

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**MODULADORES SELETIVOS DE RECEPTORES DE
ESTROGÊNIO: ANÁLISE E ESTRATÉGIAS PARA
SÍNTESE CATALÍTICA**

Doutorando: Marcus Seferin
Orientador: Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro
Co-orientador: Prof. Dr. André Arigony Souto

Tese de Doutorado em Química

Porto Alegre, agosto de 2005.

DECLARAÇÃO DE AUTORIA

O trabalho descrito na presente tese foi realizado no Laboratório de Reatividade e Catálise, sob orientação do Prof. Dr. **Adriano Lisboa Monteiro** e co-orientação do Prof. Dr. **André Arigony Souto**, pelo autor como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutos em Química junto ao Curso de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, agosto de 2005.

Marcus Seferin

À Viviane dedico esta tese e tudo o que possa haver de bom em mim

Para toda a questão complexa há sempre uma solução simples...e está errada.

(H. L. Mencken)

AGRADECIMENTOS

À Viviane, sempre à Viviane, agradeço por me deixar existir ao seu lado, por persistir em não me deixar desistir e por tantas coisas que não cabem em palavras, que não cabem em uma tese...e pelas coisas que cabem em uma tese também, claro.

Ao meu orientador, Adriano Monteiro, o agradecimento aqui escrito não pode expressar meu sentimento de gratidão. Obrigado pela amizade, pela tolerância, por acreditar que aconteceria e por fazer acontecer. Não haveria esta tese sem tudo isso e sem sua capacidade intelectual e emocional.

Da mesma forma ao meu co-orientador, colega e amigo André Souto, pelo apoio técnico e intelectual, pelas palavras tantas, por compartilhar esse projeto comigo, pelo laboratório, pelo Jonatã e, especialmente, pelas ações que viabilizaram este trabalho.

Esta tese deve sua existência a essas pessoas e à Carolina Menezes Nunes ao Jonatã Rangel Nienczewski, ao João Artur Sulzbach Peixoto, colegas do Laboratório que realizaram muito e muito trabalho que está aqui escrito e à Sabrina Madruga Nobre. A todos agradeço de todo o coração pela amizade, empenho, disponibilidade e tudo o mais.

À minha mãe, meu pai e minha avó, agradeço por me terem dado chance de fazer o que eu queria, pelo apoio, amor, atenção e carinho. Ao meu pai por ter me legado e me ensinado a ser o que eu mais gosto de ser: um curioso profissional (e um gremista também, é claro).

À Sandra Einloft, pelo apoio e amizade sempre demonstrados como colega, como amiga, como chefe também e pela participação na banca da defesa desta tese.

À Ione Maluf Baibich, de quem sempre tive o privilégio de receber apoio, amizade, atenção e alguns poucos e merecidos puxões de orelha, meu agradecimento por tudo isso e pela participação da banca da defesa desta tese.

Ao colega e amigo Mário Meneghetti por vários bons momentos compartilhados no passado e pela participação na banca de defesa desta tese.

A Roberto Fernando de Souza meu agradecimento muito especial. Esta é mais uma pessoa que mereceria vários parágrafos de agradecimento e creio ter sido uma grande sorte em minha vida poder ter convivido com o Prof. Roberto, que me ensinou muito do que sei e do que faço e que, apesar de estar na banca desta tese e da certeza que tenho que me “apertará” quando da defesa do trabalho, é mais um dos responsáveis por chegar esse momento.

Agradeço à Profa. Yeda Pinheiro Dick, que me deu a imensa honra de aceitar nosso convite para compor a banca examinadora deste trabalho, embora não tenha podido estar presente na data prevista para sua defesa.

Aos grandes amigos Eduardo Cassel, Tiziano Dalla Rosa, Ricardo Gomes da Rosa e Silvana Wolke que sempre estiveram comigo nesse período (e antes, alguns deles), que compartilharam muito comigo.

Ao Manuel Carneiro, que foi grande companheiro na concepção e desenvolvimento do projeto de análise de *trans*-resveratrol em vinhos gaúchos. Também ao Marcos Senna e aos acadêmicos Andressa Conz, Kristiane Gobbi e Alessandro Jaeger, envolvidos no projeto de análise de *trans*-resveratrol em vinhos e sucos.

Aos amigos e colegas do Departamento de Criminalística do IGP, que me ajudaram muito mesmo que nos conheçamos à pouco. Meu agradecimento especial aos Peritos Raul Pingret, Sérgio Pohlmann e Gilberto Moreira, cada um a seu modo, ajudaram em muito na concretização desta defesa. Também à Diretora do Departamento de Criminalística, Perita Eliana Sarres Pessoa, pelo apoio demonstrado, especialmente, nos momentos finais da redação e defesa deste trabalho.

Às últimas equipes diretivas da Faculdade de Química da PUCRS pelo apoio formalizado para a realização de meu de curso doutorado: Prof. Tiziano Dalla Rosa, Prof. Assis Piccini, Profa. Sandra Einloft e Prof. Ivo Vedana.

Aos colegas do LAMOCA pela amizade, convivência proveitosa e divertida e ao Prof. Jairton Dupont pelas mesmas razões e pela bela carta de recomendação que me deu quando do ingresso nesse curso.

À Cláudia, José, Luciane, Lola e Benjamin pelo apoio nesses anos todos.

À Bolita, que não lerá estes agradecimentos, mas que merece.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
SUMÁRIO	5
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 SERMs.....	17
2.2 RESVERATROL E DERIVADOS DE ESTILBENO	18
2.3 TAMOXIFENO E COMPOSTOS TRIARILETILENO.....	23
2.4 ANÁLISE DE RESVERATROL EM VINHOS VARIETAIS.....	26
2.5 MÉTODOS PARA A SÍNTESE DE TAMOXIFENO, RESVERATROL E DERIVADOS.....	29
2.5.1 <i>Formação catalítica de ligações carbono-carbono</i>	30
2.5.2 <i>Reação de Heck:</i>	32
2.5.3 <i>Reação de Suzuki</i>	35
2.5.4 <i>Reação de Negishi</i>	36
2.5.5 <i>Sínteses do trans-resveratrol e derivados</i>	38
2.5.6 <i>Sínteses de tamoxifeno e triariletilenos</i>	41
3 OBJETIVOS	44
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	45
4.1 QUANTIFICAÇÃO DE TRANS-RESVERATROL EM VINHOS E SUCOS DE UVA... ..	45
4.2 DESENVOLVIMENTO DAS ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE SERMs.....	46
4.2.1 <i>Síntese de substratos</i>	46
4.2.2 <i>Caracterização dos produtos sintetizados</i>	50

4.2.3	<i>Quantificação dos produtos sintetizados.....</i>	51
4.2.4	<i>Reações típicas utilizadas no desenvolvimento das estratégias de síntese dos SERMs.....</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	ANÁLISE DE RESVERATROL EM PRODUTOS DERIVADOS DE UVAS	55
5.1.1	<i>Sucos de uva</i>	55
5.1.2	<i>Vinhos varietais brasileiros.....</i>	58
5.2	ESTRATÉGIAS PARA A SÍNTESE DE SERMS	63
5.2.1	<i>Estratégias para a síntese de resveratrol e derivados</i>	64
5.2.2	<i>Estratégias para a síntese de tamoxifeno e derivados</i>	80
5.3	PERSPECTIVAS:	95
6	CONCLUSÕES:	97
7	BIBLIOGRAFIA	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução do número de publicações sobre <i>trans</i> -resveratrol ao longo do tempo.	15
Figura 2 – Localização dos tecidos-alvo para a atuação do estrogênio no corpo feminino, adaptado de Jordan.	17
Figura 3 – Estruturas de algumas fitoalexinas importantes.	19
Figura 4 – Compostos similares ao resveratrol com atividade biológica.	21
Figura 5 – Tamoxifeno e compostos triariletileno de aplicação farmacológica.	23
Figura 6 – Mecanismo simplificado da ação do tamoxifeno.	25
Figura 7 – SERM organometálico.	26
Figura 8 – Evolução dos teores de (1) <i>trans</i> -resveratrol, (2) <i>cis</i> -resveratrol, (3) <i>trans</i> -piceid e (4) <i>cis</i> -piceid durante a vinificação do mosto para produção de vinhos	27
Figura 9 – Esquema simplificado de reações de acoplamento cruzado carbono-carbono. ..	31
Figura 10 – Mecanismo geral para reações de acoplamento cruzado via transmetalção. ..	32
Figura 11 – Mecanismo genérico proposto para a reação de Heck.	34
Figura 12 – Síntese de Combretastatina A-4 por acoplamento Suzuki.	35
Figura 13 – Primeiro exemplo de hidrozirconação/ transmetalção em acoplamento cruzado.	36
Figura 14 – Exemplo de controle de estereosseletividade no acoplamento cruzado em protocolo de Negishi.	37
Figura 15 – Esquema da síntese do <i>trans</i> -resveratrol via reação de Wittig.	38
Figura 16 – Primeiro exemplo de aplicação da reação de Heck na síntese do <i>trans</i> - resveratrol.	39
Figura 17 – Síntese do <i>trans</i> -resveratrol por reação de Heck decarbonalítica.	40

Figura 18 – Reação de Suzuki para a síntese de resveratrol e pterostilbeno fluorados.	41
Figura 19 – Reação de McMurry para a síntese do (Z)-tamoxifeno.	41
Figura 20 – Carbometalação / acoplamento catalítico C-C na síntese de triariletilenos.	42
Figura 21 – Síntese de mistura de (E) e (Z)-tamoxifeno envolvendo reação de Negishi.	43
Figura 22 – Acoplamento iodeto de arila, alcino interno, ácido borônico para síntese de tamoxifeno.	43
Figura 23 – Cromatogramas de solução padrão de resveratrol com concentração de 5,00 mg.L ⁻¹ e amostras de sucos integrais diluídos três vezes.	56
Figura 24 – Cromatogramas de uma solução padrão de <i>trans</i> -resveratrol contendo 4,23 mg.L ⁻¹ e de uma amostra de vinho Merlot safra 1997 diluída seis vezes.	58
Figura 25 - Concentrações médias de <i>trans</i> -resveratrol em vinhos tintos varietais. Comparação entre vinhos brasileiros e de outros países.	61
Figura 26 – Precursores catalíticos do tipo paladaciclo utilizados neste trabalho.	63
Figura 27 – Estratégias estudadas para a síntese do <i>trans</i> -resveratrol.	65
Figura 28 – Substrato para síntese seletiva de <i>trans</i> -resveratrol.	66
Figura 29 – Síntese do substrato 5-iodoresorcinol.	66
Figura 30 – Síntese do <i>trans</i> -resveratrol permetilado via acoplamentos C-C catalíticos sucessivos.	67
Figura 31 – Esquema genérico para a abordagem via hidrozirconação/transmetlação/acoplamento cruzado para a síntese de <i>trans</i> -resveratrol.	68
Figura 32 – Substratos arilacetilênicos utilizados para hidrozirconação.	68
Figura 33 – Esquema da síntese de substratos acetilênicos.	69
Figura 34 – Haletos de arila testados para acoplamento cruzado com produto de hidrozirconação de arilacetenos.	70
Figura 35 – Acoplamento Suzuki catalisado por complexo de níquel.	71

Figura 36 – Rota de síntese proposta para o <i>trans</i> -resveratrol via acoplamento Suzuki-Miyaura.....	72
Figura 37 - Rota de síntese proposta para o <i>trans</i> -resveratrol via acoplamento Suzuki-Miyaura empregando derivado de β -bromoestireno.	73
Figura 38 – Síntese do ácido 3-(4-metoxifenil) propiônico.	74
Figura 39 – Síntese do (E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)etileno.	74
Figura 40 – Produtos do acoplamento cruzado entre bromo-metoxiestireno e ácido fenilborônico.....	75
Figura 41 – (Z)-tamoxifeno (esquerda) e rota idealizada para síntese de triariletilenos.	80
Figura 42 - Síntese de estirenos por acoplamento cruzado em protocolo de reação de Suzuki.	81
Figura 43 - Esquema reacional para a síntese de trifeniletileno.	82
Figura 44 - Bromação do 1,1-difeniletileno.	82
Figura 45 – Estratégia para síntese de triariletilenos via estilbeno e sucessivas reações de bromação/deidrobromação e acoplamento cruzado.	84
Figura 46 - Síntese do <i>trans</i> -estilbeno por reação de Heck catalisada por paladaciclo.....	85
Figura 47 - Bromação/deidroalogenação do <i>trans</i> -estilbeno.....	85
Figura 48 – Reações de bromação do estilbeno por protocolos alternativos.....	87
Figura 49 - Acoplamento Suzuki entre bromoestilbeno e ácidos arilborônicos.....	87
Figura 50 – Síntese do triariletileno precursor do tamoxifeno.	90
Figura 51 – Triariletilenos sintetizados.	90
Figura 52 – Reações para determinação da configuração do bromoestilbeno.	91
Figura 53 – Bromação do 1-(4-metoxifenil)-1,2-difeniletileno.....	92
Figura 54 – Acoplamento entre dietilzinco e bromoestilbeno.....	93
Figura 55 – Protocolo alternativo para formação de triariletileno.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Exemplos de efeitos de resveratrol em culturas de diferentes cepas de células..	22
Tabela II – Concentração de <i>trans</i> -resveratrol em sucos de uva integrais.	57
Tabela III - Concentração de <i>trans</i> -resveratrol em vinhos varietais tintos brasileiros.	60
Tabela IV – Otimização do acoplamento cruzado entre bromo-metoxiestireno e ácido fenilborônico.....	79
Tabela V. Otimização da deidroalogenação do 1,2-dibromoestilbeno.....	86
Tabela VI. Diferentes precursores catalíticos utilizados no acoplamento Suzuki entre bromoestilbeno e ácido <i>p</i> -metoxifenil borônico.....	89

ABREVIATURAS

Ac =	Acetil
CG =	cromatografia em fase gasosa
CLAE =	Cromatograia líquida de alta eficiência
Cp =	Ciclopentadienil
Cy =	Cicloexil
DAD =	detector por arranjo de diodos
DMF =	N,N-dimetilformamida
EM =	espectrometria de massas
eq =	Equivalentes
Et =	Etil
IV =	Infravermelho
Me =	Metil
o-tol =	orto-toluil
Ph =	Fenil
RMN =	ressonância magnética nuclear
TBDMS =	terc-butildimetilsilil
Ts =	tosil (<i>p</i> -tolenosulfonil)
UV =	Ultravioleta

RESUMO

A fitoalexina *trans*-resveratrol foi quantificada em vinhos varietais tintos brasileiros elaborados no Rio Grande do Sul, tendo sido determinado o valor médio de 2,57 mg.L⁻¹, com os varietais Merlot, Sangiovese e Tannat sendo aqueles com teores mais elevados deste produto natural. Foram analisados, também, sucos de uva comerciais de preparo convencional e ecológico, mostrando valores médios de 1,01 e 1,98 mg.L⁻¹, respectivamente.

Foram desenvolvidas estratégias para as sínteses catalíticas seletivas dos moduladores seletivos de receptores de estrogênio *trans*-resveratrol e (Z)-tamoxifeno. Duas rotas foram apresentadas para a síntese de resveratrol e três rotas em desenvolvimento para a preparação de triariletilenos e tamoxifeno.

As rotas de síntese dos compostos triariletileno utilizaram substratos até o momento originais para a obtenção de tamoxifeno, apresentando potencial e versatilidade para virem a se constituir em alternativas viáveis para sua obtenção em larga escala.

ABSTRACT

The natural product *trans*-resveratrol was quantified in southern brazilian red wines. The analytical methodology developed for those analyses showed good linearity, reproductibility and short analysis time. The average value achieved for the *trans*-resveratrol concentratios in wines was 2.57 mg.L⁻¹. Some grape juice samples were also analyzed, showing mean values of 1.01 mg.L⁻¹ for conventional juices and 1.98 mg.L⁻¹ for ecological ones.

New resveratrol and tamxoxifen synthesis protocol were explored. Some new contributions on this field was achieved on applying transition metal catalysis in order to perform those syntheses. Two methods for *trans*-resveratrol synthesis are about to be completed as well as, at least, two new synthesis for tamxifen and other triarylethylene compounds.

1 Introdução Geral

Em 1997 Pezzuto e colaboradores¹ apresentavam um trabalho sobre propriedades quimiopreventivas do *trans*-resveratrol, um produto natural encontrado em certos tipos de uvas e outras espécies vegetais, em alguns tipos de câncer. A partir deste evento, uma verdadeira avalanche de estudos vêm mostrando que o resveratrol pode exibir mais e mais aplicações em sistemas biológicos, chegando a ser chamado de “molécula milagrosa” em artigos publicados em periódicos altamente respeitados, como a *Nature Genetics*².

O fato de esta substância ocorrer em vinhos varietais e de não ter sido avaliado em vinhos brasileiros motivou um grupo da Faculdade de Química da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul a apresentar à FAPERGS um projeto para avaliar teores de resveratrol em vinhos varietais brasileiros, no final de 1998, coordenado pelo Prof. André Souto, co-orientador desta tese. A execução desse projeto e a publicação dos resultados obtidos acabaram por ocorrer em período concomitante ao período inicial de realização desta tese. Para a presente tese, concebeu-se explorar estes resultados de análise de vinhos e, posteriormente, sucos de uva e extrapolar o tema, buscando-se novos protocolos de síntese de resveratrol e derivados, aproveitando-se do histórico de nossa participação no Laboratório de Reatividade e Catálise e Grupo de Catálise Molecular do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e, mais, do histórico bem-sucedido deste grupo no desenvolvimento de metodologias para a síntese de produtos orgânicos através da catálise molecular. As propostas para novas vias de síntese do resveratrol foram baseadas na aplicação de reações catalíticas de acoplamento cruzado, o que não havia sido apresentado na literatura até aquele momento.

No entanto, conforme mostra a Figura 1, ao tempo em que este trabalho foi desenvolvido, o número de publicações sobre o tema aumentou em muito, revelando sua transformação em assunto de grande interesse.

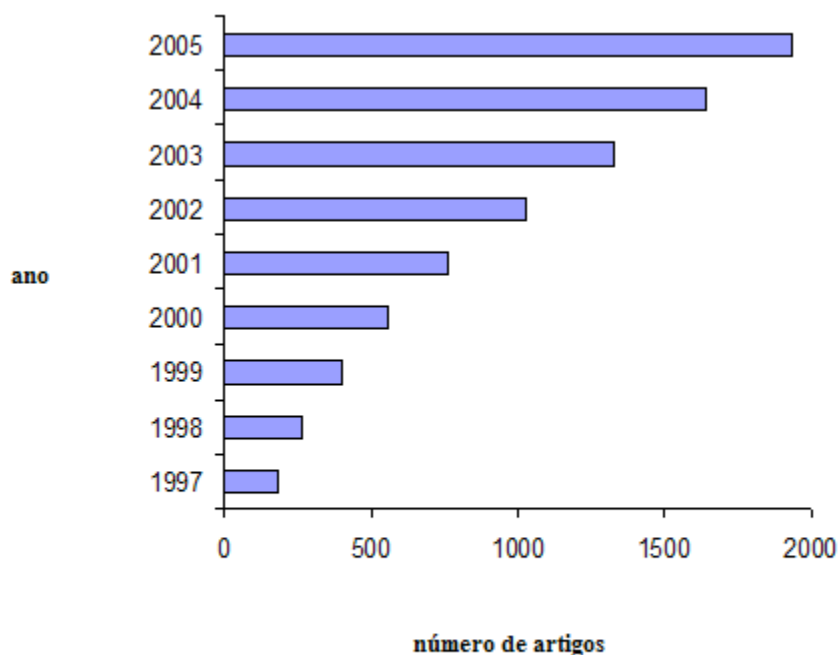


Figura 1 – Evolução do número de publicações sobre *trans*-resveratrol ao longo do tempo.

Assim, algumas novas sínteses de *trans*-resveratrol e derivados foram apresentadas, muitas delas na linha em que vínhamos trabalhando. Deste modo muitas foram as adaptações e estratégias adotadas ao longo do tempo de desenvolvimento deste trabalho. No processo de adaptação ou busca de novas estratégias sintéticas, percebeu-se que rotas de síntese para compostos triariletílenos poderiam, igualmente, ser desenvolvidas. Alguns compostos triariletíleno, além de exibirem similaridade estrutural ao resveratrol, são também similares a este por serem Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio, assim como o resveratrol. Estes fatos motivaram a ampliação do escopo inicial desta tese, que enfocava originalmente apenas a análise e síntese de *trans*-resveratrol. O presente texto apresenta o desenvolvimento desse histórico: análises e estratégias de síntese desenvolvidas para os moduladores seletivos de receptores de estrogênio *trans*-resveratrol e triariletílenos tipo tamoxifeno.

2 Revisão Bibliográfica

Este capítulo tem como objetivo situar o trabalho ora relatado no contexto das pesquisas envolvendo moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs), assim como as principais características e a relevância do estudo das atividades biológicas e dos métodos de síntese de dois destes moduladores em particular, o *trans*-resveratrol e o (Z)-tamoxifeno. Sendo o *trans*-resveratrol um produto natural encontrado, principalmente, em produtos derivados de uvas viníferas, são apresentadas análises dos teores deste composto em tais produtos.

Em seguida, os objetivos de nosso trabalho são apresentados, enfocando a análise de *trans*-resveratrol em produtos gaúchos e estratégias para a síntese deste composto e do (Z)-tamoxifeno e derivados, assim como os principais resultados obtidos até o momento. Estão, também, expostos os passos atualmente desenvolvidos para que se atinja o êxito na busca dos objetivos traçados para este estudo.

Uma vez que neste capítulo são sumariamente apresentadas algumas funções biológicas dos produtos de interesse do trabalho, cabe apresentar um breve glossário de termos utilizados em química medicinal mencionados no presente texto, recomendado pela IUPAC³:

Agonista; substância endógena ou uma droga que pode interagir com um receptor e iniciar uma resposta fisiológica ou farmacológica característica deste receptor (contração, relaxação, secreção, ativação enzimática, etc.)

Antagonista: uma droga ou um composto que se contrapõe ao efeito fisiológico de outro composto. Ao nível dos receptores, é uma entidade química que se contrapõe às respostas associadas ao receptor, normalmente induzidas por outro agente biológico.

Farmacóforo (padrão farmacofórico): conjunto de características estéricas e eletrônicas que são necessárias para obterem-se as mais favoráveis interações supramoleculares de um agente com uma estrutura biológica específica e disparar (ou bloquear) sua resposta biológica.

Um farmacóforo não representa uma molécula real ou uma associação real de grupos funcionais, mas um conceito puramente abstrato que leva em conta as capacidades de interação molecular de um grupo de compostos em relação a sua estrutura-alvo.

2.1 SERMs

O termo Moduladores Seletivos de Receptores de Estrogênio – SERMs (do inglês Selective Estrogen Receptor Modulators) foi concebido quando os conceitos de agonista e antagonista de estrogênio não se mostraram mais suficientes para contemplar as ações de duas drogas que são, hoje, bastante conhecidas: o tamoxifeno e o raloxifeno. Estas drogas claramente estabelecidas como antagonistas de estrogênio (anti-estrogênicas), com base em sua capacidade de ligarem-se ao receptor de estrogênio $ER\alpha$, atuam como agonistas de estrogênio nos ossos.

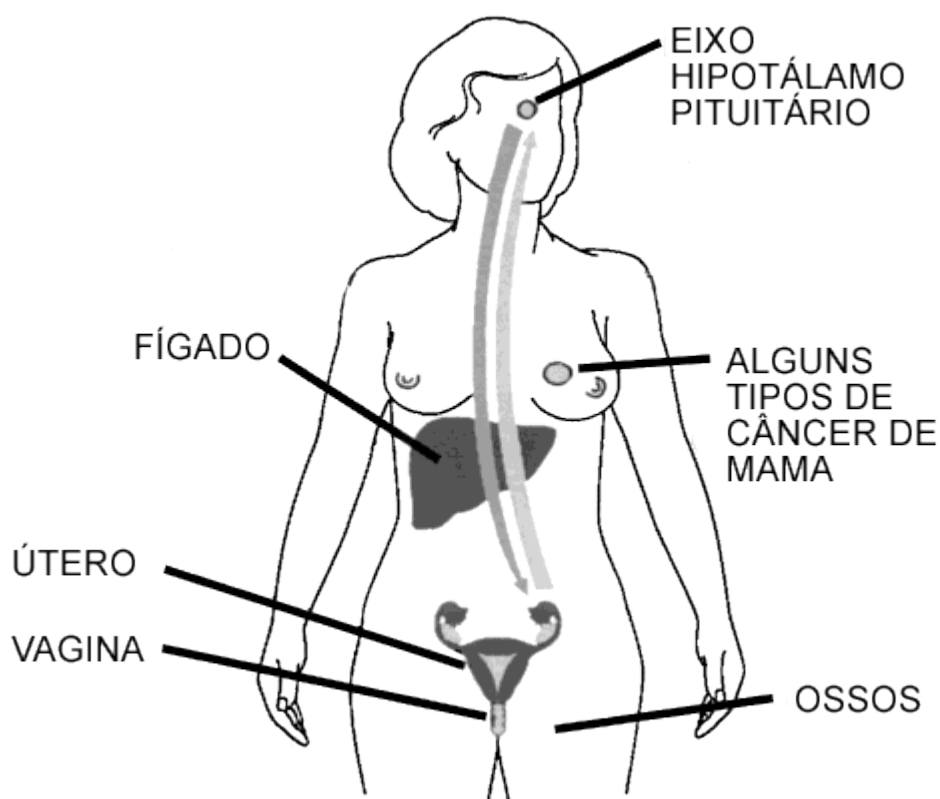


Figura 2 – Localização dos tecidos-alvo para a atuação do estrogênio no corpo feminino, adaptado de Jordan⁴.

A Figura 2⁴ apresenta alguns dos principais tecidos onde se dá a ação do estrogênio. Os receptores de estrogênio (ER) no eixo hipotálamo-pituitário regulam a liberação de gonadotropinas. Estas, por sua vez, controlam a síntese de estrogênios e progestinas que são essenciais para a manutenção do ciclo menstrual e da reprodução. Estrogênios causam proliferação no epitélio uterino e vaginal por intermédio dos receptores de estrogênio que, além disso, mediam o crescimento de alguns tipos de câncer em mamas. Os receptores de estrogênio localizados no fígado e células ósseas regulam os níveis de colesterol e lipídeos circulantes e densidade óssea, respectivamente.

O acrônimo SERM leva em consideração o fato de que a atividade de tais agentes pode ser diferenciada em tecidos distintos. Esta conclusão foi possível após a descoberta de que há dois tipos de receptores de estrogênio, conhecidos como ER α e ER β , sendo reconhecido que os receptores ER β têm atuação importante no cérebro e sistema vascular, enquanto que os receptores ER α atuam no sistema reprodutivo⁵. Pode-se afirmar que o entendimento de que agentes capazes de modular receptores de estrogênio de modo diferente em diferentes tecidos alavancou a busca pelo design de novas drogas. Atualmente, procuram-se agentes SERM para uso em mulheres que estão em pós-menopausa, nas quais a ação agonista de estrogênio é necessária para a manutenção da densidade óssea e função cerebral, efeito indesejável no útero e mamas, onde se desenvolvem cânceres responsivos a estrogênio.

2.2 Resveratrol e derivados de estilbeno

O estilbeno não é um composto de ocorrência natural. No entanto, diversos compostos derivados do estilbeno foram extraídos de várias espécies de plantas sendo que, dentre estes, os compostos poliidroxietilbenos e seus glicosídeos têm recebido particular atenção por apresentarem grande variedade de atividades biológicas e potencial como farmacóforos ou agentes terapêuticos⁶. Tais compostos apresentam a função biológica de conferir ao vegetal resistência a estresse ambiental ou ao ataque de agentes patogênicos, sendo, por isso, denominados de fitoalexinas. A Figura 3 mostra algumas das principais fitoalexinas.

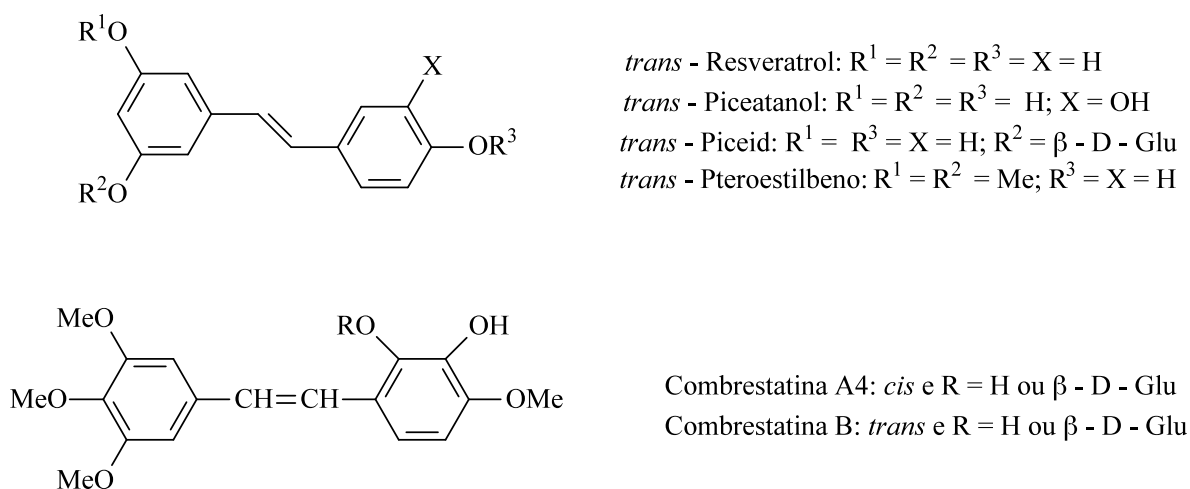


Figura 3 – Estruturas de algumas fitoalexinas importantes.

Dentre as fitoalexinas, o resveratrol e seu glicosídeo (piceid) têm sido aquelas que despertam maior interesse por apresentarem atividades biológicas diversificadas. O *trans*-resveratrol (3,5,4'-triidroxiestilbeno) é um composto encontrado em mais de 70 espécies vegetais. As maiores concentrações de resveratrol e/ou piceid foram verificadas em raízes de *Polygonum cuspidatum*, sementes de amendoim, cascas de uvas e em vinhos tintos varietais⁷. A principal ação do resveratrol como fitoalexina tem sido descrita como fungicida, em resposta ao ataque sofrido por videiras ao fungo *Botrytis cinerea*^{8;9}, conhecido no Rio Grande do Sul como “podridão cinza”.

Como já foi mencionado, a grande atenção ao resveratrol foi despertada a partir de artigo publicado em 1997 na Science por Pezzuto e colaboradores¹, onde o resveratrol foi apontado como agente quimiopreventivo no desenvolvimento de câncer nas três principais etapas do desenvolvimento deste tipo de moléstia. Na esteira desta publicação, o resveratrol passou a aparecer em diversos artigos como agente possivelmente responsável pelo chamado Paradoxo Francês¹⁰. O Paradoxo Francês advém de estudos epidemiológicos que mostraram uma correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares e câncer em populações com dietas de alto teor de gorduras¹¹.

A partir de então, um grande número de trabalhos foi publicado tendo o resveratrol como objeto de interesse. De fato, até a data em que o presente trabalho foi escrito, uma busca na base de dados *Web of Science – Institute for Scientific Information*, mostra 1937 artigos e 250 patentes que mencionam a palavra “resveratrol”, preponderantemente, em trabalhos sobre os efeitos benéficos ou potencialmente benéficos deste composto à saúde humana. Um artigo de revisão publicado por Roemer e Roemer⁷ em 2002 aponta o resveratrol como modulador de múltiplas vias moleculares associadas com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e câncer, como ciclooxigenase, metabolismo de lipídeos, agregação plaquetária, óxido nítrico, síntese de DNA, inflamações e mecanismos de morte celular e divisão celular. Sua atuação como agente anti-fúngico, anti-viral e anti-inflamatório também foi demonstrada¹², além de atividade como neuroprotetor¹³⁻¹⁵ e capturador de radicais livres¹⁶. Recentemente, foi reportada ação anti-câncer do piceid, como indutor de apoptose em células SK-Mel-28 de melanoma humano¹⁷.

Dentre os estudos mais recentes apresentados sobre a atividade biológica do *trans*-resveratrol, certamente os mais importantes são os trabalhos publicados na revista *Nature* por Howitz e colaboradores^{18;19}, mostrando a ação do *trans*-resveratrol e alguns derivados como ativadores de sirtuina e na promoção do aumento na longevidade de *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*. Em maio de 2005, Parker e colaboradores²⁰ apresentaram uma proposta para o mecanismo desta ação mediada pelo *trans*-resveratrol. Estas publicações tendem a despertar grande interesse na comunidade científica, por apontar esta nova possibilidade de ação do resveratrol, que estimularia efeitos similares àqueles que advêm da restrição alimentar no aumento da expectativa de vida. Não seria prematuro afirmar-se que uma nova perspectiva no estudo e nas aplicações do *trans*-resveratrol está sendo delineada a partir dessas publicações.

Quanto à possibilidade da atuação do *trans*-resveratrol e alguns de seus derivados como agentes quimiopreventivos ao desenvolvimento do câncer há, também, diversas publicações recentes. De fato, o editorial da edição de março de 2005 do periódico *Annals of Oncology*²¹, publicação oficial da Sociedade Européia de Oncologia Médica, corrobora as indicações de que o *trans*-resveratrol (entre outros fitoterápicos) desempenhe este papel. A Tabela I apresenta exemplos de efeitos do *trans*-resveratrol em diferentes culturas celulares, relacionadas ao aparecimento ou desenvolvimento do câncer.

O *trans*-resveratrol mostra atividade estrogênica em células MCF-7 e S30 de carcinoma de mama, enquanto que atua como antagonista dose-dependente, na presença de 17β -estradiol, age como antagonista em células T47D e LY2 de carcinoma de mama. Esta ação diferenciada em tecidos diversos permite a caracterização do *trans*-resveratrol como um modulador seletivo de receptores de estrogênio⁵.

Alguns outros compostos estruturalmente similares ao resveratrol também têm mostrado importantes ações biológicas. Para exemplificar, pode-se destacar a recente publicação de Tolomeo e colaboradores²², que encontraram atividade eficiente na indução de apoptose em linhagens MDR e BCR-ABL de células de leucemia para os compostos pterostilbeno e 3'-hidroxipterostilbeno (Figura 4). É interessante relatar-se que, embora estes compostos apresentem a atividade mencionada, os compostos hidroxilados correspondentes, *trans*-resveratrol e *trans*-picetanol (Figura 3), não apresentam efeito considerável nessas linhagens de células de câncer.

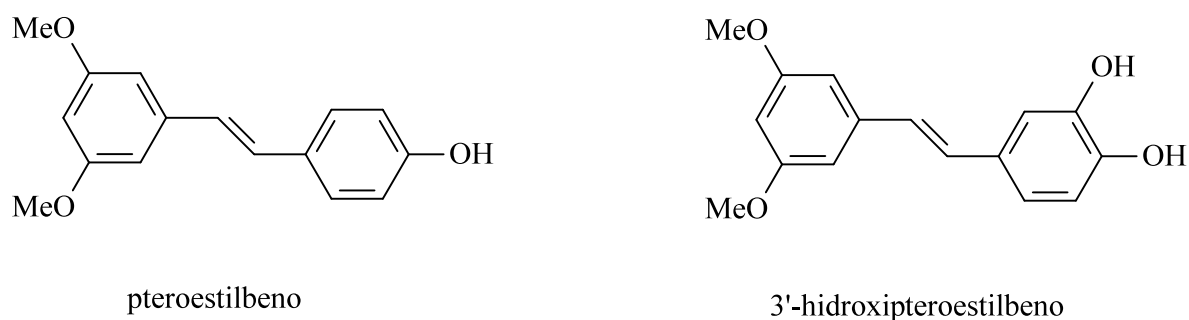


Figura 4 – Compostos similares ao resveratrol com atividade biológica.

Tabela I – Exemplos de efeitos de resveratrol em culturas de diferentes cepas de células⁷

Linagem	Tipo de célula	Efeitos
HL-60	Leucemia promielocítica humana	Inibição da formação de radicais livres Inibição da incorporação da ³ H-timidina ao DNA Apoptose
K562	Leucemia humana	Inibição da proliferação
L1210	Leucemia murina	Inibição da proliferação
MCF7, T47D	Carcinomas de mama (humano)	Inibição da proliferação (>50 mM) Estímulo da proliferação (<25 mM) Apoptose
CaCo-2	Carcinoma colorretal humano	Inibição da proliferação
SW480	Carcinoma em cólon humano	Inibição da proliferação Apoptose
HCT116	Carcinoma colorretal humano	Inibição da proliferação Apoptose
HCE7	Carcinoma esofágico humano	Inibição da proliferação Apoptose
Seg-1	Carcinoma esofágico	Inibição da proliferação
HepG2	Hepatoblastoma humano	Inibição da proliferação Apoptose
A431	Carcinoma epidermóide	Inibição da proliferação Apoptose

2.3 Tamoxifeno e compostos triariletileno

Uma busca na base de dados *Web of Science – Institute for Scientific Information*, mostra, hoje, mais de 12.500 artigos que mencionam a palavra “tamoxifeno”, embora deva-se ressaltar que, sendo o tamoxifeno (Figura 5) um princípio ativo amplamente prescrito, muitos destes estudos utilizam o tamoxifeno como modelo para comparação com outras drogas ou drogas em potencial. Assim, uma apresentação sobre o estado da arte no estudo das atividades biológicas, metabolização, métodos de síntese e relação estrutura-atividade de compostos similares, seria muito extensa e escaparia ao escopo deste texto.

Nesta seção serão apresentadas as principais características e aplicações do farmacóforo triariletileno, em especial o tamoxifeno, baseadas em artigos de revisão publicados nas revistas *Drugs of the Future*²³ e *Cancer Treatment Reviews*²⁴.

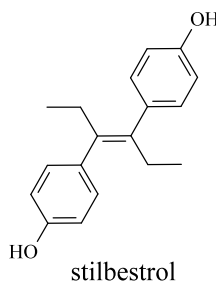
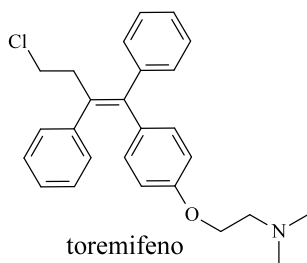
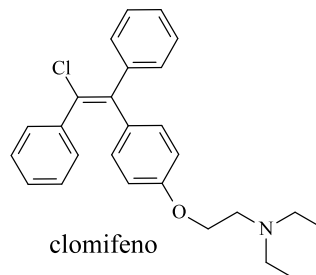
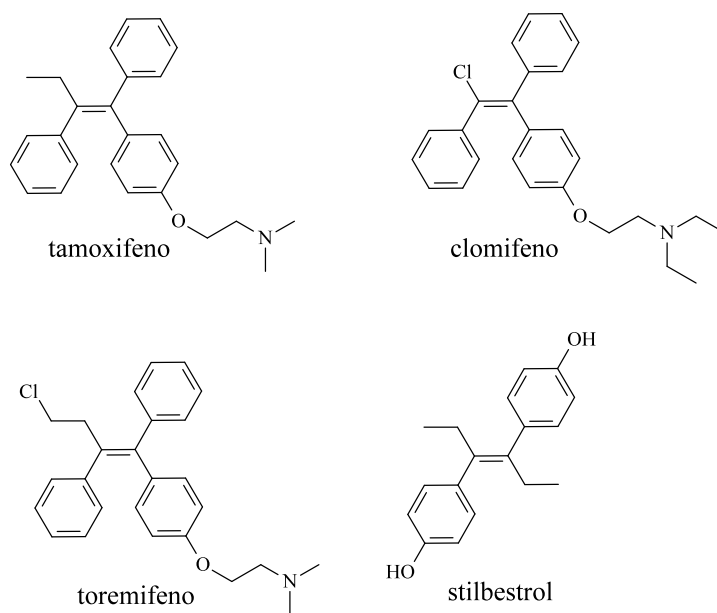


Figura 5 – Tamoxifeno e compostos triariletileno de aplicação farmacológica.

O tamoxifeno foi sintetizado em 1963²⁵, na esteira de bons resultados obtidos com outros compostos do tipo triariletileno como agentes anti-estrogênicos. Na metade do século XX, os compostos triariletileno MER-25 e clomifeno (Figura 5), ambos da Merrell, foram desenvolvidos e testados como anti-estrogênicos. Embora mostrassem resultados

satisfatórios no tratamento de câncer de mama, houve estudos que associassem seus usos continuados por longos períodos à formação de catarata em animais. Assim, em 1969, foi levado a cabo o primeiro estudo clínico que aplicava 10-20 mg por dia de (Z)-tamoxifeno em 46 pacientes com câncer de mama em estágio avançado. Neste estudo, observou-se uma taxa de remissão de 22%, um resultado benéfico comparável aos resultados obtidos com o stilbestrol (Figura 5), droga já utilizada na época. Além disso, o tamoxifeno mostrava toxicidade consideravelmente inferior ao stilbestrol e aos triariletílenos então utilizados. Desde então, novos desenvolvimentos na aplicação clínica deste composto isoladamente ou em associação com outros medicamentos têm sido verificados. Nas últimas duas décadas o tamoxifeno, comercializado na forma de citrato, vem sendo aplicado com sucesso na terapia endócrina do câncer de mama.

A Figura 6, adaptada do artigo de revisão de Hoewell e colaboradores²⁴, ilustra o mecanismo de ação anti-tumoral do tamoxifeno baseado em sua atuação como anti-estrogênio nos receptores de estrogênio. Em uma célula alvo, o estrogênio (E) liga-se ao receptor de estrogênio (ER), iniciando-se uma seqüência de eventos. O complexo estrogênio-ER homodimeriza-se e liga-se a seqüências discretas de DNA, conhecidas como elementos de resposta ao estrogênio (ERE), em regiões regulatórias de genes estrogênio-sensíveis. Há duas regiões que funcionam como ativadores transcricionais no complexo estrogênio-ER, AF1 e AF2, que interagem com outras proteínas para estimular a atividade de RNA polimerase II (RNA Pol II), regulando assim a atividade dos genes. O tamoxifeno inibe competitivamente a complexação do estrogênio ao ER. O complexo tamoxifeno-ER homodimeriza-se e liga-se ao ERE de genes estrogênio-sensíveis. Todavia, apenas AF1 está ativa. A inatividade de AF2 resulta em uma atenuação da transcrição dos genes estrogênio-sensíveis. O resultado disso é que o tamoxifeno bloqueia uma das fases do ciclo celular (fase G₁), diminuindo a proliferação celular.

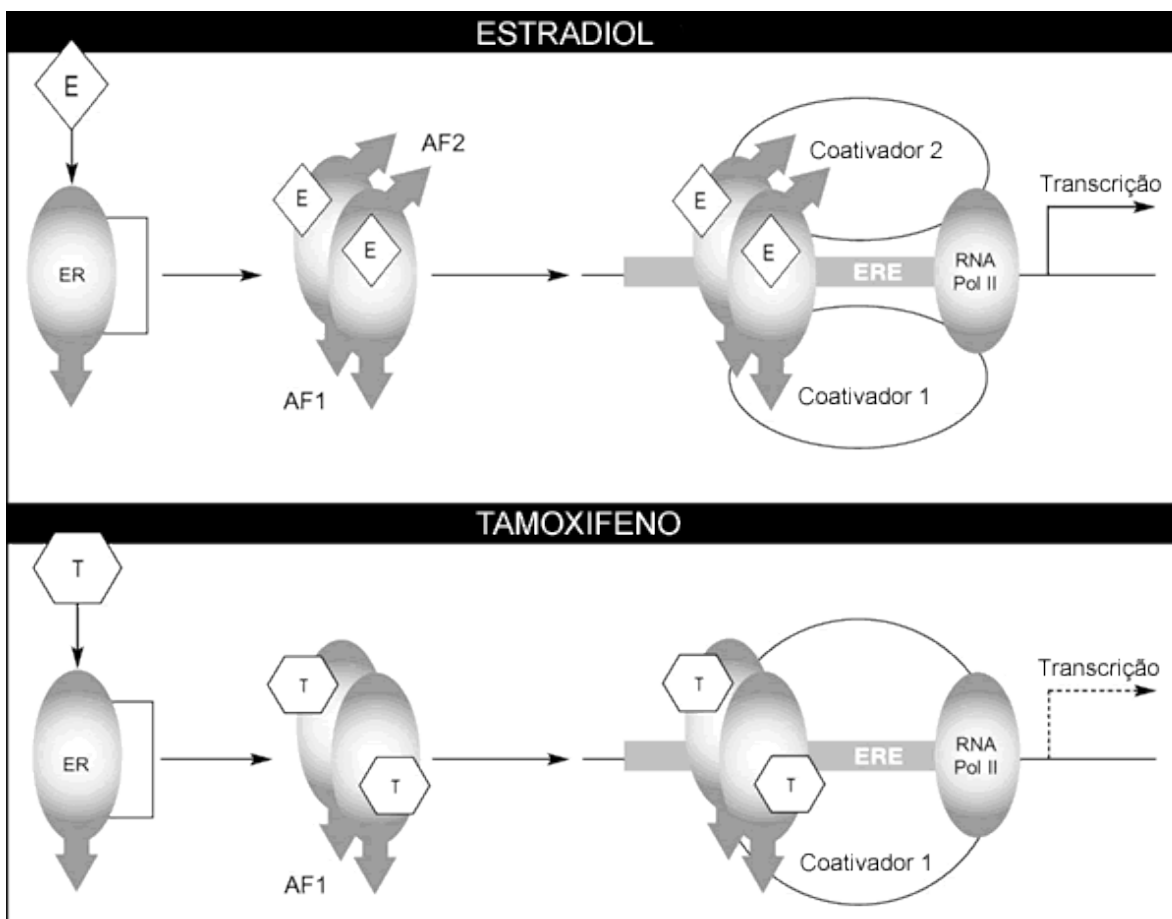


Figura 6 – Mecanismo simplificado da ação do tamoxifeno, apresentado por Hoewell²⁴.

Além do (Z)-tamoxifeno, outros compostos triariletileno apresentam atividade biológica comprovada e têm sido aplicados como medicamento. Apenas para citar alguns exemplos, o clomifeno, anteriormente mencionado, primeiro composto triariletileno a entrar no mercado, em 1968, é ainda a primeira escolha como medicamento para a indução da ovulação na maioria dos tratamentos para aumento de fertilidade. O toremifeno (Figura 5) é um derivado do tamoxifeno, desenvolvido para minimizar efeitos indesejáveis advindos do metabolismo do tamoxifeno no organismo.

Recentemente, triariletilenos com grupamento ferrocenil substituindo um dos anéis aromáticos foram apresentados como agentes de efeito antiproliferativo nas células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB231²⁶. Os autores, que sintetizaram estes SERMs por reação de McMurry, com rendimento isolado de 73% (abordada na seção 2.5.6),

encontraram efeito surpreendentemente forte do organometálico apresentado na Figura 7, que dispararia um mecanismo de oxidação intracelular, conduzindo à formação de um importante agente citotóxico. Seu regioisômero, com grupamento aromático geminado ao ferrocenil, no entanto, não mostrou efeito citotóxico importante, embora também pudesse ter comportamento eletroquímico similar.

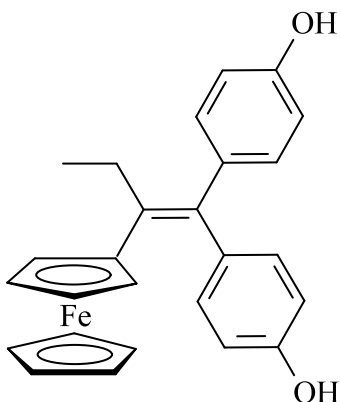


Figura 7 – SERM organometálico.

2.4 Análise de resveratrol em vinhos varietais

O *trans*-resveratrol aparece em diversos cultivares de uvas, especialmente entre as *Vitis vinifera*, em grande parte na forma de seu glicosídeo (3- β -D-glicopiranosídeo), o piceid²⁷. O glicosídeo é sintetizado nas sementes das uvas e migra para a casca durante a etapa de maturação. A forma aglicona é liberada, por exemplo, em resposta ao ataque à planta por fungos. Durante a elaboração dos vinhos tintos, as cascas das uvas permanecem no mosto e, nas duas primeiras semanas de fermentação, a aglicona (resveratrol) é liberada por hidrólise enzimática do piceid, assim como mostra a Figura 8 (reproduzida do trabalho de Mattivi e colaboradores²⁸).

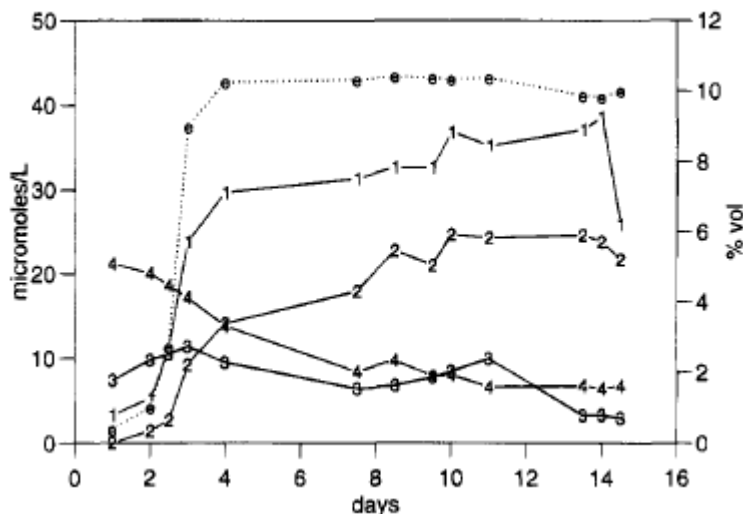


Figura 8 – Evolução dos teores de (1) *trans*-resveratrol, (2) *cis*-resveratrol, (3) *trans*-piceid e (4) *cis*-piceid durante a vinificação do mosto para produção de vinhos (escala à esquerda), onde (e) representa o percentual de etanol formado na fermentação (escala à direita).

As propriedades biológicas diferenciadas do *trans*-resveratrol, apontadas na seção 2.2, estimularam o desenvolvimento de técnicas analíticas para sua quantificação em matrizes vegetais e em vinhos, especialmente tintos.

Basicamente, há duas diferentes abordagens para o processo de determinação do teor de resveratrol em vinhos: (i) a extração desta fitoalexina da amostra seguida da quantificação da mesma no extrato (ii) a quantificação direta do produto na amostra empregando técnicas analíticas de alta eficiência.

No primeiro caso, os processos de extração do resveratrol presente nas amostras de vinho têm papel decisivo para a acuracidade da quantificação deste componente em vinhos. Tradicionalmente, processos físico-químicos empregando vários solventes são utilizados para a extração de substâncias orgânicas de um meio aquoso, como é o caso do vinho, tendo sido esta a abordagem originalmente aplicada na quantificação de resveratrol²⁹. Posteriormente, Goldberg e colaboradores utilizaram-se da técnica de extração em fase sólida, que se mostrou mais eficaz para exaurir o resveratrol das amostras de vinho analisadas. A quantificação do resveratrol extraído de amostras de vinho, derivatizado³⁰ ou

não³¹, vem sendo realizada com relativo êxito por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ou por cromatografia líquida de alta eficiência³².

Em 1997, o grupo de Goldberg³³ apresenta um estudo onde compara quatro métodos de análise do *trans*-resveratrol: dois métodos que se utilizam da extração prévia do composto com posterior quantificação do mesmo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, e dois métodos sem prévia extração do resveratrol, com injeção direta de amostras de vinho e análise por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando eluição isocrática ou gradiente de eluição, em fase reversa. Este estudo mostra que todos os métodos apresentam boa correlação entre si, permitindo a comparação de resultados obtidos por estas diferentes abordagens na quantificação da fitoalexina em vinhos.

Utilizando-se de métodos dentre os acima mencionados, Goldberg e colaboradores³⁴ realizaram estudos de quantificação de resveratrol em vinhos comerciais originários de diversas procedências. Muitos outros grupos vêm apresentando estudos de quantificação desta fitoalexina em vinhos produzidos em diversas regiões de todo o mundo. Os vinhos brasileiros, no entanto, até a realização do presente trabalho, não haviam sido analisados para a quantificação de *trans*-resveratrol.

Com o desenvolvimento de novos equipamentos para análise, assim como de novos métodos de extração, diversos protocolos de análise têm sido propostos, entre os quais salientam-se processos que empregam eletroforese capilar com detecção eletroquímica³⁵, CLAE com detecção eletroquímica³⁶, CLAE-ESI-EM-EM^{37;38}, CLAE com detecção fluorimétrica e dessorção por laser - ionização multifotônica - espectrometria de massas por tempo de voo³⁹ e CLAE com detecção por quimiluminescência, via reação do *trans*-resveratrol com sistema composto por luminol, ferricianeto de potássio em meio alcalino⁴⁰. Este último método parece particularmente curioso, uma vez que a reação fotoquímica se dá após passagem dos analitos por detector de arranjo de diodo e, mais, é necessário utilizar-se eluente não acidificado, ao contrário do que se faz na quase totalidade dos processos que se utilizam de CLAE, já que a quimiluminescência originária da transformação do luminol em um diácido somente ocorre em meio alcalino. Como grande vantagem deste método, os autores apontam a ampla faixa de linearidade do mesmo,

situando-se no intervalo de concentrações entre 75 e 100.000 µg/L. Todos os métodos anteriores foram desenvolvidos, especialmente, para a análises de vinhos mas é interessante, ainda, citar uma metodologia para a análise de resveratrol e compostos similares em cascas de uvas onde foi empregada a extração dos analitos em fluido supercrítico⁴¹.

Embora muitas destas metodologias valham-se de equipamentos sofisticados e algumas delas pareçam exóticas, seus desenvolvimentos acabaram por levar a tempos de análise menores e, em alguns casos, limites de detecção e faixas de linearidade ampliadas se comparadas aos métodos inicialmente apresentados. Pode-se, é claro, questionar para quais matrizes adicionais estes avanços poderiam ser úteis já que quase todos foram empregados para a análise de vinhos, o que parece não requerer tamanha sensibilidade.

Uma aplicação particularmente interessante da quantificação de *trans*-resveratrol foi apresentada por Arvanitoyannis e colaboradores⁴², que utilizaram a quantificação deste produto por CLAE para determinar a região de origem de vinhos da Grécia, por análise multifatorial.

Recentemente, diversos métodos de análise têm sido desenvolvidos para quantificar *trans*-resveratrol e derivados em matrizes diferentes daquelas originárias de uvas. Para exemplificar, pode-se citar o processo de extração líquido-sólido, seguida por análise via CLAE com detecção por arranjo de diodos ou por CG-EM, empregado para amendoim e diversas variedades de pistache⁴³. Também foi apresentada metodologia para análise de *trans*-resveratrol em cotilédones e cascas de ervilhas por CLAE-DAD e CLAE-EM⁴⁴. A cromatografia em camada delgada de alta eficiência também foi empregada para quantificação de resveratrol e piceid em raízes de *Polygonum cuspidatum*⁴⁵.

2.5 Métodos para a síntese de tamoxifeno, resveratrol e derivados

Nesta revisão serão apresentados os principais desenvolvimentos observados para as sínteses dos Modificadores Seletivos de Receptores de Estrogênio *trans*-resveratrol e derivados, tamoxifeno e outros triariletílenos enfocando, especialmente, reações catalíticas

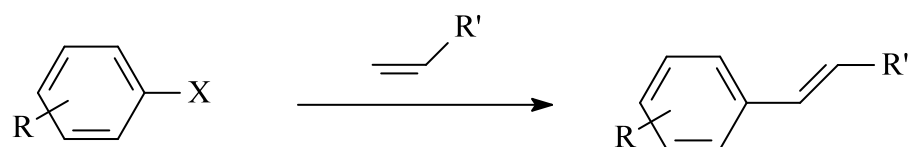
seletivas que envolvam acoplamento carbono-carbono. Dentre os métodos que poderiam ser denominados como clássicos em síntese orgânica, isto é, processos nos quais nas etapas fundamentais não são empregadas reações catalisadas por compostos de metais de transição, serão mencionados somente aqueles de importância histórica ou comercial nas sínteses dos compostos de interesse do presente trabalho.

2.5.1 Formação catalítica de ligações carbono-carbono

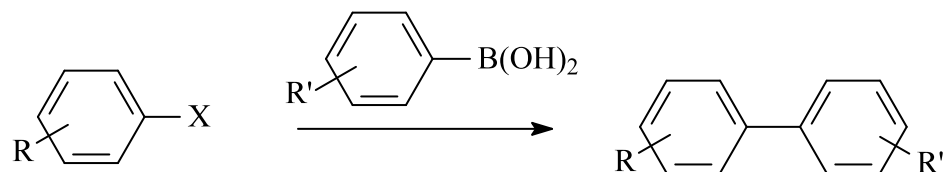
A formação de ligações carbono-carbono é, provavelmente, o processo mais importante na síntese de compostos orgânicos. Para o caso da síntese de compostos com estrutura similar ao estilbeno, é necessário obter-se a ligação entre átomos de carbono de espécies vinil ou alquinil e aril. Não há dúvida de que, para este tipo de síntese, as reações de acoplamento cruzado, mediadas por compostos de metais de transição (especialmente paládio e níquel), são as ferramentas mais efetivas para a obtenção de bons resultados quanto à seletividade e rendimento nos produtos de interesse.

Na Figura 9 estão esquematizados os tipos de reação de acoplamento cruzado que foram empregadas no presente trabalho para o desenvolvimento de estratégias de síntese de compostos triariletilenos e resveratrol⁴⁶.

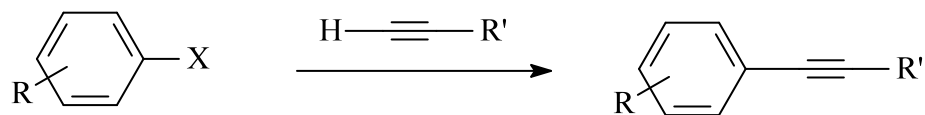
Reação de Heck



Reação de Suzuki-Miyaura



Reação de Sonogashira



Reação de Negishi

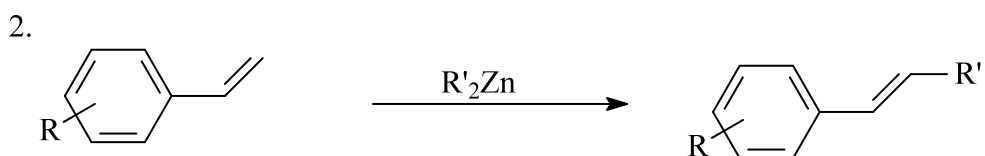
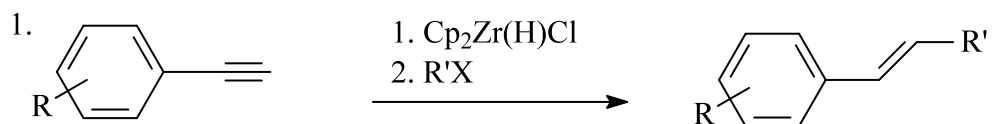


Figura 9 – Esquema simplificado de reações de acoplamento cruzado carbono-carbono.

Neste texto são sumariamente apresentadas as reações de Heck, Suzuki e Negishi, utilizadas no presente trabalho para a formação dos produtos de interesse. Isso não é feito para a reação de Sonogashira, que foi empregada apenas para a síntese de alguns dos substratos que foram utilizados em uma das estratégias de síntese do *trans*-resveratrol.

As reações de Suzuki e de Negishi encaixam-se no conceito de reações de transmetalation e acoplamento cruzado. A Figura 10 mostra um ciclo catalítico geral para esta classe de reação de acoplamento.

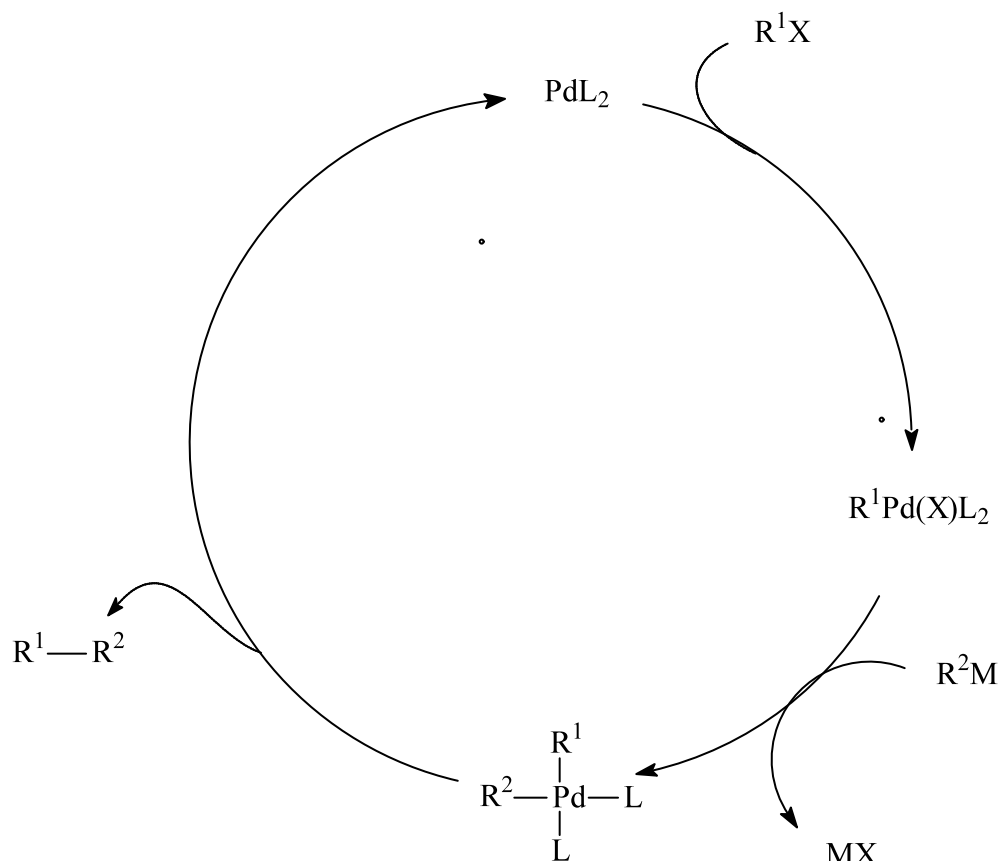


Figura 10 – Mecanismo geral para reações de acoplamento cruzado via transmetalation.

2.5.2 Reação de Heck:

Reações de acoplamento cruzado envolvendo haletos de arila e olefinas, catalisadas por precursores baseados em compostos de paládio, são usualmente denominadas de “Reação de Heck”. Desenvolvida quase simultaneamente por um grupo norte-americano⁴⁷ e outro japonês⁴⁸ no início dos anos 1970, a reação de Heck acabou se tornando rapidamente uma ferramenta quase indispensável na síntese de uma imensa variedade de compostos importantes que vão desde hidrocarbonetos, polímeros e corantes até produtos naturais

estruturalmente complexos. É importante destacar-se que a reação de Heck vem sendo aplicada a uma série de processos industriais importantes na química fina. Pode-se salientar o uso deste tipo de reação em ao menos uma etapa da produção industrial do herbicida Prosulfuron da Novartis, do fármaco Naproxeno, de monômeros para revestimentos de equipamentos eletrônicos e de agentes anti-asma como o Singulair da Merck⁴⁹.

Inicialmente aplicada ao acoplamento de haletos de arila (iodetos e brometos como grupos de saída) e olefinas, a reação de Heck passou a ganhar relevância ao se verificar sua tolerância a grupos de saída diferentes, tais como triflatos, sais de diazônio, cloretos de aroila, cloretos de arenossulfonila, N-nitroso-N-arilacetamidas e cloretos, bem como para olefinas substituídas por grupamentos alquênil, aril, alil, benzil, metil, alcoxicarbonil, etil, alquil e sili⁴⁶. Além desta versatilidade, há a possibilidade de obter-se régio e estereosseletividade nos produtos de acoplamento cruzado e condições reacionais muitas vezes amenas. Beletskaya e Cheprakov⁵⁰ afirmaram, em um dos diversos artigos de revisão publicados sobre o assunto, que esta reação apresenta características ímpares quanto a sua adaptabilidade, mostrando que substratos tidos como “não-Heckeáveis” (tradução literal) facilmente tornam-se aplicáveis, que um número enorme de sistemas catalíticos pode ser aplicado e que alterações sutis nos sistemas reacionais podem apresentar resultados, freqüentemente, imprevisíveis.

O mecanismo da reação de Heck não é inequivocamente estabelecido, havendo debates quanto ao estado de oxidação da espécie cataliticamente ativa e quanto à etapa determinante da velocidade das reações, parecendo haver dependência do sistema catalítico empregado. A Figura 11 apresenta um esquema genérico do mecanismo usualmente proposto para a reação de Heck. Em geral é indicada a formação da espécie cataliticamente ativa com a redução da espécie Pd (II) a Pd (0), o que envolve, também, a dissociação de ligantes tipo L. De fato, para diversos sistemas catalíticos, a reação apresenta rendimentos elevados somente na presença de ligantes fosforados⁵⁰. Tendo sido formada a espécie Pd (0), esta sofreria adição oxidativa do substrato R¹X (onde X representa o grupo de saída). A espécie Pd (II) assim formada seria coordenativamente instaurada e permitiria a coordenação do substrato olefina. A etapa seguinte consistiria de deslocamento

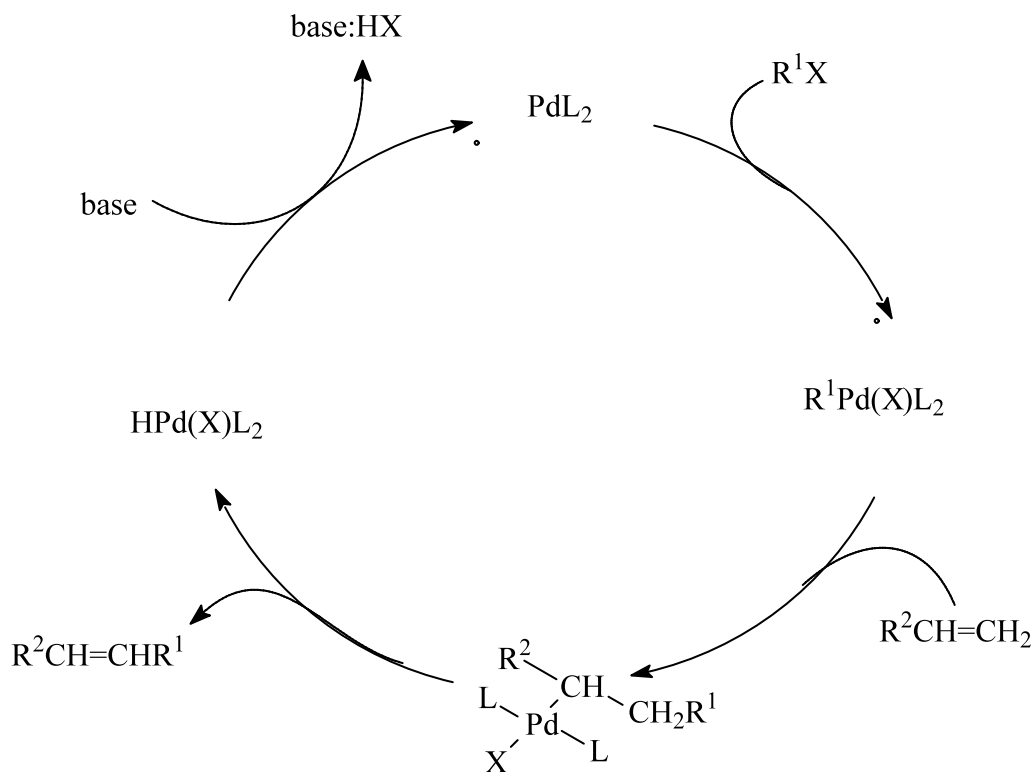


Figura 11 – Mecanismo genérico proposto para a reação de Heck.

1-2, tida como etapa responsável pela régio e estereosseletividade da reação, assim como pela seleção de substratos aplicáveis, e na qual ocorre a formação da nova ligação C-C. Os processos pelos quais se dá a seletividade nos produtos formados são extensivamente discutidos na literatura e fogem ao escopo deste texto, que procura situar as reações de acoplamento cruzado empregadas no presente trabalho no contexto da síntese orgânica mediada por catalisadores baseados em metais de transição. A β -eliminação é a etapa onde se dá a liberação dos produtos formados, gerando uma espécie paládio-hidreto, que após eliminação reductiva mediada pela base colocada no meio reacional, regeneraria a espécie cataliticamente ativa.

2.5.3 Reação de Suzuki

O acoplamento cruzado entre compostos organoboro e haletos (ou triflatos ou outros) orgânicos catalisado por complexos de paládio (ou níquel) em presença de uma base foi chamado de acoplamento Suzuki-Miyaura, após sua apresentação original por estes pesquisadores⁵¹. Esta reação, que tem como etapa-chave a transmetalção de um organoboro a um complexo haleto de paládio (II), ocorre em presença de uma base em condições reacionais relativamente amenas. Embora vários compostos organometálicos sofram esse tipo de reação, os compostos organoboro despertam atenção por serem compostos de alta estabilidade térmica, inertes ao ar e água⁴⁶.

Pouca mais de duas décadas após sua descoberta, a reação de Suzuki-Miyaura ou, simplesmente, reação de Suzuki torna-se bastante atraente pela estabilidade dos compostos organoboro, pelas condições reacionais amenas nas quais opera, pela facilidade de realizar-se a reação em sistemas heterogêneos ou em sistemas aquosos, pela alta régio e estereosseletividade da reação, pela baixa toxicidade dos sub-produtos formados e pela facilidade de remoção destes do meio reacional⁵².

Deste modo, este protocolo de reação tem sido crescentemente empregado em diversas sínteses de compostos orgânicos, sendo muitos produtos naturais ou produtos com atividade biológica⁵³.

Parar ilustrar uma destas aplicações, pode-se apresentar a síntese da combretastatina A-4, fitoalexina com alto poder antimitótico (Figura 12)⁵⁴.

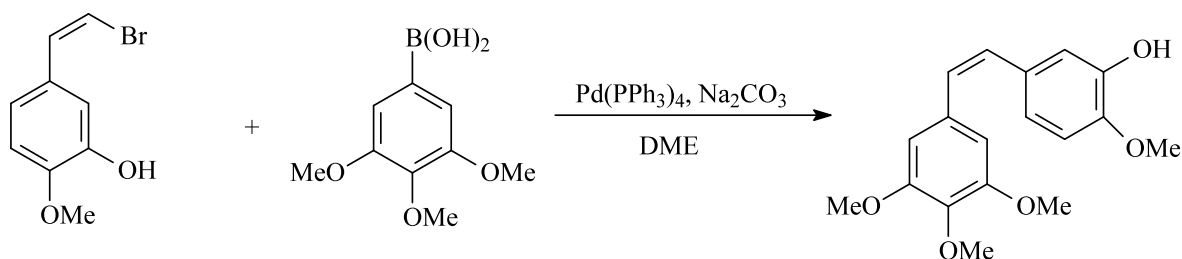


Figura 12 – Síntese de Combretastatina A-4 por acoplamento Suzuki.

Este protocolo permite a obtenção do isômero *cis* da combretastatina com rendimentos que situam-se em torno de 70 %, podendo ser isomerizada para a obtenção da *trans*-combretastatina.

2.5.4 Reação de Negishi

A reação de Negishi pode ser entendida como um processo catalítico de acoplamento cruzado entre um substrato organometálico contendo, especialmente, zinco ou zircônio, e compostos halogenados. Embora outros substratos além dos halogenados possam ser empregados, este texto mencionará somente os primeiros por serem estes os objetos de interesse desta tese no que tange à reação de Negishi. De modo análogo, embora possa ser efetuada com substratos organoalumínio ou organomagnésio, apenas compostos de zircônio e zinco serão considerados neste texto. Em 1977, Ei-Ichi Negishi e David van Horn⁵⁵ apresentaram um novo método para obter olefinas funcionalizadas por grupamento arila. Tratava-se do acoplamento cruzado entre um complexo alquenilzircônio e um haleto de arila catalisado pelo complexo de Ni(0), Ni(PPh₃)₄, apresentado na Figura 13. O organometálico alquenilzircônio era obtido por um processo chamado hidrozirconação de um alcino.

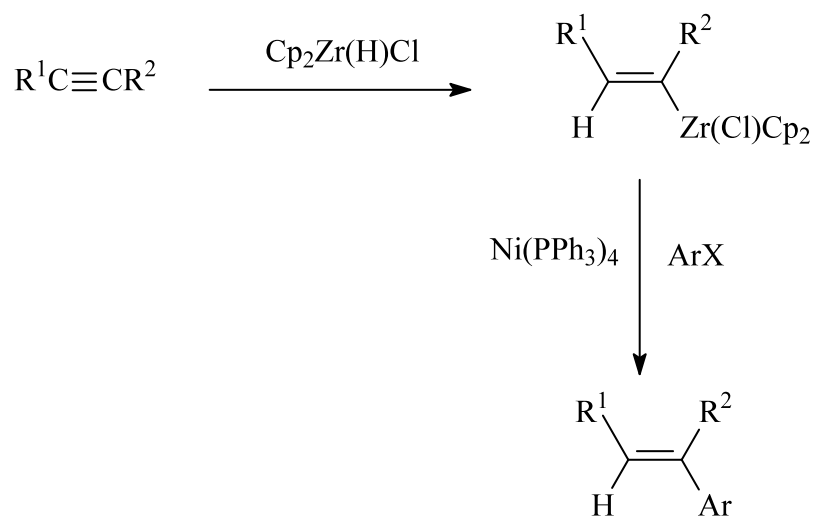


Figura 13 – Primeiro exemplo de hidrozirconação/ transmetalção em acoplamento cruzado.

A hidrozirconação é uma reação de hidrometalação onde se emprega o complexo $\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{H})\text{Cl}$, conhecido como reagente de Schwartz, para efetuar o processo. Esta reação apresenta características especialmente interessantes pois, quando aplicada a alcenos internos sempre resulta em organometálicos terminais, tendo o átomo de zircônio ligado no carbono 1. Além disso, a hidrometalação apresenta grande regioseletividade, produzindo compostos alquenilzircônio, quando aplicada a alcinos, onde o átomo de zircônio se liga sempre em posição *trans* em relação ao substituinte do carbono 2. As reações de transmetalração a complexos de níquel e paládio, etapa do acoplamento cruzado entre o organozirconoceno e o composto halogenado, ocorrem com retenção da configuração, o que confere grande estereosseletividade ao processo⁵⁶.

A Figura 14 mostra um exemplo da aplicação da reação de Negishi envolvendo hidrozirconação na síntese de um polieno conjugado com estereoquímica exclusivamente *trans*⁵⁷.

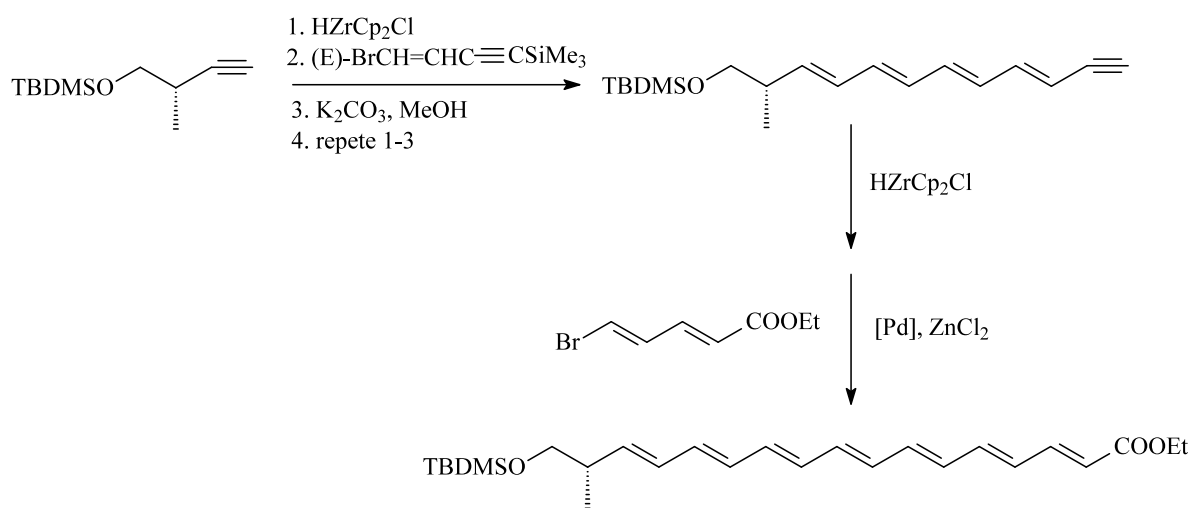


Figura 14 – Exemplo de controle de estereosseletividade no acoplamento cruzado em protocolo de Negishi.

A transmetalração de um grupamento covalentemente ligado a zinco para um complexo de paládio (ou níquel) para acoplamento cruzado também é conduzida em protocolo de reação de Negishi e, assim como para os compostos organozircônio, tem como resultado a retenção da configuração no produto formado. A aplicação de compostos

organozínco tem sido bastante utilizada pela facilidade de controle da seletividade e baixa toxicidade dos subprodutos formados⁵⁸.

2.5.5 Sínteses do *trans*-resveratrol e derivados

A primeira síntese do resveratrol data de 1941. As preparações do *trans*-resveratrol, assim como de alguns importantes derivados, para aplicação em testes de atividade biológica, envolviam, inicialmente, a reação de Wittig⁵⁹, apresentada na Figura 15, que parte do 3,5-diidróxibenzaldeído como substrato. Embora aceitável para testes em laboratório e sendo, para este fim, ainda utilizada^{60;61}, a reação de Wittig traz inconvenientes para a preparação em escala comercial de estilbenos, uma vez que se utiliza de quantidades estequiométricas de trifenilfosfina, reativo de considerável toxicidade e custo.

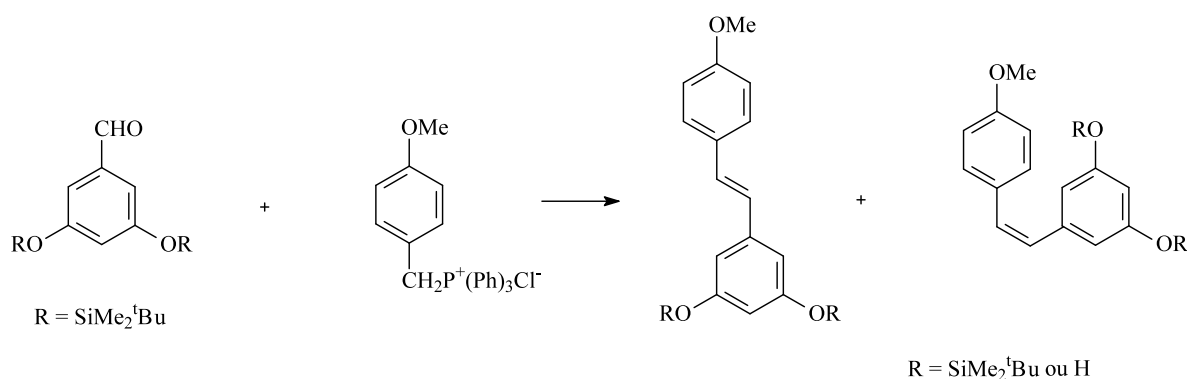


Figura 15 – Esquema da síntese do *trans*-resveratrol via reação de Wittig.

Outras estratégias de síntese para o *trans*-resveratrol e derivados vem sendo apresentadas, como, por exemplo, a olefinação de Julia modificada, que emprega sulfonas como substratos⁶² ou a reação de Perkin, que parte de um aldeído e de um ácido carboxílico como substratos⁶³.

A diversidade de métodos e a facilidade de modelagem das reações de acoplamento carbono-carbono catalisadas por sistemas baseados em metais de transição foram fatores que tornaram esta classe de reações altamente atraente na evolução da síntese seletiva de

trans-resveratrol. Certamente o emprego da reação de Heck foi a estratégia desenvolvida em maior número de trabalhos. Um dos primeiros exemplos de aplicação da reação de Heck na síntese desta fitoalexina, foi apresentado por Guiso e colaboradores⁶⁴, em 2002 (

Figura 16). Embora utilizasse uma reação catalítica e seletiva para a formação de ligação carbono-carbono, este estudo empregava a reação de Wittig para a preparação do substrato vinílico.

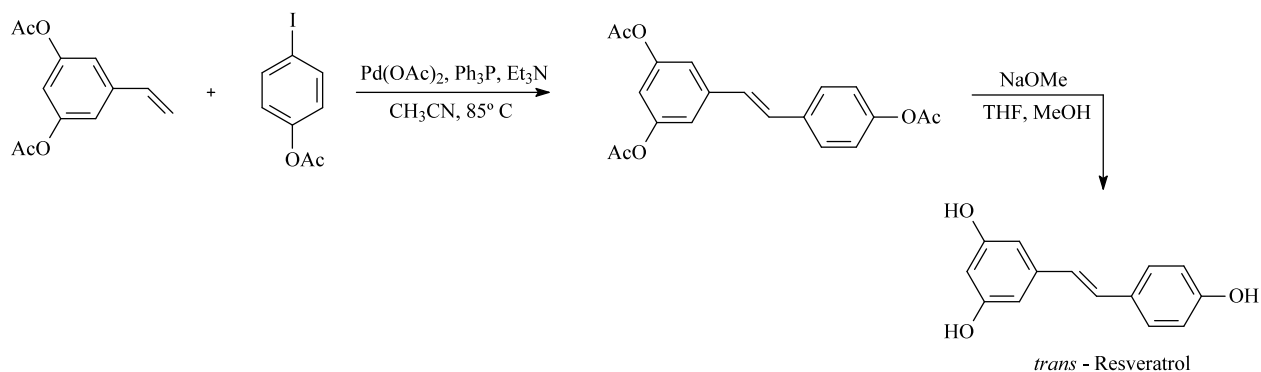


Figura 16 – Primeiro exemplo de aplicação da reação de Heck na síntese do *trans*-resveratrol.

Abordagens mais interessantes foram apresentadas após o trabalho de Guiso. Andrus e colaboradores⁶⁵ publicaram em 2003 um estudo onde preparavam *trans*-resveratrol através da reação de Heck decarbonilativa, desenvolvida nos anos 80, que promove a arilação de cloretos de aroila catalisada por complexos de paládio em presença de aminas terciárias. Assim, partindo do ácido α -resorcílico, Andrus obteve resveratrol em um rendimento global de 53% (Figura 17).

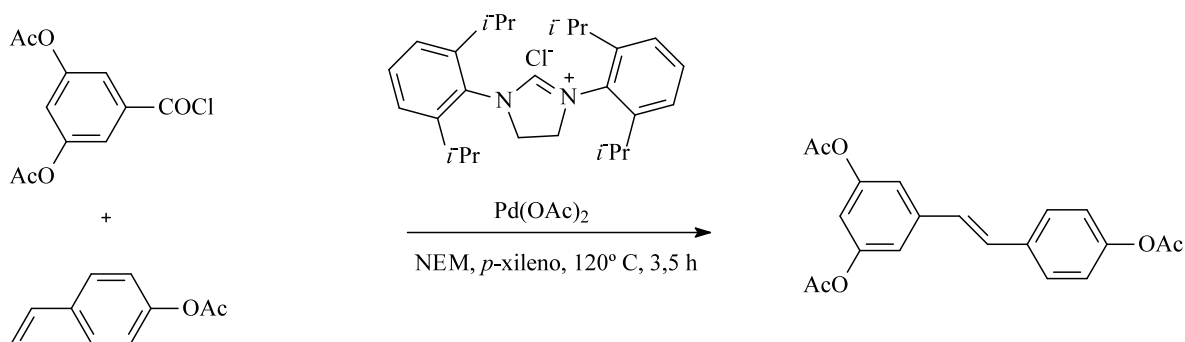


Figura 17 – Síntese do *trans*-resveratrol por reação de Heck decarbonilativa.

No mesmo estudo, Andrus apresenta a reação de Heck partindo de um sal de diazônio que acopla com o 4-acetoxiestireno. Além do emprego de um sal de diazônio e da reação de Heck para a síntese do resveratrol, destaca-se o uso do floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno), composto comercialmente disponível e de baixo custo, convertido em tetraflouroborato de 3,5-diacetoxidiazônio (em seis etapas, com rendimento global baixo) como estrutura que fornece o grupamento 3,5-diidroxifenil para formar o resveratrol.

Dentre os exemplos de aplicação da arilação de Heck para produzir *trans*-resveratrol, os trabalhos apresentados em 2003 por Ferber e em 2004 por Ikegami são os mais atraentes, até o momento. A estratégia de Ferber⁶⁶ se utiliza de dois acoplamentos conduzidos via reação de Heck em etapas subseqüentes no mesmo reator, produzindo *trans*-resveratrol após demetilação do produto obtido, com rendimento global de 61%. Ikegami⁶⁷ emprega um polímero não reticulado como ligante para catalisar a arilação do 3,5-diidróxiestireno com 4-iodoanisol, gerando *trans*-resveratrol permetilado com rendimento de 93 %. É importante ressaltar que o sistema catalítico pôde ser reutilizado em nova síntese.

A reação de Suzuki também foi aplicada à síntese de derivados do resveratrol, fluorados na porção olefínica. Em 2001 foi apresentado o acoplamento de um estireno fluorado e bromado no carbono α com ácidos borônicos derivados de 4-halofenol, conforme mostra a Figura 18. A síntese parte de um substrato dialogenado que é produzido por uma modificação da reação de Corey (um protocolo similar à reação de Wittig), onde o 3,5-diidroxibenzaldeído é posto a reagir com CFBr_3 e trifenilfosfina.

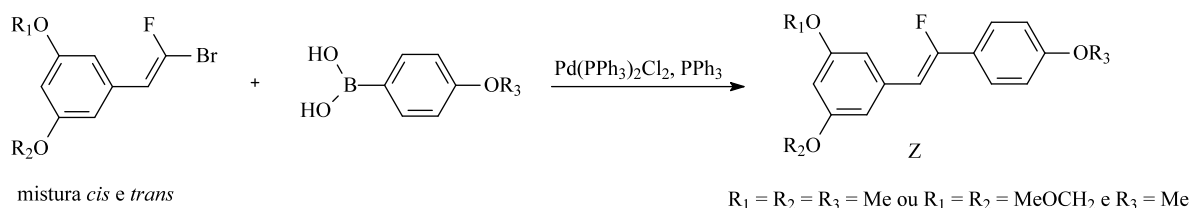


Figura 18 – Reação de Suzuki para a síntese de resveratrol e pterostilbeno fluorados.

2.5.6 Sínteses de tamoxifeno e triariletlenos

A primeira síntese do tamoxifeno data de 1963, pela ICI (atualmente AstraZeneca)²⁵. Os meios tradicionalmente empregados para a síntese de compostos triariletlenos utilizam-se da reação de McMurry, onde ocorre a condensação de duas cetonas, mediada por tetracloreto de titânio e zinco metálico, exemplificada para a síntese do (*Z*)-tamoxifeno na Figura 19. É importante destacar, novamente, que os processos para a síntese do tamoxifeno e para os demais triariletlenos devem apresentar regiosseletividade, pois, no caso do tamoxifeno, o isômero (*Z*) tem atividade anti-estrogênica enquanto que o isômero (*E*) mostra atividade estrogênica.

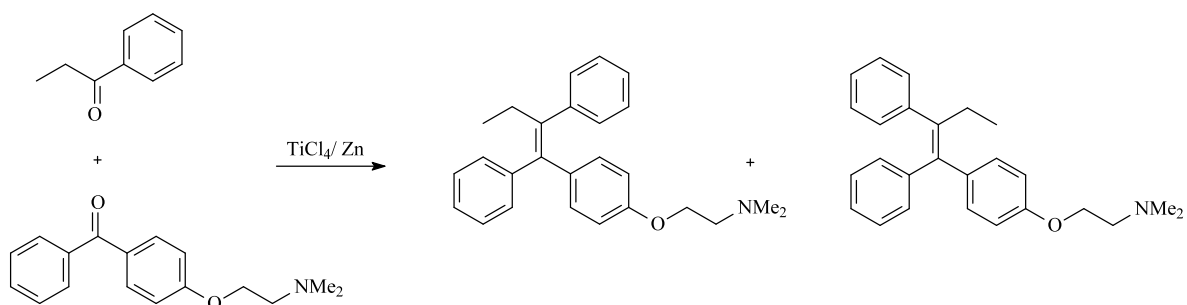


Figura 19 – Reação de McMurry para a síntese do (*Z*)-tamoxifeno.

Diversas estratégias para a síntese seletiva de (*Z*)-tamoxifeno e outros triariletlenos, apresentadas recentemente, têm como etapas importantes reações de acoplamento carbono-

carbono catalisadas por complexos de metais de transição que, normalmente, envolvem a utilização de alcinos como substratos.

Para exemplificar, pode-se citar a síntese do (Z)-tamoxifeno e compostos análogos que se baseia na carbometalação de um álcool propargílico, seguida de acoplamento C-C mediada por um complexo de paládio (0)⁶⁸, apresentada na Figura 20. Neste método, o álcool propargílico é preparado pela reação de Sonogashira e, após a formação do triarilenol mostrado na Figura 20, são necessárias outras etapas para a obtenção do (Z)-tamoxifeno: oxidação do álcool a aldeído, sua conversão em dieno e hidrogenação seletiva da vinila monossustituída. Itami e colaboradores⁶⁹ apresentaram estratégia similar a esta, onde faziam a carbometalação de um alcino funcionalizado por um grupamento piridilsilil, seguida por duas etapas de acoplamento C-C catalisadas por complexos de paládio. Este trabalho apresenta a vantagem de permitir a construção de diversos triariletlenos pelo mesmo protocolo, permitindo que se faça a abordagem sintética conhecida como “diversity-oriented synthesis”⁷⁰.

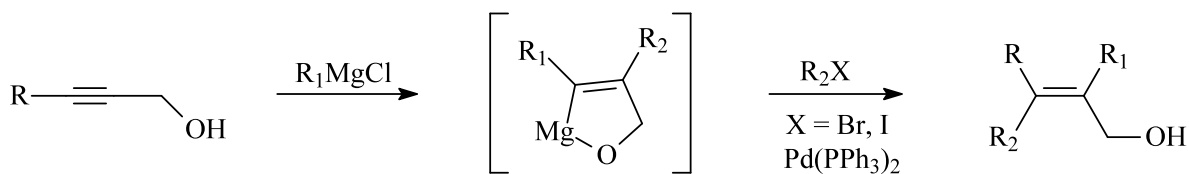


Figura 20 – Carbometalação / acoplamento catalítico C-C na síntese de triariletlenos. (R = alquil, aril ou alil. R₁ = alquil, aril, alil ou vinil e R₂ = aril, vinil ou aril)

Outros métodos para a síntese de (Z)-tamoxifeno envolvendo alcinos funcionalizados e reações de acoplamento C-C catalíticas têm sido apresentados, empregando catalisadores baseados em complexos de paládio ou níquel⁷¹⁻⁷³. Pode-se destacar o estudo apresentado por Pilli e Robello⁷⁴, que se utiliza da reação de Sonogashira (e mais oito etapas de síntese) para produzir o composto dibromado mostrado na Figura 21. Neste trabalho a reação de Negishi foi utilizada para a síntese de uma mistura de (Z)-tamoxifeno e (E)-tamoxifeno. A Figura 21 apresenta a proposta dos autores para explicar a origem da mistura de estereoisômeros observada como resultado da proposta de síntese.

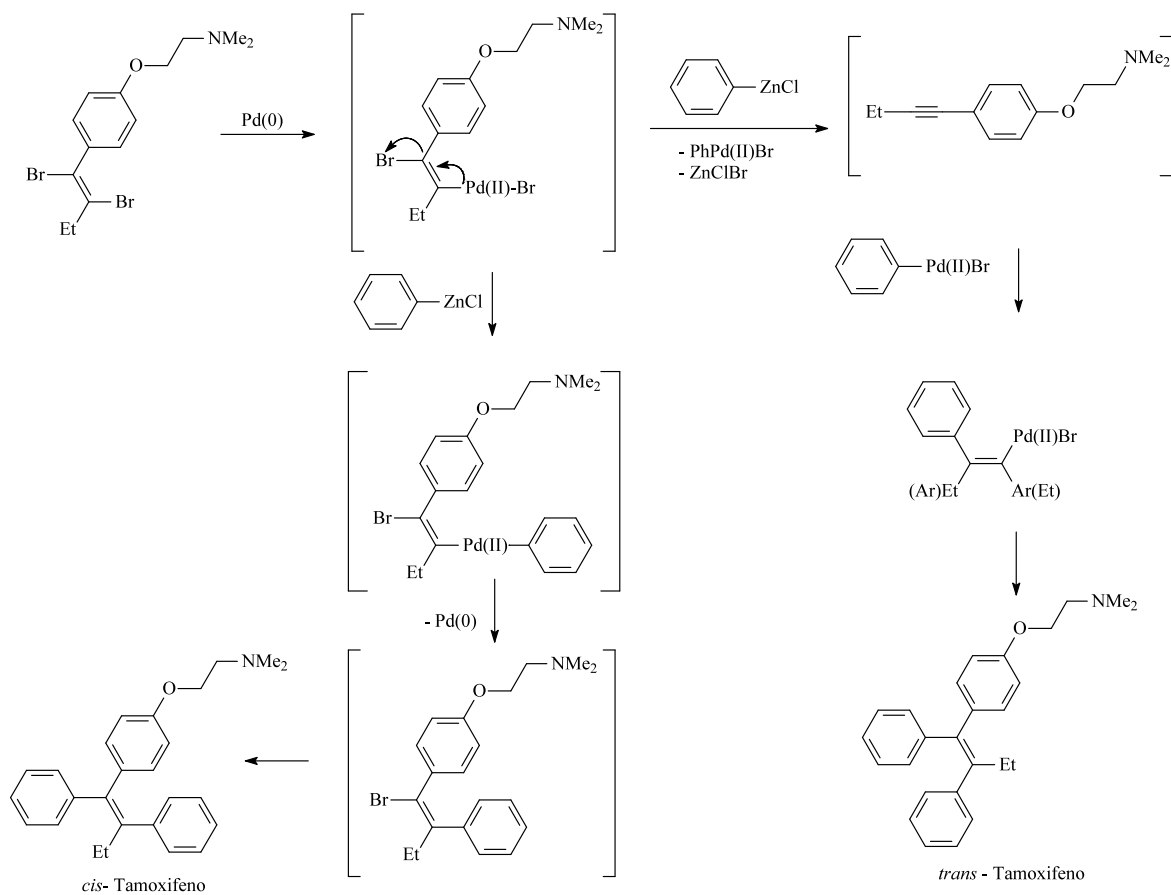


Figura 21 – Síntese de mistura de (E) e (Z)-tamoxifeno envolvendo reação de Negishi.

Recentemente, Larock e Zhou⁷⁵ publicaram a síntese do tamoxifeno e outras olefinas tetrassubstituídas por acoplamento entre iodeto de arila, alcinos internos e ácido borônico catalisado por complexos de paládio (II) (Figura 22). Neste processo, obtiveram 68 % de rendimento na mistura (95:5, Z:E) dos estereoisômeros do tamoxifeno.

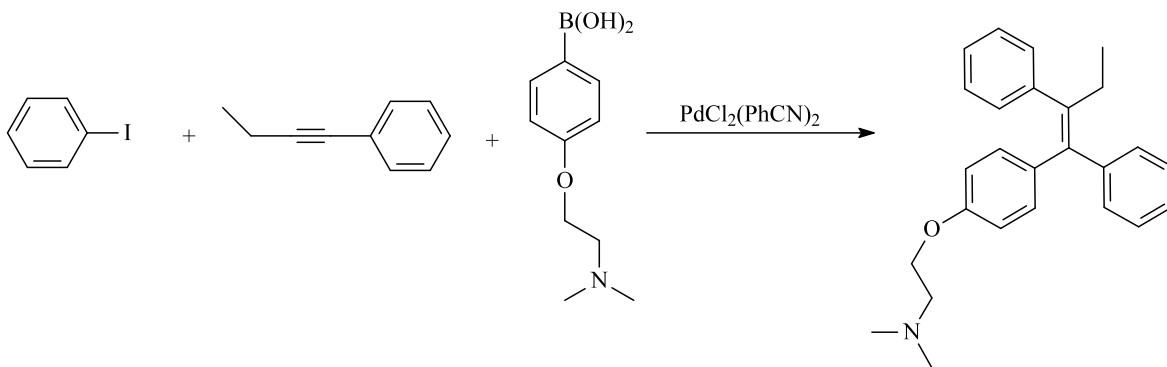


Figura 22 – Acoplamento iodeto de arila, alcino interno, ácido borônico para síntese de tamoxifeno.

3 Objetivos

Em vista das propriedades diferenciadas do *trans*-resveratrol, da ausência de dados na literatura sobre os teores desta fitoalexina em vinhos e sucos de uva brasileiros e, sendo o Rio Grande do Sul responsável por mais de 90% da produção de vinhos nacionais, um dos objetivos do presente trabalho foi a avaliação dos teores deste composto em uma amostragem de vinhos varietais brasileiros. Da mesma forma, a avaliação das concentrações de *trans*-resveratrol em sucos de uva gaúchos é proposta, levando-se em conta a possível diferença entre produtos elaborados a partir de manejo ecológico ou a partir de manejo tradicional dos cultivares.

Sendo o *trans*-resveratrol um produto natural presente em baixas concentrações em suas matrizes originais ou em produtos processados, seu isolamento para emprego em escala comercial é oneroso. Além disso, vários de seus derivados apresentam, também, atividades biológicas importantes. Assim, é proposta neste estudo a busca por rotas sintéticas genéricas para a síntese catalítica seletiva do *trans*-resveratrol e compostos similares, tendo como base a tecnologia empregada e desenvolvida pelo Grupo de Catálise Molecular na utilização e desenvolvimento de reações catalíticas de acoplamento cruzado para a formação seletiva de ligações carbono-carbono.

O terceiro objetivo se origina no decorrer do desenvolvimento de estratégias para a síntese do *trans*-resveratrol e derivados. Os compostos derivados da estrutura triariletileno, notadamente o (Z)-tamoxifeno são, assim como o resveratrol, modificadores seletivos de receptores de estrogênio. São claros a importância desta classe de compostos, a similaridade estrutural que têm com o resveratrol, e o fato de que os métodos de síntese para o (Z)-tamoxifeno e derivados se utilizam de reações que empregam substratos não facilmente disponíveis. Por estas razões, é proposto, também, o desenvolvimento de métodos sintéticos para a obtenção de compostos triariletilenos, baseados na formação seletiva de ligação carbono-carbono, a partir de reações catalisadas por complexos de metais de transição, e de matérias-primas de fácil obtenção e baixo custo.

4 Parte Experimental

4.1 Quantificação de *trans-resveratrol* em vinhos e sucos de uva

Para a quantificação de *trans-resveratrol* em amostras de vinhos e sucos vem sendo empregada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O sistema de CLAE utilizado é composto de um cromatógrafo Perkin Elmer 785A equipado com detector UV-VIS, bomba PE Series 200, interface PE 900 Series e degaseificador PE Series 200. Os dados são processados pelo programa TurboChromTM 4.0.

Para a separação dos componentes das amostras é utilizada uma coluna octadecil para fase reversa, de 250 mm de comprimento, com 5 µm de diâmetro de partícula e 4,6 mm de diâmetro interno (Brownlee). O *trans-resveratrol* empregado como padrão para as análises foi doado pela PharmaScience Inc., de Montreal, Canadá.

O método utilizado para a quantificação de *trans-resveratrol* em vinhos consiste da filtração das amostras em membranas de 0,45 µm, seguida pela diluição das amostras 6 vezes em água Milli-Q. O material assim obtido é diretamente injetado no cromatógrafo através de um loop de 20 µL. A CLAE em fase reversa é conduzida com eluição isocrática tendo a mistura água : acetonitrila (75 : 25) como eluente. O pH da solução eluente é ajustado a 3,00 com H₃PO₄ concentrado. O sinal do detector é ajustado para 306 nm. As análises são realizadas a 24°C. Cada amostra é injetada quatro vezes no sistema cromatográfico. Para quantificação, uma curva de calibração externa é preparada, no intervalo de concentração de 0,10 a 10,0 mg/L de *trans-resveratrol*.

Os vinhos varietais utilizados para análise foram adquiridos no mercado, tendo sido analisadas amostras dos varietais Merlot (n = 10), Cabernet Sauvignon (n = 13), Pinot Noir (n = 4), Gamay (n = 3), Pinotage (n = 1), Sangiovese (n = 1) e Tannat (n = 1).

Quanto à determinação do teor de *trans-resveratrol* em sucos de uva, cada amostra de suco analisada é diluída 3 vezes com água Milli-Q, filtrada em membrana de 0,45µm e diretamente injetada em triplicata através de um loop de 20 µL.

O método segue condições similares às descritas por Lamuela-Raventós e colaboradores para análise de sucos de uva⁶⁶. O perfil da eluição segue o gradiente: 0 min 83,5% A e 16,5 % B; 13 min, 82% A e 18%B; 15 min, 82%A e 18%B; 17 min, 77% A e 23% B; 21min, 75% A e 25% B; 27 min, 68,5% A e 31,5% B; 30 min, 0 % A, 100% B, sendo o solvente A ácido acético glacial em água (52,6:900 v/v) e o solvente B 20% do solvente A e 80% de acetonitrila. O fluxo é de 1,5 ml.min⁻¹, sendo o detector ajustado para 306 nm. Foram analisados 30 diferentes sucos de uva, sendo 17 industrializados a partir de uvas cultivadas pelos métodos tradicionais e 13 a partir de uvas cultivadas pelo manejo orgânico. A exemplo das análises em vinhos, cada amostra é injetada quatro vezes no sistema cromatográfico. Para quantificação, uma curva de calibração externa é preparada, no intervalo de concentração de 0,15 a 10,0 mg/L de *trans*-resveratrol.

4.2 Desenvolvimento das estratégias para a síntese de SERMs

Todas as reações foram realizadas em atmosfera inerte, empregando-se a técnica de tubos de Schlenck, com auxílio de uma linha de vácuo-argônio. Os solventes utilizados foram secos e destilados antes do uso empregando-se técnicas descritas na literatura⁶².

Os reagentes e os solventes empregados foram purificados de acordo com os métodos descritos na literatura.

4.2.1 Síntese de substratos

4.2.1.1 Síntese de alquinilarenos⁶⁸

Uma mistura de 0,050 mmol de PdCl₂(PPh₃)₂ e 0,050 mmol de iodeto cuproso é colocada em um tubo de Schlenk, sob atmosfera de argônio. A esta mistura são adicionados 10 mL de trietilamina e 5,0 mmol de bromoareno (4-bromoanisol como substrato modelo). O sistema assim constituído é posto sob agitação durante 10 minutos recebendo, em seguida, 7,50 mmol de 2-metil-3-butin-1-ol. A mistura resultante é colocada sob refluxo durante 24 horas. O material insolúvel restante ao final da reação é separado do meio reacional por filtração. A trietilamina é removida do filtrado por evaporação sob pressão reduzida. O resíduo da evaporação é dissolvido em 30 mL de éter etílico e lavado

sucessivamente com solução saturada de cloreto de sódio, solução de ácido cítrico a 10 % (m/V, 3 x 20 ml), solução saturada de cloreto de sódio (20 mL), solução de bicarbonato de sódio a 5% (m/V, 20 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (20 mL). Em seguida, a fase orgânica é seca com sulfato de magnésio, filtrada e evaporado, sob vácuo. O líquido assim obtido é destilado em forno de bolas, a 140 °C.

O 2-metil-4-(4-metoxifenil)-3-butin-1-ol obtido na etapa anterior, juntamente com 0,5 eq de hidróxido de potássio em pó e 10 mL de tolueno são postos em refluxo durante 4 horas. Decorrido este tempo, o excesso de tolueno é evaporado sob vácuo e o resíduo é dissolvido em 30 mL de éter etílico, sendo tratado de maneira análoga ao da etapa anterior da síntese.

4.2.1.2 Síntese de derivados do ácido cinâmico (ácido 3-(4-metoxifenil) propiônico e 3-(3,5-dimetoxifenil) propiônico⁶⁹).

Em um balão de três bocas de 500 mL são colocados 75 mmol de 4-metoxibenzaldeído, 2 equivalentes de ácido malônico, dissolvendo-se a mistura assim preparada em 35 mL de piridina. Ao balão são acoplados um termômetro e um condensador de refluxo. O sistema é posto em aquecimento sob agitação até que atinja a temperatura de 50°C. Neste ponto adiciona-se 1 equivalente de morfolina. Em seguida, passa-se a aquecer o sistema até 80°C, lentamente. A reação é mantida nesta temperatura durante uma hora, após a qual, eleva-se a temperatura do meio reacional até 110°C. Após três horas de agitação nessa temperatura, cessa-se o aquecimento e o meio reacional é vertido em 350 mL de água destilada resfriada. Adicionam-se, então, 45 mL de ácido clorídrico concentrado, lentamente. Após a adição de ácido, observa-se a formação de um sólido, que é separado por filtração. O sólido assim obtido é lavado com quatro porções de água resfriada e dissolvido em uma mistura de 10 g de hidróxido de sódio e 350 mL de água destilada. Esta mistura é diluída com 150 mL de água destilada, novamente filtrada e, posteriormente, acidificada com 70 mL de ácido clorídrico concentrado. O ácido 4-metoxicinâmico purificado é então filtrado, lavado três vezes com água fria e seco sob vácuo. Para a síntese do ácido 3,5-dimetoxicinâmico foi utilizada uma escala menor, partindo-se de 3,7 mmol de 3,5-dimetoxibenzaldeído. **ácido 3-(4-metoxifenil) propiônico:**

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 3,85 (s, 3 H), 6,33 (d, *J* = 16 Hz, 1 H), 6,93 (d, *J* = 8,8 Hz, 2 H), 7,55 (d, *J* = 8,9 Hz, 2 H), 7,75 (d, *J* = 16 Hz, 1 H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 55,4 (CH₃), 114,1 (CH), 114,6 (CH_{olef.}), 126,8 (C); 130,1 (CH), 146,6 (CH_{olef.}), 161,7; 172,1 (C).

4.2.1.3 Síntese dos ácidos 2,3-dibromo-3(4-metoxifenil) propiônico e 2,3-dibromo-3-(3,5-dimetoxifenil) propiônico⁷⁰

Em um balão de 250 mL, 56 mmol de ácido 3-(4-metoxifenil) propiônico são dissolvidos na menor quantidade possível de clorofórmio a quente, sob agitação. A seguir, leva-se a mistura à temperatura ambiente e adicionam-se 1,1 equivalentes de bromo. O produto da reação, rapidamente precipita-se no meio reacional e é deixado sob agitação por 15 minutos. Decorrido este tempo, o balão é posto em banho de gelo para cristalização completa do produto bromado. Os cristais são filtrados, lavados com clorofórmio gelado, secos sob vácuo e analisados.

4.2.1.4 Síntese do (E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)etileno e (E)-1-bromo-2-(3,5-dimetoxifenil)etileno.

Em balão de 500 mL são colocados 55 mmol de ácido 2,3-dibromo-3-(4-metoxifenil) propiônico e dissolvidos em 250 mL de solução aquosa de carbonato de potássio a 13%. O sistema é posto sob refluxo durante 30 minutos. Após este tempo é levado à temperatura ambiente. O produto da reação é extraído com 350 mL de éter etílico (em três porções). Os extratos são reunidos e secos sob sulfato de magnésio. O material é filtrado, o éter evaporado e o produto resultante é seco sob vácuo. **(E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)etileno:** RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 3,80 (s, 3 H), 6,60 (d, *J* = 14 Hz, 1 H), 7,03 (d, *J* = 14 Hz, 1 H), 6,84 (d, *J* = 9 Hz, 2 H), 7,22 (d, *J* = 9 Hz, 2 H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 55,3 (CH₃), 104,0 (CH_{olef.}), 114,1; 127,3 (CH), 128,7 (C), 136,5 (CH_{olef.}), 159,6 (C). CG/EM (IE, 70 eV, m/z (%)): 89 (100), 212, 214 (M⁺, 97), 133 (51), 118 (46), 197, 199 (39), 64 (29), 77 (28), 102 (21).

4.2.1.5 Síntese do *trans*-estilbeno via reação de Heck

Em um frasco de Schlenk, são colocados, sob atmosfera inerte, 1,4 equivalente de acetato de sódio e 0,2 equivalente de brometo de *n*-tetrabutilamônio. Em seguida, são adicionados ao sistema 30 mL de DMA (solvente da reação), 1,0 equivalente de iodobenzeno (tipicamente, 10 mmol), 1,2 equivalente de estireno e a solução de 0,001 equivalente do catalisador (**1**) em solução de DMA. O sistema reacional é posto em refluxo por 24 horas, sob atmosfera inerte. O estilbeno formado é filtrado e lavado com água sendo, posteriormente, recristalizado em *n*-hexano.

4.2.1.6 Bromação das arilolefinas (típica para *trans*-estilbeno)

Adicionam-se 1,5 eq de bromo a uma mistura de *trans*-estilbeno e diclorometano. Após agitação por três horas, o excesso de bromo é removido pela adição de uma solução aquosa de tiosulfato de sódio a 10%. O sólido formado na reação é filtrado e lavado, sucessivamente, com a solução de tiosulfato de sódio a 10 % e com hexano sendo, posteriormente, seco a vácuo.

4.2.1.7 Bromação do *trans*-estilbeno via HBr/H₂O₂

Em um balão de 100 mL são dissolvidos 2,8 mmol de *trans*-estilbeno em 25 mL de etanol absoluto, sob agitação. Após a dissolução do estilbeno, a solução é aquecida a 100 °C. Em seguida é adicionado 1 mL de solução aquosa a 48% (m/m) de ácido bromídrico, e logo após, 1 mL de solução a 30% em volume de peróxido de hidrogênio. Neste ponto forma-se um precipitado branco. Após dez minutos de agitação a fase líquida do sistema torna-se incolor. O meio reacional é deixado por mais vinte minutos sob agitação. Decorrido este tempo, o sistema é levado à temperatura ambiente e a ele é adicionada uma solução de bicarbonato de sódio a 5% até a neutralização do meio. Em seguida o sistema é posto em banho de gelo. O precipitado formado é filtrado à pressão reduzida, lavado com água e, posteriormente, com hexano. O sólido assim obtido é seco e analisado.

4.2.1.8 Bromação do *trans*-estilbeno via tribrometo de piridina

Em um frasco erlenmeyer de 250 mL, 10 mmol de *trans*-estilbeno são dissolvidos em 40 mL de etanol absoluto a quente. Em temperatura próxima à ebulição do sistema, são adicionados 1,1 equivalentes de tribrometo de piridina e a reação é posta sob agitação durante dez minutos nesta temperatura. Em seguida resfria-se o meio reacional. Neste ponto inicia-se a precipitação do produto da reação. Após atingir a temperatura ambiente, o meio reacional é colocado em banho de gelo e a seguir filtrado sob pressão reduzida. O sólido obtido é lavado com metanol resfriado, seco sob vácuo, analisado e armazenado.

4.2.1.9 Deidroalogenação das arilolefinas (típica para 1,2-dibromoestilbeno).

O produto obtido na reação anterior é dissolvido em uma mistura 1:1 de metanol-THF. Esta solução recebe, então, a adição de 2,0 equivalentes de carbonato de potássio e o sistema é posto sob agitação durante 24 horas, em temperatura ambiente. Após este período, o meio reacional é filtrado e o solvente evaporado. O sólido obtido é seco sob vácuo. **Bromoestilbeno:** CG/EM (IE, 70 eV, m/z (%)):179 (100), 178 (86), 89 (75), 76 (69), 258 (34), 260 (32), 88 (29), 51 (26).

4.2.2 Caracterização dos produtos sintetizados

Os produtos sintetizados foram isolados do meio reacional através da remoção do solvente, à pressão reduzida, e purificados. A caracterização dos mesmos foi efetuada por Ressonância Magnética de ^1H e de ^{13}C , empregando-se um Espectrômetro Varian VXR-200 ou Varian XL-300, Espectroscopia no Infravermelho, utilizando-se um Espectrofotômetro Bomem B-102 e por Espectrometria de Massas acoplada à Cromatografia em Fase Gasosa em um aparelho CG/MS Shimazu QP-5050 (IE, 70 eV), conforme segue.

Salienta-se que muitos dos compostos utilizados neste trabalho foram preliminarmente caracterizados por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas e utilizados em sua totalidade em etapas subseqüentes das rotas sintéticas dos produtos de interesse desta tese. Isto foi assim realizado em razão das quantidades pequenas de substratos utilizadas em etapas exploratórias das sínteses

planejadas. Quando tais rotas eram modificadas ou abandonadas, produtos intermediários sintetizados não eram plenamente caracterizados.

4.2.3 Quantificação dos produtos sintetizados

A análise quantitativa dos produtos obtidos nas reações de síntese foi feita por cromatografia gasosa, utilizando o método do padrão interno. Foram utilizados os cromatógrafos Varian 3400 CX, HP 5890 e Shimadzu xxx, equipados com colunas capilares L&M – 1 (Poli-dimetil-siloxana), Simplicity – 5 (Poli-difenil-siloxana) e DB - 17, usando um detector do tipo FID, geralmente nas seguintes condições:

$$T_{\text{injetor}}=T_{\text{detector}}= 250\text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$P_{\text{gás de arraste}}= 10\text{ psi (Hidrogênio ou Nitrogênio)}$$

Programação de temperatura do forno:

$$T_{\text{inicial}}= 60\text{ }^{\circ}\text{C Tempo}= 5\text{ min}$$

$$\text{Velocidade de aquecimento}=10\text{ }^{\circ}\text{C/ min}$$

$$T_{\text{final}}= 250\text{ }^{\circ}\text{C, Tempo}=10\text{ min}$$

4.2.4 Reações típicas utilizadas no desenvolvimento das estratégias de síntese dos SERMs

Os solventes empregados nas reações de acoplamento foram secos conforme a literatura (ref Purification) e destilados sob vácuo ou desaerados antes de sua utilização. Para a manipulação de reagentes e execução de reações em atmosfera inerte utilizou-se linha de vácuo/argônio. O iodobenzeno e o 1,2-dibromoetilbenzeno utilizados nas reações foram adquiridos (Acros e Aldrich, respectivamente) e utilizados sem purificação. O estireno (Aldrich) foi seco e destilado sob vácuo prontamente antes de sua utilização. Os ácidos borônicos empregados nas reações foram preparados segundo a literatura⁶⁷. O $\text{Cp}_2\text{Zr(H)Cl}$ e o Pd(OAc)_2 foram comprados (Aldrich e Stream, respectivamente) e utilizados tal qual como recebidos, assim como os demais reagentes.

4.2.4.1 Reação formação de alquenzircônio e acoplamento cruzado com haleto de arila

Em tubo de Schlenk, seco à quente sob vácuo, prepara-se uma suspensão de 0,6 mmol de $\text{Cp}_2\text{Zr(H)Cl}$ em 5 mL de tolueno seco. Esta suspensão é posta sob agitação e recebe, em seguida, a adição de 0,40 mmol de arilacetileno (fenilacetileno como substrato modelo), recentemente seco ou destilado. O sistema reacional assim constituído é posto sob agitação durante uma hora à temperatura ambiente. Em outro frasco Schlenk, é preparada uma mistura de 0,36 mmol de bromoareno (4-bromoanisol como substrato modelo), 0,36 mmol de trietilamina e $3,6 \times 10^{-3}$ mmol de acetato de paládio em 5 mL de tolueno e 7,5 mg de undecano, como padrão interno. Após uma hora de reação, deixa-se o primeiro sistema reacional em repouso para decantação do $\text{Cp}_2\text{Zr(H)Cl}$ não reagido e a fase líquida é transferida para o frasco Schlenk que contém o segundo sistema reacional. A nova mistura é posta em agitação sob temperatura de 130°C , durante duas horas. Ao final deste tempo, o meio reacional é analisado por cromatografia em fase gasosa.

4.2.4.2 Reação de acoplamento entre (E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)etileno e o ácido fenilborônico.

Em um frasco de Schlenk, sob atmosfera inerte, são colocados 0,25 mmol de (E)-2-bromo-1-(4-metoxifenil)estireno, 1,5 equivalente de ácido fenilborônico e 2,0 equivalente de fosfato de potássio. Em seguida, estes reagentes são dissolvidos em 4 mL de dioxano, recentemente seco e destilado sob vácuo. Logo após, adiciona-se ao meio reacional uma solução de 0,0025 mmol de acetato de paládio (1% em relação ao composto bromado), 0,01 mmol de trifetilfosfina (4 equivalentes em relação ao precursor catalítico) em 2 mL de dioxano, sob argônio, e 8,0 mg de undecano, padrão interno para quantificação dos produtos da reação por CG. O sistema reacional é posto sob agitação em temperatura de 130°C durante duas horas, após as quais resfria-se o frasco e analisam-se os produtos da reação.

4.2.4.3 Acoplamento Suzuki entre (E)-bromoestilbeno e ácido arilborônico (típica para trifeniletileno).

Em um tubo de Schlenk, sob atmosfera inerte, adiciona-se fosfato de potássio isento de água (2,00 equivalentes), (E)-bromoestilbeno (1,00 equivalente, tipicamente, 5 mmol) e ácido fenilborônico (1,50 equivalente). Ao reator são, então, adicionados 5 mL de DMF desaerado e uma solução de 0,01 equivalente de Pd(OAc)₂ e 0,02 equivalente de trifenilfosfina (ao empregar-se precursor paladaciclo também 1% de complexo em relação ao bromoestilbeno é utilizada em 5 mL de DMF desaerado). O sistema foi levado a temperatura de 80°C e posto sob agitação durante vinte e quatro horas. O triariletileno formado é extraído com 30 ml de éter etílico, fase lavada três vezes com solução 1 M de hidróxido de sódio, duas vezes com solução saturada de cloreto de sódio e seca sob sulfato de magnésio. Após filtração e evaporação do solvente, o produto obtido é purificado em coluna com fase estacionária em sílica gel flash 60, com eluente (tipicamente) n-hexano:acetato de etila 95:5, acompanhada por CCD ou CG.

trifeniletileno: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 6,96 – 7,32 (multiplete, 16 H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 126,7; 127,5; 127,9; 128,2; 128,6; 129,5 (CH), 130,4 (CH_{olef.}), 137,3; 140,3; 142,5; 143,4 (C). CG/EM (IE, 70 eV, m/z (%)): 256 (M⁺, 100), 178 (58), 120 (43), 179 (33), 126 (29), 113 (27), 255 (26), 257 (M⁺ + 1, 22).

(Z)-1-(4-metoxifenil)-1,2-difeniletileno: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 3,77 (s, 3 H), 6,84 (d, *J* = 8,9 Hz, 2 H), 7,00 – 7,31 (multiplete, 13 H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 55,2 (CH₃), 113,5; 126,4; 127,3; 127,8; 128,5; 129,4 (CH), 130,3 (CH_{olef.}), 136,0; 137,5; 140,5; 142,1; 159,2 (C). CG/EM (IE, 70 eV, m/z (%)): 286 (M⁺, 100), 165 (29), 119 (25), 287 (M⁺ + 1, 23), 178 (18), 126 (16), 113 (13), 285 (13), 91 (12). IV (KCl/filme, ν cm⁻¹) 3077, 3054, 2955, 2932, 2059, 1950, 1887, 1808, 1604, 1495, 824, 696.

(Z)-1-[4-(2-dimetilaminoetoxi)fenil]-1,2-difeniletileno: RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 2,3 (s, 6 H), 2,69 (t, *J* = 5,7 Hz, 2 H), 4,03 (t, *J* = 5,7 Hz, 2 H), 6,85 – 7,31 (multiplete, 15 H). RMN ¹³C (75,4 MHz, CDCl₃, 20° C, δ ppm): 45,7 (CH₃), 58,1;

65,8 (CH₂), 114,8; 126,3; 127,3; 127,6; 128,1; 128,4; 129,3 (CH), 130,1 (CH_{olef.}), 135,8;
137,4; 140,4; 141,9; 158,3 (C).

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise de resveratrol em produtos derivados de uvas

5.1.1 Sucos de uva

São poucos os dados disponíveis na literatura à respeito da concentração de *trans*-resveratrol em sucos de uva. Estes relatam teores muito baixos desta fitoalexina. Em 1997, Yasui e colaboradores determinaram concentrações que vão de 0,04 a 0,44 mg/L em sucos de uva japoneses, Soleas e colaboradores⁸² relataram níveis que vão de 3 a 15 µg/L, enquanto Lamuela-Raventós e colaboradores⁷⁶ encontraram concentrações de <0,01 mg/L a 1,09 mg/L em sucos espanhóis. Em 2002, van Breemen e colaboradores⁸³ apresentaram um estudo onde aplicavam CLAE acoplada a um detector de espectrometria de massas (APCI) para quantificar os teores do que chamaram de “resveratrol total” em uvas, extratos de uva, suco de uvas e vinhos. Com relação aos teores encontrados em sucos de uvas, os autores obtiveram teores médios de 1,13 nmol de resveratrol total/g de suco (equivalente à cerca de 0,25 ppm), ao analisarem amostras de sucos de uvas Concórdia. É importante destacar-se que os autores denominam “resveratrol total” às quantidades de resveratrol e de resveratrol hidrolisado de seu glicosídeo por ação de β-glicosidase. Sendo assim, logicamente os sucos estudados nesse trabalho apresentavam teores consideravelmente baixos de resveratrol.

No presente estudo, foram avaliados sucos de uva de dois tipos: integrais ecológicos e integrais comerciais por CLAE com eluição por gradiente de composição, diluindo-se em três vezes as amostras. A Figura 23 apresenta o perfil cromatográfico do padrão de *trans*-resveratrol e o cromatograma de duas amostras de sucos integrais.

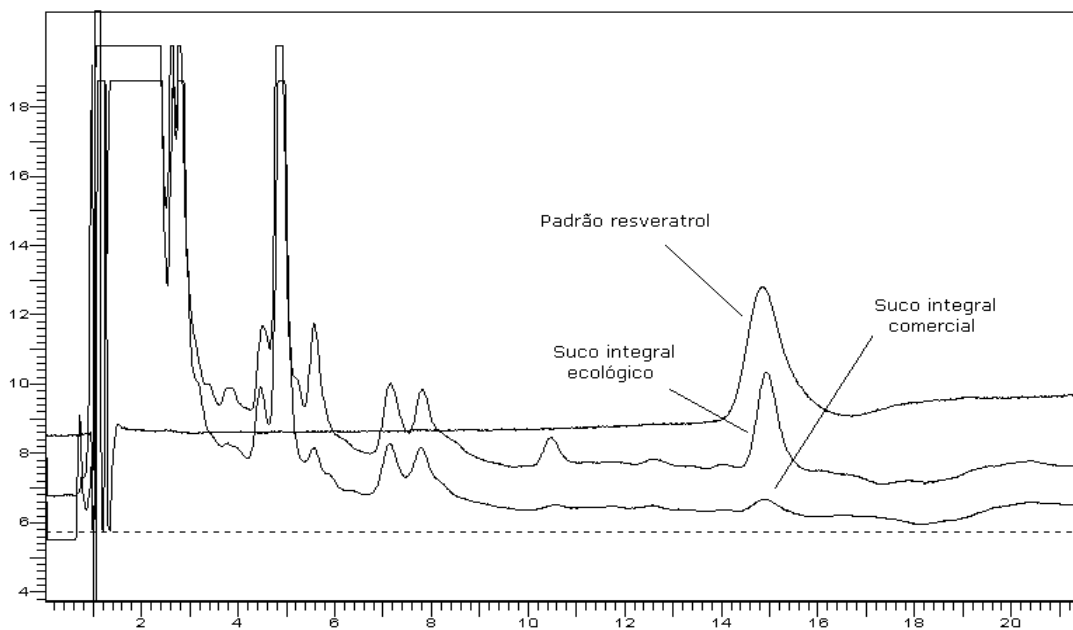


Figura 23 – Cromatogramas de solução padrão de resveratrol com concentração de 5,00 mg.L⁻¹ e amostras de sucos integrais diluídos três vezes.

O valor obtido para o limite de quantificação ficou no primeiro ponto da curva de calibração, 0,15mg/L. O coeficiente de correlação linear para a curva de calibração foi $r^2 = 0,9985$.

Os resultados obtidos nos sucos de uva brasileiros analisados estão listados na Tabela II, que mostra que os sucos ecológicos apresentam teores de *trans*-resveratrol maiores do que os sucos comerciais. Os sucos ecológicos analisados possuem concentrações que variam de 1,02 a 5,27 mg/L, enquanto os sucos comerciais analisados contêm de <0,15 a 2,62 mg/L de *trans*-resveratrol.

As concentrações de *trans*-resveratrol em vinhos dependem de vários fatores. Vinhos tintos apresentam maior quantidade de *trans*-resveratrol que os vinhos brancos e rosados, característica condicionada a variedade da uva. A tecnologia aplicada à produção, a temperatura e a capacidade intrínseca de síntese do resveratrol no cultivo empregado determinam também a variação da concentração.

Tabela II – Concentração de *trans*-resveratrol em sucos de uva integrais.

Tipo de suco	Amostra ^a	Concentração (mg.L ⁻¹)	Média (dp) ^b (mg.L ⁻¹)
Comercial	A (3)	0,95	1,01 (0,98)
	B (2)	1,52	
	C (2)	2,62	
	D (3)	0,96	
	E (3)	nd	
	F (2)	nd	
Ecológico	A (3)	2,43	2,83 (1,82)
	B (3)	5,27	
	C (3)	1,02	
	D (2)	4,10	
	E (2)	1,31	

^a Número de amostras entre parêntesis. ^b Desvio padrão (dp, %) de 3 determinações para cada amostra. Nd: concentração não detectada (< 0,15 mg/L)

Nos sucos, a variação encontrada pode ser atribuída ao processo de fabricação do suco visto que, geralmente, na elaboração dos sucos comerciais emprega-se o aquecimento direto, enquanto que, para a elaboração dos sucos ecológicos, utiliza-se o arraste a vapor, o que poderia prevenir processos de decomposição, ao mesmo tempo em que seria possível a hidrólise química do piceid presente nas uvas. Somado a isso, o cultivo da uva para os diferentes processos é diferenciado. No cultivo da uva ecológica não se empregam defensivos agrícolas, o que elicitaria a autodefesa da planta a ataques externos, como, por exemplo, infestação por fungos.

5.1.2 Vinhos varietais brasileiros

Para a determinação de *trans*-resveratrol em vinhos varietais brasileiros elaborados no Rio Grande do Sul, foram adquiridas amostras de todos os varietais então disponíveis no mercado. É importante salientar-se que, desde a realização das análises descritas neste trabalho, feitas no início do presente curso, um número considerável de novos produtos do setor vinícola vem sendo comercializado.

O método de análise empregado neste trabalho, injeção direta de amostra diluída seis vezes em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE), permitiu que se obtivesse resolução completa do analito de interesse em análises simples, de baixo custo e rápidas, por utilizar-se de eluição isocrática. A reprodutibilidade e repetibilidade das análises são plenamente aceitáveis, tanto para as curvas de calibração do padrão quanto para as amostras de vinho, 3,2% e 1,7%, respectivamente. A Figura 24 mostra cromatogramas típicos

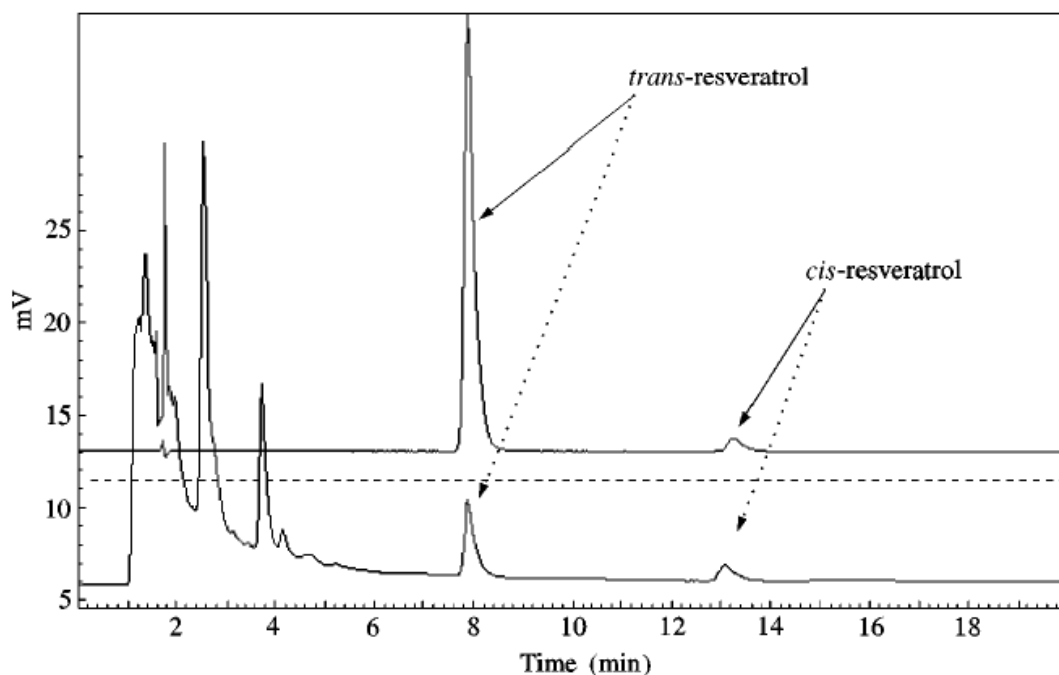


Figura 24 – Cromatogramas de uma solução padrão de *trans*-resveratrol contendo 4,23 mg.L⁻¹ (acima) e de uma amostra de vinho Merlot safra 1997 diluída seis vezes (abaixo).

Os resultados obtidos para a análise de 36 diferentes vinhos amostrados estão resumidos na Tabela III. As concentrações de *trans*-resveratrol variaram entre 0,82 a 5,75 mg.L⁻¹, com valor médio de 2,57 mg.L⁻¹, teor mais elevado que o valor médio obtido em vinhos japoneses, gregos, norte-americanos, portugueses, argentinos e chilenos^{29;84-87}.

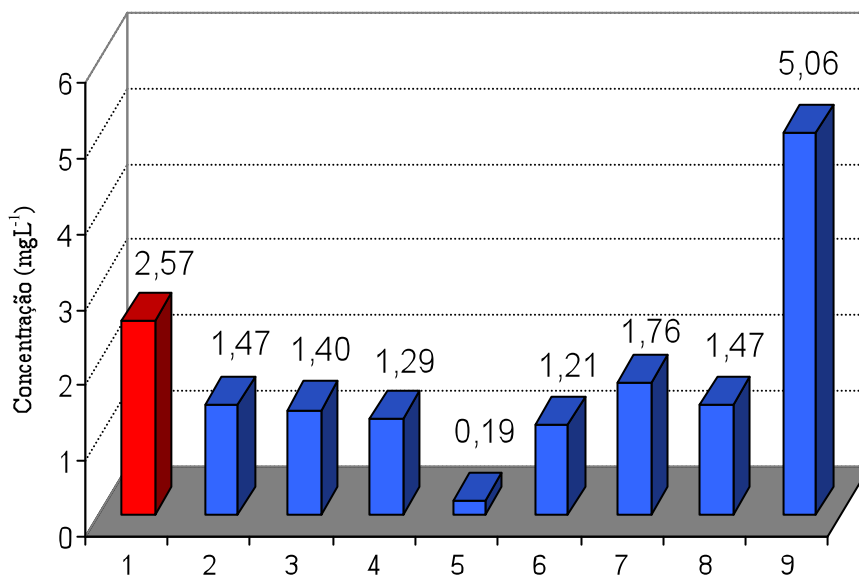
Conforme apresentado na Tabela III, os vinhos tintos analisados que mostraram maiores teores de *trans*-resveratrol foram os varietais Sangiovese (5,75 mg.L⁻¹), Merlot (5,43 mg.L⁻¹), e Tannat (4,17 mg.L⁻¹).

A Figura 25 apresenta uma comparação entre os valores médios de concentração de *trans*-resveratrol em vinhos varietais (ou com denominação de origem controlada) em vários países, até 2001, determinados por injeção direta em CLAE ou por método correlato³³. Os valores médios obtidos para os varietais Merlot brasileiros são mais elevados do que aqueles encontrados para vinhos espanhóis (3,99 mg.L⁻¹) e canadenses (0,77 mg.L⁻¹)⁸⁸. Trabalhos posteriores mostraram valores algo diferentes destes relacionados em estudos comparativos⁸⁵. Para vinhos portugueses, por exemplo, foram apresentados resultados que mostravam a comparação entre vinhos elaborados no continente com vinhos açorianos, em método que empregava extração em fase sólida seguida por CLAE em fase reversa com coluna C18. Os vinhos continentais mostraram teor médio de 1,56 mg/L, comparável com os resultados anteriores apresentados na Figura 25, enquanto que os vinhos ilhéus apresentaram valor médio de 3,36 mg/L.

Tabela III - Concentração de *trans*-resveratrol em vinhos varietais tintos brasileiros.

Varietal	Safr ^a	Concentração (mg.L ⁻¹)		
		Mínima	Máxima	Média (dp) ^b
Merlot	1999 (2)	4,97	5,23	5,10 (1,65)
	1998 (1)	—	—	3,90 (1,80)
	1997 (7)	0,91	5,43	3,12 (1,77)
Cabernet Sauvignon	1998 (6)	1,17	3,57	2,01 (1,93)
	1997 (5)	0,82	2,33	1,53 (1,95)
	1994 (1)	—	—	2,33 (1,91)
	1991 (1)	—	—	1,25 (2,03)
Cabernet Franc	1999 (1)	—	—	1,60 (1,80)
	1997 (2)	1,83	2,07	2,10 (1,90)
	1990 (1)	—	—	1,07 (2,08)
Pinot Noir	1998 (1)	—	—	3,36 (1,11)
	1996 (1)	—	—	4,21 (1,01)
	1991 (1)	—	—	1,07 (1,99)
Gamay	1999 (2)	0,91	2,37	1,64 (1,76)
	1998 (1)	—	—	1,27 (2,05)
Pinotage	1997(1)	—	—	3,43 (1,55)
Sangiovese	1993 (1)	—	—	5,75 (0,87)
Tannat	1997 (1)	—	—	4,17 (1,03)

^a Número de amostras entre parêntesis. ^b Desvio padrão (dp, %) de 4 determinações para cada amostra.



Brasil	1	Sul-América	6
EUA	2	Itália	7
Portugal	3	Austrália	8
Grécia	4	França	9
Japão	5		

Figura 25 - Concentrações médias de *trans*-resveratrol em vinhos tintos varietais. Comparação entre vinhos brasileiros e de outros países.

Em artigo publicado em julho de 2005, Teissèdre e colaboradores⁸⁹ mostraram os resultados que obtiveram ao estudarem as quantidades de alguns compostos com estrutura derivada do estilbeno em onze vinhos varietais brasileiros, quatro deles Cabernet Sauvignon, cinco varietais Merlot, um Tannat e um Cabernet Franc, todos elaborados no Rio Grande do Sul, em safras entre 1999 e 2003. Estas análises, conduzidas por CLAE com detector de arranjo de diodos, apresentaram resultados surpreendentes e, em certa medida, conflitantes com os dados expostos nesta tese. Embora tenham constatado que uma das amostras do varietal Merlot mostrara o mais alto índice de *trans*-resveratrol (5,4 mg/L), quatro dentre os onze vinhos em estudo, os varietais Merlot, Tannat e Cabernet Sauvignon,

não apresentaram teores detectáveis de *trans*-resveratrol. Salientam-se os altos teores de *cis*-resveratrol observados nessas análises, consideravelmente mais elevados que os níveis de *trans*-resveratrol encontrados para dez das onze espécies estudadas. Este dado é extremamente raro na bibliografia e divergente do também observado em nosso trabalho, onde, embora o *cis*-resveratrol não tenha sido quantificado, este não mostrou teores mais elevados, ou mesmo próximos, daqueles encontrados para o isômero *trans*, salvo em algumas análises realizadas em amostras inadequadamente armazenadas e logicamente desprezadas. Infelizmente, o trabalho publicado com os dados apresentados na presente tese⁹⁰ não foi considerado para comparação entre resultados pelos autores da pesquisa mais recente ora relatada e, assim, as prováveis causas das discrepâncias observadas não foram comentadas.

Embora a comparação entre teores de resveratrol em vinhos de diferentes procedências exija prudência, muitos autores listam uma série de causas para eventuais diferenças significativas observadas em tais análises. Fatores climáticos, ambientais e o solo têm sido citados frequentemente como variáveis importantes na indução da expressão do gene estilbeno-sintase, responsável pela biossíntese do piceid. Os fatores climáticos e ambientais estão associados, certamente, ao ataque das videiras por fungos. De fato, os teores de *trans*-resveratrol podem ser aumentados quando há atividade do fungo *Botrytis cinerea*, o que já foi relatado em diversos trabalhos^{91;92}.

No caso específico dos teores relativamente elevados de resveratrol nos vinhos brasileiros analisados, é importante ter em mente que a aplicação sistemática de fungicidas é prática corrente entre os produtores de uvas. Quanto ao solo, houve estudos⁹³ que tipificaram as características físicas e químicas de seis tipos de solo da região do Vale dos Vinhedos, um dos maiores centros produtores de vinhos do Brasil. Foram, então, avaliadas eventuais correlações entre os tipos de solo e os teores de *trans*-resveratrol em três espécies de vinhos elaborados, cada um deles, exclusivamente com uvas varietais cultivadas para este fim. Os resultados não mostraram influência significativa do tipo de solo na quantidade de *trans*-resveratrol observada nos vinhos elaborados.

Há trabalhos que correlacionam a quantidade de resveratrol em vinhos com as práticas enológicas para a elaboração da bebida⁹⁴. Há vários autores que mencionam que o

contato entre o mosto e a casca das uvas durante a elaboração dos vinhos tintos, o que não acontece na vinificação dos vinhos brancos, está claramente associado aos maiores teores de resveratrol em tintos. Está claro que a hidrólise do piceid liberando *trans*-resveratrol durante a fermentação é responsável pela acumulação da fitoalexina na forma aglicona no vinho produzido⁹⁵. Sendo assim, a presença de β -glicosidase nas leveduras que promovem a fermentação do mosto deve ser apontada como fator essencial para estabelecer a quantidade de *trans*-resveratrol nos vinhos elaborados⁹⁶. Seria importante estudarem-se as leveduras comumente utilizadas pelos vitivinicultores brasileiros para que se possa avaliar a possibilidade de haver atividade de β -glicosidase especialmente elevada. Esta poderia ser a causa de terem os vinhos sul-brasileiros mostrado altos teores de *trans*-resveratrol.

5.2 Estratégias para a síntese de SERMs

Nesta seção estão descritas as propostas de síntese catalítica seletiva de duas classes de SERMs: resveratrol e triariletilenos. Foram empregados sistemas catalíticos baseados em complexos de paládio nas reações de acoplamento realizadas. A Figura 26 apresenta catalisadores do tipo paladaciclo utilizados.

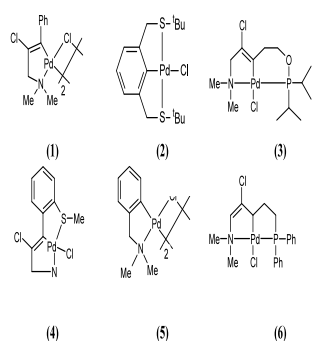


Figura 26 – Precursores catalíticos do tipo paladaciclo utilizados neste trabalho.

5.2.1 Estratégias para a síntese de resveratrol e derivados

5.2.1.1 Introdução

Ao longo do tempo em que foi realizado o presente trabalho, foram desenvolvidas diferentes estratégias para a síntese regioseletiva de *trans*-resveratrol e derivados. Conforme descrito na revisão bibliográfica, na seção 2.5.5, os principais métodos para a síntese desta fitoalexina se utilizavam da reação de Wittig, que apresenta as desvantagens já mencionadas. Sendo assim, todas as metodologias que foram buscadas no curso desta tese apresentavam a formação catalítica e seletiva de ligação carbono-carbono através de reações de acoplamento cruzado mediadas por sistemas baseados em complexos de metais de transição, sem utilizar-se da reação de Wittig ou similares em quaisquer das etapas.

O desenvolvimento de novas metodologias para a síntese do *trans*-resveratrol tem sido objeto de grande interesse pela comunidade científica, tornando-se verdadeiramente uma “corrida”, o que se compreende pelo surpreendentemente crescente leque de aplicações biológicas desta molécula e pelo potencial do esqueleto estilbeno como farmacóforo. Em decorrência disto, houve necessidade de adaptação das metodologias ora buscadas ou mesmo a desistência completa por uma ou outra estratégia que se desenvolvia, à medida em que, ao longo do percurso, algumas sínteses com abordagens similares e mesmo idênticas àquelas que pesquisávamos eram apresentadas por outros grupos.

A Figura 27 apresenta um esquema com os métodos de síntese projetados para este trabalho, visando à obtenção do *trans*-resveratrol por via catalítica e seletiva. A rota assinalada por “A” na figura envolve a hidrozirconação de um substrato acetilênico, processo estequiométrico, seguida pelo acoplamento cruzado do composto organometálico formado com um haleto de arila, catalisado por um sistema baseado em composto de paládio em protocolo de Reação de Negishi.

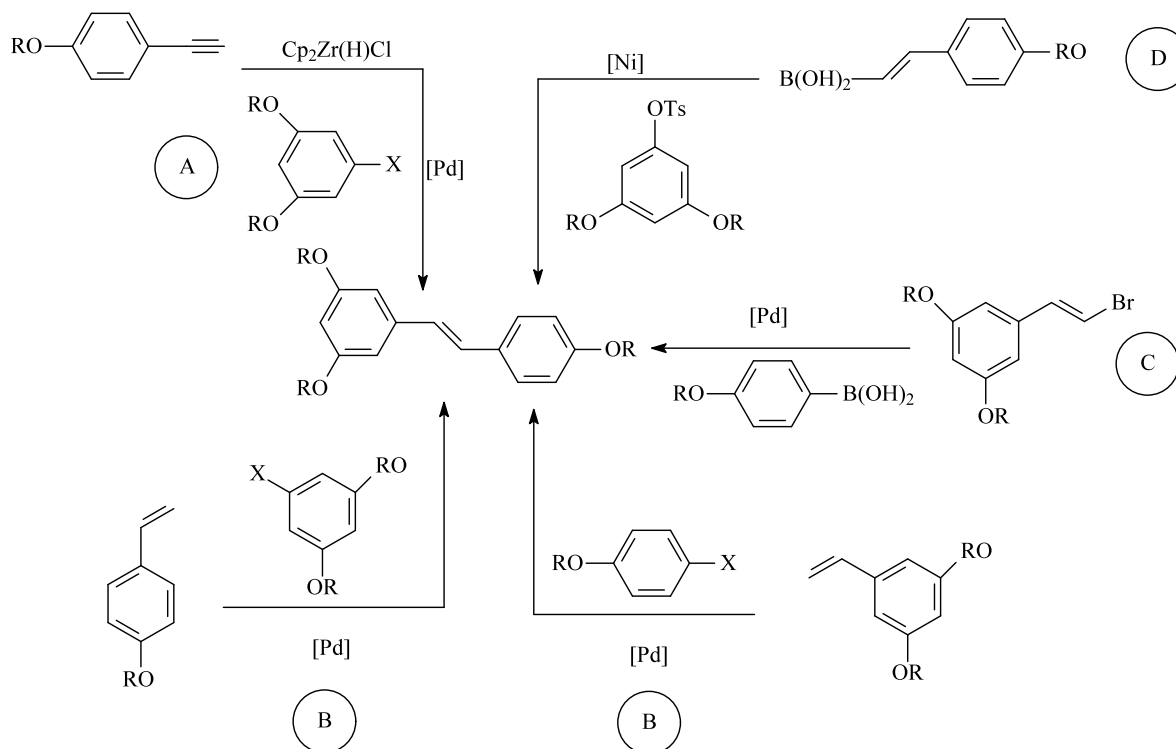
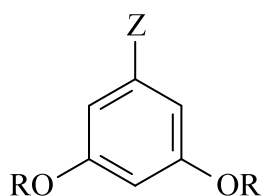


Figura 27 – Estratégias estudadas para a síntese do *trans*-resveratrol (X = halogênio, R = Me, Ac ou Ts).

A reação de Heck também foi considerada como possibilidade para viabilizar a obtenção de uma síntese seletiva do *trans*-reseratról ou derivados, ilustradas pelas rotas “B” na Figura 27. Como será detalhado adiante, esta estratégia previa a aplicação de duas etapas que operavam por protocolo de reação de Heck.

As rotas indicadas por “C” e por “D” envolviam o acoplamento cruzado via reação de Suzuki, uma delas se valendo de derivados de β -bromoestireno e catalisada por sistemas baseados em complexos de paládio (rota “C”), e a outra, catalisada por um complexo de níquel, empregando ácido vinilborônico e um composto tosilado como substratos.

O maior obstáculo para a aplicação de tais estratégias foi a obtenção de um substrato para acoplamento cruzado que contivesse os substituintes hidroxila (ou hidroxila protegida) nas posições 3 e 5 do anel, com o grupo funcional vinila ou o grupo de saída na posição 1 (Figura 28). A síntese de compostos com estas características é, geralmente, complexa e há poucas alternativas entre compostos comercialmente disponíveis.



R = H ou Me ou Ts ou Ac

Z = vinil ou grupo de saída ou vinil/grupo de saída em β

Figura 28 – Substrato para síntese seletiva de *trans*-resveratrol.

Embora a proposta do presente trabalho envolvesse a elaboração de estratégias genéricas para a síntese de *trans*-resveratrol e derivados, era necessário que se procedesse especificamente à síntese do resveratrol. Assim, foi desenvolvida uma rota para a síntese do 5-iodoresorcinol, a partir da nitração do nitrobenzeno. O *meta*-dinitrobenzeno poderia orientar uma substituição eletrofílica para nova posição *meta*. Assim, procedeu-se à síntese do iododinitrobenzeno mostrado na Figura 29, facilmente purificado e em alto rendimento (88%). A proposta de síntese envolvia a redução dos dois grupamentos nitro para subseqüentes conversões em sal de diazônio e 5-iodoresorcinol.

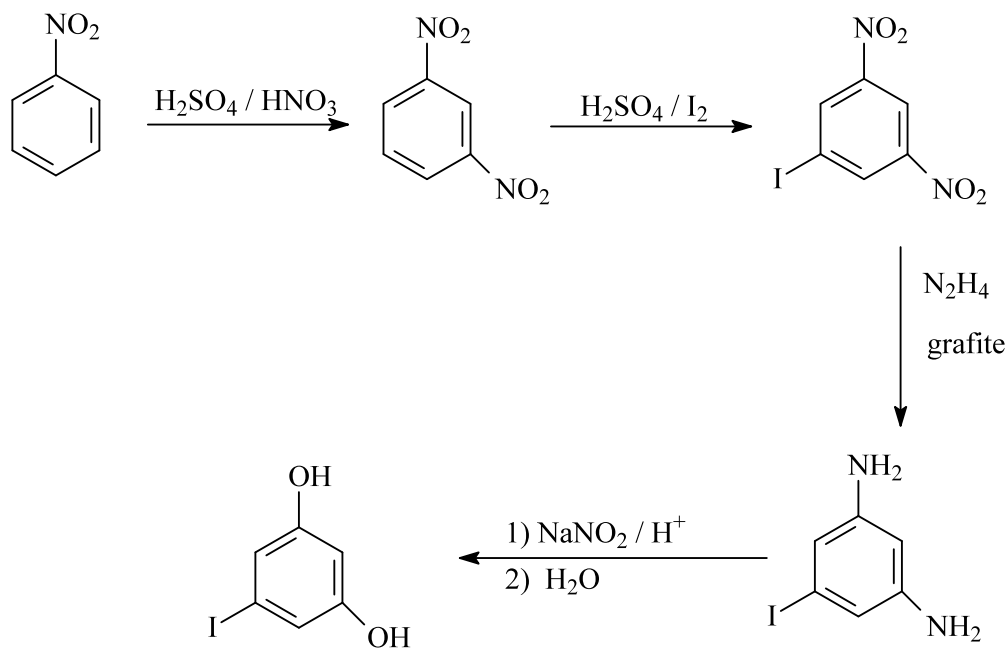


Figura 29 – Síntese do substrato 5-iodoresorcinol.

Ao examinar-se a bibliografia facilmente encontram-se métodos para a redução de nitrocompostos aromáticos, normalmente envolvendo a geração de hidrogênio molecular por reação de um ácido não-oxidante e um metal como o ferro, por exemplo. A redução deste nitrocomposto pôde ser feita, no entanto, por refluxo com hidrato de hidrazina na presença de grafite⁹⁷, permitindo a conversão completa do composto em diaminiiodobenzeno, com 89% de rendimento. O controle da estequiometria da reação também permite a redução de apenas um dos grupos nitro.

O passo subsequente envolvia a formação de sal de diazônio e posterior dediazotação com formação de 5-iodoresorcinol. Esta etapa estava sendo desenvolvida quando foi publicada por Ferber e colaboradores⁶⁶ a síntese do *trans*-resveratrol em dois acoplamentos de Heck consecutivos, envolvendo o 1-iodo-3,5-dimetoxibenzeno, produto então comercialmente disponível, conforme mostra a Figura 30.

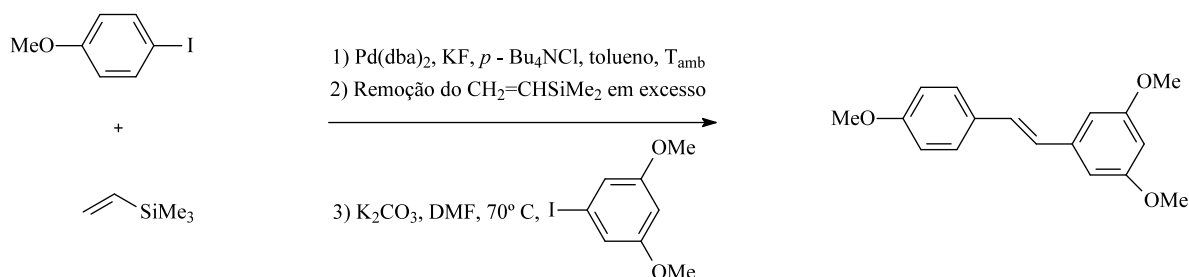


Figura 30 – Síntese do *trans*-resveratrol permetilado via acoplamentos C-C catalíticos sucessivos.

Uma vez que o processo acima descrito utilizava-se de abordagem similar àquela que vinha sendo desenvolvida no presente trabalho, a síntese do 5-iodoresorcinol foi abandonada.

5.2.1.2 Hidrozirconação / transmetalção

A hidrozirconação de um arilacetileno seguida pelo acoplamento cruzado do organozircônio formado com haleto de arila foi, cronologicamente, a primeira rota

explorada para a síntese do *trans*-resveratrol. Este processo envolvia o acoplamento cruzado de um haleto de arila a um arilacetileno, gerando um composto com esqueleto estilbeno, em protocolo de acoplamento Negishi⁴⁶. A reação de Negishi procederia pela hidrozirconação estequiométrica do arilacetileno com o reagente de Schwartz ($\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{H})\text{Cl}$), seguida de transmetalção e acoplamento cruzado com haleto de arila, catalisado por complexo de paládio ou de níquel, conforme indicado na Figura 31.

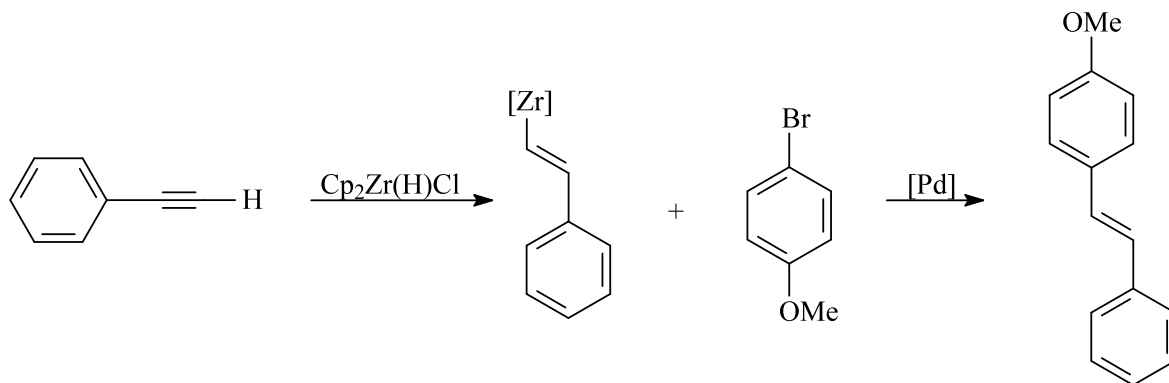


Figura 31 – Esquema genérico para a abordagem via hidrozirconação/transmetalção/acoplamento cruzado para a síntese de *trans*-resveratrol

A estereosseletividade da hidrozirconação e a posterior retenção de configuração no acoplamento cruzado foram as características mais atraentes para a adoção desta abordagem. A primeira etapa foi otimizada, empregando-se diferentes solventes e proporções entre os reagentes, tempos e temperatura de reação, utilizando-se o fenilacetileno como substrato modelo. Outros substratos acetilênicos foram sintetizados para aplicação nesta etapa da reação (Figura 32).

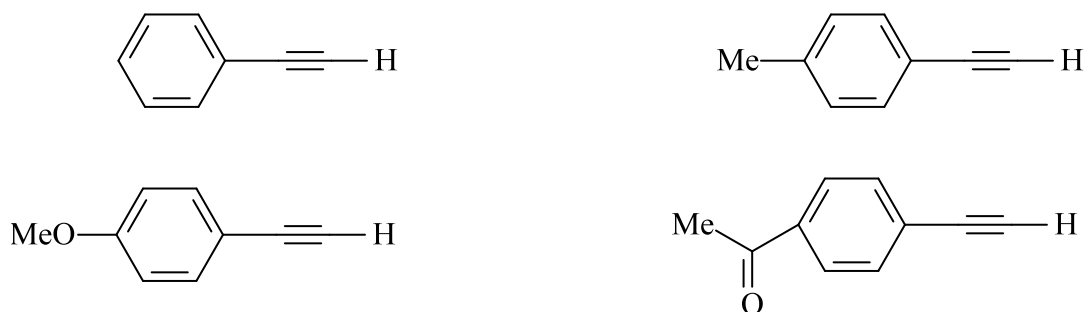


Figura 32 – Substratos arilacetilênicos utilizados para hidrozirconação.

As sínteses dos substratos acetilênicos foram efetuadas em protocolo tipo Sonogashira⁴⁶, onde o haleto de arila de interesse é acoplado com 2-metil-3-butin-1-ol, em reações catalisadas por Pd(PPh₃)₂Cl₂ / CuI. A ligação tripla terminal é obtida por refluxo do produto de acoplamento em meio alcalino, como ilustra a Figura 33 para o haloareno 1-iodo-4-metoxibenzeno.

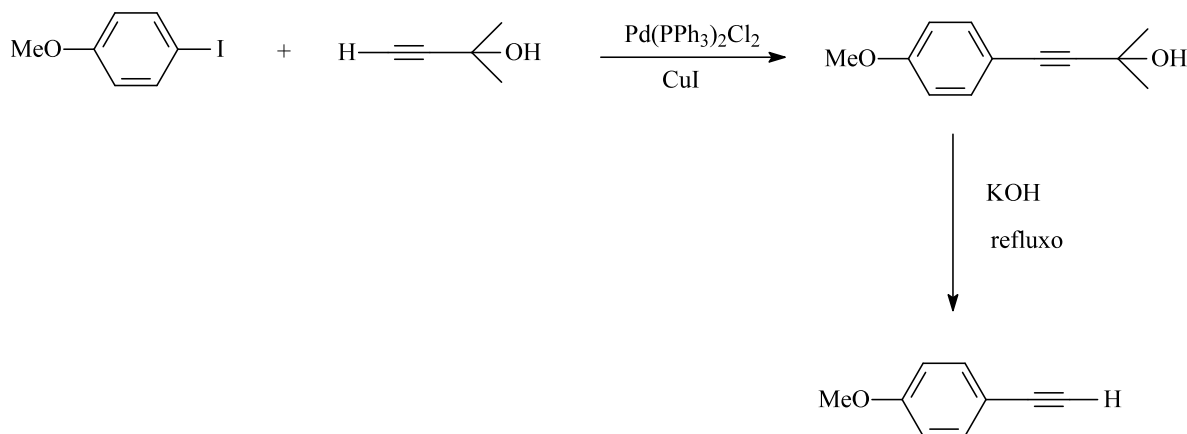


Figura 33 – Esquema da síntese de substratos acetilênicos.

Na etapa de transmetalização do alquenilzircônio ao complexo metálico de Ni ou de Pd, seguida por acoplamento cruzado com haleto de arila houve, também, diversas tentativas de otimização tendo o 4-bromoanisol como substrato modelo. Foram testados diferentes complexos de paládio e complexos de níquel como precursores catalíticos, diferentes fosfinas, reações sem fosfina, tempo de reação, proporção entre reagentes, natureza da base utilizada e temperatura reacional.

Além do substrato modelo, esta etapa da reação foi conduzida para substratos com diferentes substituintes, na posição 4: Cl, OTs, CN, CF₃, além dos substratos 4-iodoanisol e 3-bromo-1-flúor-O-tosilfenol. A Figura 34 apresenta os substratos empregados para acoplamento cruzado com o alquenilzircônio gerado por hidrozirconação.

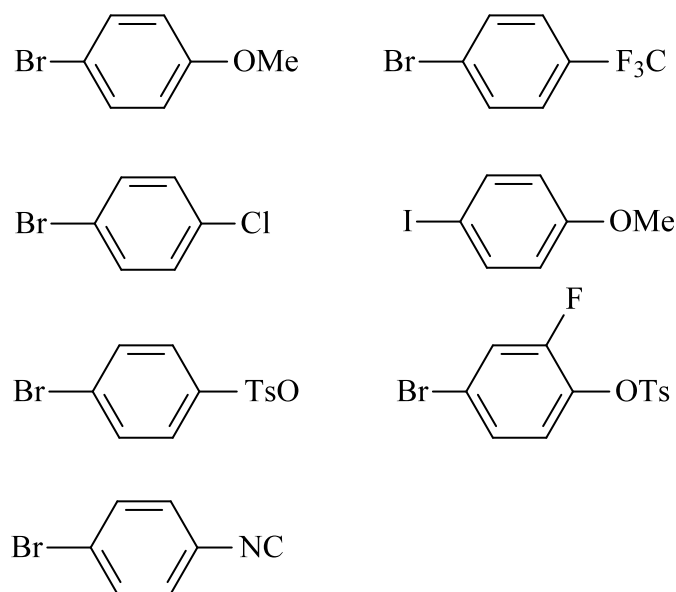


Figura 34 – Haletos de arila testados para acoplamento cruzado com produto de hidrozirconação de arilacetilenos.

Apesar das diversas tentativas empreendidas, a conclusão final foi a grande dependência que a reação tem do reativo de Schwartz $[\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{H})\text{Cl}]$, que ocorre sob a forma de oligômero e é liberado como monômero para a reação em velocidades que dependem do solvente empregado⁵⁶.

Também foi constatada a rápida degradação do reativo de Schwartz, mesmo armazenado sob atmosfera de argônio e protegido de luz e calor. De fato, diferentes partidas deste reativo foram empregadas ao longo destes estudos, inclusive reativo sintetizado imediatamente antes do uso, e o que se obteve foram resultados irreprodutíveis, chegando-se ao rendimento máximo de 65% de derivado de estilbeno.

5.2.1.3 Reação de Heck

Para a síntese do *trans*-resveratrol também foi adotada uma estratégia baseada na reação de Heck. A abordagem inicial consistia de dois acoplamentos consecutivos em protocolo de reação de Heck, consistindo no acoplamento cruzado entre etileno e 4-bromoanisol, como substrato modelo, seguida por nova reação com outro haloareno para a

formação do derivado de estilbeno de interesse. Embora vários sistemas catalíticos e condições reacionais tenham sido testados e se houvesse tido sucesso no acoplamento entre etileno e iododinitrobenzeno, infelizmente a primeira etapa não pôde ser otimizada com rendimento satisfatório no vinilareno formado antes que fosse apresentado o estudo realizado por Ferber e colaboradores⁶⁶, já mencionado. Ferber fora capaz de produzir o *trans*-resveratrol permetilado em duas etapas subseqüentes sem a necessidade de isolar o produto do primeiro acoplamento (Figura 30). Esta publicação sobrepujou a proposta similar que era desenvolvida em nosso trabalho, que teve de ser abandonada.

5.2.1.4 Reação de Suzuki

Há duas abordagens, atualmente em curso, para a síntese do *trans*-resveratrol envolvendo o acoplamento cruzado em protocolo de Suzuki-Miyaura. A primeira está baseada nos resultados originais apresentados por nosso grupo⁸¹, nos quais um sistema catalítico baseado no complexo $\text{Ni}(\text{PCy}_3)_2\text{Cl}_2$, estável e de síntese simples, promove o acoplamento entre ácidos borônicos e tosilatos aromáticos, tendo o tosilato como grupo de saída, conforme mostra a Figura 35.

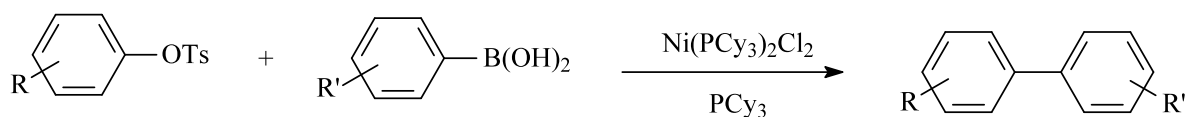


Figura 35 – Acoplamento Suzuki catalisado por complexo de níquel

Para esta rota de síntese, o substrato olefínico é um ácido arilvinilborônico que pode ser sintetizado a partir do β -bromo-4-metoxiestireno, e este a partir do 4-metoxibenzaldeído. A maior vantagem da rota sintética ilustrada na Figura 36 em relação àquelas atualmente existentes é a fonte de grupo arila com substituintes nas posições 3 e 5. O substrato empregado parte do flamenol, o 3,5-dimetoxifenol, tosilado. O flamenol é um derivado do floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno), produto de baixo custo. Além disso, o protocolo de Suzuki apresenta como vantagem inerente à própria reação a baixa toxicidade

dos subprodutos gerados na reação, o que o indica como método aplicável para sínteses em escala industrial. Após a síntese do produto permetilado, este será submetido a desproteção via reação com tribrometo de boro, processo usualmente empregado em diversas sínteses publicadas para o *trans*-resveratrol.

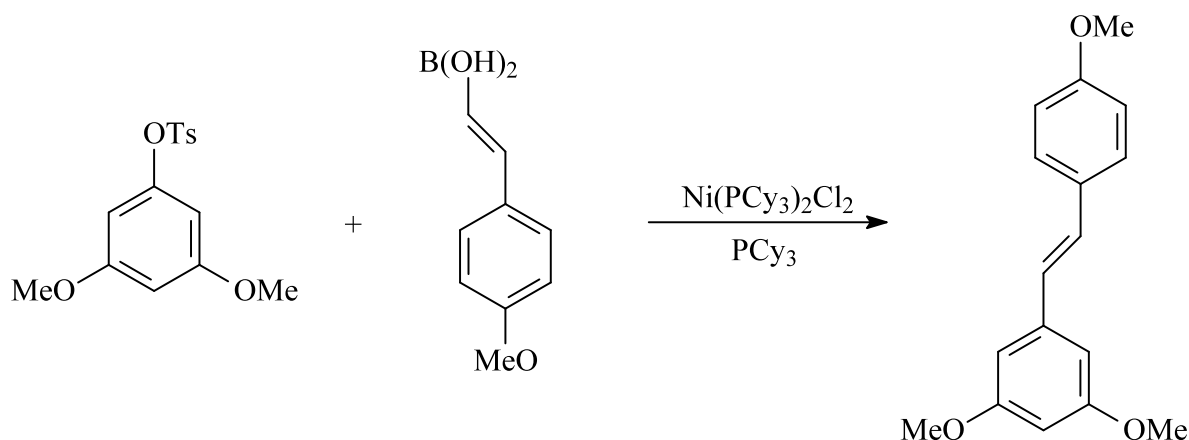


Figura 36 – Rota de síntese proposta para o *trans*-resveratrol via acoplamento Suzuki-Miyaura.

A outra rota está baseada na síntese do derivado do β -bromoestireno, apresentado na Figura 37, a partir de um derivado do ácido cinâmico. O ácido cinâmico de interesse (ácido 3-(3,5-dimetoxifenil) propiônico) pode ser obtido pela reação de 3,5-dimetoxibenzaldeído com ácido malônico⁷⁹, seguida pela bromação deste ácido e deidroalogenação decarboxilativa do ácido dibromado⁸⁰. Uma vez formado o precursor bromado, este será acoplado com o ácido 4-metoxifenil borônico, através da reação de Suzuki, para gerar o *trans*-resveratrol permetilado.

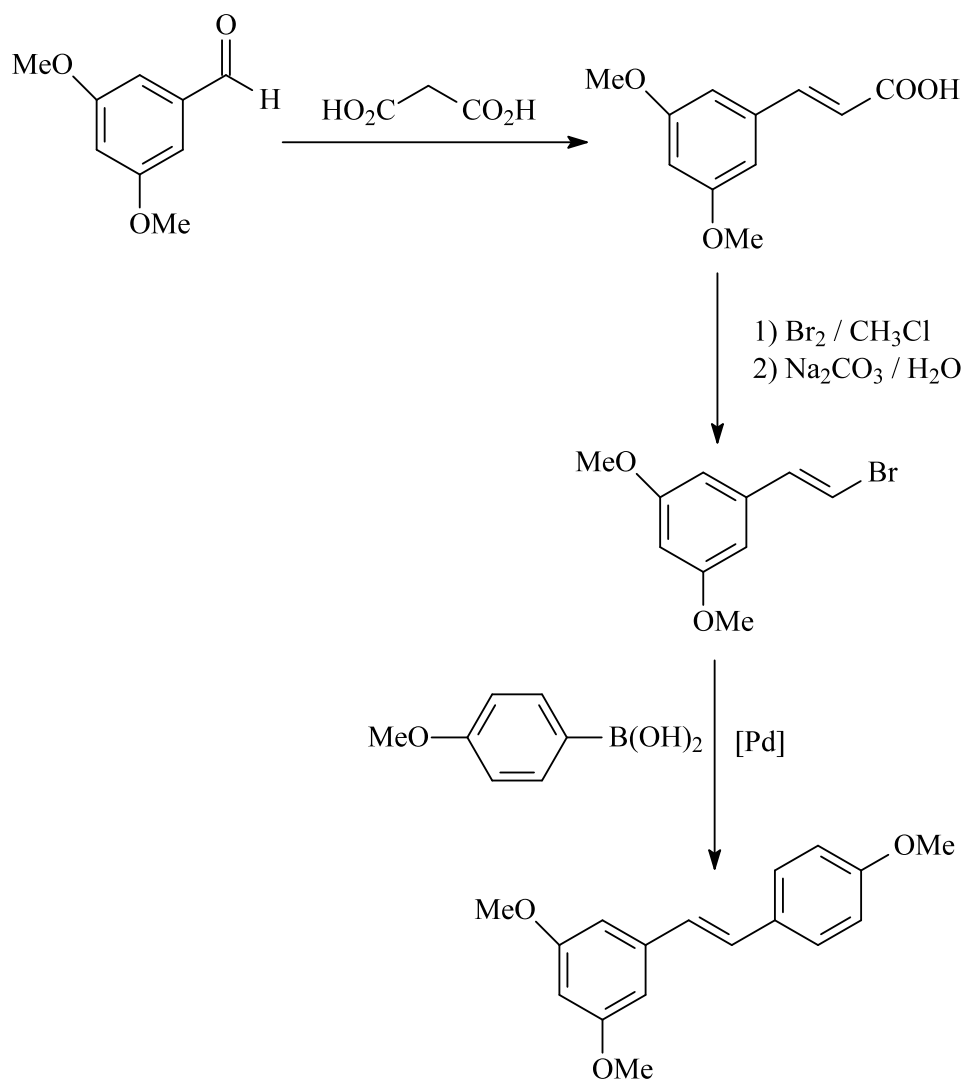


Figura 37 - Rota de síntese proposta para o *trans*-resveratrol via acoplamento Suzuki-Miyaura empregando derivado de β -bromoestireno.

Esta segunda abordagem, ao contrário da proposta anterior, prescinde da síntese de um ácido vinilborônico, reação que normalmente tem baixos rendimentos. Embora uma das etapas de formação de ligação carbono-carbono não seja catalítica, este método pode oferecer uma vantagem importante sobre os demais: o produto vinílico bromado no carbono β já tem configuração *trans*⁸⁰. Para o sucesso da síntese do *trans*-resveratrol, somente seria necessária a otimização da aplicação de um sistema catalítico para o acoplamento cruzado que possa operar com retenção de configuração para o substrato olefínico. De fato, as

reações de obtenção dos produtos bromados conduziram à formação de um isômero tendo mostrado apenas traços do estereoisômero *cis*.

Para as etapas de avaliação da viabilidade da aplicação e otimização da reação de acoplamento cruzado entre um *trans*- β -bromoestireno metoxilado e o ácido fenilborônico, utilizou-se o *trans*- β -bromo-4-metoxiestireno como substrato modelo, sintetizado a partir do 4-anisaldeído.



Figura 38 – Síntese do ácido 3-(4-metoxifenil) propiônico.

A Figura 38 ilustra a transformação do anisaldeído no ácido cinâmico correspondente por reação com ácido malônico em piridina e na presença de morfolina. Esta etapa de síntese teve 75 % de rendimento. À síntese deste ácido seguiram-se sua bromação e deidroalogenação descarboxilativa, levando a um rendimento de 79 % no produto final, o *trans*- β -bromo-4-metoxiestireno (Figura 39).

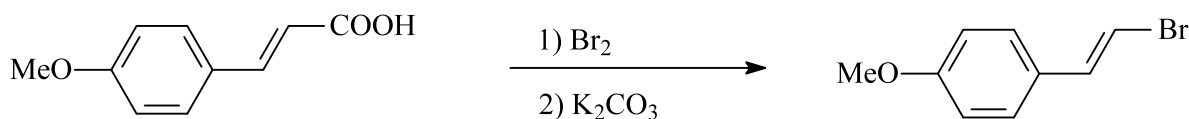


Figura 39 – Síntese do (E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)etileno.

A síntese do (E)-1-bromo-2-(3,5-dimetoxifenil)-etileno, substrato bromado precursor do *trans*-resveratrol para esta abordagem, foi realizada uma única vez até o momento e teve rendimento global de 16%. Este resultado será, ainda, otimizado.

Para avaliar-se a viabilidade de efetuar-se acoplamento cruzado entre o modelo (E)-1-bromo-2-(4-metoxifenil)-etileno e ácido fenilborônico, foi empregado sistema catalítico baseado em acetato de paládio e trifenilfosfina, com fosfato de potássio como base. Os

testes iniciais mostraram a formação dos produtos *trans*-1-(4-metoxifenil)-2-feniletileno, seu estereoisômero *cis*, 1,1-fenil(4-metoxifenil)-etileno e 1,4-di(4-metoxifenil)-butadieno, como produtos originários da arilolefina bromada, denominados, respectivamente, por “*trans*”, “*cis*”, “*gem*” e “*homo*” na Figura 40 e na Tabela IV. Também foi observada a formação de bifenila, produto do homoacoplamento do ácido fenilborônico, o que é uma característica comum dos sistemas que operam acoplamento cruzado via protocolo de reação de Suzuki. Isto não interfere na seletividade da reação de acoplamento quando há conversão completa do substrato bromado, posto que é este o reagente limitante no processo.

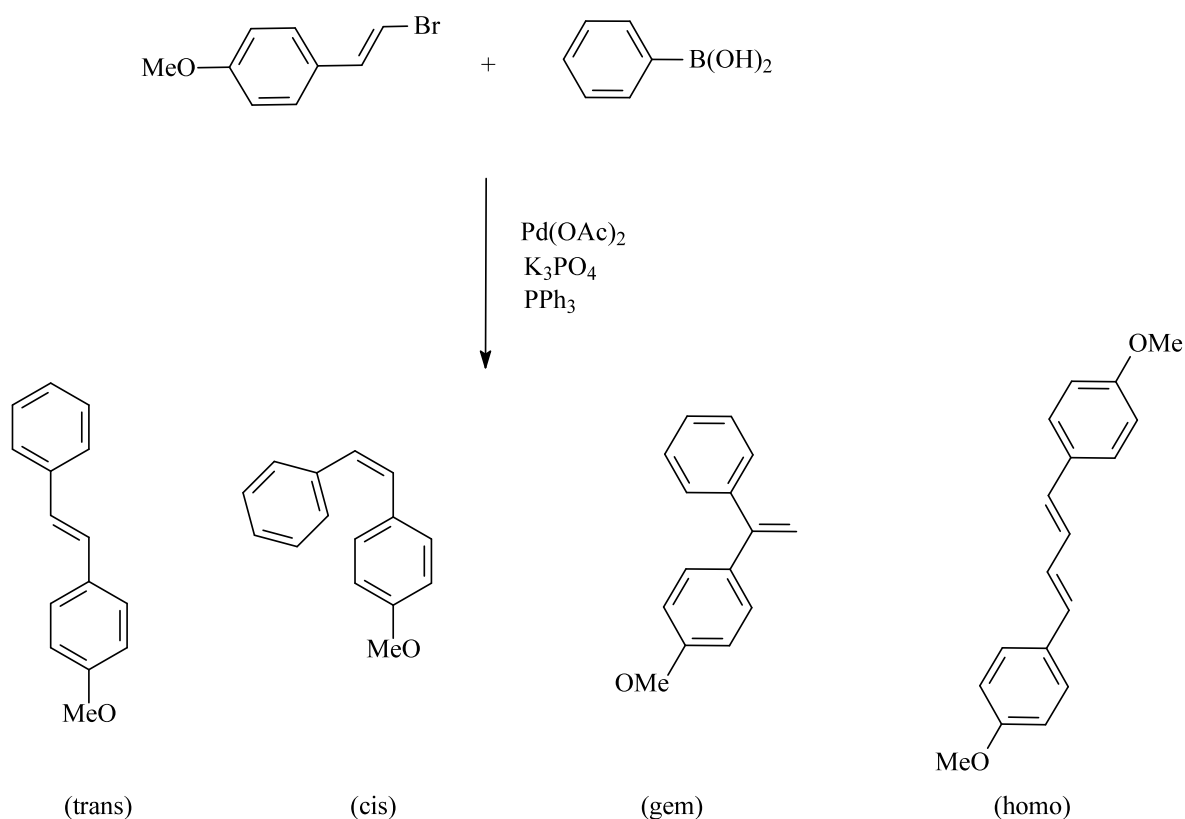


Figura 40 – Produtos do acoplamento cruzado entre bromo-metoxiestireno e ácido fenilborônico

Menos usual é, sem dúvida, a isomerização que se verifica quando da formação do produto de acoplamento 1,1- diariletileno. Mais ainda surpreende a formação do produto de homoacoplamento da olefina bromada, resultando na espécie diarilbutadieno. Se for possível otimizar-se a reação ou operar reação similar que conduza seletivamente à formação dessa classe de produtos será possível estabelecer-se uma via alternativa atraente para a síntese de compostos com características óticas interessantes.

A Tabela IV mostra os ensaios realizados para a otimização da reação de acoplamento cruzado, onde foram testadas diferentes condições e sistemas reacionais, especificamente o solvente empregado, a temperatura e o tempo da reação, o precursor catalítico, ligantes auxiliares e a razão molar entre o ligante e o precursor catalítico. O objetivo deste estudo foi a obtenção do maior rendimento possível no *trans*-1-(4-metoxifenil)-2-feniletileno tendo conversão completa da olefina bromada.

Os produtos foram quantificados por CG pelo método do padrão interno e caracterizados por CG-EM e co-injeção com produtos isolados, exceto para o 1,4-di(4-metoxifenil)-butadieno, por ora somente caracterizado por CG-EM. A reação 1 mostra baixa conversão para o sistema sem a adição de ligante fosforado. O emprego de trifenilfosfina, com relação molar $[P]:[Pd] = 4$, o aumento da temperatura e do tempo de reação permitiram a conversão de 61% do reagente limitante, com 84% de seletividade no produto de interesse (88% de seletividade entre os produtos de acoplamento cruzado), tendo a reação atingido 95% de quimiosseletividade em acoplamento cruzado (reações 2 e 3).

O uso de fosfinas com diferentes ângulos de cone e basicidades não demonstrou incrementar o desempenho do sistema catalítico neste estudo exploratório (reações 3, 4 e 5), não tendo resultado em aumento da conversão de bromoetileno, embora a quimiosseletividade em acoplamento cruzado e a seletividade em *trans*-1-(4-metoxifenil)-2-feniletileno tenham se mantido em valores aceitáveis.

Ao se empregarem precursores catalíticos do tipo paladacilco foi possível atingir-se a conversão completa do substrato, ao alterar-se o solvente da reação de dioxano para DMF (reações 6, 7 e 8). Embora com conversão completa, tais sistemas mostraram reações com baixa seletividade no produto de interesse, tanto no que diz respeito a esteroseletividade

(relação *trans:cis*) quanto no que tange à regiosseletividade (*gem* em comparação com *trans* + *cis*). Da mesma maneira, as reações catalisadas por complexos paladaciclo foram aquelas que apresentaram formação considerável do produto de homoacoplamento do bromoestireno, mostrando baixa quimiosseletividade se comparadas às reações catalisadas por sistemas baseados em acetato de paládio.

Para a reação 9 foram empregados sistemas catalíticos e condições reacionais que já haviam sido aplicados com bons resultados nos estudos desenvolvidos por nosso grupo para a síntese de derivados do estireno, por acoplamento cruzado entre um ácido arilborônico e 1,2-dibromoetileno⁹⁸. Novamente, essas condições foram responsáveis pelo melhor desempenho observado para a reação pretendida, mostrando 95% de quimiosseletividade em produtos de acoplamento cruzado, 92% de rendimento global em *trans*-1-(4-metoxifenil)-2-feniletileno, que representou 97% da quantidade entre os produtos “*trans*”, “*cis*” e “*gem*” em uma reação que teve 100% de conversão do reagente limitante. É particularmente destacável o uso de um solvente composto, tendo metanol e tetraidrofurano em proporção 1:1.

Com o sistema tendo seu desempenho assim otimizado para o acoplamento de substratos modelo, a perspectiva de que seja este um novo método atraente e simples para a síntese seletiva de *trans*-resveratrol é promissora. Esta via de síntese, além das características mencionadas, caso aplicada satisfatoriamente, poderá constituir-se, também, em um processo geral para a obtenção de outros compostos derivados do estilbeno, similares ao resveratrol, ao empregarem-se substratos α -aril- β -bromoetileno e ácidos arilborônicos funcionalizados com grupamentos e/ou em posições diferentes daqueles empregados para o resveratrol. Esta possibilidade ganha interesse pela via de obtenção do produto bromado, originário de aldeídos, abundantes em sistemas naturais.

Os últimos resultados obtidos para o desenvolvimento desta estratégia de síntese vieram da aplicação do sistema otimizado ao acoplamento cruzado entre o ácido 4-metoxifenilborônico e o (E)-2-bromo-1-(3,5-dimetoxifenil)-etileno para produzir o *trans*-resveratrol permetilado. Em apenas uma reação, não foi possível encontrarem-se os produtos advindos da conversão completa do produto bromado. No entanto, está no

momento sendo sintetizado o produto (E)-2-bromo-1-(3,5-dimetoxifenil)-etileno para novas aplicações do método.