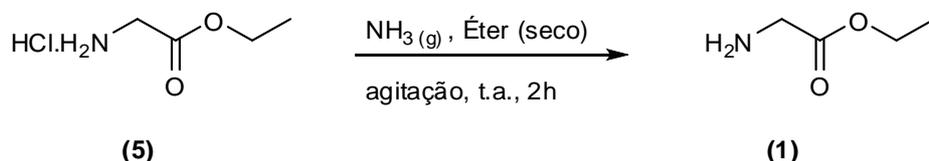
III – Objetivos

Os objetivos deste trabalho estão centrados na síntese, caracterização de novos captadores de spin baseados em nitronas derivadas de aminoácidos e nos testes de conceito *in vitro* usando modelos celulares para determinar a viabilidade de usar essas novas moléculas para fins terapêuticos.

IV – Procedimentos Experimentais

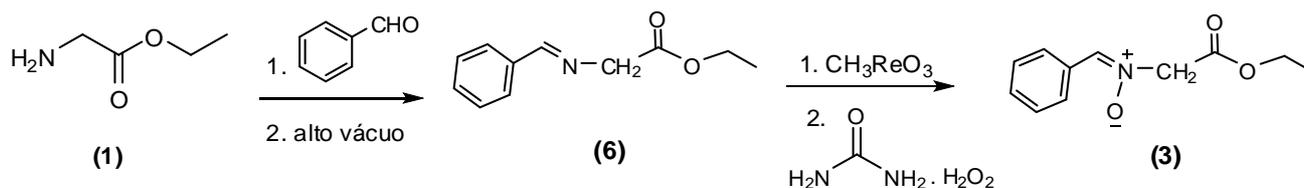
IV. 1. Química

Síntese do Éster Etilico da Glicina (1)



Procedimento: Foi suspenso 40g (287mmol) de cloridrato de éster etílico da glicina em 300 mL de éter seco em um balão de vidro de 500 mL de duas bocas, vedado com septos de borracha e equipado com uma barra de agitação magnética. Amônia gasosa foi borbulhada vigorosamente, sobre agitação, por 2h e a temperatura ambiente. Após, a mistura obtida foi filtrada à vácuo e por filtração simples. O líquido obtido teve o solvente removido sobre pressão reduzida. Em seguida o óleo amarelo obtido passou por uma destilação horizontal. O produto **(1)**, líquido incolor, foi obtido com rendimento de 45% (13,3g, 129mmol) e armazenado a -80°C.

Síntese da (Z)-N-benzilideno-2-etoxi-2-óxido oxoetanamina (3)

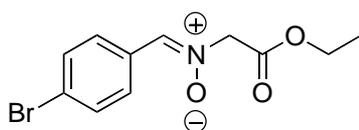


Procedimento: Foi adicionado 0,515g (5mmol) do éster etílico da glicina **(1)** e 0,51mL (5mmol) de benzaldeído em um balão de vidro e ligado ao alto vácuo por 6h. Após este período foi obtido como resultado um líquido amarelo, composto **(6)**. O vácuo foi quebrado e no mesmo balão, equipado com uma barra de agitação magnética, foi adicionado 10mL de MeOH, 1,41g (15mmol) do peróxido de carbamida (UHP) e 25mg (0,10mmol) do metiltrioxirenio(VII). A mistura reacional foi mantida sobre agitação, a temperatura ambiente, por um período de 20h, monitorada por TLC. O óleo obtido teve o solvente removido sobre pressão reduzida. Em seguida, o sólido branco amarelado obtido foi suspenso em CH₂Cl₂ e filtrado à

vácuo. Foi feita extração da fase orgânica (3x20mL) com solução aquosa saturada de NaCl e uma nova extração da fase aquosa com 20mL de CH₂Cl₂. As fases orgânicas reunidas tiveram o solvente removido sobre pressão reduzida. O óleo amarelo obtido foi submetido a uma purificação por coluna cromatográfica de sílica flash (eluente – Éter de petróleo: AcOEt 1:3), o rendimento do produto **(3)** foi de 10%. R_f=0,25 (Hexano: AcOEt 1:1, UV 254nm). **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 1,22 (t, 3H, J=7,3Hz), 4,2 (q, 2H, J=7,3Hz), 4,65 (s,2H), 7,37 (s,1H), 7,45-7,50 (m,3H), 8,16-8,25 (m,2H) (Anexo 5). **RMN de ¹³C** (CDCl₃, 50 MHz) δ: 13,96, 62,25, 67,93, 128,43, 128,79, 129,84, 130,93, 137,32, 165,64 (Anexo 6). **HRMS**: m/z [M+Na]⁺ calculado para C₁₁H₁₃NNaO₃: 230,0793; encontrado: 230,100 (Anexo 4).

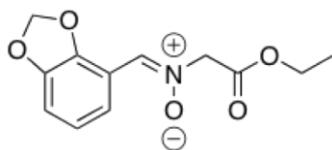
As outras nitronas foram sintetizadas de maneira similar à molécula **(3)**, alterando apenas o aldeído adicionado.

Síntese da (Z)-N-(4-bromobenzilideno)-2-etoxi-2-óxido oxoetanamina (13)



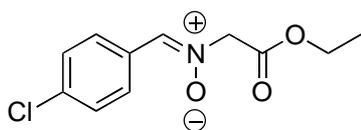
RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz) δ: 1,23 (t, 3H, J=8Hz), 4,21 (q, 2H, J=8Hz), 4,90 (s,2H), 7,67 (m, 2H) 8,20 (m, 2H) (Anexo 9.1). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13,9; 61,7; 67,7; 123,0; 129,7; 129,8; 131,4; 135,1; 166,1 (Anexo 9.2).

Síntese da (Z)-N-(benzo[d][1,3]dioxol-4-ilmetileno)-2-etoxi-2-óxido oxoetanamina (14)



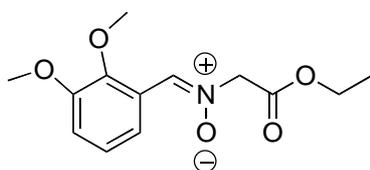
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1,26 (t, 3H, J=8Hz), 4,23 (q, 2H, J=8Hz), 4,64 (s,2H), 5,97 (s, 2H), 6,81 (d, 2H, J=8Hz), 7,32 (s, 1H), 7,52 (d, 1H, J=8Hz), 8,08 (s, 1H) (Anexo 10.1). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13,9; 62,1; 67,6; 101,5; 108,1; 108,4; 124,8; 136,8; 136,8; 147,5; 149,5; 165,7 (Anexo 10.2).

Síntese da (Z)-N-(4-clorobenzilideno)-2-etoxi-2-óxido oxoetanamina (15)



RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1,30 (t, 3H, *J*=8Hz), 4,27 (q, 2H, *J*=8Hz), 4,72 (s, 2H), 7,37-7,45 (m, 2H) 8,18-8,23 (m, 2H) (Anexo 11.1). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz) δ: 14,0; 62,3; 68,0, 128,4; 128,7, 130,0; 136,0; 165,5 (Anexo 11.2).

Síntese da (Z)-N-(2,3dimetoxibenzilideno)-2-etoxi-2-óxido oxoetanamina (16)



RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ: 1,31 (t, 3H, *J*=8Hz), 3,92 (s, 6H), 4,28 (q, 2H, *J*=8Hz), 4,69 (s, 2H), 6,89 (d, 2H, *J*=8Hz), 7,50 (t, 1H, *J*=8Hz), 8,38 (s, 1H) (Anexo 12.1). **RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz) δ: 13,93; 55,74; 62,17; 67,54; 110,44; 110,88; 123,17; 123,42; 137,02; 148,31; 151,00; 165,76 (Anexo 12.2).

IV. 2. Celular

Soluções Estoques

1. Solução da nitrona (3) 10 mM e 0,5 mM

Uma solução estoque da nitrona (3) de 50 mM foi preparada pela pesagem de 0,0207g deste composto seguido de sua solubilização em 2mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Dessa solução prepararam-se as soluções estoques nas concentrações de 10 mM e 0,5 mM, que foram esterilizadas por filtração utilizando-se de um filtro com poro de 0,22 µm e em seguida armazenadas.

2. Solução N-terc-butil-alfa-fenilnitrona (PBN) 10 mM e 0,5 mM

A partir de uma solução estoque de 200 mM de PBN preparou-se soluções estoque nas concentrações de 10 mM e 0,5 mM em DMSO, que foram esterilizadas por filtração utilizando-se de um filtro com poro de 0,22 µm e em seguida armazenadas.

3. Solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 20 mM

Esta solução estoque foi preparada na hora do uso, na qual se adicionou 20µL de H₂O₂ em 10 ml de água ultra-pura e esterilizou-se por filtração utilizando-se de um filtro com poro de 0,22 µm.

Cultura Celular

A cultura de células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y foi obtida da ATCC (American Type Culture Collection), cultivadas em meio de cultura DMEM/F-12, enriquecido com 10% v/v de soro fetal bovino inativado por aquecimento.

A cultura celular da linhagem PC12 também foi obtida da ATCC e cultivada em meio de cultura F-12K, enriquecido com 2 mM de L-glutamina, 10 % v/v de soro de cavalo inativado e 5 % v/v de soro fetal bovino.

As garrafas celulares, que possuíam uma abertura de respiração na tampa com um filtro bacteriológico, continham células em aderência e foram mantidas a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera controlada, a 5% de CO₂. Quando as células chegaram à confluência de 80%, as mesmas foram destacadas com uma solução de tripsina-EDTA 0,25%, diluídas em PBS-EDTA (1:5) e a suspensão celular foi centrifugada (1200 rpm, 5 min, 25 °C), e disseminada em meio fresco de cultura com densidade de 4x10⁴ células/cm².

Teste de Viabilidade Celular

Após as células SH-SY5Y e PC12 atingirem uma confluência de 80% nas garrafas de cultura ambas foram lavadas com solução de PBS-EDTA, para remover os vestígios do meio celular. Em seguida adicionou-se solução de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma), previamente diluídas em PBS-EDTA (1:5), e ambas as células foram incubadas a 37°C por 4 minutos. Acrescentou-se a garrafa de cultura, meio fresco e soro fetal bovino, com a finalidade de inativar a tripsina. A suspensão celular foi centrifugada (1200 rpm, 5 min, 25 °C) e disseminadas em placas de cultura de 24 poços com densidade de 4x10⁴ células/cm². Identificaram-se cada poço com o nome das soluções de tratamento que seriam adicionadas.

Após 24 horas, trocou-se o meio de cultura de cada poço, acrescentando o soro e suas respectivas soluções de tratamento.

Para a análise, incubaram-se as células a uma temperatura de 37°C em uma atmosfera controlada, a 5% de CO₂, por 6 horas de incubação e ambas as células foram foto-documentadas com uma câmera acoplada ao microscópio Olympus IX71.

Adicionou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos poços, exceto no controle negativo, e mantiveram-se as células incubadas por 4 horas, 8 horas e 24 horas.

Em seus respectivos tempos de tratamento com H₂O₂, cada poço era foto-documentado.

Tabela 1: Condições de cada poço para a realização do Teste de Viabilidade Celular na linhagem SH-SY5Y.*

Poço	Meio de cultura DMEM/F-12 (µL)	Soro (µL)	Solução estoque
Controle negativo (sem H₂O₂)	450	50 µL de SFB	----
Controle positivo (com H₂O₂)	450	50 µL de SFB	----
Nitrona (3) 25 µM	425	50 µL de SFB	25 µL Nitrona (3) 0,5 mM
Nitrona (3) 500 µM	425	50 µL de SFB	25 µL Nitrona (3) 10 mM
PBN 25 µM	425	50 µL de SFB	25 µL PBN 0,5 mM
PBN 500 µM	425	50 µL de SFB	25 µL PBN 10 mM

* SFB: soro fetal bovino.

Tabela 2: Condições de cada poço para a realização do Teste de Viabilidade Celular na linhagem PC12.*

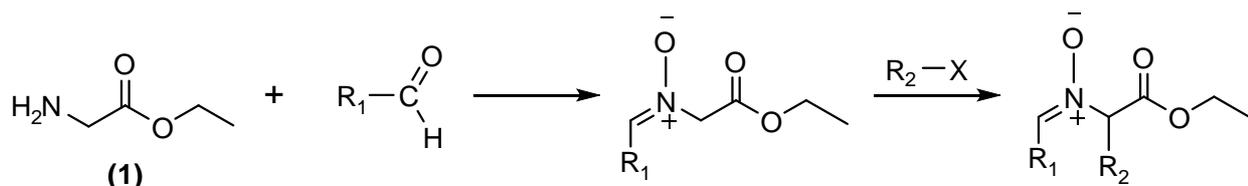
Poço	Meio de cultura F-12K (µL)	Soro SCA (µL)	Soro SFB (µL)	Solução estoque
Controle negativo (sem H₂O₂)	425	50	25	----
Controle positivo (com H₂O₂)	425	50	25	----
Nitrona (3) 25 µM	400	50	25	25 µL Nitrona (3) 0,5 mM
Nitrona (3) 500 µM	400	50	25	25 µL Nitrona (3) 10 mM
PBN 25 µM	400	50	25	25 µL PBN 0,5 mM
PBN 500 µM	400	50	25	25 µL PBN 10 mM

* SFB: soro fetal bovino, SCA: soro de cavalo.

V – Resultados e Discussão

V. 1. Química

A parte experimental foi iniciada com reações controle a fim de determinar as melhores condições reacionais para sintetizar uma série de nitronas, baseadas no esquema abaixo, Esquema 2, que teve como material de partida o éster etílico da glicina.



Esquema 2: estrutura básica das nitronas sintetizadas.

O projeto foi executado de acordo com a disponibilidade de reagentes e para melhor entendimento, foi dividido nas seguintes etapas:

V.1.1 Testes iniciais: sistema oxidante e metodologias para a síntese das iminas

V.1.2 Síntese das nitronas

V.1.3 Derivatização das nitronas via catálise de transferência de fase

V.1.4 Teste de viabilidade celular

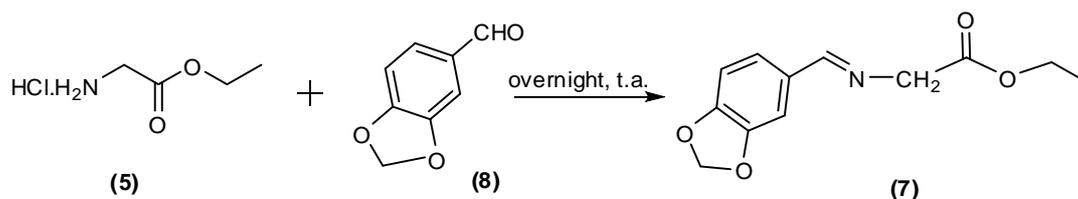
V.1.1 Testes iniciais: sistema oxidante e metodologias para a síntese das iminas

A primeira etapa foi avaliar eventuais oxidações indesejadas durante o processo oxidativo, os materiais de partida (moléculas (5), (8) e (9)) foram submetidos às condições reacionais de oxidação descritas por *Dujardin et al.*^{ix}

Para controle da reação e interpretação qualitativa do resultado de cada condição reacional, realizou-se TLC (Thin Layer Chromatography), sendo possível identificar a existência predominante de material de partida em todas as reações e a presença de produtos com R_f próximos, impossibilitando o isolamento para análise mais detalhada.

As reações controle indicaram que o processo oxidativo não afetou quantitativamente os materiais de partida e assim partimos para a síntese de imina, que é a 1ª etapa da rota de obtenção da nitrona.

A partir disso foi elaborado um procedimento para a síntese da imina **(7)** sob condições reacionais com controle de pH e utilizando-se dos reagentes **(5)** e **(8)**, conforme Esquema 3. É importante ressaltar que nesse momento os sistemas oxidantes estavam sendo importados, então iniciamos com a análise da 1ª etapa da reação da nitrona de interesse.



Esquema 3: Rota sintética proposta para síntese da imina **(7)**.

Tabela 3: Condições reacionais para síntese da imina **(7)**.

Reagente	Solvente	Agitação	Temperatura ambiente	Tempo de reação	Controle pH	Secante MgSO ₄
(5) + (8)	MeOH	Sim	Sim	Overnight	NaHCO ₃	Sim

O acompanhamento da reação foi feito por espectroscopia de infravermelho. Ao analisar os espectros não foi detectada nenhuma diferença entre os espectros dos reagentes e o espectro do produto reacional. Sendo assim, no espectro do produto reacional (Anexo 1) não foi observado a banda característica da função imina, C=N 1690-1640 cm⁻¹, descartando-se a possibilidade de sucesso na reação de formação da mesma.

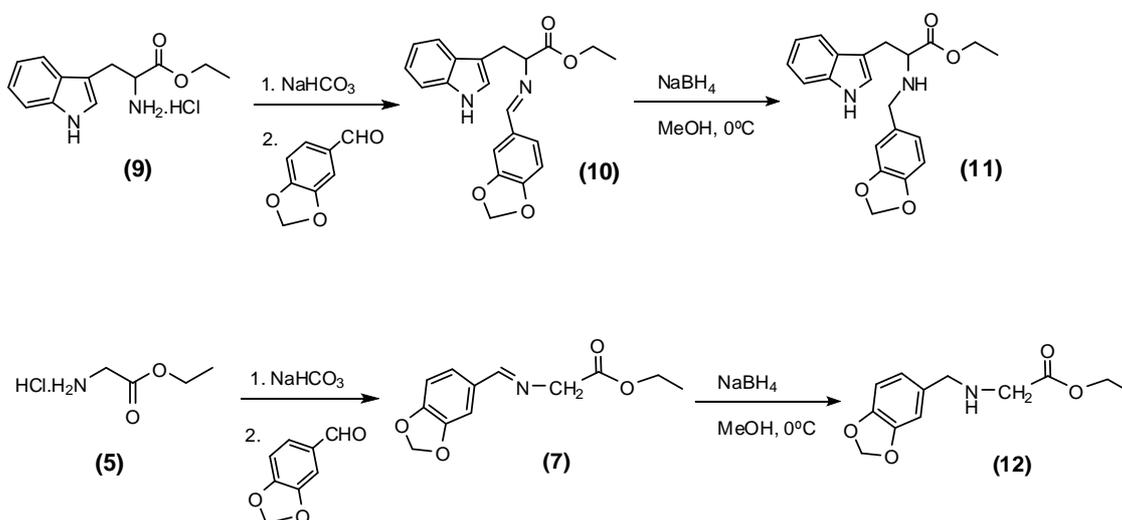
Com o sistema oxidante NaWO₄/H₂O₂ 30% em mãos, foram realizadas diversas tentativas de síntese da imina e oxidação “one pot” para geração da nitrona **(3)**.^{ix} Realizou-se uma análise por espectrometria de massas (Anexo 2) do produto gerado após a oxidação e constatou-se a não formação da molécula esperada. Pôde-se verificar também que a pesar de termos purificado a amostra, ela era uma mistura complexa de produtos de massa muito superior a massa do produto desejado, indicando a ocorrência de polimerização entre as moléculas.

Em decorrência dos resultados insatisfatórios obtidos nas reações iniciais, levantamos duas hipóteses: 1) baixo rendimento na formação de imina ou 2) geração de subprodutos de oxidação decorrentes da baixa seletividade do sistema oxidante NaWO₄/H₂O₂ 30% para a síntese de nitronas, problema este

relatado na literatura. Enquanto esperávamos a chegada do outro sistema oxidante, CH_3ReO_3 e peróxido de carbamida (UHP)^x, foi iniciada a investigação da eficiência da metodologia empregada para a síntese das iminas.

A estratégia adotada consistiu na aminação redutiva dos aminoácidos de interesse **(5)** e **(9)**, isto é, preparar a imina **(7)** e **(10)** sem isolá-la e submetê-la à redução da ligação $\text{C}=\text{N}$, levando ao isolamento da amina secundária correspondente **(12)** e **(11)**.

Como as aminas secundárias **(12)** e **(11)** são bem mais estáveis que suas iminas correspondentes **(7)** e **(10)**, a ideia foi utilizar os rendimentos globais das reações apresentadas no Esquema 4 como uma forma indireta de determinar a eficiência da etapa de síntese das iminas.

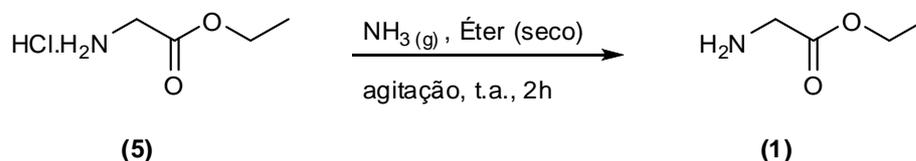


Esquema 4: Rota sintética da aminação redutiva dos aminoácidos **(5)** e **(9)**.

Baseando-se no método apresentado por *Wang et al.*^{xi} a redução foi feita. O controle da reação foi feito por TLC e realizaram-se extrações e purificação por coluna cromatográfica de sílica flash do produto obtido, a partir dos valores de R_f obtidos constatou-se o não sucesso da reação. Devido às dificuldades de análises mais detalhadas dos produtos isolados e a chegada do sistema oxidante mais adequado (CH_3ReO_3 e peróxido de carbamida (UHP)), o projeto seguiu para a próxima etapa.

V.1.2 Síntese das Nitronas

Como uma tentativa de solucionar os problemas identificados na rota sintética proposta, uma nova metodologia para obtenção do aminoácido **(5)** com a base livre foi utilizada (Esquema 5) ^{xii}.

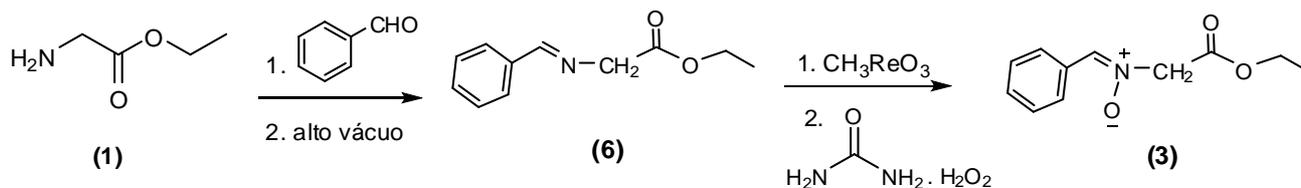


Esquema 5: Obtenção do reagente **(1)**.

Cerca de 13g do reagente **(1)** foi obtido na etapa citada no Esquema 5. Inicialmente foi feita a síntese da imina pelo método apresentado por *Bull et al.* ^{xiii} e após isso foi feita a oxidação pelo método apresentado por *Goti et al.* ^x. Foi feito o controle reacional por TLC e constatou-se que o produto final dessa reação não era o esperado. Após todas essas tentativas de sucesso na síntese da nitrona acredita-se que a justificativa para os resultados negativos seria a polimerização do reagente aminoácido e a não formação da imina por conta da presença de água ou umidade no meio reacional.

Em meio a todos esses desafios de adaptar com sucesso uma metodologia para síntese do produto desejado (nitrona), foi feita uma pesquisa na literatura e decidiu-se por testar uma metodologia de síntese de nitrona baseada na formação de nitrila como composto intermediário ^{xiv}. Foi feito o controle reacional por TLC e por espectroscopia de infravermelho e concluiu-se que não ocorreu a formação do composto alquilado. Isto pode ser confirmado pela ausência do pico característico da nitrila no espectro (Anexo 3), $2260\text{-}2240\text{ cm}^{-1}$. Uma justificativa para o não sucesso destas reações seria a possível formação de um sal entre a trietilamina (amina terciária) e a bromoacetoneitrila, pois ao adicionar estes dois reagentes ao meio reacional ocorreram uma forte turbidez seguida do aparecimento de um precipitado, provavelmente $\text{CN}-\text{CH}_2-\text{NEt}_3^+$.

Outra rota alternativa empregada foi baseada na utilização de uma bomba de alto vácuo ^{xv} para eliminação da água presente na mistura reacional como uma tentativa de favorecer o equilíbrio para a síntese da imina (1ª etapa da rota sintética proposta), Esquema 6.



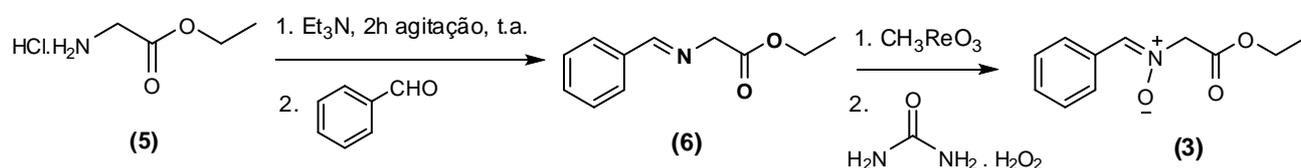
Esquema 6: Rota sintética para síntese da imina **(6)** com uso de bomba de alto vácuo.

O resultado obtido na síntese da imina mostrou-se promissor devido a presença da coloração característica desta função. Foi dada continuidade a rota sintética realizando a oxidação^x do produto obtido na síntese da imina **(6)** (solução amarela intensa).

A reação foi repetida e o controle reacional de ambas foi feito por TLC, sendo que a partir do mesmo constatou-se a presença de um produto bem intenso e com Rf diferente do material de partida. Ambas as reações apresentaram um rendimento global de aproximadamente 10%. Sendo assim, o produto obtido, óleo amarelo, foi submetido a uma análise mais completa por espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C .

Através do espectro de massas (Anexo 4) e dos espectros de RMN de ^1H (Anexo 5) e de ^{13}C (Anexo 6) foi possível constatar a obtenção do produto desejado **(3)**. Isto foi possível a partir da identificação do sinal $m/z = 208$ no espectro de massas, sinal este compatível com a massa molar do produto. E também através da comparação dos valores dos deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C com os citados na literatura.^{xvi}

Buscando melhores rendimentos e um método mais direto para síntese da nitrona **(3)**, tendo uma rota mais simples para obtenção da imina **(6)**, a via alternativa (Esquema 7) que parte do tratamento do aminoácido **(5)** com Et_3N foi utilizada.^{xvi}



Esquema 7: Rota sintética para síntese da imina **(6)** com tratamento prévio com Et_3N .

A reação foi repetida mais algumas vezes e o controle reacional de ambas foi feito por TLC, sendo que a partir do mesmo constatou-se a presença de um produto bem intenso e com Rf diferente do material de partida. Também foi feito um controle reacional por espectrometria de massas (Anexo 7) e comparando

com os dados obtidos da reação caracterizada por RMN, citada anteriormente (Esquema 6), tratava-se do mesmo produto, logo, a nitrona **(3)**. Ambas as reações apresentaram um rendimento global de aproximadamente 25%.

Com as metodologias para síntese da imina **(6)** e da nitrona **(3)** definidas, a próxima etapa foi trocar o aldeído e assim foram obtidas mais quatro nitronas, apresentadas na figura abaixo.

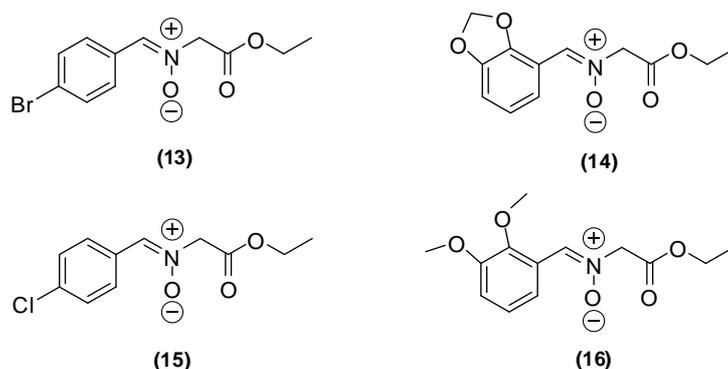
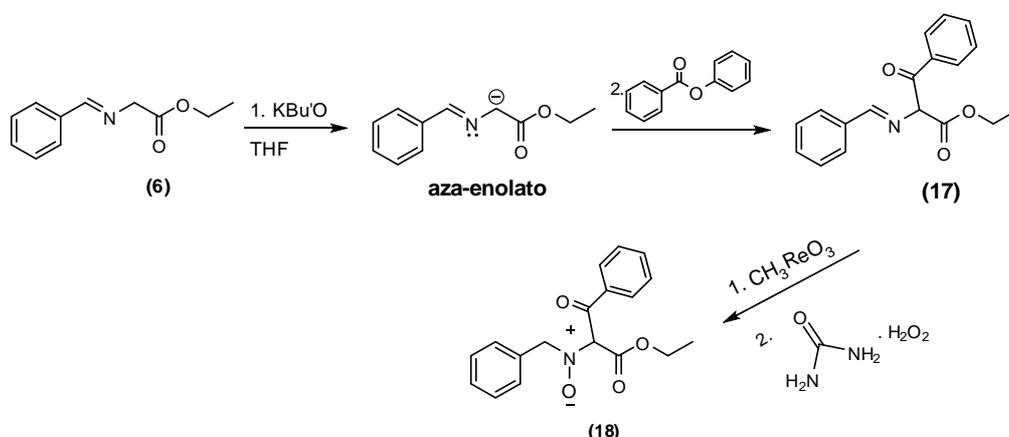


Figura 2: Nitronas sintetizadas conforme a rota proposta no Esquema 7.

V.1.3 Derivatização das nitronas via catálise de transferência de fase

Nesta etapa, a proposta era a alquilação do carbono alfa carbonila da nitrona, baseando-se no processo de derivatização do aza-enolato, conforme Esquema 8.

Inicialmente foram feitas duas reações, sendo a primeira baseada na acilação da imina **(6)** com posterior oxidação para formação da nitrona acilada **(18)** e a segunda baseada somente na acilação da imina **(6)** para geração da molécula **(17)**, conforme procedimento para a derivatização de aminoácidos.^{xvii}



Esquema 8: Rota sintética para acilação da imina **(6)**.

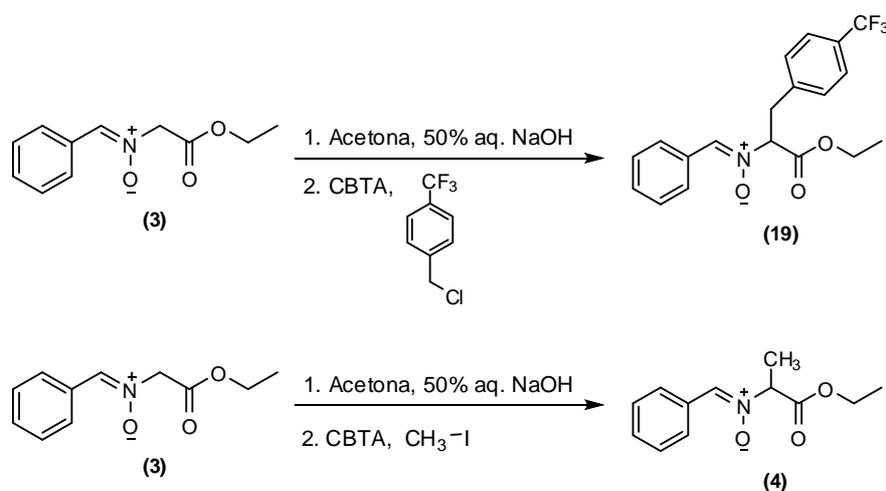
A imina (**6**) foi sintetizada conforme método já citado anteriormente. Na sequência duas reações de acilação foram feitas conforme a metodologia empregada.^{xvii}

A acilação da imina (**6**) foi feita em THF seco, com atmosfera inerte de N₂, sob agitação por 24 horas, empregando o uso da base forte K⁺Bu⁻O e do acilante benzoato de fenila. A adição dos reagentes foi feita em banho de gelo e acetona a -78°C e após isso manteve-se os mesmos sob agitação a temperatura ambiente. O resultado final desta etapa foi a obtenção de uma pasta amarela.

Em uma das reações de acilação foi dada continuidade a rota sintética sendo feita a oxidação do produto obtido na etapa de acilação da imina (**6**) conforme método já citado anteriormente.^{xvi} Sendo obtido como produto final desta reação de oxidação um óleo amarelo.

Foi feito o controle das duas reações por TLC e a partir dos valores de R_f obtidos constatou-se o não sucesso das mesmas.

Buscando uma maior seletividade e a fim de evitar a ocorrência de reações paralelas, optou-se por realizar a alquilação diretamente na nitrona (**3**) empregando uma metodologia baseada no processo de transferência de fase.^{xviii, xix}



Esquema 9: Rota sintética para alquilação da nitrona (**3**) baseada no processo de transferência de fase.

Testaram-se as seguintes concentrações de H_2O_2 : 200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M e 2000 μ M por 4 e 24 horas de incubação. Os resultados mostraram que a concentração "ideal" a ser utilizada seria a de 200 μ M para a SH-SY5Y e 500 μ M para PC12.

Já que a SH-SY5Y mostrou-se mais sensível, sendo que no tempo de 4 e 24 horas de tratamento não haviam mais células vivas nas concentrações acima de 200 μ M, optou-se por empregar esta concentração para as duas linhagens celulares com o objetivo de padronizar o teste de viabilidade celular.

Na sequência estipulou-se que as concentrações a serem utilizadas da nitrona (**3**) e do PBN seriam de 25 e 500 μ M, baseado no que foi relatado na literatura.^{vii}

Com isso, foi dado início ao teste de viabilidade celular e como primeira etapa foi feita a incubação das células com estes compostos citados anteriormente, onde foi identificado que as células SH-SY5Y morreram em sua totalidade e apenas as células PC12 sobreviveram (Anexo 14), com uma parcela muito pequena de morte celular (presença de poucos aglomerados de células na foto-documentação da cultura celular).

Dando continuidade ao teste com a linhagem de células PC12, previamente incubadas com as nitronas (**3**) e PBN e tratadas com H_2O_2 nas concentrações de 200 e 500 μ M, as placas de células com esse tratamento foram analisadas após 4, 8 e 24 horas.

Observando as fotos tiradas das culturas celulares após o período de 4 horas de incubação (Anexo 15) foi possível perceber que na menor concentração de H_2O_2 ocorreu uma menor morte celular, principalmente nas maiores concentrações de captador de spin (nitrona (**3**) e PBN), sendo o PBN mais eficiente que a nitrona (**3**) nesta condição. Já na maior concentração de H_2O_2 não se observou diferença por parte dos captadores de spin com relação ao controle da morte celular.

Para o período de 8 horas de incubação (Anexo 16) foi possível identificar que na maior concentração de H_2O_2 ocorreu a morte celular com ambos os captadores de spin. Enquanto que na menor concentração de H_2O_2 a molécula de PBN se mostrou muito mais eficiente do que a molécula de nitrona (**3**), reduzindo em maior quantidade a morte celular ocasionada pelo estresse oxidativo. Sendo isto notado pela menor quantidade de aglomerados de células, principalmente quando comparado os dois captadores de spin nas concentrações de 500 μ M.

Por fim, no período de 24 horas de incubação não foi notada nenhuma diferença relevante entre as duas moléculas testadas com relação ao poder de proteção contra a morte celular por estresse oxidativo. Em todas as condições testadas o resultado foi o mesmo, morte celular com predominância.

VI – Conclusões

A síntese apresentada neste projeto tem se mostrado promissora, e desde o início apresentado alguns desafios, como pode ser visto pelas dificuldades iniciais.

A metodologia baseada na utilização de uma bomba de alto vácuo mostrou-se de grande valia para eliminação da água do meio reacional e favorecimento da síntese de imina. Também foi possível determinar que o armazenamento do reagente **(1)** (aminoácido esterificado) a uma temperatura de -80°C mostrou-se fundamental para evitar a polimerização do mesmo.

Apesar de não conseguir reproduzir o rendimento apresentado na literatura ^{xvi} para a síntese da nitrona **(3)**, a mesma foi obtida e por um método de tratamento prévio do aminoácido **(5)** com Et₃N, dispensando a síntese prévia do reagente **(1)** para dar continuidade a rota sintética. Com base nessa rota sintética, foram sintetizadas outras nitronas.

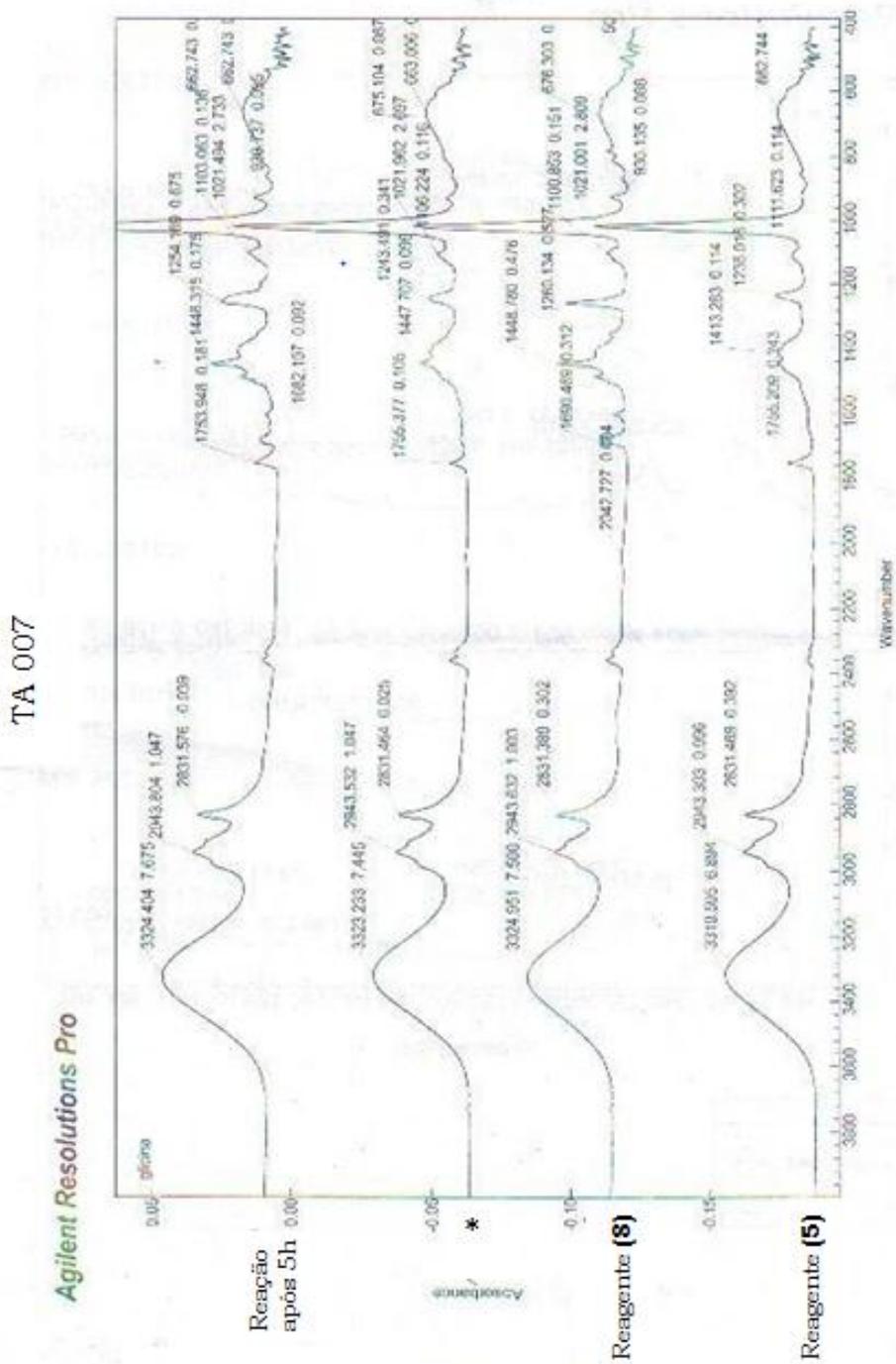
Com relação ao teste de viabilidade celular, apesar de discreta diferença, notou-se uma maior eficiência do PBN em reduzir a morte celular por estresse oxidativo quando comparada com a nitrona **(3)**. Esses resultados preliminares dão um bom indício acerca da capacidade de proteção celular da molécula **(3)**. Estudos quantitativos e mais detalhados estão sendo executados no laboratório, dando continuidade aos resultados apresentados neste trabalho.

VII - Referências

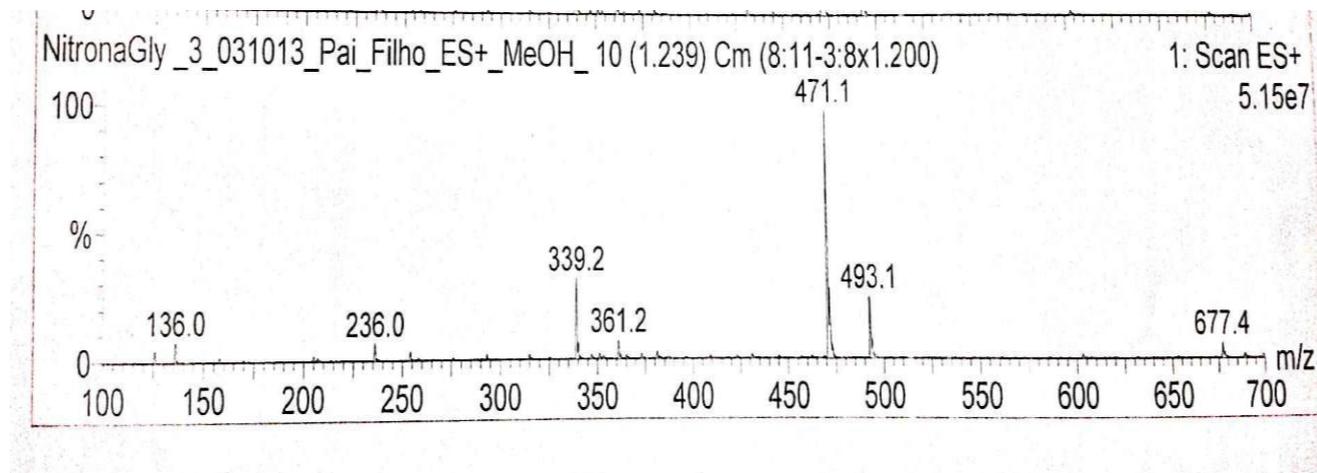
-
- ⁱ Merino, P.; Mannucci, V.; Tejero, T. *Eur J Org Chem.* 3943–3959, 2008.
- ⁱⁱ Wu, X.; Na, R. S.; Liu, H. L.; Liu, J.; Wang, M.; Zhong, J. C.; Guo, H. C. *Tetrahedron Lett.* 53, 342-344, 2012.
- ⁱⁱⁱ Rosen, G.M.; Rauckman, E.J. *Methods in Enzymology.* 105, 198-209, 1984.
- ^{iv} Sato, M. E. O. *et al. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo.* Acta Farm. Bonaerense, 23, 418-424, 2004.
- ^v Halliwell, B.; Gutteridge, J. *Free radicals in Biology and Medicine*; 1st ed.; Oxford University Press: New York, 2007.
- ^{vi} a) Turrens, J. F. *J. Physiol-London.* 552, 335, 2003; b) Finkel, T.; Holbrook, N. J. *Nature.* 408, 239, 2000; c) Stadtman, E. R. *Free Radical Bio. Med.* 33, 597, 2002.
- ^{vii} Sun, Y. *et al. Bioorg. Med. Chem.* 20, 3939-3945, 2012.
- ^{viii} a) Cao, W.; Carney, J. M.; Duchon, A.; Floyd, R. A.; Chevion, M. *Neurosci. Lett.* 88, 233, 1988; b) Schetinger, M. R.; Correa, M. D.; Maldonado, P.; da Rosa, C. S.; Lunkes, G.; Lunkes, D. S.; Kaizer, R. R.; Ahmed, M.; Morsch, V. M.; Pereira, M. E. *Biomed. Pharmacother.* 62, 317, 2008; c) Liu, G.; Cao, W.; Carney, J. M.; Floyd, R. A. *Faseb. J.* 2, A1373, 1988.
- ^{ix} Dujardin, G.; Dhal, R.; Martel, A.; Nguyen, T.B. *Synthesis.* 18, 3174-3176, 2009.
- ^x Goti, A.; Cardona, F.; Soldaini, G. *Organic Letters.* Vol. 9, No. 3, 473-476, 2007.
- ^{xi} Wang, X.; de Silva, S.O.; Reed, J.N.; Billadeau, R.; Griffen, E.J.; Chan, A.; Snieckus, V. *Organic Syntheses.* Coll. Vol. 9, p. 559, 1998; Vol. 72, p.163, 1995.
- ^{xii} Gleason, J. L.; Myers, A.G. *Organic Syntheses.* Coll. Vol. 10, p.12, 2004; Vol. 76, p.57, 1999.
- ^{xiii} Bull, S.D.; Muir, J.; Andrews, P.C.; Mahon, M.F.; Evans, C.D. *Organic Letters.* Vol. 13, No. 23, 6276-6279, 2011.
- ^{xiv} Tokuyama, H.; Kuboyama, T.; Fukuyama, T. *Organic Syntheses.* Vol. 80, p. 207-218, 2003; Coll. Vol. 11, p. 139-148, 2009.
- ^{xv} Saggiomo, V.; Luning, U. *Tetrahedron Letters.* 50, 4663-4665, 2009.
- ^{xvi} Diez-Martinez, A.; Gultekin, Z.; Delso, I.; Tejero, T.; Merino, P. *Synthesis.* No. 4, 678-688, 2010.
- ^{xvii} Alvarez-Ibarra, C. *et al. Tetrahedron.* Vol. 53, No. 10, 3679-3692, 1997.
- ^{xviii} Lygo, B.; Andrews, B.I. *Acc. Chem. Res.* 37, 518-525, 2004.
- ^{xix} Ooi, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* Vol. 125, No. 17, 5139-5151, 2003.

VIII – Anexos

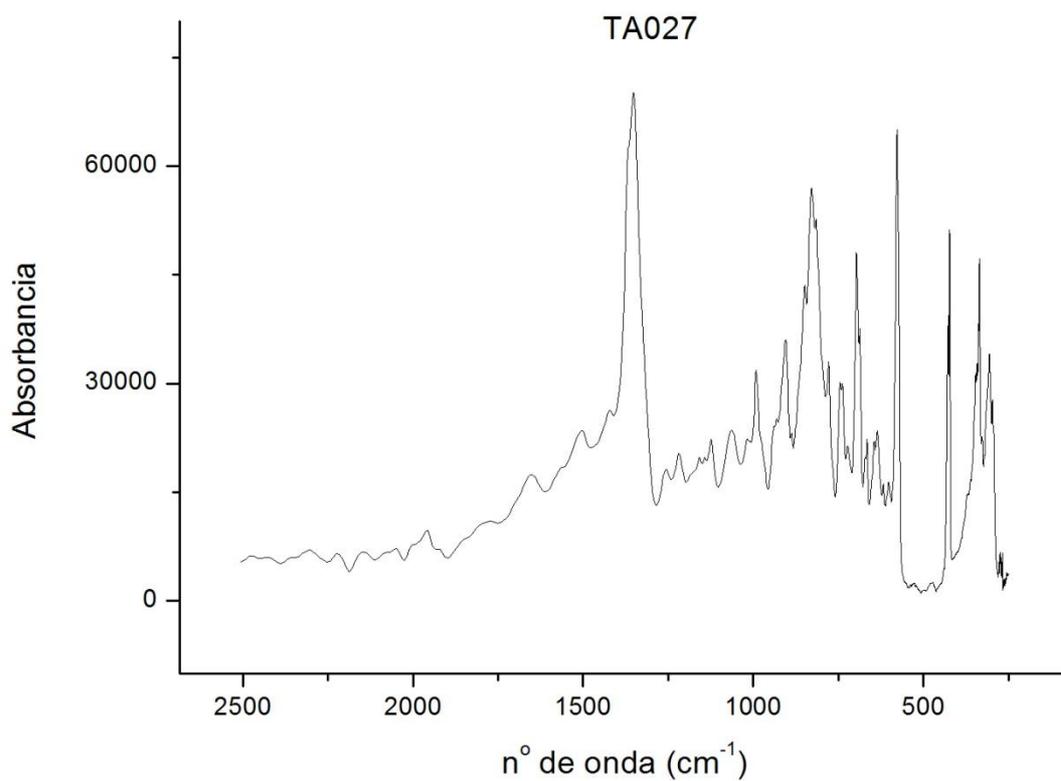
VIII. 1 – Anexo 1



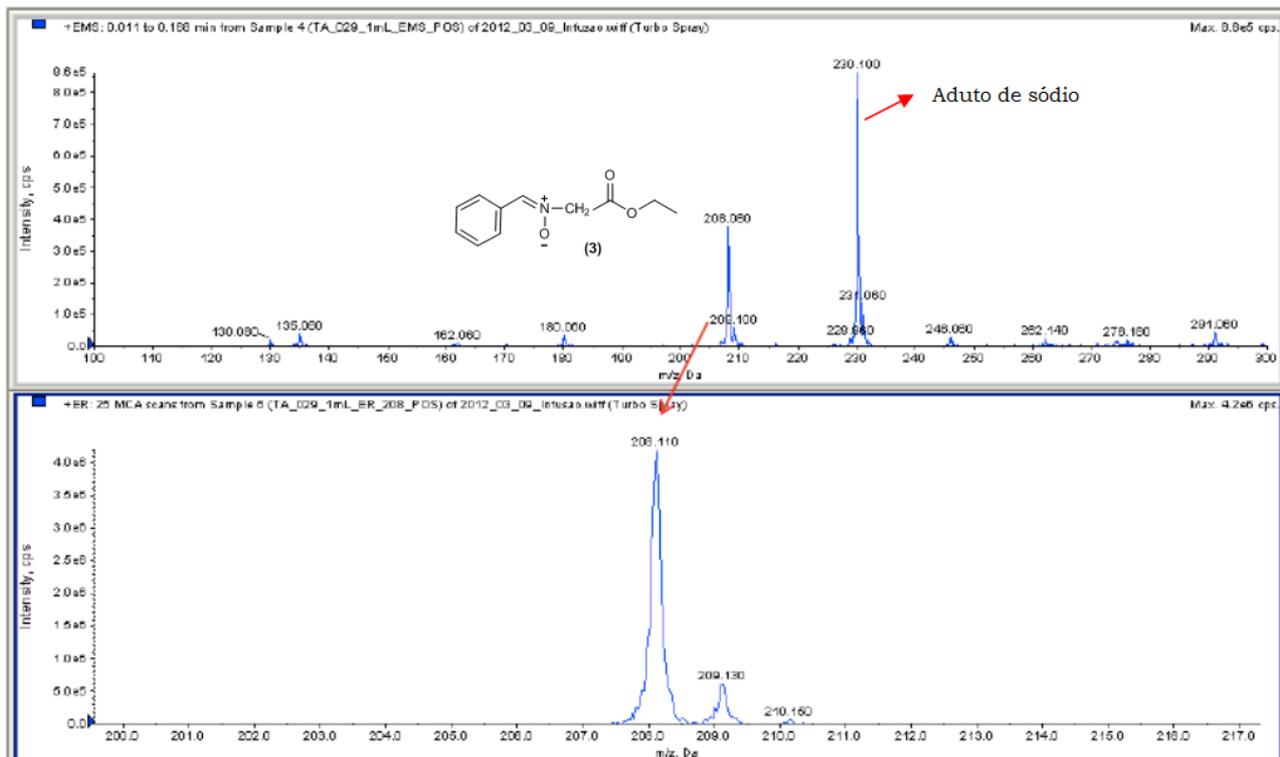
VIII. 2 – Anexo 2



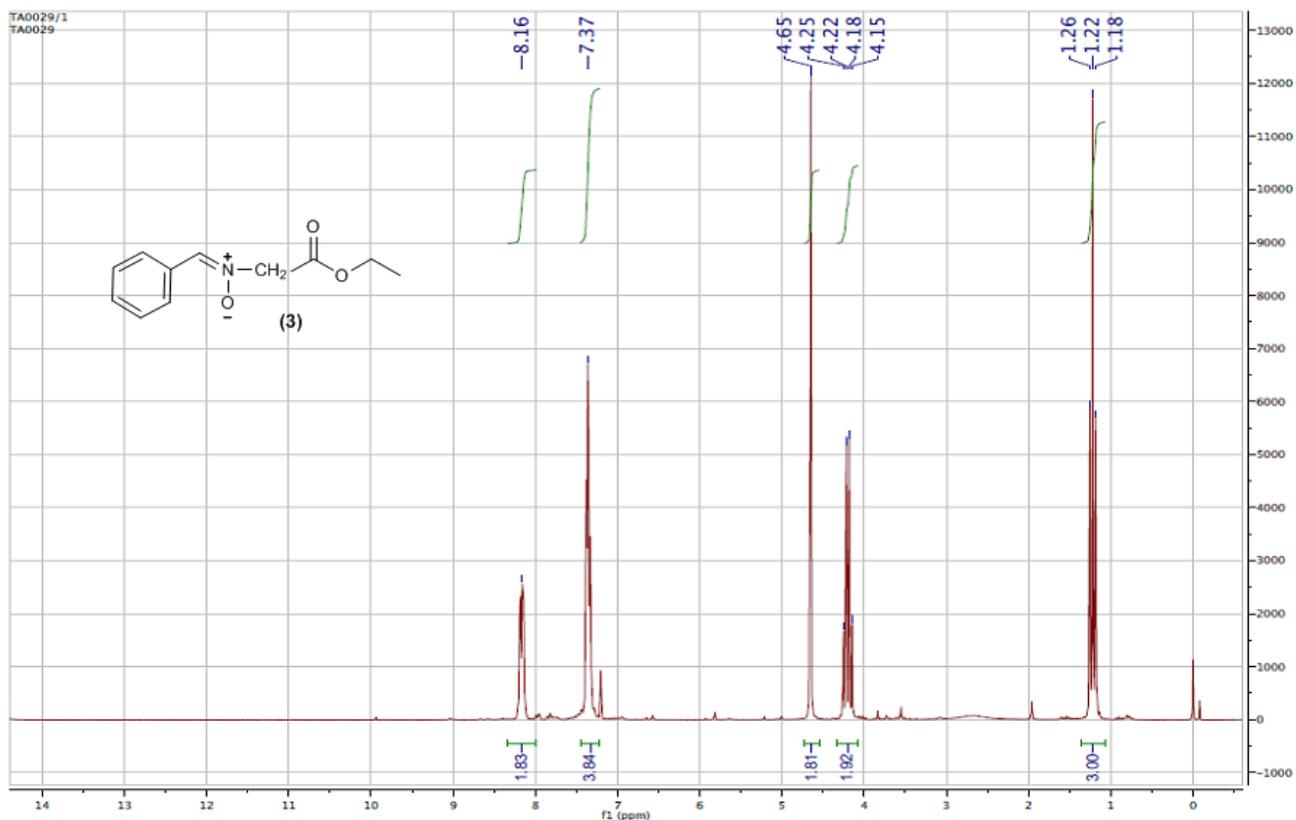
VIII. 3 – Anexo 3



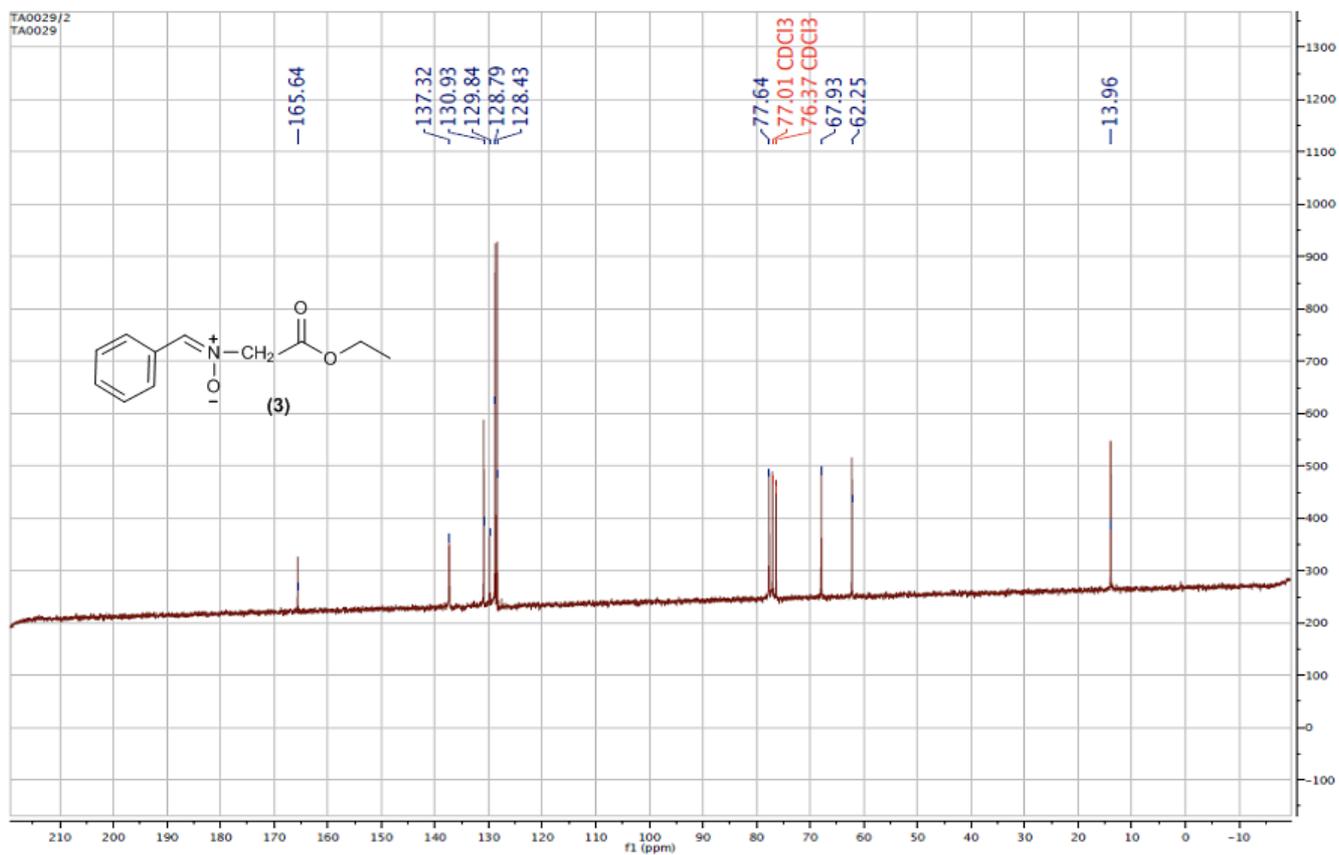
VIII. 4 – Anexo 4



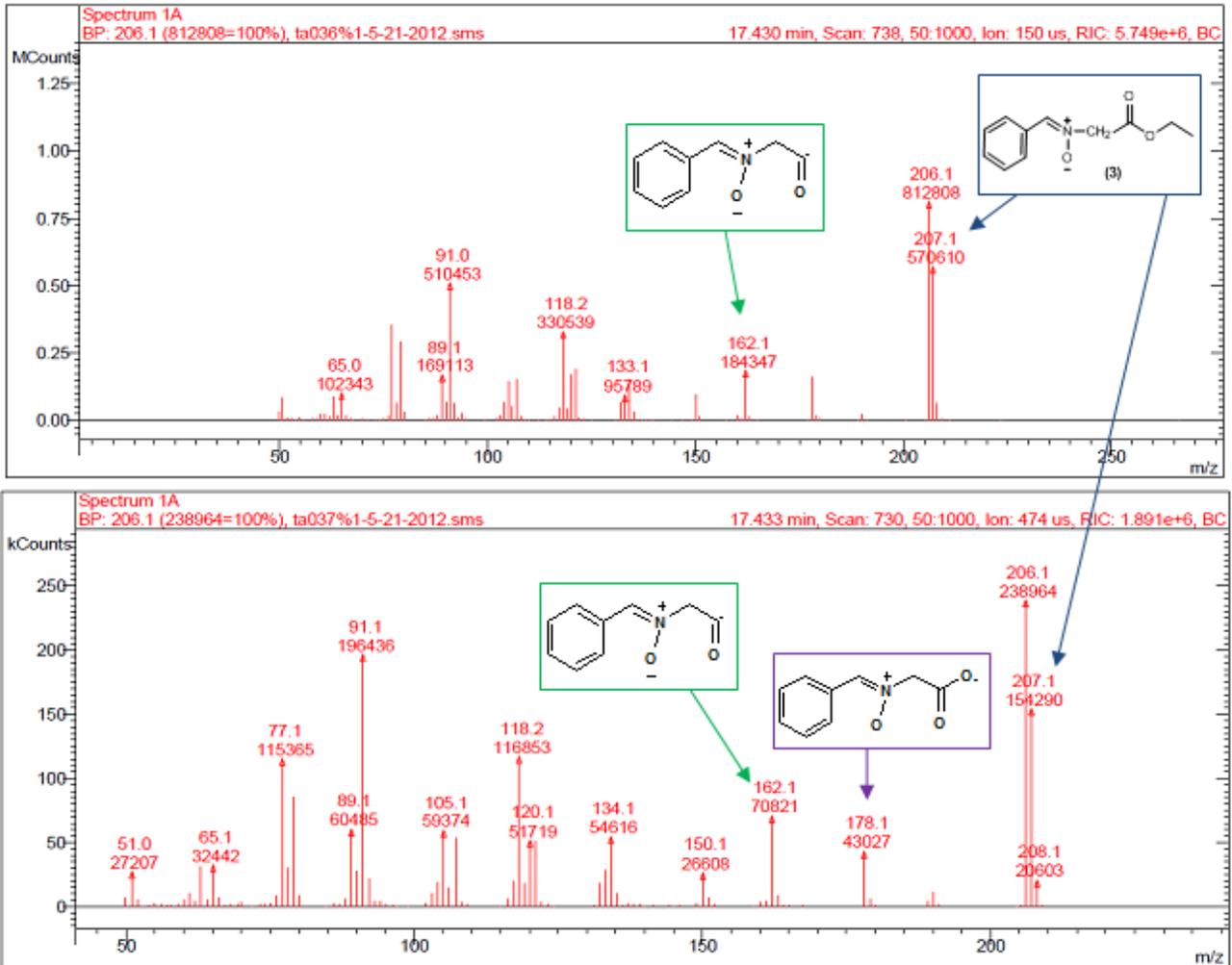
VIII. 5 – Anexo 5



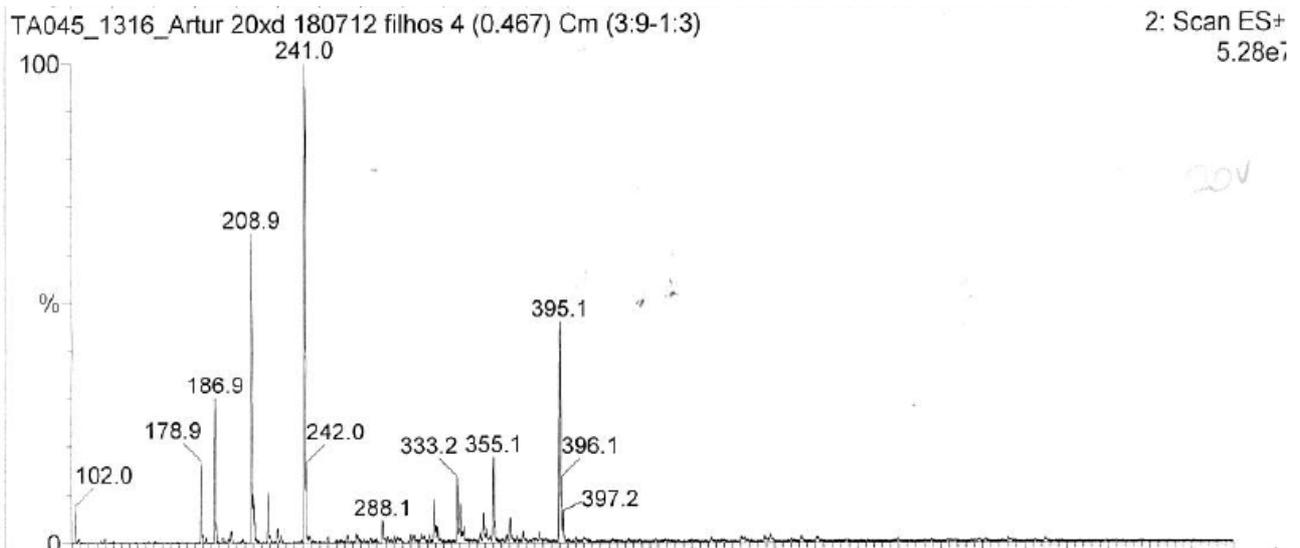
VIII. 6 – Anexo 6



VIII. 7 – Anexo 7

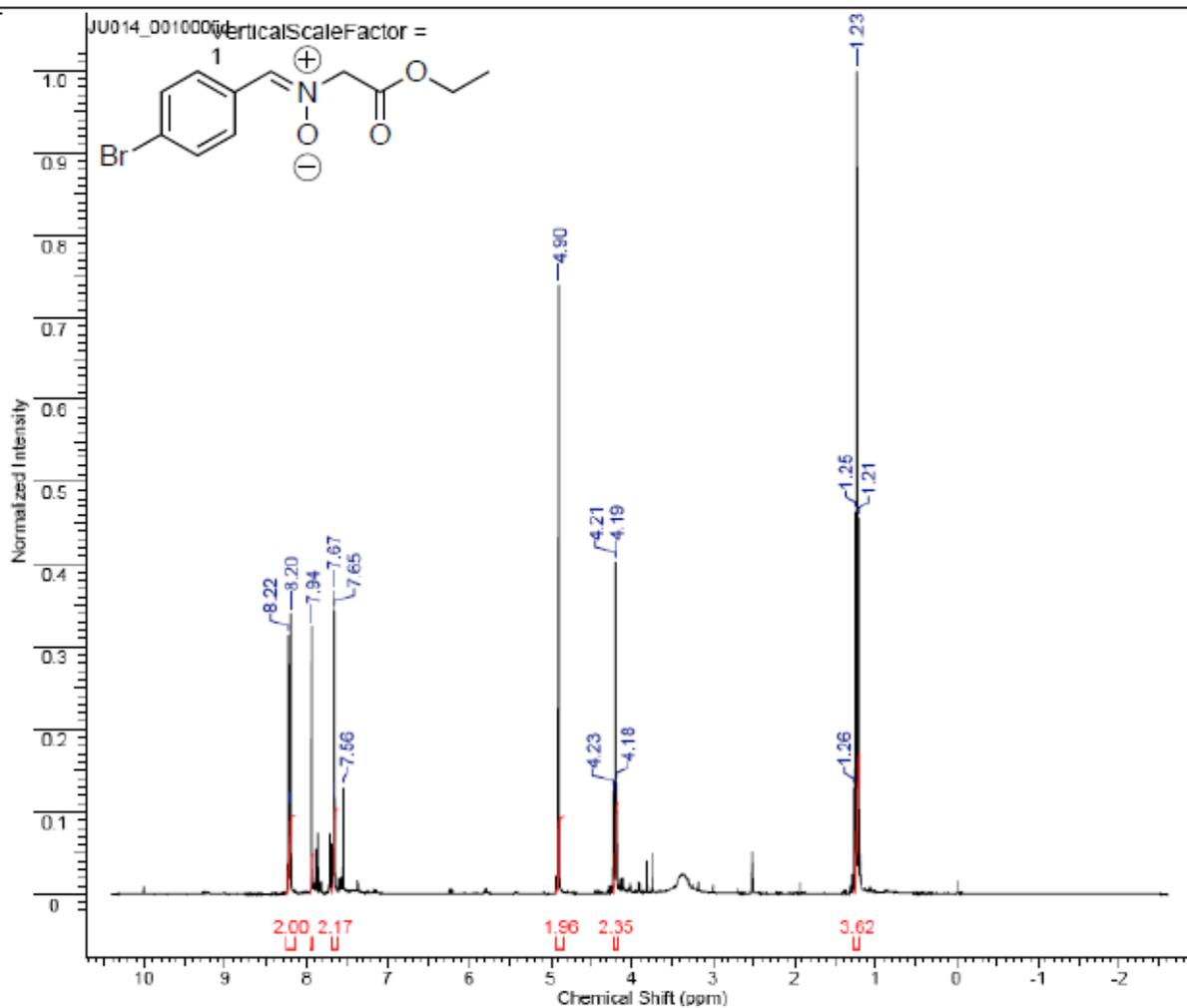


VIII. 8 – Anexo 8

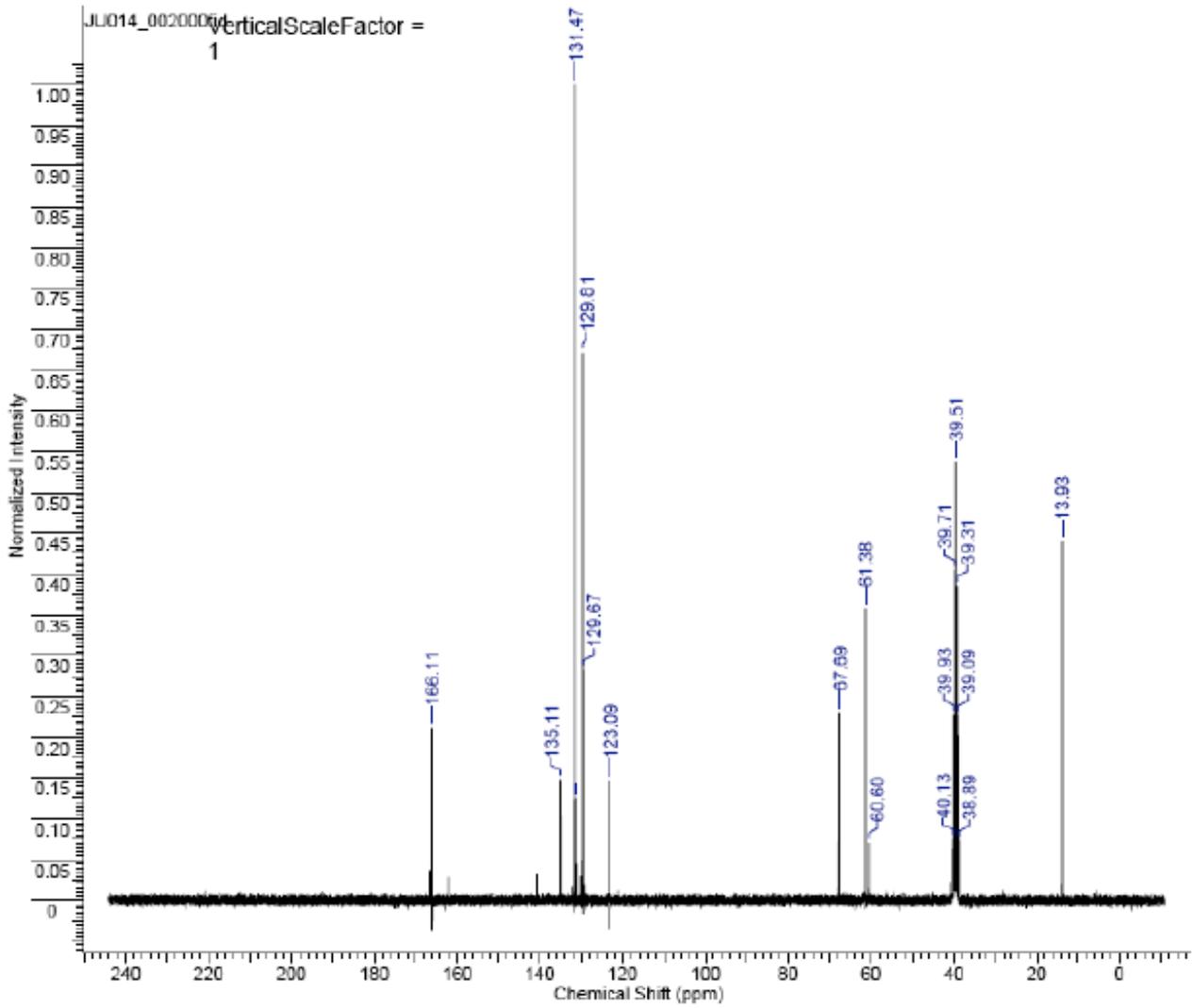


VIII. 9 – Anexo 9

VIII. 9.1 – Anexo 9.1

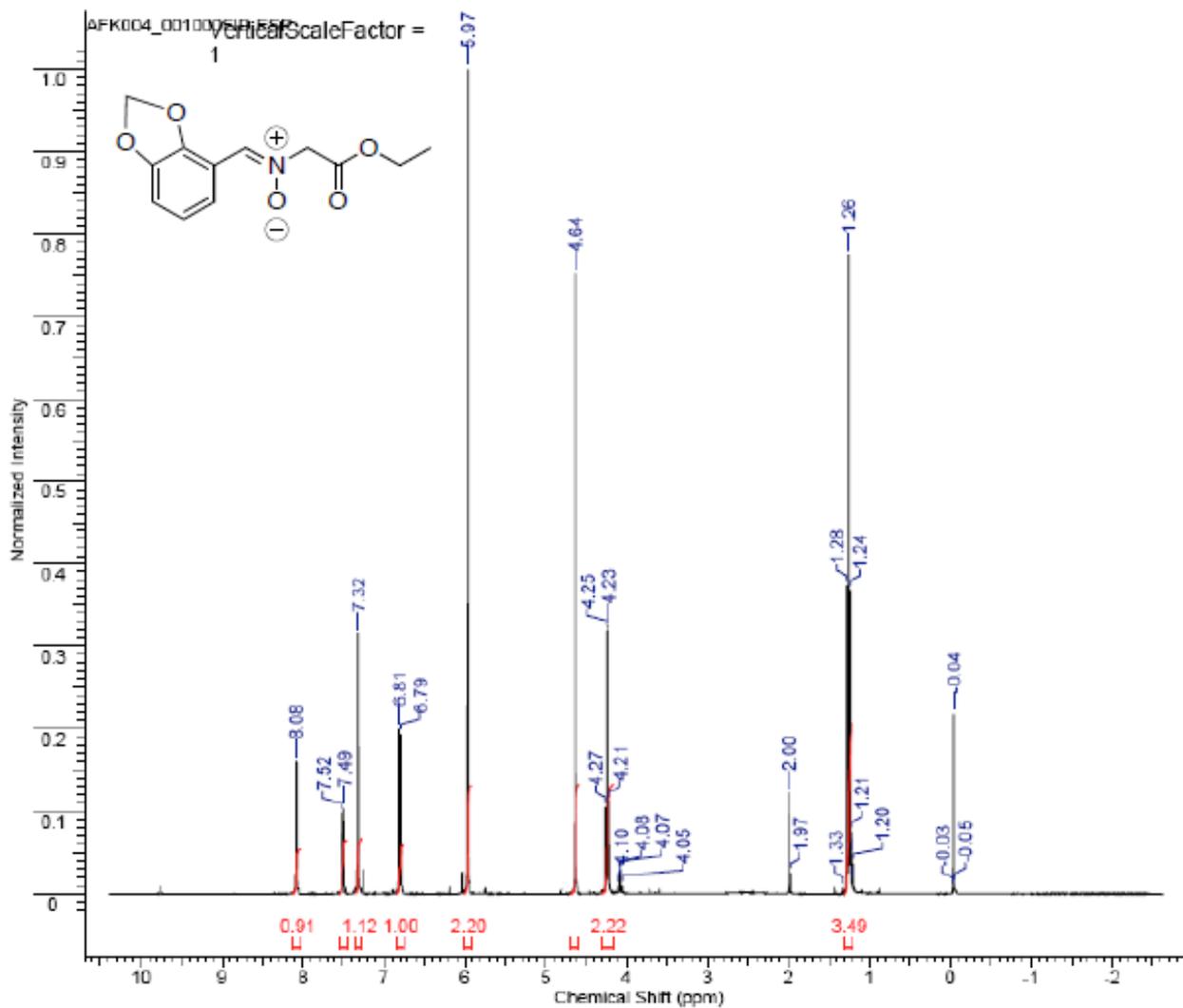


VIII. 9.2 – Anexo 9.2

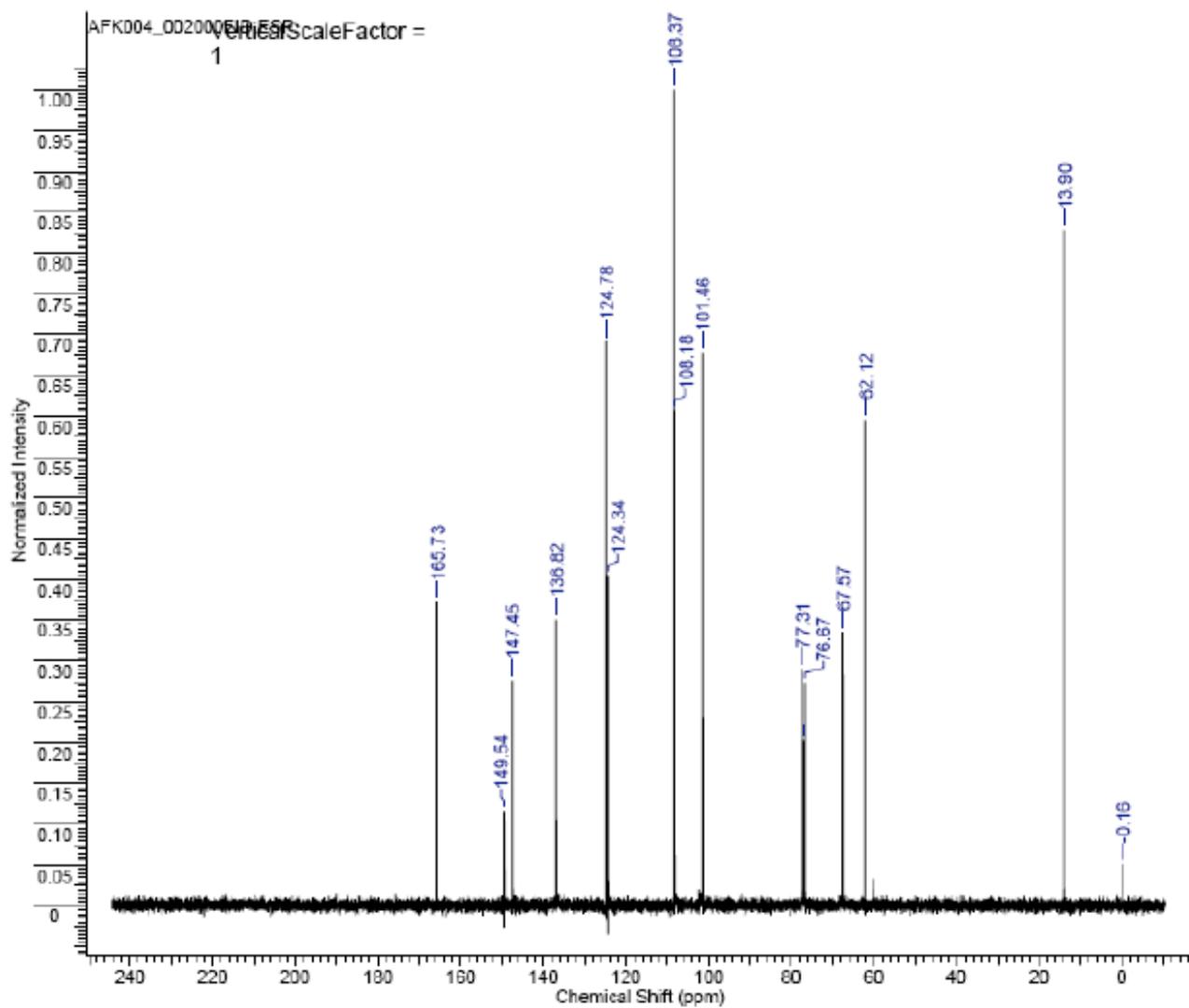


VIII. 10 – Anexo 10

VIII. 10.1 – Anexo 10.1

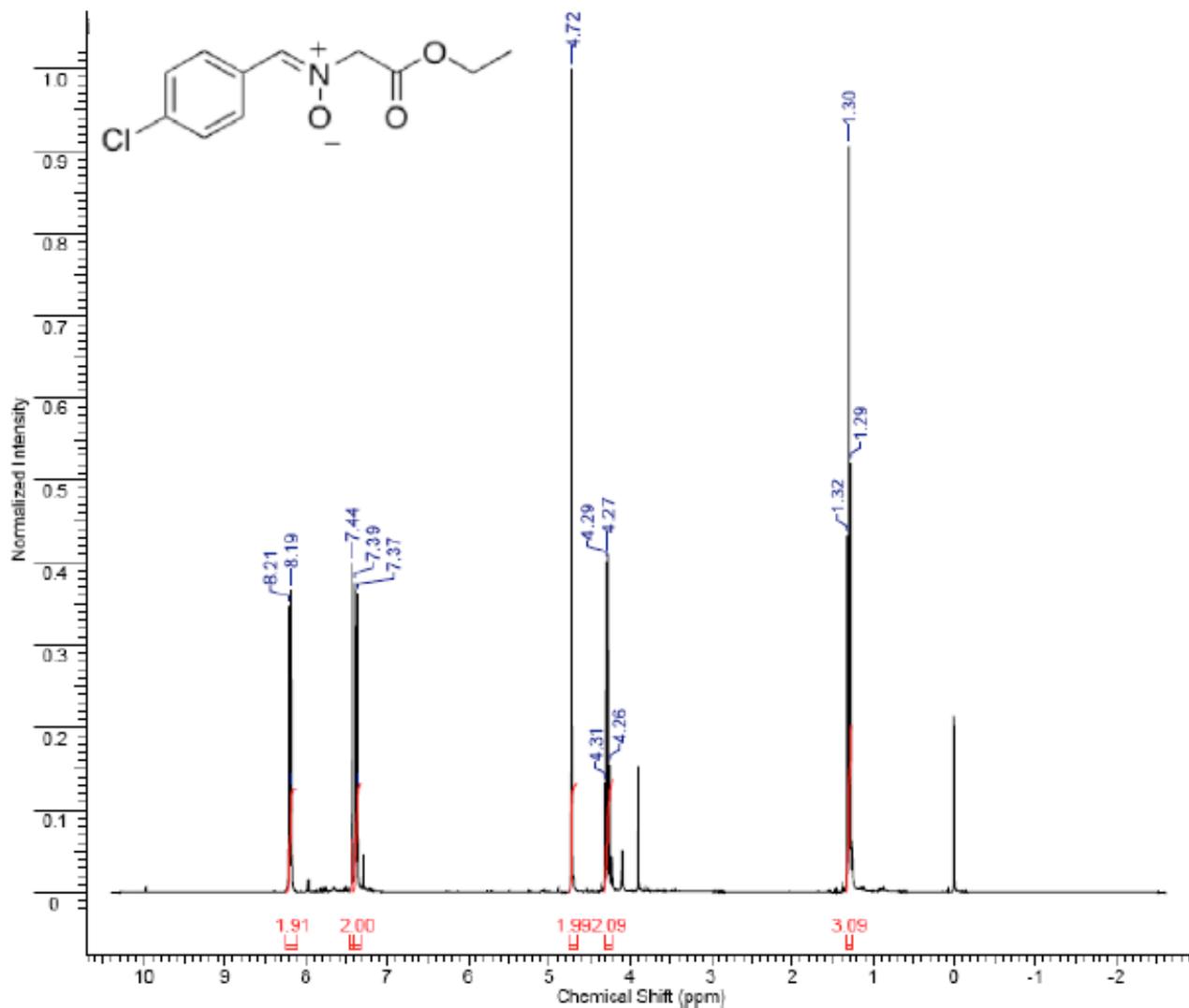


VIII. 10.2 – Anexo 10.2

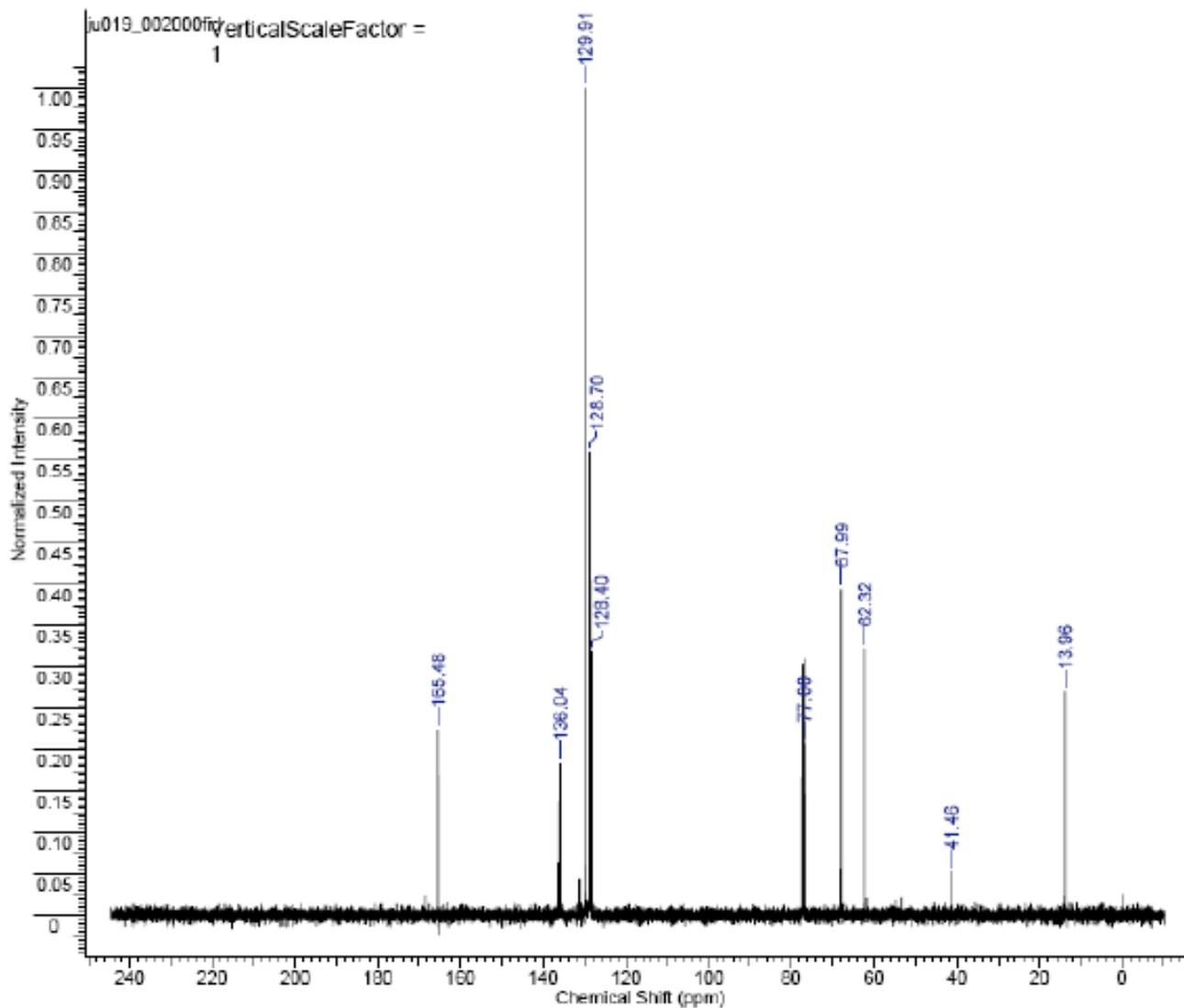


VIII. 11 – Anexo 11

VIII. 11.1 – Anexo 11.1

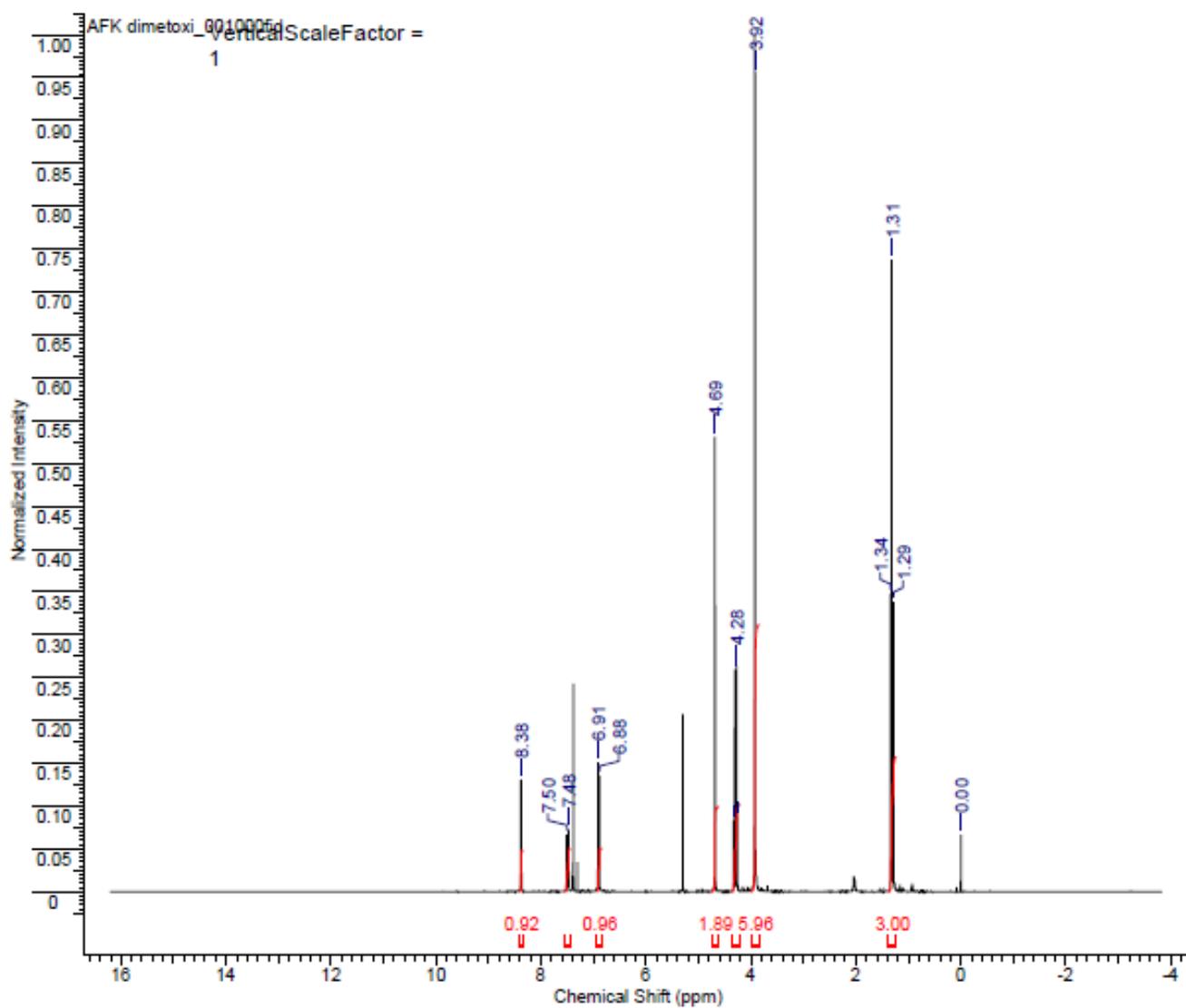


VIII. 11.2 – Anexo 11.2

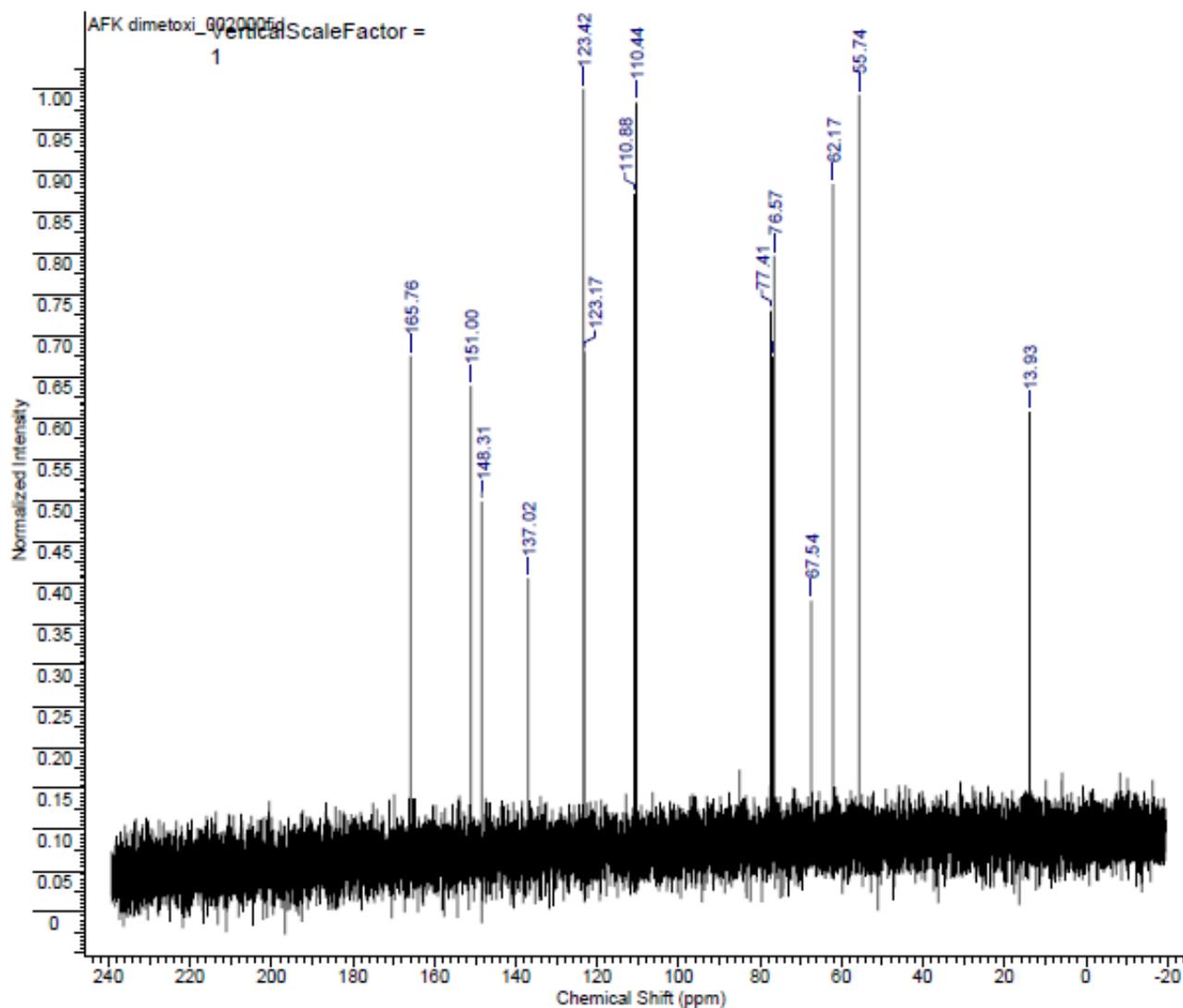


VIII. 12 – Anexo 12

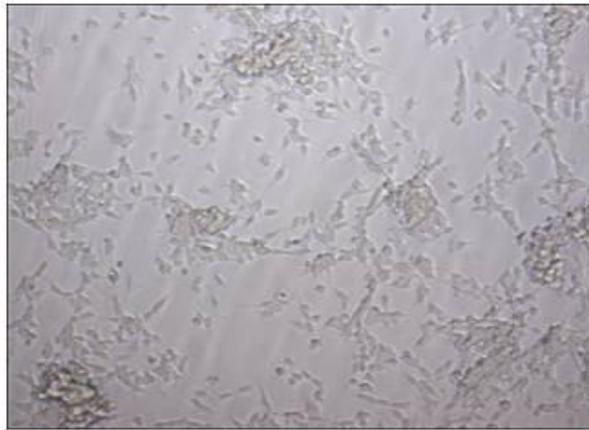
VIII. 12.1 – Anexo 12.1



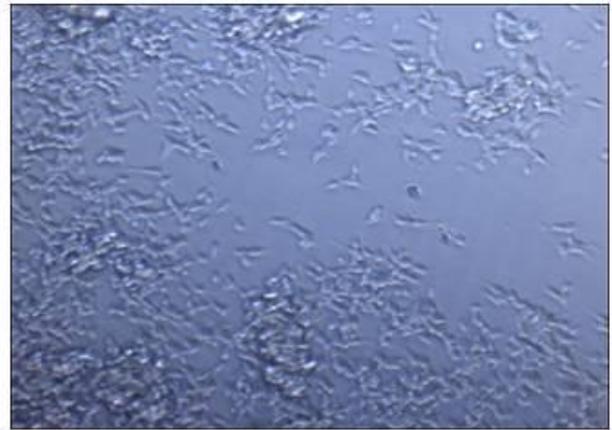
VIII. 12.2 – Anexo 12.2



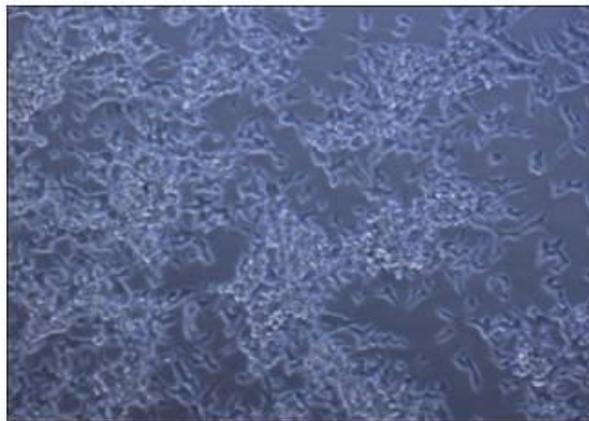
VIII. 13 – Anexo 13



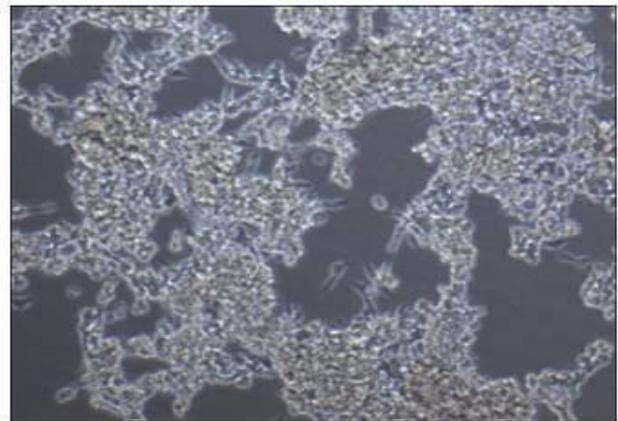
[a]



[b]

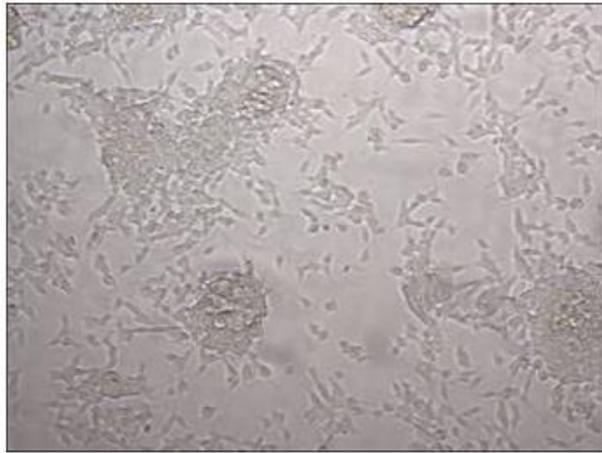


[c]

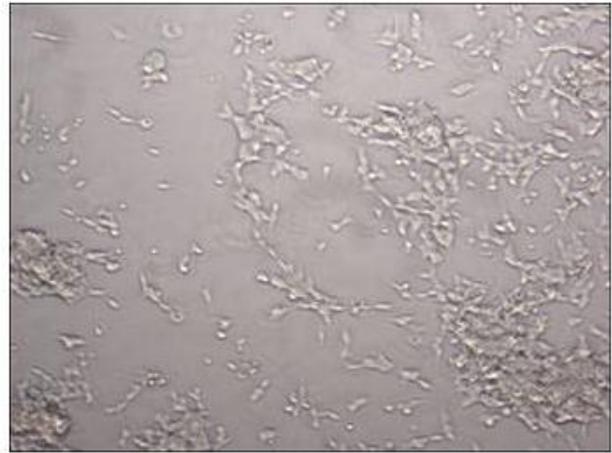


[d]

(a) controle SH-SY5Y, 4h incubação; (b) SH-SY5Y com 0,2mM H₂O₂, 4h incubação; (c) SH-SY5Y com 0,5mM H₂O₂, 4h incubação; (d) SH-SY5Y com 1,0mM H₂O₂, 4h incubação.



[a]



[b]

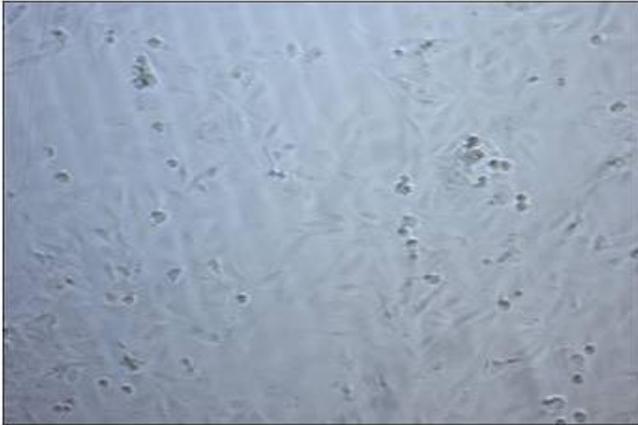


[c]

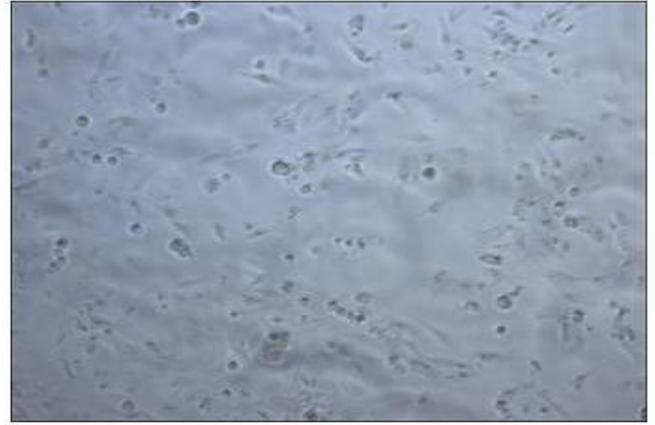


[d]

(a) controle SH-SY5Y, 24h incubação; (b) SH-SY5Y com 0,2mM H₂O₂, 24h incubação; (c) SH-SY5Y com 0,5mM H₂O₂, 24h incubação; (d) SH-SY5Y com 1,0mM H₂O₂, 24h incubação.



[a]



[b]



[c]



[d]

(a) controle PC12, 4h incubação; (b) PC12 com 0,2mM H₂O₂, 4h incubação; (c) PC12 com 0,5mM H₂O₂, 4h incubação; (d) PC12 com 1,0mM H₂O₂, 4h incubação.



[a]



[b]



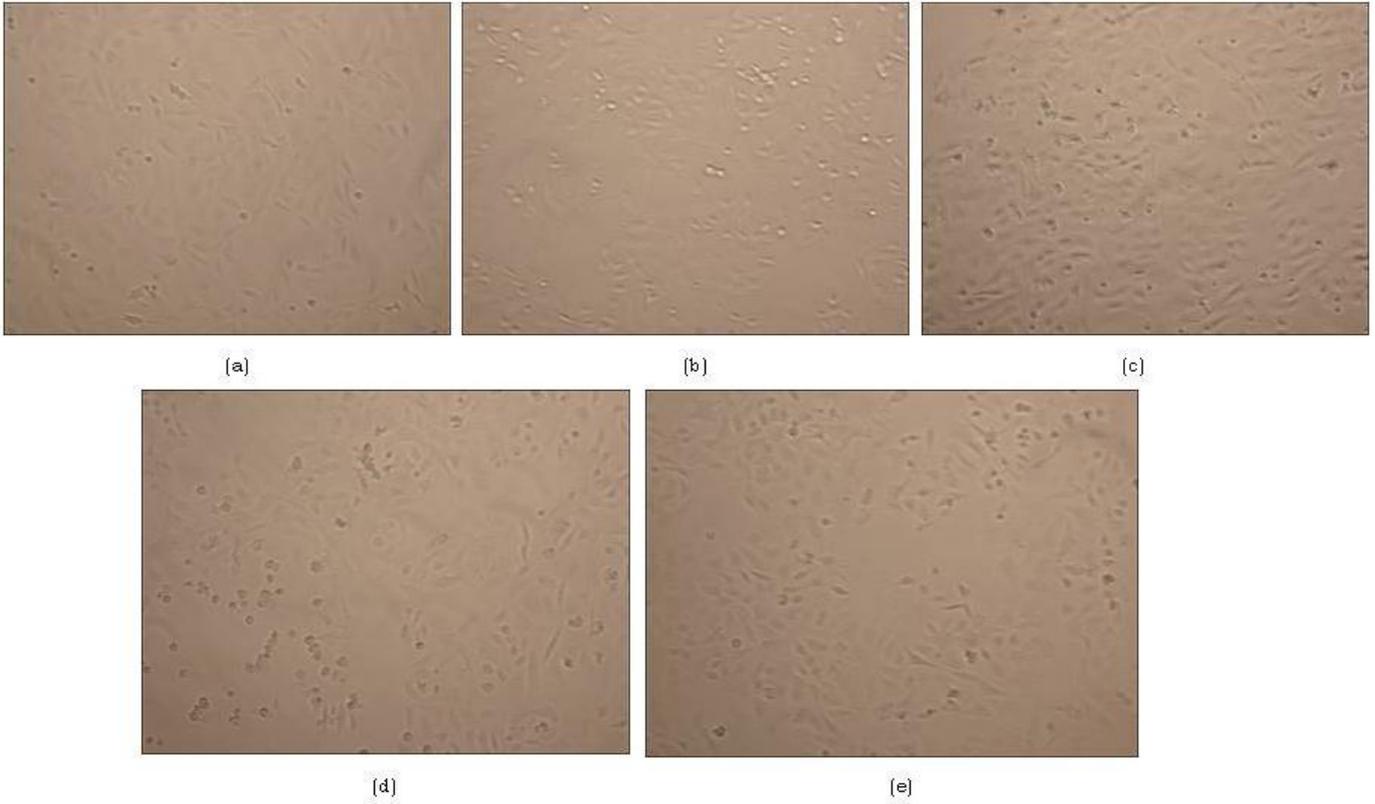
[c]



[d]

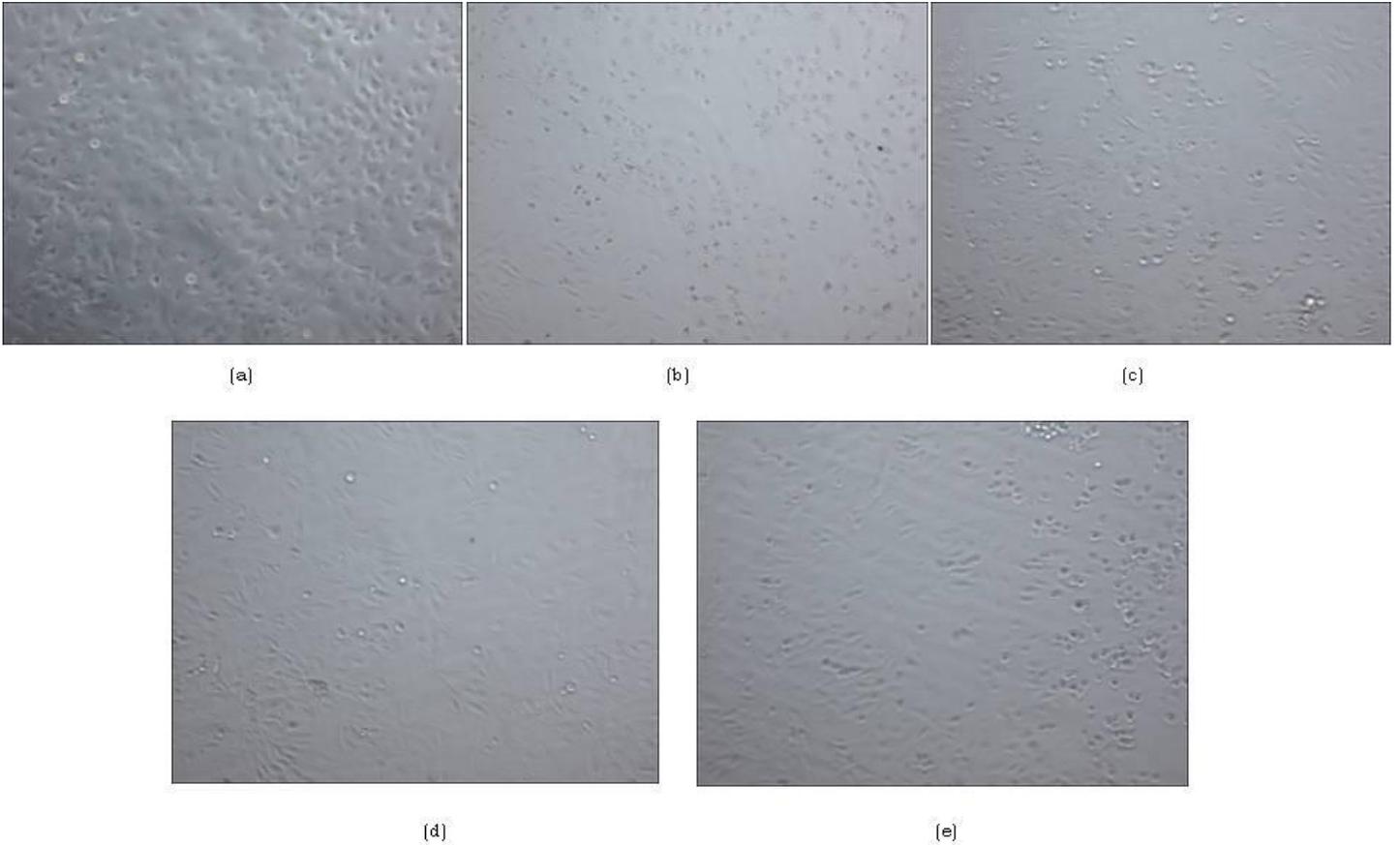
(a) controle PC12, 24h incubação; (b) PC12 com 0,2mM H₂O₂, 24h incubação; (c) PC12 com 0,5mM H₂O₂, 24h incubação; (d) PC12 com 1,0mM H₂O₂, 24h incubação.

VIII. 14 – Anexo 14



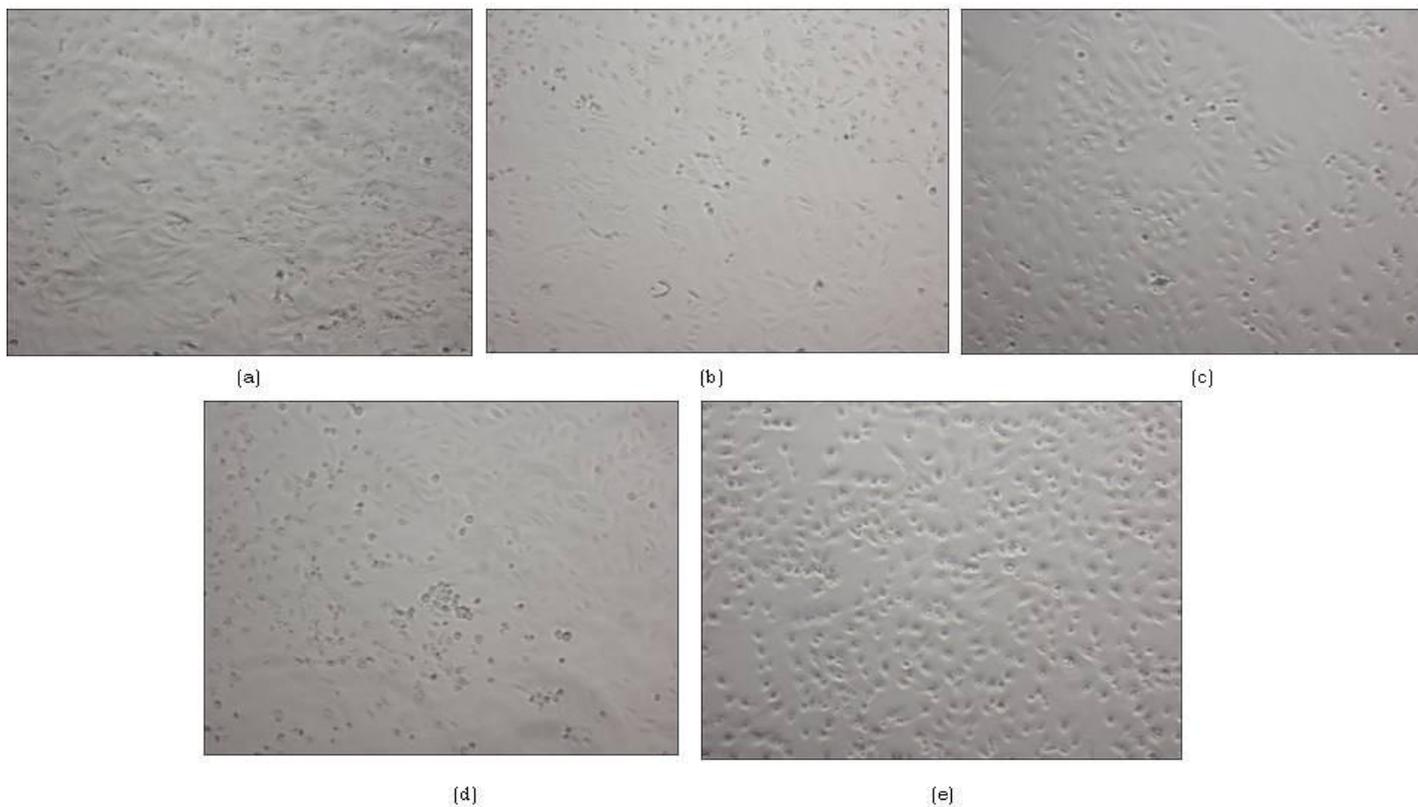
(a) controle PC12; (b) PC12 com 25μM PBN; (c) PC12 com 500μM PBN; (d) PC12 com 25μM nitrona (3); (e) PC12 com 500μM nitrona (3).

VIII. 15 – Anexo 15



PC12, 4 horas de incubação; (a) controle 0,25mM H₂O₂; (b) 25μM PBN e 0,25mM H₂O₂; (c) 500μM PBN e 0,25mM H₂O₂; (d) 25μM Nitrona (3) e 0,25mM H₂O₂; (e) 500μM Nitrona (3) e 0,25mM H₂O₂.

VIII. 16 – Anexo 16



PC12, 8 horas de incubação; (a) controle 0,25mM H₂O₂; (b) 25µM PBN e 0,25mM H₂O₂; (c) 500µM PBN e 0,25mM H₂O₂; (d) 25µM Nitrona (3) e 0,25mM H₂O₂; (e) 500µM Nitrona (3) e 0,25mM H₂O₂.