

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

NATÁLIA MACHADO PEREIRA DE OLIVEIRA TORRES

**USO DO ÁCIDO LIPOICO PARA OBTENÇÃO DE AGENTES
ANTIGLICANTES**

Belo Horizonte

2017

UFMG/ICEX/DQ. 1226^a

D. 673^a

NATÁLIA MACHADO PEREIRA DE OLIVEIRA TORRES

**USO DO ÁCIDO LIPOICO PARA OBTENÇÃO DE AGENTES
ANTIGLICANTES**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Química – Química Orgânica.

BELO HORIZONTE

2017

T693u Torres, Natália Machado Pereira de Oliveira
2017 Usu do ácidu lipoicu para obtenção de agentes
D antiglicantes [manuscrito] / Natália Machado Pereira
de Oliveira Torres. 2017.
117 f. : il.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas.
Coorientadora: Rosemeire Brondi Alves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia e anexos.

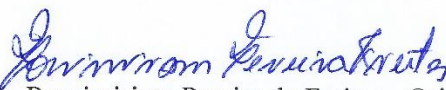
1. Química orgânica - Teses 2. Síntese orgânica -
Teses 3. Ácidos orgânicos - Teses 4. Diabetes -
Complicações e sequelas - Teses 5. Produtos naturais -
Teses I. Freitas, Rossimiriam Pereira de, Orientadora
II. Alves, Rosemeire Brondi, Coorientadora III.
Título.

CDU 043

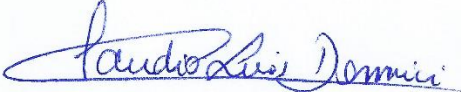
"Uso do Ácido Lipoico para Obtenção de Agentes Antiglicantes"

Natália Machado Pereira de Oliveira Torres

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Profª. Rossimiriam Pereira de Freitas - Orientadora
UFMG



Prof. Claudio Luis Donnici
UFMG



Profª. Henriete da Silva Vieira
UFMG

Belo Horizonte, 25 de julho de 2017.

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Professora Doutora Rossimiriam Pereira de Freitas e coorientação da Professora Doutora Rosemeire Brondi Alves.

Dedicado à memória do meu amigo inesquecível, Lucas Pereira Soares e Oliveira. Amigo que passou correndo pela minha vida, mas foi o suficiente para modelar uma nova visão de mundo em mim. Sempre estará em meus pensamentos!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Doutora Rossimiriam Pereira de Freitas, que tanto me ensinou nestes admiráveis cinco anos (iniciação científica, no trabalho de conclusão de curso e mestrado). Agradeço à minha coorientadora Professora Doutora Rosemeire Brondi Alves, que tanto me ajudou ao longo deste trabalho, principalmente pela dedicação na elucidação dos espectros.

Aos alunos de IC, meus amigos, que me acompanharam durante a realização deste trabalho e tanto me ajudaram Aninha, Rafa e Philipe, principalmente a Aninha que esteve comigo desde o início. Aos meus amigos de laboratório Lucas, Wallace, Inácio, Angelica, Talitinha, Rafael, Bíola, Carlos e Matheus. Aos meus amigos de curso Ju, Larissa, Brenda, Henrique, Fernandinha, Tonim, Augusto, Bruna e Gleiston.

Em especial agradeço a Thais e Joel, pela grande amizade, pelos momentos de felicidade que tivemos ao lado do nosso grande amigo e pela ajuda mútua durante a perda. À Bíola que tanto me reconfortou, que estava sempre lá para me ajudar e por despertar novas amizades.

Aos meus amigos que conheço há pouco tempo, mas já são importantes, sempre estiveram por perto nos momentos de tristeza e alegria Dudu, Talitinha, Matheus, Rafaela e Pedro e o Lobo. Como já havia sido dito por Jane Austen “Tempo ou oportunidade não determinam a intimidade, apenas a disposição”.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química, que contribuíram para a realização deste trabalho, destacando a Professora Lucienir Pains Duarte pelos triterpenos cedidos e ao doutorando Lucas pela isocumarina cedida. À técnica Mirra pela ajuda nas inúmeras tentativas de purificações dos produtos finais.

À Professora Marília Oliveira Fonseca Goulart pela oportunidade de realização dos ensaios de atividade antiglicante em seu laboratório, à doutoranda Jadri pela orientação durante a realização dos ensaios, à doutoranda Carol pela grande ajuda durante a estadia em Maceió-AL e aos outros colegas do LEEO da UFAL.

À minha família, principalmente meus pais, Maria Helena e João Camilo, e minha irmã gêmea, Ludmila, que estiveram presentes em todas as alegrias e frustrações ao longo deste trabalho e, mesmo não entendendo o contexto, sempre me deram forças para continuar. À minhas gatas Ártemis e Ariadne pelos momentos de sossego e pela companhia ao longo da produção deste manuscrito.

À banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ e FAPEMIG pela bolsa concedida e pelo financiamento da pesquisa.

“Eu prefiro olhar para trás e dizer: ‘Eu não posso acreditar que fiz isso.’ do que dizer ‘Eu gostaria de ter feito isso.’”

Clarice Lispector

RESUMO

Glicação é uma reação não enzimática entre a carbonila de açúcares redutores e o grupo amino livre de biomoléculas formando os produtos de glicação avançada (AGEs), que estão associados a diversas disfunções fisiológicas no organismo como a aterosclerose, a osteoporose, a asma, a artrite, a sarcopenia, a doença de Alzheimer, o câncer e diversas complicações diabéticas. Devido aos efeitos biológicos apresentados, a busca por novas moléculas que inibam a reação de glicação e a formação de AGEs é de extrema importância. Assim, o presente trabalho trata da síntese de novos derivados do ácido lipoico com potencial atividade antiglicante. Primeiramente são descritos os estudos realizados para a síntese de novos derivados do ácido lipoico contendo o grupo amidina ou aminoguanidina em sua estrutura, com o uso de diferentes espaçadores como estratégia para unir as duas sub-unidades. Em seguida, foram preparados novos derivados do ácido lipoico (do tipo éster ou amida) com produtos naturais ou sintéticos com potencial atividade antiglicante. Foram realizados estudos preliminares de atividade antiglicante dos novos derivados, tendo três dos compostos apresentado ação.

Palavras-chave: glicação, AGEs, antiglicante, ácido lipoico, aminoguanidina, amidina.

ABSTRACT

Glycation is a non-enzymatic reaction between reducing sugars and amino group of biomolecules, forming advanced glycation end-products (AGEs), which are associated with various pathological conditions such as atherosclerosis, osteoporosis, asthma, arthritis, sarcopenia, Alzheimer's disease, cancer and various diabetic complications. Due to their biological effects, the search for new molecules that inhibit the glycation and the formation of AGEs is of great importance. The present work aims at the synthesis of new derivatives of lipoic acid with potential antiglycation activity. First, the studies carried out for the synthesis of new derivatives of lipoic acid containing the amidine or aminoguanidine group in their structure are described, with the use of different linkers as a strategy to join two subunits. Subsequently, new derivatives of lipoic acid (ester or amide type) were prepared from natural or synthetic products with potential antiglycation activity. Preliminary studies of the anti-glycation activity of the new derivatives were carried out, with three compounds shown to be active.

Key-words: glycation, AGEs, antiglycation, lipoic acid, aminoguanidine, amidine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais etapas na formação dos AGEs (<i>Advanced Glycated End-Products</i>).....	19
Figura 2. Estruturas de alguns produtos finais de glicação avançada (AGEs). Lys = lisina e Orn =ornitina.....	21
Figura 3. Efeitos biológicos dos AGEs no organismo.....	22
Figura 4. Substâncias que apresentam diferentes mecanismos anti-AGEs.	23
Figura 5. Ácido lipoico e sua forma reduzida (DHLA).....	24
Figura 6. Thioctacid® medicamento para o tratamento dos sintomas da polineuropatia diabética periférica, em que o princípio ativo é o ácido lipoico.	25
Figura 7. Derivados do ácido lipoico e suas respectivas atividades biológicas.....	26
Figura 8. Estrutura geral de uma amidina e da aminoguanidina	27
Figura 9. Reação da aminoguanidina com compostos dicarbonílicos.	28
Figura 10. Derivado de aminoguanidina com fraca ação inibidora da enzima NOS. .	28
Figura 11. Produtos naturais que apresentam atividade antiglicante.	29
Figura 12. Triterpenos que apresentam atividades antiglicante.	30
Figura 13. Núcleo cumarínico e isocumarínico.....	31
Figura 14. Uso de espaçadores para a síntese dos novos derivados do ácido lipoico contendo os grupos amidina e aminoguanidina.	32
Figura 15. Álcoois e aminas de origem natural ou sintética a serem usados para modificação do ácido lipoico.	32
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H do composto 7 (200 MHz, CDCl ₃).....	36
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro de DEPT do composto 7 (50 MHz, CDCl ₃).	37
Figura 18. Espectro na região do IV (ATR) do composto 7.	37
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H do composto 8 (400 MHz, CDCl ₃).....	40
Figura 20. Mapa de correlação COSY do composto 8 (400MHz, CDCl ₃).	41
Figura 21. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro de DEPT do composto 8 (100 MHz, CDCl ₃).	42
Figura 22. Mapa de correlação HSQC do composto 8 (400MHz, CDCl ₃).....	43
Figura 23. Expansão do HSQC do composto 8.....	43
Figura 24. Espectro de RMN de ¹ H do composto 10 (200 MHz, D ₂ O).....	47
Figura 25. Espectro de RMN de ¹³ C e subespectro de DEPT do composto 10 (100 MHz, D ₂ O).	48
Figura 26. Espectro na região do IV (ATR) do composto 10.	49
Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H do composto 11 (400 MHz, D ₂ O).....	50

Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 11 (100 MHz, D_2O).....	51
Figura 29. Espectro na região do IV (ATR) do composto 11.	51
Figura 30. Possíveis sais formados na reação de formação da amidina 12.	53
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do composto 19 (200 MHz, CDCl_3).....	55
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do composto 20 (400 MHz, CDCl_3).....	56
Figura 33. Espectro de massas do bruto da reação contendo a amidina 22 (ESI+) .	57
Figura 34. Espectro de massas do bruto da reação contendo a aminoguanidina 23 (ESI+) .	57
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do composto 24 (400 MHz, CDCl_3).....	59
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do composto 25 (400 MHz, CDCl_3).....	60
Figura 37. Espectro de massas do bruto da reação contendo a amidina 27 (ESI-)...	61
Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do composto 29 (400 MHz, CDCl_3).....	63
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 29 (100 MHz, CDCl_3) .	63
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H do composto 30 (400 MHz, CDCl_3).....	64
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 30 (100 MHz, CDCl_3) .	65
Figura 42. Espectro de RMN de ^1H do composto 31 (400 MHz, CDCl_3).....	68
Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 31 (100 MHz, CDCl_3) .	68
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H do composto 32 (400 MHz, CDCl_3).....	71
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 32 (100 MHz, CDCl_3) .	71
Figura 46. Espectro de RMN de ^1H do composto 33 (400 MHz, CDCl_3).....	72
Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 33 (100 MHz, CDCl_3) .	73
Figura 48. Substâncias que foram realizados os preliminares de atividade antiglicante.	75
Figura 49. Inibição de AGEs pelo método BSA+(F+G) para os compostos 30, 33 e aminoguanidina em diferentes concentrações.	76
Figura 50. Inibição de AGEs pelo método BSA+MG para os compostos 8, 29 a 33 e aminoguanidina em diferentes concentrações.	77
Figura 51. Espectro de RMN de ^1H do ácido lipoico (200 MHz, CDCl_3).....	99
Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do ácido lipoico (200 MHz, CDCl_3) .	99
Figura 53. Espectro de RMN de ^1H do composto 5 (200 MHz, CDCl_3).....	100
Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 5 (50 MHz, CDCl_3) .	100

Figura 55. Espectro na região do IV (ATR) do composto 5.	101
Figura 56. Espectro de RMN de ^1H do composto 6 (200 MHz, CDCl_3).	101
Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (50 MHz, CDCl_3).	102
Figura 58. Espectro na região do IV (ATR) do composto 6.	102
Figura 59. Espectro de RMN de ^1H do composto 1 (200 MHz, CD_3OD).	103
Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1 (50 MHz, CD_3OD).	103
Figura 61. Espectro na região do IV (ATR) do composto 1.	104
Figura 62. Mapa de correlação COSY do composto 10 (400MHz, CDCl_3).	104
Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 19 (50 MHz, CDCl_3).	105
Figura 64. Espectro na região do IV (ATR) do composto 19.	105
Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 24 (100 MHz, CDCl_3).	106
Figura 66. Espectro na região do IV (ATR) do composto 24.	106
Figura 67. Espectro na região do IV (ATR) do composto 8.	107
Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 20 (100 MHz, CDCl_3).	107
Figura 69. Mapa de correlação COSY do composto 20 (400MHz, CDCl_3).	108
Figura 70. Mapa de correlação HSQC do composto 20 (400MHz, CDCl_3).	108
Figura 71. Espectro na região do IV (ATR) do composto 20.	109
Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 25 (100 MHz, CDCl_3).	109
Figura 73. Mapa de correlação COSY do composto 25 (400MHz, CDCl_3).	110
Figura 74. Mapa de correlação HSQC do composto 25 (400MHz, CDCl_3).	110
Figura 75. Espectro na região do IV (ATR) do composto 25.	111
Figura 76. Espectro de RMN de ^1H do lupeol (400 MHz, CDCl_3).	111
Figura 77. Espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (100 MHz, CDCl_3).	112
Figura 78. Espectro na região do IV (KBr) do composto 29.	112
Figura 79. Espectro na região do IV (KBr) do composto 30.	113
Figura 80. Espectro de RMN de ^1H do composto 34 (400 MHz, CDCl_3).	113
Figura 81. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 34 (100 MHz, CDCl_3).	114
Figura 82. Espectro na região do IV (KBr) do composto 31.	114
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H do composto 37 (400 MHz, CDCl_3).	115
Figura 84. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 37 (100 MHz, CDCl_3).	115
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto 36 (400 MHz, CDCl_3).	116

Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro de DEPT do composto 36 (100 MHz, CDCl_3)	116
Figura 87. Espectro na região do IV (KBr) do composto 32.	117
Figura 90. Espectro na região do IV (KBr) do composto 33.	117

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Uso de diferentes espaçadores para formação dos híbridos do trolox e do ácido lipoico com potencial atividade antioxidante e antiarrítmica.....	26
Esquema 2. Rota sintética desenvolvida para a obtenção da amidina 12 e aminoguanidina 13.	33
Esquema 3. Proposta mecanística para redução da azida em amina.	35
Esquema 4. Proposta mecanística de proteção da amina com BOC.	35
Esquema 5. a) Proposta mecanística da esterificação de Steglich com EDC como reagente de acoplamento; b) Papel do catalisador DMAP na reação.	39
Esquema 6. Proposta mecanística para a desproteção com TFA, sem a presença de água no meio.....	46
Esquema 7. Formação do cloridrato de etil éster imídico 10.	46
Esquema 8. Mecanismo de formação do cloridrato de éster etilimídico 10.	47
Esquema 9. Contribuintes de ressonância para o composto 10.....	49
Esquema 10. Formação do iodidrato de S-metiltiosemicarbazida 11.	49
Esquema 11. Proposta mecanística da formação do iodidrato de S-metiltiosemicarbazida.	50
Esquema 12. Síntese da amidina 12 na presença de trietilamina.	52
Esquema 13. Síntese da amidina 13 na presença de trietilamina.	53
Esquema 14. Nova rota proposta para a síntese da amidina 12 e aminoguanidina 13.	53
Esquema 15. Rota sintética para a obtenção da amidina 22 e aminoguanidina 23..	54
Esquema 16. Rota sintética para a obtenção da amidina 27 e aminoguanidina 28..	58
Esquema 17. Síntese dos ésteres de lupeol e eugenol (produtos naturais).	62
Esquema 18. Síntese do éster da isocumurina, da amida da cumarina e da diamida.	66
Esquema 19. Síntese da 3-(hidroximetil)-7-metoxi-1 <i>H</i> -isocromen-1-ona 34.	67
Esquema 20. Síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina 36.	69
Esquema 21. Proposta mecanística para a síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina 36.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tentativas para a desproteção do éster do ácido lipoico.....	45
Tabela 2. Novos derivados do ácido lipoico sintetizados neste trabalho.....	79
Tabela 3. Condições reacionais para a síntese de éteres e amidas do ácido lipóico, empregando EDC e DMAP.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG	Aminoguanidina
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
ATR	<i>Attenuated total reflectance</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina Bovina
BSA+(F+G)	Ensaio antiglicante com a albumina mais frutose e glicose
BSA+MG	Ensaio antiglicante com a albumina mais metilglioxal
BOC	Dicarbonato de di- <i>terc</i> -butila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	Espectroscopia de correlação H-H
d	duplete
D_2O	Água deuterada
DCM	Diclorometano
DHLA	Ácido di-hidrolipoico
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DCC	Dicicloexilcarbodiimida
DMSO	Dimetilssulfóxido
DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina).
EDC	Cloridrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
ESI	Espectroscopia de massas por eletrospray
F	Frutose
G	Glicose

GSH	Glutationa Reduzida
GOLD	Glyoxal-lysine dimer
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HSQC	Correlação heteronuclear de um único quantum
IV	Infravermelho
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia
J	Constante de acoplamento
LA	Ácido lipoico
LEEO	Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo
Lys	Lisina
m	multiplete
MG	Metilglioxal
MGO	Enzima Metilglioxal sintase
MHz	Megahertz
MOLD	Methylglyoxal-lysine dimer
NHS	<i>N</i> - Hidroxissuccinimida
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
Orn	Ornitina
PTB	brometo de fenaciltiazólico
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End-products
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
ROS	Reactive oxygen species
s	simpleto
sl	simpleto largo

SSAO	Enzima aminoxidase sensível à semicarbazida
t	tripleto
THF	Tetraidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
δ	deslocamento químico

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Glicação e doenças relacionadas	17
1.2	Agentes antiglicantes.....	22
1.2.1	Ácido lipoico	24
1.2.2	Amidina e aminoguanidina.....	27
1.2.3	Produtos Naturais.....	28
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivos específicos.....	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	Estudos para a síntese dos derivados do tipo amidina e aminoguanidina ..	33
3.1.1	Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador 1.....	33
3.1.2	Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador 2.....	54
3.1.3	Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador 3.....	58
3.2	Síntese de derivados ésteres, amida e diamida do ácido lipoico com produtos naturais e análogos	61
3.2.1	Síntese de ésteres de produtos naturais.....	61
3.2.2	Síntese de ésteres e amidas de substâncias sintéticas	65
3.3	Ensaio de Atividade Antiglicante	73
4	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	78
5	PARTE EXPERIMENTAL	80
5.1	Equipamentos.....	80
5.2	Materiais	80
5.3	Reveladores	80
5.4	Síntese, purificação e caracterização	81
5.4.1	Síntese do 10-bromodecan-1-ol (5)	81
5.4.2	Síntese do 10-azidodecan-1-ol (6)	82
5.4.3	Síntese do 10-aminodecan-1-ol (1)	82
5.4.4	Síntese do <i>tert</i> -butil-1-hidroxi-10-decilcarbamato (7).....	83

5.4.5	Síntese de éteres, amidas e diamida do ácido lipóico.....	85
5.4.6	Síntese do cloridrato de etilbenzimidato (10)	92
5.4.7	Síntese do iodidrato de S-metiltiosemicarbazida (11)	93
5.4.8	Síntese do <i>terc</i> -butil-2-hidroxietoxi-2-etilcarbamato (19).....	94
5.4.9	Síntese do <i>terc</i> -butil-3-aminometil-benzilcarbamato (24)	95
5.4.10	Síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina (37)	96
5.4.11	Síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina (36).....	96
5.5	Ensaio de atividade Antiglicantes.....	97
5.5.1	Ensaio BSA+(F+G).....	97
5.5.2	Ensaio BSA+MG.....	98
6	ANEXO.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glicação e doenças relacionadas

A glicação é uma reação não enzimática, que se dá no meio biológico ou em alimentos, e que ocorre entre a carbonila de açúcares redutores e o grupo amino livre de biomoléculas.¹ Descrita primeiramente, em 1912, por Louis Camille Maillard (1878-1936) em seus estudos sobre reações entre carboidratos e aminoácidos, o fenômeno, responsável pelo escurecimento e odor característico no cozimento de alimentos, é conhecido também por reação de Maillard.²

O mecanismo da reação de glicação foi inicialmente estudado pelo italiano Mario Amadori (1886-1941), em 1920. A reação de glicação inicia-se com a adição de uma amina primária a um açúcar redutor (glicose, por exemplo), formando uma carbinolamina intermediária (Figura 1, página 19, rota destacada na cor verde). Esta por sua vez sofre desidratação, produzindo uma base de Schiff instável, seguida do rearranjo de Amadori, levando a compostos mais estáveis, os chamados “produtos de Amadori”. Estes intermediários podem sofrer enolização, que pode ser seguida por uma série de reações de desidratação e hidrólise formando carbonilas altamente reativas, como os compostos α,β -dicarbonílicos 1-desoglicosana e 3-desoglicosana.^{3,4} Os compostos dicarbonílicos formados neste processo reagem então com o grupo amino de aminoácidos para a formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs, acrônimo em inglês para *Advanced Glycation End-products*), como mostrado na Figura 1 (página 19). Assim, todas as reações que levam à formação de compostos α,β -dicarbonílicos no organismo contribuem para a formação de produtos de glicação avançada.

Os AGEs e os compostos dicarbonílicos *in vivo* podem também ser formados por outras vias além da reação de Maillard, como pela reação de glicólise (Figura 1, página 19, rota destacada na cor laranja), pela oxidação de açúcares, de lipídios e de aminoácidos, nas reações de glicoxidação, lipoxidação e nos processos inflamatórios, respectivamente. O processo de oxidação de açúcares, quando

¹ Barbosa, J. H. P.; Souza, I. T.; Santana, A. E. G.; Goulart, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, **2016**, 39, 608-620.

² Hellwing, M.; Henle T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angew. Chem. Int.*, **2014**, 53, 10316-10319.

³ Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free radical research*, **2013**, 47, 3-27.

⁴ Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R. Fennema's food chemistry. *CRC press*, 4ª Edição, **2007**

catalisado por metais, é chamado “oxidação de Wolff” (Figura 1, página 19, rota destacada na cor roxo. Além desses processos, os dicarbonílicos podem ser formados a partir da hidrólise da base de Schiff, em um processo chamado de “rota de Namiki” (Figura 1, página 19, rota destacada na cor azul), no qual ocorre inicialmente a formação da eritrose e de uma alquilamina. O tautômero ceto glioxal mono-alquilamina pode sofrer adição de uma amina e a hidrólise da diimina formada leva à formação do glioxal.⁵

A glicólise (Figura 1, página 19, rota destacada na cor laranja) é uma reação enzimática e é uma das principais fontes de ATP (trifosfato de adenosina) na célula, iniciando-se com a fosforilação da glicose, dando origem à glicose-6-fosfato, que sofre isomerização reversível para frutose-6-fosfato catalisada por enzima. Em seguida ocorre uma segunda fosforilação formando frutose-1,6-bisfosfato que sofre clivagem para formação do gliceraldeído-3-fosfato que é facilmente convertido em dihidroxiacetona-fosfato. Essa, por sua vez, sob ação da enzima MGO sintase, é transformada no dicarbonílico metilglioxal,³ que ao reagir com o grupo amino de aminoácidos forma os AGEs.

⁵ Namiki, M.; Tateki, H. A new mechanism of the Maillard reaction involving sugar fragmentation and free radical formation. **1983**. 21-46.

A oxidação de Wolff, como citado anteriormente, é uma oxidação radicalar catalisada por metais e ocorre na forma enólica da glicose (Figura 1, página 19, rota destacada na cor verde), no produto de Amadori e também no glico-aldeído, um dos produtos da retroaldolização da glicose. A retroaldolização da glicose forma eritritol e glioxal (Figura 1, página 19, rota destacada na cor rosa) ou eritrose e glicol-aldeído (Figura 1, página 19, rota destacada na cor marrom). Neste último caso a oxidação de Wolff forma glioxal.^{6,7} O mecanismo da oxidação de Wolff inicia-se com um cátion metálico que abstrai um elétron da forma enólica da glicose, formando um intermediário radicalar que reage com o oxigênio formando compostos α -dicarbonílicos como a glucosona ou a 3-desoglicosona, e oxigênio molecular. O catalisador metálico é regenerado ao reagir com peróxido de hidrogênio, formado pela reação entre duas moléculas de oxigênio radicalar, processo que libera radicais hidroxilas. A 3-desoglicosona está em equilíbrio com a sua forma enólica e esta pode sofrer uma retroaldolização formando gliceraldeído e um ceto-enol que está em equilíbrio ceto-enólico com o metilglioxal^{6,7} (Figura 1, página 19, rota destacada na cor verde). A oxidação de Wolff do produto de Amadori resulta também na formação do glioxal.

Os compostos dicarbonílicos e os AGEs também são formados por outros açúcares redutores presentes no organismo, como por exemplo a frutose, sendo esta mais reativa que a glicose. Alguns estudos de comparação entre vegetarianos e onívoros sugerem que uma maior ingestão de frutose, provinda de um maior consumo de frutas, devida à dieta alternativa, aumenta os níveis de AGEs no organismo.⁸

A formação de AGEs é principalmente endógena e ocorre em condições fisiológicas em todos os tecidos e fluidos corporais e afeta sobretudo moléculas de meia-vida longa, como o colágeno, e exerce uma importante função no processo natural do envelhecimento.¹ No entanto, podem também ser introduzidos no organismo por formas exógenas, como dieta e fumo. Até hoje, poucos AGEs foram claramente estudados e identificados, sendo os mais comuns derivados dos α,β -dicarbonílicos glioxal, metilglioxal e 3-desoglicosana. Alguns exemplos de AGEs foram identificados e são encontrados na Figura 2 (página 21).

⁶ Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, **1999**, 344,109-116.

⁷ Wolff, S. P.; Dean, R. T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem. J.*, **1987**, 247, 243-250.

⁸ Semchyshyn, H. M. Fructation In Vivo: Detrimental and Protective Effects of Fructose. *Bio. Med. Research Int.*, **2013**, 2013, 1-9.

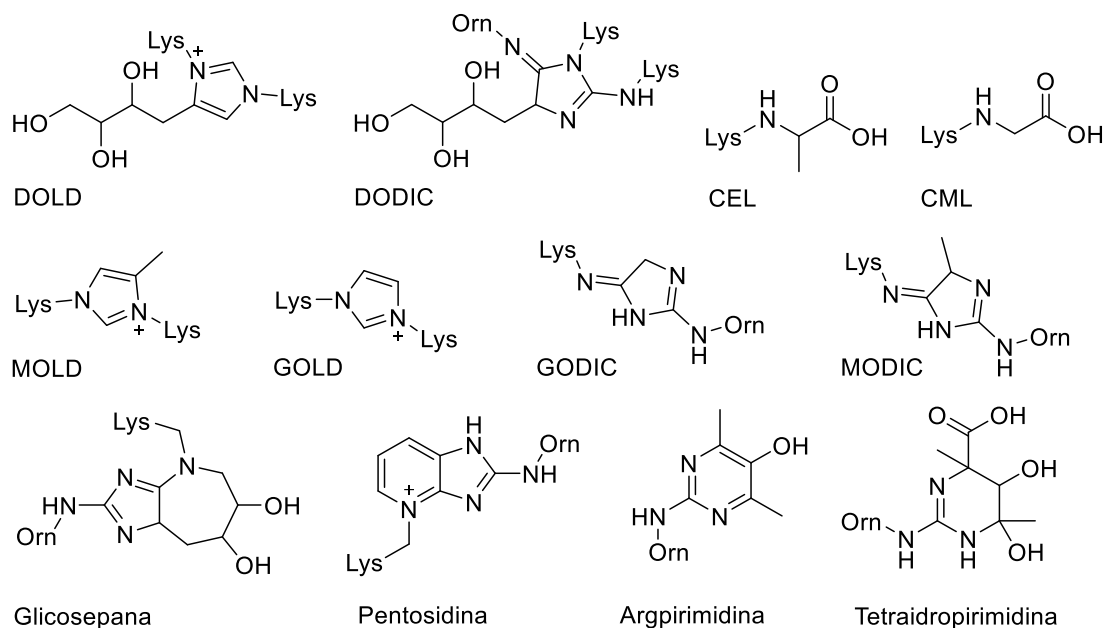


Figura 2. Estruturas de alguns produtos finais de glicação avançada (AGEs). Lys = lisina e Orn = ornitina.

A formação de AGEs e de compostos dicarbonílicos no organismo aumenta dependendo da quantidade de glicose no sangue. Assim, pacientes diabéticos apresentam de duas a três vezes mais modificações nos resíduos de lisina e arginina que uma pessoa normal.⁹ O excesso de AGEs provoca inúmeras disfunções fisiológicas e os principais efeitos biológicos dos AGEs no organismo estão esquematizados na Figura 3 (página 22).

Os AGEs possuem a capacidade de modificar as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas devido à geração de radicais livres, formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares.¹⁰ A interação dos AGEs com o receptor RAGE (acrônimo em inglês para *Receptor for Advanced Glycation End-products*) é a mais estudada e caracterizada atualmente, tendo sido descoberta por Vlassara e colaboradores, em 1985. O receptor RAGE pertence à superfamília das imonuglobulinas (proteínas ligadas na membrana), e controla a ativação do fator nuclear- κ -B responsável pela resposta inflamatória.¹⁰ A interação AGE-RAGE provoca o processo inflamatório e o estresse oxidativo nas células e está associada a diversas disfunções fisiológicas como aterosclerose, osteoporose, asma, artrite, sarcopenia, doença de Alzheimer,¹ câncer²⁰ e complicações diabéticas.⁹ Os AGEs são os principais mediadores patogênicos das complicações

⁹ Barbosa, J. H. P.; Oliveira, S. L.; Seara, L. T. O Papel dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes *Arq. Bras. Endocrinol Metab.*, **2008**, 52, 940-950.

¹⁰ Abate, G.; Delbarba, A.; Marziano, M.; Uberti, D. Advanced Glycation End Products (AGEs) in Food: Focusing on Mediterranean Pasta. *J. Nutr. Food Sci.*, **2015**, 5, 1-8.

diabéticas, como a retinopatia diabética (deterioração da visão), a nefropatia diabética (declínio da função renal) e a neuropatia diabética (degeneração dos neurônios).

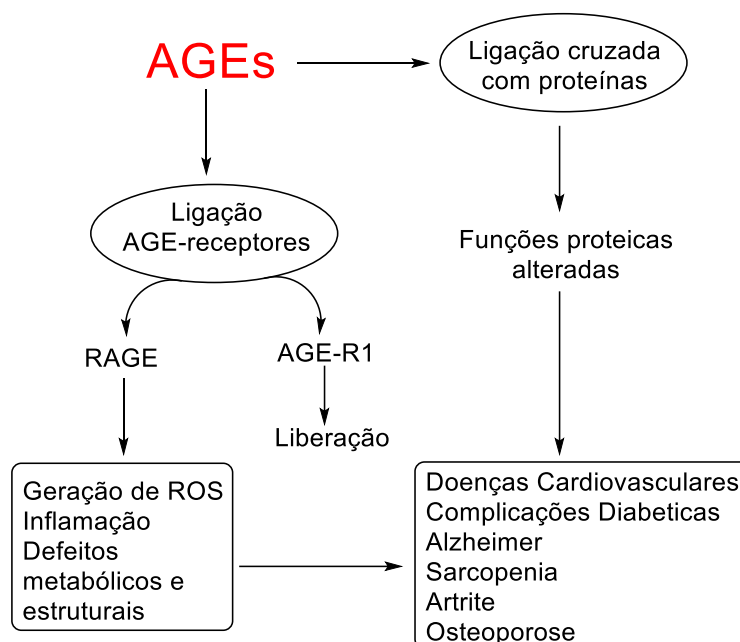


Figura 3. Efeitos biológicos dos AGEs no organismo.

O próprio organismo apresenta mecanismos de defesa contra os AGEs, como algumas enzimas e receptores. Por exemplo, as enzimas oxaldeído redutase e aldose redutase reagem com os derivados dicarbonílicos reativos e as glioxilases I e II interrompem as reações de glicação em diferentes estágios. Os receptores AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 são pertencentes à superfamília das imunoglobulinas¹⁰ e estão associados à desintoxicação dos AGEs,⁹ porém esses mecanismos são superados na presença de excesso de AGEs, principalmente em pacientes diabéticos, por isso a busca por substâncias que inibem a formação dos AGEs é muito importante.

1.2 Agentes antiglicantes

A atividade antiglicante é a capacidade de inibir a reação de glicação entre o açúcar e o aminoácido e, conseqüentemente, a formação dos AGEs. Ela pode ser avaliada por fluorescência, pois alguns AGEs possuem propriedades fluorescentes como o GOLD (acrônimo do inglês *glyoxal-lysine dimer*), o MOLD (acrônimo do inglês *methylglyoxal-lysine dimer*) e a pentosidina,¹¹ possibilitando avaliar a inibição da formação destes AGEs frente a um agente antiglicante.

¹¹ Wu, C.; Huang, S.; Lin, J.; Yen, G.; Inhibition of advanced glycation end product formation by food stuffs. *Food Funct.*, **2011**, 2, 224-234.

Atualmente a busca por novos agentes antiglicantes está sendo muito explorada na literatura. Existem vários mecanismos para o desenvolvimento de novas terapias anti-AGEs como: (i) impedir a formação de AGEs, por exemplo, com o uso de agentes como o ácido ascórbico, a aspirina e a metilformina;¹² (ii) promover a transglicação das bases de Schiff e produtos Amadori utilizando fármacos como a hidralazina;¹³ (iii) impedir a catálise das reações de oxidação por meio de radicais livres e metais,⁹ por exemplo, através do uso do garcinol, um produto natural cuja atividade antiglicante é devido à quelação de metais;¹⁴ (iv) promover a quebra da ligação cruzada entre AGE e proteínas, por exemplo, usando brometo de fenaciltiazólico (PTB);¹⁵ (v) usar bloqueadores de RAGE, como o Azeliragon® que está na fase III dos testes clínicos para a doença de Alzheimer¹⁶ e (vi) impedir os efeitos adversos da formação de AGEs, por exemplo, com resveratrol e curcumina que são produtos naturais.¹² As estruturas destas moléculas estão representadas na Figura 4.

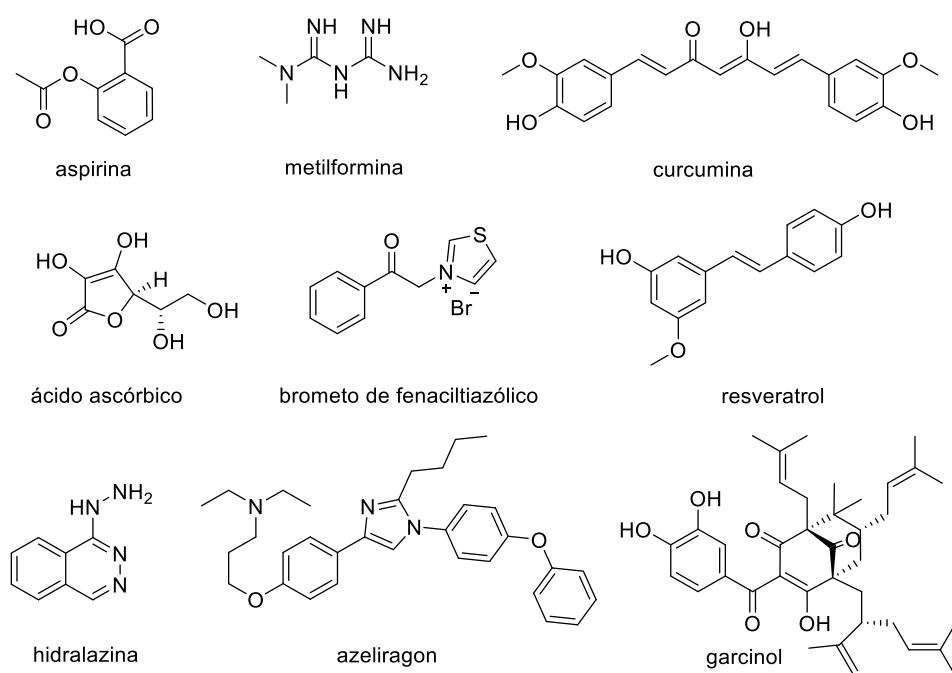


Figura 4. Substâncias que apresentam diferentes mecanismos anti-AGEs.

¹² Singh, P.; Jayaramaiah, R. H.; Agawane, S. B.; Vannuruswamy, G.; Korwar, A. M.; Anand, A.; Dhaygude, V. S.; Shaikh, M. L.; Joshi, R. S.; Boppana, R.; Kulkarni, M. J.; Thulasiram, H. V.; Giri, A. P.; Potential Dual Role of Eugenol in Inhibiting Advanced Glycation End Products in Diabetes: Proteomic and Mechanistic Insights, *Sci. Reports*, **2016**, 18798.

¹³ Kesavan, S. K.; Bhat, S.; Golegaonkar, S. B.; Jagadeeshaprasad, M. G.; Deshmukh, A. B.; Patil, H. S.; Bhosale, S. D.; Shaikh, M. L.; Thulasiram, H. V.; Boppana, R.; Kulkarni, M. J. Proteomewide reduction in AGE modification in streptozotocin induced diabetic mice by hydralazine mediated transglycation. *Sci. reports*, **2013**, 3, 2941.

¹⁴ Yamaguchi, F.; Ariga, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H.; Antioxidant and Anti Glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit Rind. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 180-185.

¹⁵ Vasani, S.; Zhang, X.; Zhang, X.; Kapurniotou, A.; Bernhagen, J.; Teichberg, S.; Basgen, J.; Wagle, D., Shih, D.; Terlecky, I.; Bucala, R.; Cerami, A.; Ege, J.; Ulrich, P. An agent cleaving glucose-derived protein cross links in vitro and in vivo. *Nature*, **1996**, 382, 275-278.

¹⁶ Godyn, J.; Jonczyk, J.; Panek, D.; Malawska, B.; Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharm. Reports*, **2016**, 68, 127-138.

Alguns agentes antiglicantes em particular serão detalhados neste trabalho como o ácido lipoico, a aminoguanidina e os produtos naturais como triterpenos, o eugenol e as cumarinas.

1.2.1 Ácido lipoico

O ácido lipoico (LA), α -ácido lipoico, ácido tióctico ou 1,2-ditiolano-3-pentanoico é um dissulfeto natural isolado primeiramente em 1951 por Reed a partir do fígado bovino.¹⁷ Ele é encontrado na mitocôndria como o cofator do complexo piruvato desidrogenase e na coenzima α -cetoglutarato desidrogenase¹⁸ e desempenha um papel importante no metabolismo energético mitocondrial, na síntese dos ácidos graxos e no ciclo do ácido cítrico. É conhecido como “antioxidante universal” por apresentar potencial de redução altamente negativo (-0,32 V) do conjunto LA/DHLA, em que DHLA (ácido di-hidrolipoico) é a forma reduzida do ácido lipoico (Figura 5).¹⁷

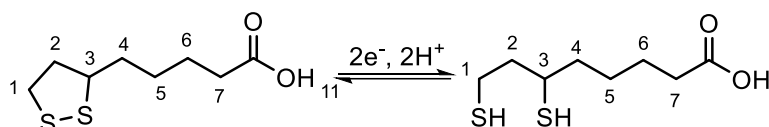


Figura 5. Ácido lipoico e sua forma reduzida (DHLA).

As propriedades antioxidantes do ácido lipoico são atribuídas a seis fatores: (i) habilidade de eliminar radicais livres; (ii) atividade quelante de metais;¹⁹ (iii) capacidade de regenerar antioxidantes exógenos e endógenos, como a vitamina C, vitamina E e GSH (glutationa reduzida);²⁰ (iv) habilidade de reparar danos oxidativos em macromoléculas;¹⁹(v) regulação da transcrição gênica e (vi) inibição da ativação do fator kapp B (NF- κ B), que regula a resposta inflamatória.²⁰

Além da atividade antioxidante, o ácido lipoico apresenta atividade anti-inflamatória,¹⁷ anticâncer, antidiabética, cardioprotetora, neuroprotetora²¹ e na literatura há alguns estudos em desenvolvimento sobre a sua potencial atividade antiglicante.^{18,22}

¹⁷ Moura, F. A.; Andrade, K. Q.; Santos, J. C. F.; Goulart, M. O. F. Lipoic Acid: Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Role and Clinical Applications. *Current Topics in Med. Chem.*, **2015**, 19, 458-483.

¹⁸ Midaoui, A. E.; Elimadi, A.; Wu, L.; Haddad, P. S.; Champlain, J. Lipoic Acid Prevents Hypertension, Hyperglycemia, and the Increase in Heart Mitochondrial Superoxide Production, *Am. J. of Hypert.*, **2003**, 16, 173-179.

¹⁹ Gurkan, A. S.; Karabay, A.; Buyukbingol, Z.; Adejare, A.; Buyukbingol, E. Syntheses of Novel Indole Lipoic Acid Derivatives and Their Antioxidant Effect on Lipid Peroxidation, *Arch. Pharm. Chem.*, **2005**, 338, 67-73.

²⁰ Golbidi, S.; Badran, M.; Laher, I. Diabetes and alpha lipoic acid, *Frontiers in Pharm.* **2011**, 2, 1-15.

²¹ Koufaki, M. Therapeutic applications of lipoic acid: a patent review (2011 - 2014), *Expert Opin. Ther. Patents*, **2014**, 24, 993-1005.

²² Shimode, A.; Yagi, M.; Hagiwara, S.; Noguchi, T.; Inomata, M.; Kitano, S.; Yonei, Y. Antiglycation Activity of Alpha-Lipoic Acid Derivatives and Vitamin E Derivatives. *Anti-Aging Med.* **2013**, 10, 42-54.

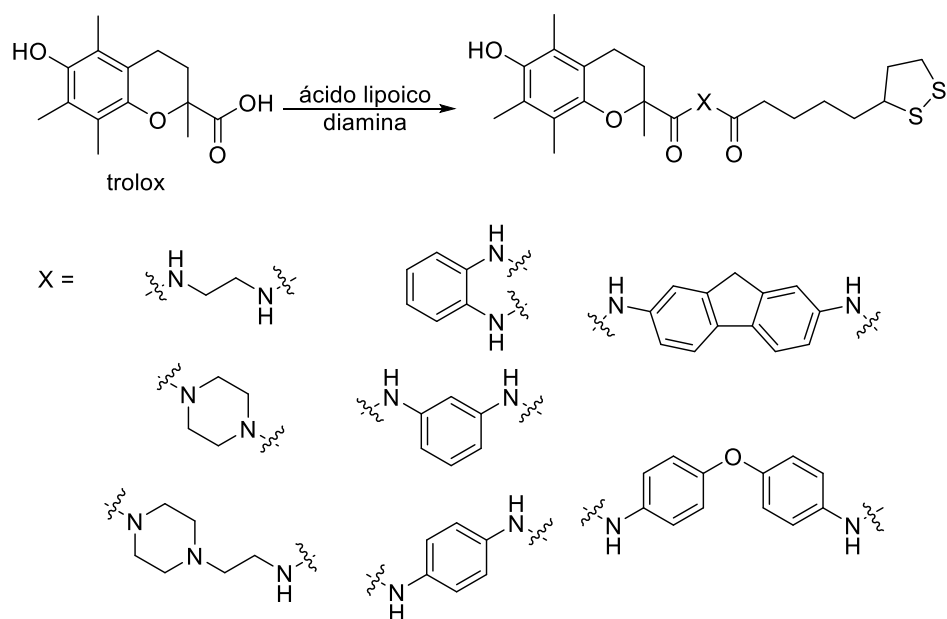
O ácido lipoico é um composto seguro, vendido sem receita médica, comercializado como Thioctacid®, fármaco para o tratamento dos sintomas da polineuropatia diabética periférica^{17,9} (Figura 6), usado também em suplementos e em cosméticos. Juntamente com o seu notável perfil antioxidante e as diversas atividades biológicas apresentadas, o ácido lipoico tem atraído o interesse da comunidade científica o que tem levado à busca de novos derivados deste.²³



Figura 6. Thioctacid® medicamento para o tratamento dos sintomas da polineuropatia diabética periférica, em que o princípio ativo é o ácido lipoico.

A estrutura do ácido lipoico possibilita a ligação com uma grande variedade de moléculas bioativas ou não, através da formação de amidas ou ésteres. O planejamento de novas moléculas híbridas com dois grupos farmacofóricos diferentes é uma abordagem bem estabelecida em química medicinal. Normalmente o híbrido pode ser concebido para reforçar a atividade biológica em um único alvo, ou atuar como fármacos multifuncionais, visando diferentes alvos. A abordagem é valiosa, combinada com a maior eficiência e com menor custo de produção, em comparação ao uso de “coquetéis” de fármacos separadas. O uso de espaçadores para unir as duas moléculas é muito utilizado. Como mostrado no Esquema 1 (página 26), diferentes espaçadores são utilizados para formar híbridos do trolox, um derivado de vitamina E, com o ácido lipoico, com potencial atividade antioxidante e antiarrítmica.²³ Na Figura 7 (página 26) está representado o híbrido do trolox com o ácido lipoico sem o uso de espaçador, além de outros derivados do ácido lipoico.

²³ Koufaki, M.; Detsi, A.; Kiziridi, C. Multifunctional Lipoic Acid Cojugates. *Current Med. Chem.*, **2009**, 16, 4728-4742.



Esquema 1. Uso de diferentes espaçadores para formação dos híbridos do trolox e do ácido lipoico com potencial atividade antioxidante e antiarrítmica.²³

Além das atividades antioxidante e antiarrítmica,²³ foram relatados derivados de ácido lipoico com atividade neuroprotetora, cardioprotetora, anti-inflamatória, anti-diabética, anti-câncer, analgésica, antiproliferativa²¹ e antiglicante.²² Alguns exemplos de derivados do ácido lipoico e suas ações biológicas são apresentados na Figura 7.

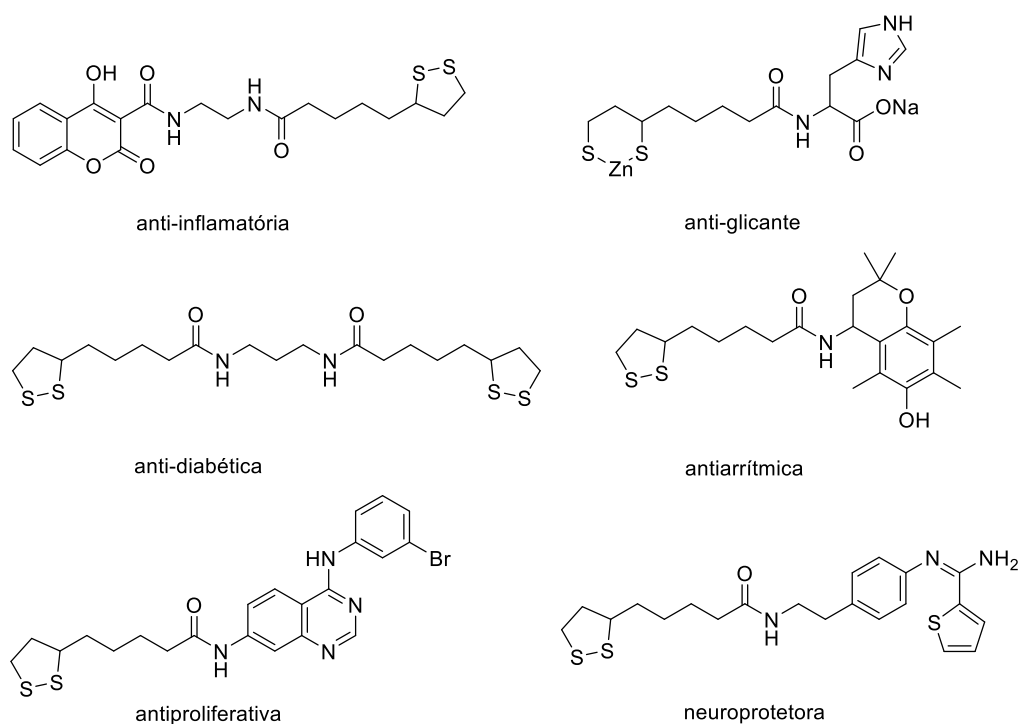


Figura 7. Derivados do ácido lipoico e suas respectivas atividades biológicas.

1.2.2 Amidina e aminoguanidina

A aminoguanidina (AG) é um derivado de amidina (Figura 8) que possui um grupo hidrazina em sua estrutura. A amidina é um grupo presente em diversos medicamentos, agrotóxicos, produtos naturais e é utilizada como bloco construtor em síntese orgânica. Derivados contendo este grupo apresentam atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer, analgésica e são potenciais agentes para o tratamento de doenças como Alzheimer, malária e pneumonia.²⁴ O grupo amidina é ainda muito usado na organocatálise por ser um importante precursor na síntese de heterocíclis²⁵ e como ligante na química de coordenação.²⁶

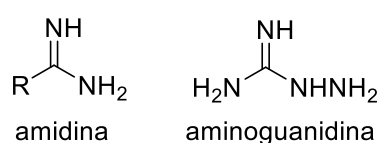


Figura 8. Estrutura geral de uma amidina e da aminoguanidina

A aminoguanidina foi o primeiro agente antiglicante explorado em testes clínicos²⁷ para a prevenção da retinopatia diabética. Porém não se obteve sucesso, uma vez que apresentou efeitos colaterais associados ao seu uso crônico, como por exemplo, deficiência de vitamina B6,⁷ perturbações gastrointestinais, anomalias nos testes de função hepática, sintomas gripais e vasculite rara. Mesmo tendo apresentado desenvolvimento de tumores em células renais dos ratos que se encontravam sob tratamento com a aminoguanidina²⁸ (o que fez com que os testes clínicos fossem descontinuados) este composto é até hoje utilizado como suplemento alimentar e constituinte de alguns cosméticos.

A aminoguanidina é seletiva a compostos carbonílicos e sua atividade antiglicante é devido a reações com os compostos dicarbonílicos como o glicoxal, formando triazinas (Figura 9, página 28). As ações das triazinas formadas no organismo ainda não foram investigadas e podem ou não estar associadas aos efeitos colaterais

²⁴ Khalifa, M. M.; Bodner, M. J.; Berglund, J. A.; Haley, M. M. Synthesis of N-substituted aryl amidines by strong base activation of amines. *Tetrahedron Letters.*, **2015**, 56, 4109-4111.

²⁵ Guo, W., Liu, D., Liao, J., Ji, F.; Wu, W.; Jiang, H.; Cu-Catalyzed intermolecular [3 + 3] annulation involving oxidative activation of an unreactive C(sp³)-H bond: access to pyrimidine derivatives from amidines and ketones. *Org. Chem. Front.* **2017**.

²⁶ Prakash, G.; Manikandan, R.; Viswanathamurthi, P.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R. Ruthenium(III) S-methylisothiosemicarbazone Schiff base complexes bearing PPH₃/AsPh₃ coligand: Synthesis, structure and biological investigations, including antioxidant, DNA and protein interaction, and in vitro anticancer activities. *J. of Photochem. and Photobio. B: Bio.*, **2014**, 138, 63-74.

²⁷ Chinchansure, A. A.; Korwar, A. M.; Kulkarni, M. J.; Joshi, S. P. Recent development of plant products with anti glycation activity: a review. *RSC Advances*, **2015**, 5, 31113-31138.

²⁸ Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Archives of Biochem. and Biophys.*, **2003**, 419, 31-40.

da aminoguanidina. Uma das propostas para os efeitos colaterais da aminoguanidina são as reações paralelas que podem ocorrer, como reações com outros grupos carbonílicos e com as enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e aminoxidase sensível à semicarbazida (SSAO). Essas reações competem com o mecanismo antiglicante devido à alta nucleofilia da aminoguanidina, resultante da união dos grupos hidrazina e amidina.²⁸

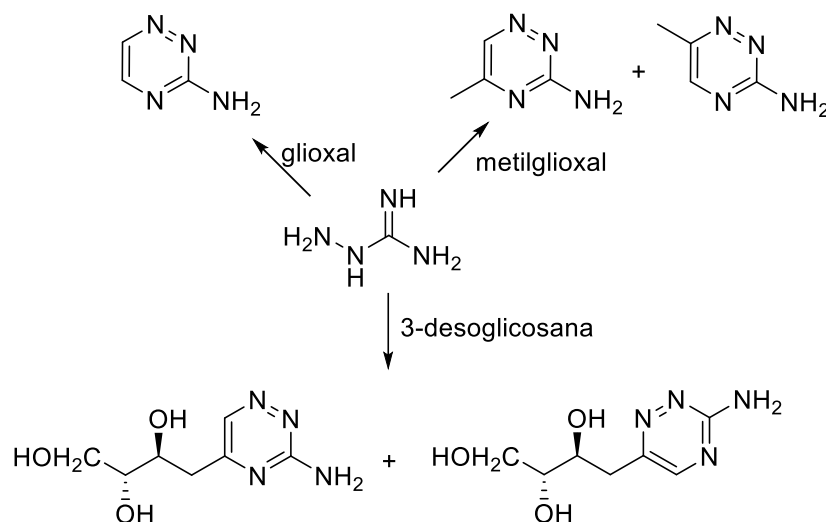


Figura 9. Reação da aminoguanidina com compostos dicarbonílicos.

A busca por aminoguanidinas menos tóxicas ou outros derivados de amidinas com potencial atividade antiglicante é pouca explorada na literatura. Um exemplo é a *N*-(2-acetamidoetil)aminoguanidina (Figura 10), que é um fraco inibidor da enzima NOS, o que garante que ela possa preferencialmente atuar no mecanismo de inibição de glicação.²⁸

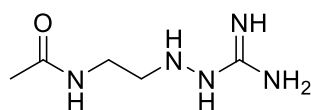


Figura 10. Derivado de aminoguanidina com fraca ação inibidora da enzima NOS.

1.2.3 Produtos Naturais

Os produtos naturais, desde a antiguidade, têm sido o pilar da medicina tradicional de várias partes do mundo, como a medicina tradicional chinesa. Atualmente, cerca de 40% da população mundial depende diretamente de algum produto natural para os seus cuidados de saúde.²⁹ Assim, não é uma exceção o uso de medicamentos

²⁹ Kaufman, T. S. The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2015**, 26, 1055-1085.

alternativos para o tratamento de diabetes e suas complicações, sendo que muitos produtos naturais têm sido testados por diabéticos em dietas e medicamentos naturais.¹²

Estudos comprovaram que vários extratos de plantas, frutas e vegetais que apresentam atividade antidiabética apresentaram também atividade antiglicante²⁷ e contém bioativos como: (i) terpenoides, por exemplo, o lupeol, e o ácido ursólico;³⁰ (ii) flavonoides, como a apigenina e quercetina;³¹ (iii) fenilpropanóides, como o eugenol¹² e derivados de cumarina;³² (iv) fenóis como o ácido gálico¹⁵ e (v) polifenóis, como a epicatequina.³³ As estruturas destes bioativos encontram-se na Figura 11.

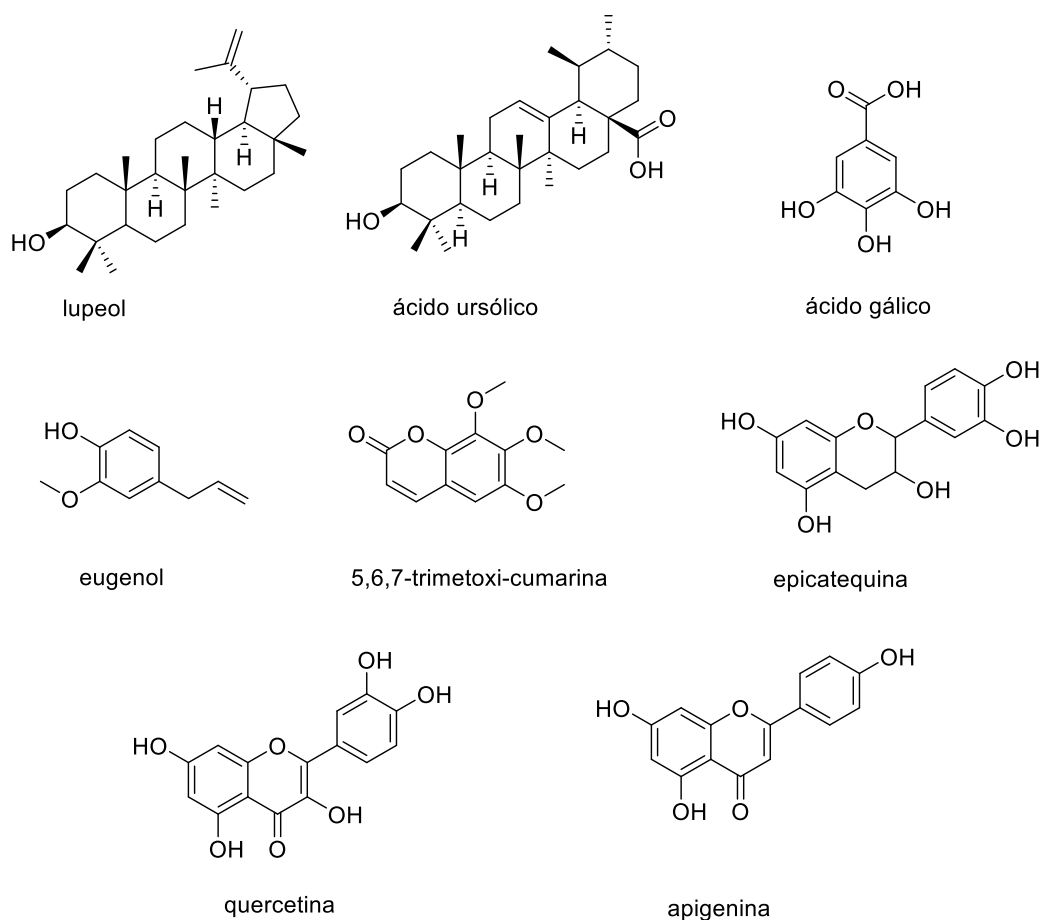


Figura 11. Produtos naturais que apresentam atividade antiglicante.

³⁰ Raza, R.; Ilyas, Z.; Ali, S.; Nisar, M.; Khokhar, M. Y.; Iqbal, J. Identification of Highly Potent and Selective – Glucosidase Inhibitors with Antiglycation Potential, Isolated from *Rhododendron arboreum*. *Rec. Nat. Prod.*, **2015**, *2*, 262-266.

³¹ Choi, J. S.; Islam, M. N.; Ali, M. Y.; Kim, E. J.; Kim, Y. M.; Jung, H. A. Effect of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of a pigenin. *Food and Chem. Toxicology*, **2014**, *64*, 27-33.

³² Asgarpanah, J.; Amin, G.; Parviz, M.; In vitro antiglycation activity of *Eremurus persicus* (Jaub. Et Sp.) Boiss. *Afr. J. Biotechnol.*, **2011**, *10*, 11287-11289.

³³ Kato, N.; Kawabe, S.; Ganeko, N.; Yoshimura, M.; Amakura, Y.; Ito, H. Polyphenols from flowers of *Magnolia coco* and their antiglycation effects. *Biosci., Biotech., and Biochem.*, **2017**, 1-4.

Os triterpenos são metabólitos secundários encontrados nas plantas como ácidos livres ou agliconas e são agrupados de acordo com sua estrutura, em eufanos, taraxanos, oleananos, lupanos, ursanos e bacaranos. Além da atividade antiglicante possuem atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antitumoral, antiobesidade e antidiabética.³⁴ Não se sabe ao certo o mecanismo de inibição dos triterpenos na formação de AGEs. O ácido ursólico, o oleonóico e o lupeol reagem preferencialmente com açúcares inibindo a reação de glicação, sendo que os ácidos se apresentaram mais ativos.³⁰ O ácido arjunólico inibe a formação da HbA_{1c} (hemoglobina glicada), AGEs e ROS (acrônimo do inglês *reactive oxygen species*).²⁷ As estruturas destes triterpenos estão mostradas na Figura 12.

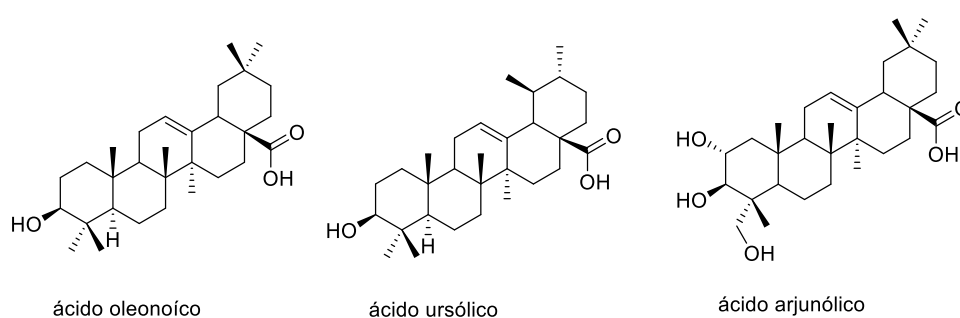


Figura 12. Triterpenos que apresentam atividades antiglicante.

O eugenol é encontrado principalmente no óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), comumente obtido por destilação por arraste de vapor ou por extração em Soxhlet utilizando etanol como solvente. Também é encontrado em noz-moscada, canela, manjerição, óleo de louro e entre outros sendo comumente usados como fragrância, aromatizantes em alimentos e cosméticos. Além da atividade antiglicante o eugenol possui uma série de atividades biológicas, como antimicrobiana, analgésica, antioxidante, anti-inflamatória, antiespasmódica, antidepressivo, antigenotóxica, anticancerígeno²⁹ e antidiabética.¹² Estudos sobre a atividade antiglicante do eugenol especulam que a atividade é devido à hidroxila fenólica, uma vez que existe grande diferença de atividade entre o eugenol e o metileugenol.¹²

Cumarinas compreendem uma grande classe de derivados fenólicos naturais ou sintéticos e são encontradas como metabólitos secundários de plantas, fungos e bactérias. São consideradas fitoalexinas, uma vez que as plantas as produzem como substâncias defensivas quando atacadas por outros organismos.³⁵ Além da atividade antimicrobiana e antiglicante, os derivados de cumarinas apresentam inúmeras

³⁴ Yin, M. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. *BioMed.*, **2012**, 2, 2-9.

³⁵ Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin-based drugs: a patente review (2008-present). *Expert Opin. Patents*, **2012**, 22, 438-454.

atividades biológicas como antiviral, anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante, anticoagulante, antitumoral, antituberculose, anti-HIV e anti-Alzheimer.³⁵ Estudos sobre a atividade antiglicante da 5,6,7-trimetoxi-cumarina especulam que devido à sua atividade antioxidante ela inibe a oxidação de Wolff.³²

A cumarina apresenta a isocumarina como isômero, com o anel lactona invertido,³⁶ como mostrado na Figura 13. Da mesma forma que as cumarinas, as isocumarinas são encontradas em plantas, fungos e bactérias. Seus derivados possuem diversas atividades biológicas, como antibiótica, antifúngica, antimalárica, antioxidante, anti-inflamatória, antituberculose, hepatoprotetora, inseticida, herbicida, antidiabética, antileucêmica, antiúlcera, antiplaquetária e anti-incrustantes.³⁶ Atualmente não se tem relato de nenhum estudo sobre atividade antiglicante da isocumarina e seus derivados.

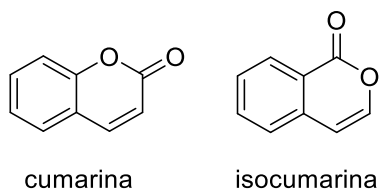


Figura 13. Núcleo cumarínico e isocumarínico.

Considerando a atividade antiglicante relatada para todos os compostos apresentados e a falta de estratégias de hibridação molecular descritas na literatura para associá-los, uma abordagem que trate da conjugação de duas sub-unidades estruturais ativas poderia resultar na obtenção de novas moléculas bioativas com potencial atividade anti-glicante, o que será estudado neste trabalho.

³⁶ Saeed, A. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 116, 290-317.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a síntese de compostos inéditos derivados do ácido lipoico, do tipo éster ou amida, para avaliação de seu potencial uso como agentes antiglicantes.

2.1 Objetivos específicos

- Síntese de novos análogos do ácido lipoico contendo os grupos amidina ou aminoguanidina em sua estrutura através do uso de espaçadores (*linkers*) como estratégia para unir as duas sub-unidades. Foi planejado o uso de três *linkers* (espaçadores 1, 2 e 3), mostrados na Figura 14.

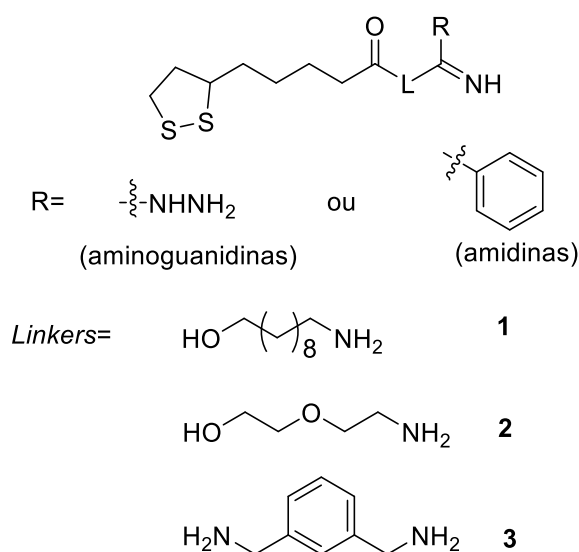


Figura 14. Uso de espaçadores para a síntese dos novos derivados do ácido lipoico contendo os grupos amidina e aminoguanidina.

- Síntese de novos ésteres, amida e diamida inéditas do ácido lipoico com produtos de origem natural ou sintética (Figura 15) com potencial atividade antiglicante.

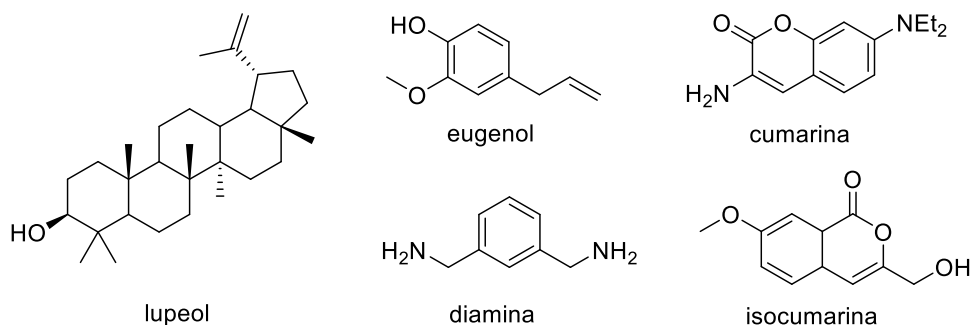


Figura 15. Álcoois e amins de origem natural ou sintética a serem usados para modificação do ácido lipoico.

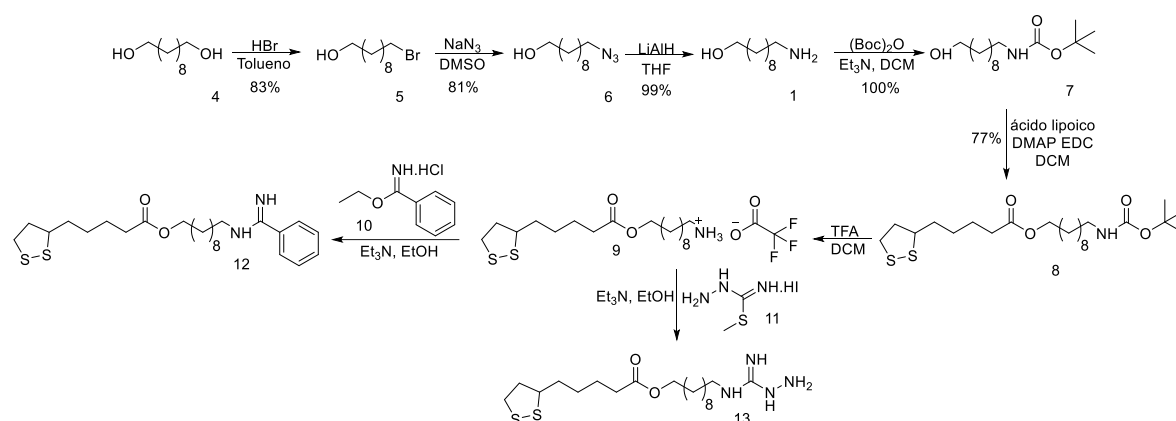
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção foi dividida em três partes. A primeira parte aborda os estudos para a síntese das amidinas e aminoguanidinas e foi dividida em três seções, cada uma correspondendo a um tipo de espaçador. Na segunda parte foi relatada a síntese de novos derivados do ácido lipoico usando reações de acoplamento clássicas com produtos naturais ou moléculas sintéticas. A terceira e última parte discorre sobre os estudos preliminares da atividade antiglicante de alguns dos derivados inéditos do ácido lipoico.

3.1 Estudos para a síntese dos derivados do tipo amidina e aminoguanidina

3.1.1 Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador 1

A rota sintética planejada e desenvolvida para a obtenção da amidina **12** e da aminoguanidina **13** envolve sete etapas e está representada no Esquema 2.



Esquema 2. Rota sintética desenvolvida para a obtenção da amidina **12** e aminoguanidina **13**.

A primeira etapa consistiu na monobromação do diol comercial **4** e foi realizada seguindo a metodologia utilizada por Gontijo e colaboradores,³⁷ em que o 1,10-decanodiol foi solubilizado em tolueno e deixado sob refluxo por 72 horas na presença de uma solução aquosa de ácido bromídrico 48%. O aparelho Dean-Stark foi utilizado para a remoção da água do meio reagente favorecendo o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da formação dos produtos. O uso de 1,10 equivalente de HBr

³⁷ Gontijo, V. S.; Oliveira, M. E.; Resende, R. J.; Fonseca, A. L.; Nunes, R. R.; Junior, M. C.; Taranto, A. G.; Torres, N. M. P. O.; Viana, G. H. R.; Silva, L. M.; Alves, R. B.; Varotti, F. P.; Freitas, R. P. Long-chainalkyl triazoles as antitumor agents: synthesis, physico chemical properties, and biological and computational evaluation. *Med. Chem. Research*, **2015**, *24*, 430-441.

favoreceu a formação do produto monobromado **5** majoritariamente com 83% de rendimento.

Na segunda etapa, a azida **6** foi obtida a partir de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular do brometo pelo íon azida. Azidas orgânicas são materiais explosivos, principalmente sob altas temperaturas e na presença de solventes clorados, devido às ligações π serem facilmente polarizadas, o que pode resultar na dissociação do composto liberando nitrogênio gasoso e grupos nitreno bastante reativos.³⁸ Por isso o método de Alvarez e colaboradores³⁹ foi escolhido e consiste no uso de uma solução 0,5 mol.L⁻¹ de azida de sódio em DMSO (dimetilssulfóxido), preparada previamente, obtendo-se nestas condições a azida **6** com 81% de rendimento em temperatura ambiente.

A terceira etapa consistiu na redução da azida, obtendo-se a amina **1** com 99% de rendimento. O método empregado foi o utilizado por Hilário e colaboradores,⁴⁰ que consiste na adição lenta de uma solução de azida sobre uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio em THF (tetraidrofurano) anidro, sob atmosfera de N₂. Nestas condições obteve-se um sólido branco insolúvel em clorofórmio, de solubilidade diferente da azida de partida.

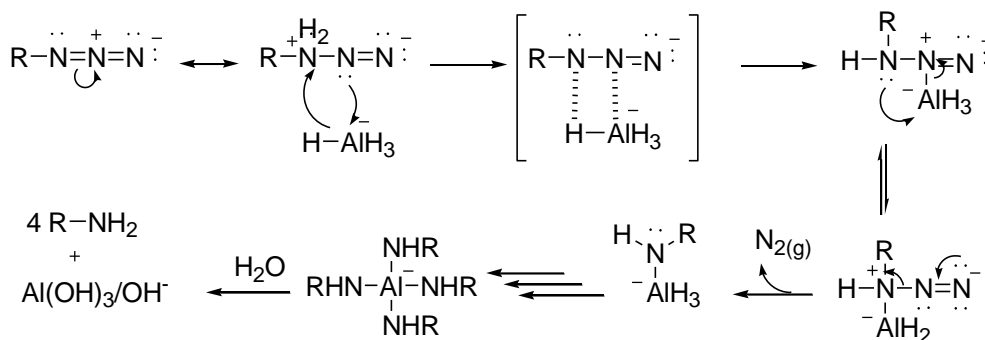
A proposta mecanística de Pereira⁴¹ para a redução de azidas é apresentada no Esquema 3 (página 35). O mecanismo se inicia com o agente redutor doando um hidreto para um dos nitrogênios da azida e ao mesmo tempo recebendo densidade eletrônica do par de elétrons livres do nitrogênio, o que facilita o rompimento da ligação hidreto-metal e a formação da ligação hidrogênio-nitrogênio. Em seguida o nitrogênio doa densidade para o metal favorecendo a saída de nitrogênio gasoso, formando o íon amino-3-hidroaluminato. A reação é repetida até que todos os hidretos tenham reagido formando o tetraaminoaluminato. Com a adição de água a amina é liberada formando hidróxido de alumínio como subproduto.⁴¹

³⁸ Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. Organicazides: Anexploding diversity of a unique class of compounds. *Angew. Chem. Int.*, **2005**, 44, 5188-5240.

³⁹ Alvarez, S.; Alvarez, M. A practical procedure for the synthesis of alkyl azides at ambient temperature in dimethylsulfoxide in high purity and yield. *Synthesis*, **1997**, 4, 413-414.

⁴⁰ Hilario, F.; Paula, R. C.; Silveira, M. L. T.; Viana, G. H. R.; Alves, R. B.; Pereira, J. R. C. S.; Silva, L. M.; Freitas, R. P.; Varotti, F. P. Synthesis and Evaluation of Antimalarial Activity of Oxygenated 3-alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues. *Chem. Bio. & Drug Design*, **2011**, 78, 477-482.

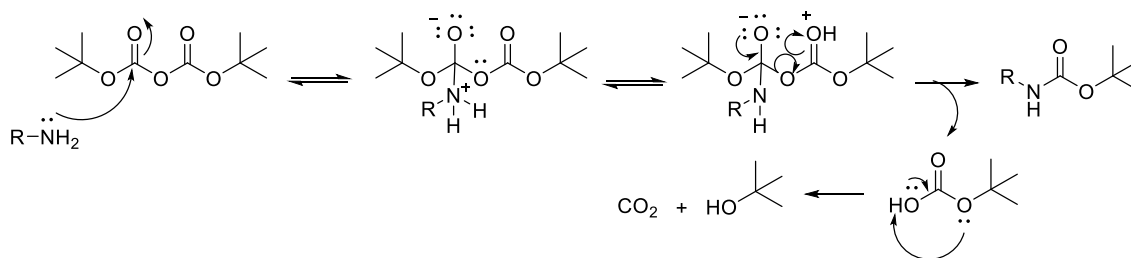
⁴¹ Pereira, G. R. *Síntese de Novos Derivados Fulerênicos Explorando a "reação Click" e de um Derivado C₆₀ - Catiônico Polar*. Tese de Doutorado, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, **2011**.



Esquema 3. Proposta mecanística para redução da azida em amina.⁴¹

Após a obtenção do aminoálcool **1** seguiu-se para a proteção da amina, já que esta competiria durante a reação de acoplamento (esterificação). A metodologia empregada foi a mesma utilizada por Pereira,⁴¹ em que foi usado o dicarbonato de *tert*-butila (BOC) na presença de trietilamina como base. Nessas condições foi possível obter o produto desejado com 100% de rendimento e sem necessidade de purificação. Um indício de que a reação ocorre é a diferença de solubilidade do material de partida e do produto, uma vez que o carbamato **7** é solúvel em clorofórmio diferentemente do aminoálcool **1**.

O mecanismo da reação de proteção de amina com BOC é mostrado no Esquema 4. A reação se inicia com o ataque do par de elétrons do nitrogênio à carbonila do dicarbonato, formando um intermediário tetraédrico instável que se decompõe restaurando a carbonila para formação do carbamato desejado e liberando o carbonato de *tert*-butila, que se decompõe em dióxido de carbono e *tert*-butanol.



Esquema 4. Proposta mecanística de proteção da amina com BOC.

Os compostos sintetizados acima não são inéditos e apenas os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H, de ¹³C e na região do Infravermelho (IV) do carbamato **7** serão detalhadamente descritos nessa seção. Os espectros das outras substâncias encontram-se no Anexo (página 100).

No espectro de RMN de ¹H do carbamato **7**, mostrado na Figura 16, o multipletto integrado para doze hidrogênios entre δ 1,28-1,30 ppm refere-se aos hidrogênios alifáticos metilênicos H3 a H8. O simpleto em δ 1,44 ppm, integrado para nove

hidrogênios, é referente às metilas do grupo *terc*-butila, um indício que a reação realmente ocorreu. Os hidrogênios metilênicos H9 e H2, por estarem mais próximos a grupos eletronegativos estão mais desblindados. Assim, o multipletto integrado para quatro hidrogênios entre δ 1,53-1,67 ppm refere-se aos hidrogênios H2 e H9. O sinal largo em δ 1,89 ppm integrado para um hidrogênio é referente à hidroxila. O quarteto em δ 3,09 ppm ($J_{9,10,NH} = 6$ Hz) integrado para dois hidrogênios é referente ao H10. O quarteto em δ 3,63 ppm ($J_{1,2} = 6$ Hz), integrado para dois hidrogênios, é referente a H1. O simpleto largo em δ 4,61 ppm, integrado para um hidrogênio, corresponde ao hidrogênio do grupo –NH do carbamato.

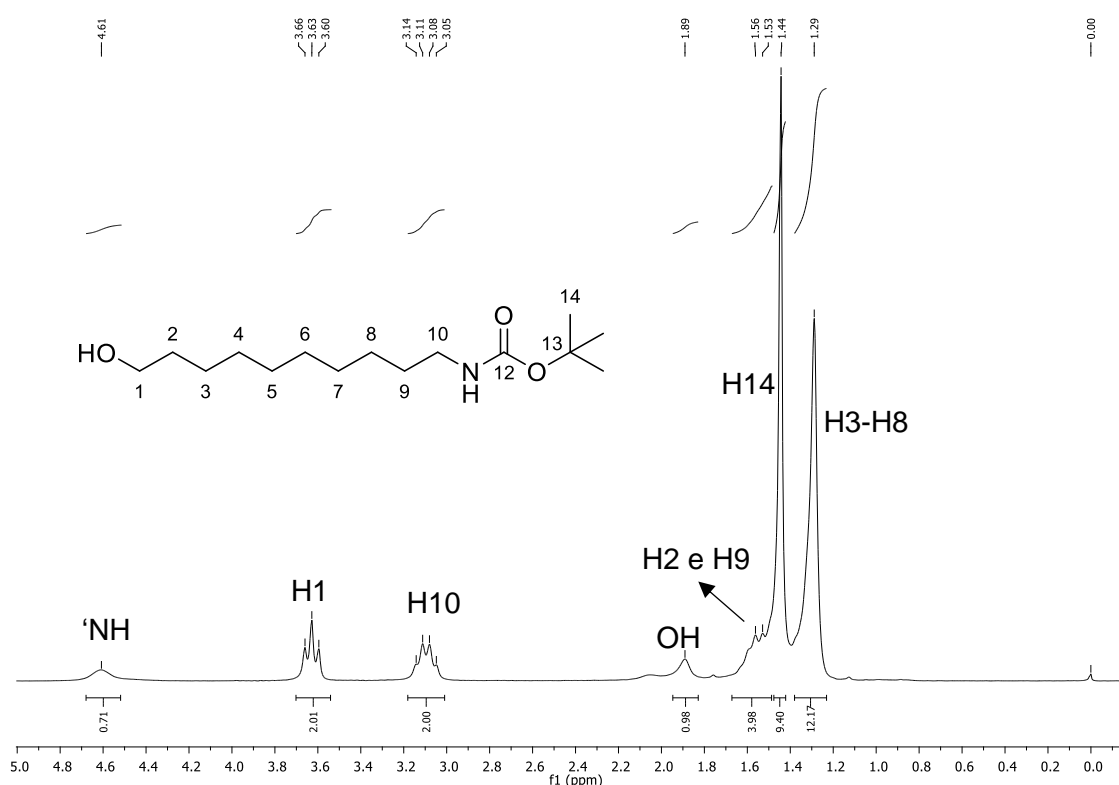


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto **7** (200 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C o sinal em δ 156,2 ppm é referente à carbonila do carbamato, como mostrado na Figura 17 (página 37), sendo esse sinal outro indício que a proteção realmente ocorreu, assim como os sinais em δ 79,2 ppm e em δ 28,6 ppm referentes aos carbonos do grupo *terc*-butila, respectivamente, C13 e C14.

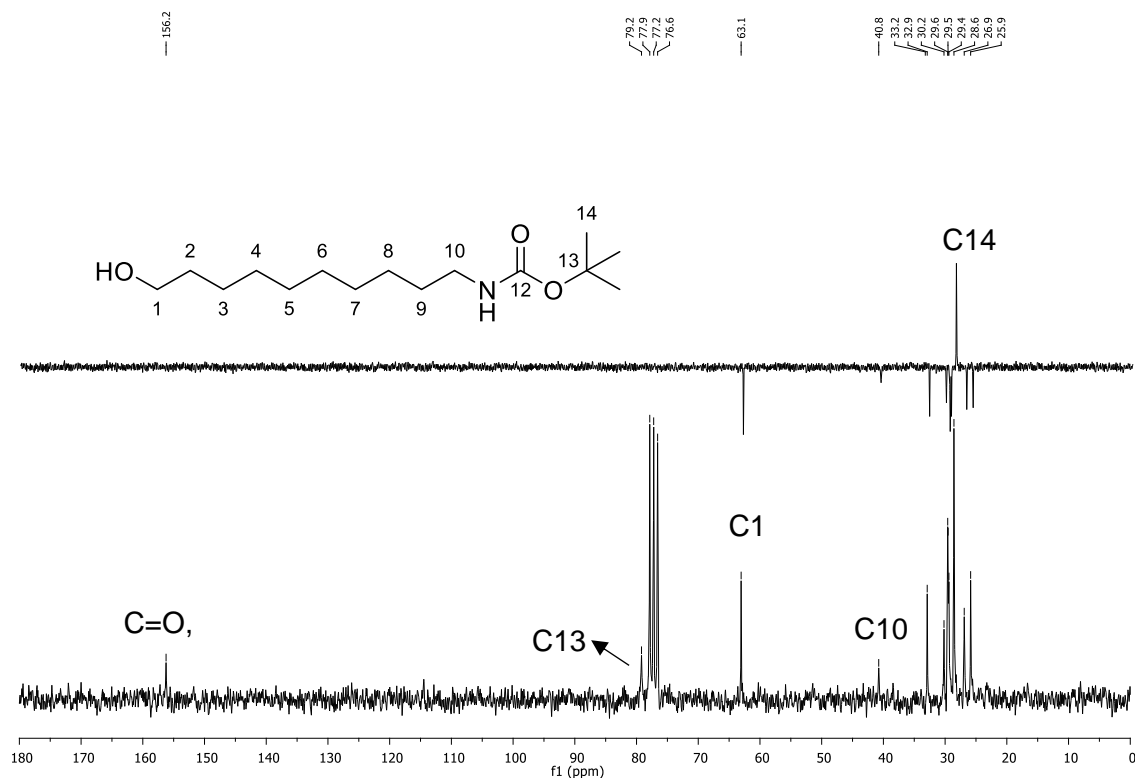


Figura 17. Espectro de RMN de ¹³C e subspectro de DEPT do composto 7 (50 MHz, CDCl₃).

No espectro na região do infravermelho a banda em 1685 cm⁻¹ é característica do estiramento da carbonila do carbamato, como mostrado na Figura 18.

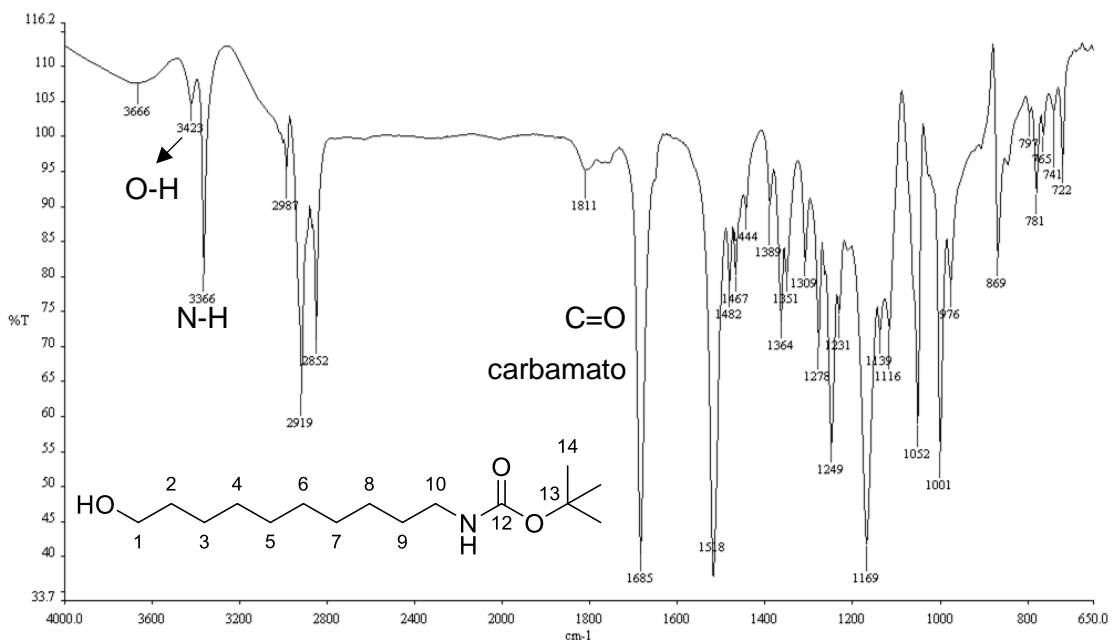


Figura 18. Espectro na região do IV (ATR) do composto 7.

Com a formação do carbamato 7 seguiu-se para a esterificação com o ácido lipoico. Na literatura há diversas metodologias para a esterificação do ácido lipoico, sendo que as mais comuns são o uso de reagentes de acoplamento do tipo

dialquilcarbodiimidas, de NHS (*N*-Hidroxissuccinimida) e de cloreto de ácido.⁴² A vantagem do uso de reagentes de acoplamento é a formação do éster desejado em apenas uma etapa, ao contrário das outras metodologias em que é necessária uma etapa para a ativação do ácido lipoico (por exemplo formação do cloreto de ácido ou do éster de succinato) e outra para a esterificação, além do cloreto de ácido ser muito lábil e facilmente degradado.

Inicialmente, o reagente de acoplamento empregado foi o DIC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida) e foi possível a obtenção do éster **8** (Esquema 2, página 33) com até 52% de rendimento. Nesta reação um dos subprodutos é a diisopropilureia que apresentou polaridade similar à do produto desejado, impossibilitando sua completa remoção mesmo com purificações sucessivas por cromatografia líquida em coluna. Assim, optou-se pelo emprego da metodologia de Chen e colaboradores,⁴³ em que usa-se o EDC (cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) como reagente de acoplamento e o DMAP (*N,N*-dimetil-4-aminopiridina) como catalisador para esterificação. O reagente EDC apresenta em sua estrutura um grupo amino, o que possibilita que a ureia formada no meio reacional seja facilmente protonada em meio ácido durante a elaboração da reação e retirada com a lavagem do bruto da reação com uma solução de HCl 1 mol L⁻¹. Assim foi possível obter o produto desejado **8** relativamente puro, sem a necessidade de purificação adicional, com 77% de rendimento.

O uso de DMAP como catalisador torna a reação similar à reação conhecida como esterificação de Steglich⁴⁴ (originalmente a reação de Steglich utiliza DCC -*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida- como reagente de acoplamento). Como álcoois não são bons nucleófilos, o uso de DMAP acelera a formação do produto final e impede o rearranjo indesejável, como mostrado na proposta mecanística do Esquema 5 (página 39). O mecanismo tem início com a abstração de um próton do ácido carboxílico pelo nitrogênio da carbodiimida do EDC, seguida pela adição do carboxilato à carbazida, acompanhada pela quebra da dupla ligação com o nitrogênio protonado e a formação do intermediário *O*-acilisourea. Ocorre então novamente uma protonação no nitrogênio da *O*-acilisourea seguida pelo ataque da hidroxila do álcool à carbonila, liberando a ureia substituída correspondente e o éster desejado, sendo esta a etapa determinante da reação. A *O*-acilisourea pode sofrer rearranjo e formar a *N*-acilureia que é

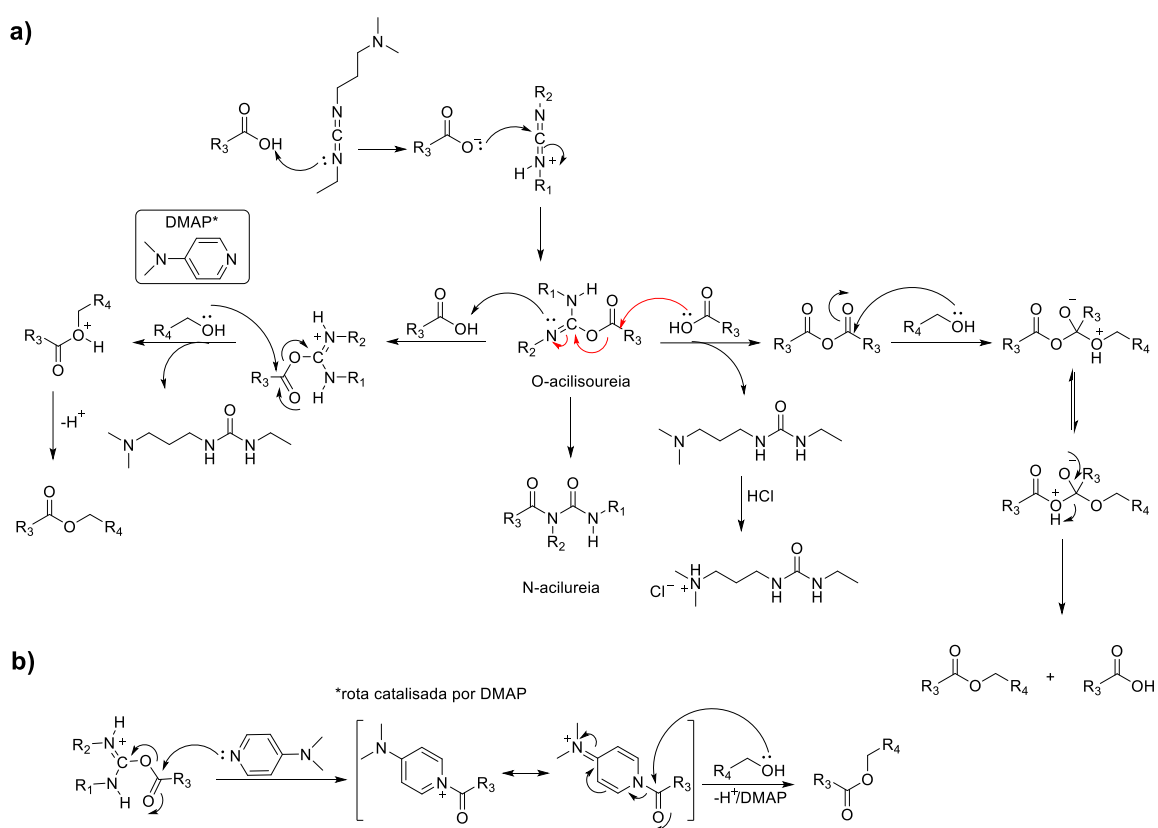
⁴² Koufaki M.; Detsi, A. Design and Synthesis of Antioxidant α -Lipoic Acid Hybrids. *Methods Mol Biol.*, **2010**, 594, 297-309.

⁴³ Chen, X.; Lawrence, J.; Parekar, S.; Emrick, T. Novel Zwitterionic Copolymers with Dihydrolipoic Acid: Synthesis and Preparation of Nonfouling Nanorods. *Macromolecules*, **2013**, 46, 119-127.

⁴⁴ Neises, B.; Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem. Int.*, **1978**, 17, 522-524.

consideravelmente estável e não reage novamente para formar o produto desejado (Esquema 5a). Como dito anteriormente, álcoois não são bons nucleófilos e, se a reação for lenta, há maior probabilidade de *O*-acilisoureia se converter em *N*-acilureia. O uso de DMAP faz com que o mesmo reaja primeiramente com a *O*-acilisoureia liberando a ureia correspondente devido à formação de um melhor grupo abandonador, possibilitando o ataque do álcool e a formação do éster correspondente (Esquema 5b).

Neste mecanismo ocorrem reações laterais com a *O*-acilisoureia, como mostrado no Esquema 5. Esta pode reagir também com o ácido carboxílico formando o anidrido correspondente, que pode reagir com o álcool e formar o éster desejado também por esta via.



Esquema 5. a) Proposta mecanística da esterificação de Steglich com EDC como reagente de acoplamento; b) Papel do catalisador DMAP na reação.⁴¹

A caracterização e a determinação estrutural do novo derivado do ácido lipoico **8** foi possível por espectrometria de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT e os mapas de correlação COSY e HSQC. Para o composto **8**, no espectro de RMN de ^1H (Figura 19, página 40) foi possível identificar alguns sinais correspondentes aos hidrogênios do espaçador **1**, como o tripleto em δ 4,00 ppm ($J_{8,9} = 6\text{Hz}$) correspondendo ao H8 e o multipletto em δ 1,23-1,38 ppm, integrado para doze hidrogênios, aos hidrogênios H10 a H15. Por comparação com o espectro do ácido lipoico (Figura 51, página 99) foi possível

identificar alguns sinais correspondentes aos hidrogênios do anel dissulfeto, por exemplo, o multipletto entre δ 3,48-3,55 ppm integrado para um hidrogênio correspondendo ao H3. Os outros multiplettos, integrados para um hidrogênio cada, correspondem aos hidrogênios diastereotópicos do anel H2 e H2', entre δ 1,82-1,90 ppm e δ 2,37-2,45 ppm. O tripleto em δ 2,26 ppm ($J_{7,6} = 8\text{Hz}$) corresponde aos dois hidrogênios H7 do ácido lipoico, vizinho à carbonila do éster. Todos os sinais foram comprovados pelas correlações no experimento COSY como mostrado na Figura 20 (página 41).

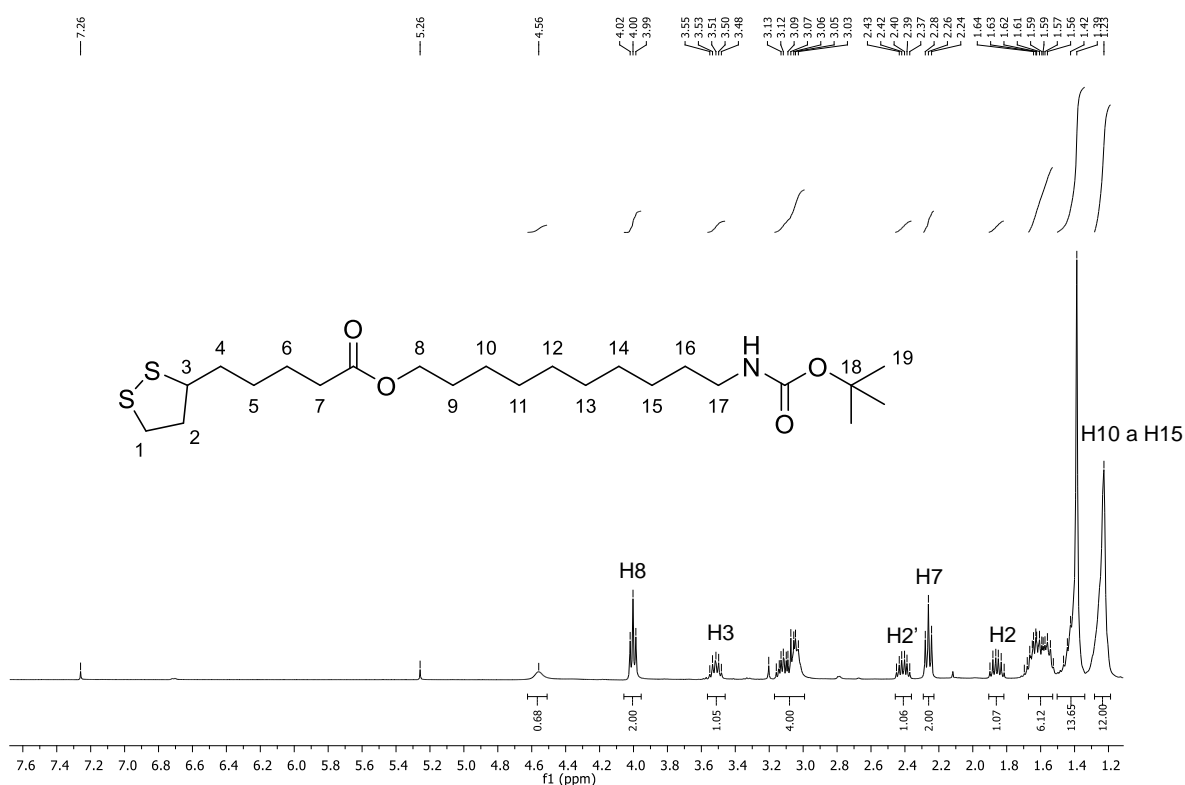


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do composto **8** (400 MHz, CDCl_3).

Pelas correlações do COSY foi possível observar que o multipletto entre δ 3,03-3,20 ppm, integrado para quatro hidrogênios, acopla com os sinais de H2 e H2', assim este sinal refere-se, pelo valor da integração, aos hidrogênios H1 e H17, já que no material de partida o sinal referente a H17 este último encontra-se na mesma região. Os sinais de H8, H7 e H3 apresentam manchas de correlação com o multipletto entre δ 1,52-1,70 ppm, integrado para seis hidrogênios, que deve portanto corresponder ao sinal dos hidrogênios H9, H6 e H4. O sinal de H17 apresenta ainda mancha de correlação com o multipletto entre δ 1,39-1,50 ppm, integrado para treze hidrogênios, que deve portanto corresponder aos hidrogênios metilênicos H16 e às metilas H19, já

que no material de partida o sinal correspondente a H19 é nessa região, e aos outros hidrogênios metilênicos do composto.

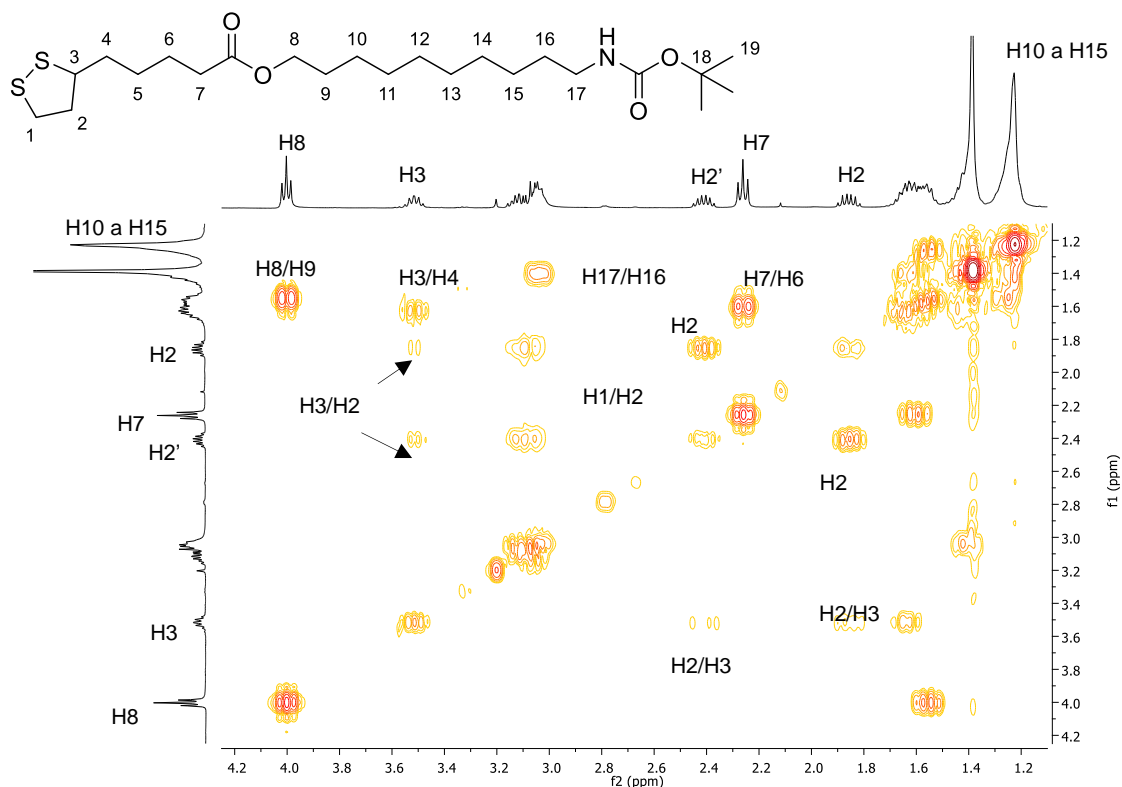


Figura 20. Mapa de correlação COSY do composto **8** (400MHz, CDCl₃).

No espectro de RMN de ¹³C (Figura 21, página 42) foi possível identificar o sinal referente à carbonila do éster em δ 173,6 ppm, comprovando que a reação ocorreu, sinal com deslocamento diferente do sinal da carbonila do carbamato que é em δ 156,0 ppm. A diferença de deslocamento entre as duas carbonilas é devido a carbonila do carbamato está mais blindada devido ressonância com o par de elétrons do nitrogênio. O sinal em δ 64,5 ppm corresponde ao C8. Pelo DEPT (Figura 21) foi possível identificar o sinal referente ao carbono terciário do anel do ácido lipoico o C3 em δ 56,3 ppm e ao C19, metilas do grupo *terc*-butila, em δ 28,4 ppm.

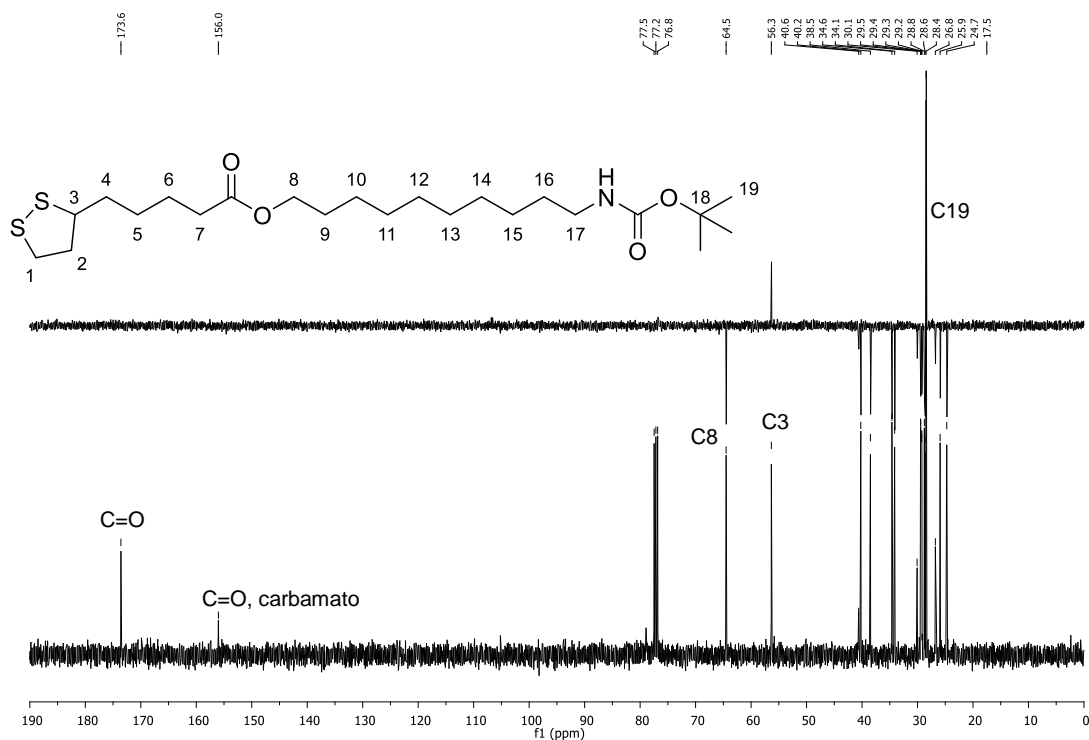


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **8** (100 MHz, CDCl_3).

No espectro resultante do experimento HSQC (Figura 22) foi possível atribuir os sinais dos carbonos C17 em $\delta 40,6$ ppm, C2 em $\delta 40,2$ ppm, C1 em $\delta 38,5$ ppm e C7 em $\delta 34,1$ ppm. Os sinais dos outros carbonos foram identificados pela expansão do espectro obtido no experimento HSQC, como mostrado na Figura 23. Assim, foi possível confirmar que o multipletto entre $\delta 1,39$ - $1,50$ ppm corresponde às metilas do grupo *tert*-butila e também aos hidrogênios metilênicos H5 e H16. O multipletto entre $\delta 1,23$ - $1,38$ ppm corresponde aos hidrogênios metilênicos H10 a H15. Pelo HSQC e pela comparação com o espectro do ácido lipoico foi possível determinar que o sinal em $\delta 24,7$ ppm corresponde ao C6, o sinal em $\delta 25,9$ ppm ao C10, o sinal em $\delta 26,7$ ppm ao C15, $\delta 28,6$ ppm ao C5 e C9, $\delta 30,1$ ppm ao C16 e $\delta 34,6$ ppm ao C4. Os sinais $\delta 28,8$ a $29,5$ ppm correspondem aos carbonos metilênicos de C11 a C14, não sendo possível correlacionar com o seu respectivo hidrogênio, pois o mapa de contornos HSQC apresenta apenas uma correlação para todos esses sinais.

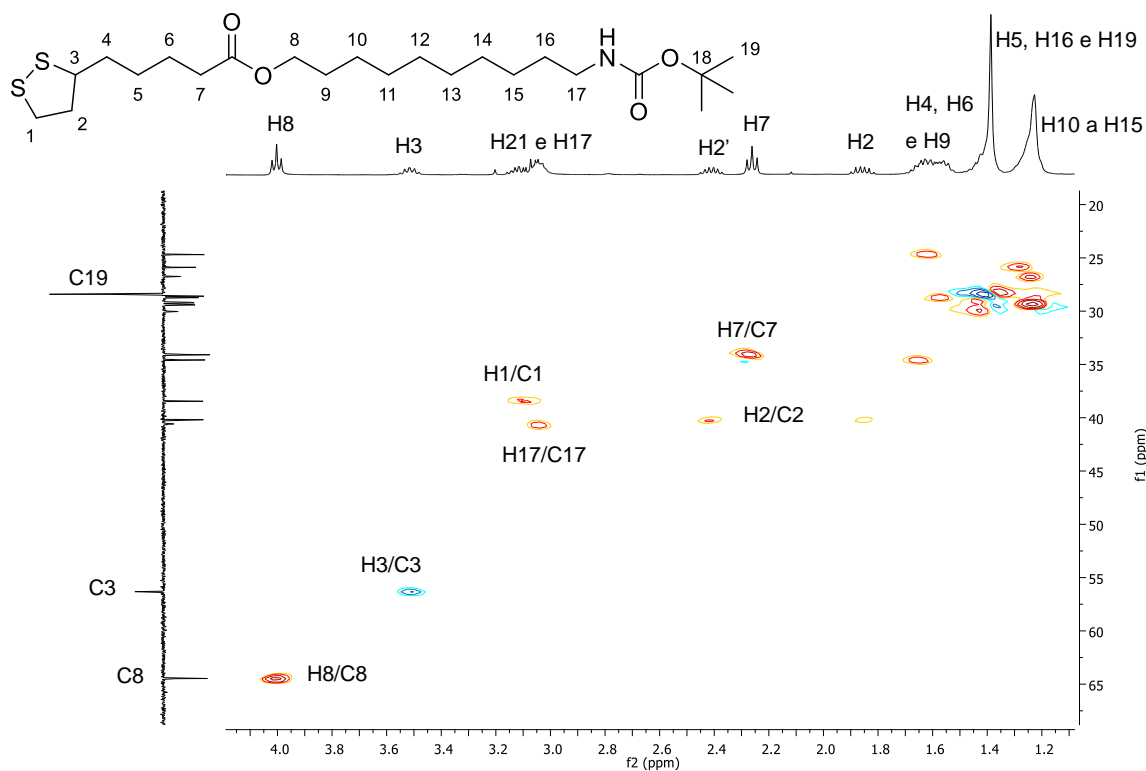


Figura 22. Mapa de correlação HSQC do composto 8 (400MHz, CDCl₃).

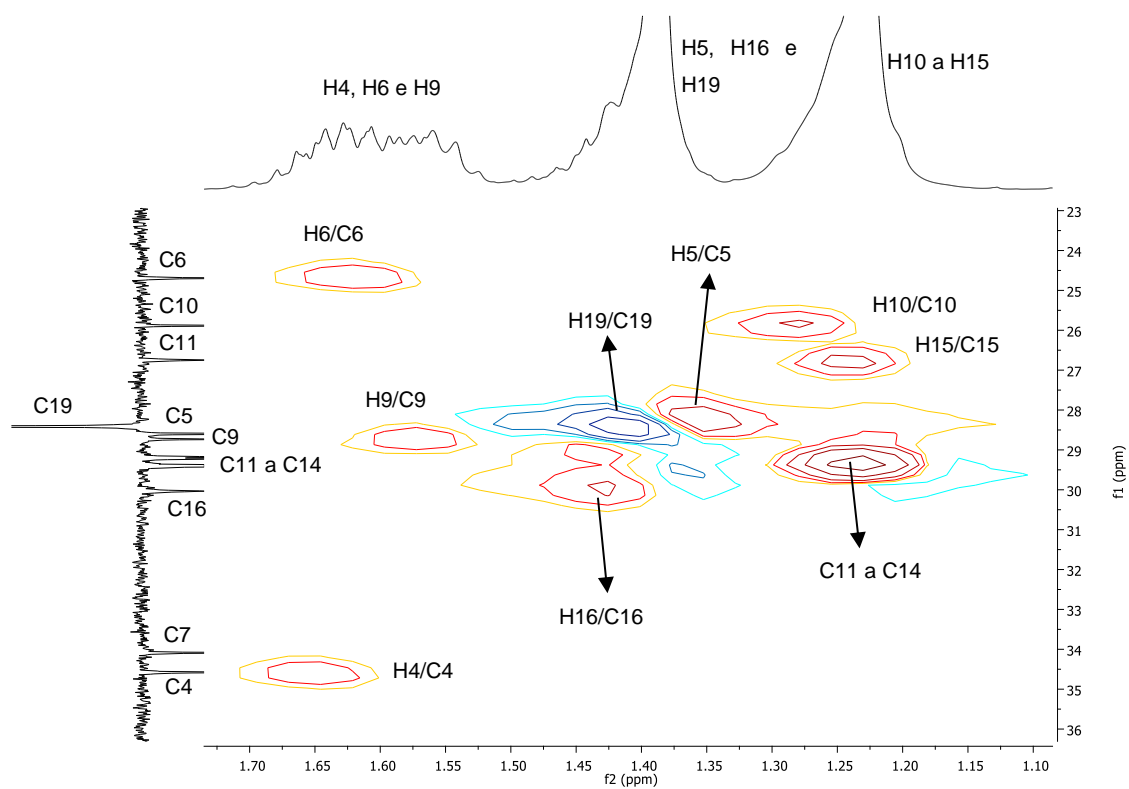


Figura 23. Expansão do HSQC do composto 8.

Com o éster do ácido lipoico seguiu-se para a desproteção da amina. Existem diversas metodologias na literatura para desproteção de carbamatos, sendo as mais comuns o uso dos ácidos clorídrico (HCl) e trifluoroacético (TFA). Foram, ao todo, testadas cinco metodologias diferentes neste trabalho, como mostrado na Tabela 1.

A primeira metodologia empregada foi a utilizada por Pereira,⁴¹ na qual o éster protegido **8** foi deixado sob agitação por 12 horas com 2 mL de TFA em diclorometano (DCM). O bruto da reação foi evaporado obtendo-se um óleo marrom. Análise do bruto da reação por RMN revelou que ocorreu, nestas condições, degradação do produto, não sendo possível observar um componente majoritário na mistura. Suspeitou-se que o problema poderia estar relacionado ao longo tempo de reação, assim a próxima reação foi deixada por um menor tempo reacional (50 min) e uma menor quantidade de TFA (1 mL). Após evaporação do excesso de ácido o bruto da reação foi analisado por RMN de ¹H e, embora se notasse a presença de sinais correspondendo a um componente majoritário correspondendo à desproteção, o fato da amina ser obtida em grande parte na forma de seu sal trifluoroacetato e a presença de outras impurezas complicaram a interpretação do espectro. Por essa razão, decidiu-se realizar tentativas de partição do bruto obtido após evaporação do excesso de ácido trifluoroacético, para liberar a base livre da amina. A tentativa em que se usou uma solução diluída de NaOH para efetuar a neutralização do meio e liberar a amina foi infrutífera: recuperou-se uma baixa massa de material na fase orgânica (provavelmente devido à alta solubilidade da amina resultante na fase aquosa) e espectro do bruto obtido da fase orgânica indicou hidrólise do material de partida (pois apenas sinais relativos ao esqueleto do ácido lipoico ou da cadeia carbônica do diol de partida eram observados nas frações por sucessivas extrações).

Em uma outra tentativa, optou-se pela troca do TFA pelo ácido clorídrico a fim de se evitar a degradação novamente e a complicação na interpretação dos espectros do bruto da reação. Assim, foi empregada a metodologia de Stahl e colaboradores,⁴⁵ e o éster **8** foi deixado sob agitação por 30 minutos em 1 mL de solução de HCl 3 mol L⁻¹ em acetato de etila. O solvente foi evaporado obtendo-se um óleo amarelo, cuja análise por RMN de ¹H revelou a hidrólise do éster.

Na quarta tentativa optou-se pelo uso, novamente, de TFA em uma menor quantidade (0,25 mL) e tempo. Com 30 minutos adicionou-se mais 0,50 mL de TFA, devido à presença do substrato na CCD (cromatografia em camada delgada). Após 50 min de reação foi verificada por CCD a presença de mistura da amina livre e do sal de

⁴⁵ Stahl, G. L.; Walter, R.; Smith, C. W. General Procedure for the Synthesis of Mono-N-acylated 1,6-Diaminohexanes. *J. Org. Chem.*, **1978**, 11, 2285-2286.

TFA. O bruto reacional foi neutralizado com solução saturada de NaHCO₃ e análise do bruto por RMN revelou novamente hidrólise do éster. Novamente foi observado recuperação de baixa massa de material após a neutralização e extração, concluindo-se que, a amina obtida devia ser muito solúvel em água.

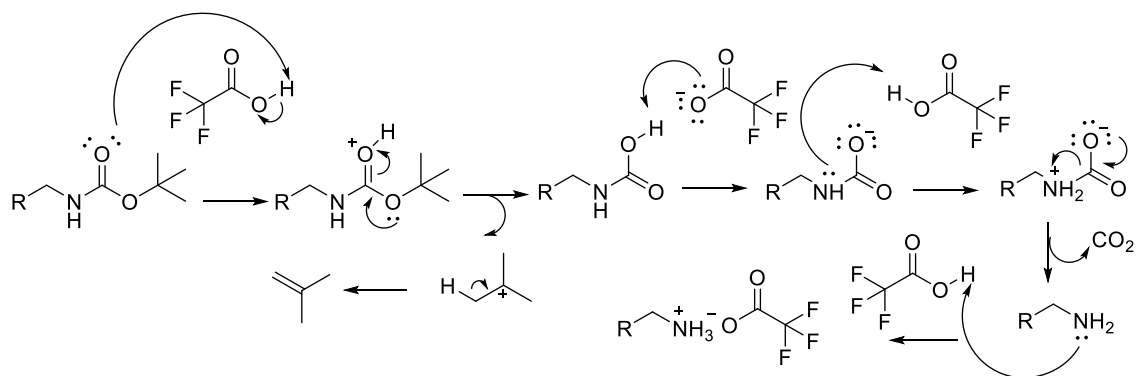
Tabela 1. Tentativas para a desproteção do éster do ácido lipoico.

Reação	Ácido	Solvente	Elaboração	Tempo (min)	OBS
I	TFA	DCM	Evaporação	720	Degradação
II	TFA	DCM	Neutralização com NaOH	50	Degradação
III	HCl	Acetato de etila	Evaporação	30	Hidrólise
IV	TFA	DCM	Neutralização com NaHCO ₃	50	Hidrólise
V	TFA	DCM	Evaporação	120	Mistura

A quinta tentativa e última foi empregada a metodologia de Wang⁴⁶ e colaboradores, em que se usa 0,5 mL de ácido trifluoroacético. O bruto da reação é apenas evaporado para a retirada de excesso de ácido. Decidiu-se que o bruto desta reação seria utilizado na próxima etapa para formação da amidina e aminoguanidina correspondente.

O mecanismo da desproteção da amina com excesso de TFA e sem a presença de água encontra-se no Esquema 6. Primeiramente a carbonila do carbamato abstrai um próton do ácido, ocorrendo em seguida a formação do ácido carbâmico e do cátion *terc*-butila, que sofre desprotonação e libera o gás isobutileno. O ácido carbâmico por meio de uma reação ácido-base sofre descarboxilação liberando a amina livre. Devido ao excesso de TFA a amina é protonada formando o sal trifluoracetato correspondente.

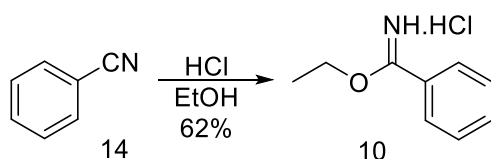
⁴⁶ Wang, Y.; El-Boubbou, K.; Kouyoumdjian, H.; Sun, B.; Huang, X.; Zeng, X. Lipoic Acid Glyco-Conjugates, a New Class of Agents for Controlling Nonspecific Adsorption of Blood Serum at Biointerfaces for Biosensor and Biomedical Applications. *Langmuir*, **2010**, 26, 4119-4125.



Esquema 6. Proposta mecanística para a desproteção com TFA, sem a presença de água no meio.

Como citado acima, considerando-se a dificuldade de obtenção da amina livre nesta etapa, a mesma não foi caracterizada e seguiu-se para a síntese das amidinas e aminoguanidinas com o sal trifluoroacetato da mesma. Como mostrado no Esquema 2 (página 33) para a síntese da amidina foi preciso sintetizar primeiramente o éster imídico **10** e para a síntese da aminoguanidina, a *S*-metiltiosemicarbazida **11**.

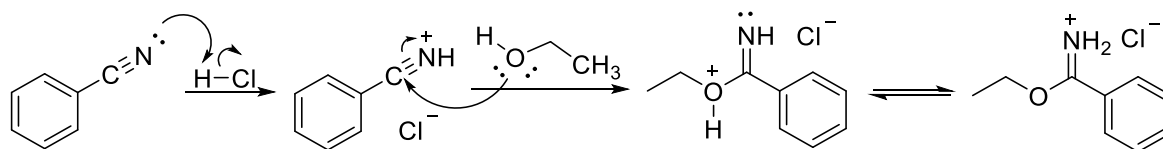
O éster imídico **10** foi sintetizado a partir da reação de Pinner, seguindo a metodologia descrita por Tang e colaboradores⁴⁷ (Esquema 7), a qual se baseia no borbulhamento por três horas de ácido clorídrico gasoso, formado *in situ* (através de um sistema acoplado ao balão que ocorre a adição de ácido sulfúrico concentrado em NaCl), em uma solução de benzonitrila em excesso de etanol. Após este tempo, a mistura reagente foi deixada no freezer e após doze horas observou-se a formação de um precipitado branco, sendo o sal cloridrato de etilbenzimidato obtido com 62% de rendimento.



Esquema 7. Formação do cloridrato de etil éster imídico **10**.

A Reação de Pinner consiste na síntese de imidatos, catalisada por ácido clorídrico, sem a presença de água no meio reagente. O mecanismo inicia-se com a abstração do próton do ácido clorídrico pelo par de elétrons do nitrogênio da nitrila, seguido pelo ataque do etanol ao carbono da nitrila ativada, acompanhado pela dupla formando o éster imídico. O prototropismo leva explica a formação do cloridrato correspondente (Esquema 8).

⁴⁷ Tang, W.; Li, H.; Poulos, L. T.; Silverman, R. B. Mechanistic Studies of Inactivation of Inducible Nitric Oxide Synthase by Amidines. *Biochemistry*, **2015**, 54, 2350-2538.



Esquema 8. Mecanismo de formação do cloridrato de éster etilímídico **10**.

O composto **10** foi caracterizado por espectrometria de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H , como mostrado na Figura 24 (página 47), o tripleto em δ 1,58 ppm ($J_{1,2} = 7\text{Hz}$) refere-se ao hidrogênio do grupo metila que acopla com os hidrogênios metilênicos, cujo sinal aparece como um quarteto em δ 4,60 ppm ($J_{2,1} = 7\text{Hz}$). Na região dos aromáticos foi possível atribuir os sinais através da análise do mapa de correlação COSY, disponível no Anexo (página 104). Assim o multipletto entre δ 7,58-7,66 ppm é referente a H5, o multipletto entre δ 7,77-7,85 ppm é referente ao H6, e o dupletto em δ 7,96 ppm ($J_{4,5} = 8\text{Hz}$) é referente ao H4.

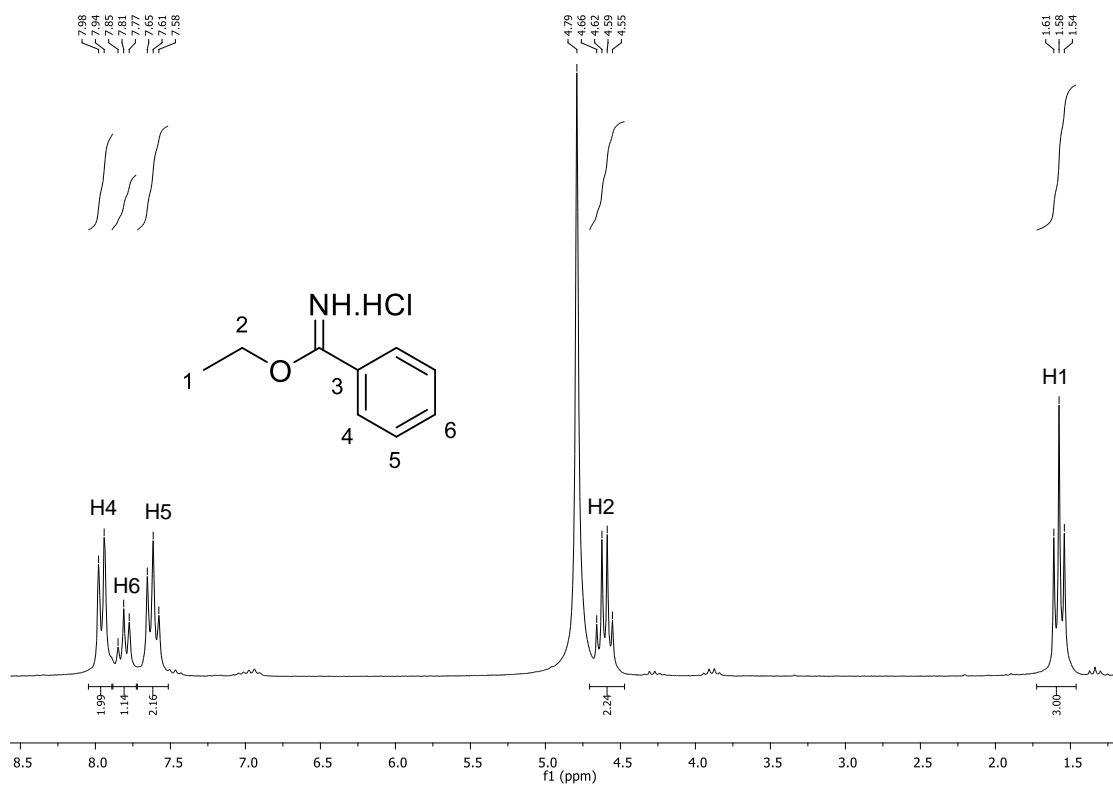


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H do composto **10** (200 MHz, D_2O).

O espectro de RMN de ^{13}C do composto **10** (Figura 25) apresenta sete sinais. O primeiro em δ 13,5 ppm é referente ao carbono metílico, o sinal em δ 70,8 ppm é

referente ao C2. O sinal em δ 125,9 ppm é referente ao carbono *ipso* do anel aromático, os sinais em δ 129,3 e 130,0 ppm são dos carbonos aromáticos C3-C4 e C6-C7 e o sinal em δ 136,5 ppm é o carbono aromático C5. O sinal em δ 173,5 ppm é referente à imina, comprovando que a reação ocorreu.

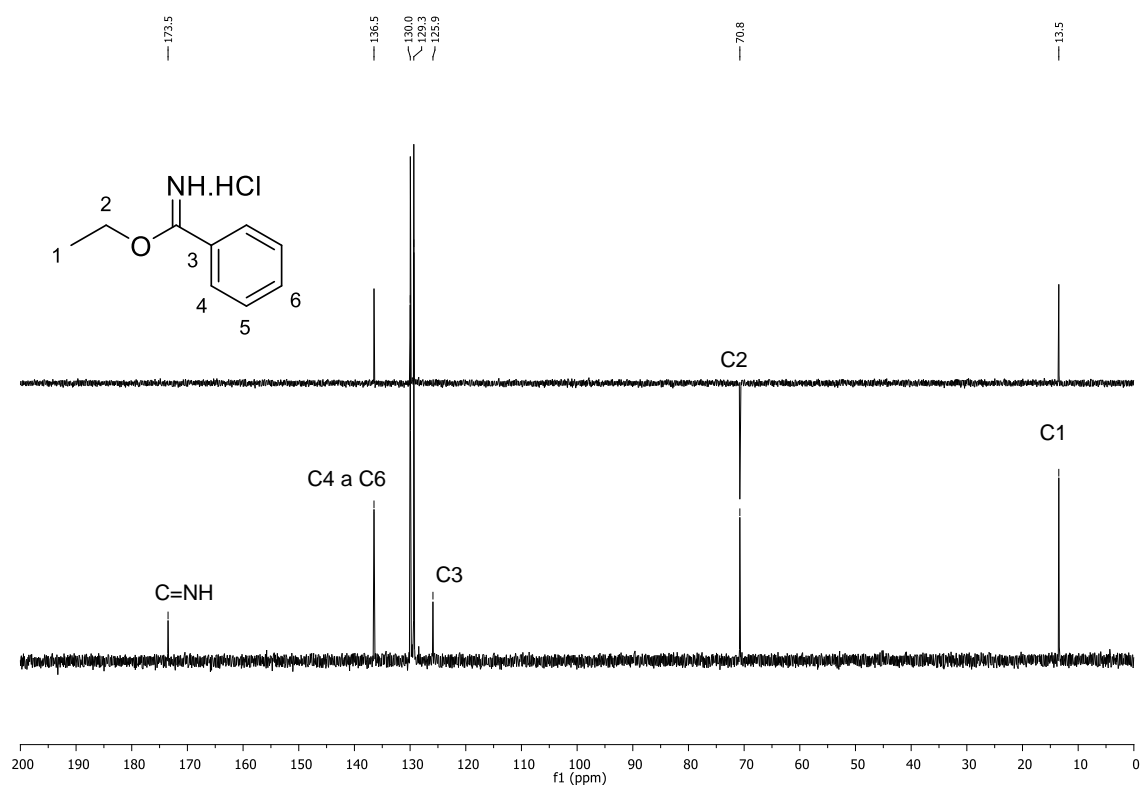


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **10** (100 MHz, D_2O).

No espectro na região do Infravermelho (Figura 26) a banda em 1626 cm^{-1} é característica do estiramento $\text{C}=\text{NH}$, comprovando a formação do éster imídico. A banda em 1715 cm^{-1} também comprova a formação do éster imídico sendo esta referente ao contribuinte de ressonância mostrado no Esquema 9 e contendo uma ligação dupla carbono-oxigênio.

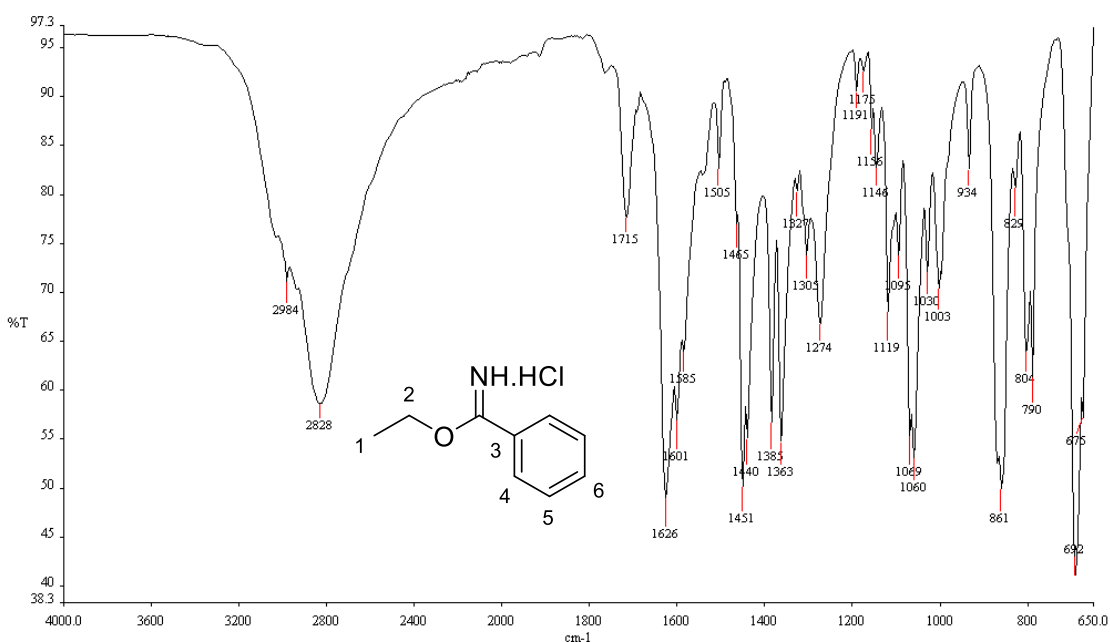
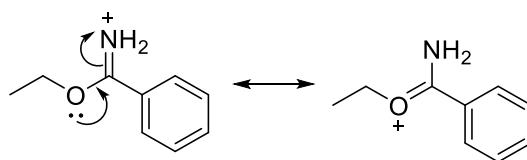
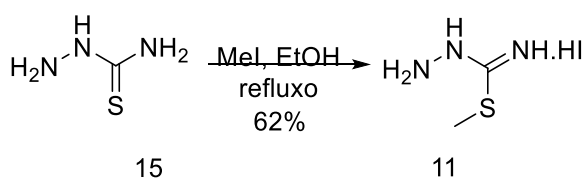


Figura 26. Espectro na região do IV (ATR) do composto **10**.



Esquema 9. Contribuintes de ressonância para o composto **10**.

A *S*-metiltiosemicarbazida **11** foi sintetizada através de uma reação de metilação envolvendo a tiosemicarbazida comercial e o iodeto de metila⁴⁸ (Esquema 10). A uma solução etanólica de tiosemicarbazida mantida a 70° C, adicionou-se o iodeto de metila e a mistura da reação foi deixada sob refluxo por quarenta e cinco minutos. O bruto da reação foi deixado resfriando no congelador por doze horas obtendo-se assim um precipitado branco. O precipitado foi filtrado a vácuo e obteve-se o iodidrato de *S*-metiltiosemicarbazida **11** com 62% de rendimento.

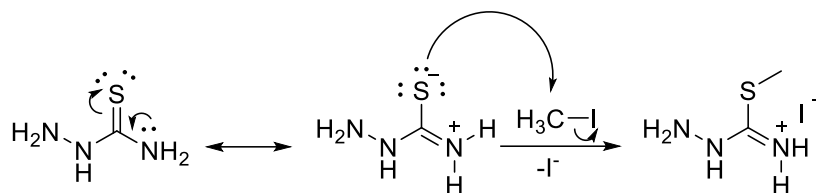


Esquema 10. Formação do iodidrato de *S*-metiltiosemicarbazida **11**.

O mecanismo da reação de metilação inicia-se com a ressonância da dupla ligação do tio para a amina formando o tiol correspondente (Esquema 11). O par de

⁴⁸ Prakash, G.; Manikandan, R.; Viswanathamurthi, P.; Velmurugan, K.; Nandhakumar, R. Ruthenium (III) *S*-methylthiosemicarbazone Schiff base complexes bearing PPH₃/AsPh₃ coligand: Synthesis, structure and biological investigations, including antioxidant, DNA and protein interaction, and in vitro anticancer activities. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **2014**, 138, 63-74.

elétrons do tiol ataca o carbono do iodeto de metila liberando o iodeto e formando a S-metiltiosemicarbazida na forma de sal iodidrato (Esquema 11).



Esquema 11. Proposta mecanística da formação do iodidrato de S-metiltiosemicarbazida.

A S-metiltiosemicarbazida foi caracterizada por espectrometria de RMN de ^1H , de ^{13}C e por espectrometria na região do Infravermelho. No espectro de RMN de ^1H mostrado na Figura 27 há apenas um sinal em $\delta 2,71$ ppm referente à metila, comprovando que a reação de metilação ocorreu. Devido ao uso de D_2O como solvente, no espectro não aparecem os sinais dos hidrogênios das aminas. O espectro de RMN de ^{13}C do composto **11** (Figura 28, página 51) apresenta dois sinais, o primeiro em $\delta 13,4$ ppm referente à metila e o segundo em $\delta 170,7$ ppm referente ao carbono da imina.

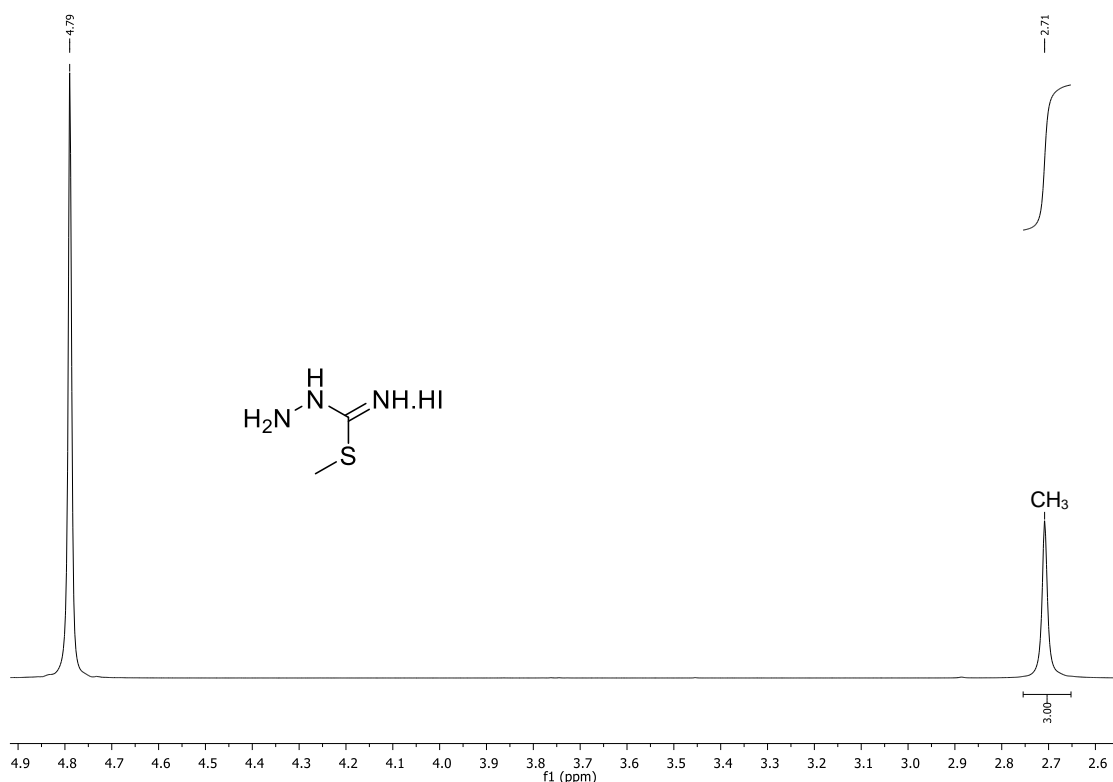


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto **11** (400 MHz, D_2O).

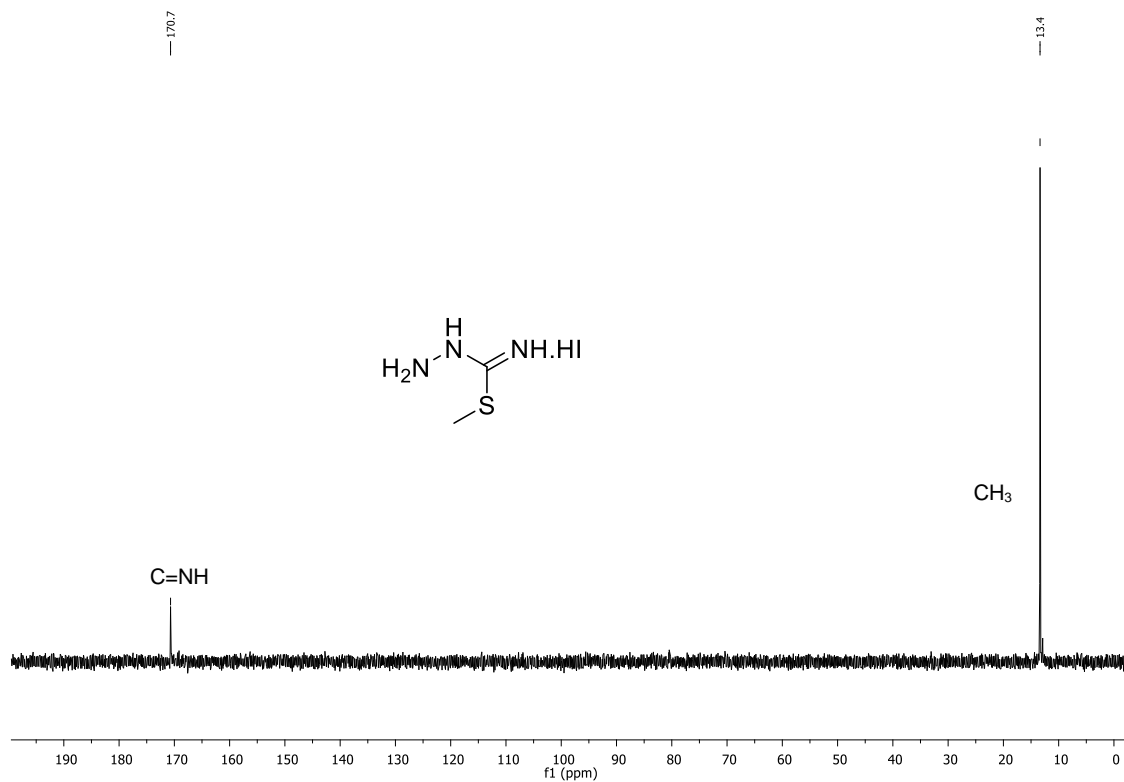


Figura 28. Espectro de RMN de ¹³C do composto 11 (100 MHz, D₂O).

No espectro na região do Infravermelho do composto 11 a banda em 1614 cm⁻¹ é característica do estiramento C=NH, comprovando também que a reação ocorreu (Figura 29).

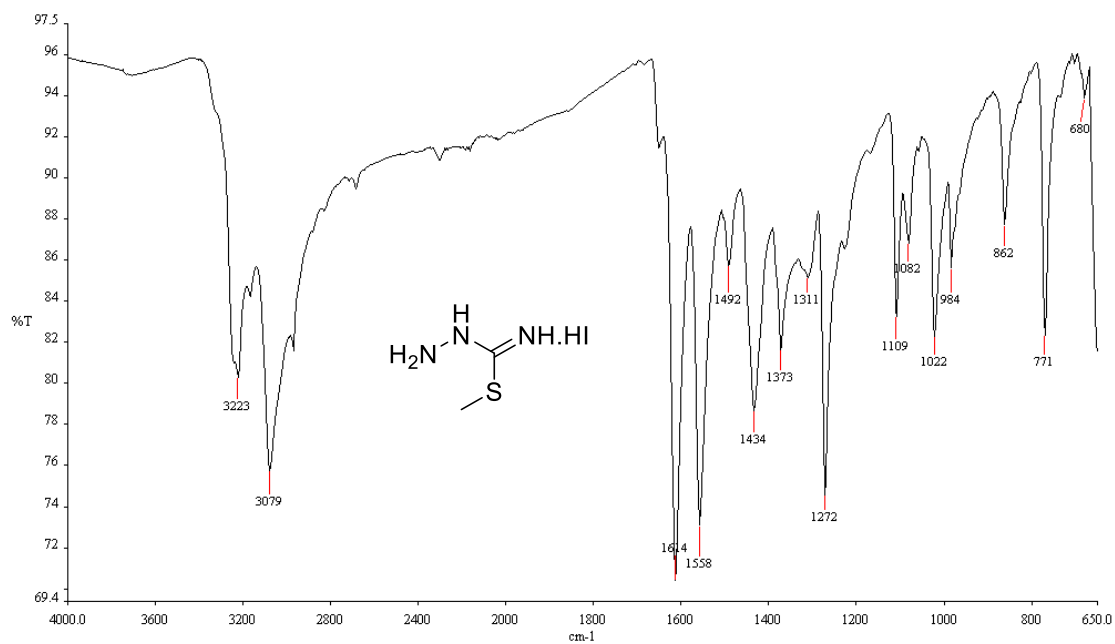
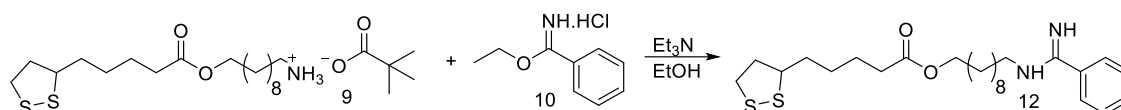


Figura 29. Espectro na região do IV (ATR) do composto 11.

Como citado anteriormente, considerando as dificuldades encontradas para se isolar a amina na forma de sua base livre após a desproteção do grupo carbamato (Esquema 2, página 33) optou-se pelo prosseguimento da rota sintética com o sal trifluoroacetato **9** na presença de trietilamina (Esquema 12). Diversas reações foram testadas nesta etapa do trabalho, variando-se a quantidade de trietilamina adicionada (1-5 equivalentes), o tempo reacional (de 2 a 24 horas), o solvente (metanol ou etanol) e a temperatura (ambiente e refluxo). O melhor resultado encontrado foi aquele em que se usou 5 equivalentes de trietilamina.



Esquema 12. Síntese da amidina **12** na presença de trietilamina.

Na reação para formação da amidina **12** usando excesso de trietilamina pode ocorrer a formação de pelo menos quatro sais diferentes: o sal trifluoroacetato de trietilamina, o trifluoroacetato de amidina, o cloridrato de trietilamina e o cloridrato de amidina (Figura 30). A extração do tipo ácido-base na elaboração da reação não foi uma alternativa, devido ao fato da amidina ficar solúvel na fase aquosa e da possível hidrólise do éster, que havia sido observada em reações anteriores. Há vários exemplos na literatura para a separação por recristalização, mas nenhum solvente utilizado conseguiu precipitar apenas um sal, mostrando que o produto e os sais de trietilamina apresentam polaridades parecidas. Como o produto é um sal bastante polar sua purificação em coluna cromatográfica também não foi possível. Optou-se pelo uso de coluna de fase reversa C18 e purificação por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). O método inicial escolhido foi o de Jamali e colaboradores,⁴⁹ onde o uso de um gradiente de acetonitrila e água com 0,1% de TFA tornou possível a separação da amidina. Entretanto o método descrito no artigo não foi adequado para purificação do composto obtido neste trabalho e nenhuma outra variação deste permitiu a obtenção do composto **12** puro, na qual a trietilamina coeluiu com o produto e esteve presente em todas as frações isoladas nas tentativas de purificação por CLAE.

Colunas filtrantes com a fase estacionária básica, como bicarbonato de sódio, carbonato de amônia e metóxido de sódio também foram usadas, além de colunas de troca iônica, mas todos os métodos não levaram à obtenção da amidina **12** pura.

⁴⁹ Jamali, H.; Khan, H. A.; Stringer, J. R.; Chowdhury, S.; Ellman, J. A. Identification of Multiple Structurally Distinct, Nonpeptidic Small Molecule Inhibitors of Protein Arginine Deiminase 3 Using a Substrate-Based Fragment Method. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 3616–3621.

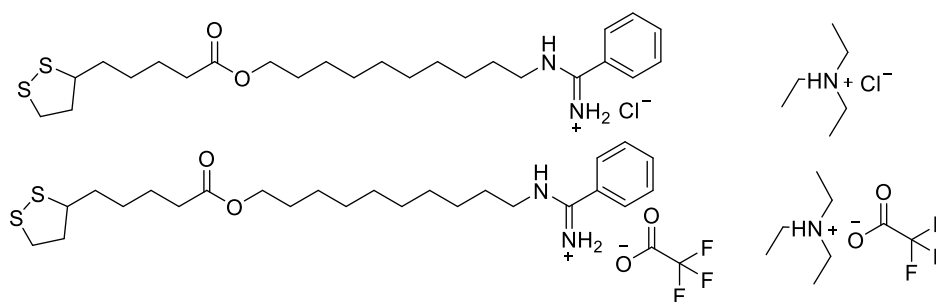
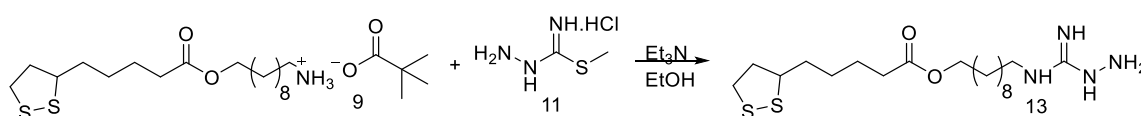


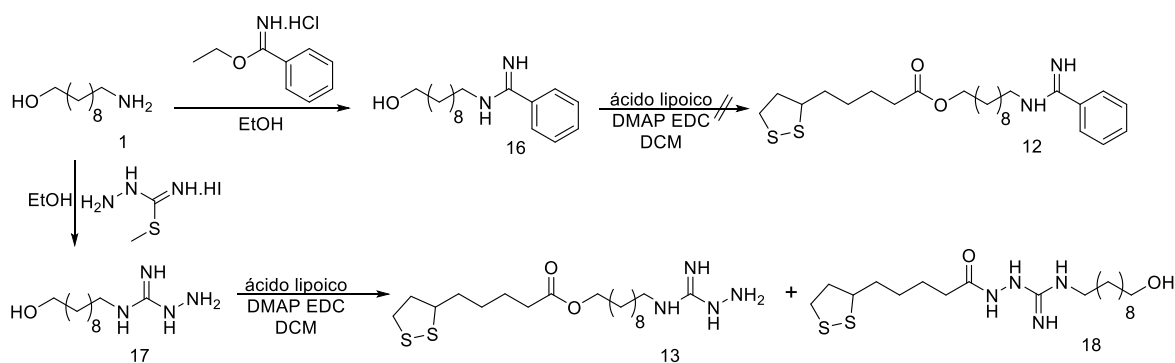
Figura 30. Possíveis sais formados na reação de formação da amidina **12**.

O mesmo tipo de problema ocorreu para a obtenção da aminoguanidina **13**, Esquema 13. Embora tenha sido observado o odor característico de metil mercaptana durante a reação, o que seria um forte indicativo de que a reação estivesse ocorrendo, após remoção do solvente e análise por RMN de ^1H do bruto da reação, foi verificada a presença de uma grande quantidade de sal de trietilamina, que não puderam ser separados do composto de interesse possivelmente formado.



Esquema 13. Síntese da amidina **13** na presença de trietilamina.

Considerando as grandes dificuldades encontradas nesta etapa, sugeriu-se a mudança da rota de síntese. Pensou-se em inicialmente preparar a amidina **16** ou a aminoguanidina **17** a partir do espaçador **1**, seguido pela posterior esterificação com ácido lipoico (Esquema 14). A estratégia baseava-se na diferença de nucleofilia entre os grupos amino e álcool.



Esquema 14. Nova rota proposta para a síntese da amidina **12** e aminoguanidina **13**.

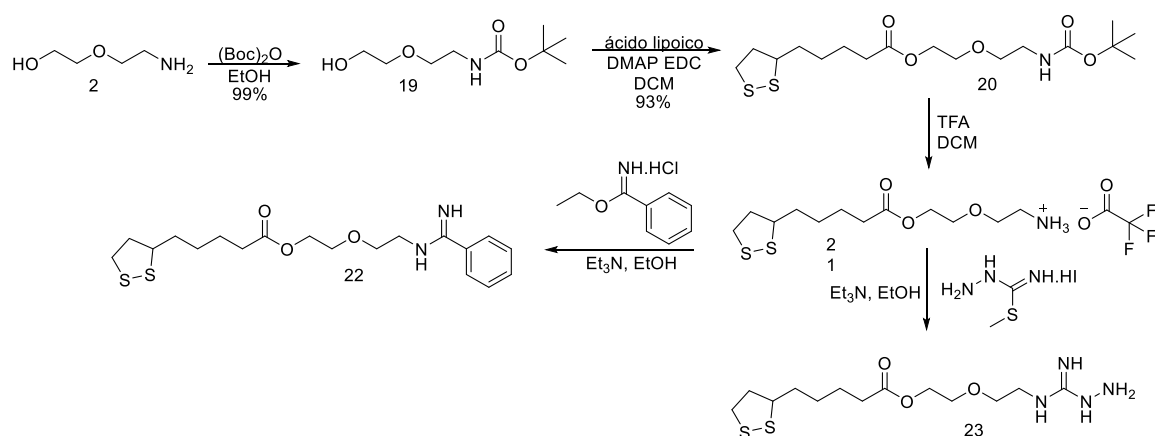
Foi possível sintetizar a amidina **16** pela metodologia de Arstad⁵⁰ e a aminoguanidina **17** pela metodologia de Sekutor e colaboradores,⁵¹ na qual a reação é feita em refluxo de etanol. No acoplamento com o ácido lipoico seguiu-se a mesma metodologia anterior de Chen,⁴³ mas análise por RMN das frações obtidas por coluna cromatográfica mostrou a obtenção de misturas complexas de produtos. No caso da aminoguanidina, um dos subprodutos foi resultante da formação da amida do lipoico **18** com a amina livre do grupo hidrazina, como mostrado no

Esquema 14. Nova rota proposta para a síntese da amidina **12** e aminoguanidina **13**.

Devido à alta polaridade dos produtos não foi possível à separação em coluna cromatográfica. Na reação de esterificação com amidina não foi observado o acoplamento. Devido ao insucesso da sequência, esta rota foi abandonada.

3.1.2 Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador **2**

A rota sintética para a obtenção da amidina **22** e aminoguanidina **23** contendo o espaçador **2** é constituída por quatro etapas e está representada no Esquema 15.



Esquema 15. Rota sintética para a obtenção da amidina **22** e aminoguanidina **23**.

A primeira etapa consiste na proteção do grupo amina do aminoálcool **2**. Apesar de apresentar uma cadeia alifática similar à do espaçador **1**, o uso da mesma metodologia utilizada anteriormente (emprego do dicarbonato de terc-butila e trietilamina) não foi satisfatório, devido ao baixo rendimento (42%) obtido para o composto **19** e à necessidade de purificação por formação de subproduto. Devido a

⁵⁰ Arstad, E.; Platzer, S.; Berthele, A.; Pilowsky, L. S.; Luthra, S. K.; Wester, H.; Henriksen, G. Towards NR2B receptor selective imaging agents for PET—synthesis and evaluation of N-[¹¹C]-(2-methoxy)benzyl (E)-styrene-, 2-naphthyl- and 4-trifluoromethoxyphenylamidine. *Bioorg. & Med. Chem.*, **2006**, 14 6307–6313.

⁵¹ Sekutor, M.; Stimac, A.; Mlinarić-Majerski, A.; Frkanec, R. Syntheses and characterization of liposome-incorporated adamantyl aminoguanidines. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 6005–6013.

estes problemas, foi empregada a metodologia de Singh e colaboradores,⁵² que não faz uso de trietilamina. O *terc*-butilcarbamato **19** foi obtido com 99% de rendimento com o uso de BOC e etanol como solvente a 0°C.

O produto foi caracterizado por espectrometria de RMN de ¹H e, como mostrado na Figura 31, o espectro apresenta um simpleto em δ 1,45 ppm integrado para nove hidrogênios referente às metilas do *terc*-butila. Os multipletos entre δ 3,29-3,34 ppm integrado para dois hidrogênios, entre δ 3,53-3,60 ppm para quatro hidrogênios e entre δ 3,71-3,76 ppm integrado para dois hidrogênios são referentes aos núcleos H4, H2-H3 e H1, respectivamente.

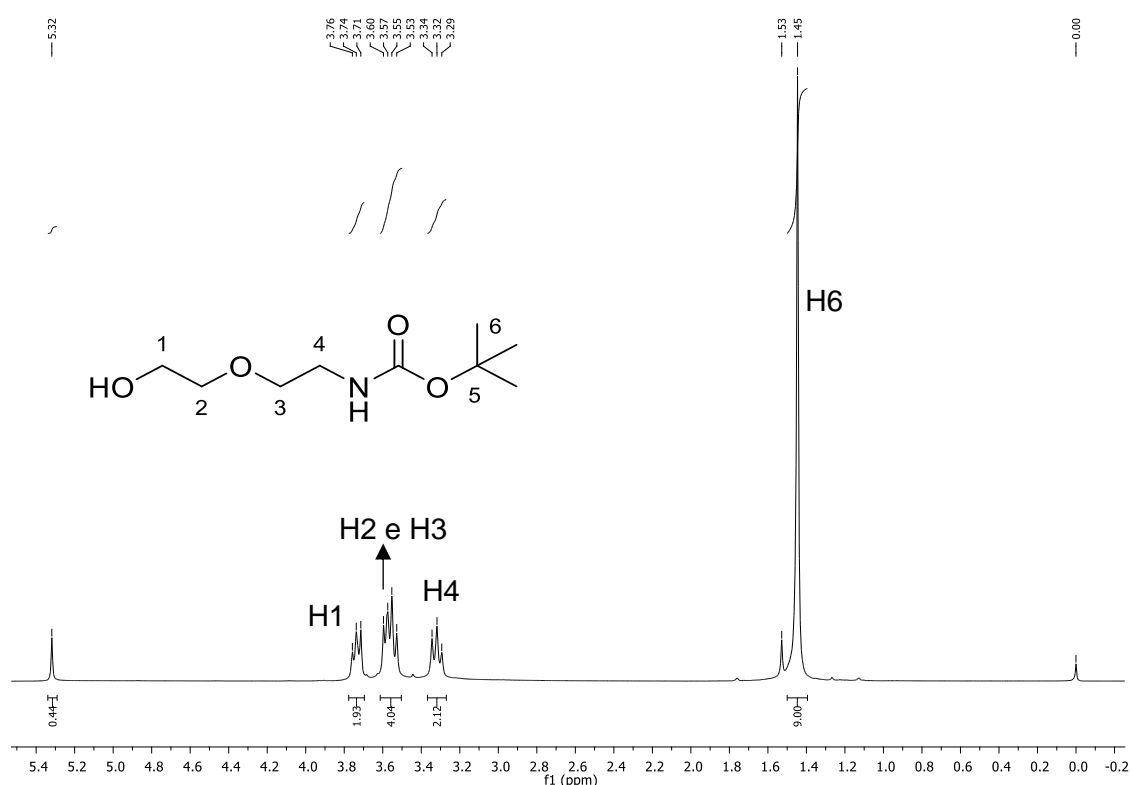


Figura 31. Espectro de RMN de ¹H do composto **19** (200 MHz, CDCl₃).

A segunda etapa consistiu na esterificação com o ácido lipoico e foi empregada a mesma metodologia discutida anteriormente para o composto **8** (Esquema 2, página 33) e obteve-se o éster **20** com 93% de rendimento. A caracterização e elucidação estrutural do composto **20** foram feitas por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, ¹³C, DEPT e obtenção de mapas de correlação COSY e HSQC.

A atribuição dos sinais dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C do composto **20** foi feita com base no mesmo raciocínio usado anteriormente para o composto **8**, sendo a

⁵² Singh, V.; Wang, S.; Kool, E. T. Genetically Encoded Multispectral Labeling of Proteins with Polyfluorophores on a DNA Backbone. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 6184-6191.

única diferença a cadeia do *linker*. Assim, pelo espectro de RMN de ^1H , Figura 32, o multipletto integrado para dois hidrogênios entre $\delta 4,21-4,23$ ppm corresponde ao H8, o multipletto entre $\delta 3,65-3,67$ ppm ao H9, aquele entre $\delta 3,53-3,55$ ppm ao H10 e o multipletto entre $\delta 3,30-3,32$ ppm ao H11. O multipletto entre $\delta 1,42-1,54$ ppm refere-se aos hidrogênios do grupo *terc*-butila cujo o sinal está sobreposto ao sinal do H5 do ácido lipoico. Os demais espectros para essa substância encontram-se no Anexo (página 107).

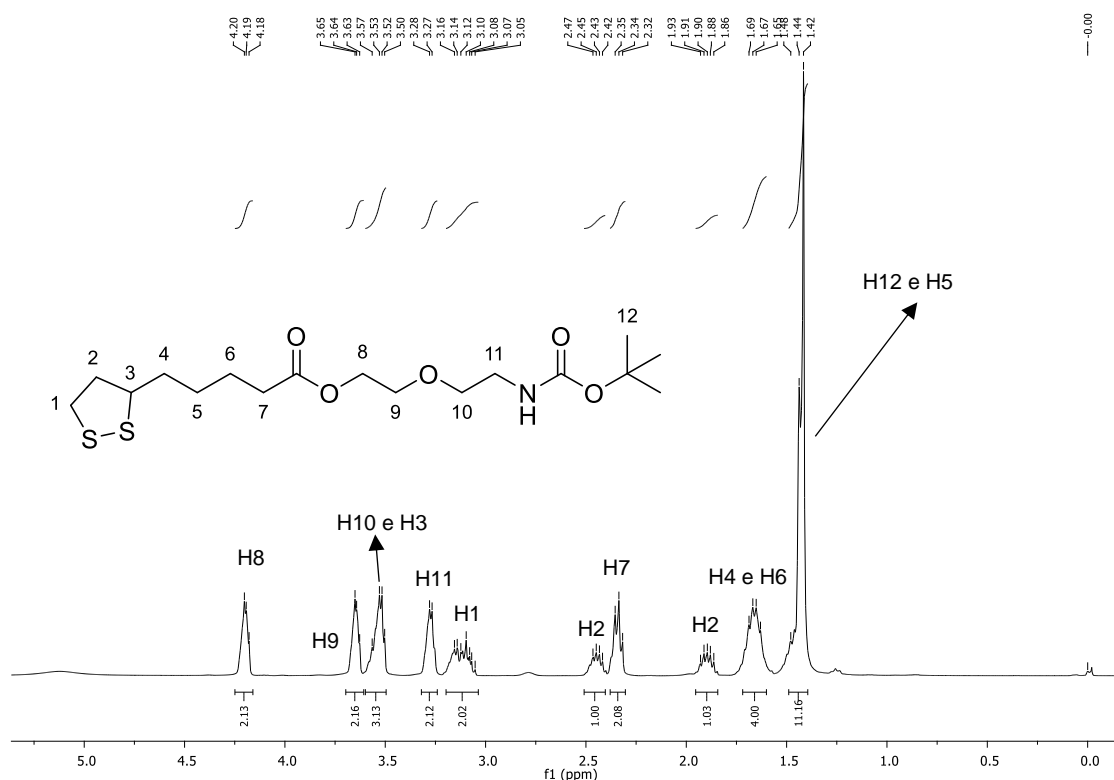


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do composto **20** (400 MHz, CDCl_3).

A terceira etapa consistiu na desproteção do grupo amino e seguiu-se a mesma metodologia empregada para o espaçador **1** ou seja, uso de excesso de ácido trifluoroacético, seguido de evaporação, ao final da reação, do excesso de reagente e prosseguimento da rota para obtenção da amidina **22** e da aminoguanidina **23** (Esquema 15, página 54) na presença de excesso de trietilamina. A formação dos derivados de amidina **22** e aminoguanidina **23** foram comprovadas por espectrometria de massas, mas como longamente discutido anteriormente, também não foi possível a purificação dos compostos **22** e **23**. No espectro de massas com ionização por eletrospray modo positivo (ESI+) mostrado na Figura 33, verifica-se a presença do pico do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ da amidina **22** com m/z de 397,1617 apresentando um erro de 0,50 ppm em relação ao valor calculado (m/z 397,1619). No espectro de massas com ionização por eletrospray modo positivo (ESI+), Figura 34, observou-se a presença do

pico do íon molecular $[M+H]^+$ da aminoguanidina **23** com m/z de 351,1503 apresentando um erro de 5,98 ppm em relação ao valor calculado (m/z 351,1524).

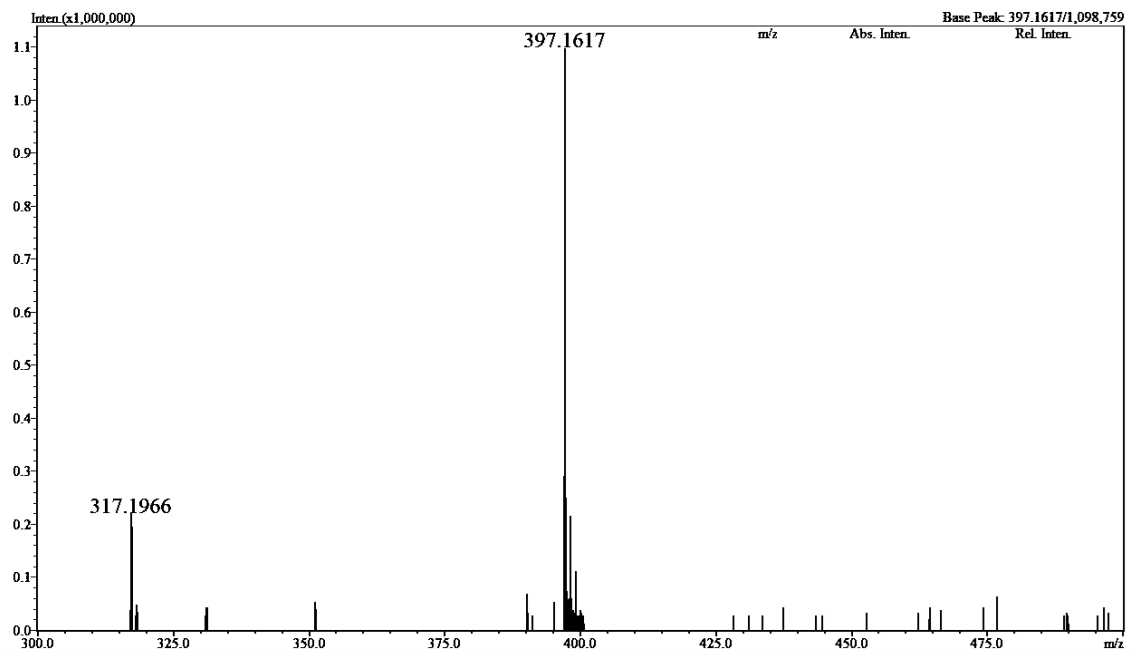


Figura 33. Espectro de massas do bruto da reação contendo a amidina **22** (ESI+).

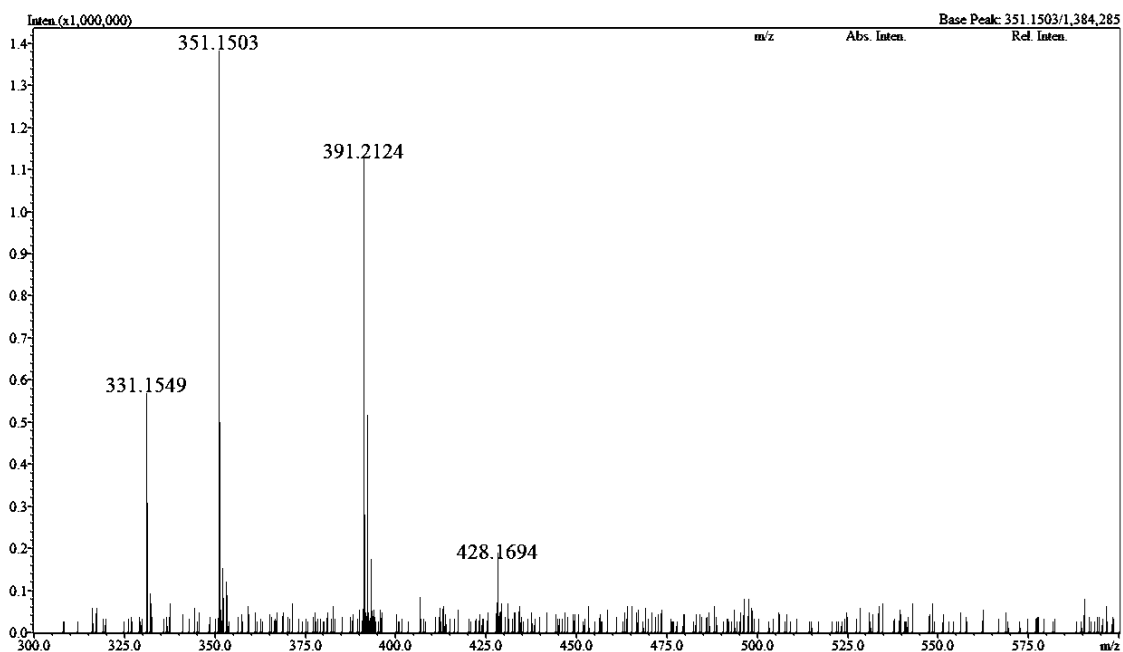
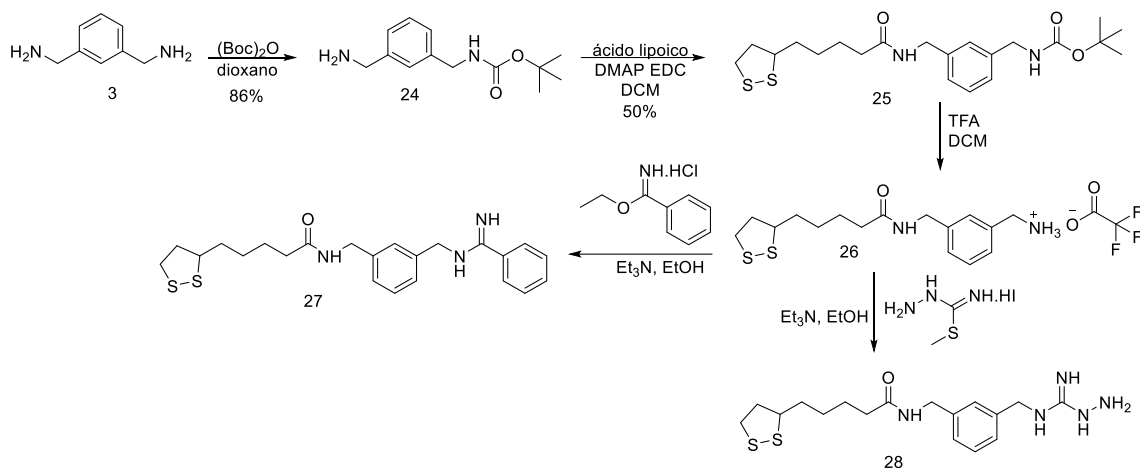


Figura 34. Espectro de massas do bruto da reação contendo a aminoguanidina **23** (ESI+).

3.1.3 Rota para a síntese dos derivados contendo o espaçador 3

A rota sintética para a obtenção da amidina **27** e aminoguanidina **28** contendo o espaçador **3** é constituída por quatro etapas e está representada no Esquema 16.



Esquema 16. Rota sintética para a obtenção da amidina **27** e aminoguanidina **28**.

A primeira etapa consistiu na monoproteção do grupo amina da diamina comercial **3** e revelou-se um grande desafio, devido ao fato das reações resultarem sempre em uma mistura de compostos mono, bis e não protegido, de difícil separação. Assim, após diversas tentativas onde variou-se o número de equivalentes, o tempo de reação, o solvente e não se obtinha bons resultados, aquela que resultou em aplicabilidade sintética neste trabalho foi a metodologia usada por Barton e colaboradores.⁵³ Assim, o uso de excesso de amina e a adição lenta de uma solução diluída de dicarbonato de di-*terc*-butila em dioxano a 0°C favoreceu a formação do produto monoprotetido. A elaboração da reação também é crucial para retirar o material de partida, pois não é possível a purificação por cromatografia em coluna, devido ao produto ficar retido e degradar. Assim, para isolar o produto desejado puro, a fase orgânica foi lavada exaustivamente com água para se obter o composto **24** com a menor quantidade possível de diamina de partida.

O espectro de RMN de ¹H do carbamato **24**, mostrado na Figura 35, apresenta o simpleto em δ 1,46 ppm integrado para nove hidrogênios referente as metilas do *terc*-butila, confirmando a monoproteção. O simpleto em δ 3,84 ppm, integrado para dois hidrogênios, e o multipletto entre δ 4,29-4,60 ppm, para dois hidrogênios, são referentes aos hidrogênios H8 e H1, respectivamente, A diferença de deslocamento do sinal

⁵³ Barton, V.; Ward, A. S.; Chadwick, J.; Hill, A.; O'Neill, P. M. Rationale Design of Biotinylated Antimalarial Endoperoxide Carbon Centered Radical Prodrugs for Applications in Proteomics. *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 4555-4559.

correspondente aos hidrogênios metilênicos é uma comprovação que a reação realmente ocorreu em apenas um dos grupos amino. Os multipletos na região dos aromáticos, entre $\delta 7,14-7,22$ ppm, integrado para três hidrogênios e entre $\delta 7,24-7,30$ ppm, integrado para um hidrogênio, são referentes aos hidrogênios aromáticos H3-H5 e H7, respectivamente. O simpleto em $\delta 3,68$ ppm, observado no espectro, corresponde ao dioxano usado como solvente na reação.

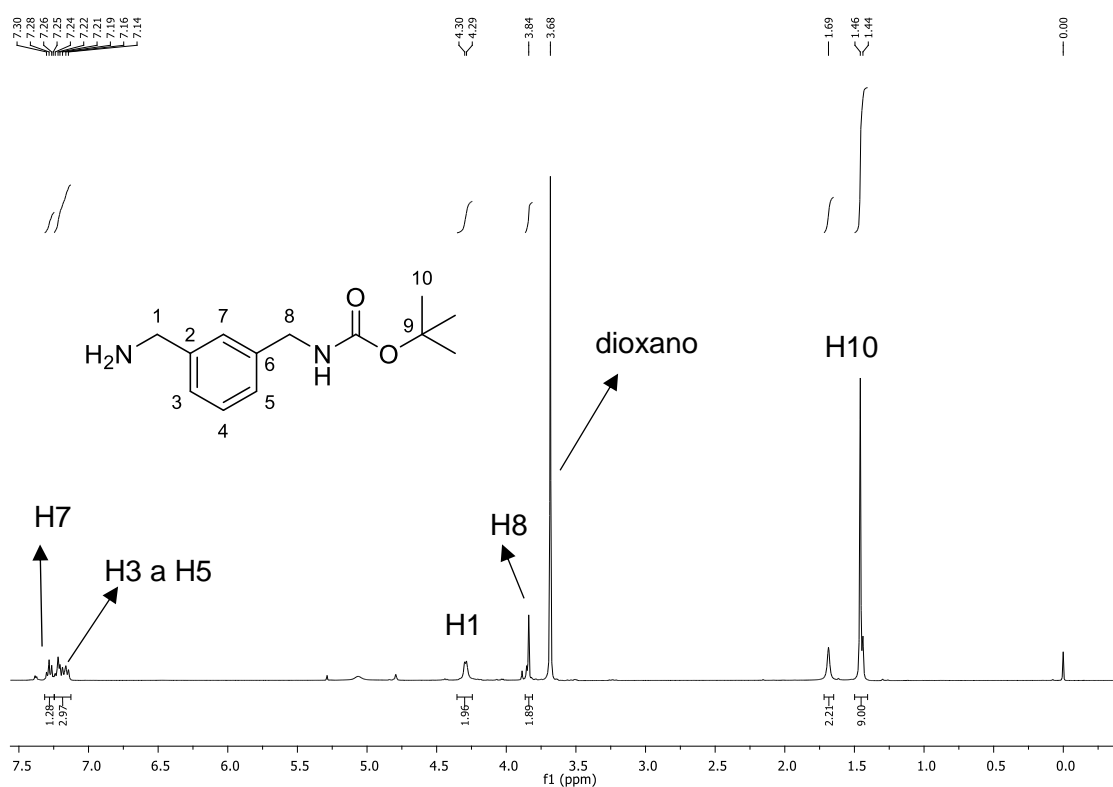


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do composto **24** (400 MHz, CDCl_3)

A segunda etapa consistiu na formação da amida com o ácido lipoico e foi empregada a mesma metodologia do composto **8** (Esquema 2, página 33), obtendo-se a amida **25** com 50% de rendimento.

Os espectros do composto **25** encontram-se no Anexo (página 109) e a atribuição dos sinais nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e nos mapas de correlação COSY e HSQC seguiu o mesmo raciocínio usado para a caracterização estrutural do composto **8** (página 40). Pelo espectro de RMN de ^1H , Figura 36, os hidrogênios da cadeia do *linker* correspondem ao simpleto em $\delta 4,27$ ppm, integrado para dois hidrogênios, referente ao sinal dos H15 e o multiplete entre $\delta 4,39-4,40$ ppm, integrado para dois hidrogênios, referente a H8. Os sinais dos hidrogênios na região dos aromáticos, multiplete entre $\delta 7,16-7,19$ ppm, integrado para três hidrogênios, e

multiplete entre δ 7,27-7,31 ppm, integrado para um hidrogênio, são referentes aos hidrogênios aromáticos H10-H12 e H14, respectivamente.

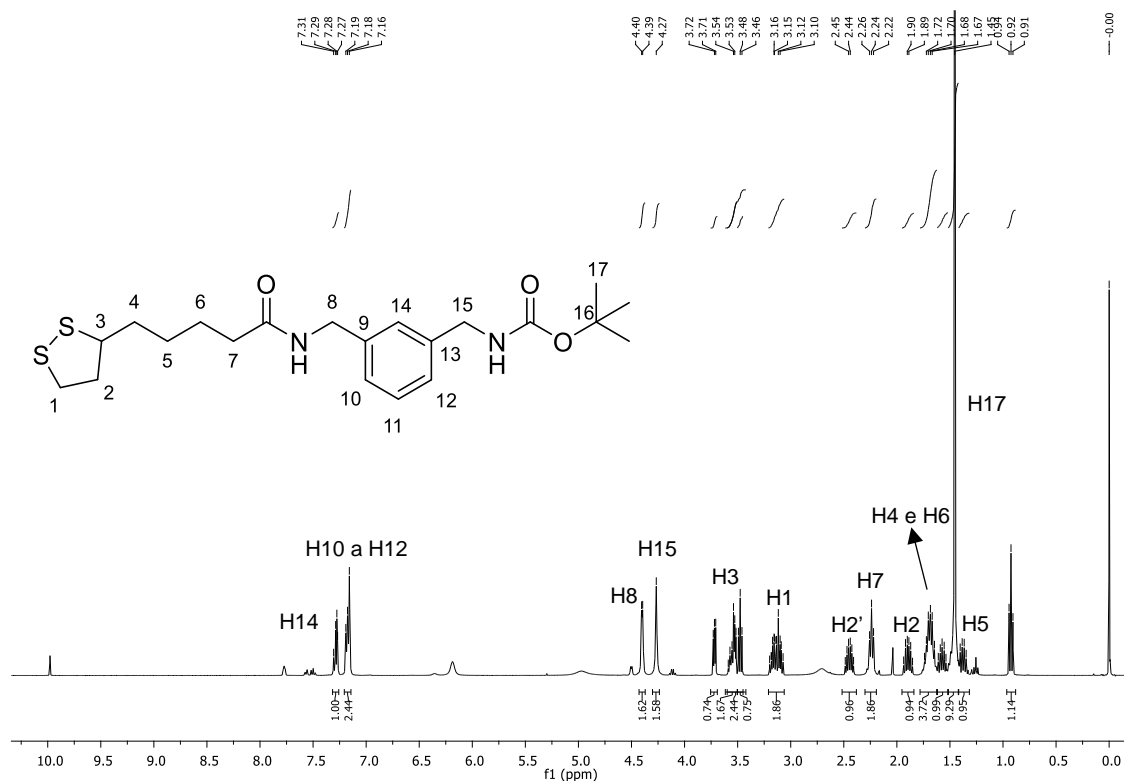


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do composto **25** (400 MHz, CDCl_3).

A terceira etapa foi a desproteção do composto **25** que foi descrita anteriormente e enfrentou os mesmos problemas já discutidos. A mistura de sais não permitiu o isolamento dos produtos desejados **27** e **28**, até o momento. A formação da amidina **27** foi verificada pela análise do espectro de massas obtido por ionização por eletrospray modo negativo (ESI-) mostrado na Figura 37, com a presença do pico do ânion $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ com m/z de 462,1422 apresentando um erro de 4,11 ppm em relação ao valor calculado (m/z 462,1441).

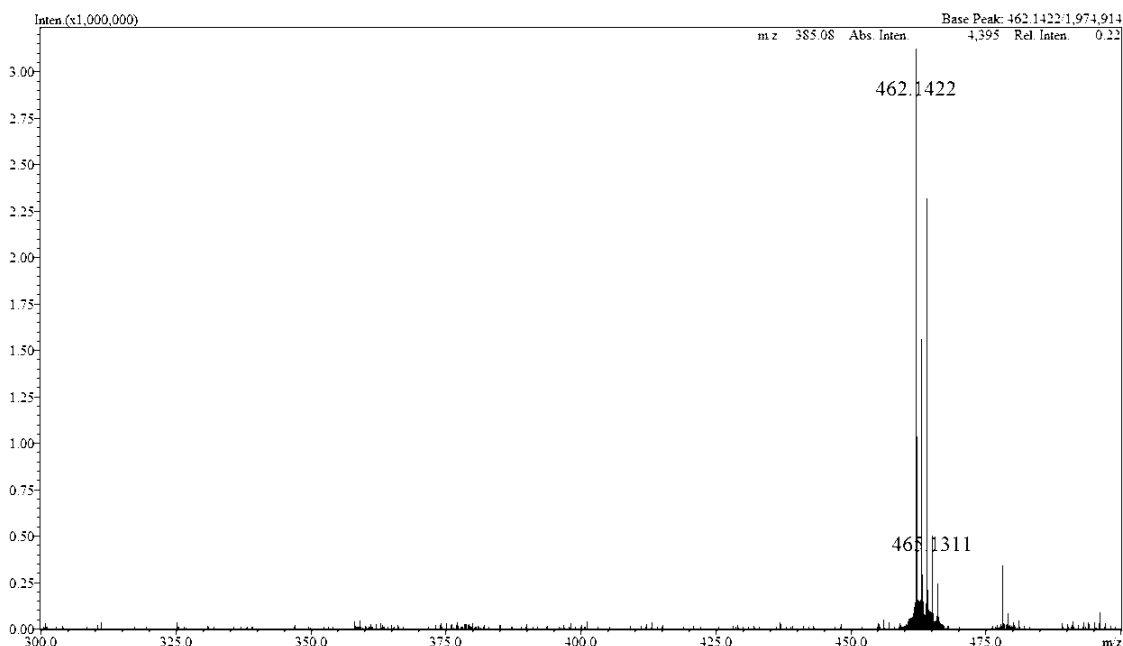
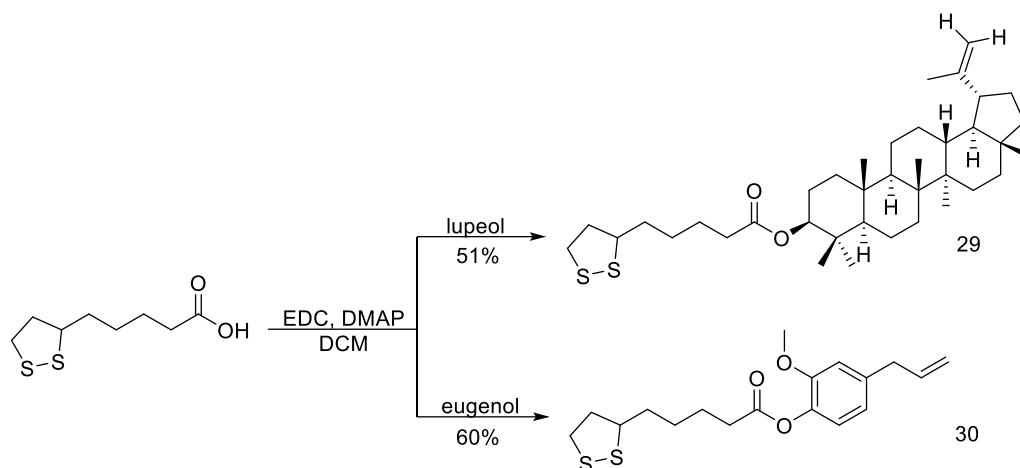


Figura 37. Espectro de massas do bruto da reação contendo a amidina **27** (ESI-).

3.2 Síntese de derivados ésteres, amida e diamida do ácido lipoico com produtos naturais e análogos

3.2.1 Síntese de ésteres de produtos naturais

Dentre os produtos naturais escolhidos para serem acoplados ao ácido lipoico nesta etapa do trabalho estavam compostos relativamente abundantes, disponíveis e que, como citados na introdução deste trabalho, já tiveram potencial antiglicante relatado na literatura. Assim, os ésteres foram sintetizados em apenas uma etapa, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, de Chen e colaboradores.⁴³ Nesta parte do trabalho foi possível sintetizar dois ésteres inéditos, sendo um derivado do lupeol **29** e um do eugenol **30**, com 51% e 60% de rendimento, respectivamente (Esquema 17). Os dois ésteres foram purificados em coluna e nos dois casos foi possível recuperar parte do material de partida que não se converteu totalmente em produto. O lupeol utilizado foi cedido pela professora Lucienir Pains Duarte e o eugenol empregado foi o produto comercial.



Esquema 17. Síntese dos ésteres de lupeol e eugenol (produtos naturais).

A caracterização do éster do triterpeno foi feita por RMN de ^1H e de ^{13}C , em que seus sinais foram comparados com o espectro do material de partida disponível no Anexo (página 111). No espectro de RMN de ^1H do composto **29**, mostrado na Figura 38 (página 63), podemos identificar os sinais de alguns hidrogênios, como os dois simpletos em δ 4,69 ppm e δ 4,57 ppm, integrados para um hidrogênio cada e que são referentes aos hidrogênios olefínicos H22 e H23 do triterpeno. O multipletto entre δ 4,45-4,50 ppm, integrado para um hidrogênio, é referente ao H8 que apresenta deslocamento diferente no lupeol (3,08-3,12 ppm), sendo que essa diferença comprova a formação do éster. No espectro também foi possível identificar sinais referentes ao ácido lipoico, como o multipletto entre δ 3,53-3,60 ppm, integrado para um hidrogênio, referente ao H3, além dos multiplettos entre δ 3,19-3,10 ppm, integrado para dois hidrogênios, referente a H1 e o entre δ 2,48-2,29 ppm, referente a H2, H7 e H19. Os outros sinais no espectro são referentes aos hidrogênios metilênicos e metílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C , mostrado na Figura 39 (página 63), o sinal da carbonila do éster em δ 174,5 ppm comprova que a esterificação ocorreu. Neste trabalho não foi possível realizar a atribuição completa de todos os sinais do espectro de ^{13}C do composto **29**. Alguns sinais identificados são: o sinal em 152,2 ppm referente ao carbono não hydrogenado olefínico do lupeol (C19); o sinal em 110,6 ppm referente ao carbono olefínico (C21); e o sinal em 82,1 ppm, referente ao carbono do lupeol ligado ao éster formado (C8). O sinal do carbono C8 no composto **29** apresenta um deslocamento maior que o observado no espectro de RMN de ^{13}C do lupeol (79,3 ppm) e é também uma comprovação que ocorreu a formação do éster.

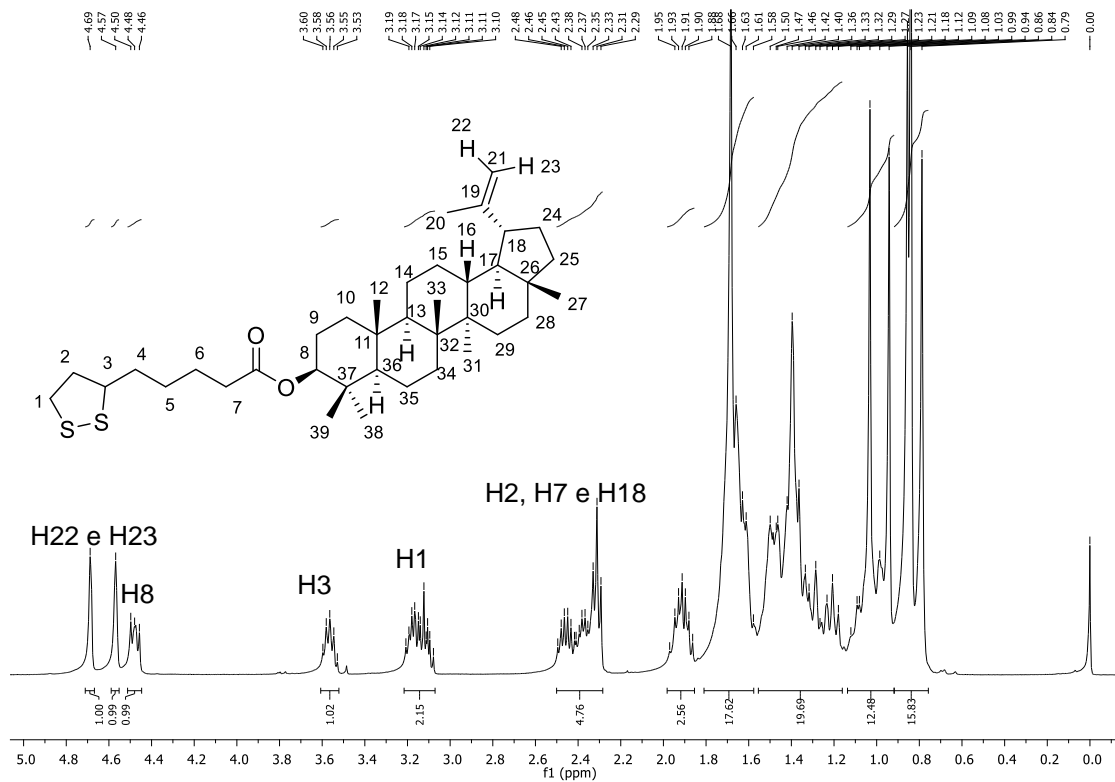


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H do composto **29** (400 MHz, CDCl_3).

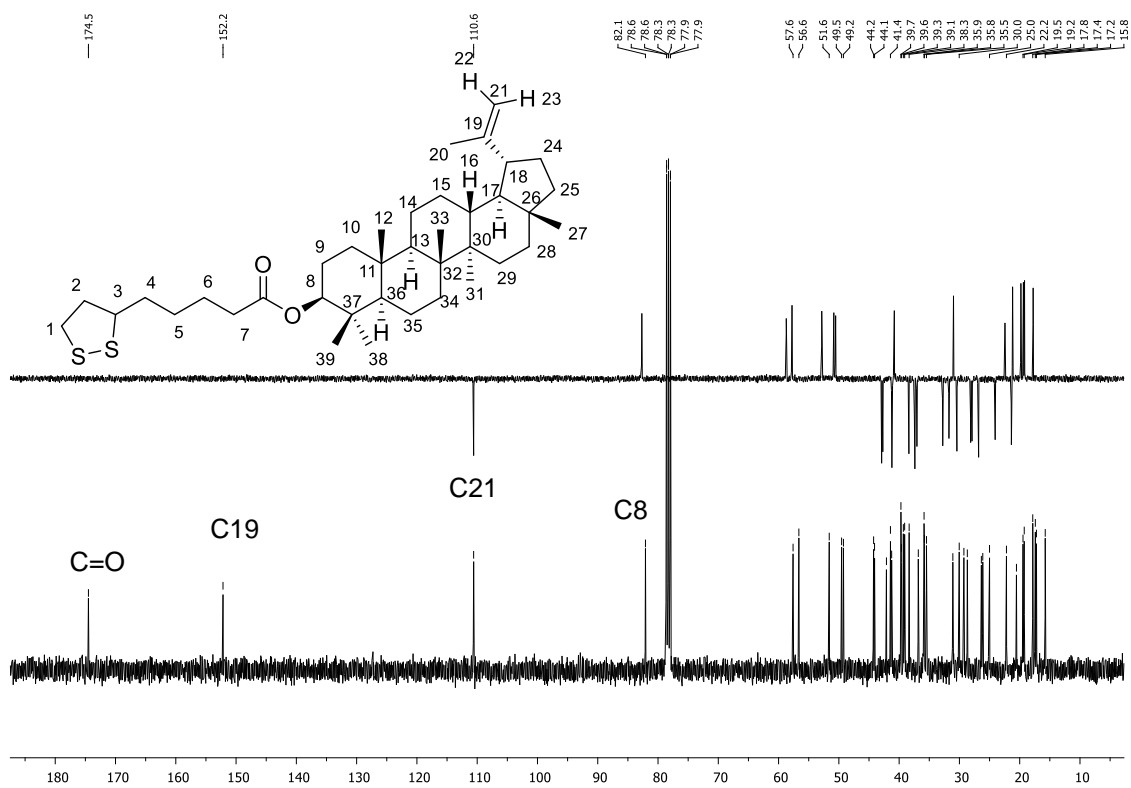


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **29** (100 MHz, CDCl_3).

O éster inédito do eugenol com ácido lipoico foi caracterizado por RMN de ^1H e de ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H do composto **30** os sinais mais desprotegidos são referentes ao eugenol, como mostrado na Figura 40. Assim, o duplete em $\delta 3,37$ ppm ($J_{15,16} = 8\text{Hz}$), integrado para dois hidrogênios, é referente ao hidrogênio metilênico H15 do eugenol. O simpleto em $\delta 3,80$ ppm, integrado para três hidrogênios, é referente à metila do eugenol. Os sinais referentes aos hidrogênios olefínicos do eugenol aparecem como multipletos entre $\delta 5,07-5,12$ ppm e entre $\delta 5,90-6,00$ ppm, integrados para um e dois hidrogênios respectivamente, referentes, portanto a H17 e H16. Os hidrogênios aromáticos resultam em dois sinais: um multiplete entre $\delta 6,75-6,78$ ppm, integrado para dois hidrogênios (H10 e H12) e o duplete em $\delta 6,93$ ppm ($J_{9,10} = 8\text{Hz}$) integrado para um hidrogênio, o H9. A ausência do sinal correspondente a hidroxila fenólica é uma comprovação que está reagiu para a formação do éster. Outra forma de comprovar a formação do éster é pelo sinal da carbonila no espectro de RMN de ^{13}C , como mostrado no sinal em 171,8 ppm na Figura 41 (página 65)

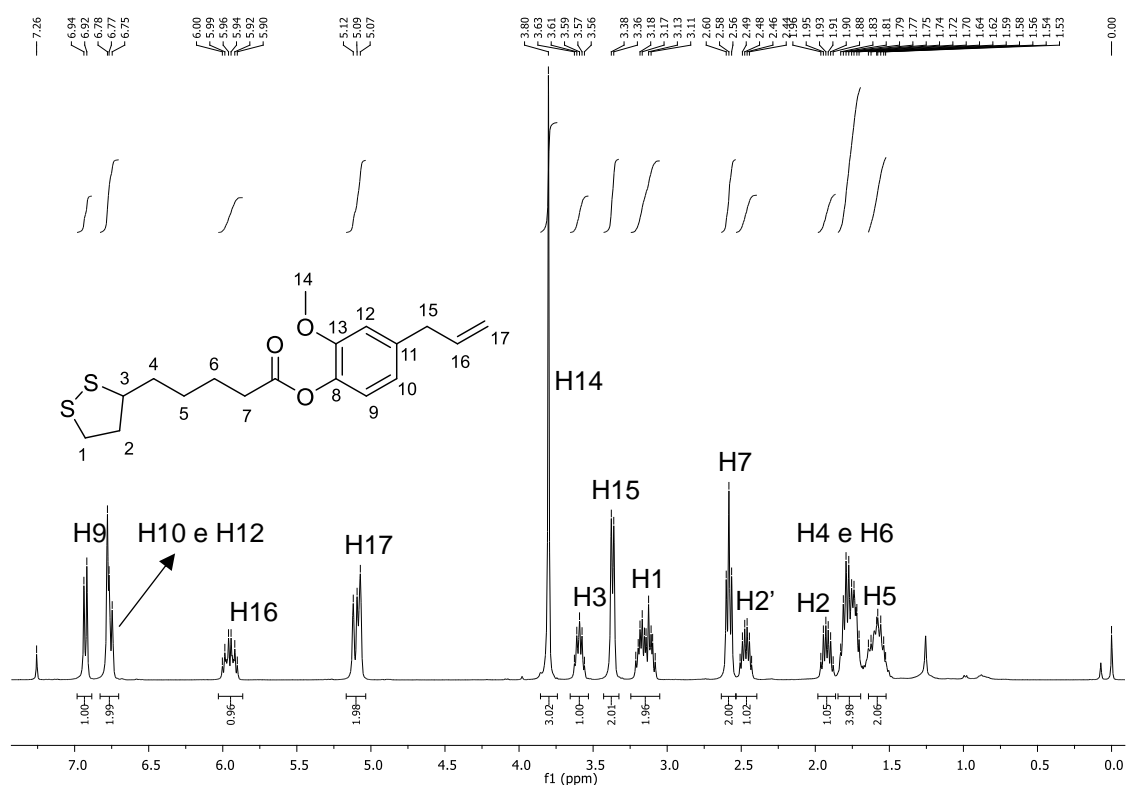


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (400 MHz, CDCl_3).

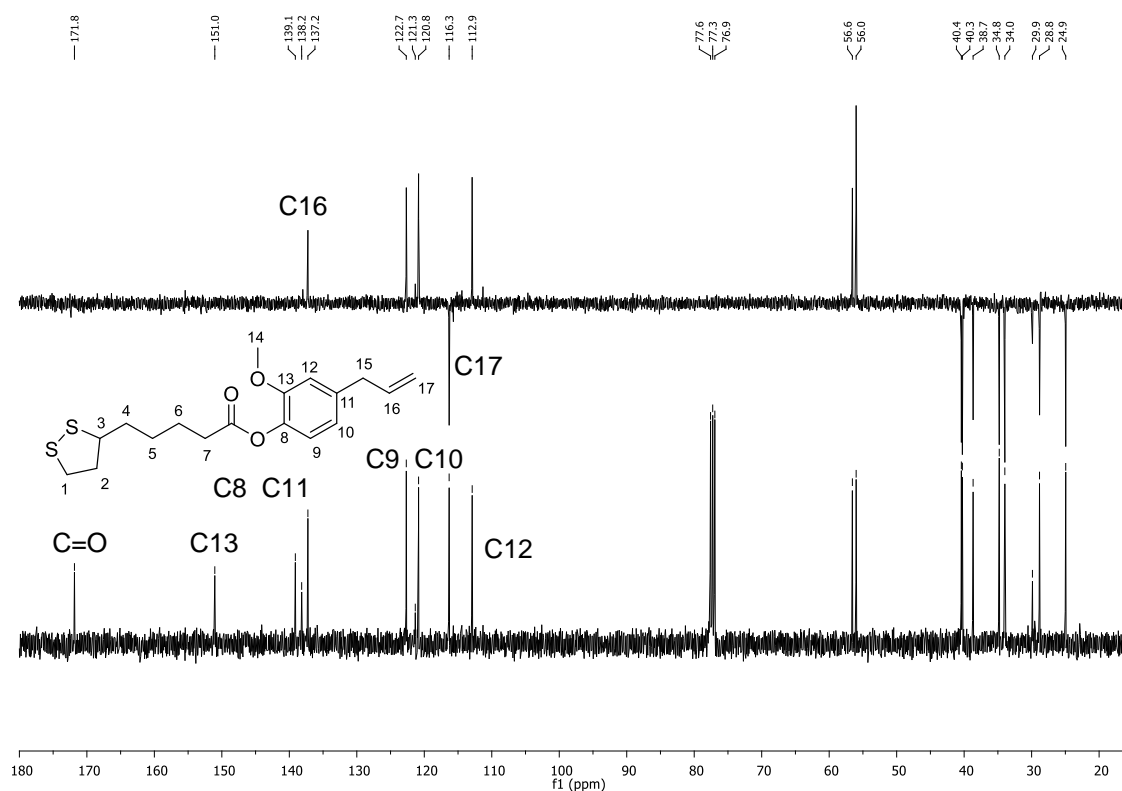


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **30** (100 MHz, CDCl_3).

3.2.2 Síntese de ésteres e amidas de substâncias sintéticas

Nesta etapa, alguns compostos sintéticos foram escolhidos para serem acoplados ao ácido lipoico, como mostra o Esquema 18. Na literatura são encontradas várias cumarinas relacionadas a produtos naturais que possuem atividade antiglicante. A 5,6,7-trimetóxi-coumarina, por exemplo, é um produto natural que apresenta um estrutura simples e atividade antiglicante provinda de sua atividade antioxidante que inibe a reação de oxidação da glicose e do produto de Amadori.⁵⁴ Desta forma baseando nas propriedades antioxidantes de cumarinas⁵⁵ e seu isômero,⁵⁶ foi planejada a síntese de um éster de isocumarina **31** e uma amida de cumarina **32** com ácido lipoico.

Na literatura, são encontrados também alguns estudos sobre diamidas e diésteres do ácido lipóico para o tratamento da diabetes. Por exemplo, no estudo de Gruzman e colaboradores um éster e uma amida dimérica do ácido lipoico foram

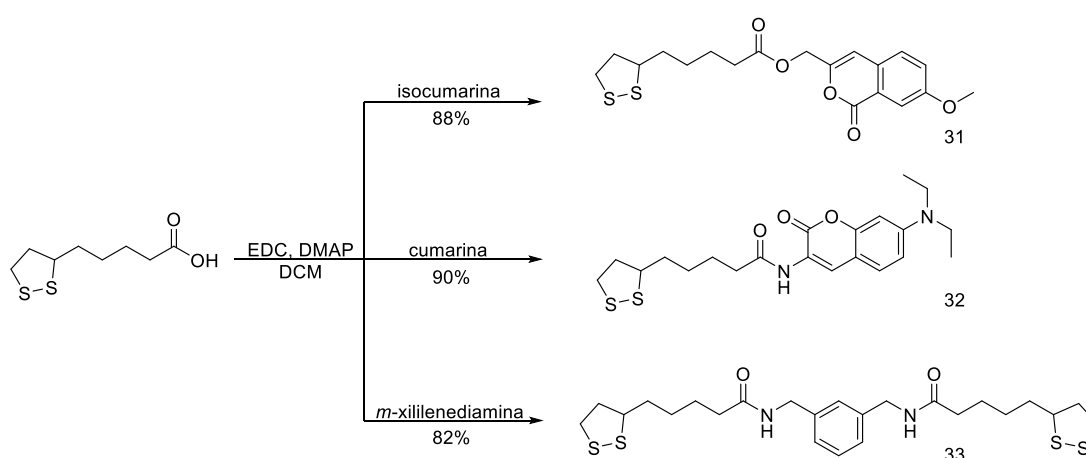
⁵⁴ Asgarpanah, J.; Amin, G.; Parviz, M.; In vitro antiglycation activity of *Eremurus persicus* (Jaub. Et Sp.) Boiss. *Afr. J. Biotechnol.*, **2011**, 10, 11287-11289.

⁵⁵ Kontogiorgis, C.; Detsi, A.; Hadjipavlou-Litina, D. Coumarin-based drugs: a patente review (2008-present). *Expert Opin. Patents*, **2012**, 22, 438-454.

⁵⁶ Saeed, A. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, 116, 290-317.

sintetizados e se ligam na glicose para ajudar no transporte desta pelo sangue.⁵⁷ Baseado neste trabalho planejou-se a síntese da diamida inédita **33** que poderia ser obtida a partir do espaçador **3**, a diamina comercial *m*-xilenodiamina.

As amidas e ésteres de substâncias sintéticas também foram sintetizados em apenas uma etapa, utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente por Chen e colaboradores.⁴³ Foi possível sintetizar um éster de isocumarina **31**, a amida de cumarina **32** e a diamida **33**, com 88%, 90 e 82% de rendimento, respectivamente, como mostrado no Esquema 18. A caracterização dos compostos foi feita por RMN de ¹H e ¹³C.

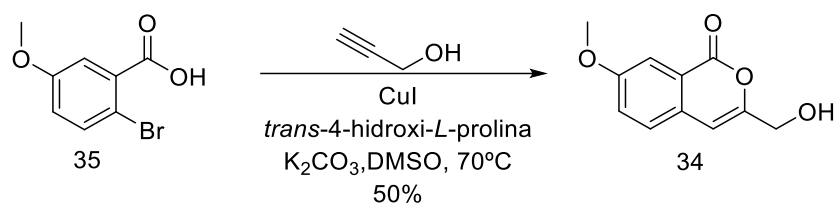


Esquema 18. Síntese do éster da isocumarina, da amida da cumarina e da diamida.

A isocumarina empregada foi a 3-(hidroximetil)-7-metoxi-1*H*-isocromen-1-ona **34**, sintetizada em uma reação *one pot* seguindo a metodologia utilizada empregada originalmente por Wang e colaboradores,⁵⁸ empregando como materiais de partida: alcinos terminais, derivados 2-halogenados do ácido benzoico, cobre (I) como catalisador e o aminoácido *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina (como aditivo da reação para garantir a regioseletividade) é possível obter apenas em uma etapa o núcleo isocumarínico. Assim, a isocumarina **34** foi obtida a partir dos reagentes comerciais, ácido 2-bromo-5-metoxibenzoico e álcool propargílico, na presença de iodeto de cobre I e *trans*-4-hidroxi-*L*-prolina com 50% de rendimento (Esquema 19). A isocumarina **34** é sintetizada usualmente em nosso grupo de pesquisa (atualmente pelo doutorando Lucas da Silva Santos) e encontra-se disponível em nosso laboratório, desta forma a sua síntese não foi realizada neste trabalho e não será relatada.

⁵⁷ Gruzman, A.; Hidmi, A.; Katzhendler, J.; Haj-Yehie, A.; Sasson, S. Synthesis and characterization of new and potent α -lipoic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1183-1190.

⁵⁸ Wang, L. L.; Zhang, X. J.; Jiang, Y. W.; Ma, D. W. An efficient synthesis of isocoumarins via a Cu catalyzed cascade reaction. *Sci. in China Series B: Chem.*, **2009**, 52, 1616-1621.



Esquema 19. Síntese da 3-(hidroximetil)-7-metoxi-1*H*-isocromen-1-ona **34**.

No espectro de RMN de ^1H do composto **31**, Figura 42, os sinais mais protegidos são referentes aos hidrogênios do ácido lipoico e não serão discutidos novamente. Os sinais restantes são referentes à subunidade derivada da 3-(hidroximetil)-7-metoxi-1*H*-isocromen-1-ona e foram comparados com o seu espectro que se encontra no Anexo (página 113). Os simpletos em δ 3,91 ppm e δ 4,91 ppm, integrados para três e dois hidrogênios respectivamente, são referentes aos hidrogênios metílicos H17 e metilênicos H8 da isocumarina, respectivamente. Os sinais na região dos aromáticos, integrados para um hidrogênio cada um, são referentes ao anel da isocumarina sendo atribuídos os simpletos em δ 6,55 ppm a H10, em δ 7,68 ppm a H15. O sinal referente a H15 é mais desblindado que o sinal do H10 devido a presença do oxigênio da metoxila que retira densidade eletrônica por ressonância. Os dupletos em δ 7,30 ppm ($J_{13,12} = 8\text{Hz}$) a H13 e em δ 7,38 ppm ($J_{12,13} = 8\text{Hz}$) a H12. No espectro de RMN de ^{13}C do composto **31** o sinal em δ 172,9 ppm referente a carbonila comprova que o éster foi formado, como mostrado na Figura 43 (página 68).

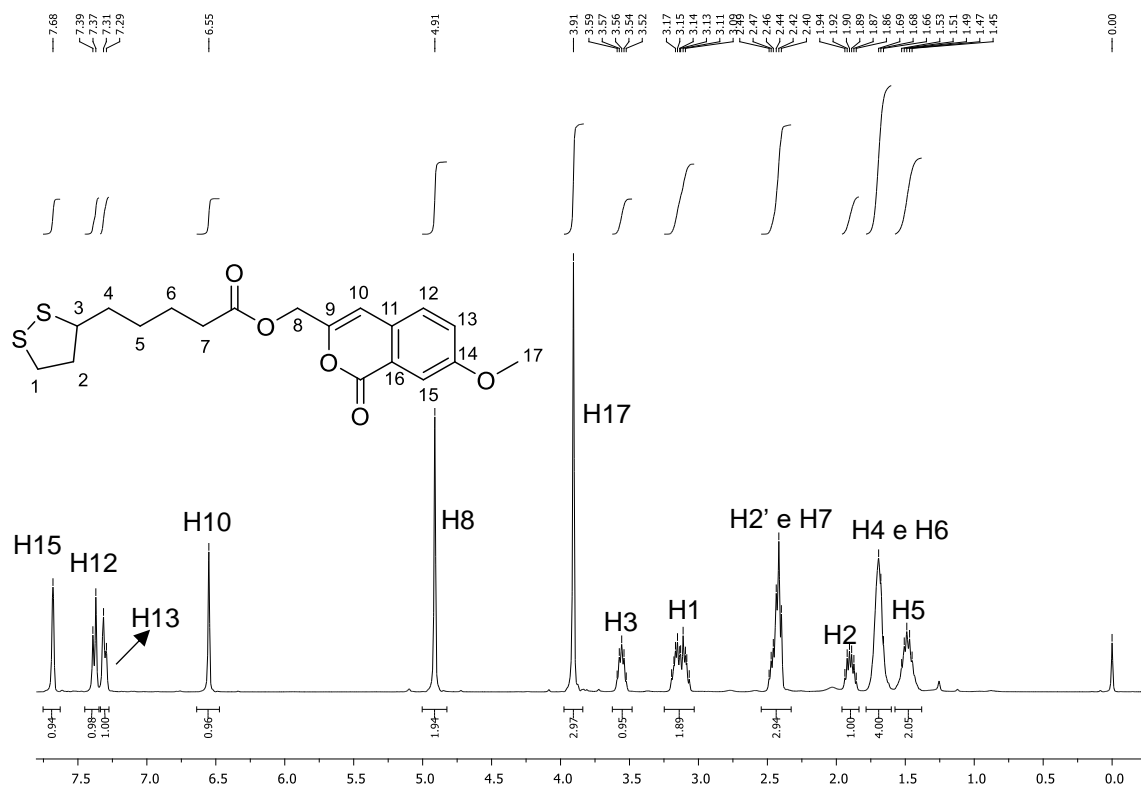


Figura 42. Espectro de RMN de ¹H do composto 31 (400 MHz, CDCl₃).

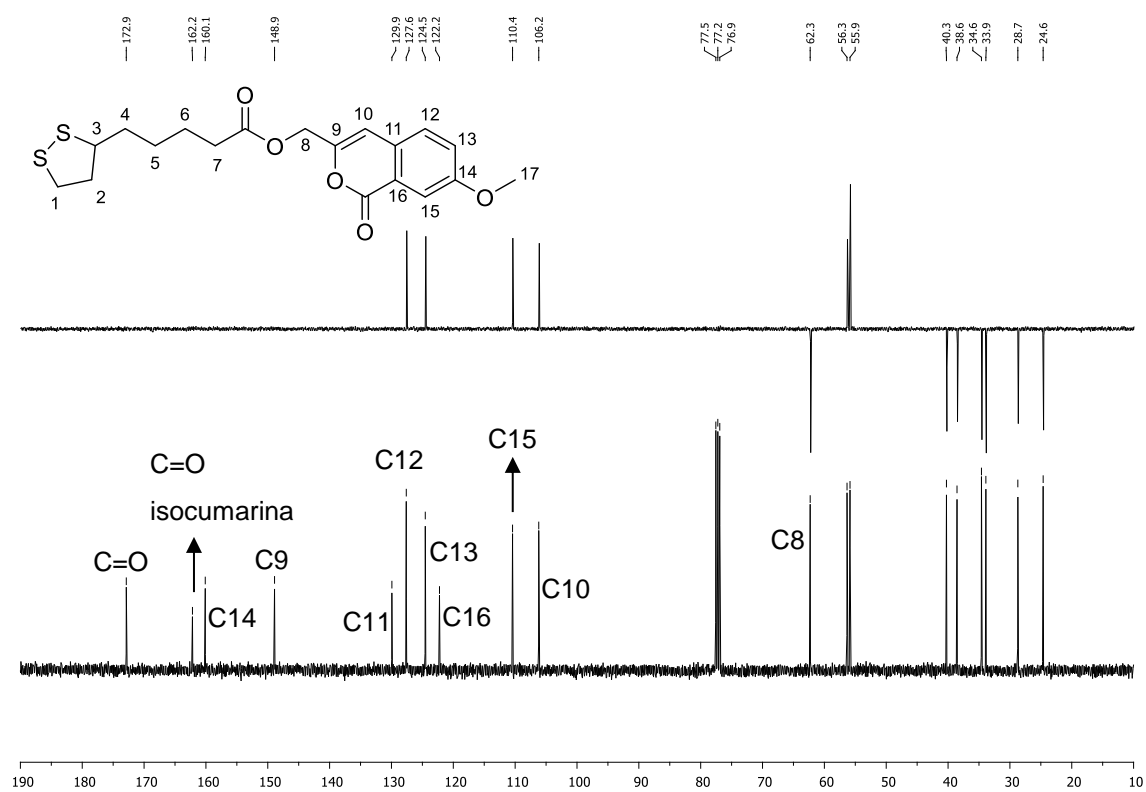
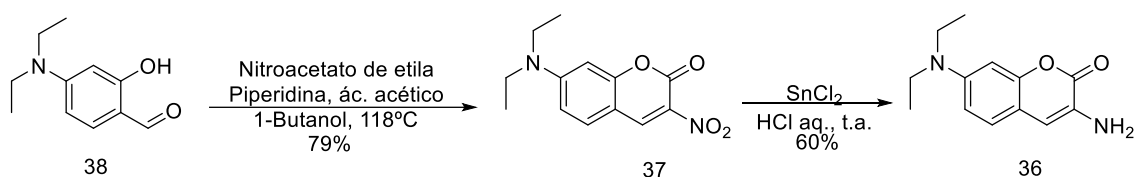


Figura 43. Espectro de RMN de ¹³C e subspectro de DEPT do composto 31 (100 MHz, CDCl₃).

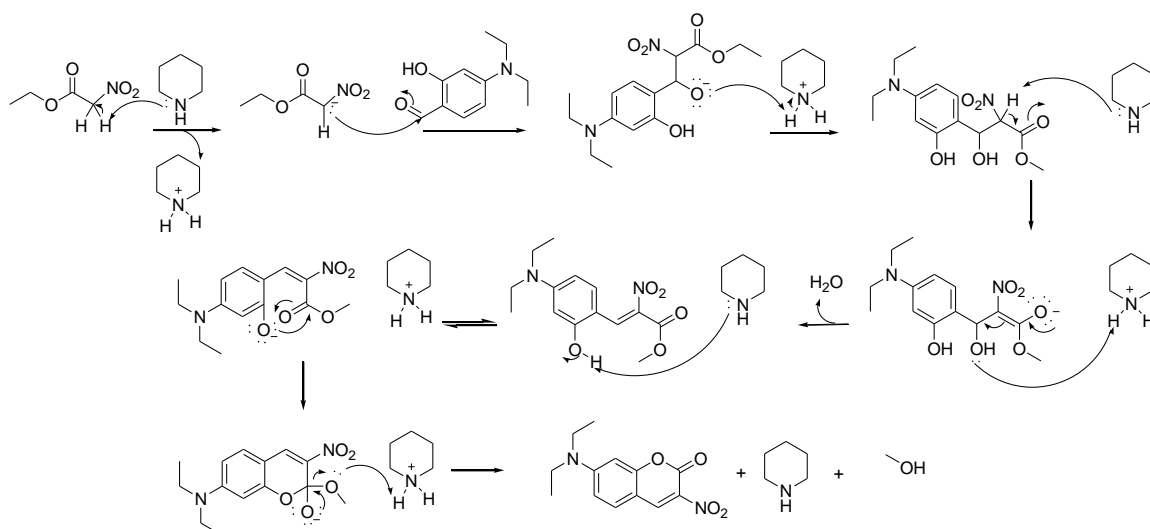
A cumarina empregada na síntese da amida **32** é a 3-amino-7-dietilaminocumarina **36** e foi sintetizada neste trabalho em duas etapas seguindo a metodologia usada por Ferreira⁵⁹ (Esquema 20). A primeira etapa consiste em uma condensação do tipo Knoevenagel, na qual a cumarina é obtida através de um aldeído e um carbânion, formado *in situ* com a ajuda de uma base fraca. A 7-dietilamino-3-nitrocumarina **37** foi obtida a partir dos reagentes comerciais 4-dietilaminossalicilaldeído e nitroacetato de etila com 79% de rendimento. A segunda etapa consistiu em uma redução do grupo nitro para a possível formação da amida na etapa posterior. Foi possível obter a 3-amino-7-dietilaminocumarina com 60% de rendimento, na qual foi utilizado o SnCl₂.2H₂O como agente redutor e HCl aquoso.



Esquema 20. Síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina **36**.

A proposta mecanística para a formação da 3-amino-7-dietilaminocumarina **36** é mostrada no Esquema 21 e inicia-se com a abstração de um próton do nitroacetato de etila pela piperidina formando o carbânion correspondente. O par de elétrons do carbânion ataca o aldeído formando o produto de adição correspondente, no qual o alcóxido formado é protonado no meio. Em seguida ocorre desidratação do β -hidroxiéster, catalisada por base. A hidroxila do fenol é desprotonada pela piperidina formando o íon fenolato correspondente e o seu par de elétrons ataca a carbonila do éster fechando o anel lactônico, liberando etanol e regenerando o catalisador.

⁵⁹ Ferreira, S. M. Z. M. D. *Estratégias para marcação de moléculas bioativas: síntese de compostos fluorescentes e radiomarcados com flúor-18*. Tese de Doutorado, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, **2015**.



Esquema 21. Proposta mecanística para a síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina **36**.

No espectro de RMN de ^1H do composto **32** (Figura 44) o tripleto em $\delta 1,20$ ppm ($J_{17,16} = 4\text{Hz}$), integrado para seis hidrogênios, é referente aos hidrogênios metílicos da dietilamina que acoplam com os hidrogênios metilênicos que por sua vez dão origem ao quarteto em $\delta 3,40$ ppm ($J_{16,17} = 4\text{Hz}$), integrado para quatro hidrogênios. Os outros sinais na região dos alifáticos são referentes aos hidrogênios do ácido lipóico e não serão discutidos novamente. Os sinais na região dos aromáticos são referentes ao anel da cumarina e as atribuições foram feitas com base no espectro da cumarina (Anexo, página 116) de partida já analisado por Ferreira.⁵⁹ Assim os simpletos em $\delta 6,52$ ppm e $\delta 7,91$ ppm, integrados para um hidrogênio cada, são referentes aos hidrogênios H14 e H9 respectivamente, já que esses não possuem hidrogênios vizinhos para ocorrer o acoplamento. O sinal de H9 é mais desblindado que o de H14 devido à presença do grupo amida que retira densidade eletrônica por ressonância. Os dupletos em $\delta 6,64$ ppm ($J_{12,11} = 8\text{Hz}$) e $\delta 6,64$ ppm ($J_{11,12} = 8\text{Hz}$) são referentes a H12 e a H11 respectivamente. O simpleto em $\delta 8,58$ ppm é referente ao NH de amida. No espectro de RMN de ^{13}C do composto **32** o sinal em $\delta 171,8$ ppm, referente à carbonila, comprova que a amida foi formada, como mostrado na Figura 45 (página 71).

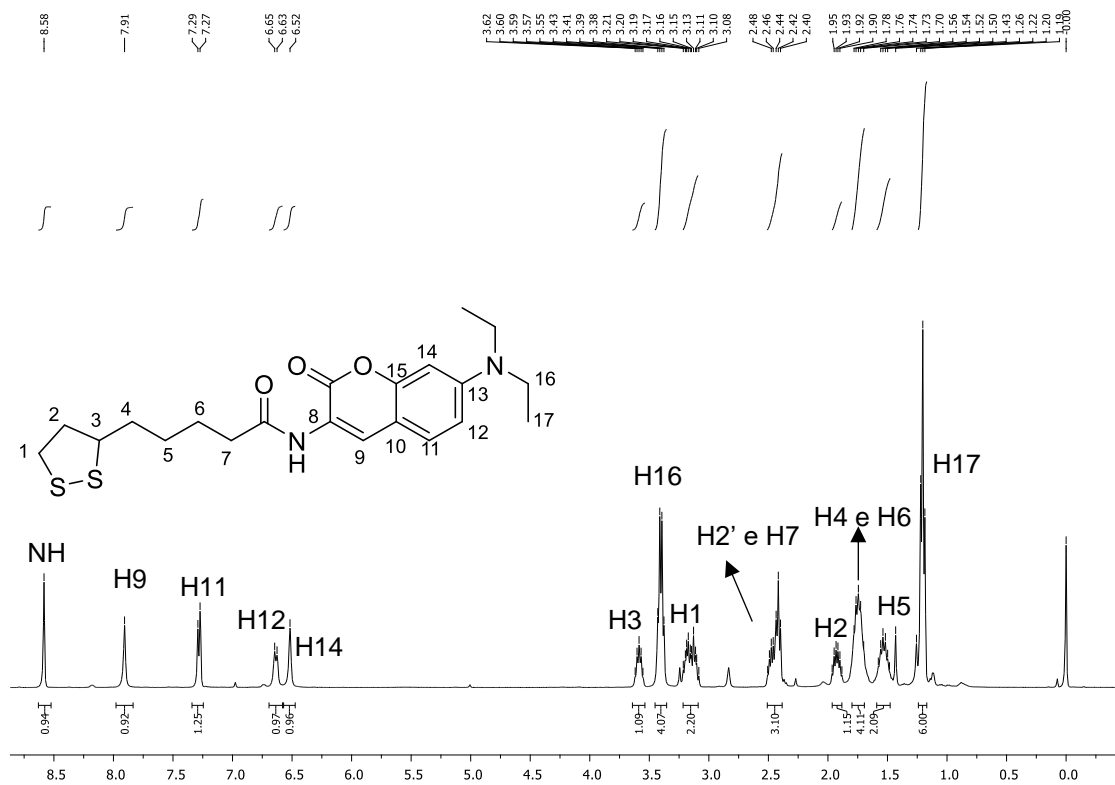


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H do composto **32** (400 MHz, CDCl_3).

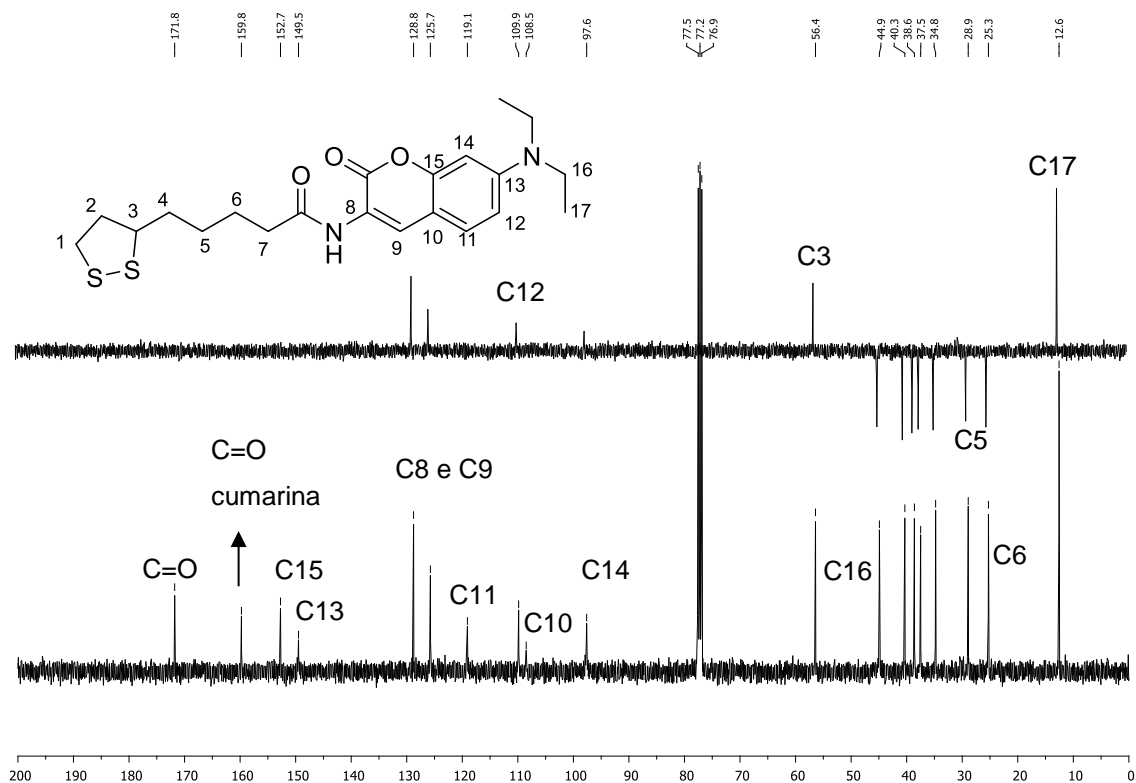


Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **32** (100 MHz, CDCl_3).

Finalmente, o uso da diamina comercial *m*-xililenodiamina **3** levou à obtenção do “dímero” de ácido lipoico **33**. O espectro de RMN de ^1H do composto **33** (Figura 46) é

muito parecido com o espectro do composto **25** (página 60) no que diz respeito aos sinais relativos ao *linker* e ao ácido lipoico, sendo que a única diferença é o aparecimento de apenas um único sinal para os hidrogênios metilênicos benzílicos em δ 4,37 ppm, integrados agora para quatro hidrogênios, devido à simetria da molécula. No espectro de RMN de ^{13}C do composto **33** o sinal em δ 173,4 ppm comprova a formação da amida, como mostrado na Figura 47.

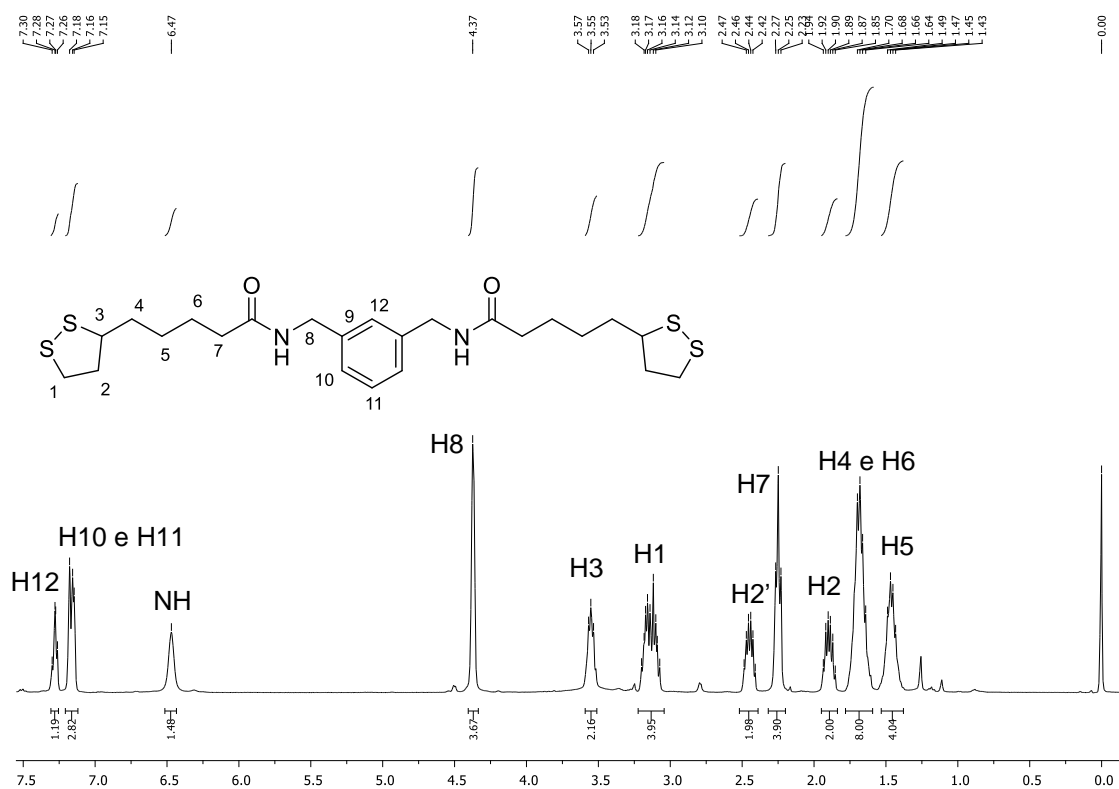


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H do composto **33** (400 MHz, CDCl_3).

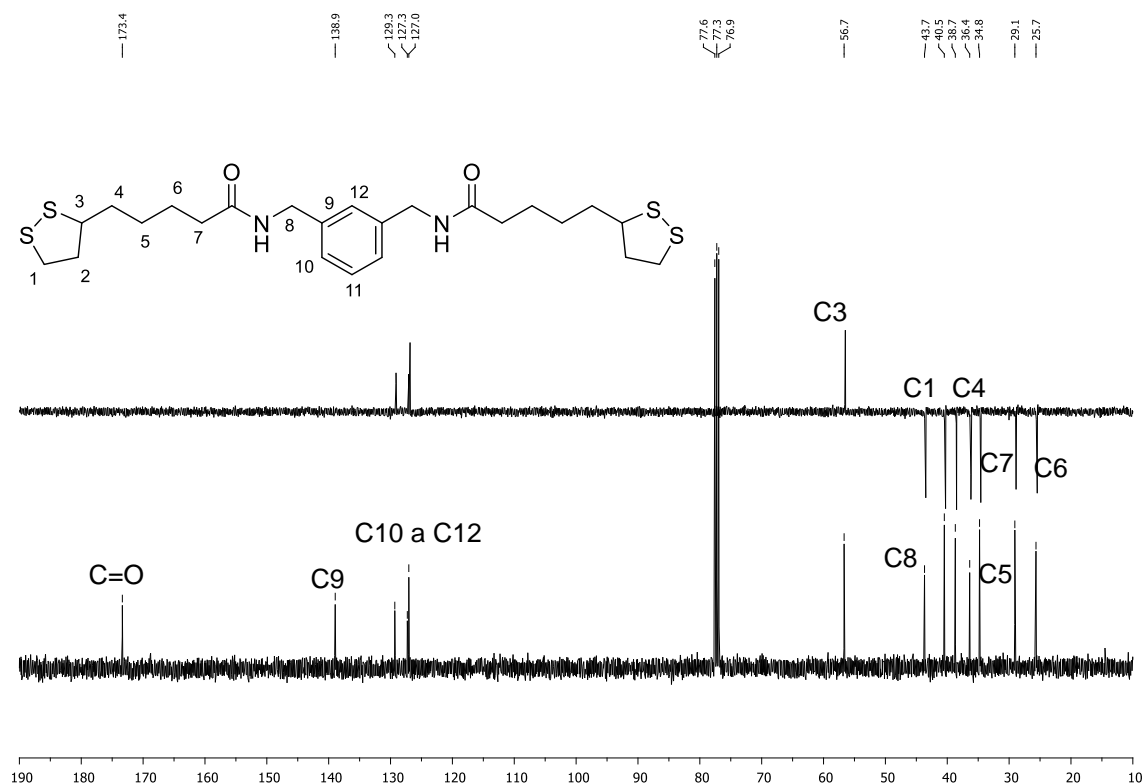


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **33** (100 MHz, CDCl_3).

3.3 Ensaios de Atividade Antiglicante

O mecanismo da reação de glicação no organismo é complexo e há várias rotas em que são possíveis formar AGEs ou dicarbonílicos, como discutido na introdução deste trabalho. Os próprios AGEs possuem diversas interações em meio biológico e, devido à esta complexidade, existem diversas metodologias descritas na literatura para avaliar a atividade antiglicante de uma determinada substância, como por exemplo medindo-se a inibição da formação de AGEs,⁶⁰ a transglicação das bases de Schiff, a formação de produtos Amadori,⁶¹ e do receptor RAGE.⁶²

O ensaio mais simples é a inibição da formação de AGEs através do acompanhamento de uma reação entre um açúcar redutor e uma proteína na presença do inibidor. Neste ensaio é possível medir a inibição da formação de AGEs em

⁶⁰ Wang, W.; Yagiz, Y.; Buran, T. J.; Nunes, C. N.; Gu, L. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Research Int.*, **2011**, 44, 2666–2673.

⁶¹ Kesavan, S. K.; Bhat, S.; Golegaonkar, S. B.; Jagadeeshprasad, M. G.; Deshmukh, A. B.; Patil, H. S.; Bhosale, S. D.; Shaikh, M. L.; Thulasiram, H. V.; Boppana, R.; Kulkarni, M. J. Proteomewide reduction in AGE modification in streptozotocin induced diabetic mice by hydralazine mediated transglycation. *Sci. reports*, **2013**, 3, 2941.

⁶² Monteiro, F. A.; Cardoso, I.; Sousa, M. M.; Saraiva, M. J. In vitro inhibition of transthyretin aggregate-induced cytotoxicity by full and peptide derived forms of the soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FEBS Letters*, **2006**, 580, 3451–3456.

comparação ao branco através do uso de espectrofotômetro de fluorescência, de ultravioleta⁶⁰ e de massas.⁶¹ O melhor equipamento para detectar a inibição é um espectrofotômetro de massas, devido à possibilidade de se detectar AGEs não fluorescentes.⁶³ Há diversas variações deste método na literatura devido a possibilidade do uso de vários açúcares, como uso de glicose,^{64,65} a frutose⁶⁰ ou a mistura dos dois.^{66,67,68}

O mesmo ensaio pode ser realizado simplesmente trocando-se o açúcar por um dicarbonílico, por exemplo, o metilglioxal.⁶⁰ A vantagem deste método é o tempo de realização, em média dois dias, ao contrário do outro, com o açúcar, que é realizado em sete dias. Além disso, o método que utiliza metilglioxal possibilita verificar se o inibidor é seletivo para dicarbonílicos e age por este mecanismo. No ensaio do açúcar o antiglicante pode reagir/interagir com qualquer produto ao longo da reação até a formação dos AGEs, como com o próprio açúcar, a base de Schiff, o produto de Amadori e o dicarbonílico, possibilitando resultados diferentes do que com o ensaio usando apenas o dicarbonílico.

O ensaio de transglicação consiste na análise da quebra da ligação entre o açúcar e a proteína ou entre o receptor RAGE. Existem diversas proteínas glicadas que podem ser utilizadas no ensaio, como hemoglobina glicada e a insulina glicada.⁶¹ No caso de uma proteína que não possui fluorescência o teste é realizado em espectrofotômetro de massas.

Neste trabalho foram realizados estudos preliminares de atividade antiglicante das substâncias mostradas na Figura 48, sendo no caso realizados dois ensaios de inibição de AGEs, o ensaio BSA+(F+G) e o BSA+MG, em espectrofotômetro de fluorescência.

⁶³ Barbosa, J. H. P.; Souza, I. T.; Santana, A. E. G.; Goulart, M. O. F. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGES) e de lipoxidação (ALES) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. *Quim. Nova*, **2016**, 39, 608-620.

⁶⁴ Shimode, A.; Yagi, M.; Hagiwara, S.; Noguchi, T.; Inomata, M.; Kitano, S.; Yonei, Y. Antiglycation Activity of Alpha-Lipoic Acid Derivatives and Vitamin E Derivatives. *Anti-Aging Med.* **2013**, 10, 42-54.

⁶⁵ Asgarpanah, J.; Amin, G.; Parviz, M.; In vitro antiglycation activity of *Eremurus persicus* (Jaub. Et Sp.) Boiss. *Afr. J. Biotechnol.*, **2011**, 10, 11287-11289.

⁶⁶ Raza, R.; Ilyas, Z.; Ali, S.; Nisar, M.; Khokhar, M. Y.; Iqbal, J. Identification of Highly Potent and Selective –Glucosidase Inhibitors with Antiglycation Potential, Isolated from *Rhododendrona rboreum*. *Rec. Nat. Prod.*, **2015**, 2, 262-266.

⁶⁷ Choi, J. S.; Islam, M. N.; Ali, M. Y.; Kim, E. J., Kim, Y. M., Jung, H. A. Effectsof C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of a pigenin. *Food and Chem. Toxicology*, **2014**, 64, 27-33.

⁶⁸ Kato, N.; Kawabe, S.; Ganeko, N.; Yoshimura, M.; Amakura, Y.; Ito, H. Polyphenols from flowers of *Magnolia coco* and the ir antiglycation effects. *Biosci, Biotec., and Biochemi.*, **2017**, 1-4.

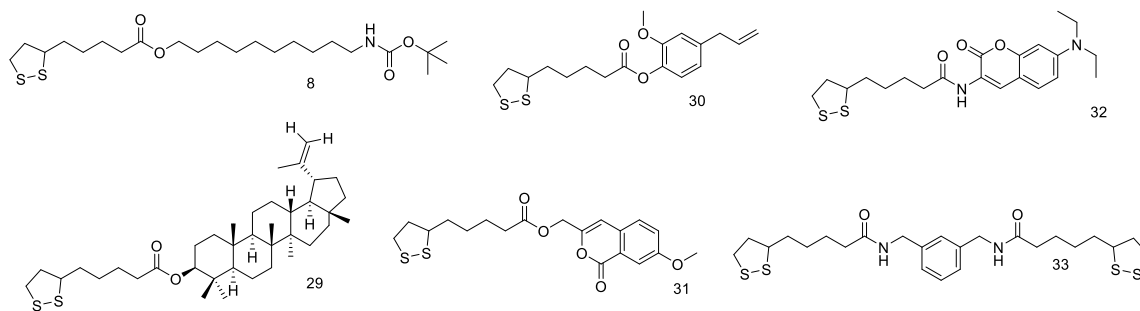


Figura 48. Substâncias que foram realizados os preliminares de atividade antiglicante.

No ensaio entre a albumina, a frutose e a glicose (BSA+(F+G)), o método utilizado seguiu a metodologia de Wang e colaboradores,⁶⁰ com modificações, e consistiu na comparação quantitativa da intensidade da banda de fluorescência dos AGEs na presença e ausência de inibidor. A reação de glicação a partir de açúcares no organismo é lenta, por isso neste ensaio é colocado um grande excesso de açúcares para que a reação ocorra mais rapidamente. Neste ensaio foi possível testar cinco derivados do ácido lipoico que são os derivados **29** a **33**. O composto **32** apresentou uma grande fluorescência intrínseca, impedindo a realização do ensaio. No caso do composto **31** foi observada uma inibição negativa, ou seja, a intensidade da banda de fluorescência relativa aos AGEs com a amostra foi maior que sem a amostra, sugerindo uma concentração de AGEs maior que a esperada, o que pode indicar que o composto testado acelera a reação de glicação. O composto **29** apresentou diferentes resultados para triplicatas e será repetido posteriormente.

O composto **33**, a diamida do ácido lipoico, foi o que mostrou melhor taxa de inibição, (37,3 % para uma concentração de 600 μm), uma taxa, entretanto inferior à da aminoguanidina usada como padrão positivo, que é de 76,2 % para a mesma concentração. Porém esse composto apresentou uma taxa de inibição superior à do ácido lipoico, já que este não apresentou inibição em nenhuma das concentrações e até em concentrações maiores que 600 μm . Isso mostra que as modificações nos compostos **30** e **33** melhoraram a atividade antiglicante do ácido lipoico, sugerindo que o mecanismo antiglicante do ácido lipoico não se adequa ao ensaio realizado. Os resultados do ensaio estão apresentados no gráfico da Figura 49. Foram colocadas apenas três concentrações no gráfico, devido à ausência de taxa de inibição em outras concentrações para os compostos analisados.

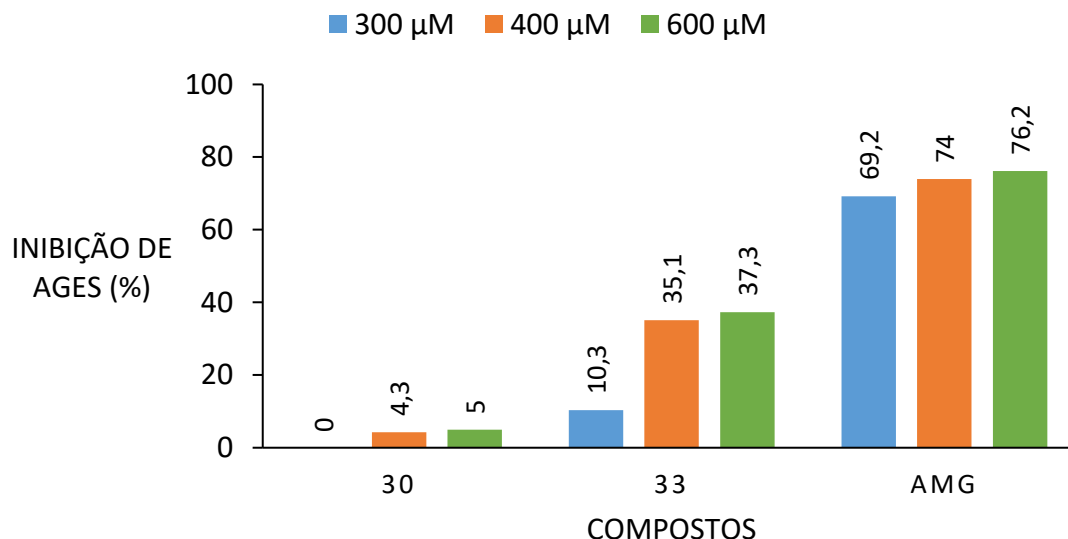


Figura 49. Inibição de AGEs pelo método BSA+(F+G) para os compostos **30**, **33** e aminoguanidina em diferentes concentrações.

O ensaio BSA+MG foi realizado seguindo a metodologia de Wang e colaboradores⁶⁰ com modificações, e consiste na inibição da formação de AGEs a partir da reação entre a proteína BSA e o dicarbonílico metilglioxal. Os resultados do ensaio estão apresentados no gráfico da Figura 50.

Neste ensaio foi possível testar seis derivados do ácido lipoico, que são os derivados **8** e **29** a **33**. O composto **32**, novamente, apresentou uma grande fluorescência impedindo a realização deste ensaio. Novamente foi observada uma inibição negativa para o composto **31**. Os compostos **29** (34,6%, derivado ácido lipoico com o lupeol) e **30** (34,4%, derivado ácido lipoico com o eugenol) apresentaram as melhores taxas de inibição quando comparados com as outras amostras, mas em uma taxa muito inferior à aminoguanidina, que é de 80 %. O composto **30** mostrou-se mais ativo neste ensaio do que no ensaio BSA+(F+G) (5% de inibição na maior concentração), indício que o seu mecanismo de atuação ocorre preferencialmente pela via de dicarbonílicos.

O contrário aconteceu com o composto **33**, que foi mais ativo no ensaio anterior (37,3% para uma concentração de 600 μm) em comparação a este, no qual ele promoveu apenas 15,1% de inibição, sugerindo que o seu mecanismo antiglicante é principalmente por via de produtos iniciais da reação de glicação. O composto **8** apresentou uma baixa inibição, de 7,2%. Pode se concluir que os produtos contendo apenas ácido lipoico na sua estrutura foram pouco ativos, indício que o ácido lipóico não age por este mecanismo. O próprio ácido lipoico não foi testado neste ensaio.

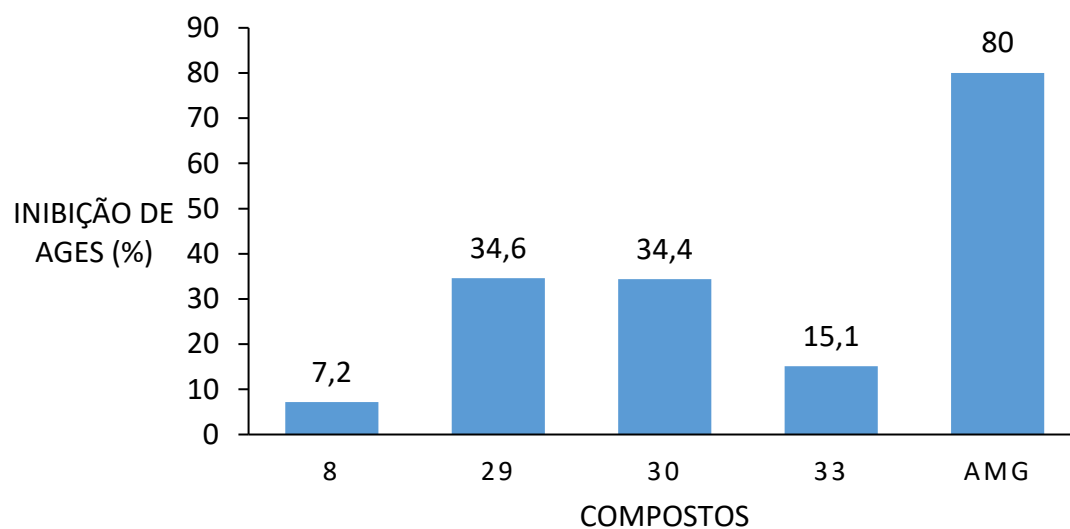


Figura 50. Inibição de AGEs pelo método BSA+MG para os compostos **8**, **29** a **33** e aminoguanidina em diferentes concentrações.

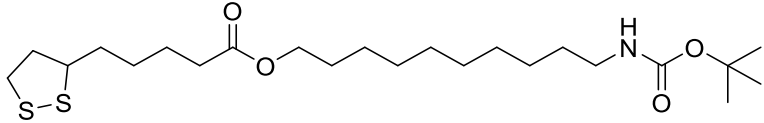
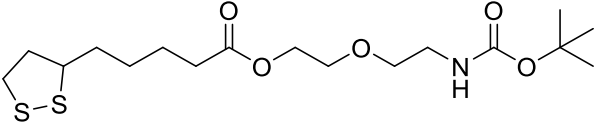
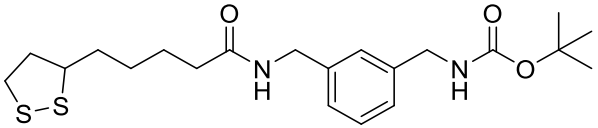
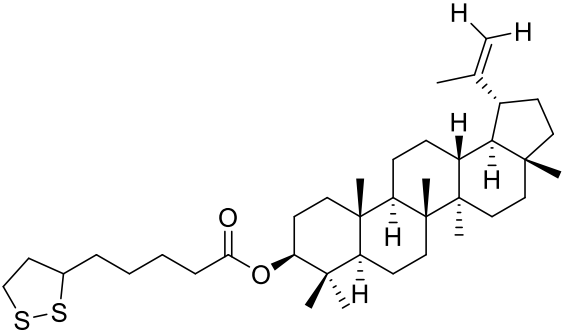
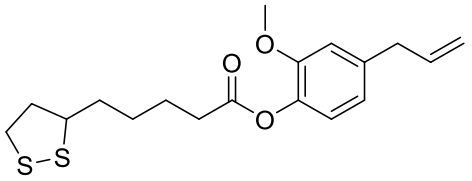
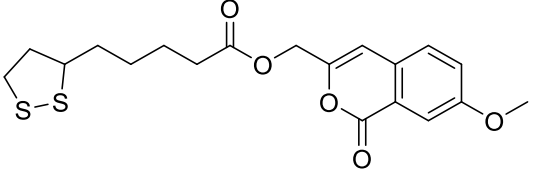
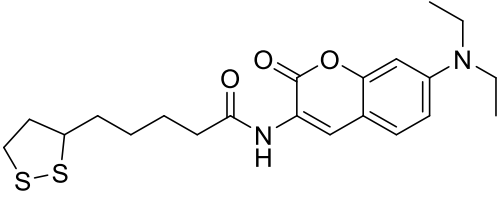
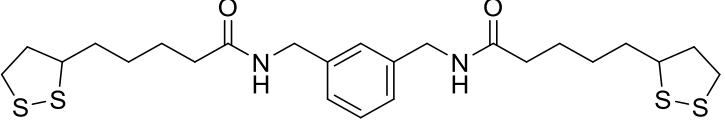
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi possível sintetizar 22 compostos, sendo oito novos derivados do ácido lipoico (**8**, **20**, **25** e **29** a **33**) com rendimentos de 43 a 92%, como mostrado na Tabela 2. Os novos derivados incluem substâncias conectando duas sub-unidades estruturais com atividade antiglicante relatada, em uma estratégia de hibridação molecular em química medicinal;

A síntese de amidinas e aminoguanidinas a partir do ácido lipoico revelou-se um grande desafio devido à alta polaridade dos produtos finais. Foi possível comprovar, por espectrometria de massas, a formação das amidinas **22** e **24** e da aminoguanidina **23**. A purificação das amidinas e aminoguanidinas não foi possível neste trabalho, mas novas metodologias serão procuradas na literatura;

Estudos preliminares de atividade antiglicante foram realizados através de dois ensaios antiglicante. Os compostos **29** a **33** foram avaliados pelo ensaio BSA+(F+G). O composto **33** foi o que apresentou melhor taxa de inibição (37,3 %) em comparação aos outros derivados e ao próprio ácido lipoico. No ensaio BSA+MG foram avaliados os compostos **8**, e **29** a **33**. Os compostos **29** (34,6%) e **30** (34,4%) apresentaram as melhores taxas de inibição em comparação aos outros derivados. Não foi possível a realização dos ensaios dos derivados **32** devido a sua alta fluorescência e novos ensaios que não utilizam técnicas de fluorescências para quantificar serão realizados posteriormente, além de novos ensaios de atividade antiglicante seletivos ao ácido lipoico.

Tabela 2. Novos derivados do ácido lipoico sintetizados neste trabalho.

Código	Estrutura	Rendimento(%)
8		51
20		92
25		43
29		51
30		60
31		88
32		90
33		82

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Equipamentos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT, e os mapas de correlação COSY e HSQC foram obtidos pelo espectrômetro de RMN Bruker AVANCE-III 400 Nanobay ou AVANCE DPX 200. Utilizou-se como referência interna o solvente deuterado ou o tetrametilsilano. Os espectros no infravermelho foram obtidos pelos espectrômetros Perkin Elmer Spectrum One FT-IR por ATR e Perkin Elmer FT-IR de feixe duplo em pastilhas de KBr anidro.

As faixas de fusão foram determinadas pelo aparelho digital de ponto de fusão Microquímica MQAPF-302. A taxa de inibição de AGEs foram determinadas no Espectrofluorímetro RF-5301PC Shimadzu utilizando cubetas de quartzo com quatro faces polidas de 10 mm de caminho ótico e volume 3,5 mL.

Em todas as reações realizadas neste trabalho foram utilizadas chapa de aquecimento com agitação magnética.

5.2 Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho são analiticamente puros conforme indicados pelos fabricantes. As purificações em coluna cromatográfica foram realizadas em sílica gel (SiliCycle 0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro de 6 nm). Em cada experimento foram utilizados reveladores previamente preparados.

5.3 Reveladores⁶⁹

- Solução ácida de CAM

Em um béquer adicionaram-se 1 g de sulfato cérico, 5 g de molibdato de amônio dissolvidos em 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e em seguida adicionaram-se 90 mL de água destilada. A solução foi deixada sob agitação por 1 hora. Para a revelação borrifou-se na CCD a solução reveladora e aqueceu-se a placa na estufa a 100 °C.

- Solução de ácido fosfomolibdico

⁶⁹ Merck, E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y em papel. *E. Merck Ag.*, 1980.

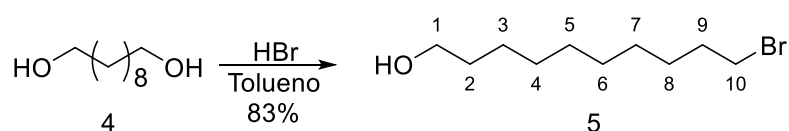
Em um béquer foram solubilizados 5 g de ácido fosfomolibdico em 100 mL de etanol. Para a revelação borrifou-se o revelador na CCD e aqueceu-se a placa na estufa a 100 °C.

- Iodo sublimado

Em uma cuba adicionou-se iodo sólido, está foi fechada para obter uma atmosfera de vapor de iodo.

5.4 Síntese, purificação e caracterização

5.4.1 Síntese do 10-bromodecan-1-ol (5)³⁷



Em um balão de fundo redondo, conectado a um aparato do tipo Dean-Stark e condensador de refluxo, dissolveu-se 1,10-decanodiol (5g, 28,69 mmol) em 80 mL de tolueno. Em seguida, adicionou-se ácido bromídrico 48% (1,10 equiv.) e a mistura foi mantida sob refluxo por 72 horas. O fim da reação foi verificado por CCD (eluente: acetato de etila/ hexano 80/20; revelador: iodo) pela ausência do material de partida. O solvente da mistura resultante foi removido sob pressão reduzida e o resíduo purificado em coluna de sílica gel (eluente: acetato de etila/hexano 0/100, 10/90, 20/80), obtendo-se um óleo de coloração amarelada com 83% de rendimento.

FM: C₁₀H₂₁BrO

MM: 237,18 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

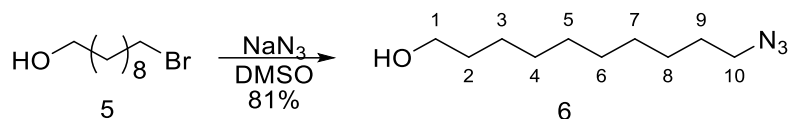
Rendimento: 83%

IV (Figura 55, página 101) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3329 (ν da ligação O-H de álcool), 2924, 2853 (ν da ligação C-H de alifático), 1055 (ν da ligação C-O de álcool)

RMN de ¹H (Figura 53, página 100) (200 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,30-1,50 (m, 12H, H3 a H8), 1,53-1,60 (m, 2H, H2), 1,78-1,92 (m, 3H, H9 e OH), 3,41 (t, 2H, *J*_{9,10} = 7 Hz, H10), 3,63 (t, 2H, *J*_{1,2} = 7 Hz, H1)

RMN de ¹³C (Figura 54, página 100) (50 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 25,8; 26,8; 28,9; 29,2; 29,5 (C3 a C9), 32,8 (C2 e C9), 51,6 (C10), 63,0 (C1)

5.4.2 Síntese do 10-azidodecan-1-ol (6) ^{37,39}



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10-bromodecan-1-ol (1,2g, 8,03 mmol) e 18,6 mL de solução 0,5 mol L⁻¹ de azida de sódio em DMSO. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética por 72 horas a temperatura ambiente. A reação foi finalizada acrescentando-se água ao meio reagente e em seguida extraiu-se com éter etílico (3 x 25 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (3 x 20 mL) e secada com Na₂SO₄. O solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo com 81% de rendimento.

FM: C₁₀H₂₁N₃O

MM: 199,30 gmol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

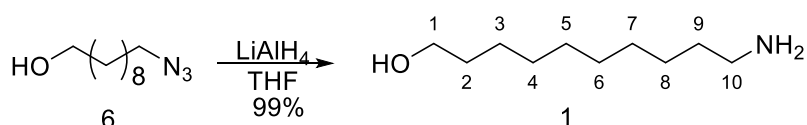
Rendimento: 81%

IV (Figura 58, página 102) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3339 (ν da ligação O-H de álcool), 2925, 2854 (ν da ligação C-H de alifático) 2091 (ν assimétrico da ligação N=N⁺=N⁻), 1258 (ν simétrico da ligação N=N⁺=N⁻), 1054 (ν da ligação C-O de álcool)

RMN de ¹H (Figura 56, página 101) (200 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,29-1,48 (m, 12H, H3 a H8), 1,51-1,61 (m, 4H, H2 e H9), 1,67 (s, 1H, OH), 3,24 (t, 2H, *J*_{9,10} = 7 Hz, H10), 3,62 (t, 2H, *J*_{1,2} = 7 Hz, H1)

RMN de ¹³C (Figura 57, página 102) (50 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 25,8; 26,7; 28,9; 29,2; 29,4 (C3 a C9), 32,7 (C2), 51,5 (C10), 62,9 (C1)

5.4.3 Síntese do 10-aminodecan-1-ol (1) ⁴⁰



Em um balão de fundo redondo foi preparada uma suspensão de hidreto de alumínio e lítio (0,473g, 12,46 mmol) em 25 mL de THF anidro, sob atmosfera de N₂. A suspensão foi resfriada a 0°C e em seguida adicionou-se, durante 2 minutos, com a ajuda de uma seringa, uma solução de 10-azidodecan-1-ol (1,24g, 6,23 mmol) em THF

anidro. A mistura da reação foi mantida sob agitação magnética por 1 hora a 0°C e a temperatura ambiente por 2 horas. A reação foi finalizada acrescentando-se, durante 5 minutos, 40 mL de uma solução saturada de sal de Rochelle. A mistura foi mantida sob agitação magnética por 12 horas até que a mesma se tornasse límpida. Em seguida realizou-se a extração com DCM (3 x 40 mL), a fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido branco com rendimento de 99%.

FM: C₁₀H₂₃NO

MM: 173,30 g mol⁻¹

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 99%

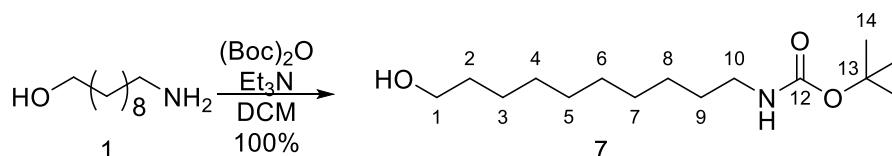
FF: 67,9-71,7°C

IV (Figura 61, página 104) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3395 (ν assimétrico da ligação N-H de amina primária), 3359 (ν simétrico da ligação N-H de amina primária), 3019 (ν da ligação O-H de álcool), 2921, 2819 (ν da ligação C-H de alifático)

RMN de ¹H (Figura 59, página 103) (200 MHz, CD₃OD, δ (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição): 1,34-1,43 (m, 12H, H3 a H8), 1,44-1,55 (m, 4H, H2 e H9), 2,62 (t, 2H, $J_{9,10} = 7$ Hz, H10), 3,55 (t, 2H, $J_{1,2} = 7$ Hz, H1)

RMN de ¹³C (Figura 60, página 103) (50 MHz, CD₃OD, δ (ppm), atribuição): 27,1 (C3), 28,2 (C8), 30,8 (C4 a C7), 33,8; 34,0 (C2 e C9), 42,7 (C10), 63,1 (C1)

5.4.4 Síntese do *terc*-butil-1-hidroxi-10-decilcarbamato (**7**)⁴¹



Em um balão de fundo redondo dissolveu-se o aminoálcool **1** (437 mg, 2,52 mmol) em uma mistura de DCM e metanol (50:3,5 v/v), sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionados trietilamina (457 μ L, 3,28 mmol) e uma solução de dicarbonato de di-*terc*-butila (811 μ L, 3,53 mmol) em 10 mL de DCM. A mistura de reação foi mantida sob agitação magnética por 4 horas a temperatura ambiente. O fim da reação foi verificado por CCD (eluente: acetato de etila/ hexano 50/50; revelador:

CAM) pela ausência de substrato. A reação foi finalizada adicionando-se 30 mL de DCM, em seguida realizou-se a extração. A fase orgânica foi lavada com água, com solução 0,1 mol L⁻¹ de HCl (3 x 30 mL) e com solução saturada de NaHCO₃ (3 x 30 mL). Em seguida, a fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se um sólido amarelado com 100% de rendimento.

FM: C₁₅H₃₁NO₃

MM: 273,42 g mol⁻¹

Aspecto: sólido amarelado

Rendimento: 100%

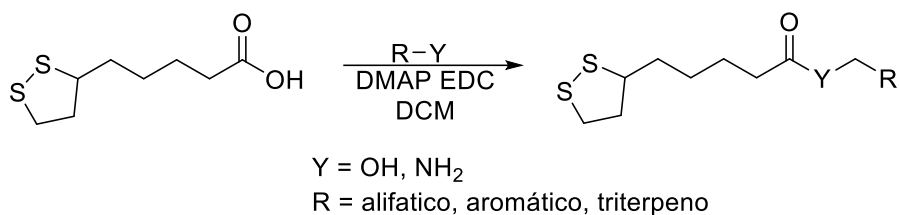
FF: 64,0-67,1°C

IV (Figura 18, página 37) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3423 (v da ligação O-H de álcool), 3366 (v da ligação N-H), 2919, 2852 (v da ligação C-H de alifático), 1685 (v da ligação C=O de carbamato)

RMN de ¹H (Figura 16, página 36) (200 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,28-1,30 (m, 12H, H3 a H8), 1,44 (s, 9H, H14), 1,53-1,57 (m, 4H, H2 e H9) 1,89 (sl, 1H, OH), 3,09 (q, 2H, *J*_{9,10,NH} = 6 Hz, H10), 3,63 (t, 2H, *J*_{1,2} = 6 Hz, H1), 4,61 (sl 1H, NH)

RMN de ¹³C (Figura 17, página 37) (50 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 25,9 (C3); 26,9 (C8); 28,6 (C14, 3xCH₃); 29,4; 29,5; 29,6; 30,2; 32,9 (C4 a C7, C9); 33,2 (C2); 40,8 (C10); 63,1 (C1); 79,2 (C13); 156,2 (C=O, carbamato)

5.4.5 Síntese de éteres, amidas e diamida do ácido lipóico ⁴³

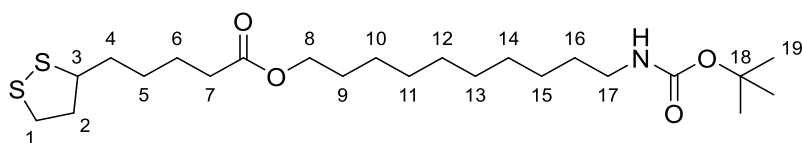


Em um balão de fundo redondo dissolveu-se o álcool, a amina ou a diamina correspondente (1,0 equiv.) em 10 mL de DCM, em seguida adicionou-se o ácido lipóico. A mistura da reação foi resfriada a 0°C e mantida sob atmosfera de N₂ e, em seguida, adicionaram-se DMAP (0,5 equiv.) e EDC. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 12 horas ou mais e a temperatura ambiente. O desenvolvimento da reação foi acompanhando por CCD (eluente: acetato de etila/ hexano 50/50; revelador: iodo). A mistura resultante foi lavada com as seguintes soluções: HCl 1 molL⁻¹ (3 x 10 mL), solução saturada de NaHCO₃ (3 x 10 mL) e solução saturada de NaCl (1 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Foram obtidos os produtos **8**, **20**, **25** e **29** a **33** com 50 a 93% de rendimento, as condições reacionais encontram-se na Tabela 3

Tabela 3. Condições reacionais para a síntese de éteres e amidas do ácido lipóico, empregando EDC e DMAP.

R-Y	Reagentes			Produto	Tempo de reação (h)	Purificação em Coluna	Rendimento (%)
	Equivalentes						
	Ácido lipóico	DMAP	EDC				
<i>tert</i> -butil-1-hidroxi-10-decilcarbamato	1,0	0,5	1,5	8	16	-	77
<i>tert</i> -butil-2-hidroxi-2-etilcarbamato	1,0	0,5	1,5	20	16	-	93
<i>tert</i> -butil-3-aminometil-benzilcarbamato	1,0	0,5	1,5	25	24	Gradiente Act/Hex	50
Lupeol	4,0	1,5	4,5	29	16	Isocrática CHCl ₃ /Hex (2:8)	51
Eugenol	1,0	0,5	1,5	30	16	Gradiente CHCl ₃ /Hex	60
3-(hidroximetil)-7-metoxi-1H-isocromen-1-ona	2,0	0,5	2,5	31	16	-	88
3-amino-7-dietilaminocumarina	1,0	0,5	1,5	32		-	90
<i>m</i> -xilenodiamina	2,0	0,5	3,0	33	16	-	82

Pentanoato de 10-((*terc*-butoxicarbonil)amino)decila 5-(1,2-ditiolan-3-il) (**8**)



FM: C₂₃H₄₃NO₄S₂

MM: 461,72 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

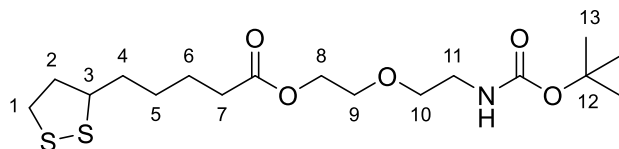
Rendimento: 77%

IV (Figura 67, página 107) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3376 (ν da ligação N-H), 2927, 2855 (ν da ligação C-H de alifático), 1710 (ν da ligação C=O)

RMN de ¹H (Figura 19, página 40) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,23-1,38 (m, 12H, H10 a H15), 1,39-1,50 (m, 13H, H5, H16 e H19), 1,52-1,70 (m, 6H, H4, H6 e H9), 1,82-1,90 (m, 1H, H2), 2,26 (t, *J*_{7,6} = 8 Hz, H7), 2,37-2,45 (m, 1H, H2'), 3,03-3,20 (m, 4H, H1 e H17), 3,48-3,55 (m, 1H, H3), 4,00 (t, 2H, *J*_{8,9} = 6Hz, H8)

RMN de ¹³C (Figura 21, página 42) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 24,7 (C6); 25,9 (C10); 26,7 (C15); 28,4 (C19); 28,6 (C5 e C9); 28,8; 29,2; 29,3; 29,4; 29,5 (C11 a C14); 30,1 (C16); 34,1 (C7); 34,6 (C4); 38,5 (C1); 40,2 (C2); 40,6 (C17); 56,3 (C3); 64,5 (C8); 78,9 (C18) ;156,0 (C=O, carbamato); 173,6 (C=O)

Pentanoato de 2-(2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)etoxi)etila 5-(1,2-ditiolan-3-il) (**20**)



FM: C₁₇H₃₁NO₅S₂

MM: 393,56 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

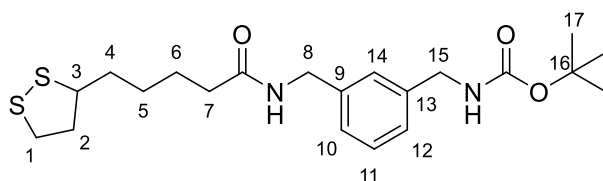
Rendimento: 93%

IV (Figura 71, página 109) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3377 (ν da ligação N-H), 2973, 2931 (ν da ligação C-H de alifático), 1709 (ν da ligação C=O), 1167, 1123 (ν da ligação C-O)

RMN de ^1H (Figura 32, página 56) (400 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição): 1,42-1,54 (m, 11H, H5 e H13), 1,63-1,73 (m, 4H, H4 e H6), 1,86-1,96 (m, 1H, H2), 2,36 (t, 2H, $J_{7,6} = 8$ Hz, H7), 2,42-2,50 (m, 1H, H2'), 3,08-3,21 (m, 2H, H1), 3,30-3,32 (m, 2H, H11), 3,53-3,55 (m, 2H, H10), 3,56-3,60 (m, 1H, H3), 3,65-3,67 (m, 2H, H9), 4,21-4,23 (m, 2H, H8)

RMN de ^{13}C (Figura 68, página 107) (100 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), atribuição): 23,6 (C6); 27,4 (C13); 27,7 (C5); 32,9 (C7); 32,6 (C4); 37,5 (C1); 39,2 (C2 e C11); 53,3 (C3); 62,3 (C8); 67,9 (C9); 69,1 (C10); 78,3 (C12); 154,9 (C=O, carbamato); 172,4 (C=O)

Pentanamida de 1-(1-(*terc*-butoxicarbonil)amino)metil)benzila-5-(1,2-ditiolan-3-il) (**25**)



FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$

MM: 424,62 g mol $^{-1}$

Aspecto: sólido amarelo

Rendimento: 50%

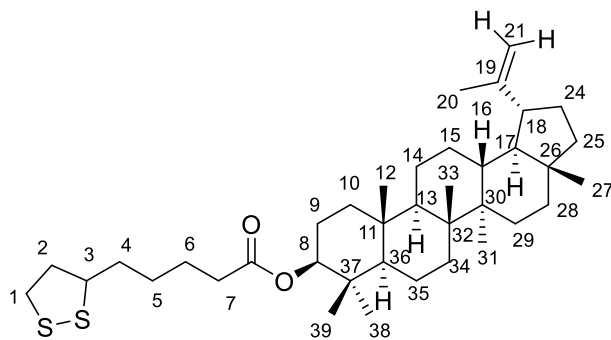
FF: 71,1-75,9°C

IV (Figura 75, página 111) (ATR, $\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3377 (ν da ligação N-H), 2973, 2931 (ν da ligação C-H de alifático), 1683 (ν da ligação C=O)

RMN de ^1H (Figura 36, página 60) (400 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição): 1,35-1,40 (m, 1H, H5), 1,45 (s, 9H, H17), 1,65-1,74 (m, 4H, H4 e H6), 1,85-1,94 (m, 1H, H2), 2,24 (t, 2H, $J_{7,6} = 8$ Hz, H7), 2,41-2,49 (m, 1H, H2'), 3,07-3,20 (m, 2H, H1), 3,46-3,54 (m, 1H, H3), 4,27 (s, 2H, H15), 4,39-4,40 (m, 2H, H8), 7,16-7,19 (m, 3H, H10 a H12), 7,27-7,31 (m, 1H, H14)

RMN de ^{13}C (Figura 72, página 109) (100 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), atribuição): 25,5 (C6); 28,5 (C17); 28,9 (C5); 34,6 (C4); 36,2 (C7); 38,5 (C1); 40,3 (C2); 43,7 (C8 e C15); 56,5 (C3); 126,6; 126,9; (C10 a C12) 129,1 (C14); 138,6; 139,6 (C9 e C13); 156,1 (C=O, carbamato); 173,1 (C=O)

Pentanoato de 3 β -lup19(21)-eno-5-(1,2-ditiolan-3-il) (**29**)



FM: C₃₈H₆₂O₂S₂

MM: 615,03 g mol⁻¹

Aspecto: sólido branco amarelado

Rendimento: 51%

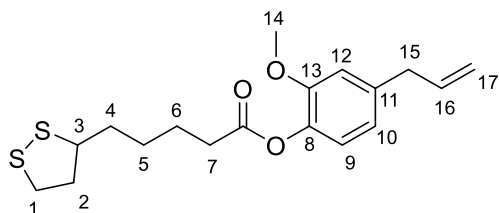
FF: 145-147 °C

IV (Figura 78, página 112) (KBr, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2938 (ν da ligação C-H de alifático), 1728 (ν da ligação C=O de éster), 1256 (ν da ligação C-O de éster)

RMN de ¹H (Figura 38, página 63) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 0,79, 0,84, 0,86, 0,94, 0,99, 1,03 (s, CH₃), 1,18-1,66 (m, CH₂), 1,68 (s, 3H, H₂₀), 1,86-1,97 (m, CH₂) 2,29-2,48 (m, 5H, H₂, H₇ e H₁₉), 3,10-3,19 (m, 2H, H₁), 3,53-3,60 (m, 1H, H₃), 4,45-4,50 (m, 1H, H₈), 4,57 (s, 1H, H₂₁), 4,69 (s, 1H, H₂₁)

RMN de ¹³C (Figura 39, página 63) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 14,8; 16,2; 16,4; 16,8; 18,2; 21,2; 24,0; 27,8; 28,3; 29,0; 30,1; 34,5; 34,8; 35,8; 34,5; 34,8; 35,8; 38,1; 38,3; 38,7; 40,2; 40,5; 43,1; 43,24; 48,2; 48,5; 50,6; 55,6; 56,6 (C₃); 81,1 (C₈); 109,6 (C₂₁), 151,2 (C₁₉), 173,5 (C=O)

Pentanoato de 4-alil-2-metoxifenila-5-(1,2-ditiolan-3-il) (**30**)



FM: C₁₈H₂₄O₃S₂

MM: 352,51 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

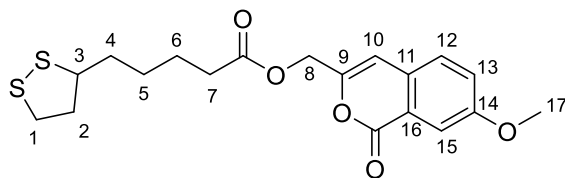
Rendimento: 60%

IV (Figura 82, página 114) (KBr, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2934 (ν da ligação C-H de alifático), 1760 (ν da ligação C=O de éster), 1508 (ν da ligação C=C)

RMN de ¹H (Figura 40, página 64) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,53-1,64 (m, 2H, H5), 1,70-1,84 (m, 4H, H4 e H6), 1,88-1,96 (m, 1H, H2), 2,43-2,51 (m, 1H, H2'), 2,58 (t, 2H, *J*_{7,6}= 8Hz, H7), 3,08-3,21 (m, 2H, H1), 3,37 (d, 2H, *J*_{15,16}= 8Hz, H15), 3,56-3,63 (m, 1H, H3), 3,80 (s, 3H, H14), 5,07-5,12 (m, 2H, H17), 5,90-6,00 (m, 1H, H16), 6,75-6,78 (m, 2H, H10 e H12), 6,93 (d, 1H, *J*_{9,10}= 8Hz, H9)

RMN de ¹³C (Figura 41, página 65) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 24,9 (C6); 28,8; 29,9 (C5 e C15); 34,0; 34,8 (C4 e C7); 38,7 (C1); 40,4 (C2); 56,0 (C14); 56,6 (C3); 112,9 (C12); 116,3 (C17); 120,8 (C10); 122,7 (C9); 137,2 (C16); 138,2 (C8); 139,1 (C11); 151,1 (C13); 171,8 (C=O)

Pentanoato de (7-metoxi-1-oxo-1H-isocromen-3-il)metila-5-(1,2-ditiolan-3-il) (**31**)



FM: C₁₉H₂₂O₅S₂

MM: 394,50 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

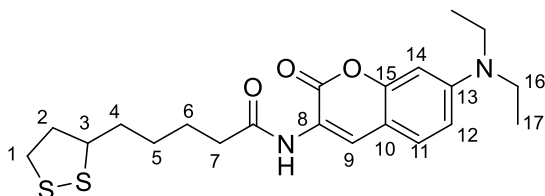
Rendimento: 88%

IV (Figura 82, página 114) (KBr, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 2928 (ν da ligação C-H de alifático), 1736 (ν da ligação C=O), 1350 (ν da ligação C-O de lactona)

RMN de ¹H (Figura 42, página 68) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,45-1,53 (m, 2H, H5), 1,66-1,69 (m, 4H, H4 e H6), 1,86-1,94 (m, 1H, H2), 2,40-2,49 (m, 3H, H2', H7), 3,07-3,19 (m, 2H, H1), 3,52-3,59 (m, 1H, H3), 3,91 (s, 3H, H17), 4,91 (s, 2H, H8), 6,55 (s, 1H, H10), 7,30 (d, 1H, *J*_{13,12}= 8Hz, H13), 7,38 (d, 1H, *J*_{12,13}= 8Hz, H12), 7,68 (s, 2H, H15)

RMN de ^{13}C (Figura 43, página 68) (100 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), atribuição): 24,6 (C6); 28,7 (C5); 33,9 (C7); 34,6 (C4); 38,6 (C1); 40,3 (C2); 55,9 (C17); 56,3 (C3); 62,3 (C8); 106,2 (C10); 110,4 (C15); 122,2 (C16); 124,5 (C13); 127,6 (C12); 129,9 (C11); 148,9 (C9); 160,1 (C14); 162,2 (C=O, isocumarina); 172,9 (C=O)

Pentanamida de N-(7-(dietilamino)-2-oxo-2H-cromen-6-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il) (**32**)



FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$

MM: 420,59 g mol $^{-1}$

Aspecto: sólido laranja escuro

Rendimento: 90%

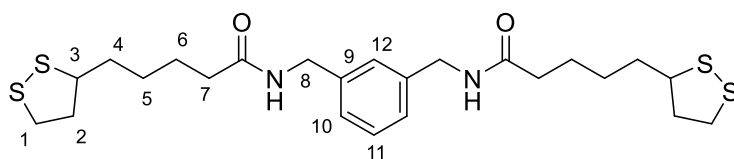
FF: 152,2-154,0°C

IV (Figura 87, página 117) (KBr, $\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3320 (ν da ligação N-H de amida), 2970, 2924 (ν da ligação C-H de alifático), 1710 (ν da ligação C=O de amida), 1666 (ν da ligação C=O de lactona), 1620 (ν da ligação C=C), 1356 (ν da ligação C-O de lactona), 1260 (ν da ligação C-N)

RMN de ^1H (Figura 44, página 71) (400 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição): 1,20 (t, 6H, $J_{17,16} = 4\text{Hz}$, H17), 1,50-1,58 (m, 2H, H5), 1,73-1,78 (m, 4H, H4 e H6), 1,88-1,90 (m, 1H, H2), 2,40-2,48 (m, 3H, H2' e H7), 3,08-3,21 (m, 2H, H1), 3,40 (q, 4H, $J_{16,17} = 4\text{Hz}$, H16), 3,55-3,62 (m, 1H, H3), 6,52 (s, 1H, H14), 6,64 (d, 1H, $J_{12,11} = 8\text{Hz}$, H12), 7,28 (d, 1H, $J_{11,12} = 8\text{Hz}$, H11), 7,91 (s, 1H, H9), 8,58 (s, 1H, NH)

RMN de ^{13}C (Figura 45, página 71) (100 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), atribuição): 12,6 (C17); 25,3 (C6); 28,9 (C5); 34,8; 37,5; 38,6; (C1, C4 e C7); 40,3 (C2); 44,9 (C16), 56,4 (C3); 97,6 (C14); 108,5 (C10); 109,9 (C12), 119,1 (C11); 125,8; 128,8 (C8 e C9); 149,5 (C13); 152,8 (C15); 159,8 (C=O, cumarina); 171,8 (C=O)

Pentanamida de N,N'-(1,3-fenilenobis(metileno))bis(5-(1,2-ditiolan-3-il) (33)



FM: C₂₄H₃₆N₂O₂S₄

MM: 512,80 g mol⁻¹

Aspecto: solido amarelo

Rendimento: 82%

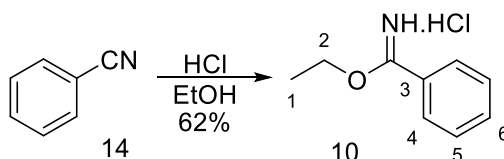
FF: 118-120 °C

IV (Figura 88, página 117) (KBr, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3292 (v da ligação N-H), 2918, 2850 (v da ligação C-H de alifático), 1638 (v da ligação C=O)

RMN de ¹H (Figura 46, página 72) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,43-1,49 (m, 4H, H5), 1,64-1,70 (m, 8H, H4 e H6), 1,85-1,94 (m, 2H, H2), 2,25 (t, 4H, *J*_{7,6} = 8 Hz, H7), 2,41-2,49 (m, 2H, H2'), 3,07-3,20 (m, 4H, H1), 3,53-3,57 (m, 2H, H3), 4,37 (s, 4H, H8), 6,47 (sl, 2H, NH), 7,15-7,18 (m, 3H, H10 e H11), 7,26-7,30 (m, 1H, H12)

RMN de ¹³C (Figura 47, página 73) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 25,7 (C6); 29,1 (C5); 34,8; 36,4 (C4 e C7); 38,7 (C1); 40,5 (C2); 43,7 (C8); 56,7 (C3); 127,1; 127,3; 129,3 (C10 a C12); 138,9 (C9); 173,4 (C=O)

5.4.6 Síntese do cloridrato de etilbenzimidato (10) ⁴⁷

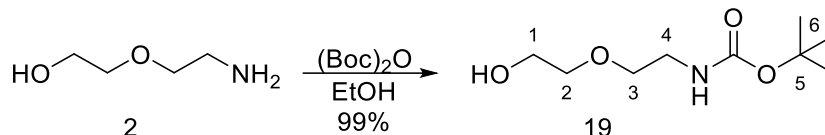


Em um balão de fundo redondo dissolveu-se a benzonitrila (48,5 mmol) em 10 mL de etanol, em seguida, borbulhou-se HCl, formado pela adição de ácido sulfúrico concentrado em NaCl, durante 3 horas em banho de gelo. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 16 horas e mantida no congelador por 12 horas. O precipitado foi filtrado e lavado com etanol, obtendo-se um sólido branco com rendimento de 62%.

FM: C₉H₁₂CINO

RMN de ^{13}C (Figura 28, página 51) (100 MHz, D_2O , δ (ppm), atribuição): 12,82 (CH_3); 170,7 ($\text{C}=\text{NH}$)

5.4.8 Síntese do *tert*-butil-2-hidroxietoxi-2-etilcarbamato (**19**)⁵²



Em um balão de fundo redondo adicionou-se o aminoálcool **2** (2,0 g, 19,12 mmol) em 20 mL de etanol absoluto, e em seguida o dicarbonato de di-*tert*-butila (4,36 g, 19,12 mmol) a 0°C. A mistura da reação foi mantida sob agitação magnética por 2 horas a temperatura ambiente. O fim da reação foi verificado por CCD (eluente: acetato de etila/ hexano 50/50; revelador: Iodo) pela ausência do material de partida. O solvente foi removido sob pressão reduzida e adicionaram-se 30 mL de DCM. A fase orgânica foi lavada com água (3 x 20 mL), secada com Na_2SO_4 e o solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se um óleo incolor com 99% de rendimento.

FM: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_4$

MM: 205,25 g mol^{-1}

Aspecto: óleo incolor

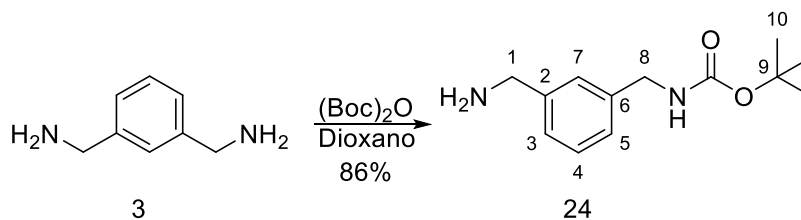
Rendimento: 99%

IV (Figura 64, página 105) (ATR, $\bar{\nu}$, cm^{-1}): 3346 (ν da ligação N-H), 2975, 2933 (ν da ligação C-H de alifático), 1687 (ν da ligação C=O de carbamato), 1167, 1121 (ν da ligação C-O)

RMN de ^1H (Figura 31, página 55) (200 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), multiplicidade, integração, J (Hz), atribuição): 1,45 (s, 9H, H6), 3,29-3,34 (m, 2H, H4), 3,53-3,60 (m, 4H, H2 e H3), 3,71-3,76 (m, 2H, H1), 5,32 (s 1H, OH)

RMN de ^{13}C (Figura 63, página 105) (50 MHz, CDCl_3 , δ (ppm), atribuição): 28,4 (C6); 40,5 (C4); 61,5 (C1); 70,3; 72,3 (C2 e C3); 79,3 (C5); 156,3 (C=O, carbamato)

5.4.9 Síntese do *tert*-butil-3-aminometil-benzilcarbamato (24) ⁵³



Em um balão de fundo redondo adicionaram-se 30 mL de solução de *m*-xilenodiamina (6,12g, 45 mmol) em dioxano a 0°C. Em seguida, adicionaram-se, com auxílio de um funil de adição, 30 mL de solução de dicarbonato de di-*tert*-butila (2,45g, 11 mmol) em dioxano durante 3 horas. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética por 24 horas. Em seguida, o solvente da mistura foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido branco, insolúvel em água. Adicionaram-se 75 mL de água ao sólido e filtrou-se a mistura a vácuo. O filtrado foi extraído com DCM (3 x 50 mL) e lavado com água (6 x 50 mL). A fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ e o solvente foi removido sob pressão reduzida obtendo-se um óleo amarelo claro, com rendimento de 86%.

FM: C₁₃H₂₀N₂O₂

MM: 236,32 g mol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo claro

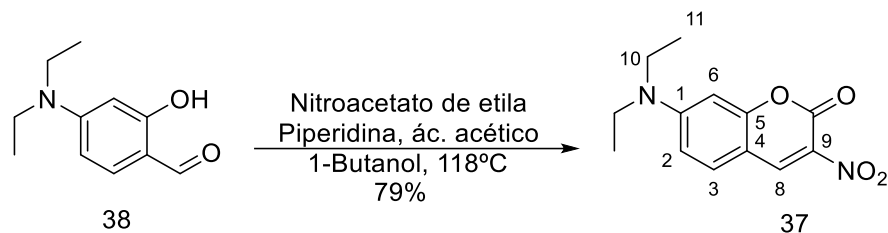
Rendimento: 86%

IV (Figura 66, página 106) (ATR, $\bar{\nu}$, cm⁻¹): 3356 (ν da ligação N-H), 2976, 2930 (ν da ligação C-H de alifático), 1692 (ν da ligação C=O de carbamato)

RMN de ¹H (Figura 35, página 59) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,44 (s, 9H, H10), 3,94 (s, 2H, H8), 4,28-4,31 (m, 2H, H1), 7,14-7,22 (m, 3H, H3 a H5), 7,24-7,30 (m, 1H, H7)

RMN de ¹³C (Figura 65, página 106) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 28,2 (C10); 44,4 (C8); 46,0 (C1); 79,0 (C9); 125,8; 128,5; (C3, C4, C5 e C7); 139,3 (C6); 143,3 (C2); 155,9 (C=O, carbamato)

5.4.10 Síntese da 7-dietilamino-3-nitrocumarina (37)⁵⁹



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 20 mL de 1-butanol, 4-dietilaminossalicilaldeído **38** (1,4 g, 7,2 mmol), nitroacetato de etila (0,8 mL, 7,2 mmol) e ácido acético (0,2 mL). A mistura foi mantida sob refluxo por 24 horas. Posteriormente a mistura foi resfriada à temperatura ambiente, em seguida adicionaram-se 100 mL de água destilada e observou-se a formação de precipitado alaranjado. O precipitado foi filtrado e obteve-se um sólido laranja com 79% de rendimento.

FM: C₁₃H₁₄N₂O₄

MM: 262,26 g mol⁻¹

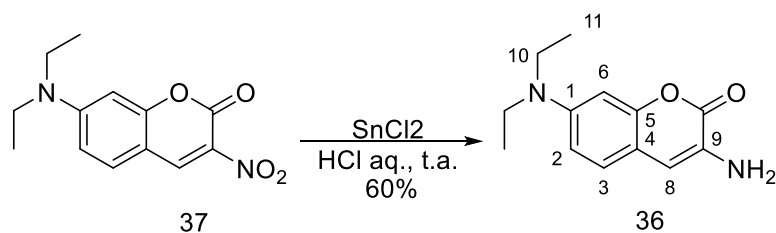
Aspecto: sólido laranja

Rendimento: 79%

RMN de ¹H (Figura 83, página 115) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,24 (t, 6H, *J*_{11,10} = 8 Hz, H11), 3,47 (q, 4H, *J*_{10,11} = 8 Hz, H10), 6,44 (s, 1H, H6), 6,68 (d, 1H, *J*_{2,3} = 8,6 Hz, H2), 7,40 (d, 1H, *J*_{3,2} = 8,6 Hz, H3), 8,66 (s, 1H, H8)

RMN de ¹³C (Figura 84, página 115) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 12,4 (C11); 45,5 (C10); 96,8 (C6); 106,2 (C4); 111,2 (C2); 132,5 (C3 e C4); 143,3 (C8 e C9); 153,4 (C1); 154,6 (C=O); 158,7 (C5)

5.4.11 Síntese da 3-amino-7-dietilaminocumarina (36)⁵⁹



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 20 mL de HCl 37,4% e cloreto estânico di-hidratado (6,4 g, 28,4 mmol). Na suspensão foi adicionado, aos poucos, 7-dietilamino-3-nitrocumarina **37** (0,25 g, 0,95 mmol) à temperatura ambiente em um intervalo de 30 minutos. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética durante quatro horas e, em seguida, foi vertida em gelo picado (20 g). O pH do meio foi ajustado para a faixa alcalina, utilizando-se uma solução de NaOH 5 mol L⁻¹. O produto foi extraído com éter dietílico, a fase orgânica foi lavada com água, secada com Na₂SO₄ e o solvente evaporado sob pressão reduzida. Obteve-se um sólido amarelo com 60% de rendimento.

FM: C₁₃H₁₆N₂O₂

MM: 232,28 g mol⁻¹

Aspecto: sólido amarelo

Rendimento: 60%

RMN de ¹H (Figura 85, página 116) (400 MHz, CDCl₃, δ (ppm), multiplicidade, integração, *J* (Hz), atribuição): 1,19 (t, 6H, *J*_{11,10} = 8 Hz, H11), 3,38-3,39 (m, 4H, H10), 6,60-6,61 (m, 2H, H2 e H6), 6,68-6,70 (m, 1H, H8), 7,12-7,14 (m, 1H, H3)

RMN de ¹³C (Figura 86, página 116) (100 MHz, CDCl₃, δ (ppm), atribuição): 12,6 (C11); 44,7 (C10); 98,3 (C6); 109,6; 110,0; 114,4 (C2, C3, C4); 126,1; 127,8 (C8 e C9); 147,7 (C1); 151,8 (C=O); 160,4 (C5)

5.5 Ensaios de atividade Antiglicantes

Os ensaios para avaliar a atividade antiglicante das moléculas **8** e **29** a **33** foram realizados no Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO) no Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob orientação da Professora Marília Oliveira Fonseca Goulart e da Doutoranda Jadriane de Almeida Xavier. Foram realizados dois ensaios o BSA+(F+G) e o BSA+MG, em espectrofotômetro de fluorescência.

5.5.1 Ensaio BSA+(F+G)⁶⁰

O ensaio é feito a partir da reação da albumina bovina (BSA) com a glicose e frutose. Inicialmente foram preparadas três soluções, BSA (3 mg L⁻¹), frutose e glicose (mistura de 0,9008 g de cada açúcar em 25 mL de solução), amostra (1800 μm, 1mL). As soluções foram feitas em tampão fosfato (50 mM, pH7, NaCl 100 mM,

azida de sódio 0,002%) e a da amostra em DMSO. A solução da amostra foi diluída em diferentes concentrações (600 µm, 400 µm, 300 µm, 150 µm, 75 µm, 50 µm). Em um eppendorf (1,5 mL) foram adicionados 0,5 mL de amostra (em diferentes concentrações), de BSA e de F+G. Foi preparado um branco contendo apenas a amostra e tampão fosfato e o controle contendo apenas a proteína e o açúcar redutor. A aminoguanidina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. As soluções foram feitas em triplicatas e a leitura feita em espectrofotômetro de fluorescência, com excitação em 360 nm e emissão em 440 nm. Após sete dias de incubação a 37°C foi realizada a releitura. A inibição de AGEs foi calculada pela equação 1, na qual a intensidade de fluorescência da primeira leitura são descontadas da segunda leitura.

$$\% \text{ inibição de AGEs} = \left(1 - \frac{(\text{Intensidade de Fluorescência com inibidor})}{(\text{Intensidade de Fluorescência sem inibidor})} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

5.5.2 Ensaio BSA+MG⁶⁰

O ensaio foi feito a partir da reação da albumina bovina (BSA) com o metilglioxal. Inicialmente foram preparadas três soluções, BSA (3 mg L⁻¹), metilglioxal (1,5 mmol), amostra (1,5 mmol). As soluções foram feitas em tampão fosfato (50 mM, pH7, NaCl 100 mM, azida de sódio 0,002%) e a da amostra em DMSO. Em um eppendorf foram adicionados 0,5 mL de amostra e metilglioxal, após uma hora adicionou-se BSA. Foi preparado um branco contendo apenas a amostra em tampão fosfato e o controle contendo apenas a proteína e o metilglioxal. A aminoguanidina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. As soluções foram feitas em triplicatas e a leitura feita em espectrofotômetro de fluorescência, com excitação em 370 nm e emissão em 440 nm. Após dois dias de incubação a 37°C foi realizada a releitura. A inibição de AGEs foi calculada pela equação 1, na qual a intensidade de fluorescência da primeira leitura são descontadas da segunda leitura.

6 ANEXO

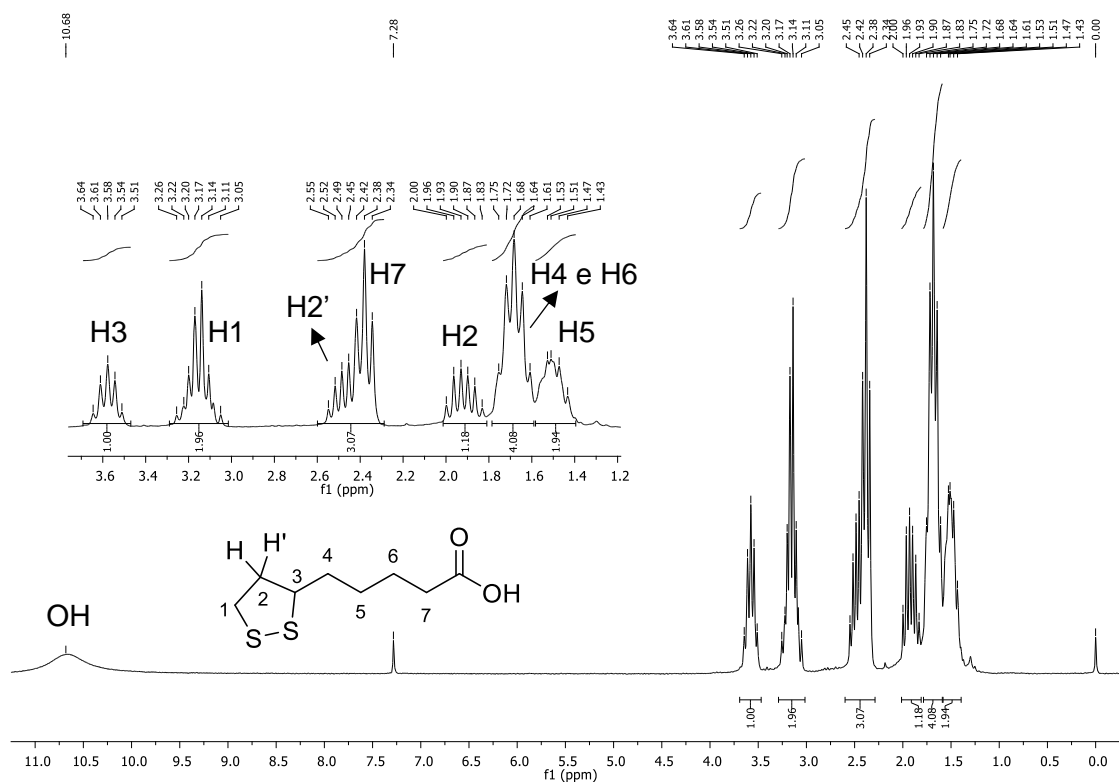


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H do ácido lipoico (200 MHz, CDCl_3).

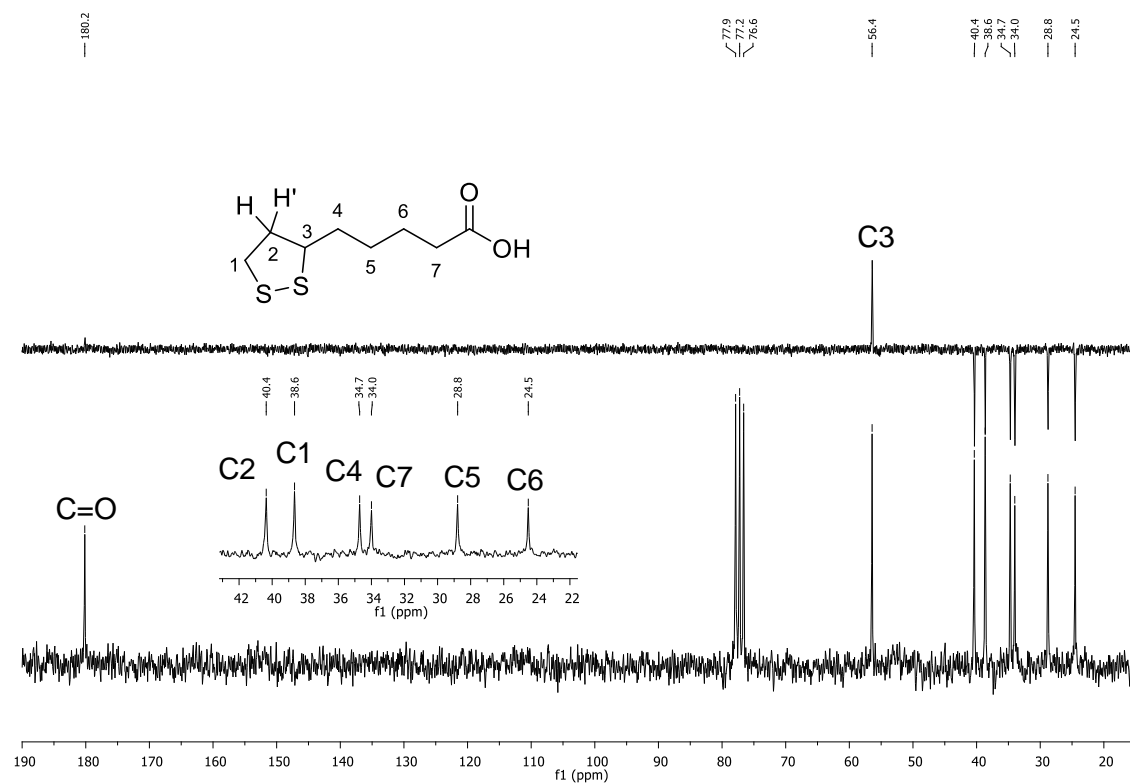


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do ácido lipoico (200 MHz, CDCl_3).

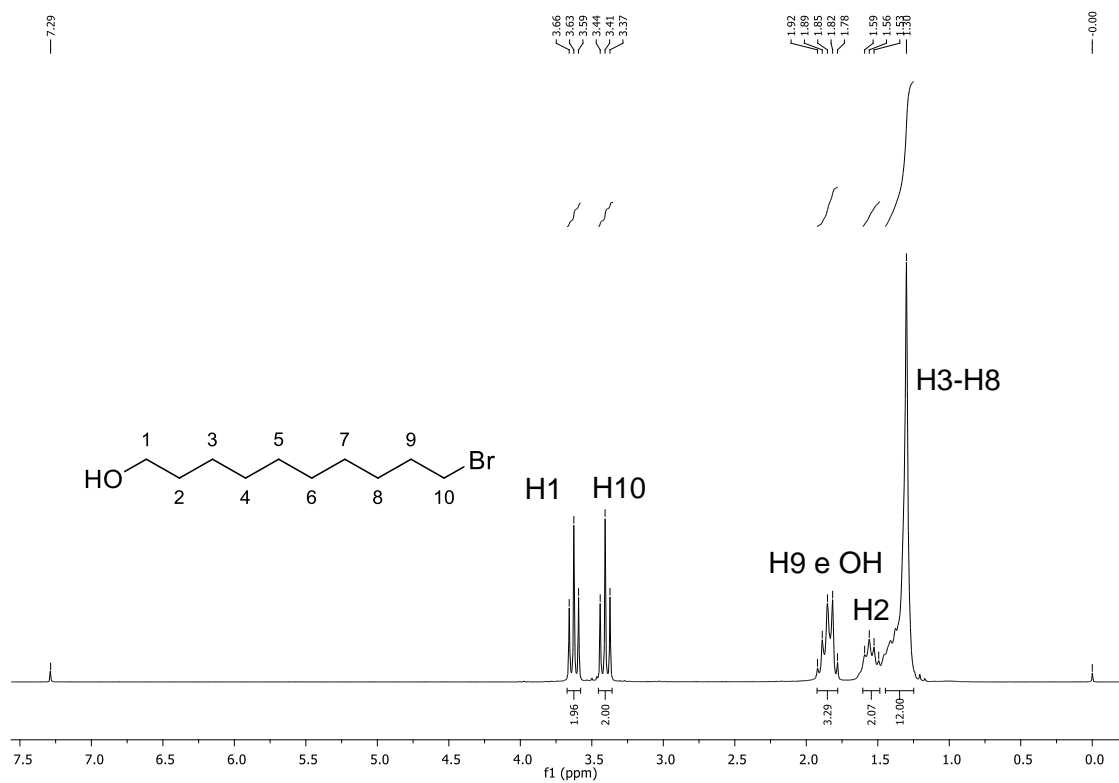


Figura 53. Espectro de RMN de ¹H do composto 5 (200 MHz, CDCl₃).

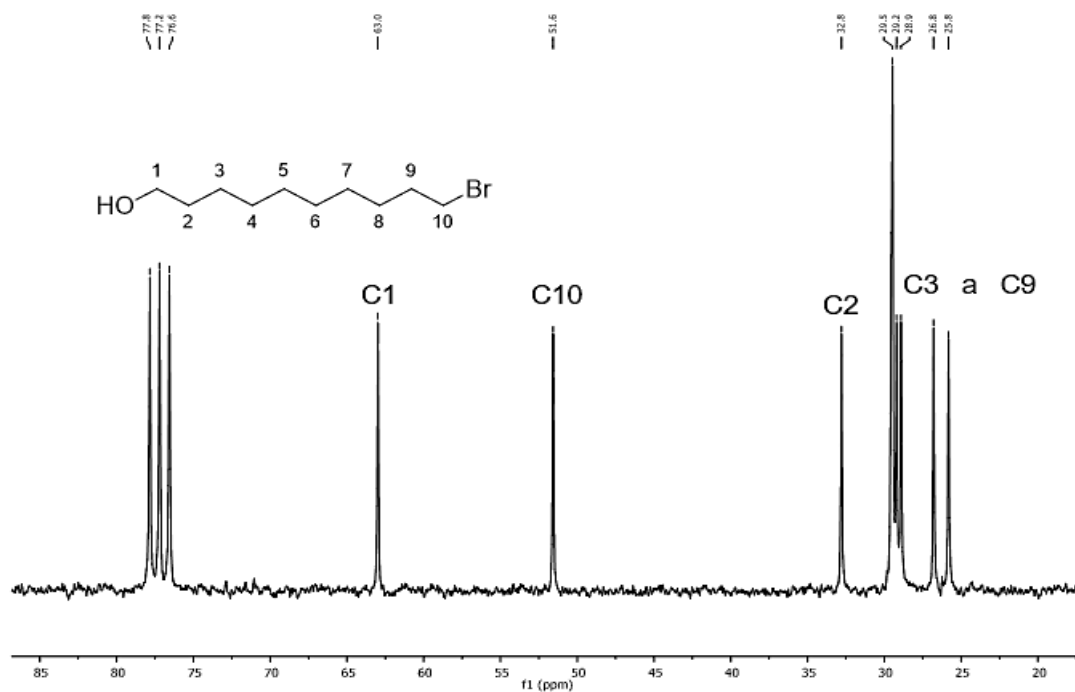


Figura 54. Espectro de RMN de ¹³C do composto 5 (50 MHz, CDCl₃).

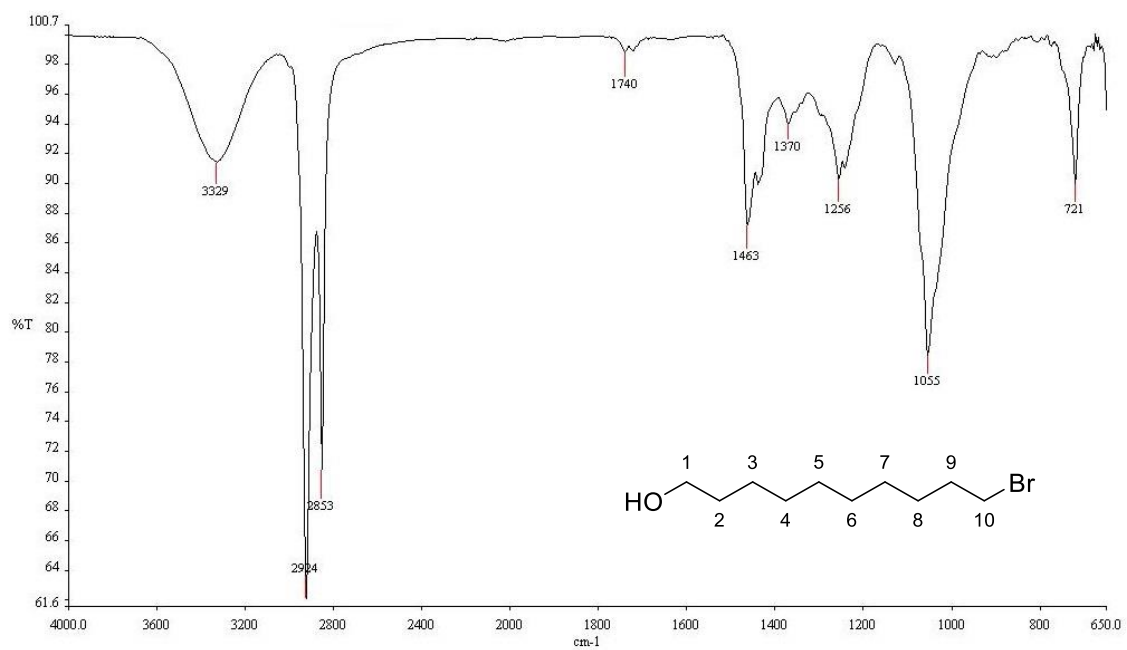


Figura 55. Espectro na região do IV (ATR) do composto 5.

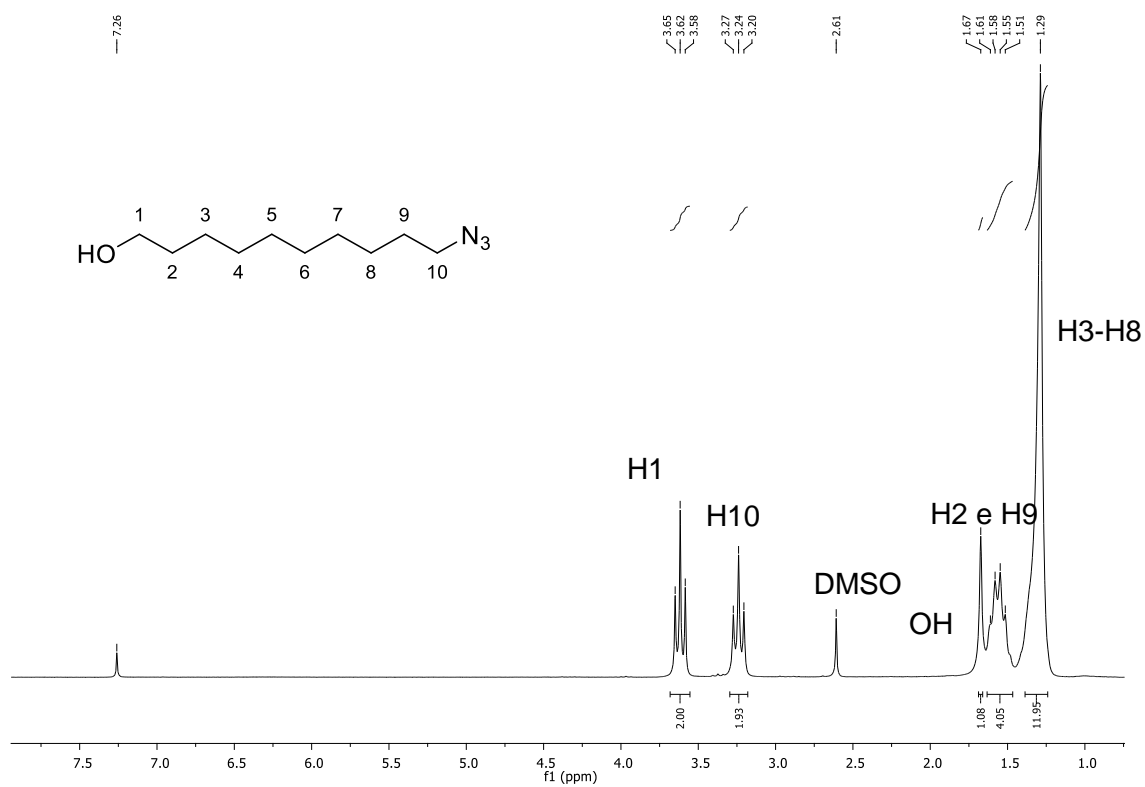


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H do composto 6 (200 MHz, CDCl_3).

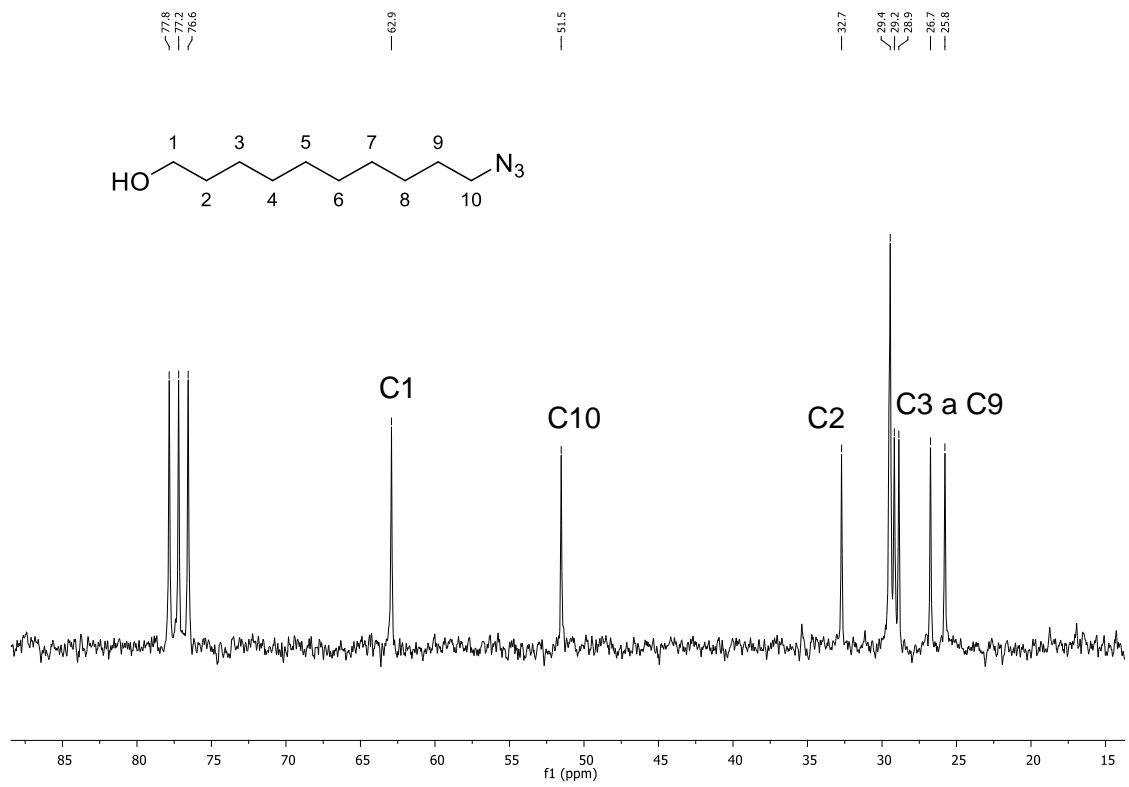


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6 (50 MHz, CDCl_3).

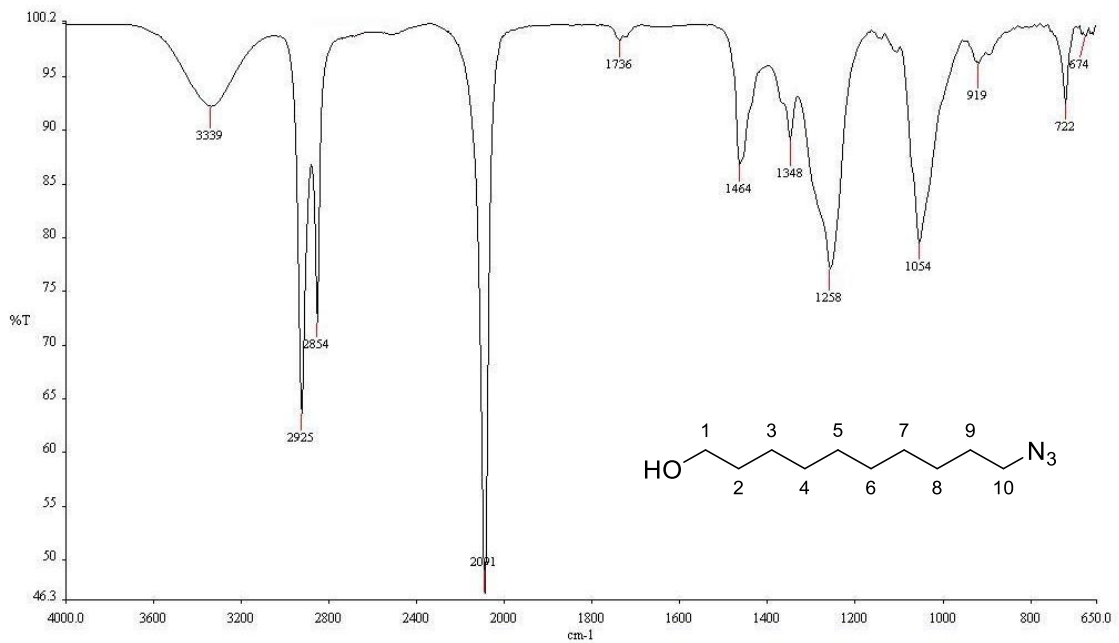


Figura 58. Espectro na região do IV (ATR) do composto 6.

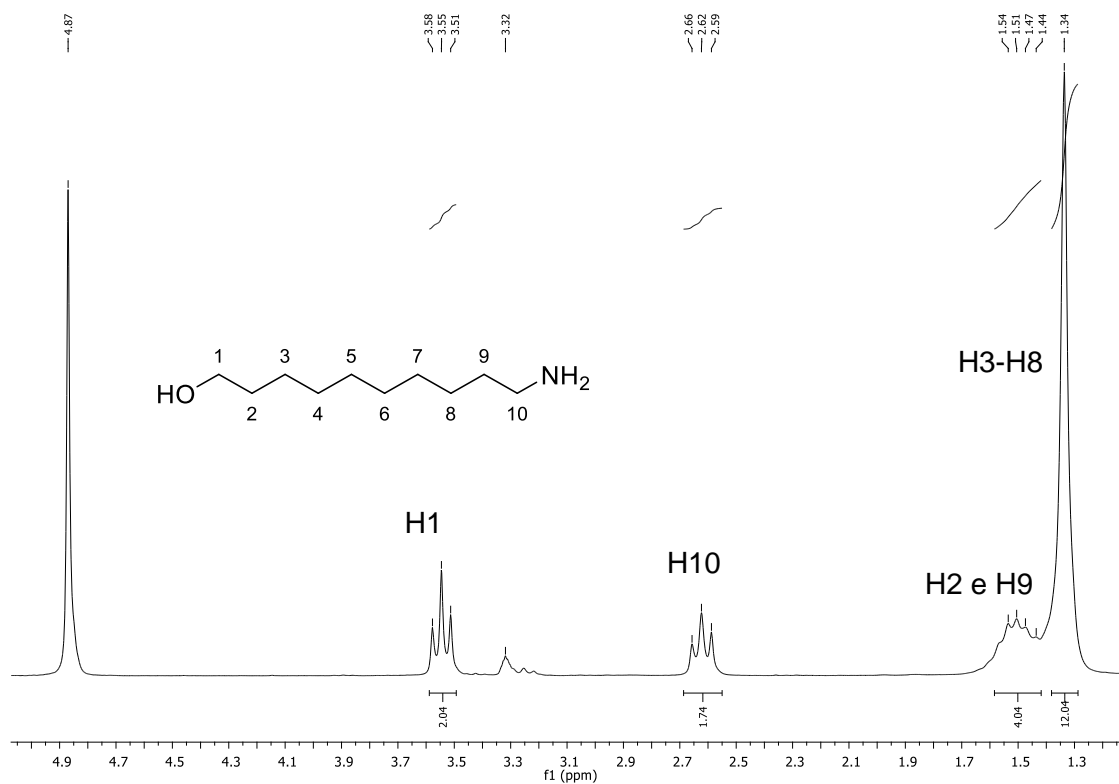


Figura 59. Espectro de RMN de ¹H do composto 1 (200 MHz, CD₃OD).

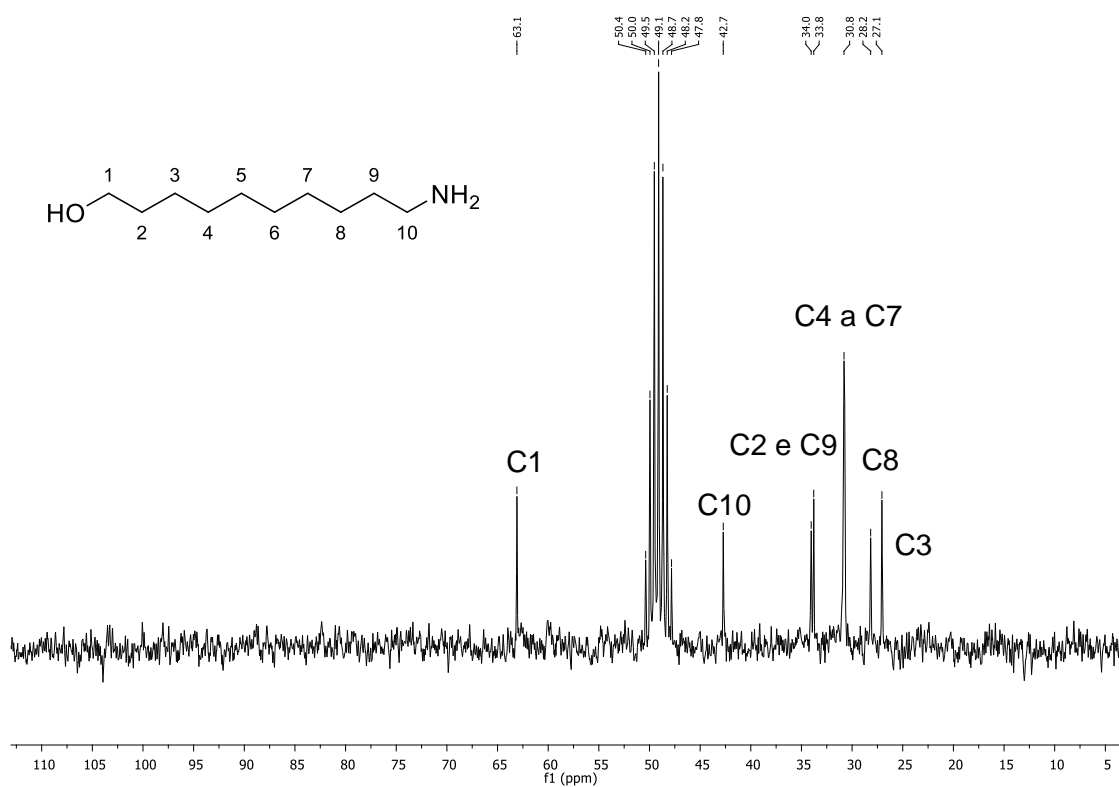


Figura 60. Espectro de RMN de ¹³C do composto 1 (50 MHz, CD₃OD).

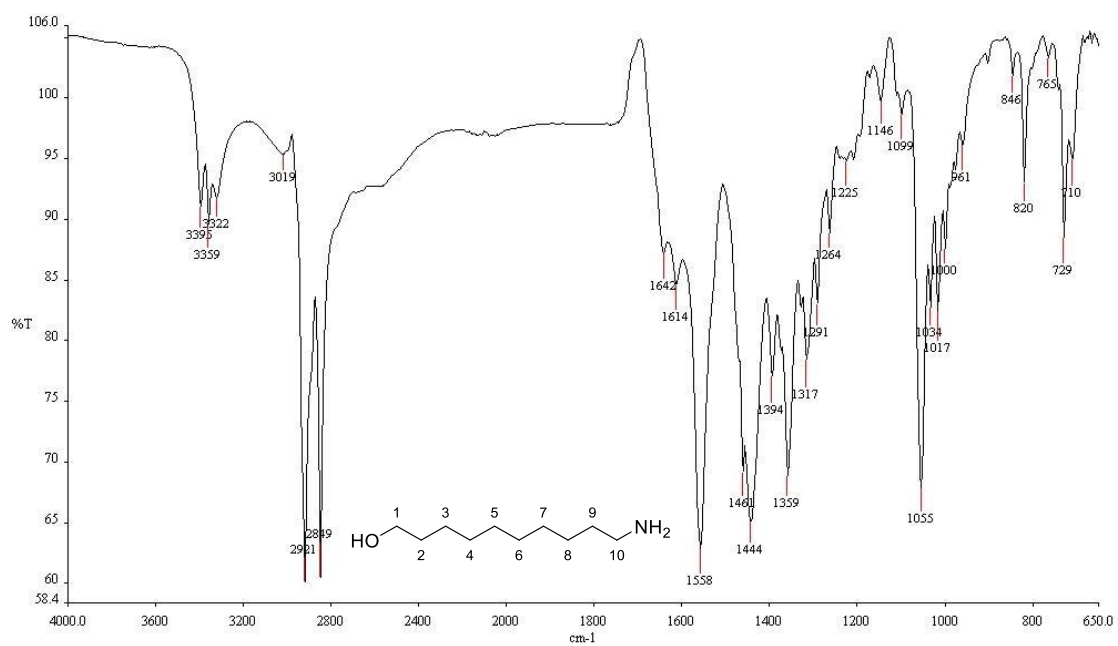


Figura 61. Espectro na região do IV (ATR) do composto 1.

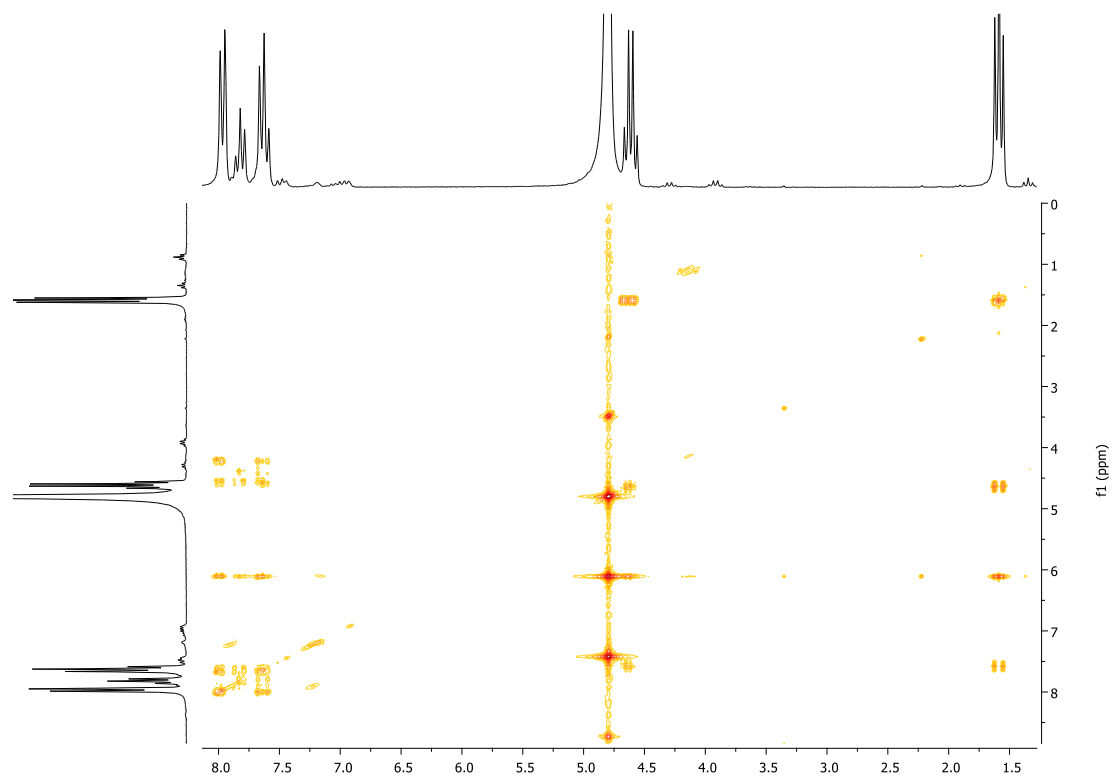


Figura 62. Mapa de correlação COSY do composto 10 (400MHz, CDCl₃).

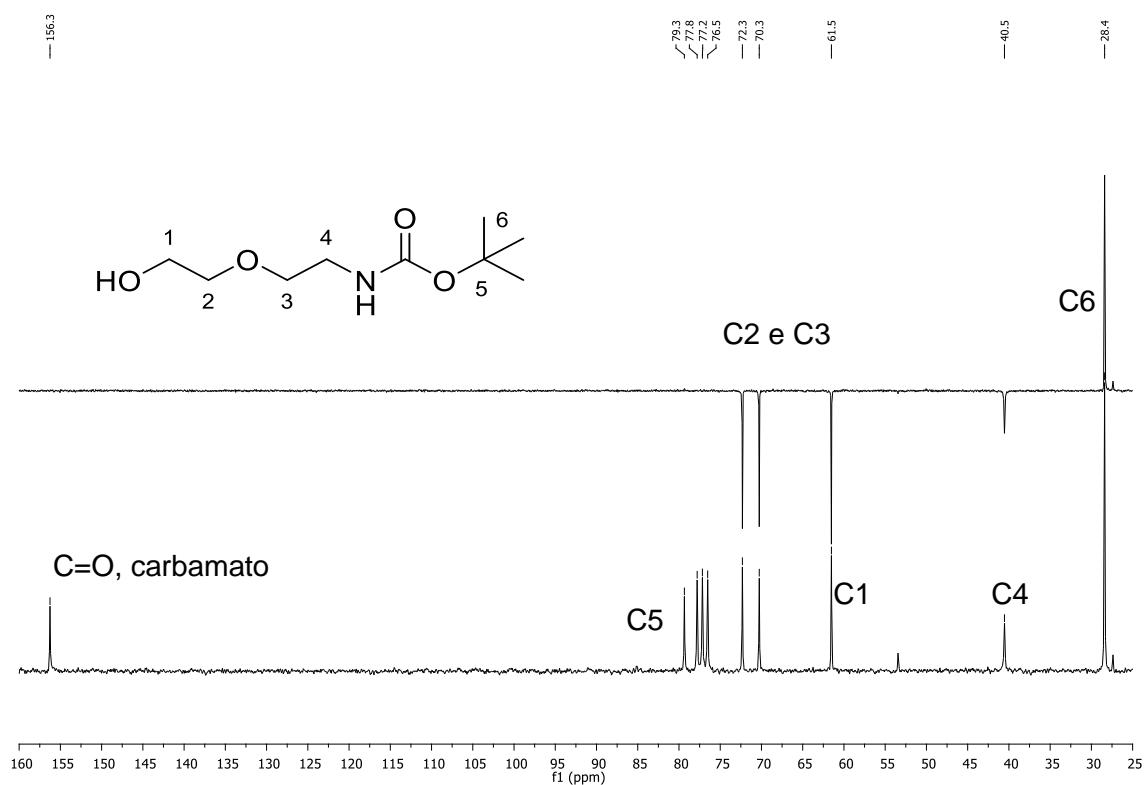


Figura 63. Espectro de RMN de ¹³C e subspectro de DEPT do composto 19 (50 MHz, CDCl₃).

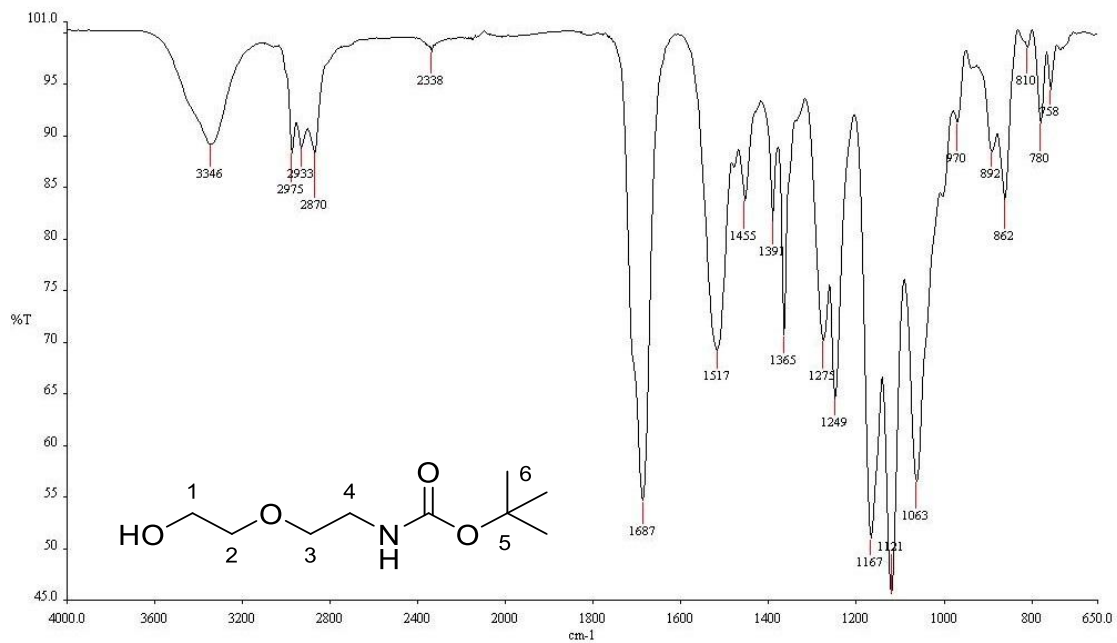


Figura 64. Espectro na região do IV (ATR) do composto 19.

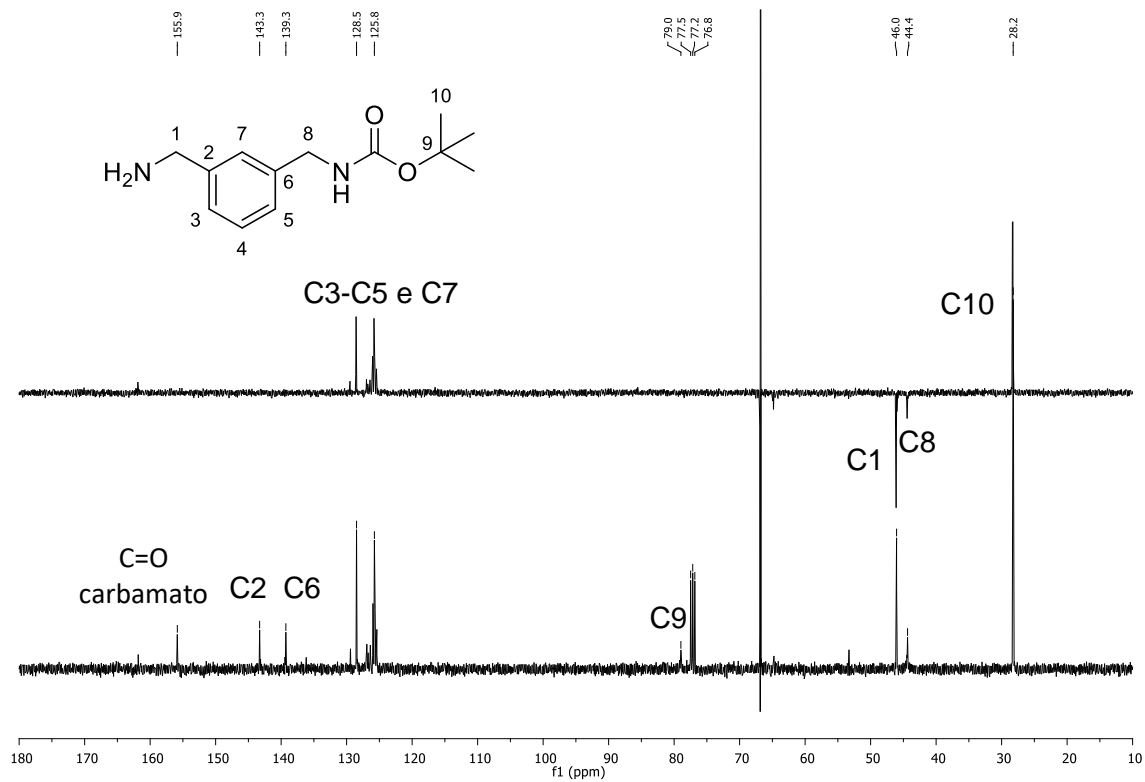


Figura 65. Espectro de RMN de ¹³C e subspectro de DEPT do composto 24 (100 MHz, CDCl₃).

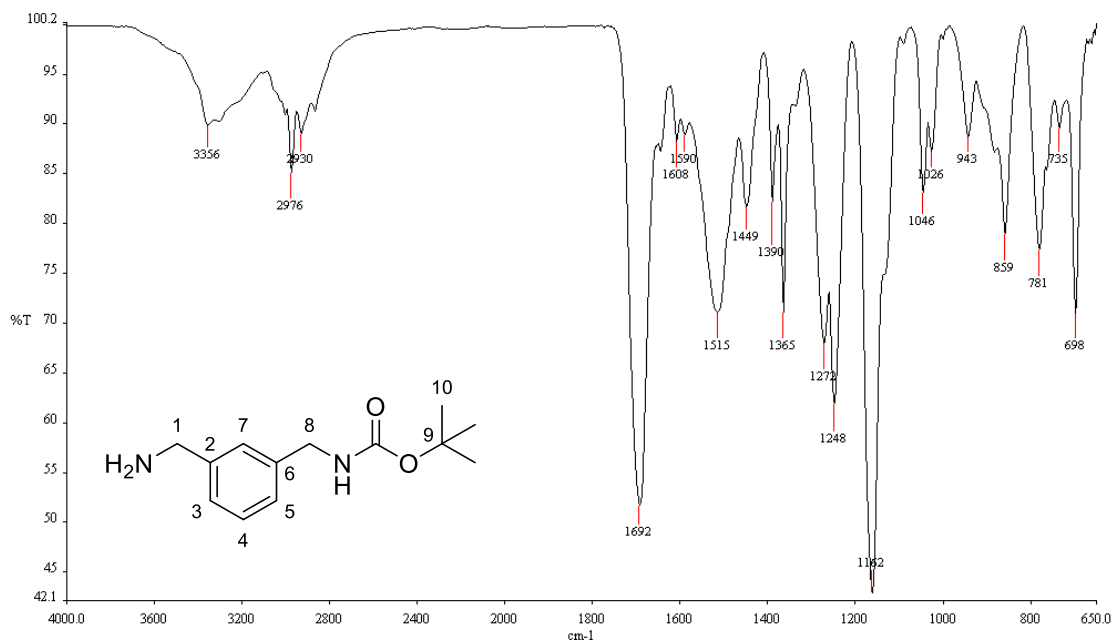


Figura 66. Espectro na região do IV (ATR) do composto 24.

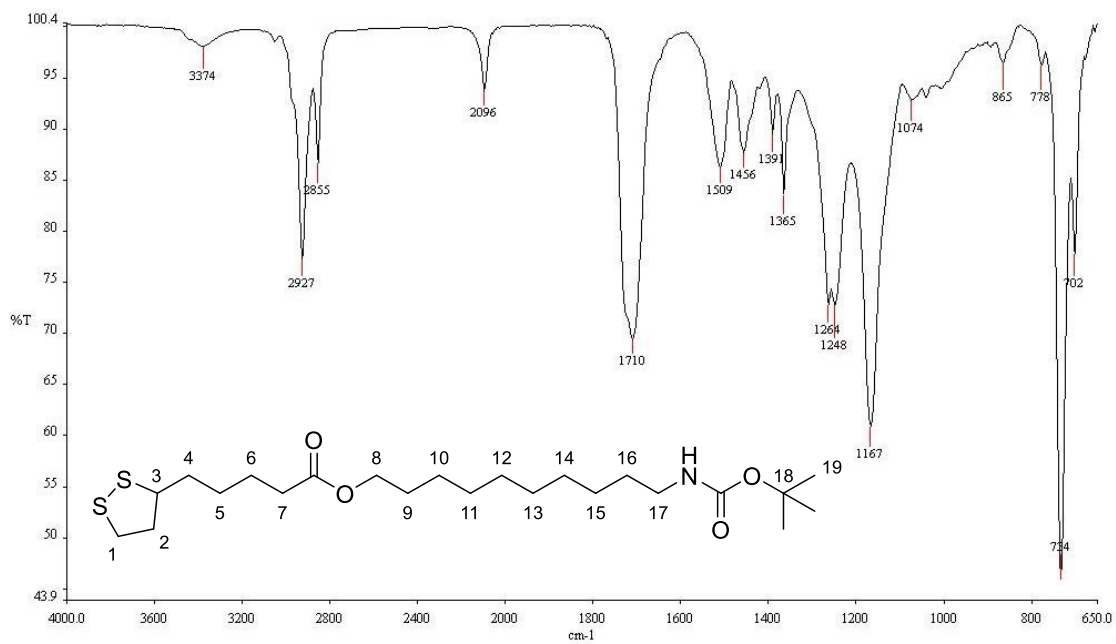


Figura 67. Espectro na região do IV (ATR) do composto 8.

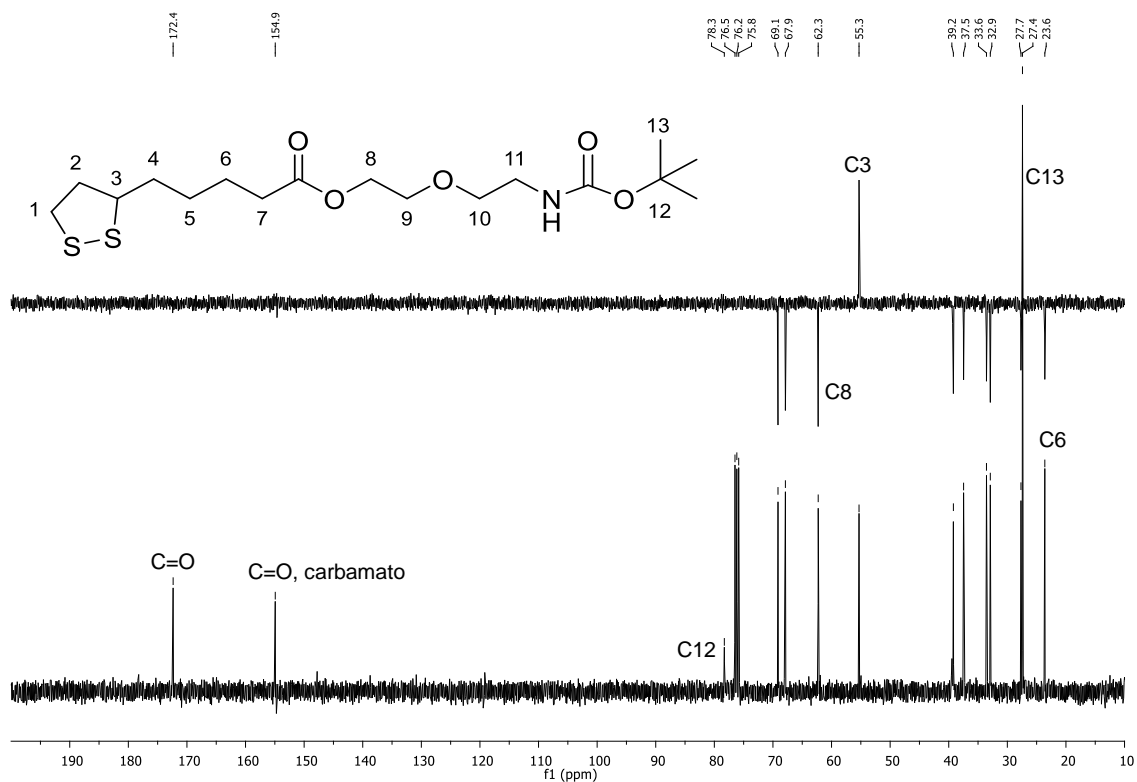


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto 20 (100 MHz, CDCl_3).

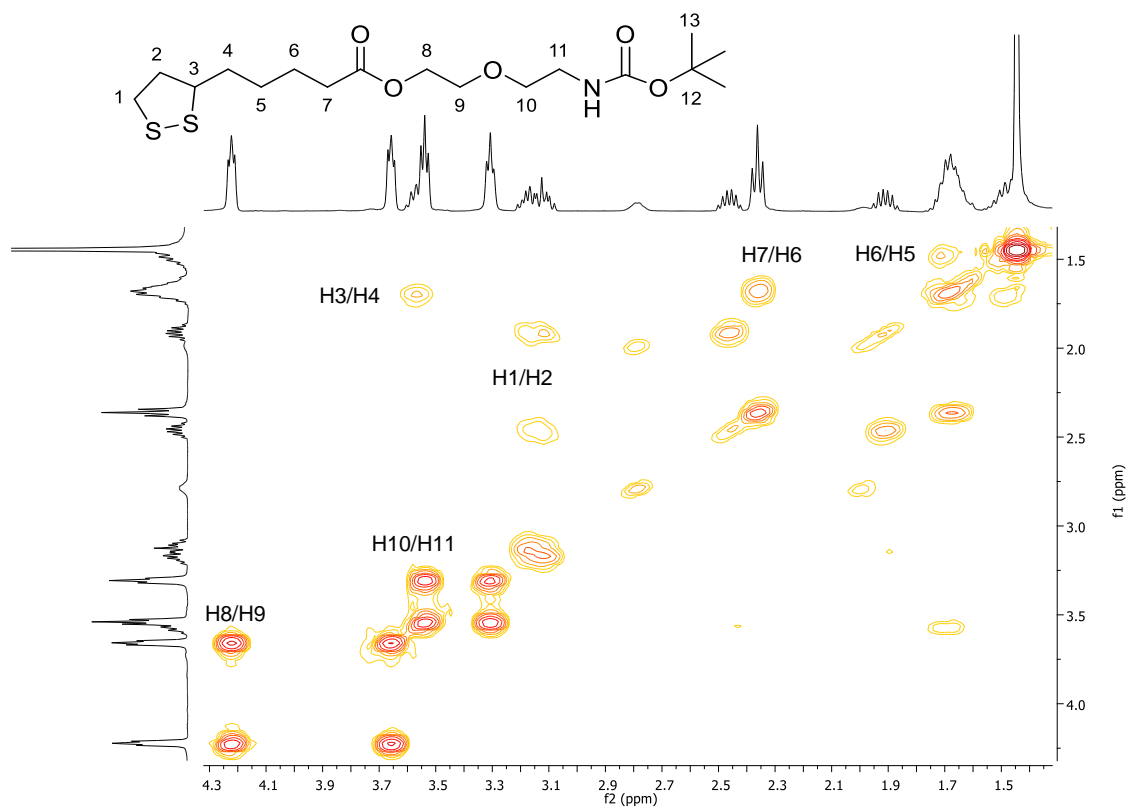


Figura 69. Mapa de correlação COSY do composto **20** (400MHz, CDCl₃).

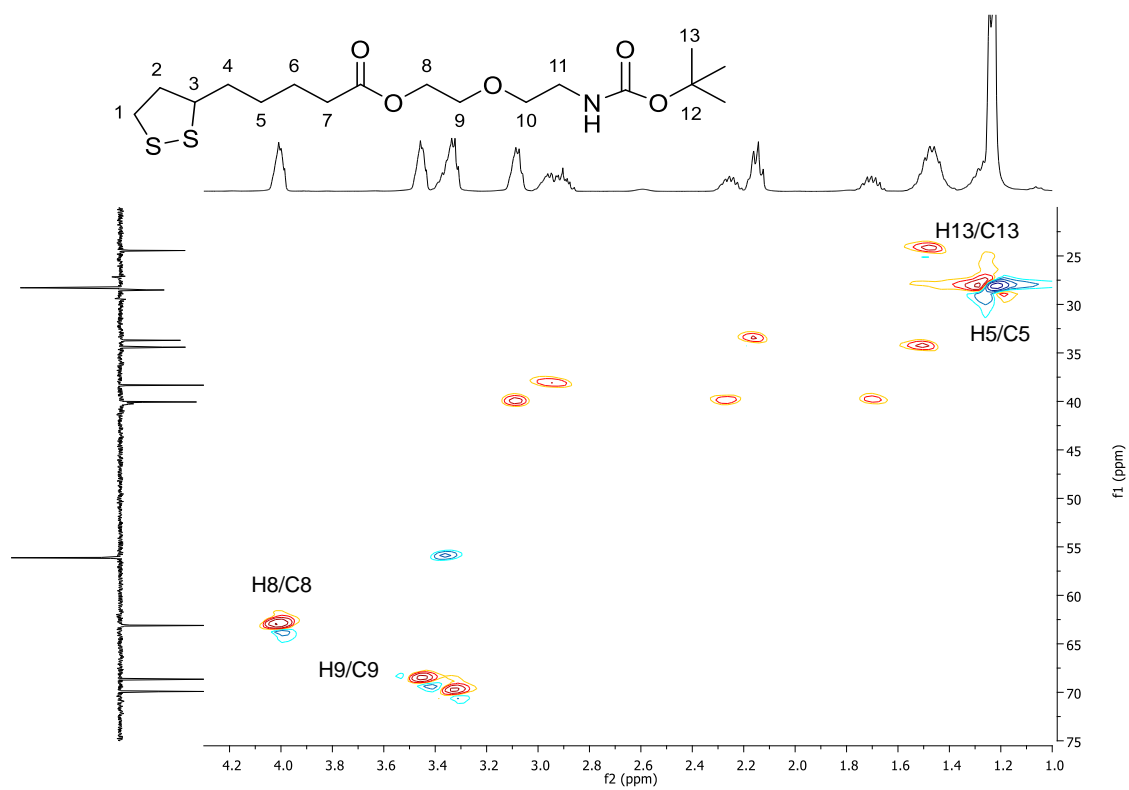


Figura 70. Mapa de correlação HSQC do composto **20** (400MHz, CDCl₃).

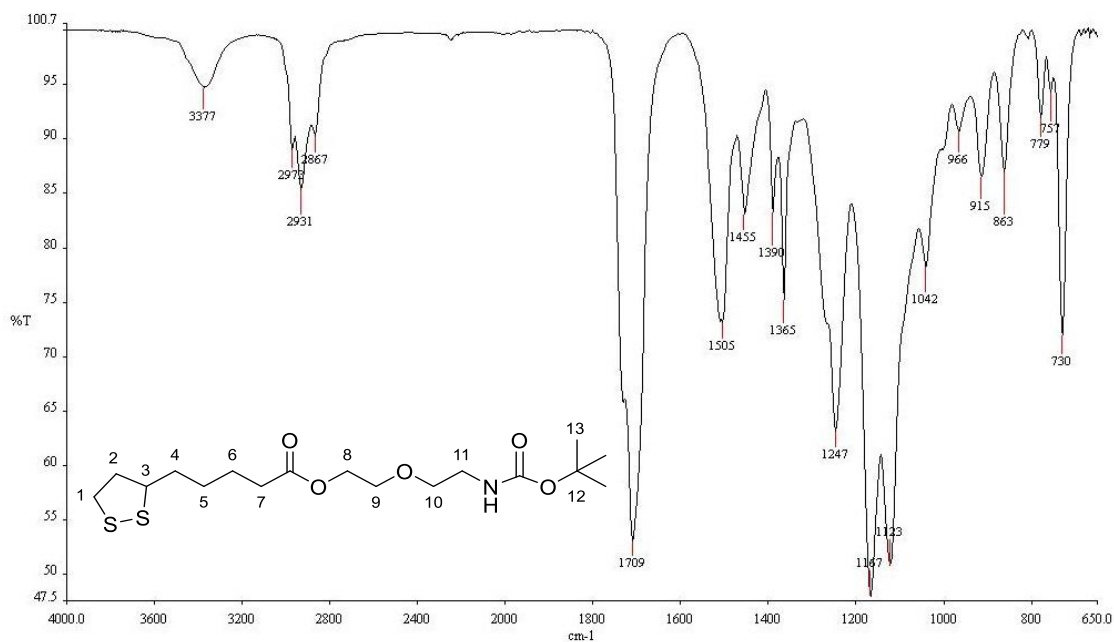


Figura 71. Espectro na região do IV (ATR) do composto 20.

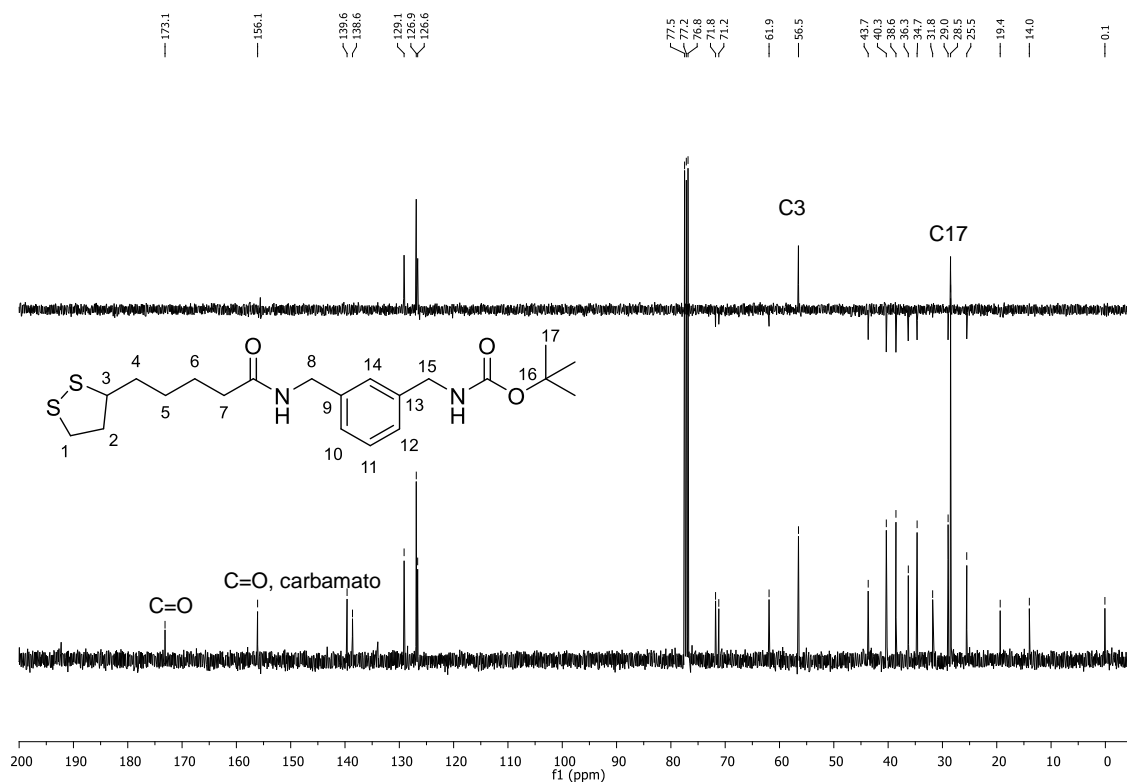


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto 25 (100 MHz, CDCl_3).

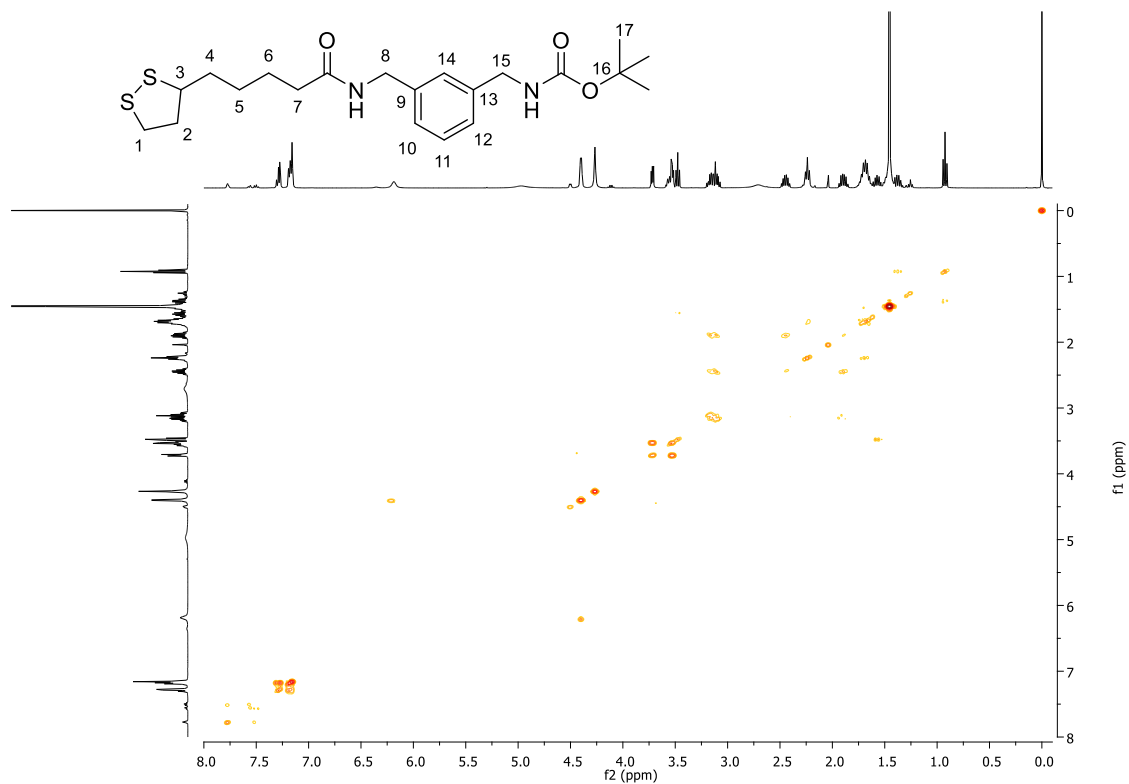


Figura 73. Mapa de correlação COSY do composto **25** (400MHz, CDCl₃).

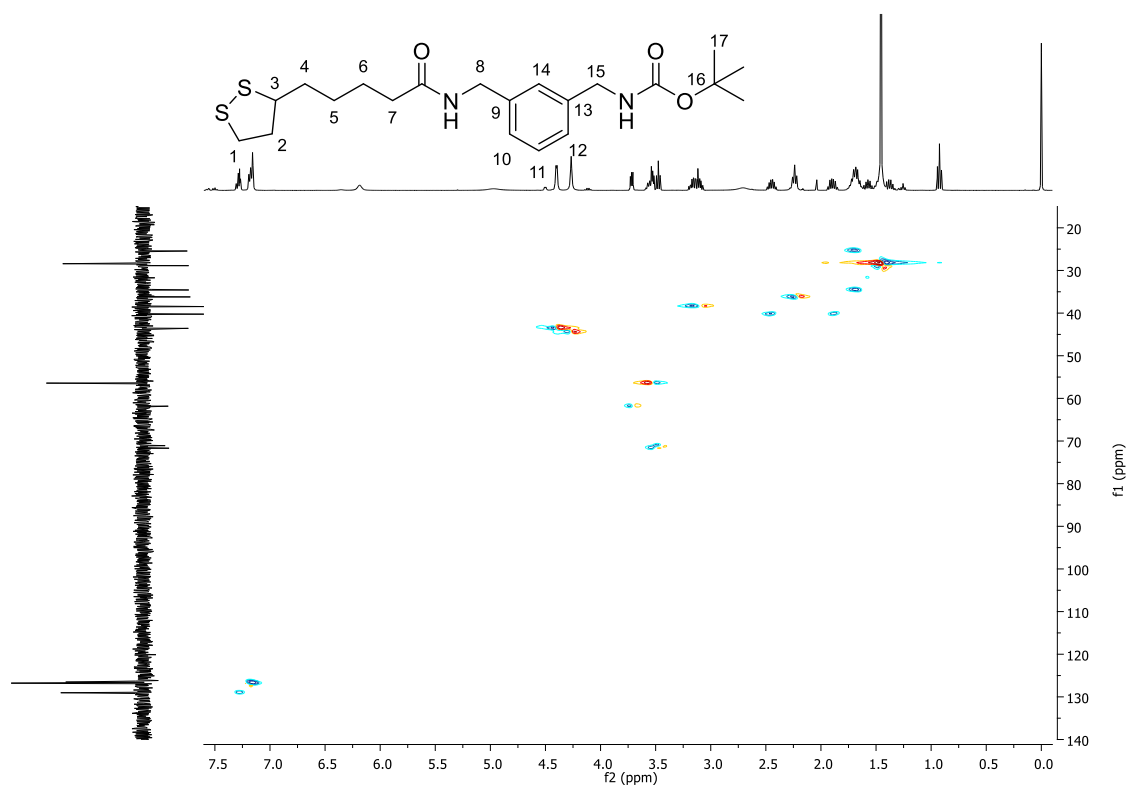


Figura 74. Mapa de correlação HSQC do composto **25** (400MHz, CDCl₃).

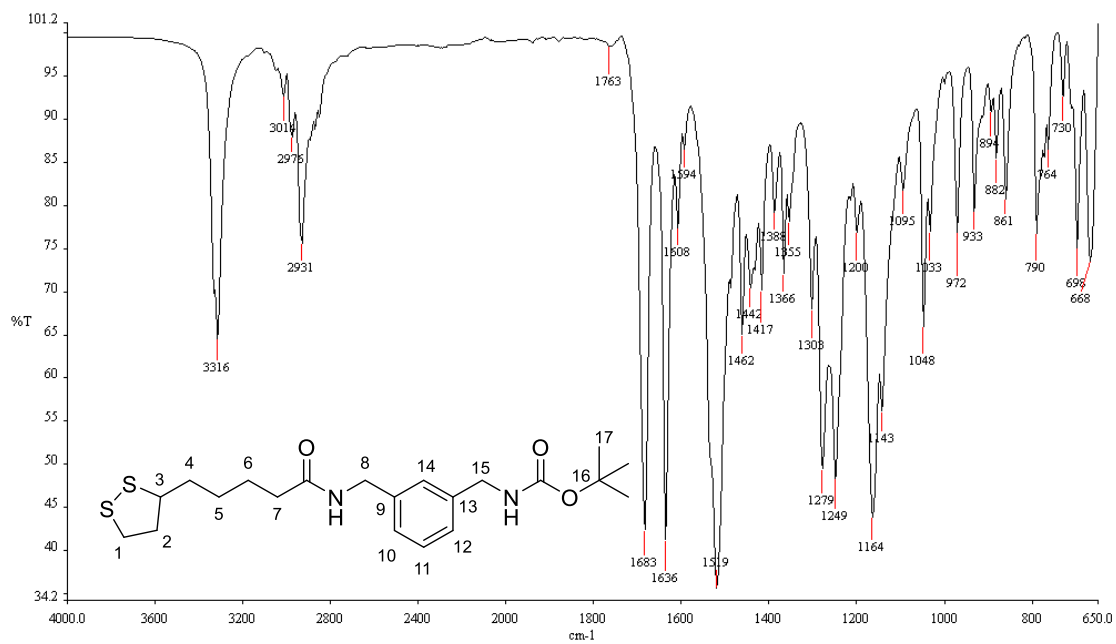


Figura 75. Espectro na região do IV (ATR) do composto 25.

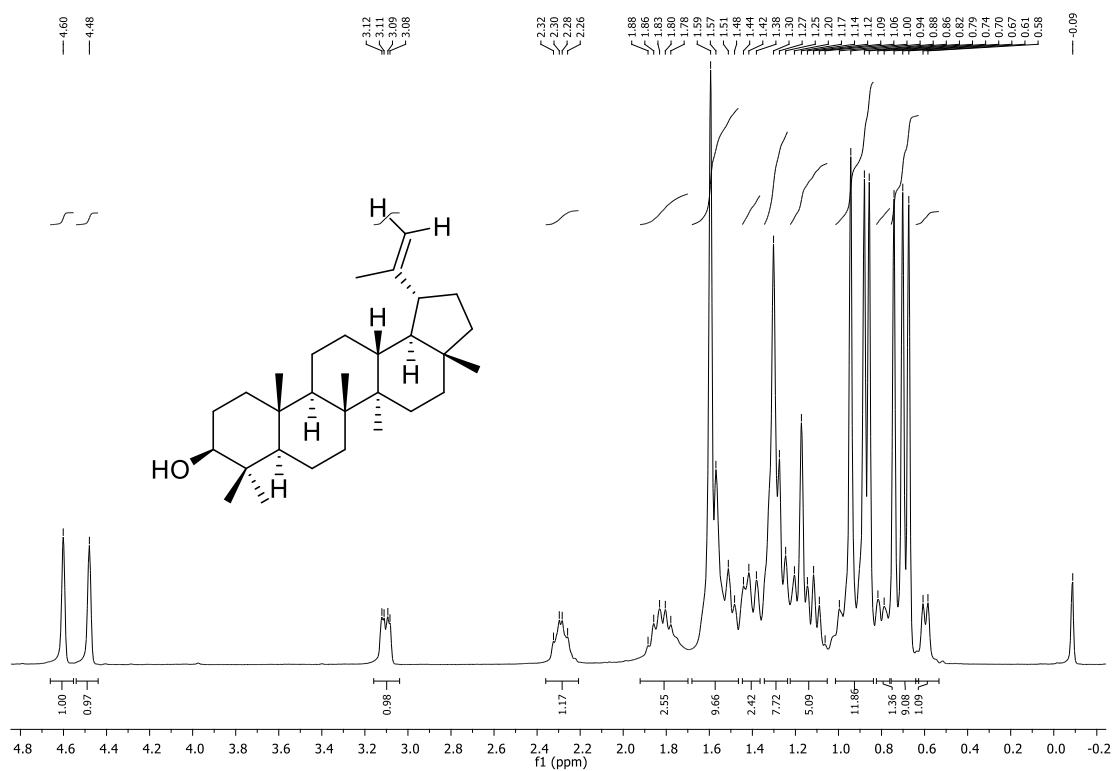


Figura 76. Espectro de RMN de ^1H do lupeol (400 MHz, CDCl_3).

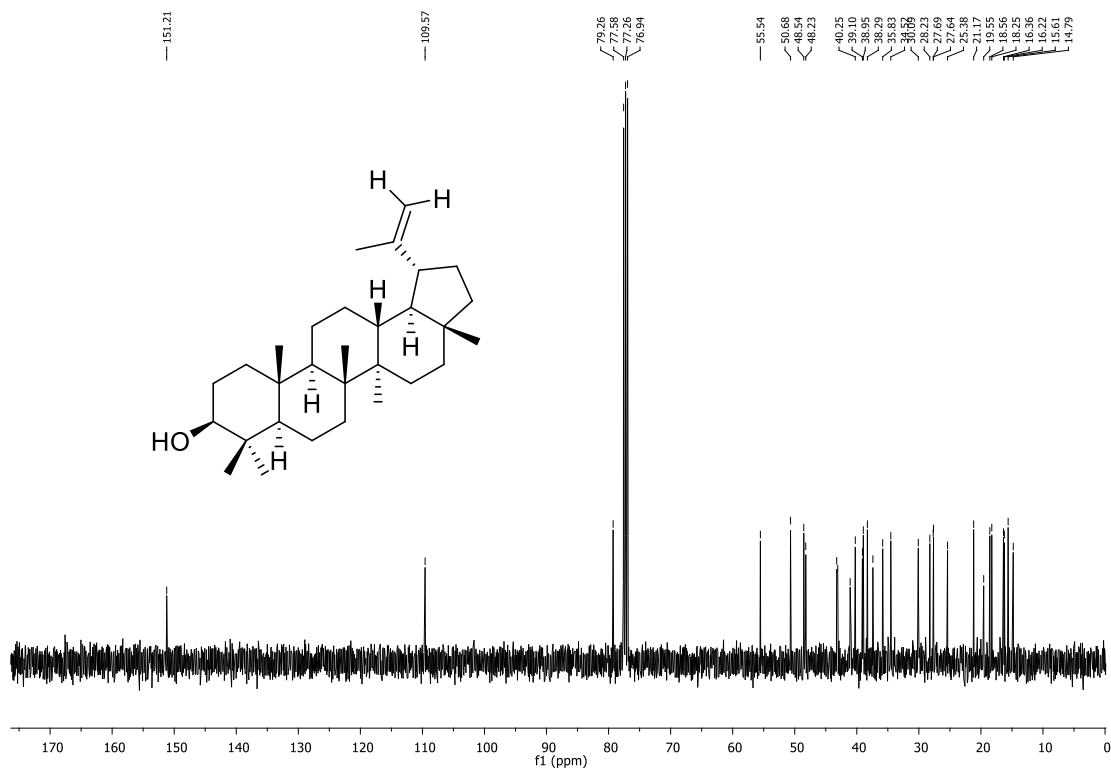


Figura 77. Espectro de RMN de ¹³C do lupeol (100 MHz, CDCl₃).

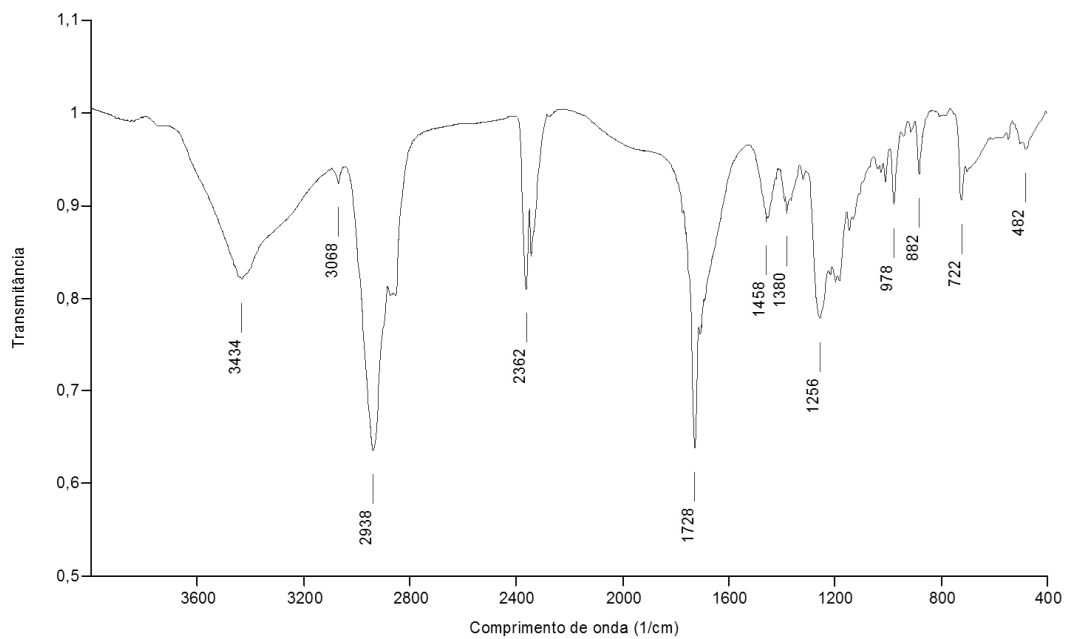


Figura 78. Espectro na região do IV (KBr) do composto 29.

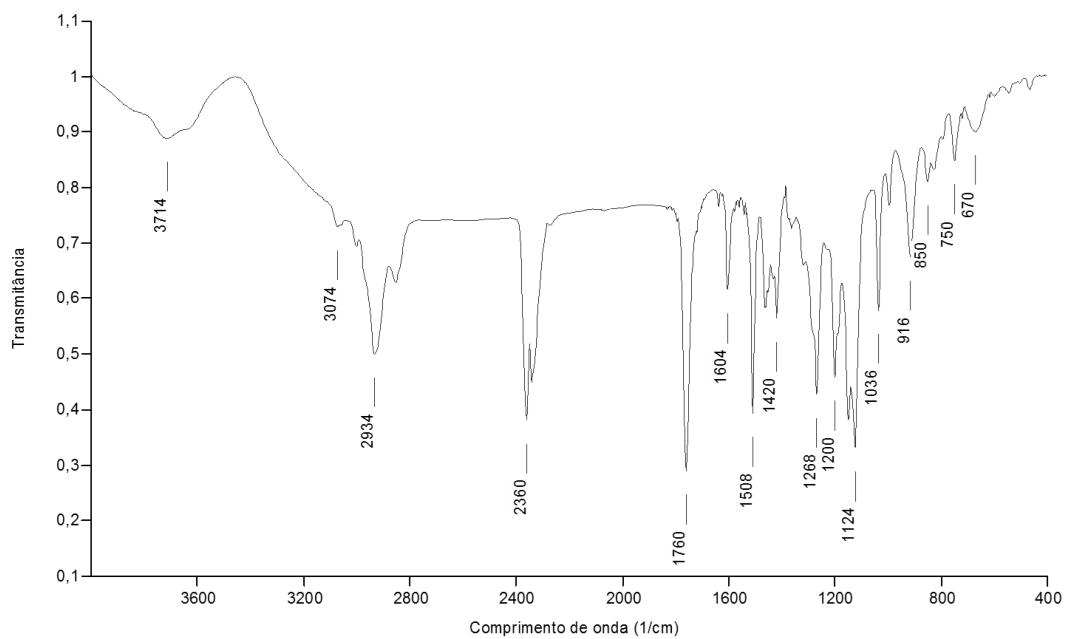


Figura 79. Espectro na região do IV (KBr) do composto 30.

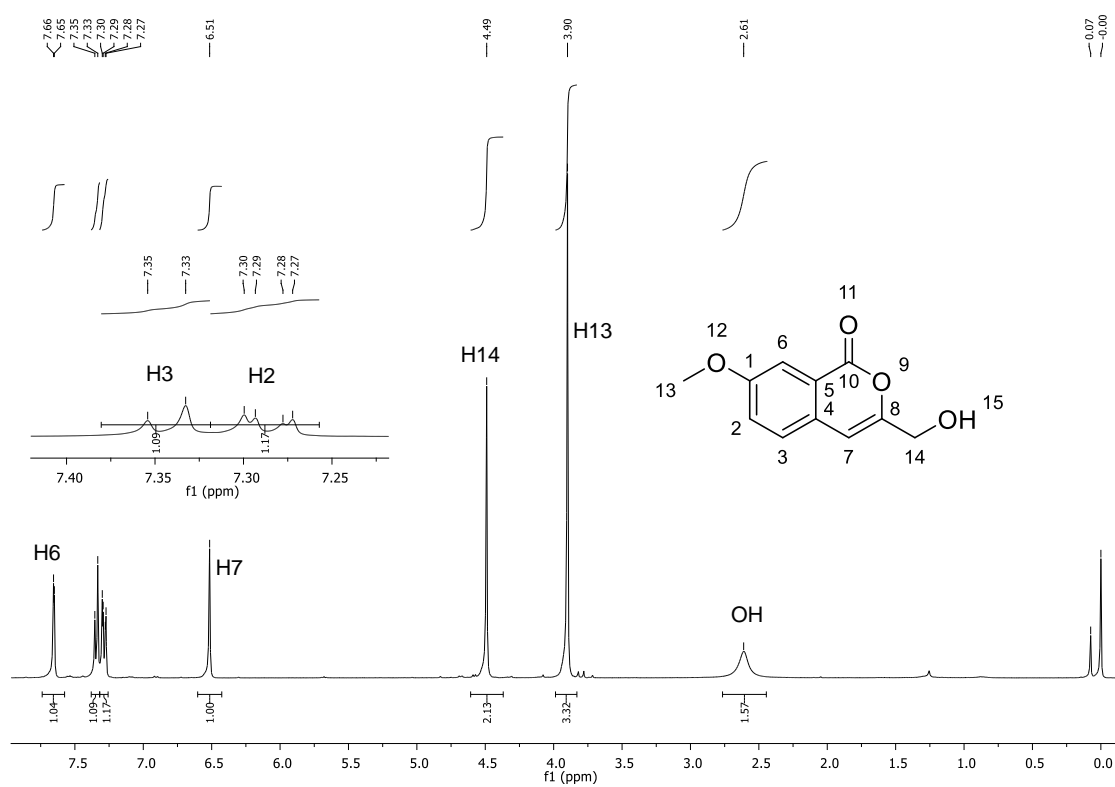


Figura 80. Espectro de RMN de ¹H do composto 34 (400 MHz, CDCl₃).

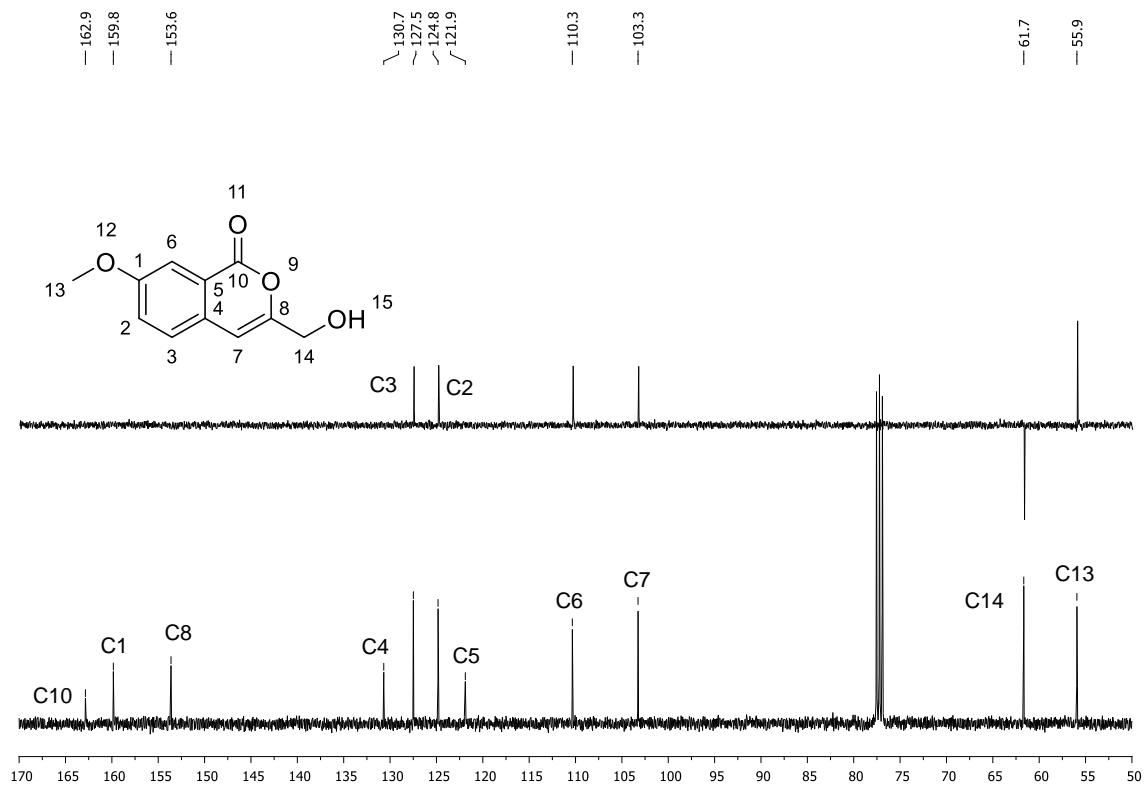


Figura 81. Espectro de RMN de ¹³C e subspectro de DEPT do composto 34 (100 MHz, CDCl₃).

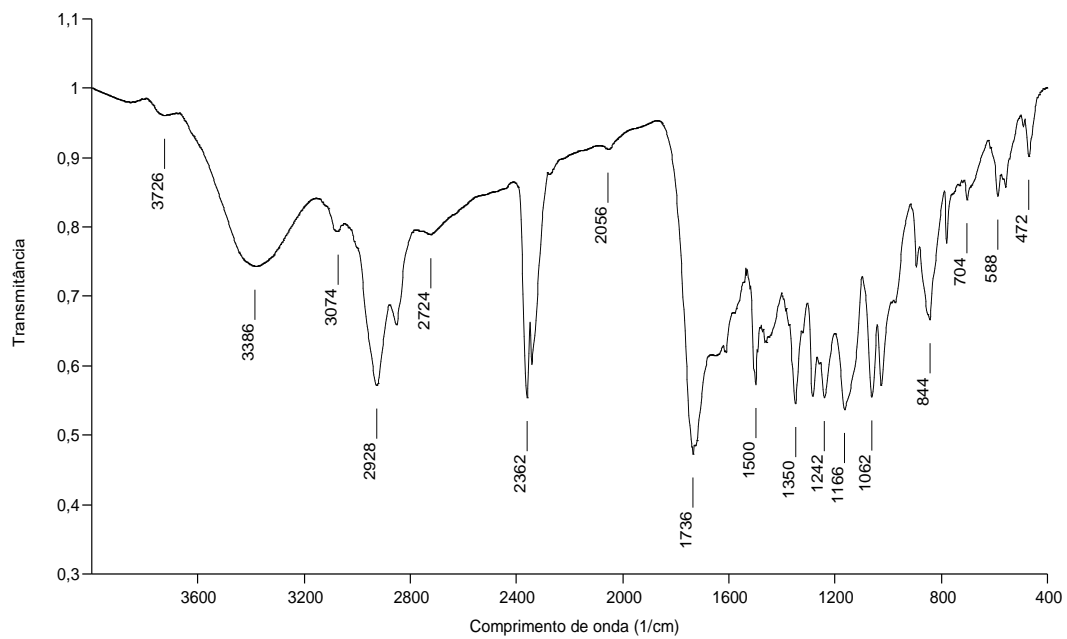
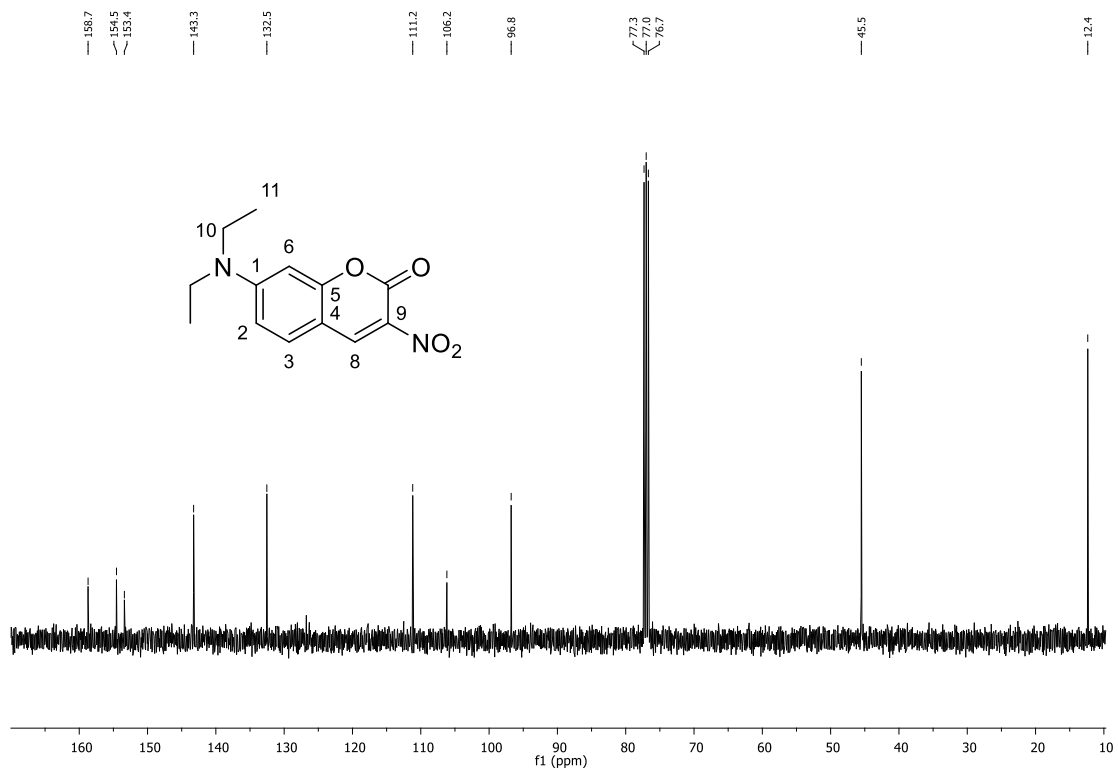
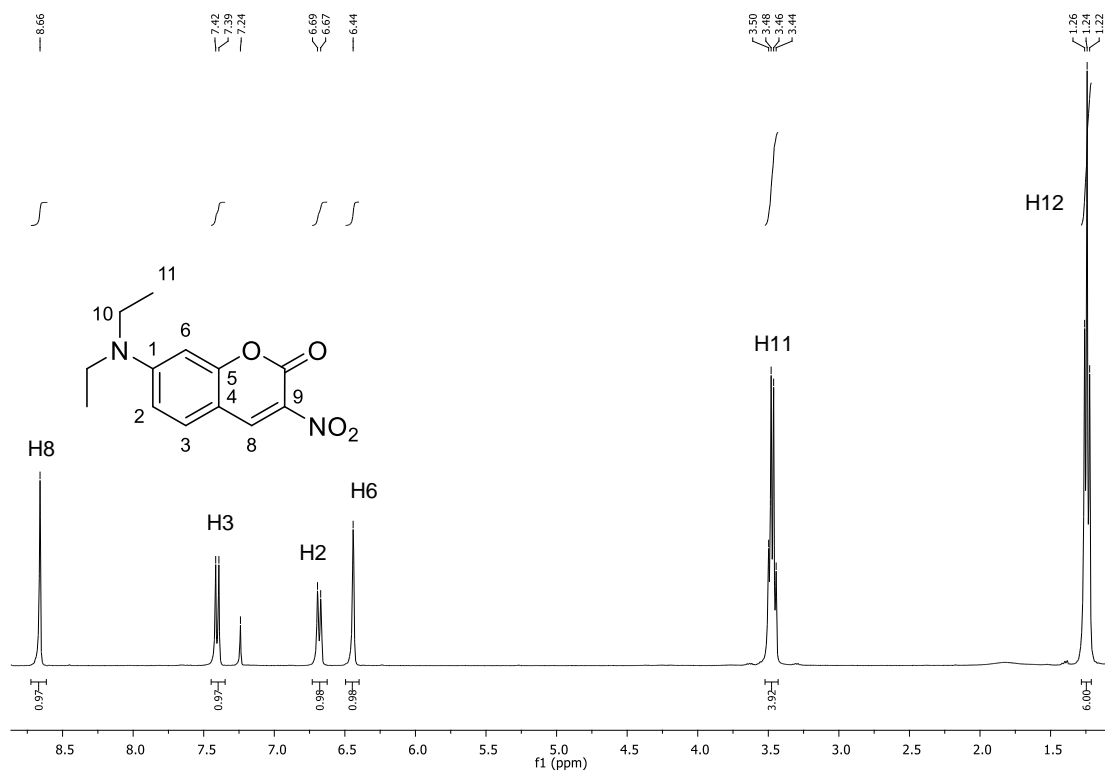


Figura 82. Espectro na região do IV (KBr) do composto 31.



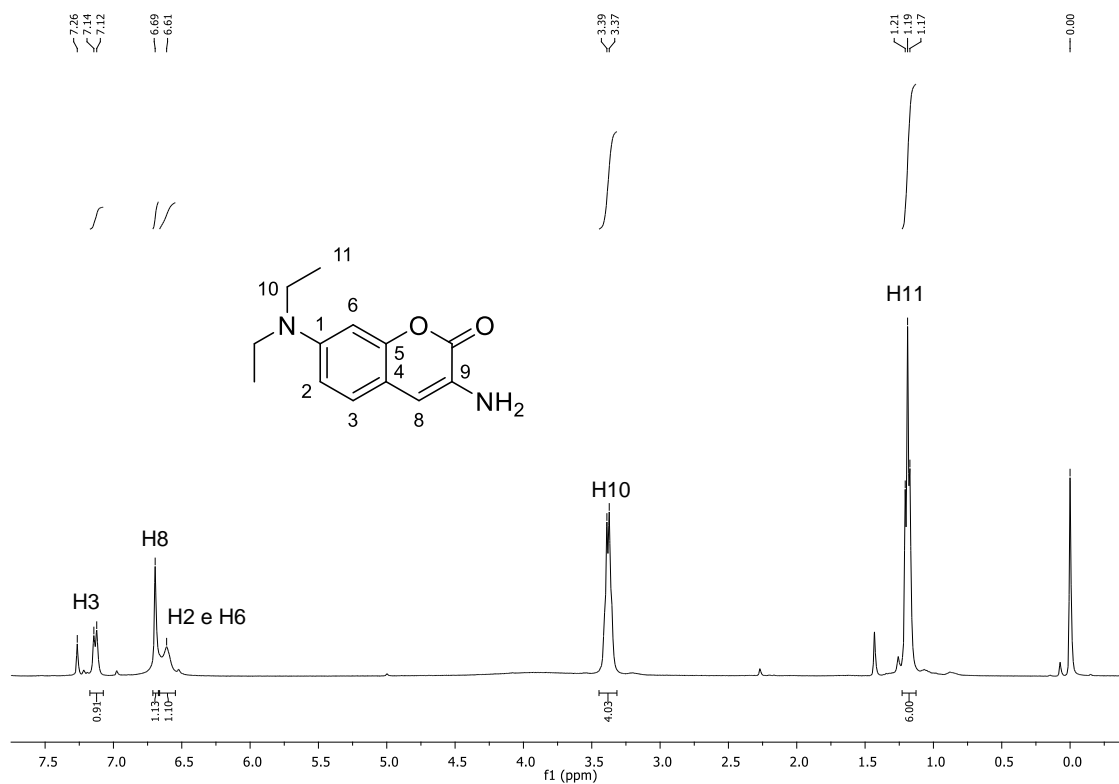


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto **36** (400 MHz, CDCl_3).

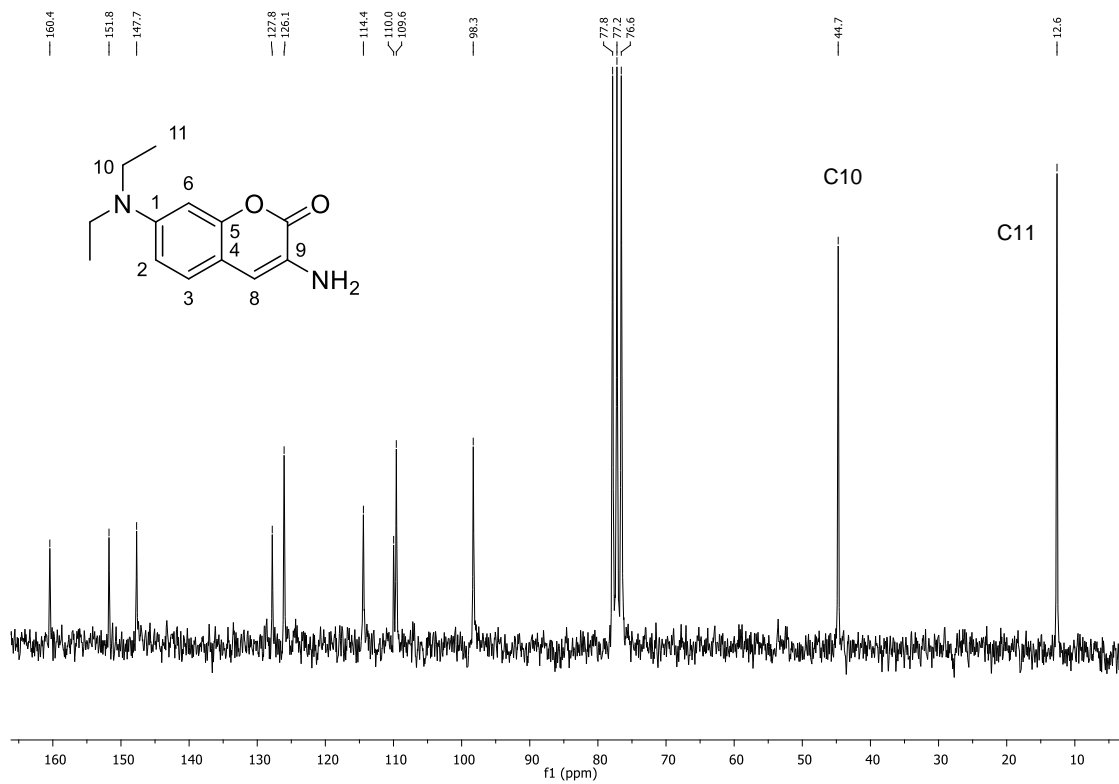


Figura 86. Espectro de RMN de ^{13}C e subspectro de DEPT do composto **36** (100 MHz, CDCl_3).

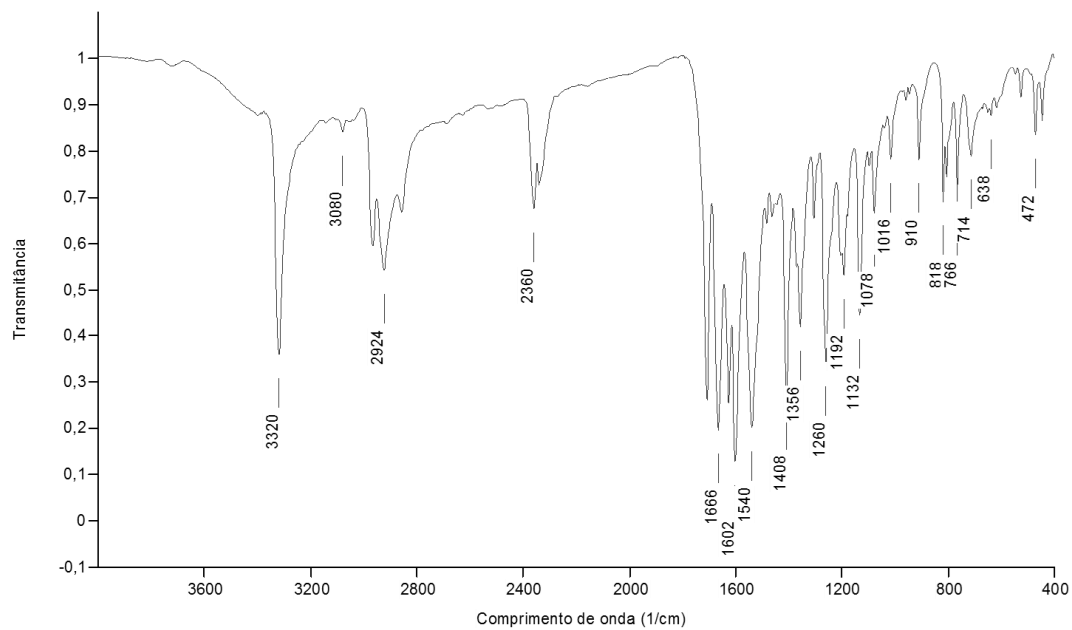


Figura 87. Espectro na região do IV (KBr) do composto 32.

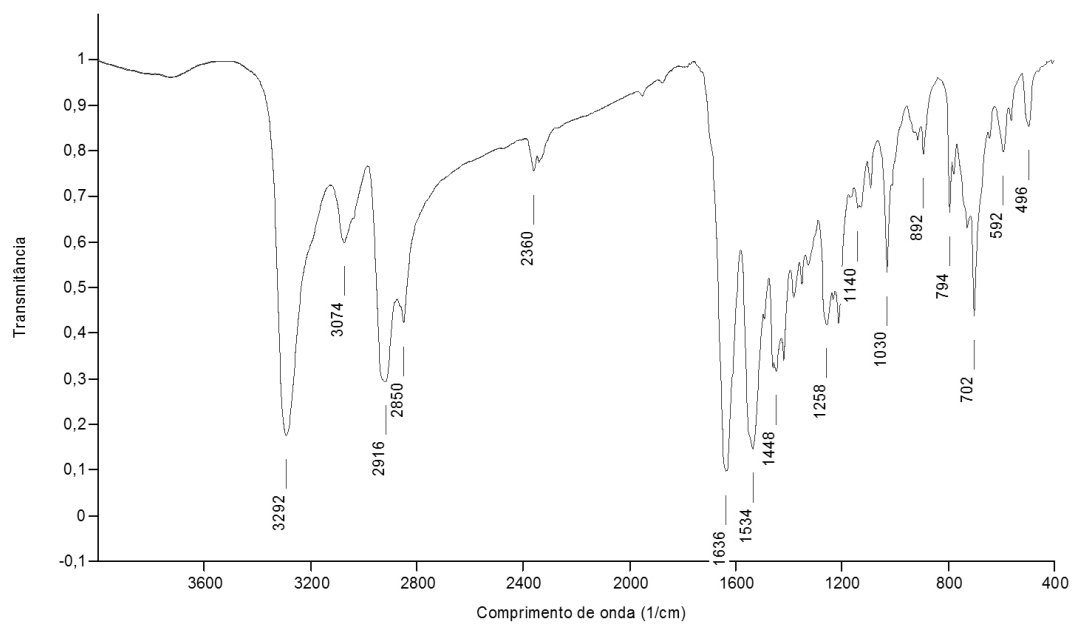


Figura 88. Espectro na região do IV (KBr) do composto 33.