

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

TESE DE DOUTORADO

**USO DA ESTRATÉGIA *DROGAS GÊMEAS* PARA A SÍNTESE DE NOVOS
HOMODIMEROS DE ADUTOS DE MORITA-BAYLLIS- HILMAN POTENCIAIS
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS**

WAGNER ANDRÉ VIEIRA DA SILVA

***João Pessoa – PB - Brasil
Agosto/2016***



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



TESE DE DOUTORADO

**USO DA ESTRATÉGIA *DROGAS GÊMEAS* PARA A SÍNTESE DE NOVOS
HOMODIMEROS DE ADUTOS DE MORITA-BAYLLIS- HILMAN POTENCIAIS
CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTIPARASITÁRIOS**

Wagner André Vieira da Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos

2º Orientador (a): Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Junior

***Bolsista (CAPES)**

João Pessoa – PB – Brasil
Agosto/2016

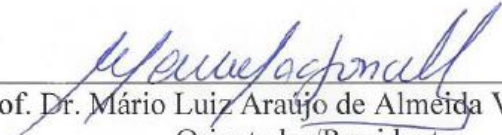
S586u Silva, Wagner André Vieira da.
Uso da estratégia drogas gêmeas para a síntese de novos homodímeros de adutos de Morita-Baylis-Hilman potenciais candidatos a fármacos antiparasitários / Wagner André Vieira da Silva.- João Pessoa, 2016.
125f. : il.
Orientadores: Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos, Cláudio Gabriel Lima Junior
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN
1. Química orgânica. 2. Drogas gêmeas. 3. Homodímeros - adutos de Morita-Baylis-Hillman. 4. *Leishmania donovani*.

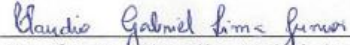
UFPB/BC

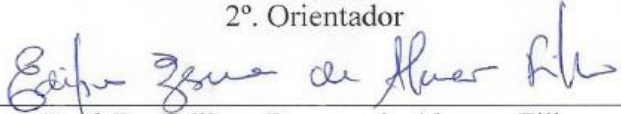
CDU: 547(043)

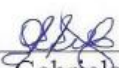
Uso da estratégia drogas gêmeas para a síntese de novos homodímeros de adutos de morita-bayllis-hilman potenciais candidatos a fármacos antiparasitários.

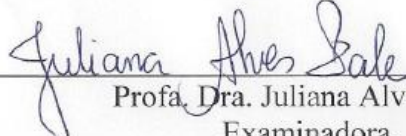
Tese de doutorado apresentada pelo aluno Wagner André Vieira da Silva e aprovada pela banca examinadora em 15 de agosto de 2016.


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


Prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Júnior
2º. Orientador


Prof. Dr. Edilson Beserra de Alencar Filho
Examinador


Profa. Dra. Gabriela Fehn Fiss
Examinadora


Profa. Dra. Juliana Alves Vale
Examinadora


Prof. Dr. José Rodrigues de Carvalho Filho
Examinador

Dedico esse trabalho a Deus e
aos meus pais Maria Audeci
Vieira e Valter Vieira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me ajudar a ter foco e determinação.

Agradeço a minha mãe Maria Audeci e ao meu pai Valter Vieira pela educação, força e orientação.

Aos meus irmãos Valber Henrique, Ana Valéria e Valter Alexandre pelo incentivo e motivação;

A minha companheira Raquel Silva Souza pelo apoio, pela força e compreensão.

Aos professores e orientadores Mário Vasconcellos e Cláudio Gabriel pela amizade, confiança, força e pelos seus ensinamentos e contribuições científicas.

Aos meus amigos do LASOM pelo amizade, pelo ambiente salutar e pelos momentos de descontração: Fábio, Francisco, João Paulo, Guilherme, Everton, Ramon, Suervy, Saulo, Tayná, Ruan, Alana, Jackson, Danilo.

Aos professores e ao departamento de pós-graduação em química, em especial aos professores Juliana Alves e José Rodrigues.

Aos professores da banca examinadora: Edilson Beserra, Gabriela Fehn Fiss, Juliana Alves e José Rodrigues pela contribuição e sugestões para a finalização da tese.

Aos diversos amigos do departamento de pós-graduação: Renê, Augusto, Alexandro, Elivaldo, Renato, André e aos demais amigos de sala de aula e corredores do departamento.

A Professora Tatijane pela colaboração no trabalho realizado.

Aos técnicos Vicente e Evandro pela realização das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

A UFPB e a CAPES pela bolsa concedida.

“O homem não é nada além
daquilo que a educação faz
dele” (*Immanuel Kant*)

RESUMO

Título: Uso da estratégia drogas gêmeas para a síntese de novos homodímeros de adutos de Morita-Baylis-Hillman potenciais candidatos a fármacos antiparasitários.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de sintetizar e bioavaliar a atividade de novos Adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) como potenciais candidatos a fármacos. Os AMBH foram sintetizados a partir da abordagem drogas gêmeas (*twin drugs approach*) e bioavaliados contra a forma promastigota *Leishmania donovani*, uma espécie da forma visceral e mais grave da doença, a qual possui o fármaco utilizado para o tratamento acompanhado de grande toxicidade. Como aceptor de *Michael* para ser utilizado na reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), foi sintetizado o diacrilato do etileno glicol (**50**) a partir da reação de esterificação entre o etileno glicol (**65**) e o ácido acrílico (**66**). A primeira RMBH investigada foi entre dois equivalentes 2-nitrobenzaldeído (**57**) e um equivalente do diacrilato **50**, em acetonitrila como solvente na presença de DABCO, obtendo-se dois produtos: um aduto **67** e um aduto homodimérico **42**. Nas investigações dos parâmetros experimentais da RMBH, o DMF, o DABCO e a temperatura ambiente mostraram ser as condições mais favoráveis para a formação dos adutos homodiméricos, sendo esses obtidos com rendimentos entre 35-94% e em tempos reacionais entre 24h e 20 dias, isolados por extração líquido/líquido e via cromatografia *flash*. Os homodímeros e os demais AMBH bioavaliados tiveram resultados de satisfatórios a excelentes de CI_{50} para os adutos homodiméricos (CI_{50} 126,20 a 0,50 μ M). Todos os AMBH homodiméricos tiveram bioatividade superior aos AMBH correspondentes, evidenciando o sucesso da abordagem de drogas gêmeas contra a espécie promastigota da *leishmania donovani*, chegando ao impressionante resultado, no caso do homodímero **49**, ser 393,1 vezes mais ativo que o AMBH correspondente **56**, sendo 1.24 mais ativo que a *anfoterinica B*, além de não apresentar toxicidade na exposição em glóbulos vermelhos do sangue humano ($IS > 400$, contra $IS = 18,73$ da *anfotericina B*). Estes resultados evidenciam que homodímero **49** é uma molécula promissora na busca de novos candidatos a fármacos.

Palavras-chave: drogas gêmeas, homodímeros de Adutos de Morita-Baylis-Hillman, *Leishmania donovani*.

ABSTRACT

Title: Use of *twin drugs* strategy for the synthesis of new homodimers adducts Morita-Bayllis-Hillman potential candidates for antiparasitic drugs.

This work was performed in order to synthesize and bioavaluar the activity of new adducts Morita-Baylis-Hillman (AMBH) as potential drug candidates. The AMBH were synthesized from the twin drug approach (approach twin drugs) and bioavaliados against *Leishmania promastigote form donovani*, a kind of visceral leishmaniasis and more severe disease, which has a drug used for the treatment accompanied by high toxicity. As Michael acceptor to be used in Morita-Baylis-Hillman (MRBH) was synthesized diacrylate ethylene glycol (**50**) from the esterification reaction between ethylene glycol (**65**) and acrylic acid (**66**). The first MRBH was investigated between two equivalent 2-nitrobenzaldehyde (**57**) and one equivalent of diacrylate **50**, in acetonitrile as solvent in the presence of DABCO, yielding two products: an adduct **67** and an adduct homodimeric **42**. In investigations of experimental parameters the MRBH, DMF, DABCO and room temperature proved to be the most favorable conditions for the formation of adducts homodimeric, these being obtained in yields of 35-94% and reaction times between 24 and 20 days, isolated by liquid / liquid and via flash chromatography. Homodimers and other bioavaliados AMBH results were satisfactory to excellent IC_{50} for homodimeric adducts (IC_{50} 126.20 to 0,50 μ M). All homodimeric AMBH had higher bioactivity the corresponding AMBH, showing the success of the twin drugs approach against promastigote species of *leishmania donovani*, reaching the impressive result, in the case of 49 homodimer be 393.1 times more active than the corresponding AMBH **56**, being 1.24 more active than the *anfoterinica B*, and no reported toxicity exposure in red blood cells of human blood ($iS > 400$ against $iS = 18.73$ *amphotericin B*). These results show that **49** homodimer is a promising molecule in the search for new drug candidates.

Keywords: *Twin drugs, homodimers adducts Morita-Baylis-Hillman Leishmania donovani*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de prevalência geográfica de seis DTNs comuns no mundo: dracunculose, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, geo-helminths e tracoma.	23
Figura 2. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	26
Figura 3. Estruturas químicas de alguns fármacos leishmanicida.	27
Figura 4. Tratamentos utilizados para a leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV). As quatro setas verdes indicam drogas utilizadas no tratamento tanto LC e LV. A seta azul indica o medicamento usado somente para LV e a seta rosa indica o medicamento usado somente para LC.	28
Figura 5. Derivados de AMBH com atividade biológica investigada.	35
Figura 6. Adutos de Morita-Baylis-Hillman mais ativos bioavaliados por Kundu e colaboradores (1999)	35
Figura 7. Estrutura dos AMBH e da cloroquina	36
Figura 8. Adutos de Morita-Baylis-Hillman mais bioativos frente à <i>Biomphalaria glabrata</i>	37
Figura 9. Cl_{50} (μ M) e liberação de LDH (%) dos AMBH com maior bioatividade contra as formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	37
Figura 10. Cl_{50} dos adutos de Morita-Baylis-Hillman bioavaliados frente a <i>L. chagasi</i>	38
Figura 11. Estruturas químicas dos antichagásicos Benznidazol, Risedronato e do aduto 13	39
Figura 12. Docking molecular em TcFPPS e alterações morfológicas observadas nas formas epimastigota e tripomastigota de <i>T. cruzi</i> quando tratadas com 13 (adaptado de SANDES <i>et al.</i> , 2010).....	39
Figura 13. LHI caracterizada por QTAIM para o aduto 22	40
Figura 14. Cl_{50} dos adutos mais ativos frente às formas promastigota de <i>L. amazonensis</i>	41
Figura 15. Design dos adutos sintetizados via abordagem de hibridização molecular.....	42
Figura 16. Cl_{50} (μ M) da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> dos AMBH 36a-36f frente as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i> , respectivamente...	42
Figura 17. Estrutura do 3-Hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenilpropanonitrila) (13)	43

Figura 18. Enantiômeros dos adutos 37 e 38	44
Figura 19. Formas de obtenção de homodímeros e heterodímeros.....	45
Figura 20. Classificação e exemplos das formas de combinação das drogas gêmeas	45
Figura 21. Exemplos de drogas gêmeas homodiméricas.....	46
Figura 22. AMBH homodiméricos planejados para síntese.....	50
Figura 23. AMBH derivados do acrilato de metila bioavaliados frente a espécies de <i>Leishmania</i> (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).....	51
Figura 24. Principais estiramentos C-O e carbonila de éster de 50	55
Figura 25. Estrutura, espectro e dados espectroscópicos de RMN ^1H de 50 ..	56
Figura 26. Estrutura, espectro e dados espectroscópicos de RMN ^{13}C de 50 .	57
Figura 27. Compostos utilizados na primeira investigação da RMBH.	57
Figura 28. Acompanhamento da formação dos produtos via CCD.....	58
Figura 29. Formação do 2-(hidroxi (2-nitrofenil) acrilato de metila (52) na reação em metanol.....	62
Figura 30. Estrutura e características do DMAE como possível catalisador para a RMBH.....	66
Figura 31. Dados espectroscópicos de RMH ^1H do homodímero 42	68
Figura 32. Dados espectroscópicos de RMH ^{13}C do homodímero 42	69
Figura 33. Estrutura geral dos homodímeros	69
Figura 34. Espectro de massas de alta resolução do homodímero 42	70
Figura 35. Estrutura geral dos homodímeros	70
Figura 36. Estrutura geral dos AMBH homodiméricos e dos AMBH com porção acrilato de metila	71
Figura 37. Possível mecanismo de ação de homodímeros de AMBH.....	74
Figura 38. Mínimo conformacional do homodímero 49 e do aduto 56 . Os enantiômeros apresentam a mesma energia, logo os cálculos foram realizados para 56 com o enantiômero (R). No entanto, o homodímero 49 possui dois carbonos assimétricos, sendo mostrado o mínimo conformacional do diastereoisômero mais estável.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura recente proposta para espécies de <i>Leishmania</i> baseada na proteína de choque térmico Hsp 70 sequência de gene.	24
Tabela 2. Valores de CI_{50} dos AMBH 15a-f contra cepa de <i>Plasmodium falciparum</i> sensíveis (FDL-B) e resistentes a cloroquina (FDL-NG) (IME, inibição da maturação da forma esquizonte; ICP, inibição total do crescimento do parasita)	36
Tabela 3. Rendimentos isolados do produto dimérico 42 e do aduto 67 frente a investigação de solventes	60
Tabela 4. Tempo reacional e rendimentos das RMBH para a síntese de 8 homodímeros de AMBH	62
Tabela 5. Investigação da temperatura para o homodímero 46	65
Tabela 6. Investigação das condições catalíticas para o substrato 64	66
Tabela 7. Tempo reacional e rendimentos para a síntese de 8 AMBH.....	67
Tabela 8. Dados espectroscópicos principais dos homodímeros de AMBH inéditos 42-47.....	69
Tabela 9. Íons moleculares dos homodímeros de AMBH	70

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento da síntese do diacrilato do etileno glicol, dos AMBH homodiméricos e dos AMBH com porção carboximetil ester para serem avaliados contra a leishmania <i>donovani</i>	20
Esquema 2. Procedimento geral da RMBH.....	29
Esquema 3. Mecanismos propostos para a reação de Morita-Baylis-Hillman.	31
Esquema 4. RMBH reversíveis investigadas por Cantillo e Kappe (2010) e Lima-Junior e Vasconcellos (2012), respectivamente.	32
Esquema 5. Etapa de C-protonação da espécie <i>zwintterionica</i> proposto por Plata e Singleton (2015)	33
Esquema 6. Mecanismo de eliminação proposto por Plata e Singleton (2015) para as etapas de eliminação.....	33
Esquema 7. Design dos AMBH usando o conceito de bioisoterismo clássico.	41
Esquema 8. Síntese do aduto do 36c com seu respectivo IC ₅₀ e IS	43
Esquema 9. Análise retrossintética para o planejamento da síntese do diacrilato do etilenoglicol e para a preparação dos AMBH homodiméricos inéditos planejados via estratégia drogas gêmeas.	51
Esquema 10. Síntese do diacrilato 50	54
Esquema 11. Primeira RMBH investigada	58
Esquema 12. Formação dos produtos 67 e do homodímero 42	59
Esquema 13. Investigação de solvente na RMBH.....	59
Esquema 14. Proposta do efeito de solvatação na estabilização das cargas das espécies zwitteriônicas.....	61
Esquema 15. Esquema geral para a síntese de 8 homodímeros de AMBH....	62
Esquema 16. Proposta mecanística para a RMBH homodimérica com base na proposta de Mcquade e colaboradores (PRICE <i>et. al.</i> , 2005).	64
Esquema 17. Reação de investigação das condições catalíticas para o substrato 64	66
Esquema 18. Esquema geral para a síntese de 8 AMBH	67

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Infravermelho (cm^{-1}) de 50	102
Espectro 2 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 50	102
Espectro 3 - RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 50	103
Espectro 4 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 42	103
Espectro 5 - RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 42	104
Espectro 6 - Massa de alta resolução de 42	104
Espectro 7 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 43	105
Espectro 8 – RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 43	105
Espectro 9 - Massa de alta resolução de 43	106
Espectro 10 - Infravermelho (cm^{-1}) de 44	106
Espectro 11 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 44	107
Espectro 12 - RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 44	107
Espectro 13 - Massa de alta resolução de 44	108
Espectro 14 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 45	108
Espectro 15 – RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 45	109
Espectro 16 - Massa de alta resolução de 45	109
Espectro 17 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 46	110
Espectro 18 - RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 46	110
Espectro 19 - Massa de alta resolução de 46	111
Espectro 20 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 47	111
Espectro 21 - RMN ^{13C} -APT 50 MHz (CDCl_3) de 47	112
Espectro 22 - Massa de alta resolução de 47	112
Espectro 23 - RMN ^{1H} 200 MHz(CDCl_3) de 48	113

Espectro 24 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 48	113
Espectro 25 - Massa de alta resolução de 48	114
Espectro 26 - Infravermelho (cm ⁻¹) do 49	114
Espectro 27 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 49	115
Espectro 28 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 49	115
Espectro 29 - Massa de alta resolução de 49	116
Espectro 30 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 52	116
Espectro 31 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 52	117
Espectro 32 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 53	117
Espectro 33 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 53	118
Espectro 34 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 12	118
Espectro 35 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 12	119
Espectro 36 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 17	119
Espectro 37 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 17	120
Espectro 38 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 56	120
Espectro 39 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 56	121
Espectro 40 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 54	121
Espectro 41 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 54	122
Espectro 42 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 55	122
Espectro 43 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 55	123
Espectro 44 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 51	123
Espectro 45 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 51	124
Espectro 46 - RMN ¹ H 200 MHz(CDCl ₃) de 67	124
Espectro 47 - RMN ¹³ C -APT 50 MHz (CDCl ₃) de 67	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMBH – Adutos de Morita-Baylis-Hillman

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

DABCO – 1,4 – Diazabicyclo[2.2.2]octano

DMAE - Dimetilaminoetanol

ESI/MS – Espectrometria de Massas com Ionização Electrospray

GRE – Grupo elétron-atrator

HC₅₀ – Citotoxicidade hemolítica na inibição de 50% do crescimento celular

IS – Índice de Seletividade

LC₅₀ – Concentração que inibe 50% da morte de uma população

LDH – Enzima Lactato Desidrogenase

LHI – Ligação de Hidrogênio Intramolecular

m/z – Razão massa carga

OMS – Organização Mundial de Saúde

QTAIM – Teoria Quântica “Átomos em moléculas”

REA – Relação Estrutura atividade

RMBH – Reação de Morita-Baylis-Hillman

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

SUMÁRIO

1.Introdução	19
2. Fundamentação Teórica	22
2.1 Doenças parasitárias e doenças negligenciadas	22
2.1.1 Leishmaniose: aspectos gerais e quimioterápicos	24
2.2 Reação de Morita-Baylis-Hillman	29
2.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman como agentes antiparasitários	34
2.4 Abordagem de drogas gêmeas (<i>twin drugs approach</i>) na busca por novos fármacos	44
3.Objetivos	48
3.1 Objetivo Geral	48
3.2 Objetivos Específicos	48
4. Estratégia	50
5. Resultados e discussão	54
5.1. Parte sintética	54
5.2 Parte espectroscópica	68
5.3 Parte biológica	71
6. Conclusões e perspectivas	78
7. Parte Experimental	81
7.1 Procedimento para a síntese de 50	81
7.2 Procedimento geral para a síntese dos AMBH homodiméricos 42-49	82
7.3 Procedimento para a síntese do homodímero 46 em aquecimento convencional a 80°C	85
7.4 Procedimentos para a síntese dos homodímero 46 em irradiação de micro-ondas	85
7.5 Procedimentos para a síntese do homodímero 46 a 0°C	86
7.6 Procedimento para a síntese de homodímero 46 utilizando os líquidos iônicos [bmin][BF ₄] e [bmin][PF ₆] e o DMAE.	86
7.7 Procedimentos geral para a síntese dos AMBH 12, 17, 51-56	86
7.8 Procedimentos para a avaliação da atividade biológica em <i>leishmania donovani</i>	89
8. Referências	92
9. Espectros	103

INTRODUÇÃO

1.Introdução

As doenças causadas por protozoários representam uma porção significativa dentro das chamadas doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que são doenças que atingem principalmente os pobres e as populações marginalizadas na África Subariana, o sudeste da Ásia e América Latina (HOTEZ *et. al.*, 2006). Estas DTNs incluem a doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose, giardíase, dengue, hanseníase, raiva, infecções de origem alimentar, dentre outras (HOTEZ *et. al.*, 2009). Segundo a organização mundial de saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010), apesar das DTNs mundialmente terem pouca visibilidade, elas afetam diretamente a vida de um bilhão de pessoas e ameaçam a saúde de outros milhões.

As drogas disponíveis para o tratamento dessas doenças estão limitadas, tendo a farmacopeia praticamente inalterada por décadas para a maioria das doenças, tanto em termos de investimento para indústria farmacêutica, quanto em termos de eficácia do medicamento, acompanhados por altas toxicidades, baixa adesão dos pacientes e pela resistência dos protozoários as drogas (PINK *et. al.*, 2005).

Nesse contexto, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando a obtenção de novas drogas para combater as DTNs, destacando-se os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH), uma classe de compostos multifuncionalizados que possui atividade contra algumas das principais doenças negligenciadas (como *Leishmania* e doença de Chagas) e contra demais doenças também causadas por protozoários, como a malária, dentre outras. Estes compostos são obtidos através da reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), uma reação que vem recebendo destaque por parte dos químicos orgânicos por apresentar características fundamentais para a eficiência de um método sintético como: elevada economia de átomos, boa reprodutibilidade, alcança ótimos rendimentos, dentre outras vantagens (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

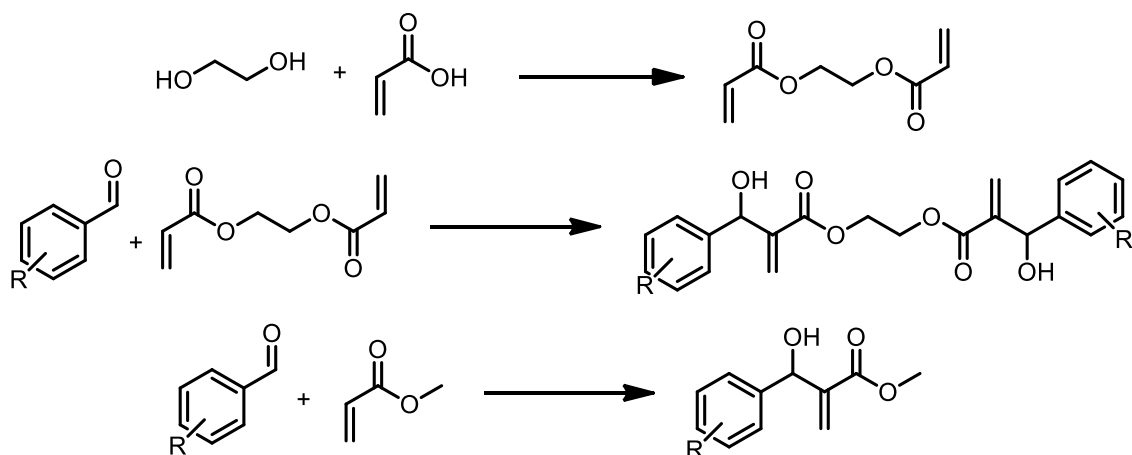
Desde a sua descoberta por Morita (1968), Baylis e Hillman (1972), as aplicações dos adutos multifuncionalizados como intermediários na síntese de produtos naturais cresce a cada ano. A partir do trabalho pioneiro de Kundu e colaboradores (1999) até hoje, pode-se observar que esta classe de compostos

vem apresentando um variado espectro de atividade biológica, tais como atividades leishmanicida, antimalarial, antifúngica e antichagássica. Embora pouco se conheça sobre os mecanismos de ação dos AMBH frente às patologias, esta classe de compostos vem se apresentando como potencial na busca de novos fármacos mais ativos e seletivos em combate as doenças negligenciadas.

A utilização de várias ferramentas sintéticas vem sendo utilizadas para a síntese dos AMBH, como hibridização molecular, bioisosterismo, dentre outras, na busca da otimização da atividade biológica, mostrando a importância desta versátil reação na busca de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças.

Com isso, o objetivo do trabalho é sintetizar AMBH homodiméricos, utilizando a estratégia de drogas gêmeas, e AMBH com porção carboximetilester para avaliar a atividade biológica contra a forma promastigota da leishmania *donovani*.

Esquema 1. Planejamento da síntese do diacrilato do etileno glicol, dos AMBH homodiméricos e dos AMBH com porção carboximetil ester para serem avaliados contra a leishmania *donovani*



FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. Fundamentação Teórica

2.1 Doenças parasitárias e doenças negligenciadas

As doenças parasitárias são doenças infecciosas causadas por protozoários aos seres humanos e representam uma ameaça significativa a saúde por ser responsável por mais de um milhão de mortes anualmente (LOZANO *et al*, 2012) e ameaçar a vida de bilhões de pessoas em todo o mundo fazendo parte do *rol* das doenças tropicais negligenciadas (KATHERINE *et al*, 2014).

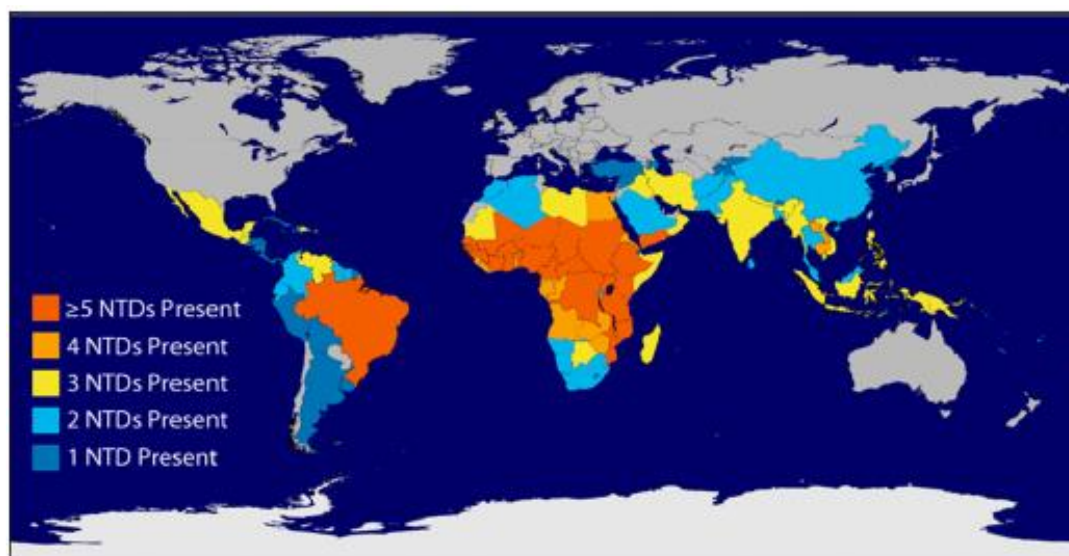
As DTNs pertencem a um grupo de doenças infecciosas, que apesar de serem tratáveis e/ou evitáveis, continuam sendo umas das principais causas de morbidade e mortalidade entre as populações mais pobres do mundo (OMS, 2010). Estas doenças são consideradas um combustível para a manutenção de um círculo vicioso da regressão do desenvolvimento da criação e da produtividade humana (TROUILLER *et al*, 2002).

Por ocorrerem entre as populações pobres nas regiões menos desenvolvidas no mundo, essas doenças não têm grande visibilidade na indústria farmacêutica, pois o retorno financeiro sobre o investimento é muito baixo para o contínuo desenvolvimento do mercado de medicamentos (HOPKINS, WITTY e NWAKA, 2007). Essa classe de doenças tem recebido investimentos muito baixos em relação às “doenças de primeiro mundo”. Entre 1975 e 1999, por exemplo, apenas 1% dos novos medicamentos eram destinados ao tratamento das DTNs, enquanto que a doenças relacionadas ao sistema nervoso central, doenças cardiovasculares, representavam 15% e 12%, respectivamente, das novas drogas introduzidas nesse período (PEDRIQUE *et al*, 2013).

O desenvolvimento de medicamentos contra essas doenças para estágios clínicos também é bastante baixo. Dos mais de 148.000 ensaios clínicos registrados no final de 2011, apenas cerca de 1% estavam concentrados a DTNs (PEDRIQUE *et al*, 2013). Porém a projeção atual tende a aumentar, de forma gradual, em 4% no desenvolvimento de novas drogas nos próximos 10 anos.

Atualmente, a OMS (2014) considera 17 doenças sendo tropicais negligenciadas: dengue, raiva, tracoma, úlcera de Buruli, treponematose endêmicas, hanseníase, doença de Chagas, tripanossomíase humano africano (THA), leishmaniose, teníase, dracunculose, equinococose, trematodíase, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, helmintíase transmitida pelo solo. Estima-se que todas essas doenças afetam mais de 1 bilhão de pobres no mundo, com renda de menos de 2 dólares por dia, sendo endêmica em 149 países.

Figura 1. Mapa de prevalência geográfica de seis DTNs comuns no mundo: dracunculose, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, geo-helmintos e tracoma.



Fonte: <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (CDC). Acesso em 25/09/2015 as 16:22h.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de doenças (CDC, 2015), sete das DTNs mais comuns podem ser encontradas em uma série de países de baixa e média renda da África, Ásia e na América Latina, afetando áreas tropicais, onde as pessoas têm pouco acesso à água potável ou a aterros sanitários.

Aliado a essas condições, a grande quantidade de infecções por protozoários deve-se a falta de vacina eficaz para cada tipo de doença. O tratamento e a profilaxia ficam à dependência de fármacos antigos, que

apresentam alta toxicidade, diminuição da eficácia (aumento da resistência da doença) e baixa adesão dos pacientes (KATHERINE *et al*, 2014).

2.1.1 Leishmaniose: aspectos gerais e quimioterápicos

A leishmaniose compreende um conjunto de mais de 20 espécies de protozoários intramacrofágicos do gênero *leishmania*. Os parasitas desta doença possuem duas formas principais: a amastigota intracelular em hospedeiros mamíferos e a promastigota flagelada através do mosquito flebótomo fêmea infectado do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, tais como *P. orientalis*, *P. martini*, *P. argentipes* e *P. celiae* (SINGH, S.; SIVAKUMAR, R, 2004).

Em relação à sua forma clínica, a leishmaniose se manifesta sob três formas, a visceal (LV), a cutânea (LC) e a muco cutâneo (LMC). Todas essas formas apresentam diferentes respostas patológicas e causam diferentes graus de morbidade e mortalidade. A forma LV, também conhecida com calazar, é a mais grave da doença em que os macrófagos infectados disseminam através dos sistemas vasculares e linfáticos, levando à infecção de todo o sistema retículo-endotelial que é comumente fatal, sendo causada pela *L. donovani* e *L. chagasi* (NJOGU e CHIBALE, 2013). Na LC, os macrófagos infectados só causam ulcerações crônicas locais na pele, enquanto que na LMC, as lesões ocorrem após o progressivo avanço da manifestação na mucosa do trato respiratório, após a LC prévia (BERN, MAGUIRE, e ALVAR, 2008). Essas duas últimas formas são causadas, dentre outras, pela *L. tropica*, *L. major* (principal), *L. mexicana*, *brasiliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (MURRAY, et al, 2005).

Tabela 1. Nomenclatura recente proposta para espécies de *Leishmania* baseada na proteína de choque térmico Hsp 70 sequência de gene.

Gênero	Complexo	Espécie	Distribuição Geográfica
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	China, Índia subcontinental, Etiópia, Sudão, Kênia, Irã, Arábia Saudita, Líbano.
		<i>L. Infantum</i>	Albânia, Argélia, França, Grécia, Itália, Marrocos, Portugal, Espanha, Síria, Tunísia, Turquia, Líbano.
		<i>L. Chagasi</i>	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Martinica,

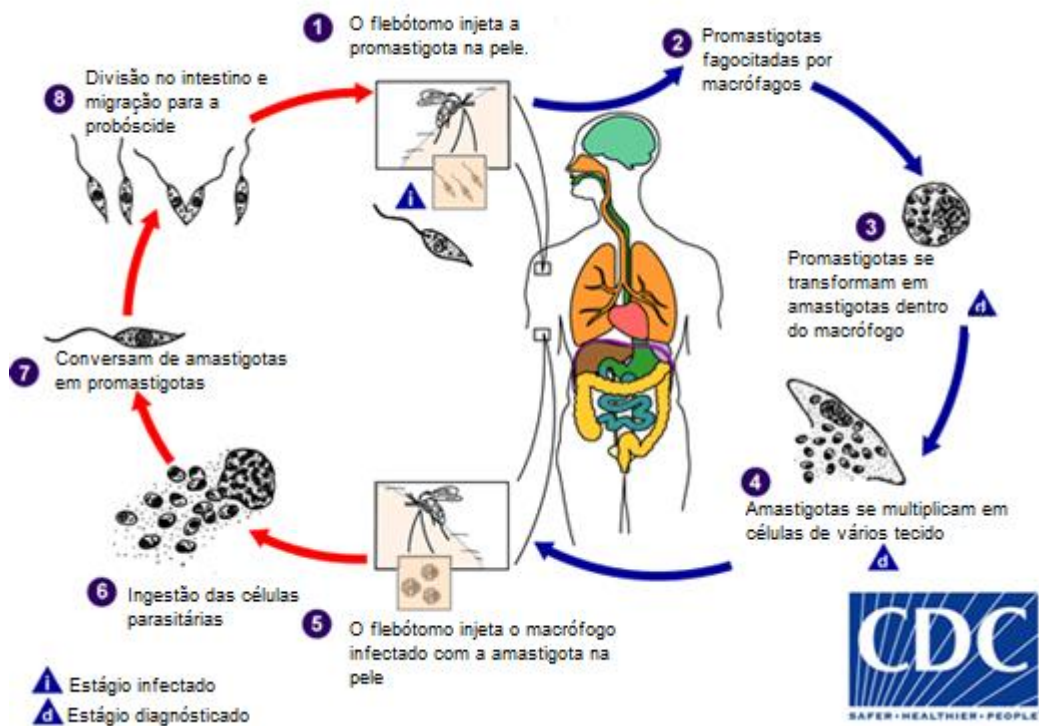
			México, Nicarágua, Paraguai, Suriname, Venezuela.
		<i>L. Archibaldi</i>	Índia, Sudão, Etiópia, Líbano, Israel
	<i>L. Tropica</i>	<i>L. Tropica</i>	Afeganistão, Argélia, Azerbaijão, Grécia, Irã, Iraque, Israel, Etiópia, Kênia
		<i>L. aethiopia</i>	Etiópia, Kênia
		<i>L. Major</i>	Alfeganistão, Argélia, Chade, Irã, Iraque, Israel, Líbia, Mauritânia, Marrocos, Síria, Sudão.
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	Belize, Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela.
		<i>L. amazonensis</i>	Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guiana Francesa, Peru, Venezuela
		<i>L. garnhami</i>	Venezuela
<i>Viannia</i>		<i>L. guynhanensis</i>	Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru, Suriname Venezuela.
		<i>L. panamensis</i>	Belize, Colômbia, Equador, Costa Rica, Honduras, Nicarágua, Panamá, Venezuela,
		<i>L. naiffi</i>	Brasil, Guiana Francesa, Equador, Peru
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, Nicarágua
		<i>L. peruviana</i>	Peru
		<i>L. lainsoni</i>	Brasil, Bolívia, Peru

Fonte: Traduzida de Hidayat H. *et al* (2014)

O ciclo de vida da leishmania mostra duas principais fases de desenvolvimento que são a amastigota, que reside no interior das células, e as prosmatigotas, que replicam no intestino de um flebótomo. O ciclo inicia quando o hospedeiro vertebrado é picado pelo inseto infectado. O inseto engole o sangue do hospedeiro e introduz a carga do parasita (promastigota) (CHANG, K. P. *et al*, 2003). A saliva do inseto contém fatores químicos que são responsáveis pela melhora do poder infeccioso do parasita e exercem um poder quimiotático sobre as células retículo-endoteliais, que em seguida, fagocitam os parasitas e estes, promovem a sua reprodução dentro do macrófago (amastigota). O rompimento da célula hospedeira, devido à multiplicação das formas amastigotas, leva à liberação de grande quantidade de parasitas. Em seguida, o

flebótomo realiza o repasto do sangue e ingere células parasitadas, ocorrendo a conversão da forma amastigotas em promastigotas (DOS REIS, 2000). Em seguida, as formas promastigotas sofrem divisão binária no intestino do vetor e migram para o probóscide, contaminando o hospedeiro e reiniciando o ciclo.

Figura 2. Ciclo de vida da *Leishmania*.



Fonte: <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html> (CDC). Acesso em 25/09/2015 às 16:22 h.

Devido à alta ocorrência dessa doença parasitária entre as populações pobres das regiões menos desenvolvidas no mundo, as infecções por leishmaniose não têm grande visibilidade na indústria farmacêutica, uma vez que o retorno financeiro sobre o investimento é muito baixo para sustentar o desenvolvimento do mercado de medicamentos (PINK *et al*, 2005). Com isso, os esforços para a descobertas de novas drogas nesta área são muito insuficientes, constatado pela escassez de novas drogas em desenvolvimento clínico para as doenças tropicais.

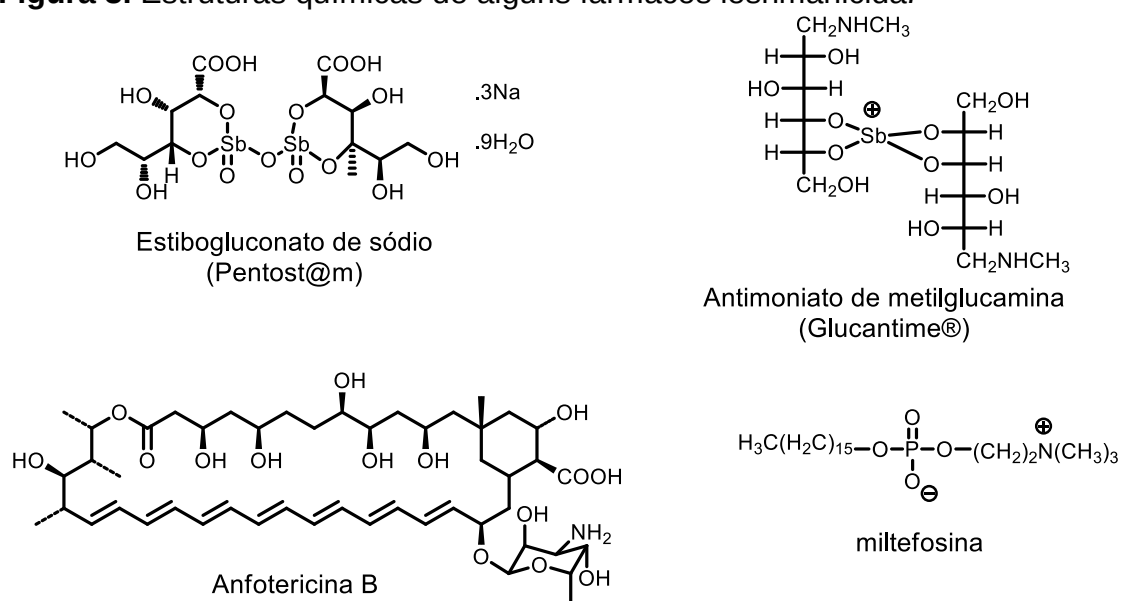
A quimioterapia utilizada para o tratamento das infecções por leishmaniose é acompanhada de limitações na sua eficácia, altas toxicidades, baixa adesão dos pacientes e de resistência do parasita (RENSLO *et al*, 2006).

Embora existam quase 25 compostos com efeito leishmanicida, apenas alguns são eficazes para a leishmaniose humana (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Além disso, todas as drogas leishmanicidas existentes foram desenvolvidas primeiro para outras indicações (MATLASHEWSKI, G et al, 2011).

Devido à diversidade e à complexidade das manifestações clínicas, o tratamento da leishmaniose ainda é complicado (HERWALDT, B.L, 1999). Por mais de 70 anos, o tratamento de primeira escolha manteve-se à utilização de fármacos altamente tóxicos administrados por via parenteral de antimoniato de metilglucamina (Glucantime®) e gluconato de antimônio (V) de sódio (Pentostan®) (figura 3) (POLONIO e EFFERTH, 2006). Embora estes fármacos tenham boa eficácia, a terapia parenteral é prolongada, podendo apresentar efeitos secundários com risco de vida, tais como arritmias cardíacas e pancreatite aguda, além da rápida resistência aos medicamentos (CHAPPUIS, et al, 2007).

As drogas de segunda escolha incluem a pentamidina antitripanossomal, o antifúngico anfotericina B, o antibiótico aminoglicósido paromomicina, e a miltefosina alquilfosfocolina. Todos estes medicamentos têm algumas limitações e apresentam efeitos colaterais, incluindo toxicidade grave, mialgias, dores abdominais, distúrbios cardiológicos, alterações hepáticas e insuficiência renal, baixa eficácia com o uso prolongado, além do alto custo da produção em escala industrial (SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

Figura 3. Estruturas químicas de alguns fármacos leishmanicida.



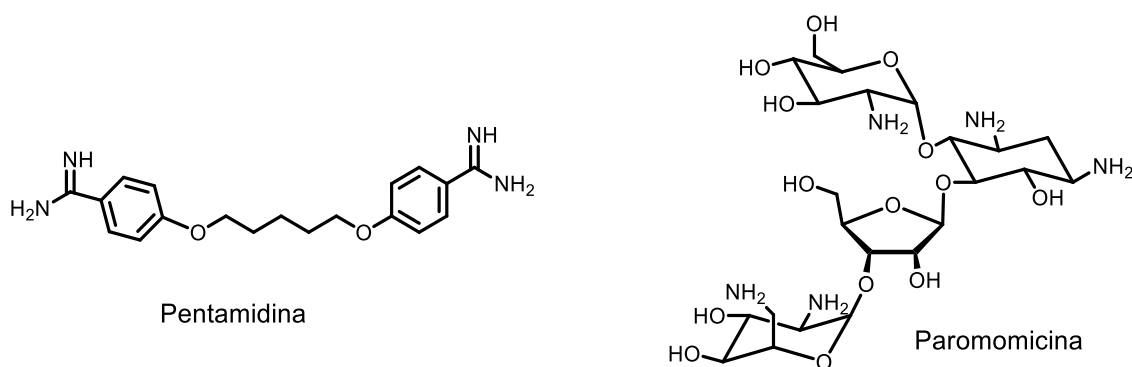
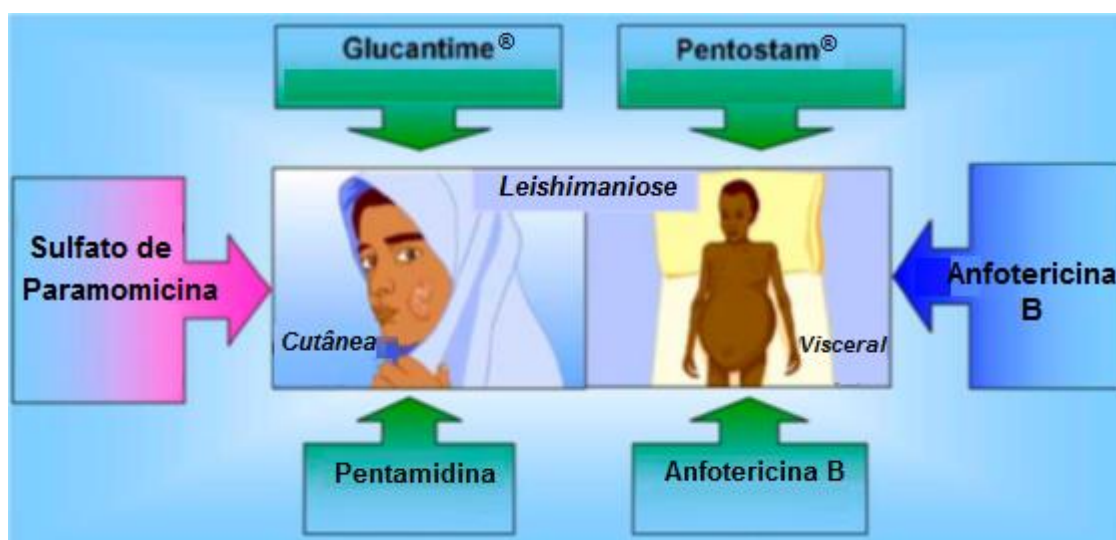


Figura 4. Tratamentos utilizados para a leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV). As quatro setas verdes indicam drogas utilizadas no tratamento tanto LC e LV. A seta azul indica o medicamento usado somente para LV e a seta rosa indica o medicamento usado somente para LC.



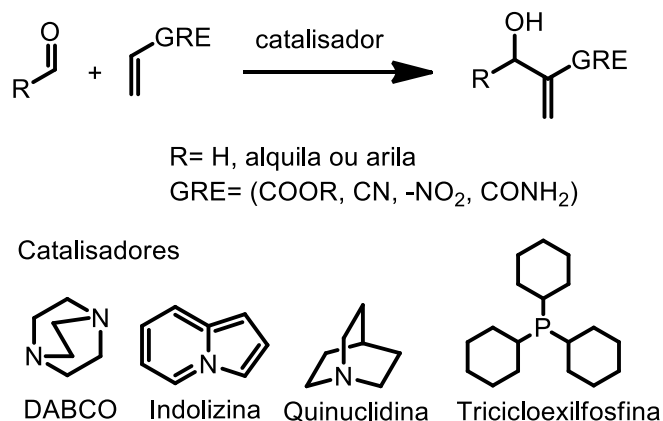
Fonte: Adaptada de Hidayat *et al* (2014)

Considerando todo o contexto das limitações, a busca por novos fármacos para o tratamento da leishmaniose com custos de produção menores que os atuais, aliada a baixas toxicidades e a melhores respostas terapêuticas tem que ser explorado para que essa problemática de décadas atrás e ainda atual seja encarada com as atenções que merece.

2.2 Reação de Morita-Baylis-Hillman

A reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) é uma reação de adição que forma uma nova ligação carbono-carbono entre carbonos eletrofílicos sp^2 (geralmente aldeídos) e a posição α de uma olefina ou de alcenos ativados (geralmente ésteres α,β -insaturados, amidas, nitrilas ou cetonas), que contém um grupo retirador de elétrons (GRE). Esta reação é catalisada por aminas ou fosfinas terciárias, sendo o DABCO o catalisador (utilizado também como promotor) mais usual para esta transformação. (BAYLIS e HILLMAN, 1972 e MORITA *et. al.*, 1968).

Esquema 2. Procedimento geral da RMBH



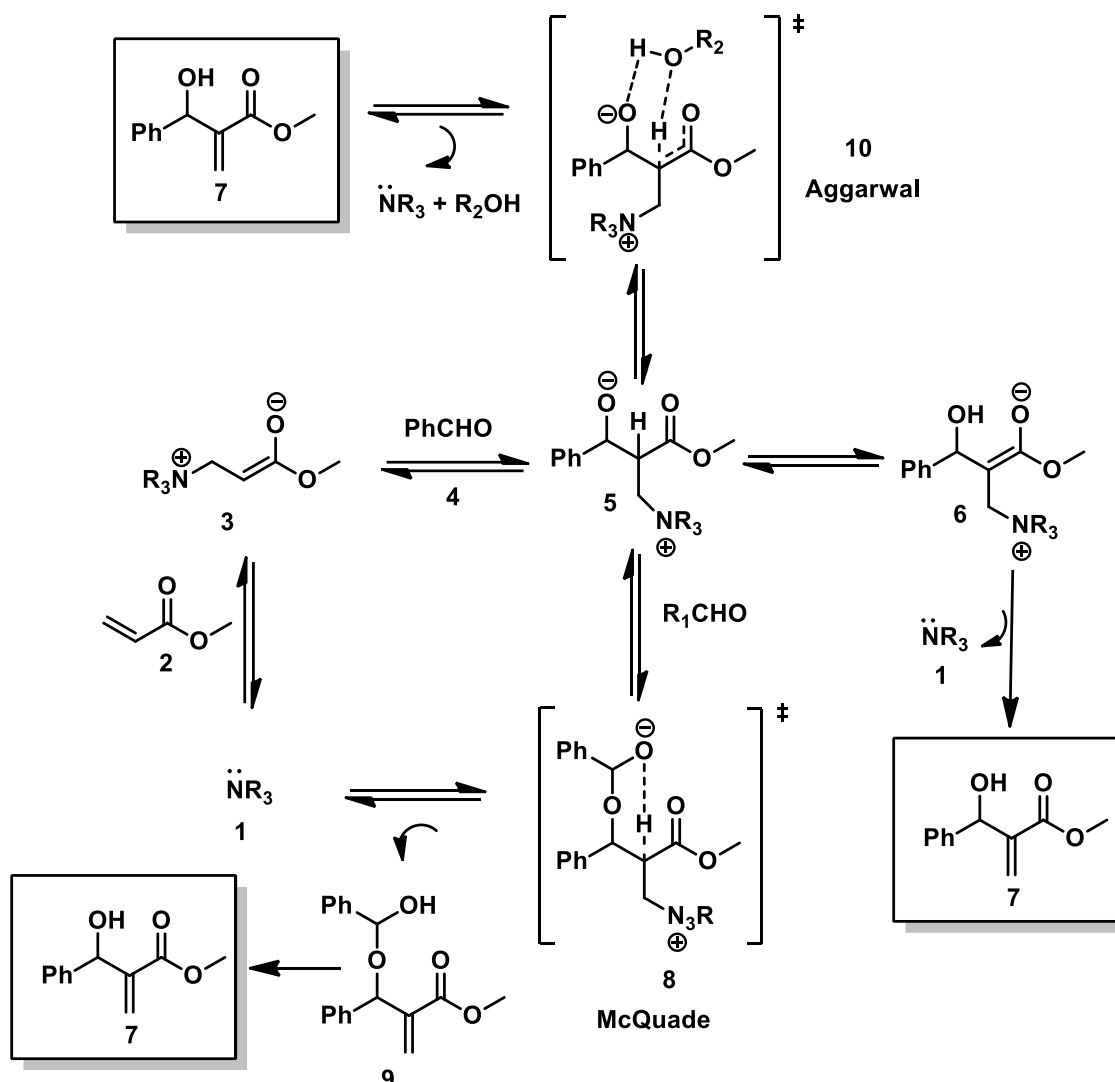
A RMBH apresenta características bastante atraentes frente a outras ligações de formação carbono-carbono, como a eficiência sintética (régio, quimio e estereosseletiva); possui economia de átomos; pode ser realizada em condições brandas, em resfriamento, aquecimento convencional ou sob irradiação de microondas; pode ocorrer em ausência de solvente; em solventes sem necessidade de tratamento prévio; em água quando o substrato for solúvel (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012); sob ação solvente-catalítica de líquidos iônicos (ROSA, AFONSO, e SANTOS, 2001) e ocorre também na versão assimétrica (PÉGOT *et al*, 2004). Apresenta como desvantagens a baixa reprodutibilidade frente a variações de substratos eletrofílicos, longos tempos reacionais e baixos rendimentos em alguns casos, e uso esquiométrico do catalisador (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

O primeiro mecanismo proposto para a RMBH foi publicado por HOFFMAN E RABE (1983) corroborado pela investigação da dependência velocidade, pressão e efeito isotópico cinético realizado sete anos depois por HILL E ISAACS (1990). Nestas propostas, o primeiro passo é a adição 1,4 do catalisador (amina terciária **1**) ao alceno ativado **2**, gerando um enolato zwitterionico **3**. A próxima etapa consiste na adição aldólica do intermediário **3** ao aldeído **4**, gerando um novo intermediário **5**, que inicialmente foi proposto como a etapa lenta da reação. O passo subsequente é a etapa de eliminação e envolve um prototropismo intramolecular de **5** a **6**, que gera o AMBH final **7** após a saída do catalisador que retorna para o ciclo catalítico (Esquema 3).

Posteriormente em 2005, dois grupos de pesquisa distintos, MCQUADE e colaboradores (PRICE *et. al.*, 2005) e AGGARWAL e colaboradores (ROBIETTE *et. al.*, 2007), investigaram a RMBH através de estudos cinéticos e teóricos. Diferentemente dos estudos anteriores, estes propuseram a transferência de hidrogênio (esquema 2) como a etapa controladora da velocidade. De acordo com MCQUADE e colaboradores (PRICE *et. al.*, 2005), para a RMBH segue à cinética de segunda ordem em relação ao aldeído e a transferência de hidrogênio intramolecular é proposta como etapa lenta que passa por estado de transição de seis membros **8**, gerando o intermediário **9**, que subsequentemente se torna o AMBH **7**. Diferentemente, AGGARWAL e colaboradores (ROBIETTE *et. al.*, 2007) propuseram que, na presença de uma fonte de hidrogênios, existe um estado de transição **10** na etapa lenta da reação onde o solvente serve de carreador para a transferência do hidrogênio do carbono para o oxigênio.

De maneira geral, estes autores observaram um aumento da velocidade da reação com o aumento da polaridade dos solventes empregados. Desta forma, eles sugeriram que o aumento da velocidade é resultado de um efeito do meio, no qual estados de transição iônicos são estabilizados na presença de solventes polares.

Esquema 3. Mecanismos propostos para a reação de Morita-Baylis-Hillman.

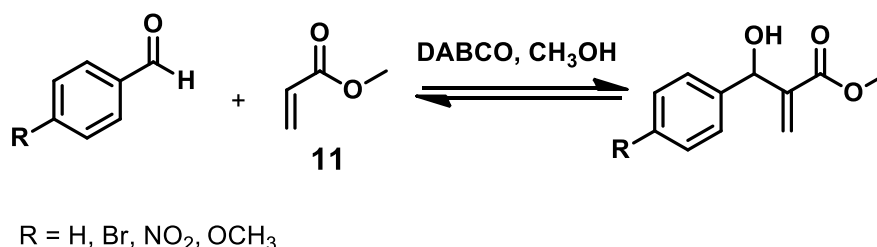


Posteriormente ocorreram outras contribuições para o mecanismo da RMBH. Amarante e colaboradores (2009) interceptaram intermediários de reação propostos por McQuade e Aggarwal pela técnica de ESI-MS (/MS). No ano seguinte, Cantillo e Kappe (2010) utilizou o método da densidade do funcional (M06-2X) para investigar controvérsia sobre a etapa lenta da RMBH ser a etapa de transferência do hidrogênio intramolecular (THI), existindo a competição das vias prótica e aprótica, ou a etapa lenta ser a adição aldólica. Eles observaram que existia a competição dualística das vias, porém a medida que se aumentava a concentração de água a reação prosseguia prioritariamente pela via prótica, sendo a etapa lenta a THI. Foi observado também, que quando

se utiliza aditivos fenólicos ocorre um decréscimo de energia tal qual que a etapa lenta da reação deixa ser a THI e passa a ser a etapa de adição aldólica.

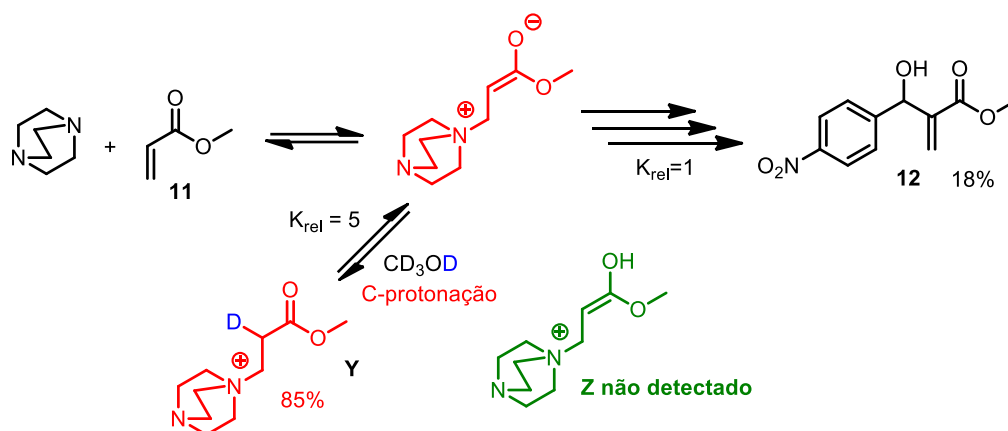
Cantillo e Kappe (2010) também investigaram através de estudo teórico da análise computacional por *ab initio* utilizando o método MP2, que a RMBH é equilibrada e reversível, sendo este fato também constatado por Lima-Junior e Vasconcellos (2012) na observação da reversibilidade da reação, mostrando o seu comportamento endergônico em temperaturas elevadas.

Esquema 4. RMBH reversíveis investigadas por Cantillo e Kappe (2010) e Lima-Junior e Vasconcellos (2012), respectivamente.



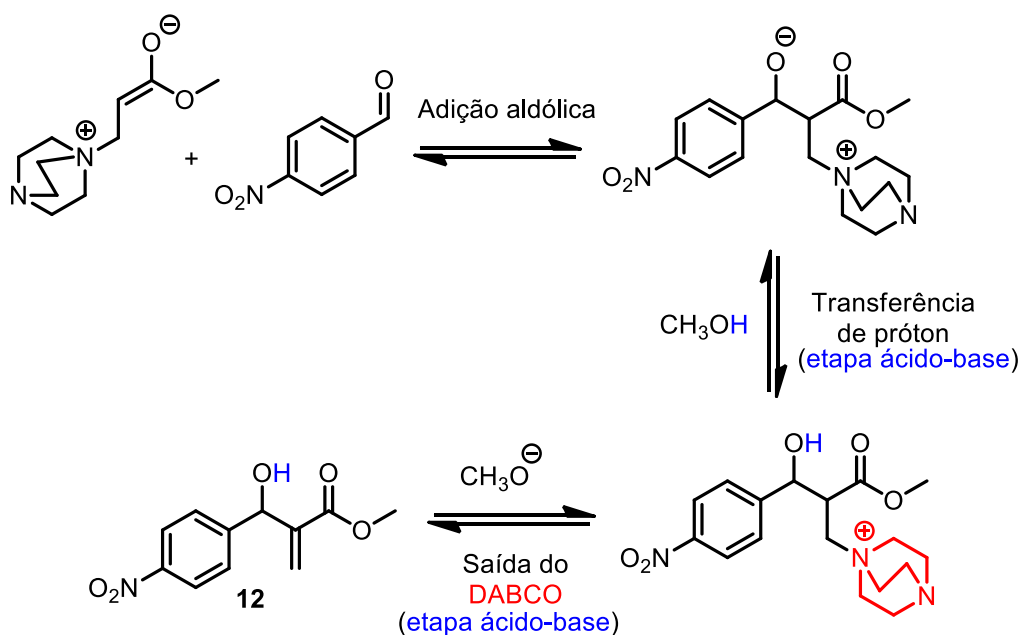
Recentemente, Plata e Singleton (2015) investigaram o mecanismo da RMBH, utilizando a reação entre 4-nitrobenzaldeído e acrilato de metila, catalisada por DABCO em metanol. Os autores interceptaram e determinaram experimentalmente as concentrações das espécies intermediárias da reação direta e inversa (reação reversível), via RMN, considerando aspectos cinéticos e termodinâmicos. Em relação a etapa de adição, Plata e Singleton (2015) identificaram que nesta etapa ocorre a C-protonação do enolato *zwitterionico* por álcoois ou água em 85% de conversão, até então não relatada em trabalhos anteriores, realizado por marcação isotópica cinética com metanol deuterado, evidenciando que a protonação ocorre de forma mais rápida que a conversão no AMBH, mostrado no esquema 4. A espécie protonada perde um próton retornando a forma enolato *zwitterionica* para dar sequência as demais etapas. O equilíbrio protônico reversível com metanol formando a espécie **Z** envolve transferência de prótons entre heteroátomos e deveria ser rápida, mas a O-protonação não foi detectada experimentalmente.

Esquema 5. Etapa de C-protonação da espécie *zwintterionica* proposto por Plata e Singleton (2015)



Diferentemente de trabalhos anteriores, Plata e Singleton (2015) propuseram que a reação ocorria em 5 etapas (uma etapa de eliminação a mais em relação aos trabalhos anteriores), com a etapa de eliminação ocorrendo em duas etapas ácido-base: a primeira uma etapa de transferência de próton (etapa controladora da velocidade) e a segunda, a saída do DABCO, mostrado no esquema 6.

Esquema 6. Mecanismo de eliminação proposto por Plata e Singleton (2015) para as etapas de eliminação.



Diferentemente de Cantillo e Kappe, da afirmativa que na RMBH existiam dois mecanismos independentes que competem entre si, Plata e Singleton

afirmaram através da investigação por EIC, que a reação envolve etapas controladoras da velocidade competitivas. Quando a reação se processa em temperaturas baixas (em torno de -20°C), a etapa limitante de velocidade é a aldólica, porém quando a reação ocorre em temperatura ambiente, a etapa lenta envolveria a transferência de próton.

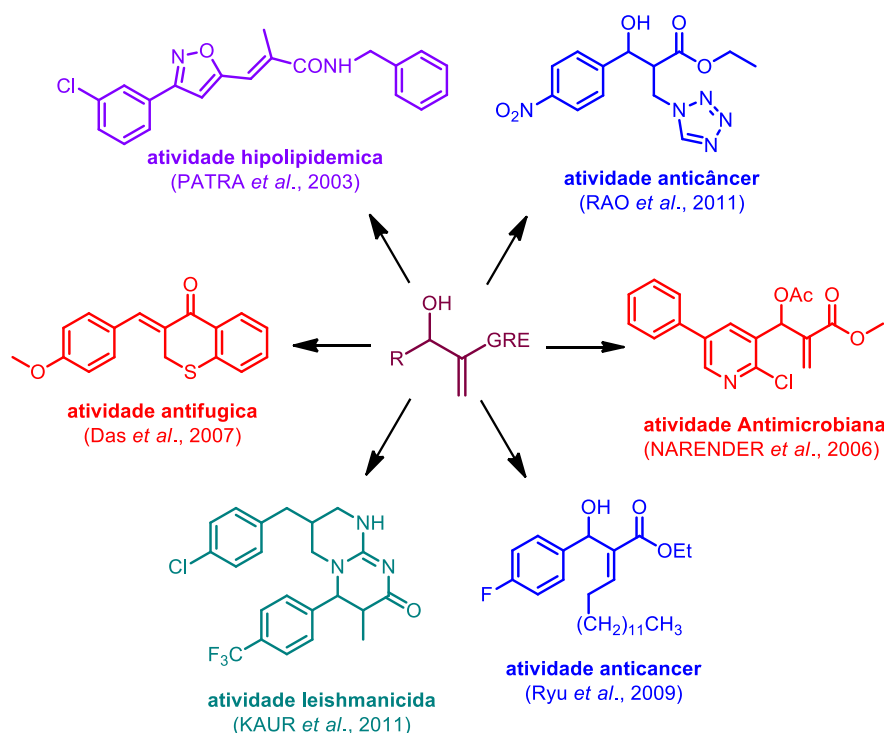
Diante da evolução do entendimento do mecanismo da RMBH fica evidente que em mecanismos multicomponentes a medida em que se altera um desses componentes o mecanismo pode assumir uma outra via, devido a competição entre as mesmas, onde cada sistema alterado deve ser compreendido de forma a não se ter uma generalização do caminho que leva a formação dos AMBH.

2.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman como agentes antiparasitários

Os adutos de Morita-Baylis-Hilman investigados como agentes antiparasitários serão aqui apresentados em ordem cronológica para justificar a importância do desenvolvimento e investigação dessa classe de compostos na busca de novos fármacos para tratamento da *leishmaniose*.

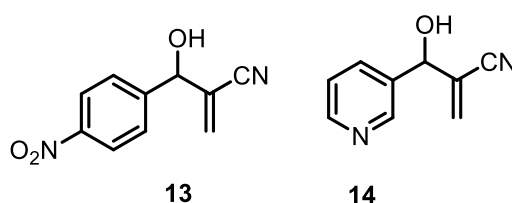
Desde os primeiros trabalhos de Drewes (1982) e de Hoffman (1983), os AMBH passaram a ser utilizados como importantes intermediários para demais reações. A partir dos AMBH vários produtos naturais ou moléculas com potencial biológico foram sintetizados com perfil biológico definido. A figura 5 a seguir mostra alguns compostos oriundos dos AMBH com atividade biológica.

Figura 5. Derivados de AMBH com atividade biológica investigada.



A primeira avaliação da atividade biológica dos AMBH só foi realizada após quase 30 anos após o primeiro relato de Morita (1968). Kundu e colaboradores (1999) relataram a bioatividade dos AMBH, mostrando a significativa atividade antimalarial de 11 adutos e 3 derivados contra *Plasmodium falciparum in vitro* e *Plasmodium berguei in vivo* (Figura 6). Dentre os adutos testados, os **13** e **14** foram os que demonstraram melhores resultados, onde ensaios *in vivo* em *P. berguei* apresentaram atividade dos mesmos em dose de 80mg/Kg.

Figura 6. Adutos de Morita-Baylis-Hillman mais ativos bioavaliados por Kundu e colaboradores (1999)



Já em 2005, Narender e colaboradores sintetizaram adutos derivados do 2-cloronicotinaldeídos substituídos e da acrilonitrila e acrilato de metila, em 98% de rendimento e em baixo tempo reacional, e avaliaram a atividade biológica

frente a cepas sensíveis e resistentes à cloroquina (FLD-B e FLD-NG), obtendo valores de IC₅₀ mostrados na tabela 1, e as estruturas químicas dos adutos na figura 7. Os AMBH mais ativos foram **15a**, **15b** e **15c**, devido à importância dos grupos nitrila e fenila na posição R₂ constatados na relação estrutura atividade (REA).

Figura 7. Estrutura dos AMBH e da cloroquina

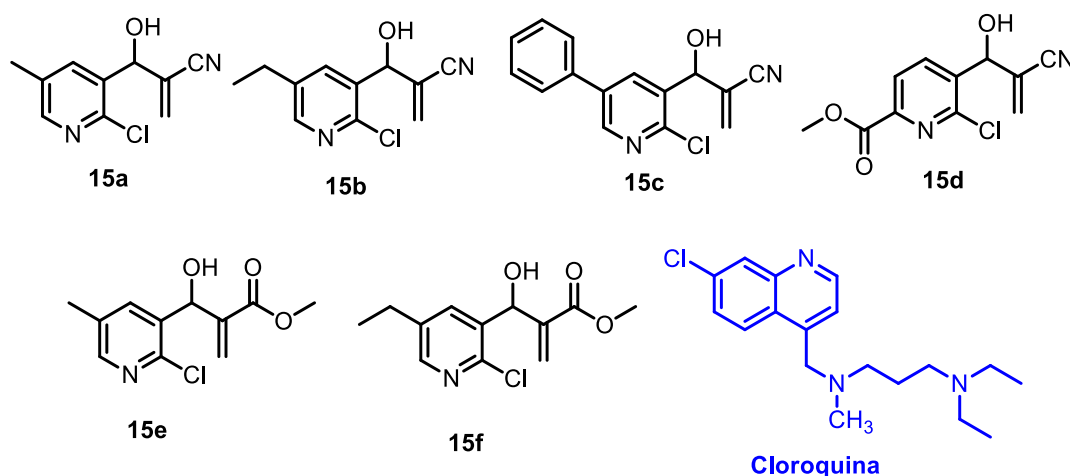


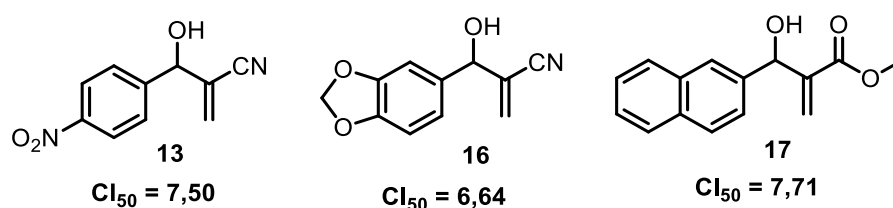
Tabela 2. Valores de Cl₅₀ dos AMBH **15a-f** contra cepa de *Plasmodium falciparum* sensíveis (FDL-B) e resistentes a cloroquina (FDL-NG) (IME, inibição da maturação da forma esquizonte; ICP, inibição total do crescimento do parasita)

Compostos	Cl ₅₀ (µg/mL) FLD-B	Cl ₅₀ (µg/mL) FLD-B	Cl ₅₀ (µg/mL) FLD-NG	Cl ₅₀ (µg/mL) FLD-NG
	IME	ICP	IME	ICP
15a	1,25	1,3	22,5	10,5
15b	1,8	4,0	2,5	5,5
15c	3,6	8,0	0,9	2,2
15d	3,4	7,0	5,75	6,75
15e	18	28,5	3,05	5,75
15f	45	115	5,0	10,75
Cloroquina	0,004	0,005	-	-

No ano seguinte, Vasconcellos e colaboradores (2006) publicaram a bioatividade de 10 AMBH frente à *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, com melhores resultados para os adutos

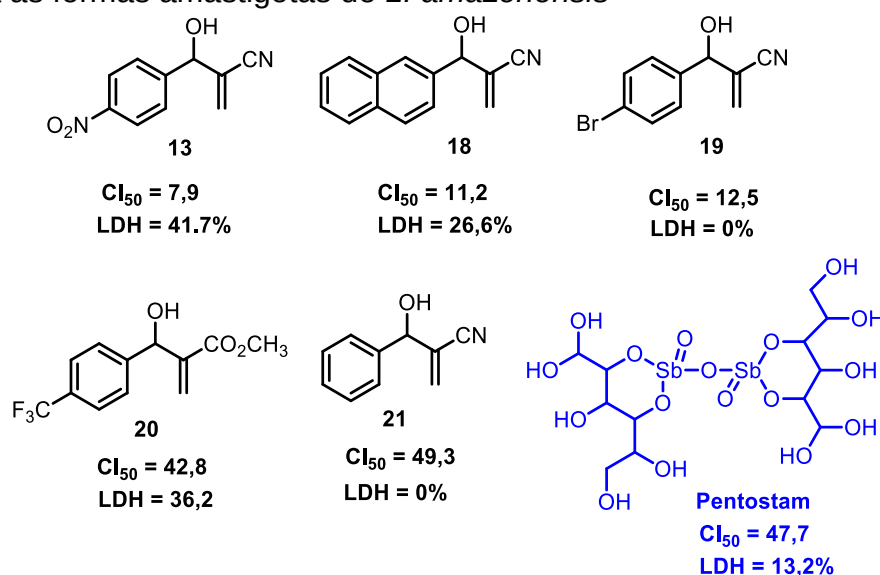
13, 16 e 17, sendo observado a importância dos grupos nitro e nitrila para a maior atividade, também observados em trabalhos anteriores Kundu (1999) e Narender (2005).

Figura 8. Adutos de Morita-Baylis-Hillman mais bioativos frente à *Biomphalaria glabrata*.



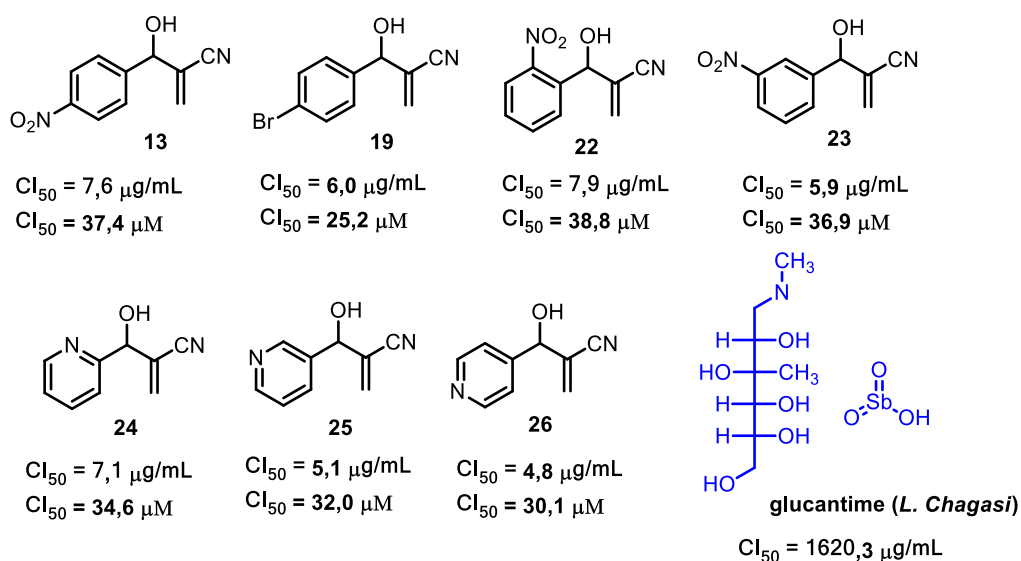
De Souza e colaboradores (2007) relataram pela primeira vez a atividade de 15 AMBH aromáticos contra as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonenses*, mostrados na Figura 9. O aduto **13** mostrou-se o mais ativo da série congênere, porém, acompanhado de citotoxicidade significativa através da medição dos níveis de liberação da enzima Lactato desidrogenase (LDH) em macrófagos. Já o aduto **19** não apresentou liberação de LDH em macrófagos, mostrando um alto potencial comparado com o Pentostam (fármaco de referência). Na investigação também se conclui que nenhum dos AMBH foi capaz de induzir à produção de óxido nítrico em meio de cultura.

Figura 9. Cl_{50} (μ M) e liberação de LDH (%) dos AMBH com maior bioatividade contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*



Posteriormente, Barbosa e colaboradores (2009), otimizaram a síntese e avaliação biológica (figura 10) dos adutos contra o microcrustáceo *Artemia salina* Leach e contra a forma promastigota de *L. chagasi*, onde todos os adutos mostraram eficiência na atividade leishmanicida. O aduto **19** continuou sendo o mais ativo frente aos demais avaliados, mostrados na figura 10.

Figura 10. CI_{50} dos adutos de Morita-Baylis-Hillman bioavaliados frente a *L. chagasi*



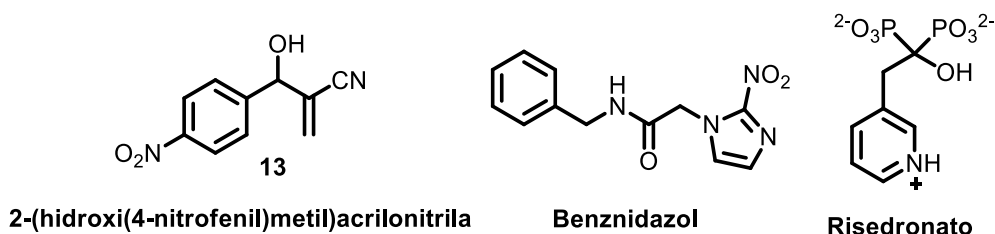
As diferenças apresentadas nos CI_{50} entre os adutos **13** e **19** nos trabalhos de Souza e colaboradores e Barbosa e colaboradores, são devido às cepas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* serem de fontes comerciais distintas e dos métodos da avaliação quantitativa também distintos, sendo considerado normal. Porém, vale destacar que a tendência que a avaliação biológica desses compostos apresentou foi a mesma entre as séries congêneres investigadas.

No ano seguinte, Sandes e colaboradores (2010) ampliaram a bioavaliação do aduto **13** contra as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi*, (figura 11), apresentando CI_{50} de 28.5 μM e 25.5 μM contra a forma epimastigota e tripomastigota, respectivamente.

Foram observados, em análise ultraestrutural realizada, alterações na morfologia da *T. Cruzi* quando administradas com o aduto **13**, como o aumento do volume e arredondamento corpuscular, intensa desorganização celular e a quebra (lise) da membrana nuclear com perda do material nuclear, evidenciando

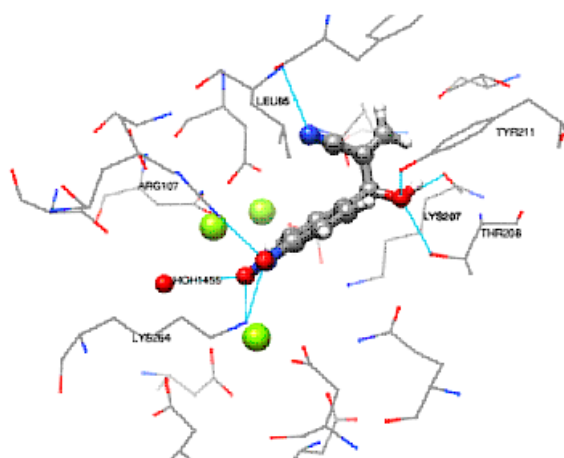
a ocorrência de mecanismos distintos da morte celular, apoptose, autofagia e necrose.

Figura 11. Estruturas químicas dos antichagásicos Benznidazol, Risedronato e do aduto **13**.



A partir dos resultados descritos, duas propostas de mecanismo de ação simultâneas foram apresentadas. A influência do potencial redox do grupo nitro (-NO₂) atuando na inibição da enzima *T. cruzi* farnesil pirofosfato sintase (TcFPPS). Nas investigações de *docking* molecular realizadas tanto com o Risedronato (inibidor desta enzima) quanto com o aduto **13**, usando o Benznidazol (não inibidor de TcFPPS) para validação da investigação, o aduto **13** mostrou moderada afinidade em TcFPPS (PMF SCORE = -77.543 Kcal mol⁻¹) quando comparado ao Risedronato (PMF SCORE = 119.142 Kcal mol⁻¹), indicando a inibição desta enzima como um dos possíveis alvos deste do aduto **13**.

Figura 12. Docking molecular em TcFPPS e alterações morfológicas observadas nas formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* quando tratadas com **13** (adaptado de SANDES *et al.*, 2010)



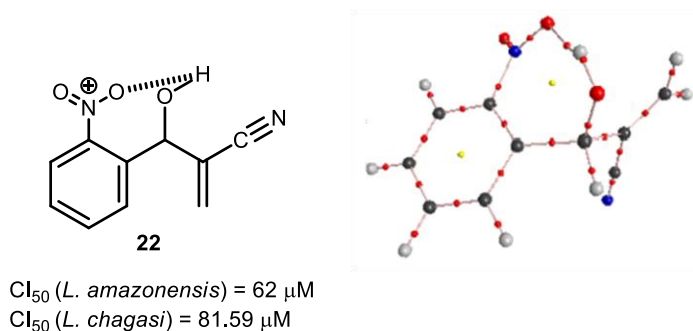
TcFPPS

PMF SCORE **13** (Kcal mol⁻¹): -77.543

Ainda em 2010, Lima-Junior e colaboradores relataram a avaliação biológica de 16 adutos aromáticos de MBH contra formas promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, realizando também a primeira análise da Relação Estrutura Atividade (REA) para esta série congênere. Todos os adutos testados tiveram atividade leishmanicida, sendo os adutos que contêm o grupo nitrila mais ativos que os adutos com a porção carboximetiléster. A ligação de hidrogênio intramolecular (LHI) entre a hidroxila e a carbonila da porção éster foi proposto como o principal motivo pela diminuição da interação com um suposto sítio ativo de um alvo enzimático doador ou aceitor de hidrogênio.

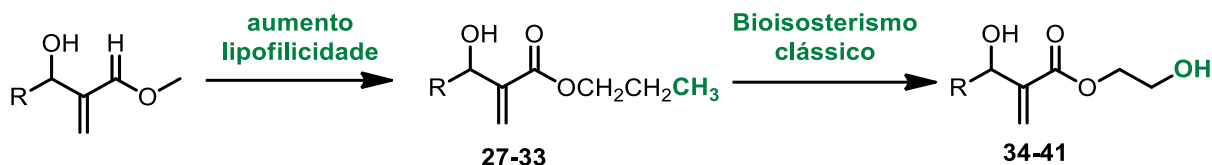
O aduto com a porção nitro (**22**) possuiu atividade semelhante ao seu análogo éster e a possível explicação para esta semelhante atividade leishmanicida foi proposta na formação de uma LHI entre o grupo nitro da posição *orto* do anel aromático e a hidroxila, onde esta LHI, foi caracterizada em anos anteriores por Alencar-Filho (2007) através de cálculos quânticos, usando a Teoria Átomos em Moléculas (QTAIM).

Figura 13. LHI caracterizada por QTAIM para o aduto **22**



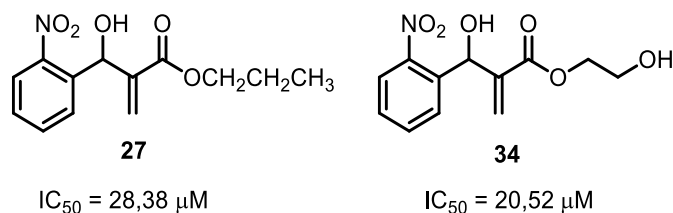
Vasconcellos e colaboradores publicaram dois trabalhos utilizando estratégias clássicas de Química Medicinal para a síntese dos AMBH. No primeiro trabalho (SILVA *et al.*, 2011), foi mostrado a síntese de 8 adutos a partir de aldeídos aromáticos e acrilato de propila (**27-33**) e 8 adutos foram sintetizados utilizando a técnica de bioisosterismo clássico (**34-41**), mostrados no esquema 7. Foi realizado também o aumento da cadeia alifática para se investigar a relação da lipofilicidade com o potencial da bioatividade leishmanicida, sendo constatada nenhuma relação entre ambas.

Esquema 7. Design dos AMBH usando o conceito de bioisoterismo clássico



Os adutos **27** e **34**, que possuem grupo nitro ligado ao anel aromático em posição *orto*, foram os mais ativos frente às formas promastigota de *L. amazonensis* com valores mostrados na figura 14. A possível explicação proposta foi a LHI sendo importante para uma mudança conformacional nos adutos **27** e **34**. Fato que influenciaria no potencial redox de ambos e consequentemente no aumento da atividade frente à forma promastigota de *L. amazonensis*.

Figura 14. IC_{50} dos adutos mais ativos frente às formas promastigota de *L. amazonensis*



Em seu segundo trabalho, Vasconcellos e colaboradores (BARBOSA *et al*, 2011) utilizam a técnica de Hibridação Molecular, uma estratégia clássica de conjugação de estruturas de compostos bioativos distintos em uma única molécula, através da reação de aldeídos aromáticos com o acrilato do salicilato de metila (**35**), promovida pelo DABCO, obtendo os adutos **36a-36f**, sendo considerada também uma abordagem de drogas gêmeas heterodimérica. O aduto **36c** foi o mais ativo na avaliação realizada frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, mostrado na figura 16.

Figura 15. Design dos adutos sintetizados via abordagem de hibridização molecular.

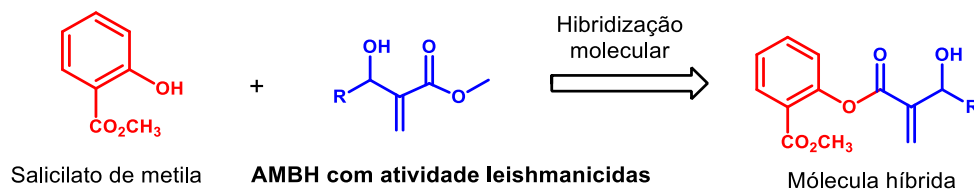
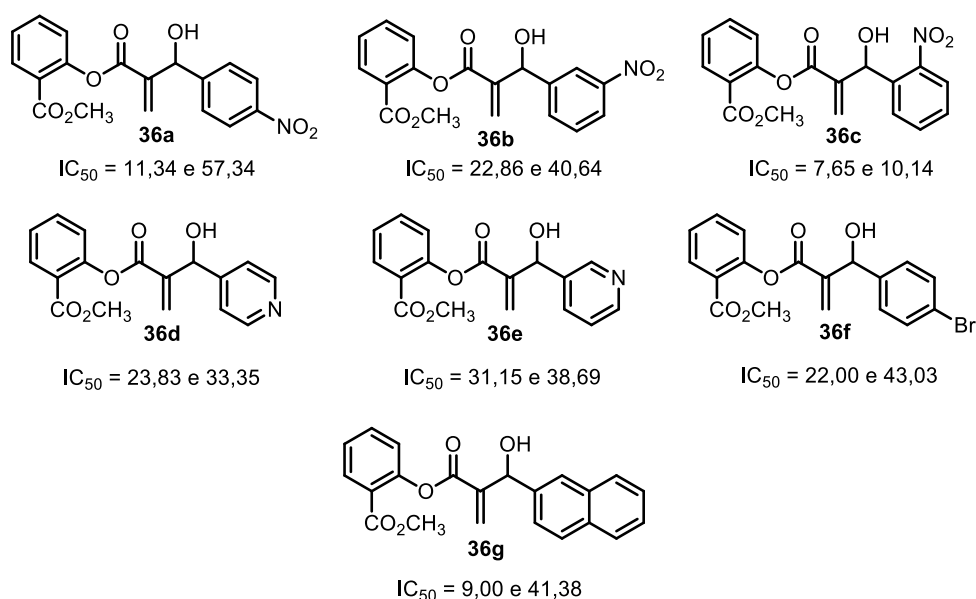
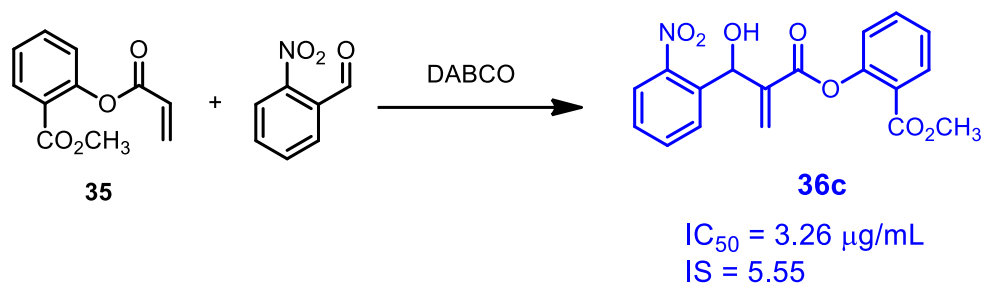


Figura 16. Cl₅₀ (μM) da atividade leishmanicida *in vitro* dos AMBH 36a-36f frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente



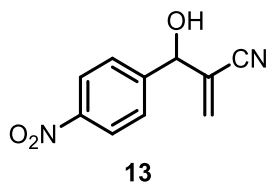
Dando prosseguimento ao trabalho, Amorin e colaboradores (2013), sintetizaram o AMBH **36c** (esquema 8) utilizando a técnica de hibridização molecular entre o salicilato de metila e um aduto derivado do *orto*-nitrobenzaldeído, e avaliaram a atividade *in vitro* contra as formas amastigota e promastigota de *L. (V.) braziliensis* para a linhagem de referência (MHOM/BR/1975/M2903). Foi relatado também que **36c** foi capaz de reduzir à produção de IL-6 e IL-10 favorecendo a ativação dos macrófagos resultando na redução da taxa de infecção, através da investigação das propriedades imunomoduladoras.

Esquema 8. Síntese do aduto do **36c** com seu respectivo IC₅₀ e IS



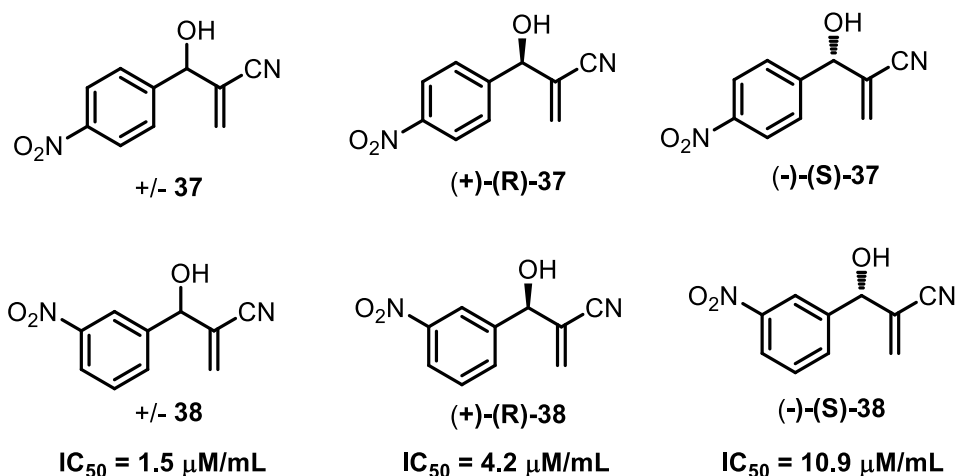
No ano seguinte, Sandes e colaboradores (2014), utilizaram a microscopia confocal e citometria de fluxo para o aduto **13**, visando melhor compreensão das alterações morfofisiológicas e do mecanismo de morte celular induzida em *T. Cruzi*. Foi constatado que, em elevadas concentrações do aduto, houve danos na membrana plasmática do parasita, perda do potencial de membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e acidificação do citoplasma, ocorrendo indução da morte celular por necrose.

Figura 17. Estrutura do 3-Hidroxi-2-metileno-3-(4-nitrofenilpropanonitrila) (**13**)



Xavier e colaboradores (2014) realizaram a primeira resolução cinética de AMBH catalisada por Lipase B *Candida antarctica*, em elevada enantiosseletividade (>99 e.e.), e elucidaram a configuração absoluta usando a metodologia Mosher. Após a bioavaliação de **+/- 38** e de seus enantiômeros frente à forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, foi observado que o composto racêmico possui maior atividade que os enantiômeros separados, porém tanto **+/- 38** quanto os enantiômeros *R* e *S* não apresentaram citotoxicidade frente a macrófagos peritonial de camundongos Swiss.

Figura 18. Enantiômeros dos adutos **37** e **38**



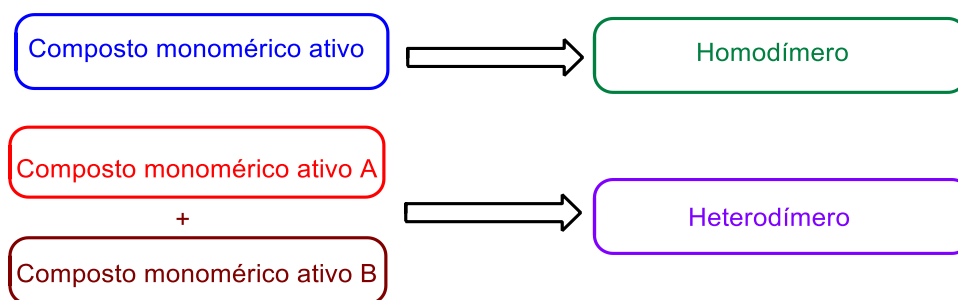
Diante dos trabalhos apresentados em ordem cronológica sobre a bioatividade dos AMBH frente a doenças antiparasitárias, fica justificado a importância do desenvolvimento dessa classe de compostos para serem investigados como novos candidatos à fármacos leishmanicidas.

2.4 Abordagem de drogas gêmeas (*twin drugs approach*) na busca por novos fármacos

O termo '*Twin drugs*' ou drogas gêmeas representa a união de duas entidades farmacofóricas que podem ser idênticas ou não, em uma única molécula, sendo classificado como homodímero ou heterodímero, respectivamente (WERMUTH, 2008).

A forma de obtenção de um homodímero é equivalente a um processo de duplicação ou dimerização de um composto ativo, com objetivo de obter uma droga mais potente e (ou) mais seletiva em comparação ao composto que a deu origem (figura 19). A abordagem de obtenção de um heterodímero consiste na união de dois compostos diferentes, com o objetivo de a nova entidade possuir as características iniciais dos compostos que a deram origem (figura 19). Esta última abordagem pode apresentar uma grande vantagem quando duas enzimas ou receptores-alvo estão envolvidos na mesma doença, onde elas sofreram ação sinérgica da droga ao mesmo tempo, através da modulação dois alvos biológicos (WERMUTH, C.G, 2008).

Figura 19. Formas de obtenção de homodímeros e heterodímeros

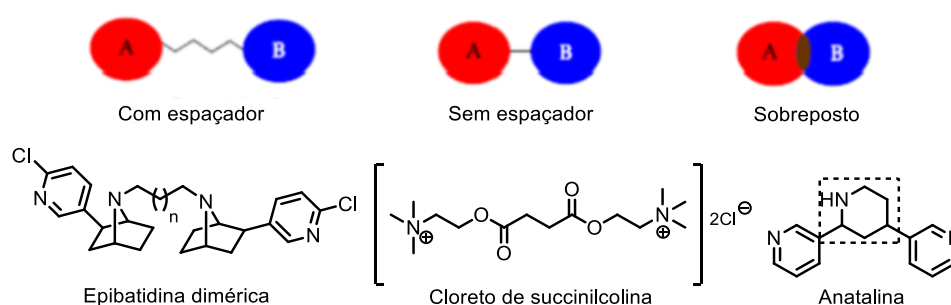


Fonte: Figura adaptada de Wermuth (2008)

A combinação de dois compostos ativos em uma molécula aumenta os pontos de interação com o alvo biológico e pode fornecer múltiplos ou complementares modos de ação (TIETZE, BELL, e CHANDRAEKHAR, 2003) (FUJII *et al*, 2009). A nova molécula formada possui propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas próprias (ISABELLE e DANIELA, 2015).

A combinação de dois compostos idênticos ou não idênticos pode ser classificada pelo tipo de conexão com espaçador (*linker*, podendo ser cadeia polimérica, um aromático, um anel heteroaromático, dentre outros), sem espaçador ou por sobreposição (*overlap*), mostrado na figura 20.

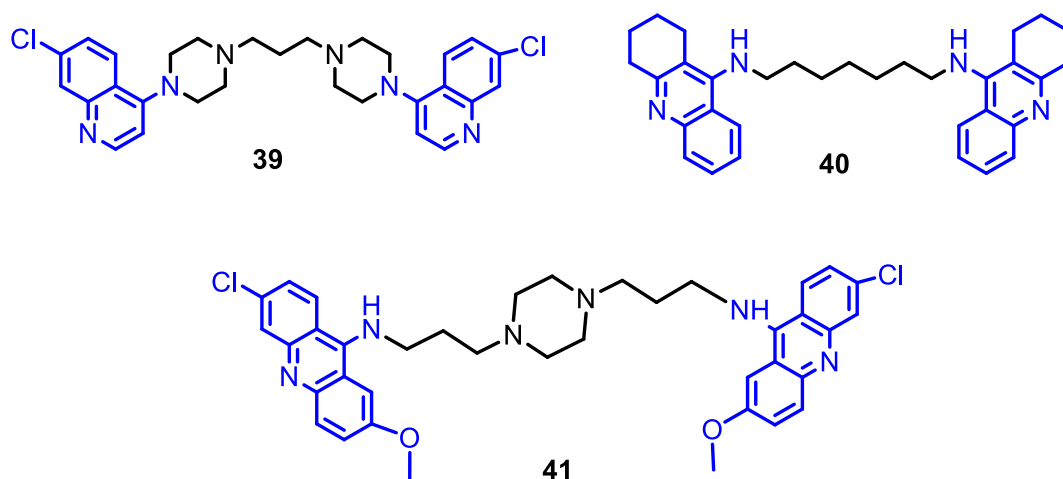
Figura 20. Classificação e exemplos das formas de combinação das drogas gêmeas



Fonte: Figura adaptada de Isabelle e Daniela (2015)

A piperaquina **39**, a bisaminoacridina **40** e a bistacrina **41** são alguns exemplos de drogas gêmeas idênticas (homodímeros), que apresentam maiores potenciais que sua forma individual, presente na literatura, mostradas na figura 21 (VENNERSTROM *et al*, 1992 e HU *et al*, 2002).

Figura 21. Exemplos de drogas gêmeas homodiméricas



Com base no discorrido, a estratégia de drogas gêmeas se mostra uma ferramenta importante na busca pela otimização de compostos que já apresentaram bioatividade em suas formas individuais e no desenvolvimento de drogas promissoras, bem como de novos e potenciais AMBH diméricos antiparasitários.

OBJETIVOS

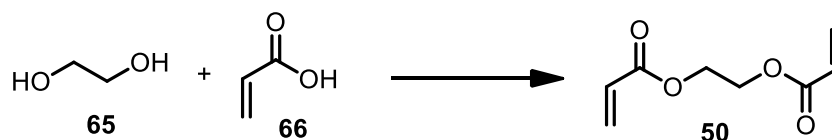
3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

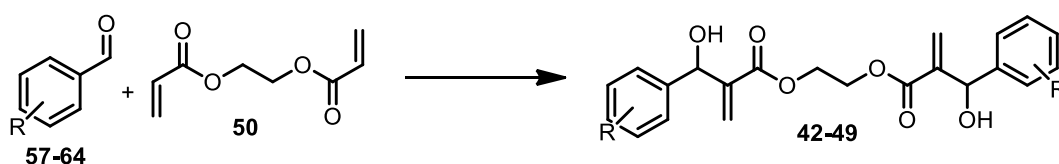
Sintetizar, caracterizar e bioavaliar a atividade antiparasitária de novos adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados a partir da abordagem de drogas gêmeas.

3.2 Objetivos Específicos

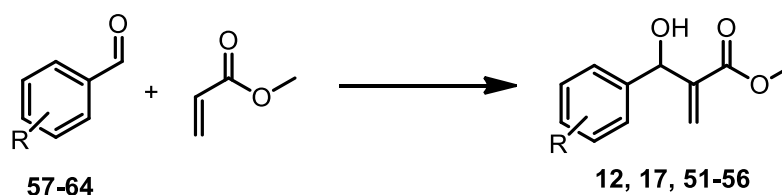
- Sintetizar e caracterizar o diacrilato do etilenoglicol (**50**) como aceitador de Michael para a RMBH;



- Sintetizar e caracterizar 8 novos adutos de Morita-Baylis-Hillman homodiméricos;



- Sintetizar 8 AMBH com porção acrilato de metila;



- Investigar e otimizar as condições experimentais sintéticas na RMBH;
- Avaliar e comparar a atividade biológica *in vitro* frente à *Leishmania donovani* de 8 homodímeros de AMBH e 8 adutos de MBH com porção carboximetilester.

ESTRATÉGIA

4. Estratégia

A administração de drogas diméricas podem alcançar melhores resultados frente à utilização de drogas separadas. A droga híbrida terá sua própria propriedade de absorção, distribuição, metabolismo e também a sua própria farmacodinâmica. Essas propriedades são mais previsíveis no híbrido do que em drogas separadas, além de apresentar maiores biodisponibilidade, potencial da droga frente ao alvo pretendido e modos de ação (WERMUTH, C.G, 2008).

Com isso, a estratégia do trabalho utiliza o conceito da abordagem de drogas gêmeas na RMBH, para obtenção e bioavaliação de novos AMBH homodiméricos (figura 22), relacionando-os com adutos que sejam parte dos homodímeros, ou já tenham sido testadas suas atividades contra espécies de *Leishmania* (figura 23).

Figura 22. AMBH homodiméricos planejados para síntese.

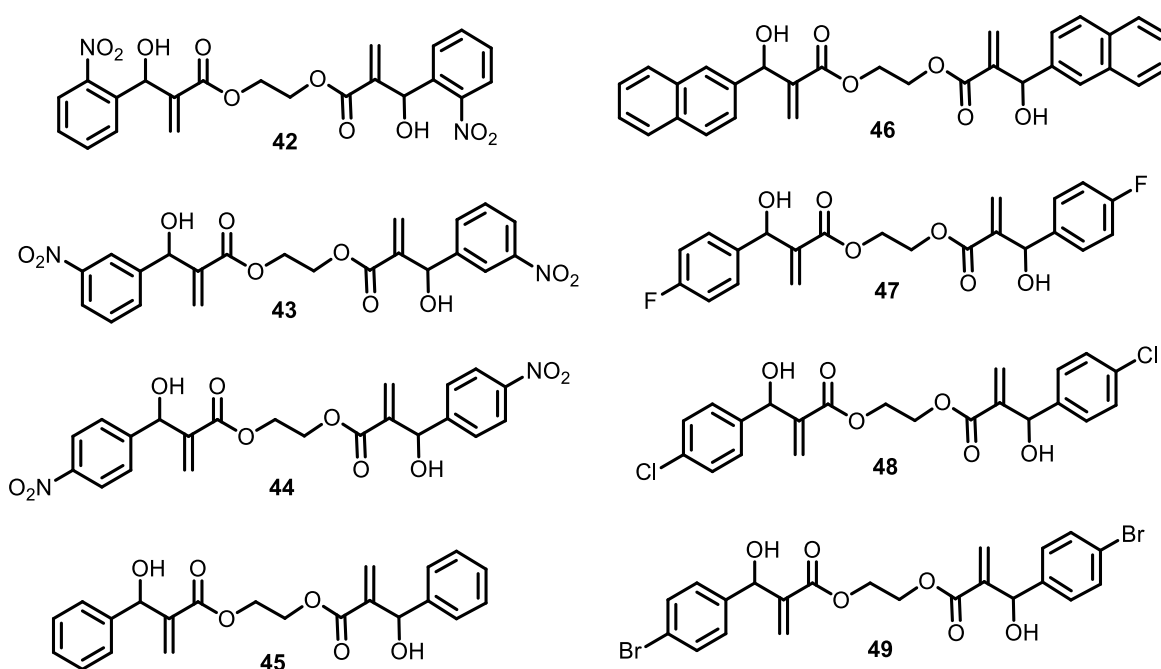
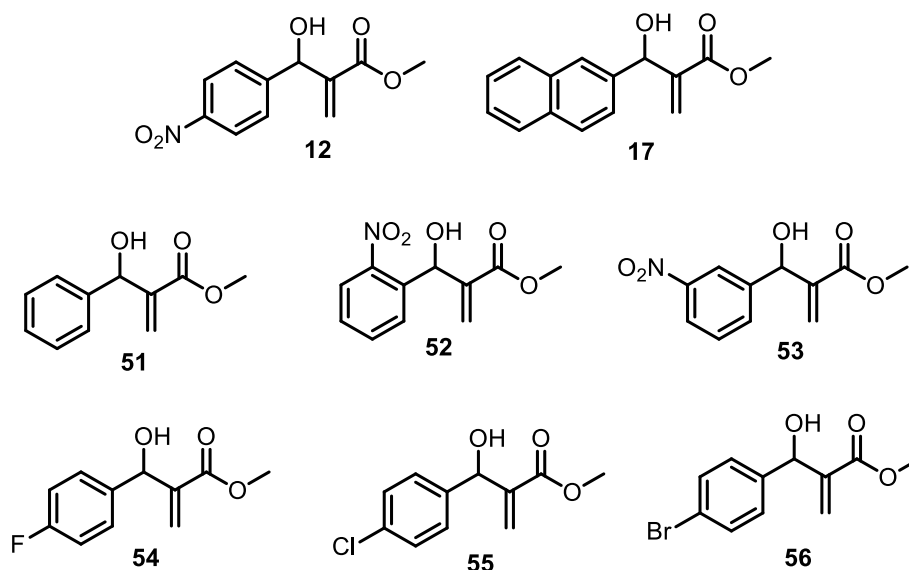


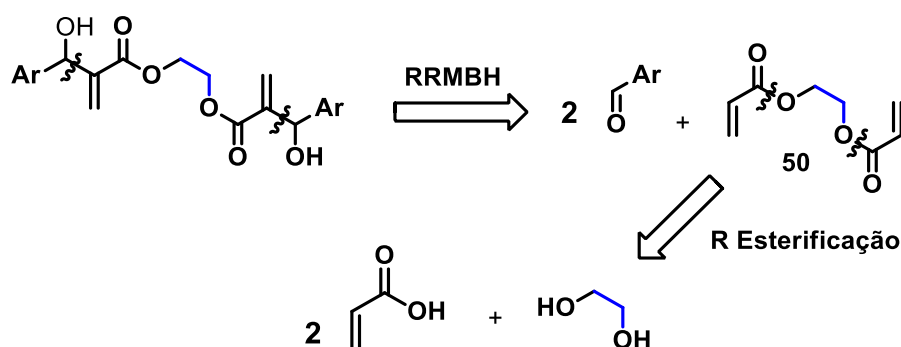
Figura 23. AMBH derivados do acrilato de metila bioavaliados frente a espécies de *Leishmania* (LIMA-JUNIOR e VASCONCELLOS, 2012).

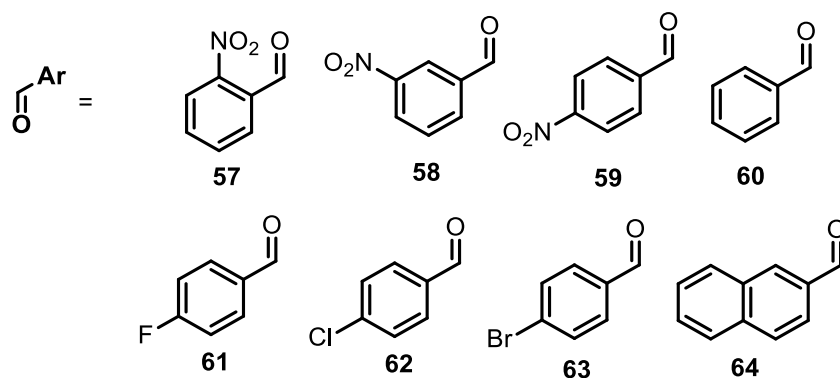


Dando início ao planejamento sintético, o primeiro passo parte da síntese do diacrilato do etilenoglicol (**50**), mostrado na análise retrossintética no esquema 8, relatado por Wu, Hao e Deng (2007), consistindo na reação de esterificação entre o etileno glicol e ácido acrílico.

Após a síntese do diacrilato **50**, o próximo passo foi a síntese de 8 AMBH homodiméricos, através da RMBH com ampla investigação das condições reacionais, utilizando aldeídos que deram origem aos adutos mostrados no esquema 9.

Esquema 9. Análise retrossintética para o planejamento da síntese do diacrilato do etilenoglicol e para a preparação dos AMBH homodiméricos inéditos planejados via estratégia drogas gêmeas.





Posteriormente, as novas moléculas foram avaliadas *in vitro* contra a forma promastigota da *leishmania donovani*, em parceria com a Professora Tatijane Kieersen, do centro de biotecnologia da UFPB. Os resultados poderiam ratificar ou não o uso da estratégia escolhida como uma importante alternativa sintética-biológica para potencializar a ação dos fármacos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e discussão

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese do diacrilato do etileno glicol, o qual foi utilizado com o aceitador de Michael na RMBH, sendo a molécula chave para as reações posteriores.

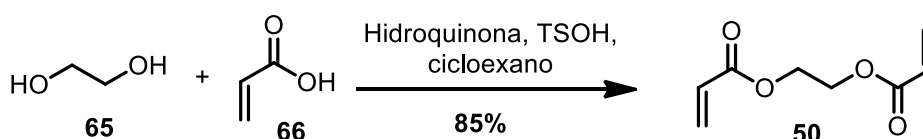
A segunda etapa foi voltada para a síntese dos homodímeros dos AMBH, utilizando a estratégia de drogas gêmeas, buscando uma melhor condição sintética e de performance na avaliação biológica. Foi realizado também, a síntese dos AMBH derivados do acrilato de metila, para fazer uma correlação dos resultados biológicos com os AMBH homodiméricos.

A terceira e última etapa foi dedicada à avaliação biológica dos AMBH e suas correlações quanto às taxas de bioatividade.

5.1. Parte sintética

Dando início ao procedimento experimental com a síntese do diacrilato do etilenoglicol (**50**), partindo de matérias-primas de baixo custo e de fácil disponibilidade comercial, o etilenoglicol (**65**) foi usado como substrato para ser esterificado com o ácido acrílico (**66**), seguindo a metodologia de Wu e colaboradores (2007). A esterificação foi realizada em cicloexano como solvente, utilizando o aparelho *Dean-Stark* sob ação ácido-catalítica do *p*-toluenossulfônico (TsOH) a 110°C por 6 horas, utilizando a hidroquinona como agente antipolimerizante, obtendo o diacrilato do etileno glicol (**50**) em 85% de rendimento. Após isso, foi realizada a neutralização da reação com solução de NaOH 0,1 M, rotaevaporação da mistura e separação do diacrilato **50** por cromatografia *flash*, otimizando a metodologia de Wu e colaboradores (Esquema 10).

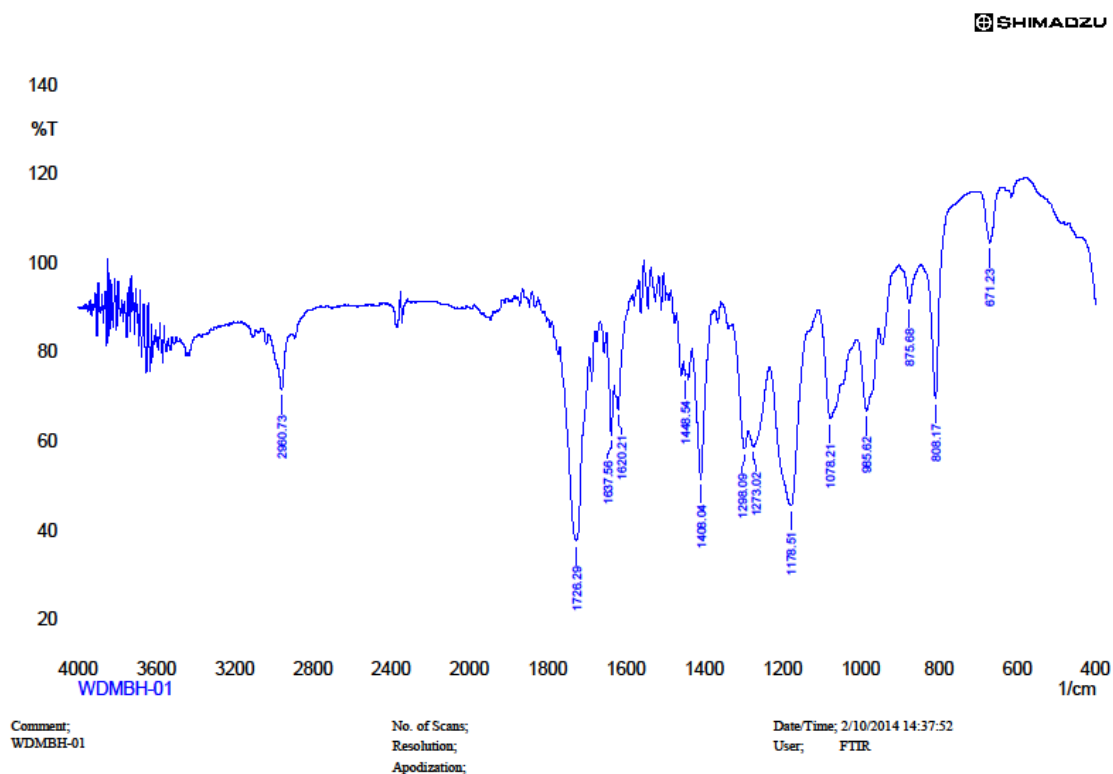
Esquema 10. Síntese do diacrilato **50**



A formação do possível produto esterificado foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), na qual foi possível verificar o aparecimento de um produto mais apolar que o **65** e **66**. O consumo total de **65**, reagente limitante, ocorreu após 6h de reação.

Na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho foi constatado a presença de carbonila de éster na região de 1726,29 (apresentando um alongamento maior da banda por apresentar carbonilas sobreponíveis), pela presença de estiramentos C-O em 1298,09, 1273,02 e pela ausência da banda de hidroxila (OH), mostrado na figura 24 e no espectro 1, na seção de espectros.

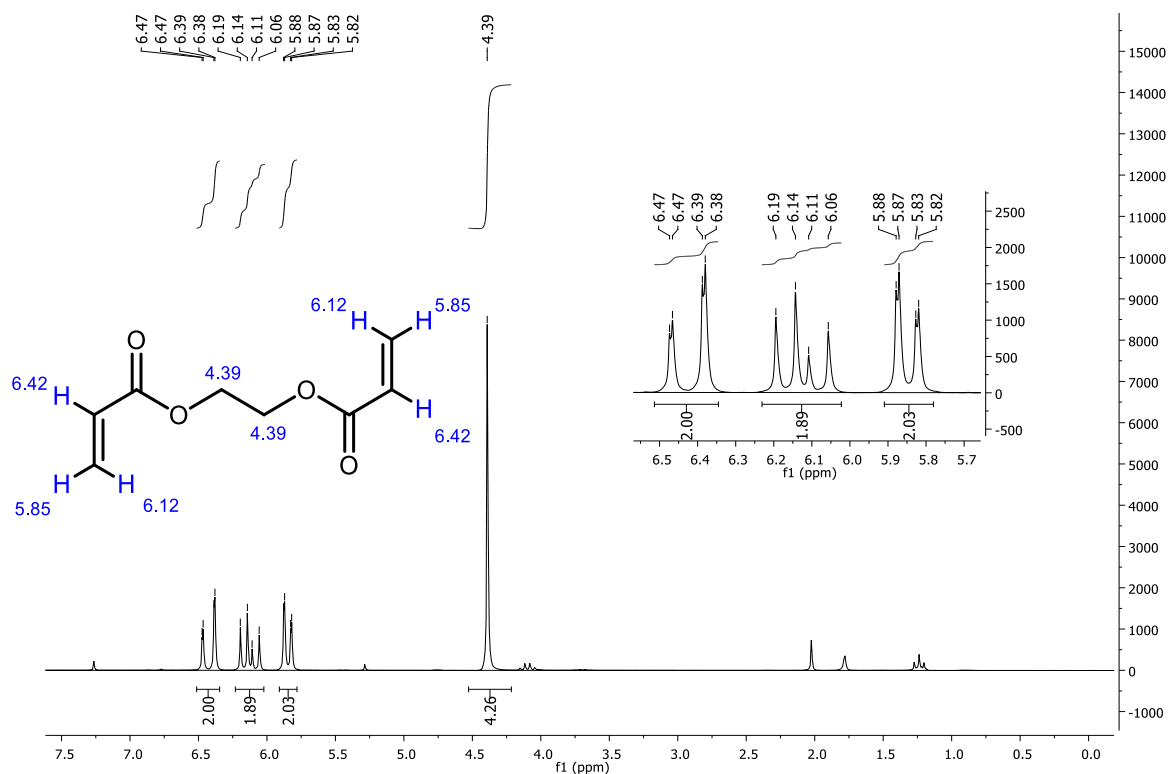
Figura 24. Principais estiramentos C-O e carbonila de éster de **50**.



O produto **50** também foi caracterizado por RMN ^1H e RMN ^{13}C , mostrado nas figuras 25 e 26.

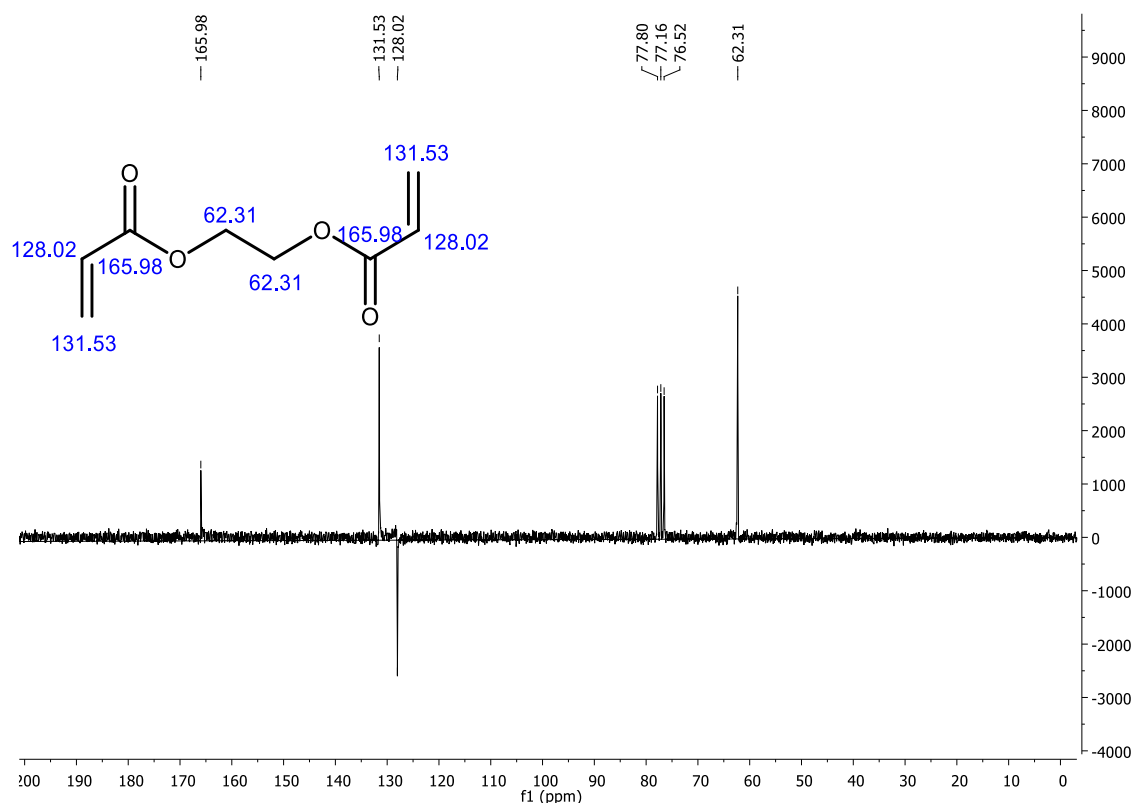
O espectro de RMN ^1H do diacrilato **50** apresenta dois *dubletos* de hidrogênios vinílicos em 6.12 e 5.85 ppm, um *dubeto* em 6.42 ppm mais desblindado por estar mais próximo à carbonila, e um *singlete* em 4.39 ppm referente aos 4 hidrogênios alquílicos.

Figura 25. Estrutura, espectro e dados espectroscópicos de RMN ^1H de **50**



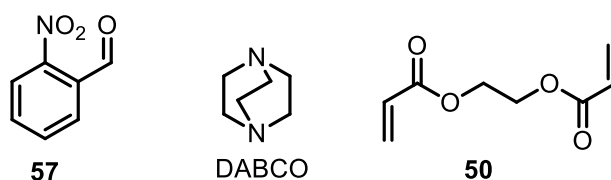
No espectro de RMN ^{13}C , os sinais apresentaram em δ 165.9 (carbonílico), 131.5, 128.0, 77.8, 77.1, 76.5 e 62.3 ppm.

Figura 26. Estrutura, espectro e dados espectroscópicos de RMN ^{13}C de **50**

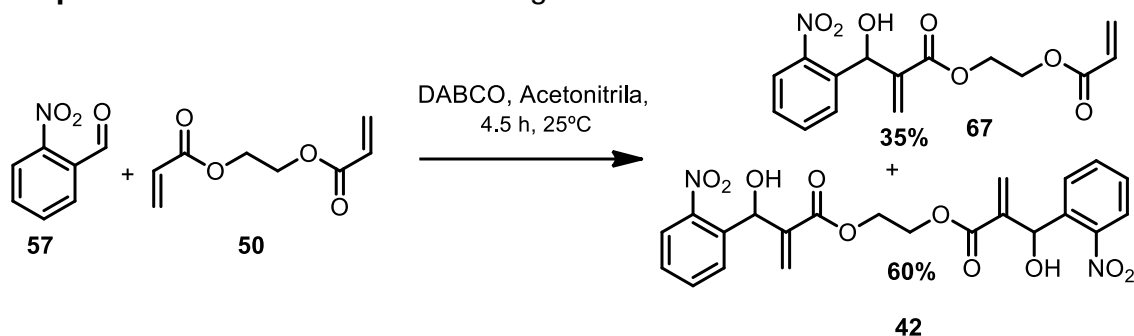


Com o diacrilato **50** em mãos, foi iniciada a investigação para a síntese dos homodímeros. Como substrato eletrofílico, inicialmente foi escolhido o aldeído **57** por apresentar boa reatividade frente aos demais aldeídos aromáticos e resposta biológica do AMBH derivado frente aos alvos investigados, relatados por Silva e colaboradores (2011). O promotor da reação e solvente inicialmente investigados foram o DABCO e acetonitrila, por apresentar bons resultados já descritos (SILVA *et al* 2011).

Figura 27. Compostos utilizados na primeira investigação da RMBH.



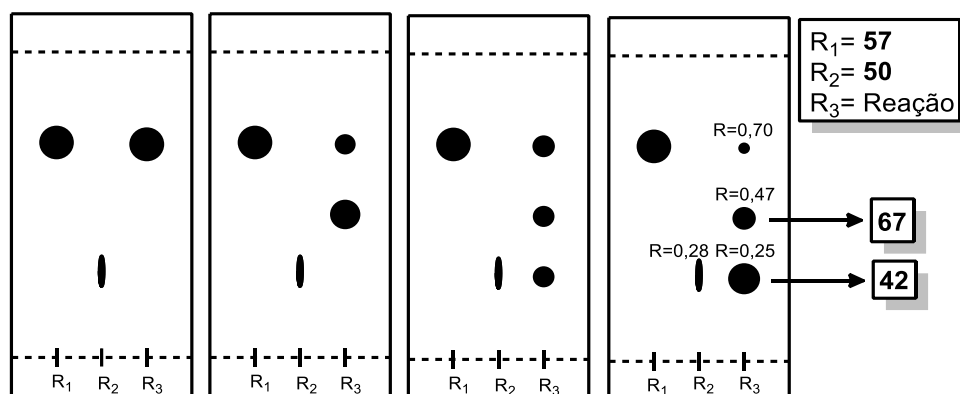
Esquema 11. Primeira RMBH investigada



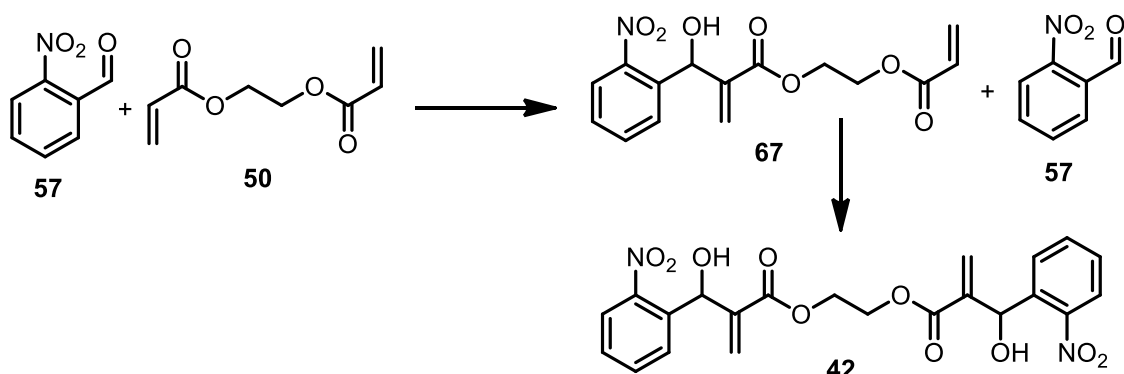
Durante o acompanhamento da reação via CCD foi observado a formação de dois produtos (**50** não foi visualizado por ultravioleta no *spot* da reação) e em seguida a reação foi isolada via cromatografia flash, com eluição 20 - 60% acetato de etila/hexano.

Os produtos da reação (figura 28) foram de fato confirmados via análise dos dados obtidos por RMN ^1H e ^{13}C (os dados se encontram no capítulo da parte experimental e dos espectros), tendo formado o produto da adição de aldeído em uma das extremidades do diacrilato **50** em 35% de rendimento, e o outro produto com a adição do aldeído nas duas extremidades de **50** em 60% de rendimento. Também foi observado por CCD que primeiro ocorre a formação do aduto (**67**) frente ao aduto dimérico (**42**), indicando **67** como o produto cineticamente favorecido.

Figura 28. Acompanhamento da formação dos produtos via CCD



Esquema 12. Formação dos produtos **67** e do homodímero **42**



Após a obtenção do primeiro AMBH homodimérico, iniciou-se o estudo para a determinação do melhor solvente para as demais RMBH homodiméricas, ainda utilizando o aldeído **57**. A investigação do solvente buscou a otimização do rendimento em relação ao favorecimento da formação do produto dimérico (**42**). A escolha dos solventes a serem investigados foi baseada em trabalho anterior de De Souza (2008), em que foi investigado o uso de vários solventes polares próticos e apróticos.

Esquema 13. Investigação de solvente na RMBH

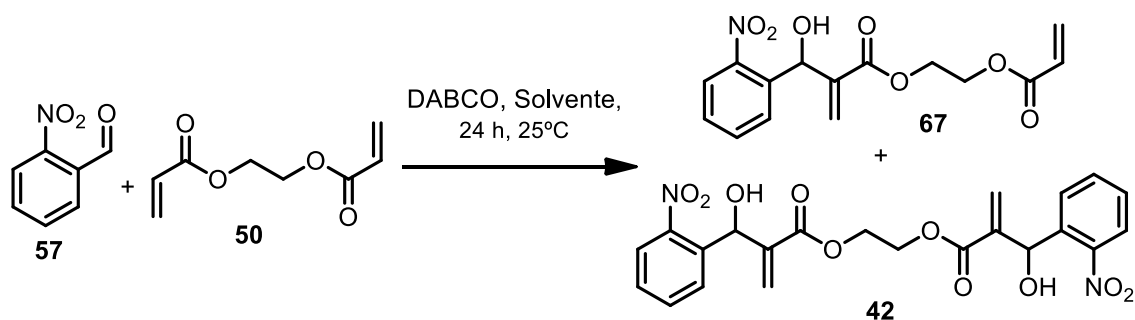


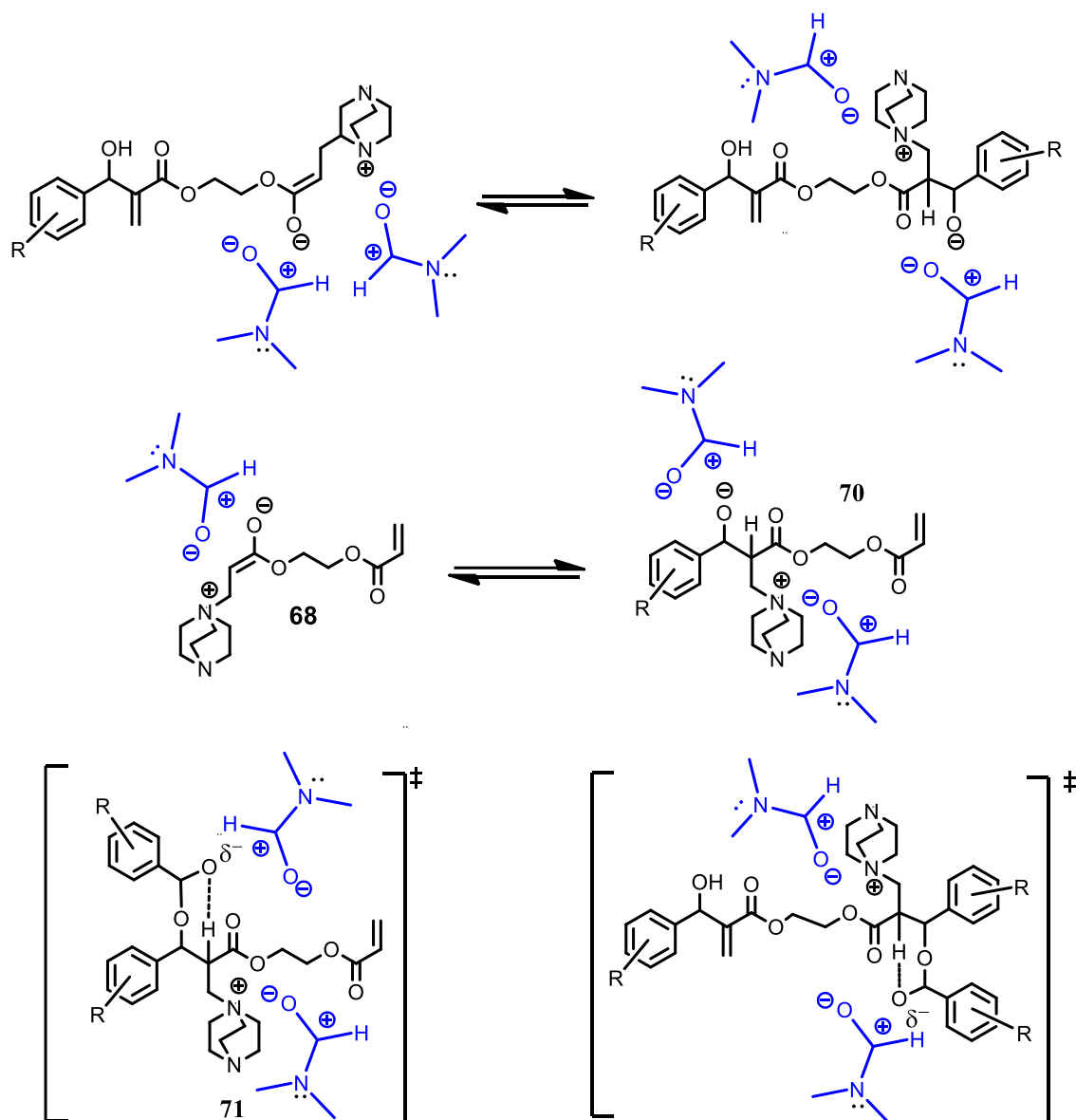
Tabela 3. Rendimentos isolados do produto dimérico **42** e do aduto **67** frente a investigação de solventes

Solvente	Rendimento de 42	Rendimento de 67
Acetonitrila	88%	6%
Acetonitrila/água	<1%	25%
<i>Terc</i> -butanol	86%	8%
<i>Terc</i> -butanol/água	33%	62%
DMF	94%	<1%
DMF/água	21%	70%
CH ₃ OH	-	-
DMSO	68%	25%
DMSO/água	15%	84%
THF	80%	6%
THF/água	<1%	59%

Dentre os solventes, a acetonitrila e *terc*-butanol apresentaram rendimentos de **42** semelhantes, 88% e 86%, respectivamente, todas em t.a. e em 24 horas. As reações em que foram utilizadas uma mistura de solvente/água obtiveram rendimentos de 33% e 21% para *terc*-butanol/água e DMF/água para o produto **42**, sendo observado o favorecimento da formação do produto **67** em rendimentos de 62% e 70%, respectivamente. As reações em DMSO/água e em THF/água produziu o produto **67** como majoritário frente ao homodímero **42** em 84% e 59%. A reação em que foi utilizado o DMF obteve melhor rendimento (94%) e, logo, este foi escolhido para as reações posteriores.

A maior eficiência do DMF pode ser atribuída devido a sua polaridade ($\epsilon=37$), característica na qual este solvente pode estar estabilizando as cargas das espécies zwitteriônicas por efeito de solvatação, possibilidade essa relatada por Mcquade (PRICE *et. al.*, 2005). De maneira geral, Mcquade observou um aumento na velocidade da reação quando se utiliza solventes polares.

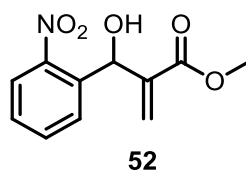
Esquema 14. Proposta do efeito de solvatação na estabilização das cargas das espécies zwitteriônicas



Todas as reações em que foram utilizadas a mistura de solvente/água produziram o homodímero **42** em menor proporção em relação ao produto produto **67**. As tentativas em se avaliar essa mistura são devido a proposta mecanística recente de Plata e Singleton (2015) onde é mostrado que fontes de próton participam da etapa de eliminação proposta em duas etapas ácido-base, sendo a primeira a transferência de próton (etapa lenta), e a segunda a eliminação do DABCO (exemplo mostrado no esquema 5), visando acelerar a obtenção do homodímero **42**. Todavia, ocorreu o favorecimento da formação do produto **67**.

Para a reação em que foi utilizado o metanol como solvente foi observado a formação, via CCD, de um único produto. Porém, após análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foi observado a formação do produto resultante da reação de transterificação através do ataque nucleofílico do metanol à carbonila do alceno ativado.

Figura 29. Formação do 2-(hidroxi (2-nitrofenil) acrilato de metila (**52**) na reação em metanol.



Os produtos das reações (tabela 3) foram confirmadas via análise dos dados obtidos de RMN ^1H , RMN ^{13}C e de massas de alta resolução e se encontram no capítulo da parte experimental e dos espectros.

Após a investigação e seleção do melhor solvente, DMF, ainda temperatura ambiente devido ao excelente rendimento do homodímero **42** nessas condições, as mesmas foram fixadas para a síntese dos demais AMBH homodiméricos planejados. A tabela 4 mostra as reações em tempos e rendimentos.

Esquema 15. Esquema geral para a síntese de 8 homodímeros de AMBH.

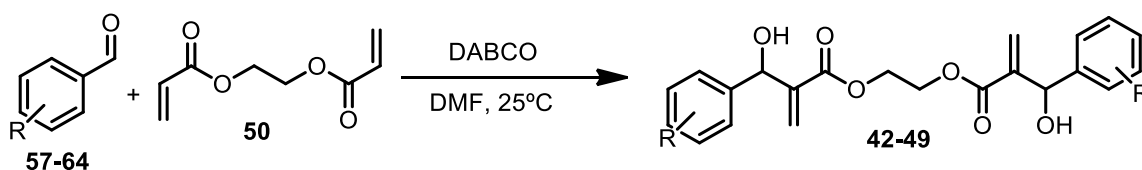


Tabela 4. Tempo reacional e rendimentos das RMBH para a síntese de 8 homodímeros de AMBH

Aldeído	R	Tempo	Rendimento (%)
57	2-NO ₂	24h	94
58	3-NO ₂	24h	88
59	4-NO ₂	24h	92
60	benzil	20 dias	60

61	F	20 dias	35
62	Cl	20 dias	48
63	Br	20 dias	40
64	naftil	20 dias	35

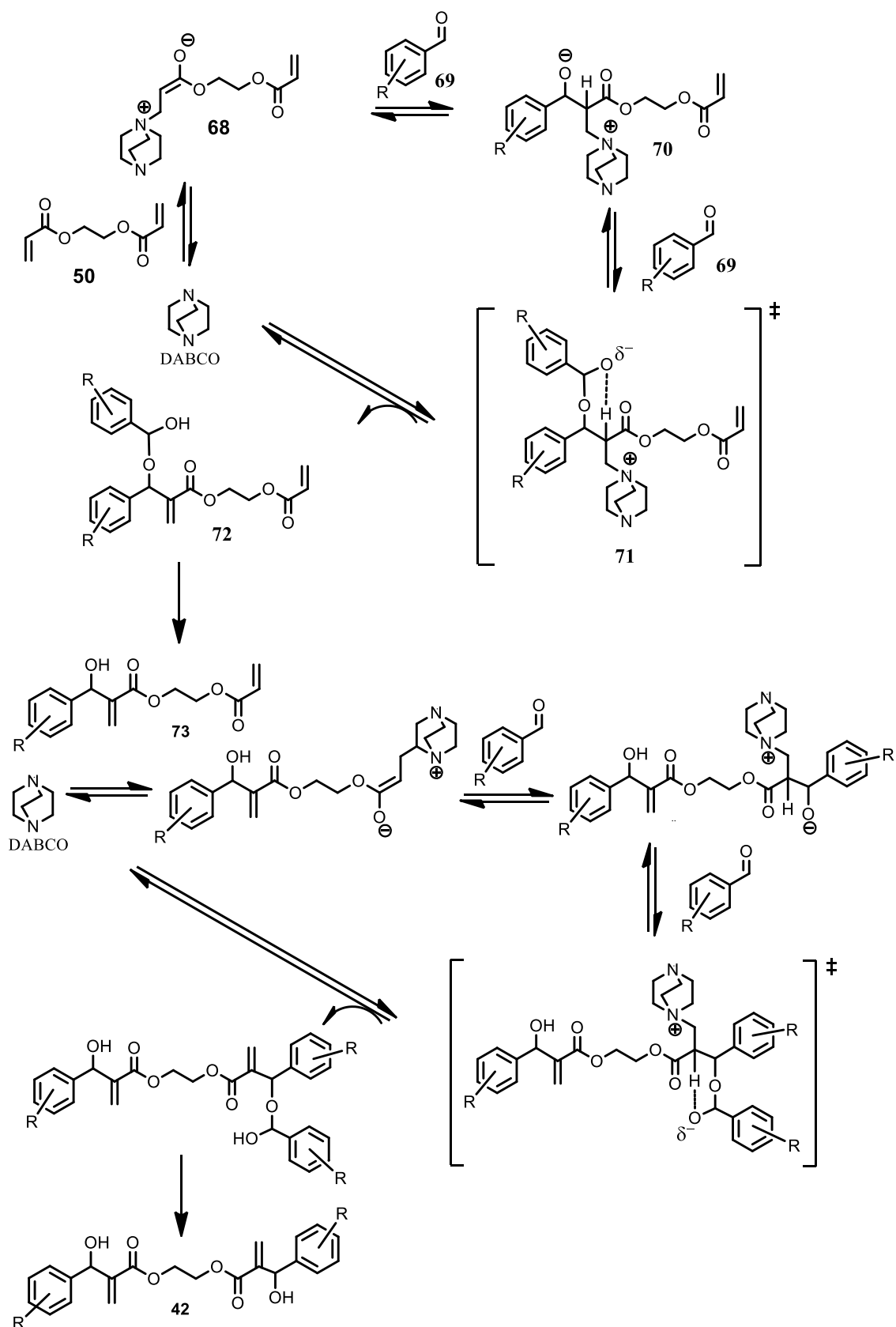
As reações que partiram de substratos contendo o grupo NO₂ foram as mais rápidas, obtendo os produtos com rendimentos entre 88-94%. Os demais substratos se mostraram menos reativos, chegando a 20 dias de reação com rendimentos entre 35-60% do produto homodimérico, sendo observado apenas a formação de traços do produto monomérico ao vigésimo dia de reação.

Os produtos das reações (tabela 4) foram confirmados via análise dos dados obtidos por RMN ¹H e ¹³C, e massa de alta resolução, e se encontram no tópico de caracterização dos homodímeros **42-49**, no capítulo da parte experimental e de espectros.

Para essas reações de Morita-Baylis-Hillman homodiméricas, propomos o mecanismo geral de acordo com a proposta de Mcquade e colaboradores (PRICE *et. al.*, 2005). O solvente utilizado, DMF, é polar aprótico e, segundo Mcquade, o mecanismo da reação consiste em 5 etapas. A primeira delas consiste na adição 1,4 do DABCO ao diacrilato **50**, gerando um enolato zwitterionico **68**, seguido da adição aldólica ao aldeído **69**, gerando um novo intermediário **70**. O próximo passo é a adição de uma segunda molécula do aldeído **69** na espécie **70** (seguindo a cinética de segunda ordem em relação ao aldeído), gerando **71**. A espécie **71** passa por um estado de transição de seis membros (etapa de eliminação, proposta pela transferência de hidrogênio intramolecular como sendo a etapa limitante da velocidade), gerando o intermediário **72** e eliminando o DABCO que retorna ao ciclo catalítico para promover a reação na outra extremidade da espécie **73**, dando sequência ao mecanismo para formação do AMBH homodimérico (Esquema 16).

Nesse trabalho não foram realizadas investigações experimentais acerca do mecanismo, porém o que é apresentado foi proposto com base na proposta de Mcquade para solventes polares apróticos, a qual atualmente continua sendo aceita na comunidade científica.

Esquema 16. Proposta mecanística para a RMBH homodimérica com base na proposta de McQuade e colaboradores (PRICE *et. al.*, 2005).



Concluído a síntese dos 8 AMBH homodiméricos, fez-se necessário investigar as condições experimentais da reação devido ao tempo reacional relativamente longo dos substratos menos reativos **60**, **61**, **62**, **63** e **64**. Primeiramente, foram investigadas variações na temperatura da reação, sendo escolhido o aldeído **64**, o menos reativo, para as investigações, conforme mostrado na tabela 5.

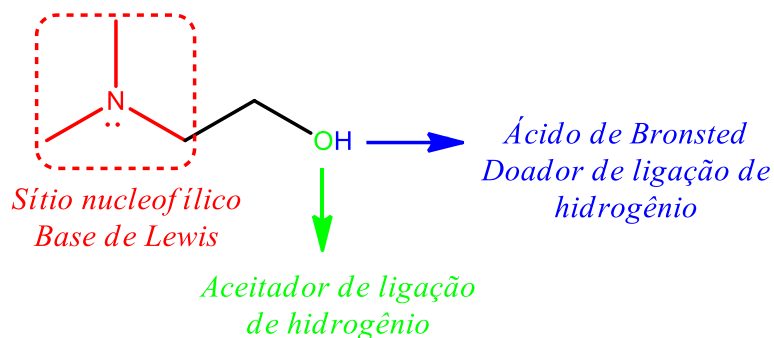
Tabela 5. Investigação da temperatura para o homodímero **46**

Temperatura/Tempo	Rendimento de 46
0 °C/5 dias	Não formado
Mw 80°C/2h	Não formado
80°C/5 dias	Não formado

Alguns relatos na literatura mostram que algumas RMBH à temperatura de 0 °C e em reator de micro-ondas com elevação da temperatura provocam a aceleração da reação (LIMA-JUNIOR *et al*, 2010). Na primeira condição, a 0°C, a escolha foi devido à ausência da formação de coprodutos e a aceleração das reações devido a fatores entrópicos. Nas demais condições, as escolhas foram devido ao relato da aceleração da reação obedecendo à temperatura de reversibilidade acima de 80°C, em que se utilizou o aldeído **64** como substrato eletrofílico (LIMA-JUNIOR *et al*, 2010). Contudo, após 5 dias de reação, não foi observado a formação do homodímero por CCD em nenhuma das condições apresentadas na tabela 5.

Foi investigado também a utilização dos líquidos iônicos (LI) [bmin][BF₄] e [bmin][PF₆], pois, de acordo com relatos na literatura (ROSA *et al*, 2001) (RODRIGUES *et al*, 2014), os LI são capazes de acelerar a RMBH por melhor estabilização de cargas por efeito de solvatação nas espécies zwittterionicas. Além do LI, também foi estudado o uso do dimetilaminoetanol (DMAE), um composto que apresenta possível característica de um catalisador para a RMBH até então não relatado na literatura (figura 30), na tentativa de acelerar a formação dos adutos homodiméricos. Escolhendo o substrato menos reativo **64** para investigação, fixamos o tempo reacional em 10 dias.

Figura 30. Estrutura e características do DMAE como possível catalisador para a RMBH



Esquema 17. Reação de investigação das condições catalíticas para o substrato **64**

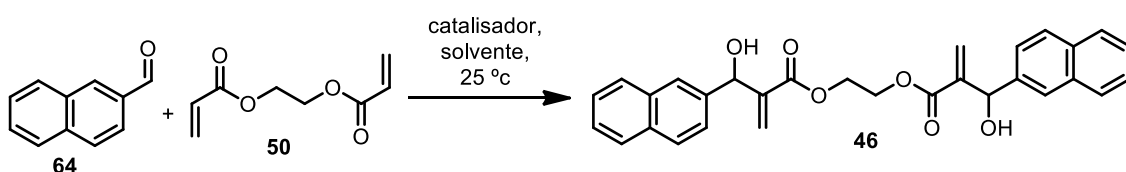


Tabela 6. Investigação das condições catalíticas para o substrato **64**

Catalisador	solvente	Rendimento dimérico
-	[bmin][PF6]	Não formado
-	[bmin][BF4]	Não formado
DABCO	[bmin][PF6]	Não formado
DABCO	[bmin][BF4]	Não formado
DMAE	-	Não formado
DMAE	[bmin][PF6]	Não formado

Conforme mostrado na Tabela 6, nenhum dos parâmetros investigados promoveu a aceleração da reação na formação dos adutos homodiméricos, onde o produto dimérico não foi formado via observação por CCD.

Concluídas as tentativas em otimizar as reações MBH homodiméricas, de acordo com os materiais disponíveis no laboratório, foi iniciado a síntese dos AMBH com porção carboximetilester aos AMBH homodiméricos. As sínteses foram realizadas seguindo a metodologia descrita em Lima-Junior e Vasconcellos (2012), mostrados no esquema 18 e Tabela 7. Os adutos obtidos

foram isolados por filtração simples em sílica-gel por não apresentarem coprodutos, e caracterizados por RMN ^1H e ^{13}C .

Esquema 18. Esquema geral para a síntese de 8 AMBH

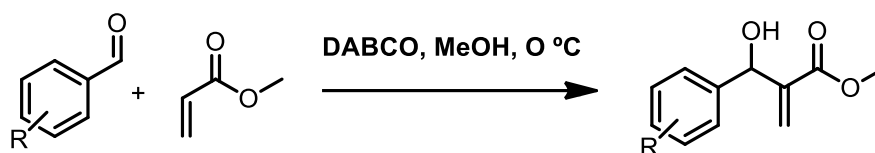


Tabela 7. Tempo reacional e rendimentos para a síntese de 8 AMBH

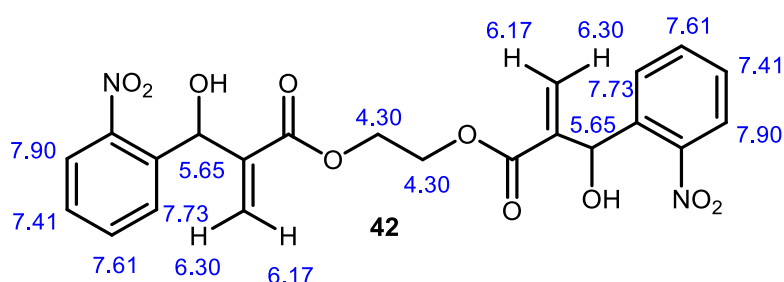
Aldeído	R	Tempo	Rendimento (%)
57	2-NO ₂	3h	90
58	3-NO ₂	1h	92
59	4-NO ₂	3h	85
60	benzil	2 dias	95
61	F	2 dias	86
62	Cl	2 dias	88
63	Br	3 dias	84
64	naftil	10 dias	65

A metodologia citada e utilizada mostra que, para o sistema acrilato de metila e aldeídos aromáticos, solvente polar prótico e a temperatura a 0 °C se tornam importante para acelerar a reação, devido à alta organização do estado de transição (volume de ativação de $-70 \text{ cm}^3/\text{mol}$) na etapa lenta da reação, o que não é favorável (volume molar do estado de transição menor que o volume molar dos reagentes) para a velocidade da reação ($\Delta G^\ddagger$ menor). Como $\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$, nota-se que a variação da temperatura altera o termo entrópico e não o entálpico. Logo, neste caso, utilizando a temperatura a 0 °C, o termo entrópico é menos significativo e a reação é mais veloz (LIMA-JUNIOR *et al*, 2010).

5.2 Parte espectroscópica

Todos AMBH homodiméricos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e massas de alta resolução, e os homodímeros **45** e **49** também por infravermelho. Os compostos **42-49** são inéditos e a tabela 7 destaca alguns sinais característicos da análise de RMN que confirmam a formação destes produtos. O composto **42** foi escolhido para apresentar a caracterização dos homodímeros, mostrado nas figuras 31 e 32.

Figura 31. Dados espectroscópicos de RMN ^1H do homodímero **42**

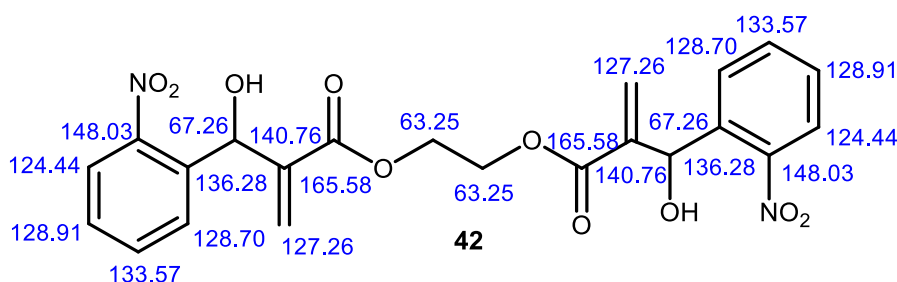


No espectro de RMN ^1H , o homodímero **42** apresenta dois dubletos em 7.90 e 7.73 ppm e dois tripletos em 7.61 e 7.41 ppm, referentes aos hidrogênios da região aromática, dois singletos referentes aos hidrogênios vinílicos em 6.30 e 6.17 ppm, um singleto em 4.30 ppm referente a 4 hidrogênios alquílicos, e um *singleto* em 5.65 ppm relativo ao hidrogênio carbinólico. Em comparação com os sinais dos hidrogênios carbinólicos dos seus isômeros, o hidrogênio carbinólico de **42** é o mais desblindado devido a ligação de hidrogênio com o grupo nitro ($-\text{NO}_2$) (FILHO et al, 2007).

De forma geral, nos espectros de RMN ^1H dos homodímeros de **42-49**, foram observados sinais referentes aos hidrogênios vinílicos que se apresentaram como singleto ou dubleto entre 5.47 e 6.30 ppm. Já os sinais referentes aos hidrogênios da região aromática estão entre 7.20 e 8.16 ppm, apresentados com dubleto ou multipeto.

No espectro de RMN ^{13}C , os sinais apresentaram em 165.58 (carbonílico), δ 148.03, 140.76, 136.28, 133.57, 128.91, 128.70, 127.26, 124.44, 67.26 (carbinólico) e 63.25 ppm.

Figura 32. Dados espectroscópicos de RMH ^{13}C do homodímero **42**



Nos espectros de RMN ^{13}C , sinais importantes foram identificados com deslocamento químico entre 67,26 e 72,99 ppm referente aos carbonos carbinólico, e entre 165,24 e 165,78 referente as carbonos carbonílicos.

As caracterizações espectroscópicas detalhadas dos homodímeros **42-49** estão descritas no capítulo da parte experimental. Os principais dados espectroscópicos estão sumarizados na tabela 8.

Figura 33. Estrutura geral dos homodímeros

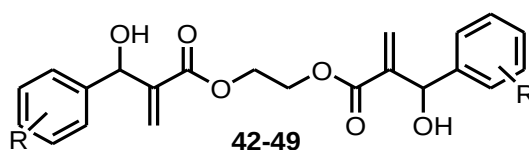


Tabela 8. Dados espectroscópicos principais dos homodímeros de AMBH inéditos **42-47**.

AMBH	R	IV (cm^{-1})	RMN ^1H (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)
42	2- NO_2	-	7.90 (d, $J=10\text{Hz}$, 2H), 7.73 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.61 (t, $J=8/J=8\text{Hz}$, 2H) 7.41 (t, $J=8/6\text{Hz}$, 2H) 6.30 (s, 2H), 6.17 (s, 2H) 5.65 (s, 2H), 4.30 (s, 4H)	67.26 (carbono carbinólico)
43	3- NO_2	-	8.18 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 8.08 (d, $J=8\text{Hz}$, 3H), 7.68 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H), 7.47 (t, $J=8/J=8\text{Hz}$, 2H), 6.32 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.58 (d, $J=4\text{Hz}$, 2H), 4.30 (s, 4H), 3.47 (s, 2H).	72.08 (carbono carbinólico)
44	4- NO_2	-	8.16 (d, $J=10\text{Hz}$, 4H), 7.53 (d, $J=8\text{Hz}$, 4H), 6.34 (s, 2H), 5.94	72.28 (carbono carbinólico)

			(s, 2H), 5.60 (s, 2H), 4.33 (s, 4H), 3.38 (2H).	
45	Benzil	-	7.31 (m, 10H), 6.29 (s, 2H), 5.86 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 4.24 (s, 6H), 3.27 (s, 2H).	72.77 (carbono carbinólico)
46	naftil	-	7.81 (m, 8H), 7.43 (m, 7H), 6.27 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 4.28 (s, 5H).	72.99 (carbono carbinólico)
47	F	-	7.35 – 7.20 (m, 8H), 6.30 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 4.30 (s, 4H).	72.52 (carbono carbinólico)
48	Cl	-	7.35 -7.20 (m, 8H), 6.29 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 4.31 (s, 4H).	72.26 (carbono carbinólico)
49	Br	3437.15(OH); 1728.22(C=O de Ester);	7.44 (d, J=8Hz, 4H), 7.21 (d, J=10Hz, 4H), 6.28, (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 4.30 (s, 4H).	72.32 (carbono carbinólico)

A espectrometria de massas de alta resolução realizada para todos homodímeros foi pelo método m-1 (adição de um íon negativo), aqui representado pelo espectro do homodímero **42** e os picos do íons moleculares mostradas na tabela 9.

Figura 34. Espectro de massas de alta resolução do homodímero **42**

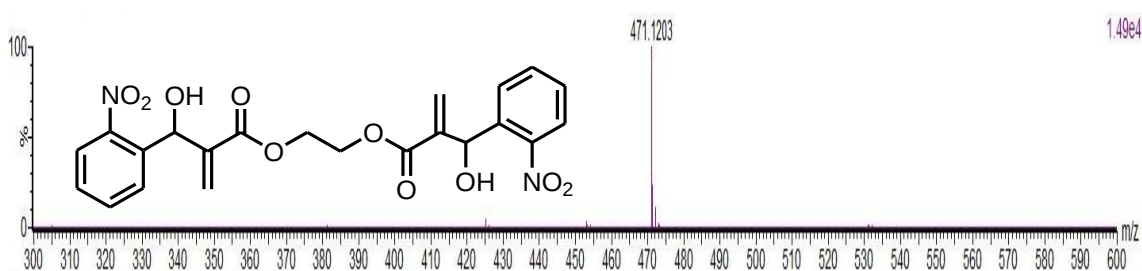


Figura 35. Estrutura geral dos homodímeros

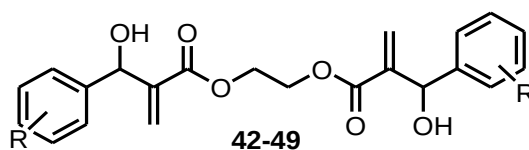


Tabela 9. Íons moleculares dos homodímeros de AMBH

AMBH	R	Íon molecular-CG (m/z)
42	<i>orto</i> -NO ₂	471.1203
43	<i>meta</i> -NO ₂	471.1099
44	<i>para</i> -NO ₂	471.1099
45	benzil	381.1318
46	naftil	481.2086
47	F	417.1414
48	Cl	449.0469
49	Br	536.9745

Os demais espectros de RMN ¹H e ¹³C e massas de alta resolução dos novos homodímeros de adutos de Morita-Bayllis-Hilman se encontram na seção de espectros.

5.3 Parte biológica

Os AMBH com porção carboximetilester, os homodímeros correspondentes e a droga de referência *Anfoterecina B* foram avaliados *in vitro* frente a forma promastigota da *Leishmania donovani*, sendo avaliados experimentalmente a concentração inibitória (CI₅₀), citotoxicidade hemolítica (CH₅₀), o índice de seletividade (IS) e o logP, este último calculado pelo molinspiration (<http://www.molinspiration.com>), um *software* on-line de informática química. As avaliações biológicas experimentais foram realizadas no Centro de Biotecnologia da UFPB, sob a coordenação da Professora Dra. Tatijane Kieersen. Esses dados são apresentados na tabela 10.

Figura 36. Estrutura geral dos AMBH homodiméricos e dos AMBH com porção acrilato de metila

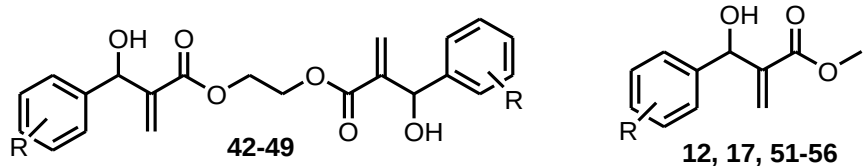


Tabela 10. Cl_{50} , CH_{50} , IS_{cv} e $LogP$ dos AMBH e homodímeros avaliados frente a *Leishmania donovani*

Substância	R	Cl_{50} $\mu g/mL$	Cl_{50} μM	CH_{50} μM	IS_{gv}	miLogP
42	2-NO ₂	11,69	24,77	-	-	2,46
52	2-NO ₂	163,60	690,29	-	-	1,48
43	3-NO ₂	20,30	43,01	-	-	2,51
53	3-NO ₂	38,23	161,31	-	-	1,50
44	4-NO ₂	21,07	44,64	-	-	2,56
12	4-NO ₂	39,19	165,36	-	-	1,53
45	benzil	48,21	126,20	-	-	2,64
51	benzil	183,0	953,13	-	-	1,51
46	naftil	18,79	38,98	-	-	5,01
17	naftil	44,86	185,37	-	-	2,75
47	F	17,71	42,37	-	-	2,97
54	F	128,10	610,00	-	-	2,25
48	Cl	4,71	10,47	>200,00	19,21	4,00
55	Cl	45,60	201,77	-		2,25
49	Br	0,27	0,50	>200,00	>400,00	4,26
56	Br	53,07	196,55	-		2,38
Anfoterecina B	-	0,57	0,62	11,61	18,73	-2,49

Em relação aos resultados da concentração inibitória (Cl_{50}), que representa a medida da eficácia de uma substância na inibição na metade (50%) de uma função biológica, pode-se observar, segundo os resultados mostrados na tabela 10, que todos os homodímeros apresentaram melhores resultados de Cl_{50} em relação aos AMBH correspondentes. Os homodímeros dos adutos que contém a porção NO₂ **42**, **43** e **44**, tiveram Cl_{50} (μM) 24,77, 43,01 e 44,64, sendo 27.86, 3.75 e 3.70 vezes mais ativos que os AMBH correspondentes **52**, **53** e **12**, com Cl_{50} μM 690,29, 161,31 e 165,36, respectivamente, evidenciando um grande aumento na bioatividade.

Os homodímeros **45** e **46** apresentaram Cl_{50} (μM) 126,20 e 38,98, sendo 7.55 e 4.75 vezes mais ativos que os adutos **51** e **17** com Cl_{50} (μM) 953,13 e

185,37, respectivamente, apresentando também ótimos aumentos na bioatividade.

Já os homodímeros halogenados **47** e **48** apresentaram Cl_{50} (μM) 42,37 e 10,47 e os adultos **54** e **55** apresentaram 610,00 e 201,77, respectivamente. Os homodímeros **47** e **48** mostraram ser 14.39 e 20.13 mais ativos que seus correlatos, sendo **48** o segundo mais ativo dos adultos homodiméricos testados, apresentando ótima atividade. Já o homodímero **49** apresentou Cl_{50} (μM) 0,50 (0,27 $\mu g/mL$), sendo mais ativo que **56** com Cl_{50} (μM) 196,55 e o fármaco de referência *Anfotericina B* com Cl_{50} (μM) 0,62 (Cl_{50} $\mu g/mL$ 0,57), mostrando o impressionante e surpreendente resultado de ser 393.1 e 1.24 (2,1 vezes mais ativo considerando Cl_{50} em $\mu g/mL$) vezes mais ativo que o adulto **56** e a *anfotericina B*. Os homodímeros **48** e **49** foram escolhidos para a investigação da CH_{50} e do IS, por apresentarem melhores valores de Cl_{50} .

A citotoxicidade hemolítica (CH_{50}) é uma avaliação *in vitro* onde as células são expostas a contaminantes para se avaliar a inibição do crescimento celular em 50% das células, neste caso, foram avaliados em células vermelhas do sangue. A tabela 9 mostra que os homodímeros **48** e **49** (ambos $>200,00 \mu M$) não apresentaram citotoxicidade para os glóbulos vermelhos do sangue humano, ao contrário da *anfotericina B* (11,61 μM), que é um fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmanias e possui efeitos colaterais graves, potenciais e podendo ser letal, além de ser demasiadamente caro para a maioria da população pobre.

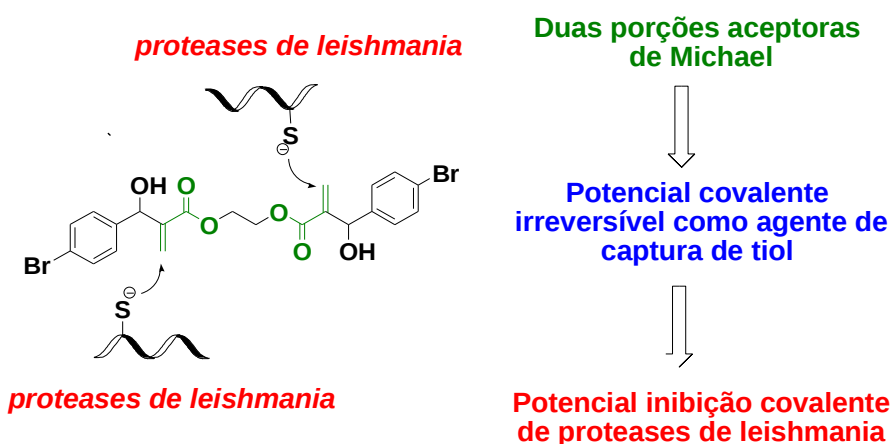
O índice de seletividade (IS) relaciona a citotoxicidade e a atividade biológica das drogas em um modelo avaliado, representando o potencial efetivo da droga sobre o parasita. Para os homodímeros **48**, **49** e a *anfotericina B*, o IS (em glóbulos vermelhos do sangue humano) relacionou os valores de CH_{50} e Cl_{50} , obtendo $>19,21$, $>400,00$ e 18,73, respectivamente, evidenciando o excelente potencial (potencialmente mais seguro) homodímero **49** com IS 21,35 vezes maior que a *anfotericina B*.

A lipofilicidade é expressada pelo logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (P), o $\log P$, e é um importante parâmetro a ser analisado na busca por novos fármacos, pois dentre outros parâmetros, reflete a biodisponibilidade

oral de um fármaco. Os fármacos que apresentam maior log P tendem a ultrapassar a bicamada lipídica da membrana plasmática durante absorção, aumentando sua biodisponibilidade, podendo influenciar no seu efeito farmacológico, que no caso de *leishmanicidas*, podem acessar o citoplasma celular do parasita de maneira mais eficiente. O log P foi calculado para todos os AMBH e a tabela 9 mostra que todos os AMBH apresentaram o valor de log P menor que 5,00, a exceção do homodímero **46** (logP = 5,01), obedecendo a regra de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997). Esta regra descreve as propriedades ótimas que as moléculas bioativas e fármacos comerciais em geral apresentavam, denominada de “regra dos 5”. Nela, os fármacos eficientes apresentam parâmetros de logP menores que 5, massa molar (g/mol) menores que 500, número de átomos doadores de ligação de hidrogênio (DLH) menor que 5 e número de átomos potencialmente aceptores de ligações de hidrogênio (ALH) menor que 10.

Até o momento, não é conhecido o mecanismo de ação dos AMBH em alvos de *leishmania*. A proposta apresentada para racionalizar os resultados parte das duas porções α,β -carbonilas insaturadas dos homodímeros de AMBH fazendo ligação covalente irreversível com proteases de *leishmania*, sendo mais ativos que os AMBH não homodiméricos **12**, **17**, **52-56** (figura 37). Esta proposta é baseada no recente relato de Cocco e colaboradores (2014), onde AMBH semelhantes foram classificados como agentes de capturas de tióis covalentes irreversíveis.

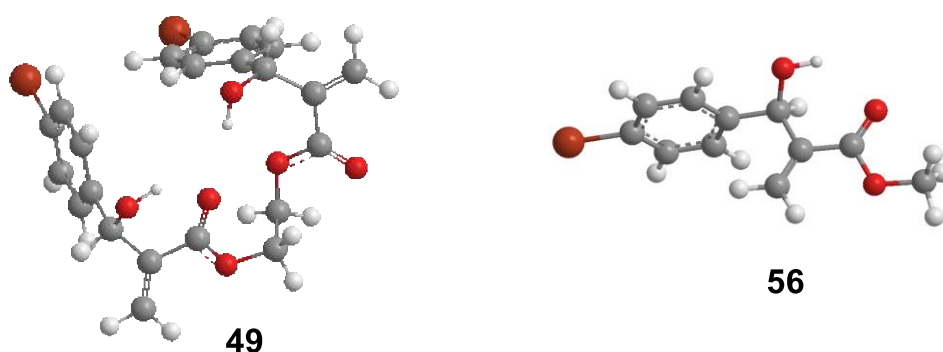
Figura 37. Possível mecanismo de ação de homodímeros de AMBH.



A *leishmania* apresenta muitas peptidases durante seu ciclo de vida, sendo a cisteína protease mais abundante. No entanto, considerando apenas a presença de dois grupos farmacofóricos idênticos, isto não explica a enorme diferença entre a atividade do AMBH **56** e o homodímero **49** (393,1 vezes mais ativo). Acreditamos que as propriedades farmacocinéticas (ADME) e, especialmente, a alteração conformacional do homodímero **49** em relação ao aduto **56**, possam explicar essa diferença da bioatividade (figura 38).

Para o cálculo, as geometrias foram totalmente otimizadas com potencial mínimo de energia superfície por meio de Scan Relaxado de Superfície de Energia Potencial (SREPS) no método PM6, seguido do HF/631g* como teórico nível de cálculo (FRISCH *et al*, 2009). Não foi encontrada frequência imaginária.

Figura 38. Mínimo conformacional do homodímero **49** e do aduto **56**. Os enantiômeros apresentam a mesma energia, logo os cálculos foram realizados para **56** com o enantiômero (R). No entanto, o homodímero **49** possui dois carbonos assimétricos, sendo mostrado o mínimo conformacional do diastereoisômero mais estável.



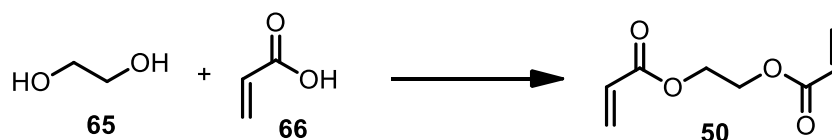
Conforme mostrados os mínimos conformacionais na figura 11, nota-se a conformação complexa tipo gaiola do homodímero **49**, várias ligações de hidrogênio intramolecular e as interações entre os anéis aromáticos na posição T (BURLEY E PETSKO, 1985). Além disso, ao contrário da posição de mínimo do aduto **56**, na conformação de mínimo do homodímero **49** existe as geometrias *S-cis* e *S-trans* para as porções acrilato. Neste caso, vale destacar a atração direta dos dois átomos de bromo que tem grande importância na geometria deste homodímero.

Na literatura é bem relatado a importância dos halogênios no aumento da bioatividade devido a ligações de cloro e bromo no ambiente enzimático (HERNANDES *et al*, 2010). No entanto, não sabemos as conformações farmacofóricas. Os estudos sobre os mecanismos de ação biológica do homodímero **49** estão em andamento e serão relatados futuramente.

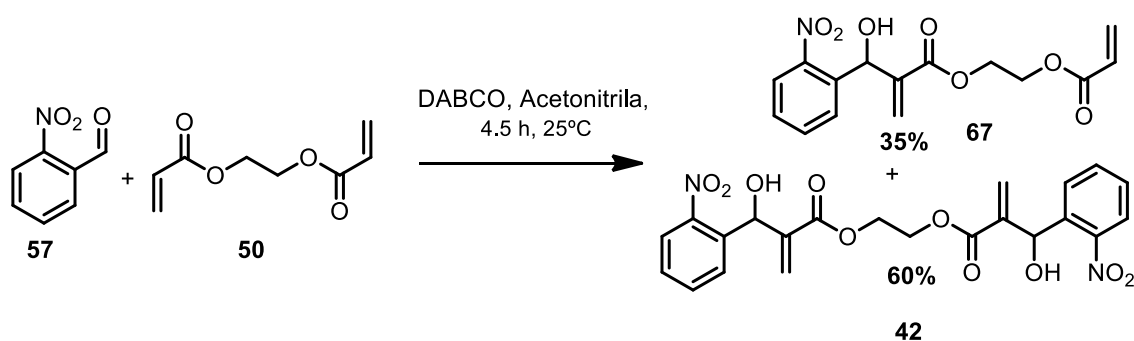
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. Conclusões e perspectivas

Todo o trabalho seguiu o planejamento elaborado conseguindo atender aos objetivos traçados nesta tese. A molécula chave de partida para este trabalho, o diacrilato **50**, foi sintetizada otimizando a metodologia de Wu e colaboradores (2007), sendo utilizada como aceptor de Michael nas RMBH.

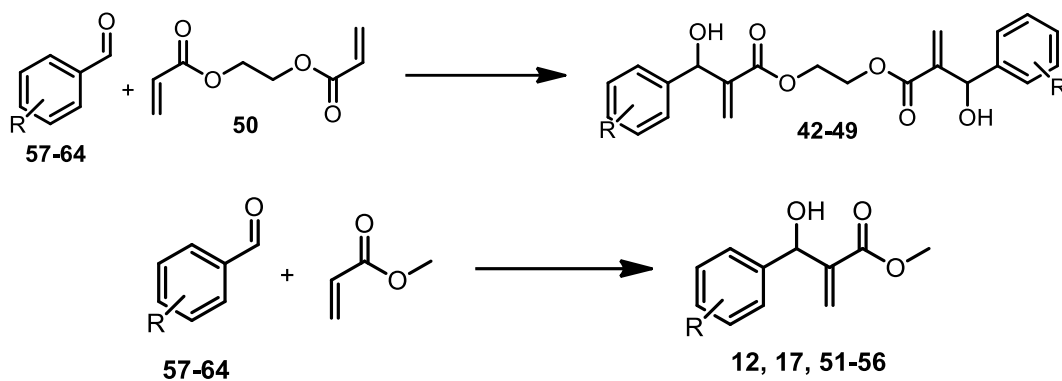


Na primeira investigação da RMBH, foi possível observar por CCD que ocorre primeiro a formação do produto **67** (produto da adição do aldeído em apenas um lado do diacrilato **50**) ao produto homodimérico **42**, indicando que **67** é o produto cineticamente favorecido.



Nas investigações das condições promotoras da reação, o DMF mostrou-se ser o melhor solvente; a temperatura ambiente mostrou-se como melhor temperatura reacional; o DABCO mostrou ser o melhor promotor da reação. No entanto, as tentativas em se otimizar as reações em que foram utilizados substratos menos reativos não foram suficientes.

Todos os homodímeros AMBH foram sintetizados e caracterizados em rendimentos satisfatórios de 35-94%, bem como os AMBH com porção acrilato de metila com rendimentos 65-95%, sendo estes últimos sintetizados seguindo a metodologia descrita em Lima-Junior e Vasconcellos (2012).



Os novos homodímeros e os demais AMBH bioavaliados frente à forma promastigota da *leishmania donovani*, tiveram resultados de satisfatórios a excelentes de Cl_{50} para os adutos homodiméricos (Cl_{50} 126,20 a 0,50 μ M). Todos os AMBH homodiméricos tiveram bioatividade superior aos AMBH correspondentes, evidenciando o sucesso da abordagem de drogas gêmeas contra a espécie promastigota da *leishmania donovani*, chegando ao impressionante resultado, no caso do homodímero **49**, ser quase 400 vezes mais ativo que o AMBH correspondente (**56**).

A bioatividade do homodímero AMBH **49** surpreendeu ainda mais em comparação com a bioatividade da *anfotericina B* (fármaco utilizado no tratamento contra a forma visceral de *Leishmaniose*; Cl_{50} 0,62 μ M), sendo 1,24 mais ativo (2.1 vezes mais ativo, considerando Cl_{50} em μ g/mL). Além disso, o homodímero **49** não apresentou toxicidade na exposição em glóbulos vermelhos do sangue humano (IS > 400, contra IS = 18,73 da *anfotericina B*). Estes resultados evidenciam que homodímero **49** é uma molécula promissora na busca de novos candidatos a fármacos. Os estudos sobre os mecanismos de ação biológica estão em andamento.

Este trabalho é o primeiro relato do uso da estratégia de drogas gêmeas em adutos de Morita-Baylis-Hillman, sendo a preparação destes homodímeros relativamente fáceis, de baixo custo e com protocolo verde. Com o sucesso desta abordagem sintético-biológica, abre-se mais uma ferramenta a ser explorada no combate as doenças parasitárias.

PARTE EXPERIMENTAL

7. Parte Experimental

As matérias-primas utilizadas nesse trabalho, como os aldeídos, DABCO, DMAE, foram adquiridas na SIGMA ALDRICH e ACROS, e os solventes orgânicos foram obtidos nas empresas TEDIA e VETEC, todos com excelente grau de pureza.

As formações dos produtos, bem como o desaparecimento dos reagentes, foram acompanhadas pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD), onde foi utilizado cromatofolhas de alumínio da empresa MERCK, suportadas em Gel de Sílica 60, como fase estacionária e uma mistura de Acetato de Etila/Hexano como fase móvel, sendo irradiadas em câmera de ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm e em solução de vanilina.

Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida e temperatura controlada em rotaevaporador do fabricante IKA®, modelo RV 10 digital.

O DMF foi retirado via extração líquido-líquido, em água destilada e acetato de etila.

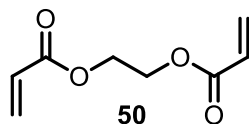
A purificação dos produtos foi feita utilizando a técnica de cromatografia em coluna do tipo “Flash”, através de colunas de vidro utilizando gel de sílica como fase estacionária de granulação 0,040 – 0,0063 mm do fabricante ACROS e misturas de Acetato de Etila / Hexano, como fase móvel, com ajuda de um pressurizador de nebulizadores comuns.

7.1 Procedimento para a síntese de **50**

Em um balão de 125mL, adicionou-se 30mmol (1,86g) do etilenoglicol **65** em 20mL de ciclohexano. Em seguida, adicionou-se 60mmol (4,32g) do ácido acrílico **66**, em presença de 0,1 equivalente (0,414g) do ácido p-tolueno sulfônico e 0,30 equivalentes (0,638g) de hidroquinona. O balão foi conectado a um Dean-Stark e a um condensador, onde foi mantido em agitação sobre temperatura de refluxo 110 °C por 6h. A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando com o eluente Acetato de etila/metanol (1:1). Após seis horas, a reação foi tratada com uma solução de NaOH 1M e salmoura até pH 7. Em seguida, o produto foi extraído com dicloro metano e isolado via cromatografia flash, em coluna contendo sílica gel previamente empacotada, com fase móvel

acetato/hexano inicialmente em 10/90. O produto foi obtido na forma de um óleo em 85% de rendimento após evaporação dos solventes em evaporador rotatório e caracterizado por RMN¹H, RMN¹³C e IV.

Dados espectroscópicos de 50



IV (cm⁻¹): 1726,29 (C=O de Ester), 1208,09 (C-O), 1273,02 (C-O) e 1178, 51 (C-O)

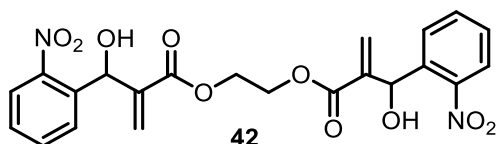
RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 6.42 (dd, J=16/J=2Hz, 2H), 6.12 (dd, J=16/J= 10Hz, 2H) 5.85 (dd, J=10/J=2Hz, 2H), 4.39 (s,4H)

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 165.98, 131.53, 128.02, 62.31

7.2 Procedimento geral para a síntese dos AMBH homodiméricos 42-49

Em um balão de 25mL, adicionou-se 1,0 mmol de aldeído (tabela 5) em 1 mL de DMF, 0,5 mmol do diacrilato do etileno glicol, em presença de 0,5 mmol de DABCO. As reações foram mantidas em agitação à temperatura ambiente em tempos variados (tabela 5). A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando como eluente o acetato de etila/hexano (1:1). Os produtos das reações foram isolados via cromatografia flash, em coluna contendo sílica gel previamente empacotada, com fase móvel acetato/hexano inicialmente em 20/80. Os produtos foram obtidos na forma de um sólido/óleo com rendimentos variável entre 35-94% após evaporação dos solventes em evaporador rotatório e caracterizado por RMN¹H e RMN¹³C e massa de alta resolução.

Dados espectroscópicos de 42

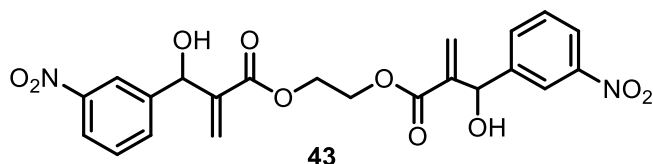


RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7.90 (d, J=10Hz, 2H), 7.73 (d, J=8Hz,2H), 7.61 (t, J=8/J=8Hz, 2H) 7.41 (t, J=8/6Hz, 2H) 6.30 (s, 2H), 6.17 (s, 2H), 5.65 (s, 2H), 4.30 (s, 4H).

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 165.58, 148.03, 140.76, 136.28, 133.57, 128.91, 128.70, 127.26, 124.44, 67.26, 63.25.

CG (m/z, m-1): 471.1203 (íon molecular)

Dados espectroscópicos de 43

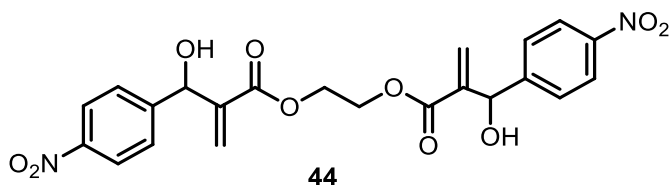


RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.18 (d, 1H), 8.08 (d, J=8Hz, 3H), 7.68 (d, J=8Hz, 2H), 7.47 (t, J=8/J=8Hz, 2H), 6.32 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 5.58 (d, J=4Hz, 2H), 4.30 (s, 4H), 3.47 (s, 2H).

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 165.40, 148.22, 143.54, 140.94, 132.79, 129.39, 127.80, 122.80, 121.56, 72.08, 62.53.

CG (m/z, m-1): 471.1099 (íon molecular)

Dados espectroscópicos de 44



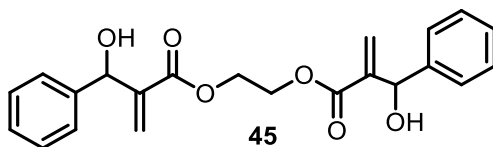
RMN¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (d, J=10Hz, 4H), 7.53 (d, J=8Hz, 4H), 6.34 (s, 2H), 5.94 (s, 2H), 5.60 (s, 2H), 4.33 (s, 4H), 3.38 (2H).

RMN¹³C (50 MHz, CDCl₃): δ 165.39, 148.46, 147.41, 140.75, 127.88, 127.36, 123.62, 72.28, 62.54.

IV (cm⁻¹): 3462.22 (O-H); 1728.22 (C=O de Ester); 1151.50, 1018.41 (C-O da função ester)

CG (m/z, m-1): 471.1099 (íon molecular)

Dados espectroscópicos de 45

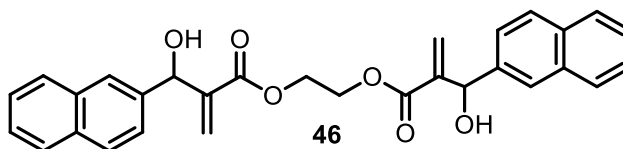


RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.31 (m, 10H), 6.29 (s, 2H), 5.86 (s, 2H), 5.50 (s, 2H), 4.24 (s, 6H), 3.27 (s, 2H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 165.24, 141.53, 141.08, 128.28, 127.73, 126.50, 72.77, 62.16.

CG (m/z, m-1): 381.1318 (ión molecular)

Dados espectroscópicos de 46

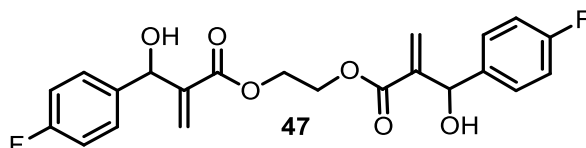


RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.81 (m, 8H), 7.43 (m, 7H), 6.27 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 4.28 (s, 5H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 165.73, 141.34, 138.38, 133.08, 132.91, 128.13, 128.00, 127.55, 126.10, 126.01, 125.47, 124.46, 72.99, 62.24.

CG (m/z, m-1): 481.2086 (ión molecular)

Dados espectroscópicos de 47

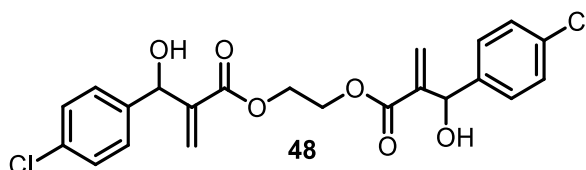


RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.35 – 7.20 (m, 8H), 6.30 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 4.30 (s, 4H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 165.78, 141.42, 139.80, 133.76, 128.73, 128.12, 127.15, 72.52, 62.51.

CG (m/z, m-1): 417.1414 (ión molecular)

Dados espectroscópicos de 48

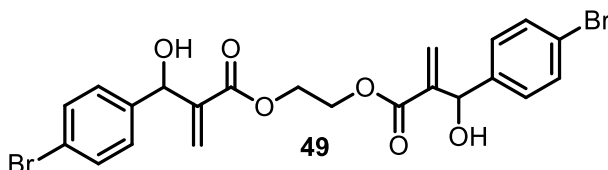


RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.35 -7.20 (m, 8H), 6.29 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 4.31 (s, 4H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 165.51, 141.13, 139.50, 133.49, 128.46, 127.84, 126.82, 72.26, 62.24

CG (m/z, m-1): 449.0469 (íon molecular)

Dados espectroscópicos de 49



IV (cm⁻¹): 3437.15 (O-H); 1728.22(C=O de Ester); 1147.65, 1014.56 (C-O da função ester)

RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (d, J=8Hz, 4H), 7.21 (d, J=10Hz, 4H), 6.28, (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 4.30 (s, 4H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 165.49, 141.05, 140.04, 131.41, 128.36, 126.95, 121.67, 72.32, 62.24.

CG (m/z, m-1): 536.9745 (íon molecular)

7.3 Procedimento para a síntese do homodímero 46 em aquecimento convencional a 80°C

Em um balão de 25mL, adicionou-se 1,0 mmol de aldeído **64** em 1 mL de DMF, 0,5 mmol do diacrilato do etileno glicol, em presença de 0,5 mmol de DABCO. As reações foram mantidas em agitação à temperatura ambiente. A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando como eluente o acetato de etila/hexano (1:1). A reação não foi isolada por não ter sido observada a formação de produtos.

7.4 Procedimentos para a síntese dos homodímero 46 em irradiação de micro-ondas

Em tubo de reação para micro-ondas, adicionou-se 1,0 mmol do aldeído **64** em 1 mL de DMF, 0,5 mmol do diacrilato do etileno glicol, em presença de 0,5 mmol de DABCO. A reação foi sob irradiação de micro-ondas a 80°C por 2 horas. A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando

como eluente o acetato de etila/hexano (1:1). A reação não foi isolada por não ter sido observada a formação de produtos.

7.5 Procedimentos para a síntese do homodímero 46 a 0°C

Em um balão de 25mL, adicionou-se 1,0 mmol do aldeído **64** em 1 mL de DMF, 0,5 mmol do diacrilato do etileno glicol, em presença de 0,5 mmol de DABCO. A reação foi mantida em agitação em um freezer a 0°C por 5 dias. A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando como eluente o acetato de etila/hexano (1:1). A reação não foi isolada por não ter sido observada a formação de produtos.

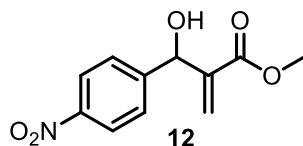
7.6 Procedimento para a síntese de homodímero 46 utilizando os líquidos iônicos [bmin][BF₄] e [bmin][PF₆] e o DMAE.

Em um balão de 25mL, adicionou-se 1,0 mmol do aldeído **64** em 1 mL de [bmin][BF₄] ou [bmin][PF₆], 0,5 mmol do diacrilato do etileno glicol, em presença de 0,5 mmol de DABCO ou DMAE. As reações foram mantidas em agitação à temperatura ambiente em por 10 dias. Não foram observados a formação do homodímero correspondente.

7.7 Procedimentos geral para a síntese dos AMBH 12, 17, 51-56

Em um balão de 25mL, adicionou-se 1,0 mmol de aldeído (tabela 5) em 1 mL de metanol, 1mmol do acrilato de metila **11**, em presença de 1 mmol de DABCO. As reações foram mantidas em agitação à temperatura de 0°C. A formação do produto foi acompanhada pela técnica de CCD, utilizando como eluente o acetato de etila/hexano (1:1). Os produtos das reações foram isolados via cromatografia flash, em coluna contendo sílica gel previamente empacotada, com fase móvel acetato/hexano inicialmente em 20%/80%. Os produtos foram obtidos na forma de um sólido/óleo com rendimentos variável de 65-95% após evaporação dos solventes em evaporador rotatório e caracterizado por RMN¹H e RMN¹³C.

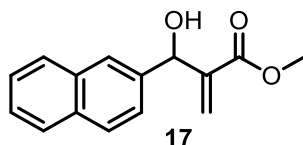
Dados espectroscópicos de 12



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

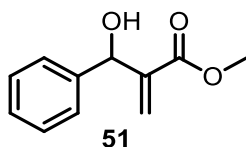
Dados espectroscópicos de 17



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.

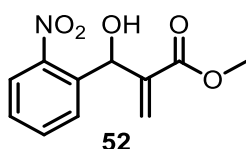
Dados espectroscópicos de 51



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)

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 166.4, 142.0, 141.2, 128.1, 127.5, 126.5, 125.5, 72.4, 51.6

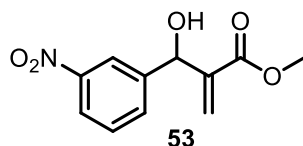
Dados espectroscópicos de 52



RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.94 (d, J=8Hz, 1H), 7.72 (d, J=8Hz, 1H), 7.64 (t, J=8/8Hz, 1H), 7.46 (t, J=8/8Hz, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.20 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 3.72 (s, 3H).

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 173.54, 161.42, 147.81, 143.20, 140.61, 135.99, 135.82, 133.62, 131.70, 84.78, 84.15, 83.51, 74.72, 59.34

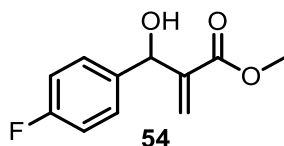
Dados espectroscópicos de 53



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

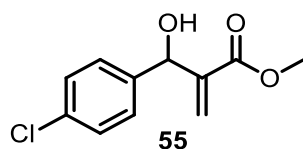
Dados espectroscópicos de 54



RMN 1H (200 MHz, CDCl₃): 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

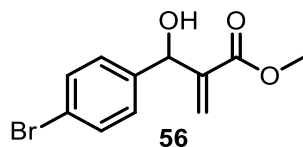
Dados espectroscópicos de 55



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

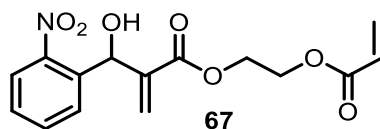
Dados espectroscópicos de 56



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.

Dados espectroscópicos de 67



RMN^{1H} (200 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (dd, J =8hz, 1H), δ 7.73 (dd, J =6hz, 2H), 7.62 (td, J = 14 Hz, J = 6 Hz, J = 2Hz, 1H), δ 7.44 (td, J = 14 Hz, J = 8Hz, J = 2Hz, 1H), 6,39 (dd, J = 16 Hz, J = 2Hz, 1H), δ 6.38 (s, 1H), δ 6.18 (s, 1H), 6,08 (dd, J = 10 Hz, J = 8Hz, 1H), δ 5.84 (dd, J = 8Hz, J = 2Hz, 1H), δ 5.73 (s, 1H), δ 4.34 (s, 4H), δ 3.83 (s, OH)

RMN^{13C} (50 MHz, CDCl₃): δ 166.05, 165.61, 140.68, 136.27, 133.62, 131.72, 128.98, 128.81, 127.90, 127.22, 124.71, 109.71, 77.79, 77.16, 76.52, 67.42, 62.97, 62.08.

7.8 Procedimentos para a avaliação da atividade biológica em *leishmania donovani*

A *leishmania donovani* (MHOM / ET / 1967 / HU3) foi fornecida pelo instituto Oswaldo Cruz Leishmania Collection-Fiocruz-RJ. As promastigotas foram mantidas *in vitro* a 26°C em no meio de Shneider pH 7 (20% de soro fetal de bovino inativado pelo calor (FBS), penicilina 100 U / ml e 100 mg / mL de estreptomicina e 2% de urina do sexo masculino), como previamente descrito (MOREIRA *et al*, 2007). As promastigotas na fase de crescimento logarítmico

foram cultivadas em placas de 96 poços de cultura de células a 1×10^6 parasitas por cavidade em meio de 100 ml de Schneider com concentrações crescentes de 3,12, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 ug / mL dos AMBH. As placas foram incubadas durante 72 horas numa incubadora com demanda biológica de oxigênio (DBO), a 26°C. A citotoxicidade das promastigotas foram avaliadas pela 3- (4,5-dimetil-2-tiazolo) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) por ensaio colorimétrico descrito por Valadares e colaboradores (2011). Absorbância foi medida utilizando um leitor de placas de ELISA (ELx800, BIOTEK) a 540 nm. A anfotericina B foi usada como controle positivo. A viabilidade das promastigotas incubadas na presença de diferentes concentrações dos adutos foi determinada por comparação com o controle de cultura (*L. donovani* cultivadas apenas em Schneider). A concentração que causou uma redução de 50% na viabilidade celular (IC50) foi calculada por análise Probit (SPSS 13.0 para Windows). Cada experiência foi realizada em duplicada e repetidas pelo menos por três vezes

REFERÊNCIAS

8. Referências

AGGARWAL, V.K., EMME, I., MEREU, A. Unexpected side reactions of imidazolium-based ionic liquids in the base-catalysed Baylis-Hillman reaction. **Chem. Comm.** 1612-1613. 2002

AMARANTE, G.W.; COELHO, F. Reações de organocatálise com aminas quirais. Aspectos mecanísticos e aplicações em síntese orgânica. **Química Nova**. Vol. 32, 469-481, 2009

AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA T. P.; NÉRIS, P. L. N.; CALDAS, J. P. A.; SOUSA, S.C.O.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; OLIVEIRA, M. R. **Parasitology**,140, 29–38, 2013.

ANDREWS, K.T., FISHER, G., SKINNER-ADAMS,T.S.,Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 95-111, 2014.

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. **Bioorganic. Medicinal. Chemistry**. 19, 4250–4256, 2011

BAYLIS, A.B.; HILMAN, M.E.D., Patente alemã 2155113, **Chem. Abst.** 77, 34174, 1972.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis**, 2(10), 1-8, 2008.

Burley, S.K; Petsko, G.A.; **Science**. 229, 23, 1985.

CANTILLO, D.; KAPPE, O., A Unified Mechanistic View on the Morita-Baylis-Hilman Reaction: Computational and Experimental Investigations, **J. Org. Chem.**, 75, nº 24, 2010.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Disponível em: <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>. Acesso em 25/09/2015, 16:22h.

CHANG, K. P.; REED, S. G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. **Acta Trop**, 85, 375, 2003.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.**, 5, 873-882, 2007.

COCCO, M.; GARELLA, D.; DI STILO, A.; BORRETTO, E.; STEVANATO, L.; GIORGIS, M.; MARINI, E.; FANTOZZI, R.; MIGLIO, G.; BERTINARIA, M. **J. Med. Chem.**, 57, 10366–10382, 2014.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D.H. Neglected tropical diseases4: Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, 375, 239-247, 2010.

DE PAIVA, Y.G; SOUZA, A. A.;JUNIOR, C.G. L.; SILVA, F.P.L., FILHO, E. B. A.; VASCONCELOS,C.C.; ABREU, F.C.; GOULART, M. O. F.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **J. Braz. Chem. Soc.**, 23, 2012.

DE SOUZA, R.O.M.A., PEREIRA, V.L.P., ESTEVES, P.M., VASCONCELLOS, M.L.A.A., The Morita–Baylis–Hillman reaction in aqueous–organic solvent system. **Tetrahedron Letters**, 49, 5902–5905, 2008.

DE SOUZA, R.O.M.A.; PEREIRA, V.L.P.; MUZITANO, M.F.; FALCÃO, C.A.B.; BERGMANN, B.R.; FILHO, E.B.A.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. High selective Leishmanicidal activity of 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-bromophenyl) propanenitrile and analogous compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 42, 2007.

DOSREIS, G. **An. Acad. Bras. Cienc**, 72, 79, 2000.

FILHO, E. B. A.; MORAES, I. A.; WEBER, K. C.; ROCHA, G. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Journal of Molecular Structure**, 1022, 72–80, 2012.

FILHO, E. B. A.; WEBER, K. C.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Med. Chem. Res.**, 23, 5328–5335, 2014.

FILHO, E.B.A, MONTE, E.V.S.A., OLIVEIRA, B.G., JUNIOR, C.G.L., ROCHA, G.B., VASCONCELLOS, M.L.A.A., Synthesis and conformational study of new class of highly biactive compounds. **Chemical physics letters**, 449, 336-334, 2007.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.;ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.;LI; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.;SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.;FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, JR., J. A.;PERALTA, J. E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, N. J.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.;MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.;FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D. J.; **Gaussian09L, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT**, 2009.

FUJII, H.; WATANABE, A.; NEMOTO, T.; NARITA, M.; MIYOSHI, K.; NAKAMURA, A.; SUZUKI, T.; NAGASE, H. BIOORG. **Med. Chem. Lett.**, 19, 438, 2009.

G.W. KABALKA, B. VENKATAIAH, G. DONG, Tetrahedron Lett., 44, 4473, 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic *leishmaniasis* and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol**, 35,1169-1180, 2005.

HERNANDES, M. Z.; CAVALCANTI, S.M. T.; MOREIRA, D. R.M.; AZEVEDO-JUNIOR, W. F. LIMA-LEITE, A. C.; **Drug Targets**, 11, 303, 2010.

HERWALDT, B.L. *Leishmaniasis*. **Lancet**, 354, 1191-1199, 1999.

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. 1. Synthesis of 2-(1-hydroxyalkyl)acrylic acid esters; simple three-step synthesis of mikanecic acid, **Angewandte Chemie**, 95, 795-796, 1983.

HOPKINS, A.L.; WITTY, M.J.; NWAKA, S. MISSION POSSIBLE. **Nature**, 449, 166-169, 2007.

HOTEZ, P.; OTTESEN, E.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. In: Hot topics in infection and immunity in children; Pollard, A.J.; Finn, A., Eds.; **Springer: New York**, 23-33, 2006.

HOTEZ, P.J.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; MOLYNEUX, D.H. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. **Lancet**, 373, 1570-1575, 2009.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Med.**, 3, e 102, 2006.

HSU, J.C.,YEN,Y.H.,CHU,Y.H.,Baylis –Hillman reaction in [bdmin][PF₆] ionic liquid. **Tetrahedron Letters**. 45, 4673-4676, 2004

HU, M. K.; WU, L. J.; HSIAO, G.; YEN, M. H.; **J. Med. Chem.**, 45, 2277, 2002.

JURCIK, V., WILHELM, R. An imidazolium salt as ionic liquid for médium and Strong bases. **Green Chemistry**. 7, 844-848, 2005

KIM ,E.J. KO, S.Y., SONG ,C.E. **Helv. Chim. Acta**, 86, 894, 2003.

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, A., PAWAR, S.S. The DABCO-catalysed Baylis-Hilman reactions in the Chloroaluminate room temperatura ionic liquides: rate promoting and recyclable media. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 211, 43-47, 2004.

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

LIMA-JUNIOR, C.G.; ASSIS, PRISCILA A.C.; SILVA, F.P.L.; SOUSA, SUERVY C.O.; ANDRADE, N.G.; BARBOSA, T.P.;NERIS, P.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.

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**, 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.

LOZANO, R.,NAGHAVI,M., FOREMAN,K., LIM,S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., MEMISH, Z.A., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. 2095-2128, 2012.

MARTINS, M.A.P., FRIZZO, C.P., MOREIRA, D. N., ZANATTA, N., BONACORSO, H.G. Ionic Liquids in Heterocyclic Synthesis. **Chemical reviews**. 108, 2015-20150, 2008.

MATLASHEWSKI, G.; ARANA, B.; KROEGER, A.; BATTACHARYA, S.; SUNDAR, S.; DAS, P.; SINHA, P.K.; RIJAL, S.; MONDAL, D.; ZILBERSTEIN, D.; ALVAR, J. Visceral *leishmaniasis*: Elimination with existing interventions. **Lancet Infect. Dis.**, 11, 322-325, 2011.

MI, X., LUO, S., CHENG, J.P. Ionic Liquid-Immobilized Quinuclidine-Catalyzed Morita-Baylis-Hilman Reactions. **J. Org. Chem.** 70, 2338-2341, 2005.

MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBÊLO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. *In vitro* leishmanicidal effect of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Rev Bras de Farmacognosia**, v. 17, 2007.

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.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. **Drug Discovery Today**, 12, 156, 2007.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, 366, 1561-1577, 2005.

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

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

NJOGU, P.M., CHIBALE, K., Recent Developments in Rationally Designed Multitarget Antiprotozoan Agents. **Current Medicinal Chemistry**, 20, 1715-1742, 2013.

NJOROGE, M., NJUGUNA, N. M., MUTAI, P., ONGARORA, D. S. B., SMITH, P. W., CHIBALE, K., Recent Approaches to Chemical Discovery and Development Against Malaria and the Neglected Tropical Diseases Human African Trypanosomiasis and Schistosomiasis. **Chemical Reviews**. 2014.

PAIVA, Y. G.; JÚNIOR, W. P.; SOUZA, A. A.; COSTA, C. O.; SILVA, F. P. L., LIMA-JUNIOR, C. G. VASCONCELLOS, M. L. A. A.; GOULART, M. O. F. **Electrochimica Acta**, 140, 557–563, 2014.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J.-H. **Lancet Global Health**, 1, 371, 2013.

PÉGOT, B.; VO-THANH, G.; GORI, D.; LOUPY, A.; First application of chiral ionic liquids in asymmetric Baylis-Hillman reaction. **Tetrahedron Letters**. 6425-6428, 2004.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIES, M-A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 5, 4, 727-740, 2005.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIES, M-A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov**, 4, 727-740, 2005.

PLATA, R.E., SINGLETON, D.A., A Case Study of the Mechanism of Alcohol-Mediated Morita Baylis-Hillman Reactions. The Importance of Experimental Observations. **Journal of the American Chemical Society**, 137, 3811-3826, 2015.

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products. **Int. J. Mol. Med.**, 22, 277-286, 2008.

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

RENSLO, A.R.; MCKERROW, J.H. Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nat. Chem. Biol.**, 2(12), 701-710, 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.

RODRIGUES, T.S.; SILVA, V.H.C.; LALLI, P.M.; OLIVEIRA, H.C.B.; SILVA, W.A.; COELHO, F.; EBERLIN, M.N.; NETO, B.A.D.; Morita-Baylis-Hilman Reaction: ESI-MS (/MS) Investigation with Charge Tags and Ionic Liquid Effect Origin Revealed by DFT Calculations. **J. Org. Chem.** 79, 5239-5248, 2014.

ROSA, J. N.; AFONSO, C.A.M.; SANTOS, A. G.; Ionic liquids as a recyclable reaction médium for the Baylis-Hilman reaction. **Tetrahedron**. 4189-4193, 2001.

SANDES, J. M.; FONTES, A.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; CASTRO, M. C. A. B.; LIMA-JUNIOR, C. G.; SILVA, F. P. L.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. **PLOS ONE**, 9 (4) 1-9, 2014.

SANDES, J.M.; BORGES, R. A.; LIMA-JUNIOR, C.G.; 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 nitrophenylpropanetrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of Trypanosoma cruzi. **Bioorganic Chemistry**. 38, 190-195, 2010.

SILVA, F.P.L.; 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.

SILVA, F.P.L.; 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.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of *leishmaniasis*. **J. Infect. Chemother**, 10, 307-315, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The 17 Neglected Tropical Diseases. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em 27/09/2015.

TIETZE, L. F.; BELL, H. P.; CHANDRAEKHAR, S. **Angew. Chem. Int. Ed.** 42, 3996, 2003.

TOMASSOLI, I., GUNDISCH, D., The twin drug approach for novel nicotinic acetylcholine receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 23, 4375-4389, 2015.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. **Lancet**, 359, 2188, 2002.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, 359, 2188-2194, 2002.

Valadares, D.G., Duarte, M.C., Oliveira, J.S., Chávez-Fumagalli, M.A., Martins, V.T., Costa, L.E., Leite, J.P.V., Santoro, M.M., Régis, W.C.B., Tavares, C.A.P., Coelho, E.A.F. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International** 60, 357–363, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.001>.

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.

VENNERSTROM, J. L.; ELLIS, W. Y.; JR., A. L. A.; ANDERSEN, S. L.; GERENA, L.; MILHOUS, W. K.; **J. Med. Chem.**, 35, 2129, 1992.

WERMUTH, C.G., The Practice of Medicinal Chemistry; Elsevier **Ltd**, Ed. 3 Chapter 18, 380–414, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. First WHO report on neglected tropical diseases 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Available online at: <http://www.gsk.com/media/downloads/WHO-report-on-NTD.PDF> , accessed April 30, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: First WHO Report on Neglected Tropical Diseases; World Health Organization: Geneva, 2010.

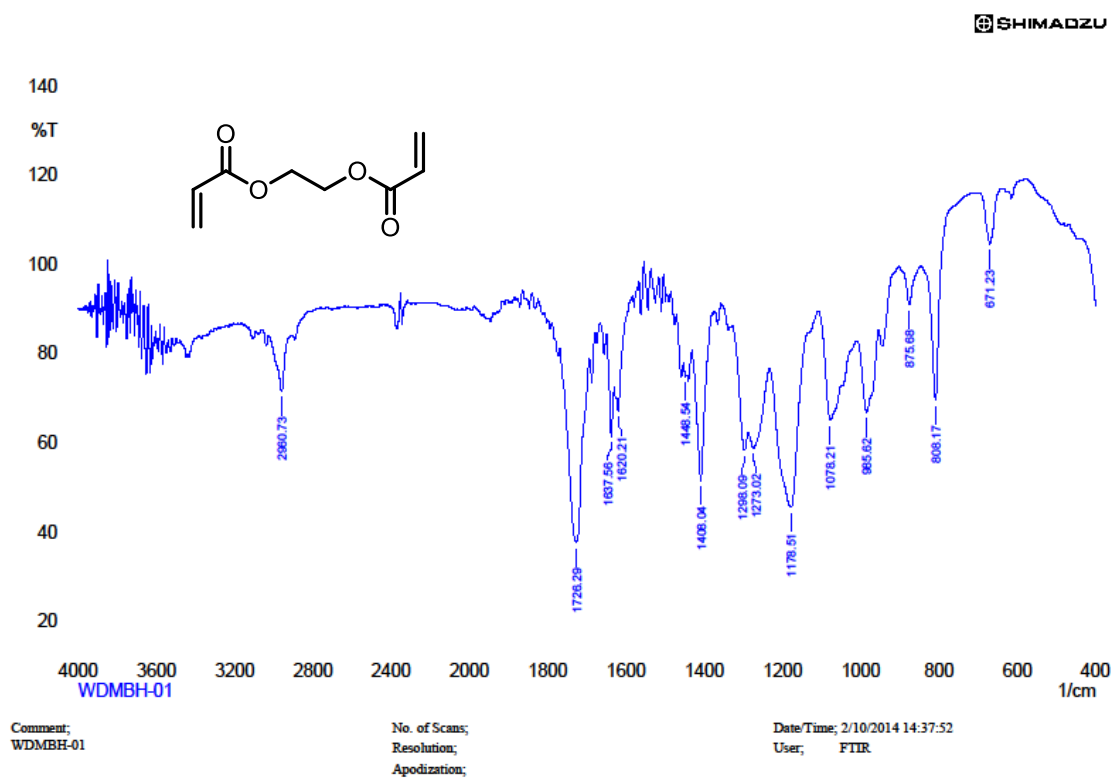
Wu, Chuan-bao, Hao, Jian-yuan, Deng, Xian-mo. A novel degradable poly (β -amino ester) and its nano-complex with poly (acrylic acid). **Polymer**, 48, 6272-6285, 2007.

XAVIER, F. J. S.; NETO, J. S. S.; NÉRIS, P. L. N.; OLIVEIRA, M. R.; VALE, J. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 108, 7–12, 2014.

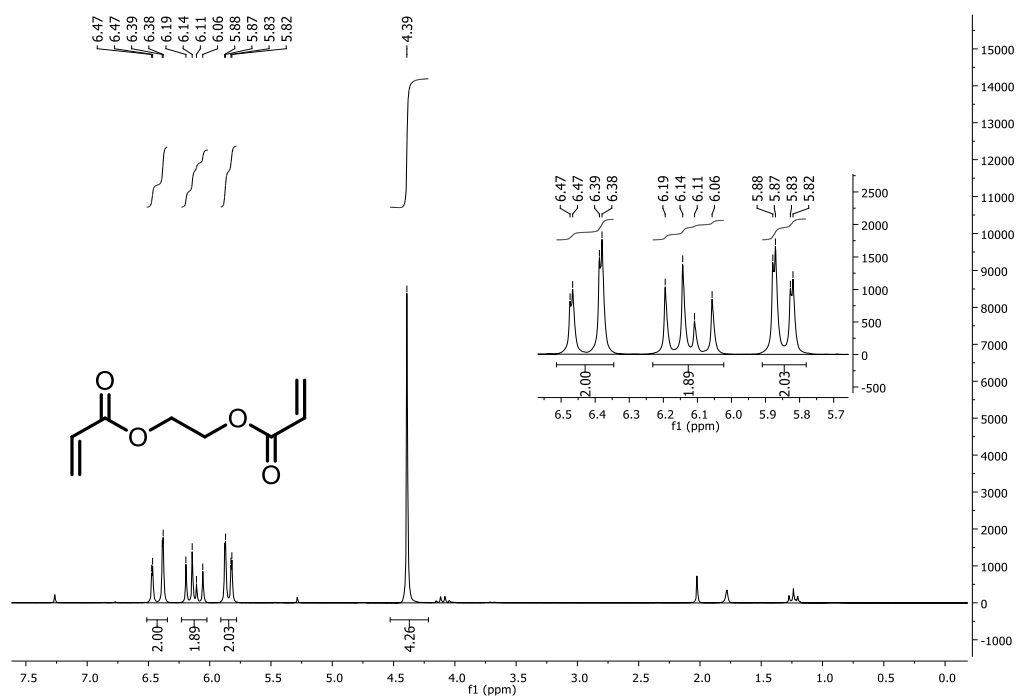
ESPECTROS

9. Espectros

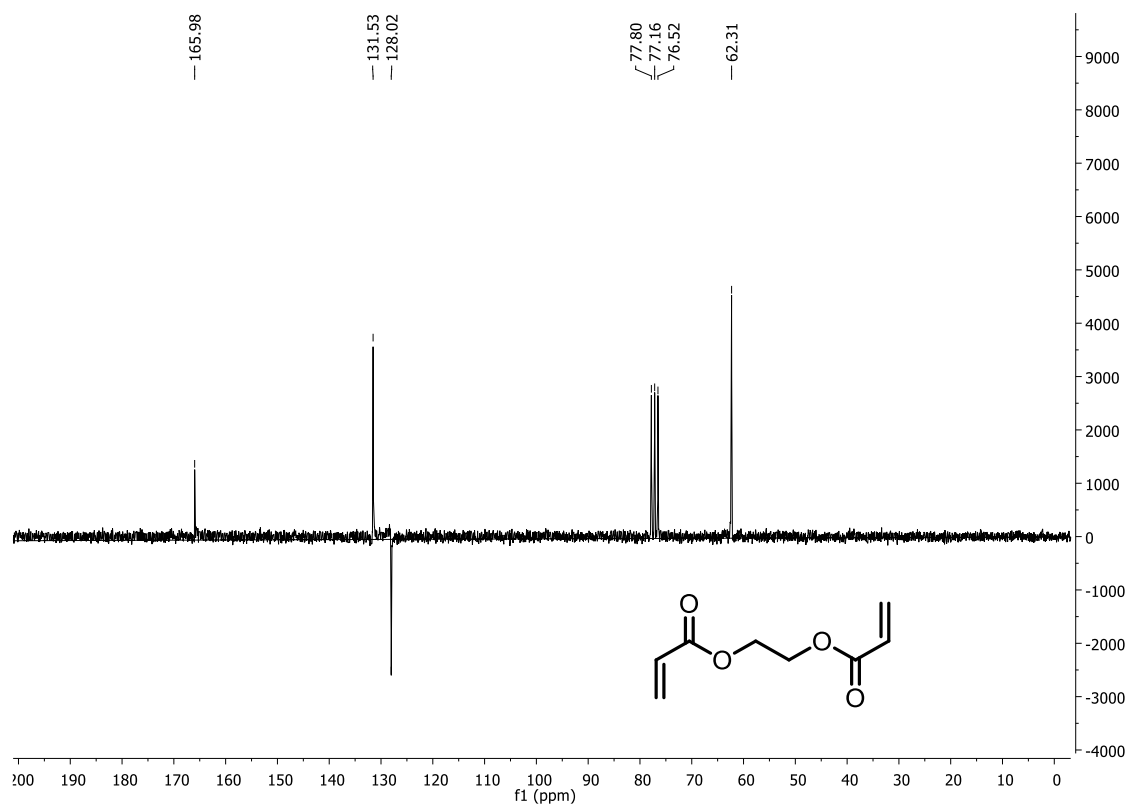
Espectro 1. Infravermelho (cm⁻¹) de 50



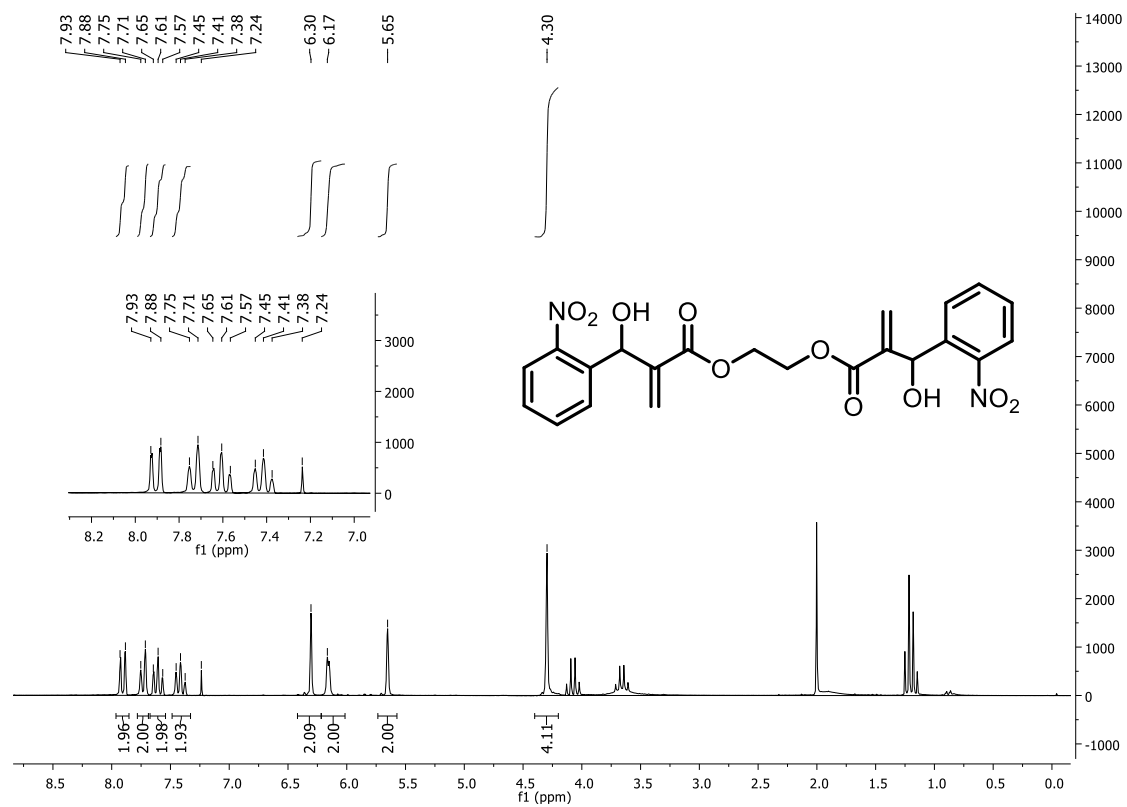
Espectro 2. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 50



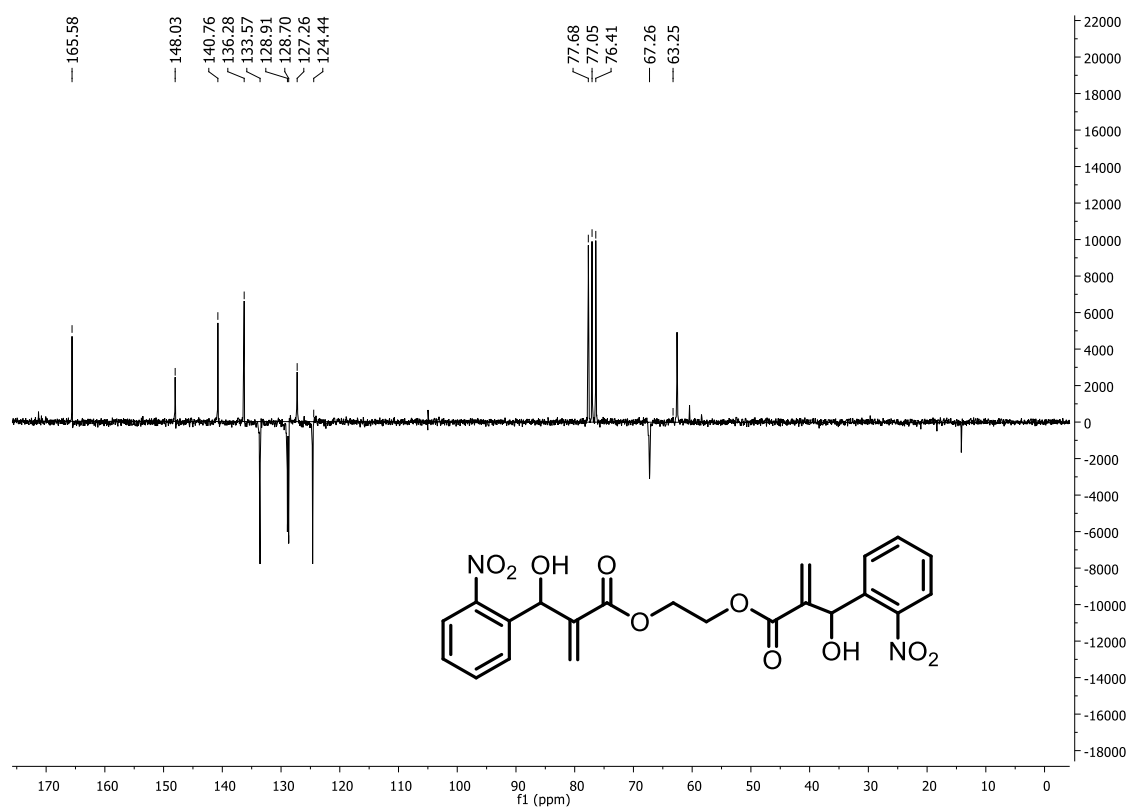
Espectro 3. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 50



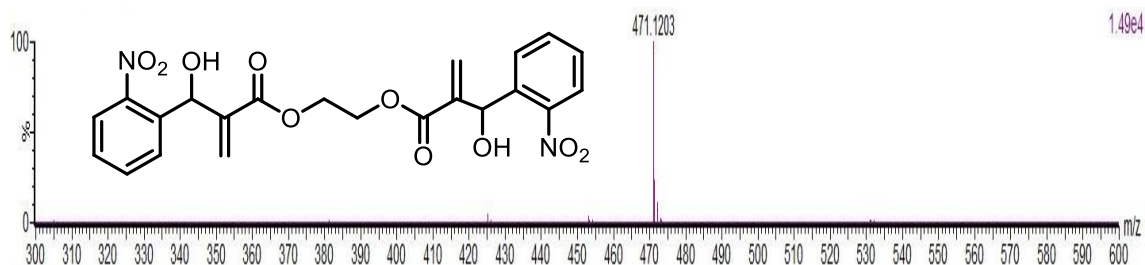
Espectro 4. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 42



Espectro 5. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **42**



Espectro 6. Massa de alta resolução de **42**



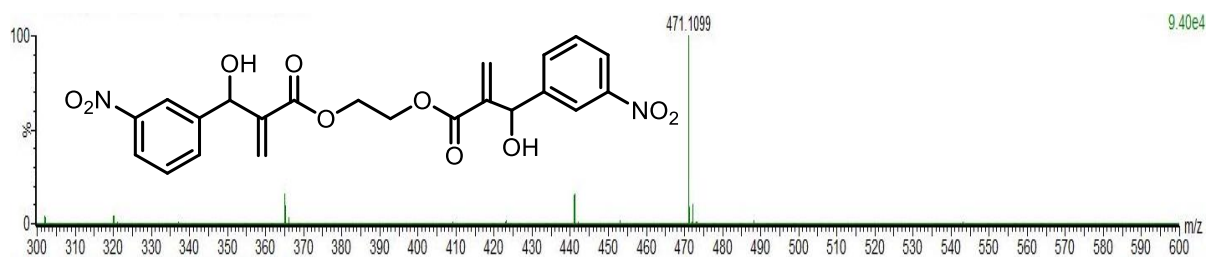
Espectro 7. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **43**



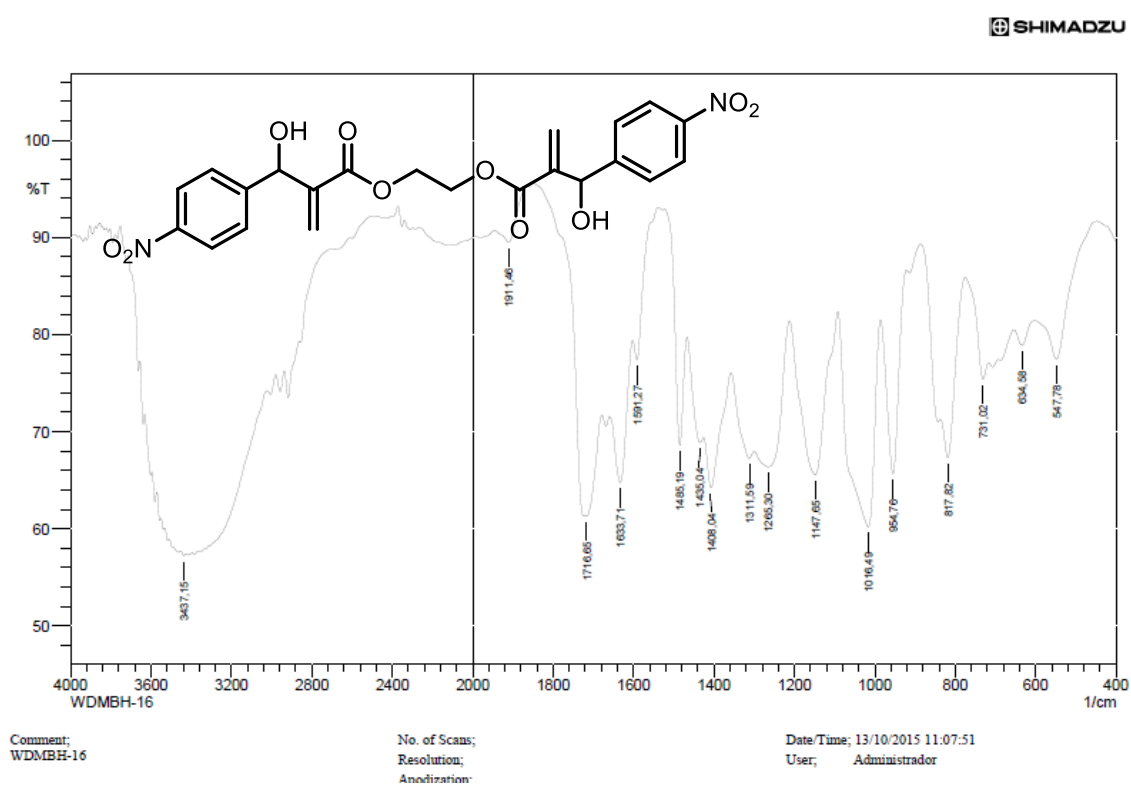
Espectro 8. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **43**



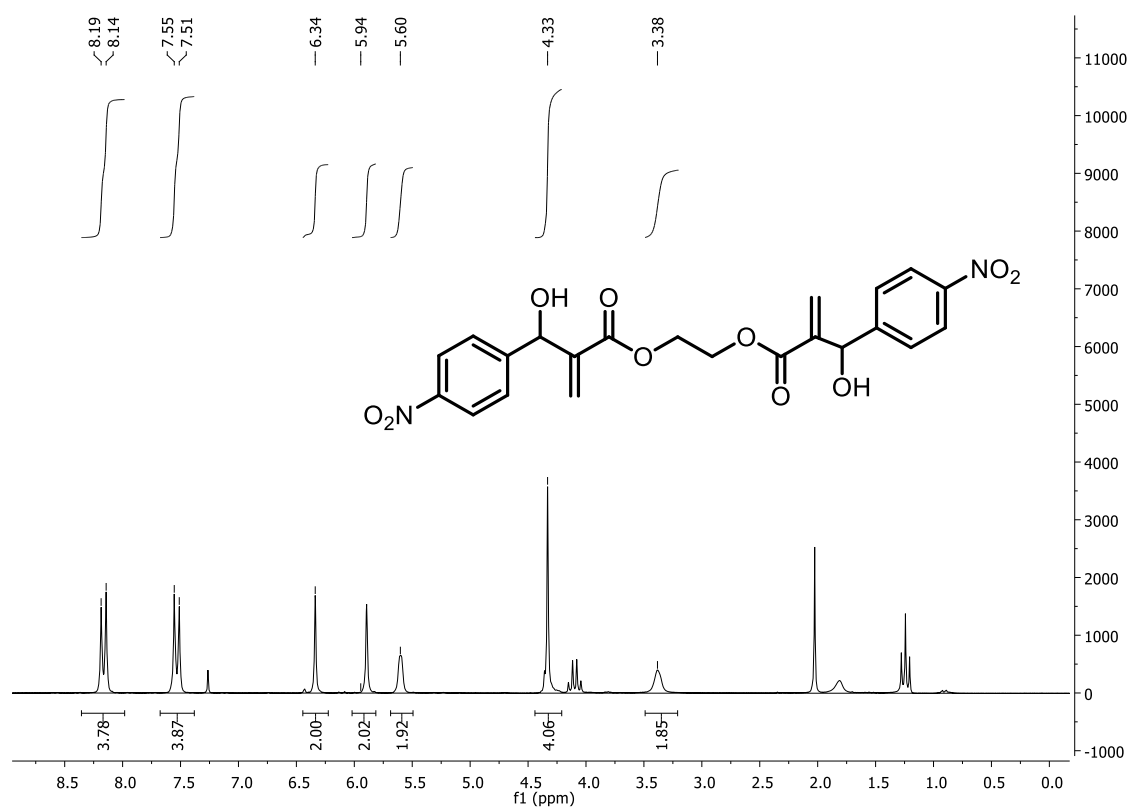
Espectro 9. Massa de alta resolução de 43



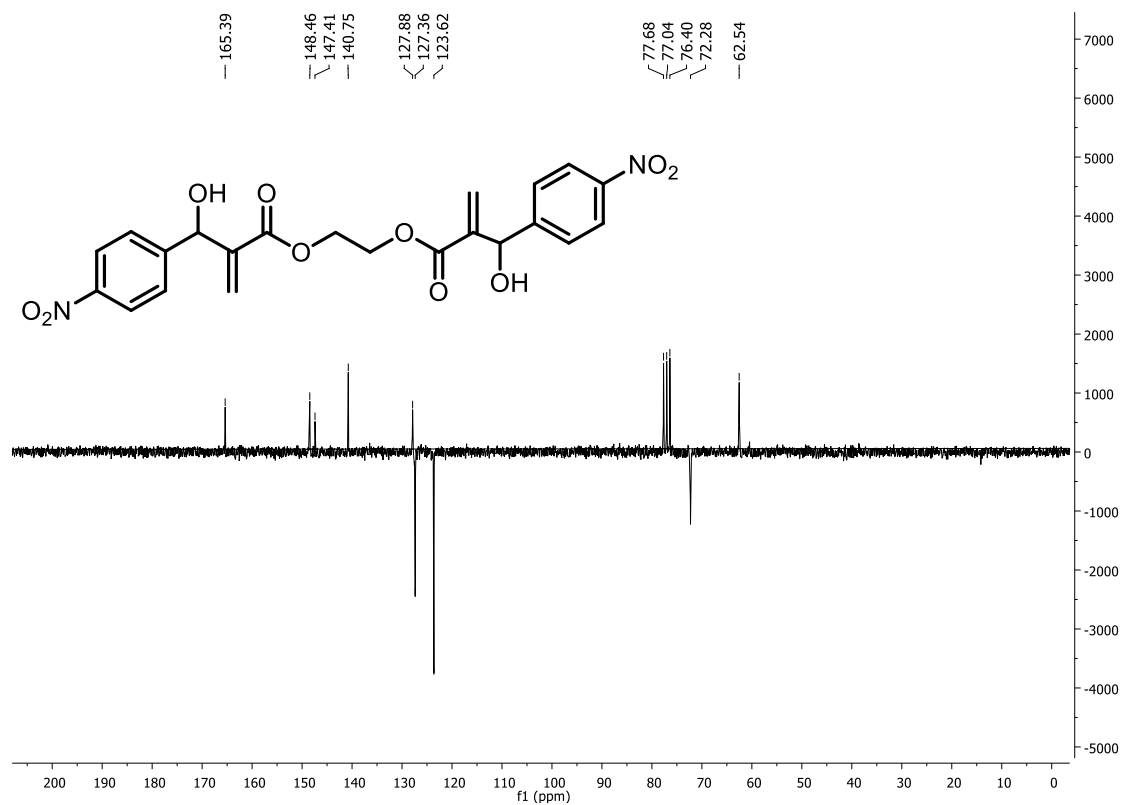
Espectro 10. Infravermelho (cm⁻¹) de 44



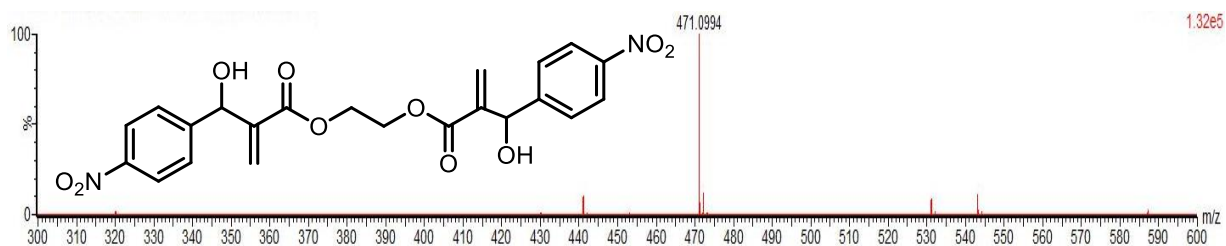
Espectro 11. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **44**



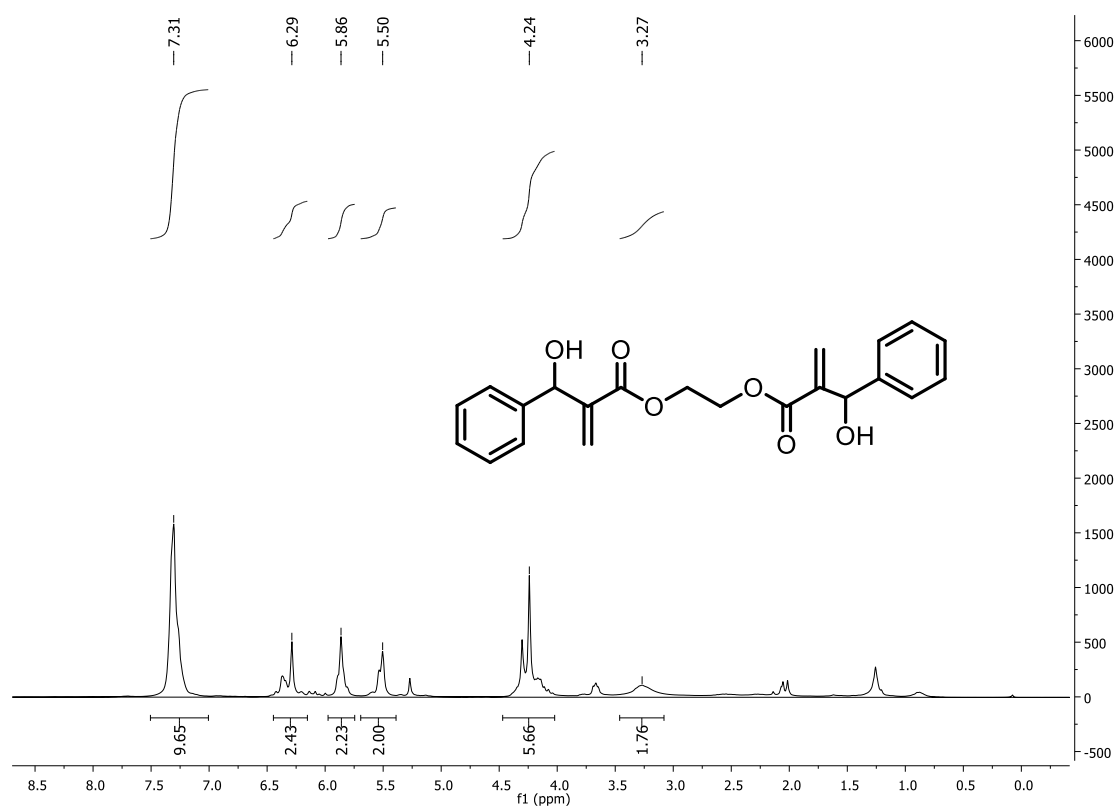
Espectro 12. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **44**



Espectro 13. Massa de alta resolução de 44



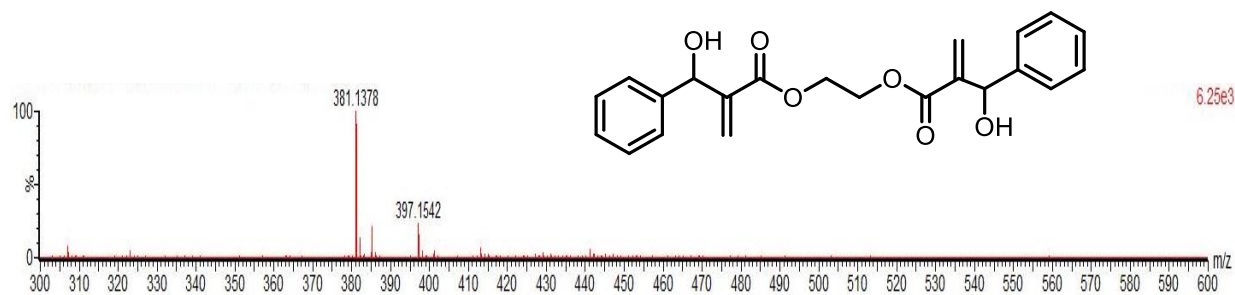
Espectro 14. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 45



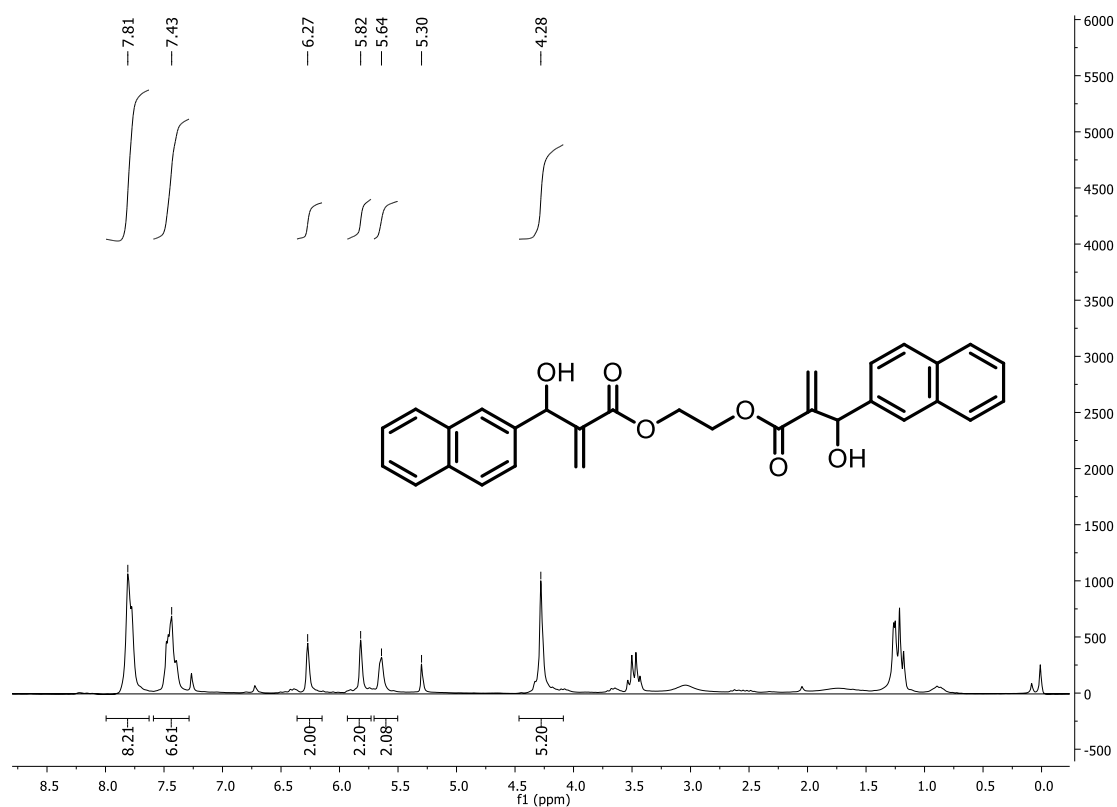
Espectro 15. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 45



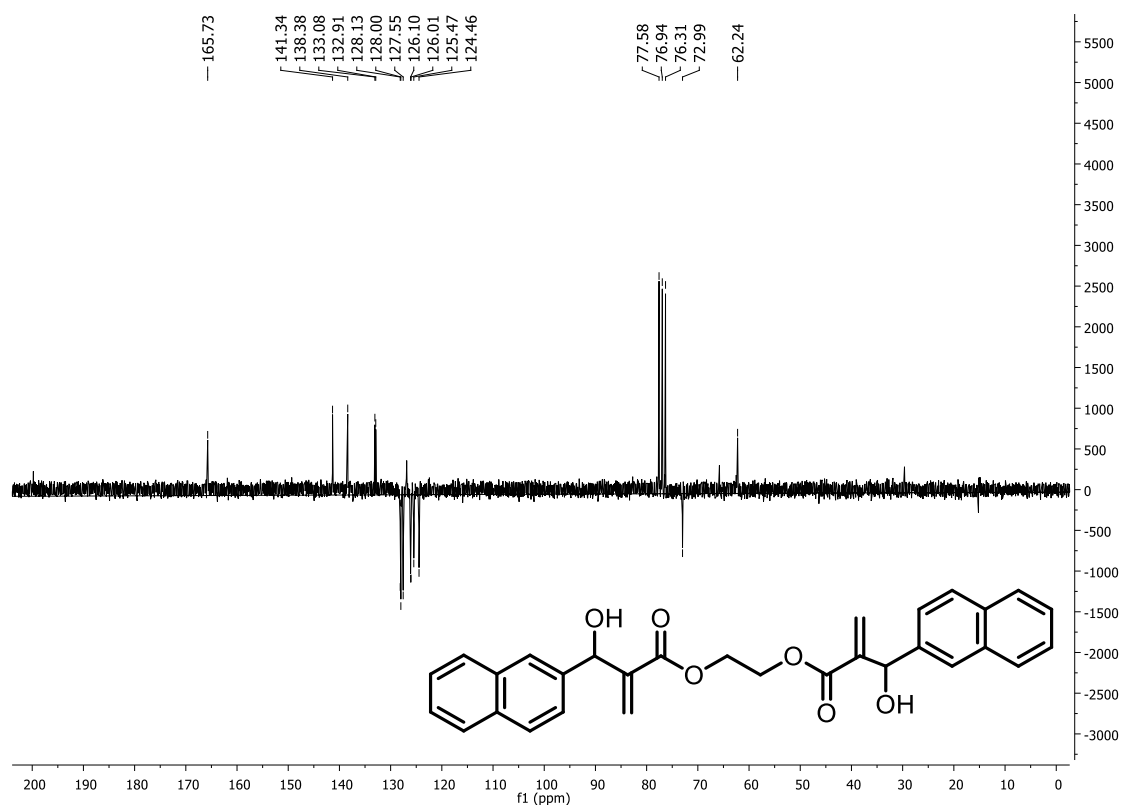
Espectro 16. Massa de alta resolução de 45



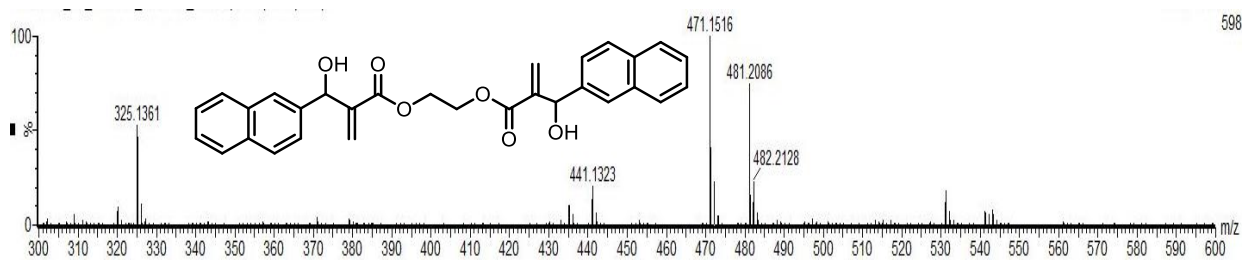
Espectro 17. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 46



Espectro 18. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 46



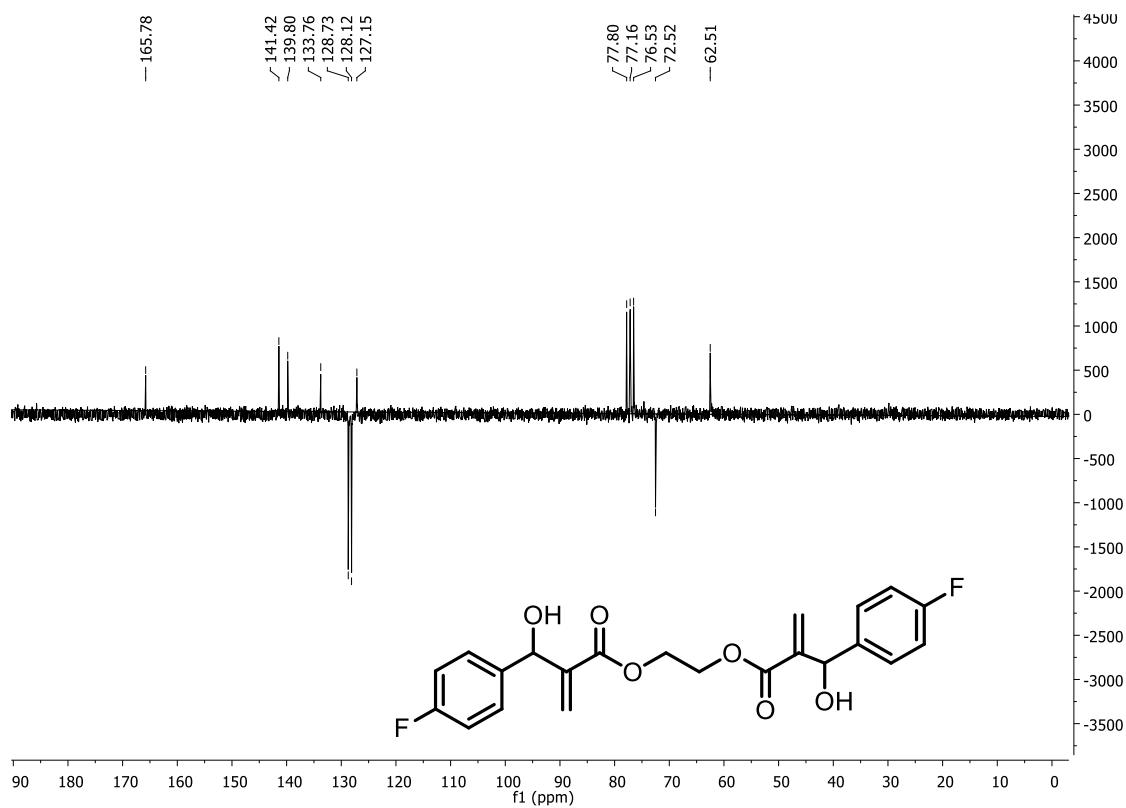
Espectro 19. Massa de alta resolução de 46



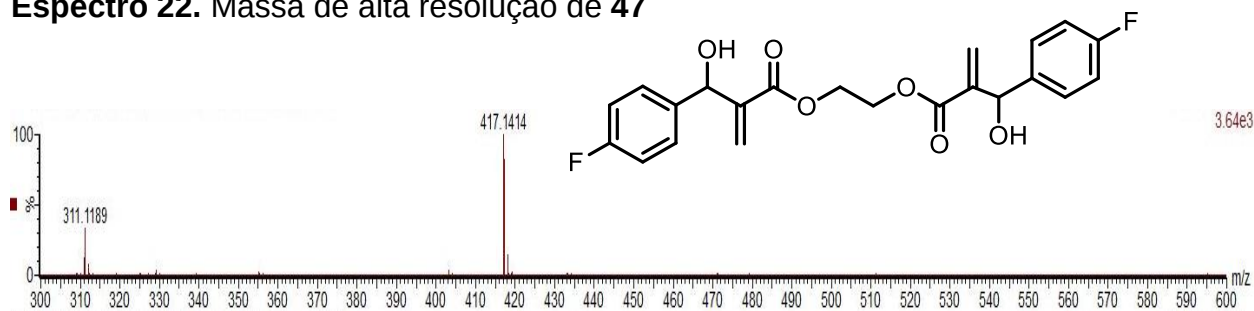
Espectro 20. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 47



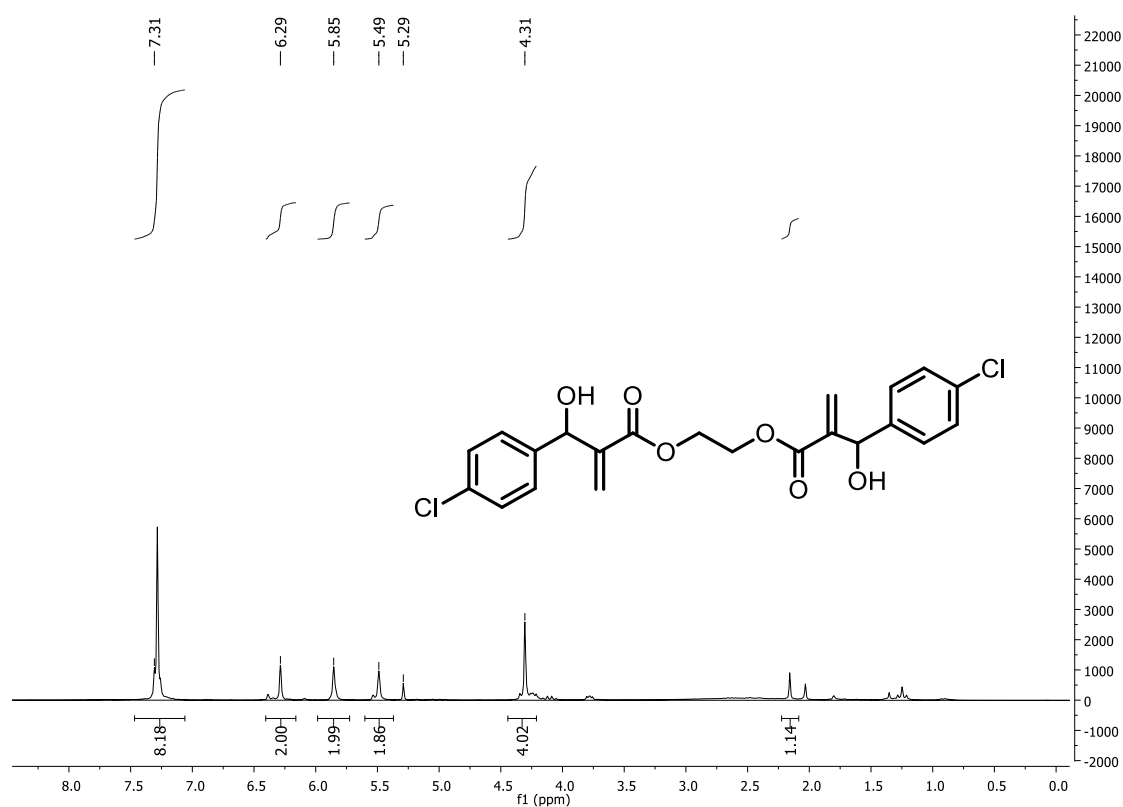
Espectro 21. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 47



Espectro 22. Massa de alta resolução de 47



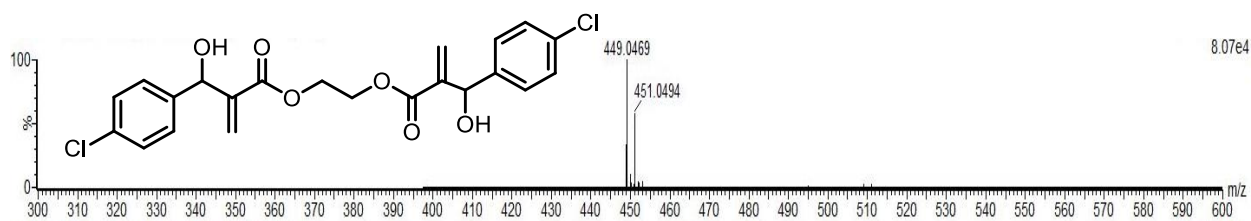
Espectro 23. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 48



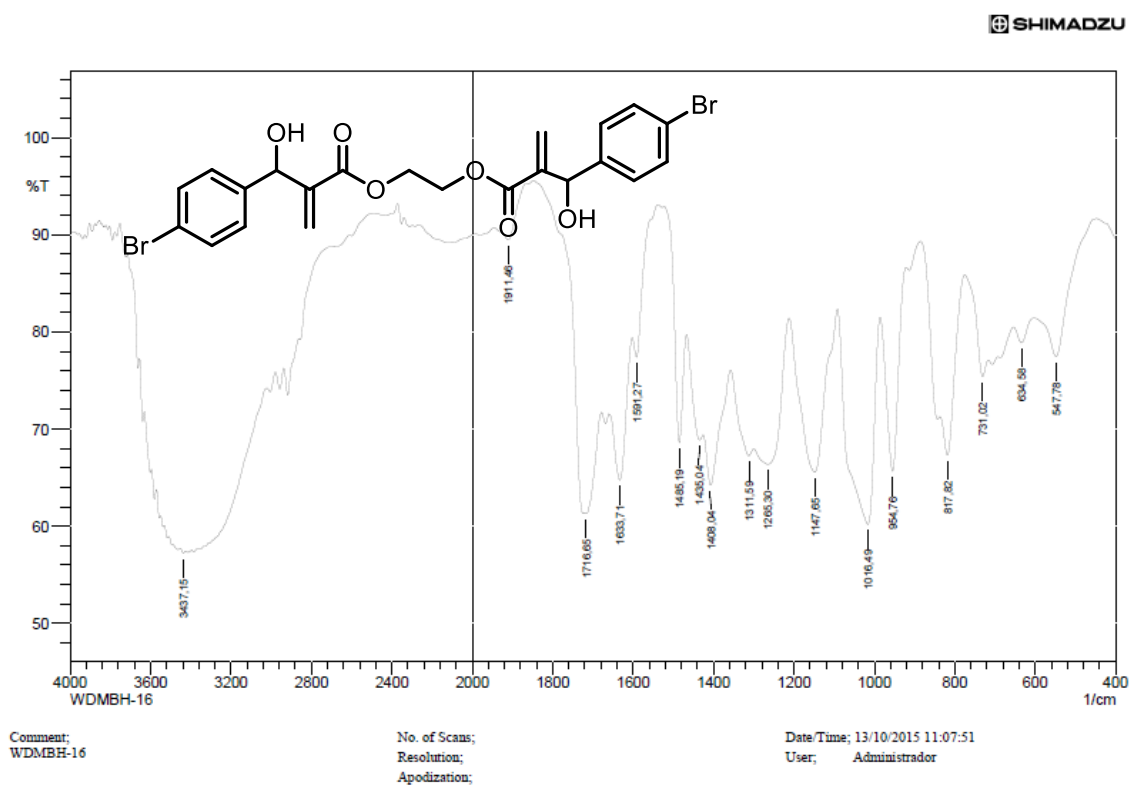
Espectro 24. RMN¹³C -APT 50 MHz (CDCl₃) de 48



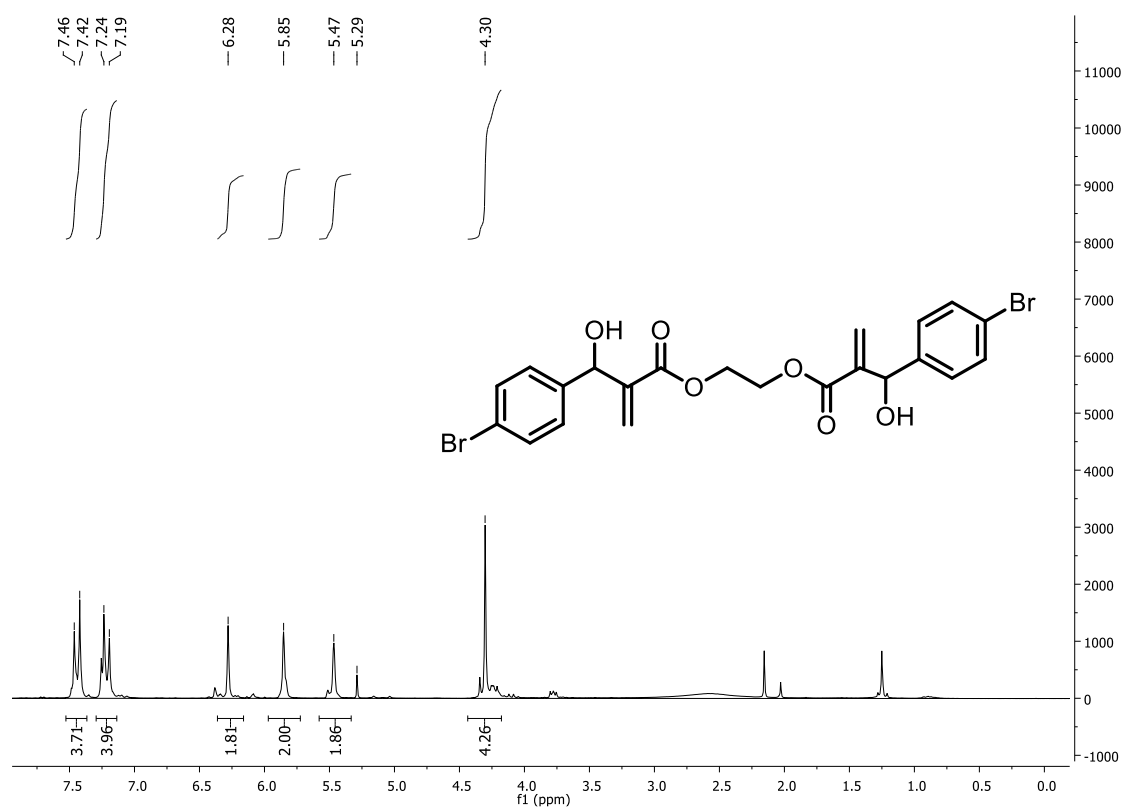
Espectro 25. Massa de alta resolução de 48



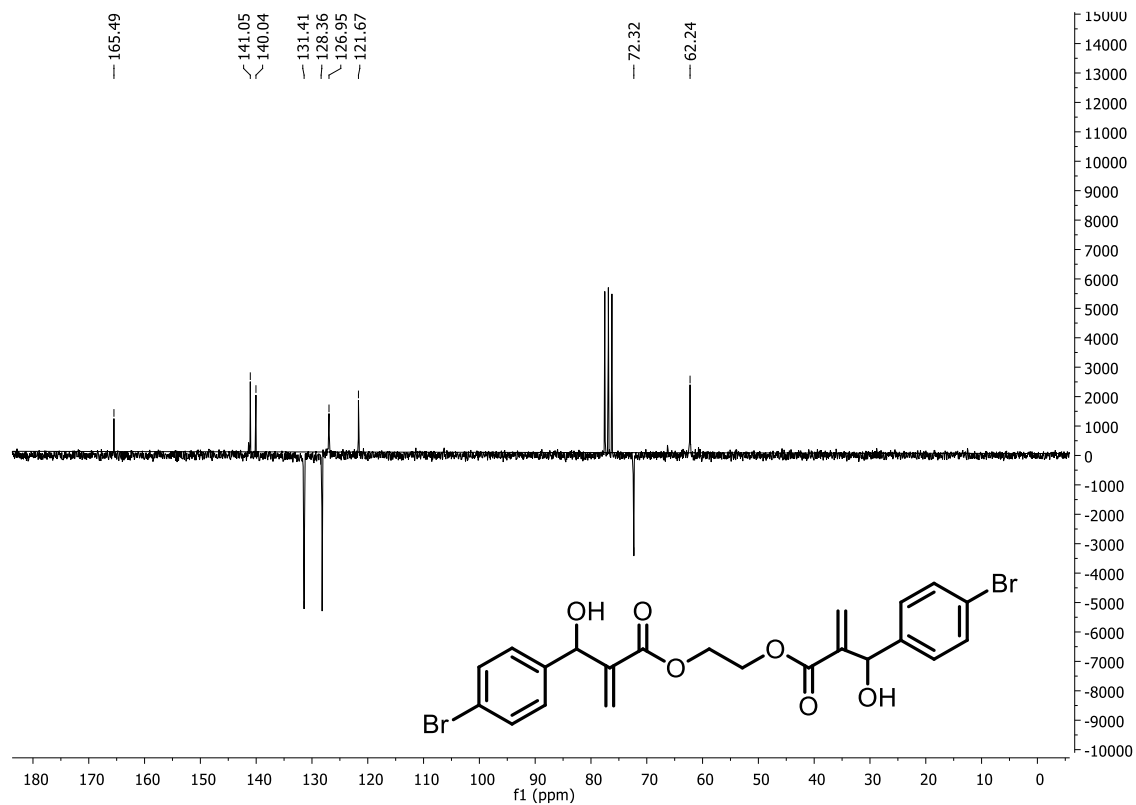
Espectro 26. Infravermelho (cm⁻¹) do 49



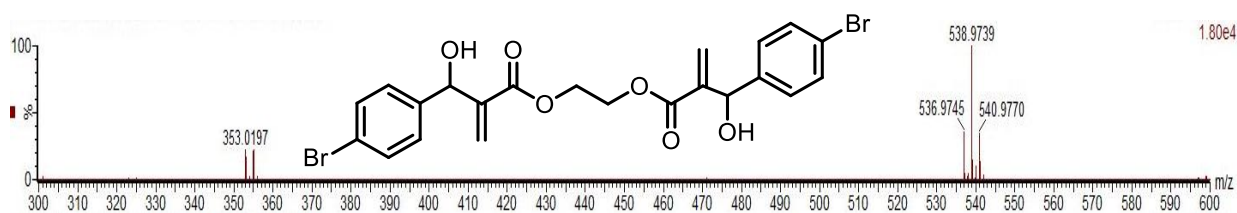
Espectro 27. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 49



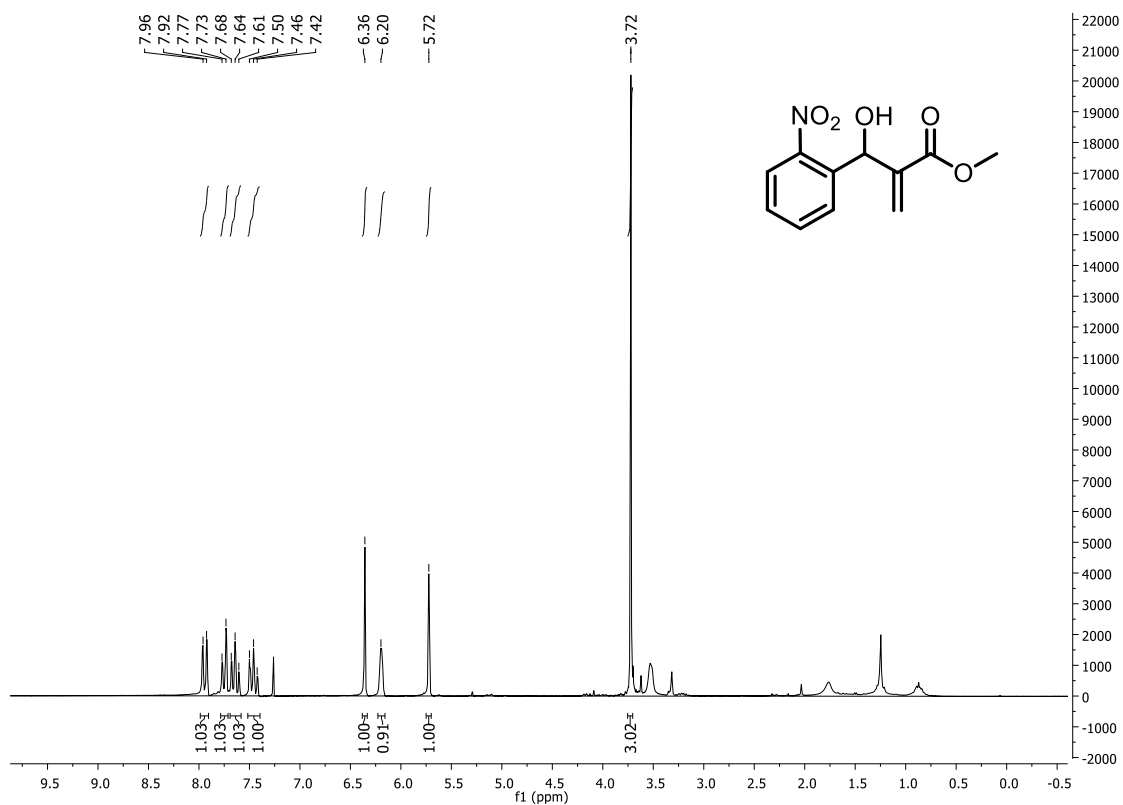
Espectro 28. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 49



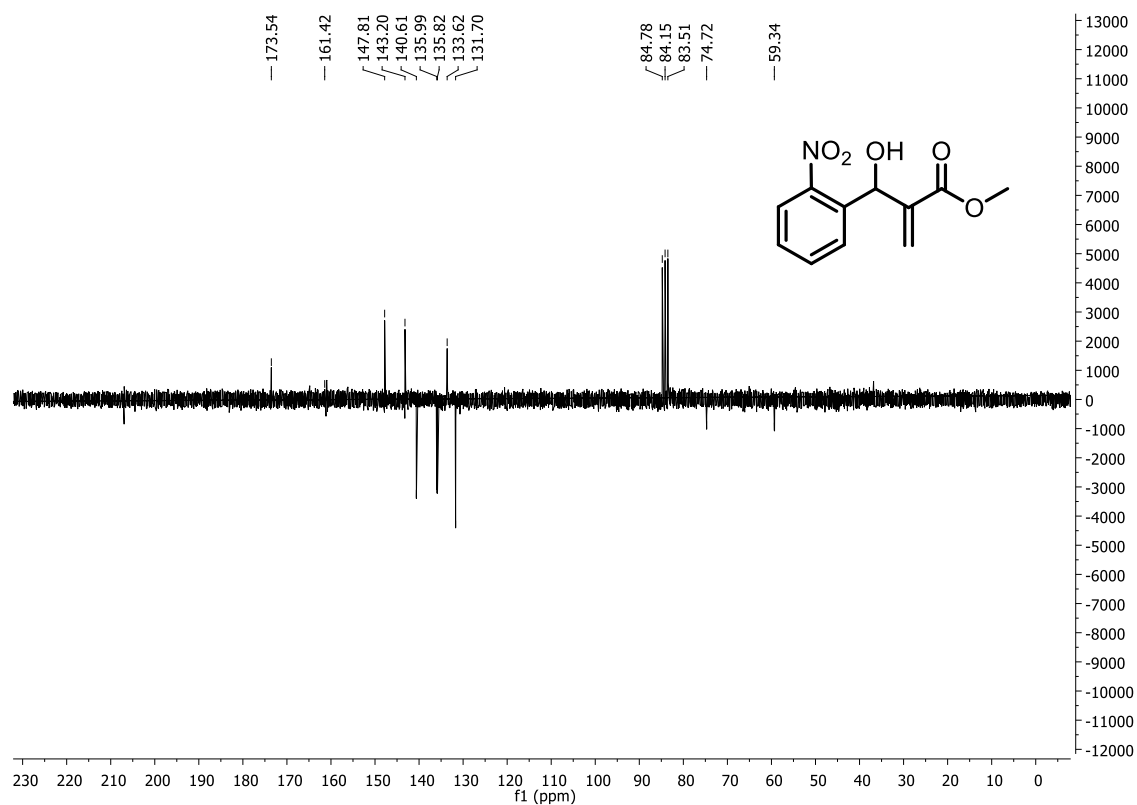
Espectro 29. Massa de alta resolução de 49



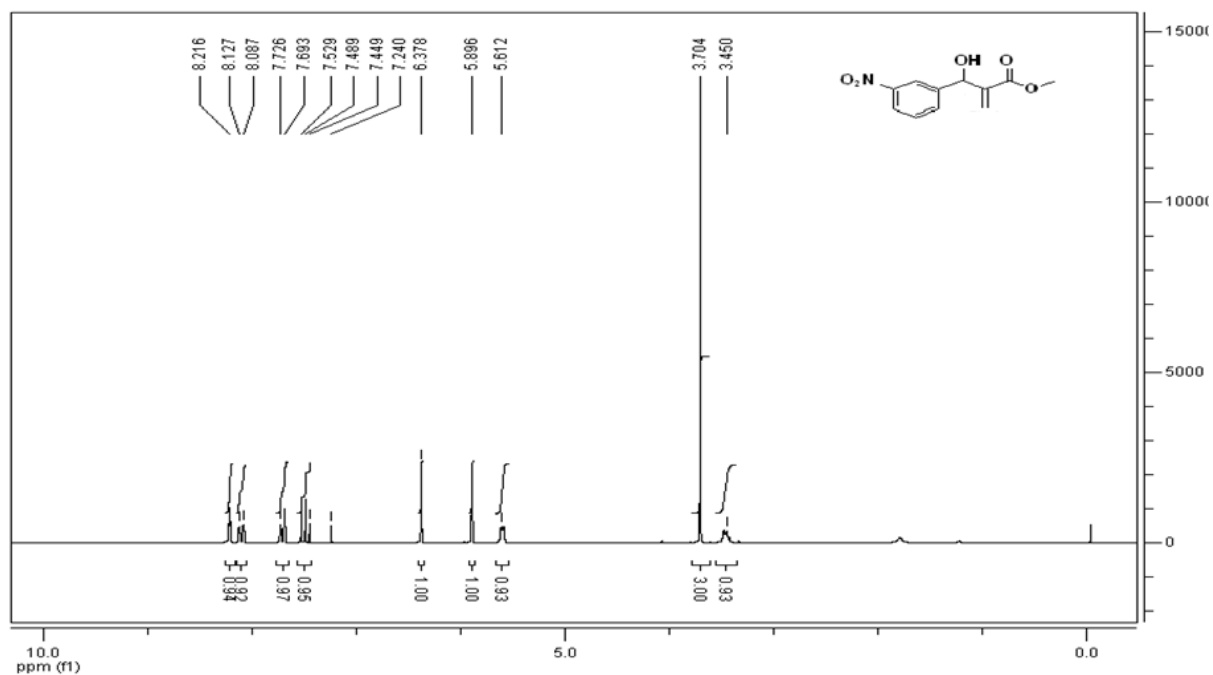
Espectro 30. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 52



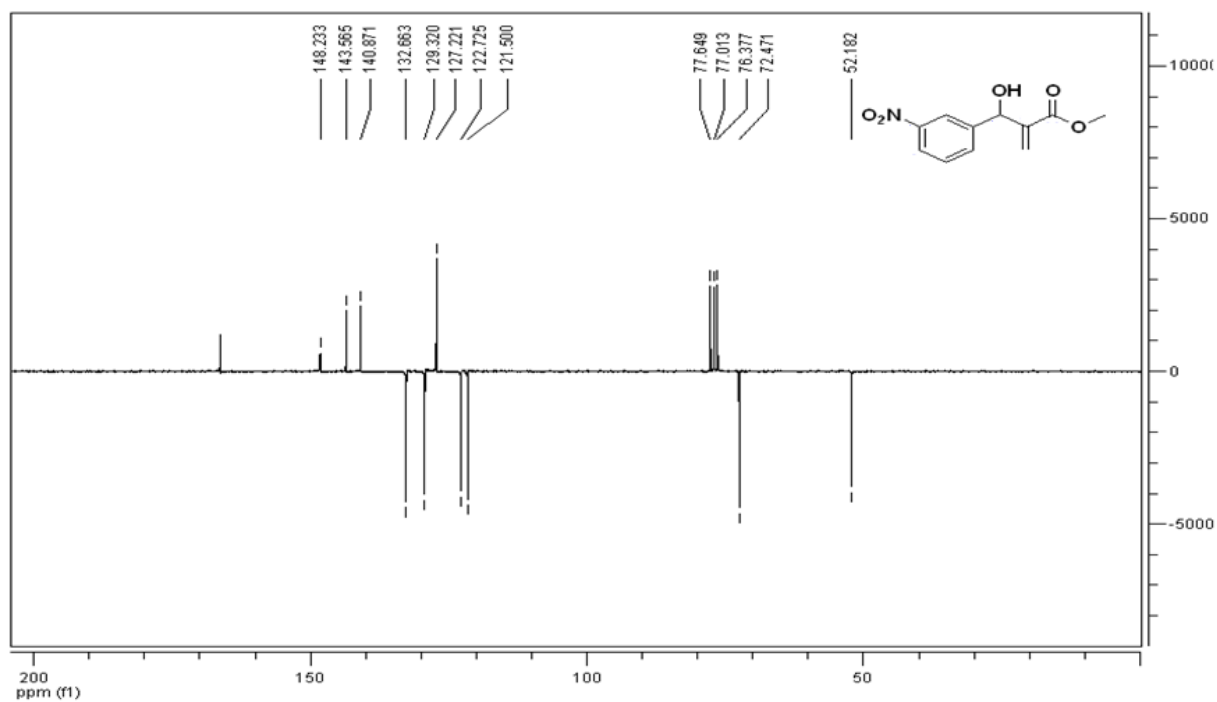
Espectro 31. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 52



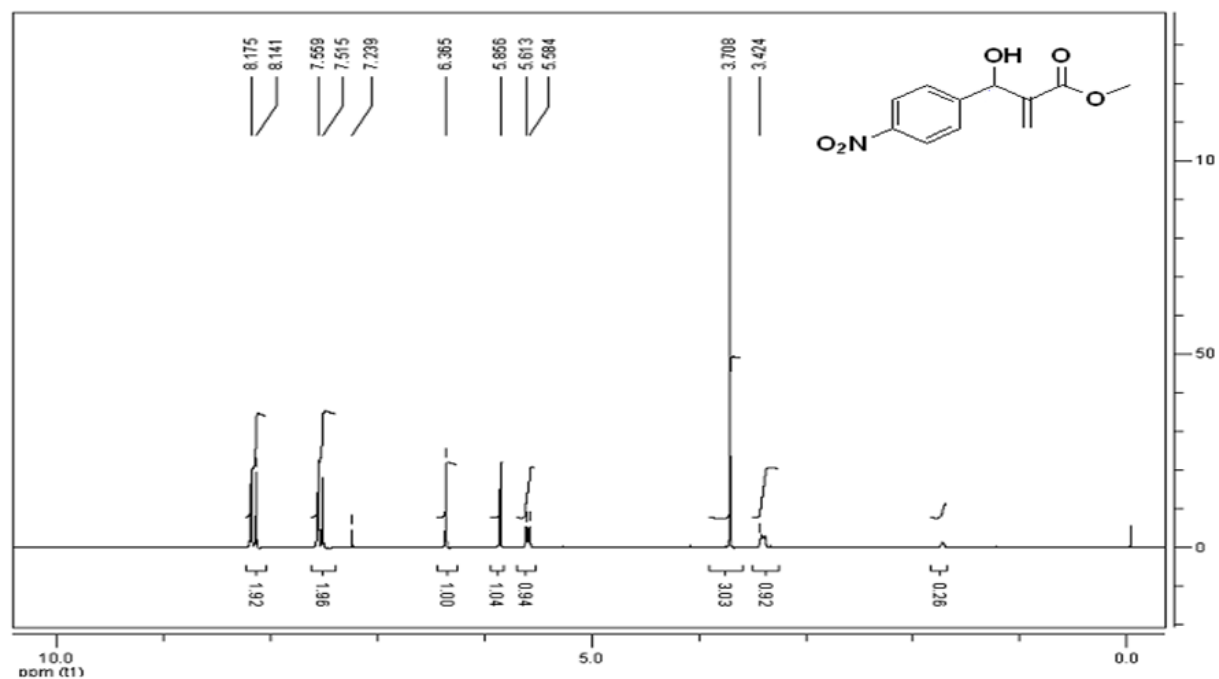
Espectro 32. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de 53



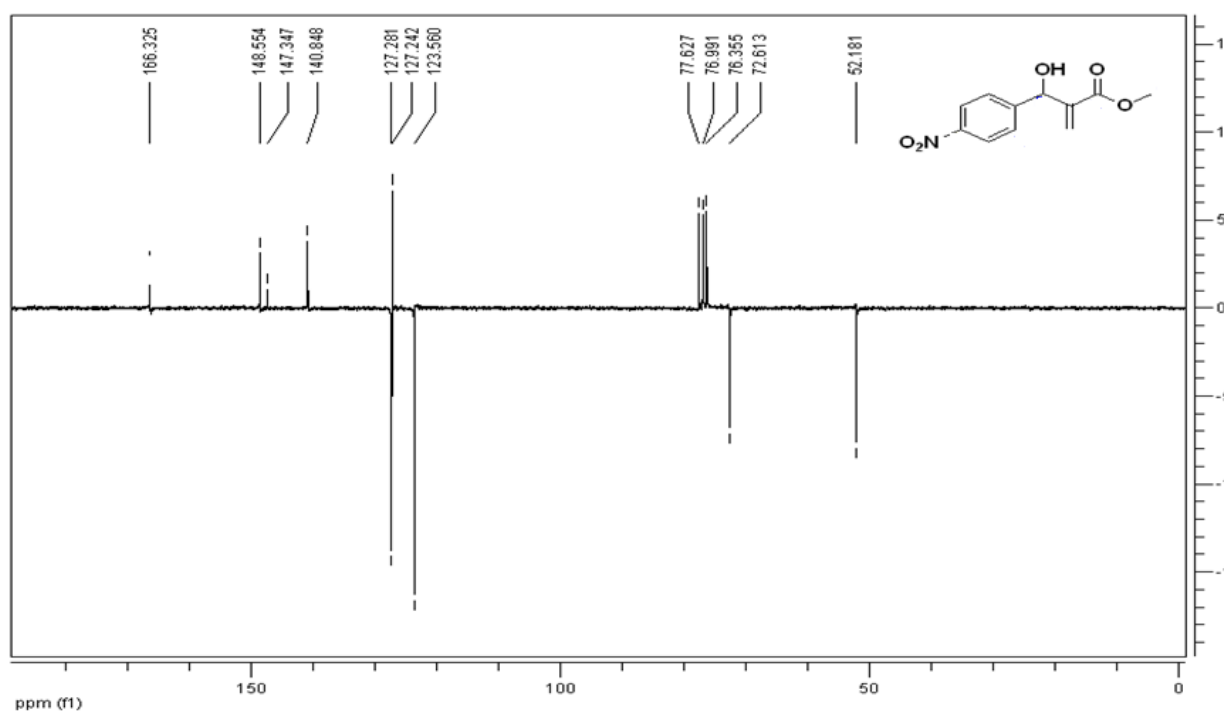
Espectro 33. RMN¹³C -APT 50 MHz (CDCl₃) de **53**



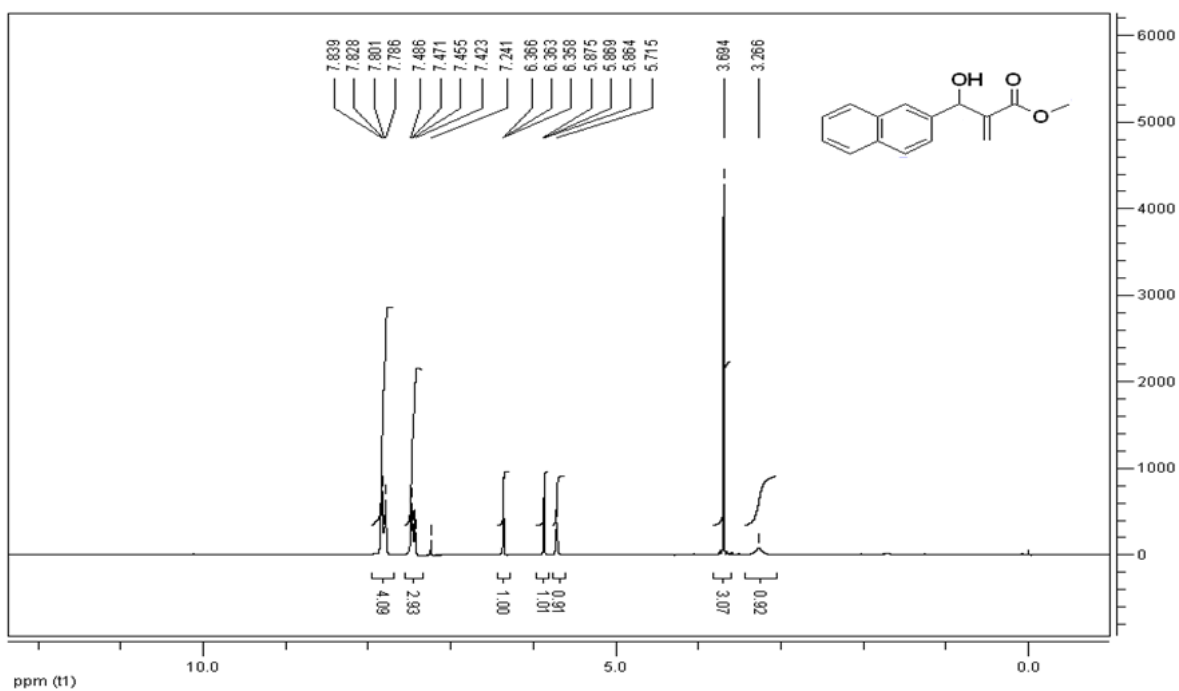
Espectro 34. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃)de **12**



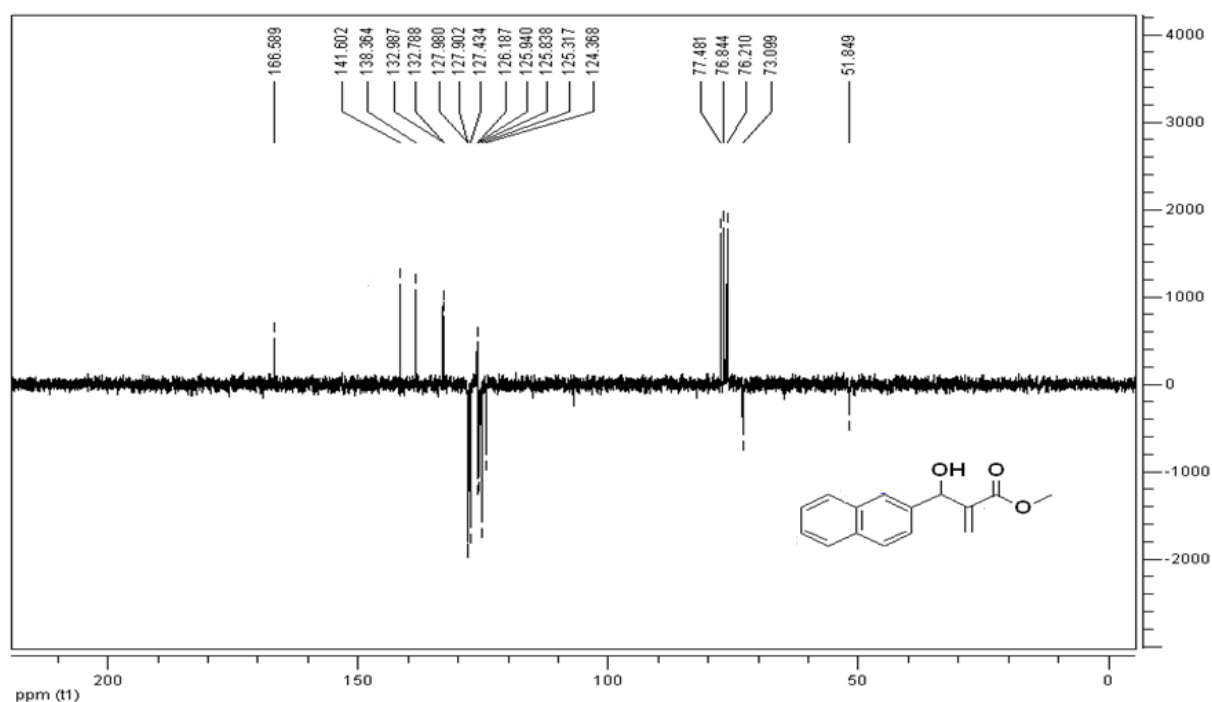
Espectro 35. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **12**



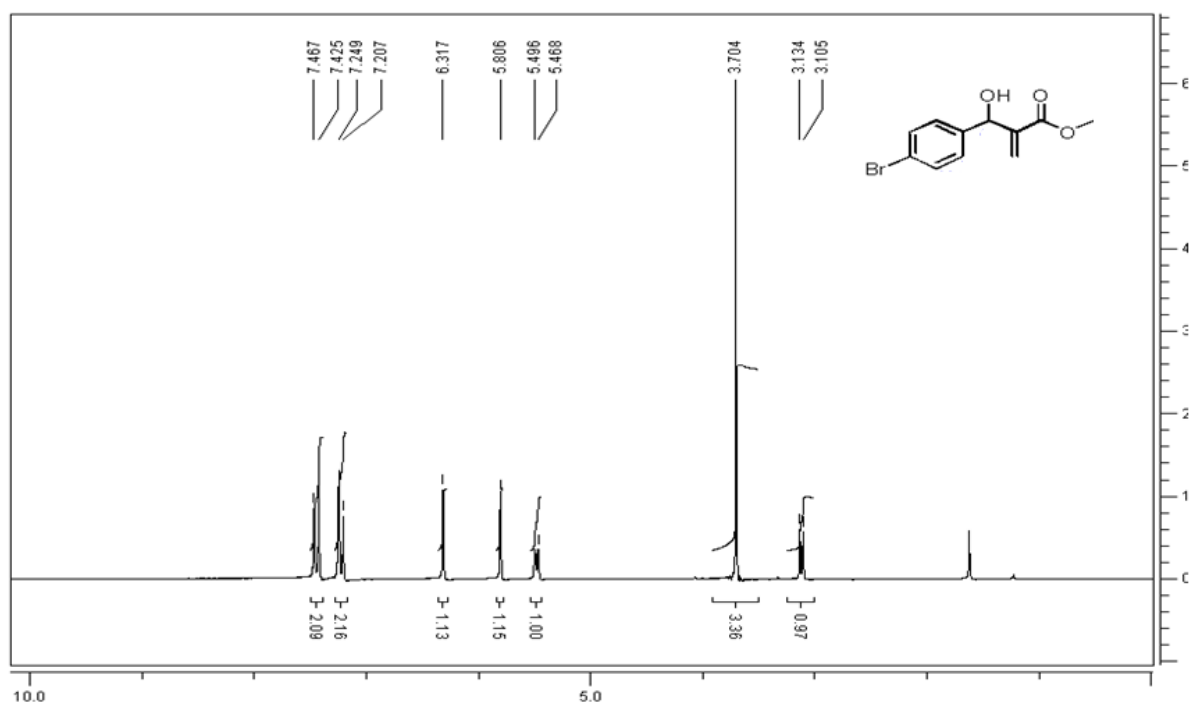
Espectro 36. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **17**



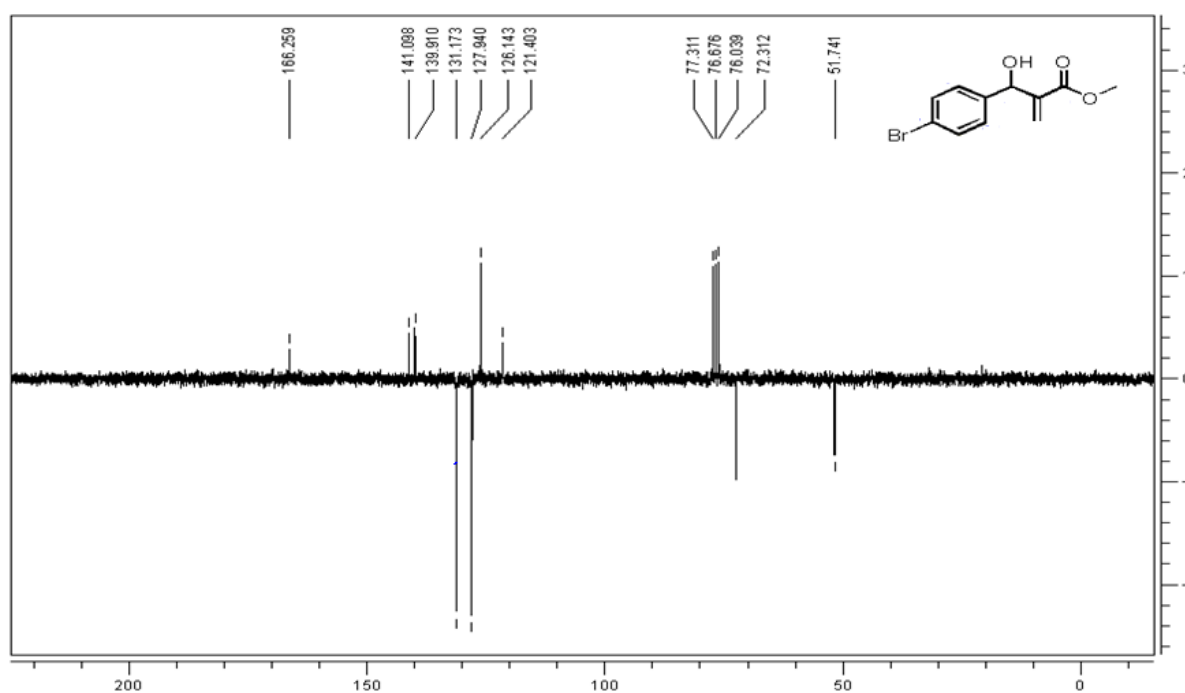
Espectro 37. RMN¹³C -APT 50 MHz (CDCl₃) de **17**



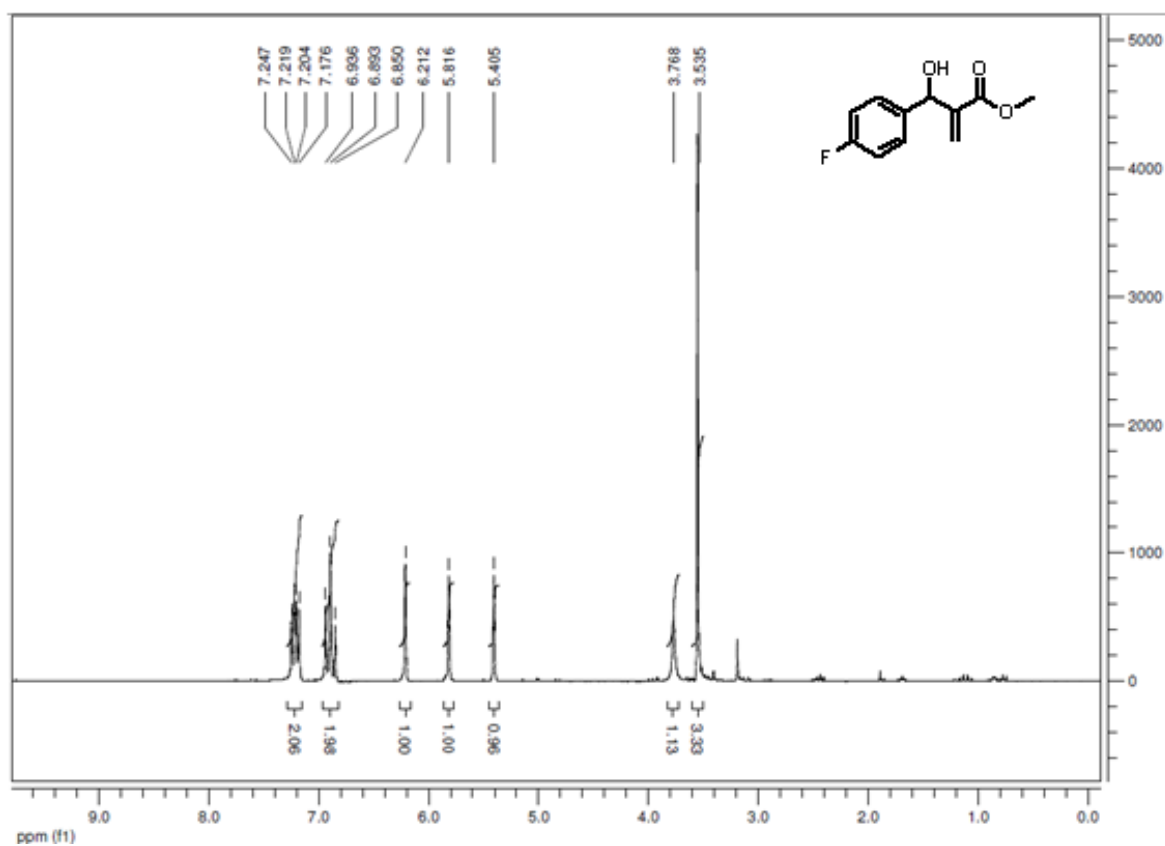
Espectro 38. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **56**



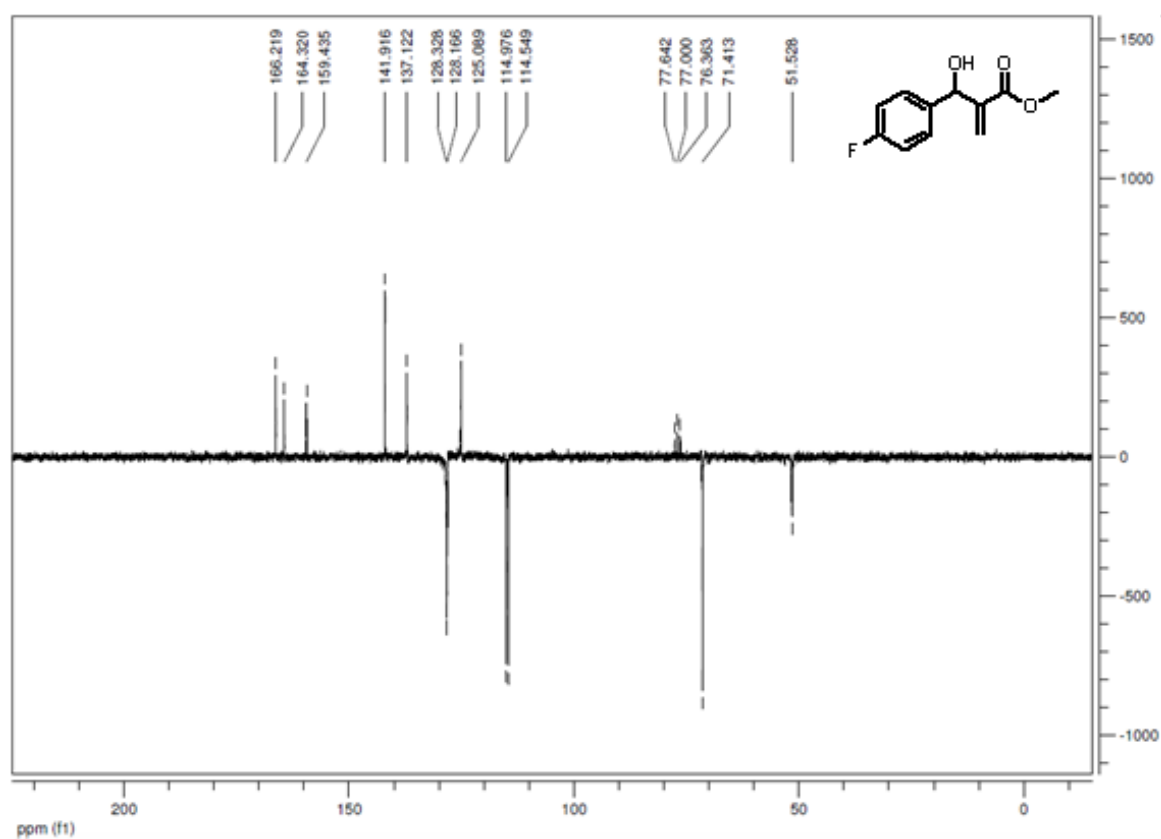
Espectro 39. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **56**



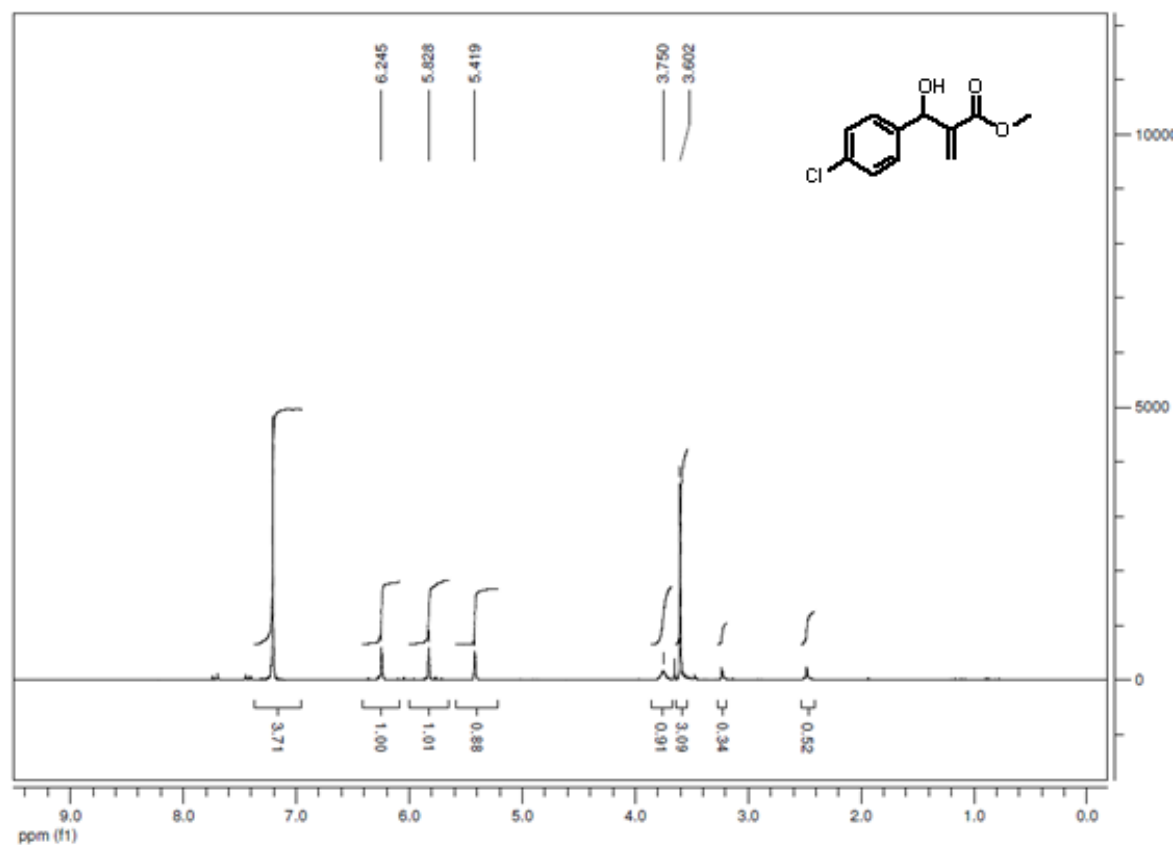
Espectro 40. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **54**



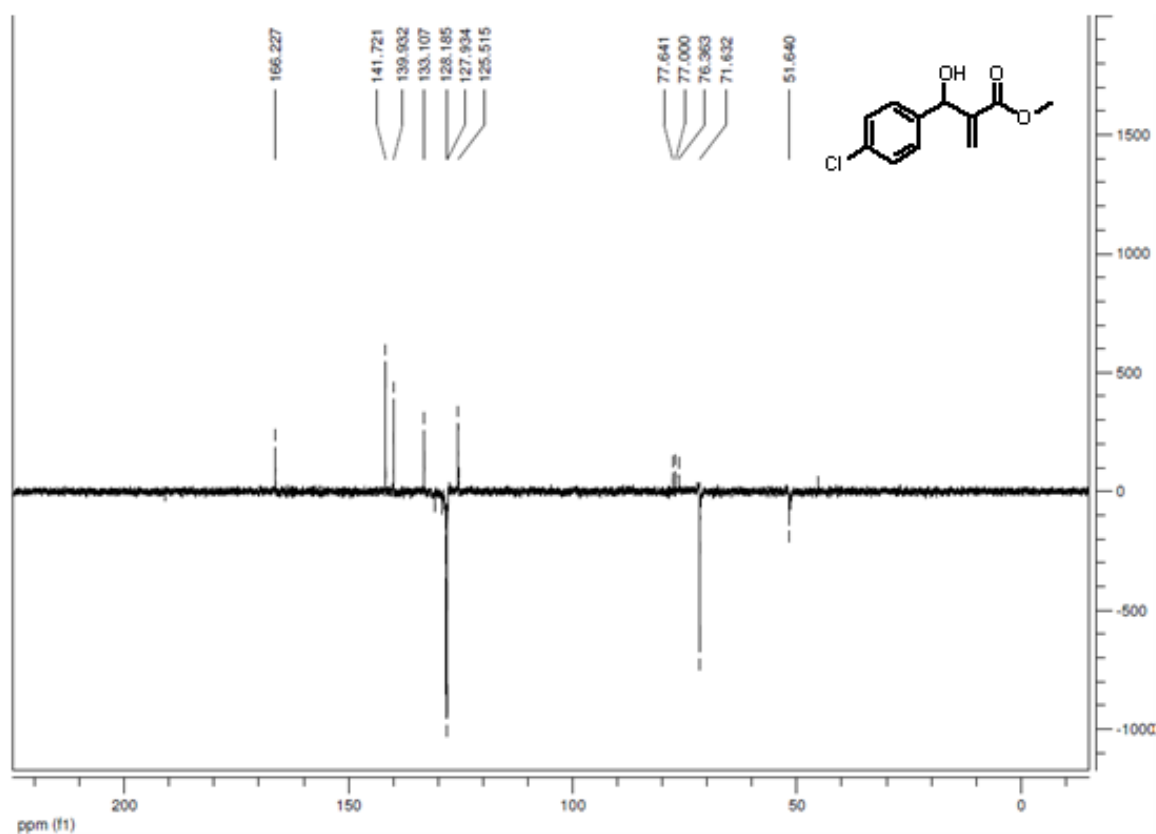
Espectro 41. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **54**



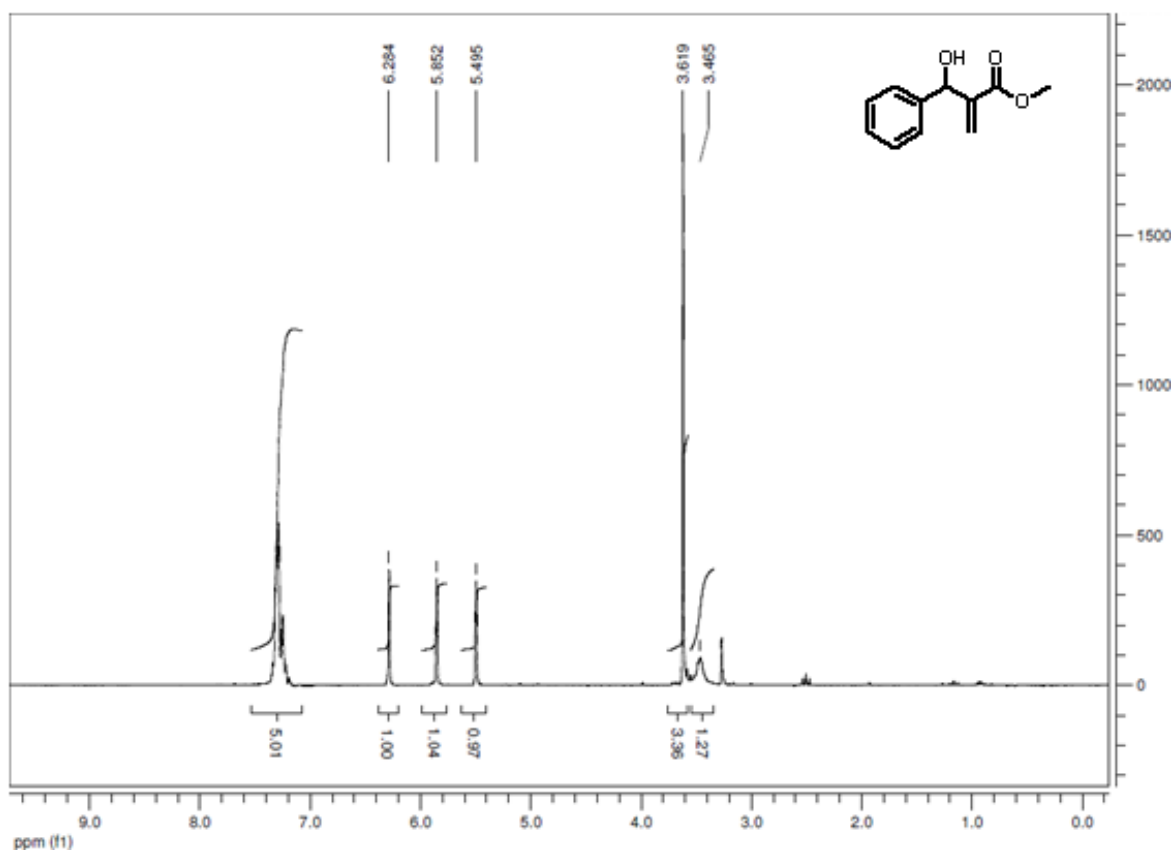
Espectro 42. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **55**



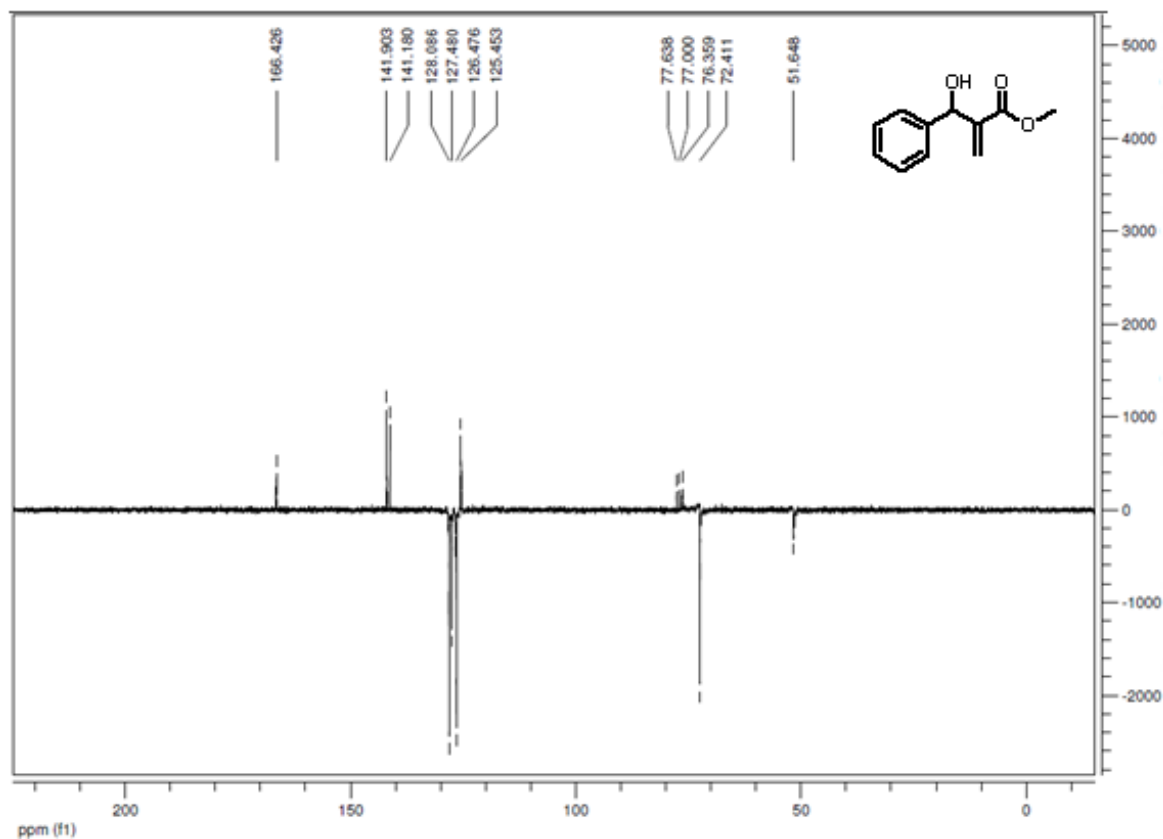
Espectro 43. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **55**



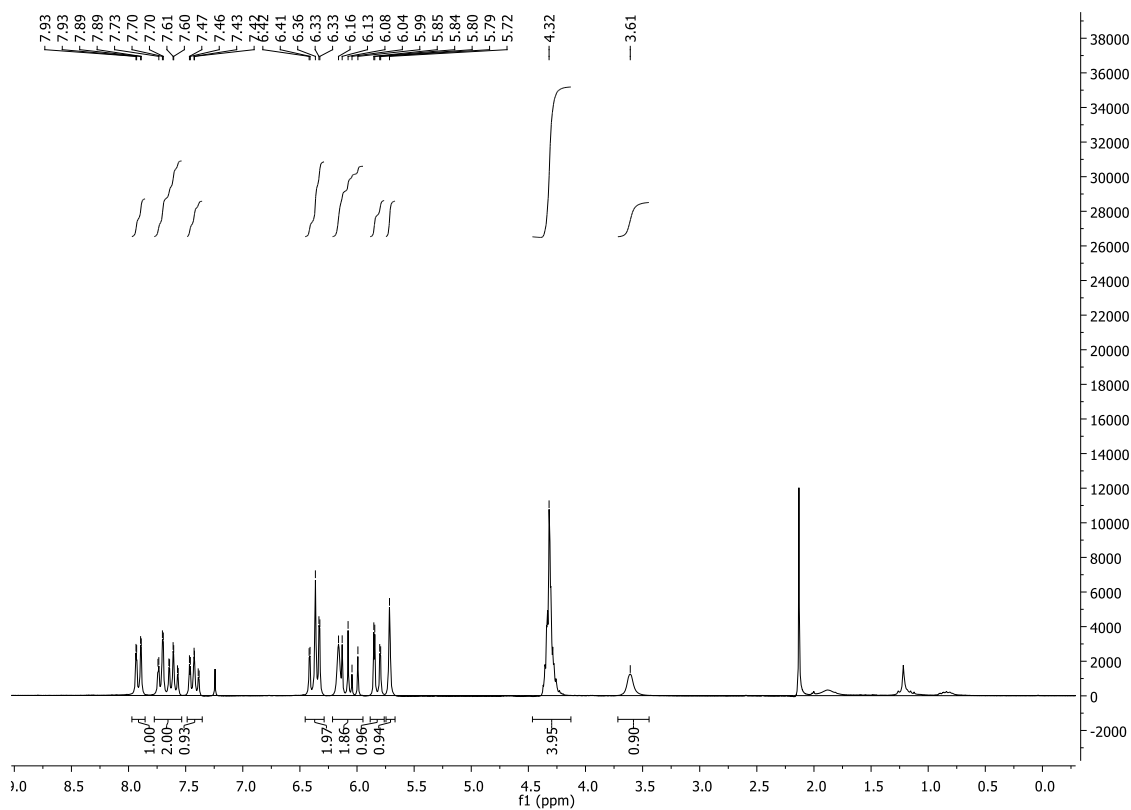
Espectro 44. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **51**



Espectro 45. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de **51**



Espectro 46. RMN¹H 200 MHz(CDCl₃) de **67**



Espectro 47. RMN¹³C-APT 50 MHz (CDCl₃) de 67

