

## ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E QUÍMICOS DA ANATOXINA-*a* E SEUS ANÁLOGOS

Vania Rodríguez, Sidnei Moura e Ernani Pinto\*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Claudio M. P. Pereira

Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Rodolfo Campos Braga

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 25/10/05; aceito em 21/12/05; publicado na web em 22/8/06

TOXICOLOGICAL AND CHEMICAL ASPECTS OF ANATOXIN-*a*. Anatoxin-*a* and its analogues are azabicyclic alkaloids that represent one of the most powerful nicotinic agonists known for the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). Because of this potent mechanism of action, anatoxin-*a* and its derivatives represent a target for the discovery of novel drugs. Their syntheses are useful for environmental monitoring and also for pharmacokinetic/pharmacodynamic and toxicological studies. Some strategies for the synthesis of anatoxin-*a* and analogous compounds are described herein, covering the period from 1996 to the present date. In this review, emphasis is given to the chemical and toxicological aspects of some variants of anatoxin-*a*, including homoanatoxin-*a* and anatoxin-*a*(s).

Keywords: anatoxin-*a*; algae; alkaloids.

### INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais referentes à preservação das águas superficiais e subterrâneas têm-se agravado muito nas últimas décadas, principalmente em razão do enorme crescimento populacional, e o conseqüente aumento da atividade industrial. Por este motivo, a legislação vem sendo cada vez mais restritiva e exige maior fiscalização<sup>1</sup>.

As cianobactérias (também chamadas “blue-green algae”) são organismos muito discutidos, tanto pela capacidade de alguns gêneros de converter N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub>, como por serem provavelmente, um dos primeiros organismos responsáveis pela geração de O<sub>2</sub> na atmosfera terrestre<sup>2</sup>. Elas são algas unicelulares que podem habitar vários ambientes em função da sua pouca exigência nutricional (energia luminosa, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, água e alguns minerais), sendo encontradas principalmente tanto em água doce como salobra<sup>2</sup>. Sua presença representa um risco à saúde pública, pela proliferação acelerada em ambientes eutrofizados e em reservatórios de água doce. Além disso, muitas espécies podem biossintetizar toxinas, aumentando ainda mais o risco à população<sup>3,4</sup>. Os incidentes toxicológicos relacionados com as cianotoxinas incluem intoxicações de seres humanos e animais, trazendo como conseqüência, morte de gado, animais selvagens, animais domésticos e até humanos em todo o mundo<sup>5</sup>. No Brasil, há relatos de florações de cianobactérias em vários estados. O primeiro relato toxicológico relacionado com cianotoxinas envolvendo humanos aconteceu na cidade de Caruaru (Açude Tabocas), Pernambuco, onde vários pacientes que realizavam hemodiálise no Hospital de Caruaru foram expostos a microcistinas (cianotoxinas produzidas pela cianobactéria *Microcystis spp.*), levando à morte quase 50% dos pacientes que foram submetidos à hemodiálise com água contaminada por microcistinas<sup>6</sup>.

Os mecanismos de ação das cianotoxinas são diversos, podendo ser hepatotóxicas, neurotóxicas, dermatotóxicas ou promotoras da inibição da síntese de proteínas<sup>6</sup>. Os principais gêneros produtores

de cianotoxinas são *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Aphanizomenon*, *Nodularia* e *Cylindrospermopsis*<sup>7</sup>. No grupo das neurotoxinas estão saxitoxinas e seus análogos, pertencentes às chamadas “paralytic shellfish poisoning” (PSP) que provocam bloqueio nos canais de sódio na membrana dos neurônios<sup>8</sup>; Anatoxina-*a*(s) (“s” de salvação), um organofosforado natural que age como inibidor irreversível da acetilcolinesterase<sup>9</sup> e Anatoxina-*a*, um potente agonista nicotínico da acetilcolina, cuja estrutura foi a primeira a ser elucidada dentro desta classe<sup>10</sup>. As estruturas químicas destas neurotoxinas estão representadas na Figura 1.

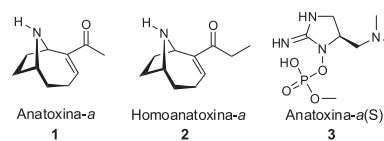


Figura 1

### MECANISMO DE AÇÃO E TOXICIDADE DA ANATOXINA-*a*

A Anatoxina-*a* (2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno) é um alcalóide que possui uma amina secundária bicíclica, com massa molecular e pK<sub>a</sub> de 165 u.m.a. e 9,4, respectivamente<sup>11</sup>. Sabe-se que é produzida por mais de um gênero de cianobactéria e dentre elas podem ser incluídas *Anabaena flos-aquae*, *Oscillatoria spp.*, *Anabaena circinalis*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Cylindrospermum spp.*<sup>12</sup>.

A Anatoxina-*a* e seu homólogo, a Homoanatoxina-*a*, agem como potentes agonistas nicotínicos, tendo sido comprovado que impedem reversivelmente a despolarização neuromuscular de receptores nicotínicos colinérgicos em músculo esquelético estriado de mamíferos<sup>13</sup>. Foi sugerido que a ativação do receptor nicotínico pós-sináptico da acetilcolina resulta em um fluxo de sódio, produzindo despolarização local suficiente para abrir os canais desse cátion e, também, os canais de cálcio dependentes de voltagem. A célula posterior pode amplificar a resposta, ativando mais canais

\*e-mail: ernani@usp.br

de cálcio<sup>14</sup>. Há um bloqueio da transmissão elétrica decorrente desta despolarização, que em dose suficientemente alta, pode levar à paralisia, asfixia e morte<sup>15</sup>.

Os sintomas observados poucos minutos após alguns animais terem sido expostos à Anatoxina-*a* por via oral (administração de água doce contaminada) foram fasciculação muscular, convulsões e morte por parada respiratória<sup>16</sup>.

## TOXICIDADE AGUDA

Os estudos sobre avaliação da toxicidade aguda da Homo- e Anatoxina-*a* estabeleceram os valores da DL<sub>1</sub> e DL<sub>50</sub> por diferentes vias de administração em animais de experimentação<sup>16-21</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Doses letais da Anatoxina-*a* (a), Homoanatoxina-*a* (b) e Anatoxina-*a*(S) (c)

DL	Via	Dose (µg Kg <sup>-1</sup> p.c.****)	Animal	Ref.
DL <sub>1</sub> (a)	i.p.*	250	camundongo	16
DL <sub>50</sub> (a)	i.p.*	375	camundongo	17
DL <sub>50</sub> (a)	i.p.*	200	rato	18
DL <sub>50</sub> (a)	i.v.**	<100	camundongo	19
DL <sub>50</sub> (a)	Oral	>5000	camundongo	20
DL <sub>50</sub> (a)	i.n.***	2000	camundongo	17
DL <sub>50</sub> (b)	i.p.*	250	camundongo	12
DL <sub>50</sub> (c)	i.p.*	20	camundongo	21

\*i.p.= intraperitoneal; \*\*i.v.= intravenosa; \*\*\* i.n.= intranasal; \*\*\*\* p.c.= peso corpóreo.

A partir dos primeiros estudos sobre a atividade farmacológica e toxicológica da Anatoxina-*a*, vários trabalhos foram realizados até o momento, principalmente referentes à potência da Anatoxina-*a* sobre os diferentes tipos de receptores nicotínicos<sup>15,22</sup>. Swanson *et al.*<sup>23</sup> propuseram a primeira hipótese de que a Anatoxina-*a* teria maior atividade que seu antípoda, pois a forma destrórgira apresentou maior afinidade pelo receptor nicotínico. Dez anos mais tarde, Alkondon e Albuquerque realizaram uma análise comparativa do grau de potência de isômeros de alguns agonistas nicotínicos na geração de corrente tipo IA e IIA em neurônios de hipocampo de rato. Neste experimento, os isômeros ópticos de Anatoxina-*a* demonstraram ser os mais estereoseletivos, comparados com os isômeros da nicotina, epibatidina e outros compostos ativos. Também neste mesmo experimento, a (+)-Anatoxina-*a* foi mais potente que o isômero levógiro. No entanto, cabe salientar que as correntes de tipo I parecem ser produzidas pelo sub-tipo de receptor nicotínico  $\alpha_7$  e as de tipo II ao subtipo  $\alpha_4\beta_2$ . Portanto, a Anatoxina-*a* pode se ligar a estes dois tipos de receptores<sup>24</sup>. Com relação à influência da Anatoxina-*a* sobre outros sistemas neurológicos, foi comprovado por vários estudos *in vitro* que, tanto a mistura racêmica de (±)-Anatoxina-*a* quanto (+)-Anatoxina-*a* tem igual ou maior potência que a nicotina, por ex., na estimulação da secreção de catecolaminas endógenas a partir de células cromafins de tecido adrenal bovinos e de terminais do nervo estriado do hipocampo de rato mediante seu receptor neuronal nicotínico<sup>25</sup>. Este fato foi corroborado em um estudo *in vivo* realizado em ratos, o qual mostrou que a Anatoxina-*a* estimula o sistema simpático por meio da liberação de catecolaminas dos terminais nervosos<sup>26</sup>. Estudos mais recentes, como o realizado por Lakshmana *et al.*<sup>27</sup>, relatam a apoptose celular provocada pela Anatoxina-*a* em células não neuronais. A citotoxicidade foi caracterizada pela perda de viabilidade celular, liberação da enzima lactato-desidrogenase, perda da função mitocondrial e fragmentação de DNA, sugerindo a possibilidade de que estes eventos sejam mediados pela geração de espécies reativas

de oxigênio e ativação da via das caspases (família de cisteína-proteases que controlam a cascata proteolítica do processo apoptótico).

Vários estudos têm examinado os níveis de Anatoxina-*a* em reservatórios de água doce seguido da aparição de florações<sup>28</sup>. Até o momento, todos os casos de incidentes toxicológicos relacionados com a Anatoxina-*a* e que levaram à morte em poucos minutos envolveram apenas animais. Por ex., alguns destes relatos incluem morte de gado na Finlândia, cachorros na Escócia, Irlanda e França e flamingos no Quênia<sup>29</sup>. Com relação ao efeito da Anatoxina-*a* em plantas, alguns testes de laboratório com a planta aquática *Lemna minore* e a macroalga filamentosa *Cladophora fracta* mostraram que houve um aumento significativamente importante na atividade da enzima peroxidase (POD) em ambos os organismos estudados. Depois de 4 dias de exposição, a uma concentração de Anatoxina-*a* de 25 µg mL<sup>-1</sup> ( $P < 0,05$ ), também se observou um incremento na atividade da enzima glutatona-transferase (GST) e uma redução na produção de oxigênio pela fotossíntese para a planta *L. minor*<sup>30</sup>. Embora não haja casos de morte em humanos relacionados à Anatoxina-*a*, o risco não deve ser descartado. Outros sintomas que também estão relacionados aos gêneros de cianobactérias produtoras de Anatoxina-*a* envolvem doenças gastrointestinais agudas, dermatite alérgica e mal-estar geral, atribuídas a extratos de *Anabaena flos-aquae*<sup>31</sup>.

## TOXICIDADE SUB-AGUDA E CRÔNICA DA ANATOXINA-*a*

Os estudos sobre a toxicidade sub-aguda e crônica da Anatoxina-*a* são escassos, pois a maioria das neurotoxinas produzidas por algas leva à morte por toxicidade aguda. Os poucos estudos existentes não evidenciaram sinais clínicos ou histopatológicos de toxicidade sub-aguda (mortes em razão da administração da toxina, mudanças importantes no peso, parâmetros hematológicos ou bioquímicos) nos animais tratados com diferentes doses de Anatoxina-*a*<sup>20,32</sup>. Entretanto, o fato da Anatoxina-*a* ter demonstrado alguma influência no aumento da atividade de enzimas importantes em plantas (GST e POD) pode indicar a possibilidade desse composto exercer um efeito indireto, a médio ou longo prazo, em proteínas com funções semelhantes em humanos. Por essas razões, os estudos com a Anatoxina-*a* poderiam ser estendidos a outros sistemas enzimáticos e/ou vias bioquímicas em mamíferos para se compreender melhor seu mecanismo de ação.

Embora existam vários grupos de pesquisa que estudam as toxinas produzidas por cianobactérias, não existem dados de ocorrência de Anatoxina-*a* ou análogos no Brasil. Apenas a Anatoxina-*a*(s) foi descrita em estudos com extratos de algas e inibição da enzima acetilcolinesterase<sup>33</sup>.

## A HOMOANATOXINA-*a*: UM POTENTE ANÁLOGO DA ANATOXINA-*a*

O análogo metilênico da Anatoxina-*a*, Homoanatoxina-*a*, foi isolado pela primeira vez de uma cultura de *Planktothrix (Oscillatoria) formosa* NIVA-CYA 92; posteriormente, foi testada a atividade do extrato desta cepa na transmissão neuromuscular, obtendo-se como resultado que esta cianotoxina tem como alvo a junção neuromuscular, agindo especificamente no receptor nicotínico pós-sináptico, diminuindo a sensibilidade deste para a acetilcolina. A Homoanatoxina-*a* foi identificada como um componente tóxico de uma cepa de *Rhodiopsis mediterranea* LBRI 48, sendo essa a primeira identificação da produção simultânea de Anatoxina-*a* e Homoanatoxina-*a* pela mesma cepa<sup>34</sup>. Aráoz *et al.*<sup>35</sup> estudaram 23 cepas de *Oscillatoria* e somente 3 delas sintetizavam apenas Anatoxina-*a*. Por outro lado, apenas uma cepa foi capaz de sintetizar Anatoxina-*a* e Homoanatoxina-*a* simultaneamente,

sugerindo que algumas espécies de cianobactérias teriam diferenças regulatórias, o que levaria à biossíntese preferencial de uma ou das duas neurotoxinas.

O mecanismo de toxicidade da Homoanatoxina-*a* é semelhante ao da Anatoxina-*a*, ou seja, age como um potente agente bloqueador neuromuscular<sup>13,18</sup>. Foi observado que em doses da ordem de µg (DL<sub>50</sub> apresentada na Tabela 1) a Homoanatoxina-*a* induz a paralisia corporal, convulsões e morte por parada respiratória entre 7 e 12 min. Foram realizadas algumas analogias entre os efeitos fisiológicos produzidos pela Homoanatoxina-*a* e a *d*-Tubocurarina mediante experimentos com preparações de neurônios de hemidiafragma. Foi observado que o efeito fisiológico de ambas é muito semelhante<sup>13</sup>. Outros estudos demonstram que a Homoanatoxina-*a* produz um aumento da liberação de acetilcolina nas terminações dos nervos colinérgicos periféricos, por meio da abertura de canais de Ca<sup>++</sup> dependentes de voltagem tipo L<sup>36</sup>. Philips *et al.*<sup>37</sup>, realizaram ensaios de competição pelo receptor nicotínico em cérebro de rato, entre Nicotina e α-Bungarotoxina marcadas e alguns análogos sintéticos da Anatoxina-*a* (Homoanatoxina-*a*, Propilanatoxina e Isopropilanatoxina). A Homoanatoxina-*a* e a Isopropilanatoxina demonstraram potência funcional similar à da (+)-Anatoxina-*a* na ligação pelo receptor nicotínico α<sub>7</sub>.

Alguns resultados experimentais obtidos por Smith<sup>38</sup> sugeriram que a primeira causa de morte de camarões durante quatro episódios em um criadouro australiano foi a presença de neurotoxinas produzidas pela cepa *Oscillatoria corakiana*. Nesses episódios evidenciaram-se danos histopatológicos no trato digestivo dos camarões e ensaios com cistos *Artemia* também mostraram toxicidade. Embora não tenha sido identificada a presença de cianotoxinas nesta cepa, propõe-se que níveis sub-letais de neurotoxinas (Anatoxina-*a*, Homoanatoxina-*a* e PSP) teriam enfraquecido os camarões, levando-os a menor consumo de alimento e imunossupressão, o que os fez mais propensos a infecção bacteriana.

## ANATOXINA-*a*(S), O ORGANOFOSFORADO NATURAL DE CIANOBACTÉRIAS

Uma outra cianotoxina no grupo de alcalóides neurotóxicos é a Anatoxina-*a*(s). A Anatoxina-*a*(s) é um éster metílico da *N*-hidroxiguanidina fosfato, de massa molecular 252, e caracteriza-se por ser química e fisiologicamente diferente das outras Anatoxinas já mencionadas. O “s” do nome da Anatoxina-*a*(s) deriva da excessiva salivacção viscosa observada em camundongos tratados com esta cianotoxina<sup>39</sup>. Por essa razão, a letra “s” de salivacção foi adicionada ao nome do composto. A Anatoxina-*a*(s) é produzida por algumas cepas de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii*<sup>40</sup>. Este composto age como um inseticida organofosforado sintético, sendo considerado o único organofosforado inibidor irreversível de acetilcolinesterase de ocorrência natural conhecido<sup>39</sup>. Cook *et al.*<sup>41</sup>, na década de 80, fizeram uma comparação da capacidade de inibição da acetilcolinesterase entre a Anatoxina-*a*(s) e inseticidas sintéticos inibidores reversíveis (carbamatos) e irreversíveis (organofosforados). Os resultados obtidos sugeriram uma capacidade inibitória da acetilcolinesterase da Anatoxina-*a*(s) comparável com o paraoxon (inseticida organofosforado). Além disso, em experimentos com animais (administração via oral e intraperitoneal) foi verificado que essa toxina é incapaz de inibir a acetilcolinesterase cerebral, concluindo-se, portanto, que ela não atravessa a barreira hematoencefálica. Por essa razão, foi também sugerido para Anatoxina-*a*(s) pouca tendência a bioacumulação e baixa permanência em células adiposas e membranas celulares. Além disso, esse composto é muito mais solúvel em água que os organofosforados sintéticos.

A inibição da colinesterase impede a hidrólise da acetilcolina, induzindo uma excessiva estimulação colinérgica e abertura dos canais

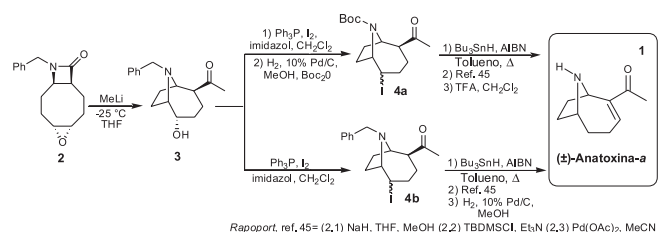
iônicos, até provocar a exaustão do músculo. Um fato muito importante do ponto de vista clínico é que a inibição da acetilcolinesterase produzida pela Anatoxina-*a*(s) não pode ser revertida por oximas<sup>8,42</sup>. A DL<sub>50</sub> da Anatoxina-*a*(s) está apresentada na Tabela 1.

## ROTAS EMPREGADAS PARA SÍNTESE DE ANATOXINA E ANÁLOGOS

Nos anos 70, após a caracterização química e estrutural da Anatoxina-*a*, várias rotas sintéticas que levam a essa substância e análogas vêm sendo descritas. Isso se deve, principalmente, ao fato dos processos existentes para a extração da Anatoxina-*a* serem morosos e, na maioria dos casos, apresentarem baixos rendimentos. Devido à importância desses compostos, vários grupos de pesquisa vêm descrevendo caminhos sintéticos para prepará-los. Nessa divulgação, selecionaram-se as estratégias mais relevantes e recentes para síntese da Anatoxina-*a* e seus análogos.

Estudos referentes à síntese desta molécula, anteriores a 1995, já foram relatadas em artigo de revisão<sup>43</sup>.

A abertura de β-lactamas, utilizando reações *tandem* de ânions, foi descrita por Parsons *et al.*<sup>44</sup> para obter a (±)-Anatoxina-*a* e seus análogos (Esquema 1).



Esquema 1

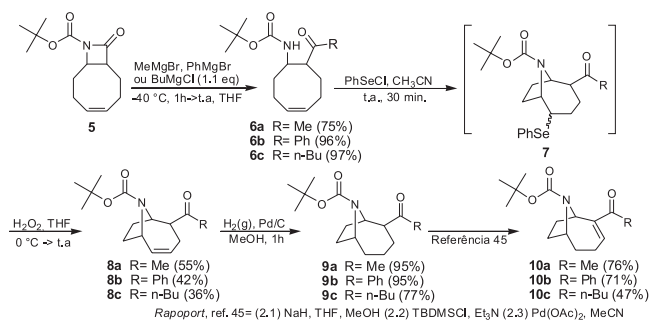
O biciclo **3**, obtido por reação de **2** com metil-lítio, foi transformado, *in situ*, no iodeto **4a** correspondente por meio de reações sucessivas de desbenzilação, proteção do átomo de nitrogênio com grupo Boc e tratamento com iodo. O iodeto **4b** foi obtido pelo tratamento do álcool **3** com iodo e trifetil fosfina. Os compostos **4a** e **4b**, assim obtidos, foram transformados na (±)-Anatoxina-*a* **1** através de metodologia já descrita por Rapoport *et al.*<sup>45</sup>, destacando-se como vantagem desta rota a possibilidade de obtenção da toxina em escala de gramas.

Na preparação de análogos da Anatoxina-*a* (Esquema 2) Parsons e colaboradores<sup>46</sup> utilizaram a β-lactama **5** como material de partida. A abertura do anel β-lactâmico foi realizada pelo emprego de reagentes de Grignard para levar às cetonas **6**. Na seqüência, ocorreu uma ciclização eletrofílica, posteriormente usou-se reagentes de selênio para introduzir uma ligação dupla, em posição definida, através da eliminação de selenóxido **7**. Os compostos **8** foram reduzidos por hidrogenação e os assim obtidos (**9**) foram transformados nos análogos **10**, seguindo novamente a estratégia proposta por Rapoport<sup>45</sup>.

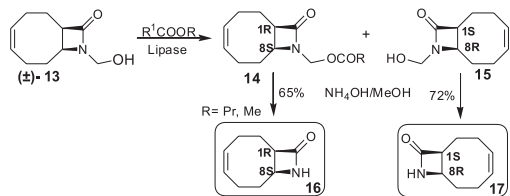
Forro e colaboradores<sup>47</sup> propuseram como um possível material de partida para síntese da Anatoxina-*a*, enantiomericamente pura, as β-lactamas **16** e **17** (Esquema 3).

A β-lactama racêmica **12** foi preparada pela adição de isocianato de clorosulfonila (CSI) no cicloocatadieno (**11**). Este foi sonicado<sup>48</sup> com paraformaldeído, resultando na ((±)-**13**) β-lactama *N*-hidroximetilada (Esquema 4).

A β-lactama *N*-hidroximetilada racêmica (**13**) em presença do vinil acetato e da PS lipase, resultou no éster (**14**) e no álcool (**15**) com 53% de conversão ((1*R*, 8*S*)-**14** (e.e. 92%), (1*S*, 8*R*)-**15** (e.e. 96%)) (Esquema 4).

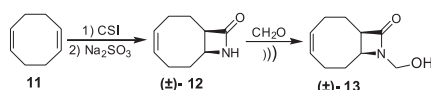


Esquema 2



Potenciais materiais de partida para síntese de Anatoxina-a

Esquema 3



Esquema 4

O tratamento do éster (**16**) e álcool (**17**) com hidróxido de amônio levaram a  $\beta$ -lactamas, com a estereoquímica definida.

A Anatoxina-*a* e Epibatidina (Figura 2) são potentes agonistas nicotínicos. Baseado nisto, foi preparado o híbrido UB-165 (**18**) e seu enantiômero, a fim de testar sua afinidade em sítios ligantes [ $^3\text{H}$ ] nicotínicos em cérebros de ratos. Estudos realizados pelo autor constataram que este híbrido é um potente agonista nicotínico situado entre Anatoxina-*a* e a Epibatidina<sup>49</sup>. Híbridos desses agonistas nicotínicos foram estudados tanto no plano sintético como biológico.

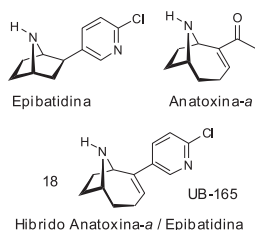


Figura 2

Gallagher *et al.*<sup>50</sup> descreveram um novo método de ativação e funcionalização no C-10. Essa estratégia permite a incorporação de resíduos de tioésteres contendo fluorescência, fornecendo novos ligantes probes estruturais (Figura 3). Os autores salientam que modificações deste tipo realizadas nesta posição, mantendo-se a unidade acetila preservada, não comprometem a atividade biológica<sup>51</sup>.

A aminocarbonilação intramolecular de aminas insaturadas foi descrita recentemente como um método eficiente na construção de importantes alcalóides e compostos biologicamente relacionados. Muitos exemplos de ciclizações de compostos com aminas insaturadas já foram estudados<sup>52</sup>.

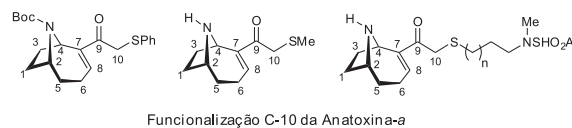
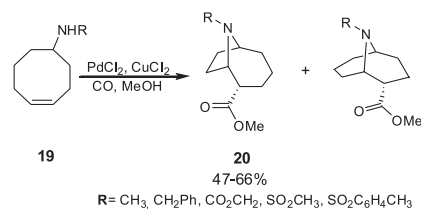


Figura 3

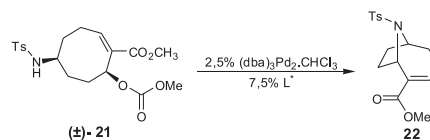
Ham *et al.*<sup>53</sup> propuseram uma reação de aminocarbonilação intramolecular (Esquema 5) utilizando a olefina cíclica **19**, catalisada por paládio, para obtenção do anel bicíclico **20**, que pôde ser facilmente convertido na ( $\pm$ )-Anatoxina-*a*<sup>54</sup>.



Esquema 5

A síntese da (-)-Anatoxina-*a* via ciclização assimétrica, utilizando novos ligantes em alquilações catalisadas por paládio<sup>55</sup>, foi descrita por Trost *et al.*<sup>56</sup>.

Essa metodologia propõe que, a partir do composto racêmico **21**, se pode chegar ao intermediário sintético **22**, enantiomericamente puro, pelo emprego de catálise de paládio induzida por ligantes quirais (Esquema 6). Os ligantes utilizados estão apresentados na Figura 4.



Esquema 6

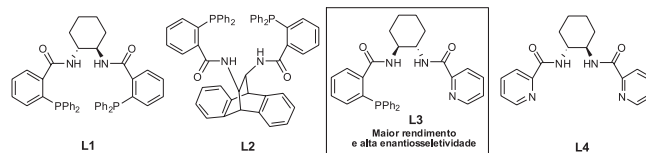


Figura 4

Os resultados do estudo envolvendo a utilização de vários ligantes (Figura 4) nessa reação estão apresentados na Tabela 2.

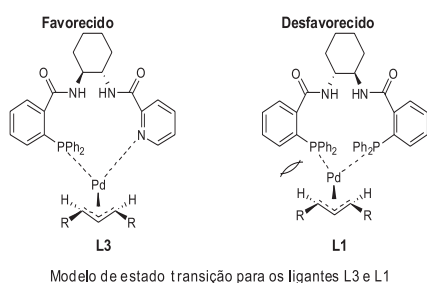
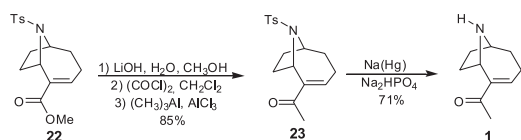
De acordo com a Tabela 2, o ligante L3 foi o que apresentou melhor desempenho, levando ao intermediário **22**, com maior rendimento e excesso enantiomérico. Para explicar os diferentes ee entre L1 e L3, os autores propuseram um modelo de estado de transição para esses ligantes. O ligante L1 apresentou maior efeito de repulsão estérica nesse estado comparado ao ligante L3, explicando-se, assim, os baixos ee induzidos pelo ligante L1 (Figura 5).

Em uma etapa final, o intermediário **22** foi convertido na metil cetona **23**, por hidrólise do éster com hidróxido de lítio, seguido de transformação no correspondente cloreto com cloreto de oxalila. Esse cloreto foi tratado com trimetil alumínio, fornecendo a cetona **23**<sup>57</sup>. A detosilação redutiva levou à (-)-Anatoxina-*a*, com estereoquímica absoluta definida, a qual corresponde ao enantiômero desse produto natural<sup>58</sup> (Esquema 7).

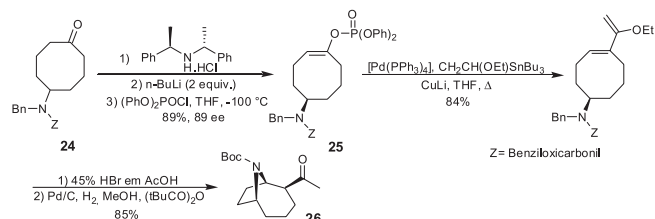
**Tabela 2.** Ciclização enantioselectiva para formar o composto **22**

Número	Ligante	Solvente	Temperatura	Rendimento (%)	ee (%)
1	L1	DMF	t.a.	sr*	
2	L1	DMF	80 °C	65	13
3	L1	DMF	100 °C	88	11
4	L1	PhCH <sub>3</sub>	100 °C	90	9
5	L2	DMF	100 °C	75	0
6	L3	DMF	100 °C	96	23
7	L3	DMF	t.a.	96	63
8	L3	DMF	t.a.	92	56
9	L3	DMF	0 °C	88	73
10	L3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	96	83
11	L3	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0 °C	90	88
12	L4	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	t.a.	45	0

\* Rendimentos dos Produtos Isolados; sr= sem reação

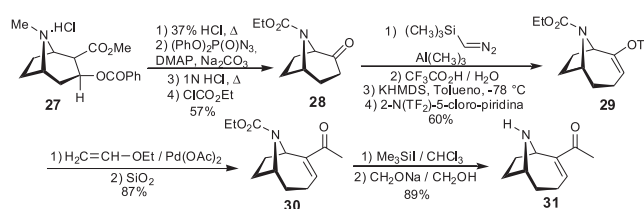
**Figura 5****Esquema 7**

A desprotonação enantioselectiva em um anel de oito membros<sup>59</sup> (Esquema 8) constituiu-se, em outra estratégia na obtenção da (+)-Anatoxina-*a*. A cetona pro-quiral **24** foi tratada com hidrocloreto de (+)-bis[(*R*)-1-etilfenil]amina e 2 equivalentes de butil lítio, levando ao fosfato enólico **25** com alta enantioselectividade. Para completar a síntese, realizou-se um acoplamento de Stille com Pd(0), seguido por hidrólise do éter vinílico/desproteção do átomo de nitrogênio e adição intramolecular conjugada. Posteriormente fez-se a troca dos grupos protetores, conduzindo ao azabiciclo **26**.

**Esquema 8**

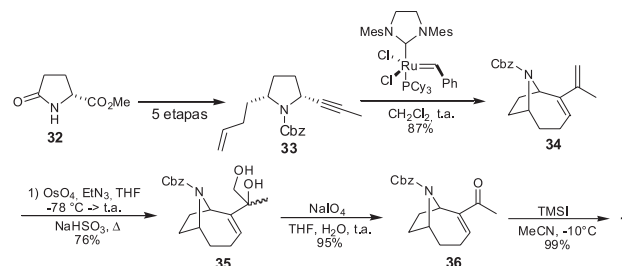
A partir da (-)-Cocaína foi possível preparar a (+)-Anatoxina-*a* enantiomericamente pura, em 8 passos, com rendimento global de 26%<sup>60</sup> (Esquema 9).

Degradando-se o cloridrato de (-)-Cocaína (27), com estereoquímica definida, obteve-se a (+)-2-tropinona que foi tratada com cloroformiato de etila, visando a proteção do átomo de ni-

**Esquema 9**

trogênio, resultando na cetona bicíclica **28**. A expansão do anel foi realizada de forma enantioselectiva, utilizando diazometil trimetilsilano na presença de ácido de Lewis. O anel já expandido foi tratado com KHMDS e 2-N(TF<sub>2</sub>)-5-cloro-piridina, levando à formação do triflato **29**, com a ligação dupla característica do produto natural. Em condições suaves, realizou-se uma reação de Heck, gerando a enona bicíclica **30**, em altos rendimentos. Por último, foi realizada a desproteção do átomo de nitrogênio, usando iodo trimetilsilano em cloroformio, resultando na (+)-Anatoxina-*a* (**31**).

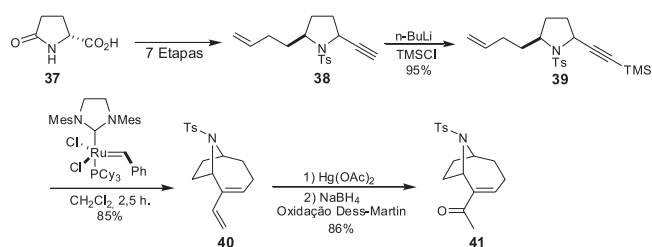
Uma síntese concisa foi descrita por Martin *et al.*<sup>61,62</sup>, fazendo o fechamento intramolecular do anel, empregando uma metátese de eninos (Esquema 10).

**Esquema 10**

Os autores obtiveram o enino **33** a partir de modificação, em cinco etapas, do composto D-metil piroglutamate **32**, comercialmente disponível. O enino **33**, na presença do catalisador de Grubbs de segunda geração, forneceu, com rendimento de 87%, o 9-azabiciclo[4.2.1]noneno **34**. O dieno **34** foi seletivamente didroxilado em presença do complexo de OsO<sub>4</sub> e trietilamina, seguido da redução do intermediário de ósmio, resultando no diol **35**. A clivagem do diol por periodato de sódio levou à cetona bicíclica **36**. A desproteção do átomo de nitrogênio com iodo trimetilsilano resultou na (+)-Anatoxina-*a*, em rendimentos praticamente quantitativos.



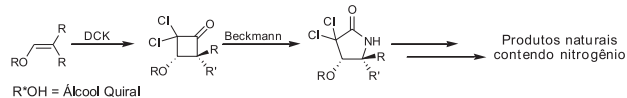
Outra forma de obter esta toxina é a utilização de metátese de eninos descrita por Mori *et al.*<sup>63</sup> (Esquema 11).



Esquema 11

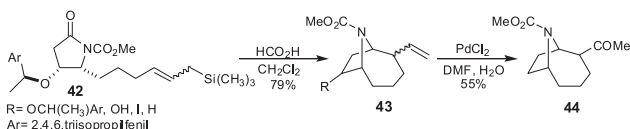
Os autores obtiveram o enino **38** a partir de modificação, em 7 etapas, do composto (-)-ácido piroglutâmico **37**, comercialmente disponível. O composto acetilênico **38** foi protegido na forma de sililacetilênico éster **39**, pelo tratamento com a base apropriada e cloro trimetilsilano. O enino **39**, na presença do catalisador de Grubbs de segunda geração, forneceu, com rendimento de 85%, a olefina **40**. Esta, por sua vez, foi submetida a um processo de oximercurização seguido do tratamento com boro hidreto de sódio, levando ao respectivo álcool. A oxidação de Dess-Martin desse álcool intermediário resultou na (+)-Anatoxina-*a* com o átomo de nitrogênio protegido com o grupo tosilila (**41**), em bons rendimentos.

A ciclo adição [2+2] de dicloro cetona com enol quiral leva às  $\alpha,\alpha$ -diclorociclobutanonas diastericamente enriquecidas, que podem ser facilmente convertidas em  $\gamma$ -lactamas pela expansão anelar de Beckmann. Estas lactamas são valiosos intermediários na produção de uma variedade de produtos naturais contendo nitrogênio, como aminoácidos, pirrolidinas, pirrolizidinas e indolizidinas<sup>64</sup> (Esquema 12).



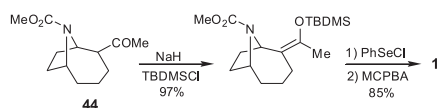
Esquema 12

Através dessa ciclo adição [2+2] foi possível preparar (+)-Anatoxina-*a*<sup>65</sup>. O alil éster **42** (Esquema 13), obtido por essa estratégia, deu origem ao bicyclo **43**, por ciclização com ácido fórmico em diclorometano a 0 °C. O bicyclo **43** foi submetido a uma oxidação de Wacker, levando à metil cetona **44**, em rendimentos moderados.



Esquema 13

O passo final foi realizado conforme metodologia descrita por Skrinjar *et al.*<sup>66</sup> (Esquema 14).



Esquema 14

Os exemplos citados neste artigo mostram a aplicabilidade das reações de metátese e outras estratégias na síntese da Anatoxina. Nos últimos 40 anos, as reações de metátese de olefinas e eninos surgi-

ram como uma potente ferramenta para formação de ligações carbono-carbono. Os catalisadores desenvolvidos por Grubbs e Schrock, indicados ao prêmio Nobel de 2005 em Química<sup>67</sup>, além de possibilitarem a aplicação desta reação na pesquisa acadêmica, permitem o desenvolvimento de novas estratégias sintéticas para obtenção de estruturas complexas, como da Anatoxina-*a*. A utilização das reações de metátese de eninos, descrita por Martin e Mori<sup>61-63</sup>, podem ser consideradas as sínteses mais eficientes, concisas e elegantes apresentadas até o momento para obtenção da referida toxina. A descoberta de novos catalisadores mais ativos, eficientes e seletivos, e ainda estáveis, para executar reações cada vez mais exigentes, porém em condições experimentais simples, constitui a perspectiva mais otimista do químico orgânico sintético para esse propósito.

## PERSPECTIVAS E AVANÇOS

A poluição ambiental traz inúmeros problemas para a sociedade; um dos mais preocupantes é a eutrofização das águas com a consequente escassez de recursos hídricos de boa qualidade, principalmente para consumo humano. Nesse contexto, em ambientes eutrofizados, as cianobactérias crescem sem controle e algumas espécies são capazes de produzir toxinas, criando um grave problema à saúde pública. O estudo de toxinas produzidas por algas é relevante, pois no Brasil já são documentadas as existências dessas toxinas em vários mananciais de água potável.

São comuns os problemas relacionados aos métodos de análise para monitoramento dessas substâncias. O principal deles é a obtenção de padrões analíticos. A extração desses compostos de culturas de algas apresenta baixo rendimento e dificuldade de separação dos interferentes, principalmente pela alta polaridade dos componentes envolvidos. Além disso, a obtenção desses compostos em grandes quantidades para testes toxicológicos mais rigorosos é fundamental.

De fato, a síntese de Anatoxina-*a* vem sendo empregada tanto para o desenvolvimento de métodos para detecção e monitoramento de toxinas em água potável e de amostras ambientais, como para estudos farmacológicos e toxicológicos. Testes para se avaliar a toxicidade dessas substâncias são prejudicados em razão da escassez desses compostos para ensaios mais rigorosos. Além disso, alguns análogos podem apresentar atividade biológica de interesse para a indústria farmacêutica. Por essas razões, a síntese dessas toxinas tem sido amplamente estudada para produção dessas importantes moléculas pelas mais diversas rotas sintéticas, ora produzindo misturas racêmicas, ora formas enantiomericamente puras. A importância dos estudos de síntese orgânica dessa classe de compostos também pode ser comprovada pelo considerável número de trabalhos recentes disponíveis na literatura.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES, CNPq, FAPESP (03/06443-0, 04/14264-0, 04/11416-4 e 06/56315-6) pelo financiamento dos projetos e bolsa para V. Rodríguez. Ao Centro de Capacitação e Pesquisa em Meio Ambiente - CEPAMA - USP.

## REFERÊNCIAS

- Lopes, T. E. R.; Peralta-Zamora, P.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 441.
- Sverck, C.; Smith, D. W.; *J. Environ. Eng. Sci.* **2004**, *3*, 155; <http://www.hc-sc.gc.ca/hecs-sesc/water/dwgsup.htm>, acessada em Janeiro 2004; Vidotti, E. C.; Rollemberg, M. C.; *Quím. Nova* **2004**, *27*, 139.
- Carmichael, W. W.; *Sci. Am.* **2004**, *270*, 781.
- Bitencourt-Oliveira, M do C.; Kujbida, P.; Cardozo, K.H.; Carvalho, V. M.; Moura, A. N.; Colepicolo, P.; Pinto, E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 694.

5. Codd, G. A.; Ward, C. J.; Beattie, K. A.; Bell, S. G.; *Proceedings of the International Symposium on Phototrophic Prokaryotes*, 9th, Vienna, Italy, 1999; Humpage, A. R.; Rositano, J.; Bretag, A. H.; Baker, P. D.; Nicholson, B. C.; Steffensen A.; *Aust. J. Mar. Freshwater* **1994**, *45*, 761; Turner, P. C.; Gamie, A. J.; Hullinrake, K.; Codd, G. A.; *Br. Med. J.* **1990**, *300*, 1440.
6. Domingos, P.; Rubim, T. K.; Molica, R. J. R.; Azevedo, S. M. F. O.; Carmichael, W. W.; *Environ. Toxicol.* **1999**, *14*, 31; Sant'Ana, C. L.; Azevedo, M. T. D.; *Nova Hedwigia* **2000**, *71*, 359; Azevedo, S. M. F. O.; Evans, W. R.; Carmichael, W. W.; Namikoshi, M.; *J. Appl. Phycol.* **1994**, *6*, 261; Jochiminsen, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J. S.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E.; Antunes, M. B.; De Melho Filho, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S.; Azevedo, S. M.; Jarvis, W. R. N.; *Engli. J. Med.* **1998**, *26*, 873; Pouria, S.; Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R. L.; Barreto, V. T. S.; Ward, C. J.; Preiser, W.; Poon, G. K.; Neild, G. H.; Codd, G. A.; *Lancet* **1997**, *352*, 21.
7. Codd, G. A.; *Water Sci. Technol.* **1995**, *32*, 149; Quilliam, M. A.; *J. AOAC Int.* **1999**, *82*, 773; Carmichael, W. W.; *Sci. Am.* **1994**, 270.
8. Catterall, W.; *Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.* **1980**, 20, 15.
9. Mahmood, N. A.; Carmichael, W. W.; *Toxicol* **1987**, *25*, 1221.
10. Devlin, J. P.; Edwards, O. E.; Gorham, P. R.; Hunter, P. R.; Pike, R. K.; Stavie, B.; *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 1367.
11. Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H. J.; *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1301.
12. Rapala, J.; Iahili, K.; Sivonen, K.; Niemelae, S. I.; *Lett. Appl. Microbiol.* **1994**, *19*, 423.
13. Skulberg, O. M.; Carmichael, W. W.; Andersen, R. A.; Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Skulberg, R.; *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, *11*, 321.
14. Soliakov, L.; Gallegher, T.; Wonnacott, S.; *Neuropharmacology* **1975**, *34*, 1535.
15. Carmichael, W. W.; Biggs, D. F.; Gorham, P. R.; *Science* **1975**, *187*, 542; Carmichael, W. W.; *Asv. Botan. Res.* **1997**, *27*, 211.
16. Carmichael, W. W.; Ownby, C. L.; Odell, G. V.; *Freshwater Cyanobacteria (blue-green algae) toxins, natural toxins, Pharmacology and Therapeutics*, ed. Pergamon Press: Oxford, 1989, p. 3.
17. Stevens, D. K.; Krieger, R. I.; *Toxicol* **1989**, *27*, 79.
18. Fitzgeorge, R. B.; Clark, S. K.; Keevil, C. W.; 1<sup>st</sup> *International Symposium on Detecion Methods for Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1994.
19. Carmichael, W. W.; *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72*, 445.
20. Fawell, J. K.; James, H. A.; *FR 0434/DoE 3728*, **1994**.
21. Mahmood, N. A.; Carmichael, W. W.; *Toxicol* **1986**, *24*, 425.
22. Carmichael, W. W.; *Science* **1975**, *187*, 542; Carmichael, W. W.; Biggs, D. F.; Peterson, M. A.; *Toxicol* **1979**, *17*, 229.
23. Swanson, K. L.; Allen, C. N.; Aronstam, R. S.; Rapoport, H.; Albuquerque, E. X.; *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 250.
24. Alkodon, M.; Albuquerque, E. X.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *274*, 771.
25. Dalit, E. D.; Zinder, O.; *Gen. Pharmac.* **1998**, *31*, 737; Molloy, L.; Wonnacott, S.; Gallagher, T.; Brought, P. A.; Livett, B. G.; *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *289*, 447; Clarke, P. B. S.; Reuben, M. *Brit. J. Pharmacol.*; **1996**, *117*, 595.
26. Dube, S. N.; Mazumder P. K.; Kumar, D.; Rao, P. V. L.; Bashkar, A. S. B.; *Def. Sci. J.* **1996**, *46*, 135.
27. Lakshmana P. V.; Bhattacharya, R.; Gupta, N.; Parida, M. M.; Baskar, A. S. B.; Dube, R.; *Arch. Toxicol.* **2002**, *76*, 227.
28. James, K. J.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A.; *Toxicol* **1997**, *35*, 811.
29. Sivonen, K.; Niemela, S.; Niemi, R.; Lepisto, L.; Luoma, H.; Rasanen, L.; *Hidrobiologia* **1990**, *190*, 267; Edwards, C.; Beattie, K. A.; Scrimgeour, C. M.; Codd, G. A.; *Toxicol* **1992**, *30*, 1165; James, K. J.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A.; 12<sup>th</sup> *European Symposium on Animal, Plant and Microbial toxin*, Basal, Switzerland, 1997; Gugger, M.; Lenoir, S.; Berger, C.; Ledreux, A.; Druart, J. C.; Humbert, J. F.; Guette, C.; Bernard, C.; *Toxicol* **2005**, *45*, 919; Krienitz, L.; Ballot, A.; Kotut, K.; Wiegand, C.; Putz, S.; Metcalf, J. S.; Codd, G. A.; Pflumacher, S.; *FEMS Microbiol. Ecol.* **2003**, *43*, 141.
30. Mitrovic, S. M.; Pflumacher, S.; James, K. J.; Furey, A.; *Aquat. Toxicol.* **2004**, *68*, 185.
31. Harada, K.; Kimura, Y.; Ogawa, K.; Suzuki, M.; Dahlem, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W.; *Toxicol* **1989**, *27*, 1289.
32. Astrachan, N. B.; Archer, B. G.; Hilbelink, D. R.; *Toxicol* **1980**, *18*, 684.
33. Molica, R. J.; Oliveira, E. J. A.; Carvalho, P. V. V.; Costa, A. N.; Cunha, C. C.; Melo, G.; Azevedo, S. M. F.; *Harmful Algae* **2005**, *4*, 743.
34. Skulberg, O. M.; Carmichael, W. W.; Andersen, R. A.; Matsunaga, S.; Skulberg, R.; *Environ. Toxicol. Chem.* **1992**, *11*, 321; Lilleheil, G.; Andersen, R. A.; Skulberg, O. M.; Alexander, J.; *Toxicol* **1997**, *35*, 1275; Namikoshi, M.; Murakami, T.; Watanabe, M. F.; Oda, T.; Yamada, T.; Tsujimura, S.; Nagai, H.; Oishi, S.; *Toxicol* **2003**, *42*, 533; Furey, A.; Crowley, L.; Shuilleabhain, A. N.; Skulberg, O. M.; James, K. J.; *Toxicol* **2003**, *41*, 297.
35. Araújo, R.; Nghiêm, H.; Rippka, R.; Palibroda, N.; Tandean, N. M.; Herdman, M.; *Microbiology* **2005**, *151*, 1263.
36. Aas, P.; Eriksen, S.; Kolderup, J.; Lundy, P.; Haugen, J.-E.; Skulberg, O. M.; Fonnun, F.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1996**, *2*, 223.
37. Philips, T.; Brough, P. A.; Gallagher, T.; Wonnacott, S.; *Drug Dev. Res.* **1994**, *31*, 147.
38. Smith, P.; *Toxicol* **1996**, *34*, 857.
39. James, K.; Furey, A.; Sherlock, I. R.; Stack, M. A.; Twohig, M.; Caudwell B. F.; Skulberg O. M.; *J. Chromatogr. A* **1998**, *798*, 147; Carmichael, W. W.; Mahmood, N. A.; Hyde, E. G. *Em Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*; Hall, S.; Strichart, G., eds.; American Chemical Society: Washington, 1990.
40. Matsunaga, S.; Moore, R. E.; Niemczura, W. P.; Carmichael, W. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8021; Onodera, H.; Oshima, Y.; Henriksen, P.; Yasumoto, T. *Toxicol* **1997**, *35*, 1645.
41. Cook, W. O.; Beasley, V. R.; Dahlem, A. M.; Dellinger, J. A.; Harlin, K. S.; Carmichael, W. W.; *Toxicol* **1988**, *26*, 750; <http://www.aims.gov.au/arnat>, acessada em Junho 2005.
42. Hyde, E. G.; Carmichael, W. W.; *J. Biochem. Toxicol.* **1991**, *6*, 195.
43. Mansell, H. L.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 6025.
44. Parsons, P. J.; Camp, N. P.; Underwood, J. M.; Harvey, D. M.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 11637.
45. Sardina, F. J.; Howard, M. H.; Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H.; *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4654.
46. Parsons, P. J.; Camp, N. P.; Edwards, N.; Sumoreeah, L. R.; *Tetrahedron* **2000**, *56*, 309.
47. Forro, E.; Arva, J.; Fulop, F.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 643.
48. Stefani, H. A.; Pereira, C. M. P.; Almeida, R. B.; Braga, R. C.; Guzen, K. P.; Cella, R.; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6833; Martins, M. A. P.; Pereira, C. M. P.; Cunico, W.; Moura, S.; Rosa, F.; Peres, R. L.; Machado, P.; Zanatta, N.; Boanacorso, H. G.; *Ultrason. Sonochem.* **2006**, *13*, 364.
49. Wright, E.; Gallagher, T.; Sharples, C. G. V.; Wonnacott, S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2867.
50. Magnus, N. A.; Ducry, L.; Rolland, V.; Wonnacott, S.; Gallagher, T.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2313.
51. Huby, N. J. S.; Thompson, P.; Wonnacott, S.; Gallagher, T.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 243.
52. Ham, W. H.; Jung, Y. H.; Lee, K.; Oh, C. Y.; Lee, K. Y.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3247; Harayama, H.; Abe, A.; Sakado, T.; Kimura, M.; Fugami, K.; Tanaka, S.; Tamaru, Y.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2113; Harayama, H.; Okuno, H.; Takahashi, Y.; Kimura, M.; Fugami, K.; Tanaka, S.; Tamaru, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7287; Kimura, M.; Saeki, N.; Uchida, S.; Harayama, H.; Tanaka, S.; Fugami, K.; Tamaru, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7611; Tamaru, Y.; Tanigawa, H.; Itoh, S.; Kimura, M.; Tanaka, S.; Fugami, K.; Sekiyama, T.; Yoshida, Z.; *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 631; Tamaru, Y.; Hojo, M.; Yoshida, Z.; *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5731; Tamaru, Y.; Hojo, M.; Higashimura, H.; Yoshida, Z.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3994; Tamaru, Y.; Kobayashi, T.; Kawamura, S.; Ochiai, H.; Yoshida, Z.; *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 4479; Hegedus, L. S.; Mckearin, J. M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2444.
53. Oh, C.; Kim, K.; Ham, W.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2133.
54. Krinjar, M.; Nilsson, C.; Wistrand, L. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1263.
55. Braga, A. L.; Vargas, F.; Sehnem, J. A.; Braga, R. C.; *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9021; Braga, A. L.; Ludtke, D. S.; Vargas, F.; Braga, R. C.; *Synlett* **2006**, *10*, 1453.
56. Trost, B. M.; Oslob, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3057.
57. Arisawa, M.; Torisawa, Y.; Kawahara, M.; Yamanaka, M.; Nishida, A.; Nakagawa, M.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4327.
58. Huber C. S.; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **1972**, *78*, 2577; Koskinen, A. M. P.; Rapoport, H.; *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1301.
59. Aggarwal, V. K.; Humphries, P. S.; Fenwick, A.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1985.
60. Wegge, T.; Schwarz, S.; Seitz, G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1405.
61. Brenneman, J. B.; Machauer, R.; Martin, S. F.; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7301.
62. Brenneman, J. B.; Martin, S. F.; *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1329.
63. Mori, M.; Tomita, T.; Kita, Y.; Kitamura, T.; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4397.
64. Roche, C.; Delair, P.; Greene, A. E.; *J. Org. Chem.* **2003**, *5*, 1741; Rasmussen, M. O.; Delair, P.; Greene, A. E.; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5438; Delair, P.; Brot, E.; Kanazawa, A.; Greene, A. E.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1383; Kanazawa, A.; Gillet, S.; Delair, P.; Greene, A. E.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4660; Nebois, P.; Greene, A. E.; *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5210.
65. Muniz, M. N.; Kanazawa, A.; Greene, A. E.; *Synlett* **2005**, 1328.
66. Skrinjar, M.; Nilsson, C.; Wistrand, L. G.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1263.
67. Rouhi, M.; *Chem. Eng. News* **2005**, *83*, 41.