

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese em fase sólida e em solução de anéis
pirrolizidínicos e avaliação da atividade carrapaticida
contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

MÔNICA OLIVEIRA DUARTE

PORTO ALEGRE, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Síntese em fase sólida e em solução de anéis
pirrolizidínicos e avaliação da atividade carrapaticida
contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.**

Dissertação apresentada por **Mônica Oliveira Duarte**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler Lima
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado - Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos - da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 24.4.2008, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Grace Gosmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Paulo Schneider
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Sílvio do Desterro Cunha
Universidade Federal da Bahia

D812s Duarte, Mônica Oliveira

Síntese em fase sólida e em solução de anéis pirrolizidínicos e avaliação da atividade carrapaticida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* / Mônica Oliveira Duarte – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xxii, 121 p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Síntese orgânica em fase sólida. 2. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. 3. Análogos das hianciantinas. I. Lima, Vera Lúcia Eifler. II. Título.

CDU: 547.057

Bibliotecária responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Agradecimentos à CAPES e ao CNPq, órgãos que financiaram a bolsa de estudos, em diferentes momentos, para o desenvolvimento deste trabalho, ao Instituto de Química, ao laboratório K210 do IQ e ao laboratório do setor de acarologia e entomologia da faculdade de veterinária desta Universidade que disponibilizaram equipamentos e materiais para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, pela vida e pelas oportunidades.
- Aos meus pais José e Suleci, por todo amor que sempre me deram.
- Ao meu amor Mateus, pela amizade, ajuda e principalmente compreensão.
- Aos meus amigos Aline, Mateus, Denis, Taciana, Thiago, Daiane, Stela, Kamila, Melissa e Bladytza, que sempre me estimularam a continuar na caminhada, por pior que fosse a situação...
- Aos meus colegas e ex-colegas do LaSOM, em especial ao Guilherme, que sem ele, teria sido impossível fazer tantas reações em SOFS ao mesmo tempo...
- Aos colegas do Instituto de Química.
- Às Professoras Suzana Zachino, Vera Lucia Sardá Ribeiro e Gilsane Von Poser pelos experimentos *in vitro*.
- Aos professores Tânia Pizzolato e Paulo Schneider e à técnica Joyce Spíndola pelos espectros RMN e ao professor Edilson Benvenuto pelas análises de infravermelho.
- À professora Vera Lucia Eifler-Lima pela orientação e por disponibilizar o seu laboratório (LaSOM) na faculdade de Farmácia da UFRGS.
- Ao professor Eduardo Rolim de Oliveira pela co-orientação.

**“ O que não me mata
imediatamente, me fortalece.”**

- Friedrich Nietzsche-

SUMÁRIO

1	Introdução Geral	1
1.1	Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa em síntese orgânica medicinal.	9
1.2	Objetivos	10
1.3	Referências	11
2	Capítulo 1	15
2.1	Introdução	17
2.1.1	Síntese de Hiacintacinas	22
2.2	Objetivos	29
2.3	Resultados e Discussão	30
2.3.1	Retrossíntese e Esquema Geral da rota sintética	30
2.4	Conclusões	43
2.5	Parte Experimental	44
2.5.1	Obtenção do produto 102	44
2.5.2	Obtenção do produto 103	44
2.5.3	Obtenção do produto 104	45
2.5.4	Obtenção do produto 107	45
2.5.5	Obtenção do produto 110	46
2.6	Referências	47
3	Capítulo 2	51
3.1	Introdução	53
3.2	Objetivos	54
3.3	Resultados e discussão	54
3.3.1	Primeira rota sintética proposta	54
3.3.2	Segunda rota sintética proposta	62
3.3.3	Terceira rota sintética proposta	64
3.3.4	Tentativas de funcionalização dos produtos obtidos nas rotas anteriores..	66
3.4	Conclusões	70
3.5	Parte Experimental	71
3.5.1	Obtenção dos produtos 114, 95, 115.	71
3.5.2	Obtenção do produto 96	72
3.5.3	Obtenção dos produtos 117, 118, 119, 97, 121 e 122.	73
3.5.4	Obtenção do produto 120	78
3.5.5	Obtenção dos produtos 123, 124, 125 e 126.	78
3.5.6	Obtenção dos produtos 127 e 128	82
3.5.7	Obtenção dos produtos 109, 132 e 133	83
3.5.8	Obtenção do produto 110	86
3.5.9	Obtenção dos produtos 134, 135, 136 e 137	86
3.6	Referências	90
4	Capítulo 3	55
4.1	Atividade antifúngica	93
4.1.1	Introdução	93
4.1.2	Objetivos	94
4.1.3	Resultados e discussão	95
4.1.4	Conclusões	96

4.1.5	Parte experimental.....	96
4.1.6	Referências.....	98
4.2	Avaliação da atividade carrapaticida.....	99
4.2.1	Introdução.....	99
4.2.2	Objetivos.....	101
4.2.3	Resultados e discussão.....	101
4.2.4	Conclusões.....	104
4.2.5	Parte experimental.....	104
4.2.6	Referências.....	107
5	Conclusões Gerais.....	109
6	Anexos.....	113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Biogênese das necinas ¹	4
Figura 1.2: Alcalóides polihidroxilados inibidores de glicosidases.	5
Figura 1.3: Base necina e ácido néxico.....	5
Figura 1.4: Compostos da família necina	6
Figura 1.5: Alcalóides polihidroxilados.....	6
Figura 1.6: Alcalóide pertencente à família das necinas.	7
Figura 1.7: Alcalóides da família das hiacintacinas.	7
Figura 1.8: Alcalóides isolados da <i>Scilla socialis</i>	8
Figura 2.1: Esquema sintético por síntese em fase sólida.	17
Figura 2.2: Comparação entre as duas metodologias : síntese em solução e SOFS.	19
Figura 2.3: Esquema da Resina merrifield.....	20
Figura 2.4: RM e RW.....	20
Figura 2.5: Resinas utilizadas em SOFS.....	21
Figura 2.6: Compostos sintetizados.	22
Figura 2.7: Espectro de IV da etapa de acoplamento.	33
Figura 2.8: Subtração entre os espectro de IV do produto 103 e da Resina Merrifield.	36
Figura 2.9: Subtração entre os espectro de IV do produto 104 e da Resina Merrifield.	37
Figura 2.10: Subtração entre os espectro de IV do produto 105 e da Resina Merrifield.	39
Figura 3.1: Espectro de RMN 1H do composto 118.	57
Figura 3.2: Espectro de RMN 1H do composto 124.	59
Figura 3.3: Espectro de RMN 1H do composto 109.	63
Figura 3.4: Espectro de APT do composto 135.....	67
Figura 4.1: Produtos sintetizados e testados para atividade antifúngica.	95
Figura 4.2: Produtos testados contra <i>R.(B.) microplus</i>	102
Figura 4.3: Tubos contendo ovos para o teste de imersão (sempre em triplicata).	105
Figura 4.4: Sacos contendo larvas para o teste de imersão (sempre em triplicata). ...	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Grau de solvatação dos solventes frente a RW e RM.....	21
Tabela 2.2: Condições reacionais no acoplamento entre a RW e o prolinato de etila..	32
Tabela 2.3: Condições reacionais no acoplamento entre a RM e a <i>L</i> -prolina.	32
Tabela 2.4: Condições reacionais no acoplamento entre a RM e a <i>L</i> -Boc-prolina.	33
Tabela 2.5: Condições da adição de Michael utilizando propiolato de etila.	37
Tabela 2.6: Condições da adição de Michael utilizando inoato de etila.....	38
Tabela 2.7: Condições da adição de Michael utilizando crotonato de etila.	39
Tabela 2.8: Condições para a reação de ciclização.....	41
Tabela 3.1: Condições da esterificação da <i>L</i> -prolina.....	56
Tabela 3.2: Condições para a adição de Michael.....	58
Tabela 3.3: Condições para redução do enaminoéster a diéster.	60
Tabela 3.4: Condições da ciclização por Baylis Hillman.	65
Tabela 3.5: Condições de redução dos compostos ciclizados.	68
Tabela 3.6: Condições de mesilação do composto 135.	68
Tabela 3.7: Condições de aminação dos compostos mesilados.....	69
Tabela 4.1: Concentração Inibitória Mínima CIM e Concentração fungicida mínima*.	95
Tabela 4.2: Resultado da ação ovicida.....	102
Tabela 4.3: Resultado da ação larvicida.	103

EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros foram analisados pelos deslocamentos químicos expressos em parte por milhão (ppm), sendo utilizado como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os solventes utilizados foram CDCl_3 e D_2O . As constantes estão representadas pela letra *J* e expressas em Hz. A análise das amostras foi realizada pelos seguintes aparelhos de ressonância magnética nuclear: Varian Inova e Varian VNMRs, ambos operando a 300MHz, pertencentes ao IQ/UFRGS.

Em RMN de ^1H , as notações utilizadas para a multiplicidade dos picos foram as seguintes: *s*: simpleto; *d*: duplete; *t*: tripleto; *q*: quadruplete; *m*: multiplete.

Em RMN APT, os espectros são apresentados em modo totalmente desacoplado.

Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros foram realizados no Espectrofotômetro SHIMADZU 8300 por transformada de Fourier (FTIR), pertencente à central analítica do Instituto de Química – UFRGS. As vibrações axiais e angulares foram expressas em cm^{-1} . As amostras analisadas em pastilhas de KBr (3% para as reações em fase sólida) ou solução em diclorometano* ou clorofórmio* (conforme a solubilidade do produto) à temperatura ambiente.

Forno de Microondas (MO)

As reações em forno de microondas foram realizadas no equipamento de MO doméstico Sharp Car@usel II, pertencente ao Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM).

* Os solventes utilizados neste trabalho foram previamente purificados e destilados conforme Perrin, D.D. & Armarego, W.L.F. **Purification of Laboratory Chemicals**. 3. ed. New York: Pergamon Press, 1988, 391 p.

LISTA DE ABREVIATURAS ADOTADAS NESTE TRABALHO

5HT2: Receptor serotoninérgico

Afu: *Aspergillus fumigatus*

Afl: *Aspergillus flavus*

An: *Aspergillus niger*

ANOVA: *analysis of variance*

Ar: arila

ATCC: *American Type Culture Collection*

Boc: t- butil carbamato

BuLi: Butil Lítio

Ca: *Candida albicans siae*

Cn: *Cryptococcus neoformans*

CbZ: bezil carbamato

CCM: Concentração carrapaticida mínima

CFM: Concentração Fungicida Mínima

DBN: 1,5-diazobiciclo[4.3.0]non-5-ene

DBU: 1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-ene

DIC: *N,N'*-Diisopropilcarbodiimida

DIPEA: Diisopropiletilamina

DMAP: 4-(Dimetilamino)piridina

ee: excesso enantiomérico

ES: Espermidina Sintase

Fmoc: 9- fluorenilmetil carbamato

GP: Grupo protetor

HES: Homoespimidina Sintase

IC₅₀: Concentração inibitória em 50% dos indivíduos

mACHR: Receptor Acetilcolina muscarínico

MBHA: Resina hidrocloreto de 4-metilbenzidrilamina

Mg: *Microsporum gypseum*

MO: Microondas

MOPS: ácido morfopropileno sulfônico

NCCLS: National Committee of clinical laboratory standards

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (coenzima na forma oxidada)

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (coenzima na forma reduzida)

NBP: 4-(4-nitrobenzil) piridina

NH₄Cl: Cloreto de Amônio

NMO: 4-Metilmorfolina N-óxido

MsCl: Cloreto de Mesila

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCC: Clorocromiato de piridina

PM: Peso Molecular

Q.C.: Química combinatória

RhuA: *L*-rhamnulose 1-fosfato aldolase de *Escherichia coli*

R_f: *Rate of flow* (distância percorrida pela mancha/ distância percorrida pelo solvente)

RM: Resina Merrifield

RW: Resina Wang

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

SOFS: Síntese orgânica em fase sólida

t.a.: Temperatura ambiente

TBAF.₃H₂O: Fluoreto de tetrabutyl amônio trihidratado

TESOTf: Trietilsilil trifluorometanosulfato

TFA: Ácido trifluoracético

Tm: *Trichophyton mentagrophytes*

TMS: tetrametilsilano

TPAP: perrutenato de tetrabutyl amônio

Tr: *Trichophyton rubrum*

TsCl: Cloreto de Tosila

RESUMO

No presente trabalho desenvolveu-se uma rota sintética em fase sólida para obter de forma rápida o esqueleto da hiacintacina **110** utilizando-se *L*-Boc-prolina **101** como bloco de construção. Não há relatos na literatura, até o momento, do uso da *L*-prolina como material de partida para a síntese de núcleos pirrolizidínicos, entretanto o estudo desta rota é uma alternativa interessante porque possibilita a síntese destes biciclos em apenas 4 etapas. A síntese iniciou com o acoplamento entre a *L*-Boc-prolina **101** e a resina Merifield **41** em condições clássicas. Após a retirada do grupamento protetor com ácido clorídrico por 40 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se à adição de Michael do produto **103** ao propiolato de etila **116** gerando o enamino-diéster **104**. Na última etapa usou-se DBU sob irradiação de microondas por 10 minutos, obtendo-se o azabicyclo **110** com rendimento de 37%. Em solução, através da adição de Michael entre a *L*-prolina *O*-protegida **95** e alcinos e alceno ativados obteve-se adutos cuja estereoquímica das olefinas foi sempre *E*, com bons rendimentos (60-95%). Os enamino-diésteres **97** e **118** foram facilmente convertidos nos seus correspondentes amino-diésteres **124** e **126** com $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ com rendimento de 65%. Na etapa da ciclização de Dieckmann obteve-se sucesso utilizando $\text{Na}/\text{THF}/3\text{h}$ sob refluxo gerando o azabicyclo[3.3.0]octano desejado com rendimento de 50-60%. Os análogos das hiacintacinas foram sintetizados a partir da redução dos produtos **109**, **132** e **133** com $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ e rendimentos de 52%. Os produtos **109**, **132**, **133**, **135**, **136** e **137** foram testados para atividades antiparasitárias e apresentaram bons resultados para a ação carrapaticida com doses até $0,625\mu\text{g}/\text{ml}$ em ovos e $1,25\mu\text{g}/\text{ml}$ em larvas.

Palavras-chaves: Análogos das hiacintacinas, Síntese orgânica, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, Síntese Orgânica em fase sólida, *L*-prolina.

ABSTRACT

Solid and solution-phase synthesis of pyrrolizidines and the evaluation of its activity against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

We present here an original solid-phase approach to synthesize rapidly the hyacinthacine core **110** using *L*-proline *N*-Boc **101** as building block. There is no reference in the literature which uses *L*-proline as building block to synthesize this pyrrolizidine skeleton. The study of this possibility would be extremely interesting because it could be used to prepare structural systems related to hyacinthacine in only four steps. The synthesis initiates with the coupling of *L*-Boc-proline **101** to Merrifield resin **41** under classical conditions. The protection group was removed with hydrogen chloride and the Michael addition was proceeded with adduct **103** and ethyl propiolate **116**, affording **104** in satisfactory yields. At least, the azabicyclo **110** was obtained by reacting **98** using DBU as catalyst at MW irradiation for 10 min, in good yields (37 %). In solution, we have proceeded to Michael addition of *L*-proline *O*-protected **95** to activated alkynoates/alkenes conducting to adducts where the stereochemistry of the olefins was always *E*, with excellent yield (60-95%). Enaminoesters **97** and **118** could be easily converted into the corresponding aminodiester **124** and **126** by NaBH(OAc)₃ in 65% yield. In the step of the Dieckmann cyclization of aminodiester the system Na/THF/3h at reflux afforded the derived azabicyclo[3.3.0]octanes in 50-60% yield. The analogs of the hyacinthacines were synthesized with reduction of **109**, **132** and **133** with LiAlH₄/THF in 52% yield with the stereochemistry to be determined. The products **109**, **132**, **133**, **135**, **136** and **137** were tested for parasitic activity and showed good results. Compounds **109**, **132**, **135** and **136** killed 100% of the larvae at the concentrations of 5 µg/ml and 2.5 µg/ml being not toxic at the lower concentrations. Compounds **133** and **137** were more toxic being lethal to the larvae at concentrations of 1.25 µg/ml but did not cause death at the lower concentrations.

Keywords: hyacinthacine core, organic synthesis, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, solid phase organic synthesis, *L*-proline.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Introdução

Segundo Pelletier (1988) “alcalóide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos.”¹

Os alcalóides fazem parte de um vasto grupo de metabólitos secundários, com uma diversidade estrutural muito ampla. Extratos vegetais contendo estes compostos são usados desde a antiguidade como medicamento, poções mágicas e venenos: o filósofo Sócrates foi morto na Grécia Antiga após ingerir uma bebida a base de cicuta; já na Roma Antiga, Livia, a esposa do Imperador Augusto, servia aos adversários políticos do seu esposo, banquetes contendo beladona.¹

Os alcalóides podem ser encontrados em todas as partes do vegetal, mas acumulam-se preferencialmente em tecidos com crescimento ativo, em células epidérmicas e hipodérmicas, em bainhas vasculares e em vasos linfáticos. Tem-se observado que animais e insetos evitam plantas que produzem alcalóides, o que pode acontecer devido ao gosto amargo destes compostos e à sua toxicidade.¹

Estes compostos possuem um amplo espectro de atividades biológicas como por exemplo, a emetina como amebicida e emético; a atropina, a hiosciamina e a escopolamina como anticolinérgicos; a quinina como antimalárico; a camptotecina, a vimblastina e a vincristina como antitumorais; a codeína e a noscapina como antitussígenos; a morfina como hipnoanalgésico; a galantamina para o tratamento do Mal de Alzheimer entre outros¹.

A biossíntese destes compostos ocorre, de maneira geral, a partir de aminoácidos como a *L*-lisina, o ácido *L*-aspártico, a *L*-tirosina, o *L*-triptofano e a *L*-histidina. O aminoácido não protéico *L*-ornitina dá origem aos alcalóides com núcleo pirrolizidínico, pirrolidínico e tropânico¹.(Figura 1.1)

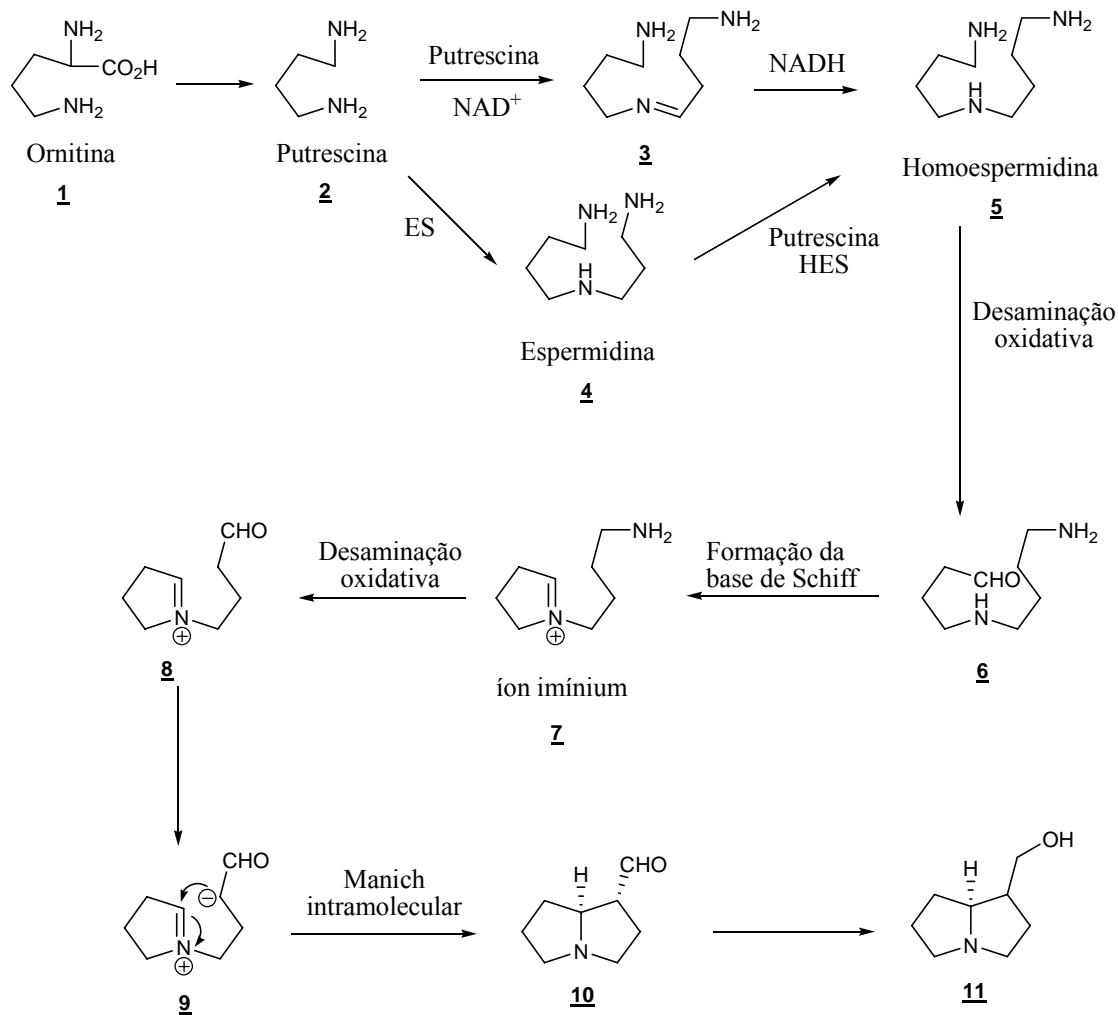


Figura 1.1: Biogênese das necinas¹.

Dentro desta diversidade de compostos existem alguns alcalóides que mimetizam estruturalmente carboidratos e, por isso, são chamados de azaçúcares ou iminoaçúcares. Esta semelhança lhes permite participar dos mesmos processos que metabolizam os carboidratos, através da inibição de enzimas glicosidases. Com ensaios biológicos percebeu-se que estes alcalóides, ao bloquear a ação das glicosidases, afetavam a síntese de oligossacarídeos presentes na parede celular e, conseqüentemente, perturbavam o processo de reconhecimento célula-célula, célula-vírus. Como este princípio é utilizado no combate a doenças como câncer, AIDS e hepatite, estes compostos tornaram-se potenciais candidatos a quimioterápicos, além de contribuírem para a elucidação e o entendimento da biossíntese de carboidratos e glicoproteínas².

Os alcalóides que possuem um heterociclo nitrogenado com a presença de hidroxilas na cadeia carbônica e que possuam ação de inibir glicosidasas são divididos em cinco grupos: piperidínicos, nortropanos, indolizidínicos, pirrolizidínicos e pirrolidínicos³ (**Figura 1.2**).

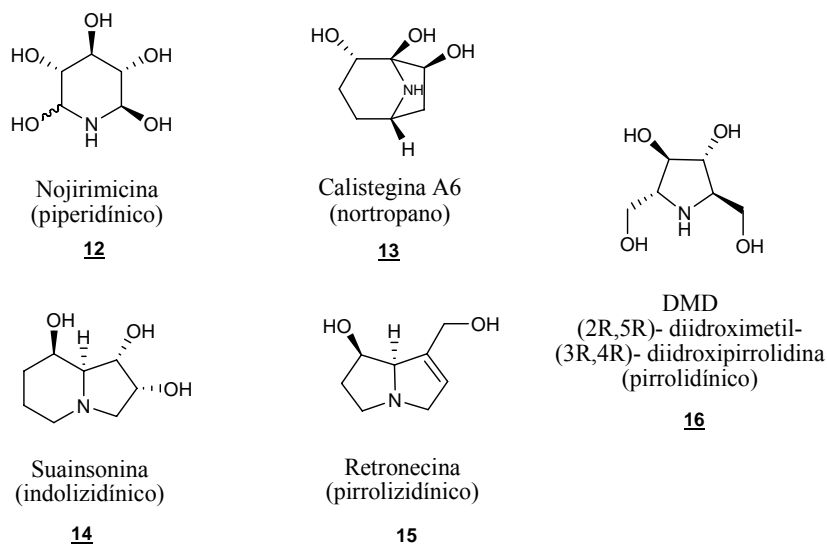


Figura 1.2: Alcalóides poli-hidroxilados inibidores de glicosidasas.

Os alcalóides pirrolizidínicos têm sido isolados, identificados e detectados em diversos organismos, incluindo plantas e animais, sendo que suas principais fontes são as plantas superiores pertencentes às diversas famílias das angiospermas. Estes compostos possuem um perfil estrutural diverso, porém sua característica geral é a presença da base necina 4-azabicyclo[3.3.0]octano e o ácido néxico nas posições 1 e 7 (**Figura 1.3**).¹

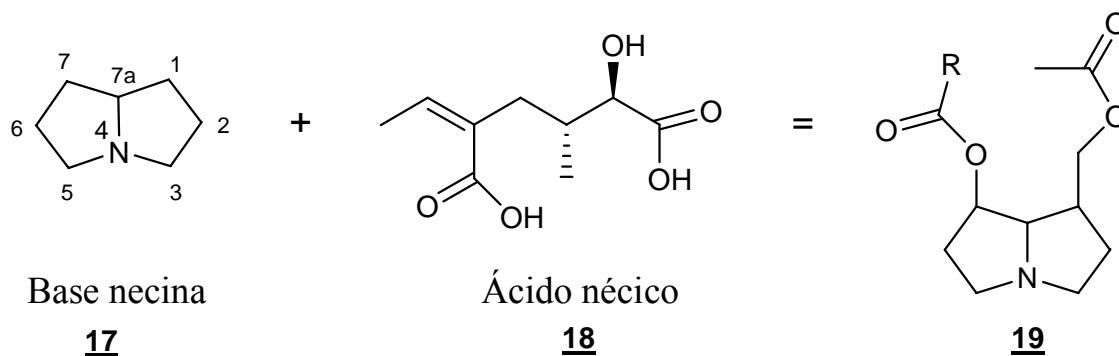


Figura 1.3: Base necina e ácido néxico.

Dentre as atividades biológicas de alcalóides pirrolizidínicos descritas na literatura até o presente, podem ser destacadas a atividade antifúngica⁴⁻⁹, antibacteriana⁹, atividade preventiva contra úlceras gástrica e duodenal¹⁰ e a inibição enzimática^{3,11-13,20}. Além disso, estudos envolvendo ensaios de radioligantes mostraram a afinidade de certos alcalóides pirrolizidínicos com receptores importantes como o 5HT-2 (serotoninérgico) e o mAChR (acetilcolina muscarínico)¹⁴.

Watt em 1909 isolou os primeiros alcalóides pirrolizidínicos pertencente à subclasse das necinas. As bases necinas que possuem substituintes na posição 1 ou na posição 7 (mais comum) são encontradas sempre com ácidos néicos nestas posições¹⁵. Ao sofrerem hidrólise, estes compostos não atuam mais como inibidores de glicosidases e tornam-se agentes hepatotóxicos (**Figura 1.4**).

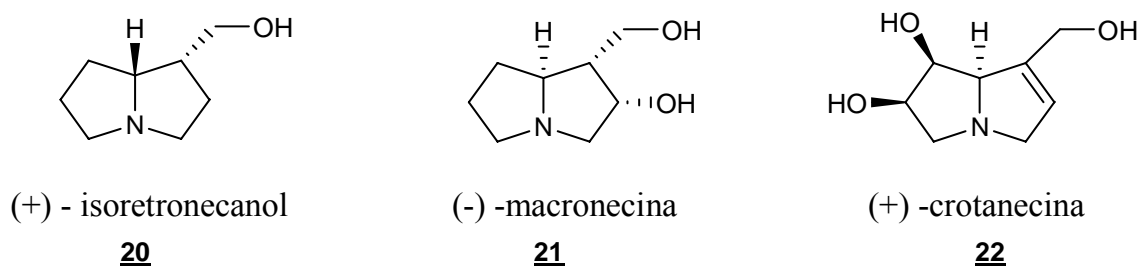


Figura 1.4: Compostos da família necina

Em 1988, Nash e Molineux isolaram dois isômeros constitucionais da castanospermina, que é um inibidor indolizidínico de glicosidases: a alexina¹⁶, obtida da leguminosa *Alexa leiopetala*, e a australina¹⁷, extraída da *Castanospermum australe* (**Figura 1.5**). Esses dois compostos são caracterizados pela presença de um grupo hidroximetila na posição C3.

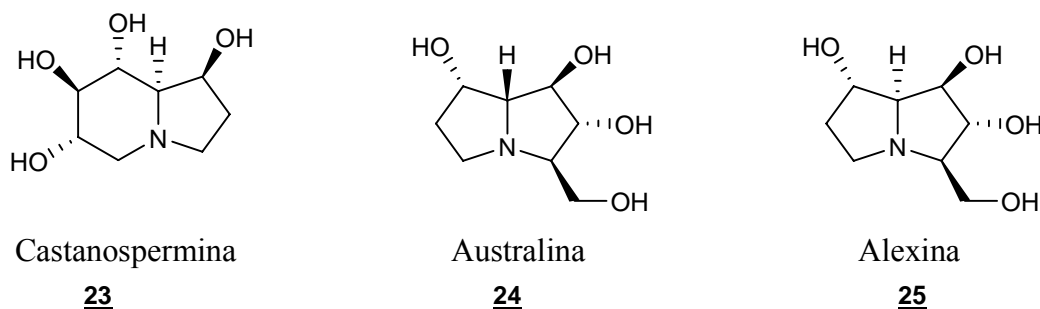


Figura 1.5: Alcalóides poli-hidroxilados

Nash e colaboradores isolaram, em 1994, a casuarina a partir da casca da *Casuarina equisetifolia* (**Figura 1.6**). Esta planta era prescrita na Samoa Ocidental para o tratamento de mulheres com câncer de mama. Enquanto que na Índia, as folhas da *Eugenia jambolana*, que também possuem a casuarina, eram indicadas para o tratamento de diabetes.¹⁸

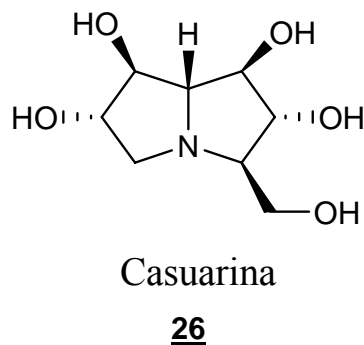


Figura 1.6: Alcalóide pertencente à família das necinas.

Em 1999, Asano e colaboradores identificaram novos alcalóides que se caracterizavam pela existência de uma ramificação em C5 e foram denominados hiacintacinas. Estes azaçúcares pirrolizidínicos foram isolados das espécies *Hyacinthoides non-scripta* e *Scilla campanulata* (**Figura 1.7**).¹⁹

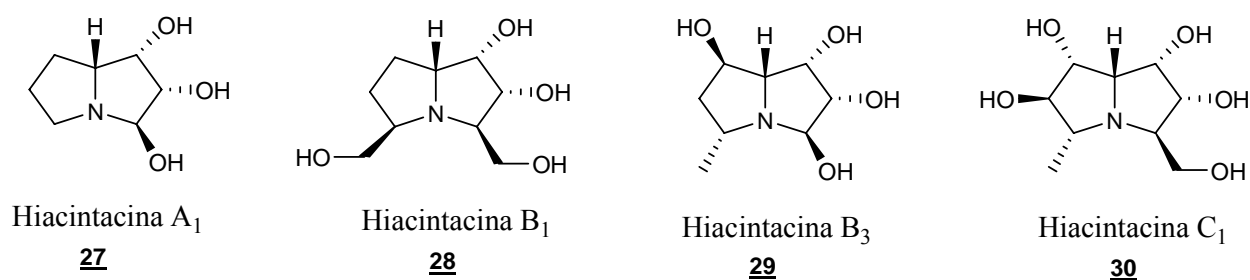


Figura 1.7: Alcalóides da família das hiacintacinas.

Em 2007, Kato e colaboradores isolaram dos bulbos da *Scilla socialis* onze alcalóides do tipo hiacintacina (**Figura 1.8**), sendo que seis são moléculas inéditas e algumas apresentaram inibição enzimática. A hiacintacina C2 apresentou boa inibição das enzimas β -glucosidase de bactéria e α -L-fucosidase de placenta humana com IC_{50} = 13 e 17 μ M respectivamente²⁰.

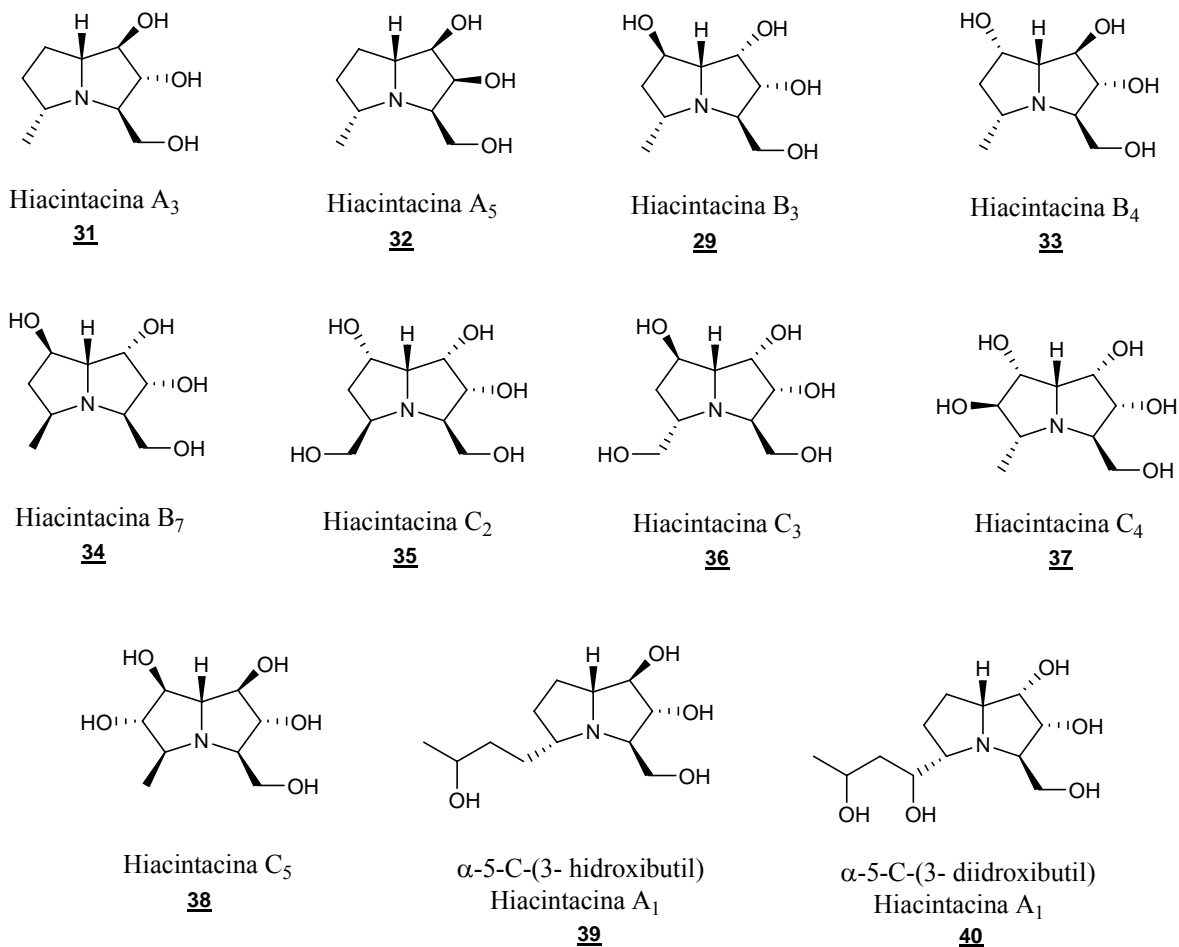


Figura 1.8: Alcalóides isolados da *Scilla socialis*.

1.1 Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa em síntese orgânica medicinal

Este trabalho teve início com a dissertação de Mestrado de Pablo David Grigol Martinez²¹, onde foi estudado a adição de amins secundárias cíclicas (pirrolidina, piperidina e morfolina) e α - aminoácidos (*L*-prolina e derivados) a alcinos ativados. Estas reações geravam o aduto de Michael com estereoquímica *E* independente do alcino ser substituído ou não e das condições reacionais. Estas reações apresentaram bons rendimentos (60-96%), porém havia dificuldade nas etapas de purificação, onde muitas vezes ocorria degradação e perda dos produtos.

Por este motivo, deseja-se empregar a Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS) para facilitar a purificação e conseqüentemente aumentar o rendimento global da rota sintética. A utilização da SOFS para síntese de alcalóides do tipo hiacintacina nunca foi descrita na literatura, o que pode disponibilizar uma nova alternativa para a síntese destes compostos.

A grande vantagem desta técnica é a purificação rápida e eficiente, onde o produto acoplado a uma resina é lavado com diversos solventes, simplificando assim o tempo de purificação e evitando a degradação dos produtos obtidos. A síntese realizada deverá ser otimizada para que possa ser automatizada para a síntese combinatória em paralelo de novos derivados diferentemente substituídos.

Para melhor compreensão dos trabalhos desenvolvidos nesta dissertação, esta foi escrita em três capítulos. O primeiro tratará da obtenção de derivados de alcalóides do tipo hiacintacinas empregando a SOFS, o segundo capítulo abordará a síntese em solução dessas moléculas e o terceiro capítulo relatará os ensaios biológicos realizados com as moléculas sintetizadas.

1.2 Objetivos

Considerando a promissora importância para os químicos medicinais dessa classe de substâncias, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar derivados dos alcalóides do tipo hiacintacinas em fase sólida e em solução, paralelamente.

Além disso, pretende-se realizar uma avaliação preliminar dos compostos sintetizados, a fim de testar possíveis atividades acaricidas e antifúngicas.

1.3 Referências

1. MOUSTAPHA, B.; PEREDA-MIRANDA, R. Alcalóides pirrolizidínicos In: **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Cap.32, p.847-867, 2003.
2. a) CARDONA, F.; FAGGI, E.; LIGUORI, F.; CACCIARINI, M.; GOTI, A. Total synthesis of hyacinthacine A₂ and 7-deoxycasuarine by cycloaddition to a carbohydrate derived nitron. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2315-2318, 2003. b) DESVERGNES, S.; PY, S.; VALLEE, Y. Total Synthesis of (+)-Hyacinthacine A₂ Based on SmI₂-Induced Nitron Umpolung. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 1459-1462, 2005.
3. ASANO, N.; NASH, R. J.; MOLYNEUX, R. J.; FLEET, G. W. J. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 11, p. 1645-1680, 2000.
4. JAIN, S. C. AND SHARMA, R. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 3487-3489, 1987.
5. MARQUINA, G., LAGUNA, A., FRANCO, P., FERNANDEZ, L., PEREZ, P. AND VALIENTE, O. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bursiferum* Wt-ex Grisebach. **Pharmazie**, v. 44, n. 12, p. 870-871, 1989.
6. REINA, M., MERICLI, A. H., CABRERA, R., AND GONZALEZ-COLOMA, A.. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 355-358, 1995.
7. REINA, M., GONZALEZ-COLOMA, A., GUTIERREZ, C., CABRERA, R., HENRIQUEZ, J. AND VILLARROEL, L. Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 845-853, 1997.
8. HOL, W. H. G. AND VAN VEEN, J. A. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* affect fungal growth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 9, p. 1763-1772, 2002.
9. SINGH, B., SAHU, P.M., SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 153- 155, 2002.
10. TOMA, W., TRIGO,J.R., DE PAULA, A.C.B., BRITO, A.R.M.S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 345-351, 2004.

11. WINK, M., SCHMELLER, T., LATZ-BRUNING, B. Modes of Action of Allelochemical Alkaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA, and Other Molecular Targets. **Journal of Chemical Ecology**, v. 24, p. 1881–1909, 1998.
12. KATO, A., KANO, E., ADACHI, I., MOLYNEUX, R.J., WATSON, A.A., NASH, R.J., FLEET, G.W.J., WORMALD, M.R., KIZU, H., IKEDA, K., ASANO, N. Australine and related alkaloids: easy structural confirmation by ¹³C NMR spectral data and biological activities. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 3, p. 325-331, 2003.
13. DONOHOE, T. J.; SINTIM, H. O.; HOLLINSHEAD, J. A Noncarbohydrate Based Approach to Polyhydroxylated Pyrrolidizines: Total Syntheses of the Natural Products Hyacinthacine A₁ and 1-Epiaustraline. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 7297- 7304, 2005.
14. SCHEMELLER, T., EL-SHAZLY, A., WINK, M. Allelochemical Activities of Pyrrolizidine Alkaloids: Interactions with Neuroreceptors and Acetylcholine Related Enzymes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 399-416, 1997.
15. WATT, H. E. Alkaloids of *Senecio latifolius*. **Journal of Chemical Society**, p. 466, 1909.
16. NASH, R. J.; FELLOWS, L. E.; DRING, J. V.; FLEET, G. W.J.; DEROME, A. E.; HAMOR, T. A.; SCOFIELD, A. M.; WATKIN, D. J. Isolation from *alexa leiopetala* and x-ray crystal structure of alexine, (1r,2r,3r,7s,8s)-3-hydroxymethyl-1,2,7-trihydroxypyrrolizidine[(2r,3r,4r,5s,6s)-2-hydroxymethyl-1-azabicyclo[3.3.0]octan-3,4,6-triol], a unique pyrrolizidine alkaloid. **Tetrahedron Letters**, v. 29, p. 2487-2490, 1988.
17. MOLINEUX, R. J.; BENSON, M.; WONG, R. Y.; TROPEA, J. E.; ELBEIN, A. D. Australine, a Novel Pyrrolizidine Alkaloid Glucosidase Inhibitor from *Castanospermum australe*. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 1198- 1206, 1988.
18. NASH, R. J.; THOMAS, P. I.; WAIGH, R. D.; FLEET, G. W. J.; WORMALD, M. R.; LILLEY, P. M. Q.; WATKIN, D. J. Casuarine: A very highly oxygenated pyrrolizidine alkaloid. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 7849- 7852, 1994.
19. KATO, A.; ADACHI, I.; MIYAUCHI, M.; IKEDA, K.; KOMAE, T.; KIZU, H.; KAMEDA, Y.; WATSON, A. A.; NASH, R. J.; WORMALD, M. R.; FLEET, G. W. J.; ASANO, N. Polyhydroxylated pyrrolidine and pyrrolizidine alkaloids from *Hyacinthoides non-scripta* and *Scilla campanulata*. **Carbohydrate Research**, v. 316, n. 95, 1999.

20. KATO, A.; KATO, N.; ADACHI, I.; HOLLINSHEAD, J.; FLEET, G. W. J.; KURIYAMA, C.; IKEDA, K.; ASANO, N.; NASH, R. J. Isolation of Glycosidase-Inhibiting Hyacinthacines and Related Alkaloids from *Scilla socialis*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 993-997, 2007.

21. MARTINEZ, P. D.G. Estudo da adição de aminas em alcalinos ativados: preparação de intermediários para a síntese de heterociclos nitrogenados. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, UFRGS, Programa de pós-graduação em química, 121p., 2005.

2 CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 - SÍNTESE ORGÂNICA EM FASE SÓLIDA - SOFS

2.1 Introdução

A partir de 1964 os químicos sintéticos puderam contar com uma nova técnica revolucionária apresentada por Bruce Merrifield: a síntese orgânica em fase sólida (SOFS) ou simplesmente síntese em fase sólida. Ele desenvolveu esta metodologia para a síntese de peptídeos, utilizando polímeros insolúveis e inertes ao meio reacional, chamados de resinas¹. A SOFS consiste em ligar de forma covalente o produto de partida à resina e a partir desta etapa, chamada de acoplamento, desenvolve-se toda a rota sintética com o produto acoplado ao polímero, como se este fosse um grupo protetor (GP). Esta técnica apresenta vantagens na quimioseletividade, com a conseqüente diminuição de reações paralelas e de formação de subprodutos. Entretanto, a maior vantagem da SOFS é a simplificação das etapas de purificação dos produtos intermediários sintetizados, que passa a consistir de um simples processo de filtração e lavagem com um coquetel de solventes em cada etapa da rota sintética, eliminando-se assim o excesso de solventes e reagentes (Figura 2.1)¹⁻¹⁰. A última etapa da rota consiste na liberação do produto final do polímero (clivagem), obtendo-se um composto com alto grau de pureza.³⁻⁵

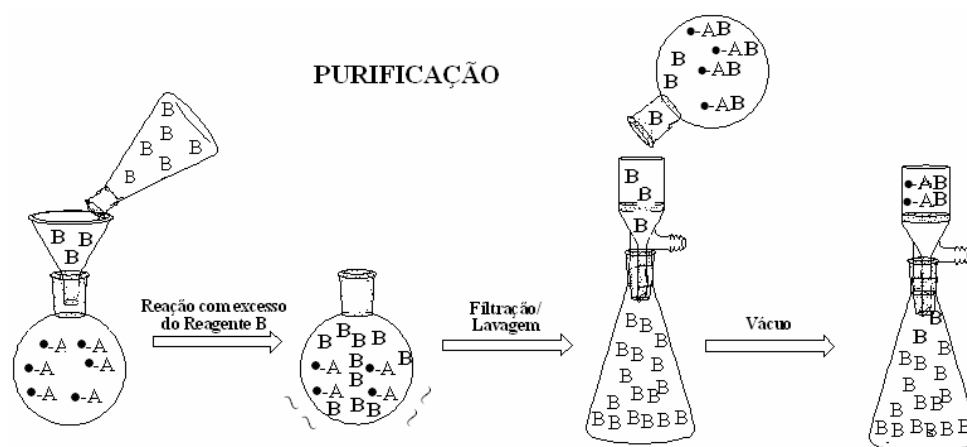


Figura 2.1: Esquema sintético por síntese em fase sólida.

O processo de descobrimento de um novo fármaco pode ser feito através de várias estratégias, todas envolvendo diversas etapas, onde o tempo total envolvido em todo o processo é de cerca de 15 anos, sendo que aproximadamente um terço deste tempo corresponde à identificação e otimização do composto-protótipo.¹¹

O desenvolvimento de estratégias em SOFS visando novos fármacos tem sido bastante explorado desde a síntese de compostos benzodiazepínicos por Bunin e Ellman¹², no início da década de 90. A partir daí outros grupos de pesquisa passaram a investir nesta metodologia, como Janda e colaboradores em 1997, que sintetizaram prostaglandinas, estruturas envolvidas em processos inflamatórios, regeneração de tecidos e resposta imunológica, immobilizadas em um suporte polimérico solúvel de poliestireno clorometilado não entrecruzado.¹³

A síntese em fase sólida de compostos heterocíclicos, bastante utilizados na terapêutica, tais como indolinas¹⁴, tetraidroquinolinas¹⁵ ou hidrobenzofuranos¹⁶, vem despertando um grande interesse da comunidade científica. Esta metodologia é aplicada também na indústria farmacêutica onde, por exemplo, o medicamento efuvirtide também conhecido como Fuzeon[®], que é utilizado no tratamento contra AIDS, é sintetizado utilizando-se 36 aminoácidos, onde 4 das 8 etapas são realizadas por SOFS.¹⁷

Comparando-se as duas metodologias (SOFS e síntese em solução) podem-se observar as vantagens da SOFS na etapa da purificação de seus intermediários (**Figura 2.2**). Na síntese em solução cada intermediário é isolado, purificado (na maioria das vezes) e caracterizado, para só então se prosseguir com rota até o final. A grande revolução da síntese em fase sólida, ao contrário, reside no fato de que os intermediários são apenas filtrados e lavados, sem caracterização, havendo apenas o acompanhamento das reações por infra-vermelho¹⁸ ou por métodos colorimétricos¹⁹. Apenas ao final da síntese, etapa de clivagem, o produto é caracterizado pelos métodos usuais, como será mais explicitado a seguir.

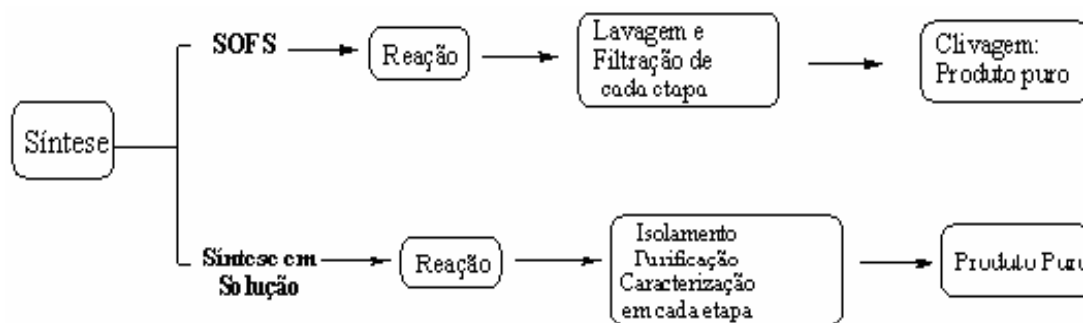


Figura 2.2: Comparação entre as duas metodologias : síntese em solução e SOFS.

A síntese em solução ocorre ao se reagir um substrato e um reagente, onde a reação é normalmente acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), após determinado período de tempo, quando não existe mais a mudança dos parâmetros cromatográficos em questão, a reação atinge seu término, passando-se então para a etapa de purificação. Esta, muitas vezes pode ser mais extensa que a própria síntese e costuma-se empregar evaporação de solventes, extração com solventes, cristalização e cromatografia em coluna (CC), sendo que em muitas ocasiões a realização de mais de uma CC se faz necessária para a obtenção do produto puro.³

Na etapa de purificação a demora ao isolar o produto ou o intermediário do meio reacional pode levar a uma degradação do mesmo. Os fatores que podem contribuir para isto são o contato com o ar, a exposição à luz, o aquecimento excessivo ou até mesmo reação com diversos produtos secundários ou resquícios de reagentes. As maiores desvantagens estão relacionadas ao tempo e aos custos do material.⁴

Na SOFS, um bom planejamento da síntese é fundamental para alcançar-se o objetivo desejado. Deve-se observar a natureza do polímero escolhido, bem como dos reagentes e dos substratos necessários, a estrutura do produto que se deseja obter, os métodos de acompanhamento das reações e, por fim, a metodologia empregada para a clivagem do produto final da resina.³⁻⁵

A resina utilizada em SOFS é uma rede polimérica complexa formada por uma cadeia principal, constituída por unidades de carbonos interligadas transversalmente, por um monômero bifuncional chamado de *cross-linking*. Em intervalos regulares, encontram-se os ligantes (*linkers*), partes reativas do polímero responsáveis pela ligação covalente entre a resina e o produto de partida. Todo esse conjunto resulta em

pequenas esferas (*beads*).³ Na **Figura 2.3** encontra-se esquematizado o polímero obtido por Merrifield: observa-se uma pequena esfera (*bead*), em que a cada dois átomos de carbono da cadeia principal da matriz polimérica existe uma cadeia aromática, que pode encontrar-se interligada por anéis benzênicos (divinilbenzeno) intercalados ou então apresentar em posição *para* o grupo clorometileno, responsável pela parte reativa do polímero (*linker*).¹

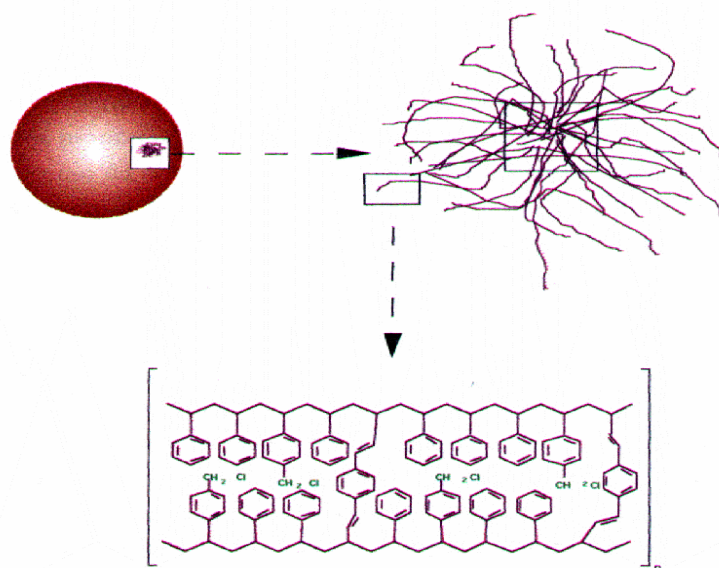


Figura 2.3: Esquema da Resina Merrifield

Na SOFS podem-se empregar diversos tipos de polímeros como a Resina Merrifield (RM) citada anteriormente, que possui como ligante o grupamento clorometileno e a Resina Wang (RW) que possui o grupamento hidroximetileno como *linker* (**Figura 2.4**).⁶ A RW possui maior labilidade em meio ácidos devido ao seu grupamento polar presente no *linker*, o que permite clivagem em ambientes menos agressivos.

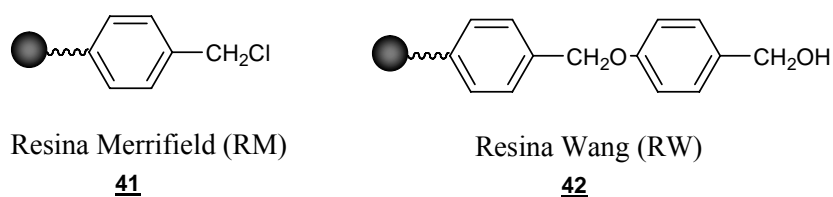


Figura 2.4: RM e RW.

As duas resinas mais empregadas atualmente são a RW e a RM, apesar da limitação encontrada quando se necessita meios reacionais mais polares, como por exemplo, o uso de álcoois como solventes de reação. Na **Tabela 2.1** pode-se observar os diferentes graus de solvatação (aumento de volume em relação ao volume original sem a presença de solvente) das resinas mencionadas em diferentes solventes orgânicos.²⁰

Tabela 2.1: Grau de solvatação dos solventes frente a RW e RM.

Solvente	RW	RM
THF	6.0	7.7
DMSO	4.2	1.8
THF/H ₂ O (1:1)	2.8	3.1
CH ₃ CN	2.0	1.8
MeOH	1.6	1.8

Para contornar essa limitação e diversificar o grupo ligante, outras resinas (**Figura 2.5**) têm sido desenvolvidas e já existem muitas disponíveis no mercado como por exemplo, a tentagel S RAM, a cloreto de tritila, a rinkamida e a MBHA.^{6,7,21,22}

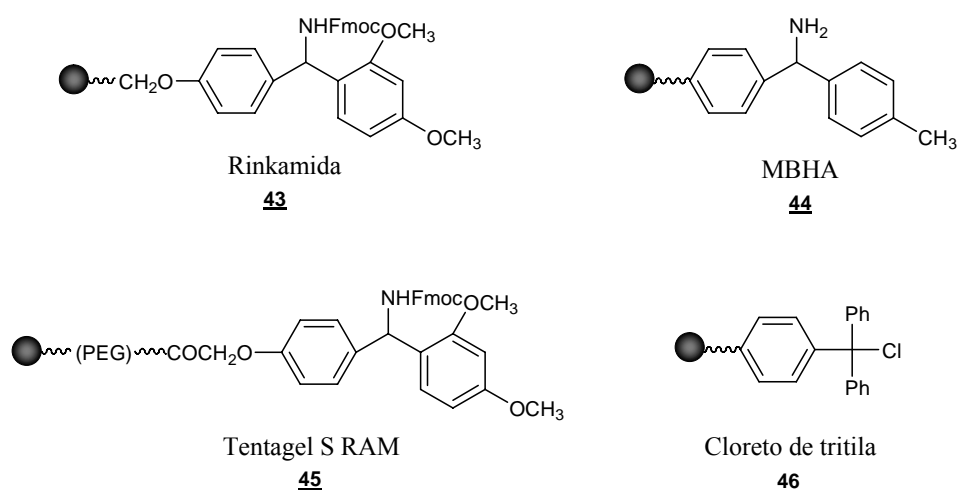


Figura 2.5: Resinas utilizadas em SOFS.

Para a realização deste projeto iniciou-se com a Resina Wang, porém após alguns testes constatou-se que a RM possuía o tipo de ligante mais adequado para o

desenvolvimento da proposta sintética e também devido à facilidade de aquisição, pois o custo é menor.

Estudos paralelos desenvolvidos no laboratório confirmaram os relatos da literatura de que esta resina liga-se com bons rendimentos a vários substratos de partida, na maioria das vezes formando uma função éster entre a RM e estes substratos.

A partir do exposto, propõe-se a síntese de derivados das hiacintacinas, empregando-se a SOFS como metodologia. Até o presente, nenhuma citação na literatura de síntese em fase sólida dessa classe de moléculas foi encontrada. Os dados publicados encontrados referem-se à síntese de hiacintacinas e de seus derivados realizada em solução e serão citados a seguir.

2.1.1 Síntese de Hiacintacinas

A importância desta família de compostos, tanto do ponto de vista de atividade biológica quanto pelo interesse químico em função de suas estruturas razoavelmente complexas, pode ser comprovada pelo bom número de abordagens sintéticas descritas na literatura no curto espaço de tempo desde seu isolamento em 1999, que continua até os dias de hoje.

Izquierdo e colaboradores sintetizaram em 2001 os compostos não naturais 7a-*epi*-hiacintacina A₂ (**47**) e A₃, (**48**),²³ partindo de uma pirrolidona adequadamente funcionalizada, derivada da *D*-frutose.²⁴ Em 2002, utilizando a mesma estratégia, este grupo publicou a primeira síntese da (+)-hiacintacina A₃ (**31**),²⁵ e finalmente em 2004 publicaram a síntese de outros epímeros de hiacintacinas naturais.²⁶

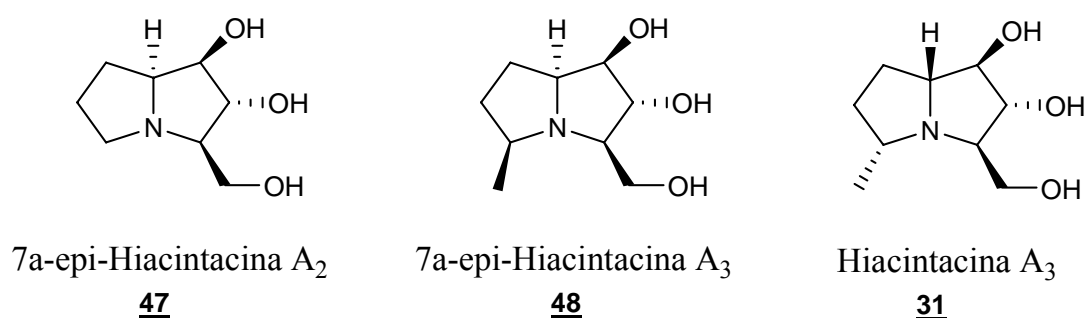
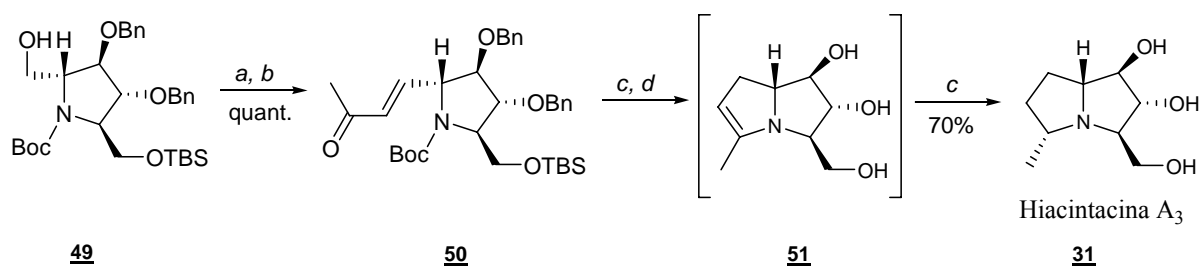


Figura 2.6: Compostos sintetizados.

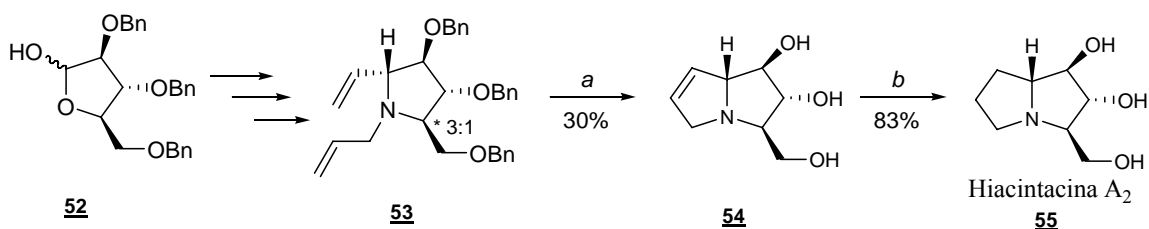
A síntese de **31** começa com a conversão da D-frutose natural, a fonte de quiralidade utilizada, na pirrolidina quiral **49** em 7 etapas, com um rendimento global de 20% a partir do carboidrato adequadamente protegido (Esquema 2.1).²⁴ A seguir a hidroxila primária é oxidada e o aldeído obtido é submetido a uma reação de Wittig levando ao composto **50** quantitativamente. A hidrogenação da olefina, seguida pela desproteção das funções álcool e amina conduz à enamina **51** na etapa-chave da síntese, na qual é construído o esqueleto pirrolizidínico. A forma côncava do bicyclo permite a hidrogenação da dupla estereosseletivamente, levando ao produto natural em 70% de rendimento a partir de **50**.



Esquema 2.1: Reagentes: a) TPAP/NMO; b) MeCOCH₂PPh₃; c) H₂/Pd/C; HCl.

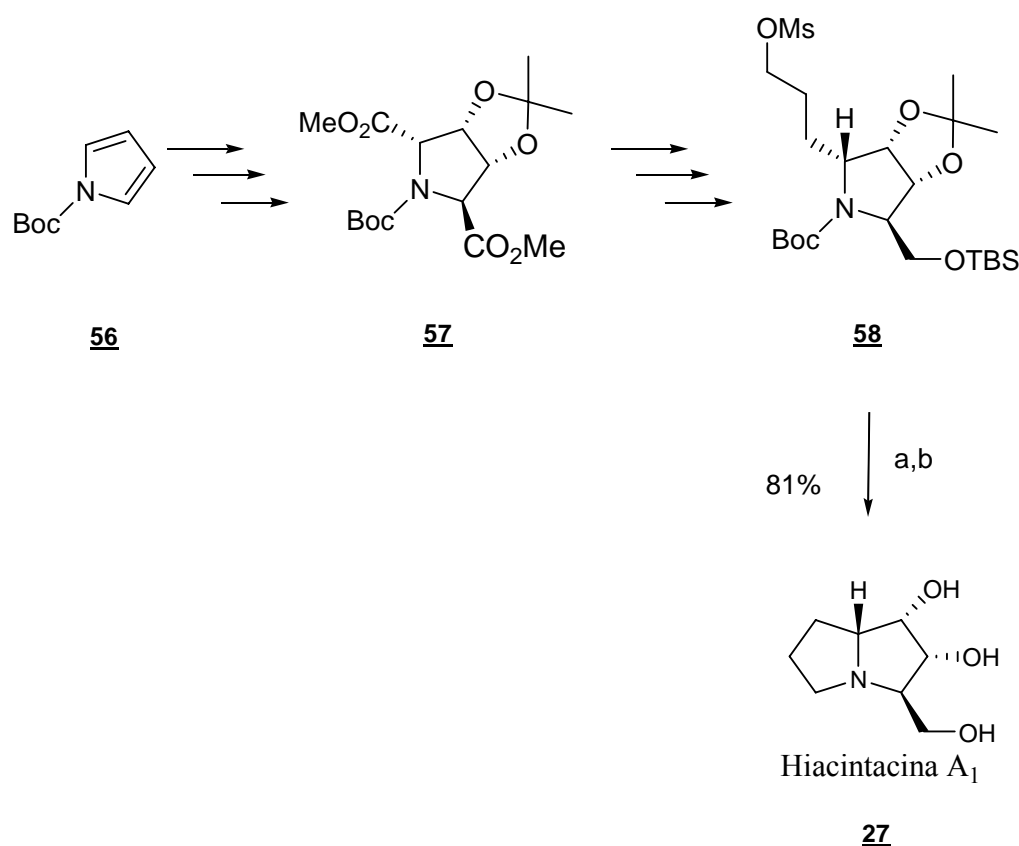
A primeira síntese da hiacintacina A₂ (**55**) foi publicada por Martin em 2001,²⁷ e este composto ainda teve mais três rotas sintéticas descritas até o presente.²⁸⁻³⁰

A síntese de Martin começa com a arabinose protegida comercial **52** que foi convertida em 4 etapas na divinilpirrolidina **53**, em uma mistura epimérica 3:1, com um rendimento global de 47%. Na etapa-chave da síntese, o cloridrato de **53** é submetido a uma reação de metátese de olefina com a utilização do catalisador de Grubbs, levando à tetrahidropirrolizina **54** em 30% de rendimento. A hidrogenação desta fornece a hiacintacina A₂ **55** com 83% de rendimento (Esquema 2.2).



Esquema 2.2: Reagentes: a) Catalisador de Grubbs/ tolueno; b) H₂/Pd/C

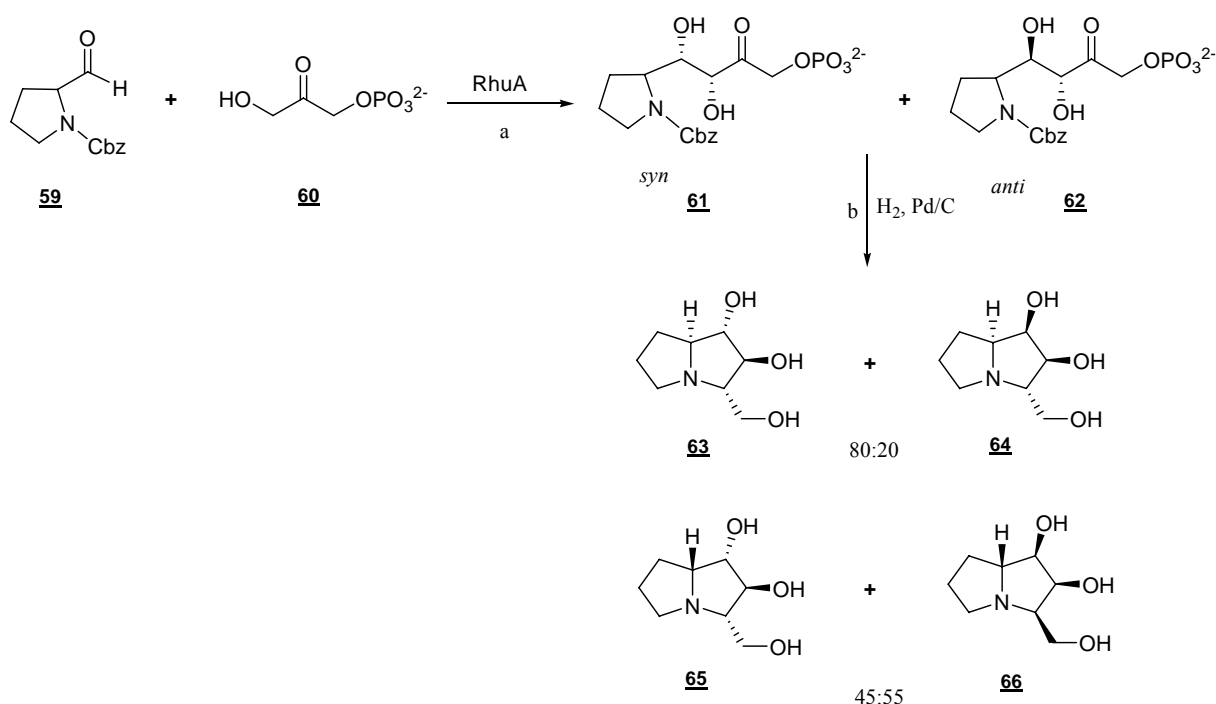
Em setembro de 2005 foram publicadas por Renaud³¹ e Donohoe,³² a primeira (enantiosseletiva) e segunda sínteses da hiacintacina A₁ (**27**), sendo esta última a primeira síntese de hiacintacinas não baseada em carboidratos como material de partida quiral. É uma síntese racêmica baseada em uma dihidroxilação assimétrica de Sharpless, que provavelmente terá uma versão enantiosseletiva publicada futuramente. A síntese inicia com o pirrol *N*-protegido **56** que é transformado em 4 etapas na pirrolidina tetrassubstituída **57** com 51% de rendimento global. Este é seletivamente funcionalizado e convertido em **58** em 6 etapas com 81% de rendimento. A desproteção do nitrogênio leva ao esqueleto pirrolizidínico em uma S_N2 intramolecular, seguida pela desproteção das hidroxilas, fornecendo a (±)-hiacintacina A₁ (**27**) com 81% de rendimento (Esquema 2.3).



Esquema 2.3: Reagentes: a) TESOTf / 2,6-lutidina; b) (COCl)₂/ MeOH.

Já em 2007, foi comunicada por Calveras a síntese quimioenzimática de estereoisômeros de alcalóides do tipo hiacintacina, como a (-)-hiacintacina A₂ **63** (o

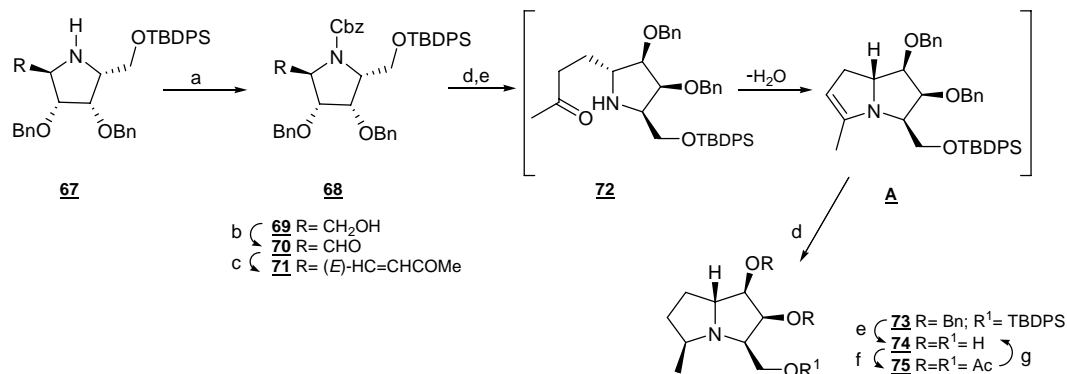
enantiômero da (+)-hiacintacina A₂ (**55**), a 7-deoxi-2-epialexina **64** (o enantiômero da 3-epihiacintacina A₂), a ent-7-deoxialexina **65** (o enantiômero da 7-deoxialexina) e a 2-epihiacintacina A₂ **66**. Esta síntese baseou-se na adição aldólica do fosfato dihidroxi acetona ao *N*-CbZ- prolinal **59** catalisada por *L*-rhamnulose 1-fosfato aldolase de *Escherichia coli* e obteve-se 89% de rendimento dos produtos já isolados (Esquema 2.4). A (-)-hiacintacina A₂ **63** foi testada e demonstrou ser boa inibidora da α -d-glucosidase de ratos; enquanto que seu enantiômero natural, a hiacintacina A₂ **55**, não apresentou esta atividade.³³



Esquema 2.4: Reagentes: a) RhuA; b) H₂/Pd/C.

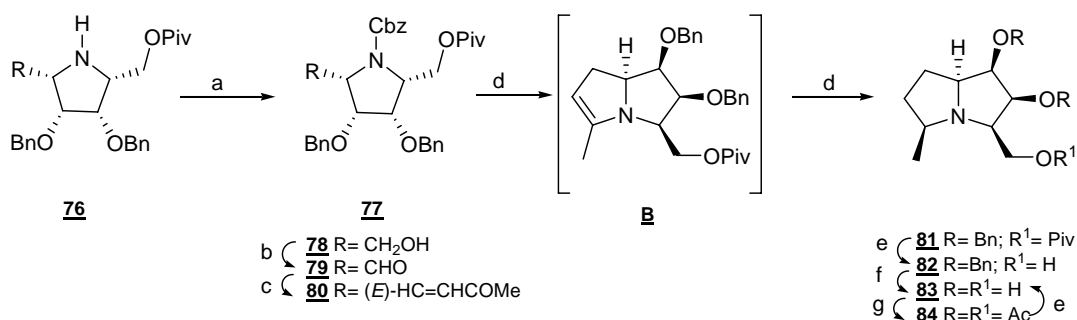
Ainda em 2007, Izquierdo e colaboradores³⁴ publicaram a síntese de dois produtos. A primeira é a síntese estereoespecífica da (+)-5-epi-hiacintacina A₅ **74** (Esquema 2.5) obtida em 5 etapas com 21% de rendimento total. A síntese teve início com a pirrolidina **67** que foi protegida com o grupamento Cbz gerando o produto **68**. Após, este produto foi oxidado ao aldeído pirrolidínico **70** que em presença de NaH gerou o composto **71**. Na etapa seguinte, a hidrogenação catalítica (Raney-nickel) de **71** desencadeou um processo tandem, onde houve hidrogenação da ligação dupla e N-desproteção gerando o produto **72**, que foi submetido à etapa seguinte, sem

isolamento. Com a subsequente condensação intramolecular, gerou-se o intermediário D5-pirrolizina A que foi hidrogenado gerando o produto **73**. Com a remoção dos grupos protetores de **73**, obteve-se então a (+)-5-epi-hiacintacina A₅ **74**.



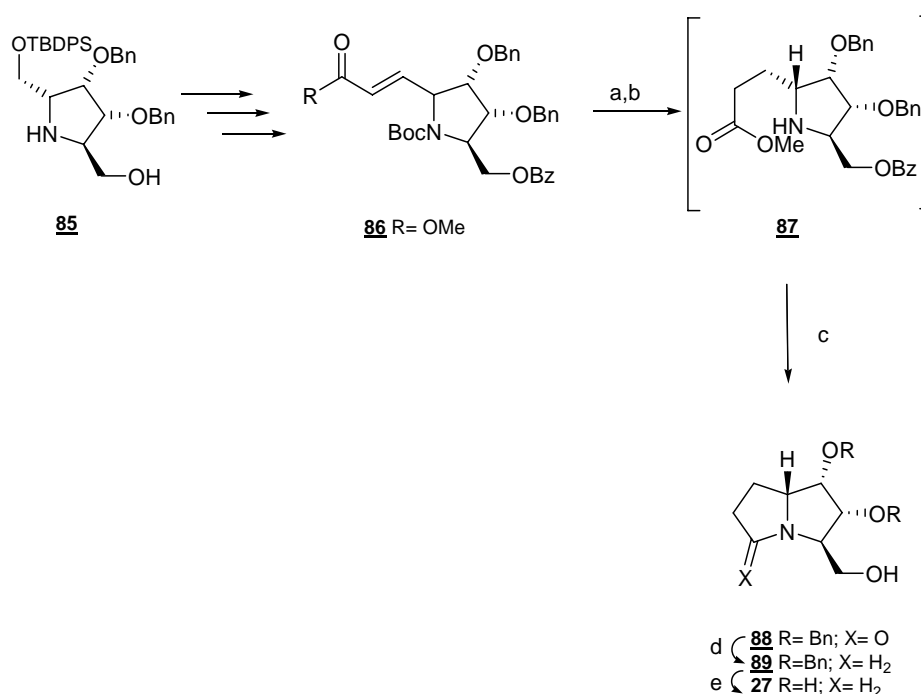
Esquema 2.5: Reagentes: a) CbzCl, Me₂CO, K₂CO₃; b) NMO, TPAP, DCM, peneira molecular 4 Å; c) (EtO)₂P(O)CH₂COCH₃, NaH, THF, t.a.; d) Raney-niquel/ H₂/ MeOH; e) (i) 10% Pd-C/H₂/HCl, amberlite IRA-400 (forma OH); (ii) TBAF·3H₂O, THF; f) Ac₂O, DMAP(cat.), piridina, t.a.; g) MeONa (cat.), MeOH, t.a.

A segunda síntese deste mesmo trabalho, é a síntese da ent-5-epi hiacintacina A₄ **83** (Esquema 2.6) em 6 etapas com rendimento global de 10%. Esta síntese inicia com o composto **76** que é N-protetido na etapa seguinte gerando o produto **77**. Este produto é oxidado ao aldeído pirrolidínico **79**, que sem isolamento, é utilizado na etapa seguinte gerando o produto **80**. A próxima etapa é a hidrogenação catalítica que leva ao produto **81**, que com a remoção dos seus grupos protetores gera a ent-5-epi hiacintacina A₄ **83**.



Esquema 2.6: Reagentes: a) CbzCl, Me₂CO, K₂CO₃; b) NMO, TPAP, DCM, peneira molecular 4 Å; c) PPh₃=CHCOCH₃, tolueno, 80°C.; d) 10% Pd-C/H₂/HCl; e) MeONa (cat.), MeOH; f) 10% Pd-C/H₂/HCl, amberlite IRA-400 (forma OH); g) Ac₂O, DMAP(cat.), piridina, t.a.

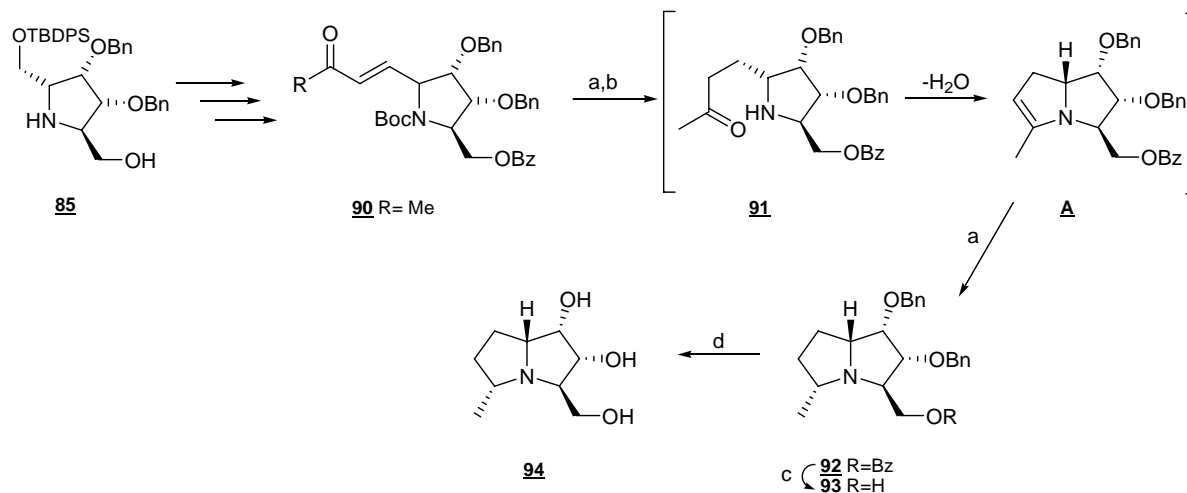
As duas últimas sínteses destes compostos citadas na literatura podem ser conferidas no trabalho de Izquierdo e colaboradores também de 2007.³⁵ A primeira, é a síntese da (+)- hiacintacia A₁ **27** (Esquema 2.7) onde partiu-se da pirrolidina **85** que após 3 etapas foi transformada no seu derivado *N*-Boc **86**. A partir deste composto foi realizada uma hidrogenação catalítica, cujo produto não foi isolado, e seguiu-se com a *N*-desproteção em meio acidificado gerando o intermediário **87**. Na etapa seguinte este composto **87** foi tratado com base para a lactamização interna e a concomitante *O*-debenzoilação, gerando o produto **88**. A redução da carbonila da lactama e a *O*-debenzilação de **88** resultou na (+)- hiacintacia A₁ **27**.



Esquema 2.7: Reagentes: a) 10% Pd-C/H₂, t.a.; b) (i) TFA, DCM, t.a.; (ii) MeONa, MeOH; c) MeONa (cat.), MeOH, aquecimento; d) H₃B-SMe₂, THF, MeOH, aquecimento; e) 10% Pd-C/H₂/HCl concentrado, amberlite IRA-400 (forma OH⁻) e cromatografia em Dowex 50Wx8 (200-400 mesh).

A segunda síntese deste trabalho é a da (+)- hiacintacina A₆ **94**, que também começou com a pirrolidina **85** (Esquema 2.8) que foi transformada no seu derivado *N*-Boc até resultar no produto **90**. A partir deste composto foi realizada uma hidrogenação catalítica, cujo produto não foi isolado, e seguiu-se com a *N*-desproteção gerando o intermediário **91**. Na etapa seguinte ocorreu uma condensação

intramolecular gerando o intermediário **A**, que não foi isolado, e finalmente a hidrogenação gerou o produto **92**. A *O*-debenzoilação de **92** resultou no produto **93** e a *O*-debenzilação, na (+)-hiacintacia A₆ **94**.



Esquema 2.8: Reagentes: a) 10% Pd-C/H₂, MeOH, t.a.; b) (i) HCl concentrado, MeOH, t.a.; (ii) MeONa, MeOH; c) MeONa (cat.), MeOH, t.a.; d) 10% Pd-C/H₂/HCl concentrado, amberlite IRA-400 (forma OH⁻) e cromatografia em Dowex 50Wx8 (200-400 mesh).

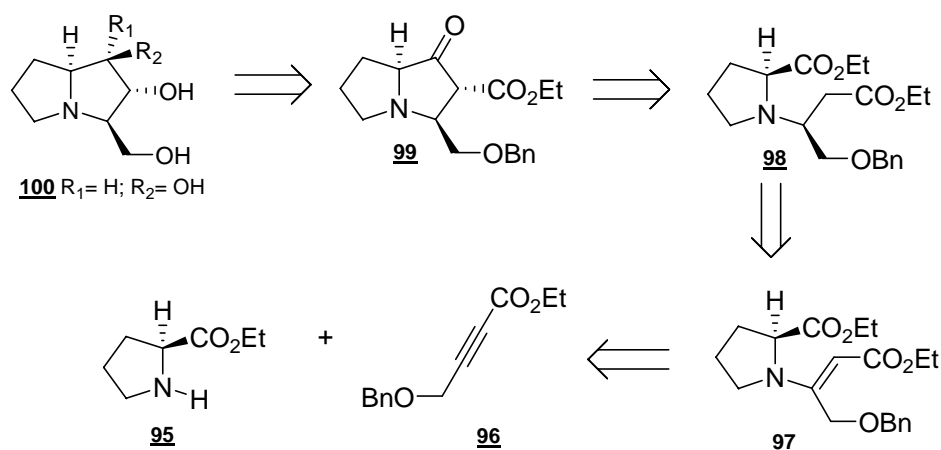
2.2 Objetivos

Sintetizar análogos de alcalóides do tipo hiacintacina por SOFS empregando a *L*-prolina como material de partida sob diversas fontes de energia: temperatura ambiente, refluxo do solvente e sob irradiação de microondas.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Retrossíntese e Esquema Geral da rota sintética

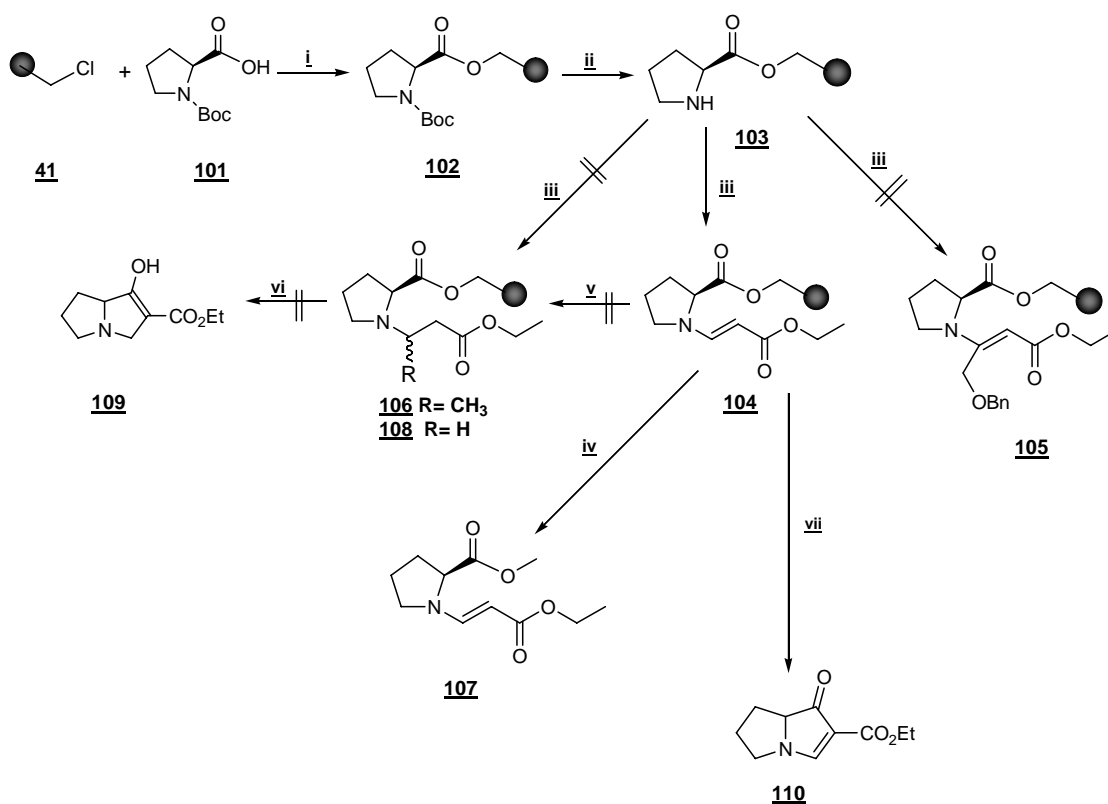
Na estratégia retrossintética planejada para esses alcalóides pirrolizidínicos (Esquema 2.9), parte-se da *L*-prolina *O*-protegida **95** e do inoato **96** que em uma etapa de condensação fornecem o enamindiéster **97** que já apresenta todos os carbonos do esqueleto das hiacintacinas. Uma redução estereosseletiva da olefina leva ao aminodiéster **98**, que por uma condensação de Dieckmann fornece o esqueleto 4-azabicyclo[3.3.0] **99**. Finalmente, reações de interconversão de grupos funcionais levam aos compostos-alvo (**100**).



Esquema 2.9

A rota sintética escolhida para a SOFS dos alcalóides encontra-se no Esquema 2.10 e é semelhante à síntese em solução também desenvolvida neste trabalho (descrita no capítulo 2), onde parte-se de um aminoácido barato e disponível: a *L*-Boc-prolina **101**. Na SOFS o rendimento das reações é calculado ao final da rota sintética, com a clivagem do produto da resina. Por esse motivo, esta síntese também pode ser chamada de *blind chemistry*. Outros métodos para o cálculo do rendimento também podem ser utilizados, como por exemplo o método chamado *cleave and analyse*, onde em cada etapa da rota sintética cliva-se a molécula da resina e analisa-se o produto

obtido. Porém a realização deste método não foi possível devido à dificuldade de acesso às análises por RMN, optando-se analisar apenas a resina acoplada.



Esquema 2.10: Condições: i) K_2CO_3 , KI, DMF, refluxo, 24 horas; ii) DCM, éter etílico, HCl 3M sat., t.a., 40 min; iii) (a,b) DIPEA, DMF, alcino, t.a., 48 horas; (c) DIPEA, DMF, alceno, t.a., 48 horas iv) metanol, hexano, K_2CO_3 , água, t.a., 10 horas; v) CH_3CN , ácido acético, $NaBH_4$, DMF, $0^\circ C$, 2 horas; vi) THF seco, Na° , refluxo, 4 horas; vii) DBU, microondas, 10 ciclos de 1 minuto, potência 540 W, sem solvente (inchamento prévio da resina com DCM e nitrogênio).

2.3.1.a Etapa de acoplamento

Esta rota sintética é inédita e mostrou-se promissora e simples, onde em apenas 4 etapas pode-se obter o esqueleto bicíclico dos alcalóides do tipo hiacintacina.

Primeiro polímero utilizado: Resina Wang

A primeira etapa consiste no acoplamento da *L*-prolina **113** ao polímero. Num primeiro momento escolheu-se a resina wang (RW) para esta etapa e as condições reacionais testadas aparecem na **Tabela 2.2.**³⁶

Tabela 2.2: Condições reacionais no acoplamento entre a RW e o prolinato de etila.

Protocolo	Resina	solvente	DIC	DMAP	L-prolina	Fonte de energia	tempo
1	Wang 1 eq	DMF	4 eq	1 eq	5 eq	t.a.	6 hs ^a
2	Wang 1 eq	DMF	4 eq	1 eq	5 eq	75° C	6 hs e 30 min ^a
3	Wang 1 eq	DMF	4 eq	1 eq	5 eq	microondas	10 min ^a
4	Wang 1 eq	DMF	x	x	5 eq esterificada	t.a.	48 hs ^a
5	Wang 1 eq	DMF	x	x	5 eq esterificada	80° C	48 hs ^a

a) Reação não ocorreu.

Na primeira situação usou-se um protocolo já conhecido na literatura e não se obteve resultado positivo, bem como na segunda situação onde se aqueceu o meio reacional. No terceiro protocolo, utilizou-se a irradiação de microondas, porém sem sucesso. Nas situações 4 e 5 esterificou-se a *L*-prolina, transformando o grupamento hidroxila em metoxila, porém as modificações não foram bem sucedidas.

Segundo polímero utilizado: Resina Merrifield

Com a falta de resultados positivos no acoplamento à RW, partiu-se então para o uso de um segundo polímero: a Resina Merrifield.³⁷ Utilizou-se os protocolos presentes na Tabela 2.3 e nas três condições de temperatura utilizadas não houve o acoplamento esperado.

Tabela 2.3: Condições reacionais no acoplamento entre a RM e a *L*-prolina.

Protocolo	Resina	solvente	Cs ₂ CO ₃	KI	L-prolina	Fonte de energia	tempo
6	RM 1 eq	DMF	0,5 eq	x	5 eq	MO	10 min ^a
7	RM 1 eq	DMF	0,5 eq	x	5 eq	t.a.	24 hs ^a
8	RM 1 eq	DMF	1,5 eq	1,1 eq	5 eq	80° C	24 hs ^a

a) Reação não ocorreu.

Na terceira tentativa de acoplamento utilizou-se a *L*-Boc-prolina, onde o grupamento amino do aminoácido encontra-se protegido, evitando desta forma reações paralelas ou até mesmo a competição com o grupamento carboxila na substituição. Na **Tabela 2.4** encontram-se as diversas condições reacionais testadas.

Tabela 2.4: Condições reacionais no acoplamento entre a RM e a *L*-Boc-prolina.

Protocolo	Resina	solvente	Cs ₂ CO ₃	K ₂ CO ₃	KI	<i>L</i> -Boc-prolina	Temperatura	tempo
9	RM 1 eq	DMF	1,5 eq	x	1,1 eq	3 eq	refluxo	6 hs ^a
10	RM 1 eq	DMF	1,5 eq	x	1,1 eq	3 eq	refluxo	48 hs ^b
11	RM 1 eq	DMF	1,5 eq	x	1,1 eq	3 eq	refluxo	24 hs ^b
12	RM 1 eq	DMF	1,5 eq	x	1,1 eq	1,5 eq	refluxo	48 hs ^b
13	RM 1 eq	DMF	x	1,5 eq	1,1 eq	1,5 eq	refluxo	24 hs ^b
14	RM 1 eq	DMF	x	1,5 eq	1,1 eq	1,1 eq	refluxo	24 hs ^c

a) Reação iniciou; b) Reações aconteceram com sucesso; c) Reação otimizada.

No protocolo **9** onde a reação totalizou 6 horas pode-se constatar por espectroscopia de infravermelho (IV) bandas com baixa intensidade referentes ao estiramento C=O das carboxilas de éster. Para contornar esta dificuldade, a reação permaneceu por 24 horas conforme protocolo **10** e constatou-se por IV que houve aumento da intensidade destas bandas (**Figura 2.7**).

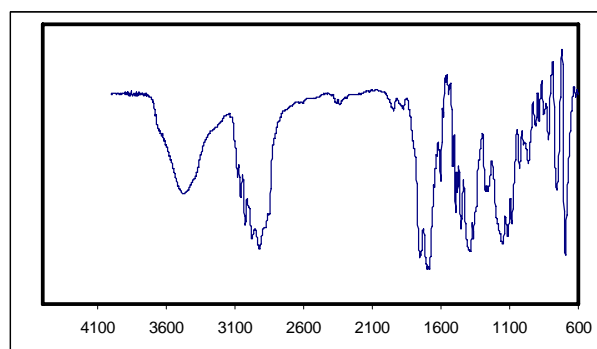
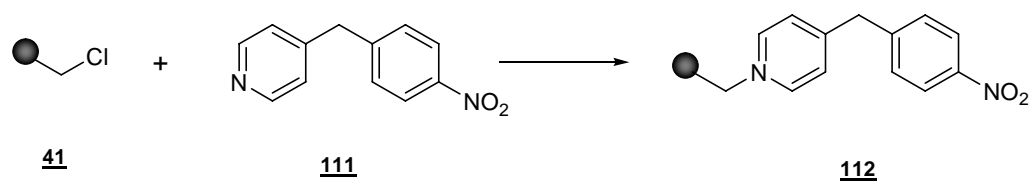


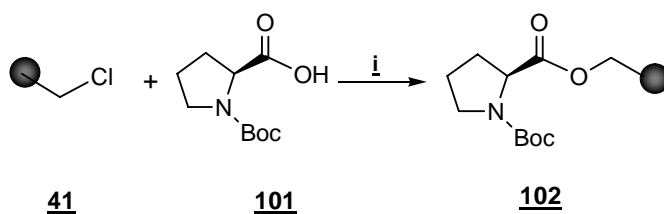
Figura 2.7: Espectro de IV da etapa de acoplamento.

Para confirmar o sucesso da reação de acoplamento utilizou-se o protocolo **11**, onde a reação permaneceu por 48 horas. Após a lavagem da resina, fez-se a análise por IV não se constatando diferenças de intensidade das bandas referentes ao estiramento C=O das carboxilas quando comparado com o protocolo anterior. Já nas fases de otimização utilizou-se o reagente 4-(4-nitrobenzil) piridina (NBP) ¹⁹. Preparou-se uma solução contendo 5,4 mg de NBP, 0,25 ml de DMF, 0,25 ml de diclorometano e 1 gota de trietilamina. A metade desta solução é adicionada a uma alíquota de 10 mg de resina retirada da reação e a outra metade é adicionada a 10 mg de RM que ainda não reagiu (branco). A amostra que contém a RM adquire uma coloração azul violeta e após 10 minutos esta cor estabiliza e a alíquota que foi retirada da reação não apresentará coloração a partir do momento em que o acoplamento tenha acontecido. Este teste colorimétrico tem 99% de precisão e está esquematizado abaixo.



Esquema 2.11

Quando a solução entra em contato com a resina, o NBP desloca o cloreto através de uma substituição. O complexo formado entre o NBP e a resina gera uma coloração azul violeta. Nos protocolos **12** e **13** diminui-se a equivalência da *L*-Boc-prolina e constatou-se que o acoplamento acontecia com sucesso. Além disso, no protocolo **13** utilizou-se o carbonato de potássio (reagente menos tóxico e mais barato) com sucesso nesta etapa.

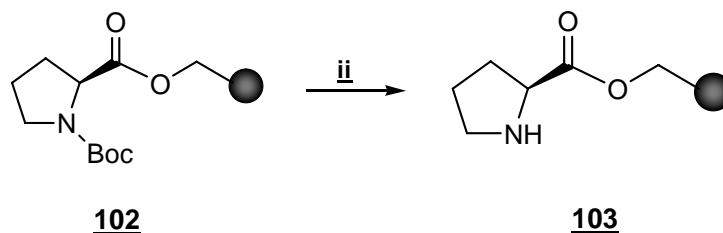


Esquema 2.12: Acoplamento - Produto **102**. Condições: K₂CO₃, KI, DMF, refluxo, 24 horas.

E finalmente com o protocolo **14** obteve-se uma reação otimizada, onde o pouco excesso de *L*-Boc-prolina não prejudicou o resultado positivo do acoplamento.

2.3.1.b Segunda etapa: Desproteção do grupamento amino

A segunda etapa desta rota sintética consistiu na desproteção do grupamento amino da *L*-Boc-prolina já acoplada à RM (Esquema 2.13).



Esquema 2.13: desproteção do grupamento amino do aminoácido *L*-prolina- Produto **103**. Condições: DCM, éter etílico, HCl 3M, t.a.

No protocolo **15** utilizou-se diclorometano/TFA numa proporção de 97:3 à temperatura ambiente por 6 horas e pode-se constatar por espectroscopia de IV que não ocorreu a desproteção, pois ao subtrair o espectro desta reação do espectro correspondente ao da RM não se constatou a banda próxima a 3400 cm^{-1} , o que pode indicar amina secundária. Partiu-se então para o protocolo **16** onde se utiliza diclorometano, éter etílico e HCl 3M num período de tempo de 45 minutos a 1 hora em temperatura ambiente.³⁷ Com este protocolo obteve-se um produto de cor levemente amarela. Apesar da perda considerável de massa, que indica a provável retirada do grupamento Boc, não estava sendo possível visualizar nos espectros de infravermelho as diferenças ocorridas nesta etapa.

Para contornar este problema utilizou-se uma técnica já conhecida de subtração de espectros³⁹ (espectro da reação subtraído do espectro da Resina Merrifield) e com isso visualizou-se uma banda alargada em torno de 3496 cm^{-1} que pode indicar a presença de amina secundária (**Figura 2.8**).

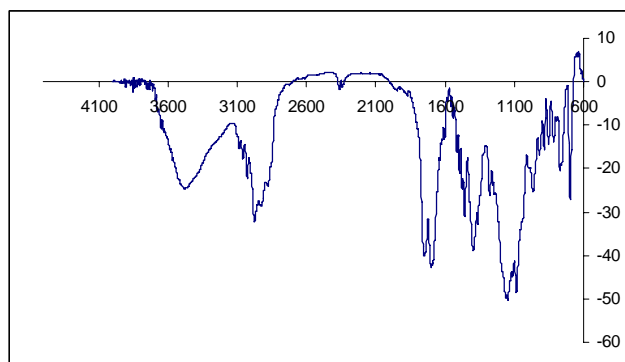


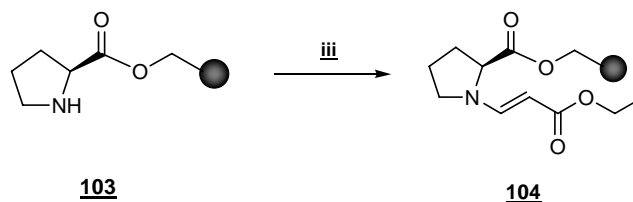
Figura 2.8: Subtração entre os espectro de IV do produto **103** e da Resina Merrifield.

Com o aumento do tempo reacional para 1 hora e 15 minutos percebeu-se uma diminuição na intensidade da banda em 1755 cm^{-1} , o que pode indicar que parte do produto tenha sido clivada.

2.3.1.c Terceira etapa: Adição de Michael

A terceira etapa consistiu na adição de Michael onde foram utilizados três aceptores diferentes.

Primeiro Aceptor: Propiolato de etila



Esquema 2.14: Adição de Michael – Produto **104**. Condições: DIPEA, DMF, propiolato de etila, t.a., 96 hs.

O primeiro aceptor empregado foi o propiolato de etila que é um reagente comercializado. Esta etapa da síntese foi adaptada da síntese clássica e utilizou-se num primeiro momento o protocolo **17** (ver **Tabela 2.5**) que ao ser analisado por

espectroscopia de IV ainda apresentou a banda em torno de 3496 cm^{-1} que podia estar indicando a presença de amina secundária, não confirmando a adição de Michael. Após, utilizou-se os protocolos **18**, **19** e **20** que ao analisar-se a resina proveniente destas reações, percebeu-se que a banda em torno de 3496 cm^{-1} não estava mais presente no espectro (**Figura 2.9**), indicando que a adição estava acontecendo.

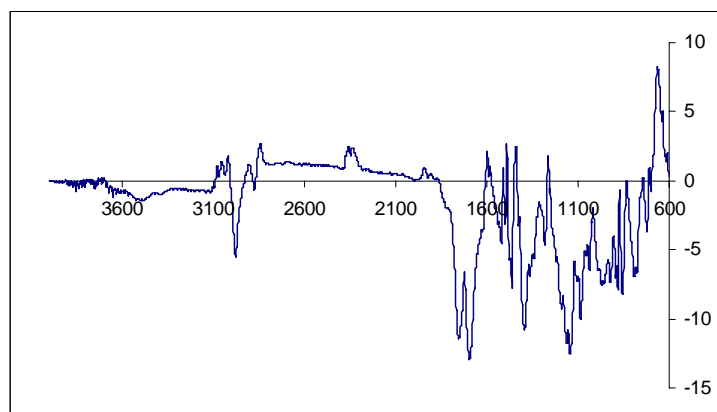


Figura 2.9: Subtração entre os espectro de IV do produto **104** e da Resina Merrifield.

Como nesta metodologia utilizada não se pode constatar por espectroscopia de IV a quantidade de produto que havia se formado, deixou-se a reação por 96 horas conforme está descrito no protocolo **21**.

Tabela 2.5: Condições da adição de Michael utilizando propiolato de etila.

Protocolo	Aduto de michael	Base	Solvente	Temperatura	Tempo
17	propiolato de etila 1 eq	DIPEA 3 eq	CH ₃ CN	65° C	48 hs ^a
18	propiolato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	48 hs ^b
19	propiolato de etila 3 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	48 hs ^b
20	propiolato de etila 2 eq	DIPEA 2 eq	DMF	t.a.	46 hs ^b
21	propiolato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	96 hs ^c

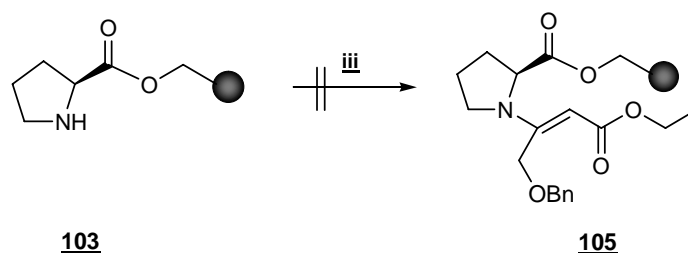
a) Reação não ocorreu; b) Reação estava ocorrendo; c) Reação otimizada.

Para analisar com maior clareza o sucesso destas reações, procedeu-se à clivagem, onde o produto foi retirado da resina conforme a **reação iv**. Após a clivagem o produto **107** foi analisado por espectroscopia de infravermelho e apresentou todas as

bandas necessárias para a confirmação de sua estrutura. Este produto não teve sua estrutura analisada por RMN, pois a quantidade de amostra era muito pequena.

Segundo Aceptor: Inoato de etila

O segundo aceptor utilizado foi o inoato de etila que é um produto preparado no laboratório (Esquema 2.15).



Esquema 2.15

Foram utilizados os protocolos **22**, **23**, **24** e **25** apenas variando o tempo reacional conforme **Tabela 2.6**.

Tabela 2.6: Condições da adição de Michael utilizando inoato de etila.

Protocolo	Aduto de michael	Base	Solvente	Fonte de energia	Tempo
22	inoato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	34 hs ^a
23	inoato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	48 hs ^a
24	inoato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	72 hs ^a
25	inoato de etila 1,1 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	7 dias ^a
26	inoato de etila 1,5 eq	DIPEA 1,5 eq	DCM	microondas	10 min ^a

a) Reação não ocorreu.

As análises por espectroscopia de IV (**Figura 2.10**) ainda apresentavam a banda da amina secundária em 3496 cm^{-1} , indicando assim o insucesso da reação nas condições utilizadas. Com este aceptor não se utilizou aquecimento convencional, pois haveria possibilidade de polimerização do inoato de etila. Para tanto, tentou-se o protocolo **26** com aquecimento não convencional em microondas. Após 10 minutos de

reação, utilizando a potência de 540 W, pode-se constatar ainda a presença da banda em 3496 cm^{-1} .

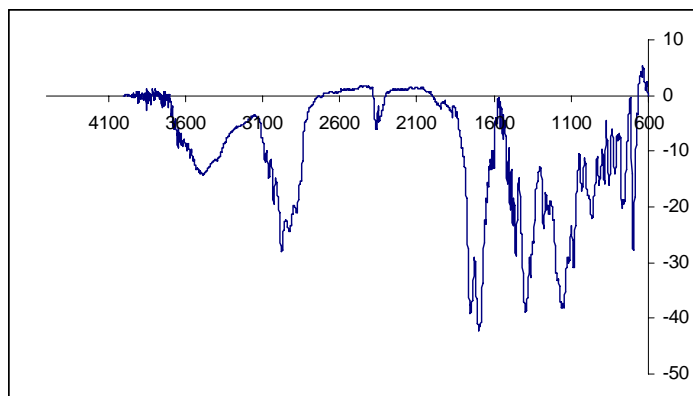
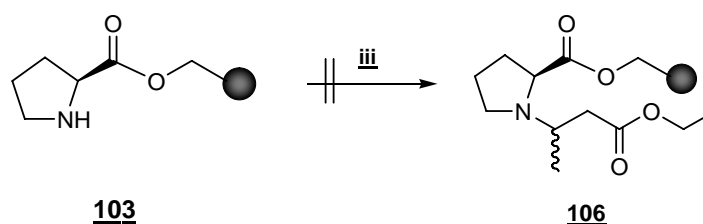


Figura 2.10: Subtração entre os espectro de IV do produto **105** e da Resina Merrifield.

Terceiro aceptor: Crotonato de etila

O terceiro aceptor de Michael utilizado foi um alceno derivado do ácido crotônico (Esquema 2.16).



Esquema 2.16

Utilizou-se o protocolo **27** (ver **Tabela 2.7**) onde não se obteve resultados positivos. A partir disso, aqueceu-se a reação no protocolo **28** e aumentou-se a quantidade de base, porém a adição de Michael não ocorreu.

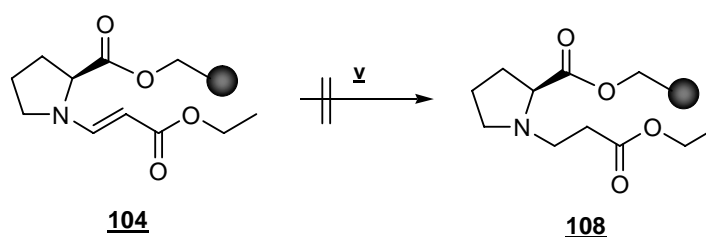
Tabela 2.7: Condições da adição de Michael utilizando crotonato de etila.

Protocolo	Aduto de michael	Base	Solvente	Fonte de energia	Tempo
27	crotonato de etila 1,5 eq	DIPEA 1 eq	DMF	t.a.	48 hs ^a
28	crotonato de etila 1,5 eq	DIPEA 1,5 eq	DCM CH ₃ CN	40° C	4 dias ^a
29	crotonato de etila 1,5 eq	DIPEA 1,5 eq	DCM	microondas	9 dias ^a

a) Reação não ocorreu.

O último protocolo testado foi o **29** onde se utilizou a irradiação por microondas com potência 540W, também sem sucesso. Acredita-se que o grupamento volumoso vicinal à tripla ligação possa causar impedimento estérico quando em reação com polímeros acoplados, neste caso com a *L*-prolina. Isto pode ser uma hipótese para que não tenha ocorrido a adição de Michael com o inoato de etila. Já com o crotonato de etila, acredita-se que por se tratar de um alceno, seja menos reativo que os alcinos utilizados, e com isso a reação não tenha acontecido com sucesso.

2.3.1.d Quarta etapa: Redução da ligação dupla



Esquema 2.17

A etapa seguinte é a de redução seletiva da ligação dupla conjugada com a carboxila do éster do composto **104** (Esquema 2.17), onde foi utilizado o protocolo **30**: NaBH₄/AcOH, CH₃CN, 0° C - t.a., 3 horas⁴⁰. Após 3 horas de reação verificou-se desprendimento de produto da resina e confirmou-se por espectroscopia de IV que parte do produto ligado à resina foi clivado, isso provavelmente ocorreu devido ao meio extremamente ácido da mistura reacional. Outros protocolos foram testados em solução, para posterior adaptação à SOFS, porém não se obteve o resultado esperado.

2.3.1.e Quinta etapa: Ciclização e clivagem

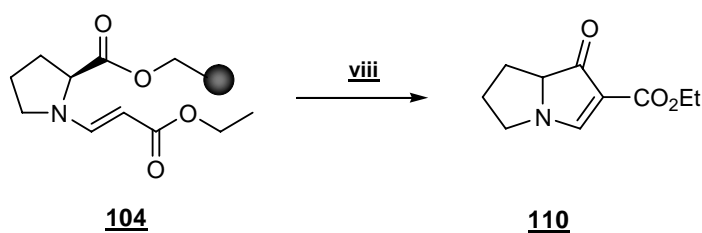
Condensação de Dieckmann

Com a dificuldade de acesso ao equipamento de infravermelho, procedeu-se imediatamente à **etapa vi** onde se utilizou sódio metálico e THF na tentativa de ciclizar o produto **108** e conseqüentemente retirá-lo da resina. Mas como já era

esperado não se obteve resultado positivo, pois na etapa anterior houve clivagem do produto da resina.

Baylis- Hillmann

Tendo em vista a dificuldade de vencer a etapa anterior, tentou-se a ciclização sem reduzir a dupla ligação.



Esquema 2.18: Ciclização via Baylis-Hillman – Produto **110**. Condições: DBU, microondas, 10 ciclos de 1 minuto, potência 540 W, sem solvente (inchamento prévio da resina com DCM e nitrogênio).

No protocolo 31 (Tabela 2.8) utilizou-se irradiação por microondas 540W e DBU como catalisador obtendo-se 37 % de rendimento após 10 minutos de reação. Já no protocolo 33, onde não se utilizou catalisador, supõe-se que o produto seja obtido através do íon iminium (intermediário E) e o rendimento obtido foi de 1,7 % (ver Esquema 2.19).

O protocolo **31** mostrou-se o melhor para a obtenção do produto **110** que após sua ciclização por microondas, foi purificado por cromatografia em coluna para retirada do excesso de DBU. Porém, ao analisar-se os RMNs do produto percebeu-se que ainda havia resquícios do catalisador utilizado.

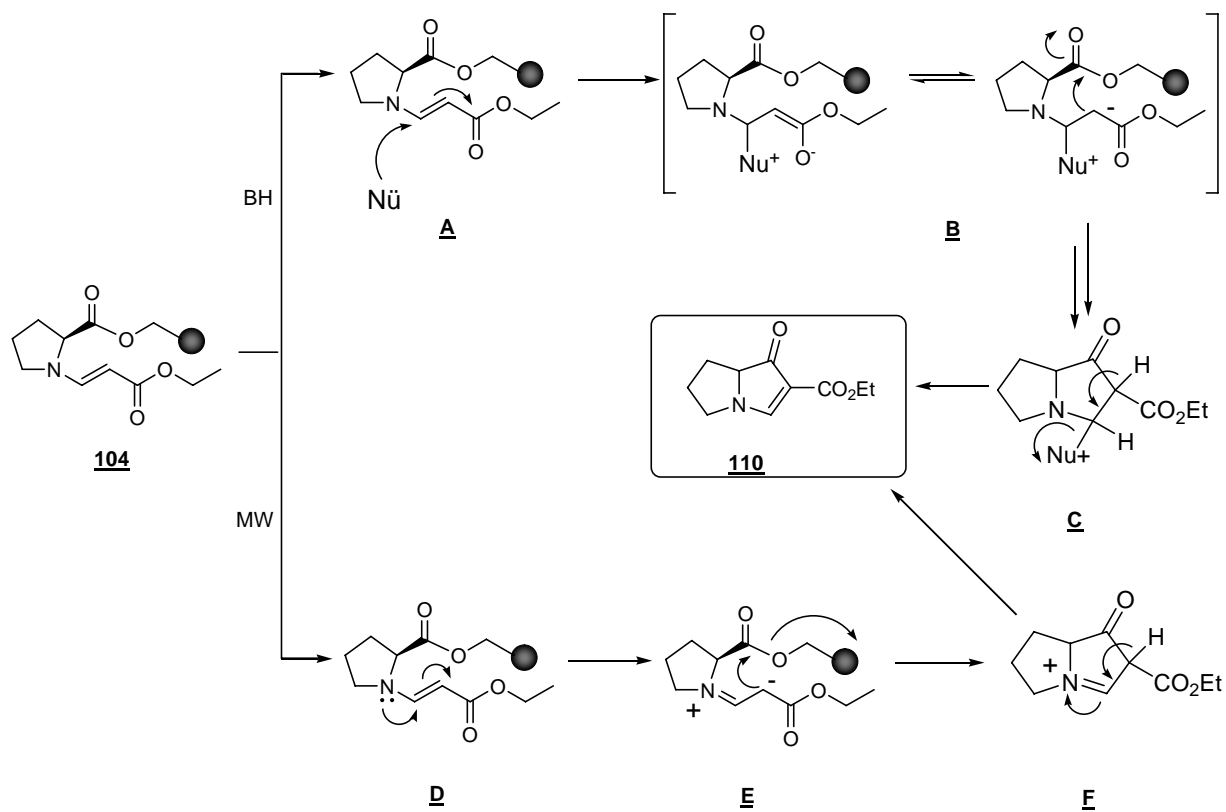
Tabela 2.8: Condições para a reação de ciclização.

Protocolo	Catalisador	Solvente	Temperatura	Tempo	Rendimento
31	DBU	DCM	microondas	10 min	37 % ^a
32	PPh ₃	DCM	microondas	10 min	- ^b
33	x	DCM	microondas	20 min	1,7 % ^a

a) Reação ocorreu; b) Reação não ocorreu.

Quando em presença de DBU acredita-se que a ciclização ocorra pelo mecanismo da reação de Baylis-Hillman (ver Esquema 2.19). Para confirmar este mecanismo, utilizou-se PPh₃ como base (protocolo **32**), nas mesmas condições do

protocolo **31**, porém não houve liberação de produto do polímero. Outros grupos de pesquisa já tentaram ciclar compostos utilizando este catalisador, porém sem sucesso.⁴¹



Esquema 2.19

2.4 Conclusões

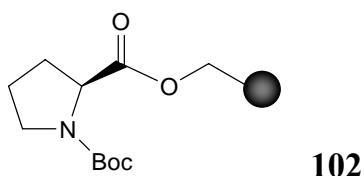
Nesta etapa do trabalho desenvolveu-se uma rota sintética por SOFS, onde se obteve um derivado de alcalóide pirrolizidínico com 37% de rendimento após a purificação por cromatografia em coluna, que apesar de parecer puro na CCD, apresentou algumas impurezas no espectro de RMN, que se acredita ser resquícios do catalisador utilizado.

Esta rota mostrou-se promissora, pois em apenas quatro etapas o produto já estava formado e clivado da Resina Merrifield. Esta metodologia proporcionou a obtenção de intermediários puros, sem perda de produto e sem dificuldade nas purificações. A rota aqui desenvolvida pode ser automatizada e empregada em química combinatória para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas (*hits*).

No futuro, outros experimentos serão realizados utilizando-se outros aceptores de Michael, possibilitando assim, a obtenção de uma quimioteca de derivados pirrolizidínicos. Este é o primeiro relato de síntese de anéis pirrolizidínicos por síntese em fase sólida.

2.5 Parte Experimental

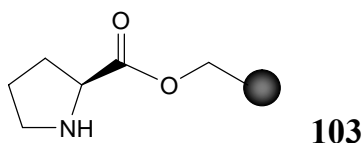
2.5.1 Obtenção do produto 102



À RM (1 eq) adicionou-se DMF, KI (1,1 eq), Cs_2CO_3 (1,5 eq) e após 15 minutos adicionou-se a prolina *N*-Boc (1,1 eq). A reação ocorreu sob refluxo por 48 horas. A Lavagem da resina foi feita três vezes com água, diclorometano, etanol e éter etílico.

IV (KBr): bandas intensas em 1757 cm^{-1} , indicando a presença de carbonila e em 1145 cm^{-1} que pode indicar a presença de nitrogênio ligado a carbono.

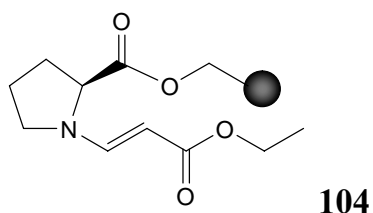
2.5.2 Obtenção do produto 103



À RM (1 eq) foi adicionado DCM, éter etílico e HCl 3M. A reação ocorreu sob t.a. por 40 min. A Lavagem da resina foi feita com diclorometano, etanol e éter etílico.

IV (KBr): banda intensa em 1755 cm^{-1} que indica presença de carbonila de éster e em 1157 cm^{-1} que indica nitrogênio ligado a carbono. Na subtração de espectros o aparecimento de uma banda alargada em torno de 3496 cm^{-1} pode indicar a presença de amina secundária.

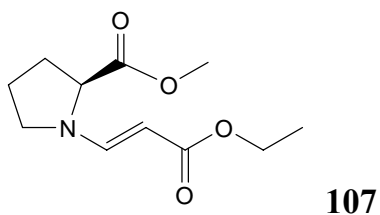
2.5.3 Obtenção do produto 104



À RM acoplada (1eq) foi adicionado DMF e DIPEA (1,5 eq). Após 15 minutos adicionou-se o propiolato de etila (1,1 eq). A reação ocorreu a t.a. por 96 horas. A lavagem da resina foi realizada com diclorometano, etanol e éter etílico.

IV (KBr): banda intensa em 1753 cm^{-1} referente à carbonila do éster. Desaparecimento da banda alargada em 3496 cm^{-1} referente à amina secundária.

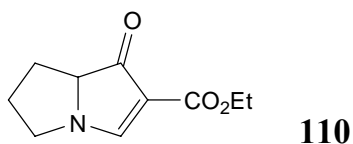
2.5.4 Obtenção do produto 107



À RM acoplada (1 eq) adicionou-se 4 ml de metanol, 0,5 ml de hexano e K_2CO_3 (5,7 eq) em 1 ml de água. A reação ocorreu sob t.a. por 10 horas. A fase aquosa extraída com acetato de etila.

IV: 2929 cm^{-1} referente (CH), 1701 cm^{-1} (CO, éster), 1400 cm^{-1} (C-N).

2.5.5 Obtenção do produto 110



Óleo marrom $C_{10}H_{13}NO_3$ PM= 195 g/mol

Rendimento: 37 %

A RM acoplada (1 eq) adicionou-se diclorometano seco para inchar a resina em atmosfera de N_2 . Após adicionou-se DBU (1eq) e reagiu-se em microondas durante 10 ciclos de 1 minuto utilizando potência 540W. Após filtrou-se a resina com DCM e éter etílico. O filtrado adquiriu coloração marrom escura. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório e purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente metanol/cloreto de amônio na proporção de 9:1, obtendo-se um rendimento de 37%.

$[\alpha]_D^{20} = -1$ (C= 1,68, etanol)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,70 (1H_j, s); 3,60 (2H_m, q, $J= 7,1$ Hz); 3,38-3,00 (1H_e+2H_j+2H_c, m); 2,05-1,95 (2H_d, m); 1,50 (3H_n, t, $J= 7,1$ Hz).

RMN APT (50MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): C-f (176,5); C-L (166,2); C-j (132,5); C-k (98,1); C-e (60,3); C-m (49,5); C-b (45,04); C-d (27,5); C-c (23,2); C-n (14,0).

2.6 Referências

1. MERRIFIELD, R.B. Solid phase peptide synthesis 1. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, p. 2149-, 1963.
2. BALKENHOL, F.; VOM DEM BUSSCHE-HUNNEFELD, C.; LANSKY, A.; ZECHEL, C. Combinatorial synthesis of small organic molecules. **Angewandte Chemie International**, v.35, p. 2289-2337, 1996.
3. EIFLER-LIMA, V. L.; MARQUARDT, M. M. A Síntese orgânica em fase sólida e seus polímeros mais utilizados. **Química Nova**, v. 24, p. 86, 2001.
4. THOMPSON, L.A.; ELMANN, J. Synthesis and application of small molecule libraries. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 555-600, 1996.
5. DULAC, C.; FRASER, S.E.; STARLING, B. New technologies. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 591-592, 2001.
6. BLACKBURN, C.; ALBERICO, F.; KATES, S.A. Functionalized resins and linkers for solid-phase synthesis of small molecules. **Drugs of the Future**, v. 22, n. 9, p. 1007-1025, 1997.
7. MARQUARDT, M.M. Polímeros de Síntese Orgânica em Fase Sólida: Aspectos genéricos. **Trabalho de conclusão de curso**. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, 1999, e referências citadas.
8. MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. 2. The synthesis of bradykinin. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 86, p. 304-305, 1964.
9. FRUCHTEL, J.S.; JUNG, G. Organic chemistry on Solid Supports. **Angewandte Chemie**, v. 35, p. 17-42, 1996.
10. FRECHET, J.M. Synthesis and applications of organic polymers as supports and protecting groups. **Tetrahedron**, v. 37, p.663-683, 1980.
11. DIAS, R.L.A. E CORRÊA, A.G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos, **Química Nova**, v.24, n. 2, p. 236-242, 2001.

12. BUNIN, B.A.; ELLMAN, J. A general and expediente method for the Solid-Phase Synthesis of 1,4-benzodiazepine derivates. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, p. 10997-10998, 1992.

13. CHEN, S. Q.; JANDA, K. D. Synthesis of prostaglandin E2 methyl ester on a soluble-polymer support for the construction of prostanoid libraries. **Journal of American Chemical Society**, v. 119, n. 37, p. 8724-8725, 1997.

14. KIM, W-G; KIM, J-P; KOSHIMO, H.; SHIN-YA, K.; SETO, H.; YOO, L.H. Benzastatins E, F and g: New indolina Alkaloids with neuronal cell protecting activity from *Streptomyces nitroporeus*. **Tetrahedron**, v. 53, n.12, p. 4309-4316, 1997.

15. KATRITZKY, A.R.; RACHWALL,S.; RACHWAL, B. Recent progress in the synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydroquinolines. **Tetrahedron**, v. 52, n. 48, p. 15031-15070, 1996.

16. SNIDER, B.B.; HAN, L.; XIE, C. Synthesis of 2,3-Dihydrobenzofurans by Mn(OAc)₃ based-oxidative cyclo addition of 2-cyclohexenones with alkenes synthesis of (+)-Conocarpan. **Journal of Organic chemistry**, v. 62, p. 6978-6984, 1997.

17. SCHNEIDER, S.E.; BRAY, B.L.; MADER, C.J.; FRIEDRICH, P.E.; ANDERSON, M.W.; TAYLOR, T.S.; BOSHERNITZAN, N.; NIEMI, T.E.; FULCHER, B.C.; WHIGHT, S.R.; WHITE, J.M.; GREENE, R.J.; STOLTENBERG, L.E. AND LICHTY, M. Development of HIV fusion inhibitors. **Journal of Peptide Science**, v. 11, p. 744-753, 2005.

18. ANTONOW, D.; GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. An Efficient Monitoring Technique for Solid-Phase Reactions by KBr Pellets/FT-IR Using Methyl *p*-Aminobenzoate Synthesis Assisted by Microwave Radiation on Merrifield Resin. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 782-785, 2004.

19. GALINDO, F.; ALTAVA, B.; BURGUETE, M.I.; GAVARA, R. AND LUIS, S.V. A Sensitive Colorimetric Method for the Study of Polystyrene Merrifield Resins and Chloromethylated Macroporous Monolithic Polymers . **Journal of combinatorial chemistry**, v. 6, p. 859-861, 2004.

20. STAHL, G.L.; WALTER, R.; SMITH, C. W. Beaded Poly(N-acrylylpyrrolidine). **Journal of American Chemical Society**, v. 101, n. 18, p. 5383-5394, 1979.

21. BRASE, S. ; KOBBERLING, J. ; ENDERS, D. ; LAZNY, R.; WANG, M. Triazenes as robust and simple linkers for amines in Solid-Phase Organic Synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 2105-2108, 1999.

22. LAZNY, R.; NODZESKA, A. Synthesis of polymeric supports with spacer-modified triazene linkers: aldol and grignard reactions of immobilized nortropinone. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2441-2444, 2003.
23. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M. T.; ROBLES, R.; FRANCO, F. Polyhydroxylated pyrrolizidines. Part I: Short and highly stereocontrolled syntheses of hyacinthacines. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 12, p. 2481-2487, 2001.
24. CUBERO, I. I.; LOPEZ-ESPINOSA, M. T. P.; DIAZ, R. R.; MONTALBAN, F. F. A practical route to partially protected pyrrolidines as precursors for the stereoselective synthesis of alexines. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 401-408, 2001.
25. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M. T.; FRANCO, F. Polyhydroxylated pyrrolizidines. Part 2: The first total synthesis of (+)-hyacinthacine A₃. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 13, p. 1581-1585, 2002.
26. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M. T.; FRANCO, F. Polyhydroxylated pyrrolizidines. Part 4: Total asymmetric synthesis of unnatural hyacinthacines from a protected derivative of DGDP. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 15, p. 1465-1469, 2004.
27. RAMBAUD, L.; COMPAIN, P.; MARTIN, O. R. First total synthesis of (+)-hyacinthacine A₂. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 12, p. 1807-1809, 2001.
28. CARDONA, F.; FAGGI, E.; LIGUORI, F.; CACCIARINI, M.; GOTI, A. Total syntheses of hyacinthacine A₂ and 7-deoxycasuarine by cycloaddition to a carbohydrate derived nitron. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2315-2318, 2003.
29. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M. T.; FRANCO, F. Polyhydroxylated pyrrolizidines. Part 3: A new and short enantiospecific synthesis of (+)-hyacinthacine A₂. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 14, p. 3933-3935, 2003.
30. DESVERGNES, S.; PY, S.; VALLEE, Y. Total Synthesis of (+)-Hyacinthacine A₂ Based on SmI₂-Induced Nitron Umpolung. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 1459-1462, 2005.
31. CHABAUD, L.; LANDAIS, Y.; RENAUD, P. Total Synthesis of Hyacinthacine A₁ and 3-*epi*-Hyacinthacine A₁. **Organic Letters**, v. 7, p. 2587-2590, 2005.
32. DONOHUE, T. J.; SINTIM, H. O.; HOLLINSHEAD, J. A Noncarbohydrate Based Approach to Polyhydroxylated Pyrrolizidines: Total Syntheses of the Natural Products Hyacinthacine A₁ and 1-Epiaustraline. **Journal of Organic Chemistry**, v. 70, p. 7297-7304, 2005.

33. CALVERAS, J.; CASAS, J.; PARELLA, T.; JOGLAR, J. AND CLAPÉS, P. Chemoenzymatic Synthesis and Inhibitory Activities of Hyacinthacines A1 and A2 Stereoisomers. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1661–1666, 2007.
34. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M.T.; TAMAYO, J.A. AND SÁNCHEZ-CANTALEJO, F. Total synthesis of the 5-epimers of naturally occurring (-)-hyacinthacine A5 and unnatural (+)-hyacinthacine A4. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 18, p. 2211–2217, 2007.
35. IZQUIERDO, I.; PLAZA, M.T.; TAMAYO, J.A. AND SÁNCHEZ-CANTALEJO, F. A New Synthetic Approach to (+)-Hyacinthacine A1 and the First Total Synthesis and Absolute Configuration Assignment of Naturally Occurring (+)-Hyacinthacine A6. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 6078–6083, 2007.
36. WANG, F. AND HAUSKE, J.R. Solid-Phase Synthesis of 3,4-Dihydroquinazoline. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 50, p. 8651-8654, 1997.
37. GISIN, B.F. The preparation of Merrifield-Resins through total esterification with cesium salts. **Helvetica Chimie Acta**, v. 56, n. 5, p. 1476-1482, 1973.
38. WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W.; **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. New York: Wiley-Interscience, 2006, 4^a. ed.
39. CROWLEY, J. I.; RAPOPORT, H. Unidirectional Dieckmann Cyclizations on a Solid Phase and in Solution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 45, p. 3215, 1980.
40. ZHU, W.; MA, D.W. Preparation of *syn*- δ -Hydroxy- β -amino Esters via an Intramolecular Hydrogen Bond Directed Diastereoselective Hydrogenation. Total Synthesis of (3*S*,4*aS*,6*R*,8*S*)-Hyperaspine. **Organic Letters**, v. 5, p. 5063-5066, 2003.
41. XU, X.J.; ZONG, Y.X. Microwave-assisted traceless synthesis of benzimidazolones. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 129-132, 2007.

3 CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 – SÍNTESE EM SOLUÇÃO DE ANÉIS PIRROLIZIDÍNICOS

3.1 Introdução

A segunda parte desta dissertação trata da síntese em solução de derivados de alcalóides pirrolizidínicos, bem como seus intermediários. Descreve a síntese e algumas características químicas e estruturais desses sistemas bicíclicos, que foram obtidos com o intuito de, a partir deles, sintetizarem-se alcalóides do tipo hiacintacina e com isto realizar testes farmacológicos. A síntese é original, utilizando-se como produto de partida um aminoácido barato e disponível, a *L*-prolina **113**. Em duas das rotas sintéticas propostas, utilizam-se alcinos deficientes eletronicamente, também conhecidos como alcinos ativados. Esta denominação refere-se à capacidade de atuarem como eletrófilos em reações de adições de Michael. Compostos com ligações triplas polarizadas por grupos retiradores de elétrons possuem capacidade de gerar produtos com diferentes grupos funcionais, permitindo que novas ligações se estabeleçam com uma variedade de reagentes como, por exemplo, aminas, enolatos, cetonas e alcenos.¹

3.2 Objetivos

Sintetizar análogos de alcalóides do tipo hiacintacina por Síntese em solução, empregando a *L*-prolina como material de partida.

3.3 Resultados e discussão

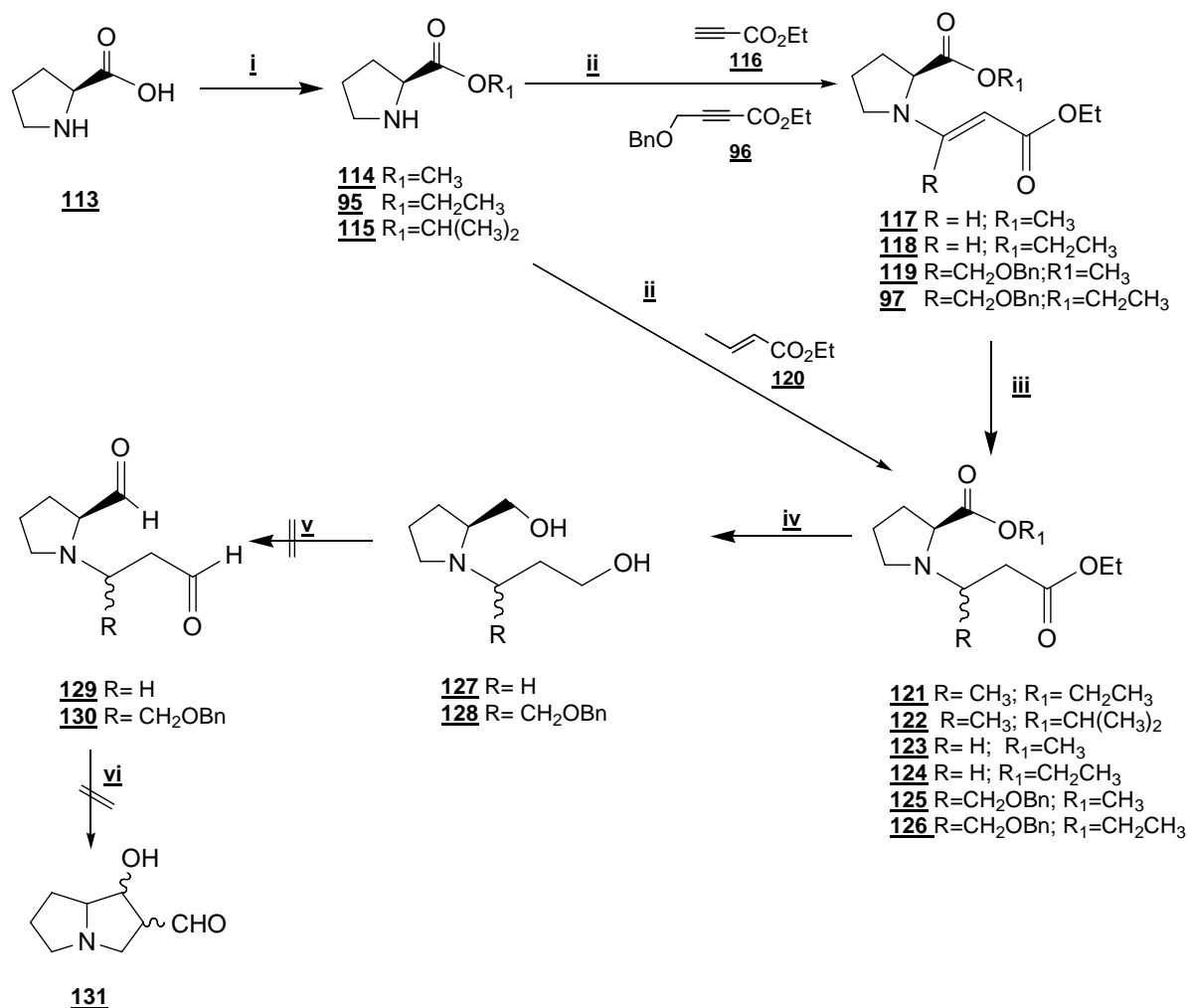
Como mencionado na Introdução, a rota sintética a seguir (Esquema 20) foi iniciada por Pablo D. Grigol¹ em sua dissertação de mestrado e apresentou muitos problemas de purificação, por isso desenvolvemos uma outra rota em SOFS, apresentada no capítulo anterior.

É comum em SOFS realizar algumas das etapas em solução simultaneamente às realizadas com a resina, objetivando a otimização da reação envolvida. Em função disso, desenvolveu-se três rotas sintéticas (esquemas 3.1, 3.9 e 3.11) com o objetivo de obter-se o anel pirrolizidínico, onde a *L*-prolina **113** foi utilizada como produto de partida em todas as rotas. No esquema 31 está a continuação da rota em solução a partir dos produtos **109**, **132** e **133** obtidos na rota 2 (Esquema 3.9). Estas três rotas sintéticas foram desenvolvidas em paralelo à síntese em fase sólida.

3.3.1 Primeira rota sintética proposta

A primeira rota proposta inicia com a O-proteção da *L*-prolina seguindo-se com a adição de Michael utilizando-se três aceptores diferentes, sendo estes, dois alcinos e um alceno. A etapa seguinte consiste na redução seletiva da ligação dupla conjugada ao grupamento éster. A partir dos aminodiésteres seria feita uma redução a diálcoois para posterior oxidação a dialdeídos. Estes dialdeídos já apresentariam todos os carbonos necessários para a obtenção produto **131** e seria obtido através de uma condensação aldólica.

Além disso, o produto final já teria uma hidroxila ligada ao bicyclo, o que diminuiria uma etapa da rota sintética para a obtenção das hiacintacinas.

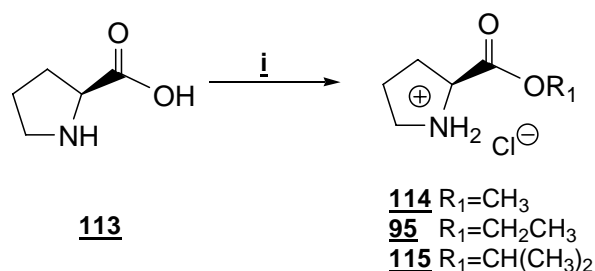


Esquema 3.1: Rota sintética em solução 1. Condições: i) SOCl_2 , álcool, 0°C , 5 horas; ii) propiolato de etila ou crotonato de etila, DIPEA, CH_3CN , $0^\circ \text{C} - 65^\circ \text{C}$, 42 horas; ou, inoato de etila, DIPEA, CH_3CN , $0^\circ \text{C} - \text{t.a.}$, 7 dias; iii) NaBH_4 , ácido acético, CH_3CN , 0°C , 2 horas; iv) LiAlH_4 , THF, $0^\circ \text{C} - \text{t.a.}$, 5 horas; v) PCC, diclorometano, t.a. , 3 horas; vi) piperidina, ácido acético, tolueno, 100°C , 1 hora.

3.3.1.a Primeira etapa: Esterificação da *L*-prolina

A primeira etapa desta rota sintética consiste na esterificação da *L*-prolina, onde este aminoácido já teria o grupamento éster necessário para a etapa da condensação de Dieckmann.

Utilizou-se 3 álcoois diferentes para a esterificação²: metanol (protocolo **34**), etanol (protocolo **35**) e isopropanol (protocolo **36**).



Esquema 3.2: Esterificação da *L*-prolina. Condições: $SOCl_2$, álcool, 0° C, 5 horas.

O isopropanol foi empregado em função de formar um melhor grupo de saída, o que favoreceria a ciclização. Entretanto isso não se confirmou, pois a reação forneceu baixos rendimentos (40%). Desta forma, a etoxila foi selecionada por sua facilidade de remoção e por não promover impedimento estérico.

Tabela 3.1: Condições da esterificação da *L*-prolina.

Protocolo	Álcool	$SOCl_2$	Temperatura	Tempo	Rendimento
34	álcool metílico 1,6 ml/mmol	2 eq	refluxo	5 horas	95 % ^a
35	álcool etílico 1,6 ml/mmol	2 eq	refluxo	5 horas	95 % ^a
36	álcool isopropílico 1,6 ml/mmol	2 eq	refluxo	5 horas	95 % ^a

a) Reação ocorreu.

3.3.1.b Segunda etapa: Adição de Michael

A partir disso, procedeu-se então à adição de Michael³ com o propiolato de etila (reação ii) onde foi observado um maior rendimento ao se aquecer o meio reacional. De acordo com o espectro de RMN ¹H do composto **118** (**Figura 3.1**), observa-se os sinais olefínicos como dubletos em 7,54 ppm e 4,52 ppm com $J= 13,0$ Hz característicos de geometria trans. Além disso, pode-se observar um tripleto em 1,20 ppm com $J= 7,2$ Hz referente às metilas das etoxilas.

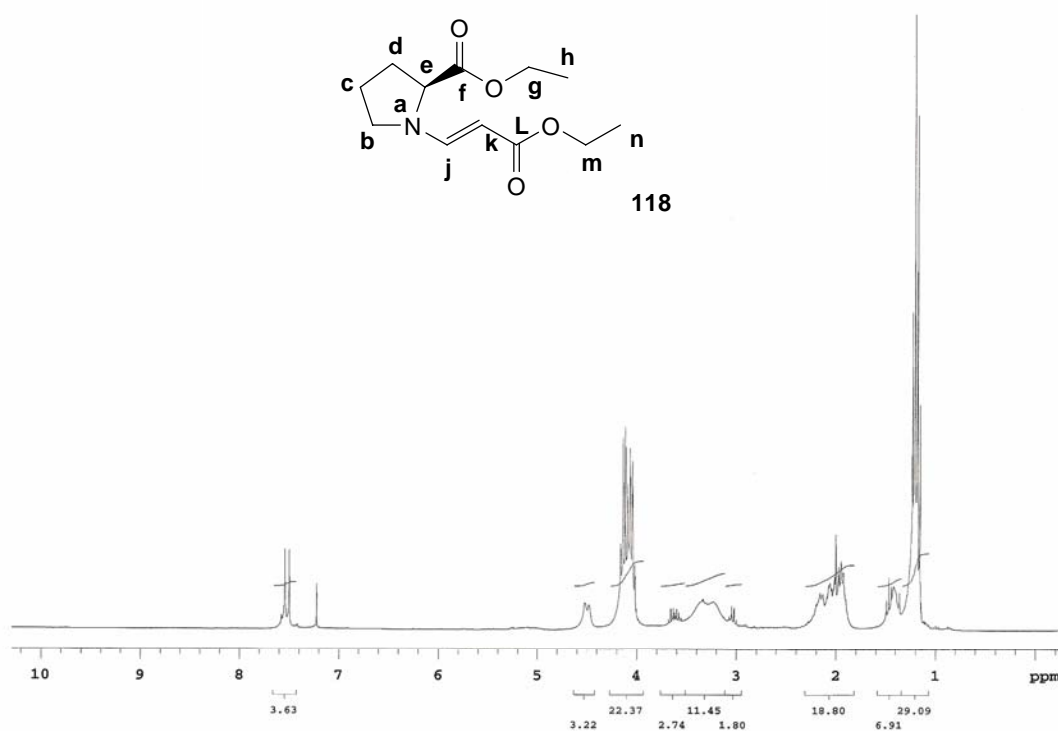
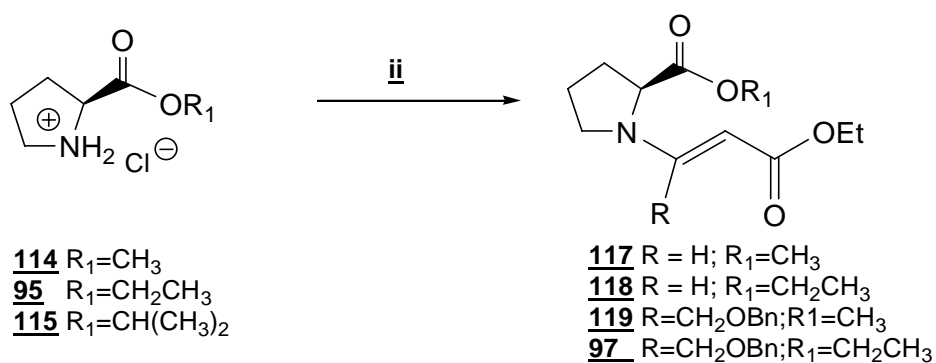


Figura 3.1: Espectro de RMN ^1H do composto **118**.

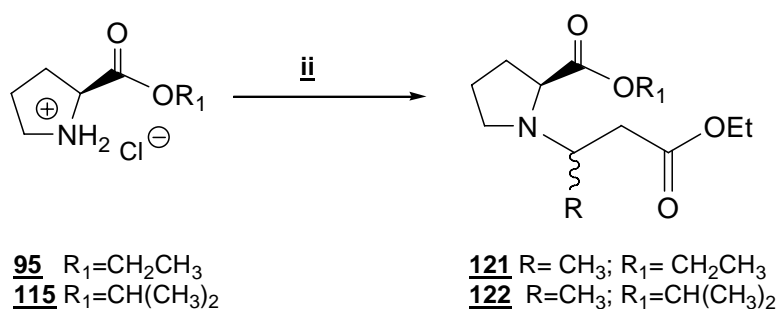
Essa mesma adição também foi realizada com o inoato de etila **96**, onde a reação ocorre durante 7 dias a temperatura ambiente e não se observou aumento no rendimento ou diminuição do tempo reacional quando o meio foi aquecido a uma temperatura de 65°C .



Esquema 3.3: Adição de Michael. Condições: propiolato de etila, DIPEA, CH_3CN , 0°C - 65°C , 42 horas ou inoato de etila, DIPEA, CH_3CN , 0°C - t.a., 7 dias.

Esta adição também foi feita com o crotonoato de etila, onde o melhor protocolo foi o mesmo utilizado para o propiolato de etila.

Observou-se que após as 42 horas havia a formação de subprodutos.



Esquema 3.4: Adição de Michael. Condições: crotonato de etila, DIPEA, CH_3CN , 0°C - 65°C , 42 horas.

A **Tabela 3.2** mostra os rendimentos das adições de Michael, onde se pode constatar que esta etapa é adequada à rota sintética planejada gerando produtos com alto rendimento (50 a 95%) e poucas impurezas.

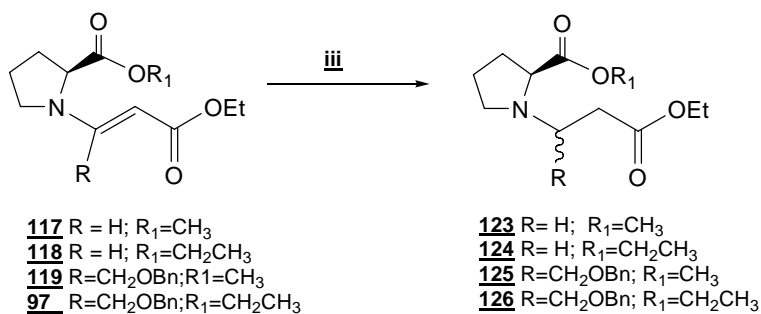
Tabela 3.2: Condições para a adição de Michael.

Protocolo	Aduto de Michael	Base	Solvente	Temperatura	Tempo	Rendimento %
37	Propiolato de etila 1 eq	DIPEA 3 eq	CH_3CN	65°C	42 hs	95 ^a
38	Inoato de etila 1 eq	DIPEA 3 eq	CH_3CN	t.a.	7 dias	75 ^a
39	Crotonato de etila 1 eq	DIPEA 3 eq	CH_3CN	65°C	42 hs	60 ^a
40	Crotonato de etila 1 eq	DIPEA 3 eq	CH_3CN	65°C	72 hs	50 ^b

a) Reação ocorreu e está otimizada; b) Reação ocorreu, maior formação de impurezas.

3.3.1.c Terceira etapa: Redução da ligação dupla

Na etapa seguinte (protocolo **30**: $\text{NaBH}_4/\text{AcOH}$, CH_3CN , 0°C - t.a, 3 horas) foi realizada a redução dos enaminoésteres⁴ **117**, **118**, **119** e **97**, onde os protocolos já estavam otimizados resultando nos produtos **123**, **124**, **125** e **126**.



Esquema 3.5: Redução do enamoéster. Condições: NaBH₄/ AcOH, CH₃CN, 0° C - t.a., 3 horas.

Pelas análises de RMN ¹H do composto **124** (**Figura 3.2**) percebe-se o desaparecimento dos dois dubletos correspondentes aos prótons olefinicos.

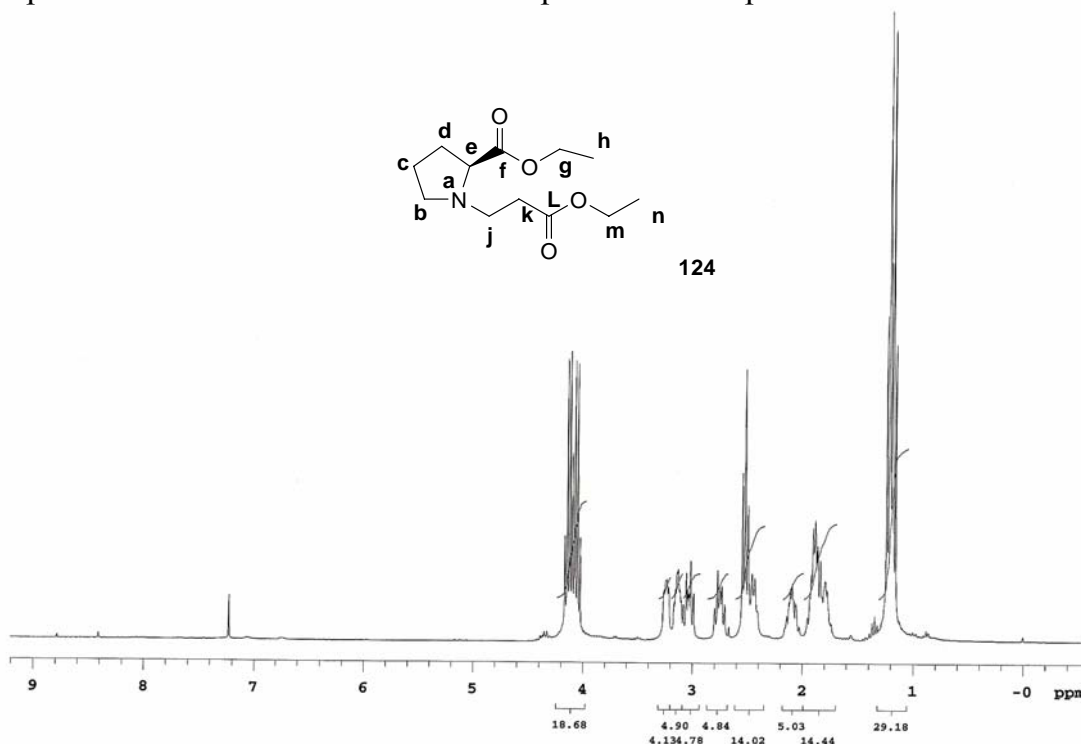


Figura 3.2: Espectro de RMN ¹H do composto **124**.

Além deste, outros protocolos foram testados utilizando condições reacionais mais brandas, para que posteriormente pudessem ser aplicados à SOFS. No protocolo **41** seguiu-se as condições descritas em Marshall and Carrol (1969)⁵, onde foi utilizado NaBH₄ e etanol, porém sem resultados positivos. Após, testou-se também o protocolo **42** em que foi utilizado o NaBH₄, CuBr e metanol seco⁶; entretanto, os resultados não foram positivos havendo a formação de sub-produtos de difícil separação.

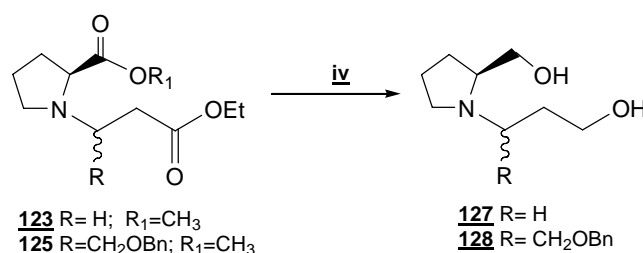
Tabela 3.3: Condições para redução do enaminoéster a diéster.

Protocolo	NaBH ₄	Etanol	Metanol	CuBr	Temperatura	Tempo
41	1,1 eq	1,3 l/mmol	x	x	t.a.	48 hs ^a
42	10 eq	x	1,5 eq	20 ml/mmol	0°C -t.a.	72 hs ^a

a) Reação não ocorreu.

3.3.1.d Quarta etapa: Redução a diálcool

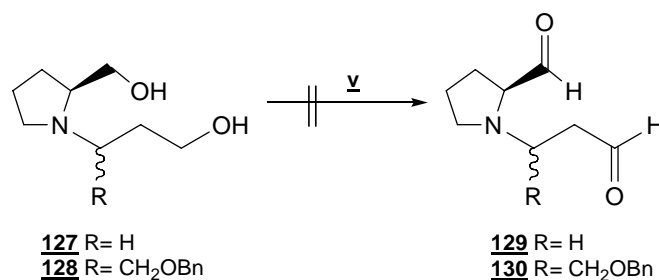
Os produtos **123** e **125** foram reduzidos a diálcoois **127** e **128** (reação iv), para posteriormente serem oxidados a dialdeídos e através de uma condensação aldólica formarem o esqueleto das hiacintacinas. Esta reação permitiria a obtenção das hiacintacinas de forma mais rápida e seletiva. Os produtos foram obtidos utilizando-se o protocolo **43**: LiAlH₄. (2,66 eq) em THF seco, temperatura inicial de 0°C chegando a t.a. por 5 horas⁷. Os rendimentos obtidos foram de 77-95%, gerando poucas impurezas, não havendo necessidade de purificação.



Esquema 3.6: Redução dos diésteres. Condições: LiAlH₄, THF, 0° C- t.a., 5 horas.

3.3.1.e Quinta etapa: Oxidação a dialdeído

Na etapa v utilizou-se PCC na tentativa de oxidar os diálcoois **127** e **128** a aldeídos, para posterior ciclização.

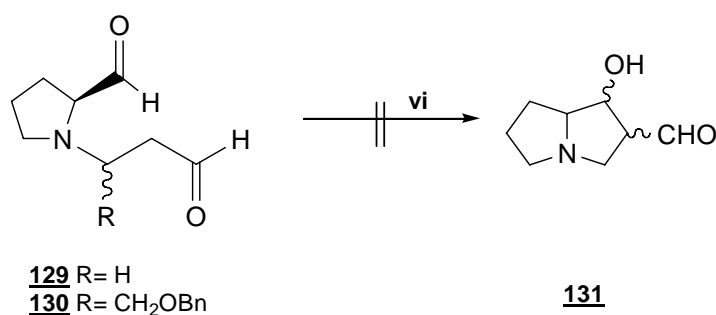


Esquema 3.7

O protocolo utilizado foi o **44**: PCC (2 eq) em diclorometano, a t.a. por 3 horas, mas os produtos obtidos não foram os esperados⁸.

3.3.1.f Sexta etapa: Condensação aldólica

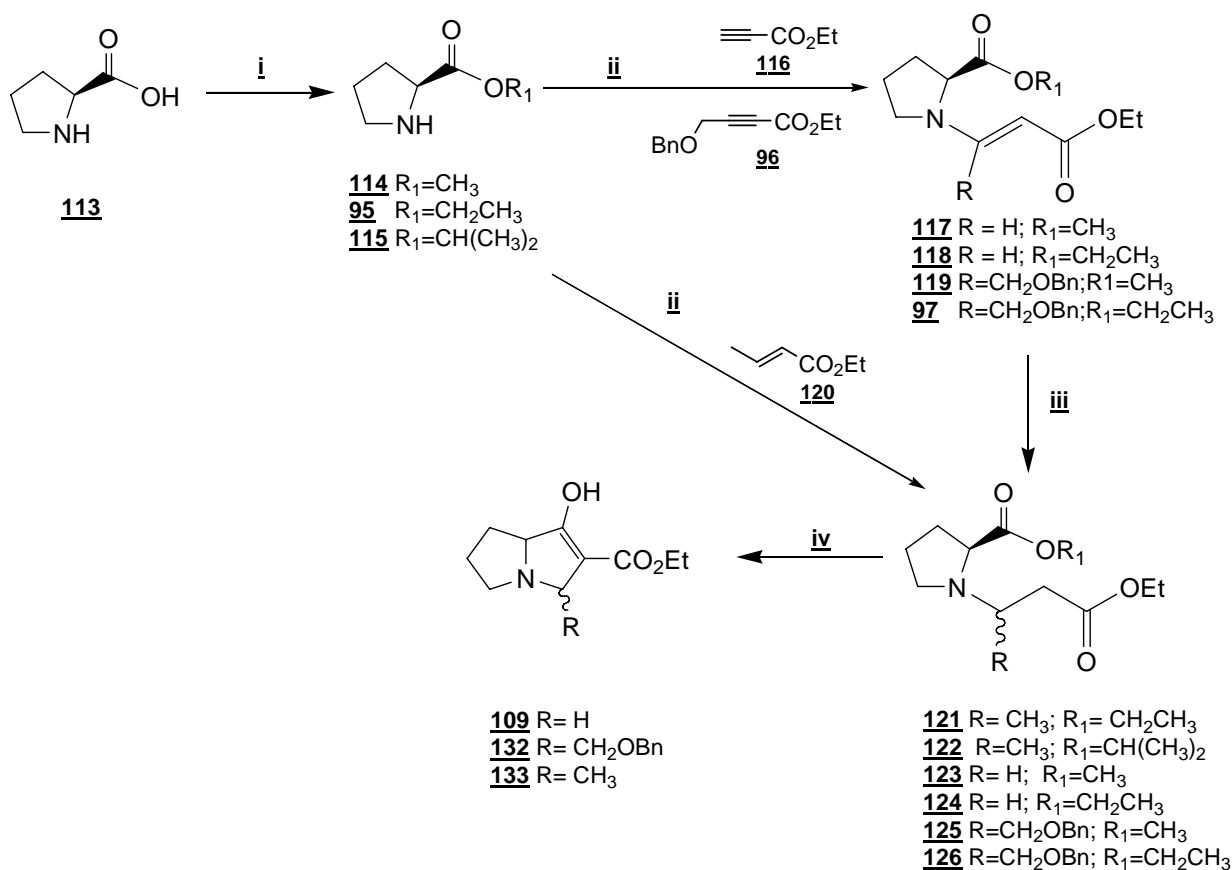
Após a etapa v, devido à reconhecida instabilidade dos aldeídos, procedeu-se imediatamente à reação de condensação aldólica, onde se utilizou o protocolo **45**: Piperidina (2 gotas), Ácido acético (1 gota), tolueno, 100°C, 1 hora. Porém, as análises espectroscópicas não confirmaram o sucesso desta etapa. Sabe-se agora que esta reação não poderia ser bem sucedida, pois na etapa anterior não se obtiveram os dialdeídos desejados.



Esquema 3.8

3.3.2 Segunda rota sintética proposta

A segunda rota sintética proposta foi desenvolvida a partir da retrosíntese proposta no capítulo 1 deste trabalho. As quatro primeiras reações são idênticas às propostas na rota 1. A última etapa, que é a diferencial, consiste na ciclização do produto através de uma condensação de dieckmann.

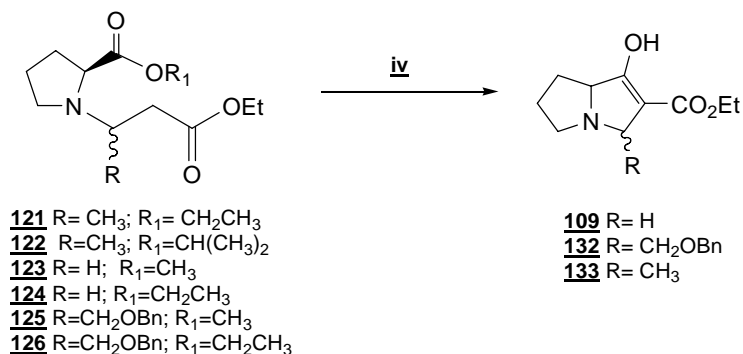


Esquema 3.9: Rota sintética em solução. 2. Condições: i) SOCl_2 , metanol, 0°C , 5 horas; ii) propiolato de etila ou crotonato de etila, DIPEA, CH_3CN , $0^\circ \text{C} - 65^\circ \text{C}$, 42 horas; ou, inoato de etila, DIPEA, CH_3CN , $0^\circ \text{C} - \text{t.a.}$, 7 dias; iii) NaBH_4 , ácido acético, CH_3CN , 0°C , 2 horas; iv) THF, Na^+ , refluxo, 4 horas.

3.3.2.a Última etapa: Condensação de Dieckmann

As etapas i, ii e iii já se encontram descritas no **item 3.3.1** e a seguir será apresentada a etapa iv que é diferencial da primeira rota. Numa outra tentativa de sintetizar o esqueleto das hiacintacinas, procedeu-se à condensação de Dieckmann

utilizando sódio metálico cujo protocolo é clássico. Utilizou-se o protocolo **46**: sódio metálico e THF seco sob refluxo por 4 horas, obtendo-se os produtos **109**, **132** e **133**.



Esquema 3.10: Condensação de Dieckmann. Condições: Sódio metálico (4 eq), THF (refluxo), 4 horas.

A purificação foi feita utilizando-se cromatografia em coluna, com a fase estacionária de sílica gel e a fase móvel etanol p.a., fornecendo os produtos com rendimentos em torno de 60%. Pelas análises de RMN ¹H do composto **109** (**Figura 3.3**) percebe-se o quadrupletto em 3,94 ppm (o pico referente ao solvente CDCl₃ apresenta-se deslocado para campo mais alto, portanto todos os demais sinais foram recalculados) com $J= 7,1$ Hz refere-se apenas a dois hidrogênios (2H_m).

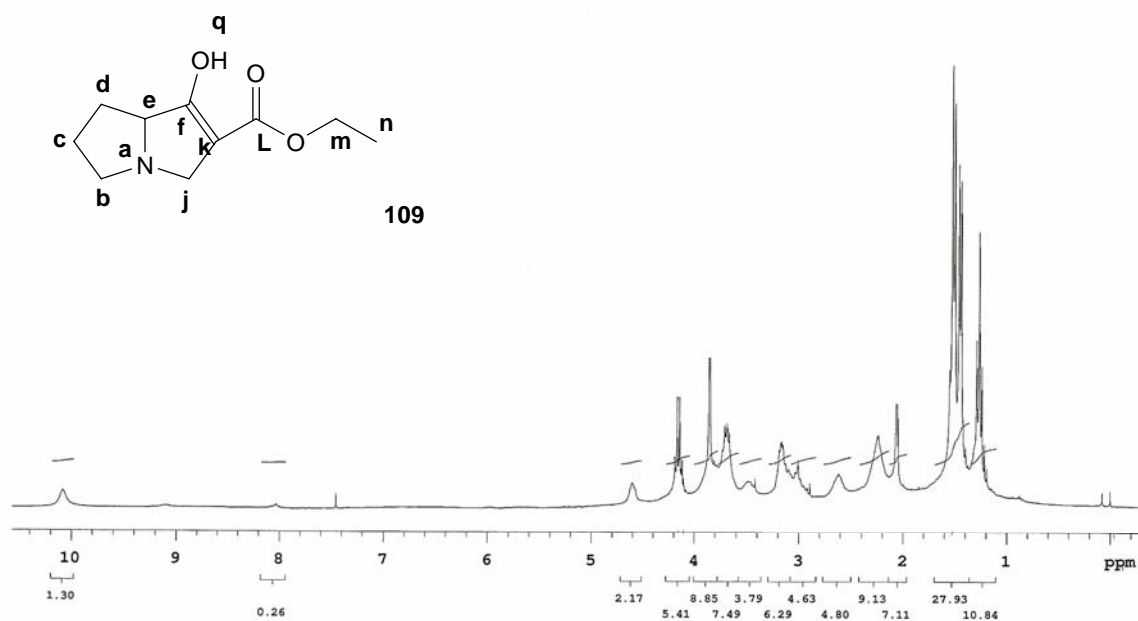
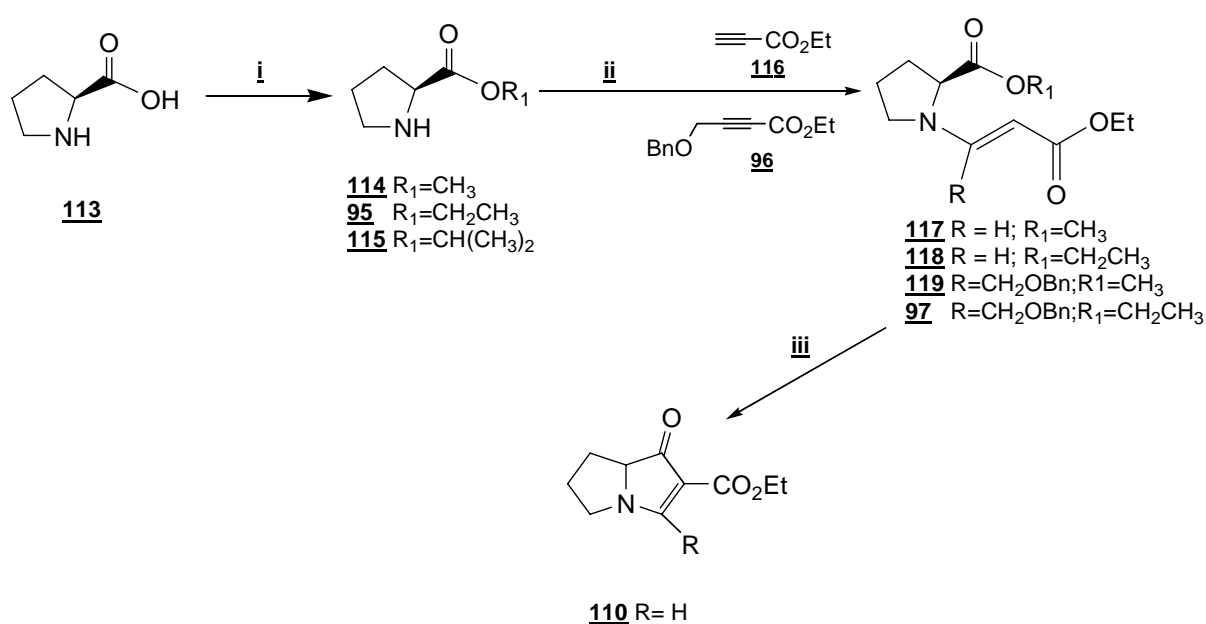


Figura 3.3: Espectro de RMN ¹H do composto **109**.

3.3.3 Terceira rota sintética proposta

A terceira rota empregada foi baseada nos resultados obtidos primeiramente em fase sólida, como já comentado no Capítulo 1 desta dissertação. Da mesma maneira que em SOFS esta rota propõe dois mecanismos distintos para a ciclização em solução. As etapas i e ii já encontram-se descritas no **item 3.3.1** e a seguir será descrita a etapa iii que é o diferencial da primeira rota. Apesar do sucesso da condensação de Dieckmann na rota 2, pensou-se numa segunda alternativa para obter-se o produto ciclizado num menor número de etapas, como já ocorrera na SOFS.

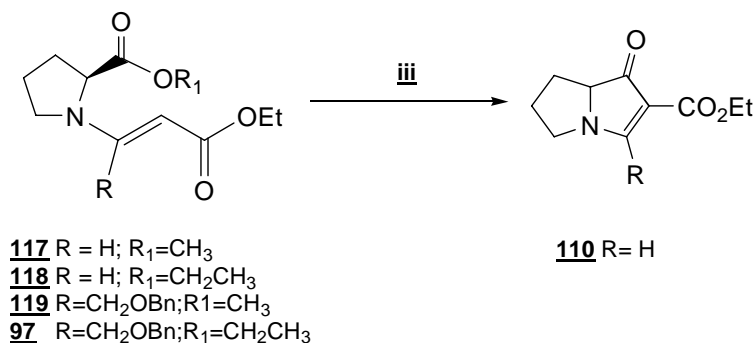


Esquema 3.11: Rota sintética em solução 3. Condições: i) SOCl_2 , metanol, 0°C , 5 horas; ii) propiolato de etila, DIPEA, CH_3CN , 0°C - 65°C , 42 horas; ou, inoato de etila, DIPEA, CH_3CN , 0°C - t.a., 7 dias;; iii) DBU, PPh_3 ou sem base, microondas 540W, 10 ciclos de 1 minuto.

3.3.3.a Última etapa: Ciclização (via Baylis-Hillman)

Utilizou-se DBU como catalisador e a reação ocorreu em microondas com potência de 540W durante 10 ciclos de 1 minuto cada (protocolo 47). Além disso, precisava-se confirmar os mecanismos de ciclização por Baylis-Hillman e via iminium dos produtos obtidos na fase sólida. Para isto, utilizou-se PPh_3 e seguiram-se as

mesmas condições do protocolo anterior (protocolo **48**). Ambas as reações foram realizadas sem solvente.



Esquema 3.12: Ciclização por Baylis-Hillman. Condições: DBU, PPh₃ ou sem base, microondas 540W, 10 ciclos de 1 minuto.

A mesma reação também foi feita sem o uso de catalisador (protocolo **49**) onde observou-se mudança no R_f do produto de partida e pelo espectro de RMN pode-se constatar que o produto formado é o mesmo obtido com os protocolos **47** e **48**.

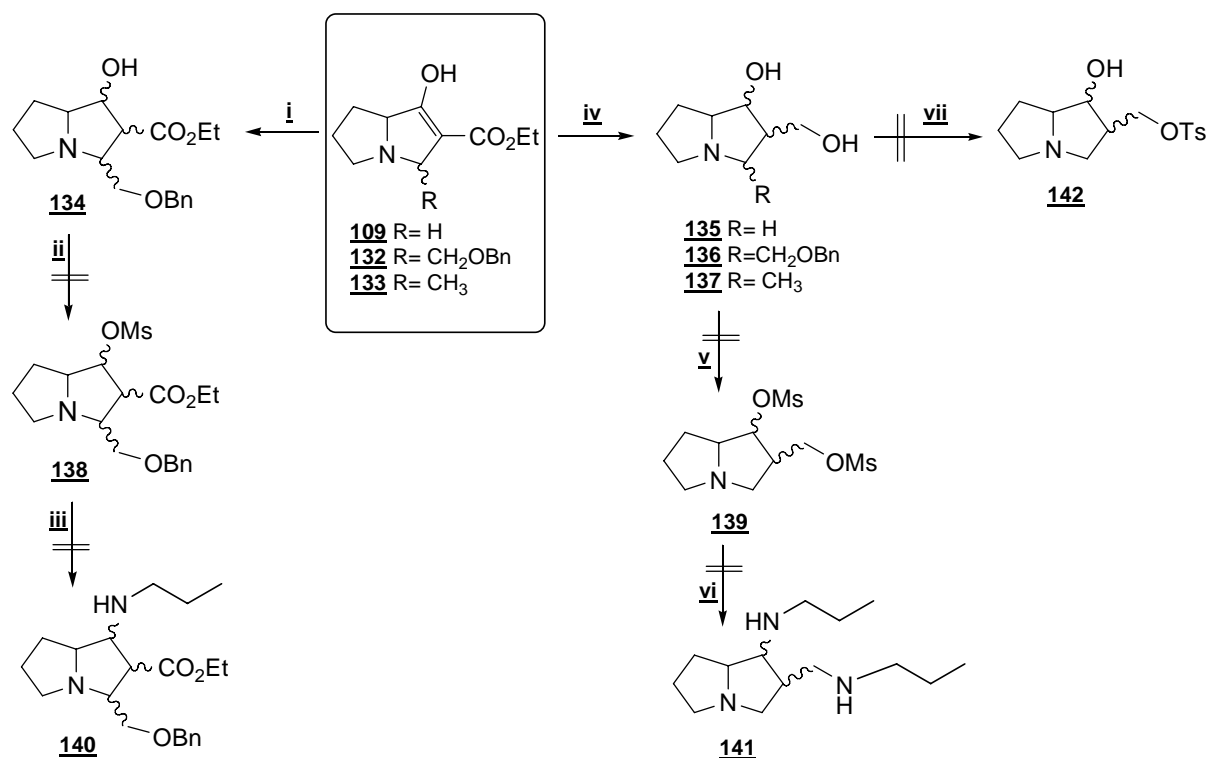
Tabela 3.4: Condições da ciclização por Baylis Hillman.

Protocolo	Catalisador	Fonte de energia	Tempo	Rendimento
47	BDU	microondas 540W	10 min	80 % ^a
48	PPh ₃	microondas 540W	10 min	80 % ^a
49	x	microondas 540W	10 min	50 % ^a

a) Reação ocorreu.

3.3.4 Tentativas de funcionalização dos produtos obtidos nas rotas anteriores

Objetivando estudar a reatividade química dos biclos obtidos em solução **109**, **132** e **133**, algumas reações foram realizadas e podem ser visualizadas no Esquema 3.13. A inserção de grupamento amina nesses anéis pirrolizidínicos foi planejada devido à reconhecida importância dos compostos aminados na terapêutica.

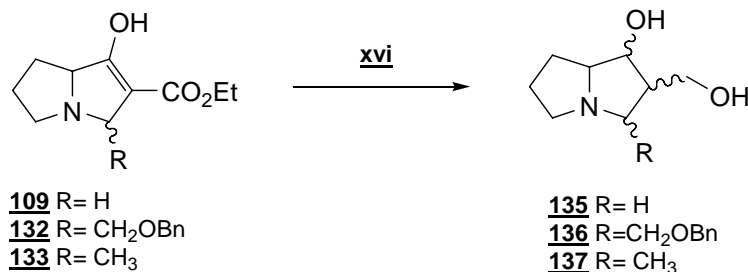


Esquema 3.13: Rota sintética em solução 4. i e iv) LiAlH₄, THF, 0°C - t.a., 5 horas; ii e v) MsCl, trietilamina, diclorometano, t.a., 2h 30 min; iii e vi) Diclorometano, n-propilamina, traços de bicarbonato de sódio, t.a., 3 dias; vii) Diclorometano, clorofórmio, TsCl, piridina, t.a., 3h.

3.3.4.a Primeira etapa: Redução dos grupamentos ligados ao biclo

Após a ciclização procedeu-se à redução dos grupamentos ligados ao biclo dos produtos **109**, **132** e **133** (reações i e iv). Constatou-se que ao utilizar 2.5 eq de

LiAlH_4 , na reação i, houve apenas a redução de um desses grupamentos ligados ao biciclo, onde o grupamento éster manteve-se inalterado (produto **134**).



Esquema 3.14: Redução dos grupamentos carbonílicos e carboxílicos dos produtos ciclizados. Condições: LiAlH_4 , THF, 0°C - t.a., 5 horas.

Na tentativa de reduzir também o grupamento éster, utilizou-se 4.0 e 5.0 eq de LiAlH_4 (reação iv), e os dados espectroscópicos confirmaram os produtos obtidos (**135**, **136** e **137**) na reação iv. Porém, observou-se que quanto mais LiAlH_4 utiliza-se, mais subproduto é formado. Pela análise do espectro de RMN APT do composto **135** (**Figura 3.4**) pode-se observar o desaparecimento dos picos correspondentes aos carbonos C_L em 173,9 ppm e C_f em 172,1 ppm, constatando-se que houve redução completa dos grupamentos carbonílicos.

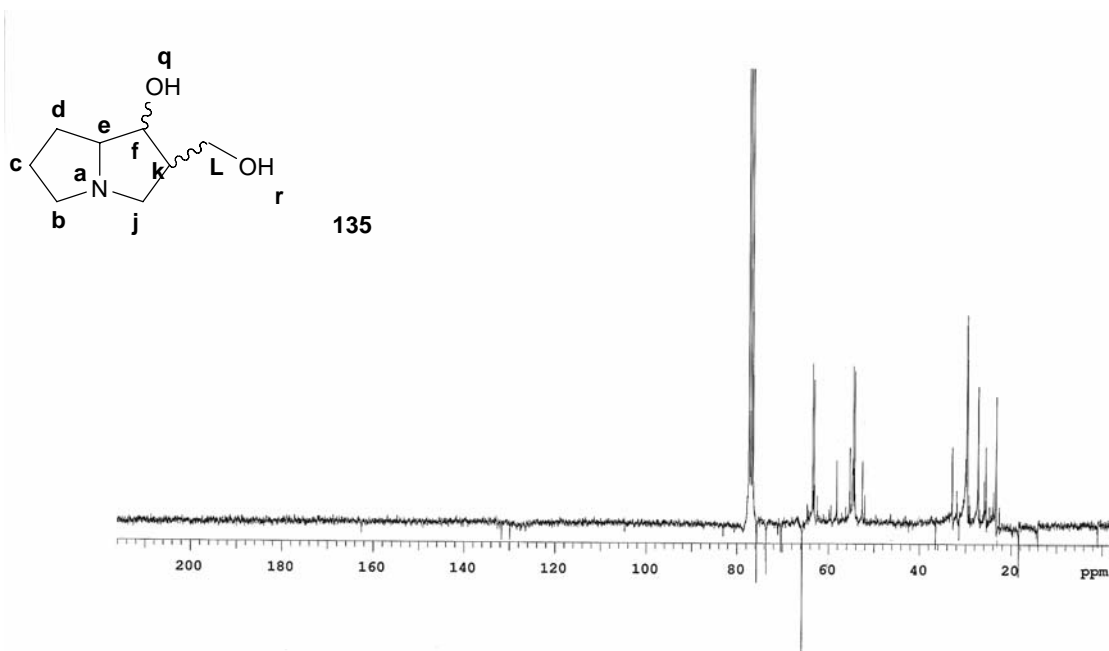


Figura 3.4: Espectro de APT do composto **135**.

Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando-se sílica gel como fase estacionária e etanol como fase móvel, fornecendo os produtos com rendimentos de 40-60%.

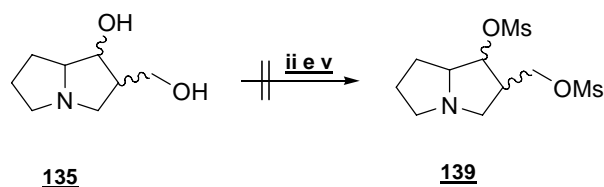
Tabela 3.5: Condições de redução dos compostos ciclizados.

Protocolo	LiAlH ₄	Solvente	Temperatura	Tempo	Rendimento
50	2,5 eq	THF	0°C - t.a.	5 horas	60 % ^a
51	4,0 eq	THF	0°C - t.a.	5 horas	60 % ^b
52	5,0 eq	THF	0°C - t.a.	5 horas	40 % ^c

a) Reduziu apenas o grupamento enol; b) Reduziu os dois grupamentos; c) Reduziu os dois grupamentos, mas gerou muitas impurezas.

3.3.4.b Segunda etapa: Mesilação e Tosilação dos compostos

No intuito de sintetizar análogos aminados dos alcalóides do tipo hiacintacina, procedeu-se à etapa seguinte: reação de mesilação (reações ii e v).



Esquema 3.15

Com a demora das análises espectroscópicas, optou-se por continuar a rota sintética, visto que por CCD pode-se constatar o aparecimento de um novo produto. Porém após as análises pode-se constatar que o produto é instável e degradou no tubo de RMN, entre uma análise e outra.

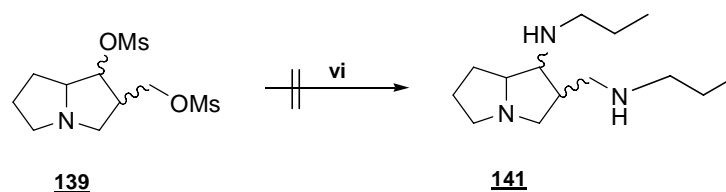
Tabela 3.6: Condições de mesilação do composto 135.

Protocolo	MsCl	Trietilamina	Solvente	Temperatura	Tempo
53	1,1 eq	1,5 eq	DCM / CHCl ₃	t.a.	2h 30 min ^a
54	2,2 eq	3,0 eq	DCM / CHCl ₃	t.a.	2 h 30 min ^a

a) Reação não ocorreu.

3.3.4.c Terceira etapa: Aminoação

A próxima etapa foi a de aminoação dos compostos mesilados (reação vi) utilizando-se a n-propilamina, porém não apresentou os produtos esperados tendo-se em vista que a etapa anterior não foi bem sucedida.



Esquema 3.16

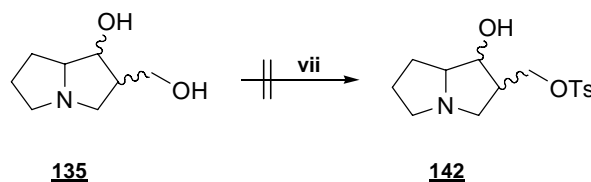
As condições reacionais estão apresentadas na **Tabela 3.7**, porém a análise espectroscópica não confirmou os produtos esperados.

Tabela 3.7: Condições de aminoação dos compostos mesilados.

Protocolo	n-propilamina	NaHCO ₃	Solvente	Temperatura	Tempo
55	1,5 eq	traços	DCM/ CHCl ₃	t.a.	3 dias ^a
56	3,0 eq	traços	DCM/ CHCl ₃	t.a.	3 dias ^a

a) Reação não ocorreu.

Para posterior reação com a amina, procedeu-se primeiramente à tosilação do produto **135**, utilizando o protocolo **57**: cloreto de tosilato (1,5 eq), clorofórmio seco e piridina (2 eq) a temperatura ambiente por 3 horas. Houve modificação no R_f do produto, porém a análise espectroscópica não confirmou a tosilação.



Esquema 3.17

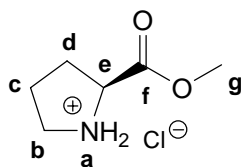
3.4 Conclusões

Pode-se concluir que a síntese em solução foi eficiente para a obtenção de análogos de alcalóides do tipo hiacintacina. A rota 2 mostrou-se mais favorável à obtenção dos compostos em questão e a rota 1 será testada com outros protocolos. Além disso, a terceira rota também precisa de estudos adicionais, mas já demonstra uma tendência de que análogos insaturados poderão ser obtidos. A maioria das reações apresentou rendimentos satisfatórios, porém ainda podem ser otimizadas a fim de evitar-se a etapa de purificação que causa muitas vezes perda ou degradação de alguns intermediários.

3.5 Parte Experimental

3.5.1 Obtenção dos produtos 114, 95, 115.

3.5.1.a Obtenção do produto 114



114

Óleo incolor a levemente dourado $C_6H_{12}NO_2Cl$ PM= 165 g/mol

A uma solução de metanol (2 ml) e *L*-prolina (1 Eq, 5 mmol) adicionou-se a 0° C o $SOCl_2$ (2 Eq, 10 mmol). Retirou-se o banho de gelo até atingir a t.a. e deixou-se em refluxo por 5 horas. Fez-se uma destilação a pressão ambiente.

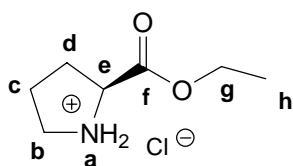
Rendimento: 95%.

RMN 1H (200MHz, D_2O , δ ppm): 4,85-4,25 (1H_e, m); 3,7 (3H_g, s); 3,4-3,2 (2H_b, m); 2,45-1,85 (2H_c+2H_d, m).

RMN APT (50MHz, D_2O , δ ppm): C-f (170,5); C-g (60,0); C-e (54,0); C-b (46,5); C-d (28,0); C-c (23,0).

IV (filme, DCM): 1745 cm^{-1} (C=O, éster), 1240 (C-O, éster).

3.5.1.b Obtenção do produto 95



95

Óleo incolor a levemente dourado $C_7H_{14}NO_2Cl$ PM= 179 g/mol

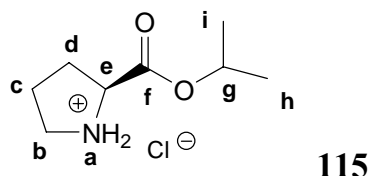
A uma solução de etanol (2 ml) e *L*-prolina (1 Eq, 5 mmol) adicionou-se a 0° C o $SOCl_2$ (2 Eq, 10 mmol). Retirou-se o banho de gelo até atingir a t.a. e deixou-se em refluxo por 5 horas. Fez-se uma destilação a pressão ambiente.

Rendimento: 95%.

RMN ^1H (200MHz, D_2O , δ ppm): 4,37 (1H_e, m); 4,21 (2H_g, q, $J=7,1$ Hz); 3,40-3,27 (2H_b, m); 2,40-1,91 (2H_c+2H_d, m); 1,19 (3H_h, t, $J=7,1$ Hz).

IV (filme, DCM): 1745 cm^{-1} (C=O, éster), 1240 (C-O, éster).

3.5.1.c Obtenção do produto 115



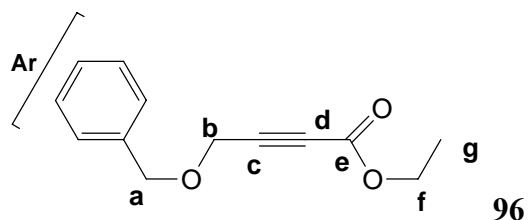
Óleo incolor a levemente dourado $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{Cl}$ PM= 193 g/mol

A uma solução de isopropanol (1.6 ml/mmol) e *L*-prolina (1 Eq) adicionou-se a 0° C o SOCl_2 (2 Eq). Retirou-se o banho de gelo até atingir a t.a. e deixou-se em refluxo por 5 horas. Fez-se uma destilação a pressão ambiente.

Rendimento: 96%.

IV (filme, DCM): 1745 cm^{-1} (C=O, éster), 1240 (C-O, éster).

3.5.2 Obtenção do produto 96



Óleo amarelo $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$ PM= 220 g/mol

A uma solução do alcino (1 eq) em THF seco adicionou-se o BuLi 1,25M (1,2 eq) a uma temperatura de -78 ° C, após 30 minutos adicionou-se o cloroformato de etila (3 eq). Após a adição retirou-se o banho de gelo e a reação atingiu a t.a. e reagiu por mais 3 horas. Ao encerrar adicionou-se água e NH_4Cl até PH 7. Após, lavou-se com solução saturada de NaCl, extraiu-se com éter etílico e destilou-se à pressão reduzida.

Rendimento: 64%.

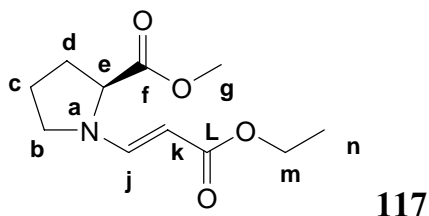
RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,31-7,38 (5H_{Ar} , m); 4,62 (2H_{a} , s); 4,29 (2H_{f} , s); 4,20 (2H_{b} , q, $J=7,1$ Hz); 1,32 (3H_{g} , t, $J=7,1$ Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-e (153,1); C-Ar (136,7; 128,5; 128,1; 127,9); C-c (83,1); C-d (78,2); C-a (72,0); C-f (62,1); C-b (56,7); C-g (14,0).

IV (filme, DCM): 2900 cm^{-1} (C-H), 2250 cm^{-1} (ligação tripla), 1950 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1710 cm^{-1} (C=O, éster), 1250 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.3 Obtenção dos produtos 117, 118, 119, 97, 121 e 122.

3.5.3.a Obtenção do produto 117



Óleo amarelo a marrom claro $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ PM= 227 g/mol

A uma solução de prolinato de metila (1 eq) em CH_3CN a 0°C adicionou-se DIPEA (3eq) em CH_3CN , após 15 minutos adicionou-se o propiolato de etila (1 eq) em CH_3CN . O banho de gelo foi retirado e a reação foi aquecida a 65°C por 2 dias. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor.

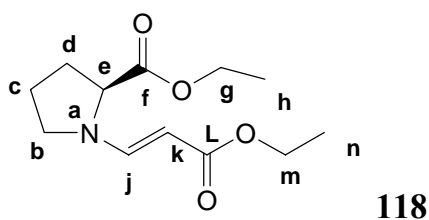
Rendimento: 80-95%.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,59 (1H_{j} , d, $J=13,2\text{Hz}$); 4,57 (1H_{k} , d, $J=13,2\text{Hz}$); 4,07-4,18 ($2\text{H}_{\text{m}}+1\text{H}_{\text{e}}$, m); 3,72 (3H_{g} , s); 3,20-3,50 (2H_{b} , m); 1,94-2,29 ($4\text{H}_{\text{c+d}}$, m); 1,26 (3H_{n} , t, $J=7,1\text{Hz}$).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-f (173,1); C-L (169,8); C-j (148,7); C-k (88,1); C-e (63,1); C-m (59,7); C-g (53,2); C-b (49,3); C-d (30,9); C-c (24,4); C-n (15,3).

IV (filme, DCM): 2981 cm^{-1} (C-H), 1743 cm^{-1} e 1689 cm^{-1} (C=O, éster e enaminoéster), 1614 cm^{-1} (C=C), 1145 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.3.b Obtenção do produto 118



Óleo amarelo a marrom claro $C_{12}H_{19}NO_4$ PM= 241 g/mol

A uma solução de prolinato de etila (1 eq) em CH_3CN a $0^\circ C$ adicionou-se DIPEA (3eq) em CH_3CN , após 15 minutos adicionou-se o propiolato de etila (1 eq) em CH_3CN . O banho de gelo foi retirado e a reação foi aquecida a $65^\circ C$ por 2 dias. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor.

Rendimento: 80-95%.

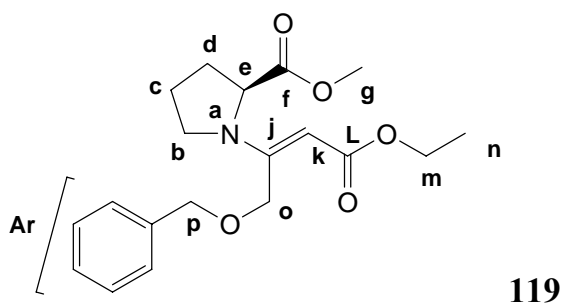
$[\alpha]_D^{20} = -73$ (C= 1,86, etanol)

RMN 1H (200MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 7,54 (1H_j, d, $J=13$ Hz); 4,52 (1H_k, d, $J=13$ Hz); 4,01-4,18 (2H_g+2H_m+1H_e, m); 3,40-3,22 (2H_b, m); 1,88-2,20 (2H_c+2H_d, m); 1,20 (3H_h+3H_n, t, $J=7,2$ Hz).

RMN APT (50MHz, $CDCl_3$, δ ppm): C-f (171,9); C-L (169,2); C-j (147,9); C-k (87,1); C-m (61,4); C-g (64,6); C- e (53,6); C-b (46,0); C-d (30,1); C-c (23,6); C-n (14,5); C-h (14,1).

IV(filme, DCM): 2981 cm^{-1} (C-H), 1743 cm^{-1} e 1689 cm^{-1} (C=O, éster e enaminoéster), 1614 cm^{-1} (C=C), 1145 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.3.c Obtenção do produto 119



Óleo amarelo a marrom claro $C_{14}H_{25}NO_5$ PM= 287 g/mol

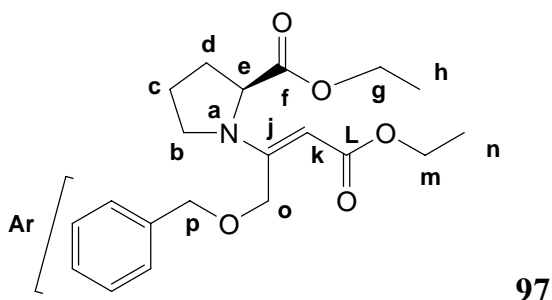
A uma solução de prolinato de metila (1 eq) em CH₃CN foi adicionada DIPEA (1eq) a 0° C, após 15 minutos adicionou-se o inoato (1 eq). Retirou-se o banho de gelo e a reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 dias. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor. Rendimento: 75%.

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, δ ppm): 7,28-7,36 (5H_{Ar}, m); 4,93 (2H_o, s); 4,49-4,73 (1H_e+1H_k+2H_p, m); 4,12 (2H_m, q, *J*= 7,1Hz); 3,30-3,62 (2H_b+3H_g, m); 1,89-2,22 (2H_c+2H_d, m); 1,26 (3H_n, t, *J*=7,1Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl₃, δ ppm): C-f (173,2); C-L (168,2); C- j (155,9); C-Ar (138,0; 128,1; 128,0; 127,6); C-k (88,5); C-p (72,3); C-o (64,1); C-e (60,4); C-m (58,8); C-g (52,1); C-b (48,4); C-d (30,5); C-c (22,7); C-n (14,6).

IV (filme, DCM): 2983 cm⁻¹ (C-H), 1850-1900 cm⁻¹ (harmônicas de aromático), 1743 cm⁻¹ (C=O, éster), 1675 cm⁻¹ (C=C), 1453 cm⁻¹ (C=C, aromático), 1143 cm⁻¹ (C-O, éster).

3.5.3.d Obtenção do produto 97



Óleo amarelo a marrom claro C₁₅H₂₇NO₅ PM= 301 g/mol

A uma solução de prolinato de etila (1 eq) em CH₃CN foi adicionada DIPEA (1eq) a 0° C, após 15 minutos adicionou-se o inoato (1 eq). Retirou-se o banho de gelo e a reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 dias. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor.

Rendimento: 75%.

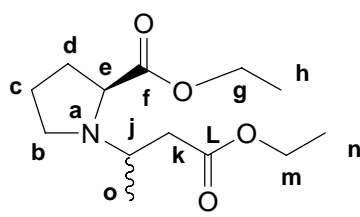
$[\alpha]_D^{20} = -11$ (C= 2,50, etanol)

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,27-7,35 (5H_{Ar} , m); 4,91 (2H_{o} , s); 4,47-4,63 ($1\text{H}_{\text{e}}+1\text{H}_{\text{k}}+2\text{H}_{\text{p}}$, m); 3,98-4,15 ($2\text{H}_{\text{m}}+2\text{H}_{\text{g}}$, m); 3,25-3,51 (2H_{b} , m); 1,90-2,12 ($2\text{H}_{\text{c}}+2\text{H}_{\text{d}}$, m); 1,17 ($3\text{H}_{\text{h}}+3\text{H}_{\text{n}}$, t, $J=7,1\text{Hz}$).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-f (172,7); C-L (168,2); C- j (155,9); C-Ar (138,1; 128,5; 128,2; 128,0; 127,8; 127,5); C-k (88,5); C-p (72,2); C-g (64,1); C-o (61,3); C-m (60,9); C-e (60,5); C-b (48,3); C-d (30,4); C-c (24,4); C-n (14,5); C-h (14,0).

IV (filme, DCM): 2983 cm^{-1} (C-H), 1850-1900 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1743 cm^{-1} (C=O, éster), 1675 cm^{-1} (C=C), 1453 cm^{-1} (C=C de aromático), 1143 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.3.e Obtenção do produto 121



121

Óleo laranja $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ PM= 257 g/mol

A uma solução de prolinato de etila (1 eq) em CH_3CN a 0°C adicionou-se DIPEA (1.5eq) em CH_3CN , após 15 minutos adicionou-se o crotonoato de etila (1 eq) em CH_3CN . O banho de gelo foi retirado e a reação foi aquecida a 65°C por 42 horas. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

Rendimento: 60 %.

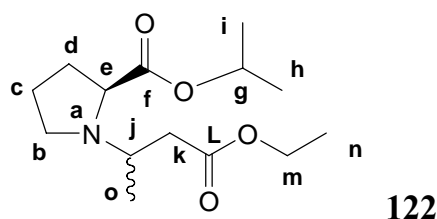
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7$ (C= 2,28, etanol)

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,10 (2H_{m} , q, $J=7,1\text{Hz}$); 4,05 (2H_{g} , q, $J=7,1\text{Hz}$); 3,54-3,49 (1H_{e} , m); 3,41-3,37 (2H_{b} , m); 3,23-3,21 (1H_{j} , m); 2,38-2,32 (2H_{k} , m); 2,10-1,98 ($2\text{H}_{\text{c}}+2\text{H}_{\text{d}}$, m); 1,31 (3H_{o} , d, $J=6,8\text{Hz}$); 1,22 ($3\text{H}_{\text{h}}+3\text{H}_{\text{n}}$, t, $J=7,6\text{Hz}$).

RMN APT (50MHz, CDCl₃, δ ppm): C-L (167,3); C-f (166,2); C-g (65,2); C-e (58,3); C-j (53,1); C-m (45,1); C-b (43,1); C-k (41,5); C-d (28,0); C-c (22,6); C-o (17,0); C-n (11,9); C-h (11,6).

IV (filme, DCM): 2981 cm⁻¹ (C-H), 1737 cm⁻¹ (C=O, éster), 1197 cm⁻¹ (C-O, éster).

3.5.3.f Obtenção do produto 122



Óleo laranja C₁₄H₂₅NO₄ PM= 271 g/mol

A uma solução de prolinato de isopropila (1 eq) em CH₃CN a 0° C adicionou-se DIPEA (1.5eq) em CH₃CN, após 15 minutos adicionou-se o crotonato de etila (1 eq) em CH₃CN. O banho de gelo foi retirado e a reação foi aquecida a 65 ° C por 42 horas. Filtrou-se o precipitado branco formado e evaporou-se em rota vapor. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

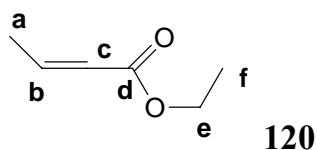
Rendimento: 60 %.

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, δ ppm): 5,04- 4,98 (1H_g, m); 4,33 (2H_m, q, J= 6,8 Hz); 3,54-3,49 (1H_e, m); 3,41-3,37 (2H_b, m); 3,23-3,21 (1H_j, m); 2,38-2,32 (2H_k, m); 2,10-1,98 (2H_c+2H_d, m); 1,41 (3H_h+3H_i, d, J=6,7 Hz); 1,31 (3H_o, d, J=6,8 Hz); 1,22 (3H_n, t, J=7,6 Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl₃, δ ppm): C-L (167,5); C-f (166,5); C-g (69,9); C-e (58,3); C-j (53,2); C-m (45,1); C-b (43,2); C-k (41,6); C-d (28,0); C-c (22,8); C-h e C-i (20,8); C-o (17,1); C-n (11,6).

IV (filme, DCM): 2981 cm⁻¹ (C-H), 1737 cm⁻¹ (C=O, éster), 1197 cm⁻¹ (C-O, éster).

3.5.4 Obtenção do produto 120



Óleo incolor $C_6H_{10}O_2$ PM= 114 g/mol

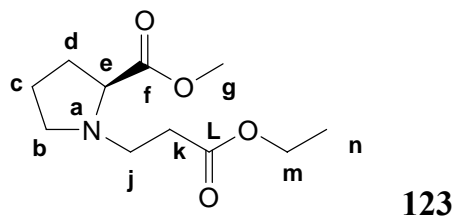
Ao ácido crotônico (1 eq) adiciona-se álcool etílico (1,1 eq) e diclorometano, após adiciona-se DMAP (0,1eq). Resfria-se a reação a 0 ° C e adiciona-se o DIC (1 eq). A reação permaneceu por 30 minutos a 0 ° C e 18 horas a t.a., foi filtrada e evaporada em evaporador rotatório.

Rendimento: 80%

IV (filme, DCM): desaparecimento da banda de hidroxila em 3200 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} (C=O, éster), 1245 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.5 Obtenção dos produtos 123, 124, 125 e 126.

3.5.5.a Obtenção do produto 123



Óleo amarelo $C_{11}H_{19}NO_4$ PM= 229 g/mol

A uma solução de ácido acético (21 eq) e CH_3CN (6ml / mmol) foi adicionado o $NaBH_4$ (7 eq) em CH_3CN lentamente, a uma temperatura de 0° C. Após o término do borbulhamento adicionou-se o enaminoéster (1 eq) em CH_3CN . A reação permaneceu por 1 hora e 30 minutos a 0° C e atingiu a t.a. nos últimos 30 minutos de reação. A reação foi encerrada com 7 ml de água, 3 ml de CH_2Cl_2 , 3 ml de hexano e NH_4Cl até PH 5. Após extraiu-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 e evaporou-se o solvente. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando silica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

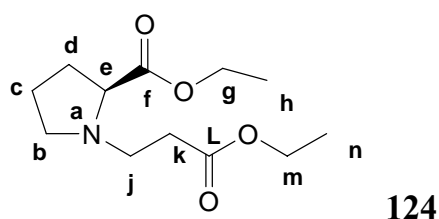
Rendimento: 65%.

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,14 (2H_m , q, $J=7,1\text{Hz}$); 3,73 (3H_g , s); 2,98-3,28 ($2\text{H}_b+1\text{H}_e$, m); 2,66-2,85 (1H_j , m); 2,35-2,59 ($2\text{H}_k+1\text{H}_j$, m); 2,02-2,23 (1H_d , m); 1,79-2,02 ($2\text{H}_c+1\text{H}_d$, m); 1,26 (3H_n , t, $J=7,1\text{Hz}$).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-L (174,2); C-f (172,0); C-g (65,6); C-m (60,5); C-j (53,2); C-e (52,0); C-b(49,7); C-k (33,5); C-d (29,2); C-c (23,1); C-n (14,2).

IV (filme, DCM): 2981 cm^{-1} (C-H), 1737 cm^{-1} (C=O, éster), 1197 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.5.b Obtenção do produto 124



Óleo amarelo $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ PM= 243 g/mol

A uma solução de ácido acético (21 eq) e CH_3CN (6ml / mmol) foi adicionado o NaBH_4 (7 eq) em CH_3CN lentamente, a uma temperatura de 0°C . Após o término do borbulhamento adicionou-se o enaminoéster (1 eq) em CH_3CN . A reação permaneceu por 1 hora e 30 minutos a 0°C e atingiu a t.a. nos últimos 30 minutos de reação. A reação foi encerrada com 7 ml de água, 3 ml de DCM, 3 ml de hexano e NH_4Cl até PH 5. Após extraiu-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 e evaporou-se o solvente. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

Rendimento: 65%.

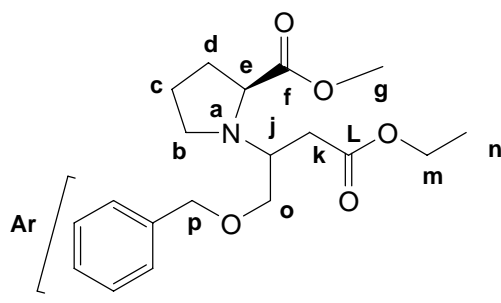
$[\alpha]_D^{20} = -12$ (C= 0,93, etanol)

RMN ^1H (200MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,12 (2H_m , q, $J=7,1\text{Hz}$); 4,07 (2H_g , q, $J=7,1\text{Hz}$); 3,23-3,20 (1H_e , m); 3,08-2,96 (2H_b , m); 2,80-2,67 (2H_j , m); 2,51-2,41 (2H_k , m); 2,11-1,73 ($2\text{H}_c+2\text{H}_d$, m); 1,20 ($3\text{H}_h+3\text{H}_n$, t, $J=7,1\text{Hz}$).

RMN APT (50MHz, CDCl₃, δ ppm): C-f (173,9); C-L (172,0); C-g (65,4); C-m (60,3); C-j (52,9); C-e (51,7); C-b (49,5); C-k (33,2); C-d (29,0); C-c (22,8); C-n (13,9); C-h (13,8).

IV (filme, DCM): 2981 cm⁻¹ (C-H), 1737 cm⁻¹ (C=O, éster), 1197 cm⁻¹ (C-O, éster).

3.5.5.c Obtenção do produto 125



Óleo amarelo a marrom claro C₁₄H₂₇NO₅ PM= 289 g/mol

A uma solução de ácido acético (21 eq) e CH₃CN (6ml / mmol) foi adicionado o NaBH₄ (7 eq) em CH₃CN lentamente, a uma temperatura de 0° C. Após o término do borbulhamento adicionou-se o enaminoéster (1 eq) em CH₃CN. A reação permaneceu por 1 hora e 30 minutos a 0° C e atingiu a t.a. nos últimos 30 minutos de reação. A reação foi encerrada com 7 ml de água, 3 ml de CH₂Cl₂, 3 ml de hexano e NH₄Cl até PH 5. Após extraiu-se a fase aquosa com DCM e evaporou-se o solvente. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

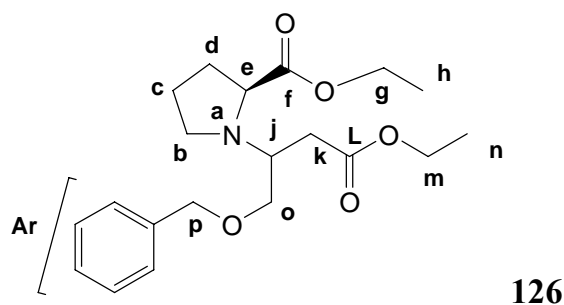
Rendimento: 65%.

RMN ¹H (200MHz, CDCl₃, δ ppm): 7,23-7,42 (5H_{Ar}, m); 4,49 (2H_p, s); 4,08 (2H_m, q, J= 7,1Hz); 3,67 (3H_g, s); 3,45-3,75 (1H_e+2H_j+2H_o, m); 3,03-3,16 (1H_b, m); 2,64-2,84 (1H_b); 2,51-2,62 (2H_k, m); 1,71-2,15 (2H_c+H_d, m); 1,22 (3H_n, t, J= 7,1Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl₃, δ ppm): C-L (175,3); C-f (172,4); C-Ar (138,2; 128,2; 127,5; 127,4); C-p (73,0); C-o (71,7); C-e (62,4); C-m (60,3); C-j (56,4); C-g (51,7); C-b (48,9); C-k (33,9); C-d (29,7); C-c (23,7); C-n (14,1).

IV (filme, DCM): 2979 cm⁻¹ (C-H), 1969 cm⁻¹ a 1890 cm⁻¹ (harmônicas de aromático), 1735 cm⁻¹ (C=O, éster), 1454 cm⁻¹ (C=C), 1182 cm⁻¹ (C-O, éster).

3.5.5.d Obtenção do produto 126



Óleo amarelo a marrom claro $C_{15}H_{29}NO_5$ PM= 303 g/mol

A uma solução de ácido acético (21 eq) e CH_3CN (6ml / mmol) foi adicionado o $NaBH_4$ (7 eq) em CH_3CN lentamente, a uma temperatura de $0^\circ C$. Após o término do borbulhamento adicionou-se o enaminoéster (1 eq) em CH_3CN . A reação permaneceu por 1 hora e 30 minutos a $0^\circ C$ e atingiu a t.a. nos últimos 30 minutos de reação. A reação foi encerrada com 7 ml de água, 3 ml de CH_2Cl_2 , 3 ml de hexano e NH_4Cl até PH 5. Após extraiu-se a fase aquosa com CH_2Cl_2 e evaporou-se o solvente. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente acetato de etila/ hexano na proporção de 4:1.

Rendimento: 65%.

$[\alpha]_D^{20} = -18$ (C= 2,26, etanol)

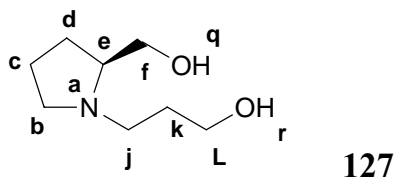
RMN 1H (200MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 7,38-7,24 ($5H_{Ar}$, m); 4,49 ($2H_p$, s); 4,17 ($2H_m$, q, $J = 7,1Hz$); 4,09 ($2H_g$, q, $J = 7,1Hz$); 3,45-3,71 ($1H_e + 2H_j + 2H_o$, m); 3,01-3,12 ($1H_b$, m); 2,59-2,77 ($1H_b$); 2,53-2,59 ($2H_k$, m); 2,05-1,79 ($2H_c + H_d$, m); 1,24 ($3H_h + 3H_n$, t, $J = 7,1Hz$).

RMN APT (50MHz, $CDCl_3$, δ ppm): C-L (172,1); C-f (171,9); C-Ar (137,9; 128,2; 127,5; 127,3); C-p (72,9); C-o (71,3); C-e (62,3); C-m (60,4); C-j (56,4); C-g (49,2); C-b (48,9); C-k (33,6); C-d (29,4); C-c (23,4); C-h (13,9); C-n (13,9).

IV (filme, DCM): 2979 cm^{-1} (C-H), 1969 cm^{-1} a 1890 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1735 cm^{-1} (C=O, éster), 1454 cm^{-1} (C=C), 1182 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.6 Obtenção dos produtos 127 e 128

3.5.6.a Obtenção do produto 127



Óleo amarelo $C_8H_{17}NO_2$ PM= 159 g/mol

Ao $LiAlH_4$ (2,66 eq) adicionou-se THF seco a $0^\circ C$ sob atmosfera inerte, após adicionou-se o diéster (1 eq) em THF seco. Retirou-se o banho de gelo e a reação atingiu t.a. onde permaneceu por 5 horas quando adicionou-se água (4,12 eq, 4,78 mmol) e NaOH 5% (2,6 eq, 1,16 mmol) e manteve-se a mistura reacional t.a. *overnigth*.

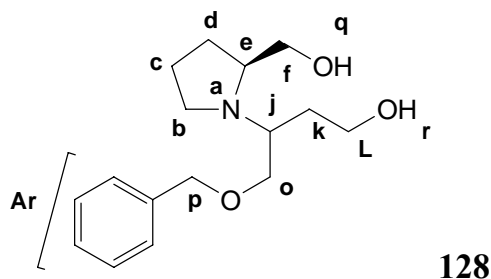
Rendimento: 95 %.

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 3,41-3,90 ($2H_f+2H_L$, m); 2,23-2,71 ($2H_b+2H_j+1H_e$, m); 1,62-1,91 ($2H_c+2H_d+2H_k$, m).

RMN APT (50MHz, $CDCl_3$, δ ppm): C-e (66,0); C-L (63,7); C-f (63,5); C-b (54,8); C-j (54,5); C-c (29,9); C-d (27,5); C-k (23,5).

IV (filme, DCM): 3419 cm^{-1} (OH), 2968 cm^{-1} (C-H), 1051 cm^{-1} (C-O de álcool primário).

3.5.6.b Obtenção do produto 128



Óleo amarelo $C_{11}H_{25}NO_3$ PM= 219 g/mol

Ao LiAlH_4 (2,66 eq) adicionou-se THF seco a 0°C sob atmosfera inerte, após adicionou-se o diéster (1 eq) em THF seco. Retirou-se o banho de gelo e a reação atingiu t.a. onde permaneceu por 5 horas quando adicionou-se água (4,12 eq, 4,78 mmol) e NaOH 5% (2,6 eq, 1,16 mmol) e manteve-se a mistura reacional t.a. *overnight*.

Rendimento: 77 %

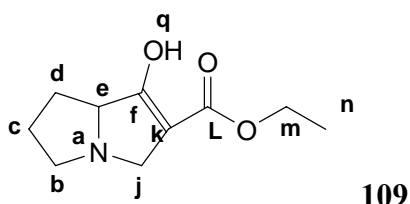
RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,37-7,18 (5H_{Ar} , m); 4,43 (2H_{p} , s); 3,64-3,23 ($2\text{H}_{\text{f}}+2\text{H}_{\text{L}}+2\text{H}_{\text{o}}$, m); 3,01-3,23 (1H_{e} , m); 2,72-2,98 ($2\text{H}_{\text{b}}+1\text{H}_{\text{j}}$, m); 1,43-1,81 ($2\text{H}_{\text{c}}+2\text{H}_{\text{d}}+2\text{H}_{\text{k}}$, m).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-Ar (138,0; 128,7; 128,6; 127,9); C-p (73,5); C-o (71,7); C-L (64,7); C-f (64,0); C-e (62,5); C-b (61,6); C-j (57,9); C-k (35,1); C-c (30,7); C-d (28,5).

IV (filme, DCM): 3384 cm^{-1} (OH), 2991 cm^{-1} (C-H), 1930 cm^{-1} a 1890 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1049 cm^{-1} (C-O de álcool primário).

3.5.7 Obtenção dos produtos 109, 132 e 133

3.5.7.a Obtenção do produto 109



Óleo marrom $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_3$ PM= 197 g/mol

A uma solução do éster (1eq) em THF seco adicionou-se sódio metálico em excesso. A reação foi aquecida a refluxo por 4 horas. Encerrou-se a reação com HCl 3M até PH 1,5 e extraiu-se com clorofórmio. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol ou metanol.

Rendimento: 50-60%.

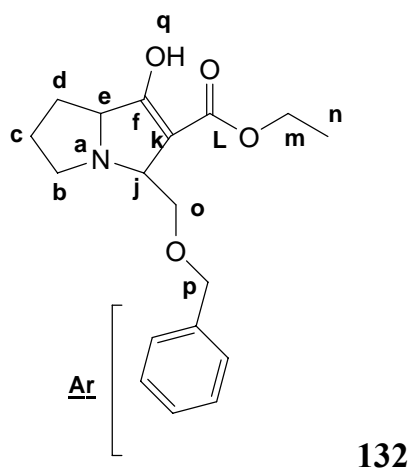
$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -16$ (C= 1,86, etanol)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,94 (2H_m , q, $J=7,1$ Hz); 2,96-2,81 ($1\text{H}_e+2\text{H}_j$, m); 2,49-2,29 (2H_b , m); 2,13-1,93 ($2\text{H}_c+2\text{H}_d$, m); 1,04 (3H_n , t, $J=7,1$ Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-L (173,9); C-f (172,1); C-k (119,1); C-e (65,7); C-m (60,5); C-j (53,1); C-b (49,7); C-d (33,7); C-c (23,0); C-n (14,0).

IV (filme, DCM): 3241 cm^{-1} OH, enol), 1685 cm^{-1} (C=O, éster), 1661 cm^{-1} (C=C), 1096 cm^{-1} (C-O, éster), 908 cm^{-1} (C=C fora do plano).

3.5.7.b Obtenção do produto 132



Óleo marrom $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ PM= 257 g/mol

A uma solução do éster (1eq) em THF seco adicionou-se sódio metálico em excesso. A reação foi aquecida a refluxo por 4 horas. Encerrou-se a reação com HCl 3M até PH 1,5 e extraiu-se com clorofórmio. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol ou metanol.

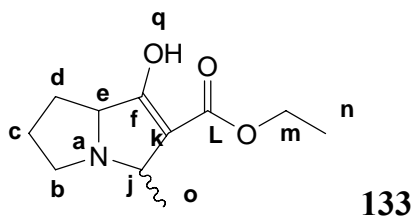
Rendimento: 50-60%.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,29-7,21 (5H_{Ar} , m); 4,59 (2H_p , s); 4,24-4,00 ($1\text{H}_j+2\text{H}_m$, m); 3,89-3,62 ($1\text{H}_e+1\text{H}_o$, m); 3,15-2,83 (2H_b , m); 2,33-1,89 ($2\text{H}_c+2\text{H}_d$, m); 1,20 (3H_n , t, $J=7,2$ Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-L (172,1); C-f (165,1); C-Ar (137,2; 127,8; 127,5; 127,2); C-k (120,1); C-p (72,6); C-e (70,1); C-j (68,5); C-o (67,6); C-m (60,2); C-b (56,6); C-d (26,9); C-c (24,0); C-n (13,7).

IV (filme, DCM): 3250 cm^{-1} (OH, enol), 2980 cm^{-1} (C-H), 1900-1950 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1694 cm^{-1} (C=O, éster), 1453 cm^{-1} (C=C), 1100 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.7.c Obtenção do produto 133



Óleo marrom $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ PM= 211 g/mol

A uma solução do éster (1eq) em THF seco adicionou-se sódio metálico em excesso. A reação foi aquecida a refluxo por 4 horas. Encerrou-se a reação com HCl 3M até PH 1,5 e extraiu-se com clorofórmio. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol ou metanol.

Rendimento: 55 %.

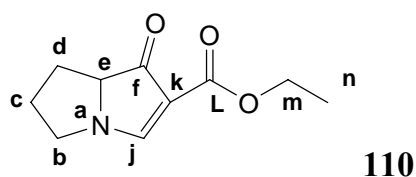
$[\alpha]_D^{20} = -6$ (C= 2,66, etanol)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,65 (2H_m, q, J= 7,1 Hz); 3,47-2,97 (1H_e+1H_j, m); 2,04 (2H_b, t, J= 7,2 Hz); 1,66-1,54 (2H_c+2H_d, m); 1,16 (32H_n, t, J= 7,1 Hz); 1,06 (3H_o, d, J= 7,4 Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-L (172,2); C-f (157,5); C-k (109,1); C-e (61,7); C-m (57,4); C-j (43,6); C-b (38,4); C-d (29,6); C-c (19,0); C-o (14,5); C-n (13,4).

IV(filme, DCM): 3241 cm^{-1} (OH, enol), 1685 cm^{-1} (C=O, éster), 1661 cm^{-1} (C=C), 1096 cm^{-1} (C-O, éster), 908 cm^{-1} (C=C fora do plano).

3.5.8 Obtenção do produto 110



Óleo marrom $C_{10}H_{13}NO_3$ PM= 195 g/mol

Rendimento: 80%

Ao enaminoéster adicionou-se DBU ou PPh_3 como catalisador e a reação ocorreu em microondas com potência de 540W durante 10 ciclos de 1 minuto cada, sem solvente. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente metanol/hidróxido de amônio na proporção de 9:1.

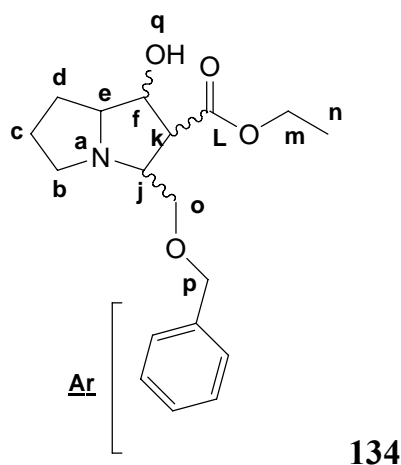
$[\alpha]_D^{20} = -1$ (C= 1,68, etanol)

RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$, δ ppm): 7,70 (1H_j, s); 3,60 (2H_m, q, $J= 7,1$ Hz); 3,38-3,00 (1H_e+2H_j+2H_c, m); 2,05-1,95 (2H_d, m); 1,50 (3H_n, t, $J= 7,1$ Hz).

RMN APT (50MHz, $CDCl_3$, δ ppm): C-f (176,5); C-L (166,2); C-j (132,5); C-k (98,1); C-e (60,3); C-m (49,5); C-b (45,04); C-d (27,5); C-c (23,2); C-n (14,0).

3.5.9 Obtenção dos produtos 134, 135, 136 e 137

3.5.9.a Obtenção do produto 134



Óleo marrom $C_{13}H_{25}NO_4$ PM= 259 g/mol

A uma solução contendo LiAlH_4 (2.5 eq) em THF seco adicionou-se o produto ciclizado (1eq) em THF seco a 0°C e atmosfera inerte. A reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 horas, após adicionou-se água (4.0 eq) e solução de NaOH 5% (0.125 ml/mmol) e deixou-se a reação *overnight*. A reação foi filtrada em funil de vidro sinterizado e concentrada em evaporador rotatório.

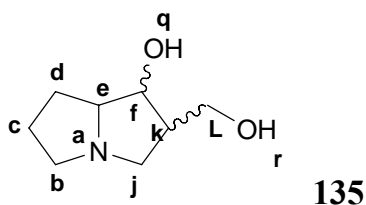
Rendimento: 50-60%.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,27-7,18 (5H_{Ar} , m); 4,59 (2H_{p} , s); 4,05 (2H_{m} , q, $J= 7,1$ Hz); 3,94 (1H_{j} , m); 3,73 (2H_{o} , m); 2,58-2,44 ($1\text{H}_{\text{e}}+2\text{H}_{\text{b}}$, m); 2,19 (1H_{k} , m); 1,81-1,76 ($2\text{H}_{\text{c}}+ 2\text{H}_{\text{d}}$, m); 1,19 (3H_{n} , t, $J= 6,7$ Hz).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-L (166,9); C-Ar (138,0; 128,2; 127,8; 127,5); C-p (72,9); C-f (70,6); C-o (69,3); C-e (65,0); C-m (62,9); C-j (58,9); C-b (56,4); C-k (49,1); C-d (27,5); C-c (24,3), C-n (14,0).

IV (filme, DCM): 3350 cm^{-1} (OH), 2980 cm^{-1} (C-H), $1900\text{-}1950\text{ cm}^{-1}$ (harmônicas de aromático), 1694 cm^{-1} (C=O, éster), 1453 cm^{-1} (C=C), 1100 cm^{-1} (C-O, éster).

3.5.9.b Obtenção do produto 135



Óleo marrom claro a alaranjado $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_2$ PM= 157 g/mol

A uma solução contendo LiAlH_4 (4.0 e 5.0 eq) em THF seco adicionou-se o produto ciclizado (1eq) em THF seco a 0°C e atmosfera inerte. A reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 horas, após adicionou-se água (4.0 eq) e solução de NaOH 5% (0.125 ml/mmol) e deixou-se a reação *overnight*. A reação foi filtrada em funil de vidro sinterizado e concentrada em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol 99%.

Rendimento: 52%.

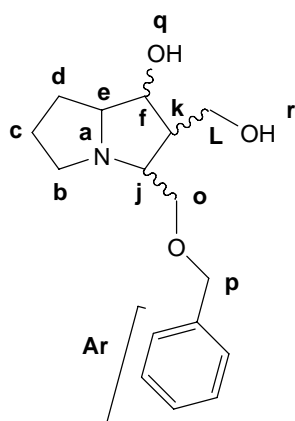
$[\alpha]_D^{20} = -1$ (C= 2,37, etanol)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,96-4,62 (1H_f, m); 3,66-3,52 (2H_L, m); 2,62-2,31 (2H_b+1H_e+2H_j, m); 27-2,10(1H_k, m); 2,02-1,45 (H_c+H_d, m).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-f (73,6); C-e (65,7); C-L (63,4); C-b (58,1); C-j (52,5); C-k (36,4); C-d (29,6); C-c (23,2).

IV(filme, DCM): 3380 cm^{-1} (OH), 2945 cm^{-1} (C-H), 1265 cm^{-1} (C-N).

3.5.9.c Obtenção do produto 136



136

Óleo marrom claro a alaranjado $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{NO}_3$ PM= 203 g/mol

A uma solução contendo LiAlH_4 (4.0 e 5.0 eq) em THF seco adicionou-se o produto ciclizado (1eq) em THF seco a 0 ° C e atmosfera inerte. A reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 horas, após adicionou-se água (4.0 eq) e solução de NaOH 5% (0.125 ml/mmol) e deixou-se a reação *overnight*. A reação foi filtrada em funil de vidro sinterizado e concentrada em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol 99%.

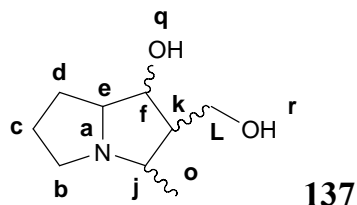
Rendimento: 52%.

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 4,51-4,37 (1H_f+2H_p, m); 3,71-3,45 (2H_L+2H_o, m); 3,37-2,70 (2H_b+1H_e+1H_j, m); 1,96-1,39 (2H_c+2H_d+1H_k, m).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-Ar (137,4; 128,2; 127,7; 127,6); C-p (73,3); C-f (72,3); C-o (69,6); C-e (67,5); C-j (66,6); C-b (54,8); C-k (51,1); C-d (28,4); C-c (24,2).

IV (filme, DCM): 3350 cm^{-1} (OH), 2945 cm^{-1} (C-H), 1600 cm^{-1} (C=C), 1950 cm^{-1} a 1850 cm^{-1} (harmônicas de aromático), 1095 cm^{-1} (C-O, éter), 1250 cm^{-1} (C-N).

3.5.9.d Obtenção do produto 137



Óleo marrom claro a alaranjado $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_2$ PM= 171 g/mol

A uma solução contendo LiAlH_4 (4.0 e 5.0 eq) em THF seco adicionou-se o produto ciclizado **133** (1eq) em THF seco a 0 ° C e atmosfera inerte. A reação atingiu t.a. e permaneceu por 5 horas, após adicionou-se água (4.0 eq) e solução de NaOH 5% (0.125 ml/mmol) e deixou-se a reação *overnight*. A reação foi filtrada em funil de vidro sinterizado e concentrada em evaporador rotatório. A purificação foi feita por cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluente etanol 99%.

Rendimento: 52%.

$[\alpha]_D^{20} = -1,3$ (C= 3,64, etanol)

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3,97-3,89 (1 H_f , m); 3,56-3,29 (2 H_L , m); 2,91-2,82 (1 H_j , m); 2,59-2,37 (1 H_e , m); 2,23-2,12 (2 H_b , m); 2,00 (H_k , t, $J= 7,1$ Hz); 1,86-1,47 (2 H_c+2H_d , m).

RMN APT (50MHz, CDCl_3 , δ ppm): C-f (66,5); C-e (63,5); C-L (62,0); C-j (59,9); C-b (57,7); C-k (39,1); C-d (29,8); C-c (24,2); C-o (18,2).

IV(filme, DCM): 3380 cm^{-1} (OH), 2945 cm^{-1} (C-H), 1265 cm^{-1} (C-N).

3.6 Referências

1. Martinez, P. D.G. Estudo da adição de aminas em alcinos ativados: preparação de intermediários para a síntese de heterociclos nitrogenados. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Química, UFRGS, Programa de pós-graduação em química, 121p, 2005.
2. ENDERS, D.; KIPPHARDT, H.; GERDES, P.; BRENAVALLE, L.J.; BHUSHAN, V. Large-scale preparation of versatile chiral auxiliaries derived from (s)-proline. **Bulletin des societes Chimiques Belges**, v. 97, p. 691-704, 1988.
3. a) CRISP, G.T.; MILLAN, M.J. Conjugate addition of amino acid side chains to alkynones and alkynoic acid derivatives. **Tetrahedron**, v. 54, p. 637-648, 1998.; b) WALTER, P.; HARRIS, T.M. Annulation of ethyl propiolate with ethyl pipercolate. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 4250-4252, 1978.; c) MA, D.W.; ZHU, W. Two-Component Method to Enantiopure Quinolizidinones and Indolizidinones. Total Synthesis of (-)-Lasubine II . **Organic Letters**, v. 3, p. 3927-3929, 2001.
4. CIMARELLI, C.; PALMIERI, G. Stereoselective Reduction of Enantiopure β -Enamino Esters by Hydride: A Convenient Synthesis of Both Enantiopure β -Amino Esters. **Journal of Organic Chemistry**, v. 61, p. 5557-5563, 1996.
5. MARSHALL, J.A. AND CARROLL, R.D. Reduction of Alkylidenecyanoacetates with sodium borohydride. **Journal of Organic Chemistry**, v. 30, p. 2748-2754, 1965.
6. DEBROY, P.; NASKAR, D.; ROY, S.A. Facile transesterification route to ferrocenyl Esters. **Inorganic Chimica Acta**, v. 359, p. 1215-1221, 2006.
7. MARSHALL, J.A. AND PIKE, M.T. Stereoselective synthesis of α and β -agarofuran **Journal of Organic Chemistry**, v. 33, p. 435-437, 1968.
8. TOJO, G.; FERNANDEZ, M. **Chromium-Based Reagents**: Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones, p. 46-83.

4 CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3 – ENSAIOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES

Neste capítulo serão abordados os resultados dos testes biológicos desenvolvidos *in vitro* com alguns compostos sintetizados neste trabalho e também com alguns intermediários da síntese.

Os testes só foram possíveis de serem realizados devido ao interesse dos professores colaboradores de diversas equipes, que colocaram seus laboratórios, conhecimentos e experiência à disposição. Agradecemos a todos por isso, antecipadamente.

4.1 Atividade antifúngica

Os testes foram realizados pela profa Dra Suzana Zacchino na Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas de Rosário na Argentina.

4.1.1 Introdução

Um dos desafios da pesquisa aplicada à micologia é o desenvolvimento de novos fármacos, em decorrência da baixa eficiência e/ou da toxicidade dos antifúngicos empregados no tratamento das micoses sistêmicas, oportunistas e/ou disseminadas. O aumento significativo da incidência de micoses em indivíduos com quadros de imunocomprometimento como HIV positivos, pacientes transplantados, diabéticos, traumatismos como queimaduras, técnicas instrumentais diagnósticas ou terapêuticas agressivas (cateteres, sondas, próteses) e alguns hábitos como o uso de drogas fornece a real dimensão da relevância do estudo destas patologias. A avaliação do impacto das micoses invasoras se completa com a aparição de novas formas clínicas de micoses não descritas, devido à variação nos tipos de fungos patogênicos e na seleção de cepas resistentes resultantes da exposição a diversos antifúngicos¹.

As infecções fúngicas são causadas principalmente por leveduras, mofo, dermatófitos e fungos dimórficos. A levedura *Candida albicans* é uma das maiores causadoras de infecção, sendo normalmente encontrada na região orofaríngea, trato gastrointestinal e vagina. É responsável pela maioria das infecções vaginais e orais, que ocorrem devido a distúrbios na população normal da flora, por uso de antibióticos, ou por flutuações hormonais. Em pacientes imunocomprometidos provocam infecções sistêmicas profundas que podem ser fatais².

Alguns dos fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas (sistêmicas e superficiais) são anfotericina B, azóis, flucitosina (pró-fármaco), tiocarbamatos, terbinafina e griseofulvina³.

Existem relatos na literatura de que alguns alcalóides pirrolizidínicos apresentam atividade antifúngica⁴⁻⁷, como por exemplo a Lasiocarpina N-óxido que inibiu o crescimento dos fungos *Curvularia lunata* e *Fusarium moniliforme*⁸ e a lasiocarpina livre que inibiu o crescimento de *Aspergillus niger*⁹.

4.1.2 Objetivos

Objetiva-se com este teste avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos compostos **135**, **136** e **137** sintetizados em solução, frente a diversas cepas de fungos.

4.1.3 Resultados e discussão

Os produtos **135**, **136** e **137** (**Figura 4.1**) foram purificados em cromatografia em coluna e testados em nove microorganismos diferentes, conforme tabela abaixo, e não apresentaram atividade antifúngica significativa nas condições do experimento.

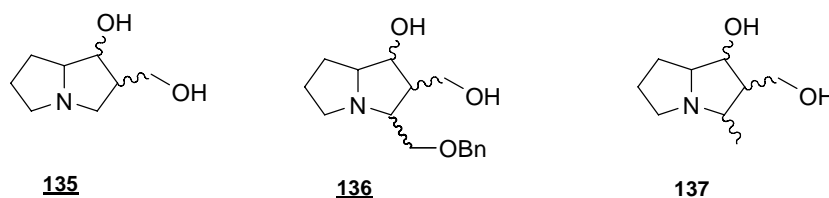


Figura 4.1: Produtos sintetizados e testados para atividade antifúngica.

Tabela 4.1: Concentração Inibitória Mínima CIM e Concentração fungicida mínima*.

	Ca	Sc	Cn	Afu	Afl	Ani	Mg	Tr	Tm
Produto 135	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Produto 136	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Produto 137	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Anfotericina B	0,78	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,125	0,075	0,075
Terbinafina	1,56	3,12	0,39	0,78	0,78	1,56	0,04	0,01	0,025
Cetoconazol	0,5	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,05	0,025	0,025

*A presença de apenas um valor, indica que os valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) e da CFM ($\mu\text{g/mL}$) são semelhantes.

Apesar dos produtos testados não apresentarem atividade contra os microrganismos em questão, sugere-se que sejam feitas modificações estruturais levando-se em consideração as estruturas dos alcalóides pirrolizidínicos que apresentam atividade antifúngica, como por exemplo a Lasiocarpina⁹ e a Europina^{4,5}.

Estes compostos normalmente apresentam grupamentos polares como hidroxilas, carboxilas e aminas, além de ligações duplas.

4.1.4 Conclusões

Os produtos testados não apresentaram atividade antifúngica nas condições dos experimentos, porém não se descarta a possibilidade de modificá-los e testá-los novamente para esta atividade. Já que existem relatos na literatura de alguns alcalóides pirrolizidínicos que possuem atividade antifúngica.

4.1.5 Parte experimental

4.1.5.a Microrganismos e meios

Para a avaliação da atividade antifúngica dos produtos **136**, **137** e **138**, foram usadas cepas da American Type Culture Collection Rockville, MD, EUA (ATCC) e do CEREMIC (C), Centro de referência Micológica, Faculdade de ciências Bioquímicas e farmacêuticas, Rosário, Argentina: Ca: *Candida albicans* ATCC 10231, Sc: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, Cn: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, An: *Aspergillus niger* ATCC 9029, Afu: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, Afl: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, Mg: *Microsporium gypseum* C 115, Tr: *Trichophyton rubrum* C113, Tm: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972. Os microrganismos cresceram em ágar inclinado sabouraud-cloranfenicol por 48 horas a 30°C.

4.1.5.b Testes de susceptibilidade antifúngica

A concentração inibitória mínima (CIM) para cada produto isolado foi determinada usando a técnica de microdiluição do caldo em microplacas de 96 poços como descrito pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos para leveduras (M27-A2)¹⁰ e para fungos filamentosos (M 38 A)¹¹. Os valores de CIMs foram determinados em meio de cultura apropriado- RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), tamponado (pH=7,0) com MOPS (ácido morfopropileno sulfônico). A inoculação inicial foi de aproximadamente 1×10^3 a 5×10^3 UFC/ml (UFC= unidades

formadoras de colônias). As placas foram mantidas em câmara escura por 35°C para o desenvolvimento de leveduras e hialofitomicetos, e a 28-30°C para dermatófitos. A CIM foi definida como a concentração inibitória mínima da amostra a qual resultou na total inibição do crescimento dos fungos, após um período de 48hs de incubação. A suscetibilidade dos fármacos utilizados como padrões cetoconazol, terbinafina e anfotericina B foi definida como a concentração mais baixa do fármaco a qual resulta na total inibição do crescimento do fungo.

Para os ensaios, as amostras dos produtos isolados foram solubilizadas em DMSO (concentração final de 1%) e submetidas a uma série de duas diluições com RPMI 1640, obtendo-se concentrações entre 800- 0,98µg/mL, com volume final de 100µL. Este volume foi adicionado a cada halo, com exceção do controle, onde a água esterilizada foi adicionada ao poço. A CIM foi definida como a concentração inibitória mínima do produto que resultou em total inibição do crescimento do fungo.

Para a realização da avaliação antifúngica com os ensaios de microdiluição em caldo, as concentrações dos produtos até 100µg/mL foram incorporados aos meios de crescimento seguindo as diretrizes do NCCLS^{10,11}. A concentração inibitória mínima considerada ativa para os produtos foi $CIM \leq 200 \mu\text{g/mL}$.

4.1.6 Referências

1. MILAN, E. P.; BURATTIN, M. N.; KALLA'S, E. G.; FISCHMANN, O.; COSTA, P. R. O., COLOMBO, A. L. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **1998**, 32, 211–216.
2. FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. *Principles of Medicinal Chemistry*. **2002**, 5 ed. New York: Williams and Wilkins, 1114p.
3. HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.) GOODMAN & GILMAN: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana, 2003. 1269p.
4. REINA, M., MERICLI, A. H., CABRERA, R., GONZALEZ-COLOMA, A.. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. *Phytochemistry* **1995**, 38, 355–358.
5. REINA, M., GONZALEZ-COLOMA, A., GUTIERREZ, C., CABRERA, R., HENRIQUEZ, J., VILLARROEL, L. Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridium*. *Phytochemistry* **1997**, 46, 845–853.
6. HOL, W. H. G. AND VAN VEEN, J. A. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* affect fungal growth. *Journal of Chemical Ecology* **2002**, 28(9), 1763-1772.
7. SINGH, B., SAHU, P.M., SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Fitoterapia* **2002**, 73, 153- 155.
8. JAIN, S. C., SHARMA, R. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1987**, 35, 3487–3489.
9. MARQUINA, G., LAGUNA, A., FRANCO, P., FERNANDEZ, L., PEREZ, P., VALIENTE, O. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bursiferum* W.-ex Grisebach. *Pharmazie* **1989**, 44(12), 870–871.
10. NCCLS, National Committee of clinical laboratory standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, second edition, Wayne, Pa, v.22, n.15, p- 1-29, **2002**.
11. NCCLS, National Committee of clinical laboratory standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard, second edition, Wayne, Pa, v.22, n.16, p- 1-27, **2002**.

4.2 Avaliação da atividade carrapaticida

Os testes foram realizados em colaboração com as professoras Gilsane Von Poser do Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia/UFRGS e Vera Lúcia Sarda Ribeiro, Laboratório do setor de acarologia e entomologia, Faculdade de Veterinária/UFRGS.

4.2.1 Introdução

A mudança climática advinda do aquecimento global pode ampliar a temporada de pólen e facilitar a difusão de carrapatos transmissores de doenças no norte da Europa, além de permitir que mosquitos prosperem em novas áreas da África e da Ásia, disseram autoridades de saúde pública¹. Conforme especialistas presentes na assembléia anual da Organização Mundial da Saúde (OMS) em Genebra, ocorrido em maio de 2007, o aquecimento global já começou a alterar os padrões de doenças parasitárias e transmitidas pela água em áreas vulneráveis a secas e inundações. A OMS também citou o movimento dos carrapatos transmissores da doença de Lyme (que pode provocar desde sintomas leves até meningite, encefalite, alucinações, perdas de memória, paralisia de músculos, problemas cardíacos e artrite) para o norte da Europa, exemplo dos novos desafios sanitários que vão acompanhar o contínuo aquecimento da Terra, um fenômeno que os cientistas atribuem principalmente à atividade humana. Parasitas de grande impacto econômico, os carrapatos (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) são responsáveis por prejuízos anuais estimados em mais de US\$ 2 bilhões na criação de gado em geral no Brasil e mais de US\$ 13 bilhões no mundo. Os carrapatos interferem no desempenho do gado de corte, afetando o peso e provocando queda na qualidade do couro e aumentam gastos com medicamentos e mão-de-obra. O problema maior é nos animais de origem européia e seus cruzamentos. O controle químico à base de piretróides feito com produtos para pulverização ou aplicados sobre o dorso do animal, em banhos de aspersão ou imersão e injetáveis vem tendo problemas de resistência, daí a necessidade de integrar métodos de controle como a rotação de pastagens que auxilia no tratamento químico. Um período de descanso de pastagem de 42 a 46 dias é suficiente para que os carrapatos

morreram por falta de alimento. A Embrapa Gado de Corte pesquisa o desenvolvimento de uma vacina contra o carrapato, a partir de uma proteína. Por enquanto, as vacinas disponíveis no mercado são importadas da Austrália e de Cuba e têm eficiência relativamente baixa. Isso evidencia a necessidade de desenvolver vacinas específicas para os carrapatos brasileiros.²

Existem também outras espécies de carrapatos que atingem não somente os animais como também os humanos. A Febre Maculosa Brasileira, também chamada de Febre Maculosa de São Paulo, tem como agente etiológico *Rickettsia rickettsii*, o mesmo agente responsável pela Febre Maculosa das Montanhas Rochosas nos EUA. No contexto ecológico algumas espécies de carrapatos podem transmitir a rickettsia para determinadas categorias de animais silvestres, dentre eles o cachorro do mato, preás, roedores silvestres e os gambás. No Brasil, o carrapato “estrela do cavalo” (*Amblyomma cajennense*) é considerado o principal transmissor desta bactéria e está presente em todo território nacional. Porém outras espécies de carrapatos, tais como, *Amblyomma cooperi* (carrapato de capivaras), *Amblyomma ovale* (carrapato que parasita canídeos) *Anocentor nitens* (carrapato da orelha do cavalo) e do gênero *Amblyommae* já apresentaram a presença da bactéria. Os cães atuam como carreadores de carrapatos de animais silvestres para o peri-domicílio humano e constituem-se em importantes indicadores da atividade do agente etiológico. A doença no homem pode ser aguda, febril e provocar manchas em todo o corpo iniciando-se pelas palmas das mãos e plantas dos pés ou com sintomas inaparentes, mimetizando o estado gripal. Nos casos graves, pode haver necrose e morte dos tecidos, além de inchaços das pálpebras e do rosto, bem como das pernas. O período de incubação da doença no homem varia de 3 a 14 dias e o início é súbito, com febre, dor de cabeça, prostração, mialgias e confusão mental. A doença evolui para a gravidade em até 3 semanas. Os casos fatais causados pela Febre Maculosa diminuíram drasticamente, após a descoberta de uma eficaz antibioticoterapia, além do uso intensivo de carrapaticidas sobre os animais domésticos. No Brasil, relatos desta zoonose parecem estar limitados aos estados da região sudeste, porém, estudos de ocorrência de Febre Maculosa no Brasil, sugerem que a distribuição desta doença pode ser mais ampla do que se

supunha³. As rickettsias se multiplicam nos tecidos do carrapato, ocorrendo tanto a transmissão transovariana quanto a transmissão transtadial permitindo ao carrapato permanecer infectado durante toda a sua vida e também por muitas gerações após uma infecção primária, mesmo na ausência de hospedeiros vertebrados parasitêmicos. Portanto além de vetores os carrapatos são verdadeiros reservatórios das rickettsias na natureza, uma vez que todas as fases evolutivas, no ambiente, são potencialmente capazes de permanecer infectadas durante meses ou anos à espera de hospedeiro, garantindo um foco endêmico prolongado. Alguns vertebrados silvestres (roedores, gambás, etc.) também representam o papel de reservatórios ou depositários transitórios, infectando os carrapatos na fase de bacteremia (transmissão horizontal). O homem adquire a doença após ter sido picado pelo carrapato e este ficar fixado à pele do hospedeiro por um período variável de 4 a 20 horas sendo este tempo necessário para uma possível reativação da *R. rickettsii* na glândula salivar do carrapato⁴.

4.2.2 Objetivos

Iniciar os testes para investigar a atividade dos produtos **109**, **132**, **133**, **135**, **136** e **137** em ovos e larvas de carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

4.2.3 Resultados e discussão

Até o presente momento não existem relatos na literatura de alcalóides pirrolizidínicos com atividades larvicidas nem ovicidas para a espécie de carrapato testada, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Os produtos testados (**Figura 4.2**) foram sintetizados em solução e têm seus protocolos descritos no capítulo 2 deste trabalho.

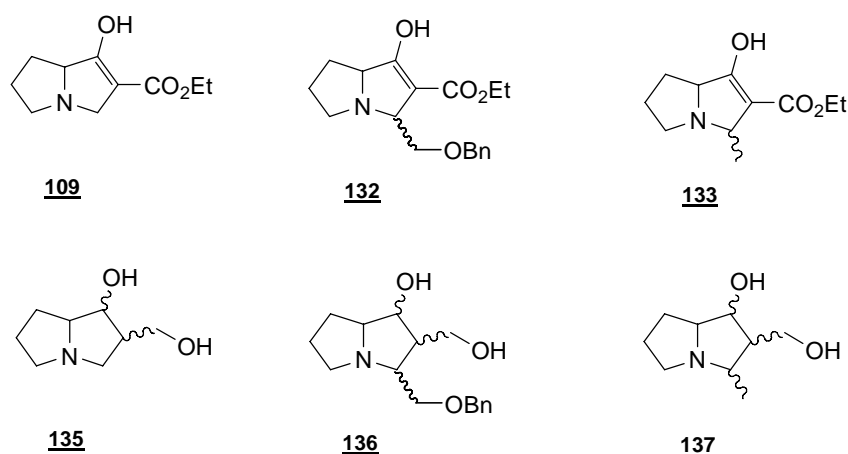


Figura 4.2: Produtos testados contra *R. (B.) microplus*.

Os dois testes realizados tiveram etanol 96% como branco, que foi o mesmo solvente utilizado para diluição, além disso não foi utilizado controle positivo, pois não existem no mercado produtos que sejam eficazes para as fases (ovos e larvas) nas quais se encontravam os ácaros testados. O produto mais utilizado no controle destes animais é o amitraz, porém tem atividade apenas em fêmeas adultas.

O primeiro teste realizado foi para ação ovicida, onde os resultados foram trabalhados no programa estatístico ANOVA.

Tabela 4.2: Resultado da ação ovicida.

Produto	109	135	132	136	133	137
Controle (etanol 96%)	0	0	0	0	0	0
10 µg/ml	100	100	100	100	100	100
5 µg/ml	100	93.3±11.5	93.7±5.7	100	99.7±0.58	100
2.5 µg/ml	21.7±20.2	100	73.3±37.8	100	21.7±10.6	100
1.25 µg/ml	10.7±16.8	66.7±15.3	95.0±8.7	89.3±18.5	95.3±8.1	74.0±23.0
0.625 µg/ml	20.0±20.0	70.0±10.0	13.3±11.5	16.7±13.6	30.0±10.0	50.0±30.0
0.125 µg/ml	0	0	0	0	0	0

Conforme a Tabela 4.2 pode-se observar desvios padrões altos para a atividade ovicida, exceto nos amostras controle, assim como na maior e na menor concentração. Este teste será refeito, porém já se têm um indicativo de que as moléculas testadas são tóxicas para ovos de carrapatos desta espécie, inibindo não somente a eclosão, como também a sobrevivência da larva.

A ação larvicida também foi testada em triplicata em larvas de *R. microplus*, cujos ovos foram coletados de animais sem tratamento carrapaticida em propriedades particulares no interior do estado do RS. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela 4.3: Resultado da ação larvicida.

	Produto 109	Produto 132	Produto 135	Produto 136	Produto 133	Produto 137
Controle (etanol 96%)	0	0	0	0	0	0
10 µg/ml	100	100	100	100	100	100
5 µg/ml	100	100	100	100	100	100
2,5 µg/ml	100	100	100	100	100	100
1,25 µg/ml	0	0	0	0	100	100
0,625 µg/ml	0	0	0	0	0	0
0,3125 µg/ml	0	0	0	0	0	0
0,150 µg/ml	0	0	0	0	0	0

Os brancos também foram feitos em triplicata utilizando somente etanol 96% (utilizado para diluição) e obteve-se 0% de mortalidade após as 48 horas do teste. Como pode ser observado, os produtos **109**, **132**, **135** e **136** apresentaram atividade máxima até a concentração de 2,5 µg/mL e após, a mortalidade foi de 0%. O que indica que a concentração carrapaticida mínima (CCM) está entre 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL e testes posteriores serão realizados para detectar tal concentração. Já os produtos **133** e **137** apresentaram maior atividade que os anteriormente citados. Como pode ser detectado na tabela acima, a concentração de 1,25 µg/mL provocou a morte

de 100 % das larvas e a concentração de 0,625 µg/mL não matou nenhuma. Neste caso, também será feita uma avaliação para descobrir qual é a concentração carrapaticida mínima.

4.2.4 Conclusões

A ação ovicida apresentou resultados com desvios padrões altos, porém os números obtidos são um indicativo de que as moléculas testadas são tóxicas para ovos de carrapatos desta espécie, necessitando de mais testes para uma resposta conclusiva. Já para a ação larvicida, os produtos **109**, **132**, **135** e **136** mostraram-se ativos até a concentração de 2,5 µg/mL e os produtos **133** e **137** foram mais ativos que os demais, com um índice de mortalidade de 100% na concentração de 1,25 µg/mL. Serão necessários mais testes para elucidar a CCM destes compostos. Porém os resultados acima mostram uma tendência de que estes compostos possuem potencial para que, a partir deles, novos compostos sejam planejados para a obtenção de potenciais candidatos para as ações larvicidas e ovicidas. Além disso, outras espécies de ácaros poderão ser testadas.

4.2.5 Parte experimental

4.2.5.a Compostos

Os produtos **109**, **132**, **133**, **135**, **136** e **137** testados foram sintetizados e estão descritos no capítulo 2 deste trabalho.

4.2.5.b Preparação das amostras

Para o teste de imersão dos ovos e das larvas, os compostos foram diluídos serialmente em etanol 96%, respectivamente, em ordem para obter-se as concentrações de 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL. O branco foi apenas etanol 96% e não foi utilizado controle positivo⁵.

4.2.5.c Preparação dos carrapatos

Coletaram-se fêmeas de *Ripicephalus (B.) microplus*, no ultimo estágio de ingurgitamento, medindo aproximadamente 4.5mm. Estas fêmeas foram lavadas com água e secas em papel toalha, e o peso médio delas foi de 0,30 g. Depois, foram incubadas a uma temperatura de 27-28 °C e umidade de 70-80% por aproximadamente duas semanas até a postura dos ovos. Esses ovos futuramente geram as larvas que são utilizadas para a ação larvicida⁵.

4.2.5.d Teste de imersão dos ovos

Aproximadamente 200 ovos férteis de *R. (B.) microplus* (0,01g) foram pesados em tubos de vidro e imersos por 5 minutos em 1 mL de solução teste contendo os produtos sintetizados (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL, 1.25 µg/mL, 0,625 µg/mL, 0,3125 µg/mL e 0,150 µg/mL). As soluções foram removidas e após a evaporação do solvente os tubos foram fechados com algodão e incubados a 27–28oC e 70–80% de umidade relativa por aproximadamente 14 dias, até o início da eclosão dos ovos⁵. O branco foi feito com o mesmo etanol utilizado na diluições seriadas. Todas as concentrações, inclusive o branco, foram realizados em triplicata (ver **Figura 4.3**).



Figura 4.3: Tubos contendo ovos para o teste de imersão (sempre em triplicata).

4.2.5.e Efeito na eclosão das larvas

O experimento foi realizado com *R. (B.) microplus*. Pesou-se aproximadamente 100 ovos férteis (0,005g) em sacos de tecido do tipo TNT (1.0cm x 1.5cm)(ver **Figura 4.4**). Os sacos foram encubados a 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por aproximadamente 14 dias, até a eclosão dos ovos. Após mais 14 dias de incubação, os

sacos que continham as larvas prontas para o teste foram imersos por 5 minutos em 10- 20 ml de solução contendo os produtos sintetizados (10 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 1.25 $\mu\text{g/mL}$, 0,625 $\mu\text{g/mL}$, 0,3125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,150 $\mu\text{g/mL}$). O controle foi feito com o mesmo etanol utilizado pra as diluições seriadas. Após aproximadamente 1 hora, tempo para evaporar o solvente, os sacos foram incubados a 27-28°C e 70-80% de umidade relativa por 48 hs. Larvas vivas e mortas foram contadas para calcular-se posteriormente o percentual de mortalidade⁵. Todas as concentrações testadas, inclusive o branco, foram realizadas em triplicata.

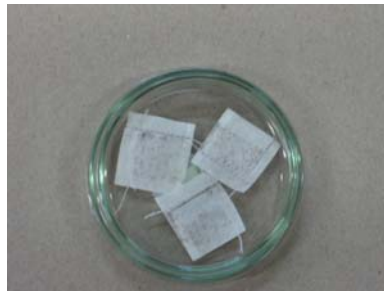


Figura 4.4: Sacos contendo larvas para o teste de imersão (sempre em triplicata).

4.2.6 Referências

1. UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. **Aquecimento global favorece alergias e carrapatos, diz OMS**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://noticias.terra.com.br/ciencia/interna/0,,OI1633235-EI8278,00.html>. Acesso em: 09/01/2008.
2. UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. **É Hora De Controlar Carrapatos**. São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/OUT/verTexto.php?codTexto=7974>. Acesso em: 09/01/2008.
3. UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. **Cuidado com os carrapatos**. Piracicaba, 2005. Disponível em: http://www.jpjornal.com.br/news.php?news_id=23337. Acesso em 09/01/2008.
4. UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas. **Febre maculosa: uma doença do meio rural**. Rondônia, 2005. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/index.php?p=texto&&idT=567>. Acesso em: 09/01/08.
5. RIBEIRO, V.L.S., TOIGO, E., BORDIGNON, S.A.L., GONÇALVES, K., VON POSER, G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 199-203, 2007.

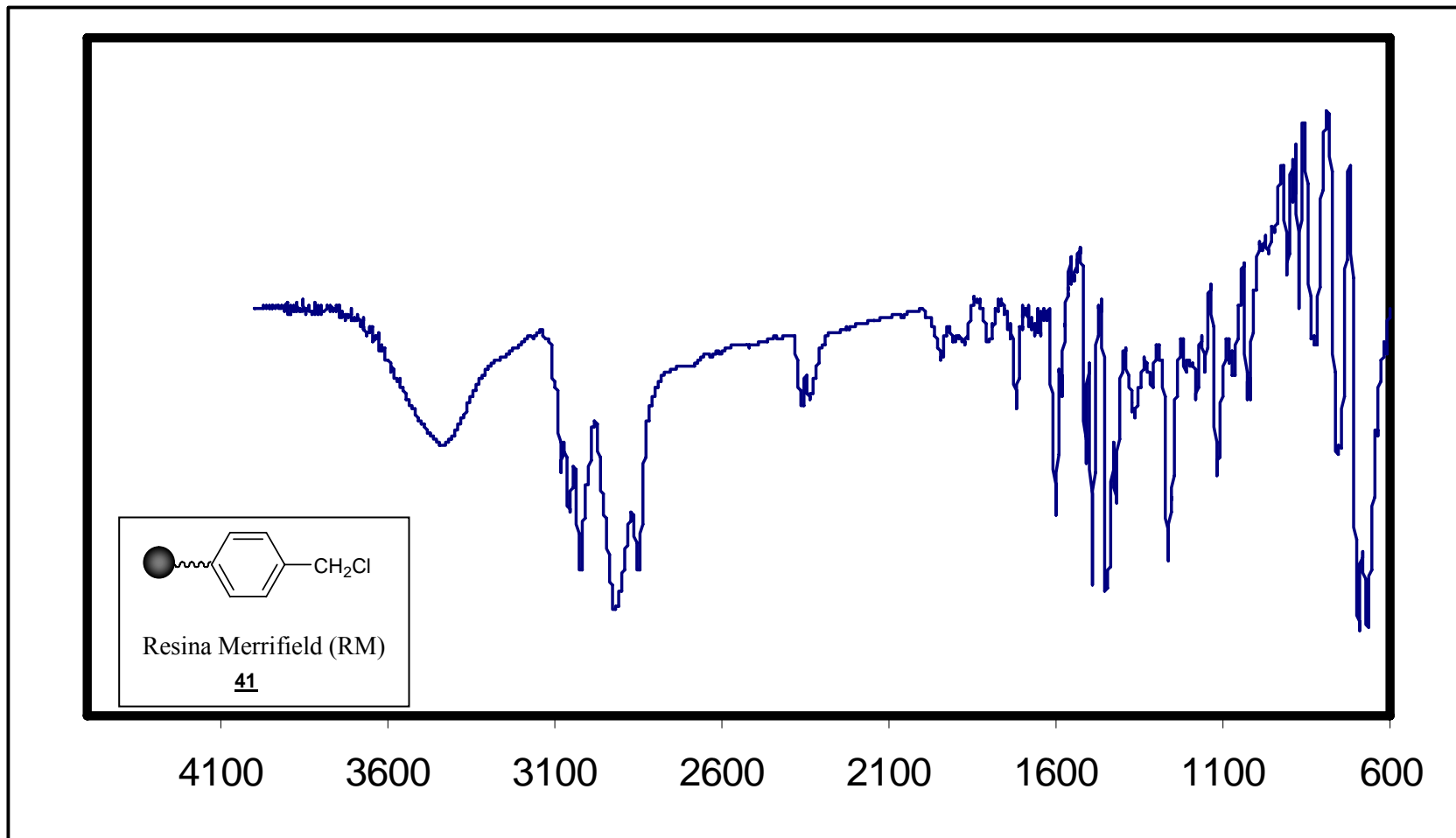
5 CONCLUSÕES GERAIS

A rota em SOFS mostrou-se promissora, pois em apenas três etapas o produto já estava formado e clivado da Resina Merrifield. Esta metodologia proporcionou a obtenção de intermediários puros, sem perda de produto e sem dificuldade nas purificações. No futuro, outros experimentos serão realizados utilizando-se outros aceptores de Michael, possibilitando assim, a obtenção de uma quimioteca de derivados pirrolizidínicos.

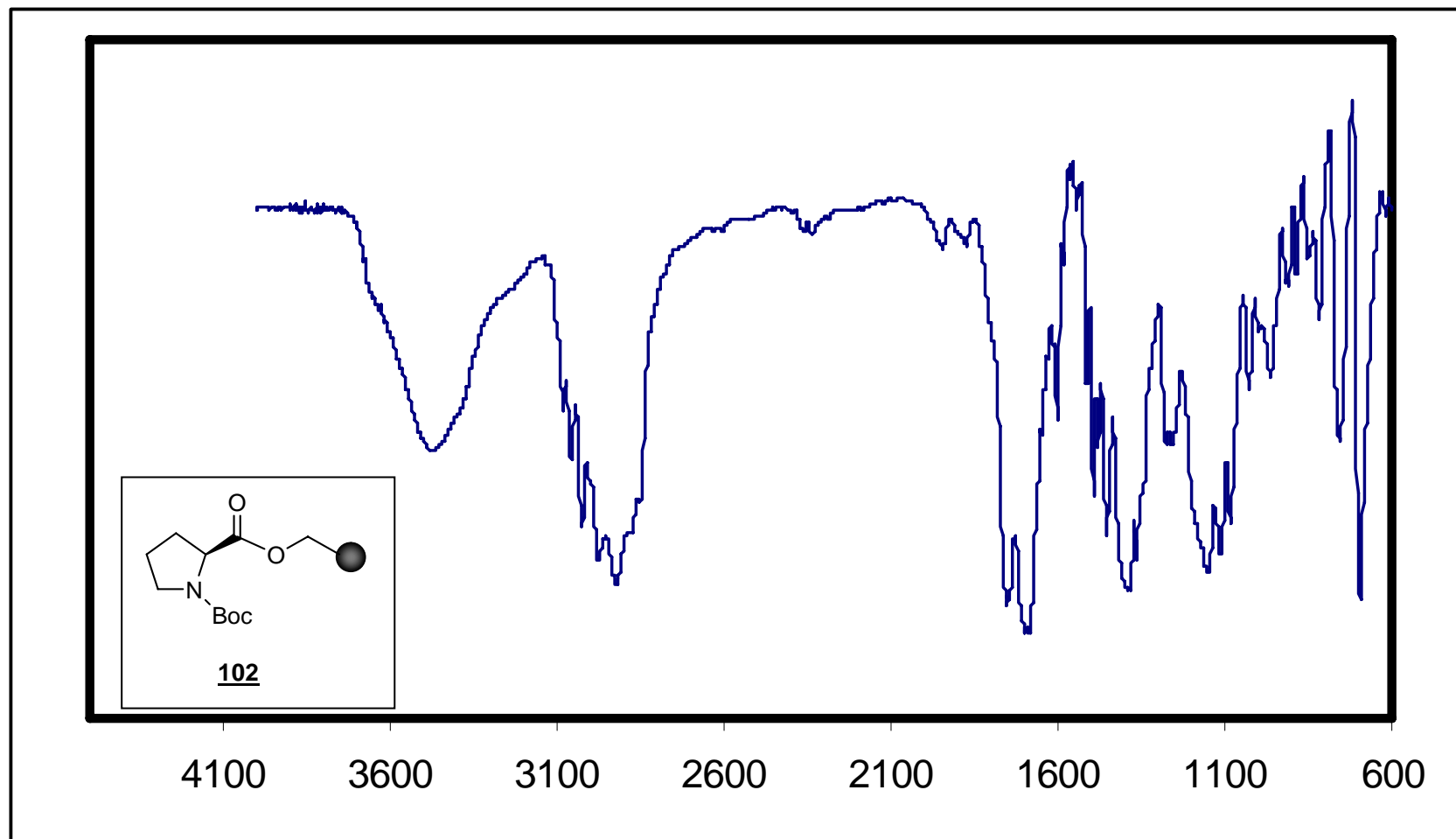
A síntese em solução foi eficiente para a obtenção de análogos de alcalóides do tipo hiacintacina. A rota 2 mostrou-se mais favorável à obtenção dos compostos em questão e a rota 1 será testada com outros protocolos. Além disso, a terceira rota também precisa de estudos adicionais, mas já demonstra uma tendência de que análogos insaturados poderão ser obtidos. A maioria das reações apresentou rendimentos satisfatórios, porém ainda podem ser otimizadas a fim de evitar-se a etapa de purificação que causa muitas vezes perda ou degradação de alguns intermediários.

Quanto aos testes farmacológicos preliminares, os produtos testados não apresentaram atividade antifúngica nas condições dos experimentos, porém não se descarta a possibilidade de modificá-los e testá-los novamente para esta atividade. Quanto à ação ovicida os produtos apresentaram resultados com desvios padrões altos, porém os números obtidos são um indicativo de que as moléculas testadas são tóxicas para ovos de carrapatos desta espécie, necessitando de mais testes para uma resposta conclusiva. Já para a ação larvicida, os produtos **109**, **132**, **135** e **136** mostraram-se ativos até a concentração de 2,5 µg/mL e os produtos **133** e **137** foram mais ativos que os demais, com um índice de mortalidade de 100% na concentração de 1,25 µg/mL. Serão necessários mais testes para elucidar a CCM destes compostos. Porém os resultados acima mostram uma tendência de que estes compostos possuem potencial para que, a partir deles, novos compostos sejam planejados para a obtenção de potenciais candidatos para as ações larvicidas e carrapaticidas. Além disso, outras espécies de ácaros poderão ser testadas.

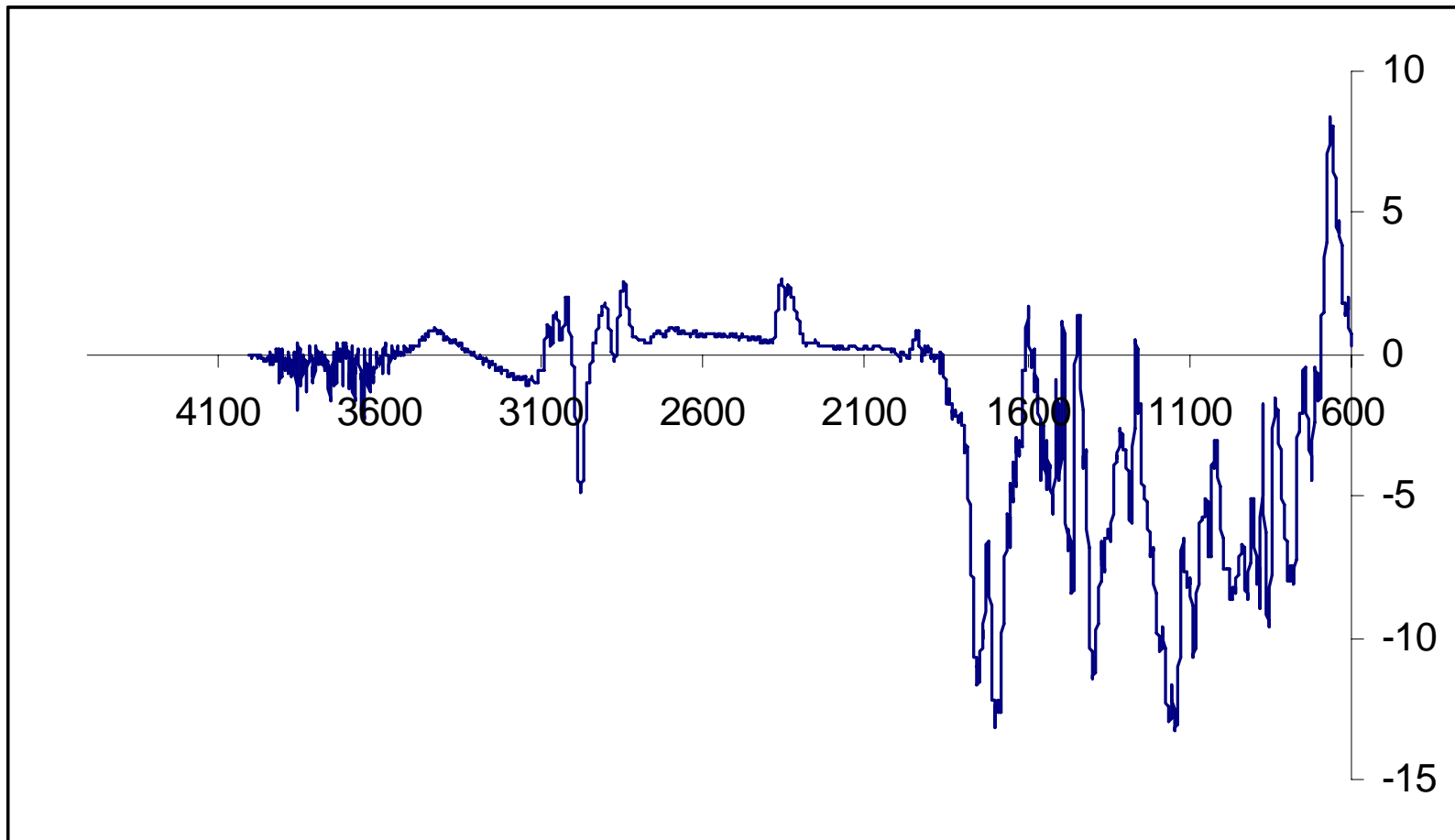
6 ANEXOS



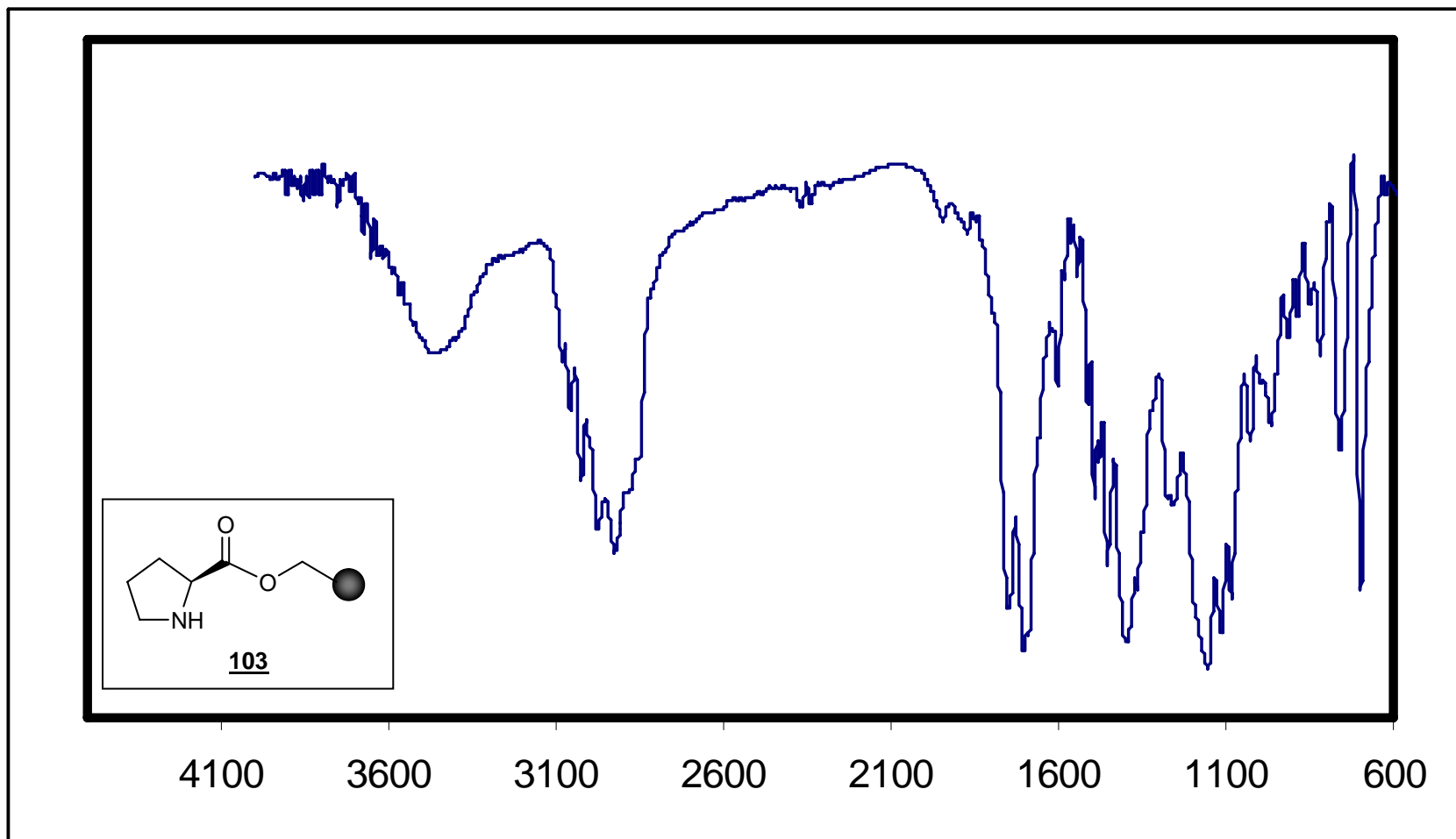
Anexo 1: Espectro de IV da Resina Merrifield (RM) 41.



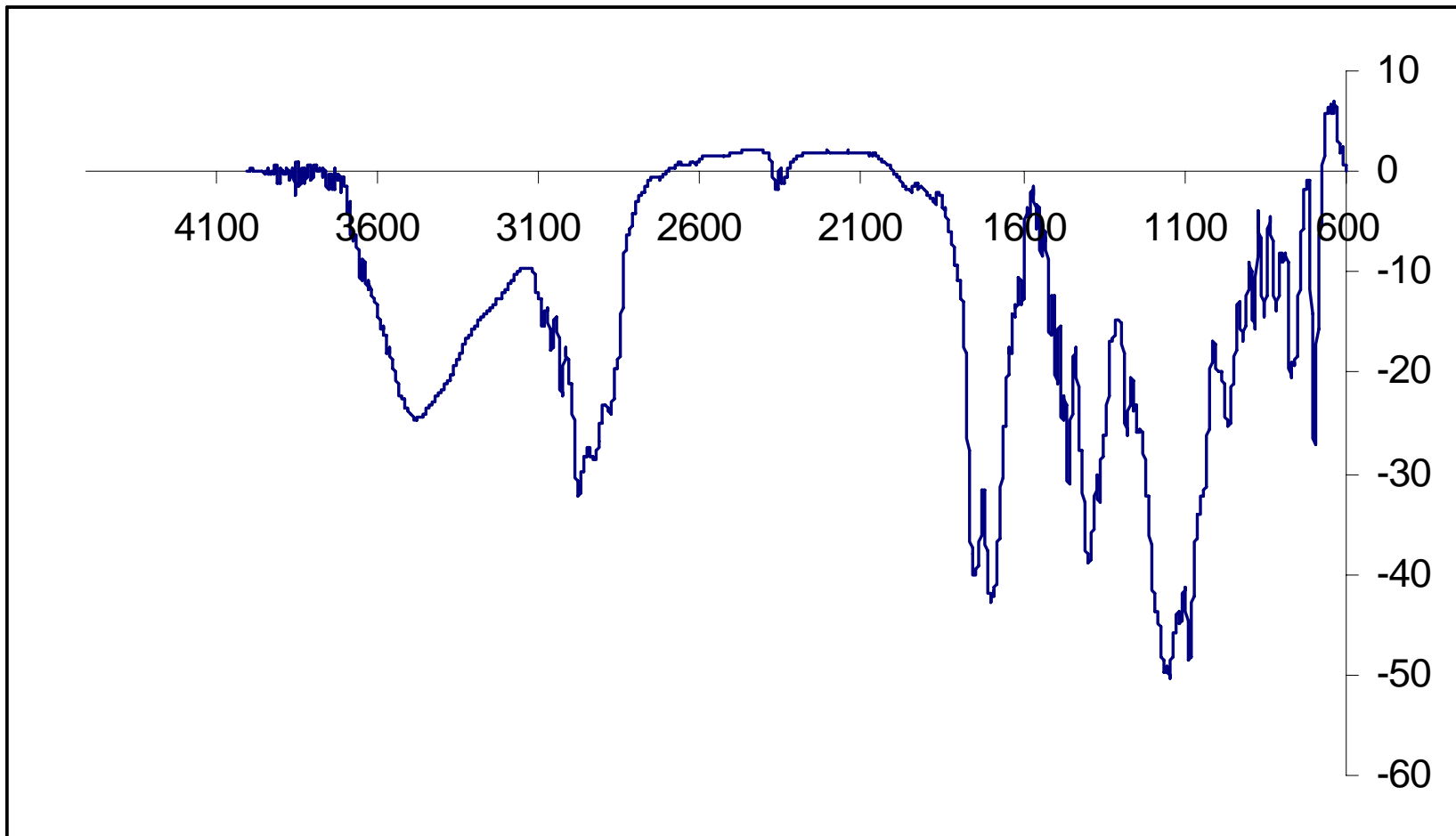
Anexo 2: Espectro de IV da reação de acoplamento (produto **102**).



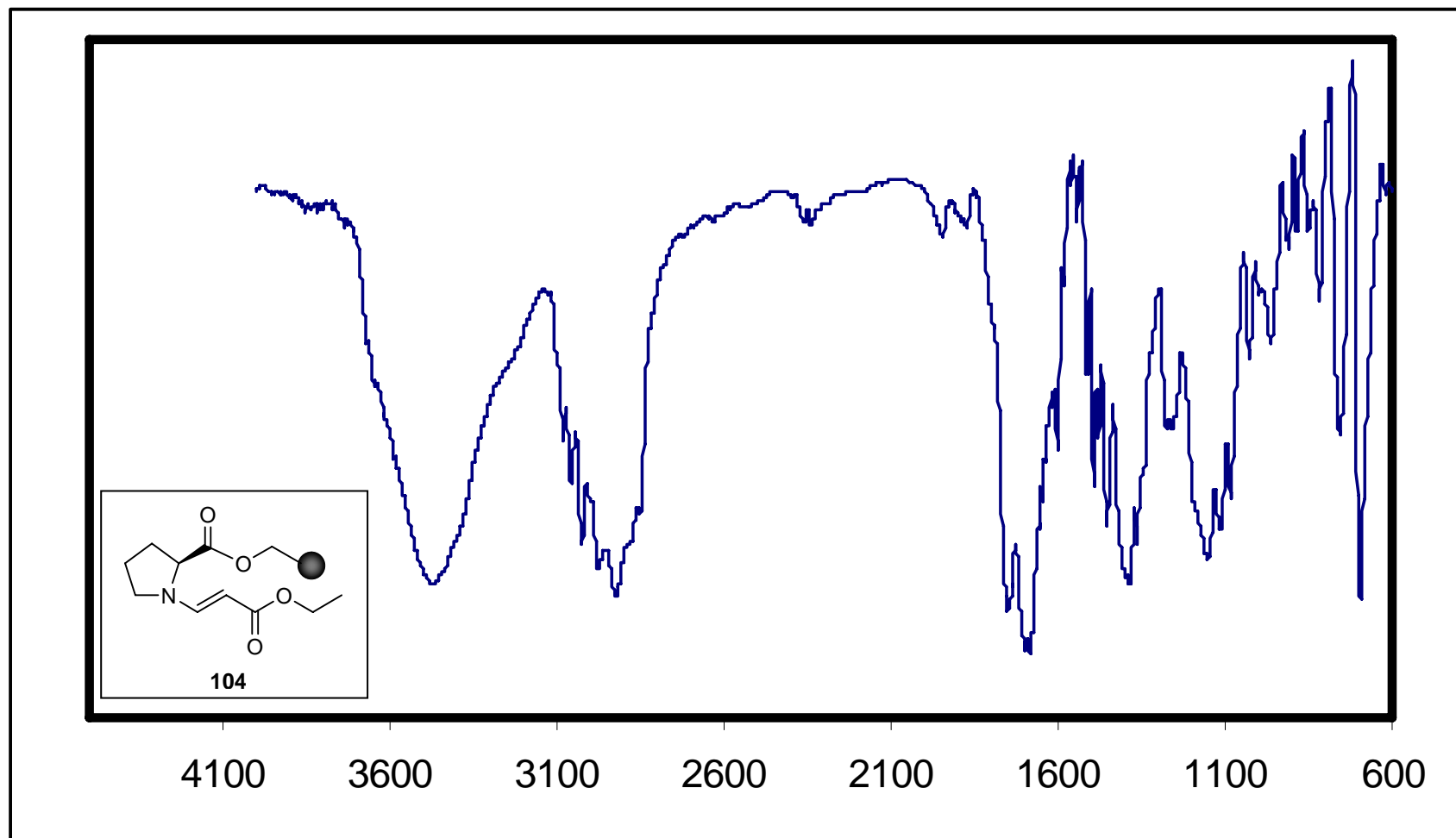
Anexo 3: Espectro de IV da subtração entre a reação de acoplamento e a RM.



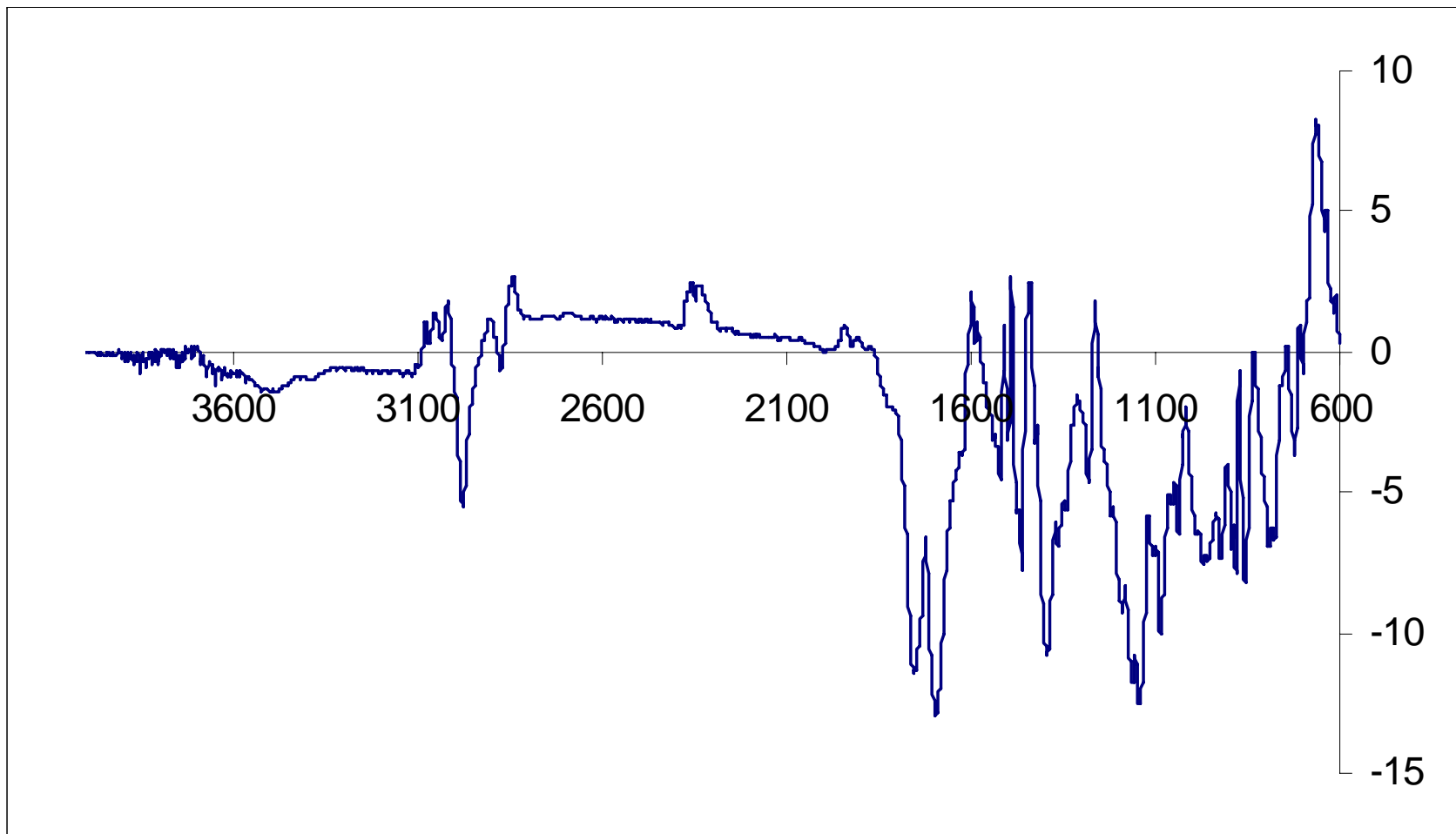
Anexo 4: Espectro de IV da retirada do grupamento protetor Boc (produto **103**).



Anexo 5: Espectro de IV da subtração entre a reação da retirada do grupamento protetor Boc e a RM.



Anexo 6: Espectro de IV da adição de Michael (produto 104).



Anexo 7: Espectro de IV da subtração entre a adição de Michael e a RM.

