

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

ISABELLA GONÇALVES ALONSO

NOVA ABORDAGEM PARA A SÍNTESE TOTAL DO ESPILANTOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

CAMPINAS
2016

ISABELLA GONÇALVES ALONSO

NOVA ABORDAGEM PARA A SÍNTESE TOTAL DO ESPILANTOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cezar Pastre

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ISABELLA GONÇALVES ALONSO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. JULIO CEZAR PASTRE.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

AL72n

Alonso, Isabella Gonçalves, 1991-
Nova abordagem para a síntese total do espilantol e avaliação da atividade antinociceptiva / Isabella Gonçalves Alonso. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Julio Cezar Pastre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Síntese total. 2. Espilantol. 3. Reação de Sonogashira. 4. Atividade biológica. 5. Efeito antinociceptivo. I. Pastre, Julio Cezar,1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: New approach to the total synthesis of spilanthol and study of antinociceptive activity
Palavras-chave em inglês:
Total synthesis
Spilanthol
Sonogashira reaction
Biological activity
Antinociceptive effect
Área de concentração: Química Orgânica
Titulação: Mestra em Química na área de Química Orgânica
Banca examinadora:
Julio Cezar Pastre [Orientador]
Wanda Pereira Almeida
Roberto Parise Filho
Data de defesa: 01-09-2016
Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Cezar Pastre (Orientador)

Prof. Dr. Roberto Parise Filho (FCF-USP)

Profa. Dra. Wanda Pereira Almeida (FCF-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **ISABELLA GONÇALVES ALONSO**, aprovada pela Comissão Julgadora em 01 de setembro de 2016.

“Ao meu pai Flávio e as minhas
duas mães Sandra e Carine,
com muito carinho”

Agradecimentos

Ao Prof. Julio Pastre, pela oportunidade de ser sua 1ª aluna de mestrado, de fazer parte do seu grupo de pesquisa e vê-lo crescer e pela excelente orientação . tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, pelo constante apoio, carinho, participação e pelos sábios conselhos. Devo tudo o que sou hoje à vocês, obrigada pelo orgulho de mim e do meu “ESPILANTROL”.

Ao meu irmão, por sempre me apoiar e se orgulhar de mim. E especialmente por me dar o maior presente de todos e a minha maior motivação, a minha sobrinha e afilhada Ana Clara.

À minha família, pelo apoio, carinho e por sempre cuidarem de mim.

Ao meu namorado Caio, por ser meu melhor amigo, por me apoiar, por fazer a distância se tornar cada dia menor, e principalmente por cuidar de mim e me amar incondicionalmente. Sem você eu não teria nem começado. Te amo muito.

Às minhas queridas amigas Larissa e Alanna, obrigada por, apesar de cada uma estar em um canto do Brasil, estarem sempre presentes, me motivando e ajudando durante todos esses anos.

Ao técnico Leandro, por toda a paciência de me ensinar, me acompanhar dia-a-dia no laboratório, me escutar e especialmente por todos os sábios conselhos de vida.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Zé, Mari, Renan, Christian, Luis e Carla, obrigada por todos os momentos, por compartilharem comigo as alegrias e frustrações. Obrigada pela contribuição a este trabalho e principalmente por tudo que me ensinaram, sobre química e sobre a vida.

Ao Luiz, pelos ensinamentos, paciência e por todas as correções perfeitas deste trabalho.

Ao Renan, por ser um grande exemplo de felicidade e bom humor. E pelas análises de HRMS.

Ao Christian, por sempre fazer o máximo para me ajudar e por sempre me ouvir.

À Mari, por dividir tudo comigo desde vidrarias até a casa. E especialmente, todos os momentos. Sua amizade é uma coisa incrível que levo pra minha vida.

Ao Zé, por me ensinar sobre tudo!! Este trabalho não avançaria sem você. Obrigada por todas as vezes que você parou tudo porque eu estava precisando de ajuda, por toda motivação e por sempre acreditar em mim. Você me fez uma pessoas mais inteligente e melhor!

À Helena, por ter sido a IC mais sábia que eu já conheci, obrigada por ter me ensinado tanto. Você faz muita falta no laboratório.

À meus queridos amigos Jonas e Nati, obrigada por estarem comigo desde o primeiro dia.

Aos queridos amigos que fiz nesses 2 anos: Gi, Re, Lili, Dani, Ridley, Julio e em especial ao Fábio. Obrigada por me acolherem, pelo carinho e por todas as risadas.

Ao Dr. Rodney, à Laís e à Verônica, obrigada por tudo que vocês me ensinaram sobre o espilantol, por motivarem esse trabalho e pela contribuição com os ensaios biológicos. Obrigada Laís, por ter se empenhado para a liberação dos camundongos e por toda paciência de me ensinar e me ajudar.

À Prof. Eneida de Paula e a Viviane, obrigada pela colaboração e ajuda nos ensaios de *tail flick*.

Aos colaboradores, Drª. Ana Carolina Migliorini Figueira, Drª. Sandra Dias, Profª. Drª. Carmen Ferreira e Prof. Dr. João Ernesto e as alunas Natália Bernardi Videira, Luciana Paradela, Drª. Karin Juliane Pelizzaro Rocha e Thais Petrochelli Banzato, obrigada por realizarem os ensaios biológicos.

Aos técnicos dos laboratórios institucionais que tornaram mais fácil a realização desse trabalho, em especial, Paula, Anderson e Gustavo da sala de RMN e Ricardo da sala de HPLC. Ao pessoal da CPG, em especial a Isabela, pelo trabalho exemplar.

Aos professores do IQ, pela valiosa contribuição à minha formação acadêmica.

À prof. Cátia Megiatto e à prof. Wanda Pereira Almeida pelas contribuições no Exame de Qualificação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar da defesa de mestrado e pelas contribuições ao trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas pela estrutura que tornou possível a realização deste trabalho de pesquisa.

À agências de fomento CAPES, pela bolsa de estudos durante o período do mestrado.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

NOVA ABORDAGEM PARA A SÍNTESE TOTAL DO ESPILANTOL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

O espilantol é uma *N*-alquilamida presente na *Spilanthes acmella*, responsável por diversas atividades biológicas, especialmente a atividade antinociceptiva. A primeira rota sintética para sua obtenção foi descrita em 1963, e a maioria das sínteses descritas apresentaram baixos rendimentos globais ou grande número de etapas, além de não descreverem a pureza do composto.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nova rota sintética para o espilantol e alguns análogos, avaliando a etapa chave (reação de Sonogashira) em fluxo contínuo, a fim de potencialmente obter uma rota mais curta, barata e eficiente, levando a um produto final de maior pureza quando comparado com as rotas presentes na literatura. A atividade amtinociceptiva dos compostos preparados foram estudadas, uma vez que a maioria dos trabalhos relatam as atividades do extrato bruto que o contém.

A etapa mais desafiadora para a obtenção do espilantol é a síntese do dieno com geometria *E*/*Z* desejada para as ligações duplas e três abordagens foram utilizadas para a obtenção desse sistema. As duas primeiras foram baseadas na reação de Wittig, porém levaram a formação de mistura de isômeros e baixos rendimentos globais. Por fim, foi avaliada uma alternativa que se baseia na reação de Sonogashira seguida de uma semi-redução *Z*-seletiva para obtenção do dieno. Em condições ótimas, essa rota leva à formação apenas do dieno com a geometria desejada para as ligações duplas e com um rendimento global de 30%. Seguindo a síntese do espilantol, foi realizada uma oxidação de Swern e uma reação de HWE com o éster fosfonato previamente preparado, que contém a porção *N*-isobutilamida.

Desta forma, foi possível desenvolver uma rota sintética para o espilantol em 5 etapas, com 25% de rendimento global, obtendo um produto de alta pureza e sem a presença de outros isômeros. Com pequenas alterações na rota inicialmente proposta, foi possível sintetizar 5 análogos naturais e não-naturais do espilantol.

A reação de Sonogashira foi avaliada em fluxo contínuo, porém, não apresentou, até o momento, vantagens em relação à reação em batelada.

Finalmente, a atividade antinociceptiva do espilantol foi avaliada utilizando-se o modelo *tail flick* em camundongos. O espilantol mostrou atividade similar ao controle positivo EMLA® (anestésico de uso tópico), ao passo que dois análogos estruturalmente mais simples levaram a resultados superiores em intensidade e duração da anestesia em comparação aos obtidos com EMLA®. Ambos os análogos possuem uma amida α,β-insaturada, indicando que essa função pode ser responsável pela atividade antinociceptiva. Esses resultados abrem possibilidades para estudos futuros e aplicações dos análogos sintetizados no desenvolvimento de novos anestésicos de uso tópico com duração prolongada.

Abstract

NEW APPROACH TO THE TOTAL SYNTHESIS OF SPILANTHOL AND STUDY OF ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY

Spilanthol is an *N*-alkylamide found in the *Spilanthes acmella* and it is considered to be the main responsible for many biological activities, including antinociceptive activity.

Its first synthetic route was described in 1963, other approaches presented low overall yields or a high number of reaction steps and did not determine the purity of the synthetized compound.

The goal of this project was to develop a new synthetic route for spilanthol and some analogues, evaluating the key step (Sonogashira reaction) in continuous flow conditions to potentially obtain a shorter, less expensive and efficient route that would afford the desired product with a high purity. The antinociceptive activity of the synthesized spilanthol was also evaluated since the majority of the studies were performed using the crude extract.

The most challenging step is the synthesis of the diene with the desired *E*/*Z* geometry for the double bonds and three different approaches were explored for the synthesis of this system. The first two routes were based on the Wittig reaction, but led to the formation of a mixture of isomers and in low overall yield. Finally, we evaluated an alternative based on the Sonogashira reaction followed by a *Z*-selective semi-reduction of the triple bond to obtain the diene system. The optimal conditions of this route led to the exclusively formation of the diene with *E*/*Z* configuration and overall yield of 30%. To conclude the synthesis of spilanthol, the alcohol was oxidized via a Swern protocol and the final product was obtained by a HWE reaction with the phosphonate ester containing the *N*-isobutylamide motif.

This final route afforded spilanthol in 5 steps with 25% overall yield, in high purity and without the presence of the other isomers.

Minor modifications in the original route allowed the synthesis of 5 different natural and non-natural analogues of spilanthol.

The Sonogashira reaction was evaluated in continuous flow conditions, but so far, the results obtained in batch are superior.

The antinociceptive activity of spilanthol and its analogues was evaluated in mice using the tail flick model. Spilanthol showed similar activity to EMLA® positive control (commercial topical anesthetic). Among the synthesized analogs, two led to superior results in intensity and duration of anesthesia compared to those obtained with EMLA®. Both analogs have simpler structure that espilantol. They also have the function amide α, β-unsaturated, indicating that this function may be important to the antinociceptive activity. These results open up possibilities for further studies and applications of the synthesized analogs in the development of new topical anesthetic for an extended duration.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura do espilantol (**1**). **24**
Figura 2. Estruturas propostas para o espilantol (**1**). **25**
Figura 3. Produtos naturais preparados em fluxo contínuo. **35**
Figura 4. Exemplos de espectro de RMN de H^1 das reações de Wittig entre o crotonaldeído (**35**) e o composto **49** (600 MHz – $CDCl_3$). **45**
Figura 5. Expansão dos espectros de RMN de ^1H do composto **51** (250 MHz, $CDCl_3$). **56**
Figura 6. Expansão do espectro de RMN de ^1H do bruto reacional da semi-redução da ligação tripla (600 MHz, CDCl3). **58**
Figura 7. Comparação da expansão dos espectros obtidos pelas duas rotas (500 MHz, $CDCl_3$). **59**
Figura 8. Comparação das rotas para obtenção do álcool **27**. **60**
Figura 9. Comparação do espectro no IV do álcool **27** e do aldeído **28**. **61**
Figura 10. Comparação do espectro de RMN de ^1H do álcool **27** e do aldeído **28**. (600 MHz, CDCl3). **62**
Figura 11. Comparação do espectro no IV da oxidação e HWE. **64**
Figura 12. Comparação do espectro de RMN de ^1H das reações de Sonogashira, redução e HWE. **66**
Figura 13. Comparação do espectro de RMN de ^{13}C do espilantol sintético e do comercial (600 MHz, CDCl3). **68**
Figura 14. Equipamento utilizado nas reações em condição heterogênea. **71**
Figura 15. Equipamento utilizado nas reações em condição homogênea. **75**
Figura 16. Análogos planejados do espilantol. **80**
Figura 17. Ensaio de viabilidade celular em células Panc-1 (**A**), SKMEL-103 (**B**) e HaCAT (**C**). **83**
Figura 18. Gráfico de morte celular/ proliferação. **84**
Figura 19. Estrutura da Lidocaína e da Procaína. **87**
Figura 20. Determinação da atividade antinociceptiva pelo modelo de *Tail Flick*. **88**
Figura 21. Gráfico de %EMP x Tempo (min) dos compostos **1**, **16**, **66**-**69** e EMLA®. **89**

Figura 22. Gráfico de duração da anestesia (min) no tratamento com cada composto. **90**
Figura 23. Etapas de produção do bioadesivo. **116**
Figura 24. Furador de 17 mm de diâmetro utilizado para cortar os filmes. **117**
Figura 25. Filme cortado em 17 mm de diâmetro. **118**
Figura 26. Determinação da atividade antinociceptiva pelo modelo de *Tail Flick*. **120**

Lista de Esquemas

Esquema 1. Rota sintética desenvolvida por Manzoor-i-Khuda e colaboradores.[12] **26**
Esquema 2. Rota sintética desenvolvida por Yamamoto e colaboradores.[13] **27**
Esquema 3. Rota sintética desenvolvida por Zhang e colaboradores.[14] **28**
Esquema 4. Rota sintética desenvolvida por Takasago International Corporation em 2012.[15] **29**
Esquema 5. Configuração representativa e componentes para reações em fluxo contínuo. **33**
Esquema 6. Análise retrossintética para o espilantol (**1**). **38**
Esquema 7. Síntese do fragmento **46.** **39**
Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de Michaelis-Arbuzov. [44] **40**
Esquema 9. Mecanismo proposto para a reação de acoplamento com DCC e DMAP catalítico.[46] **40**
Esquema 10. Mecanismo proposto para a reação de Wittig entre um ilídeo não estabilizado e um aldeído.[46] **41**
Esquema 11. Síntese do sal de fosfônio **49**. **43**
Esquema 12. Síntese do sal de fosfônio **59.** **46**
Esquema 13. Mecanismo proposto para a reação de Appel.[52] **46**
Esquema 14. Mecanismo proposto para a reação de Sonogashira.[44] **48**
Esquema 15. Isomerização do composto **52**. **55**
Esquema 16. Redução *Z*-seletiva do enino **51** pra formação do dieno **27**..... **57**
Esquema 17. Mecanismo proposto para a reação de HWE.[44] **63**
Esquema 18. Oxidação de Swern e olefinação de HWE. **63**
Esquema 19. Síntese total do espilantol (**1**). **68**
Esquema 20. Configuração do sistema em fluxo contínuo para a reação de Sonogashira heterogênea. **72**
Esquema 21. Reações controle em batelada. **73**
Esquema 22. Sistema em fluxo contínuo para a reação de Sonogashira homogênea. **74**
Esquema 23. Síntese dos análogos **66**-**69**. **81**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Reações de Wittig utilizando o sal de fosfônio **49.** **44**
Tabela 2. Reações de Wittig utilizando o sal de fosfônio protegido **59.** **47**
Tabela 3. Reações de Sonogashira realizadas pelo Prof. Julio Pastre. **48**
Tabela 4. Reações de Sonogashira variando a base utilizada em tubo selado T = 100 ºC. **50**
Tabela 5. Reações de Sonogashira variando a base utilizada em T = 60 ºC. **50**
Tabela 6. Reações de Sonogashira com DIPA. **52**
Tabela 7. Reações de Sonogashira com adição de excesso de PPh_3. ..... **53**
Tabela 8. Reações de Sonogashira diminuindo a carga catalítica. **54**
Tabela 9. Reações de Sonogashira variando a geometria da ligação dupla do composto **52**. **55**
Tabela 10. Comparação do Espectro do RMN de ^1H do Espilantol. **67**
Tabela 11. Comparação das rotas para obtenção do composto **16.** **69**
Tabela 12. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo com temperatura entre 100 e 130 ºC. **76**
Tabela 13. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo com temperatura entre t.a. e 60 ºC. **77**
Tabela 14. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo variando a geometria da ligação dupla do composto **52**. **78**
Tabela 15. Painel de linhagens tumorais testadas. **85**
Tabela 16. Valores de TGI^a (em μM) para o espilantol (**1**) e análogos. **86**
Tabela 17. Temperatura (ºC) e Vazão ($mL.min^{-1}$) nas reações de Sonogashira em fluxo contínuo homogêneo. **111**
Tabela 18. Massa (mg) e Nº de μmol de cada análogo adicionado na preparação dos filmes. **117**
Tabela 19. Espessura (mm ± DP) e massa (mg ± DP) dos filmes (n=6). **118**

Lista de Anexos

Anexo 1. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **47** (250 MHz, $CDCl_3$)..... **127**
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **47** (63 MHz, $CDCl_3$) **128**
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **46** (400 MHz, $CDCl_3$)..... **129**
Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46** (101 MHz, $CDCl_3$) **130**
Anexo 5. Espectro de RMN de ^{31}P do composto **46** (243 MHz, $CDCl_3$)..... **131**
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **55** (250 MHz, $CDCl_3$)..... **132**
Anexo 7. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **55** (63 MHz, $CDCl_3$) **133**
Anexo 8. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **50** (250 MHz, $CDCl_3$)..... **134**
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **49** (250 MHz, $CDCl_3$)..... **135**
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **49** (63 MHz, CDCl3)..... **136**
Anexo 11. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **27** (600 MHz, $CDCl_3$)..... **137**
Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **27** (150 MHz, $CDCl_3$) **138**
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **20** (400 MHz, $CDCl_3$)..... **139**
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **20** (101 MHz, $CDCl_3$) **140**
Anexo 15. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **58** (250 MHz, $CDCl_3$)..... **141**
Anexo 16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **58** (101 MHz, $CDCl_3$) **142**
Anexo 17. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **59** (400 MHz, $CDCl_3$)..... **143**
Anexo 18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **59** (101 MHz, $CDCl_3$) **144**
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{31}P do composto **59** (101 MHz, $CDCl_3$)..... **145**
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **26** (400 MHz, $CDCl_3$)..... **146**
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{1}H do composto ***E*-51** (500 MHz, $CDCl_3$) **147**
Anexo 22. Espectro de RMN de ^{13}C do composto ***E*-51** (126 MHz, $CDCl_3$)..... **148**
Anexo 23. Espectro de RMN de ^{1}H do composto ***Z*-51**(400 MHz, $CDCl_3$) **149**
Anexo 24. Espectro de RMN de ^{13}C do composto ***Z*-51**(101 MHz, $CDCl_3$)..... **150**
Anexo 25. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** (600 MHz, $CDCl_3$)..... **151**
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** (151 MHz, $CDCl_3$) **152**
Anexo 27. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **16** (600 MHz, $CDCl_3$)..... **153**
Anexo 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (151 MHz, $CDCl_3$) **154**
Anexo 29. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **66** (500 MHz, $CDCl_3$)..... **155**
Anexo 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **66** (126 MHz, $CDCl_3$) **156**
Anexo 31. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **67** (600 MHz, $CDCl_3$)..... **157**

Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **67** (151 MHz, $CDCl_3$) **158**
Anexo 33. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **68** (500 MHz, $CDCl_3$)..... **159**
Anexo 34. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **68** (126 MHz, $CDCl_3$) **160**
Anexo 35. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **69** (400 MHz, $CDCl_3$)..... **161**
Anexo 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **69** (126 MHz, $CDCl_3$) **162**
Anexo 37. Certificado de liberação dos animais (nº 4137-1) **163**

Lista de Símbolos

AcOEt – Acetato de Etila

ANOVA – Análise de variância

CCD – Cromatografia em camada delgada

CG/EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

DBU – 1,8-Diazabicycloundec-7-ene

DCC – *N*,*N*'-diciclohexilcarbodiimida

DIPA – Diisopropilamida

DIPEA – Diisopropiletilamina

DMA - *N*,*N*-dimetilacetamida

DMAP – 4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina

DMF - *N*,*N*-dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Eq. – Equivalente

ESI - Ionização por “electron spray”

ESI – “Electrospray ionization”

FTIR – “Fourier transform infrared spectroscopy”

HPLC – “High pressure liquid chromatography”

HRMS - espectrometria de massas de alta resolução

HWE – Reação de Horner-Wadsworth-Emmons

Hz – Hertz

IV – Infravermelho

J – Constante de Acoplamento

KHMDS – Hexametildissililamideto de potássio

LC – “Liquid Cromatography”

LDA – Diisopropilamina de lítio

LiHMDS – Hexametildissililamideto de lítio

MHz – Megahertz

MS – “Mass spectrometry”

MW – Microondas

NaHMDS – Hexametildissililamideto de sódio

p.f. - Ponto de fusão

PCC – Clorocromato de piridínio

PDC – Dicromato de piridínio

ppm - Partes por milhão

Rf – Fator de retenção

RMN de ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN de ^{1}H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

S_N2 – Substituição nucleofílica bimolecular

t-BuS – *terc*-butiltio

t.a. – Temperatura ambiente

TBAF – Fluoreto de *n*-tetrabutilamônio

TCA – Ácido tricloroacético

TGI – "Total growth inhibition"

THF – Tetraidrofurano

TMEDA – Tetrametiletilenodiamida

TMG – Tetrametilguanidina

TMSCl – cloreto de trimetilsilano

TOF – "Time of flight"

UV – Ultravioleta

δ - deslocamento químico

μM – micro molar

τ – Tempo de residência

Sumário

1. Introdução 24
1.1. Espilantol 24
1.1.1. Elucidação Estrutural do Espilantol 24
1.1.2. Sínteses Descritas 25
1.1.3. Atividades Biológicas do Extrato 29
1.1.4. Atividades Biológicas do Espilantol Isolado 31
1.2. Fluxo Contínuo 32

2. Objetivos 36

3. Resultados e Discussão 37
3.1. Síntese do Espilantol em Batelada 38
3.1.1. Análise Retrossintética 38
3.1.2. Síntese do Éster Fosfonato 39
3.1.3. Síntese do Espilantol - Primeira Abordagem 41
3.1.3.1. Mecanismo da Reação de Wittig 41
3.1.3.2. Síntese do Sal de Fosfônio 49 42
3.1.3.3. Reação de Wittig com o Sal de Fosfônio 49 43
3.1.4. Síntese do Espilantol - Segunda Abordagem 45
3.1.5. Síntese do Espilantol – Terceira Abordagem 47
3.1.5.1. Mecanismo da Reação de Sonogashira 47
3.1.5.2. Reação de Sonogashira 48
3.1.5.3. Semi-redução *Z*-seletiva 56
3.1.5.4. Comparação das Rotas para Obtenção do Álcool 27 58
3.1.6. Síntese do Espilantol 60
3.1.6.1. Comparação dos Espectros no IV e de RMN de ^{1}H ao Longo da Rota 64
3.2. Avaliação da Reação de Sonogashira em Fluxo Contínuo 70
3.2.1. Condição de Catálise Heterogênea 70
3.2.2. Condição de Catálise Homogênea 73
3.3. Síntese de Análogos do Espilantol 79
3.4. Avaliação Biológica do Espilantol e Análogos 81
3.4.1. Atividade Antiviral – Anti-HIV 81
3.4.2. Citotoxicidade 82

3.4.2.1. Câncer de Pâncreas e Melanoma 82
3.4.2.2. Câncer de Mama 83
3.4.2.3. Painel de Linhagens Tumorais 84
3.4.3. Avaliação da Atividade Antinociceptiva 86

4. Conclusão e Perspectivas 92

5. Parte Experimental 94
5.1. Síntese 95
5.1.1. Reagentes e Solventes 95
5.1.2. Métodos Cromatográficos 95
5.1.3. Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos 96
5.1.4. Procedimentos Experimentais em Batelada 96
5.1.5. Procedimentos Experimentais em Fluxo Contínuo 110
5.2. Ensaios Biológicos 111
5.2.1. Atividade Antiviral – Anti-HIV 111
5.2.1.1. Metodologia 111
5.2.1.2. TZM-bl e HIV-1 BaL 112
5.2.1.3. Ensaio de Citotoxicidade 112
5.2.1.4. Atividade Anti-HIV em celulas TZM-bl infectadas 112
5.2.2. Câncer de Pâncreas e Melanoma 113
5.2.2.1. Diluição dos compostos 113
5.2.2.2. Células 113
5.2.2.3. Análise da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT) 114
5.2.3. Câncer de Mama 114
5.2.3.1. Cultura de Células 114
5.2.3.2. Ensaios de High Content Analysis (HCA) 115
5.2.3.2.1. Ensaios de Inibição de Proliferação Celular e Citotoxicidade *in vitro* 115
5.2.4. Painel de Linhagens Tumorais 115
5.2.5. Ensaio de Tail Flick In Vivo 116
5.2.5.1. Materiais 116
5.2.5.2. Produção dos Filmes 116
5.2.5.3. Propriedades Físicas dos Filmes 117

5.2.5.4. Animais..... 118

5.2.5.5. Determinação da Atividade Antinociceptiva em Camundongos 119

6. Referências..... 121

7. Seção de Anexos 126

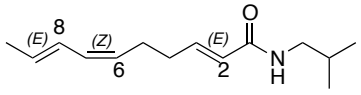
1. Introdução

1.1. Espilantol

A *Spilanthes acmella* L. Murray, sinonímia *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, é uma planta pertencente à família *Asteraceae*. É muito comum no sudeste asiático e na América do Sul, principalmente no norte do Brasil, onde é comumente conhecida como Jambu, agrião-do-pará, agrião-bravo, botão-de-ouro, jambuaçu, agrião-do-norte, agrião-do-mato, pimenta-d'água, agriãozinho, pimenteira, pimenta-do-pará, agrião-do-Brasil, agrião, jambu-rana, erva-de-malaca, jambu-assú, mastruço ou abecedaria.[1, 2]

O jambu é amplamente utilizado na culinária, em pratos típicos do norte do Brasil, tais como o tacacá, pato no tucupi e caruru. Também é utilizado na medicina popular em tratamento de dores de dente e garganta, tuberculose, anemia, problemas hepáticos, contra a tosse e como estimulante do apetite.[3]

O espilantol (**1**, **Figura 1**) é uma *N*-alquilamida, presente na *Spilanthes acmella* e em algumas outras árvores ao redor do mundo das famílias *Asteraceae*, *Solanaceae* e *Piperaceae*, sendo considerado o principal responsável pelas atividades biológicas.do extrato dessas plantas.[4, 5]



1 N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida

Figura 1. Estrutura do espilantol (**1**).

1.1.1. Elucidação Estrutural do Espilantol

Em 1903, Gerber[6] nomeou de espilantol o principal componente do extrato bruto da *Spilanthes acmella*. Em 1927, Asano e Kanematsu[7] alegaram ter isolado o espilantol pela primeira vez, determinaram sua estrutura como sendo *N*-isobutil-4,6-decadienamida (**2**, **Figura 2**). Em 1945, um composto denominado afinina foi isolado da espécie *Heliopsis longipes*[8] por Haller e colaboradores[9] e sua estrutura foi atribuída como *N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida (**3**). Em 1954, Jacobson[10] sintetizou o composto *N*-isobutil-2*E*,6*E*,8*E*-decatrienamida (**4**) e , concluiu que aquele que possui

todas as ligações com geometria *E* não se trata da afinina. O mesmo pesquisador,[11] em 1957, estudando a afinina e o espilantol, verificou que na realidade, são o mesmo composto e ambos possuem a estrutura *N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida. Além disso, concluiu que o dieno deveria possuir geometria *E*/*Z* ou *Z*/*E* (**5**). Apenas em 1963, quando Manzoor-i-Khuda[12] e colaboradores sintetizaram pela primeira vez a (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-decatrienamida (**1**) foi possível comprovar a estrutura do espilantol (**1**).

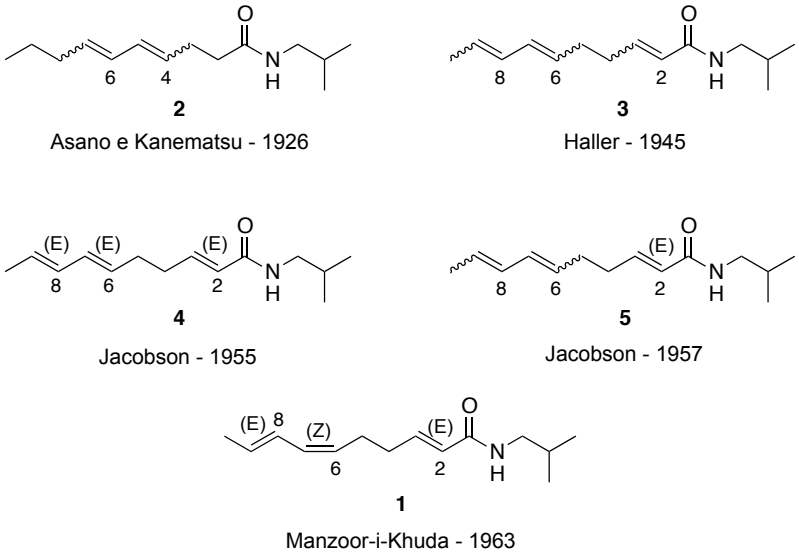


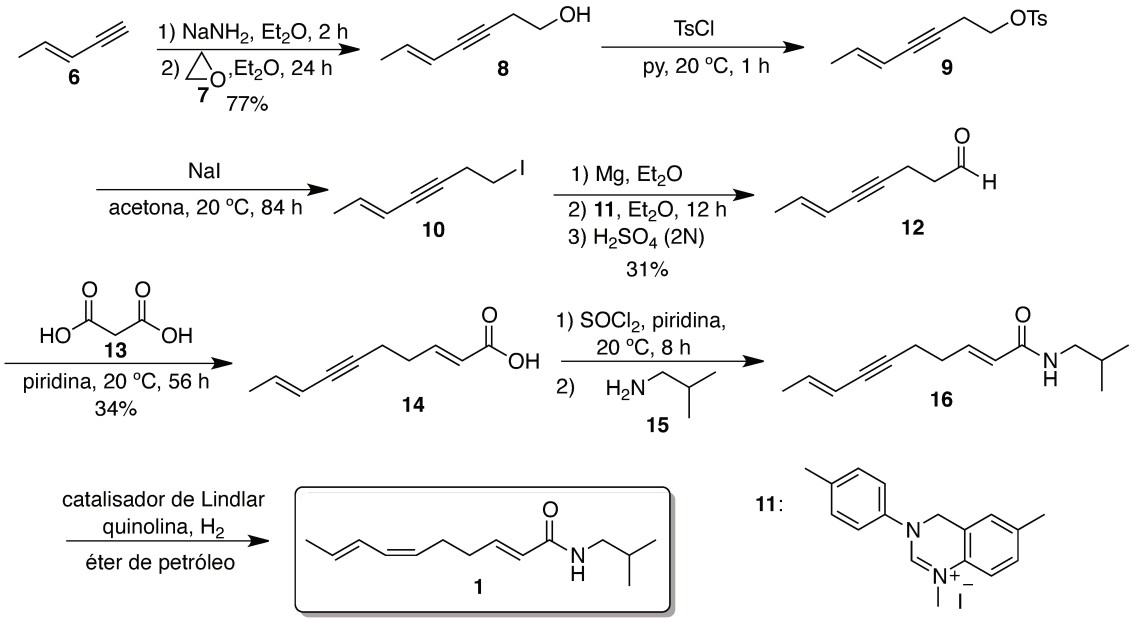
Figura 2. Estruturas propostas para o espilantol (**1**).

1.1.2. Sínteses Descritas

A síntese descrita por Manzoor-i-Khuda e colaboradores[12] possui 11 etapas, porém o rendimento de algumas etapas não é reportado, assim não é possível determinar o rendimento global desta síntese. A pureza do espilantol obtido também não foi descrita.

A rota sintética foi iniciada pelo enino **6**, que uma vez desprotonado, abre o epóxido **7** para obter o álcool **8** em 77% de rendimento. Em seguida, o álcool **8** foi transformado no tosilato **9**, para então, realizar uma substituição a fim de gerar o iodeto **10**. Em seguida, é formado o reagente de Grignard para reação de adição com o composto **11**, após tratamento ácido foi obtido o aldeído **12** em 31% de rendimento. O composto **12** reagiu com o ácido malônico para a formação do ácido carboxílico **14**, que então foi transformado para a *N*-alquilamida **16**. Por fim, o

espilantol foi obtido por meio de uma semi-redução *Z*-seletiva utilizando o catalisador de Lindlar (**Esquema 1**).

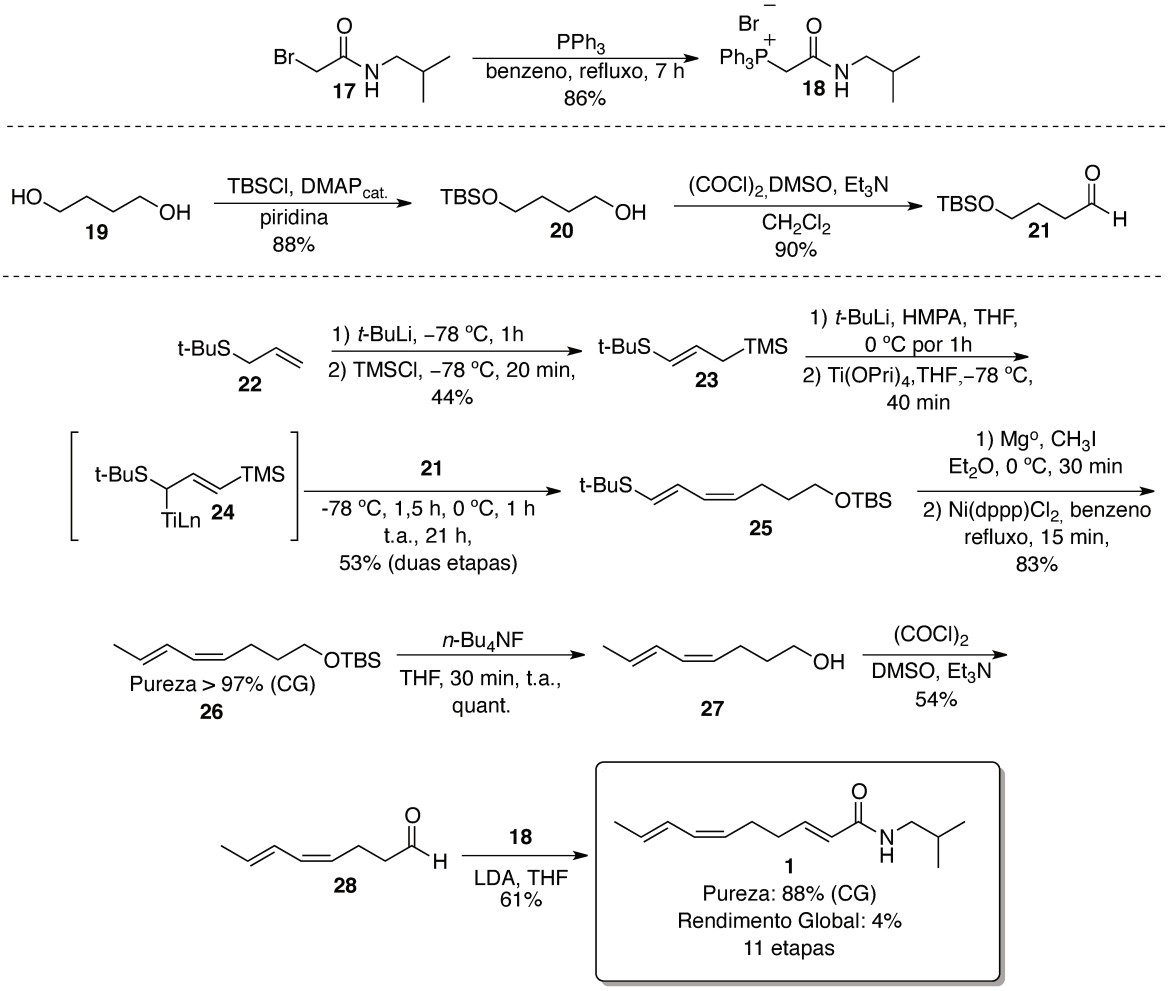


Esquema 1. Rota sintética desenvolvida por Manzoor-i-Khuda e colaboradores.[12]

Em 1984, Yamamoto e colaboradores[13] relataram a síntese do espilantol em 11 etapas, baixo rendimento (4%) e obtendo um produto com apenas 88% de pureza (**Esquema 2**).

A síntese se inicia a partir da obtenção do aldeído **21** por meio de uma reação de monoproteção do diol **19** seguido de uma oxidação de Swern. O composto **23** foi obtido pela desprotonação do sulfeto de alila **22** com *t*-BuLi, seguido da reação com TMSCl. Este composto foi desprotonado e então, reagiu com propóxido de titânio levando ao intermediário **24**. Por fim, foi realizada uma reação entre o intermediário **24** e o aldeído **21** para obter o dieno **25**.

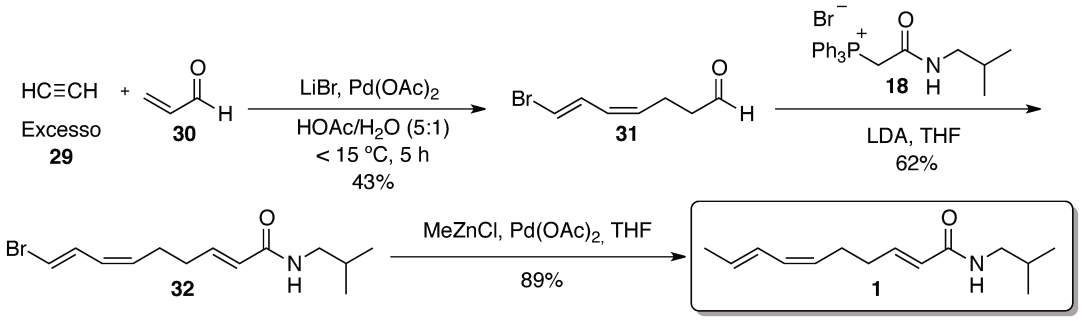
O grupo *t*-BuS foi substituído por uma metila com o iodeto de metilmagnésio na presença de Ni(dppp)Cl_2 em 83% de rendimento. O composto **28** foi obtido após a desproteção do composto **26** seguido de uma oxidação de Swern. Por fim, foi feita uma reação de Wittig entre o sal **18** e aldéido **28** para levar a formação do espilantol (**1**).



Esquema 2. Rota sintética desenvolvida por Yamamoto e colaboradores.[13]

O último artigo que reporta a síntese do espilantol foi publicado em 1998 por Zhang e colaboradores[14] (**Esquema 3**). A rota proposta possui apenas 3 etapas e 24% de rendimento global, porém, os autores não relatam a seletividade obtida para as ligações duplas formadas e a pureza do composto final. A síntese do sal de fosfônio **18** também não é relatada. Por fim, há a necessidade de utilizar grandes quantidades de acetileno, gás altamente inflamável.

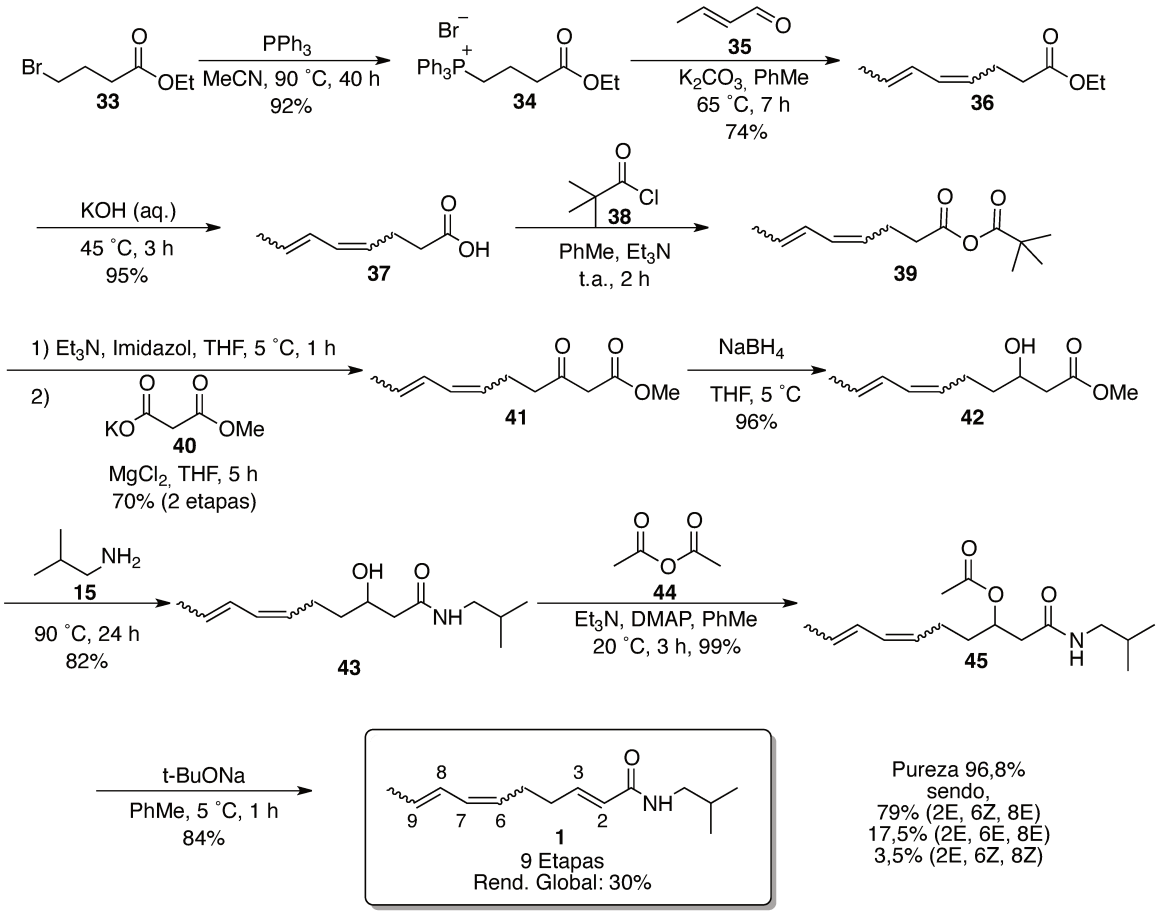
O composto **31** foi obtido por meio da reação entre a acroleína (**30**) e o acetileno (**29**) na presença de brometo de lítio e acetato de paládio (II). Em seguida, foi realizada uma reação de Wittig com o sal **18** para a obtenção do *N*-alquilamida **32** em 62% de rendimento. Por fim, o brometo foi substituído por uma metila em uma reação de Negishi, levando ao espilantol (**1**) em 89% de rendimento.



Esquema 3. Rota sintética desenvolvida por Zhang e colaboradores.[14]

Mais recentemente, uma série de patentes da síntese do espilantol foi depositada pela Takasago International Corporation entre 2009 e 2012.[15] A rota descrita na patente de 2012 (**Esquema 4**) leva à síntese do espilantol em nove etapas com 30% de rendimento global, obtendo um produto com pureza de 97%. Porém, este produto é composto de 3 isômeros, sendo apenas 79% de espilantol (**1**).

A rota se baseia em reações conhecidas e bem estabelecidas. Primeiramente, ocorre uma reação de Wittig entre o crotonaldeído (**35**) e o sal **34**, obtido por meio da reação entre o brometo **33** e PPh_3, formando o éster **36**. Este último foi submetido a hidrólise para formar o ácido carboxílico **37**, que foi utilizado para obtenção do composto **39** por meio de um acoplamento com o cloreto de ácido **38**. O anidrido misto **39** foi primeiramente ativado com imidazol, formando uma espécie mais reativa. Esta reagiu com o derivado do ácido malônico **40** e, por fim o intermediário desta reação sofre uma descarboxilação para fornecer o produto **41.** Em seguida, a cetona do fragmento **41** foi reduzida com $NaBH_4$ para formar o intermediário **42**. Este composto foi submetido a uma reação de acoplamento com a isobutilamida **15** para formar a *N*-alquilamida **43**. O produto desta reação foi submetido a um protocolo de acetilação com anidrido acético para então passar por uma reação de eliminação e formar o produto final desejado (**1**).



Esquema 4. Rota sintética desenvolvida por Takasago International Corporation em 2012.[15]

Por ser utilizado em diversas áreas e de grande dificuldade de isolamento, esse composto tem um valor comercial elevado, 1 g custa em torno de 28.000,00 dólares com pureza de 80%, sendo os outros 20% isômeros.[16] Deste modo, a síntese orgânica mostra-se como uma boa alternativa para produzir o espilantol (**1**) de forma mais barata e também para avaliação das atividades biológicas de seus análogos.

1.1.3. Atividades Biológicas do Extrato

A maioria dos estudos para avaliação de atividades biológicas do espilantol (**1**) foi realizado com o extrato bruto das plantas que o contém. Apesar de ser o principal constituinte, a presença de outros compostos pode gerar respostas que não são, necessariamente devidas ao espilantol, podendo haver também um sinergismo

entre os compostos presentes no extrato. As atividades mais comumente relatadas são: antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante, diurética, antifúngica, antimalarial, bacteriostática e atividade larvicida contra mosquitos, como o *Aedes aegypti*.[17]

As atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato de jambu foram investigadas por meio de diversos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Chakraborty e colaboradores [18] avaliaram o potencial anti-inflamatório utilizando os modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina, teste de retirada de cauda (*tail flick*) e o modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético. Em todos os modelos foi observado um efeito dose-dependente.

Werner e colaboradores [19] estudaram o efeito antinociceptivo do extrato etanólico das flores de jambu em camundongos. Foi injetado formalina a fim de verificar a atividade antinociceptiva na fase neurogênica (0 – 5 min após a injeção) e anti-inflamatória (15 a 30 min após a injeção). Foi injetado também capsaicina e cinamaldeído a fim de verificar o efeito nociceptivo provocado por ação nos receptores de calor (TRPV1) e frio (TRPA1), respectivamente. Em todos os modelos testados foi observada uma redução na nocicepção.

Recentemente foram publicados dois estudos relacionados ao tratamento de câncer com extrato de jambu. Soares e colaboradores[3] relataram a citotoxicidade do extrato hidroetanólico e o seu efeito no citoesqueleto de actina da célula tumoral. O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em células HEp-2 revelou citotoxicidade, o que foi confirmado pelo IC_{50} (concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular) de 513 $\mu g.mL^{-1}$. O arranjo do citoesqueleto de actina das células de HEp2 mostrou despolimerização dos filamentos, causando perda de morfologia e consequentemente comprometendo a adesão celular. Saha e colaboradores[20] observaram efeito antiproliferativo em células de hepatocarcinoma (Huh-7) tratadas com extrato de jambu.

Dixit e colaboradores estudaram o efeito do extrato etanólico das flores de *Spilanthes acmella* no comportamento sexual de ratos. Foi observado que os níveis do hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e da testosterona em ratos se elevaram após tratamento com o extrato, corroborando com a crença de que o Jambu age como um agente estimulante sexual.[21]

Adicionalmente, o extrato de jambu é utilizado também na indústria alimentícia como flavorizante em diversos produtos, tais como sopas, vegetais processados, condimentos, goma de mascar e em dentifrícios.[22]

Na indústria de cosméticos, o extrato de jambu é comparado à toxina botulínica devido ao seu efeito antirrugas, porém de aplicação tópica, sem a necessidade de injeção.[23] É possível encontrar diversas formulações contendo extrato de jambu, como o Chronos® Spilol da Natura, o Gatuline® In Tense e o Gatuline® Expression da indústria francesa Gattefosse, que possui uma patente de antirrugas tópico a base de espilantol.[24]

1.1.4. Atividades Biológicas do Espilantol Isolado

Existem algumas atividades relatadas para o composto isolado. Em todos os casos, o composto foi extraído da planta e sua pureza varia de acordo com o processo de extração utilizado.

Wu e colaboradores[25] avaliaram a atividade anti-inflamatória e isolaram o espilantol por meio de uma abordagem guiada por bioatividade da seguinte forma: primeiramente foi obtido o extrato etanólico seguido de partição líquido/líquido com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Em seguida, foi avaliado o efeito inibitório de cada um dos extratos sobre a produção de óxido nítrico, por meio de testes *in vitro* com macrófagos RAW 264,7. O extrato em clorofórmio apresentou a maior atividade sendo então separado em nove frações por cromatografia em sílica. Cada fração foi sujeita ao mesmo teste *in vitro*. O espilantol foi isolado a partir da fração que apresentou maior atividade. Estudos adicionais foram realizados com o espilantol obtido para investigação do seu potencial biológico. Observou-se que o espilantol possui um efeito inibitório sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico, ciclo-oxigenase-2 (COX-2), interleucina-1β, interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Os autores sugeriram que o efeito supressor deve-se, em parte, a uma diminuição na ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) provocada pelo espilantol, uma vez que esse fator está associado à expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios.

Rios e colaboradores[26] isolaram o espilantol e o atribuíram como responsável pela atividade analgésica utilizando também uma abordagem guiada por bioatividade. O extrato bruto foi submetido a cromatografia e as 6 frações obtidas foram submetidas a um teste para observar o aumento na liberação do ácido γ-aminobutírico (GABA) no cérebro de camundongos. As frações ativas, em que houve aumento significativo, foram purificadas por cromatografia e os compostos presentes em cada uma delas foram identificados. O espilantol foi o único composto presente em todas as frações ativas e o único que, após isolado, apresentou atividade analgésica.

Spelman e colaboradores[27] reportaram em 2011 a atividade antimalárica do espilantol isolado por extração. No entanto, esse material não estava puro, possuía 84% de espilantol, 13% referente a isômeros e 2% referente à outra *N*-alquilamida identificada como deca- 2*E*,6*Z*,8*E*-ácido trienenoico 2-metilbutilamida. A atividade do extrato também foi avaliada, e constatou-se que o extrato aquoso é mais potente quando comparado ao etanólico.

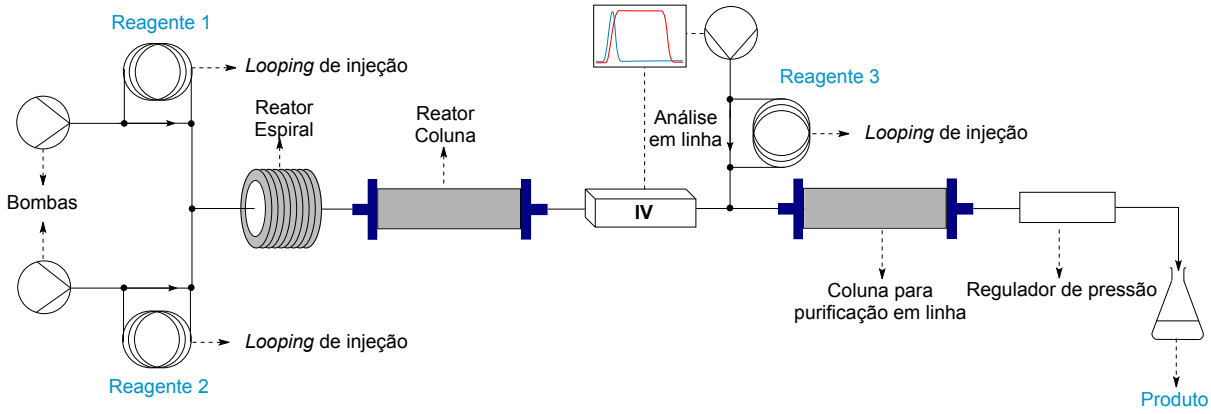
1.2. Fluxo Contínuo

A síntese orgânica evoluiu muito durante o último século, já os materiais e equipamentos usados nos laboratórios químicos não evoluíram tão rapidamente. Tradicionalmente é utilizado o método de batelada, que torna o processo de síntese manual, requerendo mão de obra altamente qualificada e uma grande demanda de tempo.[28] Além disso, uma das principais dificuldades da reação em batelada é o aumento de escala, devido à diminuição na eficiência da mistura e troca de calor resultando, normalmente, em menores rendimentos e seletividades.[29]

A reação em fluxo contínuo traz diversas vantagens em relação à reação em batelada, automatiza tarefas rotineiras integrando várias etapas em um único processo, economizando tempo, espaço e melhorando a segurança. Por outro lado, nesse tipo de reação não é possível trabalhar com suspensões ou reações que levem a formação de intermediários ou produtos sólidos.[29,30]

Um resumo geral de reação em fluxo é mostrado **Esquema 5**. Uma bomba (peristáltica ou pistão) é utilizada para bombear os reagentes, diretamente ou utilizando *loopings* de injeção, com volume definido, ideal para bombear substâncias

de difícil obtenção ou com elevado custo. Os reagentes são misturados e seguem para um reator, onde ocorre a reação. Diversos parâmetros podem ser precisamente controlados durante a reação, como temperatura, pressão e tempo reacional. O tempo de residência da mistura reacional depende da velocidade que os reagentes são bombeados (vazão) e do comprimento do reator. O reator pode ser em espiral, ou uma coluna contendo reagentes ou catalisadores suportados. Na saída do reator é possível acoplar sistemas de análise em linha, de purificação ou até efetuar uma nova etapa sem isolamento dos intermediários. Ao final é colocado um regulador de pressão para controlar a pressão interna do sistema e então, o produto é obtido em uma corrente contínua.



Esquema 5. Configuração representativa e componentes para reações em fluxo contínuo.

Atualmente, existem muitas opções comerciais de equipamentos e dispositivos para reações em fluxo em escala de laboratório, que dependem da natureza dos reagentes, das condições e etapas da reação e das possíveis formas de análise e tratamento.

A síntese de produtos naturais estruturalmente complexos em fluxo contínuo tem sido relatada com sucesso na literatura.[31] Um bom exemplo é a síntese da grossamida, primeiro produto natural sintetizado totalmente em modo contínuo, por Ley e colaboradores em 2005 (**Figura 3**).[32]

O grupo do Prof. Ley relatou a síntese em fluxo contínuo do alcaloide (±)-oxomaritidina.[33] A principal inovação deste trabalho foi a utilização de métodos de purificação em linha. Com a integração das reações e purificações, a rota sintética

otimizada levou apenas 5 horas em modo contínuo, enquanto em batelada, demorou 4 dias.

As sínteses de modo contínuo da (+)-dumetorina [34] e de quinolonas sinalizadoras de *Pseudomonas* (PQS),[35] também foram relatadas com sucesso. Estes exemplos ilustram o grande potencial da química em fluxo para a preparação de moléculas estruturalmente complexas.

A síntese dos produtos naturais (−)-peridroistrionicotoxina, [36] *O*-metilsifonazol,[37] pauciflorol A[38] e (−)-henoxazol[39] foram realizadas por meio de integração de processos em batelada com processos contínuos. Os reatores foram utilizados apenas quando existia uma vantagem significativa sobre a reação em batelada, facilitando a síntese multi gramas de intermediários chave empregados na síntese destas moléculas.

A síntese da artemisina, um produto natural de grande relevância pois trata-se do principal agente antimalárico,[40] foi relatada utilizando um método simples, barato e adequado para o escalonamento por meio de micro reatores contínuos.

Recentemente, a síntese total do espirodienal A em fluxo contínuo e a síntese biomimética da isoborreverine partindo de um produto natural mais simples, foram relatadas pelo grupo do Prof. Ley.[41,42]

Estes exemplos demonstram que o uso de reatores contínuos em escala laboratorial pode facilitar a síntese total de produtos naturais, integrando etapas em um processo único e empregando um alto nível de automação, bem como diminuindo esforços relacionados com protocolos de *work-up* e purificação.

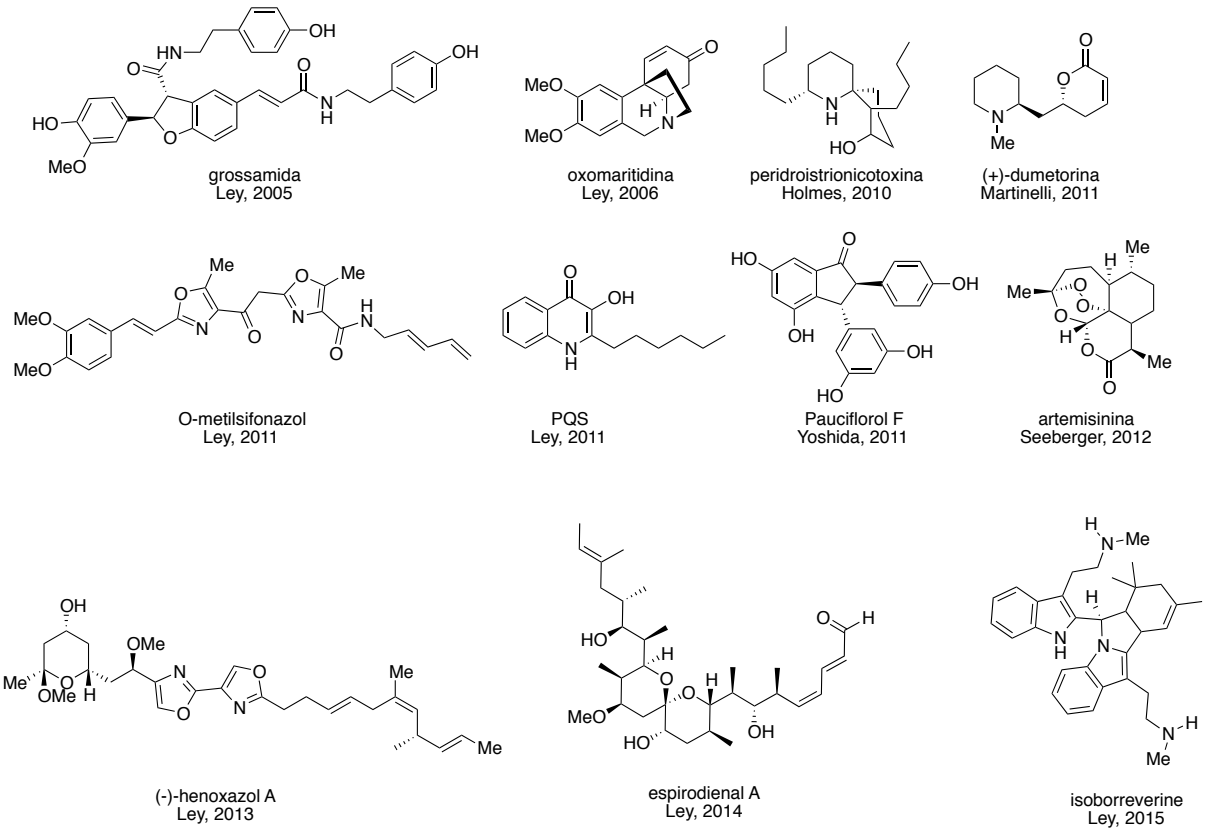


Figura 3. Produtos naturais preparados em fluxo contínuo.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma nova rota sintética para o espilantol (**1**) a fim de obter uma síntese potencialmente mais curta, barata e eficiente, levando a um produto final de maior pureza quando comparado com as rotas presentes na literatura. Com o mesmo objetivo, pretende-se estudar a reação de Sonogashira, etapa-chave da rota, em condição de fluxo contínuo.

Pretende-se ainda, estudar atividades biológicas do composto **1**, em especial a atividade antinociceptiva, uma vez que a maioria dos trabalhos relatam as atividades do extrato bruto que o contém. Além disso, pretende-se sintetizar uma série de análogos e estudar a atividade antinociceptiva a fim de obter informações acerca da relação estrutura-atividade dessa série de compostos e na tentativa de encontrar um análogo com estrutura mais simples e com atividade potencializada.

3. Resultados e Discussão

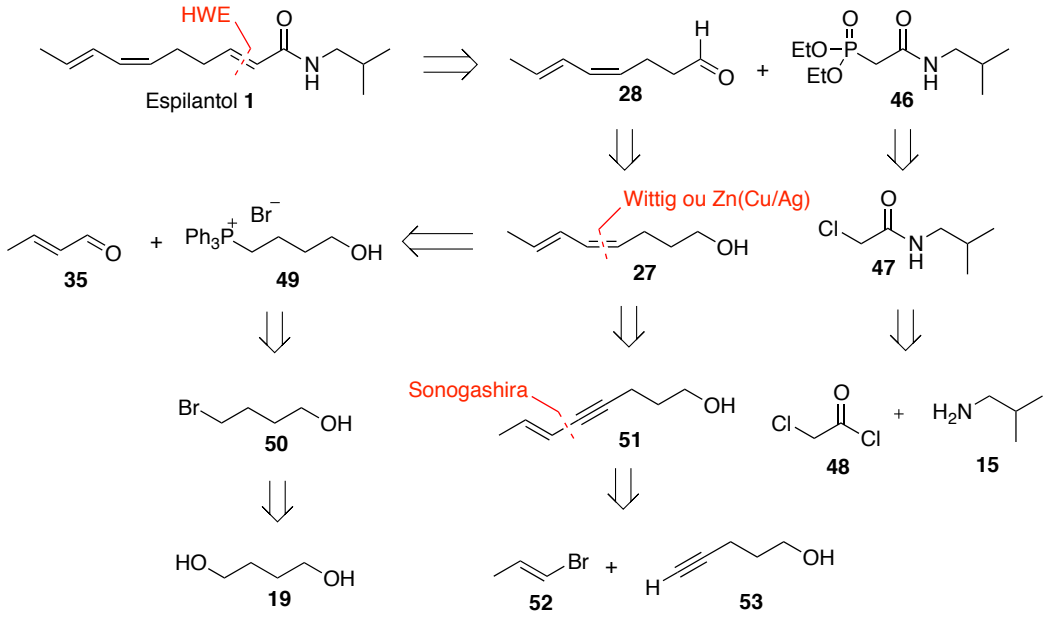
3.1. Síntese do Espilantol em Batelada

3.1.1. Análise Retrossintética

A síntese do espilantol (**1**) foi planejada através de uma rota convergente, conforme descrito no **Esquema 6**. O sistema amida α,β-insaturado seria construído por uma reação de Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) entre o aldeído **28** e o éster fosfonato **46**. Para a construção da porção diênica (*E*,*Z*) foram propostas duas alternativas: uma baseada na reação de Wittig entre o crotonaldeído (**35**) e o sal de fosfônio **49**. Esse sal poderia ser obtido por meio de uma reação entre trifenilfosfina e o brometo **50**. Apesar do composto **50** ser comercial, ele pode ser obtido por meio de uma reação de monobromação do diol **19**.

A outra alternativa proposta para a síntese do dieno se baseia na reação de Sonogashira entre o brometo de vinila **52** e o alcino **53**, seguida de uma semi-redução *Z*-seletiva do composto **51**.

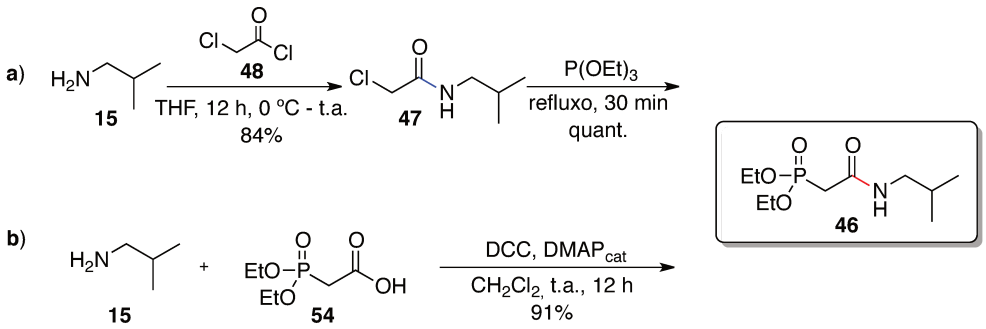
A síntese do éster fosfonato **46** foi descrita por Landor e colaboradores,[43] onde o composto **46** seria obtido por meio de uma reação de Michaelis-Arbuzov utilizando trietilfosfito e a amida **47** , que seria obtida por meio de uma reação de acoplamente entre o cloreto de cloroacetila (**48**) e a isobutilamina (**15**).



Esquema 6. Análise retrossintética para o espilantol (**1**).

3.1.2. Síntese do Éster Fosfonato

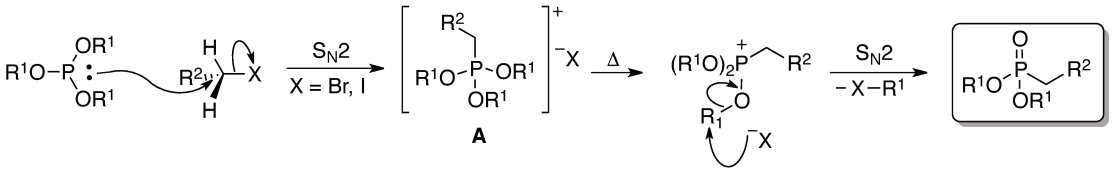
A síntese do espilantol (**1**) foi iniciada pela obtenção do fragmento éster fosfonato **46**, que contém a funcionalidade *N*-isobutilamida. A primeira estratégia utilizada foi de acordo com o reportado por Landor e colaboradores em 1977.[43] Primeiramente, foi realizada uma reação para a formação da amida **47**, utilizando cloreto de cloroacetila (**48**) e isobutilamina (**15**), com rendimento de 84%, seguida de uma reação de Michaelis-Arbuzov com trietilfosfito formando o fosfonato **46** quantitativamente (**Esquema 7a**).



Esquema 7. Síntese do fragmento **46.**

O mecanismo da reação de Michaelis-Arbuzov está descrito no **Esquema 8**.[44] Inicialmente ocorre um ataque nucleofílico do fosfito (S_N2) no haleto de alquila, obtendo o sal de fosfônio **A**. Esse sal é instável e sob aquecimento sofre uma clivagem da ligação C-O por meio de uma segunda reação de S_N2, o íon haleto liberado na primeira etapa age como nucleófilo atacando um grupo alquila (R^1), levando a formação do éster fosfonato.

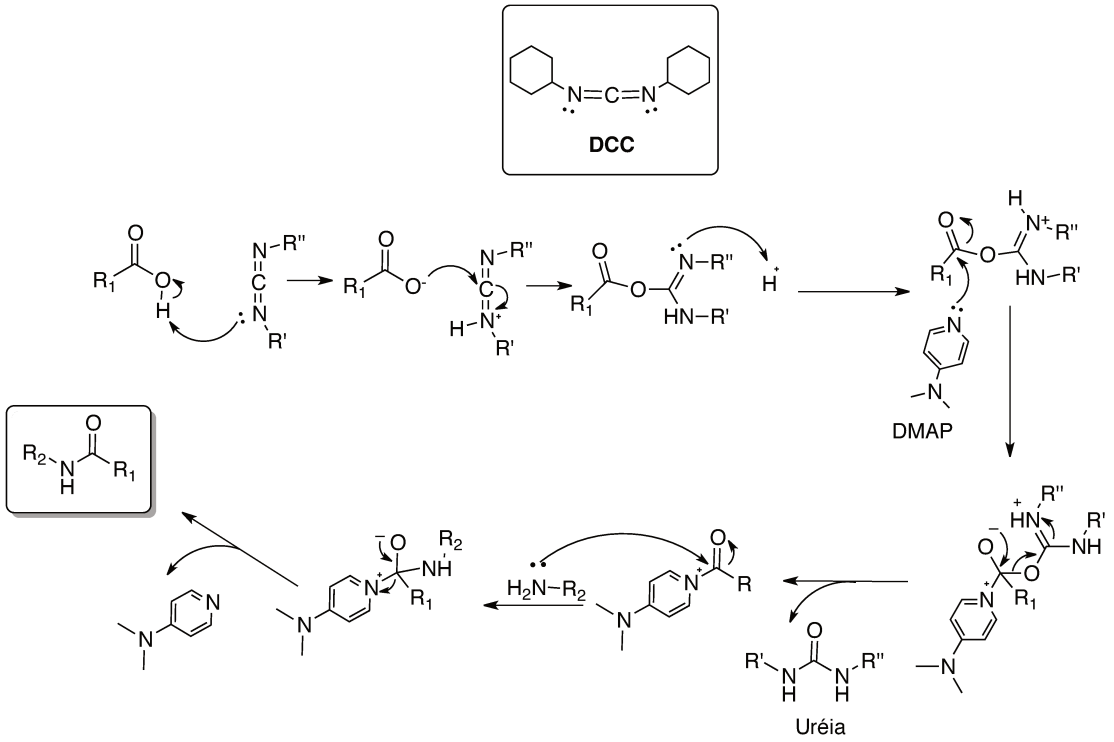
Primeiramente o sal de fosfonio A é formado por meio de uma reação de S_N2 entre o fosfito e o haleto de alquila. Este sal pode sofrer decomposição quando aquecido, o contra-ion do sal (neste caso o brometo) pode atacar o grupo alquila R^1 e levar à formação do ester fosfonato.



Esquema 8. Mecanismo proposto para a reação de Michaelis-Arbuzov. [44]

Uma segunda condição explorada se baseia no acoplamento da isobutilamina (**15**) e o ácido carboxílico comercial **54** utilizando DCC e DMAP catalítico, de maneira similar ao descrito por Barradas e colaboradores (**Esquema 7b**).[45]

O mecanismo para a reação utilizada nessa abordagem está descrito no **Esquema 9**. [46] Inicialmente ocorre uma ativação do ácido carboxílico pela carbodiimida. O DMAP é utilizado a fim de acelerar a reação, por meio da formação do íon acilpiridínio, tornando a carbonila ainda mais eletrofílica, que em seguida sofre, um ataque nucleofílico pela amina gerando a amida desejada.



Esquema 9. Mecanismo proposto para a reação de acoplamento com DCC e DMAP catalítico.[46]

A segunda abordagem foi escolhida para a continuação da síntese, uma vez que leva a formação da fosfonoacetamida **46** em apenas uma etapa e com 91% de

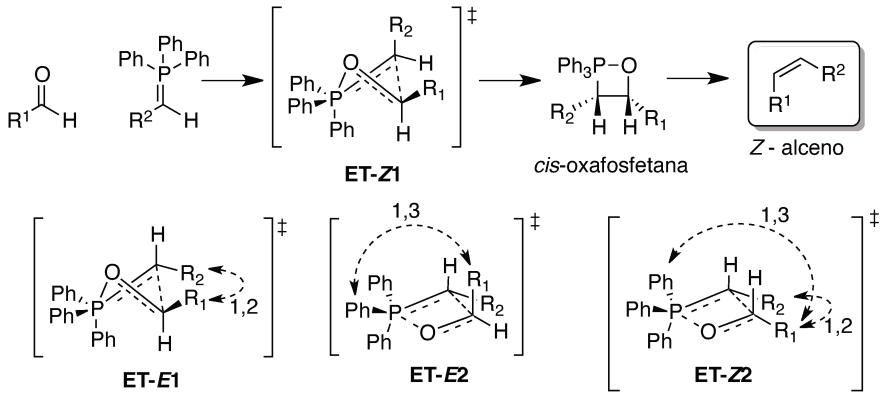
rendimento, e não utiliza trietilfosfito, um reagente tóxico, controlado e de difícil acesso.

3.1.3. Síntese do Espilantol - Primeira Abordagem

3.1.3.1. Mecanismo da Reação de Wittig

Para a síntese da porção diênica, foi estudada inicialmente uma rota baseada na reação de Wittig, que é amplamente utilizada para a síntese de alcenos e dienos.

A reação ocorre entre um ilídeo de fósforo, normalmente gerado *in situ*, a partir da desprotonação de um sal de fosfônio por uma base forte. O ilídeo formado reage com um composto carbonilado formando uma ligação dupla. A estereoquímica dessa nova ligação (*E* ou *Z*), depende principalmente dos substituintes ligados ao ilídio de fósforo. Os ilídeos de fósforo não-estabilizados fornecem majoritariamente olefinas com geometria *Z*, enquanto os ilídeos de fósforo estabilizados fornecem olefinas com geometria *E* como principais produtos. O **Esquema 10** ilustra o mecanismo aceito atualmente para a reação de Wittig com ilídeos não estabilizados e aldeídos.[46]



Esquema 10. Mecanismo proposto para a reação de Wittig entre um ilídeo não estabilizado e um aldeído.[46]

Nas reações com ilídeos não-estabilizados, de acordo com o mecanismo aceito atualmente, a oxafosfetana é o único intermediário formado e sua formação é irreversível. Sua decomposição é estereoespecífica, dessa forma, a *cis*-oxafosfetana

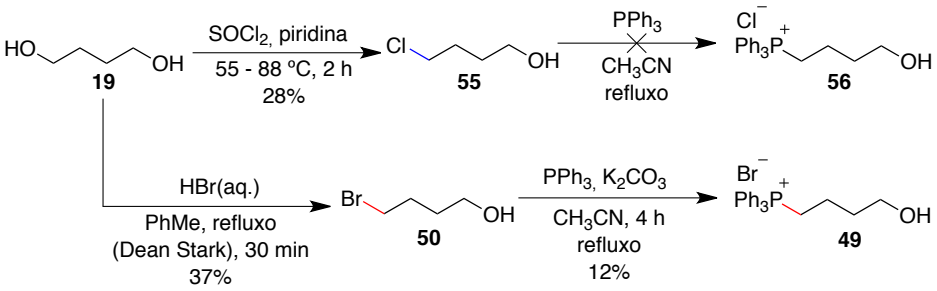
leva a formação do alceno com geometria *Z*. A explicação da formação preferencial dessa geometria está nas interações desfavoráveis que podem ocorrer nos estados de transição na formação da oxafosfetana. Para a formação da *cis*-oxafosfetana, o estado de transição planar (**ET-*Z*2**) é desestabilizado pelas interações 1,3 e 1,2 (**Esquema 10**). Quando o anel é torcido (**ET-*Z*1**) essas interações são minimizadas, sendo este um estado de transição menos energético e portanto, favorável cineticamente. Há a possibilidade de dois estados de transição que levam a *trans*-oxafosfetana, o planar (**ET-*E*2**), que também possui interação 1,3, e o anel torcido (**ET-*E*1**), que neste caso possui uma interação 1,2 entre os substituintes do ilídio e do aldeído. Existem dúvidas sobre qual dos dois estados de transição seria mais energético, porém, ambos são mais energéticos que o **ET-*Z*1**, que leva à formação seletiva do alceno *Z*.[46, 47]

3.1.3.2. Síntese do Sal de Fosfônio 49

A rota foi iniciada com a obtenção do sal de fosfônio **49**, por meio de uma mono-halogenação do 1,4-butanodiol (**19**), seguida de uma reação de substituição com trifenilfosfina. Em uma abordagem inicial, a halogenação foi feita com cloreto de tionila, obtendo o composto **55** em 28% de rendimento, porém não foi possível observar a formação do sal correspondente **56** (**Esquema 11**).

Decidiu-se então, fazer uma monobromação do diol **36**, uma vez que brometo seria um melhor grupo de saída que cloreto. A monobromação do álcool foi realizada com 37% de rendimento, seguindo o procedimento descrito por Stocker e colaboradores,[48] que consiste no aquecimento de **19** com ácido bromídrico em tolueno utilizando sistema de Dean-Stark. O baixo rendimento de **50** foi resultado da continuidade da reação, levando ao produto de dibromação, sendo este detectado mas não quantificado. Em seguida, foi feita a substituição do bromo pela trifenilfosfina para a formação do sal de fosfônio **49**, seguindo a metodologia descrita por Maryanoff e colaboradores,[49] obtendo-se 12% de rendimento (**Esquema 11**). Segundo os autores, a presença de carbonato de potássio diminui a formação do sal de bisfosfônio, no entanto, reportam que sua formação ainda ocorre sendo atribuído como o principal responsável pelo baixo rendimento. A formação do sal **49** foi

confirmada pelo espectro de RMN de ^{1}H (**Anexo 9**) e de ^{13}C (**Anexo 10**), os sinais duplicados ocorrem devido ao acoplamento com o fósforo.

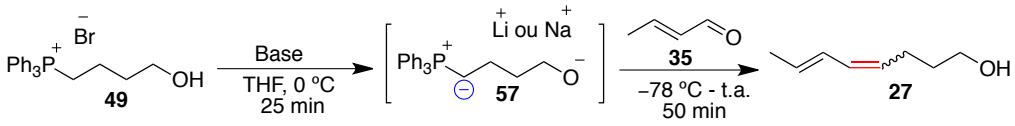


Esquema 11. Síntese do sal de fosfônio **49**.

3.1.3.3. Reação de Wittig com o Sal de Fosfônio 49

Apesar dos baixos rendimentos para formação do sal de fosfônio **49**, foram realizados testes iniciais da reação de Wittig com crotonaldeído (**35**), como reportado na **Tabela 1**. Diversos parâmetros reacionais podem ser modificados, como a base utilizada, as temperaturas de adição do aldeído, da base e o tempo reacional. A reação é sensível a essas mudanças. Os testes iniciais avaliaram o uso de algumas bases, obtendo uma variação de rendimento entre 5% a 49%. A seletividade também se mostrou sensível a alteração da base, com um máximo de 58% do isômero *Z* desejado (entrada 1). Os maiores rendimentos foram obtidos com bases de lítio, porém com essas bases, a seletividade é a inversa a desejada, obtendo uma maior proporção do isômero *E* (entrada 2 e 3). O mecanismo da reação de Wittig na presença de lítio ainda não totalmente estabelecido, porém em reações com excesso desse cátion é observada uma inversão na seletividade da reação obtendo uma maior formação do isômero *E*.[47] Essa inversão pôde ser observada nas reações em que foram empregadas bases de lítio (entradas 2 e 3), já que é necessário usar dois equivalentes de base para formação do ilídeo.

Tabela 1. Reações de Wittig utilizando o sal de fosfônio **49.**



Entrada	Base	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	NaHMDS	20	42:58
2	LiHMDS	49	63:37
3	*n*-BuLi	25	58:42
4	LDA	5	N/D

[a]Rendimento isolado. [b]Determinado por CG/EM. N/D = Não determinada.

Os isômeros foram quantificados por CG/EM, e o isômero majoritário foi determinado por RMN de ^{1}H do bruto reacional. DeVoss e colaboradores [50] reportaram a síntese o octa-4-(*E*),6-(*E*)-dien-1-ol (**27a**) e seus respectivos deslocamentos no espectro de RMN de ^{1}H. Os deslocamentos do octa-4-(*Z*),6-(*E*)-dien-1-ol (**27b**) foram reportados por Hansen e colaboradores.[51] Com esses dados foi possível determinar duas regiões onde os picos dos diastereoisômeros não se sobrepõem (destaque na **Figura 4**).

A região destacada entre 2,1-2,3 ppm representa os dois hidrogênios na posição 3. É reportado na literatura que o isômero com geometria *Z* na ligação dupla entre as posições 4 e 5 (**27b**) possui deslocamento químico de 2,24 ppm e o isômero com geometria *E* (**27a**) possui deslocamento químico de 2,11 ppm. A outra região destacada é atribuída ao hidrogênio 7, e está de acordo com os dados da literatura. Por estes sinais pôde-se confirmar as seletividades *E*/*Z* obtidas. O espectro da parte superior representa a entrada 2 da Tabela 1, ou seja, a reação que emprega base de lítio. Observa-se que o pico em 2,11 ppm é maior que aquele em 2,24 ppm, indicando maior formação do produto com geometria *E.* Porém no espectro inferior, referente a entrada 1 da Tabela 1, se observa o oposto. Essas

diferenças de seletividades também foram observadas por CG/EM. A ligação dupla entre os carbonos 6 e 7 tem a estereoquímica definida como *E*, por ser proveniente do *trans*-crotonaldeído.

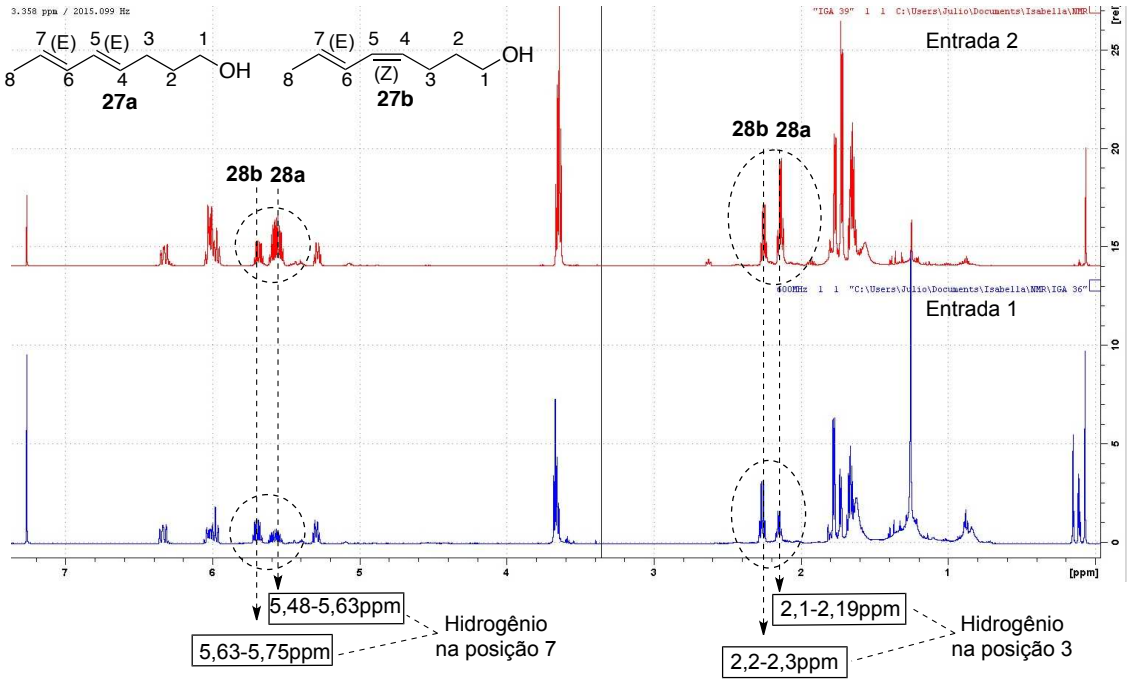


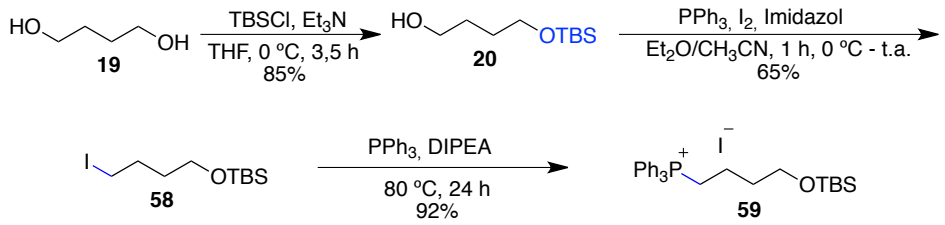
Figura 4. Exemplos de espectro de RMN de H^1 das reações de Wittig entre o crotonaldeído (**35**) e o composto **49** (600 MHz – $CDCl_3$).

Ainda seria necessário uma avaliação mais ampla das condições reacionais para aprimorar o rendimento e a seletividade. Porém, os baixos rendimentos nas etapas iniciais motivaram uma nova abordagem.

3.1.4. Síntese do Espilantol - Segunda Abordagem

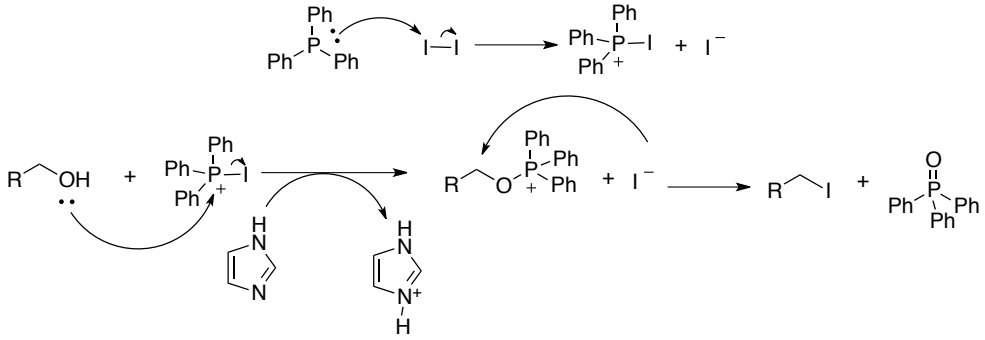
Conforme mencionado anteriormente, o grupo hidroxila terminal pode sofrer substituição nas duas primeiras etapas, levando a baixos rendimentos. Uma rota alternativa, foi a monoproteção do diol **19** com TBSCl, obtendo o produto desejado em 85% de rendimento. Em seguida foi realizada a reação de Appel[52] para substituir a hidroxila por iodo e enfim uma reação de substituição nucleofílica com trifenilfosfina para obter o sal de fosfônio **59**. A formação dos compostos **20**, **58** e **59** foi confirmada por meio do RMN de ^1H e ^{13}C (Anexo **13**-**18**), os singletos entre 0 e 1

ppm, típico das metilas do TBS estão presentes em todos os espectros. Foi realizado também um espectro de ^{31}P do sal **59**, que confirma a sua formação e pureza. Todas as etapas tiveram uma melhora significativa no rendimento, como mostrado no **Esquema 12**.



Esquema 12. Síntese do sal de fosfônio **59.**

O mecanismo da reação de Appel está descrito no **Esquema 13**.[52] Primeiro ocorre um ataque da trifenilfosfina ao iodo formando um sal de fosfônio e o iodeto. O sal é atacado pela hidroxila do álcool e forma outro sal. O iodeto liberado, ataca o carbono α-hidroxila (S_N2), formando o haleto de alquila e o óxido de trifenilfosfina.



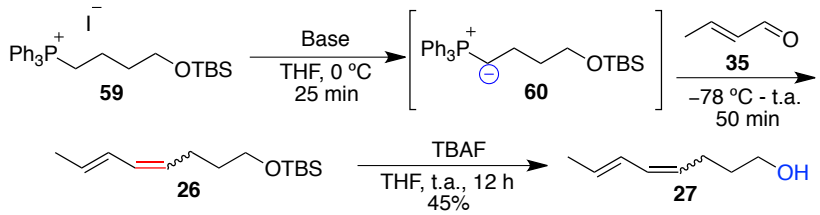
Esquema 13. Mecanismo proposto para a reação de Appel.[52]

Alguns testes da reação de Wittig com o sal protegido **59** e o crotonaldeído (**35**) foram realizados (**Tabela 2**). As reações com base de lítio (entradas 2 e 4) levaram a menores rendimentos e a uma seletividade menor para a ligação dupla formada, como foi observado nas entradas 2 e 3 da **Tabela 1**. Quando utilizada a base KHMDS (entrada 3) a seletividade melhora, porém o rendimento é moderado. A melhor condição obtida empregou NaHMDS como base (entrada 1), obtendo um rendimento de 84% e uma seletividade de 87:13 em favor do isômero *Z* desejado.

Em seguida foi realizada a desproteção da hidroxila com TBAF obtendo o álcool **27** em 45% de rendimento, mantendo a seletividade obtida anteriormente (87:13 *Z*/*E*).

A rota contendo o álcool protegido se mostrou mais promissora, porém necessita de duas etapas adicionais para a proteção e desproteção do álcool, tornando a síntese mais longa.

Tabela 2. Reações de Wittig utilizando o sal de fosfônio protegido **59.**



Entrada	Base	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*Z*/*E*)[b]
1	NaHMDS	84	87:13
2	LIHMDS	35	65:35
3	KHMDS	41	85:15
4	*n*-BuLi	19	69:31

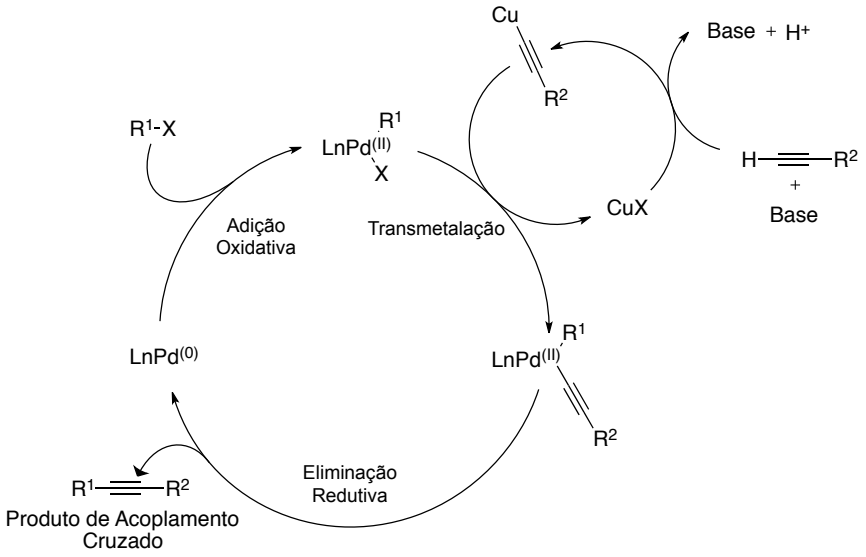
[a]Rendimento isolado. [b]Determinado por CG/EM.

3.1.5. Síntese do Espilantol – Terceira Abordagem

3.1.5.1. Mecanismo da Reação de Sonogashira

Outra abordagem sintética foi desenvolvida paralelamente. Para obtenção da porção diênica (*E*,*Z*) desejada foi estudada a reação de Sonogashira catalisada por paládio e cobre,[53] seguida de uma semi-redução diastereosseletiva da ligação tripla como proposto por Hansen.[51]

O acoplamento cruzado de Sonogashira é utilizado para formar uma ligação C-C entre um alcino terminal e um haleto de arila ou alquenila. Normalmente é catalisada por paládio e cobre, o mecanismo está detalhado no Esquema 14. [44]



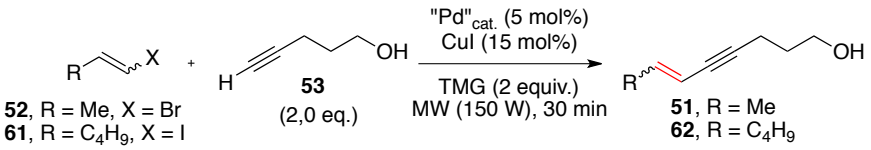
Esquema 14. Mecanismo proposto para a reação de Sonogashira.[44]

Inicialmente, ocorre uma adição oxidativa com o haleto de arila ou alquenila (R^1X) sobre a espécie de paládio (0). Paralelamente, a espécie de cobre (I) se complexa ao alcino, diminuindo o seu pKa, permitindo a desprotonação pela base, formando o acetileto de cobre. Em seguida, ocorre uma etapa de transmetalação, onde o alcino se liga ao paládio que libera um halogênio formando um sal de cobre (I). Por último, há uma etapa de eliminação redutiva que regenera o catalisador de paládio (0) e forma o produto de acoplamento cruzado.

3.1.5.2. Reação de Sonogashira

Diversos parâmetros podem ser alterados na reação de Sonogashira, como o catalisador e sua quantidade, a base, a temperatura, o tempo reacional e o solvente. O Prof. Dr. Julio Pastre, durante estágio na Universidade de Cambridge no grupo de pesquisas do Prof. Dr. Steven Ley, estudou brevemente o acoplamento de dois haletos de vinila (**53** e **63**) com pent-4-in-1-ol (**53**) catalisadas por paládio e cobre, em presença da base tetrametilguanidina (TMG), como descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Reações de Sonogashira realizadas pelo Prof. Julio Pastre.



52, R = Me, X = Br
61, R = C_4H_9, X = I

53
(2,0 eq.)

51, R = Me
62, R = C_4H_9

Entrada	Haleto de Vinila	Catalisador	Solvente	T (ºC)	Rendimento (%)[a]	Seletividade *E*/*Z*[b]
1	**63**	$Pd(PPh_3)_4$	DMF	100	89	>95:05
2	**63**	$PdCl_2(PPh_3)_2$	DMF	100	87	>95:05
3	**52**[c]	$Pd(PPh_3)_4$	DMF	120	77	92:07
4	**52**[c]	$PdCl_2(PPh_3)_2$	DMF	120	72	90:10
5	**52**[c]	$Pd(PPh_3)_4$	THF	100	96	90:10
6[d]	**52**	$Pd(PPh_3)_4$	THF	100	N/D	91:09
7[d]	**52**	$Pd(PPh_3)_4$	THF	100	N/D	96:04
8[d]	**52**	$Pd(PPh_3)_4$	THF	100	N/D	96:04
9[d]	**52**	$Pd(PPh_3)_4$	THF	100	N/D	>95:05

[a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^{1}H do bruto reacional. [c]Material de partida **52** na forma de uma mistura de isômeros (*E*/*Z* 77:23*)*. [d]Reações em quadruplicata. MW = Micro-ondas 150 W. N/D = Não determinado.

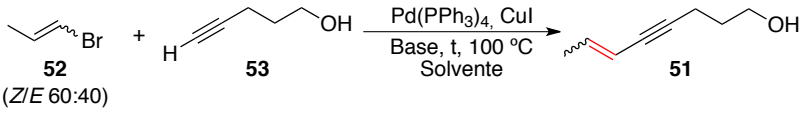
De acordo com os dados da **Tabela 3**, pode-se concluir que a mudança do catalisador não gerou alteração significativa no comportamento da reação. É interessante observar que partindo do brometo de vinila **52** com mistura de isômeros (*E*/*Z* 77:23), chegou-se a um produto com uma seletividade maior em direção ao isômero *E*, isso mostra que há uma isomerização gerando uma maior seletividade em direção ao composto desejado. Porém, também é interessante notar que mesmo quando utilizadas as mesmas condições (entradas 6 - 9) e partindo do material de partida com geometria *E*, houve variação nessa seletividade.

Os estudos iniciais foram baseados nesses resultados, porém, devido a falta do equipamento de microondas as reações foram realizadas em tubo selado, que também permite aquecer o solvente mais do que seu ponto de ebulição.

Outra mudança foi o emprego de uma mistura de isômeros de 60:40 *E*/*Z* (determinado por RMN de ^{1}H) do brometo de vinila **52**, por este ter um custo inferior em comparação com o alto preço do composto com proporção *E*/*Z* >95:05.[54]

Na reação estudada, foi formada uma ligação entre um carbono sp do pent-4-in-1-ol (**53**) e um carbono sp^2 do 1-bromoprop-1-eno (**52**), como mostrado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Reações de Sonogashira variando a base utilizada em tubo selado T = 100 ºC.



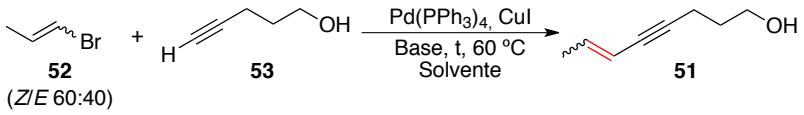
52 (*Z*/*E* 60:40) **53** **51**

Entrada	Base	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	K_2CO_3	DMF	15	77	42:58
2	Et_3N	DMF	15	18	92:08
3	DIPA	DMF	15	42	91:09
4	DIPA	DMF	3	44	81:19
5	Et_3N	DMF	6	64	77:23
6	NaOH	MeOH	15	21	>95:05

Condições: $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), 2 eq. base, 2 eq. do álcool **53**, 1 mmol do brometo de vinila **52**, 100 ºC, tubo selado. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional.

Os dados da **Tabela 4** mostram que a reação é sensível à mudança da base. A reação com o carbonato de potássio (entrada 1) levou ao maior rendimento, mas apresentou um leve excesso do isômero *Z*, configuração oposta à desejada. Já a reação com DIPA apresentou alta isomerização, formando excesso do isômero com ligação dupla de geometria *E*, em rendimento moderado (entradas 3 e 4). Trietilamina e hidróxido de sódio também geraram alta isomerização, porém em baixos rendimentos (entradas 2 e 6). O uso de trietilamina em um menor tempo reacional levou a um considerável aumento do rendimento porém com diminuição da isomerização (entrada 5). Condições de aquecimento vigoroso favoreceram a formação de produtos de reações laterais, diminuindo o rendimento da reação. Para verificar a necessidade de altas temperaturas, novos ensaios foram realizados a 60 ºC, mostrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Reações de Sonogashira variando a base utilizada em T = 60 ºC.



Entrada	Base	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	Cs_2CO_3	DMF	15	64	60:40
2	Cs_2CO_3	DMF	15	85	57:43
3[c]	DIPA	DMF	5	45	93:7
4	DIPA	DMF	15	72	61:39
5	Et_3N	DMF	15	19	85:15
6	Et_3N	DMF	15	39	88:12
7	K_2CO_3	DMF	15	55	57:43
8	K_2CO_3	DMF	15	65	45:55
9	Piperidina	DMF	15	63	60:40
10	Piperidina	DMF	15	98	54:46
11	TMG	DMF	15	25	>95:5
12	TMG	THF	2	75	82:18
13	NaOH	MeOH	4	56	93:7

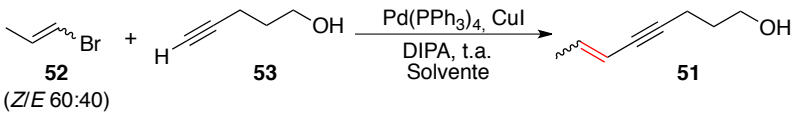
Condições: $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), 2 eq. base, 2 eq. Álcool **53**, 1 mmol do brometo de vinila **52**, DMF, 60 ºC. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional. [c] 1 equiv. do álcool **53** e 3 equiv. do brometo de vinila **52**.

O mesmo padrão reportado na **Tabela 4** é observado nos dados da **Tabela 5**. Algumas bases levaram a um alto rendimento, porém com baixa taxa de isomerização (**Tabela 4** – entrada 1 e **Tabela 5** – entradas 2 e 10), enquanto outras bases levaram à isomerização desejada, mas em rendimentos inferiores (**Tabela 4** – entrada 2 e 6 e **Tabela 5** – entradas 5, 6 e 11). Nas reações reportadas na **Tabela 5**, o brometo de vinila foi usado como reagente limitante, porém, por ser muito volátil, não foi possível acompanhar a reação por CCD ou por CG/EM dificultando a determinação do fim da reação. Frente a este fato, foram realizados dois testes utilizando o álcool **52** como reagente limitante (entradas 3 e 11), podendo assim, acompanhar a reação por CCD. Esses testes mostraram que entre 4 e 5 h houve conversão completa do material de partida e a maior taxa de isomerização, porém foram verificados rendimentos moderados.

As reações reportadas na **Tabela 5** foram realizadas em duplicata, com exceção das entradas 3, 4 e 11-13. Comparando as duplicatas, foi observada pouca variação na seletividade. No entanto, os rendimentos obtidos variaram consideravelmente. Isso pode ser justificado devido à perda do brometo de vinila **52** por evaporação, uma vez que seu ponto de ebulição (54 ºC) é menor que a temperatura utilizada na reação.

Pelos dados das **Tabelas 4** e **5** observa-se que DIPA proporcionou uma boa relação entre rendimento e isomerização. Com isso, essa base foi utilizada na sequência dos estudos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Reações de Sonogashira com DIPA.



52 (*Z*/*E* 60:40) **53** **51**

Entrada	Solvente	Alcino **53** (mmol)	Tempo (h)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1[c]	DMF	1	5	77	93:7
2	DMF	10	5	73	83:17
3	DMF	1	15	56	91:9
4	DMF	10	15	53	92:8
5	THF	1	15	52	69:31
6	THF	10	15	48	73:27

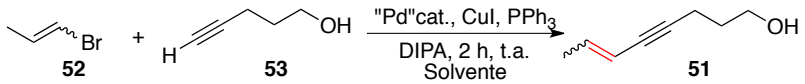
Condições: $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), 2 eq. DIPA, 1 eq. do álcool **53**, 1,2 eq. do brometo de vinila **52**, t.a. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional. [c]3 eq. do brometo de vinila **52**.

A reação foi avaliada à temperatura ambiente, e surpreendentemente, constatou-se uma melhoria: em 5 horas foi obtida seletividade de 93:7 em favor do isômero *E* desejado, e um rendimento de 77% (entrada 1). Dessa forma, é possível concluir que a isomerização não depende da temperatura. Porém, quando essa condição foi reproduzida em escala maior, observou-se uma redução da seletividade (entrada 2). Também foi avaliada a influência do solvente (entradas 3 a 6) trocando-se DMF por THF. Foi observado que tanto o rendimento quanto a seletividade

diminuíram com essa mudança, mostrando que a reação também é sensível ao solvente utilizado.

A fim de manter todo o paládio solúvel e evitar a formação de paládio *black*, foi testada a adição de excesso de ligante PPh_3 (10 mol%) nas condições anteriores. Também foi avaliado o uso de acetonitrila como solvente e a mudança do catalisador. Os resultados estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Reações de Sonogashira com adição de excesso de PPh_3.



Entrada	Solvente	Catalisador	Alcino **53** (mmol)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	1	44	>95:5
2	THF	$Pd(PPh_3)_4$	1	77	79:21
3	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	10	51	>95:5
4	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	10	42	>95:5
5	MeCN	$Pd(PPh_3)_4$	1	38	84:16
6	MeCN	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	1	55	78:22
7	DMF	$Pd(PPh_3)_2Cl_2$	1	49	83:17
8	DMF	$Pd(PPh_3)_4$	4	55	>95:5

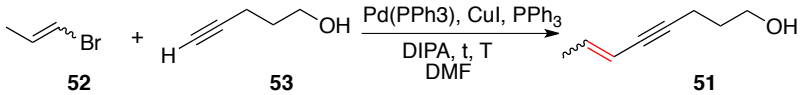
Condições: Catalisador de paládio (5 mol%), CuI (15 mol%), PPh_3 (10 mol%) 2 eq. DIPA, 1 mmol do álcool **53**, 1,2 eq. do brometo de vinila, t.a., 2 h. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional.

Ao adicionar excesso de PPh_3 nas condições anteriores foi observada maior isomerização para formação da olefina *E*. O maior rendimento foi obtido ao utilizar THF como solvente, porém verificou-se uma menor seletividade (entrada 2). O uso de MeCN e $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ também levaram a redução da seletividade (entradas 5-7), não alterando significativamente o rendimento. Desta forma, concluiu-se que a variação do solvente (THF e MeCN) e a mudança do catalisador não foram favoráveis, pois levaram a resultados inferiores aos obtidos anteriormente. As entradas 1, 3, 4, e 8 que empregaram DMF como solvente e $Pd(PPh_3)_4$ como catalisador, apresentaram a maior seletividade para obtenção do isômero *E,* e

rendimentos moderados (42-55%). Sendo assim, foi considerada a melhor condição obtida.

Por último, foi avaliado o efeito da diminuição da carga catalítica (**Tabela 8**). Em todos os casos o rendimento diminuiu significativamente. Nas reações realizadas à temperatura ambiente (entradas 1 e 2) não houve conversão total, mesmo após um período prolongado de reação. Quando a temperatura foi aumentada para 60 ºC houve conversão total, mas não foi observada melhoria no rendimento. A seletividade se manteve >95:5 (*E*/*Z*), com exceção da reação com 1 mol% de paládio à temperatura ambiente (entrada 2) em que foi observado uma menor isomerização.

Tabela 8. Reações de Sonogashira diminuindo a carga catalítica.



52 (*Z*/*E* 60:40) **53** **51**

Entrada	$Pd(PPh_3)_4$ (mol%)	T (ºC)	Tempo (h)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	2,5	t.a.	15	20[c]	>95:5
2	1,0	t.a.	15	11[c]	78:22
3	2,5	60	2,5	18	>95:5
4	1,0	60	6,5	19	>95:5

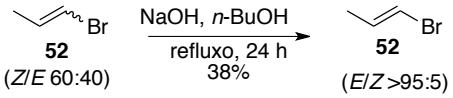
Condições: 1 mmol do álcool **53**, 1,2 eq. do brometo de vinila **52**, 2 eq. DIPA, CuI (3 eq. em relação ao Pd), PPh_3 (2 eq. em relação ao Pd), DMF. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional. [c]Sem conversão total (por CCD).

Foi definido então que a melhor condição para a reação de Sonogashira é utilizando DMF como solvente, DIPA como base, 5 mol% de $Pd(PPh_3)_4$ como catalisador, 15 mol% de CuI como co-catalisador, temperatura ambiente por 2 h e adicionando 10 mol% PPh_3, obtendo assim a maior isomerização levando a formação do produto com geometria *E* (**Tabela 7** – entradas 1, 3, 4 e 8).

Por último, foram realizadas reações variando-se a geometria da ligação dupla do composto **52** em uma tentativa de elucidar o mecanismo da isomerização.

O composto **52** com geometria *E* e com geometria *Z* são disponíveis comercialmente. Porém, o composto **52** com a dupla ligação com geometria *E*

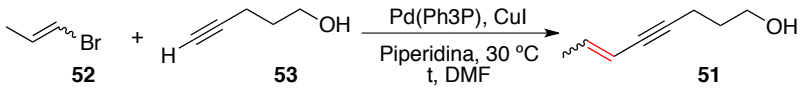
também pôde ser obtido por meio de uma reação de isomerização do composto **52** (*E*/*Z* 60:40) como descrito por Kumada,[55] obtendo o brometo de vinila com a geometria exclusivamente *E* em 38% de rendimento (**Esquema 15**).



Esquema 15. Isomerização do composto **52**.

Com o material de partida com a geometria desejada, foi realizada a reação de Sonogashira com alcino **53**, utilizando piperidina como base, devido ao maior rendimento obtido em comparação com as bases testadas anteriormente (**Tabela 5**, entrada 10). Foram utilizadas as condições mais brandas possíveis (temperatura ambiente, 1 h, 5 mol% de $Pd(PPh_3)_4$ e 15 mol% de CuI). Os resultados estão descritos na **Tabela 9**. Foram realizados experimentos com os brometos de vinila **52** com geometria *E* e *Z* puros em uma tentativa de elucidar o mecanismo de isomerização. Com o alceno *E* (entrada 1) foram obtidos resultados condizentes com o obtido com a mistura 60:40 *E*/*Z*. Na reação com o alceno *Z*, o produto desejado foi obtido com rendimento próximo ao observado para a mistura, porém não houve isomerização apreciável da ligação dupla. Os ensaios realizados não permitem obter nenhuma conclusão concreta acerca do mecanismo da isomerização. Novos experimentos seriam necessários para elucidá-lo.

Tabela 9. Reações de Sonogashira variando a geometria da ligação dupla do composto **52**.



Entrada	Geometria **52**	Tempo (min)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/*Z*)[b]
1	*E*	60	81	>95:5
2	60:40 *E*/*Z*	45	73	88:12
3	*Z*	80	68	<5:95

Condições: $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), 2 eq. piperidina, 1 mmol do álcool **53**, 1,2 eq. do brometo de vinila **52**, 30 ºC. [a]Rendimento isolado. [b]Determinado por RMN de ^1H do bruto reacional.

A Figura 5 exibe alguns exemplos de expansão dos espectros de RMN de ^{1}H obtidos na reação de Sonogashira. Essa região foi utilizada para calcular a proporção *E*/*Z* obtida na reação de acordo com Feuerstein e colaboradores,[56] que reportaram os deslocamentos do espectro de RMN de ^{1}H dos isômeros *E* e *Z* do composto **51**. O sinal entre 6,11 e 6,02 ppm representa o hidrogênio na posição 7 do isômero *E* (dq, *J*=15,9 e 6,8 Hz), enquanto o sinal entre 5,94 e 5,84 ppm representa o hidrogênio na posição 7 para o isômero *Z* (dq, *J*=10,8 e 6,8 Hz). O hidrogênio na posição 6 dos dois isômeros se encontra na região entre 5,49 e 5,42 ppm, ficando sobreposto quando há a presença de ambos os compostos. Com esses dados, foi concluído que o espectro **A** representa uma reação com leve excesso de formação do produto *E*, enquanto o espectro **B** representa uma maior formação do isômero *E*. Já o espectro **C**, mostra a formação quase que exclusiva do isômero E.

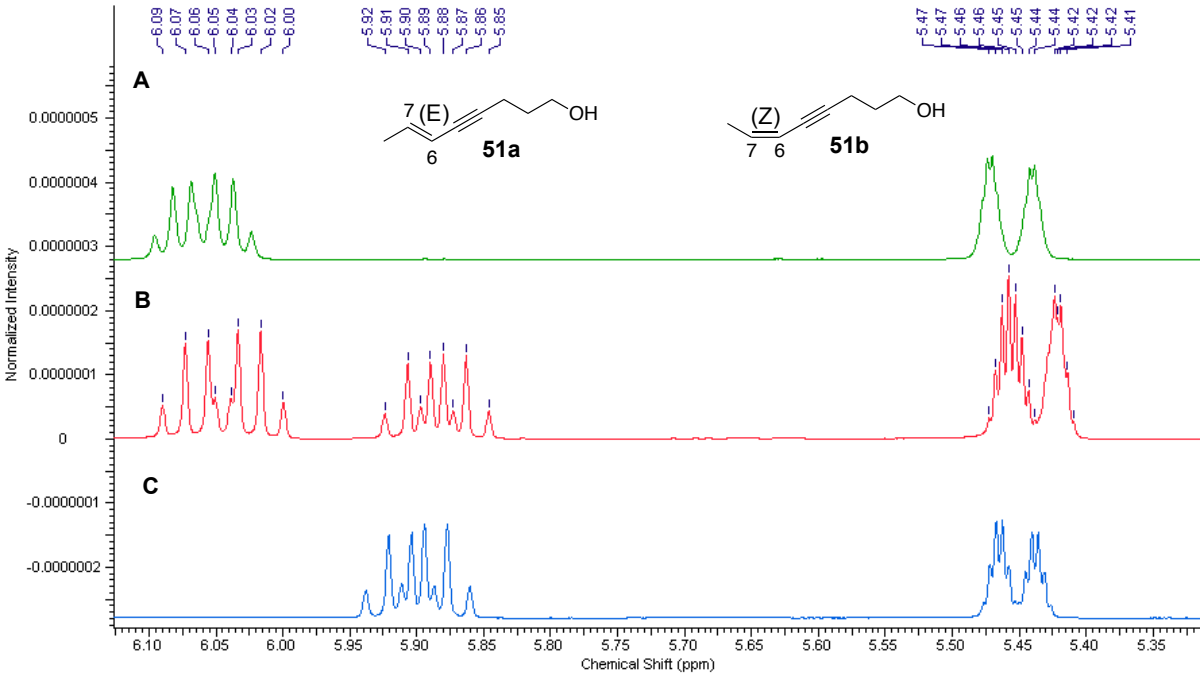


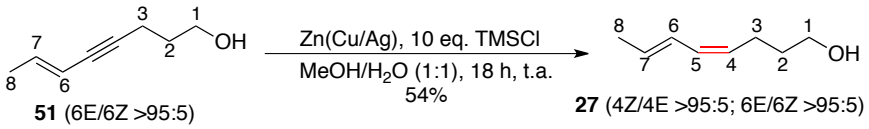
Figura 5. Expansão dos espectros de RMN de ^{1}H do composto **51** (250 MHz, $CDCl_3$).

3.1.5.3. Semi-redução *Z*-seletiva

Dando sequência na rota para a síntese do espilantol, foi realizada a redução da ligação tripla. Boland e colaboradores[57] reportaram o uso de uma amálgama de

zinco, cobre e prata para realizar a semi-redução das ligações triplas de hidrocarbonetos para ligações duplas com a estereoquímica *Z*. Hansen e colaboradores[51] avaliaram o uso dessa reação com substratos contendo outros grupos funcionais, como álcoois e ésteres, porém obtiveram baixos rendimentos. Em seu estudo reportaram que ao adicionar TMSCl ao meio reacional (10 eq.) a reação é acelerada e fornece melhores rendimentos, devido a ativação da amálgama de Zn(Cu/Ag), potencialmente pela geração de HCl *in situ*.

Inicialmente, foram reproduzidas as condições propostas por Hansen, que para o mesmo substrato obteve 86% de rendimento em 90 min., porém os resultados relatados não foram reproduzidos. Foi observada conversão total do composto **27** apenas após 18 h de reação e rendimento de 54% (**Esquema 16**). Para avaliar a necessidade da utilização de TMSCl, realizou-se uma reação como proposto por Boland, no entanto, em 5 h de reação não foi observada conversão do material de partida. Assim, foram adicionados 10 eq. de TMSCl e após 30 minutos o produto começa a ser formado, mostrando que o TMSCl é fundamental para essa reação.



51 (6E/6Z >95:5) **27** (4Z/4E >95:5; 6E/6Z >95:5)

Esquema 16. Redução *Z*-seletiva do enino **51** pra formação do dieno **27**.

Por meio de análise de RMN de ^{1}H do bruto reacional (**Figura 6**) foi possível constatar que houve apenas a formação da ligação dupla com a geometria *Z* desejada, comprovando que a reação é seletiva para essa configuração. Os sinais **c** (dd, *J* = 10,7 e 10,7 Hz) e **d** (dt, *J* = 10,6 e 7,7 Hz), referentes a ligação dupla formada, possuem valor de *J* = 10,7 Hz, condizente com a geometria *Z* esperada. A ligação dupla já existente no material de partida não sofreu alteração, mantendo-se com seletividade >95:5 *E*/*Z*, representada pelos sinais **a** (dq, *J* = 15,0 e 6,6 Hz) e **b** (dd, *J* = 15,2 e 13,0 Hz).

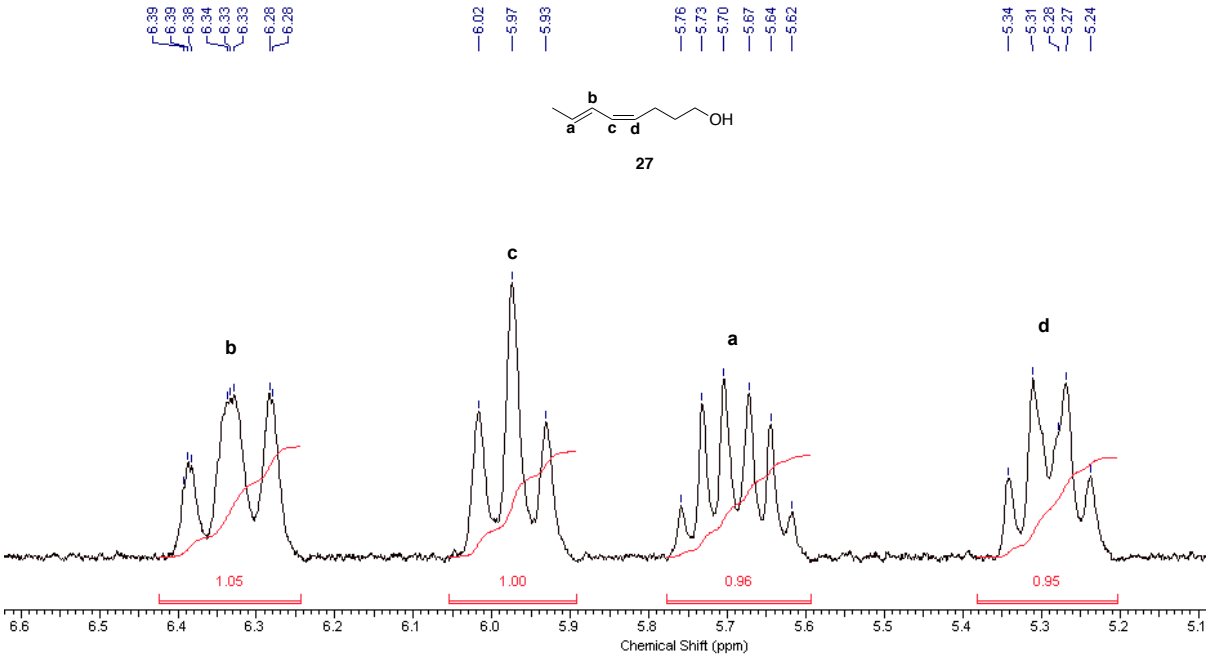


Figura 6. Expansão do espectro de RMN de ^{1}H do bruto reacional da semi-redução da ligação tripla (600 MHz, CDCl3).

3.1.5.4. Comparação das Rotas para Obtenção do Álcool 27

A Figura 7 apresenta a expansão do espectro de RMN de ^{1}H do composto **27** obtido pelas duas rotas estudadas. O espectro **a** mostra a expansão do espectro de RMN de ^{1}H obtido para o composto preparado pela rota que envolve a reação de Sonogashira (**Tabela 7,** entrada 8) seguida de semi-redução do alcino com amálgama de zinco, cobre e prata. As duas reações levaram à formação exclusiva da ligação dupla com geometria desejada, dessa forma, no espectro **a** verifica-se somente os sinais do produto **27b**. O espectro **b**, mostra a expansão do espectro de RMN de ^{1}H obtido pela mesma rota, reação de Sonogashira (**Tabela 6**, entrada 2) seguida de semi-redução do alcino com amálgama de zinco, cobre e prata. Como a reação de Sonogashira não foi completamente seletiva, houve formação do composto majoritário **27b** e do isômero minoritário **27c**. Por fim, o espectro **c** mostra a expansão do espectro de RMN de ^{1}H do dieno obtido pela reação de Wittig (Tabela 1, entrada 1). Essa reação não foi seletiva, formando os compostos **27b** (majoritário) e **27a** (minoritário). Como mencionado anteriormente, os espectros dos compostos com geometria 4*Z*,6*E* e 4*E*,6*E* são reportados na literatura, mas não há

relatos do espectro do composto 4*Z*,6*Z*. Nos três espectros é possível verificar que o produto majoritário é o mesmo, e de acordo com a literatura, determina-se serem referentes a geometria desejada 4*Z*,6*E*. Porém, cada sequência leva a formação minoritária de um diasteroisômero diferente, 4*Z*/6*Z* para a rota por reação de Sonogashira seguida de semi-redução e 4*E*/6*E* para a rota por reação de Wittig, sendo possível assim observar os picos de cada um deles.

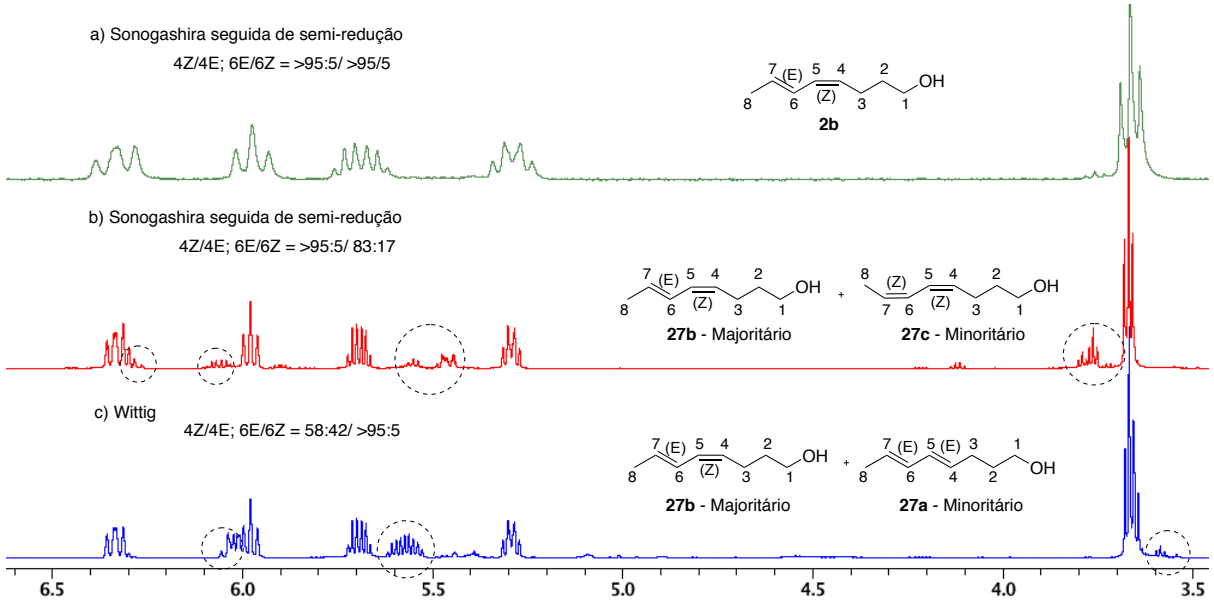


Figura 7. Comparação da expansão dos espectros obtidos pelas duas rotas (500 MHz, $CDCl_3$).

As três rotas estudadas levaram a obtenção do álcool **27** (**Figura 8**), a rota baseada na reação de Wittig como etapa chave (1ª abordagem) foi concluída em 3 etapas com 9% de rendimento global, levando a uma mistura de isômeros na posição 4. Quando a hidroxila do sal de Wittig foi protegida (2ª abordagem), o número de etapas foi igual a 5 (adicionando as etapas de proteção e desproteção da hidroxila), no entanto, houve um ganho no rendimento global (19%) e uma diminuição da formação do isômero indesejado (84:17 4*Z*/4*E*). Por fim, a rota que envolve a reação de Sonogashira seguida da semi-redução seletiva (3ª abordagem) possui apenas 2 etapas e um rendimento global superior às duas anteriores (30%), além de levar a formação exclusiva do produto desejado. A formação de isômeros foi relevante na escolha da estratégia sintética, pois não foi possível separá-los por

cromatografia em coluna em nenhuma das etapas, o que impacta na pureza do produto final.

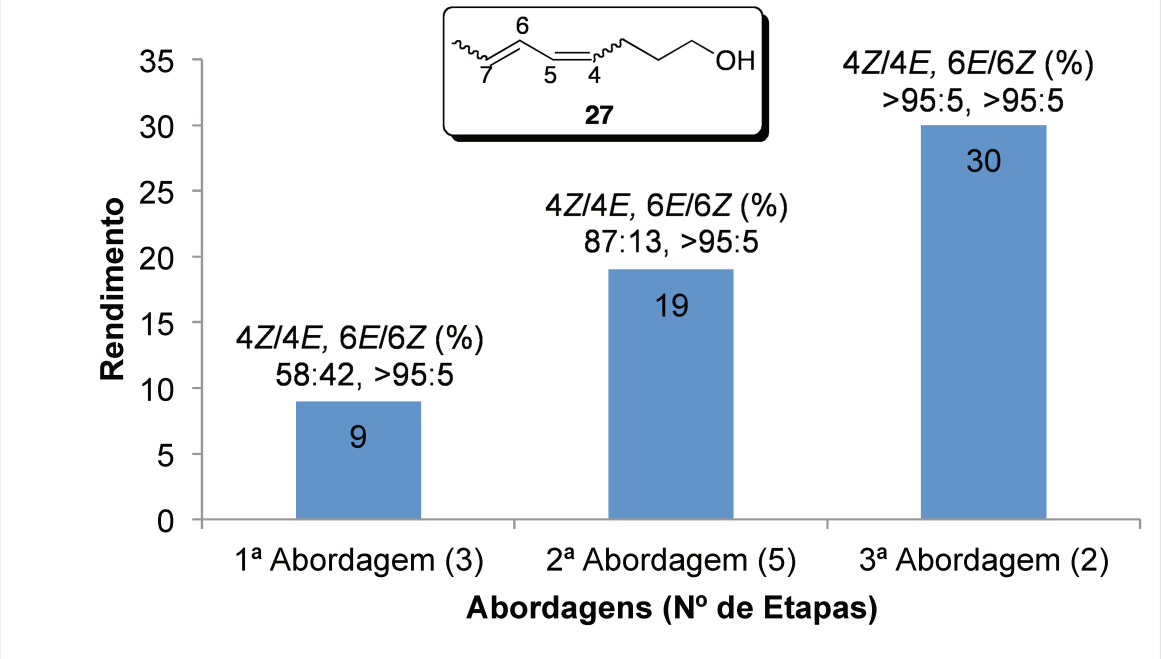


Figura 8. Comparação das rotas para obtenção do álcool **27**.

3.1.6. Síntese do Espilantol

A próxima etapa da rota é a oxidação do álcool **27** para o respectivo aldeído **28**. Existem diversas metodologias para oxidar álcoois primários a aldeídos, entre elas, foram testadas a oxidação de Swern, Parikh-Doering e a utilização de reagentes de crômio VI (PCC e PDC). Dentre as metodologias testadas, a reação mais limpa (análise de CCD e RMN do bruto) foi a de Swern, mas devido à instabilidade e volatilidade do aldeído optou-se utilizar o produto sem purificá-lo.

A **Figura 9** contém uma comparação do espectro no infravermelho do material de partida **27** e do bruto da oxidação de Swern. É possível observar que a banda alargada perto de 3300 cm^{-1} no espectro do composto **27**, típica de hidroxila de álcool, não está presente no espectro que contém o produto **28**, indicando que o álcool foi consumido. Além disso, no espectro do bruto reacional aparece uma banda em 1726 cm^{-1}, típica de estiramento de carbonila de aldeído, indicando a formação do produto.

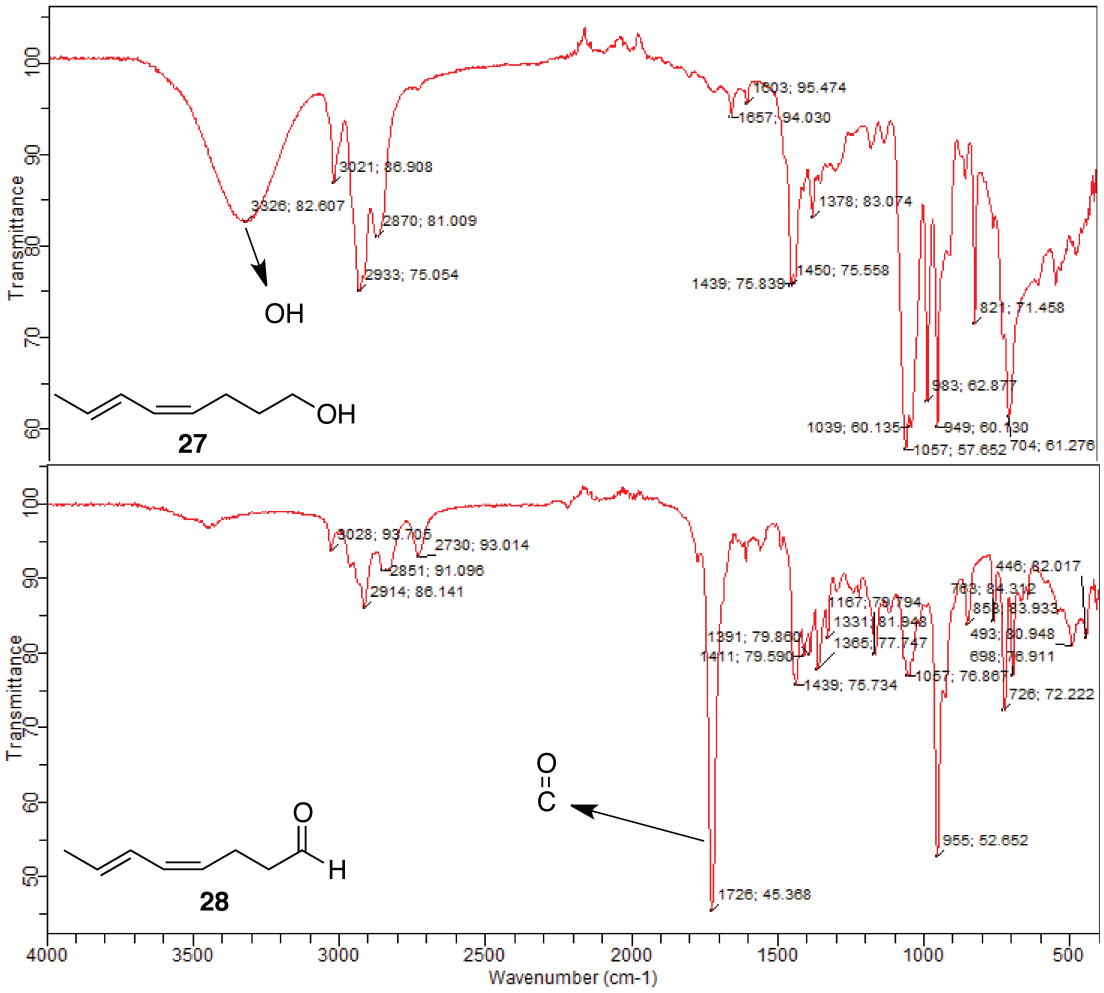


Figura 9. Comparação do espectro no IV do álcool **27** e do aldeído **28**.

Também foram realizadas análises de RMN de ^{1}H dos compostos **27** e **28** (**Figura 10**). A formação do aldeído é confirmada, no espectro do composto **28**, pelo aparecimento de um sinal em 9,78 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono da carbonila e pela ausência do sinal em 3,66 ppm referente aos hidrogênios carbinólicos. Além disso, os quatro sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos de ligação dupla, entre 5,0 e 6,5 ppm, possuem o mesmo padrão e valores de J similares nos dois espectros, comprovando a formação do composto desejado.

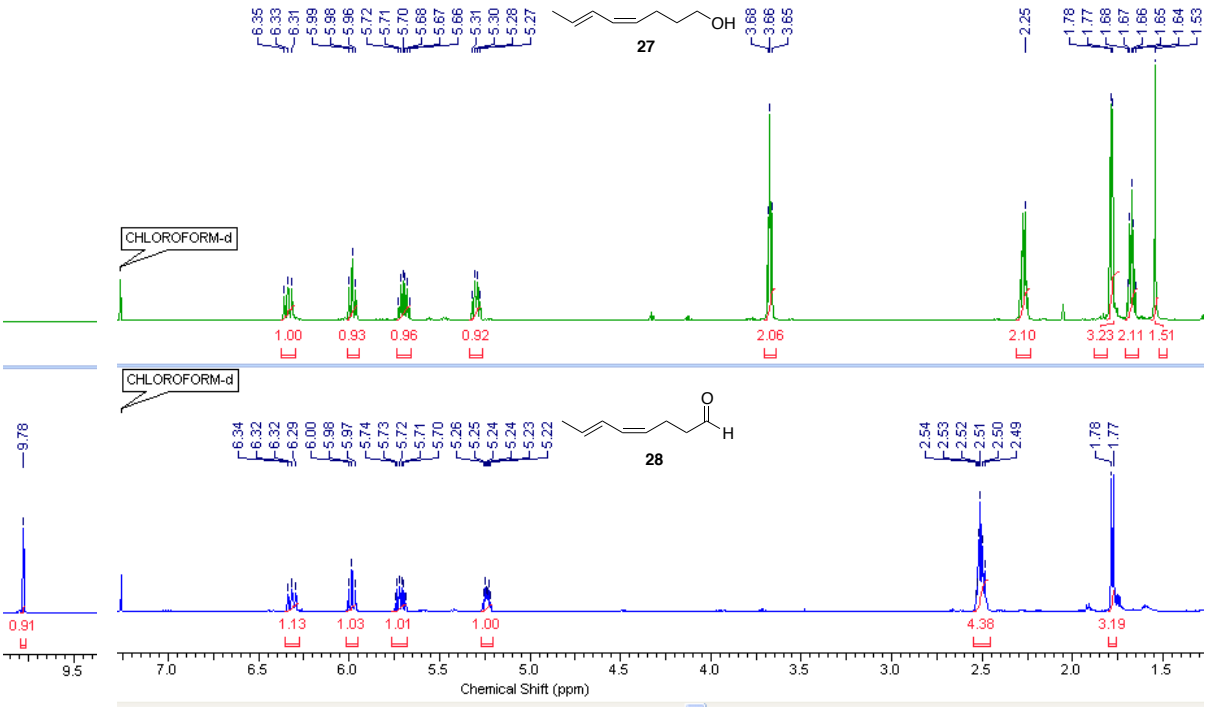
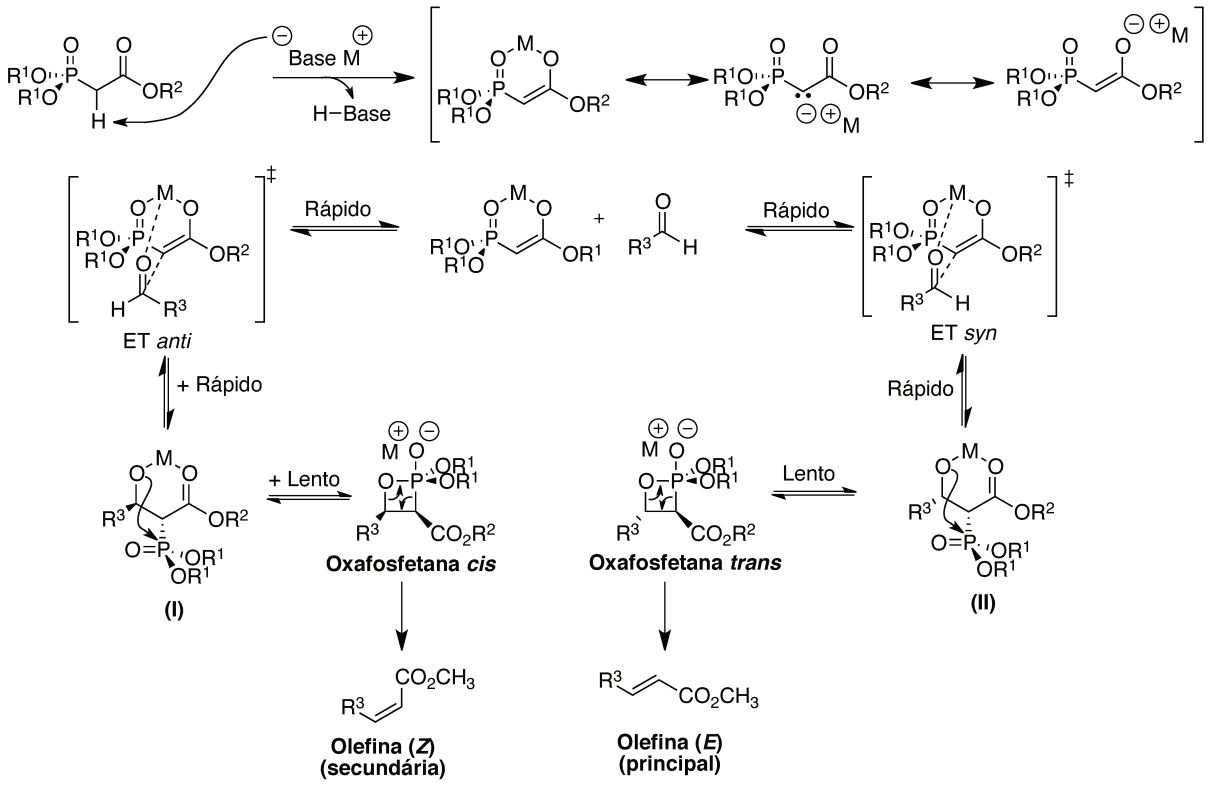


Figura 10. Comparação do espectro de RMN de ^{1}H do álcool **27** e do aldeído **28**. (600 MHz, CDCl3).

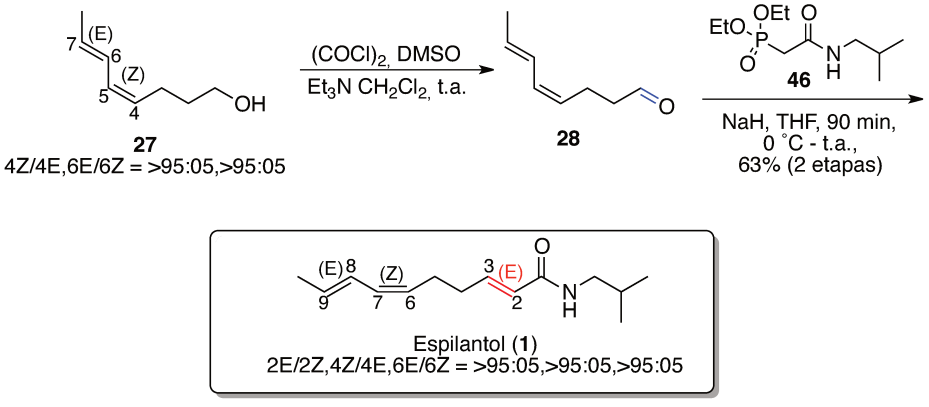
Assim, após a oxidação de Swern, o bruto reacional foi submetido imediatamente à reação de Horner-Wadsworth-Emmons. Essa reação possui um mecanismo do tipo Wittig com ilideo estabilizado, formando a ligação dupla com geometria *E* (**Esquema 17**). Apesar de fornecer o mesmo produto, a HWE apresenta algumas vantagens: o éster fosfonato normalmente é mais fácil e barato de preparar do que o sal de fosfônio. O carbânion fosfonato formado é mais nucleofílico que o ílideo de fósforo, dessa maneira a reação ocorre mais rapidamente e em condições mais brandas. O subproduto formado é solúvel em água, sendo facilmente separado, ao contrário do óxido de trifenilfosfina formado na reação Wittig.

O mecanismo se inicia com a abstração do próton por uma base, para a formação do carbânion fosfonato. Esta espécie pode reagir com o aldeído de partida pela face si ou re. Uma delas leva ao estado de transição **ET *anti***, e em seguida a formação da oxafosfetana *cis* e a outra, **ET *syn***, que forma a oxafosfetana *trans*. Devido à proximidade dos grupos R^3 e CO_2R^2, a decomposição da oxafosfetana *cis* é mais lenta e a formação da olefina *E* é favorecida.



Esquema 17. Mecanismo proposto para a reação de HWE.[44]

As duas etapas levaram a formação do espilantol (**1**) em 63% de rendimento com as ligações duplas com as geometrias desejadas. A formação do isômero 2*Z* não foi detectada por RMN de ^{1}H, apenas o isômero 2*E* desejado foi isolado. (**Esquema 18**).



Esquema 18. Oxidação de Swern e olefinação de HWE.

3.1.6.1. Comparação dos Espectros no IV e de RMN de ^1H ao Longo da Rota

A **Figura 11** contém uma comparação entre o espectro no infravermelho do composto **28**, aldeído obtido através da reação de Swern, e do espilantol obtido por meio da reação de HWE. Algumas bandas características indicam a formação do produto. A banda referente ao estiramento C=O de carbonila, no primeiro espectro, está localizada em 1726 cm^{-1}, região típica de carbonila de aldeído. Já no segundo espectro se encontra em 1627 cm^{-1}. Esse valor está um pouco abaixo ao normalmente definido para amidas (1680 – 1630 cm^{-1}), como o esperado, uma vez que amidas conjugadas possuem um valor de estiramento menor.

A banda de estiramento N-H localizada em 3280 cm^{-1} e a banda de dobramento N-H em 1545 cm^{-1} também são indicativos da formação do produto desejado.

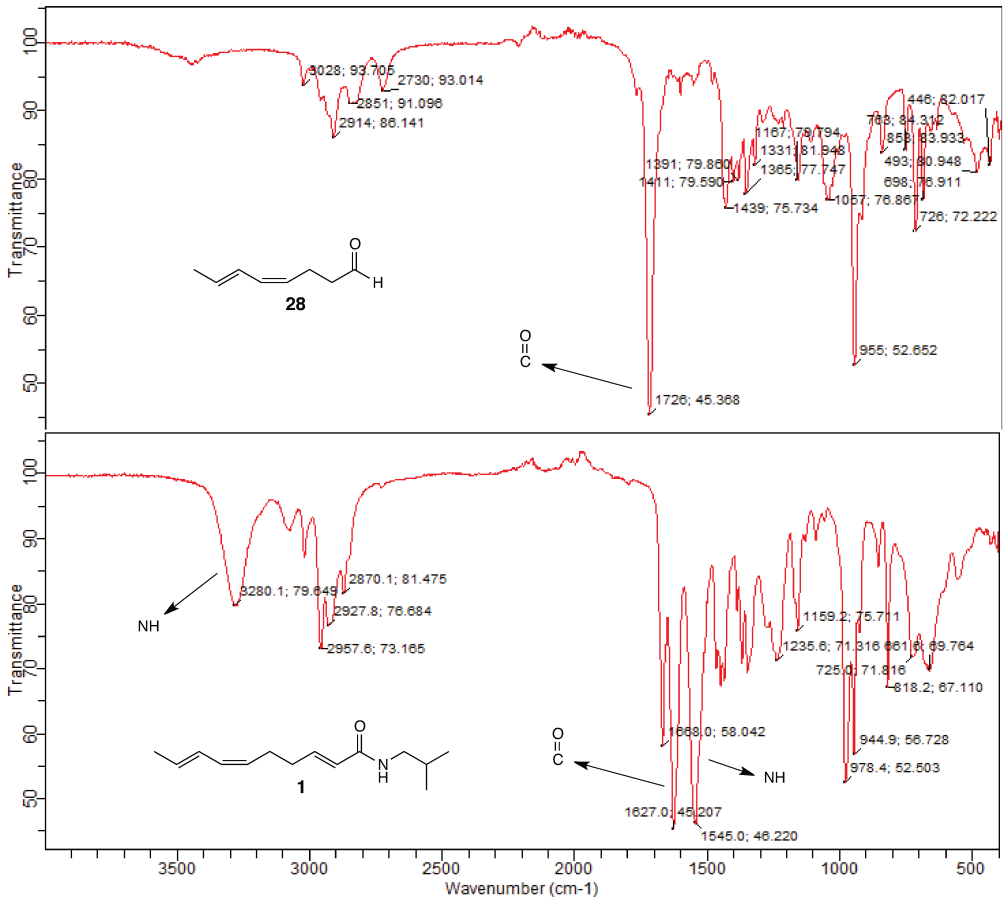


Figura 11. Comparação do espectro no IV da oxidação e HWE.

A **Figura 12** apresenta uma comparação entre a região correspondente ao hidrogênio ligado a C=C nos espectros de RMN de ^{1}H dos compostos **52**, **51**, **27** e **1**. A atribuição das ligações duplas do espilantol (**1**) foi realizada conforme elas foram formadas ao longo da rota sintética.

O primeiro espectro é referente ao brometo de vinila com geometria da ligação dupla definida como *E*. O sinal indicado como **Ha** (dq, *J* = 15,0, 6,8 Hz) mantém o mesmo padrão por toda a rota, apesar de variar seu deslocamento químico. Isso mostra que essa ligação se mantém estável durante todas as reações, sem alteração na sua geometria, que possui valores de *J* sempre próximos de 15,0 Hz, típico de ligação dupla com geometria *E*.

Apesar do sinal **Hb** representar a mesma ligação dupla, há uma variação no seu padrão após a redução. No espectro do composto **51** seu sinal é um dublete de quarteto com valor de *J* próximo de 15 Hz referente ao acoplamento com **Ha** e um valor *J* pequeno próximo de 1,5 Hz devido ao acoplamento alílico com o grupo CH_3. Porém, no espectro do composto **27** o padrão do sinal se modifica. Este fato está de acordo com o esperado, devido a mudança da vizinhança, uma vez que nesse momento existe o acoplamento com o hidrogênio na posição **Hc** que não havia anteriormente. O novo padrão foi atribuído como um dublete de dublete devido ao acoplamento com os hidrogênios **Hb** e **Hc**.

Por fim, na análise do espilantol (**1**), o padrão das ligações duplas existentes anteriormente se mantém, necessitando apenas determinar os sinais referentes ao hidrogênio entre **He** e **Hf**. O sinal do hidrogênio **He** foi definido como um dublete de triplete com valore de *J* de 15,3 e 6,6 Hz, referentes ao acoplamento *trans* com **Hf** e com o CH_2 vizinho, respectivamente. O sinal de **Hf** também foi definido como um duplete, com valor de *J* de 15,2 Hz para o acoplamente com **He**.

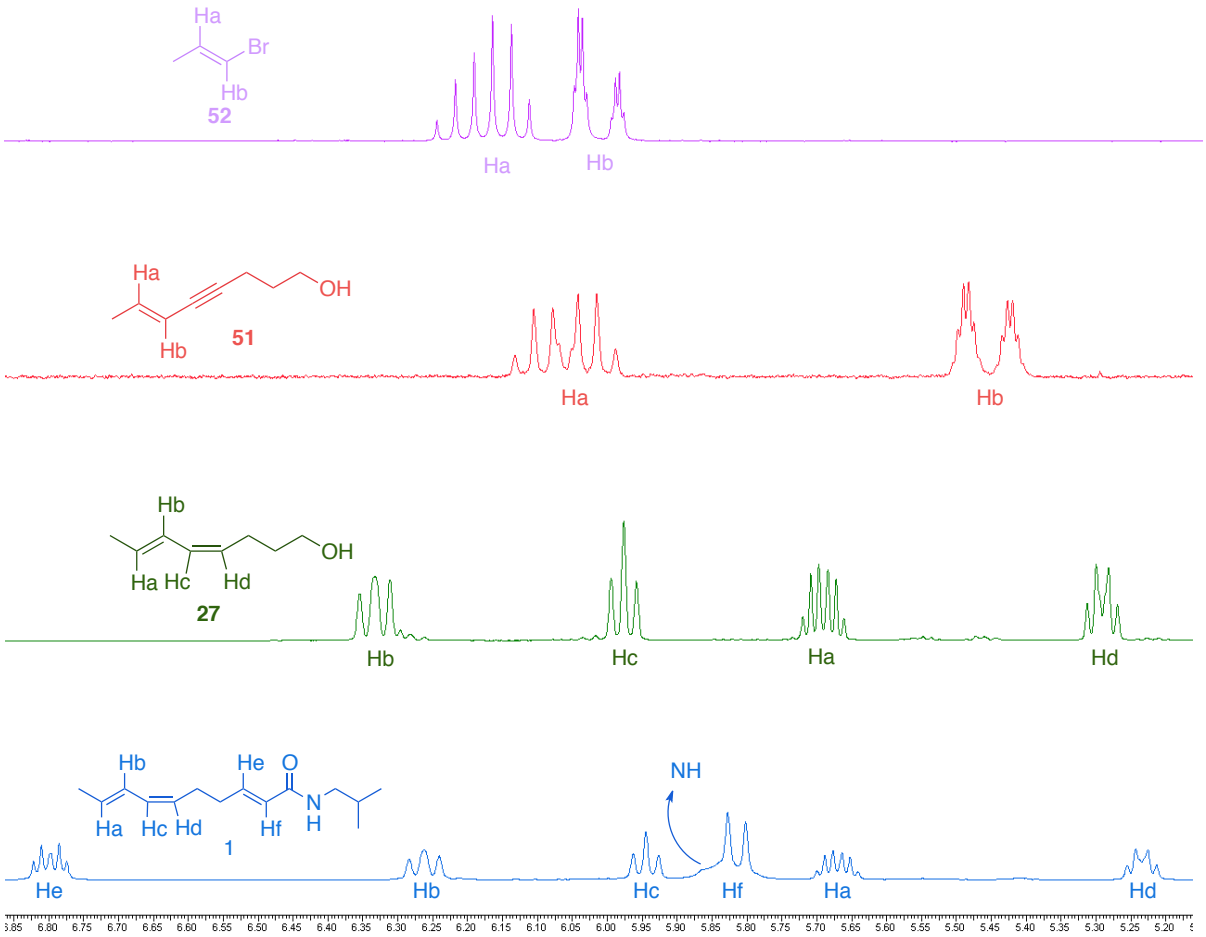
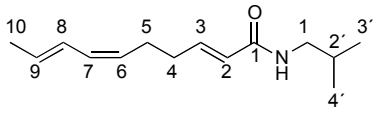


Figura 12. Comparação do espectro de RMN de ^{1}H das reações de Sonogashira, redução e HWE.

O espectro de RMN de ^{1}H do espilantol sintetizado foi comparado ao espectro obtido para o padrão do espilantol, fornecido pelo Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues, que possui 88,5% de pureza (Chromadex, Califórnia, Estados Unidos) e com os dados descritos na literatura por Nakatani e Nagashima.[5] Os dados foram relatados na **Tabela 10**. Pode-se observar que os valores são similares, apresentando apenas divergências mínimas, comprovando a formação do produto desejado.

Tabela 10. Comparação do Espectro do RMN de ^{1}H do Espilantol.



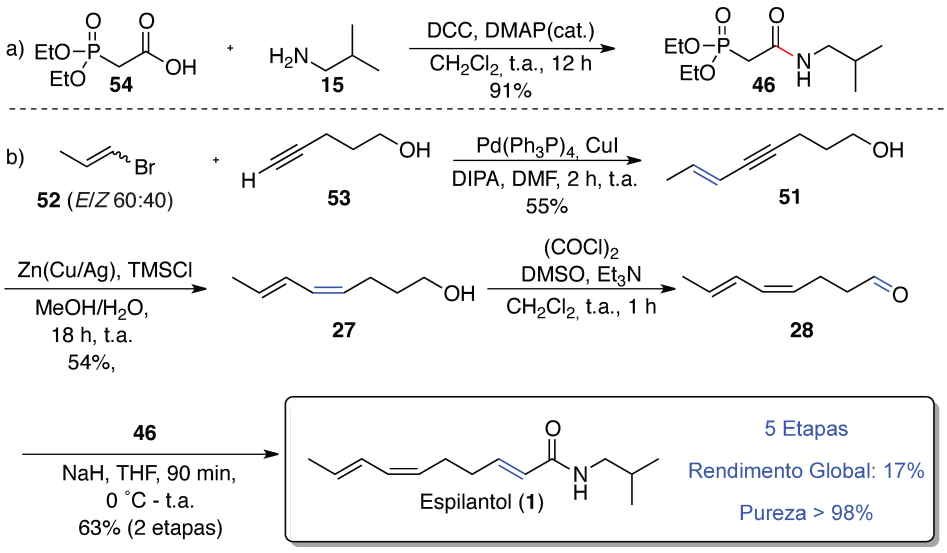
Nº	Literatura (400 MHz, $CDCl_3$)			Padrão 85% (600 MHz, $CDCl_3$)			Sintético (600 MHz, $CDCl_3$)		
	δ (ppm)	Tipo	*J* (Hz)	δ (ppm)	Tipo	*J* (Hz)	δ (ppm)	Tipo	*J* (Hz)
3	6,83	dt	15/7	6,83	dt	15,3/6,6	6,82	dt	15,3/6,6
8	6,29	dd	15/11	6,3	dddq	15,2/11,1/1,3	6,28	dddq	14,7/11,1/1,5/1,5
7	5,97	dd	11/11	5,98	dd	10,9/10,9	5,96	dd	10,9/10,9
2	5,79	d	15	5,8	dt	15,2/1,4	5,8	dt	15,2/1,5
9	5,7	dq	15/7	5,71	dq	15,0/6,9	5,69	dq	14,1/6,8
NH	5,47	s	-	5,49	s	-	5,59	s	-
6	5,26	dt	11/7	5,27	dt	10,6/7,4	5,25	dt	10,5/7,4
1´	3,15	dd	7/6	3,16	dd	6,5/6,5	3,14	dd	6,8/6,8
4	2,23-2,25	m	-	2,33	dt	7,1/7,1	2,31	dt	7,4/7,4
5	2,23-2,25	m	-	2,26	dtd	7,0/7,0/1,3	2,25	dtd	6,6/6,6/1,3
10	1,78	d	7	1,78	dd	6,2/1,1	1,75-1,83	m	-
2´	1,78	m	-	1,77-1,84	m	-	1,75-1,83	m	-
3´	0,93	d	7	0,93	d	6,8	0,92	d	6,8

Por fim, para confirmar a autenticidade do produto sintetizado foi realizada uma análise comparativa entre os valores de deslocamento químico no espectro de RMN de ^{13}C do composto obtido e do padrão do espilantol 88,5% de pureza fornecido pelo Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues (Chromadex, Califórnia, Estados Unidos) (**Figura 13**). A diferença máxima obtida entre os valores de deslocamento químico foi de 0,11 ppm no carbono 3, sendo essa uma diferença mínima. O espectro de RMN de ^{1}H entre o espilantol padrão e o sintético também foi comparado e estão de acordo. Portanto, com essas análises comparativas e as análises descritas anteriormente foi possível afirmar categoricamente que o composto sintetizado é referente ao espilantol.



Figura 13. Comparação do espectro de RMN de ^{13}C do espilantol sintético e do comercial (600 MHz, CDCl3).

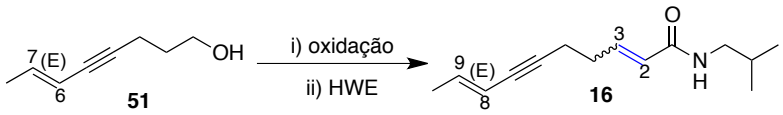
A melhor condição para a síntese total do espilantol (**Esquema 19**) possui 5 etapas e um rendimento global de 17% quando partindo do brometo de vinila **52** como mistura de isômeros (60:40 *E*/*Z*), que possui um menor valor comercial. Esse rendimento pode ser aumentado até 25% quando utilizado o brometo de vinila **52** com geometria da ligação dupla definida como *E*. Ambos levam ao produto com alta pureza (98% determinada por HPLC) e presença apenas do isômero desejado, quando comparado às sínteses descritas na literatura.[6,7]



Esquema 19. Síntese total do espilantol (**1**).

A fim de investigar outras possibilidades sintéticas, foi realizada uma inversão na ordem das reações. As reações de oxidação e HWE foram realizadas previamente a redução, no composto **51**. Foram testadas outras metodologias para oxidação, mas novamente a oxidação de Swern apresentou-se mais limpa por CCD. Em seguida, 3 condições diferentes para a HWE foram testadas. Além da condição utilizada tradicionalmente, com hidreto de sódio, foram testadas a condição descrita por Rivera,[58] que utiliza DBU como base e adição de cloreto de lítio e a condição descrita por Helquist,[59] que utiliza trietilamina como base e adiciona triflato de zinco e TMEDA (**Tabela 11**).

Tabela 11. Comparação das rotas para obtenção do composto **16.**



Entrada	Oxidação	HWE	Rendimento para o isômero 2*E*, 8*E* (%)[a]
1	PCC, NaOAc	NaH	43
2	Swern	NaH	43
3	Swern	LiCl, DBU	31
4	Swern	Et_3N, $Zn(OTf)_2$, TMEDA	46

[a]Rendimento isolado para as duas etapas.

Não foi possível determinar a seletividade da ligação dupla formada devido a sobreposição dos sinais no espectro de RMN de ^1H. Porém, foi possível observar que houve a formação de um isômero majoritário e outro minoritário. Por coluna cromatográfica foi possível isolar o isômero majoritário e confirmar que era o composto **16** com as duas ligações duplas com geometria *E*.

Em seguida, foram realizadas duas tentativas de redução do composto **16** para obter o espilantol **1**. A primeira, com a mesma metodologia utilizada anteriormente para semi-redução, utilizando a amálgama de Zn(Cu/Ag) e TMSCl. E a outra utilizando o catalisador de Lindlar e quinolina. Nas duas reações é possível observar uma lenta formação do produto por CCD, sendo que, após 5 h observou-se

degradação do produto e em nenhum caso foi possível isolar o espilantol (**1**), inviabilizando esta alternativa.

3.2. Avaliação da Reação de Sonogashira em Fluxo Contínuo

A reação de Sonogashira foi utilizada como uma etapa-chave na síntese do espilantol relatada na seção 3.1.5.2. . Utilizando o isômero *E* puro do brometo de vinila **52** foi possível obter o produto desejado com rendimento de 81%, o que levou a um aumento no rendimento global da síntese do espilantol (25%). O elevado custo deste material de partida em relação à mistura de isômeros (60:40 *E/Z*) torna sua utilização inviável, principalmente para o escalonamento. Dessa forma, é extremamente importante encontrar uma condição em que se tenha alto rendimento e alta isomerização. Mesmo após diversas tentativas não foi encontrada uma condição ótima nos experimentos realizados em batelada. O produto **52** foi obtido como uma mistura de isômeros em alto rendimento (**Tabela 5**, entrada 10) ou apenas o isômero *E* desejado mas em rendimento mediano (**Tabela 7**, entrada 8).

Este fato motivou a avaliação da reação de Sonogashira em fluxo contínuo, com objetivo de otimizar o rendimento, mantendo uma alta isomerização, ainda buscando diminuir o tempo reacional e a carga catalítica. Além de permitir a fácil preparação de grande quantidade de material em um curto período de tempo.[60]

3.2.1. Condição de Catálise Heterogênea

Primeiramente, foi testada uma condição heterogênea devido à facilidade de reutilização do catalisador e simplificação da purificação, visto que não haveria necessidade de uma etapa de filtração. Para isso, foi utilizado o sistema para reações em fluxo contínuo da marca Uniqsis (**Figura 14**), no qual os catalisadores foram suportados em uma coluna pela qual foram bombeados os reagentes para ocorrer a reação. Essa coluna fica localizada em um módulo de temperatura controlável.

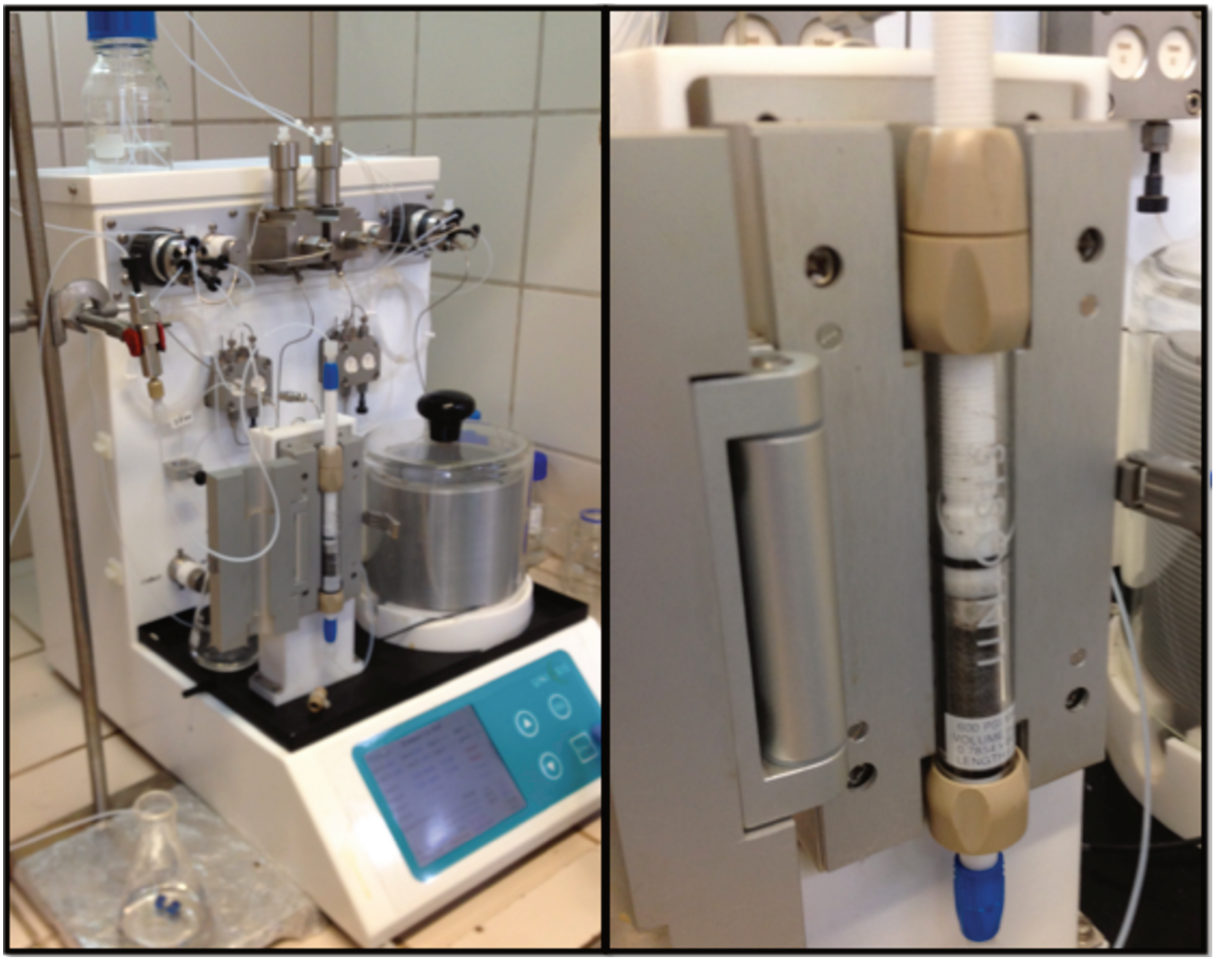
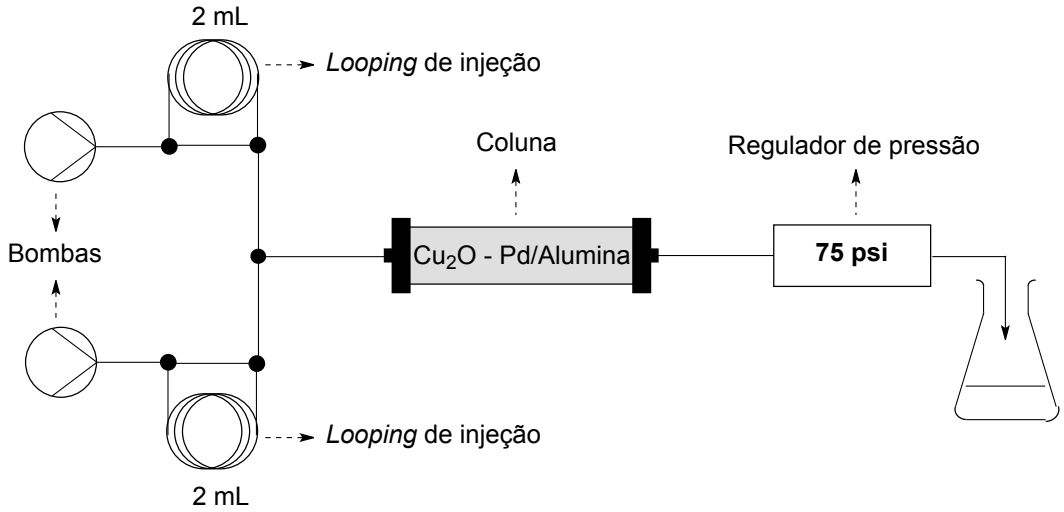


Figura 14. Equipamento utilizado nas reações em condição heterogênea.

A reação foi realizada de maneira similar com a metodologia descrita por Srogl e colaboradores.[61] Os reagentes foram introduzidos com auxílio de um *looping* de injeção de 2 mL e bombeados por uma coluna preenchida com uma mistura de óxido de cobre (I) e paládio (0) em alumina (1:17). O experimento realizado está representado no **Esquema 20**.



Esquema 20. Configuração do sistema em fluxo contínuo para a reação de Sonogashira heterogênea.

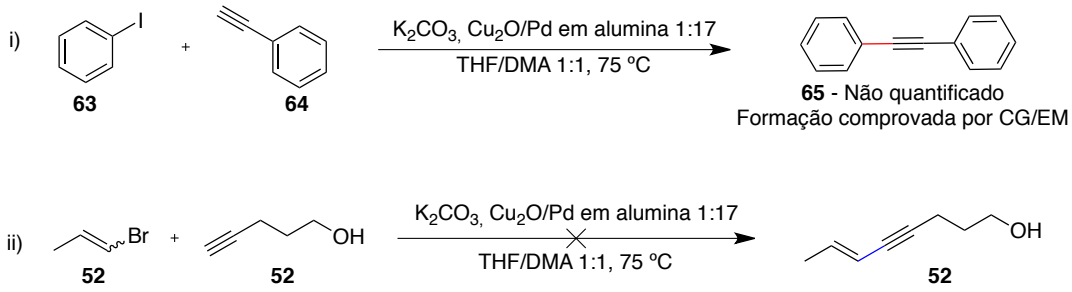
A temperatura utilizada no primeiro experimento foi de 100 ºC. Foram utilizadas duas bombas, em uma entrada foi bombeada uma solução contendo o brometo de vinila (0,5 M) e a base (DIPA – 2 equiv.) em uma mistura de THF/DMF (9:1) e na outra uma solução contendo o alcino em THF/DMF (9:1, 0,6 M), ambas operando com um fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$, obtendo assim, um fluxo total de 1 $mL.min^{-1}$ no encontro das correntes.

No segundo experimento a temperatura foi mantida a 100 ºC, mas foi feita uma única solução com todos os reagentes, mantendo as concentrações, bombeando em um fluxo de 0,5 $mL.min^{-1}$.

Em uma última tentativa, foi mantida a condição do segundo experimento, porém a temperatura utilizada foi igual a 120 ºC, isso levou à degradação do filtro da coluna e causou entupimento do sistema.

Infelizmente, nenhuma das condições testadas levou à formação do produto. Devido a esse fato, o sistema catalítico foi avaliado em duas reações controle em batelada (**Equema 21**). Uma contendo um sistema ativado, como descrito por Srogl, e a outra com os reagentes utilizados anteriormente. Na reação do sistema mais reativo (i), foi observada a formação do produto por CG/EM. De modo contrário, a reação com os reagentes menos ativados (ii), não levou à formação do composto desejado. Isso mostra que os catalisadores utilizados são capazes de conduzir a

formação do produto de Sonogashira, porém este não é ativo o suficiente para sistemas pouco reativos como o estudado.



Esquema 21. Reações controle em batelada.

Apesar de haver diversos relatos de reação de Sonogashira com catálise heterogênea em fluxo contínuo.[61,62] Não há relatos na literatura, até o momento, que envolvem sistemas menos ativados, como brometos de alquenila e alcinos alifáticos.

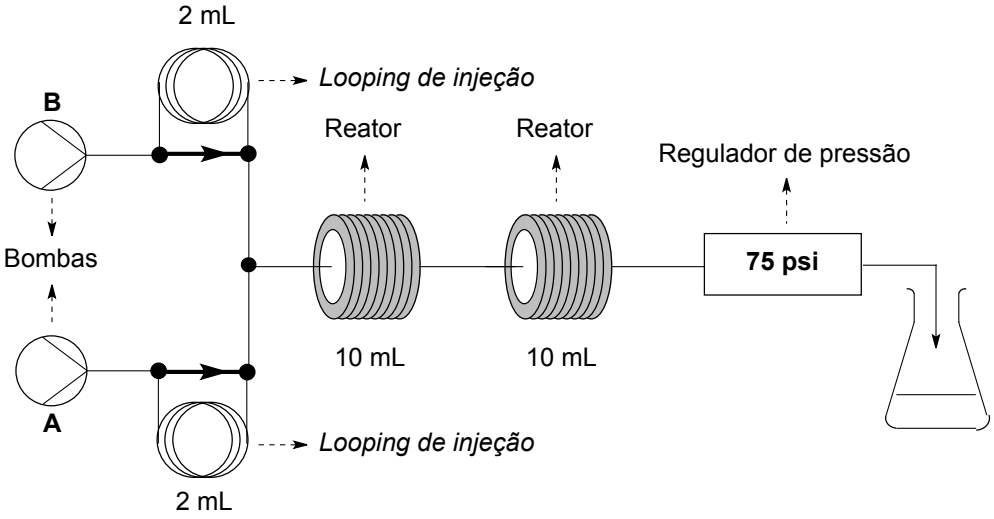
3.2.2. Condição de Catálise Homogênea

Nos últimos anos, a viabilidade das reações de acoplamento cruzado em fluxo contínuo utilizando paládio suportado vem sendo investigada. O principal problema desse tipo de reação é a lixiviação do paládio. Segundo Kappe e colaboradores[63], isso ocorre pois durante o mecanismos dessas transformações a espécie insolúvel de Pd^0 se torna Pd^{II} (solúvel), e conforme o fluxo de solvente passa pelo suporte, parte dessa espécie solúvel é arrastada, havendo perda do catalisador.

As indústrias farmacêuticas e de química fina não utilizam catálise de complexos de metais de transição imobilizados. Segundo Farina e colaboradores[64], isso ocorre pois os custos são mais elevados para esse tipo de catálise quando comparado com a catálise homogênea.

Além desses fatores, não foi possível observar a formação do produto nos experimentos realizados com catálise heterogênea. Essa proposta foi descartada e foi abordada uma condição de catálise homogênea em fluxo contínuo,[65] mantendo o intuito de obter uma condição que leve a alto rendimento e isomerização.

O **Esquema 22** contém uma descrição geral do sistema de fluxo utilizado para esses experimentos. Para cada experimento, os reagentes foram divididos em duas soluções e cada solução foi bombeada por meio de um looping de injeção de 2 mL. Em seguida as soluções encontram-se e seguem para um reator em espiral de 10 mL.



Esquema 22. Sistema em fluxo contínuo para a reação de Sonogashira homogênea.

O equipamento utilizado para esses testes foi o Vapourtec modelo R-séries (**Figura 15**). Foi utilizado o reator em espiral e com esse equipamento, é possível utilizar apenas um reator ou dois reatores iguais em sequência, o que permite obter um maior tempo de residência, mantendo a mesma vazão.



Figura 15. Equipamento utilizado nas reações em condição homogênea.

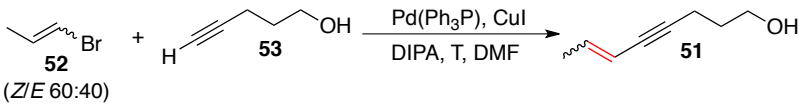
Inicialmente foram realizados 6 experimentos (**Tabela 12**), e em todos os casos foi observada a formação do produto (CCD e RMN de ^{1}H), porém as reações apresentaram diversos subprodutos que não puderam ser identificados. Com o uso de padrão interno foi possível estimar o rendimento das reações e observar que, em todas elas, foi formado apenas o isômero *E* desejado.

Nos experimentos 1-4 foi utilizado apenas um reator de 10 mL e a vazão foi modificada. Nesses 4 experimentos, não foi observada a conversão total do material de partida, mesmo quando utilizou-se uma vazão mais baixa.

Por esse motivo, nos experimentos 5 e 6 foram utilizados dois reatores de 10 mL em sequência, para aumentar o tempo de residência mantendo a vazão acima do limite mínimo do equipamento. Nesses experimentos houve conversão total do material de partida, porém baixos rendimentos foram obtidos. Nestes ensaios, foi observada a formação de paládio *black*, o que prejudica a reação e pode ser uma explicação para os rendimentos terem sido inferiores, uma vez que esta espécie de

paládio é inativa. Além disso, a formação de sólidos no reator é indesejada, pois pode levar ao entupimento do sistema.

Tabela 12. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo com temperatura entre 100 e 130 ºC.



Experimento	Vazão (mL.min^{-1})	τ (min)	T (ºC)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/Z)[b]
1[c]	1	10	100	N/D	>95:5
2[c]	0,5	20	100	16	>95:5
3[c]	0,5	20	130	26	>95:5
4[c]	0,3	33	130	30	>95:5
5[d,f]	0,5	40	130	14	>95:5
6[e,f]	0,4	50	130	20	>95:5

τ = tempo de residência, N/D = não determinado, [a]Estimativa de rendimento por RMN de ^{1}H com padrão interno (1,3-bis(trifluorometil)-5-bromobenzeno). [b]Determinado por RMN de ^{1}H do bruto reacional. [c]Bomba A = solução contendo: **34** (1 eq., 0,3 M), **33** (1,2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), PPh_3 (10 mol%) em DMF. Bomba B = solução de DIPA (2 eq.) em DMF. [d]Bomba A = solução contendo: **33** (3 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), PPh_3 (10 mol%) em DMF. Bomba B = solução de DIPA (2 eq.) e **34** (1 eq., 0,3 M) em DMF. [e]Bomba A = solução contendo: **34** (1 eq., 0,3 M), **33** (2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (5 mol%), CuI (15 mol%), PPh_3 (10 mol%) em DMF. Bomba B = solução de DIPA (2 eq.) em DMF. [f]Dois reatores em sequência.

No experimento 5 foi feita uma mudança nas soluções-estoque, o alcino foi separado dos catalisadores e adicionado junto com a base, para prevenir a formação de produto de homoacoplamento antes dos reagentes serem inseridos no equipamento. Esta mudança diminuiu a solubilidade dos catalisadores no meio reacional e foi necessário filtrar a solução, perdendo parte do catalisador de paládio, justificando o baixo rendimento obtido. Comparando os resultados dos experimentos 2 e 3, foi observado que o aumento da temperatura levou a maiores rendimentos. O mesmo foi observado quando o tempo de residência foi aumentado de 20 min para 33 min (experimentos 3 e 4). O produto obtido no experimento 5 foi purificado por CCD preparativa para confirmar o resultado obtido por padrão interno. Foi obtido 9%

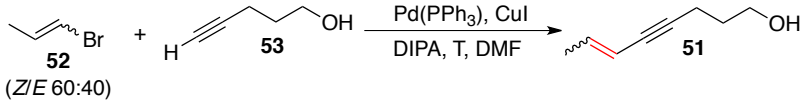
de rendimento e seletividade >95:5 para o isômero *E* desejado, concordando com o obtido por padrão interno.

Os experimentos descritos na **Tabela 12** foram realizados em alta temperatura (100 – 130 ºC) em uma tentativa de acelerar a reação. Porém, isso levou a formação de diversos subprodutos, que justificam os baixos rendimentos obtidos.

Para contornar esse problema, novos experimentos foram realizados utilizando temperaturas mais baixas. Devido à cinética mais lenta da reação nestas temperaturas, foi necessário utilizar dois reatores de 10 mL em sequência, a fim de aumentar o tempo de residência e garantir a conversão total do material de partida. Nestas condições foi observada a formação de Paládio *black* e para contornar este problema, foi utilizada uma carga catalítica menor (2,5 mol% de $Pd(PPh_3)_4$).

Os dados obtidos nesses novos testes estão relatados na **Tabela 13.** Nos quatro experimentos, foi verificada a formação do produto e isomerização total levando a formação apenas do produto de ligação dupla com geometria *E*.

Tabela 13. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo com temperatura entre t.a. e 60 ºC**.**



Experimento	Vazão (mL.min^{-1})	τ (min)	T (ºC)	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/Z)[b]
1	0,5	40	t.a.	22	>95:5
2	0,5	40	60	31	>95:5
3	0,33	60	60	33	>95:5
4	0,33	60	t.a.	13	>95:5

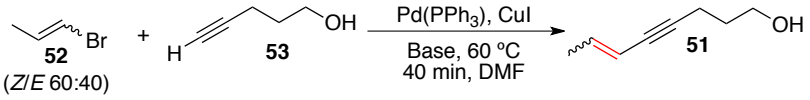
τ = tempo de residência, [a]Estimativa de rendimento por RMN de ^{1}H com padrão interno (dibromometano). [b]Determinado por RMN de ^{1}H do bruto reacional. Condição: Bomba A = solução contendo: **34** (1 eq., 0,31 M), **33** (1,2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (2,5 mol%), CuI (7,5 mol%) em DMF. Bomba B = solução de DIPA (2 eq.) em DMF. Dois reatores em sequencia.

Nestas condições, os brutos reacionais estavam mais limpos quando comparados com os experimentos anteriores, porém não foi observada conversão completa em nenhum dos experimentos. Novamente os rendimentos foram baixos

em virtude da diminuição da temperatura e pela menor quantidade de catalisador utilizada, pois os dois fatores tornam a reação mais lenta. A principio este problema poderia ser contornado utilizando maiores tempos de residência, porém isso tornaria a reação em fluxo contínuo mais lenta do que a reação em batelada, o que foge dos objetivos deste estudo.

Alguns testes adicionais foram realizados, variando a base e o material de partida. Foi utilizado o brometo de vinila **33** com a ligação dupla com geometria E, geometria Z e com mistura de isômeros (60:40 E/Z) e como base diisopropilamina e piperidina. Os resultados obtidos nesses testes estão relatados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Reação de Sonogashira em fluxo contínuo variando a geometria da ligação dupla do composto **52**.



Experimento	**52** (*E*/*Z*)	Base	Rendimento (%)[a]	Seletividade (*E*/Z)[b]
1	>95:5	Piperidina	70	>95:5
2	>95:5	DIPA	26	91:9
3	60:40	Piperidina	65	87:13
4	<5:95	Piperidina	68	<5:95

[a]Estimativa de rendimento por RMN de ^{1}H com padrão interno (dibromometano). [b]Determinado por RMN de ^{1}H do bruto reacional. Condição: Bomba A = solução contendo: **34** (1 eq., 0,31 M), **33** (2 eq.), $Pd(PPh_3)_4$ (2,5 mol%), CuI (7,5 mol%) em DMF, vazão = 0,25 mL.min^{-1}. Bomba B = solução da base (2 eq.) em DMF, vazão = 0,25 mL.min^{-1}. Dois reatores de 10 mL em sequência, vazão total = 0,5 mL.min^{-1} (τ = 40 min), T = 60 ºC.

Nos experimentos 1 e 2 foi utilizado o material de partida com ligação dupla de geometria *E*, variando apenas a base. Quando diisopropilamina foi utilizada como base (entrada 2), foi observada a formação de diversos sub-produtos, além de conversão incompleta, obtendo um rendimento de 26%. Já quando piperidina foi empregada (entrada 1), a reação exibiu conversão completa, levando a um rendimento de 70%.

Nos experimentos 1, 3 e 4, a base foi mantida (piperidina), variando apenas o material de partida. Nos três casos a reação foi limpa e os rendimentos obtidos

foram similares. Porém, nos experimentos 3 e 4 não foi observada a conversão total do material de partida (CCD). Ao utilizar o brometo **52** como uma mistura de isômeros (entrada 3), foi obtido um bom rendimento e houve isomerização parcial.

Os resultados obtidos nas reações em fluxo contínuo (**Tabela 13**) são similares aos obtidos em batelada (**Tabela 9**), onde observou-se isomerização apenas quando foi utilizado o composto **52** como mistura de isômeros. Quando utilizou-se o composto **52** com a ligação dupla com geometria *Z* não foi observada isomerização.

Assim como em batelada, não foi obtida uma condição em que se observasse alto rendimento e isomerização. Os experimentos realizados em fluxo contínuo levaram a resultados similares ou inferiores quando comparados aos obtidos em batelada, não justificando seu uso.

3.3. Síntese de Análogos do Espilantol

Com a síntese do espilantol definida e otimizada, foram planejados alguns análogos estruturais a fim de estudar suas propriedades biológicas e a relação entre a estrutura química e atividade biológica desta série. (**Figura 16**).

As *N*-alquilamidas são um grupo de compostos encontrados em diversas plantas, com uma grande diversidade estrutural e com diferentes atividades biológicas.[66] A *N*-isobutilamida é a subclasse desse grupo, da qual o espilantol (**1**) faz parte. Outras *N*-isobutilamidas foram encontradas na *Spilanthes acmella* e apresentaram atividades biológicas.[67] Com isso, optou-se manter a porção *N*-isobutilamida nos análogos sintetizados, modificando apenas a outra porção da molécula. Nesta outra porção foram realizadas pequenas modificações estruturais, a fim de obter moléculas mais simples, e com isso sintetizadas com maior facilidade. Também foram escolhidas modificações que ajudem a obter informações entre a estrutura e a atividade, principalmente a importância das insaturações.

O análogo acetilênico **16** foi sintetizado em 4 etapas, como descrito anteriormente (**Tabela 11**), com rendimento global de 23%. Foi utilizada uma rota similar a do espilantol, porém com uma etapa a menos. A única modificação realizada foi a substituição da dupla ligação Z por uma ligação tripla. Com isto, é possível obter informações sobre a importância dessa ligação dupla.

O composto **66** é uma *N*-alquilamida natural, conhecido como fagaramida,[68] que possui o mesmo sistema amida α,β-insaturada que o espilantol, porém ao invés do dieno, possui um sistema aromático que acarreta na diminuição da flexibilidade da cadeia, além de possuir uma cadeia mais curta. Não há relatos na literatura de estudos contendo os dois produtos naturais, desta forma, é de grande interesse comparar o perfil biológico deles.

O composto **68**, assim como o composto **66** possui o mesmo sistema amida α,β-insaturada que o espilantol, mas possui um sistema aromático ao invés do dieno, que acarreta na diminuição da flexibilidade.

Os compostos **67** e **69** foram sintetizados a fim de avaliar a importância das ligações duplas, tanto do dieno quanto do sistema α,β-insaturado.

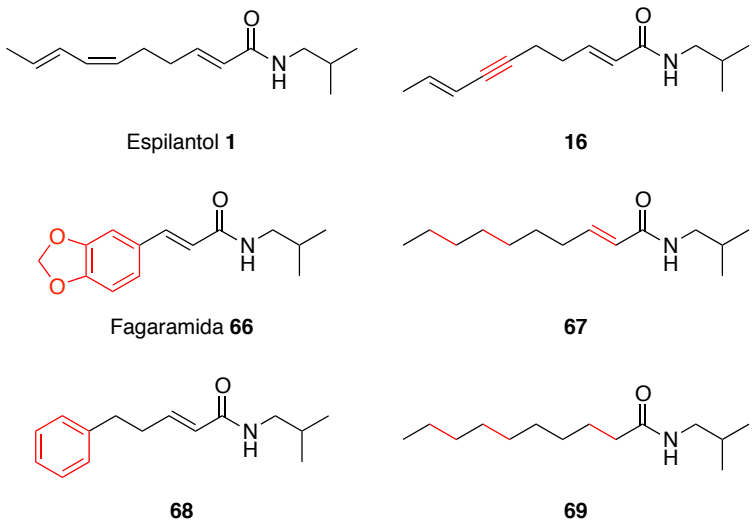
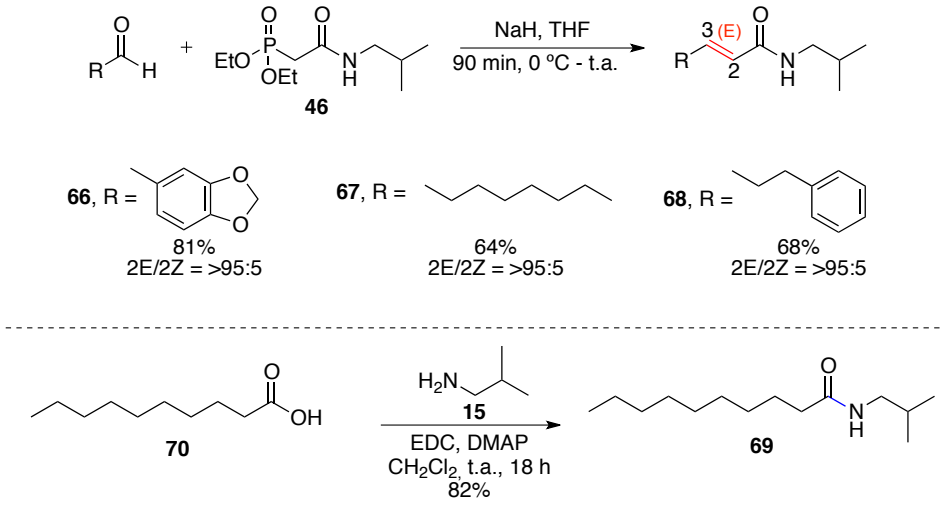


Figura 16. Análogos planejados do espilantol.

Os análogos **66**, **67** e **68** foram obtidos por meio de uma reação de HWE entre os respectivos aldeídos e a fosfonoacetamida **46,** utilizada também para obtenção do espilantol. O análogo **69** foi obtido pelo acoplamento entre o ácido carboxílico **53** e a isobutilamina (**15**, **Esquema 23**).



Esquema 23. Síntese dos análogos **66**-**69**.

3.4. Avaliação Biológica do Espilantol e Análogos

Os ensaios biológicos para avaliação do potencial terapêutico do espilantol e de seus análogos foram realizados em colaboração com alguns grupos de pesquisa.

3.4.1. Atividade Antiviral – Anti-HIV

Inicialmente, estudou-se a atividade antiviral em células TZM-bl, um tipo de célula HeLa (célula imortalizada, derivada de células de câncer cervical), infectadas com o vírus HIV-1 BaL.26. Os testes foram realizados pela doutoranda Veronica Santana de Freitas Blanco, sob supervisão do Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata na University of Southern California, Estados Unidos, e orientação dos Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método fluorimétrico CellTiter-Blue®[69]. Este ensaio consiste na capacidade de células viáveis converterem o substrato, resazurina, em um produto fluorescente, resorufina. Células não viáveis perdem rapidamente a capacidade metabólica e assim, não são capazes de produzir o sinal fluorescente.

A atividade anti-HIV *in-vitro* dos compostos foi determinada utilizando-se método descrito previamente.[70] Foram testadas concentrações variadas, de 0,1 a 1000 μM em células não infectadas, sendo possível observar redução na viabilidade celular quando utilizada a concentração de 1000 μM para todos os compostos.

Portanto, concentrações menores, ou seja, não tóxicas, foram utilizadas para avaliação do potencial anti-HIV.

Nos ensaios em células infectadas não foi possível observar redução na viabilidade celular, indicando que estes compostos não apresentaram atividade biológica apreciável contra o vírus HIV nas condições testadas.

3.4.2. Citotoxicidade

3.4.2.1. Câncer de Pâncreas e Melanoma

Paralelamente, o potencial antitumoral do espilantol e análogos foi avaliado pela Dra. Karin Juliane Pelizzaro Rocha-Brito, sob supervisão da Profª Dra. Carmen Veríssima Ferreira, no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

A atividade citotóxica foi avaliada em células de câncer de pâncreas (PANC-1), melanoma (SKMEL-103) e queratinócitos humanos (HaCaT) pelo método colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este ensaio baseia-se na redução do sal de tetrazólio em cristais de formazan azuis em células metabolicamente ativas.[71]

Os gráficos na **Figura 17** mostram que os compostos avaliados não apresentaram efeito em linhagens tumorais e foram citotóxicos para células normais de queratinócitos (HaCAT).

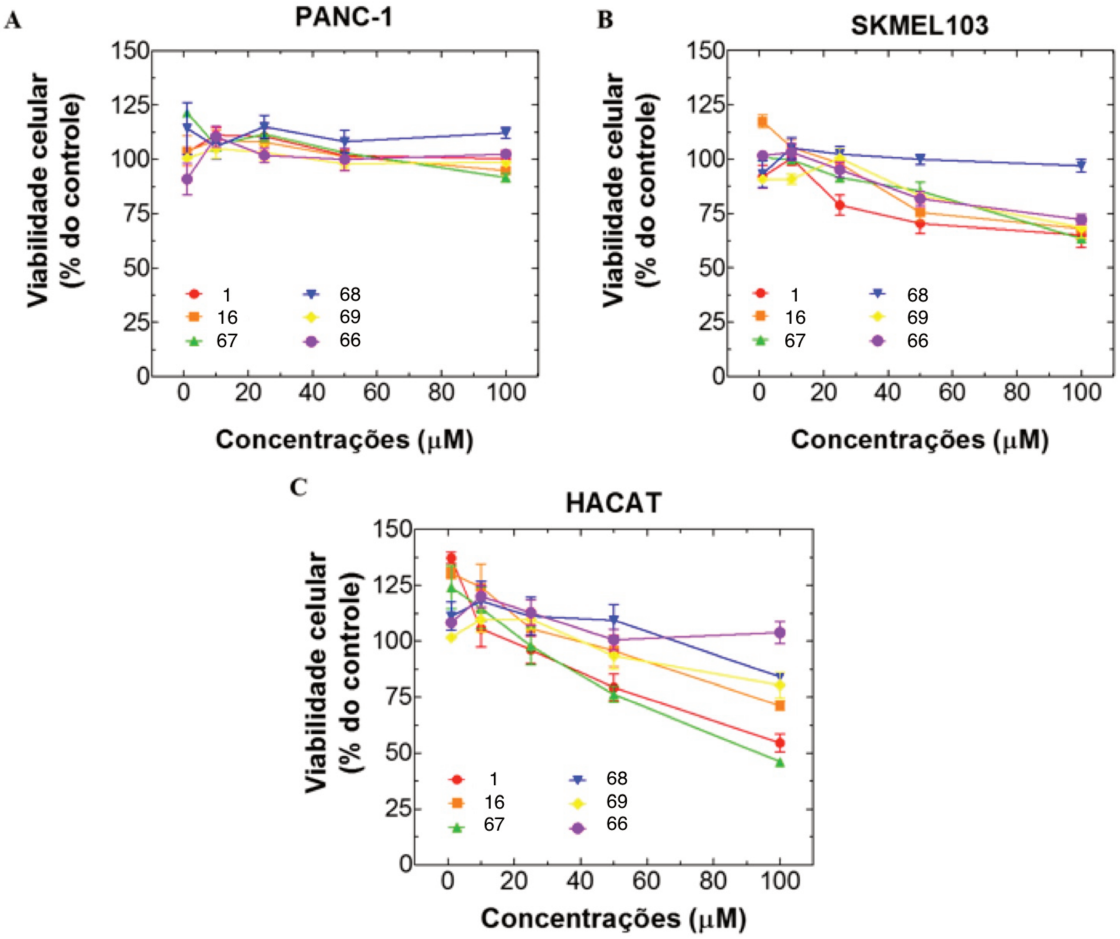


Figura 17. Ensaio de viabilidade celular em células Panc-1 (**A**), SKMEL-103 (**B**) e HaCAT (**C**).

3.4.2.2. Câncer de Mama

O potencial antitumoral do espilantol e análogos foi avaliado pela aluna de mestrado Luciana de Souza Paradela, sob supervisão da Dra. Sandra Martha Gomes Dias, no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

Os compostos foram avaliados em linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB 231 e de células transformadas MCF-10 (células não tumorigênicas) por meio de ensaios de inibição de proliferação celular *in vitro*. Foi utilizado o modelo de triagem de HCA (High Content Analysis), uma plataforma tecnológica pré-clínica baseada em células. Por meio de ensaios de HCA é possível obter uma melhor determinação da toxicidade e caracterização das alterações fenotípicas induzidas por moléculas bioativas. A HCA permite a análise qualitativa e quantitativa de vários

eventos celulares por meio da leitura de células individuais em placas multipoços com corantes fluorescentes sensíveis capazes de fornecer informações celulares através de mudanças na coloração do fluoróforo.

O composto CB839 (uma amida inibidora de glutaminase) foi utilizado como controle positivo e o DMSO foi utilizado como branco. Os compostos avaliados não apresentaram efeito significativo na inibição da proliferação celular na concentração testada, como pode ser observado na **Figura 18.**

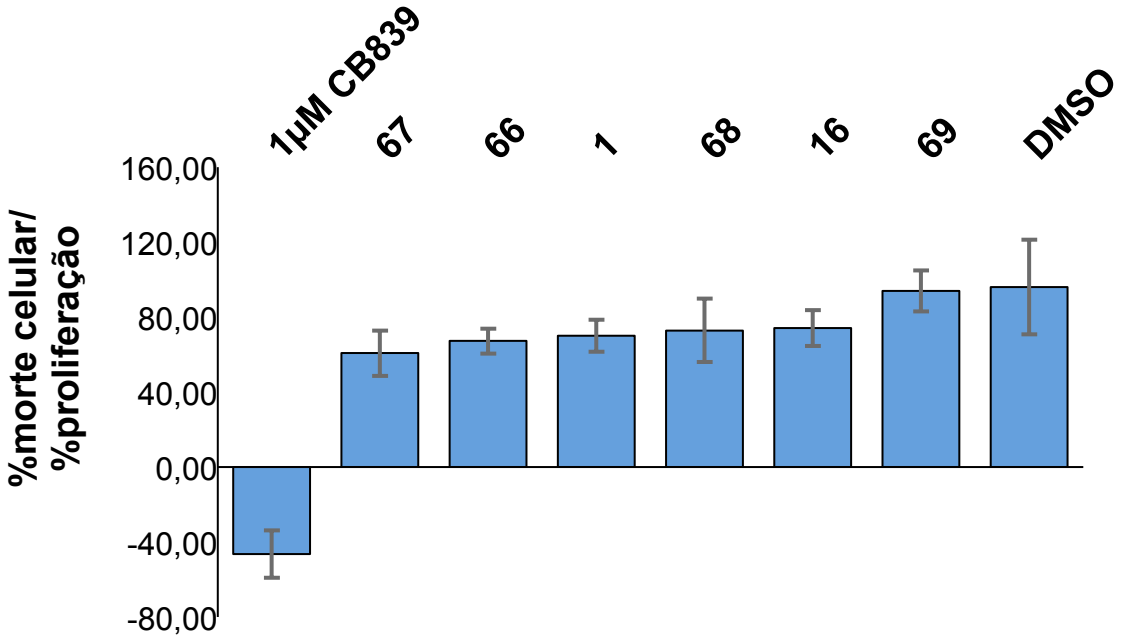


Figura 18. Gráfico de morte celular/ proliferação.

3.4.2.3. Painel de Linhagens Tumorais

O potencial antiproliferativo do espilantol e análogos em linhagens tumorais cultivadas *in vitro* foi avaliado pela aluna Thais Petrochelli Banzato, sob supervisão do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (FCF – UNICAMP), no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA – UNICAMP). O painel de linhagens é composto pelas células descritas na **Tabela 15**.

As células foram dispostas em placas de 96 compartimentos (100 µL/mL de suspensão celular) e foram expostas à quatro concentrações (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu g.mL^{-1}$) das amostras testadas em DMSO/RPMI e incubadas por 48h a 37 ºC, em atmosfera úmida com 5% de CO_2. Uma placa controle foi fixada com ácido tricloro-

acético. Após esse período de exposição, as células foram fixadas com TCA e a proliferação celular foi determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo protéico celular usando o corante sulforrodamina B.

Tabela 15. Painel de linhagens tumorais testadas.

Linhagem Celular	Nome
Pulmão	NCI-H460
Mama	MCF-7
Ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas	NCI-ADR/RES
Cólon	HT-29
Próstata	PC-3
Leucemia mielóide crónica (LMC)	K-562
Ovário	OVCAR-3
Renal	786-0
Glia	U251
Queratinócito humano**	HaCat

* DI: densidade de inoculação ** linhagem não-tumoral

A sulforrodamina B é um corante para proteínas que se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste, pois há mais células viáveis.[72]

A partir das curvas de crescimento celular de cada linhagem, em função da concentração da amostra, foi calculada a concentração efetiva TGI (concentração necessária para inibição total de crescimento celular). O TGI (**Tabela 16**) é utilizado para comparar a potência das amostras e evidenciar a seletividade. A doxorrubicina (doxo) foi utilizada como o controle positivo.

Tabela 16. Valores de TGI[a] (em μM) para o espilantol (**1**) e análogos.

Linhagens	1	16	66	67	68	69	doxo
U251	251,6	308,1	*	489,7	181,2	689,3	26,8
MCF7	370,3	513,3	*	*	447,6	*	5,2
NCI/ADR-RES	235,3	487,9	*	139,7	627,9	727,6	72,1
786-0	466,5	547,9	*	*	248,3	*	3,5
NCI-H460	233,5	248,1	*	615,8	823,1	717,1	473
PC-3	177,6	250,7	346,2	230,9	298,2	340,3	1,5
OVCAR-3	496,1	379,3	*	412,7	294,9	740,3	2,3
HT29	151,9	134,6	449,2	99,2	719,9	306,6	23,1
K-562	411,5	168,3	*	98,2	279,9	1082,8	1,7
HaCaT	261,6	271,0	*	745,2	411,4	*	1,5

TGI (total growth inhibition) foi determinada a partir da análise da regressão não-linear usando-se o programa ORIGIN 8.0® (OriginLab Corporation). * Valores maiores que 1140 mM.

A HaCaT é uma célula não tumoral utilizada para fins comparativos. Dessa forma, é interessante observar um valor mais elevado para essa linhagem e com grande diferença em relação a linhagem tumoral, demonstrando seletividade. O análogo **67** apresentou atividade interessante seletiva para a linhagem celular de câncer de cólon (HT29) e para a linhagem de leucemia mielóide crónica (K-562), dependente da concentração, sendo menos tóxica para a HaCAT. As demais amostras apresentaram atividade somente na maior concentração.

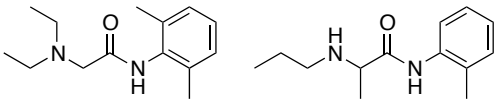
3.4.3. Avaliação da Atividade Antinociceptiva

Adicionalmente, foi avaliada a atividade antinociceptiva do espilantol e análogos pelo modelo de remoção da cauda (*tail flick*) em camundongos.

Essa atividade foi investigada com auxílio da aluna Lais Thiemi Yamane, supervisionada pelo Dr. Rodney Alexandre Rodrigues e em colaboração com a doutoranda Viviane, supervisionada pela Prof. Dra. Eneida de Paula, no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Chakraborty e colaboradores[18] relataram o efeito antinociceptivo do extrato de jambu, após administração intraperitoneal em ratos, utilizando o modelo *tail flick*.

Freitas[2] também utilizou esse método para avaliar a atividade do extrato de jambu contido em um bioadesivo de quitosana. O filme que continha 10% de extrato de jambu tratado mostrou-se ativo, superando o resultado obtido com o padrão positivo EMLA® (mistura eutética de 2,5% lidocaína e 2,5% prilocaína – **Figura 19**).



Lidocaína **Prilocaína**

Figura 19. Estrutura da Lidocaína e da Procaína.

Da mesma maneira, Yamane[73] avaliou um bioadesivo de hidroxietilcelulose contendo 15% de extrato de jambu tratado e 1,5% de óleo volátil de macela. Seus resultados também se mostraram superiores aos obtidos com EMLA®.

Em todos os casos foi observado um efeito antinociceptivo do extrato de jambu. Assim, o efeito do espilantol sintético isolado foi avaliado a fim de confirmar que este é o responsável pela atividade observada. Também foram avaliadas as atividades dos análogos sintéticos (**16**,**66**-**69**) para obter informações sobre a relação da estrutura dos compostos e sua atividade.

O teste foi realizado da seguinte forma. Primeiramente foram desenvolvidos bioadesivos de hidroxietilcelulose com cada um dos compostos e um placebo. Em seguida, os camundongos foram separados em oito grupos contendo seis camundongos em cada. Em cada grupo foi utilizado um filme com princípio ativo diferente (**1**, **16**, **66**-**69**), um grupo controle positivo, no qual foi utilizado EMLA® (150 mg) e um grupo controle negativo no qual foi aplicado apenas o filme, sem princípio ativo.

Os camundongos foram contidos em cilindro de acrílico mantendo a porção distal da cauda (10 cm) livre e em contato com um foco de luz a 55 ± 2 °C, demonstrado na **Figura 20**. O tempo necessário para remoção da cauda (latência) foi considerado como resposta aversiva ao calor. O valor basal de cada animal foi anotado antes do início do experimento e somente os que atingiram valor basal de até 6 s foram considerados para o experimento. Para evitar lesões térmicas, foi estabelecido o tempo máximo de 10 s para contato com a fonte de calor (*cut-off*).

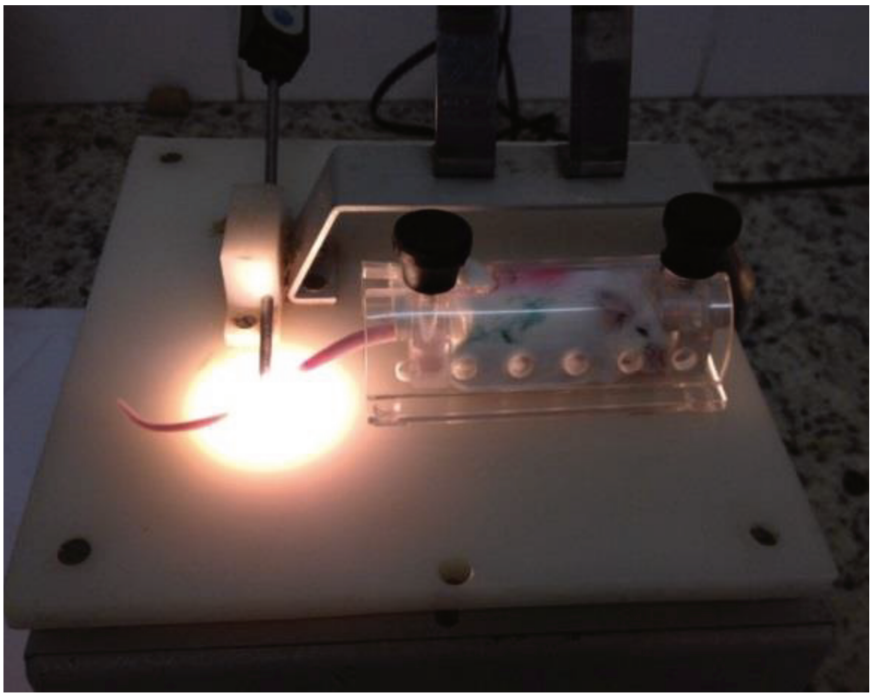


Figura 20. Determinação da atividade antinociceptiva pelo modelo de *Tail Flick*.

Após medir o tempo basal, o filme foi aplicado a 2 cm da base da cauda do animal por 5 min. Em seguida foi removido e foi realizada a primeira medida, expondo a cauda ao foco de luz na mesma região onde o filme foi aplicado. As outras medidas foram feitas a cada 15 min até cada animal atingir o seu valor basal de estímulo. A analgesia foi definida como um aumento no tempo necessário para remoção da cauda, pelo menos 50% maior que o valor de linha basal observado.

A **Figura 21** mostra um gráfico do efeito máximo possível pelo tempo. O efeito máximo possível (EMP) é calculado como $(L - B)/10 - B\,x\,100$ onde L = latência (valor obtido no teste), B = valor basal do animal e 10 é referente ao valor de *cut-off* do teste.

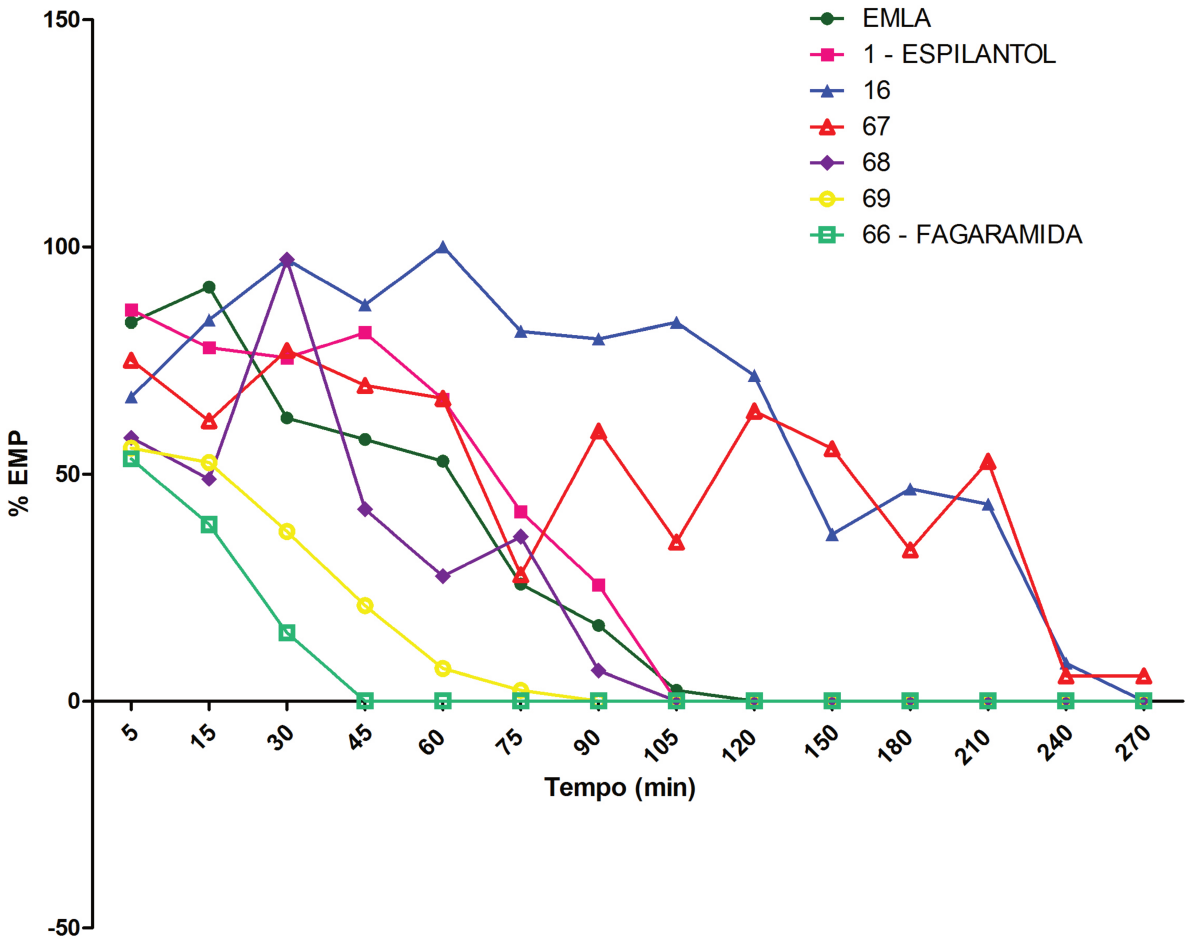


Figura 21. Gráfico de %EMP x Tempo (min) dos compostos **1**, **16**, **66**-**69** e EMLA®.

A duração da anestesia foi calculada como a média do tempo que cada animal levou para voltar ao seu valor basal. A **Figura 22** possui um gráfico da duração média em minutos do tratamento com cada composto.

Como esperado, não houve efeito antinociceptivo nos animais tratados com o bioadesivos de hidroxietilcelulose sem princípio ativo (controle negativo – dado não exibido nos gráficos).

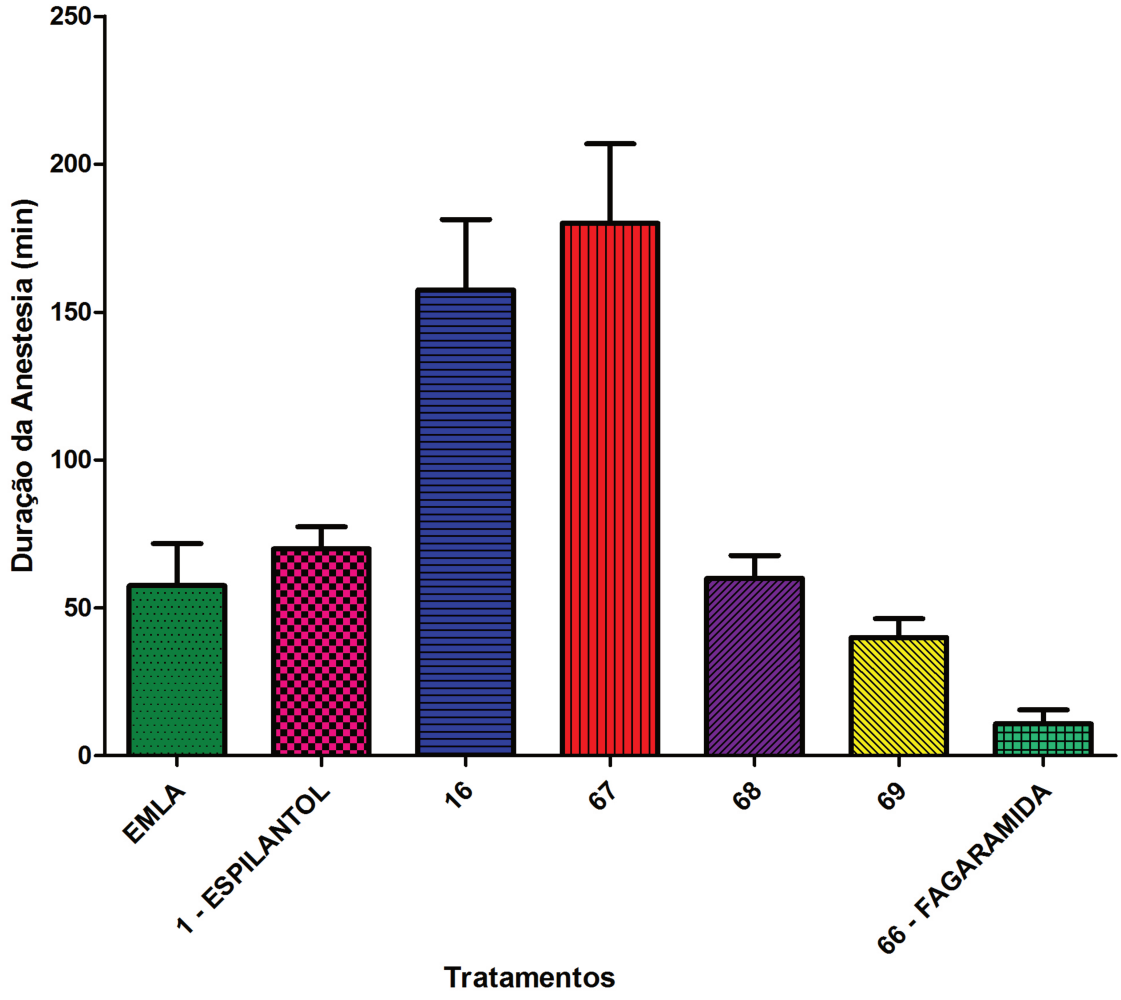


Figura 22. Gráfico de duração da anestesia (min) no tratamento com cada composto.

A partir dos gráficos contidos nas **Figuras 21 e 22** foi possível concluir que os compostos **66** e **69** levam a um mínimo aumento da resistência a dor nos primeiros 30 min, porém possuem valores de EMP e duração da anestesia menores quando comparados ao EMLA®.

O composto **68** mostrou um tempo de duração muito similar ao controle positivo, porém, é possível verificar que os valores de EMP são mais oscilantes (**Figura 21**).

O espilantol apresentou uma resposta melhor ao teste quando comparado ao EMLA®. O tempo de duração da anestesia do espilantol é de 70 ± 18 min enquanto para o EMLA® esse valor é de 58 ± 35 min. Estes resultados são esperado, uma vez

que Freitas[2] e Yamane[73] obtiveram resultados similares quando testaram o extrato de jambu. Com isso, pode-se concluir que o responsável pela atividade antinociceptiva do extrato realmente é o espilantol.

Os análogos **16** e **67** se destacaram, mostrando resultados superiores ao controle positivo (EMLA®) e também ao espilantol.

O análogo **67** foi sintetizado em 2 etapas, com rendimento global de 58%. Apesar de possuir uma estrutura simples, com apenas uma amida conjugada, mostrou um elevado tempo de duração do efeito analgésico quando comparado aos outros compostos. Levando em consideração que a única diferença do composto **67** para o **69**, é a ligação dupla conjugada à carbonila e que todos os outros análogos possuem essa ligação, foi possível concluir que a função amida conjugada é essencial para essa atividade.

A atividade mais interessante observada foi do composto **16**, além de um elevado tempo de duração (146 ± 62 min), também se mostrou muito potente, com altos valores de EMP. Sua estrutura é similar a do espilantol, a única diferença é a ligação tripla no lugar da ligação dupla com geometria *Z*, isso gera uma maior rigidez nessa porção da molécula. Sua síntese possui uma etapa a menos e rendimento global de 34%. Este composto mostra-se promissor para estudos futuros. No entando, é importante avaliar a permeação dos compostos, uma vez que um melhor resultado no teste de *tail flick* pode estar relacionado com uma melhor permeação do composto e não necessariamente devido a uma maior atividade.

É interessante observar que este efeito antinociceptivo foi obtido apenas com cinco minutos de aplicação do bioadesivo na cauda do animal, mostrando a rapidez da ação pretendida na metodologia empregada.

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA) e Tukey, considerando-se como nível crítico $p<0,05$ para que seja considerada diferença significante entre os grupos controle e tratados, as análises foram feitas com o pacote estatístico GraphPad Prism®, (GraphPad Software, Inc.).

4. Conclusão e Perspectivas

Estudos indicam que o espilantol presente no extrato de jambu apresenta diversas atividades biológicas. Portanto, o desenvolvimento de uma rota sintética que viabilize a síntese de grandes quantidades desse composto com alta pureza é de extrema importância para o estudo de suas propriedades, já que a maior parte dos ensaios foram feitos com o extrato bruto.

Neste trabalho foi possível desenvolver uma rota sintética para o espilantol (**1**) com apenas 5 etapas, chegando a um produto de alta pureza (>98% por HPLC) e sem a presença de outros isômeros (>95:5 por RMN de ^{1}H). Quando utilizado o brometo de vinila **52** com a dupla ligação com geometria *E,* o rendimento global foi de 25%. Da mesma forma, quando se utiliza o brometo de vinila **52**, que consiste na mistura de isômeros (*E*/*Z* 60:40) e possui um valor comercial inferior, foi possível obter o espilantol com a mesma pureza e com rendimento global de 17%. A rota descrita na literatura (**Esquema 4**) leva a formação do espilantol com pureza de apenas 76%, e considerando essa pureza, o rendimento global obtido foi de 23% em 9 etapas. Isso mostra que a rota proposta tem a vantagem de levar a um produto com uma pureza muito maior que a obtida na literatura, com rendimento global similar e com menos etapas. O custo da síntese de 1 g de espilantol empregando esta rota é de aproximadamente R$ 10.000,00, um valor baixo, considerando o valor para a sua aquisição de fontes comerciais US$ 28.000,00 (aproximadamente R$ 84.000,00).

O emprego de micro reatores contínuo não apresentou, até o momento, vantagens para a reação de Sonogashira, que justifiquem sua utilização. Os resultados em batelada se mostraram superiores quando comparados aos testes em fluxo contínuo.

Com pequenas alterações na rota inicialmente proposta, foi possível sintetizar 5 análogos naturais e não-naturais do espilantol que foram submetidos a diversos ensaios biológicos.

A atividade antiproliferativa e anti-HIV dos compostos sintetizados foram avaliados, a fim de obter-se informações sobre a relação estrutura atividade desta série de análogos. No entanto, até o momento não foi observado nenhum efeito biológico significativo.

Dois estudos relacionados a citotoxicidade do extrato de jambu foram publicados recentemente, apesar de se tratar de linhagens diferentes, os resultados obtidos nesse trabalho geram indícios de que o espilantol não seja o responsável por essa atividade, podendo ser causada por outros compostos presentes no extrato ou até por um sinergismo entre eles.

A atividade antinociceptiva da série de compostos foi avaliada *in vivo* empregando o modelo de *tail flick* em camundongos. Foi possível confirmar que o espilantol possui atividade antinociceptiva, obtendo valores similares aos descritos para o extrato de jambu, por Freitas e Yamane. Porém, outros dois análogos se destacaram mostrando resultados superiores ao controle positivo (EMLA®) e também ao espilantol.

O análogo **67** possui uma estrutura simples, apenas uma amida conjugada, e foi sintetizado em 2 etapas com rendimento global de 58% e mostrou um elevado tempo de duração do efeito analgésico quando comparado aos outros compostos.

A atividade mais interessante observada foi para o composto **16**, além de um elevado tempo de duração (146 ± 62 min), também se mostrou muito potente, com altos valores de EMP. Sua estrutura é similar a do espilantol (**1**), sendo a única diferença a ligação tripla no lugar da ligação dupla com geometria *Z*. Sua síntese possui uma etapa a menos e rendimento global de 34%. Esse composto mostra-se bastante promissor para futuramente aprofundar os estudos dessa atividade, que poderiam culminar no desenvolvimento de novos anestésicos de uso tópico.

5. Parte Experimental

5.1. Síntese

5.1.1. Reagentes e Solventes

Diclorometano (CH_2Cl_2) e trietilamina (Et_3N) foram tratados com hidreto de cálcio e destilados antes do uso. Tetraidrofurano (THF) foi tratado com sódio metálico e foi destilado antes do uso. Acetonitrila (CH_3CN) foi tratada com peneira molecular 4 Å por ao menos cinco dias antes do uso. Diisopropilamina (DIPA), diisopropiletilamina (DIPEA) e piperidina foram destiladas e armazenadas em frasco âmbar com hidróxido de potássio na geladeira. DMF foi destilado à vácuo e armazenado em frasco âmbar com peneira molecular 4 Å e atmosfera de N_2. DMSO e piridina foram obtidos em grau anidro, e foram usados sem prévio tratamento. Materiais de partida e demais reagentes foram obtidos de fontes comerciais e foram usados sem purificação prévia. Exceto quando mencionado, as reações foram conduzidas sob atmosfera de nitrogênio anidro.

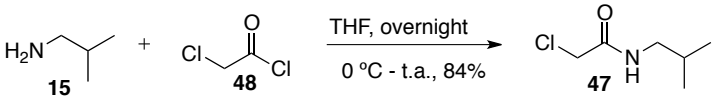
5.1.2. Métodos Cromatográficos

O progresso das reações foi monitorado por análise de cromatografia em camada delgada (sílica gel 60 F_{254} em folhas de alumínio, Merck). As separações cromatográficas foram realizadas empregando-se sílica gel 200-400 Mesh em colunador automático Isolera™ Prime da marca Biotage. Os eluentes utilizados como fase móvel foram descritos nos procedimentos experimentais. As análises por cromatografia em fase líquida (CLAE) foram realizadas em um aparelho Shimadzu contendo um detector do tipo UV com coluna analítica Zorbax Eclipse XDB-C18 da Agilent (4,6 x 150 mm 5-micron) e fase móvel de água/metanol. Análises de cromatografia gasosa CG-EM foram feitas no equipamento 9870A Agilent GC.

5.1.3. Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^{1}H) e de carbono desacoplado de próton (RMN de ^{13}C) foram obtidos em equipamentos de 250 MHz (5,87 T) da Bruker, 400 MHz (9,40 T), 500 MHz (11,7 T) e 600 MHz (14,09 T) da Avance. Os deslocamentos químicos (δ) estão reportados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram reportadas em hertz (Hz). O sinal do solvente deuterado foi usado como referência ($CDCl_3$ 7,26 ppm e 77,00 ppm). A multiplicidade dos picos foi reportada na seguinte forma: singleto (s), dupleto (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (quint.), sexteto (sext.), multipleto (m), singleto largo (sl.). Os espectros de RMN foram processados utilizando o programa ACD/NMR Processor Academic Edition; ACD/Labs versão 12.01. Espectros de massas de alta resolução (HRMS) foram obtidos no equipamento Agilent ifunnel Q-TOF 6550 LC–MS com fonte Dual Agilent Jet Stream ESI (Dual AJS-ESI) nas seguintes condições: temperatura do drying gas = 280 ºC; fluxo do drying gas = 12 L.min-1; nebulizer = 30 psi; temperatura do sheath gas = 300 °C; fluxo do sheath gas = 12 L min-1; VCap 2500 V; nozzle voltage 0 V; fragmentor 150 V; OCT 1 RF Vpp 750 V. Amostras duluídas foram injetadas por LC em modo FIA e em fluxo de 100 $mL.min^{-1}$. Os dados foram registrados em full MS mode em ESI(+) utilizando um intervalo de m/z 50 to 1000. Espectros de massas foram processados no software Mass Hunter B.06.00 (Agilent technologies, Santa Clara, California). Espectros de infravermelho foram adquiridos com o Agilent Cary 630 FT-IR e as frequências de absorção foram expressas em cm^{-1}. Os pontos de fusão são reportados em °C e não foram corrigidos.

5.1.4. Procedimentos Experimentais em Batelada

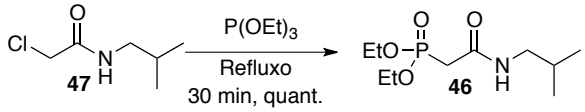


2-cloro-*N*-isobutilacetamida (47). Em um balão de fundo de redondo cloreto de cloroacetila (2 mL, 25,1 mmol, 1 eq.) foi solubilizado em THF anidro (50 mL) à 0 ºC. Esta solução foi adicionada via cânula, sob agitação vigorosa a uma solução de

isobutilamina (4 mL, 40,3 mmol, 1,6 eq.) em THF anidro (50 mL) mantida à 0 ºC. Ao término da adição, a reação foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, o meio reacional foi diluído em $CHCl_3$ e a mistura final foi lavada com uma solução aquosa de HCl 1M (3 x 30 mL), uma solução aquosa saturada de $NaHCO_3$ (3 x 30 mL) e um solução aquosa saturada de NaCl. O extrato orgânico foi seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. Foi obtido um óleo transparente (3,15 g, 21,1 mmol, 84% de rendimento) que foi utilizado sem purificação adicional. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 6,62 (sl., 1 H), 4,06 (s, 2 H), 3,15 (dd, *J* = 6,5 Hz, 2 H), 1,68 – 2,00 (m, 1 H), 0,94 (d, *J* = 6,6 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 63 MHz)** δ (ppm): 165,7 (C), 46,9 (CH_2), 42,5 (CH_2), 28,1 (CH), 19,8 (CH_3)**.**

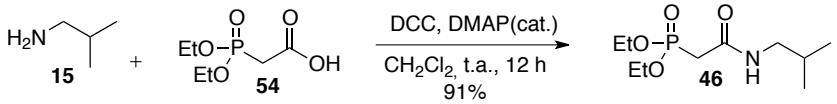
Dietil (2-(isobutilamino)-2-oxoetil)fosfonato (46)

Procedimento 1:



Em um balão de fundo redondo conectado à um condensador, trietilfosfito (4,3 mL, 24,8 mmol, 5 eq.) foi mantido a 110 ºC. Em seguida a 2-cloro-*N*-isobutilacetamida (742 mg, 4,96 mmol, 1 eq.), obtida na etapa anterior foi adicionada lentamente e a reação foi mantida sob refluxo por 30 min. Após esse período, o excesso de trietilfosfito foi destilado à vácuo deixando apenas o produto desejado no balão. Foram obtidos 1,25 g de um cristal branco (rendimento quantitativo) que foram utilizados sem purificação adicional.

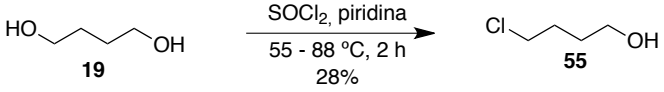
Procedimento 2 :



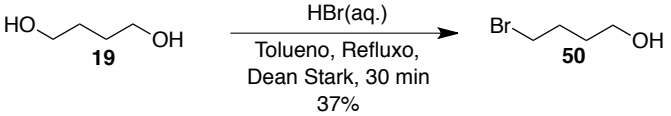
Uma solução de DCC (2,1 g, 10,1 mmol, 1 eq.) e DMAP (257 mg, 2,01 mmol, 0,2 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (60 mL) foi adicionada lentamente, à temperatura ambiente, a uma solução do composto **54** (1,87 mL, 11,1 mmol, 1,1 eq.) e de isobutilamina (1 mL, 10,1 mmol, 1 eq.) em 30 mL de CH_2Cl_2 anidro. A reação foi agitada à temperatura ambiente por 12 h. Após esse período, a mistura reacional foi filtrada e lavada com acetato de etila (20 mL). O extrato orgânico foi seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por

cromatografia em coluna (SiO_2, hexanos/EtOAc/metanol 5:4:1) para fornecer o composto **46** (2,3 g, 9,2 mmol 91% de rendimento) como um cristal branco.

Sólido branco. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ (ppm): 6,83 (sl., 1 H), 4,04 - 4,20 (m, 4 H), 3,08 (t, *J* =6,4 Hz, 2 H), 2,85 (s, 1 H), 2,80 (s, 1 H), 1,78 (tspt, *J* = 7,0 Hz, 1 H), 1,32 (t, *J* = 7,1 Hz, 6 H), 0,91 (d, *J*=6,7 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz)** δ (ppm): 163,8 (C, d, *J* = 2,9 Hz), 62,6 (CH_2, d, *J* = 6,2 Hz), 47,2 (CH_2), 34,9 (CH_2, d, *J* = 130,2 Hz), 28,4 (CH, s), 20,0 (CH_3, s), 16,3 (CH_3, d, *J* = 6,2 Hz) (obs.: alguns sinais aparecem duplicados devido ao acoplamento com ^{31}P). **RMN ^{31}P ($CDCl_3$, 243 MHz)** δ (ppm): 23,4. **HRMS** $[C_{10}H_{22}NO_4P+Na]^+$ calculado 274,1179, observado 271,1173.

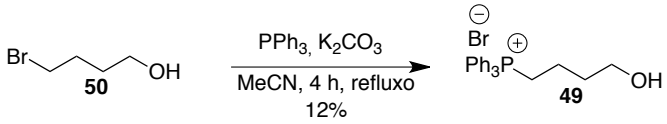


4-clorobutan-1-ol (55). Em um balão de duas bocas conectado a um condensador e com atmosfera de N_2, foi adicionado o 1,4-butanediol (9,85 mL, 110 mmol, 1 eq.) e piridina (8,91 mL, 110 mmol, 1 eq.). O cloreto de tionila (8 mL, 110 mmol, 1 eq.) foi adicionado lentamente a 55 ºC com auxílio de uma bomba do tipo seringa por 1 hora. Após o fim da adição a temperatura foi elevada para 80 ºC e a reação foi agitada por 1,5 hrs nesta temperatura. Posteriormente, a reação foi extraída com Et_2O (3 x 50 mL), as fases orgânicas foram combinadas e lavadas com uma solução de HCl 1M (25 mL), água (25 mL) e uma solução aquosa saturada de NaCl (25 mL). O extrato orgânico foi seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2, hexanos/EtOAc) para fornecer o composto **55** (3,36 g, 30,9 mmol, 28% de rendimento). Óleo incolor. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 3,64 (t, *J* = 6,2 Hz, 2 H), 3,55 (t, *J* = 6,5 Hz, 2 H), 2,19 (s, 1 H), 1,77 - 1,96 (m, 2 H), 1,60 - 1,75 (m, 2 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 63 MHz)** δ (ppm): 61,7 (CH_2), 44,8 (CH_2), 29,8 (CH_2), 28,9 (CH_2).

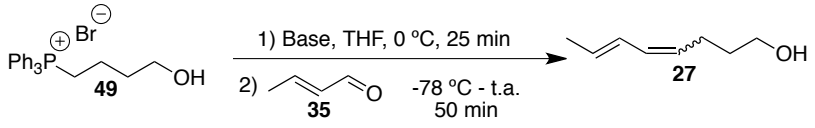


4-bromobutan-1-ol (50). Em um balão de duas bocas, conectado a um condensador e a uma vidraria de Dean- Stark foi adicionado 1,4-butanediol (4,5 mL, 50,3 mmol, 1 eq.) e tolueno (70 mL). A esta solução foi adicionada uma solução 48%

aquosa de HBr (55,2 mmol, 6,24 mL, 1,1 eq.) e a reação foi refluxada até consumo total do material de partida (verificado por CCD). Em seguida, a reação foi extraida com diclorometano (3 x 30 mL), lavada com água destilada (30 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida para formar o produto **50** (2,8 g, 18,6 mmol, 37% de rendimento) que foi utilizado na etapa seguinte sem nenhuma purificação. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 3,69 (t, *J* = 6,3 Hz, 2 H), 3,45 (t, *J* = 6,6 Hz, 2 H), 1,88 – 2,06 (m, 2 H), 1,66 – 1,79 (m, 2 H), 1,64 ppm (s, 1 H)

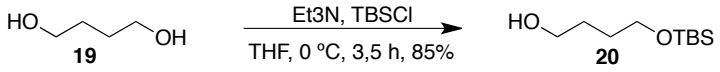


Brometo de (4-hidroxibutil)trifenilfosfonio (49). Em um balão de fundo redondo conectado a um condensador foi adicionado sequencialmente 4-bromobutan-1-ol **30** (8,85 mmol, 1,35 g, 1 eq.), CH_3CN (20 mL), PPh_3 (8,85 mmol, 2,44 g, 1 eq.) e K_2CO_3 (8,85 mmol, 1,22 g, 1 eq.). A solução resultante foi agitada sob refluxo por 4 h. Após esse período, o carbonato de potássio foi filtrado e lavado com CH_3CN. A solução resultante foi tratada com Et_2O e deixada em banho de gelo para cristalizar. Após algumas horas o produto foi filtrado á vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com pequenas porções de Et_2O. Foram obtidos 441 mg (1,06 mmol, 12% de rendimento) de um cristal branco, utilizado sem purificação adicional. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 7,60 - 7,93 (m, 15 H), 3,62 - 3,87 (m, 4 H), 2,61 (s, 4 H – OH + H_2O), 1,74 - 1,93 (m, 4 H). **RMN ^{13}C (CDCl3, 63 MHz)** δ (ppm): 135,0 (CH, d, *J* = 3,2 Hz), 133,7 (CH, d, *J* = 10,1 Hz), 130,5 (CH, d, *J* = 12,9 Hz), 118,3 (CH, d, *J* = 85,9 Hz), 60,0 (CH_2, s), 31,9 (CH_2, d, *J* = 15,6 Hz), 22,4 (CH_2, d, *J* = 50,6 Hz), 19,3 (CH_2, d, *J* = 3,7 Hz) (obs.: alguns sinais aparecem duplicados devido ao acoplamento com ^{31}P)

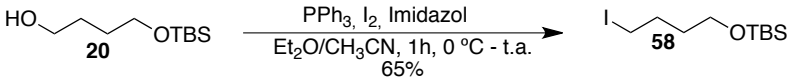


(6*E*)-octa-4,6-dien-1-ol (27). O procedimento abaixo foi utilizado com todas as bases descritas na **Tabela 1**. Em um balão de fundo redondo o sal de fosfônio **27** (0,339 mmol, 141 mg, 1 eq.) foi suspendido em em THF (4 mL). Em seguida, a base

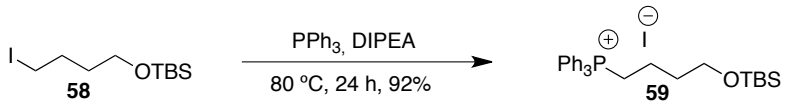
(0,745 mmol, 2 eq.) foi adicionada lentamente; a solução resultante se tornou alaranjada e foi agitada por 15 min. Após esse período, a solução foi resfriada à -78 ºC e adicionou-se uma solução do crotonaldeído (0,339 mmol, 28,4 µL, 1 eq.) em THF (0,6 mL). A mistura reacional foi agitada à baixa temperatura por 20 min, em seguida, foi mantida agitação por 1 h a temperatura ambiente. A reação foi terminada com a adição de água destilada (10 mL) e a fase orgânica foi extraída com Et_2O (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi obtido como um óleo transparente (rendimentos se encontram na **Tabela 1**). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz)** δ (ppm): 6,33 (dd, *J* = 14,5, 11,5 Hz, 1 H), 5,98 (dd, *J* = 10,9 Hz, 1 H), 5,69 (dq, *J* = 15,2, 6,8 Hz, 1 H), 5,29 (dt, *J* = 10,5, 7,7 Hz, 1 H), 3,66 (t, *J* = 6,5 Hz, 2 H), 2,26 (dt, *J* = 7,4 Hz, 2 H), 1,77 (d, *J* = 6,6 Hz, 3 H), 1,66 (quin, *J* = 6,9 Hz, 2 H), 1,53 (s, 1 H). **RMN ^{13}C (CDCl3, 151 MHz)** δ (ppm): 129,7 (CH), 129,3 (CH), 128,5 (CH), 126,7 (CH), 62,5 (CH_2), 32,5 (CH_2), 24,0 (CH_2), 18,3 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3326, 3021, 2933, 2807, 1450, 1439, 1378, 1057, 1039,983, 949, 821, 704.



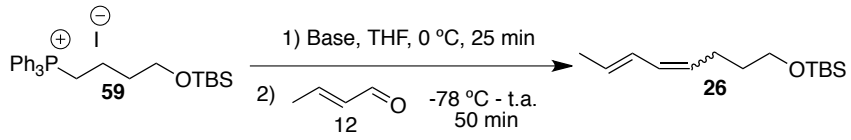
4-((tert-butildimetilsilil)oxi)butan-1-ol (20). Em um balão de fundo redondo foi adicionado o diol **36** (2,69 mL, 30 mmol, 1 eq.) e THF anidro (30 mL). A solução foi resfriada a 0 ºC e foram adicionados sequencialmente a trietilamina (5,02 mL, 36 mmol, 1,2 eq.) e o TBSCl (4,66 g, 30 mmol, 1 eq.). A solução final foi agitada à temperatura ambiente por 2 h. A reação foi interrompida adicionando-se uma solução aquosa saturada de NH_4Cl (20 mL) e produto foi extraído com Et_2O (3 x 20 mL), seco com Na_2SO_4 e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2, hexanos/EtOAc 9:1) para fornecer o composto **20** (5,2 g, 25,5 mol, 85% de rendimento) como um óleo incolor. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ (ppm): 3,57 - 3,74 (m, 4 H), 2,64 (sl., 1 H), 1,56 - 1,71 (m, 4 H), 0,89 (s, 9 H), 0,06 (s, 6 H). **RMN ^{13}C (CDCl3, 101 MHz)** δ (ppm): 63,3 (CH_2), 62,7 (CH_2), 30,2 (CH_2), 29,8 (CH_2), 25,9 (CH_3), 18,3 (C), -5,4 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3368, 2931, 2887, 2859, ,1475, 1465, 1391, 1363, 1255, 1100, 1063, 1028, 1009, 942, 834, 774, 664.



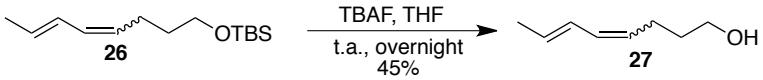
tert-butil(4-iodobutoxi)dimetilsilano (58). Em uma solução do álcool **20** (4,03 g, 19,7 mmol, 1 eq.) em 12 mL de Et_2O e 7,5 mL de CH_3CN foi adicionado a PPh_3 (5,68 g, 21,7 mmol, 1,1 eq.). A solução resultante foi resfriada a 0 ºC e foram adicionados sequencialmente o I_2 (5,28 g, 20,7 mmol, 1,05 eq.) e o imidazol (1,76 g, 25,6 mmol, 1,3 eq.). A mistura final foi agitada por 10 min a baixa temperatura e então a temperatura foi elevada para 25 ºC por 1 hora. Após esse período o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o bruto reacional foi lavado com pentano (8x). O extrato foi seco com Na_2SO_4 anidro e concentrado sob pressão reduzida. O material obtido foi deixado no freezer para precipitar o restante de trifenilfosfina, que foi separada por filtração. O produto foi obtido na forma de um liquido amarelado (4,0 g, 2,61 mmol, 65% de rendimento) suficientemente puro para ser empregado na próxima etapa. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 3,63 (t, *J* = 6,2 Hz, 2 H), 3,22 (t, *J* = 7,0 Hz, 2 H), 1,85 - 1,97 (m, 2 H), 1,55 - 1,67 (m, 2 H), 0,89 (s, 9 H), 0,05 (s, 6 H). **RMN ^{13}C (CDCl3, 101 MHz)** δ (ppm): 61,9 (CH_2), 33,5 (CH_2), 30,2 (CH_2), 25,9 (CH_2), 18,3 (C), 7,1 (CH_3), -5,3 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 2952, 2927, 2886, 2857, 1470, 1388, 1360, 1254, 1224, 1097, 1075, 958, 833, 773, 710, 661, 598, 542.



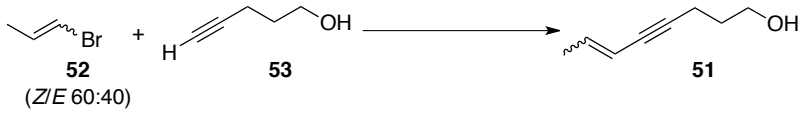
Iodeto de (4-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)butil)trifenilfosfonio (59). Em um balão de fundo redondo foi adicionado o iodeto **41** (3,99 g, 12,7 mmol, 1 eq.), DIPEA (3,58 mL, 20,3 mmol, 1,6 eq.) e PPh_3 (3,67 g, 14,0 mmol, 1,1 eq.) e a mistura foi agitada à 80 ºC durante a noite. A reação foi resfriada até temperatura ambiente, tratada com Et_2O e deixada em banho de gelo para cristalizar. Após algumas horas o produto foi filtrado á vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com pequenas porções de Et_2O. Obtendo o produto **59** como um sólido branco (6,76 g, 9,66 mmol, 92% de rendimento) **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 7,75 - 7,84 (m, 9 H), 7,65 - 7,73 (m, 6 H), 3,59 - 3,75 (m, 4 H), 1,84 - 1,95 (m, 2 H), 1,65 - 1,82 (m, 2 H), 0,75 (s, 9 H), -0,06 (s, 6 H). **RMN ^{13}C (CDCl3, 101 MHz)** δ (ppm): 135,0 (CH), 133,6 (CH), 130,5 (CH), 118,1 (C), 61,6 (CH_2), 32,6 (CH_2), 25,8 (CH_3), 22,6 (CH_2), 19,2 (CH_2), 18,1 (CH), -5,4 (CH_3).



***tert*-butildimetil((6*E*)-octa-4,6-dien-1-iloxi)silano (26).** O procedimento abaixo foi realizado com todas as bases descritas na **Tabela 2**. Em um balão de fundo redondo o sal de fosfônio **59** (1 mmol, 578 mg, 1 eq.) foi suspendido em THF anidro (4 mL) e resfriado à 0 ºC. Em seguida, a base (1,1 mmol, 1,1 eq.) foi adicionada lentamente. A solução resultante se tornou alaranjada e foi agitada por 15 min. Após esse período, a solução foi resfriada à -78 ºC e adicionou-se crotonaldeído (1,2 mmol, 101 µL, 1,2 eq.). A mistura reacional foi agitada à baixa temperatura por 20 min, em seguida agitou-se a reação por 3 h a temperatura ambiente. A reação foi terminada com a adição de água destilada (10 mL) e a fase orgânica foi extraída com Et_2O (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2, hexanos/EtOAc 9:1) para fornecer o produto **26** como um óleo incolor. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ (ppm): 6,33 (ddsxt, *J* = 15,0, 11,0, 1,6 Hz, 1 H), 5,95 (dd, *J* = 10,9, 10,9 Hz, 2 H), 5,67 (dquin, *J* = 15,3, 6,7 Hz, 1 H), 5,28 (dt, *J* = 10,5, 7,8 Hz, 1 H), 3,62 (t, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 2,22 (dt, *J* = 7,1, 7,1 Hz, 2 H), 1,77 (dd, *J* = 6,7, 0,6 Hz, 3 H), 1,53 - 1,65 (m, 3 H), 0,90 (s, 9 H), 0,05 (s, 6 H).



(6*E*)-octa-4,6-dien-1-ol (27). TBAF (1,6 mL, 1,6 mmol, 1,2 eq.) foi adicionado a uma solução do composto **28** (321 mg, 1,33 mmol, 1 eq.) em THF anidro (5 mL) à 0 ºC e a mistura foi agitada a temperatura ambiente durante a noite. Após esse período, adicionou-se uma solução aquosa saturada de NH_4Cl (5 mL), a mistura foi extraída com Et_2O (3 x 5 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2, hexanos/EtOAc 9:1) para fornecer o produto **27** (75,7 mg, 0,6 mmol, 45 % de rendimento) como um óleo incolor (produto descrito anteriormente).



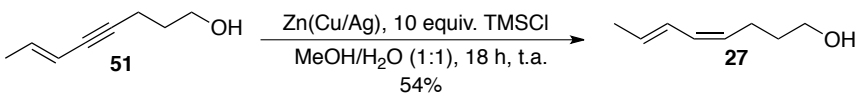
Procedimento típico para reação de Sonogashira (escala 1 mmol).

A base, o solvente, o tipo de catalisador de paládio, a temperatura, o tempo reacional, a geometria da ligação dupla do material de partida **52** e as quantidades utilizadas estão descritos nas **Tabelas 4- 9**.

Em um balão de fundo redondo foi adicionado o catalisador de paládio, o CuI e a PPh_3 (quando utilizado). O sistema foi purgado com nitrogênio e em seguida adicionou-se o sequencialmente o solvente (3 mL), o brometo de vinila **52**, o álcool **53** e por fim a base. A solução final foi agitada na temperatura e no tempo especificados nas tabelas. Após o tempo indicado, $AcOEt_2$ (2 mL) foi adicionado, a reação foi filtrada em uma pequena coluna de sílica, eluída com $AcOEt_2$ (50 mL), lavada com H_2O (3 x 30 mL) e com uma solução aquosa saturada de NaCl (30 mL), seco com $MgSO_4$ anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo o composto **51** na forma de um óleo alaranjado.

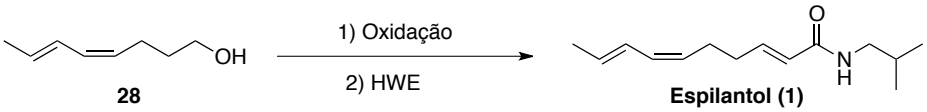
(*E*)-oct-6-en-4-yn-1-ol. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 250 MHz)** δ (ppm): 1,61 (d, OH + H_2O) 1,76 (m) 2,41 (td, *J* = 6,8, 1,7 Hz) 3,75 (t, *J* = 6,0 Hz) 5,45 (dsxt, *J* = 15,7, 1,9 Hz) 6,06 (dq, *J* = 15,7, 6,8 Hz). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz)** δ (ppm): 15,9 (CH_2), 18,4 (CH_3), 31,3 (CH_2), 61,7 (CH_2), 79,7 (C) 87,4 (C) 110,8 (CH), 138,4 (CH). **IV (ATR, cm^{-1})** 3341, 3028, 2939, 2916, 1879, 1436, 1365, 1328, 1300, 1185, 1056, 1039, 955, 936, 724, 487.

(*Z*)-oct-6-en-4-yn-1-ol. **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ (ppm): 5,90 (dq, *J* = 9,7, 6,8 Hz, 1 H), 5,45 (dsxt, *J* = 10,7, 1,9 Hz, 1 H), 3,79 (t, *J* = 6,1 Hz, 2 H), 2,49 (td, *J* = 6,9, 2,1 Hz, 2 H), 1,85 (dd, *J* = 6,8, 1,7 Hz, 3 H), 1,81 (quin, *J* = 6,5 Hz, 2 H), 1,57 (s, 1 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz)** δ (ppm): 137,3 (CH), 110,1 (CH), 93,8 (C), 77,8 (C), 61,9 (CH_2), 31,5 (CH_2), 16,1 (CH_2), 15,7 (CH_3).



Zinco em pó (5 g, 76,5 mmol, 13,8 eq.) foi adicionado a 20 mL de água

destilada e argônio foi borbulhado na suspensão em agitação por 15 min. Após esse tempo, parou-se de borbulhar argônio e foi adicionado o $Cu(OAc)_2$ (0,5 g, 2,45 mmol, 0,44 eq.) e a solução foi agitada por mais 15 min. Em seguida, foi adicionado o $AgNO_3$ (0,5 g, 2,94 mmol, 0,53 eq.) e a agitação seguiu por mais 30min. Ao final desse tempo a amálgama foi filtrada á vácuo e foi lavada com H_2O, MeOH, acetona e Et_2O (3 x 10 mL cada). Em seguida a amálgama foi transferida para um balão contendo uma solução de MeOH/H_2O (1:1), adicionou-se o substrato **51** (685,9 mg, 5,52 mmol, 1 eq.) lavando com MeOH (2 x 0,5mL) e TMSCl (7,23 mL, 55,2 mmol, 10 eq.) lentamente. A reação foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até consumo total do material de partida (18 h). Após esse período, a reação foi filtrada à vácuo em um funil de placa sinterizada com uma pequena quantidade de sílica e a amálgama foi cuidadosamente lavada com MeOH (2x 20mL) e Et_2O (2x 20mL). O filtrado foi evaporado até metade do volume inicial e a fase aquosa foi extraída com Et_2O (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa saturada de NaCl (50 mL), seca com $MgSO_4$ e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi obtido como um óleo incolor (376,2 mg, 2,98 mmol, 54% rendimento) e não houve necessidade de purificações adicionais.



28 **Espilantol (1)**

Dois procedimentos diferentes foram utilizados para a etapa a etapa de oxidação.

Procedimento 1

PCC (285 mg, 1,3 mmol, 1,5 eq.) foi adicionado, em pequenas porções, a uma solução do álcool **28** (109 mg, 0,865 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (6 mL). A reação foi agitada à temperatura ambiente por 3,5 hrs. Em seguida, a reação foi filtrada e lavada com CH_2Cl_2 (3 x 5 mL) e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional (93,3 mg) foi usado diretamente na etapa seguinte.

O éster fosfonado **46** 208 mg, 0,826 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (99,2 mg, 2,48 mmol, 3,3 eq.) em THF anidro (7 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à 0 ºC. Em seguida, o bruto reacional (93,3 mg) obtido na etapa anterior foi adicionado a solução, lavando com THF anidro (2 x 2 mL) e a

solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida (1 h). A reação foi diluída com Et_2O (10 mL), lavada com uma solução aquosa de HCl 1M (10 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **1** (28,2 mg, 0,13 mmol, 15% de rendimento).

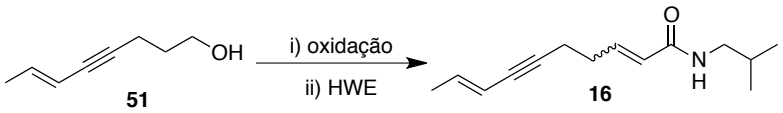
Procedimento 2

DMSO (1 mL, 14,1 mmol, 5,42 eq.) foi adicionado, lentamente, a uma solução de cloreto de oxalila (0,85 mL, 10 mmol, 3,86 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (15 mL) à -78 ºC. A solução foi agitada por 15 min e em seguida foi adicionado o álcool **28** (327,7 mg, 2,6 mmol, 1 eq.). A mistura final foi agitada por 1 h à -78 ºC. Após esse período foi adicionada Et_3N (6,3 mL, 45,2 mmol, 17,4 eq.) e o banho de gelo-seco foi removido. Após a reação alcançar a temperatura ambiente adicionou-se Et_2O (5 mL) e a reação foi lavada com água destilada (3 x 10 mL), solução aquosa saturada de NaCl, seca com $MgSO_4$ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional foi usado diretamente na etapa seguinte.

O éster fosfonado **46** (721 mg, 2,8 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (321,3 mg, 8,0 mmol, 3,1 eq.) em THF anidro (55 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à 0 ºC. Em seguida, o bruto reacional obtido na etapa anterior foi adicionado a solução, lavando com THF anidro (2 x 10 mL) e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida (1 h). A reação foi diluída com Et_2O (5 mL), lavada com uma solução aquosa de HCl 1M (5 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **1** (362,4 mg, 1,6 mmol, 63% de rendimento).

Óleo transparente/amarelado $\mathbf{R_f}$ 0,31 (SiO_2, hexanos/EtOAc 70:30). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz)** δ (ppm): 6,82 (dt, *J* = 15,3, 6,6 Hz, 1 H), 6,28 (dddq, *J* = 14,7, 11,1, 1,5 Hz, 1 H), 5,96 (dd, *J* = 10,9 Hz, 1 H), 5,80 (dt, *J* = 15,2, 1,5 Hz, 1 H), 5,69 (dq, *J* = 14,1, 6,8 Hz, 1 H), 5,59 (sl., 1 H), 5,25 (dt, *J* = 10,5, 7,4 Hz, 1 H), 3,14 (dd, *J* = 6,8 Hz, 1 H), 2,31 (dt, *J* = 7,4 Hz, 2 H), 2,25 (dtd, *J* = 6,6, 1,3 Hz, 2 H), 1,75 – 1,83 (m, 4 H), 0,92 ppm (d, *J* = 6,8 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 151 MHz)** δ (ppm): 166,0 (C), 143,4 (CH), 129,9 (CH), 129,4 (CH), 127,6 (CH), 126,6 (CH), 124,1 (CH), 46,8 (CH_2), 32,0 (CH_2), 28,5 (CH), 26,3 (CH_2), 20,1 (CH_3), 18,2 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})**

3280, 2957, 2927, 2870, 1668, 1627, 1545, 1235, 1159, 978, 944, 818, 618. **Pureza** 98%. **HRMS** $[C_{14}H_{23}NO^{+}H]^{+}$ calculado 222,1852, observado 222,1846.



51 16

(2*E*,8*E*)-*N*-isobutildeca-2,8-dien-6-enamida (16). Para a síntese do composto **16** duas reações de oxidação diferentes foram empregadas. E três variantes da reação de HWE. As reações utilizadas e os rendimentos estão descritos na **Tabela 10**.

Reações de Oxidação

Procedimento 1: A uma solução do álcool **51** (139,1 mg, 1,12 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (16 mL) à 0 ºC foi adicionado sequencialmente em peneira molecular 4 Å em pó (2,18 g), acetato de sódio anidro (50,5 mg, 0,62 mmol, 0,6 eq.) e PCC (591,9 mg, 2,69 mmol, 12,4 eq.). A reação foi agitada à 0 ºC por 3,5 hrs. Em seguida, a reação foi filtrada e lavada com CH_2Cl_2 (3 x 15 mL) e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional foi usado diretamente na etapa seguinte.

Procedimento 2: DMSO (1 mL, 14,1 mmol, 5,94 eq.) foi adicionado, lentamente, a uma solução de cloreto de oxalila (0,8 mL, 9,44 mmol, 3,98 eq.) em CH_2Cl_2 anidro (15 mL) à -78 ºC. A solução foi agitada por 15 min e em seguida foi adicionado o álcool **51** (294,4 mg, 2,37 mmol, 1 eq.). A mistura final foi agitada por 1 h à -78 ºC. Após esse período foi adicionado Et_3N (6,1 mL, 43,7 mmol, 18,4 eq.) e o banho de gelo-seco foi removido. Logo após a reação alcançar a temperatura ambiente adicionou-se Et_2O (5 mL) e a reação foi lavada com água destilada (3 x 10 mL), solução aquosa saturada de NaCl, seca com $MgSO_4$ anidro e concentrada sob pressão reduzida. O bruto reacional foi usado diretamente na etapa seguinte.

Variantes da reação de HWE

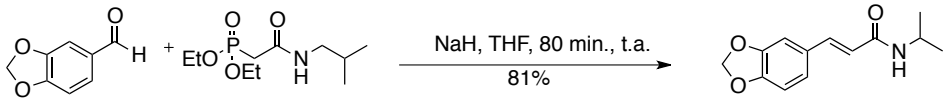
Procedimento 1: O éster fosfonado **46** (310 mg, 1,23 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (224 mg, 5,6 mmol, 5 eq.) em THF anidro (10 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à 0 ºC. Em seguida, adicionou-se o bruto reacional da reação de oxidação, lavando com THF anidro (2 x 2 mL) e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida. A reação foi diluída com éter etílico (10 mL), lavada com uma

solução aquosa de HCl 1M (10 mL), seca com Na_2SO_4 anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc).

Procedimento 2: Em um frasco contendo $Zn(OTf_2)$ (1002 mg, 2,7 mmol, 5 eq.) foi adicionado sequencialmente THF anidro (2,2 mL), o éster fosfonado **46** (387 mg, 1,54 mmol, 1,25 eq.), TMEDA (221 µL, 1,47 mmol, 1,2 eq.), Et_3N (376 µL, 2,7 mmol, 2,2 eq.) e por fim o bruto reacional obtido na etapa anterior. A solução resultante foi agitada por 20 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado HCl 1M (10 mL) e a reação foi extraída com CH_2Cl_2 (4 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc).

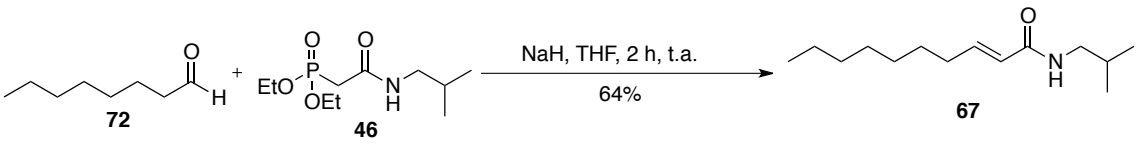
Procedimento 3: A uma solução do éster fosfonado **46** (387 mg, 1,54 mmol, 1,25 eq.) em THF anidro (30 mL) TMEDA (221 µL, 1,47 mmol, 1,2 eq.), Et_3N (376 µL, 2,7 mmol, 2,2 eq.) e por fim o bruto reacional obtido na etapa anterior. A solução resultante foi agitada por 20 h à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado HCl 1M (10 mL) e a reação foi extraída com CH_2Cl_2 (4 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc).

Sólido laranja. **P.F.** 91,4 – 95,6 ºC. **R_f** 0,36 (SiO_2, hexanos/EtOAc 7:3). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz)** δ (ppm): 6,84 (dt, *J* = 15,2, 6,4 Hz, 1 H), 6,05 (dq, *J* = 15,6, 6,8 Hz, 1 H), 5,84 (d, *J* = 15,4 Hz, 1 H), 5,64 (sl., 1 H), 5,44 (dq, *J* = 15,8, 1,8 Hz, 1 H), 3,15 (dd, *J* = 6,4 Hz, 2 H), 2,36 – 2,45 (m, 4 H), 1,76 – 1,84 (m, 1 H), 1,74 (dd, *J* = 6,8, 1,7 Hz, 3 H), 0.92 ppm (d, *J* = 6,6 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 151 MHz)** δ (ppm): 165,8 (C), 142,3 (CH), 138,6 (CH), 124,6 (CH), 110,8 (CH), 86,7 (C), 80,1 (C), 46,9 (CH_2), 31,3 (CH_2), 28,5 (CH), 20,1 (CH_3), 18,5 (CH_2), 18,4 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3291, 2959, 2914, 2870, 1666, 1625, 1545, 1334, 1236, 1220, 950, 650. **Pureza** 95%. **HRMS** $[C_{14}H_{21}NO+H]^+$ calculado 220,1696, observado 220,1710.



71 **46** **Fagaramida 66**

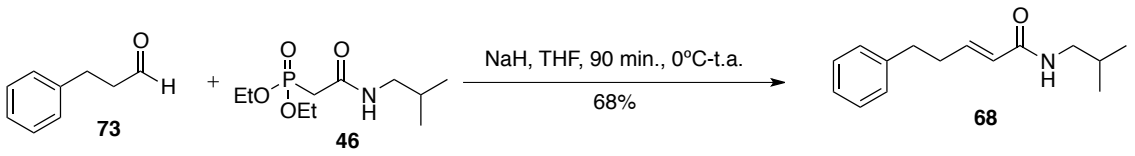
(*E*)-3-(benzo[*d*][1,3]dioxol-5-il)-*N*-isopropilacrilamida (66). O éster fosfonado **46** (276 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (126,5 mg, 3,16 mmol, 3,16 eq.) em THF anidro (15 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, piperonal (150,5 mg, 1 mmol, 1 eq.) foi adicionado à reação e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida (80 min). A reação foi diluída com água (10 mL) e o produto foi extraído com AcOEt (2 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **66** (200,7 mg, 81% de rendimento) como um sólido branco. **P.F.** 115,7 – 118,1 °C. **R_f** 0,36 (SiO_2, hexanos/EtOAc 70:30). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz)** δ (ppm): 7,54 (d, *J* = 15,4 Hz, 1 H), 7,00 (d, *J* = 1,3 Hz, 1 H), 6,97 (dd, *J* = 8,1, 1,3 Hz, 1 H), 6,78 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 6,25 (d, *J* = 15,4 Hz, 1 H), 5,98 (s, 2 H), 5,81 (sl., 1 H), 3,21 (dd, *J* = 6,1, 6,1 Hz, 2 H), 1,79 – 1,90 (m, 1 H), 0,95 (d, *J* = 6,6 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz)** δ (ppm): 166,2 (C), 149,0 (C), 148,2 (C), 140,8 (CH), 129,2 (C), 123,8 (CH), 118,6 (CH), 108,5 (CH), 106,3 (CH), 101,4 (CH_2), 47,1 (CH_2), 28,6 (CH), 20,1 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3288, 2958, 1649, 1251, 1036, 930, 809. **Pureza** 98%. **HRMS** $[C_{14}H_{17}NO_3+H]^+$ calculado 248,1281, observado 248,1286.



72 **46** **67**

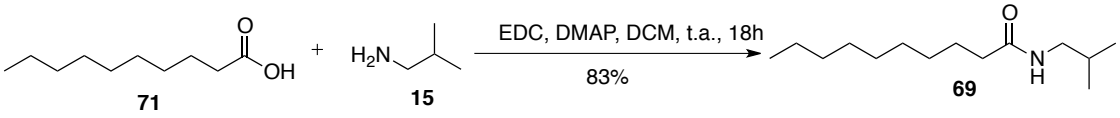
(*E*)-*N*-isobutildec-2-enamida (67). O éster fosfonado **46** (276 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (120 mg, 3 mmol, 3 eq.) em THF anidro (15 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, octanal (158 µL, 1 mmol, 1 eq.) foi adicionado à reação e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida (2 h). A reação foi diluída com AcOEt (10 mL), lavada com uma solução aquosa saturada de NH_4Cl (10 mL), NaCl (2 x 10 mL), seca com Na_2SO_4

anidro e concentrada sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **67** (126,8 mg, 64% de rendimento) como um sólido branco. **P.F.** 47,8 – 51,4 °C. **R_f** 0,28 (SiO_2, hexanos/EtOAc 8:2). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 600 MHz)** δ (ppm): 6,82 (dt, *J* = 15,2, 7,0 Hz, 1 H), 5,75 (d, *J* = 15,2 Hz, 1 H), 5,47 (sl., 1 H), 3,15 (dd, *J* = 6,4, 6,4 Hz, 2 H), 2,16 (dtd, *J* = 7,5, 7,5, 1,3 Hz, 2 H), 1,72 – 1,84 (m, 1 H), 1,43 (quin, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 1,21 – 1,33 (m, 8 H), 0,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 6 H), 0,87 ppm (t, *J* = 7,2 Hz, 3 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 151 MHz)** δ (ppm): 166,1 (C), 144,8 (CH), 123,5 (CH), 46,8 (CH_2), 32,0 (CH_2), 31,7(CH_2), 29,1 (CH_2), 29,1 (CH_2), 28,6 (CH), 28,3 (CH_2), 22,6 (CH_2), 20,1 (CH_3), 14,1 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3298, 2955, 2920, 2851, 1666, 1623, 1545, 1464, 1336, 974, 725, 663. **Pureza** 100%. HRMS [C14H27NO+Na]+ calculado 248,1985, observado 248,0000.



(*E*)-*N*-isobutil-5-phenilpent-2-enamida (68). O éster fosfonado **46** (276 mg, 1,1 mmol, 1,1 eq.) foi adicionado à suspensão de NaH (120 mg, 3 mmol, 3 eq.) em THF anidro (15 mL) e a mistura foi agitada por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 3-fenilpropionaldeido (146 µL, 1 mmol, 1 eq.) foi adicionado à reação e a solução resultante foi agitada à temperatura ambiente e acompanhada por CCD até o consumo total do material de partida (2 h). A reação foi diluída com água (10 mL) e o produto foi extraído com AcOEt (2 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro e concentradas sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **68** (157,3 mg, 68% de rendimento) como um sólido branco. **P.F.** 76,9 – 80,1 °C. **R_f** 0,36 (SiO_2, hexanos/EtOAc 70:30). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 500 MHz)** δ (ppm): 7,28 (dd, *J* = 7,2 Hz, 2 H), 7,15 – 7,21 (m, 3 H), 6,90 (dt, *J* = 15,4, 6,8 Hz, 1 H), 5,91 (sl, 1 H), 5,83 (d, *J* = 15,2 Hz, 1 H), 3,14 (dd, *J* = 6,0, 6,0 Hz, 2 H), 2,76 (t, *J* = 7,8 Hz, 2 H), 2,50 (dt, *J* = 7,2, 7,2 Hz, 2 H), 1,76 – 1,85 (m, 1 H), 0,92 ppm (d, *J* = 6,8 Hz, 6 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 126 MHz)** δ (ppm): 166,1 (C), 143,9 (CH), 141,0 (C), 128,4 (CH), 126,1 (CH), 123,8 (CH), 47,0 (CH_2), 34,5 (CH_2), 33,8 (CH_2), 28,5 (CH), 20,1 (CH_3). **IV**

(ATR, cm^{-1}) 3304, 2981, 2924, 2868, 1668, 1625, 1541, 1254, 1220, 980, 957, 747, 695, 669, 590, 501. **Pureza** 100%. HRMS [C15H21NO+Na]+ calculado 254,1515, observado 254,1519.



71 15 69

***N*-isobutildecanamida (69).** EDCI (180,1 mg, 1,02 mmol, 1,2 eq.) e DMAP (150,1 mg, 1,22 mmol, 1,19 eq.) foram adicionados a uma solução de ácido decanóico (180,1 mg, 1,02 mmol, 1 eq.) em CH_2Cl_2 (10 mL) à temperatura ambiente. A mistura foi agitada por 30 min, por fim adicionou-se isobutilamina (120 µL, 1,21 mmol, 1,18 eq.) e a solução final foi agitada à temperatura ambiente por 18 h. O meio reacional foi diluído com CH_2Cl_2 (10 mL) e lavado com uma solução aquosa de HCl 1M (30 mL), $NaHCO_3$ (30 mL) e NaCl (30 mL). A fração orgânica foi separada, seco com $MgSO_4$ anidro e concentrado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por cromatografia em coluna (biotage, SiO_2, hexanos/EtOAc) obtendo **69** (194,2 mg, 83% de rendimento) como um sólido branco. **P.F.** 40,3 – 41,9 °C. **R_f** 0,33 (SiO_2, hexanos/EtOAc 8:2). **RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz)** δ (ppm): 5,81 (sl., 1 H), 3,07 (dd, *J* = 6,2 Hz, 2 H), 2,18 (t, *J* = 7,6 Hz, 2 H), 1,81 – 1,71 (m, 1 H), 1,62 (quin, *J* = 6,8 Hz, 2 H), 1,15 - 1.39 (m, 12 H), 0,90 (d, *J* = 6,6 Hz, 6 H), 0,86 (t, *J* = 6,9 Hz, 3 H). **RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 101 MHz)** δ (ppm): 173,4 (C), 46,9 (CH_2), 36,8 (CH_2), 31,8 (CH_2), 29,4 (CH_2), 29,3 (CH_2), 29,3 (CH_2), 29,2 (CH_2), 28,4(CH), 25,9 (CH_2), 22,6 (CH_2), 20,1 (CH_3), 14,0 (CH_3). **IV (ATR, cm^{-1})** 3308, 22953, 2918, 2851, 1638, 1543, 1466, 1261, 1230, 1159, 717, 583. **Pureza** 100%. **HRMS** [$C_{14}H_{29}$NO+Na]+ calculado 250,2141, observado 250,2137.

5.1.5. Procedimentos Experimentais em Fluxo Contínuo

Procedimento para reação de Sonogashira em condição heterogênea

(*E*)-oct-6-en-4-yn-1-ol (**51**). Uma coluna foi preenchida com 3 g de uma mistura 0,1% de óxido de cobre (I) em alumina e 5% de paládio (0) em alumina na proporção 1:17. Uma solução estoque contendo o brometo de vinila (0,5 M) e o alcino de partida (0,6 M) e outra contendo a base (1 M) foram preparadas em

THF/DMF (9:1) Os reagentes foram bombeados por meio de *loopings* de injeção de 2 mL com vazões idênticas. As temperaturas e vazão utilizados em cada experimento estão especificados na tabela abaixo:

Tabela 17. Temperatura (ºC) e Vazão ($mL.min^{-1}$) nas reações de Sonogashira em fluxo contínuo homogêneo.

Experimento	Temperatura (ºC)	Vazão total ($mL.min^{-1}$)
1	100	1
1	100	0,5
3	120	0,5

Procedimento para reação de Sonogashira em condição homogênea

(*E*)-oct-6-en-4-yn-1-ol (**51**). Foi preparada uma solução estoque da base (0,9 M) em DMF anidro. As soluções dos reagentes utilizadas neste experimento foram preparadas em DMF anidro sob demanda, contendo o brometo de vinila, o alcino de partida, $Pd(PPh_3)_4$, CuI e PPh_3 (quando utilizada) nas quantidades especificadas nas tabelas **12** à **14.** Ao término do experimento, $AcOEt_2$ (2 mL) foi adicionado, a reação foi filtrada em uma pequena coluna de sílica, eluída com $AcOEt_2$ (50 mL), lavada com H_2O (3 x 30 mL) e com uma solução aquosa saturada de NaCl (30 mL), seco com $MgSO_4$ anidro e concentradas sob pressão reduzida. O rendimento foi determinado ^{1}H-RMN utilizando o padrão interno especificado nas tabelas **12** à **14** .

5.2. Ensaios Biológicos

5.2.1. Atividade Antiviral – Anti-HIV

5.2.1.1. Metodologia

Espilantol e cinco análogos foram dissolvidos em etanol (HPLC Grade, Millipore, MA, USA) e adicionados em cultura celular. Utilizou-se como controle positivo Zidovudine (AZT) (Sigma Aldrich, MO, USA) na concentração de 70 µM.

Células sem tratamento e tratadas somente com veiculo (1% v/v) foram utilizadas como controle negativo.

5.2.1.2. TZM-bl e HIV-1 BaL

As células TZM-bl, bem como a linhagem de HIV-1 BaL foram obtidos do NIH AIDS Reagent Program. O cultivo celular se deu em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Lonza, MD, USA) a 37 ºC em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

5.2.1.3. Ensaio de Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade de cada composto foi feita por meio do método fluorimétrico da resazurina (Cell Titer Blue Viability Assay, Promega Corp, WI, USA). As células TZM-bl foram semeadas (1 x 10^5 celulas/mL) em placas de 96 poços (Greiner Bio-One North America, NC, USA). Após 24 h os compostos foram adicionados nas concentrações de 1 até 1000 µM e as células foram então incubadas por mais 24 h. Adicionou-se a resazurina e após 4 h foi feita a leitura da fluorescência em um leitor de microplacas (SpectraMax M5 Microplate Reader, Molecular Devices, CA, USA) nas condições de excitação em 550 nm, emissão de 585 nm e cut-off de 570 nm.

5.2.1.4. Atividade Anti-HIV em celulas TZM-bl infectadas

A atividade anti-HIV *in vitro* dos compostos foi determinada utilizando-se método descrito previamente (Ochsenbauer-Jambor et al., 2006). Células TZM-bl foram semeadas (1 x 10^5 células.mL^{-1}) em placas de 96 poços (Greiner Bio-One North America, NC, USA) e após 24 h adicionou-se os compostos, controles e o HIV-1 BaL. Após incubação por 48 h, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 25 µL/poço de tampão de lise celular. Após 20 minutos, as células

lisadas foram transferidas para nova placa, onde acrescentou-se 20 µL/poço de reagente luciferase. A luminescência obtida foi lida em leitor de microplaca com integração de 500 ms.

5.2.2. Câncer de Pâncreas e Melanoma

5.2.2.1. Diluição dos compostos

Os compostos foram diluídos em DMSO, a fim de se obter uma solução estoque 100 mM, e mantidos em freezer −20 ºC até o uso. Para os ensaios subsequentes, uma segunda solução (1 mM) foi preparada a partir da estoque (100 mM) diretamente em meio de cultura (DMEM, 10% SFB). A concentração de DMSO final nos experimentos, descritos abaixo, não ultrapassou a concentração citotóxica de 0,1%.

5.2.2.2. Células

Duas linhagens tumorais foram utilizadas nesse trabalho, todas elas de origem humana. A linhagem de câncer de pâncreas (Panc-1) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) enquanto que a célula de melanoma (SKMEL-103) foi doada pela Professora Dra Silvya Stuchi Maria Engler da USP. Uma linhagem não tumoral também foi utilizada (HaCAT – queratinócito humano), a fim de avaliar a citotoxicidade dos compostos. O cultivo das linhagens celulares foi realizado em meio DMEM contendo 100 µg /mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO_2 a 37°C e o subcultivo foi realizado periodicamente (2-3 vezes na semana).

5.2.2.3. Análise da viabilidade celular através da função mitocondrial (ensaio do MTT)

Para a análise de viabilidade celular, células foram plaqueadas em placas de 96 poços (volume de plaqueamento por poço: 100 µL), e incubadas a 37ºC, 5% CO_2 por 24 h. Após o tratamento com 100, 50, 25 e 10 µM dos compostos por 48 h o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS, em seguida, foram adicionados aos poços meio sem soro contendo MTT (0,5 $mg.mL^{-1}$). Após incubação por 4 h a 37 °C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 100 µL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em λ = 570 nm. Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle (Mosmann, 1983). Os resultados foram representados como média ± erro padrão de 2 experimentos independentes conduzidos em triplicata.

5.2.3. Câncer de Mama

5.2.3.1. Cultura de Células

As linhagens celulares de câncer de mama MDA-MB 231 e de células transformadas MCF-10A, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC). foram incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% CO_2 e 95% de umidade com observação do crescimento celular por meio de microscópio de inversão. MDA-MB-231 foi cultivada em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. MCF-10A foi cultivada em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Alta Glicose + Nutriente Ham F12 (1:1), 5% soro de cavalo, 10 $\mu g.mL^{-1}$ de insulina humana, 0,5 $cg.mL^{-1}$ de hidrocortisona, 10 $ng.mL^{-1}$ de Epitelial Growth Factor (EGF) e 100 $ng.mL^{-1}$ de toxina colérica. Após a incubação e crescimento das células, as mesmas foram coletadas entre 70-90% de confluência com 0,5% de tripsina/EDTA, contadas com o contador automático Countess II, dispensadas em placa de cultura para realização dos testes *in vitro*.

5.2.3.2. Ensaios de High Content Analysis (HCA)

O ensaio de HCA permite a análise qualitativa e quantitativa de vários eventos celulares por meio da leitura de células individuais em placas multipoços com corantes fluorescentes sensíveis capazes de fornecer informações celulares através de mudanças na coloração do fluoróforo.

5.2.3.2.1. Ensaios de Inibição de Proliferação Celular e Citotoxicidade *in vitro*

Os compostos foram avaliados em cultura de monocamadas pela capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de células, em dose única. Para tanto, 2 x 103 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços com volume final de 150 µL e incubadas de 16 a 24 horas, a 37°C com 5% de CO_2. Posteriormente ao tempo de incubação, as células receberam tratamento com os compostos em dose única de 20 µM e, após 48h as células foram avaliadas por microscópio Operetta (Perkin Elmer) e analisadas com programa Harmony.

5.2.4. Painel de Linhagens Tumorais

As células dispostas em placas de 96 compartimentos (100 $\mu L.mL^{-1}$ de suspensão celular) foram expostas à quatro concentrações (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu g.mL^{-1}$) das amostras em teste em DMSO/RPMI e incubadas por 48h a 37 ºC, em atmosfera úmida com 5% de CO_2.

Uma placa controle foi fixada com ácido tricloro-acético (TCA) 50% (p/v). Com base em resultados anteriores, sabe-se que a concentração final de DMSO não interfere na viabilidade celular. Após esse período de exposição, as células foram fixadas com TCA e a proliferação celular determinada por quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo protéico celular usando o corante sulforrodamina B. A partir das curvas de crescimento celular, de cada linhagem, em função da concentração da amostra, foi calculada a concentração efetiva TGI (concentração necessária para inibição total de crescimento celular) por meio de

regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

5.2.5. Ensaio de Tail Flick In Vivo

5.2.5.1. Materiais

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico, hidroxietilcelulose (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos), glicerina, Tween 80, metanol (Synth, São Paulo, Brasil), Transcutol® (Etoxidiglicol, Gattefossé, Lyon, França) e mistura eutética de 2,5% lidocaína e 2,5% prilocaína (EMLA® creme, AstraZeneca, São Paulo, Brasil).

5.2.5.2. Produção dos Filmes

Foi preparada uma solução de hidroxietilcelulose (2,5 g) em 100 mL de água destilada, sob aquecimento (55 °C ± 2 °C) e agitação constante até a solução formar um gel translúcido. A mistura ficou em repouso até atingir temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados os adjuvantes Tween 80® (0,7 g), Glicerina (0,7 g) e Transcutol® (2,5 g). O gel foi separado em porções de 30 g (**Figura 22**, entrada 1).

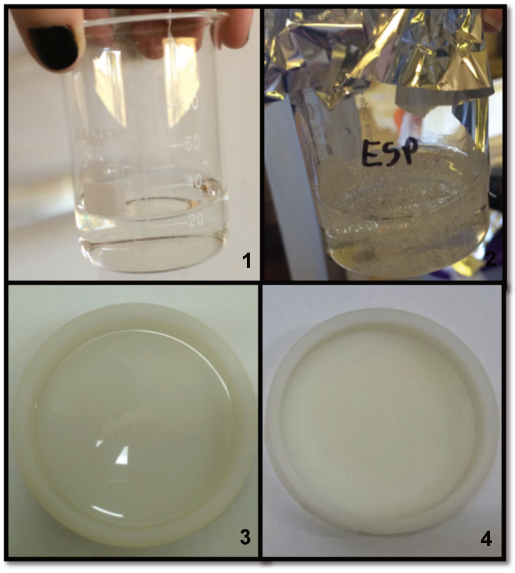


Figura 23. Etapas de produção do bioadesivo.

A quantidade dos análogos especificada na **Tabela 18** foi solubilizada em metanol (volume máximo de 0,5 mL). Cada solução foi adicionada em uma porção de gel e homogeneizado (**Figura 22**, entrada 2). Então, o gel obtido foi deixado em repouso até o fim das bolhas, depositado em placas de Nylon (**Figura 22**, entrada 3) e secos em estufa por 24 h à 40 ºC (**Figura 22**, entrada 4).

Tabela 18. Massa (mg) e Nº de µmol de cada análogo adicionado na preparação dos filmes.

Composto	MW	Massa (mg)	Nº µmol
1	221,34	4,14	18,70
16	219,32	4,12	18,79
66	247,29	4,63	18,72
67	225,37	4,22	18,72
68	231,33	4,32	18,67
69	227,39	4,28	18,82

5.2.5.3. Propriedades Físicas dos Filmes

Após secos, os filmes foram retirados das placas e cortados com um furador de 17 milímetros de diâmetro (**Figura 23**), tamanho compatível com os testes propostos. Os filmes foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil) e sua espessura foi medida com paquímetro digital (modelo Cal II, Tesa, Renens, Suíça) em três pontos diferentes, foi calculada a média e o desvio padrão das medidas.



Figura 24. Furador de 17 mm de diâmetro utilizado para cortar os filmes.

Após o corte dos filmes com o furador, os mesmos apresentaram aspectos físicos similares: homogêneos, íntegros e levemente opaco como ilustrado na **Figura 24**.

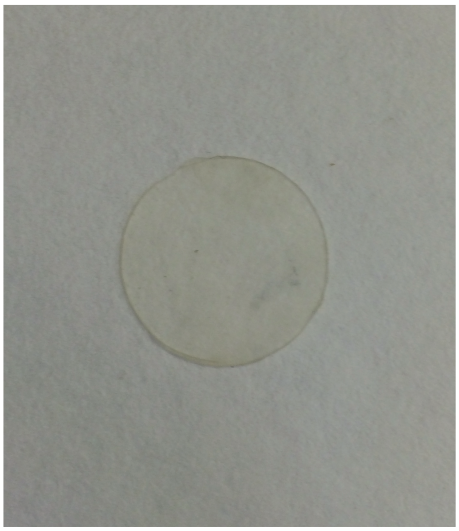


Figura 25. Filme cortado em 17 mm de diâmetro.

As medidas de espessura (mm) e massa (g) dos filmes, estão apresentadas na **Tabela 19**, com suas médias e desvios padrões.

Tabela 19. Espessura (mm ± DP) e massa (mg ± DP) dos filmes (n=6).

Composto	Espessura (mm)	Massa (mg)
1	0,3646 ± 0,03	96,2 ± 9
16	0,2624 ± 0,03	65,9 ± 9
66	0,3190 ± 0,02	87,0 ± 10
67	0,2642 ± 0,02	68,4 ± 6
68	0,2570 ± 0,03	69,1 ± 9
69	0,3164 ± 0,01	82,9 ± 4
Branco	0,3030 ± 0,04	78,9 ± 10

5.2.5.4. Animais

Os animais foram obtidos do CEMIB-UNICAMP (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório - UNICAMP,

Campinas, Brasil), estes foram mantidos sob um ambiente de clima controlado 22± 3 °C em ciclos claro-escuro de 12 h, com água e ração marca Nuvlab.

Os ensaios *in vivo* foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Unicamp sob número de protocolo nº 4137-1, conforme anexo **37**.

5.2.5.5. Determinação da Atividade Antinociceptiva em Camundongos

A determinação da atividade antinociceptiva foi realizada pelo modelo de remoção da cauda (*Tail Flick*) conforme descrito por Freitas (54). Camundongos *Swiss* machos (25 a 40 g, n=6/grupo) foram contidos em cilindro de acrílico mantendo a porção distal da cauda (10 cm) livre e em contato com um foco de luz a 55 °C, demonstrado na **Figura 25**. O tempo necessário para remoção da cauda (latência) foi considerado como resposta aversiva ao calor. O valor basal de cada animal foi anotado antes do início do experimento e somente os que atingiram valor basal de até 6 s foram considerados para o experimento. Para evitar lesões térmicas, foi estabelecido o tempo máximo de 10 s para contato com a fonte de calor (*cut-off*). Os animais foram divididos em 8 grupos: grupo 1- filme FI, grupo 2 – filme FII, grupo 3 – filme FIIII e grupo 4 - EMLA® (mistura eutética de prilocaína 2,5% e lidocaína 2,5%) 150 mg/animal (controle positivo). O filme foi aplicado a 2 cm da base da cauda do animal por 5 min, após sua remoção, a cauda foi exposta ao foco de luz na mesma região onde o filme foi aplicado e o teste foi iniciado após sua remoção. As outras medidas foram feitas a cada 15 min até cada animal atingir o seu valor basal de estímulo. A analgesia foi definida como um aumento no tempo necessário para remoção da cauda, pelo menos 50% maior que o valor de linha basal observado.

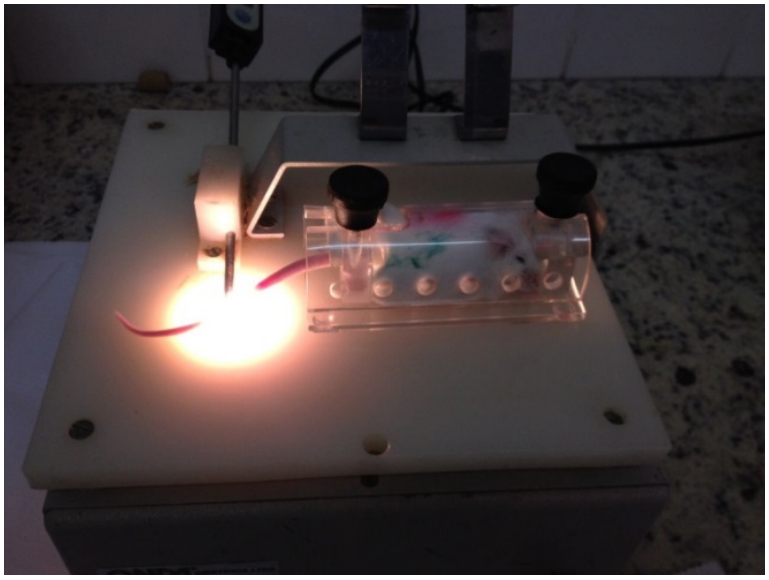


Figura 26. Determinação da atividade antinociceptiva pelo modelo de *Tail Flick*.

6. Referências

1. Stasi, L. C. Di; Hiruma-Lima, C. A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*; 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, **2002**.

2. Freitas, V. S.; *Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de Spilanthes Acmella L. Murray para administração oral como anestésico tópico*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de

2. Freitas, V. S.; *Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de Spilanthes Acmella L. Murray para administração oral como anestésico tópico*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, **2014**.

3. Soares, C. P.; Lemos, V. R.; da Silva, A. G.; Campoy, R. M.; da Silva, C. A. P.; Menegon, R. F.; Rojahn, I.; Joaquim, W. M. *Cell Biol. Int.* **2014**, *38*, 131.

4. Prachayasittikul, V.; Prachayasittikul, S.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. *EXCLI J.* **2013**, *12*, 291.

5. Nakatani, N.; Nagashima, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 759.

6. Gerber, E. *Arch. Pharm. (Weinheim).* **1903**, *241*, 270.

7. Asano, M.; Kanematsu, T. *J. Pharm. Soc. Japan* **1927**, *47*, 521.

8. Jacobson, M.; Acree Jr., F.; Haller, H. L. *J. Org. Chem.* **1947**, *12*, 731.

9. Acree Jr., F.; Jacobson, M.; Haller, H. L. *J. Org. Chem.* **1945**, *10*, 236.

10. Jacobson, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *77*, 2461.

11. Jacobson, M. *Chem. Ind.* **1957**, 50.

12. Crombie, L.; Krasinski, A. H. A.; Manzoor-i-Khuda, M. *J. Chem. Soc.* **1963**, *949*, 4970.

13. Ikeda, Y.; Ukai, J.; Ikeda, N.; Yamamoto, H. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25* , 5177.

14. Wang, Z.; Lu, X.; Lei, A.; Zhang, Z. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3806.

15. a) Tanaka, S.; Yagi, K.; Ujihara, H.; Ishida, K. *Method for production of (2E,6Z,8E)-N-isobutyl-2,6,8-decatrienamide (spilanthol), and food, beverages, cosmetics and pharmaceutical preparations each comprising the compound.* WO 2009/091040 A1. 23/07/2009. b) Lombardo, L.; Lankin, M. E.; Ishida, K.; Tanaka, S.; Ujihara, H.; Yagi, K.; Mei, J. B.; Green, C. B.; Mankoo, A. S. *Synthetic Spilanthol and*

Use Thereof. US Patent Application 2010/0184863 A1. 22/07/2010. c) Tanaka, S.; Yagi, K.; Ujihara, H.; Ishida, K. *Production method of (2E,6Z,8E)-N-isobutyl-2,6,8-decatrienamide (spilanthol), and food or drink, fragrance or cosmetic, or pharmaceutical comprising the same.* US Patent Application 2011/0105773 A1. 05/05/2011. d) Tanaka, S.; Ishida, K.; Yagi, K.; Ujihara, H. *Method for manufacturing spilanthol and intermediate manufacturing product thereof.* WO 2011/007807 A1. 20/01/2011. e) Tanaka, S.; Ishida, K.; Yagi, K.; Ujihara, H. *Method for manufacturing spilanthol and intermediate manufacturing product thereof.* EP Patent Application 2 455 363 A1. 23/05/2012. f) Tanaka, S.; Ishida, K.; Yagi, K.; Ujihara, H. *Method for manufacturing spilanthol and intermediate manufacturing product thereof.* US Patent Application 2012/0116116 A1. 10/05/2012.

16. Site da empresa Toronto Research Chemicals, visualizado no dia 10/08/2016 (http://www.trc-canada.com/).

17. Barbosa, A. F.; de Carvalho, M. G.; Smith, R. E.; Sabaa-Srur, A. U. O. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2016**, *26*, 128.

18. Chakraborty, A.; Devi, R. K. B.; Rita, S.; Sharatchandra, K.; Singh, T. I. *Indian J. Pharmacol.* **2004**, *36*, 148.

19. Nomura, E. C. O.; Rodrigues, M. R. A.; Da Silva, C. F.; Hamm, L. A.; Nascimento, A. M.; De Souza, L. M.; Cipriani, T. R.; Baggio, C. H.; De Paula Werner, M. F. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 583.

20. Mishra, A.; Roy, S.; Maity, S.; Yadav, R. K.; Amit Kumar, K.; Saha, S. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *7*, 130.

21. Sharma, V.; Boonen, J.; Chauhan, N. S.; Thakur, M.; De Spiegeleer, B.; Dixit, V. K. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 1161.

22. Flavors and Extracts Manufacturers of the United States (FEMA). *Safety Assessment of Jambu Oleoresin*. Washington, D.C.,**2000**, 12.

23. Artaria, C.; Maramaldi, G.; Bonfigli, A.; Rigano, L.; Appendino, G.; *Int. J. Cosmetic Sci*. **2011**; *33*; 328.

24. Demarne F; Passaro G.; Utilização de espilantol e processo de tratamento cosmético de rugas. INPI registro de patente nº PI0506449-0 A2; 04/01/2005.

25. Wu, L. C.; Fan, N. C.; Lin, M. H.; Chu, I. R.; Huang, S. J.; Hu, C. Y.; Han, S. Y. *J.*

Agric. Food Chem. **2008**, *56*, 2341.

26. Rios, M. Y.; Aguilar-Guadarrama, A. B.; Gutiérrez, M. del C. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 364.

27. Spelman, K.; Depoix, D.; McCray, M.; Mouray, E.; Grellier, P. *Phytother Res.* **2011**, *25*, 1098.

28. Pastre, J. C.; Browne, D. L.; Ley, S. V. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8849.

29. Seyler, H.; Haid, S.; Kwon, T.-H.; Jones, D. J.; Bäuerle, P.; Holmes, A. B.; Wong, W. W. H. *Aust. J. Chem.* **2013**, *66*, 151.

30. Hartman, R. L.; McMullen, J. P.; Jensen, K. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7502.

31. Pastre, J. C.; Browne, D. L.; Ley, S. V. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8849.

32. Baxendale, I. R.; Griffiths-Jones, C. M.; Ley, S. V.; Tranmer, G. K. Synlett **2005**, 427.

33. Baxendale, I. R.; Deeley, J.; Griffiths-Jones, C. M.; Ley, S. V.; Saaby, S.; Tranmer, G. K. *Chem. Commun.* **2006**, 2566.

34. Riva, E.; Rencurosi, A.; Gagliardi, S.; Passarella, D.; Martinelli, M. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6221.

35. Hodgkinson, J. T.; Galloway, W. R. J. D.; Saraf, S.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V.; Ladlow, M.; Welch, M.; Spring, D. R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 57.

36. Brasholz, M.; Macdonald, J. M.; Saubern, S.; Ryan, J. H.; Holmes, A. B. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11471.

37. Baumann, M.; Baxendale, I. R.; Brasholz, M.; Hayward, J. J.; Ley, S. V.; Nikbin, N. *Synlett* **2011**, 1375.

38. Kim, H.; Nagaki, A.; Yosida, J.-I. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 1.

39. Fernández, A.; Levine, Z. G.; Baumann, M.; Sulzar-Mossé, S.; Sparr, C.; Schläger, S.; Metzger, A.; Baxendale, I. R.; Ley, S. V. *Synlett* **2013**, *24*, 514.

40. Lévesque, F.; Seeberger, P. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1706.

41. Newton, S.; Carter, C. F.; Pearson, C. M.; Alves, L. C.; Lange, H.; Thansandote, P.; Ley, S. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1.

42. Ramsewak, R. S.; Erickson, A. J.; Nair, M. G. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 729.

43. Landor, P. D.; Landor, S. R.; Odyek, O. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1977**, *2*, 93.

44. Kürti, L.; Czakó, B. *Strategic application of Named Reactions in Organic Synthesis*; Elsevier, **2005**.

45. Ordóñez, M.; Hernández-Fernández, E.; Montiel-Pérez, M.; Bautista, R.; Bustos, P.; Rojas-Cabrera, H.; Fernández-Zertuche, M.; García-Barradas, O. *Tetrahedron Asymmetry* **2007**, *1*, 2427.

46. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford University Press; **2005**.

47. Byrne, P. A.; Gilheany, D. G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6670.

48. Khan, A. A.; Kamena, F.; Timmer, M. S. M.; Stocker, B. L. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 881.

49. Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B.; Duhl-Emswiler, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 217.

50. Matovic, N.; Matthias, A.; Gertsch, J.; Raduner, S.; Bone, K. M.; Lehmann, R. P.; DeVoss, J. J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 169.

51. Mohamed, Y. M. A.; Hansen, T. V. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3872.

52. Appel, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 801.

53. Khrimian, A.; Klun, J. A.; Hiji, Y.; Baranchikov, Y. N.; Pet´Ko, V. M.; Mastro, V. C.; Kramer, M. H. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6366.

54. Valores da Sigma Aldrich do brometo de vinila: mistura *E*/*Z* = R$ 13,89 por grama e apenas isômero *E* = R$ 394,00 por grama. (http://www.sigmaaldrich.com - acessado dia 10/08/2016)

55. Hayashi, T.; Kabeta, K.; Hamachi, I.; Kumada, M. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2865.

56. Feuerstein, M.; Chahen, L.; Doucet, H.; Santelli, M. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 112.

57. Boland, W.; Schroer, N.; Sieler, C. *Helv. Chem. Acta* **1987**, *70*, 1025.

58. Avalos-Alanís, F. G.; Hernández-Fernández, E.; Hernández-Romero, R.; López-Cortina, S.; Ordóñez, M.; García-Barradas, O.; Lagunas-Rivera, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 156.

59. Schauer, D. J.; Helquist, P. *Synthesis (Stuttg).* **2006**, *21*, 3654.

60. Ramsewak, R. S.; Erickson, A. J.; Nair, M. G. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 729.

61. Voltrova, S.; Srogl, J. *Org. Chem. Front.* **2014**, *1*, 1067.

62. a) Fukuyama, T.; Rahman, M. T.; Sumino, Y.; Ryu, I. *Synlett* **2012**, *23*, 2279. b) Borcsek, B.; Bene, G.; Szirbik, G.; Dorman, G.; Jones, R.; Urge, La.; Darvas, F. *Arkivoc* **2012**, *2012*, 186. c) Battilocchio, C.; Bhawal, B. N.; Chorghade, R.; Deadman, B. J.; Hawkins, J. M.; Ley, S. V. *Isr. J. Chem.* **2014**, *54*, 371.

63. Cantillo, D.; Kappe, C. O. *ChemCatChem* **2015**, *6*, 3286.

64. Hubner, S.; De Vries, J. G.; Farina, V. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 3.

65. Sugimoto, A.; Fukuyama, T.; Rahman, M. T.; Ryu, I. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6364.

66. Boonen, J.; Bronselaer, A.; Nielandt, J.; Veryser, L.; De Tré, G.; De Spiegeleer, B. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *142*, 563.

67. Ramsewak, R. S.; Erickson, A. J.; Nair, M. G. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 729.

68. Anyanwu, G. O.; Ur-Rehman, N.; Onyeneke, C. E.; Rauf, K. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 648.

69. Pasetto, S.; Pardi, V.; Murata, R. M. *PLoS One* **2014**, *9*, 1.

70 . Ochsenbauer-Jambor C., Jones J, Heil M., Zammit K. P., Kutsch O. *Biotechniques*. **2006**, 40, 91.

71. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

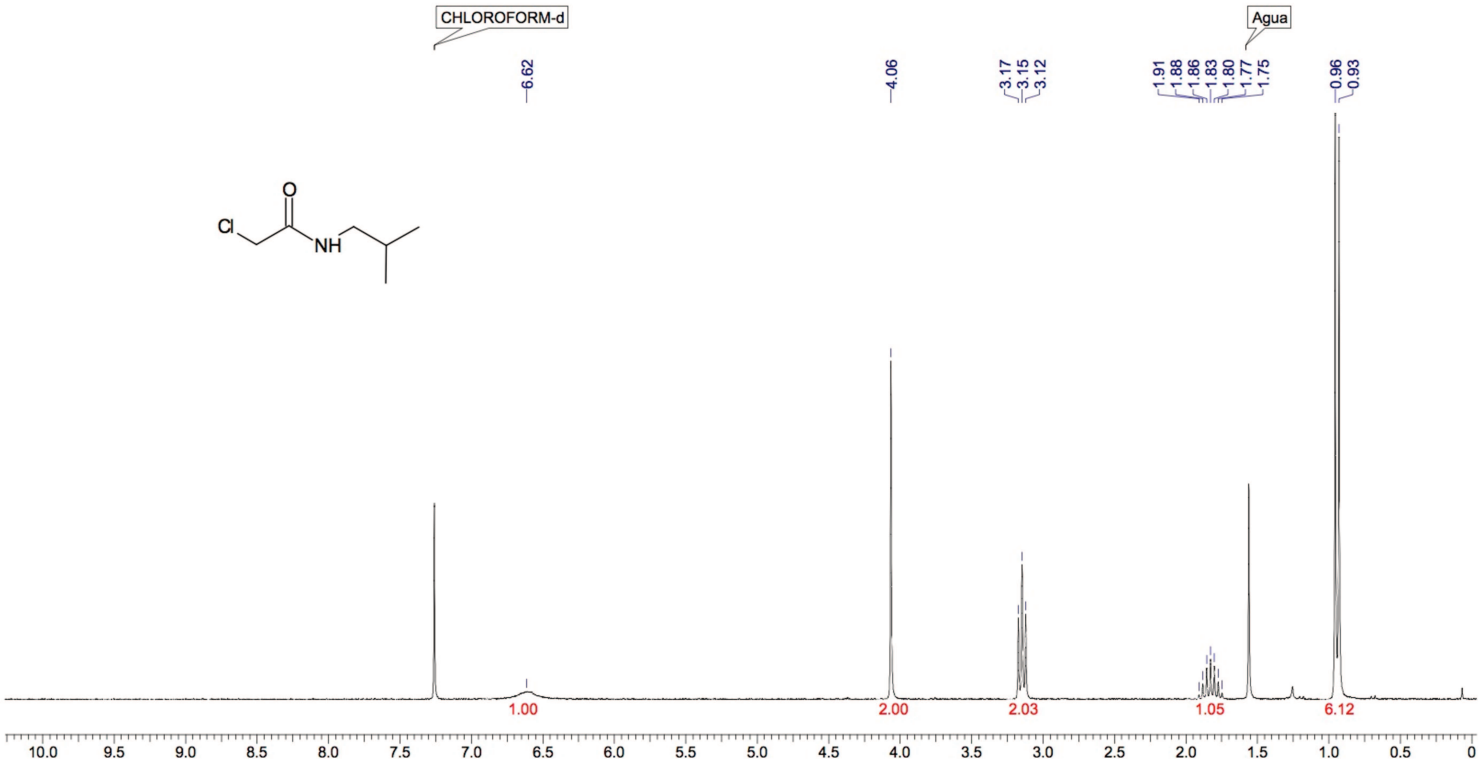
72. a) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst*. **1990**, 82, 1107. b) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray- Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst*. **1991**, 83, 757.

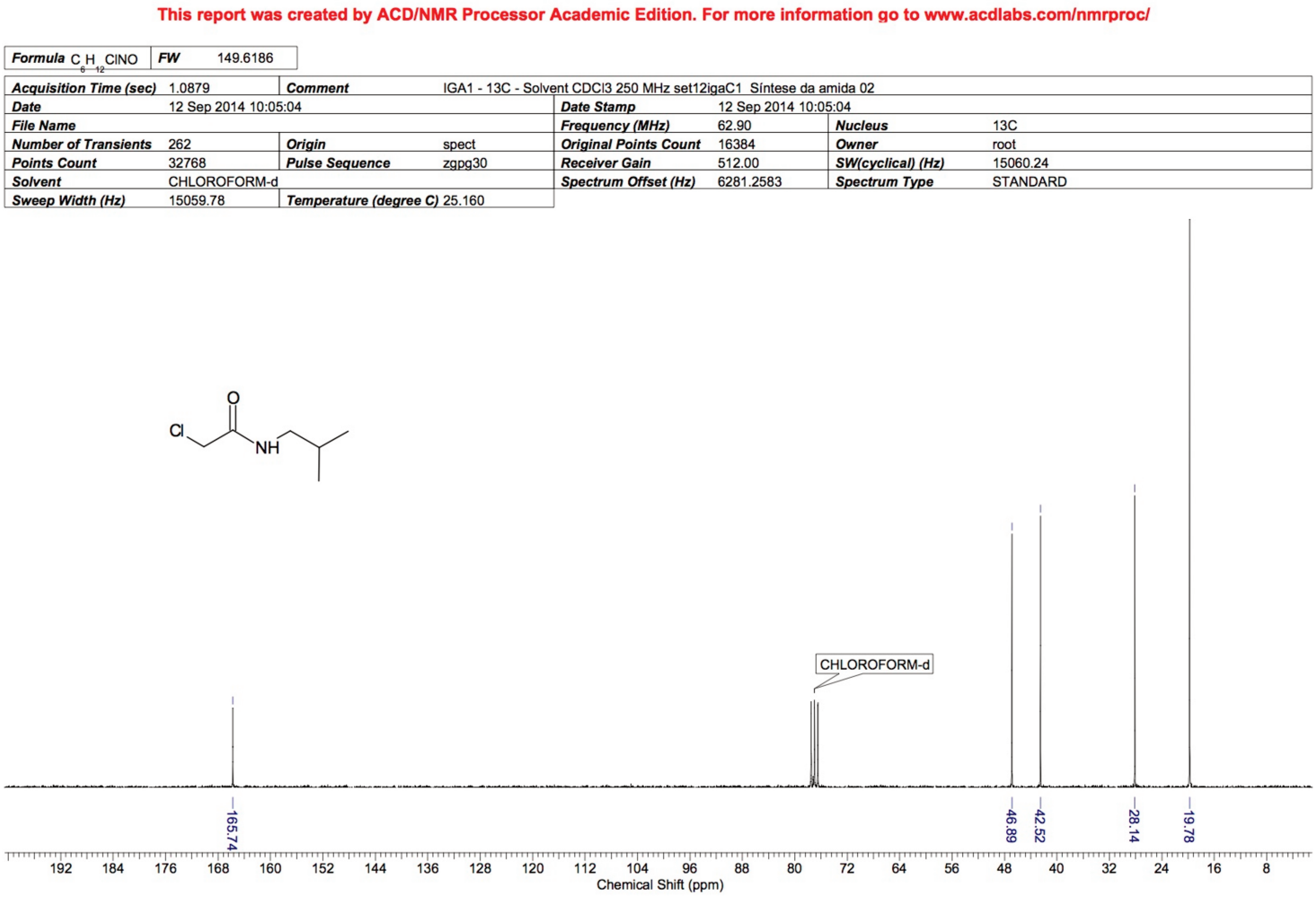
73. Yamane, L. T.; *Avaliação De Formulações Tópicas Contendo Extrato Etanólico De Acmella Oleracea (L.) R.K. Jansen (Jambu), Associado A Oleo Essencial De Achyrocline Satureioides Lam (Macela).* Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. **2016**.

7. Seção de Anexos

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_6H_{12}ClNO$	***FW***	149.6186					
Acquisition Time (sec)	3.1654	***Comment***	Isabella "IGA 02 - 1 ano" jul21igaH1		***Date***	21 Jul 2015 11:51:44	
Date Stamp	21 Jul 2015 11:51:44			***File Name***		***Frequency (MHz)***	250.13
Nucleus	1H	***Number of Transients***	16	***Origin***	spect	***Original Points Count***	16384	***Owner***	root
Points Count	32768	***Pulse Sequence***	zg30	***Receiver Gain***	3251.00	***SW(cyclical) (Hz)***	5175.98		
Solvent	CHLOROFORM-d			***Spectrum Offset (Hz)***	1544.1763	***Spectrum Type***	STANDARD	***Sweep Width (Hz)***	5175.83
Temperature (degree C)	25.160						

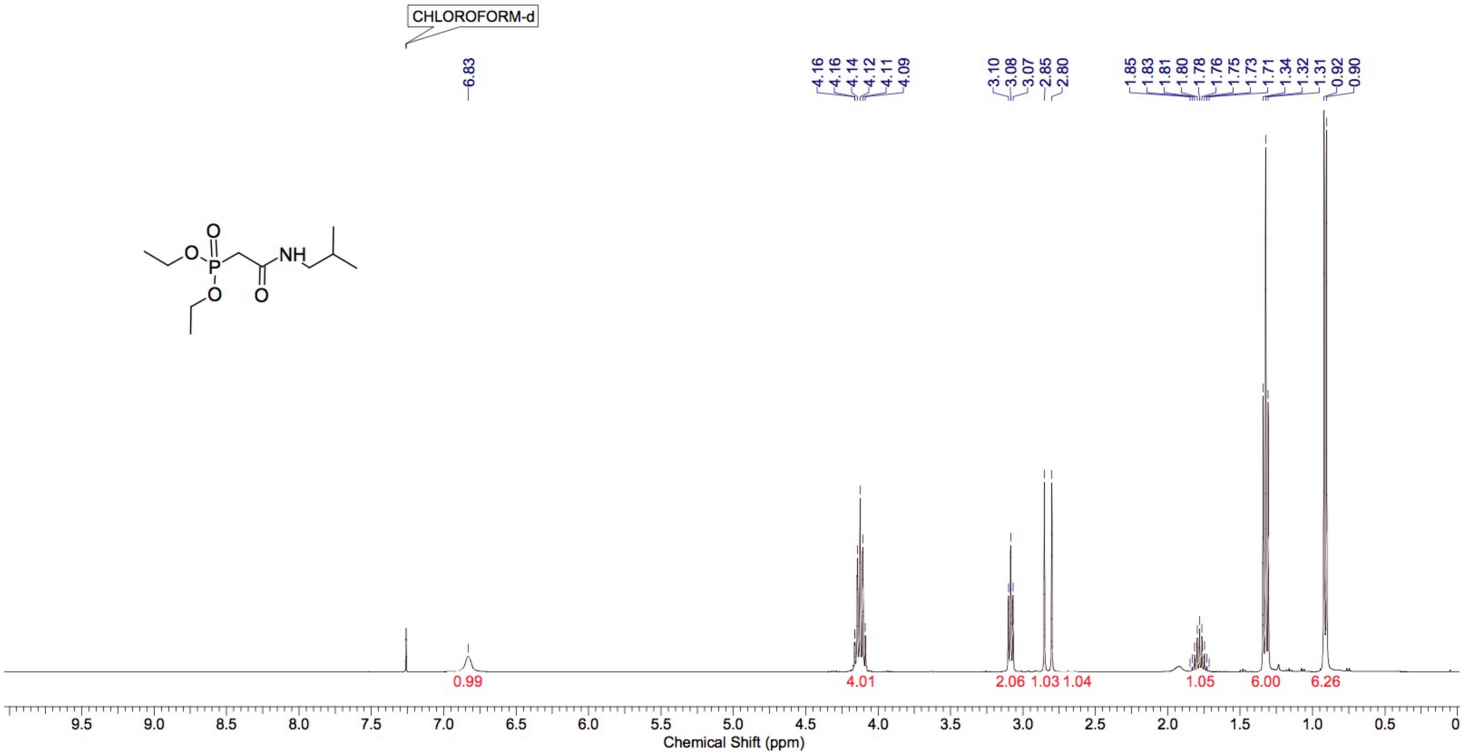




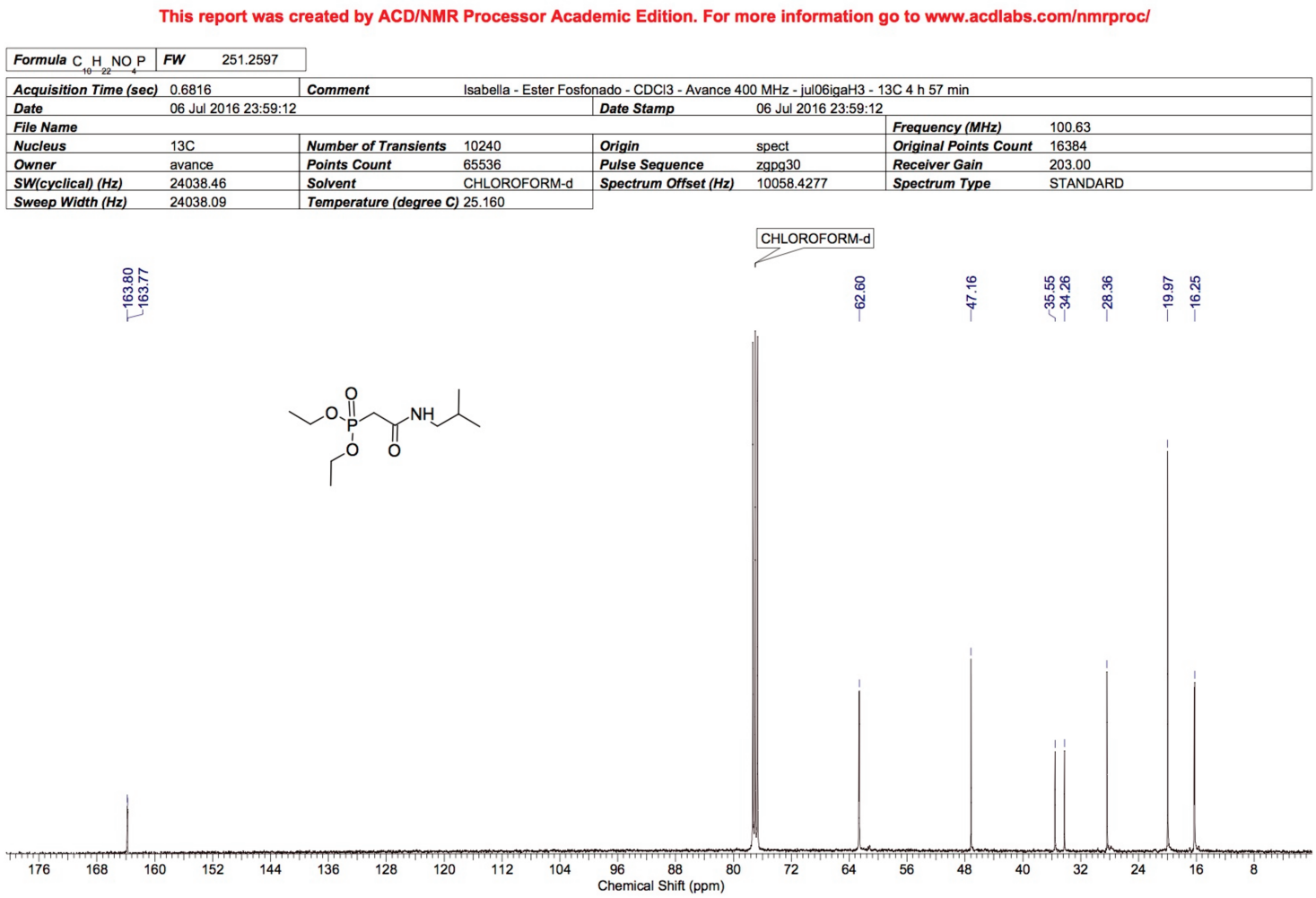
Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **47** (63 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_{10}H_{22}NO_4P$	**FW**	251.2597					
Acquisition Time (sec)	2.0447	**Comment**	Isabella - Ester Fosfonado - CDCl3 - Avance 400 MHz - jul06igaH3 - 1H				
Date	06 Jul 2016 19:00:32			**Date Stamp**	06 Jul 2016 19:00:32		
File Name						**Frequency (MHz)**	400.18
Nucleus	1H	**Number of Transients**	16	**Origin**	spect	**Original Points Count**	16384
Owner	avance	**Points Count**	65536	**Pulse Sequence**	zg30	**Receiver Gain**	71.80
SW(cyclical) (Hz)	8012.82	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	2461.7869	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	8012.70	**Temperature (degree C)**	25.160				



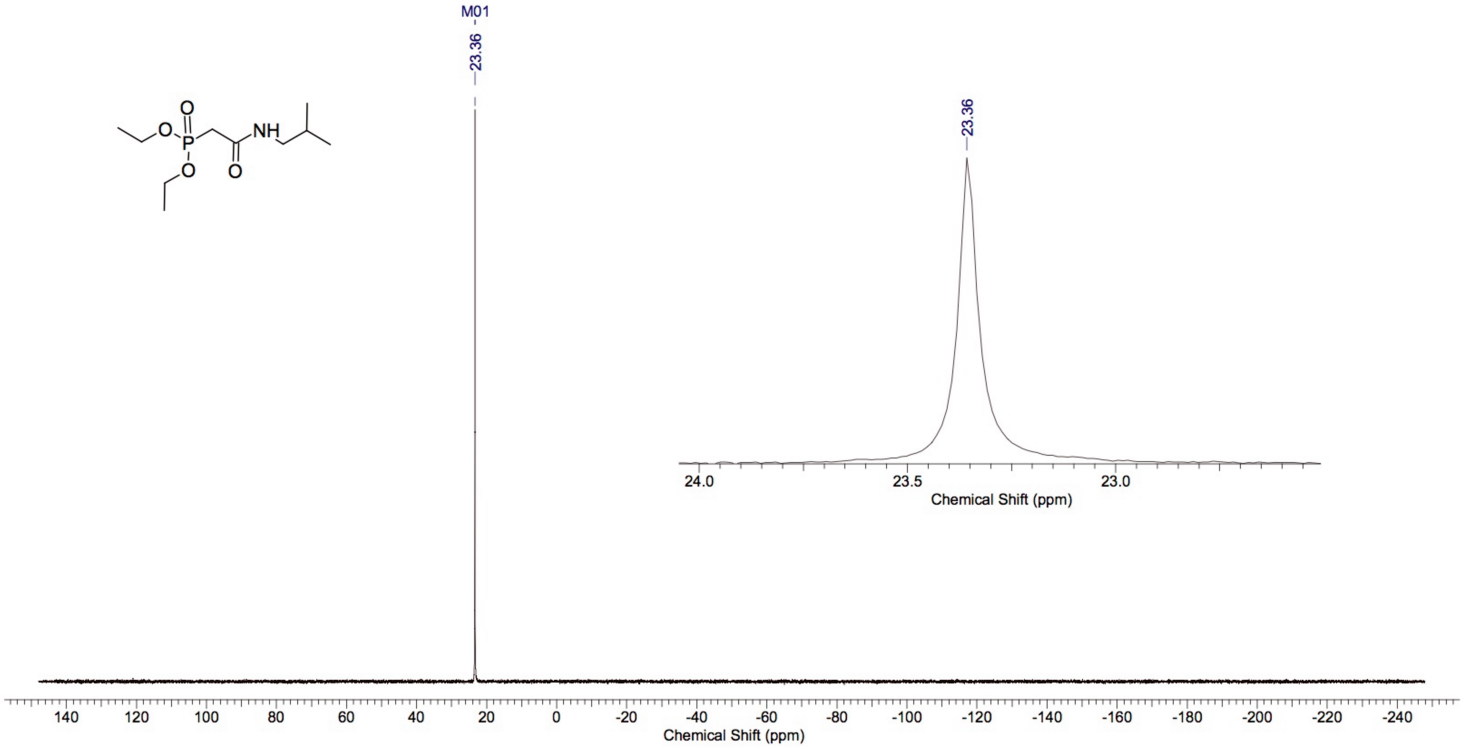
Anexo 3. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **46** (400 MHz, $CDCl_3$)



Anexo 4. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46** (101 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

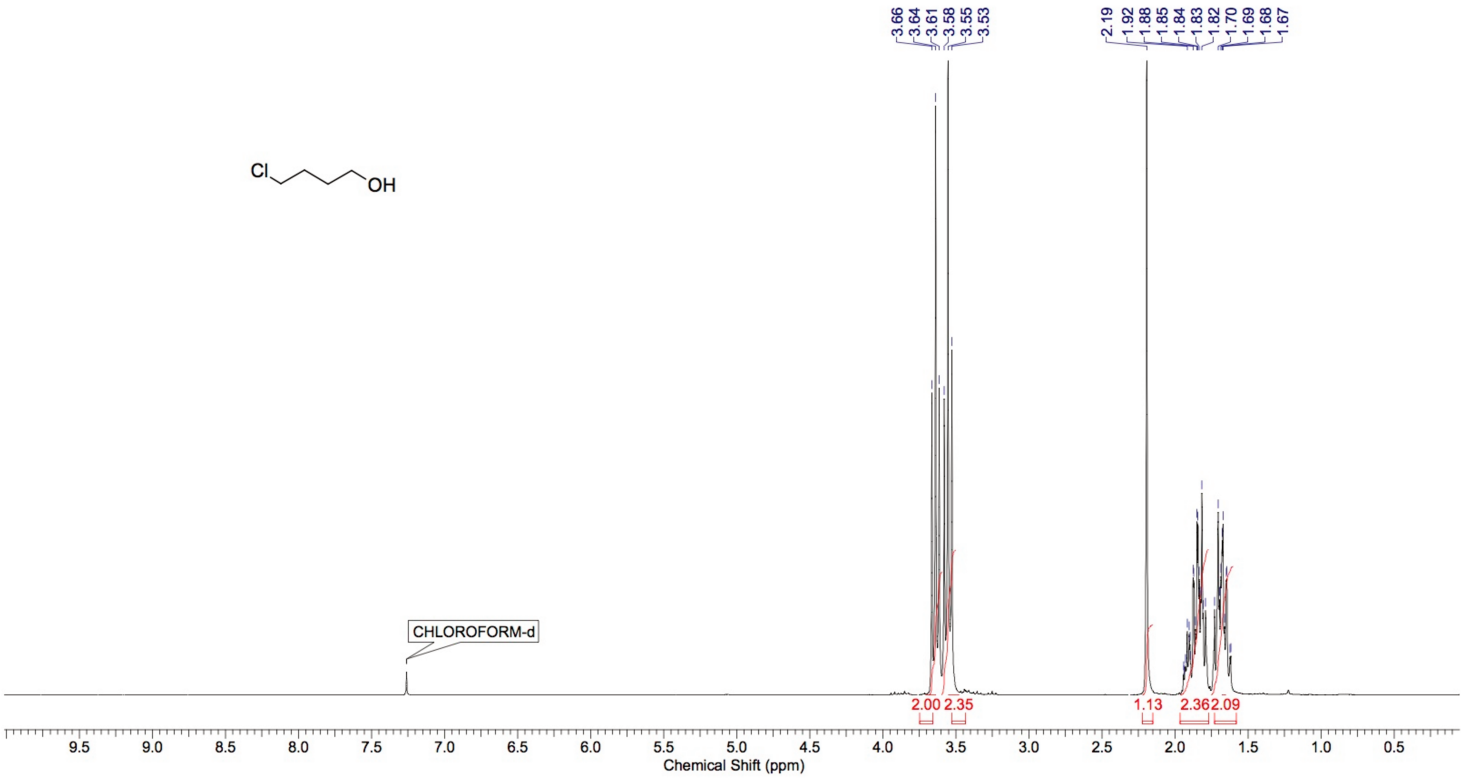
Formula $C_{10}H_{22}NO_4P$	**FW**	251.2597					
Acquisition Time (sec)	0.3408	**Comment**	Isabella - Ester Fosfonado - CDCl3 - Avance 600 MHz - jul07igaP3			**Date**	07 Jul 2016 14:31:44
Date Stamp	07 Jul 2016 14:31:44						
File Name						**Frequency (MHz)**	242.95
Nucleus	31P	**Number of Transients**	128	**Origin**	spect	**Original Points Count**	32768
Owner	Admin	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30	**Receiver Gain**	203.00
SW(cyclical) (Hz)	96153.84	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	-12147.3906	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	96150.91	**Temperature (degree C)**	24.528				



Anexo 5. Espectro de RMN de ^{31}P do composto **46** (243 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

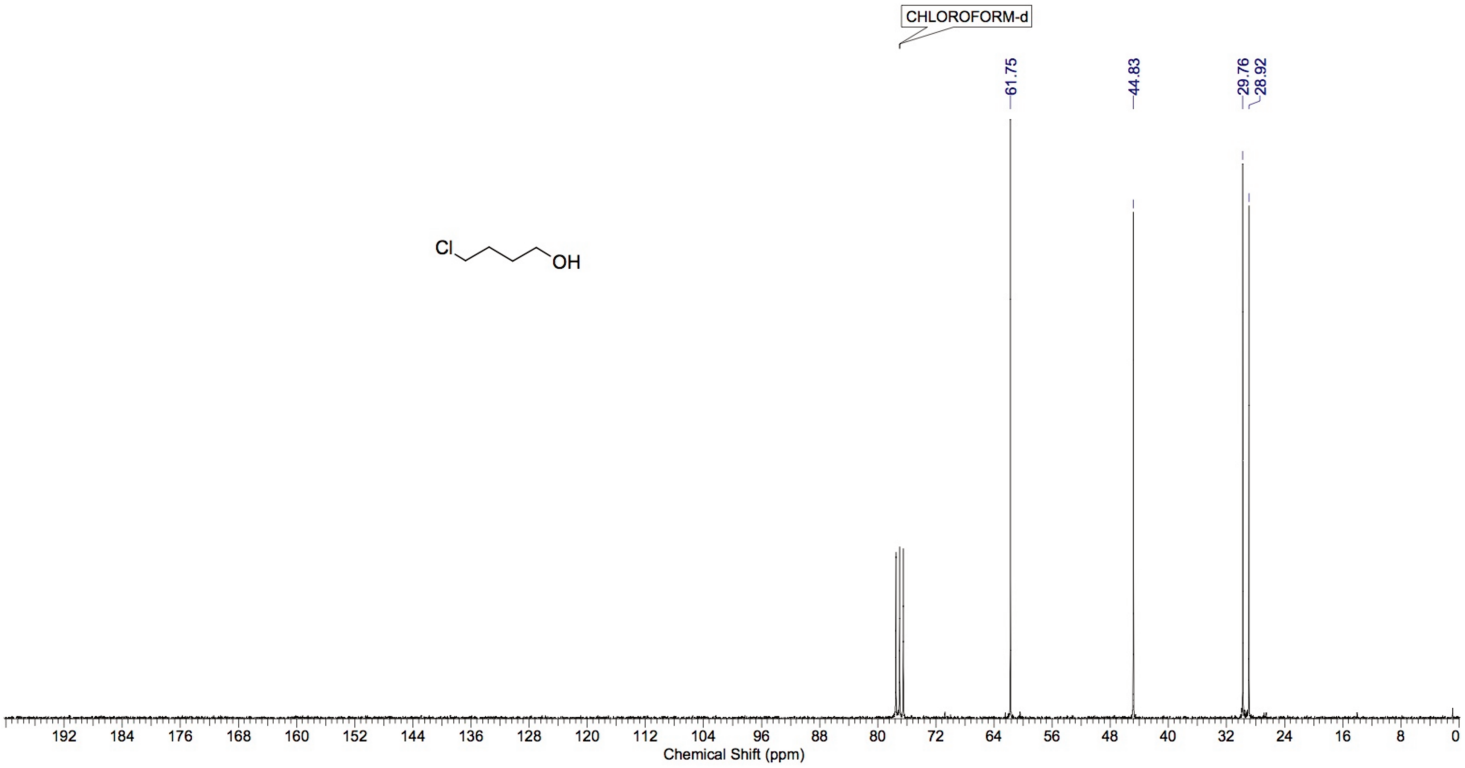
Formula C_4H_9ClO	**FW**	108.5667							
Acquisition Time (sec)	3.1654	**Comment**	out07igaH2 250MHz IGA 07			**Date**	07 Oct 2014 16:52:32		
Date Stamp	07 Oct 2014 16:52:32			**File Name**				**Frequency (MHz)**	250.13
Nucleus	1H	**Number of Transients**	16	**Origin**	spect	**Original Points Count**	16384	**Owner**	root
Points Count	32768	**Pulse Sequence**	zg30	**Receiver Gain**	181.00	**SW(cyclical) (Hz)**	5175.98	**Solvent**	CHLOROFORM-d
Spectrum Offset (Hz)	1750.6281	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	5175.83	**Temperature (degree C)**	25.160		



Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H do composto **55** (250 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

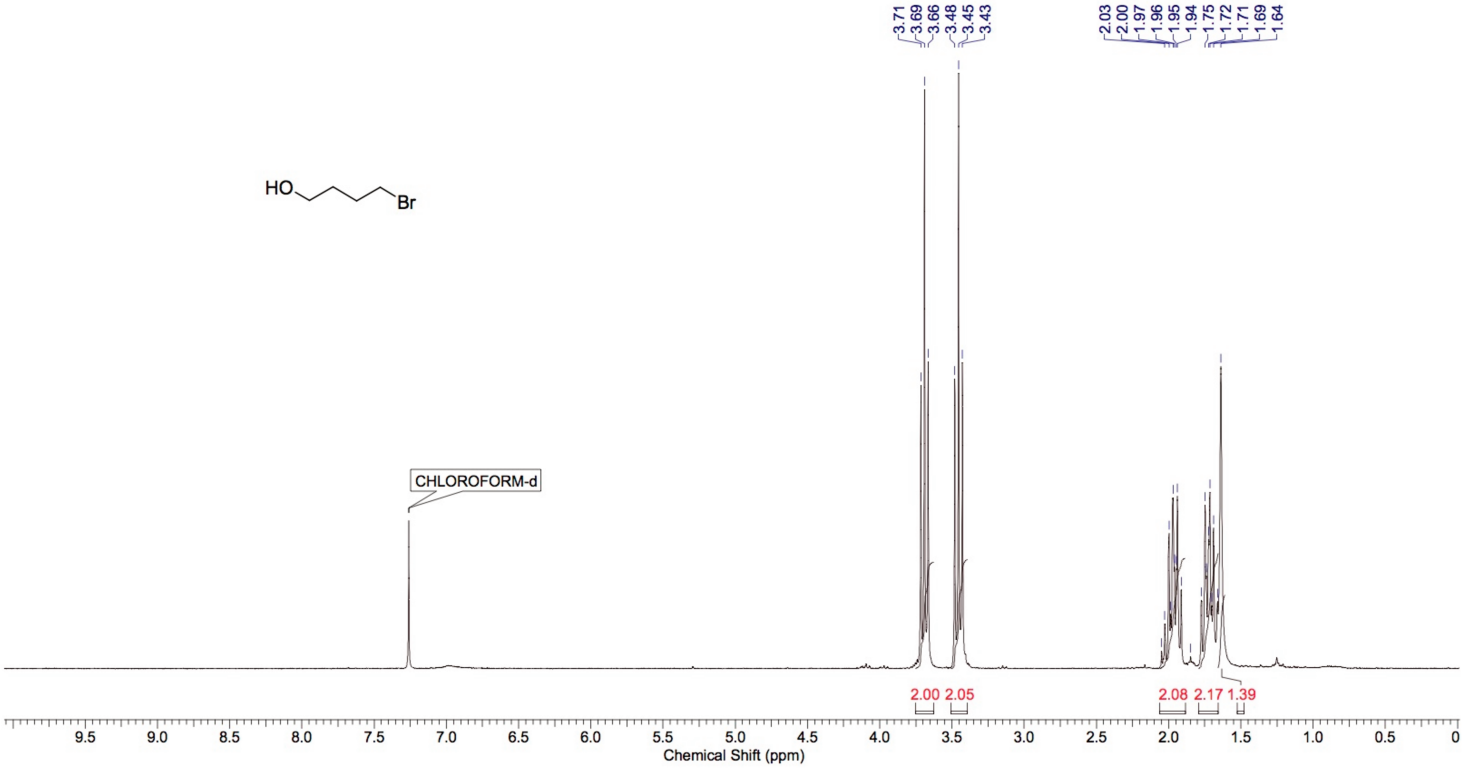
Formula C_4H_9ClO	**FW**	108.5667					
Acquisition Time (sec)	1.0879	**Comment**	IGA7 - out09igaC1 250MHz			**Date**	09 Oct 2014 09:50:08
Date Stamp	09 Oct 2014 09:50:08			**File Name**			
Frequency (MHz)	62.90	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	1024	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	root	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	645.10	**SW(cyclical) (Hz)**	15060.24	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	6284.4756	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	15059.78	**Temperature (degree C)**	25.160



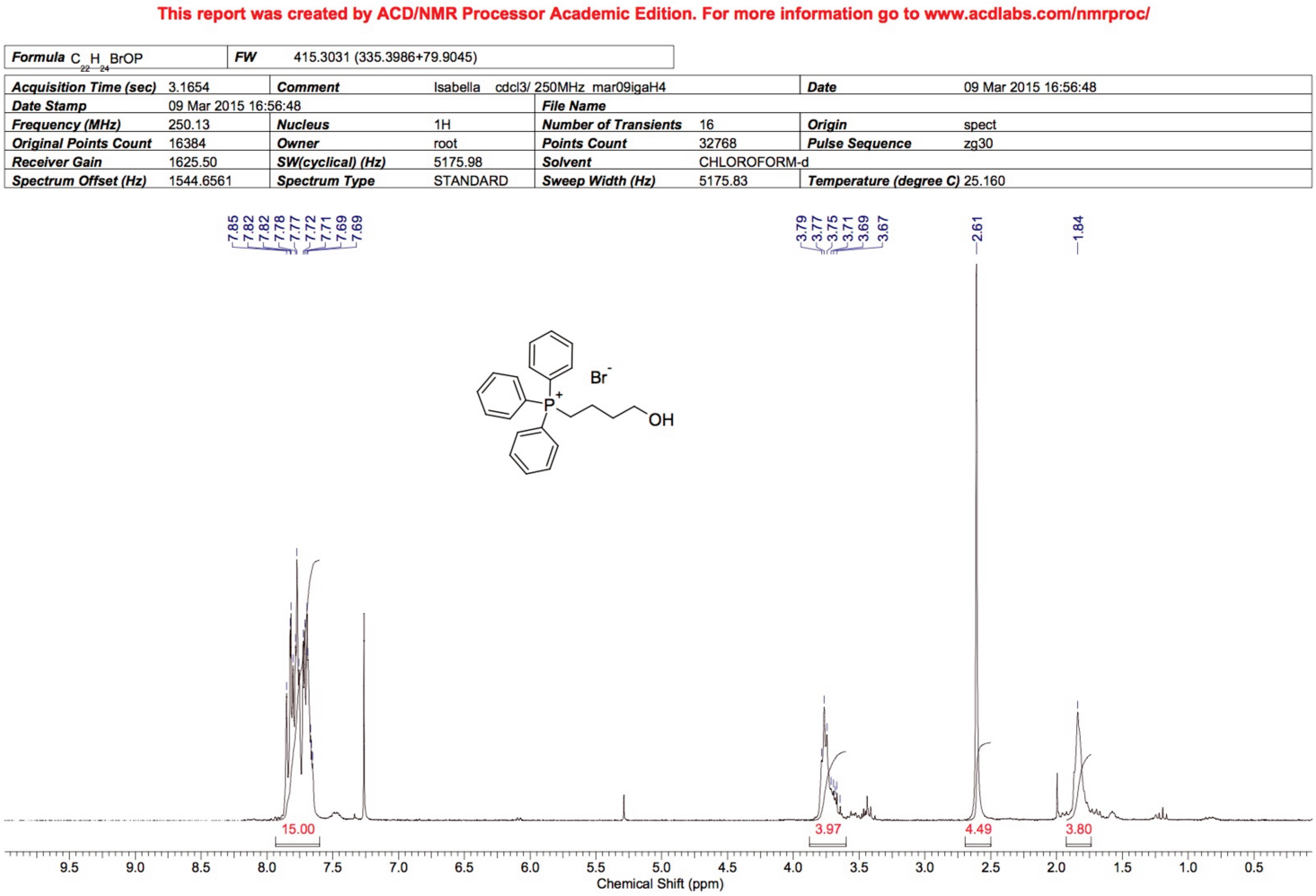
Anexo 7. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **55** (63 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula C_4H_9BrO	**FW**	153.0177					
Acquisition Time (sec)	3.1654	**Comment**	IGA 19 - Após coluna nov24igaH3 250MHz			**Date**	24 Nov 2014 15:29:36
Date Stamp	24 Nov 2014 15:29:36			**File Name**			
Frequency (MHz)	250.13	**Nucleus**	1H	**Number of Transients**	16	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	root	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zg30
Receiver Gain	1149.40	**SW(cyclical) (Hz)**	5175.98	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	1750.4702	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	5175.83	**Temperature (degree C)**	25.160



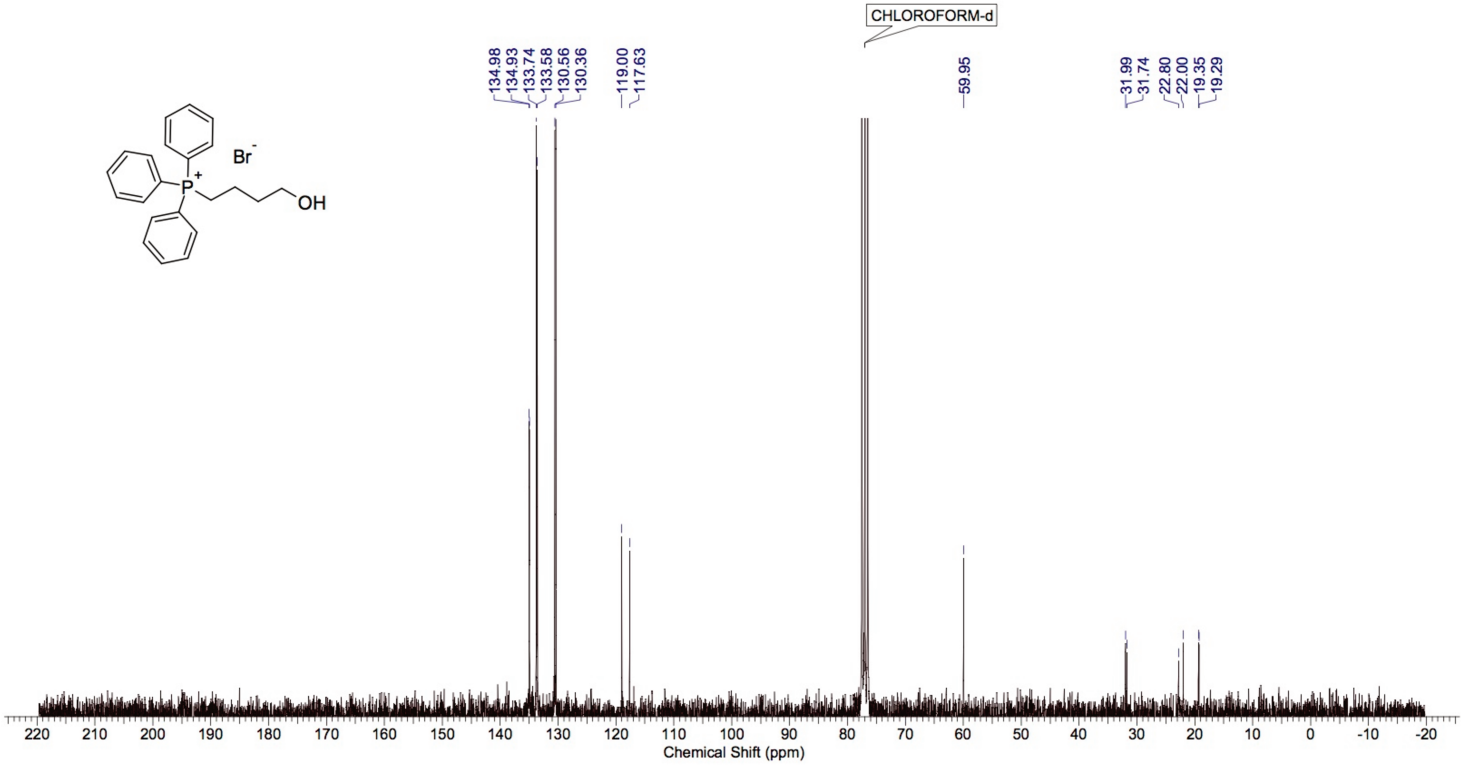
Anexo 8. Espectro de RMN de ^1H do composto **50** (250 MHz, $CDCl_3$)



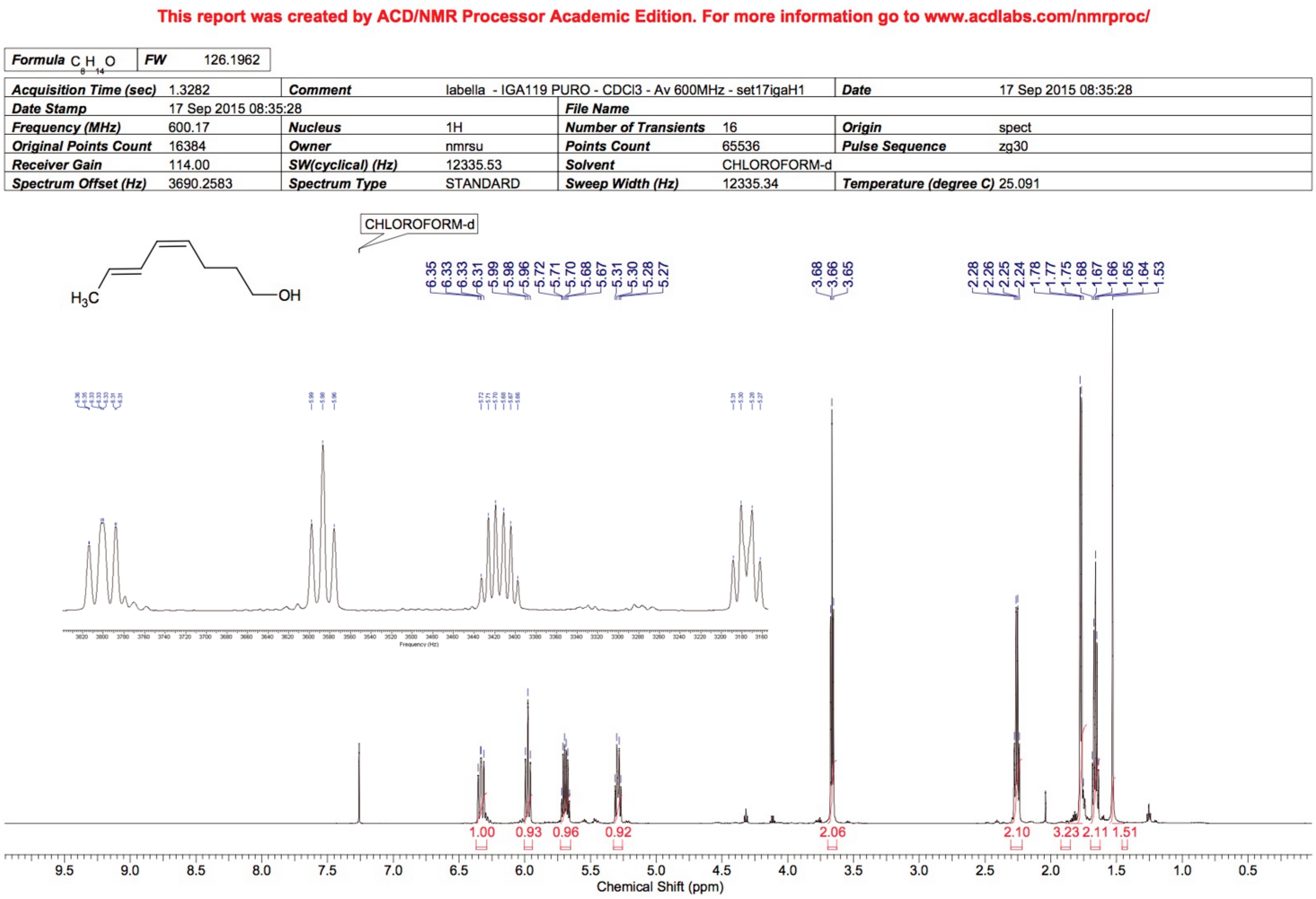
Anexo 9. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **49** (250 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_{22}H_{24}BrOP$		**FW**	415.3031 (335.3986+79.9045)				
Acquisition Time (sec)	1.0879	**Comment**	Isabella cdcl3/ 250MHz mar09igaC4			**Date**	09 Mar 2015 17:07:28
Date Stamp	09 Mar 2015 17:07:28			**File Name**			
Frequency (MHz)	62.90	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	1024	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	root	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	574.70	**SW(cyclical) (Hz)**	15060.24	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	6288.1523	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	15059.78	**Temperature (degree C)**	25.160



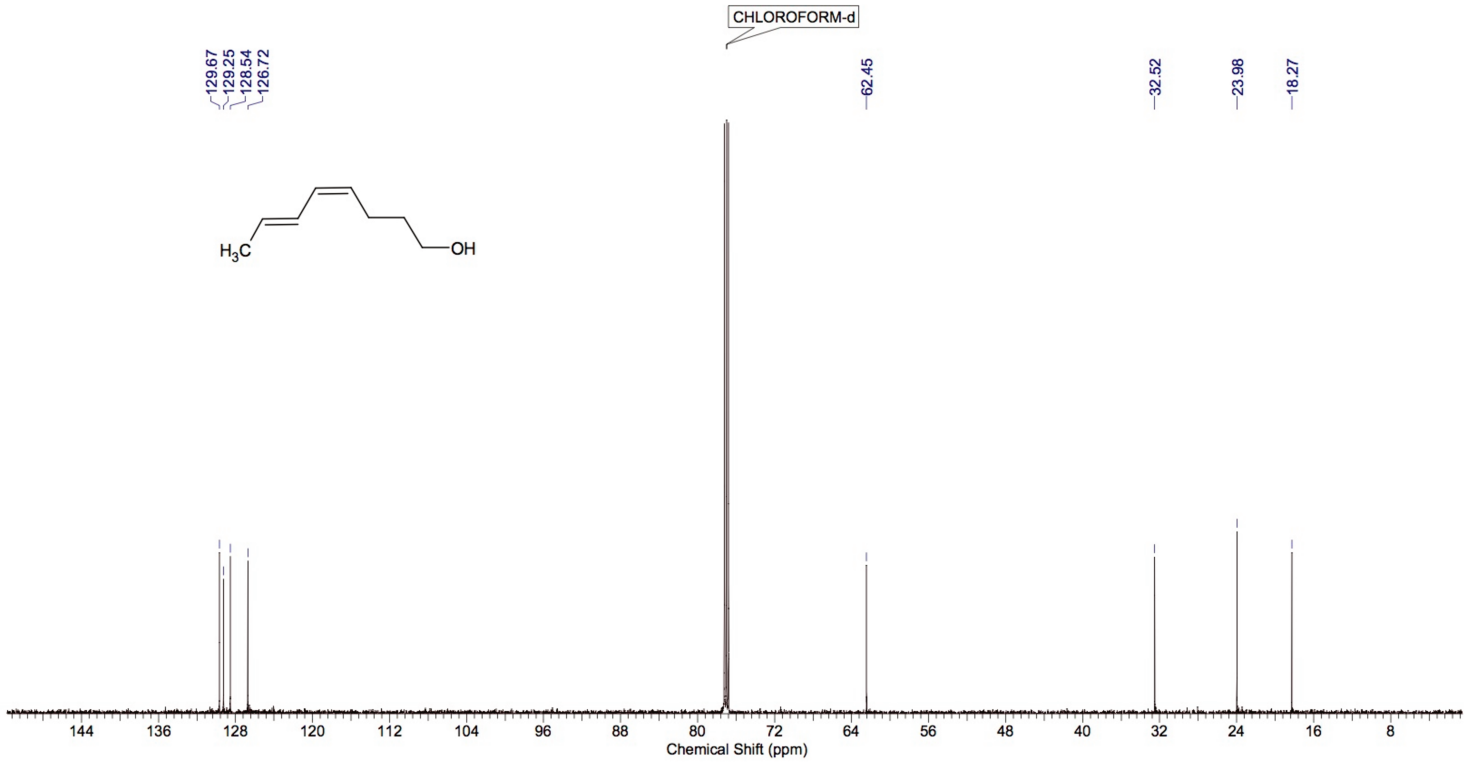
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **49** (63 MHz, CDCl3)



Anexo 11. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **27** (600 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

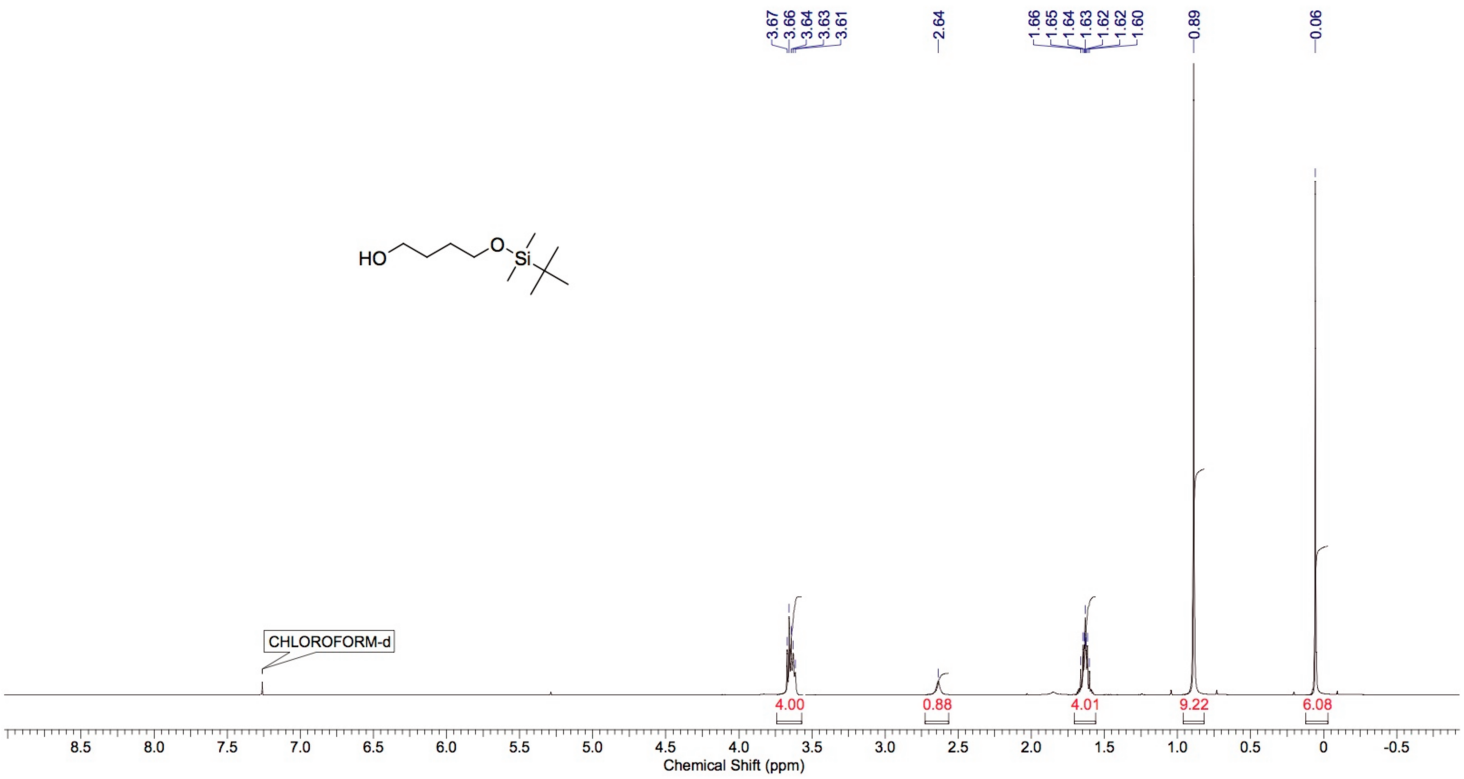
Formula $C_8H_{14}O$	**FW**	126.1962					
Acquisition Time (sec)	0.4544	**Comment**	labella - IGA119 PURO - CDCl3 - Av 600MHz - set17igaH1 13C			**Date**	17 Sep 2015 08:41:52
Date Stamp	17 Sep 2015 08:41:52			**File Name**			
Frequency (MHz)	150.91	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	128	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	nmrsu	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	203.00	**SW(cyclical) (Hz)**	36057.69	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	15085.9795
Spectrum Type	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	36056.59	**Temperature (degree C)**	25.148		



Anexo 12. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **27** (150 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

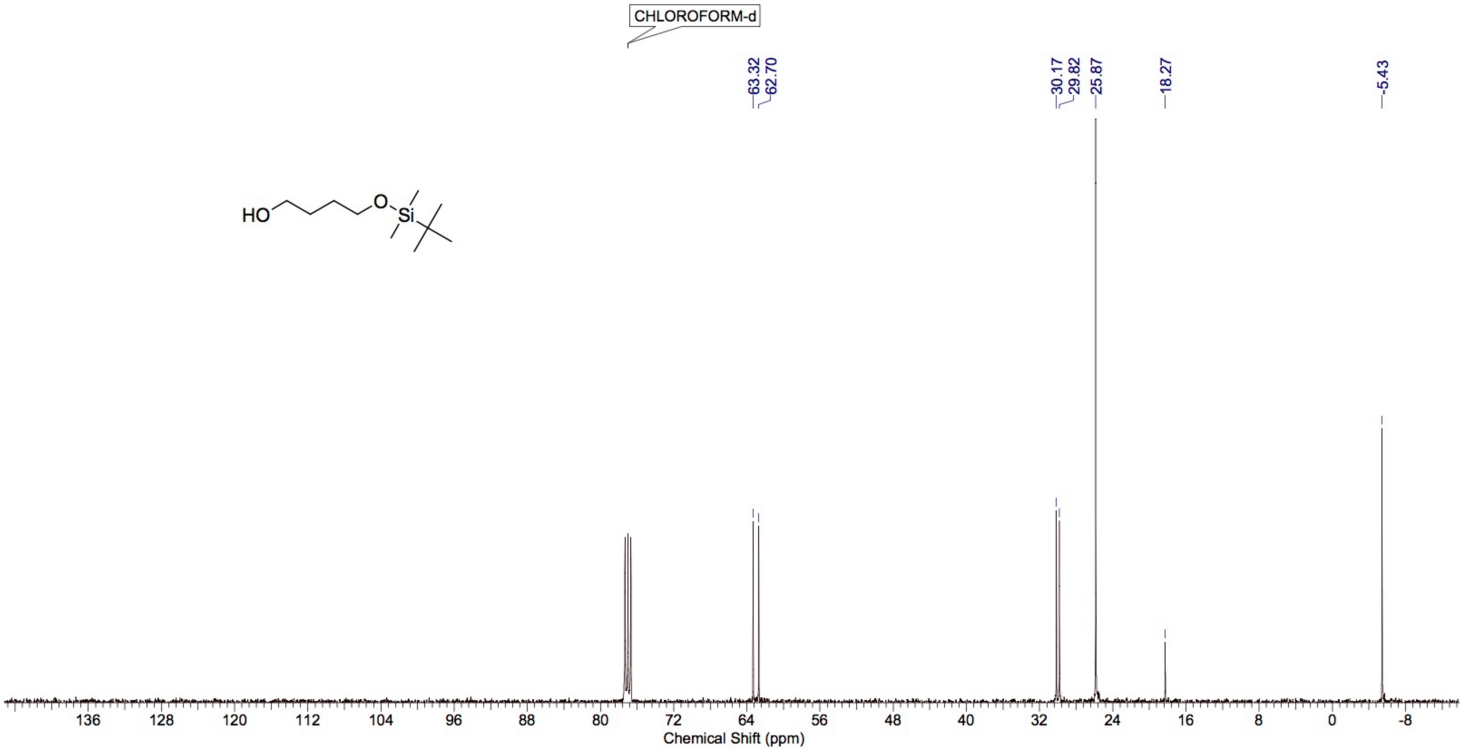
Formula $C_{10}H_{24}O_2Si$	**FW**	204.3819					
Acquisition Time (sec)	2.0447	**Comment**	Isabella - IGA 59-CP- CDCl3 - Av 400MHz - abr08igaH3			**Date**	08 Apr 2015 16:54:40
Date Stamp	08 Apr 2015 16:54:40			**File Name**			
Frequency (MHz)	400.18	**Nucleus**	1H	**Number of Transients**	16	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	avance	**Points Count**	65536	**Pulse Sequence**	zg30
Receiver Gain	32.00	**SW(cyclical) (Hz)**	8012.82	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	2461.6653
Spectrum Type	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	8012.70	**Temperature (degree C)**	25.160		



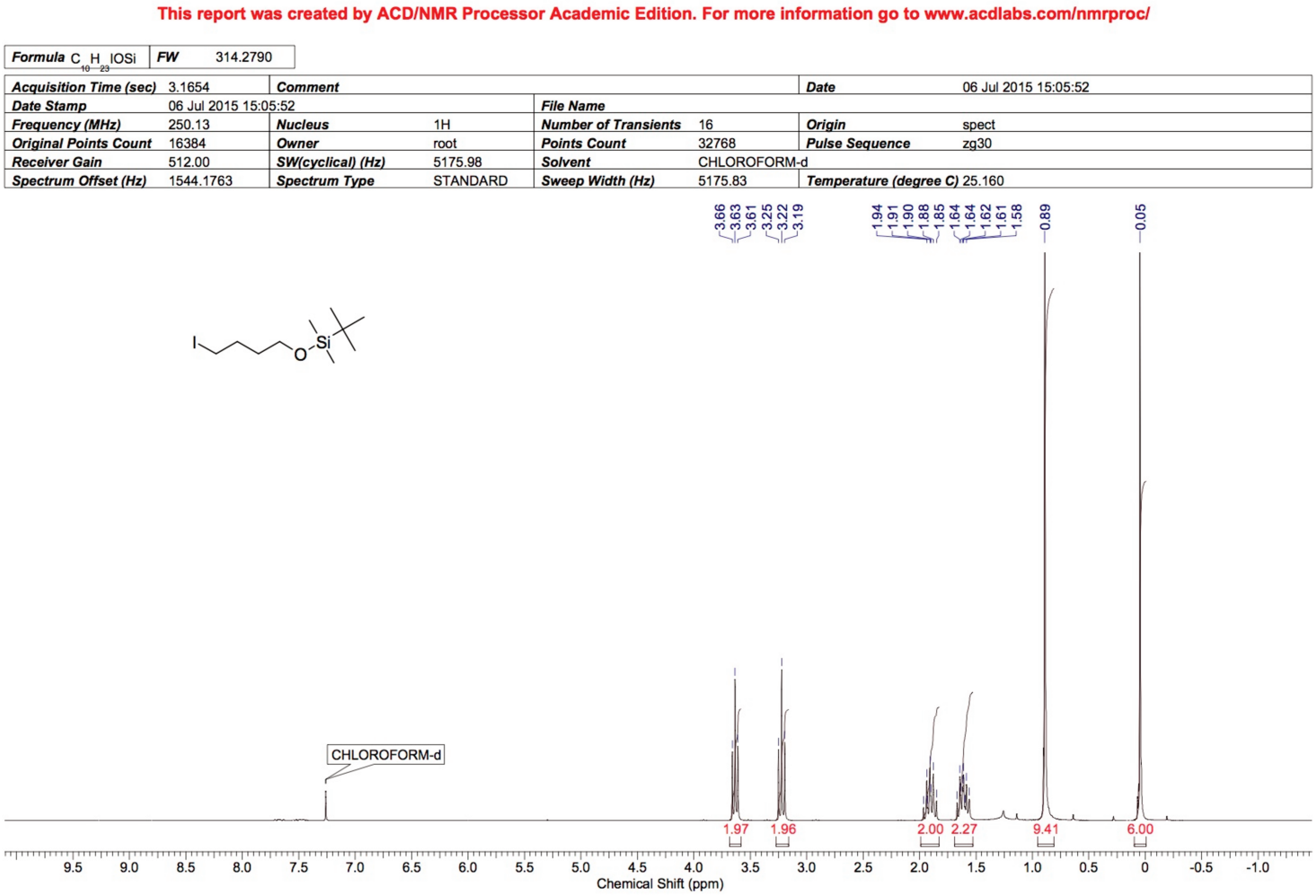
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H do composto **20** (400 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_{10}H_{24}O_2Si$	***FW***	204.3819					
Acquisition Time (sec)	0.6816	***Comment***	Isabella - IGA 59-CP- CDCl3 - Av 400MHz - abr08igaH3 13C			***Date***	08 Apr 2015 17:07:28
Date Stamp	08 Apr 2015 17:07:28						
File Name						***Frequency (MHz)***	100.63
Nucleus	13C	***Number of Transients***	431	***Origin***	spect	***Original Points Count***	16384
Owner	avance	***Points Count***	65536	***Pulse Sequence***	zgpg30	***Receiver Gain***	203.00
SW(cyclical) (Hz)	24038.46	***Solvent***	CHLOROFORM-d	***Spectrum Offset (Hz)***	10059.1611	***Spectrum Type***	STANDARD
Sweep Width (Hz)	24038.09	***Temperature (degree C)***	25.160				



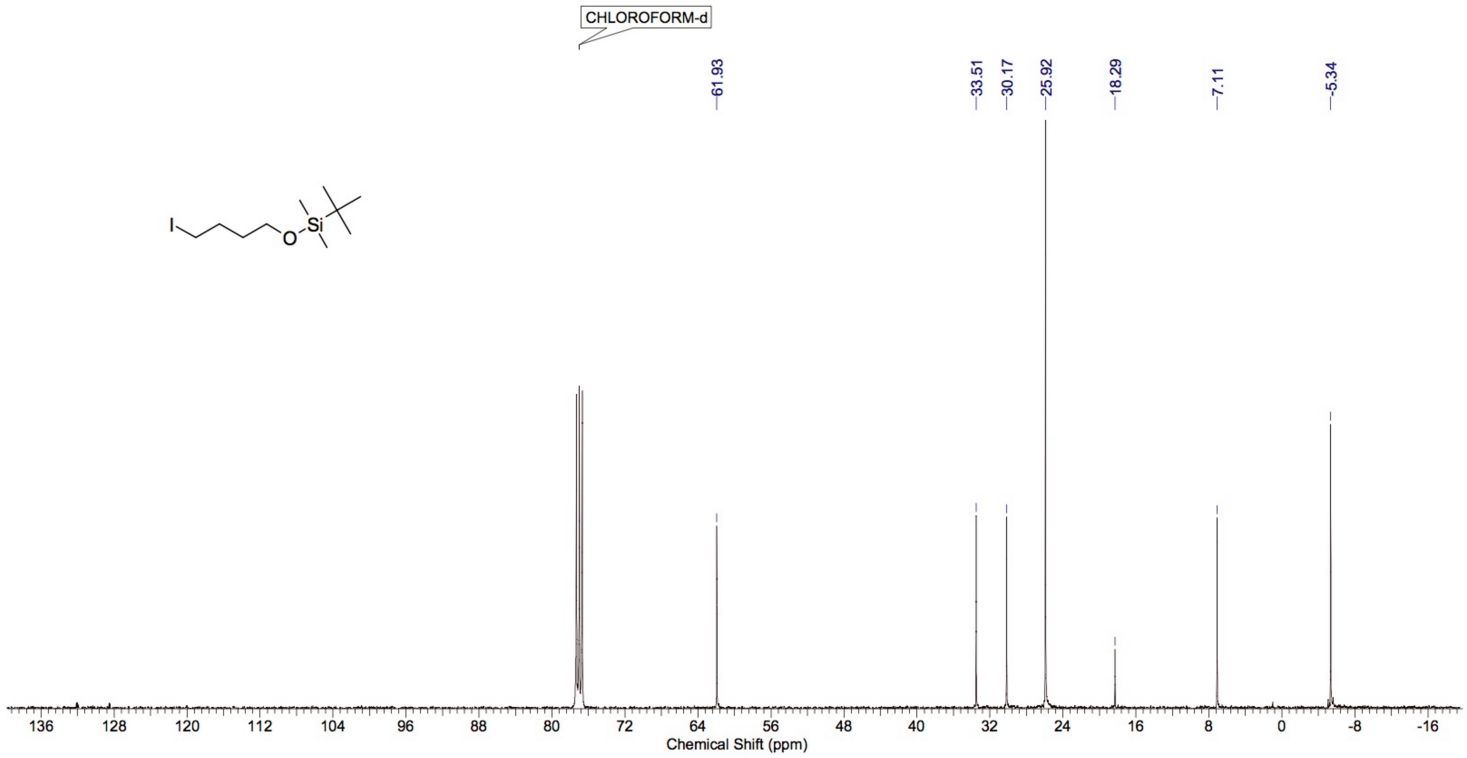
Anexo 14. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **20** (101 MHz, $CDCl_3$)



Anexo 15. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **58** (250 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

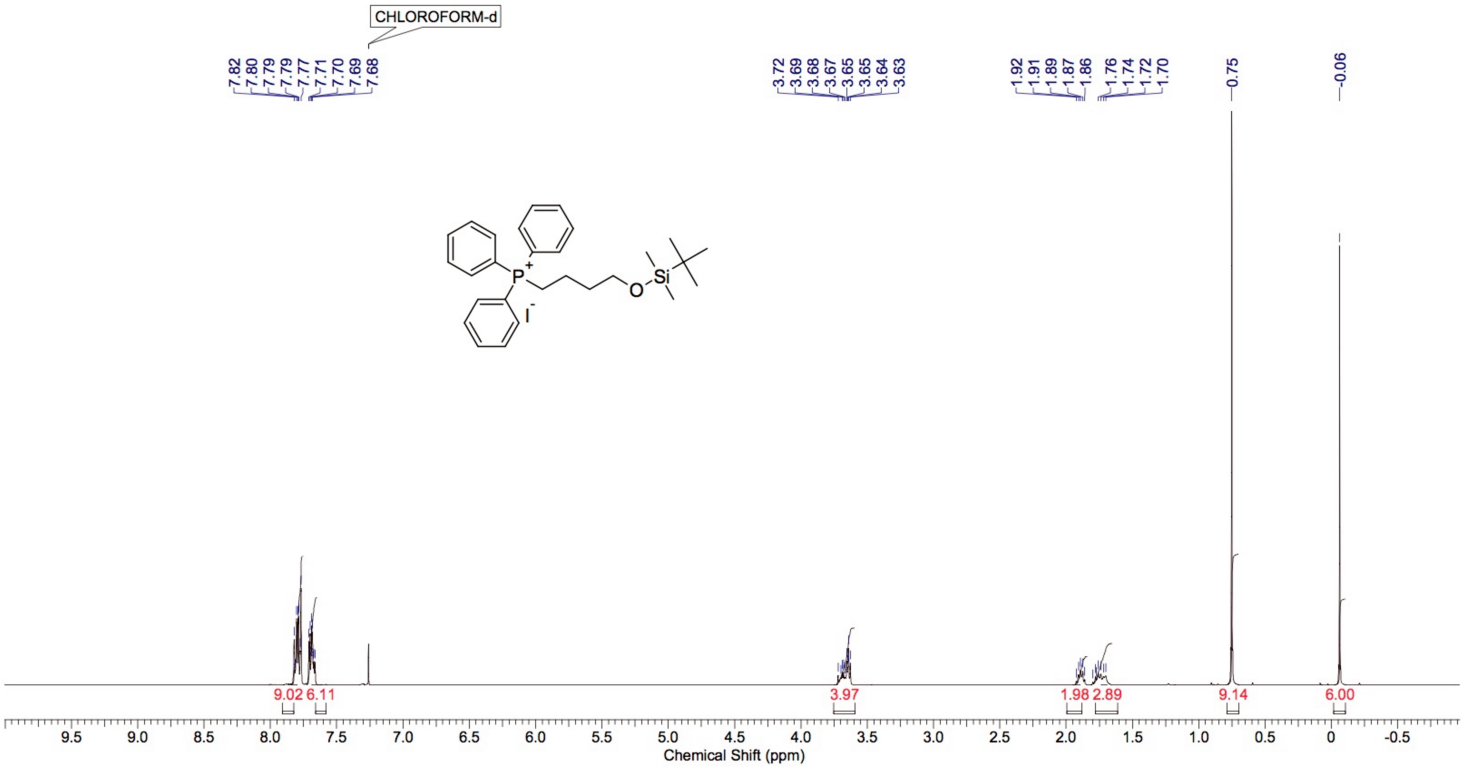
Formula $C_{10}H_{23}IOSi$	**FW**	314.2790					
Acquisition Time (sec)	0.6816	**Comment**				**Date**	06 Jul 2015 21:32:00
Date Stamp	06 Jul 2015 21:32:00			**File Name**			
Frequency (MHz)	100.63	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	5120	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	avance	**Points Count**	65536	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	203.00	**SW(cyclical) (Hz)**	24038.46	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	10058.7930
Spectrum Type	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	24038.09	**Temperature (degree C)**	23.160		



Anexo 16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **58** (101 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

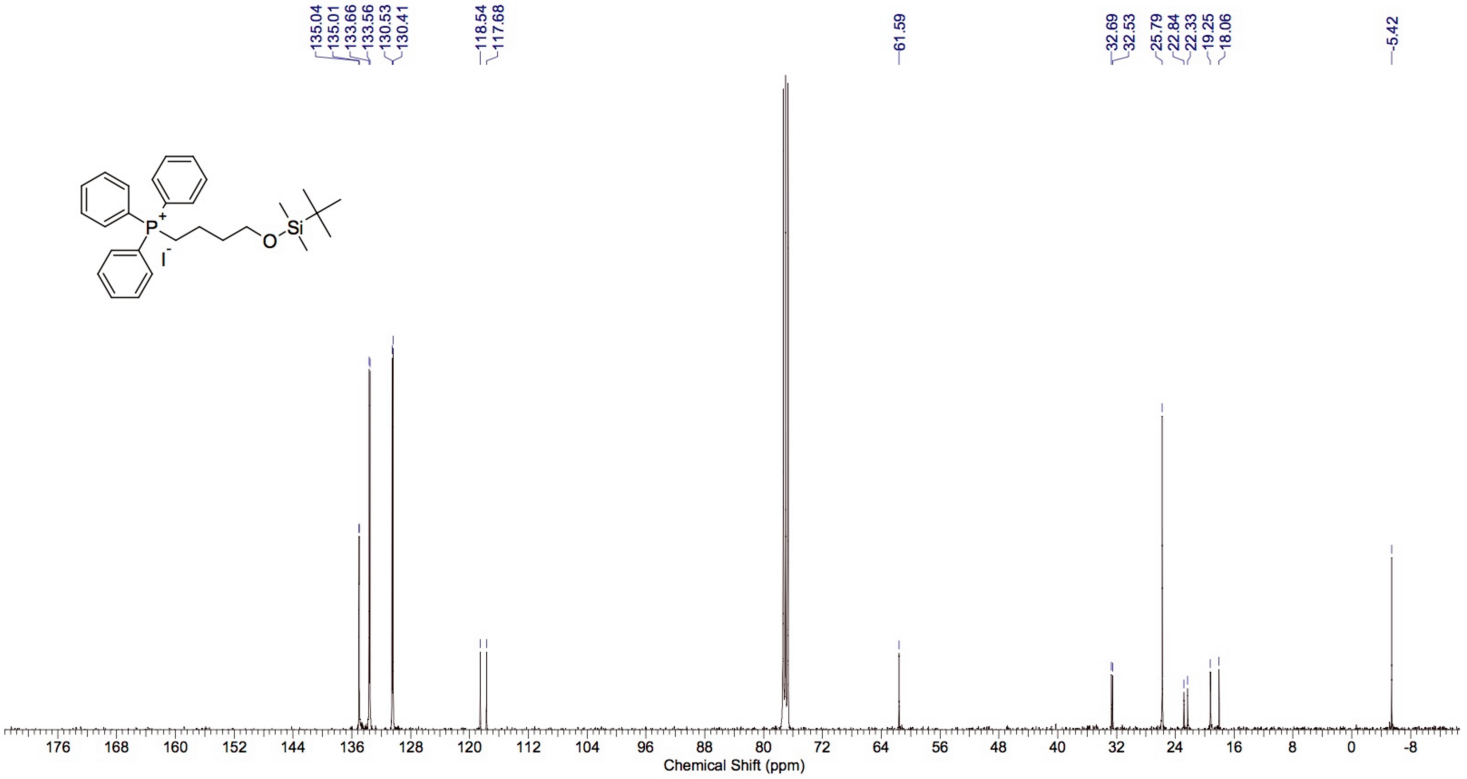
Formula $C_{28}H_{36}IOPSi$		***FW***	576.5645 (449.6594+126.9050)				
Acquisition Time (sec)	2.0447	***Comment***	Isabella - IGA 61 - CDCl3 - Av 500MHz - abr15igaH1			***Date***	15 Apr 2015 10:37:04
Date Stamp	15 Apr 2015 10:37:04			***File Name***			
Frequency (MHz)	400.18	***Nucleus***	1H	***Number of Transients***	16	***Origin***	spect
Original Points Count	16384	***Owner***	avance	***Points Count***	65536	***Pulse Sequence***	zg30
Receiver Gain	101.00	***SW(cyclical) (Hz)***	8012.82	***Solvent***	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	2461.1760	***Spectrum Type***	STANDARD	***Sweep Width (Hz)***	8012.70	***Temperature (degree C)***	25.160



Anexo 17. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **59** (400 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

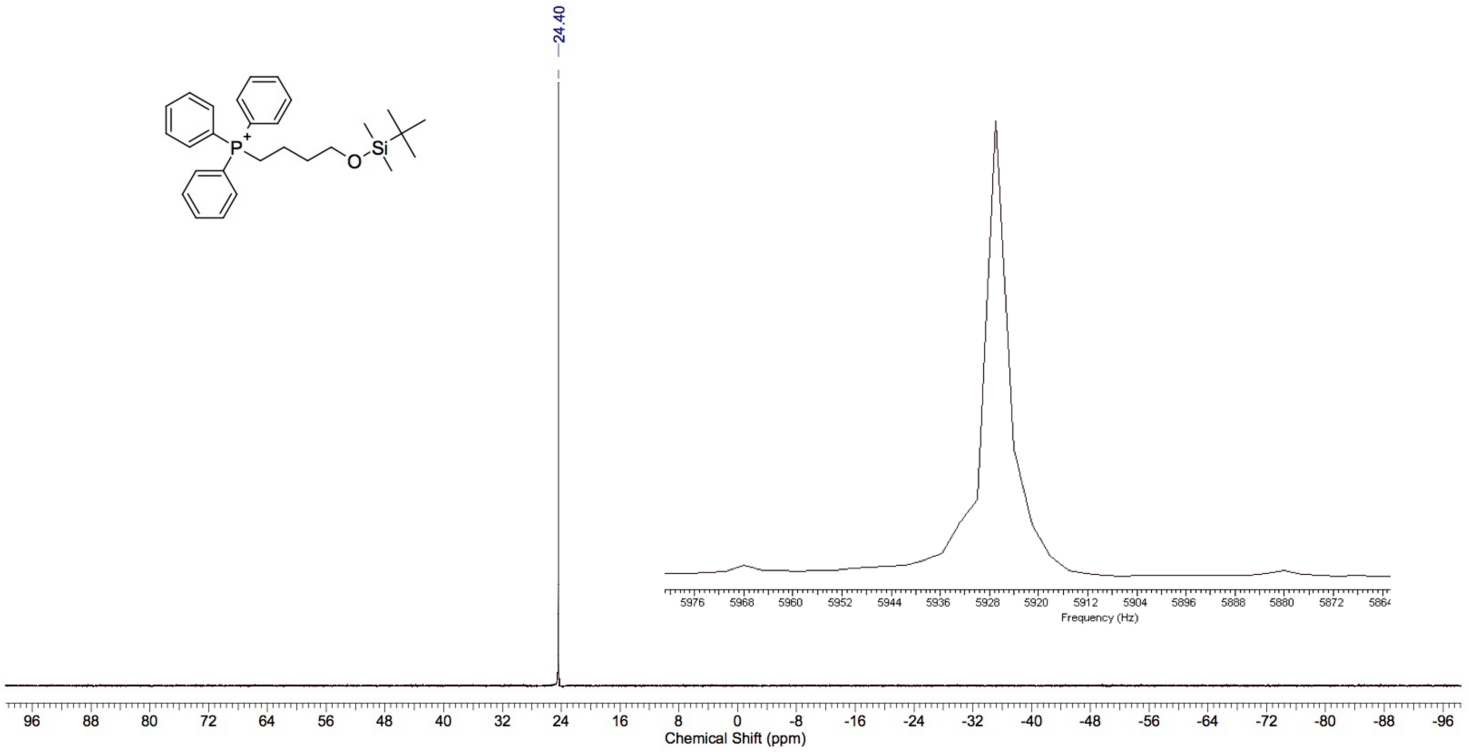
Formula $C_{28}H_{36}IOPSi$		***FW***	576.5645 (449.6594+126.9050)				
Acquisition Time (sec)	0.6816	***Comment***	Isabella - IGA 61 - CDCl3 - Av 500MHz - abr15igaH1 13C			***Date***	15 Apr 2015 10:54:08
Date Stamp	15 Apr 2015 10:54:08			***File Name***			
Frequency (MHz)	100.63	***Nucleus***	13C	***Number of Transients***	3072	***Origin***	spect
Original Points Count	16384	***Owner***	avance	***Points Count***	65536	***Pulse Sequence***	zgpg30
Receiver Gain	203.00	***SW(cyclical) (Hz)***	24038.46	***Solvent***	CHLOROFORM-d	***Spectrum Offset (Hz)***	10054.0264
Spectrum Type	STANDARD	***Sweep Width (Hz)***	24038.09	***Temperature (degree C)***	25.160		



Anexo 18. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **59** (101 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

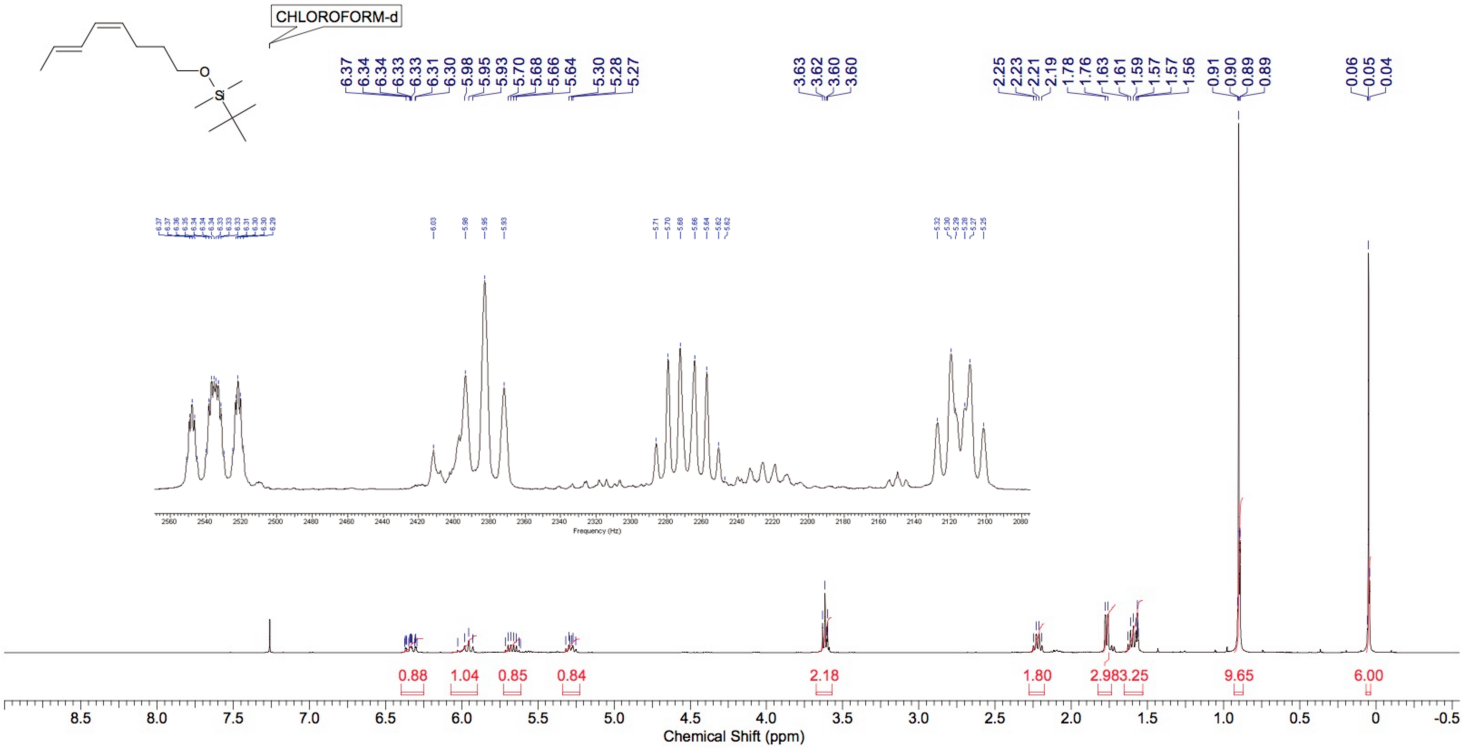
Formula $C_{28}H_{38}OPSi$	**FW**	449.6594					
Acquisition Time (sec)	0.3408	**Comment**	Isabella - Sal de Fosfonio Protegido - CDCl3 - Avance 600 MHz - jul07igaP2				
Date	07 Jul 2016 13:49:04			**Date Stamp**	07 Jul 2016 13:49:04		
File Name						**ıcy (MHz)**	242.95
Nucleus	31P	**Number of Transients**	128	**Origin**	spect	**Original Points Count**	32768
Owner	Admin	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30	**Receiver Gain**	203.00
SW(cyclical) (Hz)	96153.84	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	-12147.3906	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	96150.91	**Temperature (degree C)**	24.476				



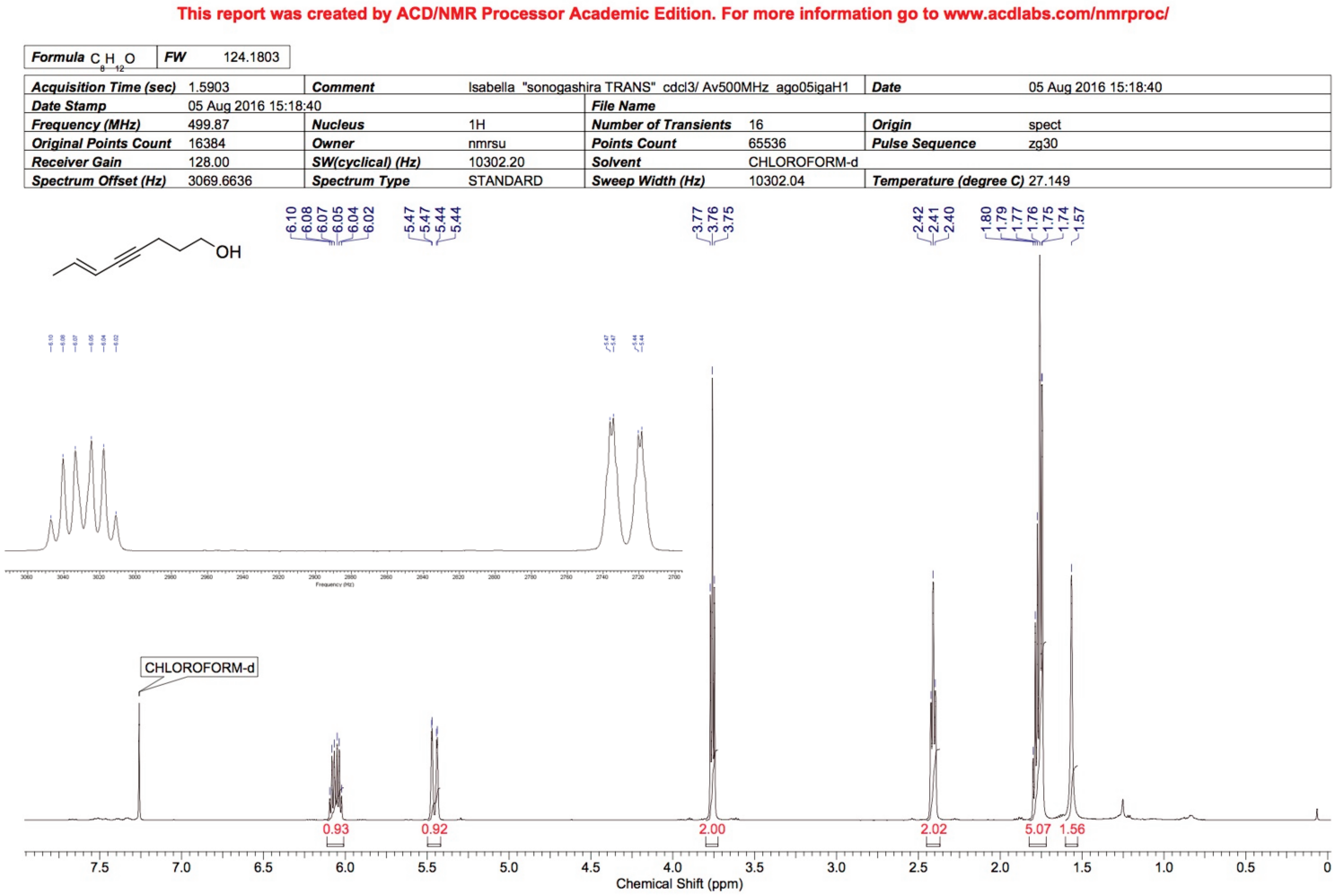
Anexo 19. Espectro de RMN de ^{31}P do composto **59** (101 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_{14}H_{28}OSi$	**FW**	240.4570					
Acquisition Time (sec)	3.4079	**Comment**	Isabella - IGA 161 - CDCl3 - Avance 400 MHz - dez17igaH1 - 1H (T = 25°C)				
Date	17 Dec 2015 14:19:12			**Date Stamp**	17 Dec 2015 14:19:12		
File Name				**Frequency (MHz)**	400.18	**Nucleus**	1H
Number of Transients	16	**Origin**	spect	**Original Points Count**	16384	**Owner**	avance
Points Count	65536	**Pulse Sequence**	zg30	**Receiver Gain**	90.50	**SW(cyclical) (Hz)**	4807.69
Solvent	CHLOROFORM-d			**Spectrum Offset (Hz)**	1992.1636	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	4807.62	**Temperature (degree C)**	24.760				



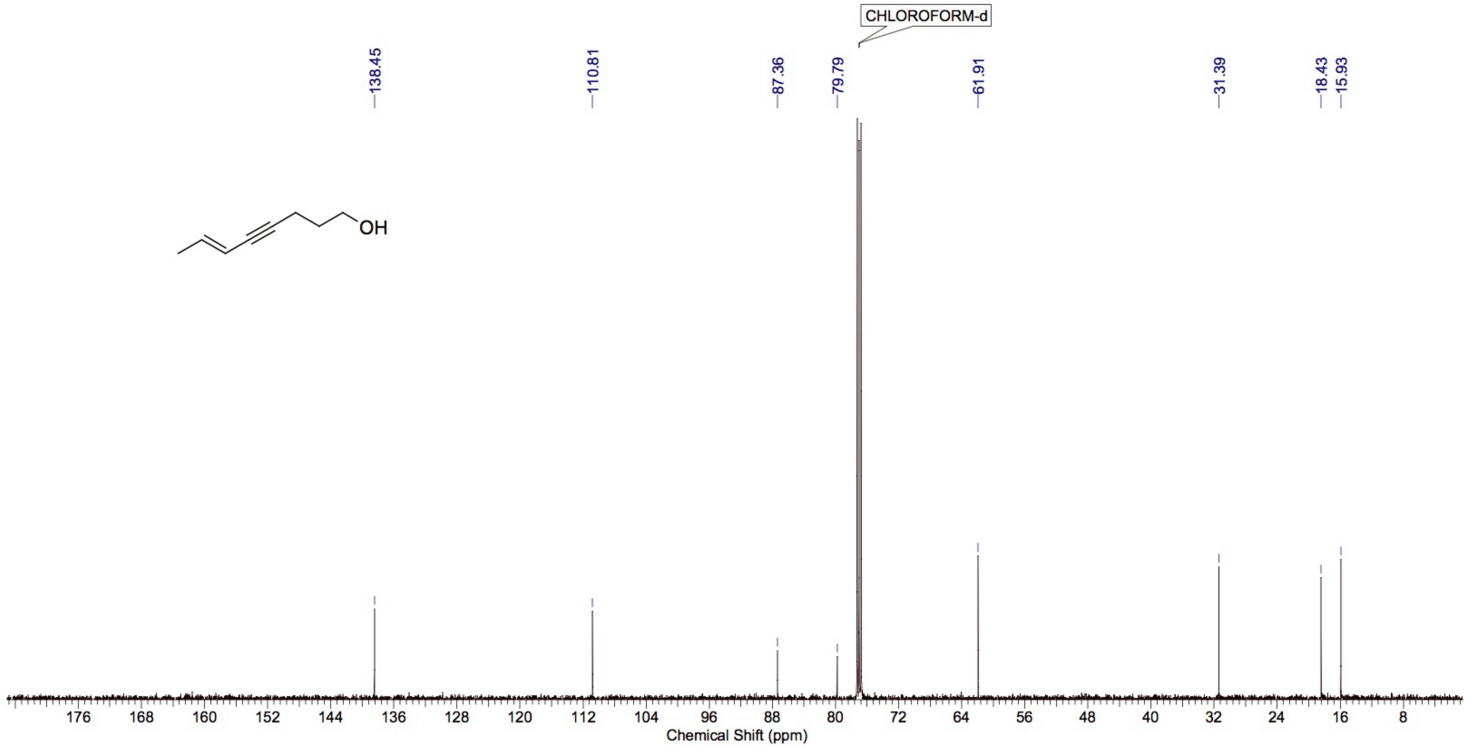
Anexo 20. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **26** (400 MHz, $CDCl_3$)



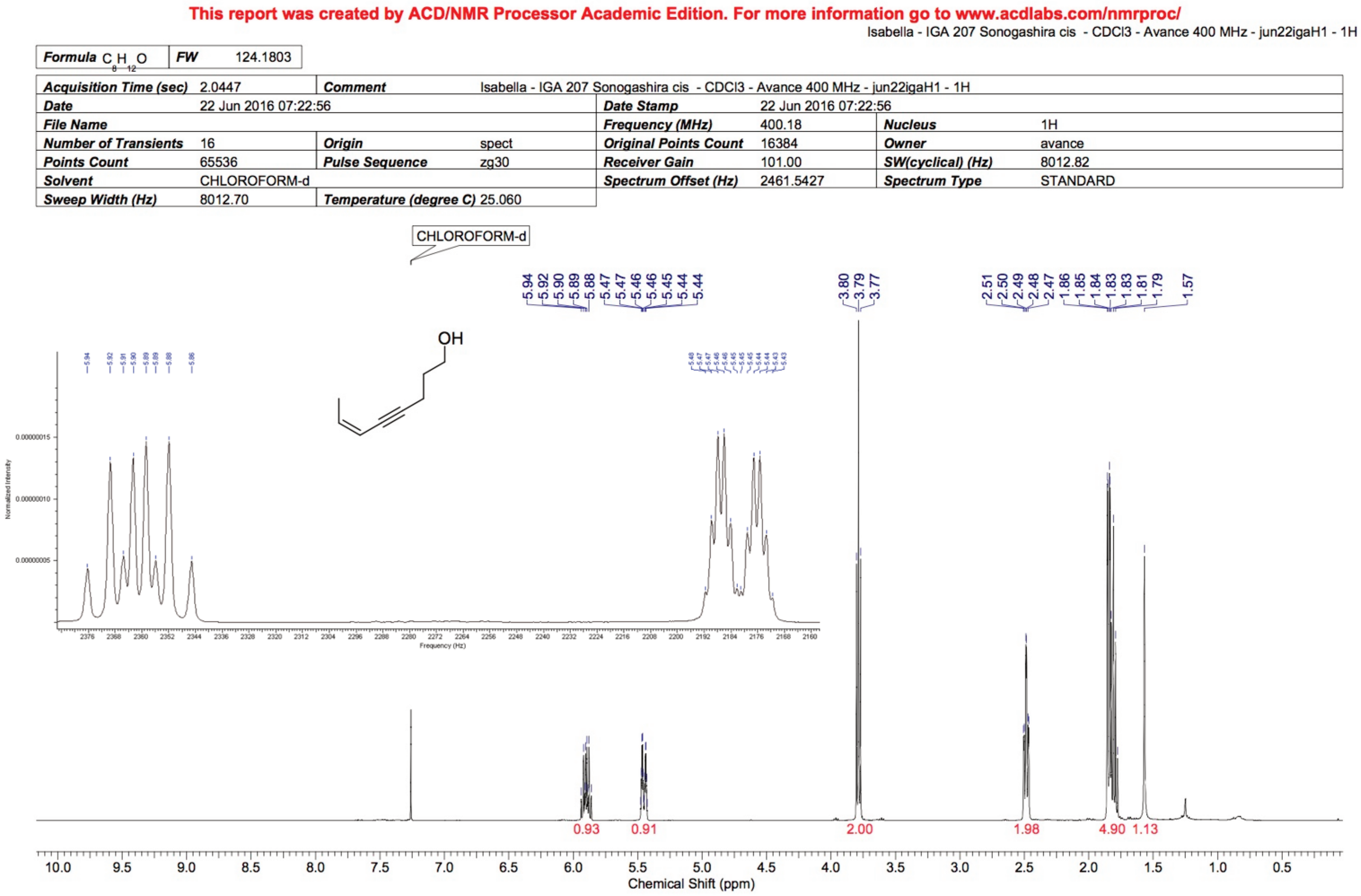
Anexo 21. Espectro de RMN de ^{1}H do composto ***E*-51** (500 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_8H_{12}O$	**FW**	124.1803					
Acquisition Time (sec)	0.4981	**Comment**	Isabella "sonogashira TRANS" cdcl3/ Av500MHz ago05igaH1 - 13C 8min				
Date	05 Aug 2016 15:27:12			**Date Stamp**	05 Aug 2016 15:27:12		
File Name						**Frequency (MHz)**	125.69
Nucleus	13C	**Number of Transients**	200	**Origin**	spect	**Original Points Count**	16384
Owner	nmrsu	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30	**Receiver Gain**	2050.00
SW(cyclical) (Hz)	32894.74	**Solvent**	CHLOROFORM-d	**Spectrum Offset (Hz)**	13822.7842	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	32893.73	**Temperature (degree C)**	27.150				



Anexo 22. Espectro de RMN de ^{13}C do composto ***E*-51** (126 MHz, $CDCl_3$)

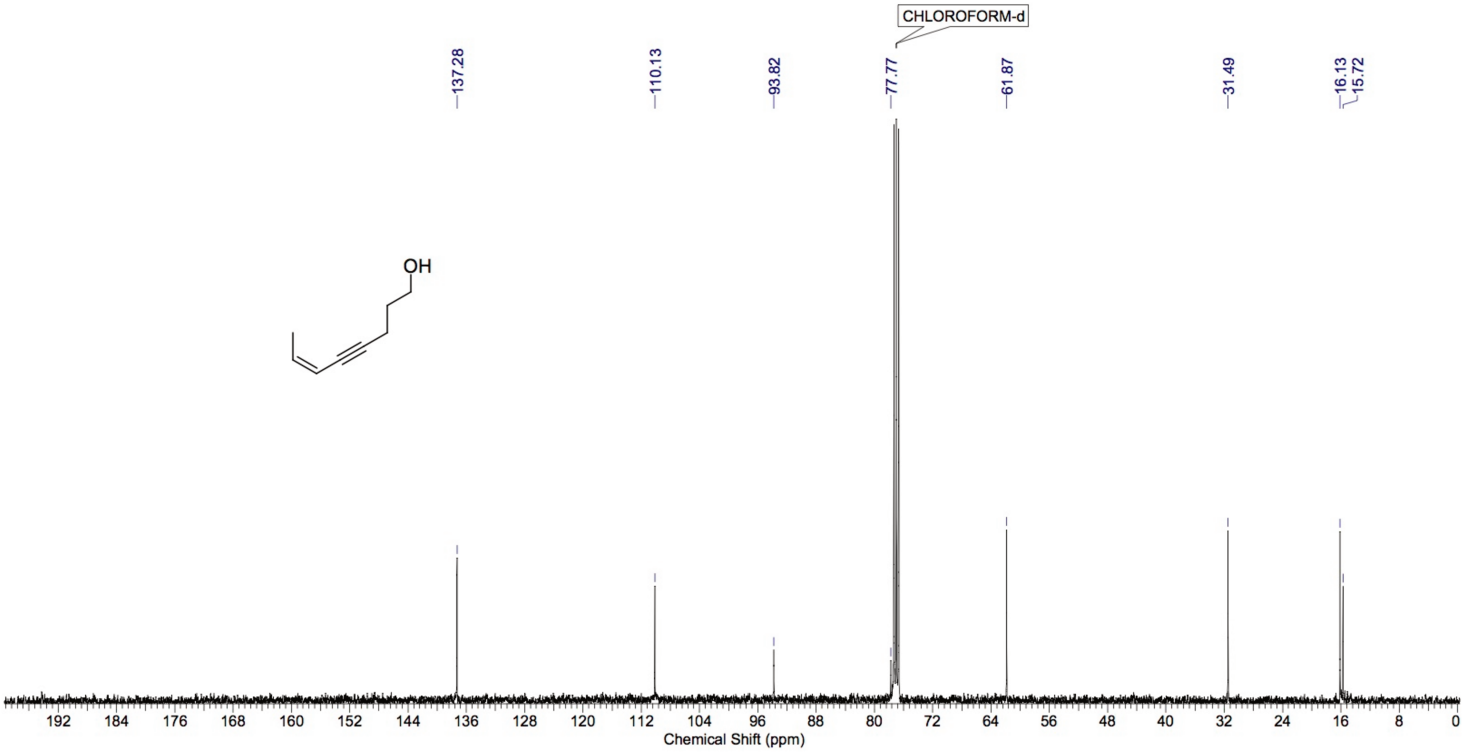


Anexo 23. Espectro de RMN de ^{1}H do composto ***Z*-51**(400 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Isabella - IGA 207 Sonogashira cis - CDCl3 - Avance 400 MHz - jun22igaH1 - 13C 30 min

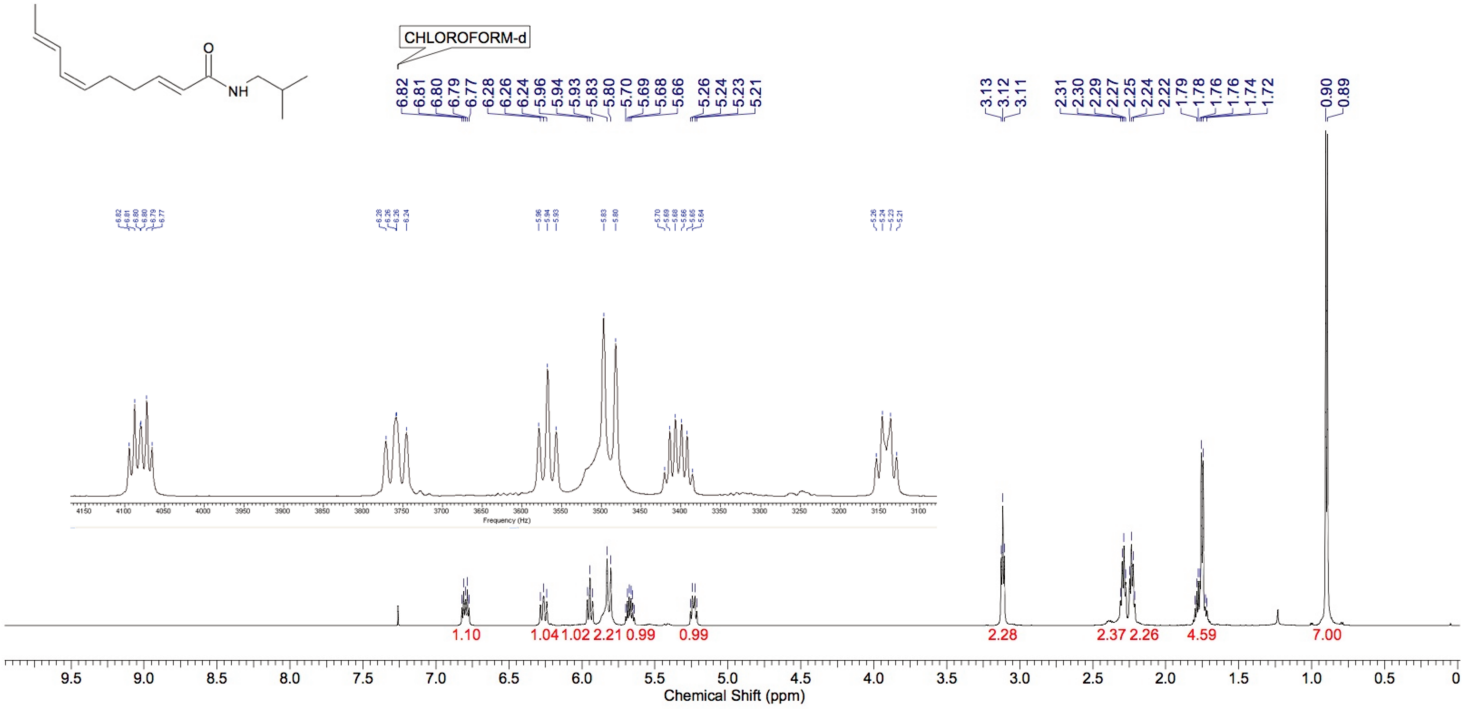
Formula $C_8H_{12}O$	***FW***	124.1803					
Acquisition Time (sec)	0.6816	***Comment***	Isabella - IGA 207 Sonogashira cis - CDCl3 - Avance 400 MHz - jun22igaH1 - 13C 30 min				
Date	22 Jun 2016 07:54:56			***Date Stamp***	22 Jun 2016 07:54:56		
File Name						***Frequency (MHz)***	100.63
Nucleus	13C	***Number of Transients***	1024	***Origin***	spect	***Original Points Count***	16384
Owner	avance	***Points Count***	65536	***Pulse Sequence***	zgpg30	***Receiver Gain***	203.00
SW(cyclical) (Hz)	24038.46	***Solvent***	CHLOROFORM-d	***Spectrum Offset (Hz)***	10059.8945	***Spectrum Type***	STANDARD
Sweep Width (Hz)	24038.09	***Temperature (degree C)***	25.160				



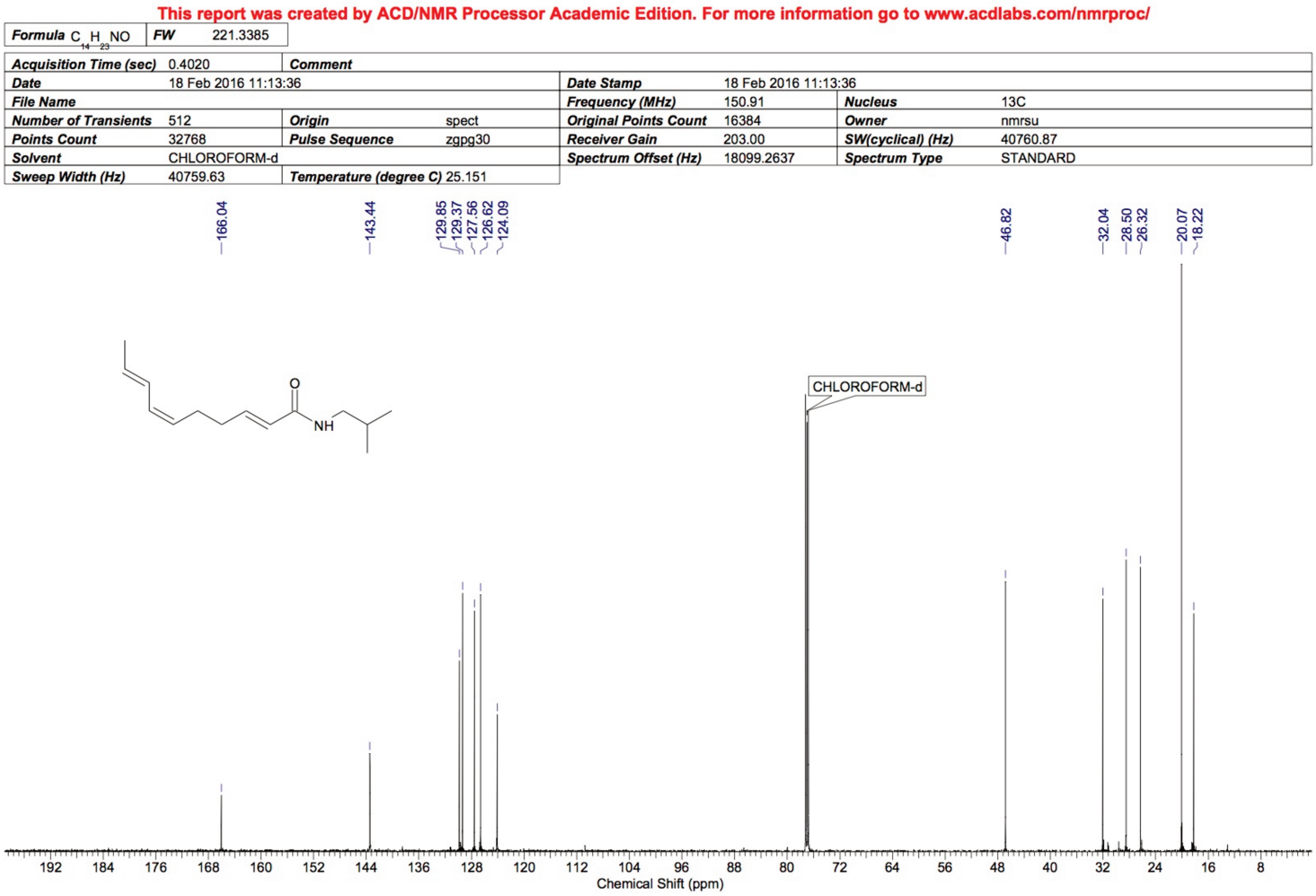
Anexo 24. Espectro de RMN de ^{13}C do composto ***Z*-51**(101 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

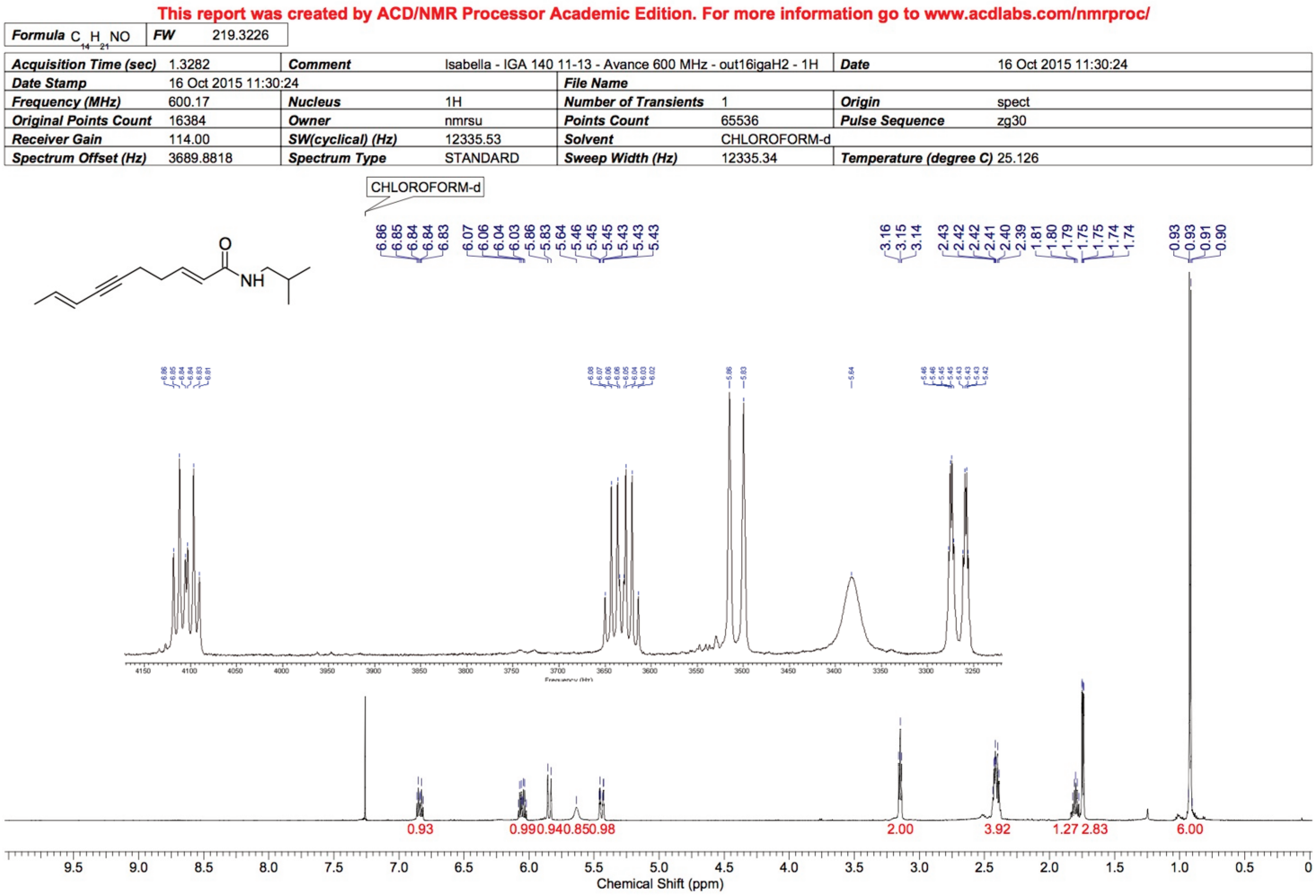
Formula $C_{14}H_{23}NO$	**FW**	221.3385					
Acquisition Time (sec)	1.3282	**Comment**	Isabella - IGA183 AN1 puro - CDCl3 - Av 600MHz - fev18igaH1				
Date	18 Feb 2016 10:54:24			**Date Stamp**	18 Feb 2016 10:54:24		
File Name				**Frequency (MHz)**	600.17	**Nucleus**	1H
Number of Transients	16	**Origin**	spect	**Original Points Count**	16384	**Owner**	nmrsu
Points Count	65536	**Pulse Sequence**	zg30	**Receiver Gain**	45.20	**SW(cyclical) (Hz)**	12335.53
Solvent	CHLOROFORM-d			**Spectrum Offset (Hz)**	3690.2581	**Spectrum Type**	STANDARD
Sweep Width (Hz)	12335.34	**Temperature (degree C)**	25.136				



Anexo 25. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **1** (600 MHz, $CDCl_3$)



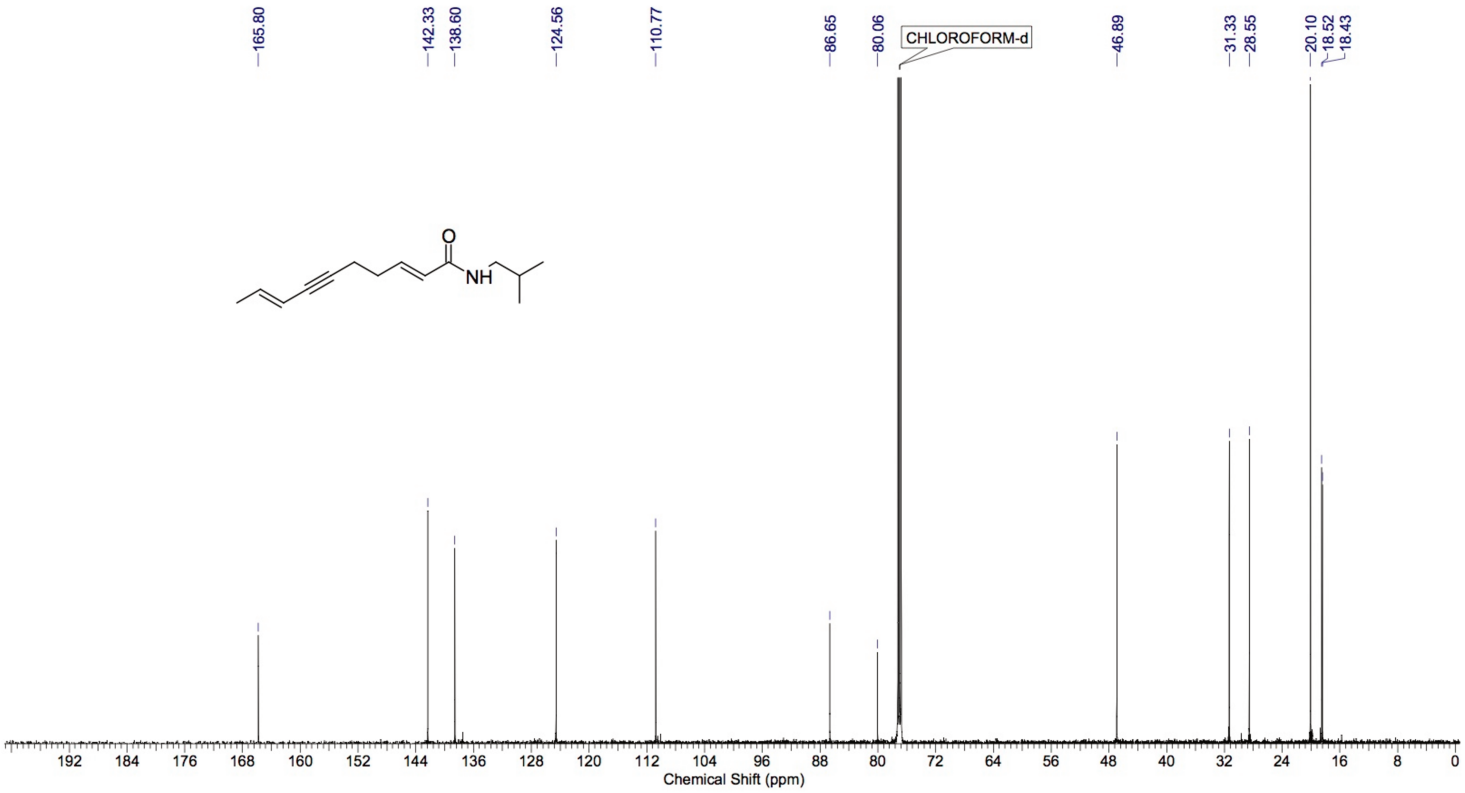
Anexo 26. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** (151 MHz, $CDCl_3$)



Anexo 27. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **16** (600 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

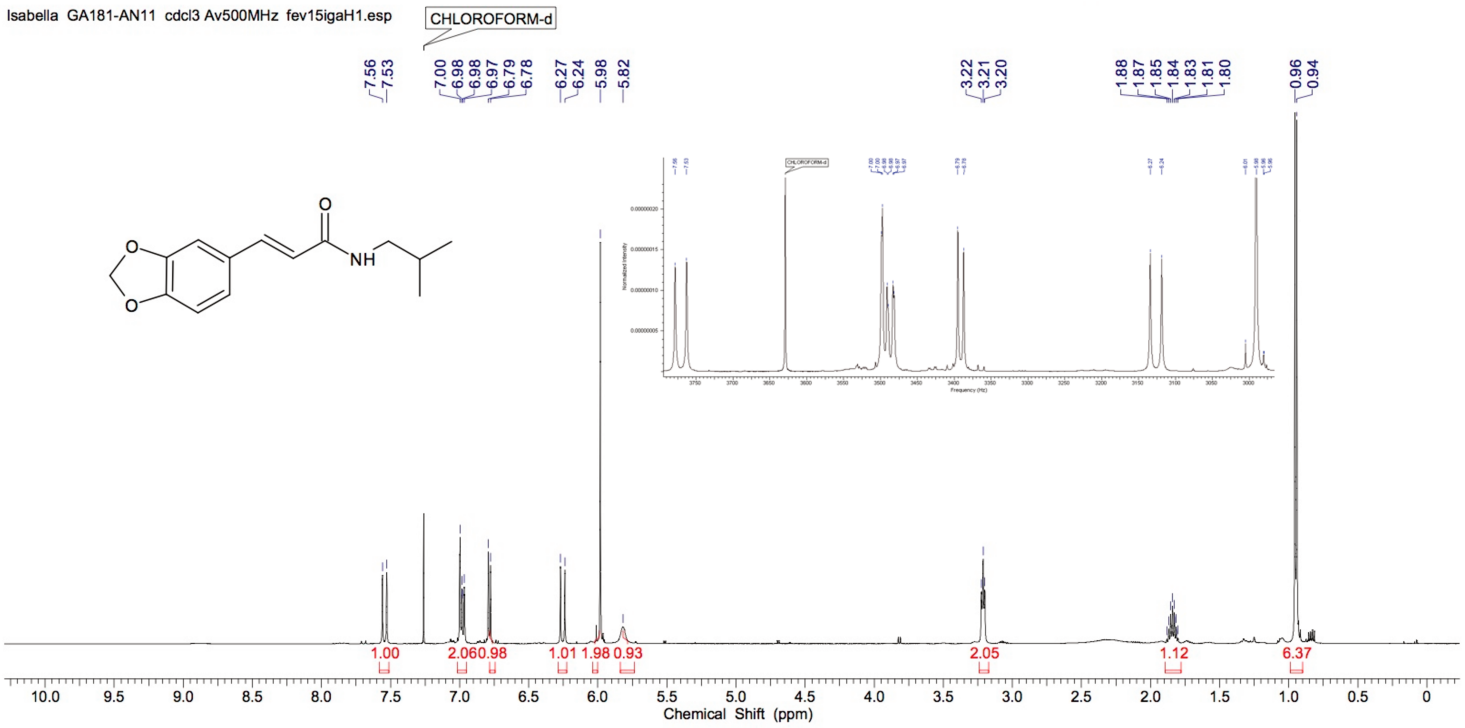
Formula $C_{14}H_{21}NO$	**FW**	219.3226					
Acquisition Time (sec)	0.4544	**Comment**	Isabella - IGA 140 11-13 - Avance 600 MHz - out16igaH2 - 13C			**Date**	16 Oct 2015 12:57:52
Date Stamp	16 Oct 2015 12:57:52			**File Name**			
Frequency (MHz)	150.91	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	2048	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	nmrsu	**Points Count**	32768	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	203.00	**SW(cyclical) (Hz)**	36057.69	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	15085.9795	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	36056.59	**Temperature (degree C)**	25.147



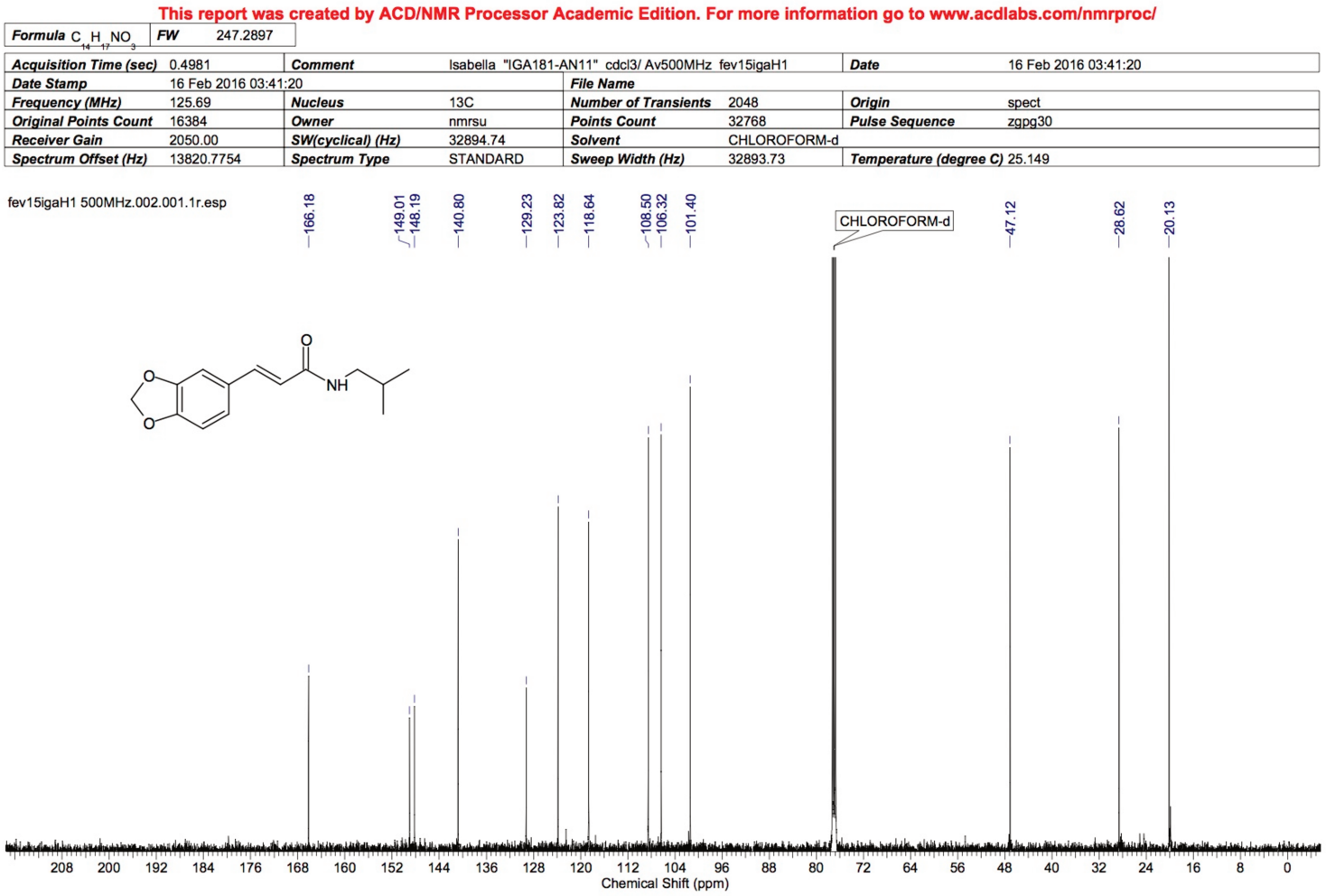
Anexo 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (151 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

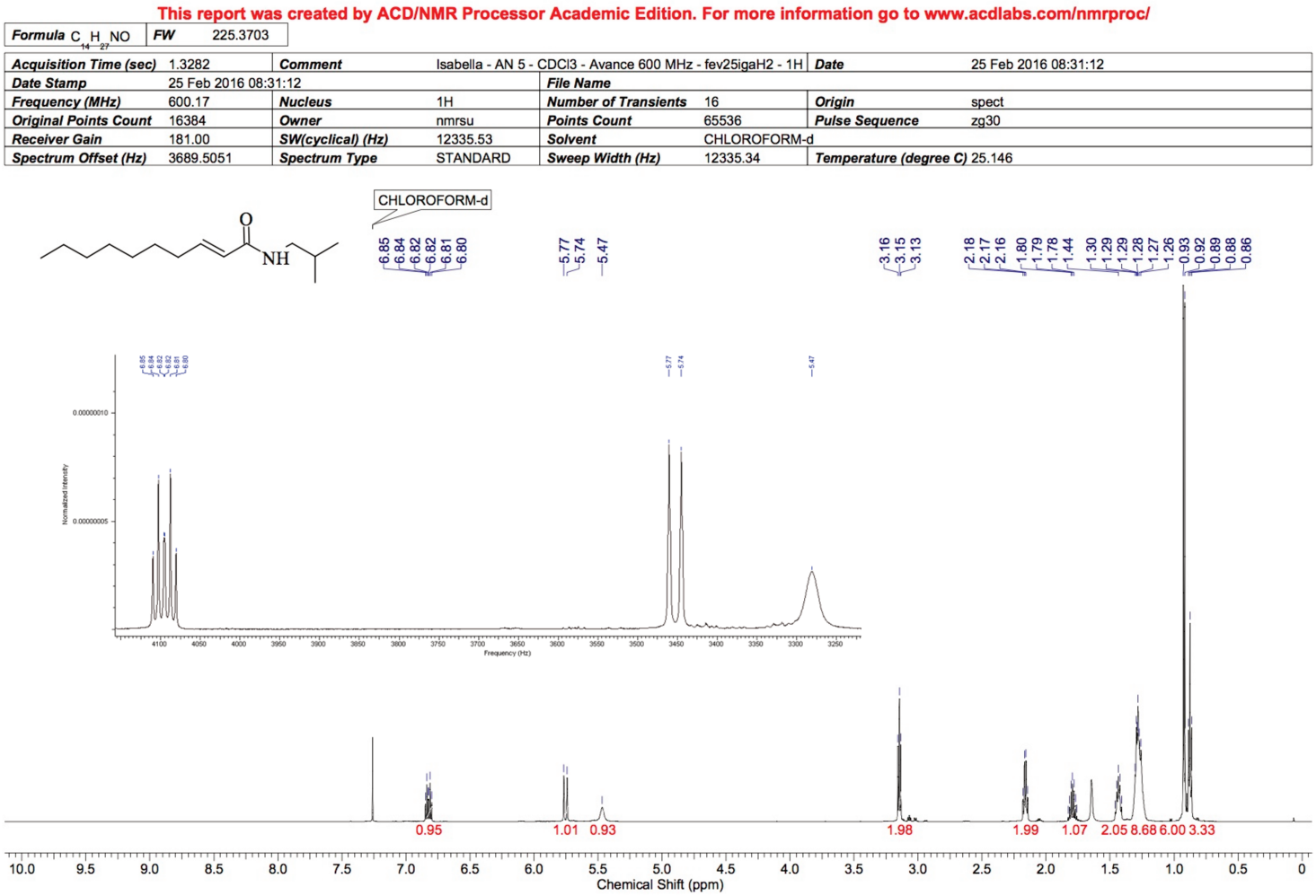
Formula $C_{14}H_{17}NO_3$	**FW**	247.2897					
Acquisition Time (sec)	1.5903	**Comment**	Isabella "IGA181-AN11" cdcl3/ Av500MHz fev15igaH1			**Date**	16 Feb 2016 02:13:52
Date Stamp	16 Feb 2016 02:13:52			**File Name**			
Frequency (MHz)	499.87	**Nucleus**	1H	**Number of Transients**	16	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	nmrsu	**Points Count**	65536	**Pulse Sequence**	zg30
Receiver Gain	128.00	**SW(cyclical) (Hz)**	10302.20	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	3069.3491	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	10302.04	**Temperature (degree C)**	25.151



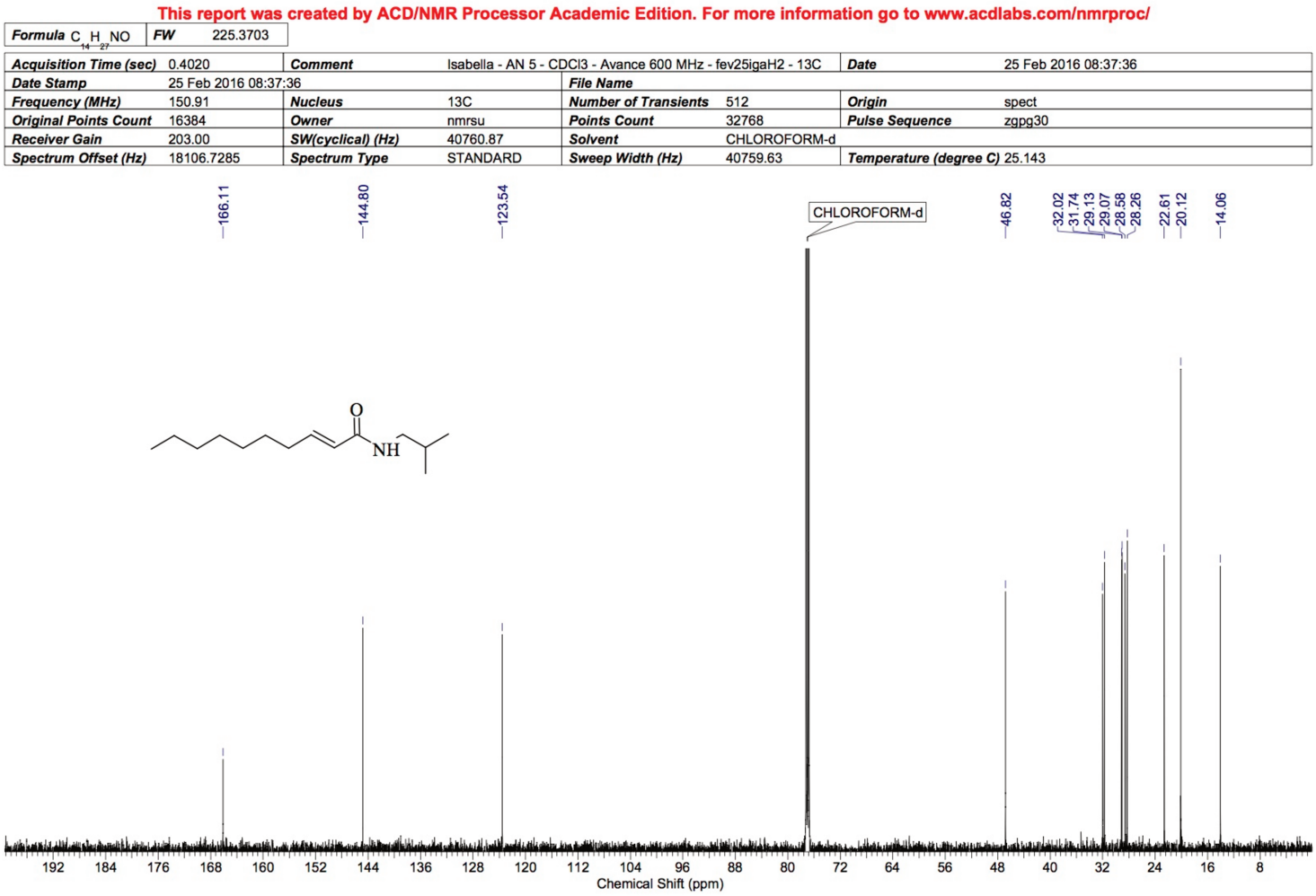
Anexo 29. Espectro de RMN de ^1H do composto **66** (500 MHz, $CDCl_3$)



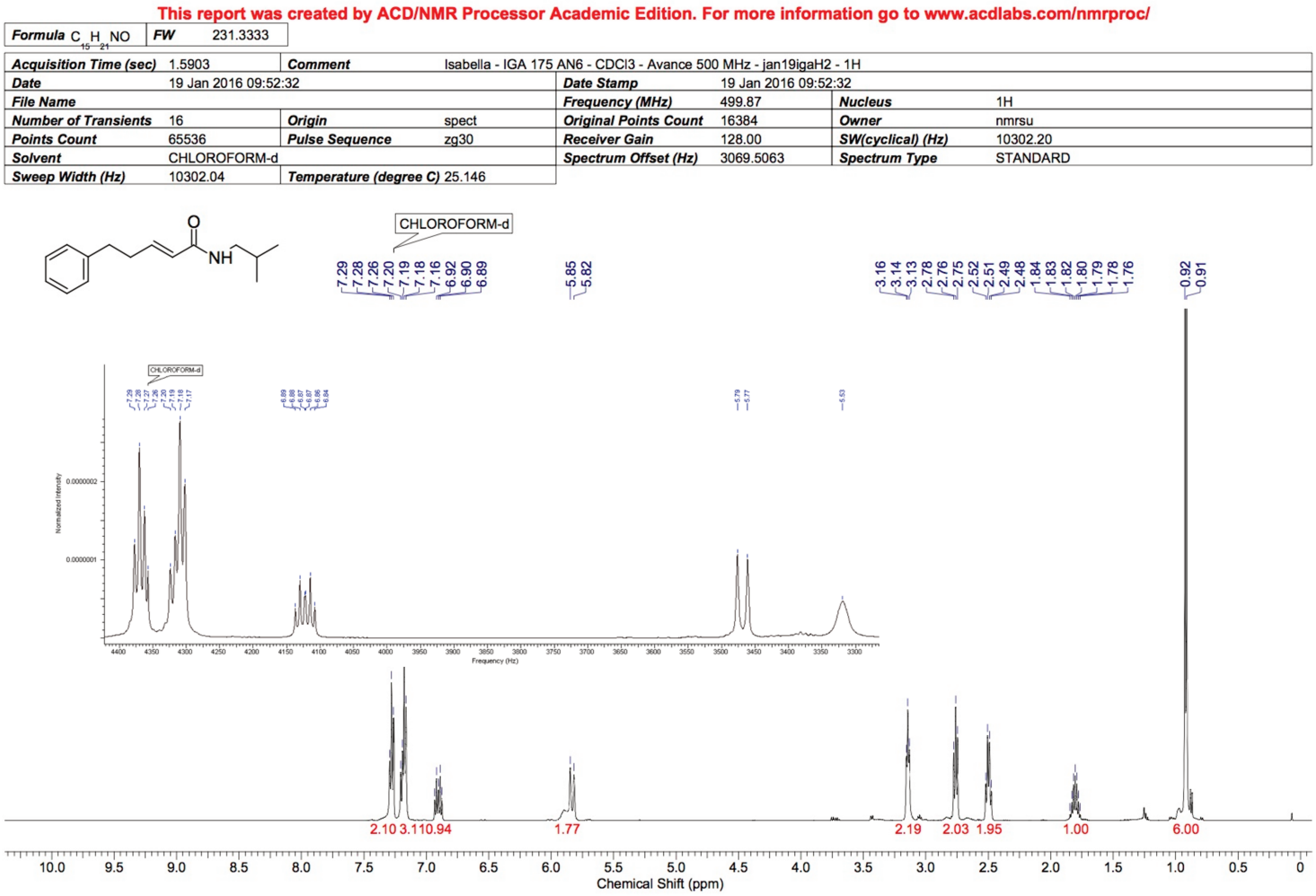
Anexo 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **66** (126 MHz, $CDCl_3$)



Anexo 31. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **67** (600 MHz, $CDCl_3$)



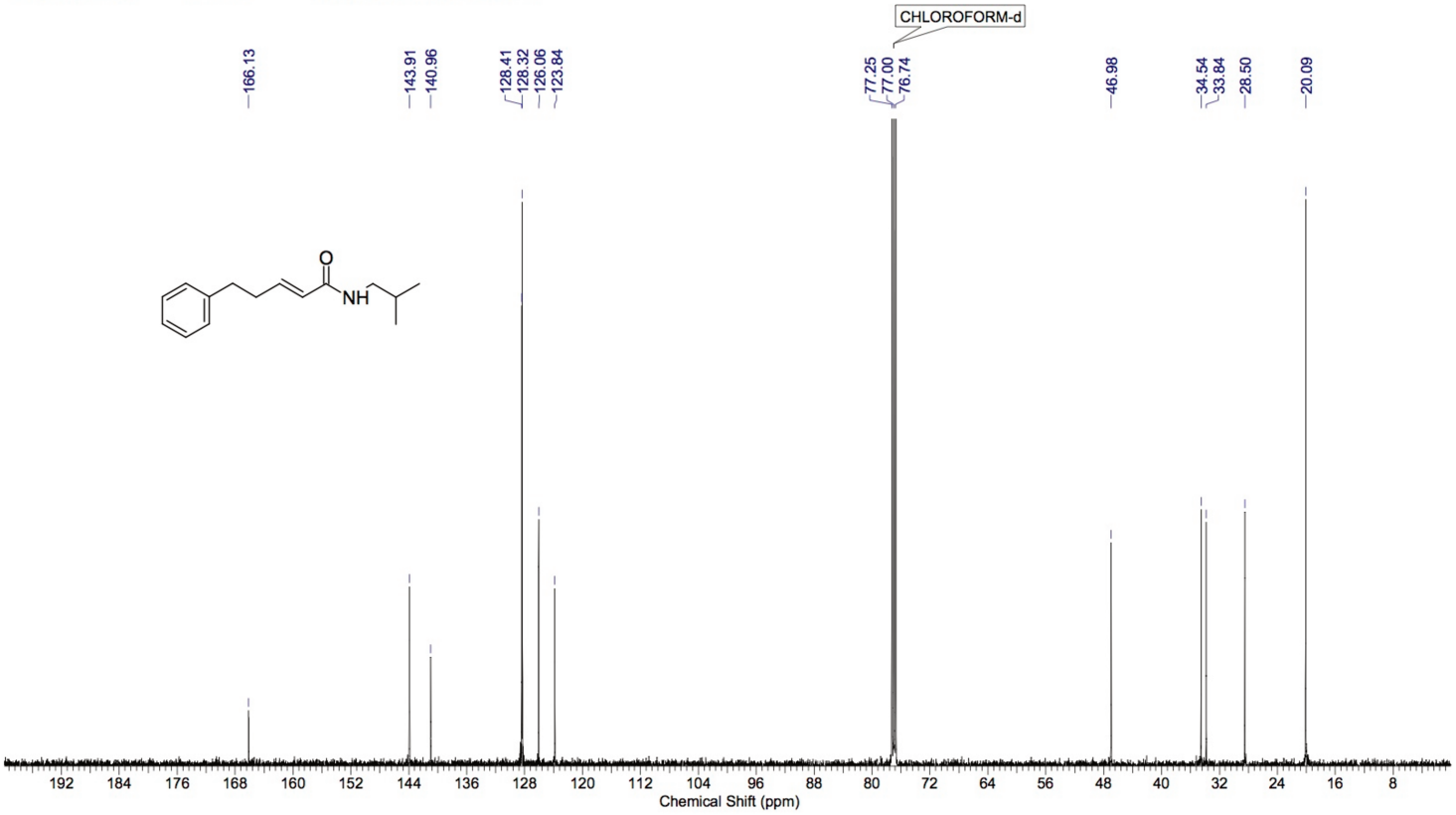
Anexo 32. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **67** (151 MHz, $CDCl_3$)



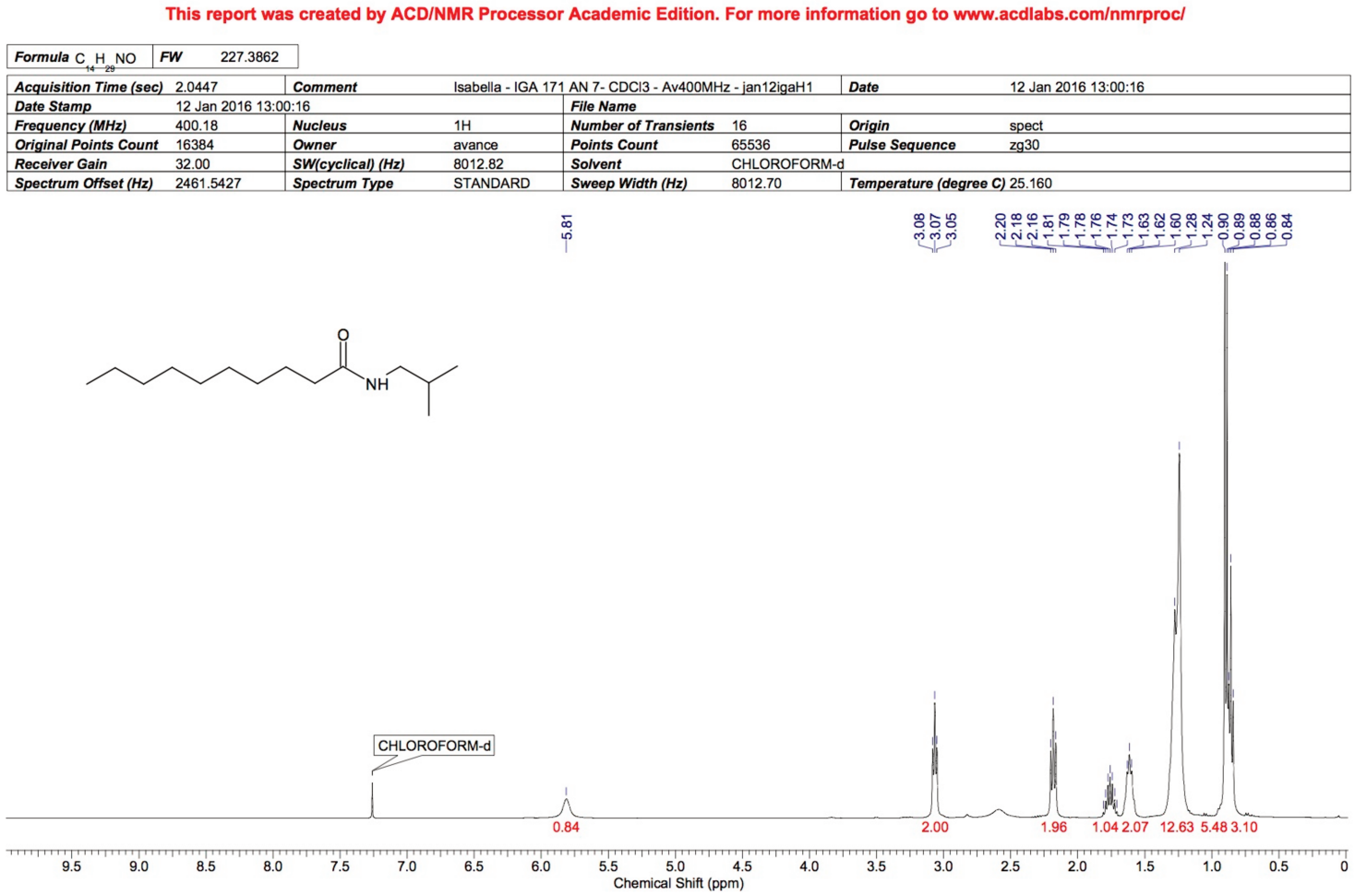
Anexo 33. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **68** (500 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	0.4981	***Comment***	Isabella - IGA 175 AN6 - CDCl3 - Avance 500 MHz - jan19igaH2 - 13C				
Date	19 Jan 2016 10:16:00			***Date Stamp***	19 Jan 2016 10:16:00		
File Name				***Frequency (MHz)***	125.69	***Nucleus***	13C
Number of Transients	555	***Origin***	spect	***Original Points Count***	16384	***Owner***	nmrsu
Points Count	32768	***Pulse Sequence***	zgpg30	***Receiver Gain***	2050.00	***SW(cyclical) (Hz)***	32894.74
Solvent	CHLOROFORM-d			***Spectrum Offset (Hz)***	13818.7676	***Spectrum Type***	STANDARD
Sweep Width (Hz)	32893.73	***Temperature (degree C)***	25.150				



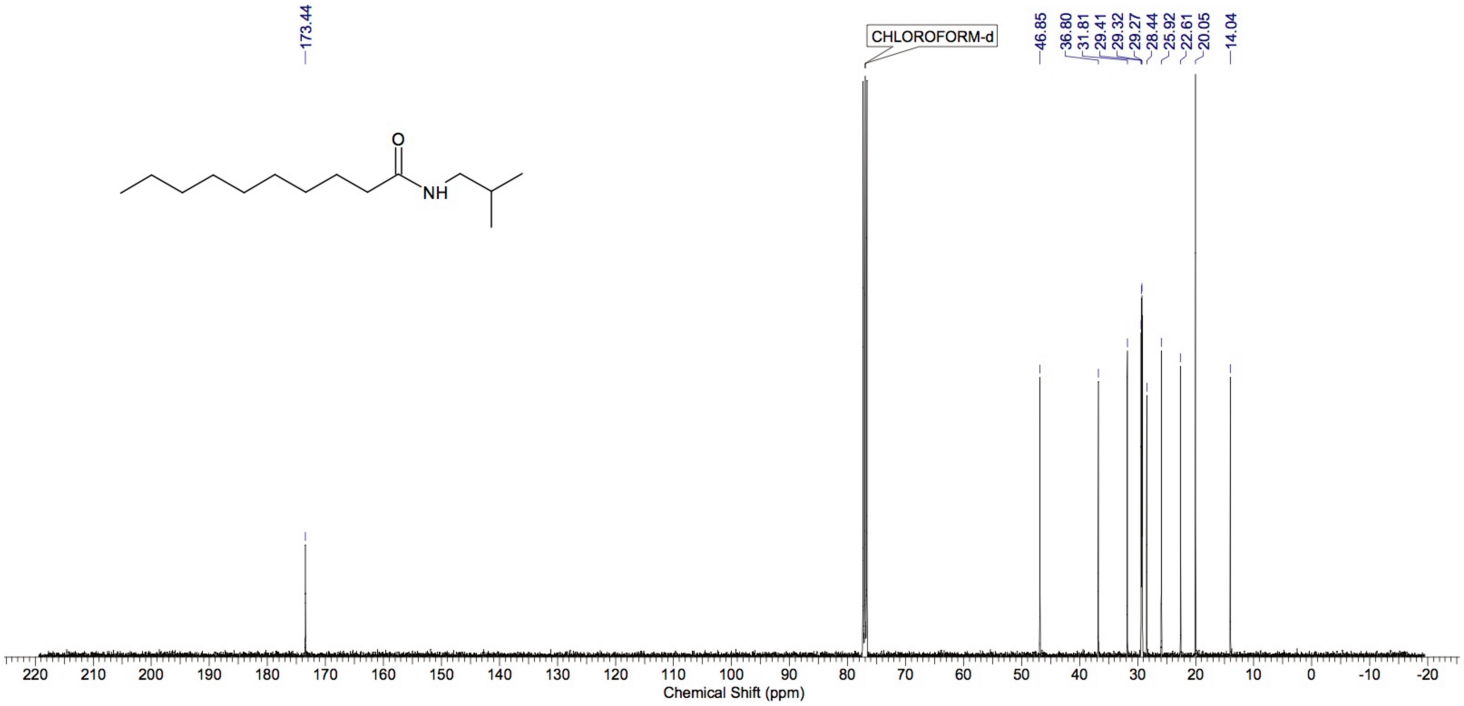
Anexo 34. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **68** (126 MHz, $CDCl_3$)



Anexo 35. Espectro de RMN de ^{1}H do composto **69** (400 MHz, $CDCl_3$)

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Formula $C_{14}H_{29}NO$	**FW**	227.3862					
Acquisition Time (sec)	0.6816	**Comment**	Isabella - IGA 171 AN 7- CDCl3 - Av400MHz - jan12igaH1 13C			**Date**	12 Jan 2016 13:42:56
Date Stamp	12 Jan 2016 13:42:56			**File Name**			
Frequency (MHz)	100.63	**Nucleus**	13C	**Number of Transients**	1453	**Origin**	spect
Original Points Count	16384	**Owner**	avance	**Points Count**	65536	**Pulse Sequence**	zgpg30
Receiver Gain	203.00	**SW(cyclical) (Hz)**	24038.46	**Solvent**	CHLOROFORM-d		
Spectrum Offset (Hz)	10057.6943	**Spectrum Type**	STANDARD	**Sweep Width (Hz)**	24038.09	**Temperature (degree C)**	25.160



Anexo 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **69** (126 MHz, $CDCl_3$)

UNICAMP

CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da atividade anestésica de espilantol e seus derivados**, registrada com o nº **4137-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Julio Cezar Pastre e Isabella Gonçalves Alonso,**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal** (**CONCEA**), **tendo sido** aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da **Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP,** em **20 de junho de 2016**.

Finalidade:	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do projeto:	**03/2016-07/2016**
Vigência da autorização para manipulação animal:	**20/06/2016-31/07/2016**
Espécie / linhagem/ raça:	**Camundongo heterogênico /Swiss**
No. de animais:	**48**
Peso / Idade:	**03 semanas / 25g**
Sexo:	**machos**
Origem:	**CEMIB/UNICAMP**

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 20 de junho de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo 37. Certificado de liberação dos animais (nº 4137-1)