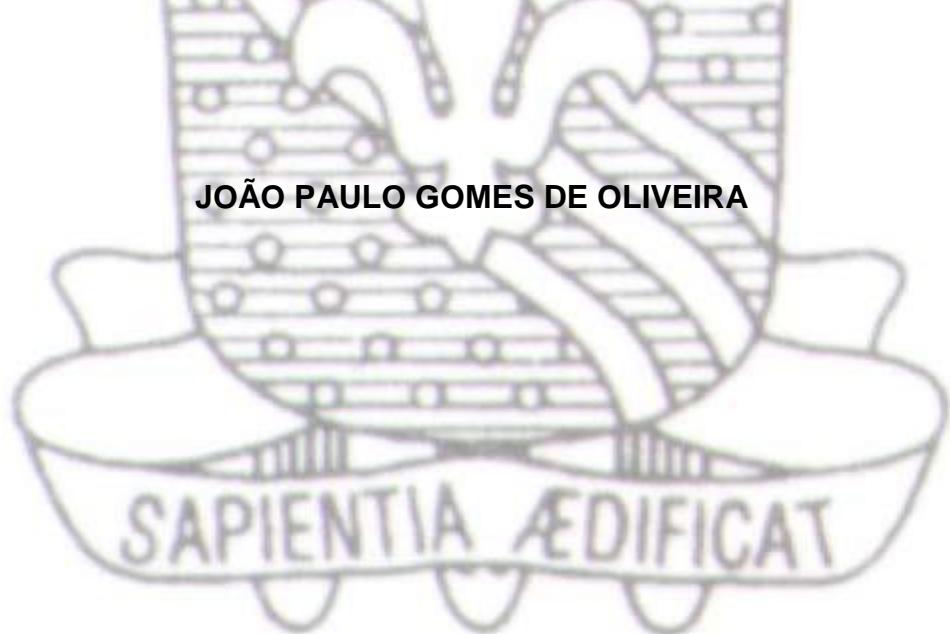




UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



SÍNTESE DE NOVOS HÍBRIDOS MOLECULARES ENTRE A ESTRUTURA
PRIVILEGIADA 7-CLOROQUINOLINA E ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIPARASITÁRIOS



João Pessoa – PB - Brasil

Dezembro /2019



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 HÍBRIDOS MOLECULARES ENTRE A ESTRUTURA
PRIVILEGIADA 7-CLOROQUINOLINA E ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIPARASITÁRIOS

João Paulo Gomes de Oliveira*

Tese de Doutorado apresentada
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Química pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

Coorientador: Claudio Gabriel Lima Júnior

*Bolsista (CAPES)

João Pessoa – PB – Brasil

Dezembro /2019

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

048s Oliveira, Joao Paulo Gomes de.

SÍNTSE DE NOVOS HÍBRIDOS MOLECULARES ENTRE A ESTRUTURA
PRIVILEGIADA 7-CLOROQUINOLINA E ADUTOS DE
MORITA-BAYLIS-HILLMAN CANDIDATOS A FÁRMACOS
ANTITUMORAIS E ANTIPARASITÁRIOS / Joao Paulo Gomes de
Oliveira. - João Pessoa, 2019.

140 f. : il.

Orientação: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos
Vasconcellos.

Coorientação: Claudio Gabriel Lima Junior Lima Junior.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. 7-cloroquinolina. 2. Morita-Baylis-Hillman. 3. AMBH.
4. antitumoral. 5. antiparasitário. I. Vasconcellos,
Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos. II. Lima
Junior, Claudio Gabriel Lima Junior. III. Título.

UFPB/BC

Síntese de novos híbridos moleculares entre a estrutura privilegiada 7-cloroquinolina e adutos de morita-baylis-hillman candidatos a fármacos antitumorais e antiparasitários.

Tese de Doutorado apresentada pelo aluno João Paulo Gomes de Oliveira e aprovada pela banca examinadora em 11 de dezembro de 2019.

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

Claudio Gabriel Lima Junior
Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior
2º. Orientador

Fábio Pedrosa Lins Silva
Dr. Fábio Pedrosa Lins Silva
Examinador

Suervy Canuto de Oliveira Sousa
Prof. Dr. Suervy Canuto de Oliveira Sousa
Examinador

Juliana Alves Vale
Profa. Dra. Juliana Alves Vale
Examinadora

Antonia Lúcia de Souza
Profa. Dra. Antonia Lúcia de Souza
Examinadora

Dedico este trabalho a minha mãe Maria Helena Gomes de Oliveira e a minha tia Beatriz Conceição de Oliveira por mais essa conquista.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a minha mãe Maria Helena e a minha tia Beatriz Conceição por me guiar e me apoiar nas escolhas feitas ao longo de toda vida, tornando assim mais essa conquista possível.

A minha esposa Alana Rodrigues por toda atenção, incentivo e principalmente paciência nas horas mais difíceis, me dando assim a força e a persistência necessária para concluir esse trabalho.

Ao meu orientador Mário Vasconcellos e ao meu coorientador Claudio Gabriel pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos, pela receptividade e boa vontade para ajudar em todos os momentos necessários.

A todos os meus amigos da família LASOM, por criarem um ambiente descontraído de muito suporte que serve como base sólida para um excelente trabalho em equipe e compartilhamento de experiências.

A todos os meus professores que me ensinaram o valor da busca pelo conhecimento, e que merecem o devido reconhecimento pois nada disso seria possível sem eles.

A Professora Priscilla Anne e a Professora Gardênia Carmen pela disponibilidade e prontidão para com a realização das análises biológicas.

Ao técnico Vicente em nome de toda a equipe do LMCA-UFPB pelas análises espectroscópicas.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Título: Síntese de novos híbridos moleculares entre a estrutura privilegiada 7-cloroquinolina e adutos de Morita-Baylis-Hillman candidatos a fármacos antitumorais e antiparasitários

A importância do núcleo quinolínico está relacionada a sua aplicabilidade em diversos alvos farmacológicos, tornando-o uma subestrutura atraente para o desenvolvimento racional de novos candidatos a fármacos. Sendo assim, propomos neste trabalho a síntese e bioavaliação de híbridos derivados da 7-cloroquinolina e de Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) nitrossubstituídos como potenciais candidatos a fármacos usando do auxílio de espaçadores saturados de diferentes dimensões, variando de dois a quatro carbonos com objetivo de observar a influência da liberdade conformacional na atividade biológica das estruturas sintetizadas. A primeira etapa do trabalho foi realizar a preparação de álcoois **2-5** com rendimentos entre 94% e 98%, por meio de uma reação de substituição nucleofílica aromática; seguida pela formação dos acrilatos intermediários **6-9** com rendimentos entre 43% e 99%, por meio de duas metodologias, via reação de Steglich (DCC/DMAP) ou pela formação do intermediário halogenado, com rendimentos e como último passo, a reação de Morita-Baylis-Hillman com rendimentos satisfatórios variando entre 33% e 74%, gerando um total de 9 substâncias inéditas (3 acrilatos e 6 AMBH). Os teste biológicos foram realizados *in vitro* em cepa de *Leishmania amazonensis* e em linhagens de células cancerígenas de MCF-7 (câncer de mama), HCT-116 (câncer colo-retal), HL-60 (leucemia mielóide crônica) e NCI -H292 (câncer de pulmão). Os resultados foram promissores tanto por parte dos adutos híbridos com $IC_{50}= 5,06\mu M$ para células tumorais e $IC_{50}= 22,12\mu M$ para cepas de leishmania quanto por parte dos intermediários observando $IC_{50}= 14,76\mu M$ para células tumorais e $IC_{50}= 12,97\mu M$ para cepas de leishmania, sugerindo possível influência dos espaçadores na atividade biológica.

Palavras-chave: 7-cloroquinolina; Morita-Baylis-Hillman, AMBH; antitumoral; antiparasitário.

ABSTRACT

Title: Synthesis of new molecular hybrids between 7-chloroquinoline privileged structure and Morita-Baylis-Hillman adducts candidate for antitumor and antiparasitic drugs

The importance of the quinolinic nucleus is related to its applicability in several pharmacological targets, making it an attractive substructure for the rational development of new drug candidates. Therefore, we propose in this work the synthesis and bioevaluation of hybrids derived from 7-chloroquinoline and Morita-Baylis-Hillman (AMBH) nitrosubstituted adducts as potential drug candidates using the aid of saturated spacers of different dimensions, ranging from two to four carbons in order to observe the influence of conformational freedom on the biological activity of synthesized structures. The first stage of the work was to prepare 2-5 alcohols with yields between 94% and 98%, by means of an aromatic nucleophilic substitution reaction; followed by the formation of intermediate acrylates 6-9 with yields between 43% and 99%, using two methodologies, via the Steglich reaction (DCC / DMAP) or by the formation of the halogenated intermediate, with yields and as a last step, the reaction of Morita-Baylis-Hillman with satisfactory yields varying between 33% and 74%, generating a total of 9 new substances (3 acrylates and 6 AMBH). Biological tests were performed *in vitro* on *Leishmania amazonensis* strain and on cancer cell lines of MCF-7 (breast cancer), HCT-116 (colorectal cancer), HL-60 (chronic myeloid leukemia) and NCI-H292 (lung cancer). The results were promising both on the part of the hybrid adducts with $IC_{50} = 5.06\mu M$ for tumor cells and $IC_{50} = 22.12\mu M$ for leishmania strains and on the part of the intermediates observing $IC_{50} = 14.76\mu M$ for tumor cells and $IC_{50} = 12.97\mu M$ for strains of leishmania, suggesting possible influence of spacers on biological activity.

Keywords: 7-chloroquinoline; Morita-Baylis-Hillman, AMBH; antitumor; antiparasitic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura privilegiada de benzodiazepinas	21
Figura 2.2 - Compostos contendo a substrutura do fenilbenzeno com atuação em diferentes receptores.....	22
Figura 2.3 – 7-cloroquinolina e as posições do anel.....	24
Figura 2.4 – Estrutura da molécula da Quinina	25
Figura 2.5 - Estruturas moleculares do azul de metileno, pamaquina e primaquina	26
Figura 2.6 – Estrutura da mepacrina/atebrina e da cloroquina/resochin	27
Figura 2.7 – Compostos derivados da cloroquina com atividade antimalárica	29
Figura 2.8 – Medicamentos de referência no tratamento de Leishmaniose	31
Figura 2.9 – Derivados com atividade leishmanicida.....	31
Figura 2.10 - Derivados ativos em cepas de tuberculose	34
Figura 2.11 - Abordagem da Hibridização molecular.....	38
Figura 2.12 – Hibridização molecular entre salicilato de metila e grupos nitrobenzaldeídos	39
Figura 2.13 – Híbridos de Quinolinas contendo atividade leishmanicida e tripanossomicida	39
Figura 2.14 - Moléculas mais ativas em cepas de <i>P.falciparum</i> presentes no trabalho de Kundu e colaboradores	43
Figura 4.1 – Adutos de Morita-Baylis-Hillman propostos	48
Figura 5.1 – Comparação entre os infravermelhos da 4,7 dicloroquinolina 1 e álcool 3 respectivamente	55
Figura 5.2 – Comparação entre os infravermelhos da 4,7 dicloroquinolina 1 e o aminoálcool 5 respectivamente	57
Figura 5.3 – Análise das bandas de infravermelho do álcool 3 e do éster 7	67
Figura 5.4 - Fragmento de RMN ¹³ C: Deslocamentos dos carbonos derivados do cloreto de acila	67
Figura 5.5 – Análise das constantes de acoplamento da ligação alfa-beta insaturada do éster 7	68
Figura 5.6 – Comparação dos espectros de infravermelho dos compostos 7 e 11a	72

Figura 5.8 – Comparação das expansões dos compostos 7 e 11c na região de 7,25 a 8,25 ppm	74
Figura 5.9 - Comparação das expansões dos compostos 7 e 11c na região de 5,45 a 6,50 ppm	75
Figura 5.10 – Comparação da Cl_{50} entre os AMBH sintetizados neste trabalho com adutos sintetizados anteriormente.....	79
Figura 5.11 – Melhores resultados nos testes de citotoxicidade em células cancerígenas.....	79
Figura 5.12 – Estruturas analisadas nos testes em <i>Leishmania amazonensis</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1- Estudo de solvente para a reação de formação do composto 3	53
Tabela 5.2 – Rendimentos das reações de formação dos acrilatos via reação de Steglish (DCC/DMAP) com tempo de reação de 48h.....	59
Tabela 5.3 – Rendimentos das reações de formação dos haletos de alquila do método 2	65
Tabela 5.4 – Rendimentos das reações de formação dos acrilatos via cloreto do álcool	66
Tabela 5.5 – Rendimentos das reações de formação dos adutos 10-12 (a-c)	70
Tabela 5.6 - Inibição percentual na concentração única de crescimento celular de amostras em três linhas tumorais e seu intervalo de confiança	77
Tabela 5.7 - Efeito citotóxico em linhas celulares tumorais. Concentração inibitória a 50% (CI ₅₀) e intervalo de confiança (IC) das amostras em três linhagens tumorais em µg / mL	78
Tabela 5.8 - Atividade citotóxica de compostos mais ativos contra células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)	80
Tabela 5.9 – Resultados gerais para atividade antileishmanica nos ensaios de quantificação direta em câmara de Neubaue.....	81

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1 – Concepção do devazepido a partir da asperlicina	23
Esquema 2.2 – Ressonância da 7-cloroquinolina.....	24
Esquema 2.3 – Reação de obtenção do derivado de 7-cloro-4-quinolinahidrazona.	32
Esquema 2.4 – Síntese de derivados clorados da 7-cloroquinolina	33
Esquema 2.5 – Síntese de derivado da 7-cloroquinolina contendo selênio	35
Esquema 2.6 – Síntese de série contendo 7-cloroquinolina com atividade citotóxica	36
Esquema 2.7 – Síntese de compostos derivados da 7-cloroquinolina contra o ZIKV	37
Esquema 2.8 – Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.....	40
Esquema 2.9 – Esquema de mecanismo da reação de MBH	42
Esquema 4.1 – Análise retrossintética dos adutos de Morita-Baylis-Hillman	49
Esquema 5.1: Reação de formação dos álcoois 2-5	52
Esquema 5.2- Equilíbrio ácido-base entre 1,2-etanodiol e o ânion de <i>t</i> -butoxi.....	53
Esquema 5.3- Mecanismo geral da reação de substituição nucleofílica aromática para formação dos compostos 2,3 e 4	54
Esquema 5.4 – Reações de formação dos acrilato 6-9	58
Esquema 5.5 – Reação de Steglish para formação dos acrilatos 6-9	59
Esquema 5.6 - Mecanismo proposto para a reação de Steglish (DCC/DMAP)	61
Esquema 5.7 – Esquema geral para obtenção dos acrilatos via reação de substituição	62
Esquema 5.8 – Proposta mecanística para formação do haleto de alquila	63
Esquema 5.9 – Esquema geral das reações de formação dos adutos 10-12 (a-c) ..	69
Esquema 5.10 – Proposta mecanística de formação dos adutos de MBH 10-12(a-c)	71

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Espectro de Infravermelho do composto 1	111
Espectro 2 – Espectro de Infravermelho do composto 2	111
Espectro 3 – Espectro de Infravermelho do composto 3	112
Espectro 4 – Espectro de Infravermelho do composto 4	112
Espectro 5 – Espectro de Infravermelho do composto 5	113
Espectro 6 – Espectro de Infravermelho do composto 6	113
Espectro 7 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto 6	114
Espectro 8 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto 6	114
Espectro 9 – Espectro de massas de baixa resolução do composto 6	115
Espectro 10 – Espectro de Infravermelho do composto 7	115
Espectro 11 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 7	116
Espectro 12 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 7	116
Espectro 13 – Espectro de massas de alta resolução do composto 7	117
Espectro 14 – Espectro de Infravermelho do composto 8	117
Espectro 15 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 8	118
Espectro 16 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 8	118
Espectro 17 – Espectro de massas de alta resolução do composto 8	119
Espectro 18 – Espectro de Infravermelho do composto 9	119
Espectro 19 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, CDCl_3) do composto 9	120
Espectro 20 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, CDCl_3) do composto 9	120
Espectro 21 – Espectro de massas de alta resolução do composto 8	121
Espectro 22 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto 10a	121
Espectro 23 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto 10a	122
Espectro 24 – Espectro de massas de alta resolução do composto 10a	122
Espectro 25 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto 10b	123
Espectro 26 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto 10b	123
Espectro 27 – Espectro de massas de alta resolução do composto 10b	124
Espectro 28 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto 10c	124
Espectro 29 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto 10c	125
Espectro 30 – Espectro de massas de alta resolução do composto 10c	125
Espectro 31 – Espectro de Infravermelho do composto 11a	126

Espectro 32 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 11a	126
Espectro 33 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 11a	127
Espectro 34 – Espectro de massas de alta resolução do composto 11a	127
Espectro 35 – Espectro de Infravermelho do composto 11b	128
Espectro 36 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 11b	128
Espectro 37 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 11b	129
Espectro 38 – Espectro de massas de alta resolução do composto 11b	129
Espectro 39 – Espectro de Infravermelho do composto 11c	130
Espectro 40 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, CDCl_3) do composto 11c	130
Espectro 41 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (101 Mhz, CDCl_3) do composto 11c	131
Espectro 42 – Espectro de massas de alta resolução do composto 11c	131
Espectro 43 – Espectro de Infravermelho do composto 12a	132
Espectro 44 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 12a	132
Espectro 45 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 12a	133
Espectro 46 – Espectro de massas de alta resolução do composto 12a	133
Espectro 47 – Espectro de Infravermelho do composto 12b	134
Espectro 48 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, DMSO-d_6) do composto 12b	134
Espectro 49 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (101 Mhz, DMSO-d_6) do composto 12b	135
Espectro 50 – Espectro de massas de alta resolução do composto 12b	135
Espectro 51 – Espectro de Infravermelho do composto 12c	136
Espectro 52 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 12c	136
Espectro 53 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 12c	137
Espectro 54 – Espectro de massas de alta resolução do composto 12c	137

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

d – Dubleto

DABCO - Diazobiciclo[2.2.2]octano

DCC – N,N'-Diciclohexilcarbodiimida

dd – Duplo dubleto

DMAP – 4-Dimetilaminopiridina

DMF – Dimetilaminoformamida

Equiv. – Equivalente

GRE – Grupo retirador de elétrons

HM – Híbrido Molecular

Hz – Hertz

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

m – Multipletos

MBH – Morita-Baylis-Hillman

MHz – Megahertz

NR₃ – Aminas terciárias

ppm – Partes por milhão

PR₃ – Fosfinas terciárias

q – Quarteto

quin. – Quinteto

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

s – Singletos

SN₂ – Substituição nucleofílica bimolecular

SOCl₂ – Cloreto de tionila

t – Tripleto

THF – Tetrahidrofuran

UV-vis – Ultravioleta visível

ZIKV – Zika Vírus

δ – Deslocamento químico em ppm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
2.1 ESTRUTURA PRIVILEGIADA	21
2.2 HISTÓRICO DA 7-CLOROQUINOLINA.....	23
2.2.1 - Ponto de vista estrutural	23
2.2.2 - Primeiro relato	25
2.2.3 - Principais usos de substâncias contendo o núcleo 7- cloroquinolina	28
2.2.3.1 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antimalária	28
2.3 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR	37
2.4 REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN.....	40
2.4.1 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE REAÇÕES DE MORITA-BAYLIS- HILLMAN.....	40
2.4.2 PROPOSTAS MECANÍSTICAS PARA REAÇÕES DE MBH	41
2.4.3 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN COM ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	42
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
4. ESTRATÉGIAS.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS A PARTIR DA 4,7- DICLOROQUINOLINA.....	52
5.2 SÍNTESE DOS ACRILATOS 6-9 DERIVADOS DOS ÁLCOOIS 2-5	57
5.2.1 Síntese dos acrilato derivados dos álcoois via reação de Steglich (DCC/DMAP).....	58

5.2.2 Síntese dos acrilato derivados dos álcoois por meio de reação de substituição.....	62
5.3 SÍNTSE DO ADUTOS 10-12 (a-c).....	69
5.4 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGENS DE CÂNCER.....	76
5.4.1 <i>Screening em vitro</i>	76
5.5 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM <i>Leishmania amazonensis</i>	80
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
7. PARTE EXPERIMENTAL	87
7.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	87
7.2 PROCEDIMENTO PARA SÍNTSE DO 2-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)ETANOL (2).....	88
7.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTSE DO 3-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)PROPAN-1-OL (3) E 4-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)BUTAN-1-OL (4).....	89
7.4 PROCEDIMENTO PARA SÍNTSE DO 2-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)AMINO)ETANOL (5)	90
7.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTSE DOS ACRILATOS 6, 7, 8, 9..	91
7.5.1 Empregando o método de esterificação de Steglich (DCC/DMAP)	91
7.5.2 Empregando rota alternativa com cloreto de tionila e acrilato de potássio	91
7.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTSE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN [10-12 (a-c)]	94
7.7 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE BIOLÓGICA PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL	99
7.7.1 MATERIAIS.....	99
7.7.2 MÉTODOS	100
7.7.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	100
7.8 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE BIOLÓGICA PARA ATIVIDADE LEISHMANICIDA	101
7.8.1 MATERIAIS.....	101

7.8.2 MÉTODOS	101
7.8.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	103
REFERÊNCIAS.....	105
ESPECTROS	111

Capítulo 1:

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A busca por novos candidatos a fármacos é uma realidade constante dentro do mercado farmacêutico mundial e entre os diversos fatores que caracterizam o setor um dos mais importantes é que após alguns anos no mercado determinados medicamentos começam a perder sua eficiência, a exemplo dos antimicrobianos; bactérias e demais microorganismos desenvolvem mecanismos de resistência pela exposição contínua aos ativos existentes, surgindo a necessidade da pesquisa por novos medicamentos.

Uma saída bastante estudada pela comunidade científica para este tipo de problema é a renovação desses fármacos por meio da alteração das suas estruturas químicas com o intuito de manter ou ampliar a eficiência da substância. Uma das possibilidades é a junção racional de duas unidades de derivados bioativos para potencializar a atividade biológica, conhecida como técnica de hibridização molecular. Para que esse tipo de alteração seja possível é necessário conhecer exatamente qual porção estrutural da droga é responsável pelos efeitos de interesse, essa porção pode ser chamada de estrutura privilegiada do fármaco (TAYLOR; MACCOSS; LAWSON, 2014) (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

A 7-cloroquinolina pode ser considerada uma estrutura privilegiada por estar presente em diversas substâncias com boa atividade biológica, representando assim, um bom ponto de partida na busca por novos fármacos. Dessa forma, seus derivados vêm sendo estudados por vários grupos de pesquisa em todo o mundo (BARBOSA-LIMA et al., 2017).

Historicamente a 7-cloroquinolina é referência no tratamento da malária, doença que expõe aproximadamente 40% da população mundial. Entretanto as pesquisas envolvendo esse núcleo vão muito além da malária. Derivados da 7-cloroquinolina apresentaram atividade antinflamatória; antitumoral; antituberculose; anti-zika entre outras (PARHIZGAR, 2017)(PINZ et al., 2016)(BISPO et al., 2015)(DE SOUZA et al., 2009) (BARBOSA-LIMA et al., 2017).

Sendo assim o estudo de modificações nos ligantes do anel da 7-cloroquinolina por meio de reações já consolidadas como as reações de Morita-Baylis-Hillman,

mostram-se bastante promissoras na busca da potencialização das atividades biológicas já relatadas na literatura.

Neste contexto este trabalho teve como meta sintetizar novos híbridos derivados da 7-cloroquinolina com diferentes espaçadores por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman e testar a sua potencialidade em diferentes alvos biológicos.

Capítulo 2:

Fundamentação

Teórica

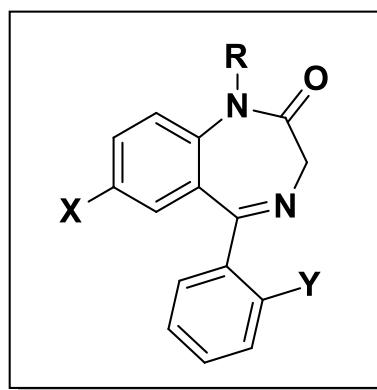
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ESTRUTURA PRIVILEGIADA

Estruturas privilegiadas são definidas como núcleos que correspondem a menor unidade comum presente em diversas moléculas que por sua vez apresentam atividades biológicas variadas (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007).

O termo estrutura privilegiada foi utilizado pela primeira vez por Evans e colaboradores em 1988, quando buscavam sintetizar uma classe de amidobenzodiazepinas antagonistas ao hormônio gastrointestinal colecistocinina (CCK) responsável pela digestão de gorduras e proteínas. Neste mesmo trabalho os autores sintetizaram uma vasta biblioteca de compostos com base na estrutura mostrada na Figura 2.1, com rendimento médio de 60%, essas estruturas mostraram atividades múltiplas, sendo assim considerada uma estrutura privilegiada (EVANS; RITTLE; BOCK, 1988).

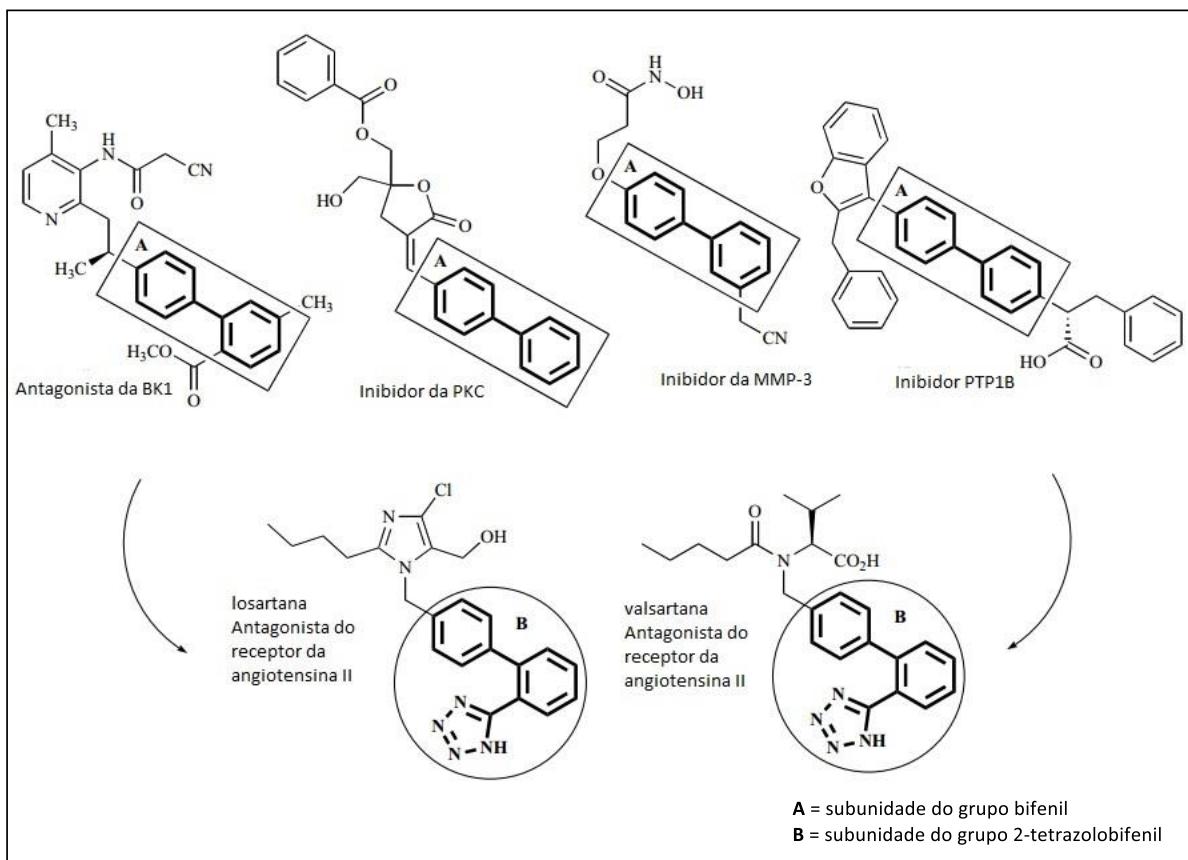
Figura 2.1 - Estrutura privilegiada de benzodiazepinas



Fonte: Elaborada pelo autor

Um exemplo de estrutura privilegiada é a classe de bifenis ou fenilbenzeno, que ao longo de estudos, mostrou-se ativo a diferentes receptores (Figura 2.2) (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007) correspondendo à definição dada por Evans e colaboradores em 1988.

Figura 2.2 - Compostos contendo a subestrutura fenilbenzeno com atuação em diferentes receptores

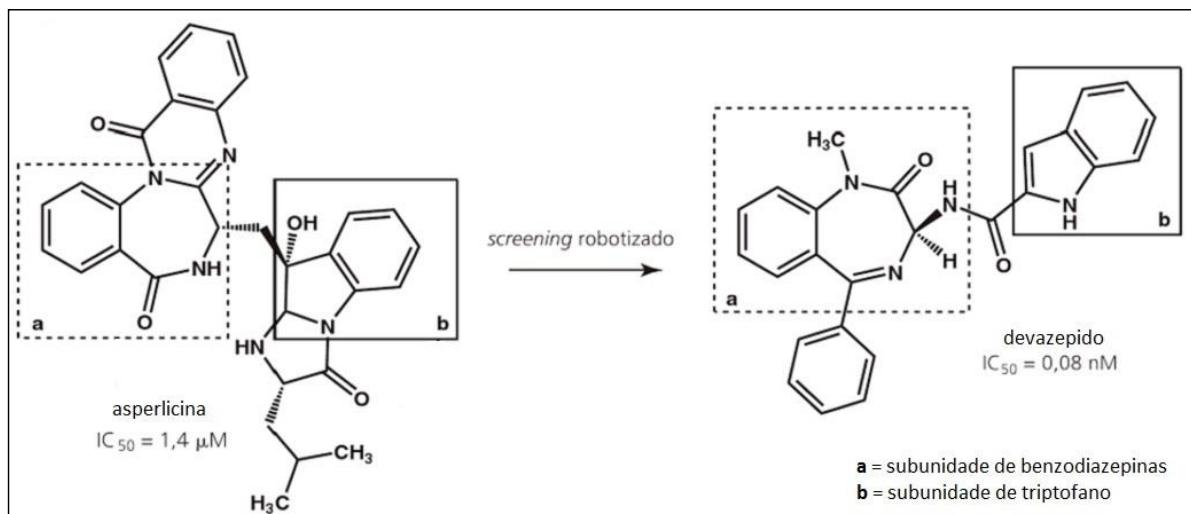


Fonte: Adaptado de DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007

A concepção de uma estrutura privilegiada parte principalmente de duas vertentes: a mais clássica, onde a partir de uma estrutura com atividade biológica comprovada é feito um fracionamento desta molécula com o objetivo de encontrar um possível grupo de suma importância, o qual seria responsável pela atividade propriamente dita; e a segunda vertente seria com base em métodos computacionais e modelos farmacofóricos (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007).

Um exemplo do uso de estrutura privilegiada baseando-se em técnicas computacionais para obtenção de um novo fármaco foi a produção do devazepido a partir do produto natural asperlicina Esquema 2.1 (BARREIRO; FRAGA, 2015).

Esquema 2.1 – Asperlicina o ponto de partida para o devazepido



Fonte: Adaptado de (BARREIRO; FRAGA, 2015)

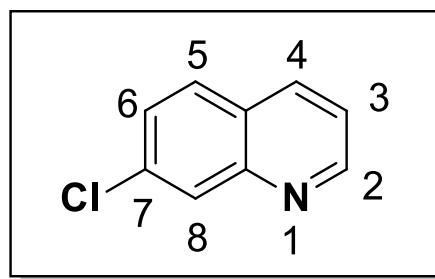
Nos dias atuais o conceito de estrutura privilegiada é amplamente utilizado, principalmente no design de novos candidatos a fármacos, onde a partir de um núcleo com atividade em determinado receptor são realizadas modificações nos seus substituintes com o objetivo de potencializar a atuação em determinado sítio ativo ou simplesmente visando uma melhor seletividade do fármaco frente ao receptor de interesse.

2.2 HISTÓRICO DA 7-CLOROQUINOLINA

2.2.1 - Ponto de vista estrutural

O núcleo 7-cloroquinolina é caracterizado por conter dois anéis de seis membros condensados sendo um benzênico e outro piridínico, com um substituinte cloro na posição 7 do anel (Figura 2.3).

Figura 2.3 – 7-cloroquinolina e as posições do anel

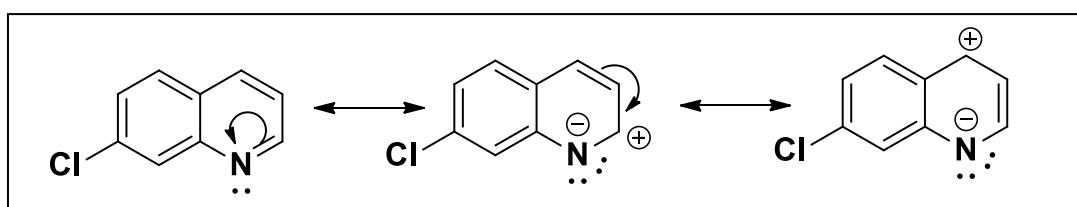


Fonte: Elaborada pelo autor

A presença desses anéis permite a este núcleo ter um caráter de dualidade em reações orgânicas, podendo atuar como nucleófilo, característica concedida pela presença do anel piridina; e também pode atuar como eletrófilo, característica favorecida pelo anel benzênico (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Normalmente reações envolvendo esse núcleo tem substituições nucleofílicas no carbono das posições 2 e 4, isso deve-se a facilidade de realizar reações nessas posições visto que tratam-se de centros eletrofílicos gerados pelo equilíbrio de ressonância com o nitrogênio eletronegativo do anel piridínico que pode acomodar um par de elétrons ficando com carga parcial negativa, sem quebrar a aromaticidade do anel (Esquema 2.2) (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Esquema 2.2 – Ressonância da 7-cloroquinolina



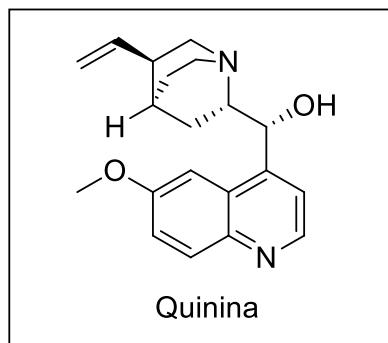
Fonte: Elaborada pelo autor

2.2.2 - Primeiro relato

A descoberta do núcleo 7-cloroquinolina ocorreu em meio à pesquisas voltadas ao aperfeiçoamento de medicamentos utilizados no tratamento da malária e para uma melhor abordagem sobre o núcleo é necessário uma breve contextualização desde o surgimento do primeiro medicamento contra essa doença.

O primeiro medicamento estabelecido contra a malária foi a quinina (Figura 2.4), segundo relatos feitos por Kouznetsov o uso da quinina data do século XVII, entretanto só teve seu reconhecimento como medicamento com propriedades antimaláricas ao fim do século XIX (KOUZNETSOV, 1979).

Figura 2.4 – Estrutura da molécula da Quinina

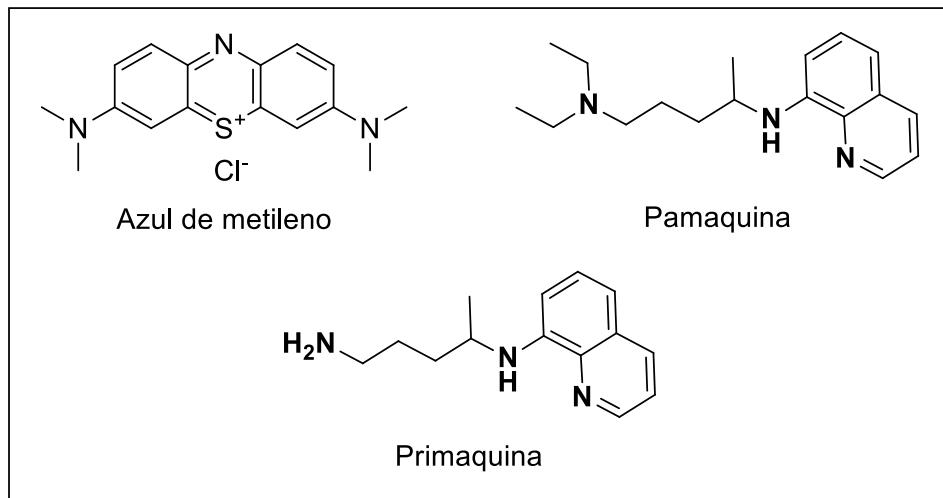


Fonte: Elaborada pelo autor

A quinina é uma substância presente no extrato de plantas do gênero *Chinchona* encontradas na América do Sul, o extrato da casca da árvore contendo quinina foi amplamente utilizado no período da primeira guerra mundial, quando a malária assolava o continente europeu e os soldados afetados pela doença morriam numa taxa de 10%. Por tratar-se de uma planta não nativa da Europa, a sua casca foi exportada por Jesuítas, e o domínio desse medicamento poderia definir o rumo da guerra, durante o período de conflitos, devido à insuficiência de recursos naturais para suprir a demanda de medicamentos para os infectados, iniciou-se pesquisas a fim de desenvolver uma rota sintética capaz de reproduzir a quinina, entretanto seu alto grau de complexidade sintético impossibilitava o desenvolvimento para comercialização da mesma (KOUZNETSOV; GÓMEZ-BARRIO, 2009).

A partir do corante azul de metileno (Figura 2.5), já conhecido na época por seu potencial antimalárico e pela presença de anéis quinolinicos em sua estrutura, grupos de químicos tentavam a síntese da quinina; em 1926 os alemães mais especificamente uma sociedade a Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. (Bayer), sintetizaram o primeiro medicamento antimalárico a plasmoquina, posteriormente chamada de pamaquina (Figura 2.5). Entretanto a pamaquina apresentava alto grau de toxicidade e foi modificada com o intuito de diminuir os efeitos negativos, surgindo assim uma estrutura mais simplificada e com menor toxicidade, a primaquina (Figura 2.5) (SÁ, 2011).

Figura 2.5 - Estruturas moleculares do azul de metileno, pamaquina e primaquina



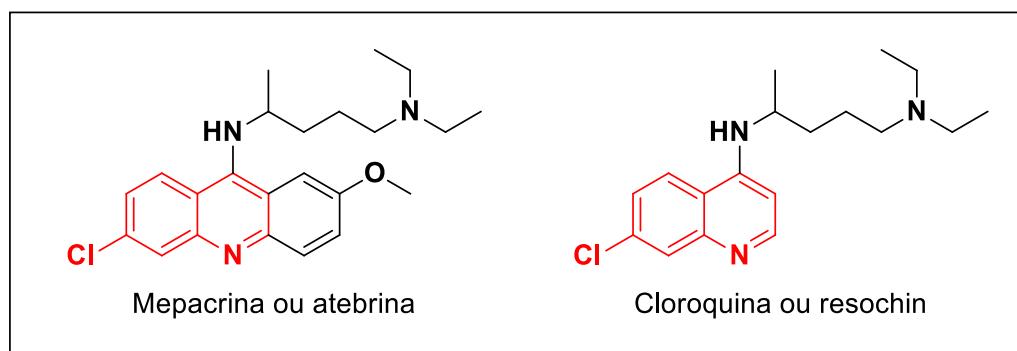
Fonte: Elaborada pelo autor

Em estudos posteriores o número de anéis aromáticos da quinina foi aumentado de dois para três; com mais algumas modificações surgiu (na década de 1930) a mepacrina também conhecida como atebrina (Figura 2.6) com comprovado efeito contra o estágio sanguíneo do protozoário *Plasmodium falciparum*, já nessa estrutura foi possível observar pela primeira vez o núcleo 7-cloroquinolina. Esta substância teve elevada importância para os norte-americanos que no período da segunda guerra mundial sofriam com a falta de abastecimento de quinina, devido à tomada dos territórios de produção de quinina pelo exército japonês.

Cientistas da Bayer desenvolveram em 1934 uma molécula com estrutura simplificada que recebeu o nome de *resochin* (Figura 2.6), que não recebeu grande

atenção por um período de uma década, devido a sua elevada toxicidade. Apenas no período da segunda guerra quando foi capturado um lote de *resochin* por tropas aliadas americanas, a droga foi reavaliada e observou-se que ela tinha menor toxicidade e maior eficiência que a mepacrina; a *resochin* então recebeu um novo nome passando a ser chamada de cloroquina e rapidamente tornou-se o medicamento de referência no tratamento da malária. Sendo que o primeiro artigo científico que relata o núcleo 7-cloroquinolina, segundo o portal periódico capes data de 1946, já citando a cloroquina (CARMACK et al., 1946)

Figura 2.6 – Estrutura da mepacrina/atebrina e da cloroquina/resochin



Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar do sucesso da cloroquina e da sua contribuição para a erradicação da malária no inicio dos anos 60, em estudos posteriores surgiram relatos do desenvolvimento de resistência por parte do parasita a este fármaco; isso impulsionou a reabertura das pesquisas na área, o que resultou no surgimento de uma nova leva de derivados da cloroquina com o intuito de obter o melhor candidato com atividade antimalária, este deveria ser eficiente e eficaz, bem tolerado pelo organismo do hospedeiro, aplicado em uma única dose, não vulnerável a mecanismos de defesa do parasita entre outros pré-requisitos (KOUZNETSOV; GÓMEZ-BARRIO, 2009).

Acredita-se que o surgimento da resistência ao medicamento tenha sido devido ao uso indiscriminado e inadequado da droga, como por exemplo dosagens incorretas e tratamentos interrompidos antes do prazo. Uma saída dada pela Organização Mundial de Saúde foi o uso da cloroquina em conjunto com seus derivados na tentativa de combater a resistência e o desenvolvimento de novos mecanismos de defesa do parasita (COOPER; MAGWERE, 2008).

2.2.3 - Principais usos de substâncias contendo o núcleo 7-cloroquinolina

Inegavelmente o núcleo 7-cloroquinolina fez história com os protozoários do gênero *Plasmodium*, como o *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* causadores da doença malária.

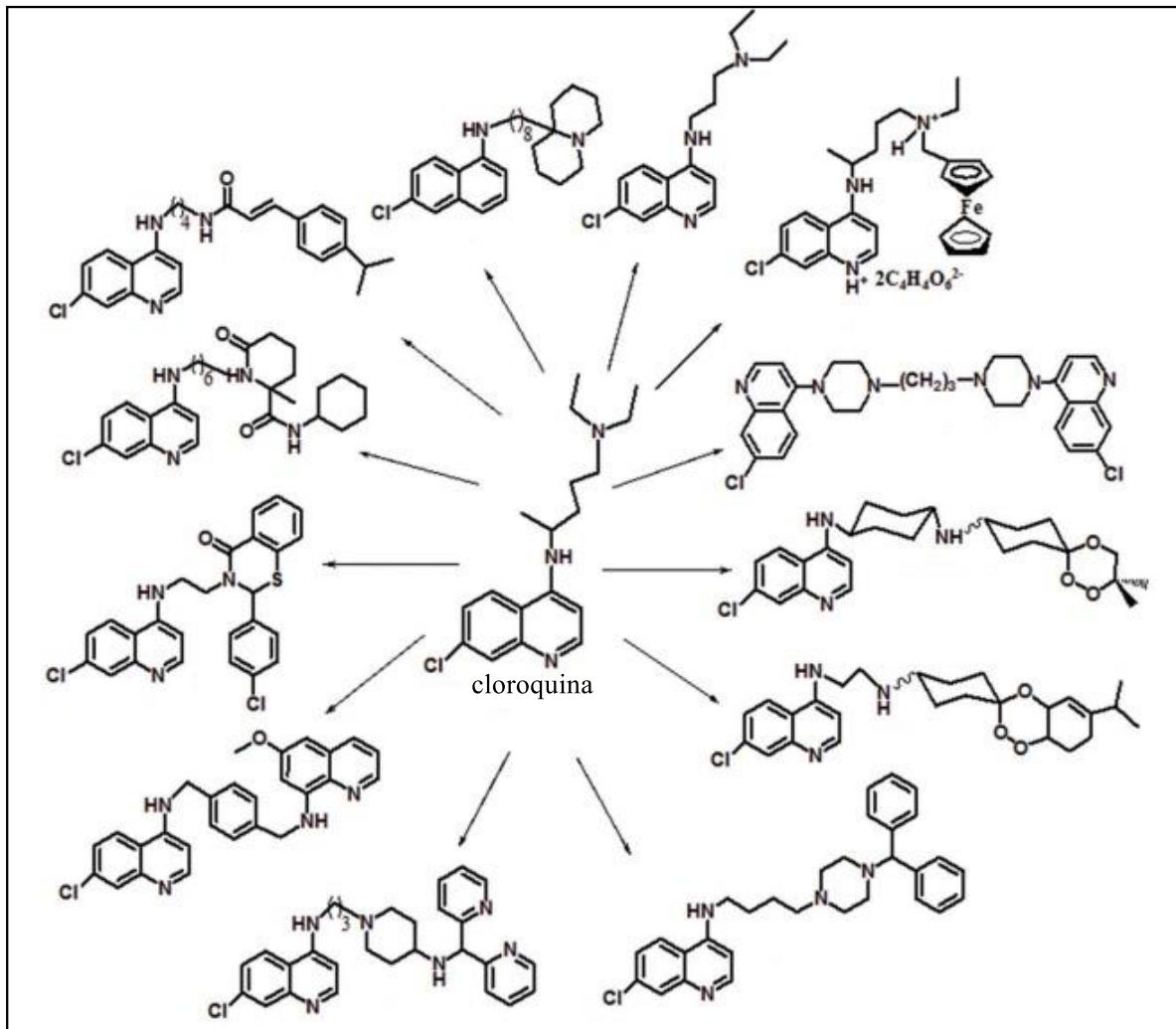
Com o decorrer dos anos, outros usos foram estudados pela comunidade científica, e atualmente diversas atividades já estão ligadas a este núcleo quinolínico como, por exemplo, atividades leishmanicidas, antinociceptivas e anti-inflamatórias, antituberculose, antitumoral e mais recentemente um marco para as pesquisas nacionais e mundiais com a atividade antizika vírus (PARHIZGAR, 2017)(COIMBRA et al., 2016)(SAVEGNAGO et al., 2013)(DE SOUZA et al., 2009)(BISPO et al., 2015)(BARBOSA-LIMA et al., 2017).

2.2.3.1 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antimalária

A malária é uma doença tropical causada por parasitas do gênero *Plasmodium* ssp. tendo como maior região endêmica a África, América do Sul e Ásia. De acordo com a (“Fact Sheet Malaria”, 2016) estima-se que só no ano de 2015, aproximadamente 212 milhões de casos foram identificados e 429,000 mortes tenham ocorrido devido a essa doença. Os seus principais sintomas clínicos incluem febre, dor de cabeça e fraqueza muscular.

O nucleo 7-cloroquinolina é considerado um dos mais estudados frente aos protozoários do gênero *Plasmodium*, em estudos recentes Parhizgar e Tahghighi selecionaram uma biblioteca de compostos análogos da cloroquina (Figura 2.7) com atividade antimalária o que fortalece ainda mais a importância deste núcleo como subestrutura chave na química medicinal (PARHIZGAR, 2017).

Figura 2.7 – Compostos derivados da cloroquina com atividade antimalária



Fonte: Adaptado de PARHIZGAR, 2017

Atualmente os estudos com o núcleo 7-cloroquinolina como parte presente em futuros medicamentos contra a malária permanecem em andamento e vem se mostrando promissores por driblarem a resistência às cepas de *plasmodium* e por apresentarem reduzida toxicidade, chegando a etapas de testes pré-clínicos e clínicos (PARHIZGAR, 2017).

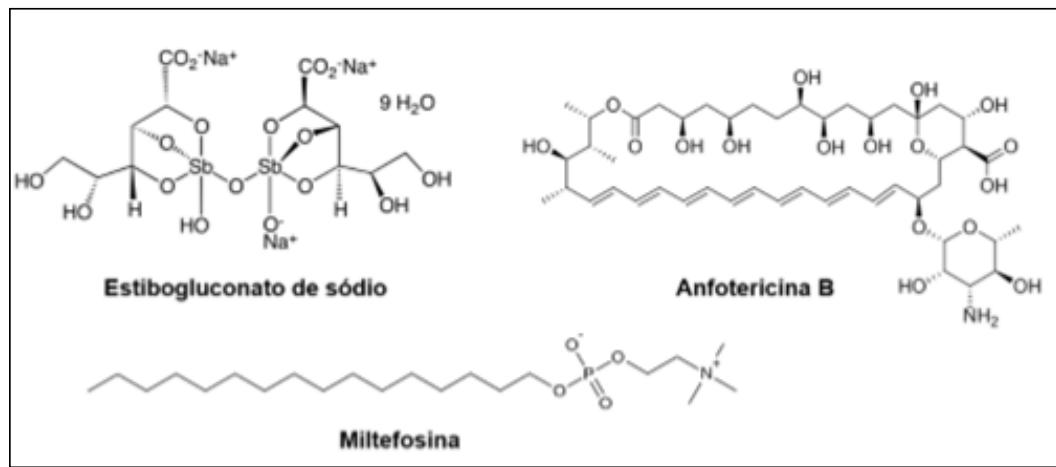
2.2.3.2 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antileishmania

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* ssp. e tal como a malária, trata-se de uma doença subtropical, afetando em sua maior parte o hemisfério sul do mundo, gerando um problema de saúde pública em 98 países com registro de 1,3 milhões de novos casos e de 20 a 30 mil mortes em 2015 (ANTINARELLI et al., 2016). Manifesta-se sob a forma cutânea e a forma visceral sendo esta última responsável pela maior parte das mortes causadas pelo protozoário (COIMBRA et al., 2016).

No caso da leishmaniose, medicamentos de referência já existentes como estibogluconato de sódio, a anfotericina B e a miltefosina (Figura 2.8), vem tornando-se cada vez menos efetivos devido ao aumento da resistência do parasita. Efeitos colaterais e inconsistência no efeito do medicamento no caso do estibogluconato de sódio; alto custo na produção e eficiência dependente da espécie do parasita no caso da anfotericina B e miltefosina torna necessária a busca por novos medicamentos ativos contra as espécies de protozoários causadoras da leishmaniose (NAGLE et al., 2014). O próprio Departamento de Protozoologia/IOC-FIOCRUZ comenta (FIOCRUZ, [s.d.]):

O Glucantime não age senão à medida em que os macrófagos estejam estimulados e o doente comece a se defender contra o parasita, na realidade os imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento. Por esse motivo a OMS tem estimulado as pesquisas com drogas alternativas, sendo propostos multicentros de investigações no Mediterrâneo e África para leishmaniose visceral e na América do Sul para leishmaniose tegumentar (Report of OMS Meeting, Nairobi, Kenia, Dec. 1987), visto que a associação do vírus AIDS com a Leishmaniose tem tido sua casuística aumentada (Clauve e col., 1986; Lortholary e col., 1990; Machado e col., 1992). As drogas atualmente empregadas como segunda escolha neste tratamento são a pentamidina e a Anfotericina B, que além de serem muito tóxicas, são de difícil administração (Berman, 1988).

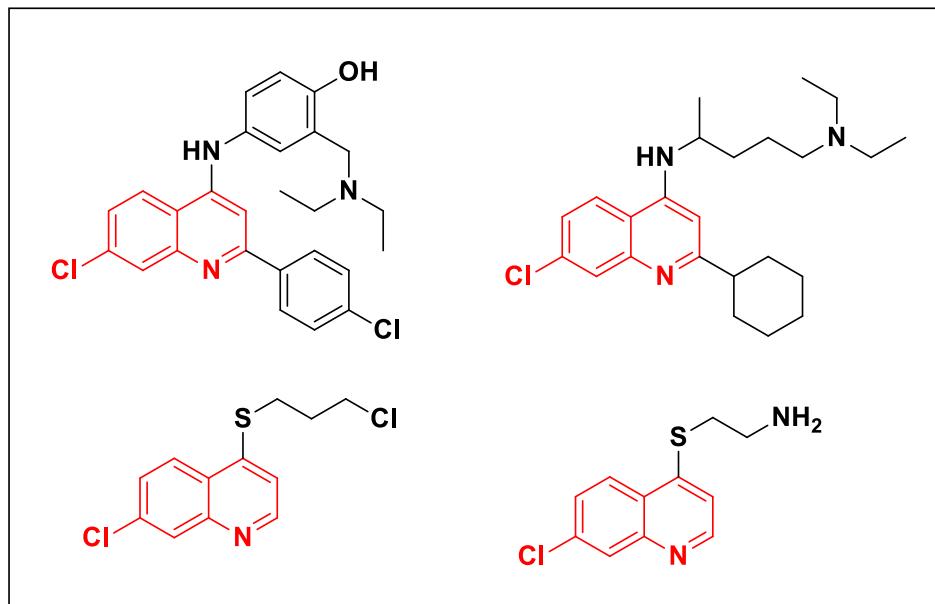
Figura 2.8 – Medicamentos de referência no tratamento de Leishmaniose



Fonte: Adaptado de (NAGLE et al., 2014)

Buscando por candidatos a fármacos contra leishmaniose é possível encontrar uma boa variedade de substâncias contendo o núcleo 7-cloroquinolina, essa variedade deriva do fato da quinina e do seu sucessor a cloroquina, apresentarem uma atividade considerável contra o protozoário da leishmania, a Figura 2.9 mostra alguns derivados da 7-cloroquinolina com atividade leishmanicida (COIMBRA et al., 2016)(HERRERA et al., 2016).

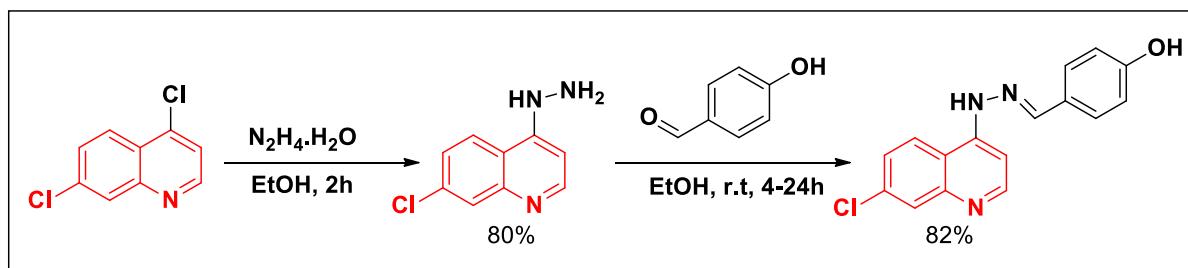
Figura 2.9 – Derivados com atividade leishmanicida



Fonte: Elaborada pelo autor

Outro exemplo do uso da 7-cloroquinolina como possível candidato a fármaco leishmanicida descrito na literatura; foi a síntese de um derivado de 7-cloro-4-quinolinahidrazona a partir da 4,7- dicloroquinolina (Esquema 2.3), o derivado apresentou atividade em cepas de *L. amazonensis* semelhante ao medicamento de referência, a miltefosina, sendo os valores de $Cl_{50} = 8,1\mu M$ (6,7-9,9) e $Cl_{50} = 6,5\mu M$ (5,2-8,2) respectivamente (ANTINARELLI et al., 2016).

Esquema 2.3 – Reação de obtenção do derivado de 7-cloro-4-quinolinahidrazona



Fonte: Elaborada pelo autor

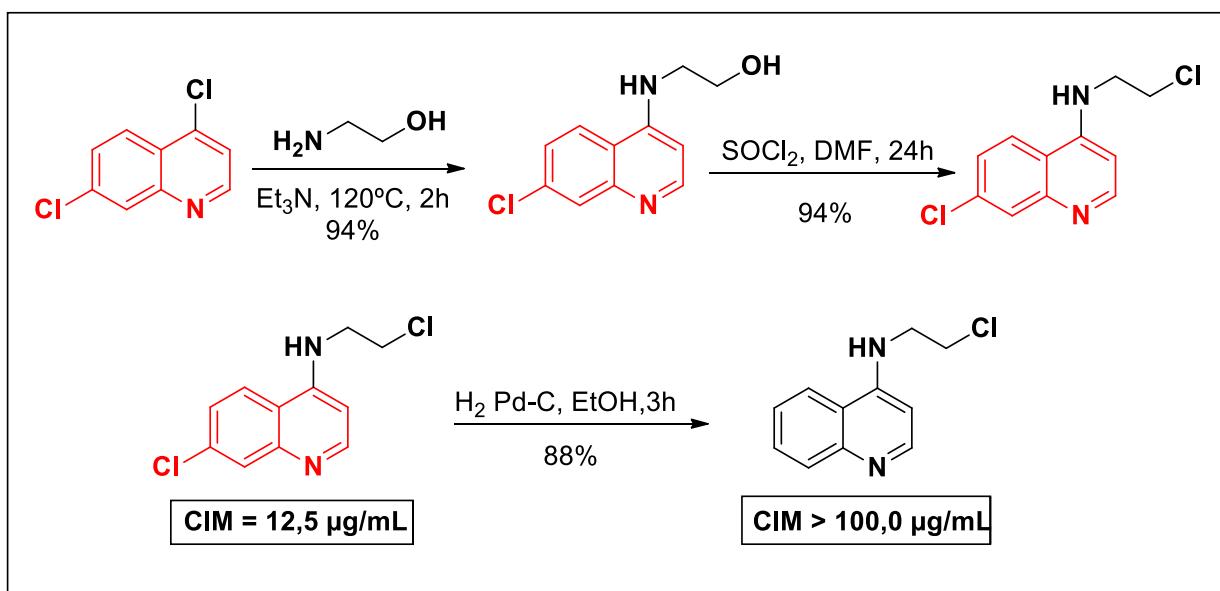
2.2.3.3 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antituberculose

A tuberculose é uma doença que afeta principalmente os pulmões é causada por bactérias (*Mycobacterium tuberculosis*), sendo transmitida pela tosse, espirro ou cuspe de pessoas infectadas, a inalação dos germes expelidos no ar já é suficiente para a infecção de uma pessoa. Trata-se de uma das doenças mais comuns, transmissíveis e fatais do mundo, tendo uma estimativa de que um terço do mundo esteja infectado com tuberculose (WHO, 2017) (XU et al., 2017).

A segunda linha de tratamento contra a tuberculose recomendada pela OMS incluem medicamentos que apresentam o anel quinolínico, com substituintes na posição 7, segundo estudos de relação estrutura atividade, indicou-se que substituintes nesta posição apresentam grande influência na potencialização dessas substâncias (FENG et al., 2010). O ponto de partida para o estudo de derivados da 7-cloroquinolina contra a tuberculose vem dos compostos já conhecidos no tratamento da malária (pamaquina, primaquina, quinina, cloroquina) por apresentarem atividade

moderada contra a tuberculose. Em estudos desenvolvidos por Souza e colaboradores (2009) foram sintetizados e estudados compostos derivados da 7-cloroquinolina contra tuberculose e foi observada a essencialidade da presença do átomo de cloro na posição 7 do anel para a atividade frente a tuberculose, pois a sua substituição diminui drasticamente a atividade da substância (Esquema 2.4) (DE SOUZA et al., 2009).

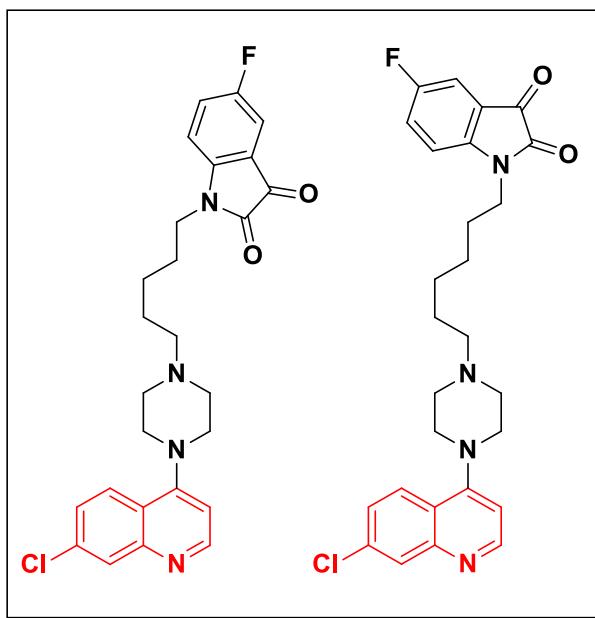
Esquema 2.4 – Síntese de derivados clorados da 7-cloroquinolina



Fonte: Elaborada pelo autor

Em estudos recentes Xu e colaboradores (2017) sintetizaram uma série de derivados da 7-cloroquinolina com potencial atividade frente a cepas de tuberculose, os quais se apresentaram promissores, em alguns casos (Figura 2.10) tendo efeitos contra a tuberculose ($\text{CIM} < 10,12 \mu\text{mol/L}$) até seis vezes mais potentes que a cefalexina ($\text{CIM} = 68,41 \mu\text{mol/L}$) (XU et al., 2017).

Figura 2.10 - Derivados ativos em cepas de tuberculose



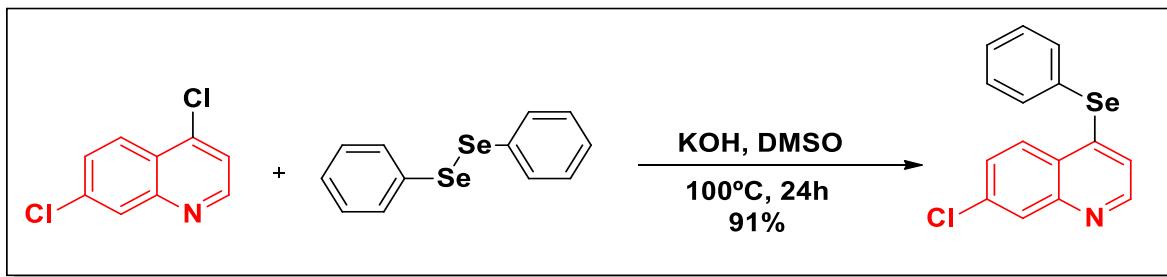
Fonte: Elaborada pelo autor

2.2.3.4 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antinociceptiva e antinflamatória

A dor e a inflamação são na maioria dos casos sintomas clínicos de que algo não está correto no organismo vivo, ambos afetam a qualidade de vida do paciente e representam um sinal de alerta. Uma grande variedade de medicamentos antinflamatórios encontra-se disponível no mercado, entretanto a busca por novas drogas mais eficientes no tratamento da dor e da inflamação faz-se necessária.

Em estudos envolvendo derivados da 7-cloroquinolina Savegnago e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de composto envolvendo selênio com potencial atividade antioxidante (Esquema 2.5) (SAVEGNAGO et al., 2013).

Esquema 2.5 – Síntese de derivado da 7-cloroquinolina contendo selênio



Fonte: Elaborada pelo autor

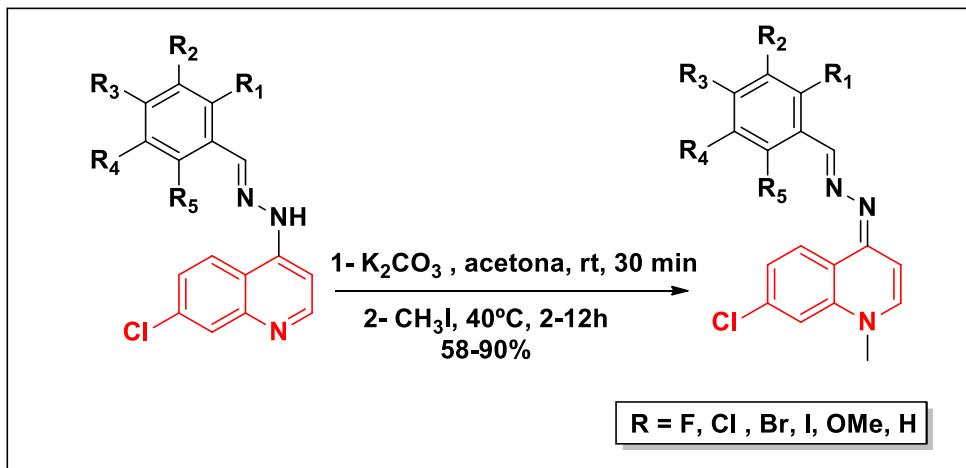
Dando continuidade ao trabalho, Pinz e colaboradores (2016) realizaram testes biológicos em camundongos, utilizando a substância que obteve melhores resultados como antioxidante e foi observado o potencial antinociceptivo e antinflamatório dessa substância comparando-a ao medicamento de referência, o meloxicam. Os resultados apresentados no mesmo trabalho mostram que a substância derivada da 7-cloroquinolina tem potencial similar ao do medicamento de referência (PINZ et al., 2016).

2.2.3.5 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antitumoral

Câncer é a denominação dada para um conjunto de doenças que tem como característica comum, a formação de tumores malignos a partir da proliferação e crescimento desordenados de células anormais. O câncer pode ser iniciado por fatores intrínsecos ou por fatores externos ao organismo que levem a alterações genéticas. O desenvolvimento do tumor pode ocorrer em qualquer parte do corpo e espalhar-se para além do seu local de origem através do processo conhecido por metástase, o que torna o tratamento mais difícil (WHO, 2015)(INCA, 2017).

Testes com substâncias contendo o núcleo 7-cloroquinolina vêm sendo realizados e mostram resultados promissores em células cancerígenas, em publicação recente, uma série de compostos sintetizados por Bispo e colaboradores (2015) contendo o núcleo 7-cloroquinolina (Esquema 2.6) foi avaliada em três linhagens de células cancerígenas humanas e mostrou bons resultados para futuras pesquisas na área (BISPO et al., 2015).

Esquema 2.6 – Síntese de série contendo 7-cloroquinolina com atividade citotóxica



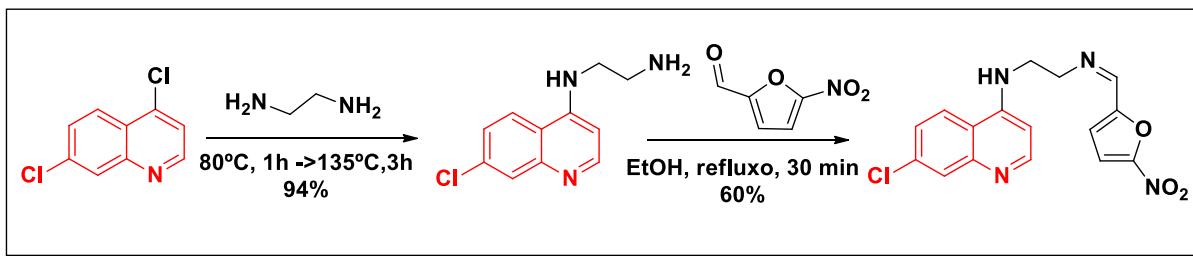
Fonte: Elaborada pelo autor

2.2.3.6 - Núcleo 7-cloroquinolina em moléculas com atividade antizika vírus

O Zika vírus (ZIKV) pertence à família dos *Flaviviridae* mesma família na qual se encaixa o vírus causador da dengue. Em meados de 2007 foi identificado o primeiro grande surto de Zika. Em 2016 a doença tomou grandes proporções, havendo relatos da infecção em todo o mundo, 52 países nos continentes da Ásia, África e nas Américas. O ZIKV tem importante impacto sobre a saúde por tratar-se de um agente que pode estar relacionado a desordens de nível neurológico de fetos em desenvolvimento. Tendo em vista a situação de emergência apresentada pela OMS a respeito da Zika, diversas pesquisas foram aprofundadas na busca por fármacos com atividade contra o vírus da zika (WHO, 2016).

A cloroquina pode ser apresentada como uma grande aposta contra o ZIKV, por tratar-se de uma droga que pode ser administrada de maneira segura em mulheres grávidas. Com isso, atrelado ao histórico da cloroquina, Barbosa-Lima e colaboradores (2017) sintetizaram uma série de compostos contendo o núcleo 7-cloroquinolina, que apresentaram bons resultados contra o vírus da zika, mostrando-se potentes e atóxicos. O composto mais ativo da série pode ser visto no Esquema 2.7 (BARBOSA-LIMA et al., 2017).

Esquema 2.7 – Síntese de compostos derivados da 7-cloroquinolina contra o ZIKV



Fonte: Elaborada pelo autor

Todas essas atividades são frutos da cloroquina, e de estudos a respeito de seu potencial farmacológico.

2.3 HIBRIDIZAÇÃO MOLECULAR

O desenvolvimento de um fármaco clinicamente útil pode levar vários anos de pesquisas contínuas, onde vários especialistas (químicos, biólogos, médicos) se ocupam, proporcionando a cura para uma doença particular ou o alívio dos sintomas de um distúrbio fisiológico. A criação de um novo candidato a fármaco com melhores propriedades químicas e aperfeiçoamento dos efeitos farmacológicos é um indicador central na busca por novas drogas (LIU et al., 2016).

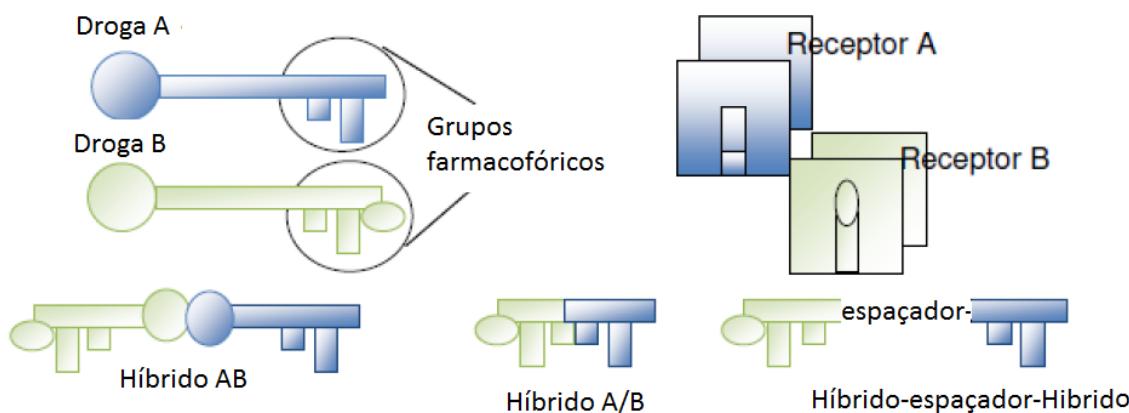
Um composto líder (do inglês. *Lead compound*), com uma atividade farmacológica desejada pode apresentar efeitos secundários indesejáveis associados a ele, por exemplo, limite da sua biodisponibilidade, ou características estruturais que influenciam negativamente no seu metabolismo e excreção do corpo. Entre as principais abordagens da Química Medicinal, para o desenvolvimento racional de um novo composto líder e a melhora constante dos efeitos benéficos (atividade farmacológica pretendida) e redução dos maléficos (minimização dos efeitos colaterais), temos o bioisosterismo e a Hibridização molecular como técnicas chave, sendo que esta última estratégia vem sendo amplamente explorada nos últimos anos (PATANI; LAVOIE, 1996) (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Hibridização molecular (HM) é uma abordagem de modificação molecular para obter-se um composto multialvo que apresente mais vantagens farmacocinéticas

(ADME) do que a administração de dois fármacos diferentes (SHAVETA; MISHRA; SINGH, 2016). O termo multialvo, proposto por Morphy (MORPHY; KAY; RANKOVIC, 2004), aplica-se a uma droga que reconhece mais do que um receptor biológico. As vantagens de uma droga multialvo estão na capacidade de: (a) ativar diferentes alvos por uma única molécula, aumentando assim a eficácia terapêutica e (b) alterar o perfil de biodisponibilidade na célula, sendo posteriormente eliminado de forma mais eficaz, após exercer o seu efeito biológico esperado.

O processo de hibridação está intimamente relacionado com a estratégia de se obter um pró-fármaco mútuo, tendo como principal diferença o fato de que a ação de um pró-fármaco depende da sua clivagem *in vivo*, enquanto que o composto híbrido pode atuar *per se* nos seus receptores ou alvos específicos (Figura 2.11).

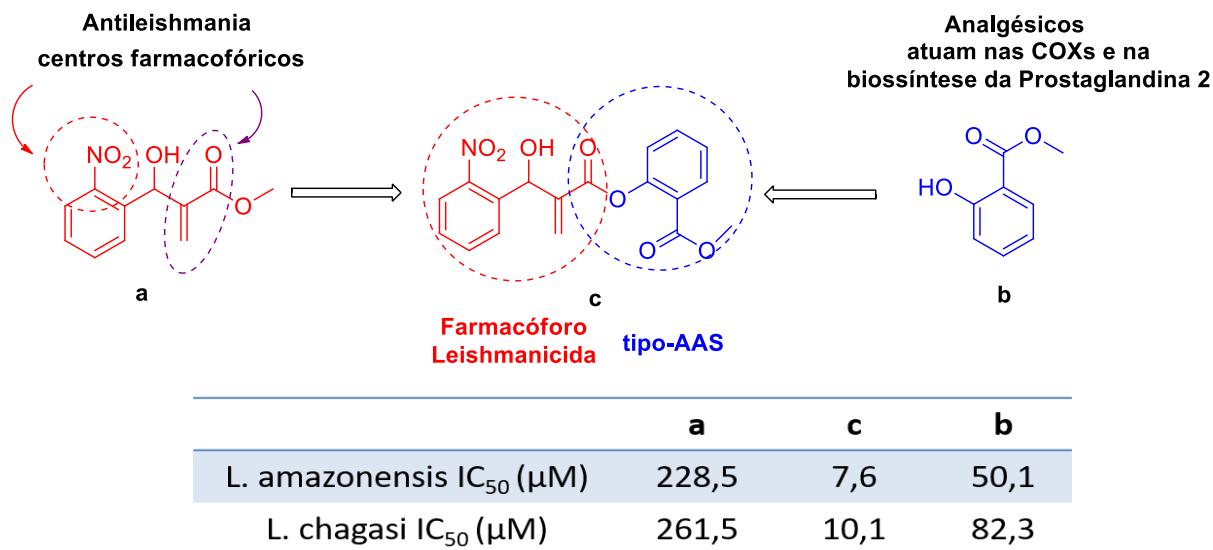
Figura 2.11 - Abordagem da Hibridização molecular



Fonte: Adaptado de BOSQUESI, 2011.

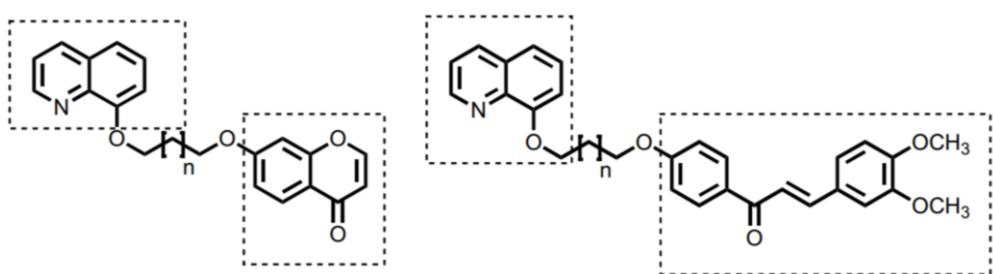
Estes híbridos podem ser construídos ligando covalentemente grupos farmacofóricos de duas drogas distintas, de forma diretamente ou com uso de um espaçador, que pode ajudar na bioatividade devido à liberdade conformacional deste híbrido. A formação de um híbrido oriundos de duas drogas de princípios ativos distintos, por exemplo, um anti-inflamatório e um antiparasitário pode potencializar a ação farmacológica esperada (BOSQUESI et al., 2011). Um exemplo bem sucedido de hibridização molecular foi o composto sintetizado por Barbosa e colaboradores onde o salicilato de metila e grupos nitrobenzaldeídos foram combinados por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman produzindo um híbrido com melhor atividade citotóxica (Figura 2.12)(BARBOSA et al., 2011).

Figura 2.12 – Hibridização molecular entre salicilato de metila e grupos nitrobenzaldeídos



Recentemente, estruturas contendo anéis quinolinicos hibridizados com chalconas com o auxílio de espaçadores do tipo cadeia carbônica saturada, tiveram suas atividades leishmanicida e tripanossomicida testadas mostrando bons resultados quando comparadas com as drogas de referência para leishmania e tripanossoma, antimoníato de meglumina e benzonidazol respectivamente (Figura 2.13) (COA et al., 2017).

Figura 2.13 – Híbridos de Quinolinas contendo atividade leishmanicida e tripanossomicida



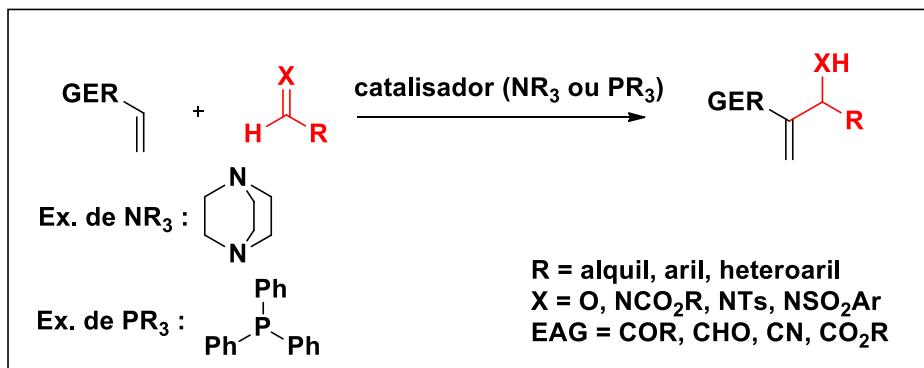
Estes resultados reforçam a necessidade de estudos dentro da área de hibridização molecular. Com o objetivo de desenvolver novos caminhos baseados na simplificação e combinação de estruturas com atividades biológicas já relatadas.

2.4 REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

2.4.1 INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE REAÇÕES DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN

A reação de Morita-Baylis-Hillman (MBH) foi desenvolvida entre os anos de 1968 e 1972, e trata-se de uma reação de adição (formação de um aduto) por meio de uma ligação carbono-carbono, entre um carbono alcenico ligado a um grupo retirador de elétrons (GRE), e um carbono eletrofílico de aldeídos, cetonas ou iminas (aza-MBH); catalisada por fosfinas ou aminas terciárias (NR_3 ou PR_3) podendo ser vista na Esquema 2.8.(MORITA; SUZUKI; HIROSE, 1968).

Esquema 2.8 – Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman



Fonte: Elaborada pelo autor

Geralmente os grupos eletrofílicos utilizados nessas reações são aldeídos e o catalisador mais comumente empregado é o DABCO (FERNANDO COELHO, 2000), a grande vantagem dessa reação é a total economia de átomos e a possibilidade de realiza-la na ausência de solvente ou usando um solvente verde (a água), além do uso de catalisadores orgânicos evitando o uso de metais, e assim caminhando para uma química mais limpa (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012).

Além das vantagens já apresentadas os adutos de MBH trazem consigo uma grande versatilidade reacional, devido a presença de diversos centros que possibilitam

diferentes reações orgânicas como por exemplo a função álcool, os carbonos alcenicos e o grupo funcional retirador de elétron existentes na estrutura (REDDY et al., 2018).

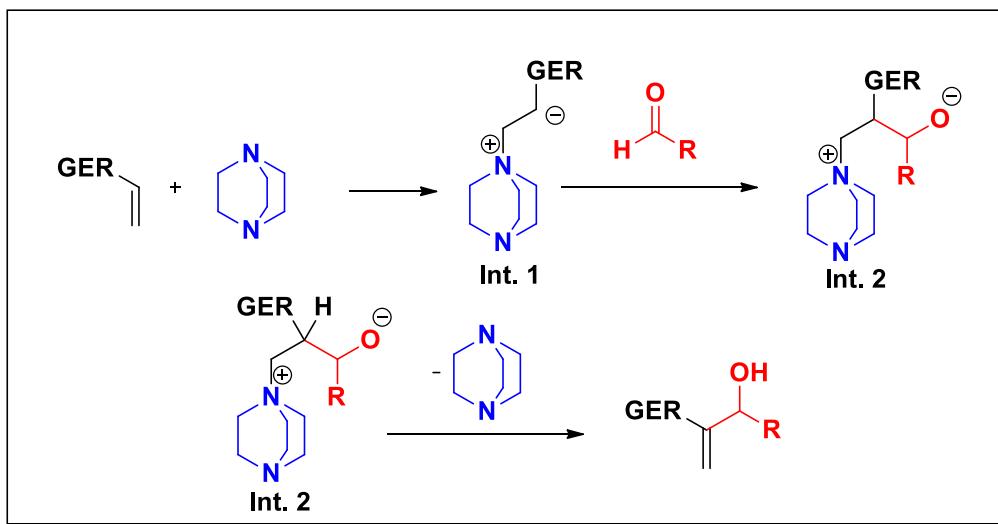
2.4.2 PROPOSTAS MECANÍSTICAS PARA REAÇÕES DE MBH

Com o passar dos anos, e o crescimento das pesquisas ligadas às reações de MBH, se tornou necessário o estudo do mecanismo dessa reação. Vários pesquisadores e propostas mecanísticas surgiram e constantemente se debate sobre a influência dos reagentes, etapa lenta e intermediários reacionais.

A primeira proposta mecanística para as reações de MBH surgiu em 1983 com Hoffman e Rabe (HOFFMANN; RABE, 1983). e os primeiros estudos cinéticos datam de 1990 com Hill e Issac (HILL; ISAACS, 1986). Estudos atuais feitos por Plata e Singleton, comparando os resultados teóricos e experimentais mostraram-se bastante esclarecedores quanto a energia envolvida na etapa de transição para formação dos adutos de MBH (PLATA; SINGLETON, 2015).

Um Esquema geral do mecanismo de ação da reação de MBH pode ser visto na Esquema 2.9, esta representação é de comum acordo entre os pesquisadores que estudam essa reação; sendo composta por uma primeira etapa que seria a adição do catalisador ao alceno e formação do primeiro intermediário (Int.1), seguida por uma reação aldólica formando o segundo intermediário (Int. 2) que para gerar o aduto esperado, passa por uma etapa de eliminação (PLATA; SINGLETON, 2015).

Esquema 2.9 – Esquema de mecanismo da reação de MBH



Fonte: Elaborada pelo autor

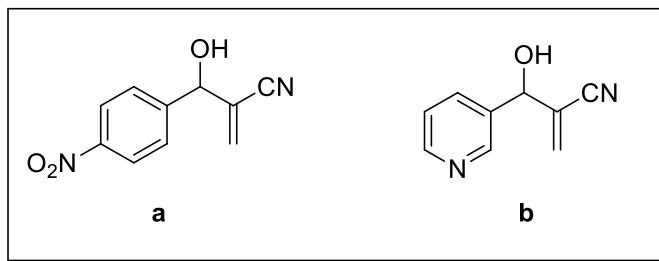
Nos estudos realizados por Plata e Singleton, os autores chegaram a conclusão que os mecanismos propostos anteriormente na literatura seriam competitivos dentro de cada etapa limitante, sendo assim a baixas temperaturas a etapa aldólica seria a limitante da reação, enquanto que a temperatura ambiente a etapa que envolve a transferência de próton mostrou-se como a etapa determinante na velocidade da reação (PLATA; SINGLETON, 2015).

2.4.3 ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN COM ATIVIDADE BIOLÓGICA

Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) são estruturas com grande potencial biológico, e tem sido amplamente estudados devido sua aplicação em diversas áreas farmacológicas, como por exemplo atividade antifúngica, antibacteriana, antinflamatória, antiprotozoaria e antitumoral (DA CÂMARA ROCHA et al., 2019; FAHEINA-MARTINS et al., 2017; NELSON et al., 2018).

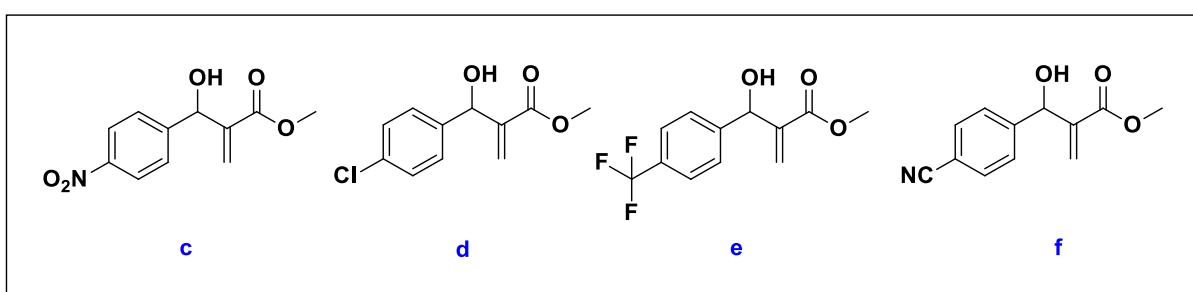
Os primeiros relatos de adutos de Morita-Baylis-Hillman com atividade biológica datam de 1999 em trabalho realizado por Kundu e colaboradores, no qual foi observada atividade antimalária em cepas de *P.falciparum* para alguns adutos com destaque nas estruturas presentes na Figura 2.14 (KUNDU et al., 1999).

Figura 2.14 - Moléculas mais ativas em cepas de *P.falciparum* presentes no trabalho de Kundu e colaboradores



Após a abertura dada pelo trabalho de Kundu, vários grupos de pesquisa iniciaram relatos das mais variadas atividades biológicas dos AMBH. Em 2006 Kohn e colaboradores relataram atividade antitumoral para adutos aromáticos e alifáticos formados a partir do acrilato de metila, onde foi observada a melhor atividade antitumoral dos AMBH derivados de anéis aromáticos quando comparados com os alifáticos, destacando-se os adutos com grupos elétron retiradores ligados ao anel aromático (Figura 2.15). Ainda no trabalho de Kohn foi confirmada a importância do sistema α - β insaturado para os resultados da atividade biológica, visto que quando os carbonos da instauração eram hidrogenados, a estrutura perdia sua atividade biológica (KOHN et al., 2006).

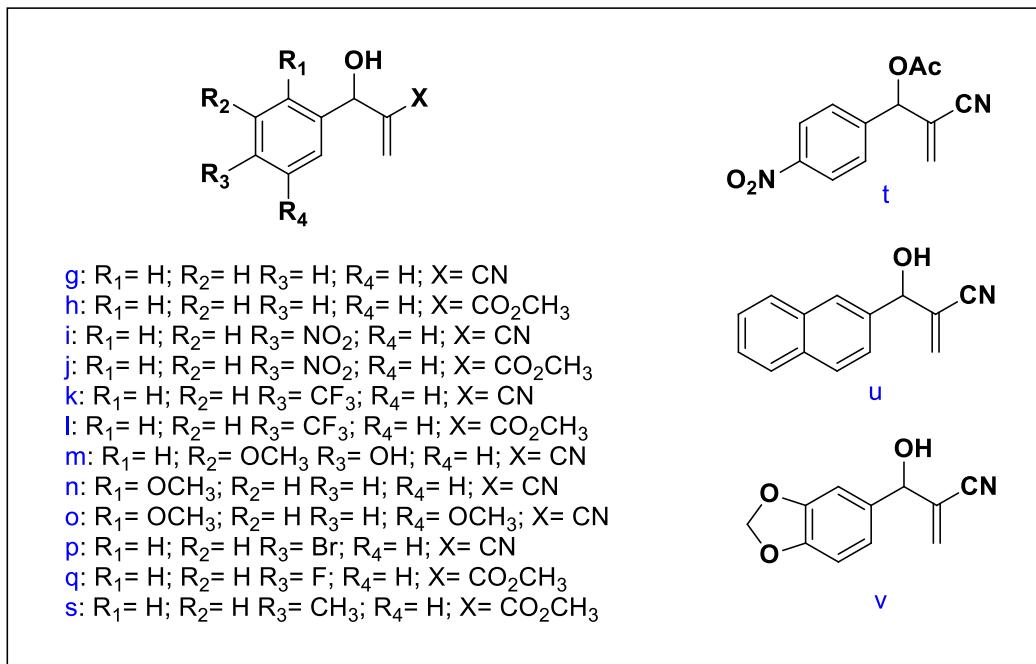
Figura 2.15 - Moléculas mais ativas em linhagens de células cancerígenas presentes no trabalho de Kohn e colaboradores



Dando continuidade a pesquisas relacionadas a reações de MBH De Sousa e colaboradores em 2007 relataram pela primeira vez atividade em formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis*, com um total de dezesseis AMBH (Figura 2.16) sintetizados e avaliados, os quais mostraram boa atividade leishmanicida e

baixos níveis de toxicidade quando comparados com o Pentostam® (DE SOUZA et al., 2007).

Figura 2.16 - Moléculas mais ativas em cepas de *Leishmania amazonensis*, presentes no trabalho de De Souza e colaboradores



Recentemente, Sousa e colaboradores sintetizaram e avaliaram dezesseis adutos de MBH híbridos com anéis tetraidropiranos em cepas de *Leishmania donovani* os quais apresentaram alta atividade leishmanicida e índices de seletividade melhores do que a droga de referência (Anfotericina B) indicando que a proposta de hibridização entre as estruturas é uma boa estratégia por ampliar as possibilidades de atividades biológicas (SOUZA et al., 2017).

Em outro trabalho, Faheina-Martins e colaboradores 2017, relacionaram o efeito antinflamatório de adutos de MBH com a atividade antitumoral, devido o bloqueio produzido pelos adutos nas citocinas IL-1 e IL-6 que são pró-inflamatórias e também estão envolvidas na progressão e no crescimento de tumores (FAHEINA-MARTINS et al., 2017).

Esses relatos da literatura reforçam as várias possibilidades de atividade dos adutos de Morita-Baylis-Hillman, mostrando assim, que trata-se de uma área abrangente e com campo para novas pesquisas e desenvolvimento de novos compostos.

Capítulo 3:

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo a síntese, avaliação da atividade biológica e análise da relação estrutura atividade de híbridos moleculares derivados do núcleo 7-cloroquinolina e adutos de Morita-Baylis-Hillman.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Sintetizar os álcoois derivados da 4,7-dicloroquinolina (**2-5**);
- ✓ Sintetizar acrilatos (**6-9**) a partir do ácido acrílico e derivados dos álcoois previamente preparados;
- ✓ Sintetizar híbridos moleculares através da reação de Morita-Baylis-Hillman (**10a** - **10c**; **11a – 11c**; **12a – 12c**; **13a - 13b**) entre os acrilatos derivados da 7-cloroquinolina e nitrobenzaldeídos.
- ✓ Avaliar a atividade biológica dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados e a sua relação com a estrutura destes compostos.

Capítulo 4:

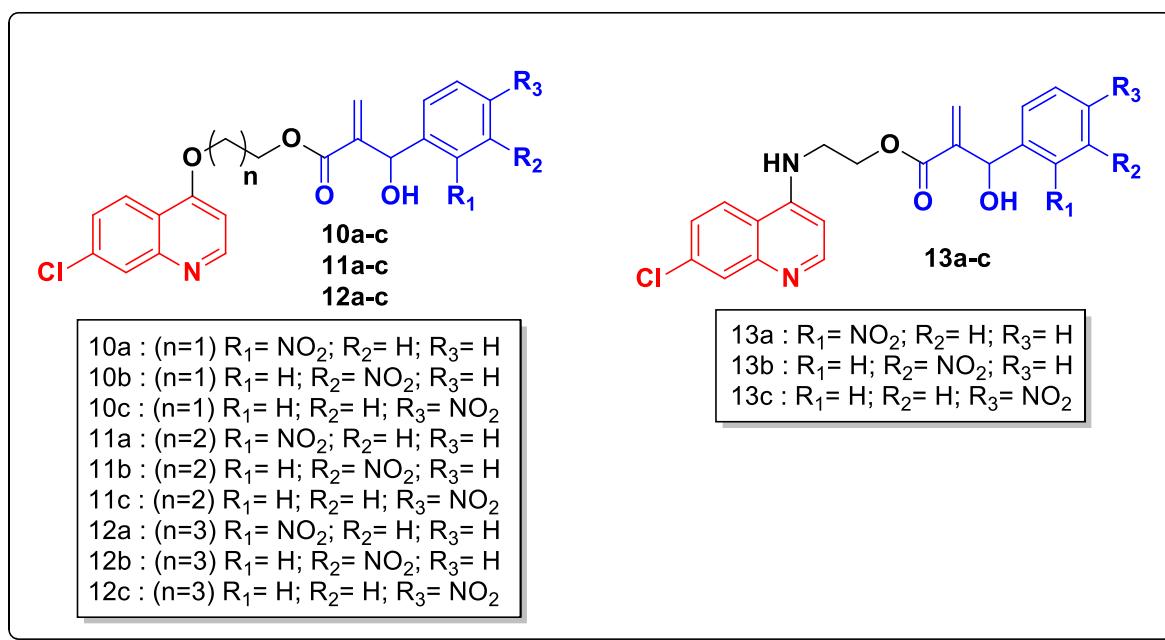
Estratégias

4. ESTRATÉGIAS

Este projeto de doutorado almejou desenvolver novos candidatos a fármacos com potencial atividade multialvo, a partir do híbrido formado entre 7-cloroquinolina que apresenta grande variedade de atividades biológicas e de adutos de Morita-Baylis-Hillman contendo anéis nitrobenzênicos, visando realizar um estudo da influência de grupos espaçadores nas respectivas atividades testadas.

A proposta do trabalho consiste na síntese de uma série de adutos, mostrados na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Adutos de Morita-Baylis-Hillman propostos

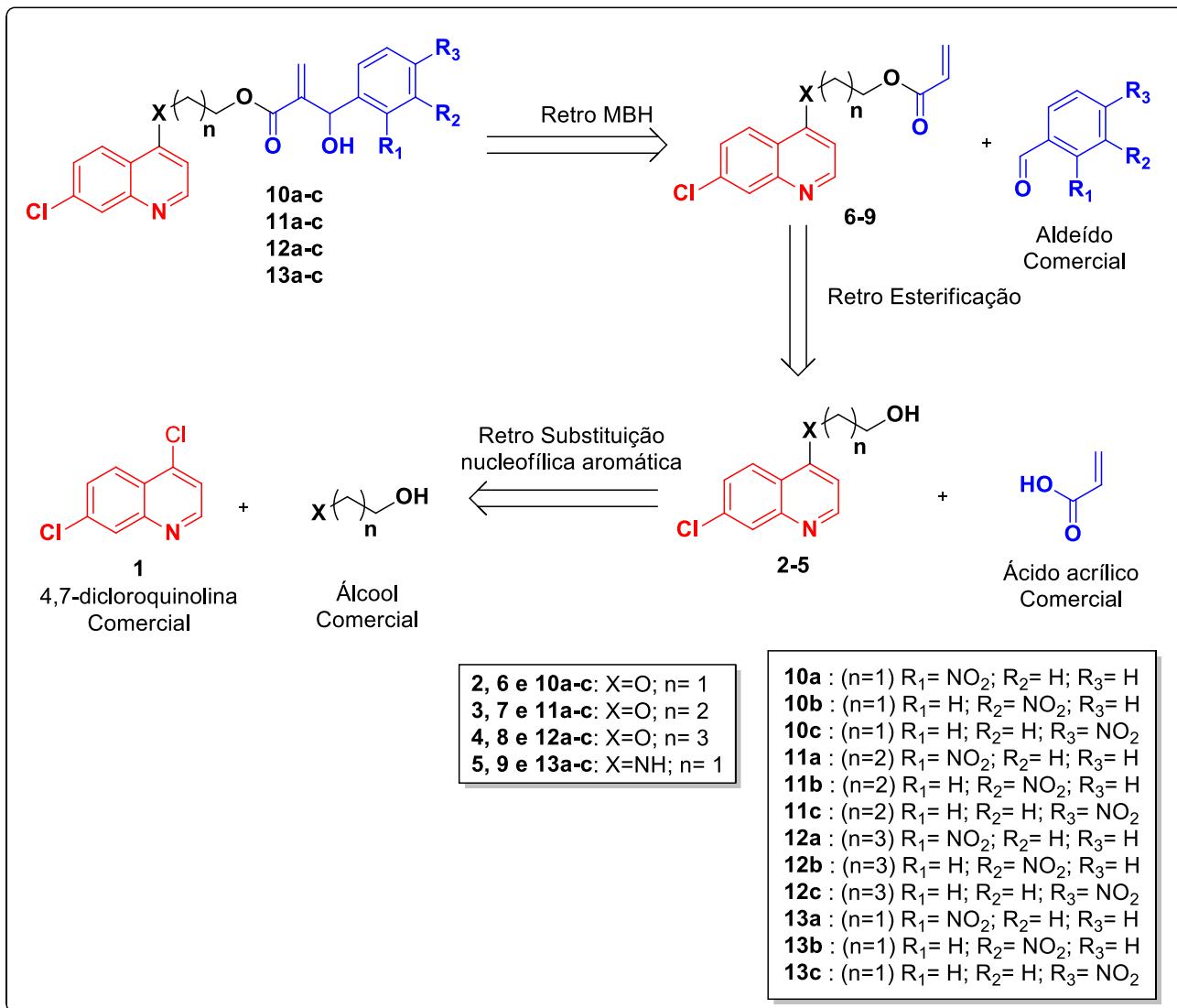


Fonte: Elaborada pelo autor

A síntese desses adutos visou ampliar os efeitos de atividade biológica gerados pelas unidades da 7-cloroquinolina (NJARIA et al., 2015) e dos adutos nitroaromáticos em questão (BARBOSA et al., 2009); além da possibilidade de trabalhar diferentes conexões entre as unidades e a influência do bioisosterismo na atividade biológica.

Uma proposta de rota sintética viável para obtenção dos adutos foi gerada a partir de uma análise retrossintética dos produtos finais, mostrada no Esquema 4.1.

Esquema 4.1 – Análise retrossintética dos adutos de Morita-Baylis-Hillman



Para obtenção dos híbridos moleculares propostos foi utilizada uma sequência de reações químicas iniciando por uma reação de substituição nucleofílica aromática empregando uma base forte, para gerar os derivados quinolínicos com espaçadores e função álcool **2-5** por meio de metodologias já existentes na literatura (NATARAJAN et al., 2008); a segunda etapa trata-se de uma reação de esterificação utilizando o ácido acrílico e o produto da primeira etapa **2-5** por diferentes metodologias como esterificação de Steglish (DCC/DMAP) ou via cloretos de acila,

para obtenção de derivados acrilados inéditos **6-9**; a etapa chave da síntese seria por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman ocorrendo entre um carbono eletrofílico do aldeído utilizado e o carbono α carbonila de um dos acrilatos **6-9** para gerar os adutos **10-13**. A proposta de avaliação biológica para os híbridos desse trabalho teve início na avaliação antitumoral e antiparasitária entretanto visa testes em vasto espectro de doenças. Os testes foram realizados *in vitro* através de cepas de leishmania e também em células cancerígenas, em parceria com o grupo de pesquisa Multidisciplinar em Biotecnologia e Saúde na Universidade Federal da Paraíba, supervisionado pela Prof. Dr. Priscilla Anne Castro de Assis e com o Laboratório de Proliferação Celular na Universidade Federal de Pernambuco, supervisionado pela Prof. Dr. Gardênia Carmen Gadelha Militão.

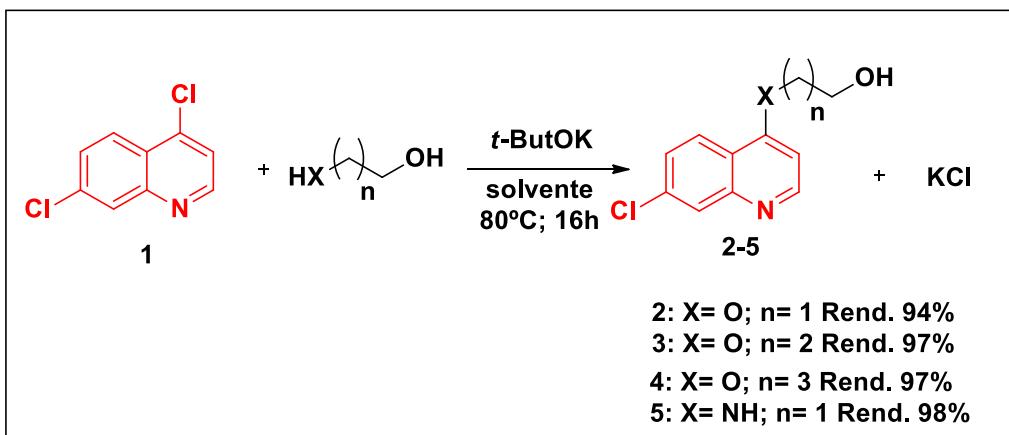
Capítulo 5:
Resultados e
Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE DOS ÁLCOOIS A PARTIR DA 4,7- DICLOROQUINOLINA

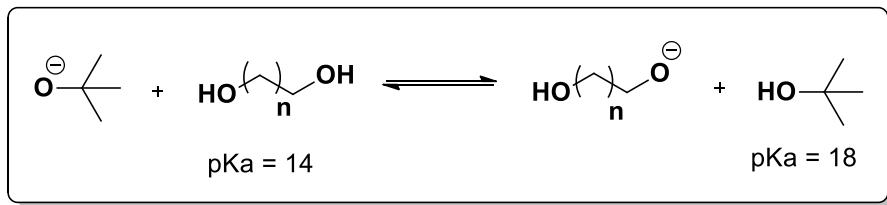
A primeira etapa do trabalho foi a síntese dos álcoois **2-5** derivados da 7-cloroquinolina. A reação para produção dos álcoois parte da 4,7-dicloroquinolina **1** por ser o reagente comercial mais próximo das estruturas desejadas e mais acessível ao laboratório no momento da produção desses trabalhos. Os álcoois foram preparados por meio de uma reação de substituição nucleofílica aromática onde o cloro da posição 4 do anel quinolínico foi substituído por um grupo mais nucleofílico conforme Esquema 5.1. Todos os álcoois desta etapa apresentaram características de sólido branco e rendimentos variando de 94-98%.

Esquema 5.1: Reação de formação dos álcoois **2-5**



A escolha da base *t*-butoxi de potássio, foi feita com o intuito de aumentar a nucleofilicidade dos dióis, pois eles são pouco reativos na sua forma não desprotonada, devido ao seu alto valor de pKa. O uso da base de *t*-butoxi ocasiona em um equilíbrio deslocado para o ácido conjugado da base (por ter uma maior estabilidade), deixando assim o diol em questão desprotonado e consequentemente muito mais nucleofílico (Esquema 5.2).

Esquema 5.2- Equilíbrio ácido-base entre 1,2-etanodiol e o ânion de *t*-butoxi



O composto 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxo)etanol (**2**), foi obtido a partir da reação entre 4,7-dicloroquinolina (**1**), etilenoglicol como reagente/solvente e uma base forte *t*-butóxido de potássio, a reação foi realizada sob aquecimento de acordo com condições reacionais já estabelecidas por nosso grupo de pesquisa (DA SILVA CALEFFI et al., 2017). O acompanhamento por cromatografia de camada delgada (CCD) mostrou total conversão do material de partida em produto após 16h de reação. Sendo a CCD de fácil interpretação devido a grande diferença de polaridade entre a 4,7-dicloroquinolina ($R_f = 0,72$) e o álcool (**2**) ($R_f = 0,24$), utilizando revelador físico (câmara de UV-Vis) e como fase móvel acetato de etila puro.

Os compostos 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propan-1-ol (**3**) e 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butan-1-ol (**4**), foram obtidos a partir da reação entre 4,7-dicloroquinolina e 1,3-propanodiol e 1,4-butanodiol respectivamente. Para estas reações a base forte utilizada também foi o *t*-butoxi de potássio (comercial), entretanto foi necessária adaptar a metodologia, para reduzir o uso dos álcoois (comerciais), com esse objetivo, foram testadas diferentes equivalências e solventes chegando assim aos resultados da Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Estudo de solvente para a reação de formação do composto **3**

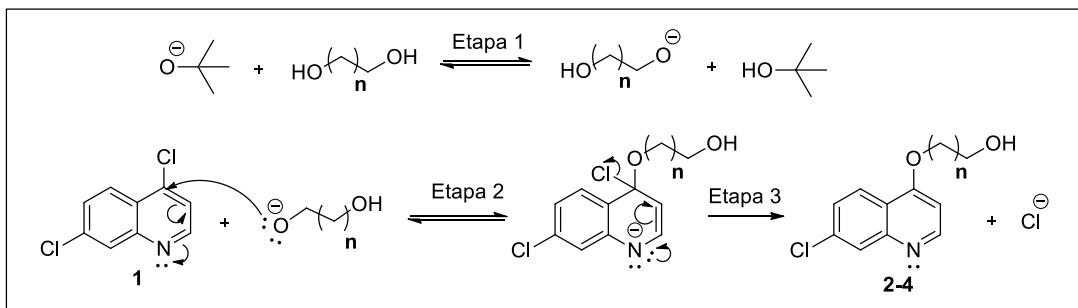
Entradas	1,3-propanodiol	Solvente (5mL/mmol)	Temperatura	Rendimento
1	35 equiv.	-	<i>t</i> -butOK (1,5 equiv.) 80°C	97%
2	7 equiv.	THF	<i>t</i> -butOK (1,5 equiv.) 80°C	30%
3	7 equiv.	<i>t</i> -butOH	<i>t</i> -butOK (1,5 equiv.) 80°C	97%

De acordo com os dados da Tabela foi observado que os resultados com um solvente de baixa polaridade como o THF não se mostraram satisfatórios, por outro lado o uso do ácido conjugado do íon *t*-butoxi, o *t*-butanol, se adequava melhor mantendo os rendimentos anteriormente obtidos na ausência de solventes, dessa forma foi definida a melhor condição para síntese de **3** e **4** como sendo o uso da combinação de *t*-butanol/*t*-butoxi (Tabela 5.1, entrada 3). Esse bom resultado com uso do *t*-butanol deve estar ligado ao seu efeito de solvatação do ânion cloreto, facilitando assim as substituições nucleofílicas desejadas. As conversões foram observadas por CCD, chegando a 100% de conversão em 16 horas de reação. Os compostos 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propan-1-ol (**3**) e 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butan-1-ol (**4**) apresentaram $R_f = 0,24$ e $R_f = 0,28$ respectivamente, a fase móvel utilizada foi acetato de etila puro e o revelação da placa cromatográfica foi feita em câmara de UV-Vis.

Após o término da reação o procedimento de extração para as reações de formação dos compostos **2**, **3** e **4** seguem o mesmo protocolo. Após confirmação de total conversão por CCD, a mistura reacional foi evaporada em evaporador rotatório para remoção do solvente, adicionada solução saturada de bicarbonato de sódio com o intuito de neutralizar o meio e o produto final foi extraído utilizando diclorometano. Foi adicionado sulfato de sódio anidro a fase orgânica para remoção de traços de água e logo em seguida filtrada e evaporada para obtenção dos produtos. Os produtos **2**, **3** e **4** obtidos, passaram por recristalização em diclorometano, mostrando-se como sólidos brancos.

O mecanismo proposto para essas reações de formação dos álcoois (**2**, **3** e **4**) é baseado na reação de substituição nucleofílica aromática, por meio de etapas de adição/eliminação (Esquema 5.3).

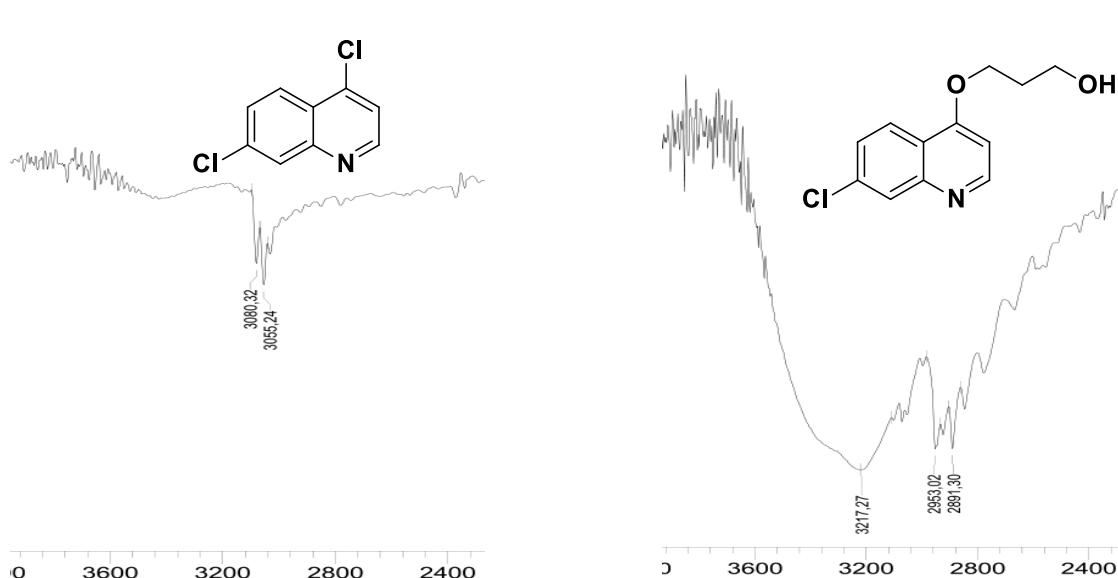
Esquema 5.3- Mecanismo geral da reação de substituição nucleofílica aromática para formação dos compostos **2**,**3** e **4**



No Esquema 5.3 podemos observar uma proposta de mecanismo para obtenção dos compostos **2-4**. A primeira etapa refere-se a uma reação ácido base para formação do álcool mais estável e como consequência a formação do grupo alcóxido de interesse como já foi dito anteriormente. A segunda etapa seria a adição nucleofílica do alcóxido, essa adição poderia acontecer nas posições 2 e 4 do anel visto que são os centros eletrofílicos da porção piridínica (CAREY; SUNDBERG, 2007). A adição é facilitada devido à presença do nitrogênio no anel aromático que por ressonância estabiliza a carga negativa gerada no anel sem quebrar a aromaticidade do composto. A última etapa (etapa 3) é uma etapa de eliminação; que ocorre reestabelecendo as ligações do anel e eliminando o grupo abandonador mais estável, que nesse caso é o íon cloreto.

Por tratar-se de substâncias já conhecidas, a identificação da formação dos compostos **2**, **3** e **4** foi realizada por espectro de infravermelho, onde foi possível observar o surgimento de bandas largas de alta intensidade em torno de 3352-3223 cm^{-1} característica de estiramento O-H, e bandas em torno de 2858-2891 cm^{-1} e em 2916-2945 cm^{-1} características de estiramento simétrico e assimétrico respectivamente de CH_2 (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Comparação entre os fragmentos de espectros de infravermelho ampliados na região de 3600 a 2400 cm^{-1} da 4,7 dicloroquinolina **1** e álcool **3** respectivamente

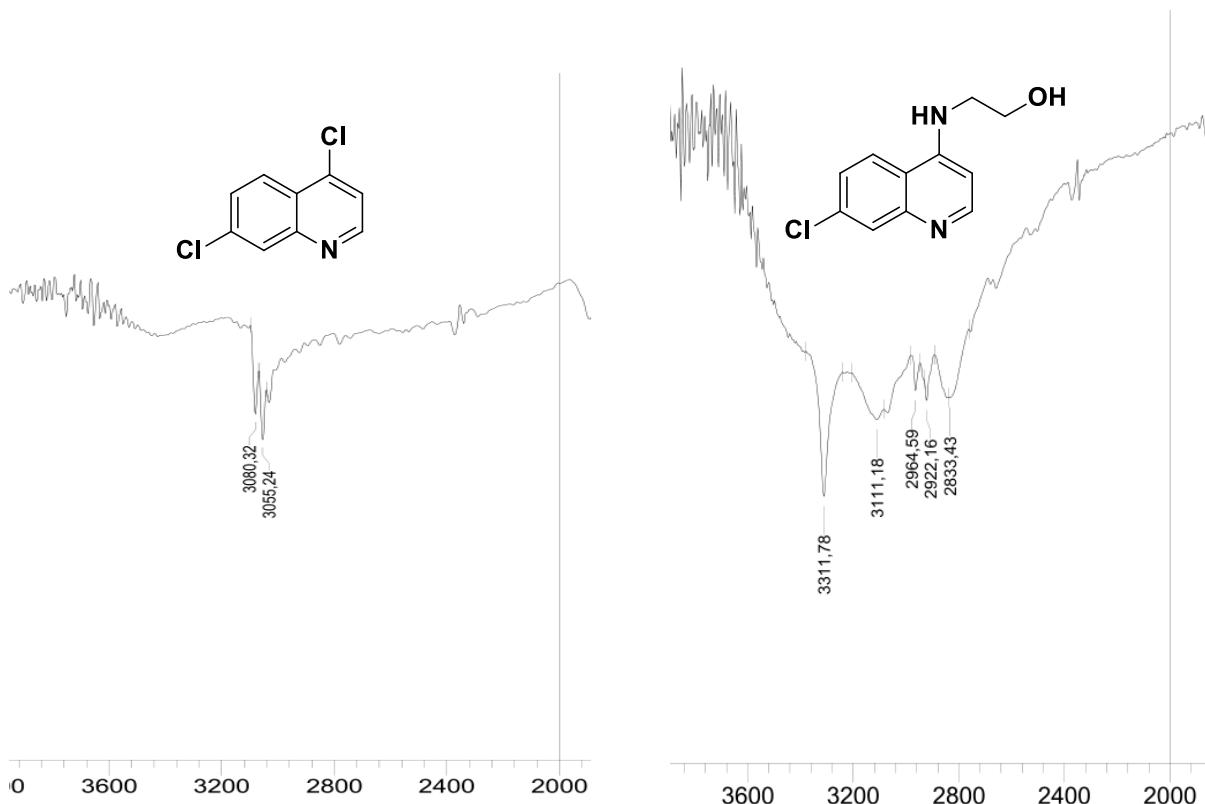


O compostos **5** foi sintetizado a partir da reação entre 4,7-dicloroquinolina **1** e 2-aminoetanol sobre condições de aquecimento/refluxo. O acompanhamento foi realizado por CCD e mostrou total conversão após 4h de reação. O sistema de eluição utilizado para esse aminoálcool difere-se do utilizado para reações com diois devido a alta polaridade ocasionada pelo grupo funcional amina, a nível de comparação, em sistema utilizando acetato de etila puro como fase móvel o composto **5** apresenta-se praticamente sobre o ponto de aplicação, com valor de Rf próximo de zero. Devido a grande diferença de coeficientes de retenção entre o produto e o reagente foi facilmente observada à conversão. Com a finalidade de confirmar a formação do produto, foi realizada a análise do seu ponto de fusão, que mostrou valor de 216 °C concordando com os valores de referência (GUANTAI et al., 2011).

Nesta reação não foi necessário uso de solvente ou base para catalisa-la, sendo o próprio 2-aminoetanol o solvente da reação. A ausência do t-butoxi de potássio não teve influência no rendimento (98%), isto se deve ao fato que aminas são bem mais nucleofílicas que álcoois, dispensando o uso de substâncias para aumentar sua nucleofilicidade.

Por tratar-se também de uma substância já conhecida, a identificação da formação do composto **5** foi realizada por espectro de infravermelho, onde foi possível observar o surgimento de banda fina de alta intensidade em 3311 cm⁻¹ característica de estiramento N-H, de banda larga de média intensidade em 3111 cm⁻¹ característica de estiramento O-H, e bandas em 2833cm⁻¹ e em 2922 cm⁻¹ características de estiramento simétrico e assimétrico respectivamente de CH₂ (Figura 5.2).

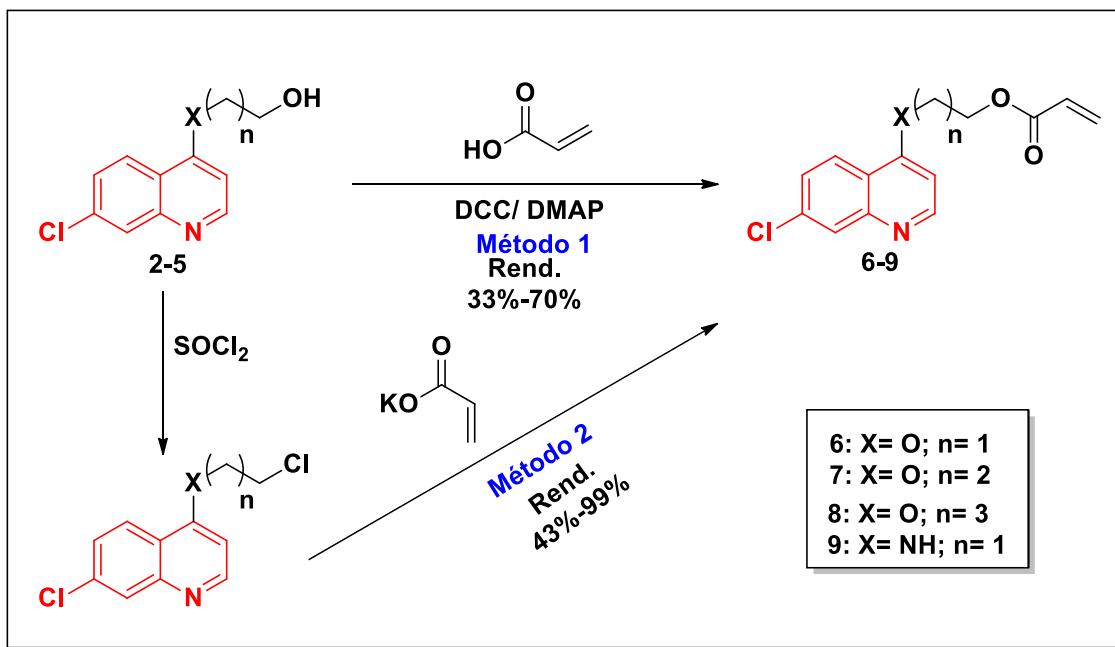
Figura 5.2 – Comparação entre as ampliações dos infravermelhos na região de 3600 a 2000 cm^{-1} da 4,7 dicloroquinolina **1** e o aminoálcool **5** respectivamente



5.2 SÍNTESE DOS ACRILATOS 6-9 DERIVADOS DOS ÁLCOOIS 2-5

Os acrilato derivados dos álcoois **2-5** foram obtidos por meio de reações de esterificação. Diferentes técnicas de esterificação foram empregadas nesta etapa com o objetivo de estabelecer uma reação simples e reproduzível. A primeira, através da reação de Steglich (DCC/DMAP) (**método 1**) e em seguida foram utilizados os cloreto de alquila derivados dos compostos **2-5** (**método 2**) (Esquema 5.4). Uma terceira metodologia via cloreto do ácido foi testada, entretanto, essa não apresentou formação do cloreto de acila inviabilizando o método. Os acrilato foram obtidos com características variando de óleo viscoso com coloração marrom, a sólido branco.

Esquema 5.4 – Reações de formação dos acrilato 6-9



5.2.1 Síntese dos acrilato derivados dos álcoois via reação de Steglish (DCC/DMAP)

A primeira metodologia testada foi a do **método 1** devido a simplicidade da proposta, comumente trabalhada em condições ambiente, a reação de Steglish não necessita de métodos elaborados e utiliza diclorometano (CH_2Cl_2) anidro como solvente, abrindo mão do uso de substâncias consideradas com alto grau de toxicidade como o benzeno ou o tolueno usualmente empregado em reações de esterificação em meio ácido (NEISES; STEGLICH, 1978).

A síntese dos compostos **6-9** foi realizada em etapa única (Esquema 5.5) a partir dos álcoois selecionados **2-5** (1,0 equiv.) e do ácido acrílico (1,2 equiv.) usando diclorometano seco como solvente da reação, com a dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador da reação (0,1 equiv.), a temperatura de 0°C, ainda a esta temperatura foi adicionada a dicicloexilcarbodiimida (DCC) (1,5 equiv.) e mantida a temperatura por 30 minutos, passado o tempo, a reação foi acondicionada a temperatura ambiente e acompanhada a formação do produto por CCD usando acetato de etila puro como eluente (fase móvel) para a síntese dos compostos **6-8** e uma mistura de metanol/ acetato de etila na proporção de 3:7 como eluente (fase

móvel) para a síntese do composto **9**. Os rendimentos das reações de formação dos acrilatos **6-9** podem ser observados na Tabela 5.2.

Esquema 5.5 – Reação de Steglish para formação dos acrilatos **6-9**

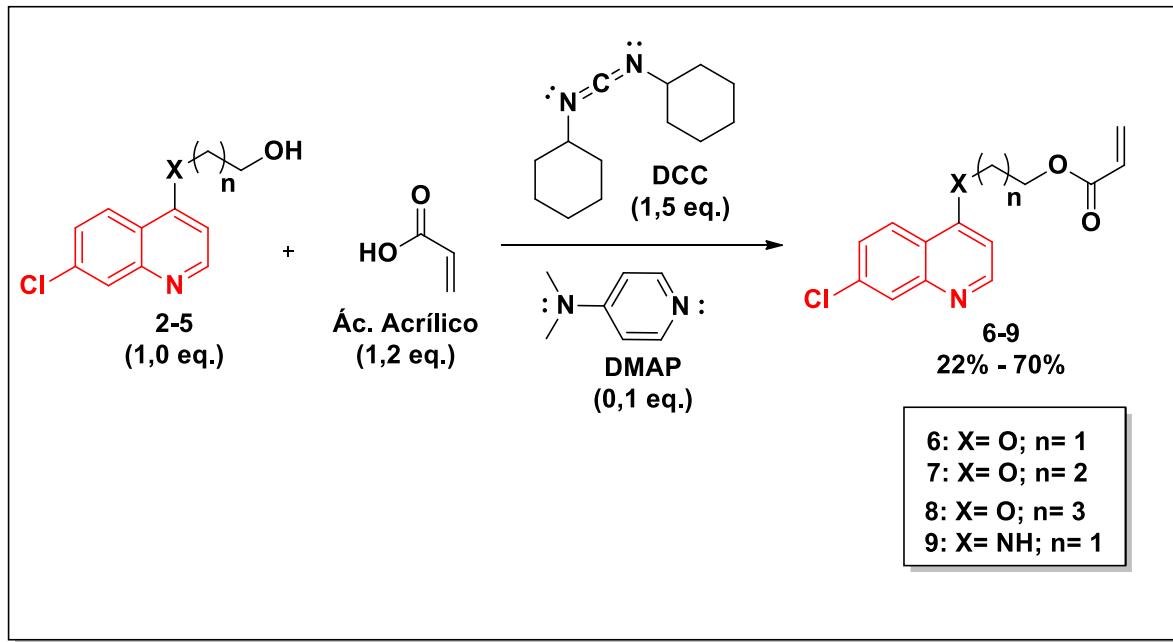


Tabela 5.2 – Rendimentos das reações de formação dos acrilatos via reação de Steglish (DCC/DMAP) com tempo de reação de 48h.

Código	Compostos sintetizados	Rendimento isolado
6		70%
7		60%
8		22%
9		33%

Uma proposta mecanística para a reação de Steglish (DCC/ DMAP) pode ser vista no Esquema 5.6. A primeira etapa (**etapa a**) do mecanismo proposto inicia-se por uma reação ácido-base entre o catalizador dimetilaminopiridina (DMAP) e o ácido acrílico para formação do íon acrilato, essa formação ocorre devido a diferença de pK_a entre o ácido acrílico ($pK_a = 4,3$) e o ácido conjugado do DMAP ($pK_a = 9,2$), favorecendo a formação do ácido mais fraco envolvido no equilíbrio químico.

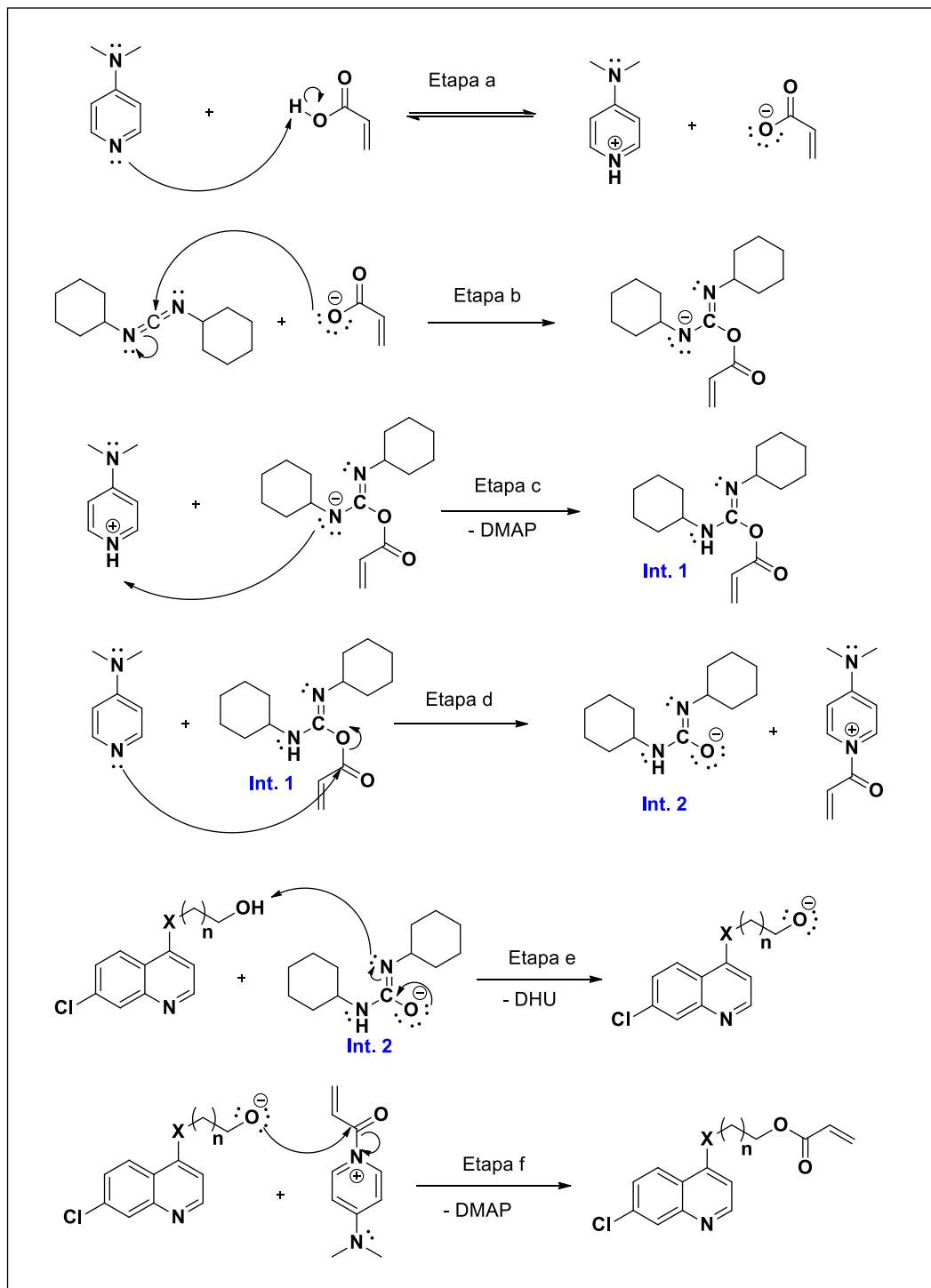
Na **etapa b** o íon acrilato realiza um ataque nucleofílico ao carbono central da estrutura do DCC que encontra-se altamente eletrofílico devido a sua proximidade a dois nitrogênios; deslocando assim o par de elétrons da ligação C=N para o nitrogênio que acomoda melhor a carga negativa devido a sua alta eletronegatividade.

Na **etapa c** o mesmo nitrogênio, carregado negativamente, abstrai um próton do ácido conjugado do DMAP, retornando ao estado de neutro e reestabelecendo o catalizador da reação.

A **etapa d** do mecanismo é uma reação de adição do grupo DMAP ao carbono da carbonila do intermediário 1 (**int. 1**), e eliminação do intermediário 2 (**int. 2**), formando a espécie acilante.

Na **etapa e** o **int. 2**, abstrai um próton do álcool em questão, gerando o alcóxido e a diciclohexilureia (DHU) (subproduto da reação de Steglish). Na última etapa (**etapa f**) o alcóxido em questão realiza um ataque a carbonila da espécie acilante, eliminando o DMAP e formando o éster desejado.

Esquema 5.6 - Mecanismo proposto para a reação de Steglich (DCC/DMAP)

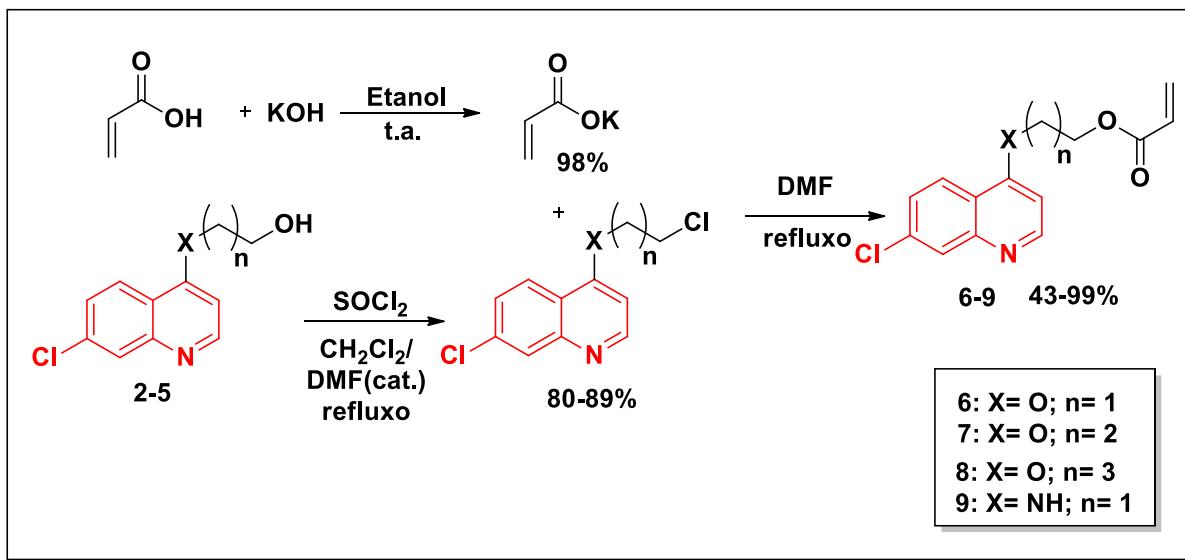


Os rendimentos não satisfatórios do **método 1**, podem ser justificados pela complexidade de isolamento dos acrilatos, visto que essa metodologia necessita de condições anidras e também pela formação do subproduto DHU, que interfere negativamente na purificação dos compostos **6-9**, devido sua difícil separação do meio reacional.

5.2.2 Síntese dos acrilato derivados dos álcoois por meio de reação de substituição

Visando melhorar os rendimentos obtidos no **método 1**, foi testada uma rota diferente para obtenção dos acrilatos **6-9**. No **método 2**, os acrilatos foram obtidos por uma combinação de intermediários (Esquema 5.7).

Esquema 5.7 – Esquema geral para obtenção dos acrilatos via reação de substituição



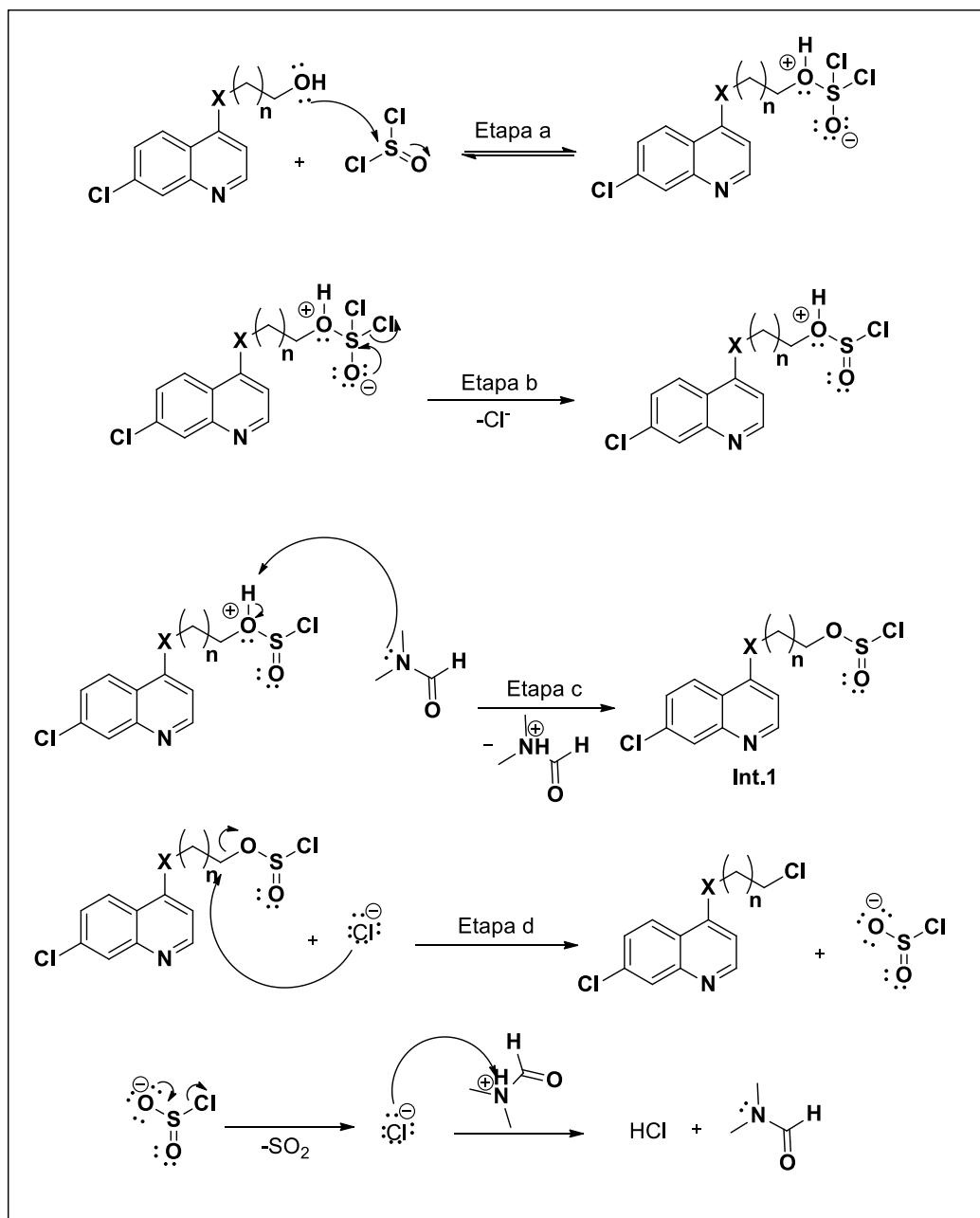
O primeiro passo para formação dos compostos **6-9** foi a produção do sal do ácido acrílico por meio de uma simples reação entre ácido e base. A base escolhida para esta reação foi o hidróxido de potássio, por ser de fácil acesso ao laboratório e custo relativamente baixo. O solvente utilizado foi o etanol, e como agente antipolimerizante para evitar a formação do polímero do acrilato de potássio foi adicionada uma pequena quantidade de hidroquinona; a reação foi realizada a temperatura ambiente sob agitação magnética, com relação estequiométrica de 1:1 entre o ácido e a base. Ao término da reação, o solvente foi evaporado em evaporador rotatório fornecendo o acrilato de potássio com características de sólido branco e rendimento de 98%.

O segundo passo do **método 2** é formar o haleto de alquila desejado, para formação desse intermediário foi utilizado o álcool em questão, o CH_2Cl_2 como

solvente, DMF como catalisador e o cloreto de tionila (SOCl_2) como fonte de íons cloro. A reação foi realizada sob refluxo e após um intervalo de 16 horas foi obtido o haleto de alquila.

A segunda etapa desse método trata-se de uma reação de substituição da hidroxila por um íon cloreto, em carbono primário. Este tipo de reação pode ser explicada via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{SN}2$), uma proposta mecanística para a reação em questão pode ser vista no Esquema 5.8.

Esquema 5.8 – Proposta mecanística para formação do haleto de alquila



No Esquema 5.8 pode-se observar que a **etapa a** trata-se de uma adição do cloreto de tionila ao álcool em questão. Essa adição é possibilitada devido ao nível de eletronegatividade do oxigênio ligado ao enxofre que lhe permite acomodar um par de elétrons ficando assim carregado negativamente. Na **etapa b**, ocorre o reestabelecimento da ligação pi entre o oxigênio e o enxofre, eliminando assim o íon cloreto que se dispõem como um bom grupo abandonador.

Na **etapa c** temos a eliminação de um próton e a formação do intermediário 1 (int. 1). A presença da dimetilformamida (DMF) se faz importante nessa etapa devido a sua característica de substância polar aprótica, o seu uso como catalizador favorece a abstração do próton e solvatação de cátion, deixando livres os ânions presentes no sistema para que possam atuar como nucleófilo na **etapa d**.

Na **etapa d** para formação do intermediário desejado, temos uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN_2), onde o carbono ligado ao oxigênio encontra-se parcialmente positivo e predisposto a um ataque nucleofílico, o íon cloreto atua como nucleófilo nessa etapa, realizando o ataque ao carbono e eliminando de maneira simultânea o cloridrato de enxofre, gerando assim o nosso intermediário reacional.

Como ultima etapa, temos a formação da ligação pi entre o oxigênio e o enxofre, gerando o dióxido de enxofre e eliminando o íon cloreto, que por sua vez abstrai o próton da dimetilamina protonada gerando o ácido clorídrico.

O isolamento dos intermediários foi realizado de maneira simples, bastando uma extração líquido-líquido utilizando diclorometano como fase orgânica e solução saturada de $NaHCO_3$ como fase aquosa, o produto ficou retido na fase orgânica e foi seco com $NaSO_4$ anidro, filtrado e evaporado em evaporador rotatório, sem necessidade do uso de método de purificação, gerando os rendimentos mostrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Rendimentos das reações de formação dos haletos de alquila do **método 2**

Tempo de reação	Intermediários sintetizados	Rendimento
16h		89%
16h		90%
20h		84%
8h		85%

A formação dos cloretos de alquila foi evidenciada por meio da técnica de infravermelho, onde foi possível observar a ausência da banda de hidroxila em torno de 3200 cm^{-1} presente nos álcoois 2-5, indicando que a reação ocorreu.

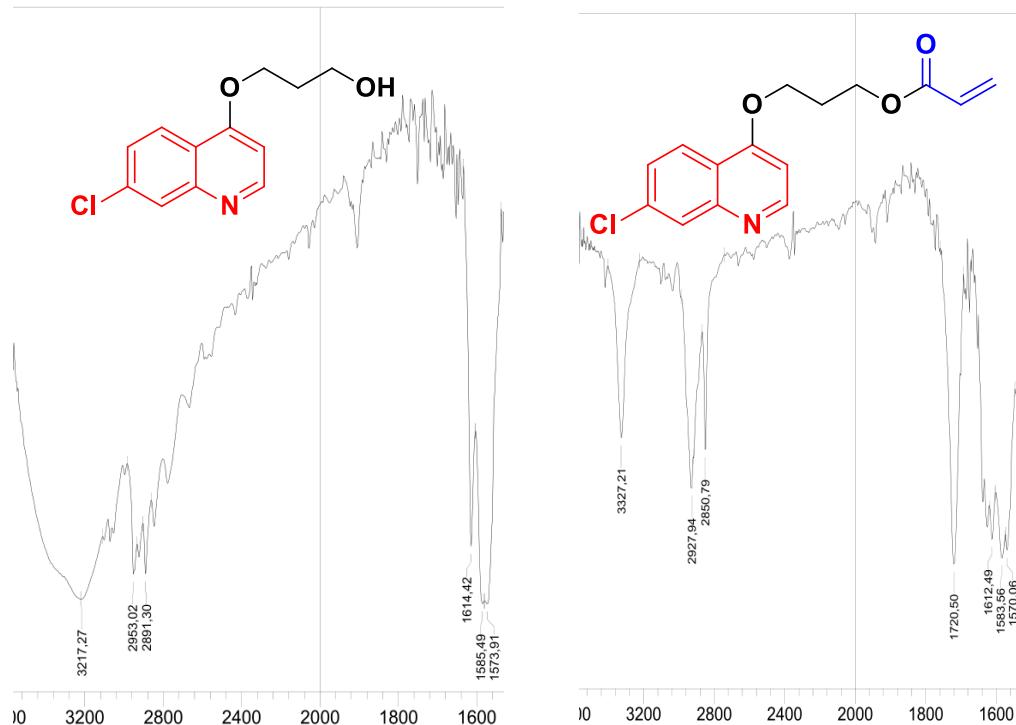
O último passo do **método 2** consiste na formação dos ésteres **6-9**, a síntese desses ésteres segue procedimento similar ao de formação dos seus intermediários, onde por meio de reação de substituição via mecanismo $\text{S}\text{N}2$, em solvente polar aprótico (DMF), e sob aquecimento, são obtidos os compostos **6-9** com os rendimentos descritos na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Rendimentos das reações de formação dos acrilatos via cloreto do álcool

Código	Compostos sintetizados	Rendimento
6		95%
7		99%
8		90%
9		43%

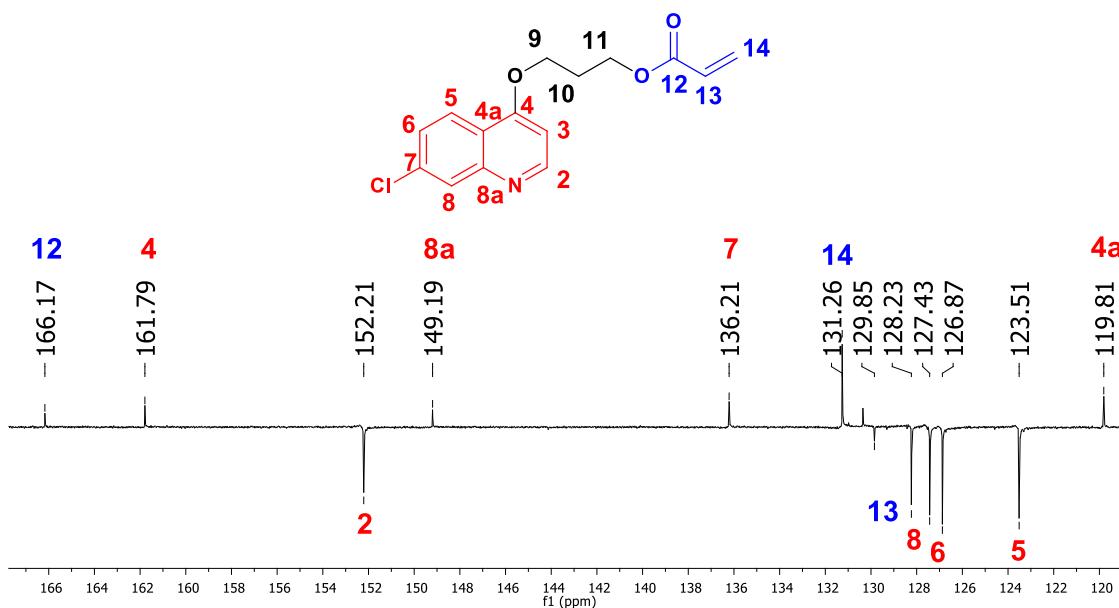
Os ésteres **6-9** formados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométrica. Por meio da análise do espectro de infravermelho das amostras, foi possível observar o desaparecimento da banda de estiramento da ligação O-H em torno de 3200 cm^{-1} e o surgimento da banda de carbonila C=O de éster em torno de 1726 cm^{-1} , evidenciando a formação do produto esperado (Figura 5.3).

Figura 5.3 – Análise das bandas de infravermelho do álcool **3 e do éster **7****



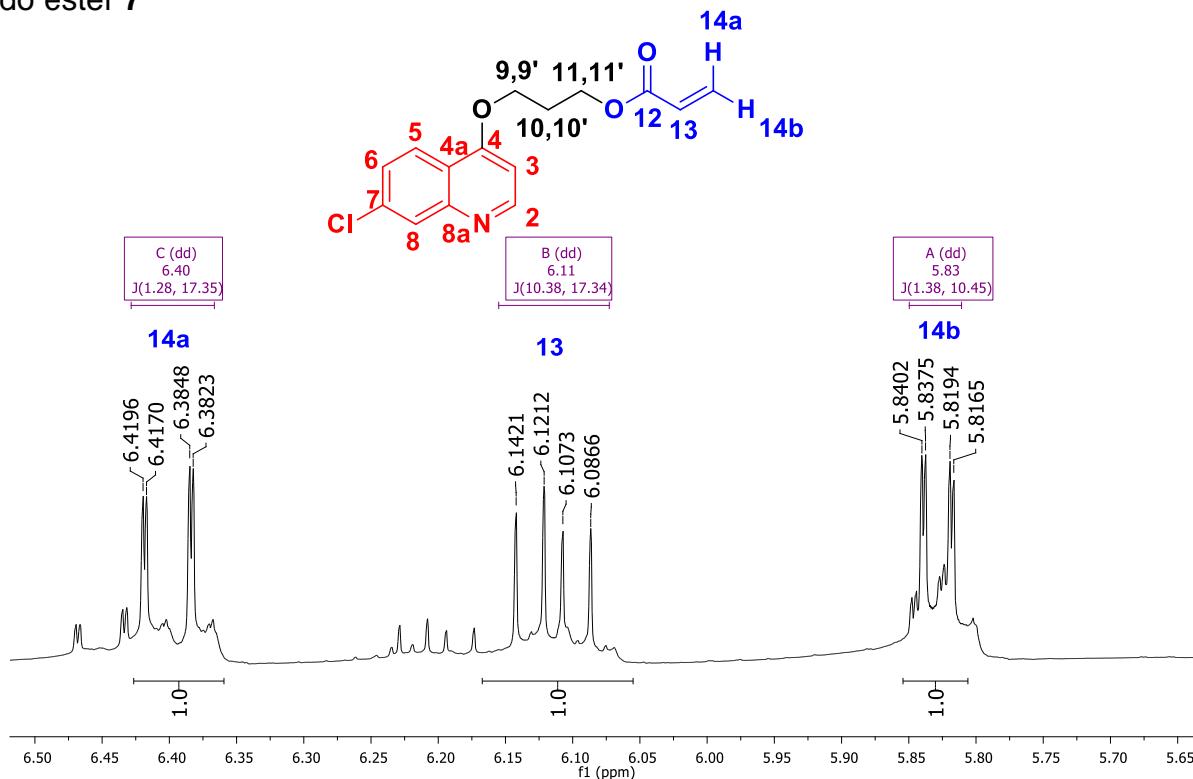
Através dos espectros de ^{13}C foi possível observar a concordância na quantidade de sinais de carbonos dos espectros com os valores esperados para os ésteres, com destaque para os novos deslocamentos ^{12}C , ^{13}C e ^{14}C referentes a adição da porção derivada do cloreto de acila (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Fragmento de RMN ^{13}C do composto **7: Deslocamentos dos carbonos derivados do cloreto de acila**



Avaliando o espectro de ^1H do composto é possível observar a presença de sinais com valor total de integração equivalente a 3H em intervalo de deslocamento 5,7-6,5 ppm com características de três duplo doubletos (dd) referentes aos hidrogênios dos carbonos C13 e C14, e através das suas constantes de acoplamento, foi possível identificar os valores de deslocamento de cada hidrogênio de carbono vinílico, visto que hidrogênios geminais tem constante de acoplamento ^2J variando entre 0 – 3 Hz e que hidrogênios de carbonos vinílicos em acoplamento trans tem maior valor de constante de acoplamento (^3J variando de 11-18 Hz) que em acoplamento cis (^3J variando entre 6 – 15 Hz) (Figura 5.5).

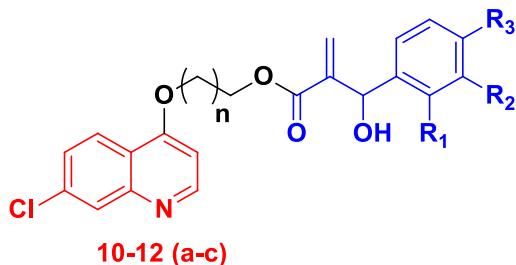
Figura 5.5 – Análise das constantes de acoplamento da ligação alfa-beta insaturada do éster 7



Avaliando o espectro de massas de alta resolução do composto 7, foi possível observar o pico do íon molecular com massa M+1 igual a 292,0726 m/z; e principal fragmentação referente ao pico de base com massa M+1 igual a 113,0588 m/z indicando fragmentação na ligação O-C de éter presente na estrutura. Além dos principais fragmentos também foi possível observar no espectro de massa algumas

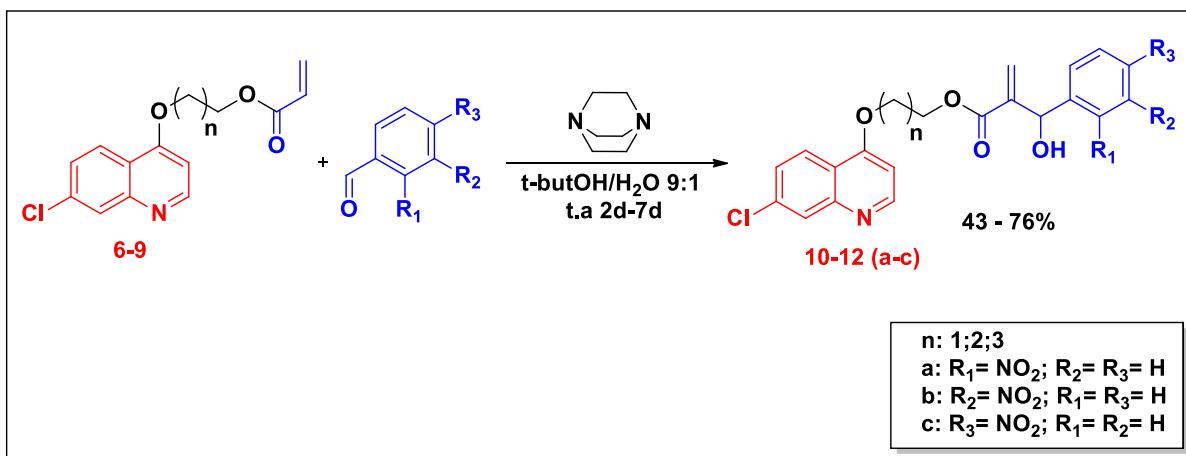
combinações de fragmentos como o de massa 471,0868 m/z indicando possível combinação do radical da estrutura **7** com o fragmento quinolínico, e massa 585,1435 m/z indicando possível combinação de dois radicais da estrutura **7**.

5.3 SÍNTESE DOS ADUTOS 10-12 (a-c)



A síntese dos adutos **10-12** foi realizada utilizando a reação de Morita-Baylis-Hillman, que consistiu na formação de uma ligação carbono- carbono (C-C) entre os compostos **6-9** e um nitrobenzaldeído, na presença de DABCO como amina terciária e uma mistura de t-butanol/água na proporção de 9:1 como solvente. Todos os reagentes foram usados em quantidades equimolares, a reação pode ser vista no Esquema 5.9. Os rendimentos para as sínteses dos adutos obtendo os compostos **10-12 (a-c)** tem seus valores descritos na Tabela 5.5

Esquema 5.9 – Esquema geral das reações de formação dos adutos **10-12 (a-c)**



O acompanhamento das reações foi realizado por CCD, uma boa eluição foi obtida com sistema acetato de etila/ hexano (1:1), sete dias foi o tempo limite estipulado para esta reação, caso não ocorresse completa conversão. Após esse

prazo os produtos foram isolados por extração líquido-líquido utilizando diclorometano como fase orgânica e água destilada como fase aquosa. A fase orgânica foi evaporada, para retirada do solvente e purificada em coluna cromatográfica tipo flash, utilizando como eluente inicialmente diclorometano para retirada do aldeído e logo depois acetato de etila para retirar o produto;.

Tabela 5.5 – Rendimentos das reações de formação dos adutos 10-12 (a-c)

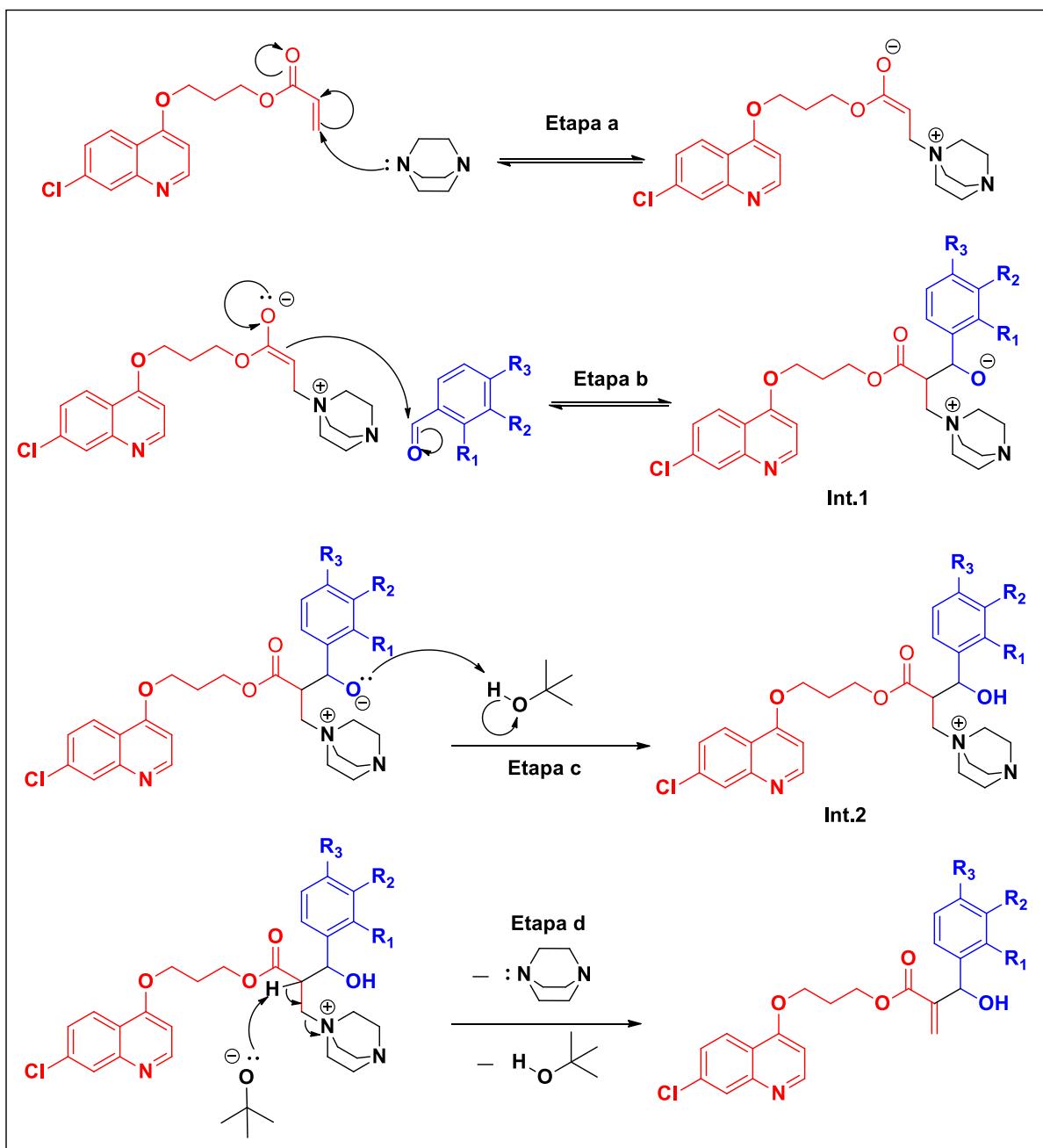
Composto	n	Nitrobenzaldeído	Tempo (d)	Rendimento
10a	n = 1	Orto (o)	2	67%
10b		Meta (m)	1	70%
10c		Para (p)	1	72%
11a	n = 2	Orto (o)	7	43%
11b		Meta (m)	3	51%
11c		Para (p)	5	74%
12a	n = 3	Orto (o)	7	33%
12b		Meta (m)	5	41%
12c		Para (p)	2,5	46%

Avaliando a Tabela 5.5 é possível observar padrões de rendimentos dentro de cada uma das séries onde os produtos **10c**, **11c** e **12c** (produtos substituídos na posição para) apresentaram os melhores rendimentos enquanto os produtos **10a**, **11a** e **12a** apresentaram os rendimentos mais baixos. De acordo com a característica de grupo eletroretirador do grupo nitro, eram esperados os melhores rendimentos para estas posições, entretanto a posição orto apresenta rendimento pouco inferior as demais, esta pequena variação pode estar relacionada ao efeito de campo elétrico e ao próprio impedimento reacional provocado pela proximidade do grupo nitro a carbonila.

Quando comparados os rendimentos entre as séries é possível observar claramente uma redução no rendimento das reações com a ampliação dos espaçadores, esta redução pode estar relacionada com o crescimento do grau de liberdade rotacional do substrato, devido ao acréscimo de ligações sigmas no espaçador.

As reações de formação dos adutos foram realizadas em condições ambientais, sem necessidade de aquecimento, testes foram realizados em micro-ondas entretanto não ocorreu formação de produto no tempo máximo preestabelecido de 2 horas, o que implicou no prevalecimento da metodologia a temperatura ambiente. Uma possível proposta mecanística da formação dos adutos de MBH pode ser vista no Esquema 5.10.

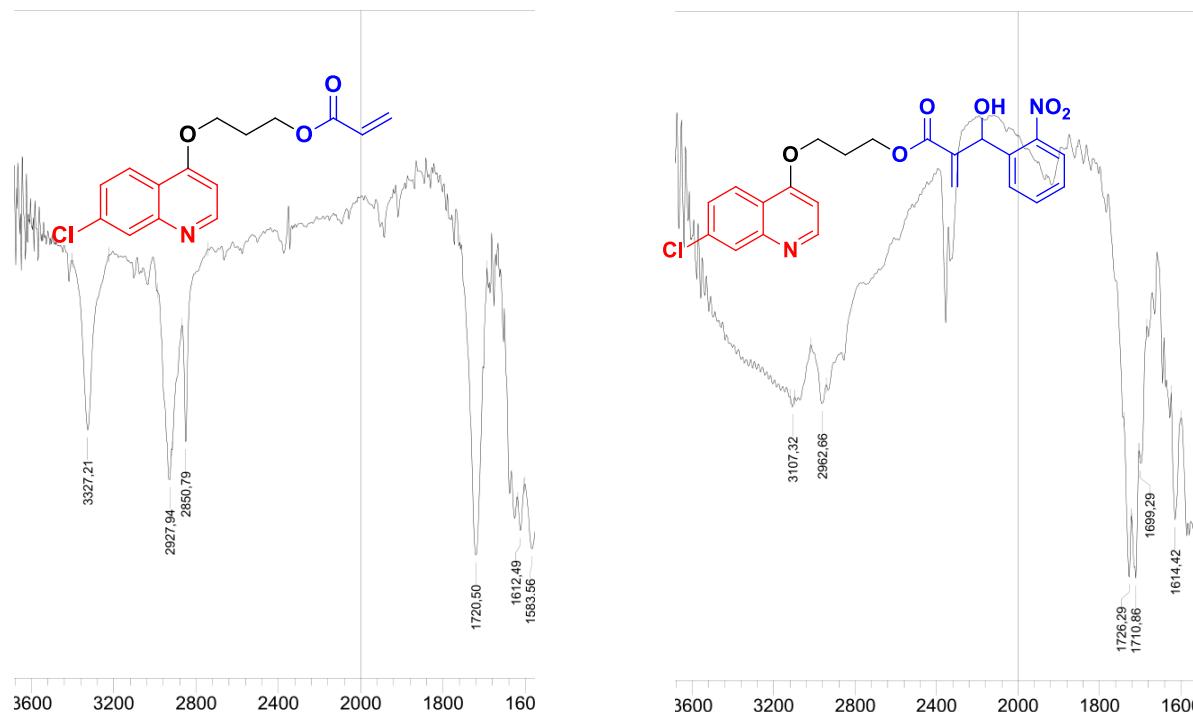
Esquema 5.10 – Proposta mecanística de formação dos adutos de MBH 10-12(a-c)



A proposta mecanística (Esquema 5.10) iniciasse por uma reação de equilíbrio na **etapa a**, onde ocorre uma adição de Michael no carbono beta insaturado, realizada pelo DABCO que atua como nucleófilo, deslocando por ressonância o par de elétrons livres para a posição mais estável. Na **etapa b**, ao reestabelecer a ligação pi da carbonila, a ligação pi existente na posição 2-3 e desfeita e o par de elétrons proveniente da instauração realiza um ataque ao carbono da carbonila do nitrobenzaldeido, formando o intermediário 1 (**int.1**) com um par de elétrons disponível no oxigênio, o **int.1** por sua vez, abstrai um próton do t-butanol (**etapa c**) que tem base conjugada mais estável por tratar-se de um álcool terciário quando comparado com o **int. 1** que é um álcool secundário, gerando então o intermediário 2 (**int.2**). Na **etapa d**, ocorre a reestruturação do solvente por meio da abstração do hidrogênio na posição alfa à carbonila relativamente ácido, reestabelecimento da ligação pi alfa-beta à carbonila e promovendo a eliminação do DABCO para formação do produto desejado.

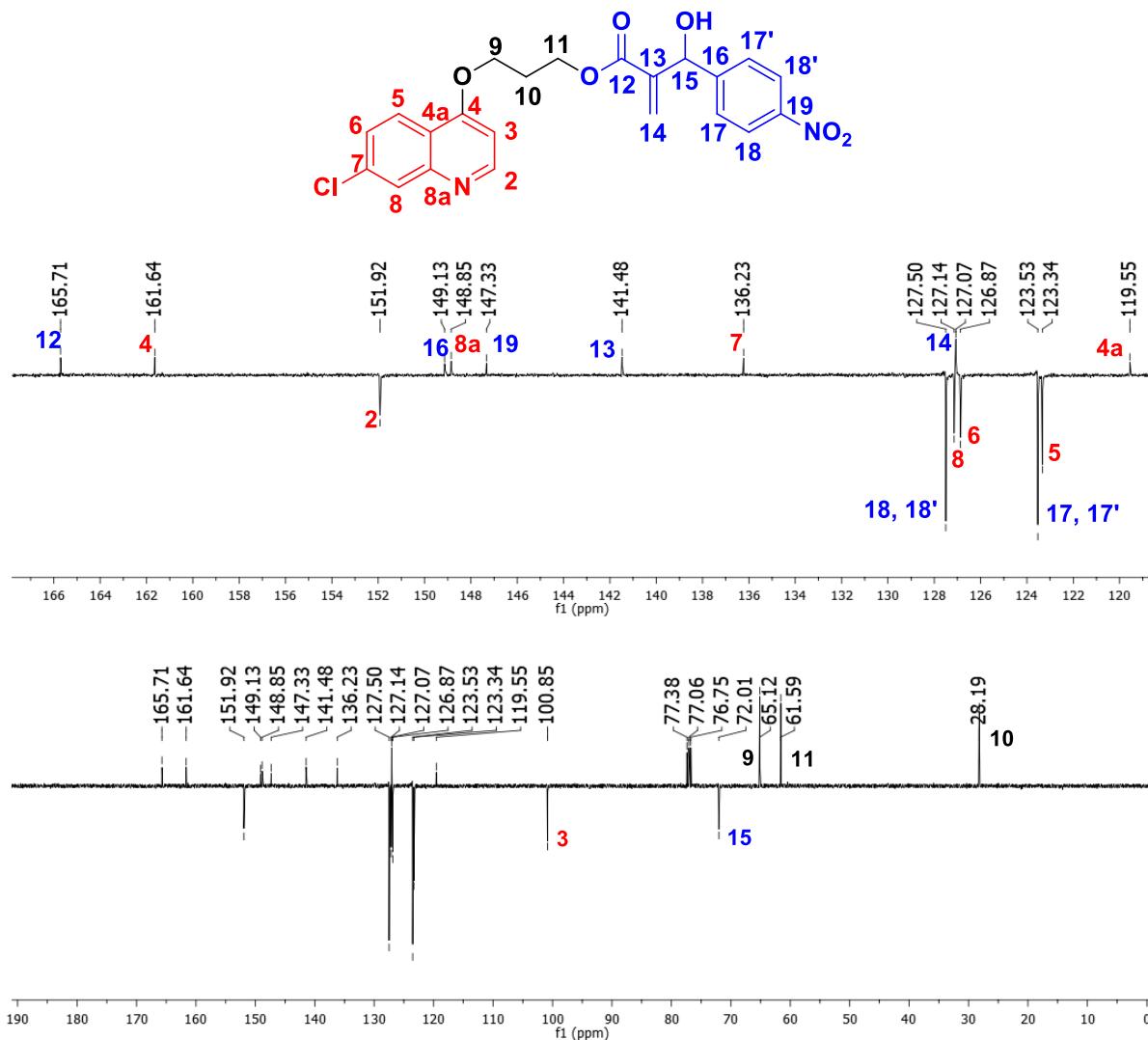
Os adutos **10-12(a-c)** formados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Por meio da análise do espectro de infravermelho das amostras, foi possível observar o surgimento da banda de estiramento da ligação O-H em torno de 3200 cm^{-1} e da permanência da banda de carbonila C=O de éster em torno de 1726 cm^{-1} , indicando a formação do produto esperado (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Comparaçāo dos espectros de infravermelho dos compostos **7** e **11a**



Tomando como exemplo o éster **7** na reação de formação do aduto **11c** tendo em vista que os adutos derivados dos acrilatos tem aldeídos similares, as caracterizações descritas aqui (Figura 5.7) são válidas em sua maioria para os demais adutos sintetizados.

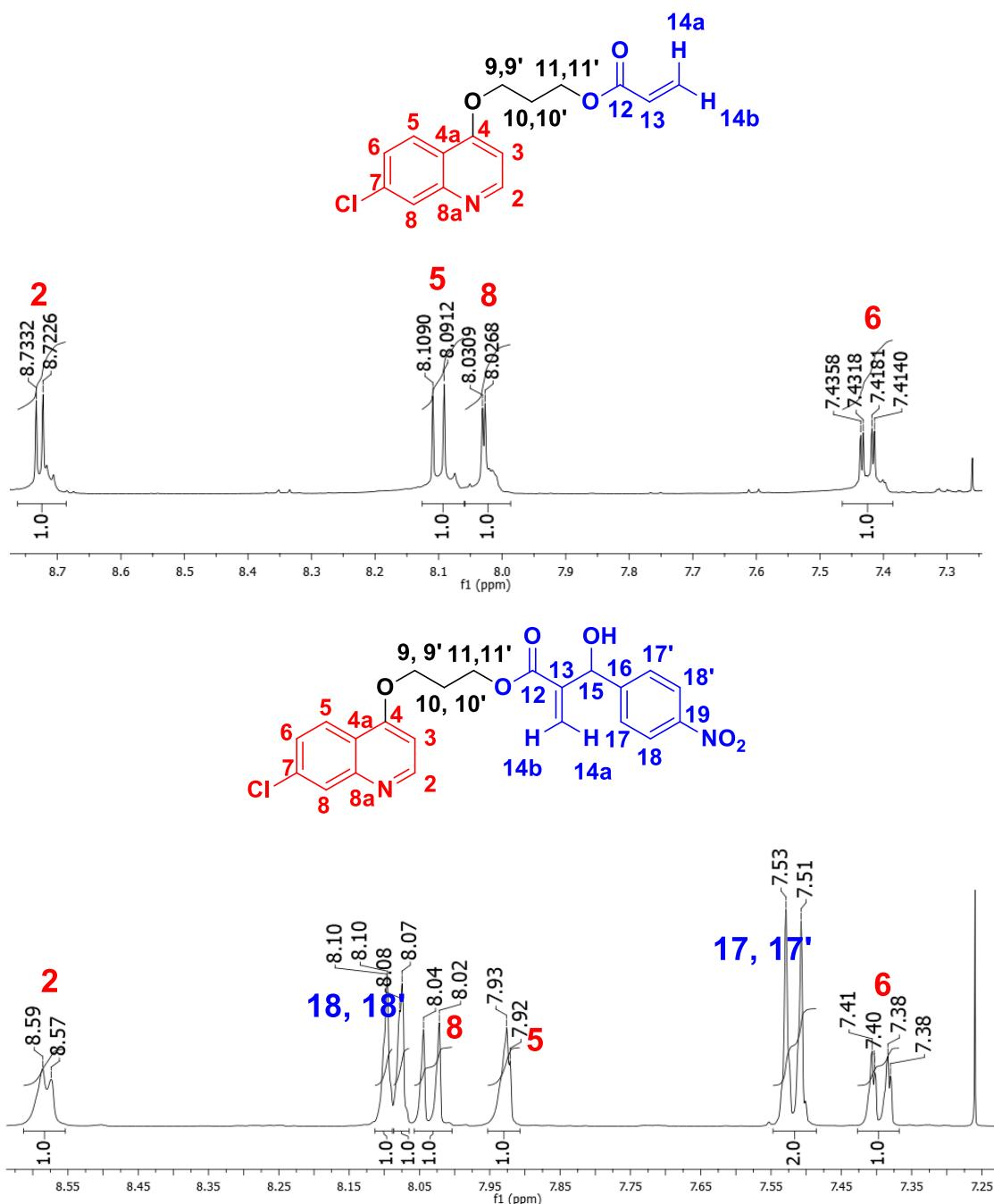
Figura 5.7 – Espectro de RMN ^{13}C para o composto 11c



Através do espectro de ^{13}C foi possível observar a concordância na quantidade de sinais de carbonos do espectro com os valores esperados para o aduto **11c**; apresentando um aumento de 4 sinais de carbono na região de 110 -170 ppm referente aos carbonos do anel aromático, que possuem duas situações de ambientes químicos iguais devido a sua substituição estar localizada na posição para; e um sinal em 72 ppm referente ao carbono carbinólico.

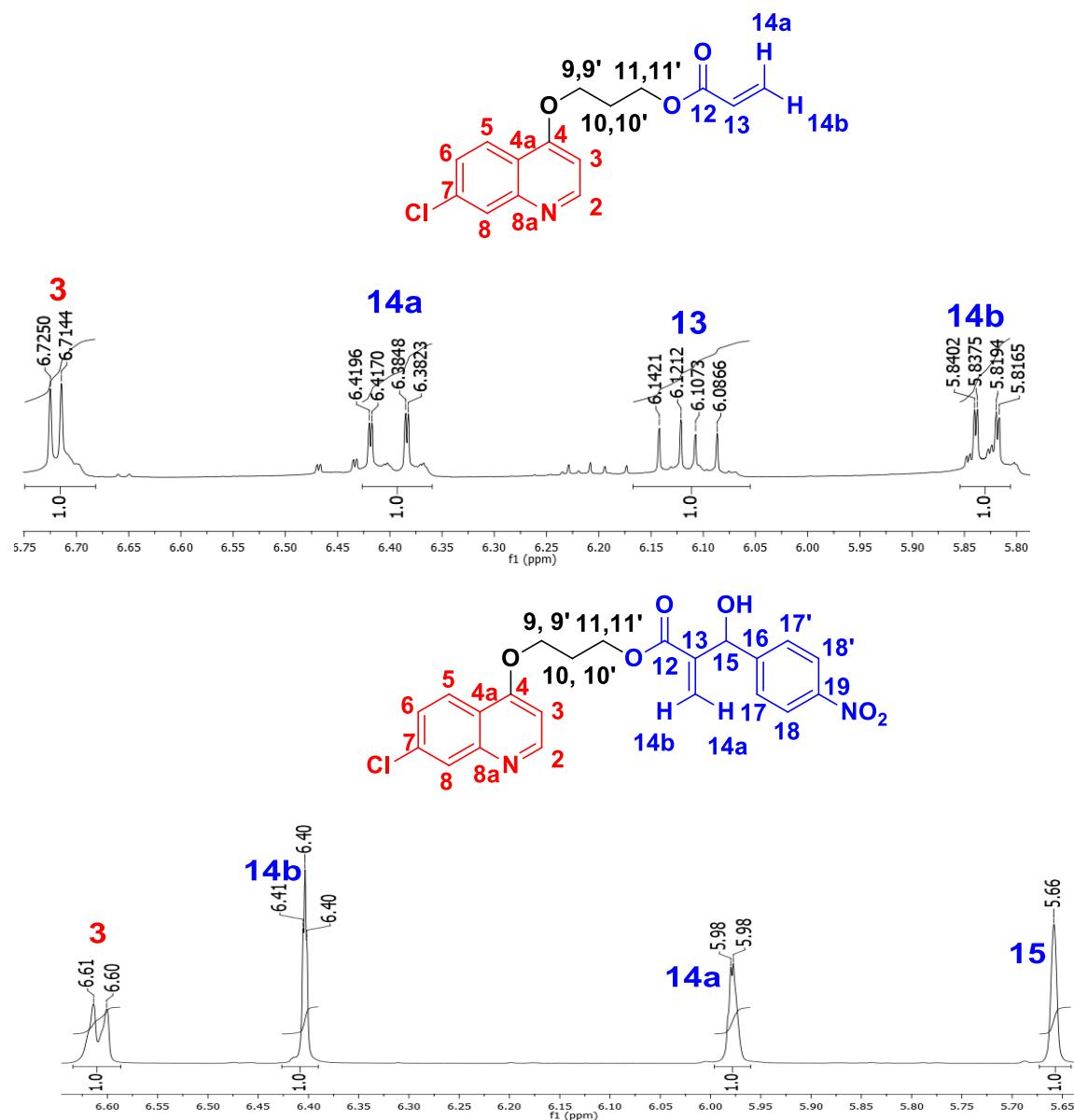
No espectro de RMN ^1H foi possível observar a formação do aduto **11c**, pelo surgimento dos sinais com somatório equivalente a 4H em intervalo de deslocamento químico equivalente a 7,25-8,25 ppm, característicos de hidrogênios pertencentes a anéis aromáticos substituído em posição *para*, indicando a adição do nitrobenzaldeído ao éster em questão (Figura 5.8).

Figura 5.8 – Comparação das expansões dos compostos **7** e **11c** na região de 7,25 a 8,25 ppm



A confirmação da formação do aduto esperado vem pelo redução na multiplicidade e nos valores de integração dos sinais referentes aos hidrogênios do carbono beta carbonílico, que apresentavam-se na forma de três duplo doubletos cada um com integração equivalente a 1H e passam a apresentar-se na forma de dois singletos, cada um com valor de integração equivalente a 1H, e um novo singletos em 5,66 ppm equivalente ao hidrogênio carbinólico, indicando a ocorrência da reação química no carbono da instauração alfa carbonílico (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Comparação das expansões dos compostos **7** e **11c** na região de 5,45 a 6,50 ppm



Avaliando o espectro de massas de alta resolução do composto **11c**, foi possível observar o pico do íon molecular com massa M+1 igual a 443,1011 m/z; e principal fragmentação referente ao pico de base com massa M+1 igual a 264,0854 m/z indicando fragmentação na ligação O-C de éter presente na estrutura.

Todas as características espectroscópicas dos compostos inéditos dessa tese encontram-se no capítulo de dados experimentais (Capítulo 7).

5.4 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGENS DE CÂNCER

5.4.1 *Screening em vitro*

Uma triagem de única concentração das moléculas foi realizada para identificar aquelas com a maior porcentagem de inibição em três tipos de células cancerígenas (ver Tabela 5.6). Após o teste de concentração única, os compostos com uma porcentagem de inibição superior a 75% foram enviados para o teste antiproliferativo *in vitro*.

Tabela 5.6 - Inibição percentual na concentração única de crescimento celular de amostras em três linhas tumorais e seu intervalo de confiança

Entrada	Comp.	NCIH292 (%)	Inibição				
			HCT 116 (%)	Desvio padrão	MCF-7 (%)	Desvio padrão	
1	2	0	0	6,81	0,16	42,00	3,54
2	3	0	0	15,56	0,94	46,17	0,92
3	4	0	0	50,41	5,60	26,00	5,47
4	6	83,70	1,72	80,02	6,30	86,05	6,98
5	7	74,00	5,00	65,27	0,14	48,10	2,74
6	8	0	0	4,97	0,29	26,26	2,58
7	10a	2,60	0,57	27,19	0,77	28,13	3,15
8	10b	77,70	10,90	65,82	2,24	55,40	1,97
9	10c	0	0	54,46	2,40	46,36	7,79
10	11a	89,70	6,60	100,68	2,18	72,04	1,18
11	11b	NT	NT	52,17	0,32	76,35	12,80
12	11c	79,38	5,43	52,41	2,35	43,65	4,21
13	12a	80,30	6,90	95,42	5,63	72,71	5,70
14	12b	83,86	1,16	90,44	8,42	61,09	0,90
15	12c	86,40	0,50	94,33	5,11	73,36	3,91
16	Dox.	86,80	3,30	79,30	1,19	80,30	2,10

Após esse teste preliminar foi possível observar que os álcoois **2**, **3** e **4**, não se mostraram promissores para esse tipo de células cancerígenas, entretanto os derivados de cadeia mais longa contendo grupos nitrobenzaldeído obtiveram resultados melhores à medida que a cadeia do espaçador aumentava, demonstrando uma possível influência do espaçador nas moléculas sintetizadas.

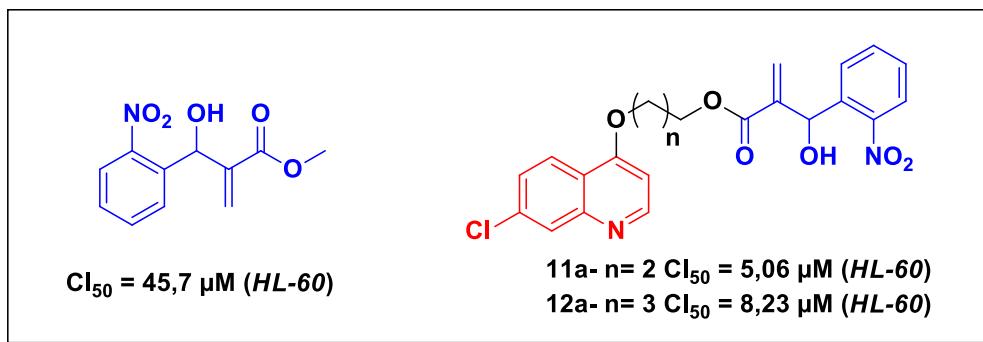
A atividade antiproliferativa dos derivados da 4-cloroquinolina foi avaliada investigando seus efeitos em quatro tipos de linhagens de células cancerígenas, MCF-7 (câncer de mama), HCT-116 (câncer colo-retal), HL-60 (leucemia mielóide crônica) e NCI -H292 (câncer de pulmão). O ensaio colorimétrico de MTT foi utilizado para avaliar a potência dos compostos (MOSMANN, 1983). Os resultados estão resumidos na Tabela 5.7, onde a doxorrubicina (Dox.) Foi usada como controle positivo.

Tabela 5.7 - Efeito citotóxico em linhas celulares tumorais. Concentração inibitória a 50% (CI₅₀) e intervalo de confiança (IC) das amostras em quatro linhagens tumorais em µg / mL.

Entrada	Comp.	MCF-7 CI ₅₀ (intervalo de confiança) µM	HCT-116 CI ₅₀ (intervalo de confiança) µM	NCIH292 CI ₅₀ (intervalo de confiança) µM	HL60 CI ₅₀ (intervalo de confiança) µM
1	6	30,97(22,69-42,49)	20,53(13,32- 30,97)	47,53(38,17-59,06)	14,76(11,88- 18,37)
2	7	NT	35,65(23,99- 53,13)	54,50(31,88- 92,55)	36,85(22,18- 61,26)
3	10b	37,52(29,52-47,71)	NT	25,42(22,15-28,68)	12,36(6,76- 22,85)
4	11a	36,04(23,48- 54,19)	17,82(10,16-31,16)	13,32(11,52-15,36)	5,06(3,88- 6,59)
5	11b	41,14(35,32- 47,96)	NT	NT	20,77(15,58- 27,66)
6	11c	33,17(26,92-40,89)	NT	16,26(12,42-21,68)	19,15(10,75- 34,12)
7	12a	4,60 (3,50-6,13)	10,94(4,38-26,70)	10,72(7,44- 15,32)	8,23(5,84- 11,60)
8	12b	24,30(15,32-38,52)	15,98(10,07-25,61)	20,14(15,32-26,27)	8,86(5,91- 13,31)
9	12c	29,07(5,91- 140,08)	7,22(5,69- 9,19)	19,70(15,98-26,05)	10,59(8,05- 13,92)
10	Dox.	0,3(0,21-0,43)	1,2(0,6- 2,2)	0,2(0,1-0,5)	0,02(0,018-0,03)

Os testes de CI₅₀ mostraram que o grupo nitro na posição orto apresenta forte influência na atividade das moléculas sintetizadas, o que já era esperado frente a outros resultados apresentados na literatura (LIMA-JUNIOR; VASCONCELLOS, 2012). Quando comparados os resultados atuais em HL60 para AMBH contendo o grupo *ortho* nitro benzaldeído com resultados anteriores relatados pelo nosso grupo de pesquisa (CLAUDIO G. LIMA-JUNIOR, GLÁUCIA V. FAHEINA-MARTINS, CAIO C. B. BOMFIM, BRUNA B. DANTAS, EVERTON P. SILVA, DEMETRIUS A. M. DE ARAÚJO, EDILSON B. A. FILHO, 2016), foi possível observar melhores índices de concentração inibitória para os compostos **11a** e **12a** indicando que a presença do grupo 7-cloroquinolina juntamente com o espaçador corroborou significativamente para o aperfeiçoamento da atividade biológica já existente do aduto de acrilato de metila com *ortho* nitro benzaldeído (Figura 5.10); além de ser possível observar um ganho na atividade quando o espaçador variou de dois para quatro carbonos indicando uma influência positiva do aumento do espaçador nas atividades biológicas dos compostos sintetizados.

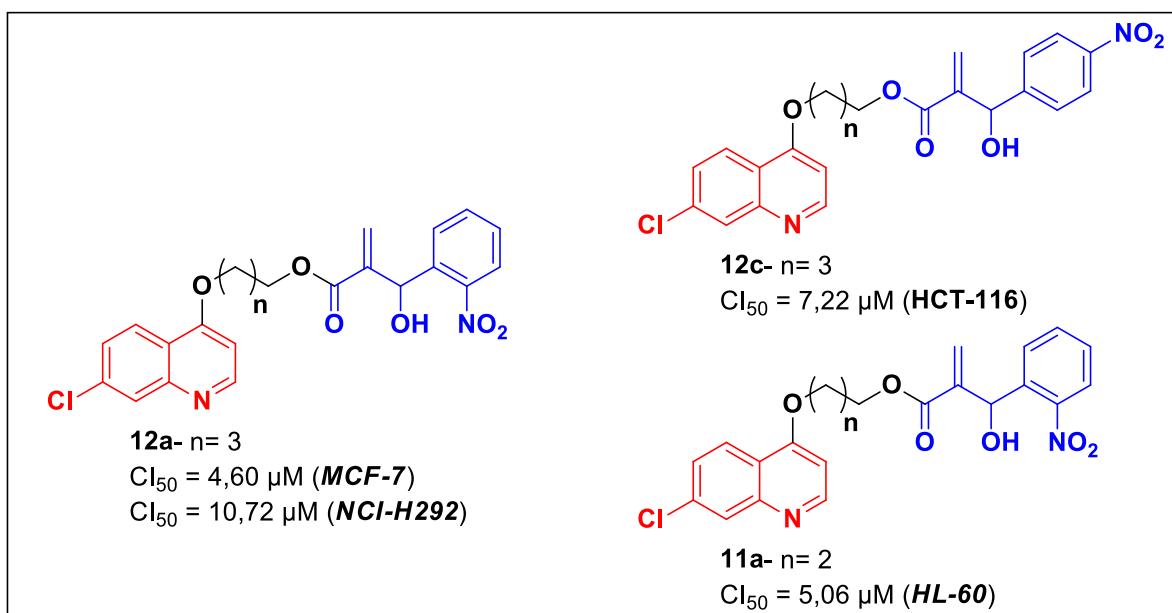
Figura 5.10 – Comparaçāo da Cl_{50} entre os AMBH sintetizados neste trabalho com adutos sintetizados anteriormente.



Ao comparar os compostos com diferentes tamanhos de espaçadores, foi possível observar que o composto **12b** com espaçador de quatro carbonos obteve melhores resultados quando comparado ao composto **10b** com espaçador de dois carbonos, uma possibilidade para estes efeitos pode estar relacionada com a maior liberdade conformacional existente na estrutura **12b**.

Os testes de concentração inibitória (Cl_{50}) mostraram que o composto **12a** apresentou melhores resultados para linhagens de MCF-7 e NCI-H292; já para as linhagens de HTC-116, o melhor resultado foi do composto **12c** e por fim para células de HL-60 a melhor inibição foi do composto **11a** (Figura 5.11).

Figura 5.11 – Melhores resultados nos testes de citotoxicidade em células cancerígenas



Após os testes em células cancerígenas as estruturas com melhores valores de IC_{50} tiveram sua seletividade avaliada em células sadias, visto que um dos maiores obstáculos do tratamento quimioterápico está relacionado com o ataque do medicamento a estas células, gerando complicações no tratamento. Os testes podem ser vistos na **Tabela 5.8**, onde a maioria das estruturas apresentou resultado satisfatório, mostrando um bom índice de seletividade. Sendo o composto **12a** o que apresenta um melhor índice de seletividade, reforçando seu potencial antiproliferativo.

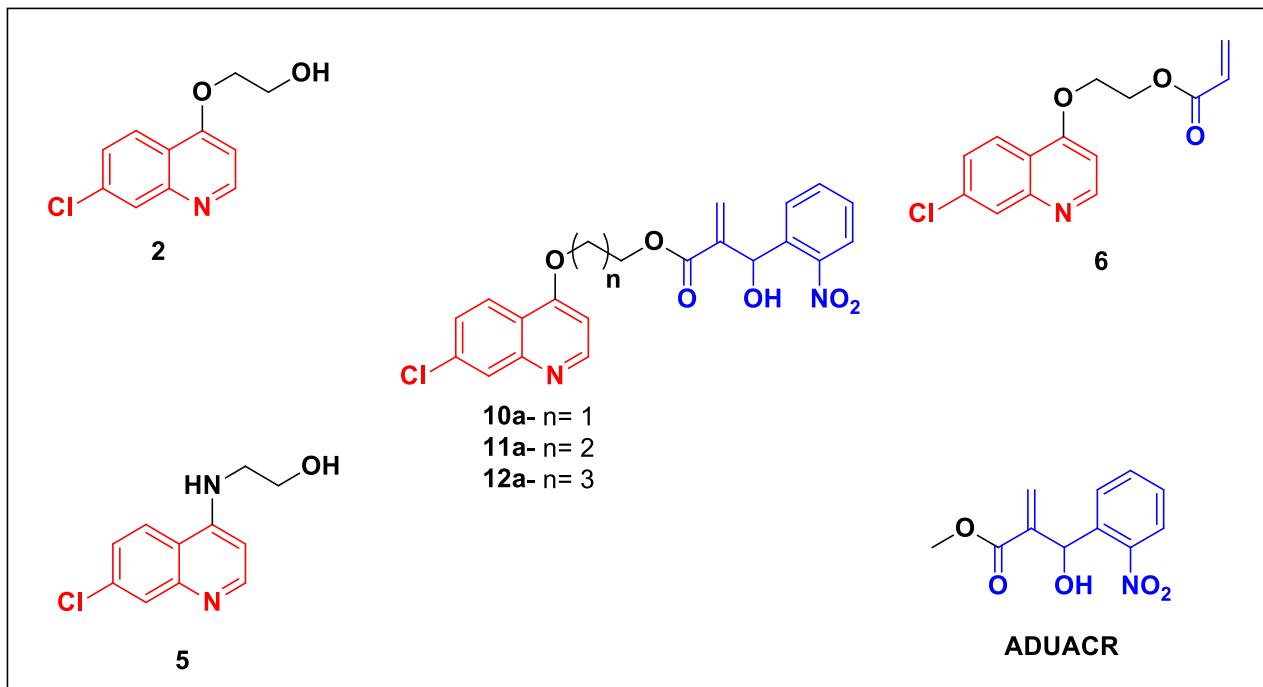
Tabela 5.8 - Atividade citotóxica de compostos mais ativos contra células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC)

Entrada	Comp.	IC_{50} μM PBMC	IS MCF-7	IS HCT-116	IS NCI-H292	IS HL-60
1	6	>90,02	2,91	4,38	1,89	6,10
2	11a	40,89(23,52) -71,03)	1,13	2,29	3,07	8,08
3	11c	>56,45	1,70	-	3,47	2,95
4	12a	>54,71	11,89	5,00	5,10	6,65
5	12b	>54,71	2,25	3,42	2,72	6,17
6	12c	>54,71	1,88	7,58	2,78	5,17

5.5 TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM *Leishmania amazonensis*

Os testes de atividade antileishmania foram realizados em cepa PH8 de *L. amazonensis*, por meio do teste por contagem direta *in vitro*. As moléculas testadas foram escolhidas de modo a maximizar as relações entre os grupos presentes nos compostos sintetizados e sua influência na atividade biológica (Figura 5.12).

Figura 5.12 – Estruturas analisadas nos testes em *Leishmania amazonensis*



Os resultados obtidos pelo teste de contagem direta realizados em duplicata com período de incubação de 72 horas, mostraram que todas as estruturas testadas apresentaram respostas inibitória significativa para as menores concentrações testadas (25 µg/mL). Para avaliar a seletividade dos compostos, foram realizados experimentos em sangue humano e então calculado o índice de seletividade para as estruturas testadas. Os resultados de IC_{50} , CH_{50} e IS podem ser vistos na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 – Resultados gerais para atividade antileishmanica nos ensaios de quantificação direta em câmara de Neubauer.

Entrada	Comp.	IC_{50} µM (72h)	CH_{50} µM	IS (CH_{50}/IC_{50})
1	2	67,27	>800	11,89
2	5	36,65	>800	21,83
3	6	12,97	>800	61,68
4	10a	29,07	>800	27,52
5	11a	22,12	>800	36,17
6	12a	35,69	>800	22,42
7	ADUACR	30,86	>800	25,92

A partir dos resultados contidos na Tabela é possível fazer algumas observações relacionadas as estruturas e a influência das mesmas na atividade antileishmania, os melhores resultados em concentração inibitória e em índice de seletividade foram obtidos com a estrutura **6**. Quando comparadas as atividades dos álcoois **2** e **5**, que tem estruturas com o mesmo tamanho de espaçador, e variação apenas no heteroátomo, é possível observar que no intervalo de 72 horas o composto **5** mostrou-se mais ativo, levando a acreditar que a presença da amina potencializa a atividade da estrutura. Quando comparadas as estruturas **2**, **ADUACR** e **10a**, é possível observar uma leve vantagem da estrutura hibridizada **10a** com resultados pouco melhores de IC_{50} mas sem apresentar uma diferença significativa quando comparada com o **ADUACR**, e por fim cabe ressaltar uma comparação entre as estruturas **10a**, **11a** e **12a** visto que a única diferença entre elas era o tamanho do espaçador, relacionando as três estruturas, observasse que a melhor atividade é do composto **11a** fornecendo indícios que o aumento excessivo do grau de liberdade na estrutura pode provocar uma redução na sua eficiência.

Capítulo 6:

Conclusões e

perspectivas futuras

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base nos objetivos propostos nesse trabalho, pode-se concluir que:

- Os álcoois derivados da 4,7-dicloroquinolina (**2-5**) e os acrilatos (**6-9**) foram preparados com ótimos rendimentos variando de 94-98% para os álcoois e de álcoois e de 33-99% para os acrilatos, sendo estes caracterizados por espectrometria e espectroscopia gerando um total de 2 acrilatos inéditos na literatura.
- Os híbridos (**10a-10c; 11a-11c e 12a-12c**) entre derivados de 7-cloroquinolina e adutos de Morita-Baylis-Hillman foram obtidos e devidamente caracterizados por espectrometria e espectroscopia, além de bioavaliados em células cancerígenas e em cepas de *L. amazonensis* mostrando resultados satisfatórios variando entre 33% e 74%, com um total de seis AMBH inéditos .
- Através dos resultados dos testes de citotoxicidade foi possível observar a influência positiva do grupo 7-cloroquinolina quando comparadas as estruturas com e sem esta porção; também foi possível avaliar a influência dos espaçadores, indicando que o aumento no grau de liberdade conformacional provoca de maneira geral uma diminuição dos valores de IC_{50} para os testes realizados nas linhagens de células cancerígenas com destaque para a estrutura **12a** que apresentou um melhor índice de seletividade para a maioria das células cancerígenas testadas.
- Os resultados em cepas de *leishmania amazonensis* mostraram que entre os híbridos moleculares pode ocorrer uma inversão da eficiência a medida que ocorre o aumento do grau de liberdade na estrutura, além de mostrar melhores resultados para o composto **6** contendo o grupo amina. Indicando que a presença desse grupo de influenciar de maneira benéfica na atividade biológica.

Como perspectivas futuras esse trabalho visa:

- A busca por rotas alternativas para a síntese das estruturas 13a-c que não foram obtidas pelas rotas propostas nesse trabalho.

- A substituição do grupo nitrobenzaldeído na síntese de novas estruturas híbridas, a partir de derivados da 7-cloroquinolina e de derivados da isatina, por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman, visto que núcleos isatínicos também apresentam grande variedade de aplicações farmacológicas, com o intuito de potencializar essas atividades (KHAN; MAALIK, 2015).

Capítulo 7:

Parte

Experimental

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich e Acros, e os solventes orgânicos foram obtidos nas empresas Tedia, Vetec e Química Moderna. Todos os reagentes e solventes presentes neste trabalho apresentavam alto grau de pureza o que possibilitou utilizá-los sem prévia purificação.

Quando necessário o uso de solventes secos (livres da humidade do ar) realizou-se um procedimento de secagem com hidreto de cálcio ou peneira molecular de 3 Å, sob atmosfera de argônio.

As reações foram acompanhadas através da técnica de cromatografia por camada delgada analítica (CCDA), onde foi utilizado cromatofolhas de alumínio da marca Macherey-Nagel, suportadas em Gel de Sílica 60 (fase estacionária), como eluente (fase móvel) foram usadas misturas de diferentes proporções dos solventes: acetato de etila e hexano; acetato de etila e metanol, sendo irradiadas em câmara de luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm e/ou analisadas no revelador químico de vanilina e/ou em vapores de iodo. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e temperatura controlada em rotaevaporador do fabricante IKA®, modelo RV 10 digital.

A purificação dos produtos obtidos após as reações foi realizada através da técnica de cromatografia em coluna do tipo flash, usando gel de sílica como fase estacionária de granulação 0,040 – 0,0063 mm da marca ACROS e mistura de acetato de etila / hexano ou acetato de etila / diclorometano com proporções variáveis, como fase móvel, com o auxílio de pressurizadores adaptados a partir de nebulizadores convencionais.

Todos os produtos inéditos deste trabalho foram caracterizados no próprio Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) /Campus 1 por espectrofotômetro FTIR modelo IRPrestige-21, do fabricante Shimadzu, usando pastilhas de brometo de potássio (KBr) e no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA) da UFPB/Campus 1, pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de carbono

e de hidrogênio (RMN ^{13}C , RMN ^1H). A descrição dos deslocamentos químicos foi realizada em relação aos sinais de referência dos solventes utilizados: Clorofórmio deuterado (CDCl_3) e Dimetilsulfóxido deuterado (DMSO).

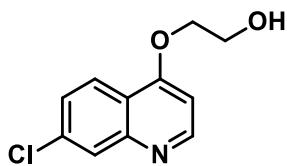
Os desdobramentos químicos referentes a cada acoplamento dos hidrogênios foram expressos como: singuleto (s), doubleto (d), tripleto (t), quinteto (quin.), duplo doubleto (dd) e multipleto (m). Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais dos carbonos foram observados pelo uso da técnica de Attached Proton Test (APT), onde os carbonos não hidrogenados e metilenos ficam na fase positiva do gráfico “para cima” e os carbonos do tipo metino e metila ficam na fase negativa do gráfico “para baixo”.

7.2 PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO 2-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)ETANOL (2)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL equipado com uma barra de agitação magnética contendo 4,7-dicloroquinolina (1) (5,10 g; 25,75 mmol; 1 equiv.) e etilenoglicol (60 mL; 1077,29 mmol; 41,8 equiv.) foi adicionado *t*-butóxido potássio (4,34 g; 38,63 mmol; 1,5 equiv.), a reação foi colocada sob agitação constante em um sistema de refluxo, a uma temperatura de 80 ° C em banho de óleo, por um intervalo de tempo de 16 horas. A confirmação da conversão dos reagentes no produto foi realizada por CCD, usando como fase móvel acetato de etila puro, e revelação em câmara de ultravioleta ($\text{Rf1}= 0,72$ e $\text{Rf2}= 0,24$).

Após confirmação da total conversão, o meio reacional foi transferido para um funil de separação, seguido da adição de 60 mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio, e realizada uma extração líquido-líquido, utilizando diclorometano (3x70 mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório para a obtenção de 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etanol (2), um sólido branco com rendimento de 94%.

2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etanol (2)



IV (cm⁻¹): 3064(O-H)

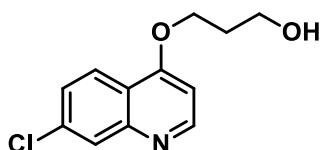
Ponto de fusão: 119-121

7.3 PROCEDIMENTO GERAL PARA SÍNTESE DO 3-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)PROPAN-1-OL (3) E 4-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)OXI)BUTAN-1-OL (4)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL equipado com uma barra de agitação magnética contendo 4,7-dicloroquinolina (1) (3,0 mmol; 1 equiv.) e o respectivo diol (36 mmol; 12 equiv.) foi adicionado *t*-butanol (15 mL) e *t*-butóxido potássio (0,505 g; 4,5 mmol; 1,5 equiv.), a reação foi colocada sob agitação constante em um sistema de refluxo, a uma temperatura de 80 ° C em banho de óleo, por um intervalo de tempo de 16 horas. A confirmação da conversão dos reagentes no produto foi realizada por CCD, usando como fase móvel acetato de etila puro, e revelação em câmara de ultravioleta (Rf1= 0,72; Rf3= 0,24 ; Rf4= 0,28).

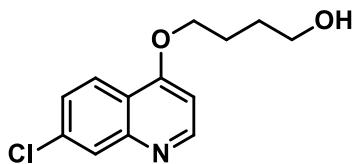
Após confirmação da total conversão, o meio reacional foi transferido para um funil de separação, seguida da adição de 20 mL de uma solução saturada de bicarbonato de sódio, e realizada uma extração líquido-líquido, utilizando diclorometano (3x20 mL). A fase orgânica foi então seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e o solvente evaporado em evaporador rotatório, os produtos foram recristalizados em diclorometano, ambos com 97% de rendimento e aspecto de sólido branco.

3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propan-1-ol (3)



IV (cm⁻¹): 3217 (O-H)

4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butan-1-ol (4)



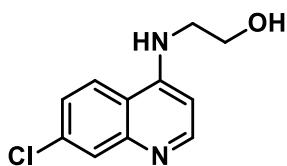
IV (cm⁻¹): 3223 (O-H)

7.4 PROCEDIMENTO PARA SÍNTESE DO 2-((7-CLOROQUINOLIN-4-IL)AMINO)ETANOL (5)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL equipado com uma barra de agitação magnética contendo 4,7-dicloroquinolina (1) (19,8g; 10,0 mmol; 1 equiv.) foi adicionada etanolamina (10,1 g; 10 mL; 16 equiv.), a reação foi colocada sob agitação constante, a uma temperatura de 120º C em banho de óleo, por um intervalo de tempo de 4 horas. A confirmação da conversão dos reagentes no produto foi realizada por CCD, usando como fase móvel uma mistura acetato de etila / metanol, na proporção de (9:1), e revelação em câmara de ultravioleta ($R_f 1 = 0,74$, $R_f 5 = 0,10$).

Após confirmação da total conversão, o meio reacional foi vertido em um funil de Büchner previamente preparado com papel de filtro para filtração a vácuo, a mistura foi então lavada com água (250 mL), seca e dissolvida em acetato de etila a quente (100mL), evaporada em evaporador rotatório, para a obtenção de 2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etanol (5), um sólido branco com rendimento de 98%.

2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etanol (5)



IV (cm⁻¹): 3311 (N-H); 3111 (O-H)

Ponto de fusão: 215-217 (lit. 215-216) (GUANTAI et al., 2011)

7.5 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS ACRILATOS 6, 7, 8, 9

7.5.1 Empregando o método de esterificação de Steglich (DCC/DMAP)

Em um balão de 50 mL foi colocado 10 mL de diclorometano, o respectivo álcool 2-5 (2 mmol; 1 equiv.), o DMAP (48,9 mg; 0,4 mmol; 0,2 equiv.) e o ácido acrílico (0,17 mL; 2,4 mmol; 1,2 equiv.). A mistura reacional foi colocada sob agitação a uma temperatura de 0°C (banho de gelo), em seguida foi adicionado o DCC (619 mg; 3 mmol; 1,5 equiv.), foi mantida a temperatura de 0°C por 30 minutos, quando retirado o banho de gelo a mistura reacional foi deixada a temperatura ambiente por 48 horas, e acompanhada por CCD.

Para o isolamento, foi adicionada uma solução de bicarbonato de sódio e realizada uma extração líquido-líquido utilizando diclorometano (3x30 mL), seguida por secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório. A purificação foi realizada pela técnica de cromatografia em coluna, com fase móvel composta por hexano e acetato de etila ou acetato de etila e metanol. Os acrilatos **6**, **7** e **8** foram obtidos com rendimentos de 70%; 60% e 22% respectivamente, enquanto que o acrilato **9**, foi obtido com rendimento de 33%.

7.5.2 Empregando rota alternativa com cloreto de tionila e acrilato de potássio

Essa rota é dividida em três partes: Substituição da hidroxila do álcool em questão por um halogênio; formação do sal do acrilato e a reação final entre as duas substâncias obtidas.

Para formação do derivado da 7-cloroquinolina com espaçador clorado, inicialmente foram adicionados 1,00 mmol do álcool a um balão de 50 mL, seguida da adição de 10,00 mL de CH_2Cl_2 a mistura foi colocada sobre agitação e feita a adição de cloreto de tionila (SOCl_2) na proporção de 5 equivalentes. A reação então foi colocada sobre aquecimento em sistema de refluxo por um período médio de 16 horas. A total conversão do substrato em produto foi observada por CCD.

O processo de extração foi feito utilizando um sistema CH_2Cl_2 (3x30 mL)/ Solução saturada de NaHCO_3 , seguida por secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtração e evaporação do solvente em evaporador rotatório com

rendimento médio de 85% . O produto obtido foi utilizado sem prévia purificação na próxima etapa.

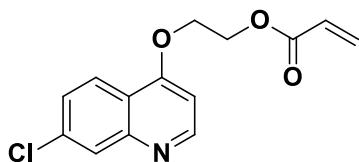
Paralelamente foi realizada a reação ácido/base do ácido acrílico e hidróxido de potássio em proporções equivalentes, utilizando etanol anidro como solvente sobre agitação magnética, por 5 horas. Em seguida feita a evaporação do solvente e da água residual em evaporador rotatório com rendimento próximo a 99%.

A última etapa da rota foi realizada utilizando o derivado da 7-cloroquinolina com espaçador clorado (1mmol) e o acrilato de potássio (1mmol) foram adicionados em um balão de 50mL contendo 5 mL de dimetilformamida (DMF) e o sistema foi colocado sobre refluxo e acompanhada por CCD, a total conversão ocorreu em um tempo médio de 15 horas.

A reação foi evaporada para retirada do solvente DMF e realizada extração utilizando um sistema CH_2Cl_2 (3x30 mL)/ H_2O a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e levada ao evaporador rotatório para retirada do solvente, resultando em um rendimento médio de 95% . O produto mostrou-se puro, sem necessidade de realizar uma etapa de purificação.

Os acrilatos **6**, **7** e **8** foram obtidos com rendimentos similares variando entre 90% e 99%, enquanto que o acrilato **9**, foi obtido com rendimento de 35%.

Acrilato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etila (6)



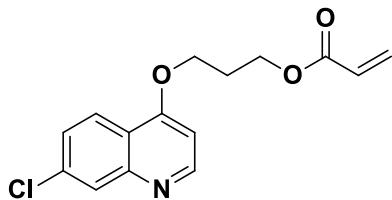
IV (cm⁻¹): 1726 (C=O); 1188 (C-O)

RMN ¹³C (50 Mhz, DMSO): δ 165,50; 160,46; 153,05; 149,17; 134,50; 132,13; 128,07; 127,31; 126,37; 123,67; 119,25; 102,22; 66,90; 62,24; 40,77; 40,36; 39,94; 39,52; 39,10; 38,69; 38,27.

RMN ¹H (200 Mhz, DMSO): δ 8,68 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,01 (d, J = 8,9 Hz, 1H), 7,90 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,49 (dd, J = 8,9, 2,1 Hz, 1H), 7,01 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,41 – 6,04 (m, 2H), 5,89 (dd, J = 9,8, 2,1 Hz, 1H), 4,56 (dd, J = 5,5, 2,7 Hz, 2H), 4,45 (dd, J = 5,5, 2,8 Hz, 2H).

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_3$: 277.05; encontrada: 277

Acrilato de 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propila (7)



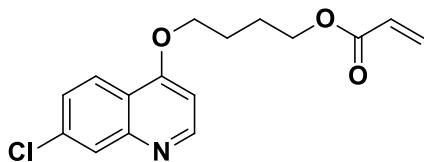
IV (cm⁻¹): 1720 (C=O); 1201 (C-O)

RMN ¹³C (126 Mhz, CDCl₃): δ 166,17; 161,79; 152,21; 149,19; 136,21; 131,26; 129,85; 128,23; 127,43; 126,87; 123,51; 119,81; 101,04; 77,41; 77,16; 76,91; 65,42; 61,14; 28,46.

RMN ¹H (500 Mhz, CDCl₃): δ 8,73 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,42 (dd, *J* = 8,9, 2,0 Hz, 1H), 6,72 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 6,40 (dd, *J* = 17,4, 1,3 Hz, 1H), 6,11 (dd, *J* = 17,3, 10,4 Hz, 1H), 5,83 (dd, *J* = 10,5, 1,4 Hz, 1H), 4,43 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 4,29 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,35 – 2,29 (q, 2H).

E.M: *m/z* [M+H] calcd. para C₁₅H₁₄CINO₃: 292.0662; encontrada: 292.0753.

Acrilato de 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butila (8)



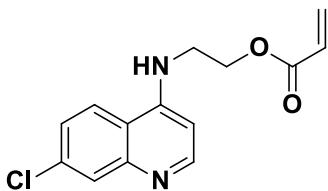
IV (cm⁻¹): 1724 (C=O); 1192 (C-O)

RMN ¹³C (126 Mhz, CDCl₃): δ 166,07; 161,86; 151,88; 135,95; 130,75; 129,84; 128,23; 126,57; 123,40; 119,61; 100,91; 77,41; 77,16; 76,90; 68,16; 63,84; 25,43; 25,32.

RMN ¹H (500 Mhz, CDCl₃): δ 8,63 (dd, *J* = 5,3, 1,6 Hz, 2H), 7,99 (dd, *J* = 8,9, 1,8 Hz, 2H), 7,94 – 7,92 (m, 2H), 7,32 (ddd, *J* = 7,9, 4,8, 3,1 Hz, 2H), 6,62 (dd, *J* = 5,4, 1,5 Hz, 2H), 6,35 – 6,30 (m, 2H), 6,08 – 6,01 (m, 2H), 5,77 – 5,73 (m, 2H), 5,22 – 5,20 (m, 1H), 4,23 – 4,11 (m, 8H), 1,99 – 1,83 (m, 8H)

E.M: *m/z* [M+H] calcd. para C₁₆H₁₆CINO₃: 306.0819; encontrada: 306.0884.

Acrilato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etila (9)



IV (cm⁻¹): 3220 (N-H); 1720 (C=O); 1210 (C-O)

RMN ¹³C (50 Mhz, CDCl₃): δ 167,16; 152,24; 149,54; 149,24; 135,12; 132,37; 128,99; 128,91; 125,85; 121,29; 117,31; 99,10; 77,80; 77,16; 76,52; 62,70; 43,23.

RMN ¹H (400 Mhz, CDCl₃): δ 8,54 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 7,96 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,68 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,38 (dd, *J* = 8,9, 2,2 Hz, 1H), 6,48 (dd, *J* = 17,3, 1,3 Hz, 1H), 6,42 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H), 6,16 (dd, *J* = 17,3, 10,4 Hz, 1H), 5,91 (dd, *J* = 10,4, 1,3 Hz, 1H), 5,65 (s, 1H), 4,56 (t, *J* = 5,2 Hz, 2H), 3,62 (q, *J* = 5,12 Hz, 2H).

E.M: *m/z* [M+H] calcd. para C₁₄H₁₃ClN₂O₂: 277.0666; encontrada: 277.0728

7.6 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DOS ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN [10-12 (a-c)]

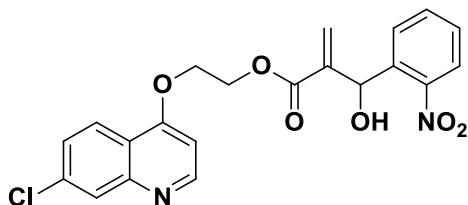
Em um balão de 25 mL contendo o respectivo acrilato (0,5 mmol; 1 equiv.) foram adicionados o nitrobenzaldeído de interesse (75,5 mg; 0,5 mmol; 1 equiv.), o 1,4-diazobiciclo[2.2.2] octano (DABCO) (56,1 mg; 0,5 mmol; 1 equiv.) e uma mistura de *t*-butanol/água na proporção de 9:1 (5 mL). A mistura reacional foi colocada sob agitação magnética a temperatura ambiente e o acompanhamento realizado por CCD, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila/hexano na proporção de 1:1. Foi utilizado o tempo limite de 7 dias reagindo ou total conversão (o que ocorrer primeiro) para essas reações.

A extração foi realizada utilizando diclorometano (2x15mL) em água (30mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada.

A purificação foi em coluna cromatográfica tipo flash, utilizando inicialmente diclorometano como eluente até total remoção do aldeído residual, em seguida foi utilizado acetato de etila como eluente para retirar o produto da coluna cromatográfica;

em seguida o solvente foi evaporado e evaporador rotatório e paraam obtidos os produtos, todos com características de óleo amarelo-marrom com rendimento variando de 43-74%.

2-(Hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etila (10a)

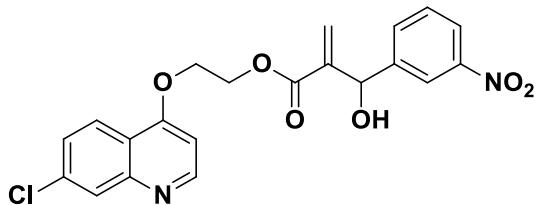


RMN ^{13}C (50 Mhz, DMSO): δ 165,34; 160,72; 153,27; 149,40; 148,34; 142,71; 137,10; 134,72; 133,35; 129,06; 128,81; 127,50; 126,53; 125,96; 124,29; 124,05; 119,52; 102,38; 67,02; 65,57; 62,71; 41,02; 40,60; 40,18; 39,77; 39,35; 38,93; 38,52.

RMN ^1H (200 Mhz, DMSO): δ 8,68 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,92 (dd, J = 5,5, 3,4 Hz, 2H), 7,75 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55 – 7,45 (m, 3H), 7,36-7,28 (m, 1H), 6,96 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,23 (s, 1H), 6,12 (d, J = 5,4 Hz, 1H), 6,01 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 5,74 (s, 1H), 4,57 – 4,30 (m, 4H).

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 429.0775; encontrada: 429.0795

2-(Hidroxi(3-nitrofenil)metil)acrilato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etila (10b)

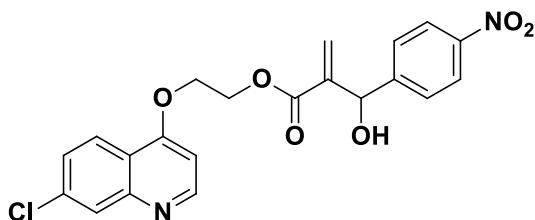


RMN ^{13}C (50 Mhz, DMSO): δ 165,26; 160,61; 153,22; 149,35; 147,59; 145,53; 142,88; 134,72; 133,83; 129,64; 127,51; 126,46; 126,04; 123,73; 122,21; 121,52; 119,39; 102,25; 70,38; 67,01; 62,53; 41,02; 40,60; 40,19; 39,77; 39,35; 38,93; 38,52.

RMN ^1H (200 Mhz, DMSO): δ 8,66 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,91 (d, J = 1,8 Hz, 1H), 7,84 – 7,70 (m, 2H), 7,63 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,43 (dd, J = 8,9, 2,0 Hz, 1H), 7,29 (t, J = 7,9 Hz, 1H), 6,91 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,29 (s, 1H), 6,08 (d, J = 4,5 Hz, 2H), 5,53 (d, J = 4,3 Hz, 1H), 4,65 – 4,27 (m, 4H).

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 429.0775; encontrada: 429.0827.

2-(Hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato de 2-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)etila (10c)

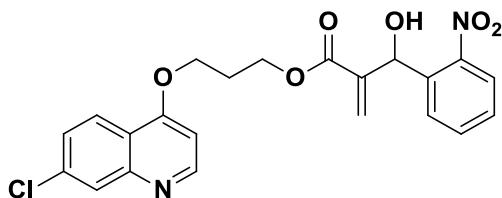


RMN ^{13}C (50 Mhz, DMSO): δ 170,10; 165,47; 158,07; 155,65; 154,23; 151,41; 147,70; 139,61; 133,09; 132,40; 131,33; 130,96; 128,62; 128,18; 124,21; 107,10; 75,36; 71,88; 67,44; 45,90; 45,47; 45,06; 44,64; 44,22; 43,81; 43,40.

RMN ^1H (200 Mhz, DMSO): δ 8,64 (d, J = 5,2 Hz, 1H), 7,92 – 7,64 (m, 4H), 7,50 – 7,33 (m, 3H), 6,91 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,28 (s, 1H), 6,12 – 6,00 (m, 2H), 5,49 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 4,64 – 4,21 (m, 4H).

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 429.0775; encontrada: 429.0826.

2-(Hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato de 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propila (11a)



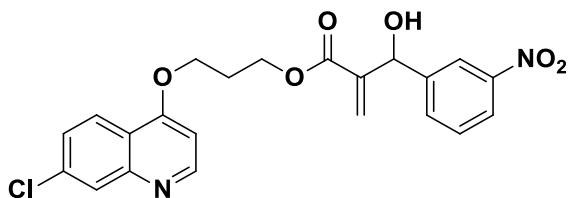
IV (cm $^{-1}$): 3107 (O-H); 1726 (C=O); 1265 (C-O)

RMN ^{13}C (126 Mhz, CDCl $_3$): δ 165,85; 161,71; 152,22; 141,21; 136,54; 133,56; 129,00; 128,80; 127,47; 126,91; 126,81; 124,62; 123,50; 119,78; 101,11; 77,41; 77,16; 76,91; 67,40; 65,16; 61,63; 28,33.

RMN ^1H (500 Mhz, CDCl $_3$): δ 8,67 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 8,08 – 8,03 (m, 1H), 8,02 – 7,97 (m, 1H), 7,86 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,73 (dd, J = 7,9, 1,0 Hz, 1H), 7,57 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 7,44 – 7,34 (m, 2H), 6,64 (d, J = 5,3 Hz, 1H), 6,38 (s, J = 4,9 Hz, 1H), 6,22 (s, 1H), 5,79 (s, J = 7,6 Hz, 1H), 4,40 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 4,19 – 4,13 (m, 2H), 2,24 (quin, J = 6,0 Hz, 2H).

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 443.0932; encontrada: 443.1002.

2-(Hidroxi(3-nitrofenil)metil)acrilato de 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propila (11b)



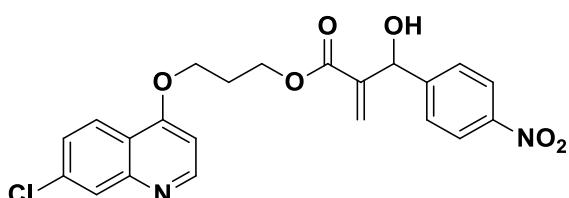
IV (cm⁻¹): 3263 (O-H); 1726 (C=O); 1269 (C-O)

RMN ¹³C (126 Mhz, CDCl₃): δ 165,83; 161,53; 152,31; 149,39; 148,36; 144,05; 141,49; 136,16; 132,87; 129,43; 127,58; 127,21; 126,87; 123,42; 122,81; 121,73; 119,73; 100,98; 77,41; 77,16; 76,90; 72,27; 65,12; 61,75; 28,34,

RMN ¹H (500 Mhz, CDCl₃): δ 8,63 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 8,20 (t, *J* = 1,9 Hz, 1H), 8,04 (dd, *J* = 8,5, 2,6 Hz, 2H), 7,94 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,70 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,45 – 7,36 (m, 2H), 7,26 (s, 1H), 6,62 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 6,42 (s, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,00 (t, *J* = 1,0 Hz, 1H), 5,65 (s, 1H), 4,45 – 4,37 (m, 2H), 4,18 (t, *J* = 6,1 Hz, 2H), 2,27 (p, *J* = 6,1 Hz, 2H),

E.M: *m/z* [M+H] calcd. para C₂₂H₁₉ClN₂O₆: 443.0932; encontrada: 443.1011.

2-(Hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato de 3-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)propila (11c)



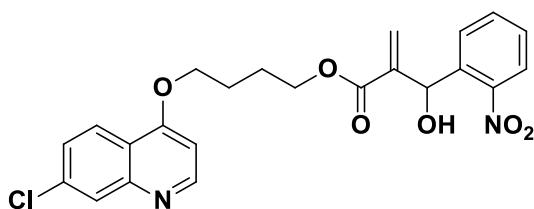
IV (cm⁻¹): 3304 (O-H); 1730 (C=O); 1240 (C-O)

RMN ¹³C (101 Mhz, CDCl₃): δ 165,71; 161,64; 151,92; 149,13; 148,85; 147,33; 141,48; 136,23; 127,50; 127,14; 127,07; 126,87; 123,53; 123,34; 119,55; 100,85; 77,38; 77,06; 76,75; 72,01; 65,12; 61,59; 28,19,

RMN ¹H (400 Mhz, CDCl₃): δ 8,58 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H), 8,10 (d, *J* = 0,4 Hz, 1H), 8,08 (d, *J* = 1,2 Hz, 1H), 8,03 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H), 7,92 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,52 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,39 (dd, *J* = 8,9, 1,5 Hz, 1H), 6,61 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 6,40 (t, 1H), 5,98 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 5,66 (s, 1H), 4,40 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 4,18 (t, *J* = 6,0 Hz, 2H), 2,27 (quin, *J* = 6,1 Hz, 2H),

E.M: *m/z* [M+H] calcd. para C₂₂H₁₉ClN₂O₆: 443.0932; encontrada: 443.1046.

2-(Hidroxi(2-nitrofenil)metil)acrilato de 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butila (12a)



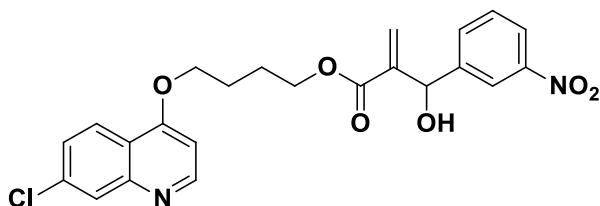
IR (cm^{-1}): 3321 (O-H); 1712 (C=O); 1260 (C-O)

RMN ^{13}C (126 Mhz, CDCl_3): δ 165,92; 161,67; 152,45; 149,46; 148,41; 141,58; 136,79; 135,91; 133,51; 129,07; 128,68; 127,60; 126,66; 126,37; 124,56; 123,49; 119,84; 101,01; 77,41; 77,16; 76,91; 68,05; 67,20; 64,55; 25,49; 25,37,

RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3): δ 8,63 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 8,05 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,94 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 7,88 (dd, $J = 8,1, 0,9$ Hz, 1H), 7,77 (dd, $J = 7,9, 1,3$ Hz, 1H), 7,61 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H), 7,42 – 7,37 (m, 2H), 6,64 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 6,37 (s, 1H), 6,25 (s, 1H), 5,79 (t, $J = 1,1$ Hz, 1H), 4,25 – 4,20 (m, 2H), 4,12 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 1,91 – 1,82 (m, 4H),

E.M: m/z [M+H] calcd. para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 457.1088; encontrada: 457.1192.

2-(Hidroxi(3-nitrofenil)metil)acrilato de 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butila (12b)



IR (cm^{-1}): 3280 (O-H); 1724 (C=O); 1271 (C-O)

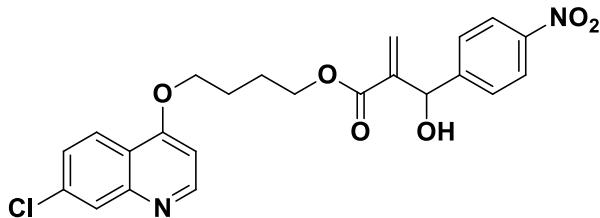
^{13}C NMR (50 Mhz, CDCl_3): δ 165,59; 161,20; 153,55; 149,62; 148,03; 145,93; 143,35; 134,84; 134,10; 130,14; 127,75; 126,65; 125,74; 124,20; 122,65; 121,81; 119,83; 102,51; 70,54; 68,54; 64,52; 40,59; 40,38; 40,17; 39,96; 39,75; 39,54; 39,33; 25,29; 25,22,

^1H NMR (400 Mhz, CDCl_3): δ 8,71 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H), 8,15 – 8,12 (m, 1H), 8,10 – 8,04 (m, 2H), 7,96 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 7,74 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H), 7,62 – 7,49 (m, 2H), 6,98

(d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 6,28 (s, 1H), 6,11 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 6,07 (s, 1H), 5,57 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 4,24 – 4,04 (m, 4H), 1,83 – 1,68 (m, 4H),

E.M: $m/z [M+H]$ calcd. para $C_{23}H_{21}ClN_2O_6$: 457.1088; encontrada: 457.1194.

2-(Hidroxi(4-nitrofenil)metil)acrilato de 4-((7-cloroquinolin-4-il)oxi)butila (12c)



IV (cm⁻¹): 3107 (O-H); 1724 (C=O); 1260 (C-O)

RMN ¹³C (126 Mhz, CDCl₃): δ 165,82; 161,70; 152,19; 149,50; 149,17; 147,35; 141,86; 135,97; 127,63; 127,29; 126,68; 126,63; 123,53; 123,40; 119,74; 100,96; 77,41; 77,16; 76,91; 71,91; 68,06; 64,54; 25,47; 25,38,

RMN ¹H (500 Mhz, CDCl₃): δ 8,54 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 8,10 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 8,01 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 7,86 (d, $J = 1,4$ Hz, 1H), 7,53 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 7,36 (dd, $J = 8,9$, 1,8 Hz, 1H), 6,61 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H), 6,39 (s, 1H), 6,00 (s, 1H), 5,67 (s, 1H), 4,24 – 4,20 (m, 2H), 4,13 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H), 1,94 – 1,86 (m, 4H),

E.M: $m/z [M+H]$ calcd. para $C_{23}H_{21}ClN_2O_6$: 457.1088; encontrada: 457.1181.

7.7 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE BIOLÓGICA PARA ATIVIDADE ANTITUMORAL

7.7.1 MATERIAIS

Células: As linhagens tumorais utilizadas, MCF-7 (câncer de mama), HCT 116 (câncer colorretal), HL60 (leucemia) e NCI H292 (câncer de pulmão) foram obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro, tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Amostras: As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril.

7.7.2 MÉTODOS

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de screening do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN et al., 1990). É um método rápido, sensível e barato. Foi descrita primeiramente por Mosmann (MOSMANN, 1983), tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996).

As linhagens MCF-7 (câncer de mama), HCT 116 (câncer colorretal), HL60 (leucemia mieloide crônica) e NCI H292 (câncer de pulmão) foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL. As substâncias previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em série no meio RPMI para obtenção das concentrações finais e adicionadas em placa de 96 poços. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595nm.

7.7.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para concentração única: Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%). As amostras que apresentam mais de 75% de inibição serão calculadas a CI₅₀.

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata em dois experimentos independentes.

Para cálculo da IC_{50} : A Concentração inibitória em 50% (IC_{50}) foi calculada por regressão não linear no programa *GraphPad Prism*. Cada amostra foi testada em duplicata.

Cabe destacar que toda a parte biológica mostrada neste trabalho relacionada a atividade antitumoral, foi realizada pela equipe da Professora Dr. Gardênia Carmen Gadelha Militão, no Laboratório de Proliferação Celular, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

7.8 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE BIOLÓGICA PARA ATIVIDADE LEISHMANICIDA

7.8.1 MATERIAIS

Cultivo do parasita: Foi utilizado um isolado de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) cedido pela Profa. Dra. Maria Norma Melo da Universidade Federal de Minas Gerais. Os parasitas foram cultivados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura Schneider completo, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de uma solução de antibiótico (estreptomicina e penicilina), incubados em estufa com demanda biológica de oxigênio (D.B.O.) a 25 °C e realizados repiques semanais para manutenção da viabilidade celular.

7.8.2 MÉTODOS

Para a avaliação da atividade antileishmania foram utilizadas formas celulares promastigotas de *L. amazonensis*. A contagem foi feita utilizando uma câmara de Neubauer por contagem direta em microscópio ótico. Após, foi realizado o cálculo do inóculo, cuja concentração inicial desejada foi de 1×10^7 células/mL. Os parasitos foram inoculados em meio Schneider suplementado (20% de SBF e 1% de antibiótico) e os compostos analisados, adicionados em diferentes concentrações (100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL). Como controle negativo foi analisado o crescimento do parasita em tubos de ensaio com a ausência dos compostos.

As promastigotas foram incubadas numa incubadora D.B.O. a 25°C, e após o período de 72 horas de cultivo, foi feita a retirada de alíquotas dos cultivos, a observação no microscópio ótico para averiguação da motilidade flagelar e a

morfologia dos parasitas, seguida da diluição em microtubos contendo solução de Isoton, sendo submetidos a agitação em vortex e quantificadas sob microscopia ótica fazendo o uso da câmara de Neubauer. A quantificação foi feita por contagem direta do número de células por campo em microscópio óptico com aumento de 40x. A média da contagem foi utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1,0 mL de cultura. O cálculo foi feito utilizando a fórmula: n° de parasitas = média dos 4 quadrantes x o inverso da diluição da amostra x 10^4 .

Para atividade hemolítica de sangue periférico humano foram utilizadas amostras sanguíneas coletadas por punção venosa periférica em voluntários adultos e saudáveis, selecionados de acordo com os seguintes critérios: sangue do tipo O+, ter uma idade compreendida entre 18 e 60 anos, não ter anemia significativa, não possuir distúrbios hidroeletrolíticos e qualquer outra doença sistêmica significativa ou aguda que pudesse interferir nos resultados pela metodologia proposta. Todos os voluntários foram recrutados no Centro de Ciências da Saúde—UFPB.

As amostras foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS)1x (8g de NaCl; 0,2 de KCl; 1,44g de Na₂HPO₄; 0,24g de KH₂PO₄; H₂O destilada), foi feito o ajuste para a concentração do sangue em 5% de hemácias em um volume de 80 µL.

Após, foram diluídas as soluções estoque dos compostos estudados em PBS 1x em diferentes concentrações (400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL) num volume final de 20 µL. Em seguida, foram distribuídas em placas de 96 poços 80 µL da solução de sanguínea com PBS, em seguida, foi adicionado 20 µL da solução de trabalho dos compostos em seus devidos poços previamente demarcados, terminando com o volume final de 100 µL.

Foram incubados durante 1 hora a 37°C em estufa D.B.O. e a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de PBS. Posteriormente, as suspensões foram centrifugadas a 1000 G (2.229,17 RPM) por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante então foi transferido para outra placa de 96 poços e submetido à espectrofotometria utilizando espectrofotômetro a 540 nm para quantificar a atividade hemolítica.

7.8.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas (IC_{50}) foi determinada utilizando o Programa GraphPad Prism versão 8.0. Os dados obtidos em cada experimento foram comparados utilizando o teste “t-Student” e a Análise de Variância (ANOVA). O nível de significância foi estabelecido em 95% (valor de $p \leq 0.05$)

Cabe destacar que toda a parte biológica mostrada neste trabalho relacionada a atividade antileishmania, faz parte do Trabalho de conclusão de Curso do estudante Edvaldo Ferreira de Pontes Neto, do Grupo de pesquisa Multidisciplinar em Biotecnologia e Saúde, sob a orientação da Professora Dr. Priscilla Anne Castro De Assis.

Referências

REFERÊNCIAS

- ANTINARELLI, L. M. R. et al. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinylhydrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 10–16, 2016.
- BARBOSA-LIMA, G. et al. N-(2-(arylmethylimino)ethyl)-7-chloroquinolin-4-amine derivatives, synthesized by thermal and ultrasonic means, are endowed with anti-Zika virus activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, p. 434–441, 2017.
- BARBOSA, T. P. et al. Improved synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): Evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1726–1730, 2009.
- BARBOSA, T. P. et al. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 4250–4256, 2011.
- BARREIRO, E. J. ; FRAGA, C. A. M. Q. **Química medicinal: bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BISPO, M. D. L. F. et al. A new and potent class of quinoline derivatives against cancer. **Monatshefte fur Chemie**, v. 146, n. 12, p. 2041–2052, 2015.
- BOSQUESI, P. L. et al. Anti-inflammatory drug design using a molecular hybridization approach. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 11, p. 1450–1474, 2011.
- CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. [s.l: s.n].
- CARMACK, M. et al. The synthesis of 4-(4'-Amino-1'-methylbutylamino)-7-chloroquinoline and some 4-(4'-Monoalkylamino-1'-methylbutylamino)-7-chloroquinolines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 496, p. 1220–1225, 1946.
- CLAUDIO G. LIMA-JUNIOR , GLÁUCIA V. FAHEINA-MARTINS , CAIO C. B. BOMFIM , BRUNA B. DANTAS , EVERTON P. SILVA , DEMETRIUS A. M. DE ARAÚJO , EDILSON B. A. FILHO, M. L. A. A. V. . Synthesis, cytotoxic activity on leukemia cell lines and quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies of Morita–Baylis–Hillman adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602– 612, 2016.
- COA, J. C. et al. Synthesis, leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of quinoline-chalcone and quinoline-chromone hybrids. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 7, p. 1405–1414, 2017.
- COIMBRA, E. S. et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. **Chemico-Biological Interactions**, v. 260, p. 50–57, 2016.

COOPER, R. G.; MAGWERE, T. Chloroquine : Novel uses & manifestations. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. April, p. 305–316, 2008.

DA CÂMARA ROCHA, J. et al. Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitology Research**, v. 118, n. 10, p. 3067–3076, 2019.

DA SILVA CALEFFI, G. et al. Synthesis and structural characterization by NMR and X-ray of new Morita-Baylis-Hillman adducts derived from 7-chloroquinoline. **Journal of Molecular Structure**, v. 1133, n. 2017, p. 358–368, 2017.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1474–1480, 2009.

DE SOUZA, R. O. M. A. et al. High selective leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl)propanenitrile and analogous compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 99–102, 2007.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108–1119, 2007.

EVANS, B. E.; RITTLE, K. E.; BOCK, M. G. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. **Journal of medicinal**, v. 31, n. 12, p. 2235–2246, 1988.

WHO. **Fact Sheet Malaria**. Disponível em: <<http://www.who.int/malaria/media/world-malaria-report-2016/en/>>. Acesso em: 28 de nov. 2017

FAHEINA-MARTINS, G. V et al. Morita-Baylis-Hillman Adducts Display Anti-Inflammatory RAW264.7 Cells. **Mediators of Inflammation**, 2017.

FENG, L. S. et al. Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of balofloxacin ethylene isatin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3407–3412, 2010.

FERNANDO COELHO, W. P. A. Reação de Morita-Baylis-Billman: Uma estratégia para a preparação de intermediários multifuncionalizados para síntese orgânica. **Química Nova Nova**, v. 23, n. 1, p. 1–10, 2000.

FIOCRUZ. **As Leishmanioses - FIOCRUZ**. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vacina_o.htm>. Acesso em: 20 maio. 2017.

GUANTAI, E. M. et al. Enone À and Chalcone À Chloroquinoline Hybrid Analogues : In Silico Guided Design , Synthesis , Antiplasmodial Activity , in Vitro Metabolism , and Mechanistic Studies. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, p. 3637–3649, 2011.

HERRERA, L. et al. Insights into the structural patterns of the antileishmanial activity

of bi- and tricyclic N-heterocycles. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 3, n. 29, p. 7053–7060, 2016.

HILL, J. S.; ISAACS, N. S. Functionalisation of the α position of acrylate systems by the addition of carbonyl compounds: Highly pressure-dependent reactions. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 41, p. 5007–5010, 1986.

HOFFMANN, H. M. R.; RABE, J. Preparation of 2-(1-Hydroxyalkyl)acrylic Esters; Simple Three-Step Synthesis of Mikanecic Acid. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 22, n. 10, p. 795–796, 1983.

INCA. **O que é o câncer?**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 20 de nov. 2017

KHAN, F. A.; MAALIK, A. Advances in pharmacology of isatin and its derivatives: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1937–1942, 2015.

KOHN, L. K. et al. Antiproliferative effect of Baylis-Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 738–744, 2006.

KOUZNETSOV, R. **Review of past and present experience in the use of drugs for malaria control in tropical Africa**World Health Organization, 1979.

KOUZNETSOV, V. V.; GÓMEZ-BARRIO, A. Recent developments in the design and synthesis of hybrid molecules based on aminoquinoline ring and their antiplasmodial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 3091–3113, 2009.

KUNDU, M. K. et al. Antimalarial activity of 3-hydroxyalkyl-2-methylene- propionic acid derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 5, p. 731–736, 1999.

LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Morita-Baylis-Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 13, p. 3954–3971, 2012.

LIU, X. L. et al. Molecular hybridization-guided 1,3-dipolar cycloaddition reaction enabled pyrimidine-fused spiropyrrolidine oxindoles synthesis as potential anticancer agents. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 39, p. 4411–4416, 2016.

MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. A Tertiary Phosphine-catalyzed Reaction of Acrylic Compounds with Aldehydes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 41, n. 1949, p. 2815–2815, 1968.

MORPHY, R.; KAY, C.; RANKOVIC, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 15, p. 641–651, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to

proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAGLE, A. S. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chem. Rev.**, v. 114, n. 22, p. 11305–47, 2014.

NATARAJAN, J. K. et al. 4- N -, 4- S -, and 4- O -Chloroquine Analogues: Influence of Side Chain Length and Quinolyl Nitrogen p K a on Activity vs Chloroquine Resistant Malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3466–3479, jun. 2008.

NEISES, B.; STEGLICH, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 17, n. 7, p. 522–524, 1978.

NELSON, G. L. et al. Synthesis and Evaluation of Baylis-Hillman Reaction Derived Imidazole and Triazole Cinnamates as Antifungal Agents. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2018, p. 1–8, 2018.

NJARIA, P. M. et al. Chloroquine-containing compounds: a patent review (2010 – 2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 9, p. 1003–1024, 2015.

PARHIZGAR, A. R. Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: A narrative review. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 115–128, 2017.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 8, p. 3147–3176, 1996.

PINZ, M. et al. 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**, v. 780, p. 122–128, 2016.

PLATA, R. E.; SINGLETON, D. A. A case study of the mechanism of alcohol-mediated morita baylis-hillman reactions. the importance of experimental observations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 11, p. 3811–3826, 2015.

REDDY, T. N. et al. Design, synthesis and structure-activity relationship of novel phenolic based pyrimidine hybrids from Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) components as potential antitumor agents. **Chemical Biology Letters**, v. 5, n. 2, p. 41–54, 2018.

SÁ, I. M. DE. A resistência à cloroquina e a busca de antimalariais entre as décadas de 1960 e 1980. **Hist. cienc. saude-Manguinhos**, v.18, n.2, 2011.

SAVEGNAGO, L. et al. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 1, p. 40–44, 2013.

SHAVETA; MISHRA, S.; SINGH, P. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 124, p. 500–536, 2016.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for. **J Natl Cancer Inst**, v. 82,

n. 4, p. 377–387, 1990.

SOUSA, S. C. D. O. et al. Synthesis of 16 new hybrids from tetrahydropyrans derivatives and Morita-Baylis-Hillman adducts: In vitro screening against *Leishmania donovani*. **Molecules**, v. 22, n. 2, 2017.

TAYLOR, R. D.; MACCOSS, M.; LAWSON, A. D. G. Rings in drugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5845–5859, 2014.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829–1852, 2007.

WHO. **Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 24 de nov. 2017

WHO. **Doença do vírus Zika**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/zika-virus-tmp/en/>> , Acesso em: 05 de nov. 2017

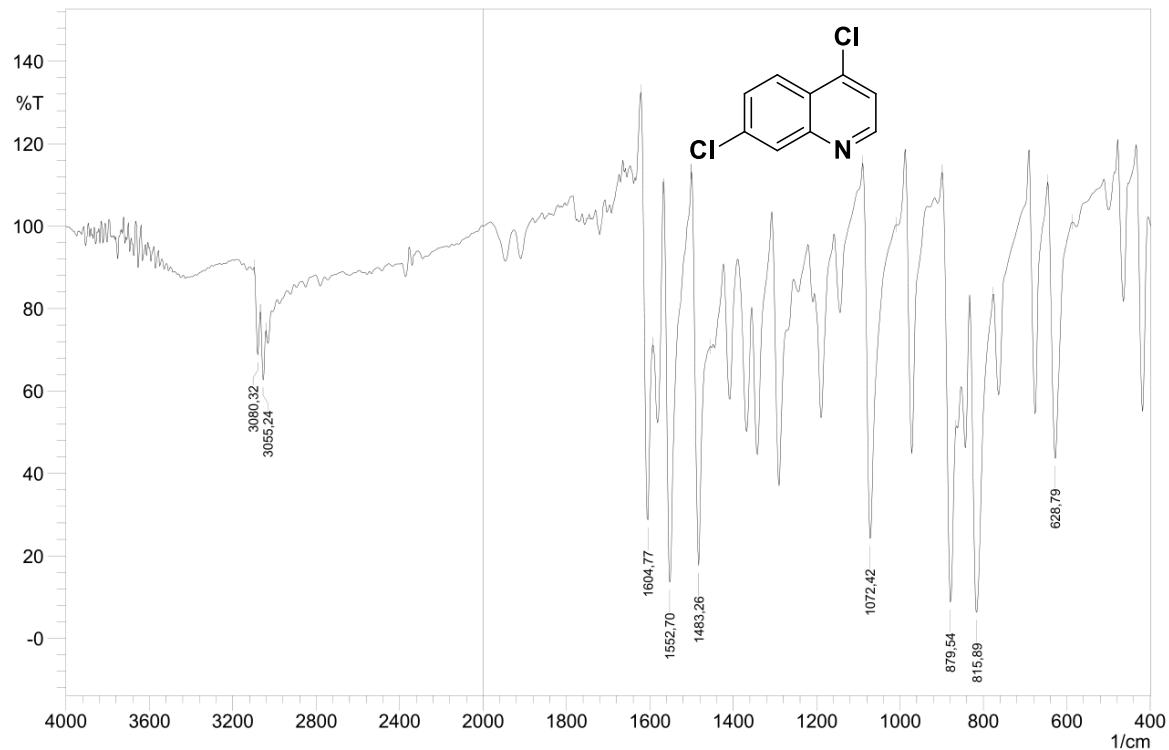
WHO. **Tuberculosis**. Disponível em: <<https://www.who.int/tb/en/>>. Acesso em: 22 de nov. 2017

XU, Z. et al. Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, n. 2, p. 159–167, 2017.

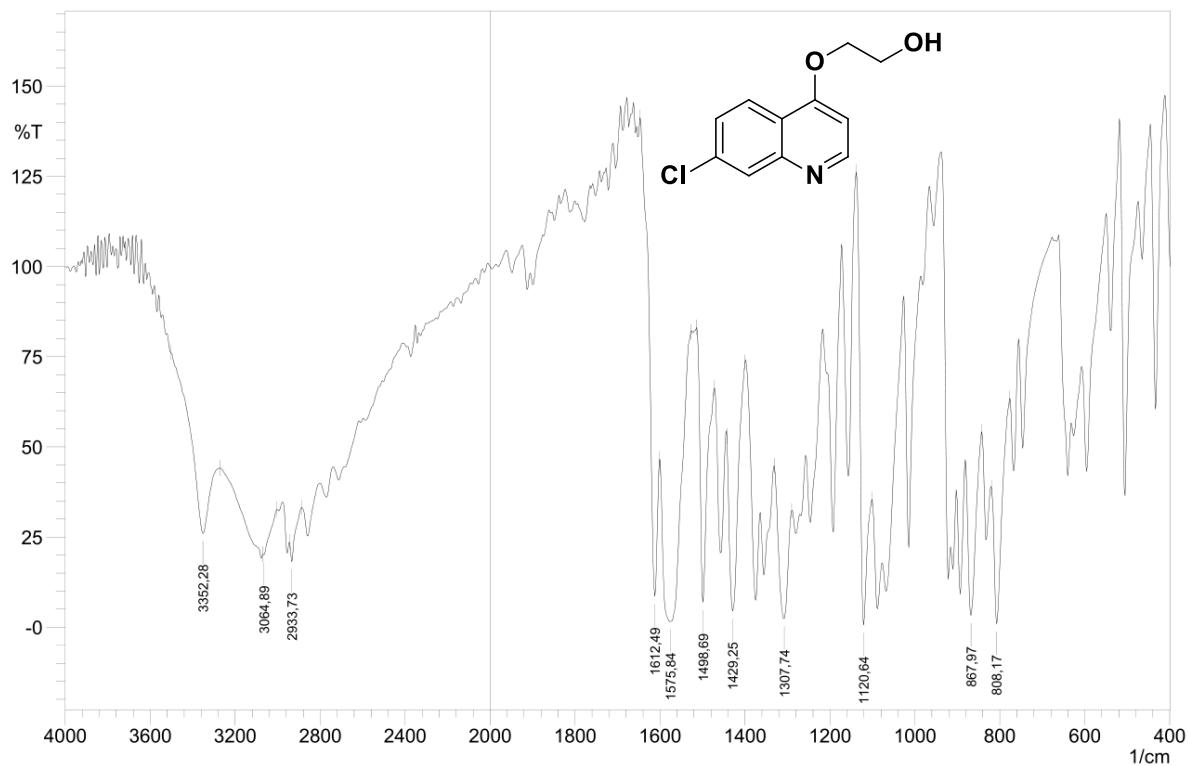
Espectros

ESPECTROS

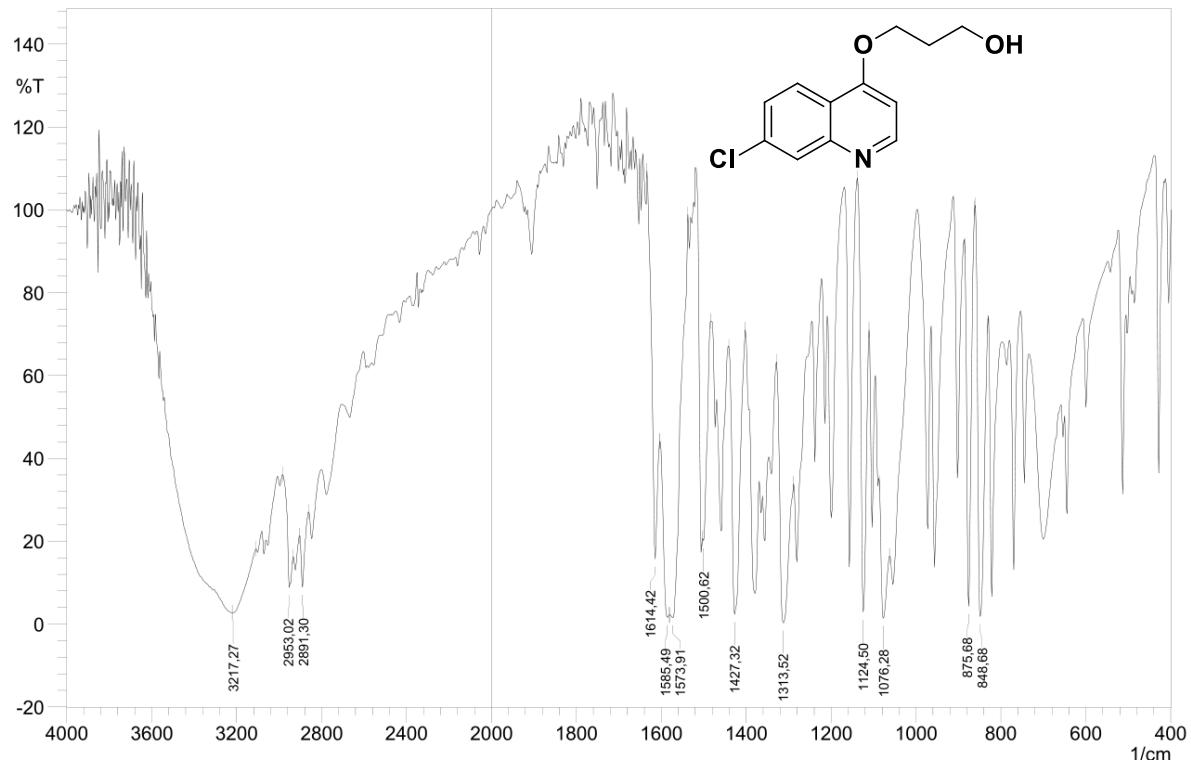
Espectro 1 – Espectro de Infravermelho do composto 1



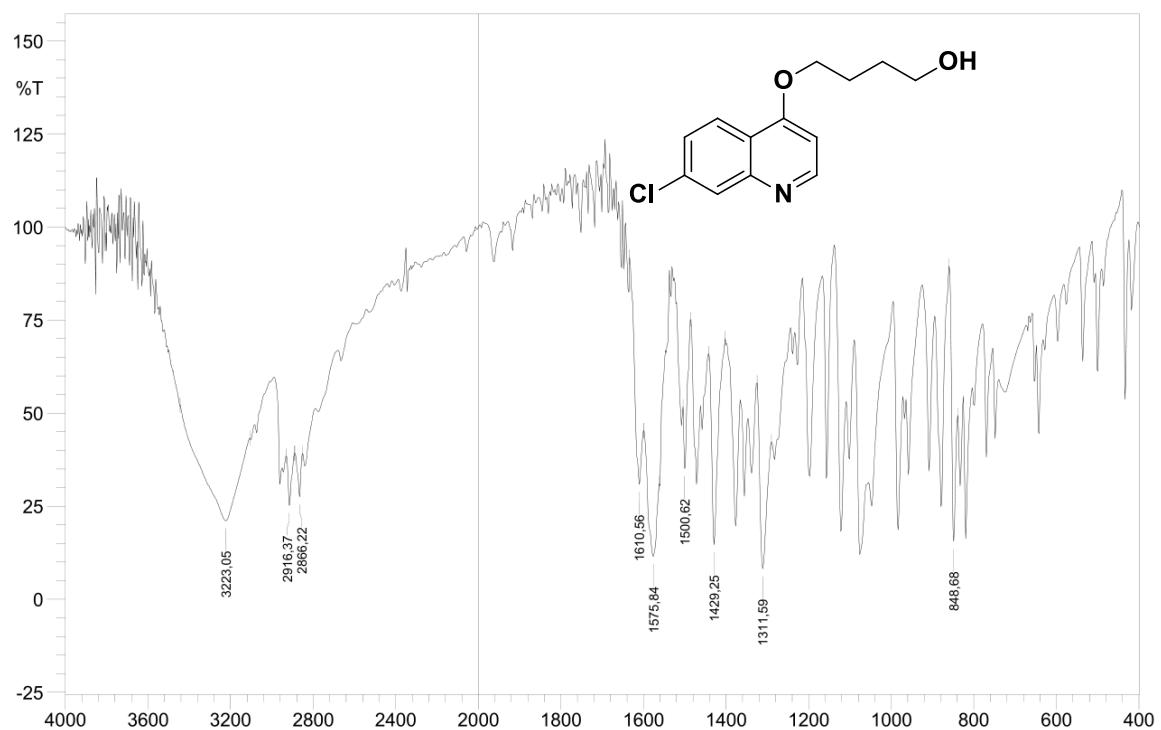
Espectro 2 – Espectro de Infravermelho do composto 2



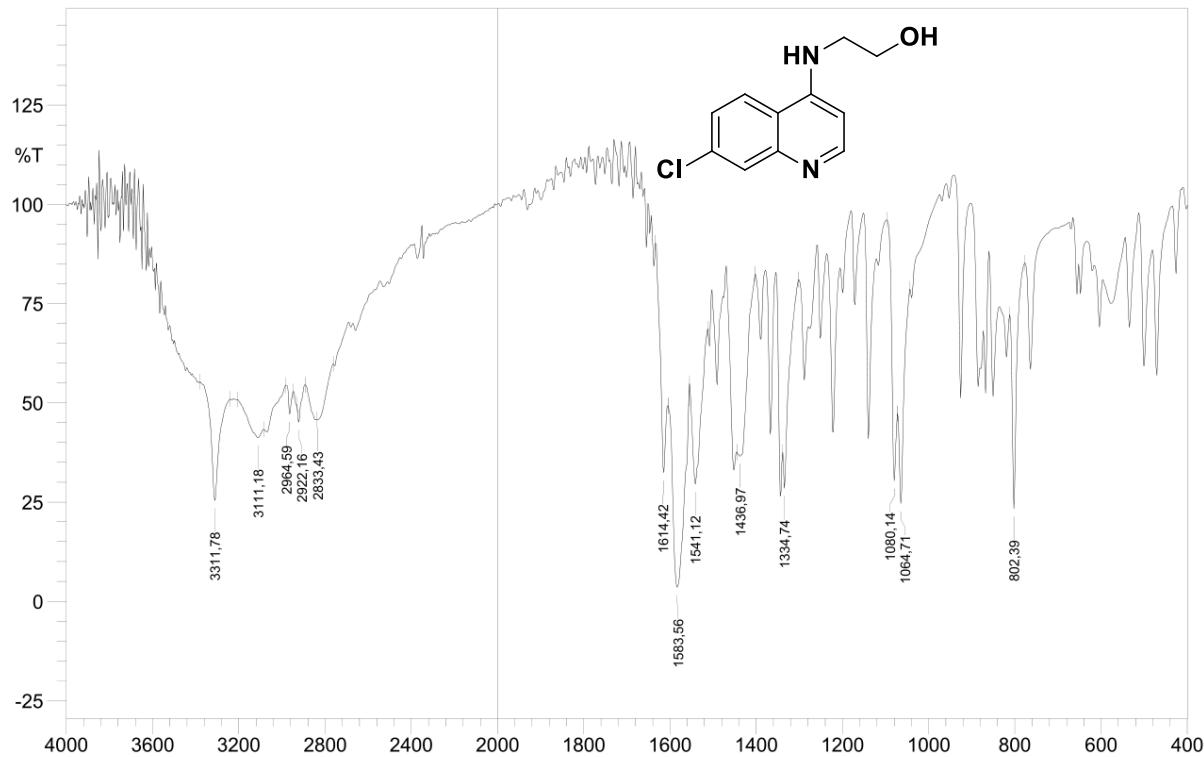
Espectro 3 – Espectro de Infravermelho do composto 3



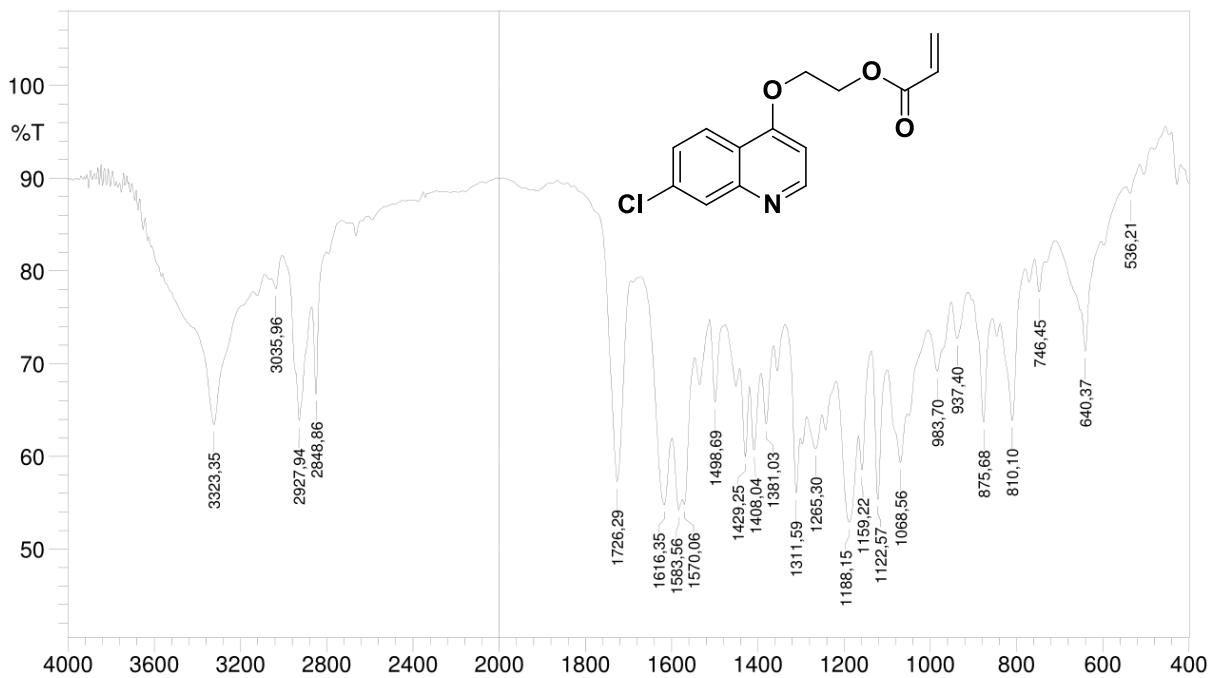
Espectro 4 – Espectro de Infravermelho do composto 4



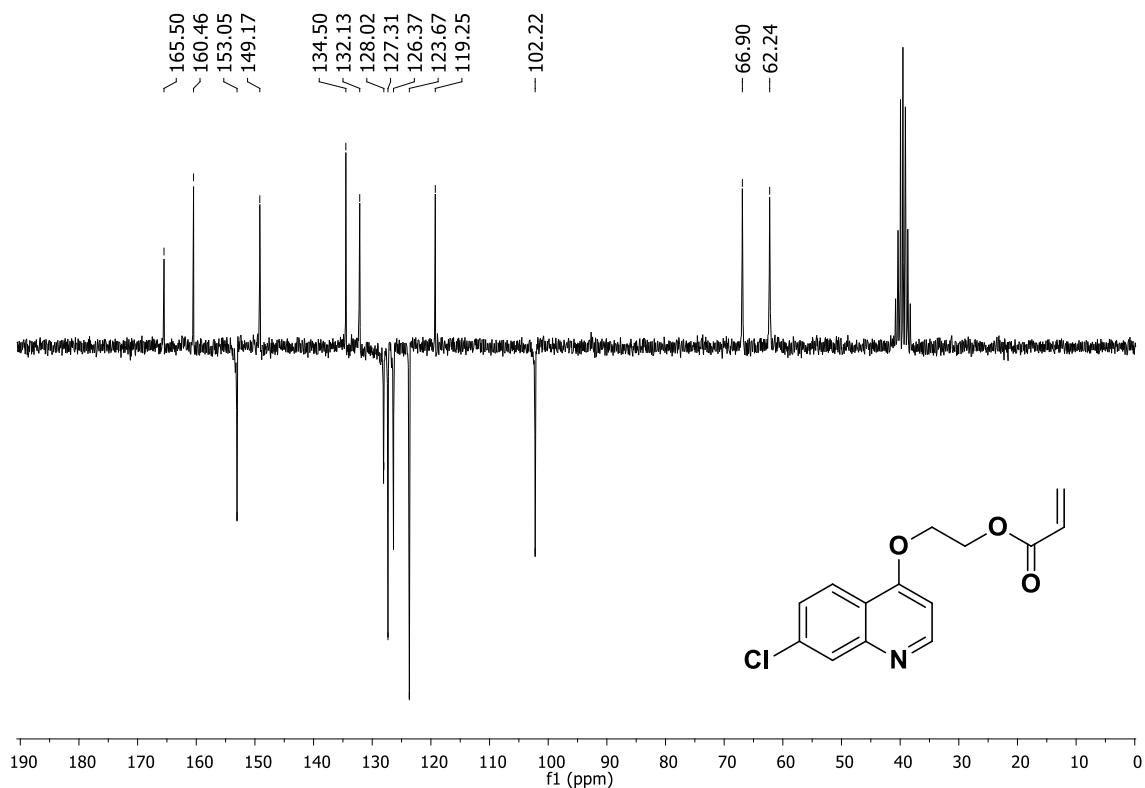
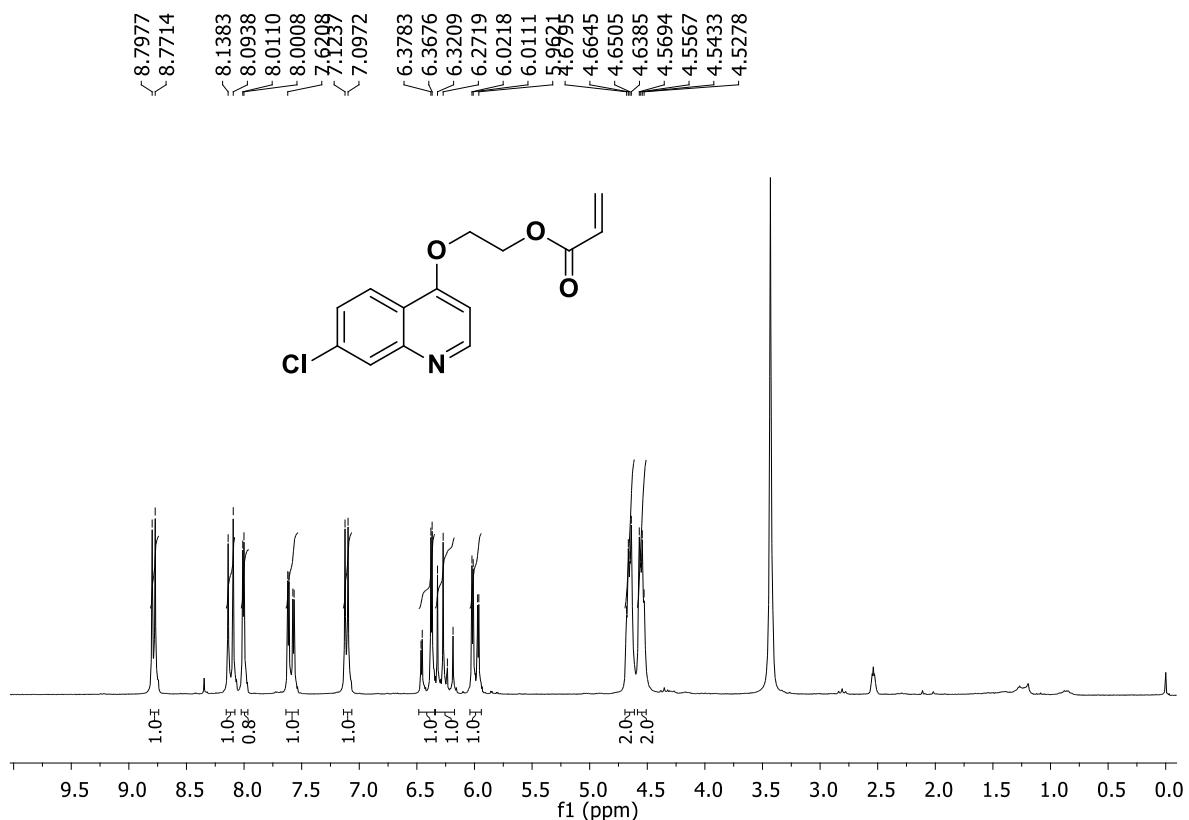
Espectro 5 – Espectro de Infravermelho do composto 5



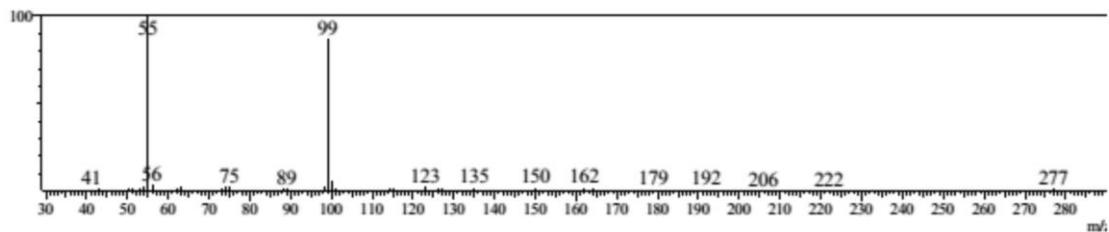
Espectro 6 – Espectro de Infravermelho do composto 6



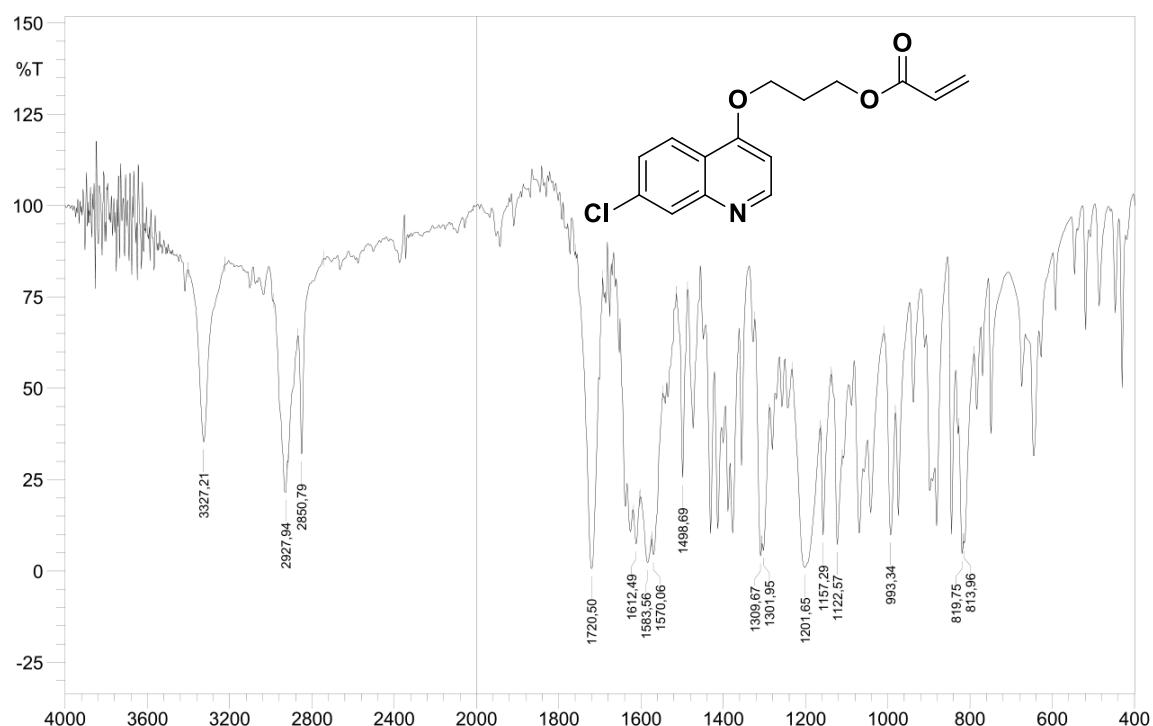
Espectro 7 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto 6



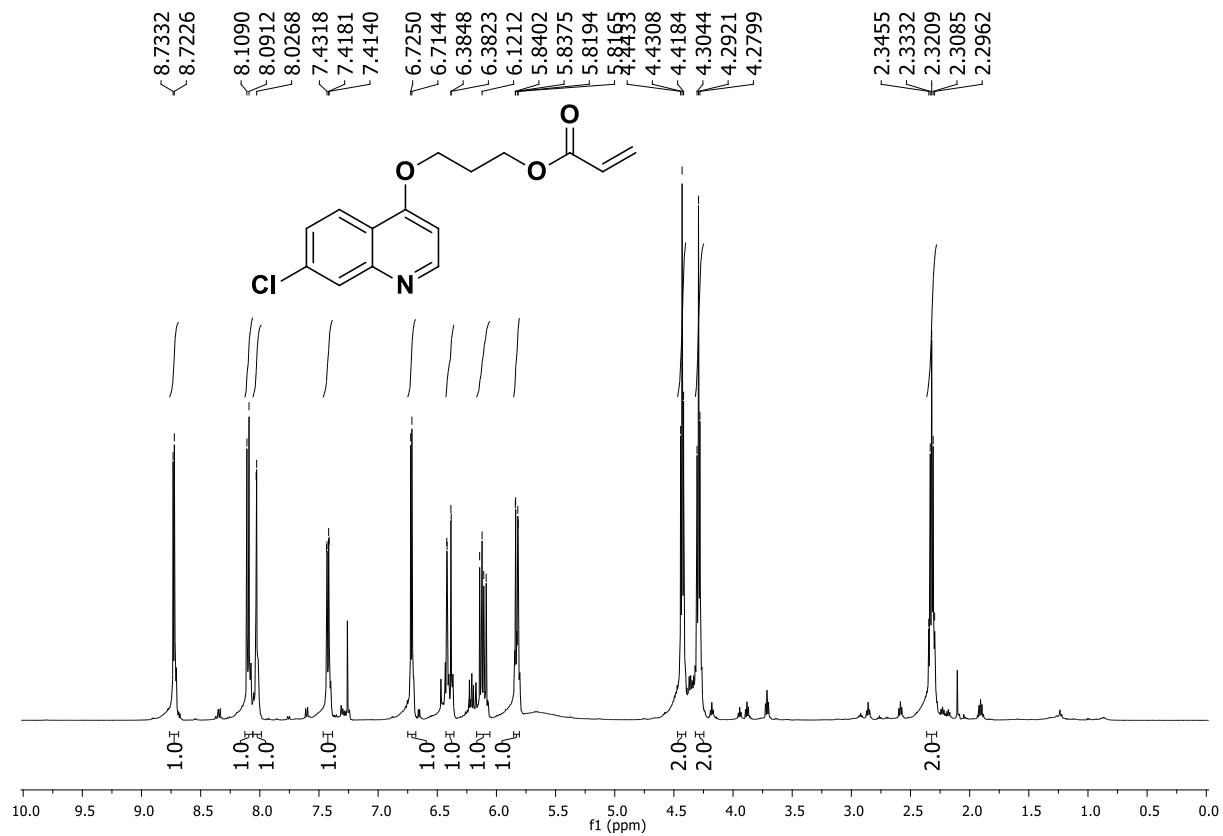
Espectro 9 – Espectro de massas de baixa resolução do composto 6



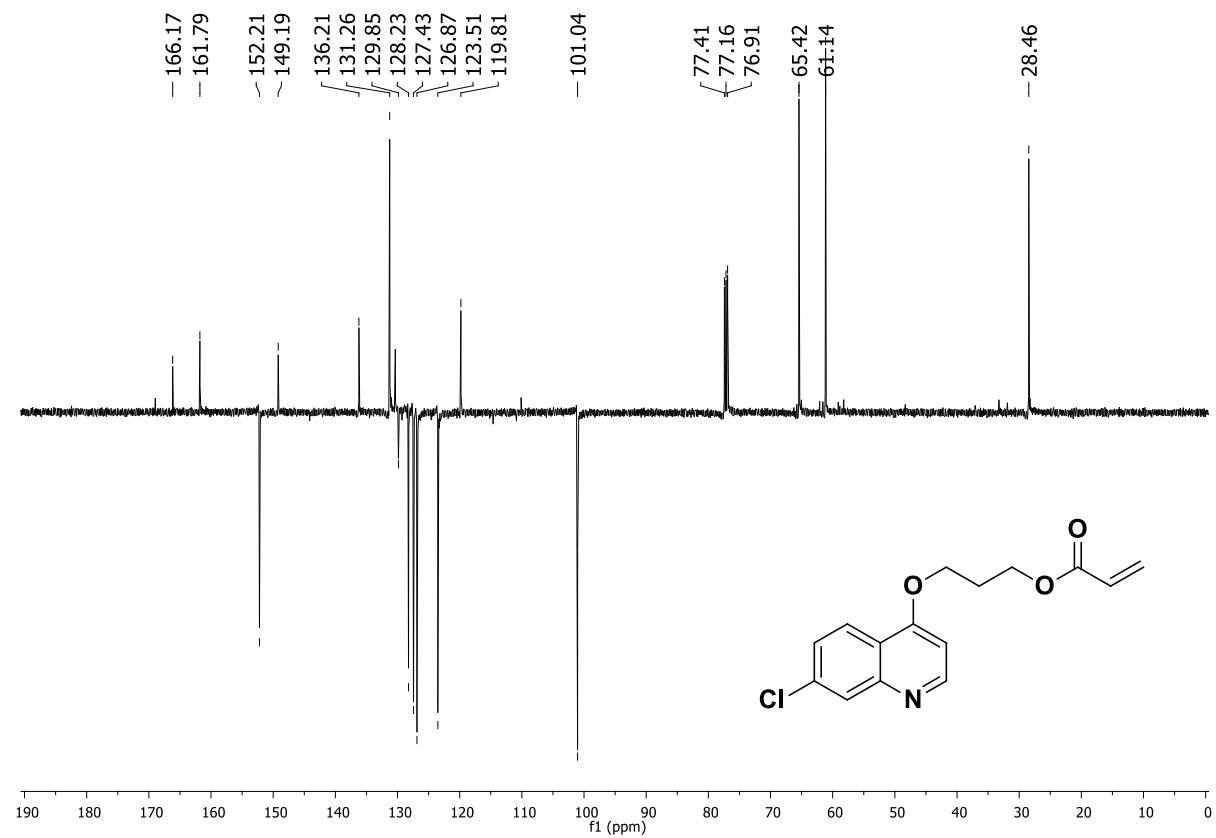
Espectro 10 – Espectro de Infravermelho do composto 7



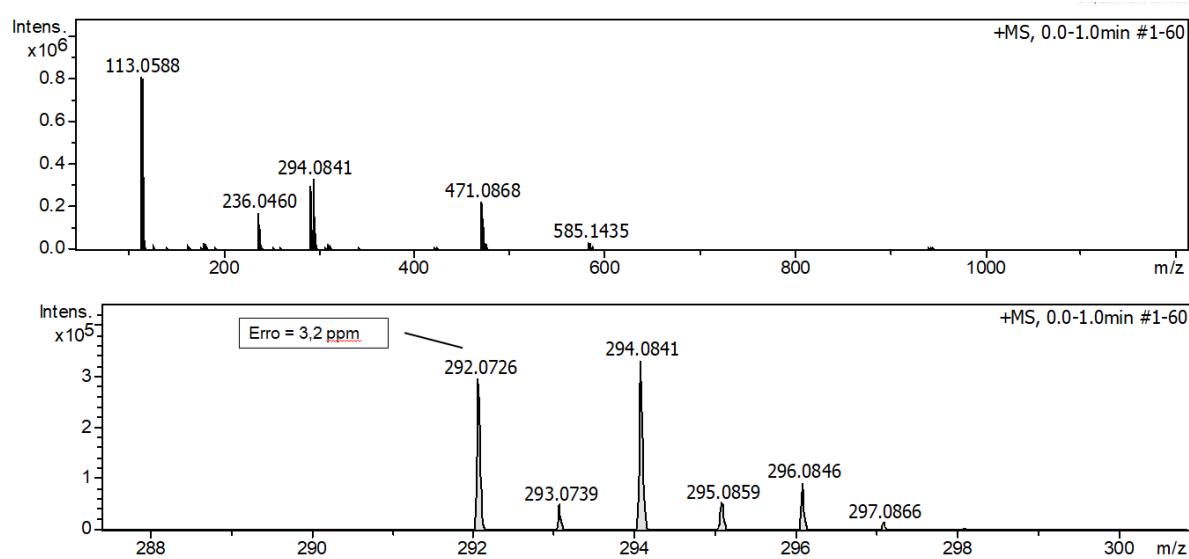
Espectro 11 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 7



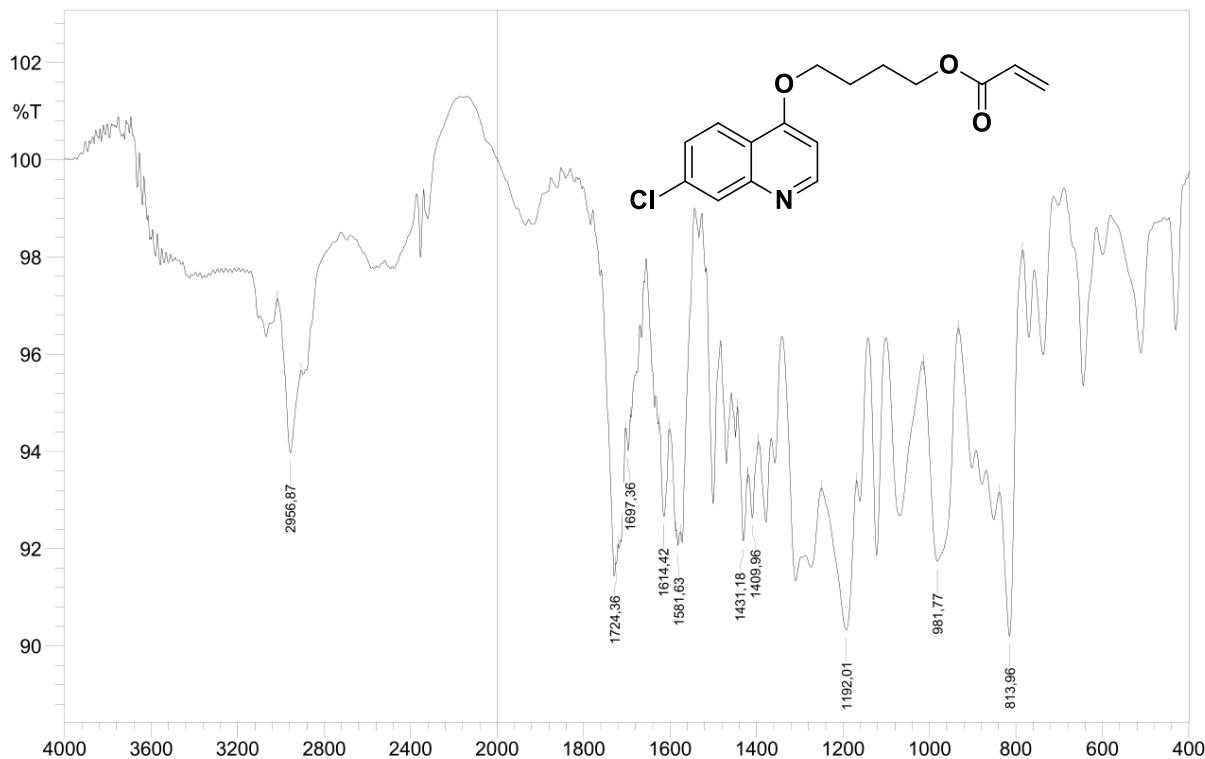
Espectro 12 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 MHz, CDCl_3) do composto 7



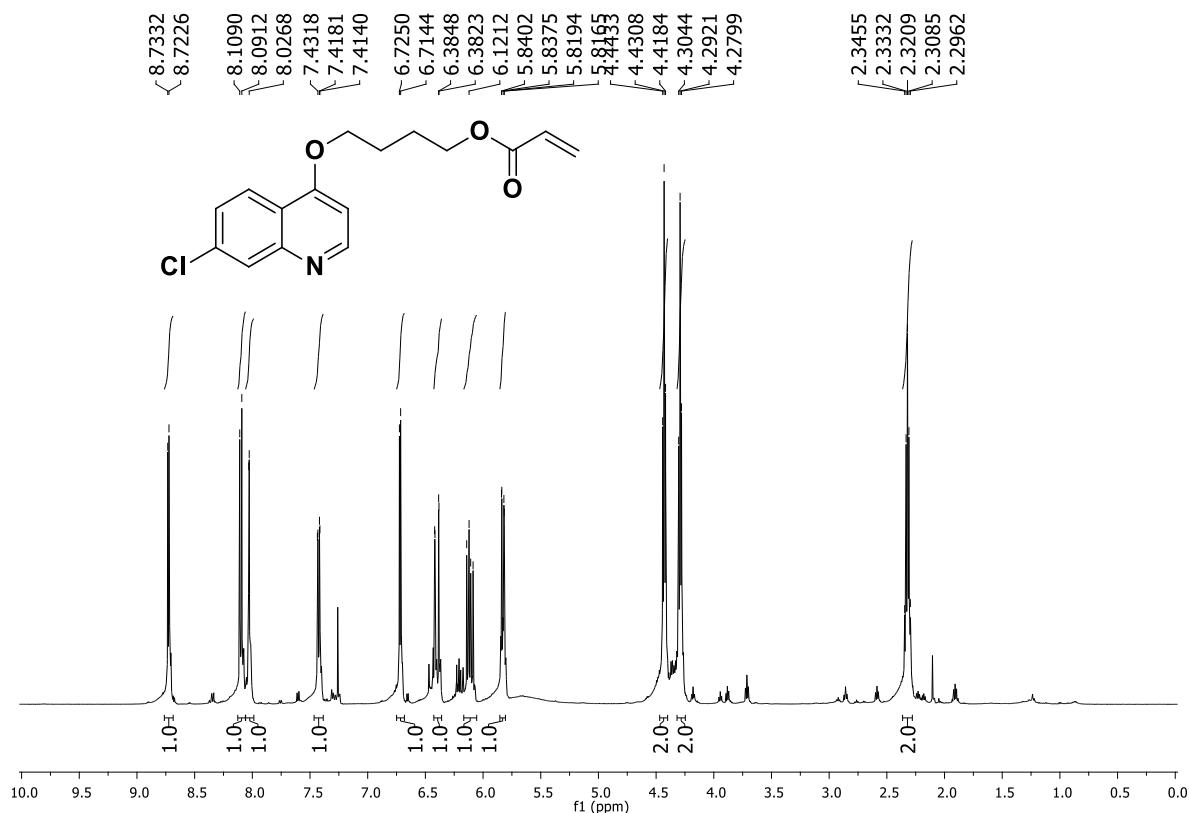
Espectro 13 – Espectro de massas de alta resolução do composto 7



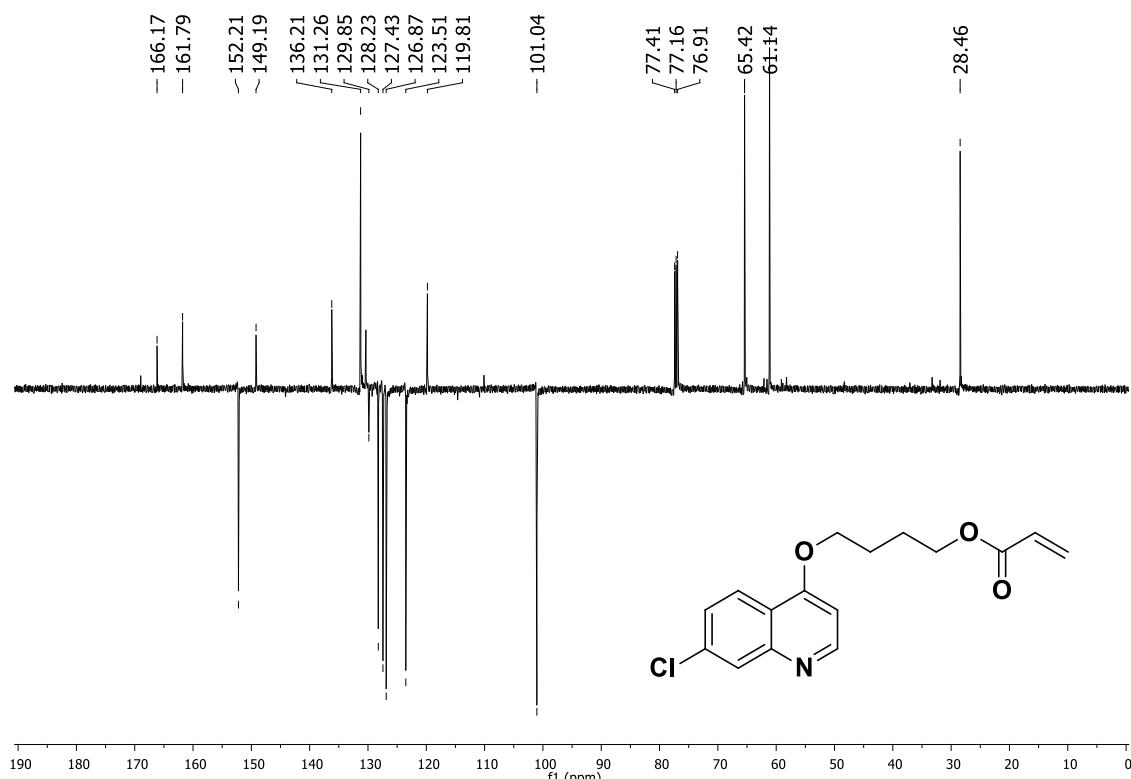
Espectro 14 – Espectro de Infravermelho do composto 8



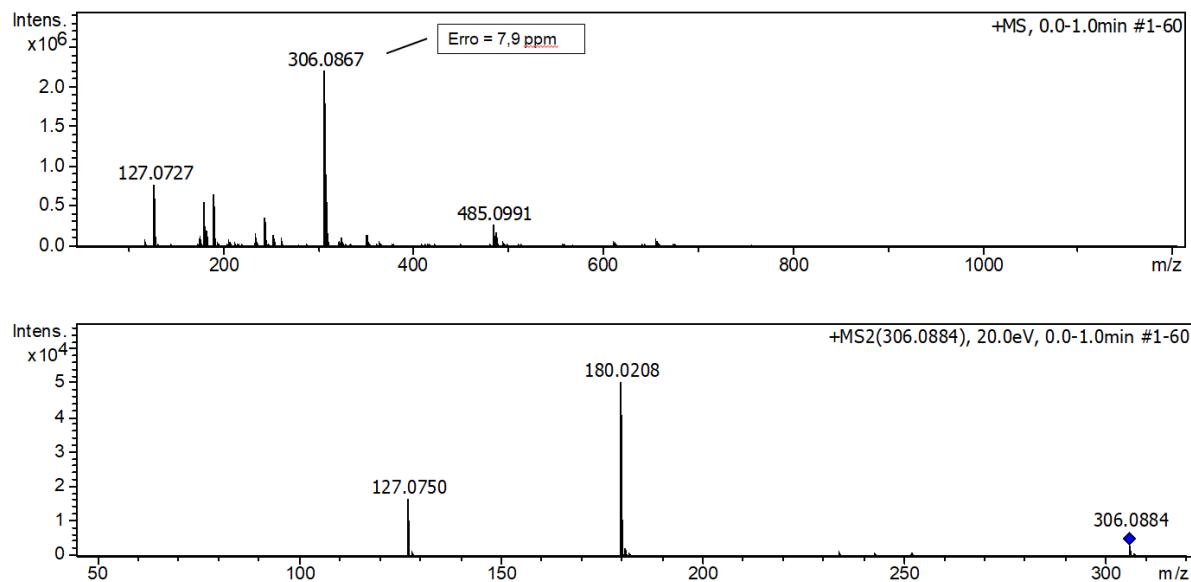
Espectro 15 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 8



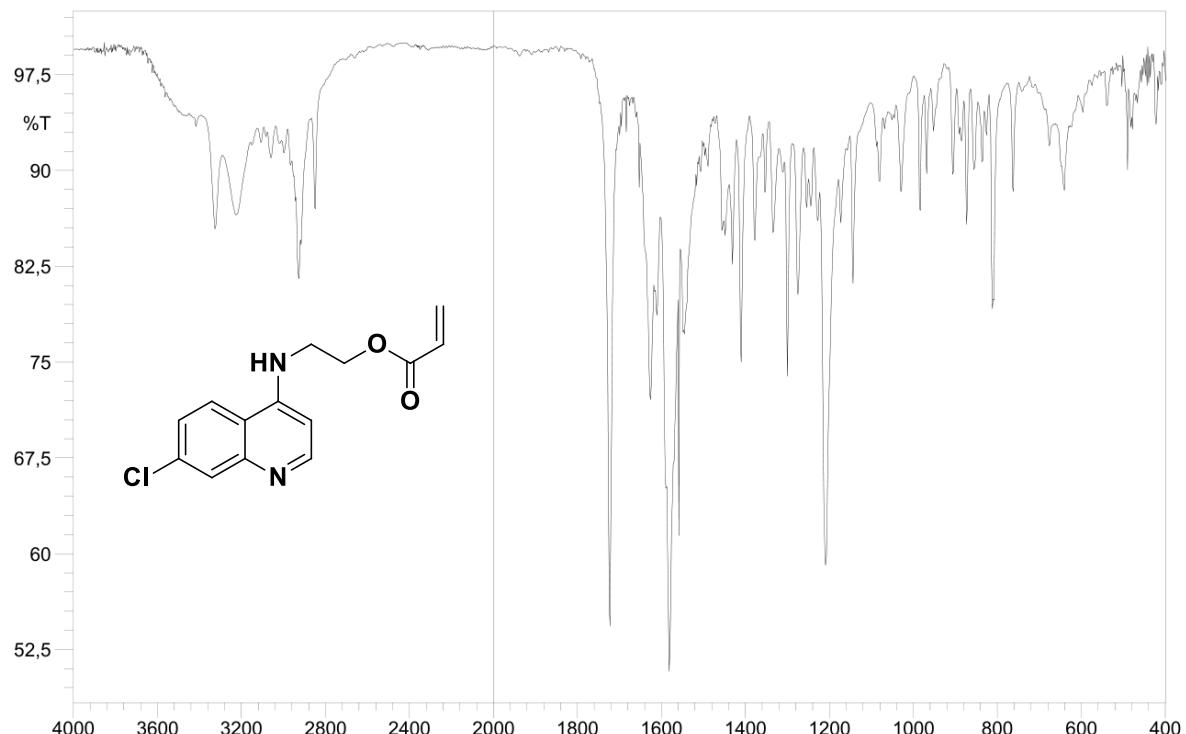
Espectro 16 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto 8



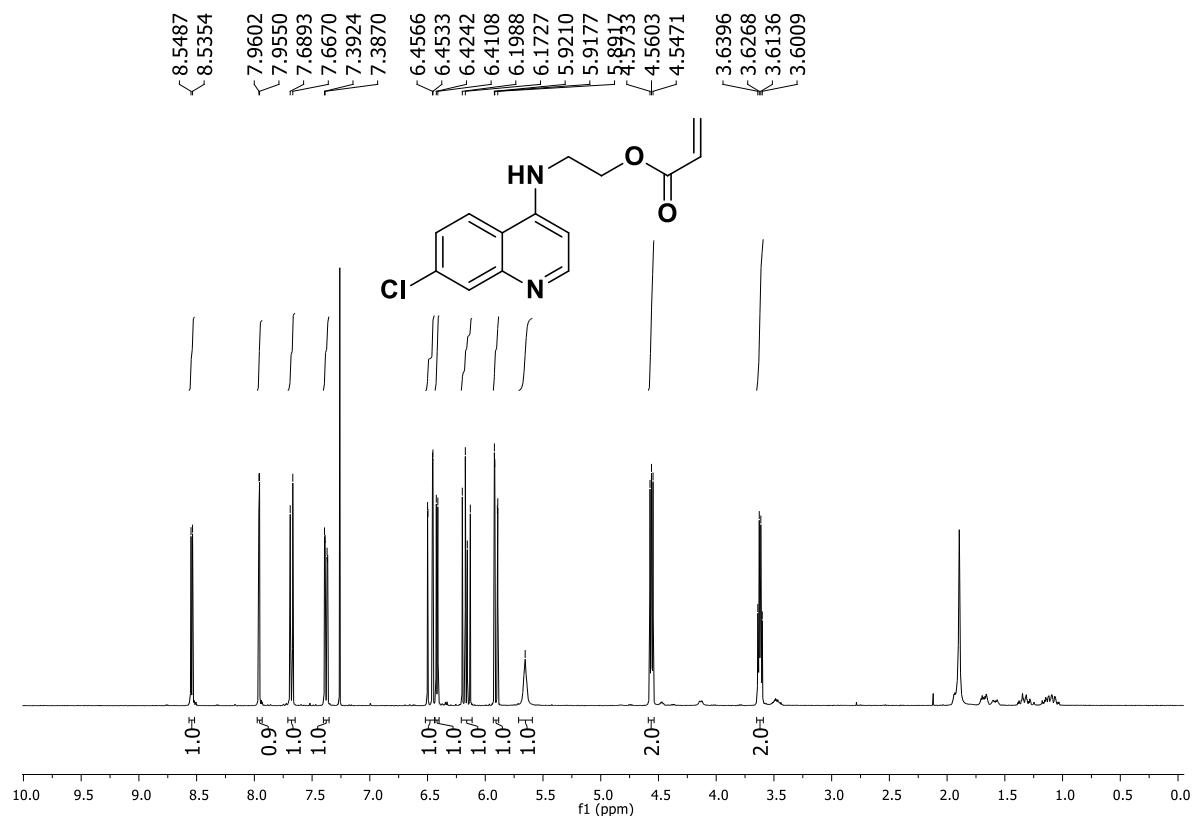
Espectro 17 – Espectro de massas de alta resolução do composto 8



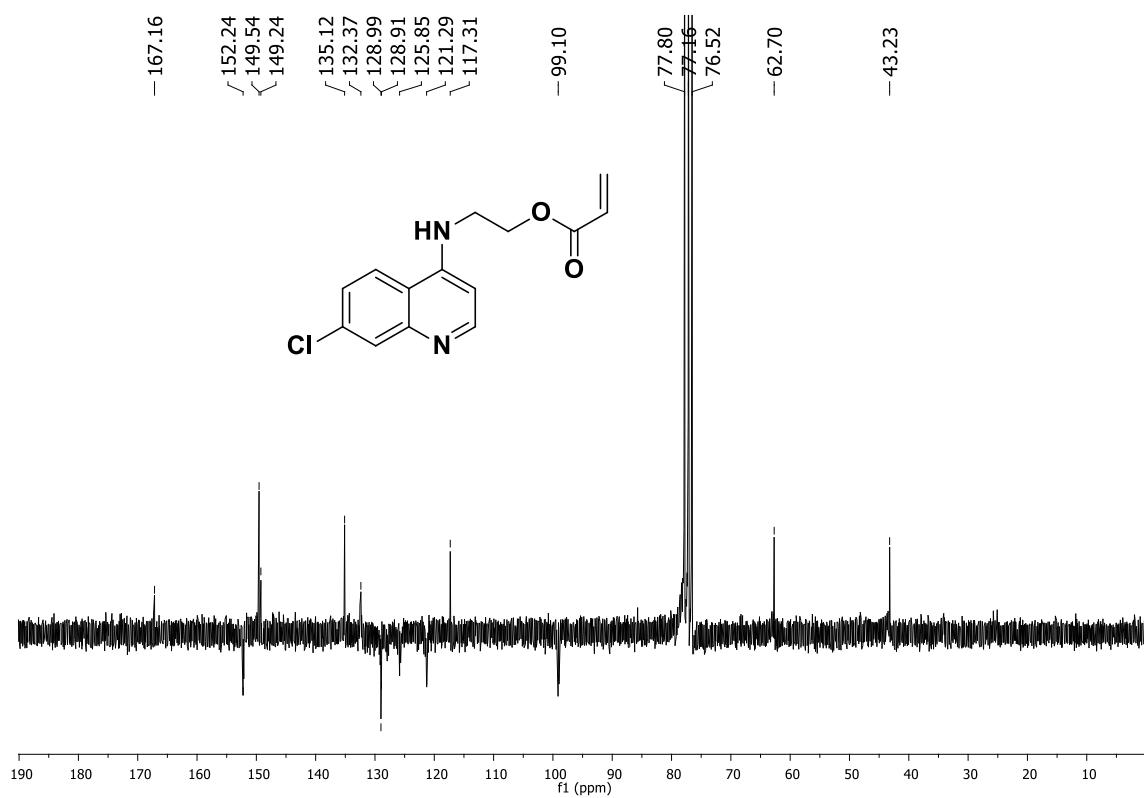
Espectro 18 – Espectro de Infravermelho do composto 9



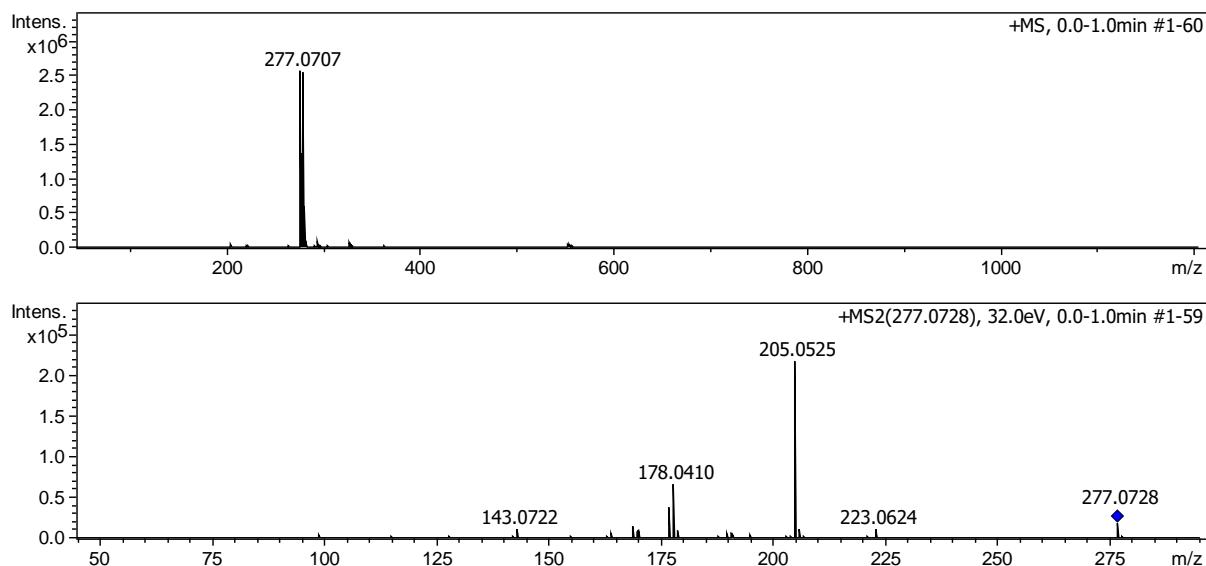
Espectro 19 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, CDCl_3) do composto 9



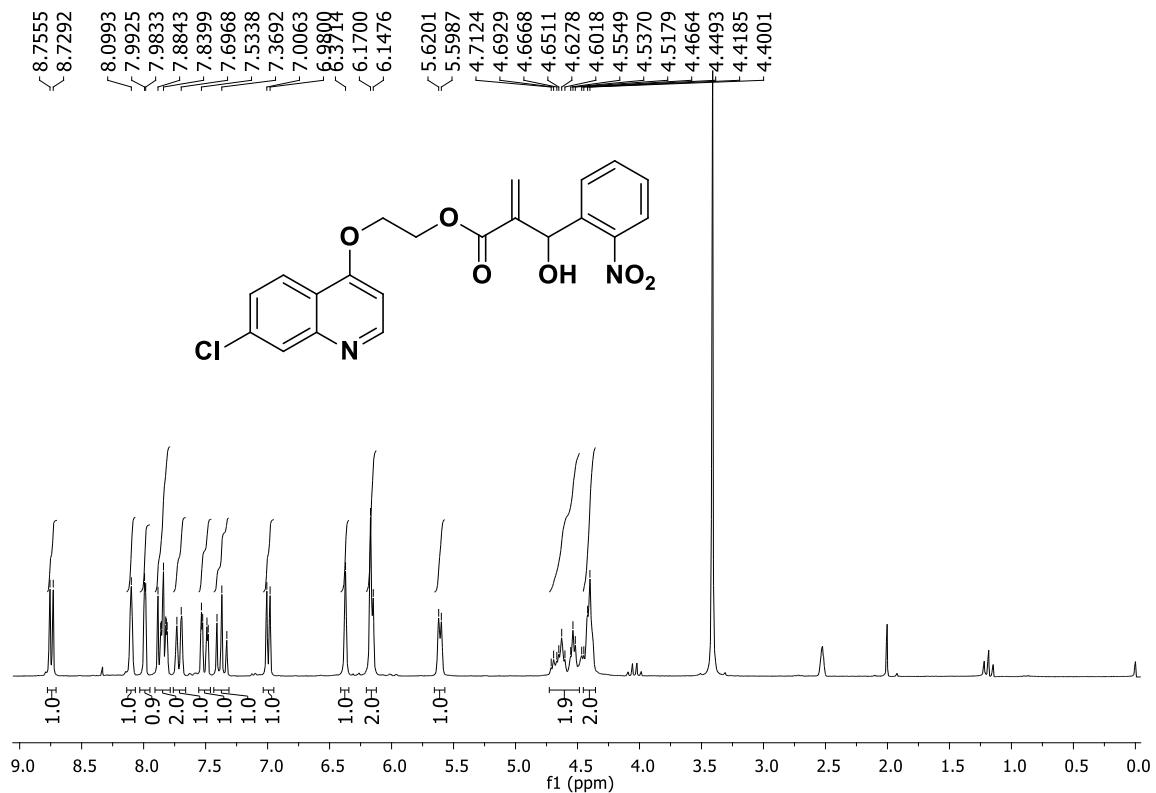
Espectro 20 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, CDCl_3) do composto 9



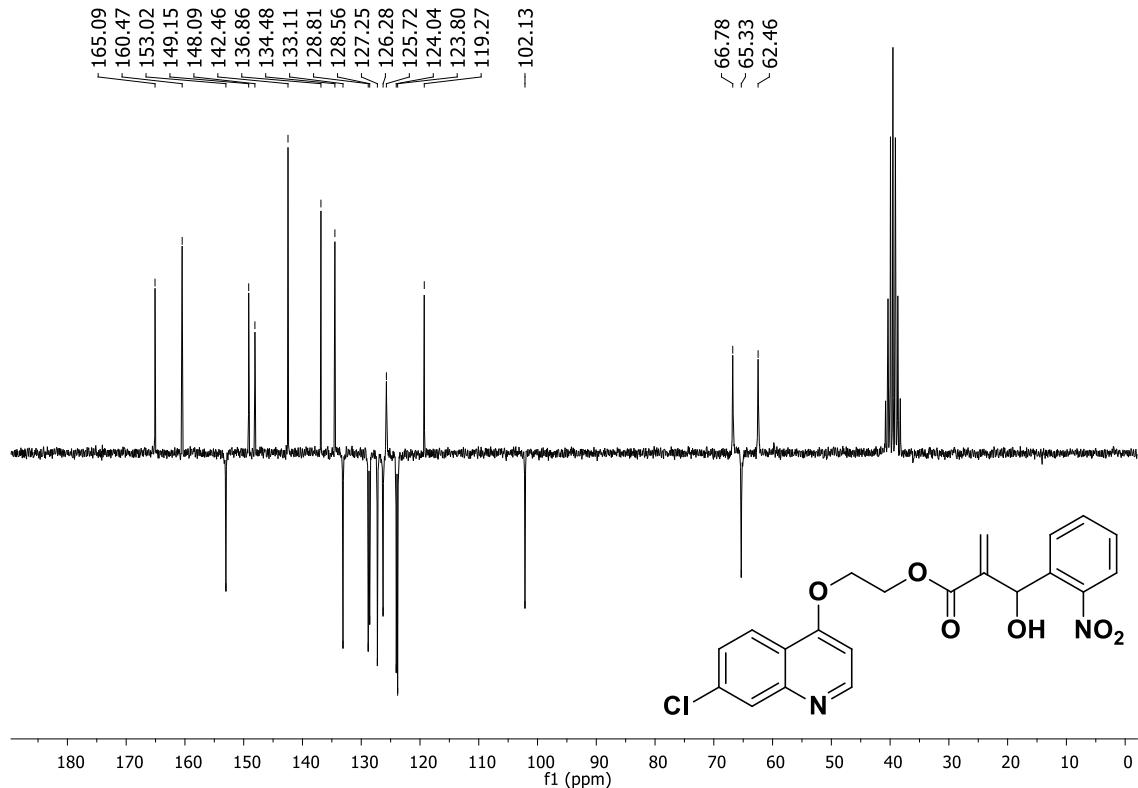
Espectro 21 – Espectro de massas de alta resolução do composto 8



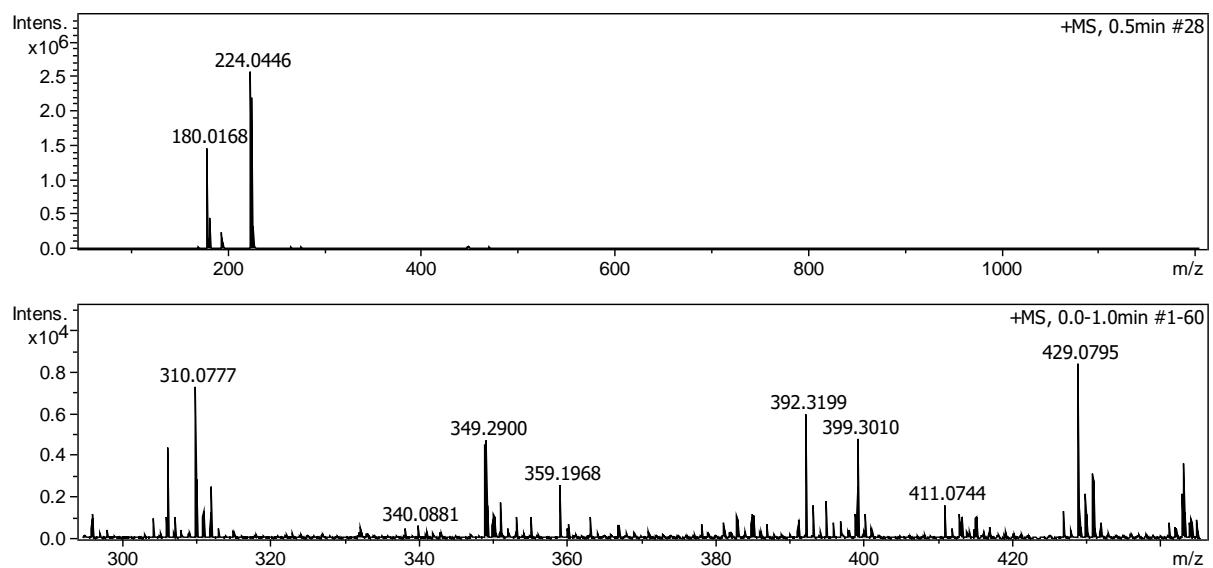
Espectro 22 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto **10a**



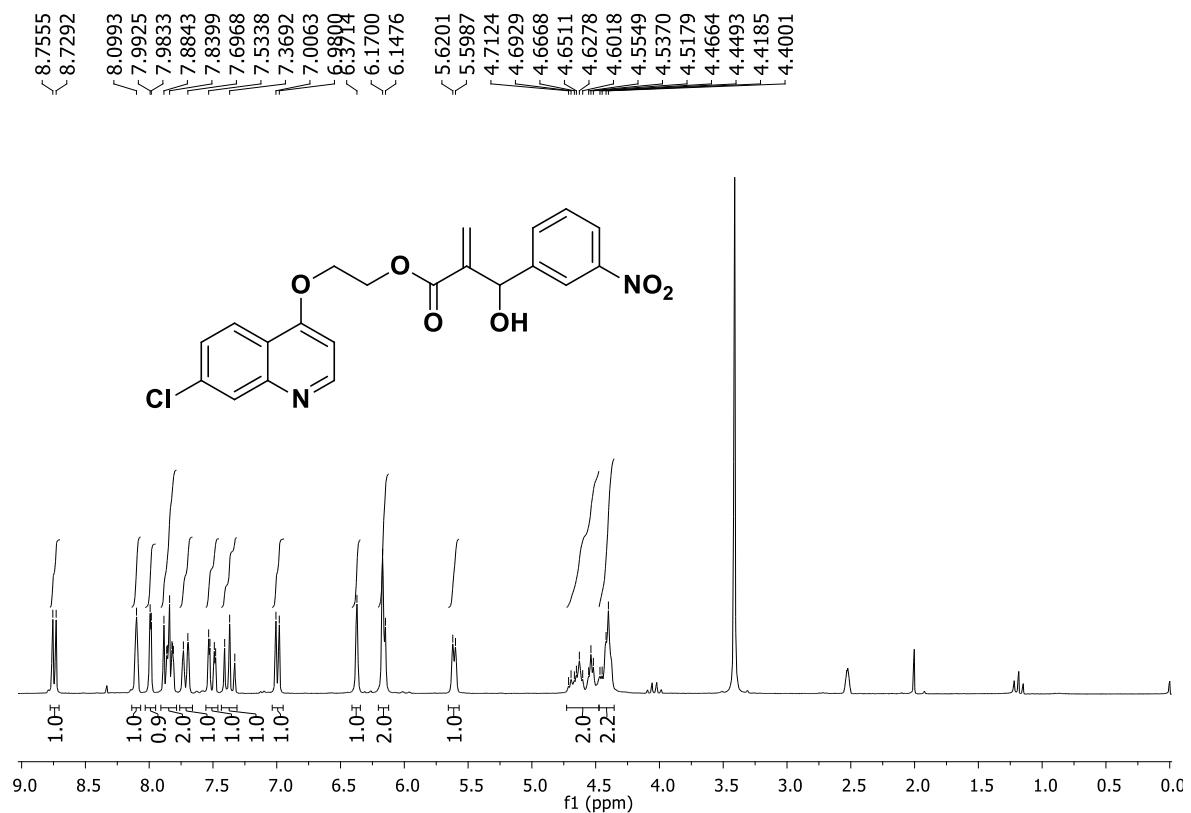
Espectro 23 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto 10a



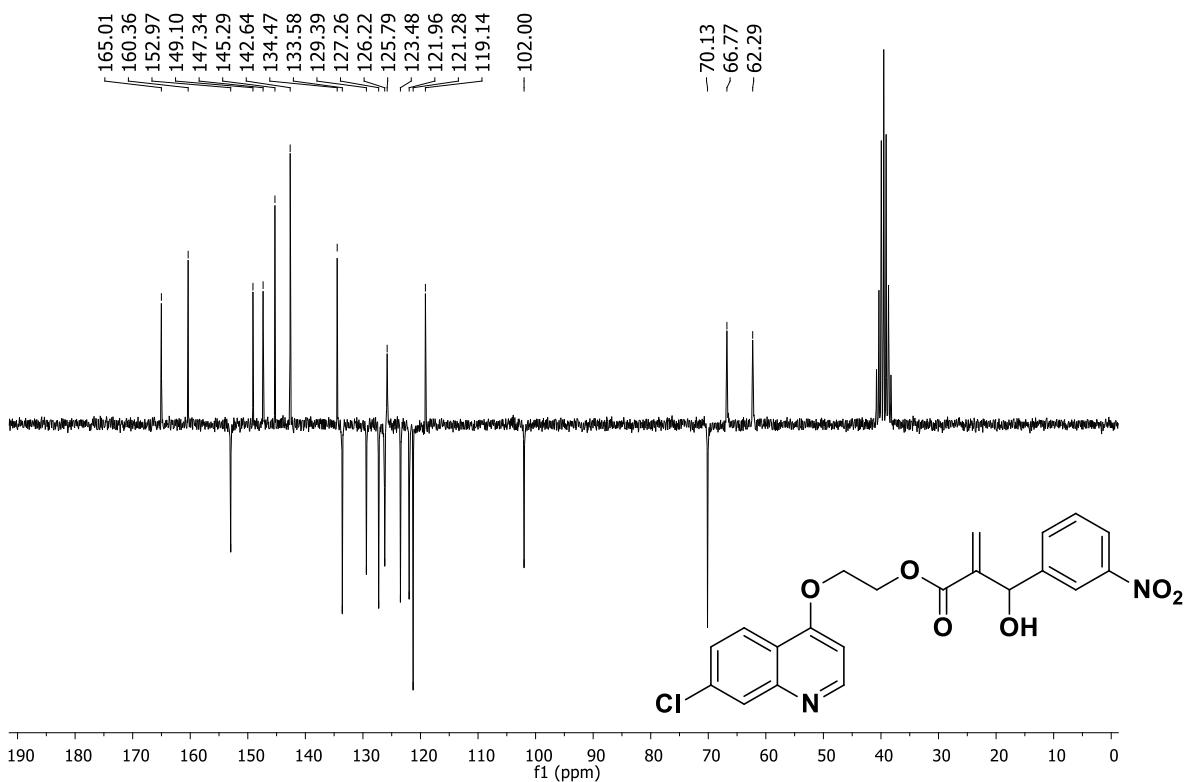
Espectro 24 – Espectro de massas de alta resolução do composto 10a



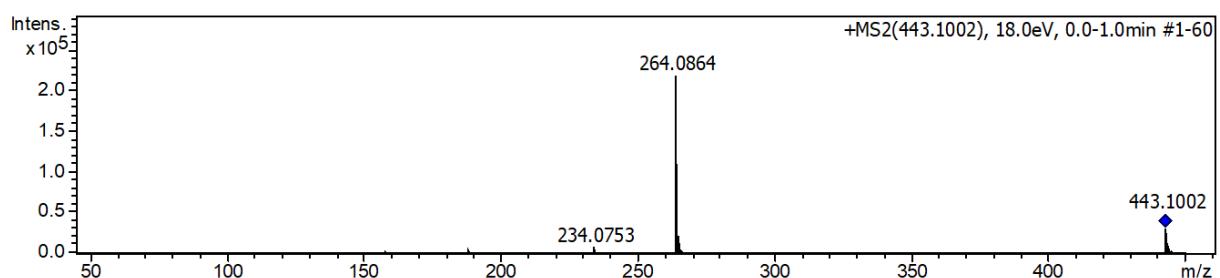
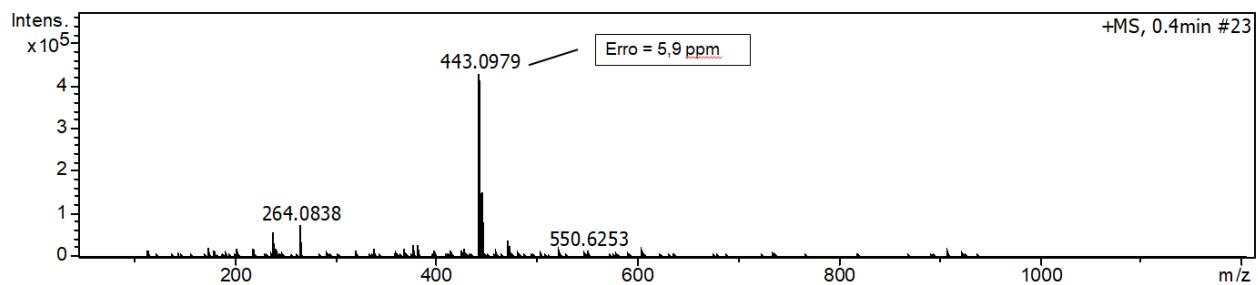
Espectro 25 – Espectro de RMN ^1H (200 Mhz, DMSO) do composto **10b**



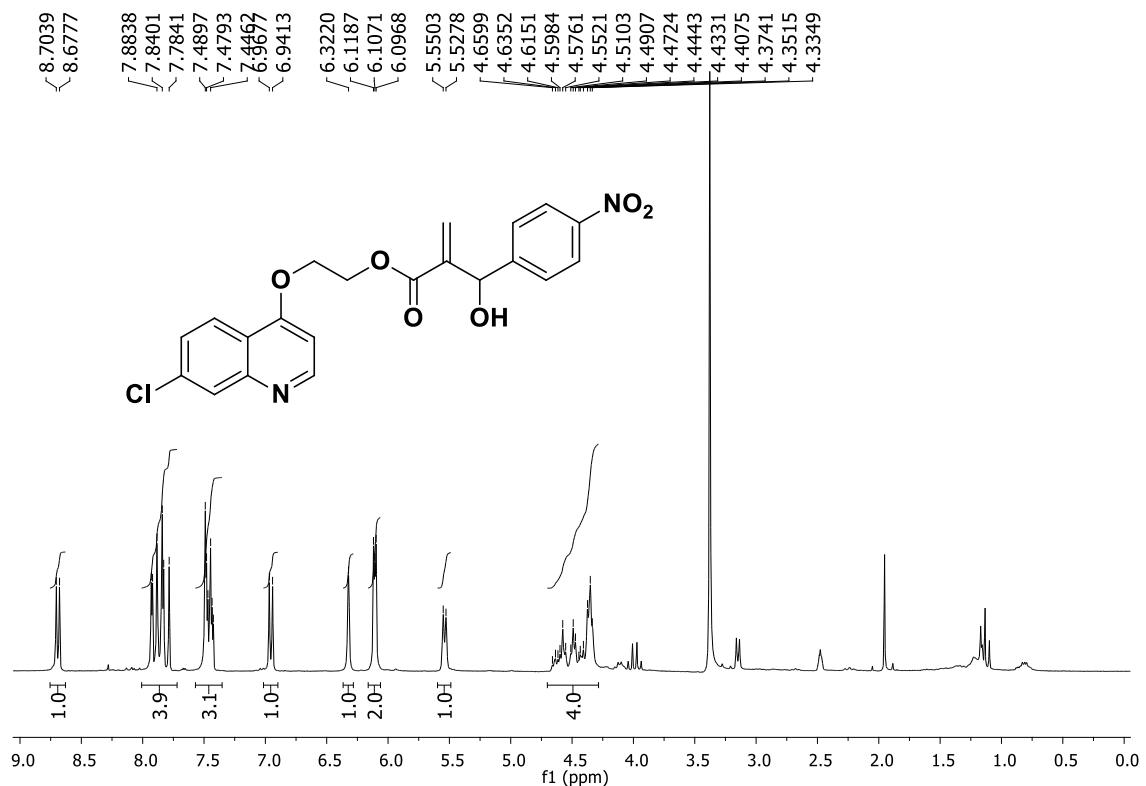
Espectro 26 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto **10b**



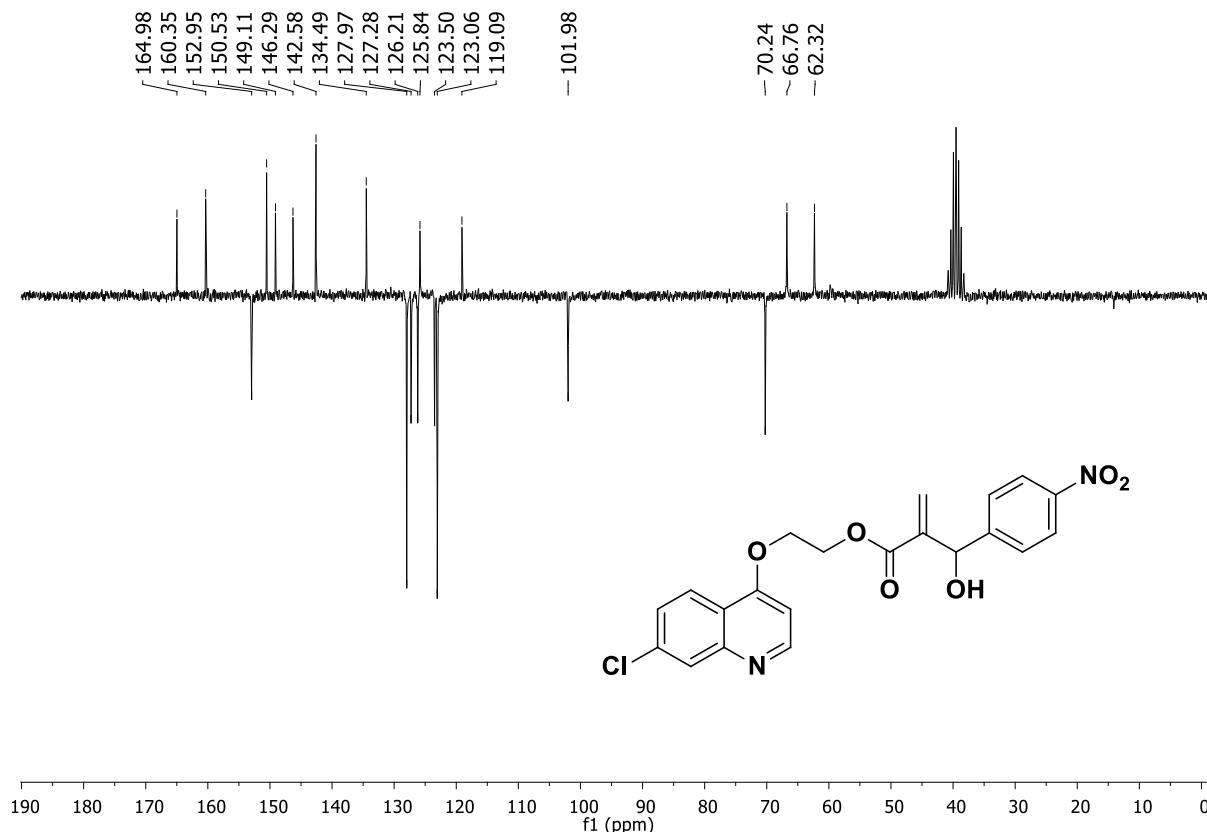
Espectro 27 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10b**



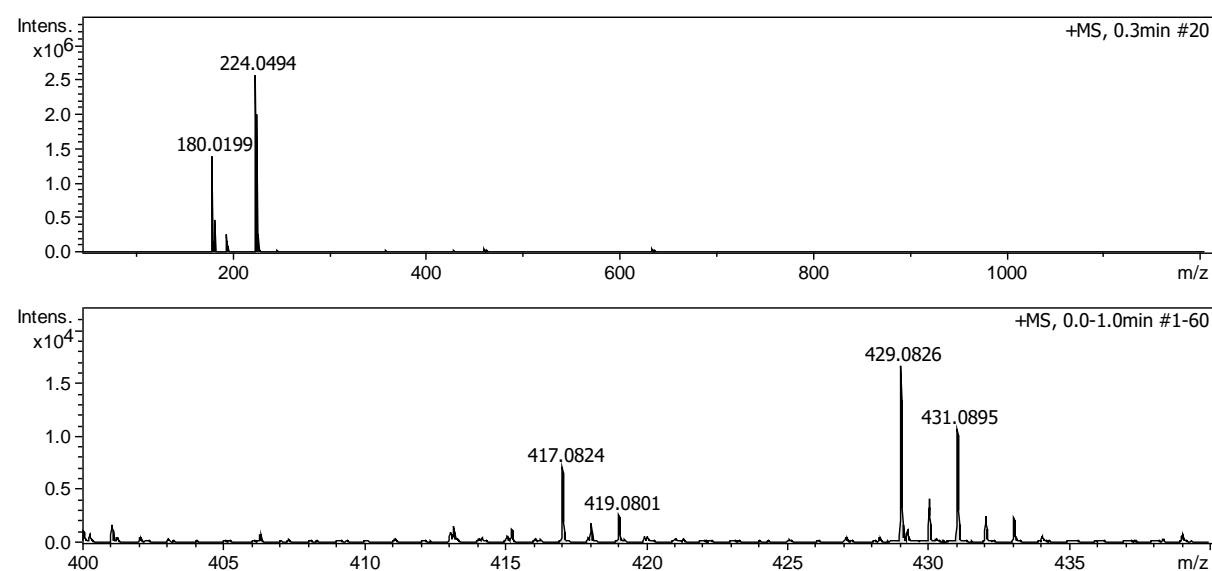
Espectro 28 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) do composto **10c**



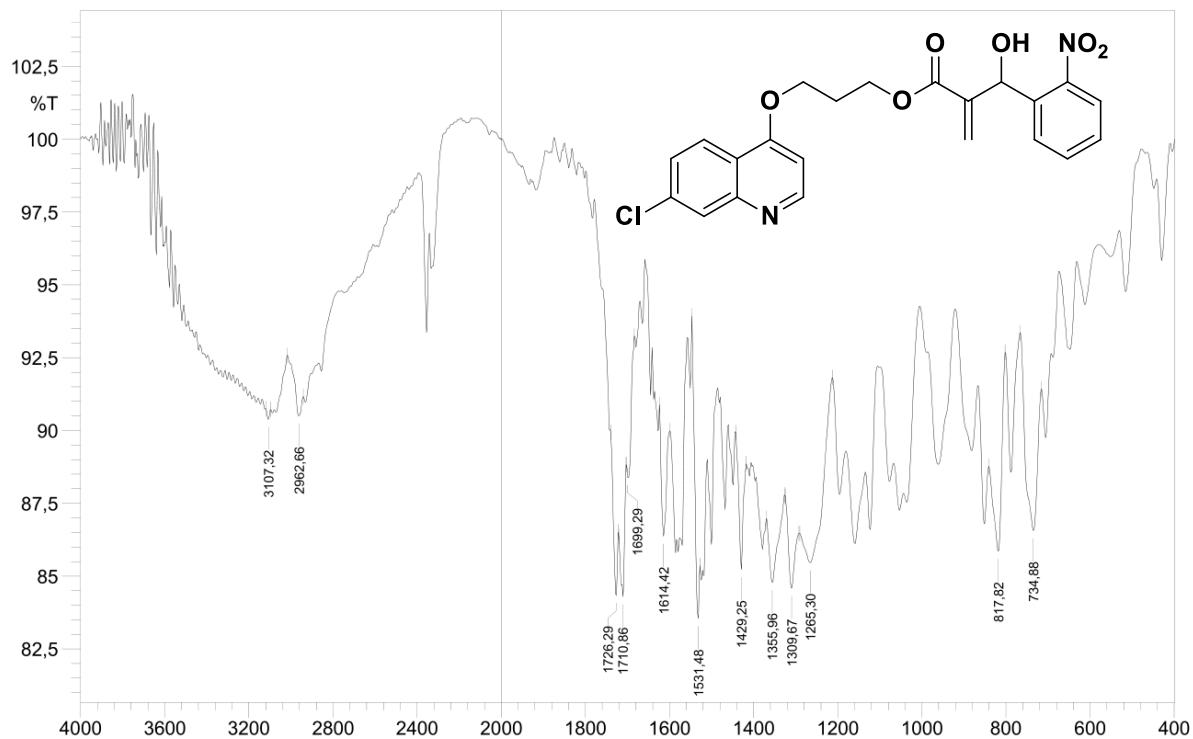
Espectro 29 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (50 Mhz, DMSO) do composto **10c**



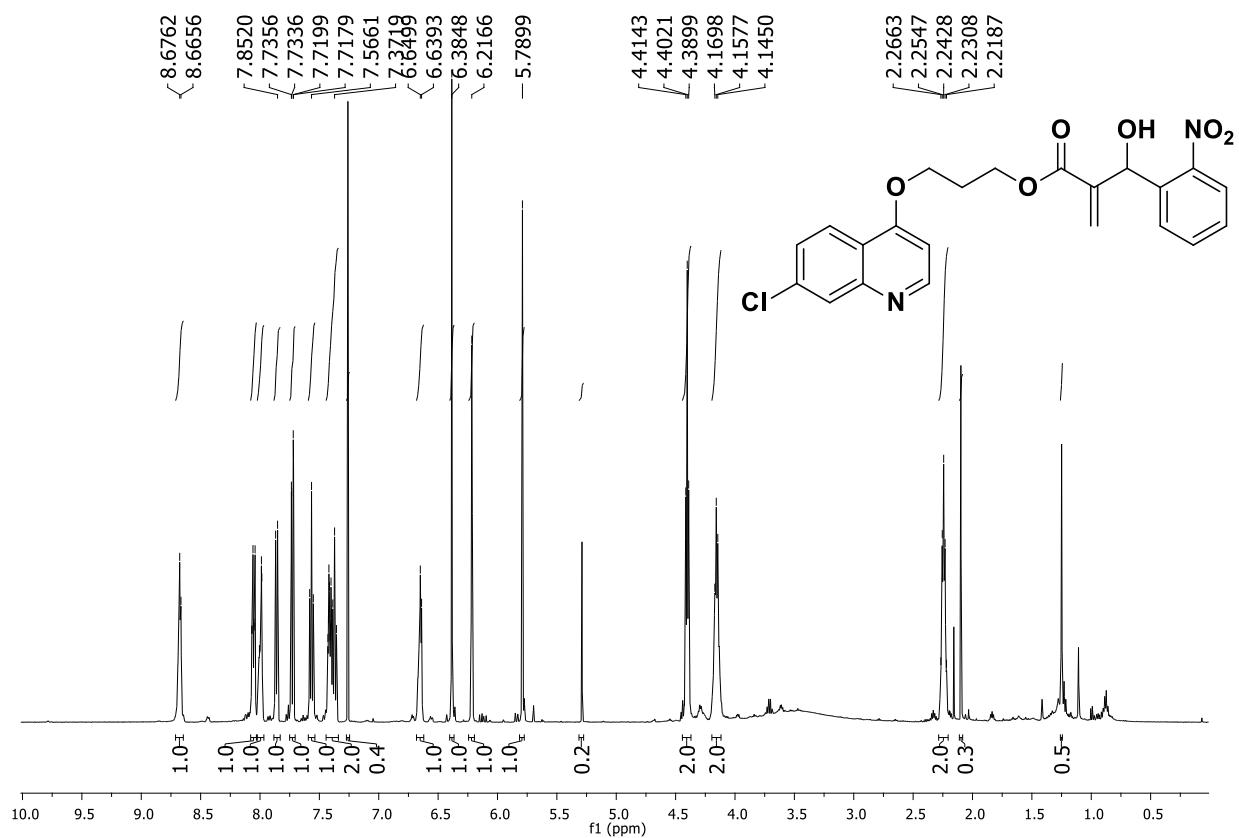
Espectro 30 – Espectro de massas de alta resolução do composto **10c**



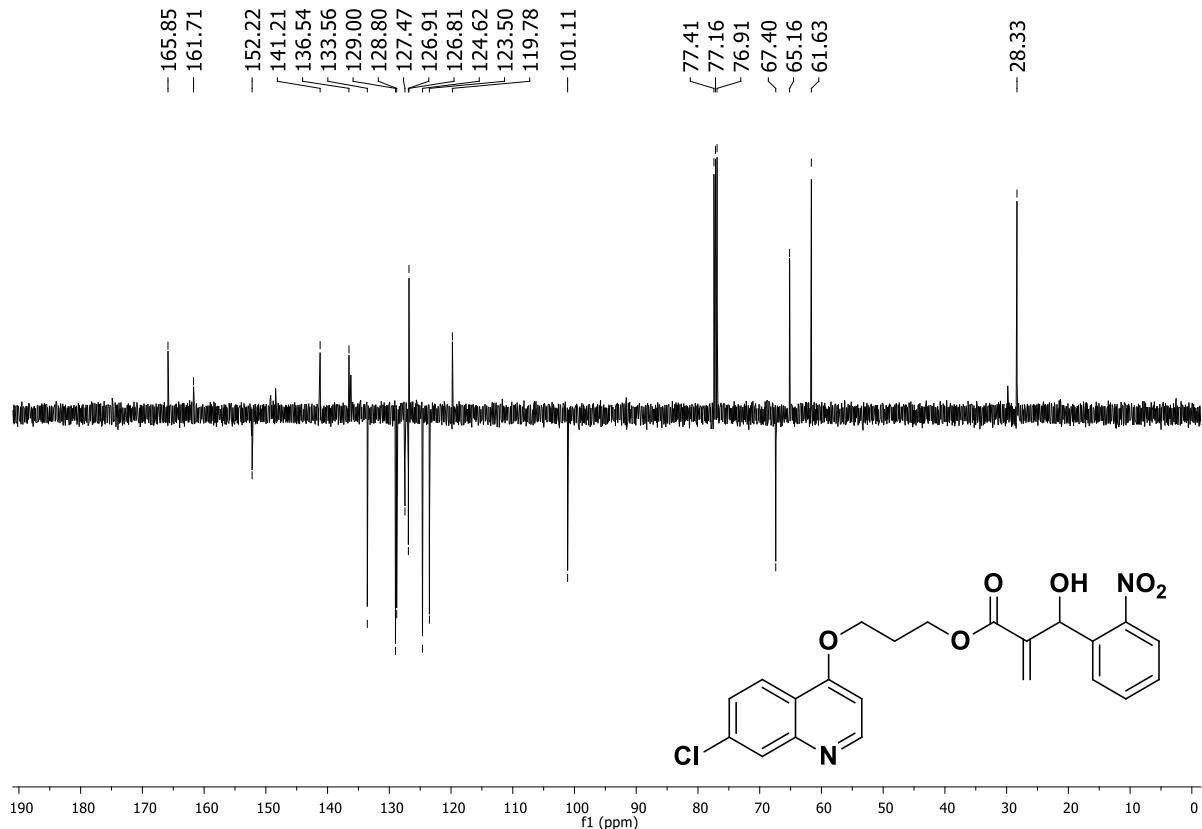
Espectro 31 – Espectro de Infravermelho do composto 11a



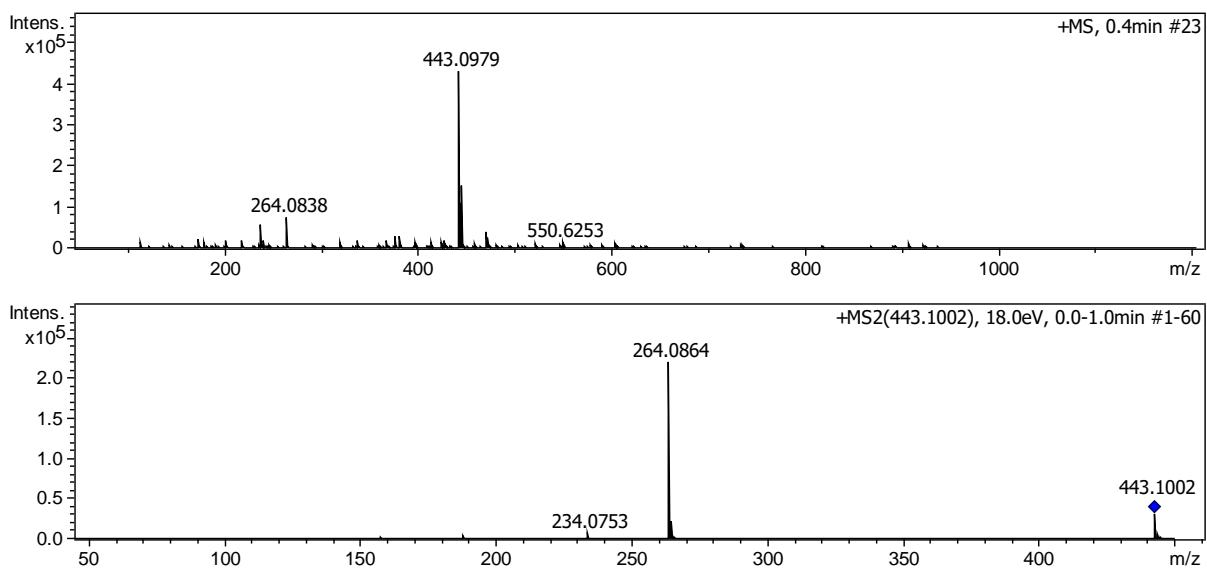
Espectro 32 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 11a



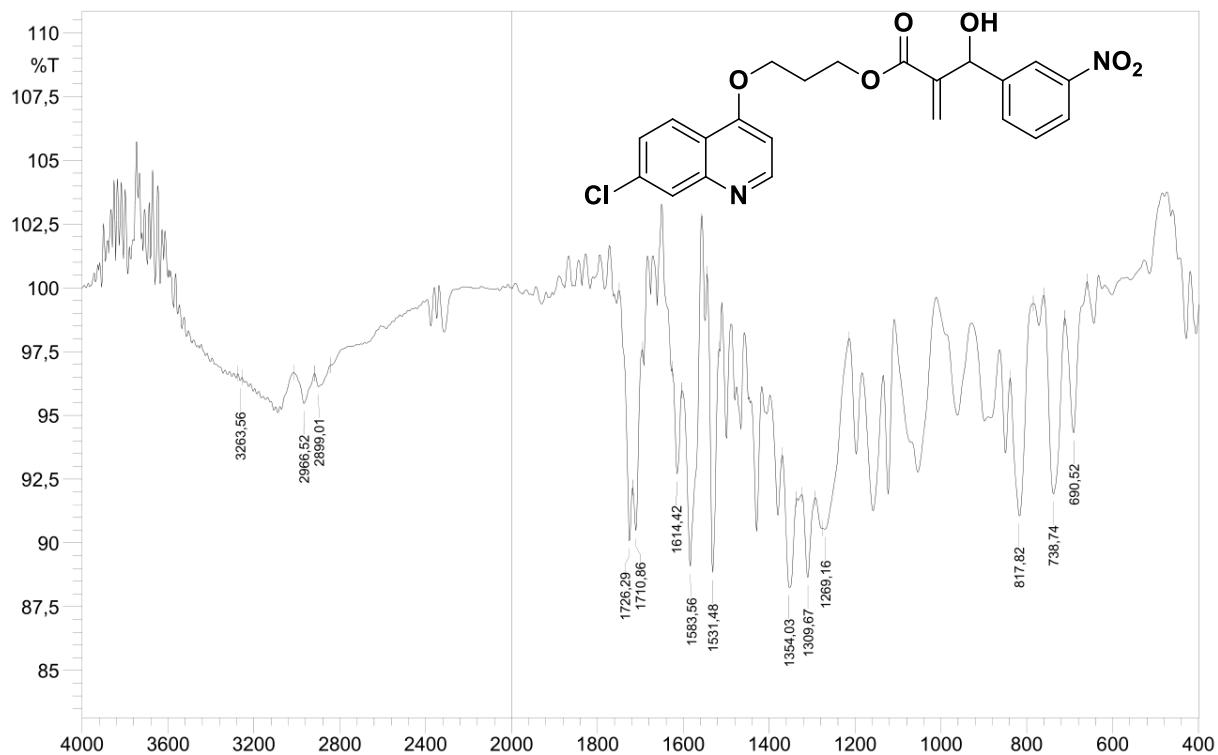
Espectro 33 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto **11a**



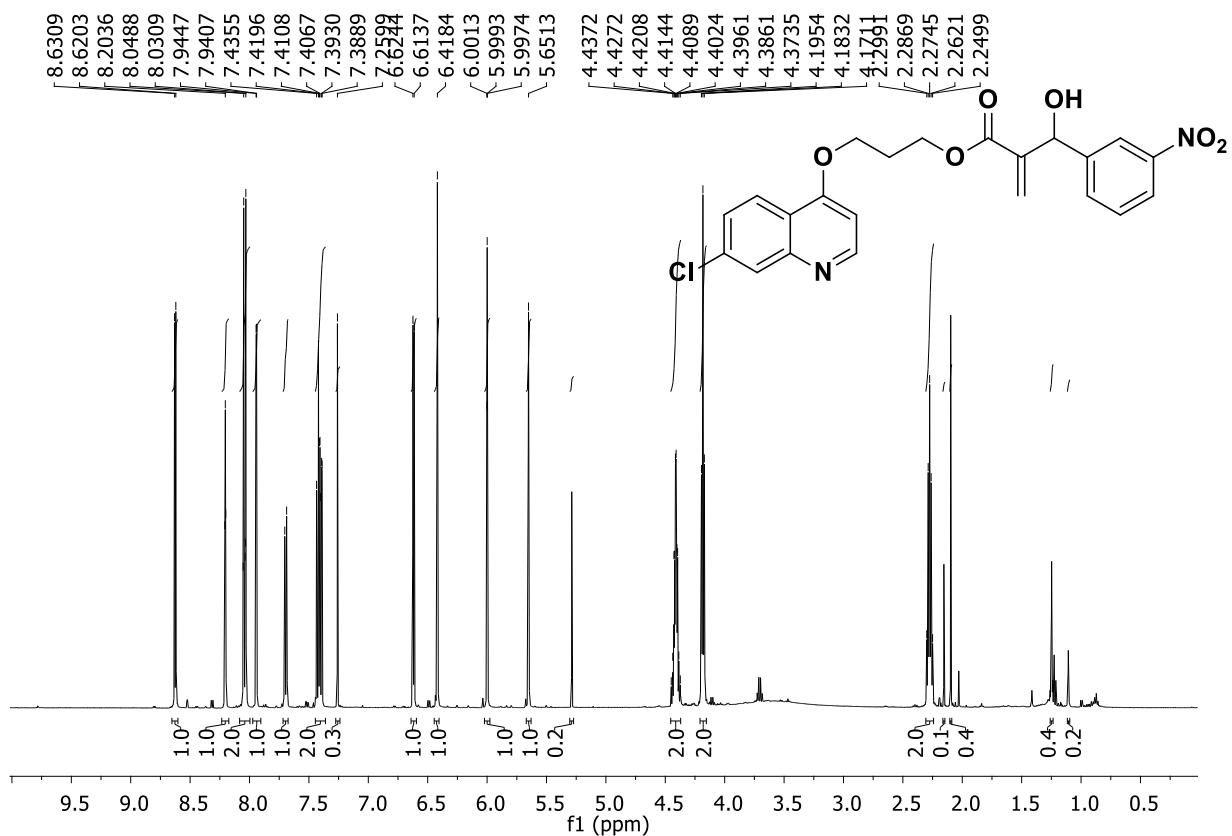
Espectro 34 – Espectro de massas de alta resolução do composto **11a**



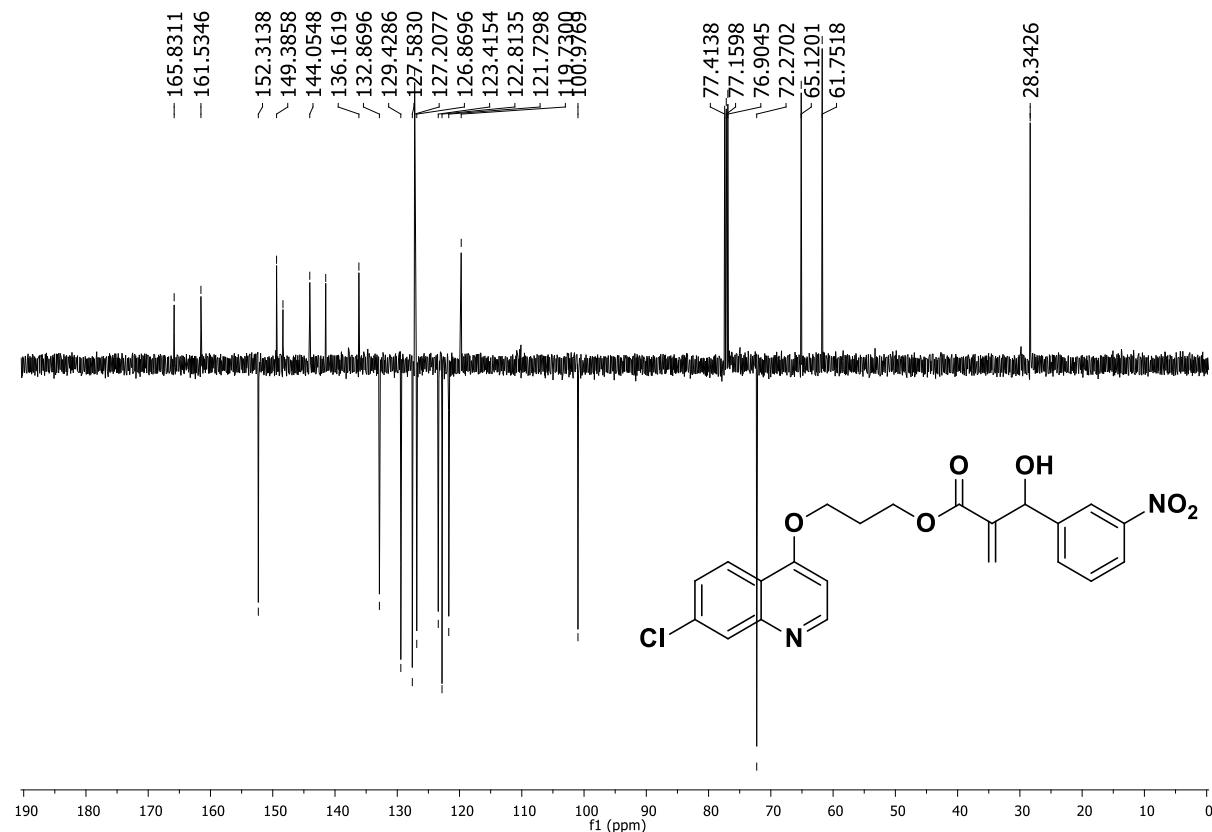
Espectro 35 – Espectro de Infravermelho do composto 11b



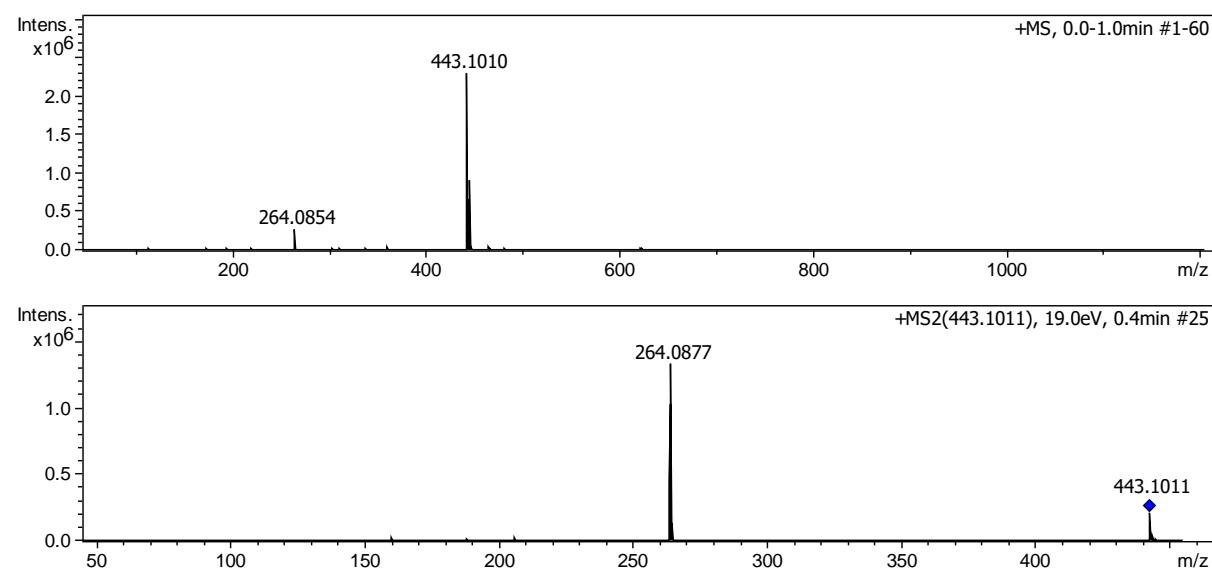
Espectro 36 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto **11b**



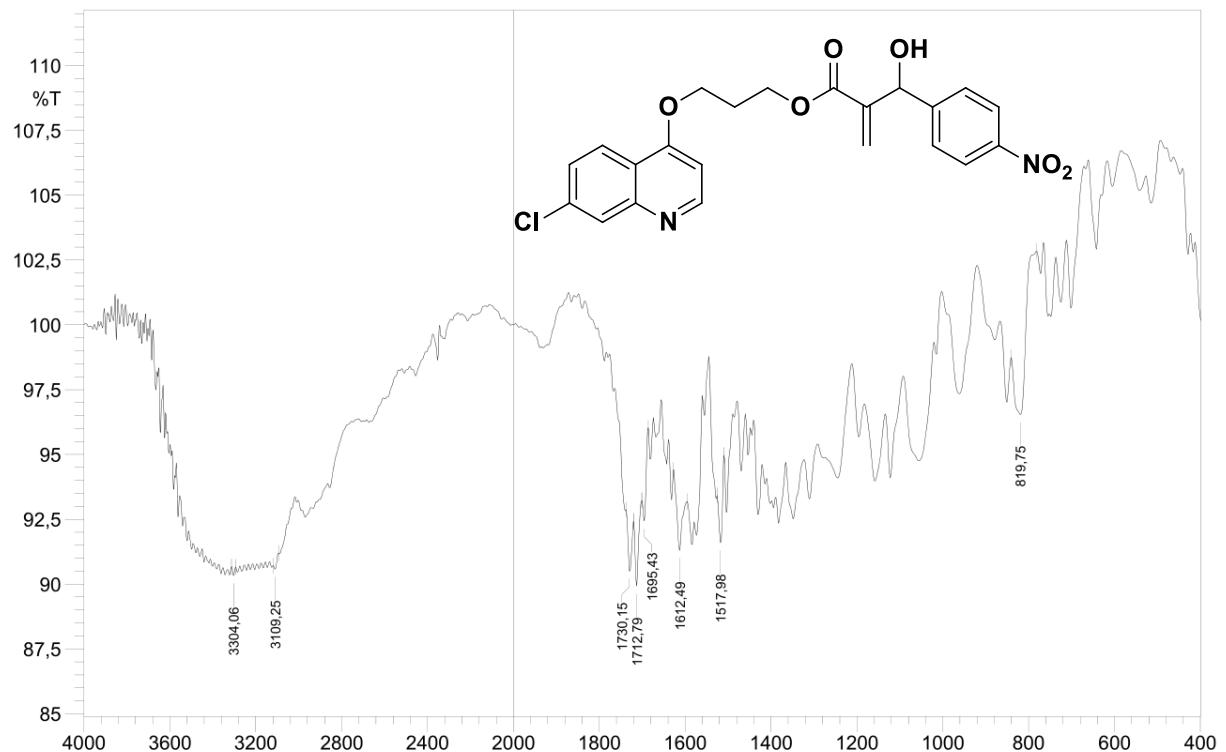
Espectro 37 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto **11b**



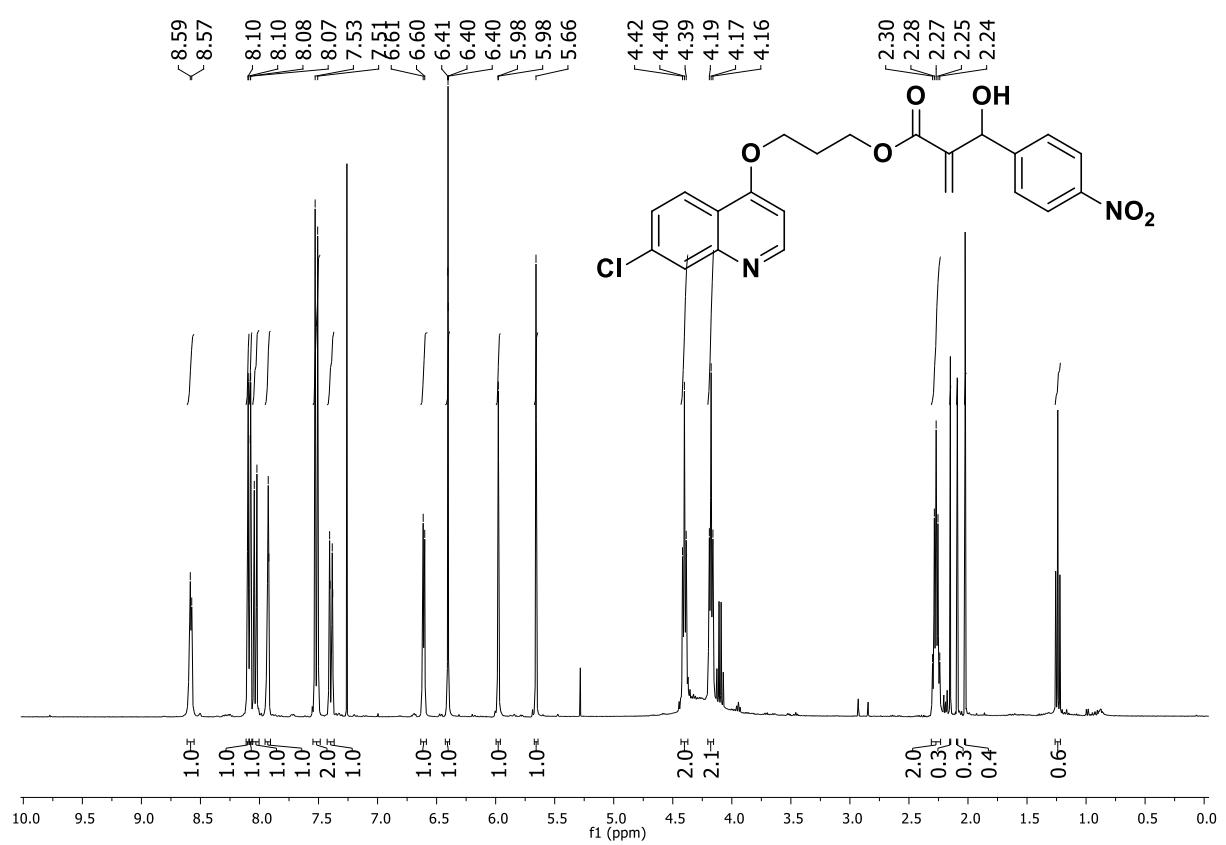
Espectro 38 – Espectro de massas de alta resolução do composto **11b**



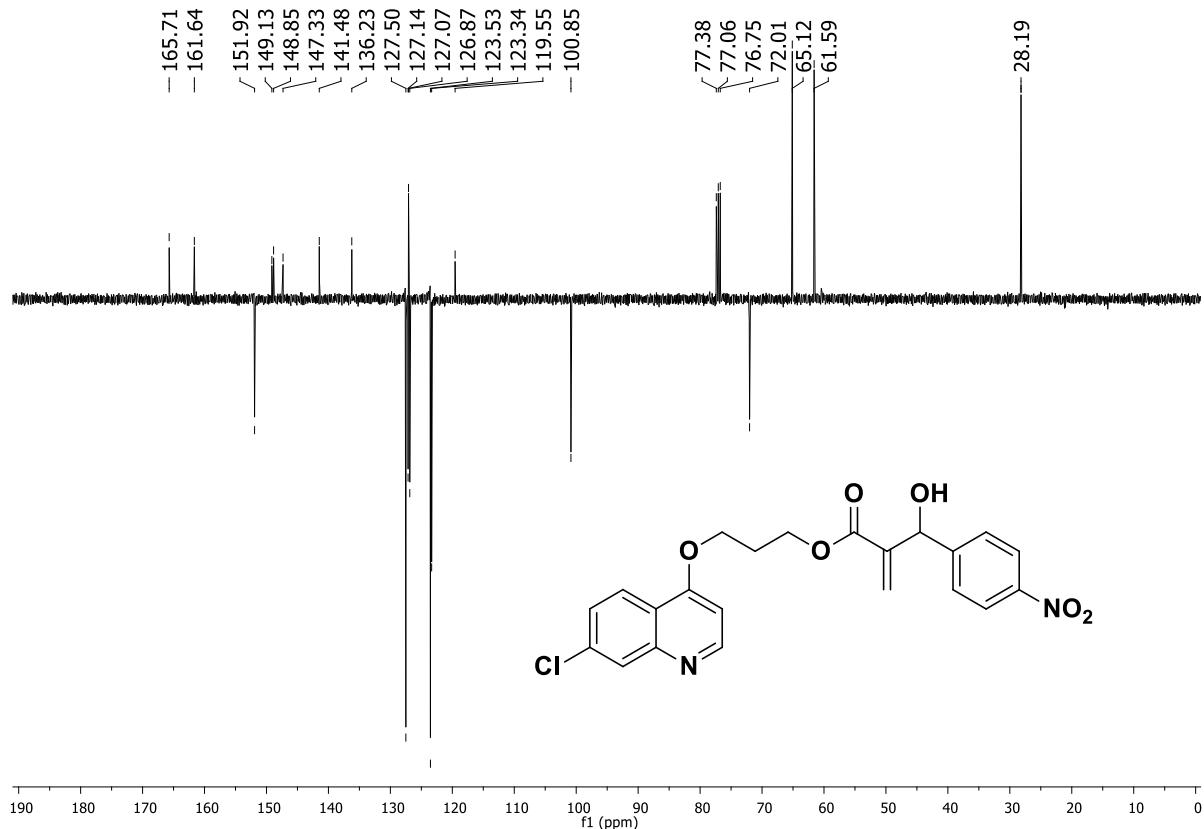
Espectro 39 – Espectro de Infravermelho do composto 11c



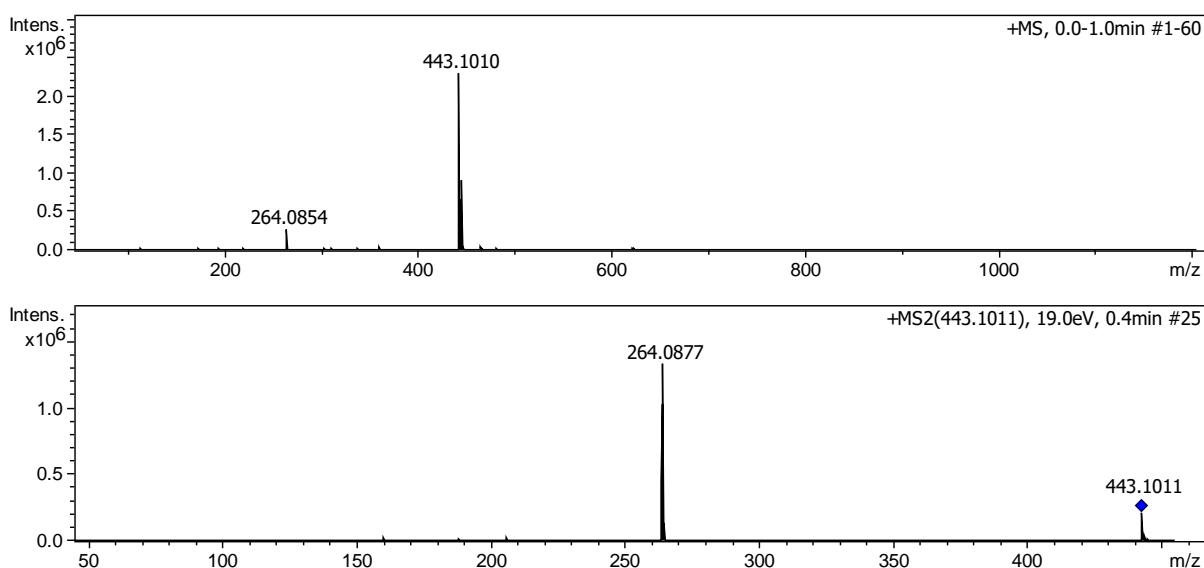
Espectro 40 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, CDCl_3) do composto 11c



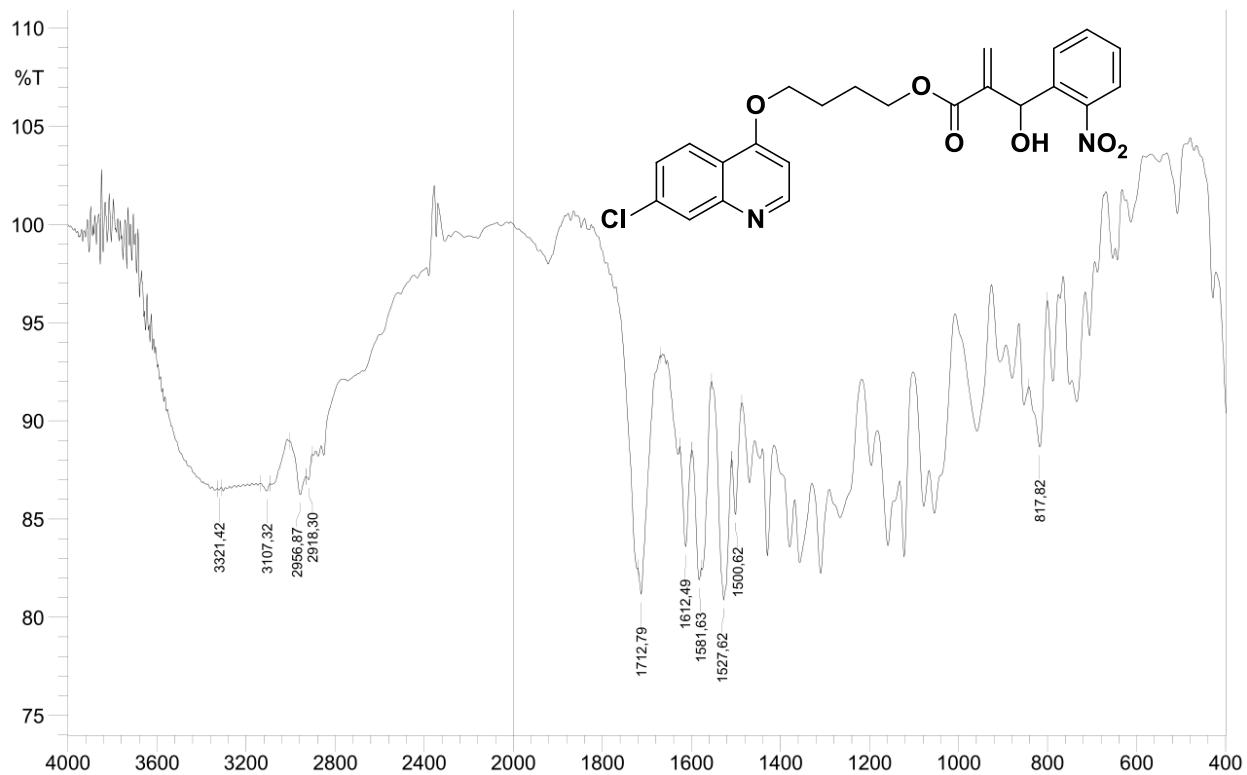
Espectro 41 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (101 Mhz, CDCl_3) do composto **11c**



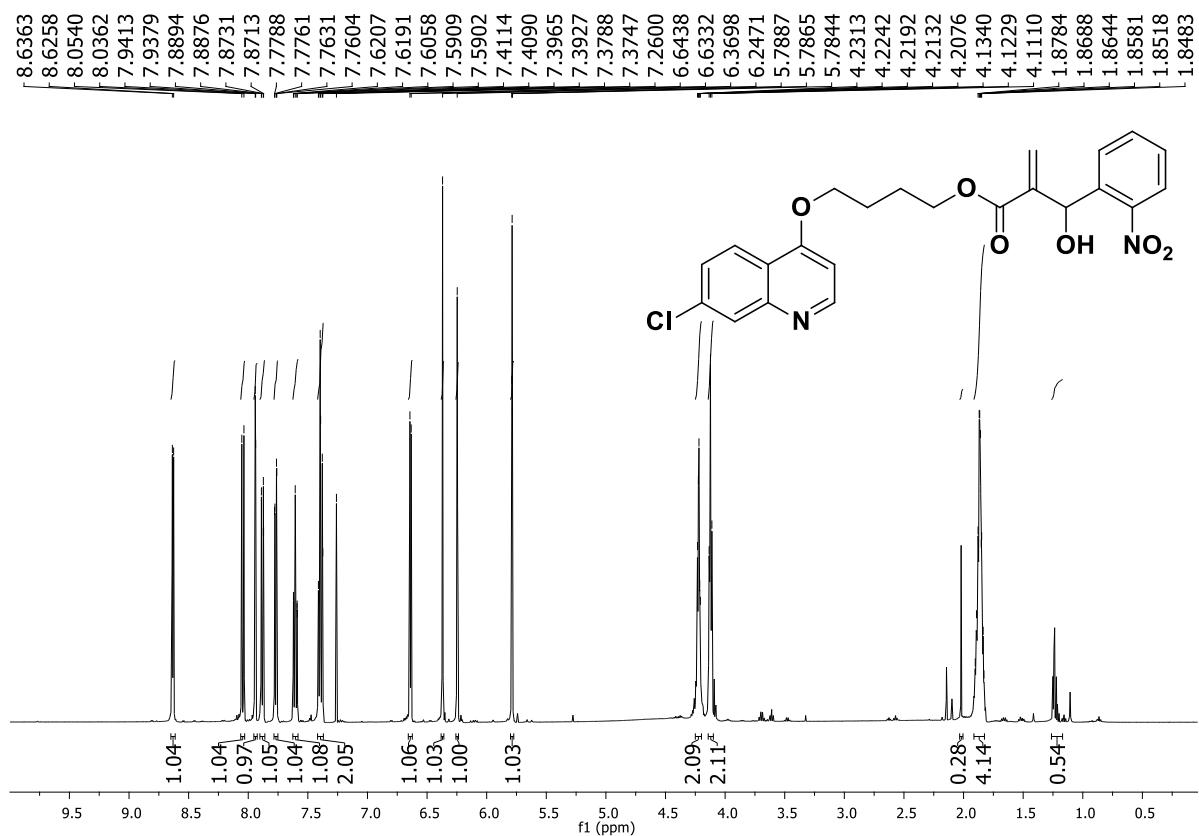
Espectro 42 – Espectro de massas de alta resolução do composto **11c**



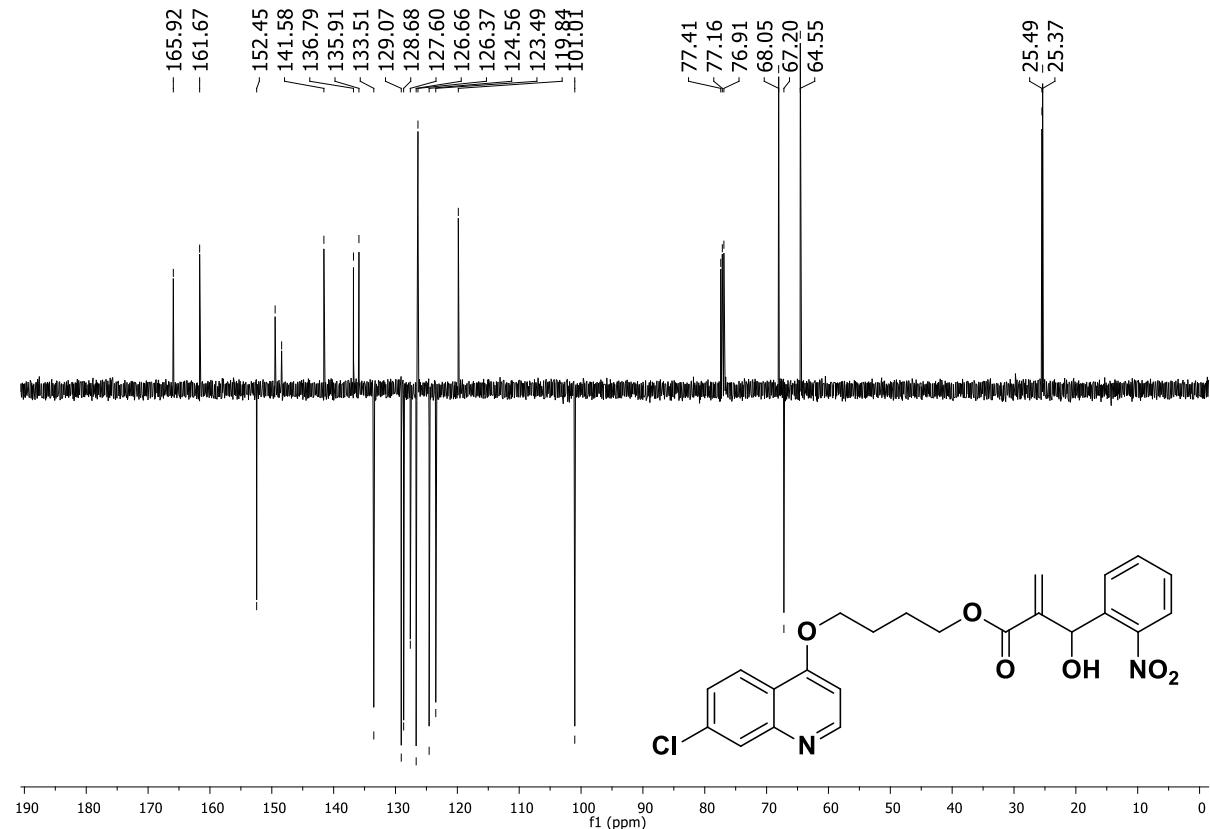
Espectro 43 – Espectro de Infravermelho do composto **12a**



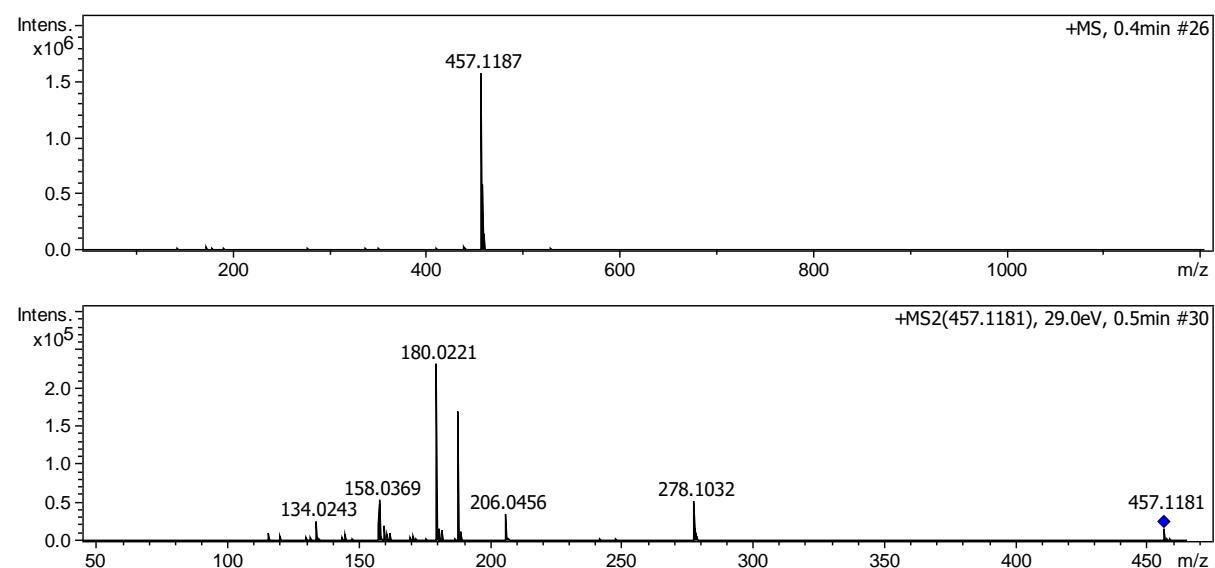
Espectro 44 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) do composto 12a



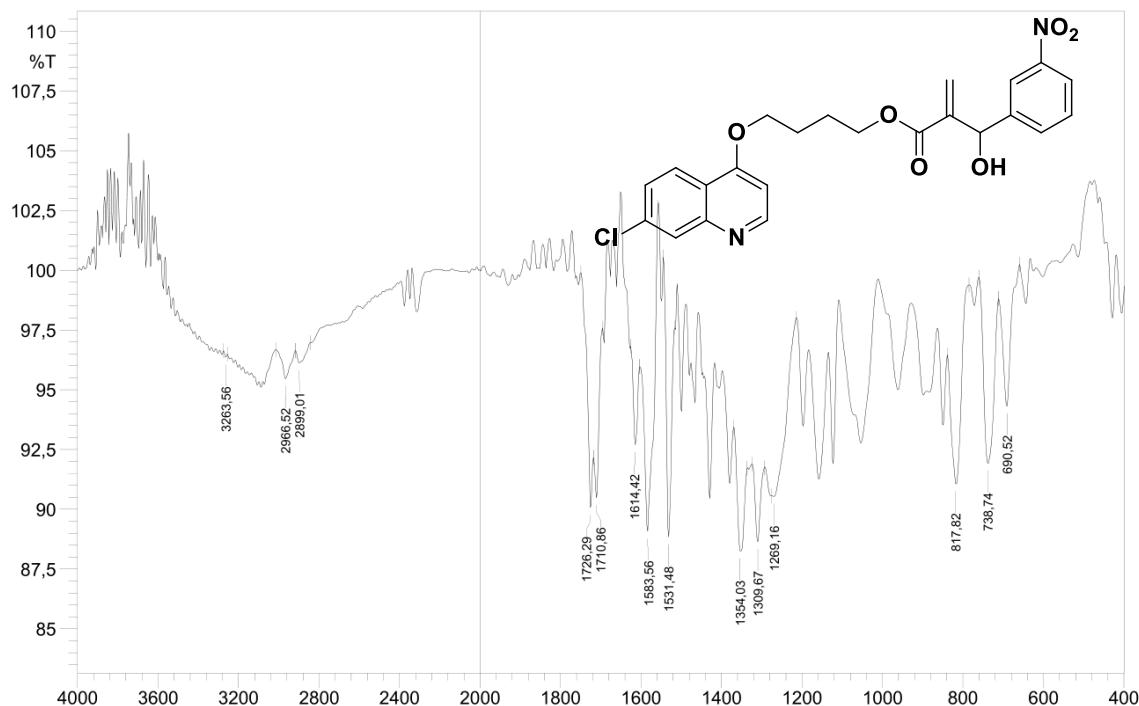
Espectro 45 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto **12a**



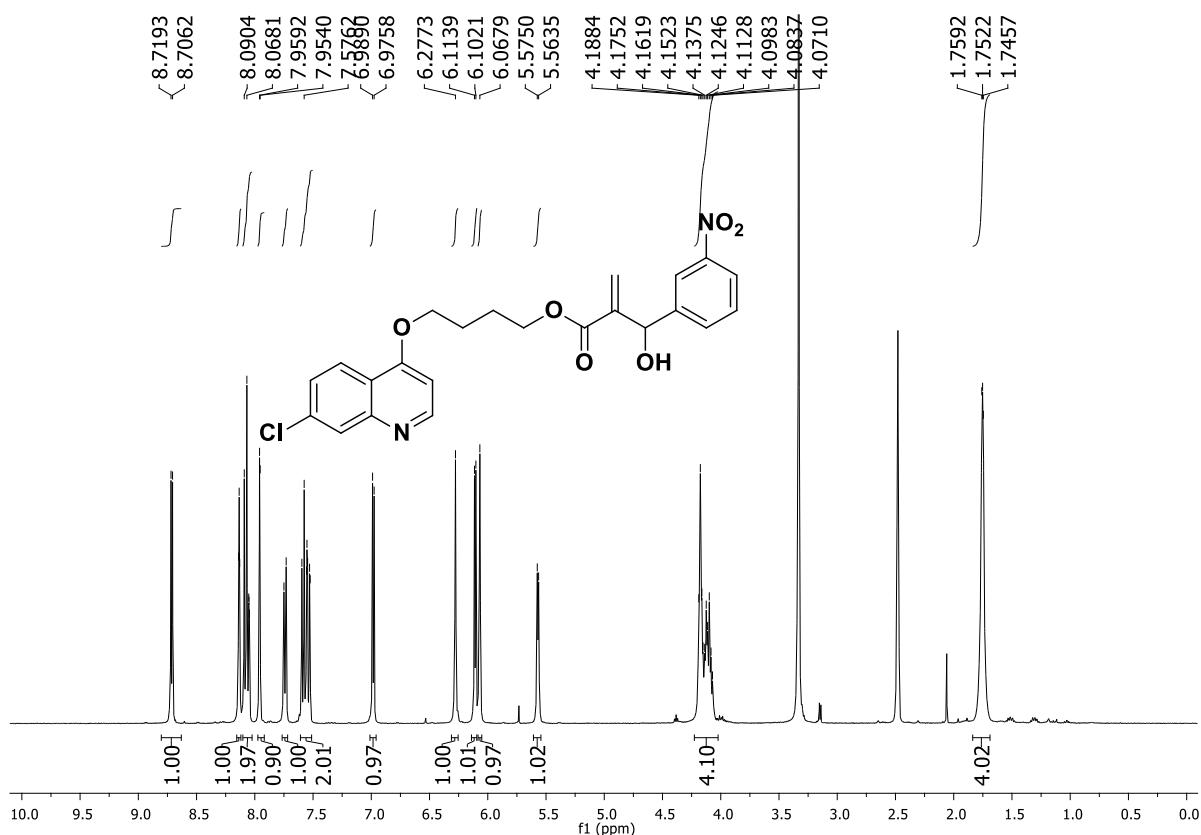
Espectro 46 – Espectro de massas de alta resolução do composto **12a**



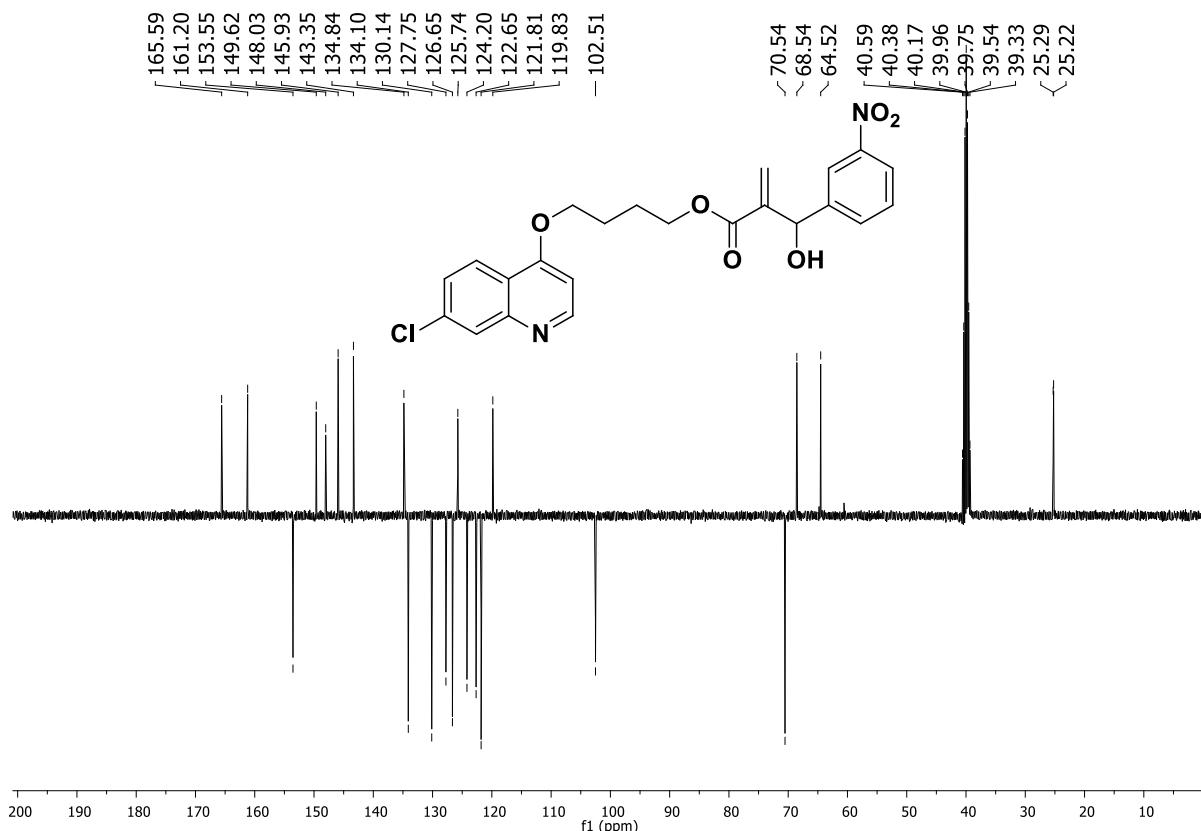
Espectro 47 – Espectro de Infravermelho do composto 12b



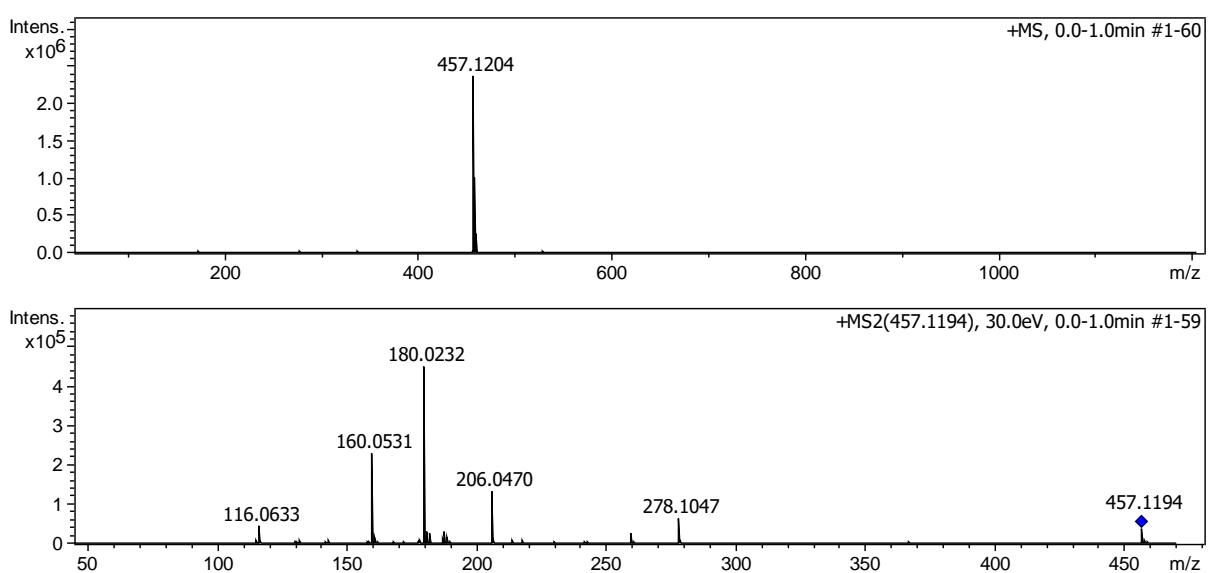
Espectro 48 – Espectro de RMN ^1H (400 Mhz, DMSO- d_6) do composto 12b



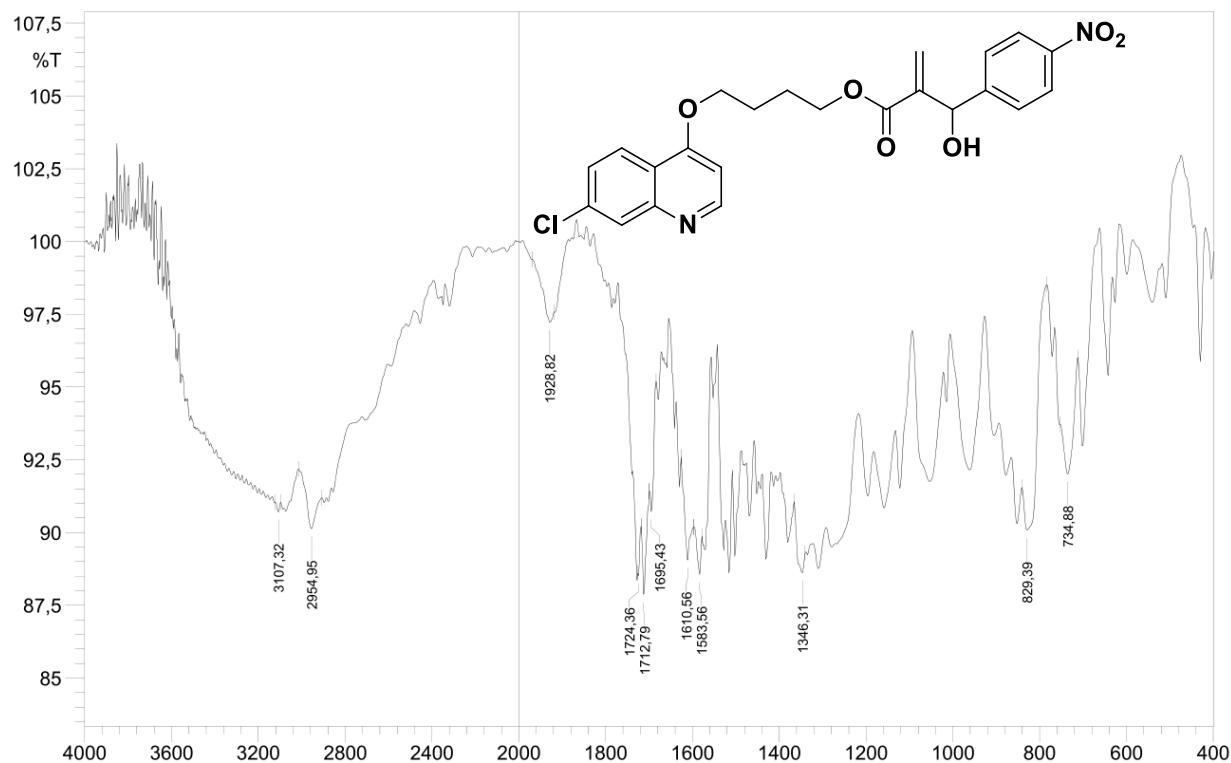
Espectro 49 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (101 Mhz, DMSO-d₆) do composto 12b



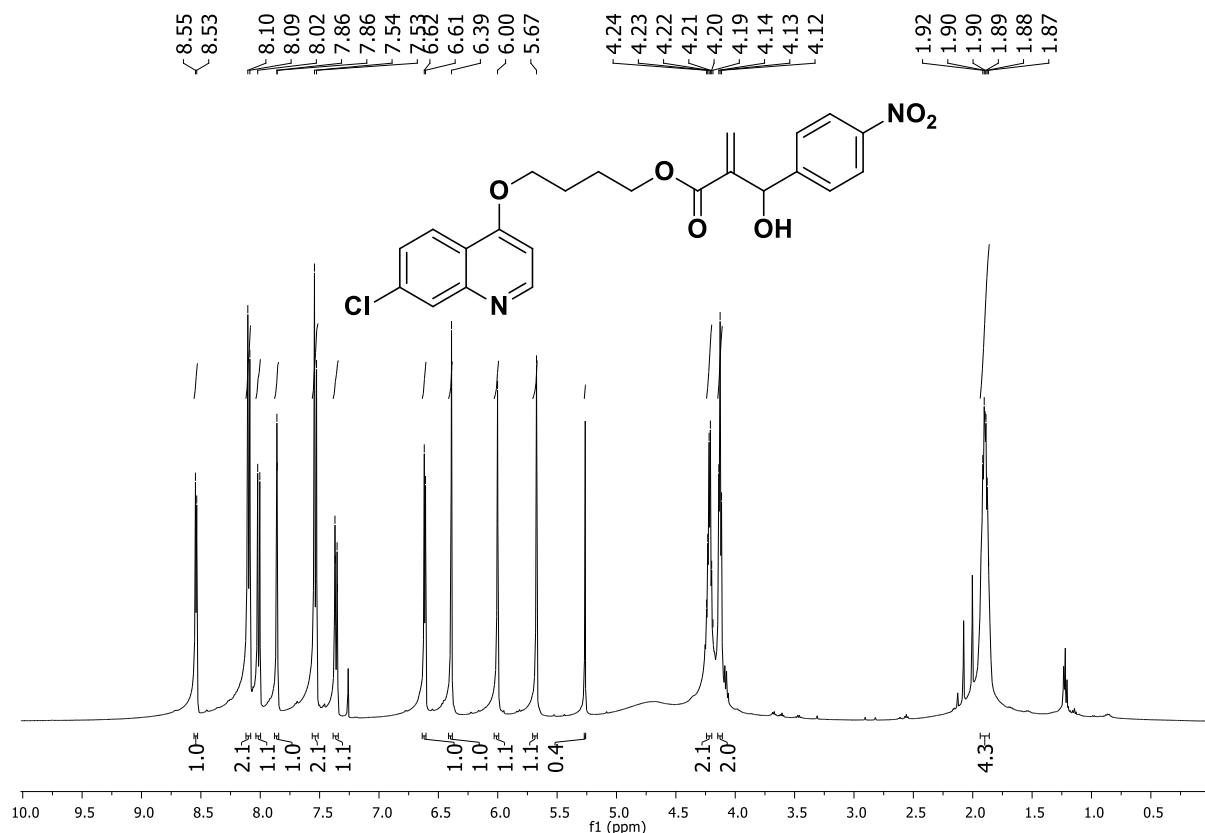
Espectro 50 – Espectro de massas de alta resolução do composto 12b



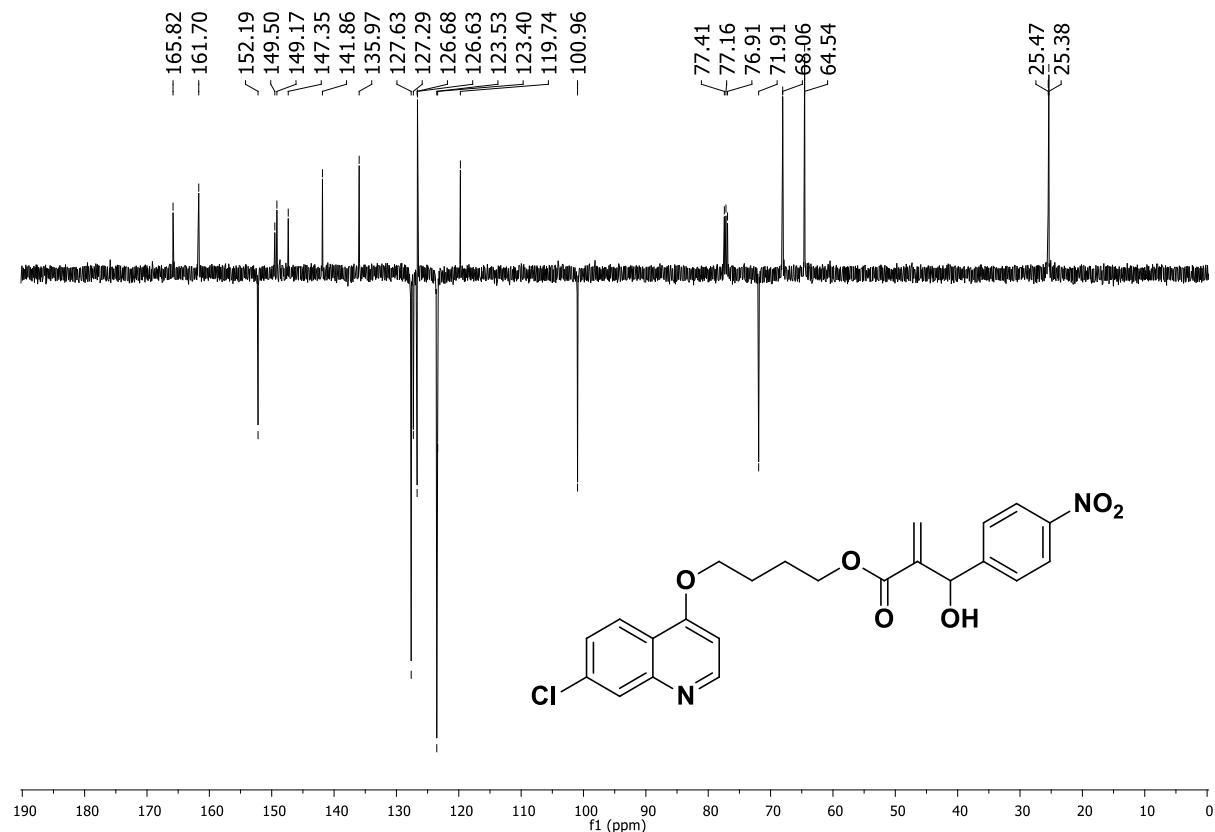
Espectro 51 – Espectro de Infravermelho do composto 12c



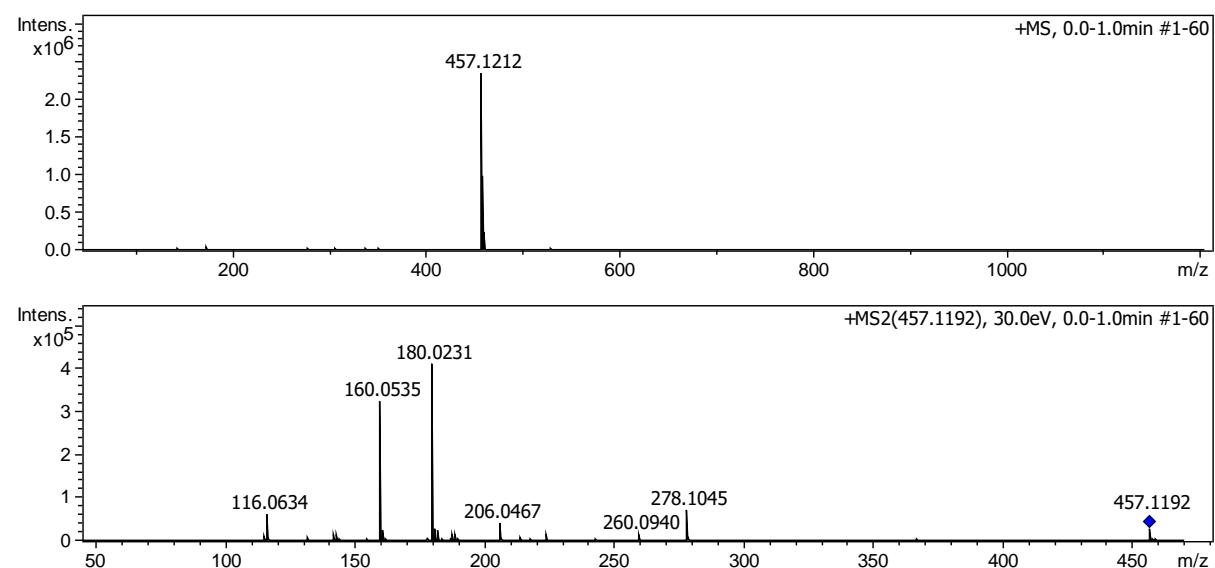
Espectro 52 – Espectro de RMN ^1H (500 Mhz, CDCl_3) do composto 12c



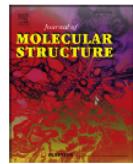
Espectro 53 – Espectro de RMN ^{13}C -APT (126 Mhz, CDCl_3) do composto **12c**



Espectro 54 – Espectro de massas de alta resolução do composto **12c**



Anexos



Synthesis and structural characterization by NMR and X-ray of new Morita-Baylis-Hillman adducts derived from 7-chloroquinoline



Guilherme da Silva Caleffi ^a, João Paulo Gomes de Oliveira ^a, Everton da Paz Silva ^a, Tayná Rodrigues Olegário ^a, Rhuan Karlos Santos Mendes ^a, Cláudio Gabriel Lima-Junior ^a, Fábio Pedrosa Lins Silva ^a, Felipe Terra Martins ^b, Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos ^{a,*}

^a Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Química, Campus I, Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), João Pessoa, PB, 58051-900, Brazil

^b Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, CP 131, 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 October 2016

Received in revised form

5 December 2016

Accepted 6 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Morita-Baylis-Hillman reaction

4,7-Dichloroquinoline

NMR

X-ray diffractometry

Potential antiprotozoal drugs

ABSTRACT

Herein we describe the design, synthesis and structural characterization by NMR and X-ray of new molecular hybrids **4a-4c** containing the nitroaromatic MBHA moiety and the 7-chloroquinoline pharmacophores, linked by an aliphatic spacer as a model for antiprotozoal drugs. Firstly, the 4,7-dichloroquinoline (7) reacted with excess of ethylene glycol, through a SNAr promoted by *t*-BuOK, to prepare the 2-(7-chloroquinolin-4-yloxy)ethanol (6) in 98% isolated yield. Then, the novel 2-(7-chloroquinolin-4-yloxy) ethyl acrylate (5) was synthesized in 78% isolated yield by reacting the alcohol (6) with acryloyl chloride and TEA in CH_2Cl_2 . Finally, this acrylate (5) reacted with *o*-nitrobenzaldehyde, *m*-nitrobenzaldehyde and *p*-nitrobenzaldehyde through Morita-Baylis-Hillman reactions promoted by DABCO at room temperature, using *t*-BuOH:Water (9:1) as solvent, to afford the new hybrids **4a-4c** in 73–76% isolated yields. Three-dimensional structures were characterized in both monomeric and intermolecular packing by X-Ray experiments.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neglected Tropical Diseases (NTDs) (e.g. Leishmaniasis, Chagas disease, human African trypanosomiasis) are protozoal infections that pose a great threat to the health of populations inhabiting the tropical and subtropical regions of the world. These infections affect the physical and intellectual development of children, reduce worker productivity, and are responsible for the deaths of hundreds of thousands of people annually. In general, the drugs available for the treatment of these diseases show a limited efficiency due to the development of resistance, high toxicity and poor patient compliance. Furthermore, the pharmaceutical industries have shown a lack of interest in developing new drugs for protozoal infections since the prospects of financial return on the investments are too low in this area [1–3]. Therefore, there is a great demand for new and efficient antiprotozoal drugs that are capable of improving the

life quality of these populations.

Over the years, it has seen the emergence of drug resistance regardless the efficacy of each drug when introduced. Thus, the drug discovery efforts are increasingly driven to the rational design of multitarget drugs through the molecular hybridization strategy. The hybrid molecules can exert dual or multiple actions depending of the different pharmacophoric units linked into a single chemical entity. Moreover, the potential advantages of this strategy include lower effective therapeutic doses and the reduction of drug resistance [4].

Our research group has reported the development of the Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA) as a new class of potent molluscicidal and antiprotozoal agents as leishmanicidal, anti-Chagas disease [5–7]. The search for even more active compounds led to the synthesis of a chalcone-like hybrid (1) between methyl 2-[hydroxyl(2-nitrophenyl) methylacrylate (2) and methyl salicylate (3) [8]. The antileishmanial activity showed by the hybrid 1 was 6–8 times higher than the precursor 2 and 26 to 30 times higher than the precursor 3 (Fig. 1).

The chalcone-like hybrid (1) is a successful example of the

* Corresponding author.

E-mail address: mlaav@quimica.ufpb.br (M.L.A.A. Vasconcellos).