



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE NOVOS ADUTOS AROMÁTICOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN:
HIBRIDAÇÃO MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA OBTENÇÃO DE
DROGAS LEISHMANICIDAS**

TICIANO PEREIRA BARBOSA



*João Pessoa – PB - Brasil
Dezembro /2010*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE NOVOS ADUTOS AROMÁTICOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN:
HIBRIDAÇÃO MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA OBTENÇÃO DE
DROGAS LEISHMANICIDAS**

Ticiano Pereira Barbosa

**Tese apresentada ao Centro de
Ciências Exatas e da Natureza da
Universidade Federal da Paraíba
como requisito para a obtenção do
título de Doutor em Química, área de
concentração em Química Orgânica.**

Orientador: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

**João Pessoa – PB – Brasil
Dezembro/2010**

B238s Barbosa, Ticiano Pereira.

Síntese de novos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: hibridação molecular como ferramenta para obtenção de drogas leishmanicidas / Ticiano Pereira Barbosa.- João Pessoa, 2010.

129f. : il.

Orientador: Mário Luiz Araújo de Almeda Vasconcellos
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN

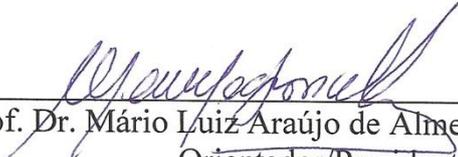
1. Química Orgânica. 2. Adutos de Morita-Baylis-Hillman.
3. Hibridação molecular. 4. Atividade leishmanicida.

UFPB/BC

CDU: 547(043)

Síntese de Novos Adutos Aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: Hibridação Molecular como Ferramenta para a Obtenção de Drogas Leishmanicidas.

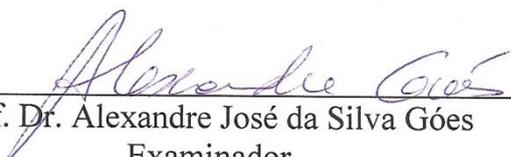
Aprovada pela banca examinadora:



Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos
Orientador/Presidente



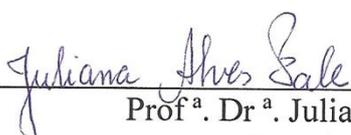
Prof. Dr. Marco Edilson Freire de Lima
Examinador



Prof. Dr. Alexandre José da Silva Góes
Examinador



Prof. Dr. Celso de Amorim Camara
Examinador



Prof.ª Dr.ª Juliana Alves Vale
Examinadora

DEDICATÓRIA

A Ana Flávia; esposa, amiga e companheira.

Não quero ser lembrado pelo que fiz, deixei de fazer ou mesmo pelas atitudes que tomei. Prefiro ser lembrado pelo Ser Humano que sou, pois as minhas ações e atitudes são apenas reflexos do meu caráter.

Ticiano Pereira Barbosa

AGRADECIMENTOS

Ao Pai da vida, razão de minha existência.

Ao amigo e professor Mário Vasconcellos, pela orientação, oportunidade e confiança depositadas em minha pessoa.

A minha esposa, Ana Flávia, companheira e amiga nos momentos de alegria e de tristeza, pela compreensão durante os períodos de ausência em razão das minhas atividades.

Aos meus pais Petronilo e Neneca por todos os anos de dedicação, educação e amor aos filhos.

A professora Márcia Rosa de Oliveira e sua mestrandia Francianne Medeiros Amorim, pela colaboração e realização dos ensaios em *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

Aos colegas do LASOM, Edilson Bezerra, Suervy, Fábio, Cláudio Júnior, Saulo Capim, Hermesson, Yen, Natália e Sara.

Aos professores da Pós-Graduação pelos conhecimentos e exemplos transmitidos com afinco e a todos os colegas da Pós-Graduação pelo companheirismo durante as disciplinas.

A Vicente Carlos, Kristerson Reinaldo e a Professora Juliana, pelos espectros de RMN.

A todos aqueles que fazem parte da minha vida e de alguma forma contribuíram ou torceram pela realização deste trabalho e do meu sucesso.

RESUMO

Título: Síntese de novos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman: Hibridação molecular como metodologia para obtenção de drogas Leishmanicidas.

Descrevemos neste trabalho a síntese de sete novos adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman, as metodologias empregadas e a avaliação da atividade Leishmanicida *in vitro* contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Este trabalho foi idealizado a partir do conceito de hibridação molecular, unindo o Salicilato de metila, fármaco conhecido por suas propriedades analgésicas e antiinflamatórias e a porção comum de adutos de MBH previamente avaliados contra espécies de *Leishmania*. Inicialmente, foi realizada a síntese do 2-acriloiloxi benzoato de metila (**48**), um acrilato inédito na literatura, em 71% de rendimento, que serviu de acceptor de Michael para a síntese dos adutos de MBH. Oito aldeídos aromáticos foram utilizados nas reações de MBH e os produtos desejados foram obtidos em rendimentos satisfatórios: Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acriloiloxi}-metila (**49**), 70%; Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acriloiloxi}-metila (**50**), 61%; Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acriloiloxi}-metila (**51**), 74%; Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acriloiloxi]-metila (**52**), 67%; Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acriloiloxi]-metila (**53**), 60%; Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acriloiloxi}-metila (**55**), 52%; Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acriloiloxi] metila (**56**), 65%. Todos os adutos foram caracterizados através dos métodos físicos de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN¹H e RMN¹³C). Propusemos também a formação de um anel indolizínico (**65**) como produto majoritário formado *in situ* a partir do aduto Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-2-il-metil)-acriloiloxi]-metila (**54**), que não foi isolado, mas caracterizado por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. Todos os adutos obtidos no trabalho apresentaram atividade Leishmanicida, com Cl₅₀ menores que 60,0 µM, sendo o aduto **51** aquele que apresentou a menor Cl₅₀, tanto em *L. amazonensis* como em *L. chagasi*, ambas com valores menores que 15 µM.

Palavras chave: Adutos de Morita-Baylis-Hillman, Hibridação molecular e Atividade Leishmanicida.

ABSTRACT

Title: Synthesis of new aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Molecular hybridization as a tool to obtaining Leishmanicidal drugs.

We described herein the synthesis of seven new aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts, the methodologies and the evaluation of the *in vitro* Leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*. This work was conceived from the concept of molecular hybridization, uniting Methyl salicylate, a drug known for its anti-inflammatory and analgesic properties, and a common moiety of the MBH adducts previously evaluated against *Leishmania* species. Initially, the synthesis of methyl 2-(acryloyloxy) benzoate (**48**), a new acrylic ester, was performed in 71% yield, which was used as a Michael acceptor for the MBH adducts synthesis. Eight aromatic aldehydes were used in the MBH reactions and the desired products were obtained in satisfactory yields: methyl 2-[2-(hydroxy(4-nitrophenyl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**49**), 70%; methyl 2-[2-(hydroxy(3-nitrophenyl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**50**), 61%; methyl 2-[2-(hydroxy(2-nitrophenyl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**51**), 74%; methyl 2-[2-(hydroxy(pyridin-4-yl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**52**), 67%; methyl 2-[2-(hydroxy(pyridin-3-yl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**53**), 60%; methyl 2-[2-((4-bromophenyl)(hydroxy)methyl)acryloyloxy] benzoate (**55**), 52%; methyl 2-[2-(hydroxy(naphthalen-2-yl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**56**), 65%. All the adducts were characterized by physical methods as infrared and Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR and ^{13}C NMR). We also proposed the formation of an indolizine (**65**) as a major product formed *in situ* from the adduct methyl 2-[2-(hydroxy(pyridin-2-yl)methyl)acryloyloxy] benzoate (**54**), which was not isolated, but characterized by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry. All the adducts obtained in this work showed Leishmanicidal activity with IC_{50} lower than 60,0 μM , and the adduct **51** showed the lowest IC_{50} , both in *L. amazonensis* and *L. chagasi*, with values below 15 μM .

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adducts, Molecular Hybridization and Leishmanicidal activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Número de novos medicamentos desenvolvidos entre 1975 e 2004 (Disponível em: < www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx >. Acessado em: 25 de setembro de 2010).....	3
Figura 1.2 Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> spp., fagocitadas por macrófagos. (Disponível em:< http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il >.)	5
Figura 1.3 Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> spp., em meio extracelular. (Disponível em:< http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il >.)	5
Figura 1.4 Vetor da Leishmaniose (<i>Lutzomyia longipalpis</i>) durante o repasto sanguíneo. (Disponível em: < http://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia >. Acessado em: 29 de setembro de 2010).	6
Figura 1.5 Modelo esquemático do ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i> .(Adaptado de: < http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/html/Leishmaniasis.htm >. Acessado em: 1 de outubro de 2010).	8
Figura 1.6 Distribuição das principais espécies de <i>Leishmania</i> causadoras da LTA no Brasil.	9
Figura 1.7 LTA, lesão ulcerada, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e com fundo granuloso.....	10
Figura 1.8 LTA, lesão cutânea com aspecto ectimóide, localizada no punho e com hiperemia e infiltração nas bordas.....	10
Figura 1.9 LTA, Forma cutânea difusa – Polimorfismo lesional (Lesões em placa infiltrada, com ulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior. Tempo de doença 3 anos).....	11
Figura 1.10 LTA, Forma cutânea difusa – Polimorfismo lesional (Lesões em placa infiltrada com deformidades nas extremidades. Tempo de doença 11 anos).	11
Figura 1.11 Leishmaniose mucocutânea, paciente apresentando placa ulcerocrostosa abrangendo lábios e mento.	12
Figura 1.12 Raposa: reservatório silvestre da <i>L. chagasi</i>	14
Figura 1.13 Marsupial didelfídeo: reservatório silvestre da <i>L. chagasi</i>	14
Figura 1.14 Fase aguda da Leishmaniose visceral.	15
Figura 1.15 Criança no período de estado da Leishmaniose visceral.	15
Figura 1.16 Criança no período final da Leishmaniose visceral.	16

Figura 1.17 Quadro comparativo da evolução clínica da Leishmaniose visceral ¹⁷ ...	16
Figura 1.18 Mapa com países endêmicos de casos de LC. (Disponível em: < http://emedicine.medscape.com/article/998804-media >. Acessado em: 10 de outubro de 2010).....	17
Figura 1.19 Mapa com regiões endêmicas (em amarelo) de casos de LV em países do novo e velho mundo. (Disponível em: < http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/ >. Acessado em: 10 de outubro de 2010).....	18
Figura 1.20 Mapa Casos de Leishmaniose visceral no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf >. Acessado em: 14 de outubro de 2010.	19
Figura 1.21 Casos de Leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lta_br_gr_uf_1990_2008.pdf >. Acessado em: 14 de outubro de 2010.....	20
Figura 1.22 Óbitos em decorrência da Leishmaniose visceral no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/5_lv_obitos_14_10_10.pdf >. Acessado em: 10 de outubro de 2010.	21
Figura 1.23 Estrutura Química do Stibogluconato de sódio (Pentostan®).	22
Figura 1.24 Estrutura Química do antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®).	23
Figura 1.25 Estrutura Química da Anfotericina B.	24
Figura 1.26 Estrutura Química da pentamidina.	24
Figura 1.27 Estrutura química da miltefosina.	25
Figura 1.28 Estrutura química do ácido integerrinécico.....	28
Figura 1.29 Conformações propostas por Hoffmann e Rabe para o aduto antes da eliminação do DABCO.	30
Figura 1.30 Espectro de massas (ESI-MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) após 10 minutos de reação.....	34
Figura 1.31 Espectro de massas (ESI-MS/MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) e metanol como solvente.	35
Figura 1.32 Adutos de MBH com maior atividade contra <i>Plasmodium falciparum</i> testados por Kundu.	36

Figura 1.33 Adutos de MBH com atividade antimalárica testados por Narender.....	36
Figura 1.34 Adutos de MBH com atividade moluscicida contra <i>Biomphalaria glabrata</i>	37
Figura 1.35 Aduto de MBH com maior atividade leishmanicida contra <i>Leishmania amazonensis</i> e seu bioisómero não clássico.....	38
Figura 1.36 Etapas hierárquicas no processo de descoberta racional de fármacos, com base em uma abordagem fisiológica. (NCE = nova entidade química).	41
Figura 1.37 Estrutura química do salol.	42
Figura 1.38 Estrutura química do acetilsalicilato de quinina.	43
Figura 1.39 Estrutura química dos AINES ácidos: Ibuprofeno, Cetorolac e Cetoprofeno.....	43
Figura 3.1 Adutos de MBH estruturalmente semelhantes com atividade Leishmanicida com a porção alcoólica do éster acrílico em destaque.	50
Figura 3.2 Adutos de MBH propostos neste trabalho.	51
Figura 3.3 Análise retrossintética de um aduto de MBH proposto no trabalho.	52
Figura 4.1 CCDA após 3 horas de reação do 4-nitrobenzaldeído com 48	57
Figura 4.2 Estrutura química da dioxanona formada na reação entre o composto 48 e o 4-nitrobenzaldeído.....	59
Figura 4.3 CCDA após 2 horas de reação do 4-nitrobenzaldeído com 48 , utilizando t-BuOH/H ₂ O como solvente.	61
Figura 4.4 Espectro de massas (ESI-MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) e 2-naftol (3 equiv.) como fonte de prótons.	66
Figura 4.5 Interação entre o alcóxido e o nitrogênio positivo do grupo nitro, distância entre os átomos igual a 3.1 Angstrom.	70
Figura 4.7 Cromatograma da reação do acrilato 48 com a piridina-2-carboxaldeído.	75
Figura 4.8 Ciclo redox do grupo nitro.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Número de publicações sobre a reação de MBH de 1991 a 2010.....	28
Tabela 3.1 Adutos propostos neste trabalho e seus respectivos coeficientes de partição calculados.....	53
Tabela 4.1 Tempos de reação e rendimentos dos adutos 49 , 50 e 51 seguindo a metodologia inicial ^a	59
Tabela 4.2 Tempos de reação e rendimentos dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando o salicilato de metila como fonte de prótons ^a	66
Tabela 4.3 Rendimentos e tempos de reação para os adutos 49 , 50 e 51 utilizando excesso do acrilato 48	69
Tabela 4.4 Tempo e rendimento da reação de obtenção do aduto 51	71
Tabela 4.5 Tempos de reação e rendimentos dos adutos 52 , 53 e 54	72
Tabela 4.6 Dados espectroscópicos dos adutos 52 e 53	72
Tabela 4.7 Tempos de reação e rendimentos dos adutos 55 e 56	73
Tabela 4.8 Dados espectroscópicos dos adutos 55 e 56	74
Tabela 4.9 Valores de CI_{50} dos adutos avaliados <i>in vitro</i> contra <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman, esquema geral.....	26
Esquema 1.2 Reação de empregada por Morita, uso de tricicloexilfosfina como catalisador.....	26
Esquema 1.3 Dimerização de Rauhut e Currier utilizando alcenos ativados.	29
Esquema 1.4 Primeiro Ciclo Catalítico Proposto por Hoffmann/Hill e Isaacs para a Reação de Morita Baylis-Hillman.	30
Esquema 1.5 Mecanismo proposto por McQuade, mostrando a formação do hemiacetal durante a transferência de próton no estado de transição.....	31
Esquema 1.6 Proposta de McQuade para a formação do Aduto de MBH e a dioxanona a partir do produto (17).	32
Esquema 1.7 Formação de co-produtos da reação de MBH utilizando Fenil vinil cetona como alceno ativado.....	32
Esquema 1.8 Transferência de próton realizada pelo metanol para a formação do aduto de MBH.	33
Esquema 1.9 Esquema geral da reação de MBH entre nitroalcenos aromáticos conjugados e formaldeído.	38
Esquema 1.10 Preparação das novas entidades química híbridas entre AINES e o <i>p</i> -aminofenol.....	44
Esquema 4.1 Reação de esterificação do salicilato de metila para gerar o seu estér acrílico.	55
Esquema 4.2 Reação de MBH entre o 2-acriloiloxi benzoato de metila e nitro benzaldeídos.....	57
Esquema 4.3 Reação de MBH entre o 2-acriloiloxi benzoato de metila e o 4-nitrobenzaldeído, utilizando solvente prótico (t-BuOH/H ₂ O).....	60
Esquema 4.4 Equilíbrio ácido-base entre a água e o DABCO e cálculo da energia livre de Gibbs.	61
Esquema 4.5 Mecanismo de reação de Hidrólise básica do acrilato 48	62
Esquema 4.6 Equilíbrio ácido-base entre o metanol e o DABCO.....	64
Esquema 4.7 Mecanismo de reação de solvólise básica do acrilato 48 pelo metanol.	64

Esquema 4.8 Mecanismo simplificado da reação de transesterificação do acrilato 48 com o salicilato de metila.	65
Esquema 4.9 Metodologia de otimização da reação de MBH para os adutos 49, 50 e 51	68
Esquema 4.10 Segunda etapa do mecanismo da reação de MBH proposto por McQuade.....	69
Esquema 4.11 Metodologia para a reação de MBH para obtenção dos adutos 52, 53 e 54	71
Esquema 4.12 Metodologia para a reação de MBH para obtenção do aduto 55	72
Esquema 4.13 Metodologia para a reação de MBH na obtenção do aduto 56	73
Esquema 4.14 Mecanismo de reação para a formação da indolizina a partir de um aduto de MBH.	76
Esquema 4.15 Formação da indolizina (65) a partir do hemiacetal (64) ou do aduto de MBH (54).....	77
Esquema 4.16 Fragmentações e respectivas <i>m/z</i> da indolizina proposta (65).....	78
Esquema 4.17 Formação do fragmento de <i>m/z</i> 261.....	78
Esquema 4.18 Rearranjo de McLafferty para a formação do íon base do aduto 54 .	79
Esquema 4.19 Formação do íon de <i>m/z</i> 121 a partir de um rearranjo de McLafferty sofrido pelo íon de <i>m/z</i> 151.	79

LISTA DE ESPECTROS

- Espectro 1.** Espectro de RMN¹³C-APT(CDCl₃, 50MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48). 107
- Espectro 2.** Expansão do espectro de RMN¹³C-APT(CDCl₃, 50MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48) na região de 121,0 a 166,0 ppm. 107
- Espectro 3.** Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48). 108
- Espectro 4.** Espectro de RMN¹H(CDCl₃, 200MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48) na região entre 5,90 e 8,20 ppm. 108
- Espectro 5.** Espectro de Infravermelho do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48) em cm⁻¹. 109
- Espectro 6.** Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona(58). 109
- Espectro 7.** Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona(58). 110
- Espectro 8.** Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona(58) na região entre 6,4 e 8,6 ppm. 110
- Espectro 9.** Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (49). 111
- Espectro 10.** Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (49). 111
- Espectro 11.** Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (49) na região entre 4.0 e 7.2 ppm. 112
- Espectro 12.** Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (49) na região entre 7.2 e 8.3 ppm. 112
- Espectro 13.** Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (49) em cm⁻¹. 113
- Espectro 14.** Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (50). 113
- Espectro 15.** Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (50). 114

Espectro 16. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (50) na região entre 7,00 e 8,40 ppm.	114
Espectro 17. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (50) na região entre 5,76 e 6,72 ppm.	115
Espectro 18. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (50) em cm ⁻¹	115
Espectro 19. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CDCl ₃ , 100MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila(51).....	116
Espectro 20. Expansão do espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CDCl ₃ , 100MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (51) na região de 120,0 a 155,0 ppm.	116
Espectro 21. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (51).....	117
Espectro 22. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 400MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (51) na região entre 7,1 e 8,1 ppm.	117
Espectro 23. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (51) em cm ⁻¹	118
Espectro 24. Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (52).....	118
Espectro 25. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (57).....	119
Espectro 26. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (52) na região entre 6,07 e 7,44 ppm.	119
Espectro 27. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (52) na região entre 7,44 e 8,6 ppm.	120
Espectro 28. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (52) em cm ⁻¹	120
Espectro 29. Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (53).....	121
Espectro 30. Espectro de RMN ¹ H(CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (53).....	121

Espectro 31. Expansão do espectro de RMN ¹ H(CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (53) na região entre 7,8 e 8,7 ppm. ...	122
Espectro 32. Expansão do espectro de RMN ¹ H(CDCl ₃ , 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (53) na região entre 5,6 e 6,8 ppm. ...	122
Espectro 33. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (55) em cm ⁻¹	123
Espectro 34. Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃ , 50MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (55).....	123
Espectro 35. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (55).....	124
Espectro 36. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (55).....	124
Espectro 37. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (55) em cm ⁻¹	125
Espectro 38. Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CDCl ₃ , 50MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56).	125
Espectro 39. Expansão do espectro de RMN ¹³ C-DEPT (CDCl ₃ , 50MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56), na região de 123 à 135 ppm.	126
Espectro 40. Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56).....	126
Espectro 41. Expansão espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56) na região entre 5,42 e 7,2 ppm..	127
Espectro 42. Expansão do espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 200MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56) na região entre 7,2 e 8,06 ppm.	127
Espectro 43. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (56) em cm ⁻¹	128
Espectro 44. Espectro de massas (70 eV) do Salicilato de metila.	128
Espectro 45. Espectro de massas (70 eV) do Acrilato 48.	128
Espectro 46. Espectro de Massas (70 eV) da indolizina obtida na tentativa de síntese do aduto 54.....	129
Espectro 47. Espectro de Massas (70 eV) do aduto 54.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α - Alfa

ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

AINES – Antiinflamatórios não-esteroidais

β - Beta

CCDA - Cromatografia de Camada Delgada Analítica

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX-2 – Ciclo-oxigenase - 2

δ - Deslocamento químico

d – Dupleto

DABCO - 1,4 - diazabicyclo [2.2.2]octano

dd - Duplo dupleto

ddd – Duplo dupleto duplo

DMSO - Dimetilsulfóxido

ESI-MS - Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray

eV – Eletronvolt

FioCruz - Fundação Oswaldo Cruz

GRE – Grupo Retirador de Elétrons

Hz – Hertz

HM – Hibridização molecular

CI₅₀ – Concentração que inibe 50% do crescimento de uma população

IUPAC - União internacional de química pura e aplicada (do inglês, International Union of Pure and Applied Chemistry)

J – Constante de acoplamento

KBr – Brometo de potássio

kcal - kilocalorias

kg - kilogramas

Log P - Coeficiente de partição

LC - Leishmaniose Cutânea

LM – Leishmaniose Mucosa

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

LVA - Leishmaniose Visceral Americana
m – multipleteo
MBH - Morita-Baylis-Hillman
MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia
m/z – Razão massa carga
OMS – Organização Mundial de Saúde
P&D – Pesquisa e Desenvolvimento
pKa – Logaritmo negativo da constante de ionização de um ácido
ppm – partes por milhão
QSAR - Relação Quantitativa Estrutura-Atividade
RMBH – Reação de Morita-Baylis-Hillman
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
s – Singleto
SAR - “Structure Activity Relationship” (Relação estrutura-atividade)
Sb⁺⁵ - Antimoniais pentavalentes
SDS - Dodecil sulfato de sódio
sex – sexteto
SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
sl – Singleto largo
SP - Substância protótipo
t - tripleto
TMS – Tetrametilsilano

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iii
EPÍGRAFE	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ESQUEMAS	xii
LISTA DE ESPECTROS	xiv
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Investimentos para Doenças Negligenciadas	2
1.2. Leishmanioses	4
1.2.1 Agentes etiológicos:	4
1.2.2 Ciclo de vida dos parasitas	6
1.2.3 Formas clínicas da infecção	8
1.2.4 Perfil epidemiológico mundial e nacional	17
1.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman	25
1.3.1 Propostas e aspectos mecanísticos da reação	29
1.3.2 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e atividade biológica	35
1.4 A Química Medicinal	39
1.5 A Hibridação Molecular	42
1.5.1 A hibridação molecular como ferramenta para o combate da leishmaniose	45
2. OBJETIVOS	48
2.1 Objetivo Geral	48
2.2 Objetivos Específicos	48
3. ESTRATÉGIA SINTÉTICA	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Preparação do 2-acriloiloxi benzoato de metila (48)	55
4.2 Preparação dos Adutos Híbridos de MBH	56
4.2.1 Preparação dos adutos 49, 50 e 51	56
4.2.2 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos 49, 50 e 51 utilizando uma mistura de terc-Butanol/Água como solvente prótico.	59
4.2.3 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos 49, 50 e 51 utilizando uma metanol como solvente prótico	62
4.2.4 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos 49, 50 e 51 utilizando Salicilato de metila como fonte protônica	64

4.2.5 Otimização dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando excesso do acrilato 48 e menor quantidade de DABCO.	68
4.2.6 Preparação dos adutos 52 , 53 e 54 utilizando em solvente aprótico.	71
4.2.7 Preparação dos adutos 55 e 56	72
4.2.8 Discussão sobre a reação do acrilato 48 e piridina-2-carboxaldeído.	74
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
6. EXPERIMENTAL	86
6.1 Materiais e Métodos	86
6.2 Preparação do 2-acrilóiloxibenzoato de metila (48)	87
6.2.1 Dados Espectroscópicos do 2-acrilóiloxibenzoato de metila (48)	88
6.3 Procedimento geral para obtenção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman 49 , 50 , 51 , 55 e 56	88
6.4 Tentativa de otimização da reação dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando terc-Butanol/Água (6:4) como solvente.	89
6.5 Tentativa de otimização da reação dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando Metanol como solvente.	89
6.6 Otimização da reação dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando salicilato de metila como solvente e fonte protônica.	89
6.7 Otimização da reação dos adutos 49 , 50 e 51 utilizando um maior excesso do acrilato 48	90
6.8 Otimização da reação do aduto 56 utilizando um maior excesso do acrilato 48 e o salicilato de metila como fonte protônica.	90
6.9 Procedimento para reação de obtenção dos adutos 57 , 58 e 59 , utilizando diclorometano como solvente a temperatura ambiente.	90
6.10 Caracterização espectroscópica do composto (1,3-Dioxanona) e dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman	91
6.10.1 Composto 5-metileno-2,6-bis(4-nitrofenil)-1,3-dioxan-4-ona	91
6.10.2 Aduto 49	92
6.10.3 Aduto 50	92
6.10.4 Aduto 51	93
6.10.5 Aduto 52	94
6.10.6 Aduto 53	94
6.10.7 Aduto 55	95
6.10.8 Aduto 56	95
6.10.1 Atividade leishmanicida contra <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Leishmania chagasi</i>	96
7. REFERÊNCIAS	99
8. ESPECTROS	107

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Em sua trajetória durante a vida, o homem experimenta diferentes situações e sensações. Todas elas, mesmo aquelas que aparentam ser demasiadamente prejudiciais, servem para que ele suba mais um degrau durante a evolução da consciência.

A ciência, referindo-me especificamente à Química, através de suas concepções teóricas, da observação e da sua experimentação prática, dá ao homem subsídios para que ele entenda um pouco da sua própria natureza. O trabalho em um laboratório não é mais do que a materialização de uma mente que se questiona e também questiona o mundo, tentando compreendê-lo para quem sabe poder dar certa contribuição para o progresso de todos. É uma idéia que se concretiza, porém, só terá valia se for empregada em benefício coletivo.

Nosso trabalho nasceu de tentativas e erros, o que nos ajudou muito em nossa formação intelectual e também moral. Descobrimos o quão esquecidos são aqueles que apresentam um quadro infeccioso de Leishmaniose. Pudemos perceber a falta de investimentos e de pesquisas para tratamentos menos dolorosos e mais eficientes por parte da Indústria Farmacêutica, que visa o lucro em grande parte dos casos. Sendo assim, pudemos dar uma pequeníssima contribuição aos que desejam ajudar aqueles que são acometidos por tal enfermidade.

1.1 Investimentos para Doenças Negligenciadas.

O desenvolvimento tecnológico e científico cada vez mais traz conforto e melhor qualidade de vida para humanidade, pelo menos para uma parcela dela. No que diz respeito à saúde mundial e ao surgimento de novas e eficientes terapias contra as mais diversas doenças, o desenvolvimento científico de novas drogas tem sido parcial e conivente com a indústria farmacêutica, quando se trata de investimentos em pesquisa, em não contemplar terapias para doenças características de países em desenvolvimento, as chamadas doenças negligenciadas.

Tais doenças como a Malária, a Febre amarela, a Dengue, a Leishmaniose, a Esquistossomose e a Doença de Chagas, ocorrem de forma endêmica¹ em vários

países em desenvolvimento e muitas vezes são esquecidas pelos órgãos de pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Outro ponto importante para se destacar é o fato de que o público alvo, pertencente aos países em desenvolvimento, não representa uma parcela significativa nos lucros das Indústrias farmacêuticas, uma vez que as pessoas acometidas pelas chamadas Doenças negligenciadas são, na grande maioria, de classes sociais menos favorecidas e de baixo poder aquisitivo.

Corroborando com este panorama, podemos perceber na Figura 1.1 que entre os anos de 1975 e 2004 que 1.556 novos medicamentos foram desenvolvidos, sendo que apenas 21 foram destinados ao combate de doenças negligenciadas, uma porcentagem de somente 1,3%².

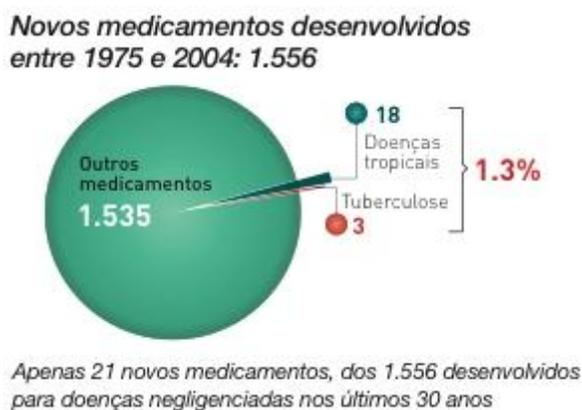


Figura 1.1 Número de novos medicamentos desenvolvidos entre 1975 e 2004 (Disponível em: <www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx>. Acessado em: 25 de setembro de 2010).

Nos Estados Unidos da America (EUA), por exemplo, se encontram as maiores indústrias farmacêuticas do mundo. Para se ter uma idéia, no ano de 2007, a receita destas indústrias chegou à soma de 315 bilhões de dólares. Em 2008, as grandes indústrias americanas despenderam algo em torno de 65 bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos. No mesmo ano, aproximadamente 2.900 novas drogas estavam em andamento nas pesquisas, porém, 750 delas eram antineoplásicas, 312 para doenças do coração, 150 para diabetes, 109 para Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e várias outras para Alzheimer e doenças senis³.

No Brasil, os investimentos em relação às doenças negligenciadas foram iniciados pelo Ministério da Saúde (MS) em 2003, com o primeiro edital temático em tuberculose, seguido pelos editais de dengue (2004) e hanseníase (2005) – todos editais nacionais que seguiram definições das oficinas de prioridades realizadas em Brasília, DF. Em 2006, priorizaram-se investimentos em doenças negligenciadas, com o início do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento em Doenças Negligenciadas no Brasil, no âmbito da parceria do MS com o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Nova oficina de prioridades em doenças negligenciadas foi realizada em 2008, visando lançamento de edital na área. Por meio desse programa, foram lançados dois editais temáticos que financiaram 140 projetos com um investimento total de R\$ 39 milhões⁴.

Com o incremento de investimentos em doenças negligenciadas e de publicações na área, surgiu a demanda de transformar os conhecimentos produzidos em produtos para a população acometida por doenças negligenciadas. Com esse objetivo, o Ministério da Saúde, e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), realizaram, em 2008, um encontro com representantes de diversas instituições e países, para definir estratégia de pesquisa translacional em doenças negligenciadas, de forma a transformar resultados de pesquisas em aplicações médicas para atender à população brasileira. A partir do encontro, foi elaborado um documento, entregue ao Ministro da Saúde José Gomes Temporão, visando à criação efetiva do Programa Translacional do Brasil em Doenças Negligenciadas.

1.2. Leishmanioses

1.2.1 Agentes etiológicos:

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas pelas diversas espécies do protozoário *Leishmania* spp., que pertencem à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae⁵. São microorganismos unicelulares que se apresentam em duas formas celulares, a primeira é denominada amastigota (Figura 1.2).

As formas amastigota apresentam formato redondo ou oval, possuindo diâmetro entre 2 e 3 μm e um núcleo de localização excêntrica. São encontradas no

interior dos fagolisossomos das principais células fagocíticas dos mamíferos, os macrófagos.



Figura 1.2 Formas amastigotas de *Leishmania* spp., fagocitadas por macrófagos. (Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.>)

Já as formas promastigotas (Figura 1.3), que são as formas infectantes, apresentam medidas aproximadas de 10 a 20 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de diâmetro. Possuem um único flagelo, que geralmente é maior que o corpo do parasita, que se estende de uma bolsa flagelar no interior do citoplasma e dá uma grande mobilidade ao protozoário. Estas formas evoluem a partir das formas amastigotas dentro de um período de 1 a 2 semanas⁶.

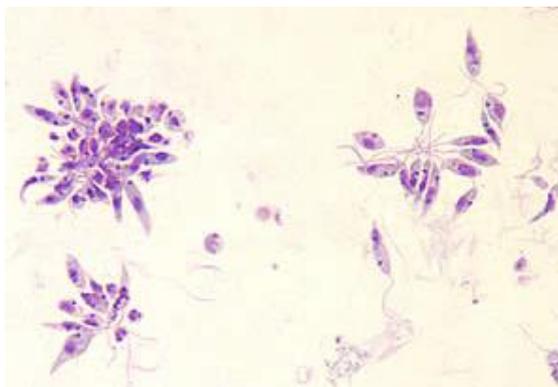


Figura 1.3 Formas promastigotas de *Leishmania* spp., em meio extracelular. (Disponível em: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.>)

Existem várias espécies de *Leishmania* e a maioria delas parasita o homem. Todas são morfologicamente indistinguíveis e geralmente a diferenciação das espécies é feita por análise de isoenzimas, anticorpos monoclonais específicos ou análise genética⁶. Entre as espécies, podemos destacar aquelas que comumente causam os diferentes quadros clínicos da Leishmaniose: *L. donovani*, *L. infantum*, *L.*

chagasi, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*.

1.2.2 Ciclo de vida dos parasitas

Como já dito, a *Leishmania* spp. existe em duas formas celulares e em seu ciclo de vida não foi identificada nenhuma fase sexual⁶. As formas promastigotas são encontradas no intestino do vetor, a fêmea de várias espécies do mosquito do Gênero *Lutzomyia*, pertencente à Ordem Díptera, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae. São também conhecidos como flebotomíneos e popularmente como mosquito-palha, birigui, tatuquira, etc. Quando adultos, os mosquitos vetores estão prontamente adaptados para viverem em diversos ambientes, entretanto, na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos, geralmente extraídos de frutos, como fonte energética, porém as fêmeas se alimentam principalmente de sangue para o desenvolvimento de seus ovos⁷.



Figura 1.4 Vetor da Leishmaniose (*Lutzomyia longipalpis*) durante o repasto sanguíneo. (Disponível em: < <http://en.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia>>. Acessado em: 29 de setembro de 2010).

O ciclo de vida da *Leishmania* spp. se inicia quando o mosquito fêmea, no momento do repasto sanguíneo, utilizando sua probóscide, lacera os vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado infectado e as formas amastigotas, contidas no interior dos macrófagos, são sugadas para o intestino do vetor juntamente com o

sangue consumido (item 1 da Figura 1.5). Os principais tipos de hospedeiros vertebrados da *Leishmania spp.* são mamíferos como os roedores, espécies de canídeos, marsupiais, primatas ou mesmo um ser humano. No intestino do inseto vetor, as formas promastigotas passam por um processo denominado metacicloênese, que é o processo pelo qual estas formas param a fase reprodutiva e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As formas reprodutivas, não infectantes (procíclicas), prendem-se à parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metacicloênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas destacam-se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo.⁶

Durante um novo repasto sanguíneo (Item 5 da Figura 1.5) as formas promastigotas adentram na pele do vertebrado e as promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. As mudanças bioquímicas ocorridas durante a metacicloênese conferem as promastigotas uma resistência aumentada à lise pelo sistema complemento. Substâncias presentes na saliva dos flebotomíneos também favorecem a infecção. Depois de serem fagocitadas pelo macrófagos do hospedeiro vertebrado, as promastigotas sofrem diferenciação para a forma amastigota. Após este estágio de diferenciação ocorre intensa multiplicação das amastigotas no interior do macrófago até resultar na ruptura da membrana plasmática e consequente liberação dos parasitas, que serão novamente fagocitados por outros macrófagos como também se disseminarão através da circulação sanguínea.⁶

O processo de ruptura da parede celular do macrófago infectado leva a liberação de partículas antigênicas que serão apresentadas ao sistema imune, gerando a resposta específica. Aquelas formas promastigotas que não forem internalizadas serão destruídas no meio extracelular pela resposta inata e as partículas antigênicas produzidas neste processo também poderão ser utilizadas pelas células apresentadoras de antígeno no processo de reconhecimento antigênico. É provavelmente neste momento que características como intensidade e qualidade da resposta imune são definidas, influenciando assim a evolução da doença para cura espontânea.⁶

Havendo então um novo repasto pelo mosquito vetor em um hospedeiro vertebrado infectado, reinicia-se o ciclo de vida do parasita.

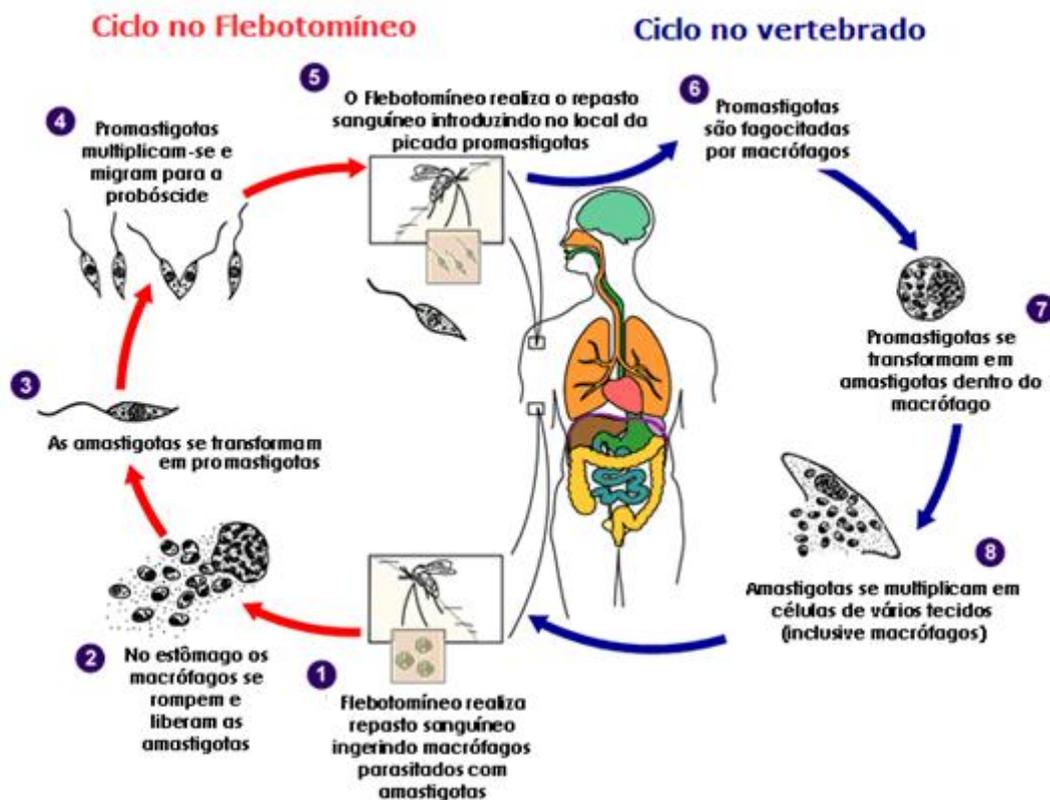


Figura 1.5 Modelo esquemático do ciclo de vida das espécies de *Leishmania* spp. (Adaptado de: < <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/html/Leishmaniasis.htm>>. Acessado em: 1 de outubro de 2010).

1.2.3 Formas clínicas da infecção

As formas clínicas conhecidas da Leishmaniose são denominadas: Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e Leishmaniose visceral (LV).

A LTA é uma forma clínica da infecção, não contagiosa, causada por diferentes espécies da *Leishmania* spp., que acomete pele e mucosas. Primariamente, é uma infecção zoonótica, afetando outros animais que não o ser humano, o qual pode ser envolvido secundariamente, tornando-a uma doença com características antropozoonóticas.

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do

subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste. A distribuição das principais espécies de *Leishmania spp.* responsáveis pela transmissão da LTA no Brasil é mostrada na Figura 1.6⁸.

Espécies de leishmânias	Unidades Federadas																										
	AC	AL	AM	AP	BA	CE	DF	ES	GO	MA	MG	MT	MS	PA	PB	PE	PI	PR	RJ	RN	RO	RR	RS	SC	SE	SP	TO
<i>L. (V.) braziliensis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>L. (V.) lainsoni</i>	X													X							X						
<i>L. (V.) naiffi</i>			X											X													
<i>L. (V.) shawi</i>										X				X			X										
<i>L. (V.) guyanensis</i>	X		X	X										X								X					
<i>L. (L.) amazonensis</i>	X		X		X	X			X	X	X	X	X	X							X			X			X
<i>L. (V.) utingensis</i>														X													
<i>L. (V.) lindenberg</i>														X													
<i>Leishmania (L.) forattinii</i>					X			X																			
<i>Leishmania (L.) enriettii</i>																			X							X	
<i>L. (L.) deanei</i>														X													

Figura 1.6 Distribuição das principais espécies de *Leishmania* causadoras da LTA no Brasil.

Classicamente, a LTA se manifesta sob duas formas: Leishmaniose cutânea (LC), que pode ser de forma localizada ou difusa, e a Leishmaniose mucosa (LM), também denominada de mucocutânea.

A Leishmaniose cutânea apresenta uma úlcera típica e indolor, que se desenvolve num período de 1 a 3 meses após a picada do mosquito vetor⁸. A úlcera costuma localizar-se em áreas expostas da pele; com formato arredondado ou ovalado; mede de alguns milímetros até alguns centímetros; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras. A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera. Adicionalmente a infecção secundária pode causar eczema na pele ao redor da úlcera, modificando seu aspecto (forma ectimóide). As Figuras 1.7 e 1.8 mostram como se apresentam estas manifestações clínicas no homem⁹.



Figura 1.7 LTA, lesão ulcerada, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e com fundo granuloso.



Figura 1.8 LTA, lesão cutânea com aspecto ectimóide, localizada no punho e com hiperemia e infiltração nas bordas.

Já a forma cutânea difusa constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões do corpo, geralmente, causando deformidade em alguns membros como mãos e pés. No Brasil, a doença é causada pela *L. (L.) amazonensis*. As Figuras 1.9 e 1.10 mostram exemplos de casos clínicos da doença⁹.



Figura 1.9 LTA, Forma cutânea difusa – Polimorfismo lesional (Lesões em placa infiltrada, com ulceração, tubérculos em face, orelha e membro superior. Tempo de doença 3 anos).



Figura 1.10 LTA, Forma cutânea difusa – Polimorfismo lesional (Lesões em placa infiltrada com deformidades nas extremidades. Tempo de doença 11 anos).

Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa. Clinicamente, a LM se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea. Na maioria dos casos, a LM resulta de LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa. Acomete com mais frequência o sexo masculino e faixas etárias usualmente mais altas do que a LC, o que provavelmente se deve ao seu caráter de complicação secundária.

Acredita-se que a forma mucosa da leishmaniose seja, geralmente, causada por disseminação hematogênica das Leishmanias inoculadas na pele para as mucosas nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior. Mais raramente, podem também ser atingidas as conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais e ânus. As lesões de pele, próximas aos orifícios naturais, também podem, por contiguidade, invadir as mucosas. Em 1% dos casos de forma mucosa, a manifestação pode ser só na laringe. Na Figura 1.11 é mostrado um exemplo de Leishmaniose mucocutânea⁹.



Figura 1.11 Leishmaniose mucocutânea, paciente apresentando placa ulcerocrostosa abrangendo lábios e mento.

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o séc. I d.C.^{10,11}. Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e

narizes, características da espúndia, hoje conhecida como a forma mucosa da Leishmaniose.¹² A doença é capaz de produzir, além das suas manifestações clínicas, um grande efeito psicológico e social na vida do paciente, transformando-se em um verdadeiro estigma para aqueles que são acometidos por tal quadro clínico, sendo muitas vezes excluídos da sociedade.

Outra manifestação clínica causada por espécies do protozoário é a Leishmaniose visceral (LV), ou calazar, uma doença crônica grave, potencialmente fatal para o homem, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado. É causada por espécies do gênero *Leishmania*, pertencentes ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*. No Brasil, o agente etiológico é a *L. chagasi*, espécie semelhante à *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia.¹³

Na América do Sul, o conhecimento da doença data de 1913, quando Migone, em Assunção, no Paraguai, descreve o primeiro caso em necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Corumbá - MS.¹⁴ Posteriormente, em 1934, a partir de um estudo realizado por Penna¹⁵ para o diagnóstico e distribuição da febre amarela no Brasil, 41 casos positivos para o protozoário foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*. Esses indivíduos eram oriundos das regiões Norte e Nordeste.

Tanto no Brasil como nas Américas, encontramos o cão doméstico (*Canis familiaris*) como sendo o principal reservatório da *L. chagasi* em ambientes rurais e urbanos.^{5,16} Já em ambientes silvestres, como matas e florestas, os reservatórios que se destacam são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, raposas infectadas foram encontradas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica (Figura 1.12). Os marsupiais didelfídeos (Figura 1.13) foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia.¹⁷



Figura 1.12 Raposa: reservatório silvestre da *L. chagasi*.



Figura 1.13 Marsupial didelphídeo: reservatório silvestre da *L. chagasi*.

De modo didático, a LV pode ser dividida em três diferentes estágios, considerando a evolução clínica da doença. São eles: período inicial, período de estado e período final.

O período inicial é caracterizado pelo início da sintomatologia, que pode variar de paciente para paciente, mas na maioria dos casos inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia. O estado geral do paciente está preservado, o baço geralmente não ultrapassa a 5 cm do rebordo costal esquerdo (Figura 1.14). Esta fase da doença, também chamada de “aguda” por alguns autores.¹⁷



Figura 1.14 Fase aguda da Leishmaniose visceral.

A segunda fase, o período de estado, caracteriza-se por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento significativo da hepatoesplenomegalia. Apresenta um quadro clínico arrastado geralmente com mais de dois meses de evolução, na maioria das vezes associado a comprometimento do estado geral (Figura 1.15).



Figura 1.15 Criança no período de estado da Leishmaniose visceral.

Caso não seja feito o diagnóstico e tratamento, a doença evolui progressivamente para o período final, com febre contínua e comprometimento mais intenso do estado geral. Instala-se a desnutrição, com cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca (Figura 1.16). Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas e/ou sangramentos¹⁷.



Figura 1.16 Criança no período final da Leishmaniose visceral.

De acordo com a Figura 1.17, podemos perceber, de maneira comparada, as relações entre as manifestações clínicas da doença e cada uma das fases de sua evolução¹⁷.

Manifestações Clínicas	Evolução clínica		
	Período Inicial	Período de Estado	Período Final
Febre	Presente	Presente	Presente
Emagrecimento	Ausente	Moderado	Acentuado
Palidez	Discreta	Moderada	Acentuada
Hepatomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Esplenomegalia	Discreta	Moderada	Acentuada
Manifestações Hemorrágicas	Ausente	Incomum	Frequente

Figura 1.17 Quadro comparativo da evolução clínica da Leishmaniose visceral¹⁷.

1.2.4 Perfil epidemiológico mundial e nacional

Todo ano, estima-se um número entre 1,5 e 2 milhões de crianças e adultos apresentam os sintomas da Leishmaniose, sem contar a incidência da infecção quando está se apresenta de maneira subclínica, ou assintomática, onde esses números podem oscilar ente 2 e 4 milhões de pessoas no mundo. Em torno de 90% dos casos da forma cutânea de Leishmaniose ocorrem em países como o Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia saudita, Argélia, Iran, Brasil e Peru, enquanto que 90% dos casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil¹⁸. As Figuras 1.18 e 1.19 mostram a distribuição geográfica da Leishmaniose em alguns Países que apresentam regiões endêmicas.

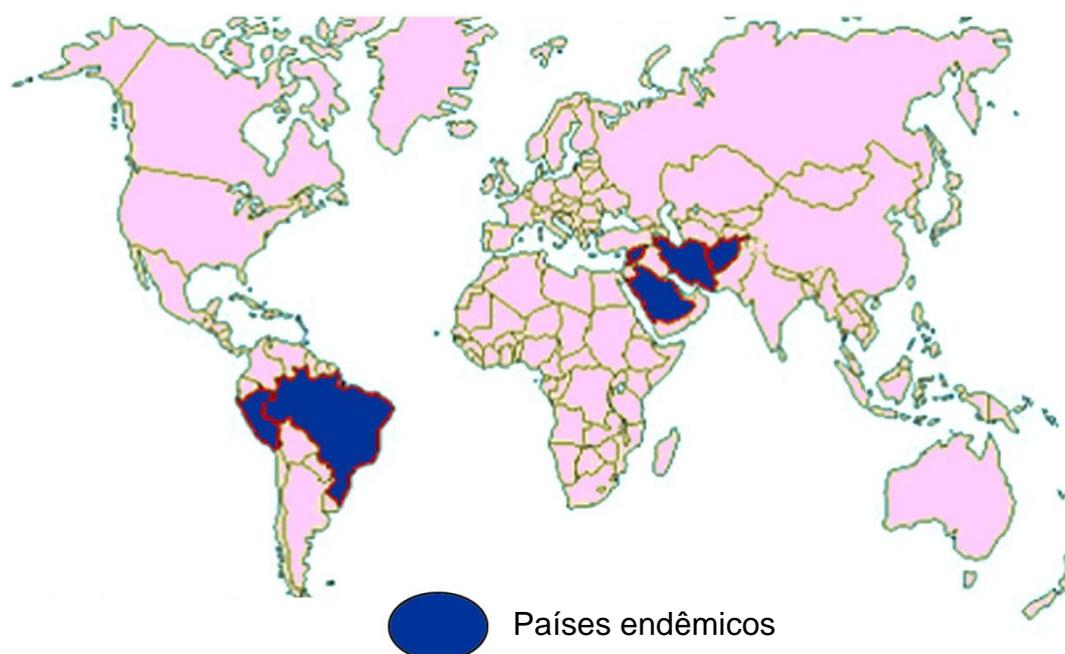


Figura 1.18 Mapa com países endêmicos de casos de LC. (Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/998804-media>>. Acessado em: 10 de outubro de 2010).

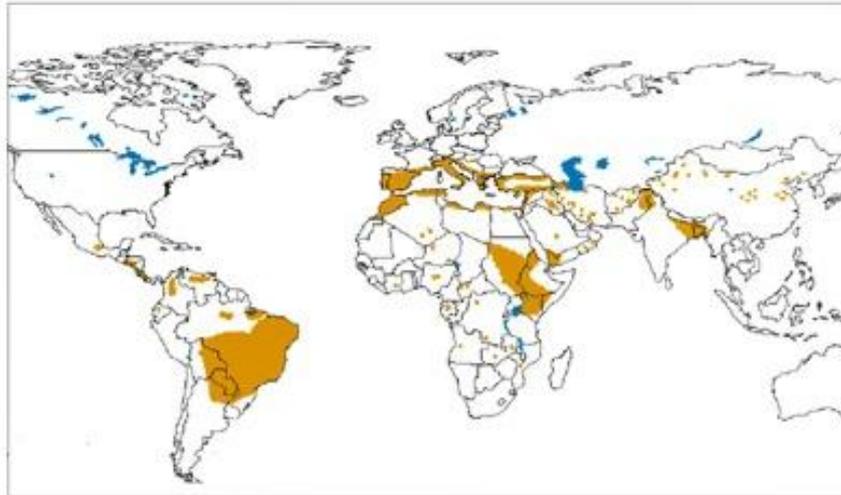


Figura 1.19. Mapa com regiões endêmicas (em amarelo) de casos de LV em países do novo e velho mundo. (Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/>. Acessado em: 10 de outubro de 2010).

De acordo com o perfil geográfico mundial, a doença ainda permanece inserida na pobreza, como uma doença negligenciada. Dentre os quase dois milhões de novos casos anuais, aproximadamente 1.500.000 casos são atribuídos a LC e cerca de 500.000 são da LV, no caso desta última, o número de óbitos pode chegar a 50.000 anuais¹⁹.

O Ministério da Saúde do Brasil, anualmente, divulga o número de casos registrados de várias doenças, entre elas, a Leishmaniose. Para se ter uma idéia do número de casos da LTA e da LV, podemos observar as Figuras 1.20 e 1.21 que mostram os números referentes às duas últimas décadas. Já a Figura 1.22 destaca o número de óbitos ocorridos em pacientes com LV do ano 2000 ao ano de 2009.

De acordo com os dados divulgados, no Brasil, assim como no panorama mundial, há sempre um grande número de casos de Leishmaniose a cada ano. Entretanto, as formas clínicas da doença não apresentam uma proporção numérica equivalente de casos. O número de casos de LTA é sempre muito maior, chegando a uma proporção de pelo menos 10 casos da doença para cada caso de LV em determinados anos no nosso país. Porém, é importante observar que a maior parte dos casos de LV ocorre em estados do Nordeste, devendo-se então dar um maior enfoque a esta forma da doença nessa região do país. Já a LTA ocorre com maior incidência tanto em estados do Nordeste como estados do Norte do país.

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009**
Região Norte	35	53	99	84	118	117	133	152	112	375	366	299	333	437	543	660	684	847	815	747
Rondônia¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0
Acre¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas¹	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	0	0	3	0	0	1	1	1	0	0
Roraima	6	41	62	39	21	49	19	12	8	2	13	4	8	9	15	12	4	2	2	6
Pará	22	12	31	33	64	20	45	43	46	188	171	140	134	191	372	471	452	403	379	300
Amapá¹	0	0	0	0	0	0	0	0	...	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0
Tocantins	7	0	6	12	33	48	69	97	58	185	182	154	188	237	154	176	225	437	434	441
Região Nordeste	1.650	1.380	1.657	2.407	3.183	3.519	2.932	2.257	1.688	2.965	4.029	1.873	1.487	1.766	1.954	2.011	1.982	1.741	1.739	1.798
Maranhão	91	61	114	575	534	263	144	116	483	724	842	490	555	747	615	555	477	392	560	432
Piauí	201	86	196	701	778	407	239	205	185	348	404	120	127	252	348	306	242	264	252	160
Ceará	140	150	159	248	486	490	220	130	158	421	496	231	221	212	296	391	599	559	508	636
Rio Grande do Norte	74	147	236	132	135	93	71	115	126	276	332	148	68	62	55	48	70	65	72	86
Paraíba	60	92	81	46	91	127	89	72	22	61	108	94	20	31	28	31	36	23	27	16
Pernambuco	97	80	60	82	188	273	208	161	110	168	539	228	86	79	85	91	96	76	73	64
Alagoas	56	32	40	58	71	111	103	87	35	171	285	234	116	49	57	57	49	32	26	31
Sergipe	82	78	119	98	203	266	210	117	1	102	142	41	30	19	32	42	47	69	32	39
Bahia	849	654	652	467	697	1.489	1.648	1.254	568	694	881	287	264	315	438	490	366	261	189	334
Região Sudeste	243	76	96	59	90	171	166	140	89	189	314	240	425	534	782	656	704	679	723	666
Minas Gerais	226	62	96	58	88	164	166	138	88	160	218	145	298	349	620	484	430	421	471	485
Espírito Santo	15	13	0	0	0	0	0	1	1	29	4	7	1	4	4	4	1	0	2	6
Rio de Janeiro	2	1	0	1	2	7	0	1	0	0	4	4	1	2	3	3	9	2	0	3
São Paulo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	88	84	125	179	155	165	264	256	250	172
Região Sul	0	3	2	2	5	3	3	3	0	8										
Paraná¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1	3	3	3	2	0	0
Santa Catarina¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	8
Região Centro-Oeste	16	1	18	20	35	78	15	21	88	95	149	123	201	231	289	261	277	331	322	292
Mato Grosso do Sul	5	1	3	3	27	59	12	18	53	47	82	87	176	190	232	204	209	249	231	185
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	13	26	23	18	8	13	20	22	21	34	61	69
Goiás	11	0	15	17	8	19	3	3	22	22	44	18	17	28	28	26	32	35	25	33
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	15	13	5	5
UF ignorada	...	11	2	1	7	6	1	3	253	330										
Brasil	1.944	1.510	1.870	2.570	3.426	3.885	3.246	2.570	1.977	3.624	4.858	2.549	2.450	2.971	3.580	3.597	3.651	3.604	3.852	3.841

Figura 1.20. Mapa de Casos de Leishmaniose visceral no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2_lv_casos_14_10_10.pdf>. Acessado em: 14 de outubro de 2010.

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Região Norte	7.318	9.359	9.720	9.739	11.306	13.117	9.987	11.058	6.078	9.129	11.140	8.107	10.207	13.508	13.125	10.679	8.833	9.890	8.576
Rondônia	1346	2118	2220	2822	2249	2499	1738	1.465	1.317	1.737	1.421	1.563	1.812	1.980	2.181	1.668	1.204	971	935
Acre	59	252	403	563	372	365	490	413	280	490	903	717	1.076	1.385	1.532	1.356	1.124	913	963
Amazonas	1733	2590	3424	1982	741	1557	988	2.290	715		1.744	2.153	2.130	3.816	2.212	1.957	1.554	2219	1737
Roraima	170	507	492	605	470	251	303	308	244	146	352	454	451	303	160	280	285	340	347
Pará	3269	3196	2236	2543	5748	7064	5042	5.038	2.177	5.051	5.565	2.521	3.741	4.862	5.324	4.345	3.554	4305	3593
Amapá	185	394	475	643	895	645	563	902	892	884	592	52	377	555	1162	580	595	667	619
Tocantins	556	302	470	581	831	736	863	642	453	821	563	647	620	607	554	493	517	475	382
Região Nordeste	12.428	12.020	7.140	8.218	14.426	13.887	11.303	11.868	8.455	9.112	13.078	11.149	9.373	7.985	7.863	8.112	6.169	5.925	5.915
Maranhão	3109	3926	2027	2868	6262	4725	3794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.658	4.364	3.777	3.072	3.395	2.174	2335	1655
Piauí	249	324	161	72	56	40	96	102	96	106	95	164	151	126	117	257	152	108	60
Ceará	3848	2862	1358	1463	1928	4262	2793	2787	1490	1372	3043	2543	2123	1329	2064	1977	1006	935	698
Rio Grande do Norte	20	6	...	13	4	15	42	49	26	13	11	8	5	8	13	10	7	6	6
Paraíba	85	165	342	273	264	196	173	233	113	128	177	50	68	56	74	68	46	60	53
Pernambuco	680	474	378	436	806	891	714	667	643	979	1.149	518	556	558	719	337	413	446	380
Alagoas	28	54	53	71	224	114	81	144	72	156	258	88	80	97	65	57	33	111	89
Sergipe	54	50	24	46	46	52	19	47	34	30	58	93	61	16	7	11	6	4	10
Bahia	4355	4159	2797	2976	4836	3592	3591	3.205	3.626	3.323	3.799	2.027	1.965	2.018	1.732	2.000	2.332	1920	2964
Região Sudeste	2.347	3.386	3.854	4.771	3.763	2.605	2.369	2.294	2.945	3.983	2.938	2.112	2.894	3.252	2.540	2.809	2.868	1.898	1.580
Minas Gerais	1338	2134	2504	2547	2040	1574	1504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.116	1.610	1.767	1.507	1.802	1.855	1322	1122
Espírito Santo	670	728	722	893	490	307	244	404	646	884	548	351	209	234	146	193	241	109	71
Rio de Janeiro	227	319	269	496	396	241	282	302	186	269	250	169	289	226	209	317	283	119	55
São Paulo	112	205	359	835	837	483	339	143	140	129	266	476	786	1.025	678	497	489	348	332
Região Sul	192	139	690	819	1.361	796	617	430	455	460	853	568	943	932	607	541	573	514	624
Paraná	192	139	690	819	1361	794	616	428	453	457	850	553	909	886	579	444	409	438	528
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	10	14	28	17	84	158	67	86
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	5	20	18	11	13	6	9	10
Região Centro-Oeste	2.468	3.546	3.264	3.907	4.247	5.343	4.721	4.640	2.981	6.384	4.605	4.629	4.839	4.980	4.460	4.388	3.852	3.095	2.969
Mato Grosso do Sul	221	165	304	215	243	568	178	433	256	338	158	372	301	235	192	139	116	99	117
Mato Grosso	2021	3200	2682	3346	3734	4492	4195	3.779	2.283	5.504	3.921	3.816	4.067	4.189	3.752	3.639	3.181	2715	2487
Goiás	226	181	277	345	270	281	348	414	440	532	525	411	441	500	458	578	505	246	350
Distrito Federal	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	30	30	56	58	32	50	35	15
UF ignorada	1.033	1.013	887	1.299	1.106	71	105	157	142	156	102	85	82
Brasil	24.753	28.450	24.668	27.454	35.103	35.748	30.030	31.303	21.801	30.367	33.720	26.636	28.361	30.814	28.737	26.685	22.397	21.407	19.746

Figura 1.21 Casos de Leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_lta_br_gr_uf_1990_2008.pdf>. Acessado em: 14 de outubro de 2010.

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Região Norte	10	7	18	30	40	37	34	26	41	17
Rondônia	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
Pará	7	4	7	11	19	26	23	11	15	8
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	3	2	11	19	20	10	11	15	25	9
Região Nordeste	127	121	107	137	124	138	144	83	94	86
Maranhão	20	16	36	49	35	36	40	18	21	16
Piauí	9	8	7	23	21	18	16	15	19	15
Ceará	4	13	13	18	22	20	40	16	29	27
Rio Grande do Norte	18	6	4	4	2	2	1	1	5	4
Paraíba	5	2	3	2	1	5	2	1	1	2
Pernambuco	19	20	9	9	9	10	10	11	5	5
Alagoas	19	12	6	4	3	3	1	3	2	1
Sergipe	6	8	5	3	1	5	4	5	1	3
Bahia	27	36	24	25	30	39	30	13	11	13
Região Sudeste	9	22	40	59	100	69	52	45	41	75
Minas Gerais	6	19	21	32	77	48	37	27	30	63
Espírito Santo	0	0	1	0	2	0	0	0	1	1
Rio de Janeiro	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
São Paulo	3	3	18	27	21	20	14	18	10	10
Região Sul	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0
Paraná	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	9	16	20	28	28	33	30	16	33	20
Mato Grosso do Sul	5	13	16	23	19	22	19	9	27	10
Mato Grosso	1	1	3	1	3	5	3	6	6	5
Goiás	2	2	1	4	3	6	5	1	0	4
Distrito Federal	1	0	0	0	3	0	3	0	0	1
UF ignorada	0	3	0	0	2	1	1	0	7	18
Brasil	155	169	186	254	295	280	262	170	216	216

Figura 1.22 Óbitos em decorrência da Leishmaniose visceral no Brasil. Fonte: BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (Disponível em: < http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/5_lv_obitos_14_10_10.pdf>. Acessado em: 10 de outubro de 2010.

Apesar da forma visceral da doença ser aquela que pode levar ao óbito, não devemos negligenciar ainda mais a LTA por não ser letal. Como mostrado nos dados do Ministério da Saúde, é grande o número de casos de pessoas acometidas pela LTA, sendo assim, devemos também dar atenção a esse tipo da infecção por causar muitas vezes deformações no corpo, transformando-se em um verdadeiro estigma social para os portadores da doença.

1.2.5 Repertório terapêutico para o tratamento das leishmanioses

A partir do ano de 1940, os derivados antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) foram introduzidos na terapêutica, desde então, os mesmos têm sido considerados como drogas de primeira escolha no tratamento dessa protozoose. Existem no mercado atualmente duas formulações de Sb^{+5} disponíveis: Estibogluconato de sódio (Figura 1.23) e o antimoniato de *N*-metil glucamina (Figura 1.24), não parecendo existir diferenças quanto a eficácia terapêutica destas formulações. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato de *N*-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde em ampolas de 5 ml, contendo 405mg de Sb^{+5} (1 ml = 81mg de Sb^{+5}). As ampolas devem ser armazenadas em local fresco e ao abrigo da luz, para evitar problemas na estabilidade do medicamento.

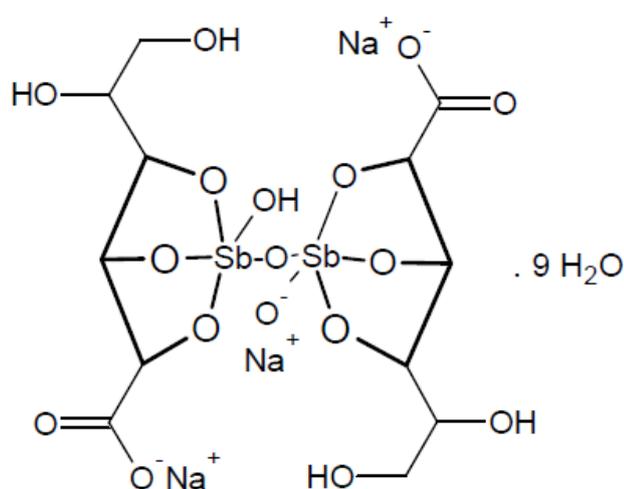


Figura 1.23 Estrutura Química do Stibogluconato de sódio (Pentostan®).

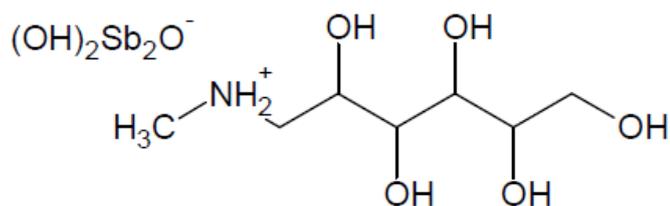


Figura 1.24 Estrutura Química do antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®).

No Brasil, apesar de não existir documentação da presença de cepas de *L. chagasi* resistentes *in vitro* aos antimoniais, recomenda-se o tratamento da leishmaniose visceral com a dose de 20mg de Sb^{+5} kg/dia, com aplicação endovenosa ou intramuscular, por no mínimo 20 e no máximo 40 dias, utilizando-se o limite máximo de 2 a 3 ampolas/dia do produto com bons índices de cura¹⁷. Nos casos de LTA, as doses dos antimoniais pentavalentes são administradas de forma semelhante⁹.

Embora sejam drogas de primeira escolha para o tratamento, elas se mostram tóxicas, nem sempre efetivas, e na LV são usadas em esquemas prolongados. O principal efeito colateral do Glucantime® é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização durante os dois primeiros trimestres de gravidez¹³.

Existem propostas de mecanismos de ação para os antimoniais pentavalentes, uma delas é que eles se ligam a grupos sulfidrilas em proteínas dos parasitas. Algumas evidências sugerem que a forma pentavalente do antimoniato é reduzida a forma trivalente *in vivo* antes de se ligar aos grupos sulfidrilas. Antimoniais trivalentes inibem a fosfofrutocinase, enzima importante para o desenvolvimento e crescimento dos parasitas²⁰.

Como drogas de segunda escolha, no arsenal terapêutico contra as Leishmanioses, são oferecidas a Anfotericina B (Figura 1.25) e as pentamidinas (Figura 1.26), quando o tratamento com antimoniais não proporciona resposta satisfatória.

O desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico poliênico, da classe dos macrolídeos, com excelente atividade *in vitro* na destruição de *Leishmania* intra e extracelular. Seu uso é limitado por suas reações adversas, principalmente no que diz respeito aos danos causados na função renal²¹.

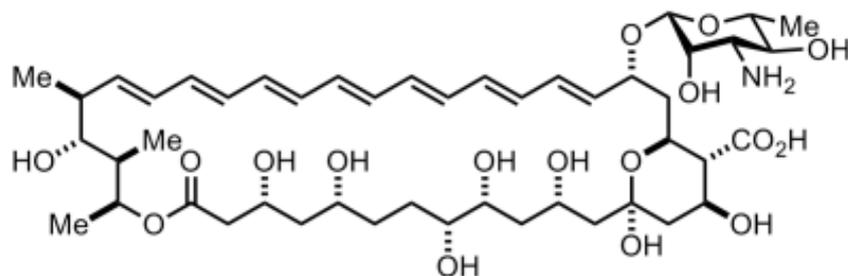


Figura 1.25 Estrutura Química da Anfotericina B.

Recentemente, novas formulações da anfotericina B (anfotericina B lipossomal e anfotericina B dispersão coloidal) tornaram-se disponíveis comercialmente. A Anfotericina B Lipossomal apresenta menor toxicidade e maior eficácia, porém, custo elevado, impossibilitando o seu uso na rotina do serviço. Está sendo indicada aos pacientes graves de leishmaniose visceral, que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do Glucantime[®] e de outras drogas de escolha não obtendo melhora ou cura clínica. Para o tratamento de leishmaniose visceral, a dose recomendada é de 1,0 a 1,5 mg/Kg/dia durante 21 dias, ou como alternativa a dose de 3,0 mg/Kg/dia durante 10 dias¹⁷.

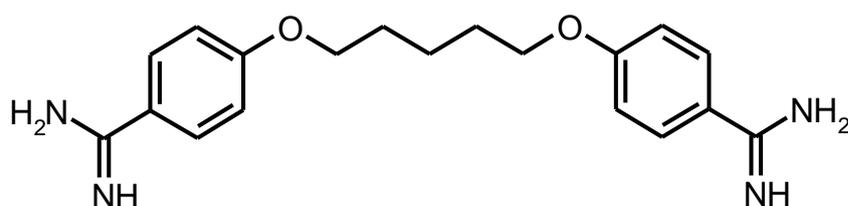


Figura 1.26 Estrutura Química da pentamidina.

A pentamidina é usada principalmente na Europa e África. Sua eficácia é inferior a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e seus efeitos colaterais maiores. A dose utilizada é de 4mg/kg/dia em dias alternados no total de 15 doses, não devendo ultrapassar a 2g como dose total. Seus efeitos colaterais mais comumente encontrados são anorexia, astenia, náusea, dor abdominal, hipoglicemia prolongada, taquicardia e outras arritmias, insuficiência renal em 25% dos pacientes, geralmente reversível e pancreatite que pode levar ao aparecimento de diabetes *mellitus*, em 10 a 15% dos casos¹⁷.

A mais recente droga na terapêutica contra a Leishmaniose é a miltefosina (Figura 1.27), é a primeira droga de uso oral para o tratamento da Leishmaniose. Sendo assim, “abre-se um porta” para um tratamento mais eficaz, menos doloroso e que pode ser administrado pelo próprio paciente. A droga foi bem sucedida em casos de LV na Índia, onde foi aprovada em 2002 e na Colômbia em 2005, onde mostrou uma eficácia de cura em mais de 90% dos casos de LC causados por *L. panamensis*, mas não mostrou grande eficácia em casos na Guatemala, causados por *L. brasiliensis*¹⁸. Existem poucos efeitos adversos tais como vômito e diarreia.

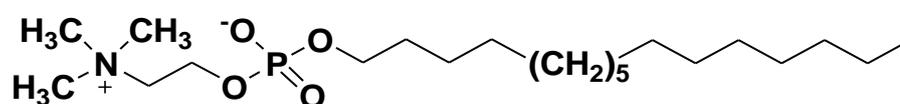


Figura 1.27 Estrutura química da miltefosina.

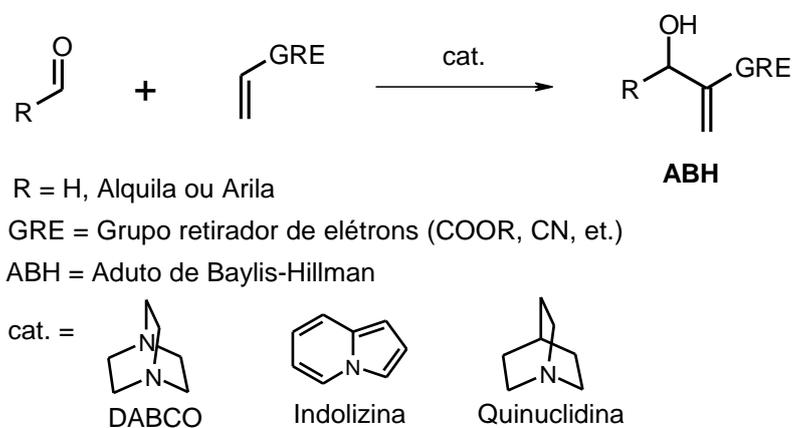
Recentemente, resultados de um estudo de fase 2 de um creme para combater LC causada por *L. major* mostrou-se bastante eficaz, com mais de 90% de taxa de cura em 20 dias de tratamento tópico. No futuro, esta poderá ser uma excelente alternativa para combater as lesões, uma vez que muitos tratamentos são feitos de maneira dolorosa, com injeções intralesionais.²²

1.3 Reação de Morita-Baylis-Hillman

Em síntese orgânica, a construção de estruturas químicas mais complexas através da formação de ligações carbono-carbono é uma das etapas fundamentais e necessárias. Além disso, o desenvolvimento de estratégias sintéticas para a construção de estruturas a partir de ligações carbono-carbono continua sendo um dos mais desafiadores esforços empregados pelos químicos orgânicos.

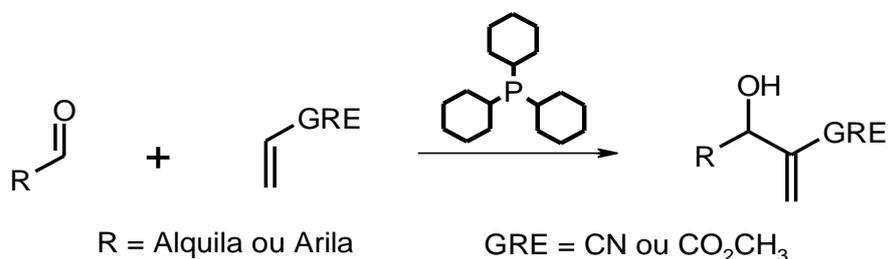
Várias reações de formação de ligações carbono-carbono foram desenvolvidas e suas aplicações sintéticas em química orgânica estão bem documentadas. Entre as mais importantes podemos citar: a reação aldólica, reação de Reformatsky, rearranjos de Claisen, reações de Friedel-Crafts, Diels-Alder, Grignard, Wittig, Heck, acoplamento de Suzuki entre outras.²³

Fazendo parte deste grupo de reações, uma estratégia sintética prática, e recente, para a aquisição de moléculas mais complexas a partir da formação de ligações carbono-carbono é o emprego da reação de Baylis-Hillman, que data de 1972,²⁴ quando o químico britânico Anthony B. Baylis e o químico alemão Melville E. D. Hillman relataram a reação de alcenos ativados, tais como ésteres α,β -insaturados, amidas, nitrilas e cetonas, com uma variedade de aldeídos e catalisada por aminas terciárias bicíclicas como o DABCO, quinuclidina ou indolizina (Esquema 1.1). O produto da reação foi um aduto polifuncionalizado, o que é de interesse para síntese orgânica.



Esquema 1.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman, esquema geral.

A reação também é conhecida como Morita-Baylis-Hillman (MBH), pois houve a contribuição do químico japonês Ken-ichi Morita quando no uso de tricicloexilfosfina como catalisador (Esquema 1.2) ao invés de aminas terciárias.²⁵



Esquema 1.2 Reação de empregada por Morita, uso de tricicloexilfosfina como catalisador.

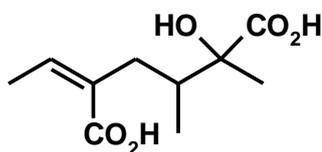
A reação de MBH foi definida como uma reação que resulta na formação de uma ligação carbono-carbono entre a posição α de um alceno ativado e um eletrófilo contendo um carbono sp^2 deficiente de elétrons sobre a influência de um catalisador,

particularmente aminas terciárias, tendo como produto moléculas polifuncionalizadas.²⁶ Recentemente, essa reação foi também definida como uma combinação “one pot” das reações de Michael, aldol (Michael ou alquilação) e eliminação de maneira sucessiva. Sendo assim, essa é uma reação com três componentes envolvidos na formação da ligação carbono-carbono, a posição α do alceno ativado, o eletrófilo e o catalisador.²⁷

Além disso, é uma reação que atende muito bem os requisitos para se desenvolver uma estratégia sintética eficiente, uma vez que ela apresenta as seguintes características experimentais:²⁸

- ✦ Na maioria dos casos, não há necessidade de solventes. Quando são necessários, os mais usados são: metanol, diclorometano, tetraidrofurano e dioxana, sem tratamento prévio, ou secagem. A água também é utilizada quando o aldeído é solúvel;
- ✦ Temperatura: a maioria das reações ocorre à temperatura ambiente, sem que este fator afete a seletividade da reação, no caso da versão assimétrica;
- ✦ Atmosfera: também não há necessidade de atmosfera inerte, sendo recomendada apenas a troca de atmosfera quando o aldeído é muito sensível ao oxigênio atmosférico;
- ✦ No caso de necessidade de ultrassom, equipamentos simples do tipo *Cleaner*, utilizados na limpeza de instrumentos, funcionam bem, e para irradiação microondas, um equipamento doméstico é suficiente;
- ✦ Escala: pode variar de 1 mmol até 0,5 mol;
- ✦ Catalisador: utilizado na proporção de 10 a 30%, podendo ser recuperado.
- ✦ Rendimentos químicos: embora não sejam muito altos (~70%), na maioria dos casos o aldeído é recuperado quase quantitativamente, podendo ser reciclado. Os adutos costumam ser estáveis frente às técnicas rotineiras de purificação, como por exemplo, coluna cromatográfica à pressão normal ou reduzida;
- ✦ Considerada como química verde, uma vez que todos os átomos dos reagentes se encontram incorporados ao produto, portanto, com total economia de átomos.

Apesar de ser conhecida desde 1972, foi apenas dez anos depois, em 1982, que se fez uma das primeiras aplicações desta reação para a síntese de moléculas provenientes de produtos naturais, quando Drewes e Emslie²⁹ utilizaram um aduto de Baylis-Hillman como intermediário sintético para a síntese do ácido integerrinécico (Figura 1.28), um monoterpreno de origem natural encontrado em várias espécies de plantas, como por exemplo, *Senecio jacobaea*. O ácido integerrinécico constitui uma porção ácida de vários alcalóides pirrolizidínicos encontrado na natureza. No ano seguinte, em 1983, Hoffmann e Rabe³⁰ publicaram a síntese racêmica de outro composto proveniente de produtos naturais, o ácido mikanécico, que é um monoterpreno dicarboxilado encontrado em alcalóides de espécies de *Senecio sp.* (família Asteraceae).



Ác. Integerrinécico

Figura 1.28 Estrutura química do ácido integerrinécico.

A cada ano, o crescente número de artigos publicados sobre metodologias e aplicações da reação de MBH enriquece o tema. Na tabela 1 podemos perceber o aumento significativo do número de publicações sobre a reação entre os anos de 2001 e 2010 em relação aos anos de 1991 e 2000.

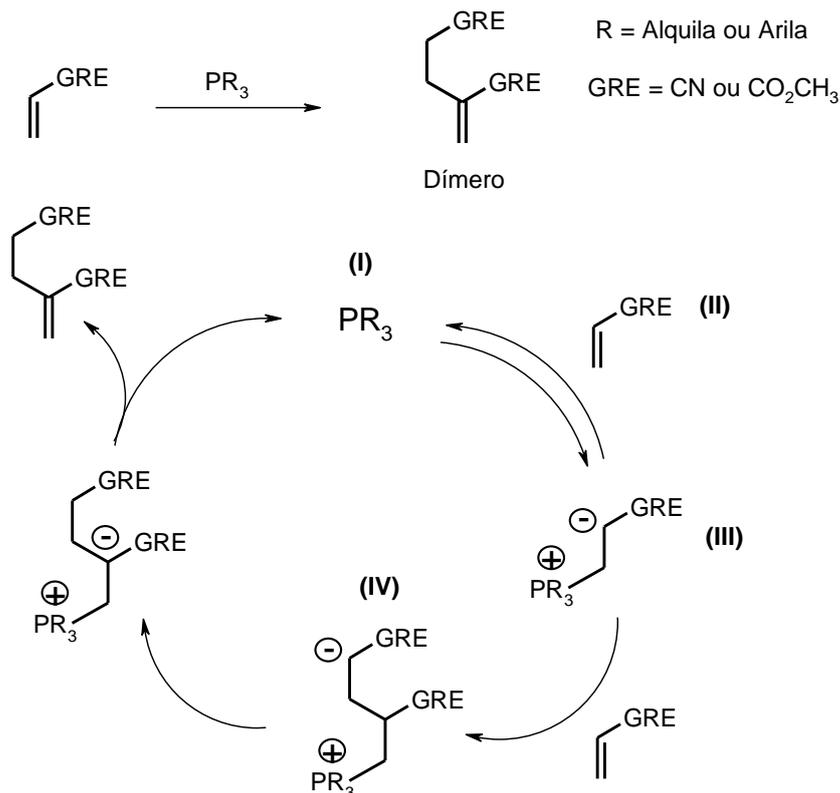
Tabela 1.1 Número de publicações sobre a reação de MBH de 1991 a 2010.

Ano	Nº de Publicações	Ano	Nº de Publicações
1991	3	2001	94
1992	7	2002	135
1993	10	2003	117
1994	13	2004	158
1995	13	2005	168
1996	11	2006	212
1997	14	2007	232
1998	34	2008	206
1999	43	2009	240
2000	55	2010	185

Fonte: SciFinder (Chemical Abstract), acessado em 15 de outubro de 2010.

1.3.1 Propostas e aspectos mecanísticos da reação

Como dito, a reação de MBH utilizando fosfinas como catalisador é conhecida desde 1968, entretanto, é importante perceber que em 1963, Rauhut e Currier²⁶, descreveram a dimerização de alcenos ativados catalisada por fosfinas (Esquema 1.3). Talvez tenha sido a partir desta patente que Morita percebeu a possibilidade da construção de novas moléculas utilizando um aldeído como eletrófilo.



Esquema 1.3 Dimerização de Rauhut e Currier utilizando alcenos ativados.

A reação descrita por Rauhut e Currier envolve uma adição, do tipo Michael, da fosfina (I) ao sistema α,β -insaturado (II), gerando um *zwitterion* (III). Segue-se então uma nova adição de Michael entre a posição α ao GRE do *zwitterion* e a posição β de um novo alceno ativado, gerando um novo *zwitterion* (IV), que sofre um prototropismo seguido de eliminação para liberar a fosfina e formar o dímero.³²

Em 1983, com a publicação de Hoffmann e Rabe,³⁰ as propostas mecanísticas da reação de MBH ganham espaço entre as publicações sobre o tema. Neste trabalho, os autores propõem dois estados conformacionais (2 e 3) possíveis para o *zwitterion* (1), antes da eliminação do DABCO.

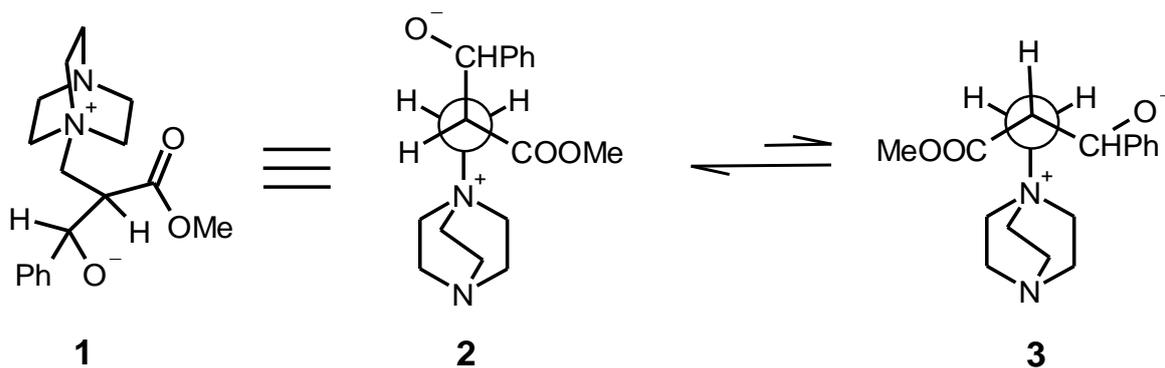
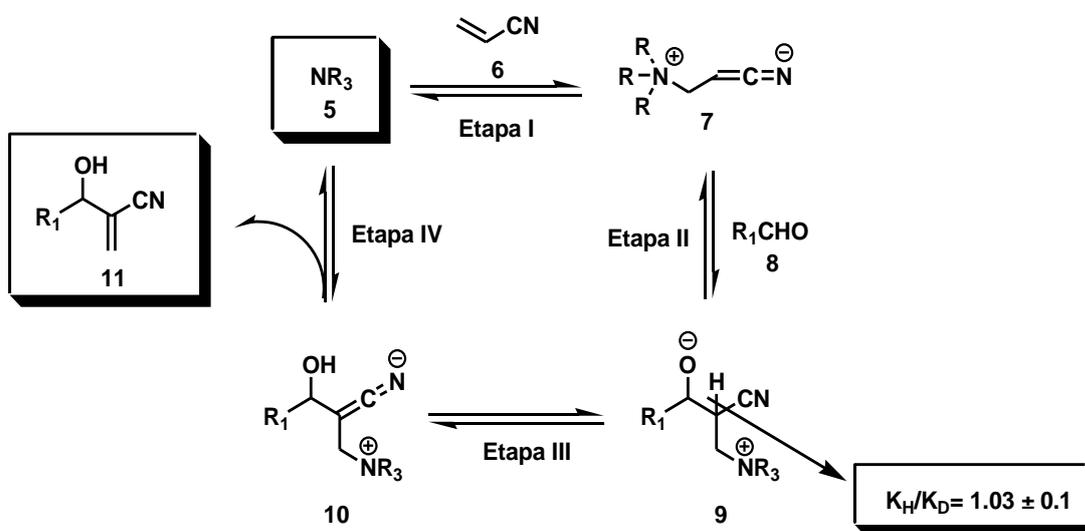


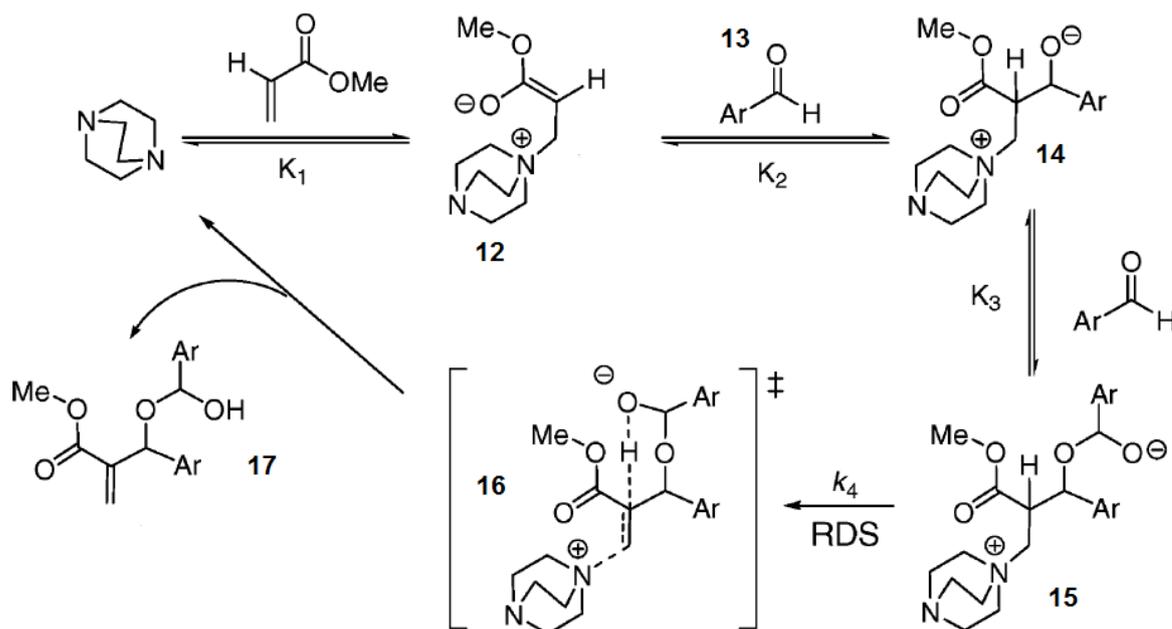
Figura 1.29 Conformações propostas por Hoffmann e Rabe para o aduto antes da eliminação do DABCO.

A proposta mecanística de Hoffmann e Rabe foi acrescentada de dados cinéticos realizados por Hill e Isaacs³³ (Esquema 1.4). A primeira etapa da reação envolve uma adição de Michael da amina terciária (**5**) ao alceno ativado (**6**) gerando um intermediário zwitterionico (**7**). Em uma segunda etapa, ocorre uma adição aldólica de (**7**) ao aldeído (**8**) gerando um segundo intermediário zwitterionico (**9**). Numa terceira etapa há transferência de próton intramolecular de (**9**) formando (**10**). Numa quarta e última etapa ocorre a eliminação da amina terciária, devolvendo-a ao ciclo catalítico e gerando o aduto de MBH (**11**). Estudos cinéticos realizados por Hill e Isaacs ($k_H/k_D = 1.03 \pm 0.1$, usando acrilonitrila como acceptor de Michael para a reação de MBH), mostraram que a etapa determinante da velocidade da reação de Morita-Baylis-Hillman corresponde ao ataque nucleofílico do azaenolato (**7**) ao aldeído (**8**) (Etapa II).



Esquema 1.4 Primeiro ciclo catalítico proposto por Hoffmann/Hill e Isaacs para a reação de Morita-Baylis-Hillman.

Entretanto, em 2005, em estudo realizado pelo grupo de pesquisas liderado pelo McQuade, foi proposto um mecanismo envolvendo um estado de transição de seis membros formado por um intermediário do tipo hemiacetal (**16**). Eles demonstraram que em solventes apróticos a reação é de segunda ordem para o aldeído (**13**) (mostrando um efeito isotópico cinético significativo, $k_H/k_D = 5.2 \pm 0.6$ em DMSO) e de primeira ordem para o acrilato de metila e o DABCO³⁴. (Esquema 1.5).

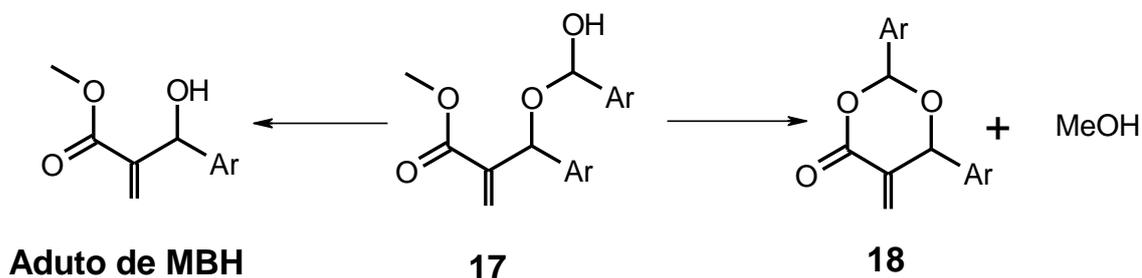


Esquema 1.5 Mecanismo proposto por McQuade, mostrando a formação do hemiacetal durante a transferência de próton no estado de transição.

Com base nessas observações, a proposta de McQuade agora apontava para a etapa de transferência de próton, sugerindo esta etapa (k_4) como determinante da velocidade da reação. A proposta de McQuade mostra as duas primeiras etapas como sendo as mesmas propostas por Hill e Isaacs. Na terceira etapa ocorre a adição a um segundo equivalente do aldeído (**13**) gerando um intermediário do tipo hemiacetal (**15**). A etapa determinante da reação (etapa lenta) seria a transferência de próton intramolecular que ocorre num estado de transição de seis membros (**16**), diferente do modelo proposto por Hill e Isaacs. Em seguida, ocorre a eliminação da amina e, subsequentemente, a formação do produto (**17**), que posteriormente é convertido no aduto de Morita-Baylis-Hillman.

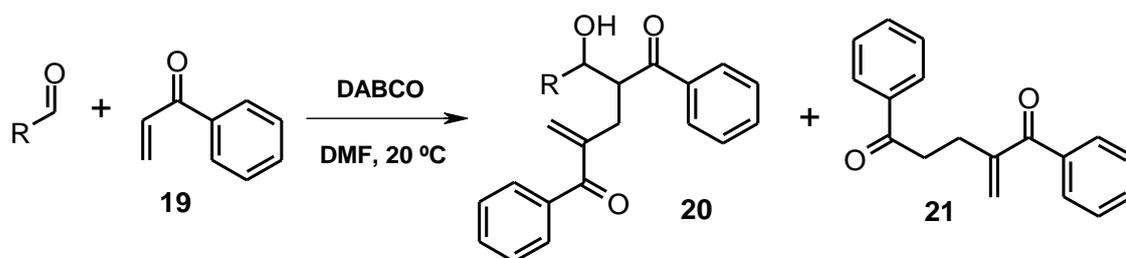
Além disso, a proposta de McQuade explica o fato de serem obtidas dioxanonas (**18**) como co-produtos da reação de Morita-Baylis-Hillman.³⁵⁻³⁹ Essas dioxanonas são formadas a partir de uma reação de transesterificação

intramolecular sofrida pelo intermediário (**17**), formando um anel de seis membros. (Esquema 1.6).



Esquema 1.6 Proposta de McQuade para a formação do Aduto de MBH e a dioxanona a partir do produto (**17**).

Outro ponto importante para se destacar, em relação ao desfavorecimento da reação, é quando a reação se processa com a utilização da Fenil vinil cetona (**19**) como o aceptor de Michael para o DABCO. Em trabalho realizado por Shi e colaboradores⁴⁰, os produtos formados na reação entre a Fenil vinil cetona e aldeídos aromáticos na presença de DABCO e DMF como solvente não foram os adutos esperados para a reação de MBH. Duas espécies de co-produtos foram formados, sendo um deles resultado de uma nova adição 1,4 de Michael ao aduto por outra molécula do alceno ativado (**20**), bem como o dímero do alceno ativado (**21**), como já havia sido verificado por Rauhut e Currier (Esquema 1.7).

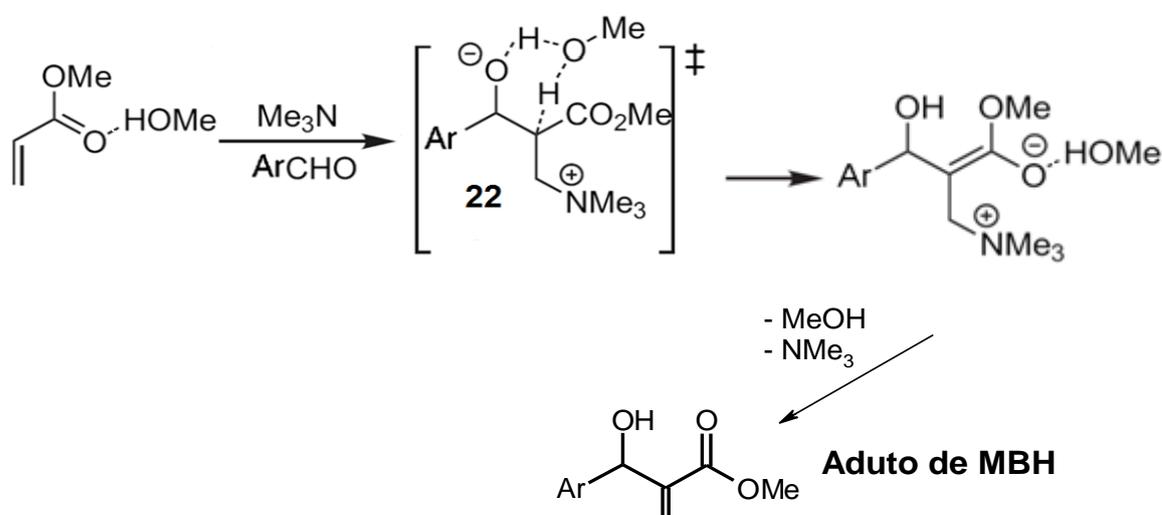


Esquema 1.7 Formação de co-produtos da reação de MBH utilizando Fenil vinil cetona como alceno ativado.

Recentemente, um detalhado estudo computacional envolvendo o mecanismo da reação de Morita-Baylis-Hillman foi feito por Aggarwal e colaboradores⁴¹. Durante o estudo eles observaram que em ausência de um solvente prótico, como o metanol, a desprotonação da posição alfa é a etapa determinante da velocidade e ocorre através de um estado de transição cíclico (**16**), como mostrado no Esquema 1.5, corroborando os dados experimentais obtidos por McQuade. Em contrapartida, quando a reação se processa utilizando metanol como solvente para a reação, eles

observaram um caminho reacional ligeiramente menos energético na etapa lenta, onde o metanol serve de carreador para a transferência do próton do carbono para o oxigênio (**22**), como mostrado no Esquema 1.8.

Neste estudo computacional foram calculadas as respectivas energias dos estados de transição com solvente aprótico e com metanol, chegando-se aos valores de 28,7 kcal/mol no primeiro caso (**16**) e 25,8 kcal/mol no segundo (**22**), que foi um pouco menos energético que o estado de transição proposto por McQuade.



Esquema 1.8 Transferência de próton realizada pelo metanol para a formação do aduto de MBH.

Em 2009, um estudo realizado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), coordenado pelos professores Fernando Coelho e Marcos Eberlin⁴², investigou o mecanismo da reação de MBH utilizando como ferramenta de análise a técnica de espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (ESI-MS). A utilização da técnica permitiu aos pesquisadores a possibilidade de caracterizar intermediários importantes da reação de MBH. Por ser rápida e de alta sensibilidade, a técnica de ESI-MS permitiu que intermediários sintéticos da reação, com curta duração de formação, fossem transferidos de maneira eficiente da solução de reação para a fase gasosa. A técnica utilizada pelos autores proporcionou “fotografias” instantâneas e coerentes da composição iônica de cada solução de reação analisada, funcionando assim como um interessante método de caracterização de íons (“pescador de íons”). A técnica de ESI-MS mostrou-se uma ferramenta importante para a solução de estudos mecanísticos e suas proposições.

Utilizando acrilato de metila e benzaldeído como reagentes e o DABCO como catalisador, os pesquisadores observaram que na reação sem solvente, portanto sem fonte de prótons, o intermediário proposto por McQuade (**16**) foi atribuído ao íon de razão massa carga (m/z) 433, em uma análise feita 10 minutos após o início da reação (Figura 1.30). A estrutura do íon m/z 433 foi então caracterizada através da análise dos íons filhos pela técnica ESI-MS/MS.

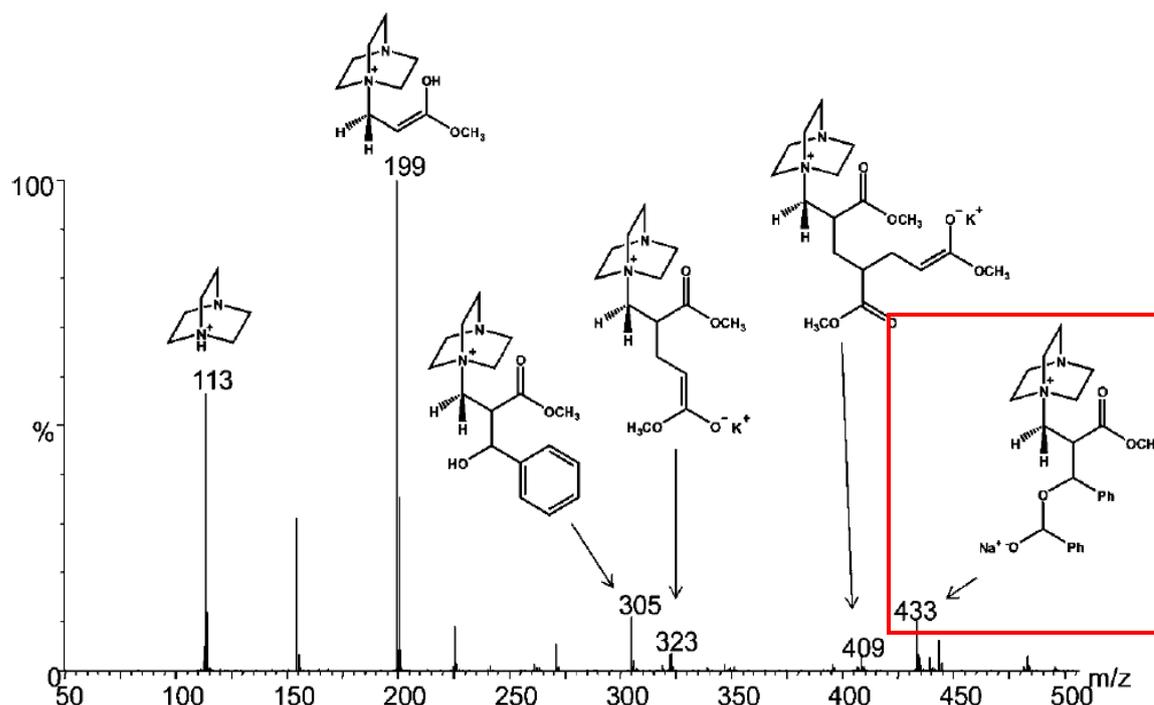


Figura 1.30 Espectro de massas (ESI-MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) após 10 minutos de reação.

Dando continuidade ao estudo mecanístico e considerando a proposta de Aggarwal, a reação foi repetida utilizando metanol como solvente. Logo após a mistura dos reagentes, uma alíquota foi submetida à técnica de ESI-MS, sendo um novo íon, de razão massa carga m/z 337, interceptado e caracterizado via ESI-MS/MS (Figura 1.31). O íon perde metanol para fornecer o fragmento m/z 305, o que corrobora com os dados teóricos de Aggarwal para a formação do intermediário **22**.

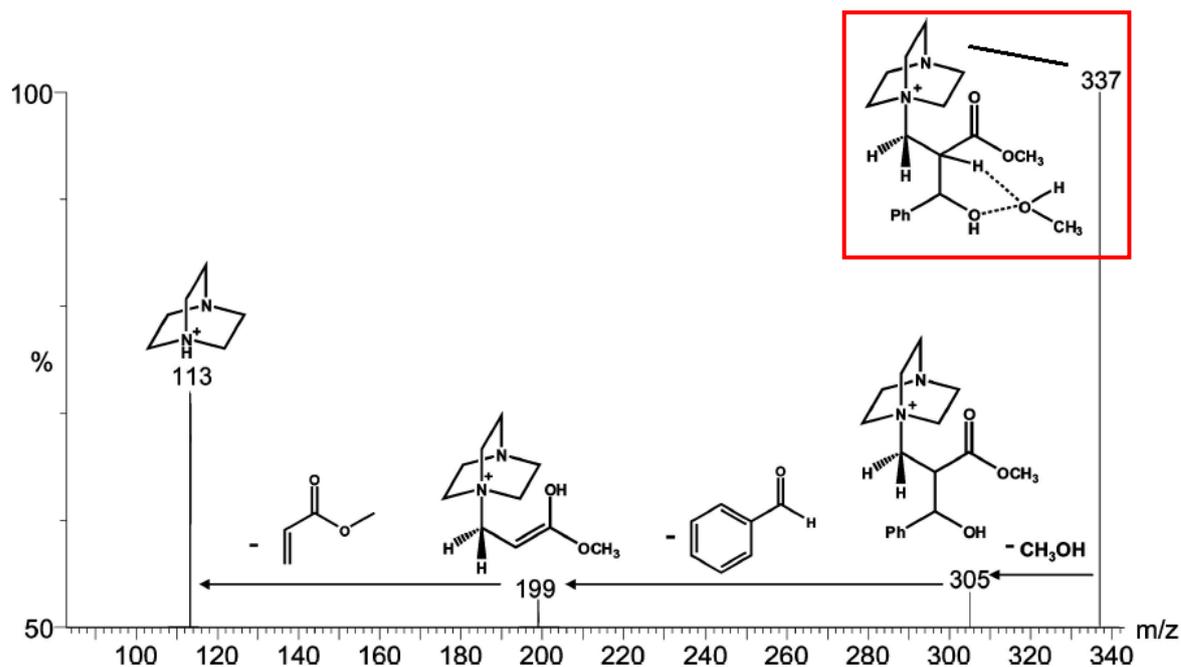


Figura 1.31 Espectro de massas (ESI-MS/MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) e metanol como solvente.

As conclusões dos autores foram que caracterização estrutural dos intermediários-chave exemplifica o complexo equilíbrio que acontece durante as reações de MBH. A interceptação dos intermediários **16** e **22** confirma a natureza dualística da etapa lenta de transferência de próton. Estes resultados podem também ajudar a desenvolver versões gerais assimétricas da reação de MBH, que poderão considerar todos os principais equilíbrios, e usar um rápido e eficiente transferidor de prótons.

1.3.2 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e atividade biológica

A partir da publicação de Drewes e Emslie²⁹, em 1982, iniciou-se o interesse pelos adutos de MBH como intermediários sintéticos pelos químicos. Vários produtos naturais e moléculas de interesse biológico foram sintetizadas a partir de adutos ou utilizando a reação de MBH como etapa chave para a síntese de um composto biologicamente importante.⁴³⁻⁴⁷

Entretanto, adutos simples de MBH, oriundos da reação entre um alceno ativado e diversos aldeídos aromáticos, só foram diretamente bioavaliados três décadas depois da reação realizada por Morita, em 1999. No trabalho realizado por

Kundu e colaboradores,⁴⁸ os adutos de MBH **23** e **24** foram os que mostraram uma alta atividade contra *Plasmodium falciparum*, o protozoário causador da malária.

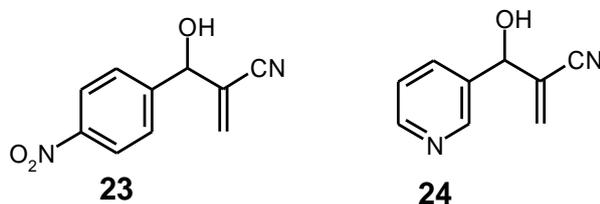


Figura 1.32 Adutos de MBH com maior atividade contra *Plasmodium falciparum* testados por Kundu.

Já no ano de 2005, Narender e colaboradores também sintetizaram e testaram alguns adutos de MBH, a partir da reação de acrilonitrila e acrilato de metila com 2-cloronicotinaldeídos, em cepas de *P. falciparum*.⁴⁹ No total foram seis adutos (**25**, **26**, **27**, **28**, **29** e **30**) sintetizados e testados, todos apresentaram atividade antimalárica, sendo que três deles (**26**, **27** e **29**) apresentaram significativa atividade antimalárica contra as cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina.

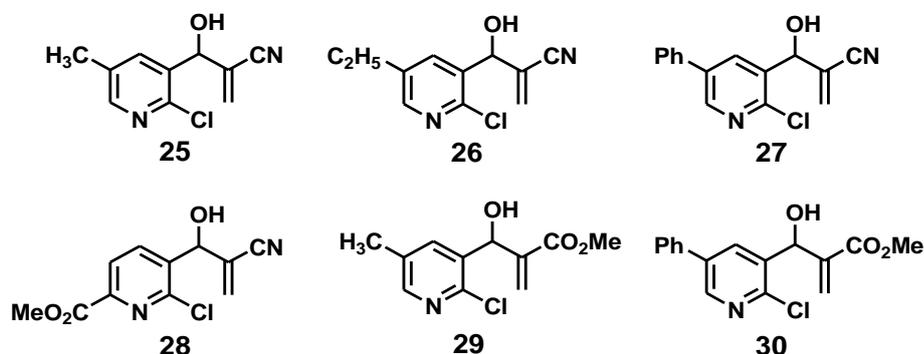


Figura 1.33 Adutos de MBH com atividade antimalárica testados por Narender.

Já em 2006, Narender e colaboradores utilizaram alguns adutos acetilados, derivados dos 2-cloronicotinaldeídos, para a síntese de quinolinas com atividade antimicrobiana.⁵⁰

Também em 2006, Vasconcellos e colaboradores publicam o primeiro artigo brasileiro relacionando adutos de MBH (sintetizados a partir da reação do acrilato de metila e acrilonitrila com aldeídos aromáticos) com atividade biológica, no caso, atividade moluscicida contra o *Biomphalaria glabrata*, um caramujo de água doce que serve de hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, helminto

trematódeo causador da esquistossomose. A Figura 1.34 apresenta as estruturas químicas dos adutos sintetizados e bioavaliados durante o trabalho.⁵¹

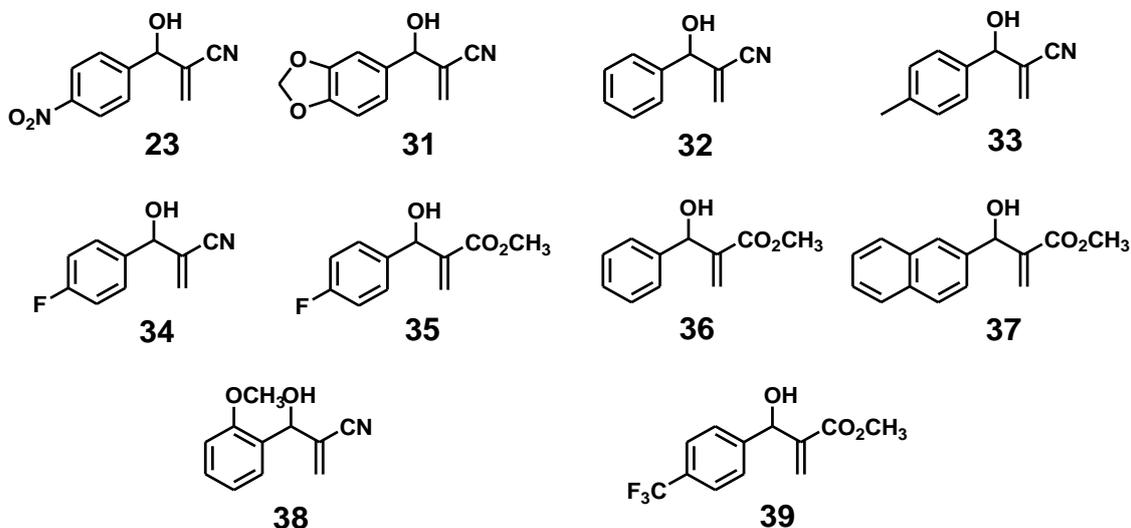


Figura 1.34 Adutos de MBH com atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata*.

Ainda em 2006, Kohn e colaboradores⁵² investigaram e relataram a atividade antiproliferativa que alguns adutos de MBH (da reação de acrilato de metila com aldeídos aromáticos e alifáticos) apresentaram sobre linhagens de células tumorais humanas. Neste trabalho, os resultados apontaram para uma relação estrutura-atividade significativa dos adutos que apresentava uma porção aromática, substituída com grupos retiradores de elétrons em relação aos aromáticos com grupos doadores de elétrons e derivados de aldeídos alifáticos.

Dando continuidade aos trabalhos de investigação da atividade biológica dos adutos de MBH oriundos das reações entre acrilonitrila e acrilato de metila com aldeídos aromáticos, Vasconcelos e colaboradores descreveram em 2007, pela primeira vez, a atividade leishmanicida *in vitro* de dezesseis adutos de MBH contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis*.⁵³ Estes adutos apresentaram alta atividade leishmanicida e baixa toxicidade em macrófagos quando comparada com a droga de referência Pentostam[®]. Este trabalho motivou o grupo de pesquisas na busca de alternativas terapêuticas para o problema das doenças negligenciadas no Brasil, principalmente a Leishmaniose, através de síntese e da bioavaliação de adutos de MBH contra espécies de *Leishmania*.

Em 2009, Vasconcellos e colaboradores⁵⁴ relataram a forte atividade, *in vitro*, de sete adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman (da reação da acrilonitrila com sete aldeídos aromáticos) contra a forma promastigota de *L. chagasi*, a principal espécie causadora de Leishmaniose Visceral no Brasil. Sendo mais um trabalho importante do referido grupo de pesquisas. Também em 2009, no mesmo grupo, dezesseis adutos de MBH foram sintetizados utilizando como estratégia o bioisosterismo clássico. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da lipofilicidade na atividade leishmanicida dos adutos. Foram testados os adutos sintetizados nas reações de MBH do acrilato de propila e do acrilato de 2-hidroxieta com oito aldeídos aromáticos, com os compostos **40** e **41** apresentando maior atividade contra *Leishmania amazonensis*, sendo o primeiro com o melhor índice terapêutico.⁵⁵

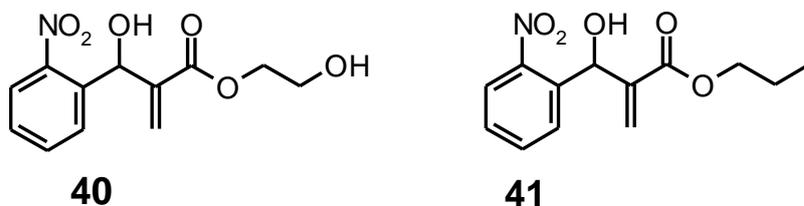
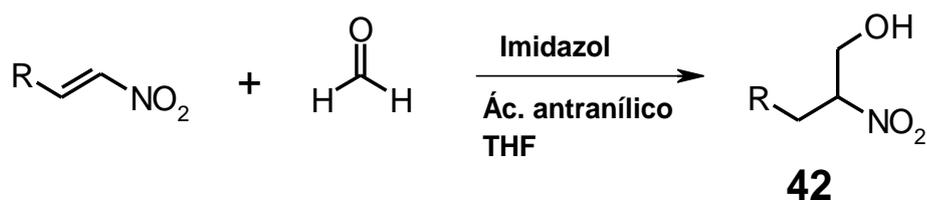


Figura 1.35 Aduto de MBH com maior atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* e seu bioisóstero não clássico.

Também em 2009, Mohan e colaboradores⁵⁶ relataram a síntese de onze adutos de MBH (**42**) a partir da reação de nitroalcenos aromáticos conjugados com formaldeído, utilizando imidazol como catalisador. Os adutos obtidos no trabalho avaliaram a potencial atividade anticâncer das moléculas através da inibição da proliferação de células, tendo como alvo molecular os microtúbulos celulares durante a divisão mitótica. No Esquema 1.9 está a reação geral para a obtenção dos adutos de MBH avaliados no trabalho de Mohan.



R = aromático ou heteroaromático

Esquema 1.9 Esquema geral da reação de MBH entre nitroalcenos aromáticos conjugados e formaldeído.

Em 2010, dois trabalhos envolvendo eficiência na síntese e avaliação biológica de adutos de MBH (proveniente da reação da acrilonitrila com aldeídos aromáticos e do acrilato de metila com aldeídos aromáticos) foram realizados por Vasconcellos e colaboradores. Um dos trabalhos enfoca a atividade dos adutos aromáticos contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*⁵⁷ (causador da doença de Chagas) e outro com resultados para a atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*.⁵⁸ É importante ressaltar que o grupo vem realizando estudos sobre a potencial aplicação dos adutos de MBH derivados de aldeídos aromáticos e alcenos ativados para o combate de doenças negligenciadas. O grande interesse pelos adutos consiste principalmente por serem sintetizados em apenas uma etapa reacional e nos resultados que eles vêm apresentando nos testes feitos com os agentes causadores dessas doenças. Entretanto, uma metodologia e condições únicas para a síntese de compostos ainda está longe de ser elaborada, visto que as particularidades inerentes de reagentes diversos e solventes utilizados nas metodologias influenciam no mecanismo como também na formação dos produtos desejados na reação.

1.4 A Química Medicinal

A Química Medicinal, em sua essência, é tão antiga quanto a Química e as Ciências Médicas. As bases e seus conceitos antigos surgem na Grécia, com Hipócrates (chamado de o Pai da Medicina), época em que de maneira rústica, mas de grande pensamento filosófico, tentava-se entender a relação entre as doenças e a cura promovida por certos tipos de materiais, geralmente as plantas ditas medicinais. Destacam-se também Claudius Galenus, em Roma, e Paracelso na Idade Média.⁵⁹

É importante reconhecer que a Química Medicinal é uma disciplina de caráter híbrido, inter e multidisciplinar. Conhecimentos de várias disciplinas como biofísica, biologia molecular, bioquímica, clínica médica, físico-química, fisiologia, neurobiologia, patologia, química biológica, química inorgânica, química orgânica e química quântica são necessários para a formação e atuação dos estudos em Química Medicinal.

Segundo as recomendações de 1998 da IUPAC, a Química Medicinal pode ser definida como: A disciplina com base na Química que também envolve aspectos das ciências biológicas, médicas e farmacêuticas. Ela ocupa-se com a criação, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, a interpretação do seu mecanismo de ação em nível molecular e a construção de uma relação estrutura-atividade.⁶⁰

Um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo. Entende-se por descoberta a etapa destinada à eleição do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia. Nesta etapa, são utilizadas estratégias de modificação molecular clássicas da Química Medicinal como ferramentas para o planejamento de novas moléculas. Dentre os métodos de obtenção de novos fármacos, a modificação ou variação molecular, utilizando os conceitos de bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular, vem sendo a metodologia mais utilizada. Outra ferramenta que vem se mostrando bastante útil na descoberta de novas moléculas é o emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular e o QSAR.⁶¹

A etapa de otimização compreende o melhoramento da molécula protótipo, através de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas. Estas podem identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado. Todas essas informações visam o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil farmacocinético (**absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, ADMET**) e estabelecimento da SAR.⁶¹

A etapa de desenvolvimento do protótipo objetiva a otimização de suas propriedades ADMET e farmacêuticas (solubilidade, odor, sabor), de modo a viabilizar seu uso clínico em preparações farmacêuticas adequadas. O conhecimento do coeficiente de partição (Log P) e do pK_a são propriedades estruturais úteis e de extrema importância nesta etapa, uma vez que estão relacionadas ao padrão de estabilidade e absorção que os compostos em estudo poderão apresentar nos diferentes compartimentos biológicos.

Fazendo uma abordagem fisiológica em Química Medicinal, é importante destacar que uma vez comprovada a atividade farmacológica desejada por meio de

protocolos farmacológicos *in vivo*, tem-se um novo composto-protótipo (Figura 1.37),⁶² candidato a novo fármaco. Recentemente introduziu-se o termo “hit” para designar ligante ou análogo-ativo de baixa afinidade ou eficácia, respectivamente, representando uma etapa anterior à identificação do composto-protótipo.

O novo composto-protótipo pode ter sua eficácia otimizada por modificações estruturais subseqüentes, planejadas de forma a preservar as propriedades farmacocinéticas detectadas nos bioensaios *in vivo*. Uma vez otimizado o composto-protótipo identificado na série congênere bioativa e com comprovada ausência de toxicidade, tem-se uma nova entidade química, estruturalmente original, que pode ser submetida às fases de ensaios pré-clínicos e clínicos, resultando, finalmente, num novo fármaco. Para levar a termo e com sucesso esta missão, a Química Medicinal dispõe de diversas estratégias de planejamento molecular. Neste processo, embora a *intuição química* do químico medicinal contribua enormemente, identificar e preservar as sub-unidades farmacofóricas é essencial para o sucesso do desenho dos novos padrões estruturais pretendidos.⁶²

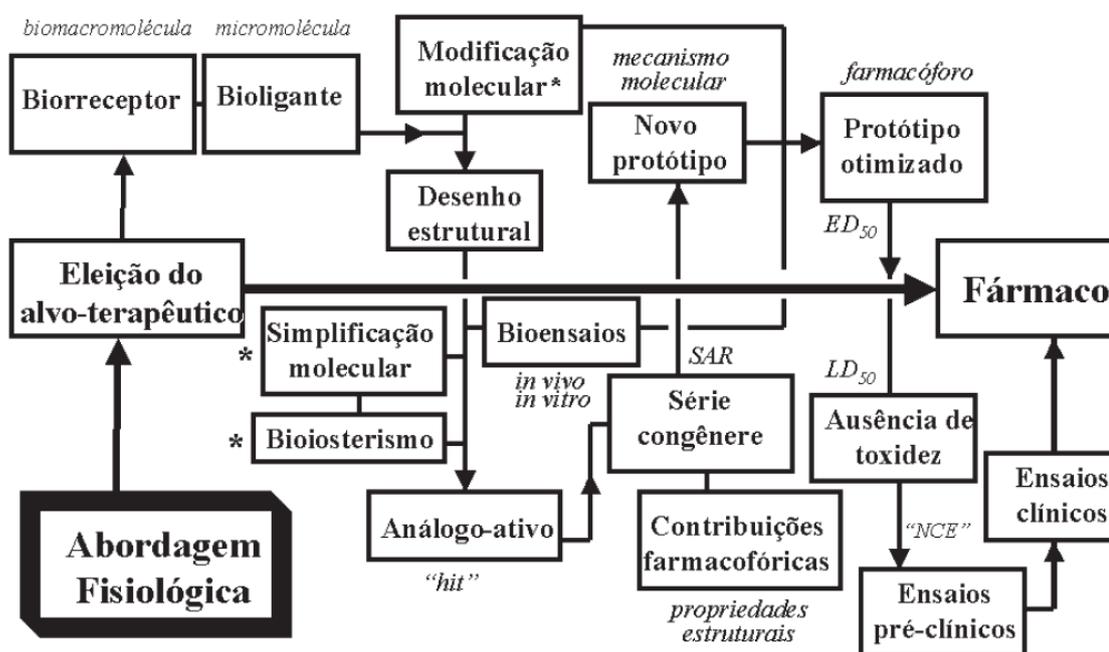


Figura 1.36 Etapas hierárquicas no processo de descoberta racional de fármacos, com base em uma abordagem fisiológica. (NCE = nova entidade química).⁶²

Dentro do contexto da Química Medicinal, a constante necessidade de novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade,

são desafios que impulsionam os pesquisadores a intensificar os estudos para a descoberta de novos fármacos.

1.5 A Hibridação Molecular

Uma ferramenta importante para a construção de um novo fármaco é a técnica de Hibridação Molecular (HM). Tal ferramenta é uma estratégia de planejamento racional de novos ligantes ou composto-protótipo, baseada no reconhecimento das subunidades farmacofóricas na estrutura química de dois ou mais compostos bioativos conhecidos, e que através de uma fusão dessas subunidades leva a uma nova entidade química híbrida, com uma nova arquitetura molecular que mantém as características das moléculas originais.⁶³

Possivelmente, a primeira utilização da ferramenta de HM aconteceu em 1883, quando o Professor von Nencki, na Suíça, sintetizou o salicilato de fenila através da esterificação do ácido salicílico e fenol, batizando o novo composto de salol (**43**). Em 1875, Carl Buss já havia relatado a utilização do ácido salicílico como antipirético, porém a sua palatabilidade não era das melhores. Na tentativa de melhorar esta propriedade organoléptica o Professor von Nencki preparou o salol, que se mostrou benéfico em combater a febre.⁶⁴ Uma vez que o salol sofria hidrólise no intestino delgado, liberava lentamente o ácido salicílico e também fenol, resultando em uma ação bactericida adicional por parte do fenol.

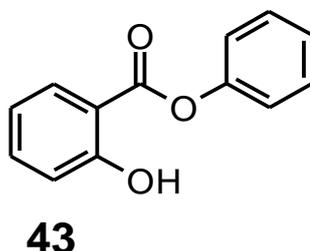


Figura 1.37 Estrutura química do salol.

Moléculas híbridas são de grande interesse farmacológico, podemos citar também como exemplo o acetilsalicilato de quinina (**44**), um fármaco híbrido que preserva tanto a atividade antimalárica como antipirética.⁶⁵

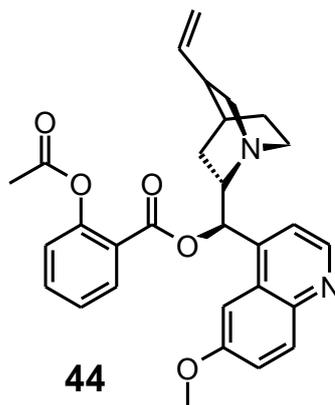


Figura 1.38 Estrutura química do acetilsalicilato de quinina.

Vários trabalhos sobre Química Medicinal, envolvendo particularmente a HM, foram publicados por diversos grupos no mundo. No Brasil alguns grupos se destacam na pesquisa, como os da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), que recentemente publicou uma revisão sobre o tema.⁶³

Em 2006, um interessante trabalho sobre HM foi publicado, com o intuito de criar novas entidades químicas que apresentassem tanto uma atividade antipirética como antiinflamatória, sem provocar os danos gastrointestinais conhecidos que os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) causam, como as úlceras estomacais.⁶⁶

O objetivo do trabalho era sintetizar e testar uma série de novas entidades químicas provenientes da HM do *p*-aminofenol (**45**) com vários AINES possuindo grupos carboxílicos ácidos, como o Ibuprofeno, o Cetorolac, o Cetoprofeno, entre outros (Figura 1.40).

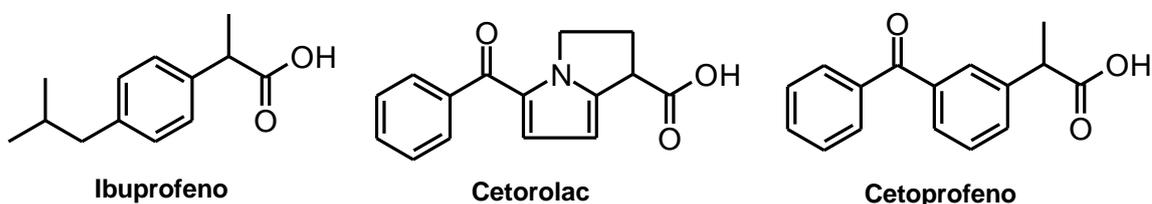
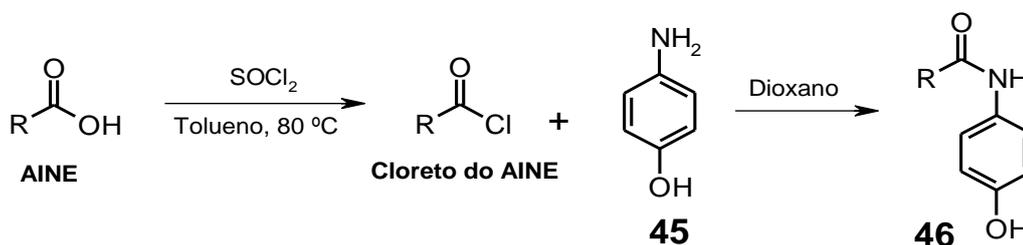


Figura 1.39 Estrutura química dos AINES ácidos: Ibuprofeno, Cetorolac e Cetoprofeno.

A estratégia de síntese dos autores foi bastante simples. Inicialmente os AINES ácidos eram transformados em cloretos dos respectivos ácidos, utilizando cloreto de tionila e em uma segunda etapa, adicionou-se o *p*-aminofenol (**45**) para a

obtenção das amidas (**46**) através de uma reação de Schotten-Baumann (Esquema 1.10).



Esquema 1.10 Preparação das novas entidades química híbridas entre AINES e o *p*-aminofenol.

Apesar de baixos rendimentos reacionais, os autores tinham os seguintes objetivos com o trabalho:

- ✦ Proteger o grupo carboxílico ácido do AINE, transformando-o numa amida, resistente ao processo de hidrólise em pH fisiológico, de modo a diminuir a irritação gástrica;
- ✦ Tentar obter um produto com maior seletividade pela enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), prevenindo o efeito ulcerogênico dos AINES;
- ✦ Adicionar ao composto híbrido a atividade antipirética, uma vez que incorporando o *p*-aminofenol ao novo composto, o mesmo terá, também, uma porção estruturalmente semelhante a do paracetamol, que é utilizado na farmacologia médica como antipirético.

Os resultados da avaliação *in vitro* e *in vivo* dos compostos híbridos obtidos foram bastante promissores. Os novos compostos apresentaram boa atividade antiinflamatória e analgésica, não apresentaram potencial ulcerogênico estomacal, em relação aos AINES ácidos correspondentes estruturalmente. Todas as moléculas apresentaram também a atividade antipirética, e algumas delas se mostraram com uma atividade antipirética mais elevada do que o próprio paracetamol.

O que podemos perceber da HM é que ela se apresenta como uma ferramenta bastante versátil para a modificação estrutural de um composto-protótipo, no que diz respeito à otimização dos mesmos através de um incremento farmacofórico em sua arquitetura molecular. Esta ferramenta pode nos fornecer novas classes de fármacos mais seletivos e mais potentes na forma de derivados híbridos, com uma possível perspectiva de diminuição dos efeitos colaterais ou

adversos. Sendo assim, as moléculas híbridas possuem a habilidade de, utilizando dois compostos com atividades distintas e farmacóforos diferentes, gerar novas drogas com ações farmacológicas duais, como por exemplo, antipirética e antiinflamatória, antimicrobiana e analgésica, antitussígena e expectorante, antitumoral e analgésica, antimalárica e antipirética ou, porque não, leishmanicida e antiinflamatória.

1.5.1 A hibridação molecular como ferramenta para o combate da leishmaniose

Com a resistência cada vez maior dos microorganismos frente às drogas usuais, o aparecimento de novas doenças e o número decrescente de drogas aprovadas para comercialização, a HM se apresenta como uma interessante proposta para tentar criar novos protótipos para drogas inovadoras.⁶³

No caso da leishmaniose, importantes contribuições foram feitas no sentido de entender o mecanismo da infecção pelo parasita. Estudos apontam para duas substâncias presentes na saliva do flebotomíneo que facilitam a infecção. Duas são as moléculas mais investigadas. A primeira é a Maxadilan, presente nas glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis*, que inibe as funções das células T e dos macrófagos em relação à produção de NO, H₂O₂ e à secreção de TNF- α e aumenta a secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂). A segunda é a Apyrase, molécula vasodilatadora mais abundante em *Phlebotomus papatasi*, que inibe as funções das células T e também a produção de citocinas Th1, aumentando a produção de IL-4 e ocasionando uma infecção exacerbada. A resposta imunológica humana também é influenciada pelas moléculas contidas na saliva dos flebotomíneos, como proteínas, enzimas e prostaglandinas. Além de serem anticoagulantes e vasodilatadores, atuam na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas.⁶⁷

Uma vez que a PGE₂ é uma molécula envolvida na participação da imunossupressão do hospedeiro, a secreção desta pode favorecer a instalação e a propagação do parasita durante a infecção. A biossíntese das prostaglandinas ocorre a partir do ácido araquidônico, numa etapa inicial de oxidação envolvendo a enzima ciclo-oxigenase (COX).⁶⁸

Sendo assim, a incorporação de uma porção proveniente de um inibidor da COX em um fármaco que já possui atividade leishmanicida, poderá dificultar a instalação e proliferação do parasita no hospedeiro vertebrado. No nosso presente trabalho, a incorporação de uma porção proveniente de um fármaco antiinflamatório, inibidor da COX, ao aduto de Morita-Baylis-Hillman poderá favorecer uma resposta de defesa mais eficaz por parte do hospedeiro, uma vez que a produção de PGE_2 será reduzida pela inibição da COX.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a síntese e a avaliação *in vitro* de oito adutos de Morita-Baylis-Hillman contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, fazendo-se uma relação estrutura atividade (SAR).

2.2 Objetivos Específicos

- ✦ Utilizar a Hibridação Molecular como ferramenta para a síntese dos adutos de MBH com potencial atividade Leishmanicida *in vitro*;
- ✦ Sintetizar o composto 2-acrilóiloxi benzoato de metila (salicilato de metila acrilado = **48**);
- ✦ Sintetizar adutos de MBH híbridos a partir do Salicilato de metila acrilado (**48**) e oito aldeídos aromáticos;
- ✦ Caracterizar os adutos de MBH híbridos pelas técnicas de espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C);
- ✦ Bioavaliar *in vitro* os adutos de MBH híbridos contra a forma promastigota dos protozoários *L. amazonensis* e *L. chagasi*.
- ✦ Analisar a relação estrutura-atividade biológica (SAR) dos adutos de MBH.

3. Estratégia Sintética

3. ESTRATÉGIA SINTÉTICA

Fazendo parte de um grupo de pesquisas que, além dos estudos de síntese orgânica, objetiva a busca por moléculas inovadoras para o combate de doenças negligenciadas, propusemos a síntese de novos adutos aromáticos de MBH utilizando a ferramenta de Hibridação Molecular para uma possível melhora na atividade Leishmanicida.

De acordo com as publicações sobre adutos de MBH derivados de ésteres acrílicos e aldeídos aromáticos que demonstraram atividade Leishmanicida^{53,55 e 58} *in vitro*, podemos perceber que todos os compostos são estruturalmente semelhantes, variando apenas a porção alcoólica proveniente do éster acrílico (Figura 3.1). O que pode ser inferido que a porção alcoólica proveniente do éster acrílico não exerce uma influência significativa na atividade Leishmanicida, não sendo então caracterizado como um grupo farmacofórico.

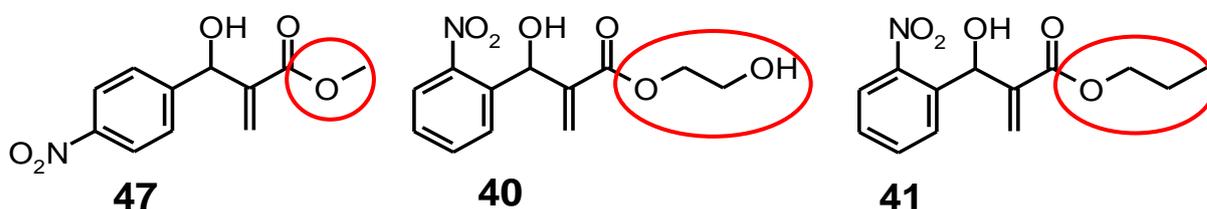


Figura 3.1 Adutos de MBH estruturalmente semelhantes com atividade Leishmanicida com a porção alcoólica do éster acrílico em destaque.

Sendo assim, podemos considerar que o grupo hidroxila, formado após a reação de MBH, bem como a dupla ligação conjugada ao grupo carbonílico do éster (aceptor de Michael) podem ter uma grande influência na atividade Leishmanicida destas moléculas, sendo os possíveis grupos farmacofóricos dos adutos citados.

Diante dos dados e resultados obtidos em nosso grupo de pesquisas, propusemos a síntese de novos adutos aromáticos de MBH a partir composto 2-acrilóiloxi benzoato de metila (**48**) e uma série de oito aldeídos aromáticos para a obtenção dos novos adutos (**49**, **50**, **51**, **52**, **53**, **54**, **55** e **56**), como mostra a Figura 3.2.

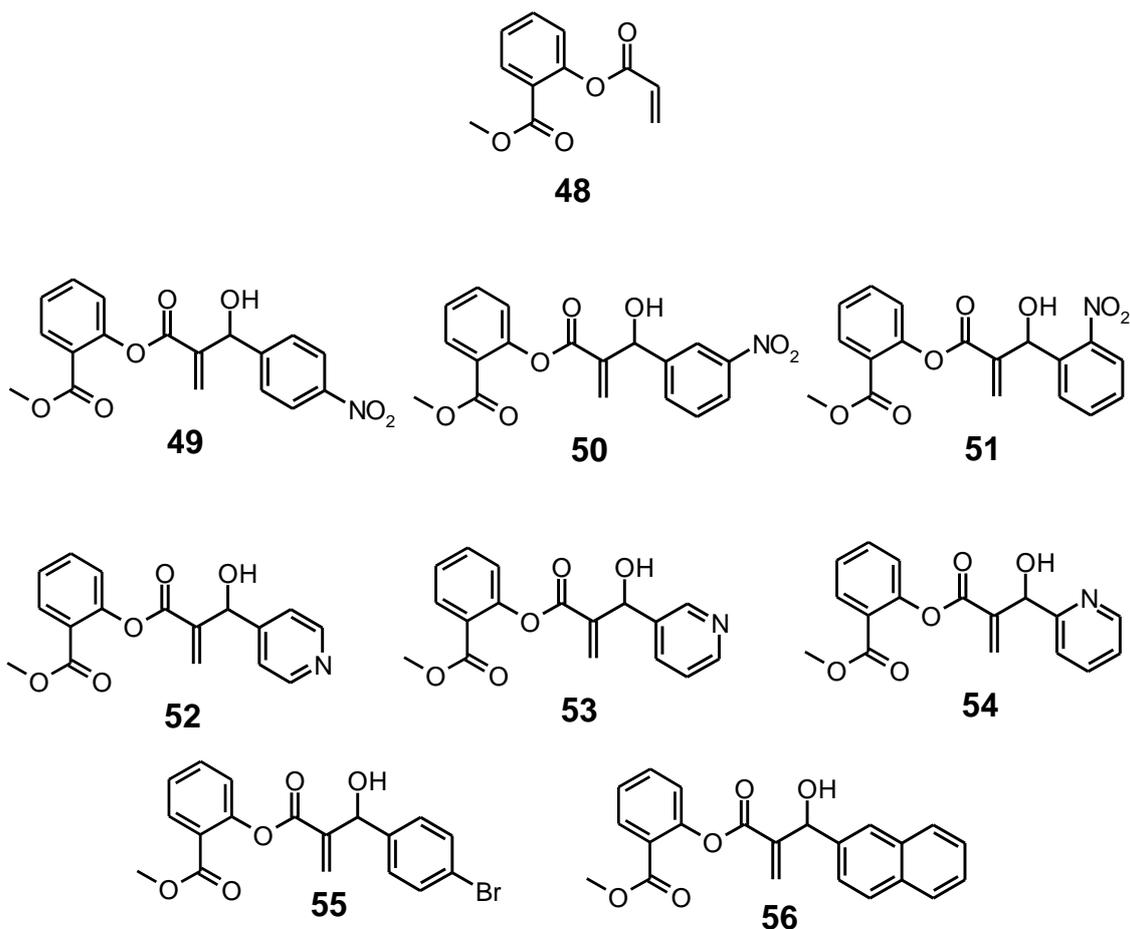


Figura 3.2 Adutos de MBH propostos neste trabalho.

Considerando uma análise retrossintética dos adutos de MBH propostos neste trabalho, podemos perceber que eles apresentam a porção do éster acrílico formada com um fenol no lugar de um álcool. Este fenol é na verdade o Salicilato de metila (**57**), um fármaco bastante conhecido em formulações farmacêuticas devido a sua atividade analgésica.⁶⁹

Na Figura 3.3 é mostrada a análise retrossintética dos adutos propostos neste trabalho. Como exemplo, mostramos a retrossíntese do aduto **49**, que pode ser obtido a partir da reação de Morita-Baylis-Hillman a partir do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (**48**) e o 4-nitrobenzaldeído. O composto **48**, por sua vez, pode ser obtido a partir da reação de esterificação do Salicilato de metila (**57**) com o cloreto de acrilóila.

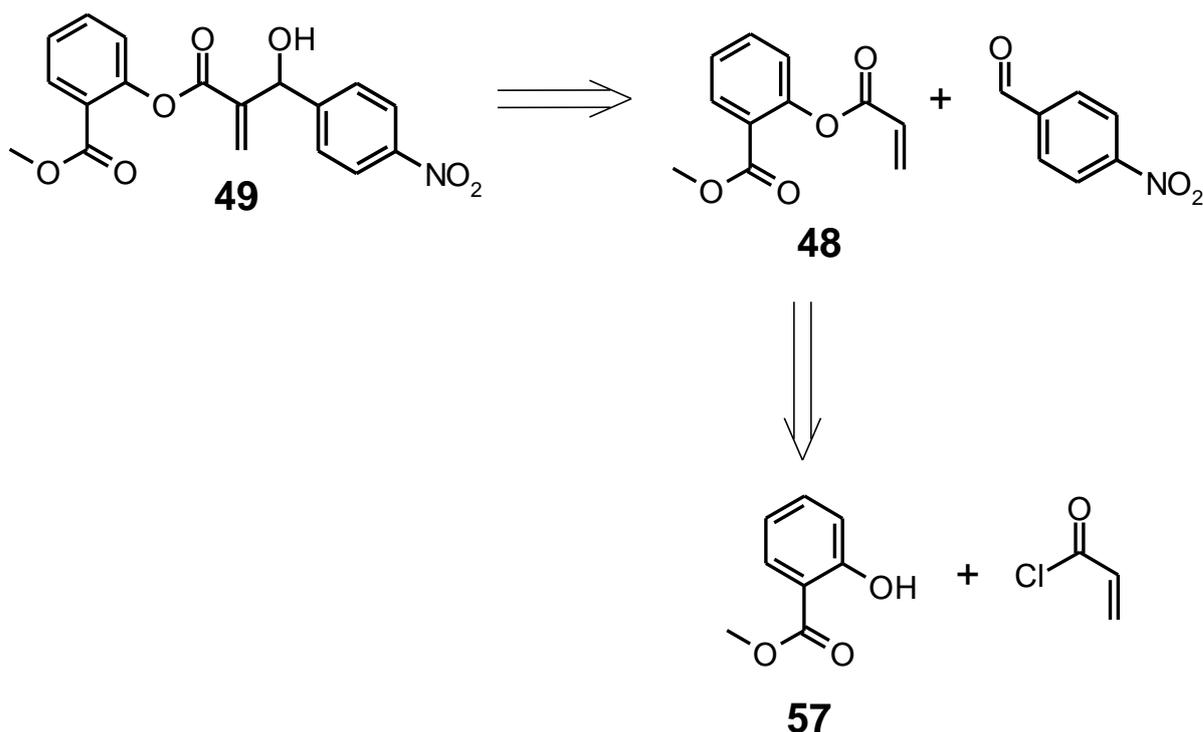


Figura 3.3 Análise retrossintética de um aduto de MBH proposto no trabalho.

A proposta sintética, com a obtenção dos adutos de MBH **49-56**, aborda três aspectos no que diz respeito à atividade Leishmanicida:

1. Porções importantes da estrutura química dos adutos de ésteres acrílicos já bioavaliados e com atividade Leishmanicida foram mantidas, de modo a preservar os possíveis grupos farmacofóricos;
2. A substituição de um álcool do éster acrílico pelo Salicilato de metila, uma molécula de função farmacológica conhecida, que poderá incrementar a atividade Leishmanicida dos novos adutos de MBH, reduzindo a biossíntese da PGE_2 através da inibição da COX, favorecendo a resposta imune por parte do hospedeiro vertebrado;
3. O aumento da lipofilicidade dos adutos em relação àqueles que possuíam uma porção alcoólica, facilitando a difusão através da membrana plasmática do parasita.

A lipofilicidade é definida pelo coeficiente de partição (P) de uma substância entre a fase aquosa e a fase orgânica ($P = C_{org}/C_{aq.}$). Os fármacos que apresentam maior Log P tendem a ultrapassar a bicamada lipídica da membrana plasmática, aumentando sua biodisponibilidade, podendo influenciar no seu efeito farmacológico,

que no caso de Leishmanicidas, acessar o citoplasma celular do parasita de maneira mais eficiente. Na Tabela 3.1 estão elencados os valores calculados dos coeficientes de partição dos respectivos adutos híbridos de MBH propostos neste trabalho.

Tabela 3.1 Adutos propostos neste trabalho e seus respectivos coeficientes de partição calculados.

Aduto híbrido de MBH	Log P calculado
49	2,24
50	2,24
51	2,24
52	1,79
53	1,79
54	1,79
55	4,12
56	2,73

Cálculos realizados com o programa ChemDraw®

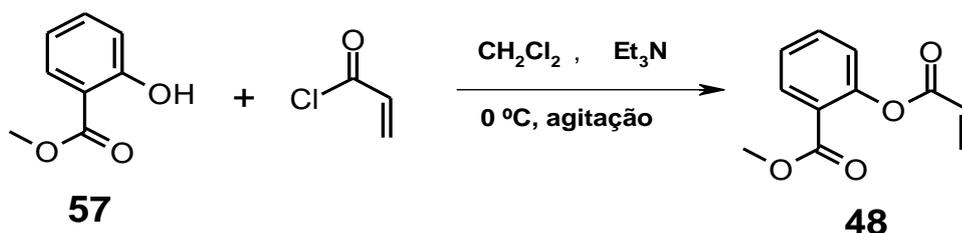
Por fim, as avaliações da atividade Leishmanicida foram realizadas no Laboratório de Leishmanioses, coordenado pela professora Dra. Márcia Rosa de Oliveira, pesquisadora do Departamento de Biologia Molecular da UFPB (DBM), que, em parceria com o nosso grupo de pesquisas, desenvolve trabalhos relacionados ao uso de novas drogas para avaliação da atividade leishmanicida. Com os resultados da atividade leishmanicida dos compostos, poderemos então procurar entender melhor a relação entre estrutura química e a atividade dos adutos propostos neste trabalho, bem como reforçar a hipótese dos possíveis grupos farmacofóricos contidos nas estruturas químicas dos adutos de MBH sintetizados, como também avaliar se a incorporação de uma porção farmacologicamente ativa, através de hibridação molecular, potencializará a atividade Leishmanicida.

4. Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação do 2-acriloiloxi benzoato de metila (48)

Inicialmente, realizamos a síntese do composto 2-acriloiloxibenzoato de metila (48) a partir de Salicilato de metila (57) e cloreto de acrílico comerciais. Para tanto utilizamos uma metodologia sintética descrita na literatura para a obtenção de fenóis acrilados.^{40,68} O Esquema 4.1 mostra as condições para a síntese do composto 48.



Esquema 4.1 Reação de esterificação do salicilato de metila para gerar o seu estér acrílico.

A reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) a cada meia hora. O tempo total da reação foi de duas horas, com um rendimento de 71% após a purificação do produto em cromatografia em coluna.

O produto se apresentou na forma de um óleo incolor, e a análise do seu espectro de infravermelho (Espectro 5) foi possível observar uma absorção em 1726 cm⁻¹, uma banda larga característica de estiramento de ligações C=O (carbonilas) de ésteres conjugados. No caso, a banda larga pode ser atribuída à sobreposição das duas bandas das respectivas carbonilas presentes na estrutura química do produto. Uma banda em 1631 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento da ligação dupla carbono-carbono (C=C) conjugado da porção acrílica, bem como as bandas em 1606 cm⁻¹ e 1452 cm⁻¹ pode ser atribuídas ao estiramento das ligações C=C do anel aromático. A ausência de uma banda larga em torno de 3200 cm⁻¹ confirma que a reação foi bem sucedida, uma vez que essa banda seria característica de estiramento de ligação O-H, presente no salicilato de metila.

Na análise do espectro de RMN¹H (Espectro 4) podemos observar três duplos dubletos em δ 6,02; 6,35 e 6,61 ppm; que são atribuídos aos hidrogênios da porção acrílica da molécula. Os valores de deslocamento químicos δ 6,02 (1H, $J = 1,8$ e 10,2Hz) e 6,61 (1H, $J = 1,8$ e 17,2Hz) podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados

ao carbono beta da ligação C=C, em relação ao hidrogênio da posição alfa, uma vez que os dois valores das constantes de acoplamento são característicos de hidrogênios de alcenos com duplas ligações terminais, sendo o primeiro valor (1,8Hz) atribuído ao acoplamento geminal entre os hidrogênios beta e os valores 10,2 e 17,2Hz atribuídos aos acoplamentos com os hidrogênios em posição *E* e *Z*, respectivamente. O sinal em δ 6,35 (1H, $J = 10,2$ e $17,2\text{Hz}$) apresentou valores de constantes de acoplamento iguais aos dois sinais anteriormente citados, confirmando assim suas configurações espaciais.

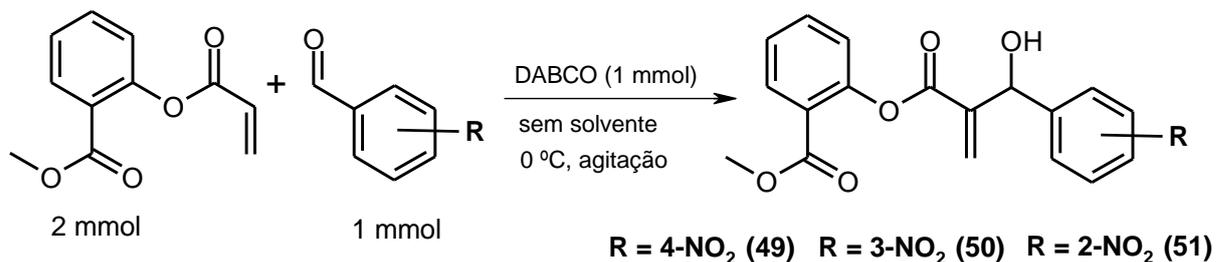
Através da análise do espectro de RMN¹³C (Espectro 2) foi possível observar três sinais que confirmaram a formação do produto da reação, são eles: δ 127,5; 132,7 e 164,5 ppm. Estes sinais foram atribuídos ao carbono alfa, do carbono beta e da carbonila da porção acrílica do produto, respectivamente.

4.2 Preparação dos Adutos Híbridos de MBH

Para a síntese dos adutos foram utilizados aldeídos aromáticos comerciais com bom grau de pureza. Inicialmente, foi realizada a síntese dos adutos em condições apróticas, de modo a favorecer a reação de acordo com a proposta de McQuade.³⁴ Uma vez que em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo⁵⁴, o tempo de reação foi bastante reduzido na preparação de adutos de MBH com atividade Leishmanicida, quando ela se processa a uma temperatura de 0 °C e com excesso do acceptor de Michael em condições apróticas, optou-se por realizar a síntese dos adutos **49-56** através de uma metodologia similar, acreditando ser uma boa alternativa para as reações.

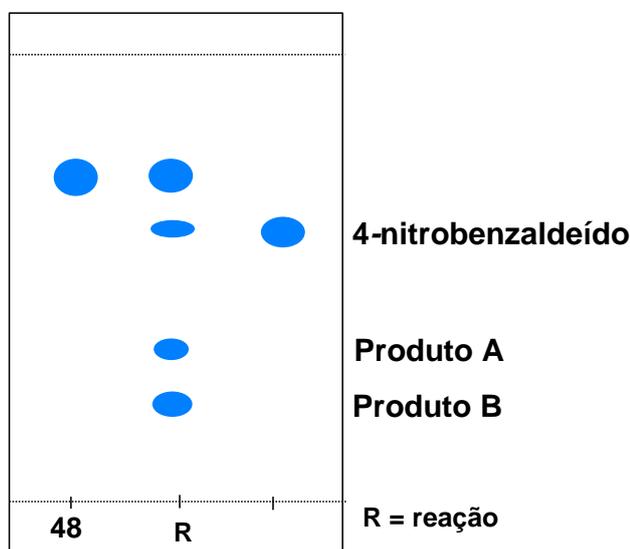
4.2.1 Preparação dos adutos **49**, **50** e **51**

Inicialmente, foi realizada a reação entre o 2-acriloiloxi benzoato de metila e o 4-nitrobenzaldeído. Não houve a necessidade de solvente, pois o aldeído dissolve-se quase por completo no excesso de acrilato.



Esquema 4.2 Reação de MBH entre o 2-acrilóiloxi benzoato de metila e nitro benzaldeídos.

A reação foi acompanhada por CCDA e após 3 horas de reação foi possível observar a formação de dois produtos majoritários em proporção de quase 1:1 (Produto A e Produto B). Também foi possível perceber através da CCDA que o aldeído havia sido bastante consumido como mostrado na Figura 4.1. A reação foi então interrompida para evitar a formação de outros produtos além do aduto desejado. Após isolamento por cromatografia em coluna, os dois produtos principais da reação foram analisados por RMN¹H e RMN¹³C.



Eluente: Acetato de etila/Hexano (3:7)

Figura 4.1 CCDA após 3 horas de reação do 4-nitrobenzaldeído com **48**.

O produto **A** foi identificado como sendo o aduto de MBH esperado para a reação (**49**). Após a análise do seu espectro de RMN¹H (Espectro 11) foi possível observar os seguintes sinais: dois singletos em δ 5,96 ppm e 6,65 ppm, atribuídos

aos hidrogênios da posição beta da dupla ligação proveniente do acrilato. A ausência de desdobramento de sinais e a impossibilidade de cálculo de suas constantes de acoplamento para os valores atribuídos aos hidrogênios correspondentes às posições *E* e *Z*, indicam a formação da ligação C-C através da reação de MBH. A presença de um dubleto em δ 5,79 ppm (1H, $J = 3,6\text{Hz}$), atribuído ao hidrogênio do carbono carbinólico, apresenta um valor de J característico de acoplamento com o hidrogênio da hidroxila. O que pode ser confirmado pelo aparecimento de um dubleto em δ 4,06 ppm (1H, $J = 4,0\text{Hz}$), atribuído ao hidrogênio da hidroxila formada pela reação de MBH.

Na análise do espectro de RMN¹³C (Espectro 9), dois sinais que são característicos para o grupo de adutos de MBH propostos neste trabalho, o primeiro é um sinal com deslocamento químico δ 71,94 ppm, atribuído ao carbono carbinólico formado e a ausência deste sinal indica a não formação do aduto. O segundo sinal importante de se destacar apresenta deslocamento químico δ 140,94 ppm, atribuído ao carbono alfa do sistema α,β -insaturado do acrilato.

Na análise dos espectros de RMN¹H do produto **B** (Espectros 7 e 8) foi possível observar dois dubletos δ 5,38 ppm (1H, $J = 1,4\text{Hz}$) e 6,69 ppm (1H, $J = 1,6\text{Hz}$) que pelos deslocamentos químicos e valores de constante de acoplamento atribuiu-se a dois hidrogênios vicinais de uma dupla ligação terminal, proveniente do sistema α,β -insaturado do acrilato. Foi possível observar também dois dubletos δ 7,61 ppm (2H, $J = 8,4\text{Hz}$) e 7,76 ppm (2H, $J = 8,4\text{Hz}$) e um duplo dubleto em δ 8,28 ppm (4H, $J = 1,8\text{Hz}$ e $9,0\text{Hz}$), de acordo com os deslocamentos químicos, as multiplicidades e pelos valores das constantes de acoplamento, atribuímos os respectivos sinais aos hidrogênios aromáticos do sistema AA'BB' proveniente do 4-nitrobenzaldeído. Entretanto, a multiplicidade dos hidrogênios aromáticos está numa proporção de dois equivalentes do aldeído para um equivalente dos hidrogênios do sistema α,β -insaturado do acrilato.

Durante a análise do espectro de RMN¹³C (Espectro 6) foi possível confirmar a presença de dois sistemas AA'BB', através da atribuição dos sinais δ 123,81 ppm e 124,24 ppm aos carbonos em posição *orto* ao grupo nitro do produto **B** e os sinais δ 127,40 ppm e 128,69 ppm aos carbonos em posição *meta* ao grupo nitro.

As características espectrais do produto **B**, associado ao fato da reação ter sido realizada em meio aprótico, levou-nos a comparar os dados espectrais obtidos com os já descritos na literatura³⁵⁻³⁹ para a dioxanona citada por McQuade em seu estudo mecanístico em meio aprótico.³⁴ Sendo assim, chegamos a estrutura de uma dioxanona formada por 1 equivalente de acrilato para dois equivalentes do aldeído. A Figura 4.2 mostra estrutura química da dioxanona formada.

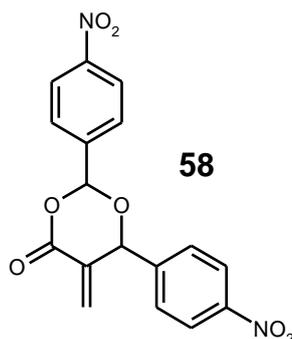


Figura 4.2 Estrutura química da dioxanona formada na reação entre o composto **48** e o 4-nitrobenzaldeído.

Na reação com o 3-nitrobenzaldeído, bem como o 2-nitrobenzaldeído, foi observado semelhante padrão cromatográfico na CCDA. As reações foram interrompidas e os produtos principais (os adutos de MBH) de cada reação foram isolados. Com isso, os rendimentos não foram satisfatórios utilizando esta metodologia para a reação com os aldeídos empregados. Os tempos e rendimentos das reações utilizando essa metodologia estão dispostos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Tempos de reação e rendimentos dos adutos **49**, **50** e **51** seguindo a metodologia inicial^a.

Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento
1	49	3 horas	27%
2	50	3 horas	15%
3	51	6 horas	26%

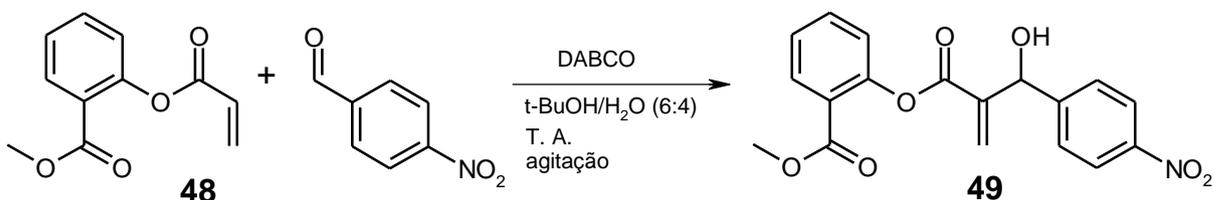
a. 2mmol de **48**, 1mmol de aldeído, 1mmol de DABCO, sem solvente e 0°C.

4.2.2 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos **49**, **50** e **51** utilizando uma mistura de terc-Butanol/Água como solvente prótico.

Foi então realizada uma tentativa de otimizar a reação de MBH para os compostos **49**, **50** e **51**. Inicialmente utilizou-se como reagentes o 4-nitrobenzaléido e o acrilato **48**. Entretanto, foi adicionado um solvente prótico à reação, considerando a proposta mecanística relatada por Aggarwal.⁴¹

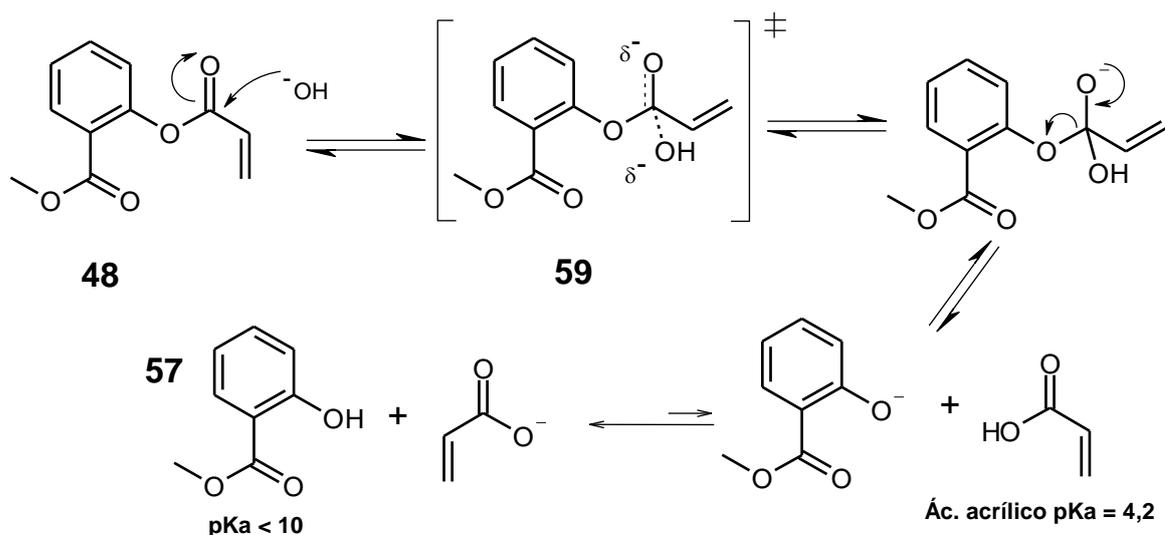
Como sistema solvente prótico, escolhemos uma mistura de terc-Butanol/Água (t-BuOH/H₂O) na proporção 6:4. Esta metodologia mostrou-se extremamente eficiente para a síntese do aduto de MBH **23**, com um tempo reacional de 20 minutos e rendimento quantitativo (>99%).⁷¹

Diante disso, a reação de preparação do aduto **48** foi feita com 2 mmol de **48**, 1 mmol do 4-nitrobenzaléido, 1 mmol de DABCO e 1 mL do sistema solvente (t-BuOH/H₂O) e à temperatura ambiente (T. A.), como descrito no Esquema 4.3.



Esquema 4.3 Reação de MBH entre o 2-acrilóiloxi benzoato de metila e o 4-nitrobenzaléido, utilizando solvente prótico (t-BuOH/H₂O).

Após trinta minutos de reação foi possível visualizar, por CCDA, que havia uma mínima quantidade do produto desejado. Após duas horas de reação, uma nova CCDA foi realizada e ao abrir o balão reacional pode-se sentir um odor característico do salicilato de metila. Após a realização da CCDA foi possível observar a formação do Salicilato de metila (comparando-se com o padrão), o consumo de quase todo o composto **48** e o pouco consumo do aldeído. Houve uma pequena formação do possível aduto, como mostrado na Figura 4.3.



Esquema 4.5 Mecanismo de reação de Hidrólise básica do acrilato **48**.

Observando o mecanismo da reação de hidrólise básica no Esquema 4.5 poderemos perceber que na primeira etapa ocorre o ataque nucleofílico do ânion hidroxila ao carbono carbonílico do éster acrílico, levando a um estado de transição carregado negativamente (**59**) e à subsequente formação de um intermediário tetraédrico. Numa segunda etapa temos uma eliminação, fragmentando o intermediário tetraédrico em ácido acrílico e o fenolato do salicilato de metila. Numa terceira e última etapa ocorre a reação ácido-base entre o fenolato e o ácido acrílico. Vale lembrar que o DABCO protonado (Esquema 4.4) também pode participar como doador de próton para o fenolato. A última etapa é altamente favorecida para a formação do salicilato de metila, devido a grande diferença de pK_a entre as espécies químicas.⁷³ Diante disso, podemos destacar que a hidrólise é favorecida no éster acrílico e não no éster metílico, nas condições da reação, devido à formação de uma espécie carregada que pode ser estabilizada por ressonância (o ânion fenolato), sendo assim, um caminho menos energético para ocorrer a hidrólise.

4.2.3 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos **49**, **50** e **51** utilizando uma metanol como solvente prótico

Outra tentativa de otimizar a reação de MBH entre o 4-nitrobenzaléido e o acrilato **48** foi realizada utilizando como solvente prótico o metanol, já descritos na

literatura como agente transferidor de prótons durante a etapa lenta da reação de MBH.^{41,42} Utilizamos uma metodologia semelhante para a reação realizada com o sistema solvente t-BuOH/H₂O (6:4), substituindo apenas este sistema solvente pelo metanol, adicionando 0,5 mL.

Após uma hora de reação, ao abrir o balão que continha a reação para analisar o comportamento da reação através de CCDA, foi possível perceber que o meio reacional apresentava odor característico do acrilato de metila. Considerou-se então a hipótese de uma provável solvólise realizada pelo metanol, através de uma reação de transesterificação. Para confirmarmos essa suspeita preparamos uma placa de CCDA e também aplicamos padrões do Salicilato de metila e do aduto **47** (vide Figura 3.1). O comportamento cromatográfico da reação está apresentado na Figura 4.4.

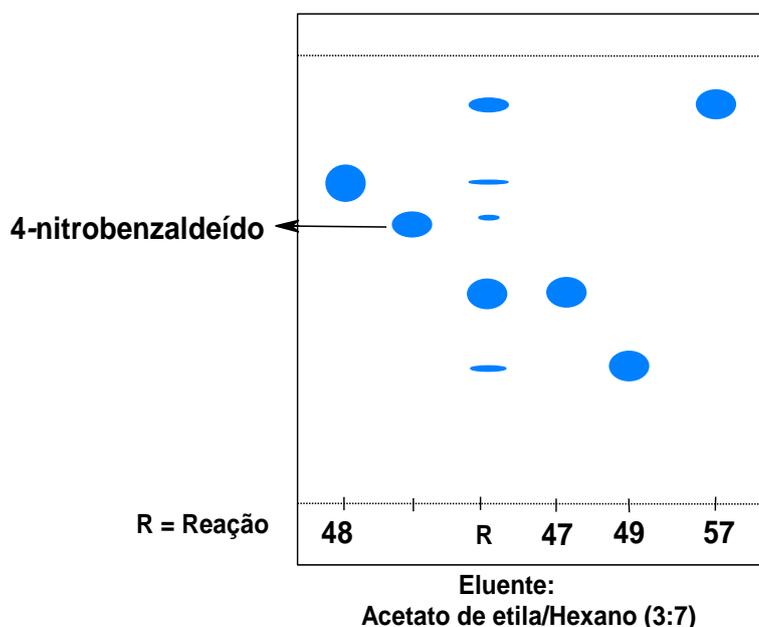
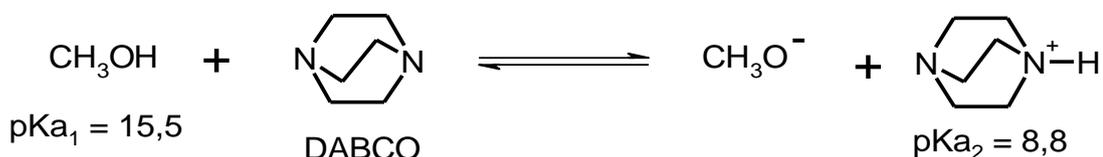


Figura 4.4 CCDA após 1 hora de reação do 4-nitrobenzaldeído com **48**, utilizando metanol como solvente.

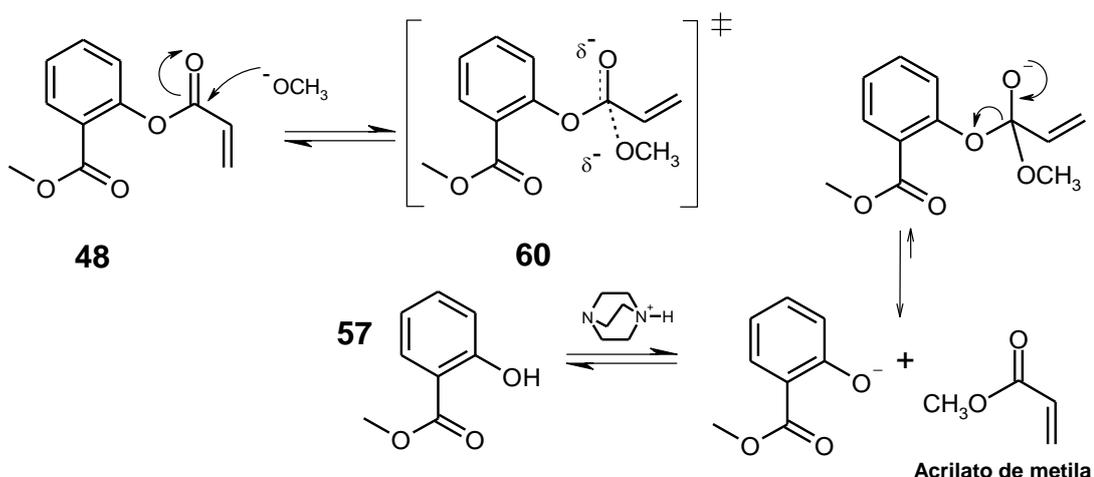
De acordo com a análise em CCDA constatamos a formação do aduto **47** de forma majoritária, confirmando a suspeita de sua formação durante a reação. Houve também a formação do salicilato de metila, dado que corrobora a solvólise provocada pelo metanol.

Assim como no equilíbrio ácido-base entre a água e o DABCO, existe, de modo semelhante, um equilíbrio ácido-base entre o metanol e o DABCO. Entretanto, neste caso, além da formação do ácido conjugado do DABCO, há a formação do ânion metóxido.



Esquema 4.6 Equilíbrio ácido-base entre o metanol e o DABCO.

Sendo assim, o mecanismo da reação é semelhante ao mostrado no Esquema 4.5, porém, uma vez que o nucleófilo é o ânion metóxido, na etapa de eliminação são formados o acrilato de metila e o fenolato, onde este pode ser protonado pelo ácido conjugado do DABCO.

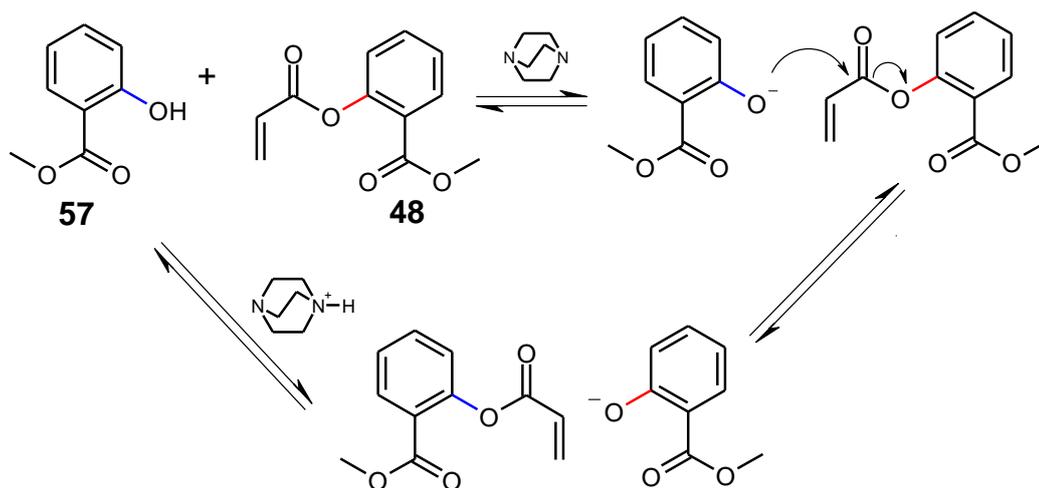


Esquema 4.7 Mecanismo de reação de solvólise básica do acrilato **48** pelo metanol.

Como houve a formação do acrilato de metila, este atuou como aceptor de Michael que reagiu com o 4-nitrobenzaldeído, catalisado pelo DABCO, para formar o aduto de MBH **47**.

4.2.4 Tentativa de otimização da reação de MBH para os adutos **49**, **50** e **51** utilizando Salicilato de metila como fonte protônica

Visto que a utilização de solventes próticos como água e alcoóis poderiam levar à hidrólise ou reações de transesterificação, decidimos realizar a reação utilizando o próprio Salicilato de metila como solvente e fonte de prótons, pois caso ocorra a transesterificação, os produtos formados na reação seriam os próprios reagentes, o salicilato de metila e o seu acrilato (**48**), como está mostrado de maneira simplificada no Esquema 4.8.



Esquema 4.8 Mecanismo simplificado da reação de transesterificação do acrilato **48** com o salicilato de metila.

Foi realizada a reação de preparação do aduto **49**, utilizando uma metodologia semelhante àquela empregada para a reação com t-BuOH/H₂O e com metanol. Utilizamos 2 mmol de **48**, 1 mmol do 4-nitrobenzaléido, 1 mmol de DABCO e 1 mL do salicilato de metila. Diferentemente das duas metodologias anteriores, realizamos a reação na temperatura de 0 °C.

Análises em CCDA foram realizadas em intervalos de uma hora, durante quatro horas de reação, percebemos que a reação prosseguia de maneira lenta para a formação do produto. Após vinte e quatro horas de reação realizamos uma nova análise por CCDA e observamos a formação do produto, porém também a formação da dioxanona, em menor proporção do que a quando a reação foi realizada sem solvente.

A formação da dioxanona, apesar do uso de uma fonte transferidora de prótons no meio reacional, é explicada pelo mecanismo dual da reação de MBH, onde os mecanismos propostos por McQuade e Aggarwal competem entre si. Este fato foi bem demonstrado por Coelho, quando identificou os dois intermediários

propostos para a transferência de prótons, utilizando o 2-naftol como fonte de prótons, através da espectrometria de massas.⁴² A Figura 4.5 trás o espectro de massas com dois íons que foram atribuídos aos respectivos intermediários propostos tanto por McQuade quanto por Aggarwal.

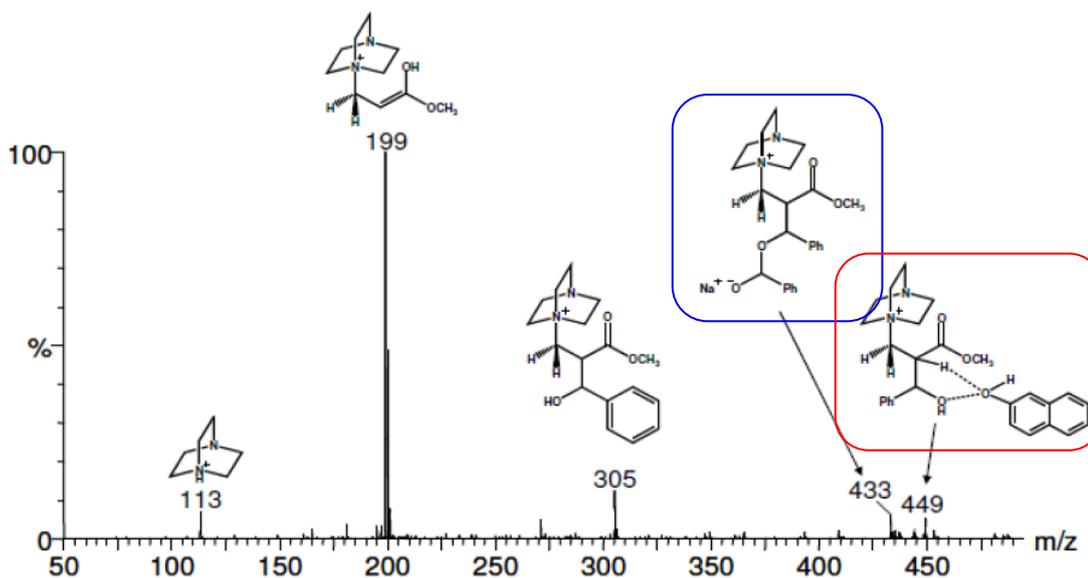


Figura 4.4 Espectro de massas (ESI-MS) da reação de MBH utilizando benzaldeído (3 equiv.), acrilato de metila (1 equiv.) e DABCO (1 equiv.) e 2-naftol (3 equiv.) como fonte de prótons.

Resolvemos isolar o produto, uma vez que poderia haver um aumento na formação da dioxanona. Diante de uma significativa melhora na formação do aduto de MBH, observado por CCDA, realizamos as reações tanto para o 3-nitrobenzaldeído como para o 2-nitrobenzaldeído. Os resultados estão na tabela 4.2.

Tabela 4. 2 Tempos de reação e rendimentos dos adutos **49**, **50** e **51** utilizando o salicilato de metila como fonte de prótons^a.

Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento
1	49	24 horas	53%
2	50	48 horas	48%
3	51	24 horas	51%

a. 2mmol de **48**, 1mmol de aldeído, 1mmol de DABCO, 1mL de salicilato de metila, 0°C e agitação magnética.

Os adutos **50** e **51** foram submetidos a técnicas espectroscópicas de infravermelho, RMN¹H e RMN¹³C. No entanto, os espectros obtidos são bastante similares, destacaremos apenas sinais importantes que confirmem a formação do aduto desejado.

No espectro de infravermelho do aduto **50** (Espectro 18,) foi possível observar uma banda em 3498 cm⁻¹, atribuída ao estiramento da ligação O-H, uma banda em 1350 cm⁻¹ e outra em 1531 cm⁻¹, atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente, do grupo NO₂. Em 1728 cm⁻¹ uma banda forte atribuída ao grupo carbonila. No espectro de RMN¹³C (Espectro 14) dois sinais importantes foram identificados, um em δ 72,1 ppm, atribuído ao carbono carbinólico formado e δ 141,0 ppm atribuído ao carbono alfa do sistema α,β -insaturado do acrilato. Em seu espectro de RMN¹H (Espectro 16), um sinal em δ 8,35 ppm (sl, 1H) foi atribuído ao hidrogênio da posição 2 da porção do 3-nitrobenzaldeído. Sendo assim, não há desdobramento em um dubleto por não possuir hidrogênios em posição orto (3 ligações) para o acoplamento dos mesmos, sendo então caracterizado como singleto largo.

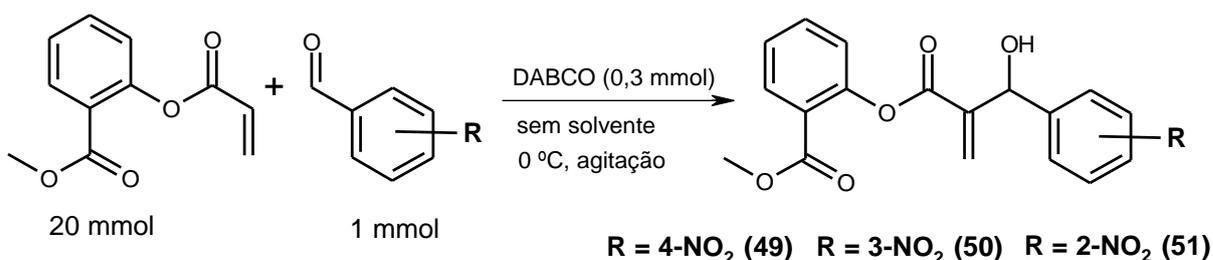
No espectro de infravermelho do aduto **51** (Espectro 23) foi possível observar algumas bandas de absorção características, em 3479 cm⁻¹ (estiramento O-H), 1531 cm⁻¹ (estiramentos simétrico NO₂), 1350 cm⁻¹ (estiramentos assimétrico NO₂) e 1732 cm⁻¹ (carbonila de éster conjugado). De maneira similar aos seus isômeros, o espectro de RMN¹³C (Espectro 14) do aduto **51** apresentou dois sinais importantes, um em δ 72,1 ppm, atribuído ao carbono carbinólico formado e δ 141,0 ppm atribuído ao carbono alfa do sistema α,β -insaturado do acrilato. Maiores detalhes sobre os dados espectroscópicos dos adutos **49**, **50** e **51** estão apresentados nos capítulos 6 e 8.

Uma observação importante que podemos fazer sobre a metodologia anterior é que, apesar de ter sido realizada a 0 °C, os tempos de reação foram maiores em relação à metodologia sem solvente, uma vez que a diluição do meio reacional com o salicilato de metila diminui o choque molecular entre as espécies químicas reagentes.

4.2.5 Otimização dos adutos **49**, **50** e **51** utilizando excesso do acrilato **48** e menor quantidade de DABCO.

Na tentativa de otimizar os rendimentos das reações de obtenção dos adutos **49**, **50** e **51**, e devido ao fato que os adutos correspondentes derivados do acrilato de metila mostraram excelente atividade antipromastigota em cepas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*⁵⁸, decidiu-se por usar outra metodologia para tentar melhorar os rendimentos das reações com esses adutos em particular.

Como reportado por Lee e colaboradores³⁹, excesso de aldeído sob um prolongado tempo de reação leva a formação das dioxanonas (**58**). Sendo assim, foi utilizada uma maior quantidade do excesso do acrilato **48**, de modo que ele funcione também como solvente da reação. A perspectiva também foi de minimizar a formação da dioxanona, pois uma vez diluído o meio reacional, as dioxanonas formadas a partir da reação do aduto com uma molécula do aldeído livre seriam menos favorecidas do que no intermediário sintético formado após a etapa de transferência de prótons, como porposto por McQuade (intermediário **17**, Esquema 1.5). Optou-se também por diminuir a quantidade de DABCO para tentar evitar a possível formação de dímeros entre os acrilatos (**48**).



Esquema 4.9 Metodologia de otimização da reação de MBH para os adutos **49**, **50** e **51**.

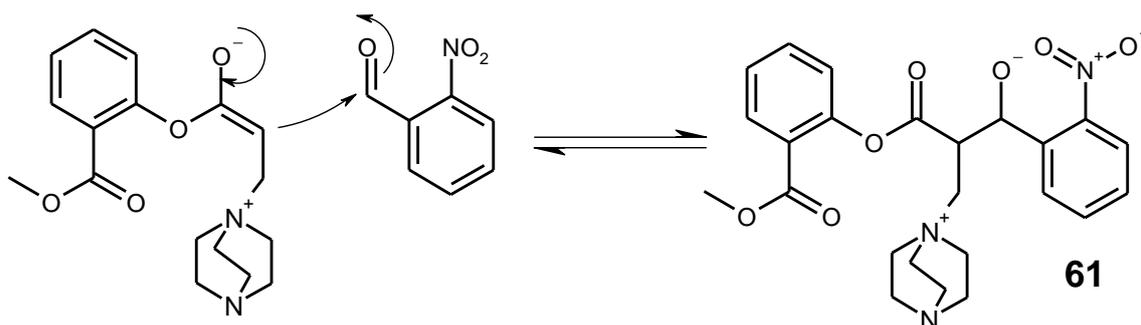
As reações foram acompanhadas por CCDA, e a formação da dioxanona foi minimizada. Os tempos reacionais, rendimentos e porcentagem de recuperação do acrilato estão dispostos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 Rendimentos e tempos de reação para os adutos **49**, **50** e **51** utilizando excesso do acrilato **48**..

Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento	Recuperação de 48
1	49	3 horas	70	91%
2	50	24 horas	61	85%
3	51	15 dias	NR	-

NR = não ocorreu reação

Foi observado que não houve formação do produto após 15 dias de reação entre o acrilato **48** e o eletrófilo 2-nitrobenzaldeído. Se analisarmos a segunda etapa do mecanismo da reação de MBH, de acordo com a proposta de McQuade, pode-se perceber uma distância, relativamente pequena, entre o oxigênio negativamente carregado do enolato formado e o nitrogênio do grupo nitro na posição *orto* do intermediário **61**. Neste caso particular, uma possível interação entre os grupos poderia ser considerada, de modo a diminuir a nucleofilicidade do oxigênio do alcóóxido, através da interação de cargas com o nitrogênio eletrofílico do grupo nitro. Podemos considerar também o fato, aliado ao primeiro, de que o meio reacional por estar bastante diluído poderia dificultar a formação do hemiacetal proposto por McQuade para formação do aduto, já que o choque intermolecular do intermediário **61** com outra molécula do aldeído seria mais impedido.



Esquema 4.10 Segunda etapa do mecanismo da reação de MBH proposto por McQuade.

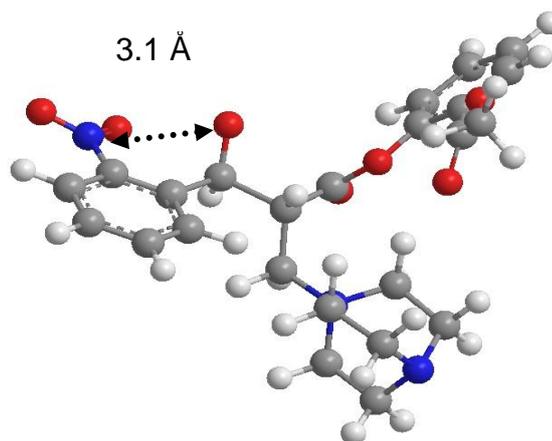


Figura 4.5 Interação entre o alcóxido e o nitrogênio positivo do grupo nitro, distância entre os átomos igual a 3.1 Angstrom.

Como mostrado na Figura 4.5, os átomos em destaque (nitrogênio do grupo nitro e oxigênio do alcóxido) apresentaram uma distância de aproximadamente 3.1 Å. Modelagem molecular foi feita utilizando o programa Chem3D Ultra 8.0[®], usando o método AM1 para minimizar a Energia do intermediário **61**.

Em reações sem solventes ou com solventes apróticos, o mecanismo de reação de MBH ocorre preferencialmente como proposto por McQuade, onde há uma necessidade de duas moléculas do aldeído para a formação do intermediário hemiacetal na etapa de transferência de próton. Visto que não foi possível observar a formação do produto, foi adicionado ao meio reacional 1 mL de Salicilato de metila, para servir de fonte de prótons e, deste modo, a reação passaria a acontecer preferencialmente pelo mecanismo proposto por Aggarwal. Após adição do salicilato de metila, a reação foi acompanhada por CCDA e foi possível observar a formação do produto, com os resultados mostrados na Tabela 4.4. Podemos considerar também que pode ter havido uma melhor dissolução do DABCO após a adição do solvente prótico. A repetição da reação talvez seja necessária para observar a completa dissolução de todos os componentes do meio reacional, bem como observar a não formação do produto desejado quando na ausência de fonte de prótons.

Tabela 4.4 Tempo e rendimento da reação de obtenção do aduto **51**.

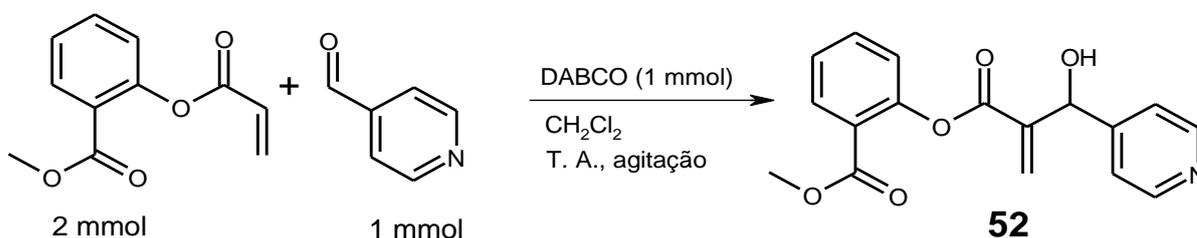
Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento	Recuperação de 48
1 ^a	51	48 horas	74%	88%

a. Metodologia empregada (Esquema 4.12) com adição de 1 mL de Salicilato de metila.

Este último resultado foi bastante satisfatório quanto ao rendimento da reação e a metodologia empregada parece ser a mais adequada para se conseguir melhores rendimentos dos adutos **49**, **50** e **51**.

4.2.6 Preparação dos adutos **52**, **53** e **54** utilizando em solvente aprótico.

Para a preparação dos adutos obtidos pela reação do acrilato **48** e os aldeídos piridina-4-carboxaldeído, piridina-3-carboxaldeído e piridina-2-carboxaldeído, optou-se por utilizar o diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente, uma vez que a mistura reacional apresentava baixa solubilidade nas condições sem solvente, além de que a agitação magnética era dificultada pela maior viscosidade do meio reacional. O diclorometano apresenta as vantagens de poder solubilizar bem o meio reacional, ser de fácil evaporação e de não conter traços significativos de água, o que poderia gerar hidrólise do éster acrílico **48**. O Esquema 4.11 mostra a metodologia empregada para a obtenção dos referidos adutos, tendo como exemplo o aduto **52**.



Esquema 4.11 Metodologia para a reação de MBH para obtenção dos adutos **52**, **53** e **54**.

As reações foram monitoradas através de CCDA e ao termino das reações os produtos principais foram isolados por cromatografia em coluna. Os tempos e os rendimentos das reações estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 Tempos de reação e rendimentos dos adutos **52**, **53** e **54**.

Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento
1	52	4 horas	67%
2	53	20 minutos	60%
3	54*	3 horas	-%

*A discussão sobre o produto obtido encontra-se no item 4.2.8

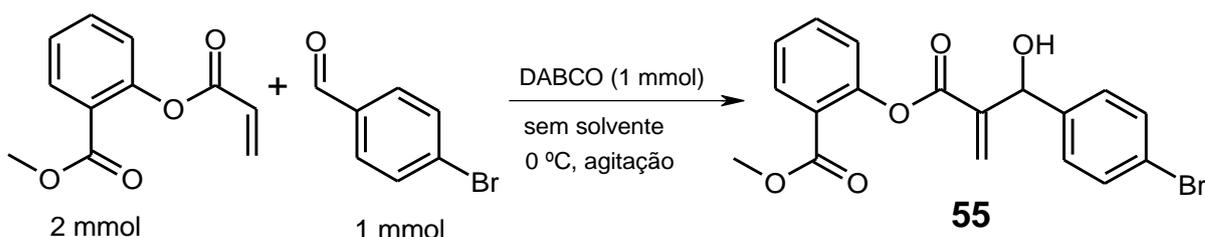
Os espectros de infravermelho, RMN¹H e RMN¹³C apresentaram sinais característicos para os adutos obtidos, indicando a ocorrência da reação de MBH. Os dados estão de forma resumida na Tabela 4.6. As caracterizações espectroscópicas detalhadas dos compostos estão descritas nos capítulos 6 e 8.

Tabela 4.6 Dados espectroscópicos dos adutos **52** e **53**.

Aduto	Infravermelho (cm ⁻¹)	RMN ¹³ C (δ ppm)	RMN ¹ H (δ ppm)
52	3113 (O-H), 1728 e 1708 (C=O de éster)	141.4 (carbono alfa do acrilato), 69.9 (C-OH)	5,68 (s, 1H; hidrogênio do carbono carbinólico).
53	3151 (O-H), 1728 (C=O de éster)	141.4 (carbono alfa do acrilato), 69.9 (C-OH)	5,74 (s, 1H; hidrogênio do carbono carbinólico).

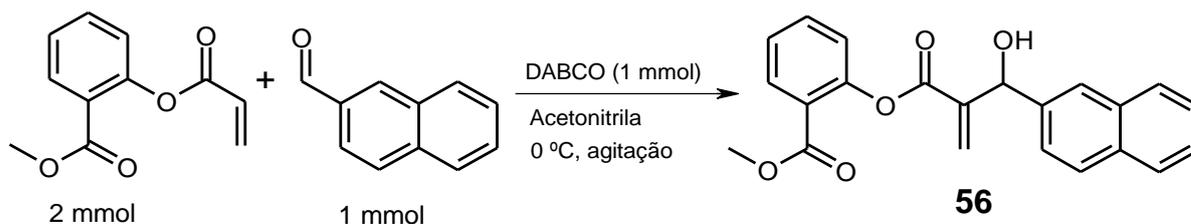
4.2.7 Preparação dos adutos **55** e **56**.

Para a preparação do aduto **55** foi utilizada a mesma metodologia empregada para obtenção dos adutos **49**, **50** e **51** no item 4.2.1.



Esquema 4.12 Metodologia para a reação de MBH para obtenção do aduto **55**.

Para o aduto **56**, a metodologia empregada levou em consideração resultados anteriores realizados com acrilato de metila e o 2-naftaldeído.⁵⁷ A reação, quando realizada sem solvente, possui um tempo total de 16 dias. Sendo assim, optou-se por fazer uso da acetonitrila como solvente aprótico, uma vez que o emprego deste solvente em reação de vários acrilatos (alifáticos e aromáticos) com o benzaldeído resultou em uma diminuição considerável do tempo reacional³⁹.



Esquema 4.13 Metodologia para a reação de MBH na obtenção do aduto **56**.

Os tempos e rendimentos das reações de preparação dos adutos **55** e **56**, bem como os dados dos espectros de infravermelho, RMN¹H e RMN¹³C desses dois adutos, estão dispostos nas tabelas 4.7 e 4.8, respectivamente. Os dois adutos apresentaram sinais característicos, indicando a ocorrência da reação de MBH. Apenas os principais picos e bandas de absorção de cada molécula foram elencados, pois as caracterizações espectroscópicas detalhadas dos compostos estão descritas nos capítulos 6 e 8.

Tabela 4.7 Tempos de reação e rendimentos dos adutos **55** e **56**.

Entrada	Aduto	Tempo	Rendimento
1 ^a	55	4 horas	52%
2 ^b	56	24 horas	65%

a. Reação sem solvente. b. 0,5 mL de acetonitrila.

Tabela 4. 8 Dados espectroscópicos dos adutos **55** e **56**.

Aduto	Infravermelho (cm ⁻¹)	RMN ¹³ C (δ ppm)	RMN ¹ H (δ ppm)
55	3502 (O-H), 1716 (C=O de éster)	141.5 (carbono alfa do acrilato), 72.2 (C-OH)	5,90 (s, 1H; hidrogênio do carbono carbinólico).
56	3498 (O-H), 1732 (C=O de éster)	141.9 (carbono alfa do acrilato), 72.7 (C-OH)	5,74 (s, 1H; hidrogênio do carbono carbinólico).

4.2.8 Discussão sobre a reação do acrilato **48** e piridina-2-carboxaldeído.

Após 1 hora do início da reação, o meio reacional tornou-se de cor esverdeada, sendo possível perceber a formação de um óleo bastante viscoso de coloração preto-esverdeada e pouco solúvel no diclorometano. Com mais meia hora resolveu-se interromper a reação, uma vez que o produto oleoso de cor preto-esverdeada estava sendo formado com maior intensidade. A análise por CCDA revelou que o aldeído havia sido bastante consumido em relação ao acrilato, formando-se dois produtos visíveis na CCDA, em proporções muito pequenas.

Acreditando-se que pudesse ter havido oxidação do aldeído ou formação da dioxanona como co-produto, a reação foi repetida utilizando a metodologia empregada no item 4.2.4, onde a reação de MBH é feita em meio prótico, acrescentando desta vez o Salicilato de metila como solvente e fonte de prótons. Após 4 horas de reação, o aspecto do meio reacional era semelhante àquele descrito para a reação em meio aprótico, sendo formado um óleo viscoso de coloração preto-esverdeada. Uma análise por CCDA revelou que o aldeído havia sido quase totalmente consumido.

Assim, uma alíquota de 0,1 mL foi retirada da reação e levada à filtração em sílica (microcromatografia), utilizando uma pipeta Pasteur como coluna de vidro, empacotada com 0,2 g de sílica e eluída com 1 mL de diclorometano, para retirar o excesso do salicilato de metila, depois com 5 mL de acetato de etila, de modo a filtrar a reação e obter os outros compostos presentes no meio reacional. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 µL da solução contendo os componentes do

meio reacional e levada á análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para verificar a formação dos possíveis produtos. No cromatograma obtido, foi possível identificar cinco picos com os respectivos tempos de retenção, que estão ilustrados na Figura 4.6.

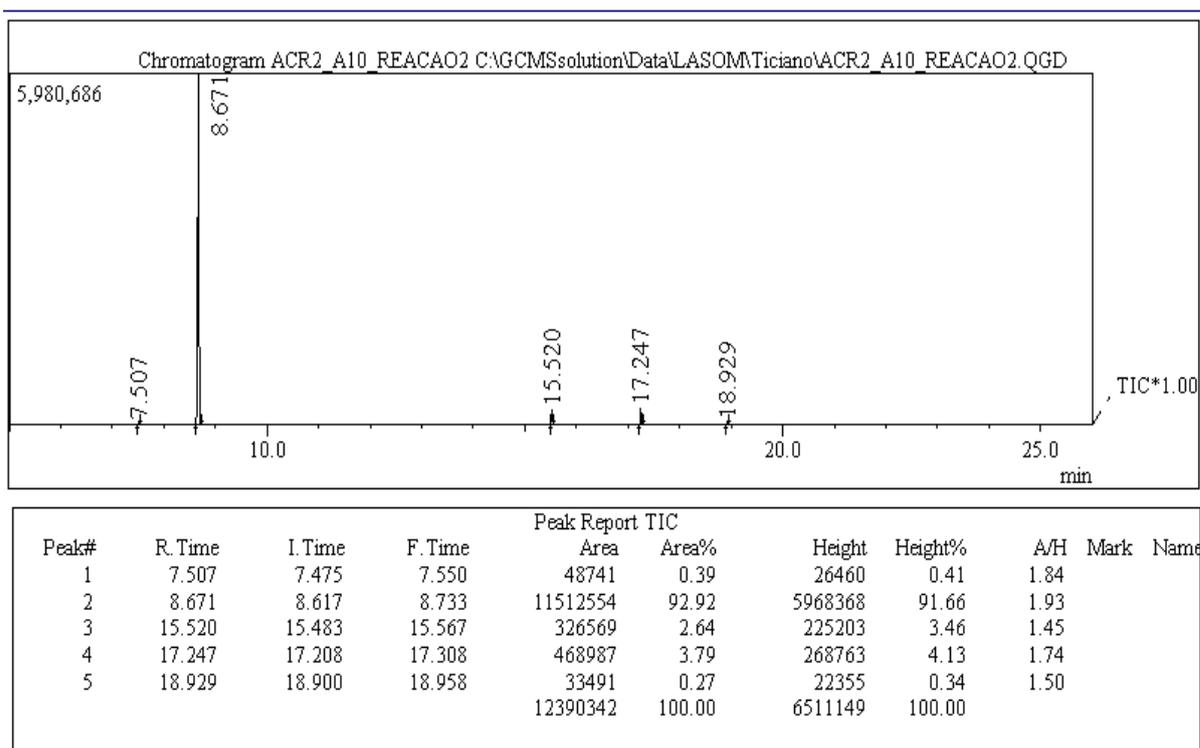


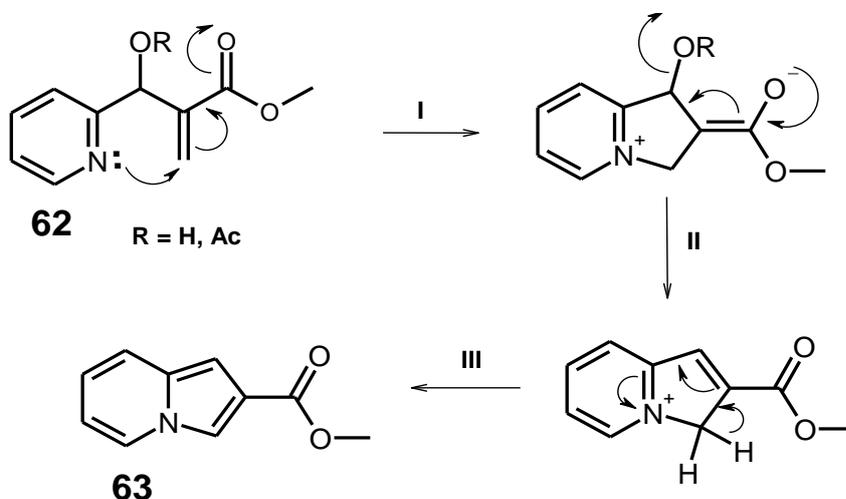
Figura 4.6 Cromatograma da reação do acrilato **48** com a piridina-2-carboxaldeído.

No cromatograma, o primeiro pico, de tempos de retenção 7,50 minutos, apresentou em seu espectro de massas (Espectro 44) um íon base de m/z 120 e outro íon de m/z 152, com aproximadamente 80% de abundância. Este último foi atribuído ao íon molecular do Salicilato de metila. Como o íon base apresenta uma perda de 32 u.m.a., pode ser atribuída a uma perda de metanol (metoxila do éster e hidrogênio da hidroxila fenólica), já o íon de m/z 92 pode ser atribuído à perda de todo grupo éster mais o hidrogênio da hidroxila fenólica.

O pico com tempo de retenção 8,671 minutos apresentou em seu espectro de massas (Espectro 45) um íon com m/z 206, atribuído ao íon molecular do acrilato (**48**). O íon base, de m/z 55, corresponde ao um íon acroleína, proveniente da quebra da ligação C-O entre a carbonila α,β -insaturada e o oxigênio do fenol.

O pico com tempo de retenção 17,24 minutos apresentou em seu espectro de massas (Espectro 46) um íon base com m/z 144. Um íon de m/z 295 foi inicialmente atribuído ao aduto **54** (de massa 313 u.m.a.) com a perda de 18 u.m.a., ou seja, uma molécula de H_2O . Entretanto, o espectro não apresentou nenhum íon que pudesse ser atribuído a um fragmento da molécula do aduto **54** sem a perda da água, como por exemplo, m/z 282, que corresponderia à perda de 31 u.m.a. ($CH_3O\bullet$), ou então o íon de m/z 162, que corresponderia à perda de 151 u.m.a., que seria a perda do íon do salicilato de metila, bastante estabilizado por ressonância.

Sendo assim, diante da presença dos íons m/z 295, m/z 264 e m/z 144, admitimos uma hipótese de formação de indolizina a partir do aduto **54** no meio reacional. A obtenção de indolizinas a partir de adutos de MBH já foi descrita na literatura, utilizando uma variedade de ésteres acrílicos ou acrilonitrila como aceptores de Michael e a piridina-2-carboxaldeído, sendo a reação favorecida quando se introduz um melhor grupo abandonador no lugar da hidroxila alcoólica.⁷⁶ No Esquema 4.14 está ilustrada a formação da indolizina (**64**) a partir do aduto de MBH **63**, obtido na reação entre o acrilato de metila e a piridina-2-carboxaldeído.



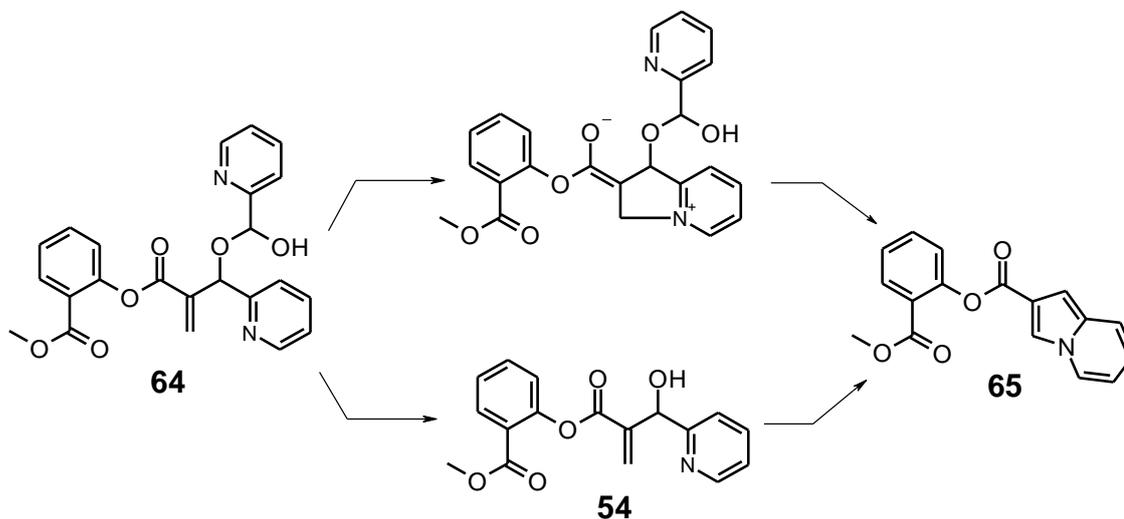
Esquema 4.14 Mecanismo de reação para a formação da indolizina a partir de um aduto de MBH.

Como mostrado no Esquema 4.14, a formação da indolizina consiste em etapas de adição e eliminação, sendo a primeira uma adição do tipo Michael 1,4 no sistema α,β -insaturado, realizada pelo nitrogênio do anel piridínico. Após eliminação

do grupo abandonador, seguido por um rearranjo alílico (etapa III), a indolizina é formada.

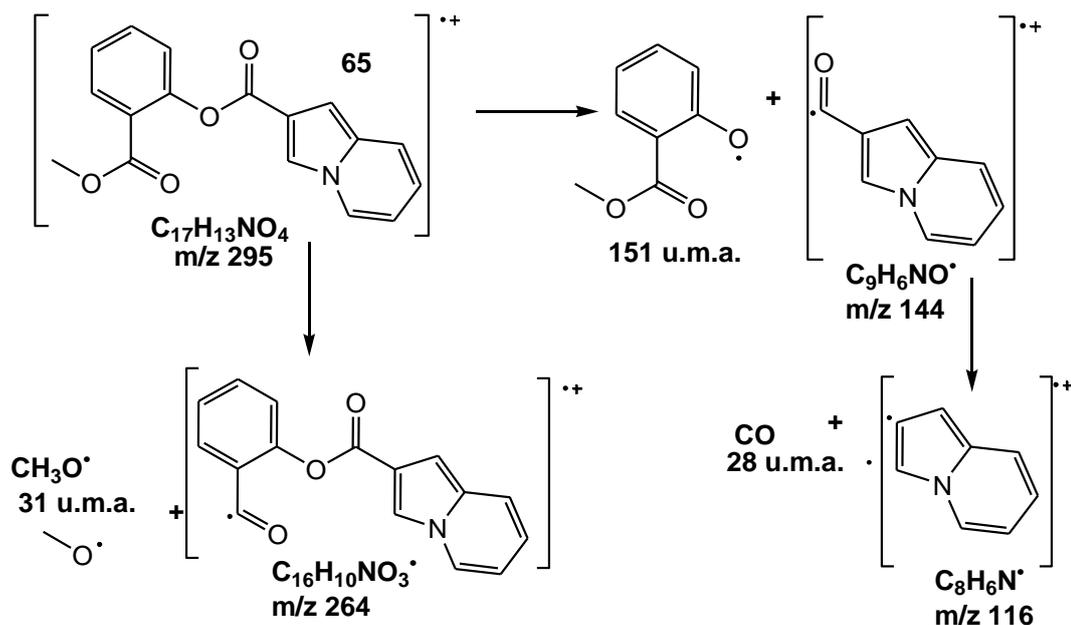
Os núcleos indolizínicos estão presentes em vários compostos que apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como a atividade no Sistema Nervoso Central, antiinflamatórias⁷⁴, inibidora de fosfatases⁷⁵ e antiproliferativa em células cancerígenas.⁷⁶

Para a formação da indolizina a partir do aduto **54** teríamos as mesmas etapas reacionais, porém, a razão pode envolver a eliminação de uma molécula de água ou de outro grupo abandonador, o hidrato da piridina-2-carboxaldeído (**69**), que se encontra na forma de um hemiacetal, como proposto por McQuade. O Esquema 4.15 mostra a formação da indolizidina proposta (**65**) a partir do aduto **59**.



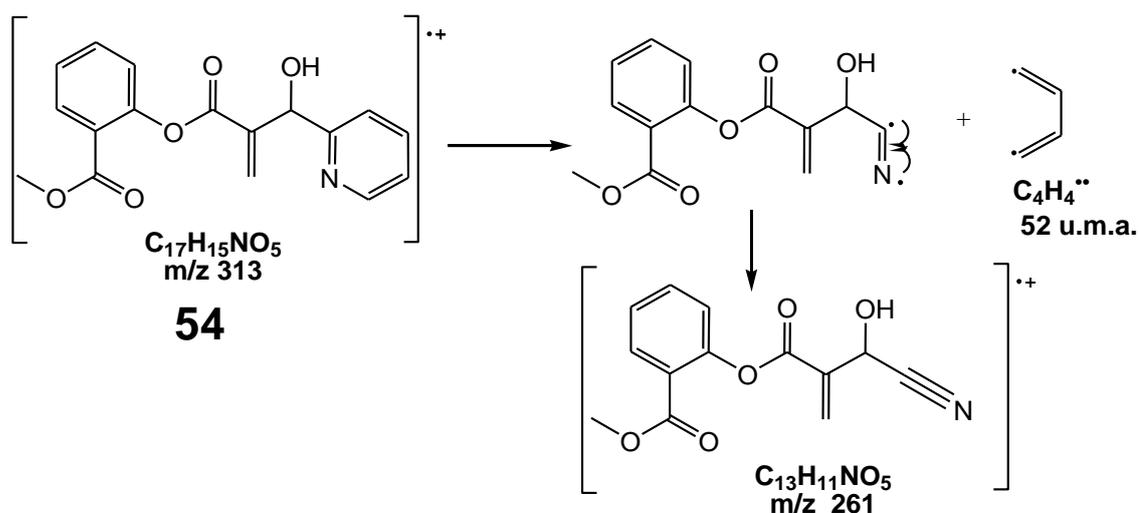
Esquema 4.15 Formação da indolizina (**65**) a partir do hemiacetal (**64**) ou do aduto de MBH (**54**).

Admitindo-se a formação da indolizina **65**, podemos atribuir alguns fragmentos encontrados no espectro de massas do composto relativo ao pico em 17,24 minutos do cromatograma (Figura 4.6). Estas atribuições estão dispostas no Esquema 4.16, que mostra as fragmentações da indolizina proposta.



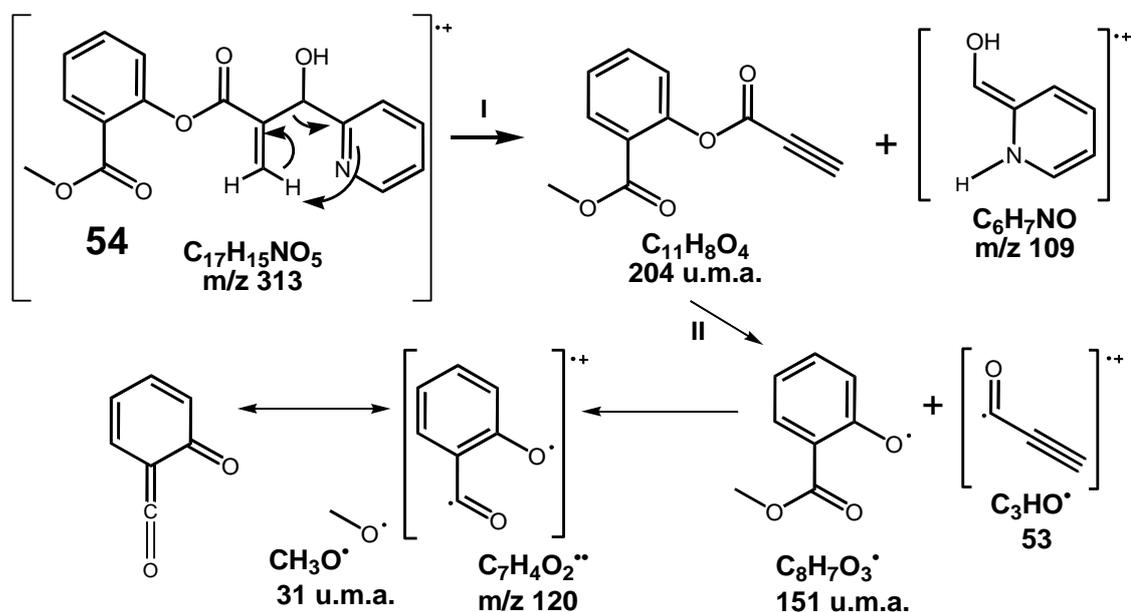
Esquema 4.16 Fragmentações e respectivas m/z da indolizina proposta (**65**).

No espectro de massas do composto referente ao pico 5 do cromatograma (Espectro 47), com tempo de retenção 18,29 minutos (Figura 4.6), não foi possível verificar a presença do íon molecular de m/z 313, porém, foi possível verificar um íon de m/z 261. Consideramos a hipótese de ser o aduto de MBH **54**, uma vez que o fragmento com 261 u.m.a. pode ser atribuído a uma perda de 52 u.m.a., como mostra o Esquema 4.17. Este tipo de fragmentação é característico em piridinas substituídas na posição 2. O fragmento gerado é estabilizado por formar uma nitrila.



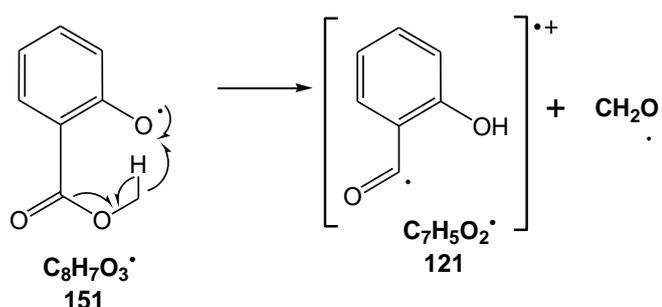
Esquema 4.17 Formação do fragmento de m/z 261.

No mesmo espectro, o íon base apresentou uma m/z de 109, o que reforça a hipótese de ser o aduto de MBH **54**, uma vez que podemos atribuir este íon a um fragmento gerado através de um rearranjo de McLafferty, também característico de piridinas substituídas na posição 2, como mostrado no Esquema 4.18.



Esquema 4.18 Rearranjo de McLafferty para a formação do íon base do aduto **54**.

Também é mostrado no esquema 4.18, a formação do íon atribuído ao fragmento de m/z 53, que pode ser estabilizado por ressonância. Bem como a formação do íon de m/z 120, originado a partir da perda de um íon $CH_3O\cdot$ no íon do salicilato de metila, com 151 u.m.a. Além do íon de m/z 120, foi observado outro íon de semelhante abundância, com m/z 121. Este último pode ser gerado a partir de um rearranjo de McLafferty sofrido pelo íon de m/z 151, gerando também formaldeído, como mostra o Esquema 4.19. O íon de 121 u.m.a. pode ser estabilizado por ressonância.



Esquema 4.19 Formação do íon de m/z 121 a partir de um rearranjo de McLafferty sofrido pelo íon de m/z 151.

Dos produtos obtidos, o composto de tempo de retenção, 18,29 minutos, foi o que apresentou menor área de pico no cromatograma (Figura 4.6). Uma vez que este pico foi atribuído ao aduto de MBH **54**, como mostrado na análise do espectro de massas, devemos considerar que o rendimento da reação para o produto desejado não foi satisfatório. Entretanto, para a indolizina **65**, a área do pico 4 corresponde a uma massa mais de dez vezes maior que a do pico 5.

4.3 Avaliação da atividade Leishmanicida

Os adutos de MBH obtidos neste trabalho foram levados a uma avaliação da atividade Leishmanicida *in vitro* contra cepas das espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. Foram também incluídos na avaliação o Salicilato de metila (**57**) e o seu respectivo acrilato (**48**)

Os resultados da avaliação da atividade foram bastante promissores e todos os compostos apresentaram alta atividade Leishmanicida. Os valores das CI_{50} dos adutos estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 Valores de CI_{50} dos adutos avaliados *in vitro* contra *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Compostos avaliados	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. chagasi</i>	
	$\mu\text{g/mL}$	μM	$\mu\text{g/mL}$	μM
57	34,73	228,5	39,74	261,44
48	22,35	108,5	24,48	118,83
49	4,05	11,34	20,48	57,36
50	8,16	22,85	14,51	40,64
51	2,73	7,64	3,62	10,14
52	7,46	23,83	10,44	33,35
53	9,75	31,15	12,11	38,69
55	3,26	8,33	14,98	38,31
56	8,58	23,70	16,78	46,35

Como mostrado na Tabela 4.9, todos os adutos apresentaram expressiva atividade Leishmanicida contra os dois tipos de espécies do parasita. Porém, tanto em *L. amazonensis* como em *L. chagasi* o aduto **51** mostrou-se com alta atividade em relação aos demais.

Em uma revisão recente de Fávero e colaboradores⁷⁷ destacam a importância de nitrocompostos na atividade antiparasitária, incluindo algumas espécies de *Leishmania*. Ao estudar os nitrocompostos, observa-se que o mecanismo de ação, em nível molecular, ainda não está totalmente estabelecido, uma vez que pode variar de acordo com diferenças estruturais dos compostos. Em 1995, Rozenski e colaboradores⁷⁸ conseguiram relacionar a ação antibacteriana com o potencial de redução de alguns nitrocompostos, comprovando que esta bioatividade é decorrente da redução do grupo nitro (Figura 4.7). Esta redução leva ao aumento da concentração intracelular de nitrocompostos, maior quantidade de radicais livres é gerada e, conseqüentemente, maior é o dano causado pelo estresse oxidativo.

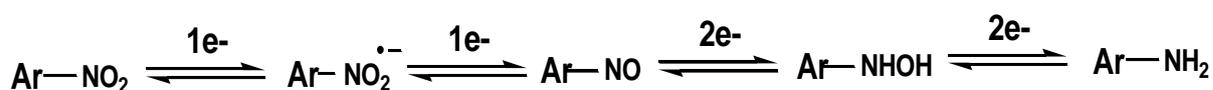


Figura 4.7 Ciclo redox do grupo nitro.

Sendo assim, os adutos de MBH sintetizados neste trabalho, e que possuem em sua estrutura química um grupo nitro que pode ser reduzido, como mostrado no ciclo redox, favorece a atividade leishmanicida por gerar radicais livres.

Com relação ao mecanismo de ação, foi proposto que os antimoniais atuam no parasito pela indução do efluxo de glutathiona (GSH) e tripanotiona (T[SH]₂) e a inibição da atividade da enzima tripanotiona redutase (TryR).⁷⁹ A glutathiona (GSH) é um abundante antioxidante que tem sido relacionado com a proteção celular. Os tripanossomatídeos como a *Leishmania* mantêm o balanço de óxido-redução (redox) por um mecanismo singular, pois são desprovidos de glutathiona redutase que, na maioria dos outros organismos, é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular redutor/protetor dependente de GSH.

Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona (T[SH]₂; duas moléculas de GSH ligadas por uma unidade de

espermidina) como principal tiól reduzido. A tripanotiona é mantida em sua forma reduzida pela enzima tripanotiona redutase (TryR), de modo que a TryR exerce um papel central na proteção de *Leishmania* spp. contra espécies reativas derivadas do oxigênio e nitrogênio (produzidos pelo hospedeiro) por meio da reciclagem de tripanotiona oxidada. Desse modo, uma função fisiológica vital tem sido descrita para a TryR na manutenção dos níveis de T[SH]₂, particularmente no interior de células do hospedeiro, sob condições altamente oxidantes geradas durante a resposta de defesa.⁸⁰

Outra possibilidade que merece também ser considerada para pesquisa do mecanismo de ação dos adutos, seria uma possível inativação de enzimas, como a TryR, através de uma adição (tipo Michael 1,4) irreversível de grupos nucleofílicos (OH, NH₂ ou SH) à dupla conjugada. Uma vez que o grupamento fenólico do salicilato de metila é melhor grupo abandonador que um grupo proveniente de um álcool alifático, a eletrofilicidade da dupla ligação pode ser aumentada, favorecendo a formação de um ceteno.

5. Conclusões e perspectivas

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando os objetivos e as propostas deste trabalho, concluímos que as reações de obtenção dos adutos híbridos de MBH tiveram rendimentos satisfatórios. Entretanto, uma metodologia única continua sendo um desafio para o nosso trabalho, bem como para a reação utilizando outros reagentes.

A incorporação do grupamento fenólico do Salicilato de metila potencializou consideravelmente a atividade Leishmanicida dos adutos descritos neste trabalho, em relação aos adutos de MBH derivados do acrilato de metila e os respectivos aldeídos aromáticos. Isso pode ser devido ao aumento lipossolubilidade da molécula, como também do incremento na eletrofilicidade da dupla conjugada pela incorporação de um éster derivado de um fenol, sendo o mesmo um bom grupo abandonador.

Metodologias que empregaram solventes próticos diferentes do salicilato de metila não foram satisfatórias, pois provocaram solvólise, sendo assim, para testes *in vivo*, essas moléculas talvez possam ser hidrolisadas no organismo do hospedeiro antes de atingirem os parasitas. Por outro lado, os resultados em *Leishmania amazonensis* foram bastante promissores nos ensaios *in vitro*, podendo-se considerar testes *in vivo* das moléculas com preparações farmacêuticas do tipo pomadas, utilizando veículos lipossolúveis.

Após verificação dos espectros de massas obtidos durante a análise da reação pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, foi possível identificar um núcleo indolizínico formado a partir da reação de obtenção do aduto **54**. Como compostos contendo este tipo de heterociclo são de interesse biológico, temos como perspectiva a síntese de novas indolizinas a partir de adutos de MBH para realização de outros testes biológicos, além da atividade Leishmanicida.

6. Experimental

6. EXPERIMENTAL

6.1 Materiais e Métodos

Neste trabalho foram utilizados aldeídos adquiridos do fabricante Acros, solventes adquiridos dos fabricantes Tedia e Vetec, cloreto de acrilóida do fabricante Merck e o Salicilato de metila da empresa Dinâmica, todos com excelente grau de pureza.

A formação dos produtos foi acompanhada pela técnica de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), onde foi utilizado cromatofolhas de alumínio dos fabricantes Macherey-Nagel e Whatman, suportadas em Gel de Sílica 60 (fase estacionária), contendo indicador de fluorescência a 254nm, e uma mistura de acetato de etila / hexano como fase móvel, sendo irradiadas em câmara de ultravioleta com comprimento de onda de 254nm. A purificação dos produtos foi feita utilizando a técnica de cromatografia em coluna do tipo relâmpago, utilizando gel de sílica (fase estacionária) do fabricante Acros, apresentando uma granulometria de 0.035 - 0.070mm, e misturas de acetato de etila / hexano, como fase móvel.

Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e temperatura controlada em evaporador rotatório da marca Fisaton.

Todos os adutos MBH sintetizados são inéditos e foram caracterizados mediante análise espectroscópica de RMN¹³C, RMN¹H e Infravermelho. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C foram obtidos por três tipos de aparelho: Varian Mercury Spectra AC 20 (200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C), Bruker Avance II (400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C) e Varian Inova (500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C) em CDCl₃ em Clorofórmio deuterado (CDCl₃) com Tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Os desdobramentos químicos referentes a cada acoplamento dos hidrogênios foram expressos da seguinte forma: singleto (s), singleto largo (sl), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd), duplo dubleto duplo (ddd) e multiplete (m). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais dos carbonos foram observados pelo uso das técnicas de APT, onde são colocados em fase “para cima” carbonos quaternários e metilenos e em fase “para baixo”

carbonos de metino e metila, como também da técnica de DEPT, onde todos se encontram “para cima”.

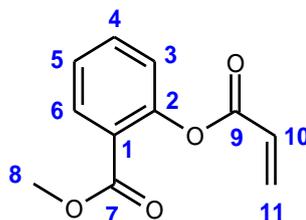
Os espectros de infravermelho foram obtidos no Espectrofotômetro FTIR, modelo IRAffinity-1, do fabricante Shimadzu, instalado em nosso próprio laboratório, utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os valores para as absorções são referidos em números de ondas, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}).

O cromatograma e os espectros de massas dos compostos presentes na reação de obtenção do aduto **54** foram obtidos através do aparelho modelo GCMS-QP2010 Series do fabricante SHIMADZU, que encontra-se em nosso laboratório.

6.2 Preparação do 2-acriloiloxibenzoato de metila (48)

Em um balão de 125mL, dissolveu-se 40mmol (6,08g) de Salicilato de metila em 20mL de diclorometano. Em seguida, adicionou-se 42mmol de trietilamina. A mistura resultante foi mantida em agitação por 15 minutos em banho de gelo, logo após este tempo gotejou-se dentro do balão uma solução contendo 42mmol (3,5mL) de cloreto de acrilóila em 10mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida sob agitação e a formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCDA, utilizando com o eluente Acetato de etila/Hexano (1:9). Após 2h de reação, colocou-se a mistura em um funil de separação e adicionou-se 30 mL de uma solução de NH_4Cl 10% para retirar o sal de trietilamônio e em seguida, procedeu-se à extração com diclorometano (3x15mL). A fase orgânica então foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório. O produto da reação foi isolado em coluna cromatográfica contendo sílica gel previamente empacotada, utilizando inicialmente Hexano como eluente (200mL), aumentando-se em seguida a polaridade da fase móvel para 1:9 de Acetato de Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e o produto foi obtido na forma de um óleo em 71% de rendimento após evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

6.2.1 Dados Espectroscópicos do 2-acriiloiloxibenzoato de metila (**48**)



RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

52,14(C₈); 123,21(C₁); 123,69(C₃); 126,02(C₅); 127,58(C₁₀); 131,73(C₆); 132,74(C₁₁); 133,78(C₄); 150,30(C₂); 164,55(C₉); 164,8(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,82 (s, 3H), 6,02 (dd, 1H, $J = 1,8/10,2$ Hz), 6,35 (dd, 1H, $J = 10,2/17,2$ Hz), 6,61 (dd, 1H, $J = 1,8/17,2$ Hz), 7,11 (dd, 1H, $J = 1,0/ 8,0$ Hz), 7,29 (dt, 1H, $J = 1,2/7,6$ Hz) 7,54 (dt, 1H, $J = 1,8/7,6$ Hz/8,0Hz) 8,00 (dd, 1H, $J = 1,6/7,8$ Hz).

IV (cm⁻¹/KBr): 2999, 2953, 1726, 1631, 1606, 1452, 1404, 1300, 1205, 1153, 1083, 756.

6.3 Procedimento geral para obtenção dos adutos de Morita-Baylis-Hillman **49**, **50**, **51**, **55** e **56**.

Em um balão de 25 mL, foi adicionado 1mmol do respectivo nitrobenzaldeído, juntamente com 1mmol (112mg) de DABCO e 2mmol (412mg) do acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida à 0 °C e sob agitação magnética. A formação do produto foi acompanhada por CCD, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7). O isolamento foi feito dissolvendo-se a mistura reacional em 1mL de diclorometano e transferido-a para uma coluna cromatográfica contendo sílica gel previamente empacotada, utilizando inicialmente a mistura eluente com Acetato de etila/Hexano (1:9), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel para 2:8 e 3:7 de Acetato de Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório. Para a reação de obtenção do aduto **56** adicionou-se 0,5 mL de acetonitrila

como solvente. Todos os compostos foram obtidos na forma de um óleo com rendimentos de 27%, 15%, 26%, 52%, e 65% respectivamente.

6.4 Tentativa de otimização da reação dos adutos 49, 50 e 51 utilizando terc-Butanol/Água (6:4) como solvente.

Em um balão de 25mL, foi adicionado 1mmol do 4-nitro-benzaldeído, 1mL de de uma mistura 1:1 de terc-Butanol/H₂O, juntamente com 1mmol (112mg) de DABCO e 2mmol (412mg) do Acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação magnética. O desenvolvimento da reação foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7).

6.5 Tentativa de otimização da reação dos adutos 49, 50 e 51 utilizando Metanol como solvente.

Em um balão de 25 mL, foi adicionado 1mmol do 4-nitro-benzaldeído, 1mL de metanol, juntamente com 1mmol (112mg) de DABCO e 2mmol (412mg) do Acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente, sob agitação magnética. O desenvolvimento da reação foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7).

6.6 Otimização da reação dos adutos 49, 50 e 51 utilizando salicilato de metila como solvente e fonte protônica.

Em um balão de 25mL, foi adicionado 1mmol do respectivo nitro-benzaldeído, 1mL de salicilato de metila, juntamente com 1mmol (112mg) de DABCO e 2mmol (412mg) do Acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida a temperatura 0 °C, sob agitação magnética. A formação do produto foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7). O isolamento foi feito dissolvendo-se a mistura reacional em 1mL de diclorometano e transferido-a para uma coluna cromatográfica contendo sílica gel flash previamente empacotada, utilizando inicialmente um eluente de acetato de etila/Hexano (1:9), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel para 2:8 e 3:7 de Acetato de

Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

6.7 Otimização da reação dos adutos 49, 50 e 51 utilizando um maior excesso do acrilato 48.

Em um balão de 50 mL, foi adicionado 1mmol do respectivo nitrobenzaldeído, juntamente com 0,3mmol (37 mg) de DABCO e 20mmol (4,12g) do acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida a temperatura 0 °C, sob agitação magnética. A formação do produto foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7). O isolamento foi feito dissolvendo-se a mistura reacional em 1mL de diclorometano e transferido-a para uma coluna cromatográfica contendo sílica gel previamente empacotada, utilizando inicialmente um eluente de acetato de etila/Hexano (1:9), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel para 2:8 e 3:7 de Acetato de Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

6.8 Otimização da reação do aduto 56 utilizando um maior excesso do acrilato 48 e o salicilato de metila como fonte protônica.

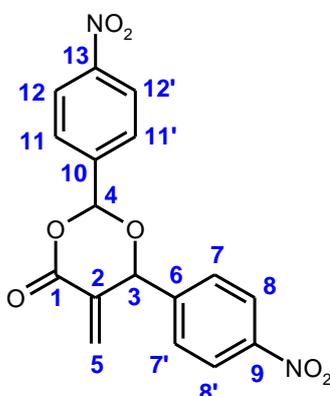
Adicionou-se 1 mL de Salicilato de metila ao meio reacional descrito no item **6.7** para a reação de obtenção do aduto **56**. A formação do produto foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (3:7). O isolamento foi feito dissolvendo-se a mistura reacional em 1mL de diclorometano e transferido-a para uma coluna cromatográfica contendo sílica gel flash previamente empacotada, utilizando inicialmente um eluente de acetato de etila/Hexano (1:9), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel para 2:8 e 3:7 de Acetato de Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

6.9 Procedimento para reação de obtenção dos adutos 57, 58 e 59, utilizando diclorometano como solvente a temperatura ambiente.

Em um balão de 25 mL, foi adicionado 1mmol do respectivo aldeído, juntamente com 1mmol (112mg) de DABCO e 1,0 mL de diclorometano como solvente. Em seguida, foram adicionados 2mmol (412mg) do acrilato **48**. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação magnética. A formação dos produtos foi acompanhada por CCDA, utilizando como eluente acetato de etila/Hexano (7:3). O isolamento foi feito dissolvendo-se a mistura reacional em 1mL de diclorometano e transferido-a para uma coluna cromatográfica contendo sílica gel previamente empacotada, utilizando inicialmente a mistura eluente com Acetato de etila/Hexano (5:5), seguido do aumento gradativo da polaridade da fase móvel para 8:2 de Acetato de Etila/Hexano. As frações foram reunidas, e a obtenção do produto foi efetuada pela evaporação dos solventes em evaporador rotatório.

6.10 Caracterização espectroscópica do composto (1,3-Dioxanona) e dos Adutos de Morita-Baylis-Hillman

6.10.1 Composto 5-metileno-2,6-bis(4-nitrofenil)-1,3-dioxan-4-ona



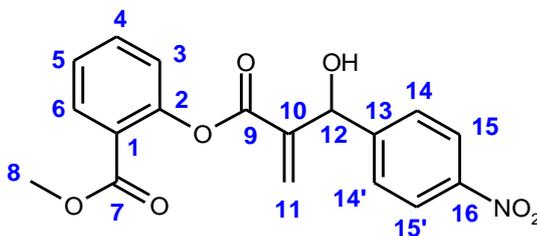
RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

80,25(C₃); 99,48(C₄); 123,81(C₁₂ e C_{12'}); 124,24(C₈ e C_{8'}); 127,40(C₁₁ e C_{11'}); 128,69(C₇ e C_{7'}); 130,64(C₅); 135,08(C₂); 140,98(C₁₀); 144,02(C₆); 148,44(C₉); 148,86(C₁₃); 161,23(C₁).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

5,38 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz), 5,89 (sl, 1H), 6,59 (sl, 1H), 6,69 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz), 7,61 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz), 7,76 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz) 8,28 (dd, 4H, $J = 1,8$ Hz/9,0Hz).

6.10.2 Aduto 49



RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

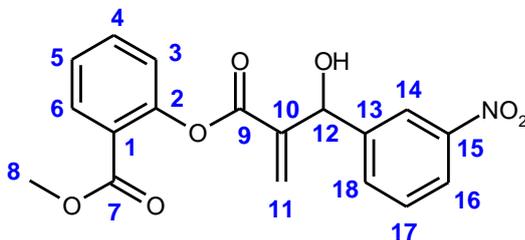
52,30(C₈); 71,94(C₁₂); 122,43(C₁); 123,42(C₁₅ e C_{15'}); 123,59(C₃); 126,31(C₅); 127,45(C₁₄ e C_{14'}); 129,50(C₁₁); 131,80(C₆); 134,05(C₄); 140,94(C₁₀); 147,22(C₁₆); 148,49(C₁₃); 149,96(C₂); 164,2(C₉); 164,7(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,76 (s, 3H), 4,06 (d, 1H, *J* = 4,0Hz, CHOH), 5,79 (d, 1H, *J* = 3,6Hz), 5,96 (s, 1H), 6,65 (s, 1H), 7,04 (dd, 1H, *J* = 0,8Hz/8,0Hz), 7,31 (ddd, 1H, *J* = 1,0Hz/7,8Hz), 7,54 (ddd, 1H, *J* = 1,8Hz/7,6Hz/7,9Hz), 7,63 (d, 2H, *J* = 8,8Hz) 8,01 (dd, 1H, *J* = 1,8Hz/7,8Hz) 8,19 (d, 2H, *J* = 8,8Hz).

IV (cm⁻¹): 3478, 3001, 2954, 1732, 1612, 1531, 1446, 1400, 1346, 972, 852, 825, 756, 732

6.10.3 Aduto 50



RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

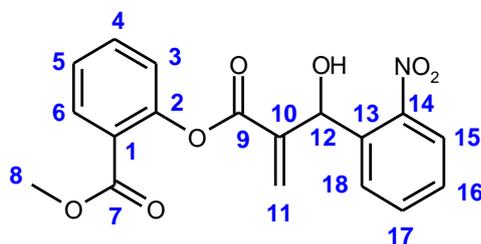
52,41(C₈); 72,10(C₁₂); 121,71(C₁₆); 122,55(C₁); 122,70(C₁₄); 123,69(C₃); 126,39(C₅); 129,27(C₁₇); 129,67(C₁₁); 131,92(C₆); 132,86(C₁₈); 134,12(C₄); 141,02(C₁₀); 143,40(C₁₃); 148,29(C₁₅); 150,10(C₂); 164,37(C₉); 164,79(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,80 (s, 3H), 5,82 (d, 1H, *J* = 5,4Hz), 5,97 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 7,07 (dd, 1H, *J* = 1,2/8,0Hz), 7,33 (ddd, 1H, *J* = 1,2/7,6/7,8Hz), 7,54 (t, 1H, *J* = 7,8/8,0Hz), 7,57 (ddd, 1H, *J* = 1,8/2,0/7,8Hz), 7,83 (d, 1H, *J* = 7,8Hz), 8,04 (dd, 1H, *J* = 1,6Hz/7,8Hz), 8,16 (ddd, 1H, *J* = 0,8/1,2/2,2/7,8Hz), 8,35 (sl, 1H).

IV (cm⁻¹): 3498, 3078, 3020, 2951, 1728, 1608, 1531, 1435, 1350, 1300, 1083, 806, 759, 690

6.10.4 Aduto 51



RMN¹³C-DEPT (CDCl₃, 100 MHz, δ ppm):

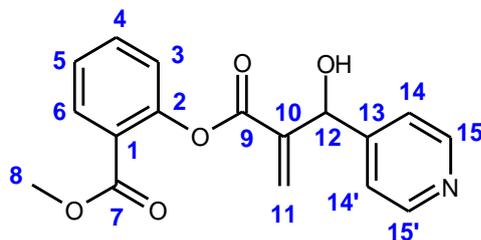
52,50(C₈); 67,68(C₁₂); 122,67(C₁); 124,00(C₃); 124,76(C₁₅); 126,32(C₅); 128,42(C₁₈); 128,65(C₁₆); 129,27(C₁₁); 131,95(C₆); 133,67(C₁₇); 134,13(C₄); 136,13(C₁₃); 141,19(C₁₀); 147,97(C₁₅); 150,37(C₂); 164,49(C₉); 165,10(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 400MHz, δ ppm):

3,85 (s, 3H), 5,66 (s, 1H), 6,44 (s, 1H), 6,56 (s, 1H), 7,17 (dd, 1H, *J* = 0,8/1,2/8,0Hz), 7,35 (ddd, 1H, *J* = 0,8/1,2/8,0Hz), 7,50 (ddd, 1H, *J* = 1,2/1,6/8,0Hz), 7,59 (ddd, 1H, *J* = 1,6/8,0Hz), 7,71 (ddd, 1H, *J* = 1,2/7,6Hz), 8,00 (d, 1H, *J* = 8,0Hz), 8,03 (dd, 1H, *J* = 1,2/8,8Hz), 8,05 (dd, 1H, *J* = 1,6/8,0Hz).

IV (cm⁻¹): 3479, 3078, 3001, 2954, 1732, 1612, 1531, 1446, 1350, 1300, 1087, 856, 736.

6.10.5 Aduto 52



RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

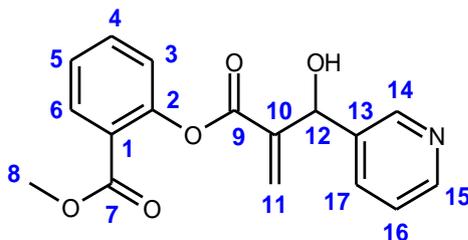
52,31(C₈); 71,70(C₁₂); 121,58(C₁₄ e C_{14'}); 122,65(C₁); 123,64(C₃); 126,33(C₅); 129,61(C₁₁); 131,87(C₆); 134,04(C₄); 140,90(C₁₀); 149,60(C₁₅ e C_{15'}); 150,02(C₂); 150,57(C₁₃); 164,32(C₉); 164,81(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,74 (s, 3H); 5,68 (s, 1H); 5,99 (s, 1H); 6,64 (s, 1H); 7,01 (dd, 1H, *J* = 1,0/8,2Hz); 7,30 (ddd, 1H, *J* = 1,2/7,4/7,8Hz); 7,38 (dd, 2H, *J* = 1,0/4,8Hz); 7,53 (ddd, 1H, *J* = 1,4/1,6/8,0Hz); 8,01 (dd, 1H, *J* = 1,6/8,0Hz); 8,52 (dd, 2H, *J* = 1,4/4,4Hz).

IV (cm⁻¹): 3113, 2951, 2850, 1728, 1708, 1600, 1454, 1296, 1199, 1130, 1056, 968

6.10.6 Aduto 53



RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

51,94(C₈); 69,91(C₁₂); 122,81(C₁₁); 123,30(C₁₆); 123,50(C₃); 126,03(C₅); 128,00(C₁); 131,63(C₆); 133,76(C₄); 134,89(C₁₇); 137,62(C₁₃); 141,47(C₁₀); 148,19(C₁₄ e 15); 149,88(C₂); 164,11(C₉); 164,69(C₇).

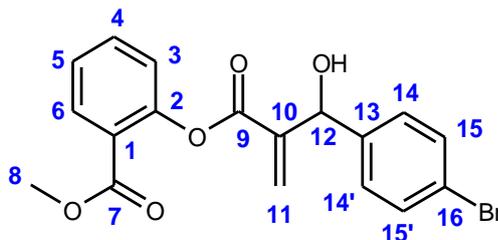
RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,68 (s, 3H); 5,74 (s, 1H); 6,20 (s, 1H); 6,67 (s, 1H); 7,00 (d, 1H, *J* = 8,0Hz); 7,24 (d, 1H, *J* = 7,8Hz); 7,28 (ddd, 1H, *J* = 1,0/7,8Hz); 7,51 (ddd 1H, *J* = 1,8/7,8Hz); 7,81 (dd,

1H, $J = 7,8\text{Hz}$); 7,98 (dd, 1H, $J = 1,6/7,8\text{Hz}$); 8,39 (d, 1H, $J = 4,6\text{Hz}$); 8,56 (d, 1H, $J = 1,8\text{Hz}$).

IV (cm^{-1}): 3151, 3055, 1728, 1608, 1454, 1431, 1203, 1053, 964, 732

6.10.7 Aduto 55



RMN¹³C-APT (CDCl_3 , 50 MHz, δ ppm):

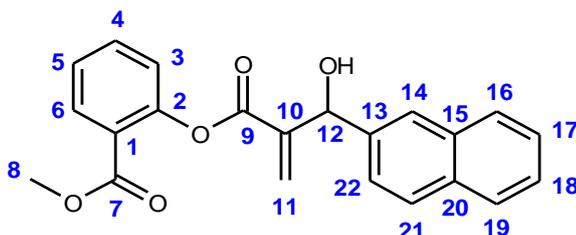
52,33(C₈); 72,25(C₁₂); 121,66(C₁₆); 122,82(C₁); 123,74(C₃); 126,27(C₅); 128,49(C₁₄ e C_{14'}); 128,82(C₁₁); 131,44(C₁₅ e C_{15'}); 131,80(C₆); 134,05(C₄); 140,10(C₁₀); 141,59(C₁₃); 150,11(C₂); 164,88(C₇). O carbono C₉ não foi visualizado no Espectro 34, mas seu deslocamento químico foi atribuído através de outro espectro de RMN¹³C realizado, com valor de 164,58 ppm.

RMN¹H (CDCl_3 , 200MHz, δ ppm):

3,76 (s, 3H); 5,68 (s, 1H); 5,92 (s, 1H); 6,61 (s, 1H); 7,05 (dd, 1H, $J = 1,2/8,0\text{Hz}$); 7,31 (1H) 7,33 (d, 2H, $J = 8,6\text{Hz}$); 7,48 (d, 2H, $J = 8,0\text{Hz}$); 7,55 (ddd, 1H, $J = 1,6/7,6\text{Hz}$); 8,02 (dd, 1H, $J = 1,8/7,8\text{Hz}$).

IV (cm^{-1}): 3502, 3078, 3001, 2951, 1716, 1604, 1485, 1435, 1404, 1300, 1041, 960, 844, 810, 756, 729.

6.10.8 Aduto 56



RMN¹³C-DEPT (CDCl₃, 50 MHz, δ ppm):

52,29(C₈); 72,79(C₁₂); 123,03(C₁); 123,81(C₃); 124,78(C₁₈); 125,75(C₁₇); 126,04(C₁₄);
126,15(C₂₁) 126,21(C₅); 127,65(C₁₆); 128,12(C₁₉); 128,15(C₂₂); 128,78(C₁₁);
131,89(C₆); 133,06(C₂₀); 133,28(C₁₅); 133,92(C₄); 138,40(C₁₃); 141,97(C₁₀);
150,22(C₂); 164,84(C₇); 164,97(C₇).

RMN¹H (CDCl₃, 200MHz, δ ppm):

3,69 (s, 3H); 5,90 (sl, 1H); 5,97 (s, 1H); 6,64 (s, 1H); 7,02 (dd, 1H, $J = 0,8/8,0\text{Hz}$);
7,28 (ddd, 1H, $J = 0,8/7,8\text{Hz}$); 7,50 (m, 4H); 7,84 (m, 3H); 7,95 (sl, 1H); 8,01 (dd, 1H,
 $J = 1,6/7,8\text{Hz}$).

IV (cm⁻¹): 3498, 3055, 2951, 1732, 1604, 1485, 1446, 1300, 1087, 1041, 960, 856,
817, 752.

6.10 Procedimentos da avaliação da atividade leishmanicida.

6.10.1 Atividade leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*.

A avaliação da atividade Leishmanicida dos adutos obtidos durante este trabalho foi feita em parceria com a equipe do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de biologia Molecular da UFPB (DBM-UFPB), coordenada pela Professora Doutora Márcia Rosa de Oliveira.

Trabalhou-se com duas espécies do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), a *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/68/PH8) e a *Leishmania chagasi* (MCAN/BR/99/JP15). Ambas as culturas do parasita foram mantidas em meio NNN/Schneider, o qual é suplementado com 20% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina), a 25°C e repicadas semanalmente.

Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo meio Schneider nos quais foram adicionados 1×10^6 células/mL de formas promastigotas dos parasitas em fase logarítmica de crescimento. Estes parasitas foram incubados na ausência e na presença de diferentes concentrações dos adutos estudados. Após 72 e 96 horas de incubação, para *L. amazonensis* e para *L. chagasi*,

respectivamente, as culturas foram analisadas sob microscopia óptica comum e quantificadas em câmara de Neubauer. Para esta quantificação, alíquotas das culturas foram diluídas em solução de Isoton (10,5g de ácido cítrico, 7g de NaCl, 15mL de formol e 1L de água destilada). Os percentuais inibitórios dos compostos foram obtidos por comparação direta ao grupo controle, o qual era representado pelas culturas incubadas apenas na presença do meio. Para a análise estatística dos resultados obtidos utilizou-se o teste ANOVA através do GraphPad Prism 5.0, sendo considerados significativos os resultados nos quais $p \leq 0,05$. Além disso, para os cálculos do IC_{50} utilizou-se o programa SPSS 8.0.

7. Referências

7. REFERÊNCIAS

1. CAMARGO, E. P. Doenças tropicais, **Estudos Avançados**, 22 (64), 95-110, 2008.
2. MORAN, M., GUZMAN, J., ROPARS, A. L., JAMESON, N., Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending?, **Plos Medicine**, 6 (2), 2009. Disponível em: http://www.dndi.org.br/Portugues/doencas_negligenciadas.aspx. Acessado em: 01 de outubro de 2010.
3. **US Pharmaceutical Industry Report, 2008-2009**, abril de 2009. Disponível em: <http://www.reportlinker.com/p0118600/US-Pharmaceutical-Industry-Report.html>. Acessado em: 20 de setembro de 2010.
4. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde; **Revista de Saúde Pública**, 44(1), 200-2, 2010.
5. LAINSON, R., SHAW, J. J., Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, R Killick-Kendrick (eds), **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, Vol. 1, Academic Press, London, p. 1-120, 1987.
6. GILLESPIE, S. H.; PEARSON, R. D., **Principles and Practice of Clinical Parasitology**, John Wiley & Sons Ltd., 287-313, 2001.
7. FORATTINI, O. P., **Entomologia Médica**, 4. ed., São Paulo: Edgard Blücher, 1973.
8. DOWLATI, Y., Cutaneous leishmaniasis: clinical aspects. **Clinical Dermatology**, 14, 425–431, 1996.
9. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2007. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: SVS / MS.
10. LAINSON, R., Leishmania e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, 11(1), 29-40, 1997.
11. CAMARGO, L. M. A., BARCINSKI, M. A., Leishmanioses, feridas bravas e calazar. *Ciência e Cultura*, 1, 34-37, 2003.
12. LAINSON, R., SHAW, J. J., New world Leishmaniasis – The Neotropical Leishmania species. Em: **Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections** (9ª ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.
13. GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N., Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas, **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3), 338-349, 2004.
14. ALENCAR, J. E., DIETZE, R., Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R., **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 8ª ed: 706-717, 1991.

15. PENNA, H. A., Leishmaniose visceral no Brasil., **Brasil-Médico**, 48, 949-950,1934.
16. MARZOCHI, M. C. A., MARZOCHI, K. B. F., CARVALHO, R. W., Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro., **Parasitology Today**,10(1), 34-37, 1994.
17. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2006. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral**. 1ª Edição. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: SVS / MS.
18. MURRAY H. W., BERMAN J. D., DAVIES C. R., SARAVIA N. G., **Lancet**, 366, 1561–1577, 2005.
19. OLIVEIRA, J. M., FERNANDES, A. C., DORVAL, M. E. C., ALVES, T. P., FERNANDES, T. D., OSHIRO, E. T., OLIVEIRA, A. L. L., **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43(2), 188-193, 2010.
20. CRAIG, C. R., STITZEL, R. E., **Modern pharmacology with clinical applications**, 6th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; p.611, 2003.
21. SAMPAIO, R. N., MARSDEN, P. D., Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B, **Review Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(2), 125-8, 1997.
22. SALAH, A. B., BUFFET, P. A., MORIZOT, G., MASSOUD, N. B., ZÂATOUR, A., ALAYA, N. B., HAMIDA, N. B. H., AHMADI, Z. E., DOWNS, M. T., SMITH, P. L., DELLAGI, K., GRÖGL, M., WR279,396, a Third Generation Aminoglycoside Ointment for the Treatment of *Leishmania major* Cutaneous Leishmaniasis: A Phase 2, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study, **PLoS Neglected Tropical Disease**, 3(5), 1-9, 2009. Disponível em: <<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0000432>>. Acessado em 13 de outubro de 2010.
23. BASAVIAH, D., RAO, A. J., SATYANARAYANA, T., Recent Advances in the Baylis-Hillman Reaction and Applications, **Chemical Reviews**, 103, 811-891, 2003.
24. BAYLIS, A. B.; HILLMAN, M. E. D., **German Patent** 2155113, 1972.
25. MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H., A Tertiary Phosphine-catalyzed Reaction of Acrylic Compounds with Aldehydes, **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 41, 2815, 1968.
26. BASAVIAH, D.; RAO, P. D.; HYMA, R. S.; The Baylis-Hillman Reaction: A novel carbon-carbon bond forming reaction, **Tetrahedron**, 52, 8001-8062, 1996.
27. BASAVIAH, D., RAO, K. V., REDDY, R. J., The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry, **Review Chemical Society**, 36, 1581-1588, 2007.
28. COELHO, F.; ALMEIDA, W. P., Reação de Baylis-Hillman: Uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica, **Química Nova**, 23, 98-101, 2000.

29. DREWES, S. E., EMSLIE, N. D., Necic acid synthons. Part 1. Total synthesis of integerrineic acid, **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 1, 9, 2079, 1982.
30. HOFFMANN, H. M. R., RABE, J., DABCO-catalyzed couplings of acrylic acid esters with aldehydes. 1. Synthesis of 2-(1-hydroxyalkyl)acrylic acid esters; simple three-step synthesis of mikanecic acid, **Angewandte Chemie**, 95, 795-796, 1983.
31. RAUHUT, M.; CURRIER, H., **U. S. Patent** 3,074,999, Chemical Abstract, 58, 11224a, 1963.
32. LEE, K. Y., GOWRISANKAR, S., KIM, J. N., Baylis-Hillman Reaction and Chemical Transformations of Baylis-Hillman Adducts, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 26(10), 1481-1490, 2005.
33. HILL, J. S., ISAACS, N. S., Mechanism of α -substitution reactions of acrylic derivatives, **Journal of Physical Organic Chemistry**, 3, 285-290, 1990.
34. a) PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., JUNG, H. M., MCQUADE, D. T., Baylis-Hillman mechanism: a new interpretation in aprotic solvents, **Organic Letters**, 7, 147-150, 2005. b) PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., WALKER, B. J., MCQUADE, D. T., A new interpretation of the Baylis Hillman mechanism, **Journal of Organic Chemistry**, 70, 3980-3987, 2005.
35. DREWES, S. E.; EMSLIE, N. D.; FIELD, J. S.; KHAN, A. A.; RAMESAR, N. S., A novel tetrahydrofuran derivative via a tertiary ketol-type rearrangement, **Tetrahedron Letters**, 34, 1205-1208, 1993.
36. PERLMUTTER, P.; PUNIANI, E.; WESTMAN, G., The reactions of aryl acrylates under Baylis-Hillman conditions, **Tetrahedron Letters**, 37, 1715-1718, 1996.
37. BRZEZINSKI, L. J.; RAFEL, S.; LEAHY, J. W., The asymmetric Baylis-Hillman reaction as a template in organic synthesis, **Tetrahedron**, 53, 16423-16434, 1997.
38. IWABUCHI, Y.; NAKATANI, M.; YOKOYAMA, N.; HATAKEYAMA, S., Chiral Amine-Catalyzed Asymmetric Baylis-Hillman Reaction: A Reliable Route to Highly Enantiomerically Enriched (α -Methylene- β -hydroxy)esters, **Journal of the American Chemical Society**, 121, 10219-10220, 1999.
39. LEE, W-D., YANG, K-S., CHEN, K., A remarkable rate acceleration of the Baylis-Hillman reaction, **Chemical Communications**, 17, 1612-1613, 2001.
40. SHI, M., LI, C.-Q., JIANG, J.-K., Different Reaction Patterns in the Baylis-Hillman Reaction of Aryl Aldehydes with Phenyl Vinyl Ketone, Phenyl Acrylate and Phenyl Thioacrylate, **Molecules**, 7, 721-733, 2002.
41. ROBIETTE, R. L., HARVEY, J. N., AGGARWAL, K. V., Mechanism of the Morita-Baylis-Hillman Reaction: A Computational Investigation, **Journal of the American Chemical Society**, 129, 15513-15525, 2007.
42. AMARANTE, G. W., MILAGRE, H. M. S., VAZ, B. G., VILACHÃ, B. R. F., EBERLIN, M. N., COELHO, F., Dualistic nature of the mechanism of the Morita-

Baylis-Hillman reaction probed by electrospray ionization mass spectrometry, **Journal of Organic Chemistry**, 74, 3031-3037, 2009.

43. MATEUS, C. R.; FELTRIN, M. P.; COSTA, A. M.; COELHO, F.; ALMEIDA, W. P., Diastereoselectivity in heterogeneous catalytic hydrogenation of Baylis-Hillman adducts. Total synthesis of (\pm)-sitophilate, **Tetrahedron**, 57, 6901-6908, 2001.

44. SILVEIRA, G. P. D.; COELHO, F., Enantioselective synthesis of 2-ethyl-2,3-dihydrobenzofuran carboxylic acid, direct precursor of (+)-efaroxan, from a Baylis-Hillman adduct, **Tetrahedron Letters**, 46, 6477-6481, 2005.

45. LOPES, E. C. S.; COELHO, F., Studies toward the synthesis of Amaryllidaceae alkaloids from Morita-Baylis-Hillman adducts: a straightforward synthesis of functionalized dihydroisoquinolin-5(6*H*)-one core, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 18, 1415-1438, 2007.

46. KRISHNA, P. R.; KANNAN, V.; SHARMA, G. V. M., First Diastereoselective Intramolecular Baylis-Hillman Reaction: An Easy Access to Chiral α -Methylene- β -hydroxylactones, **Journal of Organic Chemistry**, 69, 6467-6469, 2004.

47. REDDY, L. R.; SARVANAN, P.; COREY, E. J., A Simple Stereocontrolled Synthesis of Salinosporamide A, **Journal of the American Chemical Society**, 126, 6230-6231, 2004.

48. KUNDU, M. K., SUNDAR, N., KUMAR, S. K., BHAT, S. V., BISWAS, S. V. N., Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene-propionic acid derivatives, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 9, 731-736, 1999.

49. NARENDER, P., SRINIVAS, U., GANGADASU, B., BISWAS, S., RAO, V. J., Anti-malarial activity of Baylis-Hillman adducts from substituted 2-chloronicotinaldehydes, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 15, 5378-5381, 2005.

50. NARENDER, P., SRINIVAS, U., RAO, B. A., RAMESH, CH., HARAKISHORE, K., GANGADASU, B., MURTHY, U. S. N., RAO, V. J., Synthesis of multisubstituted quinolines from Baylis-Hillman adducts obtained from substituted 2-chloronicotinaldehydes and their antimicrobial activity, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 14, 4600-4609, 2006.

51. VASCONCELLOS, M. L. A. A., SILVA, T. M. S., CÂMARA, C. A., MARTINS, R. M., LACERDA, K. M., LOPES, H. M., PEREIRA, V. L. P., DE SOUZA, R. O. M. A., CRESPO, L. T. C., Baylis-Hillman adducts with molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, **Pest Management Science**, 62, 288-292, 2006.

52. KOHN, L. K., PAVAM, C. H., VERONESE, D., COELHO, F., De CARVALHO, J. E., ALMEIDA, W. P., Antiproliferative effect of Baylis-Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 41, 738-744, 2006.

53. DE SOUZA, R. O. M. A., PEREIRA, V. L. P., MUZITANO, M. F., FALCÃO, C. A. B., ROSSI-BERGMANN, B., FILHO, E. B. A., VASCONCELLOS, M. L. A. A., High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)

propanenitrile and analogous compounds, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 42, 99-102, 2007.

54. BARBOSA, T. P., JUNIOR, C. G. L., SILVA, F. P. L., LOPES, H. M., FIGUEIREDO, L. R. F., SOUSA, S. C. O., BATISTA, G. N., SILVA, T. G., SILVA, T. M. S., OLIVEIRA, M. R., VASCONCELLOS, M. L. A. A., Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, 1726-1730, 2009.

55. SILVA, F. P. L., Síntese de novos adutos de Morita-Baylis-Hillman: bioisosterismo clássico na otimização de leishmanicidas, **Dissertação de Mestrado**, João Pessoa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPB, 2009.

56. MOHAN, R., RASTOGI, N., NAMBOOTHIRI, I. N. N., MOBIN, S. N., PANDA, D., Synthesis and evaluation of α -hydroxymethylated conjugated nitroalkenes for their anticancer activity: Inhibition of cell proliferation by targeting microtubules **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 8073-8085, 2006.

57. SANDES, J. M., BORGES, A. R., JUNIOR, C. G. L., SILVA, F. P. L., CARVALHO, G. A. U., ROCHA, G. B., VASCONCELLOS, M. L. A. A., FIGUEIREDO, R. C. B. Q., 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl)propanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, **Bioorganic Chemistry**, 38, 190-195, 2010.

58. JUNIOR, C. G. L., DE ASSIS, P. A. C., SILVA, F. P. L., SOUSA, S. C. O., DE ANDRADE, N. G., BARBOSA, T. P., NERÍS, P. L. N., SEGUNDO, L. V. G., ANJOS, I. C., CARVALHO, G. A. U., ROCHA, G. B., OLIVEIRA, M. R., VASCONCELLOS, M. L. A. A., Efficient synthesis of 16 aromatic Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological evaluation on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*, **Bioorganic Chemistry**, 38, 279-284, 2010.

59. MONTANARI, C. A., A Química Medicinal na próxima década, **Química Nova**, 23, 134-137, 2000.

60. WERMUTH, C. G. ; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A., Glossary of terms used in medicinal chemistry, **Pure & Applied Chemistry**, 70, 1129-1143, 1998.

61. LIMA, L. M., Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira, **Química Nova**, 30, 1456-1468, 2007.

62. BARREIRO, E. J., Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo, **Química Nova**, 25, 1172-1180, 2002.

63. VIEGAS-JUNIOR C. DANUELLO A., BOLZANI V. S., BARREIRO E. J., FRAGA C. A. M., Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes, **Current Medicinal Chemistry**, 14, 1829-1852, 2007.

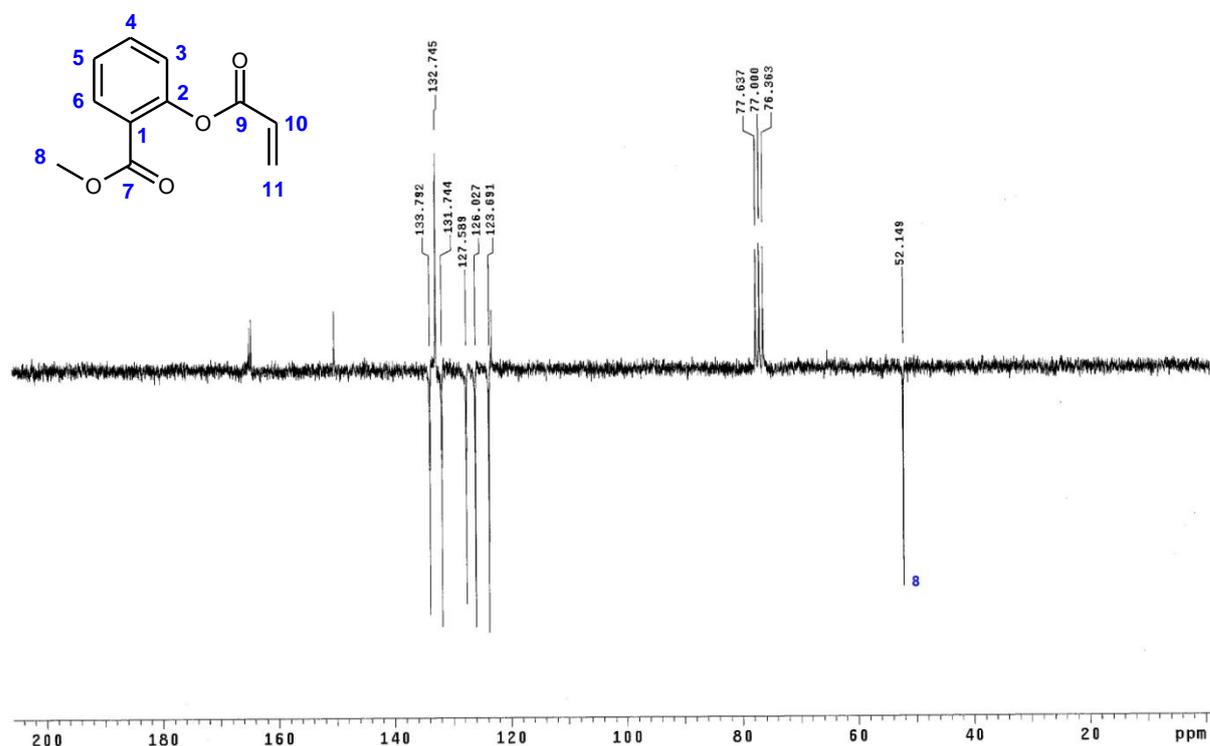
64. WILLIAMS, D. A., FOYE, W. O., LEMKE, T. L., **Foye's principles of medicinal chemistry**, 5th ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; p. 3, 2002.

65. KAR, A., **Medicinal Chemistry**, 4th ed., Nova Delhi, New Age International Publishers, p. 16, 2007.
66. YADAV, M. R., NIMEKAR, D. M., ANANTHAKRISHNAN, A., BRAHMKSHATRIYA, P. S., SHIRUDE, S. T., GIRIDHAR, R., PARMAR, A., BALARAMAN, R., Synthesis of new chemical entities from paracetamol and NSAIDs with improved pharmacodynamic profile, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 8701-8706, 2006.
67. GILLESPIE, R. D, MBOW, M. L, TITUS, R. G., The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva., **Parasite Immunology**, 22, 319-331, 2000.
68. MATTE, C., MAION, G., MOURAD, W., OLIVIER, M., *Leishmania donovani*-induced macrophages cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ synthesis, **Parasite Immunology**, 23 (4), 177–184, 2001.
69. MILES, S., Methyl Salicylate, **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, 1-6, 2008.
70. REDDY, B. S. R., BALASUBRAMANIAN, S., Novel activated acrylates: synthesis, characterization and the reactivity ratios of 4-acetamidophenyl acrylate copolymers with methyl methacrylate and glycidyl methacrylate, **European Polymer Journal**, 38, 803-813, 2002.
71. DE SOUZA, R. O. M. A., Reatividade da reação de morita-baylis-hillman em diferentes condições reacionais: um estudo teórico – experimental, **Tese de Doutorado**, Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, UFRJ, 2007.
72. COSTA, P., FERREIRA, V., ESTEVES, P., VASCONCELLOS, M., **Ácidos e Bases em Química Orgânica**, 1^a Ed., Porto Alegre, Editora Bookman, 2005.
73. COSTA, P., PILLI, R., PINHEIRO, S., VASCONCELLOS, M., **Substâncias Carboniladas**, 1^a Ed., Porto Alegre, Editora Bookman, 2003.
74. BODE, M. L., KAYE, P. T., Indolizine studies. Part 2. Synthesis and NMR spectroscopic analysis of 2-substituted indolizines, **Journal of the Chemical Society**, 1, 1809-1813, 1993.
75. WEIDE, T., ARVE, L., PRINZ, H., WALDMANN, H., KESSLER, H., 3-Substituted indolizine-1-carbonitrile derivatives as phosphatase inhibitors **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16, 59–63, 2006.
76. JAMES, D. A., KOYA, K., LI, H., LIANG, G., XIA, Z., YING, W., WU, Y., SUN, L., Indole- and indolizine-glyoxylamides displaying cytotoxicity against multidrug resistant cancer cell lines, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 18, 1784–1787, 2008.
77. FÁVERO, R. P., SERRANO, S. H. P., TAVARES, L. C., Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos, **Química Nova**, 32, 1013, 2009.

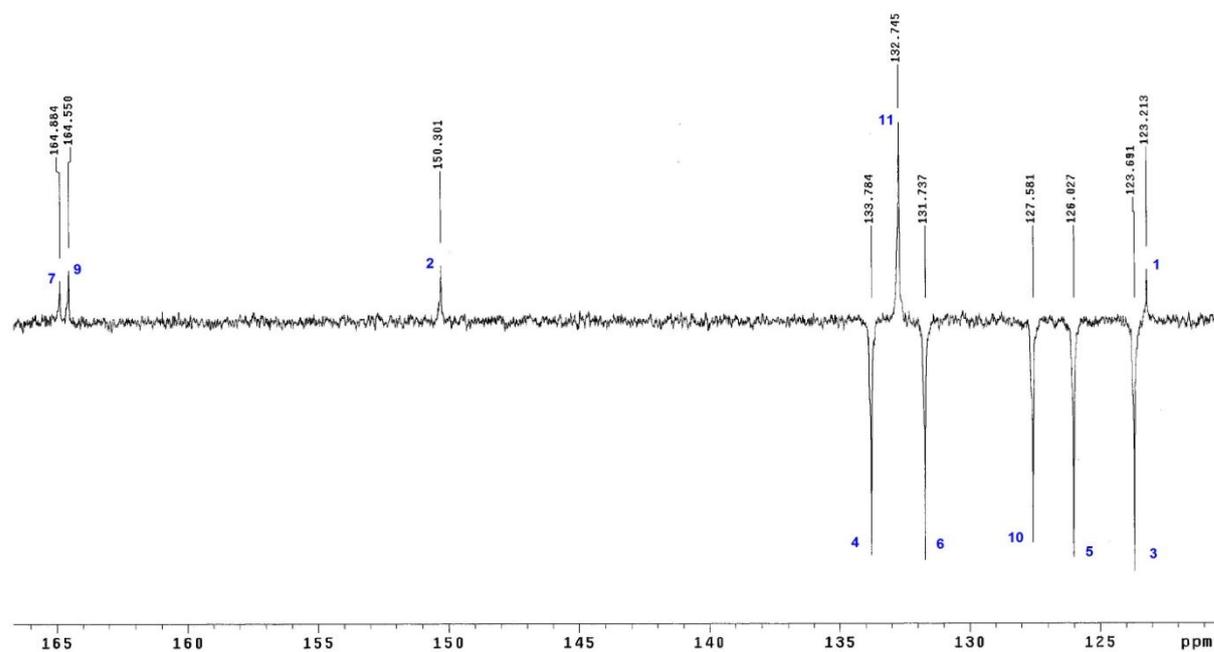
78. ROZENSKI, J., DE RAUNTER, C. J., VERPLANKEN, H., Quantitative structure-activity relationships for antimicrobial nitroheterocyclic drugs, **Quantitative Structure-Activity Relationship**, 14, 134, 1995.
79. WYLLIE, S., CUNNINGHAM, M. L., FAIRLAMB, A. H., Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*., **Journal of Biological Chemistry**, 279, 39925-39932, 2004.
80. ROMÃO, P. R., TOVAR, J., FONSECA, S. G., MORAES, R. H., CRUZ, A. K., HOTHERSALL, J. S., NORONHA-DUTRA, A. A., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q., Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 39, 355-363, 2006.

8. Espectros

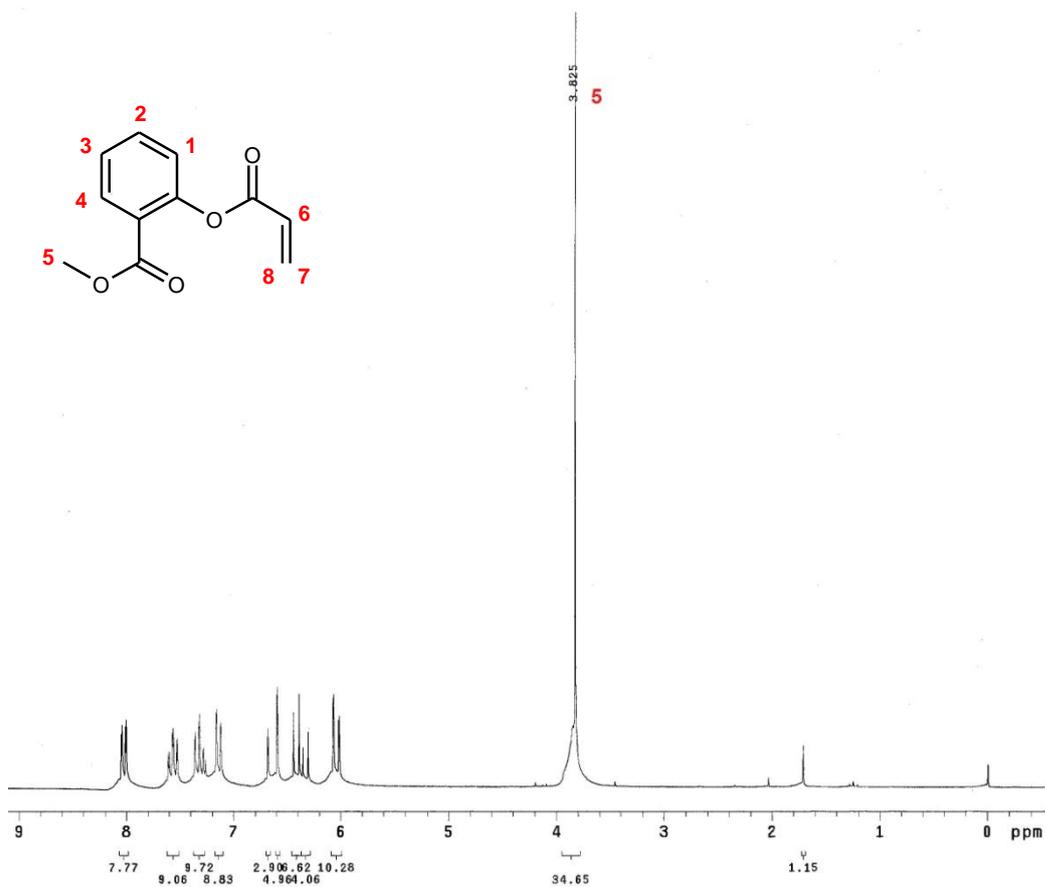
8. ESPECTROS



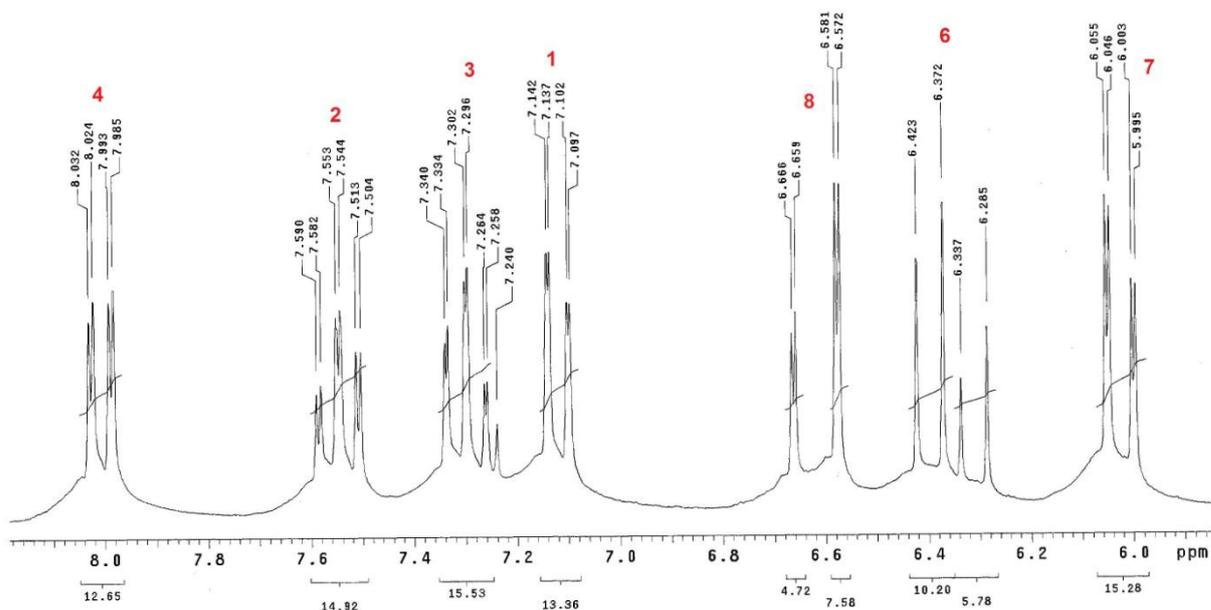
Espectro 1. Espectro de RMN¹³C-APT(CDCl₃, 50MHz) do 2-acrilóioxi benzoato de metila (**48**).



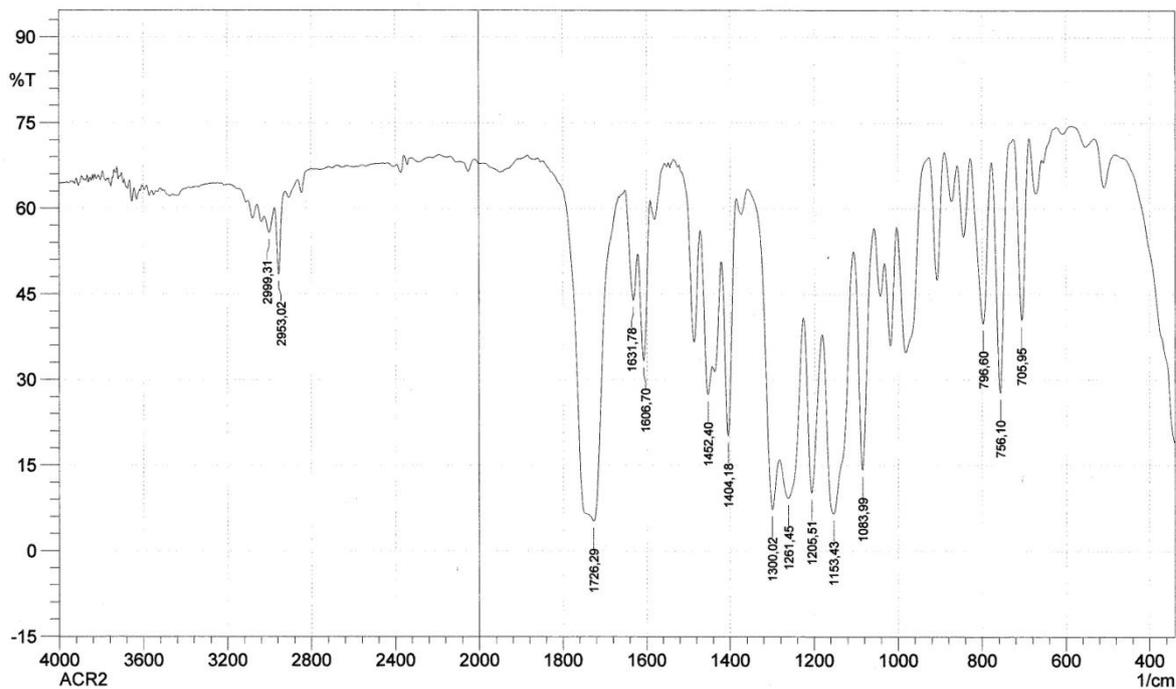
Espectro 2. Expansão do espectro de RMN¹³C-APT(CDCl₃, 50MHz) do 2-acrilóioxi benzoato de metila (**48**) na região de 121,0 a 166,0 ppm.



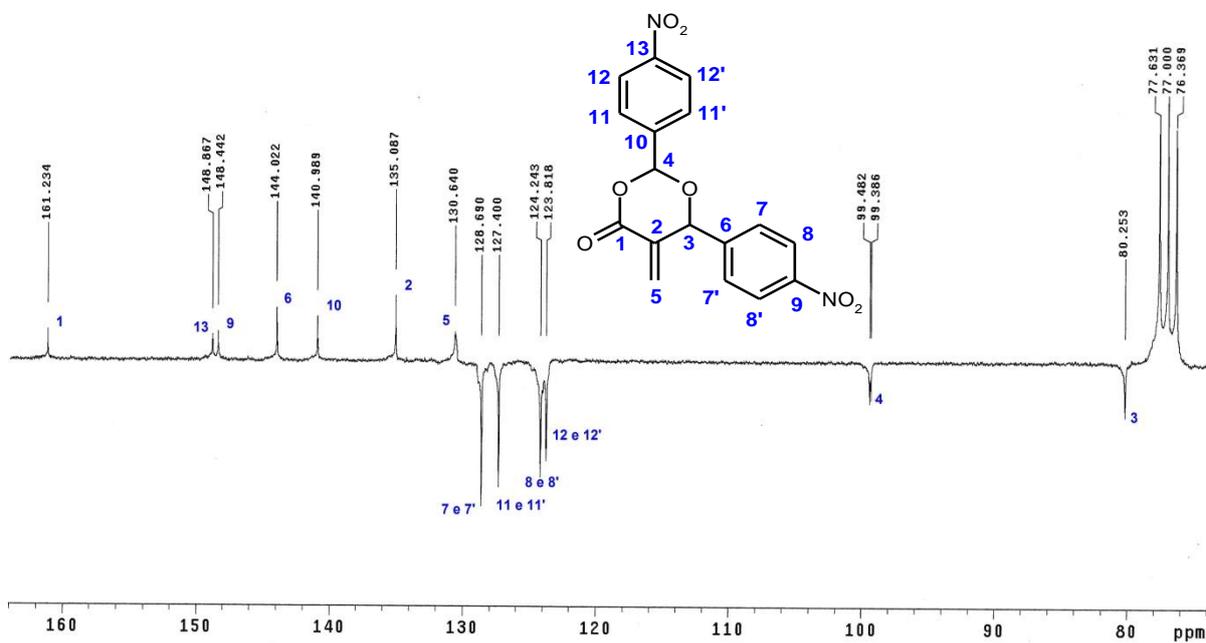
Espectro 3. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48).



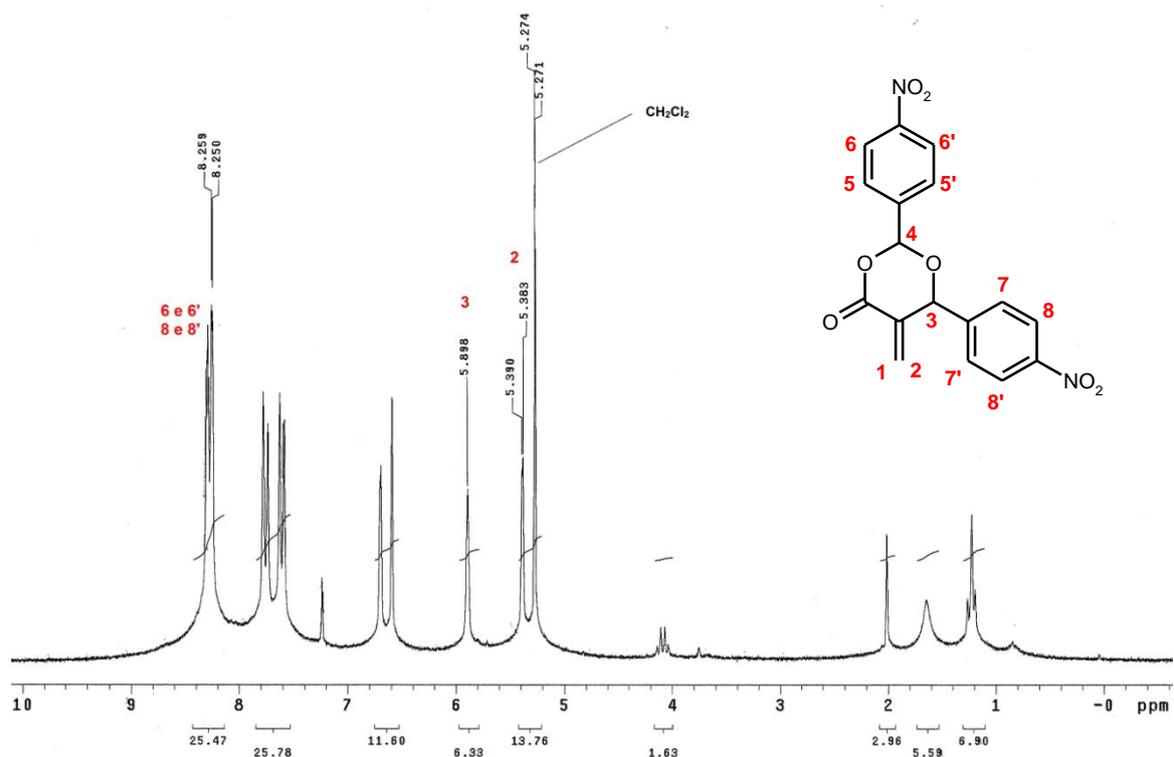
Espectro 4. Espectro de RMN¹H(CDCl₃, 200MHz) do 2-acrilóiloxi benzoato de metila (48) na região entre 5,90 e 8,20 ppm.



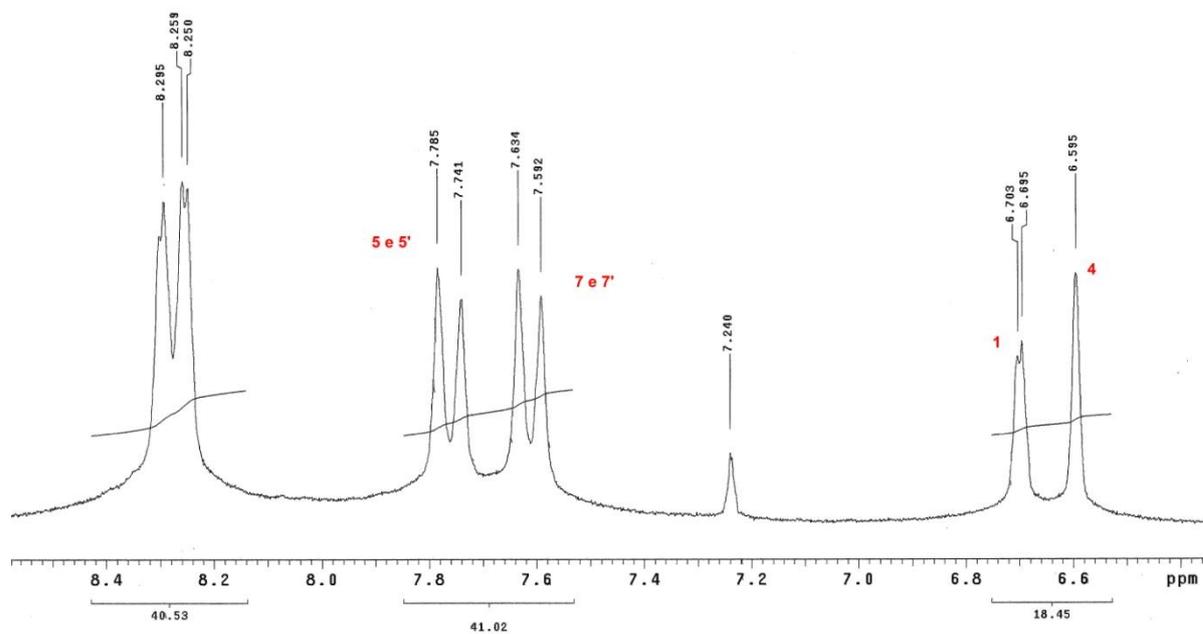
Espectro 5. Espectro de Infravermelho do 2-acrilóioxi benzoato de metila (**48**) em cm^{-1} .



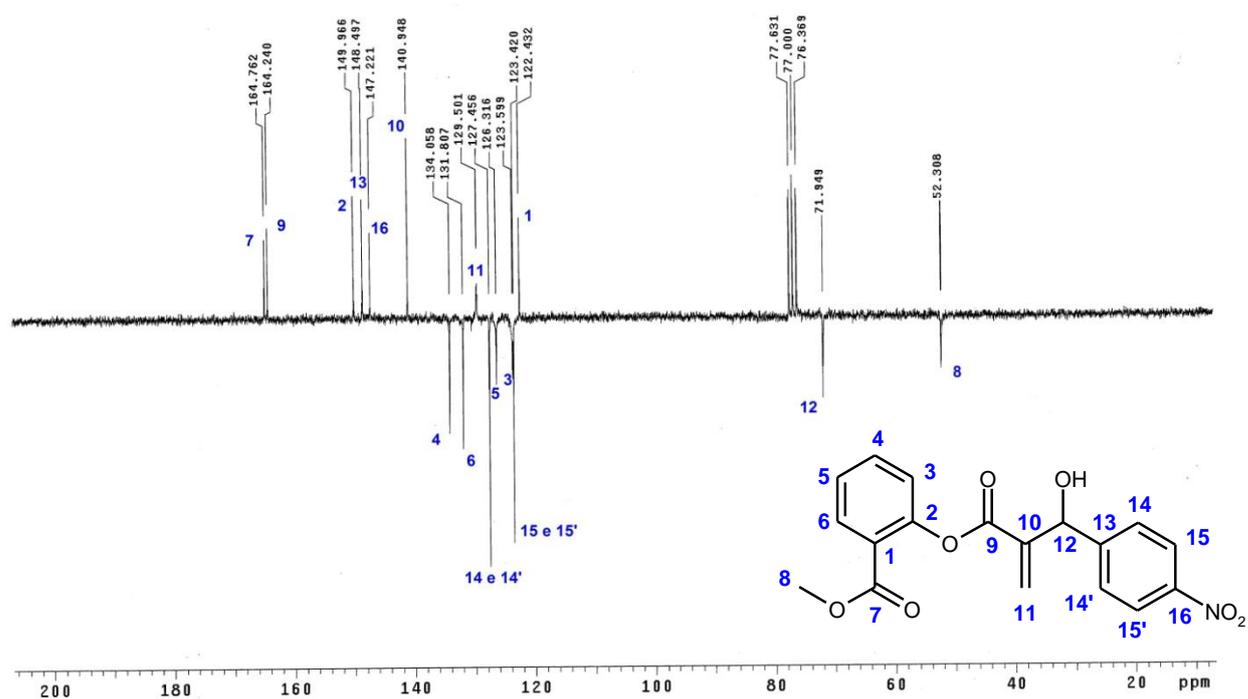
Espectro 6. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl_3 , 50MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona (**58**).



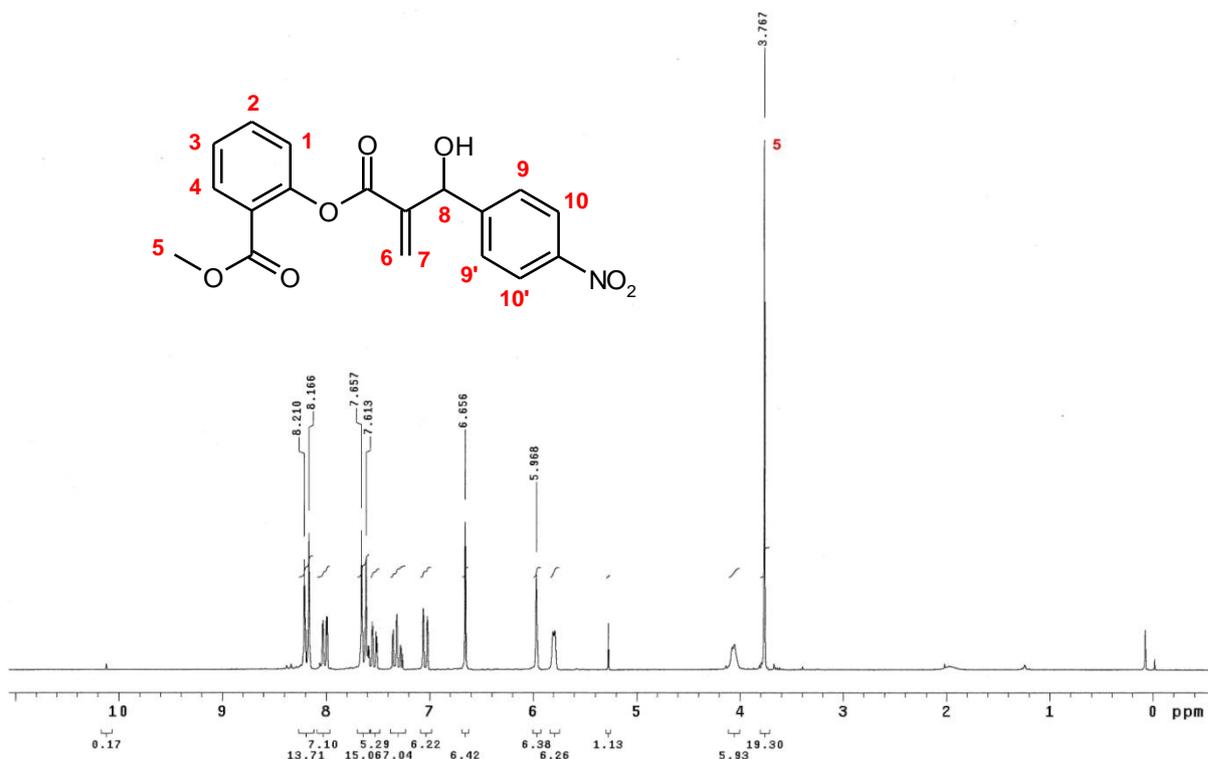
Espectro 7. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona(**58**).



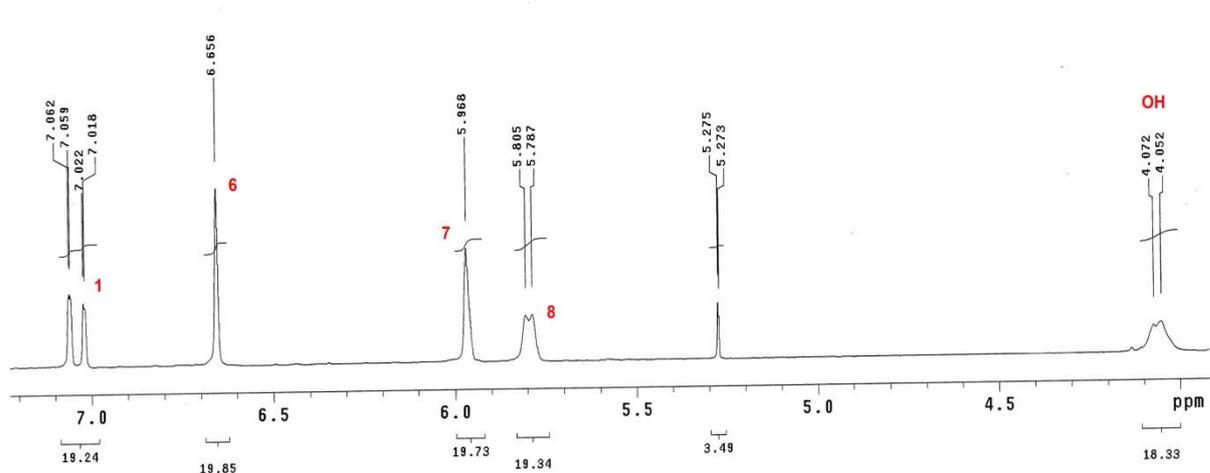
Espectro 8. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da 2,6-di(4-nitrofenil)-5-metileno-1,3-dioxan-4-ona(**58**) na região entre 6,4 e 8,6 ppm.



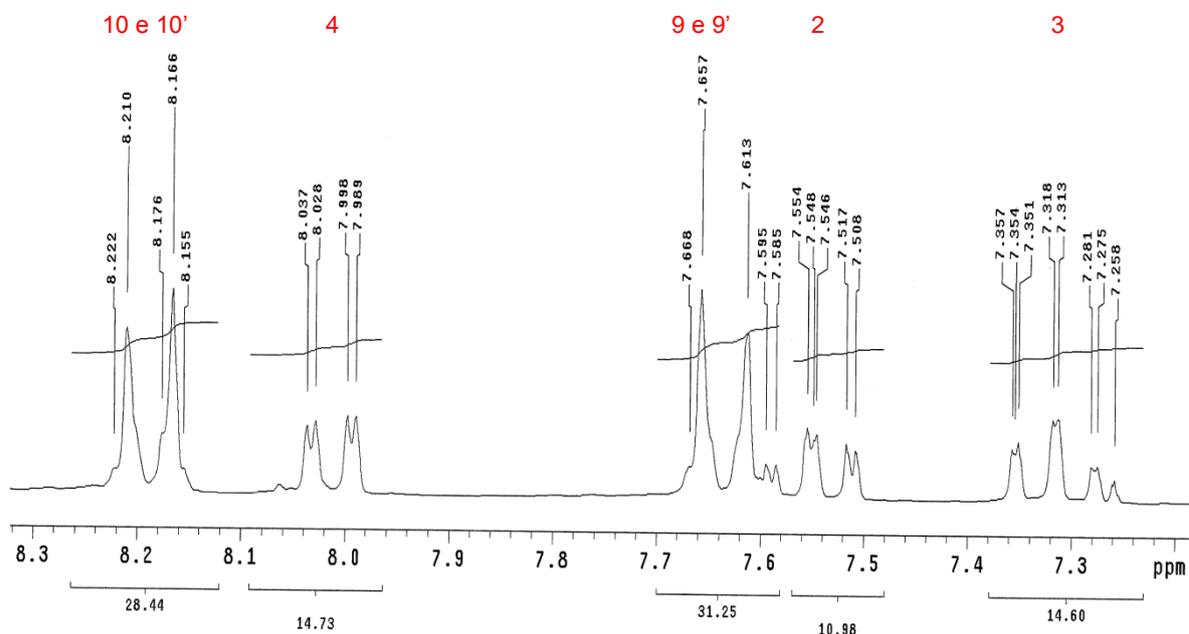
Espectro 9. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**49**).



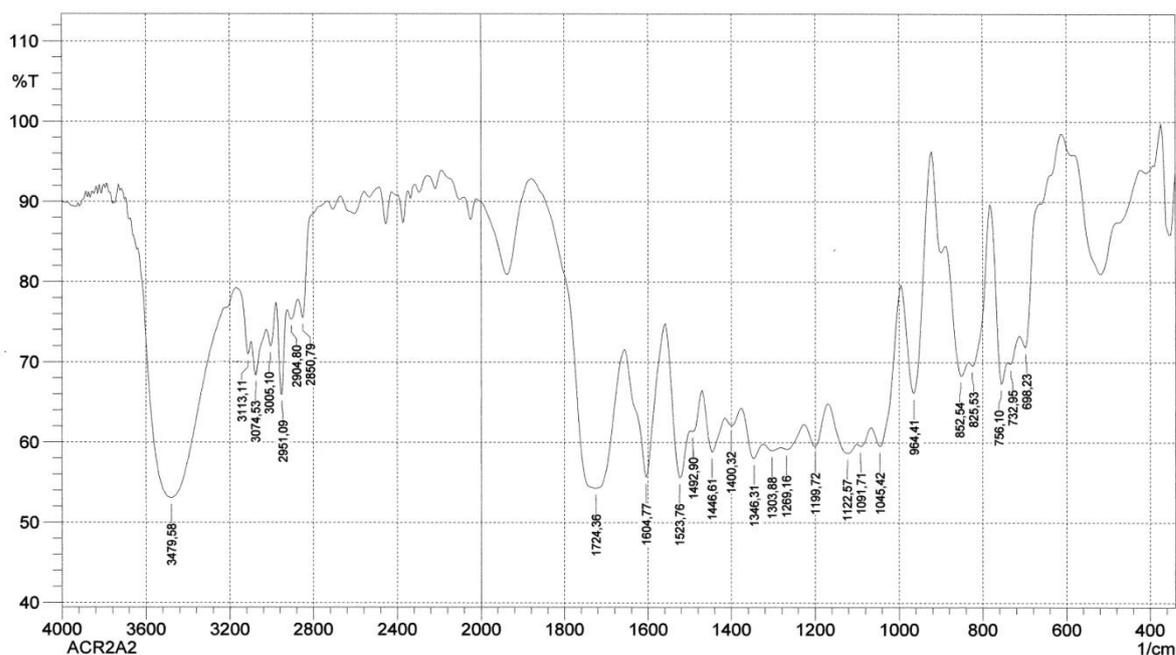
Espectro 10. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**49**).



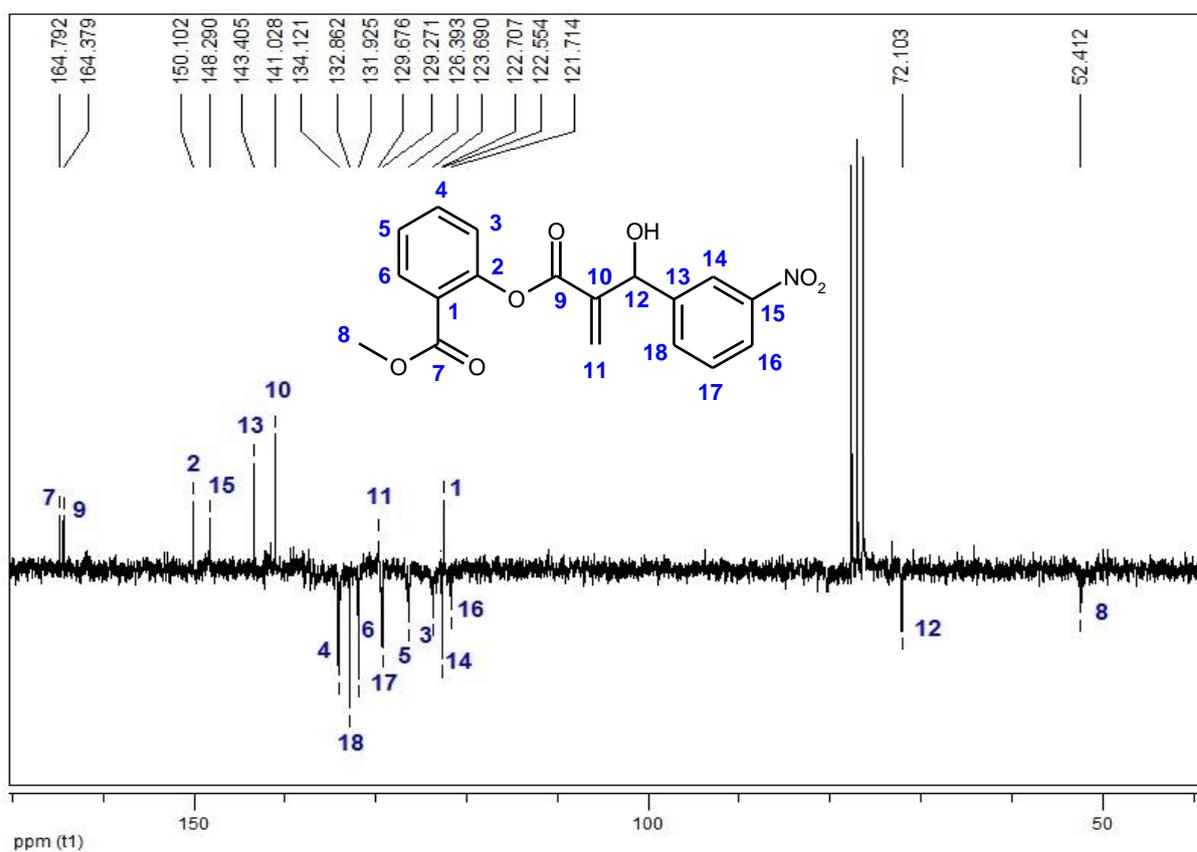
Espectro 11. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**49**) na região entre 4.0 e 7.2 ppm.



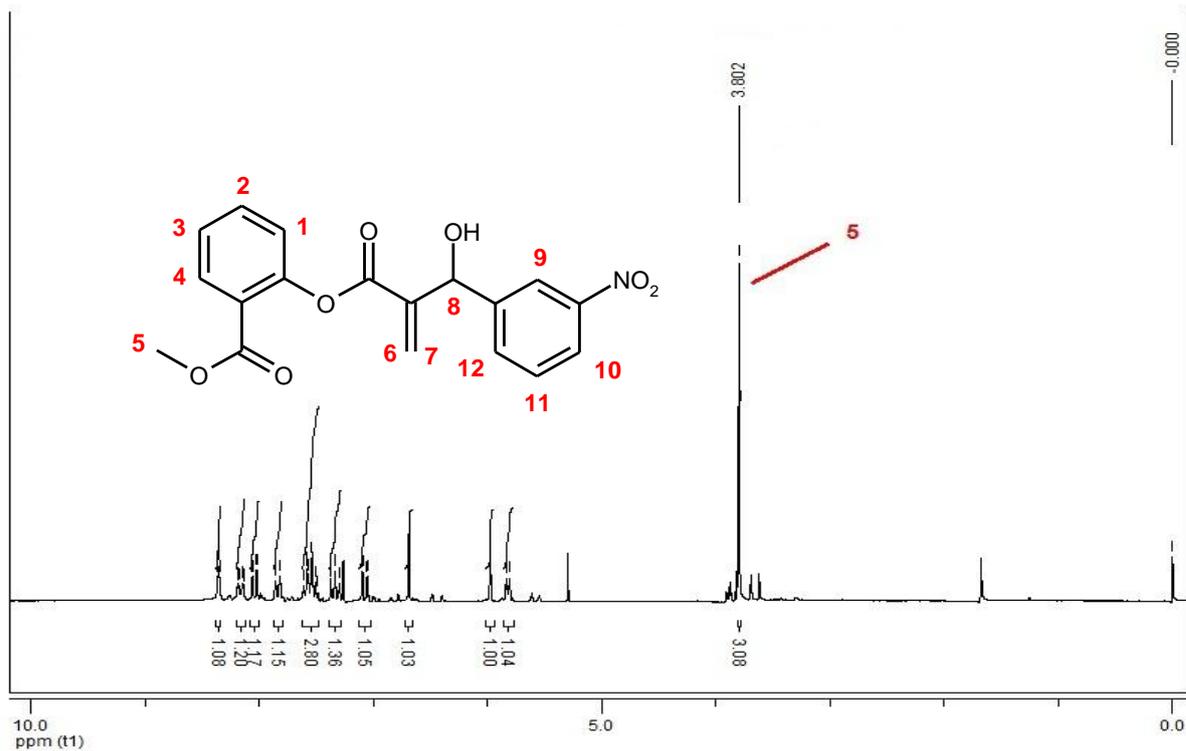
Espectro 12. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**49**) na região entre 7.2 e 8.3 ppm.



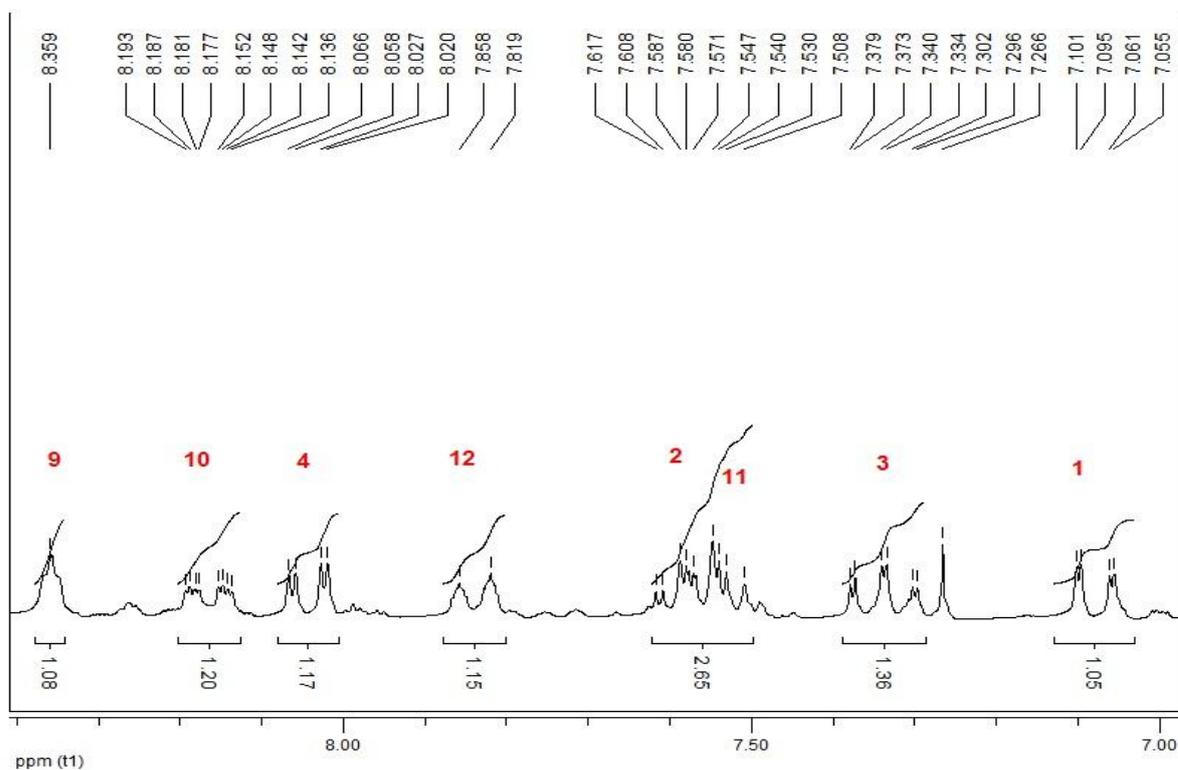
Espectro 13. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(4-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**49**) em cm^{-1} .



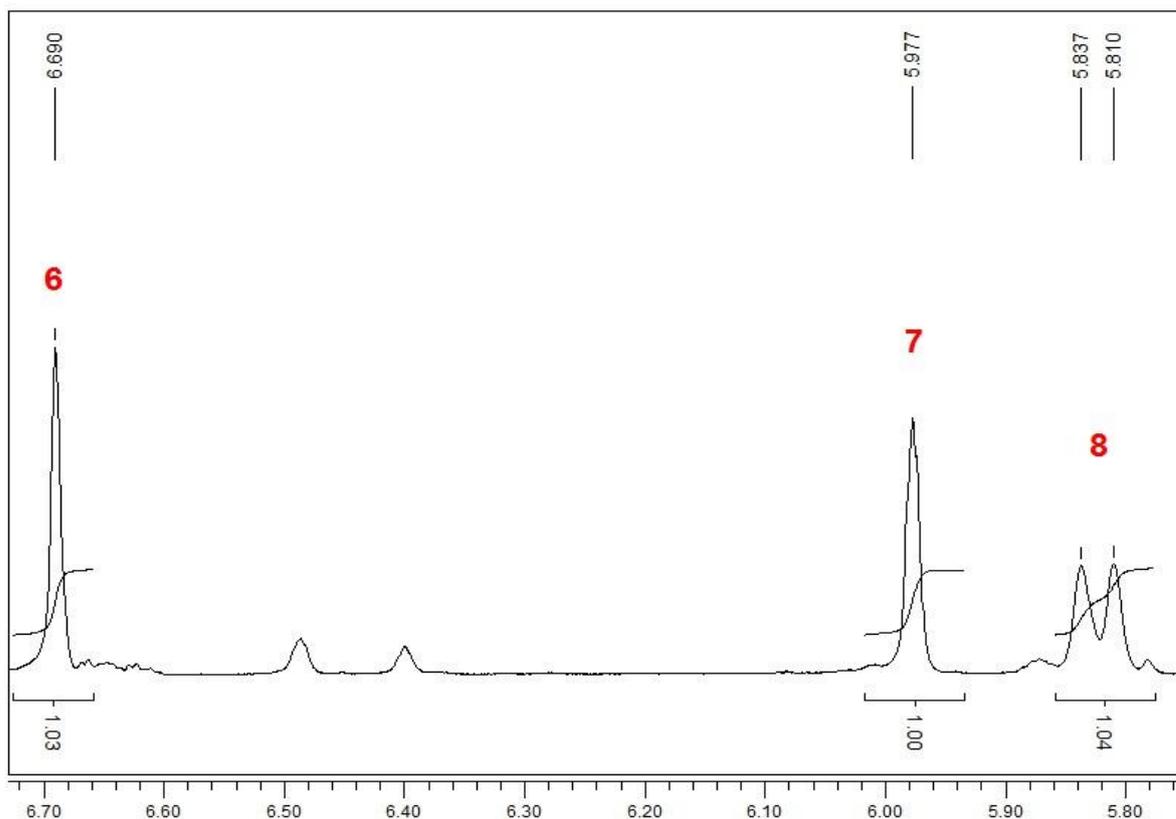
Espectro 14. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl_3 , 50MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**50**).



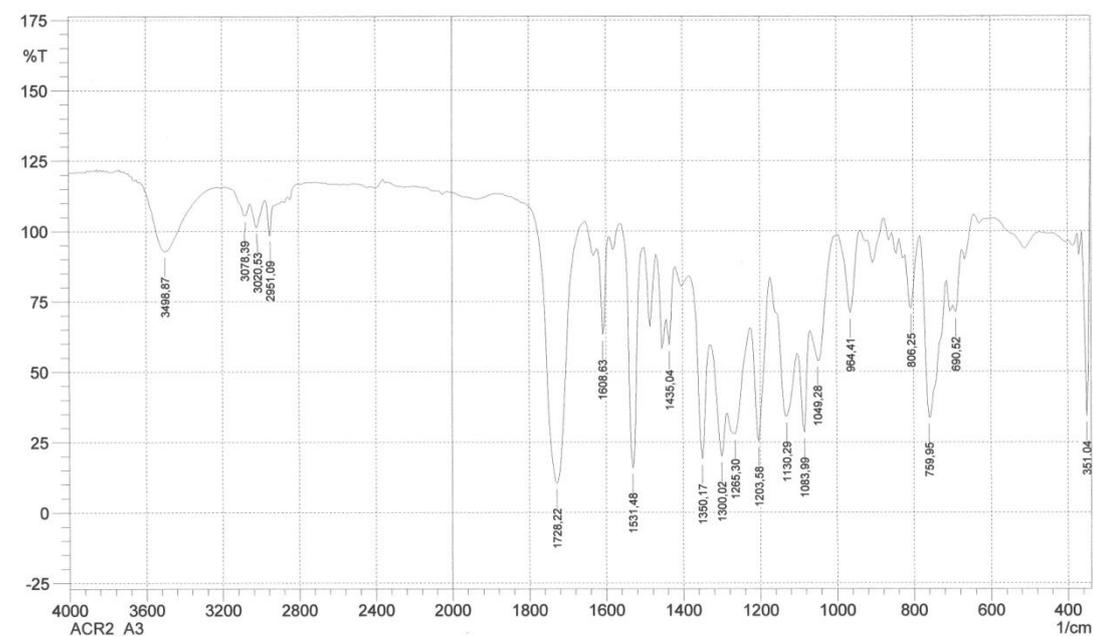
Espectro 15. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**50**).



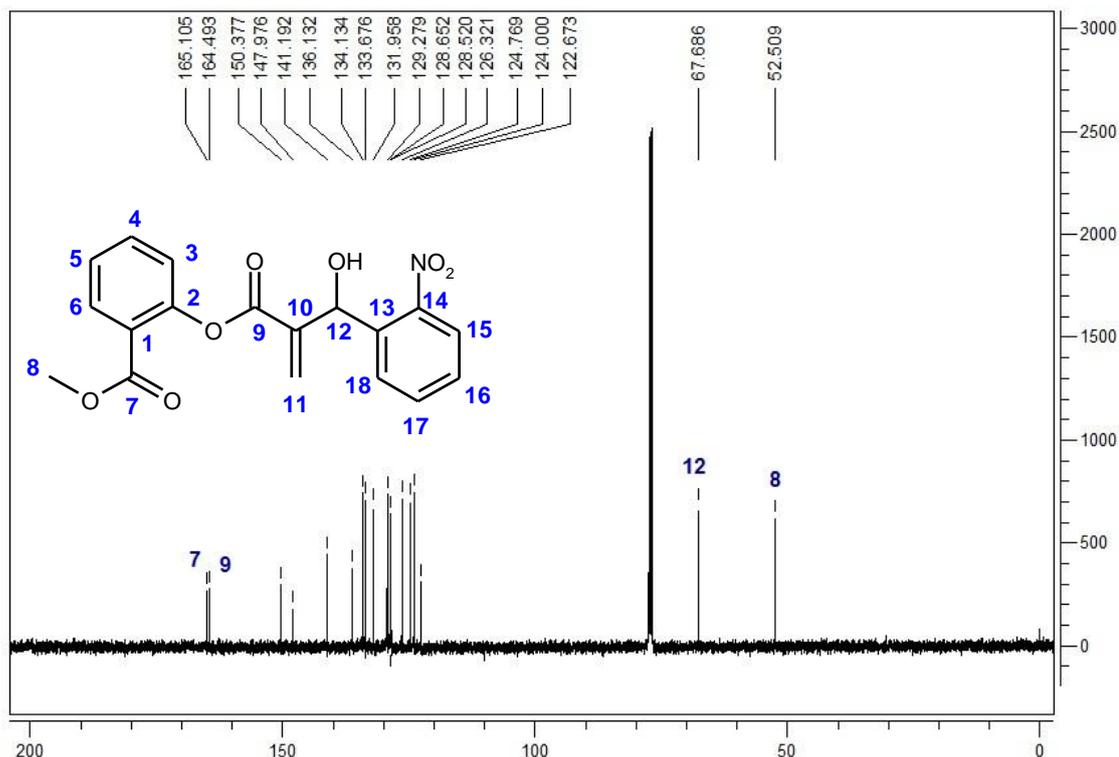
Espectro 16. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**50**) na região entre 7,00 e 8,40 ppm.



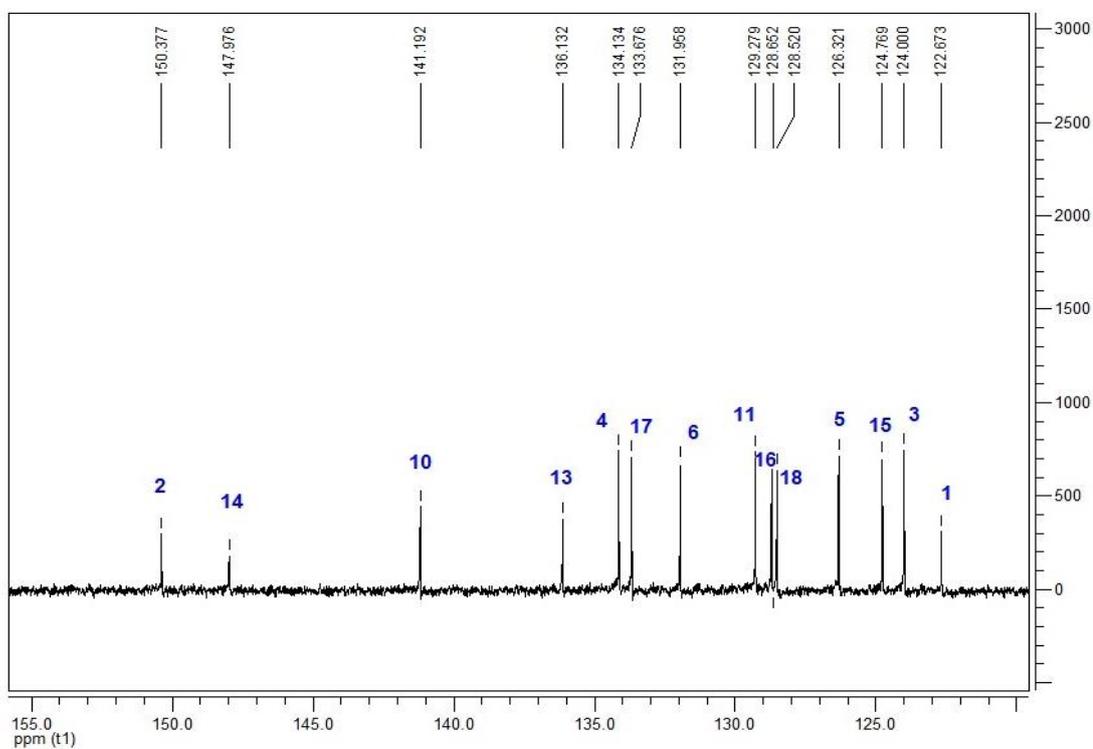
Espectro 17. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**50**) na região entre 5,76 e 6,72 ppm.



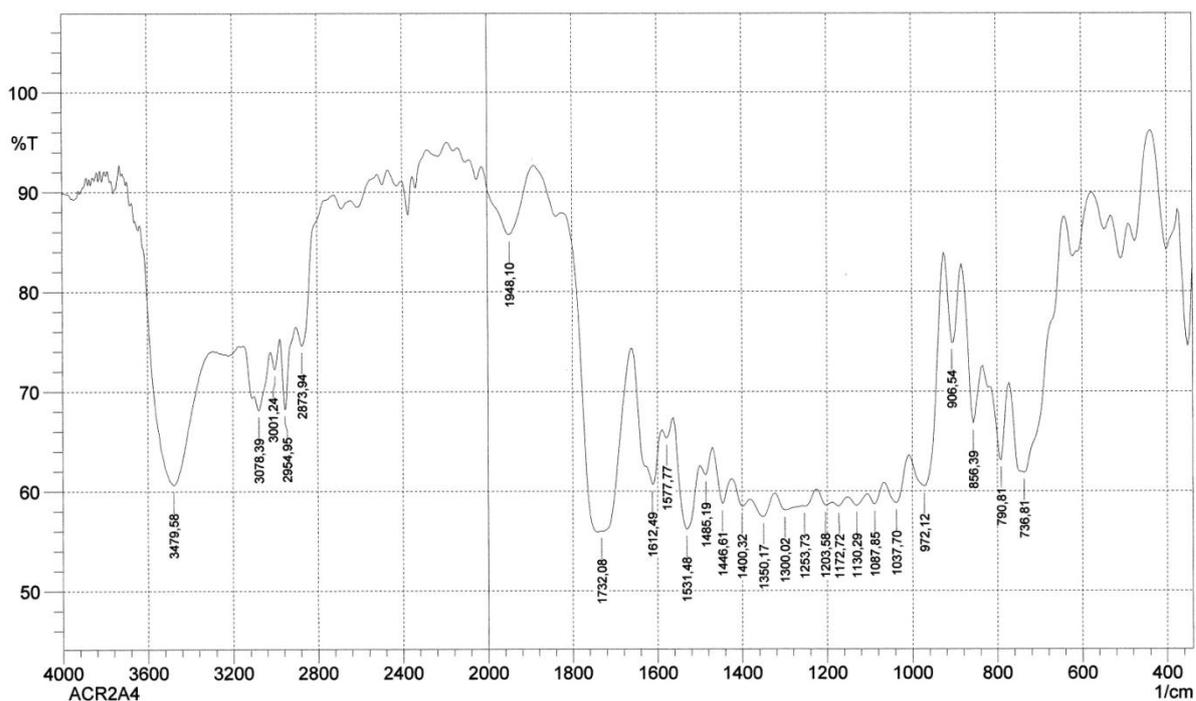
Espectro 18. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(3-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**50**) em cm⁻¹.



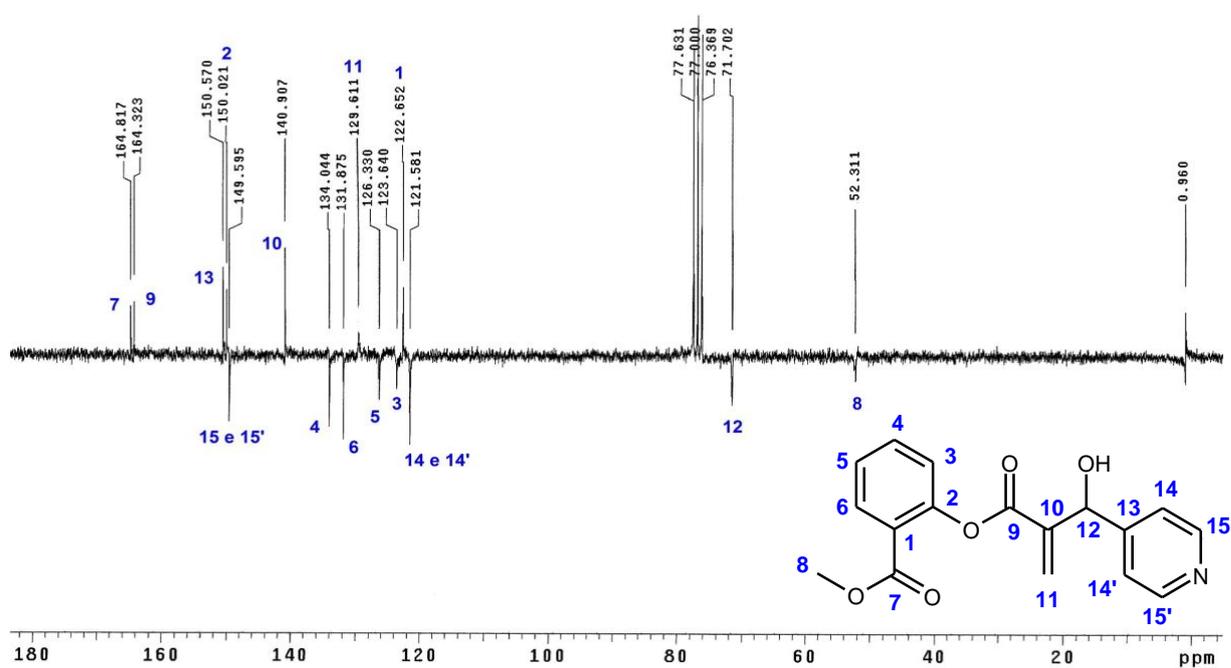
Espectro 19. Espectro de RMN¹³C-DEPT (CDCl₃, 100MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**51**).



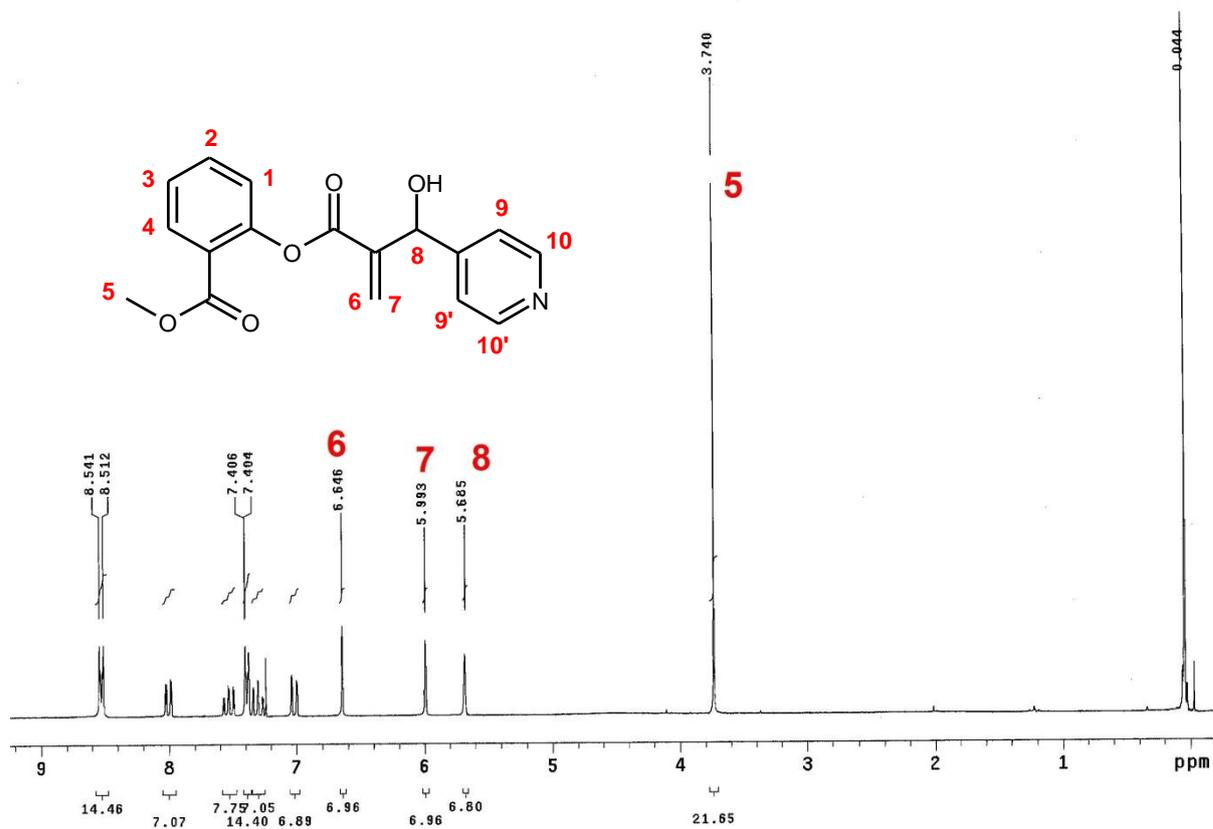
Espectro 20. Expansão do espectro de RMN¹³C-DEPT (CDCl₃, 100MHz) da Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**51**) na região de 120,0 a 155,0 ppm.



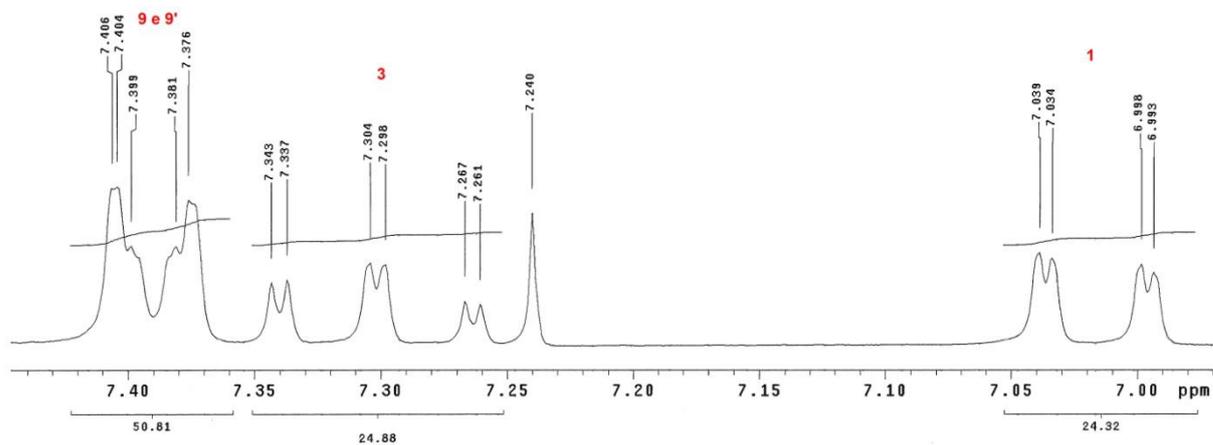
Espectro 23. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(2-nitrofenil)-hidroxi-metil]-acrilóioxi}-metila (**51**) em cm^{-1} .



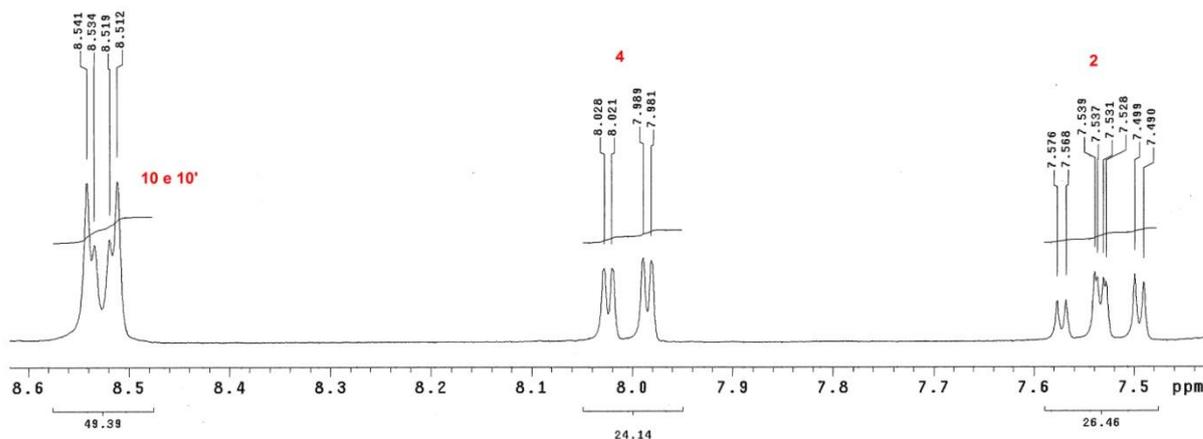
Espectro 24. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl_3 , 50MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóioxi]-metila (**52**).



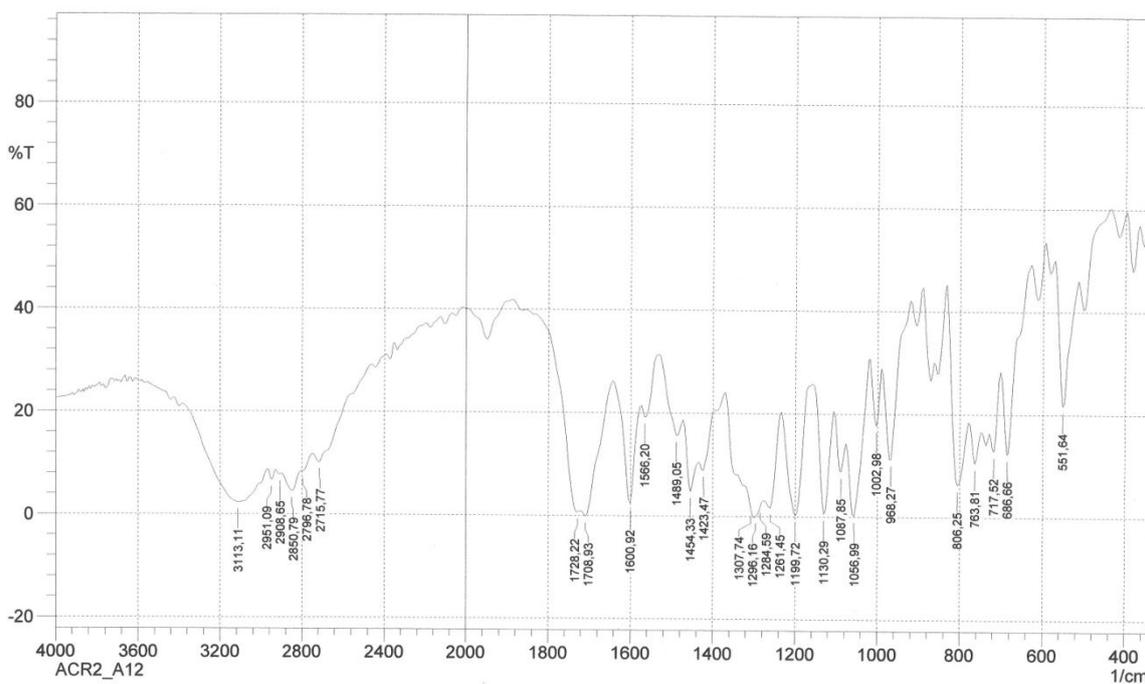
Espectro 25. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**57**).



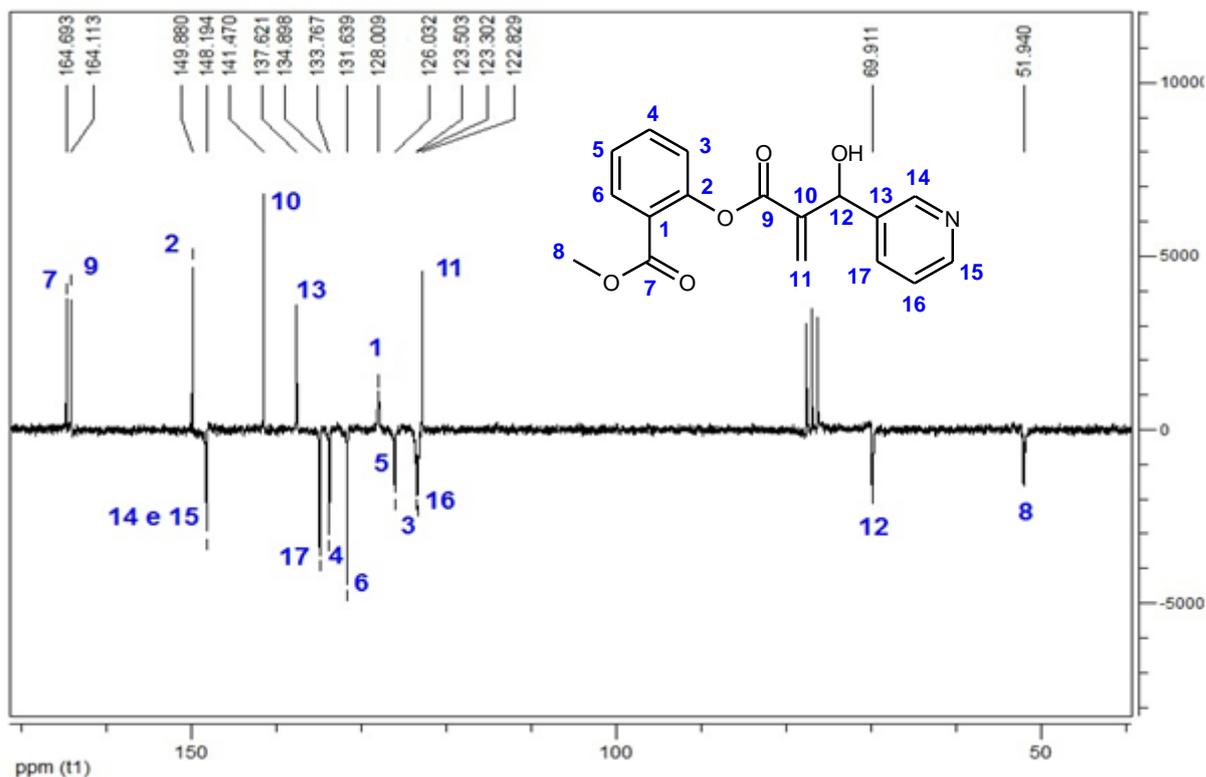
Espectro 26. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**52**) na região entre 6,07 e 7,44 ppm.



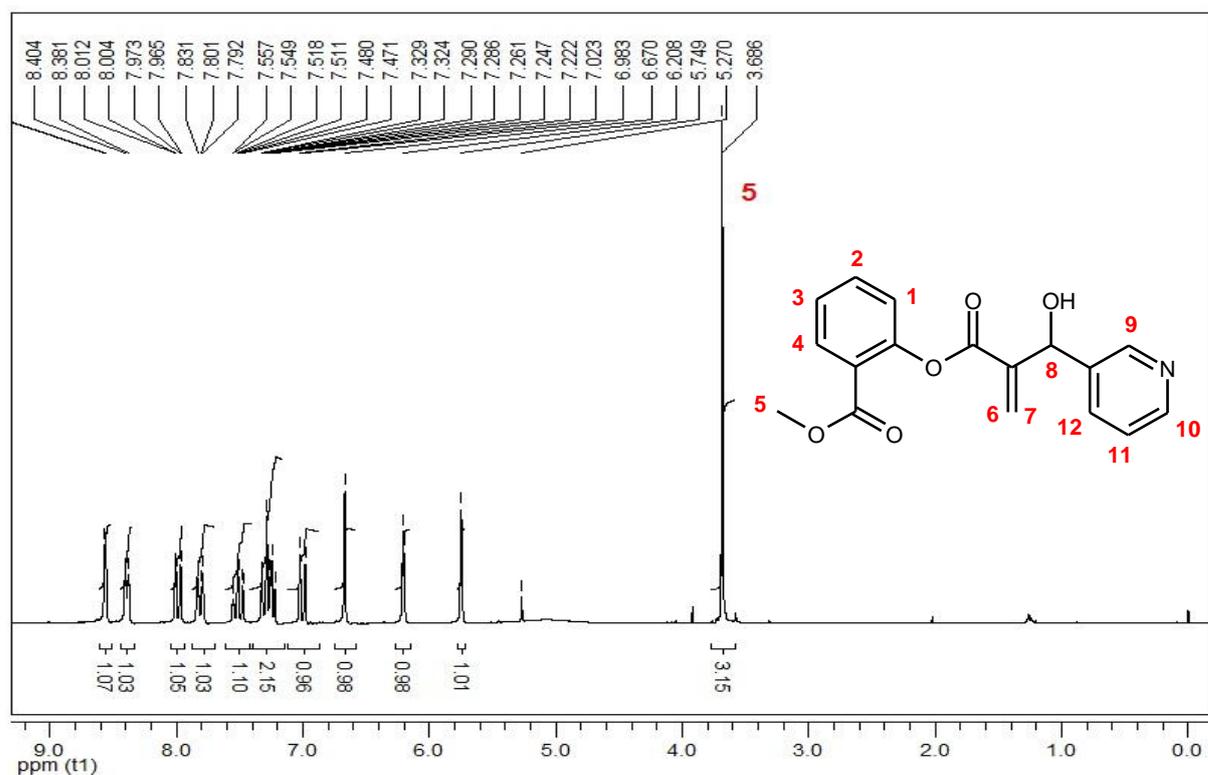
Espectro 27. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**52**) na região entre 7,44 e 8,6 ppm.



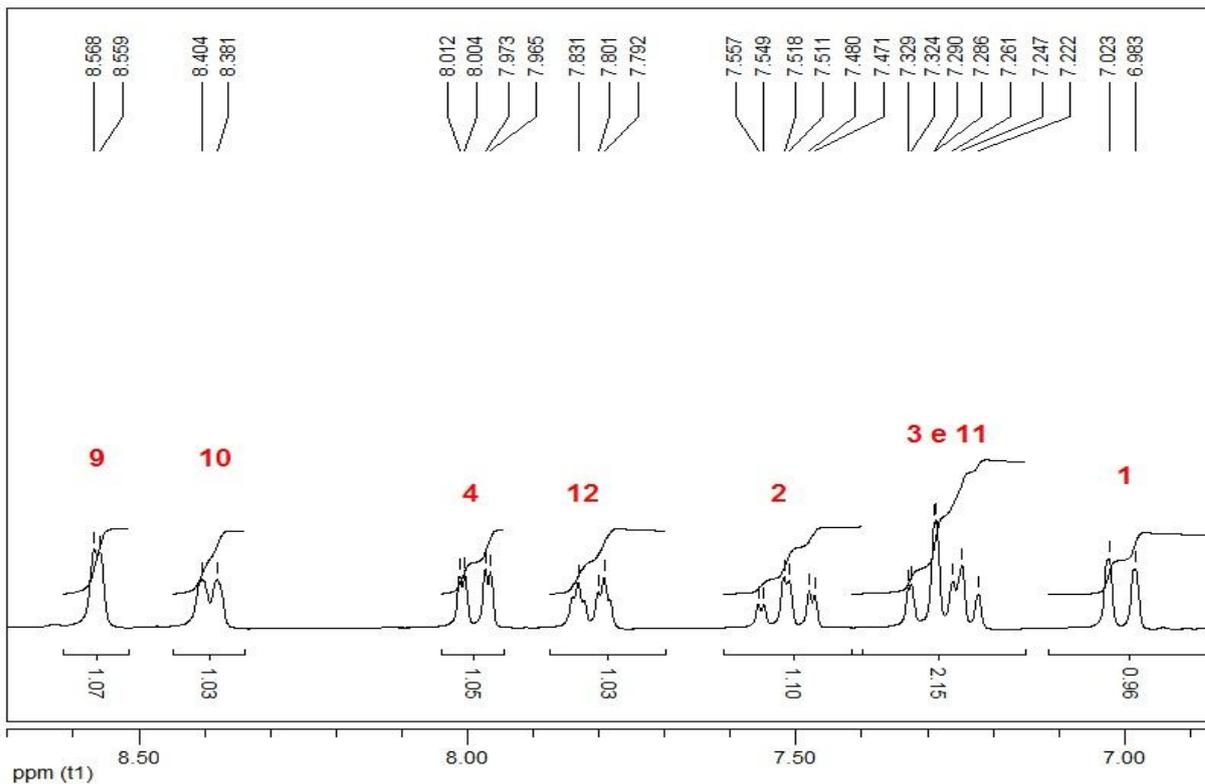
Espectro 28. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-4-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**52**) em cm⁻¹.



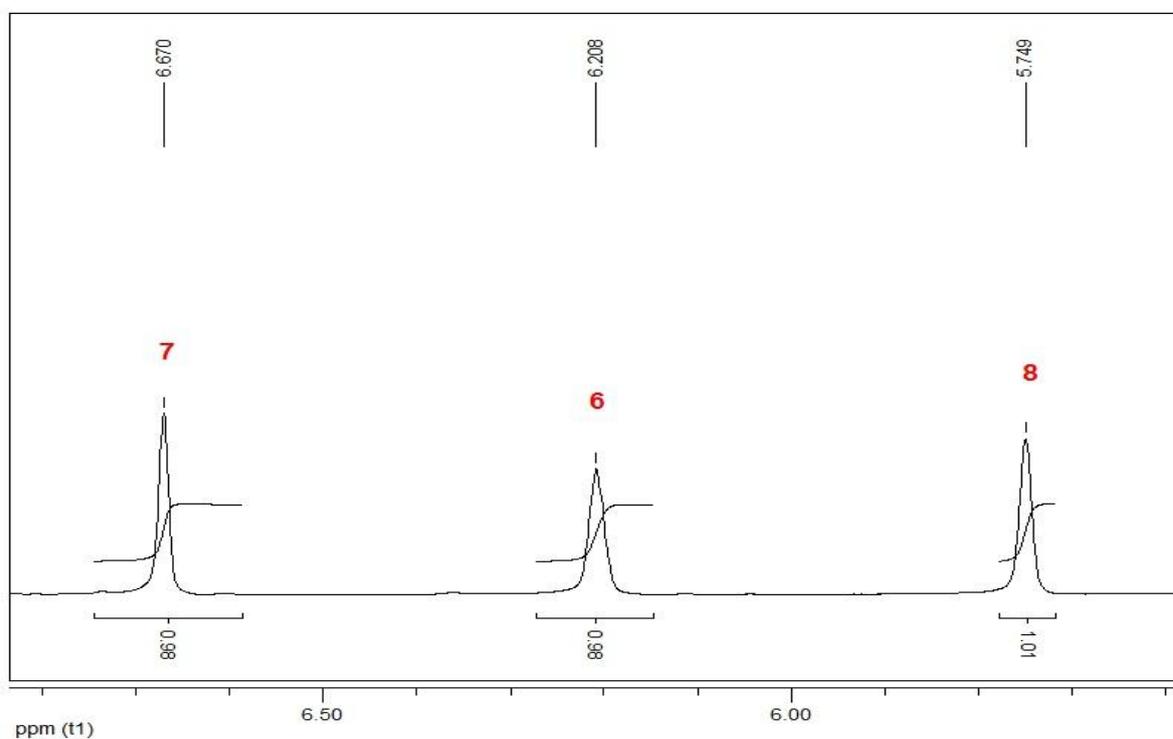
Espectro 29. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl₃, 50MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**53**).



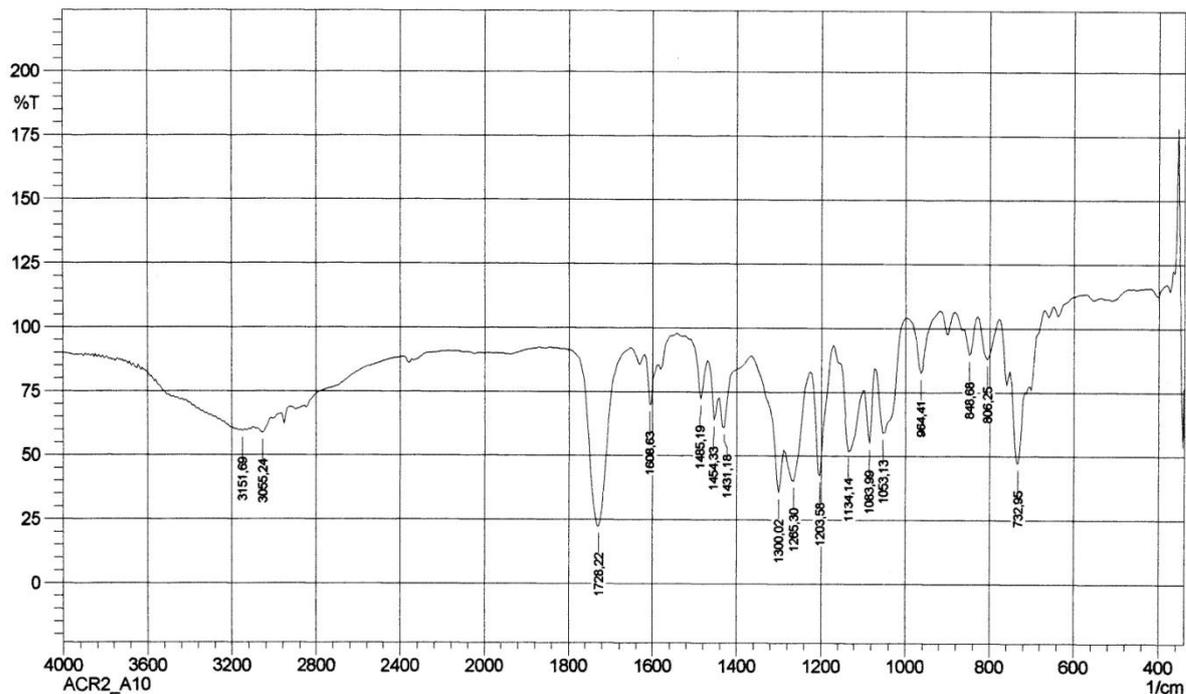
Espectro 30. Espectro de RMN¹H(CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**53**).



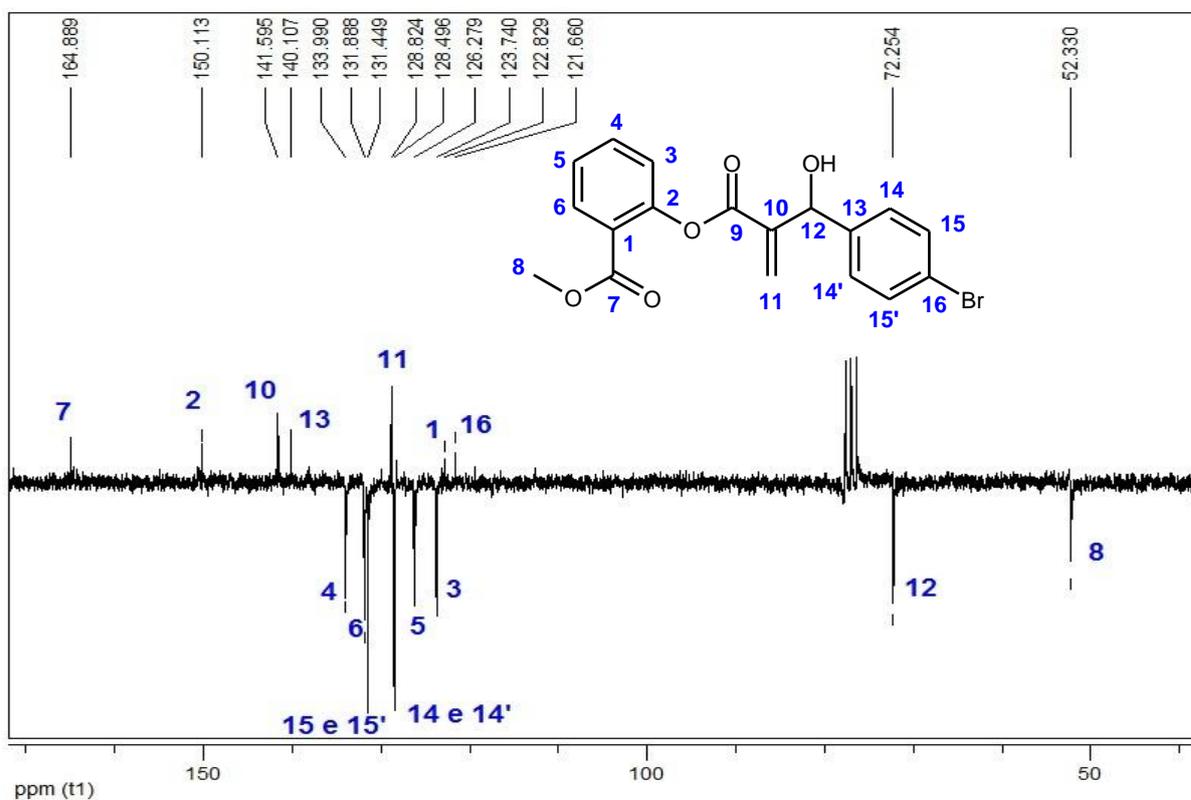
Espectro 31. Expansão do espectro de RMN¹H(CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**53**) na região entre 7,8 e 8,7 ppm.



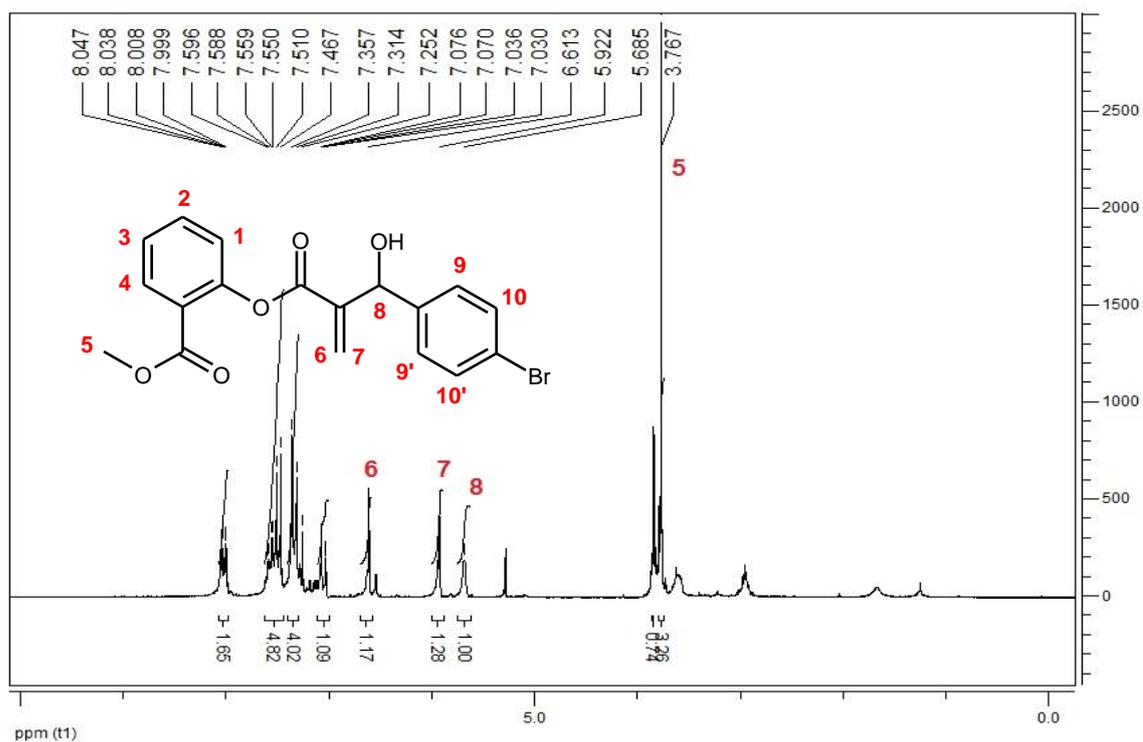
Espectro 32. Expansão do espectro de RMN¹H(CDCl₃, 200MHz) da Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**53**) na região entre 5,6 e 6,8 ppm.



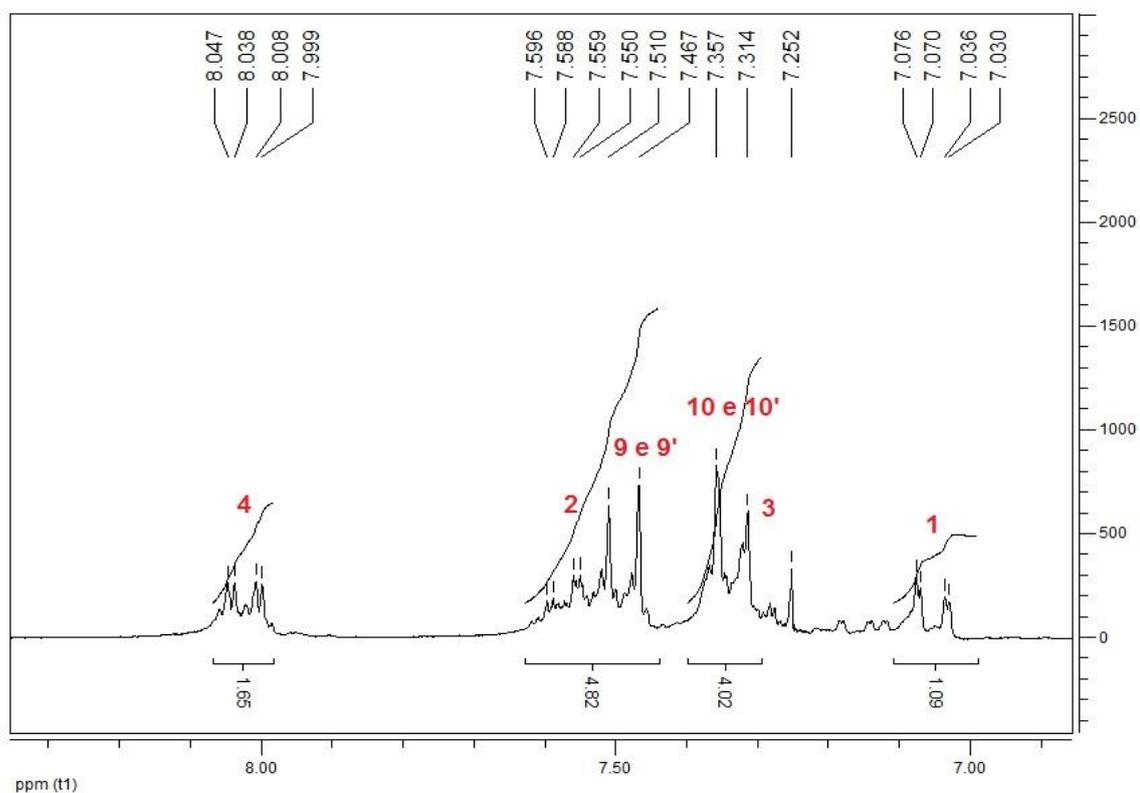
Espectro 33. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(hidroxi-piridin-3-il-metil)-acrilóiloxi]-metila (**55**) em cm^{-1} .



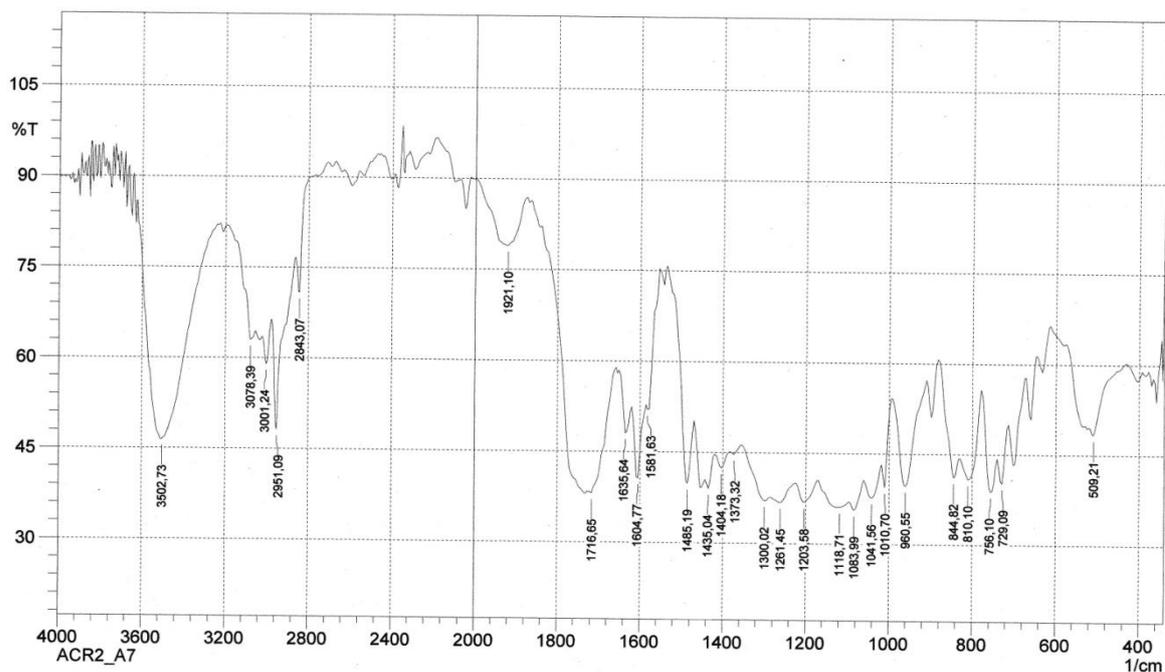
Espectro 34. Espectro de RMN¹³C-APT (CDCl_3 , 50MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**55**).



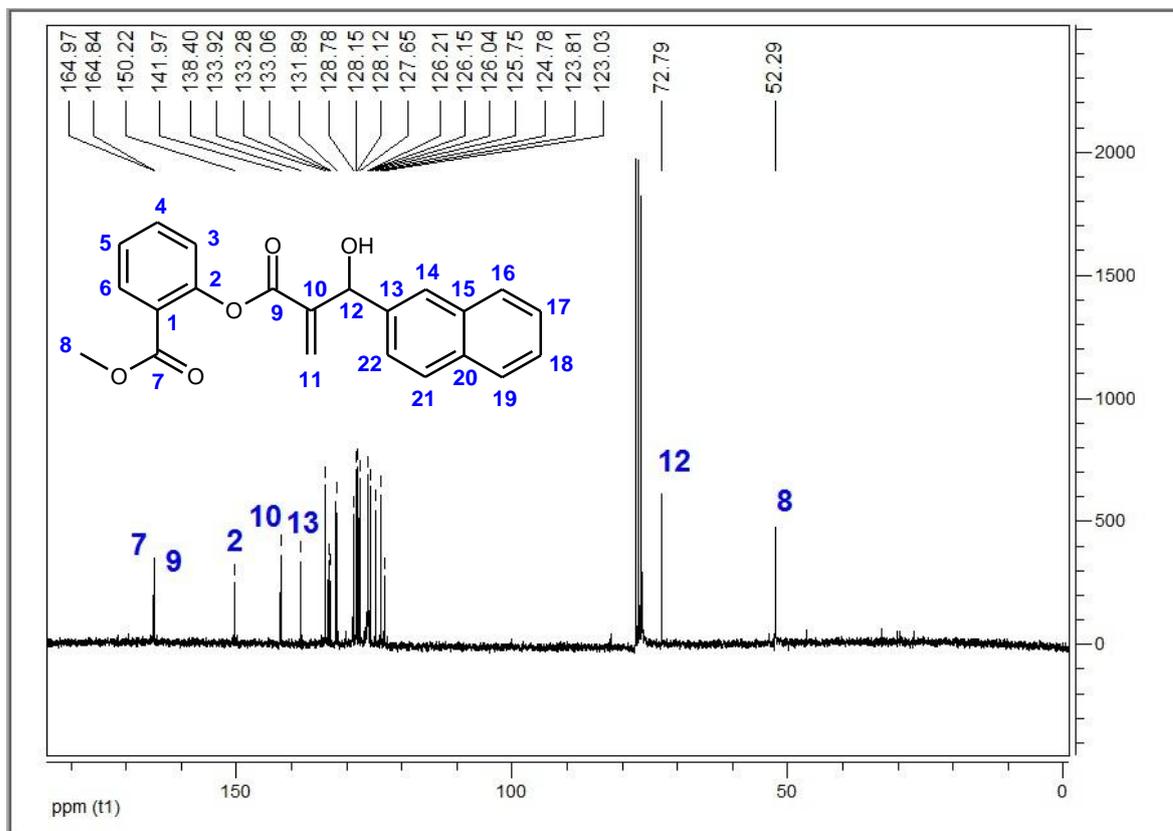
Espectro 35. Espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**55**).



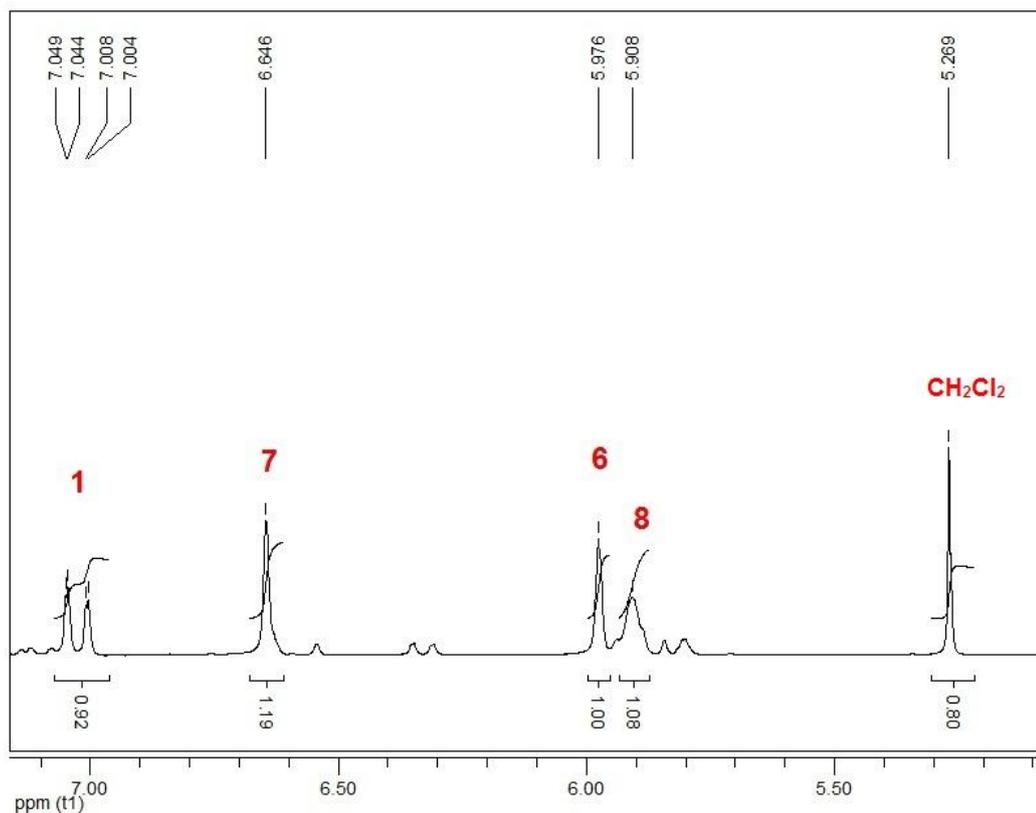
Espectro 36. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroxi-metil]-acrilóiloxi}-metila (**55**).



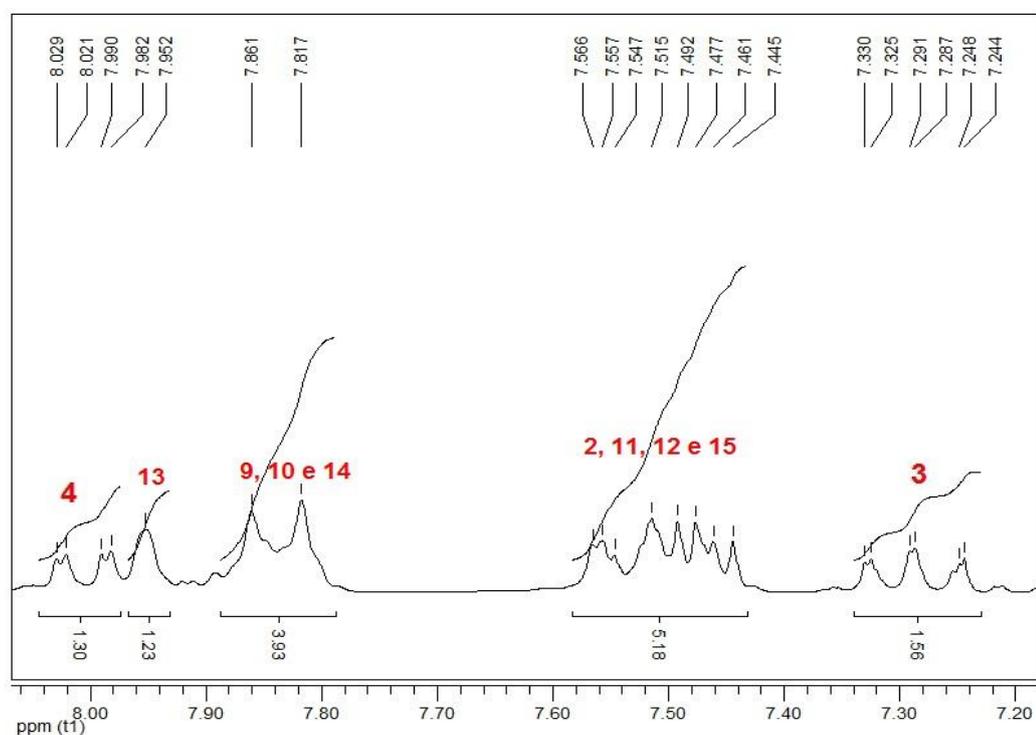
Espectro 37. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-{2-[(4-bromofenil)-hidroximetil]-acrilóiloxi}-metila (**55**) em cm^{-1} .



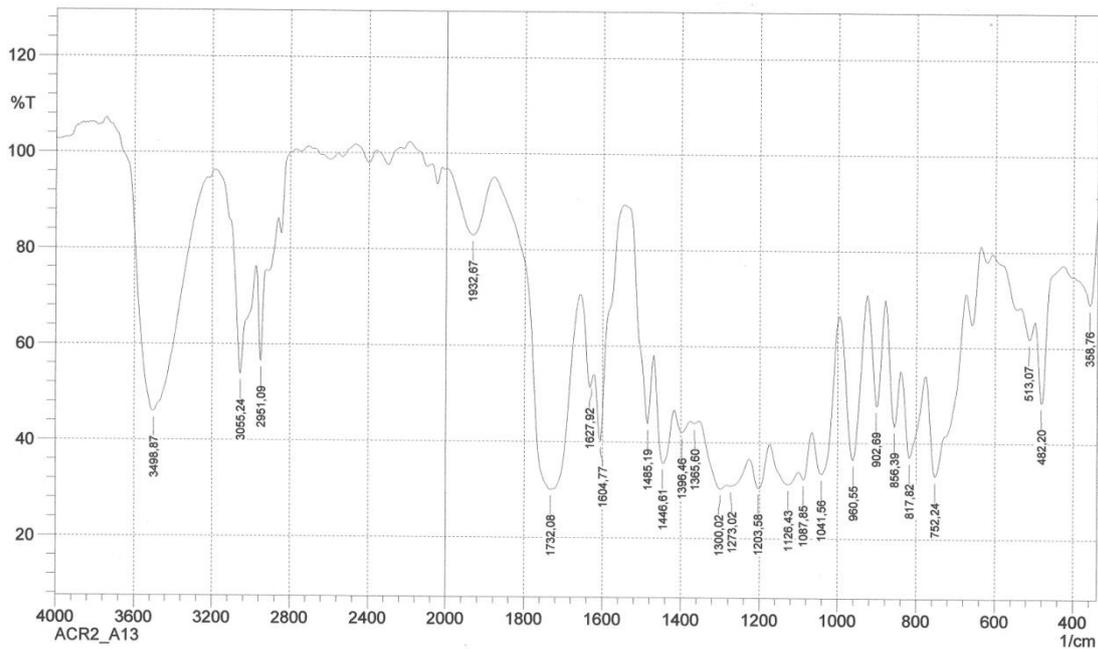
Espectro 38. Espectro de RMN¹³C-DEPT (CDCl_3 , 50MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóiloxi] metila (**56**).



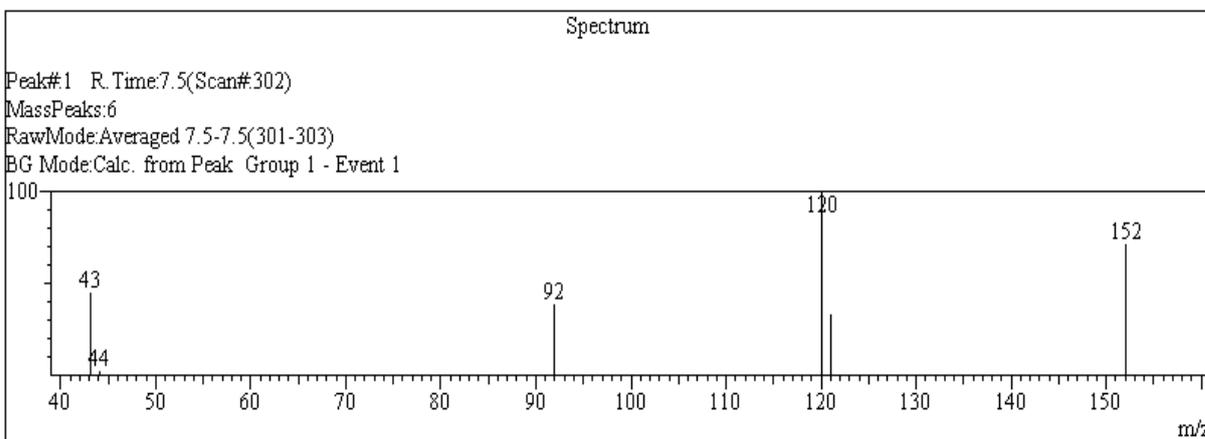
Espectro 41. Expansão espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóioxi] metila (**56**) na região entre 5,42 e 7,2 ppm.



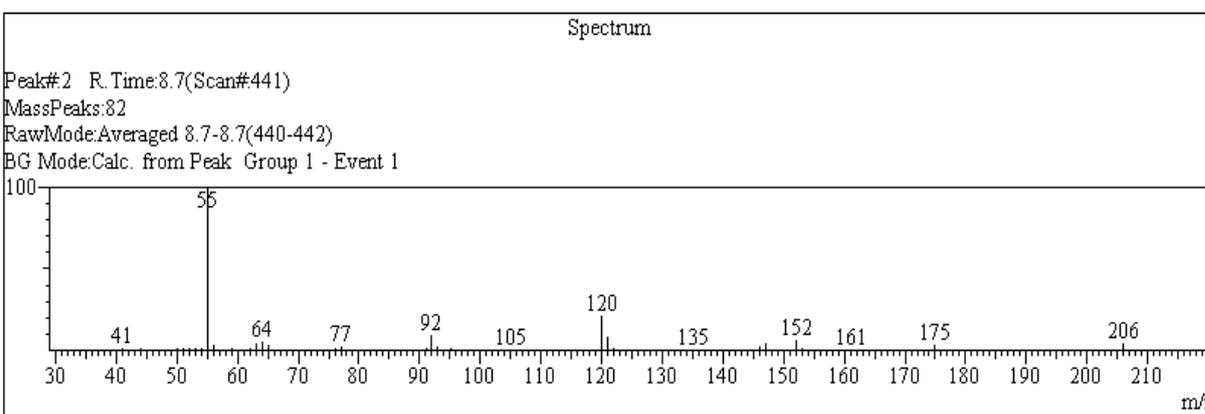
Espectro 42. Expansão do espectro de RMN¹H (CDCl₃, 200MHz) do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóioxi] metila (**56**) na região entre 7,2 e 8,06 ppm.



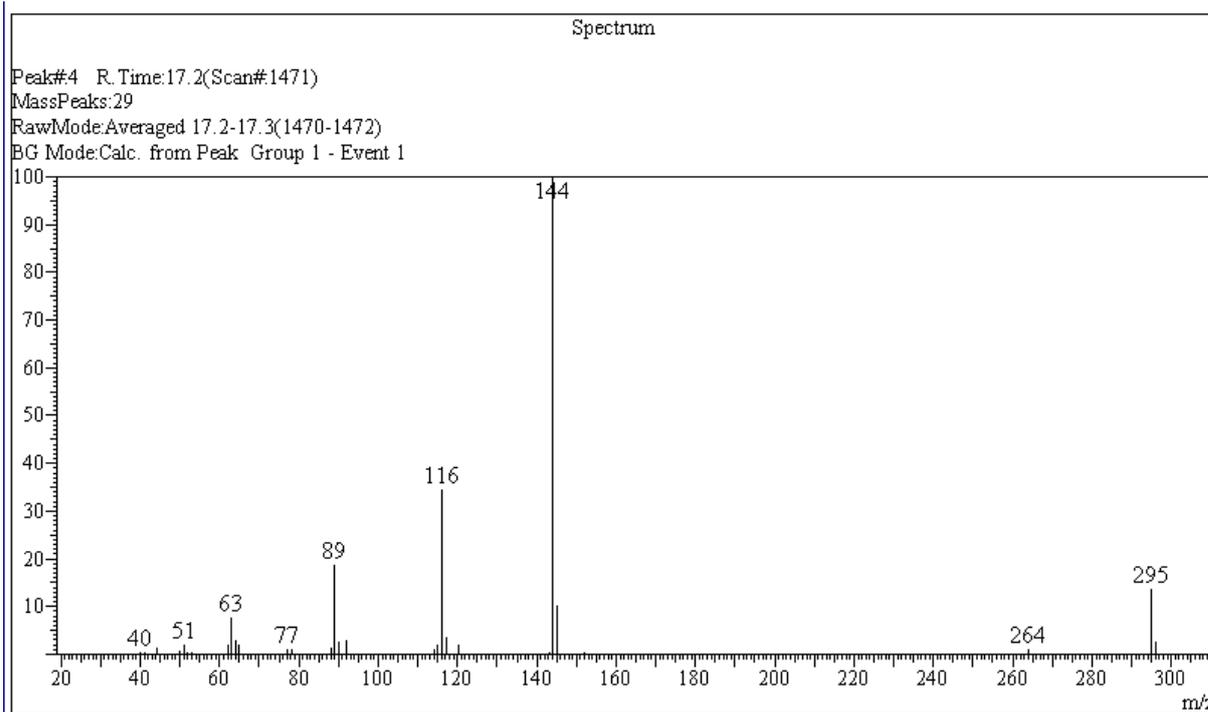
Espectro 43. Espectro de Infravermelho do Benzoato de 2-[2-(Hidroxi-naftalen-2-il-metil)-acrilóioxi] metila (**56**) em cm^{-1} .



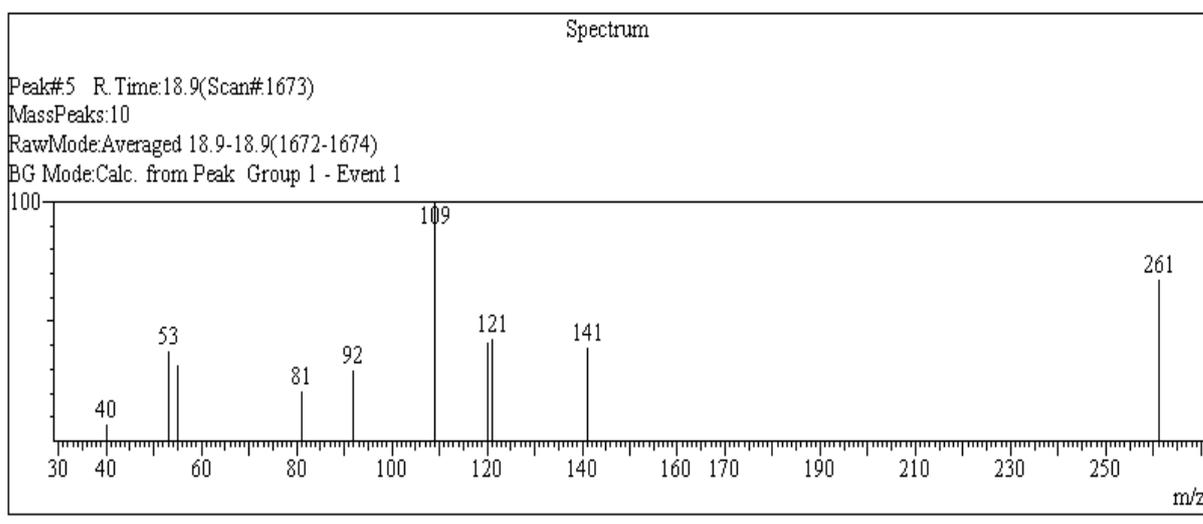
Espectro 44 Espectro de massas (70 eV) do Salicilato de metila.



Espectro 45 Espectro de massas (70 eV) do Acrilato **48**.



Espectro 46 Espectro de Massas (70 eV) da indolizina obtida na tentativa de síntese do aduto **54**.



Espectro 47 Espectro de Massas (70 eV) do aduto **54**.