

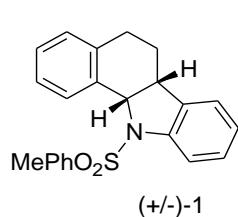
Síntese de derivados do tetraidro-benzocarbazóis com ação antineoplásica, anti-inflamatória e antiparasitária

Aluna: Wanessa Muniz de Andrade

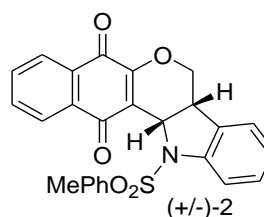
Orientadora: Camilla Djenne Buarque Müller

Introdução

Continuando o projeto que envolve o planejamento e a síntese de aza-deoxipterocarpanos bioativos, em especial a ação antineoplásica, anti-inflamatória e antiparasitária, se estudou as moléculas de benzocarbazóis. Moléculas da classe dos aza-pterocarpanos, aza-pterocarpanoquinonas e análogos tem sido alvo de estudos sistemáticos por parte do nosso grupo, pois esses têm se mostrado biologicamente ativos no combate ao câncer, inflamação e malária. Em particular, recentemente, após uma triagem de mais de 100 compostos, descobrimos o aza-desidropterocarpano (1, **LQB223**) e aza-pterocarpanoquinona (2) (Figura 1), que foram muito ativas quanto à ação antineoplásica *in vitro* frente às diversas linhagens de células de câncer estudadas e com baixa toxicidade para células saudáveis (Buarque, 2011).



aza-desidropterocarpano



aza-pterocarpanoquinona

K562	IC ₅₀ 1,9 μM
HL-60	IC ₅₀ 1,0 μM
HCT-8	IC ₅₀ 3,0 μM
SF-295	IC ₅₀ 3,9 μM
MDA-MB435	IC ₅₀ 62,0 μM
PBMC	IC ₅₀ 27,2 μM

L. amazonensis
(amastigota) IC₅₀ 2,15 μM

L. amazonensis
(promastigota) IC₅₀ 4,85 μM

K562	IC ₅₀ 7,4 μM
HL-60	IC ₅₀ 5,5 μM
HCT-8	IC ₅₀ 0,6 μM
SF-295	IC ₅₀ 3,9 μM
MDA-MB435	IC ₅₀ 0,4 μM
PBMC	IC ₅₀ 23,0 μM

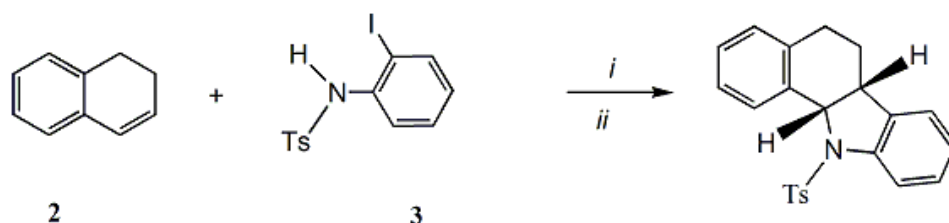
L. amazonensis
(amastigota) IC₅₀ >20,0 μM

L. amazonensis
(promastigota) IC₅₀ 15,0 μM

Figura 1. Aza-Pterocarpanos com ações antineoplásica e antileishmanial

Este composto (1) foi sintetizado utilizando como estratégia chave a reação de aza-arilação de Heck catalisada por paládio entre os substratos **2** e **3**, que se mostrou de altíssima eficiência pois possibilita a formação da ligação C-C e C-N em um único pote com 66% de rendimento global a partir da tosil iodo anilina (Esquema 1). Após diversos estudos metodológicos da etapa de aza-arilação de Heck, encontramos a condição *i* em que foi possível obter o produto em 88% de rendimento na etapa chave de aza-arilação de Heck em 8

horas de reação (Buarque, 2011). Diante do fato desta substância ser tão promissora, seguimos com novos estudos para aprimorar ainda mais esta etapa tornando-a mais “verde” e mais barata, e encontramos a condição *ii* (Esquema 1) em que foi possível obter o produto em apenas 1 hora e reduzindo a quantidade de prata que é cara, além do uso do PEG400 (Wang, 2012; Luo, 2005) como um solvente mais benigno ao meio ambiente (dados não publicados).



i. acetona, 10 mol% Pd(OAc)₂, 3 equiv. Ag₂CO₃, 70⁰C, 8 horas
ii. PEG400, 10 mol% Pd(OAc)₂, 1,2 equiv. Ag₂CO₃, 80⁰C, 1 hora

Esquema 1

A reação de aza-arilação de Heck usando a condição *i* do Esquema 1 também foi empregada para obter o análogo **4** (Figura 2) com diferentes padrão de substituição no átomo de nitrogênio (anel C) e o rendimento foi de 66%. Além de m grupo CbZ ao invés de sulfonamida, este composto **4** também funciona como intermediário para obtenção de **5**, um outro derivado *N*-substituído.

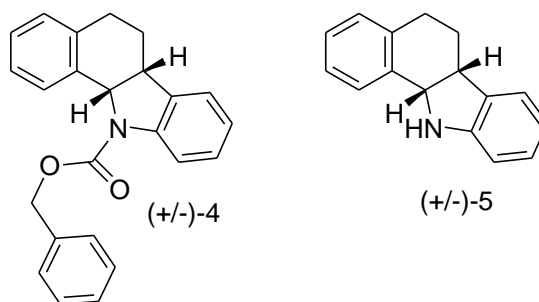


Figura 2: Derivado *N*-substituído

Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é estudar a relação estrutura x atividade biológica entre o LQB223 (**1**) e os análogos **4**, **5** e **6** (Figura 3). Os derivados *N*-substituídos **4** e **5** serão obtidos empregando a reação de aza-arilação de Heck, enquanto que o composto **6**, com diferente padrão de substituição do anel D será através de reações de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr).

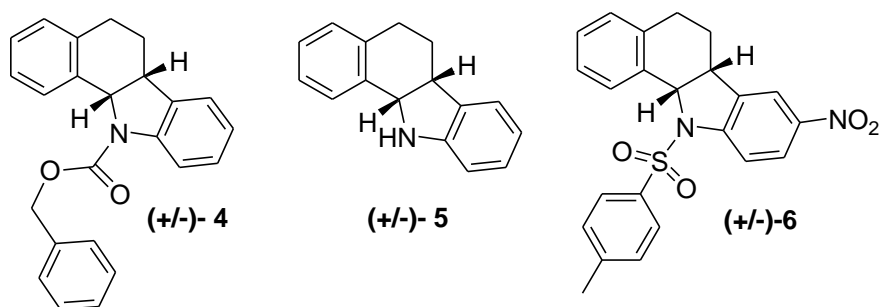
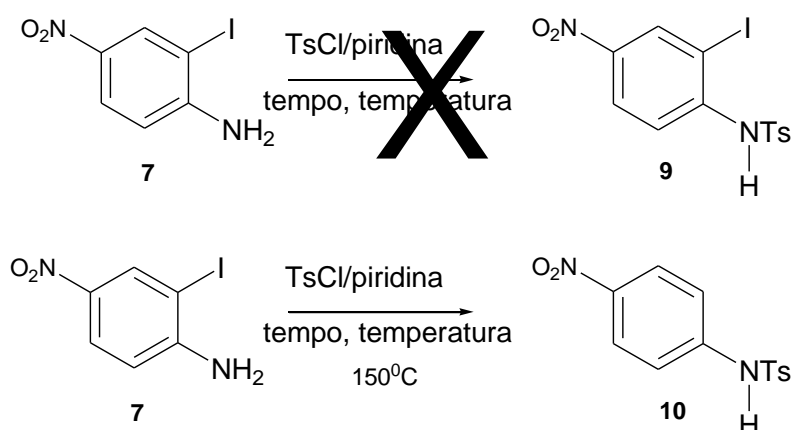


Figura 3: Análogos do LQB223 com diferentes padrões de substituição no anel C e D

Todo esse trabalho vem sendo feito com uma equipe multidisciplinar que envolve diversas instituições no Rio e fora do Estado do Rio de Janeiro.

Metodologia

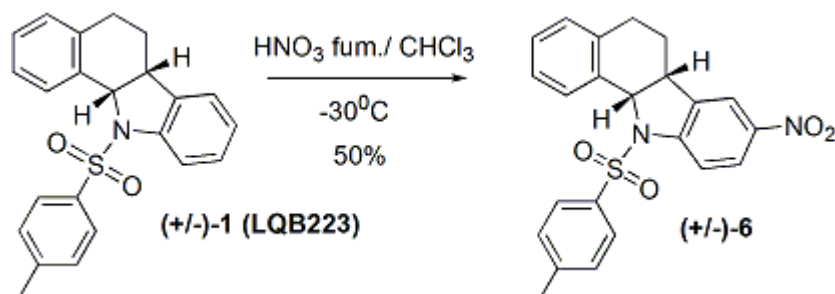
Primeiramente tentamos obter o composto o 4-nitro-2-tosil-iodoanilina (9) a partir da reação com a 4-nitro-2-iodo-anilina (7) e cloreto de tosila (8) na presença de piridina. Aquecemos a mistura em refluxo e após diversas otimizações, variando a temperatura entre 80 e 200⁰ C e tempo entre 24 e 50 horas não conseguimos obter o produto desejado. Após a análise pelo CG-MS, foi possível observar que não somente não conseguimos obter o produto de interesse, e ainda por cima obtivemos um produto com a perda do iodo quando a reação acontecia a temperaturas muito altas (Esquema 2).



Esquema 2

Tendo em vista que não conseguimos obter o produto 6, não pudemos seguir com a estratégia de aza-arilação de Heck para a obtenção do composto 7, um análogo do LQB223 contendo o grupo nitro no anel D. Partimos então para a estratégia de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr) do LQB 223 (1) com ácido nítrico fumegante e o produto 6 foi obtido em 50% de rendimento. Utilizamos 1,4 mL de CHCl₃, 0,2 mL de ácido nítrico fumegante a -30°C com agitação por um período de duas horas. Após esse período de tempo, a TLC mostrou a formação de um produto mais polar que o material de partida, logo deixamos em banho de água gelada e fizemos uma extração com acetato de etila. Lavamos a camada

orgânica com NaCl saturado e secamos com sulfato de sódio anidro. Acrescentamos mais 5 gotas de ácido nítrico fumegante após 3 horas de reação e a deixamos ocorrendo no banho de água gelada com agitação. Depois de 7 horas, a TLC mostrou que a reação havia funcionado, obtendo 50% de rendimento após isolamento com acetato de etila e NaCl, sem necessidade de purificação posterior (Esquema 3).



Esquema 3

Farmacologia

A concepção e síntese dos aza-desidroptero-carpanos realizada pelo nosso grupo permitiu que diversos grupos pudessem dedicar tempo de pesquisa buscando compreender o mecanismo de ação dessas moléculas, tendo tido resultados interessantes. O grupo da professora Prof^a Vivian Rumjanek do Laboratório de Imunologia Tumoral (LIT – Instituto de Bioquímica Médica-UFRJ) e o da professora Raquel Maia (INCA-RJ) passaram a estudar mais intensamente o perfil antineoplásico de **1** e paralelamente estudaram as substâncias **4** e **6** com o objetivo de compreender o requisito estrutural necessário para a ação biológica em função das variações do grupo R¹ (Esquema 1). Os dados indicam que o LQB223 (**1**) é a substância mais potente quanto a ação antitumoral nas linhagens de células estudadas, o que sugere que o grupo sulfonamida do tipo tosil é o requisito estrutural necessário. A citotoxicidade do novo composto **1** foi avaliada pelo ensaio de MTT nas linhagens celulares de LMC: K562 (sensível a vincristina e Pgp negativa) e K562-Lucena (resistente a vincristina e Pgp positiva), e nas linhagens de LMA: Kasumi-1 (subtipo M4/M5), HL-60 (subtipo M3) e U937 (subtipo M2). A IC₅₀, do novo composto LQB-**223** foi 2,5 µM em 72 horas para a linhagem K562. A concentração de 5 µM por 48 horas foi necessária para inviabilizar 40% das células da linhagem K562-Lucena. O composto **1** também se mostrou eficaz em linhagens celulares de LMA. Para a linhagem celular HL-60 (subtipo M3) a IC₅₀ foi atingida com 2,5 µM após 48 horas; para a linhagem Kasumi-1 com 5 µM após 48 horas e por fim, para a linhagem celular U937 5 µM após 72 horas de incubação.

Este composto não apresentou toxicidade para células saudáveis mesmo em concentrações superiores a 30 μM . O composto **6**, entretanto foi muito menos ativo em todas as linhagens de células estudadas ($> 30 \mu\text{M}$).

Resultados preliminares indicam que o composto **1** foi capaz de alterar o conteúdo de DNA ao longo da análise de ciclo celular por iodeto de propídeo na linhagem K562. Adicionalmente, estão em curso avaliação da marcação por anexina V e a detecção da ativação de caspase 3, ambas por citometria de fluxo. Após 48 horas de incubação com **1** 2,5 μM , houve ativação de caspase 3 e cerca de 25% de células marcadas com anexina nas linhagens celulares K562, HL-60 e U937, indicando a indução de morte celular por apoptose nas linhagens mieloides em consequência à exposição ao novo composto **1**. A citotoxicidade do composto **1**, analisada, através do ensaio MTT, em leucócitos do sangue periférico de doadores saudáveis não causou inviabilidade em todas as concentrações testadas até 20 μM .

O professor Ralph Santos-Oliveira (Laboratório de nanoradiopharmaceuticals- Coppe-UFRJ) estuda a biodistribuição das moléculas marcadas com iodo radioativo (I^{123}) em camundongos e mostrou que **1** se distribui muito bem no organismo, havendo grande quantidade deste composto na circulação e não se acumulando em órgãos específicos, além de não ter passado pela barreira hematoencefálica. Estes dados indicam que possivelmente este composto não será tóxico *in vivo* também.

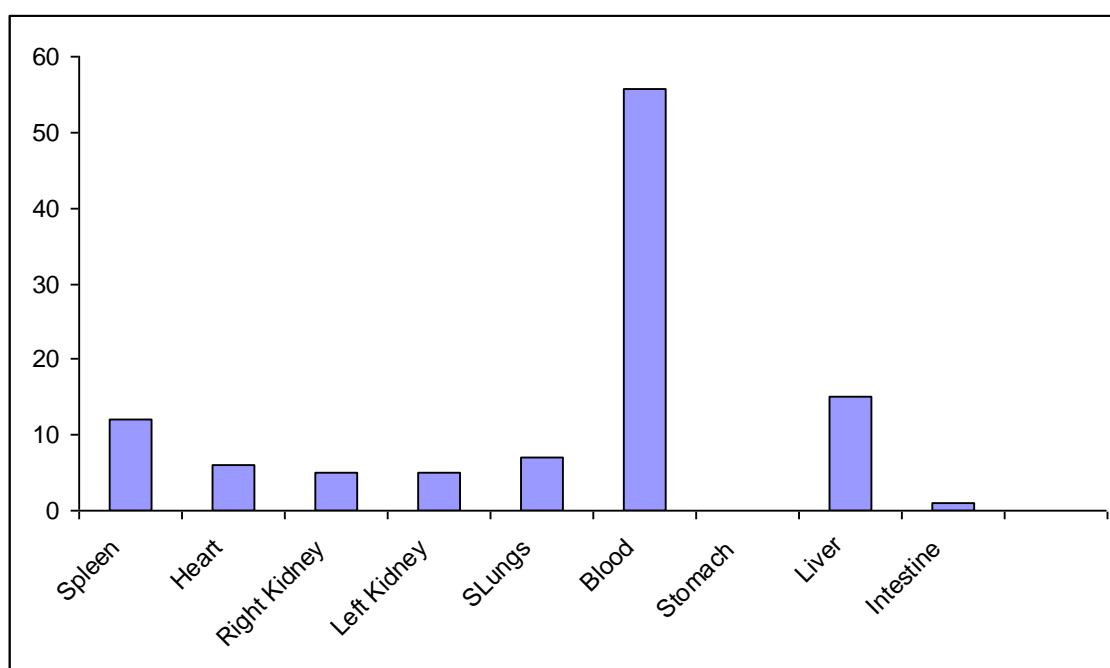


Figura 4: Biodistribuição do composto **1**. Quantificação da dose por órgão

A professora Luzineide Tinoco (NPPN-UFRJ) estudou a ação do composto **1** quanto a inibição da enzima topoisomerase I e II. A topoisomerase é uma enzima celular que atua regulando o superenovelamento positivo e negativo do DNA. Sem a ação desta enzima a célula morre, fazendo da topoisomerase um excelente alvo para a terapia do câncer (dados não publicados).

Estudos adicionais de docking e de dinâmica molecular realizados pelo professor André Pimentel (PUC-Rio) mostraram que **1** se liga no sítio ativo da enzima de forma semelhante à camptotecina, um fármaco utilizado clinicamente na terapia do câncer (dados não publicados).

Conclusões

Através da reação de Substituição Eletrofílica Aromática (SEAr) do composto **1** (LQB223), foi possível obter o composto 4-nitro-11-tosil-benzocarbazol (**6**) em 50% de rendimento. Através da reação de aza-arilação de Heck, obtivemos o composto **4**, um análogo do LQB223 (**1**) *N*-substituído e que não tem o grupo sulfonamida em sua estrutura. Todos os compostos foram testados quanto a ação antineoplásica e de fato, o composto **1** (LQB223), foi o mais ativo entre os três, sugerindo que não devemos dar continuidade aos estudos pré-clínicos e clínicos com os compostos **4** e **6** e que possivelmente o grupo sulfonamida é o grupo farmacofórico.

Referências

- 1** - Buarque C.D.; Militão, G.; Lima, D.J.B.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; de Moraes, M.O.; da Cunha Junior, E.F.; Torres-Santos, E.C.; Netto, C.D.; Costa, P.R.R.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2011**, 19, 6885
- 2** - Netto C. D., da Silva A. J. M, Salustiano E. J. S., Bacelar T. S., Riça I. G., Cavalcanted M. C. M., Rumjanek V. M., Costa P. R. R.; New pterocarpanquinones: Synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF-amodulation in human PBMC cells; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18** (2010) 1610–1616.
- 3** - Wang, W.; Yang, Q.; Zhou, R.; Fu, H-Y.; Li, R-X. Palladium Nanoparticles generated from allylpalladium chloride in situ.: *Jornal of Organomettalic Chemistry*, **2012**, 697, 1-5;