



**UnB**

Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

REAÇÕES MULTICOMPONENTES EM FOCO: INVESTIGAÇÕES SOBRE O  
MECANISMO REACIONAL DA REAÇÃO PETASIS BORONO-MANNICH E A  
AÇÃO CITOTÓXICA DE DIIDROPIRIMIDINONAS FLUORESCENTES

ROBERTO YOSHIO DE SOUZA FILHO

Prof. Dr. BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO  
(Orientador)

Prof. Dr. JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA  
(Coorientador)

Brasília, DF  
2017



**UnB**

Instituto de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

REAÇÕES MULTICOMPONENTES EM FOCO: INVESTIGAÇÕES SOBRE O  
MECANISMO REACIONAL DA REAÇÃO PETASIS BORONO-MANNICH E A  
AÇÃO CITOTÓXICA DE DIIDROPIRIMIDINONAS FLUORESCENTES

Tese apresentada ao PPGQ, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Química

ROBERTO YOSHIO DE SOUZA FILHO

BRENNO AMARO DA SILVEIRA NETO  
(Orientador)

JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA  
(Coorientador)

Brasília, DF  
2017

## Agradecimentos

Ao professor Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto pela oportunidade e orientação deste trabalho;

Ao Professor Dr. José Raimundo Corrêa pela coorientação deste trabalho;

Aos professores Wender Alves Silva, Alexandre Augusto Lapis; Patrícia Abdelnur e Mauro Vicentini Correia que gentilmente, dispondo de seu tempo e conhecimento, aceitaram o convite para compor a banca examinadora;

Aos amigos e colegas do LaQuiMeT, e aqui destaco categoricamente Thiago, Gisele e Haline pelo tempo, estudo e companhia nas horas do “sufoco”;

Ao meu pai e minha vó, aqui representando a família, pela criação, educação, orientação e suporte em todo momento;

A “Dona” Mariane Ribeiro, que tamanho carinho e preocupação mais se parece mãe do que sogra;

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos e ao Instituto de Química (IQ-UnB) pela infraestrutura básica.

## Dedicatória

À Riane Ribeiro Carvalho...

Poderia, com toda razão e merecimento, agradecer pela paciência, compreensão e apoio ao longo da conclusão desta etapa, mas seria injusto! Sim, injusto. Doutores não são formados da noite para o dia, tão pouco o conseguem de maneira “rápida e fácil!” Mas posso dizer o quanto sou grato por ter você ao meu lado, acompanhando e vivenciando cada etapa ao longo dessa trajetória. Ao namoro iniciada na graduação, a persistência junto ao mestrado e a teimosia para com o doutorado fizeram toda a diferença para que hoje conseguisse finalizar mais essa etapa. Assim, hoje sou doutor, mas não o seria sem a sua companhia...

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Figuras .....	vii
Lista de Esquemas .....	x
Lista de Gráficos.....	xiii
Lista de Anexos .....	xiv
Resumo .....	xv
Abstract.....	xvi
Introdução.....	1
Objetivos.....	15
Materiais e Métodos .....	16
i. Procedimentos Sintéticos .....	18
ii. Ensaio Biológico .....	25
Capítulo 1: Investigações Sobre o Mecanismo Reacional da Reação Petasis Borono-Mannich.....	28
Capítulo 2: Ação Citotóxica de Diidropirimidinonas Fluorescentes.....	56
Conclusão .....	75
Referências Bibliográficas.....	76
Anexos 1: Artigo Publicado Referente ao Capítulo 1 .....	79

## Lista de Abreviaturas

AAN	alfa amino nitrila
BAC	beta amino carbonila
Bn	benzil
BSA	albumina de soro bovino
Bz	benzoil
BTB	benzotiadiazol
CDCl <sub>3</sub>	clorofórmio deuterado
Da	Dalton (unidade de massa)
DFT	teoria de densidade funcional
DHP	diidropiridina
DHPM	diidropirimidinona
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOH	etanol
Et <sub>3</sub> N	trietilamina
ESI	ionização por electrospray
FPS	soro fetal bovino
IU	unidade internacional
KCN	cianeto de potássio
MCF-7	adenocarcinoma de mama humano
MeOH	metanol
MS	espectroscopia de massa
<i>m/z</i>	razão massa/carga
PBM	Petasis borono-Mannich
PBS	tampão fosfato-salino
Q/TOF	analizador quadrupolo/tempo de voo
RMN	ressonância magnética nuclear
RMC	reação multicomponente
TBS	<i>t</i> -butildimetilsilil
TPS	triisopropilsilil
ZVPE	energia vibracional do ponto zero

## Lista de Figuras

Figura 1. Movimento dos centríolos durante a mitose celular. Acima: Pictograma extraído de: <a href="http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo6.php">http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo6.php</a> (com adaptações). Abaixo: imagens celulares do acervo pessoal; esquema de cores: azul os cromossomos, vermelho microtubulinas. ....	6
Figura 2. Indução de fuso monoastral durante a mitose celular. A) célula cultivada sem a adição de monastrol (controle). B) fuso monoastral em célula tratada com monastrol (68 $\mu$ M). Em verde: microtubulinas; azul:cromatina. <sup>18</sup> .....	7
Figura 3. Representação esquemática da ação motora da Eg5. (Figura extraída da referência 26).....	8
Figura 4. grupos essenciais (farmacofórico) e secundários (auxofóricos) à atividade citotóxica apresentada pelo monastrol.....	8
Figura 5. DHPM's análogas ao monastrol e com atividade inibitória sobre as proteínas motoras Eg5.....	9
Figura 6. Exemplos de amins alílicas (e benzílica) com atividade biológica diversificada. ....	12
Figura 7. Espécies observadas, <i>via</i> ESI(+)-MS, na reação PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional. ....	29
Figura 8. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do produto da reação ( <i>m/z</i> 270) PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. ....	29
Figura 9. ESI(+)-MS/MS evidenciando o padrão de fragmentação da espécie supramolecular <i>m/z</i> 196, formada pelo subproduto <i>m/z</i> 164 e MeOH. ....	30
Figura 10. ESI(+)-MS da reação PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Nenhum intermediário reacional detectado ao longo do período reacional. Alíquota coletada após 60 min. do início do período reacional.....	30
Figura 11. Espécies observadas, <i>via</i> ESI(+)-MS, na reação PBM utilizando o 4-(N,N-dietilamino)-salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional.....	32
Figura 12. ESI(+)-MS/MS evidenciando o padrão de fragmentação da espécie <i>m/z</i> 293, formada pela reação entre o 4-(N,N-dietilamino)-salicilaldeído e a morfolina.....	33

Figura 13. Acima: ESI(+)-MS da reação 3 evidenciando a presença do íon $m/z$ 212, alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional. Abaixo: padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon imínio.....	35
Figura 14. Espécies observadas, ESI(+)-MS, na reação 3 (salicilaldeído, benzilamina e ácido borônico). Alíquota coletada após 30 min. do início do período reacional .....	36
Figura 15. Acima: ESI(+)-MS/MS do íon $m/z$ 330 evidenciando sua conversão a espécie $m/z$ 298. Abaixo: padrão de fragmentação do íon $m/z$ 298. ....	37
Figura 16. Padrão de fragmentação do intermediário $m/z$ 352, o produto da reação 3 complexado a espécie inorgânica $B(OH)_3$ .....	39
Figura 17. Presença do íon $m/z$ 212 (imínio) na reação 3 (salicilaldeído, benzilamina e ácido borônico) em tolueno a temperatura de 90°C. Alíquota coletada após 4 horas do início do período reacional. ....	42
Figura 18. Espécies observadas <i>via</i> ESI(+)-MS para a reação 4 em metanol. Alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional. ....	44
Figura 19. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon $m/z$ 283, evidenciando a estrutura do intermediário imínio/enamina. ....	45
Figura 20. Relação estrutural entre as espécies $m/z$ 298 e 352 observados na reação 3 e seus análogos $m/z$ 369 e 423 presentes na reação 4.....	46
Figura 21. Padrão de fragmentação das espécies $m/z$ 369 e 423, observados na reação 4 .....	47
Figura 22. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon $m/z$ 651 obtido na reação 4. ....	48
Figura 23. Equivalência estrutural entre as espécies $m/z$ 509, observado na reação 3, e $m/z$ 651 na reação 4. ....	48
Figura 24. Padrão de fragmentação da espécie $m/z$ 387 observado na reação 4, o intermediário análogo a espécie 315 Da não observado na reação 3. ....	50
Figura 25. Padrão de fragmentação do íon $m/z$ 809, ESI(+)-MS/MS, evidenciando sua constituição supramolecular entre as espécies 422 e 386 Da (formas neutras dos respectivos íons $m/z$ 423 e 387).....	51
Figura 26. Espectros de RMN $^1H$ (300 Mhz, solvente: $CDCl_3$ ) evidenciando a conversão do composto BTB (acima) a BTB_Br <sub>2</sub> (abaixo).....	58
Figura 27. Espectros de RMN $^{13}C$ (300 Mhz, solvente: $CDCl_3$ ) evidenciando a conversão do composto BTB (acima) a BTB_Br <sub>2</sub> (abaixo).....	59

Figura 28. Espectros de RMN $^1\text{H}$ (300 Mhz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ) evidenciando a conversão do composto BTB-Br2 (acima) a BTB_Br2-mp01 (abaixo). .....	61
Figura 29. Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ (300 Mhz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ) evidenciando a conversão do composto BTB-Br2 (acima) a BTB_Br2-mp01 (abaixo). .....	62
Figura 30. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do derivado DHPM fluorescente não citotóxico BTB_Br2-pf01.....	64
Figura 31. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do derivado DHPM fluorescente não citotóxico BTB_Br2-pf01.....	65
Figura 32. Espectros de RMN (300 Mhz, solvente: $\text{CDCl}_3$ ) de $^1\text{H}$ (acima) e $^{13}\text{C}$ (abaixo) evidenciando a estrutura do composto BTB_NH <sub>2</sub> -1,3-dicarbonil.....	67
Figura 33. Espectro de RMN $^1\text{H}$ (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do composto BTB_NH <sub>2</sub> -pf01.....	69
Figura 34. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do composto BTB_NH <sub>2</sub> -pf01.....	70
Figura 35. Agrupamento de células visto sob microscopia confocal. Em vermelho: microtubulos; em azul: cromatina; em verde: DHPM fluorescente BTB_Br2-mp01. Acima: destaque da morfologia celular. Abaixo: formação do fuso dipolar mitótico na presença da DHPM fluorescente. ....	72
Figura 36. Alterações celulares causadas pelo composto BTB_NH <sub>2</sub> -pf02. A e B: alterações morfológicas. C: fuso monoastral, setas amarelas indicam a dispersão do composto no citoplasma. ....	73
Figura 37. A esquerda: dispersão do composto BTB_NH <sub>2</sub> -pf01 através da membrana nuclear. A direita: dispersão do composto BTB_Br2-pf01 ao redor da membrana nuclear, detalhe para a ausência do contorno da membrana nuclear. (A: células vivas; B) destaque para a morfologia celular; C) células fixadas, D) destaque para a morfologia celular...	73
Figura 38. Célula tratada com o composto citotóxico BTB_NH <sub>2</sub> -pf01. Acima: imagem de contraste evidenciando a disformidade da morfologia celular. Abaixo: visualização “RGB” do composto disperso no ambiente celular. ....	74

## Lista de Esquemas

Esquema 1. Síntese total do taxol por Nicolaou e colaboradores <sup>3</sup> (com adaptações). ....	1
Esquema 2. Obtenção do praziquantel. 1) síntese industrial patenteada pela Merck® <sup>7</sup> e 2) síntese <i>via</i> RMC. <sup>8,9</sup> (com adaptações). ....	2
Esquema 3. Primeiras reações multicomponentes. ....	3
Esquema 4. RMC Ugi-4C. <sup>11,12</sup> (com adaptações). ....	4
Esquema 5. Sínteses de Behrend, Schiff e Biginelli para obtenção de adutos envolvendo uréia. <sup>13</sup> (Com adaptações). ....	5
Esquema 6. Formação de diidropiridinas <i>via</i> Reação multicomponente de Biginelli. .	6
Esquema 7. Síntese de $\beta$ -amino carbonilas <i>via</i> RMC de Mannich. Acima, amina terciária obtida por Mannich. <sup>33</sup> Abaixo, reagentes gerais da RMC (3C) de Mannich. <sup>34</sup> .....	9
Esquema 8. Mecanismo reacional, em meio ácido, para a reação de Mannich. ....	10
Esquema 9. Exemplos de conversão de grupos funcionais e compostos obtidos <i>via</i> bases de Mannich. <sup>35</sup> .....	11
Esquema 10. RMC Petasis-boronic Mannich. <i>Reagentes e condições</i> : i) tolueno, 90°C, 10 min.; ii) adição do ácido vinilborônico, 90°C, 30 min. ....	12
Esquema 11. Reação PBM e seu mecanismo simplificado. ....	13
Esquema 12. Reação PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em etanol para análise <i>via</i> ESI(+)-MS(/MS). ....	28
Esquema 13. Reações PBM para análise <i>via</i> ESI(+)-MS(/MS). Acima: reação entre o salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Abaixo: modificação utilizando o 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. ....	31
Esquema 14. Reação entre 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído e morfolina para formação do intermediário imínio e sua conversão a enamina devido a presença do grupo 4-( <i>N,N</i> -dietilamino). ....	32
Esquema 15. Reações PBM para análise <i>via</i> ESI(+)-MS(/MS). Reação 1: salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Reação 2: modificação utilizando o 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. Reação 3: salicilaldeído, benzilamina e ácido fenil borônico. ....	34
Esquema 16. Formação do íon imínio nas reações: 2) partir do 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído e morfolina. 3) salicilaldeído e benzilamina. ....	35
Esquema 17. Acima: ESI(+)-MS/MS do íon <i>m/z</i> 330 evidenciando sua conversão a espécie <i>m/z</i> 298. Abaixo: padrão de fragmentação do íon <i>m/z</i> 298. ....	37

Esquema 18. Formação dos intermediários $m/z$ 298 e 330 a partir da reação da imina com o ácido borônico. ....	38
Esquema 19. Acima: formação do intermediário de massa 508 Da a partir da reação entre a imina e o ácido borônico. Abaixo: ESI(+)-MS/MS do íon $m/z$ 509.....	38
Esquema 20. Possibilidade de transferência do grupo fenila a partir das espécies $m/z$ 298, 330 e 509. ....	39
Esquema 21. Formação de um possível precursor do produto da reação PBM pela transferência do grupo fenila a partir do intermediário 508 Da. Não há convergência <i>via</i> DFT (Nível teórico utilizado PBE1PBE/cc-pVDZ). ....	40
Esquema 22. Acima: formação das espécies $m/z$ 330 e 329 Da ( <i>zwitterion</i> ) a partir do intermediário $m/z$ 298. Abaixo: cristais da espécie 329 Da e sua elucidação estrutural por raio-X (ORTEP-3). ....	41
Esquema 23. Reações PBM para análise <i>via</i> ESI(+)-MS(/MS). Reação 1: salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Reação 2: modificação utilizando o 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. Reação 3: salicilaldeído, benzilamina e ácido fenil borônico. Reação 4: modificação utilizando o 4-( <i>N,N</i> -dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. ....	43
Esquema 24. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon $m/z$ 283, evidenciando a estrutura do intermediário imínio/enamina. ....	45
Esquema 25. Formação dos intermediários imínio/enamina nas reações 2, 3 e 4.....	46
Esquema 26. Acima: formação as espécies $m/z$ 298 e 330 a partir do intermediário 315 Da (não observado) nas reação 3. Abaixo: formação íon $m/z$ 387 na reação 4, intermediário de estrutura análoga ao composto 315. ....	49
Esquema 27. Energia de conversão entre a forma acíclica/cíclica do intermediário 386 Da (a forma neutra do íon $m/z$ 387). Nível teórico utilizado PBE1PBE/CC-pVDZ. ....	52
Esquema 28. Mecanismo reacional para a reação PBM baseado nos intermediários observados experimentalmente <i>via</i> ESI(+)-MS.....	53
Esquema 29. Interação cooperativa do solvente (duas moléculas de metanol) na etapa de transferência do grupo fenila, a partir do “intermediário-chave”, e seu perfil energético. Nível teórico utilizado PBE1PBE/cc-pVDZ. ....	55
Esquema 30. DHPM's planejadas a partir da inserção do fluorofulo BTD nas regiões farmacofórica e auxofóricas do monastrol. ....	56
Esquema 31. Sequência sintética para obtenção do composto BTD_Br <sub>2</sub> .....	57
Esquema 32. Reação de Suzuki para a obtenção do composto BTD_Br <sub>2</sub> -mp-01. ....	60

Esquema 33. Reação de Biginelli, utilizando o aldeído BTD_Br2-mp01, para obtenção da DHPM fluorescente BTD_Br2-pf01. ....	63
Esquema 34. Síntese do composto BTD_NH2-1,3-dicarbonil. ....	66
Esquema 35. Síntese do derivado DHPM citotóxico BTD_NH2-pf01 <i>via</i> reação de Biginelli. ....	68

## Lista de Gráficos

Gráfico 1. Taxa de inibição de viabilidade celular (citotoxicidade) para os compostos BTD_Br <sub>2</sub> -pf01 e BTD_NH <sub>2</sub> -pf01 em células cancerígenas MCF-7. ....	71
--	----

## **Lista de Anexos**

Anexo 1: Artigo publicado referente ao capítulo 1

## Resumo

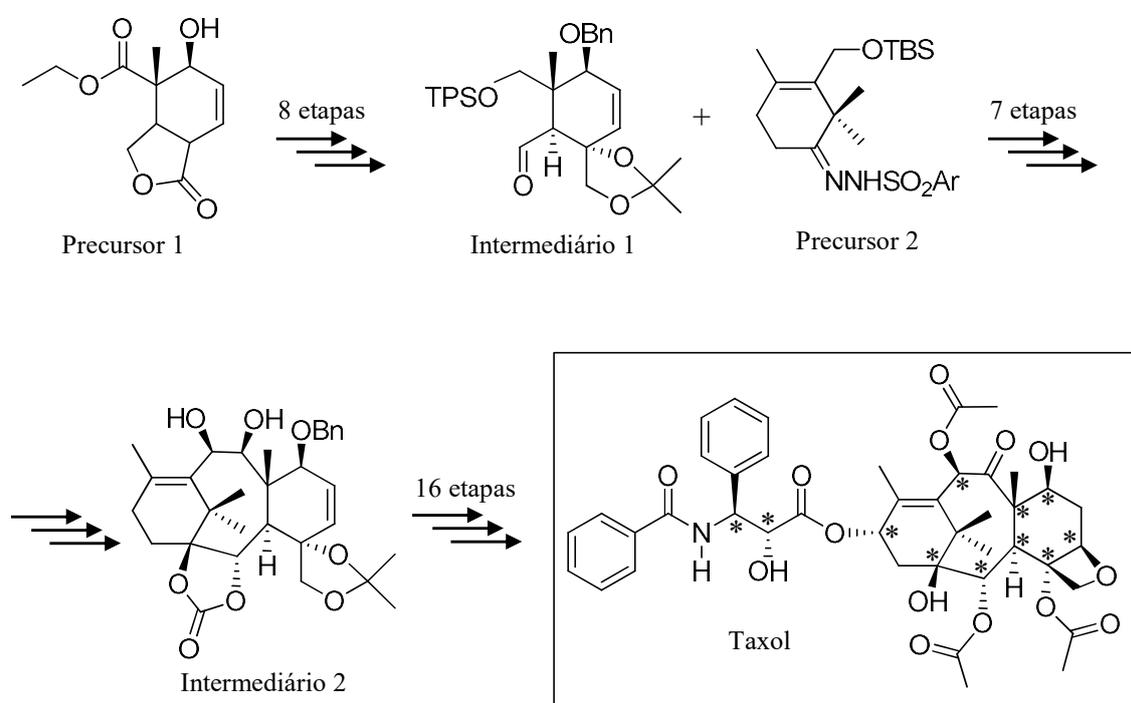
Neste trabalho realizou-se uma abordagem teórico-experimental para investigação do mecanismo reacional da reação multicomponente Petasis Borono-Mannich. Utilizando-se da espectrometria de massas ESI(+)-MS(/MS), associada à técnica de etiquetas de cargas (charged-tag), da análise estrutural por raio-X e do emprego de cálculos de DFT para otimização conformacional e energia das espécies reacionais observadas, a metodologia possibilitou a proposição de um mecanismo reacional mais detalhado, e coerente com os dados disponíveis na literatura, para essa importante reação multicomponente. Notadamente, a participação do solvente para a formação do estado de transição responsável pela formação do produto da reação. Adicionalmente, para investigação dos fatores envolvidos na ação citotóxica apresentada pela diidropirimidinona (DHPM) monastrol no decurso do fuso mitótico celular, utilizou-se a reação multicomponente de Biginelli, para a obtenção de novas DHPM's fluorescentes planejadas a partir da inserção do fluoróforo benzotiadiazol (BTD) na estrutura base do monastrol, resultando na obtenção de derivados fluorescentes citotóxicos e não citotóxicos para observação direta, *via* microscopia confocal, dos fatores envolvidos na ação biológica do monastrol sob as proteínas motoras do fuso mitótico (Eg5).

## Abstract

In this work, it have fulfilled as theoretical as experimental approach about mechanism reaction investigation of multicomponent reaction Petasis Borono-Mannich. For a complete investigation, it resorted the electrospray mass spectrometry ESI(+)-MS(/MS), associated with charged-tags shift as well as the structural analysis by X-ray and the use of DFT calculations for conformational and energy optimization for the species observed. The methodology allowed the proposal more detailed mechanism reaction and it is consistent with the available data found in literature about this important multicomponent reaction. Notably, it observed that the solvent participation in the transition form is responsible to afford the product. Additionally, Biginelli multicomponent reaction was used to afford new fluorescent dihidropirimidinones (DHPM's) derivatives, designed through insertion of benzothiadiazol (BTD) on monastrol base structure, it was purpose to understand the factors involved in citotoxic action presented by DHPM monastrol in cellular mitotic spindle. This provided new citotoxic and non citotoxic fluorescent DHPM's to direct observation, *via* confocal microscopy, on the biological action factors involved in monastrol molecule against Eg5 motor proteins.

## Introdução

Os avanços da síntese orgânica desencadearam uma perspectiva ilimitada na arquitetura de novas moléculas, possibilitando a obtenção de estruturas variadas como o Taxol. Descoberto em 1971,<sup>1</sup> seu mecanismo de estabilização das tubulinas celulares, inviabilizando a multiplicação de células cancerígenas, e sua estrutura complexa<sup>2</sup> despertaram interesse de grupos de pesquisas, tendo sua primeira síntese total apresentada em 1994, uma sequência de 31 etapas reacionais para a formação do produto, taxol, contendo 11 carbonos assimétricos (Esquema 1).<sup>3\*</sup>



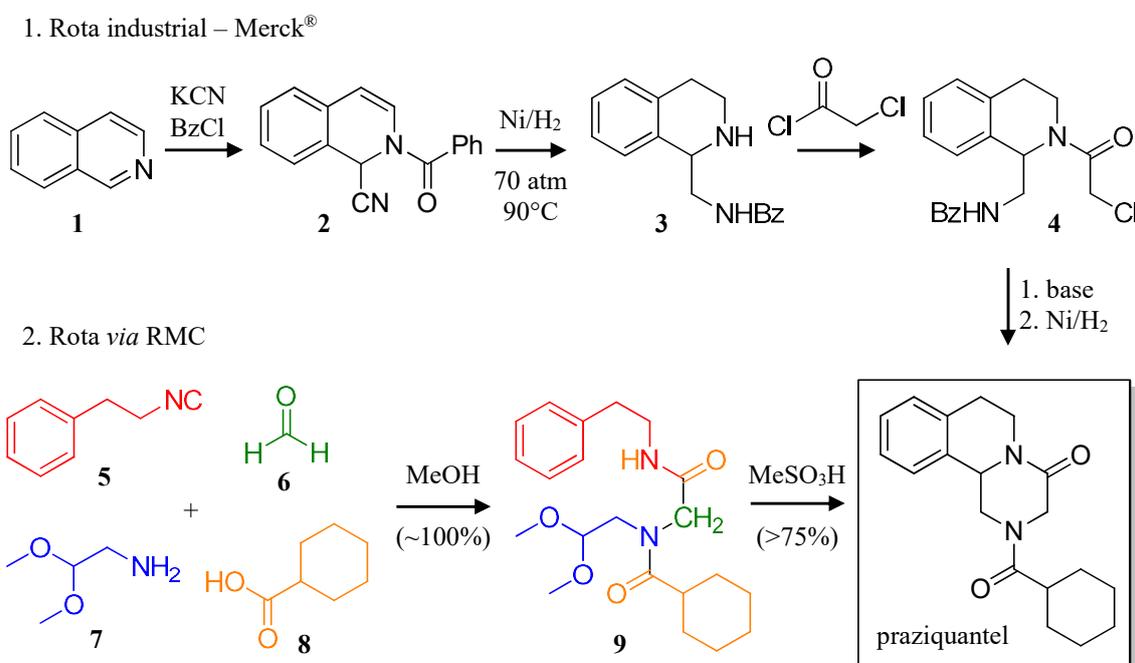
Esquema 1. Síntese total do taxol por Nicolaou e colaboradores<sup>3</sup> (com adaptações).

A metodologia apresentada por Nicolaou e colaboradores demonstra a potencial ilimitado da síntese orgânica e seus avanços na conversão, inserção, proteção de grupos funcionais e a formação de ligações carbono-carbono. Entretanto existem desvantagens, notadamente para a obtenção de compostos de estrutura mais complexas, associadas ao procedimento de síntese linear: uso excessivo de solventes orgânicos, longos períodos

\* Não há consenso quanto ao crédito da primeira síntese total, ver Holton e colaboradores; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1599.

reacionais, necessidade de isolamento e purificação de intermediários, baixos rendimentos, excesso de subprodutos e resíduos, elevados custos e recursos humanos que precisam ser sanados para a utilização prática em larga escala. E, nesse sentido, as reações multicomponentes (RMC's) surgem como ferramenta alternativa junto ao escopo da síntese orgânica.

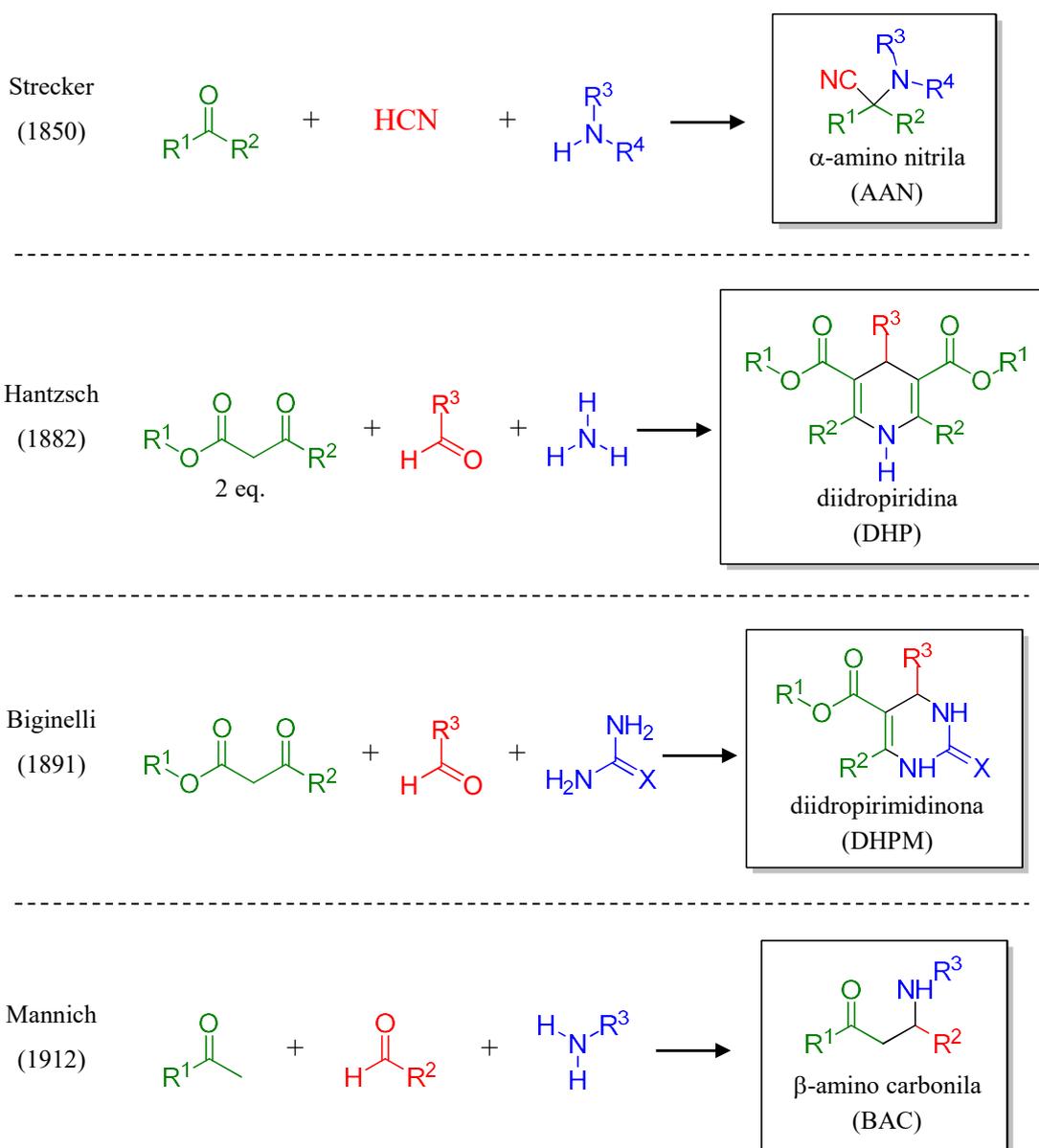
Embora possuam as mesmas desvantagens da síntese linear (citadas anteriormente) as RMC's minimizam de forma eficiente essas limitações por serem reações de “uma única etapa”, proporcionando economia efetiva de reagentes, solventes, processos de purificação e isolamento de intermediários, procedimentos e manipulações simples, menor uso de recursos humanos, melhores rendimentos globais, elevada viabilidade para obtenção de séries de compostos homólogos e implementação em larga escala.<sup>4,5</sup> Tais características, consonantes com as demandas da química verde, proporcionaram a utilização das RMC's na produção de fármacos<sup>6</sup> como o praziquantel. Comercializado pela Merck® para o tratamento da esquistossomose, sua síntese industrial (5 etapas) utiliza excesso de KCN, gerando quantidade significativa de cianeto aquoso como resíduo.<sup>7</sup> De forma alternativa, Dömling e colaboradores reportaram sua obtenção em duas etapas: uma RMC seguida de uma reação de ciclização.<sup>8,9</sup> Metodologias distintas apresentadas de forma comparativa no Esquema 2.



Esquema 2. Obtenção do praziquantel. 1) síntese industrial patenteada pela Merck®<sup>7</sup> e 2) síntese *via* RMC.<sup>8,9</sup> (com adaptações).

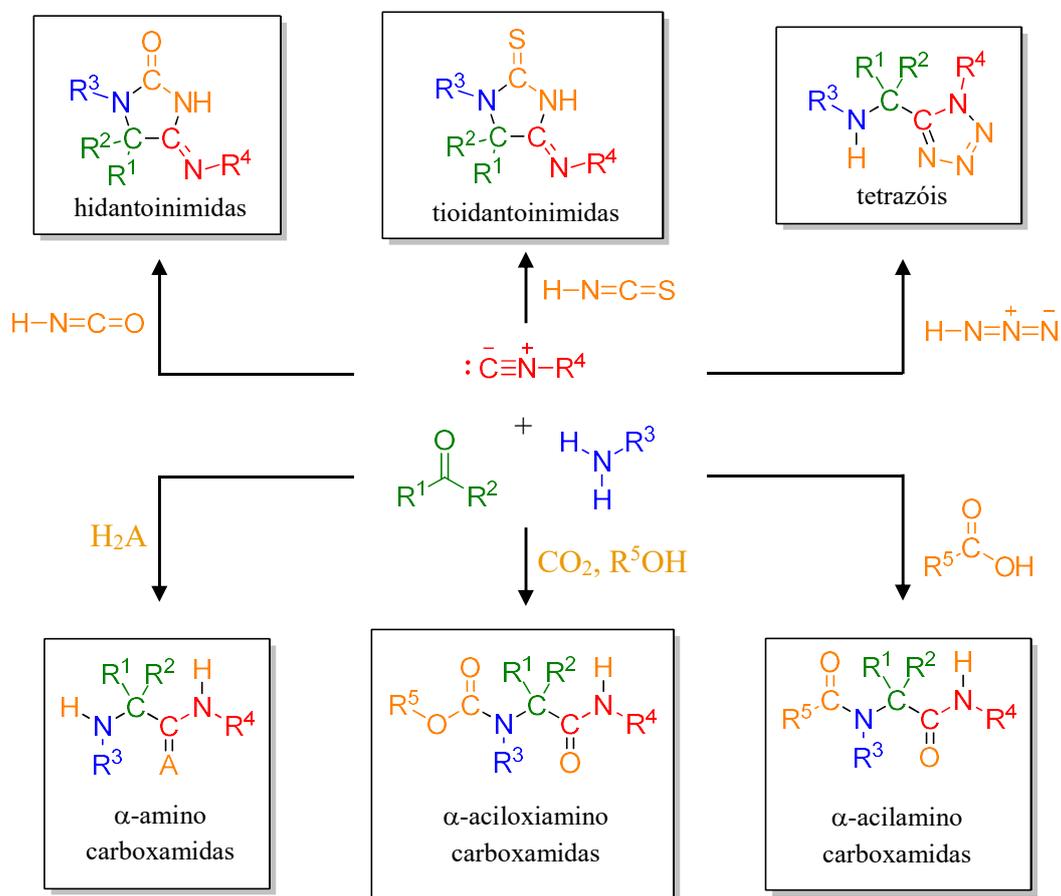
Definidas como um processo reacional de uma única etapa (*one-pot*), onde três ou mais reagentes se unem para formar um produto majoritário, convergente e que possua a maioria dos átomos constituintes de seus reagentes (resultando em economia de átomos),<sup>10</sup> as RMC's são, com frequência, referenciadas como modelo ideal de síntese e nomeadas pela quantidade de reagentes que as constituem, o reagente principal, o nome de seus descobridores ou, ainda, variações desses.

Os trabalhos de Strecker para a obtenção de  $\alpha$ -amino nitrilas (AAN), Hantzsch para diidropiridinas (DHPs), Biginelli na síntese de diidropirimidinonas (DHPMs) e Mannich para  $\beta$ -amino carbonilas (BAC) marcam o início do desenvolvimento das RMC's (Esquema 3).<sup>11,12</sup>



Esquema 3. Primeiras reações multicomponentes.

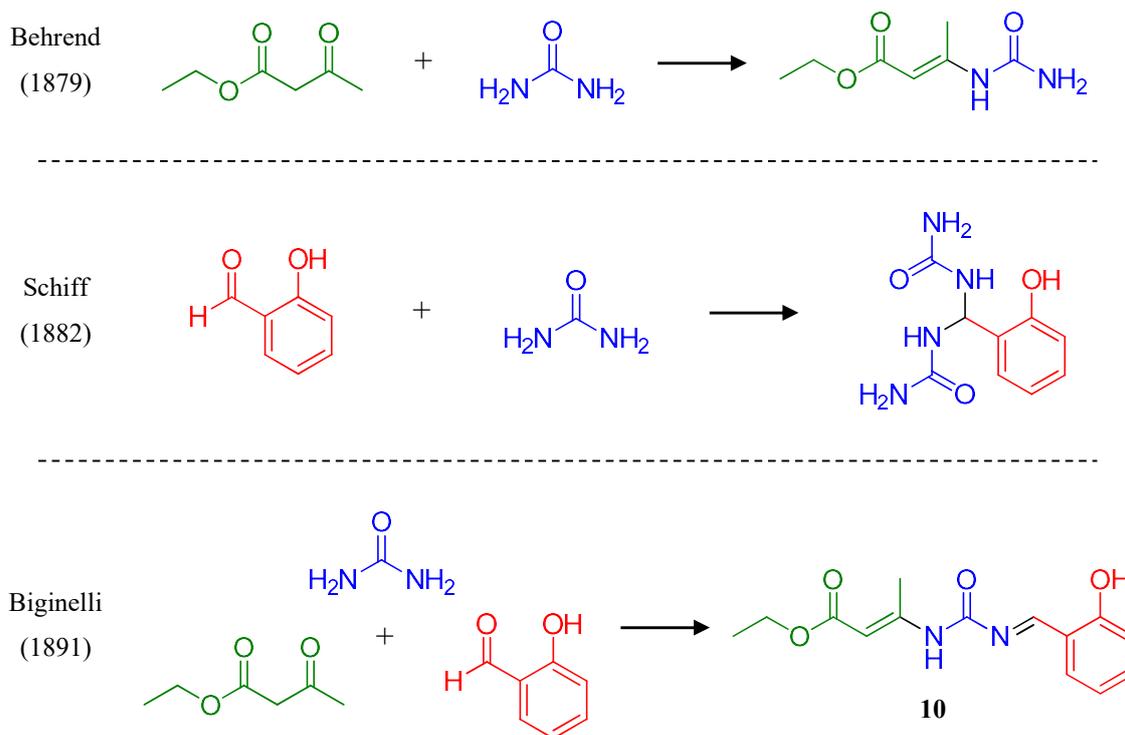
Destacando-se, em 1959, os trabalhos de Ugi (denominada U-4CR),<sup>11,12</sup> como a retomada das pesquisas em RMC. Consistindo numa reação entre 4 componentes, sua metodologia não apenas ampliou o escopo das RMC's como também evidenciou a variabilidade estrutural proporcionada por essa nova classe reacional (Esquema 4).



Esquema 4. Variações da reação multicomponente Ugi-4C.<sup>11,12</sup> (com adaptações).

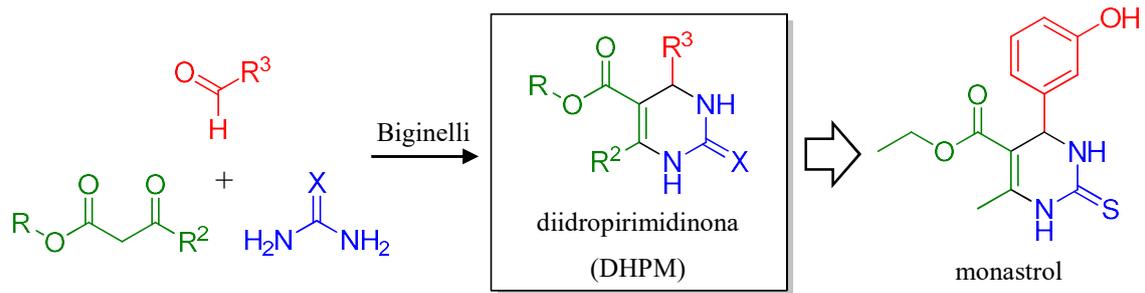
A complexidade estrutural e a variabilidade (esqueleto carbônico contendo heteroátomos e/ou anéis com elevado número de ligações; produtos funcionalizados como resultado da prévia escolha dos reagentes de partida) associadas a “pronta obtenção” de séries de compostos homólogos tornaram as RMC's ferramenta atrativa para a síntese orgânica, despertando interesse de grupos de pesquisas voltados ao desenvolvimento dessa classe reacional objetivando a otimização das condições reacionais (solventes, temperatura, catálise e síntese assimétrica), a aplicação dos compostos obtidos (intermediários reacionais como *building blocks*, investigação da atividade biológica e materiais poliméricos) e, notadamente, o desenvolvimento de novas RMC's.

Baseado nos trabalhos de Behrend e Schiff, para a formação de adutos envolvendo uréia e compostos carbonilados,<sup>13</sup> Pietro Biginelli reportou em 1891 a síntese do composto **10**, um produto de cadeia aberta formado pela reação, em uma única etapa, entre a uréia, acetoacetato de etila e salicilaldeído (Esquema 5).



Esquema 5. Sínteses de Behrend, Schiff e Biginelli para obtenção de adutos envolvendo uréia.<sup>13</sup> (Com adaptações).

Embora comprovadamente reconhecida como uma reação de adição, a estrutura inicialmente proposta por Biginelli mostrou-se equivocada, sendo o produto corretamente elucidado, por Biginelli em seus trabalhos seguintes, como uma diidropirimidinona (DHPM), a exemplo do monstrol (Esquema 6). As DHPM's são especialmente importantes por apresentarem ação biológica diversificada,<sup>14-17</sup> atuando como moduladoras de canais de cálcio, bactericidas, antivirais e, notadamente, inibidoras de proteínas do fuso mitótico (Eg5 kinases), características que fazem da RMC de Biginelli ferramenta essencial no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos baseados na estrutura base das DHPM's.



Esquema 6. A esquerda: reação multicomponente de Biginelli para obtenção de DHPMs. A direita: estrutura do monastrol.

Mayer e colaboradores reportaram, em 1999, a viabilidade do uso das DHPM's como agentes antitumorais ao evidenciar a ação inibitória do monastrol na divisão celular.<sup>18</sup> Durante a mitose observa-se, entre outros eventos, a separação gradativa dos centríolos (prófase) e sua migração em direções opostas (metáfase) para iniciar a divisão dos cromossomos que, neste ponto, já se encontram completamente condensados e prontos para serem divididos entre as duas futuras células-filhas (Figura 1).

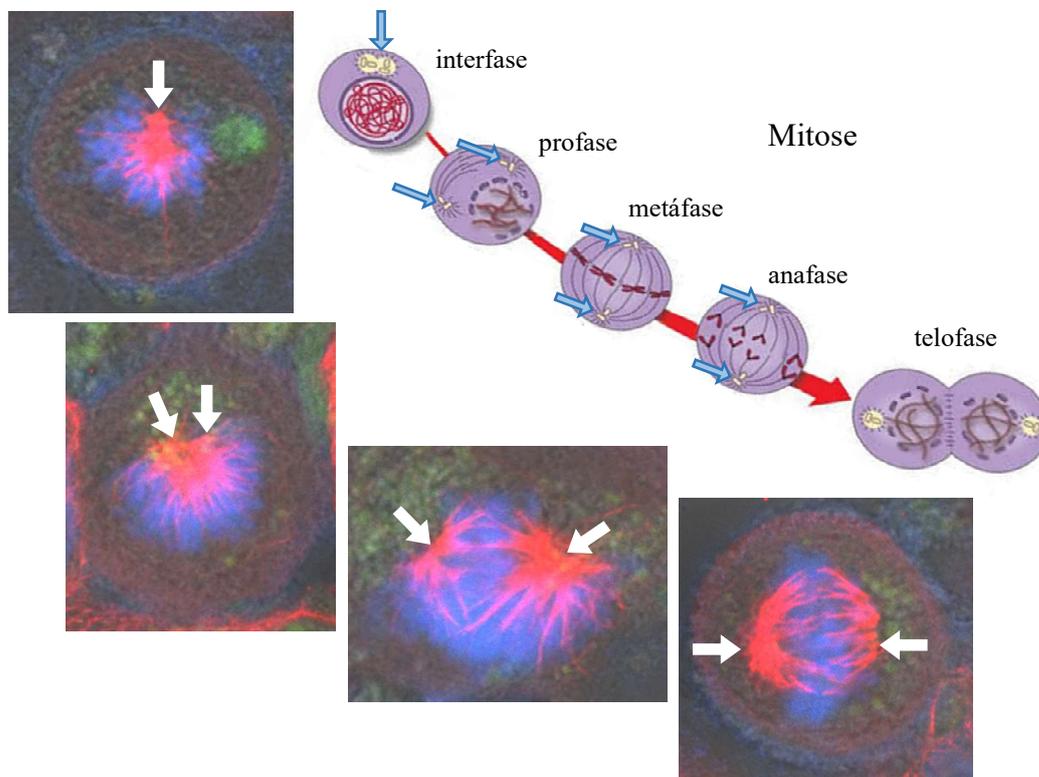


Figura 1. Movimento dos centríolos durante a mitose celular. Acima: Pictograma extraído de: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo6.php> (com adaptações). Abaixo: imagens celulares do acervo pessoal; esquema de cores: azul os cromossomos, vermelho microtubulinas.

Enquanto outros compostos, a exemplo do taxol, possuem mecanismo de inibição celular baseado na estabilização das microtubulinas (interferindo no seu processo natural de crescimento e degradação),<sup>19,20</sup> o monastrol apresentou atuação diferenciada e inédita durante o curso da mitose celular. Agindo sobre as proteínas motoras Eg5, responsáveis pela migração dos centríolos durante prófase, o monastrol inviabiliza o progresso de divisão celular ao impedir a formação do fuso dipolar que resultaria na metáfase, originando um fuso “monoastrol” do qual, conforme observado nas imagens originais do trabalho de Mayer e colaboradores (Figura 2), deriva o nome do referido composto.<sup>18</sup>

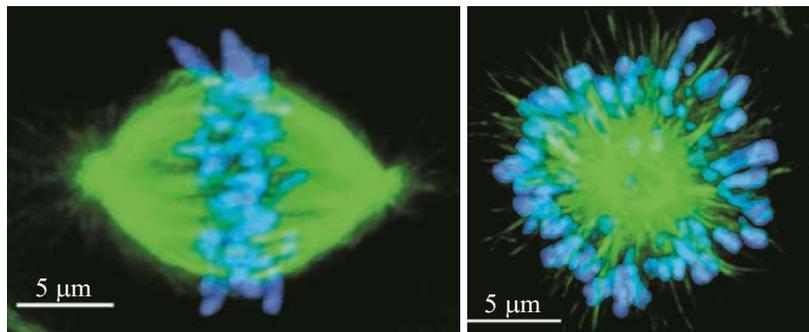


Figura 2. Indução de fuso monoastrol durante a mitose celular. A) célula cultivada sem a adição de monastrol (controle). B) fuso monoastrol em célula tratada com monastrol (68 µM). Em verde: microtubulinas; azul:cromatina.<sup>18</sup>

Este mecanismo de ação proporcionou uma nova abordagem para obtenção de possíveis agentes antitumorais, compostos baseados na ação inibitória das proteínas motoras do fuso mitótico (kinesinas Eg5).<sup>21-24</sup> Estruturalmente, as kinesinas Eg5 são formadas por um corpo helicoidal alongado, contendo proteínas motoras globulares em suas extremidades. A ação motora é resultado da adesão das proteínas motora ao substrato (a tubulina) e do “movimento circular” mediado pelo consumo de ATP (Figura 3).<sup>25,26</sup>

Notadamente, a atuação do monastrol sobre as proteínas Eg5 ocorre de forma alostérica, causando modificações estruturais que interferem na conversão do ATP.<sup>27,28</sup> Embora modificações estruturais para a obtenção de novas DHPM's sejam virtualmente ilimitadas, a ação inibitória apresentada pelo monastrol não é uma característica associada a classe das DHPM's.

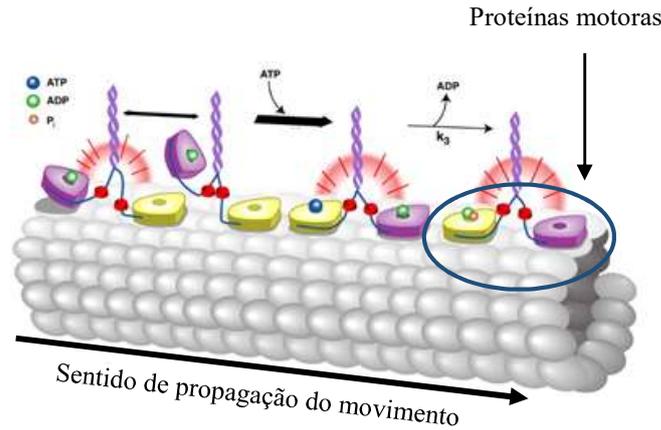


Figura 3. Representação esquemática da ação motora da Eg5. (Figura extraída da referência 26)

Embora a possibilidade de obtenção de novas DHPM's seja, em princípio, ilimitada, a ação citotóxica apresentada pelo monoastrol não é uma característica da classe das diidropirimidinonas. Ao contrário, os dados da literatura indicam a existência de uma relação estrutura/atividade bem definida a partir da estrutura básica do monoastrol (Figura 5). Em geral, oxo-derivados (obtidos a partir do emprego da uréia, *via* RMC de Biginelli) apresentam atividade inibitória menor, ou nula, quando comparados aos tio-derivados e, mais significativamente, a presença e posição do grupo hidróxido são fundamentais, enquanto a cadeia lateral do anel da DHPM é mais propensa a mudanças sem alterações significativas a atividade (Figura 5).<sup>29-32</sup>

Resultados que, embora auxiliem na descobertas de novos análogos com potencial atividade biológica sobre as proteínas motoras Eg5, demonstram a complexidade envolvida na ação citotóxica apresentada pela molécula do monoastrol.

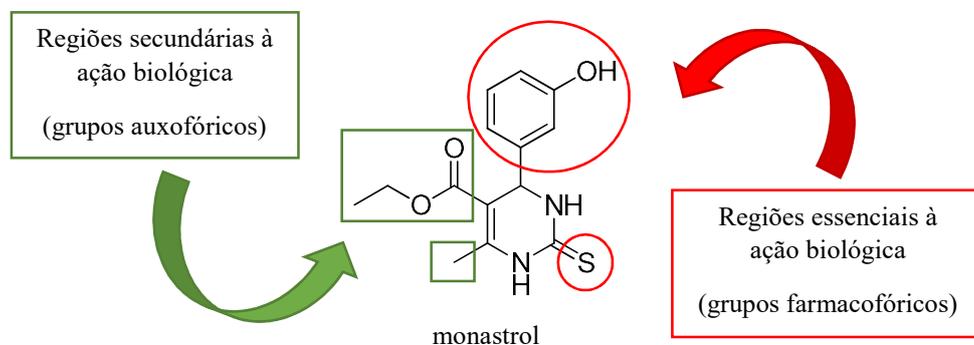


Figura 4. grupos essenciais (farmacofórico) e secundários (auxofóricos) à atividade citotóxica apresentada pelo monoastrol.

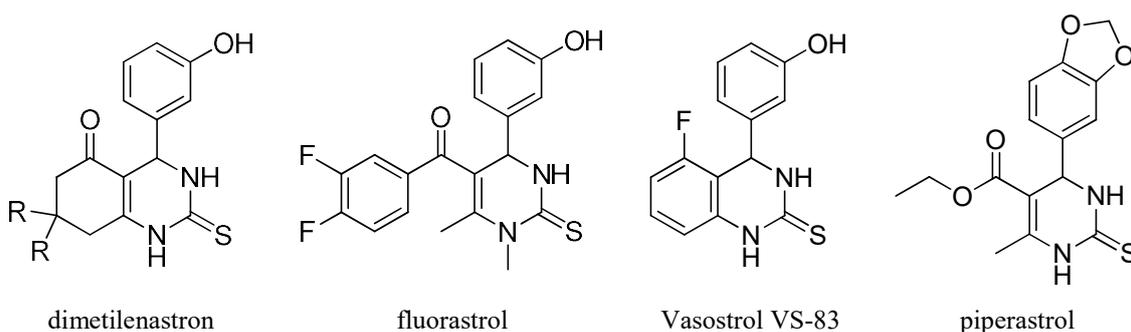
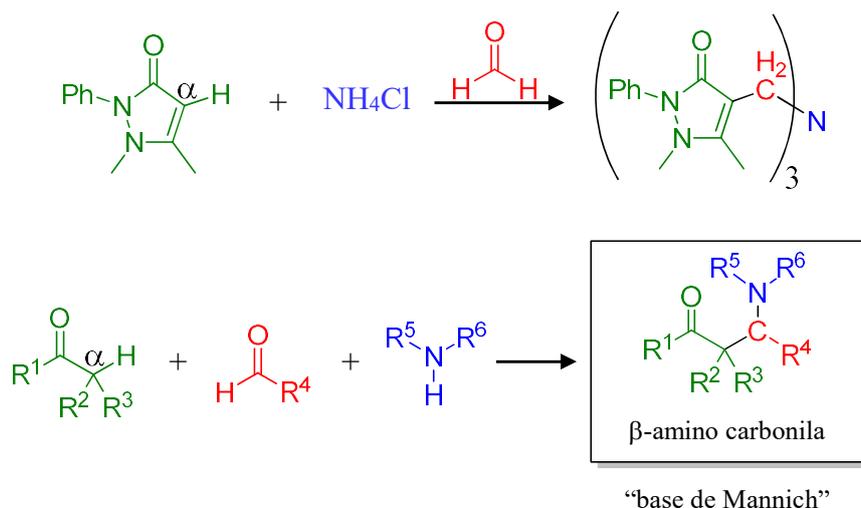


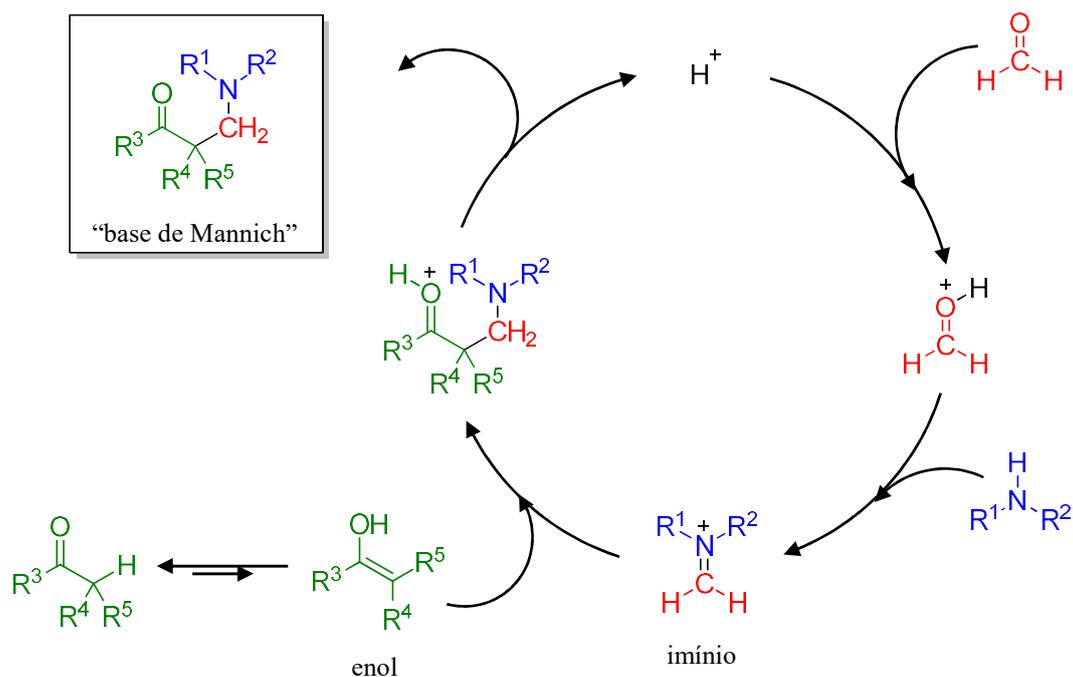
Figura 5. DHPM's análogos ao monastrol e com atividade inibitória sobre as proteínas motoras Eg5.

Carl Mannich, em 1912, ao reagir um composto contendo uma ligação C-H ativada na posição  $\alpha$ , uma carbonila não enolizável e uma amina (Esquema 7),<sup>33,34</sup> desenvolveu uma metodologia geral para a formação de  $\beta$ -amino carbonilas, comumente denominadas “bases de Mannich”.



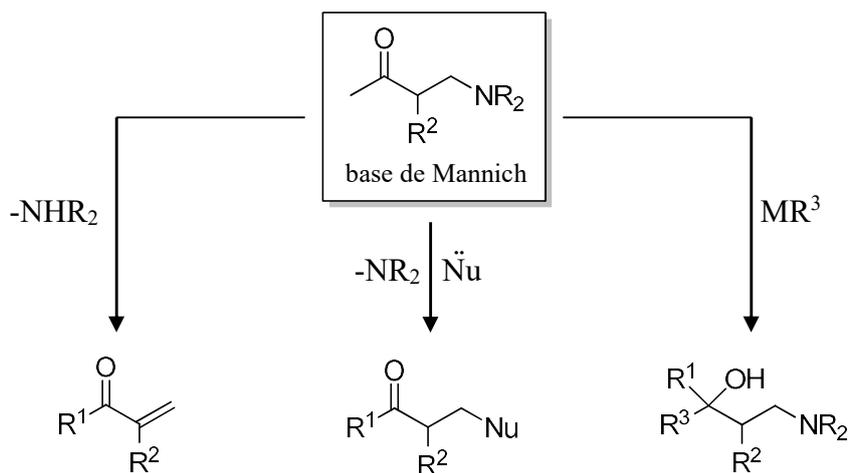
Esquema 7. Síntese de  $\beta$ -amino carbonilas *via* RMC de Mannich. Acima, amina terciária obtida por Mannich.<sup>33</sup> Abaixo esquema geral da RMC de Mannich.<sup>34</sup>

O mecanismo reacional da RMC de Mannich procede *via* formação do íon imínio (eletrófilo formado pela reação entre o formaldeído e a amina) que, em seguida, sofre um ataque nucleofílico pelo enol (gerado pelo composto contendo a ligação C-H ativada na posição  $\alpha$ ), conforme apresentado no Esquema 8.<sup>35,36</sup>

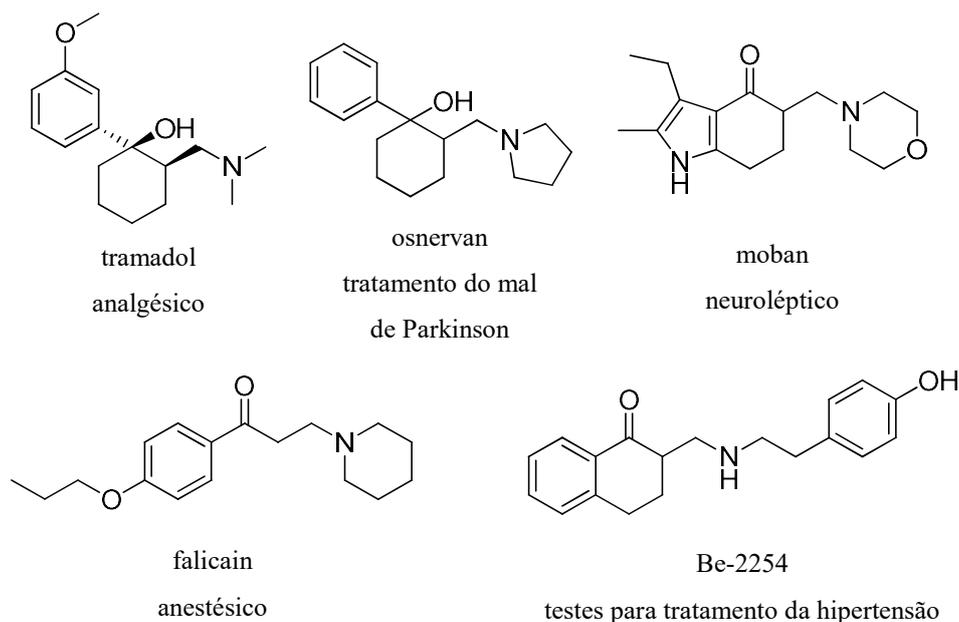


Esquema 8. Mecanismo reacional, em meio ácido, da reação multicomponente de Mannich.

As “bases de Mannich” podem ser empregadas como matéria prima para transformação de grupos funcionais, na produção de intermediários para a síntese de composto mais complexos (Esquema 9) e no tratamento de doenças (Esquema 10).<sup>35</sup>

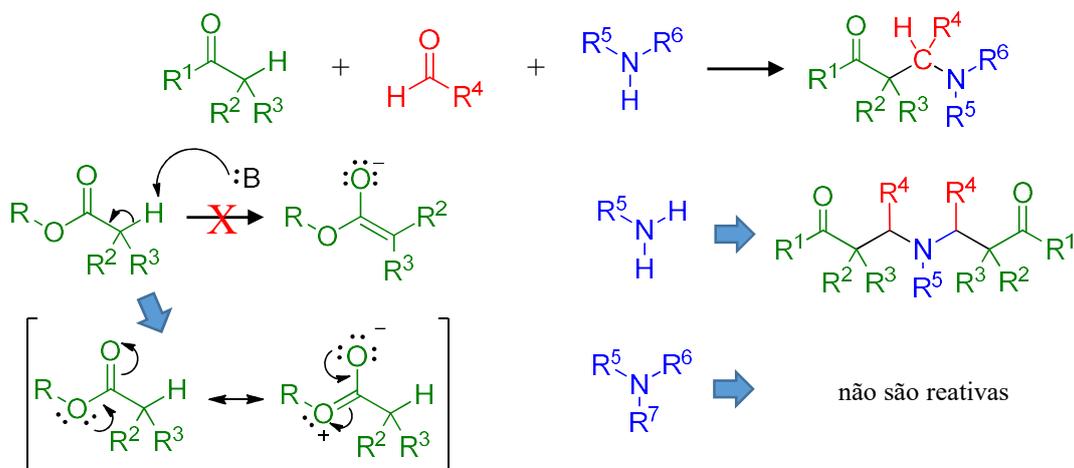


Esquema 9. Exemplos de conversões de grupos funcionais a partir das bases de Mannich.



Esquema 10. Exemplos de conversão de grupos funcionais e compostos obtidos via bases de Mannich.<sup>35</sup>

Entretanto, ácidos carboxílicos e derivados não são reativos limitando-se ao uso de cetonas e aldeídos como substratos enolizáveis; aminas terciárias não são reativas, enquanto primárias e a amônia levam a formação de subprodutos por substituição de seus átomos de H (Esquema 11), bem como elevadas temperaturas, longo período reacional e utilização de solventes polares são fatores limitantes necessários para condição reacional, tornando o aspecto metodológico objeto de estudo de grupos de pesquisa, tanto para a resolução das limitações como para a obtenção de novos compostos.

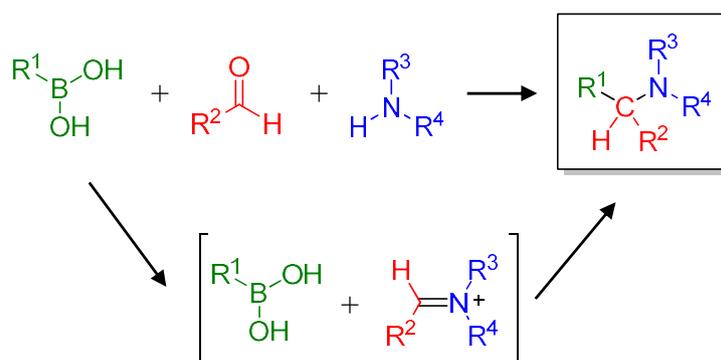


Esquema 11. Limitações a RMC de Mannich. Ácidos carboxílicos e derivados não tendem a formação de enóis; aminas 1<sup>a</sup> e amônia geram subprodutos por adições subsequentes.



As proposições mecanísticas baseiam-se em estudos teóricos<sup>46,47</sup> ou de trabalhos de síntese que utilizam a reação como etapa sintética para obtenção de determinados produtos.<sup>48-50</sup> Embora experimentos de RMN <sup>11</sup>B e do efeitos de solventes<sup>48</sup> sobre a reação tenham evidenciado a importância do uso de solventes polares próticos para o sucesso da reação, não foram encontradas evidências diretas dos intermediários envolvidos no mecanismo reacional. Assim, a busca por um mecanismo detalhado para a reação PBM continua em aberto e foco de intenso debate.

Consistindo em uma variação direta da reação de Mannich, as propostas mecanísticas para a PBM pressupõem, inicialmente, a formação do íon imínio, sua reação com o ácido borônico e posterior transferência do grupo vinil/aryl. Não havendo evidências direta, ou consenso, sobre a maneira como ocorrem estas duas últimas etapas (Esquema 13).



Esquema 13. Mecanismo simplificado para a reação PBM, indicando a formação do íon imínio.

A espectrometria de massas, principalmente pelo uso da ionização por *electrospray* (ESI), tem contribuído para a compreensão de mecanismos reacionais<sup>51-54</sup> como Morita-Baylis-Hillman,<sup>55</sup> Heck<sup>56</sup> e Hantzsch.<sup>57</sup> Apesar dos avanços obtidos via ESI-MS(/MS)<sup>58</sup> na elucidação de mecanismos reacionais a técnica não se aplica a reações que geram, como intermediários, espécies neutras (*zwitterion*) e, embora a modificação do meio reacional pela alteração do pH favoreça a formação de espécies carregadas, a adição de ácido/base tende a interferir no caminho reacional, podendo levar a falsas conclusões sobre o mecanismo reacional.

A utilização de marcadores de carga (*charge tags*), também chamados de etiquetas de carga, vem superando essa limitação e ampliando o uso da técnica de ESI-MS(/MS) para tais reações.<sup>59</sup> A inserção de estruturas carregadas, ou sua geração *in situ*, ligadas

covalentemente e preferencialmente a regiões não reativas das moléculas dos reagentes, favorecem a detecção e caracterização da maioria, ou da totalidade, das espécies reacionais formadas no meio reacional, principalmente dos intermediários-chave que sem a etiqueta de carga podem não ser detectados devido a sua baixa abundância ou natureza transiente.

## Objetivos

1. A investigação do mecanismo reacional da RMC Petasis-boronic Mannich - tema pouco abordado na literatura e que, até o desenvolvimento deste trabalho, não possuía uma abordagem empírica voltada especificamente ao tema - utilizando:
  1. Espectroscopia de massas para a investigação dos intermediários gerados no curso da reação;
  2. Técnica de marcadores de carga (*charged tag*) para evitar a formação de espécies intermediárias neutras;
  3. Cálculos teóricos para otimização da geometria, energia e estados de transição.
2. Investigação direta da atividade citotóxica (inibição do fuso mitótico celular) de novas DHPM's fluorescentes, utilizando-se:
  1. Da síntese de precursores fluorescentes, baseados no núcleo benzotriazol (BTD);
  2. A RMC de Biginelli para a obtenção de novas DHPM's, racionalizadas a partir do monastrol;
  3. A avaliação citotóxica em linhagens de células cancerígenas MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano);
  4. A análise em microscopia confocal para o imageamento celular.

## Materiais e Métodos

- ❖ As reações e procedimentos químicos foram realizados no Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília – LaQuiMeT/UnB;
- ❖ Os solventes e reagentes foram adquiridos de fontes comerciais (Aldrich, Merck e Vetec) e, quando necessários, tratados/purificados/secos segundo procedimentos descritos específicos.<sup>60</sup>;
- ❖ Análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em placas de sílicagel suportadas em alumínio 60F<sub>254</sub>/02 mm (Merck), utilizando como reveladores: luz ultravioleta, iodo e solução de vanilina sulfúrica;
- ❖ Os produtos obtidos foram purificados por cristalização/cromatografia em coluna utilizando silicagel 60 (0,05 0,2 mm) como fase estacionária, e acetato de etila em hexano, em concentrações variáveis, como fase móvel;
- ❖ Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetros Varian Mercury Plus (300 MHz, 7.05T), utilizando como solvente CDCl<sub>3</sub> e DMSO. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ), com referência ao TMS (δ = 0 ppm), e os padrões de acoplamentos definidos por: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), m (multiplete), dd (duplo duplete), td (triplo duplete), dt (duplo triplete) e bl (banda larga);
- ❖ Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o programa ACD labs;
- ❖ Os nomes dos compostos apresentados, bem como suas estruturas, foram obtidos utilizando-se o programa ChemBioOffice 2011.
- ❖ Os ensaios biológicos foram realizados no Instituto de Biologia da Universidade de Brasília – IB/UnB sob a supervisão do prof. Dr. José Raimundo Corrêa;
- ❖ As análises e processamento dos dados de imageamento celular foram realizados pelo prof. Dr. José Raimundo Corrêa, utilizando microscópio confocal Leica TCS-SP5.

## Experimento de Espectroscopia de Massas:

As análises foram realizadas no laboratório ThoMSon-Unicamp (Thomson Mass Spectrometry Laboratory) em colaboração com a Dr.<sup>a</sup> Giovana A. Bataglione e sob a supervisão do prof. Dr. Marcos N. Eberlin (coordenador do grupo ThoMSon) utilizando-se o sistema Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS, constituído por uma fonte ESI e a analisador híbrido quadrupolo/TOF. As condições utilizadas para a fonte de ionização foram: temperatura de gás 280°C, gás de secagem a 11 L.min.<sup>-1</sup>, nebulizador a 30 psi, gás de cobertura a 300°C, gás de fluxo a 12 L.min.<sup>-1</sup>, Vcap a 3000 V. Aliquotas de 10 µL, coletadas no decurso da reação, diluídas em 1 mL de metanol, foram utilizadas na aquisição dos dados espectroscópicos, no modo positivo, abrangendo a escala de  $m/z$  100 a 1000. Para as análises de MS/MS os íons de interesse foram selecionados no analisador quadrupolar e transferidos para a célula de colisão (com energia variando de 10 a 40 V dependendo do padrão de fragmentação do íon de interesse) seguindo para o analisador TOF, com a escala ajustada até  $m/z$  50 acima do íon precursor. Os dados foram obtidos e analisados utilizando-se o software Agilent MassHunter (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

## Cálculos Teóricos:

Todos os cálculos, realizados pelo prof. Dr. Davi A. C. Ferreira, do Instituto de Química da Universidade de Brasília – IQ/UnB, foram baseados na Teoria de Densidade Funcional (DFT), utilizando-se o funcional PBE1PBE combinado a base cc-pVDZ para otimização da geometria molecular. Para a otimização dos estados de transição utilizou-se o algoritmo de Berny. Todas as estruturas foram otimizadas e os cálculos de frequência foram realizados de modo a garantir a ausência de quaisquer frequências imaginárias em mínimos locais e apenas a presença de uma única frequência imaginária nos estados de transição. A energia vibracional do ponto zero (ZPVE) foi calculada a 298,15 K e 1 atm. Para o cálculo das estruturas utilizou-se o metanol como meio reacional, empregando o tratamento explícito investigação do solvente do mecanismo reacional. Os cálculos eletrônicos e de geometria molecular foram realizados utilizando-se o software Gaussian 09.

## **i. Procedimentos Sintéticos**

Condição reacional para a RMC Petasis Borono-Mannich:

Reação 1: salicilaldeído, morfolina e ácido (4-formilfenil)borônico;

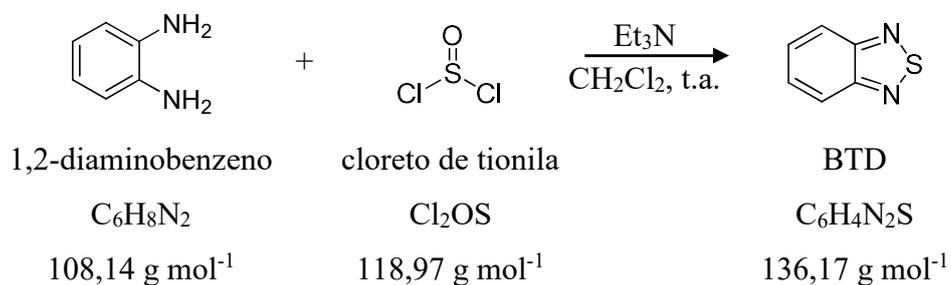
Reação 2: 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído, morfolina e ácido (4-formilfenil)borônico;

Reação 3: salicilaldeído, benzilamina e ácido (4-formilfenil)borônico;

Reação 4: -(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído, benzilamina e ácido (4-formilfenil)borônico.

A mistura reacional, empregando-se as reações de 1-4, foi preparada diluindo-se 0,25 mmol de cada reagente (1:1:1) em 2,5 mL de metanol (ou tolueno). A solução metanólica foi aquecida a 65°C (90°C para o tolueno) durante 4 horas, período em que foram coletadas alíquotas (1 µL para 1 mL do mesmo solvente utilizado para a reação, metanol ou tolueno) para análise ESI(+)-MS(/MS). A reação 3, em metanol, apresentou a formação de cristais suscetíveis a análise de raio-X.

### Síntese do composto 2,1,3-benzotiadiazola (BTD)



Em um balão de 2 L foram diluídos, a temperatura ambiente, 30 g de 1,2-diamina (0,278 mol) e 155 mL de  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,113 mol) em 1 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Após a adição gota-a-gota de 40 mL (0,551 mol) de  $\text{SOCl}_2$ , o sistema reacional foi mantido sob refluxo por um período de 8 horas.

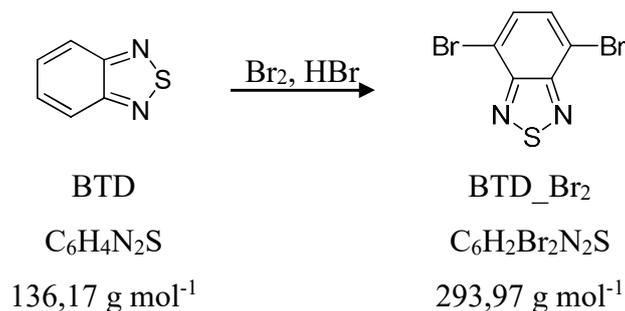
A mistura reacional foi concentrada em rotaevaporador, diluída em 700 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e acidificada com  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  até atingir  $\text{pH} = 2$ , em seguida, realizou-se a destilação por araste de vapor. A fase aquosa obtida foi submetida à extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 x 250 mL), seca com  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e concentrada em rotaevaporador, fornecendo 26,81 g (71%) de um sólido de cor branca, caracterizado como o composto BTD.

P.F. ( $^{\circ}\text{C}$ ) = 42 - 44

RMN  $^1\text{H}$  [600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (multiplicidade)]: 8,01 (d, 9,90 Hz, 0,99); 7,58 (d, 9,90 Hz, 1,00).

RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 154,8; 129,3; 121,5.

Síntese do composto 4,7-dibromo-2,1,3-benzotiadiazola (BTD\_Br<sub>2</sub>)



Em um balão de 2 bocas, de 1 L de capacidade, acoplado a um condensador e um funil de adição (contendo uma mistura de 15 mL g de Br<sub>2</sub> em 130 mL de HBr) adicionou-se 150 mL de HBr conc e diluiu-se 13,0 g (95,5 mmol) de BTD. A mistura reacional foi levada à temperatura de refluxo para, em seguida, adicionar (gota-a-gota durante um intervalo de 1 hora) a solução contida no funil de adição. Outros 130 mL de HBr foram adicionados e o refluxo mantido por 8 horas, observando-se gradativa deposição de um sólido nas paredes do balão. Atingido a temperatura ambiente, adicionou-se NaHSO<sub>3</sub> para reagir com o Br<sub>2</sub> em excesso.

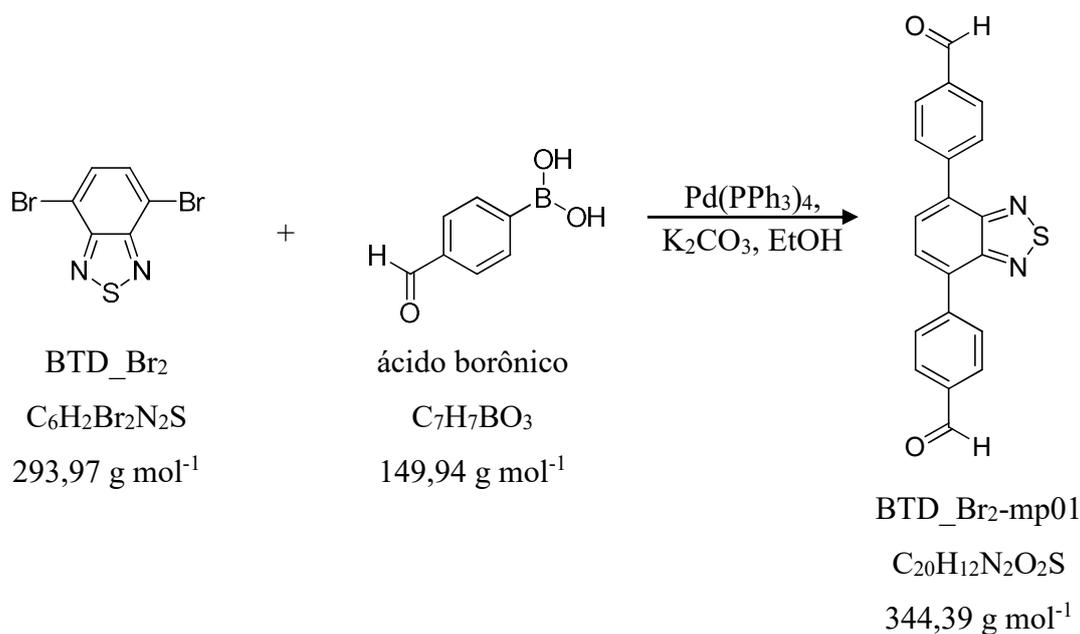
A mistura reacional foi filtrada e a parte sólida obtida lavada exaustivamente com H<sub>2</sub>O e uma vez com 50 mL de acetona (fria), resultando em 26,5 g (94%) de um sólido de cor amarela, caracterizado como o produto BTD\_Br<sub>2</sub>.

P.F. (°C) = 187 – 188

RMN <sup>1</sup>H [600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (multiplicidade)]: 7,72 (s, 2,00).

RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 152,9; 132,3; 113,9

Síntese do composto 4,4'-(benzoil[c][1,2,5]tiadiazol)dibenzaldeído (BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01)



Em tubo schlenk sob aquecimento (80°C), posto sob agitação e atmosfera inerte, 0,516 g (1,76 mmol) de BTD\_Br<sub>2</sub>, 1,087g (6,63 mmol) do ácido borônico, 1,276 g (9,25 mmol) de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 0,052 g de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> reagiram, em 10 ml de etanol, por 24 horas. A mistura reacional possuía, inicialmente, coloração castanha e no decorrer do tempo observou-se gradativa formação de sólido de cor amarela, apresentando coloração azul sob comprimento de onda de 366 nm.

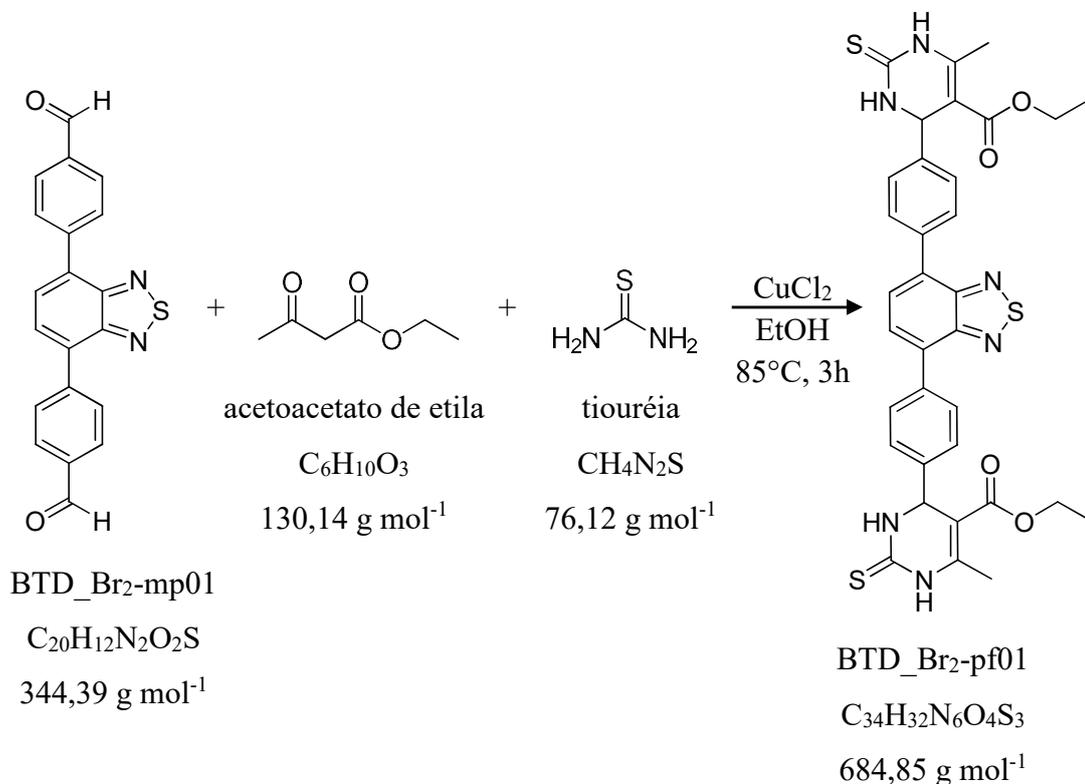
A mistura reacional foi diluída em água (70 mL) e extraída com acetato de etila (4 x 25 mL). As frações orgânicas foram reunidas, secadas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentradas em evaporador rotatório, fornecendo 275,9 mg (46 %) de um sólido de cor amarela, apresentando coloração azul quando visto sob comprimento de onda de 366 nm, caracterizado como sendo composto BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01.

P.F. (°C) = 243 - 245

RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (multiplicidade, J, integral)]: 10,14 (s, 1,09); 8,18 (d, 8,07 Hz, 2,07); 8,09 (d, 8,07 Hz, 2,09); 7,92 (s, 1,00).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 191,8; 153,8; 142,9; 136,0; 133,0; 130,0; 129,9; 128,7.

Síntese do composto dietil 4,4'-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-4,7-bis(4,1-fenileno))bis(6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato). (BTD\_Br<sub>2</sub>\_pf01)



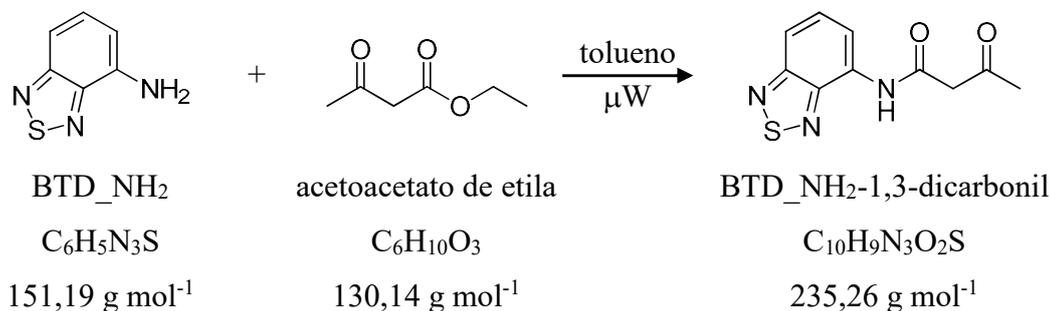
Em tubo schlenk sob aquecimento (85°C), agitação e atmosfera inerte, 182,7 mg (0,53 mmol) do aldeído BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01, 152,3 mg (2,00 mmol) de tiouréia e 16,7 mg (23 mol %) de CuCl<sub>2</sub>, reagiram com 529,0 mg (4,07 mmol) de acetoacetato de etila por 3 horas. O precipitado formado no decurso da reação foi filtrado e lavado com etanol, fornecendo 78,1 mg (21,5%) de um sólido de cor amarela e coloração verde quando visto sob comprimento de onda de 366 nm, caracterizado como o composto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01.

P.F. (°C) = 258 - 260

RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, DMSO, δ (multiplicidade, J, integral)]: 10,45 (bl, 0,89); 9,81 (bl, 0,81); 7,99 (d, 8,21 Hz, 2,00); 7,95 (s, 0,87); 7,41 (d, 8,21 Hz, 1,93); 5,29 (d, 3,52 Hz, 0,80); 4,07 (t, 7,07 Hz, 1,52); 2,34 (s, 2,88); 1,16 (t, 7,03 Hz, 3,00)

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO, δ): 174,2; 165,2; 153,4; 145,3; 143,4; 142,0; 136,3; 132,0; 129,5; 128,3; 126,6; 100,7; 59,8; 17,3; 14,1.

Síntese do composto N-(benzo[c][1,2,5]tiadiazol-3-oxobutanamida (BTD\_NH<sub>2</sub>-1,3-dicarbonil)



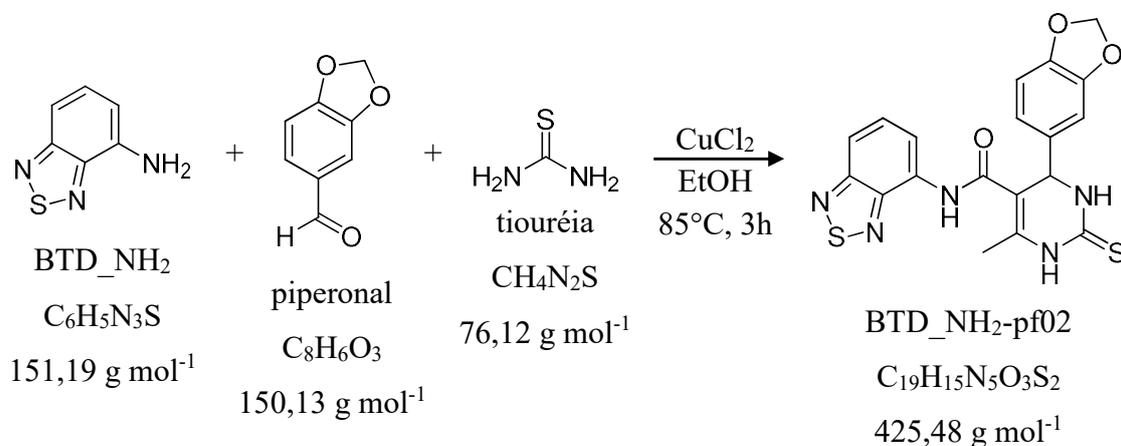
Em um frasco de 30 mL contendo 5 mL de tolueno, 151,0 mg (1,00 mmol) da BTD\_NH<sub>2</sub> e acetoacetato de etila (10 eq.) reagiram a 110°C por 1,5h em equipamento de micro-ondas. A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotatório e purificada em coluna cromatográfica, utilizando-se sílica gel 70-230 mesh como fase estacionária e solução de acetato de etila em hexano (20%) como fase móvel, obtendo-se 98,0 mg (41,7%) de um sólido amarelo, caracterizado como o composto BTD\_NH<sub>2</sub>-1,3-dicarbonil.

P.F. (°C) = 98 - 100

RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ (multiplicidade)]: 10,24 (bl, 0,73); 8,32 (d, 7,33 Hz, 1,00); 7,57 (d, 8,79 Hz, 0,95); 7,46 (dd, 7,33, 8,79 Hz, 1,00); 3,67 (s, 1,92); 2,31 (s, 2,73).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ): 204,6; 164,9; 154,6; 147,8; 130,7; 129,5; 116,1; 115,3; 49,7; 31,2.

Síntese do composto *N*-(benzo[*c*][1,2,5]tiadiazol-4-il)-4-(benzo[*d*][1,3]dioxo-5-il)-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxamida (BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02)



Em um tubo schlenk sob aquecimento (85°C), agitação e atmosfera inerte, reagiu-se 58,3 mg (0,25 mmol) de BTD\_NH<sub>2</sub>-mp01, 38,9 mg (0,26 mmol) de piperonal, 20,1 mg (0,28 mmol) de tiouréia e 4,7 mg (14 mol %) de CuCl<sub>2</sub> por 3 horas. O precipitado formado no decurso reacional foi filtrado e lavado com etanol, fornecendo 19,7 mg (18,5%) de um sólido de cor amarela caracterizado como sendo o composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02.

P.F. (°C) = 125 - 127

RMN <sup>1</sup>H [300 MHz, DMSO, δ (multiplicidade)]: 10,14 (bl, 0,98); 9,88 (bl, 0,92); 9,54 (bl, 0,90); 8,12 (d, 7,34 Hz, 0,98); 7,78 (d, 8,80 Hz, 1,02); 7,66 (dd, 8,80 7,34 Hz, 0,96); 6,92 (m, 2,98); 5,99 (s, 2,00); 5,41 (s, 2,93 Hz, 0,99); 2,27 (s, 2,86).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO, δ): 173,6; 165,1; 154,6; 148,5; 147,6; 147,0; 138,6; 136,7; 130,9; 130,3; 120,3; 117,5; 116,1; 108,3; 107,3; 105,9; 101,1; 56,0; 54,9; 18,6; 17,0.

## ii. Ensaio Biológico

Cultura celular:

As linhagens de célula cancerígena, MCF-7 (mama adenocarcinoma humano), foram mantidas em meio de cultura apropriado, suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina a 100IU/mL e estreptomicina a 100 mg/mL, atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C, conforme recomendações da ATCC (American Type Culture Collection).

Ensaio de viabilidade celular:

As células de MCF-7 foram semeadas por um período de 24 horas, empregando-se separadamente soluções contendo as dihidropirimidinas (DHPM's) BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 e BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02 em concentrações de 16; 31; 62; 125; 250; 500 e 1000 µM. As análises foram realizadas utilizando-se o método MTT padrão (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2-5-difeniltetrazol) em conformidade com as recomendações do fabricante (R&D System Inc, MN, USA).

Inicialmente, 3x10<sup>3</sup> células foram cultivadas em placa de 96 poros e mantidas a 37°C durante a noite. As amostras foram incubadas com as DHPM's por um período de 24 horas, utilizando-se como controle negativo o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e o meio de cultura padrão como controle positivo. Após 24 horas de incubação, as soluções contendo as DHPM's foram removidas e substituídas por 150 µL de solução MTT (0,5 mg/mL), deixando o meio de cultura no escuro, a 37°C, por 4 horas. A atividade metabólica das células reduz o MTT, transformando-o em cristais insolúveis de coloração roxa, que se acumulam no citoplasma celular. Em seguida, retira-se a solução de MTT e adiciona-se 200 µL de DMSO a todas as amostras para solubilizar os cristais formados pela redução do MTT. A leitura da placa de poros é feita em um espectrofotômetro (Spectramax M5 – Molecular, Devices, CA, USA) utilizando-se comprimento de onda de 570 nm. O ensaio MTT foi realizado em triplicata e de forma independente.

A inibição da viabilidade celular é determinada comparando-se a evolução dos resultados de MTT para as amostras testadas, com os valores observados nas amostras de controle, e expresso de acordo com a fórmula: [sobrevivência % = [(amostra testada-branco)/(amostra de controle-branco)] x 100. Os resultados foram submetidos a One-way

ANOVA com pós teste de Dunnett utilizando-se GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego CA, USA).

#### Ensaio de Fluorescência:

As células foram semeadas em lamelas de vidro redondas de 13 mm no fundo de uma placa de 24 poços, deixadas a aderir durante a noite e lavadas três vezes com meio isento de soro para remoção das células não aderidas. Após a confluência, as células foram separadas em duas amostras - vivas e fixadas. As amostras vivas foram incubadas durante 30 minutos em soluções de 250  $\mu$ M de BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 ou BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02 a 37°C. Essa concentração otimizada foi obtida a partir dos resultados do ensaio de viabilidade. As amostras foram lavadas três vezes com PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e fixadas em formaldeído a 3,7% durante 30 minutos. As amostras foram novamente lavadas, três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e as lamelas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando ProLong Gold Antifade (Invitrogen, OR, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras fixas foram primeiro lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) e depois fixadas em formaldeído a 3,7% durante 30 minutos. Após o procedimento de fixação as amostras foram lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e incubadas durante 30 minutos em 250  $\mu$ M de BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 ou BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02 à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas três vezes em PBS 1X (pH 7,4) à temperatura ambiente e as lamelas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando ProLong Gold Antifade (Invitrogen, OR, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O controle negativo foi realizado por incubação das amostras em 1% de DMSO (dimetilsulfóxido), que foi o diluente utilizado.

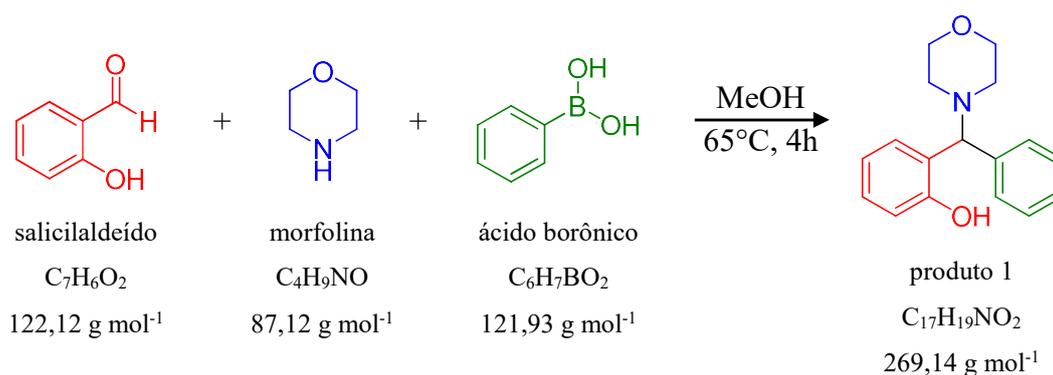
As amostras foram analisadas em microscópio Leica Confocal TCS SP5 utilizando-se emissão de laser em comprimento de onda de 488 nm para excitação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes para cada amostra e condição experimental.

### Análise de fuso mitótico por $\alpha$ -tubulinas imunocarcadas:

Alíquotas de  $7 \times 10^4$  células MCF-7 foram semeadas em lamelas de vidro redondas de 13 mm e colocadas na base de cada poço de uma placa de 24 poços. Após a adesão, as células foram tratadas durante 48 h com o BTD\_NH<sub>2</sub>-fp02 a 250  $\mu$ M ou tratadas com o BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 a 1 mM. As amostras incubadas apenas em meio de cultura padrão, no mesmo período de tempo, foram utilizadas como controle negativo. As células foram lavadas três vezes em PBS, fixadas com formaldeído a 3,7%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% e bloqueadas em PBS suplementado com leite desnatado a 1%, albumina de soro bovino (BSA) a 2,5% e soro bovino fetal (FBS) a 8% a temperatura ambiente. As células foram incubadas durante a noite com anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina de rato (1: 500) a 4 ° C, seguido por incubação com anticorpo secundário: Alexa Fluor 488 de coelho e anti-rato IgG (1: 400), durante 1 hora a 37 ° C. Os núcleos foram corados com 300 nM de DAPI. Os lamínulas foram montados sobre lâminas de vidro ProLong Gold Antifade e os espécimes foram observados sob microscópio confocal de varredura a laser.

## Capítulo 1: Investigações Sobre o Mecanismo Reacional da Reação Petasis Borono-Mannich

Inicialmente, para observação dos possíveis intermediários formados durante a reação PBM, analisou-se a reação entre o salicilaldeído, a morfolina e ácido fenilborônico em metanol (Esquema 14). Empregando-se o salicilaldeído pelo fato de aldeídos contendo o grupo  $\alpha$ -hidróxi favorecerem a reação PBM por formarem complexos com os ácidos borônicos.<sup>43</sup>



Esquema 14. Reação PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em etanol para análise *via* ESI(+)-MS(/MS).

A primeira alíquota analisada *via* ESI(+)-MS (coletada após 5 minutos do início do período reacional) evidenciou a presença de cinco espécies na mistura reacional, os íons  $m/z$  88, 164, 183, 196 e 270, sendo as espécies de  $m/z$  88 e 270 correspondentes a forma  $[M-H]^+$  do reagente morfolina e do produto da reação, respectivamente (Figura 7).

O padrão de fragmentação da espécie  $m/z$  270 confirma a estrutura do produto obtido pela presença da espécie  $m/z$  88 (morfolina  $[M-H]^+$ ) e do resíduo  $m/z$  183, formados pela quebra da ligação N-C (Figura 8). Os íons de  $m/z$  164 e 196 se inter-relacionam pela perda de uma molécula de solvente (metanol, 32 Da), sendo a espécie  $m/z$  196 constituída por uma interação supramolecular entre uma molécula de metanol e a espécie  $m/z$  164 (um subproduto formado pela reação entre a morfolina e o ácido borônico) conforme observado *via* ESI(+)-MS/MS do íon 196 (Figura 9).

Embora o produto da reação tenha sido observado, e elucidado *via* ESI(+)-MS/MS, nenhum intermediário reacional foi detectado ao longo do curso reacional. Alíquotas posteriores apenas evidenciaram a intensificação dos sinais referentes ao produto ( $m/z$  270) e seu fragmento constituinte ( $m/z$  183), Figura 10.

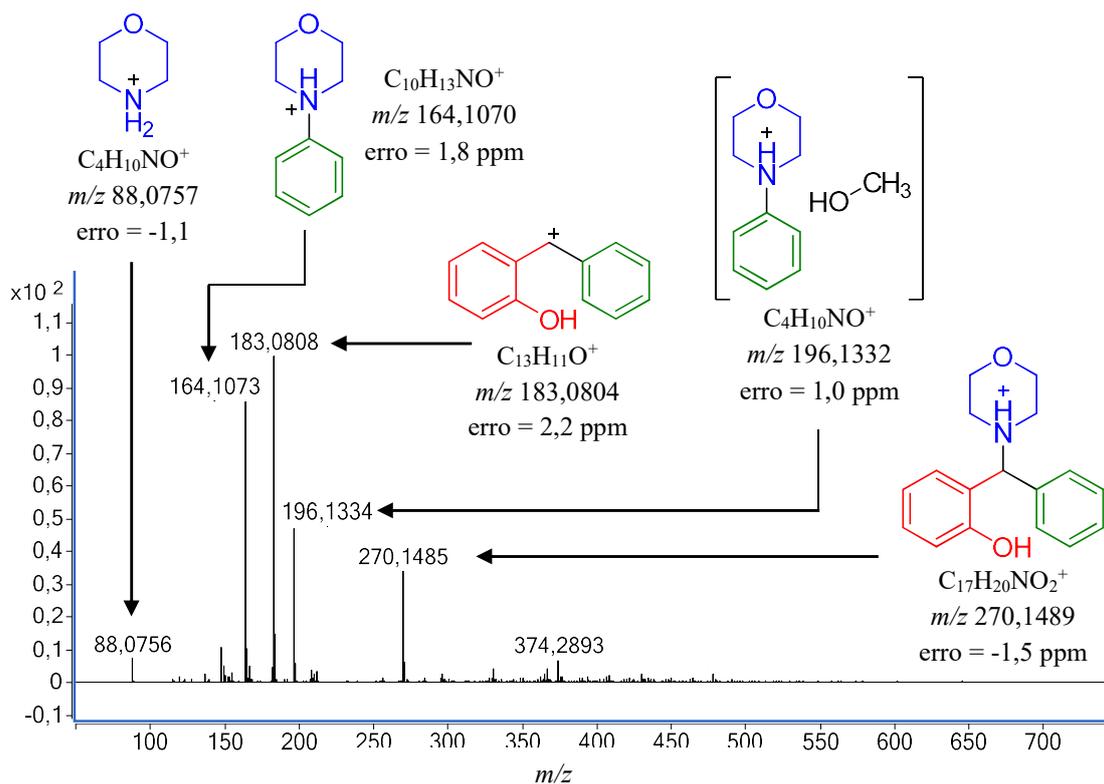


Figura 7. Espécies observadas, *via* ESI(+)-MS, na reação PBM utilizando salicinaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Aliquota coletada após 5 min. do início do período reacional.

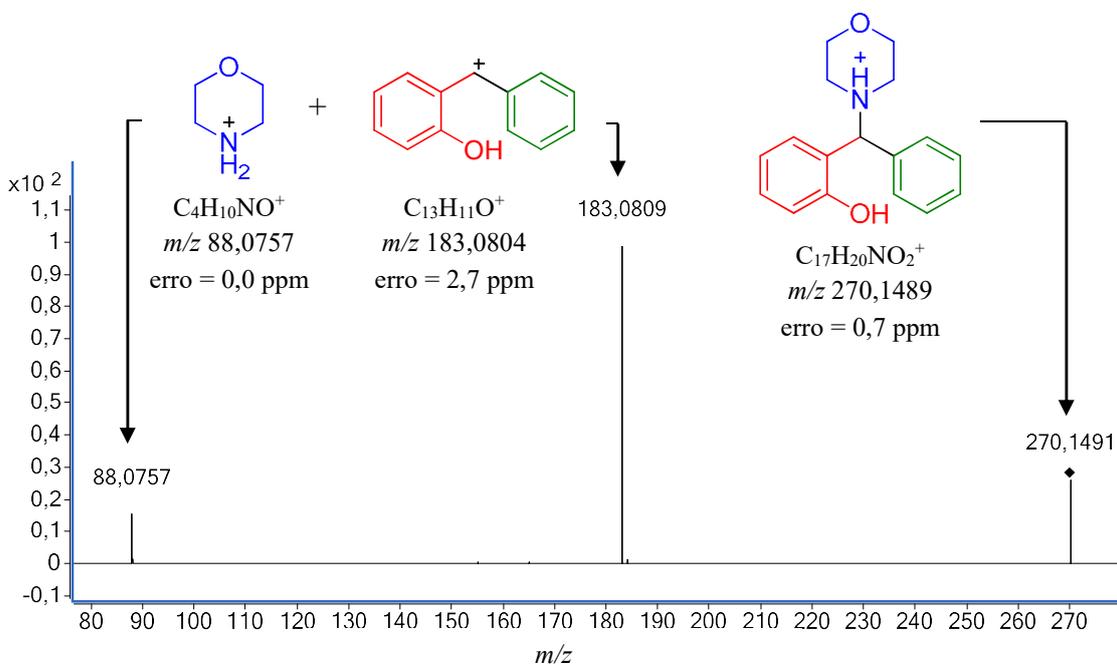


Figura 8. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do produto da reação ( $m/z$  270) PBM utilizando salicinaldeído, morfolina e ácido borônico.

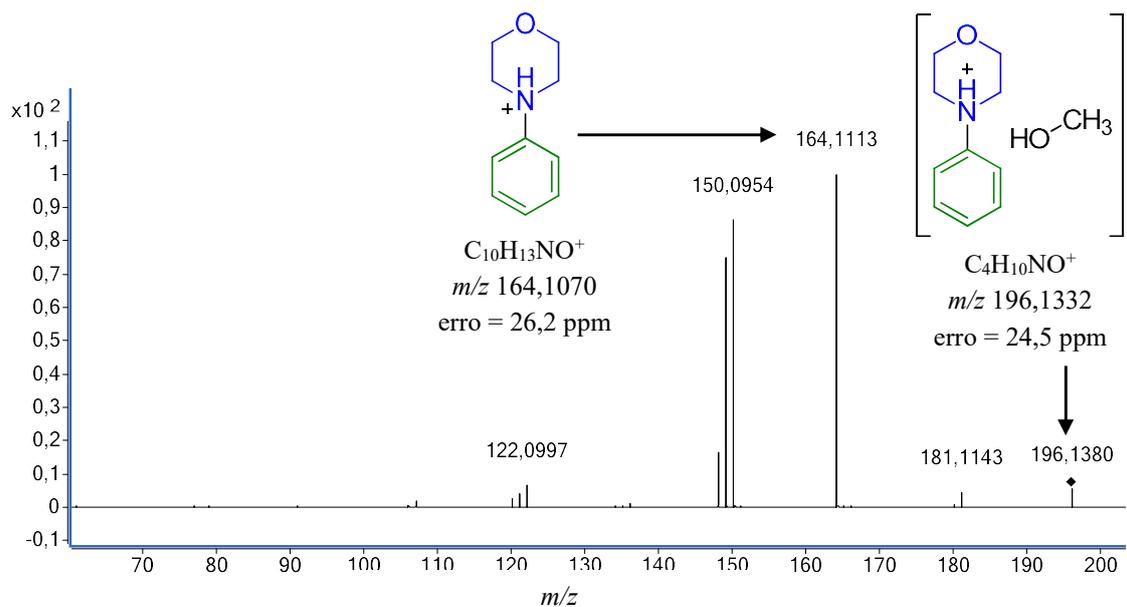


Figura 9. ESI(+)-MS/MS evidenciando o padrão de fragmentação da espécie supramolecular  $m/z$  196, formada pelo subproduto  $m/z$  164 e MeOH.

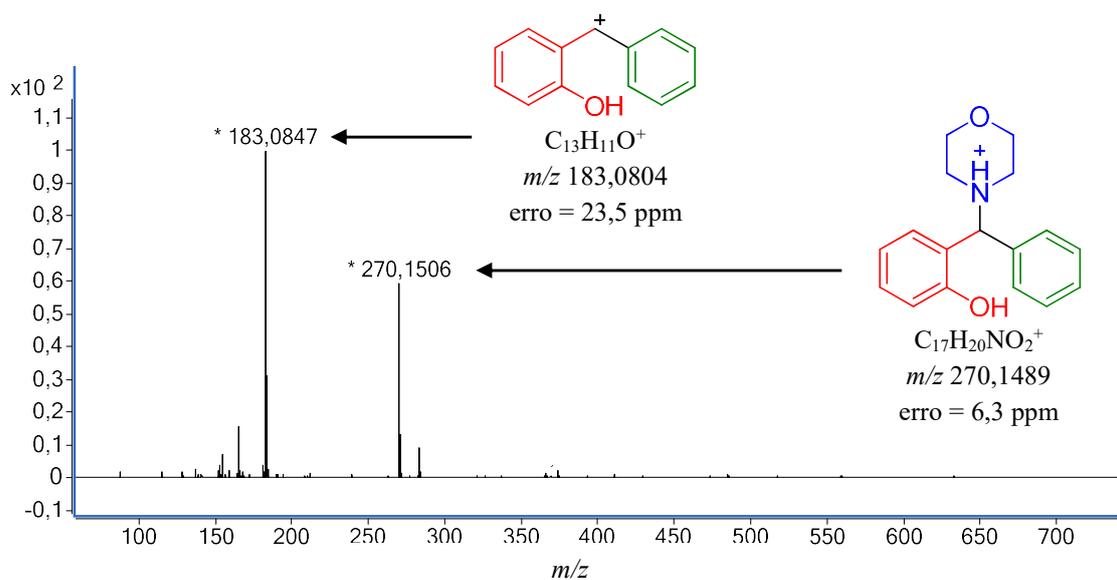
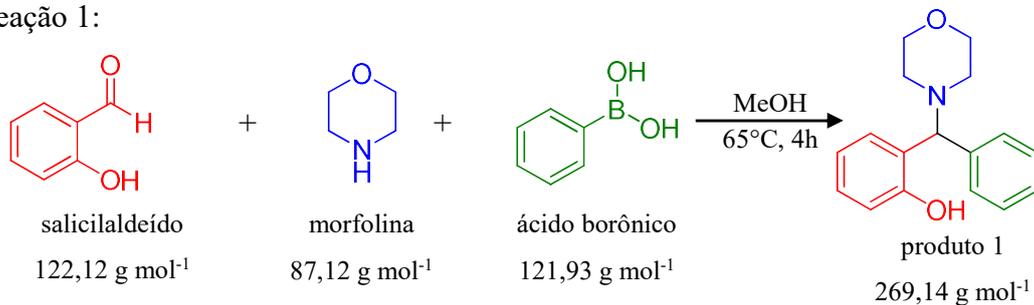


Figura 10. ESI(+)-MS da reação PBM utilizando salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Nenhum intermediário reacional detectado ao longo do período reacional. Aliquota coletada após 60 min. do início do período reacional.

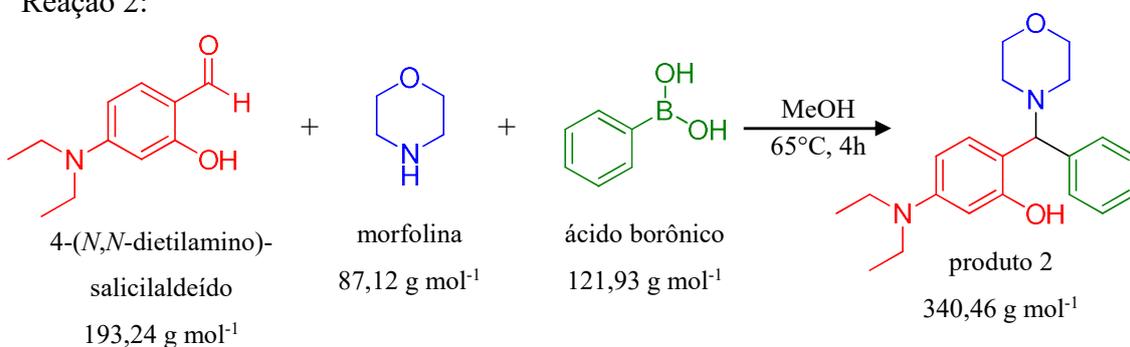
Assim, na tentativa de interceptar os possíveis intermediários envolvidos na reação PBM que levaram a formação do produto 1 (Esquema 14), utilizou-se da técnica

de etiquetas de cargas (*charged-tags*), substituindo o salicilaldeído pelo composto 4-(*N,N*-dietil)-salicilaldeído (Esquema 15).

Reação 1:



Reação 2:



Esquema 15. Reações PBM para análise via ESI(+)-MS(/MS). Acima: reação entre o salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Abaixo: modificação utilizando o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga.

A presença do grupo amino a estrutura do salicilaldeído potencializa a análise *via* ESI(+)-MS(/MS) ao proporcionar uma região susceptível a formação de cargas (íon amônio) evitando a formação de espécies neutras (zwitteriônicas), essenciais ao curso reacional que não foram detectadas anteriormente.

Decorridos 5 minutos do início da reação, a análise *via* ESI(+)-MS evidenciou a presença de duas espécies no meio reacional: o íon  $m/z$  194 referente ao aldeído marcado (forma  $[\text{M}-\text{H}]^+$ ) e o íon  $m/z$  263 (Figura 11).

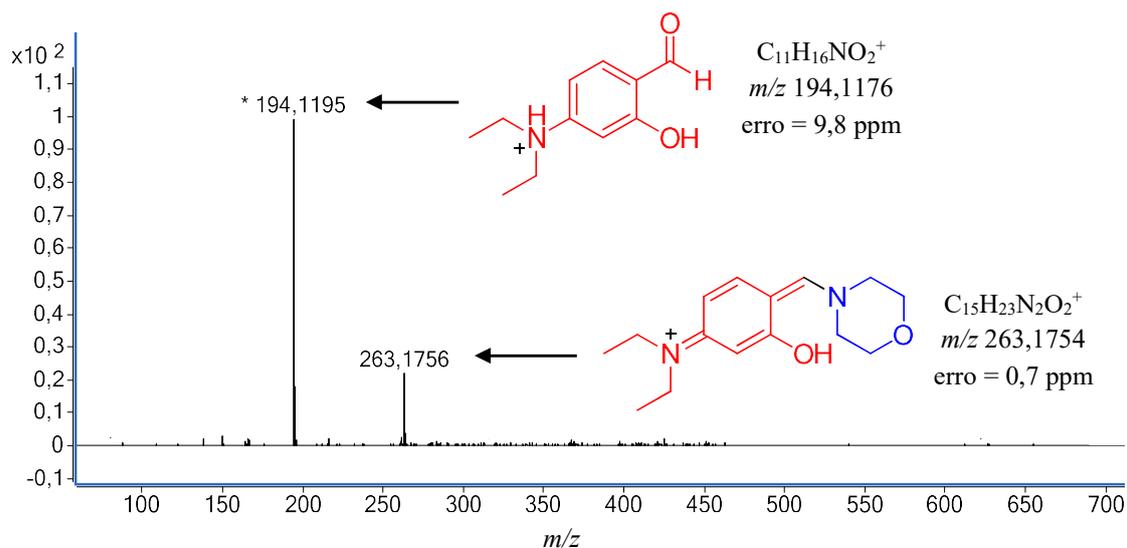
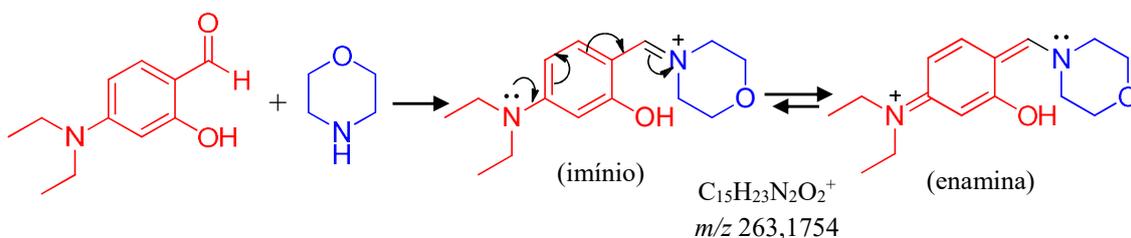


Figura 11. Espécies observadas, *via* ESI(+)-MS, na reação PBM utilizando o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído, morfolina e ácido borônico em metanol. Aliquota coletada após 5 min. do início do período reacional.

A espécie *m/z* 263 corresponde ao intermediário formado pela reação entre o aldeído marcado (4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído) e a morfolina, (Esquema 16), com sua estrutura determinada pela análise do padrão de fragmentação do íon *m/z* 263 (Figura 12).



Esquema 16. Reação entre 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído e morfolina para formação do intermediário imínio e sua conversão a enamina devido a presença do grupo 4-(*N,N*-dietilamino).

Embora a inserção do aldeído marcado tenha possibilitado a interceptação deste intermediário reacional (*m/z* 263), alíquotas retiradas ao longo do período reacional não evidenciaram a formação de outras espécies.

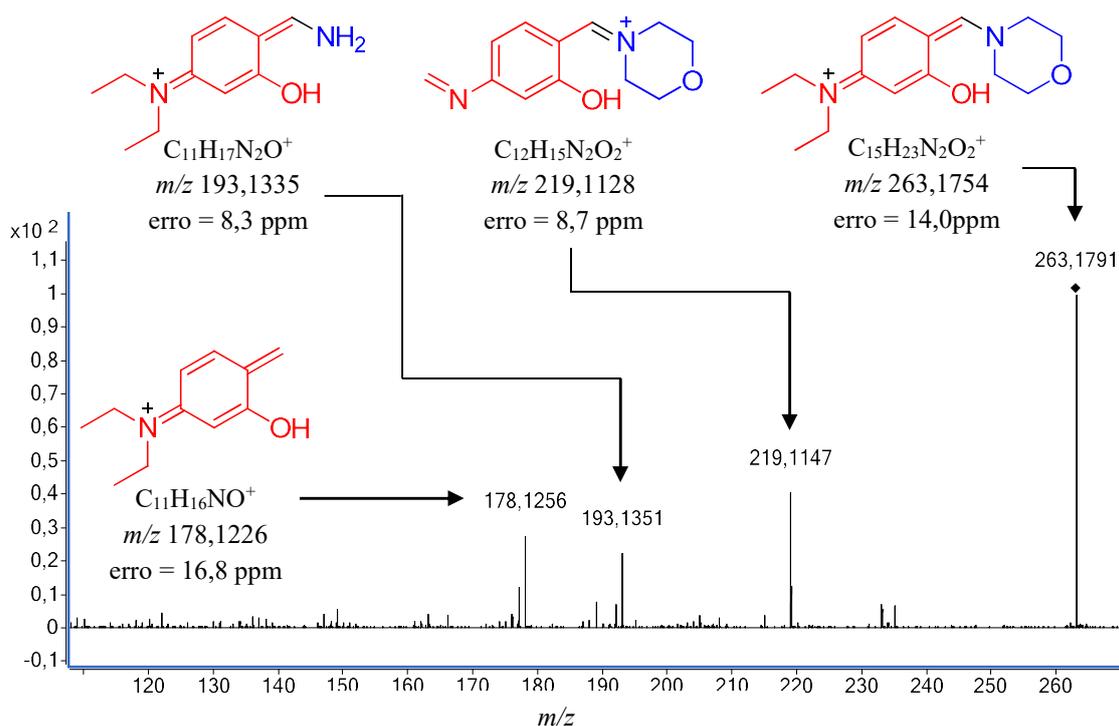
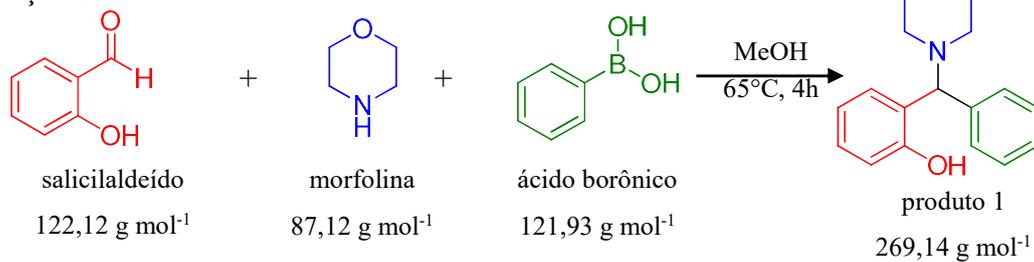


Figura 12. ESI(+)-MS/MS evidenciando o padrão de fragmentação da espécie  $m/z$  293, formada pela reação entre o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído e a forfolina.

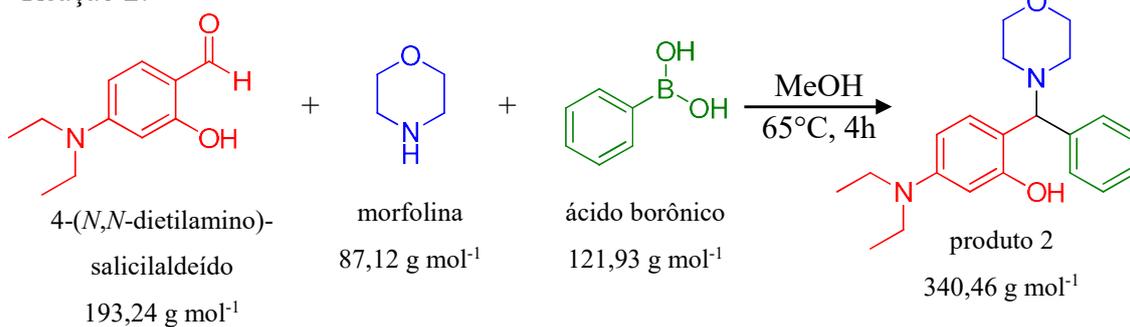
Para ampliar o escopo de observação, realizou-se uma segunda modificação a reação proposta no Esquema 14, a substituição da morfolina pela benzilamina (Esquema 17), valendo-se do fato de aminas secundárias serem mais reativas do que as aminas primárias (como previamente descrito no Esquema 11, pág. 11), possibilitando, a princípio, a formação de mais espécies no meio reacional susceptíveis a análise via ESI(+)-MS(/MS).

A primeira alíquota analisada (coletada após 5 minutos do início da reação) evidenciou a presença de uma única espécie no meio reacional. Este intermediário, com  $m/z$  212, é formado pela reação entre o salicilaldeído e a benzilamina (e perda de uma molécula de  $H_2O$ ) fornecendo o íon imínio. O padrão de fragmentação da espécie  $m/z$  212, *via* ESI(+)-MS/MS, confirma a estrutura do íon imínio pela presença do íon tropílio ( $m/z$  91) e consequente perda da espécie neutra 121 Da, devido a clivagem da ligação sigma C-N (Figura 13), um primeiro intermediário reacional análogo ao íon  $m/z$  263 observado na reação 2 (Figura 11, pág. 32).

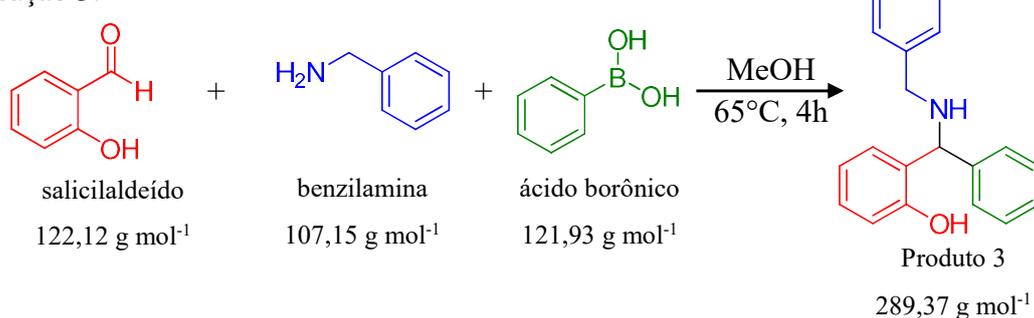
Reação 1:



Reação 2:



Reação 3:



Esquema 17. Reações PBM para análise via ESI(+)-MS(/MS). Reação 1: salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Reação 2: modificação utilizando o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. Reação 3: salicilaldeído, benzilamina e ácido fenil borônico.

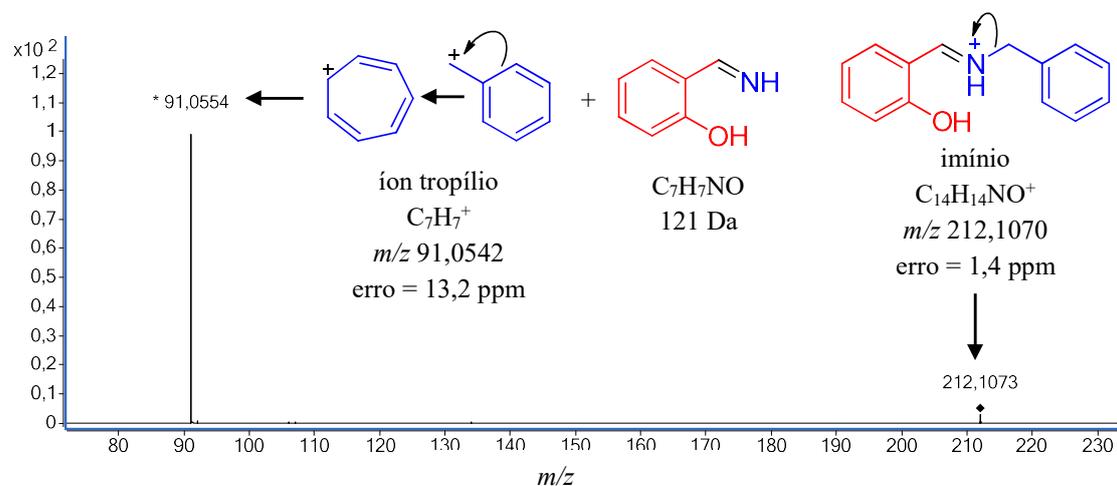
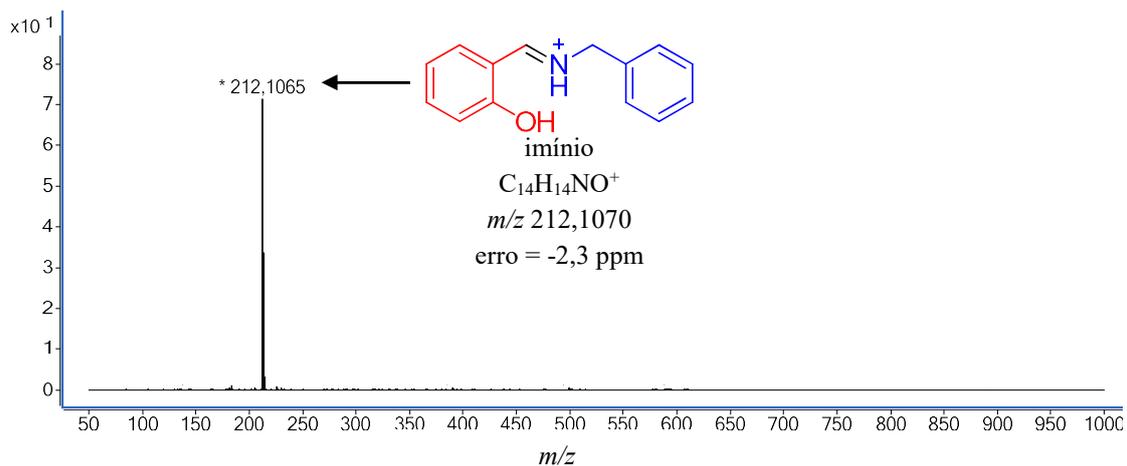
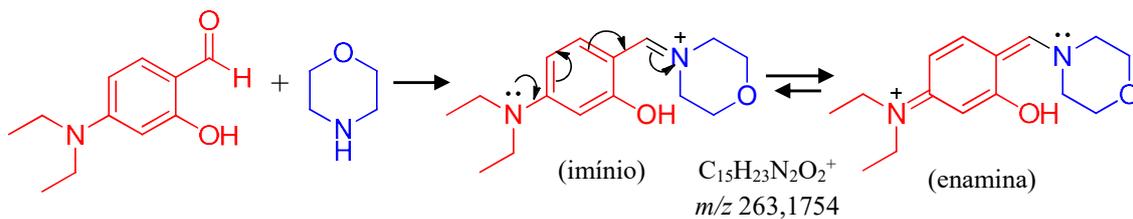
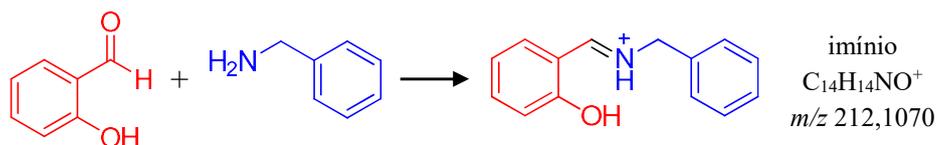


Figura 13. Acima: ESI(+)-MS da reação 3 evidenciando a presença do íon  $m/z$  212, alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional. Abaixo: padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon imínio.

Reação 2:



Reação 3:



Esquema 18. Formação do íon imínio nas reações: 2) partir do 4-(N,N-dietilamino)-salicilaldeído e morfolina. 3) salicilaldeído e benzilamina.

Na alíquotas coletada após 30 minutos do início do período reacional, observa-se a presença de novas espécies no meio reacional, os íons  $m/z$  298, 330, 352 e 509 conforme apresentado na Figura 14.

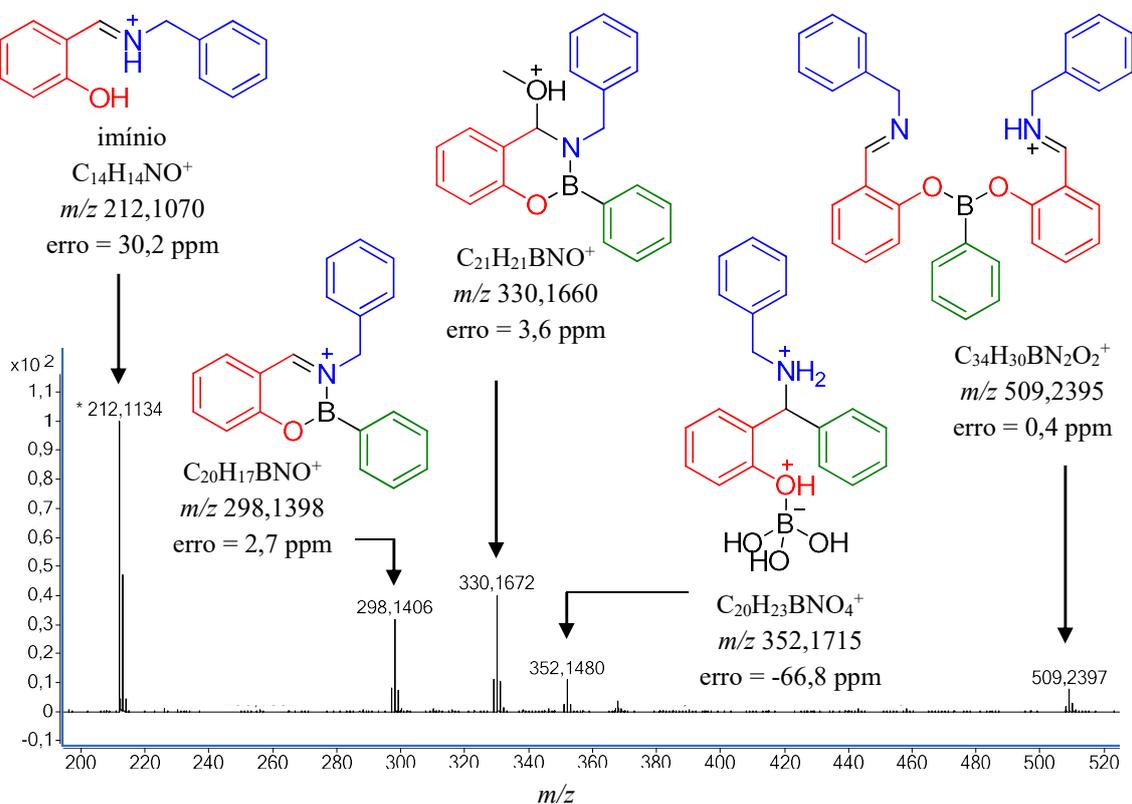


Figura 14. Espécies observadas, ESI(+)-MS, na reação 3 (salicinaldeído, benzilamina e ácido borônico). Alíquota coletada após 30 min. do início do período reacional

As espécies  $m/z$  330 e 298 apresentam o padrão isotópico do átomo de boro (sinal  $[M - 1]^+$  com intensidade relativa de 1/3 ao sinal  $[M]^+$ ) e, conforme observado no padrão de fragmentação do íon  $m/z$  330, se inter-relacionam pela perda de uma molécula de solvente (metanol, 32 Da).

Consistindo em um derivado direto da espécie  $m/z$  330, o padrão de fragmentação do íon  $m/z$  298 (formação do íon tropílio e perda do resíduo 207 Da, devido a clivagem da ligação sigma C-N) possibilita a proposição das estruturas apresentadas para os intermediários  $m/z$  330 e 298 (Figura 14) que, notadamente, apresentam um anel de seis membros (contendo os átomos de oxigênio, nitrogênio e boro) formado pela ligação do átomo de nitrogênio ao átomo de boro (Figura 15).

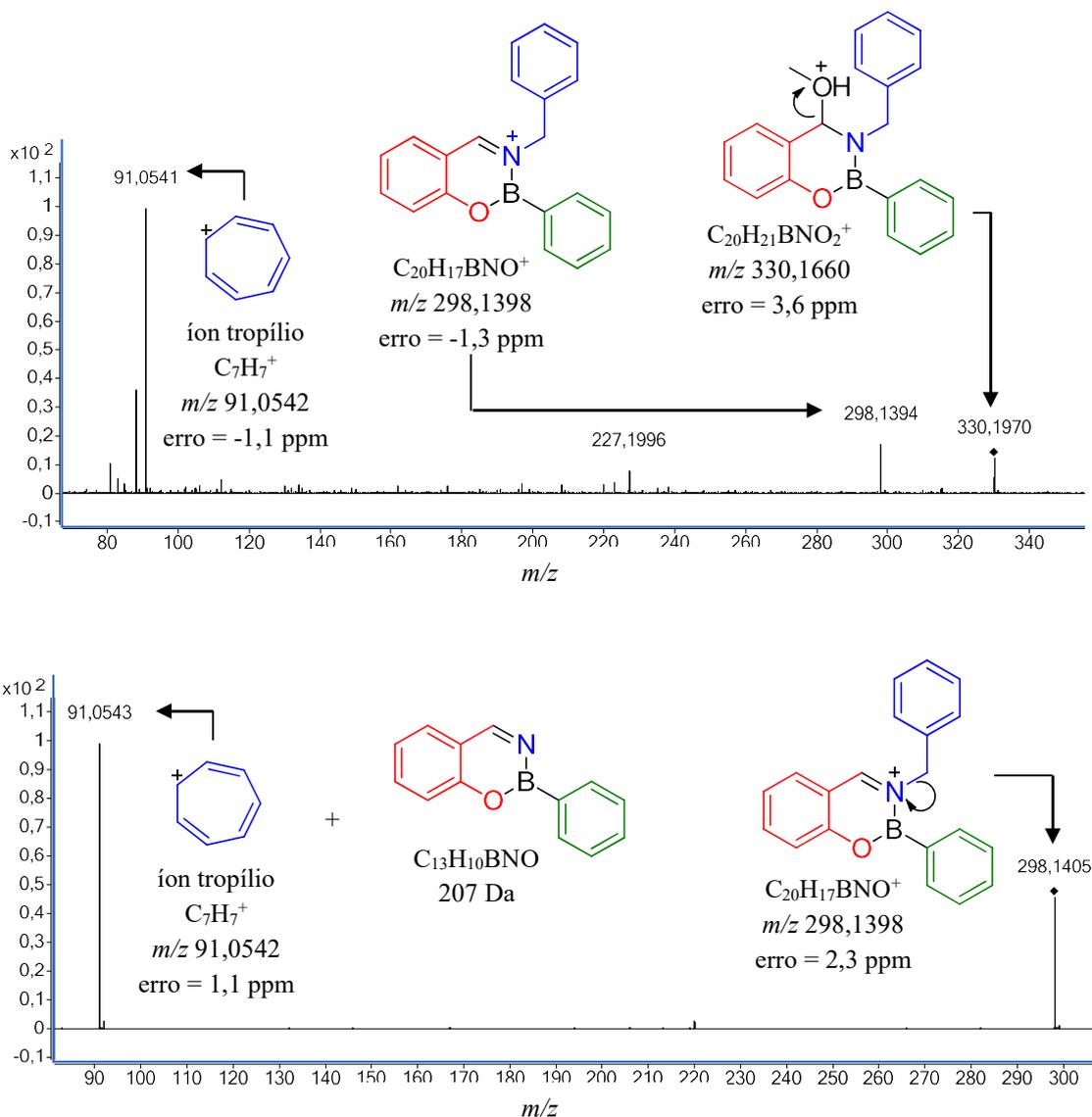
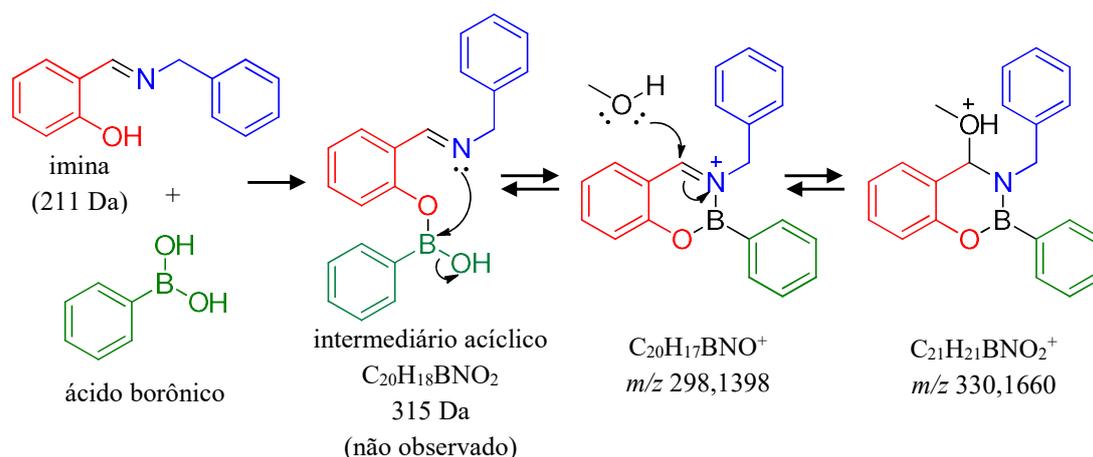


Figura 15. Acima: ESI(+)-MS/MS do íon  $m/z$  330 evidenciando sua conversão a espécie  $m/z$  298. Abaixo: padrão de fragmentação do íon  $m/z$  298.

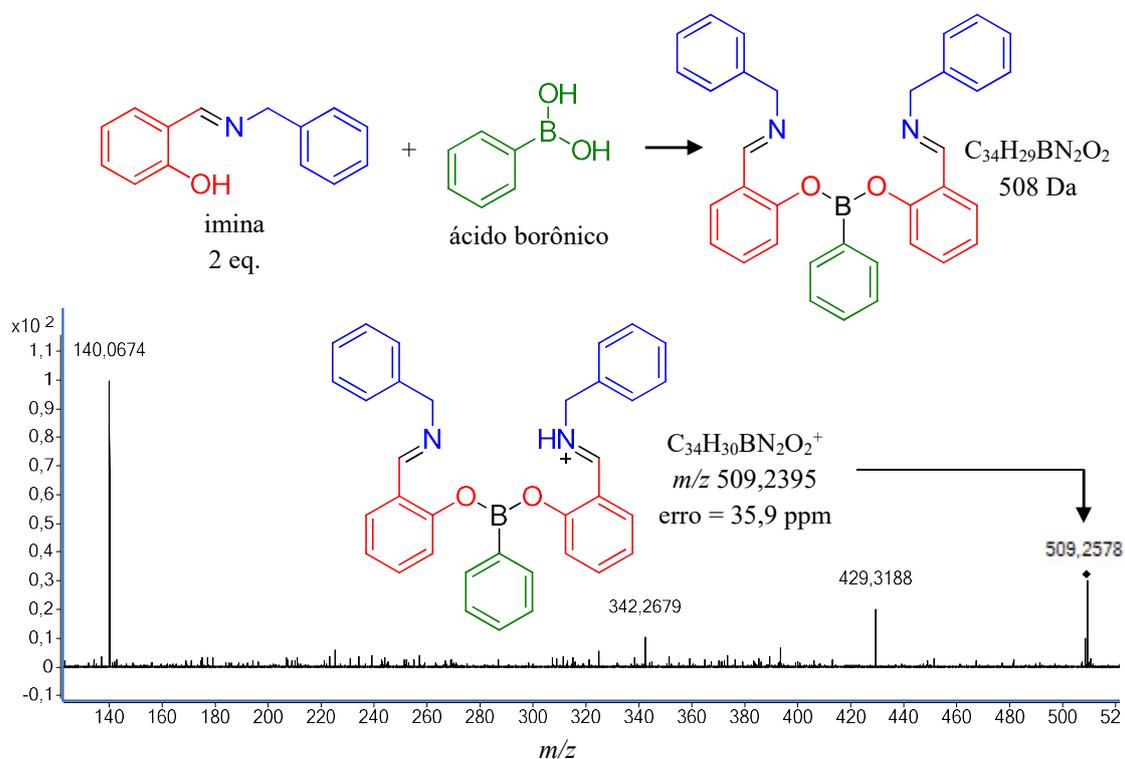
A formação das espécies  $m/z$  289 e 330 ocorre pela reação do intermediário imina (observado anteriormente como o íon imínio  $m/z$  212) com o ácido borônico, resultando no intermediário acíclico de massa 315 Da que, após ciclização intramolecular, fornece o intermediário  $m/z$  289. A adição de uma molécula de metanol (solvente utilizado na reação, 32 Da) a ligação dupla  $C=N$  resulta na formação da espécie  $m/z$  330 (Esquema 19).

Embora o intermediário 315 Da (forma neutro) seja a espécie precursora dos íons  $m/z$  298 e 330, esse intermediário não foi observado ao longo do período reacional.



Esquema 19. Formação dos intermediários  $m/z$  298 e 330 a partir da reação da imina com o ácido borônico.

Apesar da análise *via* ESI(+)-MS/MS do íon  $m/z$  509 apresentar fragmentos de estruturas não identificadas, possivelmente formada pelo resultado de rearranjos e/ou clivagens adicionais, esse intermediário parece ser resultado da reação de dupla condensação entre o ácido borônico e duas moléculas de iminas, apresentando a estrutura indicada no Esquema 20.



Esquema 20. Acima: formação do intermediário de massa 508 Da a partir da reação entre a imina e o ácido borônico. Abaixo: ESI(+)-MS/MS do íon  $m/z$  509.

O intermediário  $m/z$  352, ao contrário das espécies  $m/z$  298 e 330, apresenta uma estrutura acíclica em relação aos átomos de oxigênio, nitrogênio e boro e, embora seu padrão de fragmentação apresente íons com estrutura não elucidada (a exemplo da espécie  $m/z$  509) uma estrutura possível para esse intermediário parece ser o produto da reação (produto 3, Esquema 17) complexado a espécie inorgânica  $B(OH)_3$ , conforme observado na Figura 16.

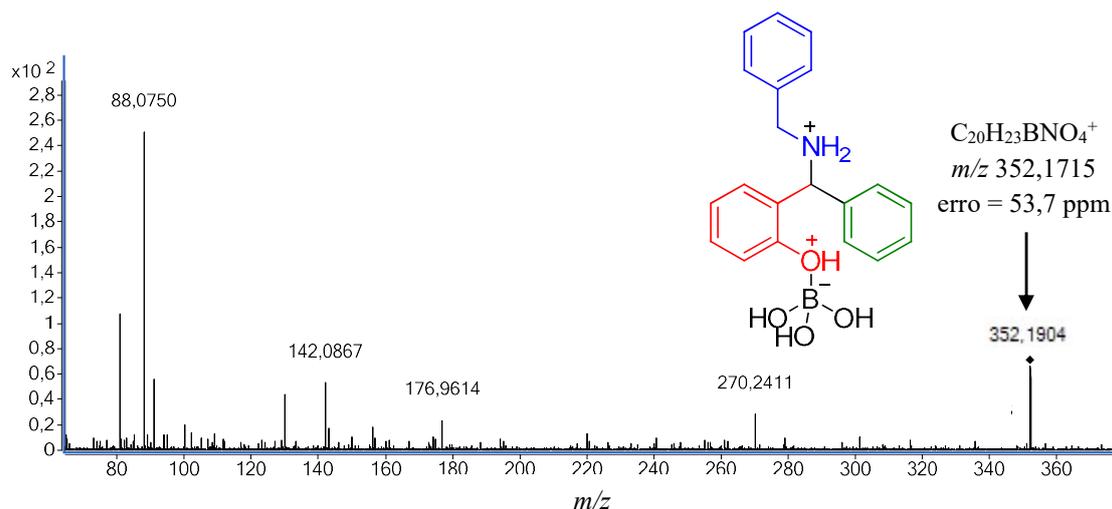
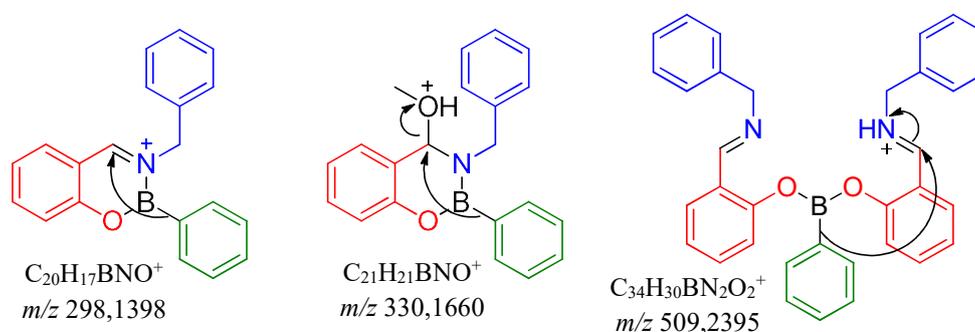


Figura 16. Padrão de fragmentação do intermediário  $m/z$  352, o produto da reação 3 complexado a espécie inorgânica  $B(OH)_3$ .

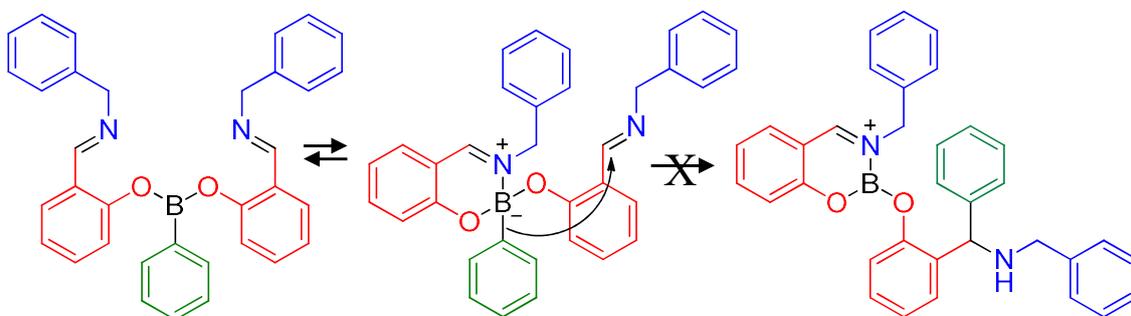
As estruturas das espécies  $m/z$  298, 230 e 509 são formadas pela adição dos três reagentes utilizados na reação PBM (aldeído, amina e ácido borônico), estes intermediários poderiam, a princípio, levar a formação do produto da reação pela formação do precursor gerado pela transferência do grupo fenila, ligado ao átomo de boro, para o átomo de carbono da ligação C-N. (Esquema 21).



Esquema 21. Possibilidade de transferência do grupo fenila a partir das espécies  $m/z$  298, 330 e 509.

Entretanto, a estrutura cíclica apresentada pelas espécies  $m/z$  298 e 330 proporcionam restrições geométricas/conformacionais que inviabilizam um estado de transição que possibilite a formação da ligação C-Ar.

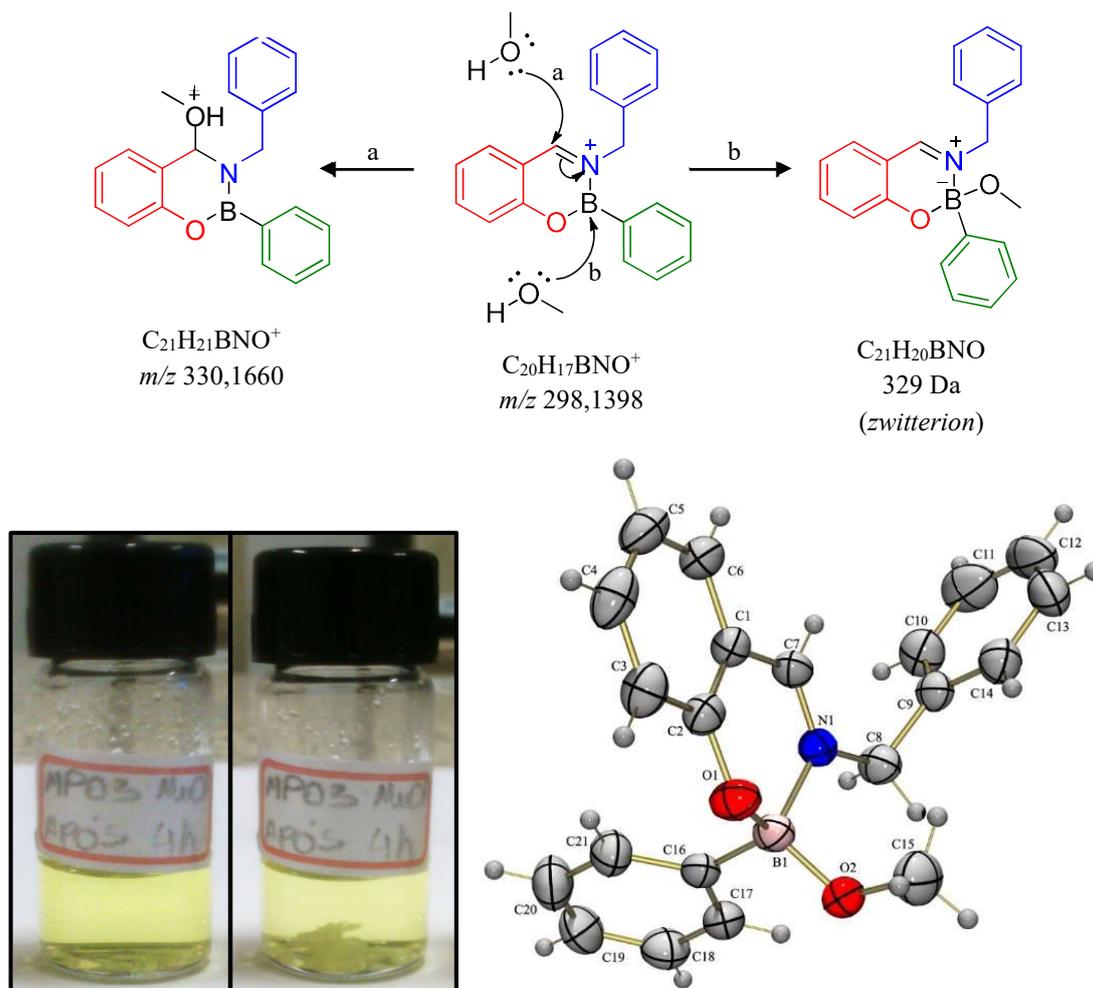
Por outro lado, a estrutura acíclica do intermediário  $m/z$  509 poderia favorecer a formação de um estado de transição que possibilitasse a transferência do grupo fenila. A utilização da Teoria da Densidade Funcional (DFT), para o cálculo de otimização estrutural e energia de conversão da espécie 508 Da (forma neutra do íon  $m/z$  509) num possível precursor do produto da reação, demonstrou a inviabilidade dessa conversão. Embora a forma acíclica da espécie 508 Da possua certa liberdade conformacional, o estado de transição necessário a transferência do grupo fenila não pode ser alcançado por motivos estéricos (Esquema 22).



Esquema 22. Formação de um possível precursor do produto da reação PBM pela transferência do grupo fenila a partir do intermediário 508 Da. Não há convergência *via* DFT (Nível teórico utilizado PBE1PBE/cc-pVDZ).

Durante a realização dos experimentos, observou-se gradativa formação de cristais no frasco contendo a alíquota retirada após 4 horas do início da reação. A análise por raio-X confirmou ser a espécie neutra (*zwitterion*) 329 Da, um intermediário estruturalmente análogo a espécie  $m/z$  330, mas com a molécula de metanol reagindo com o átomo de boro (Esquema 23), proporcionando evidências adicionais para a proposição estrutural dos intermediários observados *via* ESI(+)-MS(/MS).

Devido a quantidade de espécies observadas ao longo do período reacional, a reação 3 (salicilaldeído, benzilamina e ácido borônico em metanol, Esquema 17) foi novamente realizada utilizando-se tolueno (solvente apolar). A substituição do metanol (solvente polar prótico) teve por objetivo a verificação da influência do solvente no curso do mecanismo reacional.



Esquema 23. Acima: formação das espécies  $m/z$  330 e 329 Da (zwitterion) a partir do intermediário  $m/z$  298. Abaixo: cristais da espécie 329 Da e sua elucidação estrutural por raio-X (ORTEP-3).

O monitoramento *via* ESI(+)-MS da reação 3 empregando-se tolueno como solvente evidenciou apenas a formação do íon imínio ao longo das 4 h de monitoramento do sistema reacional (Figura 17). Esse resultado, coerente com os dados da literatura que indicam a preferência do meio polar prótico para a obtenção dos produtos da reação PBM, demonstra a importância do solvente para o curso da reação PBM: a estabilização das cargas dos intermediários gerados no meio reacional a partir do íon imínio/imina.

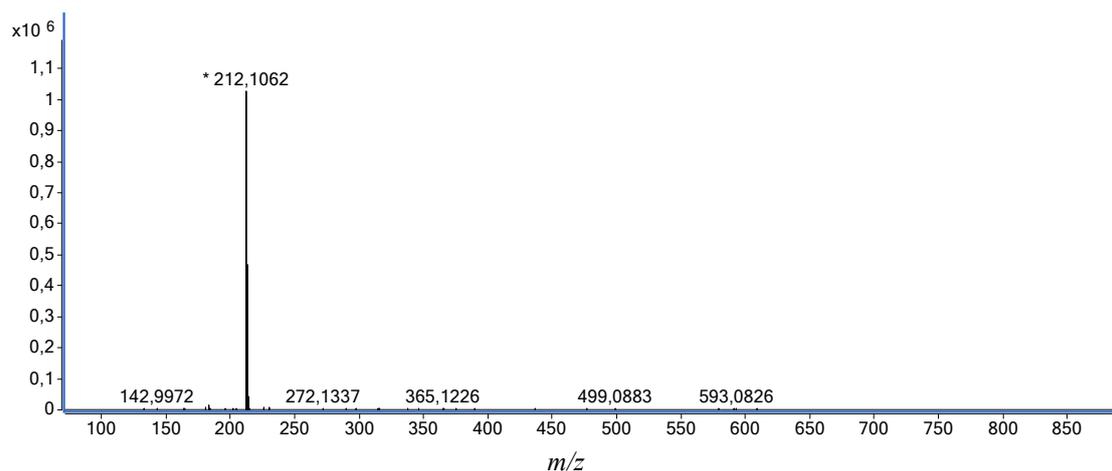


Figura 17. Presença do íon  $m/z$  212 (imínio) na reação 3 (salicilaldeído, benzilamina e ácido borônico) em tolueno a temperatura de 90°C. Aliquota coletada após 4 horas do início do período reacional.

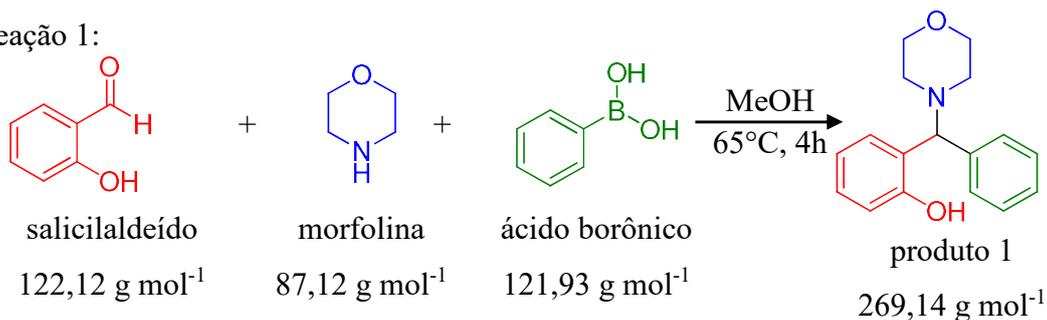
A inobservância da espécie  $m/z$  316 (a forma  $[M-H]^+$  do intermediário precursor das espécies  $m/z$  289 e 330, Esquema 19, pág. 38) e a obtenção do intermediário 229 Da (*zwitterion*) evidenciam a formação de intermediários, que devido sua natureza neutra e/ou transiente, não não podem ser detectados *via* ESI(+)-MS(/MS).

Assim, com o objetivo de capturar outras possíveis espécies reacionais e verificar a formação de intermediários ainda não detectados, realizou-se a substituição do salicilaldeído pelo 4-(dietilamino)-salicilaldeído, a exemplo da reação 2 (Esquema 24).

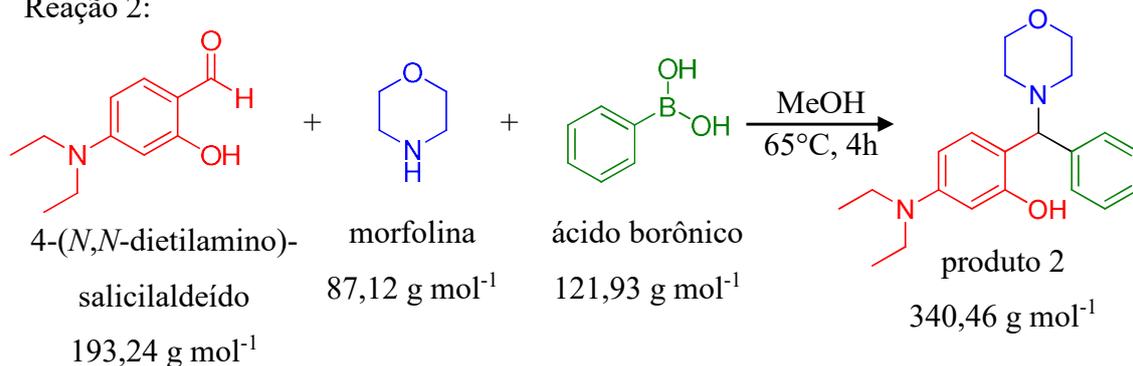
Decorridos 5 min. do início do período reacional, o monitoramento da reação 4 (utilizando metanol como solvente) evidenciou a presença de várias espécies no meio reacional, os íons  $m/z = 283, 369, 387, 423, 651$  e 809 (bem como a espécie  $m/z$  194, referente a forma  $[M-H]^+$  do aldeído marcado) conforme apresentado na Figura 18.

A análise dos padrões de fragmentação das espécies observadas revela a correlação entre as estruturas dos intermediários obtidos na reação 4 ( $m/z$  283, 369, 423 e 509) com as respectivas espécies observadas na reação 3 (os íons  $m/z$  212, 289, 352 e 509), diferenciando-se apenas pela presença do grupo 4-(N,N-dietilamino) na estrutura do aldeído utilizado na reação 4, conforme apresentado adiante.

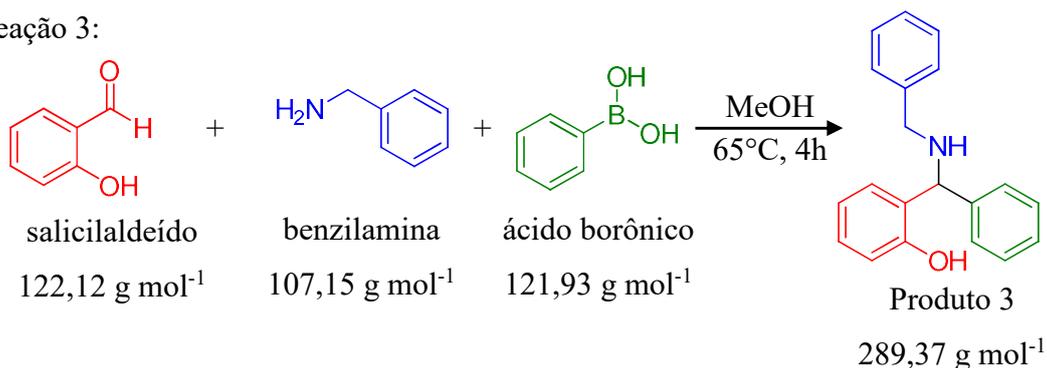
Reação 1:



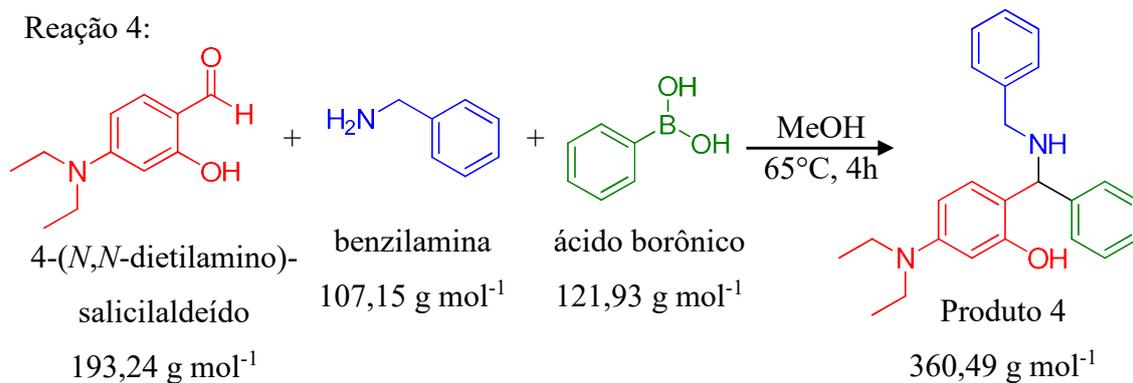
Reação 2:



Reação 3:



Reação 4:



Esquema 24. Reações PBM para análise via ESI(+)-MS(/MS). Reação 1: salicilaldeído, morfolina e ácido borônico. Reação 2: modificação utilizando o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga. Reação 3: salicilaldeído, benzilamina e ácido fenil borônico. Reação 4: modificação utilizando o 4-(*N,N*-dietilamino)-salicilaldeído como etiqueta de carga.

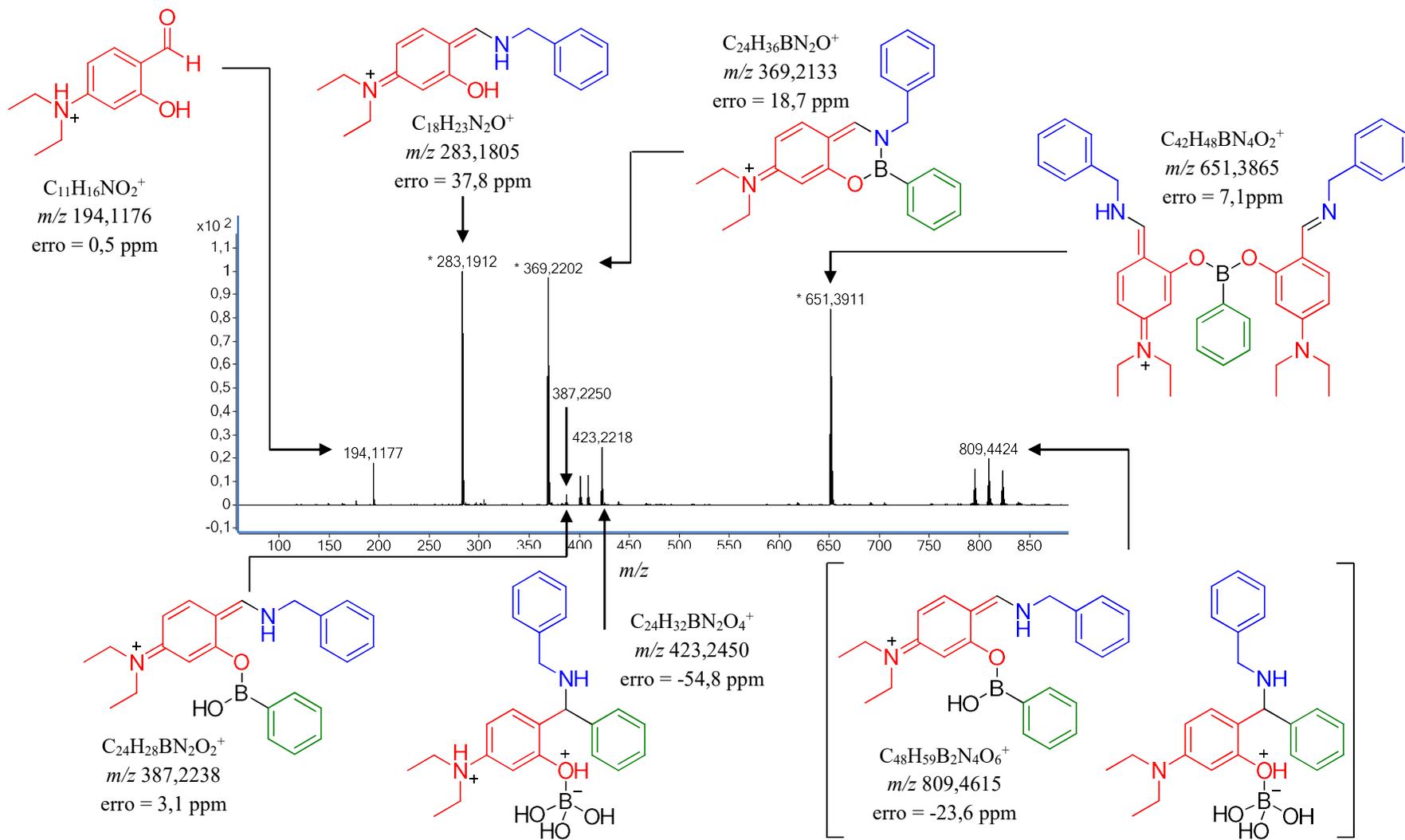


Figura 18. Espécies observadas *via* ESI(+)-MS para a reação 4 em metanol. Alíquota coletada após 5 min. do início do período reacional.

A estrutura da espécie  $m/z$  283 (atribuída com base em seu padrão de fragmentação, Figura 19) corresponde ao intermediário imínio/enamina formado pela reação entre o aldeído marcado e a benzilamina, um intermediário gerado de forma análoga às espécies  $m/z$  263 e 212 nas reações 2 e 3 respectivamente (Esquema 25).

A observação e caracterização desses intermediários confirmam as propostas apresentadas nos dados da literatura, nas quais o mecanismo da reação possui como ponto de partida o intermediário imínio/enamina.

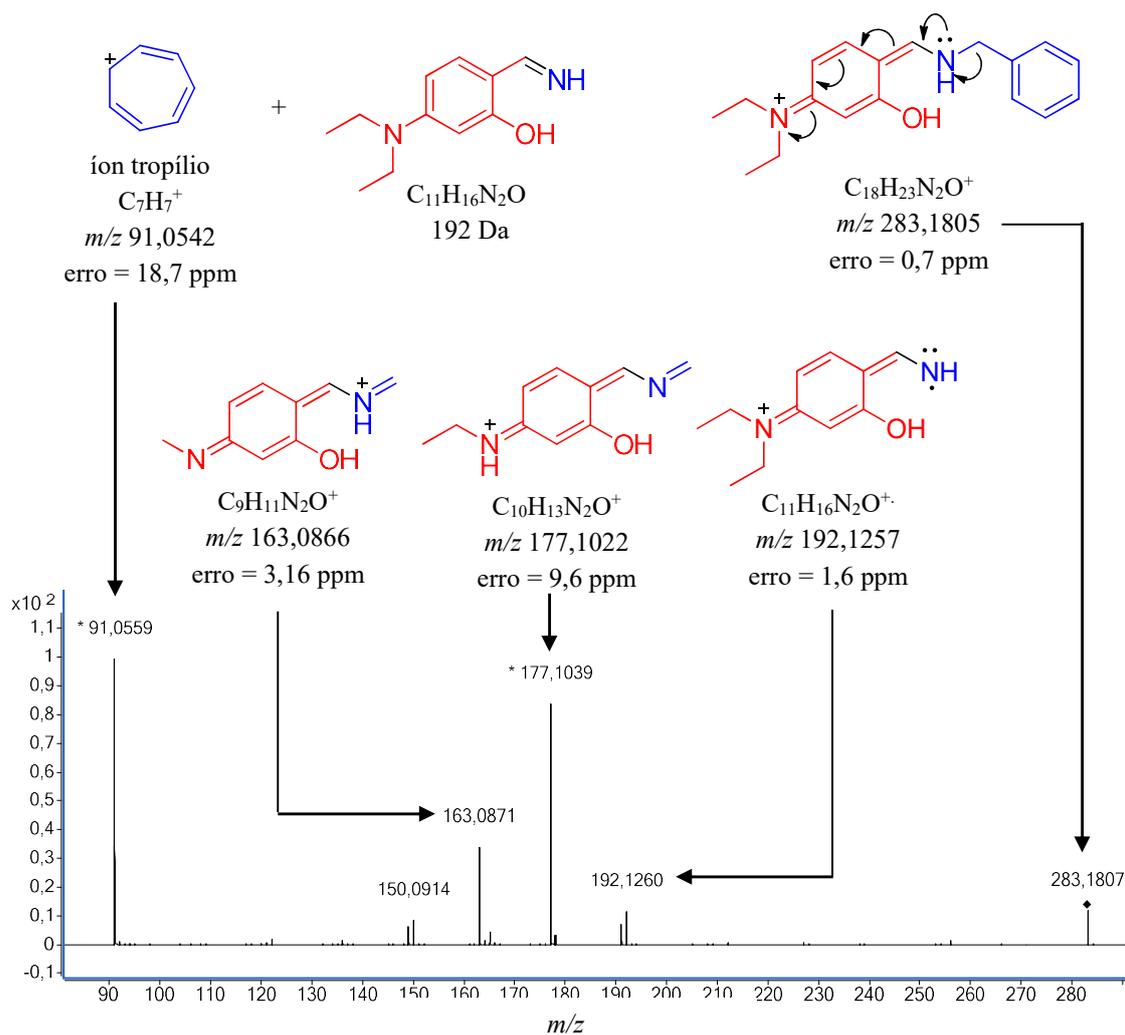
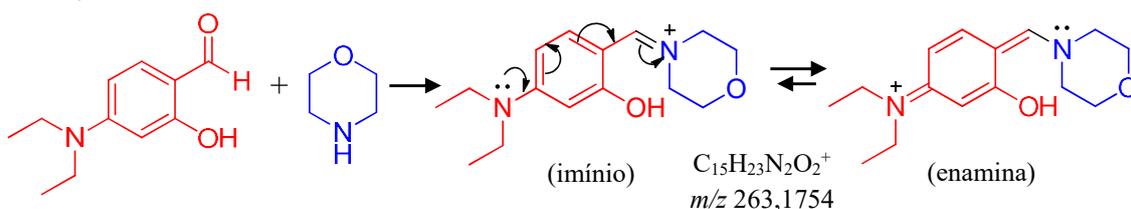
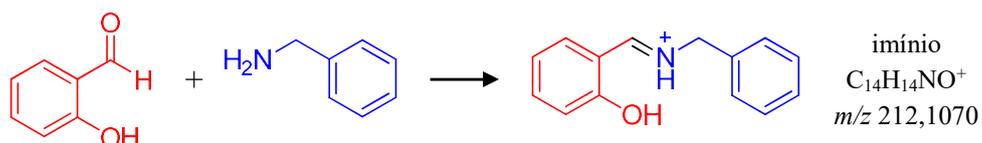


Figura 19. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon  $m/z$  283, evidenciando a estrutura do intermediário imínio/enamina.

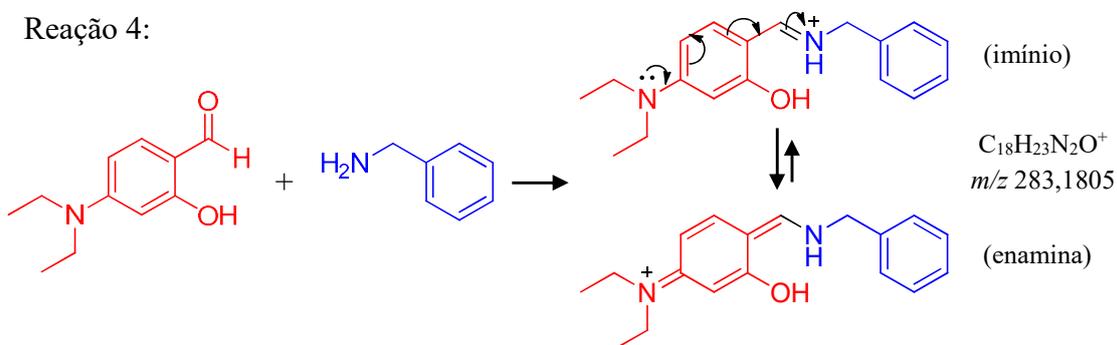
Reação 2:



Reação 3:



Reação 4:



Esquema 25. Formação dos intermediários imínio/enamina nas reações 2, 3 e 4.

De forma semelhante, os intermediários  $m/z$  369 e 423 são estruturalmente equivalentes às espécies  $m/z$  298 e 352 observados na reação 3 (Figura 20), conforme evidenciado por seus padrões de fragmentação (Figura 21).

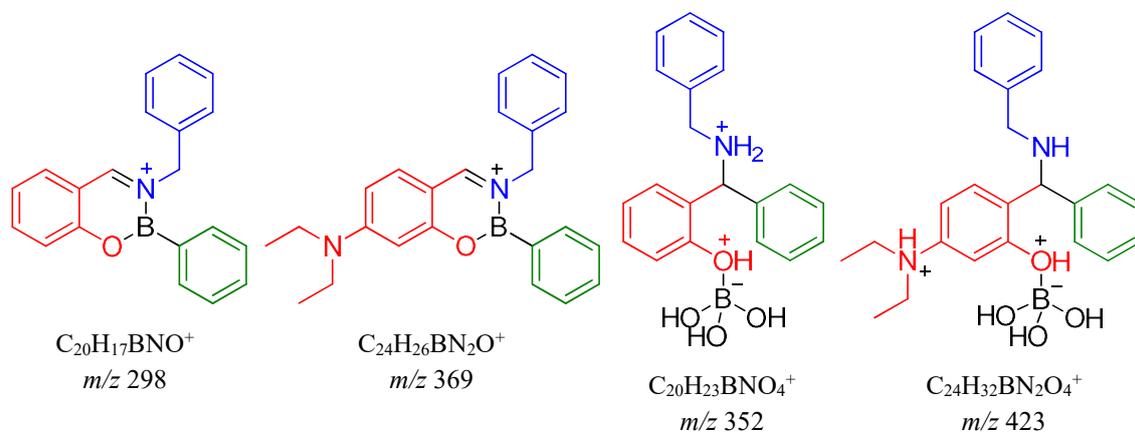


Figura 20. Relação estrutural entre as espécies  $m/z$  298 e 352 observados na reação 3 e seus análogos  $m/z$  369 e 423 presentes na reação 4.

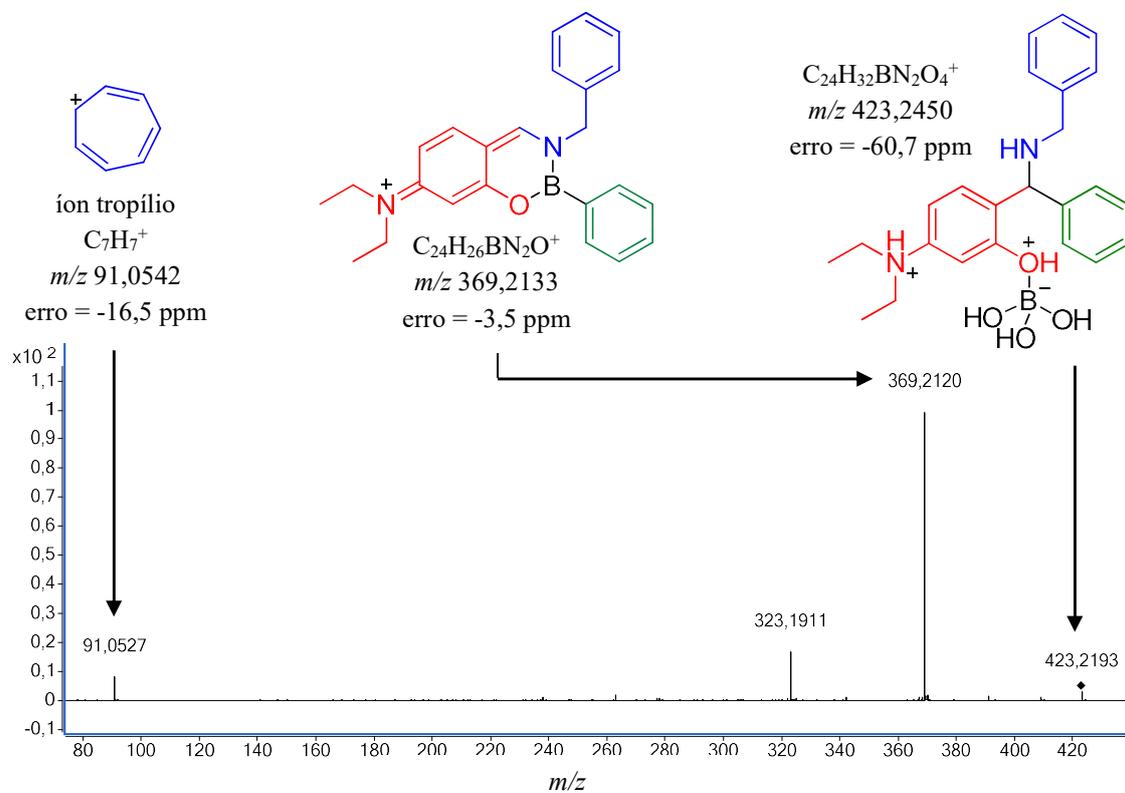
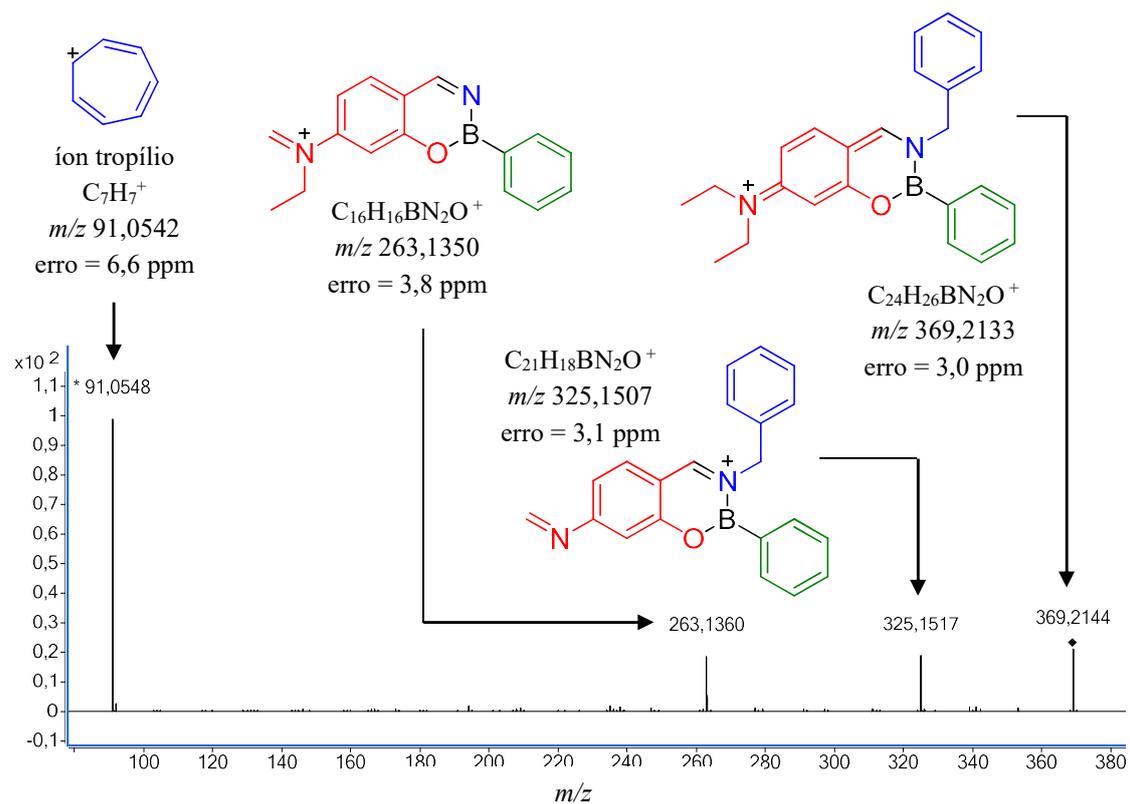


Figura 21. Padrão de fragmentação das espécies  $m/z$  369 e 423, observados na reação 4

Por fim, a estrutura da espécie  $m/z$  651 (baseada em seu padrão de fragmentação, Figura 22) corresponde ao intermediário formado pela reação entre duas moléculas do intermediário enamina ( $m/z$  283) com uma molécula do ácido borônico, um intermediário análogo a espécie  $m/z$  509 observado na reação 3 (Figura 23).

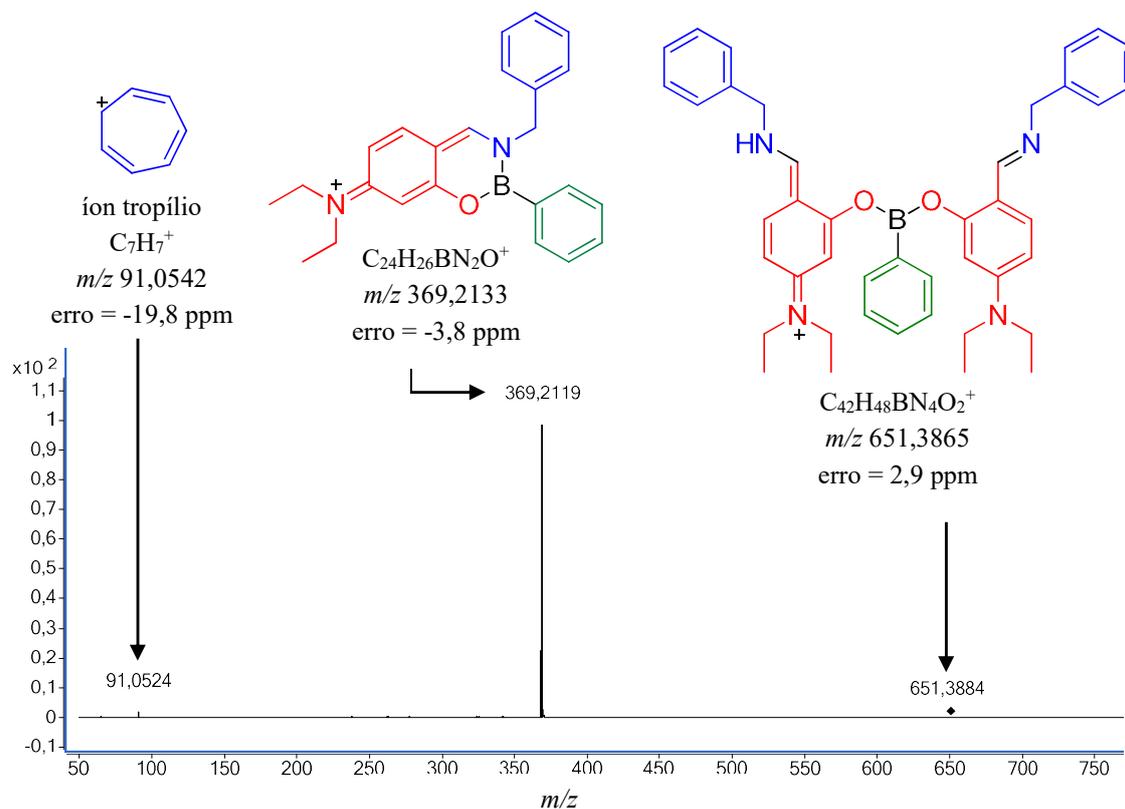


Figura 22. Padrão de fragmentação, ESI(+)-MS/MS, do íon  $m/z$  651 obtido na reação 4.

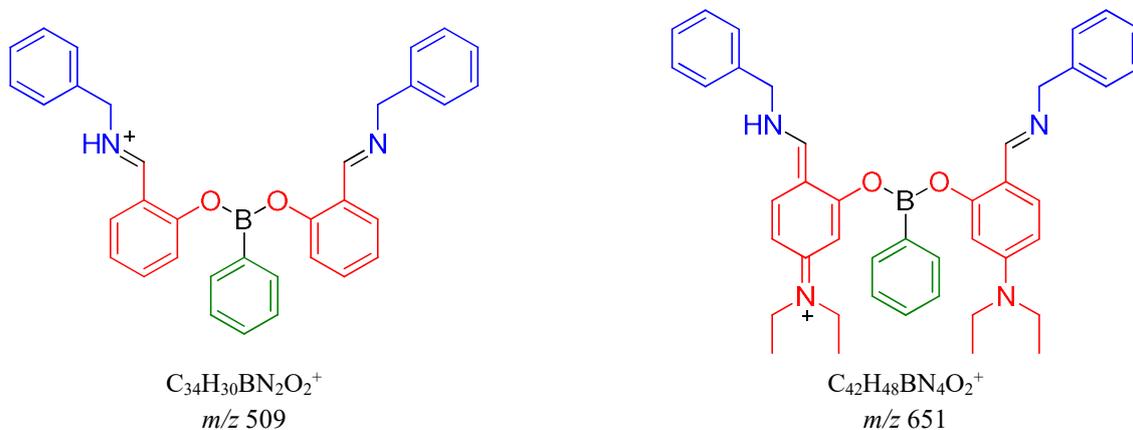
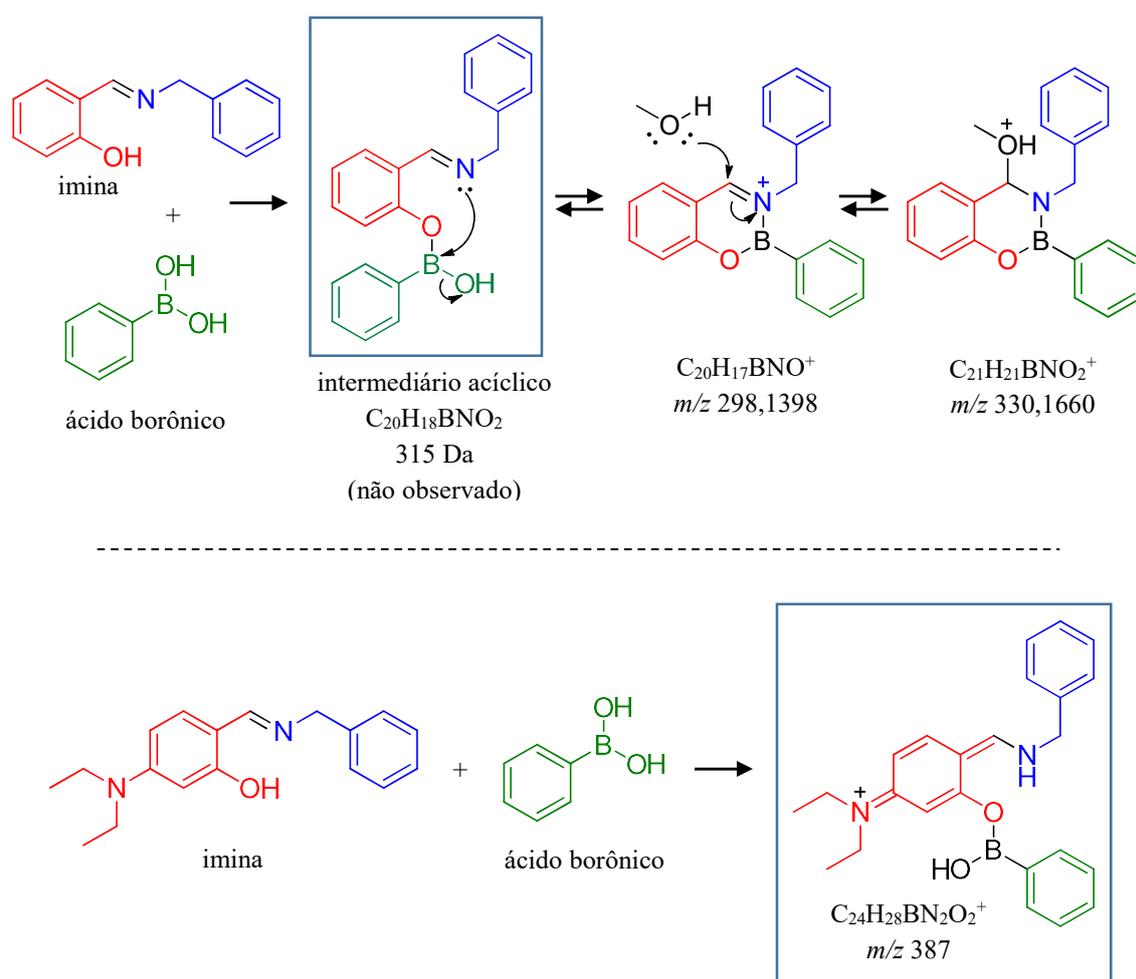


Figura 23. Equivalência estrutural entre as espécies  $m/z$  509, observado na reação 3, e  $m/z$  651 na reação 4.

As estruturas identificadas na reação 4, e seus respectivos análogos na reação 3, evidenciam um padrão de intermediários formados no decurso da reação PBM: A formação inicial do intermediário imínio, o composto formado pela adição do imínio ao ácido borônico e seus derivados.

Notadamente, a inserção do aldeído marcado na reação 4, proporcionou a detecção da espécie  $m/z$  387 que, conforme observado em seu padrão de fragmentação, Figura 24) corresponde a espécie acíclica formada pela reação entre o imínio e o ácido borônico, um intermediário reacional estruturalmente equivalente a espécie 315 Da (não observado via ESI(+)-MS) proposto para a sequência de formação dos intermediário observados na reação 3 (Esquema 26).



Esquema 26. Acima: formação as espécies  $m/z$  298 e 330 a partir do intermediário 315 Da (não observado) na reação 3. Abaixo: formação íon  $m/z$  387 na reação 4, intermediário de estrutura análoga ao composto 315.

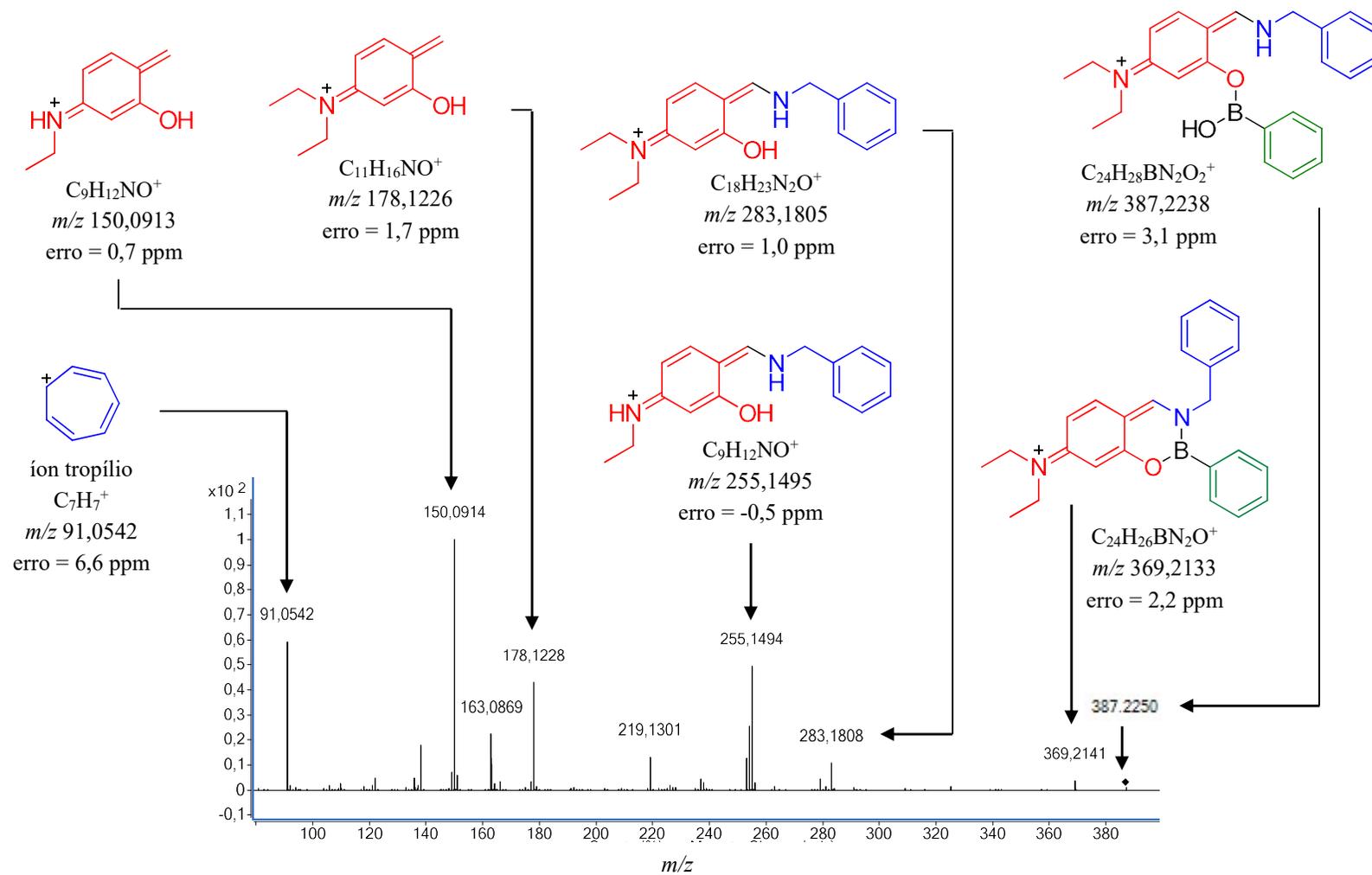


Figura 24. Padrão de fragmentação da espécie  $m/z$  387 observado na reação 4, o intermediário análogo a espécie 315 Da não observado na reação 3.

E, por fim, o íon  $m/z$  809 constitui-se em uma interação supramolecular entre as espécies 422 Da (a forma neutra do íon  $m/z$  423, o precursor do produto da reação) e a espécie  $m/z$  387 que, após dissociação da interação, se converte a espécie  $m/z$  369, conforme observado no padrão de fragmentação do íon 809 (Figura 25).

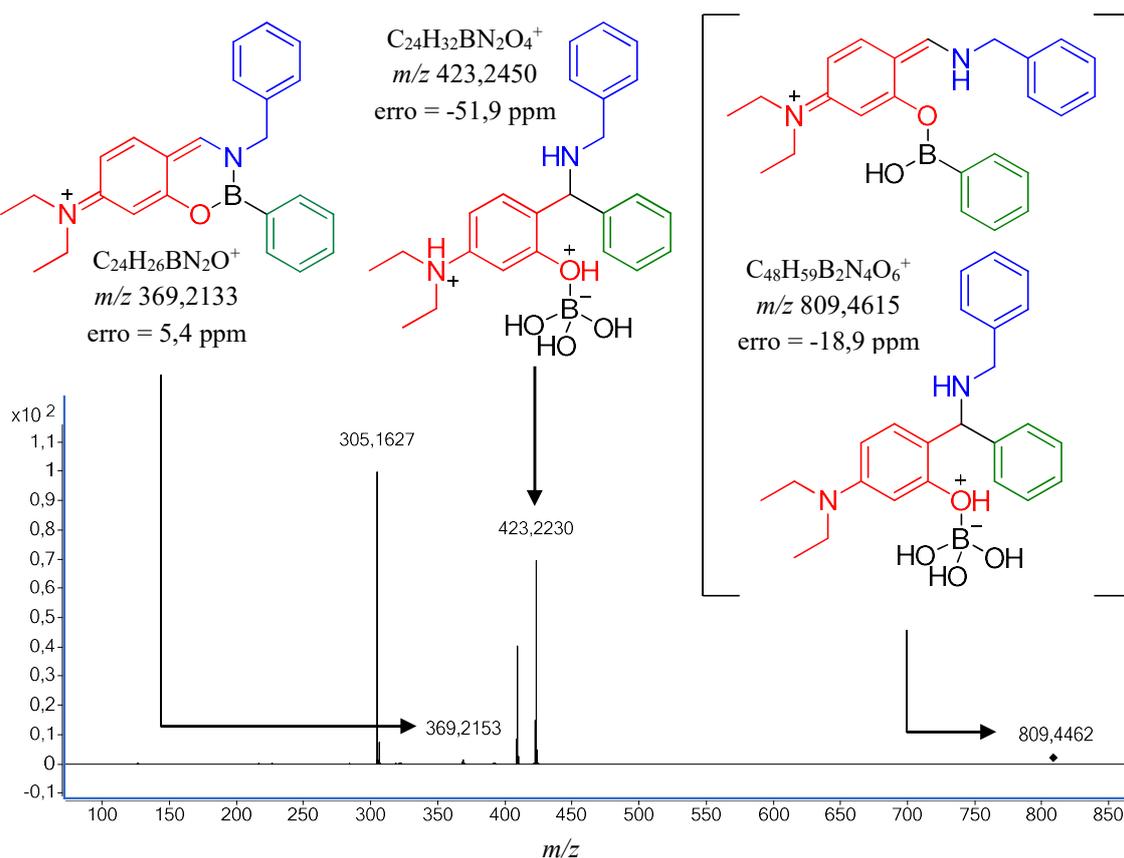
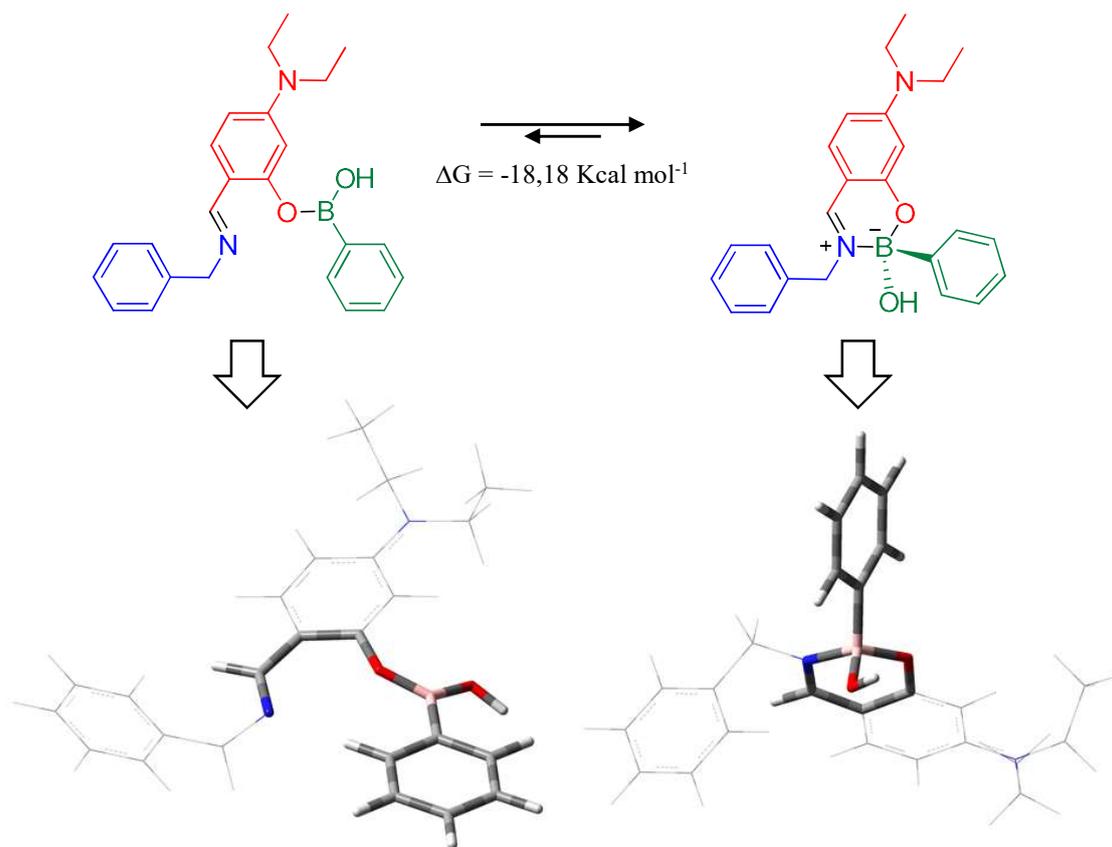


Figura 25. Padrão de fragmentação do íon  $m/z$  809, ESI(+)-MS/MS, evidenciando sua constituição supramolecular entre as espécies 422 e 386 Da (formas neutras dos respectivos íons  $m/z$  423 e 387).

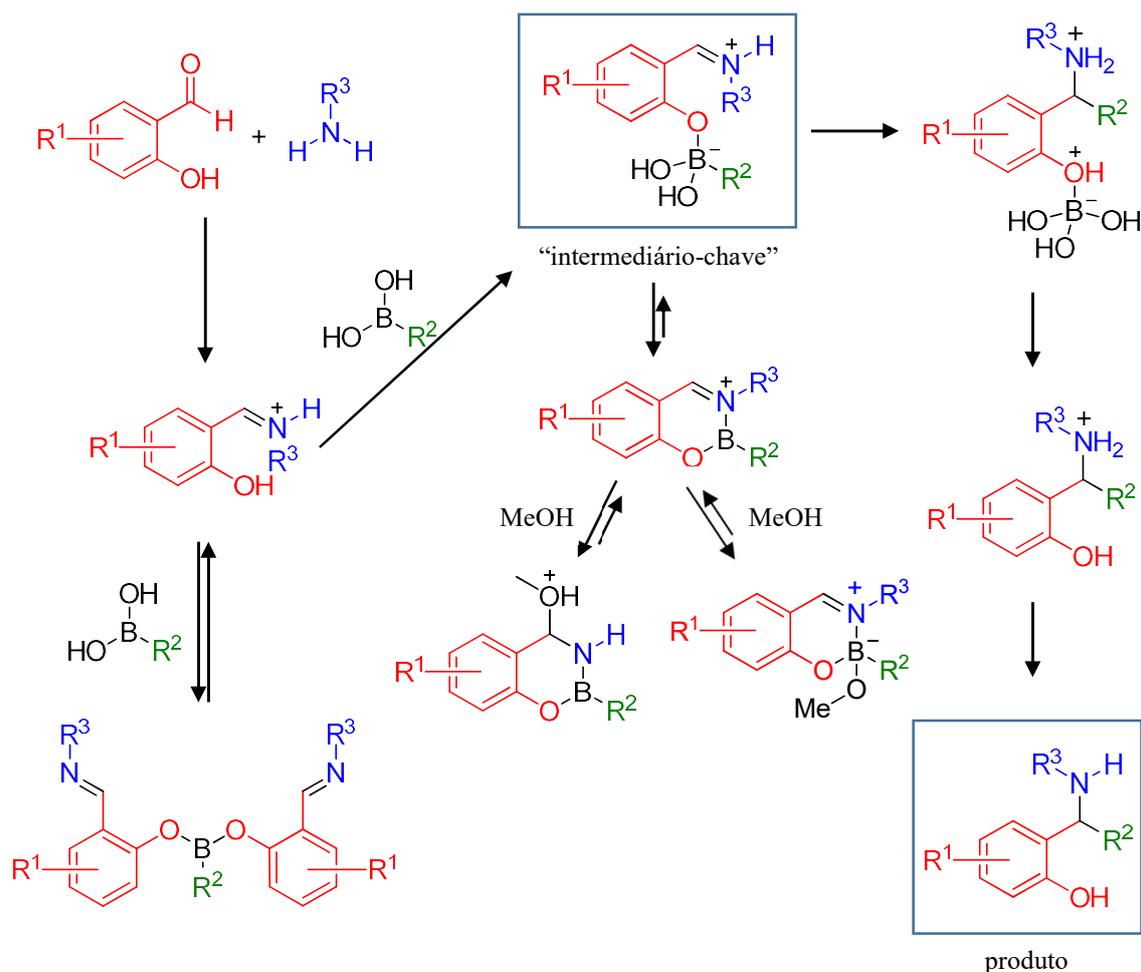
A observação da espécie  $m/z$  387 (intermediário acíclico equivalente ao intermediário 315 Da na reação 3) na reação 4 e sua baixa intensidade relativa frente aos derivados na forma cíclica indicam seu elevado consumo e preferência para formação do derivados cíclicos que, como demonstrado por cálculos de energia livre, apresenta elevada estabilidade (Esquema 27). Dessa forma, a espécie acíclica consiste no “intermediário-chave” responsável pela formação do produto da reação PBM, tendo como caminho competitivo as espécies de estrutura cíclica envolvendo os átomos de O, B e N.



Esquema 27. Energia de conversão entre a forma acíclica/cíclica do intermediário 386 Da (a forma neutra do íon  $m/z$  387). Nível teórico utilizado PBE1PBE/CC-pVDZ.

A preferência para a forma cíclica das espécies formadas pela dupla adição do imínio/imina ao ácido borônico (íons  $m/z = 509$  na reação 3 e  $m/z = 651$  na reação 4. Figura 23, pág. 48) inviabilizam a transferência do grupo fenila para o átomo de carbono da ligação C=N, sugerindo que estas espécies participam do mecanismo reacional como “reservatórios” de intermediários efetivos para a o caminho reacional, ou seja, suas respectivas formas acíclicas.

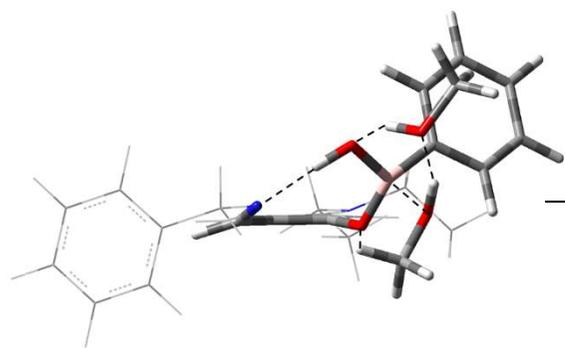
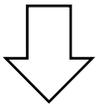
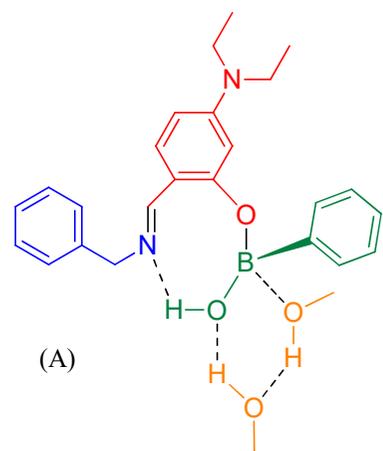
Embora os dados obtidos fundamentem a proposição do mecanismo reacional proposto para a reação PBM apresentado no Esquema 28, fez-se necessário a utilização de estudo teórico para o entendimento da etapa envolvida na transferência do grupo fenila, a partir do “intermediário-chave”, para a formação da estrutura precursora do produto da reação. Assim, realizou-se cálculos de DFT empregando-se tratamento explícito para o solvente utilizado na reação (duas moléculas de metanol). Essa abordagem evidenciou a participação efetiva do solvente na etapa de transferência do grupo fenila e o perfil energético envolvido nessa transformação.



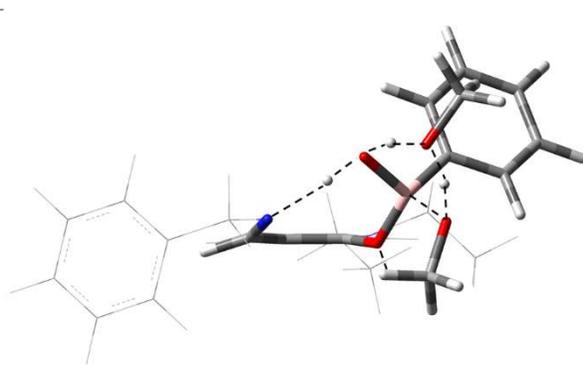
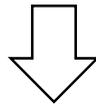
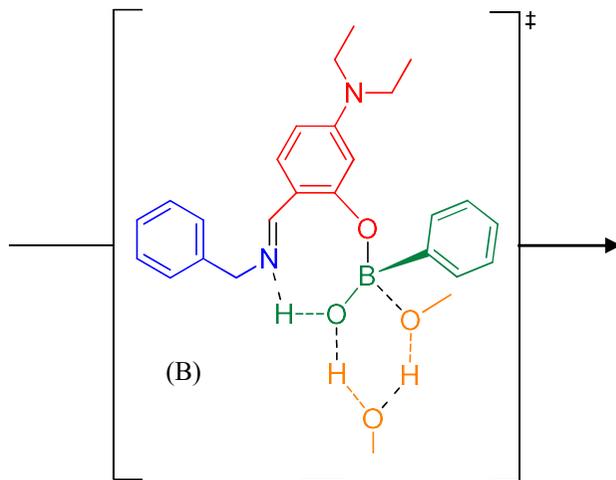
Esquema 28. Mecanismo reacional para a reação PBM baseado nos intermediários observados experimentalmente *via* ESI(+)-MS.

O papel do metanol, solvente polar prótico, para o curso reacional consiste (além da estabilização dos intermediários formados) na interação cooperativa como “intermediário-chave”, *via* interações de hidrogênio, proporcionando a formação de uma geometria favorável para a migração do grupo fenila para o átomo de carbono da ligação C=N (Esquema 29).

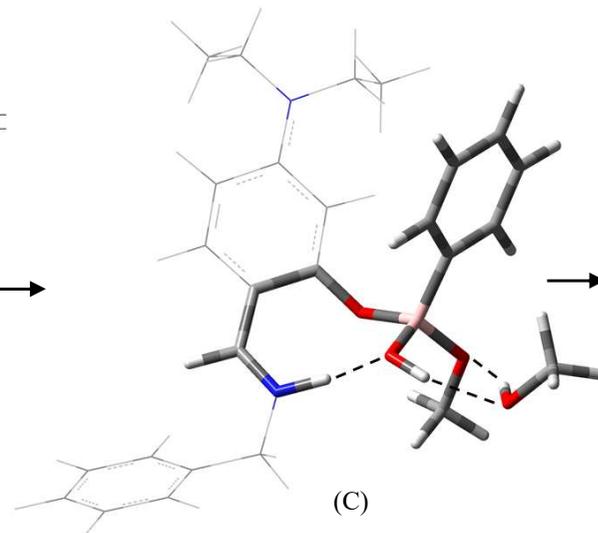
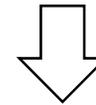
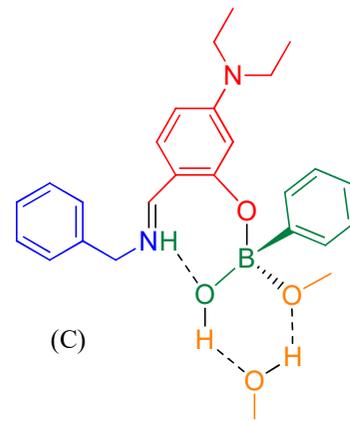
O “intermediário-chave” interage por ligações de hidrogênio com duas moléculas de metanol, atingindo o estado de transição B, fornecendo o intermediário C. Em seguida, a transferência do grupo fenila (passando pelo estado de transição D) gera o intermediário E, uma estrutura análoga aos íons *m/z* 352 e 423 (Figura 20, pág. 46) que após hidrólise fornece o produto da reação PBM.



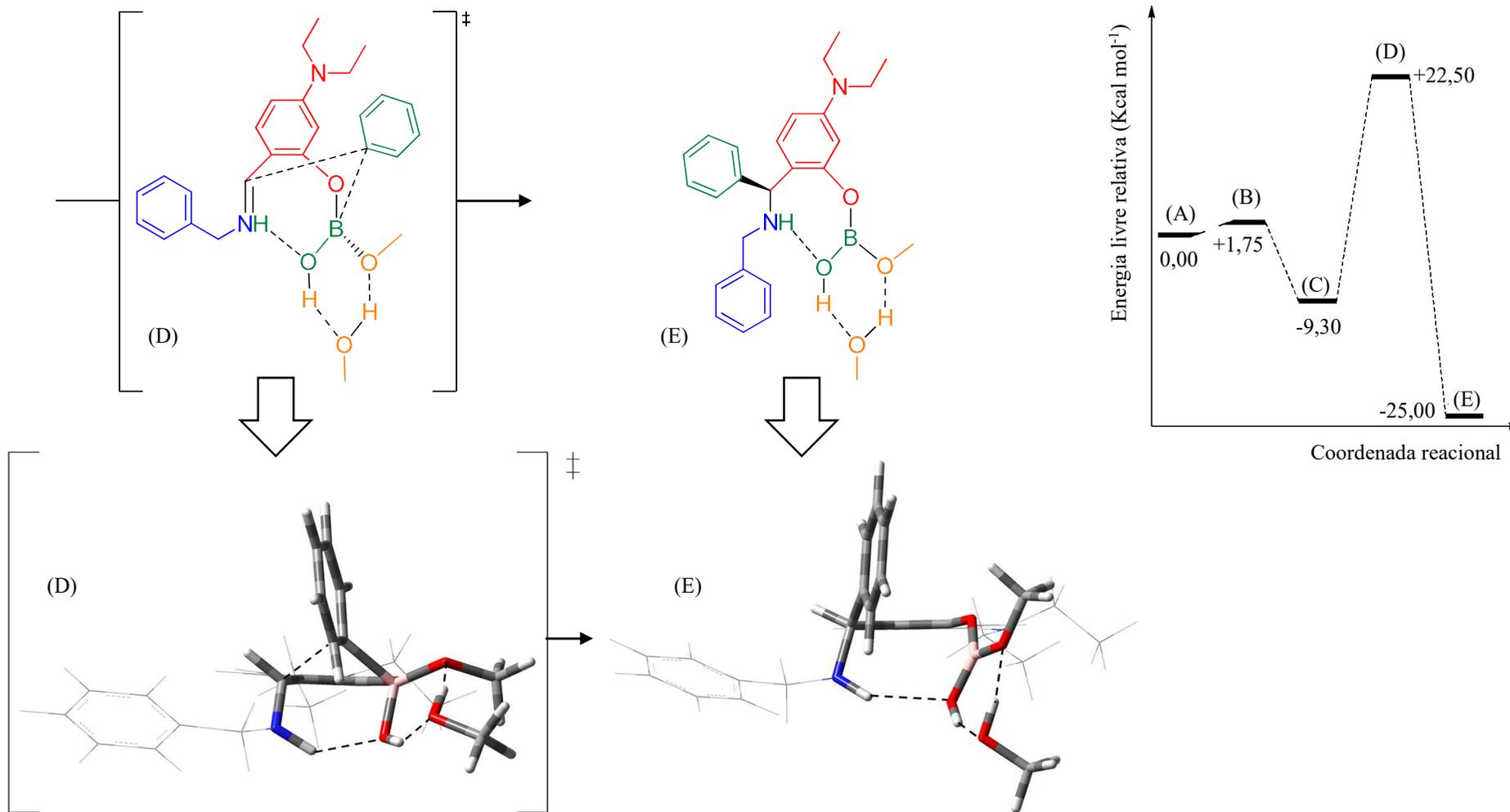
(A)



(B)



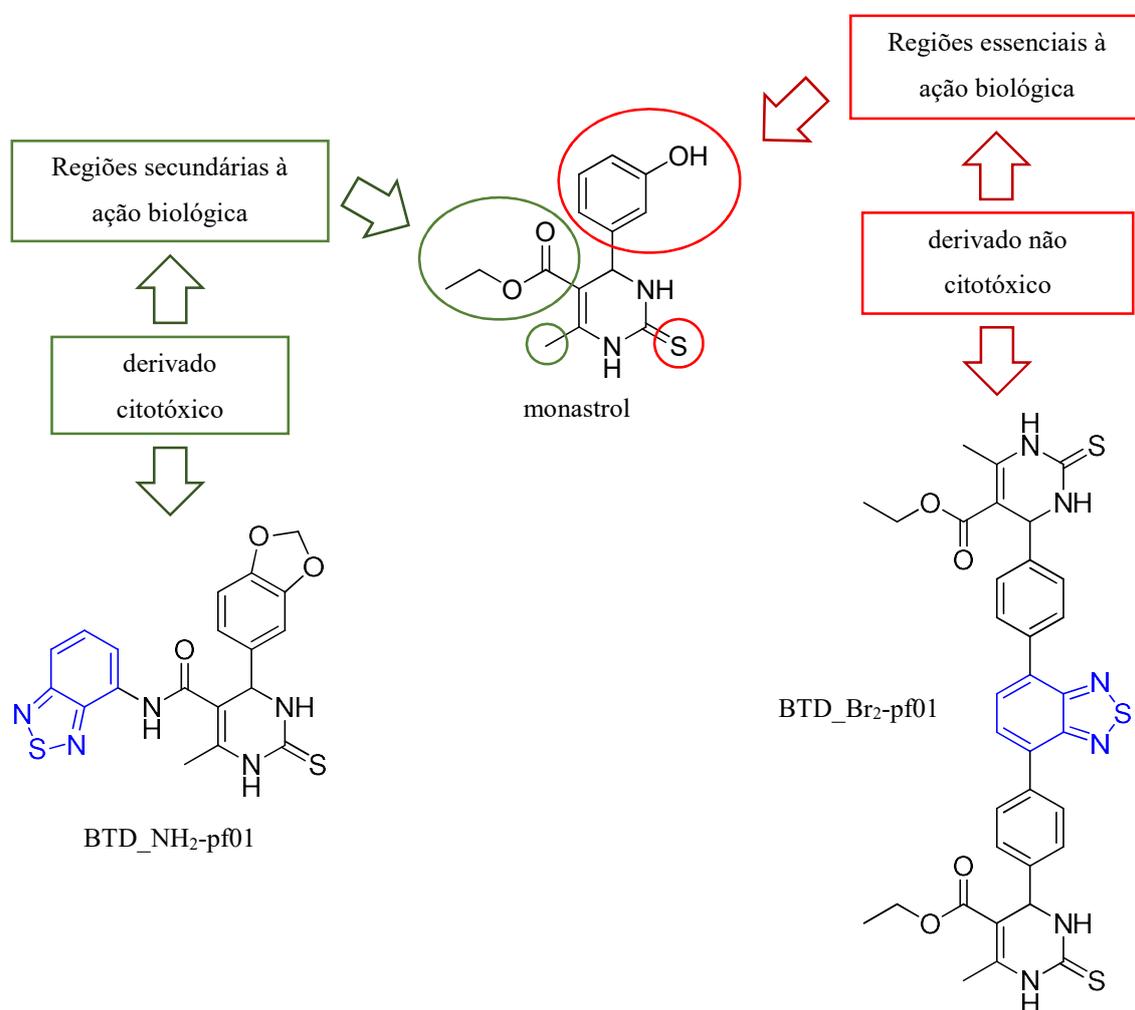
(C)



Esquema 29. Interação cooperativa do solvente (duas moléculas de metanol) na etapa de transferência do grupo fenila, a partir do “intermediário-chave”, e seu perfil energético. Nível teórico utilizado PBE1PBE/cc-pV

## Capítulo 2: Ação Citotóxica de Diidropirimidinonas Fluorescentes

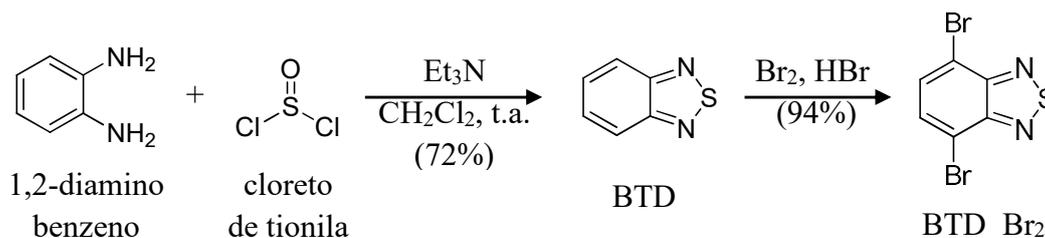
Com base nos dados da literatura, indicando as regiões essenciais à atividade inibitória do monastrol,<sup>29,30,32,61</sup> a obtenção das diidropirimidinonas (DHPM's) fluorescentes análogas ao monastrol baseou-se na inserção do fluoroforo benzotiadiazola (BTD) em sua estrutura, gerando os derivados citotóxico BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 (com a inserção da BTD na região do grupo éster) e não citotóxico BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 (obtidas com a inserção do fluoroforo na região aromática) conforme apresentado no Esquema 30.



Esquema 30. DHPM's planejadas a partir da inserção do fluoroforo BTD nas regiões farmacofórica e auxofóricas do monastrol.

Inicialmente, realizou-se a preparação do intermediário  $\text{BTD\_Br}_2$ , o reagente precursor do aldeído a ser utilizado na reação de Biginelli para a obtenção do composto luminescente não citotóxico  $\text{BTD\_Br}_2\text{-pf01}$ .

A reação entre a 1,2-diaminobenzô e cloreto de tionila forneceu o núcleo benzotiadiazola (BTD) que, em seguida, foi convertido ao intermediário  $\text{BTD\_Br}_2$  (4,7-dibromobenzotiadiazol) ao reagir com bromo (Esquema 31).



Esquema 31. Sequência sintética para obtenção do composto  $\text{BTD\_Br}_2$ .

Os dados de RMN confirmam a formação do produto desejado pela análise da variação dos sinais de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  observados na conversão do composto BTD em  $\text{BTD\_Br}_2$ .

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , a substituição do  $\text{H}_1$  por um átomo de Br resulta na ausência do duplete observado em 8,01 ppm ( $\text{H}_1$ , BTD) e deslocamento do duplete em 7,58 ppm ( $\text{H}_2$ , BTD) para 7,72 ppm ( $\text{H}_2$ ,  $\text{BTD\_Br}_2$ ) devido a diferença de eletronegatividade conferida pela ligação C-Br (Figura 26). Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  a reação é evidenciada pelo deslocamento do sinal referente ao átomo  $\text{C}_2$  em 121,5 ppm ( $\text{C}_2\text{-H}_1$ , BTD) para 113,9 ppm ( $\text{C}_2\text{-Br}$ ,  $\text{BTD\_Br}_2$ ) em decorrência da formação da ligação C-Br que, devido a diferença de eletronegatividade da nova ligação  $\text{C}_2\text{-Br}$ , também resulta no deslocamento dos sinais em 154,8 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 129,3 ppm ( $\text{C}_3$ ) observados no composto BTD, para os valores de 153,0 ppm ( $\text{C}_1$ ) e 132,3 ppm ( $\text{C}_3$ ) no produto  $\text{BTD\_Br}_2$  (Figura 27).

Após obtenção e caracterização do produto  $\text{BTD\_Br}_2$ , realizou-se a síntese do composto  $\text{BTD\_Br}_2\text{-mp01}$ , o aldeído necessário para a obtenção da DHPM fluorescente  $\text{BTD\_Br}_2\text{-pf01}$  *via* reação de Biginelli. O produto desejado foi obtido empregando-se a reação de Suzuki (uma reação entre um haleto de arila/vinila com o ácido fenil/vinil borônico, catalisado por paládio, para a formação de ligação  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-C}_{\text{sp}^2}$ ) conforme apresentado no Esquema 32.

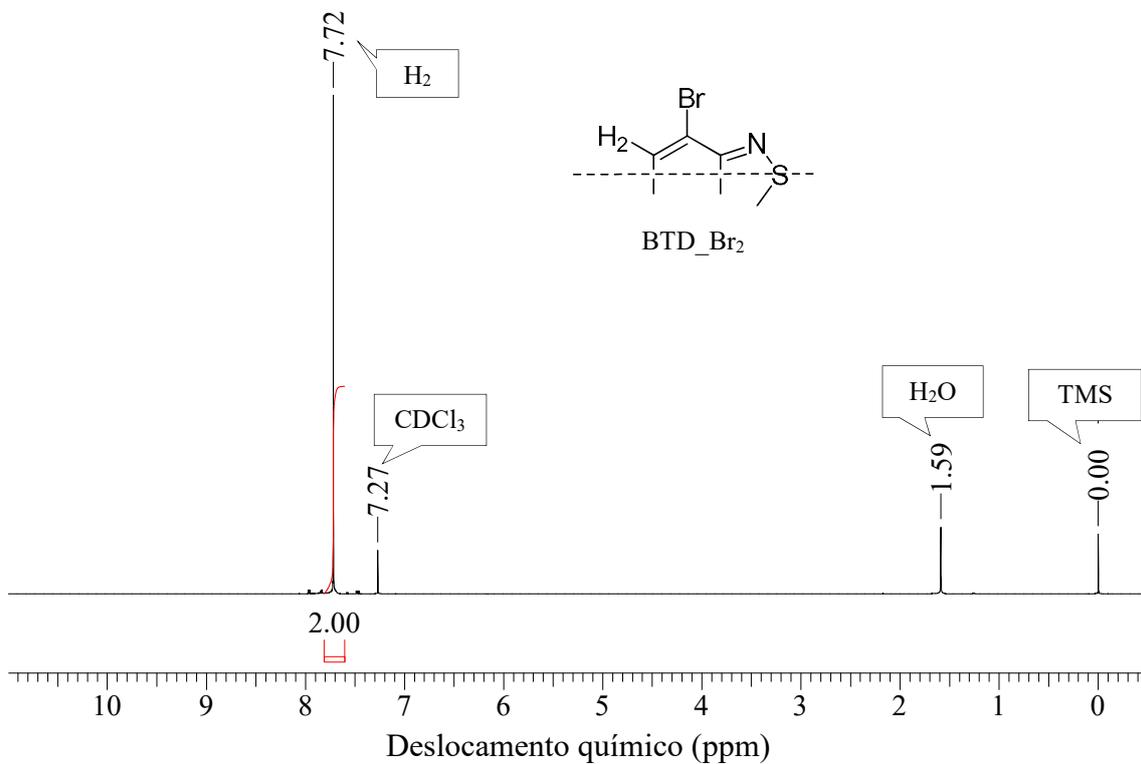
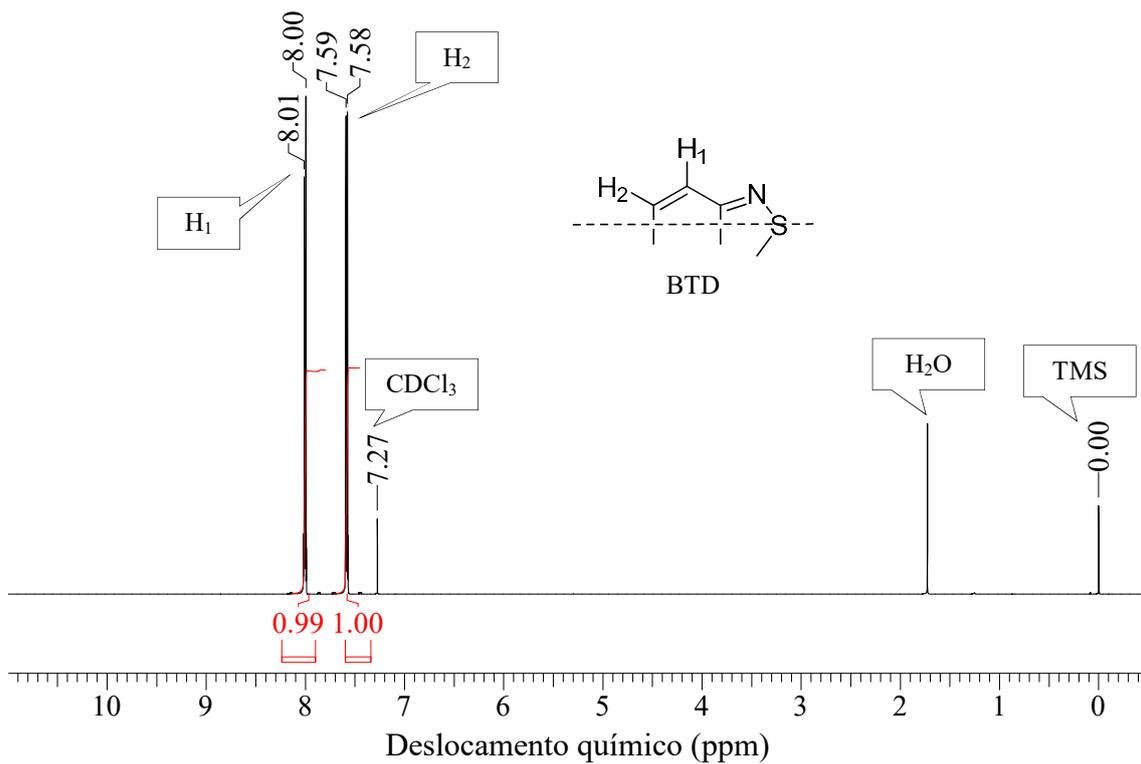


Figura 26. Espectros de RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, solvente: CDCl<sub>3</sub>) evidenciando a conversão do composto BTB (acima) a BTDBr<sub>2</sub> (abaixo).

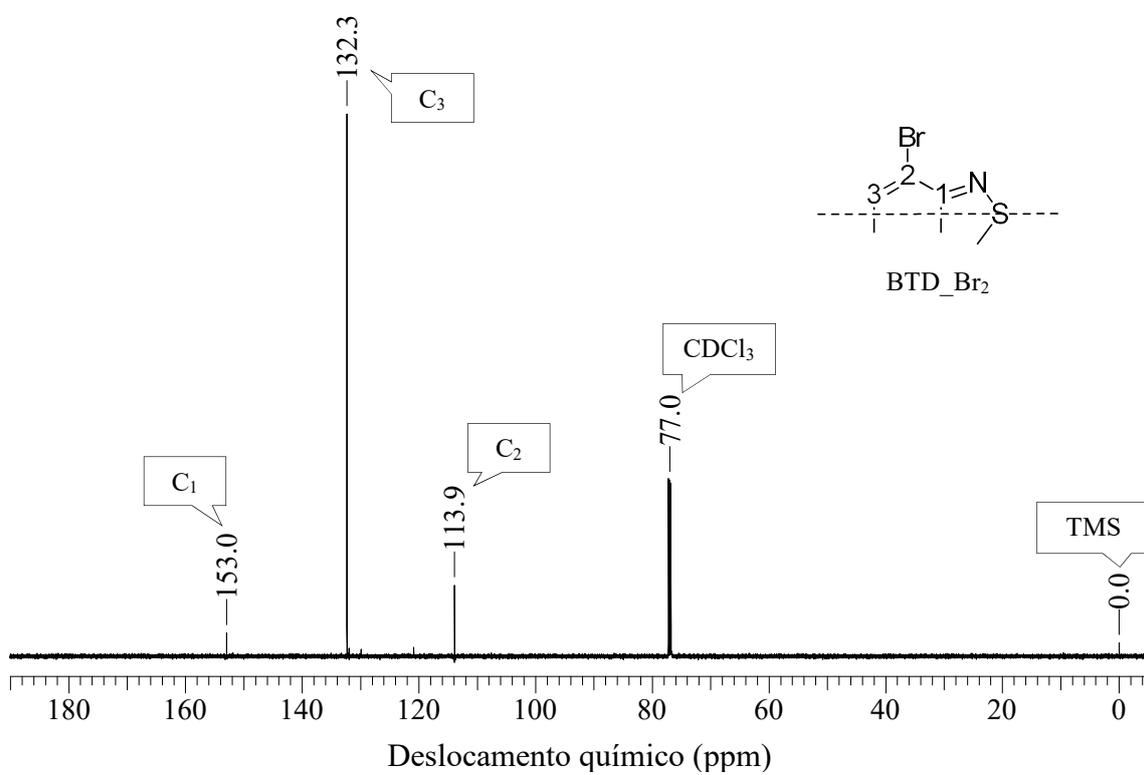
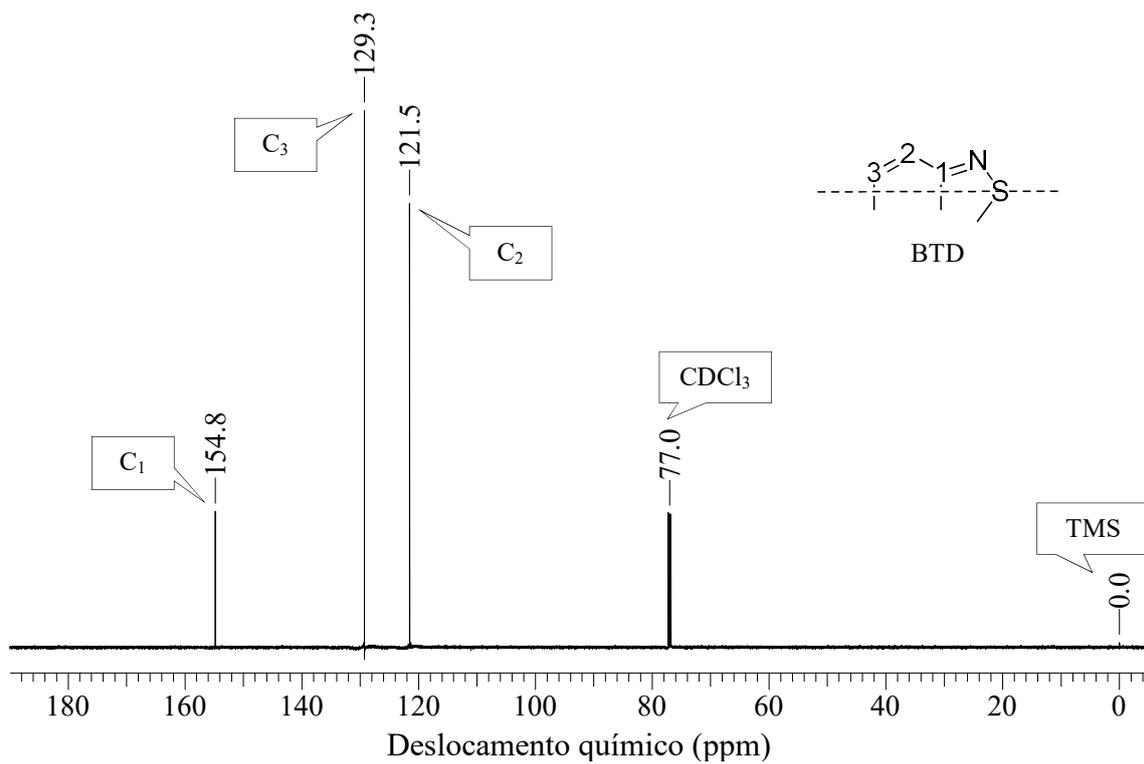
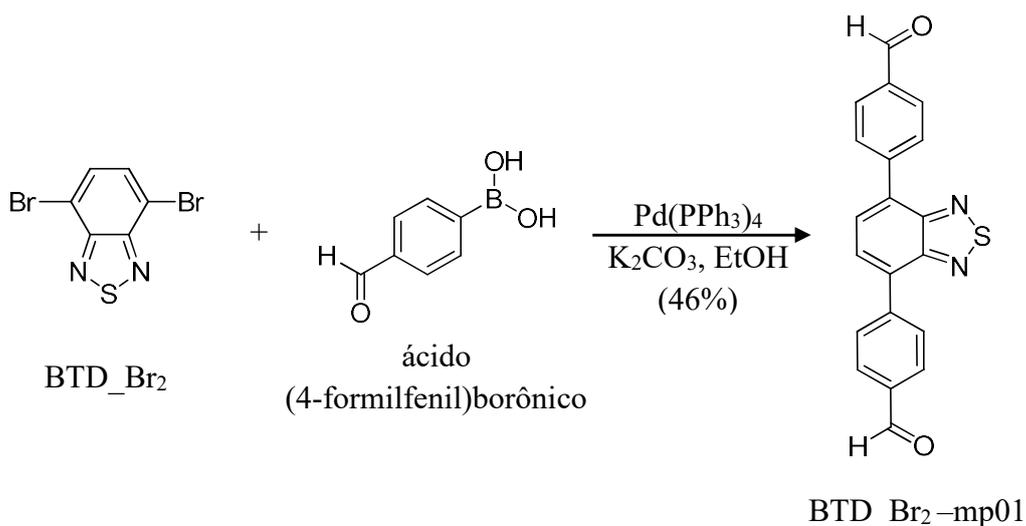


Figura 27. Espectros de RMN <sup>13</sup>C (300 Mhz, solvente: CDCl<sub>3</sub>) evidenciando a conversão do composto BTD (acima) a BTD\_Br<sub>2</sub> (abaixo).



Esquema 32. Reação de Suzuki para a obtenção do composto BTDBr<sub>2</sub>-mp-01.

Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H, a formação da ligação C<sub>sp2</sub>-C<sub>sp2</sub> verifica-se pelo pequeno deslocamento do único sinal presente no reagente, o simpleto referente ao H<sub>2</sub> aromático em 7,72 ppm (H<sub>2</sub>, BTDBr<sub>2</sub>) para 7,92 no produto (H<sub>2</sub>, BTDBr<sub>2</sub>-mp01) devido a troca da ligação C<sub>sp2</sub>-Br por C<sub>sp2</sub>-C<sub>sp2</sub> no carbono adjacente e, por consequência, a formação do simpleto em 10,14 ppm referente ao átomo H<sub>5</sub> do aldeído (H<sub>5</sub>, BTDBr<sub>2</sub>-mp01) e os dupletos em 8,19 e 8,09 ppm referentes aos átomos H<sub>4</sub> e H<sub>3</sub> aromáticos (H<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>, BTDBr<sub>2</sub>-mp01) componentes da estrutura do produto formado (Figura 28).

Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C a reação é evidenciada pelo deslocamento do sinal referente ao átomo C<sub>2</sub> em 113,9 ppm (C<sub>2</sub>-Br, BTDBr<sub>2</sub>) para 133,0 ppm (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, BTDBr<sub>2</sub>-mp01) em decorrência da formação da ligação C<sub>sp2</sub>-C<sub>sp2</sub> que, resultando no acoplamento do benzaldeído junto a estrutura do reagente BTDBr<sub>2</sub>, apresenta os sinais em 129,9; 130,0; 136,1 e 143,0 ppm referentes aos carbonos aromáticos (C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>, BTDBr<sub>2</sub>-mp01), bem como o sinal em 191,8 ppm referente ao átomo C<sub>8</sub> do aldeído (Figura 29).

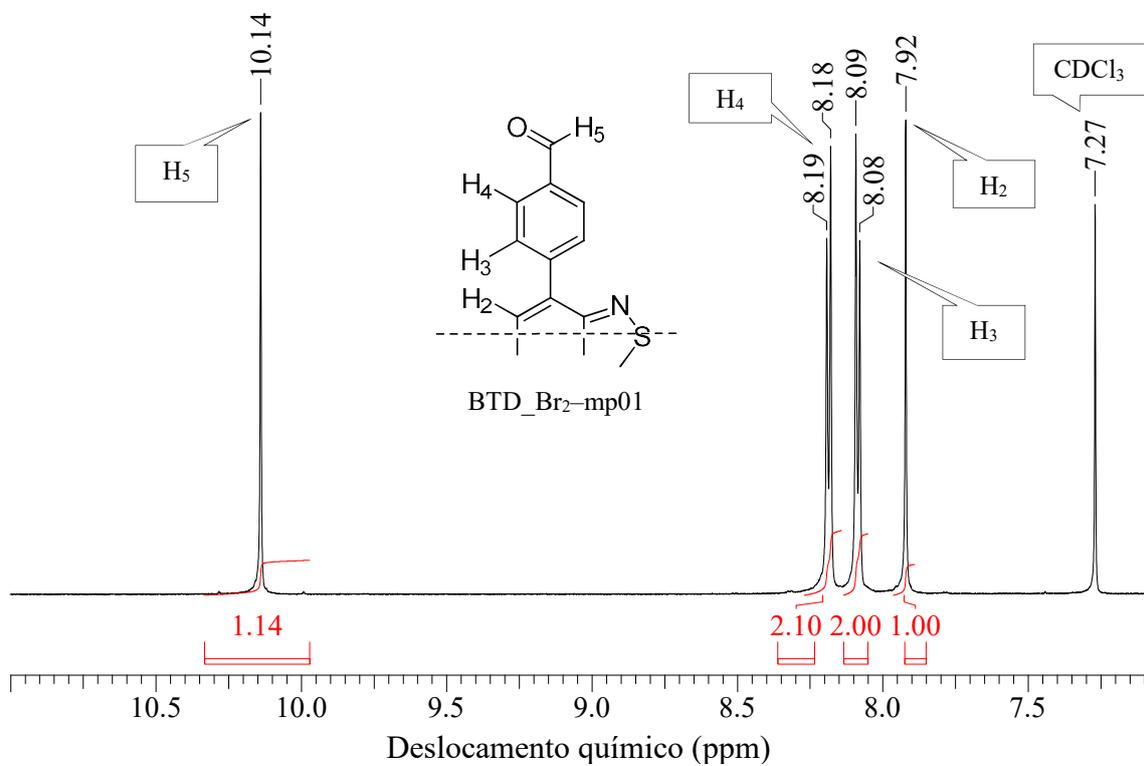
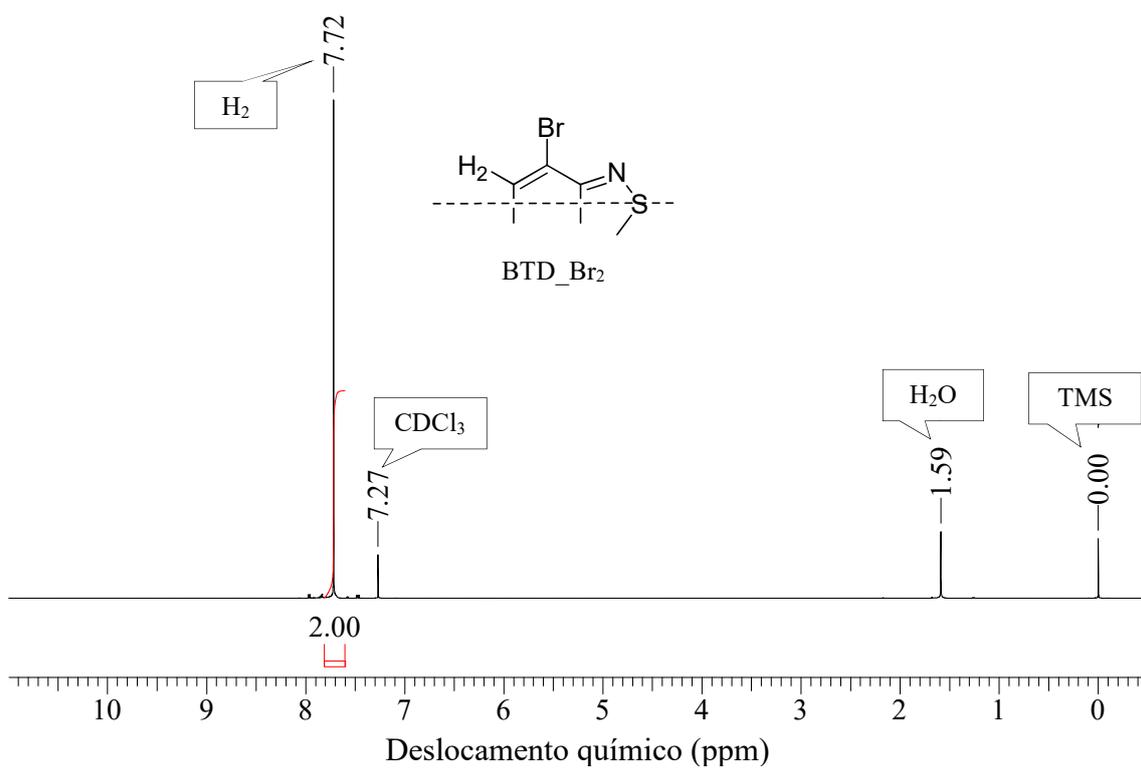


Figura 28. Espectros de RMN <sup>1</sup>H (300 Mhz, solvente: CDCl<sub>3</sub>) evidenciando a conversão do composto BTDBr<sub>2</sub> (acima) a BTDBr<sub>2</sub>-mp01 (abaixo).

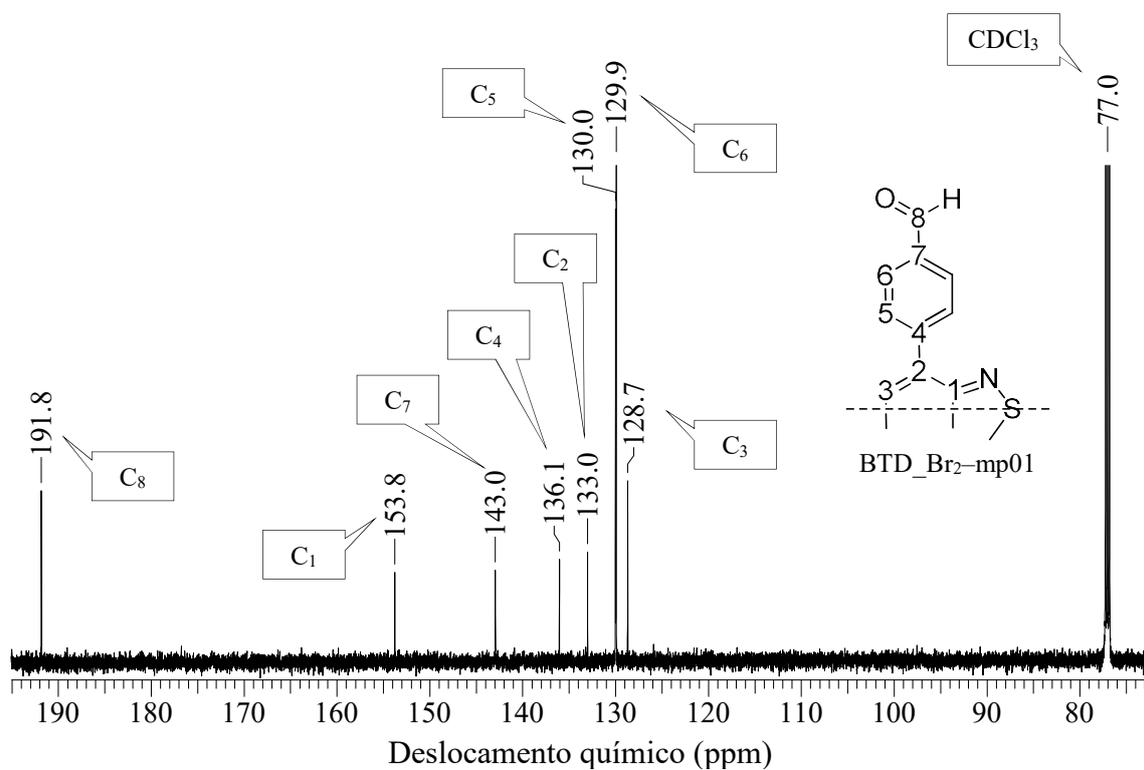
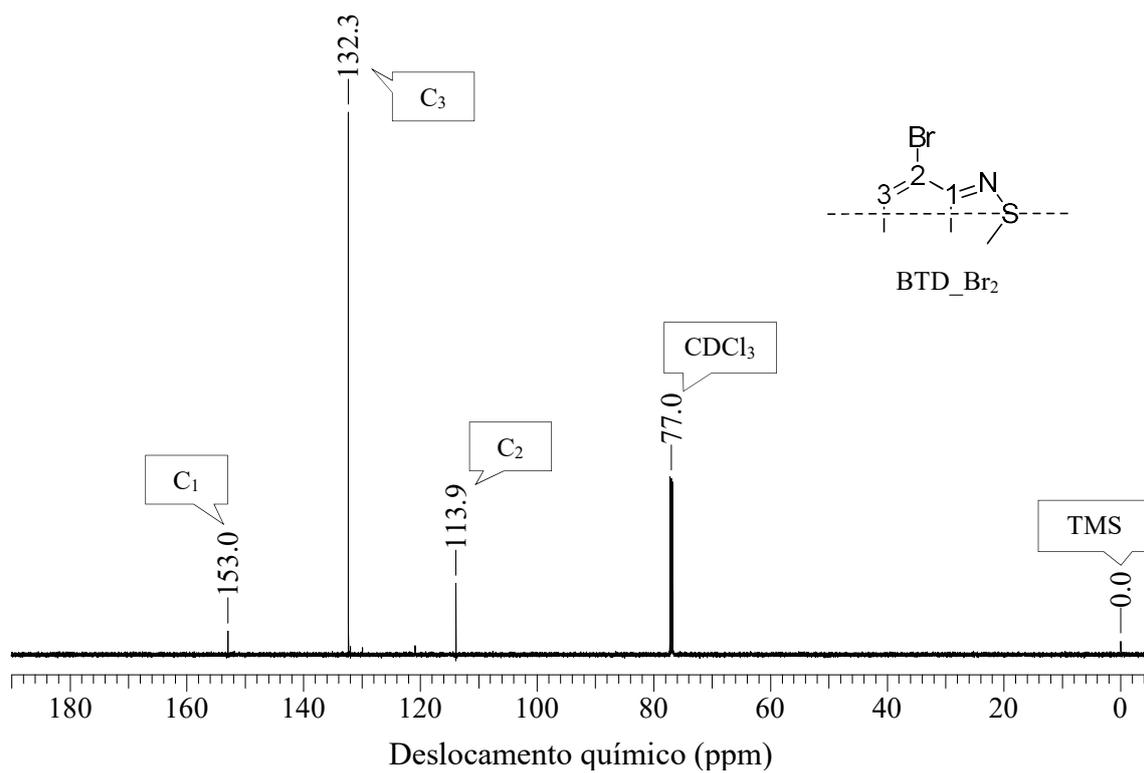
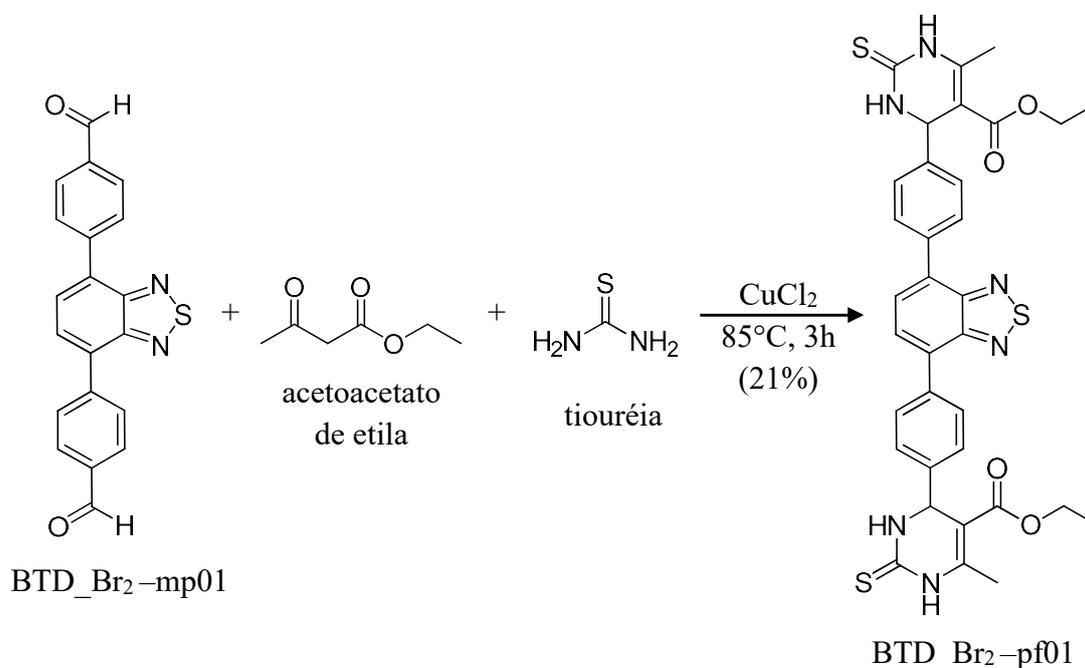


Figura 29. Espectros de RMN <sup>13</sup>C (300 Mhz, solvente: CDCl<sub>3</sub>) evidenciando a conversão do composto BTDBr<sub>2</sub> (acima) a BTDBr<sub>2</sub>-mp01 (abaixo).

Finalmente, para a obtenção do derivado DHPM fluorescente não citotóxico, o produto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01, realizou-se a reação de Biginelli utilizando o acetoacetato de etila, a tiouréia e o aldeído obtido na etapa anterior, o composto BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01 (Esquema 33).



Esquema 33. Reação de Biginelli, utilizando o aldeído BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01, para obtenção da DHPM fluorescente BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 30) a formação do núcleo DHPM é evidenciado pelo deslocamento do sinal do H<sub>5</sub> para 5,30 ppm, resultado da conversão do grupo aldeído do reagente (H<sub>5</sub> em 10,14 ppm, BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01) ao carbono assimétrico presente no anel DHPM; dos sinais em 4,07 e 1,16 ppm referentes aos átomos H<sub>6</sub> e H<sub>7</sub> do grupo éster – CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, o sinal em 2,34 ppm do H<sub>8</sub> da metila ligada ao carbono sp<sup>2</sup> do anel DHPM e o deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênio aromático H<sub>3</sub> e H<sub>4</sub> para 7,98 e 7,40 ppm, observados em 8,08 e 8,19 ppm no reagente. No espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura 31) observa-se os sinais referentes aos carbonos da ligações duplas C=S (δ = 174,2) e C=O (δ = 162,2) e o deslocamento do sinal em 191,8 ppm (referente ao carbono -CHO do reagente) para 145,3 ppm (carbono assimétrico do produto) confirmando a formação da DHPM desejada.

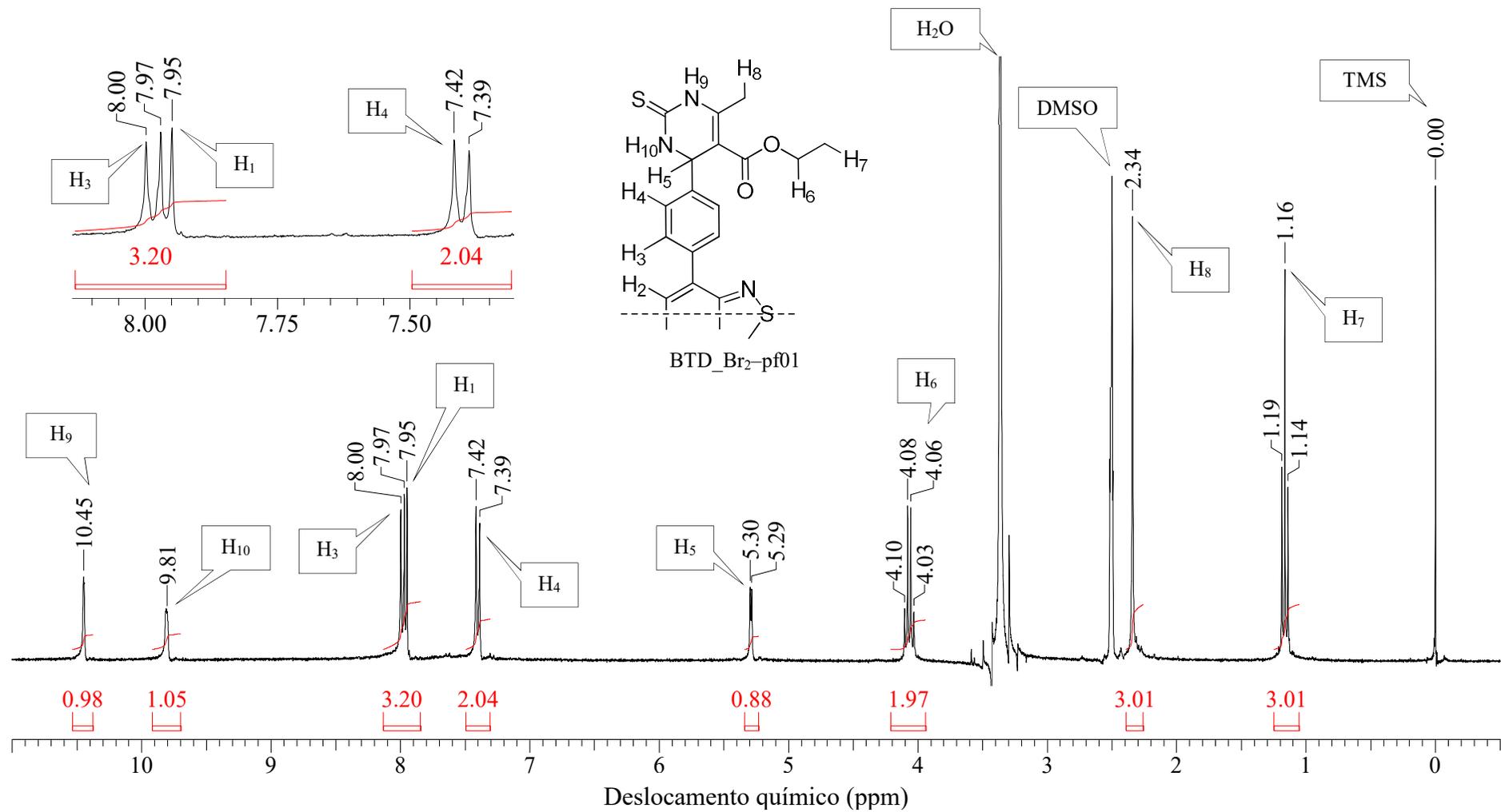


Figura 30. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do derivado DHPM fluorescente não citotóxico BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01.

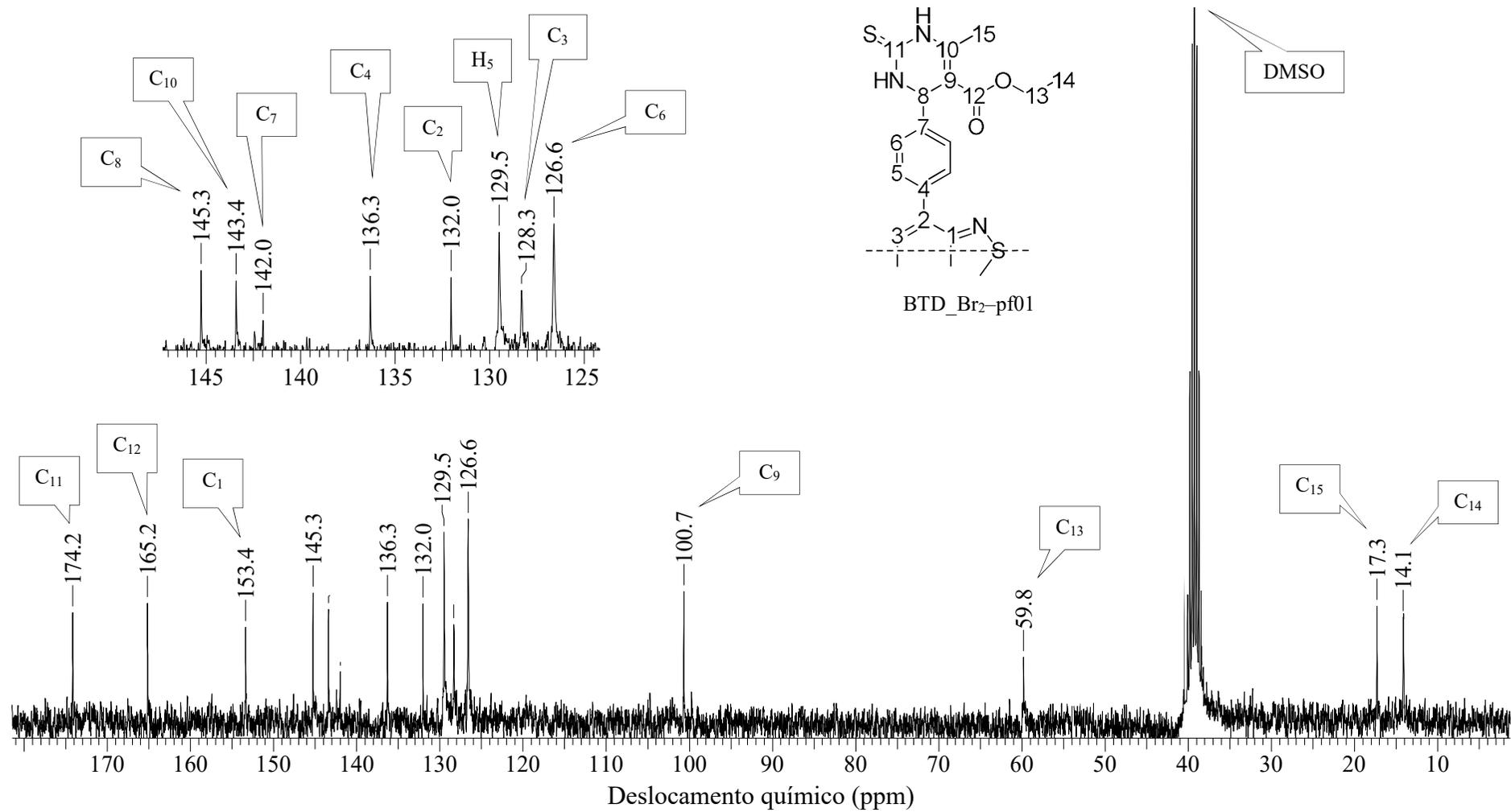
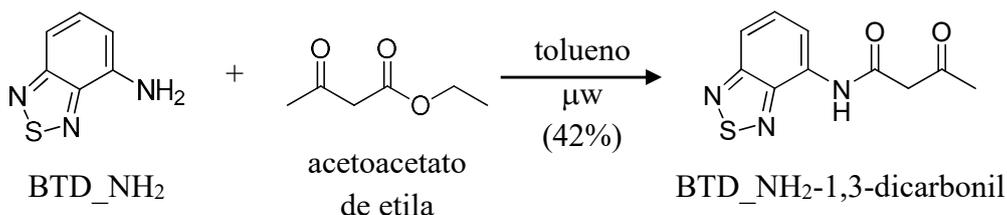


Figura 31. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do derivado DHPM fluorescente não citotóxico BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01

Enquanto a síntese do derivado DHPM não citotóxico  $\text{BTD\_Br}_2\text{-pf01}$  fez-se necessário a preparação do fluorofulo  $\text{BTD\_Br}_2$  (Esquema 31, pág. 57), a obtenção do composto citotóxico partiu do fluorofulo comercial 4-aminobenzotiazol ( $\text{BTD\_NH}_2$ ) que, reagindo com acetoacetato de etila, forneceu o produto  $\text{BTD\_NH}_2\text{-1,3-dicarbonil}$  (Esquema 34), o componente dicarbonílico a ser utilizado na reação multicomponente de Biginelli para obtenção do produto final  $\text{BTD\_NH}_2\text{-pf01}$ .



Esquema 34. Síntese do composto  $\text{BTD\_NH}_2\text{-1,3-dicarbonil}$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do produto obtido apresenta os sinais em 8,43; 7,69 e 7,58 ppm referentes aos hidrogênio aromáticos  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_3$  e  $\text{H}_2$  do núcleo BTDA e os simples em 3,67 e 2,31 ppm referentes aos átomos  $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$  da sequência  $-\text{COCH}_2\text{COCH}_3$ . No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  observa-se os sinais referentes aos carbonos  $\text{NC=O}$  e  $\text{C=O}$  em 164,0 e 204,6 ppm, os carbonos da sequência  $-\text{COCH}_2\text{COCH}_3$  em 49,8 e 31,3 ppm, coerentes com a formação da estrutura desejada (Figura 32).

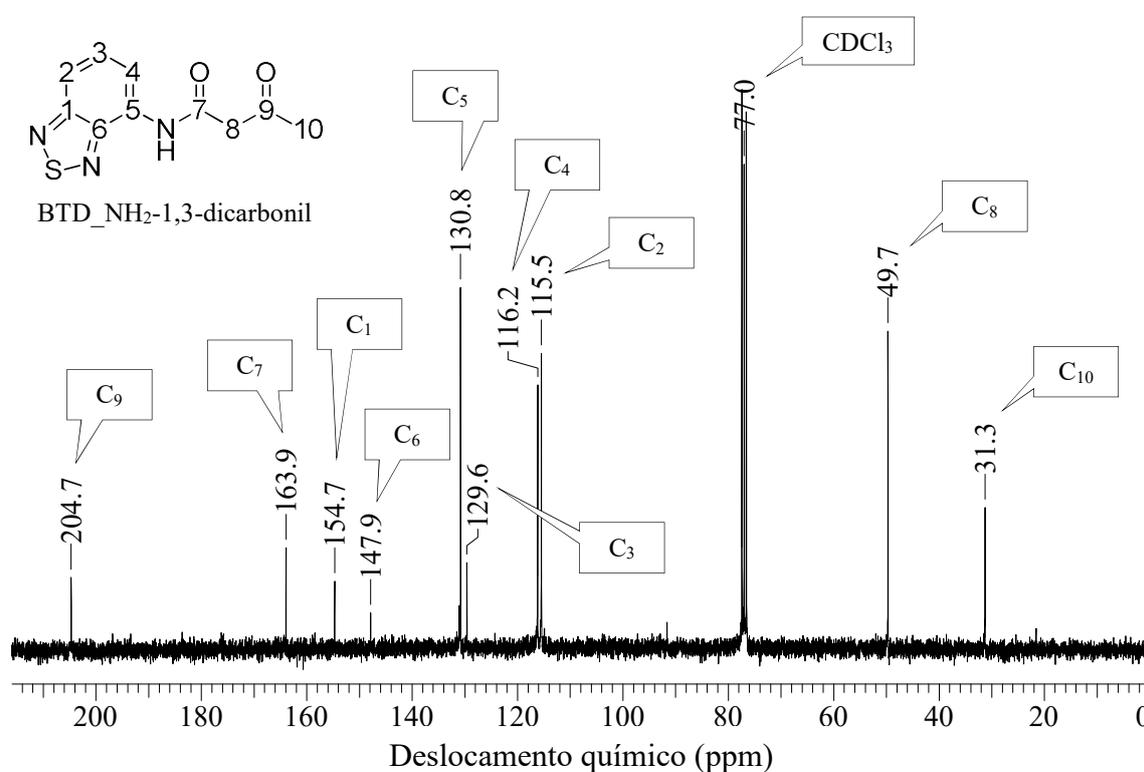
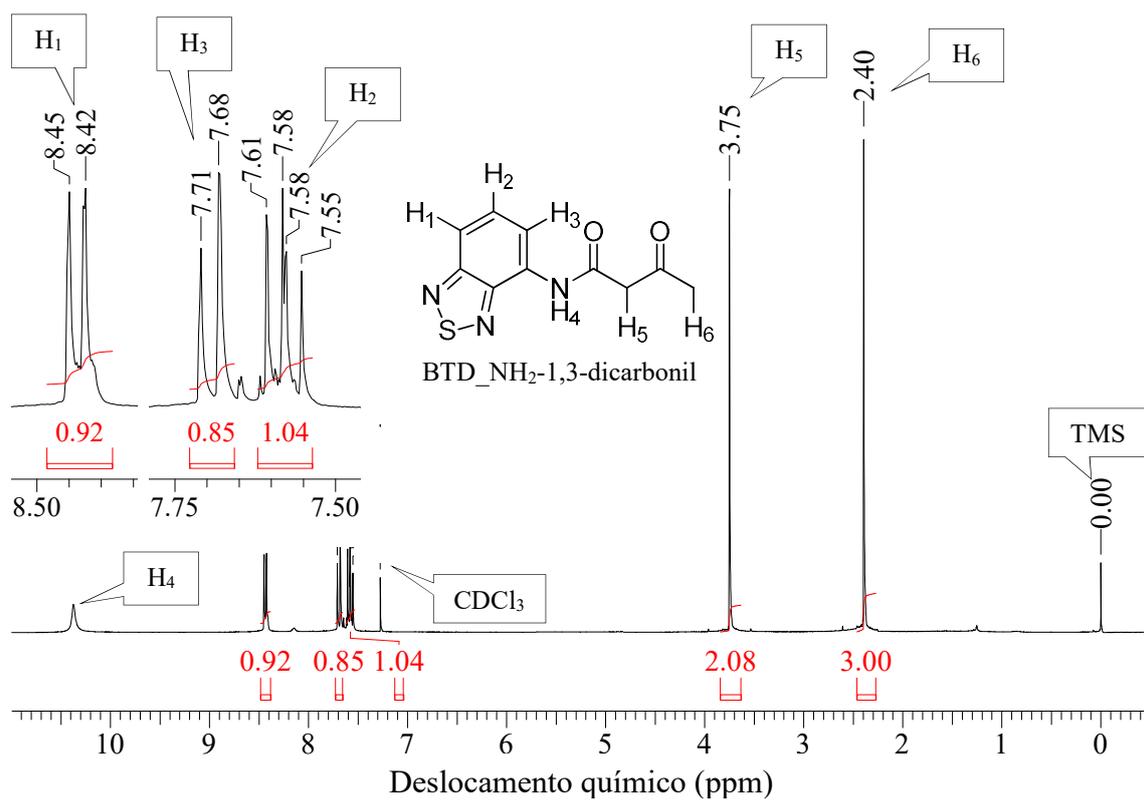
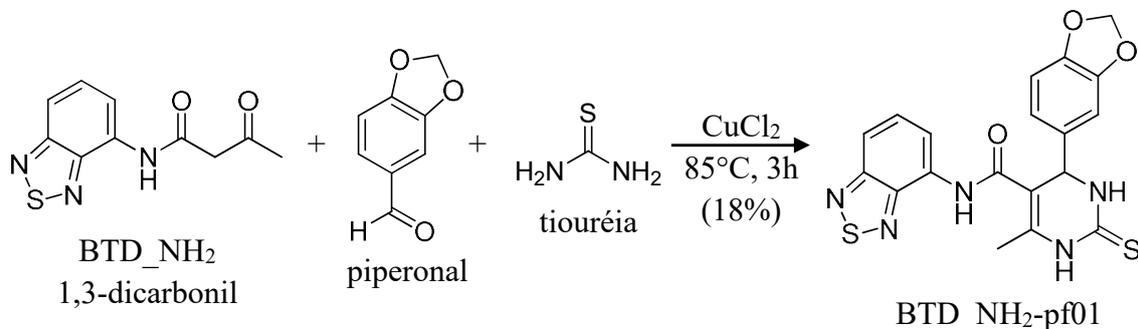


Figura 32. Espectros de RMN (300 Mhz, solvente: CDCl<sub>3</sub>) de <sup>1</sup>H (acima) e <sup>13</sup>C (abaixo) evidenciando a estrutura do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-1,3-dicarbonil.

Após obtenção e caracterização do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-1,3-dicarbonil, realizou-se a reação de Biginelli para síntese do derivado BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 (Esquema 35), o derivado DHPM fluorescente citotóxico.



Esquema 35. Síntese do derivado DHPM citotóxico BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 *via* reação de Biginelli.

A comparação dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do reagente BTD\_NH<sub>2</sub>-1,3-dicarbonil com os espectros obtidos do produto da reação confirma a estrutura do composto desejado.

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H observa-se a perda do sinal referente ao hidrogênio CH<sub>2</sub> (simpleto, δ = 3,75) e deslocamento do sinal referente ao grupo –CH<sub>3</sub> (simpleto, δ = 2,40) para 2,27 no produto (Figura 33). Adicionalmente, o espectro de RMN de <sup>13</sup>C evidencia os deslocamentos dos sinais referentes ao carbono do grupo –CH<sub>2</sub> (de 49,7 para 120,0 ppm devido sua conversão a carbono quartenário e posição na estrutura do produto) e do grupo C=O (de 204,6 para 148,5 ppm no produto). Os sinais característicos no RMN de <sup>1</sup>H para o produto são os hidrogênios aromáticos (simpleto, δ = 6,92; duplete δ = 6,90; duplete δ = 6,86) e –CH<sub>2</sub>- (simpleto, δ = 5,99) do grupo piperonal (Figura 34).

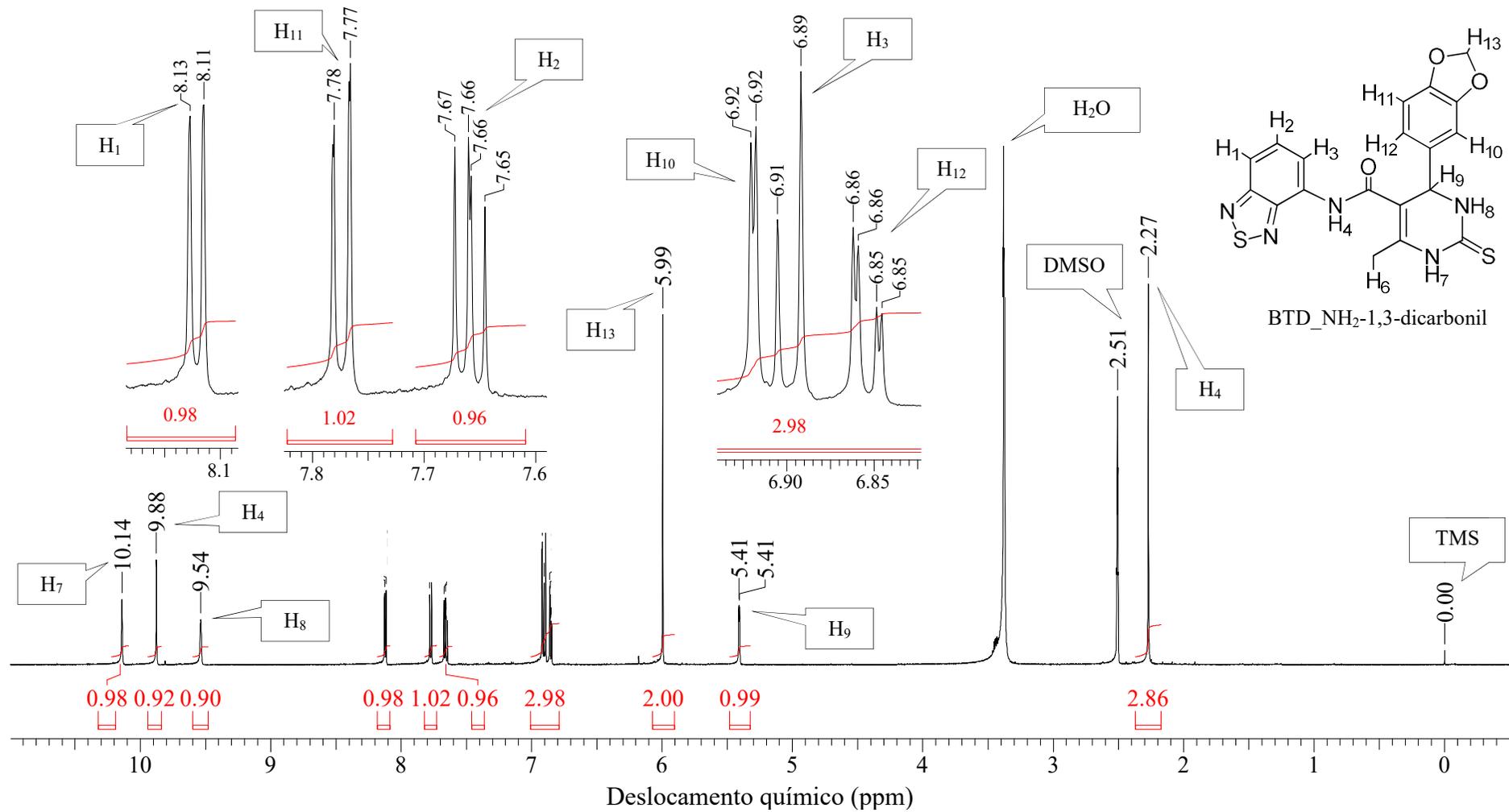


Figura 33. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01.

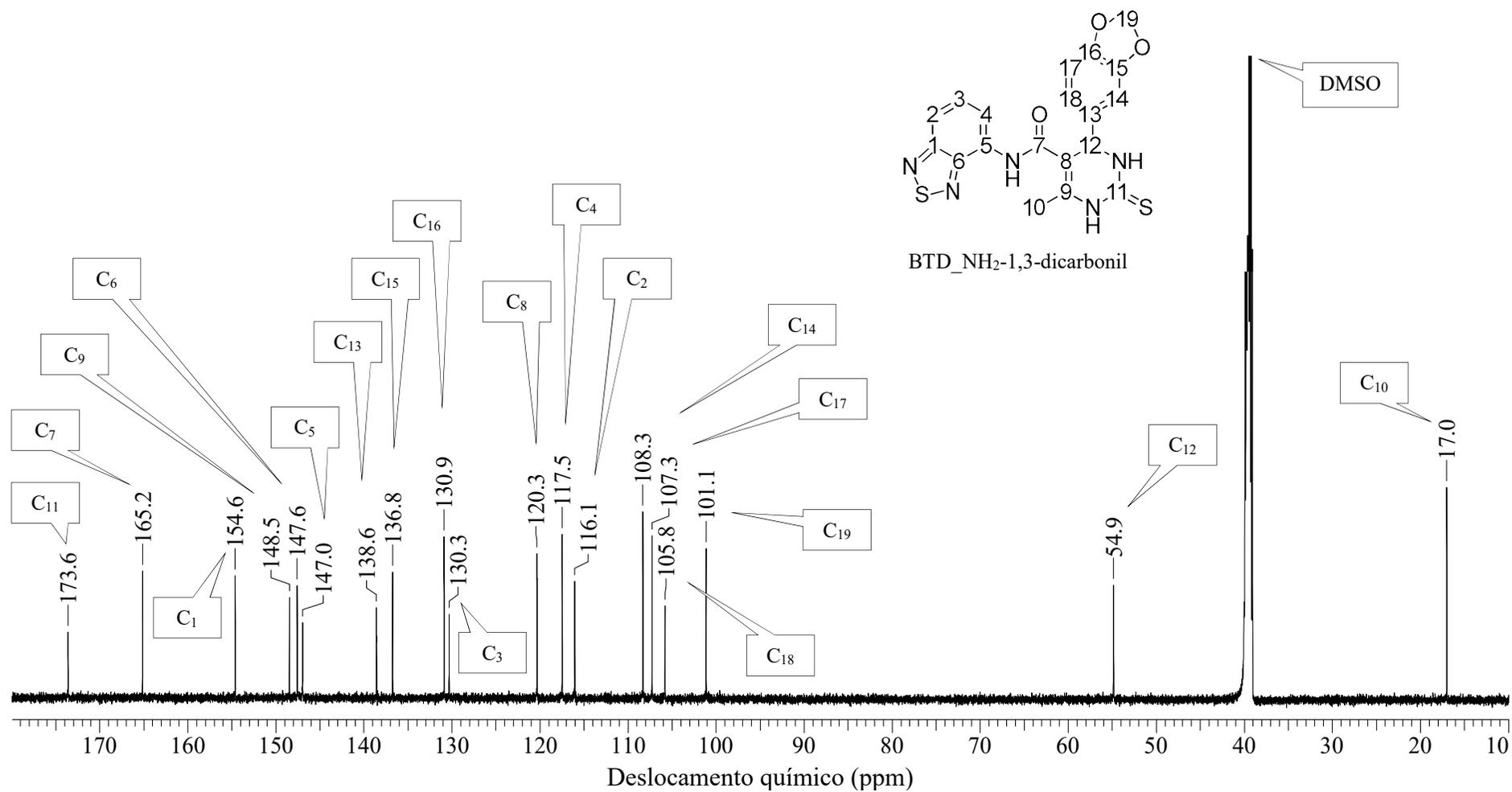


Figura 34. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (300 Mhz, solvente: DMSO) evidenciando a estrutura do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01.

Os derivados DHPM fluorescentes BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01 e BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 foram submetidos a testes biológicos e, conforme esperado, a análise biológica (inviabilidade do crescimento celular de linhagens cancerígenas MCF-7) comprovou a ação citotóxica do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 (IC<sub>50</sub> = 250 μM) e mostrou não haver citotoxicidade para o composto BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01, que utilizando concentrações da ordem de 0,75 a 100 μM apresentou aumento discreto aumento da taxa de inibição da viabilidade celular, de 3% para 12%, permanecendo constante para concentrações de 125 a 500 μM e, de forma mais significativa, apresentando pequeno aumento da atividade inibitória somente em concentrações acima de 1000 μM. Resultados que classificam o composto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 como não citotóxico, enquanto o composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 apresentou acentuada inibição em concentrações de 125 a 1000 μM (Gráfico 1).

Esses resultados que confirmam a necessidade do grupo farmacofórico para a atividade citotóxica apresentada pelos derivados do monastrol, conforme dados previamente estabelecido pela literatura.

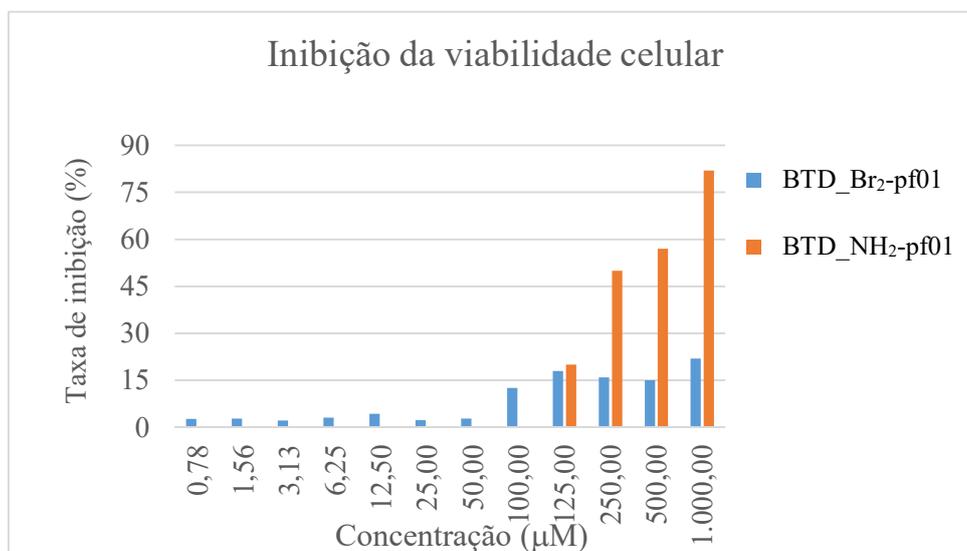


Gráfico 1. Taxa de inibição de viabilidade celular (citotoxicidade) para os compostos BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 e BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 em células cancerígenas MCF-7.

As análises do imageamento celular, *via* microscopia confocal, evidenciaram células com morfologia preservada (células globulares e sem deformidades aparentes) e ciclo de divisão celular mitótica normal (fuso mitótico dipolar) para as células tratadas com o composto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01, reforçando não haver ação citotóxica pela presença do composto no ambiente celular (Figura 35).

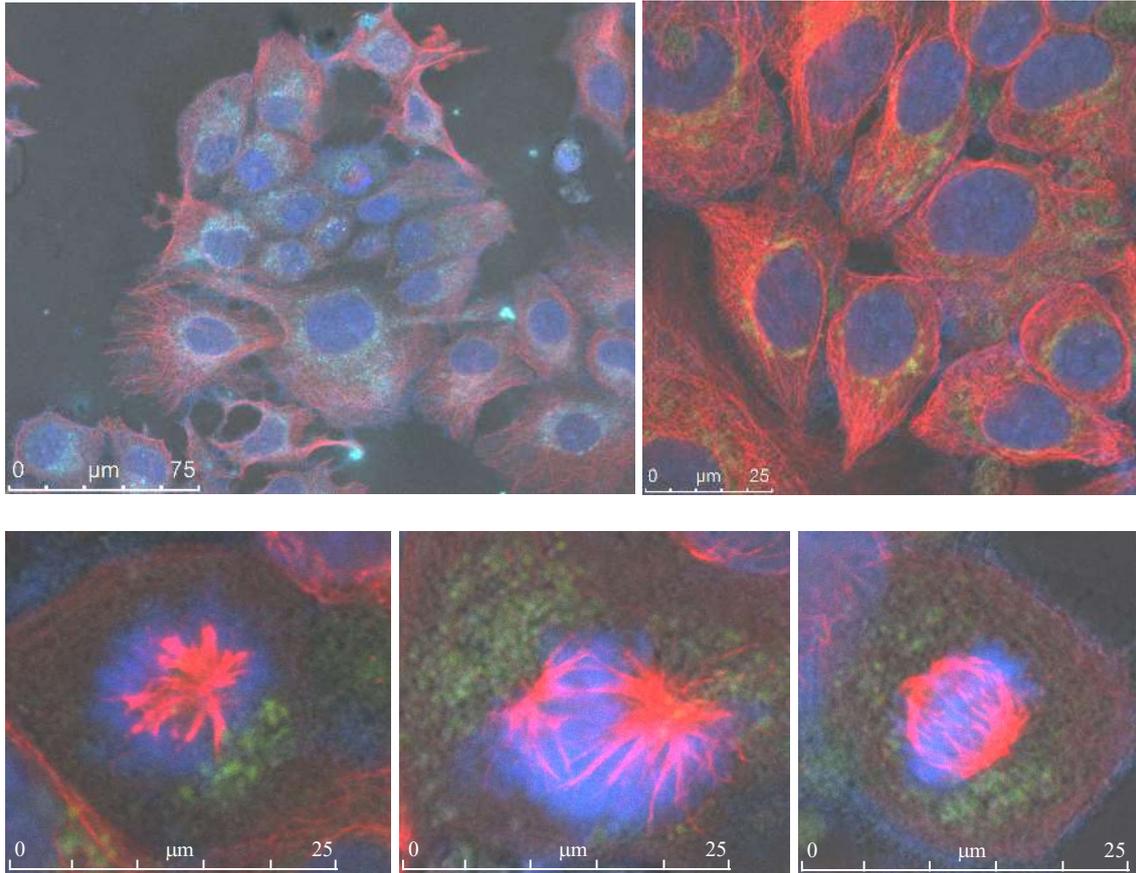


Figura 35. Agrupamento de células visto sob microscopia confocal. Em vermelho: microtubulos; em azul: cromatina; em verde: DHPM fluorescente BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01. Acima: destaque da morfologia celular. Abaixo: formação do fuso dipolar mitótico na presença da DHPM fluorescente.

Em contraste, as imagens obtidas ao tratar as células com o composto citotóxico BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01, apresentam células com estrutura morfológica comprometida, corpos disformes, rugosidade, fragmentação da membrana celular e alterações no processo mitótico causado pela formação do fuso monoastral (Figura 36).

Adicionalmente, observa-se uma dinâmica de dispersão diferenciada entre os compostos citotóxico BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 e não citotóxico BTD\_Br<sub>2</sub>-mp01. Após entrar no citoplasma celular, o composto se acumula na membrana nuclear e se dispersa em direção ao núcleo antes da celular entrar em divisão. Enquanto o composto não citotóxico apresenta impermeabilidade à membrana nuclear, acumulando-se ao redor do núcleo, somente tendo acesso a as proteínas Eg5 quando a célula, em momento avançado da divisão celular, desfaz a carioteca (Figura 37).

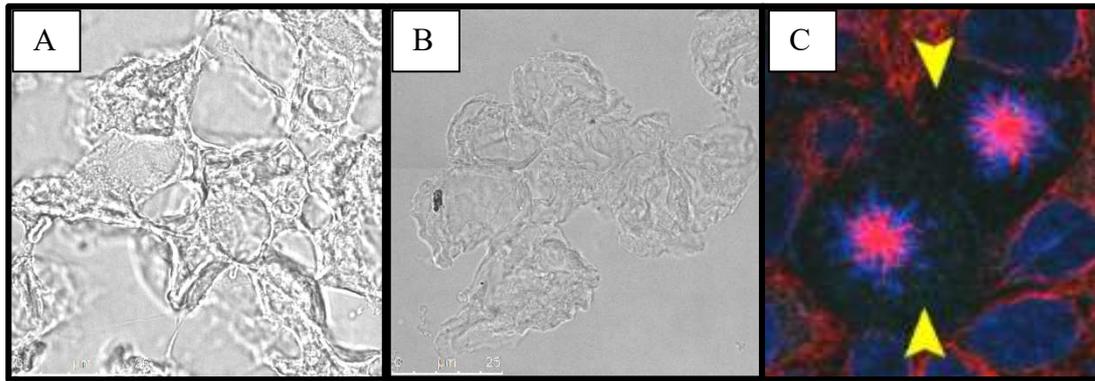


Figura 36. Alterações celulares causadas pelo composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf02. A e B: alterações morfológicas. C: fuso monoastral, setas amarelas indicam a dispersão do composto no citoplasma.

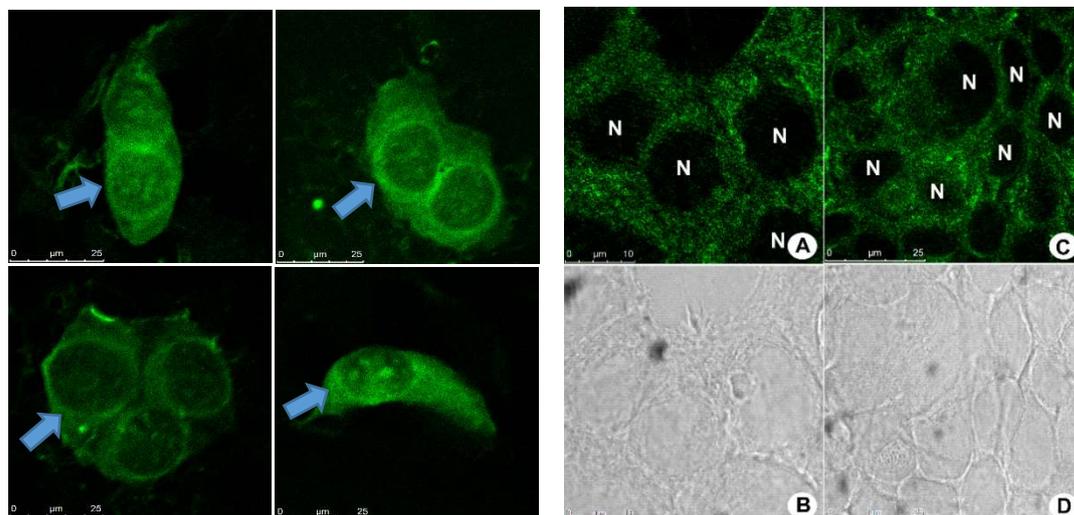


Figura 37. A esquerda: dispersão do composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01 através da membrana nuclear. A direita: dispersão do composto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 ao redor da membrana nuclear, detalhe para a ausência do contorno da membrana nuclear. (A: células vivas; B) destaque para a morfologia celular; C) células fixadas, D) destaque para a morfologia celular.

Outra característica fundamental associada ao composto BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01, e de especial interesse para a microscopia confocal, está na sua emissão característica. Embora as imagens anteriormente apresentadas demonstrem o produto citotóxico na cor verde, este apresenta espectro de emissão triplo (RGB: *red, green and blue*), ou seja, pode ser observado tanto nas cores verde, azul ou vermelha, a depender das características dos demais marcadores celulares presentes no experimento (Figura 38)

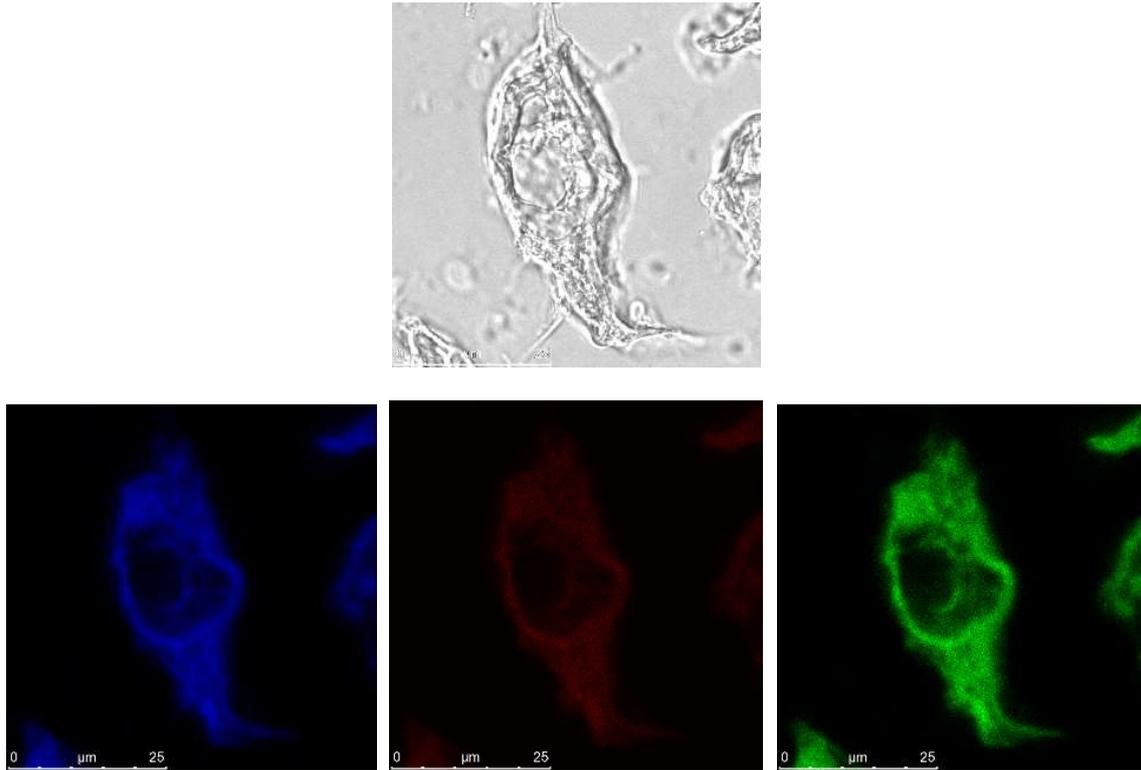


Figura 38. Célula tratada com o composto citotóxico BTD\_NH<sub>2</sub>-pf01. Acima: imagem de contraste evidenciando a disformidade da morfologia celular. Abaixo: visualização “RGB” do composto disperso no ambiente celular.

Embora os dados de toxicidade e da microscopia confocal claramente comprovem a inatividade do composto BTD\_Br<sub>2</sub>-pf01 sobre as proteínas motoras Eg5, a análise do acompanhamento da evolução do processo de divisão celular evidencia uma característica importante associada ao produto testado. O composto não se dispersa pelo citoplasma celular, ao contrário, as imagens demonstram a formação de agrupamentos definidos (manchas de cor verde) e de movimentação progressiva durante o processo de mitose celular. Esta observação indica que, mesmo não apresentando citotoxicidade, o composto apresenta especificidade para as proteínas motoras Eg5, mas não interferem no seu funcionamento normal, conforme pode ser visto na Figura 35.

## Conclusão

O monitoramento da reação PBM *via* ESI(+)-MS(/MS), associado a técnica de etiqueta de cargas, a caracterização por raio-X do intermediário neutro gerado ao longo da reação e a utilização de cálculos DFT empregando-se a abordagem explícita para o solvente, forneceram dados inéditos e conclusivos para que este trabalho pudesse apresentar um caminho reacional mais detalhado para a reação multicomponente PBM.

Notadamente, para a etapa de transferência do grupo fenila, os cálculos de DFT revelaram que a forma acíclica do intermediário-chave, apesar de menos estável que a forma cíclica, é a estrutura responsável pela transferência do fenila, sendo a participação do solvente fundamental para a formação do estado de transição com requisitos energéticos/geométricos necessários para que a transferência do grupo fenila ocorra.

Adicionalmente, a obtenção de Diidropirimidinonas fluorescentes citotóxicas e não citotóxicas para investigação da ação inibitória sobre proteínas motoras do fuso mitótico (Eg5), *via* microscopia confocal, mostrou-se satisfatória. Os dados obtidos sugerem haver outro fator relacionado a ação citotóxica apresentada pelas DHPM's, a capacidade de transpor a membrana nuclear antes do início do processo de divisão celular.

Assim, DHPM's com elevada afinidade a proteína Eg5, podem estar apresentando baixa, ou nenhuma, citotoxicidade por não terem acesso ao núcleo celular no momento apropriado.

## Referências Bibliográficas

- (1) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, a T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2325–2327.
- (2) Mountford, P. G. *Green Chem. Pharm. Ind.* **2010**, 145–160.
- (3) Nicolaou, K. C.; Yang, Z.; Liu, J. J.; Ueno, H.; Nantermet, P. G.; Guy, R. K.; Claiborne, C. F.; Renaud, J.; Couladouros, E. A.; Paulvannan, K. *Nature* **1994**.
- (4) Müller, T. J. J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 960–961.
- (5) Van Der Heijden, G.; Ruijter, E.; Orru, R. V. a. *Synlett* **2013**, *24* (6), 666–685.
- (6) Slobbe, P.; Ruijter, E.; Orru, R. V. a. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3* (10), 1189.
- (7) praziquantel - patente.pdf, 1997.
- (8) Liu, H.; William, S.; Herdtweck, E.; Botros, S.; Dömling, A. *Chem. Biol. Drug Des.* **2012**, *79* (4), 470–477.
- (9) Cao, H.; Liu, H.; Dömling, A. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (41), 12296–12298.
- (10) Knapp, J. M.; Kurth, M. J.; Shaw, J. T.; Younai, A. In *Diversity-Oriented Synthesis: Basics and Applications in Organic Synthesis, Drug Discovery, and Chemical Biology*; John Wiley & Sons, Inc., 2013; p 29.
- (11) Ugi, I.; Dömling, a; Hörl, W. *Endeavour* **1994**, *18* (3), 115–122.
- (12) Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic applications of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms*; 2005.
- (13) Tron, G. C.; Minassi, A.; Appendino, G. **2011**.
- (14) Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35* (12), 1043–1052.
- (15) Wan, J.; Pan, Y. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2012**, *12* (4), 337–349.
- (16) Singh, K.; Arora, D.; Falkowski, D.; Liu, Q.; Moreland, R. S. *Eur. J. Org. Chem. Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3258–3264.
- (17) Ali, F.; Mohammed, K.; Salar, U.; Iqbal, S.; Taha, M.; Hadiani, N.; Perveen, S.; Wadood, A.; Ghufran, M.; Ali, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (16), 3624–3635.
- (18) Hassell, M. P.; Lawton, J. H.; May, R. M.; Ecol, J. A.; Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J. *Science (80-. )*. **1999**, *286* (October), 1997–2000.
- (19) Jordan, A.; Hadfield, J. A.; Lawrence, N. J.; McGrow, A. T. *Med. Res. Rev.* **1998**, *18* (4), 259–296.
- (20) Vindya, N. G.; Sharma, N.; Yadav, M.; Ethiraj, K. R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15* (1), 73–82.

- (21) Bergnes, G.; Brejc, K.; Belmont, L. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5* (2), 127–145.
- (22) Zhang, Y.; Xu, W. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2008**, *8* (6), 698–704.
- (23) Salmela, A.-L.; Kallio, M. J. *Chromosoma* **2013**, *122* (25), 431–449.
- (24) Myers, S. M.; Collins, I. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (4), 463–489.
- (25) Kaan, H. Y. K. Structural and functional characterisation of conventional kinesin and mitotic kinesin Eg5 — a validated target for cancer chemotherapy Hung Yi Kristal Kaan ( B . Sc ), University of Glasgow, 2012.
- (26) Toprak, E.; Yildiz, A.; Hoffman, M. T.; Rosenfeld, S. S.; Selvin, P. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (31), 12717–12722.
- (27) Maliga, Z.; Kapoor, T. M.; Mitchison, T. J. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (9), 989–996.
- (28) Debonis, S.; Simorre, J.; Crevel, I.; Lebeau, L.; Skoufias, D. A.; Blangy, A.; Ebel, C.; Gans, P.; Cross, R.; Hackney, D. D.; Wade, R. H.; Kozielski, F. *Biochemistry* **2003**, *42* (2), 338–349.
- (29) Gartner, M.; Sunder-Plassmann, N.; Seiler, J.; Utz, M.; Vernos, I.; Surrey, T.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2005**, *6* (7), 1173–1177.
- (30) Russowsky, D.; Canto, R. F. S.; Sanches, S. A. A.; D’Oca, M. G. M.; de Fátima, Â.; Pilli, R. A.; Kohn, L. K.; Antônio, M. A.; de Carvalho, J. E. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34* (4), 173–182.
- (31) Yi, H.; Kaan, K.; Ulaganathan, V.; Rath, O.; Prokopcov, H.; Dallinger, D.; Kappe, C. O.; Kozielski, F. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5676–5683.
- (32) Müller, C.; Gross, D.; Sarli, V.; Gartner, M.; Giannis, A.; Bernhardt, G.; Buschauer, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *59* (2), 157–164.
- (33) Mannich, C. *J. Chem. Soc. Abstr.* **1917**, *112*, 634.
- (34) Mannich, C. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **1917**, *255*, 261.
- (35) Arend, M.; Westermann, B.; Risch, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (8), 1044–1070.
- (36) Alvim, H. G. O.; da Silva Júnior, E. N.; Neto, B. a. D. *RSC Adv.* **2014**, *4* (97), 54282–54299.
- (37) Schultz, S. G.; Schultz, G. *Science (80-. )*. **1984**, *224* (June), 1239–1241.
- (38) Stutz, A.; Georgopoulos, A.; Granitzer, W.; Petranyl, G.; Berneyt, D. *J. Med. Chem.* **1986**, *29* (1), 112–125.
- (39) Liu, M.; Lin, T.; Cory, J. G.; Cory, A. H.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (13), 2586–2593.
- (40) Schulte, T. W.; Neckers, Leonard, M. *Cancer Chemother Pharmacol* **1998**, 273–279.
- (41) Kirino, O.; Oshita, H.; Oishi, T.; Kato, T. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44* (1), 35.

- (42) Petasis, N. A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *4*, 583.
- (43) Candeias, N. R.; Montalbano, F.; Cal, P. M. S. D.; Gois, P. M. P. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6169–6193.
- (44) Au, C. W. G.; Pyne, S. G. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7097–7099.
- (45) Han, W.; Zuo, J.; Zhang, X.; Yuan, W. *Tetrahedron* **2013**, *69* (2), 537–541.
- (46) Candeias, N. R.; Veiros, L. F.; Afonso, C. A. M.; Gois, P. M. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 1859–1863.
- (47) Jingcong, T.; Shuhua, L. *Chin. J. Chem.* **2010**, *28*, 41–49.
- (48) Schlienger, N.; Bryce, R.; Hansen, T. K. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10023–10030.
- (49) Petasis, N. A.; Boral, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 539–542.
- (50) Candeias, Nuno, R.; Cal, Pedro, M. S. D.; André, V.; Duarte, M. T. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2736–2745.
- (51) Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (98), 11488.
- (52) Santos, L. S. *Synthesis (Stuttg.)* **2011**, *22* (10), 1827–1840.
- (53) Koch, K. J.; Gozzo, F. C.; Nanita, S. C.; Takats, Z.; Eberlin, M. N.; Cooks, R. G. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (10), 1721–1724.
- (54) Neto, B. a D.; Meurer, E. C.; Galaverna, R.; Bythell, B. J.; Dupont, J.; Cooks, R. G.; Eberlin, M. N. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3* (23), 3435–3441.
- (55) Santos, L. S.; Pavam, C. H.; Almeida, W. P.; Coelho, F.; Eberlin, M. N. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43* (33), 4330–4333.
- (56) Sabino, A. a.; Machado, A. H. L.; Correia, C. R. D.; Eberlin, M. N. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (19), 2514–2518.
- (57) Santos, V. G.; Godoi, M. N.; Regiani, T.; Gama, F. H. S.; Coelho, M. B.; de Souza, R. O. M. a.; Eberlin, M. N.; Garden, S. J. *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20* (40), 12808–12816.
- (58) Vikse, K. L.; Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *279*, 96–114.
- (59) Limberger, J.; Leal, B. C.; Monteiro, A. L.; Dupont, J. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (1), 77–94.
- (60) Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Organic Chemicals*; 2009.
- (61) Sarli, V.; Huemmer, S.; Sunder-Plassmann, N.; Mayer, T. U.; Giannis, A. *ChemBioChem* **2005**, *6* (11), 2005–2013.

## **Anexos 1: Artigo Publicado Referente ao Capítulo 1**

Investigações Sobre o Mecanismo Reacional da Reação Petasis-Borono\_Mannich

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 76337Received 28th May 2015  
Accepted 28th August 2015

DOI: 10.1039/c5ra16678k

www.rsc.org/advances

## Insights on the Petasis Borono–Mannich multicomponent reaction mechanism†

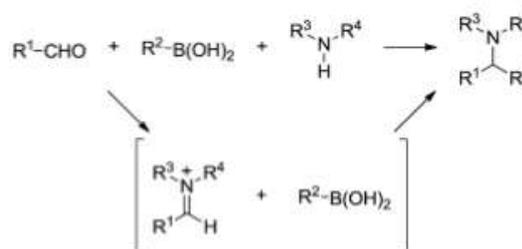
Roberto Y. Souza,<sup>a</sup> Giovana A. Bataglion,<sup>b</sup> Davi A. C. Ferreira,<sup>a</sup> Claudia C. Gatto,<sup>a</sup> Marcos N. Eberlin<sup>b</sup> and Brenno A. D. Neto<sup>\*a</sup>

A joint experimental and theoretical investigation on the mechanism of the Petasis Borono–Mannich reaction is described. Using the charge-tag strategy for mass spectrometry ion monitoring in solution, unprecedented key intermediates were intercepted and characterized. A key intermediate was also isolated from the reaction solution and its structure could be deduced from single crystal X-ray diffraction. A mechanism further consolidated by DFT calculations that reconciles the present and all available data on this important multicomponent reaction is presented.

The lack of compelling evidence supporting a general mechanism for the Petasis Borono–Mannich (PBM) reaction (Scheme 1) has hindered both the development of more efficient catalysts and their effective chiral induction.<sup>1–3</sup> Most mechanistic proposals have relied on theoretical investigations<sup>4,5</sup> or on data from quite specific PBM reactions,<sup>6–8</sup> as reviewed elsewhere,<sup>9</sup> and the available experimental data has been scarce and conflicting. From a <sup>11</sup>B NMR and solvent effects investigation,<sup>6</sup> some mechanistic considerations were presented, but no direct evidence on the intermediates was presented. The solvent, where protic and polar solvents are notably preferred,<sup>9</sup> proved to be crucial for the reaction success, but a few exceptions have been reported. For instance, 1,2-dichloroethane proved to be a better solvent than water.<sup>4</sup> The mechanism of the PBM reaction is therefore still under hot debate<sup>10</sup> and an universally accepted and detailed mechanism is yet to be demonstrated.

Mass spectrometry, especially when electrospray ionization and tandem MS are applied,<sup>11–13</sup> has greatly contributed to the comprehension of several mechanisms for major reactions<sup>14–17</sup> such as for the Morita–Baylis–Hillman,<sup>18</sup> Heck,<sup>19</sup> and Hantzsch<sup>20</sup> reactions. Despite the progress observed in the mechanistic investigation *via* ESI-MS(/MS),<sup>21</sup> the technique may fail for reactions in which intermediates display a neutral (including zwitterionic) character. Acidification or basification may facilitate the detection of intermediates in the form of protonated or deprotonated molecules but the pH change may also affect reaction pathways leading to misleading conclusions. To overcome this drawback, the elegant charge tag strategy has been developed and successfully applied for several reactions.<sup>22</sup> The *in situ* generation of a fixed charge or the remote placement of a covalently bonded charge tag on the structure of reactants favours the continuous ESI-MS detection and characterization of most, if not all, the species added or being formed in the reaction solution therefore including key intermediates.

Based in our interest in multicomponent reactions<sup>23–26</sup> and mechanistic investigations,<sup>27–31</sup> we report herein a joint theoretical and experimental investigation of the mechanism of the PBM reaction. ESI-MS(/MS) monitoring was performed and data was corroborated by DFT calculations. Fortunately, a key intermediate was isolated and its single crystal X-ray analysis



Scheme 1 The Petasis Borono–Mannich (PBM) reaction and its simplified mechanism.

<sup>a</sup>Laboratory of Medicinal and Technological Chemistry, University of Brasília (IQ-UnB), Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP 70904970, P. O. Box 4478, Brasília DF, Brazil. E-mail: brenno.ipi@gmail.com

<sup>b</sup>Thomson Mass Spectrometry Laboratory, University of Campinas-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available: ESI-MS/MS monitoring conditions, reactions, computational details and X-ray diffraction data collection and refinement parameters. CCDC 1060124. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c5ra16678k

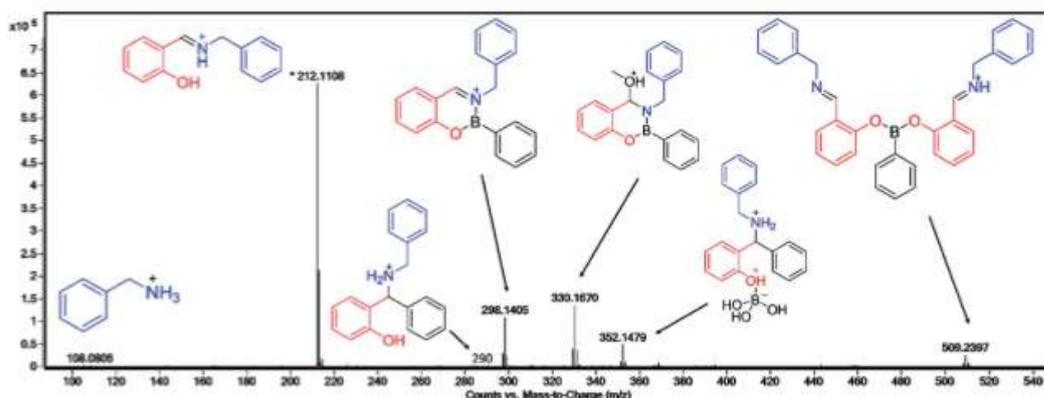


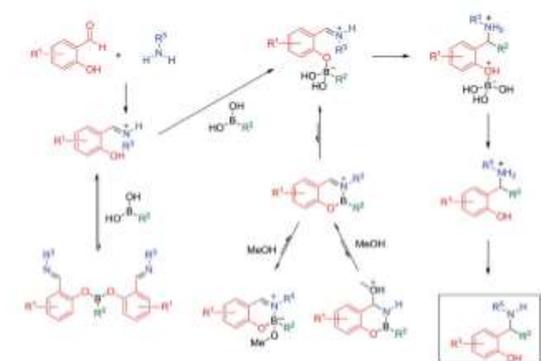
Fig. 1 ESI(+)-MS of the PBM reaction solution in methanol after 30 min at 65 °C. The proposed structures for detected ions due to reactants and intermediates are indicated.

could be performed. The unprecedented data collected herein allowed us to propose a preferred reaction pathway for the PBM reaction and to unveil its most likely mechanism.

We initiate the study reacting benzylamine, phenylboronic acid and salicylaldehyde (see ESI†). The choice of reactants benefits from the knowledge that aldehydes bearing an  $\alpha$ -hydroxy group have been used in PBM reactions to facilitate the formation of a complex with the boronic acid.<sup>9</sup> Both a polar (methanol) and less polar (toluene) solvent were tested. The first reaction to be monitored online by direct infusion ESI(+)-MS was performed in methanol. Fig. 1 shows a quite comprehensive view of the PBM mechanism with several intermediates being directly intercepted by ESI(+)-MS from the reaction solution and further characterized in the gas phase by ESI(+)-MS/MS (Fig. S1–S6 in the ESI†).

The reaction was monitored for a total of 4 h. Before the appearance of the iminium intermediate of  $m/z$  212, no other intermediate could be noted. After 30 min, an intermediate of  $m/z$  509 could also be detected and characterized by ESI(+)-MS/

MS. This ion is likely formed *via* double condensation of the iminium/imine intermediate with the boronic acid. As will be evidenced *via* the theoretical analysis below, no phenyl group transfer to the C=N bond takes place from this intermediate ion of  $m/z$  509. This ion probably arises from a dead-end intermediate, as rationalized in Scheme 2. The condensation of the iminium ion with the phenylboronic acid should afford an intermediate ion of  $m/z$  334 (not detected) which in turn rapidly cyclizes to the detectable intermediate of  $m/z$  298. Reversible addition of methanol to the intermediate ion of  $m/z$  298 seems to afford the ion of  $m/z$  330. The cyclic ion of  $m/z$  298 fails to display proper geometry for phenyl group transfer. This spatial restriction was also indicated by the theoretical analysis. A dynamic equilibrium with its open form (Scheme 2) is likely the process that favours the transfer of the phenyl group to the C=N bond. The ion of  $m/z$  352 is formed after such phenyl transfer and then eliminates B(OH)<sub>3</sub> affording the PBM adduct of  $m/z$  290 (Fig. S2†). Using toluene as the solvent, only the iminium intermediate could be detected and characterized during 4 h of ESI-MS monitoring.



Scheme 2 The PBM reaction mechanism as depicted from MS experiments.

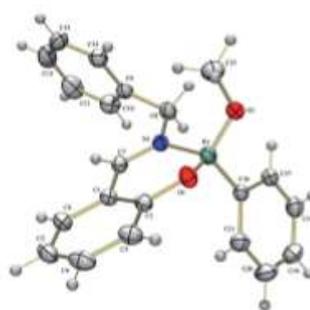


Fig. 2 An ORTEP-3 representation (30% probability displacement ellipsoids) of the asymmetric unit of a key intermediate from the PBM reaction showing crystallographic labelling.

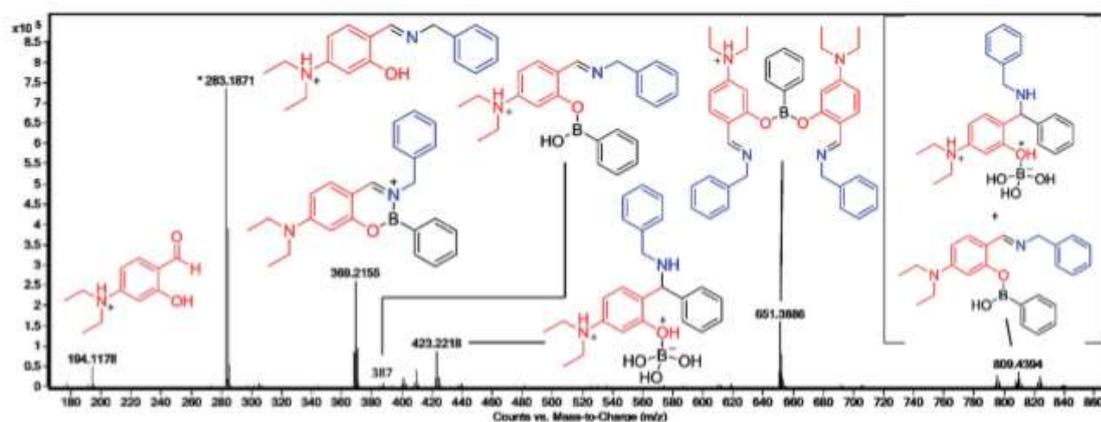


Fig. 3 ESI(+)-MS of the PBM reaction in methanol after 30 min at 65 °C using the charge-tagged salicylaldehyde.

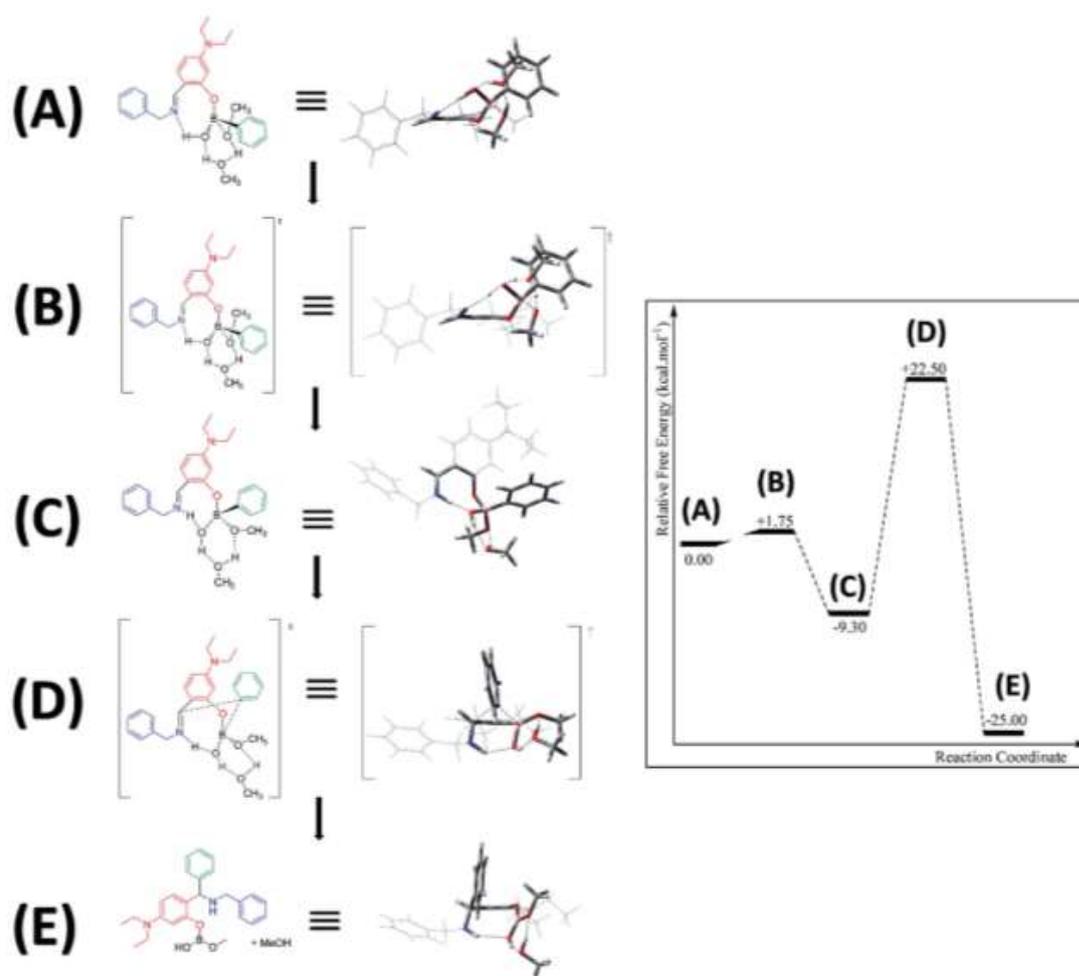


Fig. 4 Relative energy profile for the PBM reaction starting from the imine intermediate in methanol (explicit treatment), PBE1PBE/cc-pVDZ level of theory.

For the PBM reaction performed in methanol, we were fortunate to observe the precipitation of crystals, which were found to be suitable for X-ray analysis (Fig. 2 and Table S1†). The data revealed the unprecedented characterization of the key PBM intermediate, that is, the product of methanol addition to the intermediate detected as the ion of  $m/z$  298 in Fig. 1. The X-ray analysis revealed a zwitterionic cyclic structure formed from methanol addition to the boron atom.

Although they seem inevitable to corroborate the intercepted species, some intermediates proposed in Scheme 2 have not been intercepted by ESI(+)-MS(/MS). To make sure that no intermediate has escaped detection due to the limitation of monitoring intrinsically neutral intermediates, an *in situ* generated charge tag<sup>23</sup> was then added to the reactants, that is, salicylaldehyde was replaced by 4-diethylamino-salicylaldehyde. The idea is to add a strong basic site that should be easily protonated in the reaction solution regardless the pH thus serving as a remote charge tag. Both methanol and toluene were again tested as the solvents, but now with similar results. The reaction performed in toluene produced similar ESI(+)-MS with ions of the same exact mass, but with considerably lower abundance and detected after a longer time of monitoring (120 min). As Fig. 3 and S7–S12† show, ESI(+)-MS monitoring of the charge tagged PBM reaction solutions were also quite revealing in regard to the PBM mechanism.

For the reaction in methanol (Fig. 3), several key species were detected as cations which included the charge-tagged aldehyde of  $m/z$  194, the iminium ion of  $m/z$  283, the cyclic boron intermediate of  $m/z$  369, the intermediate from the double condensation with the boronic acid of  $m/z$  651, and the intermediate formed just before  $B(OH)_3$  elimination of  $m/z$  423. Note their structures which are similar as those intercepted from the reaction solution with the untagged aldehyde. Using the charge-tagged reagent, however, the open form of the boron-containing intermediate of  $m/z$  387, which is the species proposed for the phenyl group transfer, was additionally detected and characterized. It seems that such intermediate is rapidly formed and consumed (Scheme 2), affording its preferentially cyclic form, in the course of the PBM reaction judging for its low abundance even when the charge tag was added. But fortunately, the charge tag strategy allowed for its proper ESI(+)-MS/MS characterization (Fig. S9†).

A key supramolecular ion of  $m/z$  809 has also been detected and characterized. Its structure was attributed to the association of the intermediate of  $m/z$  423 and the neutral intermediate (386 Da). The use of a charge-tagged reagent returned therefore complementary information that supported the mechanistic proposition of Scheme 2.

For a better understanding of the intermediates intercepted and proposed in Scheme 2, as well as for the key phenyl group transfer process, theoretical calculations (DFT) were performed. The calculations also aimed at probing the solvent effect, that is, for methanol which was calculated using explicit treatment. Theoretical evaluations already described only used implicit treatments. Fig. 4 shows the reaction pathway and transition states starting from the universally accepted imine/iminium intermediate.

Fig. 4 depicts a cooperative action from the solvent which points to the importance of solvent effects towards the PBM adduct formation. Protic polar solvents such as methanol or ethanol are commonly used to perform the PBM reaction and possibly H-bonds with the substrate and intermediates are likely to affect the reaction outcome. Structure A (Fig. 4) interacts with two solvent molecules and affords the key intermediate C (Fig. 4) in its open form *via* transition state B (Fig. 4). Intermediate C may cyclize *via* water loss to afford the stable structure similar to that deduced from single crystal X-ray analysis (Fig. 2). The other route involves phenyl group transfer *via* transition state D (Fig. 4) resulting in an intermediate similar to that of  $m/z$  423 (Fig. 3) or  $m/z$  352 (Fig. 1), which in turn undergoes hydrolysis to afford the final PBM adduct. Note again the importance of methanol (the solvent) in facilitating H-transfer as showed by the optimized structure of transition state D (Fig. 4).

Intermediate C (Fig. 4) indeed have a higher preference to cyclize (Fig. 5) rather than forming intermediate E (Fig. 4) since its cyclization is highly favoured ( $\Delta G = 18.18 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). The same process occurs from the dormant intermediate (Fig. S13†) similar to those of  $m/z$  509 (Fig. 1) and  $m/z$  651 (Fig. 3). All attempts to simulate phenyl group transfer to the C=N bond from the cyclic intermediates miserably failed. The DFT results indicate therefore that these intermediates act as reservoirs to the corresponding open form, which is the only one capable of transferring the phenyl group.

In summary, from comprehensive ESI-MS(/MS) reaction monitoring data and predictions from DFT calculations, as well as the unprecedented characterization of a crystallized form of a key intermediate, a plausible route for the controversial mechanism of the important multicomponent PBM reaction has been proposed. Structure variations in the PBM reactants are

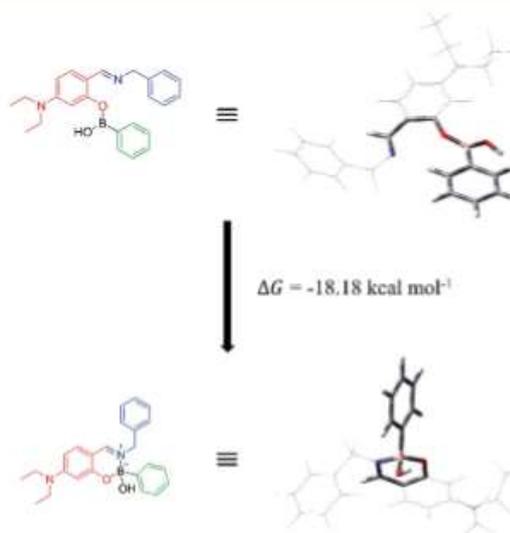


Fig. 5 Formation of the cyclic intermediate in the PBM reaction. PBE1PBE/cc-pVDZ level of theory.

being continuously tried in the hope to accumulate further evidence for the proposed PBM mechanism and the results will be disclosed in due course.

## Acknowledgements

Authors acknowledge the partial financial support from CNPq, CAPES, INCT-Catalysis, INCT-Transcend group, FAPDF, FAPESP, Petrobras, Inmetro, and DPP-UnB. We also thanks Prof. Dr Angelo H. L. Machado (IQ-UnB) for the fruitful discussions.

## Notes and references

- 1 W.-Y. Han, Z.-J. Wu, X.-M. Zhang and W.-C. Yuan, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 976–979.
- 2 W.-Y. Han, J. Zuo, X.-M. Zhang and W.-C. Yuan, *Tetrahedron*, 2013, **69**, 537–541.
- 3 C. W. G. Au and S. G. Pyne, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 7097–7099.
- 4 N. R. Candeias, L. F. Veiros, C. A. M. Afonso and P. M. P. Gois, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 1859–1863.
- 5 J. Tao and S. Li, *Chin. J. Chem.*, 2010, **28**, 41–49.
- 6 N. Schlienger, M. R. Bryce and T. K. Hansen, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 10023–10030.
- 7 N. A. Petasis and S. Boral, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 539–542.
- 8 N. R. Candeias, P. Cal, V. Andre, M. T. Duarte, L. F. Veiros and P. M. P. Gois, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 2736–2745.
- 9 N. R. Candeias, F. Montalbano, P. Cal and P. M. P. Gois, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 6169–6193.
- 10 N. Heublein, J. S. Moore, C. D. Smith and K. F. Jensen, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 63627–63631.
- 11 L. S. Santos, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 235–253.
- 12 F. Coelho and M. N. Eberlin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5261–5263.
- 13 R. G. Cooks, D. R. Ifa, G. Sharma, F. K. Tadjimukhamedov and Z. Ouyang, *Eur. J. Mass Spectrom.*, 2010, **16**, 283–300.
- 14 Z. Ahmadi and J. S. McIndoe, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 11488–11490.
- 15 L. S. Santos, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2011, **22**, 1827–1840.
- 16 K. J. Koch, F. C. Gozzo, S. C. Nanita, Z. Takats, M. N. Eberlin and R. G. Cooks, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1721–1724.
- 17 B. A. D. Neto, E. C. Meurer, R. Galaverna, B. J. Bythell, J. Dupont, R. G. Cooks and M. N. Eberlin, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 3435–3441.
- 18 L. S. Santos, C. H. Pavam, W. P. Almeida, F. Coelho and M. N. Eberlin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 4330–4333.
- 19 A. A. Sabino, A. H. L. Machado, C. R. D. Correia and M. N. Eberlin, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 4389.
- 20 V. G. Santos, M. N. Godoi, T. Regiani, F. H. S. Gama, M. B. Coelho, R. O. M. A. de Souza, M. N. Eberlin and S. J. Garden, *Chem.–Eur. J.*, 2014, **20**, 12808–12816.
- 21 K. L. Vikse, Z. Ahmadi and J. S. McIndoe, *Coord. Chem. Rev.*, 2014, **279**, 96–114.
- 22 J. Limberger, B. C. Leal, A. L. Monteiro and J. Dupont, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 77–94.
- 23 H. G. O. Alvim, T. B. Lima, A. L. de Oliveira, H. C. B. de Oliveira, F. M. Silva, F. C. Gozzo, R. Y. Souza, W. A. da Silva and B. A. D. Neto, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 3383–3397.
- 24 L. M. Ramos, B. C. Guido, C. C. Nobrega, J. R. Corrêa, R. G. Silva, H. C. B. de Oliveira, A. F. Gomes, F. C. Gozzo and B. A. D. Neto, *Chem.–Eur. J.*, 2013, **19**, 4156–4168.
- 25 H. G. O. Alvim, T. B. de Lima, H. C. B. de Oliveira, F. C. Gozzo, J. L. de Macedo, P. V. Abdelnur, W. A. Silva and B. A. D. Neto, *ACS Catal.*, 2013, **3**, 1420–1430.
- 26 H. G. O. Alvim, G. A. Bataglion, L. M. Ramos, A. L. de Oliveira, H. C. B. de Oliveira, M. N. Eberlin, J. L. de Macedo, W. A. da Silva and B. A. D. Neto, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 3306–3313.
- 27 L. M. Ramos, A. Tobio, M. R. dos Santos, H. C. B. de Oliveira, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, A. L. de Oliveira and B. A. D. Neto, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 10184–10193.
- 28 G. A. Medeiros, W. A. da Silva, G. A. Bataglion, D. A. C. Ferreira, H. C. B. de Oliveira, M. N. Eberlin and B. A. D. Neto, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 338–340.
- 29 T. S. Rodrigues, V. H. C. Silva, P. M. Lalli, H. C. B. de Oliveira, W. A. da Silva, F. Coelho, M. N. Eberlin and B. A. D. Neto, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 5239–5248.
- 30 M. R. dos Santos, J. R. Diniz, A. M. Arouca, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, S. M. Tamborim, A. L. Parize, P. A. Z. Suarez and B. A. D. Neto, *ChemSusChem*, 2012, **5**, 716–726.
- 31 B. A. D. Neto, A. A. M. Lapis, A. B. Bernd and D. Russowsky, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 2484–2496.