UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE FARMÁCIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Síntese e avaliação da atividade farmacológica *in vitro* de aminas derivadas do limoneno

CEDRIC STEPHAN GRAEBIN

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE FARMÁCIA

	,	~	^	^
PROGRAMA	. DE POS-GR.	ADUAÇAO	EM CIENCIA	S FARMACÊUTICAS

Síntese e avaliação da atividade farmacológica *in vitro* de aminas derivadas do limoneno

Tese apresentada por **Cedric Stephan Graebin** como requisito parcial para a obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Eifler Lima

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gomes da Rosa

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19/12/2008 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Aloir Antônio Merlo Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Flávia de Toni Uchôa Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana Universidade de São Paulo

G734s Graebin, Cedric Stephan

Síntese e avaliação da atividade farmacológica *in vitro* de aminas derivadas do limoneno / Cedric Stephan Graebin — Porto Alegre : UFRGS, 2008. — xxii, 178 p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Limoneno. 2. Síntese orgânica. 3. Leishmaniose. I. Lima, Vera Lucia Eifler. II. Rosa, Ricardo Gomes da. III. Título.

CDU: 547.05

Bibliotecária responsável:

Heloísa do Canto Canabarro - CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Faculdade de Farmácia/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, Laboratório de Catálise por Metais de Transição, Instituto de Química/UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil, e Laboratório de Parasitoses, Centro de Referência em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil, sendo financiado pela Coordenação Acadêmica para o Pessoal de Ensino Superior (CAPES/MEC), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, projeto UNIVERSAL) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, projeto PROADE-3).

"We may, I believe, anticipate that the chemist of the future who is interested in the structure of proteins, nucleic acids, polysaccharides, and other complex substances with high molecular weight will come to rely upon a new structural chemistry, involving precise geometrical relationships among the atoms in the molecules and the rigorous application of the new structural principles, and that great progress will be made, through this technique, in the attack, by chemical methods, on the problems of biology and medicine."

Linus Pauling (1901-1994), ao receber seu prêmio Nobel em Química (11/12/1954)

•	٠
١	ı

Dedico esta tese a meus pais, Ricardo e Cleusa, à minha esposa Kátia e à minha filha

Luísa, ainda em gestação no momento que escrevo esta dedicatória, por todo o amor e

compreensão nestes anos de pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

A Ciência nunca é o trabalho de apenas duas mãos, mas sim de muitas. Neste momento, é gratificante poder "olhar" para o passado e relembrar todas as pessoas que de algum modo contribuíram para que eu pudesse estar apresentando este manuscrito. A todos quero expressar meu agradecimento.

À Profa. Vera Lucia Eifler Lima, minha orientadora desde os tempos de iniciação científica, obrigado pela orientação, pelo apoio e por todos os conselhos dados.

Ao Prof. Ricardo Gomes da Rosa, co-orientador, mas que excedeu em muito suas obrigações como tal, obrigado pelo apoio, pela orientação e conselhos dados. Obrigado também por ter confiado em mim e aberto as portas do Laboratório de Catálise por Metais de Transição para o meu trabalho, e por sempre estar disponível para questionamentos científicos (e outros nem tanto).

À Dra. Maria de Fátima Madeira, muito obrigado por ter me acolhido de um modo tão bom dentro do Laboratório de Parasitoses do IPEC/FIOCRUZ, tendo colocado o laboratório inteiro à minha disposição para as quatro semanas de trabalho que realizei em seu laboratório.

Aos professores Martin Steppe e Teresa C. Dalla Costa, pela oportunidade de ter realizado os ensaios da atividade antimicrobiana em seus laboratórios. Obrigado por todo o apoio e suporte.

Agradeço também aos professores Hugo Cerecetto, Suzana Zacchino e Silvia Reni Bortolin Uliana, pelos ensaios farmacológicos realizados em seus laboratórios.

Aos professores Jairton Dupont, Adriano Lisboa Monteiro e Maria do Carmo Rualba Pereira, agradeço pelo empréstimo e uso de equipamentos essenciais na conclusão desta tese.

À equipe do LaSOM: Patrícia, Thiago, Rômulo, Mônica, Stela, Madson, Dayane, Guilherme e Taciana: obrigado pela convivência, pela amizade e por todos os

conselhos e dicas. Agradeço também aos alunos de iniciação científica Eduardo, Patrícia e Jaqueline.

À equipe do Lab. de Catálise por Metais de Transição: Jones, Aline, Ana Nery, Melina, Silvana, Cristiane e César: obrigado pela amizade, conselhos e dicas.

Agradeço também a meus colegas, pela amizade e companheirismo nestes anos de jornada acadêmica: Simone Gnoatto, Andréia Adams, Inara, Simone Quintana, Juliane, Ângelo, Cézar, Bibiana, Rodrigo, Renata, Lali, Fernanda, Crestina, Alexandre, Brenno, Dagoberto, Jackson, Elízeo, Sabrina, Carol, Tati, Diego, Eduardo, Douglas, Jessé, Liliane, Mariane, Marizane e Marcelo. Obrigado por tudo.

Não poderia também deixar de mencionar meu grande amigo Júlio Rocha e sua família, que me acolheram no Rio de Janeiro durante minha estadia de 4 semanas por lá. Júlio, Renan "pai", Renan "filho" e dona Olinda, obrigado pela hospitalidade e por tudo o mais.

E, finalmente, agradeço a meus pais, Ricardo e Cleusa, a meu irmão Cristian e sua família, e à minha irmã Anna, pelo apoio durante estes anos todos. À Kátia, minha esposa, obrigado pela compreensão, amor, suporte e pelo apoio dado a mim.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
ANÁLISES INSTRUMENTAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	XX
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. O LIMONENO	2
1.1.1. O limoneno como material de partida	2
1.1.2. Atividade antimicrobiana	4
1.1.3. Trabalhos anteriores do Grupo de Pesquisa em Síntese Orgânica Med	licinal5
1.1.4. Atividade citotóxica e antitumoral	6
1.1.5. Terpenos e derivados como leishmanicidas	7
1.1.6. Atividade nociceptiva	8
1.2. OBJETIVOS GERAIS E ESTRATÉGIA DE SÍNTESE	9
1.3. REFERÊNCIAS	11
CADÍTURO A OLÍMICA COMBINATIÓDIA. CÍNTRECE EM EAC	CIE.
CAPÍTULO 2. QUÍMICA COMBINATÓRIA: SÍNTESE EM FA	
SÓLIDA DE DERIVADOS DO LIMONENO	15
2.1. INTRODUÇÃO	16
2.1.1. Química Combinatória	16
2.1.2. Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS)	19
2.1.2.1. As resinas	20
2.2. OBJETIVOS	
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
2.3.1. Detalhes da estratégia original	25
2.3.2. Estratégia "A": síntese do bloco de construção com o grupo ácido car	boxílico.25
2.3.3. Estratégia "B": acoplamento via Resina Merrifield com ligante amina	ı27
2.3.4. Estratégia "C": Uso do ácido bromoacético como bloco de construçã	
	30

2.3.5. Estratégia "D": aminoácidos e aminações redutivas	32
2.3.6. Estratégia "E": Hidroformilação diretamente na resina	34
2.3.7. Considerações sobre a etapa de clivagem	35
2.4. EXPERIMENTAL	37
2.4.1. Protocolos sintéticos	37
2.4.1.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanal 26	37
2.4.1.2. Ácido 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanóico 27	
2.4.1.3. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanoato de metila 18	
2.4.1.4. Resina Merrifield modificada com ligante aminometileno 28	
2.4.1.5. Síntese da amina secundária acoplada 29	
2.4.1.6. Síntese do azidoálcool acoplado 30	
2.4.1.8. Síntese do ázidoalcool N -acethado 31	
2.4.1.9. Síntese da amina terciária acoplada à resina 35	
2.4.1.10. Síntese do azidoálcool 36	
2.4.1.11. Acoplamento e desproteção da glicina e fenilalanina (síntese dos	
aminoésteres 41 e 42)	
2.4.1.13. Síntese dos aninoésteres substituidos 44 e 45	
2.4.2. Testes colorimétricos.	
2.4.2.1. Teste de Kaiser (Ninhidrina)	
2.4.2.1. Teste de Raisei (Nillilarina)	
2.5. CONCLUSÕES	45
2.6. REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3. SÍNTESE EM SOLUÇÃO DE DERIVADOS DO	
LIMONENO ATRAVÉS DAS REAÇÕES DE HIDROFORMILAÇÃ	ĂO E
HIDROAMINOMETILAÇÃO	
3.1. INTRODUÇÃO	
3.1.1.1. Aspectos gerais	
3.1.2. Hidroaminometilação	
3.2. OBJETIVOS	
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.3.1. Hidroformilação do limoneno 1 e do óxido de limoneno 14	59
3.3.2. Oxidação do aldeído ao seu respectivo ácido carboxílico	61
3.3.3. Metoxicarbonilação do limoneno	62

3.3.4. Hidroaminometilação do limoneno com diversas aminas	63
3.3.4.1. Hidroaminometilação do limoneno com <i>n</i> -propilamina: amina modelo para otimização reacional	
3.3.4.2. Monitoramento em tempo real da hidroaminometilação com <i>n</i> -propilamina.	
3.3.4.3. Síntese da "Família A" de aminas derivadas do limoneno	
3.3.4.4. Análise espectroscópica dos produtos: "Família A"	
3.3.4.5. Atividade farmacológica da "Família A"	
3.3.4.6. Síntese da "Família B": compostos análogos ao derivado anilínico 56	
3.3.4.7. Análise espectroscópica: "Família B"	
3.3.4.8. Síntese de outros derivados	
3.4. EXPERIMENTAL	
3.4.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanoato de metila 18	
3.4.2. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanal 26	
3.4.3. Ácido 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanóico 27	
3.4.4. 3(<i>R</i>)-(6-metil-7-oxabiciclo[4.1.0]hept-3-il)butanal 43	
3.4.5. Procedimento geral para a hidroaminometilação do limoneno. Síntese "Família A" (aminas 34, 53-58)	da
3.4.5.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -propilbutanamina 34	83
3.4.5.2. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -isopropilbutanamina 53	84
3.4.5.3. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -morfonil-1-butanamina 54	85
3.4.5.4. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -piperidinil-1-butanamina 55	
3.4.5.5. <i>N</i> -[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 56	
3.4.5.6. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -benzil-1-butanamina 57	
3.4.5.7. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -piperazinil-1-butanamina 58	87
3.4.6. Procedimento modificado para a hidroaminometilação do limoneno. Síntese	
"Família B" (aminas 59-65)	88
3.4.6.1. 4-cloro-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 59	
3.4.6.2. 4-metóxi- <i>N</i> -[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]-anilina 60	
3.4.6.3. 4-metil-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 61	
3.4.6.4. 3-(4-metilciclohexen-3-il) <i>N</i> -furfuril-1-butanamina 62	
3.4.6.5. 3-trifluormetil-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 63	
3.4.6.6. <i>N</i> -metil- <i>N</i> -[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 64	
3.4.6.7. 2-{ <i>N</i> -[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]}aminopiridina 65	93
3.4.7. 2-{[3-(4-metilciclohexen-3-il)-butil]amino}etanol 66	93
3.4.8. <i>N</i> -propil- <i>N</i> -[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]4-metilbenzeno-1-sulfonamida 71	
3.5. CONCLUSÕES	
3.6. REFERÊNCIAS	97

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATI	VIDADES
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIPARASITÁRI	A DOS
COMPOSTOS SINTETIZADOS	101
4.1. INTRODUÇÃO	102
4.1.1. Antimicrobianos e antifúngicos: necessidade da busca por novos	compostos .102
4.1.2. Leishmaniose	104
4.1.2.1. Aspectos gerais	104 106 107
4.1.2.5. Tratamento da leishmaniose no Brasil	
4.1.3. Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas)	
4.2. OBJETIVOS	
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana	
4.3.1.1. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de inibição da no ágar em poços	116
4.3.2. Avaliação da atividade antifúngica	119
4.3.3. Avaliação da atividade antiparasitária	120
4.3.3.1. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	
4.3.4. Discussão da atividade anti-leishmania dos compostos da "Família B"	
4.3.4.1. Influência dos substituintes	126
4.3.4.4. Influência de descritores físico-químicos	
4.3.5. Mecanismo de ação	131
4.4. EXPERIMENTAL	133
4.4.1. Determinação da Atividade Antibacteriana pelo Método da Ini com Poços	
4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	133
4.4.3. Determinação da atividade anti-leishmania	
4.5. CONCLUSÕES	
4.6. REFERÊNCIAS	125

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIV	VAS141
5.1. CONCLUSÕES GERAIS	142
5.2. PERPECTIVAS	143
ANEXOS	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura do limoneno e seus dois estereoisômeros
Figura 1.2. Produtos sintetizados a partir do (R) ou (S) limoneno
Figura 1.3. Estruturas do carvacrol e do perilaldeído5
Figura 1.4. Síntese de derivados do limoneno por Limberger6
Figura 1.5. Estrutura do álcool perlílico
Figura 1.69
Figura 2.1. Comparação entre a Química Combinatória e a Síntese orgânica medicinal tradicional
Figura 2.2. Blocos de construção na síntese combinatória de amidas
Figura 2.3. Fármacos originados da Química Combinatória
Figura 2.4. Ilustração do processo de purificação de uma etapa sintética usando SOFS20
Figura 2.5. Representação esquemática da Resina Merrifield (adaptado da ref. 13)21
Figura 2.6. Alguns exemplos de resinas constituídas de PS/DVB (a porção reativa das mesmas está realçada na figura)
Figura 2.7. Detalhes da estratégia original de síntese
Figura 3.1. Reação de hidroformilação
Figura 3.2. Mecanismo da reação de hidroformilação para catalisadores de ródio modificados, mostrando o mecanismo (1), dissociativo e (2), associativo54
Figura 3.3. Reação de hidrogenação com catalisadores de ródio modificados55
Figura 3.4. Reação de isomerização com catalisadores de ródio modificados55
Figura 3.5. Reação de hidroaminometilação
Figura 3.6. Cromatograma (CG-DIC) da reação de síntese do aldeído 26 60

Figura 3.7. Desenho do reator modificado com uma válvula de injeção manual de
cromatografia líquida, utilizada na monitorização em tempo real da
hidroaminometilação do limoneno (as conexões de gases do reator não estão
mostradas na figura)65
Figura 3.8. Gráfico do monitoramento em tempo real da hidroaminação do limoneno
com <i>n</i> -propilamina (legenda: "Amina" = produto 34)66
Figura 4.1. Estruturas químicas dos compostos Atoxil 73 e arsfenamina 74 103
Figura 4.2. Ciclo de vida do parasita responsável pela leishmaniose. Origem: Center
for Disease Control (EUA)105
Figura 4.3
Figura 4.4
Figura 4.5
Figura 4.6
Figura 4.7

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Síntese da "Família A" de aminas70
Tabela 4.1. Ensaio de inibição do crescimento bacteriano em ágar com poços116
Tabela 4.2. Determinação da CIM do composto 34
Tabela 4.3. Determinação da CIM dos produtos 53-58 contra <i>S. aureus</i> ATCC 6538 P
118
Tabela 4.4. Determinação da CIM e da CFM dos Compostos 34 e 53-58 119
Tabela 4.5. Avaliação da atividade anti-tripanossoma de alguns dos compostos
sintetizados
Tabela 4.6. Atividade anti-leishmania da "Família A" de compostos sintetizados e
outros derivados do (R)-(+)-limoneno
Tabela 4.7. Atividade anti-leishmania da "Família B" de compostos sintetizados123
Tabela 4.8. Valores obtidos por métodos in silico de propriedades físico-químicas dos
compostos testados

LISTA DE ABREVIATURAS

¹³C-RMN Ressonância Magnético-Nuclear do Carbono-13

¹**H-RMN** Ressonância Magnético-Nuclear do Hidrogênio

AIDS Acquired human Imunodeficiency Syndrome, ou Síndrome da

Imunodeficiência humana Adquirida

APT Attached Proton Test

ATCC American Type Cell Culture

CDCl₃ Clorofórmio deuterado

CFM Concentração Fungicida Mínima

CG-DIC Cromatografia Gasosa acoplada a um Detector de Ionização de Chama

CG-EM Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas

CIM Concentração Inibitória Mínima

CLAE Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

CLSI Clinical Laboratories Standards Institute

DMF *N,N*-dimetilformamida

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Deoxyribonucleic Acid, ou Ácido desoxiribonucléico

DNDi Drugs for Neglected Diseases Initiative

Et₃N Trietilamina

EtOH Etanol

Fmoc 9*H*-fluoren-9-ilmetoxicarbonil

HIV Vírus da imunodeficiência humana adquirida

HMG-CoA β -Hidróxi- β -Metilglutaril-Coenzima A

iOWH Institute for One World Health

IC₅₀ Inhibitory concentration, 50%, ou Concentração que inibe 50% do

crescimento de uma população ou a atividade de uma enzima

IUPAC International Union for the Pure and Applied Chemistry, ou União

Internacional de Química Pura e Aplicada

IV Espectroscopia no infravermelho com transformações de Fourier

LD₅₀ Lethal dose, 50%, ou Concentração (ou dose) letal de uma substância

para 50% de uma determinada população

mCPBA Perácido 3-clorobenzóico

MeOH Metanol

MeONa Metóxido de sódio

MO Microondas

NBP 4-(4'-nitrobenzil)-piridina

ONG Organização Não-Governamental

OMS Organização Mundial da Saúde

PBS Phosphate buffered saline, ou Tampão fosfato-salino

PCC Clorocromato de piridínio

PEG Polietilenoglicol

PI₅₀ Porcentagem de inibição do crescimento de uma cultura in vitro

causada por uma determinada substância à concentração de 50 µM

ppm Partes por milhão

PS/DVB Poliestireno/divinilbenzeno

p-TsCl Cloreto de *p*-toluenosulfonila

p-TsOH Ácido p-toluenosulfônico

QC Química Combinatória

SOFS Síntese Orgânica em Fase Sólida

TDR The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Programme for

Research and Training in Tropical Diseases

TFA Ácido trifluoracético

THF Tetrahidrofurano

TMS Tetrametilsilano

UNDP United Nations Development Program, ou Programa das Nações

Unidas para o Desenvolvimento

UNICEF United Nations Childrem's Fund ou Fundo das Nações Unidas para a

Infância

WHO World Health Organization ou Organização Mundial da Saúde

WRAIR Walter Reed Army Institute of Research

XANTPHOS 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

RESUMO

O limoneno é um produto natural da classe dos terpenos, encontrado abundantemente em plantas cítricas e relatado na literatura como um composto com atividades farmacológicas interessantes, entre elas antibacteriana, antifúngica, antileishmania, nociceptiva e citotóxica. A presente tese relata a funcionalização do limoneno utilizando a Síntese Orgânica em Fase Sólida e a Síntese Orgânica Clássica (em solução). A partir da síntese orgânica em solução, especialmente através das reações de hidroformilação e hidroaminometilação, obtiveram-se vinte compostos. Os compostos foram testados para várias atividades farmacológicas *in vitro*, a saber: antibacteriana, antifúngica, anti-tripanossoma e anti-leishmania. Destes, dezessete foram testados para a atividade anti-leishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e sete apresentaram atividade superior ao fármaco pentamidina, utilizado como padrão no teste, com valores de IC₅₀ entre 11,5 e 35,6 μM.

Unitermos: limoneno, Leishmania braziliensis, Química Medicinal.

ABSTRACT

Limonene is a natural product from the terpene family, found in great proportions in citrical plants, being reported in the literature as having interesting pharmacological activities, such as antibacterial, antifungical, antileishmanial, nociceptive and citotoxic. This thesis reports the funcionalization of limonene *via* Solid-Phase Organic Synthesis and classical solution-phase synthesis. Twenty products were obtained from the solution-phase protocols, especially from reactions such as hydroformylation and hydroaminomethylation. The compounds were tested for several pharmacological activities, *e.g.*: antibacterial, antifungical, anti-tripanossomal and anti-leishmanial. Seventeen of those compounds were tested against *in vitro* promastigote strains of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* and seven compounds were found to have greater anti-leishmanial activity than pentamidine, the standard drug used in this test, presenting IC₅₀ values ranging from 11,5 to 35,6 μM.

Keywords: limonene, Leishmania braziliensis, Medicinal Chemistry.

ANÁLISES INSTRUMENTAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Cromatografia Gasosa - CG

A cromatografia gasosa foi feita em um cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-17A, com um detector de ionização de chama (DIC) equipado com uma coluna DB-5 (30 m x 0,25 mm), pertencente ao Instituto de Química da UFRGS. Hidrogênio gasoso (fluxo de 1,1 mL/min) foi utilizado como gás de arraste. O aparelho foi programado para iniciar a análise com a coluna estabilizada a 50 °C, depois iniciar uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até que atingisse 250 °C, mantendo essa temperatura por 10 min (tempo total de análise: 30 min).

Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas - CG-MS

A espectrometria de massas foi realizada em um espectrômetro de impacto eletrônico (70 eV) Shimadzu modelo CGMS-QP5050 em modo SCAN na faixa de 45-400 daltons, acoplado a um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-17A equipado com uma coluna DB-17 (30 m x 0,25 mm), pertencentes ao Instituto de Química da UFRGS. Hélio foi usado como gás de arraste (fluxo de 1,4 mL/min). O método utilizado é o mesmo descrito anteriormente.

Cromatografia sólido-líquido

As cromatografias preparativas em coluna foram realizadas com sílica-gel 60 (MERCK), na proporção de cerca de 20 g de sílica para 1 g de amostra bruta a ser purificada. As misturas de eluentes utilizadas (em volume) são indicadas na Parte Experimental. As cromatografias analíticas foram foram efetuadas em placas de alumínio cobertas com uma camada de gel de sílica 60, F₂₅₄ (MERCK). As revelações foram realizadas com vapores de iodo e/ou com o auxílio do ultra-violeta, que permite estimar os valores de Rf.

Destilação Fracionada

As destilações fracionadas foram realizadas em um destilador de bolas Büchi acoplado a uma bomba de alto vácuo BOC Edwards, pertencente ao Instituto de Química da UFRGS.

Espectroscopia no Infra-Vermelho – IV

Os espectros de infra-vermelho com transformações de Fourier foram realizados em um espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo DR-8001, pertencente ao Laboratório de Análise e Preparação de Padrões Secundários (LAPPS), da Faculdade de Farmácia/UFRGS. As amostras isoladas sólidas foram misturadas com brometo de potássio (KBr), de modo a terem a proporção aproximada de 1,5%. As amostras de resina eram preparadas com proporção aproximada de 3,5%. As amostras líquidas foram lidas com o auxílio de pastilhas de cloreto de sódio (NaCl) lavadas com Hexano antes e após as análises.

Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do 1 H e do 13 C foram realizados em aparelhos INOVA e Varian com seqüências de pulsos operando a 300 MHz (1 H) e 75 MHz (13 C), pertencentes ao Instituto de Química da UFRGS. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em partes por milhão (ppm) e estão relacionados ao tetrametilsilano (TMS), utilizado como referência interna. O solvente empregado foi o CDCl₃, exceto indicação contrária. As constantes de acoplamento (J) estão expressas em Hz e as notações utilizadas foram as seguintes: s = singlete; d = dublete; t = triplete; m = multipleto.

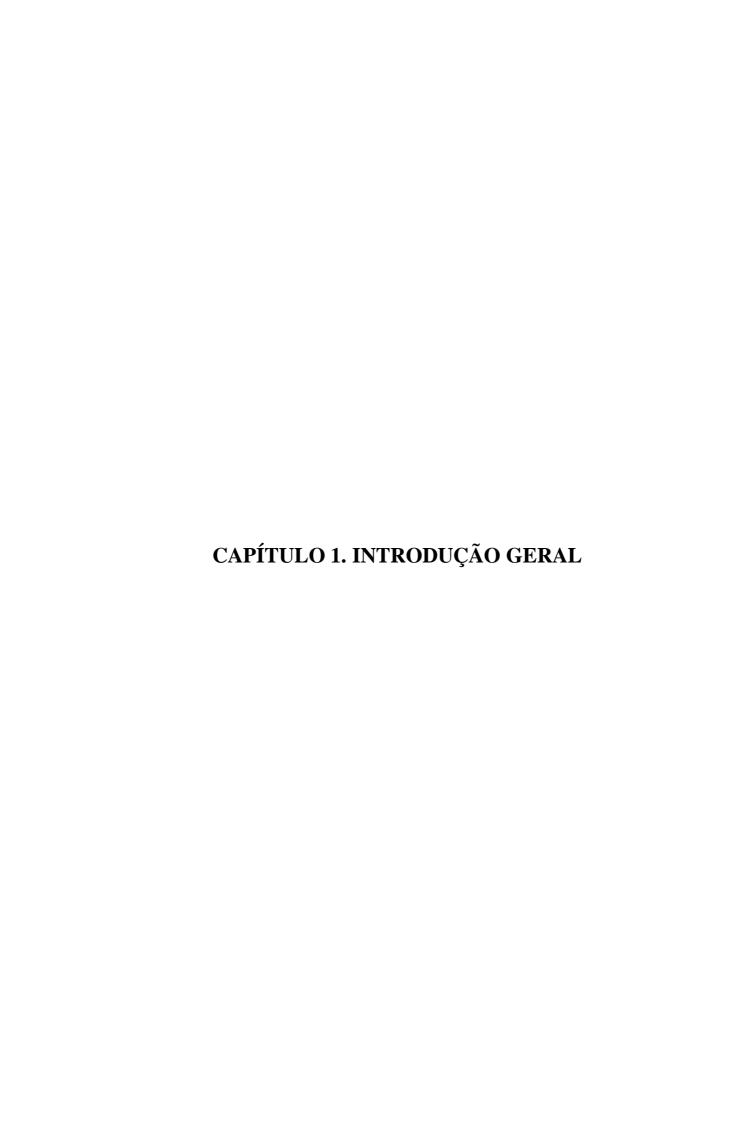
Reações em reator de Microondas (MO)

As reações utilizando MO como fonte de energia foram realizadas em um forno doméstico, marca SHARP, modelo CARROUSEL-II, com potência nominal máxima

de 900 W. As reações foram realizadas ajustando-se o seletor de potência à magnitude desejada (*i.e.*: para potência de 90 W utilizou-se a seleção de 10%, e assim por diante). As reações foram realizadas com o frasco reacional aberto.

Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados foram, após aquisição, purificados segundo Perrin (ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. **Purification of Laboratory Chemicals**. New York: Butterworth-Heinemann, 2003, 5^a. ed., 608 p.). Limoneno foi obtido da ACROS Organics, Bélgica. Óxido de limoneno foi obtido da ACROS Organics e da ALDRICH (EUA).



1.1. O LIMONENO

O limoneno é um monoterpeno encontrado no óleo essencial de várias plantas cítricas, especialmente o limoeiro e a laranjeira. Por apresentar um carbono assimétrico, o mesmo existe na forma de dois estereoisômeros (Figura 1.1): (*R*)-(+)-limoneno 1, encontrado no óleo essencial da laranja e do limão, e (*S*)-(-)-limoneno 2, no óleo essencial do capim-limão. A abundância destas plantas no Brasil e a abundância deste terpeno no óleo essencial dessas plantas tornam o mesmo um produto de fácil obtenção e baixo custo.

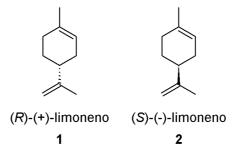


Figura 1.1. Estrutura do limoneno e seus dois estereoisômeros

O limoneno apresenta em sua estrutura química duas ligações duplas: uma endocíclica e outra na porção isopropenila. Essas duas insaturações são os principais pontos de funcionalização do limoneno, sendo possível realizar reações químicas com as mesmas quimiosseletivamente.

1.1.1. O limoneno como material de partida

Os estereoisômeros (R) e (S) do limoneno são encontrados na literatura como versáteis materiais de partida para a síntese de diversos compostos (Figura 1.2).

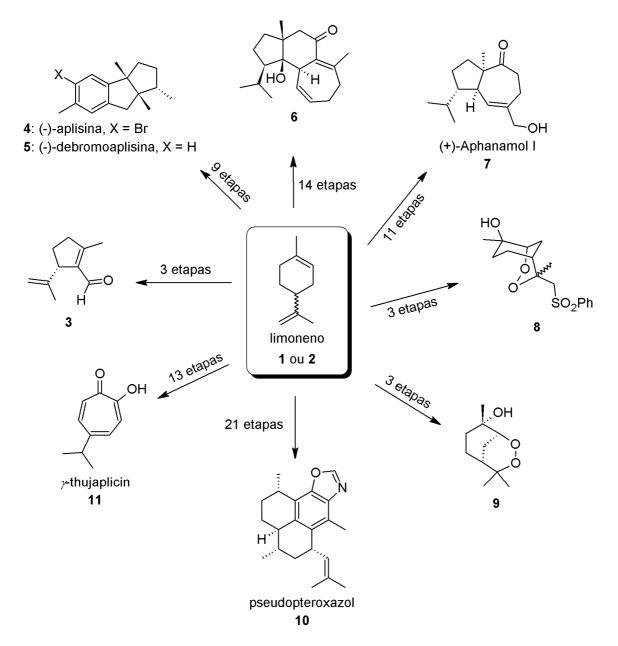


Figura 1.2. Produtos sintetizados a partir do (R) ou (S) limoneno

Recentemente o aldeído α,β -insaturado **3**, um precursor útil na síntese de outros produtos naturais, foi sintetizado a partir do limoneno¹. Este terpeno também foi utilizado como precursor da síntese formal dos produtos naturais de origem marinha (-)-aplysin **4** e (-)-debromoaplysin **5**².

O produto 6, um intermediário da síntese da Alociatina B2, composto capaz de induzir a produção de fatores de crescimento do tecido nervoso, foi sintetizado por Wender e colaboradores a partir do limoneno³. Wender e Zhang sintetizaram o

sesquiterpeno (+)-Aphanamol I 7, um produto natural com atividade citotóxica encontrado na casca da planta *Aphanamaxis grandifolia*⁴.

O endoperóxido **8**, relacionado estruturalmente com o endoperóxido natural Yingzhaosu A, apresentando atividade antimalárica *in vitro* foi sintetizado a partir do limoneno por Bachi e colaboradores em três etapas⁵. Outro endoperóxido, **9**, também relacionado com este produto natural, foi sintetizado por Tokyatsu e colaboradores em três etapas⁶.

Corey e Davidson sintetizaram a partir do limoneno, em 21 etapas, o produto natural pseudopteroxazol **10**, um produto obtido do coral *Pseudopteragorgia elisabethae* que apresentou atividade *in vitro* contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis*⁷.

A γ -thujaplicin **11**, uma tropolona monocíclica de origem natural com atividade antibacteriana e antifúngica, foi sintetizada a partir do limoneno por Soung e colaboradores em 13 etapas⁸.

1.1.2. Atividade antimicrobiana

O limoneno e outros terpenos estruturalmente relacionados apresentam interessantes atividades biológicas. Óleos essenciais de plantas contendo limoneno, entre outros terpenos, são capazes de inibir o crescimento de culturas de bactérias e fungos, quando testados puros ou em altas concentrações^{9,10}.

É importante ressaltar que, mesmo que o limoneno seja o componente majoritário nos óleos essenciais de algumas plantas cítricas (chegando até a proporção de 96%)¹¹, é possível que a atividade dos óleos seja devida a um sinergismo entre os vários terpenos presentes nos óleos. Jeongmok Kim e coloaboradores testaram onze terpenos isolados contra microrganismos presentes como contaminantes de alimentos e verificaram que, nas concentrações testadas, o limoneno não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos, embora outros terpenos estruturalmente relacionados como o carvacrol **12** (Figura 1.3) e o perilaldeído **13** tenham inibido o crescimento dos microrganismos¹².

Di Pasqua e colaboradores relataram que a adição de terpenos ao meio de cultura de algumas bactérias, em concentrações menores que a concentração inibitória mínima (CIM), causa alterações na composição de ácidos graxos insaturados na membrana dessas bactérias, provavelmente pela capacidade destes terpenos em interferir na biossíntese de ácidos graxos destas bactérias¹³.

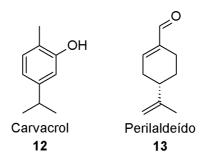


Figura 1.3. Estruturas do carvacrol e do perilaldeído

1.1.3. Trabalhos anteriores do Grupo de Pesquisa em Síntese Orgânica Medicinal

Visando a síntese de β -aminoálcoois, um grupo funcional com grande importância farmacológica e sintética por ser um precursor da síntese de vários compostos, Limberger sintetizou a partir do óxido de limoneno **14** (comercializado como uma mistura dos isômeros *cis/trans*) em reação de aminólise com alilamina e anilina, dois aminoálcoois **15** e **16**. Nas condições reacionais foi possível obter-se apenas o aminoálcool oriundo da aminólise do epóxido *trans*, permanencendo o óxido *cis* inalterado. A partir do derivado alilaminoálcool **15** em presença de PPh₃Br₂, sintetizou-se a aziridina **17**; enquanto que o éster metílico **18** foi sintetizado a partir do (R)-(+)-limoneno **7**. Os produtos inibiram o crescimento da bactéria *Micrococcus luteus* na concentração de 15 mg/mL, sendo que o éster **18** foi o mais ativo no teste. O limoneno, testado nas mesmas concentrações, não apresentou atividade (Figura 1.4) ¹⁴⁻

Figura 1.4. Síntese de derivados do limoneno por Limberger

Mais recentemente, Ferrarini expandiu esta família de aminoálcoois derivados do óxido de limoneno, sintetizando 11 aminoálcoois a partir de 11 diferentes aminas. Alguns desses aminoálcoois apresentaram atividades marcantes como agentes antileishmania, sendo o aminoálcool **16** (Figura 1.4) o mais ativo, com concentração que inibiu 50% do crescimento da cultura (IC₅₀) de 0,408 μM¹⁷.

1.1.4. Atividade citotóxica e antitumoral

Atividades citotóxicas e antitumorais foram encontradas para o limoneno e outros terpenos. É relatado na literatura o uso do limoneno na prevenção do surgimento de tumores em ratos^{18,19} e na reversão tumores induzidos por agentes cancerígenos no tecido gástrico de ratos Wistar²⁰.

Outro terpeno amplamente mencionado na literatura é o álcool perílico **19**¹⁹. Este álcool é um dos principais metabólitos do limoneno e apresenta atividade citotóxica e antitumoral. A atividade deste álcool é relacionada à inibição da enzima

farnesiltransferase²¹, envolvida na síntese do colesterol e importante para o crescimento celular e na diminuição da expressão do gene *ras*²², um gene envolvido na cascata de sinalização do crescimento celular desordenado e considerado um oncogene²³.

Figura 1.5. Estrutura do álcool perlílico

Esta atividade antitumoral foi considerada promissora a ponto de o álcool perílico ter sido testado clinicamente na Fase I^{24} e $II^{25,26}$.

1.1.5. Terpenos e derivados como leishmanicidas

Existem alguns relatos na literatura demonstrando a atividade leishmanicida de produtos naturais como diterpenos de *Cistus sp.*²⁷, timol e derivados semi-sintéticos²⁸, óleos essenciais de plantas como *Melissa oficinalis*, *Thymus vulgaris* e *Melaleuca alternifolia*²⁹ e triterpenos da planta nativa da floresta amazônica *Dolicarpus dentatus*³⁰.

Recentemente, Arruda realizou uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* com parasitas do gênero *Leishmania* e dois terpenos: nerolidol e limoneno. Nesses experimentos, detectou-se a atividade anti-leishmania dos dois compostos, onde o limoneno foi capaz de reduzir as lesões em 60-80% dos animais tratados por via tópica ou intraretal, além de diminuir a carga parasitária nas lesões. Investigações sobre o mecanismo de ação do limoneno indicam que o mesmo inibe a síntese do mevalonato (um precursor da biossíntese de esteróis como ergosterol, lanosterol e colesterol), através da inibição da enzima β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) sintase ou da enzima HMG-CoA redutase³¹.

Como mencionado anteriormente, foi sintetizado em nosso laboratório uma série de β -aminoálcoois que foram testados *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Dois dos produtos apresentaram valores de LD₅₀ de 0,408 \pm 0,01 e 0,71 \pm 0,095 μ M, inferiores aos da pentamidina, utilizado como fármaco de refência no teste¹⁷.

1.1.6. Atividade nociceptiva

O limoneno, quando injetado intraperitonealmente em ratos nas doses de 25 e 50 mg/Kg, apresenta um efeito antinociceptivo no teste do ácido acético e no segundo estágio do teste da formalina; mas não no teste da placa quente, o que parece indicar que o provável mecanismo de ação antinociceptiva do limoneno seja relacionado com a analgesia periférica e não com o estímulo de receptores opióides³².

1.2. OBJETIVOS GERAIS E ESTRATÉGIA DE SÍNTESE

Conforme apresentado anteriormente, o limoneno é um terpeno de fácil obtenção, usado como produto de partida na síntese de diversos compostos orgânicos e que apresenta interessantes atividades farmacológicas. Observa-se também que outros terpenos e alguns produtos sintéticos estruturalmente relacionados com o mesmo, apresentando funcionalizações em uma de suas ligações duplas com oxigênio e/ou nitrogênio, levam a produtos com uma atividade farmacológica mais pronunciada que a do próprio terpeno.

Esta tese insere-se, então, nesse contexto, ao propor a seguinte hipótese: a funcionalização com aminas de uma ou das duas ligações duplas do terpeno gerará compostos com uma atividade farmacológica mais pronunciada que a do limoneno.

Para tanto, empregar-se-á a técnica de Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS) para a obtenção dos derivados bis-funcionalizados (Figura 1.6), utilizando-se principalmente compostos nitrogenados. A Síntese Orgânica em Solução será empregada para a obtenção de uma série de compostos funcionalizados apenas na porção exocíclica do terpeno, utilizando-se aminas primárias e secundárias para a obtenção dos derivados.

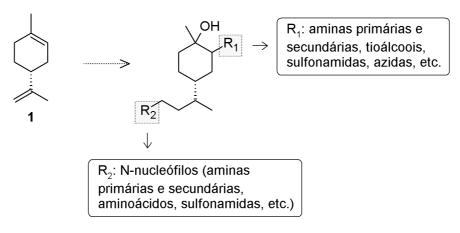


Figura 1.6.

De modo a facilitar a compreensão do manuscrito, esta tese está dividida em capítulos:

Capítulo 1: Introdução e Objetivos gerais do trabalho;

Capítulo 2: A Síntese em Fase Sólida de derivados do limoneno;

Capítulo 3: A Síntese em Solução de derivados do limoneno através das reações de hidroformilação e hidroaminometilação;

Capítulo 4: A avaliação das atividades antibacteriana, antifúngica, antitripanossoma e anti-leishmania dos compostos sintetizados;

Capítulo 5: Conclusões gerais e perspectivas.

1.3. REFERÊNCIAS

- 1. JR., J. J.; KOVER, R. X.; KOVER, W. B.; CASTRO, F. de L. A novel synthesis of 1-acetyl-4-isopropenyl-1-cyclopentene by chemoselective cyclization of 4-methyl-3-(oxobutyl)-4-pentenal: an important intermediate for natural product synthesis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 2, p. 112-116, 1999.
- 2. SRIKRISHNA, A.; BABU, N. C. An enantiospecific formal total synthesis of (-)-aplysin and (-)-debromoaplysin. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 4913–4914, 2001.
- 3. WENDER, P. A.; BI, F. C.; BRODNEY, M. A.; GOSSELIN, F. Asymmetric synthesis of the tricyclic core of NGF-inducing cyathane diterpenes via a transition-metal-catalyzed [5+2]-cycloaddition. **Organic Letters**, v. 3, n. 13, p. 2105-2108, 2001.
- 4. WENDER, P. A.; ZHANG, L. Asymmetric total synthesis of (+)-aphanamol I based on the transition metal catalyzed [5+2] cycloaddition of allenes and vinylcyclopropanes. **Organic Letters**, v. 2, n. 15, p. 2323-2326, 2000.
- 5. BACHI, M. D.; KORSHIN, E. E.; PLOYPRADITH, P.; CUMMING, J. N.; XIE, S.; SHAPIRO, T. A.; POSNER, G. H. Synthesis and in vitro antimalarial activity of sulfone endoperoxides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 903-908, 1998.
- 6. TOKUYASU, T.; KUNIKAWA, S.; ABE, M.; MASUYAMA, A.; NOJIMA, M.; KIM, H-S.; BEGUM, K.; WATAYA, Y. Synthesis of antimalarial Yingzhaosu A analogues by the peroxidation of dienes with Co(II)/O₂/Et₃SiH. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 7361-7367, 2003.
- 7. COREY, E. J.; DAVIDSON, J. P. First enantiospecific total synthesis of the antitubercular marine natural product Pseudopteroxazole. Revision of assigned stereochemistry. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 13486-13489, 2003.
- 8. SOUNG, M-G.; MATSUI, M.; KITAHARA, T. Regioselective synthesis of β and γ -Thujaplicins. **Tetrahedron**, v. 56, p. 7741-7745, 2000.
- 9. DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, p. 165-180, 1987.
- 10. DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 308-316, 2000.
- 11. CACCIONI, D. R. L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D. M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils

- and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 73-79, 1998.
- 12. KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.
- 13. DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2745-2749, 2006.
- 14. GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G. da; EIFLER-LIMA, V. L. Solid-phase synthesis of limonene derivatives. In: THE 2nd BRAZILIAN SIMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY. **Livro de Resumos...** Rio de Janeiro: Instituto Militar da Engenharia, 2004.
- 15. LIMBERGER, J. Carbonilação catalítica de alilaminoálcoois: síntese de hidróxigama-lactamas e oxazolidinas bicíclicas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- 16. LIMBERGER, J.; MOTTIN, M.; NACHTIGALL, F. F.; CASTELLANO, E. E.; ROSA, R. G. Rhodium-catalyzed carbonylation of allylaminoalcohols: catalytic synthesis of *N*-(2-hydroxy-alkyl)-gamma-lactams and bicyclic oxazolidines. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 294, p. 82-92, 2008.
- 17. FERRARINI, S. R. Síntese de β -aminoálcoois derivados do limoneno e avaliação biológica *in vitro*. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- 18. TSUDA, H.; OSHSHIMA, Y.; NOMOTO, H.; FUJITA, K. ICHI; MATSUDA, E.; IIGO, M.; TAKASUKA, N.; MOORE, M. A. Cancer prevention by natural compounds. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 19, n. 4, p. 245-264, 2004.
- 19. CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **The Journal of Nutrition**, p. 775S-778S, 1999.
- 20. UEDO, N.; TATSUTA, M.; IISHI, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANIA, T. Inhibition by *D*-limonene of gastric carcinogenesis induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine in wistar rats. **Cancer Letters**, v. 137, p. 131-136, 1999.
- 21. REN, Z.; ELSON, C. E.; GOULD, M. N. Inhibition of type I and type II geranylgeranyl-protein transferases by the monoterpene perillyl alcohol in NIH3T3 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 113–120, 1997.
- 22. CERDA, S. R.; IV, J. W.; THORGEIRSDOTTIR, S.; BROITMAN, S. A. R-(+)-perillyl alcohol-induced cell cycle changes, altered actin cytoskeleton, and decreased

- ras and p34cdc2 expression in colonic adenocarcinoma SW480 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 19-30, 1999.
- 23. HARDCASTLE, I. R.; ROWLANDS, M. G.; BARBER, A. M.; GRIMSHAW, R. M.; MOHAN, M. K.; NUTLEY, B. P.; JARMAN, M. Inhibition of protein prenylation by metabolites of limonene. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 801-809, 1999.
- 24. RIPPLE, G. H.; GOULD, M. N.; ARZOOMANIAN, R. Z.; ALBERTI, D.; FEIERABEND, C.; SIMON, K.; BINGER, K.; TUTSCH, K. D.; POMPLUN, M.; WAHAMAKI, A.; MARNOCHA, R.; WILDINGA, G.; BAILEY, H. H. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 390-396, 2000.
- 25. BAILEY, H. H.; LEVY, D.; HARRIS, L. S.; SCHINK, J. C.; FOSS, F.; BEATTY, P.; WADLER, S. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: eastern cooperative oncology group study E2E961. **Gynecologic Oncology**, v. 85, p. 464-468, 2002.
- 26. LIU, G.; OTTEL, K.; BAILEY, H.; UMMERSEN, L. V.; HORVARTH, D.; ALBERTI, D.; ARZOOMANIAN, R.; REZAZADEH, H.; MCGOVERN, J.; ROBINSON, E.; DEMETS, D.; WILDING, G. Phase II trial of perillyl alcohol (NSC64066) administered daily in patients with metastatic androgen independent prostate cancer. **Investigational New Drugs**, v. 21, p. 367-372, 2003.
- 27. FOKIALAKIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; TEKWANI, B. L.; SKALTSOUNIS, A. L.; DUKE, S. O. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus sp.* and semisynthetic derivatives thereof. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1775-1778, 2006.
- 28. ROBLEDO, S.; OSORIO, E.; MUNOZ, D.; JARAMILLO, L. M.; RESTREPO, A.; ARANGO, G.; VELEZ, I. *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1652-1655, 2005.
- 29. MIKUS, J.; HARKENTHAL, M.; STEVERDING, D.; REICHLING, J.; *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. **Planta Medica**, v. 66, p. 366-368, 2000.
- 30. SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (*Dilleniaceae*). **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 1-4, 1996.
- 31. ARRUDA, D. C. Caracterização da atividade leishmanicida de nerolidol e limoneno e da interferência desses terpenos na biossíntese de isoprenóides. **Tese de Doutorado**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.

32. AMARAL, J. F.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A.; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O.; SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effect of the monoterpene *R*-(+)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1217-1220, 2007.

CAPÍTULO 2. QUÍMICA COMBINATÓRIA: SÍNTESE EM FASE SÓLIDA DE DERIVADOS DO LIMONENO

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Química Combinatória

A Química Combinatória (QC) é definida pela IUPAC (*International Union for the Pure and Applied Chemistry*, ou União Internacional de Química Pura e Aplicada) como "o uso de um processo combinatório para produzir-se uma série de compostos a partir de uma série de blocos de construção". É possível definir-se de outra forma a QC como uma técnica usada na Química Medicinal que permite a síntese e subseqüente avaliação farmacológica de uma família de compostos, a partir da síntese da coleção de compostos simultaneamente, seguida da avaliação farmacológica simultânea desta mesma coleção. A grande vantagem desta técnica é o ganho de tempo que se obtém ao sintetizar-se toda a coleção de compostos simultaneamente, em vez de sintetizar-se um composto de cada vez (veja Figura 2.1) ².

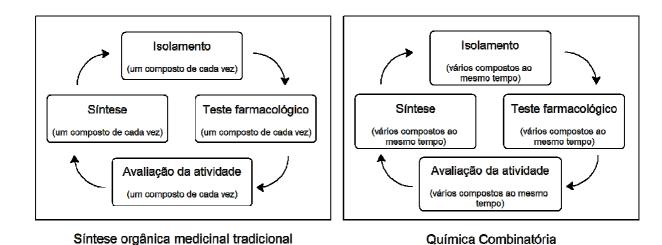


Figura 2.1. Comparação entre a Química Combinatória e a Síntese orgânica medicinal tradicional

A quimioteca (do inglês *Combinatorial Library*), isto é, a coleção de compostos obtida através de uma síntese combinatória, pode ser obtida tanto em paralelo (onde cada membro da quimioteca está isolado) ou em mistura (de grupos de membros ou de todos os membros da coleção). Quanto ao método de síntese, a mesma pode ser obtida por meio da Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS) ou pela síntese em solução (a síntese orgânica clássica).

A síntese de uma quimioteca pode ser caracterizada por sua natureza altamente modular, onde normalmente a mesma reação, com reagentes diferentes, está sendo realizada nas mesmas condições em paralelo ou em mistura. Portanto, é importante que esses múltiplos reagentes também sejam versáteis, com grupos funcionais facilmente transformáveis e/ou com pontos facilmente funcionalizáveis. Na Figura 2.2 é possível ver um exemplo de uma síntese combinatória de amidas. Nesse caso, os diferentes ácidos carboxílicos e as diferentes aminas são os blocos de construção da síntese que são unidos de modo a formar o produto final, a amida.

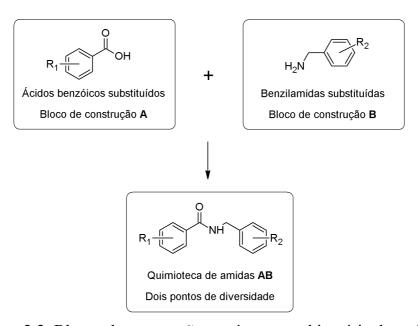


Figura 2.2. Blocos de construção na síntese combinatória de amidas

De modo a aumentar a eficiência da síntese e facilitar a tarefa do químico medicinal ao lidar com muitas reações sendo executadas simultaneamente, atualmente a QC apresenta-se com um alto grau de automatização. Existem empresas especializadas na produção e comercialização de reatores em paralelo, programáveis e permitem que se realizem várias reações simultaneamente.

É importante ressaltar que a QC não muda a síntese orgânica medicinal tradicional. As reações químicas que ocorrem na síntese são as mesmas, combinatorialmente ou não. A grande diferença entre as duas técnicas está no número de produtos obtidos no final da síntese planejada e na rapidez com que os resultados farmacológicos são obtidos e avaliados.

Desde seu início, a QC foi utilizada com a Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS), aliando-se assim a facilidade de purificação dos intermediários da rota sintética trazida pela SOFS com o ganho de tempo gerado na síntese das quimiotecas. Alguns exemplos da união dessas técnicas são as sínteses de derivados benzodiazepínicos³, oxazolidinonas⁴, β-lactamas⁵ e nucleosídeos⁶, entre outras.

O tamanho das quimiotecas publicadas na literatura nos anos 90 era normalmente grande (i.e.: com 1000 ou mais compostos)⁷, tendo-se em mente a suposição de que quanto maior o tamanho da quimioteca, não importando quais grupos funcionais seriam inseridos na molécula, maior era chance de se descobrir um novo *hit* (composto com uma atividade farmacológica marcante, normalmente na ordem de concentração de nanomolar). Alguns autores criticaram fortemente essa abordagem, afirmando que em vez de se aumentar o número de agulhas (compostos farmacologicamente ativos) em um palheiro, estava-se sim aumentando a quantidade de palha⁸. Essas grandes quimiotecas deram lugar a coleções menores, planejadas com o auxílio de outras ferramentas da química medicinal moderna, tais como: bioisosterismo, bioinformática, simplificação molecular, hibridização, entre outras. Essas quimiotecas são chamadas de *focused libraries*⁷.

Dentre os desafios apresentados na síntese de uma quimioteca, citam-se alguns: nem sempre todos os membros da quimioteca apresentarão o mesmo grau de rendimento e/ou de pureza, o que requer que se faça também, além da síntese, um trabalho de análise da quimioteca sintetizada, o qual também deve ser feito em paralelo de modo a evitarem-se "gargalos" na descoberta de novos compostos ativos e a otimização da síntese de modo a obterem-se os produtos em um alto grau de pureza. A síntese de quimiotecas em misturas também levou a vários problemas, como o grande número de falsos positivos nas misturas que não eram confirmados ao se sintetizar a mesma quimioteca em paralelo, certamente causado por efeitos sinérgicos entre os vários compostos da mesma, o que fez com que a síntese de misturas caísse em desuso em favor da síntese em paralelo. Além disso, o alto grau de automatização da síntese, análise e ensaios farmacológicos requerida para uma síntese combinatória requer um alto grau de investimento em equipamentos e materiais.

É conveniente salientar também que a QC não tem por objetivo direto "descobrir ou gerar novos fármacos", mas sim de "identificar, gerar e otimizar novos *hits*", os quais serão, por sua vez, otimizados até que sejam transformados em um "candidato a fármaco". Mesmo não sendo seu objetivo primordial é possível, entretanto, citar alguns exemplos de fármacos aprovados para uso terapêutico que são advindos da química combinatória, como o antineoplásico sorafenib⁹ **20** e o anti-HIV enfuvirtide¹⁰ (**21**, Figura 2.3).

Figura 2.3. Fármacos originados da Química Combinatória

2.1.2. Síntese Orgânica em Fase Sólida (SOFS)

A SOFS é uma técnica de síntese orgânica criada por Robert Bruce Merrifield em 1964^{11,12}. Essa técnica consiste, resumidamente, em ligar-se covalentemente o material de partida de interesse a um polímero inerte e insolúvel chamado de resina. Todas as modificações e funcionalizações planejadas são feitas então com o substrato preso à resina. No final da rota sintética, o substrato é clivado (liberado) da resina e o produto final é facilmente isolável¹³. Merrifield recebeu o prêmio Nobel de Química em 1984 "pelo desenvolvimento da metodologia de síntese química em uma matriz polimérica"¹⁴.

A maior vantagem do emprego da SOFS é a facilidade de purificação dos intermediários (Figura 2.4). Como a resina é inerte e insolúvel, a etapa de purificação consiste em uma filtração, lavando-se a resina com solventes de vários graus de polaridade. Essa facilidade de purificação permite, entre outras coisas, o uso de excesso de reagentes de modo a garantir o maior rendimento possível em cada etapa sintética. Além disso, na última etapa da rota sintética (a etapa de clivagem) a resina

continua a ser insolúvel e o produto, que agora será solúvel, é facilmente isolado, já em um alto grau de pureza. A facilidade da etapa de purificação permite também a automatização da síntese, especialmente na síntese de peptídeos, oligossacarídeos e oligonucleotídeos.

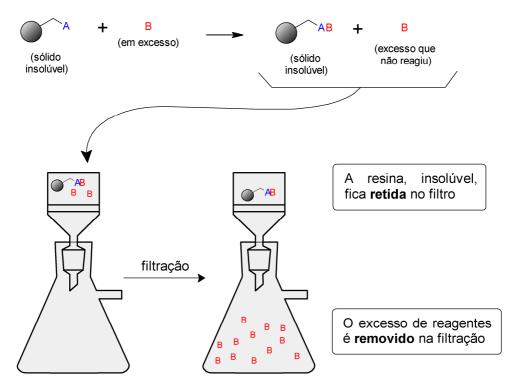


Figura 2.4. Ilustração do processo de purificação de uma etapa sintética usando SOFS

Com o uso desta técnica, Merrifield foi capaz de sintetizar peptídeos como a bradicinina (8 aminoácidos)^{15,16} e até mesmo enzimas completas, como a Ribonuclease A (120 aminoácidos)¹⁷. Atualmente, a SOFS é o método de escolha para a síntese de fármacos peptídicos. O antiretroviral enfuvirtide¹⁰ **21**, mencionado anteriormente, apresenta síntese industrial feita em quase sua totalidade (99 de 106 etapas) empregando-se a SOFS¹⁸.

2.1.2.1. As resinas

Como mencionado anteriormente, as resinas são polímeros inertes e insolúveis no meio reacional, nas quais o material de partida é acoplado como primeira etapa da rota sintética em fase sólida.

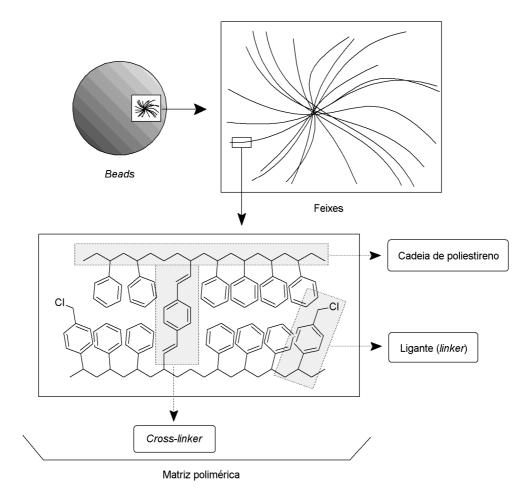


Figura 2.5. Representação esquemática da Resina Merrifield (adaptado da ref. 13).

Estas resinas são esferas de tamanho padronizado (chamadas na literatura de beads) e normalmente constituem-se (Figura 2.5) de uma matriz polimérica base, ligações cruzadas (cross-linker) e o ligante propriamente dito (linker). As cadeias do polímero base (normalmente compostas de poliestireno) são ligadas umas às outras pelas ligações cruzadas, dando às resinas suas características mecânicas. Normalmente o ligante cruzado é divinilbenzeno e a proporção destes ligantes reticuladores na resina normalmente não é superior a 2%, sendo então essas resinas denominadas resinas de poliestireno/divinilbenzeno (PS/DVB). A natureza química do ligante determinará qual o tipo de resina com a qual se trabalhará e também definirá quais as estratégias de acoplamento e clivagem que serão empregadas na síntese.

Entre as resinas de PS/DVB destacam-se as resinas Merrifield **22**, Wang **23** (as duas mais utilizadas na SOFS e nomeadas assim em homenagem a seus criadores), Cloro-Tritila **24** e BAL-linker **25** (Figura 2.6).

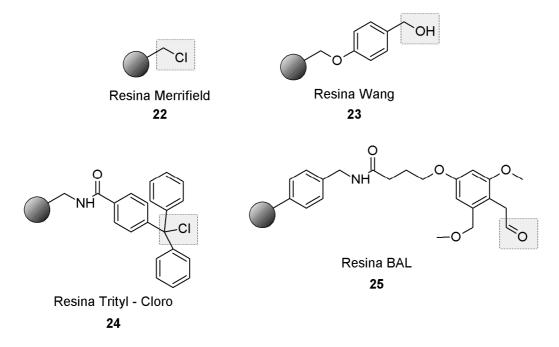


Figura 2.6. Alguns exemplos de resinas constituídas de PS/DVB (a porção reativa das mesmas está realçada na figura)

Existem também resinas que além de serem constituídas de PS/DVB apresentam um espaçador (normalmente polietilenoglicol) entre o polímero e o ligante. Isto permite que estas resinas sejam compatíveis com solventes de polaridade alta (água, etanol, etc.), ao contrário das resinas de PS/DVB, compatíveis com solventes de polaridade média (diclorometano, clorofórmio, tetrahidrofurano, dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, etc.). Estas resinas com polietilenoglicol (abreviadamente PS/DVB-PEG), disponíveis no mercado sob os nomes comerciais TentaGel[®], ArgoGel[®], entre outros, apresentam os mesmos ligantes das resinas de PS/DVB. Contudo, a presença de PEG nestas resinas torna-as mais suscetíveis a rompimentos da cadeia do espaçador em condições reacionais fortemente ácidas ou básicas¹⁹.

A compatibilidade das resinas com determinados solventes está ligada a uma propriedade físico-química das mesmas. Ao serem suspendidas em solventes, as mesmas são capazes de sofrer um intumescimento (*swelling*) e, dependendo do solvente, esse intumescimento pode ser maior ou menor. Na literatura convenciona-se que "bons" solventes para uma determinada resina são os solventes capazes de causar o maior intumescimento possível nas mesmas. Esse intumescimento é crucial para permitir uma melhor difusão do solvente e dos reagentes dentro da matriz polimérica,

garantindo o sucesso das reações. Solventes "bons" para as resinas de PS/DVB são solventes que apresentam polaridade mediana, tais como: tetrahidrofurano, dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, dimetilsulfóxido, diclorometano, entre outros. "Bons" solventes para as resinas de PS/DVB-PEG são solventes de polaridade alta, como água, etanol, acetonitrila, metanol, ácido fórmico, entre outros.

2.2. OBJETIVOS

Conforme apresentado na introdução deste manuscrito, o limoneno é um produto de partida, de fácil obtenção e baixo custo. Além disso, este terpeno e seus derivados apresentam atividades farmacológicas que o tornam um interessante composto a ser usado como bloco de construção na síntese de derivados visando compostos com atividades farmacológicas marcantes. Os trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa²⁰ mostram, de forma preliminar, que modificações em uma das olefinas do mesmo geram derivados com uma atividade antimicrobiana superior à do próprio limoneno.

Considerando-se que derivados com funcionalização em apenas uma das olefinas do limoneno apresentam uma atividade farmacológica maior que a do próprio terpeno, o objetivo deste capítulo é sintetizar uma quimioteca de derivados do (*R*)-(+)-limoneno 1, utilizando a SOFS como técnica de síntese e a resina Merrifield como suporte sólido. Essa quimioteca apresentará ambas as olefinas funcionalizadas com nucleófilos e outros derivados, e modo a verificar-se se as modificações planejadas gerarão derivados com atividades farmacológicas mais pronunciadas que a dos produtos já mencionados.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Detalhes da estratégia original

Visando, como detalhado nos objetivos deste capítulo, a síntese de derivados do limoneno com funcionalizações em ambas as olefinas, utilizando-se a SOFS como técnica de síntese, era necessário que uma das olefinas do limoneno 1 fosse funcionalizada com um grupo ácido carboxílico, de modo a realizar-se o acoplamento na Resina Merrifield utilizando a técnica clássica de acoplamento para esta resina (Figura 2.7.). Com a derivatização regiosseletiva do limoneno na forma de éster, procedeu-se para a funcionalização da outra olefina e a obtenção da quimioteca planejada.

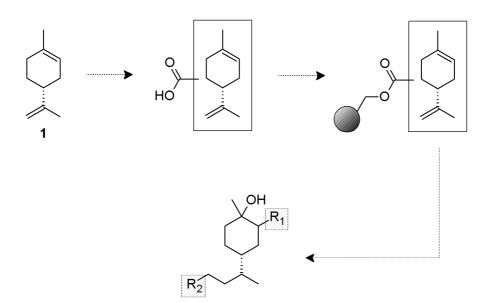


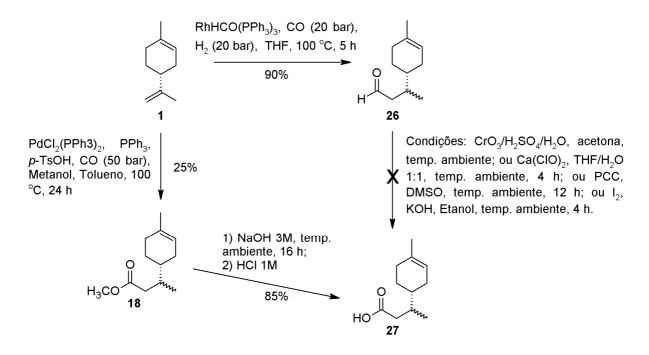
Figura 2.7. Detalhes da estratégia original de síntese

2.3.2. Estratégia "A": síntese do bloco de construção com o grupo ácido carboxílico

Optou-se pela estratégia de realizar-se a hidroformilação do limoneno, seguida da oxidação do aldeído obtido a ácido carboxílico para a ligação da resina na forma de éster.

A reação de hidroformilação é uma reação na qual a partir de uma olefina, CO, H₂ e um catalisador baseado em Ródio ou Cobalto, obtem-se um aldeído com um carbono a mais que a olefina usada como produto de partida. Essa reação será discutida em detalhes no Capítulo 3 desta tese.

O (*R*)-(+)-limoneno **1** foi então hidroformilado (Esquema 2.1), gerando o aldeído **26** como produto. A hidroformilação (como será discutido com detalhes no capítulo 3) permitiu a obtenção do aldeído **26** de forma quimio e regioseletiva, mas não enantioseletiva, pois a inserção do hidrogênio na ligação dupla exocíclica não é estereoseletiva, gerando o aldeído **26** como uma mistura de diastereômeros.



Esquema 2.1

Após várias tentativas com protocolos diferentes de oxidação do aldeído **26** ao respectivo ácido carboxílico **27**, como a oxidação de Jones (CrO₃/H₂SO₄/H₂O)²¹, hipoclorito de cálcio²², PCC/DMSO²³ e o protocolo de Yamada (I₂, KOH, EtOH)²⁴, não foi possível observar, nem por espectroscopia no infravermelho (IV) ou por Ressonância Magnética Nuclear do próton (¹H-RMN) e do carbono-13 (¹³C-RMN) a transformação do grupamento aldeído em ácido carboxílico. Além disso, durante a oxidação do aldeído com o protocolo de Jones observou-se pelo IV e por ¹H-RMN que

o aldeído isolado como produto não apresentava mais em sua estrutura a olefina endocíclica.

Para contornar esse problema, optou-se por modificar a estratégia inicial, realizando a metoxicarbonilação do limoneno 1, obtendo-se então o éster metílico 18 (Esquema 2.1) como produto. A reação de metoxicarbonilação é uma reação na qual, a partir de uma olefina, CO, um álcool e um catalisador baseado em Paládio, um éster é obtido como produto. Embora a reação tenha ocorrido em algumas tentativas com sucesso, esta reação não se apresentou confiável quanto à sua reprodutibilidade, pois não foi possível obter-se os rendimentos do protocolo estabelecido na literatura²⁵. Modificações no protocolo experimental levaram à obtenção do éster desejado, mas com um baixo rendimento, *ca.* 25%. Através da hidrólise do éster 18, obteve-se o ácido carboxílico 27, mas devido à falta de reprodutibilidade da reação e aos seus baixos rendimentos, optou-se por não usar esta abordagem para a obtenção dos derivados planejados.

O espectro no IV de **18** mostra uma banda em 1740 cm⁻¹ característica da carboxila de ésters. O espectro de ¹H-RMN mostra um singlete em $\delta = 3,5$ ppm característico de grupos metoxila (-OCH₃) e outro singlete em $\delta = 5,35$ ppm, atribuído ao próton da olefina endocíclica. O sucesso da hidrólise de **18** levando ao ácido **27** é comprovado pelo IV, que mostra o desaparecimento da banda em 1740 cm⁻¹ (atribuída à carboxila de ésteres) e ao surgimento de uma banda larga entre 3540-3000 cm⁻¹, atribuída à hidroxila do ácido, e em 1709 cm⁻¹, característica de ácidos carboxílicos alifáticos. Igualmente pelo ¹H-RMN com o desaparecimento do singlete em $\delta = 3,5$ ppm, o aparecimento de um singlete em $\delta = 10,15$ ppm, atribuído ao próton da função COOH e à manutenção do singlete em $\delta = 5,35$ ppm.

2.3.3. Estratégia "B": acoplamento via Resina Merrifield com ligante amina

Devido aos problemas apresentados pela estratégia "A" detalhados anteriormente, decidiu-se por explorar a versatilidade funcional do aldeído **26**, realizando o acoplamento *via* uma aminação redutiva.

Para realizar esse acoplamento, a Resina Merrifield **22** foi funcionalizada e transformada em uma resina modificada com um ligante aminometileno **28**. A estratégia sintética escolhida foi a substituição nucleofílica do cloro por um grupamento azida seguido da redução da mesma com trifenilfosfina e água (reação de Staudinger²⁶, Esquema 2.2). A azidação de **22** foi realizada sob irradiação de microondas²⁷, em um tempo total de reação de apenas 9 minutos.

Esquema 2.2

O aldeído **26** foi acoplado à Resina Merrifield modificada **28** através de uma aminação redutiva, usando ácido acético como catalisador da etapa de condensação e cianoborohidreto de sódio²⁸ como agente redutor, obtendo-se a amina secundária acoplada **29** como produto (Esquema 2.3).

Esquema 2.3

A amina secundária acoplada à resina **29** foi então tratada com o perácido *m*-clorobenzóico (*m*CPBA)²⁹, transformando a ligação dupla endocíclica em um epóxido. Este epóxido obtido foi prontamente aberto utilizando-se azida sódica como nucleófilo, gerando o azidoálcool **30** como produto (Esquema 2.4). A presença do

grupo azida no produto foi facilmente verificada através do IV, que mostrou uma banda em 2095 cm⁻¹, característica do grupo azida.

Esquema 2.4

O azidoálcool **30** foi acetilado com o emprego de cloreto de acetila, obtendo-se a amida **31** como produto (Esquema 2.5). Observou-se nessa etapa, por IV, o surgimento de uma banda em 1680 cm⁻¹, característica de carbonilas de amidas.

Esquema 2.5

A próxima etapa – a etapa de clivagem – foi baseada numa estratégia de clivagem de aminas acopladas à resina BAL-linker³⁰. Essa clivagem baseia-se na acetilação de uma amina secundária seguida da clivagem da mesma, liberando em solução uma amida monossubstituída. Essa clivagem foi realizada em meio fortemente ácido (Esquema 2.6), porém sem sucesso.

Esquema 2.6

2.3.4. Estratégia "C": Uso do ácido bromoacético como bloco de construção adicional

Após os problemas encontrados na estratégia "B" resolveu-se retornar ao acoplamento à Resina Merrifield **22** utilizando um ácido carboxílico. Para tanto, devido seu baixo custo, facilidade de manuseio (por ser um composto orgânico sólido) e pelo fato de que o mesmo tornar-se-ia no decorrer da síntese, um resíduo de aminoácido, escolheu-se o ácido bromoacético como reagente.

O ácido bromoacético foi acoplado à Resina Merrifield **22**, usando o protocolo clássico desta resina, levando ao haloéster acoplado **33** (Esquema 2.7). Essa reação foi realizada tanto sob irradiação de microondas em 10 minutos, quanto com agitação a temperatura ambiente durante 5 horas, ambas foram acompanhadas através de resultados indicativos do teste colorimétrico realizado com o reagente 4-(4'-nitrobenzil)-piridina (NBP)³¹. Resumidamente, este teste funciona a partir da reação do NBP com um haleto de alquila, formando um piridínio que apresenta uma coloração roxa intensa (ver seção 2.4.2.2).

Esquema 2.7

A amina secundária derivada do limoneno **34**, obtida através da reação de hidroformilação do limoneno na presença de *n*-propilamina (reação a qual será discutida mais amplamente no Capítulo 3 desta tese) foi utilizada como nucleófilo na substituição nucleofílica entre a mesma e o haloéster acoplado **33**, levando ao aminoéster substituído e preso à resina **35** (Esquema 2.8).

Esquema 2.8

O aminoéster acoplado **35** foi epoxidado e subsequentemente tratado com azida sódica, gerando o azidoálcool **36**. A presença do grupo azida no produto final foi confirmada por IV (*ca.* 2095 cm⁻¹) (Esquema 2.9).

Esquema 2.9

Não foi possível, entretanto, clivar-se o produto da resina através de protocolos de clivagem em meio básico (Esquema 2.10) ou ácido (Esquema 2.11). Monitoramento por IV mostrou que após as tentativas de clivagem a molécula continuou acoplada à resina. Tentativas de clivagens com protocolos mais enérgicos (i.e.: uso de temperatura, meios básicos e ácidos mais fortes) causaram a degradação da resina **36** e/ou da pequena quantidade de produto isolado.

Esquema 2.10

Esquema 2.11

2.3.5. Estratégia "D": aminoácidos e aminações redutivas

Outra estratégia experimentada baseou-se em elementos das estratégias anteriores, utilizando aminoácidos como blocos de construção e uma estratégia de acoplamento ao limoneno *via* aminação redutiva.

Dois aminoácidos protegidos com o grupo protetor de aminas Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil) a saber: glicina **39** e fenilalanina **40** foram acoplados em paralelo (Esquema 2.12) à Resina Merrifield **22**. Neste acoplamento a troca da base (Cs₂CO₃) por outra de custo menor (K₂CO₃) foi realizada com sucesso. O grupo protetor Fmoc foi removido com o uso de piperidina³², levando aos aminoésteres derivados da glicina e fenilalanina **41** e **42**, respectivamente.

1)
$$K_2CO_3$$
 (1,5 eq.), KI (1 eq.), DMF, 14 h, temp. ambiente;
2) Piperidina/DMF 1:5, 30 min., temp. ambiente
39: $R_1 = H$
40: $R_1 = Bz$
41: $R_1 = Bz$

Esquema 2.12

O aldeído 43, obtido através da hidroformilação do óxido de limoneno 14, foi acoplado em paralelo aos aminoésteres 41 e 42 *via* aminação redutiva, utilizando ácido acético como catalisador da etapa de condensação e cianoborohidreto de sódio como agente redutor, levando aos epóxidos 44 e 45, respectivamente (Esquema 2.13). O sucesso da aminação redutiva foi verificado com o teste colorimétrico de Kaiser³³, que utiliza ninhidrina como reagente e é amplamente utilizado para verificar o sucesso do acoplamento de aminoácidos em SOFS. Esse teste, específico para aminas primárias alifáticas, permitiu acompanhar o andamento da aminação redutiva.

Esquema 2.13

Para a abertura dos epóxidos 44 e 45, optou-se por uma estratégia modificada. A abertura de um epóxido é uma reação que requer normalmente condições mais energéticas para seu sucesso, sendo necessário normalmente o uso de um grande excesso do nucleófilo (p. ex.: aminas) ou algum catalisador (p. ex.: água³⁴). A aminólise de um éster, gerando uma amida, requer também condições forçadas, mas mais brandas do que as da aminólise de um anel epóxido. Ou seja, em situações como as dos produtos 44 e 45, é possível postular que se as mesmas forem submetidas a condições de aminólise do grupo epóxido, a aminólise do grupo éster ocorrerá primeiro, gerando amidas e depois a aminólise do epóxido, já em condições de síntese em solução.

Portanto, optou-se por realizar a aminólise de ambas as funções (éster e epóxido) ao mesmo tempo, utilizando-se microondas como fonte de aquecimento e *n*-propilamina como nucleófilo, de modo a se obter os produtos na forma de amidas. Após a reação (Esquema 2.14), as análises nos produtos isolados mostraram que

mesmo nas condições empregadas, apenas a aminólise da função éster ocorreu; ou seja, os produtos isolados **46** e **47** são epóxidos.

N-propilamina (10 eq.),

$$H_2O$$
, microondas (270 W),
 R_1

15 min.

NH

NH

NH

NH

NH

NH

NH

NH

R1

46: R1 = H

47: R1 = Bz

Esquema 2.14

2.3.6. Estratégia "E": Hidroformilação diretamente na resina

Após os problemas encontrados nas estratégias anteriores, resolveu-se inverter a ordem de algumas das reações da rota sintética planejada, de modo a evitar os problemas com a aminólise do epóxido e do éster. Para tanto, realizou-se primeiro a aminólise do óxido de limoneno 14 usando a glicina acoplada à Resina Merrifield 41 como nucleófilo e água como catalisador da reação, levando ao aminoálcool acoplado 48 (Esquema 2.15). A vantagem desta abordagem em relação às anteriores consiste no fato de que nessas condições apenas o isômero *trans* de 14 reage³⁴, sendo o isômero 15 removido por simples filtrações. O sucesso desta reação foi comprovado com o teste colorimétrico de Kaiser, que comprovou no final das 48 horas de reação o desaparecimento de aminas primárias livres no meio reacional. O teste de Kaiser é um teste clássico utilizado para a detecção de aminas primárias, utilizando ninhidrina como reagente identificador (ver 2.4.2.1).

Esquema 2.15

A hidroformilação da olefina **48**, entretanto, não foi realizada com sucesso (Esquema 2.16). Esta reação foi executada tanto com a resina separada fisicamente do agitador magnético (com o uso de um cartucho de papel-filtro) como com a mesma diretamente em contato com o agitador. Os espectros de IV da resina antes e depois da reação não apresentam diferenças. Nenhuma das bandas atribuíveis ao grupo aldeído, como a banda de carbonila em torno de 1710 cm⁻¹ ou a banda de C-H em torno de 2750-2800 cm⁻¹, foram detectadas.

Esquema 2.16

2.3.7. Considerações sobre a etapa de clivagem

Nas estratégias detalhadas acima, diversos protocolos de clivagem tentados não levaram à separação dos produtos da resina. Outros autores³⁵ relataram problemas na clivagem, especialmente com o uso do ácido trifluoroacético (TFA) como reagente, mas foram capazes de resolver as dificuldades com métodos alternativos, dos quais alguns foram testados, a saber: HCl 2 mol/L em THF³², hidróxido de sódio 2 mol/L em etanol¹¹, e carbonato de potássio em uma mistura de THF e água³⁶, todos sem sucesso. De um modo geral, nas clivagens com TFA ou não foi observada a clivagem (TFA 20-30% em CH₂Cl₂) ou apenas uma pequena fração da quantidade de produto esperada era recuperada (TFA 50% em CH₂Cl₂). Nas reações onde foi possível isolar-se uma quantidade suficiente de produto para realizar-se o espectro de ¹H-RMN, observou-se que o padrão dos picos do anel de 6 membros do limoneno estava diferente, o que indicou que nessas condições fortemente ácidas os produtos foram degradados, o que foi observado também durante a oxidação do aldeído **26** ao ácido carboxílico **27**. Outros trabalhos do laboratório com o limoneno em fase sólida³⁷ mostraram

igualmente a degradação deste terpeno durante a clivagem, confirmando a dificuldade de sua utilização em SOFS.

2.4. EXPERIMENTAL

2.4.1. Protocolos sintéticos

2.4.1.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanal 26

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1 mL, 1,19 g, 8,73 mmol), catalisador HRh(CO)(PPh₃)₃ (11,48 mg, 0,0125 mmol, 0,143 mol%) e THF (10 mL) foram colocados sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 20 bar de CO, 20 bar de H₂ e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 5 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica. A mistura obtida da coluna foi seca em bomba de álto vácuo com *trap* de nitrogênio líquido para remoção do solvente e dos produtos leves. Rendimento (CG-DIC): 95%. Rendimento isolado: 90%.

IV (cm⁻¹): 2780, 1728.

Espectrometria de massas: 166,40 (M⁺, 0,81).

¹H-RMN: (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,95 (3H, d, J = 8,6 Hz, H-4), 1,35 (3H, m, H-2'a + H-6), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,8 (1H, m, H-3), 1,98 (3H, s, H-2'a + H-5'), 2,25 (1H, m, H-2a), 2,5 (1H, dd, J = 22,3 Hz, 5,7 Hz, H-2b), 5,36 (1H, s, H-3'), 9,75 (1H, s, H-1).

¹³C-RMN: (75 MHz, CDCl₃, ppm): 16,6 (C-4*), 17 (C-4*), 23,5 (4'-<u>C</u>H₃), 26,5 (C-6'), 28 (C-2'), 29 (C-5'), 30,5 (C-3*), 30,8 (C-3*), 32 (C-5'), 38,5 (C-1'), 48 (C-2*), 48,3 (C-2*), 120,5 (C-3'), 134 (C-4'), 225 (C-1).

2.4.1.2. Ácido 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanóico 27

Uma solução de NaOH 3 mol/L em água (3,5 mL, 10,5 mmol) foi colocada gota a gota sobre o éster **18** (678 mg, 3,5 mmol) e esta mistura foi agitada a temperatura ambiente por 16 horas. Após este tempo a mistura reacional teve seu pH ajustado a 4 com HCl 1 mol/L. A solução tornou-se uma suspensão esbranquiçada. Esta suspensão foi extraída com 7 porções de hexano (volume de cada porção: 5 mL). As frações orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio, filtradas e o solvente foi removido por evaporação rotatória, obtendo-se um óleo de coloração amarelo-clara. Rendimento (isolado): 85%.

IV (cm⁻¹): 3540-3000 (largo), 1709.

Espectrometria de massas: 182,30 (M⁺, 0,64).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,95 (3H, m, H-4), 1,3 (2H, m, H-1' + H-6'a), 1,45 (1H, m, H-6'b), 1,6 (3H, s, 4'-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,7 (1H, m, H-2'b), 1,95 (4H, m, H-3 + H-2'a + H-5'), 2,15 (1H, m, H-2a), 2,45 (1H, dd, J = 21,7 Hz, 5,7 Hz, H-2b), 5,35 (1H, s, H-3'), 10,15 (1H, s, H-1).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, ppm): 16 (C-4), 22 (4'-<u>C</u>H₃), 25 (C-6'), 27 (C-2'), 29 (C-5'), 31 (C-3), 34 (C-1'), 38 (C-2*), 39 (C-2*), 120 (C-3'), 134 (C-4'), 180 (C-1).

2.4.1.3. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanoato de metila 18

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1,6 mL, 10 mmol), catalisador PdCl₂(PPh₃)₂ (70,14 mg, 0,1 mmol, 1 mol%), metanol (1 mL, 24,7 mmol), trifenilfosfina (79 mg, 0,3 mmol) e ácido *p*-toluenosulfônico (38 mg, 0,2 mmol) foi colocada sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 50 bar de CO e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 24 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica, seca sob vácuo e o resíduo oleoso foi purificado por cromatografia em coluna (usando Hexano e depois Acetato de Etila como eluentes). Rendimento (CG-DIC): 28%. Rendimento (isolado): 25%.

Espectrometria de massas: 196,30 (M⁺, 0,55).

IV (cm⁻¹): 2970, 1740, 1240.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, d, J = 8 Hz, H-4), 1,3 (4H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b + H-3), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,75 (1H, m, H-6'a) 1,95 (3H, s, H-2'a + H-5'), 2,15 (1H, m, H-2a), 2,4 (1H, dd, J = 16,1 Hz, 4,35 Hz, H-2b), 3,65 (3H, s, -OC<u>H</u>₃), 5,35 (1H, s, H-3').

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃, ppm): 16 (C-4), 24 (4'-<u>C</u>H₃), 27 (C-6'), 29 (C-2'), 31 (C-5'), 34 (C-3), 38 (C-1'), 39 (C-2), 51 (-O<u>C</u>H₃), 120 (C-3'), 134 (C-4'), 174 (C-1).

2.4.1.4. Resina Merrifield modificada com ligante aminometileno 28

Azidação da resina Merrifield: Uma grama (1000 mg, 2,5 mmol) de Resina Merrifield **22** (ACROS Organics, Bélgica) e 179 mg de azida sódica (2,75 mmol, 1,1 eq.) foram suspensas em 8 mL de DMF dentro de um frasco Erlenmeyer e colocadas em um forno de Microondas por 9 minutos à 10% da potência máxima (aprox. 90 W). Após esse tempo o frasco foi resfriado à temperatura ambiente, e a resina foi filtrada em funil sinterizado G3 ou G4 com 3 porções de 10 mL de THF, água e éter etílico e seca em estufa a vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3100, 2800-3000, 2087, 1601, 1450.

Redução de Staudinger: A resina obtida da reação anterior foi suspensa em THF e nessa suspensão adicionaram-se 1,972 g de PPh₃ (3 equiv., 7,5 mmol) e a mistura foi agitada por uma noite. Após esse tempo adicionou-se 7 mL de água destilada e deixou-se agitar a mistura por mais duas horas. A resina foi filtrada em funil sinterizado com 3 porções de 10 mL de THF e éter etílico e seca em estufa a vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3100, 2800-3000, 1601, 1450.

2.4.1.5. Síntese da amina secundária acoplada 29

Em um balão de duas bocas acoplado com um condensador foram adicionados 200 mg da resina **28** (0,5 mmol de amina), 91 mg do aldeído **26** (1,2 equiv., 0,55 mmol), 18 mg de cianoborohidreto de sódio (0,275 mmol, 0,5 eq. em relação ao aldeído), duas gotas de ácido acético (o suficiente para o pH do meio reacional estar em torno de 5, conforme indicador universal) e 5 mL de DMF. O balão foi aquecido com banho de óleo de silicone e mantido à temperatura de 60 °C por 18 h. Após esse tempo o sistema foi resfriado, a resina foi filtrada em funil sinterizado com 3 porções de 10 mL de água, etanol e éter etílico e seca em estufa a vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3100, 2800-3000, 1601, 1450.

2.4.1.6. Síntese do azidoálcool acoplado 30

Epoxidação: 200 mg da amina **29** (0,5 mmol) foram suspensas em 5 mL de diclorometano. A essa suspensão foram adicionadas 431 mg de *m*CPBA (2,5 mmol, 5 equiv.) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente por dois dias. Durante o curso da reação ocorreu a precipitação de um sólido branco (provavelmente o ácido *m*-clorobenzóico, que é insolúvel em diclorometano). Após esse tempo a resina foi filtrada com 3 porções de 10 mL de etanol, diclorometano e éter etílico e seca sob vácuo.

Azidólise do epóxido: A resina proveniente da epoxidação foi suspensa em 6 mL de DMF em um frasco de Erlenmeyer, adicionou-se 65 mg de azida sódica (1

mmol, 2 equiv.) e a mistura foi aquecida por 15 minutos em um forno de microondas à 10% da potência máxima (aprox. 90 W). Após esse tempo o frasco foi resfriado e a resina foi filtrada em funil sinterizado com 3 porções de 10 mL de água, etanol e éter etílico e então seca sob vácuo.

IV (cm⁻¹): 3600-3000 (largo), 3000-3200, 2800-3000, 2091, 1601, 1450.

2.4.1.7. Síntese do azidoálcool N-acetilado 31

Em um frasco de Erlenmeyer foram adicionados 200 mg do azidoálcool acoplado **29** (0,5 mmol), 5 mL de DMF e 0,3 mL de cloreto de acetila em DMF (1 equiv. de AcCl) adicionado gota a gota sob a suspensão, sendo a mesma agitada por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo a resina foi filtrada em funil sinterizado com 3 porções de 10 mL de DMF, DMF/água 1:1 e éter etílico, e seca sob vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3200, 2800-3000, 2091, 1690, 1601, 1450.

2.4.1.8. Síntese do éster α -bromoacético acoplado à resina Merrifield 33

Em um frasco de Erlenmeyer foram adicionados 1000 mg de Resina Merrifield **22** (2,5 mmol), 522 mg de ácido bromoacético **32** (3,75 mmol, 1,5 equiv.), 408 mg de carbonato de Césio (1,25 mmol, 0,5 equiv.) e 6 mL de DMF. A mistura foi aquecida em forno de microondas por 9 minutos à 10% da potência máxima. Após resfriamento a resina foi filtrada em funil sinterizado e lavada com 3 porções de 10 mL de água, etanol e éter etílico, e seca sob vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3200, 2800-3000, 1745, 1601, 1450, 1290.

2.4.1.9. Síntese da amina terciária acoplada à resina 35

Em um balão de duas bocas acoplado a um condensador de refluxo foram adicionados 500 mg da resina **33** (1,25 mmol), 411 mg da amina **34** (1,375 mmol, 1,1

equiv.), 0,18 mL de trietilamina (1,25 mmol) e 6 mL de DMF. A reação foi mantida à temperatura de 60 °C por uma noite. Após esse tempo a reação foi resfriada e a resina filtrada em funil sinterizado, sendo lavada com 3 porções de 10 mL de DMF, água, etanol e éter etílico, e seca sob vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3200, 2800-3000, 1745, 1601, 1450, 1290.

2.4.1.10. Síntese do azidoálcool 36

O protocolo para a síntese do azidoálcool **36** é semelhante ao protocolo para a síntese do azidoálcool acoplado **30** partindo-se de 500 mg da resina **35**.

IV (cm⁻¹): 3600-3000 (largo), 3000-3150, 2800-3000, 2091, 1745, 1601, 1450, 1290.

2.4.1.11. Acoplamento e desproteção da glicina e fenilalanina (síntese dos aminoésteres 41 e 42)

Em um frasco de Erlenmeyer foram adicionados 1000 mg da Resina Merrifield **22** (2,5 mmol), 519 mg de carbonato de potássio (3,75 mmol, 1,5 eq.), 415 mg de iodeto de potássio (2,5 mmol), 7 mL de DMF e 3,75 mmol (1,5 equiv.) do aminoácido protegido com o grupo Fmoc (1115 mg de glicina-Fmoc-OH **39** ou 1453 mg de fenilalanina-Fmoc-OH **40**). O frasco foi agitado à temperatura ambiente por 14 horas. Após esse tempo a resina foi filtrada em funil sinterizado e lavada com 4 porções de 10 mL de água, etanol e éter etílico, e seca sob vácuo. A desproteção do grupo Fmoc foi realizada com piperidina 20% em DMF, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a desproteção, o teste de Kaiser feito com a resina seca deu positivo, indicando a presença de aminas primárias.

IV (cm⁻¹): 3000-3160, 2800-3000, 1735, 1601, 1450, 1290.

2.4.1.12. Síntese dos aminoésteres substituídos 44 e 45

Em um balão de duas bocas acoplado com um condensador de refluxo foram adicionados 500 mg de resina acoplada com um dos aminoácidos (**41** ou **42**) (1,25 mmol), 488 mg do aldeído **43** (1,875 mmol, 1,5 equiv.), 6 mL de DMF e três gotas de ácido acético glacial (quantidade suficiente para o pH do meio ficar próximo de 5 usando-se um indicador universal de pH). A reação foi aquecida a 60 °C por 4 horas. Após esse tempo adicionou-se 157 mg de cianoborohidreto de sódio (2,5 mmol, 2 equiv) e a reação foi mantida aquecida (60 °C) por 15 horas. A reação foi resfriada e a resina filtrada e lavada com 3 porções de 10 mL de etanol, água e éter etílico e seca sob vácuo. Teste de Kaiser realizado com a resina seca deu um resultado negativo, evidenciando a alquilação do grupo amina primária.

IV (cm⁻¹): 3000-3160, 2800-3000, 1735, 1601, 1450, 1290.

2.4.1.13. Síntese do aminoálcool acoplado 48

Em uma ampola com tampa rosca foram adicionados 700 mg (1,75 mmol) do aminoácido acoplado **41**, 534 mg (3,5 mmol, 2 equiv.) de óxido de limoneno **14**, 0,5 mL de água e 5 mL de DMF. A mistura foi mantida em refluxo por 48 horas. Após esse tempo a reação foi resfriada e a resina foi filtrada em funil sinterizado, lavada com 3 porções de 10 mL de água, etanol e éter etílico e seca sob vácuo.

IV (cm⁻¹): 3000-3200, 2800-3000, 1726, 1670, 1601, 1450, 1210.

2.4.2. Testes colorimétricos

2.4.2.1. Teste de Kaiser (Ninhidrina)

Uma pequena amostra (menos de 10 mg) de resina da reação a ser analisada foi retirada da reação e lavada com algumas porções de etanol. A amostra de resina foi colocada em um tubo de ensaio e sobre este tubo foram colocadas 3 gotas das seguintes soluções: fenol 50% em etanol e ninhidrina 10% em etanol (preparada na

hora do ensaio), mais 3 gotas de piridina. O tubo foi fechado e aquecido em banho de óleo a 100 °C por 5 minutos. Junto com a amostra outro tubo, normalmente com glicina, era testado junto, de modo a se obter um padrão positivo. O teste é considerado positivo (isto é, detecta a presença de aminas primárias na amostra) quando após o aquecimento a solução apresenta uma coloração azul-púrpura intensa, cor conhecida na literatura como "Azul de Ruhemann".

2.4.2.2. Teste do NBP

Uma pequena amostra da resina a ser analisada (*ca.* 10 mg) foi colocada em um tubo de ensaio. Nesse mesmo tubo foi colocado 0,25 mL de uma solução de 4-(4'-nitrobenzil)-piridina (NBP) 0,05 mol/L em CH₂Cl₂/DMF 1:1, e uma gota de trietilamina. Em outro tubo foi colocada uma pequena amostra da resina Merrifield (3), a solução de NBP e trietilamina, de modo a se obter um padrão positivo de comparação. O tubo é deixado sob temperatura ambiente por 15 minutos e após esse tempo o resultado do ensaio é avaliado. É considerado um resultado positivo (presença de haletos de alquila, ou seja, resina Merrifield com ligantes que não reagiram) quando a resina apresenta uma coloração violeta.

2.5. CONCLUSÕES

O aldeído do limoneno não se mostrou um bom bloco de construção para a SOFS usando a resina Merrifield, devido principalmente à sua labilidade frente a protocolos de oxidação, os quais impediram a síntese direta do derivado com o grupo ácido carboxílico. Essa dificuldade levou a outras estratégias sintéticas que aproveitaram a versatilidade do grupo aldeído, especialmente *via* a reação de aminação redutiva, técnica com a qual foi possível acoplar-se o limoneno à Resina Merrifield já parcialmente funcionalizada.

Embora a SOFS tenha se mostrado uma técnica rápida e ágil de síntese orgânica, não foi possível obter-se a quimioteca planejada de produtos através dessa técnica. Muitos dos problemas na técnica remetem-se às dificuldades na clivagem dos derivados da resina. Contudo, foi possível desenvolver e otimizar várias das etapas pré-clivagem da rota sintética, como o acoplamento e a aminação redutiva, para citar dois exemplos. O uso da irradiação por microondas, da espectroscopia no IV e dos testes colorimétricos foram de grande ajuda na otimização destas etapas.

As dificuldades de clivagem do limoneno podem ser remetidas à instabilidade do mesmo em meio ácido ou básico fortes, onde observou-se no decorrer do capítulo que ou não ocorria a clivagem nas condições utilizadas, ou que quando era possível obter um produto isolado da reação, observou-se que o composto não resistia às condições de clivagem, degradando-se. O uso de uma resina com um ligante mais sensível a meios ácidos que a resina Merrifield 22, como a resina Tritil-cloro 24, apresenta uma probabilidade maior de sucesso na quimioteca planejada (e de outras) usando-se a SOFS e o limoneno como produto de partida.

2.6. REFERÊNCIAS

- 1. MACLEAN, D.; BALDWIN, J. J.; IVANOV, V. T.; KATO, Y.; SHAW, A.; SCHNEIDER, P.; GORDON, E. M. Glossary of terms used in combinatorial chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2349-2365, 1999.
- 2. AMARAL, P. A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química combinatória. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 351-363, 2003.
- 3. BUNIN, B. A.; ELLMAN, J. A. A general and expedient method for the solid-phase synthesis of 1,4-benzodiazepine derivatives. **The Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10997, 1992.
- 4. BUCHSTALLER, H-P. Solid-Phase synthesis of oxazolidinones by cycloaddition of resin-bound epoxides with isocyanates. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 5, p. 789-793, 2003.
- 5. LE ROY, I.; MOUYSSET, D.; MIGNANI, S.; VUILHORGNE, M.; STELLA, L. Solid phase β-lactams synthesis using the Staudinger reaction, monitored by ¹⁹F-NMR spectroscopy. **Tetrahedron**, v. 59, p. 3719-3727, 2003.
- 6. VARAPRASAD, C. V.; HABIB, Q.; LI, D. Y.; HUANG, J.; ABT, J. W.; RONG, F.; HONG, Z.; AN, H. Synthesis of novel exocyclic amino nucleosides by parallel solid-phase combinatorial strategy. **Tetrahedron**, v. 59, p.2297-2307, 2003.
- 7. DOLLE, R. E. Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 2003. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 623-679, 2004.
- 8. LAHANA, R. How many leads from HTS? **Drug Discovery Today**, v. 4, p.447-448, 1998.
- 9. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v 70, p. 461-477, 2007.
- 10. BRAY, B. L. Large-scale of peptide therapeutics by chemical synthesis. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 2, p. 587-593, 2003.
- 11. MERRIFIELD, R. B. Solid-phase organic synthesis 1. The synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, p. 2149, 1963.
- 12. MERRIFIELD, R. B. Solid-phase organic synthesis. IV. The synthesis of methyonyl-lysyl-bradikinin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 3100-3102, 1964.

- 13. 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.
- 14. MERRIFIELD, R. B. Solid phase synthesis. In: FRÄNGSMYR, T.; MALMSTRÖM, B. G. (Ed.). **Nobel Lectures, Chemistry, 1981-1990**. Singapura: World Scientific Publishing Co., 1992.
- 15. 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.
- 16. MERRIFIELD, R. B. Solid-phase peptide synthesis, 3. An improved synthesis of bradykinin. **Biochemistry**, v. 3, p. 1385-1390, 1964.
- 17. GUTTE, B.; MERRIFIELD, R. B. The synthesis of ribonuclease A. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 1922-1941, 1971.
- 18. 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.; LICHTY, M. Development of HIV fusion inhibitors. **Journal of Peptide Science**, v. 11, p. 744-753, 2005.
- 19. RAPP-POLYMERE GMBH. **TentaGel Resins: a brief summary and overview**. Disponível em http://www.rapp-polymere.com/preise/tent_s_d.htm. Acesso em 22/02/2008.
- 20. GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G. da; EIFLER-LIMA, V. L. Solid-phase synthesis of limonene derivatives. In: THE 2nd BRAZILIAN SIMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY. **Livro de Resumos...** Rio de Janeiro: Instituto Militar da Engenharia, 2004.
- 21. EISENBRAUN, E. J. Cyclooctanone. **Organic Syntheses Collection**, v. 5, p. 310, 1973.
- 22. LAN, J.; LI, J.; LIU, Z.; LI, Y.; CHAN, A. S. C. The first total synthesis of (-)-sinulariol-B and three other cembranoids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 1877-1885, 1999.
- 23. SARASWAT, S.; SHARMA, V.; BANERJI, K. K. Kinetics and mechanism of oxidation of aliphatic aldehydes by pyridinium chlorochromate. **Indian Journal of Chemistry A**, v. 40, p. 583-587, 2001.
- 24. YAMADA, S.; MORIZONO, D.; YAMAMOTO, K. Mild oxidation of aldehydes to the corresponding carboxylic acids and esters: alkaline iodine oxidation revisited. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 4329-4322, 1992.

- 25. BARROS, H. J. V.; OSPINA, M. L.; ARGUELLO, E.; ROCHA, W. R.; GUSEVKAYA, E. V.; SANTOS, E. N. Rhodium catalyzed hydroformylation of betapinene and camphene: effect of phosphorous ligands and reaction conditions on diastereoselectivity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 671, p. 150, 2003.
- 26. SCRIVEN, E. F. V.; CANTER, F. C.; Azides: their preparation and synthetic uses. **Chemical Reviews**, v. 77, p. 297-368, 1988.
- 27. GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O uso do forno de microondas na síntese orgânica em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, p. 73-76, 2005.
- 28. HUDLICKY, M. Reductions in Organic Chemistry. New York: Marcel Dekker, 1984.
- 29. LE HELET, C.; DAVID, M.; CARREAUX, F.; CARBONI, B.; SAULEAU, A. Synthesis of functionalized γ-and δ-lactones via polymer-bound epoxides. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 2593-2595, 1997.
- 30. OUYANG, X.; TAMAYO, N.; KISELYOV, A. S. Solid support synthesis of 2-substituted dibenz[b,f]oxazepin-11(10*H*)-ones *via* SN_{Ar} methodology on AMEBA resin. **Tetrahedron**, v. 55, p. 2827-2834, 1999.
- 31. GALINDO, F.; B. ALTAVA; BURGUETE, M. I.; GAVARA, R.; 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, 2004.
- 32. WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W.; Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. New York: Wiley-Interscience, 2006, 4^a. ed.
- 33. KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, p. 595-598, 1970.
- 34. CHRISMAN,W.; CAMARA, J. N.; MARCELLINI, K.; SINGARAM, B.; GORALSKI, C. T.; HASHA, D. L.; RUDOLF, P. R.; NICHOLSON, L.W.; BORODYCHUK, K. K. A simple and convenient synthesis of beta-amino alcohol chiral auxiliaries based on limonene oxide. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 5805-5807, 2001.
- 35. MEESTER, W. J. N.; RUTJES, F. P. J. T.; HERMKENS, P. H. H.; HIEMSTRA, H. Synthesis of homoallylic amines via *N*-acyliminium ion reactions on solid support. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 1601, 1999.
- 36. HUFFMAN, W. F.; HALL, R. F.; GRANT, J. A.; HOLDEN, K. G. Nuclear analogs of beta-lactam antibiotics. 4. Total synthesis of bisnorisopenicillins from antibacterially active monocyclic beta-lactam precursors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 21, 413, 1978.

37. GRAEBIN, C. S.; FERRARINI, S. R.; CANTO, R. F. S.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. The use of SPOS to prepare a library of limonene beta-aminoalcohols as potential antiparasitic agents. *In:* THE 12th BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS. **Book of Abstracts...** Florianópolis: UFSC, 2007.

CAPÍTULO 3. SÍNTESE EM SOLUÇÃO DE DERIVADOS DO LIMONENO ATRAVÉS DAS REAÇÕES DE HIDROFORMILAÇÃO E HIDROAMINOMETILAÇÃO

3.1. INTRODUÇÃO

3.1.1. Hidroformilação

3.1.1.1. Aspectos gerais

A reação de hidroformilação foi descoberta acidentalmente por Otto Roelen¹, na indústria alemã Ruhrchemie em 1938. Enquanto trabalhava na reação de Fischer-Tropsch, ele observou uma quantidade apreciável de aldeídos e cetonas junto com os produtos desejados da reação (olefinas com cadeias alongadas). Por esse motivo a hidroformilação também é conhecida na literatura como "processo oxo", "oxo process" ou "oxo synthesis". A princípio achou-se que o catalisador heterogêneo da reação de Fischer-Tropsch (uma mistura de óxidos metálicos) era o responsável pela hidroformilação, mas estudos posteriores mostraram que o verdadeiro catalisador era homogêneo, HCo(CO)₄, resultado da reação do óxido de cobalto presente no catalisador com os gases CO e H₂ presentes na reação².

Esta reação consiste na adição de um hidrogênio e de um grupo formila (-CHO), através de CO e H₂, a uma olefina, gerando como produto um aldeído que apresenta um carbono a mais que a olefina de partida. Dependendo da olefina que é utilizada como produto de partida, a hidroformilação pode gerar como produtos dois aldeídos: o aldeído linear (*n*-aldeído), resultado da inserção do grupo formila de um modo *anti*-Markownikow, e o aldeído ramificado (ou *iso*-aldeído), resultado da inserção do grupo formila *via* Markownikow à olefina (Figura 3.1)².

Figura 3.1. Reação de hidroformilação

Dependendo das condições da reação como temperatura, pressão dos gases, catalisador utilizado, etc, outros produtos, oriundos reações paralelas também podem ser observados, tais como: outros alcenos, devido a reações de isomerização, alcanos,

devido à hidrogenação da olefina, alcoóis, resultado da hidrogenação dos aldeídos obtidos no final da reação, e também produtos pesados, derivados de condensações aldólicas. A quimiosseletividade, regiosseletividade e a proporção dos produtos paralelos obtidos podem ser controladas através da escolha do catalisador e das condições da reação, o que torna a otimização do processo crucial para efetuar-se a reação em escala laboratorial e industrial.

O aldeído normalmente não é o produto final da síntese, mas sim um intermediário para a síntese de outros produtos, graças à sua grande versatilidade funcional em reações como: oxidações (formando ácidos carboxílicos e ésteres), reduções (formando alcoóis), olefinações (reações como as de Wittig, Horner-Wadsworth-Emmons e McMurry), condensações (ex: condensação aldólica), formação de iminas e enaminas, aminações redutivas, entre outras.

Como já mencionado anteriormente, o primeiro catalisador utilizado foi o catalisador homogêneo HCo(CO)₄. Trabalhos posteriores no início da década de 60 mostraram que a adição de fosfinas terciárias aos catalisadores aumentava a atividade dos mesmos e permitia realizar a reação em condições mais brandas que a do catalisador original. Esses sistemas são chamados de catalisadores de cobalto modificados. Com o catalisador de cobalto não modificado, a reação é realizada em temperaturas entre 150-180 °C e pressões de 200-350 bar. Com os catalisadores de cobalto modificados as temperaturas usuais estão entre 100-150 °C e as pressões entre 50-100 bar. Com esse sistema modificado, a hidrogenação dos aldeídos obtidos como produto é muito rápida, recuperando-se alcoóis primários como o produto dessa reação. Os catalisadores modificados de cobalto também alteram a regiosseletividade da reação, aumentando a seletividade para o produto *n* (linear)³.

Os trabalhos de Wilkinson e colaboradores⁴ na metade da década de 1960, utilizando catalisadores baseados em ródio com fosfinas terciárias (catalisadores de ródio modificados), foram um grande avanço no estudo dessa reação, pois com esses catalisadores é possível realizar a reação em temperaturas entre 100-120 °C e com pressões moderadas (15-20 bar). Embora o ródio seja um metal com um custo bem maior que o cobalto, a alta atividade dos catalisadores de ródio modificados faz com

que as reações feitas com os mesmos sejam realizadas com uma proporção metal/olefina bem menor que a das reações com cobalto, o que compensa em parte o alto custo do metal^{2,3}.

Nas hidroformilações com catalisadores baseados em ródio, podem-se usar diferentes precursores catalíticos, tais como RhCl(CO)(PPh₃)₃, RhH(CO)(PPh₃)₃, Rh₄(CO)₁₂ + PPh₃, Rh₂(AcO)₄ + PPh₃. Nas condições da reação de hidroformilação, todos eles formam a espécie ativa RhH(CO)₂(PPh₃)₂. Segundo Wilkinson, há dois caminhos possíveis no mecanismo desta reação: o associativo e o dissociativo^{2,3} (Figura 3.2).

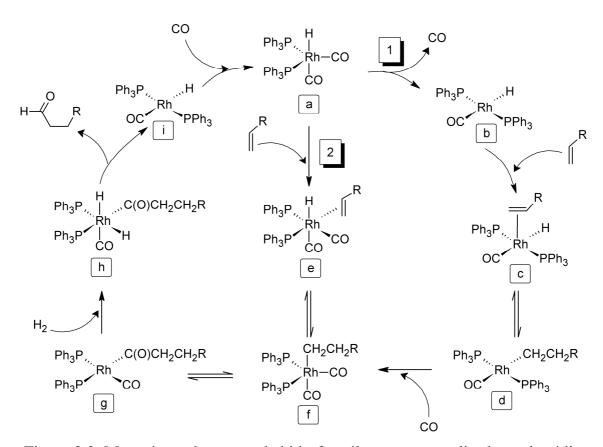


Figura 3.2. Mecanismo da reação de hidroformilação para catalisadores de ródio modificados, mostrando o mecanismo ($\underline{1}$), dissociativo e ($\underline{2}$), associativo

O caminho dissociativo, indicado por <u>1</u> na Figura 3.2, é iniciado pela dissociação de um ligante CO do complexo RhH(CO)₂(PPh₃)₂ (**a**), formando RhH(CO)(PPh₃)₂ (**b**). A coordenação da olefina, a formação do complexo metalalquila e a coordenação de um ligante CO formam o complexo Rh(CO)₂(PPh₃)₂CH₂CH₂R (**f**). As próximas etapas são idênticas no caminho

associativo (2) e dissociativo, a saber: migração do CO para formação do complexo metal-acila (**g**), adição oxidativa de H_2 (**h**) e eliminação redutiva do aldeído, formando o complexo $RhH(CO)(PPh_3)_2$ (**i**), ao qual se coordena um novo ligante CO para regenerar o catalisador.

Como mencionado anteriormente, na reação de hidroformilação pode ocorrer a formação de dois aldeídos: o aldeído linear ou *n*-aldeído (*anti*-Markownikow) e o aldeído ramificado ou *i*-aldeído (Markownikow). O uso de um excesso de ligantes fosforados como trifenilfosfina ou de ligantes com alto "ângulo de cone"⁵, como o ligante XANTPHOS⁶, por exemplo, dá à reação uma regioseletividade quase que total para o aldeído linear (*n*), o qual é o produto desejado da síntese na maioria dos casos.

Outras reações paralelas normalmente acompanham a hidroformilação, como a hidrogenação (Figura 3.3) e a isomerização (Figura 3.4)^{2,3}.

Figura 3.3. Reação de hidrogenação com catalisadores de ródio modificados.

$$\begin{array}{c|c} Ph_3P & H \\ Ph_3P & CO \end{array}$$

$$\begin{array}{c} Ph_3P & H \\ Ph_3P & CO \end{array}$$

$$\begin{array}{c} Ph_3P & H \\ Ph_3P & CO \end{array}$$

$$\begin{array}{c} Ph_3P & H \\ Ph_3P & CO \end{array}$$

Figura 3.4. Reação de isomerização com catalisadores de ródio modificados.

Conforme mencionado anteriormente, a hidroformilação é uma reação amplamente empregada em escala industrial, para a síntese de diversos aldeídos (sendo o principal o *n*-butanal, obtido a partir do propeno). Vários processos industriais são utilizados atualmente, como os processos baseados em cobalto (processos BASF,

Exxon, Shell) e em ródio (Union Carbide/Dow, BASF, Mitsubishi, Rurhchemie/Rhône Poulenc), os quais produziram juntos cerca de 6,6 milhões de toneladas de aldeídos em 1995 ⁷ e em 2006 produziram mais de 10 milhões de toneladas de aldeídos⁸.

Surgiram recentemente na literatura muitos relatos de reações "em cascata" (tandem/domino reactions) aliadas à hidroformilação. Essas reações seqüenciais são realizadas de modo one-pot em relação à hidroformilação, usando o aldeído obtido nessa reação como precursor das reações subseqüentes. Entre as várias reações nas quais essa metodologia é aplicada, pode-se citar a realização em cascata de hidroformilação com condensação de Knoevenagel, hidroformilação com condensação aldólica, hidroformilação com olefinação de Wittig, hidroformilação com acetalização, hidroformilação com reação de Fischer (síntese de Indóis) e hidroformilação com aminação redutiva, reação chamada também de hidroaminometilação e que será discutida mais amplamente no decorrer desta introdução.

Outros desenvolvimentos recentes na reação de hidroformilação incluem: o uso de CO₂ supercrítico como solvente da reação^{10,11}; o uso de microondas como fonte de energia para o sistema¹²; hidroformilação à temperatura ambiente sob baixas pressões (1 atm) de gases¹³, o uso de rutênio como catalisador no lugar do ródio^{14,15} e a hidroformilação em um sistema bifásico de solventes, que permite uma fácil reutilização do sistema catalítico e a separação do mesmo dos produtos da reação³.

Por essas razões a hidroformilação é considerada uma reação elegante, versátil e, por apresentar no produto final todos os reagentes utilizados, uma reação com 100% de economia atômica, sendo uma reação-modelo para o conceito de economia atômica divulgado por Trost¹⁶.

3.1.2. Hidroaminometilação

A reação de hidroaminometilação, relatada pela primeira vez em 1943 consiste, resumidamente, em uma hidroformilação realizada na presença de uma amina primária ou secundária^{9,17}. O aldeído formado na hidroformilação reage com essa amina,

formando uma imina ou enamina, a qual é reduzida pelo catalisador da reação de hidroformilação, gerando como produto uma amina secundária ou terciária.

$$R_1$$
 + co + H_2 + H_2N R_2 catalisador R_1 R_2 catalisador R_1 R_2 R_2 R_1 R_2

Figura 3.5. Reação de hidroaminometilação

Realizada a princípio com catalisadores baseados em ferro ou em cobalto⁹ atualmente esta reação é realizada principalmente com catalisadores de ródio modificados.

O limoneno também foi utilizado como material de partida para a síntese de aminas terciárias **50** e **51** por Kranemann e Eilbracht¹⁸ (Esquema 3.1), aminas as quais já haviam sido sintetizadas antes com o uso de um protocolo de aminação redutiva clássica e patenteadas para seu uso como inibidores de crescimento de plantas de tabaco ^{19,20}.

Esquema 3.1

3.2. OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo, inseridos dentro do contexto do capítulo anterior, são listados abaixo:

- a) realizar-se em solução a hidroformilação do limoneno **1** e de seu óxido **14**, de modo a se obterem os blocos de construção necessários para a síntese da quimioteca delineada no capítulo anterior;
- b) Sintetizar em solução de uma série de derivados aminados do limoneno a partir da reação de hidroaminometilação do mesmo, com o emprego de diversas aminas.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Hidroformilação do limoneno 1 e do óxido de limoneno 14

De modo a sintetizar-se o bloco de construção com a função ácido carboxílico, necessária para a síntese em fase sólida (SOFS) dos derivados do limoneno (mais detalhes sobre a estratégia escolhida para a SOFS estão detalhadas no Capítulo 1), o (*R*)-(+)-limoneno **1** foi hidroformilado (Esquema 3.2), gerando o aldeído **26**. A princípio a reação era realizada em 24 horas, mas uma monitorização cuidadosa do consumo de gases durante o decorrer do tempo mostrou que a mesma estava completa em 5 horas.

Esquema 3.2

O acompanhamento desta reação por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e com espectrometria de massas (CG-EM) mostra um rendimento cromatográfico de 90% para essa reação, o que coloca esse resultado como um dos melhores já relatados na literatura para a hidroformilação desse terpeno²¹⁻²⁴.

O espectro de ¹H-RMN de **26** (ver Anexo 1) mostra um pico em δ = 9,3 ppm referente ao próton ligado à carbonila do grupo aldeído, um pico em δ = 1,65 ppm referente à metila ligada à olefina endocíclica, e um pico em δ = 5,4 ppm, referente ao próton da olefina endocíclica, demonstrando que a olefina interna do limoneno não é hidroformilada nessas condições, resultado consistente com os mencionados anteriormente²¹⁻²⁴. O uso do limoneno permite a obtenção exclusiva do aldeído n (linear), funcionalizado apenas na olefina exocíclica (isopropenila). Ou seja, a hidroformilação do limoneno é feita de modo quimio e regiosseletivo. O ¹H-RMN

mostra também um pico em $\delta=0.9$ ppm, referente à metila exocíclica que, embora devesse aparecer como um dublete, aparece como um multiplete. Uma análise mais cuidadosa mostrou que esse multiplete é na verdade dois dubletes sobrepostos. A hidroformilação do limoneno gera mais um carbono assimétrico, adjacente ao carbono fixo na configuração (R) do produto de partida, gerando o aldeído **26** como uma mistura de diastereômeros (R,R e R,S). Embora não seja possível analisar diretamente pelo 1 H-RMN a proporção dos diastereômeros, dados da literatura 18 permitem a suposição de que ambos estão em uma proporção igual ou muito próxima a 1:1.

O CG-DIC desta reação (Figura 3.6) mostra o aldeído (tempo de retenção = 11,740 min.) como apenas um pico, indicando que os dois diastereômeros presentes apresentam polaridades e pontos de ebulição muito próximos.

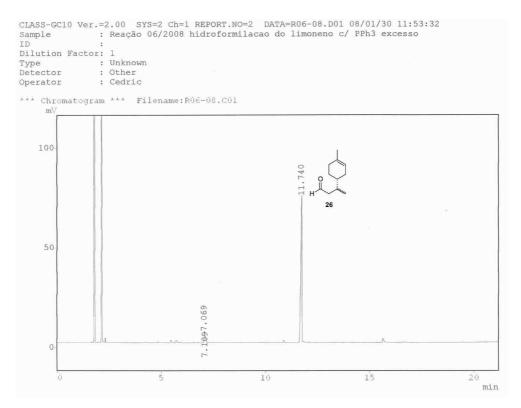


Figura 3.6. Cromatograma (CG-DIC) da reação de síntese do aldeído 26.

O óxido de limoneno **14** foi hidroformilado nas mesmas condições (Esquema 3.3), em um tempo de 24 horas, gerando como produto o aldeído **43**. A síntese deste aldeído permitiu evitar-se uma etapa de epoxidação na síntese em fase sólida planejada (ver Capítulo 1 para mais detalhes).

Esquema 3.3

Embora em teoria, o aldeído **43** exista como uma mistura de 8 diastereômeros (considerando que um carbono está fixo na configuração (R)), o espectro de 1 H-RMN não permite diferenciá-los. Assim como no produto **26**, o multiplete em $\delta = 0,92$ ppm, correspondente à metila em C-4, apresenta o mesmo padrão (dois dubletes superpostos), o que permite concluir que o aldeído **43** é também uma mistura de diastereômeros. O singlete em $\delta = 1,3$ ppm é atribuído à metila ligada diretamente ao anel epóxido e não aparece em duplicidade. O multiplete em $\delta = 3,0$ ppm é atribuído ao próton do anel epóxido e o singlete em $\delta = 9,75$ ppm é atribuído ao próton do grupo aldeído.

3.3.2. Oxidação do aldeído ao seu respectivo ácido carboxílico

A próxima etapa planejada da síntese era oxidação do aldeído **26** ao seu respectivo ácido carboxílico **27**. Entretanto, em nenhum dos protocolos testados obteve-se sucesso nessa reação (Esquema 3.4).

Condições: $CrO_3/H_2SO_4/H_2O$, acetona, temp. ambiente; ou $Ca(CIO)_2$, THF/H_2O 1:1, temp. ambiente, 4 h; ou PCC, DMSO, temp. ambiente, 12 h; ou I_2 , KOH, Etanol, temp. ambiente, 4 h.

Esquema 3.4

Após várias tentativas utilizando diversos protocolos sintéticos, tais como: oxidação de Jones (CrO₃, H₂SO₄, H₂O)²⁵, hipoclorito de Cálcio²⁶, PCC em DMSO²⁷ e Yamada²⁸, não foi observado nem por IV ou RMN o desaparecimento do grupamento aldeído e o surgimento das absorções referentes ao grupo ácido carboxílico. Além disso, observou-se que durante a oxidação de Jones o aldeído isolado como produto não apresentava a olefina endocíclica, o que indica que ocorreu uma reação de adição na olefina endocíclica.

3.3.3. Metoxicarbonilação do limoneno

De modo a contornar o problema da oxidação do aldeído **26**, optou-se pela metoxicarbonilação (ou hidroesterificação) do (*R*)-(+)-limoneno **1**. Essa reação apresenta grandes semelhanças com a hidroformilação, mas nesse caso com o uso de metanol, CO, ácido *p*-toluenosulfônico e um catalisador baseado em Paládio, um éster metílico é obtido como produto (Esquema 3.5). Outros ésteres podem ser obtidos através da troca do metanol por outro álcool.

Esquema 3.5

O IV de **18** mostra uma banda em 1740 cm⁻¹, característica de carboxila de ésteres. O ¹H-RMN mostra um singlete em $\delta = 3,65$ ppm, característico de prótons de um grupo metoxila e um singlete em $\delta = 5,35$ ppm, atribuído ao próton da olefina interna; e em $\delta = 1,65$ ppm, atribuído à metila ligada diretamente à olefina endocíclica.

Embora essa reação de metoxicarbonilação tenha ocorrido com sucesso, a mesma não se mostrou confiável quanto à sua reprodutibilidade, pois não foi possível obterem-se os rendimentos do protocolo estabelecido na literatura²⁴. Modificações no protocolo levaram à obtenção do éster desejado, mas com um baixo rendimento, ca.

25%. Foi possível, a partir do éster **18** isolado, obter-se o ácido carboxílico **27** através de uma hidrólise em meio básico (Esquema 3.6), mas devido à falta de reprodutibilidade na técnica da metoxicarbonilação e aos baixos rendimentos da mesma, optou-se por não utilizar-se desta abordagem para a obtenção dos derivados planejados.

Esquema 3.6

O IV do ácido carboxílico **27** mostra o desaparecimento da banda de carboxila de éster em 1740 cm⁻¹ e o aparecimento de uma banda larga entre 3500-3000 cm⁻¹ e uma banda em 1709 cm⁻¹, atribuída à hidroxila e à carboxila de ácidos carboxílicos, respectivamente. O ¹H-RMN mostra a manutenção dos picos em $\delta = 1,6$ e $\delta = 5,35$ ppm, referentes à metila endocíclica e ao próton olefínico, respectivamente, além do singlete em $\delta = 10,15$ ppm, referente ao próton do grupo ácido carboxílico.

3.3.4. Hidroaminometilação do limoneno com diversas aminas

Devido aos problemas apresentados nas estratégias hidroformilação/oxidação e metoxicarbonilação/hidrólise; e de modo a explorar a versatilidade do grupo aldeído para as reações em SOFS e em solução, decidiu-se funcionalizar a olefina exocíclica do R-(+)-limoneno ${\bf 1}$ através da reação de hidroaminometilação, com o uso de várias aminas primárias e secundárias. Esta estratégia permite a geração rápida de diversidade química nesta porção da molécula.

3.3.4.1. Hidroaminometilação do limoneno com *n*-propilamina: amina modelo para otimização reacional

A primeira amina testada nesse protocolo foi a *n*-propilamina **52** (Esquema 3.7), especialmente pelo fato de que esta amina apresenta um baixo ponto de ebulição (*ca*. 55 °C a 760 mmHg), o que facilitaria a remoção de excessos da mesma durante a purificação dos produtos.

Nesta primeira reação (Esquema 3.7) fez-se o uso de peneira molecular para garantir a eficiência da reação de formação da imina, uma vez que esta reação está em equilíbrio e a remoção da água formada no decorrer da mesma ajuda a melhorar seus rendimentos²⁹. O tempo de hidrogenação também foi mais longo, 16 horas. Repetições posteriores da reação mostraram que a presença da peneira molecular não é necessária, pois não se observou diferença nos rendimentos das reações com e sem a mesma, e que para a *n*-propilamina o tempo de hidrogenação pode ser reduzido para 5 horas.

Esquema 3.7

É comum encontrar na literatura reações de hidroaminometilação que são realizadas em condições de hidroformilação (isto é, na presença dos gases CO e H₂), com tempos de até 48 horas¹⁸. Após algumas repetições desta reação observou-se que o tempo total da síntese pode ser diminuído ao dividir-se o processo em duas etapas: uma etapa de hidroformilação/formação da imina, realizada em condições de hidroformilação; e uma etapa de hidrogenação, onde o reator é pressurizado apenas com H₂. Assim, foi possível reduzir o tempo total da síntese para um total de 10 horas, isolando a amina secundária **34** com um alto rendimento (90%).

3.3.4.2. Monitoramento em tempo real da hidroaminometilação com npropilamina

Continuando a investigação desta reação de hidroaminometilação, a reação mostrada no Esquema 3.7 (síntese da amina **34**) foi monitorada em tempo real. Para essa monitorização, foi utilizado um reator (Figura 3.7) no qual foi adaptada uma válvula de injeção manual de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE).

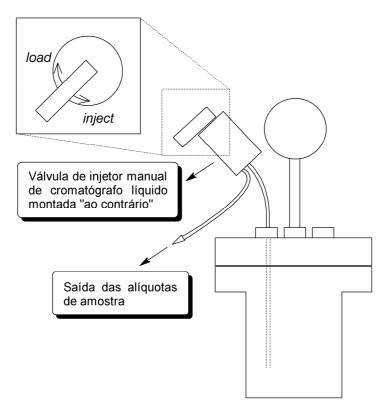


Figura 3.7. Desenho do reator modificado com uma válvula de injeção manual de cromatografia líquida, utilizada na monitorização em tempo real da hidroaminometilação do limoneno (as conexões de gases do reator não estão mostradas na figura).

Essa válvula foi adaptada no sentido "contrário" do normalmente usado. Quando a válvula era colocada na posição "load", 20 µL da solução que estava dentro do reator eram transferidas para o interior do "loop" da válvula, e ao virar-se a válvula para a posição "inject", essa solução era então expelida pela saída mostrada na figura e recolhida em um frasco de análise. O reator utilizado nesse acompanhamento foi acoplado a um vaso-pulmão, carregado com uma mistura 1:1 de H₂ e CO, de modo que a pressão dos gases dentro do reator mantivesse-se constante durante todo o

procedimento (uma vez que a cada retirada de amostra havia também uma pequena perda de gases). Desse modo, foi possível coletar-se amostras de tempos determinados da reação e após análises por CG-DIC esses dados foram traçados em um gráfico (Figura 3.8).

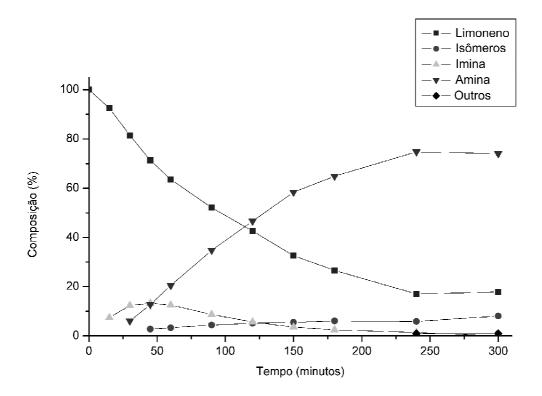


Figura 3.8. Gráfico do monitoramento em tempo real da hidroaminação do limoneno com n-propilamina (legenda: "Amina" = produto **34**).

Algumas observações podem ser feitas a partir do gráfico da Figura 3.8. Das três reações ocorrendo sequencialmente dentro do reator (hidroformilação, condensação e hidrogenação), a hidrogenação é a mais lenta, o que confirma dados publicados na literatura¹⁷. Mesmo sendo a reação mais lenta, o gráfico mostra que nessa monitorização sob pressão constante de CO e H₂ a hidrogenação está completa em um tempo de 240 min (4 horas), um tempo bem menor que as 48 horas relatadas anteriormente¹⁸. Em nenhuma das alíquotas retiradas da reação foi possível detectar o aldeído, indicando que uma vez formado, o mesmo reage rapidamente com a *n*-propilamina formando a imina correspondente.

Com essa reação monitorada e otimizada, partiu-se para a síntese de novos derivados, que serão detalhados em seguida.

3.3.4.3. Síntese da "Família A" de aminas derivadas do limoneno.

Após a síntese da amina secundária **34** partiu-se para a síntese (Esquema 3.8) de uma pequena família de aminas secundárias e terciárias derivadas do (*R*)-(+)-limoneno **1**, denominada aqui de "Família A". Com isso foi possível a otimização dessa reação com outras aminas e também a realização dos ensaios farmacológicos com esses derivados (capítulo 4). Para tanto, o limoneno foi hidroaminometilado com algumas aminas alifáticas (*n*-propilamina, isopropilamina, benzilamina), alicíclicas (morfolina, piperidina e piperazina), aromáticas (anilina), diaminas (etilenodiamina, putrescina) e um aminoálcool (etanolamina), obtendo-se 7 aminas (**34**, **53-58**) como produtos.

A amina terciária **54** derivada da morfolina já havia sido sintetizada por Eilbracht e Kranemann¹⁸ em um tempo total de síntese de 20 horas. Ao dividir o

processo em duas etapas o tempo total de síntese (vide Experimental deste capítulo) foi reduzido para 10 horas.

Uma alíquota de amostra foi retirada, antes e após a etapa de hidrogenação, de todas as reações. Os resultados das análises destas alíquotas estão mostrados na

Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Síntese da "Família A" de aminas.

Rend.		(88) 06	70 (50)	56 (44)	67 (62)	82 (79)	92 (89)	(82)	1	1	51 (32)	71 (50)	
Etapa de Hidrogenação (%)		Outros	1	7	∞	0	ε	1	1	1	1	0	19
	_o p	Isômeros	4	13	6	11	∞	4	7	ı	ı	4	2
		Aldeído	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
	idad	Imina	0	2	0	0	0	-	0	ı	1	3	\mathcal{S}
	Seletividade ^b	Amina ^c	95 (34)	83 (53)	83 (57)	(55) 68	90 (54)	94 (58)	97 (55)	ı	ı	26 (56)	76 (56)
	Conv. ^a		95	84	89	75	91	86	88	ı	ı	91	94
Etapa de Hidroformilação (%)		Outros	0	\mathcal{E}	0	0	7	0	0	0	0	0	2
	Seletividade ^b	Isômeros	5	13	10	12	7	4	9	100	0	4	3
		Aldeído	0	0	0	0	0	0	ω	0	0	0	9
		Imina	95	39	06	40	8	8	29	0	0	15	84
		Amina	0	45	0	49	84	93	62	0	0	4	S
	Conv. ^a		94	84	9	92	91	86	98	6	0	06	95
Amina substrato			n-propilamina	i-propilamina	Benzilamina	Piperidina	Morfolina	Piperazina	Piperidina	Putrescina	Etilenodiamina	Anilina	Anilina
Exp. Método		1	1	П	Н	П	8	2	8	8	1	4	
Exp.		1	2	3	4	5	9	7	∞	6	10	11	

produto/mols de limoneno consumido; c) Número do composto isolado entre parênteses; d) Rendimento cromatográfico (rendimento Notas: a) Conversão = (no. de mols de limoneno convertidos)/no. de mols de limoneno adicionados; b) Seletividade = mols de um Métodos: 1) vide Esquema 3.8; 2) idem 1, com a adição de 0,0875 mmol de PPh₃ (PPh₃/Rh = 10); 3) idem 1, com a proporção amina:limoneno igual a 2:1; 4) Idem método 2, com o tempo de hidrogenação extendido para 44 horas. isolado entre parêntesis). Rendimento cromatográfico = conversão x seletividade (amina)

A partir dos dados da

Tabela 3.1 algumas considerações podem ser colocadas. Após a etapa de hidroformilação na maioria das reações (Experimentos 2, 4-7, 10 e 11) já se observava, em maior ou menor proporção, a presença do produto hidrogenado (amina). Nas reações com as aminas secundárias, tais como piperidina, morfolina e piperazina (Experimentos 4-7) observou-se inclusive que as aminas já eram o produto majoritário, o que era esperado uma vez que esses substratos formam enaminas como produtos de condensação, mais fáceis de serem hidrogenadas que iminas⁹. Mesmo assim, a reação com piperidina (Experimento 4) apresentou uma conversão e seletividade menores que os experimentos com morfolina e piperazina (Experimentos 5 e 6, respectivamente). A repetição desse experimento com o uso de um excesso de trifenilfosfina³⁰ (Experimento 7) aumentou o rendimento da reação, principalmente por inibir a reação paralela de isomerização do limoneno.

Entre as aminas alifáticas, observou-se que a reação com benzilamina (Experimento 3) apresentou uma conversão menor do que a das reações com n-propilamina ou i-propilamina (Exp. 1 e 3), provavelmente causado pelo efeito conhecido na literatura de substratos benzílicos em formarem complexos π -alílicos com ródio, os quais são inativos como catalisadores³¹.

No primeiro experimento com anilina (Experimento 10) observou-se uma grande isomerização do limoneno, a qual foi contornada (Experimento 11) com o uso de um excesso de trifenilfosfina³⁰. Mesmo assim, observou-se que a hidrogenação da imina formada como intermediário nessa reação apresentou uma velocidade bem mais lenta do que as outras iminas formadas. Tal efeito pode ser explicado pelo fato de que a imina formada nessa reação está em ressonância com o anel aromático da anilina, o que a torna mais estável e, portanto, mais difícil de ser reduzida.

Das aminas testadas não foi possível isolar os produtos das reações com etilenodiamina, putrescina, 1,3-propilenodiamina e etanolamina. Nos casos da etilenodiamina e putrescina (Experimentos 8 e 9), observou-se apenas a isomerização e hidrogenação do limoneno ou então nenhuma conversão sobre o limoneno. Resultados semelhantes foram encontrados com a 1,3-propilenodiamina e etanolamina (não incluídas na tabela).

A hipótese mais provável para explicar a falta de reatividade destas aminas é que as mesmas, não apresentando restrições conformacionais, são capazes de formarem um complexo quelato com o ródio, causando o "envenenamento" do catalisador e a subsequente inativação e/ou alteração de sua atividade catalítica³². O uso de outra diamina (Experimento 6) com restrições conformacionais como a piperazina, leva à formação do produto esperado, a amina terciária **58** (Esquema 3.8).

3.3.4.4. Análise espectroscópica dos produtos: "Família A"

O espectro do ¹H-RMN da amina **34** mostra sinais em $\delta = 2,57$ e 2,67 ppm, relativos aos dois metilenos (-CH₂-) ligados diretamente ao grupo NH da molécula. Os sinais em $\delta = 1,65$ e 5,38, relativos à metila ligada diretamente à olefina endocíclica e ao próton dessa mesma olefina estão presentes em todos os produtos e mostram que na hidroaminometilação do limoneno a olefina interna permanece intacta, como observado na síntese do aldeído 26. O ¹³C-RMN da amina 34 mostra os carbonos originários da *n*-propilamina em $\delta = 11.8, 15.9$ e 52,0 ppm, sendo este último o do metileno ligado diretamente ao grupo NH. Devido ao fato de que os produtos são misturas de diastereômeros os sinais em torno de C-3 (que é o carbono racêmico no produto), isto é, os sinais de C-2, C-3, C-4 e C-1' aprecem como dois sinais, separados por alguns poucos décimos de ppm, a saber: $\delta = 34.3$ e 34.6 ppm (C-2), 38.4 e 38.6 (C-3), 15,8 e 16,3 (C-4, que são os que aparecem mais separados) e 35,2 e 35,3 (C-1'). Em alguns compostos, os sinais de C-1, C-2', C-5' e C-6' aparecem dobrados também. Em todos os compostos observam-se também os sinais em torno de $\delta = 23$, 121 e 134 ppm, atribuídos à metila ligada à olefina endocíclica e aos dois carbonos olefínicos da molécula, C-3' e C-4' respectivamente.

Em 53 é possível observar as metilas do grupamento isopropila no 1 H-RMN como um dublete em $\delta = 1,06$ ppm e o próton do carbono terciário como um multiplete em $\delta = 2,8$ ppm, e no 13 C-RMN em $\delta = 22,7,22,8$ e 48,7 ppm.

Observam-se em **54** os metilenos do anel morfolínico: dois em $\delta = 2,5$ ppm (mais próximos ao nitrogênio heteroátomo) e os outros dois em $\delta = 3,7$ ppm (mais

próximos ao oxigênio). O 13 C-RMN deste composto mostra os carbonos do anel em δ = 57,5 ppm (mais próximos ao nitrogênio) e δ = 66,8 (mais próximos ao oxigênio).

Os prótons do anel piperidina de **55** aparecem juntos aos prótons do ciclo do limoneno em $\delta = 1,4$, 1,6 e 2,4 ppm. O 13 C-RMN mostra os carbonos do anel em $\delta = 25,4$ (C-4 do anel), 25,8 (C-3 e C-5) e 57,9 (C-2 e C-6) ppm.

Em **56** é possível observar os prótons do anel aromático da anilina em $\delta = 6.85$ e 7,2 ppm. O 13 C-RMN mostra os carbonos do anel aromático em $\delta = 115.5$, 115,6, 120,7, 129,3, 131,9 e 144,9 ppm.

Os prótons do anel aromático de **57** em δ = 7,23 e 7,32 ppm e o singlete em δ = 3,8 confirmam a presença do grupo benzila no produto isolado. O ¹³C-RMN mostra o metileno ligado diretamente ao anel aromático em δ = 54 ppm, e os carbonos do anel em δ = 126,9, 128,1, 128,2, 128,3, 128,4 e 140,2.

Os metilenos do anel piperazina de **58** são atribuídos aos multipletes em $\delta = 2,5$ (mais próximos à amina terciária) e 2,95 ppm (mais próximos à amina secundária) e aparecem no 13 C-RMN em $\delta = 45,8$ (mais próximos à amina secundária) e 55,7 ppm (mais próximos à amina terciária).

3.3.4.5. Atividade farmacológica da "Família A"

Dentre os vários experimentos farmacológicos realizados com os compostos desta família, destacaram-se a atividade anti-leishmania das aminas **34** (*n*-propilamina) e **56** (anilina), que apresentaram uma atividade maior do que a do padrão utilizado no teste, o fármaco pentamidina (esse e outros ensaios realizados com as moléculas serão apresentados em detalhe no Capítulo 3 desta tese).

Devido a esses resultados, optou-se por expandir os objetivos deste trabalho, realizando-se a síntese de uma nova família de compostos, denominada "Família B", utilizando-se como aminas derivados funcionalizados da anilina nas posições 3 e 4 do anel aromático, e outros sistemas aromáticos benzenóides e não-benzenóides, de modo a serem obtidos análogos do derivado anilínico **56** ao explorar-se o espaço químico ao redor do anel aromático e observar os efeitos das modificações químicas na atividade

farmacológica dos derivados em relação ao protótipo. A síntese destes derivados será descrita com mais detalhes abaixo.

3.3.4.6. Síntese da "Família B": compostos análogos ao derivado anilínico 56

Dados os resultados obtidos no ensaio farmacológico mencionado acima, optou-se pela síntese de uma família de compostos análogos ao derivado da anilina **56**. O objetivo é a geração de diversidade química em torno do anel aromático, utilizando grupamentos ativadores e desativadores do anel, heterociclos e com outros anéis ligados diretamente ao anel aromático, de modo a verificar se estas modificações são capazes de criar compostos com uma atividade anti-leishmania superior à de **56**.

Nas reações com as aminas aromáticas substituidas (4-cloroanilina, 4-metoxianilina, 4-toluidina, furfurilamina, 3-trifluorometilanilina, *N*-metilanilina, 2-aminopiridina, 4-nitroanilina, 4-aminofenol, 4-bromoanilina, 2-aminobenzotiazol, 2-aminotiazol, e α-naftilamina) obteve-se a coleção de compostos **59-65**. O protocolo utilizado para a síntese dessa "família" de compostos foi modificado em relação ao protocolo da "Família A" (Esquema 3.9). Devido à alta isomerização causada na primeira reação com a 4-cloroanilina, optou-se pelo uso de um excesso de PPh₃ em todas as reações, assim como observado anteriormente na reação com a anilina. O aumento no tempo (de 5 para 24 horas) da etapa de hidroformilação é justificado pela diminuição da velocidade da hidroformilação quando se acrescenta um excesso de trifenilfosfina no sistema^{2,3}.

Esquema 3.9

A reação de hidroaminometilação com algumas aminas desta série como 4-nitroanilina, 4-aminofenol, 4-bromoanilina, 2-aminobenzotiazol, 2-aminotiazol e α -naftilamina, não ocorreu com sucesso. No caso da 4-nitroanilina, análises das reações revelaram que a reação majoritária é a redução da 4-nitroanilina a 4-fenilenodiamina (dianilina). Eilbracht e colaboradores mencionam o uso de compostos nitroaromáticos em hidroaminometilações e observam que nas condições de hidroformilação ocorre a redução do grupo nitro à amina¹⁷. Embora a hidroformilação nesses casos relatados ocorra sem contratempos, não foi o ocorrido na reação com a 4-nitroanilina, onde não se observou conversão do limoneno após a redução do grupo nitro. Análises das reações com 4-aminofenol, 4-bromoanilina, 2-aminobenzotiazol, 2-aminotiazol e α -naftilamina mostram que não ocorre reação com esses substratos, indicando que essas aminas, assim como as diaminas discutidas anteriormente, são capazes de "envenenar" o catalisador, inativando-o para estas reações^{33,34}.

3.3.4.7. Análise espectroscópica: "Família B"

O ¹H-RMN de **59** mostra claramente o anel aromático com o padrão de substituição 1,4 apresentando dois picos em $\delta = 6,49$ e 7,1 ppm, ambos integrados para dois prótons. Os carbonos do anel aromático do composto são observados no ¹³C-RMN em $\delta = 113,6$ (dois carbonos), 120,7, 128,9 (dois carbonos) e 147 ppm.

Em **60** observa-se, além dos picos referentes ao anel aromático em $\delta = 6,5$ e 6,73 ppm, o singlete referente ao grupo metoxila em $\delta = 3,65$ ppm. O sinal dessa metoxila é observado no ¹³C-RMN em $\delta = 48,0$ ppm, e os carbonos do anel aromático são observados em $\delta = 114,9, 115,0, 115,3, 115,8, 142,8$ e 152,0 ppm.

O produto **61** apresenta os picos do anel em $\delta = 6,45$ e 6,9 ppm e o singlete referente ao grupo metila ligado diretamente ao anel em $\delta = 2,42$ ppm. No ¹³C-RMN observa-se o sinal dessa metila em $\delta = 20,3$ ppm e os carbonos do anel em $\delta = 113,0$ (dois carbonos), 126,0, 129,8 (dois carbonos) e 146,4 ppm.

Observa-se no derivado furfurilamina **62** os prótons do grupo metileno ligado diretamente ao anel furano em δ = 3,7 ppm e os três prótons do anel aromático em δ = 6,1, 6,3 e 7,25 ppm. O metileno ligado ao anel furano é observado no ¹³C-RMN em δ = 47,5 ppm e os sinais dos carbonos do anel furano são observados em δ = 108,5, 110, 141,7 e 154,1 ppm.

Em **63** observa-se no ¹H-RMN os prótons do anel aromático em $\delta = 6,65, 6,81$ e 7,18 ppm, além de um singlete largo em 3,65 ppm atribuído ao próton do grupo amina. O sinal do grupo -CF₃ é observado no ¹³C-RMN em $\delta = 120,8$ ppm, junto com os sinais dos carbonos do anel aromático em $\delta = 108,5, 113,5, 115,8, 129,9, 132,0,$ e 148,5 ppm.

Na amina terciária **64** observa-se no ¹H-RMN o sinal do grupo *N*-metil em δ = 2,85 ppm e os picos do anel aromático em δ = 6,6 (integrado como três prótons) e 7,15 ppm (integrado como dois prótons). No ¹³C-RMN observa-se a metila ligada diregamente ao nitrogênio da molécula em δ = 39,0 ppm e os carbonos do anel aromático em δ = 112,0 (dois carbonos), 115,7, 129,0 (dois carbonos) e 149,2 ppm.

O próton da amina do derivado aminopiridínico **65** é observado no ¹H-RMN como um singlete largo em $\delta = 4,45$ ppm e os sinais dos prótons do anel aromático são observados em $\delta = 6,4$, 7,35 e 8,0 ppm, em um padrão diferente dos compostos anteriores devido à presença do heteroátomo no anel aromático. No ¹³C-RMN observase os sinais dos cinco carbonos do anel aromático em $\delta = 106,2$, 112,3, 137,7, 150,0 e 158,8 ppm.

3.3.4.8. Síntese de outros derivados

Com o objetivo de testar a atividade de moléculas mais polares que as já sintetizadas anteriormente, realizou-se a síntese do aminoálcool **66** (Esquema 3.10) a partir do aldeído **26** e a etanolamina, através de um protocolo de aminação redutiva clássica em duas etapas, usando ácido sulfúrico como catalisador da etapa de condensação e cianoborohidreto de sódio (NaCNBH₃) como agente redutor³⁵.

Esquema 3.10

O ¹H-RMN do aminoálcool **66** mostra os sinais dos dois metilenos ligados diretamente à amina em $\delta = 3,05$ ppm e do carbono ligado diretamente à hidroxila em $\delta = 3,8$ ppm. Os hidrogênios das funções amina e álcool são observados em $\delta = 4,9$ ppm. O ¹³C-RMN deste composto mostra os dois carbonos originários da etanolamina em $\delta = 51$ e 58,5 ppm, além de outros sinais, comuns a todos os compostos, já discutidos anteriormente.

De modo a completar a "Família B" de compostos com as aminas que não haviam funcionado no protocolo catalítico, tentou-se a aminação redutiva clássica do aldeído do limoneno **26** com algumas dessas aminas: 4-nitroanilina **67**, 4-bromoanilina

68 e 4-aminofenol **69**, sem sucesso. O acompanhamento destas reações por CG mostrou que, nas condições mostradas abaixo (Esquema 3.11), a formação da imina não ocorreu.

Esquema 3.11

O mesmo protocolo foi testado com o composto 2-aminotiazol **70**, também sem sucesso. Assim como nas tentativas detalhadas acima, não se observou por CG a formação da imina esperada da condensação entre a amina e o aldeído **26**. É possível que essas aminas sejam nucleófilos fracos, incapazes de realizar o ataque nucleofílico à carbonila do aldeído, primeira etapa na formação do produto de condensação (imina).

Esquema 3.12

Os dois produtos mais ativos no ensaio mencionado anteriormente, o derivado da *n*-propilamina **34** e o derivado da anilina **56** foram tosilados³⁶ de modo a se obterem derivados com o grupo sulfonamida nas duas moléculas mais ativas. A literatura relata a atividade anti-leishmania *in vitro* de sulfonamidas^{37, 38}. A toslilação da amina alifática **34** ocorreu com sucesso (Esquema 3.13), obtendo-se a 4-toluenosulfonamida **71** como produto. Já a tosilação da amina aromática (Esquema 3.14) não ocorreu,

mesmo estendendo a reação por 24 horas. Acredita-se que a reação com o derivado **56** não ocorreu devido a impedimentos estéricos causados pela molécula e à baixa nucleofilicidade da amina aromática.

Esquema 3.13

Esquema 3.14

3.4. EXPERIMENTAL

3.4.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanoato de metila 18

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1,6 mL, 10 mmol), catalisador PdCl₂(PPh₃)₂ (70,14 mg, 0,1 mmol, 1 mol%), metanol (1 mL, 24,7 mmol), trifenilfosfina (79 mg, 0,3 mmol) e ácido *p*-toluenosulfônico (38 mg, 0,2 mmol) foi colocada sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 50 bar de CO e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 24 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica, seca sob vácuo e o resíduo oleoso foi purificado por cromatografia em coluna (usando Hexano e depois Acetato de Etila como eluentes). Rendimento (CG-DIC): 28%. Rendimento (isolado): 25%.

Espectrometria de massas: 196,30 (M⁺, 0,55).

IV (cm⁻¹): 2970, 1740, 1240.

RMN do ¹H (200 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, d, J = 8 Hz, H-4), 1,3 (4H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b + H-3), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,75 (1H, m, H-6'a) 1,95 (3H, s, H-2'a + H-5'), 2,15 (1H, m, H-2a), 2,4 (1H, dd, J = 16,1 Hz, 4,35 Hz, H-2b), 3,65 (3H, s, - OCH₃), 5,35 (1H, s, H-3').

RMN do ¹³C (50 MHz, CDCl₃, ppm): 16 (C-4), 24 (4'-<u>C</u>H₃), 27 (C-6'), 29 (C-2'), 31 (C-5'), 34 (C-3), 38 (C-1'), 39 (C-2), 51 (-O<u>C</u>H₃), 120 (C-3'), 134 (C-4'), 174 (C-1).

3.4.2. 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanal 26

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1 mL, 1,19 g, 8,73 mmol), catalisador HRh(CO)(PPh₃)₃ (11,48 mg, 0,0125 mmol, 0,143 mol%) e THF (10 mL) foram colocados sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 20 bar de CO, 20 bar de H₂ e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 5 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica. A mistura obtida da coluna foi seca em bomba de álto vácuo com *trap* de nitrogênio líquido para remoção do solvente e dos produtos leves. Rendimento (CG-DIC): 95%. Rendimento isolado: 90%.

IV (cm⁻¹): 2780, 1728.

Espectrometria de massas: 166,40 (M⁺, 0,81).

RMN do ¹H: (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,95 (3H, d, J = 8,6 Hz, H-4), 1,35 (3H, m, H-2'a + H-6), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,8 (1H, m, H-3), 1,98 (3H, s, H-2'a + H-5'), 2,25 (1H, m, H-2a), 2,5 (1H, dd, J = 22,3 Hz, 5,7 Hz, H-2b), 5,36 (1H, s, H-3'), 9,75 (1H, s, H-1).

RMN do ¹³C: (75 MHz, CDCl₃, ppm): 16,6 (C-4*), 17 (C-4*), 23,5 (4'-<u>C</u>H₃), 26,5 (C-6'), 28 (C-2'), 29 (C-5'), 30,5 (C-3*), 30,8 (C-3*), 32,0 (C-5'), 38,5 (C-1'), 48 (C-2*), 48,3 (C-2*), 120,5 (C-3'), 134 (C-4'), 225 (C-1).

3.4.3. Ácido 3-(4-metilciclohexen-3-il)butanóico 27

Uma solução de NaOH 3 mol/L em água (3,5 mL, 10,5 mmol) foi colocada gota a gota sobre o éster **18** (678 mg, 3,5 mmol) e esta mistura foi agitada a temperatura

ambiente por 16 horas. Após este tempo a mistura reacional teve seu pH ajustado a 4 com HCl 1 mol/L. A solução tornou-se uma suspensão esbranquiçada. Esta suspensão foi extraída com 7 porções de hexano (volume de cada porção: 5 mL). As frações orgânicas foram combinadas, secas com sulfato de sódio, filtradas e o solvente foi removido por evaporação rotatória, obtendo-se um óleo de coloração amarelo-clara. Rendimento (bruto): 85%.

IV (cm⁻¹): 3540-3000 (largo), 1709.

Espectrometria de massas: 182,30 (M⁺, 0,64).

RMN do ¹H (200 MHz, CDCl₃, ppm): 0,95 (3H, m, H-4), 1,3 (2H, m, H-1' + H-6'a), 1,45 (1H, m, H-6'b), 1,6 (3H, s, 4'-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,7 (1H, m, H-2'b), 1,95 (4H, m, H-3 + H-2'a + H-5'), 2,15 (1H, m, H-2a), 2,45 (1H, dd, J = 21,7 Hz, 5,7 Hz, H-2b), 5,35 (1H, s, H-3'), 10,15 (1H, s, H-1).

RMN do ¹³C (50 MHz, CDCl₃, ppm): 16 (C-4), 22 (4'-<u>C</u>H₃), 25 (C-6'), 27 (C-2'), 29 (C-3), 31 (C-5), 34 (C-1'), 38 (C-2*), 39 (C-2*), 120 (C-3'), 134 (C-4'), 180 (C-1).

3.4.4. 3(R)-(6-metil-7-oxabiciclo[4.1.0]hept-3-il)butanal 43

O protocolo experimental é semelhante à síntese do aldeído **26**, partindo-se de 1,43 mL (8,73 mmol) de óxido de *R*-(+)-limoneno **14**. Rendimento (bruto): 90%. IV (cm⁻¹): 1725, 953.

Espectrometria de massas: 182,45 (M⁺, 1,45).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,92 (3H, m, H-4), 1,25 (2H, m, H-2'a + H-4'a), 1,3 (3H, s, 6'-C<u>H</u>₃), 1,55 (3H, m, H-4'b + H-5'), 1,95 (3H, m, H-3 + H-3' + H-2'b), 2,25 (1H, m, H-2a), 2,45 (1H, m, H-2b), 3,0 (1H, m, H-1'), 9,75 (1H, s, H-1).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 18,8 (C-4), 19,8 (6'-<u>C</u>H₃), 25,8 (C-4'), 30 (C-2'), 33,1 (C-5'), 34,5 (C-3), 38 (C-3'), 51,7 (C-2), 58,8 (C-1'), 59 (C-6'), 221 (C-1).

3.4.5. Procedimento geral para a hidroaminometilação do limoneno. Síntese da "Família A" (aminas 34, 53-58)

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1 mL, 1,19 g, 8,73 mmol), catalisador HRh(CO)(PPh₃)₃ (11,48 mg, 0,0125 mmol, 0,143 mol%), amina e THF (10 mL) foram colocados sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 20 bar de CO, 20 bar de H₂ e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 5 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e repressurizado com 40 bar de H₂, aquecido com banho de óleo de silicone, com agitação magnética a 100 °C. Após o tempo determinado o reator foi esfriado, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica para remoção do catalisador.

3.4.5.1. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-propilbutanamina 34

Amina utilizada: *n*-propilamina (0,8 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 5 horas. A purificação foi feita por extração ácido-base ou então por remoção do limoneno e outros produtos leves em bomba de alto vácuo. Rendimento (CG-DIC): 95%. Rendimento isolado: 90%.

Espectrometria de massas: 209,25 (M⁺, 0,82).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,85 (3H, m, H-4), 0,92 (3H, t, J = 7.48 Hz, H-3"), 1,35 (4H, m, H-2" + H-2), 1,5 (4H, m, J = 7.5 Hz, H-1" + H-2'a + H-6'a),

1,65 (3H, s, 4'-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,95 (4H, m, H-5' + H-2'b + H-6'b), 2,57 (2H, t, J = 7.5 Hz, H-1''), 2,67 (2H, m, H-1), 5,38 (1H, s, H-3').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 11,8 (C-3"), 15,8 (C-4*), 15,9 (C-2"), 16,3 (C-4*), 23,2 (4'-<u>C</u>H₃), 26,9 (C-2"), 27,5 (C-6"), 30,8 (C-5"), 34,3 (C-2*), 34,6 (C-2*), 35,2 (C-1"*), 35,3 (C-1"*), 38,4 (C-3*), 38,6 (C-3*), 48,3 (C-1*), 48,4 (C-1*), 52 (C-1"), 121 (C-3"), 133,9 (C-4").

3.4.5.2. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-isopropilbutanamina 53

Amina utilizada: isopropilamina (0,82 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 10 horas. A purificação foi feita por extração ácido-base seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 63%. Rendimento (isolado): 40%.

Espectrometria de massas: 209,25 (M⁺, 3,98).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,86 (3H, m, J = 6,4 Hz, H-4), 1,06 (6H, d, J = 6,3 Hz, H-2''), 1,3 (4H, m, H-2 + H-3 + H-6'a), 1,63 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,7 (3H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b), 1,95 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,6 (2H, m, H-1), 2,8 (1H, m, J = 6,3 Hz, H-1''), 5,37 (1H, s, H-3').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,8 (C-4*), 16,2 (C-4*), 22,7 (C-2*), 22,8 (C-2*), 23,2 (4'-<u>C</u>H₃), 26,8 (C-2'), 27,4 (C-6'), 30,7 (C-5'), 34,4 (C-2*), 34,7 (C-2*), 35,3 (C-1**), 35,4 (C-1**), 38,3 (C-3*), 38,6 (C-3*), 45,7 (C-1), 48,7 (C-1*), 120,9 (C-3'), 133,7 (C-4').

3.4.5.3. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-morfonil-1-butanamina 54

Amina utilizada: morfolina (0,84 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 5 horas. A purificação foi feita por remoção dos produtos leves em bomba de alto vácuo. Rendimento (CG-DIC): 90,3%. Rendimento (isolado): 88%.

Espectrometria de massas: 237,25 (M⁺, 1,69).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4), 1,3 (4H, m, H-2 + H-3 + H-6'a), 1,65 (3H, s, 4'-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,7 (3H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b), 1,95 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,4 (2H, m, H-1), 2,5 (4H, m, H-3'' + H-5''), 3,7 (4H, t, J = 4,7, H-2'' + H-6''), 5,38 (1H, s, H-3').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,8 (C-4*), 16,2 (C-4*), 23,3 (4-<u>C</u>H₃), 26,8 (C-2'), 27,4 (C-6'), 30,4 (C-2), 30,7 (C-5'*), 30,8 (C-5'*), 35,4 (C-1'*), 35,6 (C-1'*), 38,3 (C-3*), 38,5 (C-3*), 53,7 (C-1), 57,5 (C-3'' + C-5''), 66,8 (C-2'' + C-6''), 120,8 (C-3'), 133,8 (C-4').

3.4.5.4. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-piperidinil-1-butanamina 55

Amina utilizada: piperidina (0,95 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 4 horas. A purificação foi feita por remoção dos produtos leves em bomba de alto vácuo. Rendimento (CG-DIC): 66%. Rendimento (isolado): 60%.

Espectrometria de massas: 235,25 (M⁺, 6,18).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,85 (3H, m, H-4), 1,4 (6H, m, H-2 + H-3 + H-6'a + H-4''), 1,6 (4H, m, H-3'' + H-5''), 1,65 (3H, s, 4'-C $\underline{\text{H}}_{3}$), 1,7 (3H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b), 1,95 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,3 (2H, m, H-1), 2,4 (4H, m, H-2'' + H-6''), 5,39 (1H, s, H-3').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,9 (C-4*), 16,3 (C-4*), 23,4 (4'-<u>C</u>H₃), 25,4 (C-4''), 25,8 (C-3'' + C-5''), 26,9 (C-2'), 27,5 (C-6'), 30,8 (C-2), 30,9 (C-5'), 35,8 (C-1'*), 35,9 (C-1'*), 38,3 (C-3*), 38,6 (C-3*), 54,6 (C-1), 57,9 (C-2'' + C-6''), 120,9 (C-3'), 133,8 (C-4').

3.4.5.5. N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 56

Amina utilizada: anilina (0,8 mL, 8,73 mmol). Tempo de hidrogenação: 60 horas. A purificação foi feita por extração ácido-base seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 50%. Rendimento (isolado): 36%.

Espectrometria de massas: 243,40 (M⁺, 39,86).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3,18 (2H, m, H-1'), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,85 (3H, m, H-2 + H-3 + H-6), 7,2 (2H, m, H-3 + H-5).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 26,9 (C-2'), 27,8 (C-6''), 30,7 (C-2'), 30,8 (C-5''), 32,5 (C-4'*), 32,7 (C-4'*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 44,8 (C-1'), 115,5 (C-2), 115,6 (C-6), 120,7 (C-4), 120,8 (C-3''), 129,3 (C-3), 131,9 (C-5), 133,9 (C-4''), 144,9 (C-1).

3.4.5.6. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-benzil-1-butanamina 57

Amina utilizada: benzilamina (0,96 mL, 8,73 mmol). Tempo de hidrogenação: 14 horas. A purificação foi feita por remoção dos produtos leves em bomba de alto vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 56%. Rendimento (isolado): 44%.

Espectrometria de massas: 257,29 (M⁺, 42,22).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,84 (3H, m, H-4), 1,35 (4H, m, H-2 + H-3 + H-6'a), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,7 (2H, m, H-1' + H-6'b), 1,8 (1H, m, H-2'a), 1,95 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,63 (2H, m, H-1), 3,8 (2H, s, H-1''), 5,38 (1H, s, H-3'), 7,23 (2H, m, H-4'' + H-6''), 7,32 (3H, m, H-3'' + H-5'' + H-7'').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,9 (C-4*), 16,3 (C-4*), 23,4 (4'-<u>C</u>H₃), 25,4 (C-6'), 27,0 (C-2'*), 27,5 (C-2'*), 29,5 (C-2), 30,8 (C-5'*), 30,9 (C-5'*), 34,1 (C-4'*), 34,4 (C-4'*), 35,1 (C-1'*), 35,3 (C-1'*), 38,4 (C-3*), 38,6 (C-3*), 47,7 (C-1), 54 (C-1''), 120,9 (C-3'), 126,9 (C-5''), 128,1 (C-3''), 128,2 (C-7''), 128,3 (C-4''), 128,4 (C-6''), 133,9 (C-4'), 140,2 (C-2'').

3.4.5.7. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-piperazinil-1-butanamina 58

Amina utilizada: piperazina (1.5 g, 17,4 mmol). Tempo de hidrogenação: 14 horas. A purificação foi feita por remoção dos produtos leves em bomba de vácuo

seguida da filtração do excesso de piperazina precipitada e lavada com éter etílico gelado e remoção do solvente de lavagem. Rendimento (bruto): 89%.

Espectrometria de massas: 236,40 (M⁺, 33,55).

RMN do ¹H (CDCl₃, ppm): 0,93 (3H, m, H-4), 1,32 (4H, m, H-2 + H-3 + H-6'a), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,7 (3H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b), 1,98 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,4 (2H, m, H-1), 2,5 (4H, s, H-3'' + H-5''), 2,95 (4H, m, H-2'' + H-6'') 5,39 (1H, s).

RMN do ¹³C (CDCl₃, ppm): 15,8 (C-4*), 16,2 (C-4*), 23,3 (4'-<u>C</u>H₃), 25,3 (C-6'), 26,8 (C-2'*), 27,3 (C-2'*), 29,1 (C-2), 30,4 (C-5'*), 30,7 (C-5'*), 35,5 (C-1'*), 35,6 (C-1'*), 38,2 (C-3*), 38,5 (C-3*), 45,8 (C-2'' + C-6''), 54,4 (C-1), 57,7 (C-3'' + C-5''), 120,8 (C-3'), 133,7 (C-4').

3.4.6. Procedimento modificado para a hidroaminometilação do limoneno. Síntese da "Família B" (aminas 59-65)

Uma mistura de (*R*)-(+)-limoneno **1** (1 mL, 1,19 g, 8,73 mmol), catalisador HRh(CO)(PPh₃)₃ (11,48 mg, 0,0125 mmol, 0,143 mol%), amina, trifenilfosfina (23 mg, 0,0875 mmol) e THF (10 mL) foram colocados sob argônio em um reator autoclave pressurizado com 20 bar de CO, 20 bar de H₂ e aquecido com banho de óleo de silicone com agitação magnética a 100 °C por 24 horas. Após este tempo o reator foi esfriado sob água corrente, despressurizado e repressurizado com 40 bar de H₂, aquecido com banho de óleo de silicone, com agitação magnética a 100 °C. Após o tempo determinado o reator foi esfriado, despressurizado e a mistura reacional foi passada em uma coluna de sílica para remoção do catalisador.

3.4.6.1. 4-cloro-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 59

Amina utilizada: 4-cloroanilina (1114 mg, 8,73 mmol). Tempo de hidrogenação: 20 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 30,6%. Rendimento (isolado): 23%.

Espectrometria de massas: 277,20 (M⁺, 8,27).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3,08 (2H, m, H-1'), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,49 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-2 + H-6), 7,09 (2H, d, J = 8,6 Hz, H-3 + H-5).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 42,8 (C-1'), 113,6 (C-2 + C-6), 120,7 (C-4), 120,8 (C-3''), 128,9 (C-3 + C-5), 133,9 (C-4''), 147 (C-1).

3.4.6.2. 4-metóxi-*N*-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]-anilina 60

Amina utilizada: anisidina (1183 mg, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 24 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada e extração ácido-base. Rendimento (CG-DIC): 40%. Rendimento (isolado): 24%.

Espectrometria de massas: 273,40 (M+, 9,12).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3,08 (2H, m, H-1'), 3,65 (3H, s, 4-OC $\underline{\text{H}}_3$), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,5 (2H, d, J = 8,8, H-2 + H-6), 6,73 (2H, d, J = 8,8, H-3 + H-5).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 42,8 (C-1'), 48,0 (4-O<u>C</u>H₃), 114,9 (C-2), 115,0 (C-6) 115,5 (C-3), 115,8 (C-5), 119,8 (C-3''), 134 (C-4''), 142,8 (C-1), 152,0 (C-4).

3.4.6.3. 4-metil-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 61

Amina utilizada: 4-toluidina (1029 mg, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 48 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 83%. Rendimento (isolado): 70%.

Espectrometria de massas: 257,30 (M⁺, 13,48).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 2,18 (3H, s, 4-C $\underline{\text{H}}_3$), 2,42 (1H, s, N $\underline{\text{H}}$), 3,08 (2H, m, H-1'), 5,39 (1H, s, H-3''), 6,45 (2H, d, J = 7,0 Hz, H-2 + H-6), 6,9 (2H, d, J = 7,0 Hz, H-3 + H-5).

RMN do 13 C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 20,3 (4- $\underline{\text{CH}}_3$), 23,4 (4''- $\underline{\text{CH}}_3$), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,1 (C-1''*), 35,2 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 42,8 (C-1'), 113,0 (C-2 + C-6), 121,0 (C-3''), 126,0 (C-4), 129,8 (C-3 + C-5), 134,0 (C-4''), 146,4 (C-1).

3.4.6.4. 3-(4-metilciclohexen-3-il)N-furfuril-1-butanamina 62

Amina utilizada: furfurilamina (0,9 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 22 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 90,1%. Rendimento (isolado): 75%.

Espectrometria de massas: 247,25 (M⁺, 6,28).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4), 1,3 (4H, m, H-2 + H-3 + H-6'a), 1,65 (3H, s, 4'-C<u>H</u>₃), 1,75 (3H, m, H-1' + H-2'a + H-6'b), 1,98 (3H, m, H-2'b + H-5'), 2,55 (3H, s, H-1 + N<u>H</u>), 3,7 (2H, s, H-6''), 5,39 (1H, s, H-3'), 6,1 (1H, s, H-3''), 6,23 (1H, s, H-4''), 7,25 (1H, s, H-5'').

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4*), 16,2 (C-4*), 23,4 (4'-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6'), 26,9 (C-6'*), 27,3 (C-6'*), 29,2 (C-2), 30,7 (C-5'*), 30,8 (C-5'*), 35,1 (C-1'*), 35,2 (C-1'*), 38,1 (C-3*), 38,3 (C-3*), 46 (C-1), 47,5 (C-6''), 108,5 (C-3''), 110,0 (C-4''), 121 (C-3'), 134 (C-4'), 141,7 (C-4''), 154,1 (C-2'').

3.4.6.5. 3-trifluormetil-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 63

Amina utilizada: 3-trifluormetilanilina (1,2 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 48 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 30%. Rendimento (isolado): 21%.

Espectrometria de massas: 311,20 (M⁺, 7,75).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_{3}$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3.05 (2H, m, H-1'), 3,65 (1H, s, N $\underline{\text{H}}$), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,65 (1H, m, H-6), 6,81 (2H, m, H-2 + H-4), 7,18 (1H, m, H-5).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 42 (C-1'), 108,5 (C-2), 113,5 (C-4), 115,8 (C-6), 120,8 (3-<u>C</u>F₃), 120,9 (C-3''), 129,9 (C-5), 132,0 (C-3), 134,0 (C-4''), 148,5 (C-1).

3.4.6.6. N-metil-N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]anilina 64

Amina utilizada: *N*-metilanilina (1,05 mL, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 22 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 50,7%. Rendimento (isolado): 40%.

Espectrometria de massas: 257,35 (M⁺, 13,67).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_{3}$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 2,85 (3H, s, N-C $\underline{\text{H}}_{3}$), 3.15 (2H, m, H-1'), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,6 (3H, m, H-2 + H-4 + H-6), 7,15 (2H, m, H-3 + H5).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 39,0 (N-<u>C</u>H₃), 51,5 (C-1'), 112,0 (C-2 + C-6), 115,7 (C-4), 120,9 (C-3''), 129,0 (C-3 + C-5), 134,0 (C-4''), 149,2 (C-1).

3.4.6.7. 2-{N-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]}aminopiridina 65

Amina utilizada: 2-aminopiridina (904 mg, 9,6 mmol). Tempo de hidrogenação: 24 horas. A purificação foi realizada por remoção dos produtos leves e do solvente em bomba de vácuo seguida de destilação fracionada. Rendimento (CG-DIC): 33,5%. Rendimento (isolado): 24%.

Espectrometria de massas: 244,30 (M⁺, 24,52).

RMN do ¹H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C<u>H</u>₃), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3,2 (2H, m, H-1'), 4,45 (1H, s, N<u>H</u>), 5,38 (1H, s, H-3''), 6,4 (2H, m, H-3 + H-5), 7,35 (1H, m, H-4), 8,0 (1H, m, H-6).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-6''), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 40,5 (C-1'), 106,2 (C-3), 112,3 (C-5), 121 (C-3''), 134 (C-4''), 137,7 (C-4), 150,0 (C-6), 158,8 (C-2).

3.4.7. 2-{[3-(4-metilciclohexen-3-il)-butil]amino}etanol 66

Em um balão de duas bocas, foram adicionados sob atmosfera de argônio o aldeído **26** (300 mg, 1,804 mmol), etanolamina (0,17 mL, 2,71 mmol, 1,5 equiv.), 1 gota de ácido suflúrico concentrado e 5 mL de etanol absoluto, sob agitação vigorosa à

temperatura ambiente. Após 4 horas de reação (quando observou-se que todo o aldeído havia sido consumido), adicionou-se cianoborohidreto de sódio (340 mg, 5,412 mmol, 3 equiv.) e manteve-se a reação por 18 horas. Após esse tempo, ao verificar-se que havia ainda imina não reduzida, acrescentou-se igual quantidade do agente redutor e manteve-se a reação por mais 4 horas. A mistura reacional foi seca em bomba de vácuo e o agente redutor precipitado foi removido por filtração e lavado com algumas porções de éter etílico a seco. O éter foi removido em bomba de vácuo e o resíduo bruto foi purificado por destilação fracionada. Rendimento (isolado): 57%.

Espectrometria de massas: 211,25 (M⁺, 1,15).

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,9 (3H, m, H-4'), 1,3 (4H, m, H-2' + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_{3}$), 1,75 (3H, m, H-1'' + H-2''a + H-6''b), 1,98 (3H, m, H-2''b + H-5''), 3,05 (4H, m, H-1' + H-2), 3,8 (2H, m, H-1), 4,9 (2H, s, N $\underline{\text{H}}$ + O $\underline{\text{H}}$), 5,38 (1H, s).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 15,7 (C-4'*), 16,2 (C-4'*), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,2 (C-2''*), 26,9 (C-2''*), 27,3 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 35,0 (C-1''*), 35,1 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 47,0 (C-1'), 51,0 (C-2), 58,5 (C-1) 120,9 (C-3''), 134,0 (C-4'').

3.4.8. *N*-propil-*N*-[3-(4-metilciclohexen-3-il)butil]4-metilbenzeno-1-sulfonamida 71

Em um balão de duas bocas com agitador magnético, sob atmosfera inerte de argônio, foram colocados 3 mL de diclorometano, 150 mg da amina **34** (0,717 mmol) e 146 mg de trietilamina (1,434 mmol, 2 equiv.). O balão foi colocado em um banho de gelo e então 302 mg de cloreto de *p*-toluenosulfonila (1,58 mmol, 2,2 equiv.) foi adicionado ao balão em pequenas porções, em um intervalo de tempo de 10 minutos.

Trinta minutos após o início da adição, o banho de gelo foi retirado e o balão continuou sob agitação vigorosa durante mais 4 horas. Após esse tempo o solvente foi removido em um evaporador rotatório, o resíduo foi retomado em acetato de etila e extraído com 12 porções de 10 mL de água destilada. A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio e filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotatório e o resíduo bruto foi purificado sob destilação fracionada. Rendimento (isolado): 44%.

RMN do 1 H (300 MHz, CDCl₃, ppm): 0,85 (3H, m, H-4'), 0,92 (3H, t, J = 7.48 Hz, H-1'), 1,35 (4H, m, H-2' + H-2'''), 1,5 (4H, m, J = 7.5 Hz, H-1'' + H-2''a + H-3' + H-6''a), 1,65 (3H, s, 4''-C $\underline{\text{H}}_3$), 1,95 (4H, s), 2,4 (3H, s, 4-C $\underline{\text{H}}_3$), 3,1 (4H, m, H-1' + H-1'''), 5,38 (1H, s, H-4''), 7,3 (2H, m, H-3 + H-5), 7,7 (2H, m, H-2 + H-6).

RMN do ¹³C (75 MHz, CDCl₃, ppm): 11,2 (C-3'''), 15,7 (C-4'*), 16,1 (C-4'*), 21,4 (C-2'''), 21,9 (4-<u>C</u>H₃), 23,4 (4''-<u>C</u>H₃), 25,3 (C-2''*), 26,9 (C-2''*), 27,4 (C-2''*), 29,2 (C-2'), 30,7 (C-5''*), 30,8 (C-5''*), 34,8 (C-1''*), 35,0 (C-1''*), 38,1 (C-3'*), 38,3 (C-3'*), 46,6 (C-1'), 49,8 (C-1'''), 120,8 (C-3''), 127,1 (C-2 + C-6), 129,5 (C-3 + C-5), 134,0 (C-4''), 137,1 (C-4), 142 (C-1).

3.5. CONCLUSÕES

O limoneno apresentou-se como um ótimo bloco de construção para a síntese de derivados em solução, a partir da qual 20 compostos foram sintetizados (dos quais 15 são originais, sendo relatados pela primeira vez neste trabalho) a partir de um pequeno número de protocolos sintéticos, através do emprego de várias aminas e outros substratos.

A hidroformilação do limoneno mostrou-se uma reação rápida, versátil e reprodutível, a partir da qual foi possível obter o aldeído 26 em ótimos rendimentos. O insucesso na oxidação de 26 ao seu respectivo ácido carboxílico e os problemas encontrados na reprodução dos protocolos de metoxicarbonilação levaram ao aproveitamento da grande versatilidade do grupo aldeído na reação hidroformilação/aminação redutiva em cascata (hidroaminometilação), onde foi possível sintetizarem-se duas famílias de 7 compostos cada, utilizando-se diferentes aminas disponíveis comercialmente. Algumas das aminas planejadas não puderam ser sintetizadas, devido ao fato de que levaram ao envenenamento do catalisador. Contudo, um dos produtos planejados, o aminoálcool 66, foi obtido com sucesso através de um protocolo sintético clássico de aminação redutiva, o que permite então verificar o efeito da inclusão do grupamento OH na atividade dos compostos.

3.6. REFERÊNCIAS

- 1. CHEMISCHE VERWERTUNGSGESELLSCHAFT OBERHAUSEN M.B.H. Otto Roelen. **Verfarhen zur Herstellung von sauerstoffhaltingen Verbindungen**. DE n. 849548, 1951.
- 2. BAYON, J. C. Carbonilación. In: ORO, L. A.; SOLA, E. (Ed.). **Fundamentos Y Aplicaciones de la Catálisis Homogénea**. Zaragosa: CYTED, 2000, cap. 6.
- 3. MENDES, A. N. F. Hidroformilação de alfa-olefinas e ésteres graxos insaturados catalisada por complexo de ródio: estudo da atividade catalítica e de novas estratégias para reciclagem do catalisador. **Tese de Doutorado.** Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- 4. EVANS, D.; OSBORN, J. A.; WILKINSON, G. Hydroformylation of alkenes by use of Rhodium complex catalysts. **Journal of Chemical Society**, v. 33, p. 3133-3142, 1968.
- 5. KRANENBURG, M.; BURGT, Y. E. M. van der; KAMER, P. C. J.; VAN LEEUWEN, P. W. N. M. New diphosphine ligands based on heterocyclic aromatics inducing very high regioselectivity in rhodium-catalyzed hydroformylation: effect of the bite angle. **Organometallics**, v. 14, p. 3081-3089, 1995.
- 6. KAMER, P. C. J.; VAN LEEUWEN, P. W. N. M.; REEK, J. N. H. Wide bite angle diphosphines: XANTPHOS ligands in transition metal complexes and catalysis. **Accounts in Chemical Research**, v. 34, p. 895-904, 2001.
- 7. LEEUW, F. de. A literature study of new hydroformylation techniques. **Monografia** (**Exame de Qualificação**). Vakken Scheikundige Technologie, Vakken, 2006.
- 8. WIESE, K-D.; OBST, D. Hydroformylation. **Topics in Organometallic Chemistry**, v. 18, p. 1-33, 2006.
- 9. EILBRACHT, P.; BÄRFACKER, L.; BUSS, C.; HOLLMANN, C.; KITSOS-RZYCHON, B. E.; KRANEMANN, C. L.; RISCHE, T.; ROGGENBUCK, R.; SCHMIDT, A. Tandem reaction sequences under hydroformylation conditions: New synthetic applications of transition metal catalysis. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 3329-3365, 1999.
- 10. ERKEY, C., PALO, D. Kinetics of the homogeneous catalytic hydroformylation of 1-octene in supercritical carbon dioxide with HRh(CO)[P(p-CF₃C₆H₄)₃]₃. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 38, p. 3786-3792, 1999.
- 11. BEKTESEVIC, S.; KLEMANA, A. M.; MARTEEL-PARRISH, A. E.; ABRAHAMA, M. A. Hydroformylation in supercritical carbon dioxide: catalysis and benign solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 232-241, 2006.

- 12. PETRICCI, E.; MANN, A.; SCHOENFELDER, A.; ROTA, A.; TADDEI, M. Microwaves make hydroformylation a rapid and easy process. **Organic Letters**, v. 8, p. 3725-3727, 2006.
- 13. SEICHE, W.; SCHUSCHKOWSKI, A.; BREIT, B. Bidentate ligands by self-assembly through hydrogen bonding: a general room temperature/ambient pressure regioselective hydroformylation of terminal alkenes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 347, p. 1488-1494, 2005.
- 14. MITSUDO, T.; SUZUKI, N.; KONDO, T.; WATANABE,Y. Ru₃(CO)₁₂/1,10-phenanthroline-catalyzed hydroformylation of olefins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 109, p. 219-225, 1996.
- 15. FUJITA, S.; OKAMURA, S., AKIYAMA, Y.; ARAI, M. Hydroformylation of cyclohexene with carbon dioxide and hydrogen using ruthenium carbonyl catalyst: influence of pressures of gaseous components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, p. 749-759, 2007.
- 16. TROST, B. M. Atom economy. a challenge for organic synthesis. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 34, p. 259, 1995.
- 17. BREIT, B.; SEICHE, W. Recent advances on chemo-, regio- and stereoselective hydroformylation. **Synthesis**, v. 2001, p. 1-36, 2001.
- 18. KRANEMANN, C. L.; EILBRACHT, P.; One-pot synthesis of tertiary α, ω -diamines via carbonylative bis[hydroaminomethylation] of α, ω -diolefins using di(μ -chloro)bis(η^4 -1,5-cyclooctadiene)dirhodium as a catalyst precursor. **Synthesis**, v. 1998, p. 71-77, 1998.
- 19. MOBIL OIL CORPORATION. Jerry G. Strong. *N*-[3-(4-methyl-3-cyclohexenyl)butyl] amines. US n. 3890384, 1972.
- 20. MOBIL OIL CORPORATION. Jerry G. Strong. N-[3-(4-methyl-3-cyclohexenyl)butyl] amines and their use as plant growth regulators. US n. 4030908, 1977.
- 21. SIROL, S.; KALCK, P. Hydroformylation of optically pure monoterpenes catalyzed by dinuclear thiolato-bridged rhodium complexes. **New Journal of Chemistry**, v. 21, p. 1129, 1997.
- 22. FOCA, C. M.; BARROS, H. J. V.; SANTOS, E. N. dos; GUSEVKAYA, E. V.; BAYÓN, J. C. Hydroformylation of myrcene: metal and ligand effects in the hydroformylation of conjugated dienes **New Journal of Chemistry**, v. 27, p. 533, 2003.
- 23. HALLIGUDI, S. B.; BHATT, K. N.; VENKATASUBRAMANIAN, K. Hydroformylation of olefins catalyzed by rhodium complex anchored on clay matrices. **Reaction Kinetics Catalysis Letters**, v. 51, p. 459, 1993.

- 24. BARROS, H. J. V.; OSPINA, M. L.; ARGUELLO, E.; ROCHA, W. R.; GUSEVKAYA, E. V.; SANTOS, E. N. dos. Rhodium catalyzed hydroformylation of beta-pinene and camphene: effect of phosphorous ligands and reaction conditions on diastereoselectivity. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 671, p. 150, 2003.
- 25. EISENBRAUN, E. J. Cyclooctanone. **Organic Synthesis Collection**, v. 5, p. 310, 1973.
- 26. LAN, J.; LI, J.; LIU, Z.; LI, Y.; CHAN, A. S. C. The first total synthesis of (-)-sinulariol-B and three other cembranoids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 1877-1885, 1999.
- 27. SARASWAT, S.; SHARMA, V.; BANERJI, K. K. Kinetics and mechanism of oxidation of aliphatic aldehydes by pyridinium chlorochromate. **Indian Journal of Chemistry A**, v. 40, p. 583-587, 2001.
- 28. YAMADA, S.; MORIZONO, D.; YAMAMOTO, K. Mild oxidation of aldehydes to the corresponding carboxylic acids and esters: alkaline iodine oxidation revisited. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 4329-4322, 1992.
- 29. CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry**. 3. ed. New York: Plenum, 1990, vol. 2.
- 30. MENDES, A. N. F.; GREGÓRIO, J. R.; ROSA, R. G. Studies on the experimental variables effects on rhodium catalyzed hydroformylation of unsaturated fatty esters and comparison of [RhH(CO)(PPh₃)₃] and [RhCl₃.3H₂O] as starting catalytic precursors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1124-1129, 2005.
- 31. VAN LEEUWEN, P. W. N. M.; ROOBEEK, C.F. The hydroformylation of butadiene catalysed by rhodium-diphosphine complexes. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 31, p. 345-353, 1985.
- 32. MARCAZZAN, P.; PATRICK, B. O.; JAMES, B. R. Amine products and catalyst poisoning in the homogeneous H₂ hydrogenation of Imines catalyzed by the [Rh(COD)(PPh₃)(₂)]PF₆ precursor. **Organometallics**, v. 22, p. 1177, 2003.
- 33. GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G. One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1066-1070, 2008.
- 34. MARCAZZAN, P.; PATRICK, B. O.; JAMES, B. R. Amine products and catalyst poisoning in the homogeneous H₂ hydrogenation of imines catalyzed by the [Rh(COD)(PPh₃)₂]PF₆ precursor. **Organometallics**, v. 22, p. 1177-1179, 2003.
- 35. HUDLICKY, M. **Reductions in Organic Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1984.

- 36. WUTS, P. G. M.; GREENE, T. W. **Greene's Protective Groups in Organic Synthesis**. New York: Wiley-Interscience, 2006, 4^a. ed.
- 37. BHATTACHARYA, G.; HERMAN, H.; DELFÍN, D.; SALEM, M. M.; BARSZCZ, T.; MOLLET, M.; RICCIO, G.; BRUN, R.; WERBOVETZ, K. A. Synthesis and antitubulin activity of N¹- and N⁴-substituted 3,5-dinitro sulfanilamides against african trypanosomes and *leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1823-1832, 2004.
- 38. SILVA, L. E.; JOUSSEF, A. C.; PACHECO, L. K.; SILVA, D. G.; STEINDEL, M.; REBELO, R. A. Synthesis and *in vitro* evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of *N*-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7553-7560, 2007.

CAPÍTULO 4. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIPARASITÁRIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

4.1. INTRODUÇÃO

4.1.1. Antimicrobianos e antifúngicos: necessidade da busca por novos compostos

Desde os trabalhos de Koch e Pasteur no século XIX já era conhecido o papel de microorganismos em algumas doenças (como a tuberculose) e também em outros processos, como a fermentação. Mesmo assim, doenças causadas por bactérias (ex.: Sífilis) matavam milhares de pacientes, sem a existência de métodos adequados para seu tratamento.

Tendo como alvo o tratamento desta doença, Paul Ehrlich (considerado por muitos o "pai da Química Medicinal") postulou, na primeira década do século XX, que seria possível encontrar uma "bala mágica", isto é, um composto sintetizado em laboratório que fosse capaz de matar o organismo causador de uma doença sem que se atingisse o organismo hospedeiro ou portador da mesma. Ao tratamento de doenças causadas por organismos com o uso de compostos químicos Erlich denominou de "quimioterapia". Após a síntese e avaliação farmacológica de centenas de compostos estruturalmente relacionados ao Atoxil 73, composto de arsênico (Figura 4.1), Erlich e o bacteriologista Sahachiro Hata descobriram em 1908 a arsfenamina 74, comercializado a partir de 1910 pela Hoechst com o nome de Salvarsan. Este composto causou uma revolução no tratamento da Sífilis, pois era tratada até aquela época com sais de Mercúrio¹.

Figura 4.1. Estruturas químicas dos compostos Atoxil 73 e arsfenamina 74

À parte de seus efeitos adversos tóxicos, alguns causados pelo fato de que o medicamento era fornecido como um pó para reconstituição e cada médico deveria preparar a solução para o mesmo ser administrado via intravenosa, a arsfenamina tornou-se o medicamento mais prescrito no mundo, sendo usada no tratamento da Sífilis até o surgimento das penicilinas na década de 1940¹.

Desde a descoberta da arsfenamina até os tempos atuais, muitas classes de quimioterápicos e antibióticos antimicrobianos e antifúngicos foram descobertas, tais como as sulfonamidas na década de 1930, os beta-lactâmicos como penicilinas (que entraram em produção na década de 1940) e cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, macrociclos polipeptídicos, glicopeptídicos ou poliênicos, azóis, quinolonas, monobactâmicos e carbapenêmicos, entre outros. Infelizmente, junto com o surgimento de novas classes de antimicrobianos e antifúngicos, o problema da resistência de bactérias^{2,3} e fungos^{4,5} a estes compostos também se tornou grave, de modo tal que hoje a indústria farmacêutica (especialmente no caso dos antibacterianos) está desenvolvendo novos compostos para fazer frente a cepas de microrganismos multi-resistentes^{2,3}.

Somando-se a isso também o fato de que hoje o número de compostos em ensaios clínicos para o tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos é menor e vem diminuindo em comparação com décadas anteriores². Desse modo, a busca por novos agentes bactericidas e fungicidas tornou-se novamente uma prioridade na terapêutica.

4.1.2. Leishmaniose

4.1.2.1. Aspectos gerais

A leishmaniose é uma parasitose causada por cerca de 20 espécies de parasita do gênero *Leishmania*, afetando cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países, especialmente na América Latina, sul da Europa, norte da África, Oriente Médio e Ásia, colocando em risco a saúde de cerca de 350 milhões de pessoas nesses locais⁶. Aproximadamente 2 milhões de novos casos de leishmaniose ocorrem a cada ano e, segundo o Programa de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR, *The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) da Organização Mundial da Saúde, cerca de 60 mil pessoas morreram de leishmaniose no mundo todo em 2002⁷.

4.1.2.2. O parasita, seu vetor e ciclo de transmissão

Os parasitas responsáveis pela leishmaniose são, conforme mencionado anteriormente, cerca de 20 espécies de parasitas da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. Além do gênero *Leishmania*, outro gênero importante desta ordem é o gênero Trypanosoma, no qual estão presentes parasitas causadores de doenças importantes para o homem: a Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) e a Doença do Sono (Tripanossomíase Africana).

Morfologicamente as principais características dos protozoários da ordem Kinetoplastida são: a presença de um ou dois flagelos oriundos da mesma bolsa flagelar e a presença de uma única mitocôndria contendo o cinetoplasto (organela celular autoreplicável que contém DNA extranuclear e está ligada ao flagelo) ^{8,9}.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são dimórficos, apresentando-se nas formas promastigota e amastigota. A forma promastigota apresenta um corpo celular alongado, com aparência fusiforme, medindo de 14-20 µm de comprimento e 1,5-4 µm de largura e um flagelo livre. A forma amastigota apresenta um aspecto oval,

medindo de 2-6 µm de comprimento e 1,5-3 µm de largura. Os parasitas nas duas formas reproduzem-se assexuadamente, em divisão binária.

O vetor e hospedeiro principal dos protozoários são cerca de 30 espécies de flebotomíneos hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomya* ou *Psychodopigus* (Novo Mundo), conhecidos popularmente no Brasil como "mosquitopalha" ou "birigui" ^{6, 8, 9}.

O ciclo de vida do parasita (Figura 4.2) se inicia quando os vetores se alimentam de sangue contaminado de um hospedeiro vertebrado, ingerindo formas amastigotas do parasita. Dentro do intestino do vetor esses amastigotas transformar-se-ão na forma promastigota, a qual migra para o esôfago do vetor. Quando o inseto alimenta-se novamente, inocula saliva com promastigotas que passam para a corrente sanguínea do hospedeiro. Os parasitas sobrevivem aos mecanismos de defesa do mesmo e infectam macrófagos ao serem fagocitados. Dentro dos macrófagos ocorre a fusão do vacúolo parasitófago com lisossomos, formando o fagolisossomo e dentro deste fagolisossomo o parasita transforma-se em amastigota. Após essa transformação, multiplica-se, rompe a membrana do macrófago e infecta outros macrófagos^{6, 8, 9}.

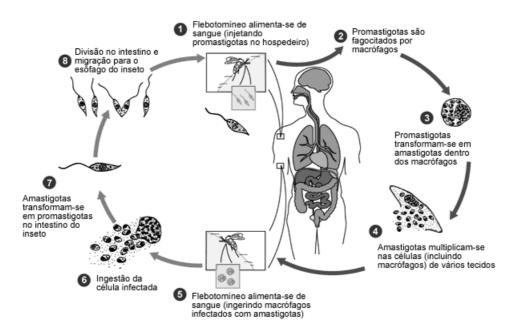


Figura 4.2. Ciclo de vida do parasita responsável pela leishmaniose. Origem: Center for Disease Control (EUA)

O homem participa desse ciclo como um hospedeiro acidental. Normalmente os principais hospedeiros vertebrados são animais silvestres, que são reservatórios naturais do protozoário, adaptados ao parasitismo. Dentre esses animais, podem-se citar como hospedeiros roedores, marsupiais e canídeos silvestres. Além desses, outros animais nos quais é possível encontrar a doença são: cães, gatos, eqüinos, mulas e roedores domésticos^{6, 8, 9}.

4.1.2.3. Formas da doença

A leishmaniose é classicamente dividida em duas formas clínicas, a saber: a leishmaniose tegumentar ou cutânea que atinge a pele, linfonodo ou mucosa¹⁰, e a leishmaniose visceral que afeta fígado, baço e medula óssea¹¹, sendo que esta forma visceral da doença é fatal em quase todos os casos se não houver tratamento^{6, 12, 13}.

A leishmaniose tegumentar é a forma mais comum da doença. É conhecida no Brasil pelo nome popular de "úlcera de Bauru" e no Velho Mundo como "botão do oriente". Pode causar úlceras crônicas, disseminar-se progressivamente afetando linfonodos ou resultar em curas espontâneas. A forma mais destrutiva da doença é a leishmaniose mucocutânea, causada no Novo Mundo por *Leishmania (L.) braziliensis*, que afeta as cavidades nasais, faringe, laringe e cavidade oral, podendo ocorrer destruição total ou parcial da pirâmide nasal e de estruturas acometidas na boca. Pode ocorrer também perfuração do septo nasal e do palato. Os danos causados, permanentes, levam muitas vezes à exclusão social do paciente, devido às desfigurações faciais e também podem causar problemas na alimentação do mesmo, quando ocorrem danos na faringe. Segundo a OMS, 90% dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru^{7-10, 13}. O Brasil tem registrado um aumento no número de casos relatados de 21.800 casos em 1998 para 60.000 casos em 2003¹⁴.

A leishmaniose visceral é a forma mais perigosa da doença. Conhecida como "calazar", "febre dundum" e esplenomegalia tropical, é uma doença crônica e sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, anorexia, diarréia, linfadenopatia,

seguidas de hepato e esplenomegalia, edemas, hemorragias orais, nasais e intestinais, prostração e caquexia. A progressão da doença debilita o paciente e torna-o mais suscetível a infecções oportunistas, as quais levam o paciente a óbito.

Outro problema importante que apareceu recentemente na pesquisa são os casos de co-infecção de leishmaniose e o HIV, que tornam o paciente, já imunocomprometido, mais suscetível aos problemas da leishmaniose ¹⁵.

Dados da OMS indicam que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral no mundo ocorrem em quatro países: Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão⁶. No Brasil observou-se um aumento no número de casos relatados de 2.042 (1989) para 3.911 (1999), um aumento de 52%, o que indica que o tratamento da doença não tem recebido a atenção necessária dos órgãos governamentais^{8,9,11}.

4.1.2.4. Tratamento

O tratamento da leishmaniose é essencialmente quimioterápico, realizado com alguns fármacos que serão apresentados a seguir.

Os *antimoniais*, compostos de antimônio pentavalente (Sb^V), são fármacos que foram introduzidos na terapêutica na década de 1930 e usados desde então no tratamento da leishmaniose, sendo os de primeira escolha no tratamento em quase todos os países do mundo. Dois fármacos pertencem atualmente a esta classe (Figura 4.3) são o stibogluconato de sódio 75 (Pentostam®, GlaxoSmithKline) e o antimoniato de meglumina 76 (Glucantime®, Sanofi-Aventis). Ambos são adminstrados via parenteral, sendo o stibogluconato de sódio 75 via intravenosa e o antimoniato de meglumina 76 via i.v. ou intramuscular.

* não há um consenso na literatura quanto à fórmula estrutural correta deste composto. A fórmula mostrada aqui é uma proposta.

Figura 4.3

Mesmo com seus muitos anos de uso, o mecanismo de ação dos mesmos ainda é incerto. A própria fórmula estrutural correta do antimoniato de meglumina **76** é desconhecida; sendo a fórmula mostrada na Figura 4.3 uma proposta para o composto ¹⁶. Acredita-se que os antimoniais são ativos ao serem reduzidos, dentro dos macrófagos e/ou dentro da forma amastigota do parasita, a compostos de antimônio trivalente (Sb^{III}), os quais são tóxicos para o parasita e resultam em sua morte. Os antimoniais não são ativos contra a forma promastigota do parasita e apresentam uma série de efeitos adversos, tais como: cardiopatias, insuficiência renal reversível, pancreatite, anemia, mialgia e trombocitopenia, entre outros. Esses efeitos adversos, somados ao fato de que o tratamento com esses fármacos costuma durar de três a quatro semanas, fazem com que muitos pacientes abandonem o tratamento. Além disso, nos últimos anos, o alto número de relatos de resistência dos parasitas aos antimoniais no estado de Bihar¹⁷, na Índia, fez com que os mesmos perdessem o posto de fármacos de primeira escolha para a Anfotericina B **78**.

Figura 4.4

A pentamidina 77 (Figura 4.4) é uma diamidina utilizada também no tratamento da tripanossomíase africana ("doença do sono") e considerada um fármaco de segunda escolha no tratamento da leishmaniose quando os antimoniais não são efetivos. Seu mecanismo de ação, assim como o dos antimoniais, é incerto. Acredita-se que a pentamidina atue diretamente no DNA da mitocôndria do parasita, dado corroborado pela observação de que é nesta organela do parasita que ocorre a acumulação do fármaco. É ativa também contra a forma promastigota do parasita. Apesar de sua efetividade os efeitos adversos graves como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e indução de diabetes insulino-dependente ou insulino-independente irreversível, fazem com que a Anfotericina B 78 seja usada preferencialmente ^{8, 12, 13, 17}.

O macrociclo poliênico Anfotericina B **78** é mais conhecido por ser um antifúngico amplamente usado em infecções fúngicas sistêmicas, embora se saiba desde a década de 1960 que o mesmo é ativo também contra leishmanias. A razão para esta ação é que parasitas do gênero *Leishmania* apresentam ergosterol como lipídio de membrana e não colesterol (como os mamíferos). Por isso, este composto é capaz de interagir com a membrana do parasita, abrindo poros na mesma causando o fluxo livre de íons para dentro e fora da célula, levando à morte do parasita⁸⁻¹³.

O principal problema do uso deste fármaco reside nos vários efeitos adversos relacionados à aplicação do mesmo via intravenosa (febre, tremores, tromboflebites, endurecimento dos vasos sanguíneos e nefrotoxicidade). A maior parte destes efeitos (incluindo a nefrotoxicidade) pode ser diminuída (ou até mesmo eliminada) com o uso

de preparações lipossomais de Anfotericina B, que apresentam, entretanto, um alto custo, proibitivo para o seu uso no tratamento da leishmaniose em países em desenvolvimento⁸⁻¹³.

Paromomicina **79** (Figura 4.5) e Miltefosina **80** são os novos fármacos adicionados ao arsenal terapêutico no século XXI para o tratamento da leishmaniose. O primeiro é um aminoglicosídeo usado desde a década de 1960 no tratamento de infecções bacterianas. Embora se soubesse desde essa época que o fármaco era um agente anti-leishmania *in vitro*, apenas no final do século XX, com o suporte de Organizações Não-Governamentais (ONGs) como o *Institute for One World Health* (iOWH) e a Fundação Bill e Melinda Gates, que a Fase III de ensaios clínicos recebeu o aporte financeiro necessário, resultando na aprovação, na Índia, para o uso no tratamento da leishmaniose visceral em 2006¹⁸. A paromomicina, administrada via intravenosa, está em Fase III de ensaios clínicos em outros países do mundo, sendo esses testes suportados pela DNDi (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*)¹⁹. Acredita-se que o mecanismo de ação da paromomicina seja o mesmo de sua ação antibacteriana, isto é, a inibicão da subunidade 30S dos ribossomos.

Figura 4.5

Além dos efeitos adversos mais suaves (ototoxicidade reversível, dor no local da injeção) do que os antimoniais, a paromomicina apresenta como grande vantagem seu baixo custo (estimado em cerca de 10 dólares por paciente para todo o tratamento)

em comparação à Anfotericina B lipossomal (100 dólares por paciente para todo o tratamento) ¹⁸.

A miltefosina **80** é um alquilaminofosfolipídio, relacionado estruturalmente com a colina. Planejado inicialmente como um antineoplásico, ensaios independentes mostraram sua atividade na década de 1980. Após a falha do composto na Fase II de ensaios clínicos para o tratamento de tumores, a companhia então detentora da propriedade intelectual ASTA Medica (atualmente Æterna Zentaris), decidiu desenvolve-lo como um agente anti-leishmania em parceria com o TDR. O fármaco foi aprovado para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia em 2002 e na Colômbia em 2005²⁰. A grande vantagem da miltefosina sobre os outros fármacos na quimioterapia da leishmaniose é que é o único agente que pode ser administrado via oral. Isso facilita muito o regime de administração, transporte e estoque do medicamento em regiões sem infra-estrutura básica e sem bons hospitais ou centros de atendimento. Atualmente este fármaco está em Fase III de ensaios clínicos em outros países do mundo, incluindo o Brasil.

Embora seu mecanismo de ação não esteja elucidado, é provável que a miltefosina atue na inibição da síntese dos lipídios de membrana¹². Seus principais efeitos adversos são gastrointestinais, com náuseas e vômitos acometendo 40% dos pacientes que utilizam o medicamento. Além disso, a miltefosina é teratogênica em ratas e seu uso em pacientes grávidas não é recomendado^{6, 8, 20}.

A 8-aminoquinolina sitamaquina **81**, também conhecida durante a fase préclínica como WR 6026, foi desenvolvida pelo *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) em colaboração com a companhia farmacêutica GlaxoSmithKline e está em fase III de ensaios clínicos para o tratamento da leishmaniose, sendo ativo também por via oral. O imunomodulador Imiquimod **82** quando administrado juntamente com antimoniais, é capaz de tratar com sucesso lesões cutâneas de leishmaniose que são refratárias ao tratamento apenas com os compostos de antimônio e está atualmente na fase II de ensaios clínicos para o tratamento tópico da leishmaniose cutânea^{12, 21}.

Figura 4.6

Mesmo com as novas adições ao arsenal terapêutico, observa-se que os medicamentos disponíveis apresentam problemas em termos de custo, efeitos adversos e duração do tratamento. Somando-se a isso o fato de que dos quatro fármacos em testes nos últimos vinte anos (paromomicina, miltefosina, sitamaquina e imiquimod), apenas um pode ser considerado inédito (sitamaquina) em termos de alvo planejado de tratamento. Também o fato alarmante de que não existem compostos em fase préclínica ou em fase I de ensaios clínicos tornam a busca por novos agentes uma prioridade na pesquisa.

4.1.2.5. Tratamento da leishmaniose no Brasil

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, para o tratamento da leishmaniose tegumentar recomenda-se como fármaco de primeira escolha o antimoniato de meglumina na dose de 10-20 mg Sb^V/dia, aplicado de forma intravenosa ou intramuscular, entre 20-30 dias. A Anfotericina B é o fármaco de segunda escolha em pacientes refratários aos antimoniais e de primeira escolha em gestantes, sendo indicada a dose de 1-4 mg/kg/dia até se atingir a dose total administrada de 1-3g ¹⁰. No tratamento da leishmaniose visceral recomenda-se como fármaco de primeira escolha o antimoniato de meglumina na mesma dose usada na leishmaniose tegumentar. Assim como na forma tegumentar, anfotericina B é o fármaco de segunda escolha em pacientes refratários aos antimoniais e de primeira escolha em gestantes, sendo indicada a dose de 1mg/kg/dia, em dias alternados, até atingir-se a dose total de 3g ¹¹.

4.1.3. Tripanossomíase Americana (Doença de Chagas)

A Doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, é causada por um parasita da ordem Kinetoplastida, denominado *Trypanosoma* (*Schyzotrypanum*) *cruzi*. É formalmente uma zoonose, afetando mamíferos de pequeno porte entre a Argentina e o Sul dos Estados Unidos da América. Devido ao avanço da população humana sobre áreas antigamente inabitadas e à domesticação urbana do vetor, a doença afeta também a população humana residente entre o norte do México e a Argentina. A doença está presente em atualmente 16-18 milhões de pessoas na América Latina, colocando em risco a saúde de cerca de 90 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas, causando cerca de 50.000 mortes por ano²².

O vetor do parasita são insetos da ordem Hemíptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, sendo mais relevantes os insetos *Triatoma infestans*, *Rhodinius prolixus* e *Panstrongylus megistrus*. O ciclo de vida do parasita é complexo, com fases proliferativas no hospedeiro invertebrado (epimastigota) e no hospedeiro vertebrado (amastigota intracelular), assim como fases não-proliferativas (tripomastigotas) em ambos^{22,23}.

A doença apresenta-se em duas fases, a saber: aguda e crônica. A fase aguda, que dura em torno de dois meses, apresenta-se na maioria dos casos de forma assintomática ou oligossintomática, mas em alguns casos observam-se vários sintomas como: dor de cabeça, dispnéia, mialgia, edemas, hepatomegalia, *rash* cutâneo, esplenomegalia, linfoadenopatias, miocardite e mais raramente meningoencefalites (convulsões e paralisias). Esta forma da doença pode ser fatal em crianças menores de 5 anos de idade, idosos, pacientes imunocomprometidos ou em casos onde houve uma entrada de um grande número de parasitas, como nos casos de infecção oral. Em pacientes com AIDS a meningoencefalite é a manifestação mais freqüente²²⁻²⁴. A fase crônica é caracterizada pela migração do parasita para tecidos como o coração e a musculatura lisa do aparelho digestivo, podendo ser assintomática (indeterminada) durando por toda a vida do paciente. Cerca de 10-30% dos pacientes apresentam danos em órgãos infectados, levando às formas cardíaca, digestiva e neuronal da doença, que

causam sérias complicações, levando em alguns casos ao óbito (especialmente na forma cardíaca).

O tratamento da doença é feito principalmente na fase aguda da mesma com dois fármacos: nifurtimox 83, introduzido na década de 1960, e benzinidazol 84, introduzido nos anos 70. Apenas o benzinidazol está disponível para uso no Brasil (Rochagan®, Roche). Ambos são ativos contra o parasita, especialmente na fase aguda, onde se conseguem altos índices de cura da doença. O mesmo não vale, entretanto, para a fase crônica, embora já se saiba que o uso de benzinidazol durante a fase crônica ajuda a diminuir a gravidade da doença nos pacientes, devido à diminuição da parasitemia no paciente. Ambos os fármacos causam sérios efeitos adversos aos pacientes (incluindo vômitos, anorexia polineuropatia periférica e dermopatia alérgica), o que causa em muitos casos o abandono do tratamento. Devido a esses problemas, a necessidade de novos fármacos efetivos em ambas as fases da doença e com menos efeitos adversos e tóxicos é ressaltada na literatura²²⁻²⁴.

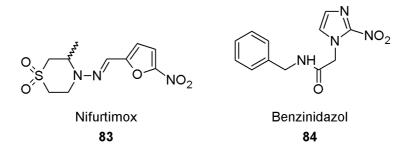


Figura 4.7.

4.2. OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo constituem-se em: a) avaliar através de testes farmacológicos *in vitro* a atividade antibacteriana, antifúngica e antiparasitária dos compostos sintetizados nos capítulos anteriores; e b) a partir destes resultados, realizar uma tentativa de correlação entre a estrutura dos mesmos e a atividade farmacológica observada.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Avaliação da atividade antibacteriana

4.3.1.1. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de inibição do crescimento no ágar em poços

Este teste foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Controle de Qualidade, Faculdade de Farmácia/UFRGS, sob a coordenação do Prof. Dr. Martin Steppe.

O *R*-(+)-limoneno **1** e os derivados **18**, **26**, **27** e **34** foram testados contra seis microrganismos selecionados. A Tabela 4.1 mostra os resultados deste ensaio.

Tabela 4.1. Ensaio de inibição do crescimento bacteriano em ágar com poços

Bactéria	Compostos					
		H ₃ CO H ₄ Co	O	O	NH THU	
	1	18	26	27	34	
Micrococcus luteus ATCC 9341	-	+	+	+	+	
Escherichia coli ATCC 25922	-	+	+	-	+	
Staphylococcus. aureus ATCC 6538P	-	+	+	+	+	
Streptococcus.epidermides ATCC 12228	-	+	-	-	+	
Pseudomonas. aeruginosa ATCC 27853	-	+	+	+	+	
Bacillus. subtilis ATCC 66633	-	+	+	+	+	

Legenda: "+" = halo de inibição com diâmetro médio maior que 12 mm; "-" = sem halo de inibição. Concentração dos compostos no teste: 15 mg/mL (600-800 μM)

Os resultados expressos na Tabela 4.1 mostram que, mesmo nas altas concentrações do ensaio (15 mg/mL), o (*R*)-(+)-limoneno 1 não inibiu o crescimento de nenhuma das bactérias testadas. Todos os derivados funcionalizados inibiram o crescimento de pelo menos quatro dos seis microrganismos testados e dois dos compostos (o éster 18 e a amina secundária 34) inibiram o crescimento de todas as

bactérias no ensaio. Ressalta-se aqui que este é um ensaio qualitativo, no qual se tem por objetivo descobrir se um composto é capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Neste teste observou-se (dados não publicados) que os halos de inibição da amina **34** eram maiores que os do éster **18**, indicando que esta amina foi o composto mais ativo dentre os testados. Portanto, decidiu-se pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da mesma.

4.3.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este teste foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Controle de Qualidade, Faculdade de Farmácia/UFRGS, sob coordenação do Prof. Dr. Martin Steppe, e no Laboratório de Farmacocinética, Faculdade de Farmácia/UFRGS, sob coordenação da Profa. Dra. Teresa C. Dalla Costa.

De modo a determinar o perfil antibacteriano da amina secundária **34**, mais ativa no teste de inibição em poços, fez-se a determinação da CIM do composto. Os resultados estão expressos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Determinação da CIM do composto **34**.

Bactéria	CIM (µg/mL)				
	NH The 34	Vancomicina			
M. luteus ATCC 9341	32	< 2			
E. coli ATCC 25922	64	32			
S. aureus ATCC 6538P	256	2			
S. epidermides ATCC 12228	128	4			
K. pneumoniae ATCC 18051	64	4			
P. aeruginosa ATCC 27853	64	8			
B. subtilis ATCC 6633	64	4			

O experimento da CIM foi realizado em duplicata.

Os resultados da determinação mostram que, embora a amina **34** tenha apresentado capacidade de inibir o crescimento de bactérias na concentração de 15 mg/mL, a mesma apresenta valores de CIM altos para todos os microrganismos testados, apresentando valores de CIM entre 32-256 µg/mL.

Os compostos sintetizados **53-58**, que junto com a amina **34** formam a "Família A" de aminas derivadas do limoneno (ver Capítulo 2), também foram testados nesses protocolo, tendo suas CIMs contra *Staphylococcus aureus* determinadas, conforme dados da Tabela 4.3. Essa bactéria foi escolhida nesse teste por ter sido a mais resistente ao composto **34** no ensaio anterior (Tabela 4.2).

Tabela 4.3. Determinação da CIM dos produtos 53-58 contra S. aureus ATCC 6538 P

Compostos	CIM (µg/mL)	Compostos	CIM (µg/mL)	
NH 144.	64	NH 1444	64	
N	128	HN 58	64	
N 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	64	Vancomicina	2	
NH 1944.	64			

Microrganismo utilizado: *S. aureus* ATCC 6538P. Esse experimento foi realizado em duplicata.

Os dados da Tabela 4.3 indicam que, mesmo com a melhora na atividade dos derivados em relação à amina **34** (CIM = 256 µg/mL contra *S. aureus*), nenhum dos derivados apresentou uma boa atividade antimicrobiana.

4.3.2. Avaliação da atividade antifúngica

Estes testes foram realizados pela Profa. Dra. Suzana Zacchino da Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas de Rosário, Argentina. Os dados da determinação da CIM e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) estão expressos na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Determinação da CIM e da CFM dos Compostos 34 e 53-58.

		Fungos							
	Candida albicans ATCC 10231	Saccharomyces cereviseae ATCC 9763	Criptococcus neoformans ATCC 32264	Aspergillus flavus ATCC 9710	Aspergillus fumigatus ATCC 26934	Aspergillus niger ATCC 9029	Microsporum gypseum C115	Trichophyton rubrum C113	Tricophyton mentagrophytes ATCC 9972
Compostos			(CIM / (CFM ((μg/m	L)		
34	250/ > 250	250	125 /250	> 250	> 250	> 250	62,5 /125	62,5 /125	62,5 /125
53	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250	250	250
54	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	125	125	125
55	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250	250	250
56	> 250	> 250	> 250		> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
57	62,5/125	62,5 /125	62,5 /125	125	62,5	125	31,25	15,6	31,25
58	125	125	125 /250	> 250		> 250	31,25	15,6/31,25	
Anfotericina B	0,78	0,50	0,25	0,50	0,50	0,50	0,125	0,075	0,075
Cetoconazol	1,56	3,12	0,39	0,78	0,78	1,56	0,04	0,01	0,025
Terbinafina	0,5	0,5	0,25	0,125	0,50	0,25	0,05	0,025	0,025

A presença de apenas um valor, sem a "/", significa que os valores da CIM e da CFM são semelhantes.

Os dados da tabela mostram que, apesar dos compostos **57** e **58** apresentarem uma atividade antifúngica maior do que as dos outros compostos da série, nenhum dos

compostos sintetizados apresentou bons resultados nesse teste, com valores de CIM e CFM bem superiores aos padrões Anfotericina B, Cetoconazol e Terbinafina usados no teste.

4.3.3. Avaliação da atividade antiparasitária

4.3.3.1. Atividade anti-Trypanosoma cruzi

Estes ensaios foram realizados sob a coordenação do Prof. Dr. Hugo Cerecetto, da Facultad de Farmácia e Bioquímica da Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai.

Alguns dos compostos sintetizados foram testados *in vitro* contra a forma epimastigota da cepa Tulahuen 2 de *T. cruzi*. Os resultados estão expressos na tabela abaixo.

Os dados da tabela mostram que, embora nenhum produto tenha apresentado um valor de IC_{50} menor que o do padrão nifurtimox, os produtos **56** e **58** apresentaram valores de IC_{50} próximos ao do padrão e valores de PI (50 μ M) maiores que 70%.

Tabela 4.5. Avaliação da atividade anti-tripanossoma de alguns dos compostos sintetizados

Composto	PI (50 μM) ^a	$IC_{50} \atop (\mu M)^b$	Composto	PI (50 μM) ^a	$IC_{50} \ (\mu M)^b$
NH - 1 _{th}	21	> 50	0 NH 1444	51,4	50
N 14444	20,7	> 50	64	0	> 50
NH Thus	70,5	29,5	HO NH Hun. 666	41,8	> 50
NH 1444	53,5	50	Nifurtimox (83)	-	7,7
N 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	82,4	19,2			

a) Porcentagem de inibição de crescimento da forma epimastigota da cepa Tulahuen 2 causada por um determinado produto à concentração de 50 µM.

4.3.3.2. Atividade anti-leishmania

Estes ensaios foram realizados sob a coordenação da Profa. Dra. Maria de Fátima Madeira, do Serviço de Parasitologia Clínica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ.

b) Concentração que inibe 50% do crescimento da mesma cepa acima.

Alguns dos produtos sintetizados tiveram sua atividade anti-leishmania testada *in vitro* contra promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Os resultados estão expressos na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Atividade anti-leishmania da "Família A" de compostos sintetizados e outros derivados do (*R*)-(+)-limoneno

Composto	IC ₅₀ (μM)	Composto	IC ₅₀ (μM)
1	876,2 ± 216	NH 1444.	$11,5 \pm 0,8$
H ₃ CO 18	$141,6 \pm 28,5$	NH 144444 577	257,9 ± 22,5
NH 1444.	$17,2 \pm 0,9$	HN 58	$269,5 \pm 38,9$
NH 53	253,6 ± 33,9	HO NH Tanto	23,2 ± 1,9
N 14444	1027 ± 138,6	Pentamidina (77)	$48,5 \pm 28,7$

Os valores de IC₅₀ estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos.

Os resultados expressos na tabela 4.6 mostram que, à exceção do derivado **54** todos os compostos foram mais ativos que o limoneno, apresentando valores de IC $_{50}$ que variaram de $11,5\pm8,8$ a $269,5\pm38,9$ μM . Estes resultados revelam também que destes sete derivados mais ativos que o limoneno, três deles (**34**, **56** e **66**) apresentaram uma atividade anti-leishmania superior ao padrão utilizado no teste, pentamidina **77**.

A partir destes resultados, sintetizou-se outra coleção de sete compostos, análogos à amina aromática **56**, mais ativa, de modo a verificar se modificações no anel ou no átomo de nitrogênio alterariam a atividade anti-leishmania dos mesmos (conforme descrito no Capítulo 3). O mesmo foi realizado com a amina **34** onde foi adicionado o grupamento sulfonamida, transformando-a na amina secundária **71**. Essa "Família B" de compostos foi submetida ao mesmo ensaio e os resultados estão expressos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Atividade anti-leishmania da "Família B" de compostos sintetizados.

Composto	IC ₅₀ (μM)	Composto	IC ₅₀ (μM)
CI NH 1444.	58,4 ± 5,1	CF ₃ NH	84,6 ± 2,6
MeO NH THULL	57,6 ± 7,3	N 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	54,5 ± 14,8
NH Trus.	28,0 ± 1,2	N NH 1444. 65	27,0 ± 2,9
0 NH There	35,6 ± 1,6	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	$12,1 \pm 0,3$
Os volonos do IC astão		ádio I dosvio modeão do teô	: .

Os valores de IC₅₀ estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos.

Os resultados arrolados na Tabela 4.7 mostram que todos os compostos apresentaram uma atividade na mesma ordem de grandeza que o padrão pentamidina, com a IC₅₀ variando de 12,1 \pm 0,3 a 84,6 \pm 2,6 μ M. Observa-se também que quatro compostos da Família B, **61**, **62**, **65** e **71**, apresentaram um valor de IC₅₀ inferior ao padrão pentamidina **77** e que a sulfonamida **71** apresentou uma atividade antileishmania (IC₅₀ = 12,1 \pm 0,3 μ M) muito próxima aos apresentados pelos compostos da "Família A", especialmente pelos derivados anilínico **56** (IC₅₀ = 11,5 \pm 0,8 μ M) e n-propila **34** (IC₅₀ = 17,2 \pm 0,9 μ M).

Combinando os resultados dos ensaios anti-leishmania das duas "Famílias" de compostos, observa-se que dos dezessete compostos testados 16 são mais ativos que o próprio limoneno, e que sete destes dezesseis apresentaram um valor de IC₅₀ menor que o do padrão pentamidina 77, a saber: os derivados da *n*-propilamina 34, anilina 56, etanolamina 66, 4-metilanilina 61, furfurilamina 62, 2-aminopiridina 65 e a sulfonamida 71, obtida a partir do composto 34.

4.3.4. Discussão da atividade anti-leishmania dos compostos da "Família A" e "Família B"

Primeiramente, os resultados obtidos com os compostos sintetizados mostram que as modificações realizadas no "scaffold" limoneno agregaram valor a este terpeno, pois apenas um dos derivados apresentou atividade inferior a ele (54, IC $_{50}=1027\pm138,6~\mu M$). Igualmente, de uma maneira geral, pode-se afirmar que substituintes amino e sulfonamida foram mais eficazes que carbonilas e carboxilas.

Em segundo lugar, é possível observar que as modificações estruturais realizadas nos compostos causam diferenças na atividade anti-leishmania *in vitro* dos mesmos. Embora não seja possível estabelecer uma regra geral, devido ao pequeno número de compostos testados, pode-se traçar um paralelo entre os compostos apresentados.

4.3.4.1. Influência dos substituintes

Os substituintes introduzidos no *scaffold* são tanto de natureza aromática quanto alifática. Isto foi planejado objetivando-se detectar possíveis influências na atividade em função do caráter hidrofóbico dos derivados. Contudo, os resultados obtidos (Tabelas 4.6 e 4.7) não permitem traçar nenhuma correlação, pois a adição desses substituintes resultou em diferentes atividades. Cinco dos compostos (**34**, **53**, **54**, **58** e **66**) possuem uma cadeia lateral alquílica, sendo que dois destes apresentaram importante atividade: n-propil **34** (IC₅₀ = 17,2 ± 0,9 μ M) e etanolamina **66** (IC₅₀ = 23,2 ± 1,9 μ M), superior à pentamidina. Por outro lado, o derivado ramificado isopropil **53** não apresentou a mesma magnitude de atividade (IC₅₀ = 253,6 ± 33,9 μ M), mostrando uma atividade cerca de 14 vezes inferior ao seu isômero **34**. Os alifáticos cíclicos **58** e **54** apresentaram uma atividade bastante baixa (IC₅₀ = 269,5 ± 38,9 μ M e IC₅₀ = 1027 ± 138,6 μ M, respectivamente), sendo que o derivado com o anel morfolina **54** foi o único dos compostos sintetizados que foi menos ativo que o próprio limoneno.

Aparentemente aumentos no volume espacial do substituinte em torno do átomo de nitrogênio perecem ser responsáveis pelas alterações na atividade dos derivados, como se pode observar comparando-se a *n*-propilamina **34** com a isopropilamina **53**. O mesmo efeito pode ser observado comparando-se a *n*-propilamina **34** com os derivados da morfolina **54** e da piperazina **58**.

Os derivados aromáticos de uma maneira geral apresentaram uma excelente atividade. Com exceção do composto benzílico **57** que se revelou menos ativo que a pentamidina ($IC_{50} = 257.9 \pm 22.5 \,\mu\text{M}$ contra $IC_{50} = 48.5 \pm 28.7 \,\mu\text{M}$ de **77**), os demais tiveram atividade superior a este padrão. O composto **56**, derivado da anilina, como já mencionado, foi o mais ativo de todos ($IC_{50} = 11.5 \pm 0.8 \,\mu\text{M}$). Modificações na natureza do substituinte ou no padrão de substituição do anel aromático conduziram a compostos menos ativos, como pode ser observado para os derivados **59** ($IC_{50} = 58.4 \pm 5.1 \,\mu\text{M}$), **60** ($IC_{50} = 57.6 \pm 7.3 \,\mu\text{M}$), **61** ($IC_{50} = 28.0 \pm 1.2 \,\mu\text{M}$), **62** ($IC_{50} = 35.6 \pm 1.6 \,\mu\text{M}$), **63** ($IC_{50} = 84.6 \pm 2.3 \,\mu\text{M}$), **64** ($IC_{50} = 54.5 \pm 14.8 \,\mu\text{M}$), **65** ($IC_{50} = 27.0 \pm 2.9 \,\mu\text{M}$) e **71** ($IC_{50} = 12.1 \pm 0.3 \,\mu\text{M}$). Contudo, todos estes apresentaram uma boa atividade, sendo que quatro deles (**61**, **62**, **65** e **71**) foram mais ativos que a

pentamidina. Como os substituintes no anel aromático são tanto doadores quanto retiradores de elétrons, os fatores eletrônicos podem ser descartados como responsáveis pelas atividades detectadas. Novamente o volume dos substituintes parece influenciar na atividade, como pode ser exemplificado com os compostos **59**, **60** e **63** que apresentaram as piores atividades nesta última comparação e possuem os substituintes mais volumosos no anel aromático (4-Cl, 4-MeO e 3-CF₃, respectivamente).

Neste sentido, o derivado da benzilamina **57** (IC₅₀ = $257.9 \pm 22.5 \mu M$) é mais volumoso que o derivado da anilina **56** e apresentou uma atividade cerca de 22 vezes inferior a **56**, parecendo corroborar com esta hipótese.

Ao mesmo tempo, comparando-se o derivado da n-propilamina **34** (IC₅₀ = 17,2 \pm 0,9 μ M) com o derivado da anilina **56** (IC₅₀ = 11,5 \pm 0,8 μ M), observa-se que não há uma grande diferença de atividade entre os compostos, embora possa-se dizer que o anel aromático de **56** apresenta um volume espacial um pouco maior que a cadeia alquílica do derivado **34**. Isto mostra que a lipofilicidade parece não ter uma maior influência na atividade detectada.

Observa-se também, que a sulfonamida **71** (IC $_{50} = 12,1 \pm 0,3 \mu M$), derivada da amina **34**, apresenta um valor de IC $_{50}$ próximo a este derivado e à amina **56**, mesmo apresentando o volumoso grupo 4-toluenosulfonamida ligado diretamente ao nitrogênio, sendo uma clara exceção a essa "regra" observada com os demais compostos. Indicando que **71** possa estar atuando por mecanismo de ação diferente dos demais.

4.3.4.2. Influência da presença de heteroátomos

Os resultados dos ensaios permitem a constatação de que os derivados mais ativos nos ensaios são aminas. O único éster testado, o composto **24** (IC₅₀ = 141,6 \pm 28,5 μ M) apresentou atividade inferior à do padrão pentamidina **77**. Não é possível inferir, entretanto, se outros compostos que apresentem apenas oxigênios como

heteroátomos tais como éteres, outros ésteres, cetonas ou aldeídos, não sejam ativos nesse teste.

Algumas das moléculas sintetizadas apresentam heteroátomos adicionais, além do nitrogênio. Comparando o derivado da n-propilamina **34** (IC₅₀ = 17,2 ± 0,9 μ M) com o derivado da etanolamina **66** (IC₅₀ = 23,2 ± 1,9 μ M) observa-se que a substituição da metila de **34** pela hidroxila em **66** não causa uma grande alteração da atividade. Já a substituição do nitrogênio no derivado da piperazina **58** (IC₅₀ = 269,5 ± 38,9 μ M) pelo oxigênio no derivado da morfolina **54** (IC₅₀ = 1027 ± 138,6 μ M) causa uma grande diminuição da atividade.

A troca do anel benzeno no derivado da benzilamina **57** (IC₅₀ = 257,9 \pm 22,5 μ M) pelo anel furano no derivado **62** (IC₅₀ = 35,6 \pm 1,6 μ M) causa um grande aumento na atividade do composto, que pode ser explicado mais pela presença do oxigênio como heteroátomo do que pela diminuição do volume do anel.

Substituindo-se o anel benzeno no derivado da anilina **56** (IC₅₀ = 11,5 \pm 0,8 μ M) por um anel piridina no derivado **65** (IC₅₀ = 27,0 \pm 2,9 μ M), a atividade do composto é diminuída.

A inclusão da sulfonamida no composto **71** (IC₅₀ = 12,1 \pm 0,3 μ M), aparentemente traz benefícios, quando o mesmo é comparado com seu precursor **34** (IC₅₀ = 17,2 \pm 0,9 μ M).

4.3.4.3. Influência do grau de substituição do nitrogênio

Na grande maioria dos casos, é possível observar que as aminas mais ativas são as secundárias. Aminas terciárias como os derivados **54** (morfolina) e **58** (piperazina) apresentam atividade menor do que o derivado **34** (n-propilamina). O mesmo ocorre quando se comparam o derivado da N-metilanilina **64** ($IC_{50} = 54,5 \pm 14,8 \mu M$) com o derivado da anilina **56** ($IC_{50} = 11,5 \pm 0,8 \mu M$).

Assim como anteriormente, a sulfonamida **71**, apresentando o grupamento amina totalmente substituído, parece ser uma exceção a essa "regra".

4.3.4.4. Influência de descritores físico-químicos

Em muitos casos, descritores físico-químicos podem ajudar a encontrar-se uma correlação entre a atividade de alguns compostos e suas propriedades físico-químicas. Atualmente o advento de ferramentas *in silico* permite o cálculo, com um bom grau de aproximação, de algumas propriedades das moléculas, as quais podem ser utilizadas para o estabelecimento de uma relação quantitativa entre a estrutura e a atividade dos compostos (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationship*).

Para realizar essa comparação, os valores dos coeficientes de partição (ALOGPS) e pKa (AB/pKa) foram calculados através do programa VCCLAB²⁵ descrito por Tetko e colaboradores²⁶, e o volume atômico foi calculado através do programa Molinspiration Property Calculator²⁷. Os resultados desses cálculos estão expressos

Tabela 4.8. Embora o segundo programa mencionado também faça o cálculo do coeficiente de partição, os valores calculados pelo VCCLAB foram utilizados pelo fato de que o valor previsto pelo programa para o logP do limoneno **1** é idêntico ao valor obtido experimentalmente, 4,50 ²⁸.

Tabela 4.8. Valores obtidos por métodos *in silico* de propriedades físico-químicas dos compostos testados

Composto	$IC_{50} \left(\mu M\right)^a$	$\mathbf{pIC_{50}}^{\mathrm{b}}$	ALOGPs (log P)	AB/pK_a^{c}	Vol. Molecular (ų)
1	876,2	2,06	4,50	_d	157,296
34	17,2	3,76	4,36	10,6	242,563
53	253,6	2,60	4,07	10,6	242,348
57	257,9	2,59	4,49	9,5	280,609
54	1027,0	1,99	3,37	7,4	258,13
58	269,5	2,57	2,8	10,6	261,548
56	11,5	3,94	5,82	5,1	263,807
59	58,4	3,23	6,38	3,7	277,343
60	57,6	3,24	6,09	5,4	289,353
61	28,0	3,55	6,31	5,5	280,368
62	35,6	3,45	3,86	8,5	262,177
63	84,6	3,07	6,16	3,3	295,105
64	54,5	3,26	5,47	6,4	280,75
65	27,0	3,57	5,32	6,9	259,651
66	23,2	3,63	2,39	9,6	234,02
71	12,1	3,92	4,73	_d	362,346

a) Valores obtidos a partir das Tabelas Tabela 4.6 e Tabela 4.7

Os valores expressos na tabela indicam, assim como as considerações mencionadas anteriormente, que não é possível estabelecer uma regra geral que satisfaça a todos os compostos e suas respectivas atividades contra a forma promastigota de *Leishmania (V.) braziliensis*, e nem estabelecer uma correlação entre a atividade dos compostos e os descritores físico-químicos apresentados na tabela. Embora os compostos com o log P mais altos foram os que apresentaram maior atividade: log P = 4,73 – 6,38 (com exceção de **34** e **66** que apresentam baixos valores de coeficiente de partição).

É possível que a dificuldade em estabelecer-se uma regra geral que correlacione a atividade das moléculas com suas estruturas e/ou propriedades físico-químicas devase ao fato de que, à exceção do (R)-(+)-limoneno $\mathbf{1}$, todas as moléculas testadas sejam misturas de diastereômeros. A literatura relata que pares de enantiômeros ou de diastereômeros podem apresentar diferenças nas atividades farmacológicas

b) Valores calculados a partir do logaritmo inverso do valor da LD_{50} em mol/L

c) O valor de pK_a expresso é o valor da constante do ácido conjugado, uma vez que todos os compostos, à exceção de 1 e 71, apresentam caráter básico.

d) Não foi possível ao programa calcular o valor requisitado.

apresentadas, ao ponto de casos como o dos enantiômeros do propoxifeno, onde um enantiômero apresenta atividade analgésica e o outro, antitussígena²⁹.

Outra possibilidade é a de que nem todas as moléculas atuem pelo mesmo mecanismo de ação. Essa possibilidade parece ser mais provável no caso específico da sulfonamida **71**, que não se encaixou em nenhuma das hipóteses propostas anteriormente.

4.3.5. Mecanismo de ação

Quanto ao mecanismo de ação das moléculas sintetizadas, não é possível traçarem-se muitas conclusões. Conforme Croft e Combs¹², entre os vários mecanismos de ação que podem ser explorados na busca de novos agentes com atividade *in vitro* e *in vivo* contra o parasita, encontram-se:

- a) Inibição da enzima tripanotiona redutase;
- b) Inibição de cisteína peptidases específicas do parasita;
- c) Inibição da enzima dihidrofolatoredutase (que apresenta grandes diferenças em relação à dihidrofolatoredutase humana);
- d) Inibição da biossíntese de esteróis (especialmente na inibição das enzimas farnesiltransferase e *N*-miristoiltransferase);
 - e) Inibição de glicosidases específicas do parasita;
- f) Inibição da síntese de poliaminas, especialmente sobre a enzima ornitina descarboxilase (embora se saiba que o medicamento eflornitina, inibidor suicida desta enzima e usado na terapêutica da Tripanossomíase Africana, seja inativo *in vitro* contra leishmanias);
 - g) Inibição de cinases protéicas específicas do parasita;
 - f) Interação com os microtúbulos do parasita, inibindo a reprodução do mesmo.

Sabendo-se que: a) o limoneno apresenta uma ação citotóxica contra algumas linhagens celulares, através da inibição da enzima farnesiltransferase (conforme discutido no Capítulo 1 dessa tese); e b) O mesmo terpeno também apresenta uma atividade anti-leishmania *in vitro* e *in vivo*, sendo capaz de inibir a síntese do mevalonato através da inibição da enzima HMG-CoA sintase ou redutase⁸, é possível traçar a hipótese de que a atividade anti-leishmania das moléculas apresentadas anteriormente está sendo causada pela inibição da biossíntese de esteróis do parasita, afetando alguma das enzimas do ciclo biossintético, provavelmente uma das enzimas onde o limoneno já apresentou atividade inibitória (farnesiltransferase, HMG-CoA sintase ou redutase). Ensaios *in vitro* de inibição destas enzimas podem ajudar a comprovar ou não essa hipótese.

4.4. EXPERIMENTAL

4.4.1. Determinação da Atividade Antibacteriana pelo Método da Inibição em Ágar com Poços

Este ensaio foi conduzido de acordo com as especificações da Farmacopéia Brasileira³⁰ e realizado sob coordenação do Prof. Dr. Martin Steppe (Lab. de Pesquisa em Controle de Qualidade, Faculdade de Farmácia/UFRGS).

Em uma capela de fluxo laminar horizontal, 20 mL de meio de cultura estéril foram adicionados em uma placa de petri de 20 mL previamente esterilizada. Após a solidificação desta camada, mais 5 mL de meio de cultura estéril com 2% de uma suspensão da bactéria escolhida para o teste em solução salina. Esta solução foi padronizada de modo a apresentar uma absorvância de $25 \pm 2\%$. A placa com as duas camadas solidificadas foi então perfurada com um furador de 10 mm de diâmetro de modo a se fazer quatro poços equidistantes na placa. Esses poços foram identificados como P (padrão do ensaio), A1 (produto a ser ensaiado), A2 (produto a ser ensaiado) e B (branco). Em cada poço foram colocados $100 \mu L$ das soluções, de acordo com a marcação definida previamente. Os produtos ensaiados foram diluídos em DMSO. Os padrões dos ensaios foram diluídos em solventes apropriados. O branco do ensaio foi DMSO. A placa foi incubada a uma temperatura de 36 ± 1 °C por 24 horas. Após este tempo as placas foram retiradas da incubação e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos com um paquímetro digital.

4.4.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada conforme as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI)³¹ e realizado sob coordenação da Profa. Dra. Teressa C. Dalla Costa (Lab. de Farmacocinética, Faculdade de Farmácia/UFRGS).

Neste ensaio, para cada produto foram utilizados dez tubos de ensaio de 5 mL cada previamente esterilizados. Estes tubos foram marcados como 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μg/mL, C+ (controle positivo) e C- (controle negativo), respectivamente. Em todos os tubos (exceto no controle negativo) foram colocados 50 μg/mL de uma suspensão do

microrganismo utilizado no teste em solução salina. Esta suspensão foi previamente padronizada em fotocolorímetro de modo a ter a mesma absorvância de uma solução-padrão chamada de *Solução McFarland 0,5*, preparada conforme as normas acima. Em cada tubo (exceto no controle positivo) foram colocados volumes predeterminados da solução do produto a ser testado (1,28 μ g/mL) de modo que o volume final fosse o volume marcado nos tubos (isto é, 1 mL no tubo de 256 μ g/mL, 0,5 mL no tubo de 128 μ g/mL, e assim por diante). Todos os tubos receberam volume suficiente de caldo Mueller-Hinton (MERCK) estéril ou caldo número 3 (dependendo do microrganismo) para completar o volume final de 5 mL. Os 10 tubos foram incubados a uma temperatura de 36 \pm 1 °C por 24 horas e após este tempo os tubos foram retirados da estufa. A CIM de cada produto foi definida como a menor concentração na qual não se observou visualmente (contra campos visuais claro e escuro) crescimento microbiológico, quando comparado com os tubos C+ e C-.

4.4.3. Determinação da atividade anti-leishmania

Os testes para a determinação da atividade anti-leishmania³² dos compostos foram realizados no Centro de Referência sobre Leishmanioses (CRLeish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Cunha da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, sob a coordenação da Profa. Dra. Maria de Fátima Madeira.

Para os ensaios utilizaram-se formas promastigotas de *Leishmania* (*Vianna*) brasiliensis (MCAN/BR/98/R.619) obtidas do banco de amostras do Serviço de Parasitologia/IPEC/Fiocruz em fase infectiva. Os parasitas foram mantidos *in vitro* em meio Schneider's *Drosophila medium* (pH 7,2) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C em estufa biológica, sendo utilizados somente até a quinta passagem para garantir a infectividade dos parasitas nos ensaios. Em fase log da curva de crescimento (quarto dia), a cultura foi centrifugada (4000 rpm, 10 min, 4 °C) e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL do sobrenadante da mesma cultura, quantificada em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2 x 10⁶ promastigotas/mL.

Os compostos foram dissolvidos em DMSO para concentração estoque de 10 mg/mL e conservados à temperatura de 4 $^{\circ}$ C até o momento do uso. Nos ensaios utilizaram-se as concentrações de 0,156 µg/mL a 320 µg/mL.

A determinação da atividade foi realizada em placas para cultura de 96 poços. Um volume de 100 µL da suspensão de parasitas (2 x 10⁵ promastigotas) foi colocado nos poços em triplicatas, com o mesmo volume dos compostos diluídos. O controle utilizado foram parasitas sem adição de nenhuma outra substância; parasitas com isotionato de pentamidina (320 µg/mL) e parasitas expostos à concentração de 1,4% do solvente, que foi a concentração utilizada nos ensaios. Tal concentração não possui efeito lesivo sobre os parasitas. A incubação foi feita a 26 °C em estufa biológica e após 24 horas os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer empregando corante vital (Azul de Triptan 0,1 em Tampão Fosfato-Salino [PBS]). As atividades foram expressas em IC₅₀ (μM), indicando a concentração necessária para a inibição de 50% do crescimento de formas promastigotas de L. braziliensis. Os valores obtidos a partir da contagem dos parasitas foram plotados de forma gráfica no software Microsoft Office Excel® e analisados pelo teste t de Student. Para os testes de significância estatística, considerando os valores de $p \le 0.05$ foi empregado o teste ANOVA seguido pelo teste Student-Newman-Keuis e Kuskall-Wallis do software SPSS for Windows®.

4.5. CONCLUSÕES

As moléculas sintetizadas nesse trabalho foram testadas em diversos ensaios farmacológicos, a saber: atividade antibacteriana, antifúngica, anti-tripanossoma e anti-leishmania, apresentando atividade mais promissora no teste *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania* (V.) braziliensis.

No ensaio da atividade anti-tripanossoma, dois compostos apresentaram valores de PI_{50} maiores que 70%, embora não tenham apresentado valores de IC_{50} próximos ao do padrão Nifurtimox.

Através do ensaio da atividade anti-leishmania observou-se que das dezessete moléculas testadas, apenas uma apresentou um valor de IC₅₀ menor que o do *scaffold* limoneno e que sete delas apresentaram ativdade superior ao fámaco padrão utilizado, a pentamidina. Não foi possível, entretanto, estabelecer-se uma correlação geral entre a atividade dos derivados e as suas estruturas, embora seja possível afirmar que, na maioria dos casos, o volume e a natureza hidrofóbica do substituinte ligado ao nitrogênio parece ser importante na atividade dos compostos.

Além disso, a partir de evidências encontradas na literatura, é provável que os compostos apresentem essa atividade através da inibição da biossíntese de esteróis do parasita. O mecanismo propriamente dito não é conhecido, sendo necessários mais ensaios farmacológicos para elucidá-lo.

Finalmente, as modificações introduzidas no limoneno conduziram a compostos com atividade anti-leishmania promissora, pelo menos contra as formas promastigotas, comprovando a hipótese de que substituintes nitrogenados podem levar a compostos biologicamente ativos. Outros ensaios devem ser realizados contra formas amastigotas de leishmania, bem como *in vivo*, a fim de que estes compostos possam ser modulados objetivando sua transformação em candidatos a fármacos contra leishmania.

4.6. REFERÊNCIAS

- 1. YARNELL, A. The Top Pharmaceuticals that Changed the World: Salvarsan. **Chemical & Engineering News**, v. 83, p. 8325, 2005.
- 2. PROJAN, S. J.; BRADFORD, P. A. Late stage antibacterial drugs in the clinical pipeline. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 441-446, 2007.
- 3. COATES, A.; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 1147-1154, 2007.
- 4. MONK, B. C.; GOFFEAU, A. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, p. 367-369, 2008.
- 5. HOF, H.; Will resistance in fungi emerge on a scale similar to that seen in bacteria? **European Journal of Clinical Infectious Diseases**, v. 27, p. 327-334, 2008.
- 6. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: the disease and its epidemiology**. Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/en. Acesso em 24/12/2007.
- 7. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis disease information**. Disponível em http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>. Acesso em 20/06/2008.
- 8. ARRUDA, D. C. Caracterização da atividade leishmanicida de nerolidol e limoneno e da interferência desses terpenos na biossíntese de isoprenóides. **Tese de Doutorado**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.
- 9. AEDO, J. R. N. G. Atividade do álcool, aldeído e ácido perílico contra *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.
- 10. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de leishmaniose tegumentar americana**. 2ª. ed. Brasília: Editora MS, 2008.
- 11. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora MS, 2003.
- 12. CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **TRENDS in Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.
- 13. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- 14. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Disease watch. Focus: leishmaniasis**. Disponível em http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm, acesso em 20/06/2008.

- 15. RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, p. S17-S28, 2003.
- 16. ROBERTS, W. L., McMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1076-1082, 1998.
- 17. OLLIARO, P. L.; GUERIN, P. J.; GERSTL, S.; HAASKJOLD, A. A.; ROTTINGEN, J-A.; SUNDAR, S. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. **Lancet Infections Diseases**, v. 5, p. 763-774, 2005.
- 18. INSTITUTE FOR ONE WORLD HEALTH. **About us: History**. Disponível em http://www.oneworldhealth.org/about/history.php>, acesso em 20/07/2008.
- 19. DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **About DNDi**. Disponível em http://www.dndi.org, acesso em 20/07/2008.
- 20. CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100S, p. S4-S8, 2006.
- 21. CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YEARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 399-410, 2006.
- 22. URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 733-741, 2001.
- 23. BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiases. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- 24. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American Trypanosomiasis).**Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html, acesso em 20/07/2008.
- 25. VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY. **On-line Lipophilicity/Aqueous Solubility Calculation Software**. Disponível em http://www.vcclab.org/lab/alogps/>. Acesso em 20/07/2008.
- 26. TETKO, I. V.; GASTEIGER, J.; TODESCHINI, R.; MAURI, A.; LIVINGSTONE, D.; ERTL, P.; PALYULIN, V. A.; RADCHENKO, E. V.; ZEFIROV, N. S.; MAKARENKO, A. S.; TANCHUK, V. Y.; PROKOPENKO, V. V. Virtual computational chemistry laboratory design and description. **Journal of Computer-Aided Drug Design**, v. 19, p. 453-463, 2005.

- 27. MOLINSPIRATION CHEMINFORMATICS. Calculation of Molecular **Properties**. Disponível em http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Acesso em 20/07/2008.
- 28. COPOLOVICI, L. O.; NIINEMETS, Ü.Temperature dependencies of Henry's law constants and octanol/water partition coefficients for key plant volatile monoterpenoids. **Chemosphere**, v. 61, p. 1390-1400, 2005.
- 29. FRIES, D. S. Opioid Analgesics. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L.; FOYE, W. O. (Eds.). **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, p. 453.
- 30. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 1988.
- 31. CLINICAL LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos** Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma M2-A6. 6^a. ed. Wayne, 2003.
- 32. MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 73-77, 2007.



5.1. CONCLUSÕES GERAIS

O limoneno mostrou-se um bom bloco de construção para a síntese de derivados, especialmente em solução. Foi possível, através de uma rápida síntese *one-pot* de duas etapas a obtenção de aminas derivadas do limoneno. Na Síntese Orgânica em Fase Sólida, diversos problemas surgiram, especialmente na última etapa da síntese (a etapa de clivagem) onde o limoneno mostrou-se instável no meio fortemente ácido requerido para a clivagem da Resina Merrifield. Entretanto, foi possível otimizar uma série de reações intermediárias da síntese, especialmente a reação de acoplamento.

No total, vinte produtos foram sintetizados sendo a maioria inéditos na literatura. Estes não apresentaram um bom perfil antimicrobiano nem antifúngico nas condições testadas. No ensaio da atividade anti-tripanossoma, dois compostos apresentaram valores de PI₅₀ maiores que 70%, embora seus valores de IC₅₀ sejam maiores que o do padrão Nifurtimox. Sete dos mesmos apresentaram uma boa atividade anti-leishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, apresentando valores de IC₅₀ menores do que o fármaco pentamidina, padrão utilizado no ensaio.

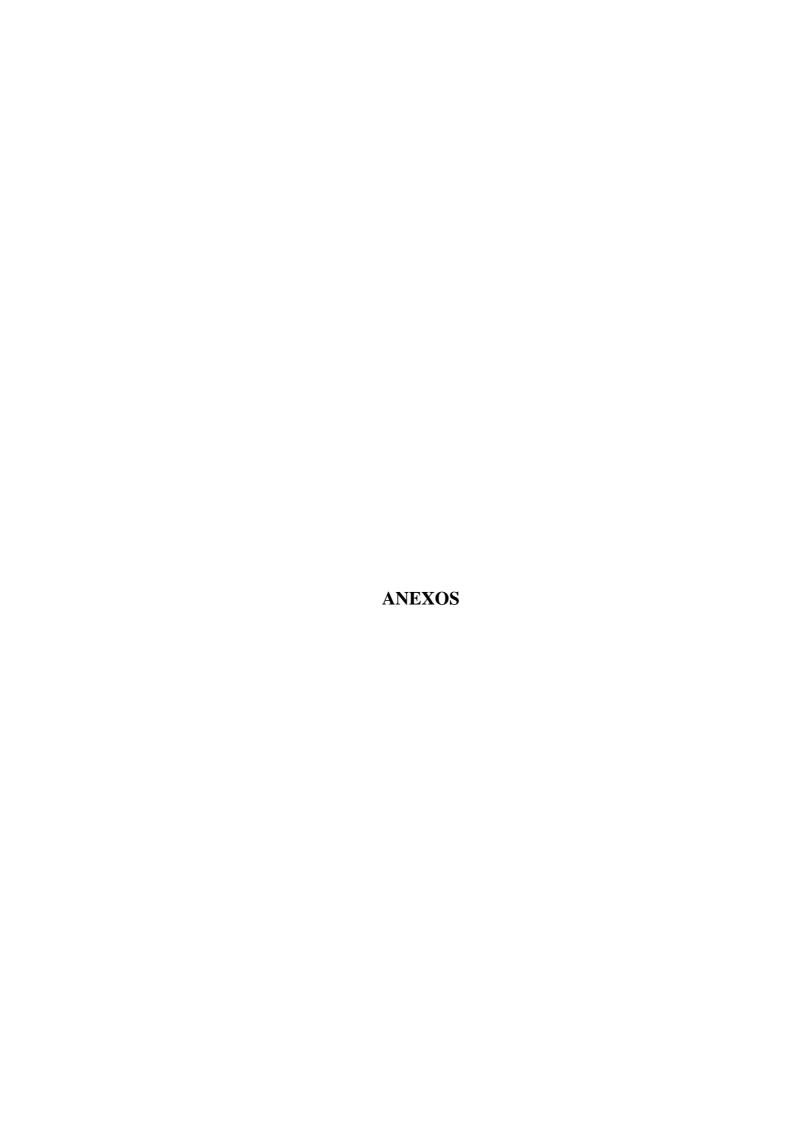
Retomando a hipótese traçada na Introdução Geral, de que compostos derivados do limoneno com funcionalizações em uma ou duas das olefinas do terpeno apresentariam atividades farmacológicas superiores que as do mesmo, observou-se que os derivados aminados, funcionalizados na olefina exocíclica do terpeno, apresentaram atividades farmacológicas melhores que a do terpeno. A questão dos compostos bisfuncionalizados mantém-se aberta, uma vez que não foi possível a síntese dos mesmos devido aos problemas detalhados no Capítulo 2.

Foi possível então, usando o (*R*)-(+)-limoneno como produto de partida, sintetizar-se através de um protocolo rápido, simples e escalonável, uma família de aminas derivadas do terpeno, das quais sete apresentaram uma interessante atividade anti-leishmania.

5.2. PERPECTIVAS

O presente trabalho, no decorrer destes anos de pesquisa, gerou alguns questionamentos e abriu novas oportunidades de investigação, que podem ser exploradas e que servem como perspectivas de continuidade deste trabalho, as quais são detalhadas abaixo.

- a) Comprovação da hipótese do mecanismo de ação das moléculas postulado no Capítulo 4, através de ensaios *in vitro* de inibição enzimática das enzimas mencionadas (farnesil transferase, HMG-CoA sintase e HMG-CoA redutase);
- b) Caso a hipótese mencionada acima seja verdadeira, um maior entendimento do mecanismo de ação e da relação entre a estrutura das moléculas e sua atividade pode ser obtido através de métodos *in silico* estudando-se a interação das mesmas com o receptor;
- c) Realização do ensaio anti-leishmania *in vitro* em outras espécies do gênero *Leishmania*, uma vez que é conhecido que existe uma grande variabilidade interespécie da sensibilidade de diferentes espécies do parasita aos fármacos utilizados na terapêutica;
- d) Realização do ensaio anti-leishmania *in vivo* e *in vitro*, em formas amastigotas do parasita, de modo a verificar o potencial terapêutico das moléculas.
- e) O uso de uma resina que apresente um ligante mais sensível a meios ácidos, de modo a realizar-se a síntese planejada em Fase Sólida.

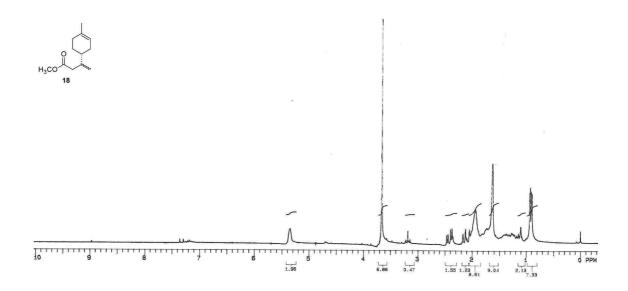


ANEXO 1

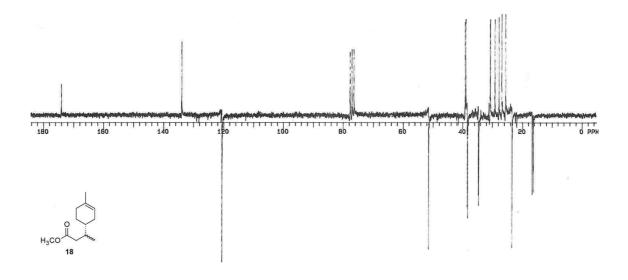
ESPECTROS DE RMN DOS PRODUTOS SINTETIZADOS

Espectros de RMN do produto 18	147
Espectros de RMN do produto 26	148
Espectros de RMN do produto 27	149
Espectros de RMN do produto 34	150
Espectro de RMN do produto 43.	151
Espectros de RMN do produto 53	152
Espectros de RMN do produto 54	153
Espectros de RMN do produto 55	154
Espectros de RMN do produto 56	155
Espectros de RMN do produto 57	156
Espectros de RMN do produto 58	157
Espectros de RMN do produto 59	158
Espectros de RMN do produto 60	159
Espectros de RMN do produto 61	160
Espectros de RMN do produto 62	161
Espectros de RMN do produto 63	162
Espectros de RMN do produto 64	163
Espectros de RMN do produto 65	164
Espectros de RMN do produto 66	165
Espectros de RMN do produto 71	166

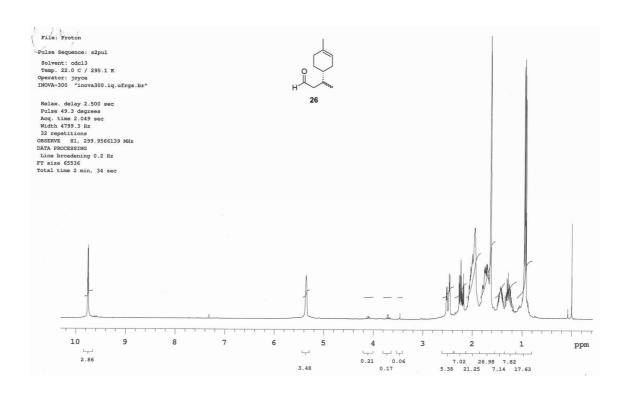
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) do produto **18**:



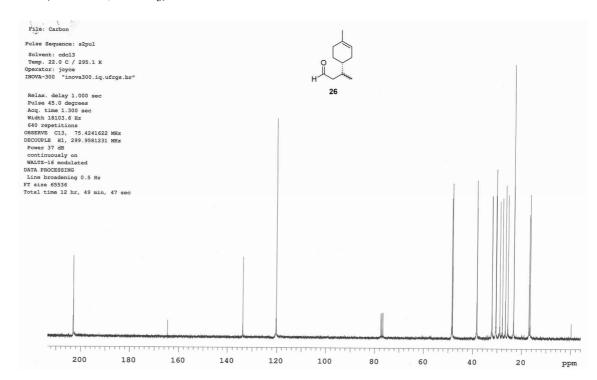
¹³C-RMN APT (50 MHz, CDCl₃):



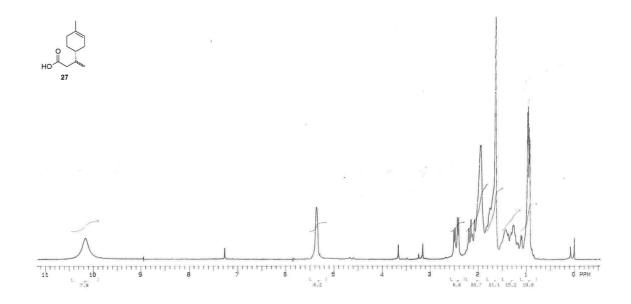
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **26**:



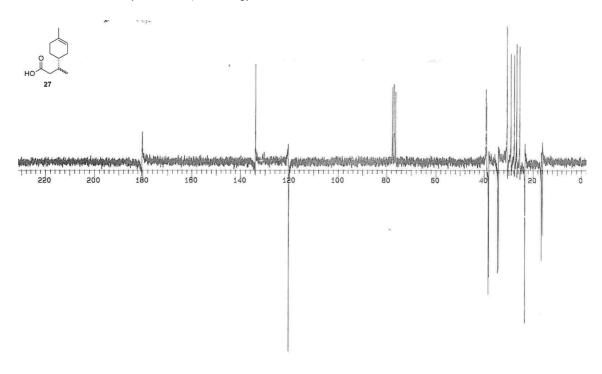
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):



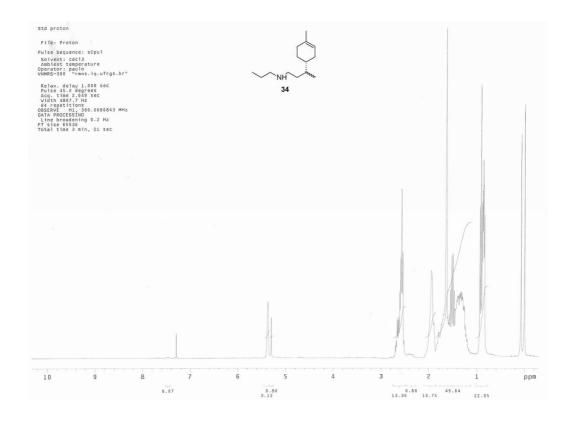
¹H-RMN (200 MHz, CDCl3) do produto **27**:



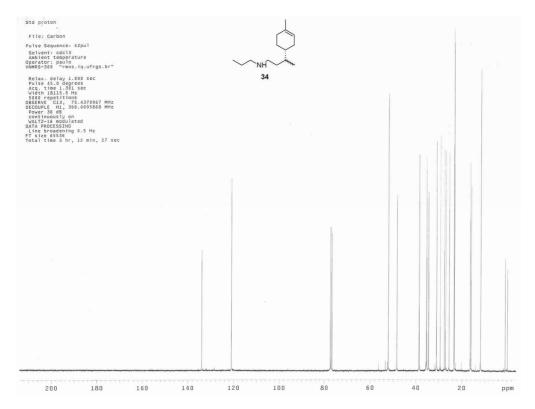
¹³C-RMN APT (50 MHz, CDCl₃):



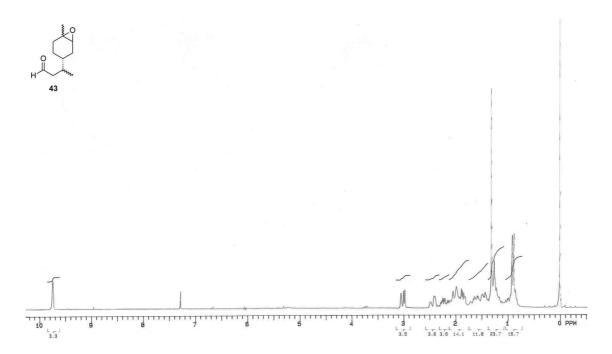
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **34**:



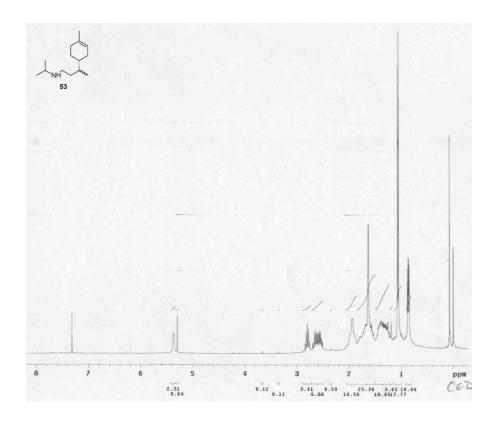
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):



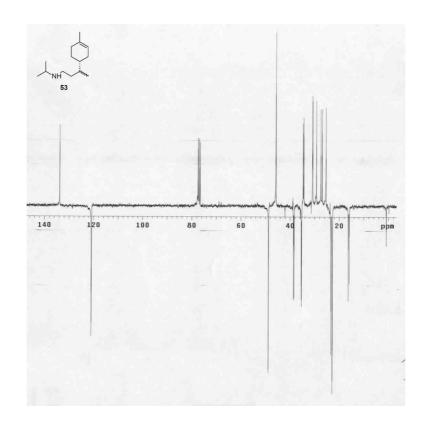
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) do produto **43**:



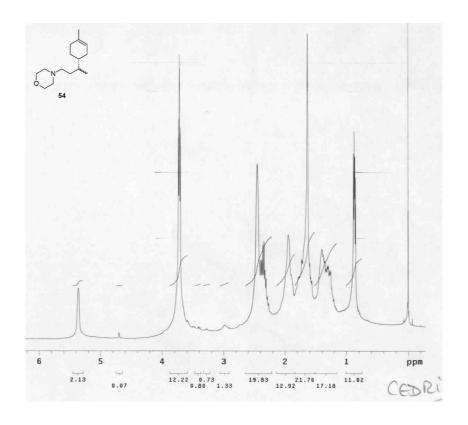
¹H-RMN (300 MHz, CDCl3) do produto **53**:



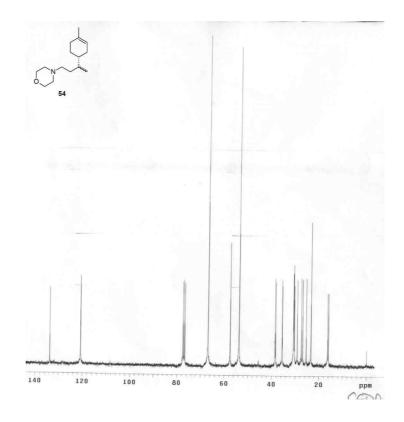
¹³C-RMN APT (75 MHz, CDCl₃):



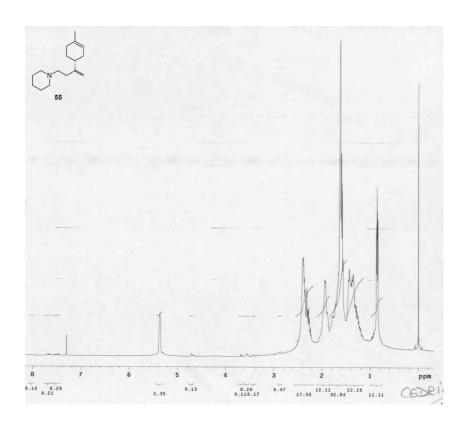
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **54**:



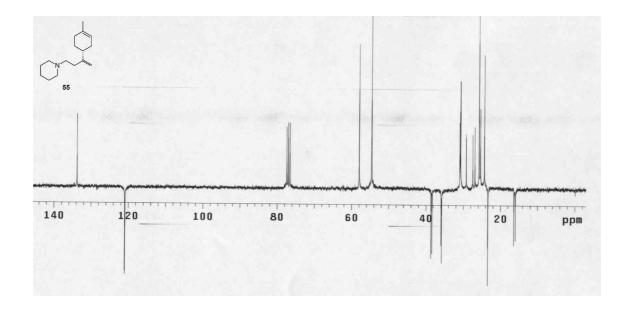
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):



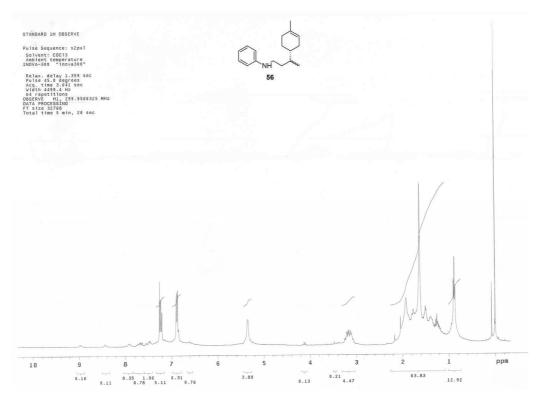
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **55**:



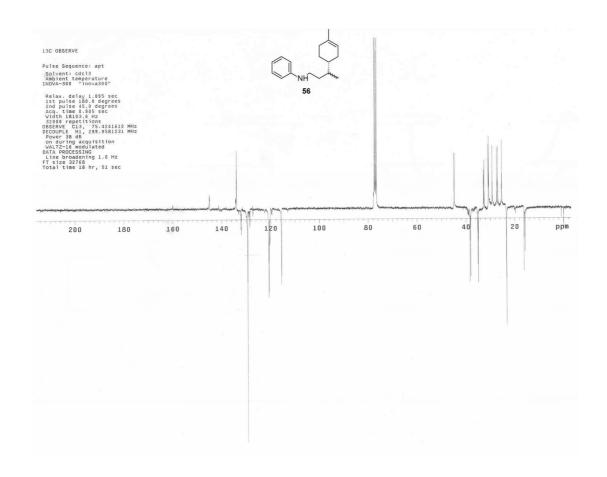
¹³C-RMN APT (75 MHz, CDCl₃):



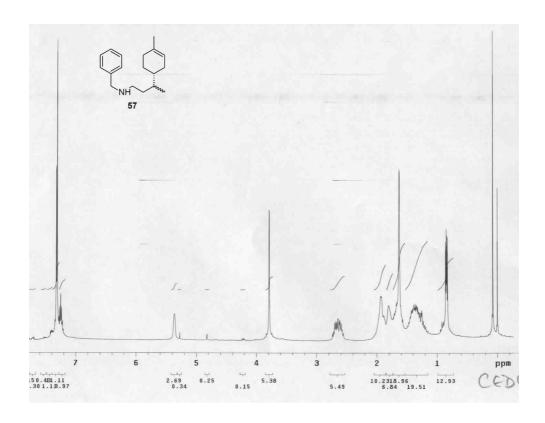
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **56**:



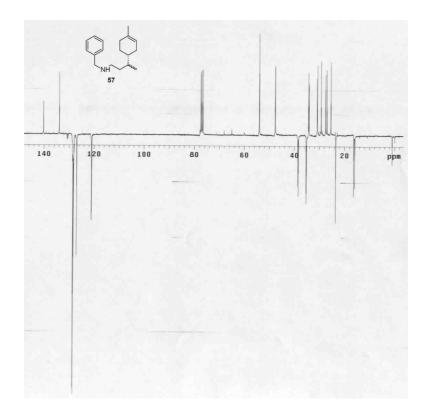
13 C-RMN APT (75 MHz, CDCl₃):



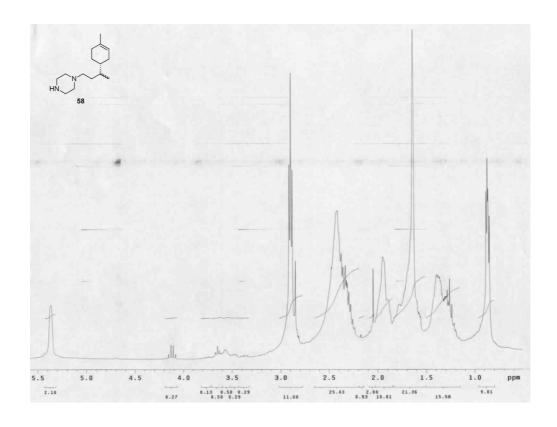
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **57**:

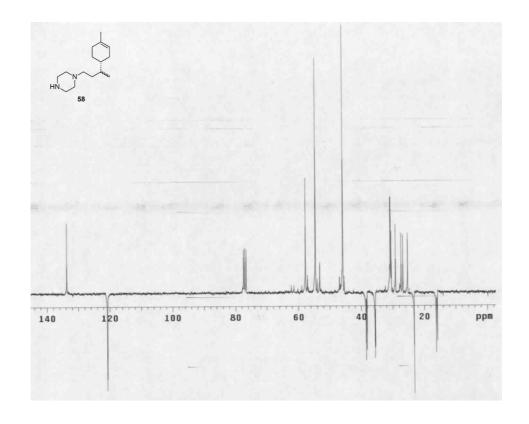


¹³C-RMN APT (75 MHz, CDCl₃):

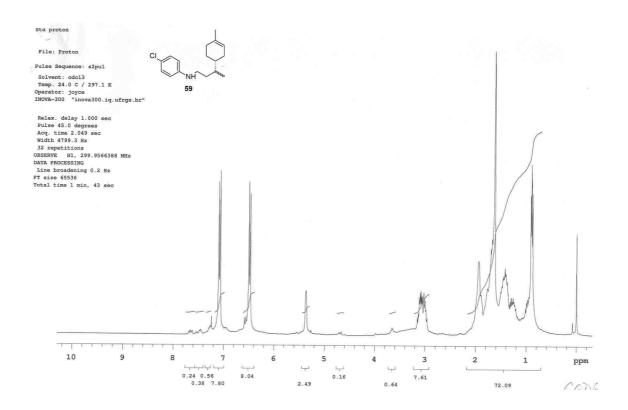


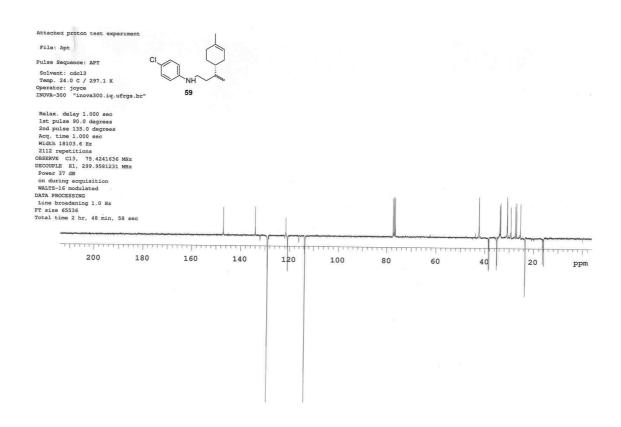
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **58**:



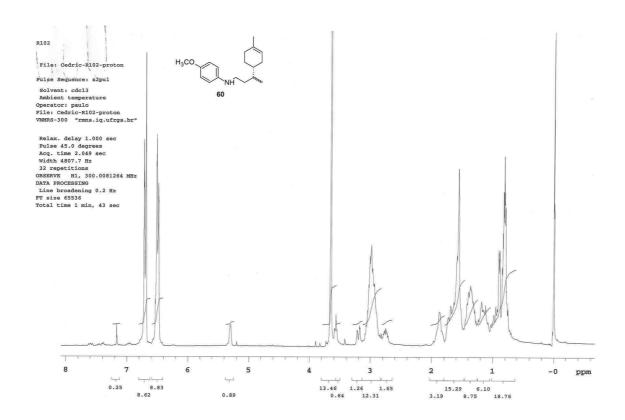


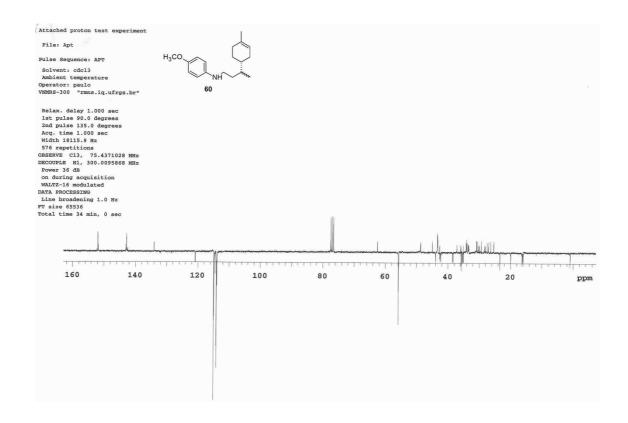
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **59**:



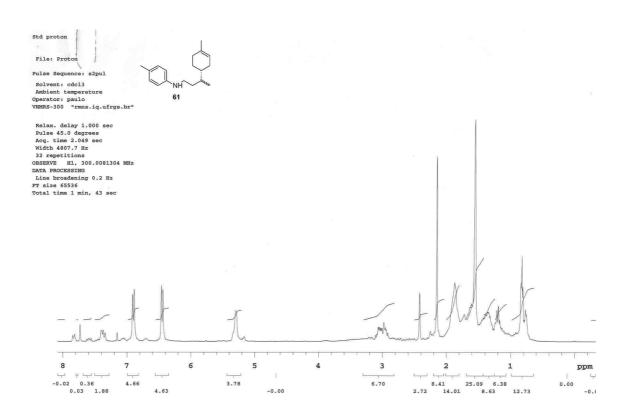


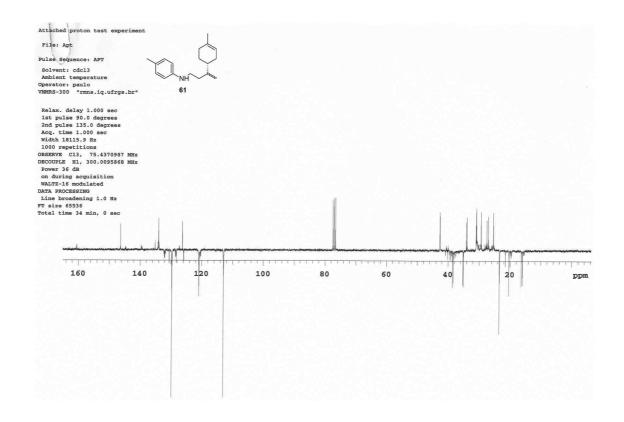
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **60**:



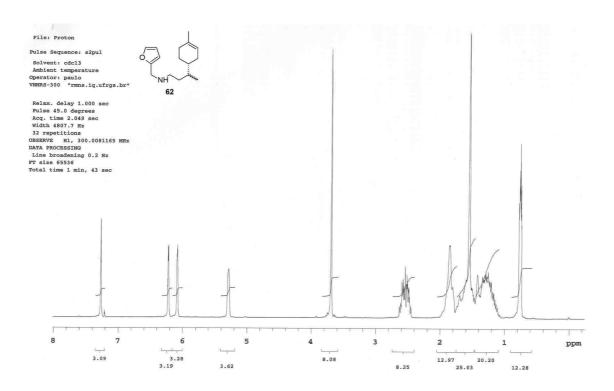


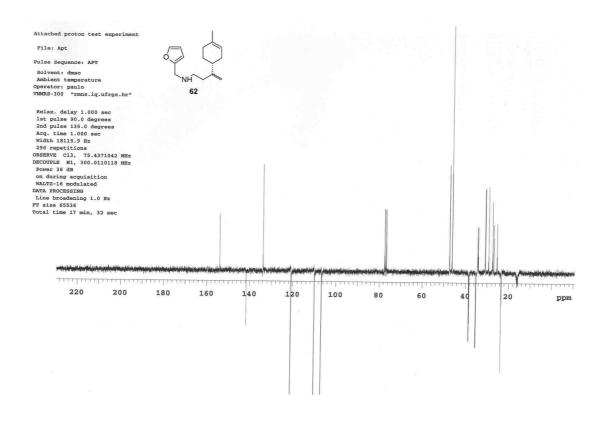
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **61**:



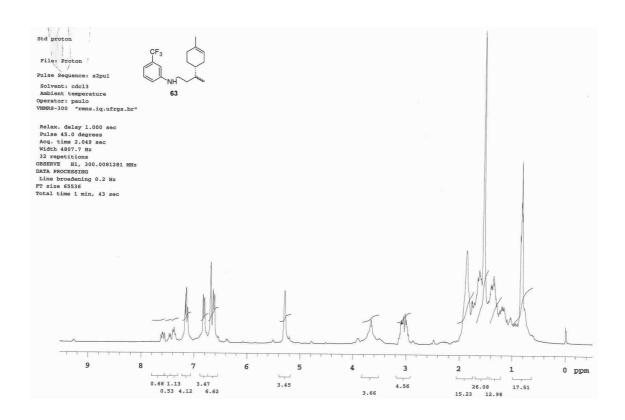


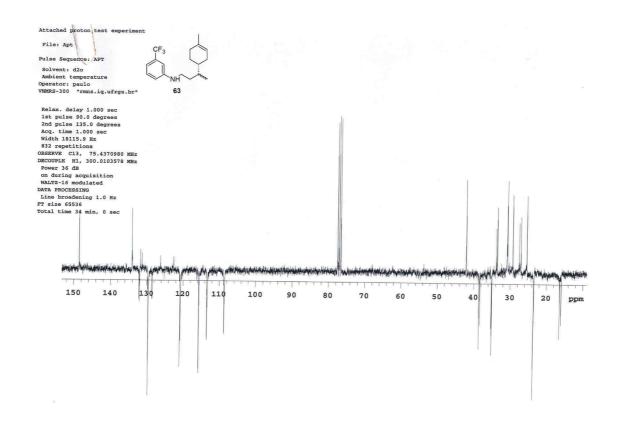
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **62**:



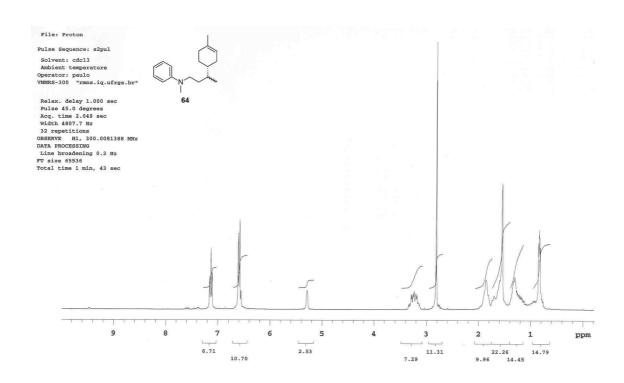


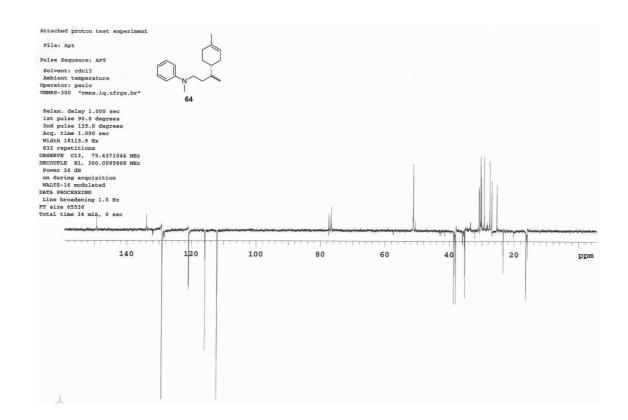
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **63**:



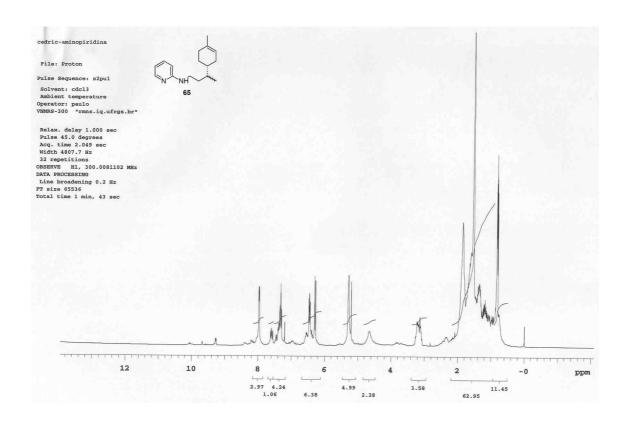


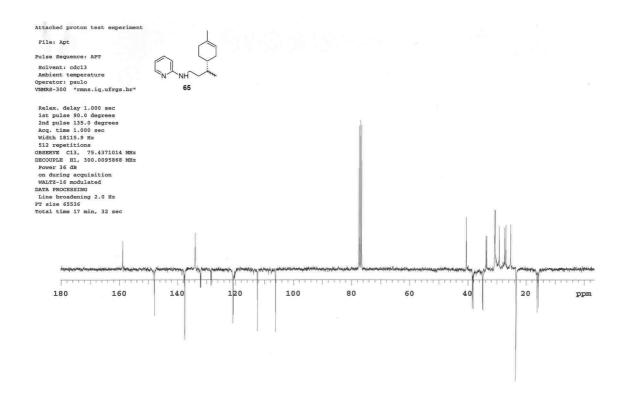
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **64**:



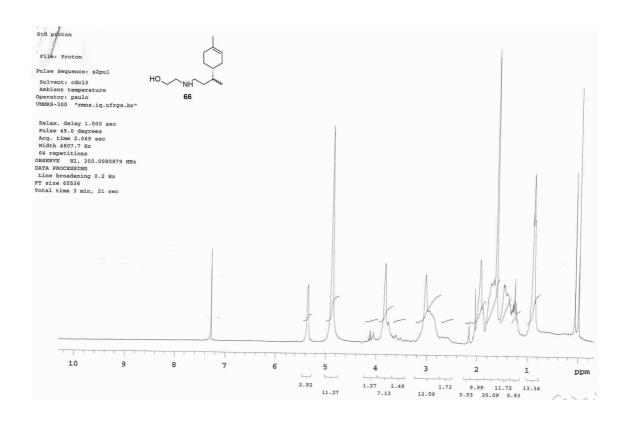


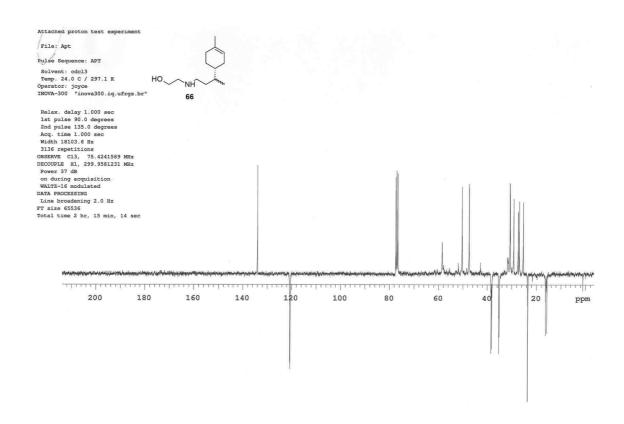
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **65**:



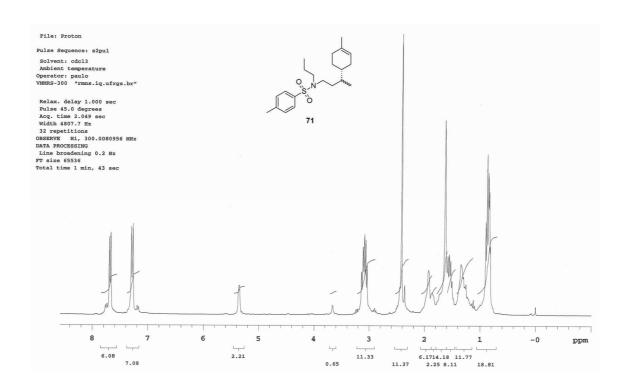


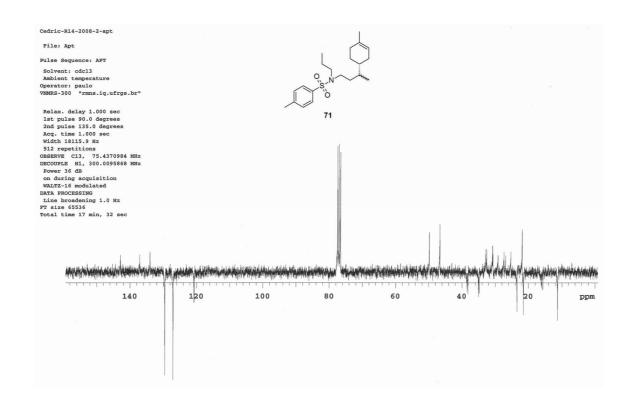
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **66**:





¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) do produto **71**:





ANEXO 2

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DERIVADA DESTE MANUSCRITO

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Solid-phase synthesis of limonene derivatives. In: THE 2nd BRAZILIAN SIMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY. **Livro de Resumos...** Rio de Janeiro: Instituto Militar da Engenharia, 2004.

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J. CANTO, R. F. S.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Síntese em fase sólida de derivados do limoneno. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Livro de Resumos...** São Paulo: Águas de Lindóia, 2006.

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Valorização do limoneno através das reações de hidroformilação, hidroaminometilação e metoxicarbonilação. In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Livro de Resumos...** São Paulo: Águas de Lindóia, 2006.

GRAEBIN, C. S.; FERRARINI, S. R.; CANTO, R. F. S.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. The use of SPOS to prepare a library of limonene beta-aminoalcohols as potential antiparasitic agents. In: THE 12th BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS. **Book of Abstracts...** Florianópolis: UFSC, 2007.

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G. One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1066-1070, 2008.

FERRARINI, S.R.; GRAEBIN, C. S.; CANTO, R.F.; DIAS, D.O.; MADEIRA, M.F.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of limonene derivatives towards new leishmanicidal compounds. In: THE 4th BRAZILIAN SIMPOSIUM IN

MEDICINAL CHEMISTRY. **Livro de Resumos...** Pernambuco: Porto de Galinhas, 2008.

ANEXO 3

PRODUÇÃO CIENTÍFICA REALIZADA PELO ALUNO DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO, ALÉM DAS CITADAS NO ANEXO 2

LACERDA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; SILVA, R. C.; LINS, G.; SILVA, A. L.; GRAEBIN, C. S.; KOBER, U. A.; PISONI, D. S.; SILVA, E. O.; POHLMANN, A. R.; Reações de cicloadição: uma abordagem teórica e aplicações em síntese orgânica. **Caderno de Farmácia**, v. 21, p. 11-29, 2005.

TROSSINI, G.; GRAEBIN, C. S.; BOTELHO, K.; FERREIRA, E. I.; EIFLER-LIMA, V. L. Use of microwave in solid phase synthesis of dipeptide spacer groups with specificity for cysteine proteases: cruzain and falcipain. In: THE 12th BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS. **Book of Abstracts...** Florianópolis: UFSC, 2007.

CRUZ, L.; GRAEBIN, C. S.; VIANA, A.; PIATO, A. L. S.; GHISLENI, D.; SANTOS, E.; LIMBERGER, J.; VAUCHER, L.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, S. Q.; OPPE, T. P.; SCHAPOVAL, E.; EIFLER-LIMA, V. L. Síntese e ensaio *in vivo* de ésteres da indometacina. Desenvolvimento de aula prática em química medicinal para alunos de pós-graduação. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2008, v. 27, p. 716-720.

FERRARINI, S.; GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R. F.; DIAS, D. O.; ROSA, R. G.; MADEIRA, M. F.; EIFLER-LIMA, V. L.; Synthesis of limonene β-amino alcohols derivatives with potential antileishmanial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2008, v. 103, p. 773-777.

ANEXO 4

BIOGRAFIA

1) Dados pessoais:

Nome: Cedric Stephan Graebin

Filiação: Ricardo Henrique Graebin e Cleusa Maria Gomes Graebin

Nascimento: 10/07/1981, Porto Alegre – RS, Brasil.

URL do Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/4900857097448760

2) Formação Acadêmica:

1999-2003: Graduação em Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil)

2004-atual: Doutorando no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3) Produção Científica:

c) Artigos completos publicados em periódicos:

CRUZ, L.; GRAEBIN, C. S.; VIANA, A.; PIATO, A. L. S.; GHISLENI, D.; SANTOS, E.; LIMBERGER, J.; VAUCHER, L.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, S. Q.; OPPE, T. P.; SCHAPOVAL, E.; EIFLER-LIMA, V. L. Síntese e ensaio *in vivo* de ésteres da indometacina. Desenvolvimento de aula prática em química medicinal para alunos de pós-graduação. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, p. 716-720, 2008.

FERRARINI, S.; GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R. F.; DIAS, D. O.; ROSA, R. G.; MADEIRA, M. F.; EIFLER-LIMA, V. L.; Synthesis of limonene β-amino alcohols derivatives with potential antileishmanial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 773-777, **2008**.

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G. One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). **Catalysis Communications**, v. 9, p. 1066-1070, **2008**.

GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L. O Uso do Forno de Microondas na Síntese Orgânica em Fase Sólida. **Química Nova**, Brasil, v. 28, n. 1, p. 73, **2005**.

LACERDA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; SILVA, R. C.; LINS, G.; SILVA, A. L.; GRAEBIN, C. S.; KOBER, U. A.; PISONI, D. S.; SILVA, E. O.; POHLMANN, A. R.; Reações de cicloadição: uma abordagem teórica e aplicações em síntese orgânica. **Caderno de Farmácia**, v. 21, p. 11-29, **2005**.

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 the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 782, **2004**.

e) Resumos publicados em anais de congressos:

FERRARINI, S.R.; GRAEBIN, C. S.; CANTO, R.F.; DIAS, D.O.; MADEIRA, M.F.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of limonene derivatives towards new leishmanicidal compounds. In: THE 4th BRAZILIAN SIMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY. **Livro de Resumos...** Pernambuco: Porto de Galinhas, 2008.

TROSSINI, G.; GRAEBIN, C. S.; BOTELHO, K.; FERREIRA, E. I.; EIFLER-LIMA, V. L. Use of microwave in solid phase synthesis of dipeptide spacer groups with specificity for cysteine proteases: cruzain and falcipain. In: THE 12th BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS. Florianópolis: UFSC, 2007.

GRAEBIN, C. S.; FERRARINI, S. R.; CANTO, R. F. S.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. The use of SPOS to prepare a library of limonene beta-

aminoalcohols as potential antiparasitic agents. In: THE 12th BRAZILIAN MEETING ON ORGANIC SYNTHESIS. **Book of Abstracts...** Florianópolis: UFSC, 2007.

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J. CANTO, R. F. S.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Síntese em fase sólida de derivados do limoneno. In: 29ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. São Paulo: Águas de Lindóia, 2006.

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Valorização do limoneno através das reações de hidroformilação, hidroaminometilação e metoxicarbonilação. In: 29^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. São Paulo: Águas de Lindóia, 2006.

GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; ROSA, R. G.; EIFLER-LIMA, V. L. Solid-phase synthesis of limonene derivatives. In: THE 2nd BRAZILIAN SIMPOSIUM IN MEDICINAL CHEMISTRY. Rio de Janeiro: Instituto Militar da Engenharia, 2004.

GRAEBIN, C. S.; ANTONOW, D.; EIFLER-LIMA, V. L. FT-IR para o monitoramento e estudos cinéticos das reações em fase sólida. In: VII Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica, 2002, Goiânia.

GRAEBIN, C. S.; ANTONOW, D.; EIFLER-LIMA, V. L.; MANTA, E.; MAHLER, G.; SERRA, G. Síntese de tiazois 2,4-dissubstituídos e desenvolvimento de metodologia analítica por FT-IR para o monitoramento de reações em fase sólida. In: VII Encontro Nacional de Professores de Química Farmacêutica, 2002, Goiânia.

f) Prêmios e Títulos

Menção Honrosa na 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia/SP, 2006. Divisão de Química Orgânica.

ANEXO 5

ARTIGO CIENTÍFICO

Páginas: 174-178

Título: One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R-(+)-limonene by

tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation).

Autores: GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G.

Referência: Catalysis Communications, v. 9, p. 1066-1070, 2008.



Available online at www.sciencedirect.com





Catalysis Communications 9 (2008) 1066-1070

One-pot synthesis of secondary and tertiary amines from R(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation)

Cedric S. Graebin ^a, Vera Lucia Eifler-Lima ^a, Ricardo G. da Rosa ^{b,*}

- ^a Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, lab. 704, Porto Alegre 90610-000, Brazil
- ^b Laboratório de Catálise por Metais de Transição, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Sala K-104A, Brazil

Received 23 August 2007; received in revised form 3 October 2007; accepted 5 October 2007 Available online 16 October 2007

Abstract

In this work, we were able to synthesize, in good isolated yields, seven R(+)-limonene derived amines (five of that described for the first time) employing a rhodium catalysed hydroaminomethylation reaction. This protocol consists in an one-pot three step reaction: double bond hydroformylation, aldehyde/amine condensation and imine/enamine hydrogenation. Hydroaminomethylation, besides the high yields, has a high atom economy because just 1 mol of water is wasted per mol of limonene. Due to our catalytic optimizations, the reaction time was reduced from 48 h (described in the literature) to 10–24 h, as well as limonene isomerization was strongly minimized by the triphenylphosphine added.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Limonene; Hydroformylation; Hydroaminomethylation; Terpenes; Secondary amines; Tertiary amines

1. Introduction

Limonene is a main constituent in the essential oil of citrical plants. In nature it is abundant and available in both enantiomeric forms, R(+)-limonene and S(-)-limonene. This and other terpenes have an important role in cosmetics industry. From a chemical point of view, this terpene is very versatile because it presents two double bonds that can be selectively converted in several functional groups. The use of limonene as a building block in organic synthesis is well established in the syntheses of others systems or as a chiral auxiliary in asymmetric synthesis [1,2].

Hydroaminomethylation is a tandem reaction consisting of a one-pot hydroformylation/reductive amination where

the same catalyst is responsible for the hydroformylation of the double bond and for the final hydrogenation of the imine/enamine intermediate [3–5]. In this reaction, the hydroformylation is made in the presence of a primary or secondary amine. The aldehyde formed reacts with this amine to obtain the imine or enamine, and then this intermediate is reduced by the catalyst to form a secondary or tertiary amine as the final product.

Limonene 1 has been already hydroaminomethylated with secondary amines [6], and some of them were patented for its use as tobacco growth inhibitors using the aldehyde intermediate as starting material [7,8]. In this work we report improvements in the hydroaminomethylation protocol of limonene with these secondary amines, the synthesis of novel products with primary amines and we briefly discuss some of the findings, taking in account the steric and electronic features of the amine substrates.

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 7318; fax: +55 51 3308 7304. E-mail address: ricardo.gomes@ufrgs.br (R.G. da Rosa).

2. Experimental

2.1. General experimental procedures

¹H and ¹³C NMR spectra were obtained in a INOVA-300 spectrophotometer with standard pulse sequences operating at 300 MHz in ¹H NMR and 75 MHz in ¹³C NMR, using CDCl₃ as solvent. Chemical shifts are reported as δ values (ppm) relative to TMS (0.0 ppm). Gas chromatography was performed in a Shimadzu model GC-17A instrument with FID detector and equipped with a DB-5 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm}$) column. The carrier gas was hydrogen with a flux of 1.1 mL/min. The following method was used: sample injection = $0.5 \mu L$; initial column temperature = 50 °C; heating rate = 10 °C /min; final temperature = 250 °C; final temperature hold = 10 min (total method time = 30 min). Mass spectrometry was performed in a Shimadzu model CGMS-QP5050 with resolution range from 45 to 400 daltons, in SCAN mode (70 eV), coupled with a Shimadzu model GC-17A gas chromatograph equipped with a DB-17 (30 m \times 0.25 mm) column. The carrier gas was Helium with a flux of 1.4 mL/min. The method was the same as detailed in the gas chromatography. The mass spectrometry results are reported as the M/z ratio with the respective relative abundance in parenthesis. The M⁺ symbol indicates that the peak is the molecular ion of the compound.

2.2. General procedure for hydroaminomethylation of limonene

A stainless steel autoclave reactor was charged with a mixture of limonene (1.0 mL, 1.19 g, 8.73 mmol), HRh(CO)(PPh₃)₃ (11.48 mg, 0.0125 mmol, 0.143 mol%), THF (10 mL) and amine substrate under argon atmosphere. The reactor was purged and charged with 20 bar of H₂ and 20 bar of CO (CAUTION! Carbon monoxide is a very toxic gas and its handling must be done in a well ventilated hood) and heated over a heating plate with magnetic stirring and a silicon oil bath at 100 °C for 5 h. After this time the reactor was cooled, depressurized, purged and pressurized with 40 bar of H₂, and heated in the same conditions as above for 14 h. The reactor was cooled, depressurized and the reaction mixture was eluted in a tiny silica-gel column for the remotion of the catalyst. The solvent and the lightweight components of the mixture (limonene, isomerizated products) were removed in vacuo.

2.2.1. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-propyl-1-butanamine 2a

Amine substrate: *n*-propylamine (0.8 mL, 9.6 mmol). Hydrogenation step time: 5 h. The product was isolated by remotion of the lightweight components (limonene, amine substrate, isomerizated products) in a high vaccum pump. Yield: 85%. Mass spectrometry: 209.30 (M^+ , 0.82). ¹H NMR: 0.85 (3H, m), 0.92 (3H, t, J = 7.48 Hz), 1.35 (m), 1.5 (m, J = 7.5 Hz), 1.65 (3H, s), 1.95 (3H, s), 2.57

(2H, t, J = 7.5 Hz), 2.67 (2H, m), 5.38 (1H, s). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers): 11.8, 15.9, 16.3, 23.2, 23.4, 26.9, 27.5, 30.8, 34.3, 34.6, 35.2, 35.3, 38.4, 38.6, 48.3, 48.4, 52, 121, 133.9.

2.2.2. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-isopropyl-1-butanamine **2b**

Amine substrate: *i*-propylamine (0.82 mL, 9.6 mmol). Hydrogenation step time: 10 h. The product was isolated by acid–base extraction and fractionated distillation of the extract. Yield: 50%. Mass spectrometry: 209.25 (M⁺, 3.98). ¹H NMR: 0.86 (3H, m, J = 6.4 Hz), 1.06 (6H, d, J = 6.3 Hz), 1.3 (6H, m), 1.63 (3H, s), 1.7 (3H, m), 1.95 (3H, m), 2.6 (2H, m), 2.8 (1H, m(5), J = 6.3 Hz), 5.37 (1H, s). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers): 15.8, 16.2, 22.7, 22.8, 23.4, 25.4, 26.8, 27.4, 29.2, 30.7, 30.8, 34.4, 34.7, 35.3, 35.4, 38.3, 38.6, 45.7, 48.7, 120.9, 133.7.

2.2.3. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-benzyl-1-butanamine

Amine substrate: benzylamine (0.96 mL, 8.73 mmol). Hydrogenation step time: 14 h. The product was isolated by fractionated distillation of the dried reactional mixture. Yield: 44%. Mass spectrometry: 257.29 (M⁺, 42.22). ¹H NMR: 0.84 (3H, m), 1.35 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.7 (2H, m), 1.8 (2H, m), 1.95 (3H, m), 2.63 (2H, m), 3.8 (2H, s), 5.38 (1H, s), 7.23 (2H, m), 7.32 (3H, m). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers): 15.9, 16.3, 23.4, 25.4, 26.97, 27.5, 29.3, 30.8, 30.9, 34.1, 34.4, 35.1, 35.3, 38.4, 38.6, 47.67, 47.71, 54, 120.9, 126.9, 128.1, 128.2, 128.3, 128.4, 133.9, 140.2.

2.2.4. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-piperidinyl-1-butanamine **2d**

Amine substrate: piperidine (0.95 mL, 9.6 mmol). An excess of PPh₃ (0.0875 mmol) was added in the reaction. Hydrogenation step time: 5 h. The product was isolated by remotion of the lightweight components of the mixture (limonene, piperidine, isomerizated products) in a high vaccum pump. Yield: 80%. Mass spectrometry: 235.25 (M⁺, 6.18). ¹H NMR: 0.85 (3H, m), 1.4 (6H, m), 1.6 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.7 (3H, m), 1.95 (3H, m), 2.3 (2H, m), 2.4 (4H, m), 5.39 (1H, s). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers): 15.95, 16.3, 23.4, 24.3, 25.4, 25.8, 26.9, 27.5, 29.2, 30.8, 30.85, 30.97, 35.8, 35.9, 38.3, 38.6, 54.6, 57.9, 120.9, 133.8.

2.2.5. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-morphonyl-1-butanamine **2e**

Amine substrate: morpholine (0.84 mL, 9.6 mmol). Hydrogenation time: 5 h. The product was isolated by remotion of the lightweight components of the mixture (limonene, morpholine, isomerizated products) in a high vaccum pump. Yield: 79%. Mass spectrometry: 237.25 (M^+ , 1.69). ¹H NMR: 0.9 (3H, m), 1.3 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.7 (3H, m), 1.95 (3H, m), 2.4 (3H, m), 2.5 (4H, s), 3.7 (4H, t, J = 4.7 Hz), 5.38 (1H, s). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers):15.8, 16.3, 23.3, 25.3, 26.8, 27.4, 29.1,

30.4, 30.7, 30.8, 35.4, 35.6, 38.3, 38.5, 53.7, 57.5, 66.8, 120.8, 133.8.

2.2.6. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-piperazinyl-1-butanamine **2f**

Amine substrate: piperazine (1.5 g, 17.46 mmol). Hydrogenation step time: 5 h. The product was isolated by remotion by filtration of the precipitated remaining piperazine. The filtrated was washed with Et₂O and the dried with a high vaccum pump. Yield: 89%. Mass spectrometry: 236.40 ($\rm M^+$, 33.55). $^1\rm H$ NMR: 0.93 (3H, m), 1.32 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.7 (3H, m), 1.98 (3H, m), 2.4 (3H, m), 2.5 (4H, s), 2.95 (4H, m), 5.39 (1H, s). $^{13}\rm C$ NMR (mixt. of diastereomers): 15.8, 16.2, 23.3, 25.3, 26.8, 27.3, 29.1, 30.4, 30.65, 30.69, 30.7, 35.5, 35.6, 38.2, 38.5, 45.8, 54.4, 57.7, 120.8, 133.7.

2.2.7. 3-(4-methylcyclohexen-1-yl)-N-phenyl-1-butanamine 2g

Amine substrate: aniline (0.8 mL, 8.73 mmol). Hydrogenation step time: 19 h. The product was isolated with acidbase extraction and subsequent fractional distillation. Yield: 36% (with 44 h of hydrogenation it is possible to increase its yield to about 50%). Mass spectrometry: 243.40 (M⁺, 39.86). ¹H NMR: 0.9 (3H, m), 1.3 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.75 (3H, m), 1.98 (3H, m), 3.18 (2H, m), 5.38 (1H, s), 6.85 (3H, m), 7.2 (2H, m). ¹³C NMR (mixt. of diastereomers): 15.7, 16.2, 23.4, 25.2, 26.9, 27.3, 29.2, 30.7, 30.8, 32.5, 32.7, 34.95, 35.1, 38.1, 38.3, 44.8, 115.5, 115.6, 120.3, 120.37, 120.7, 120.75, 129.3, 131.9, 133.9, 144.9.

3. Results and discussion

We have used alkylated amines (*n*-propylamine, isopropylamine, benzylamine), diamines (ethylenediamine, propilenediamine), cyclic amines (piperidine, piperazine, morpholine) and an aromatic one (aniline) for the hydroaminomethylation of limonene, synthesizing the amines **2a**–**2g** in good yields (Fig. 1). It is important to emphasize that the amines **2a**, **2b**, **2c**, **2f** and **2g** are, for the best of our knowledge, novel products.

Although olefin hydroformylation can, in theory, lead to two products: the *n*-aldehyde (linear) and the *i*-aldehyde (branched), we have found only *n*-products, probably due

Fig. 1. Hydroaminomethylation of limonene.

to the steric hindrance of the isopropenyl group of the terpene [9–12]. Usually hydroaminomethylations are made under hydroformylation conditions (i.e., with the presence of CO in the reaction) and it may take up to 48 h for its completion [6]. We found that the reaction time can be improved splitting the process into two steps: hydroformylation (under a CO/H_2 mixture) and hydrogenation (only H_2). With this protocol modification we were able to decrease the total reaction time to 10–24 h, depending on the amine used as substrate.

During all reactions, samples were taken before the hydrogenation step and analyzed by GC. In order to better understand and to correlate the catalytic results with the nature of the amines used as substrates they were organized in primary, secondary, diamine and aromatic (Table 1). In the case of primary amines (runs 1–3), its possible to see that conversion is high for both n-propylamine and iso-propylamine but not for benzylamine. Benzylic substrates are known to form stable π -allylic complexes with rhodium which are inactive for catalysis [13]. A closer look at the product distribution in the hydroformylation step shows that the isopropylamine reaction has the higher selectivity to amine. It could be possible that the hydrogenation of the imine is related to the nucleophilicity of the nitrogen atom.

Table 1 (runs 4–7) shows high selectivity for the products of the reactions with secondary amines. This result was expected because enamine intermediates are easy to hydrogenate. However, the results obtained with piperidine in terms of both conversion and selectivity were lower than the results of morpholine and piperazine. The most important difference in these three substrates is the presence of heteroatoms (oxygen and nitrogen) in the morpholine and piperazine, respectively. These heteroatoms might be stabilizing the rhodium catalyst, rapidly switching between coordinated/non-coordinating forms on demanding by the metal. Considering this hypothesis, we have decided to add an extra amount of PPh₃ [14] to the piperidine experiment (run 7) resulting in a significant improvement in the conversion and selectivity to the product, mainly by reducing the isomerization of limonene.

The reaction with diamines at first gave poor results leading only to isomerization products with putrescine (run 8) and no products with ethylenediamine (run 9). Given the low conversion of these reactions, it is possible that these substrates inactivated the rhodium catalyst by forming stable chelated compounds with it. To avoid this supposed inactivation, we added ethylenediamine (runs 10 and 11) after the hydroformylation step, to ensure that the aldehyde was present in the reaction medium. We observed, indeed, the aldehyde as a product, but as the isomerization was high in the first experiment (run 10), we added an excess of PPh3 (run 11) and found that the conversion was higher and the isomerization was lowered from 55 to 12%. After the hydrogenation step, the chromatogram showed that all the aldehyde was consumed and after long time run, peaks related to a mixture of heavy

Limone	ne hydroamine	Limonene hydroaminomethylation with several amines	ral amines												
Run	Method	Amine substrate	Hydrofor	Hydroformylation step (%)	(%) dat				Hydrogen	Hydrogenation step (%)	(%)				Yield (%)°
			Conv. ^a	Selectivity	y				Conv. ^a	Selectivity	y				
				Amine	Imine	Aldehyde	Isomer.	Others		Amine	Imine	Aldehyde	Isomer.	Others	
1	1	n-Propylamine	94	0	95	0	5	0	95	95	0	0	4	1	90 (85)
2	1	i-Propylamine	84	45	39	0	13	3	84	83	7	0	13	7	70 (50)
Э	1	Benzylamine	65	0	06	0	10	0	89	83	0	0	6	8	56 (44)
4	1	Piperidine	9/	49	40	0	12	0	75	68	0	0	11	0	67 (62)
5	1	Morpholine	91	84	3	0	7	7	91	06	0	0	~	\mathcal{E}	82 (79)
9	3	Piperazine	86	93	3	0	4	0	86	94	-	0	4	_	92 (89)
7	2	Piperidine	98	62	29	3	9	0	88	26	0	0	2	_	85 (80)
8	3	Putrescine	6	0	0	0	100	0	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu
6	3	Ethylenediamine	0	0	0	0	0	0	pu	pu	pu	pu	pu	pu	pu
10	4	Ethylenediamine	80	0	0	45	55	0	78	0	0	0	63	$37^{\rm b}$	pu
11	5	Ethylenediamine	95	0	0	88	12	0	95	0	87 ^d	0	6	4	pu
12	1	Aniline	06	41	15	0	44	0	91	56	33	0	41	0	51 (32)
13	9	Aniline	95	5	84	9	3	7	94	9/	3	0	7	19	71 (50)

Methods

1 - Hydroformylation step: HRh(CO)(PPh₃)₃ (0.0125 mmol), limonene (8.73 mmol), amine substrate, CO (20 bar), H₂ (20 bar), THF (10 mL), 100 °C, 5 h.; Hydrogenation step: Reactor purged and pressurized with 40 bar of H₂, 100 °C, 5 h. Conversion = mols of limonene consumed/mols of limonene initially added; Selectivity = mols of a given product/mols of limonene consumed;

Yield = $conversion \times selectivity$.

2 – Idem method 1, with 0.0875 mmol of PPh₃ (PPh₃/Rh = 10). 3 – Idem method 1, with 17.46 mmol of amine substrate.

4 - Idem method 3, amine substrate added just in the hydrogenation step.

5 – Idem method 4, with 0.0875 mmol of PPh₃ (PPh₃/Rh = 10).

6 - Idem method 5, hydrogenation step extended to 44 h.

(a) All the data in this table was obtained with data from the CG-FID chromatograms. Notes

(b) A complex mixture of heavy products.

(c) Chromatographic yields. Isolated yields are within parenthesis.

(d) A mixture of heavy products. A tentative of extract the amine product from the mixture with acid-base extraction gave mainly the aldehyde as recovered product, indicating that imines are the main

Nd = not determined.

products appeared. A tentative of extract the amine products from these reactions with acid-base extraction gave only aldehyde as recovered product, which indicates that dimerizated imines were the main products of these mixtures. It seems that ethylenediamine is either inactivating the catalyst [15] and/or the steric hindrance of the products impeaches the coordination of the catalyst to the imine double bonds, leading to no hydrogenation products.

Even though, not all imine/enamine intermediates were easily hydrogenated. The reaction with aniline, for example (runs 12 and 13) generates an imine intermediate that are in resonance with the aromatic ring and the stabilized double bond should be more difficult to hydrogenate. In fact, we have observed that the hydrogenation step takes 44 h to carry out with 76% yield. The use of an excess of PPh₃ (PPh₃/Rh ratio = 10) lowered the isomerization selectivity from 42.6 to 3.1%, as the piperidine reaction.

This effect could be explained considering that under phosphine excess the equilibrium should be shifted to the coordinated phosphine-rhodium species such as HRh(CO)(PPh₃)₂. The higher steric hindrance caused by the phosphine ligands in these species will suppress or decrease the formation of branched alkyl intermediates required for the isomerization process. [14,16].

The structural assignments of all amines **2a–2g** was based in their spectral analyses. For all products the ¹H NMR spectra showed additional peaks attributed to the amine substitutions and showed a singlet peak at 1.65–1.67 ppm (attributed to the methyl group directly attached on the double bond) and the vinylic hydrogen at 5.35–5.38 ppm, indicating that the internal double bond remains untouched in all reactions.

4. Conclusion

We have demonstrated the synthetic utility of the hydroaminomethylation of Limonene by the synthesis of original derivatives with good yields in a clean, fast and efficient one-pot method, with reaction times shorter than previously reported in the literature.

Acknowledgements

The authors would like to thank Jones Limberger (Inst. de Química/UFRGS) for technical assistance, Ms. Joyce Espindola and Dr. Jaïrton Dupont (Inst. de Química/UFRGS) for the NMR spectra, Dr. Maria do Carmo R. Peralba and Dr. Adriano L. Monteiro (Inst. de Química/UFRGS) for GC-FID and GC-MS experiments, CAPES for the fellowship to C.G., CNPq (felllowship to V.L.E-L. and Universal Project 483674/2006), FAPERGS (02/0351.8) and PRONEX (04/0887.0) for funding.

References

- [1] T. Tokuyasu, S. Kunikawa, M. Abe, A. Masuyama, M. Nojima, H.S. Kim, Y. Wataya, J. Org. Chem. 68 (2003) 7361.
- [2] P.A. Wender, F.C. Bi, M.A. Brodney, F. Gosselin, Org. Lett. 3 (2001) 2105.
- [3] P. Eilbracht, L. Bärfacker, C. Buss, C. Hollmann, B.E. Kitsos-Rzychon, C.L. Kranemann, T. Rische, R. Roggenbuck, A. Schmidt, Chem. Rev. 99 (1999) 3323.
- [4] M. Ahmed, A.M. Seayad, R. Jackstell, M. Beller, Angew. Chemie. Intl. Ed. 42 (2003) 5615.
- [5] M. Ahmed, A.M. Seayad, R. Jackstell, M. Beller, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 10311.
- [6] C.L. Kranemann, P. Eilbracht, Synthesis (1998) 71.
- [7] J. Strong, US Patent 3,890,384, 1975.
- [8] J. Strong, US Patent 4,030,908, 1977.
- [9] S. Sirol, P. Kalck, New J. Chem. 21 (1997) 1129.
- [10] C.M. Foca, H.J.V. Barros, E.N. dos Santos, E.V. Gusevskaya, J.C. Bayón, New J. Chem. 27 (2003) 533.
- [11] S.B. Halligudi, K.N. Bhatt, K. Venkatasubramanian, React. Kinet. Catal. Lett. 51 (1993) 459.
- [12] H.J.V. Barros, M.L. Ospina, E. Arguello, W.R. Rocha, E.V. Gusevskaya, E.N. dos Santos, J. Organomet. Chem. 671 (2003) 150
- [13] P.W.N.M. Van Leeuwen, C.F. Roobeek, J. Mol. Catal. 31 (1985) 345.
- [14] N.F. Mendes Ana, J.R. Gregório, R.G. Rosa, J. Braz. Chem. Soc. 16 (2005) 1124.
- [15] P. Marcazzan, B.O. Patrick, B.R. James, Organometallics 22 (2003) 1177.
- [16] H.J.V. Barros, C.C. Guimaraes, E.N. dos Santos, E.V. Gusevskaya, Catal. Commun. 8 (2007) 747.