



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

TESE DE DOUTORADO

**INVESTIGAÇÃO DA REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN EM REATOR
DE MICRO-ONDAS USANDO ALDEÍDOS AROMÁTICOS E ISATINA COMO
ELETRÓFILOS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGEM
DE CÉLULAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANAS (HL-60)**

CLAUDIO GABRIEL LIMA JUNIOR

João Pessoa – PB

Novembro /2012

SAPIENTIA ÆDIFICAT



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

TESE DE DOUTORADO

INVESTIGAÇÃO DA REAÇÃO DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN EM REATOR DE MICRO-ONDAS USANDO ALDEÍDOS AROMÁTICOS E ISATINA COMO ELETRÓFILOS: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA HUMANAS (HL-60)

CLAUDIO GABRIEL LIMA JUNIOR*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, como um dos requisitos para obtenção do título de doutor em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

***Bolsista (CAPES)**

João Pessoa – PB

Novembro /2012

L732i Lima Junior, Claudio Gabriel.
Investigação da reação de Morita-Baylis-Hillman em reator de micro-ondas usando aldeídos aromáticos e isatina como eletrófilos: avaliação da atividade citotóxica em linhagem de células de leucemia promielocítica humanas (HL-60) / Claudio Gabriel Lima Junior.-- João Pessoa, 2012.
245f. : il.
Orientador: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1. Química Orgânica. 2. Adutos de Morita-Baylis-Hillman.
3. Reator – micro-ondas. 4. Atividade citotóxica e antimetabólica.
5. Reversibilidade.

UFPB/BC

CDU: 547(043)

Investigação da Reação de Morita-Baylis-Hillman em Reator de Micro-ondas Usando Aldeídos Aromáticos e Isatina como Eletrofilos: Avaliação da Atividade Citotóxica em Linhagens de Células de Leucemia Promielocítica Humana (HL-60).

Tese de Doutorado de Cláudio Gabriel Lima Júnior aprovada pela banca examinadora em 14 de novembro de 2012:



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



Prof. Dr. Sebastião José de Melo
Examinador



Prof. Dr. Ticiano Pereira Barbosa
Examinador



Profa. Dra. Juliana Alves Vale
Examinadora



Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais
Claudio e Inací, e a minha esposa
Kecya, os quais me mostraram
os reais valores que conduzem
a uma vida de felicidade perene.

“Quando alguém julga ter alcançado o saber,
é porque ainda não sabe onde
está o verdadeiro conhecimento”

(1Cor 8, 2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me guiar sempre pelos caminhos da paz e do amor.

Ao meu orientador e amigo Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos pela amizade, oportunidade, seus ensinamentos, contribuições acadêmicas e científicas.

Ao professor Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo e toda a equipe pela parceria e colaboração nos estudos relacionados à atividade citotóxica.

Ao professor Dr. Luís Fernando Marques dos Santos e a Jocelmo Cássio de Araújo Leite (LABID-DBM-UFPB) pela colaboração nos estudos relacionados à avaliação anti-mitótica.

Aos amigos do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), presentes e que passaram, pelos momentos de grande alegria e descontração compartilhadas durante a realização deste trabalho: Fábio, Suervy, Ramon, Everton, Natália, Wagner, Hermesson, Saraghina, Gutemberg, Saulo, Ticiano, Horacimone, Kelly e Edilson.

A professora Dra. Rosanne Albuquerque Pinto Melo e aos demais colegas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Sergipe (IFS) pela acolhida, apoio, excelente ambiente agradável de trabalho e torcida.

Ao técnico Vicente pela realização das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

Título: Investigação da Reação de Morita-Baylis-Hillman em Reator de Micro-Ondas Usando Aldeídos Aromáticos e Isatina como Eletrófilos: Avaliação da Atividade Citotóxica em Linhagem de Células de Leucemia Promielocítica Humanas (HL-60).

Neste trabalho, nós descrevemos a investigação da reação de Morita-Baylis-Hillman em reator de micro-ondas, sob condições de vaso fechado para preparação de 40 adutos, sendo seis inéditos, utilizando 30 aldeídos aromáticos e a isatina como eletrófilos e acrilonitrila (**62a**), acrilato de metila (**2**), acrilato de hidroxietila (**62b**), acrilato de 2,2-dimetil-1,3-dioxalila (**62c**) e acrilato de 2,3-diidroxipropila (**62d**) como aceptores de Michael catalisada por 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano (DABCO). A maioria dos adutos foram sintetizados de forma eficiente em curtos tempos reacionais e excelentes rendimentos (70-99%) usando este protocolo reacional. No entanto, esta metodologia sintética apresentou limitações para substratos menos reativos, devido a formação de subprodutos e em alguns casos a não formação do aduto desejado. A aplicação de baixa temperatura e / ou protocolo convencional a temperatura ambiente conduziram a preparação dos adutos de forma quimiosseletiva. Provamos que a reação de formação do acrilato de 2-hidroxi(4-bromofenil)metila (**43**) é reversível a 120° C, fato que explica a limitação observada na preparação de alguns adutos usando aquecimento por irradiação de micro-ondas e o sucesso no emprego de protocolo a temperatura de 0° C. A avaliação preliminar da atividade citotóxica contra linhagem de células de leucemia humana HL-60 foi realizada, onde os adutos nitrilados derivados da isatina (**56a** e **56b**) foram os mais ativos. Estudos preliminares da atividade antimitótica em células embrionárias de ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) realizados com adutos nitrilados contendo anéis piridínicos (**49**, **47**, **20**), grupo nitro (**16**, **38**, **15**) e átomo de bromo ligados ao anel aromático (**42**) revelaram que, exceto **47**, todos os adutos investigados inibiram fortemente os estágios de desenvolvimento embrionário de primeira clivagem e mórula. Além disso, observações experimentais não demonstraram inibição da organização dos microtúbulos, indução de necrose celular e toxicidade por parte dos adutos, sugerindo como mecanismo de ação o bloqueio da síntese protéica e/ou de DNA.

Palavras chave: Adutos de Morita-Baylis-Hillman. Reator de Micro-ondas. Atividade citotóxica e antimitótica e Reversibilidade.

ABSTRACT

Title: Investigation of Morita-Baylis-Hillman Reaction on Microwave Reactor using Aromatic Aldehydes and Isatin as Electrophiles: Evaluation of Cytotoxic Activity in cell line human promyelocytic leukemia (HL-60).

In this work, we describe the investigation of the Morita-Baylis-Hillman reaction in microwave reactor, under closed vessel conditions to prepare 40 adducts, six novel, using 30 aromatic aldehydes and isatin as electrophiles and acrylonitrile (**62a**), methyl acrylate (**2**), hydroxyethyl acrylate (**62b**), 2,2-dimethyl-1,3-dioxalyl acrylate (**62c**) and 2,3-dihydroxypropyl acrylate (**62d**) as Michael acceptors catalyzed by 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO). Most adducts were synthesized efficiently in short reaction times and excellent yields (70-99%) using this reaction protocol. However, this synthetic methodology showed limitations for less reactive substrates due to formation of byproducts and in some cases the formation of the desired adduct was not obtained. The application of low temperatures and / or conventional room temperature protocol led to the adducts preparation in a chemoselective manner. We proved that the formation of 2-hydroxy (4-bromophenyl) methyl acrylate (**43**) is reversible at 120 °C, which explains the restriction observed in the preparation of certain adducts using heating by microwave irradiation and successfully protocol employing temperature of 0 °C. Preliminary evaluation of cytotoxic activity against cell lines of human leukemia HL-60 was performed, where the nitrilated isatin derivatives adducts (**56a** and **56b**) were the most active. Preliminary studies of antimitotic activity in embryonic cells of sea urchin (*Echinometra lucunter*) performed with nitrilated adducts containing pyridine rings (**49**, **47**, **20**), nitro group (**16**, **38**, **15**) and bromine atom attached to the aromatic ring (**42**) revealed that except **47**, all investigated adducts strongly inhibited stages of embryonic development of the first cleavage and morula. Moreover, experimental observations showed no inhibition of microtubule organization, induction of cell necrosis and toxicity of the adducts, suggesting that the blocking mechanism of action of protein synthesis and / or DNA.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adducts. Microwave Reactor. Cytotoxic and antimitotic activities and Reversibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Espectro de Massas (ESI-MS) para a reação entre benzaldeído e acrilato de metila, em presença de β -naftol após 10 minutos de reação	8
Figura 2.2 Produtos naturais sintetizados por Drewes e Emslei (1982) e Hoffman e Rabe (1983b) a partir de um AMBH.....	9
Figura 2.3 Gráfico representando a evolução no número de publicações por ano (2004-2010) usando pesquisa informatizada (programa Scifinder TM Scholar 2007) usando como palavra chave “Baylis-Hillman reaction”.	10
Figura 2.4 Derivados de AMBH com atividade biológica	11
Figura 2.5 Adutos de Morita-Baylis-Hillman bioavaliados por Kundu e colaboradores (1999)	12
Figura 2.6 AMBH sintetizados e bioavaliados por Narender e colaboradores (2005)..	13
Figura 2.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados e bioavaliados contra <i>Biomphalaria glabrata</i>	13
Figura 2.8 Design dos AMBH fungicidas apresentados por Yu e colaboradores (2006).	14
Figura 2.9 Estruturas químicas dos antichagássicos Benznidazol, Risedronato e do aduto 15	15
Figura 2.10 Docking molecular em TcFPPS e alterações morfológicas observadas nas formas epimastigota e tripomastigota de <i>T. cruzi</i> quando tratadas com 15.....	16
Figura 2.11 Design dos AMBH usando o conceito de bioisosterismo clássico	16
Figura 2.12 AMBH mais ativos contra formas promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> sintetizados por Silva e colaboradores.....	17
Figura 2.13 Design de AMBH leishmanicidas usando a abordagem de Hibridação Molecular	17
Figura 2.14 Gráfico da estimativa de novos casos de câncer em 2012 por região brasileira.....	18
Figura 2.15 Estruturas químicas dos agentes anticancerígenos Vimblastina (A), Vincristina (B) e Taxol (C).....	21
Figura 2.16 Ciclo de divisão celular para célula em mitose.....	22
Figura 2.17 Alguns agentes antimetabólitos antineoplásicos.....	22
Figura 2.18 Estruturas químicas de Bleomicina (A), Dactinomicina (B), Plicamicina (C), Cisplatina (D), Carboplatina (E), Acridina (F) e Proflavina (G)	23
Figura 2.19 Tipos de ligações cruzadas	23
Figura 2.20 Alguns agentes CCNE que agem por intercalação	24
Figura 2.21 Análise REA para 18 AMBH bioativos contra algumas linhagens de célula tumorais humanas.....	25
Figura 2.22 AMBH mais ativos frente a HeLa sintetizados e bioavaliados por Mohan e colaboradores	26
Figura 2.23 AMBH mais ativos frente a HeLa sintetizados e bioavaliados por Rastogi e colaboradores (2006).....	26
Figura 2.24 Adutos mais ativos frente a HeLa com inibição acima de 70% na concentração de 5 μ M bioavaliados por Dadwal e colaboradores	27
Figura 2.25 Produtos naturais anticâncer contendo a porção 3-Substituídos 3-hidróxi-2-oxindol.	28

Figura 2.26 Regiões do espectro eletromagnético.....	29
Figura 2.27 Diferença de padrões de transferência de energia para o etanol em aquecimentos promovidos por irradiação de micro-ondas e banho de óleo	30
Figura 2.28 Mecanismo de polarização dipolar	32
Figura 2.29 Partícula carregada negativamente seguindo o campo elétrico aplicado. 33	
Figura 2.30 Abaixamento da energia do estado de transição polar pelo campo de micro-ondas.....	35
Figura 2.31 Tipos de reatores de Micro-ondas	36
Figura 2.32 Número de artigos publicados em periódicos de Química Medicinal no período de 2000 até agosto/2011	38
Figura 4.1 AMBH propostos inicialmente neste trabalho usando reator de micro-ondas como fonte de aquecimento.....	43
Figura 4.2 Análise retro-sintética para os AMBH	44
Figura 4.3 Derivados 3-substituídos 3-hidróxi-2oxindol com atividade biológica.....	45
Figura 4.4 AMBH derivados de isatina propostos neste trabalho.....	46
Figura 4.5 Aceptores de Michael usados na preparação dos adutos derivados de isatina ou N-metil-isatina	46
Figura 5.1 Análise da conversão de 63 em 14 usando 0.1, 0.5 e 1 equivalente de DABCO.....	48
Figura 5.2 Subprodutos detectados por análise de CG-EM. 65a Ar = <i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄ ; 65b Ar = <i>p</i> -(F)C ₆ H ₄ ; 65c Ar = <i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄ ; 65d Ar = <i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄ ; 65e Ar = 2-C ₁₀ H ₇ ; 66a Ar = 2-C ₁₀ H ₇ ; 66b Ar = 3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃ ; 66c Ar = <i>p</i> -(F)C ₆ H ₄ ; R = CH ₃ , CH ₃ CH ₂	54
Figura 5.3 Possível mecanismo envolvido na formação dos subprodutos do tipo 65 e 66	55
Figura 5.4 formação dos aza-enolatos Z e E.....	57
Figura 5.5 Porções aromáticas dos aldeídos investigados na RMBH	58
Figura 5.6 Visão genérica do quanto a inserção de um grupo volumoso pode melhorar a afinidade de um AMBH no sítio ativo de um alvo biológico	74
Figura 5.7 AMBH investigados quanto à atividade antimitótica em células embrionárias de ouriço-do-mar	75
Figura 5.8 Efeito dos adutos 16, 38, 15, 42, 47, 20 e 49 na primeira clivagem	76
Figura 5.9 Efeito dos adutos 16, 38, 15, 42, 47, 20 e 49 na formação de mórula	77
Figura 5.10 Efeito do tratamento prévio dos óvulos com os AMBH na formação de mórulas em comparação ao tratamento com embriões	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Valores de fator de dissipação ($\tan \delta$), fator de perda dielétrica (ϵ'') e constante dielétrica (ϵ') para algumas substâncias	31
Tabela 5.1 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilato de metila usando irradiação de micro-ondas	49
Tabela 5.2 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilato de metila usando condição a 0 °C	52
Tabela 5.3 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila usando irradiação de micro-ondas	53
Tabela 5.4 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila usando condição a 0 °C	56
Tabela 5.5 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos derivados de isatina ou N-metil-isatina usando irradiação de micro-ondas	60
Tabela 5.6 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos derivados da isatina usando condições convencionais a temperatura ambiente ou a 0 °C sob agitação magnética	62
Tabela 5.7 Dados espectroscópicos principais dos adutos 59a-b, 60a-b e 61a-b	64
Tabela 5.8 Valores de CI_{50} dos AMBH oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila ou acrilato de metila	65
Tabela 5.9 Valores de CI_{50} dos AMBH 56a-b, 57a-b, 59a-b, 60a-b e 61a-b	67
Tabela 5.10 Parâmetros de Lipinski calculados para os AMBH sintetizados neste trabalho	68
Tabela 5.11 Valores de atividade citotóxica e parâmetros obtidos usando cálculos quânticos	71

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman	5
Esquema 2.2 Principais propostas mecanísticas para a RMBH.....	7
Esquema 2.3 Reversibilidade para a RMBH.....	8
Esquema 4.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman derivados de isatina ou N-metil-isatina	45
Esquema 5.1 Reação entre <i>p</i> -(NO ₂)-benzaldeído (63) e acrilato de metila (2) sob catálise de DABCO em diferentes proporções.	48
Esquema 5.2 Equilíbrio na reação entre 64 e 2 sob catálise de DABCO observado por Cantillo e Kappe (2010).....	50
Esquema 5.3 Característica reversível na RMBH entre 65 e 2 em metanol.....	51
Esquema 5.4 Preparação dos aceptores de Michael 62c e 62d a partir do glicerol	59
Esquema 5.5 Preparação de <i>N</i> -metil-isatina (58b).....	59

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro de IV (KBr) do aduto 13	117
Espectro 2	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 13	117
Espectro 3	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 13	118
Espectro 4	Espectro de massas (70 eV) do aduto 13	118
Espectro 5	Espectro de IV (KBr) do aduto 16	119
Espectro 6	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 16	119
Espectro 7	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 16	120
Espectro 8	Espectro de IV (KBr) do aduto 38	120
Espectro 9	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 38	121
Espectro 10	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 38	121
Espectro 11	Espectro de massas (70 eV) do aduto 38	122
Espectro 12	Espectro de massas (70 eV) do subproduto 65a	122
Espectro 13	Espectro de IV (KBr) do aduto 15	123
Espectro 14	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 15	123
Espectro 15	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 15	124
Espectro 16	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 26	124
Espectro 17	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 26	125
Espectro 18	Espectro de massas (70 eV) do aduto 26	125
Espectro 19	Espectro de massas (70 eV) do subproduto 66c	126
Espectro 20	Espectro de IV (KBr) do aduto 40	126
Espectro 21	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 40	127
Espectro 22	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 40	127
Espectro 23	Espectro de massas (70 eV) do aduto 40	128
Espectro 24	Espectro de massas (70 eV) do subproduto 65c	128
Espectro 25	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 42	129
Espectro 26	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 42	129
Espectro 27	Espectro de massas (70 eV) do aduto 42	130
Espectro 28	Espectro de IV (KBr) do aduto 25	130
Espectro 29	Espectro de massas (70 eV) do aduto 25	131
Espectro 30	Espectro de IV (KBr) do aduto 45	131
Espectro 31	Espectro de massas (70 eV) do aduto 45	132
Espectro 32	Espectro de IV (KBr) do aduto 47	132
Espectro 33	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 47	133
Espectro 34	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 47	133
Espectro 35	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 20	134
Espectro 36	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 20	134
Espectro 37	Espectro de massas (70 eV) do aduto 20	135
Espectro 38	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 49	135
Espectro 39	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 49	136
Espectro 40	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 51	136
Espectro 41	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 51	137
Espectro 42	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 52	137
Espectro 43	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 52	138

Espectro 44	Espectro de massas (70 eV) do aduto 52	138
Espectro 45	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 24	139
Espectro 46	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 24	139
Espectro 47	Espectro de massas (70 eV) do aduto 24	140
Espectro 48	Espectro de IV (KBr) do aduto 12	140
Espectro 49	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 12	141
Espectro 50	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 12	141
Espectro 51	Espectro de massas (70 eV) do aduto 12	142
Espectro 52	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 37	142
Espectro 53	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 37	143
Espectro 54	Espectro de massas (70 eV) do aduto 37	143
Espectro 55	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 39	144
Espectro 56	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 39	144
Espectro 57	Espectro de massas (70 eV) do aduto 39	145
Espectro 58	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 14	145
Espectro 59	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 14	146
Espectro 60	Espectro de massas (70 eV) do aduto 14	146
Espectro 61	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 27	147
Espectro 62	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 27	147
Espectro 63	Espectro de massas (70 eV) do aduto 27	148
Espectro 64	Espectro de IV (KBr) do aduto 41	148
Espectro 65	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 41	149
Espectro 66	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 41	149
Espectro 67	Espectro de massas (70 eV) do aduto 41	150
Espectro 68	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 43	150
Espectro 69	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 43	151
Espectro 70	Espectro de massas (70 eV) do aduto 43	151
Espectro 71	Espectro de IV (KBr) do aduto 44	152
Espectro 72	Espectro de massas (70 eV) do aduto 44	152
Espectro 73	Espectro IV (KBr) do aduto 46	152
Espectro 74	Espectro de massas (70 eV) do aduto 46	153
Espectro 75	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 48	153
Espectro 76	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 48	154
Espectro 77	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 19	154
Espectro 78	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 19	155
Espectro 79	Espectro de massas (70 eV) do aduto 19	155
Espectro 80	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 50	156
Espectro 81	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 50	156
Espectro 82	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 28	157
Espectro 83	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 28	157
Espectro 84	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 53	157
Espectro 85	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 53	158
Espectro 86	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 54	159
Espectro 87	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 54	159
Espectro 88	Espectro de IV (KBr) do aduto 56a	160

Espectro 89	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 56a	160
Espectro 90	Espectro de RMN ¹³ C-APT (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 56a	161
Espectro 91	Espectro de IV (KBr) do aduto 56b	161
Espectro 92	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 56b	162
Espectro 93	Espectro de RMN ¹³ C-APT (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 56b	162
Espectro 94	Espectro de IV (KBr) do aduto 57a	163
Espectro 95	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 57a	163
Espectro 96	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CD ₃ OD) do aduto 57a	164
Espectro 97	Espectro de IV (KBr) do aduto 57b	164
Espectro 98	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 57b	165
Espectro 99	Espectro de RMN ¹³ C-APT (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 57b	165
Espectro 100	Espectro de IV (KBr) do aduto 59a	166
Espectro 101	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 59a	166
Espectro 102	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 59a na região de 3.2 a 4.1 ppm.	167
Espectro 103	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CDCl ₃) do aduto 59a	167
Espectro 104	Espectro de Massas de alta resolução do aduto 59a	168
Espectro 105	Espectro de IV (KBr) do aduto 59b	168
Espectro 106	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 59b	169
Espectro 107	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CD ₃ OD) do aduto 59b	169
Espectro 108	Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto 59b	170
Espectro 109	Espectro de IV (KBr) do aduto 60a	170
Espectro 110	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 60a	171
Espectro 111	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 60a na região de 1.1 a 4.1 ppm	171
Espectro 112	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CD ₃ OD) do aduto 60a	172
Espectro 113	Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto 60a	172
Espectro 114	Espectro de IV (KBr) do aduto 60b	173
Espectro 115	Espectro de RMN ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 60b	173
Espectro 116	Espectro de RMN ¹³ C-APT (DMSO- <i>d</i> ₆) do aduto 60b	174
Espectro 117	Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto 60b	174
Espectro 118	Espectro de IV (KBr) do aduto 61a	175
Espectro 119	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 61a	175
Espectro 120	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 61a na região de 3.1 a 5.1 ppm	176
Espectro 121	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CD ₃ OD) do aduto 61a	176
Espectro 122	Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto 61a	177
Espectro 123	Espectro de IV (KBr) do aduto 61b	177
Espectro 124	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃) do aduto 61b	178
Espectro 125	Expansão do espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD) do aduto 61b na região de 3.1 a 4.2 ppm	178
Espectro 126	Espectro de RMN ¹³ C-APT (CD ₃ OD) do aduto 61b	179
Espectro 127	Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto 61b	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH – Aceptores de Ligação de Hidrogênio

AM1 – Método semiempírico *Austin Model One*

AMBH – Adutos de Morita-Baylis-Hillman

B-DNA – Ácido desoxirribonucléico do tipo B

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCE – Ciclo Celular Específico

CCNE – Ciclo Celular Não Específico

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

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

CL₅₀ – Concentração que inibe 50% da morte de uma população

δ – Deslocamento químico em ppm

d - Dubleto

DABCO – 1,4 - Diazabicyclo[2.2.2]octano

dd – duplo dubleto

ddd – duplo duplo dubleto

DLH – Doadores de Ligação de Hidrogênio

ϵ' - Constante dielétrica

ϵ'' - Fator de perda dielétrica

ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização Electrospray

eV – Eletronvolt

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GRE – Grupo Retirador de Elétrons

GHz – Gigahertz

GSH – Glutathiona

ha – Hectare

HF – Método Hartree-Fock

Hela – Linhagem de células de câncer cervical humanas

HL-60 – Linhagem de células de leucemia promielocítica

HOMO – Orbital Molecular Ocupado de Maior Energia

HT-29 – Linhagem de células de câncer de cólon

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IS – Índice de Seletividade

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

kg – Kilograma

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas

LogP – Coeficiente de partição

LUMO – Orbital Molecular não Ocupado de Menor Energia

m – Multiplete

m/z – Razão massa carga

MCF7 – Linhagem de células de câncer de mama

mg – Miligrama

MHz – Megahertz

MO – Micro-ondas

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-2H-tetrazolium

NCI460 – Linhagem de células de câncer de pulmão

OMS – Organização Mundial de Saúde

OVCAR – Linhagem de células de câncer de ovário

PBS – Solução tampão fosfato

PC03 – Linhagem de células de câncer de próstata

pKa – Logaritmo negativo da constante de ionização de um ácido

ppm – Partes por milhão

QSAR – Relação Quantitativa Estrutura-Atividade

REA – Relação Estrutura-Atividade

RMBH – Reação de Morita-Baylis-Hillman

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPESS – “Scan” Relaxado na Superfície de Energia Potencial

RRMBH – Retro-reação de Morita-Baylis-Hillman

SDS – Dodecil sulfato de sódio

s - singleto

sl – Singleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

t – Tripleto

t.a – Temperatura Ambiente

Tan δ – Fator de dissipação

TcFPPS – Enzima Farnesil Pirofosfato Sintase de *T. Cruzi*

TOF-MS – Espectrômetro de massa por tempo de voo

UACC62 – Linhagem de células de melanoma

786-0 – Linhagem de células de câncer de rins

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1 INTRODUÇÃO	2
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman	5
2.1.1 Aspectos gerais	5
2.1.2 Aspectos mecanísticos	6
2.1.3 Crescimento e presente status.....	9
2.1.4 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e atividade biológica.....	11
2.2 Câncer	18
2.2.1 Definições e estatísticas atuais	18
2.2.2 Classificação do câncer.....	19
2.2.2.1 <i>Leucemia</i>	19
2.2.3 Tipos de tratamento para o câncer.....	20
2.2.4 Classificação dos agentes antineoplásicos.....	21
2.2.5 Adutos de Morita-Baylis-Hillman com Atividade Anticâncer.....	25
2.2.6 3-Substituídos 3-hidróxi-2-Oxindol Como Potenciais Antineoplásicos	27
2.3 Radiação de Micro-ondas	29
2.3.1 Aspectos teóricos	29
2.3.2 Micro-ondas em Síntese Orgânica: breve histórico, aplicações e principais efeitos.....	33
2.3.3 Reatores de Micro-ondas.....	35
2.3.4 Síntese Orgânica Assistida por Micro-Ondas e Química Medicinal.....	37
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	40
3 OBJETIVO	41
3.1 Objetivo Geral	41

3.2 Objetivos específicos	41
CAPÍTULO 4: ESTRATÉGIAS	42
4 ESTRATÉGIAS	43
4.1 Parte 1	43
4.2 Parte 2	44
CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Preparação de AMBH entre aldeídos aromáticos e acrilato de metila ou acrilonitrila sob condições de irradiação de microondas	48
5.2 Preparação de AMBH a partir da isatina sob condições de irradiação de microondas	59
5.3 Avaliação da atividade citotóxica dos AMBH sintetizados	65
5.4 Mecanismos de ação: considerações iniciais	72
5.5 Avaliação da atividade antimetabólica dos adutos	74
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	80
6.1 Conclusões	80
6.2 Perspectivas	81
CAPÍTULO 7 – MATERIAIS E MÉTODOS	82
7.1 Materiais e métodos	83
7.2 Procedimento geral para a preparação dos AMBH oriundos da reação utilizando aldeídos aromáticos como eletrófilos e irradiação de Microondas ..	83
7.3 Procedimento geral para a preparação dos AMBH oriundos da reação utilizando aldeídos aromáticos como eletrófilos e protocolo a temperatura de 0° C	84
7.4 Preparação de N-metil-isatina (58b)	84
7.5 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da Isatina usando irradiação de Microondas	85
7.6 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da Isatina usando protocolo a temperatura de 0° C	85
7.7 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da isatina usando protocolo a temperatura ambiente	85
7.8 Procedimento usado para a investigação da reversibilidade da RMBH	86
7.9 Procedimento computacional para otimização de geometria	86
7.10 Procedimento para a avaliação citotóxica contra HL-60	86

7.11 Procedimento para a avaliação da atividade anti-mitótica	87
7.12 Dados espectroscópicos dos AMBH sintetizados neste trabalho	88
7.12.1 Aduto 13	88
7.12.2 Aduto 16	88
7.12.3 Aduto 38	89
7.12.4 Aduto 15	89
7.12.5 Aduto 26	89
7.12.6 Aduto 40	90
7.12.7 Aduto 42	90
7.12.8 Aduto 25	90
7.12.9 Aduto 45	91
7.12.10 Aduto 47	91
7.12.11 Aduto 20	91
7.12.12 Aduto 49	91
7.12.13 Aduto 51	92
7.12.14 Aduto 52	92
7.12.15 Aduto 24	93
7.12.16 Aduto 12	93
7.12.17 Aduto 37	93
7.12.18 Aduto 39	94
7.12.19 Aduto 14	94
7.12.20 Aduto 27	94
7.12.21 Aduto 41	95
7.12.22 Aduto 43	95
7.12.23 Aduto 44	95
7.12.24 Aduto 46	96
7.12.25 Aduto 48	96
7.12.26 Aduto 19	96
7.12.27 Aduto 50	96
7.12.28 Aduto 28	97
7.12.29 Aduto 53	97
7.12.30 Aduto 54	97
7.12.31 Aduto 56a	98
7.12.32 Aduto 56b	98

7.12.33 Aduto 57a	98
7.12.34 Aduto 57b	99
7.12.35 Aduto 59a	99
7.12.36 Aduto 59b	100
7.12.37 Aduto 60a	100
7.12.38 Aduto 60b	101
7.12.39 Aduto 61a	101
7.12.40 Aduto 61b	101
REFERÊNCIAS	103
ESPECTROS	116
ANEXOS	180

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) é uma das reações de formação de ligação C-C que vem ganhando relevante destaque na química orgânica sintética. Desde a sua descoberta por Morita (1968), Baylis e Hillman (1972), as aplicações dos adutos polifuncionalizados como intermediários na síntese de produtos naturais só aumenta ano após ano (BASAVIAH *et al.*, 2010).

Muitos dos adutos oriundos desta reação vem apresentando amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimalarial, leishmanicida, antitumoral, herbicida, antifúngica, antibacteriana entre outras, demonstrando ser uma potencial fonte de candidatos a fármacos na busca por quimioterapia mais potente e seletiva, principalmente para o tratamento do câncer e de doenças classificadas como negligenciadas e extremamente negligenciadas (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

Uma das limitações referentes à obtenção destes compostos decorre da velocidade desta reação, sendo relatados, em alguns casos, tempos reacionais acima de 65 dias. Vários protocolos têm sido descritos com o objetivo de melhorar os rendimentos e acelerar a reação, tais como a utilização de ultrassom, altas pressões e líquidos iônicos.

A irradiação por micro-ondas aplicada à síntese orgânica vem se destacando na comunidade científica nos últimos anos, principalmente por gerar compostos em curto tempo reacional e com melhores rendimentos, minimizando muitas vezes a formação de produtos colaterais. Aliados a este fato, químicos medicinais têm aplicado esta tecnologia em uma ou mais etapas chave na síntese de novos fármacos, acelerando o processo de desenvolvimento de novas drogas e também na geração de novas bibliotecas de compostos para futura avaliação biológica e posteriores estudos da relação estrutura atividade (REA).

Embora algumas investigações já tenham sido realizadas de forma isolada para a reação de Morita-Baylis-Hillman, somente um pequeno número de substratos foi até o momento investigado (De Souza e Miranda, 2010). Além

disso, o uso de fornos de micro-ondas doméstico em alguns destes trabalhos torna os processos sintéticos não reprodutíveis e sem controle de parâmetros reacionais importantes, tais como a temperatura (KUNDU *et al.*, 1994).

O uso de reatores de micro-ondas específicos para síntese orgânica vem se apresentando como uma importante ferramenta para a busca de protocolos reacionais mais simples do ponto de vista operacional, seguro e reprodutível, sendo de grande uso na preparação de substâncias com interesse biológico, tanto na indústria quanto na academia (Sá *et al.*, 2010).

Neste contexto, este trabalho tem como meta a investigação a reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) em reator de micro-ondas para preparação de 40 adutos aromáticos, usando aldeídos aromáticos e isatina (1-*H*-indol-2,3-diona) como eletrófilos e a avaliação da atividade citotóxica frente à linhagem de células de leucemia promielocíticas humanas (HL-60).

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

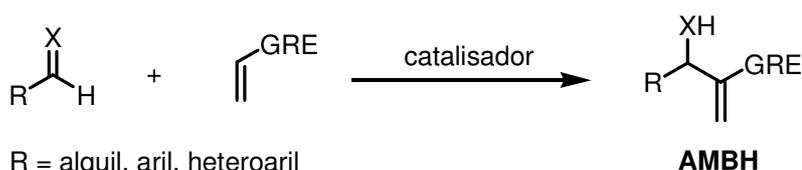
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman

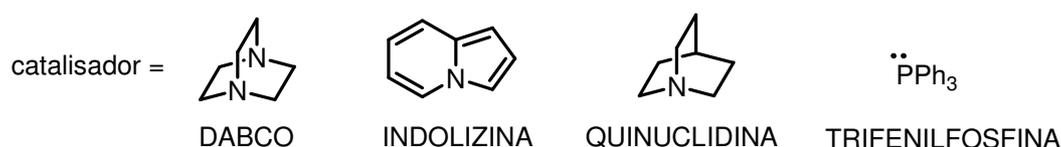
2.1.1 Aspectos gerais

A reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) é uma reação de formação de ligação C-C entre um carbono eletrofílico (aldeídos, cetonas ou iminas) e a posição α de um alceno (ou Alcino) ligado a grupos retiradores de elétrons (GRE) catalisada por aminas terciárias ou alquil(aril) fosfinas, sendo o DABCO o catalisador mais utilizado (BASAVIAH *et al.*, 2007) (Esquema 2.1). Esta reação gera compostos polifuncionalizados chamados adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), que vêm sendo amplamente utilizados como intermediários na síntese de produtos naturais e não naturais com interesse biológico (BASAVIAH *et al.*, 2010).

Esquema 2.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman



R = alquil, aril, heteroaril
 X = O, NCO₂R, NTs, NSO₂Ph etc.
 GRE = COR, CHO, CN, CO₂R etc.



Esta reação apresenta características importantes, tais como a completa economia de átomos, a possibilidade de ser realizada em meio aquoso ou na ausência de solventes e o fato de ser uma reação organocatalisada. Estas características têm recebido grande atenção dos químicos orgânicos sintéticos atualmente devido a busca pelo desenvolvimento de processos ecologicamente satisfatórios.

Um inconveniente associado com esta reação são os longos tempos reacionais. Devido à utilidade sintética do adutos, vários protocolos vêm sendo desenvolvidos para acelerar a reação e melhorar os rendimentos, tais como o

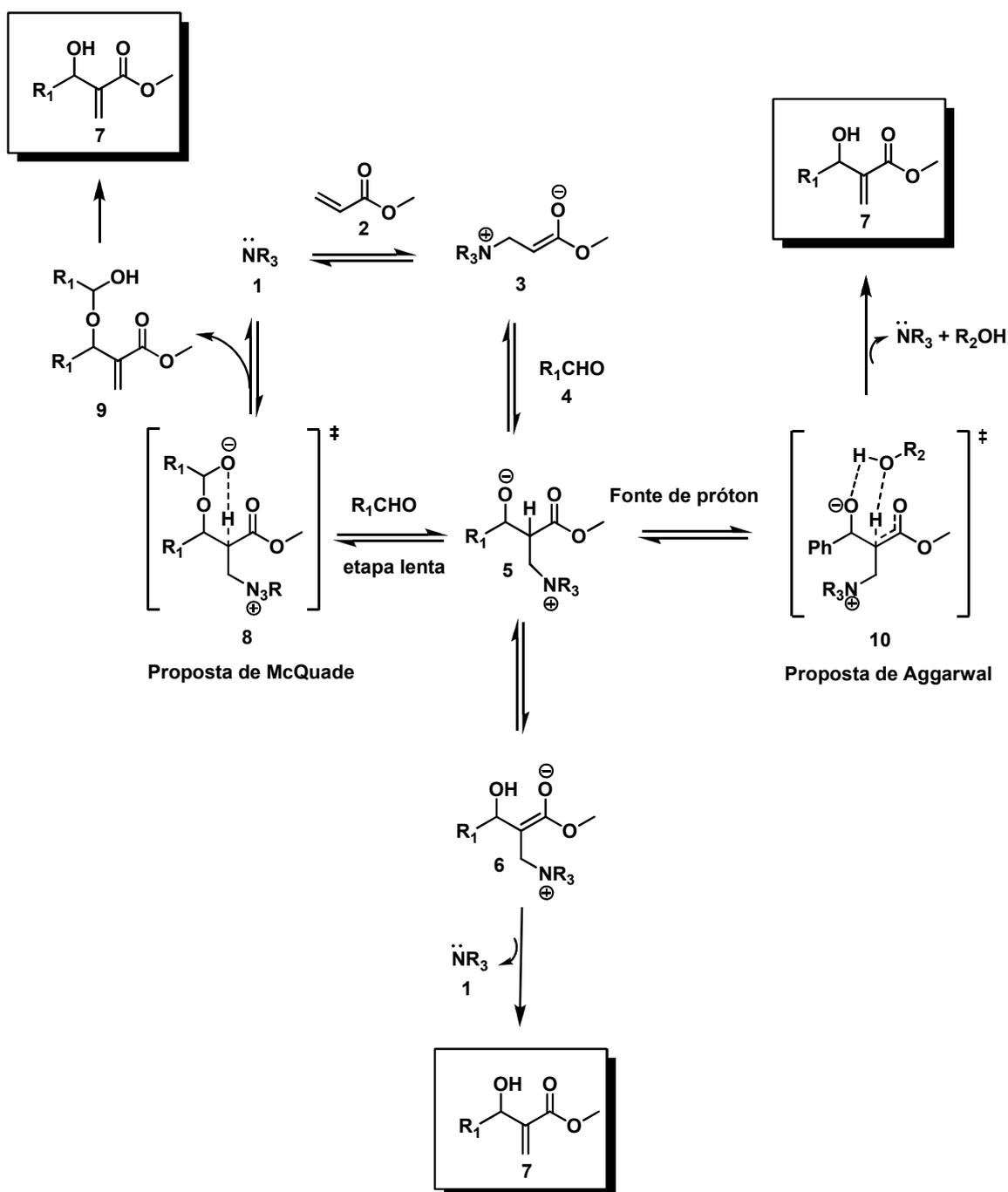
uso de micro-ondas (KUNDU *et al.*, 1999), ultra-som (COELHO *et al.*, 2002), altas pressões (HILL e ISAACS, 1988), uso de líquidos iônicos (De SOUZA *et al.*, 2006) entre outros.

2.1.2 Aspectos mecânicos

A primeira proposta mecânica para a reação de Morita-Baylis-Hillman foi publicada por Hoffman e Rabe (1983a) e estudos cinéticos foram realizados sete anos depois (HILL e ISAACS, 1990). A primeira etapa desta reação consiste numa adição de Michael do catalisador (amina terciária) **1** ao alceno ativado **2** gerando um enolato zwitteriônico **3**. A etapa posterior consiste numa adição aldólica do intermediário **3** ao aldeído **4** gerando o intermediário **5**, sendo esta etapa considerada como a controladora da velocidade. A etapa posterior envolve um prototropismo intramolecular de **5** para formar **6** que gera o AMBH final **7** após eliminação do catalisador **1** que retorna ao ciclo catalítico (Esquema 2.2).

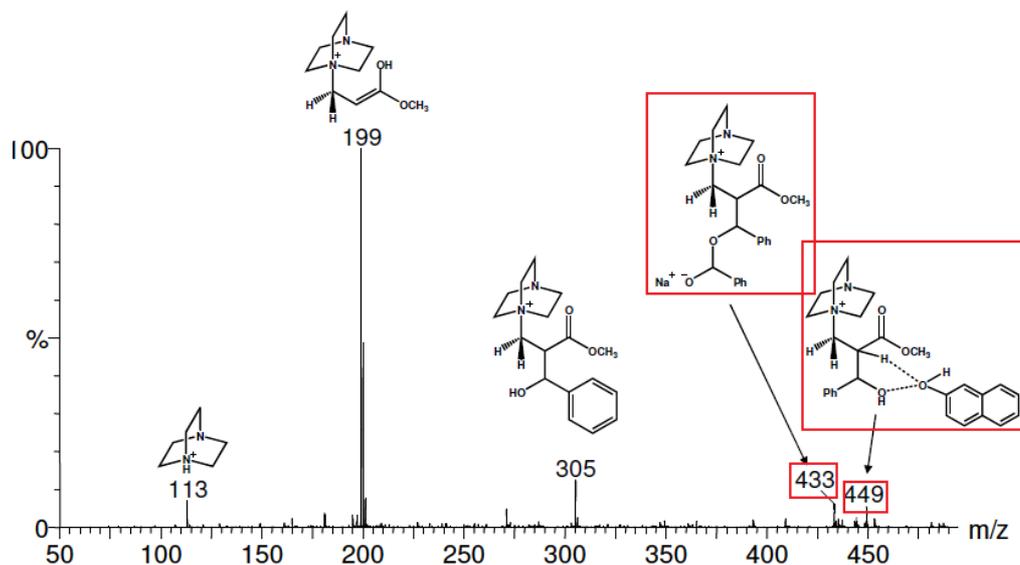
Entretanto, em 2005 os grupos de pesquisa liderados por McQuade e Aggarwal reavaliaram o mecanismo usando estudos cinéticos e teóricos, onde propuseram a etapa lenta como sendo a etapa de transferência de próton (PRICE *et al.*, 2005a; AGGARWAL *et al.*, 2005). De acordo com McQuade e colaboradores, a RMBH é de segunda ordem com relação ao aldeído, mostrando significativo efeito isotópico cinético ($K_H/K_D = 5.2$ em DMSO). Estes autores propuseram a etapa lenta como sendo a etapa de transferência de próton intramolecular com formação de um estado de transição de seis membros **8**, gerando o intermediário **9** que se converte no AMBH **7** (PRICE *et al.*, 2005b). Aggarwal e colaboradores propuseram que na presença de uma fonte de prótons, ocorre formação de um estado de transição onde o solvente atua como um transportador de próton do carbono para o oxigênio **10**.

Esquema 2.2 Principais propostas mecanísticas para a RMBH



Amarante e colaboradores (2009) conseguiram interceptar e caracterizar alguns novos intermediários da RMBH entre benzaldeído e acrilato de metila pela técnica de ESI-MS (/MS). Dentro destes novos intermediários, dois intermediários chave (m/z 433) e (m/z 449) propostos por McQuade e Aggarwal foram interceptados e caracterizados, demonstrando a natureza dualística do mecanismo da RMBH (Figura 2.1).

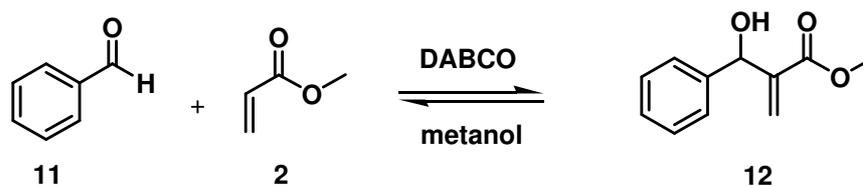
Figura 2.1 Espectro de Massas (ESI-MS) para a reação entre benzaldeído e acrilato de metila, em presença de β -naftol após 10 minutos de reação



(Adaptado de Amarante *et al.*, 2009)

Recentemente, uma investigação experimental e computacional das propriedades termodinâmicas e do mecanismo da RMBH foi realizada por Cantillo e Kappe (2010). Os autores demonstraram inicialmente que a reação entre o benzaldeído **11** e o acrilato de metila **2** foi reversível a 120 °C, fato que demonstrou a dependência da temperatura para a constante de equilíbrio. (Esquema 2.3).

Esquema 2.3 Reversibilidade para a RMBH



Cantillo e Kappe (2010) também observaram através de estudos teóricos que, dependendo das condições empregadas e da quantidade de espécies próticas adicionadas no meio reacional, os dois mecanismos recentemente propostos (McQuade e Aggarwal) ocorrem simultaneamente. Esta característica dualística para o mecanismo da RMBH já tinha sido observada em trabalho anterior de Amarante e colaboradores, usando a técnica de ESI-

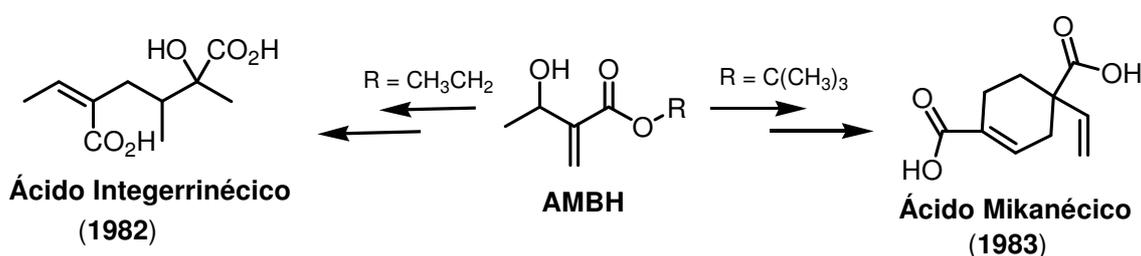
MS (/MS), onde mesmo em meio prótico (β -naftol), o intermediário proposto por McQuade foi interceptado e caracterizado.

Devido a um grande número de variações de parâmetros envolvidos nesta reação com relação a todos os três componentes essenciais (eletrófilo, alceno ativado e catalisador), e ainda outros efeitos, tais como aditivos, solventes e temperatura, a compreensão deste mecanismo é realmente uma tarefa desafiadora que ainda exige produção intelectual (BASAVIAH *et al.*, 2010)

2.1.3 Crescimento e presente status

Após sua descoberta em 1972, a reação de Morita-Baylis-Hillman não ganhou muito interesse por parte dos químicos sintéticos. Só após dez anos, surgiram as primeiras aplicações dos adutos na preparação de produtos naturais. Em 1982, Drewes e Emslei realizaram a síntese, a partir de um AMBH, do ácido integerrinécico, um monoterpreno natural encontrado em várias espécies de plantas, sendo um constituinte ácido de vários alcalóides pirrolizidínicos encontrados na natureza. Um ano depois, Hoffman e Rabbe (1983b) publicaram a síntese racêmica do ácido Mikanécico, um monoterpreno dicarboxilado encontrado em alcalóides de espécies de *Senecio sp.* (família Asteraceae) (Figura 2.2).

Figura 2.2 Produtos naturais sintetizados por Drewes e Emslei (1982) e Hoffman e Rabe (1983b) a partir de um AMBH



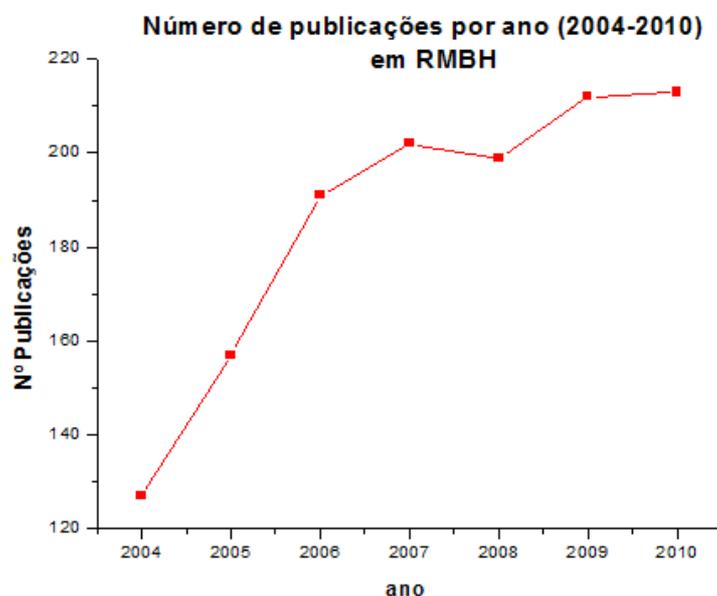
Estas duas publicações levaram os químicos a um maior interesse pela investigação e utilização das potencialidades desta reação. Basavaiah e colaboradores (2007) publicaram uma revisão dando uma maior atenção para as versões intramolecular e assimétrica da reação.

A última revisão acerca desta temática foi recentemente publicada (BASAVIAH *et al.*, 2010) e traz 1028 referências mostrando as várias contribuições desta reação para a química orgânica sintética, além dos avanços desta reação com relação a busca de novos catalisadores assimétricos, aplicação de derivados sintéticos produzidos a partir desta reação, versão intramolecular, síntese de heterocíclicos e avanços na compreensão mecanística.

Um recente livro publicado por Shi e colaboradores (2011) intitulado “The Chemistry of the Morita-Baylis-Hillman Reaction” também demonstra o grande interesse da comunidade científica em difundir o tema, tanto entre os estudantes de graduação quanto a todos os químicos que trabalham em laboratórios acadêmicos e industriais. O livro traz 563 páginas onde relata não somente aspectos históricos relacionados à reação como também a aplicações sintéticas, mecanismo de reação, versão assimétrica e utilização de AMBH e derivados na construção de heterocíclicos e produtos naturais.

O crescente interesse pela RMBH vem se traduzindo em um aumento no número de publicações de artigos científicos a cerca desta temática. A Figura 2.3 abaixo mostra o número de publicações de artigos científicos de 2004 até o ano de 2010.

Figura 2.3 Gráfico representando a evolução no número de publicações por ano (2004-2010) usando pesquisa informatizada (programa Scifinder™ Scholar 2007) usando como palavra chave “Baylis-Hillman reaction”.

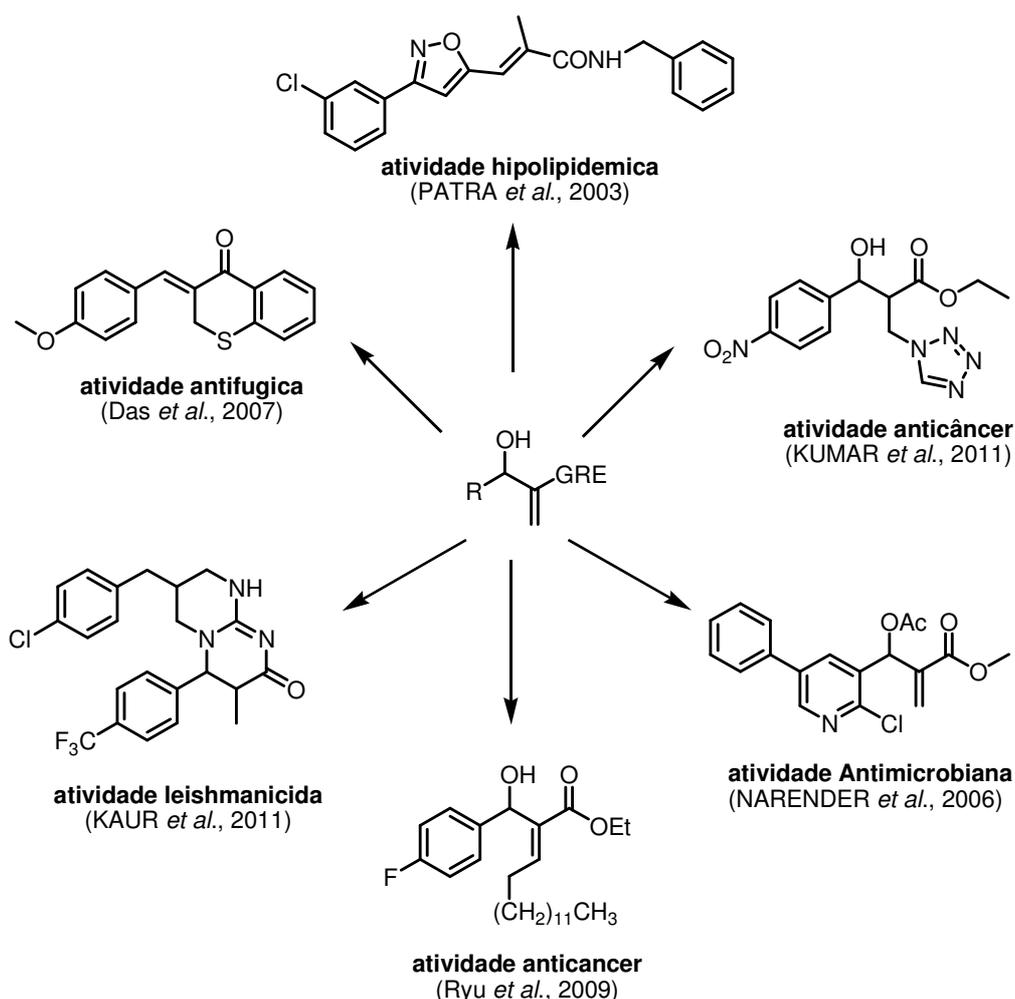


Pelo gráfico, podemos observar que nos últimos anos, um aumento linear no número de publicações, confirmando a relevante importância desta versátil reação de formação de ligação C-C.

2.1.4 Adutos de Morita-Baylis-Hillman e atividade biológica

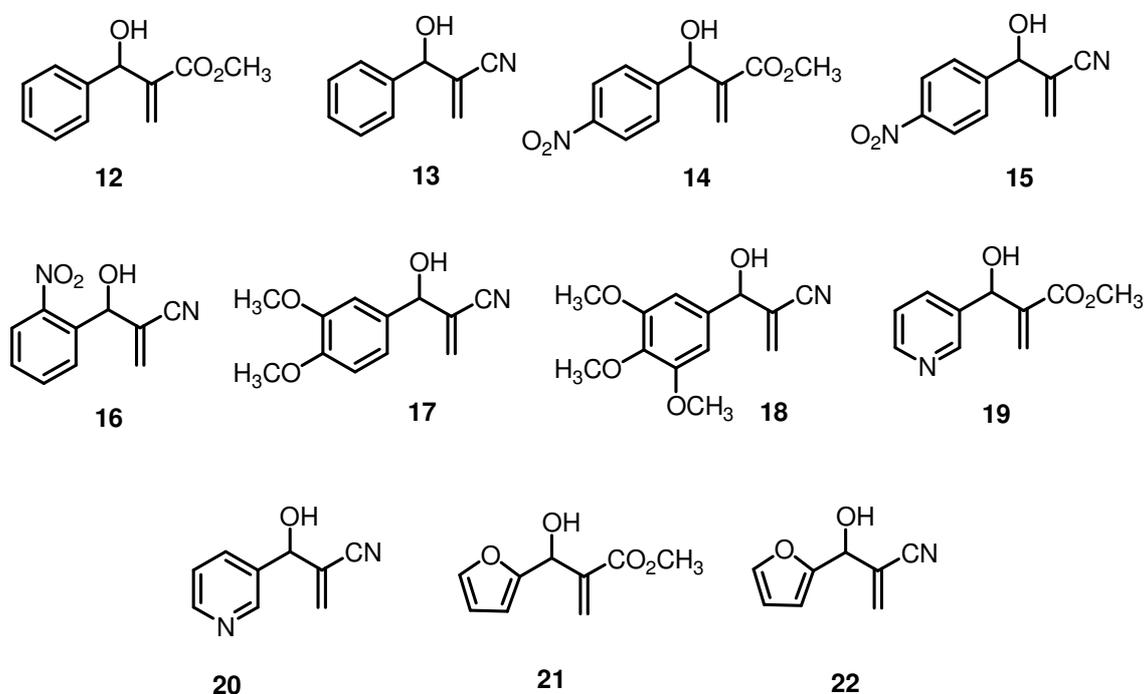
A partir dos trabalhos de Drewes (1982) e de Hoffman (1983b), os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) passaram a ser utilizados pelos químicos como intermediários sintéticos. Diversos produtos naturais e moléculas de interesse biológico foram sintetizados a partir de adutos ou utilizando a reação de MBH como etapa chave para a preparação de um determinado composto com interesse biológico. A Figura 2.4 abaixo mostra alguns compostos derivados de AMBH com atividade biológica.

Figura 2.4 Derivados de AMBH com atividade biológica

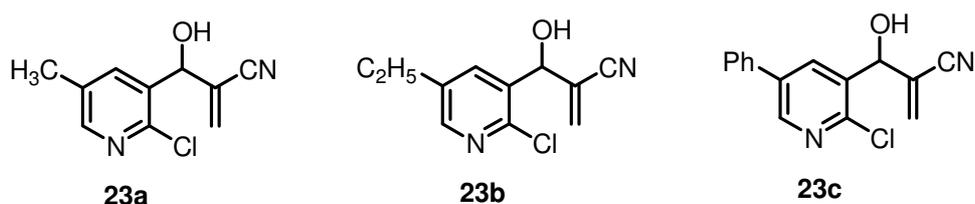


No entanto, a bioavaliação de adutos simples de Morita-Baylis-Hillman oriundos de aldeídos aromáticos e alcenos ativados só foi explorada 3 décadas após publicação do trabalho de Morita (1968). O primeiro relato de atividade biológica de AMBH data de 1999, quando Kundu e colaboradores reportaram a significativa atividade antimalarial de 11 adutos e 3 derivados contra *P. falciparum in vitro* e *P. berguei in vivo* (Figura 2.5). Os adutos **15** e **20** foram os que demonstraram maior potência, onde ensaios *in vivo* em *P. berguei* apresentaram atividade dos mesmos em dose de 80mg/Kg.

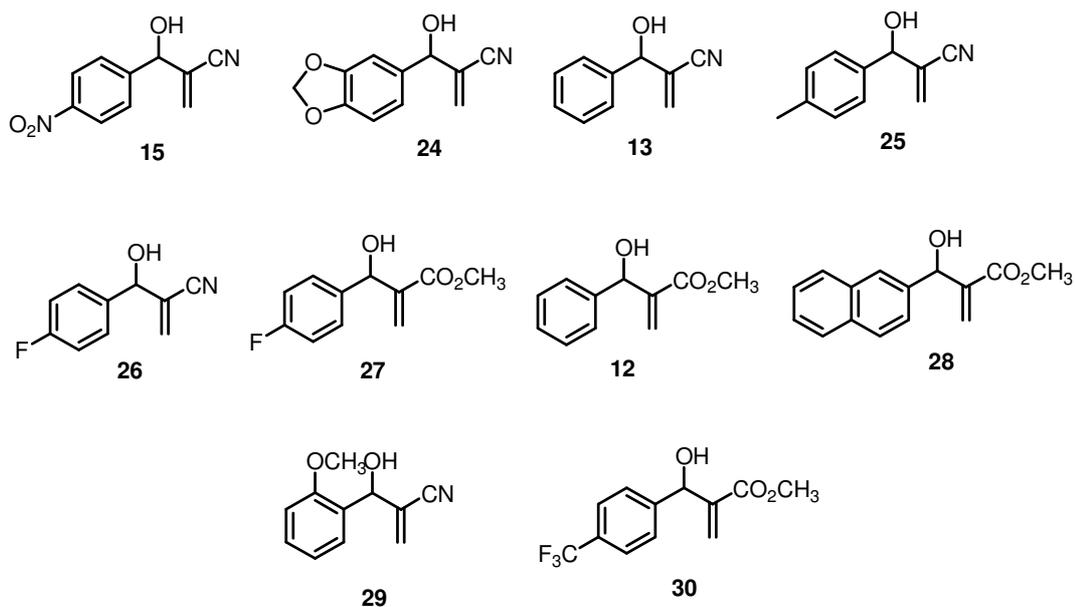
Figura 2.5 Adutos de Morita-Baylis-Hillman bioavaliados por Kundu e colaboradores (1999)



Em 2005, Narender e colaboradores sintetizaram AMBH entre 2-cloronicotinaldeídos substituídos e acrilonitrila ou acrilato de metila. Os adutos foram sintetizados em excelentes rendimentos (97-98%) e em curtos tempos reacionais (10 – 15 minutos). A bioavaliação destes adutos frente a cepas de *P. falciparum* sensíveis e resistentes a cloroquina (FLD-B e FLD-NG) revelaram significativa atividade antimalarial para todos os compostos sintetizados, sendo os adutos **23a**, **23b** e **23c** os mais ativos em ambas as cepas (Figura 2.6).

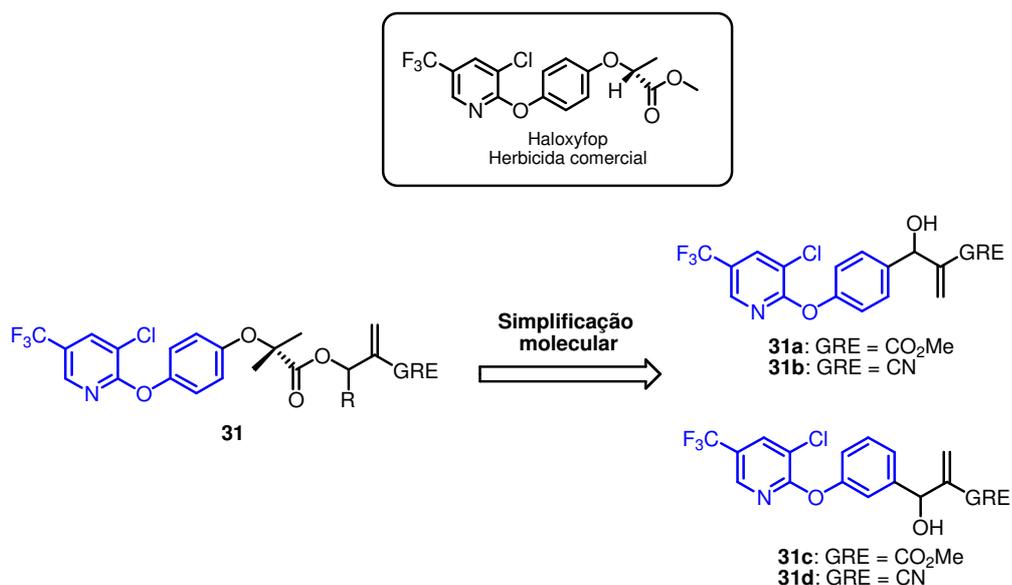
Figura 2.6 AMBH sintetizados e bioavaliados por Narender e colaboradores (2005)

Um ano após o trabalho de Narender e Colaboradores, Vasconcellos e colaboradores (2006) publicaram a atividade de adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*. A Figura 2.7 mostra os adutos sintetizados e bioavaliados neste trabalho. Dos compostos bioavaliados, os adutos **15**, **24** e **28** foram os que demonstraram maior atividade moluscicida com CL_{50} de 7.50, 6.64 e 17.1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A importância da presença do grupo nitro ligado ao anel aromático para a significativa atividade moluscicida assim como a presença do grupo nitrila foi observada. É importante ressaltar que resultados anteriores publicados por Kundu (1999) e Narender (2005) para a atividade antimalarial dos adutos **15-20** e **23a-23c** também já apontavam a importância da presença do grupo nitrila para o aumento da atividade biológica.

Figura 2.7 Adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados e bioavaliados contra *Biomphalaria glabrata*

Yu e colaboradores (2006) publicaram um interessante trabalho relatando a atividade antifúngica e herbicida de alguns 3-cloro-5-(trifluorometil)-piridin-2-iloxi) fenil contendo derivados de acrilonitrila e acrilatos. O planejamento sintético dos derivados e dos novos adutos foi baseado na estrutura do Haloxyfop® (Figura 2.8), um herbicida comercial que, quando adicionado ao AMBH, formou o composto **31** que apresentou excelente atividade herbicida em safras de monocotiledôneas. Através da estratégia de simplificação molecular, 15 compostos foram sintetizados, onde os adutos **31a** e **31c** apresentaram pronunciada atividade fungicida controlando 80 e 70% de míldio em pepinos a 400 g /ha. Já o aduto **31b** foi efetivo contra brusone em arroz com 85% de controle a 25 g /ha. Neste trabalho, foi observada também a perda da atividade fungicida após a eterificação do grupo hidroxila dos AMBH sintetizados, fato que demonstrou a importância deste grupo funcional.

Figura 2.8 Design dos AMBH fungicidas apresentados por Yu e colaboradores (2006).



Em 2010, Sandes e colaboradores apresentaram também de forma inédita o estudo do aduto **15** em relação a sua atividade contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (Figura 2.9). Este composto apresentou potente inibição do crescimento tanto da forma epimastigota quanto da forma tripomastigota, apresentando valores de CI₅₀ de 28.5 µM e 25.5 µM respectivamente. Análise ultra-estrutural foi realizada,

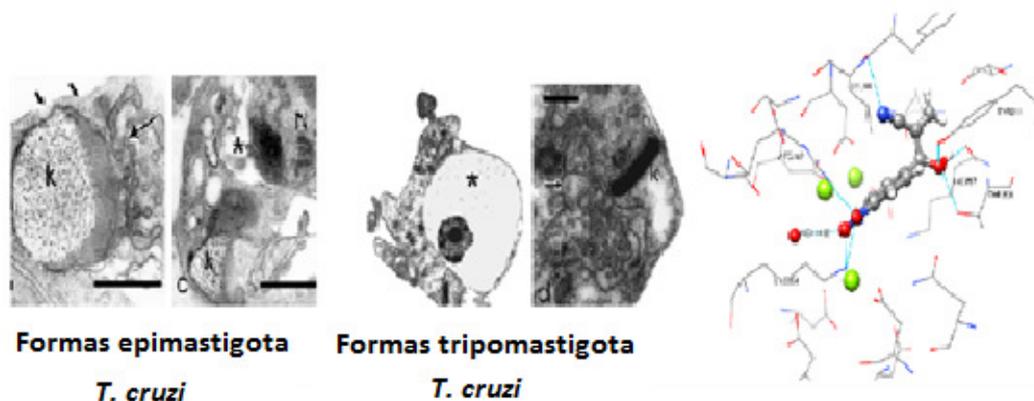
mostrando relevantes mudanças morfológicas em ambas as formas de *T. cruzi* quando tratadas com o aduto **15** (Figura 2.10). Dentre as alterações observadas, destacou-se o aumento no volume e arredondamento do corpo celular, intensa desorganização celular e ruptura da membrana nuclear com perda do material nuclear, indicando que mecanismos diferentes de morte celular estavam ocorrendo como apoptose, necrose e autofagia.

Figura 2.9 Estruturas químicas dos antichagássicos Benznidazol, Risedronato e do aduto **15**



Estes resultados levaram a proposta de dois mecanismos de ação simultâneos para este aduto, sendo o primeiro a influência do potencial redox, já que se trata de um nitrocomposto e atuação na inibição da enzima *T. cruzi* farnesil pirofosfato sintase (*TcFPPS*). Estudos de *docking* molecular foram realizados tanto com o inibidor conhecido desta enzima (Risedronato) quanto com o aduto **15**, usando o Benznidazol (não inibidor de *TcFPPS*) para validação do estudo (Figura 2.10). O aduto em estudo apresentou moderada afinidade em *TcFPPS* (PMF SCORE = $-77.543 \text{ Kcal mol}^{-1}$) quando comparado ao Risedronato (PMF SCORE = $-119.142 \text{ Kcal mol}^{-1}$), indicando a inibição desta enzima um dos possíveis alvos deste AMBH.

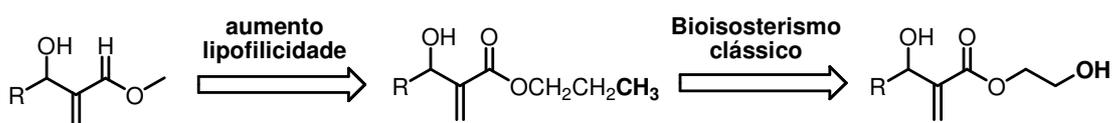
Figura 2.10 Docking molecular em TcFPPS e alterações morfológicas observadas nas formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* quando tratadas com **15**



(Adaptado de SANDES *et al.*, 2010).

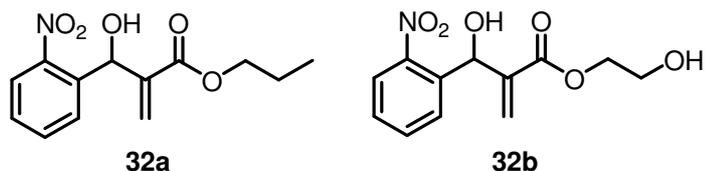
Recentemente, foram publicados dois artigos, onde novos AMBH foram sintetizados usando estratégias em Química Medicinal. O primeiro artigo (SILVA *et al.*, 2011) relatou a síntese de 8 adutos obtidos pela reação entre aldeídos aromáticos e acrilato de propila e 8 adutos bioisósteros clássicos, como mostrado na Figura 2.11. O aumento da lipofilicidade dos adutos foi realizado com o objetivo de observar a influência deste parâmetro na potencialidade ou não da atividade leishmanicida.

Figura 2.11 Design dos AMBH usando o conceito de bioisosterismo clássico



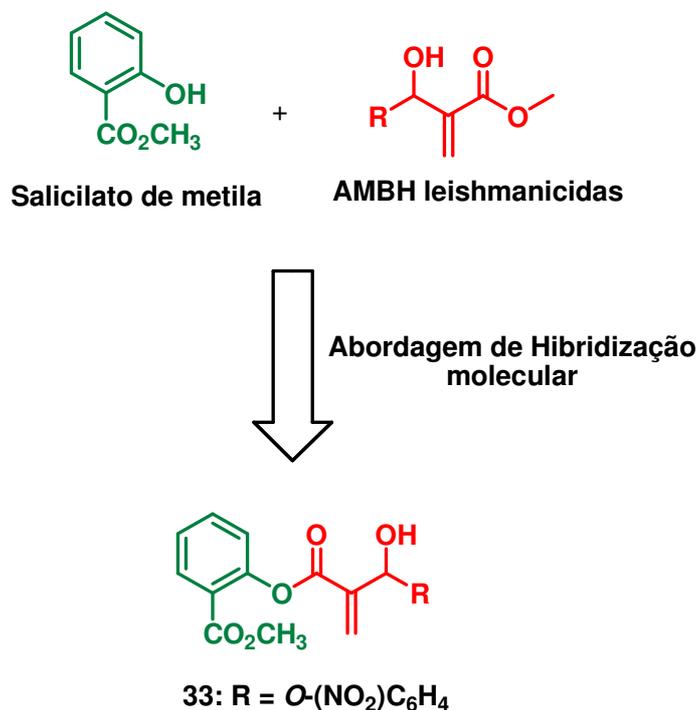
Embora nenhuma relação entre lipofilicidade e atividade leishmanicida tenha sido encontrada, os adutos **32a** e **32b** ilustrados na Figura 2.12 foram os mais ativos frente às formas promastigota de *Leishmania amazonensis* com valores de CI_{50} de 28.38 e 20.52 μM respectivamente. Além disso, ambos os compostos apresentaram índices de seletividade (IS) de 4.75 e 5.43 respectivamente.

Figura 2.12 AMBH mais ativos contra formas promastigota de *Leishmania amazonensis* sintetizados por Silva e colaboradores



No segundo artigo publicado (BARBOSA *et al.*, 2011), o planejamento dos adutos foi baseado no conceito de Híbridação Molecular (Figura 2.13), onde aldeídos aromáticos e o acrilato do salicilato de metila reagiram sob catálise de DABCO, gerando adutos em moderados rendimentos. Os adutos foram bioavaliados contra as formas promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, sendo o aduto **33** o mais ativo com valores de CI_{50} de 7.65 μ M 10.14 μ M respectivamente.

Figura 2.13 Design de AMBH leishmanicidas usando a abordagem de Híbridação Molecular



2.2 Câncer

2.2.1 Definições e estatísticas atuais

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas, sendo o termo neoplasia aplicado especificamente aos tumores malignos (de ALMEIDA *et al.*, 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda maior causa de morte depois das doenças cardiovasculares na maioria dos países desenvolvidos e há evidências epidemiológicas que essa tendência emergente no mundo menos desenvolvido. Estima-se que o número de mortes por câncer globais deverá aumentar 45% entre 2007 e 2030 (de 7,9 milhões para 11,5 milhões de mortes), influenciadas em parte pelo aumento da população e o envelhecimento global e que novos casos de câncer neste período são estimados para saltar de 11,3 milhões em 2007 para 15,5 milhões em 2030 (WHO, 2012).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para 518.510 novos casos neste ano, sendo 257.870 homens acometidos e 260.640 mulheres. A Figura 2.14 abaixo mostra o número de novos casos de câncer estimados no Brasil em 2012 por região.

Figura 2.14 Gráfico da estimativa de novos casos de câncer em 2012 por região brasileira



(Dados: INCA, 2012a)

Podemos observar que as regiões brasileiras com maior número de casos estimados neste ano são a região Sudeste, com 272.890 novos casos, seguido da região Sul, com 90.940 novos casos. Para a região Nordeste, a estimativa é de 88.350 novos casos e a região Norte é a que possui o menor número de novos casos.

2.2.2 Classificação do câncer

O câncer é classificado de acordo com o tipo de célula normal que o originou, sendo que quase todos os tipos podem ser classificados como carcinomas (tecidos epiteliais), sarcomas (tecidos conjuntivos), linfomas (sistema linfático), leucemia (células da medula óssea), melanomas (melanócitos), gliomas (tecidos de suporte cerebral ou da medula espinhal), mielomas (malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos) e neuroblastomas, sendo esta última classificação geralmente dada a tumor pediátrico derivado de células malignas embrionárias advindas de células neuronais primordiais (de ALMEIDA *et al.*, 2005).

2.2.2.1 Leucemia

A leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente, de origem desconhecida e que tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais (INCA, 2012b).

As leucemias podem ser classificadas de duas maneiras, uma com base em quão rapidamente a doença evolui e torna-se grave ou com base nos glóbulos brancos que elas afetam. Quando analisamos a evolução na gravidade da enfermidade, a doença pode ser do tipo crônica (agrava-se lentamente) ou aguda (agrava-se rapidamente). Se a classificação for dada com relação nos tipos de glóbulos brancos que elas afetam, podem ser linfóides ou mielóides. As que afetam as células linfóides são chamadas de linfóide, linfocítica ou linfoblástica. A leucemia que afeta as células mielóides são chamadas mielóide ou mieloblástica (INCA, 2012b).

Combinando as duas classificações, existem quatro tipos mais comuns de leucemia: linfóide crônica, mielóide crônica, linfóide aguda e mielóide aguda.

As pessoas que são acometidas por esta enfermidade apresentam como principais sintomas anemia, fadiga, palpitação, sangramentos das gengivas e pelo nariz, manchas roxas na pele ou pontos vermelhos sob a pele. Além disso, o paciente pode apresentar gânglios linfáticos inchados, mas sem dor, principalmente na região do pescoço e das axilas; febre ou suores noturnos; perda de peso sem motivo aparente; desconforto abdominal; dores nos ossos e nas articulações. Quando a doença afete o Sistema Nervoso Central (SNC), podem surgir dores de cabeça, náuseas, vômitos, visão dupla e desorientação (INCA, 2012b).

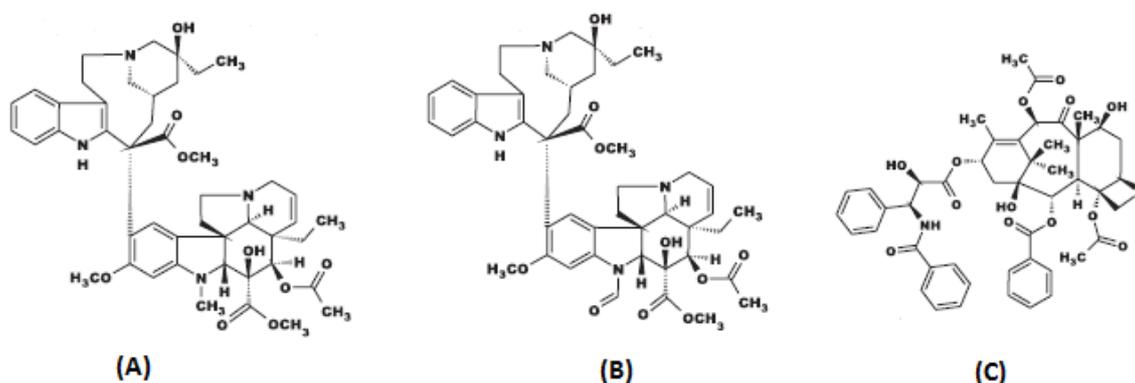
Segundo dados do INCA, em 2010 foram 5.935 mortes, sendo 3.202 homens e 2.733 mulheres. A estimativa de novos casos de leucemia para este ano chega a 8.510, sendo 4.570 homens e 3.940 mulheres. As regiões brasileiras com maior estimativa de novos casos são a região Sudeste com 4.020 e a região Nordeste com 1.840 casos (INCA, 2012a).

2.2.3 Tipos de tratamento para o câncer

O tratamento para o câncer consiste numa terapia combinada, como por exemplo, cirurgia, radioterapia e quimioterapia (BRANDÃO *et al.*, 2010). A cirurgia consiste na remoção de tumores e pode ser eficaz, se não houver a ocorrência de metástase. A radioterapia é uma metodologia antineoplásica muito usada, sendo comumente usada juntamente com a cirurgia. Embora ocorra diminuição de tumores grandes com a utilização da radioterapia, os efeitos colaterais gerados tornam o método limitado. A quimioterapia tem por objetivo a destruição das células neoplásicas, preservando as células normais. Sua limitação é a atuação não específica dos agentes quimioterápicos, lesando tanto células malignas quanto células normais. De forma particular, as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico são muito afetadas, explicando assim a maior parte dos efeitos colaterais da quimioterapia, tais como náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções (de ALMEIDA *et al.*, 2005).

Alguns agentes anticancerígenos de origem vegetal recentemente descoberto vêm sendo aplicados com sucesso no tratamento de alguns tipos de câncer. Como exemplo, podemos citar os alcalóides Vimblastina e Vincristina que vem sendo utilizados no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil. Já o Taxol apresentou capacidade de regredir o câncer de mama e de ovário, resistentes à terapia tradicional (MANN, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2010). Na Figura 2.15 abaixo apresentamos a estrutura químicas destes agentes anticancerígenos obtidos de plantas.

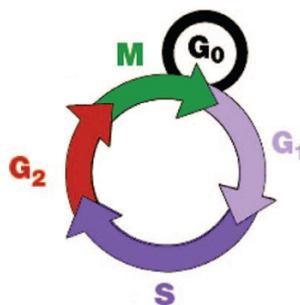
Figura 2.15 Estruturas químicas dos agentes anticancerígenos Vimblastina (A), Vincristina (B) e Taxol (C)



(Adaptado de Brandão *et al.*, 2010)

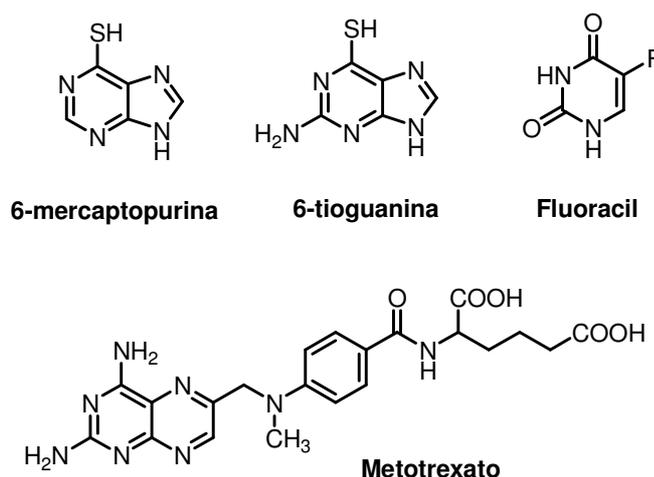
2.2.4 Classificação dos agentes antineoplásicos

Os agentes antineoplásicos podem ser divididos em Ciclo Celular Específico (CCE) e Ciclo Celular Não Específico (CCNE). Os fármacos específicos atuam em uma das fases do ciclo célula em mitose: G0, G1, S, G2 e M (Figura 2.16). Já os fármacos CCNE têm a capacidade de exterminar as células tumorais independentemente de estarem atravessando o ciclo ou de estarem em repouso (de ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 2.16 Ciclo de divisão celular para célula em mitose

(Adaptado de de ALMEIDA *et al.*, 2005)

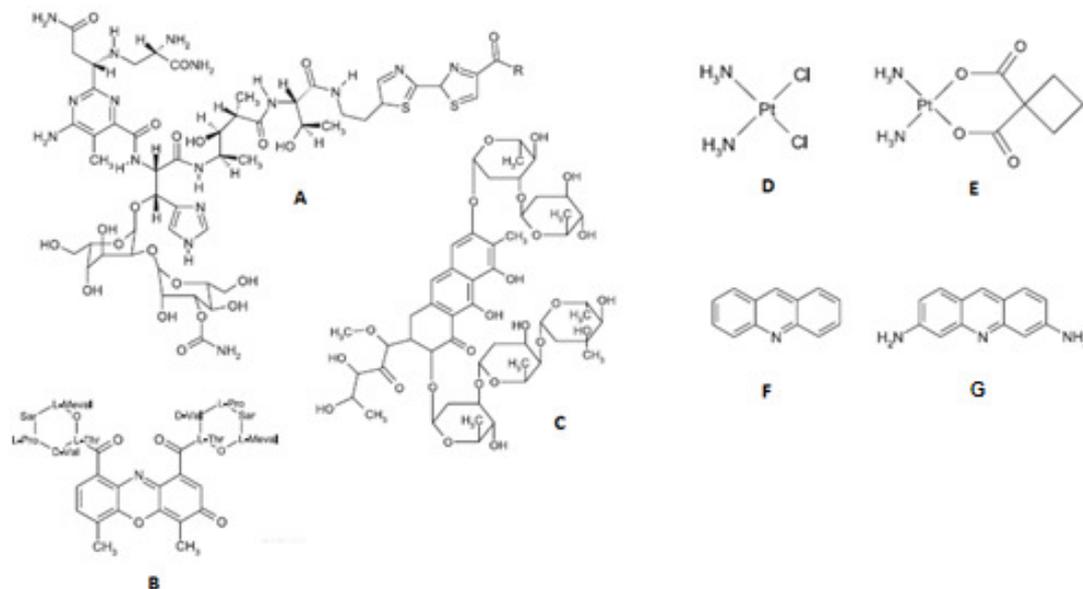
Dentro dos agentes classificados como CCE, podemos citar os alcalóides Vimblastina, Vincristina e Taxol (Figura 2.15), que inibe o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, posteriormente, interrompendo a divisão celular na metáfase, e os fármacos antimetabólitos (análogos de bases nitrogenadas). Estes últimos exercem seus efeitos principalmente por bloquearem bioquimicamente a síntese do DNA e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular (de ALMEIDA *et al.*, 2005). Na Figura 2.17 são apresentados alguns antimetabólitos usados no tratamento de neoplasias.

Figura 2.17 Alguns agentes antimetabólitos antineoplásicos

Os principais agentes classificados como CCNE são representados pelos complexos de coordenação de platina, antibióticos naturais e as acridinas (Figura 2.18). Estes agentes atuam geralmente como eletrófilos sobre macromoléculas nucleofílicas, formando ligações covalentes por reação de

alquilação, principalmente com o DNA, nas bases purínicas e pirimidínicas, conduzindo a posterior morte celular.

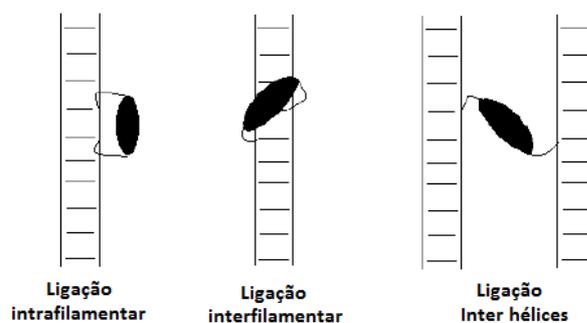
Figura 2.18 Estruturas químicas de Bleomicina (A), Dactinomomicina (B), Plicamicina (C), Cisplatina (D), Carboplatina (E), Acridina (F) e Proflavina (G)



(Adaptado de De Almeida *et al.*, 2010)

Estes fármacos atuam interagindo com o DNA por formação de ligações cruzadas ou por intercalação. No caso das ligações cruzadas, estas podem ocorrer intrafilamentar, interfilamentar ou inter hélices. A Figura 2.19 abaixo mostra os padrões de ligações cruzadas entre os agentes e o DNA.

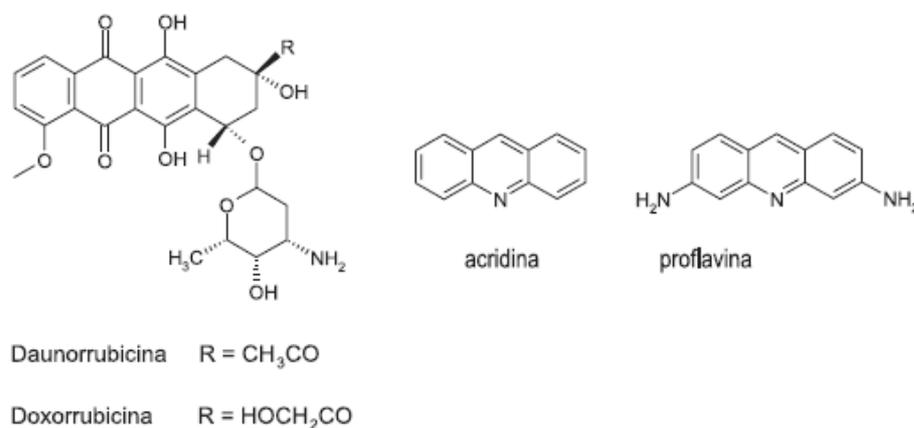
Figura 2.19 Tipos de ligações cruzadas



(Adaptado de De Almeida *et al.*, 2010)

No caso dos agentes antineoplásicos que agem por intercalação, o principal alvo é a fenda menor do B- DNA. O mecanismo de ação se baseia na intercalação nos pares de bases nitrogenadas citosina-guanina (CHEN *et al.*, 1993). A intercalação apresenta uma componente eletrostática relacionada à interação do tipo π , existente entre os intercalantes e as bases Citosina-Guanina, além de complexos de transferência de elétrons. Os intercalantes são constituídos por anéis aromáticos fundidos, apresentando alta densidade eletrônica. A Figura 2.20 abaixo mostra alguns agentes antineoplásicos que agem por mecanismo de intercalação.

Figura 2.20 Alguns agentes CCNE que agem por intercalação



(Adaptado de De Almeida *et al.*, 2010)

Alguns anticancerígenos, como a camptotecina e etoposídeos, possui ação sobre a enzima DNA topoisomerase I e II, respectivamente. Inibidores de topoisomerasas agem principalmente na etapa intermediária da clivagem, onde a fita de DNA permanece clivada por períodos de tempo praticamente indetectáveis, favorecendo alterações que conduzem a morte celular por apoptose (BRANDÃO *et al.*, 2010).

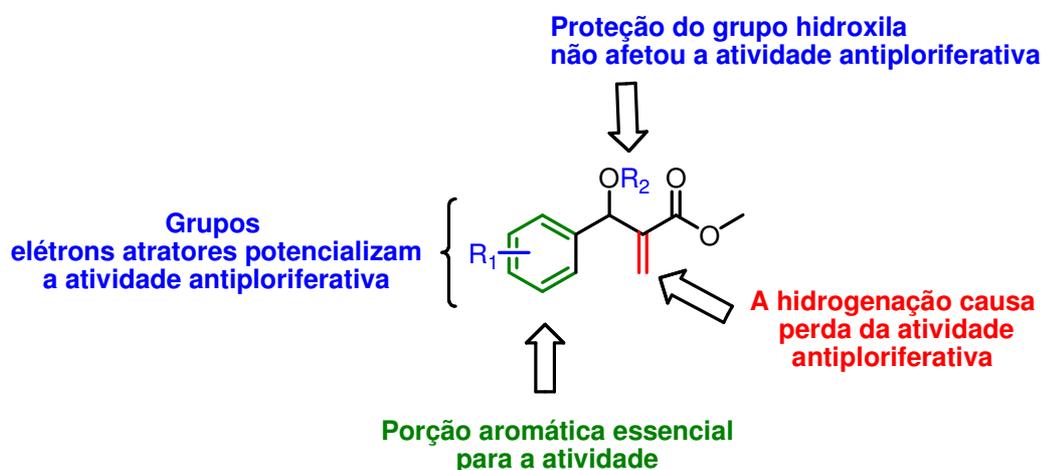
Além dos agentes antineoplásicos citados acima, existem outros fármacos utilizados no tratamento clínico de diferentes tipos de câncer. Devido a não seletividade nos tratamentos atuais, a busca por novos agentes eficientes e menos tóxicos vêm sendo motivação de vários grupos de pesquisa.

A seguir serão apresentadas duas importantes classes de compostos que vem sendo apresentado como potenciais fármacos antineoplásicos.

2.2.5 Adutos de Morita-Baylis-Hillman com Atividade Anticâncer

O primeiro trabalho apresentando a bioavaliação de AMBH contra linhagens de células tumorais humanas foi apresentado em trabalho de Kohn e colaboradores (2006), onde 18 AMBH (aromáticos e alifáticos) e derivados apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro*. Foram investigadas neste trabalho 8 linhagens diferentes de células tumorais: UACC62 (melanoma), MCF7 (mama), NCI460 (pulmão), OVCAR (ovário), PC03 (próstata), HT29 (côlon) e 786-0 (rins). Estudo de relação Estrutura Atividade (REA) apontaram informações muito relevantes, como a importância da dupla ligação do sistema α,β insaturado e de grupos elétron atratores ligados ao anel aromático para a atividade biológica em estudo (Figura 2.21).

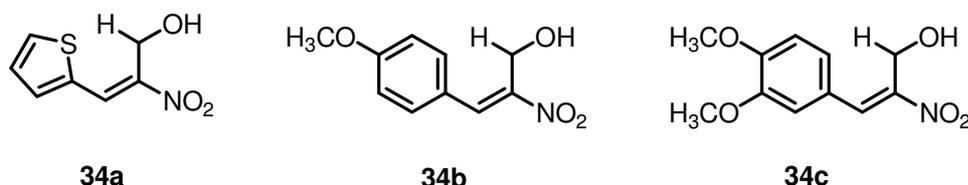
Figura 2.21 Análise REA para 18 AMBH bioativos contra algumas linhagens de célula tumorais humanas



Mohan e colaboradores publicaram em 2006 três artigos relatando a atividade anticâncer de vários AMBH obtidos da reação usando nitroalcenos aromáticos conjugados como aceptor de Michael e catalisadas por imidazol. No primeiro artigo publicado, 11 adutos foram obtidos pela reação entre nitroalcenos aromáticos com formaldeído usando ácido antranílico como aditivo. Todos os adutos foram bioavaliados contra células de câncer cervical (HeLa). Os adutos **34a**, **34b** e **34c** apresentaram CI_{50} entre 2-3 μM (Figura

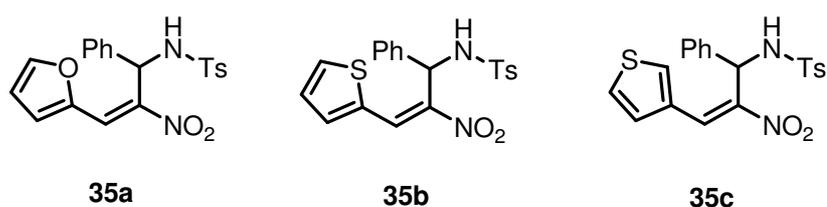
2.22). Estudos sobre o mecanismo de ação mostrou que estes adutos inibiram a formação de tubulina e causaram despolimerização dos microtúbulos celulares.

Figura 2.22 AMBH mais ativos frente a HeLa sintetizados e bioavaliados por Mohan e colaboradores



No segundo trabalho (RASTOGI *et al.*, 2006), 11 adutos foram sintetizados usando N-tosiliminas substituídas como substrato eletrofílico em presença de LiCl como aditivo usando 1,4 dioxana como solvente. Os adutos sintetizados foram incubados com células humanas de câncer cervical (HeLa) nas concentrações de 1, 5 e 10 μM por 24 h. Os compostos **35a**, **35b** e **35c** mostrados na Figura 2.23 apresentaram potente inibição de células de HeLa *in vitro* com inibição de >40% a 5 μM e também inibiram a formação de microtúbulos *in vitro*.

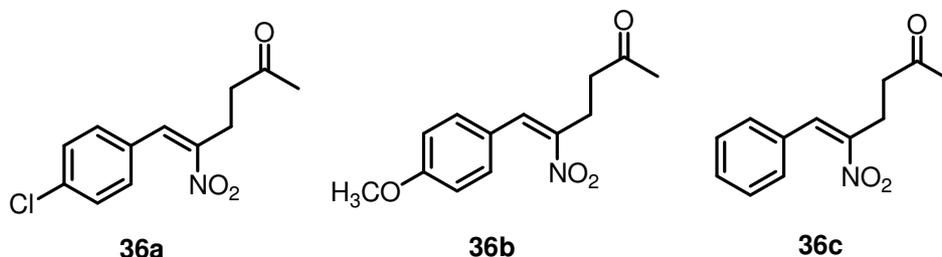
Figura 2.23 AMBH mais ativos frente a HeLa sintetizados e bioavaliados por Rastogi e colaboradores (2006)



Em seguida, Dadwal e colaboradores (2006) relataram a síntese de 14 adutos, agora usando nitroalcenos aromáticos juntamente com acrilato de etila ou metil vinil cetona como eletrófilos, sob catálise de imidazol. Dos adutos sintetizados, **36a**, **36b** e **36c** foram os que apresentaram melhor atividade também frente a células humanas de câncer cervical (HeLa) com inibição do crescimento destas células acima de 70% na concentração de 5 μM (Figura 2.24). O aduto **36b** demonstrou ser o mais potente com inibição de 80% na

concentração de 5 μ M e todos os adutos sintetizados apresentaram afinidade com tubulina.

Figura 2.24 Adutos mais ativos frente a HeLa com inibição acima de 70% na concentração de 5 μ M bioavaliados por Dadwal e colaboradores



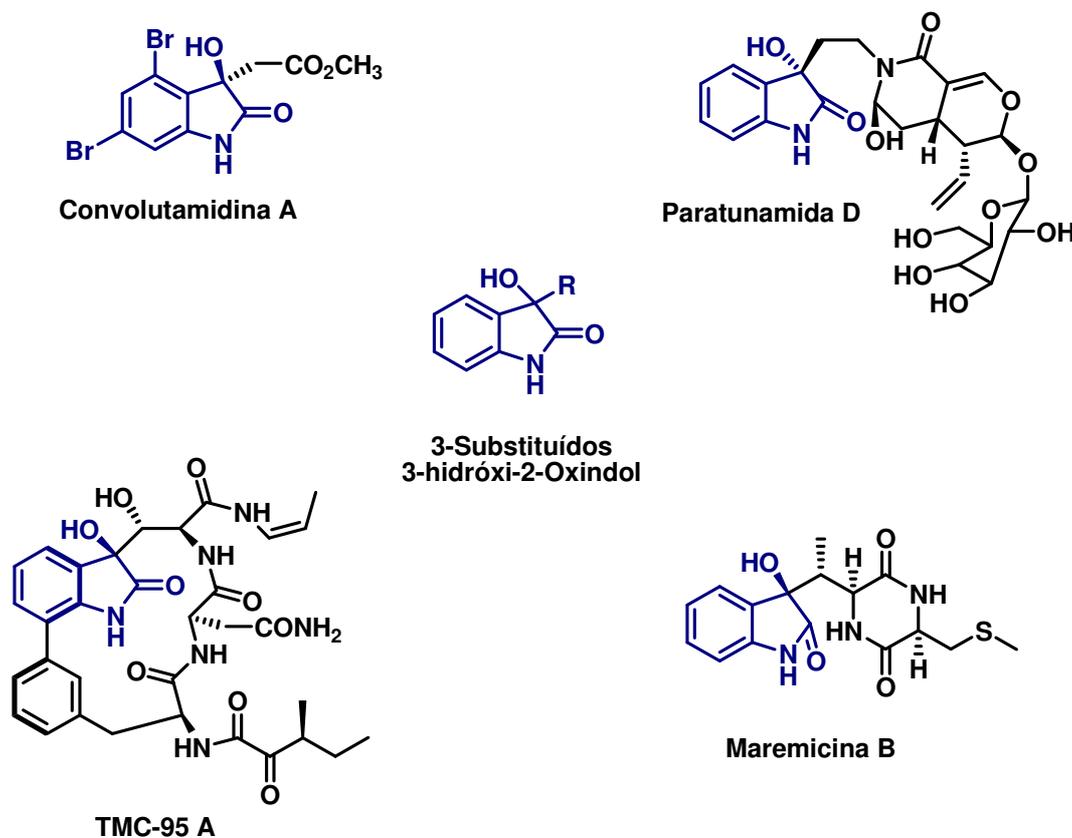
Podemos observar que os adutos de Morita-Baylis-Hillman vêm se apresentando também como uma importante classe de compostos antineoplásicos, sendo de total relevância futuras investigações não somente da atividade frente a outras linhagens de células tumorais *in vitro* como também no aprofundamento dos estudos *in vivo* e do mecanismo de ação apresentado por estes compostos.

2.2.6 3-Substituídos 3-hidróxi-2-Oxindol Como Potenciais Antineoplásicos

Muitos produtos naturais vêm sendo utilizados no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano. Metodologias recentes cada vez mais modernas de isolamento e identificação de compostos de fontes naturais têm propiciado aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para inúmeras indicações terapêuticas (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Recentemente, diversos produtos naturais contendo a porção 3-substituídos 3-hidróxi-2-oxindol vêm despertando grande interesse dos químicos medicinais, devido a potentes atividades biológicas apresentadas contra alguns tipos de neoplasias, inspirando assim, alguns grupos de pesquisa para o planejamento e síntese de análogos mais potentes e seletivos (PEDDIBHOTLA, 2009). A Figura 2.25 apresenta alguns produtos naturais anticancerígenos que contém a porção 3-Substituídos 3-hidróxi-2-Oxindol.

Figura 2.25 Produtos naturais anticâncer contendo a porção 3-Substituídos 3-hidróxi-2-oxindol.



A Convolutamidina A, mostrada na Figura 2.25, é um alcalóide oxindólico isolado do briozoário *Amathia convoluta*, um organismo marinho que foi coletado do Nordeste do Golfo do México por Kamano e colaboradores (1995). Esta substância contendo um esqueleto 4,6-dibromo-3-hidroxioxindol apresentou atividade na diferenciação de células de leucemia promielocítica humanas HL-60.

Paratunamidas A - D foram isoladas de *Cinnamodendron axillare* (KAGATA *et al.*, 2006), onde a Paratunamida D (Figura 2.25) se demonstrou moderadamente citotóxica contra células de carcinoma epidermóide *in vitro* ($Cl_{50} = 6.0 \mu\text{g/mL}$). Já o álcalóide Maremicina B, isolado do caldo de cultura de espécies marinhas de *Streptomyces* B 9173, apresentou atividade citotóxica na linhagem de célula humana de leucemia K562 e células de câncer cervical (Hela) com valores próximos de $50 \mu\text{g/mL}$ (TANG *et al.*, 2001).

Koguchi e colaboradores (2000) isolaram 4 inibidores do proteossoma 20S, um importante alvo na quimioterapia do câncer (ALMOND e COHEN,

2002), a partir do caldo de fermentação de *Angiospora montagnei* Sacc. TC 1093, sendo que o TMC-95A (Figura 2.25) demonstrou ser um inibidor reversível (não covalente) com valor de CI_{50} de 5,4 nM, inspirando assim a busca por análogos mais simples como potenciais agentes terapêuticos (YANG *et al.*, 2003).

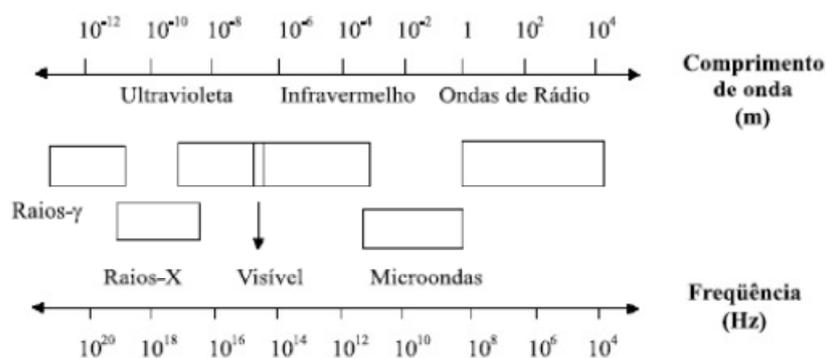
Observa-se claramente que a porção 3-substituídos 3-hidróxi-2-Oxindol representa um terreno fértil para o planejamento racional e descoberta de novas drogas antineoplásicas. Tendo em vista a grande complexidade estrutural da maioria dos produtos naturais apresentados, a busca por moléculas mais simples do ponto de vista operacional sintético e mais seletivos continua sendo objetivo de pesquisas na área de Química Medicinal.

2.3 Radiação de Micro-ondas

2.3.1 Aspectos teóricos

Micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes que possuem uma frequência que vai de 300 a 300.000 MHz, correspondendo a comprimento de onda de 1 metro a 1 milímetro. A região de micro-ondas situa-se entre a região de infravermelho e ondas de rádio, como mostrado na Figura 2.26 (SANSEVERINO, 2002). A frequência utilizada em fornos comerciais é de 2.450 GHz, correspondendo a um comprimento de onda de 12.25 centímetros. Nesta frequência, a energia associada a esta onda eletromagnética é muito baixa (0.0016 eV), diferentemente do observado para a radiação ultravioleta e visível, utilizada nos processos fotoquímicos (De Souza e Miranda, 2011).

Figura 2.26 Regiões do espectro eletromagnético

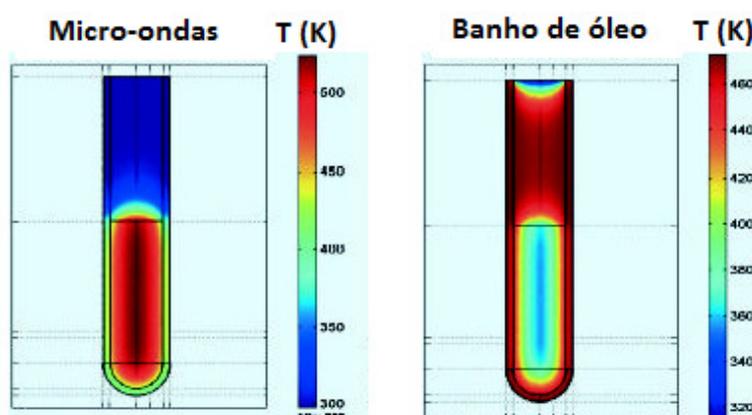


(Fonte: De Souza e Miranda, 2011)

A utilização da irradiação de micro-ondas, ao invés do aquecimento convencional nas reações químicas, vem conduzindo, na maioria das vezes, a uma diminuição nos tempos reacionais e na minimização de produtos colaterais. Este aquecimento, por sua vez é completamente diferente do tipo de aquecimento que ocorre em um forno de cozinha convencional (De Souza e Miranda, 2011).

No aquecimento convencional, a transferência de energia depende das correntes de convecção e da condutividade térmica de vários materiais que devem ser penetrada, e geralmente, a temperatura do vaso de reação é mais alta do que na mistura reacional. De forma adicional, gradiente de temperatura pode se desenvolver na amostra, ocasionando superaquecimento local e subsequente decomposição de produto, substrato ou reagente. Por outro lado, a irradiação por micro-ondas produz um aquecimento eficiente interno pela direta interação da energia de micro-ondas com as moléculas (solventes, reagentes, catalisadores) que estão presentes na mistura reacional. Como os vasos empregados nos reatores de micro-ondas modernos são fabricados com materiais transparentes as micro-ondas (vidros de borossilicato, quartzo ou teflon), a radiação passa através das paredes do vaso e inverte o gradiente de temperatura, quando comparado com o aquecimento convencional (Kappe, 2009, p. 19). A Figura 2.27 ilustra a diferença de transferência de energia entre o aquecimento realizado de forma convencional e sob irradiação de micro-ondas.

Figura 2.27 Diferença de padrões de transferência de energia para o etanol em aquecimentos promovidos por irradiação de micro-ondas e banho de óleo



(Adaptado de KAPPE e DALLINGER, 2006)

O aquecimento por micro-ondas também é chamado de aquecimento dielétrico e este depende da habilidade de um material específico (por exemplo, um solvente ou reagente) de absorver energia de micro-ondas e convertê-la em calor. Para que isso seja possível de ocorrer, este material deve possuir um momento dipolar. A habilidade de uma substância específica de converter energia elétrica em calor a uma dada frequência e temperatura é determinada pelo fator de dissipação ($\tan \delta$). Este fator é expresso pelo quociente entre o fator de perda dielétrica (ϵ''), que indica a eficiência da conversão de energia eletromagnética em calor e a constante dielétrica (ϵ'), medida que indica a polaridade de uma molécula. Uma substância ou meio reacional com um alto fator de dissipação ($\tan \delta$) é necessário para uma eficiente absorção e, conseqüentemente, para um rápido aquecimento. A Tabela 2.1 mostra algumas substâncias com seus respectivos valores de fator de dissipação ($\tan \delta$), fator de perda dielétrica (ϵ'') e constante dielétrica (ϵ') a 25 ° C e 3 GHz.

Tabela 2.1 Valores de fator de dissipação ($\tan \delta$), fator de perda dielétrica (ϵ'') e constante dielétrica (ϵ') para algumas substâncias

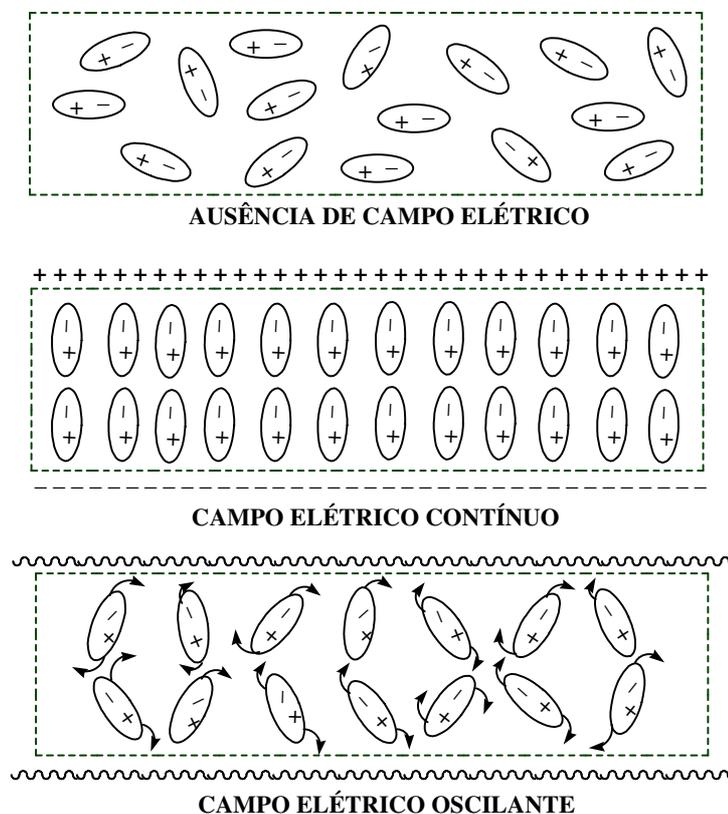
Material	ϵ'	ϵ''	$\tan \delta \times 10^4$
Gelo	3.2	0.00288	9
Água	76.7	12.0419	1570
NaCl aq 0.1 M	75.5	18.12	2400
Etilenoglicol	12.0	12.0	10000
Heptano	1.9	0.00019	1
CCl ₄	2.2	0.00088	4

(Adaptado de SANSEVERINO, 2002)

Como podemos ver na Tabela 2.1, substâncias polares, tais como água e etilenoglicol absorvem bem microondas (altos valores de $\tan \delta$), enquanto que substâncias menos polares (heptano) ou substâncias com momento de dipolo nulo (CCl_4) absorvem microondas fracamente. Já materiais cristalinos altamente ordenados também são pouco aquecidos por microondas, como por exemplo, o gelo, que possui baixo valor de fator de dissipação ($\tan \delta \times 10^4 = 9$).

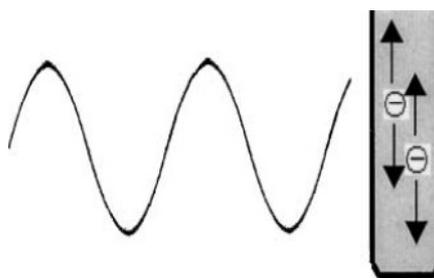
Dois são os mecanismos principais para a transformação de radiação eletromagnética em calor: polarização dipolar e condução iônica. No primeiro mecanismo citado, moléculas possuidoras de momento dipolo permanentes ou induzido, são alinhadas com o campo elétrico aplicado. Ao remover o campo eletromagnético, as moléculas retornam a um estado desordenado, fazendo com que a energia absorvida para a orientação seja dissipada na forma de calor (LIDSTRÖM *et al.*, 2001). Como o campo elétrico na frequência de 2,45 GHz oscila $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, ocorre um pronto aquecimento destas moléculas. A Figura 2.28 abaixo mostra a influência do campo elétrico oscilante na orientação de moléculas dipolares.

Figura 2.28 Mecanismo de polarização dipolar



No mecanismo de condução iônica, as partículas carregadas dissolvidas na amostra (normalmente íons) se movem devido ao campo elétrico oscilante, colidindo com moléculas vizinhas, causando aumento da taxa de colisões, convertendo energia cinética em calor (PERREUX e LOUPY, 2001). A Figura 2.29 abaixo mostra uma partícula carregada sob influência de um campo elétrico oscilante.

Figura 2.29 Partícula carregada negativamente seguindo o campo elétrico aplicado



(Fonte: LIDSTRÖM *et al.*, 2001)

2.3.2 Micro-ondas em Síntese Orgânica: breve histórico, aplicações e principais efeitos.

Embora o desenvolvimento da tecnologia de micro-ondas tenha iniciado nos anos 40, os primeiros relatos da utilização desta ferramenta em síntese orgânica só surgiram em meados dos anos 80, com os trabalhos independentes de Gedye e Guiguere (GEDYE *et al.*, 1986; GUIGUERE *et al.*, 1986). Nestes trabalhos, os autores realizaram reações de Diels-Alder, Claisen e esterificação usando forno de micro-ondas doméstico e frasco selado como vaso de reação. Em seus resultados, foi observado um aumento da velocidade de reação e redução de formação de produtos colaterais quando comparado com experimentos sob aquecimento convencional.

Após estas pioneiras publicações, o número de publicações utilizando a irradiação de micro-ondas em reações orgânicas só aumentou, chegando a mais de 4.000 publicações entre 1986 - 2008. Em muitos dos exemplos apresentados, o aquecimento por micro-ondas promoveu reduções dramáticas nos tempos reacionais, aumento nos rendimentos e minimização de produtos colaterais (KAPPE e DALLINGER, 2009),

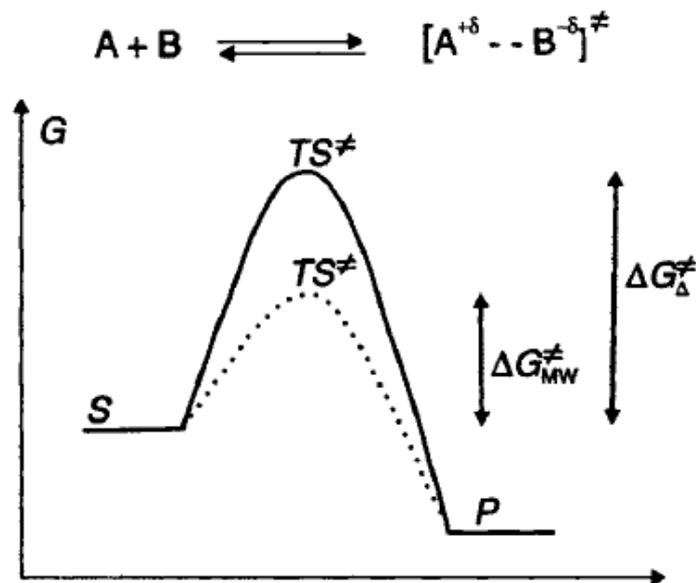
Atualmente, podemos observar que várias reações orgânicas vêm sendo investigadas usando o aquecimento por micro-ondas, tanto em sistemas homogêneo quanto em heterogêneo, conduzindo a bons rendimentos. Dentre elas, podemos citar as reações de Mizoroki-Heck, Suzuki-Miyaura, Mitsunobu, cicloadições, reduções, hidrogenações, metáteses, substituições nucleofílicas aromáticas, reações de proteção e desproteção e síntese de heterociclos (KAPPE e DALLINGER, 2009).

Alguns efeitos que justificam o sucesso obtido nas reações orgânicas assistidas por micro-ondas podem ser racionalizados através de três diferentes propostas: efeitos térmicos; efeitos específicos de micro-ondas e efeitos não térmicos de micro-ondas (PERREUX e LOUPY, 2001).

Efeitos térmicos são conseqüências das altas temperaturas reacionais que são rapidamente alcançadas quando materiais polares ou misturas reacionais são irradiados sob condições de vaso fechado em um campo de micro-ondas (PERREUX e LOUPY, 2006, p. 134-218). Já o denominado efeito específico, que ainda é um efeito de natureza térmica, é definido como a aceleração das transformações químicas em um campo de micro-ondas que não podem ser realizados ou duplicados por aquecimento convencional. Este mecanismo pode ser evidenciado, por exemplo, no superaquecimento de solventes a pressão atmosférica e na eliminação do efeito de vaso causado pela inversão de gradiente de temperatura (PERREUX e LOUPY, 2001).

O efeito não-térmico é resultado da interação direta do campo elétrico com moléculas específicas geradas no meio reacional. Como moléculas polares se orientam com o campo elétrico oscilante aplicado, ocorre mudança no fator pré-exponencial A ou energia de ativação (termo entrópico) da equação de Arrhenius para certos tipos de reação (PERREUX e LOUPY, 2001). De forma análoga, tem sido discutido que similar efeito é observado para mecanismos de reação polar, onde o aumento da polaridade durante o caminho racional até o estado de transição resultando na diminuição da energia de ativação, como ilustrado na Figura 2.30 (PERREUX e LOUPY, 2001; HERRERO *et al.*, 2008).

Figura 2.30 Abaixamento da energia do estado de transição polar pelo campo de micro-ondas



(Adaptado de BOGDAL, 2005, p. 19)

Mesmo com as propostas acima citadas, muita discussão e algumas controvérsias persistem entre os pesquisadores que estudam a racionalização dos efeitos de micro-ondas. Mesmo assim, devido às inúmeras vantagens, a utilização do aquecimento controlado por micro-ondas em síntese vem sendo não somente explorado pelos químicos orgânicos como também tem penetrado no campo da Química Medicinal (KAPPE e DALLINGER, 2006).

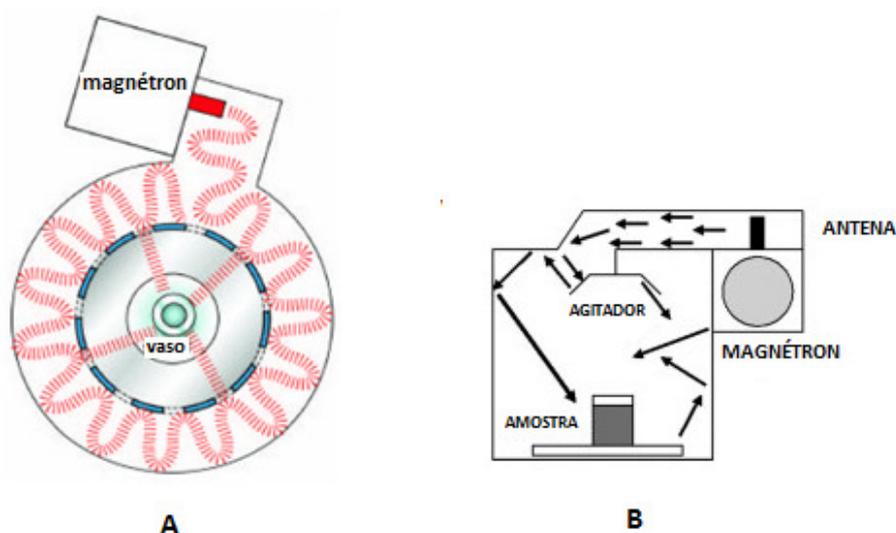
2.3.3 Reatores de Micro-ondas

A maioria dos trabalhos pioneiros em síntese química usando micro-ondas foi executada usando forno de micro-ondas doméstico. Devido à falta de controle de parâmetros reacionais (pressão, temperatura e potência) e por questões de segurança operacional, surgiram em meados dos anos 90 os aparelhos de micro-ondas construídos especificamente para uso pelos químicos orgânicos sintéticos. Os reatores de micro-ondas, assim chamados, conduziram a comunidade científica a realizar experimentos com maior segurança e reprodutibilidade, devido ao controle de parâmetros reacionais, podendo realizar tanto experimentos sob pressão de 20 bar quanto em condições criogênicas (De SOUZA e MIRANDA, 2011).

Em geral, um reator de micro-ondas consiste de uma fonte de micro-ondas (magnétron), uma linha de transmissão que distribui micro-ondas do magnétron até uma antena e posteriormente até a cavidade, onde será inserido o vaso reacional. Atualmente, dois tipos de reatores de micro-ondas vêm sendo construídos e utilizados em síntese orgânica: multimodo e monomodo.

Nos instrumentos multimodo (conceitualmente similar aos aparelhos de micro-ondas domésticos), as micro-ondas que entram na cavidade são refletidas pelas paredes e são carregadas pela larga cavidade. Em muitos instrumentos multimodo, um agitador interno garante que a distribuição do campo seja a mais homogênea possível. Em reatores monomodo, a cavidade é muito menor, permitindo que somente um modo seja apresentado e a irradiação eletromagnética seja aplicada diretamente no vaso reacional, através de uma linha de transmissão retângula ou circular. As diferenças chave entre os dois tipos de reatores é que, enquanto na cavidade de reatores multimodo, existe a possibilidade de vários vasos de reação ser irradiados simultaneamente, em reatores monomodo, somente um vaso reacional pode ser irradiado (KAPPE *et al.*, 2009, p. 45-51). Na Figura 2.31 abaixo mostramos um reator de microondas monomodo (A) e um multimodo (B).

Figura 2.31 Tipos de reatores de Micro-ondas



(Adaptado de KAPPE *et al.*, 2009, p. 50)

Podemos observar que a tecnologia de micro-ondas na otimização de reações químicas vem tornando estes processos mais rápidos, limpos, seguro e mais econômico do que reações convencionais, fazendo com que laboratórios acadêmicos e industriais busquem cada vez mais a utilização destes reatores em seus programas educacionais e de pesquisa e desenvolvimento (P&D), respectivamente.

2.3.4 Síntese Orgânica Assistida por Micro-Ondas e Química Medicinal

Com o crescimento da síntese orgânica assistida por micro-ondas, pequenas moléculas passaram a serem construídas em fração de minutos ou segundos, superando os protocolos reacionais clássicos. Como resultado, esta técnica tem ganhado grande aceitação como ferramenta disponível para uma aceleração dos processos de descobrimento e desenvolvimento de drogas (MAVANDADI e PILOTTI, 2006; SANTAGADA *et al.*, 2009).

Muitos grupos de pesquisa vêm usando de forma extensiva a tecnologia de micro-ondas no desenvolvimento de moléculas de interesse farmacológico. Com a chegada dos reatores específicos para reações orgânicas, os problemas de reprodutibilidade, segurança e controle de parâmetros reacionais foram resolvidos. Com isso, novas tecnologias e estratégias foram incorporadas a síntese assistida por micro-ondas, tais como, por exemplo, síntese livre de solventes, reações em meio aquoso, reações multicomponentes, reações em fluxo contínuo e reações em larga escala (NASCIMENTO – JUNIOR *et al.*, 2011).

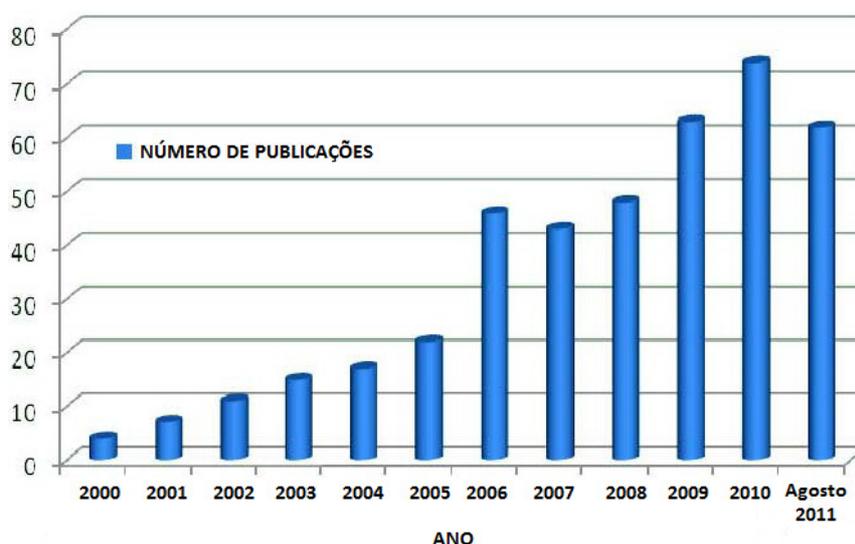
No contexto de Química Medicinal, muitas subestruturas farmacologicamente interessantes e estruturas privilegiadas (WELSCH *et al.*, 2010) vêm sendo obtidas através da síntese orgânica assistida por micro-ondas. Dentre elas podemos citar a preparação de indóis, 1,2,4 triazóis, N-acilhidrazonas, porfirinas e 1,2,4 oxadiazóis (PATIL *et al.*, 2011; YEUNG *et al.*, 2005; ANDRADE e BARROS, 2010; LUCAS *et al.*, 2008; ADIB *et al.*, 2006).

Recentemente, duas revisões vêm demonstrando a grande utilização da síntese assistida por micro-ondas no desenvolvimento de drogas. Observa-se que antineoplásicos, antiinflamatórios, antivirais, agentes antimicrobianos e agentes para o tratamento de doenças negligenciadas e doenças do sistema

nervoso central vêm sendo preparados com sucesso usando a irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento (NASCIMENTO – JUNIOR *et al.*, 2011; FERRO *et al.*, 2011).

O sucesso no emprego dos reatores de micro-ondas no processo de síntese de novos fármacos vem sendo demonstrado pelo crescente número de artigos publicados nas principais revistas na área de Química Medicinal nos últimos anos, como mostrado na Figura 2.32 (NASCIMENTO – JUNIOR *et al.*, 2011).

Figura 2.32 Número de artigos publicados em periódicos de Química Medicinal no período de 2000 até agosto/2011



(Adaptado de NASCIMENTO – JUNIOR *et al.*, 2011)

Com base no exposto, observa-se que moléculas com interesse biológico estão sendo extensivamente preparadas usando a tecnologia de micro-ondas, diminuindo não somente os tempos reacionais, como também contribuindo para a redução no tempo de desenvolvimento de uma droga, sendo de grande benefício na construção de novas bibliotecas de compostos para posterior avaliação em alvos biológicos e estudos da relação estrutura atividade (REA).

A reação de Morita-Baylis-Hillman vem demonstrando ser uma porta de acesso a substâncias de amplo espectro de atividades biológicas e a preparação de adutos bioativos usando reatores de micro-ondas torna-se de grande relevância na busca por métodos que apresentem simplicidade

operacional, reprodutibilidade, altos rendimentos e curto tempo de obtenção dos mesmos.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Realizar uma investigação da reação de Morita-Baylis-Hillman em reator de micro-ondas, usando aldeídos aromáticos e isatina como eletrófilos e a posterior avaliação citotóxica contra linhagens de leucemia (HL-60), analisando de forma qualitativa as relações entre a estrutura atividade (REA).

3.2 Objetivos específicos

Neste trabalho de tese objetivamos especificamente:

- ✓ Usar o reator de Micro-ondas na síntese de 40 adutos de Morita-Baylis-Hillman, usando aldeídos aromáticos e isatina como eletrófilos;
- ✓ Caracterizar os adutos sintetizados por métodos físicos;
- ✓ Avaliar a concentração inibitória (CI_{50}) *in vitro* dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados em células de leucemia promielocítica humanas (linhagem HL-60);
- ✓ Discutir as relações estrutura-atividade (REA).

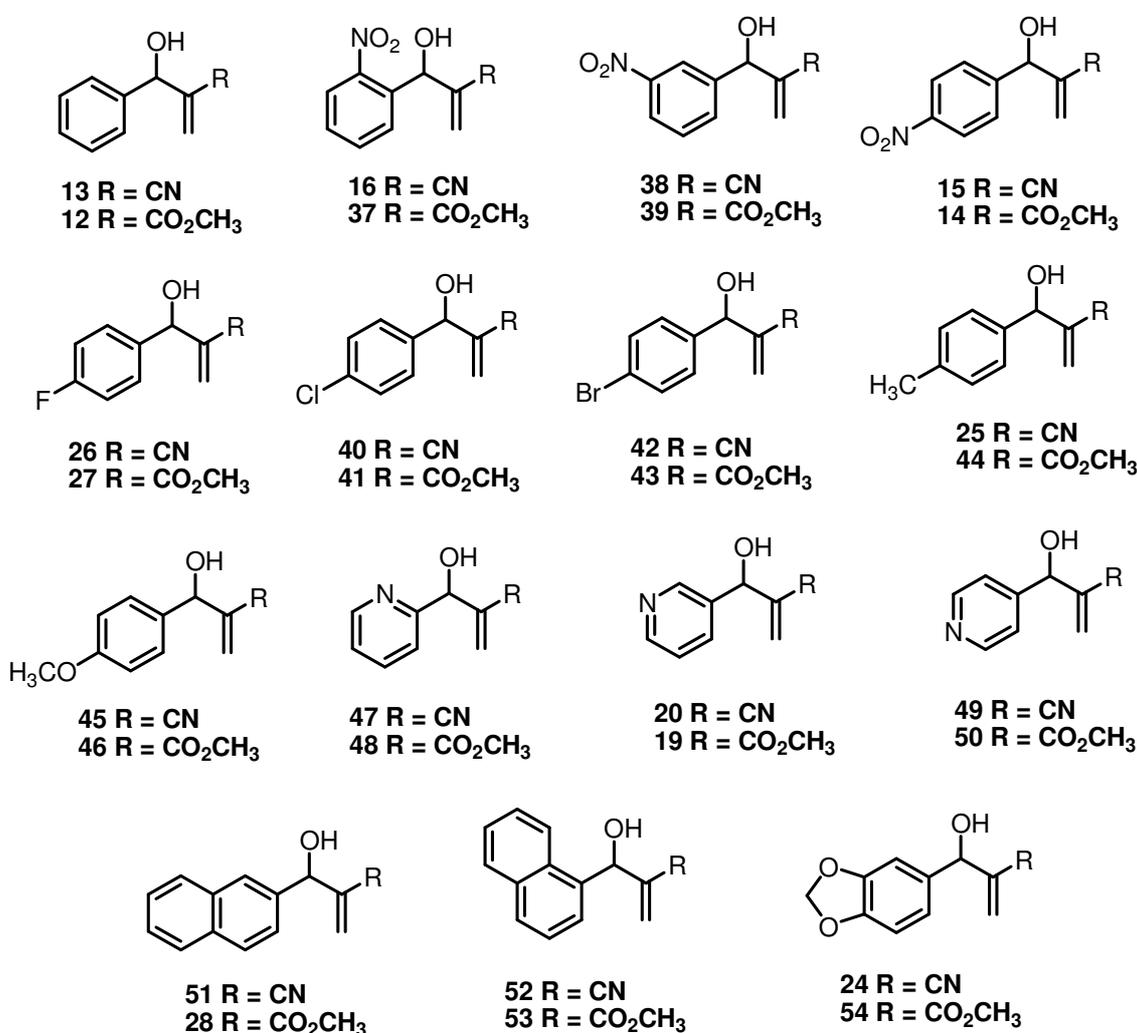
CAPÍTULO 4: ESTRATÉGIAS

4 ESTRATÉGIAS

4.1 Síntese dos adutos oriundos de aldeídos aromáticos como eletrófilos promovida por micro-ondas

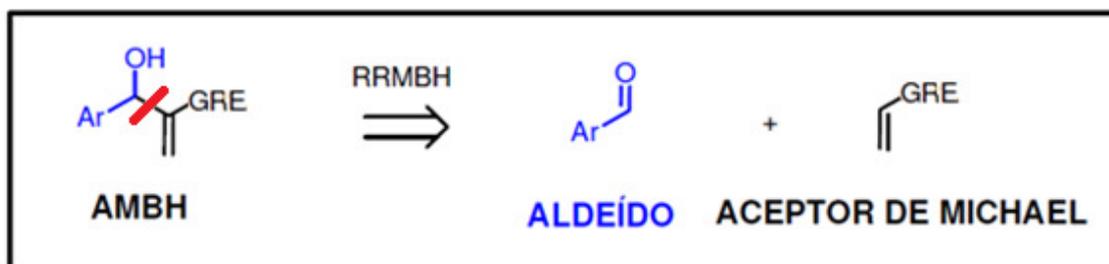
Tendo em vista o grande espectro de atividades biológicas apresentados por adutos aromáticos de Morita-Baylis-Hillman (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012), a estratégia de trabalho inicial consiste na preparação de 30 adutos, mostrados na Figura 4.1, usando reator de micro-ondas como fonte de aquecimento.

Figura 4.1 AMBH propostos inicialmente neste trabalho usando reator de micro-ondas como fonte de aquecimento



A Figura 4.2 mostra a análise retro-sintética para a síntese os adutos propostos. A desconexão em vermelho está baseada numa retro-reação de Morita-Baylis-Hillman (RRMBH).

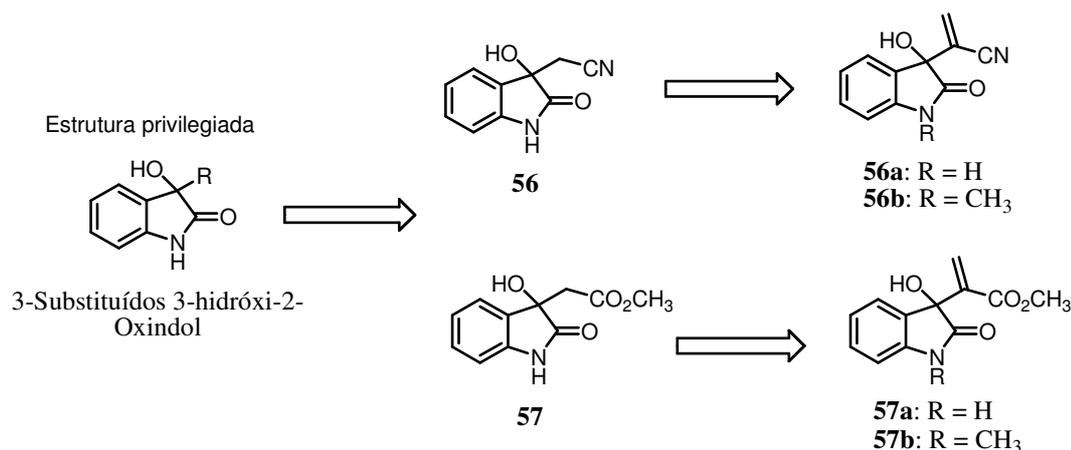
Figura 4.2 Análise retro-sintética para os AMBH



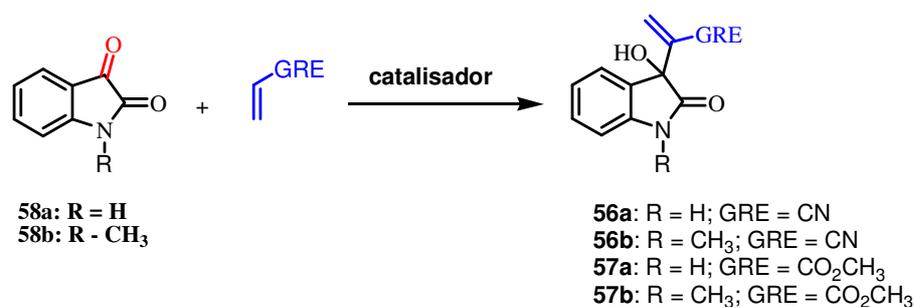
Para a obtenção dos adutos propostos, serão utilizados como material de partida, 15 aldeídos aromáticos e dois alcenos ativados distintos: acrilonitrila e acrilato de metila.

4.2 Síntese dos adutos oriundos da isatina como eletrófilo promovida por micro-ondas

A porção 3-substituídos 3-hidróxi-2-oxindol vêm se apresentando como estrutura privilegiada, estando presente em muitos produtos naturais com potentes atividades antineoplásicas (PEDDIBHOTLA, 2009). O derivado oxindólico **56** (Figura 4.3), por exemplo, foi isolado de repolho inoculado com *Pseudomonas cichorii* (MONDE *et al.*, 1991; WELSCH *et al.*, 2010), onde o enantiômero R demonstrou ser inibidor seletivo de algumas citoquinas. Já o composto **57** (Figura 4.3), isolado de farelo de trigo, inibiu células de câncer de colon, apresentando CI_{50} de 42.63 $\mu\text{g/mL}$ (LEE *et al.*, 2008).

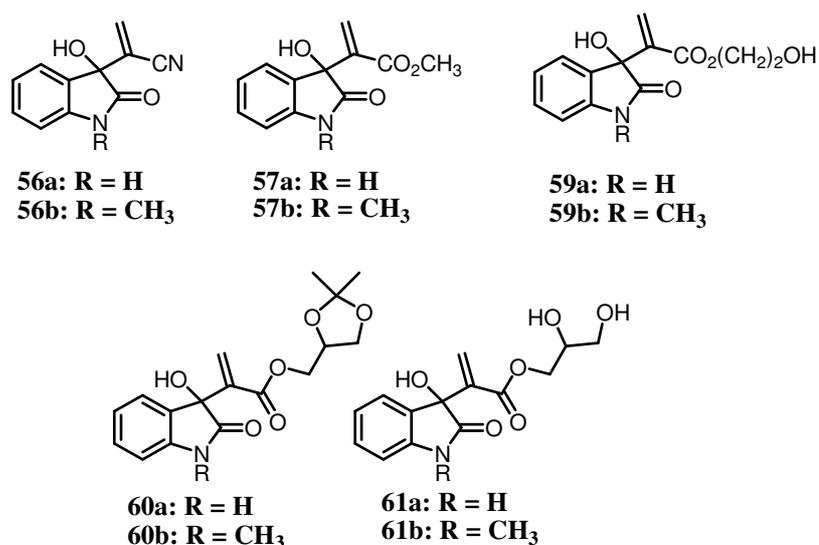
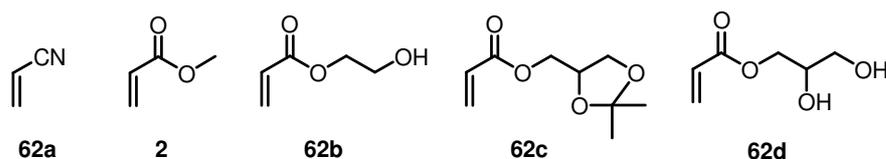
Figura 4.3 Derivados 3-substituídos 3-hidróxi-2-oxindol com atividade biológica.

Observa-se que os compostos **56a-b** e **57a-b** podem ser considerados derivados vinólogos de **56** e **57**, apresentando potencial atividade antineoplásica. A preparação destes vinólogos envolve uma RMBH, usando isatina ou *N*-metil-isatina **58a-b** como substrato (Esquema 4.1), cuja presença da porção aceptora de Michael já vem sendo descrita como importante para a atividade de alguns adutos previamente investigados em algumas linhagens de células tumorais (KOHN *et al.*, 2006).

Esquema 4.1 Reação de Morita-Baylis-Hillman derivados de isatina ou *N*-metil-isatina

A investigação da RMBH em reator micro-ondas usando Isatina ou *N*-metil-isatina ainda não foi realizada até o presente momento. O potencial biológico destas moléculas torna a busca por metodologias mais atraentes um processo altamente relevante.

Neste sentido, foi proposta a síntese de 10 AMBH (Figura 4.4), usando como eletrófilos, isatina (**58a**) ou *N*-metil-isatina (**58b**) (Esquema 4.1) e os aceptores de Michael **62a-62d** e **2** (Figura 4.5), sob irradiação de micro-ondas.

Figura 4.4 AMBH derivados de isatina propostos neste trabalho**Figura 4.5** Aceptores de Michael usados na preparação dos adutos derivados de isatina ou *N*-metil-isatina

Para a investigação em micro-ondas, as reações foram conduzidas em reator monomodo CEM modelo Discover Benchmate, com controle de temperatura (sensor de infravermelho) e agitador magnético, sob condições de vaso fechado (“closed vessel”).

Todos os 40 adutos propostos neste trabalho de tese foram posteriormente, enviados para avaliação da atividade citotóxica em linhagem de células de leucemia promielocítica humanas (HL-60) pelo grupo de pesquisas coordenado pelo professor Dr. Demétrius de Araújo, pesquisador do CBioTec (UFPB).

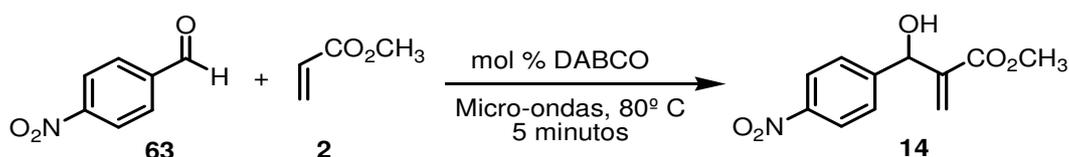
CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Preparação de AMBH entre aldeídos aromáticos e acrilato de metila ou acrilonitrila sob condições de irradiação de microondas

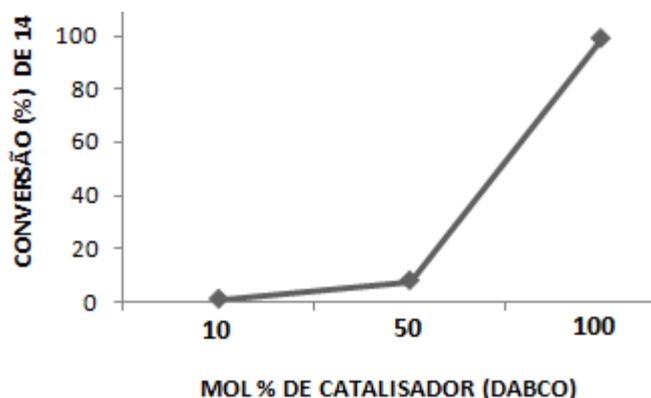
Iniciamos nosso trabalho buscando a preparação dos AMBH oriundos da reação entre aldeídos aromáticos e acrilato de metila. Para isto, submetemos primeiramente três reações de preparação do aduto **14**, usando 0.1, 0.5 e 1 equivalente de DABCO como catalisador e excesso do acrilato **2** (5.3 mmol). As reações foram realizadas a temperatura de 80° C sob agitação magnética em tempo fixo em 5 minutos (Esquema 5.1).

Esquema 5.1 Reação entre *p*-(NO₂)-benzaldeído (**63**) e acrilato de metila (**2**) sob catálise de DABCO em diferentes proporções.



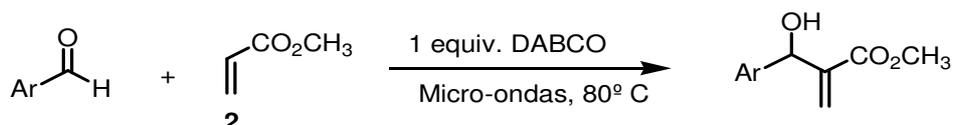
Ao término das reações, as misturas reacionais foram previamente filtradas em sílica gel e a análise por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de Massas (CG-EM) nos forneceu as conversões para estes três processos (Figura 5.1). Podemos observar que a conversão máxima de **63** em **14** ocorreu quando 1 equivalente de DABCO foi utilizado, onde o produto foi isolado em rendimento quantitativo.

Figura 5.1 Análise da conversão de **63** em **14** usando 0.1, 0.5 e 1 equivalente de DABCO



Com base nos resultados obtidos na preparação de **14**, procedemos a síntese dos demais adutos usando 0.5 mmol de aldeídos aromáticos, 1 equivalente de DABCO como catalisador e 1 mL de acrilato de metila (5.3 mmol). As reações foram irradiadas a 80° C sob condições de vaso fechado. Limitamos o tempo máximo de irradiação em 120 minutos para as reações. Os resultados destes procedimentos reacionais estão sumarizados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilato de metila usando irradiação de micro-ondas



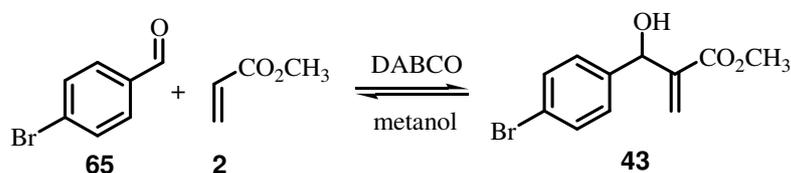
Entrada	Ar	AMBH	Tempo (min)	Rendimento (%) ^a
1	C ₆ H ₅	12	120	NR
2	<i>o</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	37	10	99
3	<i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	39	5	99
4	<i>p</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	14	5	99
5	<i>p</i> -(F)C ₆ H ₄	27	120	NR
6	<i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄	41	120	NR
7	<i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄	43	120	NR
8	<i>p</i> -(CH ₃)C ₆ H ₄	44	120	NR
9	<i>p</i> -(OCH ₃)C ₆ H ₄	46	120	NR
10	2-C ₅ H ₄ N	48	10	99
11	3-C ₅ H ₄ N	19	10	99
12	4-C ₅ H ₄ N	50	5	99
13	2-C ₁₀ H ₇	28	120	NR
14	1-C ₁₀ H ₇	53	120	NR
15	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	54	120	NR

^a rendimento isolado; NR = não ocorreu reação.

mesmo foi obtido com rendimento quantitativo em 5 minutos de reação (Tabela 5.1, entrada 4).

Com o objetivo de provar o equilíbrio em nossas reações investigadas, nós realizamos um similar experimento ao realizado por CANTILLO e KAPPE, onde o aduto puro **43**, preparado previamente por protocolo reacional descrito em breve, foi dissolvido em 1 mL de metanol em presença de DABCO (2 equivalentes) e posteriormente foi aquecido a 120° C sob irradiação de micro-ondas por 2 horas. Em seguida, nós observamos a formação de aldeído **65** em considerável quantidade, tanto por análise de Cromatografia por Camada Delgada (CCD) quanto por CG-EM (~55%). Após essa inicial investigação, a mistura reação foi deixada a temperatura de 0° C sob agitação magnética por 24 horas, sendo observado o deslocamento do equilíbrio novamente no sentido e formação de **43**, confirmando assim a natureza reversível desta reação (Esquema 5.3).

Esquema 5.3 Característica reversível na RMBH entre **65** e **2** em metanol



Recentemente, nosso grupo vem demonstrando que o abaixamento da temperatura minimiza a formação de co-produtos na reação de Morita-Baylis-Hillman (Junior *et al.*, 2010). Aliada a este fato, a diminuição de temperatura poderia favorecer as reações que fossem endergônicas já próximas a temperatura ambiente. Sendo assim, realizamos a síntese para os adutos usando condição a baixa temperatura (0° C) sob agitação magnética. Em alguns casos, a utilização de metanol como fonte de prótons foi mais efetiva, tornando a reação mais rápida, considerando a proposta mecanística relatada por Aggarwal (ROBIETTE *et al.*, 2007). Os resultados de tempo e rendimento obtidos a baixa temperatura para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilato de metila estão sumarizados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilato de metila usando condição a 0° C^a

Entrada	Ar	AMBH	Tempo	Rendimento (%) ^b
1	C ₆ H ₅	12	48 h	99 ^c
2	<i>o</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	37	3 h	92
3	<i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	39	2 h	98
4	<i>p</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	14	3 h	85
5	<i>p</i> -(F)C ₆ H ₄	27	48 h	99 ^c
6	<i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄	41	48 h	95 ^c
7	<i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄	43	72 h	90 ^c
8	<i>p</i> -(CH ₃)C ₆ H ₄	44	22 dias	83 ^c
9	<i>p</i> -(OCH ₃)C ₆ H ₄	46	23 dias	60 ^c
10	2-C ₅ H ₄ N	48	5 h	95
11	3-C ₅ H ₄ N	19	2 h	98
12	4-C ₅ H ₄ N	50	2 h	81
13	2-C ₁₀ H ₇	28	16 dias	85
14	1- C ₁₀ H ₇	53	10 dias	60
15	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	54	9 dias	63 ^c
16	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	54	18 h	90 ^d

^a Reações usando aldeído (0.5 mmol), acrilato de metila (5.3 mmol) e DABCO (0.5 mmol) ;

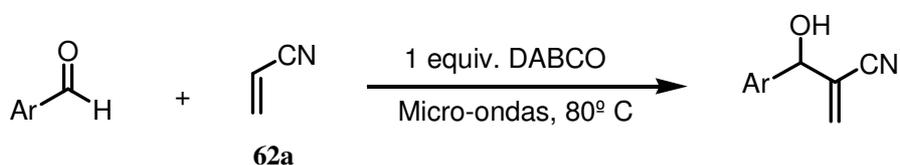
^b rendimento isolado; ^c 0.5 mL de metanol foi usado como solvente; ^d 0.5 mL de DMF:H₂O (9:1) foi usado como solvente

Podemos observar na Tabela 5.2 que esta metodologia se demonstrou muito eficiente para a síntese dos adutos propostos. Os adutos **12**, **27**, **41**, **43**, **44**, **46**, **28**, **53** e **54** foram obtidos em rendimentos bons a excelentes, confirmando o esperado. Observe que reações que não formaram produto na metodologia de micro-ondas foram eficientes quando o protocolo a 0° C foi aplicado. Na preparação do aduto **54**, o melhor resultado foi obtido usando uma mistura de DMF e H₂O (9:1) como solvente, quando comparado com a utilização de

metanol como solvente, onde a reação se processou de forma lenta, obtendo 63% de rendimento (Entradas 15 e 16, Tabela 5.2).

Em seguida, investigamos a reação entre aldeídos aromáticos e acrilonitrila (**62a**) em reator de micro-ondas à temperatura de 80° C. As reações foram realizadas usando 1 equivalente DABCO como catalisador, excesso do acceptor **62a** (3.1 mmol) sob agitação magnética em condições de vaso fechado, de forma análoga a realizada com aldeídos aromáticos e acrilato de metila. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila usando irradiação de micro-ondas



Entrada	Ar	AMBH	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	C ₆ H ₅	13	60	86 ^{b,h}
2	<i>o</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	16	1.5	99 ^a
3	<i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	38	1.5	70 ^{a,h}
4	<i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	38	5	98 ^{a,c}
5	<i>p</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	15	1.5	99 ^a
6	<i>p</i> -(F)C ₆ H ₄	26	120	82 ^{b,d,h}
7	<i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄	40	120	84 ^{b,f,h}
8	<i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄	42	30	54 ^{a,e,h}
9	<i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄	42	60	63 ^{a,f,h}
10	<i>p</i> -(CH ₃)C ₆ H ₄	25	120	82 ^b
11	<i>p</i> -(OCH ₃)C ₆ H ₄	45	120	Traços
12	2-C ₅ H ₄ N	47	1.5	99 ^a
13	3-C ₅ H ₄ N	20	1.5	99 ^a
14	4-C ₅ H ₄ N	49	1.5	99 ^a

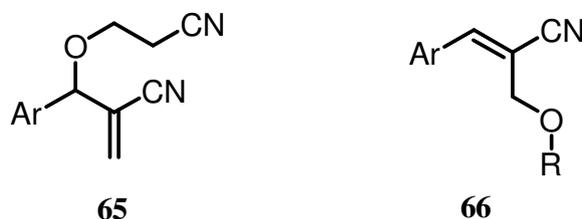
Tabela 5.3 - Continuação

Entrada	Ar	AMBH	Tempo (min)	Rendimento (%)
15	2-C ₁₀ H ₇	51	120	10 ^{b,g,h}
16	1- C ₁₀ H ₇	52	120	80 ^b
17	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	24	120	Traços

^a rendimento isolado; ^b conversão determinada por CG-EM; ^c 0.5 mL de THF foi usado como solvente; ^d 0.5 mL de metanol foi usado como solvente; ^e > 20% de **65d** foi detectado por CG-EM; ^f 0.5 mL de etanol foi usado como solvente; ^g 0.5 mL de DMSO foi usado como solvente; ^h outros solventes foram investigados, mas sem sucesso.

Podemos observar que alguns adutos foram obtidos em excelentes rendimentos e em curto tempo reacional, sendo estas reações realizadas usando excesso de acrilonitrila como solvente (Entradas 2, 5, 12-14, Tabela 5.3). O aduto **38** foi obtido em 70% devido à formação de um subproduto mais polar observado por CCD e que foi detectado por CG-EM (ver anexo), sugerindo a formação de **65a** (Figura 5.2), similar ao observado no trabalho de Kundu e colaboradores (1999). Na tentativa de minimizar a formação deste subproduto, alguns solventes foram avaliados. Satisfatoriamente, a irradiação de micro-ondas a 80° C durante 5 minutos usando THF como solvente foi encontrada como as condições ótimas para a preparação de **38** (Entradas 3 e 4, Tabela 5.3).

Figura 5.2 Subprodutos detectados por análise de CG-EM. **65a** Ar = *m*-(NO₂)C₆H₄; **65b** Ar = *p*-(F)C₆H₄; **65c** Ar = *p*-(Cl)C₆H₄; **65d** Ar = *p*-(Br)C₆H₄; **65e** Ar = 2-C₁₀H₇; **66a** Ar = 2-C₁₀H₇; **66b** Ar = 3,4-(OCH₂O)C₆H₃; **66c** Ar = *p*-(F)C₆H₄; R = CH₃, CH₃CH₂.



Na preparação dos adutos **26** e **40**, foi detectado por CG-EM pequena formação de subprodutos **65b** e **65c** (Figura 5.2). No entanto, os solventes utilizados nestes dois experimentos foram os que forneceram melhores resultados. Na preparação de **42**, observamos uma maior proporção do

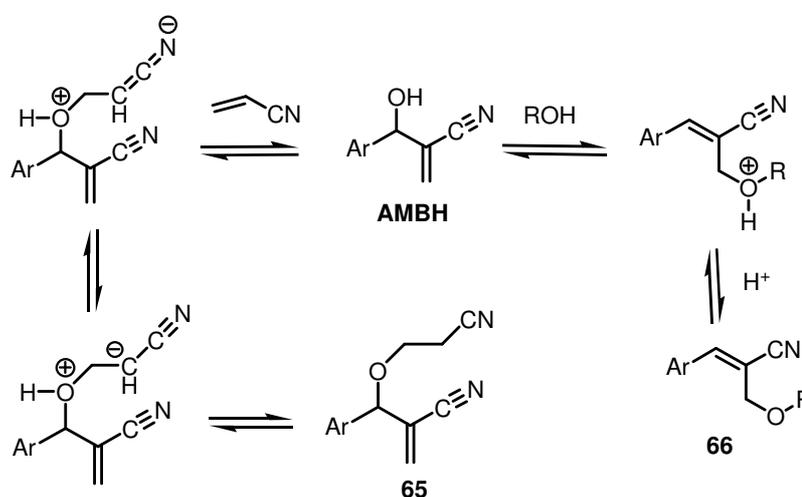
subproduto **65d** (Figura 5.2) quando a reação foi investigada usando somente o aceptor de Michael como solvente em 30 minutos de irradiação de micro-ondas. A mudança de solvente para etanol conduziu a um aumento de rendimento (Entradas 8 e 9, Tabela 5.3). Em etanol, a preparação de **42** foi também investigada usando irradiação de micro-ondas a 100° C e 120° C, onde foi observando uma diminuição dos rendimentos isolados para 45% e 15% respectivamente.

Baixo rendimento foi obtido para a preparação de **51** após 120 minutos de irradiação. Mesmo com a utilização de vários solventes, a reação conduziu a formação em maior proporção dos subprodutos **65e** e **66a**, ambos detectados por CG-EM (Figura 5.2), sendo o DMSO o solvente que conduziu maior formação de produto (Entrada 15, Tabela 5.3).

De forma análoga, a preparação de **24** não foi obtida nas condições de micro-ondas aplicadas, conduzindo também a formação dos subprodutos do tipo **65** e **66b**. O aduto **45** também não foi obtido com sucesso usando este protocolo reacional, demonstrando que a irradiação de micro-ondas tem suas limitações para a síntese de alguns adutos de Morita-Baylis-Hillman.

As formações dos subprodutos do tipo **66** ocorreram provavelmente devido a adição de Michael nucleofílica do álcool a dupla do alceno ativado seguido por isomerização e os subprodutos do tipo **65** ocorreram provavelmente devido ao ataque nucleofílico da hidroxila do aduto formado a acrilonitrila, como mostrados na Figura 5.3.

Figura 5.3 Possível mecanismo envolvido na formação dos subprodutos do tipo **65** e **66**



Devido às limitações apresentadas na preparação de alguns substratos usando o aquecimento por irradiação de micro-ondas, realizamos também as reações a temperatura de 0° C. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila usando condição a 0° C^a

Entrada	Ar	AMBH	Tempo	Rendimento (%) ^b
1	C ₆ H ₅	13	20h	99
2	<i>o</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	16	40 mim	99
3	<i>m</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	38	25 mim	99
4	<i>p</i> -(NO ₂)C ₆ H ₄	15	15 mim	99
5	<i>p</i> -(F)C ₆ H ₄	26	20 h	95
6	<i>p</i> -(Cl)C ₆ H ₄	40	3.5 h	99
7	<i>p</i> -(Br)C ₆ H ₄	42	4 h	98
8	<i>p</i> -(CH ₃)C ₆ H ₄	25	24 h	99
9	<i>p</i> -(OCH ₃)C ₆ H ₄	45	48 h	92
10	2-C ₅ H ₄ N	47	30 mim	99
11	3-C ₅ H ₄ N	20	50 mim	99
12	4-C ₅ H ₄ N	49	10 mim	99
13	2-C ₁₀ H ₇	51	10 h	98
14	1- C ₁₀ H ₇	52	8 h	84
15	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	24	3 dias	90 ^c

^a Reações usando aldeído (0.5 mmol), acrilonitrila (3.1 mmol), DABCO (0.5 mmol)

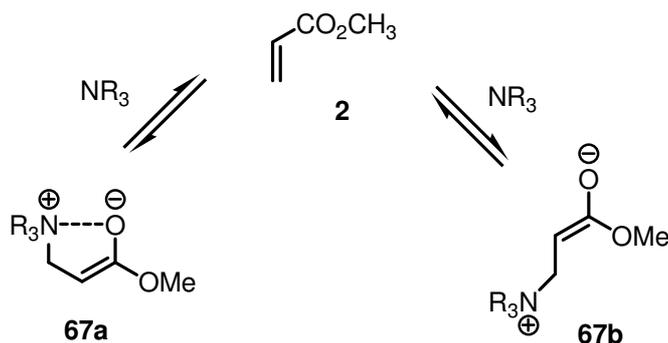
^b rendimento isolado; ^c 0.5 mL de metanol foi usado como solvente

Podemos observar que todos os adutos foram obtidos em excelentes rendimentos (84-99%). O abaixamento da temperatura conduziu a minimização dos subprodutos, tornando a reação quimiosseletiva na preparação dos adutos oriundos da reação entre os aldeídos aromáticos e acrilonitrila. De forma particular, a preparação de **24** necessitou do uso de metanol como solvente,

pois a reação se tornou muito lenta quando realizada em ausência de solvente ou em solventes apróticos. Mesmo com a temperatura baixa, ocorreu formação de um subproduto mais polar do tipo **65** em pequena proporção, detectada por CG-EM (Figura 5.2).

Em 1997, Rafel e Leahy reportaram o não esperado aumento da velocidade para a reação de Morita-Baylis-Hillman realizada a 0° C. Neste trabalho, 6 aldeídos, sendo 4 alifáticos e 2 aromáticos, foram investigados. A racionalização para este fenômeno foi a maior estabilidade em 0° C do enolato Z-aza-enolato (**67a**) no estado de transição em comparação ao E-aza-enolato (**67b**), mostrado na Figura 5.4. Curiosamente, a aceleração não foi observada para reações usando acrilonitrila como acceptor de Michael (Rafel e Leahy, 1997), fato que contraria resultados descritos por nosso grupo recentemente (JUNIOR *et al.*, 2010).

Figura 5.4 formação dos aza-enolatos Z e E



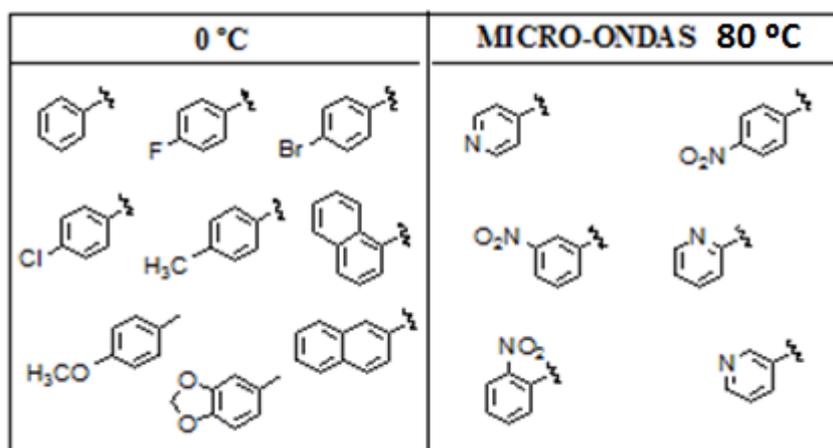
(Adaptado de Rafel e Leahy, 1997)

O sucesso no emprego de RMBH em baixa temperatura pode ser agora interpretado, se analisarmos o trabalho de Cantillo e Kappe (2010) acerca das propriedades termodinâmicas desta reação. A impossibilidade de acelerar a reação pelo aumento da temperatura foi racionalizada com base em cálculos teóricos da termodinâmica da reação. Um leve aumento da temperatura reacional pode deslocar o equilíbrio para os reagentes. Desta forma, protocolos reacionais a baixa temperatura deslocam o equilíbrio no sentido dos produtos, além de minimizar possíveis reações colaterais.

Observe que os adutos **12**, **24**, **27**, **41**, **43**, **44**, **45**, **46**, **28**, **53** e **54** não foram formados quando as reações foram conduzidas em aquecimento por irradiação de micro-ondas (Tabela 5.1). No entanto, reações a 0 °C conduziram a formação destes adutos em bons a excelentes rendimentos (Tabela 5.2). Diante destes resultados, nós observamos que dependendo dos aldeídos usados na RMBH, a mudança de temperatura do meio reacional pode conduzir a formação ou não do produto esperado, sendo o aquecimento por micro-ondas efetivo para aldeídos ativados. Ambos os protocolos reacionais aplicados são simples do ponto de vista operacional, onde uma simples filtração em sílica gel, seguido de retirada de solvente por evaporador rotatório gera adutos aromáticos em alto grau de pureza. Estes adutos, por sua vez, vêm apresentando atividades biológicas importantes (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

Na Figura 5.5, ilustramos as porções aromáticas de cada substrato (aldeído) com as melhores metodologias de síntese dos adutos usando acrilato de metila (**2**) e acrilonitrila (**62a**) como alcenos ativados.

Figura 5.5 Porções aromáticas dos aldeídos investigados na RMBH



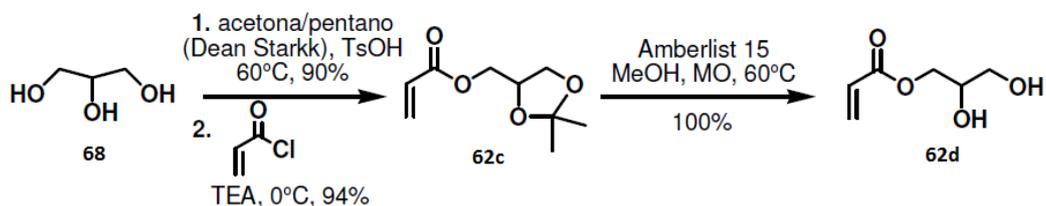
Cabe ressaltar que todos estes AMBH sintetizados foram caracterizados por métodos físicos (IV, RMN ¹H, RMN ¹³C e espectrometria de massas) e comparados com a literatura para confirmação estrutural (JUNIOR *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2009; de SOUZA *et al.*, 2004).

5.2 Preparação de AMBH a partir da isatina sob condições de irradiação de microondas

Para a realização da RMBH usando isatina (**58a**) como eletrófilo em micro-ondas, iniciamos pela busca na literatura de um protocolo convencional para definirmos a escolha do solvente. No pioneiro trabalho, Garden e Kakle (2002) relataram o uso de THF e etanol como solvente para a reação de isatina e *N*-alquil isatinas com acrilato de metila e acrilonitrila. Optamos por usar THF em virtude de observarmos anteriormente à formação de co-produto oriundo do ataque a dupla ligação do aduto pelo álcool etílico após aquecimento por micro-ondas a 80° C (Ver **66b**, Figura 5.2).

Nossos experimentos iniciaram com a preparação dos aceptores de Michael **62c** e **62d**, os quais tem sido eficientemente preparados em recente trabalho publicado por nosso grupo a partir do glicerol (**68**), como mostra o Esquema 5.4 (SOUSA *et al.*, 2011).

Esquema 5.4 Preparação dos aceptores de Michael **62c** e **62d** a partir do glicerol



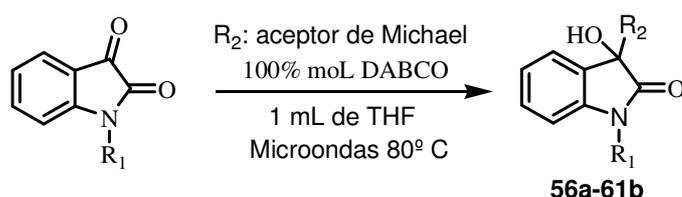
Após a preparação dos acrilatos **62c** e **62d**, partimos para a síntese de *N*-metil-isatina (**58b**). De forma breve, **58b** foi preparado pela reação de isatina com NaH em DMF seco, seguido pela adição de iodeto de metila ao meio reacional, produzindo **58b** em rendimento quantitativo de acordo com a literatura (Vyas *et al.*, 2010), como mostrado no Esquema 5.5.

Esquema 5.5 Preparação de *N*-metil-isatina (**58b**)



De posse aos materiais de partida, iniciamos a investigação da RMBH usando isatina e *N*-metil-isatina como eletrófilo (0.5 mmol), aceptores de Michael em excesso, sob condições de micro-ondas a 80 °C usando THF como solvente. Os valores de rendimentos e tempos reacionais encontram-se sumarizados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos derivados de isatina ou *N*-metil-isatina usando irradiação de micro-ondas



Entrada	R ₁	R ₂	AMBH	Tempo	Rendimento (%)
1	H	62a ^b	56a	20 min	99
2	CH ₃	62a ^b	56b	45 min	99
3	H	2 ^c	57a	1 h	78
4	CH ₃	2 ^c	57b	2 h	NR (74) ^a
5	H	62b ^d	59a	1 h	70
6	CH ₃	62b ^d	59b	2 h	NR
7	H	62c ^d	60a	2 h	82
8	CH ₃	62c ^d	60b	2 h	32
9	H	62d ^d	61a	2 h	21
10	CH ₃	62d ^d	61b	2 h	22

^a Rendimento obtido quando foi utilizado irradiação de microondas à 120° C usando 1,4 dioxana como solvente; ^b Foram utilizados 0.2 mL (3.1 mmol) do aceptor de Michael; ^c Foram utilizados 0.5 mL (5.3 mmol) do aceptor de Michael; ^d Foram utilizados 1.2 equivalentes do aceptor de Michael; NR = Não houve formação de produto

Da Tabela 5.5, podemos observar inicialmente que os adutos **56a**, **56b**, **57a**, **59a** e **60a** foram obtidos em bons rendimentos (70 – 99%) usando aquecimento por irradiação de micro-ondas. De forma particular, os adutos **56a**

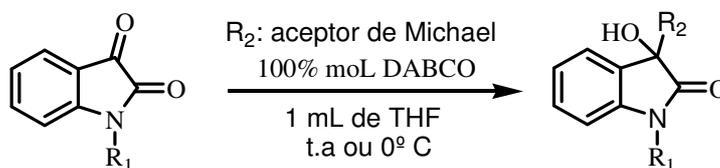
e **56b**, ambos obtidos da reação entre isatina ou *N*-metil-isatina e acrilonitrila, foram obtidos em rendimentos quantitativos e em menores tempos reacionais, quando comparado com os tempos de reação para a síntese dos demais adutos (Entradas 1 e 2 versus 3-10, Tabela 5.5). Outro ponto observado foi que o uso da irradiação de micro-ondas não foi efetiva para a preparação de **59b**, **60b**, **61a** e **61b**. Estes adutos foram obtidos em baixos rendimentos ou não houve formação de produto, mesmo após 2 horas de irradiação (Entradas 6, 8, 9 e 10, Tabela 5.5).

De forma particular, a síntese de **57b** não foi eficiente usando as condições iniciais de reação. Mesmo com 2 horas de irradiação a 80° C, o produto não foi formado. Elevamos a temperatura para 100° C e após duas horas de reação, **57b** foi obtido em apenas 16% . Usamos 1,4 dioxana como solvente para investigarmos a reação a temperatura de 120° C. O aduto **57b** foi obtido em 74% após duas horas de irradiação (Entrada 4, Tabela 5.5).

Observa-se que usando a metodologia de micro-ondas, as reações onde a isatina (**58a**) foi o eletrófilo de partida foram mais rápidas, quando comparadas com as reações realizadas usando *N*-metil-isatina (**58b**), como mostrado na Tabela 5.5. É conhecido que a adição de solventes próticos na RMBH auxiliam a migração de próton da etapa lenta, sendo esta espécie um carreador para esta transferência (AGGARWAL *et al.*, 2005). Alguns trabalhos recentes vem demonstrando que fenóis (pKa = 10) são aditivos que proporcionam significativa aceleração para a RMBH (FALTIN *et al.*, 2004, CANTILLO e KAPPE, 2010). Neste caso, o aditivo faz transferência de hidrogênio na etapa rápida de reação, fazendo com que a adição aldólica seja a etapa controladora da velocidade da reação (CANTILLO e KAPPE, 2010). Como o hidrogênio da isatina é ácido (pKa = 10.34), nós acreditamos que o comportamento doador de hidrogênio da isatina é semelhante aos fenóis.

Posteriormente a esta investigação, conduzimos as mesmas reações realizadas anteriormente usando protocolo a temperatura ambiente e a 0 °C. Os resultados estão sumarizados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 Rendimentos e tempos reacionais para os adutos derivados da isatina usando condições convencionais a temperatura ambiente ou a 0° C sob agitação magnética ^a



Entrada	R	R ₂	AMBH	Temperatura ambiente		Temperatura 0° C	
				Tempo	Rendimento (%) ^b	Tempo	Rendimento (%) ^b
1	H	62a ^c	56a	2.5 h	99	5 h	99
2	CH ₃	62a ^c	56b	1.5 h	95	1.5 h	96
3	H	2 ^d	57a	18 h	93	18 h	62
4	CH ₃	2 ^d	57b	5 dias	93	6 dias	85
5	H	62b ^e	59a	3.5 dias	84	2 dias	95
6	CH ₃	62b ^e	59b	1 dia	48	6 dias	88
7	H	62c ^e	60a	4 dias	72	2 dias	80
8	CH ₃	62c ^e	60b	2 dias	25	2 dias	84
9	H	62d ^e	61a	3 dias	64	3 dias	65
10	CH ₃	62d ^e	61b	3 dias	47	3.5 dias	75

^a Reações realizadas usando 0.5 mmol de isatina ou N-metil-isatina e 0.5 mmol de DABCO; ^b Rendimento isolado; ^c Foram utilizados 0.2 mL (3.1 mmol) do aceptor de Michael; ^d Foram utilizados 0.5 mL (5.3 mmol) do aceptor de Michael; ^e Foram utilizados 1.2 equivalentes do aceptor de Michael.

Observa-se que, com a diminuição da temperatura do meio reacional, os adutos **59b**, **60b**, **61a** e **61b** foram preparados de forma mais eficiente, quando comparados com os rendimentos reacionais obtidos via metodologia que empregou aquecimento por micro-ondas (Entradas 5-8 e 10, Tabela 5.6), onde se observou minimização de subprodutos não caracterizados. No entanto, para a preparação de **57a** e **57b**, as reações a temperatura ambiente foram mais satisfatórias, conduzindo a excelentes rendimentos (Entradas 2 e 3, Tabela

5.6). Já os adutos **56b** e **61a** foram obtidos em tempos e rendimentos semelhantes, tanto em protocolo reacional a temperatura ambiente quanto a 0° C, demonstrando que o comportamento dos substratos para reação de Morita-Baylis-Hillman não é geral e uniforme.

Estes adutos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (Infravermelho, RMN ¹H, RMN ¹³C e espectrometria de massas). As estruturas dos compostos **56a-b** e **57a-b** foram confirmadas de acordo com a literatura (CHUNG *et al.*, 2002). Os compostos **59a-b**, **60a-b** e **61a-b** são inéditos e destacaremos alguns sinais característicos que confirmam a formação do desejado aduto.

De forma geral, nos espectros de infravermelho, foi possível observar bandas largas entre 3291-3410 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento da ligação O-H e bandas fortes em 1717 cm⁻¹ atribuídas à presença do grupo carbonila de éster. A banda atribuída a carbonila de amida foi sobreposta a carbonila do éster. Somente nos adutos **60a** e **60b** foi possível observar em 1701 e 1712 cm⁻¹, respectivamente, a banda atribuída a carbonila amídica. Nos espectros de RMN ¹H, foram observados sinais referentes aos hidrogênios vinílicos que se apresentaram como singlete ou dubleto entre 6.5 e 6.6 ppm sinais entre 7.05 e 7.25 ppm referentes aos hidrogênios da região aromática. Nos espectros de RMN ¹³C, um sinal importante foi identificado com deslocamento químico entre 108.6 e 113.8 ppm referente ao carbono carbinólico formado.

Para os adutos **60a-b** e **61a-b**, observamos nos espectros de RMN ¹H uma região complexa de sinais (~ 3.2-4.2 ppm) provocada pela presença de hidrogênios diastereotópicos, apresentando conseqüentemente deslocamentos químicos distintos aos dois pares de diastereoisômeros formados, estando os sinais na maioria dos casos sobrepostos em 200 MHz. No entanto, nos espectros de RMN ¹H dos adutos **60a-b** observou-se a presença dos dois singletos por volta de 1.3 ppm atribuídos as metilas do grupo acetal.

Espectros de massa de alta resolução foram obtidos para os seis compostos inéditos estando dentro dos valores permitidos.

As caracterizações espectroscópicas detalhadas dos compostos inéditos **59a-b**, **60a-b** e **61a-b** estão descritas no capítulo 7. Os principais dados espectroscópicos estão sumarizados na Tabela 5.7.

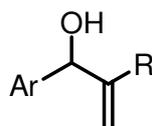
Tabela 5.7 Dados espectroscópicos principais dos adutos inéditos **59a-b**, **60a-b** e **61a-b**

AMBH	IV (cm ⁻¹)	RMN ¹ H (δ ppm)	RMN ¹³ C (δ ppm)
59a	3313 (O-H), 1717 (C=O)	7.16-7.25 (m, 1H); 6.84-7.05 (m, 3H); 6.63 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H vinílico); 6.51 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz, 1H vinílico)	113.8 (carbono carbinólico)
59b	3410 (O-H), 1708 (C=O)	7.25-7.33 (m, 1H); 6.92-7.08 (m, 3H); 6.63 (s, 1H vinílico); 6.52 (s, 1H vinílico)	112, 5 (carbono carbinólico)
60a	3291 (O-H), 1717 (C=O de éster), 1701 (C=O de amida)	7.17-7.25 (m, 1H); 6.84-7.05 (m, 3H); 6.60 (s, 1H vinílico); 6.51 (s, 1H vinílico)	110.8 (carbono carbinólico)
60b	3368 (O-H), 1728 (C=O de éster), 1712 de amida)	7.31-7.35 (m, 1H); 6.96-7.01 (m, 3H); 6.53 (s, 1H vinílico); 6.48 (s, 1H vinílico)	108.6 (carbono carbinólico)
61a	3406 (O-H), 1717 (C=O)	7.15-7.24 (m, 1H); 6.83-7.04; 6.61 (s, 1H vinílico); 6.49 (s, 1H vinílico)	111.4 (carbono carbinólico)
61b	3399 (O-H), 1709 (C=O)	7.25-7.34 (m, 1H); 6.92-7.02 (m, 3H); 6.63 (s, 1H vinílico); 6.53 (s, 1H vinílico)	110.0 (carbono carbinólico)

5.3 Avaliação da atividade citotóxica dos AMBH sintetizados

Os adutos sintetizados neste trabalho de tese foram enviados para avaliação da citotoxicidade na linhagem de células de leucemia HL-60. Na Tabela 5.8, mostramos os valores de CI_{50} dos AMBH oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila ou acrilato de metila.

Tabela 5.8 Valores de CI_{50} dos AMBH oriundos de aldeídos aromáticos e acrilonitrila ou acrilato de metila



Entrada	Ar	R	AMBH	CI_{50} (μM)
1	C_6H_5	CN	13	103.5
2	C_6H_5	CO_2CH_3	12	158,3
3	<i>o</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CN	16	24.28
4	<i>o</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CO_2CH_3	37	45.65
5	<i>m</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CN	38	17.28
6	<i>m</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CO_2CH_3	39	39.35
7	<i>p</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CN	15	22.39
8	<i>p</i> - $(NO_2)C_6H_4$	CO_2CH_3	14	29.14
9	<i>p</i> - $(F)C_6H_4$	CN	26	74.12
10	<i>p</i> - $(F)C_6H_4$	CO_2CH_3	27	105.9
11	<i>p</i> - $(Cl)C_6H_4$	CN	40	213,8
12	<i>p</i> - $(Cl)C_6H_4$	CO_2CH_3	41	40.29
13	<i>p</i> - $(Br)C_6H_4$	CN	42	27.16
14	<i>p</i> - $(Br)C_6H_4$	CO_2CH_3	43	73.76
15	<i>p</i> - $(CH_3)C_6H_4$	CN	25	104.9
16	<i>p</i> - $(CH_3)C_6H_4$	CO_2CH_3	44	120.9
17	<i>p</i> - $(OCH_3)C_6H_4$	CN	45	143.1
18	<i>p</i> - $(OCH_3)C_6H_4$	CO_2CH_3	46	106.2

Tabela 5.8 - Continuação

Entrada	Ar	R	AMBH	CI ₅₀ (μM)
19	2-C ₅ H ₄ N	CN	47	250.3
20	2-C ₅ H ₄ N	CO ₂ CH ₃	48	131.8
21	3-C ₅ H ₄ N	CN	20	88.10
22	3-C ₅ H ₄ N	CO ₂ CH ₃	19	159.1
23	4-C ₅ H ₄ N	CN	49	73.7
24	4-C ₅ H ₄ N	CO ₂ CH ₃	50	63.44
25	2-C ₁₀ H ₇	CN	51	16.42
26	2-C ₁₀ H ₇	CO ₂ CH ₃	28	30.6
27	1- C ₁₀ H ₇	CN	52	25.47
28	1- C ₁₀ H ₇	CO ₂ CH ₃	53	30.31
29	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	CN	24	103.9
30	3,4-(OCH ₂ O)C ₆ H ₃	CO ₂ CH ₃	54	125.2

Como mostrado na Tabela 5.8, todos os adutos sintetizados apresentaram expressiva atividade citotóxica. Uma análise inicial da relação estrutura atividade (REA) nos revela que quase todos os adutos que possuem o grupo nitrila possuem maiores atividades citotóxicas do que os adutos que possuem o grupo carboximetiléster. O aumento da atividade pela modificação dos grupos CO₂R por CN tem sido observado extensivamente por nosso grupo, sugerindo que estes grupos são farmacofóricos para os AMBH pertencentes a estas classes (Junior *et al.*, 2010). Em outros casos, a atividade para os adutos contendo grupo carboximetiléster são maiores do que os adutos contendo o grupo nitrila.

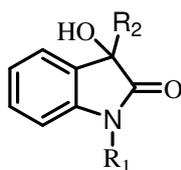
Os adutos nitrilados que possuem grupos naftil (**51** e **52**) e nitroaromáticos (**16**, **38** e **15**) foram os que apresentaram maior atividade da série congênere, apresentando valores de CI₅₀ entre 16.42 e 25.47μM. Dentre estes adutos mais ativos, aqueles que possuem grupo nitro ligado ao anel aromático já vêm apresentando atividade antibacteriana e protozoária, sendo a

redução do grupo nitro, o mecanismo de ação proposto (BHAT e SINGH, 2011; SILVA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2012).

Observa-se ainda pela Tabela 5.8 que dentre os adutos que possuem halogênios ligados ao anel aromático, os compostos halogenados **41** e **42** foram os que demonstraram maior atividade contra HL-60, apresentando Cl_{50} de 40.29 e 27.16 μ M, respectivamente. Os adutos que possuem grupos doadores de elétrons se demonstraram os menos ativos da série (Entradas 15-18 e 29-30, Tabela 5.8), além dos adutos **47** e **19** que contem anéis piridínicos em sua estrutura (Entradas 19 e 22, Tabela 5.8).

A investigação da atividade citotóxica foi realizada posteriormente para os adutos oriundos da RMBH usando isatina como eletrófilo. Os valores de Cl_{50} estão mostrados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Valores de Cl_{50} dos AMBH **56a-b**, **57a-b**, **59a-b**, **60a-b** e **61a-b**.



ENTRADA	R ₁	R ₂	AMBH	Cl ₅₀ (μ M)
1	H	62a	56a	10.8
2	CH ₃	62a	56b	7.8
3	H	2	57a	69.6
4	CH ₃	2	57b	69
5	H	62b	59a	>100
6	CH ₃	62b	59b	>100
7	H	62c	60a	63.5
8	CH ₃	62c	60b	72.8
9	H	62d	61a	>100
10	CH ₃	62d	61b	>100

Como mostrado na Tabela 5.9, os adutos **56a-b**, **57a-b** e **60a-b** foram os que apresentavam maiores atividades contra HL-60. De forma particular, os adutos nitrilados **56a e 56b** foram os mais ativos dentre todos os 40 adutos sintetizados neste trabalho. Observa-se que os adutos lipofílicos **57a-b e 60a-b** são mais ativos do que seus análogos hidrofílicos **59a-b e 61a-b**.

A lipofilicidade é um importante parâmetro a ser analisado no processo de busca de novos fármacos, pois reflete a biodisponibilidade oral de um fármaco, juntamente com outros parâmetros que fazem parte a regra de Lipinski. Esta regra descreve as propriedades ótimas que moléculas bioativas e fármacos comerciais em geral apresentavam, denominada de “regra dos 5” (LIPINSKI *et al.*, 1997). Nesta regra, fármacos eficientes apresentam parâmetros de lipossolubilidade (expressada pelo coeficiente de partição octanol / água, log P) menores do que 5; massa molar (M em g/mol) menores do que 500; número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH) menor do que 5 e número de átomos potencialmente aceptores de ligações de hidrogênio (nALH) menor do que 10.

Com o intuito de investigar a biodisponibilidade oral *in sílico* dos AMBH sintetizados neste trabalho, realizamos cálculos computacionais das propriedades pertencentes a “regra dos 5” para os mesmos. Observa-se na Tabela 5.10 abaixo que todos os adutos não causam nenhuma violação na regra de Lipinski, sendo promissores como fármacos com boa biodisponibilidade oral.

Tabela 5.10 Parâmetros de Lipinski calculados para os AMBH sintetizados neste trabalho^a

Entrada	AMBH	M	logP	nALH	nDLH	nVIOL ^b
1	13	159.18	1.49	2	1	0
2	12	192.21	1.57	3	1	0
3	16	204.19	1.40	5	1	0
4	37	237.21	1.48	6	1	0
5	38	204.19	1.43	5	1	0
6	39	237.21	1.51	6	1	0
7	15	204.19	1.45	5	1	0

Tabela 5.10 - Continuação

Entrada	AMBH	M	logP	nALH	nDLH	nVIOL^b
8	14	237.21	1.53	6	1	0
9	26	177.18	1.66	2	1	0
10	27	210.20	1.73	3	1	0
11	40	193.63	2.17	2	1	0
12	41	226.66	2.25	3	1	0
13	42	238.08	2.30	2	1	0
14	43	271.11	2.38	3	1	0
15	25	173.22	1.94	2	1	0
16	44	206.24	2.02	3	1	0
17	45	189.21	1.55	3	1	0
18	46	222.24	1.63	4	1	0
19	47	160.18	0.32	3	1	0
20	48	193.20	0.40	4	1	0
21	20	160.18	0.26	3	1	0
22	19	193.20	0.33	4	1	0
23	49	160.18	0.20	3	1	0
24	50	193.20	0.28	4	1	0
25	51	209.25	2.68	2	1	0
26	28	242.27	2.75	3	1	0
27	52	209.25	2.65	2	1	0
28	53	242.27	2.73	3	1	0
29	24	203.20	1.38	4	1	0
30	54	236.22	1.46	5	1	0
31	56a	200.20	0.69	4	2	0
32	56b	214.22	0.94	4	1	0
33	57a	233.22	0.77	5	2	0
34	57b	247.25	1.01	5	1	0
35	59a	263.25	0.04	6	3	0

Tabela 5.10 - Continuação

Entrada	AMBH	M	logP	nALH	nDLH	nVIOL ^b
36	59b	277.28	0.29	6	2	0
37	60a	333.34	1.38	7	2	0
38	60b	347.37	1.63	7	1	0
39	61a	293.28	-0.51	7	4	0
40	61b	307.30	-0.26	7	3	0

^a Cálculos realizados usando a plataforma Molinspiration ; ^b Violação da regra de Lipinski

Com os resultados descritos anteriormente, podemos observar que a maioria dos AMBH sintetizados possui atividade contra linhagens de células de leucemia. Os adutos foram sintetizados em protocolos sintéticos eficientes, onde a irradiação em micro-ondas foi importante na preparação de adutos considerados mais promissores neste trabalho.

Com a tentativa de racionalizarmos melhor a relação entre a estrutura química e a atividade dos adutos bioavaliados, todos os adutos sintetizados neste trabalho foram submetidos a cálculos quânticos para obtenção inicial de descritores físico-químicos.

Após as etapas de “scan” para cada aduto, foi selecionado o mínimo conformacional mais estável. Posteriormente, estes mínimos foram submetidos a cálculo de otimização de geometria e determinação de frequência vibracionais no nível HF/6-31+G(d). Todas as conformações mais estáveis obtidas para cada aduto presente neste trabalho estão em anexo. Energias dos orbitais HOMO, LUMO e momento dipolo foram retirados destes cálculos. A Tabela 5.11 sumariza os descritores obtidos por cálculos teóricos juntamente com os valores de atividade biológica (CI₅₀).

Tabela 5.11 Valores de atividade citotóxica e parâmetros obtidos usando cálculos quânticos

Entrada	AMBH	CI ₅₀ (μ M)	pCI ₅₀ ^a	μ (Debie)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP ^b
1	13	103.5	3.99	3.97	- 0.34555	0.05915	0.40470
2	12	158,3	3.80	3.41	- 0.32878	0.06487	0.39365
3	16	24.28	4.61	3.60	- 0.37771	0.03565	0.41336
4	37	45.65	4.34	5.26	- 0.35726	0.05263	0.40989
5	38	17.28	4.76	6.60	- 0.38100	0.03195	0.41295
6	39	39.35	4.41	8.54	- 0.35895	0.04574	0.42826
7	15	22.39	4.65	5.69	- 0.38252	0.03068	0.41320
8	14	29.14	4.54	7.05	- 0.36494	0.04539	0.41033
9	26	74.12	4.13	4.04	- 0.34984	0.05498	0.40482
10	27	105.9	3.98	4.12	- 0.33276	0.06150	0.39426
11	40	213,8	3.67	4.11	- 0.34681	0.05373	0.40054
12	41	40.29	4.39	4.33	- 0.33123	0.06027	0.39150
13	42	27.16	4.57	4.14	- 0.34320	0.05083	0.39403
14	43	73.76	4.13	4.39	- 0.32848	0.05763	0.38611
15	25	104.9	3.98	4.12	- 0.33459	0.06035	0.39494
16	44	120.9	3.92	3.37	- 0.31768	0.06530	0.38298
17	45	143.1	3.84	3.87	- 0.32162	0.05972	0.38134
18	46	106.2	3.97	2.22	- 0.30485	0.06624	0.37109
19	47	250.3	3.60	3.36	- 0.36129	0.06014	0.42143
20	48	131.8	3.88	1.98	- 0.34029	0.06907	0.40936
21	20	88.10	4.06	4.91	- 0.36039	0.05674	0.41713
22	19	159.1	3.80	2.42	- 0.34095	0.06521	0.40616
23	49	73.7	4.13	3.95	- 0.36371	0.05445	0.41816
24	50	63.44	4.20	4.63	- 0.34499	0.06018	0.40517
25	51	16.42	4.78	4.02	- 0.30521	0.05940	0.36461
26	28	30.6	4.51	3.33	- 0.29083	0.06237	0.35320

Tabela 5.11 - Continuação

Entrada	AMBH	Cl ₅₀ (μ M)	pCl ₅₀ ^a	μ (Debie)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	GAP ^b
27	52	25.47	4.59	4.09	- 0.30517	0.06132	0.36649
28	53	30.31	4.52	3.61	- 0.29092	0.06503	0.35595
29	24	103.9	3.98	3.52	- 0.31512	0.05817	0.37329
30	54	125.2	3.90	3.28	- 0.30211	0.06548	0.36459
31	56a	10.8	4.97	3.44	- 0.32655	0.05670	0.38325
32	56b	7.8	5.11	5.01	- 0.32107	0.05600	0.37707
33	57a	69.6	4.16	4.81	- 0.31366	0.06085	0.37451
34	57b	69	4.16	4.57	- 0.30776	0.06344	0.37120
35	59a	>100	-	4.71	- 0.32714	0.05346	0.38060
36	59b	>100	-	4.59	- 0.32107	0.05787	0.37894
37	60a	63.5	4.20	4.06	- 0.31422	0.06008	0.37430
38	60b	72.8	4.14	4.51	- 0.30999	0.06050	0.37049
39	61a	>100	-	6.02	- 0.32772	0.05130	0.37902
40	61b	>100	-	4.63	- 0.30521	0.05753	0.36274

^a pCl₅₀ = -logCl₅₀; ^b GAP = E_{LUMO} - E_{HOMO}

Como podemos observar, nenhum dos descritores apresentou relação direta com os valores de atividade biológica para os adutos sintetizados neste trabalho, sendo a análise da relação quantitativa estrutura-atividade uma investigação futura a ser realizada por nosso grupo.

5.4 Mecanismos de ação: considerações iniciais

Em breve análise da REA, observamos que os regioisômeros nitrilados **16**, **38** e **15**, além dos adutos **51**, **52**, **27**, **56a** e **56b** demonstraram alta atividade citotóxica. No entanto, investigações sobre o mecanismo de ação destes compostos ainda não foram realizados.

Sabe-se que, compostos contendo a porção acceptora de Michael podem atuar como eletrófilos reagindo com grupos nucleofílicos (OH, SH, NH)

presentes em receptores ou enzimas, sendo importante no planejamento e novos agentes anti-câncer (AHN e SOK, 1996). A adição de Michael irreversível pode ocorrer, conduzindo a inibição do alvo biológico. No entanto, evidências sugerem que compostos antineoplásicos alquilantes ligam-se a vários nucleófilos celulares, perdendo seletividade (ANH e SOK, 1996).

Berube e colaboradores (1996) investigaram a reação dos nucleófilos biológicos glutationa (GSH) e DNA com β -hidroxiacrilatos, onde foi observado que a interação ocorre de forma mais rápida com a glutationa. É conhecido que compostos que inibem ou estimulam a síntese de GSH ou afetam a concentração celular tem sido avaliados como quimioterápicos contra câncer, devido aos níveis de glutationa celular serem encontrados em maior concentração em linhagens de células de câncer humano do que em células normais (RUSSO *et al.*, 1986; TEW, 1994). Existem evidências mostrando que agentes que alteram a concentração de GSH afetam a transcrição de detoxificação de enzimas, proliferação celular e apoptose (POWIS *et al.*, 1997).

Em 2007, um estudo eletroquímico foi realizado com o aduto **14**, onde foi observada a formação da espécie **63** em presença de GSH, como mostra a Esquema 5.6. O aduto foi considerado como um agente biorredutivo com a função de diminuir os níveis de glutationa (GOULART *et al.*, 2007).

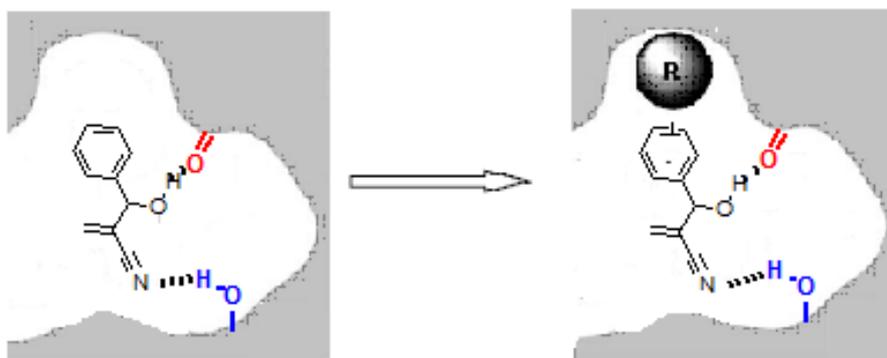
Esquema 5.6 Formação da espécie **63**



Com relação aos adutos **51**, **52** e **42**, acreditamos que o aumento da lipofilicidade pode ser um fator importante para a atividade biológica observada, tendo em vista que substâncias com maior coeficiente de partição (logP) tendem a ultrapassar com mais facilidade as biomembranas lipofílicas, conferindo melhor perfil farmacológico (BARREIRO e FRAGA, 2008, p. 41). A introdução de um átomo de halogênio ou grupos volumosos pode melhorar também a afinidade por um determinado alvo biológico (HERNANDES *et al.*, 2010). Observe na Figura 5.6 que o aduto **13** ($Cl_{50} = 103.5 \mu M$) possui uma

interação menos favorável com um hipotético sítio ativo de uma enzima, do que quando inserido no anel aromático, um grupo R volumoso, como por exemplo, um átomo de bromo, correspondendo ao aduto **42** ($Cl_{50} = 27.23 \mu\text{M}$) ou um grupo naftil, correspondendo aos adutos **51** e **52** que possuem valores de Cl_{50} 16.42 e 25.47 μM respectivamente.

Figura 5.6 Visão genérica do quanto a inserção de um grupo volumoso pode melhorar a afinidade de um AMBH no sítio ativo de um alvo biológico



Os adutos nitrilados derivados da isatina **56a** e **56b** demonstram que a utilização de estruturas privilegiadas e ou inspiradas em produtos naturais continua sendo um instrumento relevante no processo de planejamento e descoberta de novos fármacos.

Investigações sobre o mecanismo de ação destes compostos foram realizadas usando citometria de fluxo, onde nenhuma alteração no ciclo celular, fragmentação de DNA ou despolarização mitocondrial foi observada, sugerindo que **56a** e **56b** devem estar alterando apenas o metabolismo celular, sem causar apoptose ou necrose. Recentemente, o alcalóide paratunamida C foi isolado de *Turpinia arguta* e foi observada moderada ação na clivagem da fita de DNA, sendo este um possível mecanismo de ação para estes adutos (WU *et al.*, 2011).

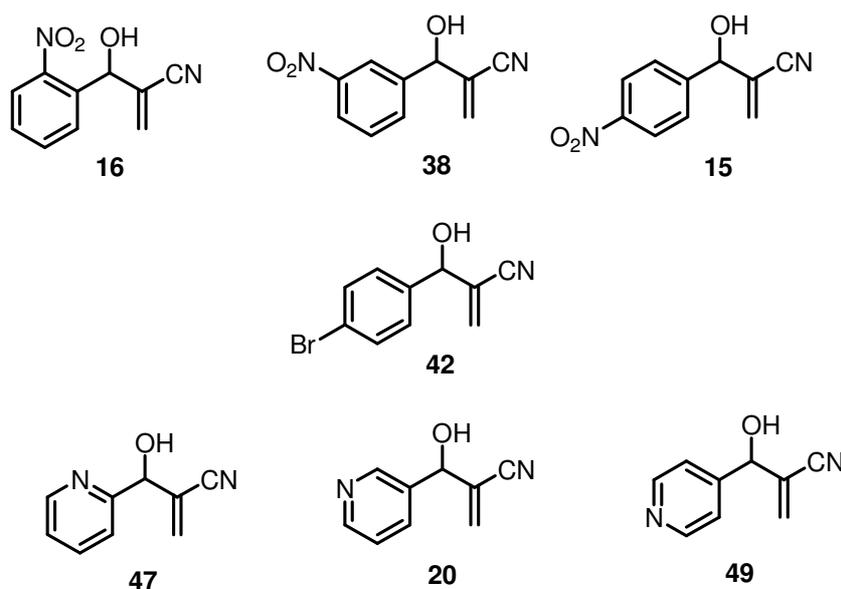
5.5 Avaliação da atividade antimetabólica dos adutos

Embriões de ouriços-do-mar têm sido amplamente utilizados como modelo para elucidação do modo de ação de vários agentes antineoplásicos, adicionando novas descobertas na área da oncofarmacologia (MONTENEGRO *et al.*, 2004). Células embrionárias de ouriços-do-mar apresentam várias

similaridades com o ciclo celular humano, tornando-se um interessante modelo não somente usado para a busca de novos agentes antimetabólicos, como também na identificação de compostos que agem no bloqueio da síntese de DNA, tradução de RNA e reorganização dos microtúbulos (SIMON-LEVERT *et al.*, 2007).

Sendo assim, alguns AMBH sintetizados neste trabalho foram enviados para o LABIDE-UFPB (Laboratório de Desenvolvimento) para investigação da ação dos mesmos no desenvolvimento embrionário inicial do ouriço do mar (*Echinometra lucunter*) com o objetivo de procurar evidências do modo de atuação destes compostos no processo de divisão mitótica. Na Figura 5.7 abaixo estão mostrados os adutos investigados.

Figura 5.7 AMBH investigados quanto à atividade antimetabólica em células embrionárias de ouriço-do-mar

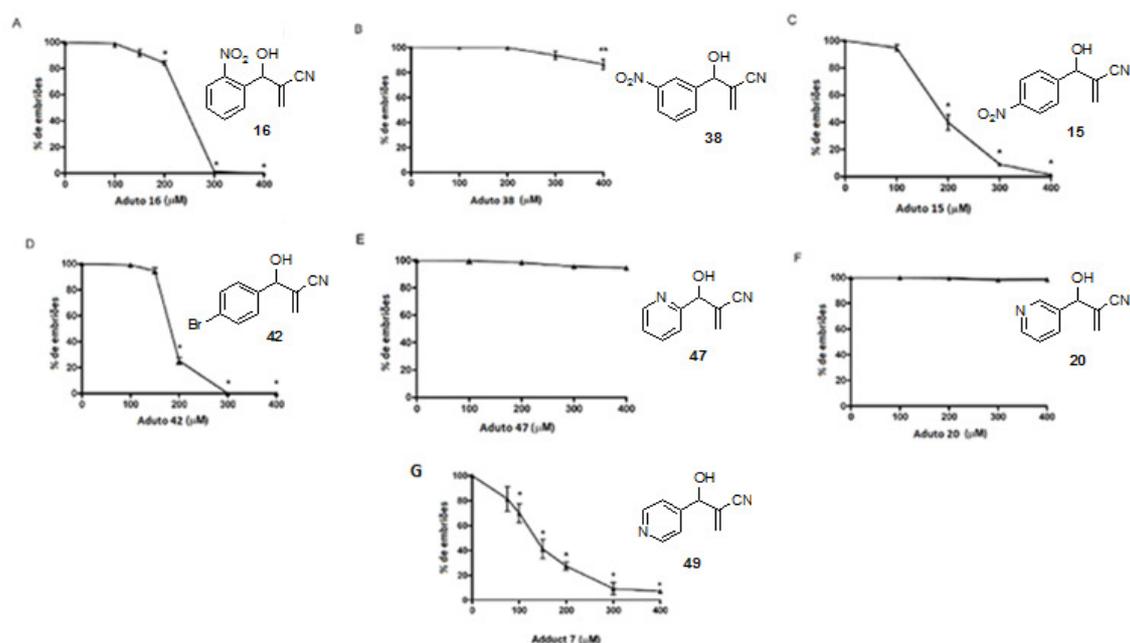


Inicialmente, foi realizado o tratamento dos embriões em diferentes concentrações dos adutos seguido da observação dos estágios embrionários de primeira clivagem e mórula. A Figura 5.8 apresenta o efeito dos adutos investigados no estágio de primeira clivagem, onde o percentual de embriões corresponde ao número de embriões que já passaram pela primeira clivagem.

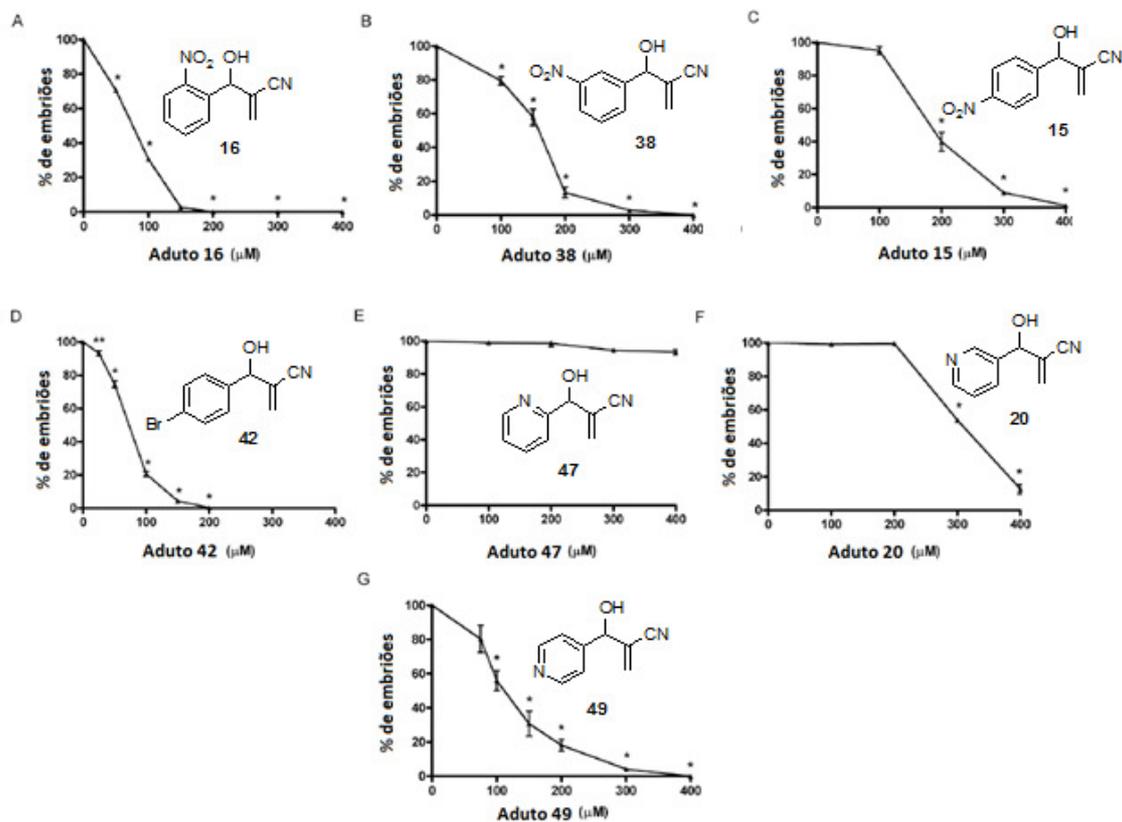
Podemos observar pela Figura 5.8 que os AMBH **16**, **38**, **15**, **42** e **49** apresentaram forte atividade antimetabólica em células embrionárias de ouriço do mar. Os adutos com anéis piridínicos **47** e **20** não tiveram efeito no progresso

neste estágio de desenvolvimento embrionário em nenhuma das concentrações testadas. Os adutos **16**, **38**, **15**, **42** e **49** inibiram a primeira divisão celular, apresentando resposta do tipo dose-dependente (Figura 5.8 A-D e G). Os compostos **15**, **42** e **49** foram os adutos mais ativos, com valores de Cl_{50} de 180.5, 172.2 e 128.3 μ M, respectivamente. O aduto piridínico **42** mostrou um significativo efeito no bloqueio do progresso do estágio de primeira clivagem a partir da concentração de 100 μ M (Figura 5.8 G).

Figura 5.8 Efeito dos adutos **16**, **38**, **15**, **42**, **47**, **20** e **49** na primeira clivagem

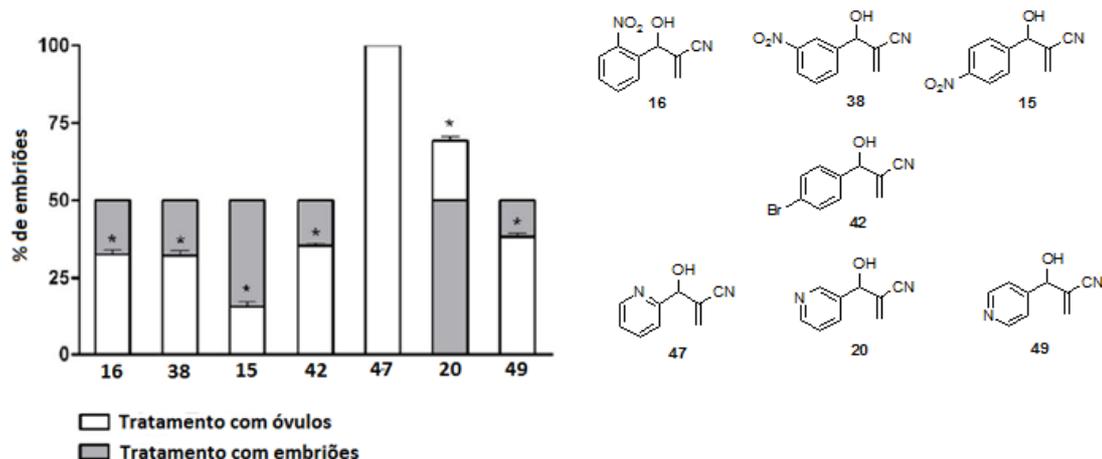


Em etapa posterior de investigação, os AMBH foram avaliados no progresso do estágio de mórula. Os resultados demonstraram mesma tendência em relação ao estágio de primeira clivagem. Contudo, os AMBH foram mais efetivos no bloqueio do progresso deste estágio de desenvolvimento, como mostrado na Figura 5.9. Observa-se que somente o aduto **47** não inibiu o progresso do estágio de mórula nas concentrações usadas. Os adutos **16** e **42** foram os mais efetivos apresentando Cl_{50} de 75.8 e 72.6 μ M, respectivamente. Ambos adutos bloquearam completamente o desenvolvimento quando os embriões foram incubados com 200 μ M dos compostos (Figuras 5.9 A e D).

Figura 5.9 Efeito dos adutos **16**, **38**, **15**, **42**, **47**, **20** e **49** na formação de mórula

Os AMBH **16**, **38**, **15**, **42** e **49** foram ainda mais efetivos no bloqueio da progressão para o estágio de mórula quando os óvulos de *Echinometra lucunter* foram pré-incubados com os mesmos, como podemos observar na Figura 5.10. Nenhum aduto foi capaz de bloquear a fertilização nas concentrações usadas. O aduto **47** não teve efeito no progresso do estágio de mórula sob tratamento prévio com os óvulos.

Figura 5.10 Efeito do tratamento prévio dos óvulos com os AMBH na formação de mórulas em comparação ao tratamento com embriões



Estes resultados conduziram a investigações da possibilidade dos adutos serem substratos de proteínas da superfamília ABC. Estas proteínas estão relacionadas com o transporte transmembranar de várias substâncias, tais como hormônios, esteróis, lipídeos, fosfolipídeos, oligopeptídeos, nucleotídeos e metais pesados (BELLAMY, 1996) e na resistência apresentada por células tumorais (JAEGER, 2009). Experimentos realizados demonstraram que os adutos **16**, **38**, **15**, **42** e **49** não são substratos de proteínas ABC, demonstrando o potencial destes compostos. Foi observado também que todos os adutos investigados não possuem toxicidade, onde os mesmos não induziram necrose das células, mantendo a integridade da membrana plasmática dos óvulos e embriões. A inibição da organização dos microtúbulos não foi observada, o que conduz a sugestão que o efeito observado nos adutos **16**, **38**, **15**, **42** e **49** pode estar relacionado com o bloqueio da síntese protéica e/ou de DNA.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Considerando os objetivos e as propostas deste trabalho, podemos concluir que:

- ✓ A reação de Morita-Baylis-Hillman promovida por irradiação de micro-ondas em reator específico para síntese orgânica a 80 °C foi eficiente para a preparação de adutos oriundos de aldeídos aromáticos mais reativos e acrilato de metila ou acrilonitrila.
- ✓ O uso de isatina e *N*-metil-isatina como eletrófilos nos forneceu os compostos **56a-b**, **57a**, **59a** e **60a** em bons a moderados rendimentos usando aquecimento por micro-ondas em reator específico para síntese orgânica.
- ✓ A aplicação do aquecimento por micro-ondas não foi favorável para a preparação de adutos oriundos de aldeídos aromáticos menos reativos, além dos compostos **57b**, **59b**, **60b** e **61a-b**, onde foi observada a formação de subprodutos e / ou a não formação de produto.
- ✓ O uso de protocolo reacional a temperatura de 0 °C foi eficiente para a preparação dos adutos menos reativos, atendendo as limitações apresentadas pelo uso da irradiação de micro-ondas, minimizando formação de subprodutos e/ou evitando inconveniente causado pela reversibilidade da reação.
- ✓ Os adutos **16**, **38**, **15**, **42**, **51**, **52**, **56a** e **56b** apresentaram forte atividade citotóxica frente à linhagem de células tumorais de leucemia (HL-60), sendo potenciais candidatos a fármacos antineoplásicos.
- ✓ Os adutos **16**, **38**, **15**, **42** e **49** apresentaram significativa atividade antimitótica em células embrionárias de ouriço do mar, bloqueando o ciclo

celular, tanto nos estágios de primeira clivagem quanto de mórula, além de apresentar baixo perfil tóxico.

6.2 Perspectivas

Como perspectivas deste trabalho de tese, podemos citar:

- ✓ A realização de estudos da Relação Quantitativa Estrutura Atividade (QSAR) com os 40 adutos investigados.
- ✓ A preparação de outros adutos derivados da isatina usando a tecnologia de micro-ondas ou baixa temperatura, visando obter compostos mais ativos e seletivos frente à patologia estudada.
- ✓ Avaliar biologicamente os adutos **56a** e **56b** em modelos experimentais *in vivo*, a fim de obter índice terapêutico e outras informações relevantes a cerca da toxicidade e mecanismo de ação.
- ✓ Preparar os adutos mais ativos na sua forma enantiomericamente pura e investigar a atividade dos enantiômeros frente às patologias estudadas pelo nosso grupo de pesquisas.
- ✓ Investigar o mecanismo de ação dos adutos através da inibição *in vitro* das enzimas topoisomerases.

CAPÍTULO 7 – MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Materiais e métodos

Todos os solventes e reagentes foram obtidos comercialmente e utilizados sem purificação prévia. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD). A detecção foi realizada por lâmpada de ultravioleta de 254nm. As colunas cromatográficas foram realizadas usando sílica gel 300-400 mesh. As fases orgânicas foram secadas sobre MgSO₄ ou Na₂SO₄ antes da evaporação em evaporador rotatório. As reações executadas sob irradiação em microondas foram realizadas em um reator de microondas CEM modelo Discover-System benchmate com temperatura monitorada por sensor de infravermelho. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e ¹³C) foram obtidos usando um espectrômetro Varian Mercury Spectra AC 20 (200 MHz para ¹H e 50 MHz para ¹³C). Os deslocamentos químicos foram relatados em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS), usando CDCl₃, CD₃OD e DMSO-*d*₆ como solvente. Os desdobramentos químicos referentes a cada acoplamento dos hidrogênios foram expressos como singleto (s), singleto largo (sl), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd), duplo dubleto duplo (ddd) e multiplete (m). Os espectros de infravermelho foram registrados no espectrofotômetro FTIR modelo IRPrestige-21 do fabricante Shimadzu usando pastilhas de KBr. As análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massas foram realizadas em aparelho modelo GCMS-QP2010 e os espectros de massas de alta resolução foram obtidos de um espectrômetro GCT Premier (TOF-MS), usando coluna: HP 5-MS e um LC-MS-IT-TOF do fabricante Shimadzu.

7.2 Procedimento geral para a preparação dos AMBH oriundos da reação utilizando aldeídos aromáticos como eletrófilos e irradiação de Microondas

Os correspondentes aldeídos (0.5 mmol), acrilonitrila (0.2 mL, 3.1 mmol) ou acrilato de metila (0.5 mL, 5.3 mmol), DABCO (0.5 mmol) e 0.5 mL de solvente (quando utilizado) foram colocados em tubo de vidro de 10 mL específico para reator de micro-ondas juntamente com um agitador magnético. A reação foi realizada sob irradiação de micro-ondas à 80° C (leitura monitorada por sensor de infravermelho) de 1.5–120 minutos (“Hold Time”) sob

condições de vaso fechado (“closed vessel”). Após o término da reação, a mistura reacional foi deixada esfriar a temperatura ambiente e em seguida foi realizada uma filtração em sílica gel usando uma mistura hexano/acetato de etila (7:3) como solvente. Os produtos reacionais foram concentrados sob pressão reduzida.

7.3 Procedimento geral para a preparação dos AMBH oriundos da reação utilizando aldeídos aromáticos como eletrófilos e protocolo a temperatura de 0 ° C

As reações foram realizadas usando os correspondentes aldeídos (0.5 mmol), acrilonitrila (0.2 mL, 3.1 mmol) ou acrilato de metila (0.5 mL, 5.3 mmol), DABCO (56 mg, 0.5 mmol) e 0.5 mL de solvente (quando necessário) à 0° C sob agitação pelo tempo indicado nas Tabelas 5.2 e 5.4. Posteriormente, o meio reacional foi diretamente filtrado em sílica gel, usando hexano/acetato de etila (7:3) como solvente e os produtos foram concentrados sob pressão reduzida.

7.4 Preparação de *N*-metil-isatina (58b)

Em balão seco de 125 mL foi adicionado hidreto de sódio (245 mg, 6.11 mmol, 1.1 equivalente, 60% dispersão em óleo mineral) e 25 mL de DMF sob atmosfera de argônio. Esta mistura foi colocada em banho de gelo até atingir a temperatura de 0 °C. Posteriormente, foi adicionado de forma lenta e gotejada a essa mistura, uma solução de isatina (818 mg, 5.60 mmol, 1.0 equivalente) em DMF (15 mL). Após a adição desta solução, a mistura ficou sob agitação magnética a temperatura ambiente. Após o término da reação (acompanhada por CCD), foi adicionado uma solução saturada de cloreto de amônio. A fase orgânica foi secada em Na₂SO₄ e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório para gerar o composto **58b** como um sólido vermelho em rendimento quantitativo.

7.5 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da Isatina usando irradiação de Micro-ondas

Isatina (73.5 mg, 0.5 mmol) ou *N*-metil-isatina (80.5 mg, 0.5 mmol), acrilatos **62a-62d** e **2**), THF (1 mL) e DABCO (56 mg, 0.5 mmol) foram colocados em um tubo de vidro apropriado para micro-ondas com um agitador magnético. A reação foi deixada sob irradiação de micro-ondas à temperatura de 80° C, sob condições de vaso fechado (“closed vessel”) pelo tempo indicado na Tabela 5.5. Após o término da reação, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o produto foi isolado por coluna cromatográfica usando sílica gel e uma mistura de acetato de etila/hexano como eluente.

7.6 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da Isatina usando protocolo a temperatura de 0° C

Para uma solução agitada de isatina (73.5 mg, 0.5 mmol) ou *N*-metil-isatina (80.5 mg, 0.5 mmol) e os acrilatos **62a-62d** e **2** em THF (1 mL), foi adicionado DABCO (56 mg, 0.5 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética à temperatura de 0° C pelo tempo indicado na Tabela 5.6. Após o término da reação, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o produto foi isolado por coluna cromatográfica usando sílica gel e uma mistura de acetato de etila/hexano como eluente.

7.7 Procedimento geral para a preparação dos AMBH derivados da isatina usando protocolo a temperatura ambiente

Para uma solução agitada de isatina (73.5 mg, 0.5 mmol) ou *N*-metil-isatina (80.5 mg, 0.5 mmol) e os acrilatos **62a-62d** e **2** em THF (1 mL), foi adicionado DABCO (56 mg, 0.5 mmol). A mistura reacional foi deixada sob agitação magnética à temperatura ambiente pelo tempo indicado na Tabela 5.6. Após o término da reação, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o produto foi isolado por coluna cromatográfica usando sílica gel e uma mistura de acetato de etila e hexano como eluente.

7.8 Procedimento usado para a investigação da reversibilidade da RMBH

Uma amostra do aduto **43** foi dissolvida em 1 mL de metanol e transferida para um tubo de vidro específico para reator de micro-ondas. Posteriormente, foi adicionado 2 mmols de DABCO e a reação foi deixada sob irradiação de micro-ondas à 120 °C por 2 h. Posteriormente, uma alíquota foi retirada do meio reacional, filtrada em sílica gel, dissolvida em CH₂Cl₂ e analisada por CG-EM. A mistura reacional restante foi deixada a 0 °C durante 24 h e uma nova alíquota foi retirada do meio reacional, filtrada em sílica gel, dissolvida em CH₂Cl₂ e analisada por CG-EM.

7.9 Procedimento computacional para otimização de geometria

Os cálculos de mapeamento da Superfície de Energia Potencial (SEP) foram realizados com auxílio do software Gaussian 09W® (FRISCH et al., 2009) ,através da técnica RPES (‘‘Relaxed Potential Energy Surface Scan’’), utilizando o método semi-empírico AM1. Para cada ligação sigma, o ângulo diedral envolvendo quatro átomos foi mantido fixo em passos de 10 graus até completar 360 graus onde, a cada passo, a porção restante da molécula tinha sua geometria otimizada. Ao final, para cada ligação selecionada foi visualizada sua respectiva curva utilizando o programa GaussView5® (DENINGTON, 2009), permitindo assim a observação das conformações de máximo e mínimo energético.

Após as etapas de ‘‘scan’’, para cada molécula, foi selecionado o mínimo conformacional mais estável. Este foi então submetido a cálculo de otimização de geometria e determinação de frequências vibracionais no nível HF 6-31+G(d). Energias dos Orbitais HOMO (‘‘Highest Occupied Molecular Orbitals’’ e LUMO (‘‘Lowest Unoccupied Molecular Orbitals’’ além do momento dipolo foram obtidos destes cálculos.

7.10 Procedimento para a avaliação citotóxica contra HL-60

A linhagem de células de leucemia promielocítica humanas (HL-60) foi adquirida no banco de células no Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células de leucemia foram mantidas em meio RPMI

1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 Mm de glutamina, 100 U/MI penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina a 37 °C com 5% CO₂.

A citotoxicidade dos compostos em células de leucemia foi avaliada usando a redução enzimática original de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil-2H-tetrazolium (MTT) para produzir cristais de formazan (MOSMANN, 1983).

As células foram cultivadas a 5×10^4 células/poço em placas de cultura com 96 poços. As células foram expostas a diferentes concentrações dos adutos (3,12 – 100 µM) dissolvidos em meio RPMI (três poços por concentração) com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas de incubação, as placas foram centrifugadas (500 x g, 5 min) e o sobrenadante foi removido, seguido pela adição da solução de MTT (0.5 mg/mL in PBS) e incubação a 37 °C. Após 3 horas, o produto MTT formazan foi dissolvido em SDS/HCl 0,01N e a absorbância foi mensurada a 570 nm em placa de leitura ELISA (Biotek ELx800) (Faheina-Martins *et al.*, 2011).

7.11 Procedimento para a avaliação da atividade anti-mitótica

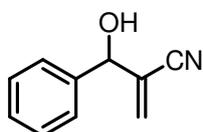
Ouriços-do-mar da espécie *Echinometra lucunter* foram coletados na Praia do Cabo Branco, município de João Pessoa, Paraíba – Brasil (7° 7' S, 34° 49' W). Os animais foram transportados para o laboratório em um recipiente de plástico preenchido com água do mar coletada nesta mesma praia.

Para os ensaios com embriões de ouriço do mar, 1×10^4 embriões / mL foram incubados em placas com 24 poços a 26 °C. Os AMBH foram adicionados 5 minutos após a fertilização a diferentes concentrações. Em diferentes intervalos de tempo, 200 µL de embriões foram fixados com o mesmo volume de formaldeído 4% estocadas a 4 °C. Análises dos estágios do desenvolvimento embrionário (primeira clivagem, segunda clivagem e mórula) foram realizadas usando um microscópio óptico comum, onde um total de 100 óvulos ou embriões foram avaliados em cada amostra. Após cada contagem foi determinada a percentagem de inibição correspondente aos óvulos e embriões que não se encontravam na fase de desenvolvimento característica para cada intervalo de tempo.

Para o tratamento prévio dos óvulos, 1×10^4 óvulos / mL foram incubados com os AMBH por 15 minutos antes da adição dos espermatozoides. Após fertilização, os embriões foram incubados e os estágios de desenvolvimento embrionário foram avaliados como descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes.

7.12 Dados espectroscópicos dos AMBH sintetizados neste trabalho

7.12.1 Aduto 13



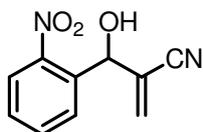
Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 86%

IV (KBr): 3444, 2229 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 7.30–7.40 (m, 5H), 6.04 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 5.77 (d, $J = 0.8$, 1H), 5.20 (s, 1H), 3.34 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 134.8, 130.3, 128.3, 128.1, 125.8, 115.7, 115.3, 72.9.

Massa de baixa resolução: $M^+ = 159$

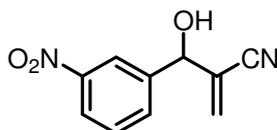
7.12.2 Aduto 16



Aspecto físico: óleo castanho

Rendimento: 99%

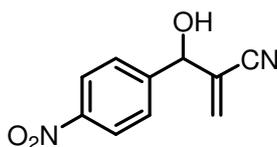
IV (KBr): 3341, 2229, 1350, 1516 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 8.01 (dd, $J = 8.0/1.4$ Hz, 1H); 7.84 (dd, $J = 6.0/1.8$, 1H); 7.72 (ddd, $J = 8.0/1.8/1.4$ Hz, 1H); 7.52 (ddd, $J = 8.0/1.6/1.4$ Hz, 1H); 6.12 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H); 6.09 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 5.98 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 69.1, 116.5, 124.3, 125.1, 129.1, 129.7, 132.0, 134.2, 134.3, 147.9.

7.12.3 Aduto **38**

Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 99%

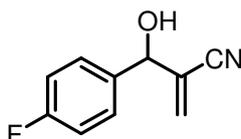
IV (KBr): 3345, 2229, 1520, 1350 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 8.24 (dd, $J = 1.8/1.6$ Hz, 1H); 8.18 (ddd, $J = 8.0/1.0/1.2$ Hz, 1H); 7.57 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H); 7.75 (ddd, $J = 7.8/1.6$ Hz, 1H); 6.09 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H); 6.20 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H); 5.43 (s, 1H); 3.02 (s, 1H, *CHOH*). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 72.7, 116.3, 121.1, 123.4, 125.0, 129.7, 131.5, 132.5, 141.2, 148.0. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 204$

7.12.4 Aduto **15**

Aspecto físico: óleo castanho

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3447, 3115, 2228, 1599, 1520, 1348, 736 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 8.21 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H); 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H); 6.07 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H); 6.16 (d, $J = 0.6$ Hz, 1H); 5.42 (s, 1H); 3.23 (s, 1H, *CHOH*). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 73.0, 116.6, 123.9, 126.1, 127.3, 130.5, 146.8, 147.8.

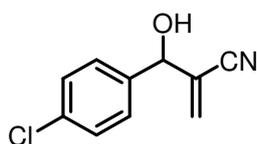
7.12.5 Aduto **26**

Aspecto físico: óleo amarelado

Rendimento: 95%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 7.26-7.37 (m, 4H), 6.07 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 5.98 (d, 1H, $J = 0.8$ Hz), 5.23 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 137.6, 134.6, 130.2, 128.9, 127.9, 125.9, 116.7, 73.3. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 177$

7.12.6 Aduto 40

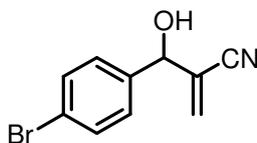


Aspecto físico: óleo amarelado

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3441, 2229 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 7.28-7.25 (m, 2H), 6.97-7.06 (m, 2H), 6.04 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 5.94 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.17 (s, 1H), 3.45 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 134.8, 130.3, 128.3, 128.1, 125.8, 116.7, 115.7, 115.3, 72.9. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 193$

7.12.7 Aduto 42

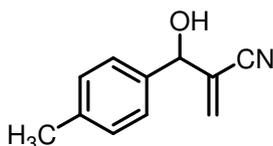


Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 98%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 7.54 (dd, $J = 6.0/2.0$ Hz, 2H); 7.28 (dd, $J = 6.0/1.8$ Hz, 2H); 6.11 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H); 6.04 (d, $J = 1.0$ Hz, 1 H); 5.27 (s, 1 H); 2.71 (s, CHOH). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 73.3, 116.7, 122.7, 125.8, 128.1, 130.3, 131.9, 138.1. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 237$

7.12.8 Aduto 25

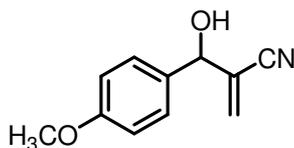


Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3447, 2228 cm^{-1} ; **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 173$

7.12.9 Aduto 45

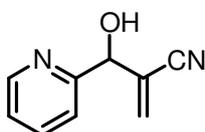


Aspecto físico: óleo amarelado

Rendimento: 92%

IV (KBr): 3447, 2228 cm^{-1} ; **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 189$

7.12.10 Aduto 47

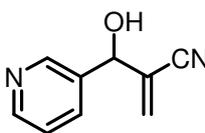


Aspecto físico: sólido marrom

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3113, 2225 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3):** δ 8.56 (ddd, $J = 8.0/1.4$ Hz, 1H); 7.75 (ddd, $J = 7.8/7.6/1.6$ Hz, 2H); 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H); 7.29 (ddd, $J = 0.8/1.0/1.2$ Hz, 1 H); 5.28 (s, 1 H); 6.21 (s, 1H); 6.05 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 72.9, 116.7, 121.2, 123.7, 125.8, 130.9, 137.4, 148.5, 156.0.

7.12.11 Aduto 20

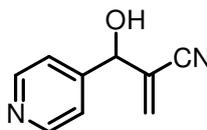


Aspecto físico: sólido castanho

Rendimento: 99%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 8.41 (m, 2H); 7.79 (ddd, $J = 7.8/1.8/1.6$ Hz, 1H); 7.33 (dd, $J = 8.0$ Hz, 1H); 6.05 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H); 6.17 (d, $J = 1.2$, 1H); 5.33 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 71.5, 116.7, 124.1, 126.0, 130.4, 135.0, 136.1, 147.4, 148.9. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 160$.

7.12.12 Aduto 49

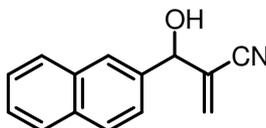


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.50 (d, *J* = 6 Hz, 2H); 7.36 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H); 5.31 (s, 1 H); 6.16 (d, *J* = 0.6 Hz, 1 H); 6.06 (s, 1 H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 72.5, 116.5, 121.4, 125.7, 130.6, 149.1, 149.6.

7.12.13 Aduto 51

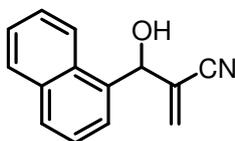


Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 98%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.42–7.89 (m, 7H); 6.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 2H); 6.06 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H); 5.46 (d, *J* = 3.8 Hz, 1 H); 2.50 (d, *J* = 3.8 Hz, 1 H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 137.8, 134.9, 134.5, 131.6, 130.4, 129.6, 129.18, 129.16, 128.0, 127.5, 127.4, 125.2, 118.4, 75.9.

7.12.14 Aduto 52

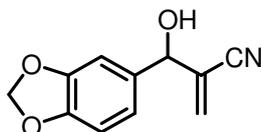


Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 84%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.44–8.04 (m, 7H), 6.09 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.06 (dd, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.97 (s, 1H), 2.64 (s, 1H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 135.0, 134.7, 131.9, 131.2, 130.5, 129.8, 127.4, 126.7, 126.2, 126.1, 125.9, 123.8, 118.0, 71.9. **Massa de baixa resolução:** M⁺ = 209

7.12.15 Aduto 24

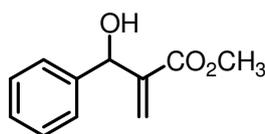


Aspecto físico: óleo amarelo

Rendimento: 90%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.74–6.83 (m, 3H), 6.07 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.94 (s, 2H), 5.15 (s, 1H), 3.04 (s, 1H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 148.1, 148.0, 133.2, 129.8, 126.3, 120.5, 117.1, 108.5, 106.9, 101.4, 73.8. **Massa de baixa resolução:** M⁺ = 203.

7.12.16 Aduto 12

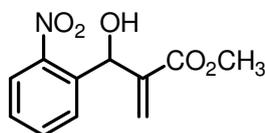


Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3344, 1716 cm⁻¹; **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃):** δ 7.34–7.19 (m, 5H), 6.28 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.47 (s, 1H, OH). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 166.4, 142.0, 141.2, 128.1, 127.5, 126.5, 125.5, 72.4, 51.6. **Massa de baixa resolução:** M⁺ = 191.

7.12.17 Aduto 37

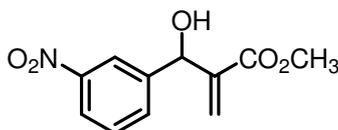


Aspecto físico: óleo castanho

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.82 (d, J = 8.47 Hz, 1H), 8.56 (t, J = 7.55/7.35 Hz, 1H), 8.42 (t, J = 8.47/ 7.35 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 8.47 Hz, 1H), 6.36 (s, 1 H), 6.31 (s, 1 H), 5.59 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 3.74 (s, 3 H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 52.2, 67.6, 124.6, 126.5, 128.7, 133.5, 136.0, 140.7, 148.3, 166.4. **Massa de baixa resolução:** [M⁺ - OH] = 219.

7.12.18 Aduto 39

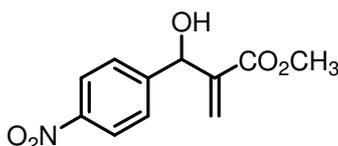


Aspecto físico: óleo amarelo

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H); 8.39 (dd, *J* = 5.0/1.5 Hz, 1H); 7.74 (ddd, *J* = 8.0/2.0/2.0 Hz, 1H); 7.28 (m, 1H); 6.40 (d, *J* = 0.6, 1H); 6.01 (sl, 1H); 5,60 (sl, 1 H); 3,71 (s, 3H); **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 52.0, 70.5, 123.4, 126.1, 134.7, 137.6, 141.6, 148.2, 148.4, 166.2. **Massa de baixa resolução:** M⁺ = 236.

7.12.19 Aduto 14

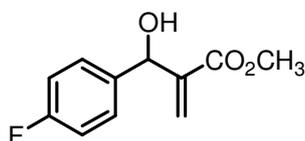


Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 1.57 (s, 1H), 3.74 (s, 3H), 5.63 (d, *J* = 6.32 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 6.40 (s, 1H), 7.61 (m, 2H), 8.25 (m, 2H); **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 52.1, 72.5, 123.5, 127.1, 127.2, 140.9, 147.3, 148.5, 166.2. **Massa de baixa resolução:** M⁺ = 236.

7.12.20 Aduto 27



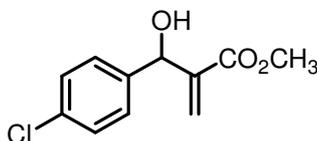
Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.18-7.25 (m, 2H), 6.85-6.94 (m, 2H), 6.21 (s, 1H), 5.82 (s, 1H), 5.41 (s, 1H), 3.77 (s, OH), 3.54 (s, 3H). **RMN ¹³C (50 MHz,**

CDCl₃): δ 166.2, 159.4, 141.9, 137.1, 128.3, 128.2, 125.1, 114.9, 114.5, 71.4, 51.5. **Massa de baixa resolução**: $M^+ = 209$.

7.12.21 Aduto 41

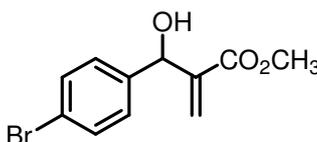


Aspecto físico: óleo incolor

Rendimento: 95%

IV (KBr): 3255, 1720 cm^{-1} ; **RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃)**: δ 7.21 (s, 4H), 6.25 (s, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 3.75 (s, OH), 3.60 (s, 3H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃)**: δ 166.2, 141.7, 139.9, 133.1, 128.2, 127.9, 125.5, 71.6, 51.6. **Massa de baixa resolução**: $M^+ = 226$.

7.12.22 Aduto 43

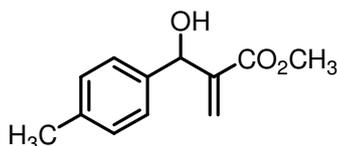


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 90%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.26 (s, 1 H), 5.78 (s, 1 H), 5.41 (s, 1 H), 3.63 (s, 3H), 3.39 (s, 1 H); **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃)**: δ 166.4, 141.5, 140.3, 131.3, 128.3, 126.1, 121.6, 72.3, 51.9. **Massa de baixa resolução**: $M^+ = 270$.

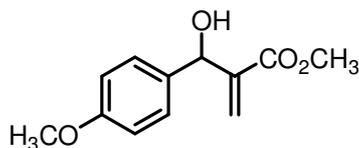
7.12.23 Aduto 44



Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 83%

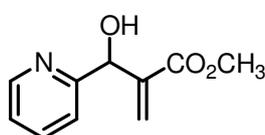
IV (KBr): 3331, 1724 cm^{-1} ; **Massa de baixa resolução**: $M^+ = 206$

7.12.24 Aduto **46**

Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 60%

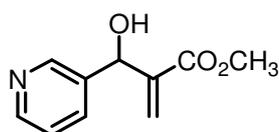
IV (KBr): 3347, 1713 cm^{-1} ; **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 222$

7.12.25 Aduto **48**

Aspecto físico: sólido preto

Rendimento: 99%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 8.51 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H); 7.66 (ddd, $J = 7.8/1.6$ Hz, 1H); 7.4 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H); 7.21 (m, 1H); 6.34 (sl, 1H); 5.96 (sl, 1H); 5.61 (sl, 1H); 3.71 (s, 3H); **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 51.8, 72.0, 121.2, 122.6, 126.8, 136.8, 141.5, 148.1, 159.4, 166.4.

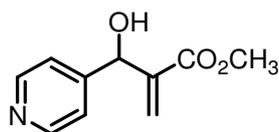
7.12.26 Aduto **19**

Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 99%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 8.48 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H); 8.39 (dd, $J = 5.0/1.5$ Hz, 1H); 7.74 (ddd, $J = 8.0/2.0/2.0$ Hz, 1H); 7.28 (m, 1H); 6.40 (d, $J = 0.6$, 1H); 6.01 (sl, 1H); 5.60 (sl, 1H); 3.71 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 52.0, 70.5, 123.4, 126.1, 134.7, 137.6, 141.6, 148.2, 148.4, 166.2. **Massa de baixa resolução:** $M^+ = 192$.

7.12.27 Aduto **50**

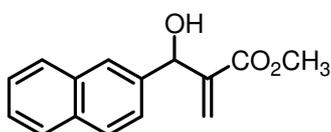


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 99%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.47 (dd, *J* = 4.6/1.6 Hz, 2H); 7.30 (dd, *J* = 4.6/1.6 Hz, 2H); 5.89 (s, 1H); 5.51 (s, 1H); 3.70 (s, 1H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 52.1, 71.9, 121.5, 127.1, 140.9, 149.3, 151.0, 166.3.

7.12.28 Aduto **28**

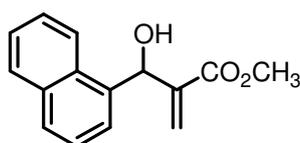


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 85%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 1.57 (s, 1 H), 3.73 (s, 3H), 5.75 (d, *J* = 5.77 Hz, 1 H), 5.88 (t, *J* = 1.14 / 1.10 Hz, 1 H), 6.39 (s, 1 H), 7.50 (m, 3H), 7.78 (m, 4H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 51.9, 73.2, 124.5, 125.4, 125.9, 126.0, 126.8, 127.5, 128.0, 128.1, 132.9, 133.1, 138.5, 141.8, 166.7.

7.12.29 Aduto **53**

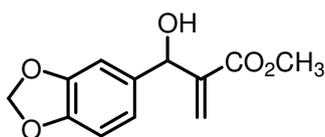


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 60%

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.26–8.02 (m, 7H), 6.37 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.59 (s, 1H), 3.75 (s, 3H). **RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃):** δ 167.2, 141.7, 136.3, 133.7, 130.7, 128.7, 127.3, 127.2, 126.2, 125.6, 125.3, 124.4, 123.7, 69.2, 52.2.

7.12.30 Aduto **54**

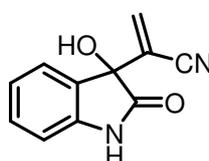


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 90%

RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3): δ 6.78–6.86 (m, 3H), 6.32 (s, 1H), 5.94 (s, 2H), 5.85 (s, 1H), 5.48 (s, 1H), 3.72 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3):** δ 166.9, 148.1, 147.9, 147.3, 142.0, 135.4, 126.0, 120.3, 108.3, 107.3, 101.2, 73.1, 52.1.

7.12.31 Aduto **56a**

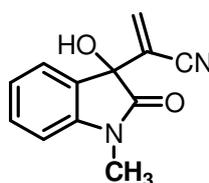


Aspecto físico: sólido marrom

Rendimento: 99%

IV (KBr): 3348, 3264, 2226, 1708, 1620, 1474 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** δ 10.67 (s, 1H); 6.86-7.32 (m, 4H); 6.32 (s, 1H); 6.21 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** δ 175.2, 142.0, 132.1, 130.4, 129.0, 124.5, 122.8, 122.4, 116.3, 110.3, 76.1.

7.12.32 Aduto **56b**

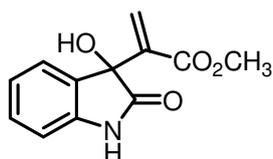


Aspecto físico: sólido marrom

Rendimento: 99%

IR (KBr): 3306, 2229, 1713, 1620 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** δ 7.09-7.47 (m, 4H); 6.36 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H); 6.23 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H); 3.38 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** δ 173.5, 143.3, 132.5, 130.7, 128.4, 124.3, 123.2, 122.6, 116.3, 109.4, 75.8, 26.2.

7.12.33 Aduto **57a**

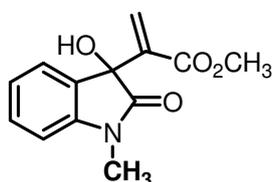


Aspecto físico: sólido castanho

Rendimento: 93%

IV (KBr): 3421, 3232, 1717, 1697, 1620, 1470 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD):** δ 6.88-7.28 (m, 4H); 6.57 (s, 1H); 6.53 (s, 1H); 3.54 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD):** δ 180.5, 166.4, 144.2, 141.1, 132.7, 130.9, 128.1, 124.6, 123.4, 111.3, 77.3, 52.2.

7.12.34 Aduto **57b**

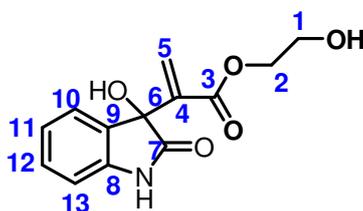


Aspecto físico: sólido marrom

Rendimento: 93%

IV (KBr): 3225, 1716, 1697, 1616, 1496 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD):** δ 7.26-7.35 (m, 1H); 6.93-7.04 (m, 3H); 6.46 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 6.44 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 3.48 (s, 3H), 3.13 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD):** δ 180.6, 169.6, 149.7, 144.9, 136.0, 134.7, 132.5, 128.1, 127.2, 113.7, 80.1, 56.9, 31.2.

7.12.35 Aduto **59a**



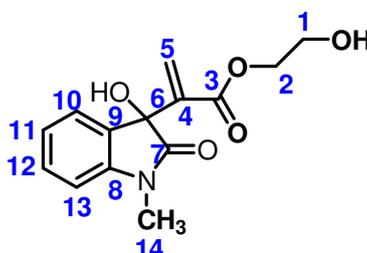
Aspecto físico: sólido laranja

Rendimento: 95%

IV (KBr): 3314, 1717, 1620, 1474 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD):** δ 7.16-7.25 (m, 1H); 6.84-7.05 (m, 3H); 6.63 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 6.51 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H); 3.98 (t, $J = 4.2$ Hz, 2H), 3.56 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H); 3.27 (s, 1H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD):** δ 168.5(C_3/C_7), 146.7(C_4), 143.5(C_8), 135.2(C_9), 133.4(C_{10}),

130.9(C₅), 127.2(C₁₂), 125.9(C₁₁), 113.8(C₁₃), 69.79(C₂), 63.2(C₁). **Massa de alta resolução:** [M+1] (calculado) = 264.0794 / [M+1] (experimental) = 264.0929

7.12.36 Aduto **59b**

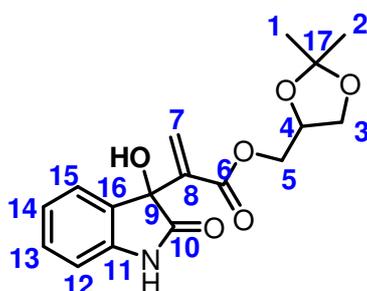


Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 88%

IV (KBr): 3410, 1709, 1613 cm⁻¹; **RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD):** δ 7.25-7.33 (m, 1H); 6.92-7.08 (m, 3H); 6.63 (s, 1H); 6.52 (s, 1H); 3.93 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.52 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H); 3.30 (s, 1H), 3.18 (s, CH₃). **RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD):** δ 168.5(C₃/C₇), 148.5(C₈), 143.5(C₄), 133.6(C₁₀), 131.1(C₅), 126.8(C₁₂), 126.5(C₁₁), 112.5(C₁₃), 69.8(C₂), 63.2(C₁), 29.2(C₁₄). **Massa de alta resolução:** [M-1] (calculado) = 276.095 / [M-1] (experimental) = 276.0558

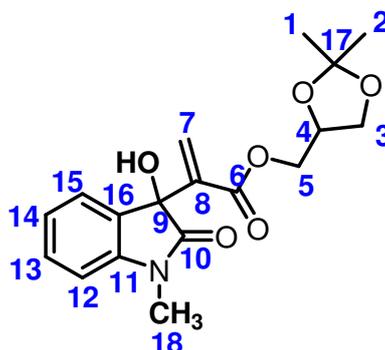
7.12.37 Aduto **60a**



Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 82%

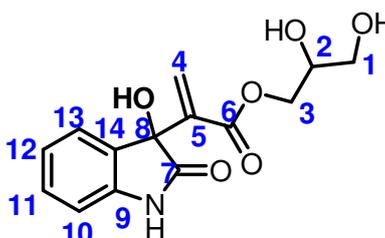
IV (KBr): 3291, 1717, 1701, 1617, 1478 cm⁻¹; **RMN ¹H (200 MHz, CD₃OD):** δ 7.17-7.25 (m, 1H); 6.84-7.05 (m, 3H); 6.60 (s, 1H); 6.51 (s, 1H); 3.80-4.10 (m, 4H), 3.39-3.61 (m, 1H); 3.26 (sl, 1H), 1.27 (s, CH₃); 1.24 (s, CH₃). **RMN ¹³C (50 MHz, CD₃OD):** δ 180.3(C₆), 165.6(C₁₀), 144.2(C₁₁), 140.8(C₈), 132.6(C₁₆), 130.9(C₁₅), 128.8(C₇), 124.7(C₁₃), 123.5(C₁₄), 111.4(C₁₂), 110.8(C₁₇), 77.2(C₉), 74.6(C₄), 67.3(C₃), 65.9(C₅), 27.0(C₂), 25.5(C₁). **Massa de alta resolução:** [M+1] (calculado) = 334.1212 / [M+1] (experimental) = 334.1264

7.12.38 Aduto **60b**

Aspecto físico: óleo amarelo

Rendimento: 84%

IV (KBr): 3368, 1728, 1713, 1612, 1470 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 7.31-7.35 (m, 1H); 6.96-7.01 (m, 3H); 6.53 (s, 1H); 6.48 (s, 1H); 3.70-4.08 (m, 5H); 3.13 (s, 3H), 1.26 (s, CH_3); 1.24 (s, CH_3). **RMN ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6):** δ 175.2(C_6), 163.8(C_{10}), 144.5(C_{11}), 139.5(C_8), 130.1(C_{16}), 129.6(C_{15}), 128.0(C_7), 127.8(C_{13}), 123.0(C_{14}), 108.8(C_{17}), 108.6(C_{12}), 74.8(C_9), 72.8(C_4), 65.2(C_3), 64.6(C_5), 26.5(C_2), 26.0(C_1), 25.3(C_{18}). **Massa de alta resolução:** $[\text{M}+1]$ (calculado) = 348.1369 / $[\text{M}+1]$ (experimental) = 348.1433

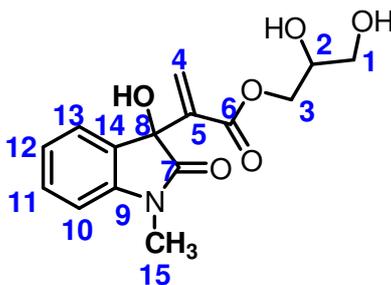
7.12.39 Aduto **61a**

Aspecto físico: óleo castanho

Rendimento: 65%

IV (KBr): 3406, 1717, 1620, 1474 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD):** δ 7.15-7.24 (m, 1H); 6.83-7.04; 6.61 (s, 1H); 6.49 (s, 1H); 3.24-4.03 (m, 8H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD):** δ 165.9(C_6/C_7), 144.9(C_5), 140.9(C_9), 130.9(C_{13}), 128.6(C_4), 124.9(C_{11}), 124.6(C_{12}), 111.4(C_{10}), 70.9(C_2), 66.8(C_3), 63.9(C_1). **Massa de alta resolução:** $[\text{M}-1]$ (calculado) = 292.0810 / $[\text{M}-1]$ (experimental) = 292.0636.

7.12.40 Aduto **61b**



Aspecto físico: óleo castanho

Rendimento: 75%

IV (KBr): 3399, 1709, 1612, 1470 cm^{-1} ; **RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD):** δ 7.25-7.34 (m, 1H); 6.92-7.02 (m, 3H); 6.63 (s, 1H); 6.53 (s, 1H); 3.24-4.17 (m, 8H), 3.18 (s, 3H). **RMN ^{13}C (50 MHz, CD_3OD):** δ 178.5(C_7), 165.9(C_6), 145.9(C_9), 140.8(C_5), 131.9(C_{14}), 131.1(C_{13}), 128.8(C_4), 124.2(C_{11}), 124.0(C_{12}), 110.0(C_{10}), 70.9(C_2), 66.8(C_3), 63.8(C_1), 26.8(C_{15}). **Massa de alta resolução:** $[\text{M}-1]$ (calculado) = 306.1056 / $[\text{M}-1]$ (experimental) = 306.0625

REFERÊNCIAS

ADIB, M.; JAHROMI, A.H.; TAVOOSI, N.; MAHDAVI, H.; BIJANZADEH, H.R. Microwave-assisted one efficient, one pot, three-multicomponent synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under free-solvent conditions. **Tetrahedron Letters**, 47, 2965-2967, 2006.

AGGARWAL, V. K.; FULFORD, S. Y.; LLOYDE-JONES, G. C.; Reevaluation of the Mechanism of the Baylis-Hillman Reaction: Implications for Asymmetric Catalysis, **Angewandte Chemie International Edition**, 44, 1706-1708, 2005.

AHN, B-Z; SOK, D-E. Michael Acceptors as a Tool for Anticancer Drug Design, **Current Pharmaceutical Design**, 2, 247-262, 1996.

ALMOND, J. B.; COHEN, G. M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy, **Leukemia**, 16, 433-443, 2002.

AMARANTE, G. W.; MILAGRE, H. M. S.; VAZ, B. G.; FERREIRA, B. R. V.; EBERLIN, M. N.; COELHO, F. Dualistic nature of the mechanism of the Morita-Baylis-Hillman reaction probed by electrospray ionization mass spectrometry, **The Journal of Organic Chemistry**, 74, 3031-3037, 2009.

ANDRADE, M. M.; BARROS, M.T. Fast synthesis of N-Acylhydrazones employing a microwave assisted neat protocol. **Journal of Combinatorial Chemistry**, 12, 245-247, 2010.

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

BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C. O.; AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; de ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Design, synthesis and antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: A molecular hybridization approach, **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 19, 4250-4256, 2011.

BARREIRO, E. J. e FRAGA, C. A. M. Química Medicinal As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, São Paulo 2008. (ARTMED editora Ltda).

BASAVAI AH, D.; RAO, K. V.; REDDY, R. J. The Baylis-Hillman reaction: a novel source of attraction, opportunities, and challenges in synthetic chemistry, **Chemical Society Reviews**, 36, 1581-1588, 2007.

BASAVAI AH, D.; REDDY, B. S.; BADSARA, S. S. Recent Contributions from the Baylis-Hillman Reaction to Organic Chemistry. **Chemical Review**, 110, 5447-5674, 2010.

BAYLIS, A. B.; HILLMAN, M. E. D., **German Patent** 2155113, 1972.

BELLAMY, W. T. P-Glycoprotein and Multidrug Resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 36, 161-183, 1996.

BERUBE, L. R.; FARAH, S.; McCLELLAND, R. A.; RAUTH, A. M. Depletion of intracellular glutathione by 1-methyl-2-nitrosoimidazole, **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 22, 817-820, 1992.

BHAT, S. V.; SINGH, S. A. Antimicrobial potential of 3-hydroxy-2-methylene-3-phenylpropionic acid derivatives, **Acta Pharmaceutica**, 61, 447-455, 2011.

BOGDAL, D. Microwave-assisted Organic Synthesis. One Hundred Reaction Procedures, Elsevier, Oxford, 2005; Chapter 2, p. 19.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e Farmacologia de Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados de Plantas, **Química Nova**, 33, 1359-1369, 2010.

CANTILLO, D.; KAPPE, C. O. A Unified Mechanistic View on the Morita-Baylis-Hillman Reaction: Computational and Experimental Investigations, **The Journal of Organic Chemistry**, 75, 8615-8626, 2010.

CHUNG, Y. M.; IM, Y. J.; KIM, J. N. Baylis-Hillman Reaction of Isatin Derivatives: Isatins as a New Entry for the Baylis-Hillman Reaction, **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 23, 1651-1654, 2002.

COELHO, F. A. S.; ALMEIDA, W. P.; VERONESE, D. ; MATEUS, C. R.; LOPES, E. ; SILVEIRA, G. P. C. E. ; ROSSI, R. C.; PAVAM, C. H. Ultrasound in Baylis-Hillman Reactions with Aliphatic and Aromatic Aldehydes: Scope and Limitations, **Tetrahedron**, 58, 7437-7447, 2002.

DADWAL, M.; MOHAN, R.; PANDA, D.; MOBIN, S. N.; NAMBOOTHIRI, I. N. N. The Morita–Baylis–Hillman adducts of β -aryl nitroethylenes with other activated alkenes: synthesis and anticancer activity studies, **Chemical Communication**, 3, 338-340, 2006.

DAS, B.; CHOOWDHURY, N.; DAMODAR, K.; BANERJEE, J. Studies on novel synthetic methodologies and their application – part 108 – A mild and efficient stereoselective synthesis of (Z)- na (E)-Allyl Sulfides and potent antifungal agent, (Z)-3-(4-Methoxybenzylidene)thiochroman-4-one from Morita-Baylis-Hillman Acetates, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 55, 1725-1727, 2007.

de ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPEZ, M. T. P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma Introdução, **Química Nova**, 28, 118-129, 2005.

de SOUZA, R. O. M. A.; MEIRELES, B. A.; AGUIAR, L. C. S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Hexamethylenetetramine as a Cheap and Convenient Alternative Catalyst in the Baylis–Hillman Reaction: Synthesis of Aromatic Compounds with Anti-Malarial Activity, **Synthesis**, 10, 1595–1600, 2004.

de SOUZA, R. O. M. A.; FREGADOLLI, PH; AGUIAR, L. C. ; GONÇALVES, K. M ; PEREIRA, V. L. P. ; FILHO, LC ; ESTEVES, P. M. ; VASCONCELLOS, M. L. A. A. ; ANTUNES, O. A. C. Hexamethylenetetramine-Ionic Liquids Combined System to Promote Baylis-Hillman Reactions, **Letters in Organic Chemistry**, 3, 936, 2006.

de SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. Recent Advances in Baylis-Hillman Reaction under Microwave Irradiation, **Mini Reviews in Organic Chemistry**, 7, 212-220, 2010.

de SOUZA, R. O. M. A.; MIRANDA, L. S. M. Irradiação de Micro-ondas Aplicada à Síntese Orgânica: Uma História de Sucesso no Brasil, **Química Nova**, 34, 497-506, 2011.

GaussView, Version 5, DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. Semichem Inc., Shawnee Mission KS, 2009.

DREWES, S. E., EMSLIE, N. D. Necic acid synthons. Part 1. Total synthesis of integerrineic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, 9, 2079-2083, 1982.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; SILVEIRA, A. L.; RAMOS, M. V.; MARQUES-SANTOS, L. F.; ARAUJO, D. M. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells, **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 25, 290, 2011.

FALTIN, C.; FLEMING, E. M.; CONNON, S. J. Acrylamide in the Baylis–Hillman Reaction: Expanded Reaction Scope and the Unexpected Superiority of DABCO over More Basic Tertiary Amine Catalysts, **The Journal of Organic Chemistry**, 69, 6496–6499, 2004.

FERRO, S.; De GRAZIA, S.; De LUCA, L.; GITTO, R.; FALITI, C. E.; DEBYZER, Z.; CHIMIRRI, A. Microwave Assisted Organic Synthesis (MAOS) of Small Molecules as Potential HIV-1 Integrase Inhibitors, **Molecules**, 16, 6858-6870, 2011.

GAUSSIAN 09, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GARDEN, S. J.; SKAKLE, J. M. S. Isatin derivatives are reactive electrophilic components for the Baylis–Hillman reaction, **Tetrahedron Letters**, 43, 1969–1972, 2002.

GEDYE, R.; SMITH, F.; WESTAWAY, K.; ALI, H.; BALDISERA, L.; LABERGE L.; ROUSELL, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis, **Tetrahedron Letters**, 27, 279, 1986.

GOULART, M. O. F.; de SOUZA, A. A.; de ABREU, F. C.; de PAULA, F. S.; SALES, E. M.; ALMEIDA, W. P.; BURIEZ, O.; AMATORE, C. Electrochemical Study of Methyl 2-[p-Nitrophenyl(Hydroxy)Methyl]Acrylate, An Anticancer Drug

and its reactivity towards GSH and Oxygen, **Journal of The Electrochemical Society**, 154, 121, 2007.

GIGUERE, R.J.; BRAY, T.L.; DUNCAN, S.M.; MAJETICH, G.; Application of commercial microwave ovens to organic synthesis, **Tetrahedron Letters**, 27, 4945, 1986.

HERNANDES, M. Z.; CAVALCANTI, S. M. T.; MOREIRA, D. R. M.; JUNIOR, W. F. A.; LEITE, A. C. L. Halogen Atoms in the Modern Medicinal Chemistry: Hints for the Drug Design, **Current Drug Targets**, 2010, 11, 303-314, 2010.

HERRERO, M. A.; KREMSNER, J. M.; KAPPE, C. O., Nonthermal Microwave Effects Revisited: On the Importance of Internal Temperature Monitoring and Agitation in Microwave Chemistry, **The Journal of Organic Chemistry**, 73, 36-47, 2008.

HILL, J.S.; ISAACS, N.S. Nucleophile-catalysed additions to aldehydes and ketones to acrylic compounds: the effectiveness of high pressures, **Journal of Chemical Research, Synopses**, 330-331, 1988.

HILL, J. S., ISAACS, N. S. Mechanism of α -substitution reactions of acrylic derivatives, **Journal of Physical Organic Chemistry**, 3, 285-290, 1990.

HOFFMANN, H. M. R. RABE, J., DABCO-catalyzed couplings of acrylic acid esters with aldehydes. 2. New stereocontrolled synthesis of alkenes with trisubstituted double bonds via functionalized acrylic acid esters, **Angewandte Chemie International Edition**, 95, 796-797, 1983a.

HOFFMANN, H. M. R., RABE, J. DABCO-catalyzed couplings of acrylic acid esters with aldehydes. 1. Synthesis of 2-(1-hydroxyalkyl)acrylic acid esters; simple three-step synthesis of mikanecic acid. **Angewandte Chemie International Edition**, 95, 795, 1983b.

INCAa - inca.gov.br, Agosto 2012. Disponível em:
<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/d
efinicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/definicao)>. Acessado em 19 de agosto de 2012.

INCAb – inca.gov.br, Agosto 2012. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/tbregioes_consolidado.asp>. Acessado em 19 de agosto de 2012.

JAEGER, W. Classical resistance mechanisms, **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, 47, 46-48, 2009.

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

KAGATA, T.; SAITO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; ISHIYAMA, H.; KUBOTA, T.; KOBAYASHI, J. Paratunamides a-d, oxindole alkaloids from *Cinnamodendron axillare*, **Journal of Natural Products**, 69, 1517-1521, 2006.

KAMANO, Y.; ZHANG, H.-P.; ICHIHARA, Y.; KIZU, H.; KOMIYAMA, K.; PETTIT, G. R. Convolutamydines A, a novel bioactive hydroxyoxindole alkaloid from marine bryozoan *Amathia convoluta*, **Tetrahedron Letters**, 36, 2783-2784, 1995.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery, **Nature Reviews Drug Discovery**, 5, 51-63, 2006.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004–2008 literature, **Molecular Diversity**, 13, 71–193, 2009.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S., **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

KAUR, J.; KUMAR, P.; TYAGI, S.; PATHAK, R.; BATRA, S.; SINGH, P.; SINGH, N. In Silico Screening, Structure-Activity Relationship, and Biologic Evaluation of Selective Pteridine Reductase Inhibitors Targeting Visceral Leishmaniasis, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55, 659-666, 2011.

KOGUCHI, Y.; KOHNO, J.; NISHIO, M.; TAKAHASHI, K.; OKUDA, T.; OHNUKI, T.; KOMATSUBARA, S. TMC-95A, B, C, and D, novel proteasome inhibitors produced by *Apiospora montagnei* Sacc. TC 1093. Taxonomy, production, isolation and biological activities, **The Journal of Antibiotics**, 53, 105-109, 2000.

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

KUMAR, C. N. S. S. P.; PARIDA, D. K.; SANTHOSHI, A.; KOTA, A. K.; SRIDHAR, B.; RAO, V. J. Synthesis and biological evaluation of tetrazole containing compounds as possible anticancer agents, **Medicinal Chemistry Communications**, 2, 486-492, 2011.

KUNDU, M. K.; MUKHERJEE, S. B.; BALU, N.; PADMAKUMAR, R.; BHAT, S. V. Microwave Mediated Extensive Rate Enhancement of the Baylis-Hillman reaction, **Synlett**, 444, 1994.

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

LEE, M. -Y.; LIN, H. Y.; CHENG, F.; CHIANG, W.; K, Y. -H. Isolation and characterization of new lactam compounds that inhibit lung and colon cancer cells from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) bran, **Food and Chemical Toxicology**, 46, 1933-1939, 2008.

LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted Organic Chemistry – A Review, **Tetrahedron**, 57, 9225-9283, 2001.

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 & Medicinal Chemistry**, 20, 3954-3971, 2012.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F. D. B. W.; FEENEY, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, **Advanced Drug Delivery Reviews**, 23, 3-25, 1997.

LUCAS, R.; VERGNAUD, J.; TESTE, K.; ZERROUK, R.; SOL, V.; KRAUSZ, P. A facile and rapid iodine-catalyzed meso-tetraphenylporphyrin synthesis using microwave activation. **Tetrahedron Letters**, 49, 5537-5539, 2008.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, 2, 143-148, 2002.

MAVANDADI, F.; PILOTTI, A. The impact of microwave – assisted organic synthesis in drug discovery, **Drug Discovery Today**, 11(3-4), 165-174, 2006.

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

MONDE, K.; SASAKI, K.; SHIRATA, A.; TAKASUGI, M. Brassicanal C and two dioxindoles from cabbage, **Phytochemistry**, 30, 2915-2917, 1991.

MONTENEGRO, R. C.; JIMENEZ, P. C.; FARIAS, R. A. F.; ANDRADE-NETO, M.; BEZERRA, F. S.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of pisosterol, a triterpene isolated from *Pisolithus tinctorius* (Mich.: Pers.) Coker & Couch, 1928. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 59, 519-522, 2004.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

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

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

NASCIMENTO-JUNIOR, N. M.; KÜMMERLE, A. E.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. MAOS and Medicinal Chemistry: Some Important Examples from the Last Years, **Molecules**, 16, 9274-9297, 2011.

PAIVA, Y. G.; SOUZA, A. A.; LIMA-JUNIOR, C. G.; SILVA, F. P. L.; FILHO, E. B. A.; VASCONCELOS, C. C.; ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Correlation between Electrochemical and Theoretical Studies on the Leishmanicidal Activity of Twelve Morita-Baylis-Hillman Adducts, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23, 894-904, 2012.

PATIL, S. A.; PATIL, R.; MILLER, D. D. Microwave-assisted synthesis of medicinally relevant indoles, **Current Medicinal Chemistry**, 18, 615-637, 2011.

PATRA, A.; BATRA, S.; BHADURI, A. P.; KHANNA, A.; CHANDER, R.; DIKSHIT, M. Isoxazole-Based Derivatives from Baylis–Hillman Chemistry: Assessment of Preliminary Hypolipidemic Activity, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 11, 2269–2276, 2003.

PEDDIBHOTLA, S. 3-Substituted-3-hydroxy-2-oxindole, an Emerging New Scaffold for Drug Discovery with Potential Anti-Cancer and other Biological Activities, **Current Bioactive Compounds**, 5, 20-38, 2009.

PERREUX, L.; LOUPY, A. A Tentative Rationalization of Microwave Effects in Organic Synthesis According to the reaction medium, and Mechanistic Considerations, **Tetrahedron**, 57, 9199-9223, 2001.

PERREUX, L.; LOUPY, A. **Microwaves in Organic Synthesis**, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

POWIS, G.; GASDAKA, J. R.; BAKER, A. Redox signaling and the control of cell growth and death., **Advances in Pharmacology**, 38, 329-359, 1997.

PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., JUNG, H. M., MCQUADE, D. T., Baylis-Hillman mechanism: a new interpretation in aprotic solvents, **Organic Letters**, 7,147-150, 2005a.

PRICE, K. E., BROADWATER, S. J., WALKER, B. J., MCQUADE, D. T., A new interpretation of the Baylis Hillman mechanism, **The Journal of Organic Chemistry**, 70, 3980-3987, 2005b.

RAFEL, S.; LEAHY, J. W., An Unexpected Rate Acceleration-Practical Improvements in the Baylis-Hillman Reaction, **The Journal of Organic Chemistry**, 62, 1521, 1997.

RASTOGI, N.; MOHAN, R.; PANDA, D.; MOBIN, S. N.; NAMBOOTHIRI, I. N. N. Synthesis and anticancer activity studies of α -aminoalkylated conjugated nitroalkenes, **Organic & Biomolecular Chemistry**, 4, 3211-3214, 2006.

ROBIETTE, R. L., HARVEY, J. N., AGGARWAL, K. V., Mechanism of the Morita-Baylis-Hillman Reaction: A Computational Investigation, **Journal of the American Chemical Society**, 129, 15513-15525, 2007.

RUSSO, A.; DEGRAFF, W.; FRIEDMAN, N.; MITCHELL, J. B. Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs, **Cancer Research**, 46, 2845, 1986.

RYU, D. H.; HWANG, G. S.; KIM, K. H.; PARK, J. H.; KIM, H. J. **International patent** 110655 A1, 2009.

SÁ, M. M.; MEIER, L.; DUTRA, L. G.; BISOL, T. B. Reator de Micro-ondas do DQ/UFSC: Quatro Anos Acelerando Reações, Descobertas e Oportunidades, **Revista Virtual de Química**, 2, 165-177, 2010.

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

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica, **Química Nova**, 25, 660-667, 2002.

SANTAGADA, V.; FRECENTESE, F.; PERISSUTTI, E.; FIORINO, F.; SEVERINO, B.; CALIENDO, G. Microwave Assisted Synthesis: A New Technology in Drug Discovery, **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 9, 340-358, 2009.

SHI, M.; WANG, F.; ZHAO, M.-X.; WEI, Y. **Chemistry of the Morita–Baylis–Hillman Reaction**, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 2011.

SILVA, F. P. L.; de ASSIS, P. A. C.; JUNIOR, C. G. L.; ANDRADE, N. G.; CUNHA, S. M. D.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Synthesis, evaluation against *Leishmania amazonensis* and cytotoxicity assays in macrophages of sixteen new congeners Morita-Baylis-Hillman adducts, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 46, 4295-4301, 2011.

SIMON-LEVERT, A.; AZEB, A.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BANAIGS, B.; GENEVIÈRE, A., Antimitotic activity of methoxyconidiol, a meroterpene isolated from an ascidian. **Chemico-Biological Interactions**, 168, 106-116, 2007.

SOUSA, S. C. O.; JUNIOR, C. G. L.; SILVA, F. P. L.; ANDRADE, N. G.; BARBOSA, T. P.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Microwave-Promoted Morita-Baylis-Hillman Reactions: Efficient Synthesis of New Monoacylglycerols (MAGs) as Potential Anti-Parasitic Compounds, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22, 1634-1643, 2011.

TANG, Y. -Q., SATTLE, I., THIERICKE, R., GRABLEY, S., FENG, X.-Z. Maremycins c and d, new diketopiperazines, and maremycins e and f, novel polycyclic spiro-indole metabolites isolated from *Streptomyces* sp. **European Journal of Organic Chemistry**, 261-267, 2001.

TEW, K. D. Glutathione-associated Enzymes in Anticancer Drug Resistance, **Cancer Research**, 54, 4313, 1994.

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

VYAS, D. J.; FRÖHLICH, R.; OESTREICH, M. Stereochemical Surprises in the Lewis Acid-Mediated Allylation of Isatins, **The Journal of Organic Chemistry**, 75, 6720-6723, 2010.

WELSCH, M. E.; SNYDER, S. A.; STOCKWELL, B. R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery, **Current Opinion in Chemical Biology**, 14, 1-15, 2010.

WHO – Who.int, agosto 2012. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/15/en/index.html>>. Acessado em 19 de agosto de 2012.

WU, M.; WU, P.; XIE, H.; WU, G.; WEI, X. Monoterpenoid Indole Alkaloids Mediating DNA Strand Scission from *Turpinia arguta*, **Planta Medica**, 77, 284-286, 2011.

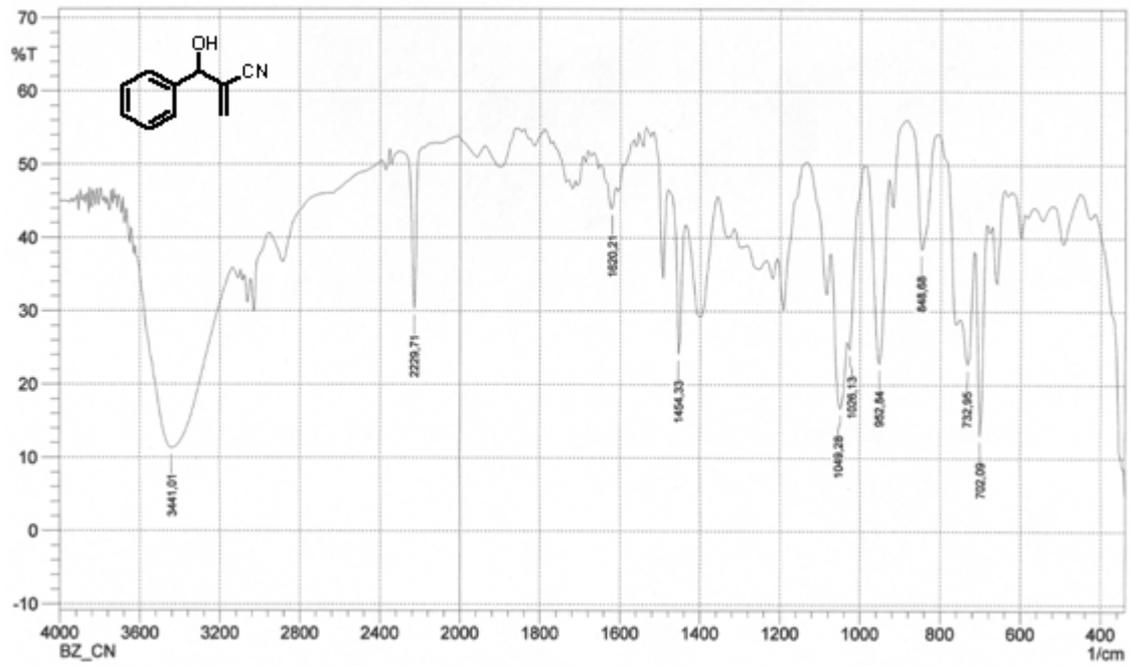
YANG, Zhi-Qiang ; KWOK, B. H. B.; LIN, S.; KOLDOBSKIY, M. A.; CREWS, C. M.; DANISHEFSKY, S. J. Simplified Synthetic TMC-95A/B Analogues Retain the Potency of Proteasome Inhibitory Activity, **ChemBioChem**, 4, 508 – 513, 2003.

YEUNG, K.-S.; FARKAS, M.E.; KADOW, J.F.; MEANWELL, N.A. A base-catalyzed, direct synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-triazoles from nitriles and hidrazides. **Tetrahedron Letters**, 46, 3429-3432, 2005.

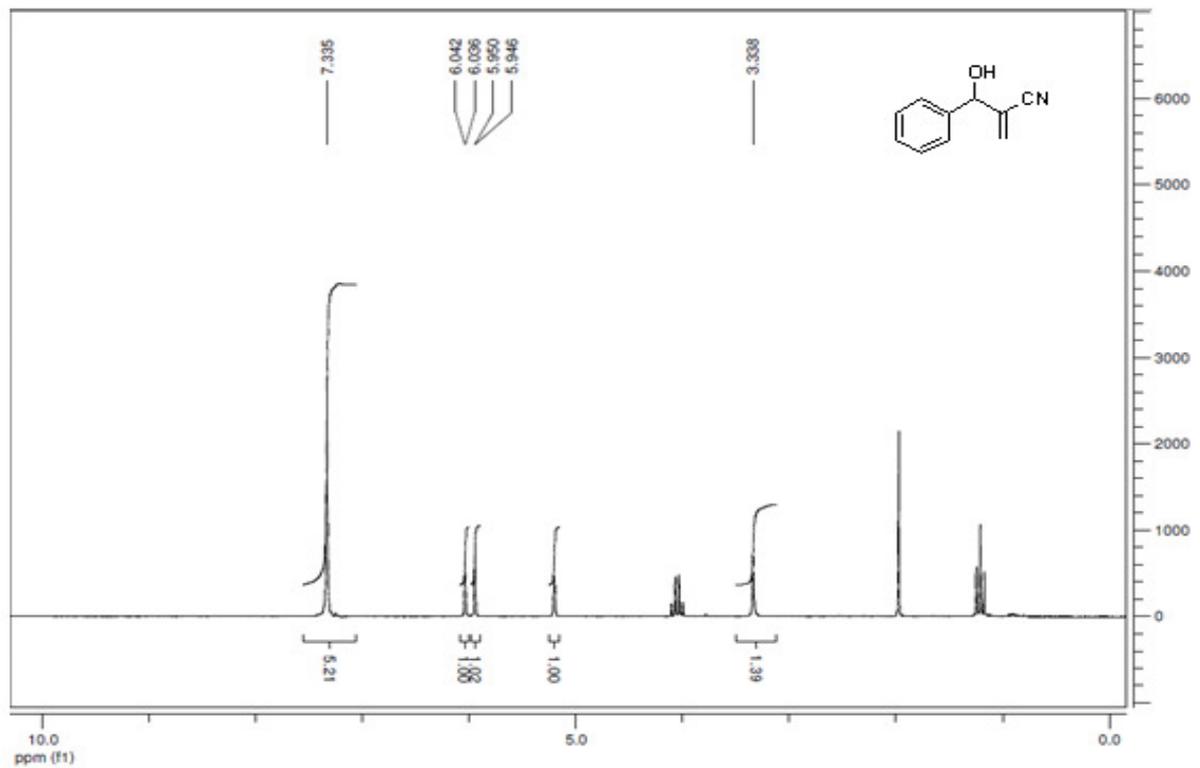
YU, C. R.; XU, L. H.; TU, S.; LI, Z. N.; LI, B. Synthesis and bioactivity of novel (3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yloxy)phenyl containing acrylate and acrylonitrile derivatives, **Journal of Fluorine Chemistry**, 127, 1540-1546, 2006.

ESPECTROS

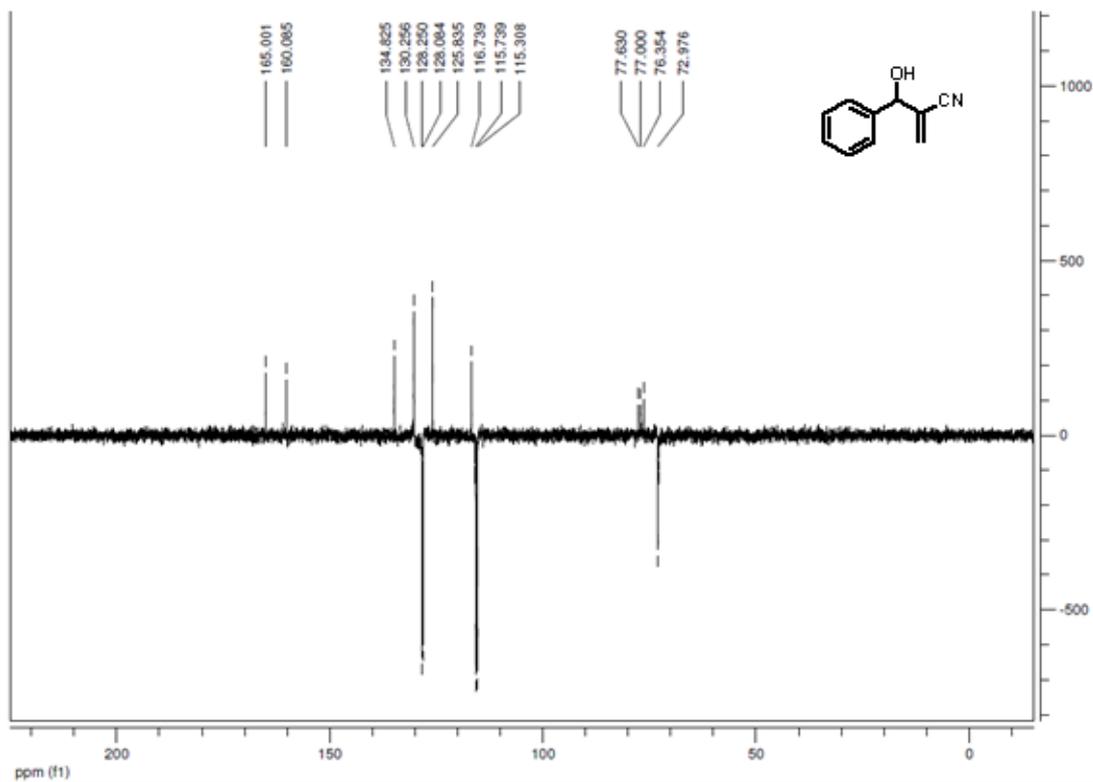
Espectro 1 Espectro de IV (KBr) do aduto 13



Espectro 2 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto 13



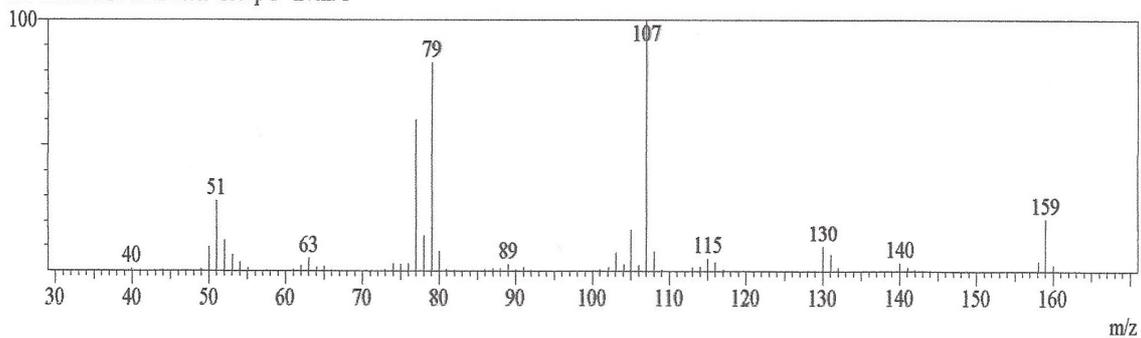
Espectro 3 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **13**



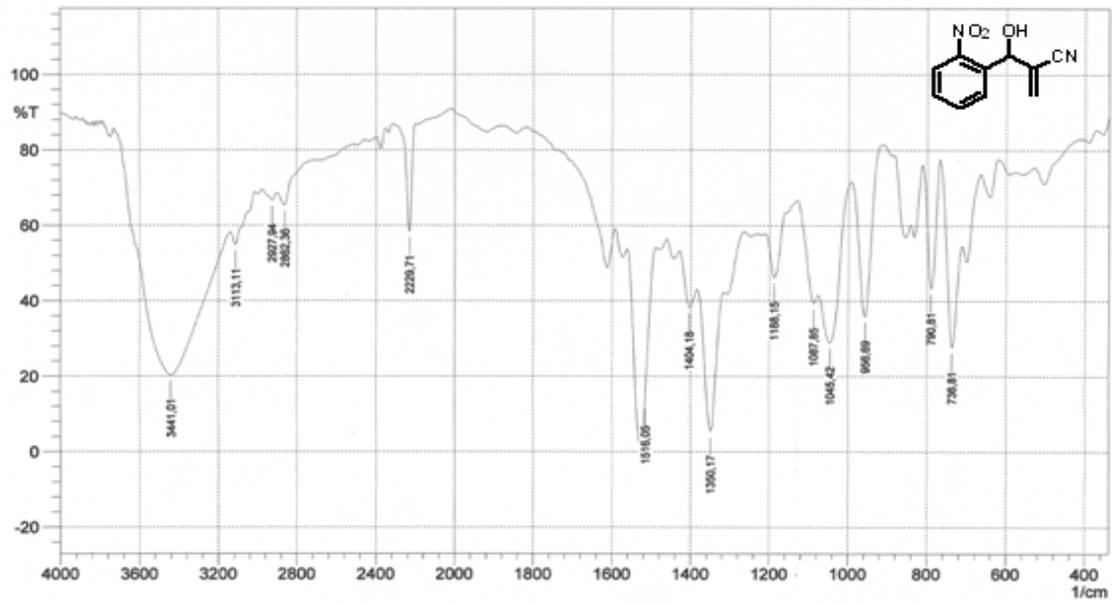
Espectro 4 Espectro de massas (70 eV) do aduto **13**

Spectrum

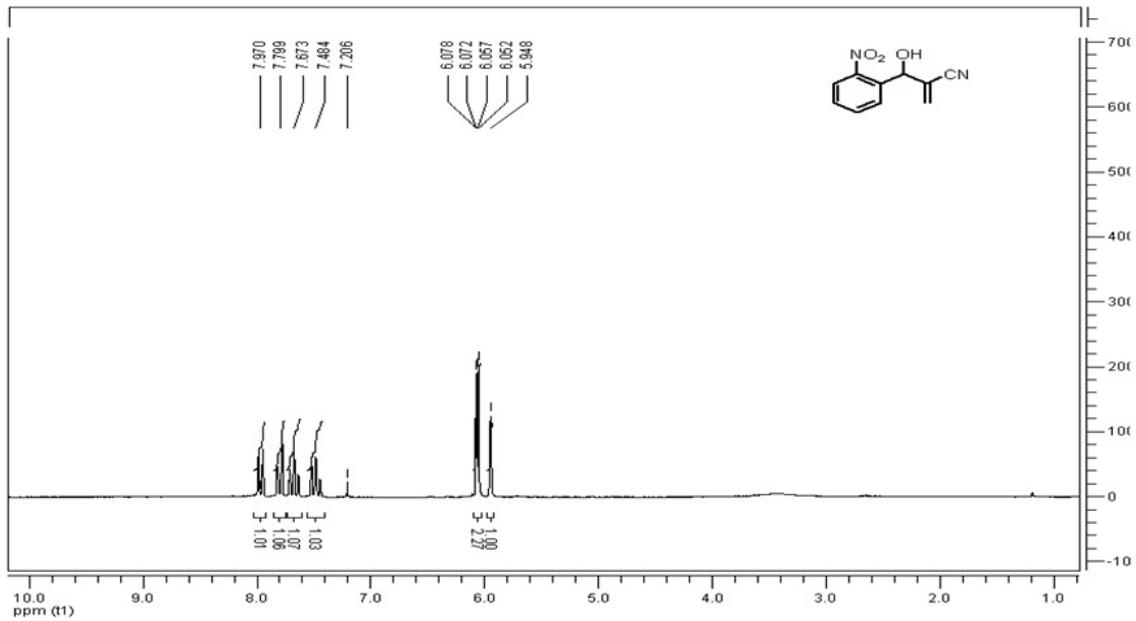
Peak#:1 R.Time:10.7(Scan#:681)
 MassPeaks:66
 RawMode:Averaged 10.7-10.7(680-682)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



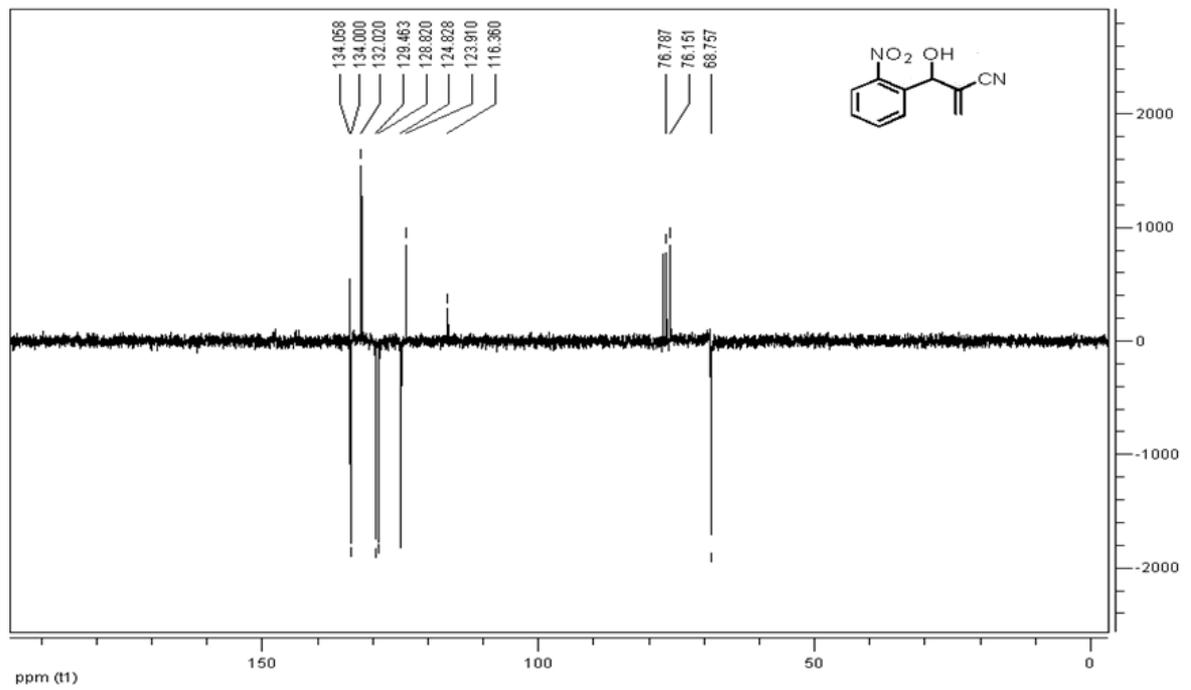
Espectro 5 Espectro de IV (KBr) do aduto **16**



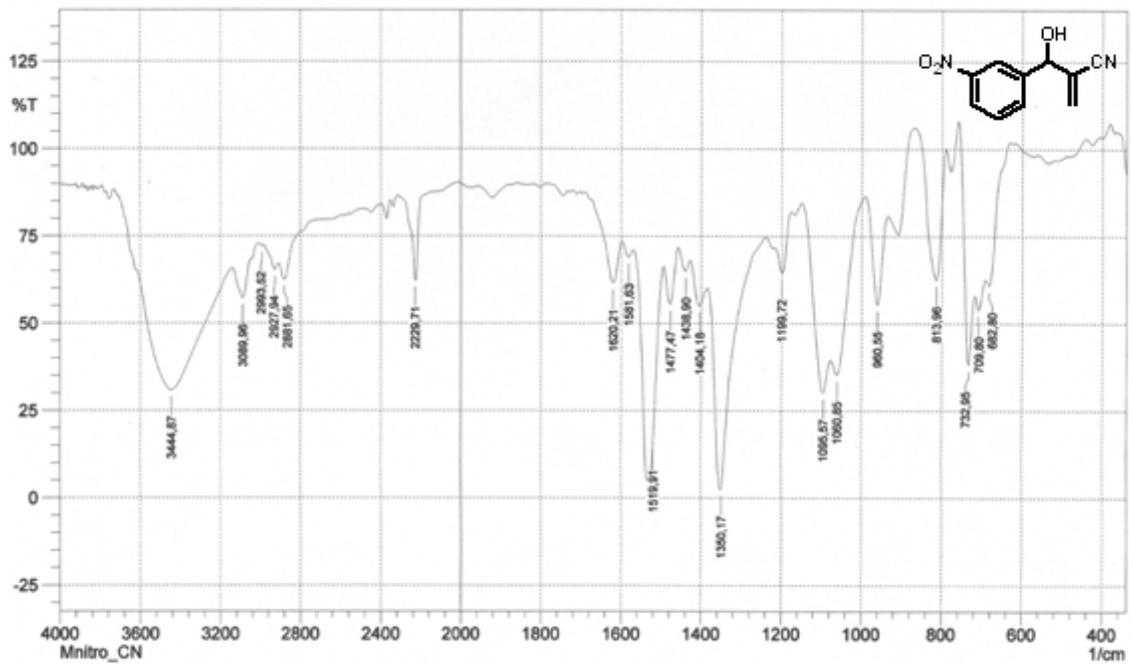
Espectro 6 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **16**



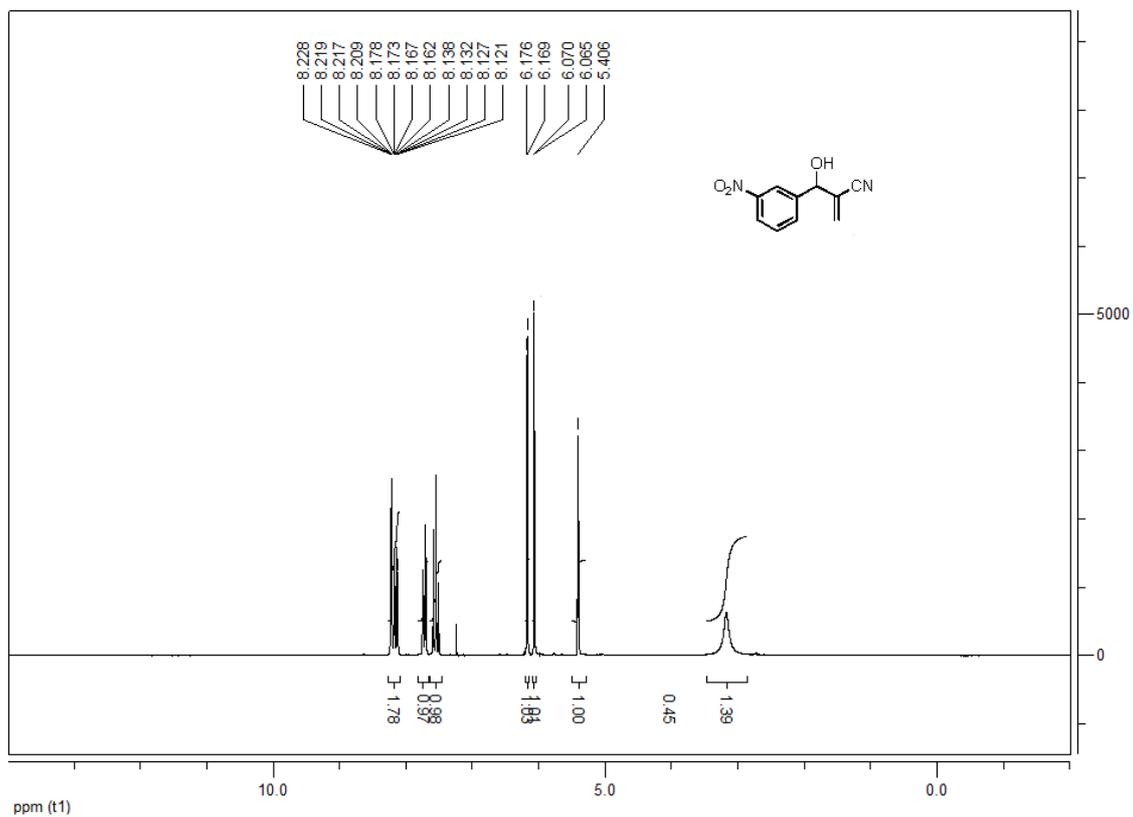
Espectro 7 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **16**



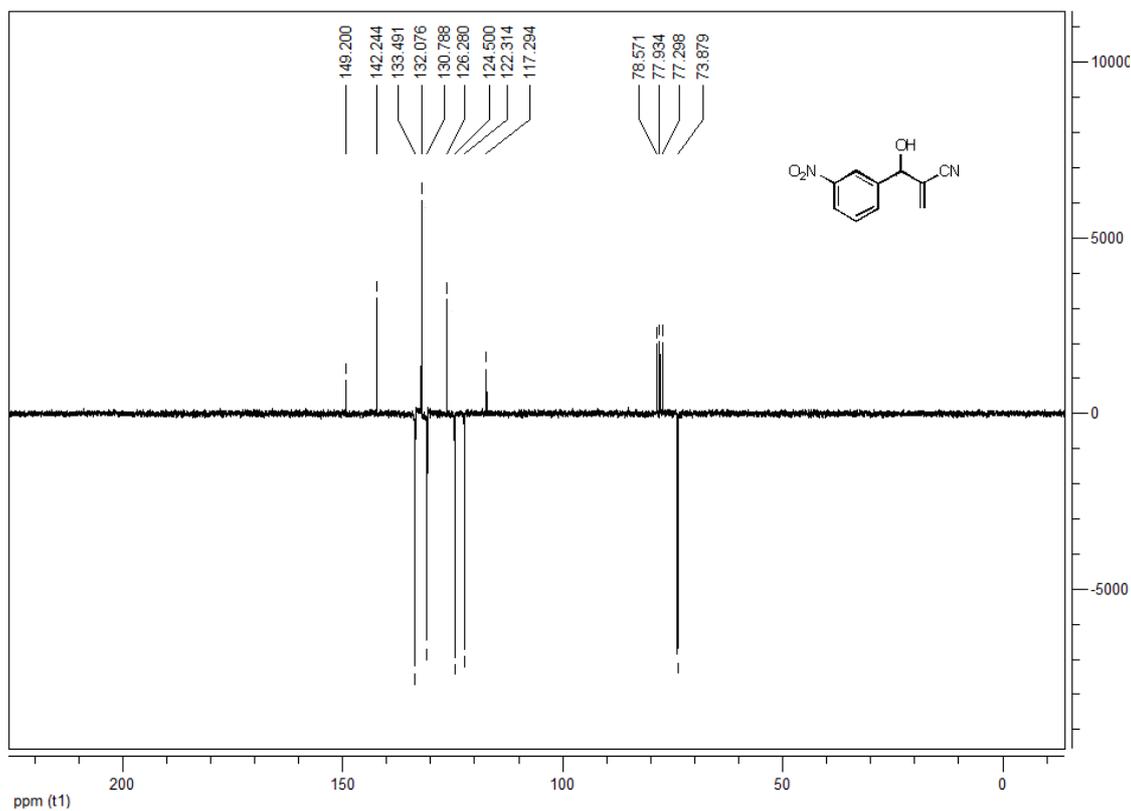
Espectro 8 Espectro de IV (KBr) do aduto **38**



Espectro 9 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **38**



Espectro 10 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **38**



Espectro 11 Espectro de massas (70 eV) do aduto **38**

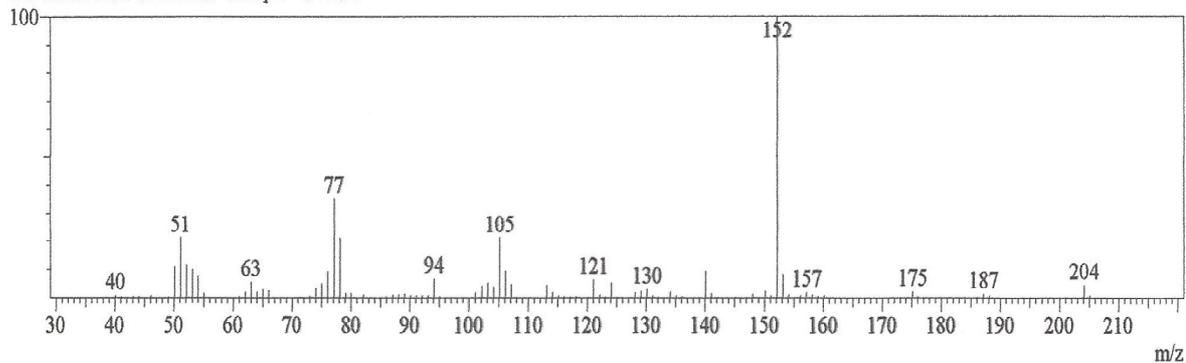
Spectrum

Peak#:1 R.Time:15.9(Scan#:1307)

MassPeaks:89

RawMode:Averaged 15.9-15.9(1306-1308)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

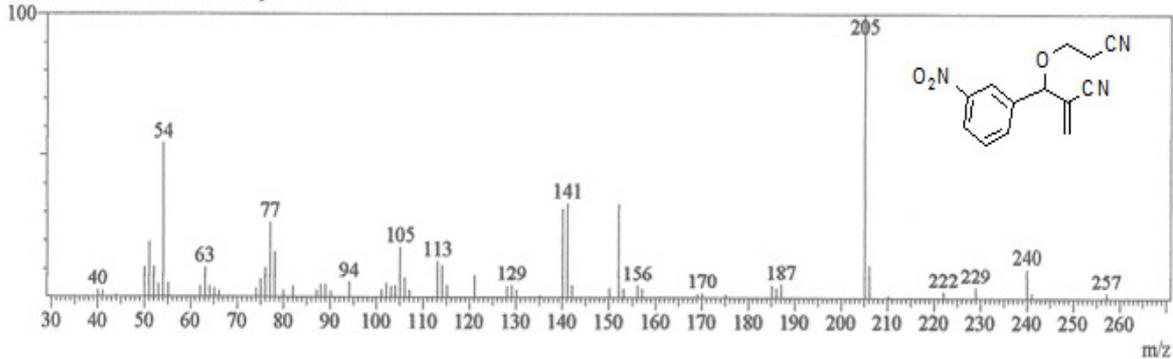
**Espectro 12** Espectro de massas (70 eV) do subproduto **65a**

Peak#:3 R.Time:18.9(Scan#:1664)

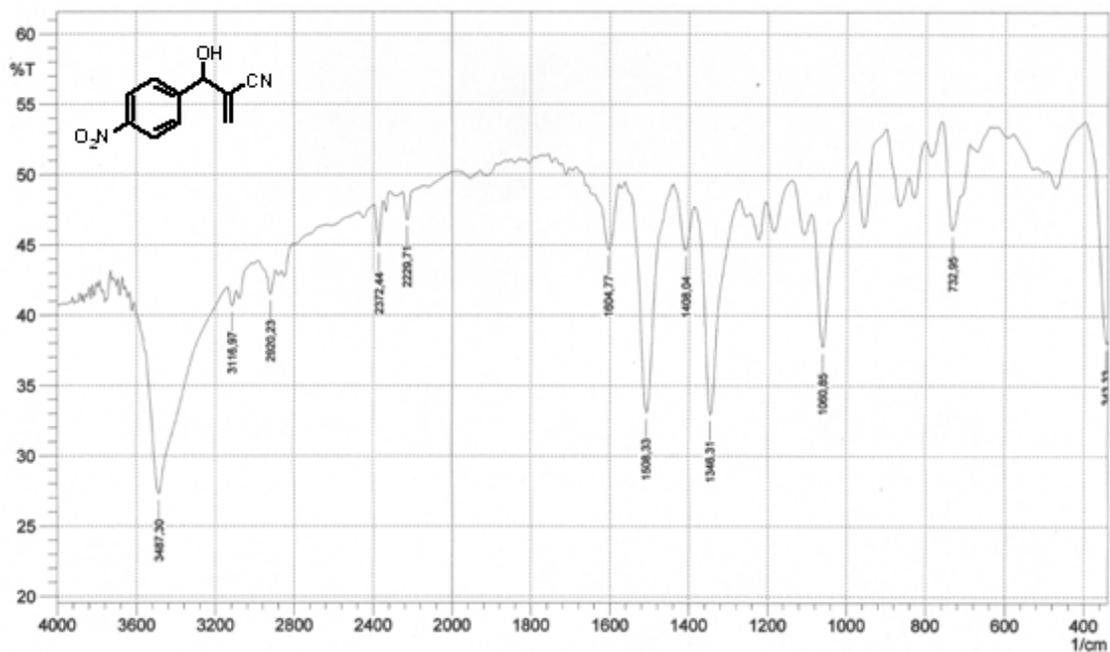
MassPeaks:63

RawMode:Averaged 18.9-18.9(1663-1665)

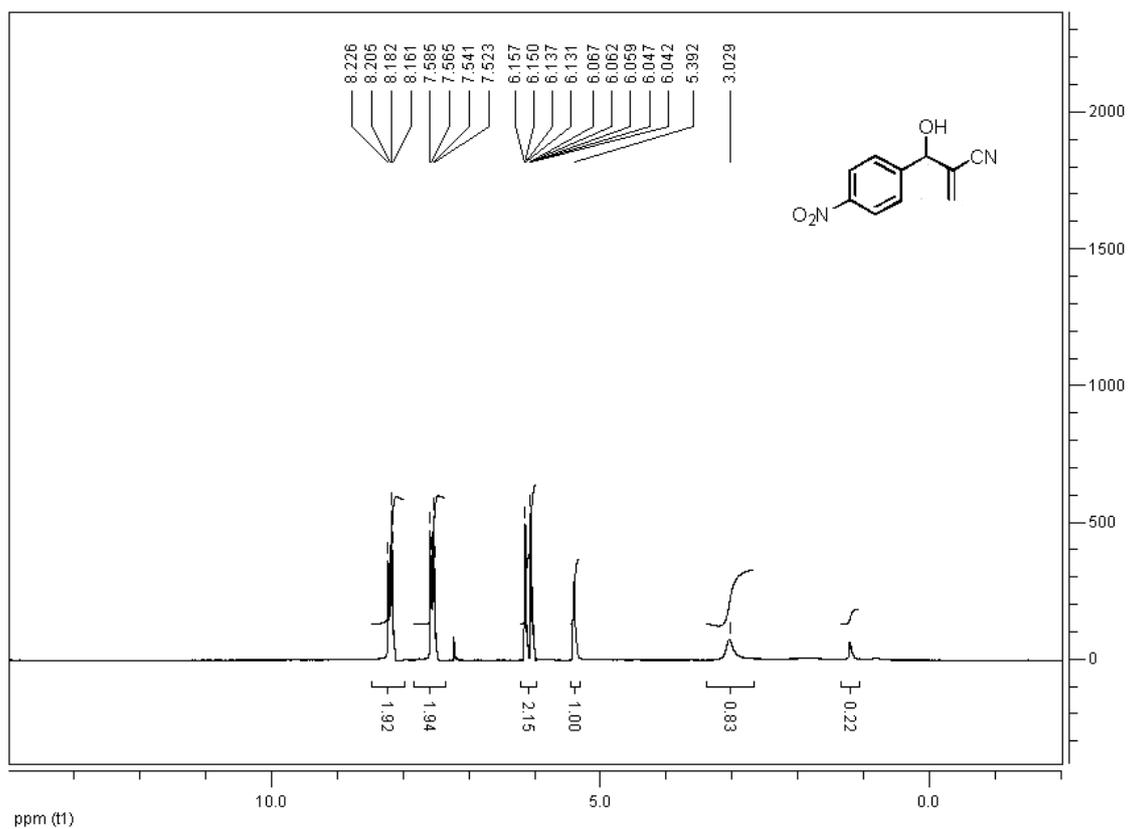
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



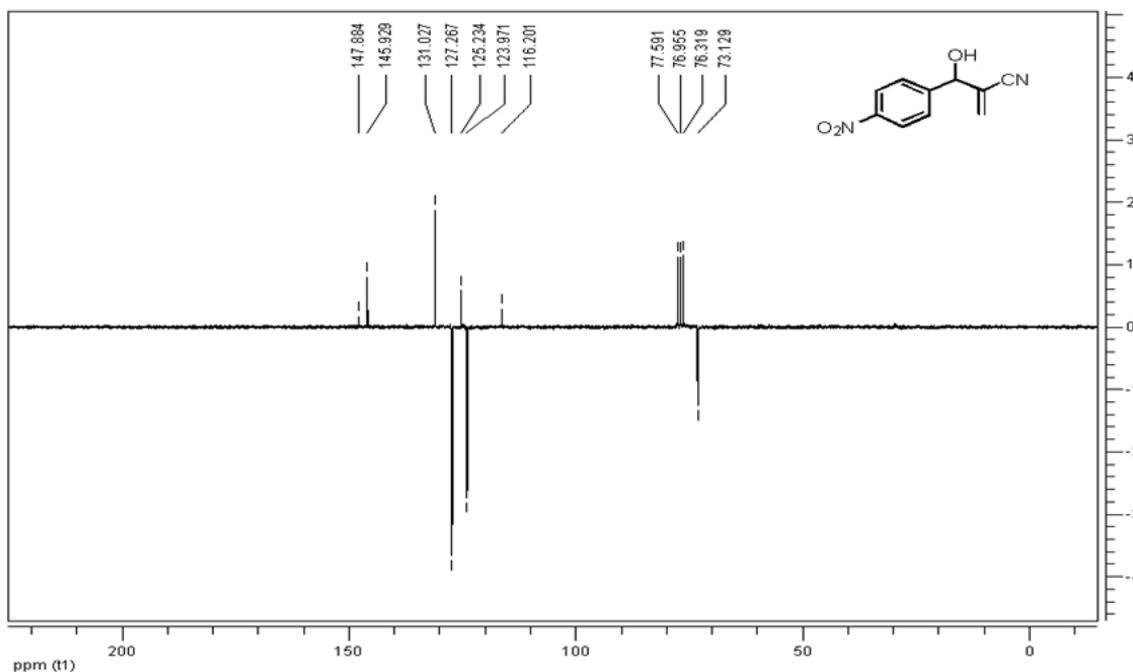
Espectro 13 Espectro de IV (KBr) do aduto 15



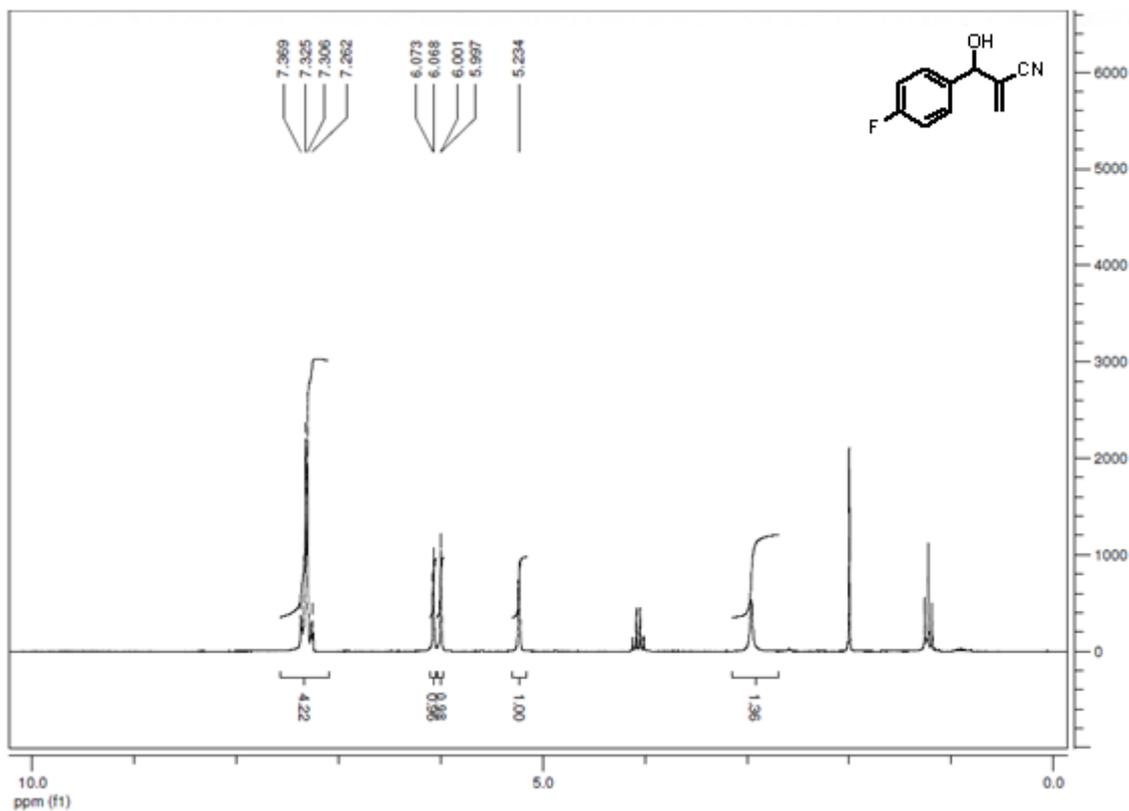
Espectro 14 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto 15



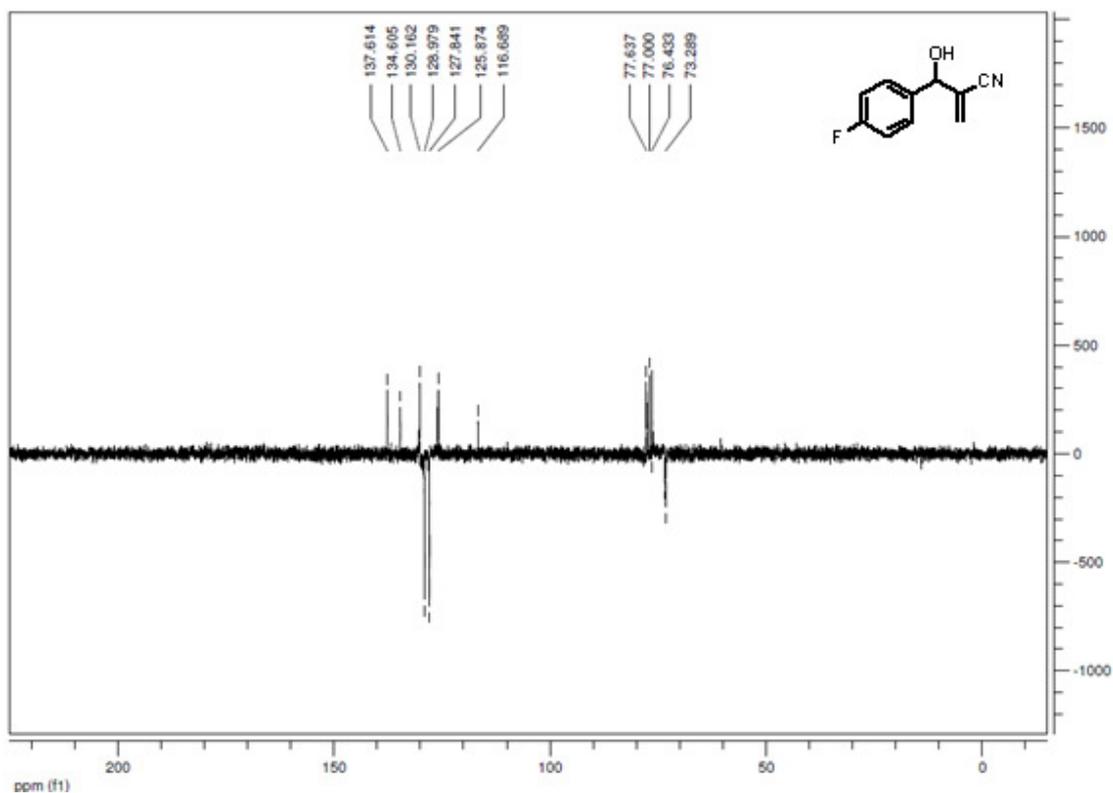
Espectro 15 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **15**



Espectro 16 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **26**



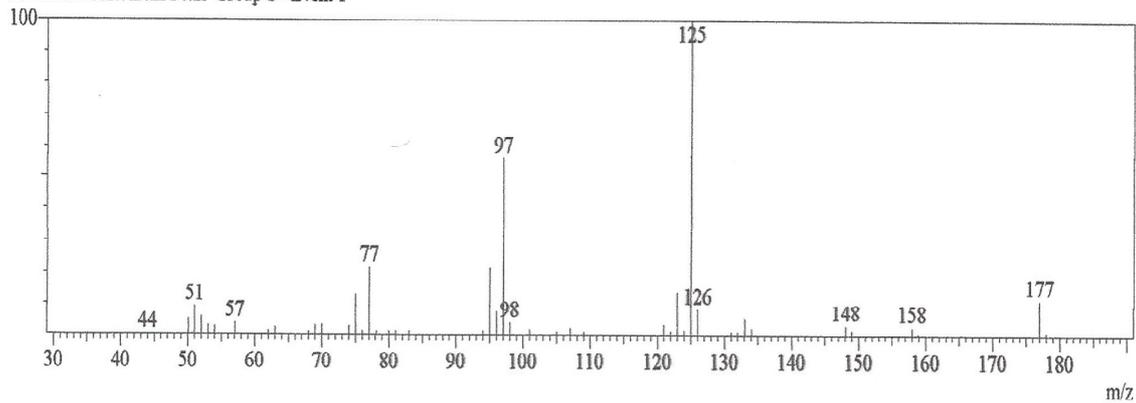
Espectro 17 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **26**



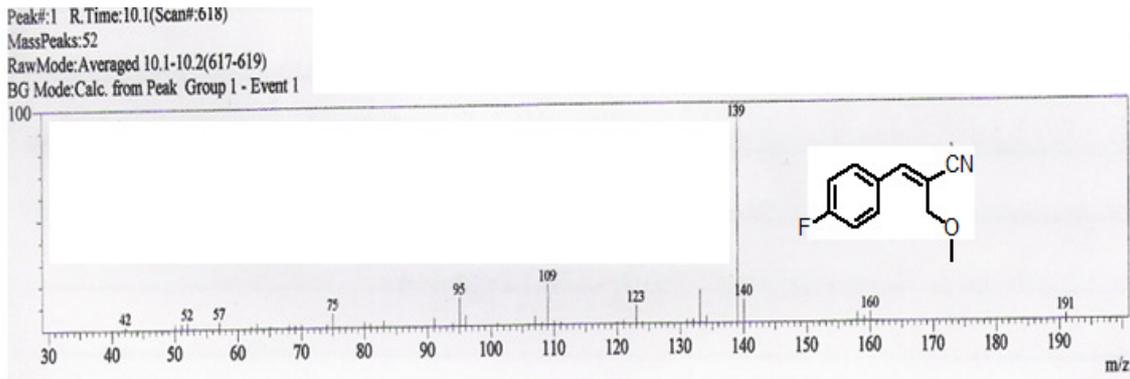
Espectro 18 Espectro de massas (70 eV) do aduto **26**

Spectrum

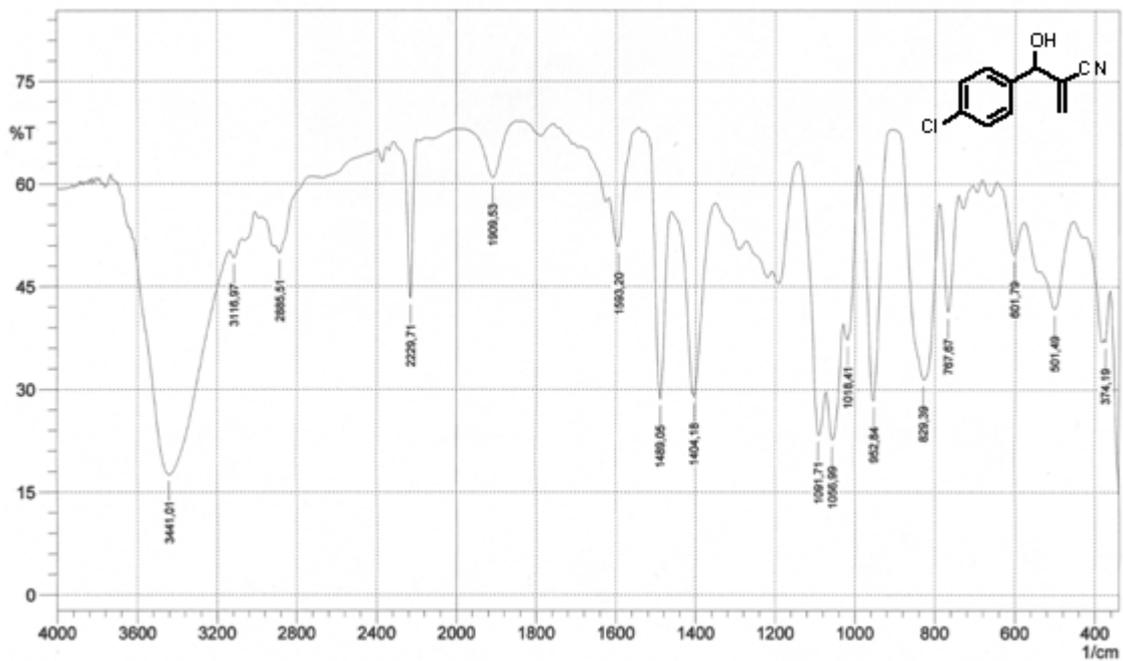
Peak#:2 R.Time:10.8(Scan#:700)
 MassPeaks:45
 RawMode:Averaged 10.8-10.8(699-701)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



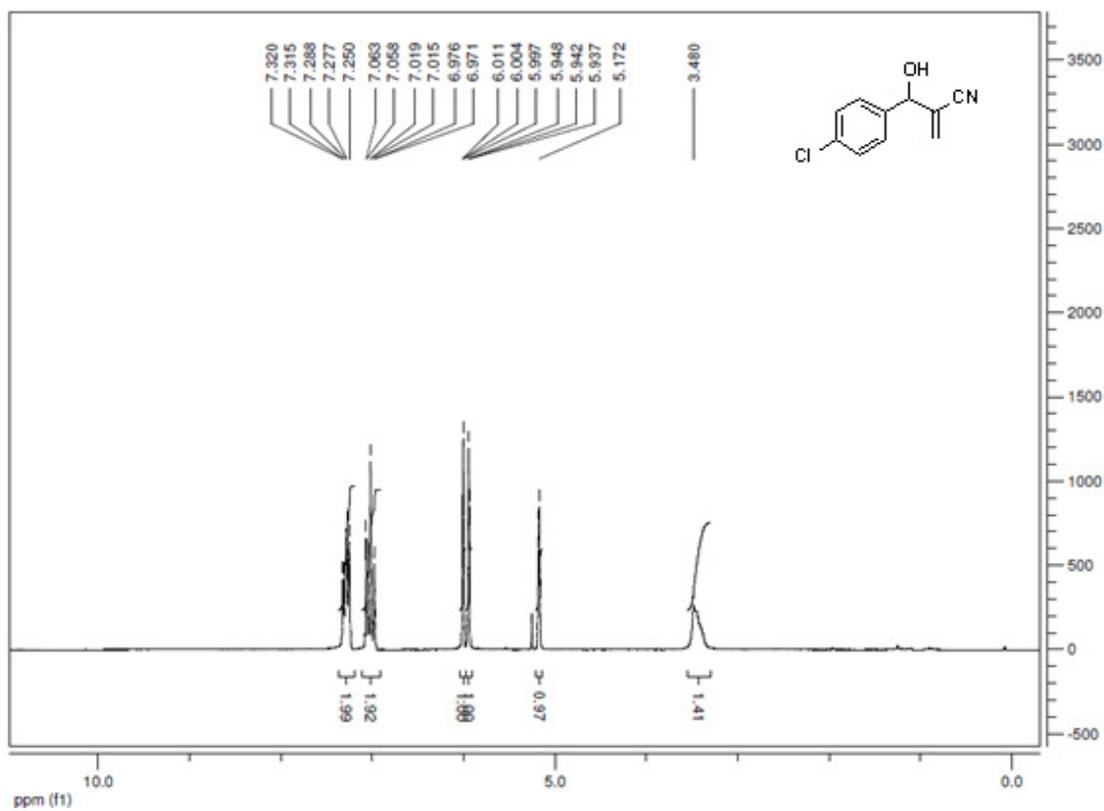
Espectro 19 Espectro de massas (70 eV) do subproduto **66c**



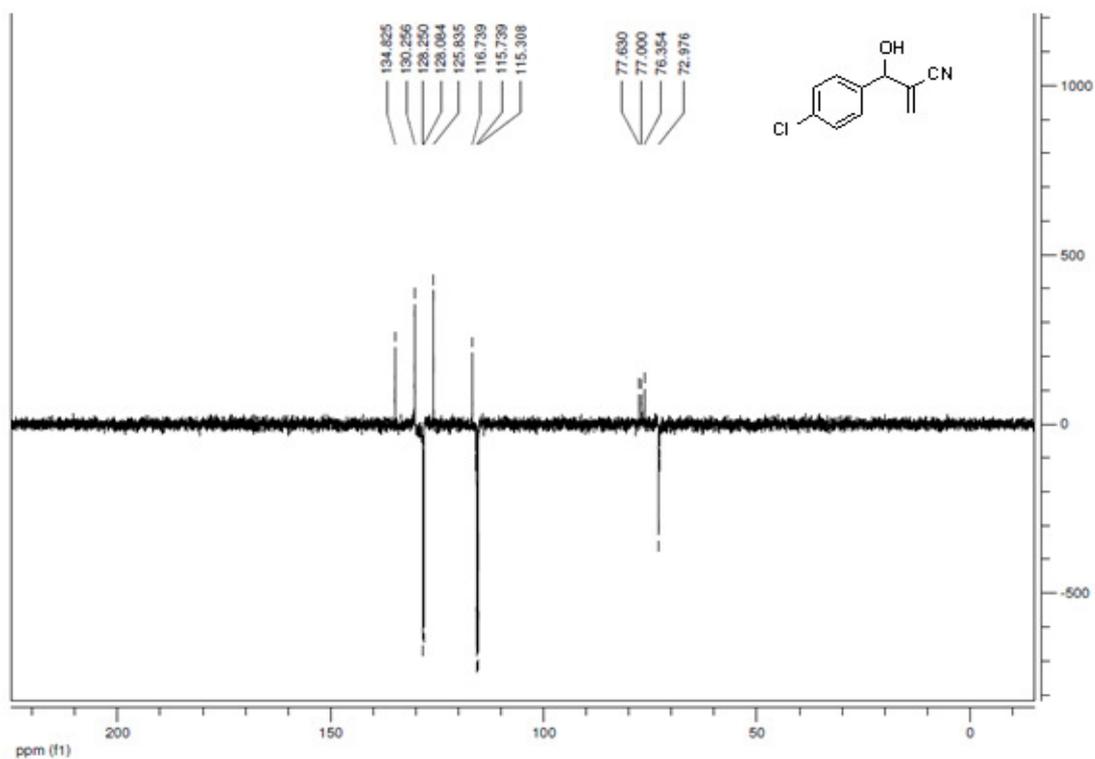
Espectro 20 Espectro de IV (KBr) do aduto **40**



Espectro 21 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **40**



Espectro 22 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **40**



Espectro 23 Espectro de massas (70 eV) do aduto **40**

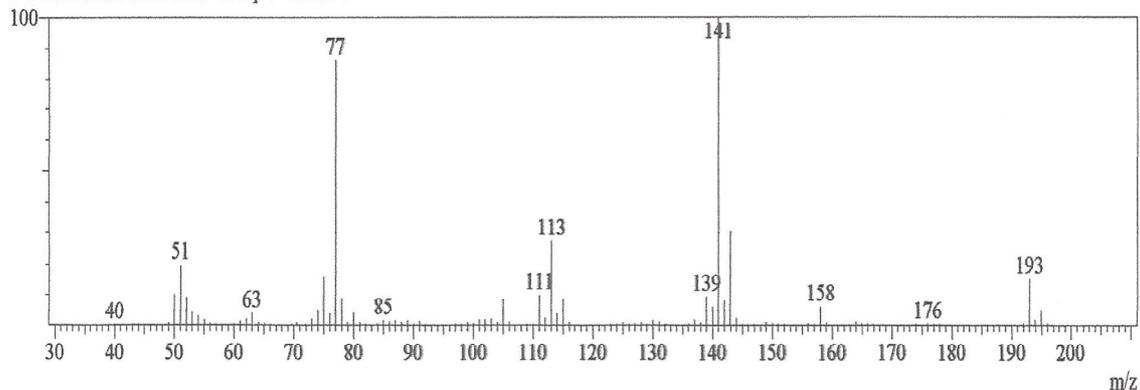
Spectrum

Peak#:4 R.Time:12.8(Scan#:933)

MassPeaks:119

RawMode:Averaged 12.8-12.8(932-934)

BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1

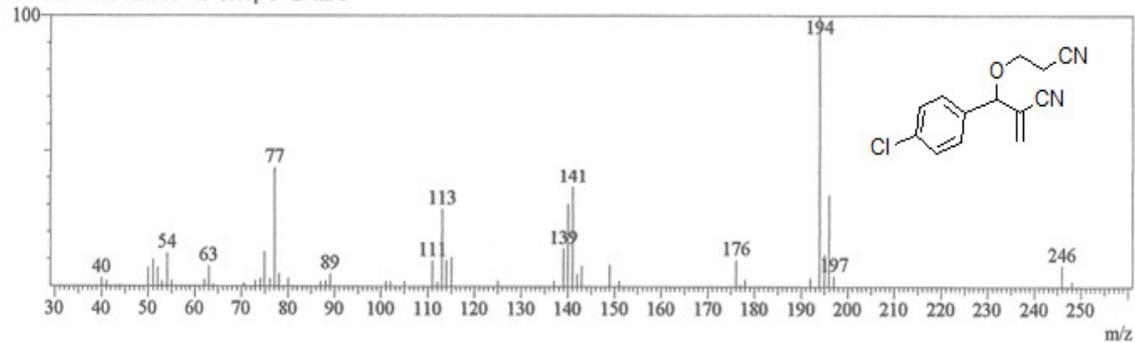
**Espectro 24** Espectro de massas (70 eV) do subproduto **65c**

Peak#:5 R.Time:16.0(Scan#:1317)

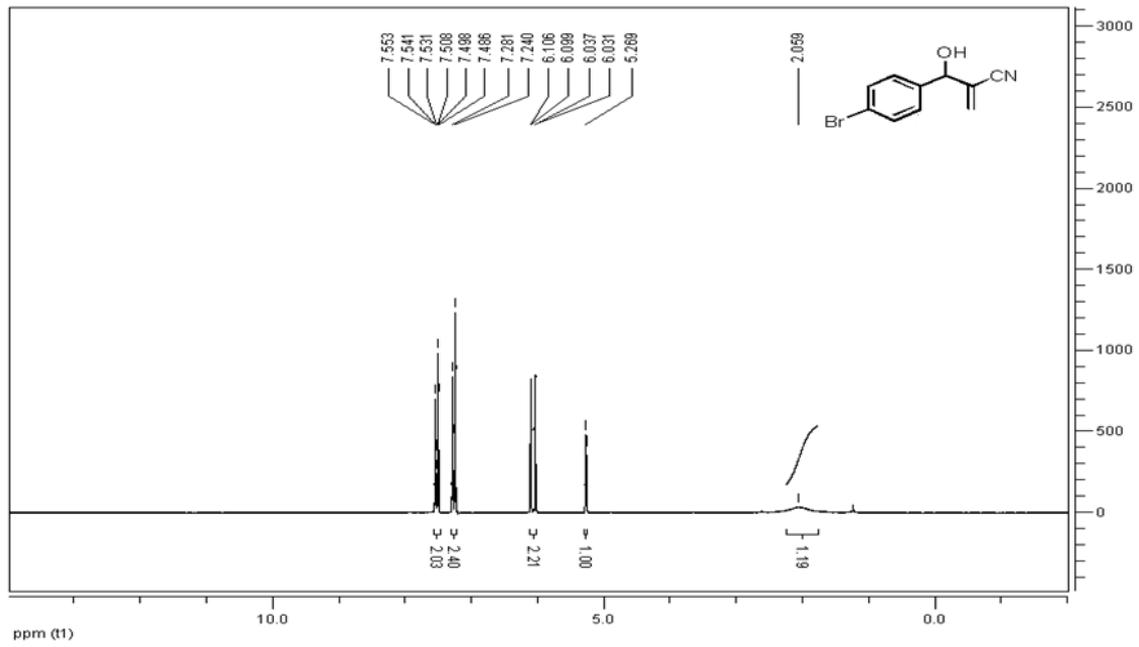
MassPeaks:51

RawMode:Averaged 16.0-16.0(1316-1318)

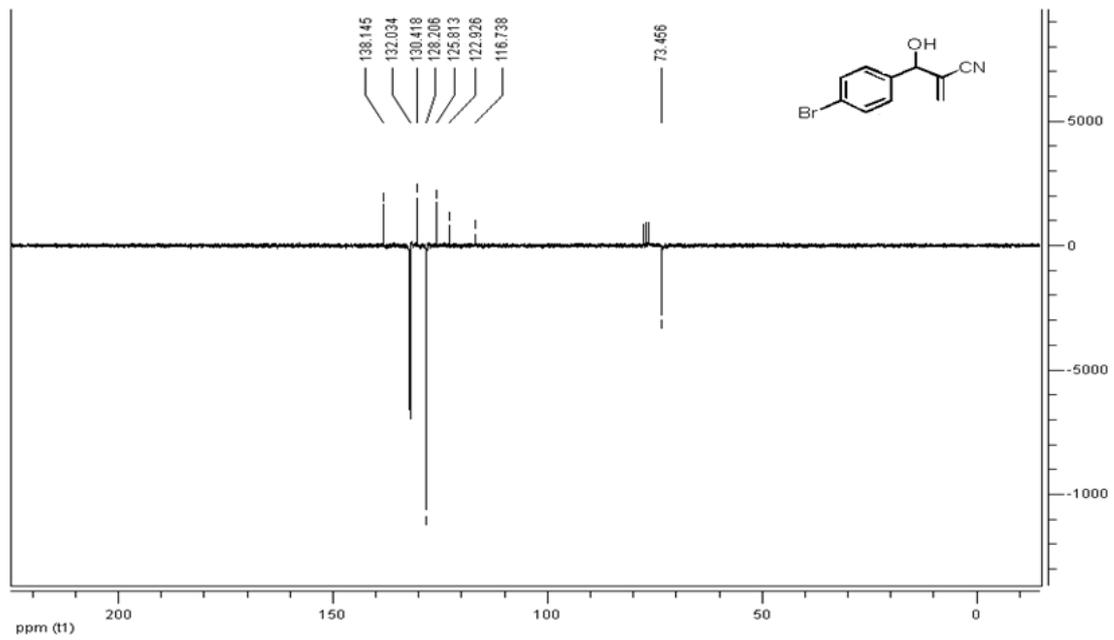
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



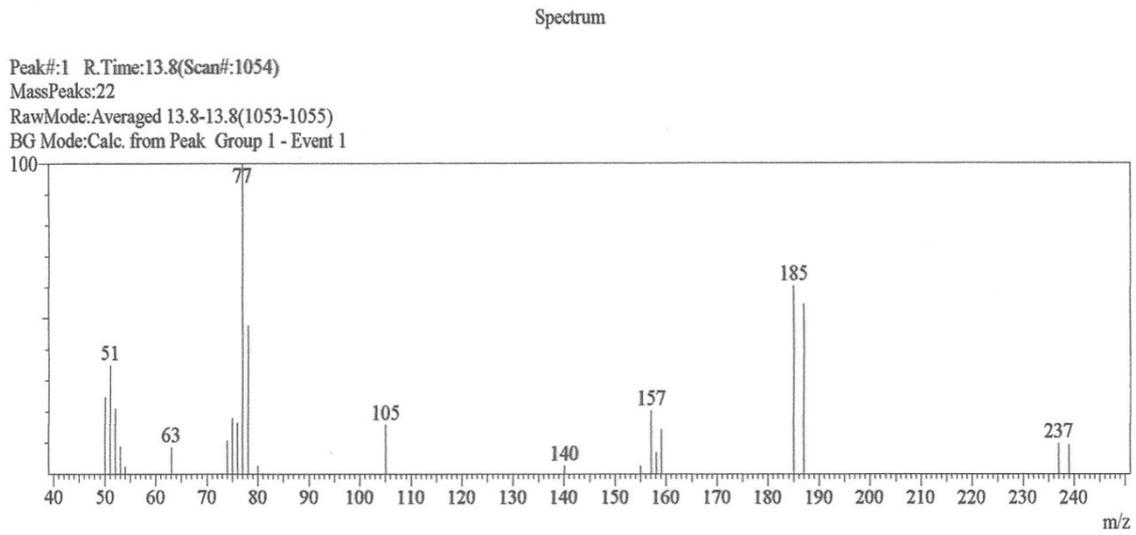
Espectro 25 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **42**



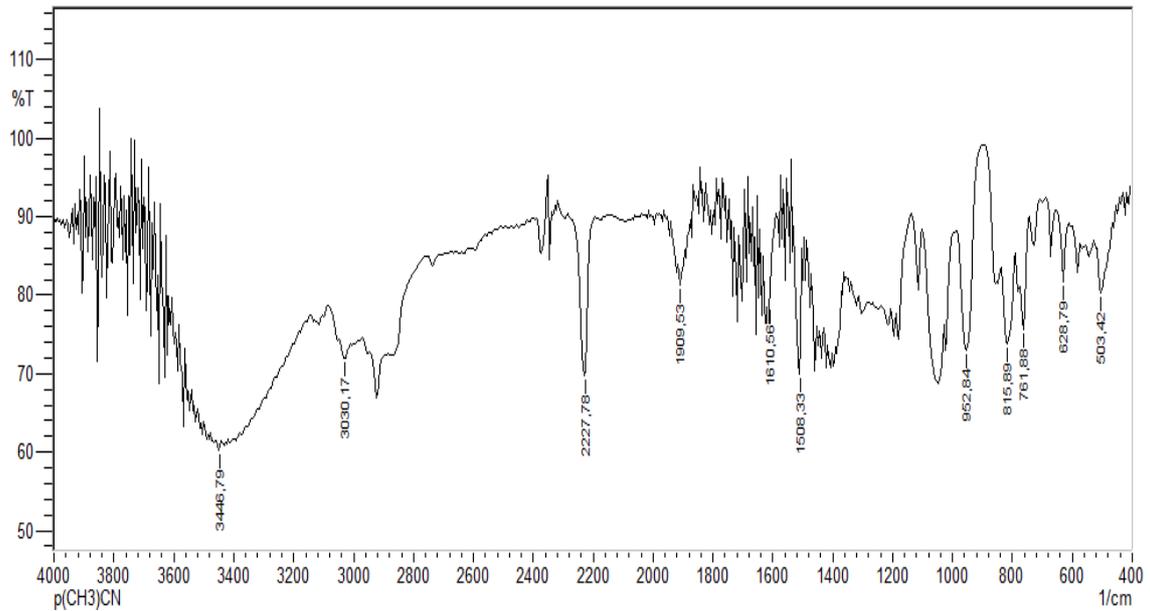
Espectro 26 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **42**



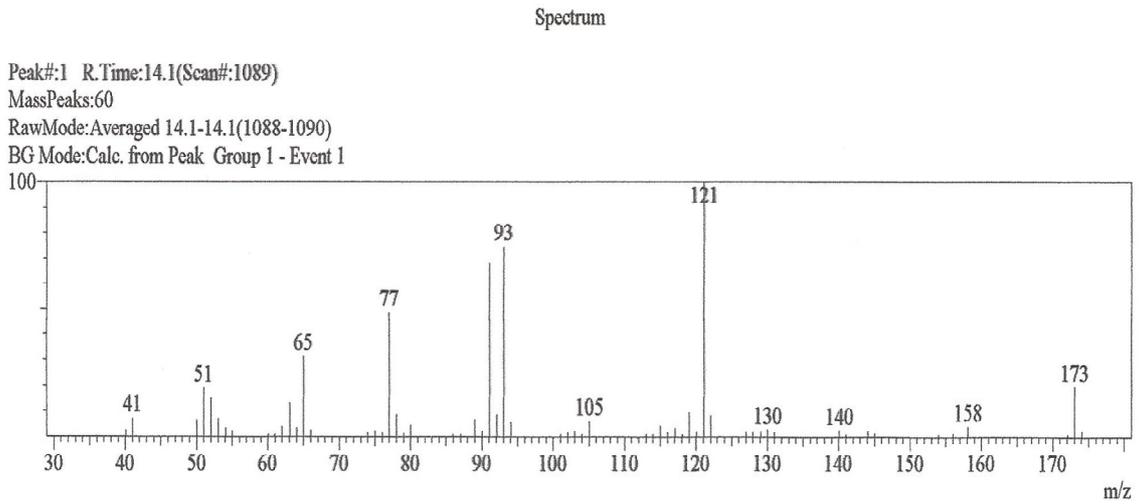
Espectro 27 Espectro de massas (70 eV) do aduto **42**



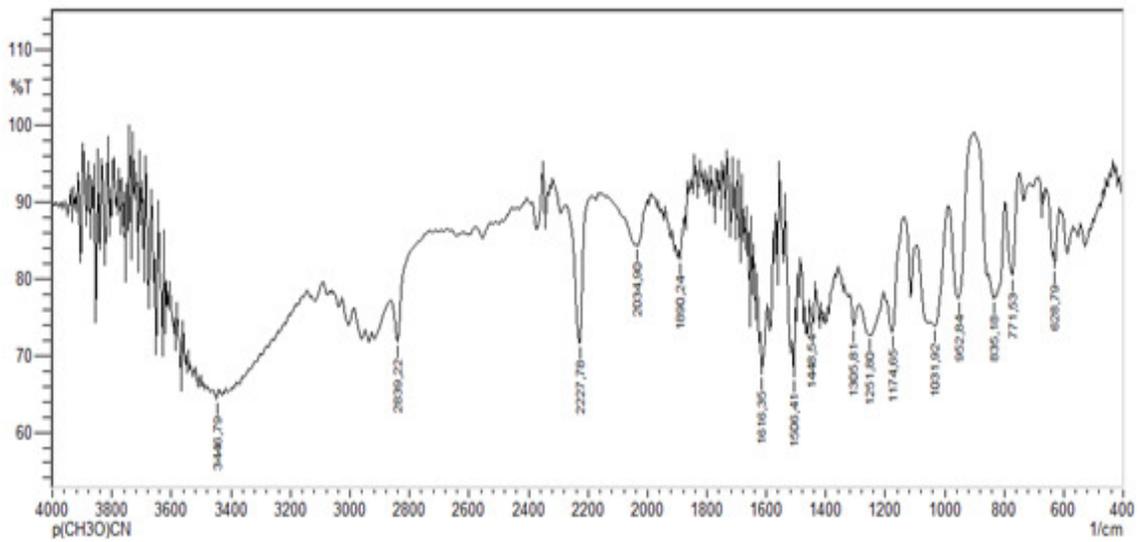
Espectro 28 Espectro de IV (KBr) do aduto **25**



Espectro 29 Espectro de massas (70 eV) do aduto **25**



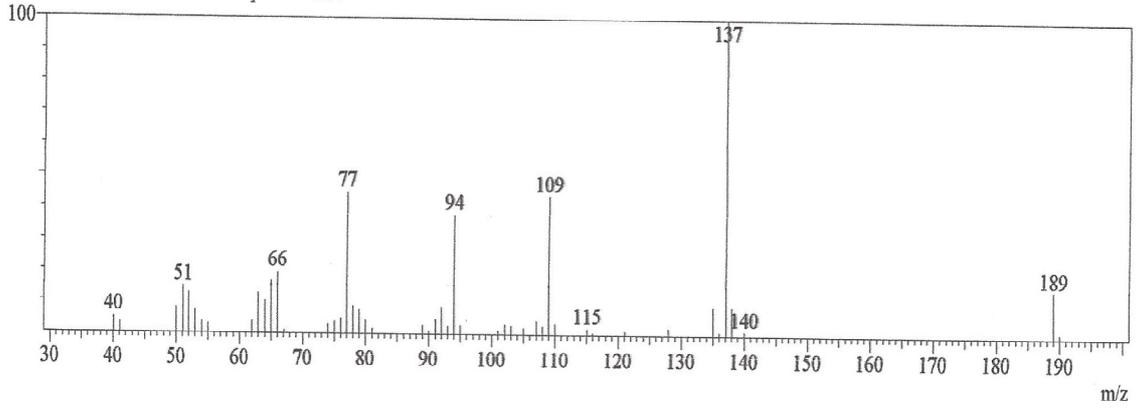
Espectro 30 Espectro de IV (KBr) do aduto **45**



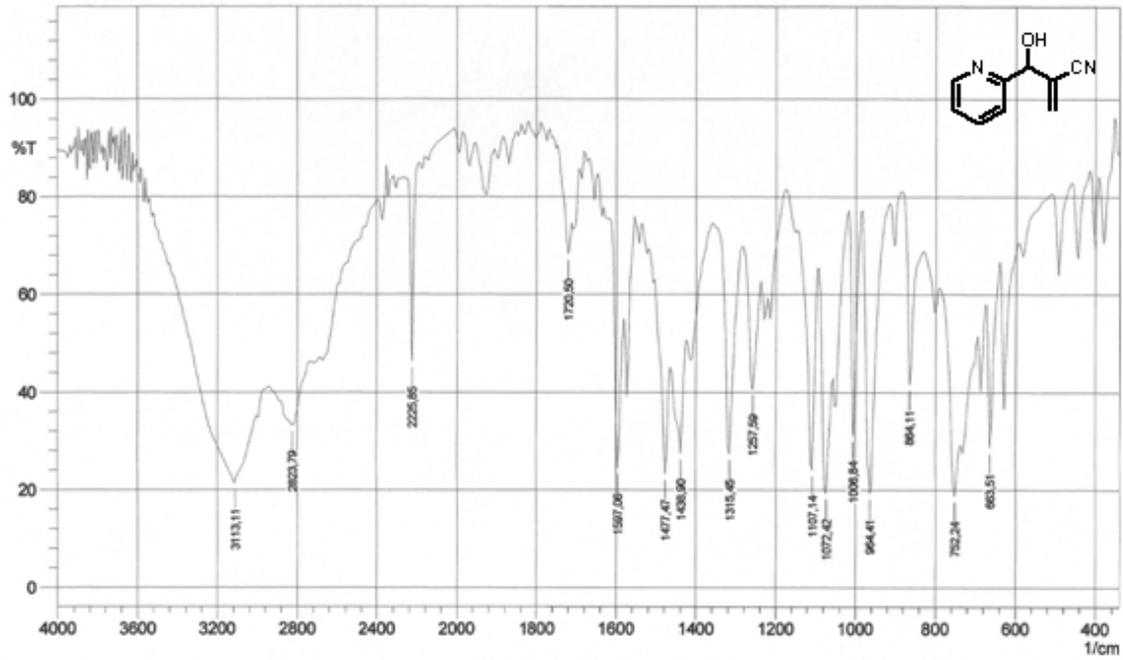
Espectro 31 Espectro de massas (70 eV) do aduto **45**

Spectrum

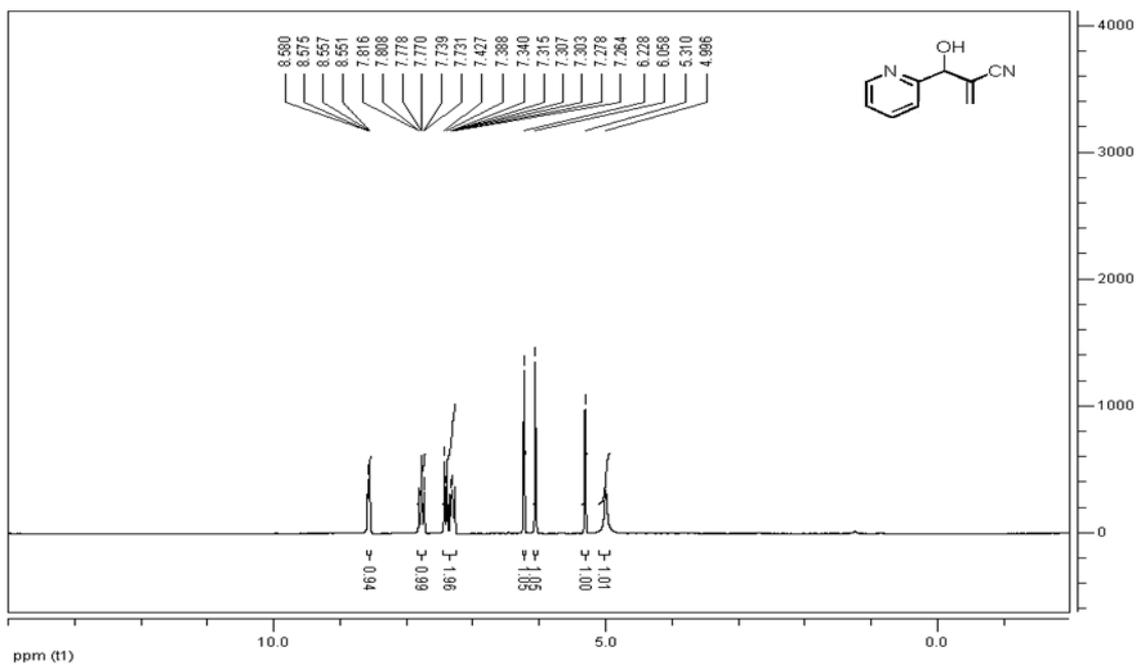
Peak#:1 R.Time:15.8(Scan#:1295)
 MassPeaks:48
 RawMode:Averaged 15.8-15.8(1294-1296)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



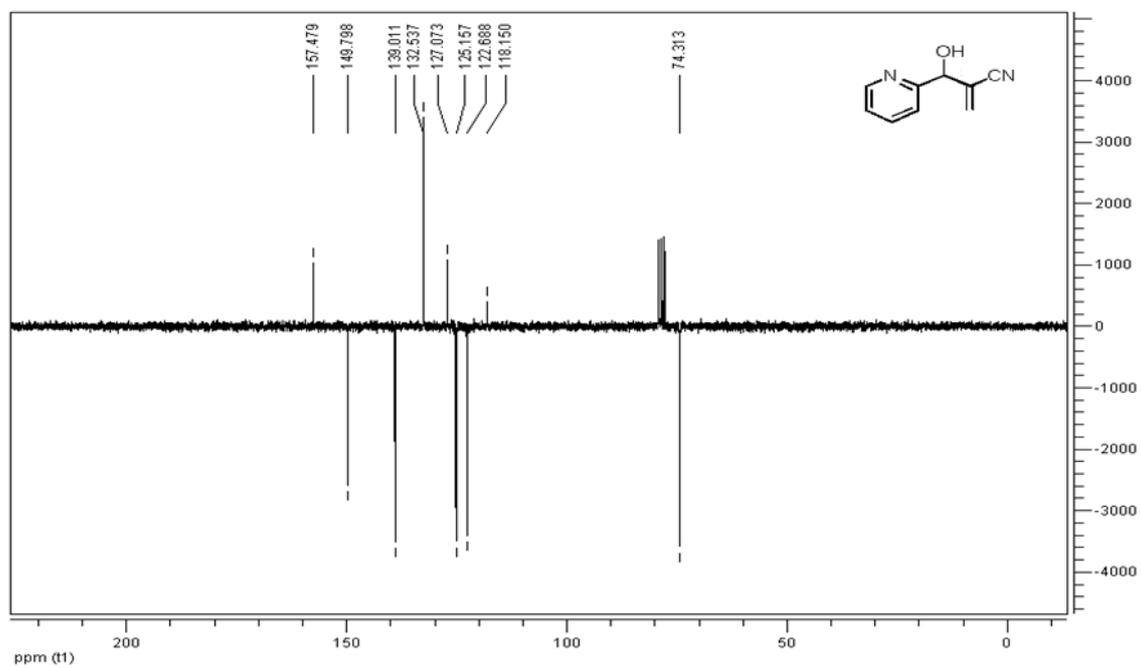
Espectro 32 Espectro de IV (KBr) do aduto **47**



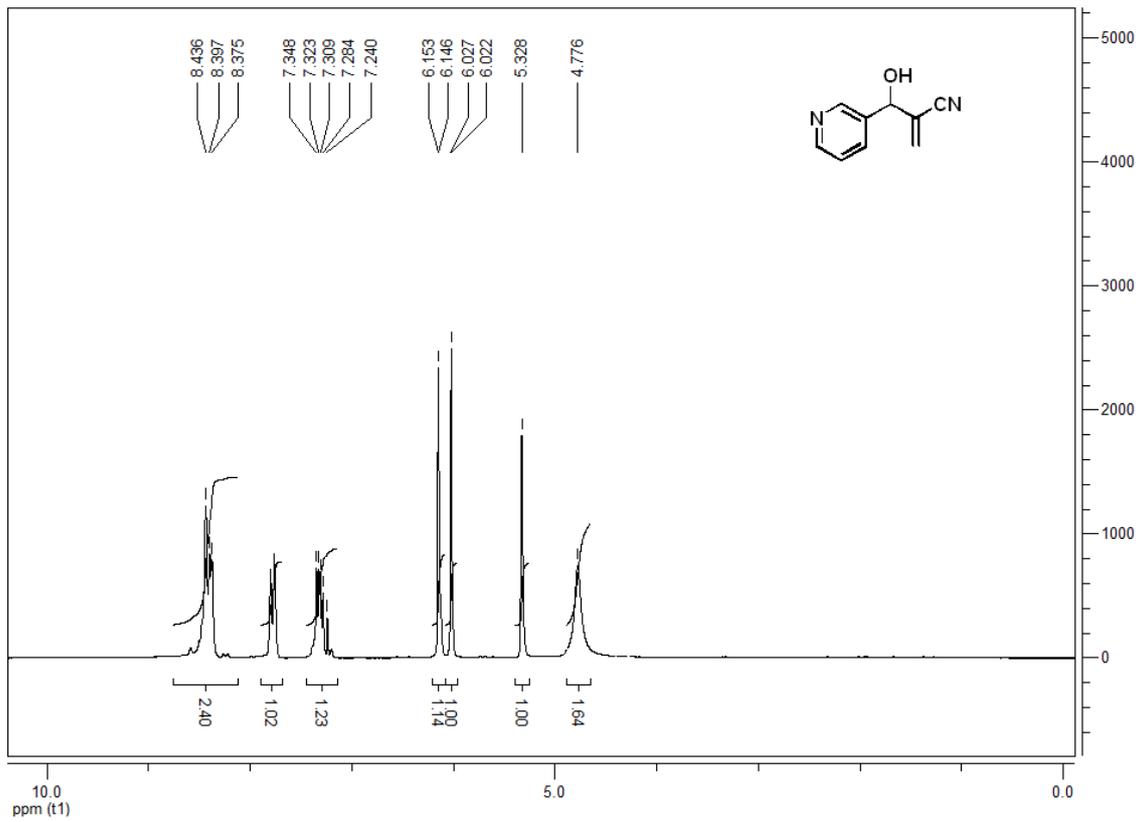
Espectro 33 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **47**



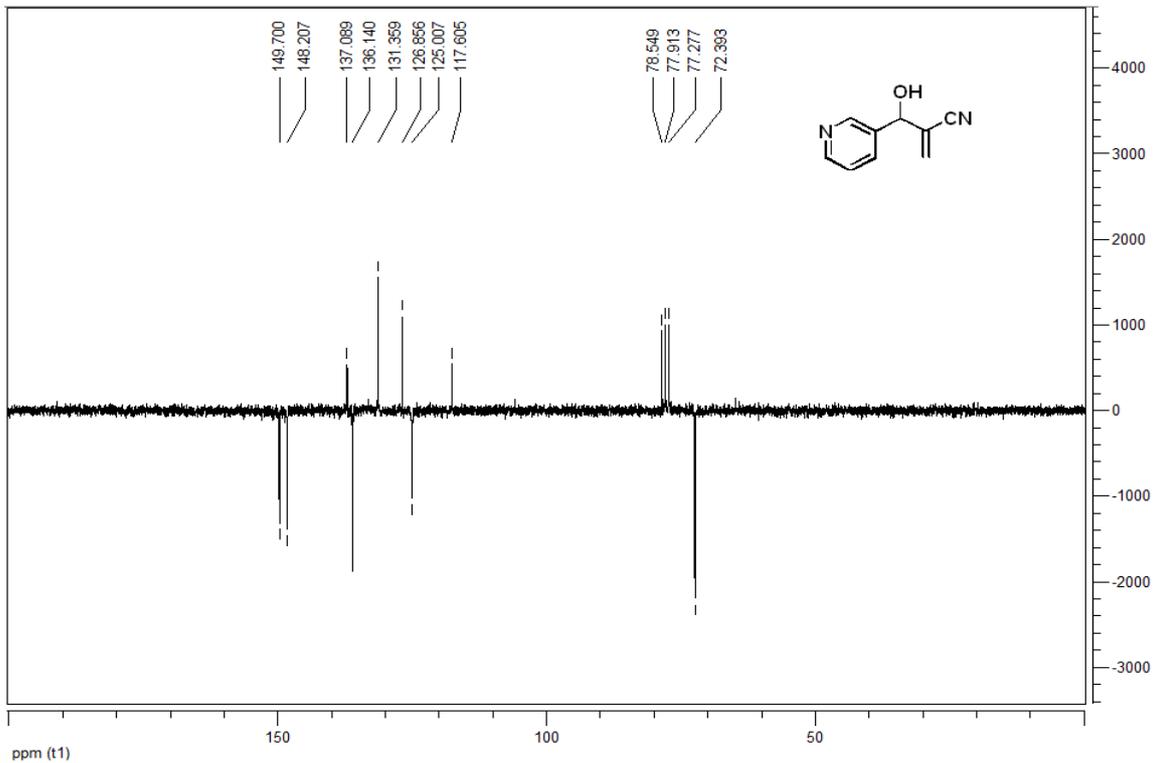
Espectro 34 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **47**



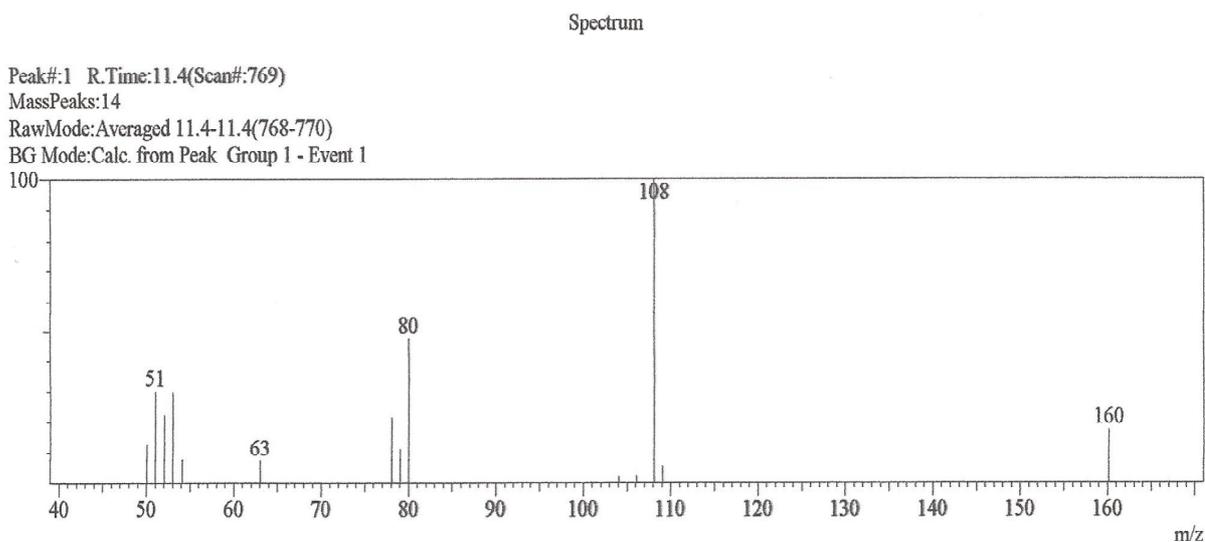
Espectro 35 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **20**



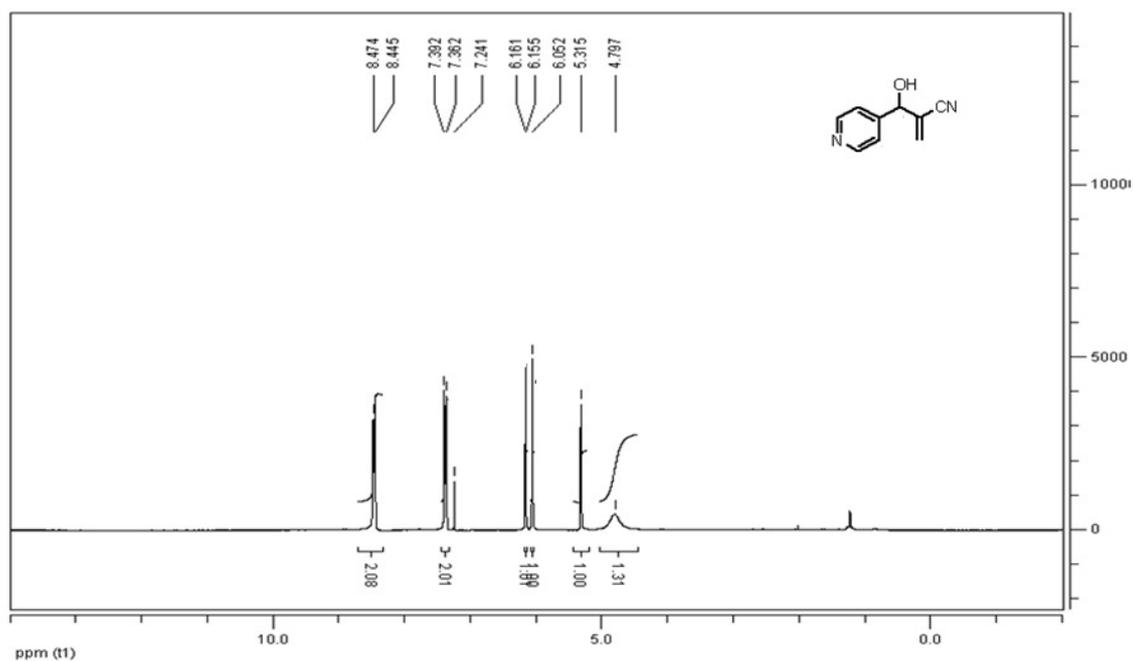
Espectro 36 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **20**



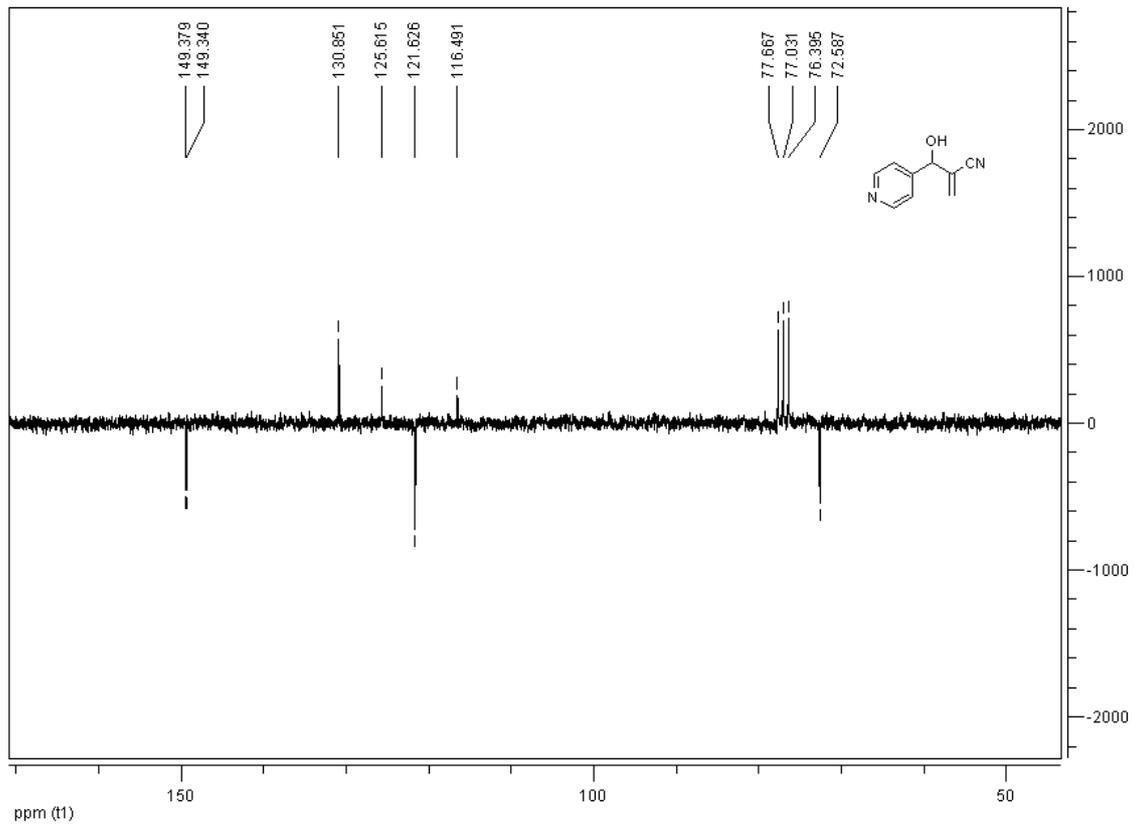
Espectro 37 Espectro de massas (70 eV) do aduto **20**



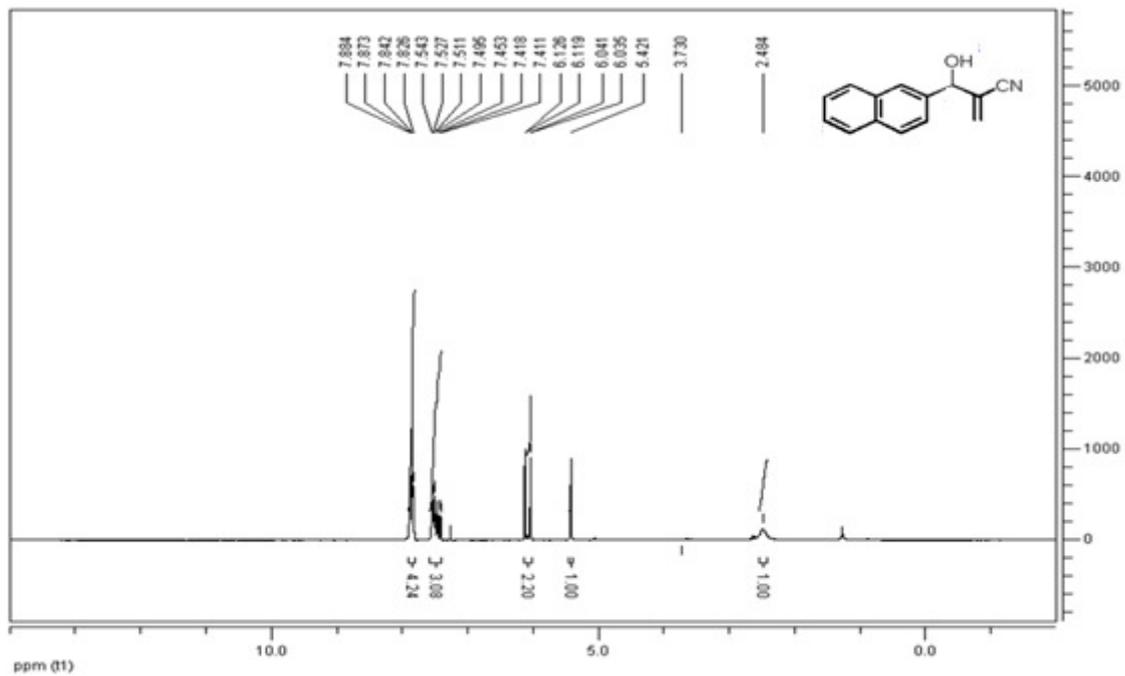
Espectro 38 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **49**



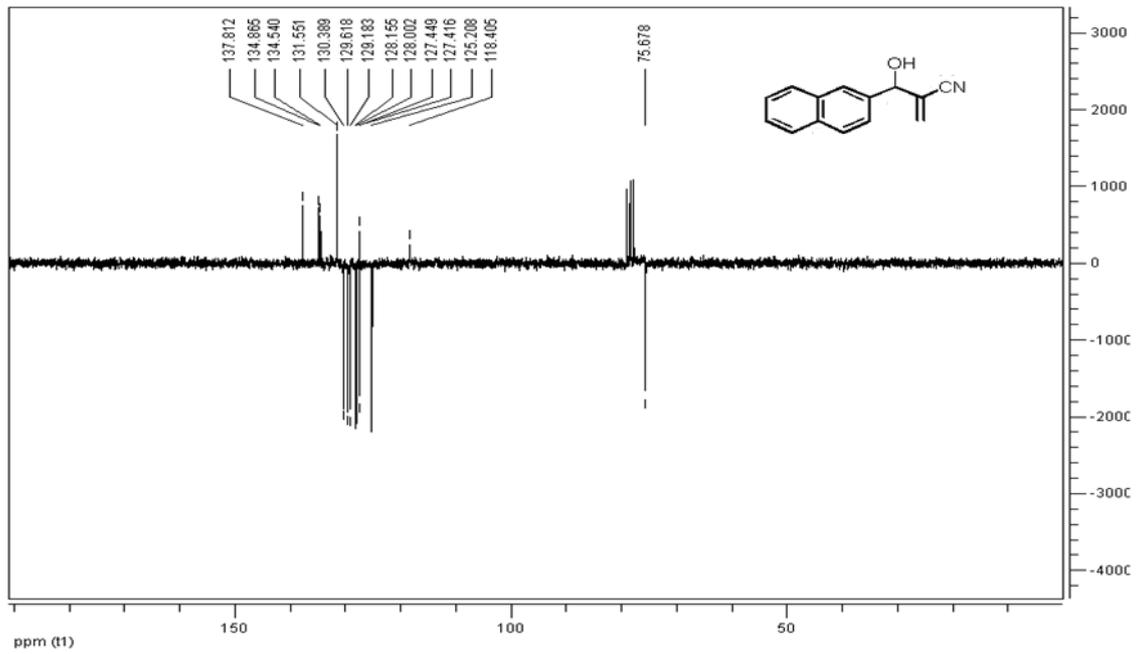
Espectro 39 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **49**



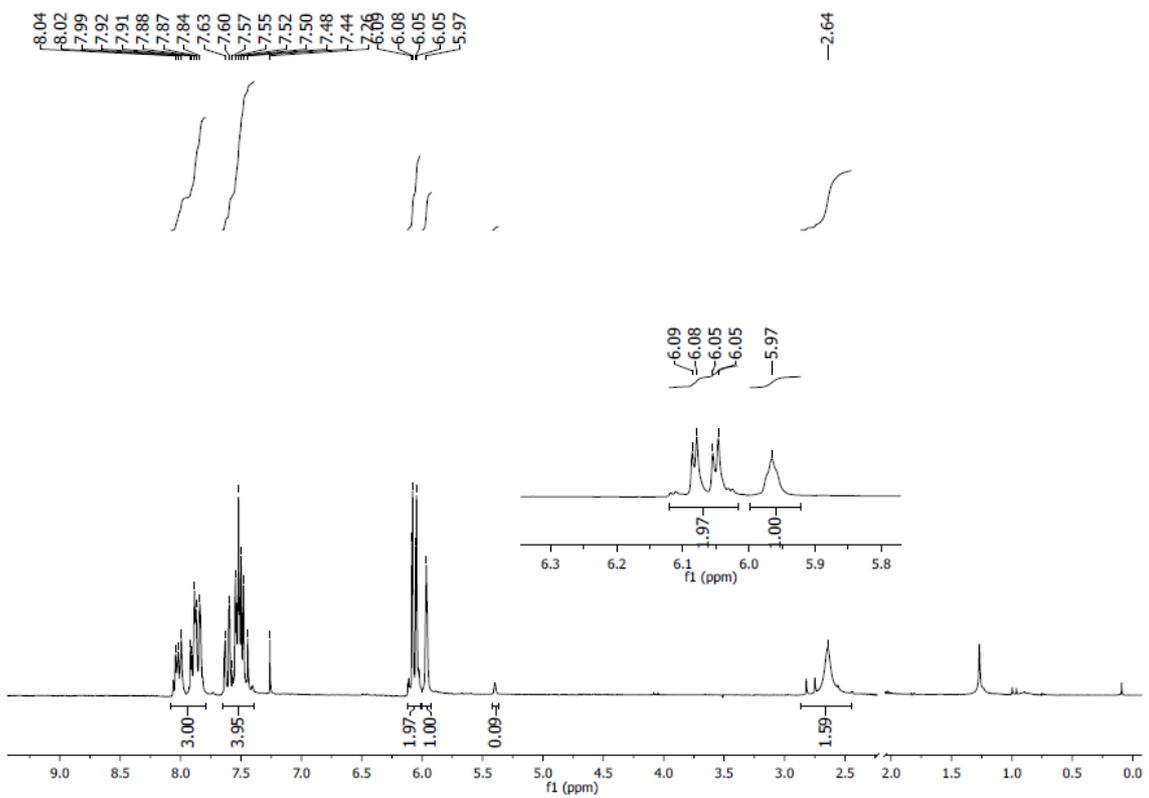
Espectro 40 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **51**



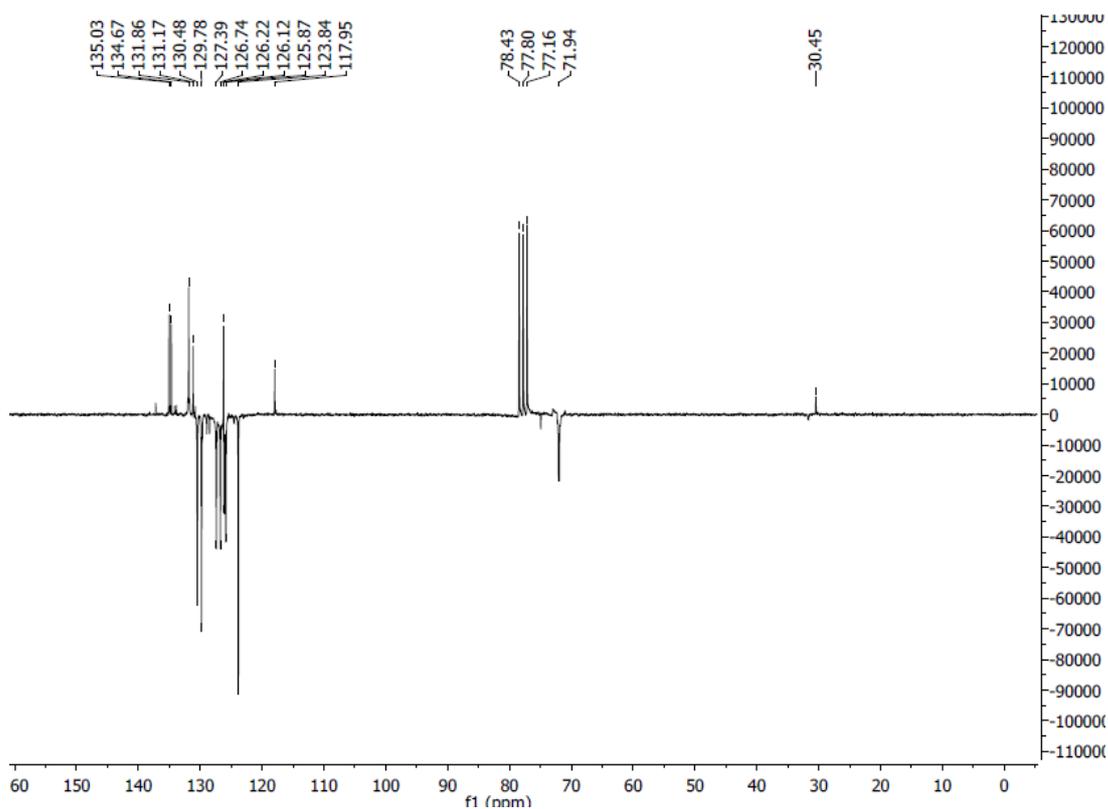
Espectro 41 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **51**



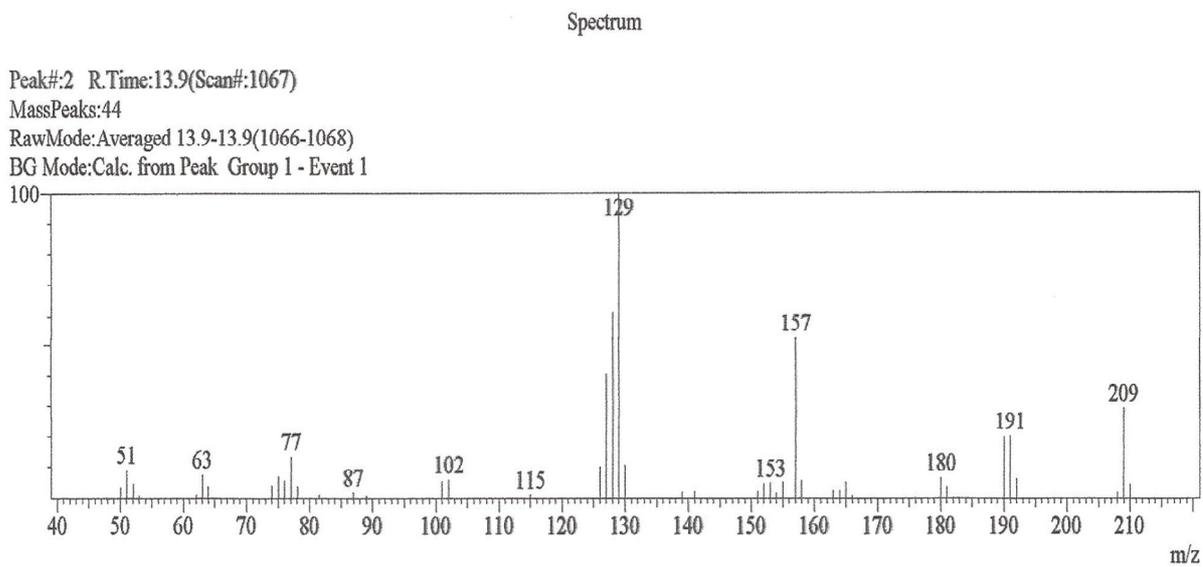
Espectro 42 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **52**



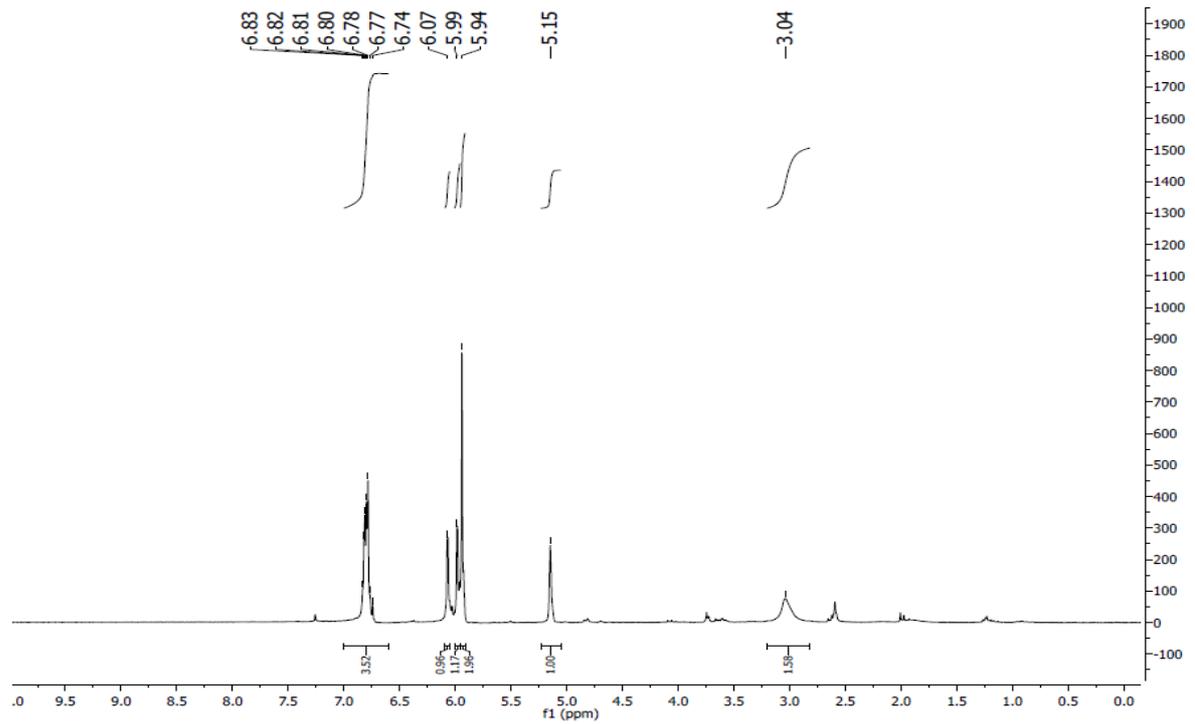
Espectro 43 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **52**



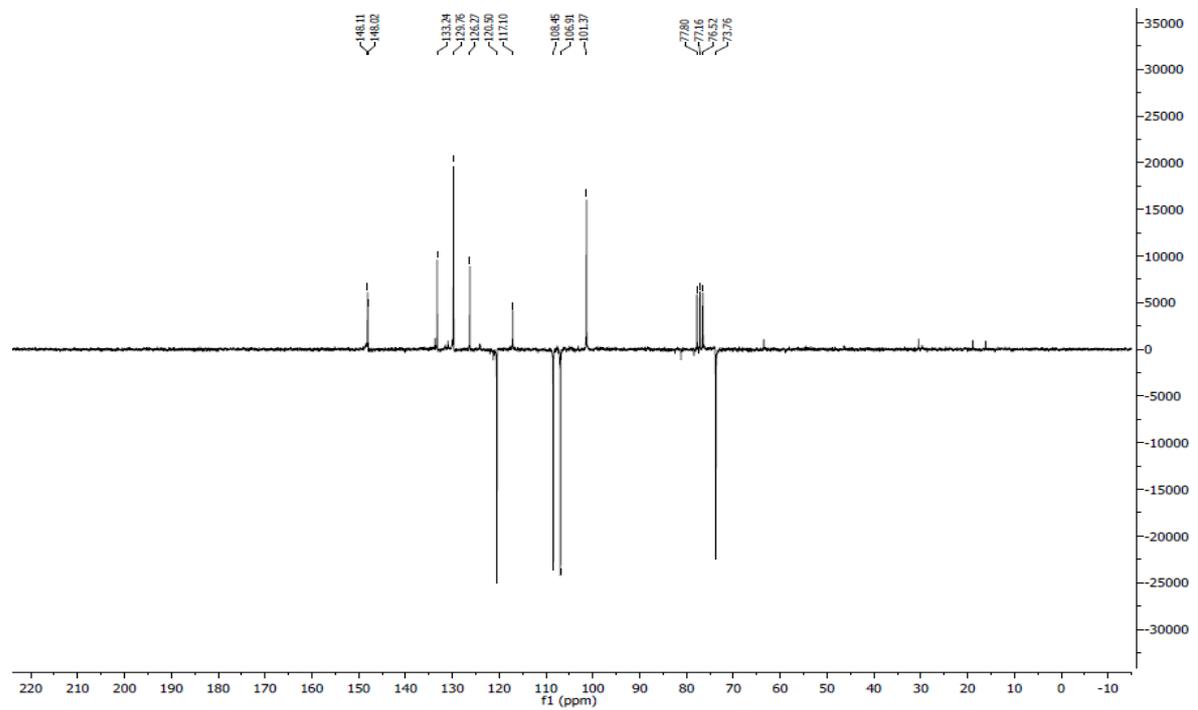
Espectro 44 Espectro de massas (70 eV) do aduto **52**



Espectro 45 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **24**



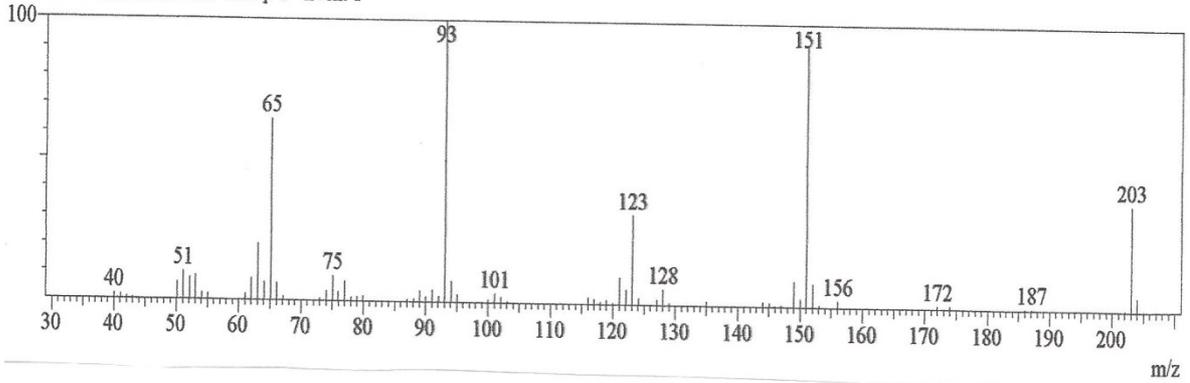
Espectro 46 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **24**



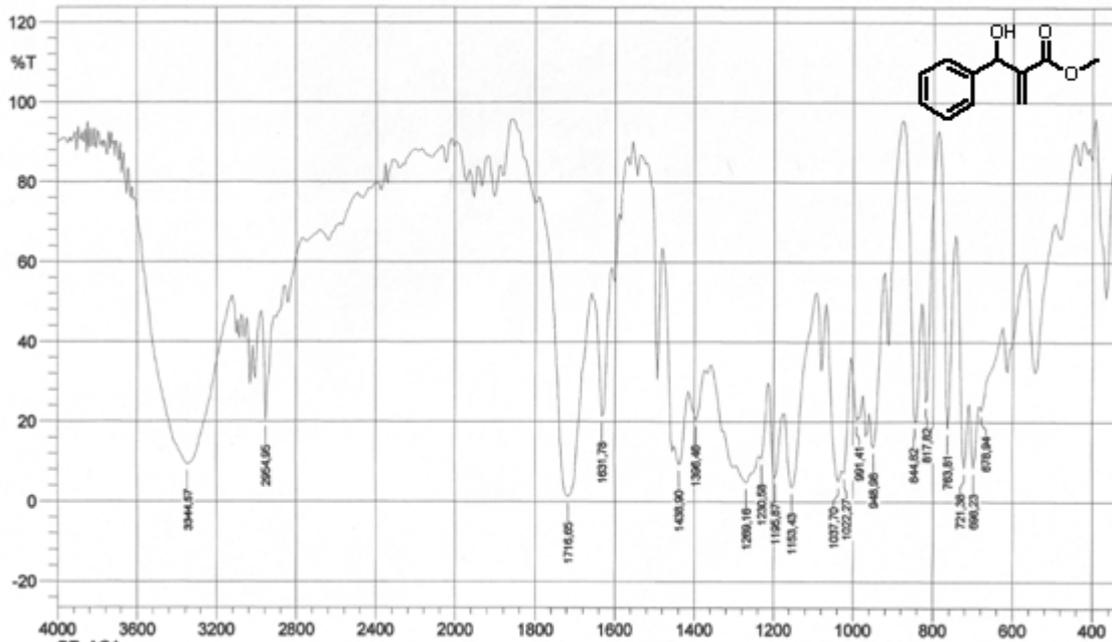
Espectro 47 Espectro de massas (70 eV) do aduto 24

Spectrum

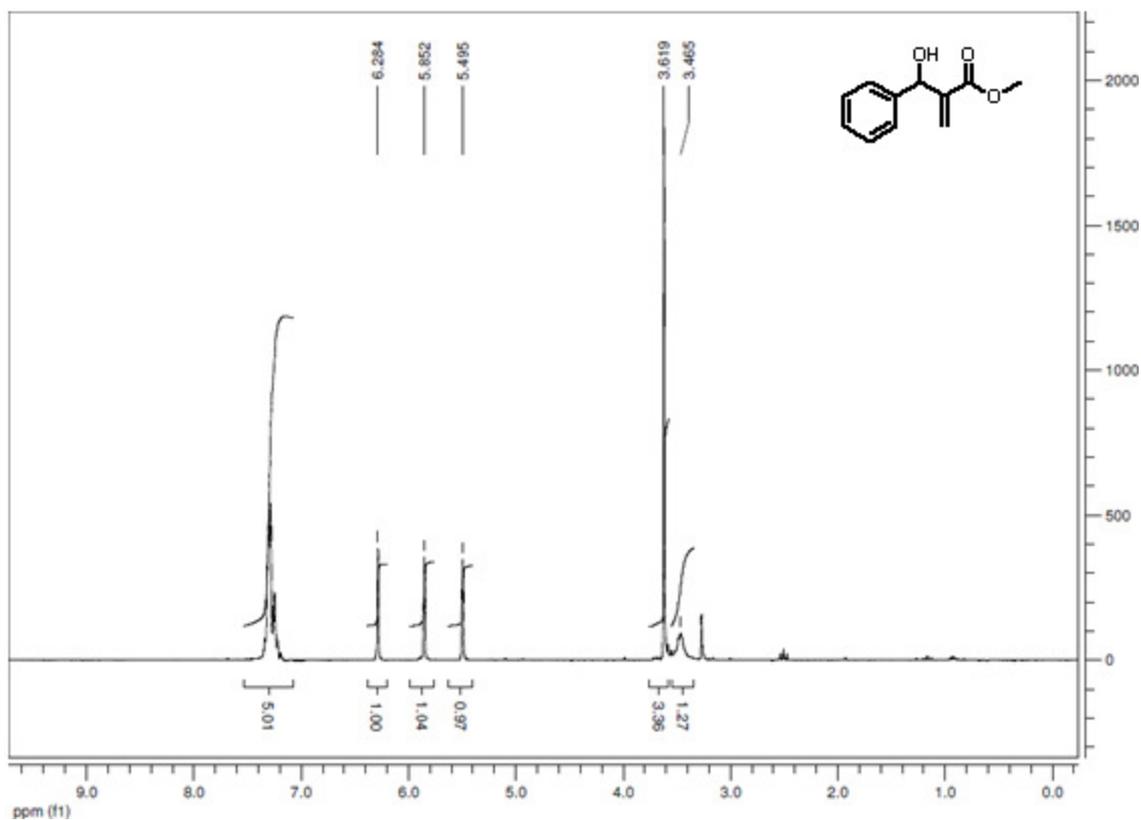
Peak#:1 R.Time:13.8(Scan#:1055)
 MassPeaks:71
 RawMode:Averaged 13.8-13.8(1054-1056)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



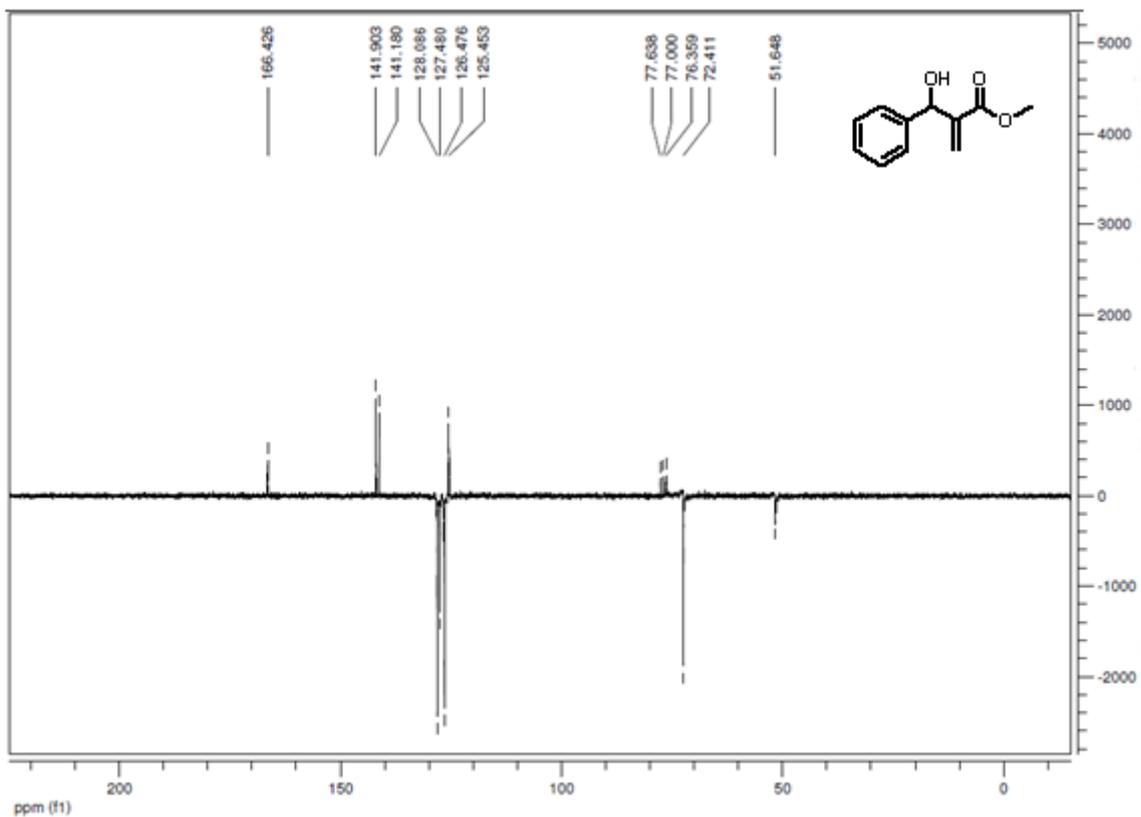
Espectro 48 Espectro de IV (KBr) do aduto 12



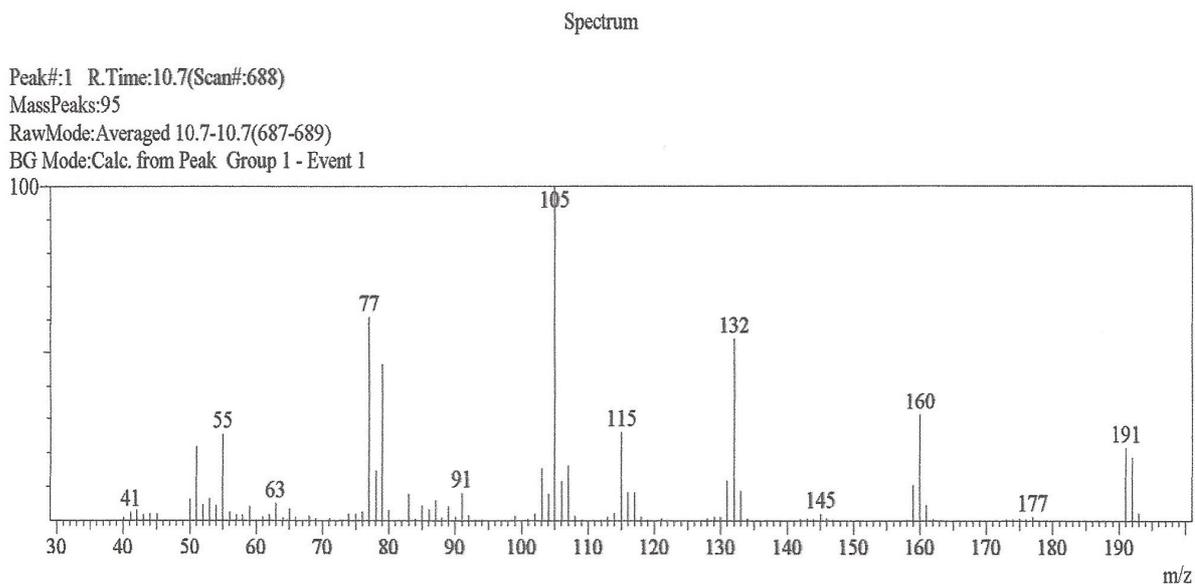
Espectro 49 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **12**



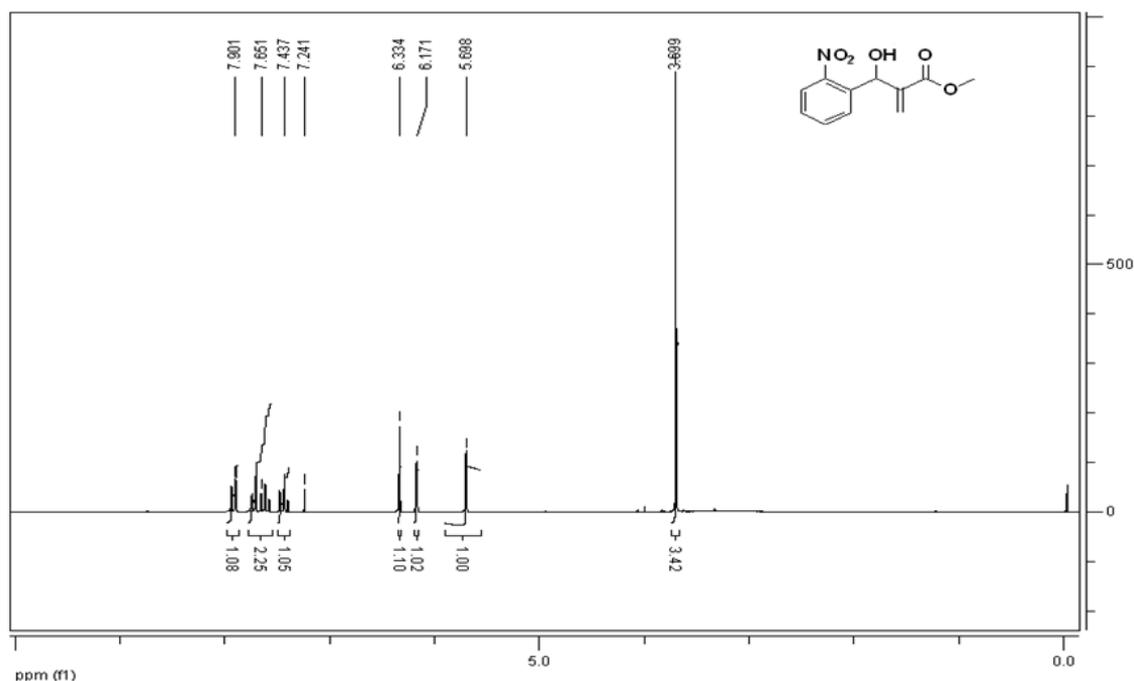
Espectro 50 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **12**



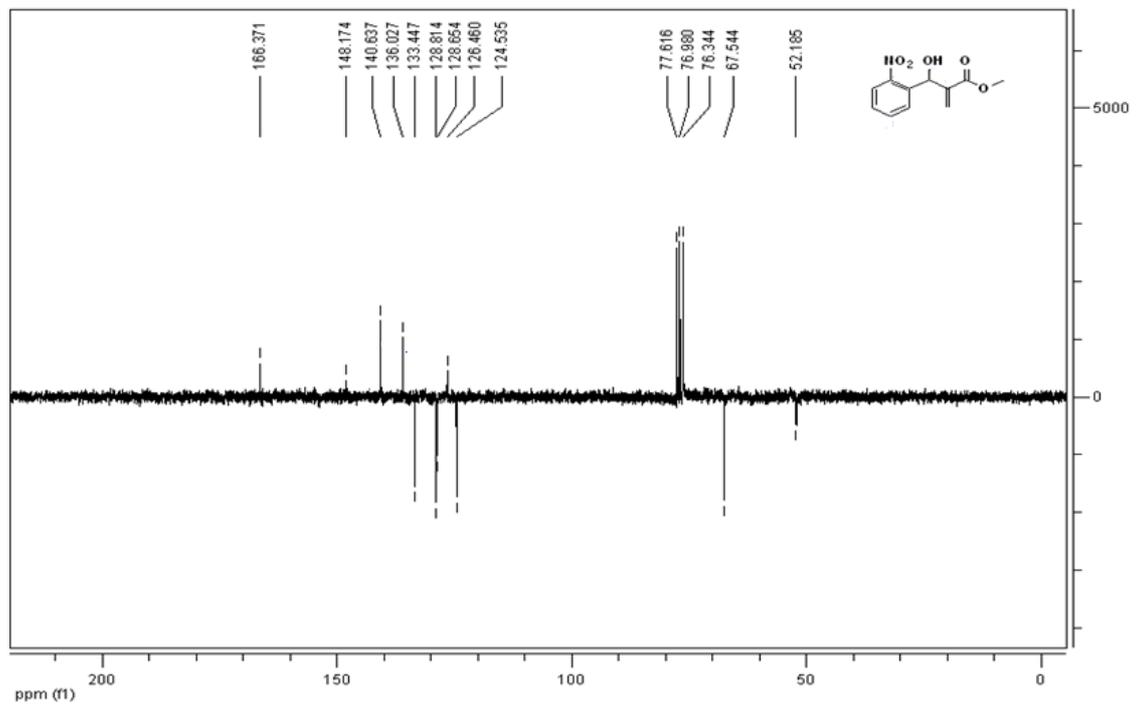
Espectro 51 Espectro de massas (70 eV) do aduto **12**



Espectro 52 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **37**



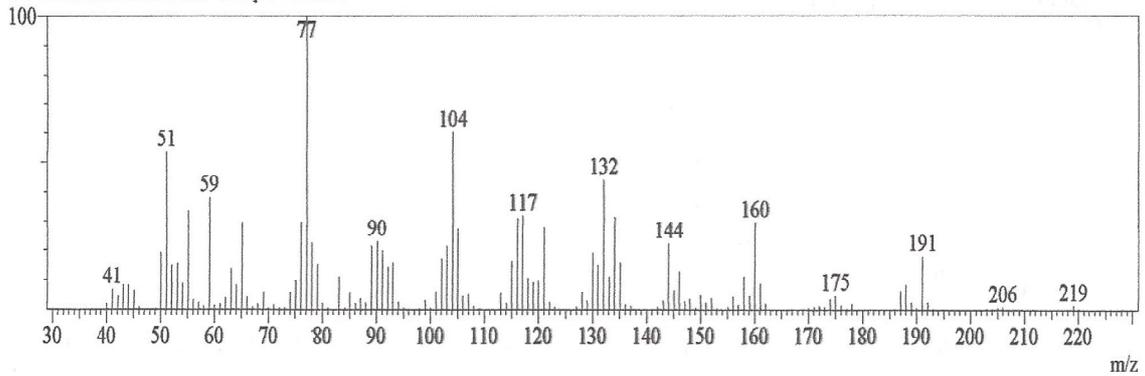
Espectro 53 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **37**



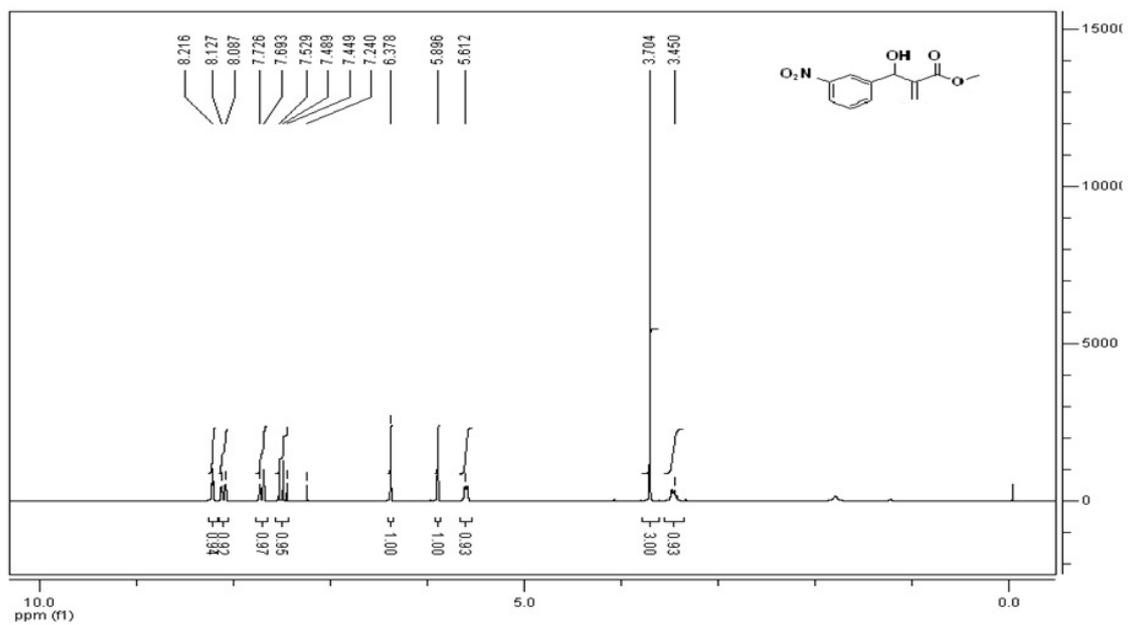
Espectro 54 Espectro de massas (70 eV) do aduto **37**

Spectrum

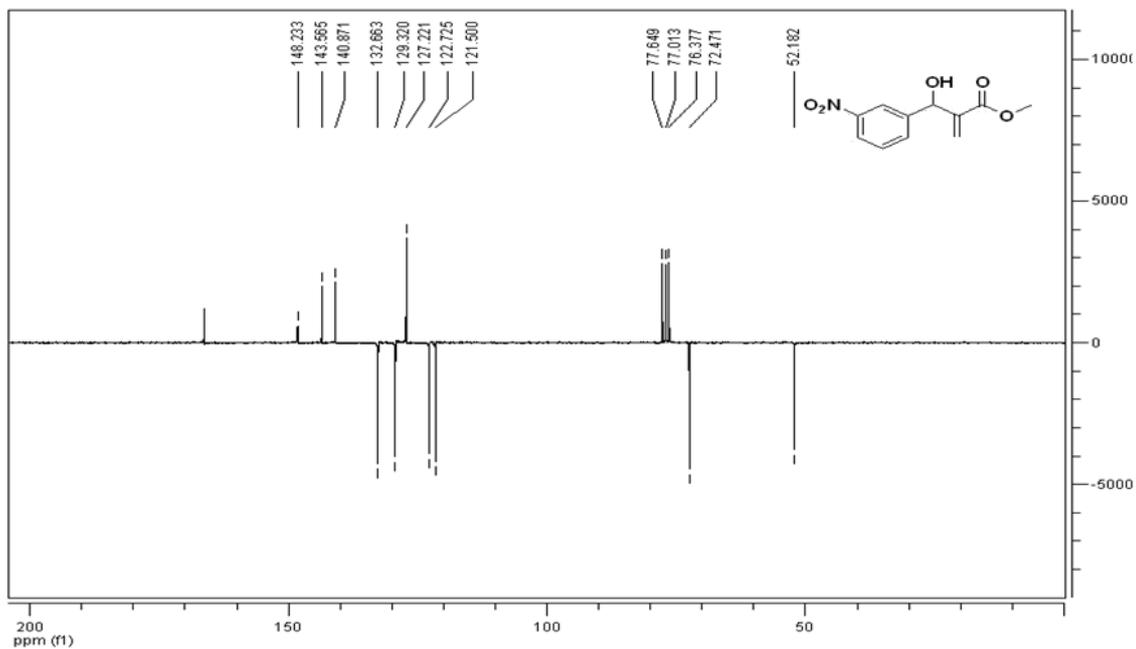
Peak#:1 R.Time:13.6(Scan#:1032)
 MassPeaks:129
 RawMode:Averaged 13.6-13.6(1031-1033)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Espectro 55 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **39**



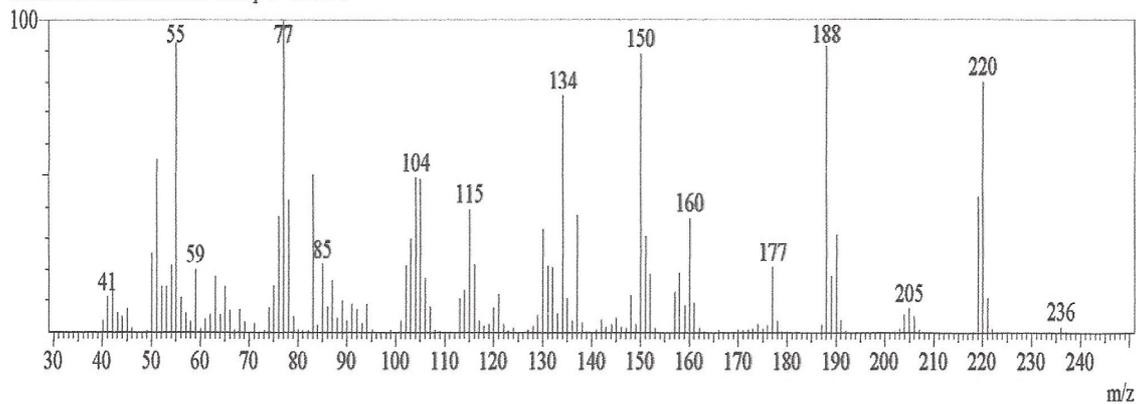
Espectro 56 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **39**



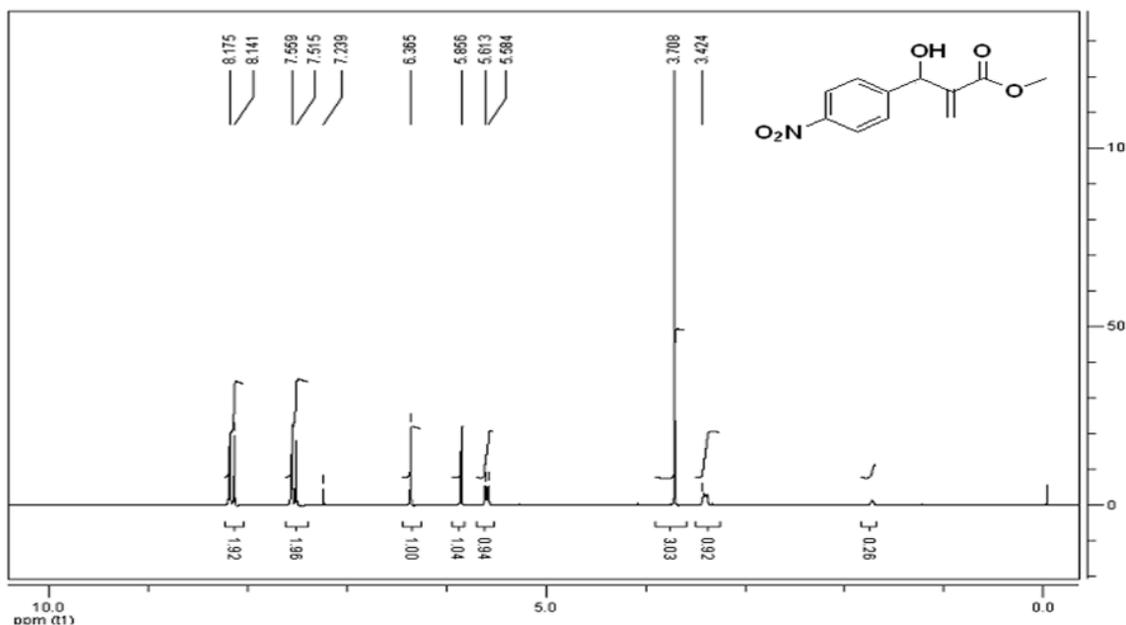
Espectro 57 Espectro de massas (70 eV) do aduto **39**

Spectrum

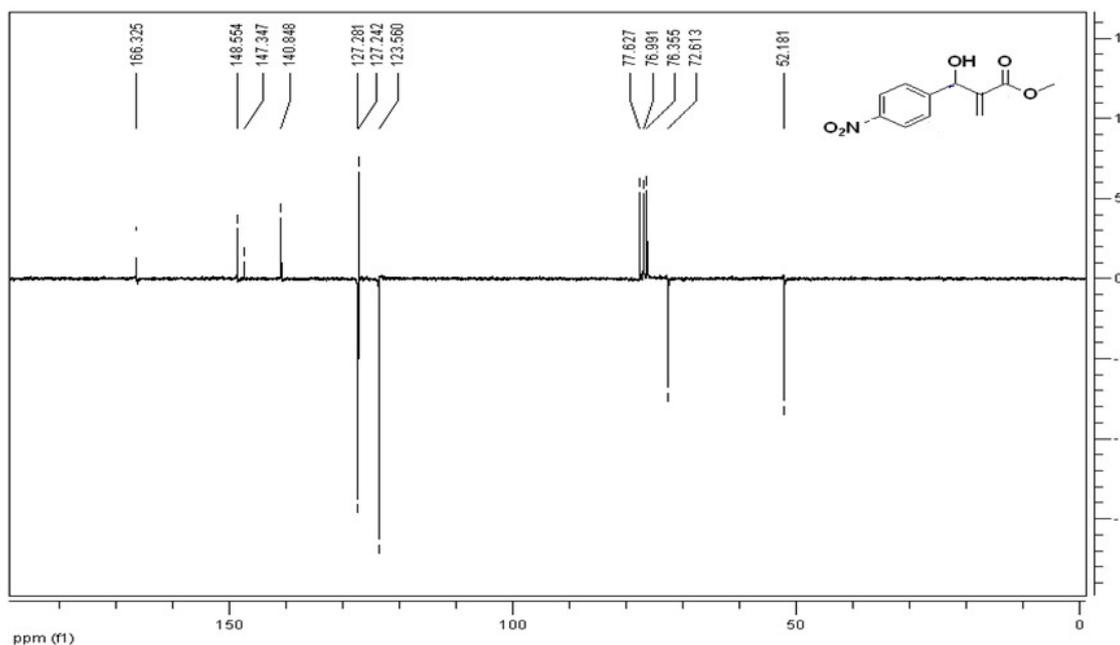
Peak#:1 R.Time:14.8(Scan#:1173)
 MassPeaks:140
 RawMode:Averaged 14.8-14.8(1172-1174)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Espectro 58 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **14**



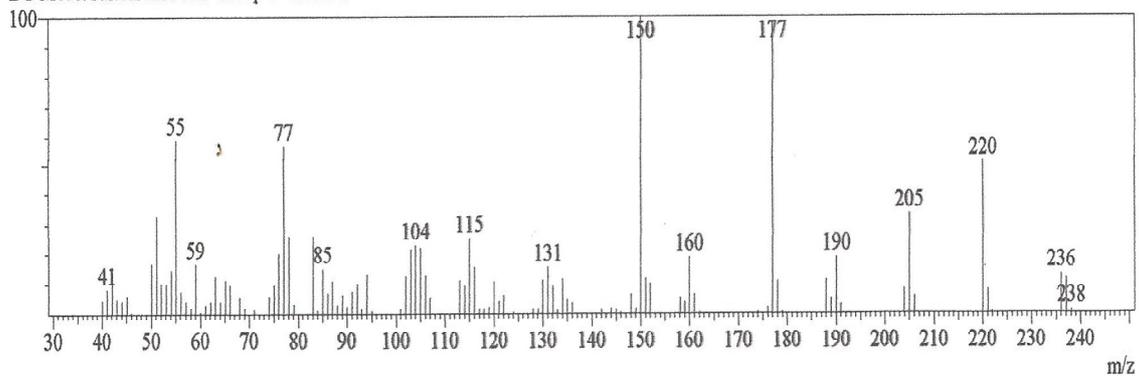
Espectro 59 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **14**



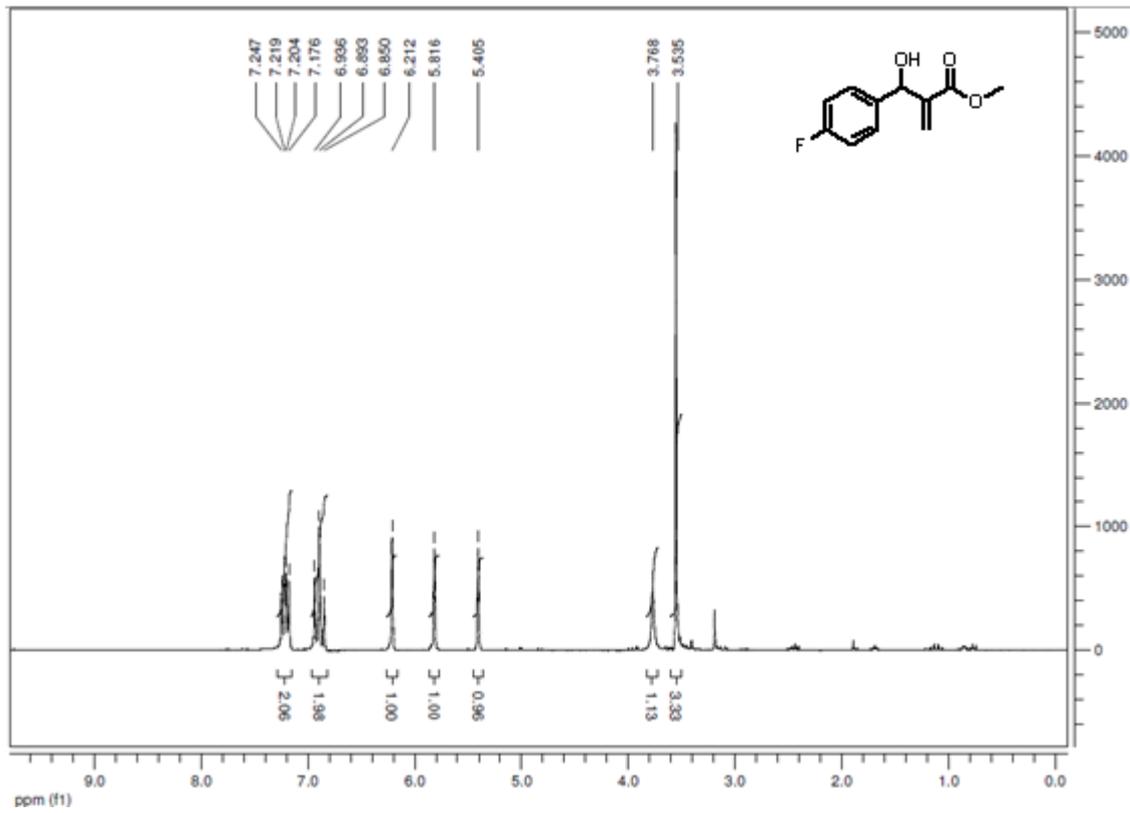
Espectro 60 Espectro de massas (70 eV) do aduto **14**

Spectrum

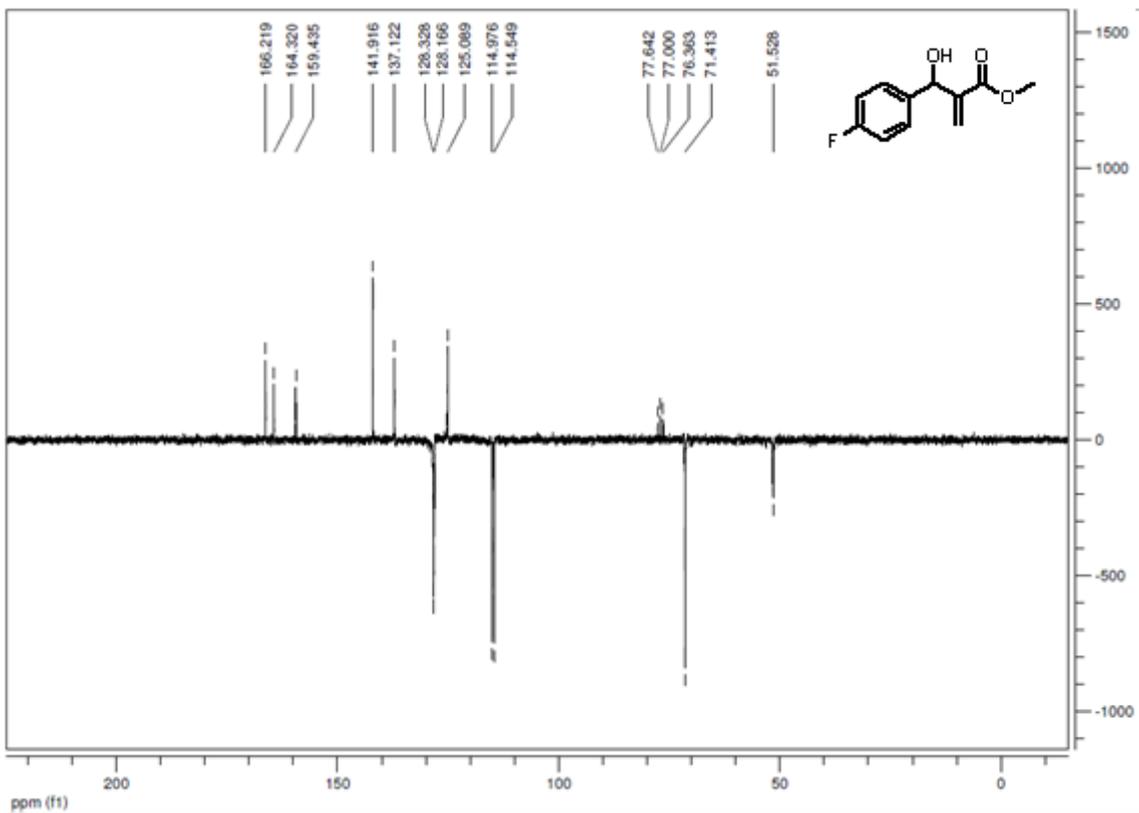
Peak#:1 R.Time:15.0(Scan#:1201)
 MassPeaks:105
 RawMode:Averaged 15.0-15.0(1200-1202)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



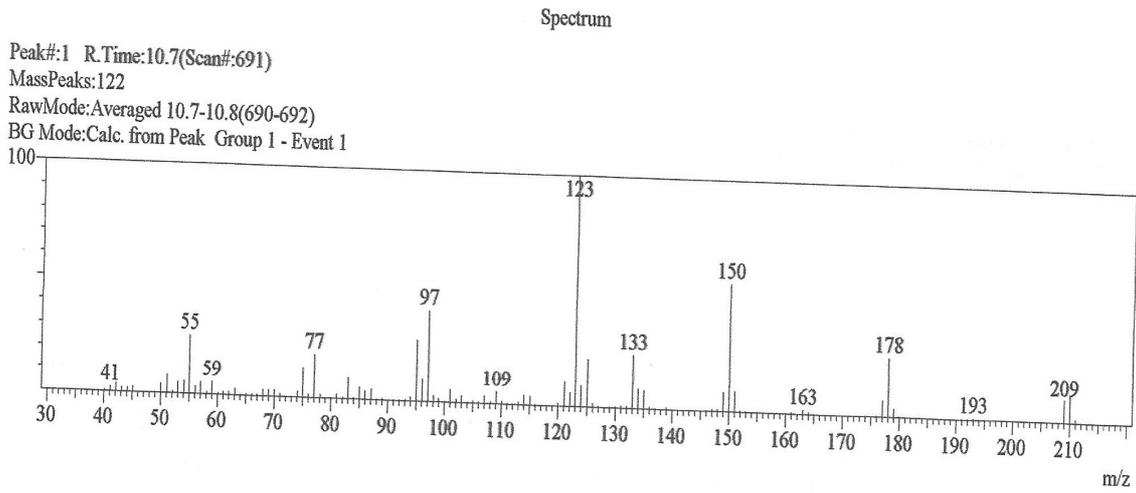
Espectro 61 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **27**



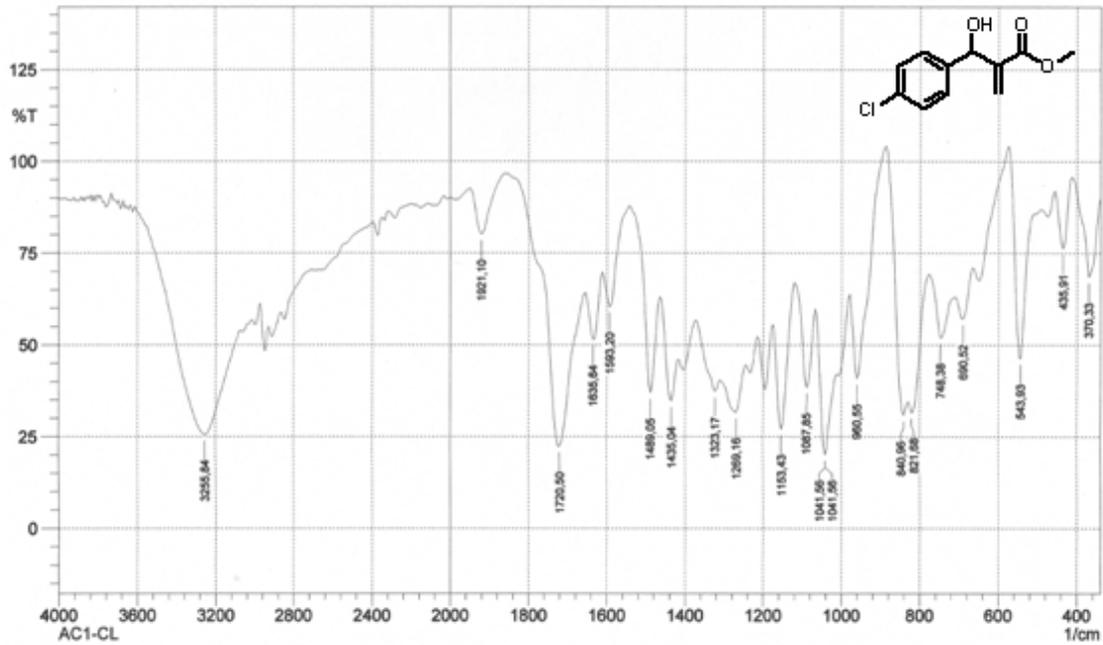
Espectro 62 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **27**



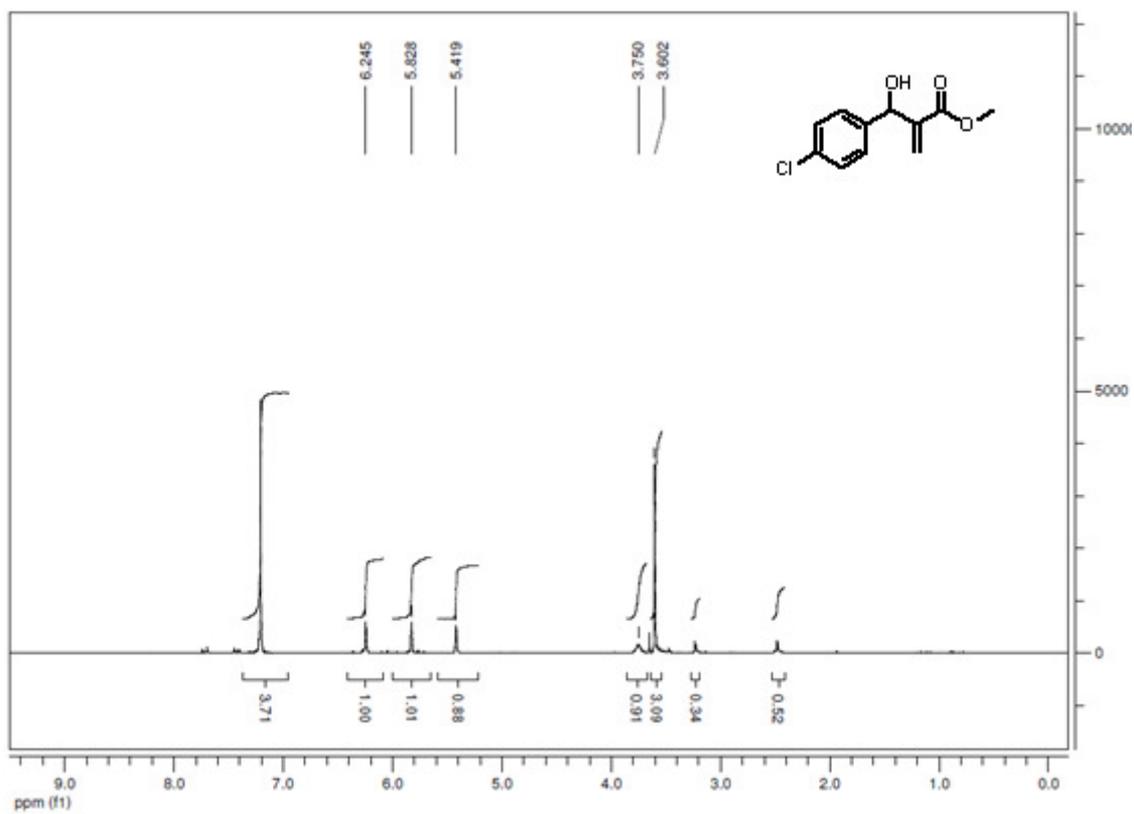
Espectro 63 Espectro de massas (70 eV) do aduto 27



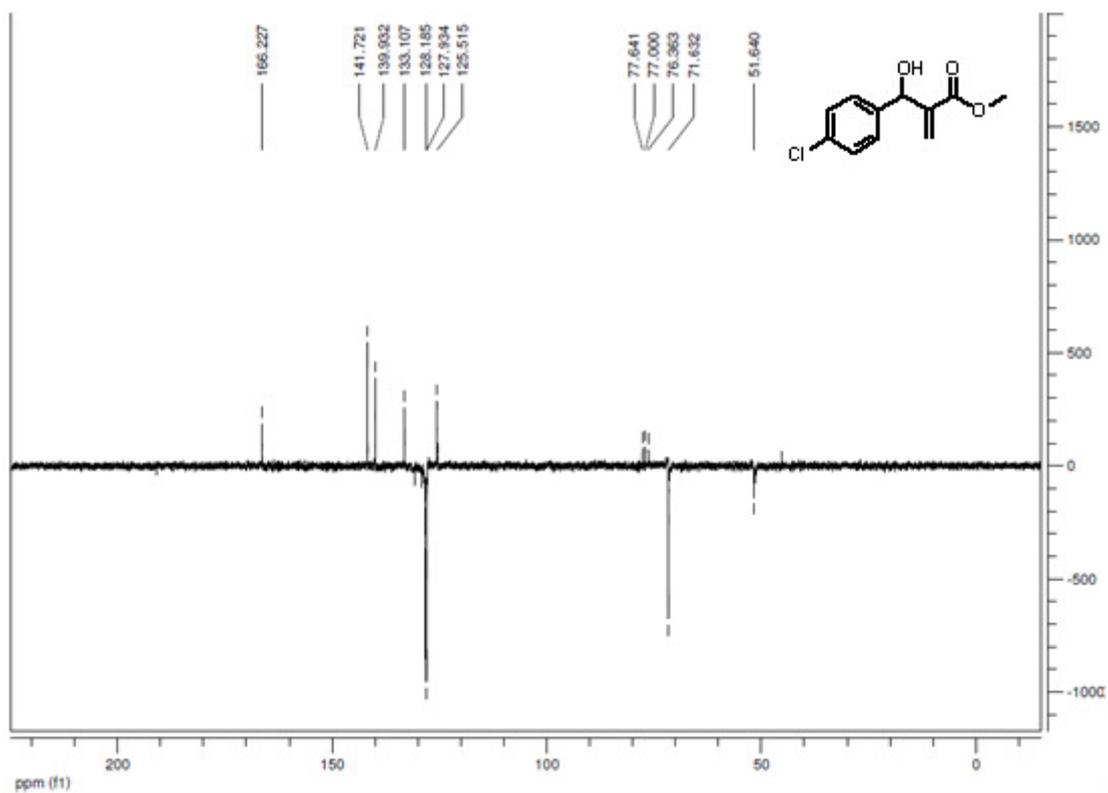
Espectro 64 Espectro de IV (KBr) do aduto 41



Espectro 65 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **41**



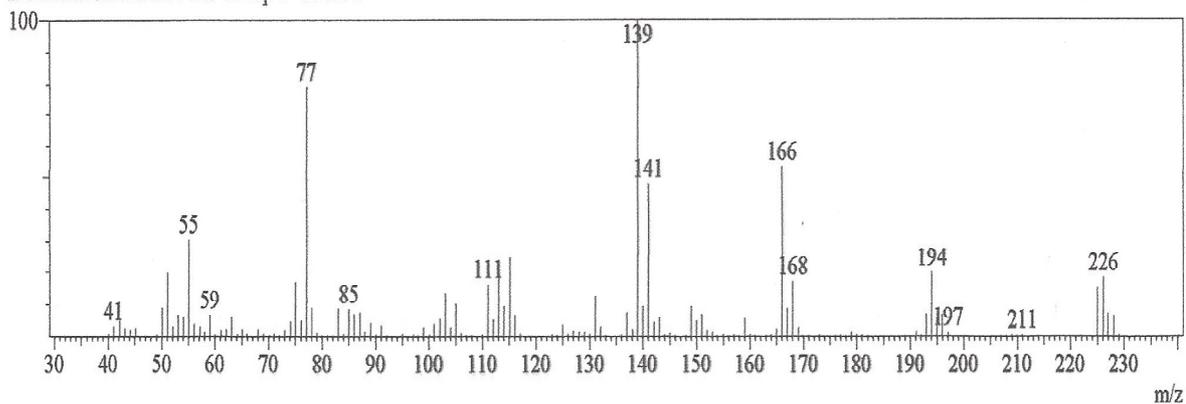
Espectro 66 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **41**



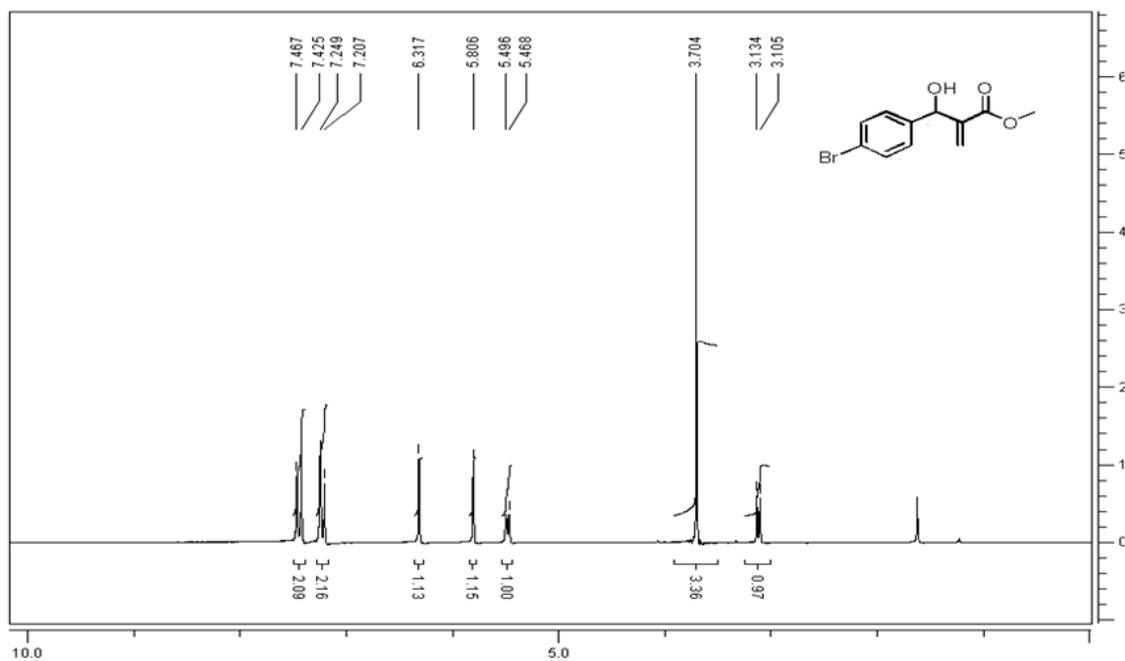
Espectro 67 Espectro de massas (70 eV) do aduto **41**

Spectrum

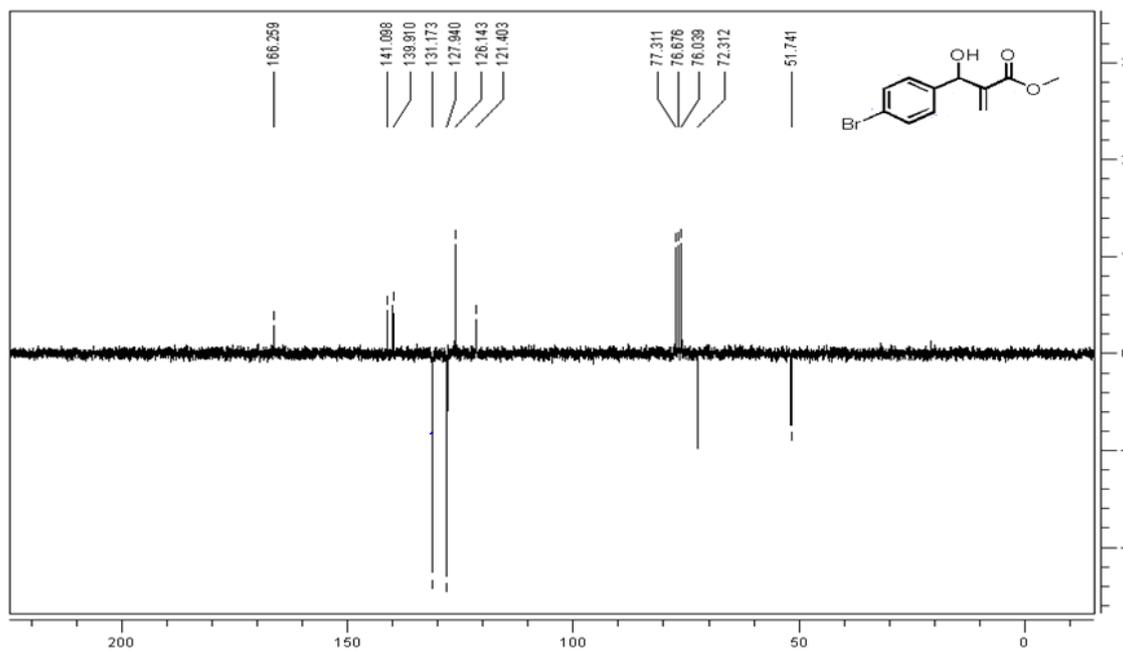
Peak#:1 R.Time:12.6(Scan#:909)
 MassPeaks:142
 RawMode:Averaged 12.6-12.6(908-910)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Espectro 68 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **43**



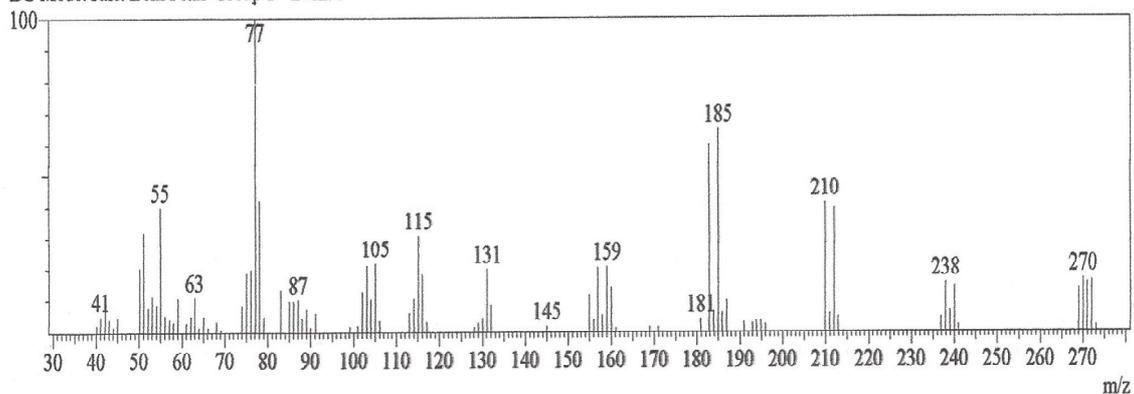
Espectro 69 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **43**



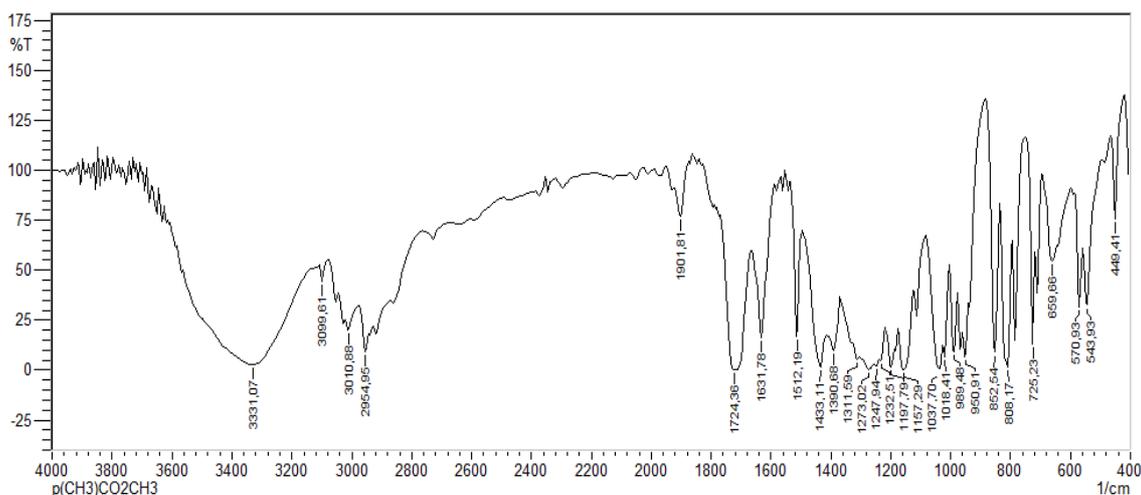
Espectro 70 Espectro de massas (70 eV) do aduto **43**

Spectrum

Peak#:2 R.Time:13.4(Scan#:1005)
 MassPeaks:90
 RawMode:Averaged 13.4-13.4(1004-1006)
 BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Espectro 71 Espectro de IV (KBr) do aduto 44



Espectro 72 Espectro de massas (70 eV) do aduto 44

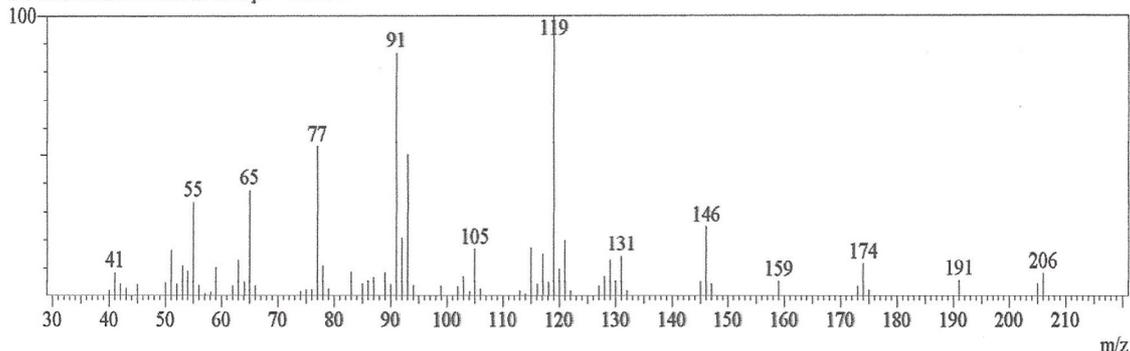
Spectrum

Peak#:1 R.Time:14.5(Scan#:1146)

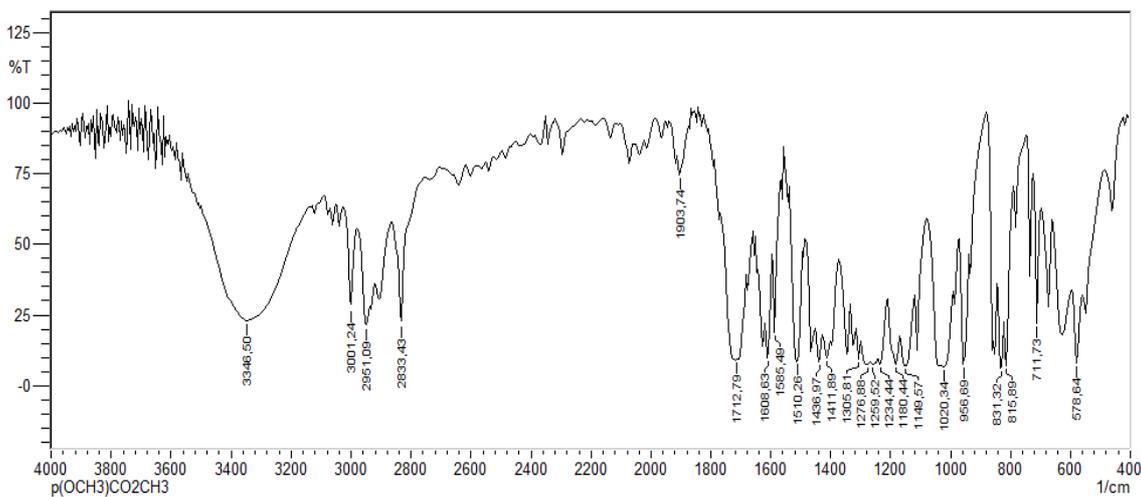
MassPeaks:68

RawMode:Averaged 14.5-14.6(1145-1147)

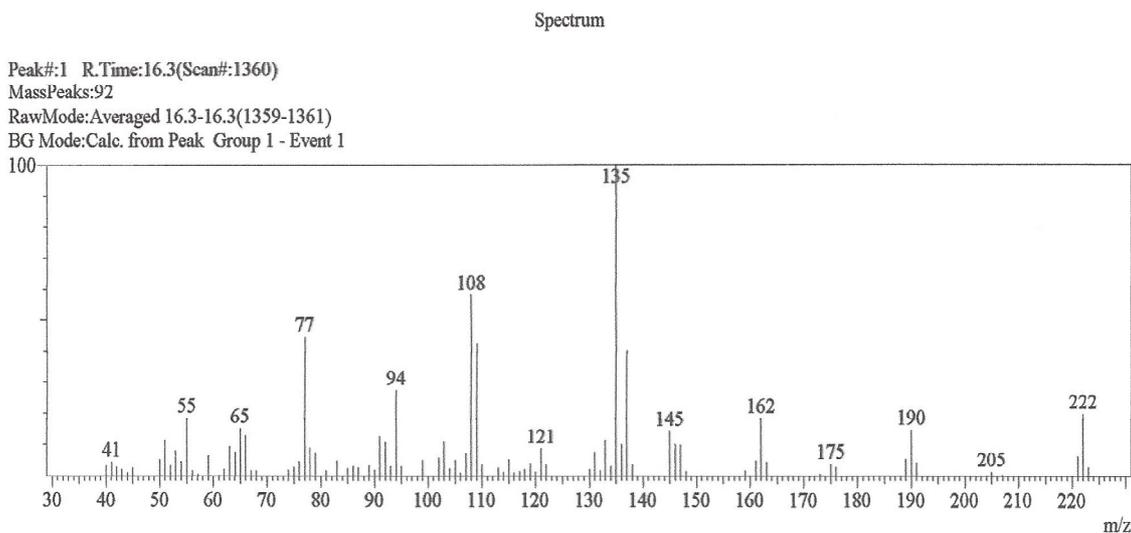
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



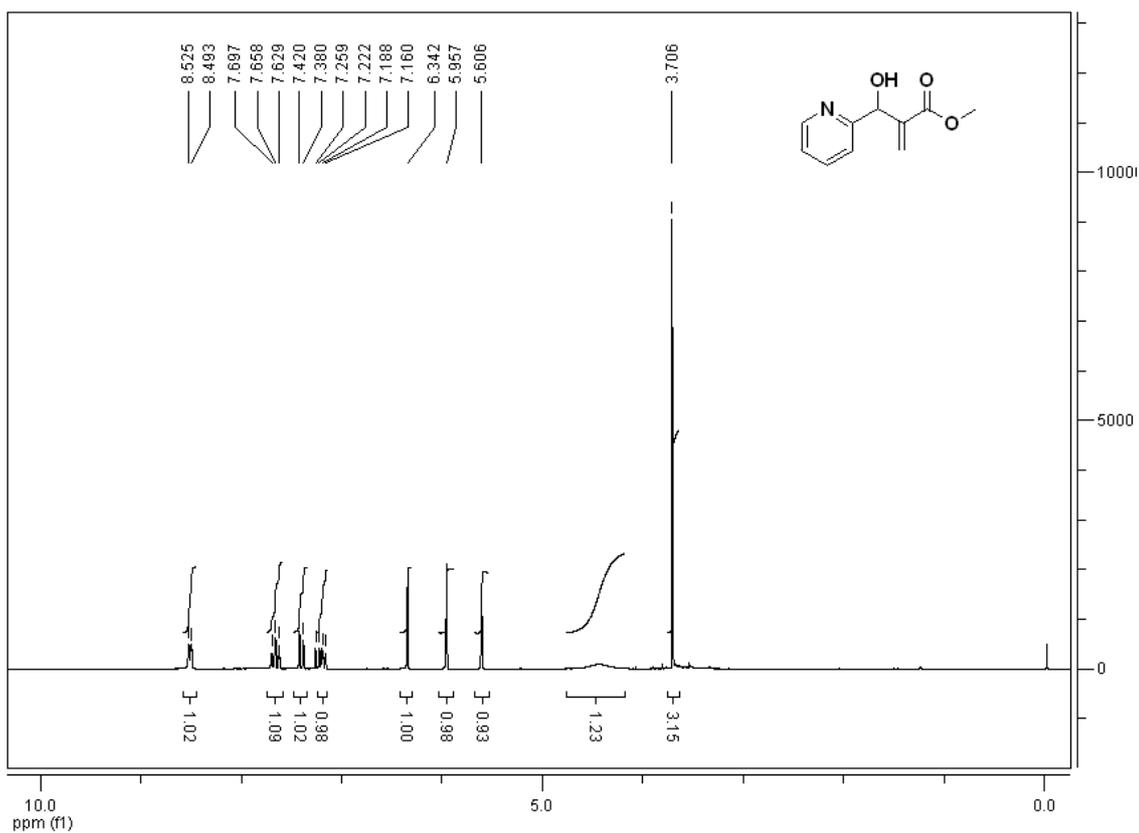
Espectro 73 Espectro IV (KBr) do aduto 46



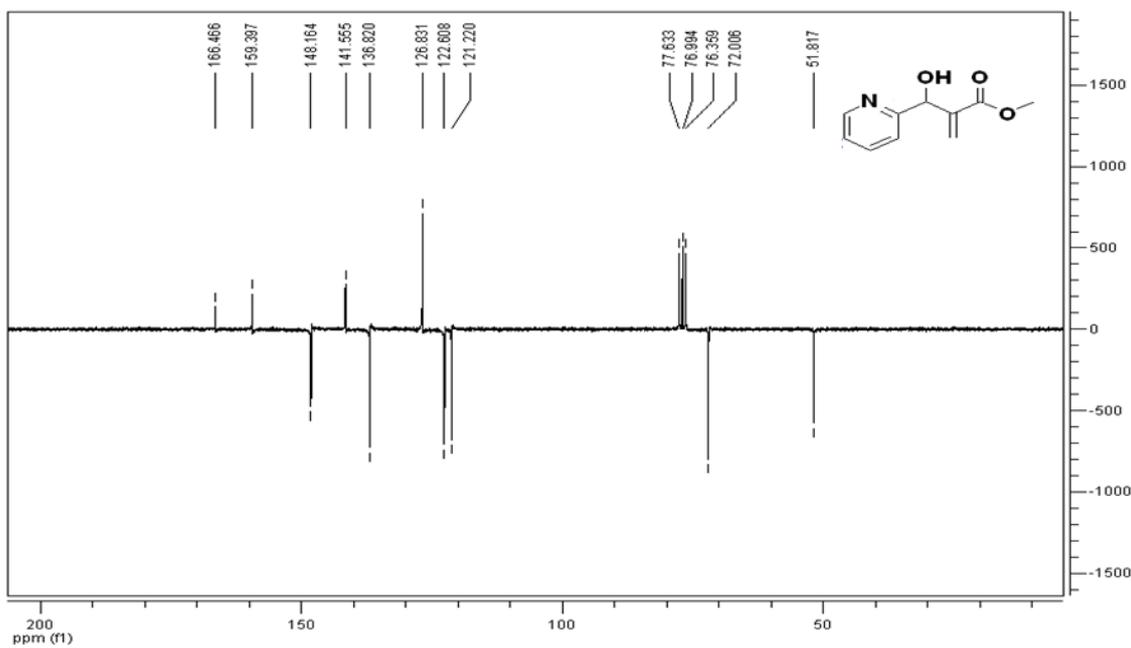
Espectro 74 Espectro de massas (70 eV) do aduto **46**



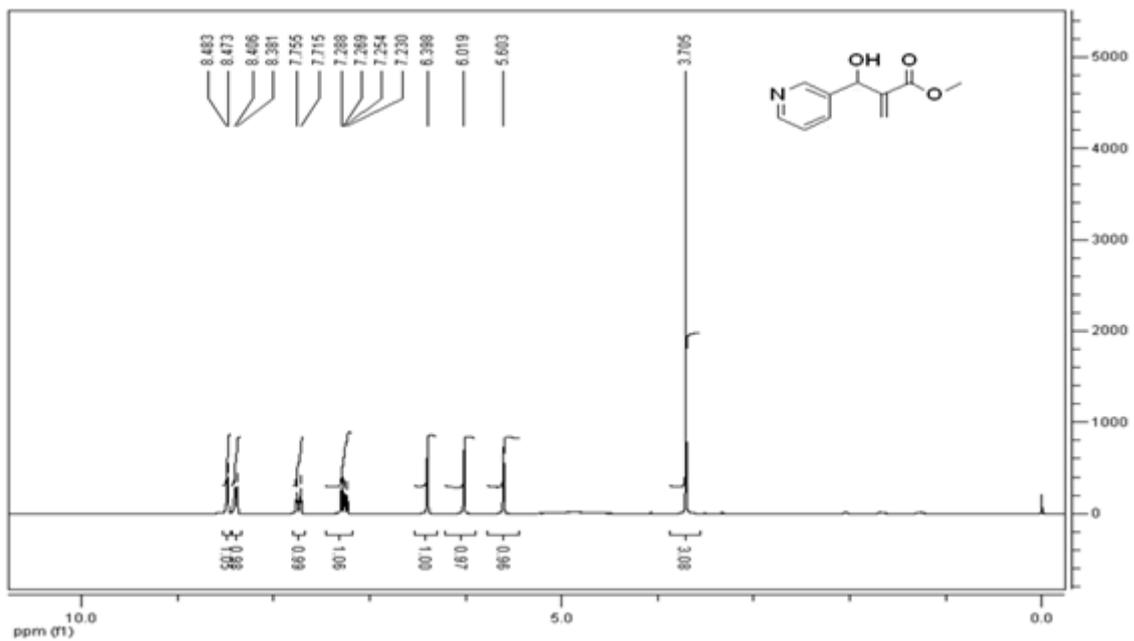
Espectro 75 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **48**



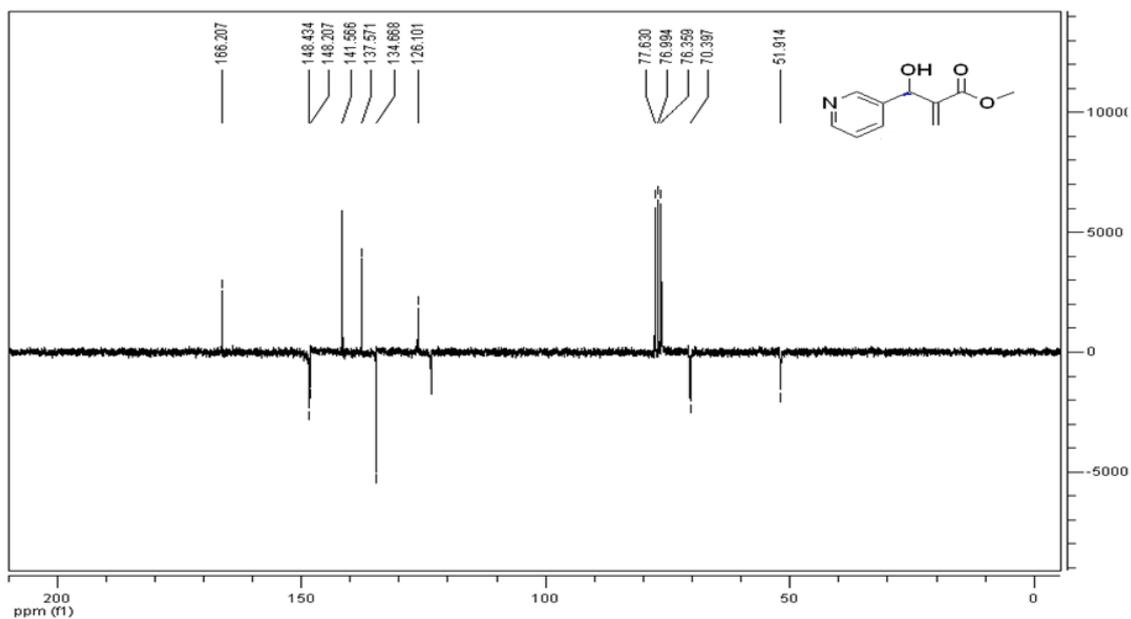
Espectro 76 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **48**



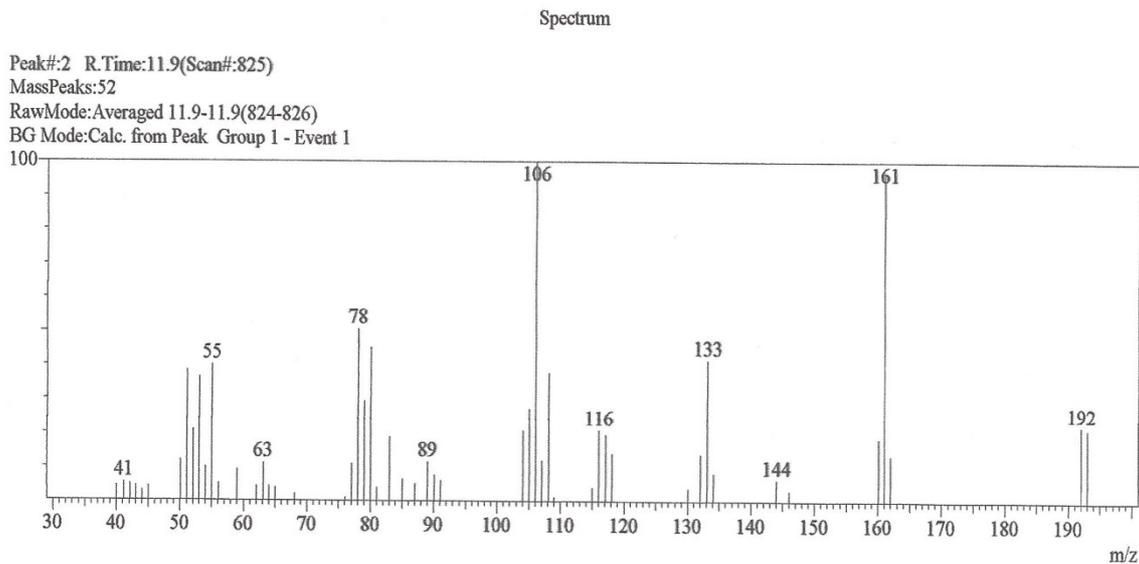
Espectro 77 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **19**



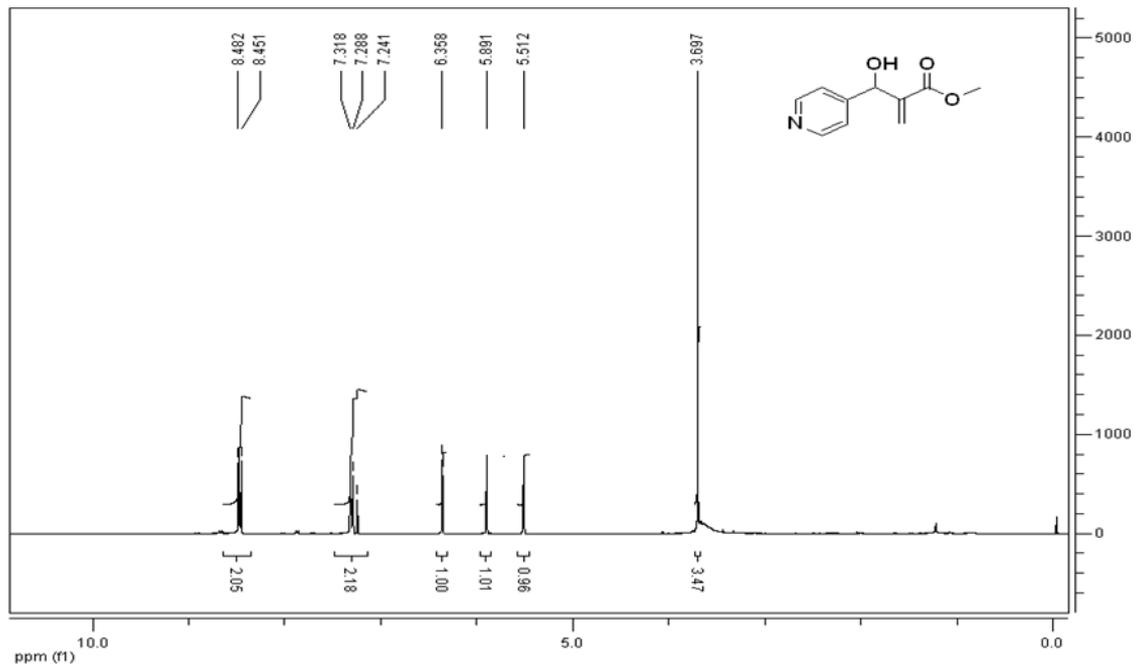
Espectro 78 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **19**



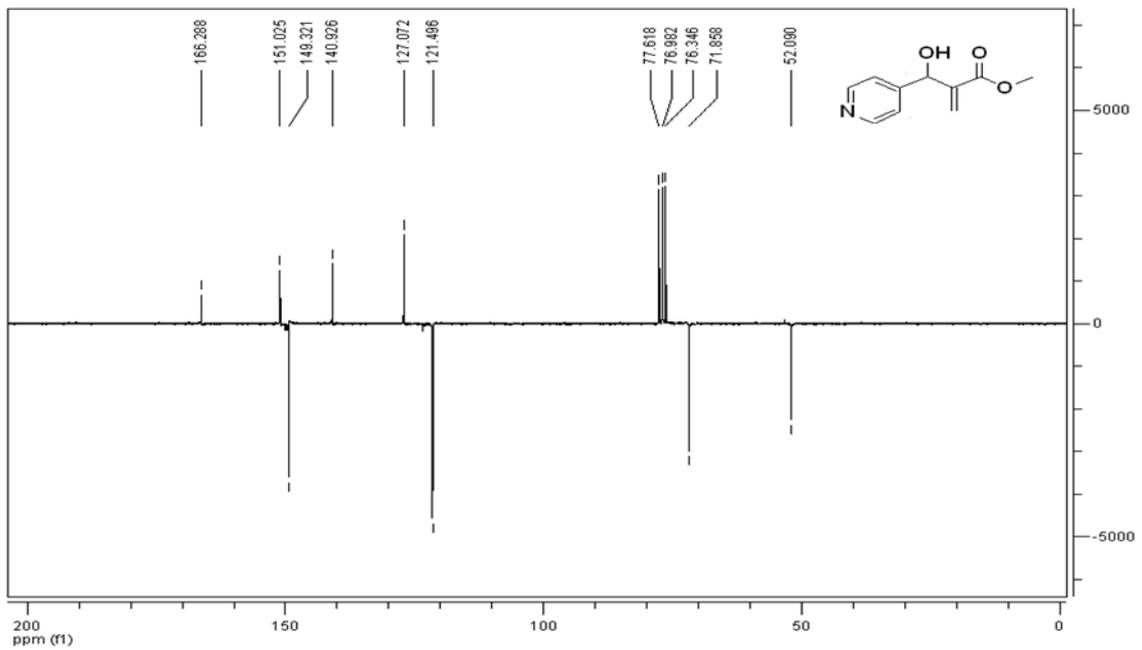
Espectro 79 Espectro de massas (70 eV) do aduto **19**



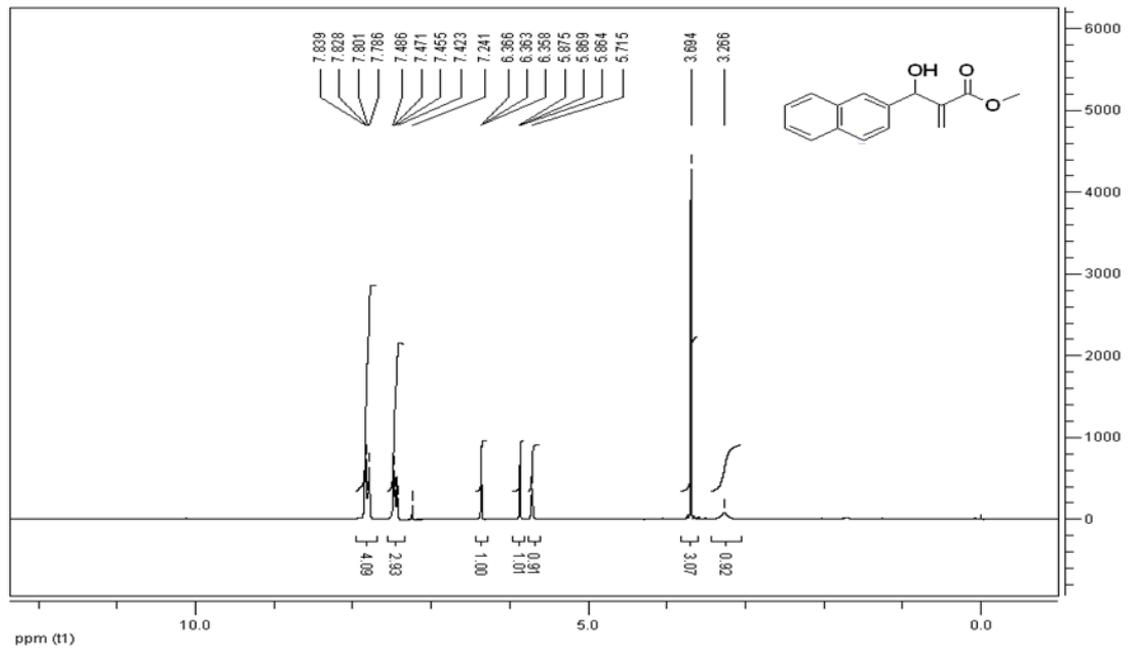
Espectro 80 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **50**



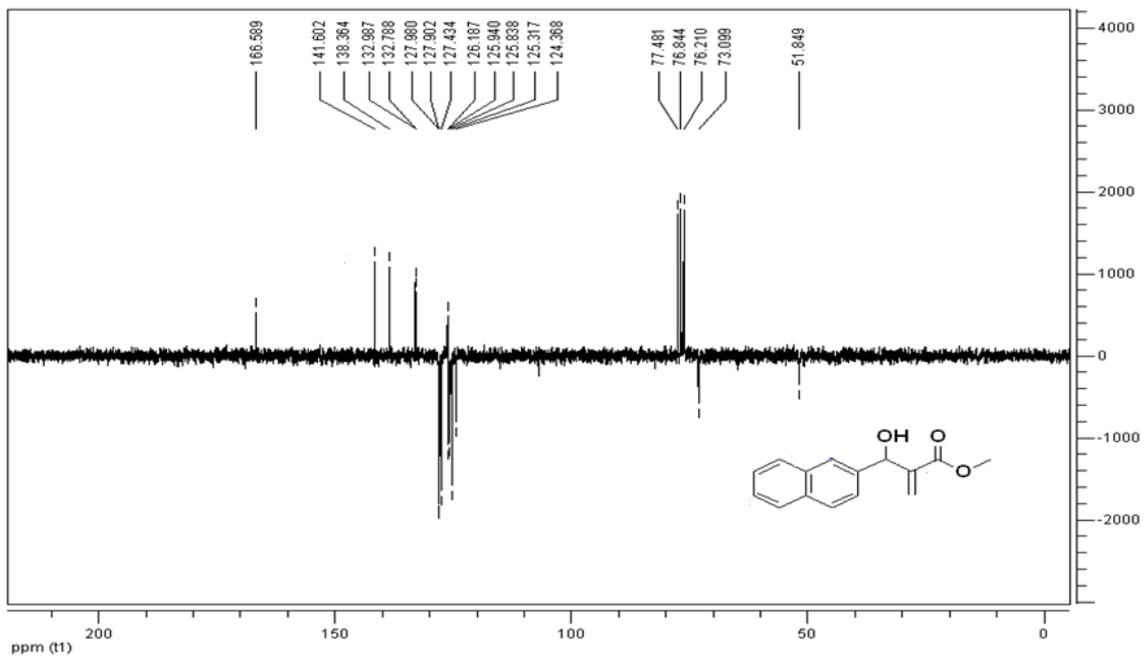
Espectro 81 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **50**



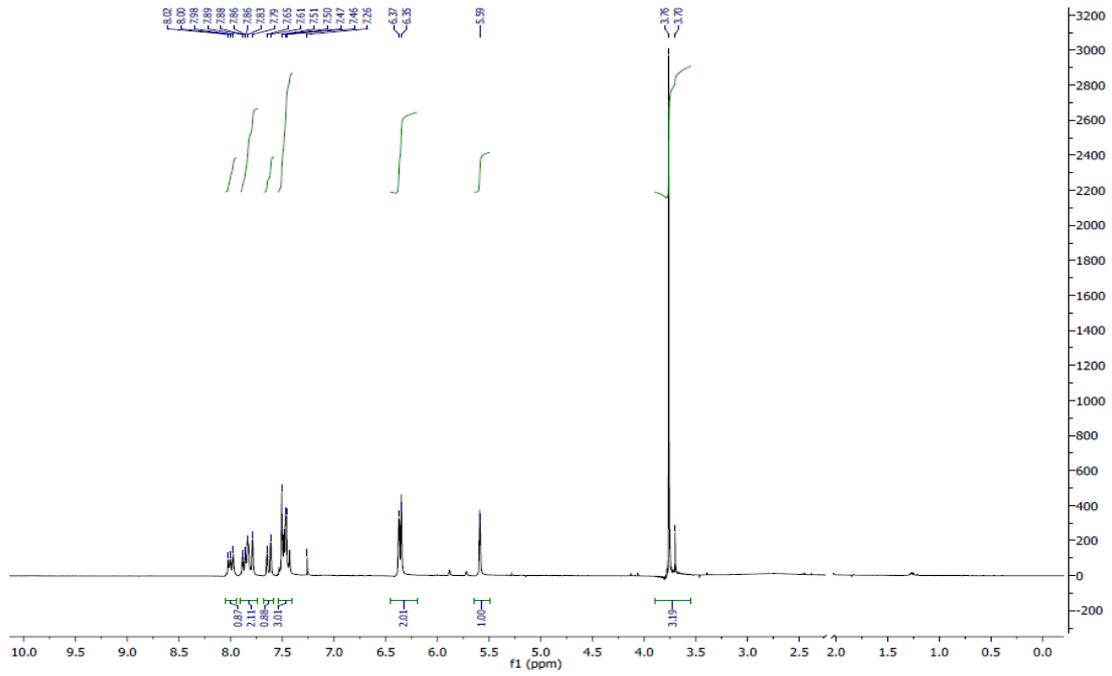
Espectro 82 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **28**



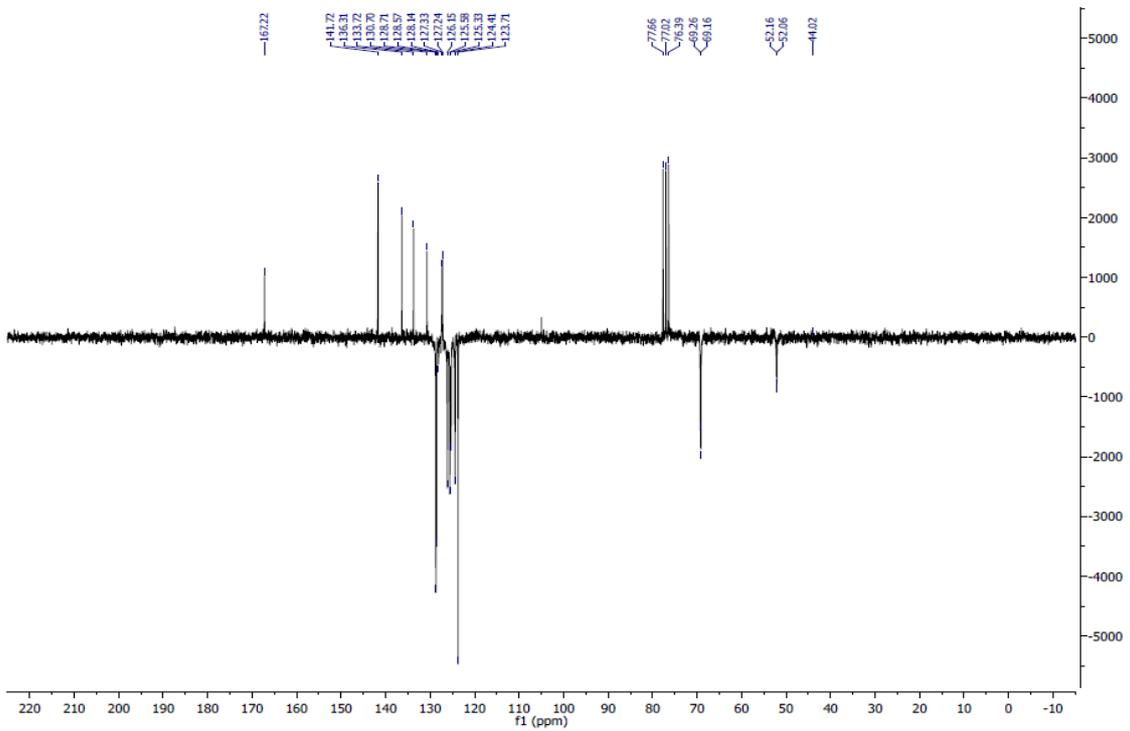
Espectro 83 Espectro de RMN ¹³C-APT (CDCl₃) do aduto **28**



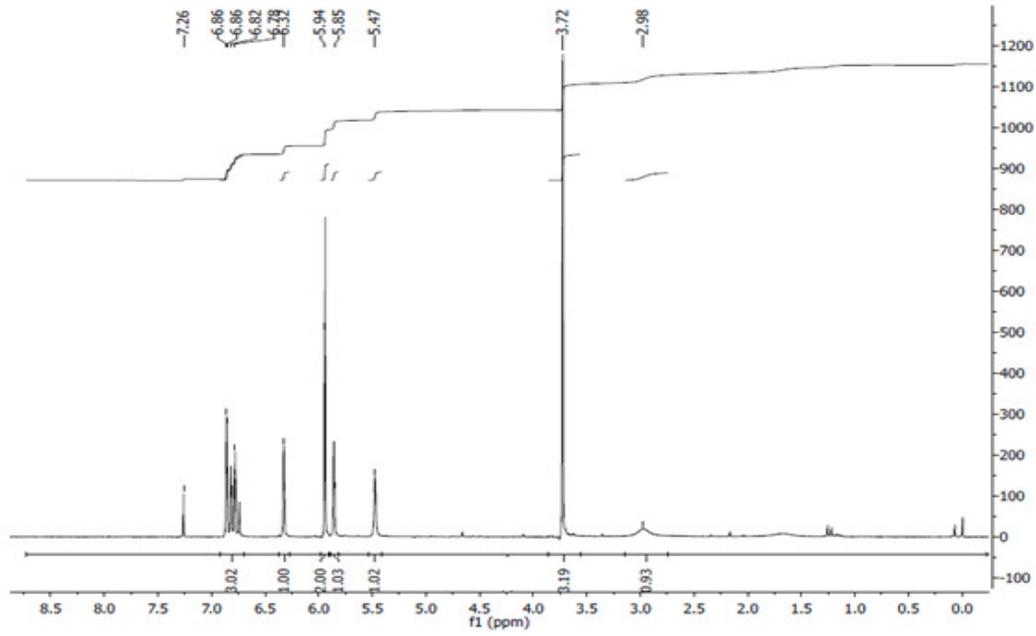
Espectro 84 Espectro de RMN ¹H (CDCl₃) do aduto **53**



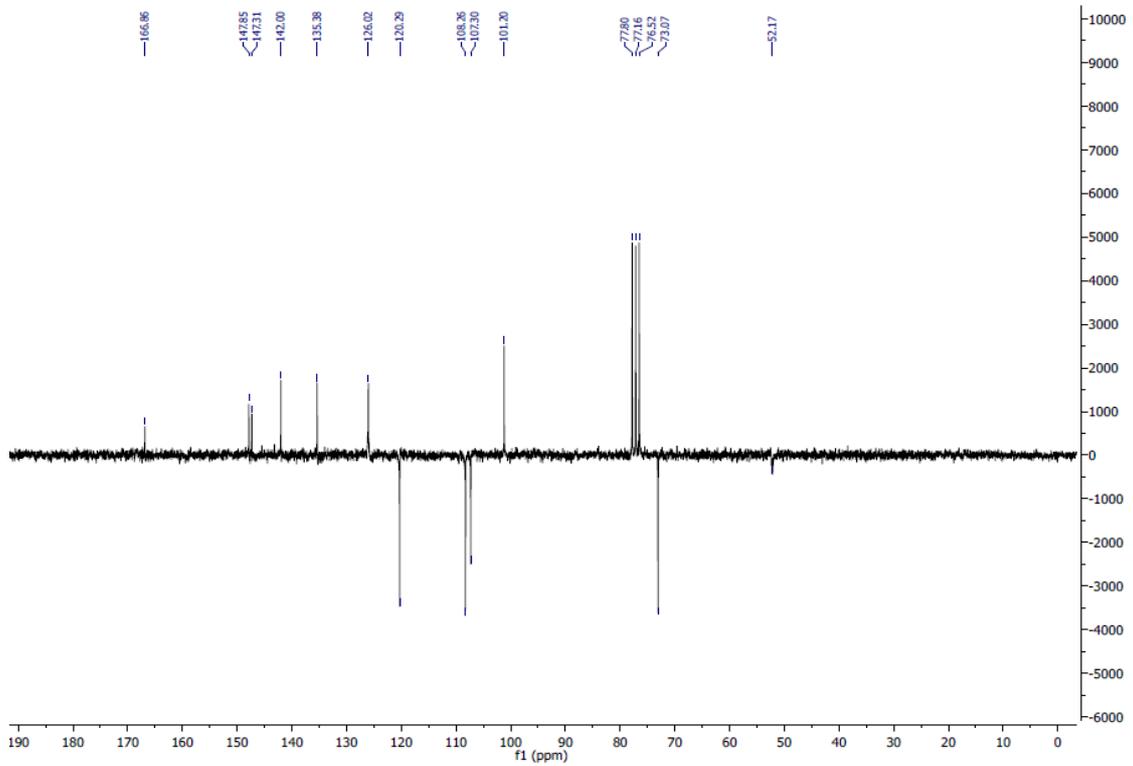
Espectro 85 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **53**



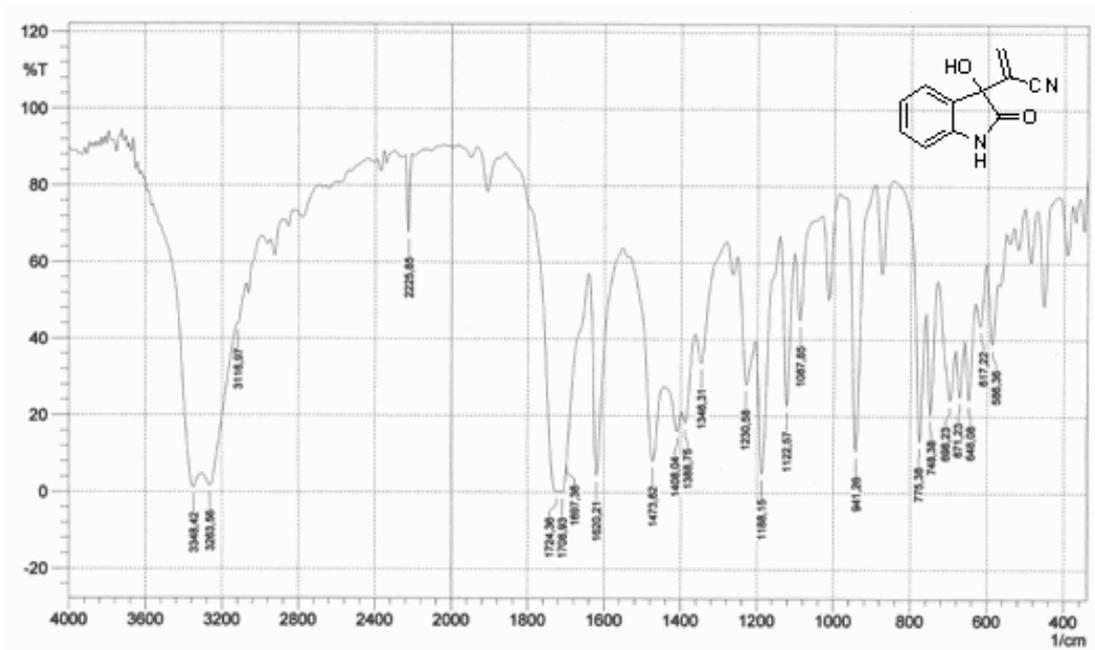
Espectro 86 Espectro de RMN ^1H (CDCl_3) do aduto **54**



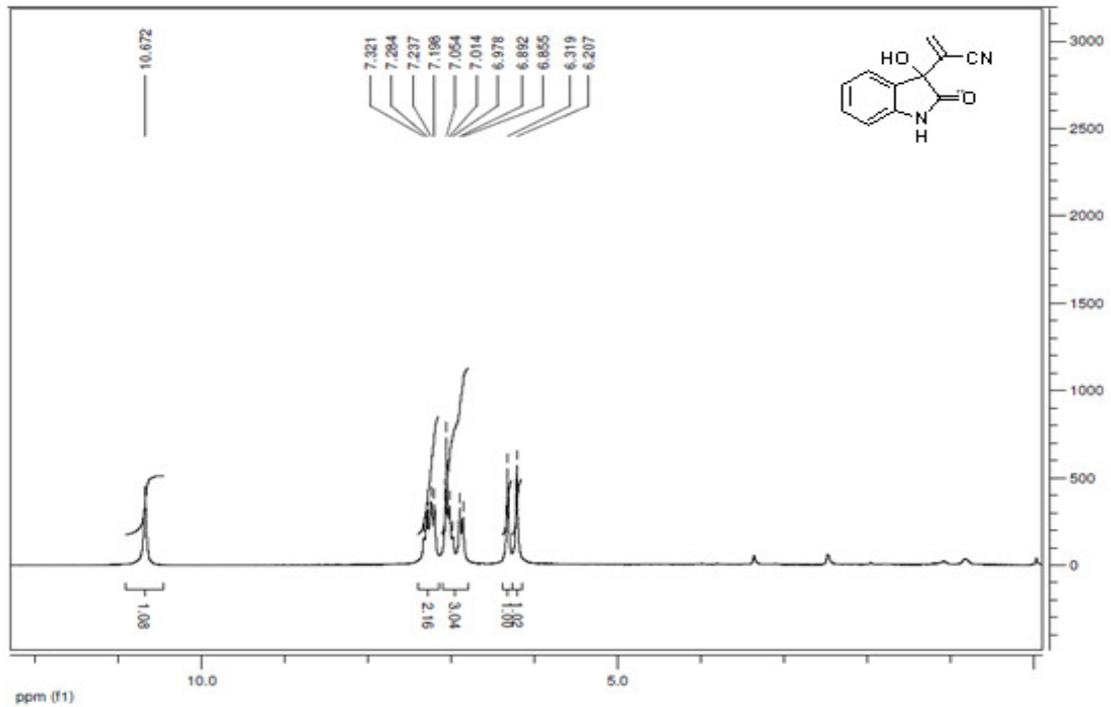
Espectro 87 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **54**

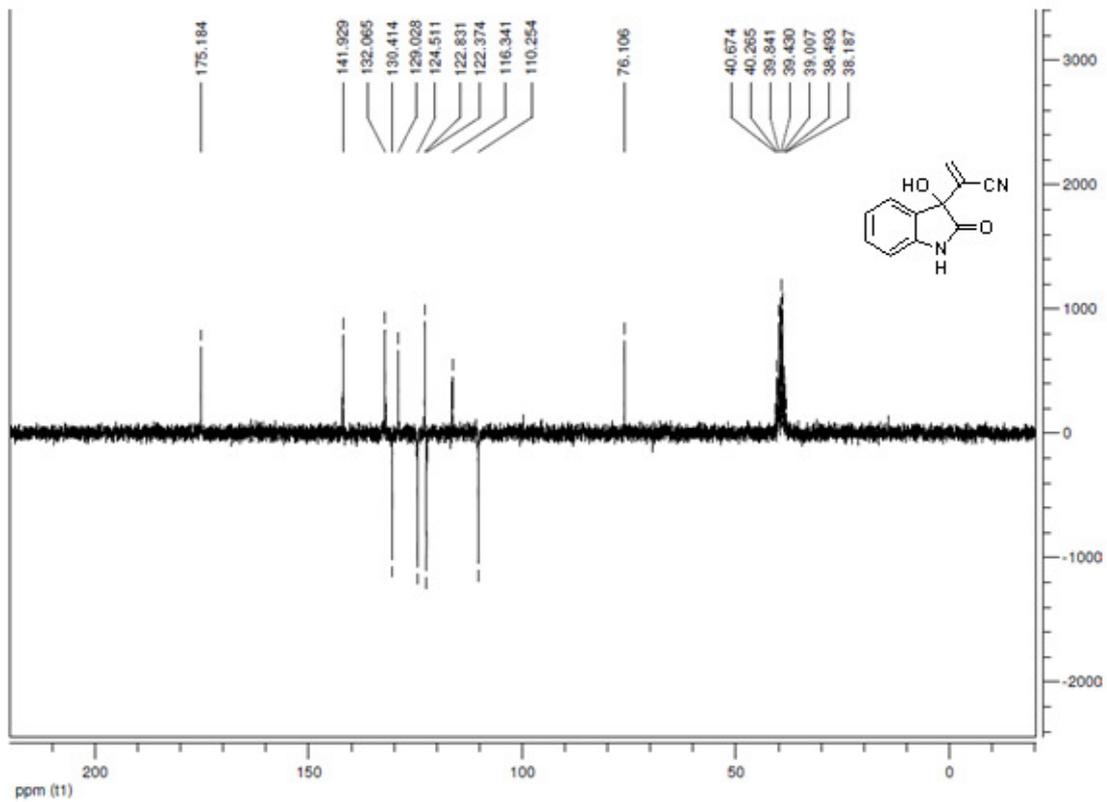
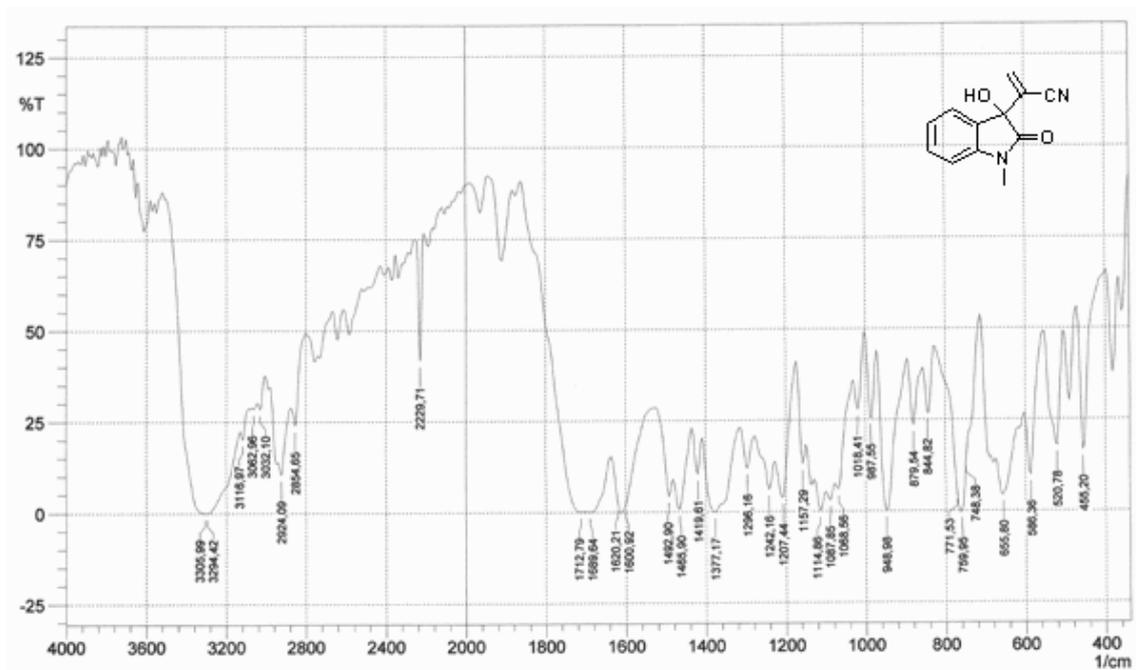


Espectro 88 Espectro de IV (KBr) do aduto **56a**

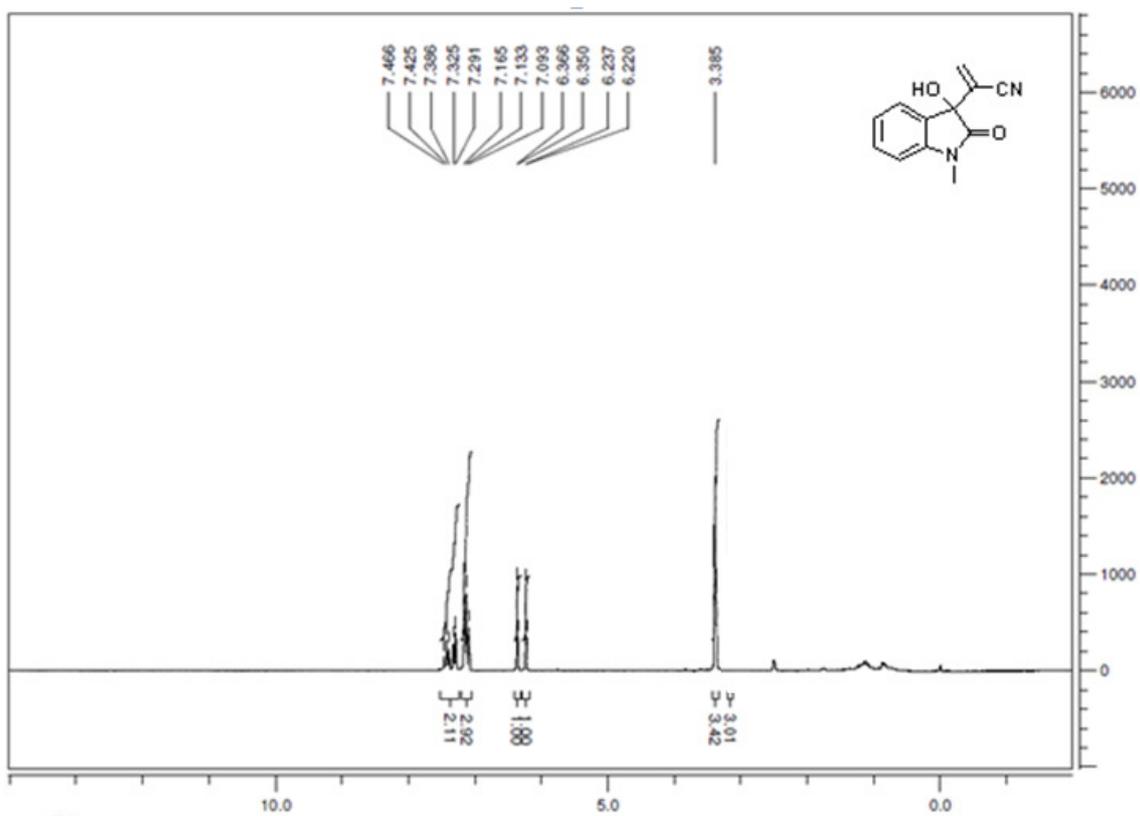


Espectro 89 Espectro de RMN ¹H (DMSO-*d*₆) do aduto **56a**

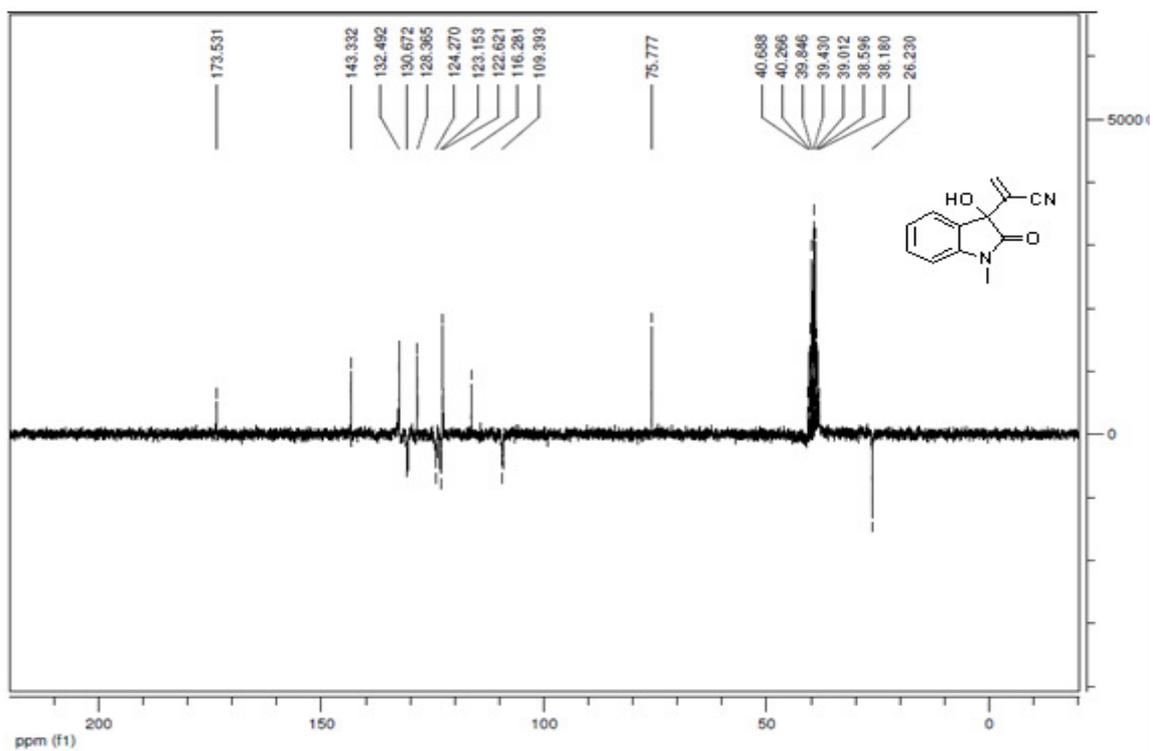


Espectro 90 Espectro de RMN ^{13}C -APT (DMSO- d_6) do aduto **56a****Espectro 91** Espectro de IV (KBr) do aduto **56b**

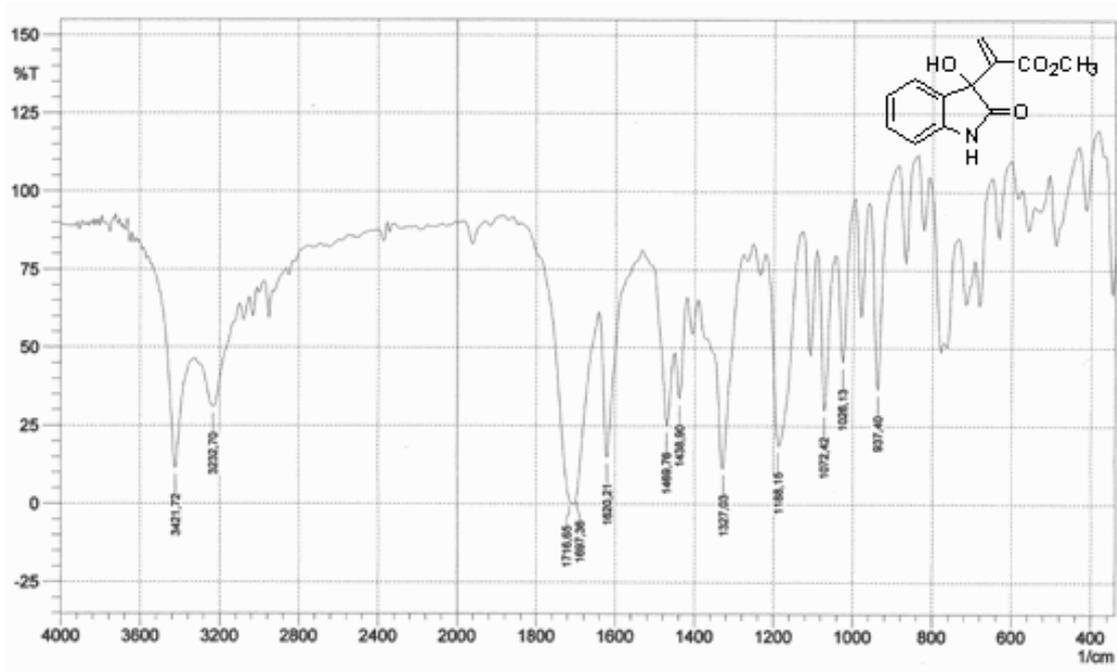
Espectro 92 Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do aduto **56b**



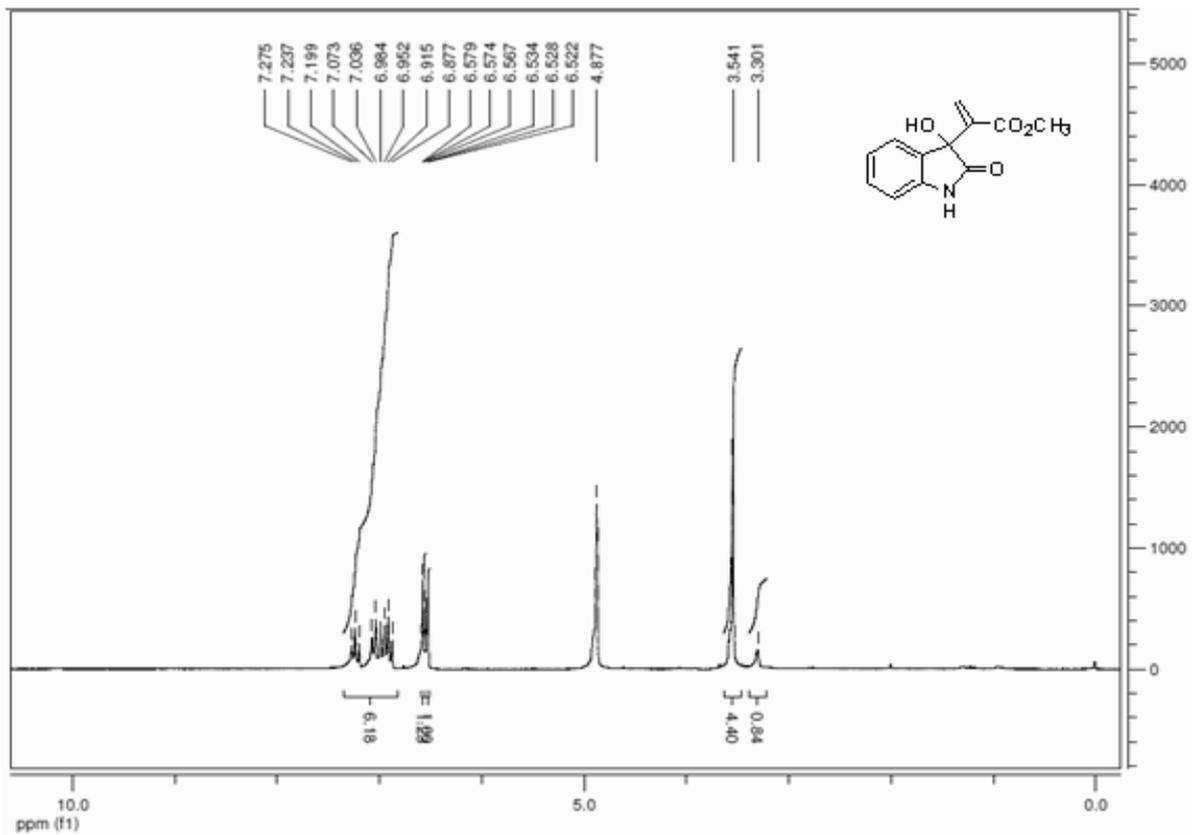
Espectro 93 Espectro de RMN ^{13}C -APT (DMSO- d_6) do aduto **56b**



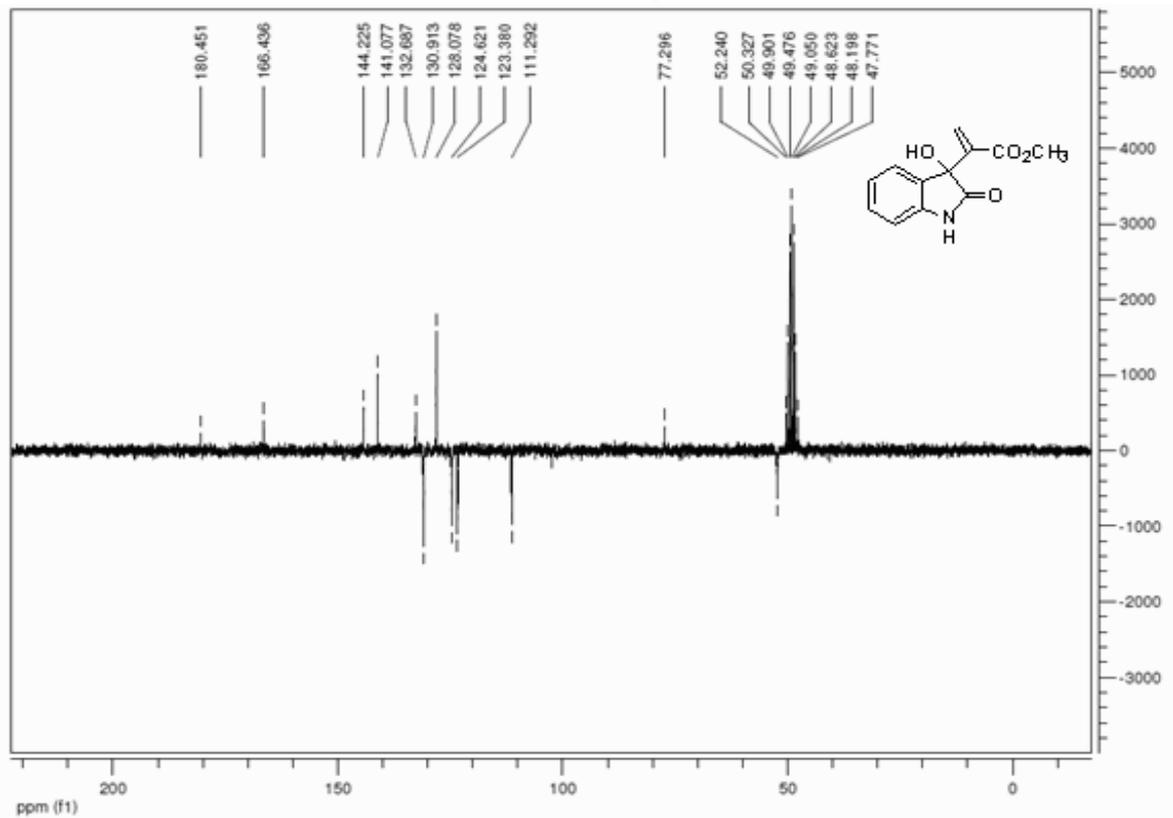
Espectro 94 Espectro de IV (KBr) do aduto **57a**



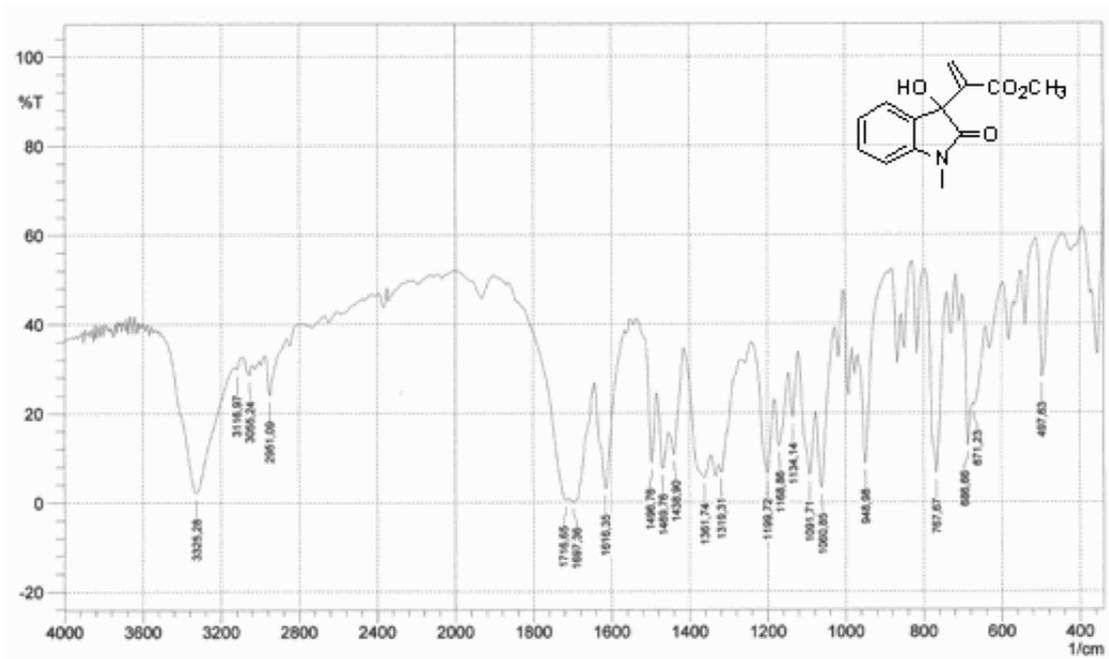
Espectro 95 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **57a**



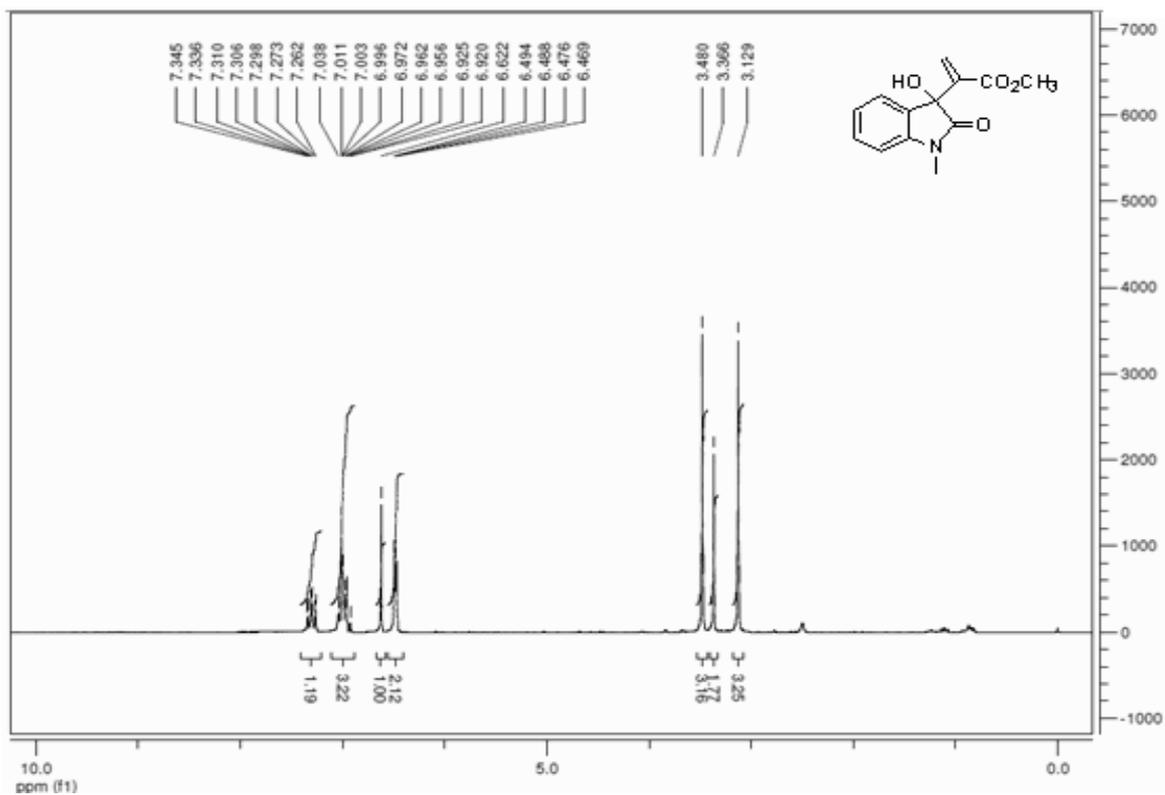
Espectro 96 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CD_3OD) do aduto **57a**



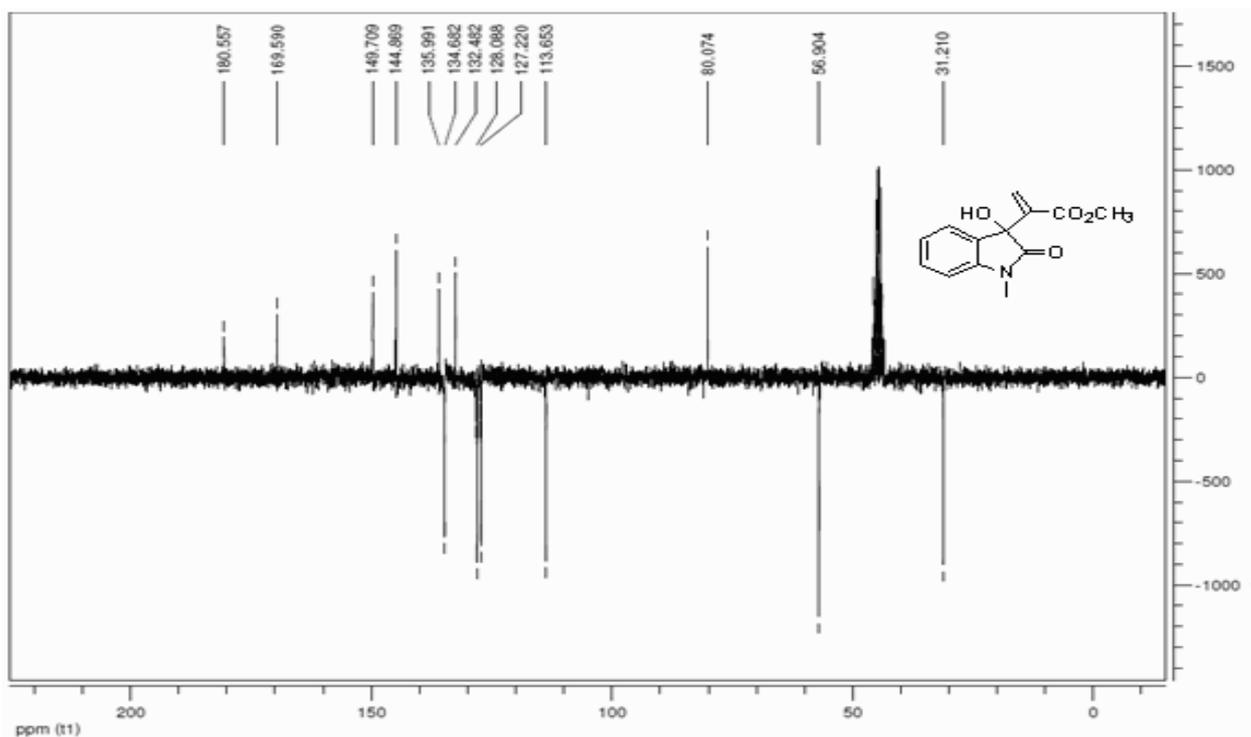
Espectro 97 Espectro de IV (KBr) do aduto **57b**



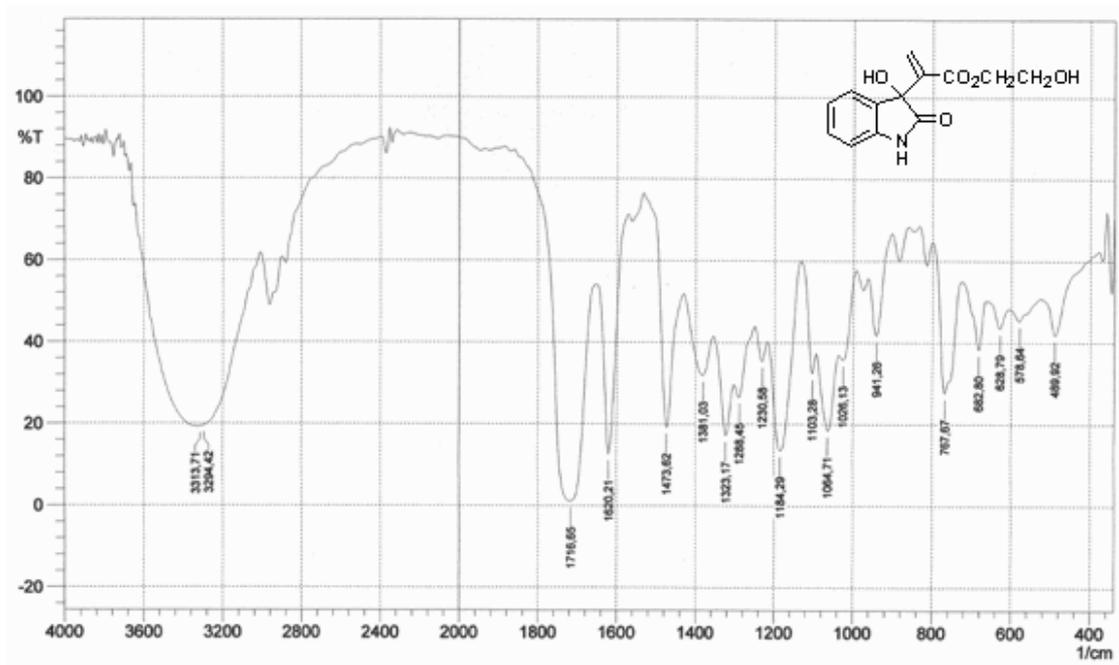
Espectro 98 Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do aduto **57b**



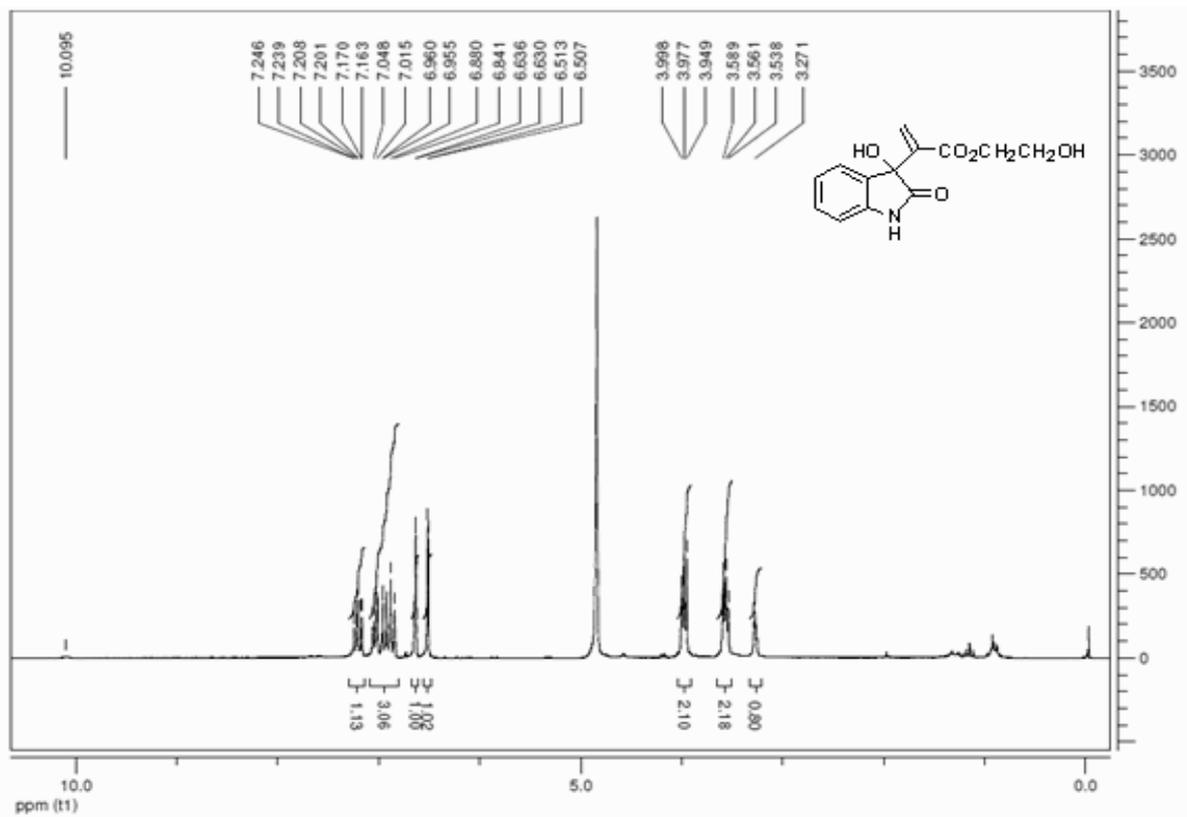
Espectro 99 Espectro de RMN ^{13}C -APT (DMSO- d_6) do aduto **57b**



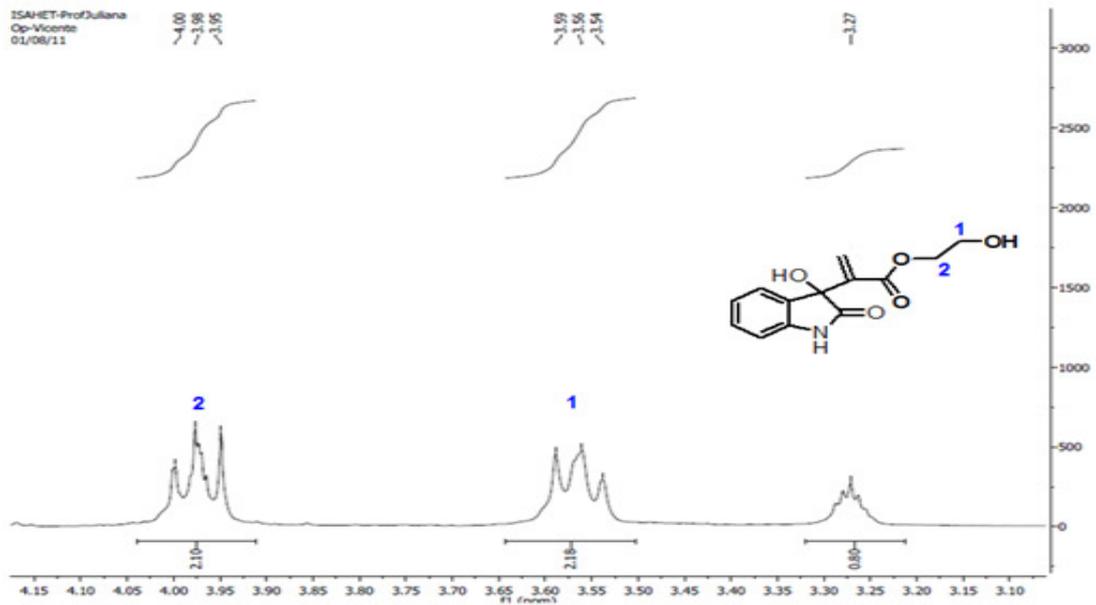
Espectro 100 Espectro de IV (KBr) do aduto **59a**



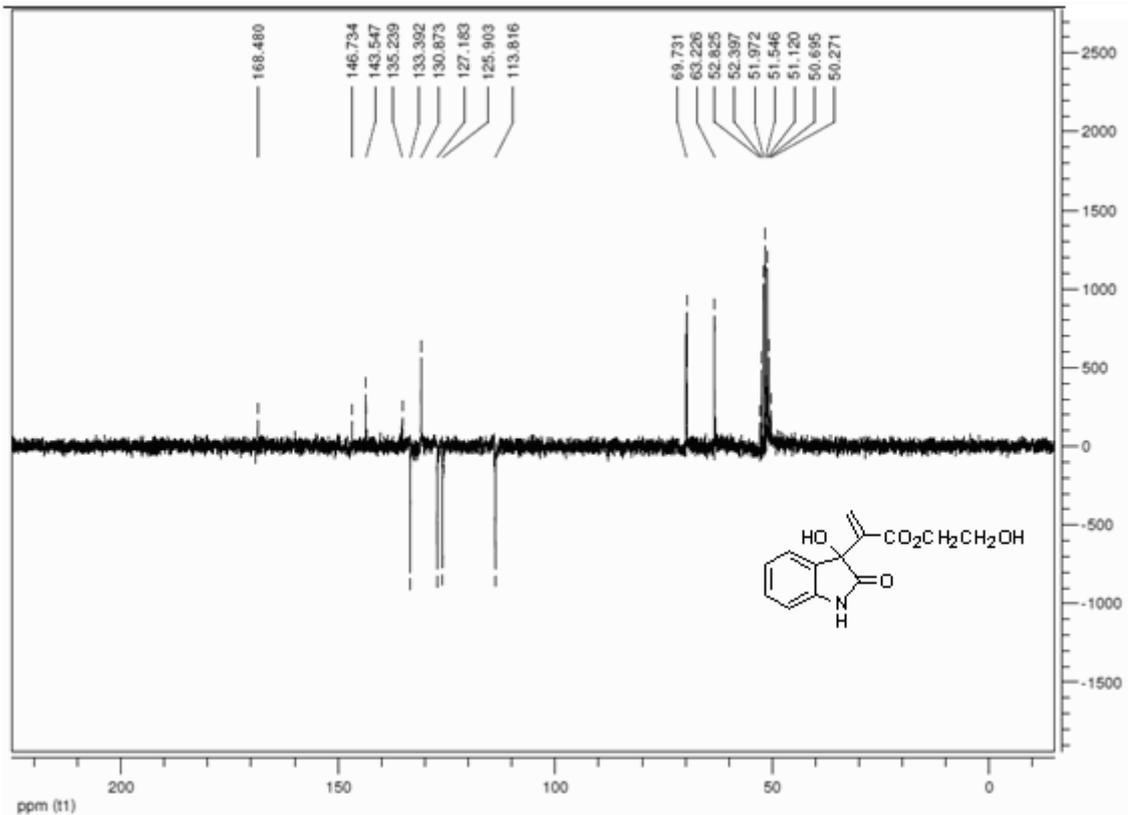
Espectro 101 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **59a**



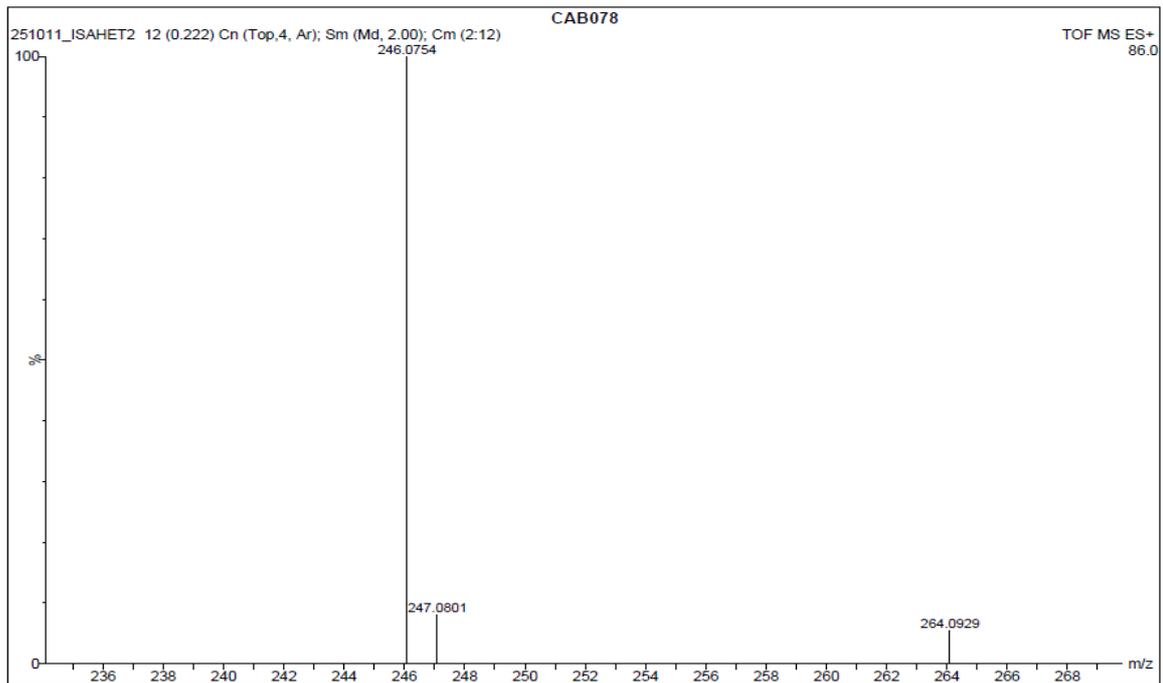
Espectro 102 Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD) do aduto **59a** na região de 3.2 a 4.1 ppm.



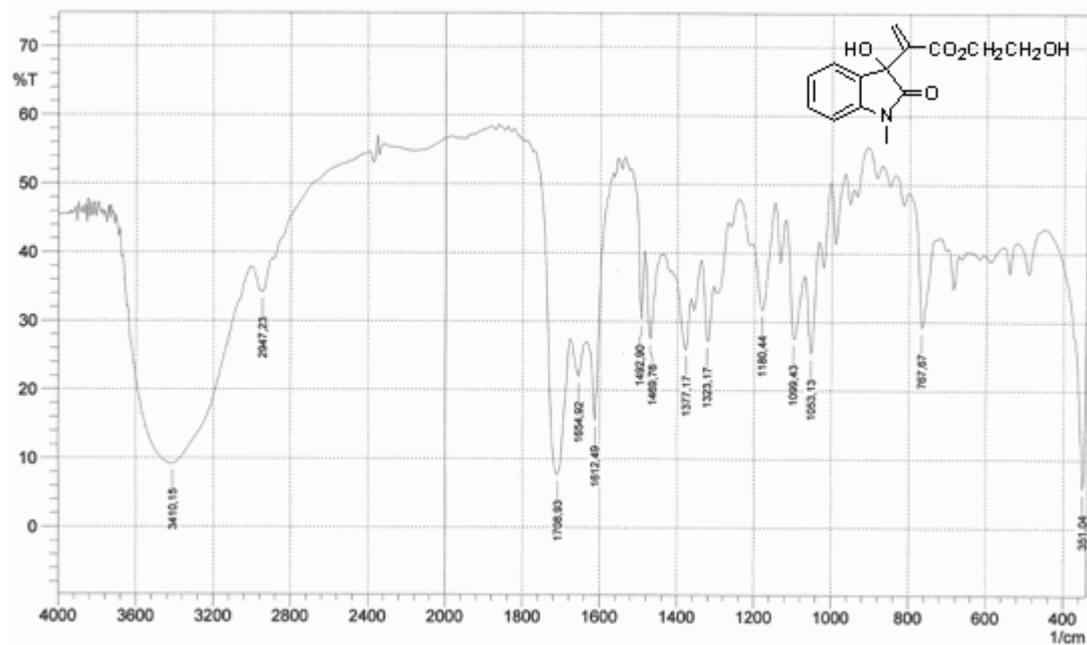
Espectro 103 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CDCl_3) do aduto **59a**



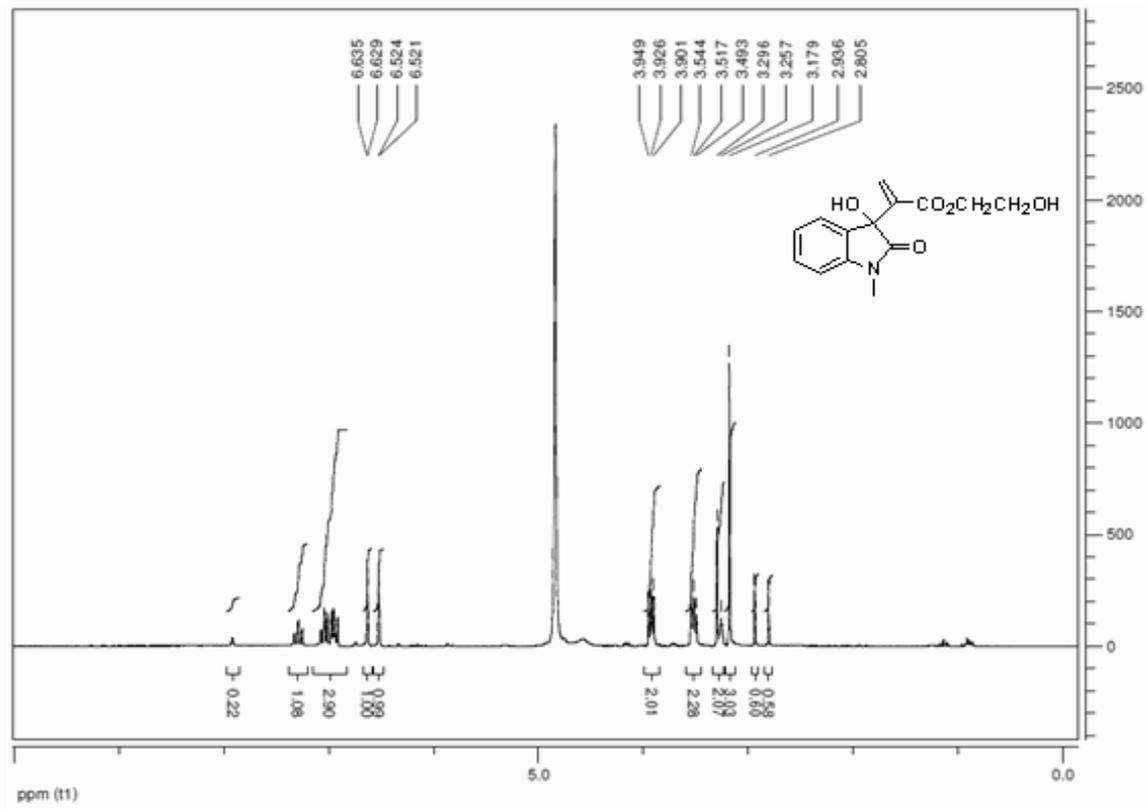
Espectro 104 Espectro de Massas de alta resolução do aduto **59a**



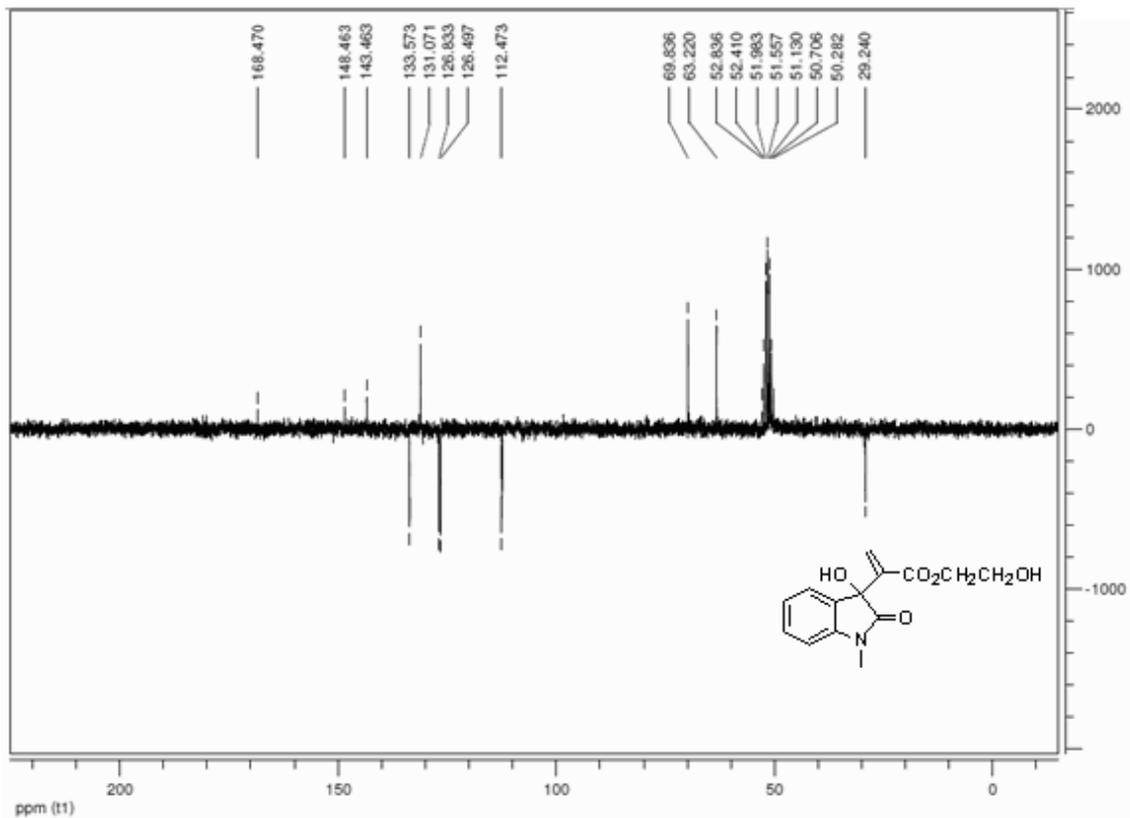
Espectro 105 Espectro de IV (KBr) do aduto **59b**



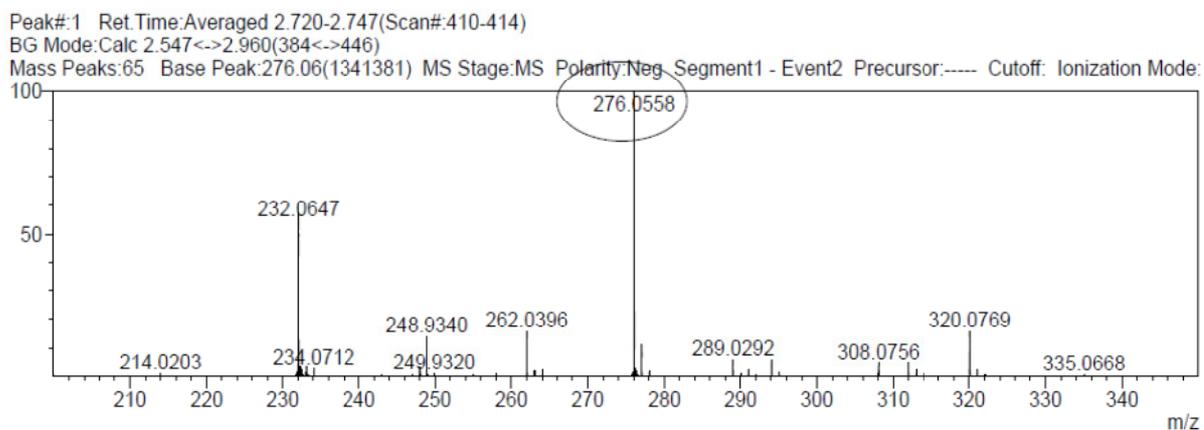
Espectro 106 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **59b**



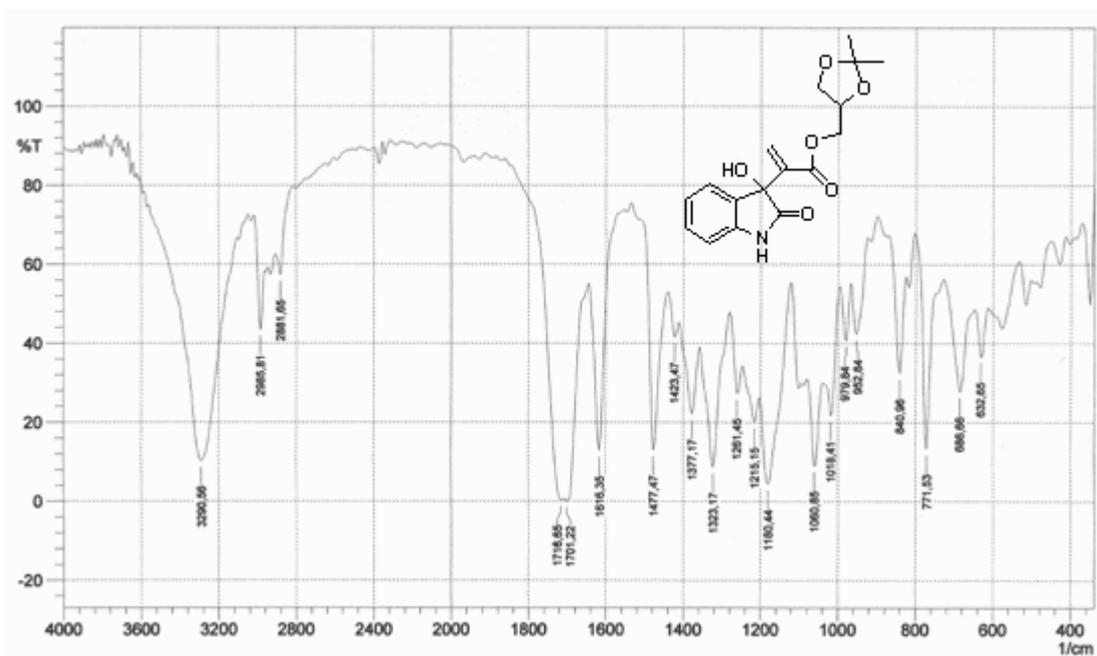
Espectro 107 Espectro de RMN ¹³C-APT (CD₃OD) do aduto **59b**



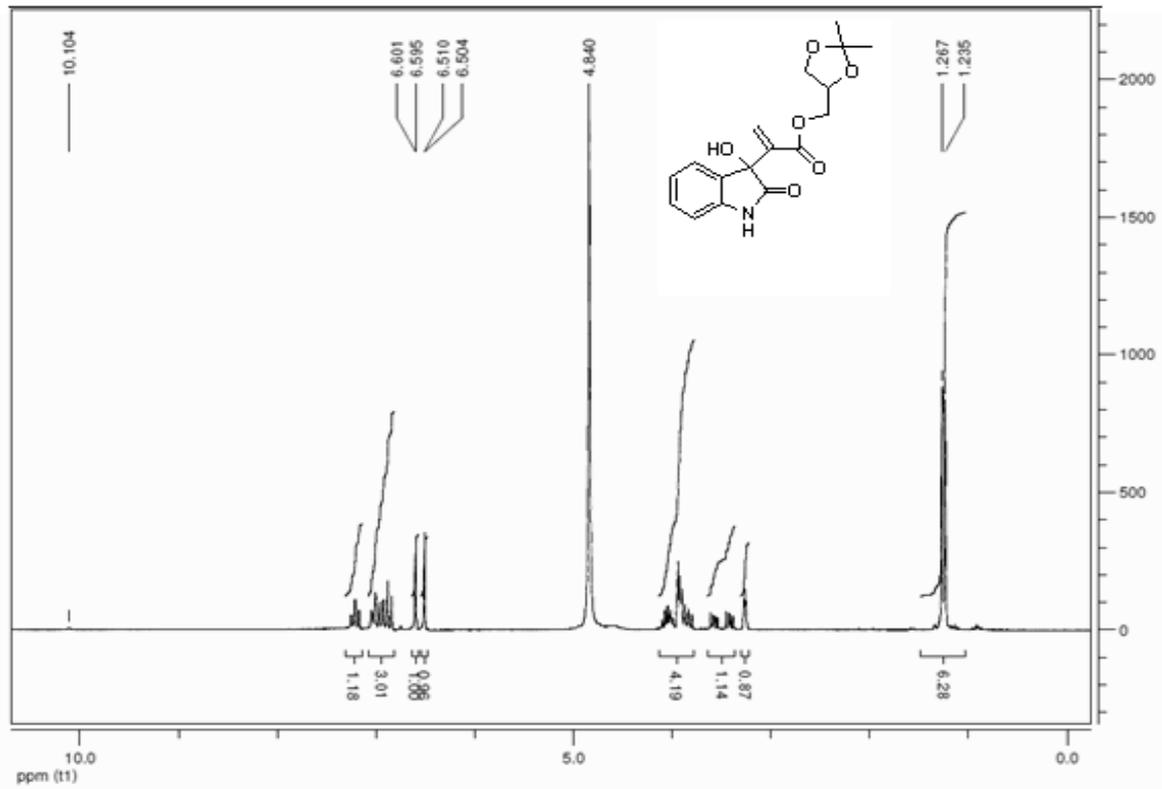
Espectro 108 Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto **59b**



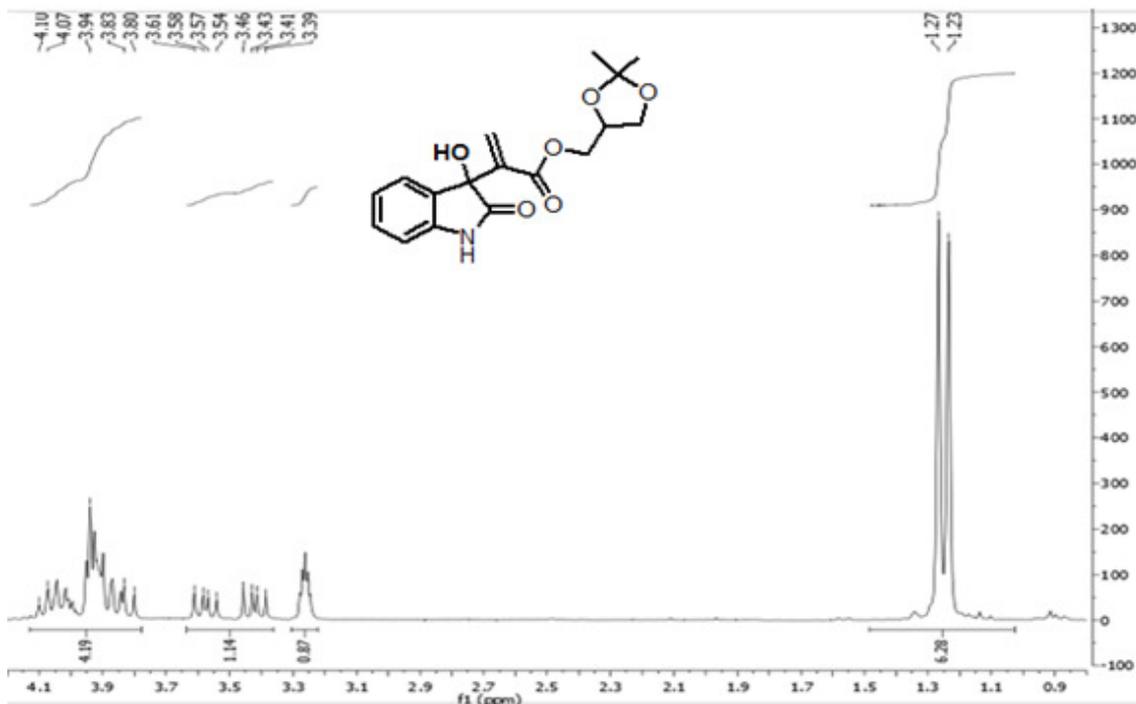
Espectro 109 Espectro de IV (KBr) do aduto **60a**



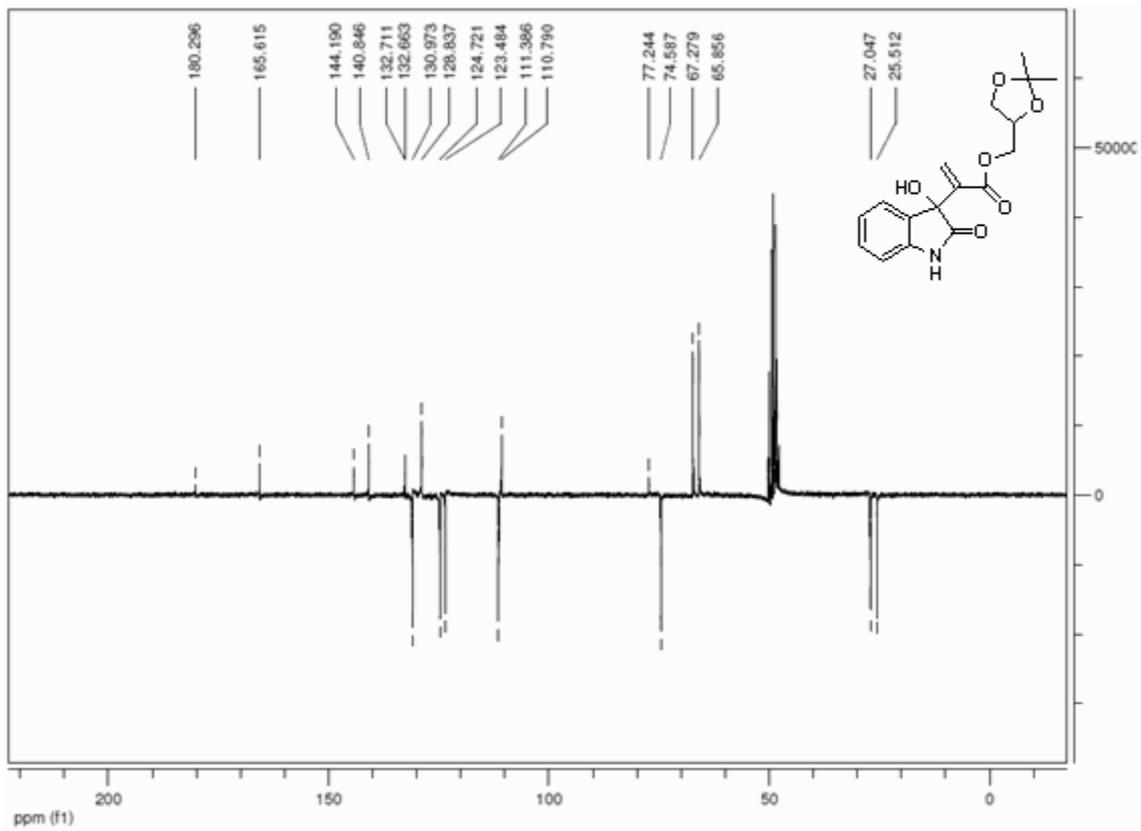
Espectro 110 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **60a**



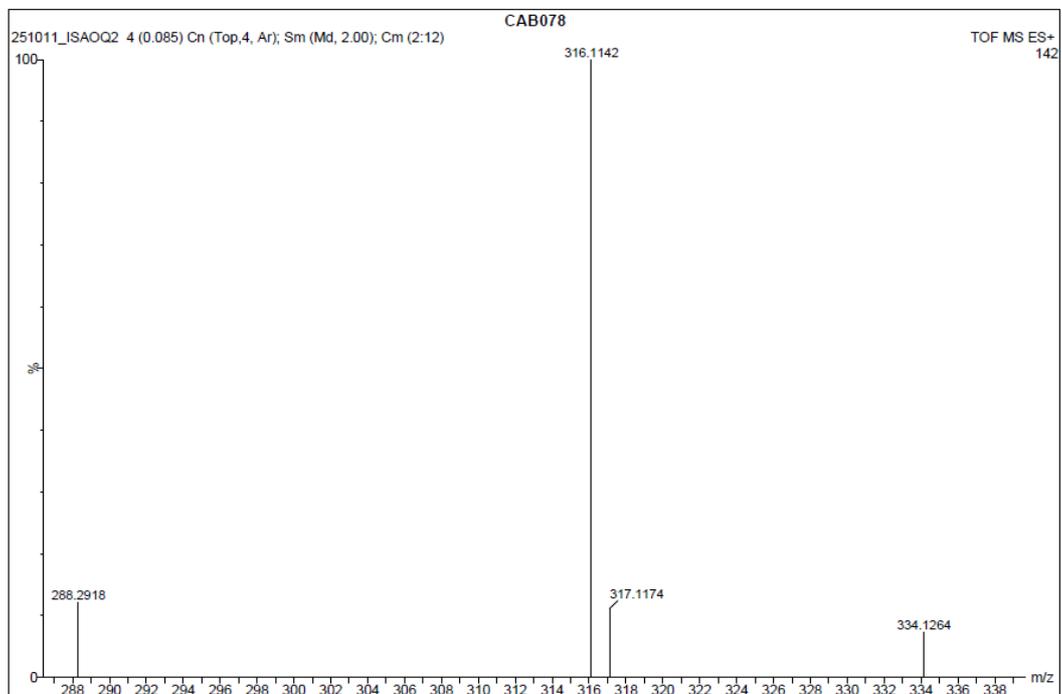
Espectro 111 Expansão do espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **60a** na região de 1.1 a 4.1 ppm



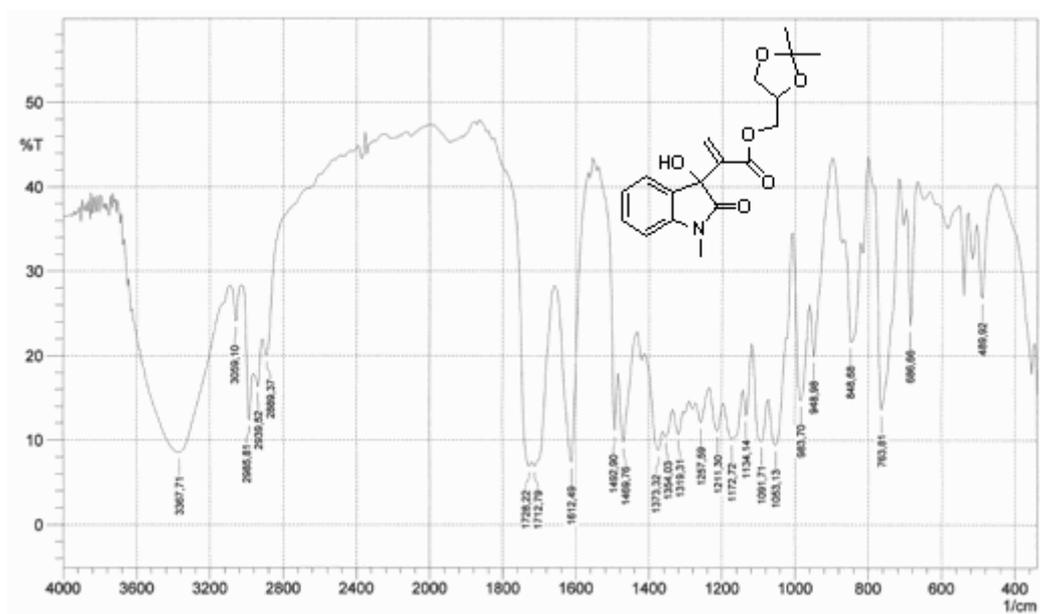
Espectro 112 Espectro de RMN ¹³C-APT (CD₃OD) do aduto **60a**



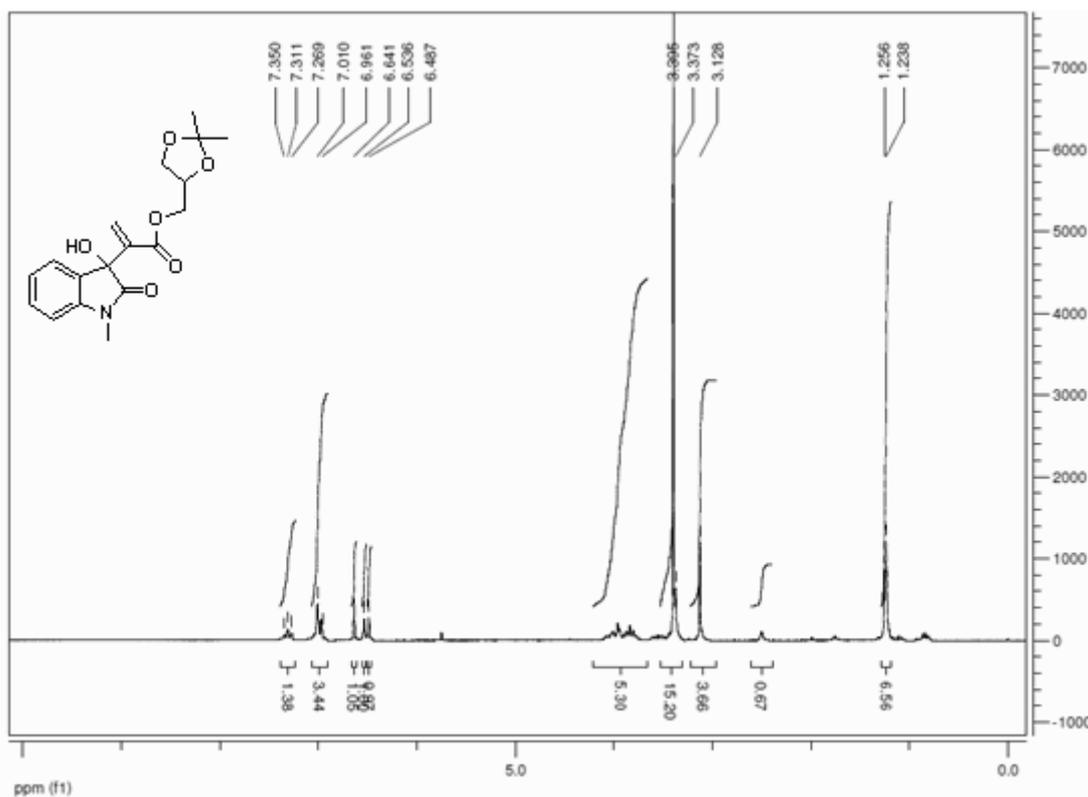
Espectro 113 Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto **60a**



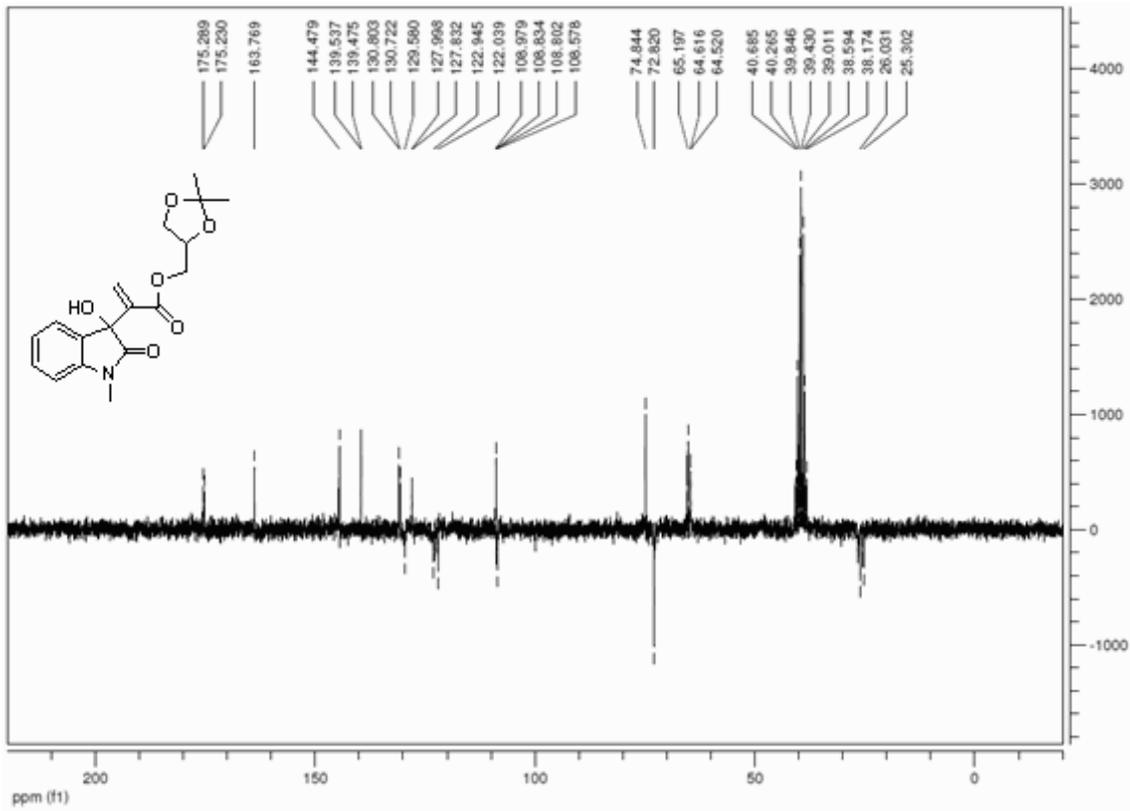
Espectro 114 Espectro de IV (KBr) do aduto **60b**



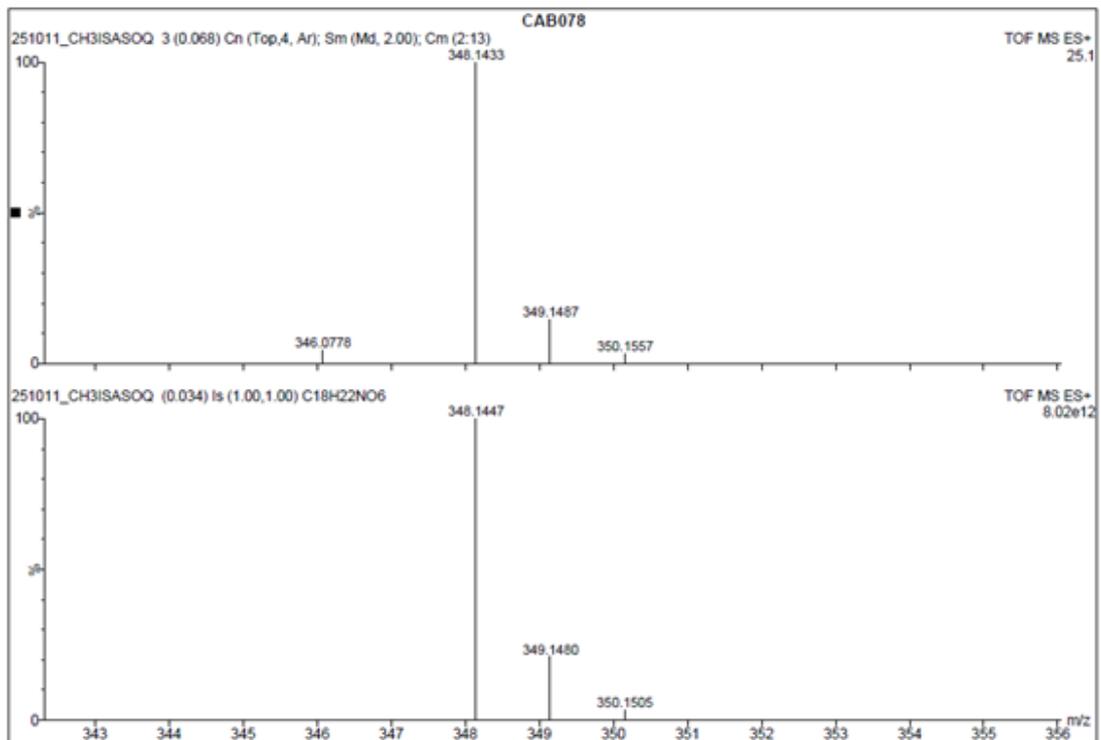
Espectro 115 Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆) do aduto **60b**



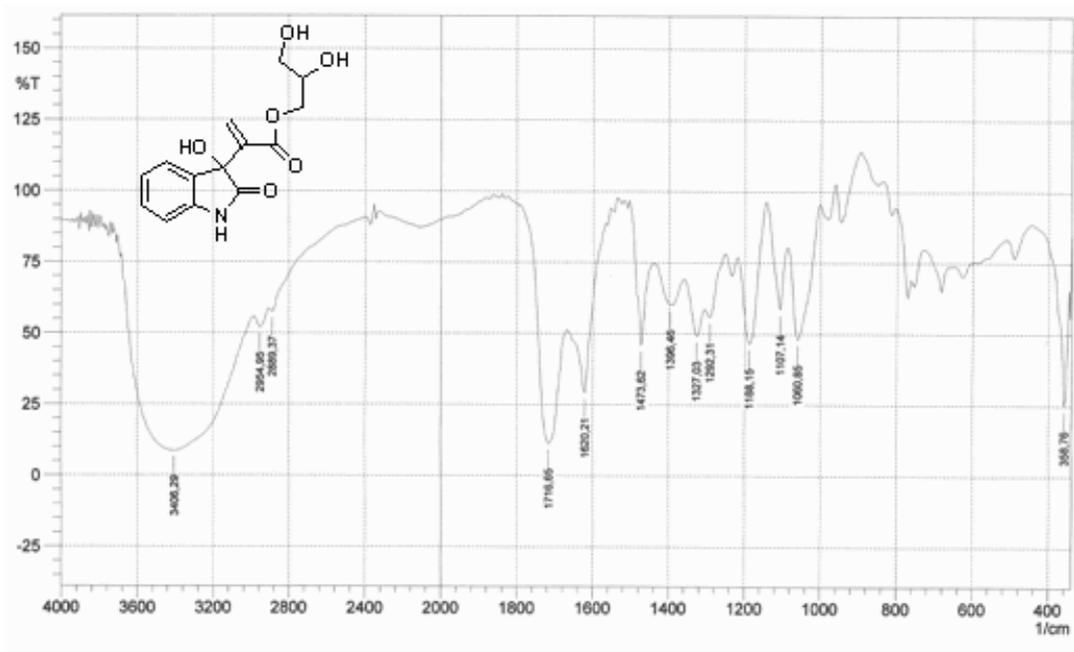
Espectro 116 Espectro de RMN ¹³C-APT (DMSO-d₆) do aduto **60b**



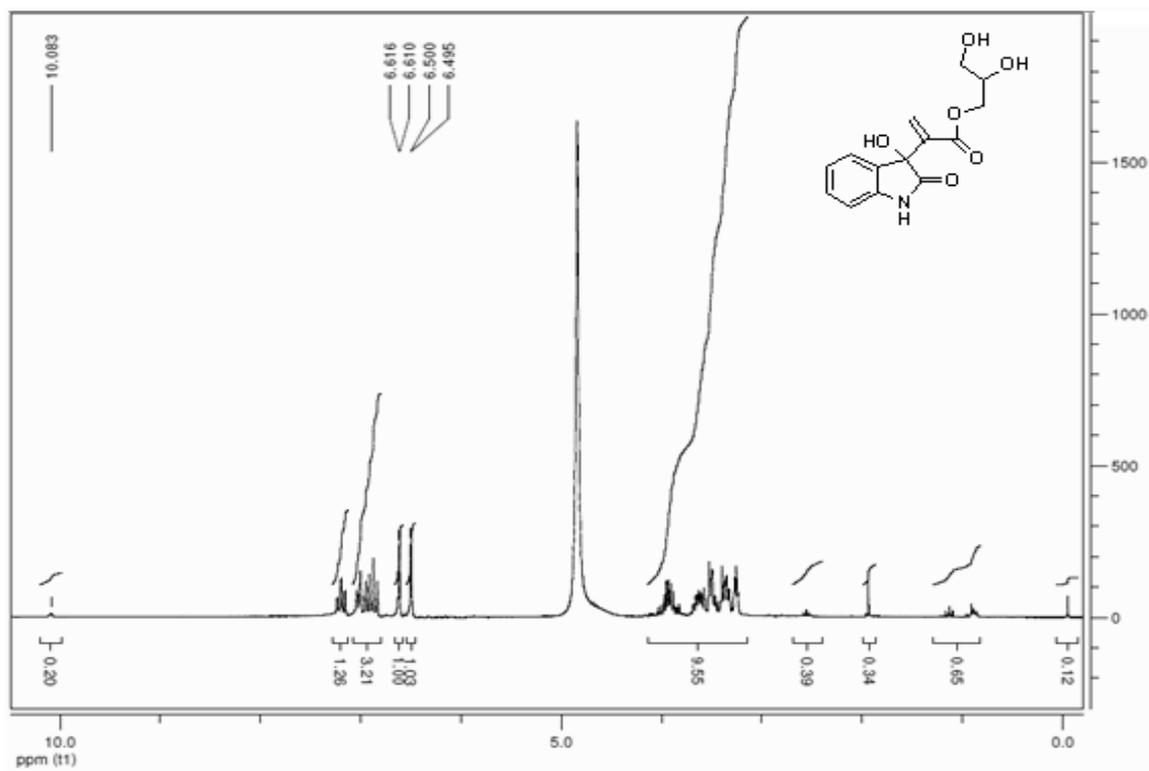
Espectro 117 Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto **60b**



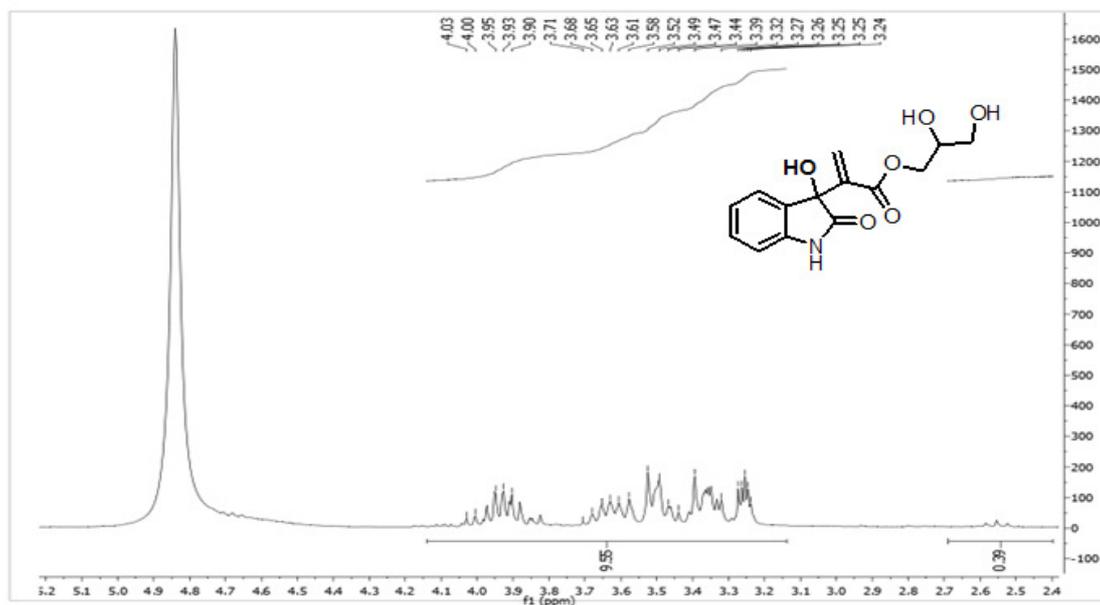
Espectro 118 Espectro de IV (KBr) do aduto **61a**



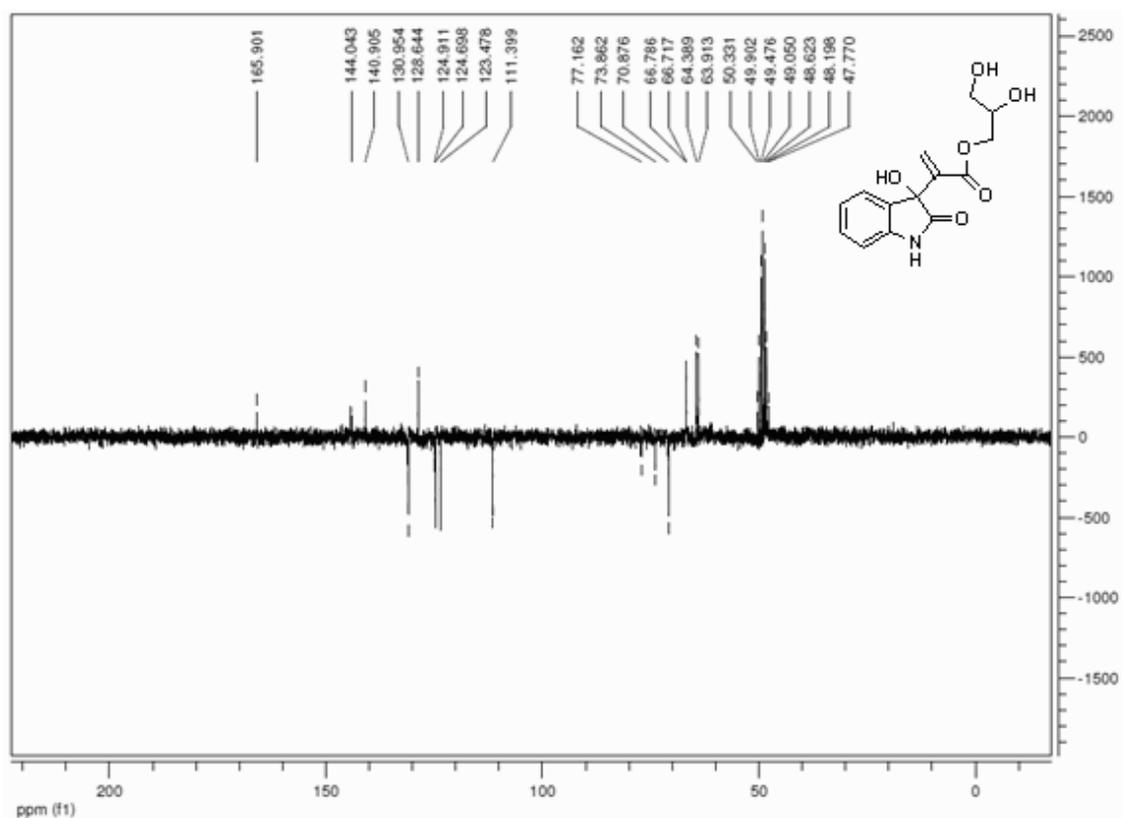
Espectro 119 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **61a**

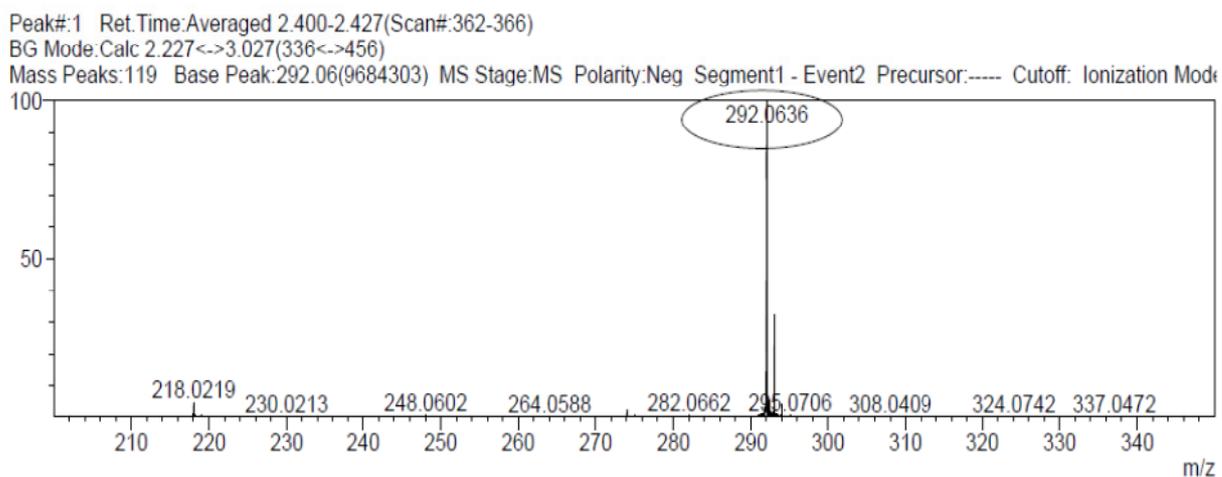
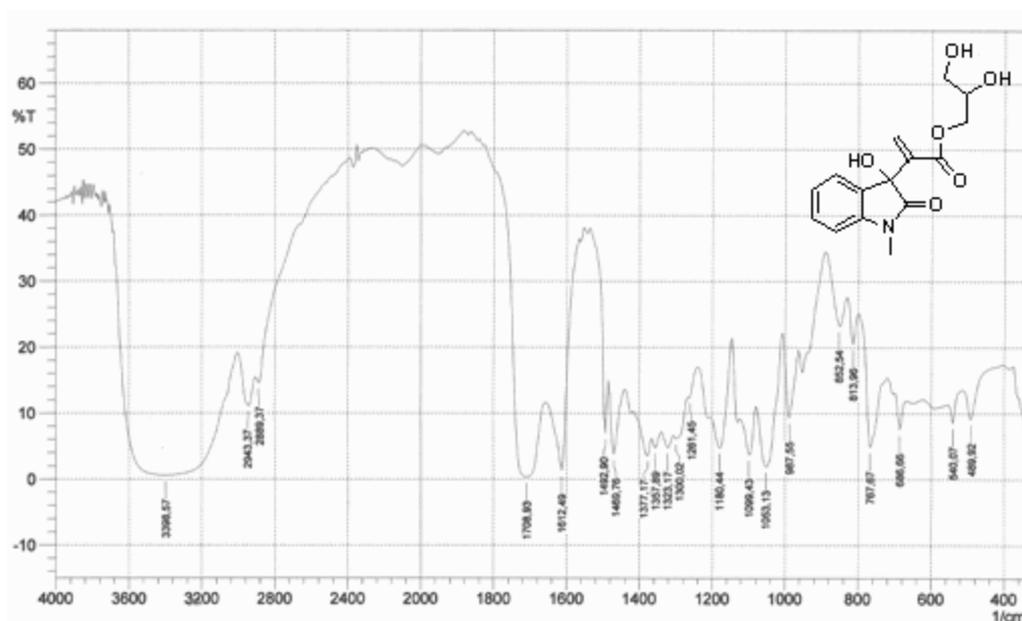


Espectro 120 Expansão do espectro de RMN ^1H (CD_3OD) do aduto **61a** na região de 3.1 a 5.1 ppm

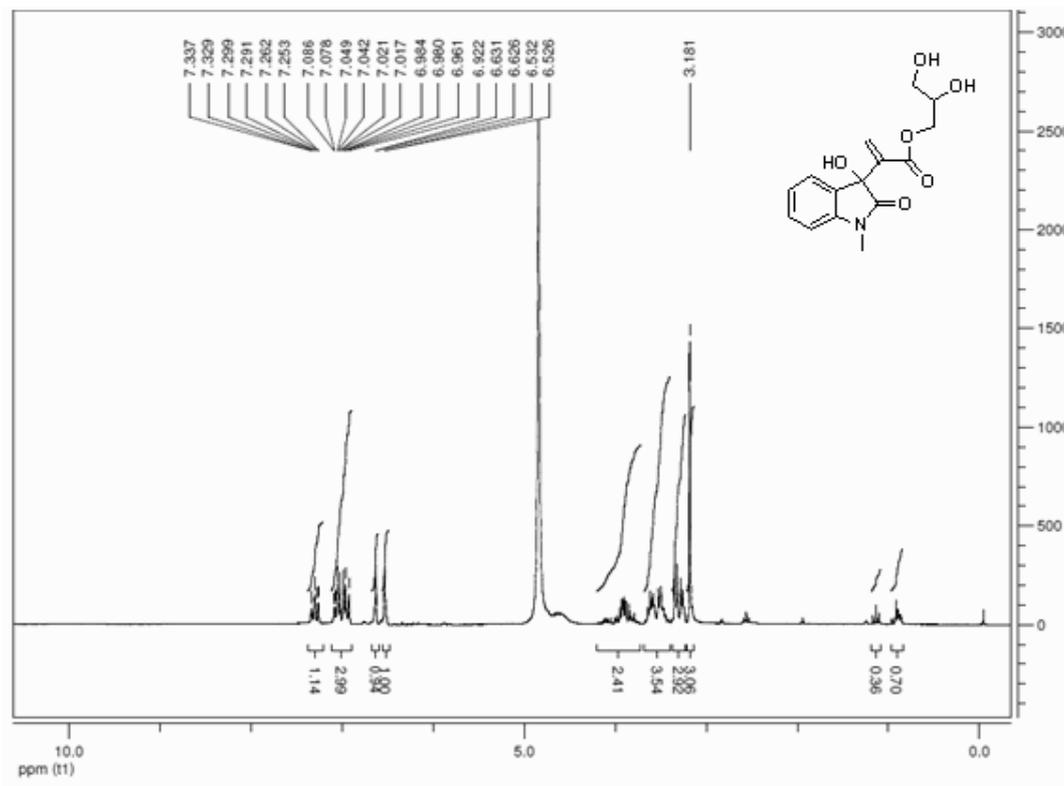


Espectro 121 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CD_3OD) do aduto **61a**

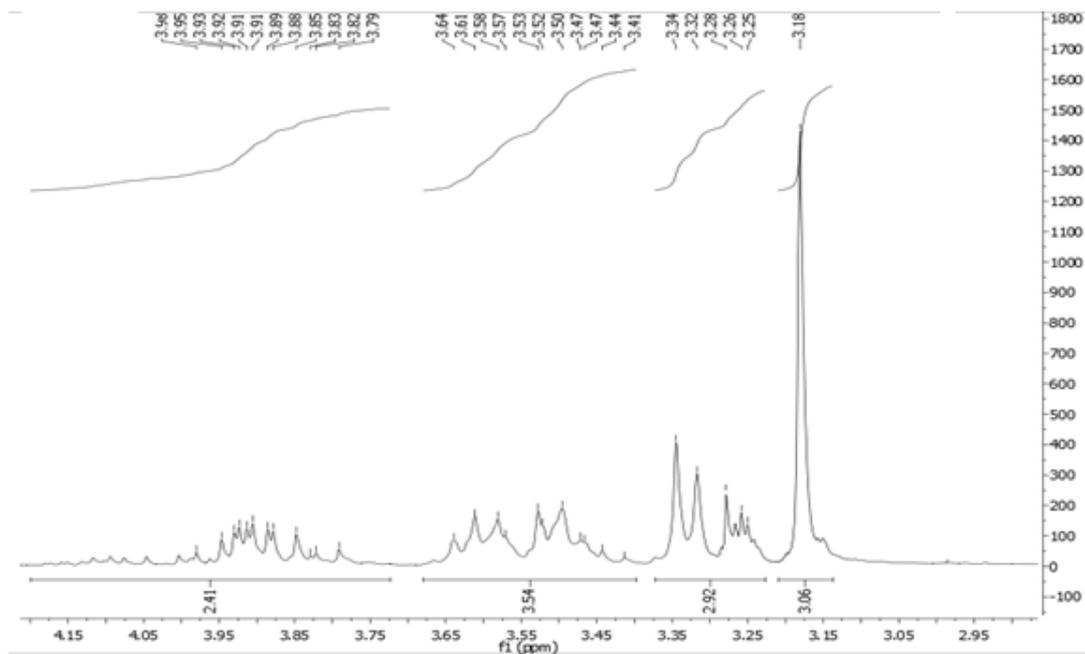


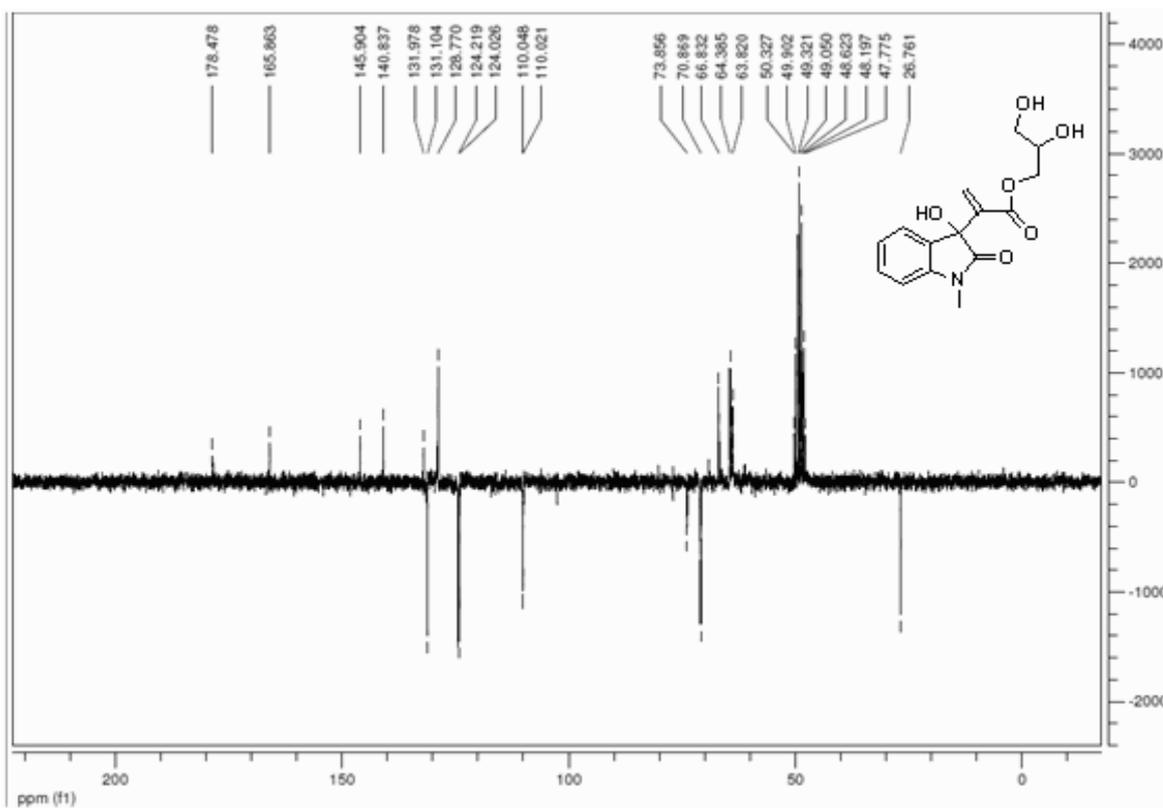
Espectro 122 Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto **61a****Espectro 123** Espectro de IV (KBr) do aduto **61b**

Espectro 124 Espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **61b**



Espectro 125 Expansão do espectro de RMN ¹H (CD₃OD) do aduto **61b** na região de 3.1 a 4.2 ppm

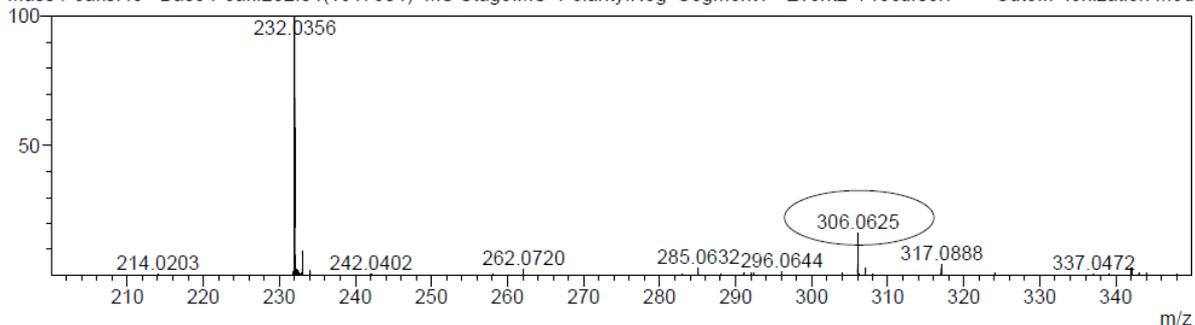


Espectro 126 Espectro de RMN ^{13}C -APT (CD_3OD) do aduto **61b****Espectro 127** Espectro de Massas de Alta Resolução do aduto **61b**

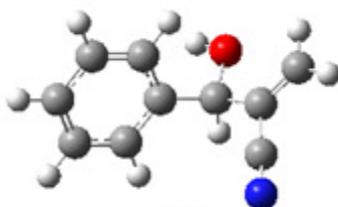
Peak#:1 Ret.Time:Averaged 3.573-3.600(Scan#:538-542)

BG Mode:Calc 3.267<->4.040(492<->608)

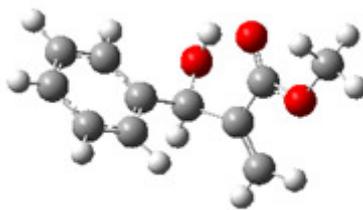
Mass Peaks:45 Base Peak:232.04(1917504) MS Stage:MS Polarity:Neg Segment1 - Event2 Precursor:----- Cutoff: Ionization Mod



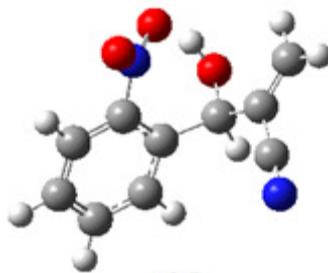
ANEXOS

ANEXO I - GEOMETRIAS DE SAÍDA DOS CÁLCULOS EM RHF/6-31G+(d):**13**

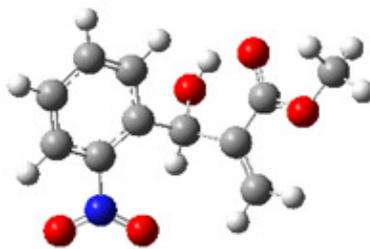
C	-2.99162200	-0.51039300	-0.71645900
C	-3.03347200	-0.85393200	0.62346700
C	-1.96825300	-0.52437300	1.45431700
C	-0.86877700	0.14248600	0.94323700
C	-0.82078400	0.49361000	-0.40451400
C	-1.88849200	0.16481000	-1.22634900
C	0.38338900	1.23851800	-0.96451700
O	0.69957600	2.37169300	-0.20412100
C	1.63101400	0.37166100	-1.01475700
C	2.75029800	0.61277900	-0.35151500
C	1.55119500	-0.77882700	-1.89248800
N	1.47686600	-1.66639300	-2.59914300
H	-3.81014800	-0.76353700	-1.36615000
H	-3.88569000	-1.37548500	1.02115500
H	-1.99566800	-0.79128100	2.49576800
H	-0.04505500	0.39193200	1.58794000
H	-1.86340500	0.42631900	-2.27006900
H	0.15459000	1.53465500	-1.98504600
H	-0.08255200	2.88773600	-0.06235700
H	3.59869300	-0.04031000	-0.43864500
H	2.83359500	1.47162700	0.28464700

**12**

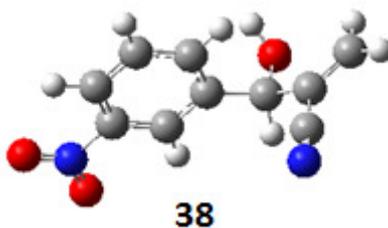
C	-2.74207900	-1.30515700	-0.84983800
C	-3.43805900	-1.42509900	0.34350700
C	-3.24023500	-0.48414200	1.34202600
C	-2.35208300	0.56549100	1.15259600
C	-1.64295600	0.68875000	-0.03708700
C	-1.85336900	-0.25661900	-1.03741000
C	-0.71144700	1.88384900	-0.26065400
O	-0.40595100	2.55059900	0.92999500
C	0.55027900	1.52394900	-1.03204700
C	0.79686600	1.97429800	-2.25138600
C	1.54440300	0.66875700	-0.31427800
O	1.49244600	0.46694700	0.86375000
O	2.48921900	0.17114000	-1.08567300
C	3.49346500	-0.61656800	-0.46237700
H	-2.88767100	-2.02623500	-1.63488800
H	-4.12546400	-2.23894200	0.49179200
H	-3.77710600	-0.56359700	2.27088600
H	-2.21391400	1.29336800	1.92871600
H	-1.32425700	-0.18221600	-1.97054800
H	-1.24842000	2.61049100	-0.85700200
H	0.16036700	1.99661600	1.45570300
H	1.69266700	1.71534800	-2.78248500
H	0.10058800	2.62393200	-2.75196600
H	4.15649000	-0.91988600	-1.25688300
H	3.05139800	-1.47993900	0.01232800
H	4.02652300	-0.03193600	0.27302000

**16**

C	-2.77262000	-0.64442700	-1.00111000
C	-3.62498200	0.10728100	-0.21236400
C	-3.10112300	0.84816000	0.83107100
C	-1.73624800	0.83761300	1.07803500
C	-0.84951500	0.08491200	0.31718800
C	-1.41745700	-0.65785200	-0.72223900
C	0.64211400	0.20505300	0.66667300
O	1.17761400	-0.93521200	1.24570300
C	1.48564500	0.73395100	-0.49339200
C	2.59217800	0.16898400	-0.94631300
C	1.04700100	1.99732000	-1.05327800
N	0.68478600	2.99416300	-1.46335800
N	-0.61656200	-1.53030200	-1.58217200
O	-0.93461900	-1.62893400	-2.72237000
O	0.29974900	-2.12695600	-1.08457800
H	-3.14771700	-1.22303300	-1.82192200
H	-4.67939300	0.11258000	-0.41699500
H	-3.74692300	1.44313400	1.45076100
H	-1.34870700	1.43890400	1.87945000
H	0.69423300	0.96028000	1.43874100
H	1.01000500	-1.68558600	0.68855600
H	3.16199300	0.61570300	-1.73965500
H	2.95105100	-0.75103800	-0.52863300

**37**

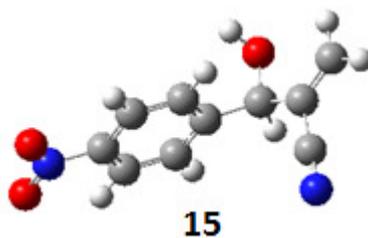
C	-3.15599000	0.42671500	1.74321200
C	-3.15180400	1.78945700	1.53658600
C	-2.45999100	2.30169200	0.44911300
C	-1.77838000	1.46006600	-0.41053500
C	-1.73162700	0.07858500	-0.21698100
C	-2.44433900	-0.39994600	0.88353800
C	-0.99319600	-0.79883000	-1.24666000
O	-1.28953000	-0.38846900	-2.55033700
C	0.51370400	-0.88090400	-0.99520800
C	1.09628500	-1.97994000	-0.53988000
C	1.34742800	0.29960100	-1.36813800
O	0.93308300	1.21418400	-2.02573400
O	2.58756700	0.24794000	-0.93384600
C	3.45826400	1.30910000	-1.30055200
N	-2.50662000	-1.82526000	1.21143100
O	-3.50923500	-2.23258600	1.71310600
O	-1.54673200	-2.50204300	0.98108200
H	-3.69889300	-0.00709700	2.55897800
H	-3.68742300	2.43774200	2.20519200
H	-2.45687400	3.36043500	0.26182700
H	-1.27313400	1.88572300	-1.25285800
H	-1.37456200	-1.79985500	-1.17731500
H	-0.74955900	0.35389900	-2.79184100
H	2.15704400	-2.02687400	-0.38717900
H	0.52435800	-2.85555700	-0.30279000
H	4.40997900	1.06621500	-0.85588300
H	3.08900100	2.24743400	-0.91416500
H	3.54617500	1.36827900	-2.37536500



C	-2.44284900	0.26382000	-0.33087100
C	-2.37607900	-0.51133200	0.81252600
C	-1.13294400	-0.73704600	1.37779100
C	0.00598300	-0.19558400	0.80003600
C	-0.07441400	0.58501300	-0.34944300
C	-1.31902300	0.81273200	-0.91993000
C	1.15450700	1.24109100	-0.96485800
O	1.44272400	2.47145900	-0.36007100
C	2.38526200	0.34181200	-0.95977400
C	3.55708700	0.67438200	-0.44243900
C	2.23675500	-0.93226400	-1.63533500
N	2.10035600	-1.92516700	-2.17194700
N	-3.74822100	0.51080500	-0.94206500
O	-3.77880900	1.17879300	-1.93092900
O	-4.70459300	0.03085700	-0.41277500
H	-3.26807200	-0.92490000	1.23794000
H	-1.05103100	-1.34228600	2.26148600
H	0.96415100	-0.39597800	1.24559900
H	-1.42103200	1.40641200	-1.80672900
H	0.93053000	1.46638200	-2.00014700
H	1.15298700	2.47989800	0.54208900
H	4.39963100	0.01034300	-0.49678800
H	3.69349500	1.62716300	0.03063600

**39**

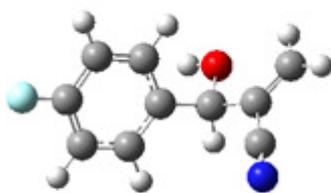
C	-2.54230600	-1.21974400	-0.27722800
C	-3.11096800	-0.36946500	-1.20721600
C	-2.56935900	0.89674400	-1.34069800
C	-1.48694900	1.28121600	-0.56272000
C	-0.91831700	0.41311700	0.36469200
C	-1.46484200	-0.85438400	0.50977500
C	0.24017500	0.85668400	1.26461400
O	0.81484100	-0.21688500	1.94614300
C	1.28604600	1.67952600	0.52630100
C	1.49877600	2.96035000	0.78141400
C	2.11624600	0.94359200	-0.47555300
O	2.11114000	-0.24997200	-0.55947200
O	2.85640600	1.71602200	-1.24087500
C	3.70817600	1.07948900	-2.18520400
N	-3.10518100	-2.56059200	-0.11653100
O	-2.60235400	-3.28323600	0.68934400
O	-4.03819300	-2.85455500	-0.80351000
H	-3.94438200	-0.68976700	-1.79890400
H	-2.98923600	1.58409100	-2.05210900
H	-1.08453300	2.27027900	-0.68675600
H	-1.06587800	-1.54336100	1.22406900
H	-0.17410700	1.49098600	2.03777600
H	1.30862200	-0.74914000	1.33178100
H	2.24516600	3.52620700	0.25781300
H	0.92876400	3.47785900	1.53288300
H	4.21891300	1.87938900	-2.69670000
H	3.12443300	0.49571300	-2.88113700
H	4.41599800	0.44004200	-1.67888800



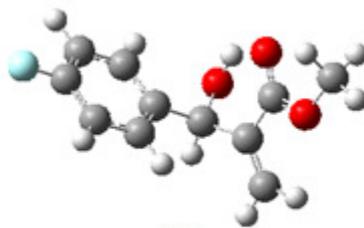
C	-2.56948100	-0.03243500	-0.92445700
C	-2.55016100	-0.77688200	0.24022300
C	-1.40225600	-0.92818200	0.99620700
C	-0.24058200	-0.30964600	0.56741600
C	-0.22908200	0.45359700	-0.59651000
C	-1.39929200	0.58272700	-1.33551000
C	1.02520500	1.19575800	-1.04165300
O	1.17482000	2.40574600	-0.35373300
C	2.29096700	0.35309100	-0.93647500
C	3.37887200	0.70950700	-0.27280100
C	2.28131100	-0.88760300	-1.68608100
N	2.25236300	-1.85145200	-2.28815400
N	-3.78105700	-1.42810500	0.68526700
O	-3.73698300	-2.05904500	1.69788300
O	-4.75567200	-1.28691600	0.01070200
H	-3.47399800	0.06075900	-1.49098300
H	-1.41828300	-1.51997700	1.88913200
H	0.66011600	-0.43927700	1.14001900
H	-1.40251900	1.16631600	-2.23804600
H	0.90572500	1.46254300	-2.08410500
H	0.82045100	2.34326500	0.52319700
H	4.25368400	0.08642900	-0.25982800
H	3.41465500	1.64168200	0.25649300

**14**

C	-2.14266600	-1.68261000	1.13204300
C	-2.76571700	-1.64894400	-0.10154800
C	-2.50930800	-0.64488400	-1.01772400
C	-1.60031400	0.34275900	-0.68376300
C	-0.94952400	0.33264400	0.54836000
C	-1.23647200	-0.68551700	1.45147100
C	0.01022800	1.46047400	0.93981200
O	0.75418800	1.14734500	2.07864400
C	0.90225500	1.91299800	-0.20680100
C	0.80752100	3.11255800	-0.75682400
C	1.94837500	0.94073900	-0.64751600
O	2.21260000	-0.04331300	-0.01952700
O	2.55541900	1.26557000	-1.76745700
C	3.59262300	0.40637100	-2.22462500
N	-3.72013600	-2.69706000	-0.44651800
O	-3.92616700	-3.55008200	0.36397000
O	-4.24136800	-2.64174800	-1.52074100
H	-2.36279400	-2.46942300	1.82534300
H	-3.00806600	-0.63948300	-1.96602600
H	-1.40082300	1.12217700	-1.39545000
H	-0.75483500	-0.69742700	2.40903600
H	-0.59817600	2.30970700	1.22412900
H	1.40010400	0.48609500	1.85479300
H	1.44970700	3.41967500	-1.55976900
H	0.08049500	3.82578400	-0.41030500
H	3.95010500	0.84936300	-3.14012500
H	3.20332400	-0.58371700	-2.40889600
H	4.38531300	0.35524900	-1.49299000

**26**

C	-2.28353700	-1.01153000	0.15414700
C	-2.24555300	-0.92006100	1.52555000
C	-1.28221900	-0.18507000	2.19005200
C	-0.32472100	0.47639900	1.44338800
C	-0.33127900	0.41041800	0.05111400
C	-1.31631000	-0.33497300	-0.57916000
C	0.72177800	1.15069900	-0.76116400
O	0.82496000	2.49560600	-0.38461700
C	2.10543100	0.53855300	-0.61398300
C	3.16229400	1.16022200	-0.11656700
C	2.23247800	-0.82215000	-1.09601200
N	2.31403200	-1.88356400	-1.49520500
F	-3.16844500	-1.55912000	2.24142600
H	-3.04752700	-1.59488200	-0.32463400
H	-1.28948200	-0.14277900	3.26326100
H	0.43352400	1.04934300	1.94573900
H	-1.33590900	-0.40219500	-1.65271700
H	0.44900500	1.08319000	-1.81129100
H	-0.03365800	2.89665200	-0.39543500
H	4.11423600	0.66740800	-0.04738200
H	3.08950100	2.17423200	0.22369000

**27**

C	-2.65237700	-1.30130100	-0.84694300
C	-3.33706400	-1.37650900	0.34557000
C	-3.16283300	-0.44600100	1.34537700
C	-2.26660100	0.59292000	1.14042200
C	-1.54803900	0.70030000	-0.04537200
C	-1.75908800	-0.25666000	-1.03348900
C	-0.60866500	1.88835200	-0.27427300
O	-0.30656700	2.55819800	0.91532500
C	0.65395600	1.51378300	-1.03699200
C	0.90743400	1.95159300	-2.25958600
C	1.64020300	0.65928500	-0.30734800
O	1.58016600	0.46775900	0.87217300
O	2.58560800	0.15049600	-1.06953000
C	3.58442500	-0.63616600	-0.43496600
F	-4.19578000	-2.38029400	0.53586000
H	-2.81500500	-2.04336600	-1.60654200
H	-3.71719400	-0.53458600	2.26131400
H	-2.13030500	1.32792500	1.90971300
H	-1.22537400	-0.19890700	-1.96472500
H	-1.13660000	2.61606600	-0.87714400
H	0.26418400	2.00887700	1.44136700
H	1.80358200	1.68242300	-2.78496400
H	0.21728700	2.60136700	-2.76843700
H	4.24933800	-0.94883600	-1.22412600
H	3.13664300	-1.49350200	0.04516800
H	4.11647300	-0.04701800	0.29745300



40

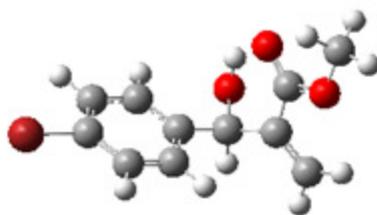
C	-1.45184800	-1.84215100	0.14402800
C	-2.70187200	-1.25747400	0.00303700
C	-2.83604800	0.11101100	-0.11605700
C	-1.69757000	0.90704200	-0.08905400
C	-0.43791700	0.34568700	0.04841700
C	-0.32731700	-1.03792600	0.16328800
C	0.80540300	1.22435300	0.07975800
O	1.64024700	0.91056000	1.15854100
C	1.63888800	1.09140700	-1.18464600
C	2.88535600	0.64967900	-1.22851800
C	0.98441800	1.52142100	-2.40378900
N	0.45771300	1.88013100	-3.34530800
Cl	-4.12030700	-2.26741500	-0.02221100
H	-1.36373500	-2.90848800	0.23362600
H	-3.80834100	0.55246600	-0.22690200
H	-1.80602400	1.97324400	-0.18391000
H	0.64253400	-1.48918100	0.26954600
H	0.48670400	2.26119200	0.14999700
H	1.14279100	0.93048800	1.96504500
H	3.41923600	0.58741100	-2.15851600
H	3.39049000	0.34914200	-0.33197300

**41**

C	-2.49402900	-1.27705500	-0.86932400
C	-3.17903200	-1.38574000	0.32673000
C	-2.98225800	-0.46358400	1.33728200
C	-2.08500700	0.57686800	1.14658400
C	-1.37657600	0.70429400	-0.04212500
C	-1.59891100	-0.23320300	-1.04579400
C	-0.43549000	1.89299800	-0.25866300
O	-0.13077300	2.54960100	0.93693300
C	0.82436600	1.52531200	-1.02914300
C	1.07583400	1.97755900	-2.24684900
C	1.80949900	0.65965800	-0.31148600
O	1.74633100	0.45028400	0.86488700
O	2.75607400	0.16278500	-1.07944000
C	3.75318700	-0.63485300	-0.45548100
C1	-4.30383600	-2.69839600	0.56030400
H	-2.65420300	-1.99560000	-1.65122700
H	-3.52146900	-0.55318600	2.26169500
H	-1.94169300	1.29600100	1.92950700
H	-1.07346600	-0.16114800	-1.98078400
H	-0.96632700	2.62589600	-0.85273900
H	0.44198000	1.99530300	1.45557900
H	1.97050500	1.71312000	-2.77710800
H	0.38588200	2.63461200	-2.74650600
H	4.41942900	-0.93517600	-1.24826000
H	3.30367000	-1.49942600	0.00976900
H	4.28401500	-0.05782500	0.28736100

**42**

C	-2.63156600	-0.52700400	-0.78811800
C	-2.68795100	-0.87048600	0.54714400
C	-1.66088400	-0.53365400	1.41612100
C	-0.56372200	0.15356000	0.93113500
C	-0.48545500	0.51070400	-0.41233000
C	-1.52545100	0.16765000	-1.26109100
C	0.72943700	1.26074500	-0.93970100
O	1.05074800	2.36500300	-0.14224600
C	1.96621500	0.37912400	-1.00306100
C	3.08750400	0.59704300	-0.33528900
C	1.87174000	-0.75464600	-1.90038100
N	1.78331000	-1.62786900	-2.62298700
Br	-4.19101400	-1.81076200	1.20676600
H	-3.43106500	-0.79236100	-1.45316100
H	-1.71740600	-0.80683300	2.45264300
H	0.23689900	0.41223300	1.60016500
H	-1.48129100	0.43060700	-2.30340700
H	0.51267500	1.58832900	-1.95326800
H	0.28868800	2.91911800	-0.03958800
H	3.92829000	-0.06432900	-0.43252900
H	3.18049700	1.44432900	0.31488500

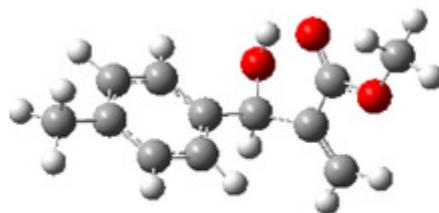
**43**

C	-2.43790000	-1.25861800	-0.87625600
C	-3.09606600	-1.37700200	0.33380400
C	-2.87838500	-0.46463100	1.34815600
C	-1.98544600	0.57757600	1.14751800
C	-1.30463700	0.71389900	-0.05535100
C	-1.54689000	-0.21398600	-1.06323000
C	-0.36900100	1.90249600	-0.28882500
O	-0.07570700	2.58513000	0.89465800
C	0.89769700	1.52060400	-1.04079100
C	1.16716700	1.95791600	-2.26001100
C	1.86783600	0.65731000	-0.30036400
O	1.79483900	0.47381000	0.87982700
O	2.81191800	0.13236300	-1.05204700
C	3.79481500	-0.66516800	-0.40554100
Br	-4.31452300	-2.80216100	0.60136000
H	-2.61434500	-1.96812700	-1.66250100
H	-3.39628700	-0.55975100	2.28375300
H	-1.82673200	1.29135400	1.93224100
H	-1.04117600	-0.13226400	-2.00834600
H	-0.89898600	2.61934200	-0.90287200
H	0.50202800	2.04792400	1.42556800
H	2.06671200	1.68184100	-2.77598400
H	0.48810300	2.61421000	-2.77532400
H	4.46156300	-0.99071200	-1.18784900
H	3.33095400	-1.51379400	0.07472100
H	4.32884800	-0.07976200	0.32838900

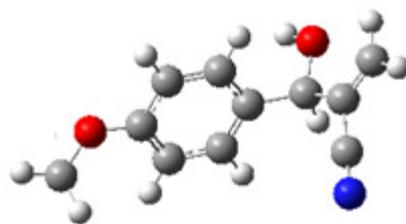


25

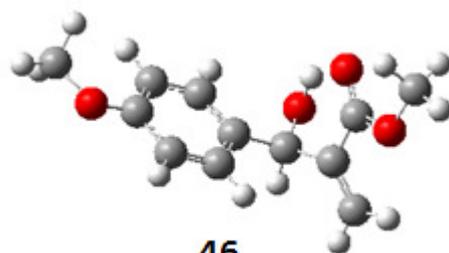
C	-1.23443600	-1.74701400	-0.11806600
C	-2.48628300	-1.12649200	-0.10115800
C	-2.52672500	0.25469300	-0.00251700
C	-1.35450400	1.00130200	0.07774400
C	-0.11747300	0.38224700	0.05581000
C	-0.07053800	-1.00856700	-0.04400000
C	1.16310000	1.19772400	0.15047200
O	1.99921800	0.74626100	1.18081500
C	1.97600700	1.15822500	-1.13328400
C	3.20034700	0.66839900	-1.24298700
C	1.33059000	1.73987700	-2.29342400
N	0.81696600	2.21551400	-3.18935300
C	-3.74945700	-1.95019000	-0.19346400
H	-1.17532100	-2.81947200	-0.19495600
H	-3.47489900	0.76312700	0.01180500
H	-1.41878900	2.07344000	0.15026900
H	0.88108800	-1.50949500	-0.06391600
H	0.89170500	2.23520900	0.32845300
H	1.49318000	0.63945300	1.97487900
H	3.72021100	0.67853000	-2.18298400
H	3.70082800	0.25459000	-0.39001300
H	-3.79969600	-2.67938900	0.60931600
H	-3.79081200	-2.49358500	-1.13255700
H	-4.63221000	-1.32458700	-0.13198800

**44**

C	-2.36177900	-0.95766400	-1.06162800
C	-3.10702900	-1.12198500	0.09949800
C	-2.84186500	-0.26509100	1.16220500
C	-1.86315000	0.71307000	1.07406900
C	-1.11066300	0.86664700	-0.08478100
C	-1.38037600	0.01909500	-1.15321500
C	-0.07833200	1.99147400	-0.19651500
O	0.26221300	2.52576100	1.05070800
C	1.16143200	1.59002400	-0.98284900
C	1.46481200	2.11603300	-2.15834500
C	2.06787700	0.59586500	-0.33085700
O	1.98218900	0.30231200	0.82564900
O	2.97834100	0.08374400	-1.13407100
C	3.90261600	-0.83558000	-0.57072800
C	-4.15309900	-2.20665700	0.21431900
H	-2.54487800	-1.59733400	-1.90831500
H	-3.40739200	-0.35810000	2.07402100
H	-1.68951900	1.36518900	1.90859800
H	-0.82819500	0.11303600	-2.07138000
H	-0.53883800	2.81117300	-0.73318200
H	0.76543500	1.87988400	1.53395500
H	2.34355600	1.82562700	-2.70155000
H	0.83406200	2.86202700	-2.60898700
H	4.54931100	-1.12846500	-1.38247000
H	3.38205700	-1.69400800	-0.17278200
H	4.47249600	-0.36138200	0.21488300
H	-3.74156200	-3.09536000	0.68527600
H	-4.52924500	-2.49568500	-0.76092700
H	-4.99547400	-1.87864700	0.81389900

**45**

C	-1.61121300	0.19904800	-0.01915400
C	-1.49555400	-0.72276000	1.00649900
C	-0.25362800	-0.92101500	1.61830200
C	0.84528400	-0.20942500	1.19916200
C	0.74610800	0.72741600	0.16444200
C	-0.48665200	0.91651100	-0.42641600
C	1.96156400	1.51859600	-0.28837600
O	2.59071100	2.17620400	0.77821400
C	3.01243800	0.64544200	-0.95493800
C	4.24548900	0.46371300	-0.51043300
C	2.59232200	0.00463400	-2.18537300
N	2.25089900	-0.47534100	-3.15793100
O	-2.50789000	-1.46882600	1.48366100
C	-3.78337500	-1.36849400	0.91171600
H	-2.54824700	0.37427800	-0.51073400
H	-0.18069000	-1.64146000	2.41193500
H	1.79493400	-0.37762800	1.67516400
H	-0.59457900	1.62690300	-1.22794700
H	1.63520100	2.24817700	-1.02541400
H	1.93969500	2.62724600	1.29850400
H	4.93862800	-0.16581400	-1.03696500
H	4.57892200	0.94802600	0.38599900
H	-4.40709900	-2.06760200	1.44746200
H	-3.76423800	-1.63654600	-0.13904600
H	-4.18733200	-0.36817900	1.02547200

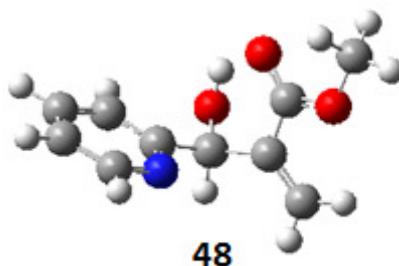


46

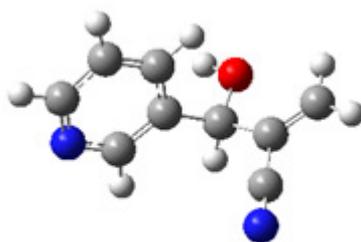
C	-2.04053800	-0.20024300	-1.46378200
C	-2.74863400	-0.69113700	-0.36873900
C	-2.37278100	-0.30453800	0.90684200
C	-1.29540200	0.56178100	1.07957900
C	-0.57597700	1.05031200	0.00422400
C	-0.97547200	0.65501600	-1.27461500
C	0.56618300	2.04767300	0.20973800
O	0.97172500	2.12192600	1.54662100
C	1.74915700	1.79416200	-0.71450100
C	2.09681800	2.63160200	-1.67808000
C	2.54946400	0.55984600	-0.44743300
O	2.45594000	-0.06577300	0.56807400
O	3.37794000	0.23044900	-1.41747700
C	4.20258900	-0.90762900	-1.21348900
O	-3.77161600	-1.52522900	-0.65002300
C	-4.53397700	-2.06835900	0.39047700
H	-2.33979400	-0.50191800	-2.45084500
H	-2.89667400	-0.65898100	1.77358500
H	-1.02637100	0.85834200	2.07525900
H	-0.44898500	1.01675100	-2.13988200
H	0.19370900	3.03723300	-0.02287000
H	1.42224600	1.31648900	1.77515700
H	2.93272600	2.44075600	-2.32342000
H	1.54761900	3.54181100	-1.84355800
H	4.79374900	-0.99999700	-2.11064700
H	3.59559100	-1.78884200	-1.06778900
H	4.83986600	-0.76044300	-0.35380800
H	-5.27762200	-2.69560200	-0.07774600
H	-5.03055700	-1.29164100	0.96265700
H	-3.92292400	-2.67201600	1.05339000

**47**

C	-1.43675200	-1.49776200	1.25291500
C	-2.68247800	-1.40874000	0.65649200
C	-2.90671400	-0.36511100	-0.22741200
C	-1.88636400	0.53584700	-0.47896000
C	-0.67041200	0.34843800	0.16313500
N	-0.45875600	-0.64198300	1.01027100
C	0.52276200	1.27556000	-0.06501400
O	1.34468600	1.30999100	1.05077000
C	1.31989500	0.86163000	-1.30416400
C	2.57952300	0.45842800	-1.27843200
C	0.63367300	0.97578500	-2.57539800
N	0.07334300	1.08975000	-3.55851000
H	-1.21700800	-2.28441800	1.95231100
H	-3.44745200	-2.12806900	0.88231000
H	-3.86074800	-0.25135300	-0.70995800
H	-2.02919500	1.35624800	-1.15709900
H	0.15352500	2.28110400	-0.23294300
H	1.21016300	0.50894000	1.54783700
H	3.09924500	0.19185100	-2.17992600
H	3.11266000	0.40096500	-0.35002600



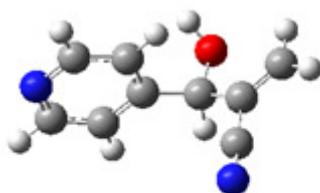
C	-2.30962600	-1.51615300	-0.72455200
C	-3.13846900	-1.68218200	0.37033400
C	-3.22723700	-0.63653800	1.27676300
C	-2.49081000	0.51262400	1.05425800
C	-1.68344800	0.57353600	-0.07751100
N	-1.60288800	-0.41977900	-0.94439500
C	-0.89358900	1.83965700	-0.40831900
O	-0.71248900	2.64800400	0.71977000
C	0.41687700	1.55262100	-1.11893800
C	0.65909400	1.93458000	-2.36046700
C	1.45277000	0.85001700	-0.30884700
O	1.34479700	0.69291400	0.87414200
O	2.49817800	0.43633000	-0.99338900
C	3.53546900	-0.21250400	-0.27407400
H	-2.20806100	-2.29792500	-1.45686500
H	-3.69094900	-2.59380000	0.50506100
H	-3.86020000	-0.71557800	2.14297500
H	-2.53511600	1.34336500	1.73026200
H	-1.50325800	2.42583900	-1.08431700
H	-0.09928800	2.21895000	1.30619700
H	1.59446900	1.72877800	-2.84413200
H	-0.08311000	2.46251700	-2.93209200
H	4.28136400	-0.46735700	-1.01008000
H	3.15837000	-1.10343100	0.20598900
H	3.95005600	0.45191100	0.47003000

**20**

N	-2.97741800	-0.59825900	-0.69320800
C	-3.00692200	-0.87000300	0.59526400
C	-1.96813700	-0.55910700	1.46604100
C	-0.84821700	0.06294800	0.95314900
C	-0.80098700	0.35446500	-0.40711800
C	-1.89799800	-0.00175000	-1.17491900
C	0.39164700	1.06058500	-1.02934000
O	0.65621300	2.28449600	-0.40089700
C	1.66461100	0.23429700	-0.95130800
C	2.76778300	0.59943300	-0.31818700
C	1.62836800	-1.02766000	-1.66252200
N	1.58635900	-2.00781900	-2.23691600
H	-3.89451300	-1.35623400	0.95942400
H	-2.04309100	-0.80331200	2.50960700
H	-0.02232300	0.32048600	1.59208900
H	-1.90810100	0.20128900	-2.23213400
H	0.17663300	1.22588100	-2.08209200
H	-0.13005300	2.81347900	-0.38605600
H	3.63671100	-0.03199800	-0.30937800
H	2.81753400	1.53928800	0.19509600

**19**

N	-2.53040200	-1.60624400	-0.73275200
C	-3.20900600	-1.63748400	0.39970100
C	-3.13356300	-0.63435500	1.35192500
C	-2.30654900	0.44887600	1.10734100
C	-1.57834400	0.49437000	-0.07360100
C	-1.74234700	-0.56866300	-0.95538600
C	-0.69432400	1.69573400	-0.41367400
O	-0.45121000	2.49596600	0.70705500
C	0.59882900	1.30680300	-1.11533400
C	0.85080900	1.62143900	-2.37550100
C	1.61063700	0.58481600	-0.28514200
O	1.52699700	0.50419800	0.90618900
O	2.60343100	0.06195100	-0.97212100
C	3.62257100	-0.60892600	-0.24341000
H	-3.83986700	-2.49488700	0.55440800
H	-3.70740400	-0.70033600	2.25819200
H	-2.22860200	1.24908800	1.81830400
H	-1.21016800	-0.58677900	-1.88964100
H	-1.24517000	2.33054900	-1.09569200
H	0.14437100	2.03706300	1.28931900
H	1.76712600	1.34078200	-2.85814100
H	0.13822800	2.17545000	-2.96082600
H	4.32528700	-0.95545900	-0.98408300
H	3.20533600	-1.44224700	0.30199800
H	4.10173400	0.07219300	0.44436800



49

C	-1.62927600	-1.86905400	0.02338000
N	-2.87014200	-1.43682100	0.16135900
C	-3.06253800	-0.13132400	0.19635000
C	-2.03626900	0.79771800	0.10330200
C	-0.73423300	0.34444400	-0.03811800
C	-0.53165000	-1.02929900	-0.08306700
C	0.42676700	1.32851200	-0.07889300
O	1.06716500	1.41445800	1.16378800
C	1.43441200	1.01464400	-1.17824600
C	2.72664200	0.81185500	-0.97888200
C	0.90701000	1.00863600	-2.52857200
N	0.47380000	1.01913700	-3.57959300
H	-1.49845400	-2.93589000	-0.01068100
H	-4.08080200	0.19724500	0.30373300
H	-2.25827900	1.84874900	0.14071200
H	0.44992000	-1.44827300	-0.21400800
H	0.02675700	2.31428700	-0.28150800
H	0.94356200	0.61867900	1.66317700
H	3.39443800	0.62113200	-1.79827200
H	3.13737400	0.84836400	0.01114300

**50**

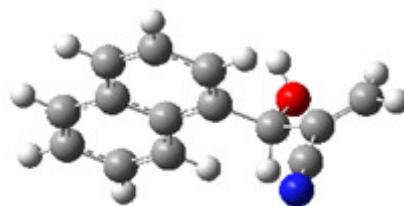
C	-2.62361800	-1.49562700	-0.64428700
N	-3.27030700	-1.61735100	0.50141900
C	-3.10025800	-0.65701600	1.39221900
C	-2.29039000	0.45098100	1.19237200
C	-1.60566500	0.57384900	-0.00788400
C	-1.78871200	-0.43288300	-0.94919600
C	-0.74601200	1.80413000	-0.30154700
O	-0.47704400	2.54798500	0.84904600
C	0.52583700	1.47355100	-1.06820000
C	0.73372300	1.86791900	-2.31379800
C	1.56983000	0.71555300	-0.31378500
O	1.51417100	0.55179200	0.87025300
O	2.55459100	0.25937900	-1.05757700
C	3.60342700	-0.43825400	-0.39885600
H	-2.77379700	-2.28424600	-1.36064500
H	-3.63621900	-0.76942900	2.31825300
H	-2.20336100	1.19921800	1.95544900
H	-1.29615300	-0.40570600	-1.90361300
H	-1.33565700	2.45892800	-0.93051300
H	0.12900600	2.06142300	1.39698400
H	1.63837900	1.63071400	-2.83989600
H	-0.00306800	2.44726100	-2.84180400
H	4.29414300	-0.72087200	-1.17699800
H	3.21478800	-1.31374300	0.09956400
H	4.08656500	0.20534200	0.32143900

**51**

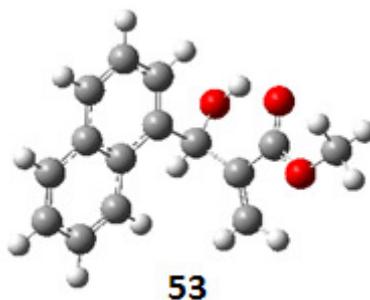
C	-0.91659700	-0.58475500	-0.33587300
C	-1.98512400	-0.12139100	0.45543000
C	-1.71679600	0.83805300	1.47034400
C	-0.45657900	1.29987400	1.67512300
C	0.63022000	0.83662000	0.88084400
C	0.39260900	-0.08284100	-0.09524600
C	2.02534400	1.34118400	1.21688400
O	2.58201900	0.61693600	2.28202200
C	2.98206000	1.36719100	0.03211100
C	4.13787400	0.72466300	-0.01803900
C	2.59835900	2.22473900	-1.07272000
N	2.29193400	2.90861800	-1.92776500
C	-1.17571500	-1.53770600	-1.35681200
C	-2.43772400	-2.00137900	-1.56864400
C	-3.51237300	-1.53601000	-0.77123200
C	-3.29200500	-0.62092700	0.21210100
H	-2.53008300	1.19929900	2.07509200
H	-0.26861400	2.02528400	2.44713200
H	1.19515000	-0.44265700	-0.71479200
H	1.93898500	2.36217600	1.57010300
H	2.23440600	-0.26467600	2.29280700
H	4.78716500	0.80808200	-0.86976700
H	4.45881000	0.11573000	0.80434500
H	-0.35906300	-1.88646600	-1.96453600
H	-2.62647000	-2.72157500	-2.34447500
H	-4.50486100	-1.90930000	-0.95003500
H	-4.10753000	-0.26427000	0.81669500

**28**

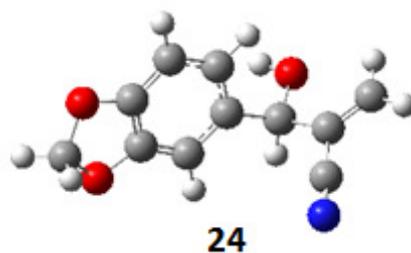
C	-2.18379300	-0.12904400	-0.59292600
C	-2.83723800	-0.46574000	0.60737600
C	-2.28908000	0.00566100	1.83066000
C	-1.15908600	0.76016800	1.84872700
C	-0.48773800	1.10114000	0.64028000
C	-1.00387100	0.66412300	-0.54240100
C	0.74031700	2.01153000	0.71882700
O	1.40257300	1.89287100	1.94678900
C	1.70273000	1.84220800	-0.44622000
C	1.89068700	2.78076100	-1.35959800
C	2.48354500	0.56743500	-0.48265300
O	2.52973400	-0.19150500	0.44071300
O	3.12638400	0.35884600	-1.61376800
C	3.92404700	-0.81309800	-1.70455500
C	-2.72355900	-0.59228300	-1.82312700
C	-3.85392700	-1.35053700	-1.84540500
C	-4.51033000	-1.68995800	-0.63628200
C	-4.01445700	-1.25888800	0.55587900
H	-2.78373800	-0.24392700	2.75346200
H	-0.75722600	1.10779800	2.78099100
H	-0.52691300	0.91385200	-1.47348800
H	0.38960800	3.03551100	0.69382300
H	1.80852400	1.03444900	1.99568000
H	2.57766300	2.65217100	-2.17387600
H	1.35609400	3.71309500	-1.31168100
H	4.35519100	-0.79255000	-2.69275000
H	3.31217900	-1.69365500	-1.57639500
H	4.69956500	-0.79827100	-0.95286500
H	-2.22456700	-0.33446900	-2.74134400
H	-4.25511900	-1.69631800	-2.78152300
H	-5.40232600	-2.29001500	-0.66720000
H	-4.51046900	-1.51495800	1.47605300

**52**

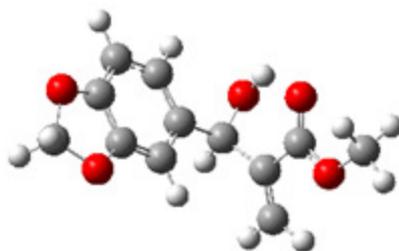
C	-2.08384700	-0.75767600	0.47678100
C	-1.74038400	-1.85229700	1.31710900
C	-0.44691800	-2.08837500	1.64736700
C	0.57802300	-1.24960900	1.14281600
C	0.30022800	-0.19496800	0.32567500
C	-1.06723900	0.08845300	-0.01776400
C	1.40301400	0.71634800	-0.20045100
O	1.40612500	1.95205200	0.46460700
C	2.79644900	0.10043500	-0.17800900
C	3.82782300	0.59423500	0.48778700
C	2.99316900	-1.05830600	-1.02779600
N	3.13900800	-1.96015200	-1.70461500
C	-1.45194500	1.19035600	-0.83276000
C	-2.75940000	1.41080300	-1.14492300
C	-3.77123500	0.55074800	-0.65987500
C	-3.43781300	-0.50277400	0.13300600
H	-2.52460300	-2.48932900	1.68692200
H	-0.18484300	-2.91491500	2.28275100
H	1.59366200	-1.47286700	1.41148300
H	1.19877100	0.94014500	-1.23980200
H	1.06757200	1.84940900	1.34379200
H	4.79933900	0.13944400	0.43035200
H	3.71774200	1.47487200	1.08974200
H	-0.70879900	1.87394800	-1.19417500
H	-3.02674600	2.24989800	-1.76204900
H	-4.79887900	0.73631400	-0.91607600
H	-4.19947300	-1.16099500	0.51300400



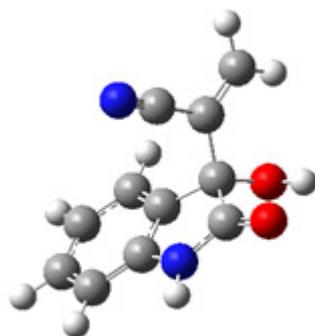
C	-3.05472200	-0.81428100	-0.30029400
C	-2.99887800	-1.94824700	0.55251900
C	-2.00872600	-2.06193500	1.47224700
C	-1.01610200	-1.05842500	1.57854500
C	-1.01342900	0.03960800	0.77151900
C	-2.06601400	0.19176700	-0.19598900
C	0.09043500	1.09555700	0.91431200
O	0.69406900	1.07878600	2.17603000
C	1.14087200	0.99757800	-0.19082200
C	1.36591800	1.96297000	-1.06653000
C	2.00769800	-0.22068700	-0.18534100
O	2.16862900	-0.89543300	0.79072000
O	2.60180800	-0.46890200	-1.33270100
C	3.48754000	-1.57840600	-1.38436500
C	-2.18707600	1.32169000	-1.05501100
C	-3.20669300	1.43057800	-1.95108800
C	-4.18232000	0.41310700	-2.05770900
C	-4.10346200	-0.67687100	-1.24916100
H	-3.75732700	-2.70629200	0.46304400
H	-1.96655300	-2.91272900	2.12865600
H	-0.25432600	-1.17822400	2.32253500
H	-0.36183400	2.07347600	0.83992100
H	1.30879100	0.35662200	2.22375200
H	2.11689100	1.87314500	-1.82778700
H	0.80690800	2.88122700	-1.04180700
H	3.86069100	-1.60199600	-2.39572500
H	2.95757700	-2.49094900	-1.15534200
H	4.29889000	-1.44434200	-0.68393200
H	-1.46812600	2.11336800	-1.00319200
H	-3.27248200	2.29863800	-2.58285800
H	-4.98141900	0.50850900	-2.77095000
H	-4.84293200	-1.45610300	-1.31349600



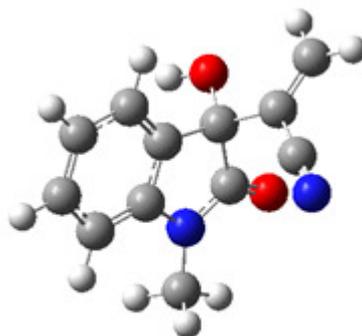
C	-2.13477400	0.16054400	-0.38221100
C	-2.08177300	-0.43110200	0.86278300
C	-0.92755000	-0.46207600	1.59883800
C	0.20212000	0.12909700	1.02616600
C	0.15680000	0.72640400	-0.22500800
C	-1.04050000	0.75102700	-0.95363700
C	1.40874600	1.36139500	-0.81769200
O	2.02990000	2.24161700	0.07674500
C	2.44876100	0.32888100	-1.22209100
C	3.67171600	0.24691800	-0.72365800
C	2.03201800	-0.59788000	-2.25547500
N	1.69248400	-1.30578500	-3.07785600
O	-3.40170600	0.07063700	-0.86079200
C	-4.07314900	-0.82434700	-0.00426600
O	-3.31272000	-0.90354300	1.18055600
H	-0.89231300	-0.92117800	2.56902300
H	1.12954500	0.11572000	1.56910000
H	-1.10242100	1.20699000	-1.92482100
H	1.12119100	1.89855000	-1.71804300
H	1.38435300	2.83196500	0.44115500
H	4.35880800	-0.50698700	-1.06045900
H	4.00291400	0.93746800	0.02645600
H	-4.12234400	-1.80200300	-0.46823900
H	-5.05460800	-0.44311200	0.22062100

**54**

C	-2.28267300	-0.38138400	-0.49419100
C	-2.77029600	-0.68218600	0.76196000
C	-2.23732900	-0.12038400	1.88624600
C	-1.17188300	0.77371700	1.70887600
C	-0.66975500	1.07449300	0.45442600
C	-1.24329400	0.48396200	-0.68634400
C	0.45480300	2.10358200	0.29982900
O	1.08271200	2.39267800	1.51451000
C	1.46894200	1.72220900	-0.76983200
C	1.61539300	2.40634000	-1.89281200
C	2.34858200	0.55264400	-0.46407700
O	2.44237800	0.08373400	0.63253400
O	3.02154500	0.09500100	-1.49961300
C	3.91031100	-0.98982300	-1.27353800
O	-2.97673300	-1.09588000	-1.41957900
C	-4.07707400	-1.64617600	-0.73303500
O	-3.77504300	-1.59077400	0.64057200
H	-2.61406900	-0.35348000	2.86475500
H	-0.74097500	1.24318100	2.57118800
H	-0.88375800	0.69254500	-1.67638400
H	0.00625100	3.03816500	-0.01224500
H	1.59127600	1.63599600	1.78454400
H	2.33640700	2.12866700	-2.63752900
H	1.01184900	3.27387300	-2.09434400
H	4.35190600	-1.20548200	-2.23335600
H	3.36784900	-1.84775300	-0.90498200
H	4.67181400	-0.70882900	-0.56086800
H	-4.21486000	-2.67134400	-1.03300200
H	-4.96167800	-1.05279300	-0.93411400

**56a**

C	0.18532500	-0.58324700	-0.33898900
C	-0.07754400	-0.33951900	1.00068700
C	0.93018300	0.04861100	1.88018800
C	2.20239100	0.17913800	1.36760800
C	2.48121900	-0.05840600	0.02808400
C	1.47876400	-0.43649300	-0.83543000
N	3.37910100	0.54072500	2.03722300
C	4.45762900	0.50279700	1.21931400
C	3.95570900	0.18577000	-0.21487800
O	5.60619400	0.63128100	1.51568400
O	4.60172900	-0.96084600	-0.66731900
C	4.20824600	1.36090900	-1.15741500
C	4.84342000	1.25501200	-2.31294500
C	3.68773400	2.64890800	-0.74436600
N	3.27715800	3.65176500	-0.40165900
H	-0.61081700	-0.88238200	-0.99572100
H	-1.08046500	-0.45002100	1.37235000
H	0.71741700	0.23847000	2.91674000
H	1.68979800	-0.61963200	-1.87378100
H	3.46490800	0.67598600	3.02057400
H	5.52235800	-0.91269400	-0.42911400
H	4.98333800	2.10877300	-2.94925200
H	5.22706100	0.31048800	-2.64572800

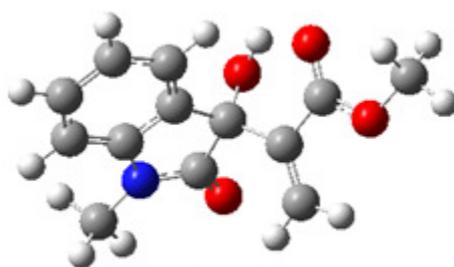
**56b**

C	0.03829100	-0.08601300	-0.07060700
C	0.00908900	-0.03832100	1.31402200
C	1.18030800	0.01652400	2.06794200
C	2.37933500	0.02317400	1.38453000
C	2.42173000	-0.02086900	-0.00470900
C	1.26059900	-0.07352800	-0.74111200
N	3.67438300	0.06090400	1.91092200
C	4.61302300	0.02950000	0.92211800
C	3.86971600	-0.00481000	-0.44916900
O	5.79469300	0.01334700	1.06746200
O	4.24858400	-1.12545900	-1.18708600
C	4.24180800	1.21923900	-1.27081700
C	4.83881300	1.16751400	-2.44978400
C	3.99224600	0.11950700	3.31986800
C	3.92146900	2.50416800	-0.68340200
N	3.66806000	3.50462700	-0.20692700
H	-0.88020700	-0.12566800	-0.62685500
H	-0.93784400	-0.04200000	1.82367400
H	1.13983800	0.05553000	3.14055500
H	1.29526700	-0.10158000	-1.81594300
H	3.91265300	-1.91441900	-0.78234200
H	5.08125000	2.06683600	-2.98456000
H	5.09739000	0.22679000	-2.89269900
H	5.06592800	0.14468100	3.41975000
H	3.57101200	1.01349400	3.76492400
H	3.60563700	-0.75291600	3.83521700

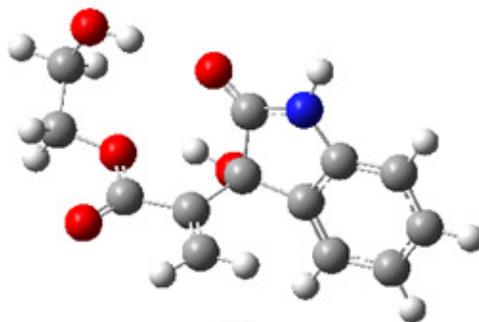


57a

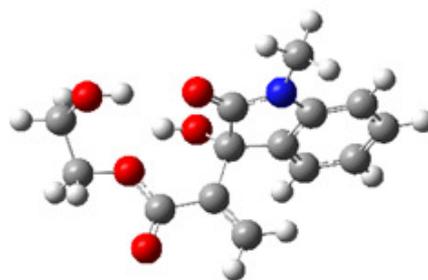
C	-1.98657000	-2.62946000	0.03677200
C	-3.17464700	-2.09359200	-0.43186700
C	-3.32909400	-0.71872200	-0.58942900
C	-2.25777000	0.08464500	-0.26352700
C	-1.05171500	-0.43245200	0.19786300
C	-0.91472600	-1.79573300	0.35609300
N	-2.17941800	1.47640500	-0.32547300
C	-0.98670700	1.95113000	0.12787700
C	-0.09610300	0.72748700	0.48114600
O	-0.68751800	3.09820900	0.23004600
O	0.20301100	0.88002900	1.83665600
C	1.16744400	0.69982800	-0.38207700
C	1.38104800	1.47389300	-1.43536300
C	2.21217100	-0.27974800	0.04452000
O	2.09958700	-0.97422800	1.01559300
O	3.27298800	-0.31499000	-0.73137700
C	4.32332000	-1.20097700	-0.36955400
H	-1.88892600	-3.69287200	0.15925600
H	-3.99475700	-2.74538700	-0.67519300
H	-4.25428600	-0.30251800	-0.94647000
H	0.00004100	-2.21644600	0.72755100
H	-2.94117900	2.08728000	-0.52169200
H	0.73123100	0.14202600	2.11887000
H	2.28670100	1.39067500	-2.00340000
H	0.67538300	2.21621600	-1.75336400
H	5.08496200	-1.06487500	-1.12044800
H	4.70592200	-0.94880300	0.60825300
H	3.96996100	-2.22148100	-0.36972300

**57b**

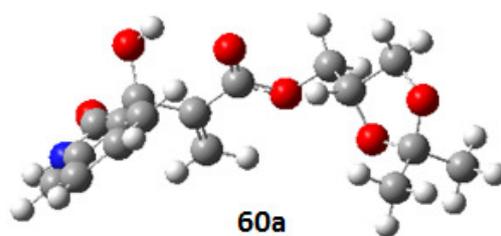
C	-7.23197800	-0.51439600	-0.90429300
C	-6.98336400	-0.22983100	-2.23482100
C	-5.77821000	0.34584700	-2.63507000
C	-4.84332600	0.61829900	-1.65844000
C	-5.07128000	0.32793800	-0.31573300
C	-6.26938300	-0.23294500	0.06746500
N	-3.58507100	1.20258700	-1.82357100
C	-2.94429900	1.34730500	-0.63087700
C	-3.85227400	0.77140100	0.48751400
O	-1.86811500	1.83607700	-0.47294400
O	-4.11062800	1.85563200	1.33058500
C	-3.15917000	-0.37352500	1.22960500
C	-2.03594500	-0.95758300	0.84050500
C	-3.83100900	-0.82096500	2.48722800
O	-4.82527700	-0.30651500	2.91701800
O	-3.23799600	-1.82718700	3.09165100
C	-3.80381600	-2.28737200	4.31090800
C	-3.06535800	1.69795100	-3.07640400
H	-8.17047700	-0.95071300	-0.61389000
H	-7.73048300	-0.45003400	-2.97651700
H	-5.59603200	0.57220900	-3.66939200
H	-6.47088000	-0.44679600	1.09969500
H	-4.69278000	1.57078600	2.02568000
H	-1.61338700	-1.76598700	1.40419200
H	-1.50019500	-0.64259100	-0.03328700
H	-3.16732400	-3.09466600	4.63604100
H	-3.81269600	-1.49364500	5.04305700
H	-4.81065700	-2.64203200	4.14708300
H	-2.08972300	2.11937100	-2.89224800
H	-2.97746000	0.89235400	-3.79694800
H	-3.71517000	2.46620300	-3.48138700

**59a**

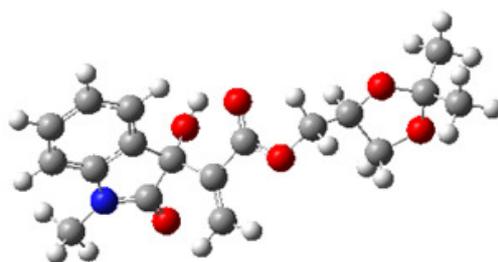
C	0.02170600	-0.04823000	0.02510700
C	0.04432600	-0.03291800	1.41198400
C	1.24555500	-0.00794000	2.11608800
C	2.41143000	0.00636000	1.38016900
C	2.40643800	0.01295600	-0.00653000
C	1.21490400	-0.02713200	-0.69462700
N	3.73290700	-0.00299200	1.84097200
C	4.62330100	-0.11351500	0.82225500
C	3.83289200	0.01804700	-0.51545500
O	5.79981800	-0.29256300	0.94448500
O	4.02998500	-1.11432200	-1.30469900
C	4.22699500	1.31978500	-1.22996700
C	3.49309000	2.42268700	-1.19888100
C	5.52841400	1.42284700	-1.98362500
O	5.87794800	2.40354100	-2.55888500
O	6.24804100	0.31462800	-1.93903600
C	7.58236900	0.31963800	-2.45925700
C	8.33344100	-0.77792700	-1.73597000
O	8.48993500	-0.50493600	-0.38082600
H	-0.91804200	-0.08089800	-0.49520700
H	-0.88184200	-0.04829600	1.95816400
H	1.25745300	-0.00998900	3.19127000
H	1.20604600	-0.04629300	-1.76947300
H	4.00884100	-0.14041600	2.78857900
H	4.93819100	-1.14575000	-1.58108700
H	3.83599100	3.30716200	-1.70080900
H	2.55545000	2.47495100	-0.68133900
H	8.02785600	1.28388600	-2.27361300
H	7.53550500	0.14146400	-3.52639000
H	9.32688300	-0.85245900	-2.16168100
H	7.83451200	-1.73260300	-1.89292200
H	7.64418500	-0.47656400	0.05651500

**59b**

C	-7.32883200	1.01865100	-2.25660900
C	-6.49079200	1.45738900	-3.26869100
C	-5.10523200	1.46268900	-3.11259500
C	-4.59808600	1.00645500	-1.91340900
C	-5.42549700	0.54243800	-0.90001600
C	-6.79126500	0.55692000	-1.05487300
N	-3.25871000	0.95400600	-1.50469500
C	-3.16173900	0.54202300	-0.21600500
C	-4.57719600	0.12619800	0.27963000
O	-2.15259500	0.51359500	0.43176200
O	-4.94448000	0.89063600	1.38709900
C	-4.60785500	-1.38423400	0.56000900
C	-5.12167200	-2.27296700	-0.27800500
C	-3.99507200	-1.95192500	1.81526600
O	-3.98118900	-3.11382600	2.07029500
O	-3.47112100	-1.03167300	2.60687400
C	-2.70064500	-1.43512300	3.74449700
C	-1.72614900	-0.31183100	4.02835100
O	-0.78841200	-0.15876400	3.01208700
C	-2.14173200	1.44838800	-2.27836200
H	-8.39435200	1.03770800	-2.39563900
H	-6.91333300	1.81049900	-4.19241300
H	-4.46650600	1.82100100	-3.89851400
H	-7.43404900	0.22083500	-0.26130300
H	-4.37840400	0.67001800	2.11714000
H	-5.09071200	-3.31773400	-0.03449900
H	-5.57250500	-1.99119900	-1.20917200
H	-2.18183600	-2.35094800	3.51081400
H	-3.37639500	-1.60274200	4.57401200
H	-1.17900200	-0.55135300	4.93227000
H	-2.27083900	0.61351300	4.20745100
H	-1.21370800	0.09368900	2.19775600
H	-1.24134800	1.29760400	-1.70416300
H	-2.06479100	0.90723500	-3.21398800
H	-2.25956600	2.50630600	-2.48652400



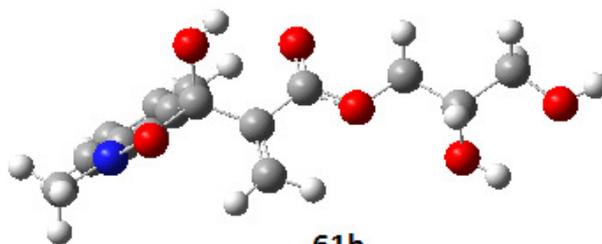
C	-4.46014800	-0.46703200	-3.74372100
C	-4.70137800	0.56092700	-4.64008800
C	-5.31657500	1.74102700	-4.23042900
C	-5.67399000	1.84646600	-2.90356200
C	-5.43187900	0.83128200	-1.98401900
C	-4.82750300	-0.33478200	-2.40457000
N	-6.30514600	2.91599200	-2.26748800
C	-6.55838600	2.66455600	-0.95367200
C	-5.97065000	1.26484500	-0.62041900
O	-7.12694600	3.39097500	-0.20235300
O	-7.06661400	0.51008200	-0.19481800
C	-4.89342000	1.36478800	0.46165300
C	-4.33496200	2.49451700	0.86940400
C	-4.47424300	0.06782600	1.07174100
O	-4.92014600	-0.99152300	0.72612500
O	-3.57843400	0.18697900	2.02760200
C	-3.12522000	-0.98340000	2.69622200
C	-1.99586700	-1.65827300	1.94936800
C	-1.51287400	-2.95072700	2.59531000
O	-0.16723600	-2.99497700	2.21426400
C	0.30279500	-1.68716500	1.97469300
O	-0.84070900	-0.86263500	1.99588700
C	0.96100200	-1.65266700	0.60631200
C	1.23643900	-1.24588700	3.08799800
H	-3.99044100	-1.37335900	-4.08039300
H	-4.41389900	0.44894000	-5.67033500
H	-5.50938300	2.53630200	-4.92830000
H	-4.64602700	-1.13789000	-1.71615000
H	-6.67372500	3.72097800	-2.72366900
H	-6.77601900	-0.37617900	-0.01292100
H	-3.57017900	2.48974700	1.62093500
H	-4.62543900	3.45011100	0.47816700
H	-2.77661300	-0.63589200	3.65661100
H	-3.95344300	-1.66464000	2.82822300
H	-2.28681200	-1.83502300	0.91934100
H	-2.01276300	-3.83531300	2.22676500
H	-1.60442300	-2.91613000	3.67899600
H	0.24709900	-1.93710900	-0.15793100
H	1.79408900	-2.34580500	0.57380800
H	1.32478000	-0.65456600	0.38959000
H	1.53700300	-0.21472700	2.94021100
H	0.73650400	-1.32606700	4.04632100
H	2.12189600	-1.87134100	3.10433200

**60b**

C	-4.35463900	4.27272700	-1.89956300
C	-5.43533300	4.45579700	-2.74322500
C	-6.08188600	3.36969000	-3.33179400
C	-5.60741200	2.10786900	-3.04100200
C	-4.52700000	1.90398400	-2.18643600
C	-3.89290200	2.98562800	-1.61655200
N	-6.08666800	0.88616200	-3.52072300
C	-5.35826500	-0.15730700	-3.03738200
C	-4.25324300	0.40586000	-2.10511600
O	-5.53590700	-1.30904200	-3.29016600
O	-3.05291300	0.03047000	-2.71624000
C	-4.37296900	-0.16845300	-0.69205300
C	-5.42352800	-0.83236100	-0.23404500
C	-3.19280900	0.06151300	0.19495600
O	-2.22735400	0.68144900	-0.14991700
O	-3.30367800	-0.48163900	1.39153700
C	-2.24575900	-0.31350600	2.33399800
C	-1.21343600	-1.41258000	2.17255500
C	-1.70620000	-2.83140400	2.42620700
O	-0.55591100	-3.45937400	2.92286300
C	0.25944600	-2.50880300	3.56373200
O	-0.25685100	-1.24896900	3.18585100
C	1.68144500	-2.66940000	3.05694800
C	0.15298200	-2.64079800	5.07340500
C	-7.15206700	0.74039700	-4.48472600
H	-3.86478300	5.12293200	-1.46072000
H	-5.78428000	5.45075300	-2.95538900
H	-6.91581000	3.52062900	-3.99210900
H	-3.04887100	2.84911700	-0.96779500
H	-2.32935200	0.40462500	-2.22710800
H	-5.44950900	-1.19441100	0.77488500
H	-6.27742800	-1.04437400	-0.84722500
H	-1.79280400	0.65723200	2.21395700
H	-2.71556300	-0.37880200	3.30379400
H	-0.74323100	-1.33911800	1.19712700
H	-2.03089800	-3.35211400	1.53748700
H	-2.50538300	-2.85092000	3.16335900
H	1.71050900	-2.52744000	1.98309400
H	2.04919200	-3.66377700	3.28371800
H	2.33195300	-1.93853700	3.52407400
H	0.53665300	-3.60322500	5.39273000
H	0.72105200	-1.85646100	5.56094700
H	-0.88267500	-2.56011400	5.38318700
H	-8.07735000	1.14923400	-4.09410700
H	-7.28331500	-0.31150500	-4.68384300
H	-6.90158000	1.24997800	-5.40877100

**61a**

C	-5.58400300	3.08549100	-2.77378100
C	-5.82760600	2.17999100	-3.79576000
C	-5.63002600	0.81344300	-3.61424600
C	-5.19153400	0.39510100	-2.37595900
C	-4.96772200	1.28419500	-1.33486200
C	-5.14425500	2.63532400	-1.53026300
N	-4.88196600	-0.90308500	-1.95507500
C	-4.38087700	-0.92348900	-0.69466600
C	-4.47090500	0.52458500	-0.12322000
O	-3.95807700	-1.88470500	-0.12008300
O	-3.20381800	1.00056500	0.21002100
C	-5.44502800	0.50287400	1.06103000
C	-6.66524700	1.01628000	1.02263300
C	-5.07170000	-0.20298400	2.34040100
O	-5.87490200	-0.64160900	3.09764300
O	-3.76191500	-0.25562800	2.55552100
C	-3.27106200	-1.02154200	3.66307400
C	-3.00319400	-2.44891100	3.21317100
C	-1.81575100	-2.55622500	2.26771200
O	-1.71318800	-3.86278600	1.75749800
O	-2.77268700	-3.18764600	4.38285400
H	-5.72883400	4.13678200	-2.94325700
H	-6.16663400	2.53699300	-4.75175500
H	-5.80353100	0.11779300	-4.41559700
H	-4.94095500	3.33209400	-0.73713400
H	-4.87978400	-1.71219300	-2.53637000
H	-2.91724100	0.59613500	1.02031100
H	-7.31516600	0.92248200	1.87184100
H	-7.04525800	1.52959100	0.16146500
H	-2.36437200	-0.52501100	3.97807300
H	-3.98938700	-1.00806400	4.46473000
H	-3.89092700	-2.81902500	2.70842600
H	-1.89652100	-1.84054700	1.46141700
H	-0.90299400	-2.36610700	2.81964600
H	-2.30985200	-3.95706600	1.02593200
H	-2.50746800	-4.06764700	4.14594700



C	-3.75743800	1.47211300	1.89180100
C	-4.56547400	0.37668400	2.13703500
C	-4.01899000	-0.88848200	2.34938200
C	-2.64588200	-1.00842900	2.30380700
C	-1.81750000	0.08167600	2.05010800
C	-2.36918200	1.32696400	1.84771500
N	-1.88459500	-2.16432400	2.49524200
C	-0.55157800	-1.90294400	2.39942300
C	-0.36878700	-0.39287000	2.09423500
O	0.32614800	-2.69901700	2.53255500
O	0.33915900	0.10505600	3.19286700
C	0.39114600	-0.17818100	0.78454000
C	0.59944400	-1.11284700	-0.13017600
C	0.90631400	1.20577000	0.56052100
O	0.69082900	2.11598000	1.31200300
O	1.62501800	1.34292900	-0.53083800
C	2.13011400	2.63446600	-0.83457100
C	2.90085100	2.53181600	-2.13273200
C	3.68165600	3.80956800	-2.40277900
C	-2.42365600	-3.45671000	2.84693500
O	1.98410300	2.29138900	-3.16080200
O	4.31002600	3.63469700	-3.64831700
H	-4.19713700	2.44049800	1.73566200
H	-5.63372800	0.49772700	2.16864900
H	-4.65308300	-1.73326500	2.54578400
H	-1.74511100	2.18049900	1.66339200
H	0.43815500	1.04476000	3.09172100
H	1.12058100	-0.88603300	-1.03959600
H	0.26673500	-2.12422600	0.00056600
H	2.76986200	2.96078000	-0.02539900
H	1.30596500	3.32627000	-0.93425500
H	3.60649100	1.70787000	-2.06086600
H	4.41911400	3.97255100	-1.62179600
H	3.00491000	4.65929200	-2.43300200
H	-1.60101700	-4.14628500	2.95263500
H	-3.09301400	-3.81377800	2.07201200
H	-2.96548000	-3.40107800	3.78492900
H	2.44273000	2.30764200	-3.99158400
H	4.72940000	4.43417700	-3.93310300

ANEXO II: TRABALHOS DECORRENTES DA TESE



J. Braz. Chem. Soc., Vol. 22, No. 11, 2220-2224, 2011.
Printed in Brazil - ©2011 Sociedade Brasileira de Química
0103 - 5053 \$6.00+0.00

Short Report**Microwave Irradiation or Low Temperature Improved Synthesis of Antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts**

*Claudio G. L. Junior, Fábio P. L. Silva, Ramon G. de Oliveira, Fernanda L. Subrinho, Natália G. de Andrade and Mário L. A. A. Vasconcellos**

*Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I,
João Pessoa-PB 58059-900, Brazil*

Relatamos a síntese de 24 adutos de Morita-Baylis-Hillman (3a-3l/6a-6l) usando irradiação de microondas a 80 °C ou protocolo convencional a 0 °C para promover reações entre aldeídos aromáticos e acrilato de metila ou acrilonitrila (81-99%). Provamos que a reação de formação do acrilato de 2-hidroxi(4-bromofenil)metila é reversível a 120 °C.

It is reported the synthesis of 24 Morita-Baylis-Hillman adducts (3a-3l/6a-6l) using microwave irradiation at 80 °C or conventional protocol at 0 °C to promote the reactions between aromatic aldehydes and methyl acrylate or acrylonitrile (81-99%). It is shown that the reaction of 2-hydroxy(4-bromophenyl)methyl acrylate formation is reversible at 120 °C.

Keywords: microwave-promoted reactions, Morita-Baylis-Hillman reaction, thermodynamic control, temperature effect, antiparasitic compounds

Introduction

The Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR, Scheme 1) is one of the most powerful and versatile carbon-carbon bond forming methods in organic synthesis.^{1,2} An inconvenience associated with this reaction is the long reaction times, that last up to 65 days.² Due to the synthetic utility of these Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA), several protocols have been described to improve the reaction time and yields, such as the ultrasound use,³ high pressures,⁴ ionic liquids use⁵ and several experimental protocol variations.²

Microwave heating is an ecofriendly approach and a valuable tool for synthetic chemists because it is possible to enhance the reaction rate and, in many cases, to improve product yields.⁶ There is an enormous growth of interest in this promising technique for promoting reactions.⁷ Nevertheless, considering its significance, a reduced number of reports about the use of microwave irradiation promoting MBHR has been published.⁸

Despite the fact that MBHR has already more than 40 years of existence,¹ the general mechanism of the reaction is still highlighted in discussions on the scientific community. The first catalytic cycle suggested by Hill and Isaacs⁹ is

even accepted, but being the rate-determining step (RDS) remains at the center of the debate. Differently as proposed by Hill and Isaacs, McQuade and co-workers¹⁰ (nonprotic condition), Aggarwal (protic condition),¹¹ supported by Amarante *et al.*¹² (through electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) experiments), consider the last step of this catalytic cycle as the RDS. However, these ways of thinking about this mechanism were recently expanded by Cantillo and Kappe¹³ in their unified mechanistic point of view. They proposed that the RDS can be changed, depending on the reagents, additives and experimental protocols of the reactions.¹³

In connection with our efforts towards the MBHR reactivity study,¹⁴ and aiming to expand the MBHA synthesis in one easily prepared step as an effective class of antiparasitic compounds,¹⁵ the present work show results about microwave irradiation promoting MBHR, the limitations found and, in some cases, the importance to carried out reactions at lower temperature.¹³

Results and Discussion

Initially, Table 1 is presented with the reactions between some aromatics aldehydes (1) and acrylonitrile (2) in the preparation of 3a-3l MBHA^{5,8,14-17} (Scheme 1).

*e-mail: mlaav@quimica.ufpb.br



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Review

Morita–Baylis–Hillman adducts: Biological activities and potentialities to the discovery of new cheaper drugs

Claudio G. Lima–Junior, Mário L.A.A. Vasconcellos*

Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa PB 58059-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 January 2012
 Revised 3 April 2012
 Accepted 27 April 2012
 Available online 9 May 2012

Keywords:

Morita–Baylis–Hillman adducts
 Biological activities
 Negligenced disease
 Antibiotics
 Cancer
 Herbicides

ABSTRACT

This review aims to present by the first time the Morita–Baylis–Hillman adducts (MBHA) as a new class of bioactive compounds and highlight its potentialities to the discovery of new cheaper and efficient drugs. Now, most these compounds can be prepared fast and on a single synthetic step (one-pot reaction) in high yields and using ecofriendly synthetic protocols. We highlight here the aromatic MBHA, which have shown diverse biological activities as anti-*Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* (parasites that cause cutaneous and visceral leishmaniasis), anti-*Trypanosoma cruzi* (parasite that cause Chagas disease), anti-*Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* (parasites that cause malaria), lethal against *Biomphalaria glabrata* (the snail transmitter of schistosomiasis), antibacterial, antifungal, herbicide and actives against some human tumor cell lines. Understanding of the biological mechanisms of action of this new class of molecules is still in the infancy stage. However, we report here which has been described to date on the possibilities of biological mechanisms of action, and we present new analyzes based on literature in this area. The academic and industrial interest in selecting green and cheaper experiments to the drugs development has been the prime mover of the growth on the subject.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	3954
2. Mechanistic aspects	3955
3. The growth and the present status	3957
4. The Morita–Baylis–Hillman adducts	3958
4.1. The use of MBHA as starting material on the chemical synthesis	3958
4.2. Biological evaluations of simples MBHA	3958
4.3. Synthetics potentialities of the MBHA to the discovery of new 'one-pot' drugs	3966
5. Conclusion	3970
References and notes	3970

1. Introduction

The Morita–Baylis–Hillman reaction (MBHR) is a relatively recent form to the C–C bond formation.^{1,2} This reaction occurs between an sp² electrophilic carbon (e.g., aldehydes, ketones or imines) and the α position of an alkene (or alkyne) connected to an electron-attractors groups (EAG), under tertiary amines as nucleophilic catalysis, being 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane (DABCO) widely used catalyst (Scheme 1).³ This reaction generates compounds called Morita–Baylis–Hillman adducts (MBHA). The MBHA

have been widely used as the starting material in the natural and unnatural products synthesis.⁴ When the group X is N (typically NTs) this reaction is classified as Aza-MBHR and products of this reaction are the Aza-MBHA.⁴

This reaction has important features such as the complete atom economy, the possibility of being performed in an aqueous medium or in absence of solvents and on free-metal condition (organocatalysis). These characteristics are today receiving great attention of the synthetic organic chemists which work into academic and industries laboratories on searching on the more ecological, efficient and cheap synthetic protocols to new drug discovery.

A pivotal limitation described in several articles about this reaction is the long reaction time, for example, there are reactions that

* Corresponding author.

E-mail address: m1aav@quimica.ufpb.br (M.L.A.A. Vasconcellos).

Antimitotic Activity on Sea Urchin Embryonic Cells of Seven Antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts: A Potential New Class of Anticancer Drugs

Jocelmo C. A. Leite,¹ Claudio G. L. Junior,² Fábio P. L. Silva,² Suervy C.O. Sousa,² Mário L. A. A. Vasconcelos^{2*} and Luis F. Marques-Santos^{1*}

¹Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

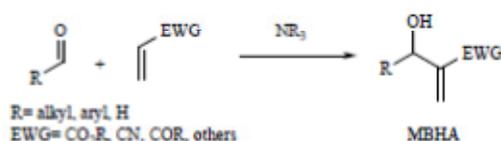
²Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB)-Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

Abstract: In the present work we have described improvements in the 1-7 antiparasitic Morita-Baylis-Hillman Adducts synthesis and their antimitotic activity on sea urchin embryonic cells. The 2-[Hydroxy(2-nitrophenyl)methyl]acrylonitrile (1) and 2-[Hydroxy(4-bromophenyl)methyl]acrylonitrile (4) were the most effective compounds to block the progression to embryonic morula stage (EC₅₀ = 75.8 μM and 72.6 μM, respectively). Compounds 1 and 4 were also effective in blocking the first cell division but to a lesser extent. The 2-[Hydroxy(pyridin-4-yl)methyl]acrylonitrile (7) has also highly inhibited cell divisions and progression to first cleavage and morula stage. Fluorescent dye extrusion assay suggest that these adducts are not ABC protein substrate, conferring an additional interest in these new class of potential anticancer drugs.

Keywords: Antimitotic activities, Sea urchin embryonic cells, Morita-Baylis-Hillman adducts, Cancer.

1. INTRODUCTION

Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR) is an important C-C bond formation synthetic route [1]. It involves the coupling of alkenes containing electron-withdrawing groups (EWG) with aldehydes, ketones and others. Tertiary amines, of which 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) is the most widely used (Scheme 1), are used as nucleophilic catalysts [2].



Scheme 1. The Morita-Baylis-Hillman reactions with e.g. aldehyds.

The Morita-Baylis-Hillman adducts (MBHA), which can be prepared in "one-pot" from MBHR, have been extensively used as intermediates in organic synthesis for a variety of applications [3]. One inconvenient of this reaction is the long time spans needed to carry the reaction on. There are reports of reactions lasting up to 65 days. However, due to the synthetic potential of these adducts, several protocols have been proposed to accelerate this rate; such as the use of

microwaves, ultrasound, salts and metals addition, high pressure, aqueous medium and ionic liquids [3].

The bioactivity of MBHA derivatives were first described in 1999, against the protozoan *Plasmodium falciparum*, the etiologic agent of malaria [4]. In 2006, the molluscicidal activity against the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of schistosomiasis [5], of ten aromatic MBHA was described. That same year, Kohn *et al.* described *in vitro* anti-proliferative effect of some derivatives: MBHA on human tumoral cell lines [6]. Kohn *et al.* have also demonstrated that aromatics MBHA have better bioactivities when compared to aliphatic MBHA. Subsequently, high *in vitro* activities against *Leishmania amazonensis* [7] and *Leishmania chagasi* parasites [8] were described for aromatic MBHAs 1-7 (Fig. 1).

In 2010, we have shown that the MBHA 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenyl) propanenitrile (3), a high anti-leishmania compound, is also a highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes Chagas disease [9]. In the same year, we presented an improved synthesis for sixteen MBHA and their biological evaluation against *L. amazonensis* and *L. chagasi* and we proposed, at the first time, a Structure-Activity-Relationship (SAR) analysis for this class of new anti-parasitic compounds [10].

Since 1908 sea urchin development has widely been used in studies of cell division [11]. Sea urchin embryonic cell cycle shows many similarities with human cell cycle as molecular mechanisms that control cell division are highly conserved across all kingdoms of life [12]. This biological model has also been used in the investigation of pharmacological activities of many compounds [13-15]. Several par-

*Address correspondence to these authors at the Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil; Tel: +55 83 32167646; Fax: +55 83 32167787; E-mail: marques@dbm.ufpb.br and (M. L. A. Vasconcelos) Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB)-Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil; Tel: +55 83 32167589; Fax: +55 83 32167437; email address: mlav@quimica.ufpb.br