

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TALITA BÁRBARA GONTIJO

**Síntese de dipeptídeos miméticos com potencial uso na terapia
da osteoporose e desenvolvimento de nova metodologia para
obtenção de 2-amino-1,3,4-oxadiazóis**

BELO HORIZONTE

2021

UFMG/ICEX/DQ. 1.450

T. 659

Talita Bárbara Gontijo

Síntese de dipeptídeos miméticos com potencial uso na terapia da osteoporose e desenvolvimento de nova metodologia para obtenção de 2-amino-1,3,4-oxadiazóis

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas

Coorientador: Eufrânio Nunes da Silva Júnior

BELO HORIZONTE

2021

Ficha Catalográfica

G641s Gontijo, Talita Bárbara
2021 Síntese de dipeptídeos miméticos com potencial uso
T na terapia da osteoporose e desenvolvimento de nova
metodologia para obtenção de 2-amino-1,3,4-oxadiazóis
[manuscrito] / Talita Bárbara Gontijo. 2021.
[xxiii], 269 f. : il.

Orientadora: Rossimiriam Pereira de Freitas.
Coorientador: Eufrânio Nunes da Silva Júnior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Peptídeos - Síntese
- Teses. 3. Osteoporose - Teses. 4. Nitrilas - Teses.
5. Compostos heterocíclicos - Teses. 6. Compostos
bioativos - Teses. I. Freitas, Rossimiriam Pereira de,
Orientadora. II. Silva Júnior, Eufrânio Nunes da,
Coorientador. III. Título.

CDU 043

Elaborada por Sérgio Ferreira da Silva - CRB6-2719.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Síntese de Dipeptídeos Miméticos Com Potencial Uso Na Terapia da Osteoporose e Desenvolvimento de Nova Metodologia Para Obtenção de 2-amino-1,3,4-oxadiazóis"

Talita Bárbara Gontijo

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Rossimiriam Pereira de Freitas - Orientadora
UFMG

Profa. Fernanda Andreia Rosa
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Mara Rubia Costa Couri
UFJF

Profa. Amanda Silva de Miranda
UFMG

Profa. Lucienir Pains Duarte

Belo Horizonte, 02 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Rosimíriam Pereira de Freitas, Presidente de comissão**, em 03/07/2021, às 08:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Silva de Miranda, Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2021, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucienir Pains Duarte, Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2021, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mara Rubia Costa Couri, Usuário Externo**, em 03/07/2021, às 18:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Andreia Rosa, Usuário Externo**, em 05/07/2021, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0804282** e o código CRC **747D7F16**.



Agradecimentos

Agradeço a Deus,

À minha orientadora Profa. Dra. Rossimiriam, pela orientação, dedicação em todas as etapas de realização deste trabalho, pela motivação, conselhos, sempre me acalmando nos momentos de desespero. Agradeço imensamente pelos seus esforços dedicados para construção e correção deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Eufrânio, por oferecer oportunidades importantes no meu caminho acadêmico.

À Profa. Dra. Rosemeire pela disponibilidade em sanar dúvidas referentes a assuntos da pós-graduação, e contribuir para minha formação ao longo desse tempo.

Aos funcionários e professores do Departamento de Química da UFMG, em especial à funcionária Mirra Angelina, pelo auxílio em diversas purificações.

À Ana Carolina por ter me ensinado a prática da química dos peptídeos; agradeço também à Lidia por estar sempre disponível em sanar dúvidas referentes ao assunto.

Aos amigos do LABSINTO, pela amizade, companheirismo e apoio: Lucas, Fernanda, Wallace, Natália, Ruth, Gabriele e Fabíola.

Agradeço em especial à Renata, Roberta e Matheus Langake, pela amizade, desabafos e conversas produtivas. Ao Renato e ao Gleiston pela imensa ajuda prestada no período que estive na Alemanha.

A todos os colaboradores deste trabalho, pelos testes biológicos realizados.

À minha família, essencial na minha vida. Aos meus pais pela compreensão, carinho e força nos momentos de dificuldades, obrigada por tudo que fizeram por mim. Ao meu marido André, pelo companheirismo, por entender os momentos de angústias e felicidades que passei ao longo dessa trajetória, pela imensa paciência, pelo carinho e amor.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

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



Resumo

O trabalho desenvolvido nesta tese está dividido em dois capítulos. No capítulo I, compostos nitrilo-dipeptídeos e amino-1,3,4-oxadiazólicos foram sintetizados e testados frente à enzima catepsina K e em diferentes células do tecido ósseo, com o objetivo de avaliar o potencial desses novos compostos para o tratamento da osteoporose. O capítulo II aborda o desenvolvimento de uma nova metodologia sintética para a construção do heterociclo amino-1,3,4-oxadiazol.

No trabalho apresentado no Capítulo I foram sintetizados 16 novos compostos dipeptídicos e 7 novos compostos contendo o núcleo amino-1,3,4-oxadiazol, cujas estruturas moleculares foram baseadas em inibidores da catepsina K relatados na literatura. Os novos compostos foram testados frente a catepsina K, e o composto (**S**) -*N*- (1- (5-amino-1,3,4-oxadiazol-2-il) -3-metilbutil)benzamida **38a**, contendo o heterociclo amino-1,3,4-oxadiazol, apresentou uma excelente atividade inibitória, com valor de $K_i = 2,13 \mu\text{M}$. Foi também avaliada a atividade desses novos compostos em células de osteoblastos, osteoclastos e célula tronco mesenquimais humanas. Os resultados mostraram que os compostos estimularam positivamente a atividade dos osteoblastos, e não interferiram negativamente na atividade dos osteoclastos, além de apresentarem um potencial osteogênico nas células troncos mesenquimais humanas. De forma geral, os resultados também mostraram que o núcleo amino-1,3,4-oxadiazol apresenta-se como um promissor bloco construtor para o desenvolvimento de novos inibidores da catepsina K e para o tratamento da osteoporose.

No trabalho descrito no Capítulo II uma nova metodologia de síntese empregando a *N*-ciano-*N*-fenil-*p*-toluenossulfonamida (NCTS) como fonte eletrofílica de nitrila, não tóxica e mais acessível, foi desenvolvida para a construção do heterociclo amino-1,3,4-oxadiazol. Empregando esse novo protocolo foi possível sintetizar 14 compostos contendo o núcleo amino-1,3,4-oxadiazol com rendimentos que variaram entre 42-70%.

Palavras-chave: dipetídeos miméticos, amino-1,3,4-oxadiazóis, catepsina K, osteoporose



Abstract

This work is divided into two chapters. In chapter I, new nitrile dipeptides and amino-1,3,4-oxadiazole derivatives were synthesized and their potential for the management of osteoporosis disease was evaluated. Chapter II approach the development of a new methodology for the synthesis of the amino-1,3,4-oxadiazole core.

Osteoporosis is a metabolic bone disease, characterized by decreasing bone mass and increase of fractures risks. The currently treatment used for this disease cause several side effects in patients, so research for new anti-osteoporosis therapies is an important challenge in many knowledge fields. Promising targets for the development of new anti-osteoporosis therapies include selective cathepsin K inhibitors (a cysteine protease expressed mainly in osteoclast cells, which are involved in degradation of bone matrix). In this work, 16 new dipeptides compounds and 7 amino-1,3,4-oxadiazole derivatives, whose molecular structures are based on scaffolds of cathepsin K inhibitors, were synthesized. The new derivatives were evaluated as cathepsin K inhibitors, and the compound **38a** containing the amino-1,3,4-oxadiazole core display an excellent inhibitory activity, with $K_i = 2.13 \mu\text{M}$. *In vitro* tests with osteoblast and osteoclast cells and human mesenchymal stem cells were performed, and the results have shown that the compounds can able stimulated the osteoblast activity, and not acting negatively in osteoclast activity, in addition, these compounds showed an osteogenic potential in stem cells human mesenchymal. The results suggested that amino-1,3,4-oxadiazole core display a remarkable potential as a building block for new drugs for anti-osteoporosis therapies.

In view that compounds containing amino-1,3,4-oxadiazole core have a broad range spectrum of biological activities and considerable applications in several areas, a new synthetic methodology was developed for the construction of this heterocycle using an electrophilic nitrile source less toxic and accessible. The new protocol was employed for the synthesis of the amino-1,3,4-oxadiazole derivatives **47a-g** achieved yields range 42 to 70%.

Keywords: Dipeptide Mimetic, amino-1,3,4-ixadiazole, cathepsin K, osteoporosis



Sumário

Lista de Abreviaturas e Acrônimos	vi
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Esquemas	xix
CAPÍTULO I: Síntese de novos derivados peptídicos com potencial uso na terapia da osteoporose	xxi
1. Introdução.....	1
1.1. Osteoporose	1
1.2. Terapias anti-osteoporose	2
1.3. Agentes anabólicos	3
1.4. Agentes anti-reabsortivos	4
1.5. Catepsina K.....	8
1.5.1. Inibidores da catepsina K	9
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral.....	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. Resultados e discussão	18
3.1. Síntese e caracterização dos compostos dipeptídicos miméticos 25a-p	18
3.1.1. Síntese do composto 30	20
Síntese dos compostos inéditos 25a-p	28
3.1.2. 28	
3.2. Síntese e caracterização dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos.....	33
3.2.1. Síntese do éster (33)	34
3.2.2. Síntese dos compostos 34a-g e 36a-g.....	34
3.2.3. Síntese dos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g.....	39
3.3. Testes biológicos.....	51
3.3.1. Inibição da Catepsina K.....	51
3.3.1.2. Modelagem Molecular	53
3.3.2. Avaliação dos efeitos dos inibidores em células de origem osteoblástica, células troncos mesenquimais humanas e precursores de osteoclastos.....	55
3.3.2.1. Ensaio de viabilidade celular das células rOB, mOB e hASC.....	56



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG

Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo

Sumário

3.3.2.2. Ensaio de quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e quantificação de colágeno expresso pelas células rOB, hASC e mOB.....	60
3.3.2.3. Avaliação do potencial anti-osteoclastogênico dos compostos dipeptídicos miméticos e do amino-1,3,4-oxadiazol (38a) em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl/6.....	67
3.3.3. Ensaio de co-cultura de pré-osteoclastos e osteoblastos mOB	70
4. Parte experimental.....	72
4.1. Materiais e Equipamentos.....	72
4.2. Síntese dos dipeptídeos 26a-p e dos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g	73
4.2.1. Síntese de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-2-amino- <i>N</i> -(2-cianoetil)-3-metilpentanamida (30) ^{33,34} ...	73
4.2.2. Síntese dos dipeptídeos (25a-p) ^{33,34}	74
4.2.3. Síntese do cloridrato de (<i>S</i>)-1-metoxi-4-metil-1-oxopentan-2-amina ³¹	79
4.2.4. Síntese dos compostos 34a-g ^{33,34}	79
4.2.5. Síntese das hidrazidas 36a-g ⁴¹	83
4.2.6. Síntese dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g.....	86
5. Conclusões e perspectivas.....	89
CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma nova metodologia sintética para a construção do heterociclo 2-amino-1,3,4-oxadiazol.....	90
1. Introdução.....	91
1.1. O heterociclo 1,3,4-oxadiazol	91
1.2. Metodologias de síntese do núcleo 1,3,4-oxadiazol	93
1.2.1. Metodologias sintéticas para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos mono e dissustituídos	94
1.2.2. Metodologias sintéticas aplicadas para obtenção de amino-1,3,4-oxadiazóis	98
1.3. Fontes eletrofílicas de grupo CN	100
2. Objetivos	105
2.1. Objetivo geral	105
2.2. Objetivos específicos	105
3. Resultados e Discussões.....	107
3.1. Síntese dos substratos: NCTS (30) e hidrazidas	107
3.1.1 Síntese do NCTS (30).....	107
3.1.2. Síntese das hidrazidas 46a-n.....	108
3.2. Otimização e aplicação do novo método	109



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG

Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo

Sumário

4. Parte Experimental	125
4.1. Materiais e Equipamentos	125
4.2. Síntese do NCTS (30) e das hidrazidas 46a-n	126
Síntese de <i>N</i> -ciano- <i>N</i> -fenil- <i>p</i> -toluenossulfonamida NCTS (30).....	126
4.2.3. Síntese das benzo-hidrazidas 46a-n e 48 ⁷¹	126
4.3. Síntese dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos	130
5. Conclusão	135
Conclusão Geral	136
Anexos Capítulo I.....	137
ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	138
ANEXO II: Espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C	156
ANEXO III: Espectros no IV dos compostos finais.....	196
ANEXO IV: Espectros de Massas	208
ANEXOS CAPÍTULO II	227
ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 47a-l	228
ANEXO II: Espectros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos compostos obtidos.....	233
ANEXO III: Espectros de Massas	263



Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ALP -	Fosfatase Alcalina (do inglês, <i>Alkaline phosphatase</i>)
Cat K -	catepsina K
CCD	cromatografia em camada delgada
d	dupleto
dd	dupleto duplo
DEPT 135	intensificação da distorção por transferência de polarização (do inglês, <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135</i>)
DIPEA	<i>N,N</i> -di-isopropiletilamina
DMF	dimetilformamida
DCM	diclorometano
DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridina
DMSO	dimetilssulfóxido
DMEM -	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DCC	<i>N, N'</i> - dicioexilcarbodi-imida
DIC	<i>N-N'</i> - di-isopropilcarbodi-imida
EDC	cloridrato de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodi-imida
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonila
K _i	constante de inibição
h	hora
Hz	hertz
hASC -	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (do inglês, <i>Human adipose-derived stem cell</i>)
HMQC	Correlação Heteronuclear Múltiplo Quântica (do inglês : <i>Heteronuclear-Multiple -Quantum – Correlation</i>)
HMBC	Coerência Heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
IC ₅₀	A metade da concentração inibitória máxima
IV	espectroscopia na região do infravermelho



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG

Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo

Lista de abreviaturas e acrônimos

<i>J</i>	constante de acoplamento (Hz)
m	multiplete
MHz	Megahertz
m-CSF –	Fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês, <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)
min	minuto
mOB	osteoblastos de camundongos C57b1/6
nm	nanômetros
ng	nanograma
NCTS	<i>N</i> -ciano- <i>N</i> -fenil- <i>p</i> -toluenossulfonamida
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rOB	osteoblastos de ratos Wistar
s	simpleto
sl	sinal largo
OLEDs	Diodos orgânicos emissores de Luz (do inglês <i>organic light-emitting diode</i>)
OPG	Osteoprotegerina
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
THF	tetraidrofurano
δ	deslocamento químico (ppm)
μ M	micromolar



Lista de Tabelas

Tabela 1. Otimização das condições de reação para obtenção do derivado (38a) a partir da hidrazida (36a).....	45
Tabela 2. Valores de K_i dos novos derivados dipeptídeos e 2-amino-1,3,4-oxadiazóis frente à Cat K.....	52
Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos por cálculos de docking molecular para os inibidores no sítio ativo da Cat K, por meio do software MVD®.....	53
Tabela 4. Concentração ideal de uso dos derivados em cada modelo celular.....	57
Tabela 5. Estudo de otimização da reação para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazol, a partir da benzohidrazida 46a , e NCTS, via uso de base.....	111
Tabela 6. Estudo de otimização da reação para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos, a partir da benzo-hidrazida 46a , e NCTS, via uso de ácido de Lewis.....	115

Lista de Figuras

Figura 1. Bisfosfonatos utilizados na terapia anti-osteoporose.	5
Figura 2. SERMs utilizados no tratamento da osteoporose.....	6
Figura 3. Ranelato de estrôncio.	7
Figura 4. Representação esquemática de inibidores de catepsina K indicando os sítios de interação (S1, S2 e S3) com o qual cada grupo da molécula interage no sítio ativo da enzima..	10
Figura 5. Inibidores da Cat K que passaram por testes clínicos para o tratamento da osteoporose.	11
Figura 6. Inibidores da Cat K baseados no esqueleto molecular do balicatib (11). ²⁷	12
Figura 7. Esqueleto molecular dos azadipeptídeos nitrílicos.	13
Figura 8. Derivados de nitrilo azadipetídeos com atividade inibitória da Cat K.....	14
Figura 9: Inibidores da Cat K de origem natural.	14
Figura 10. Estruturas gerais dos dipeptídeos e azadipeptídeos propostos neste trabalho....	16
Figura 11. Estruturas dos dipeptídeos miméticos 25a-p	17
Figura 12. Estruturas dos azadipeptídeos miméticos 26a-g	17
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H do composto 30 (CDCl ₃ / 400 MHz).....	25
Figura 14. Mapa de contornos COSY de 30(A), Expansão do mapa de contornos COSY de 30 (B) (CDCl ₃ / 400 MHz).	26
Figura 15. Expansão do mapa de contornos HMQC de 30 (CDCl ₃ / 400 MHz).	27
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25b (CDCl ₃ /400 MHz).	29
Figura 17. Mapa de contornos COSY do composto 25b (CDCl ₃ /400 MHz).....	30
Figura 18. Espectros de RMN de ¹³ C (a) de DEPT 135 (b) do composto 25b (100 MHz, CDCl ₃).....	31
Figura 19. Mapa de contornos HMQC do composto 25b (CDCl ₃ /400 MHz).....	31
Figura 20. Espectro no IV do composto 25b	32
Figura 21. Espectro de RMN de ¹ H de do composto 34a (CDCl ₃ /400 MHz).....	36
Figura 22. Espectro de RMN de ¹³ C do composto 34a (CDCl ₃ /100 MHz).	36
Figura 23. Espectro de RMN de ¹ H do composto 36a (CD ₃ OD, 400 MHz).....	38
Figura 24. Espectros de RMN de ¹³ C (a) de DEPT 135 (b) do composto 36a (CD ₃ OD, 100 MHz).....	39
Figura 25. Espectro no IV do composto 38a	42



Figura 26. Espectros de RMN de ^{13}C (a) de DEPT 135 (b) do composto 38a (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	42
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto 38a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	48
Figura 28. Mapa de contornos HMQC do composto 38a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	49
Figura 29. Expansão do mapa de contornos HMQC do composto 38a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	49
Figura 30. Mapa de contornos HMBC de 38a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	50
Figura 31. Representação das ligações de hidrogênio realizadas pelos inibidores mais potentes no sítio ativo da Cat K.....	55
Figura 32. Viabilidade dos rOB. Viabilidade dos rOB em exposição aos compostos sintetizados durante A. 7 dias e B. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	58
Figura 33. Viabilidade das hASC. Viabilidade das hASC em exposição aos compostos sintetizados durante A. 7 dias, B. 14 dias e C. 21 dias de cultivo comparados aos controles. <i>Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	59
Figura 34. Viabilidade dos mOB. Viabilidade dos mOB expostos aos compostos durante A. 3 dias B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	60
Figura 35. Atividade da ALP em rOB. Atividade da fosfatase alcalina em rOB em exposição aos compostos sintetizados durante A. 3 dias, B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	61
Figura 36. Quantificação de colágeno nos rOB. Quantificação de colágeno produzidos pelos rOB expostos aos compostos sintetizados durante A. 3 dias, B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	62
Figura 37. Atividade da ALP em hASC. Atividade da fosfatase alcalina em hASC em exposição aos compostos sintetizados durante A. 7 dias, B. 14 dias e C. 21 dias de cultivo comparados aos controles. <i>Fonte: Tese de doutorado de Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	64
Figura 38. Quantificação de colágeno em hASC. Quantificação de colágeno em hASC em exposição aos compostos sintetizados durante A. 7 dias, B. 14 dias e C. 21 dias de cultivo comparados aos controles. <i>Fonte: Tese de doutorado de Rebecca Medeiros</i> ^{48a}	65
Figura 39. Atividade da ALP nos mOB. Atividade da fosfatase alcalina em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante A. 3 dias, B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	66
Figura 40. Produção de colágeno em mOB. Produção de colágeno em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante A. 3 dias, B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	67
Figura 41. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas á mesma amostra <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	68



Figura 42 A Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) em osteoclastos expostos aos compostos.. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas à mesma amostra. <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	69
Figura 43. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas á mesma amostra <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a}	71
Figura 44. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas a mesma amostra. <i>Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.</i> ^{48a} ..	71
Figura 45. Estrutura química dos 4 isômeros de oxadiazóis (A) e aplicações no campo da química medicinal (B) e tecnológica do isômero 1,3,4-oxadiazol (C).....	93
Figura 46. Fontes eletrofílicas de nitrila.....	101
Figura 47. Espectro de RMN de ¹ H de 47i (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	118
Figura 48. Mapa de contornos HMQC de 47i (DMSO-d ₆ , 400 MHz).....	119
Figura 49. Mapa de Contornos HMBC de 47i (DMSO-d ₆ , 400 MHz).	120
Figura 50 . Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) de 47i (DMSO-d ₆ , 100 MHz).	121
Figura 51. Espectro de RMN de ¹ H do composto 30 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	157
Figura 52. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 30 (CDCl ₃ , 100 MHz).	157
Figura 53. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25a (CDCl ₃ , 400 MHz).....	158
Figura 54. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25a (CDCl ₃ , 100 MHz).....	158
Figura 55. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25b (CDCl ₃ , 400 MHz).	159
Figura 56. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 26b (CDCl ₃ , 100 MHz).....	159
Figura 57. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25c (CDCl ₃ , 400 MHz).....	160
Figura 58. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25c (CDCl ₃ , 100 MHz).....	160
Figura 59. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25d (CDCl ₃ , 400 MHz).	161
Figura 60. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25d (CDCl ₃ , 100 MHz).....	161
Figura 61. Espectro de RMN de ¹ H do composto 25e (CDCl ₃ , 400 MHz).....	162
Figura 62. Espectros de RMN de ¹³ C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25e (CDCl ₃ , 100 MHz).....	162



Figura 63. Espectro de RMN de ^1H do composto 25f (CDCl_3 , 400 MHz).	163
Figura 64. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25f (CDCl_3 , 100 MHz).....	163
Figura 65. Espectro de RMN de ^1H do composto 25g (CDCl_3 , 400 MHz).....	164
Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 25g (CDCl_3 , 100 MHz).....	164
Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do composto 25h (DMSO, 400 MHz).....	165
Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 25g (CDCl_3 , 100 MHz).....	165
Figura 69. Espectro de RMN de ^1H do composto 25i (CD_3OD , 400 MHz).....	166
Figura 70. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25i (CD_3OD , 100 MHz).....	166
Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do composto 25j (CD_3OD , 400 MHz).	167
Figura 72. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25j (CD_3OD , 100 MHz).....	167
Figura 73. Espectro de RMN de ^1H do composto 25k (CD_3OD , 400 MHz).....	168
Figura 74. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25k (CD_3OD , 100 MHz).....	168
Figura 75. Espectro de RMN de ^1H do composto 25l (CD_3OD , 400 MHz).....	169
Figura 76. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25l (CD_3OD , 100 MHz).....	169
Figura 77. Espectros de RMN de ^1H do composto 25m (CD_3OD , 400 MHz).....	170
Figura 78. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25m (CD_3OD , 100 MHz).....	170
Figura 79. Espectro de RMN de ^1H do composto 25n (CD_3OD , 400 MHz).....	171
Figura 80. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25n (CD_3OD , 100 MHz).....	171
Figura 81. Espectro de RMN de ^1H do composto 25o (CDCl_3 , 400 MHz).....	172
Figura 82. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25o (CDCl_3 , 100 MHz).....	172
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H do composto 25p (CD_3OD , 400 MHz).....	173
Figura 84. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 25p (CD_3OD , 100 MHz).....	173
Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto 33 (CD_3OD , 400 MHz).....	174
Figura 86. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 33 (CD_3OD , 100 MHz).....	174
Figura 87. Espectro de RMN de ^1H do composto 34a (CDCl_3 , 400 MHz).....	175



Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 34a (CDCl_3 , 100 MHz).....	175
Figura 89. Espectro de RMN de ^1H do composto 34b (CDCl_3 , 400 MHz).	176
Figura 90. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 34b (CDCl_3 , 100 MHz).	176
Figura 91. Espectro de RMN de ^1H do composto 34c (CDCl_3 , 400 MHz).	177
Figura 92. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 34c (CDCl_3 , 100 MHz).....	177
Figura 93. Espectro de RMN de ^1H do composto 34d (CDCl_3 , 400 MHz).	178
Figura 94. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 34d (CDCl_3 , 100 MHz).....	178
Figura 95. Espectro de RMN de ^1H do composto 34e (CDCl_3 , 400 MHz).	179
Figura 96. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT135 (b) do composto 34e (CDCl_3 , 100 MHz).....	179
Figura 97. Espectro de RMN de ^1H do composto 34f (CDCl_3 , 400 MHz).	180
Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 34f (CDCl_3 , 100 MHz).	180
Figura 99. Espectro de RMN de ^1H do composto 34g (CDCl_3 , 400 MHz).....	181
Figura 100. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT135 (b) do composto 34f (CDCl_3 , 100 MHz).....	181
Figura 101. Espectro de RMN de ^1H do composto 36a (CD_3OD , 400 MHz).....	182
Figura 102. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT135 (b) do composto 36a (CD_3OD , 100 MHz).....	182
Figura 103. Espectro de RMN de ^1H do composto 36b (CDCl_3 , 400 MHz).	183
Figura 104. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 36b (CDCl_3 , 100 MHz).....	183
Figura 105. Espectro de RMN de ^1H do composto 36c (CDCl_3 , 400 MHz).....	184
Figura 106. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT135 (b) do composto 36c (CDCl_3 , 100 MHz).....	184
Figura 107. Espectro de RMN de ^1H do composto 36d (CDCl_3 , 400 MHz).	185
Figura 108. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT135 (b) do composto 36d (CDCl_3 , 100 MHz).....	185
Figura 109. Espectro de RMN de ^1H do composto 36e (DMSO-d_6 , 400 MHz).	186
Figura 110. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 36e (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	186
Figura 111. Espectro de RMN de ^1H do composto 36f (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	187
Figura 112. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 36f (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	187



UFMG

Figura 113. Espectro de RMN de ^1H do composto 36g (DMSO- d_6 , 400 MHz).	188
Figura 114. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 36g (DMSO- d_6 , 100 MHz).	188
Figura 115. Espectro de RMN de ^1H do composto 38a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	189
Figura 116. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38a (DMSO- d_6 , 100 MHz).	189
Figura 117. Espectro de RMN de ^1H do composto 38b (CDCl_3 , 400 MHz).	190
Figura 118. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38b (CDCl_3 , 100 MHz).	190
Figura 119. Espectro de RMN de ^1H do composto 38c (CDCl_3 , 400 MHz);	191
Figura 120. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38c (CDCl_3 , 100 MHz).	191
Figura 121 Espectro de RMN de ^1H do composto 38d (DMSO- d_6 , 400 MHz).	192
Figura 122. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38d (DMSO- d_6 , 100 MHz).	192
Figura 123. Espectro de RMN de ^1H do composto 38e (DMSO- d_6 , 400 MHz).	193
Figura 124. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38e (DMSO- d_6 , 100 MHz).	193
Figura 125. Espectro de RMN de ^1H do composto 38f (DMSO- d_6 , 400 MHz).	194
Figura 126. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38f (DMSO- d_6 , 100 MHz).	194
Figura 127. Espectro de RMN de ^1H do composto 38g (DMSO- d_6 , 400 MHz).	195
Figura 128. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto 38g (DMSO- d_6 , 100 MHz).	195
Figura 129. Espectro no IV do composto 25a (Pastilha de KBr).	197
Figura 130. Espectro no IV do composto 26b (Pastilha de KBr).	197
Figura 131. Espectro no IV do composto 26c (Pastilha de KBr).	198
Figura 132. Espectro no IV do composto 26d (Pastilha de KBr).	198
Figura 133. Espectro no IV do composto 26e (Pastilha de KBr).	199
Figura 134. Espectro no IV do composto 26f (Pastilha de KBr).	199
Figura 135. Espectro no IV do composto 26g (Pastilha de KBr).	200
Figura 136. Espectro no IV do composto 26h (Pastilha de KBr).	200
Figura 137. Espectro no IV do composto 26i (Pastilha de KBr).	201
Figura 138. Espectro no IV do composto 26j (Pastilha de KBr).	201
Figura 139. Espectro no IV do composto 26k (Pastilha de KBr).	202



UFMG

Figura 140. Espectro no IV do composto 26l (Pastilha de KBr).....	202
Figura 141. Espectro no IV do composto 26m (Pastilha de KBr).....	203
Figura 142. Espectro no IV do composto 26n (Pastilha de KBr).....	203
Figura 143. Espectro no IV do composto 26o (Pastilha de KBr).....	204
Figura 144. Espectro no IV do composto 26p (Pastilha de KBr).....	204
Figura 145. Espectro no IV do composto 38b (Pastilha de KBr).....	205
Figura 146. Espectro no IV do composto 38c (Pastilha de KBr).	205
Figura 147. Espectro no IV do composto 38d (Pastilha de KBr).....	206
Figura 148. Espectro no IV do composto 38e (Pastilha de KBr).	206
Figura 149. Espectro no IV do composto 38f (Pastilha de KBr).....	207
Figura 150. Espectro no IV do composto 38g (Pastilha de KBr).....	207
Figura 151. Espectro de Massas do composto 30 (ESI modo negativo).	209
Figura 152. Espectro de Massas do composto 25a (ESI modo positivo).....	209
Figura 153. Espectro de Massas do composto 25b (ESI modo positivo).....	210
Figura 154. Espectro de Massas do composto 25c (ESI modo positivo).	210
Figura 155. Espectro de Massas do composto 25d (ESI modo positivo).....	211
Figura 156. Espectro de Massas do composto 25e (ESI modo positivo).	211
Figura 157. Espectro de Massas do composto 25f (ESI modo positivo).....	212
Figura 158. Espectro de Massas do composto 25g (ESI modo positivo).	212
Figura 159. Espectro de Massas do composto 25h (ESI modo positivo).....	213
Figura 160. Espectro de Massas do composto 25i (ESI modo positivo).	213
Figura 161. Espectro de Massas do composto 25j (ESI modo positivo).....	214
Figura 162. Espectro de Massas do composto 25k (ESI modo positivo).....	214
Figura 163. Espectro de Massas do composto 25l (ESI modo positivo).	215
Figura 164. Espectro de Massas do composto 25m (ESI modo positivo).....	215
Figura 165. Espectro de Massas do composto 25n (ESI modo positivo).....	216
Figura 166. Espectro de Massas do composto 25o (ESI modo positivo).	216
Figura 167. Espectro de Massas do composto 25p (ESI modo positivo).....	217
Figura 168. Espectro de Massas do composto 34b (ESI modo positivo).....	217
Figura 169. Espectro de Massas do composto 34c (ESI modo positivo).	218
Figura 170. Espectro de Massas do composto 34d (ESI modo positivo).....	218
Figura 171. Espectro de Massas do composto 34e (ESI modo negativo).	219



Figura 172. Espectro de Massas do composto 34f (ESI modo negativo).....	219
Figura 173. Espectro de Massas do composto 34g (ESI modo negativo).	220
Figura 174. Espectro de Massas do composto 36a (ESI modo negativo).	220
Figura 175. Espectro de Massas do composto 36c (ESI modo negativo).	221
Figura 176. Espectro de Massas do composto 36d (ESI modo negativo).....	221
Figura 177. Espectro de Massas do composto 36e (ESI modo positivo).	222
Figura 178. Espectro de Massas do composto 36f (ESI modo positivo).....	222
Figura 179. Espectro de Massas do composto 36g (ESI modo positivo).....	223
Figura 180. Espectro de Massas do composto 38a (ESI modo positivo).	223
Figura 181. Espectro de Massas do composto 38b (ESI modo positivo).....	224
Figura 182. Espectro de Massas do composto 38c (ESI modo positivo).	224
Figura 183. Espectro de Massas do composto 38d (ESI modo positivo).....	225
Figura 184. Espectro de Massas do composto 38e (ESI modo positivo).	225
Figura 185. Espectro de Massas do composto 38f (ESI modo positivo).....	226
Figura 186. Espectro de Massas do composto 38g (ESI modo positivo).	226
Figura 187. Espectro de RMN de ^1H do composto 30 (CDCl_3 , 400 MHz).....	234
Figura 188. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 30 (CDCl_3 , 100 MHz).....	234
Figura 189. Espectro de RMN de ^1H do composto 46a (DMSO-d_6 , 400 MHz).	235
Figura 190. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46a (DMSO-d_6 , 100 MHz).	235
Figura 191. Espectro de RMN de ^1H do composto 46b (DMSO-d_6 , 400 MHz).	236
Figura 192. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46b (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	236
Figura 193. Espectro de RMN de ^1H do composto 46c (DMSO-d_6 , 400 MHz).	237
Figura 194. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46c (DMSO-d_6 , 100 MHz).	237
Figura 195. Espectro de RMN de ^1H do composto 46d (DMSO-d_6 , 400 MHz).	238
Figura 196. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46d (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	238
Figura 197. Espectro de RMN de ^1H do composto 46e (DMSO-d_6 , 400 MHz).	239
Figura 198. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46e (DMSO-d_6 , 100 MHz).	239
Figura 199. Espectro de RMN de ^1H do composto 46f (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	240
Figura 200. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46f (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	240
Figura 201. Espectro de RMN de ^1H do composto 46g (DMSO-d_6 , 400 MHz).	241
Figura 202. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46g (DMSO-d_6 , 100 MHz).....	241
Figura 203. Espectro de RMN de ^1H do composto 46h (DMSO-d_6 , 400 MHz).....	242



Figura 204. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46h (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	242
Figura 205. Espectro de RMN de ^1H do composto 46i (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	243
Figura 206. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46i (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	243
Figura 207. Espectro de RMN de ^1H do composto 46j (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	244
Figura 208. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46j (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	244
Figura 209. Espectro de RMN de ^1H do composto 46k (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	245
Figura 210. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46k (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	245
Figura 211. Espectro de RMN de ^1H do composto 46l (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	246
Figura 212. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46l (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	246
Figura 213. Espectro de RMN de ^1H do composto 46m (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	247
Figura 214. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46m (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	247
Figura 215. Espectro de RMN de ^1H do composto 46n (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	248
Figura 216. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 46n (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	248
Figura 217. Espectro de RMN de ^1H do composto 47a (DMSO- d_6 , 400 MHz).	249
Figura 218. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47a (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	249
Figura 219. Espectro de RMN de ^1H do composto 47b (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	250
Figura 220. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47b (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	250
Figura 221. Espectro de RMN de ^1H do composto 47c (DMSO- d_6 , 400 MHz).	251
Figura 222. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47c (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	251
Figura 223. Espectro de RMN de ^1H do composto 47e (DMSO- d_6 , 400 MHz).	252
Figura 224. Espectro de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47e (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	252
Figura 225. Espectro de RMN de ^1H do composto 47f (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	253
Figura 226. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47e (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	253
Figura 227. Espectro de RMN de ^1H do composto 47d (DMSO- d_6 , 400 MHz).	254
Figura 228. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47d (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	254
Figura 229. Espectro de RMN de ^1H do composto 47g (DMSO- d_6 , 400 MHz).	255
Figura 230. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47g (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	255



Figura 231. Espectro de RMN de ^1H do composto 47h (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	256
Figura 232. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47h (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	256
Figura 233. Espectro de RMN de ^1H do composto 47j (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	257
Figura 234. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47j (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	257
Figura 235. Espectro de RMN de ^1H do composto 47k (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	258
Figura 236. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47k (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	258
Figura 237. Espectro de RMN de ^1H do composto 47l (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	259
Figura 238. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 47l (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	259
Figura 239. Espectro de RMN de ^1H do composto 48 (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	260
Figura 240. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 48 (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	260
Figura 241. Espectro de RMN de ^1H do composto 49 (DMSO- d_6 , 400 MHz).....	261
Figura 242. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto 49 (DMSO- d_6 , 100 MHz).....	261
Figura 243. Espectro de RMN de ^1H da amina V (CDCl_3 , 400 MHz).....	262
Figura 244. Espectro de RMN de ^{13}C da amina V (CDCl_3 , 100 MHz).....	262
Figura 245. Espectro de Massas do composto 47a (ESI modo positivo).....	264
Figura 246. Espectro de Massas do composto 47b (ESI modo positivo).....	264
Figura 247. Espectro de Massas do composto 47c (ESI modo positivo).....	265
Figura 248. Espectro de Massas do composto 47e (ESI modo positivo).....	265
Figura 249. Espectro de Massas do composto 47f (ESI modo positivo).....	266
Figura 250. Espectro de Massas do composto 47d (ESI modo positivo).....	266
Figura 251. Espectro de Massas do composto 47g (ESI modo positivo).....	266
Figura 252. Espectro de Massas do composto 47h (ESI modo positivo).....	267
Figura 253. Espectro de Massas do composto 47i (ESI modo positivo).....	267
Figura 254. Espectro de Massas do composto 47j (ESI modo positivo).....	268
Figura 255. Espectro de Massas do composto 47k (ESI modo positivo).....	268
Figura 256. Espectro de Massas do composto 47l (ESI modo positivo).....	269
Figura 257. Espectro de Massas do composto 49 (ESI modo positivo).....	269



Lista de Esquemas

Esquema 1. Reação dos inibidores contendo o grupo nitrila com o resíduo catalítico da enzima cathepsina K resultando na formação reversível do aduto tioimidato. (adaptado da ref 23).....	10
Esquema 2. Retrossíntese proposta para os derivados dipeptídicos 25a-p	19
Esquema 3. Síntese do composto 30	20
Esquema 4. Proposta mecanística para obtenção de amidas a partir de ácidos carboxílicos, utilizando reagentes de acoplamentos do tipo carbodiimidás e DMAP como catalisador (adaptado das Refs. 35,36 e 37).	22
Esquema 5. Mecanismo de desproteção do grupo Fmoc com piperidina.	24
Esquema 6: Reação de acoplamento mediada pelo EDC/DMAP para obtenção dos novos derivados dipeptídicos 25a-p , com seus respectivos rendimentos.....	28
Esquema 7. Retrossíntese dos derivados azadipeptídeos 26a-p	33
Esquema 8. Síntese do éster 33	34
Esquema 9. Síntese dos intermediários 34a-g	35
Esquema 10. Síntese das hidrazidas 36a-g	37
Esquema 11. Rota sintética proposta para obtenção dos derivados 26a-g a partir das hidrazidas 36a-g utilizando Br-CN como fonte eletrofílica de nitrila.	39
Esquema 12. Reação de Von Braun.	40
Esquema 13. Uso do BrCN para obtenção de N-ciano-hidrazida substituídas a partir de N,N'-dimetil-hidrazidas. ²⁸	40
Esquema 14. Metodologia descrita na patente US09296332, 1999, para a obtenção de N-ciano-hidrazida não substituída. ⁴³	41
Esquema 15. Reação entre hidrazida 36a com BrCN na presença de base levando ao derivado 2-amino-1,3,4-oxadiazólico 38a e a representação Ortep do cristal obtido como produto majoritário.	43
Esquema 16. Reação entre a hidrazida (36a) e o BrCN sem a presença de base levando a formação do derivado (38a).	44
Esquema 17. Síntese dos novos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g	46
Esquema 18. Proposta de mecanismo para formação de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir de hidrazidas.	47
Esquema 19: Síntese do heterociclo 1,3,4-oxadiazol a partir de diferentes substratos.....	94
Esquema 20. Diferentes rotas sintéticas para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos dissubstituídos.	95



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG

Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo

Lista de Esquemas

Esquema 21. Síntese de derivados 1,3,4-oxadiazóis dissustituídos.	97
Esquema 22. Síntese de derivados 1,3,4-oxadiazóis monossustituídos via ciclização direta de hidrazidas.....	98
Esquema 23. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis.....	100
Esquema 24. Síntese do NCTS via método de Kurzer.....	102
Esquema 25. Uso do NCTS como fonte eletrofílica de CN para síntese de nitrilas aromáticas.	103
Esquema 26. Uso do NCTS para construção de derivados amino-benzoxazóis e amino-benzoimidazóis.....	104
Esquema 27. Rota sintética para obtenção dos substratos NCTS e benzo-hidrazidas.	105
Esquema 28. Estudo de otimização do método para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos utilizando NCTS como fonte de nitrila.	106
Esquema 29: Síntese do NCTS via método de Kurzer.....	108
Esquema 30. Síntese das benzo-hidrazidas 46a-n	109
Esquema 31. Uso de catalisador metálico como ácido de Lewis para aumentar a reatividade do NCTS.....	112
Esquema 32. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-n a partir de benzo-hidrazidas e NCTS como fonte eletrofílica de nitrila.....	117
Esquema 33. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos estruturalmente privilegiados via o uso de NCTS.	122
Esquema 34. Proposta de mecanismo para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazol via o uso de NCTS como fonte eletrofílica de nitrila.....	123



CAPÍTULO I: Síntese de novos derivados peptídicos com potencial uso na terapia da osteoporose



1. Introdução

1.1. Osteoporose

A osteoporose é uma doença metabólica, sistêmica, progressiva, caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração de sua microarquitetura, ocasionando a fragilidade dos ossos e o aumento no risco de fraturas em pacientes acometidos por essa patologia.¹ A osteoporose é considerada uma doença silenciosa, devido ao fato de muitas vezes ser assintomática e evoluir até a ocorrência de fratura e, dependendo do tipo e nível dessa fratura e da idade do paciente, levar a óbito.²

Geralmente a osteoporose afeta a população com idade mais avançada, principalmente acima dos 50 anos, e em sua maioria mulheres pós-menopausa, devido ao fato desses indivíduos apresentarem um desequilíbrio na formação e reabsorção óssea. Além dos fatores de risco como idade avançada e o paciente ser do gênero feminino, outros fatores também contribuem para o aparecimento dessa doença, como por exemplo: fatores genéticos, deficiência hormonal, dieta pobre em cálcio e vitamina D, sedentarismo, uso de álcool e cigarro, dentre outros.¹ Segundo dados da Organização Internacional de Osteoporose (IOF), 200 milhões de pessoas em todo mundo sofrem com essa doença, e estima-se que em 2050 o número de fraturas de quadril na população mundial será de aproximadamente 6,26 milhões,³ o que leva a osteoporose ser considerada um problema de saúde pública.

O sistema ósseo, uma vez formado, passa por um processo de manutenção constante, conhecido como remodelação, o qual envolve a reabsorção e a formação do osso. Na remodelação óssea, há duas células principais atuando, **os osteoblastos**, que são responsáveis pela formação óssea, e **os osteoclastos**, que atuam na reabsorção óssea. Em indivíduos saudáveis há um equilíbrio entre a ação dos osteoblastos (formação óssea) e a dos osteoclastos (reabsorção óssea), sendo a reabsorção óssea a “destruição” do tecido ósseo, através da secreção de ácido clorídrico que dissolve os sais de cálcio e algumas enzimas

¹ Compston J E, McClung M R, Leslie W D Osteoporosis. *Lancet* 393 (2019) 364–376.

² (a) Svedbom A., Ivergård M., Hernlund E., Rizzoli R., Kanis J. A., Epidemiology and economic burden of osteoporosis in Switzerland” *Arch. Osteoporos* 9 (2014) 187 (b) Khajuria, D., K.; Razdan, R.; Mahapatra, D., R.; Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. *Rev Bra Reumatol*, 51 (2011) 365-382.

³ www.iofbonehealth.org acesso 19/04/2021



presentes na matriz óssea, e em seguida ocorre a renovação desse tecido pela ação dos osteoblastos. Esse mecanismo de substituição e reconstrução do tecido ósseo é de grande importância para a saúde do osso, uma vez que preserva sua integridade, otimizando sua função bem como prevenindo a sua degradação.^{4,5}

Em indivíduos com osteoporose, como dito anteriormente, ocorre um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, em que a atividade dos osteoclastos (reabsorção óssea) se sobressai sobre a atividade dos osteoblastos (formação óssea), tornando os ossos porosos e mais susceptíveis a fraturas.¹ Diante dessa característica, o tratamento da osteoporose baseia-se na diminuição da atuação dos osteoclastos e/ou no aumento da atividade dos osteoblastos, ou em ambos.

1.2. Terapias anti-osteoporose

Atualmente são utilizados nas terapias anti-osteoporose agentes farmacológicos que podem ser classificados em dois principais grupos: os agentes anabólicos, que atuam na formação óssea estimulando a atividade dos osteoblastos, e os agentes anti-reabsortivos, que têm como principal mecanismo de ação a redução da reabsorção óssea, por meio da inibição da atividade dos osteoclastos.^{6,7} Além da utilização de fármacos, a mudança no estilo de vida do paciente é de grande importância para o sucesso no tratamento, como por exemplo, praticar atividade física regularmente, alimentação balanceada, evitar consumo de bebidas alcoólicas, cafeína e cigarro. Alguns estudos sugerem que, aliado a todas essas práticas, o uso de suplementos nutricionais como cálcio e vitamina D é de grande relevância.⁷

O cálcio é um importante componente inorgânico da matriz óssea, sendo um dos elementos presentes no cristal da hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é responsável pela resistência mecânica do osso. O cálcio pode ser ingerido pelo ser humano a partir de diversas

⁴ Andia D. C., Cerri P. S., Spolidorio L. C., Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev. Odont.* 2 (2006) 191-198

⁵ Boyle W. J. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 (2003) 337-342

⁶ Ozra T-M., Salari P., Khashayar P., Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *J. Pharm. Sci.*, , 25 (2017) 2-16.

⁷ (a) Rachner T. D., Khosla S., Hofbauer L. C. Osteoporosis: now and the future. *Lancet.* 377 (2011) 1276–1287 (b) Souza, M., P., G. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. *Rev. Bras. Ortop.* 45 (2010) 220-229. (c) Nakamichi Y. *et al.*, “VDR in Osteoblast-Lineage Cells Primarily Mediates Vitamin D Treatment-Induced Increase in Bone Mass by Suppressing Bone Resorption.” *J. bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 32(6) (2017) 1297–1308

fontes, como leites e seus derivados, dentre outras, porém nem sempre a ingestão de alimentos ricos em cálcio resulta na absorção desse, sendo que essa absorção depende de o cálcio estar na forma de sal absorvível, então muitas vezes é necessário o uso de suplementos. A vitamina D atua no processo de absorção intestinal do cálcio e na reabsorção tubular renal do mesmo, logo o uso desses suplementos em conjunto é essencial.⁷

1.3. Agentes anabólicos

Os agentes anabólicos, como citado anteriormente, atuam estimulando diretamente a formação óssea, regulada pelos osteoblastos, tendo o potencial de afetar positivamente propriedades esqueléticas e a densidade óssea. Esses agentes são capazes de ajudar a reconstruir o esqueleto afetado, o que não ocorre com alguns agentes anti-reabsortivos.⁸ Apesar de todos esses benefícios citados, fármacos pertencentes à classe de agentes anabólicos causam efeitos adversos aos pacientes e muitas vezes, alguns tratamentos a bases desses agentes não se mostraram eficazes.^{6,7}

Dentre os agentes anabólicos utilizados no tratamento da osteoporose, destaca-se o paratormônio (PTH), um peptídeo linear formado por 84 resíduos de aminoácidos^{8a,8b}, secretado pelas glândulas paratireoide. Atua sobre a atividade dos osteoblastos bem como inibe a reabsorção óssea quando ministrado de forma intermitente. Entretanto, o uso contínuo e concentrações elevadas desse hormônio podem provocar a desmineralização óssea e a ação de reabsorção do tecido ósseo.^{8b} Outro agente anabólico também utilizado é a teriparatida, um análogo peptídico do PTH, que atua de forma similar ao paratormônio, mas que por ser um medicamento de custo elevado, é pouco utilizado. O uso desses dois fármacos citados é indicado para o tratamento de pacientes com alto risco de fraturas ou pacientes reincidentes.^{8a,8b}

Outro fármaco aprovado pela FDA recentemente para o tratamento da osteoporose que atua estimulando a formação óssea é o romosozumab, um anticorpo monoclonal que

⁸(a) Giratra M., Rubin M. R., Bielizikian J. P. Anabolic skeletal therapy for osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50 (2006) 745-754. (b) Rosen C. J., Bilezikian J. P. Anabolic Therapy for Osteoporosis *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(3) (2001) 957–964 (c) van Bezooijen R. L. *et al.* Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J. Exp. Med.*, 199(6) (2004) 805–814 (d) Lewiecki E. M. Romosozumab clinical trials and real-world care of patients with osteoporosis. *Annals of translational medicine* 8(15) (2020) 974.



promove a formação óssea por meio da inibição da atividade da esclerostina.^{8c,8d} A esclerostina é uma glicoproteína composta por 190 aminoácidos que atua na diminuição da taxa de formação óssea, por meio da inibição da via de sinalização denominada Wnt. Esta via exerce um papel importante no controle da osteoblastogênese e formação óssea e, por essa razão, a inibição da esclerostina vem demonstrando ser uma abordagem interessante para o desenvolvimento de novos agentes anabólicos para o tratamento da osteoporose.^{8c}

1.4. Agentes anti-reabsortivos

Os fármacos classificados como anti-reabsortivos são os mais utilizados em terapias anti-osteoporose. Estes agentes, como já relatado, atuam no processo de reabsorção óssea, inibindo a ação dos osteoclastos por diferentes mecanismos.

Dentre os agentes anti-reabsortivos pode-se destacar os bisfosfonatos, fármacos de primeira linha empregados no tratamento da osteoporose atualmente.² Os bisfosfonatos representam uma classe de substâncias que atuam na inibição da reabsorção óssea, e apresentam uma estrutura química geral contendo um átomo de carbono central ligados a dois grupos fosfonatos (PO_3H_2) e dois grupos R^1 e R^2 com estruturas químicas variadas (Figura 1, página 5). A ligação química P-C-P na estrutura dos bisfosfonatos é de grande importância para a atividade biológica dessa classe de substâncias, sendo responsável pela alta afinidade que esses compostos têm pelos cristais de hidroxiapatita, em especial pelos íons de cálcio, componente básico da matriz óssea, havendo assim uma adsorção dessas substâncias pelos ossos.^{2,7} Dependendo da estrutura química e da disposição espacial de alguns grupos na molécula do bisfosfonato, a afinidade pelos cristais de hidroxiapatita pode ser variável.⁷ No processo da reabsorção óssea, tanto o tecido ósseo quanto o bisfosfonato que se ligou à matriz óssea serão reabsorvidos e esse bisfosfonato então, por diferentes mecanismos, inibe a atividade dos osteoclastos, diminuindo assim o processo de reabsorção.⁷

O primeiro bisfosfonato disponível no mercado para uso na terapia anti-osteoporose, foi o ácido etidrônico (**1**) (Figura 1, página 5), porém este fármaco apresentou alguns efeitos adversos tais como: fortes dores nas articulações e músculos, problemas gastrointestinais, diarreia, dores de cabeças, dentre outros, então viu-se a necessidade de se desenvolver novas substâncias que apresentassem efeitos adversos mais brandos. Além do ácido etidrônico, outros bisfosfonatos estão disponíveis no mercado, como por exemplo, ácido alendrônico

(2), ácido residrônico (3), ácido ibandrônico (4), que são medicamentos de uso oral, e o ácido zolendrônico (5), de uso endovenoso e aplicado uma vez ao ano (Figura 1). Atualmente, o uso desses fármacos é essencial no tratamento da osteoporose, porém esses medicamentos apresentam alguns efeitos colaterais, por exemplo, quando administrados por via oral, podem causar irritação no esôfago² e problemas gastrointestinais.² Além disso alguns estudos apontaram que pacientes tratados com o o ácido zolendrônico (5) desenvolveram osteonecrose de mandíbula⁹ e fibrilação arterial.¹⁰

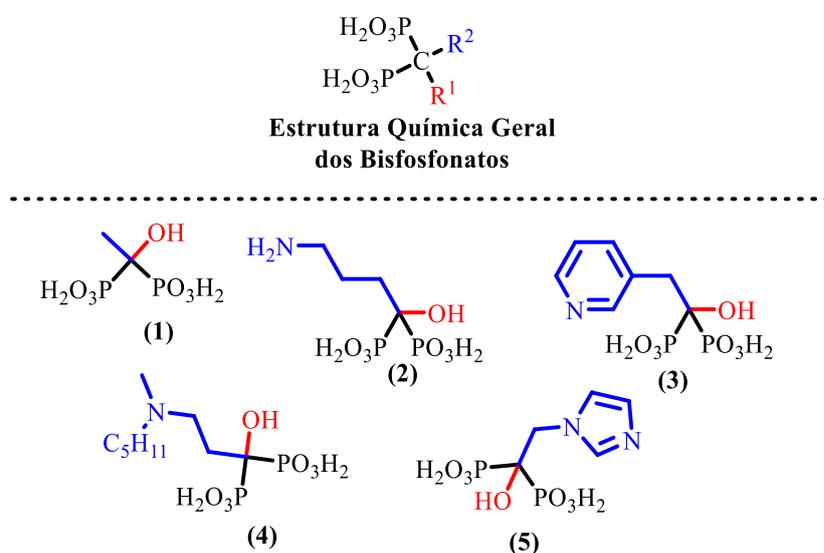


Figura 1. Bisfosfonatos utilizados na terapia anti-osteoporose.

Outra abordagem na terapia da osteoporose é a reposição hormonal em mulheres pós-menopausa, sendo que um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento da doença nesse grupo de indivíduos é a diminuição dos níveis de estrogênio no organismo.^{2,7} Todavia o uso desse hormônio pode ocasionar diversos efeitos colaterais, como o surgimento de câncer de mama, distúrbios tromboembólicos,² dentre outros. Assim, em grupos de indivíduos que apresentam elevado risco de desenvolvimento de câncer de mama, os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs) são empregados

⁹ Edwards B. J., Gounder M., McKoy J. M. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *Lancet Oncol.* 9 (2008) 1166-1172.

¹⁰ Black D. M., Delmas P. D., Eastell R., Reid I. R., Boonen S., Cauley J. A. *et al.* Once yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 1809-1822.

preferencialmente no tratamento. Esses moduladores se ligam ao receptor de estrogênio e atuam por meio de ações agonista e antagonista em tecidos específicos; os efeitos agonista no tecido ósseo são relevantes para o tratamento da osteoporose, já a ação antagonista nos tecidos mamários possibilitam minimizar os efeitos colaterais causados pelo uso do estrogênio, como o desenvolvimento do câncer de mama. Atualmente, os SERMs utilizados na terapia anti-osteoporose são: tamoxifeno (6), lasofoxifeno (7), bazedoxifeno (8) e o raloxifeno (9) (Figura 2), tendo sido o raloxifeno (9) o primeiro fármaco desse grupo a ser produzida e comercializada.⁶

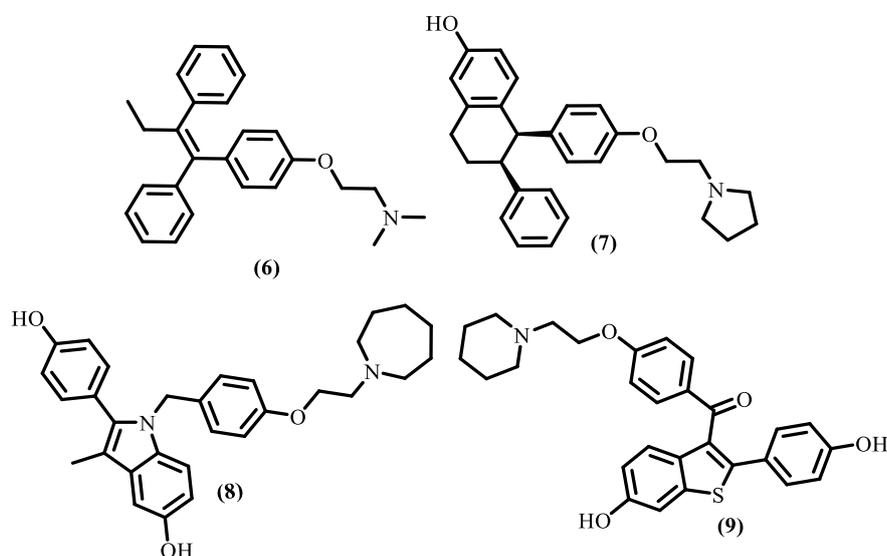


Figura 2. SERMs utilizados no tratamento da osteoporose.

Um outro medicamento aprovado para uso no tratamento da osteoporose é o ranelato de estrôncio (10) (Figura 3, página 7), que atua tanto na inibição do processo de reabsorção óssea como também na formação do osso. O ranelato de estrôncio é um sal do ácido ranélico, apresentando em sua estrutura dois íons de estrôncio complexados com os grupos carboxilatos. Estudos mostraram que esse fármaco estimula a produção dos osteoblastos e, em consequência, favorece a formação do tecido ósseo, além de estimular a formação de colágeno, componente da matriz óssea. Por outro lado, o ranelato de estrôncio atua no processo de reabsorção óssea, sendo capaz de reduzir a diferenciação e a atividade dos

osteoclastos.^{11,12} Todavia, esse fármaco causa efeitos adversos nos pacientes, como risco elevado de tromboembolismo venoso, embolia pulmonar, podendo ainda levar ao surgimento de doenças cardiovasculares graves, além de efeitos como náuseas, diarreia e dor de cabeça.^{12,13}

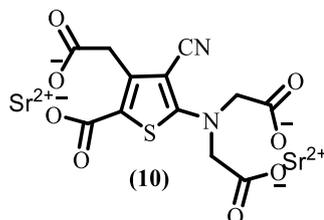


Figura 3. Ranelato de estrôncio.

Uma outra abordagem promissora que vem despertando o interesse de pesquisadores na busca de novas substâncias ativas a serem usadas no combate da osteoporose é a inibição da ligação RANK-RANKL. O RANKL (ligante do receptor do fator nuclear kapa B) é uma proteína secretada por células dos osteoblastos e apresenta um importante papel na diferenciação dos osteoclastos, sendo que, ao se ligar no seu receptor específico, o RANK (receptor ativador do fator nuclear kapa B), desencadeia uma cascata complexa de processos que leva à ativação de fatores de transcrição para diferenciação dos osteoclastos e, em consequência, ao processo da reabsorção óssea. Este processo de diferenciação celular tem como regulador importante um outro receptor endógeno, a osteoprotegerina (OPG), que atua de forma competitiva com o RANK, se ligando ao RANKL e inibindo a diferenciação. A ausência ou baixas concentrações de OPG podem levar ao surgimento de doenças como a osteoporose, logo substâncias que venham a atuar de forma similar à OPG vêm sendo pesquisadas.¹⁴

O denosumabe, um anticorpo monoclonal humano, é um exemplo de medicamento que atua similarmente à OPG. O denosumabe tem grande afinidade pelo RANKL e, ao interagir

¹¹ Bonnelye E., Chabadel A., Saltelm F., Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 42 (2008) 129–38

¹² Moshiri A., Sharifi A. M., Oryan A. Current Knowledge, Drug-Based Therapeutic Options and Future Directions in Managing Osteoporosis. *Clinic. Ver. Bone. Miner. Metab.* 15 (2017) 1-23.

¹³ Strontium still authorised despite an unfavourable opinion of the European Pharmacovigilance committee. *Prescrire Int.* 24 (2015) 156:15.

¹⁴ Hofbaur L. C., Heufelder A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J. Mol. Med.* 9 (2001) 243-253.



com esse ligante, impede a ligação RANK-RANKL, inibindo assim a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea. Muitos estudos realizados comprovaram a eficácia do denosumabe em reduzir significativamente o risco de fraturas vertebrais, não vertebrais e de quadril em mulheres pós-menopausa diagnosticadas com osteoporose.¹⁵

Além do interesse pelo alvo RANK-RANKL, a comunidade científica vem pesquisando outros alvos para o desenvolvimento de novas substâncias ativas no manejo da osteoporose, sendo que um bastante promissor é a catepsina K, uma protease expressa em grandes quantidades nas células dos osteoclastos. Muitas pesquisas relacionadas a inibidores seletivos de catepsina K têm sido relatadas e estão sendo desenvolvidas por pesquisadores ao longo dos últimos anos.¹⁸

1.5. Catepsina K

A catepsina K (Cat K) é uma proteína monomérica de peso molecular de 24 kDa, constituída por 329 resíduos de aminoácidos.¹⁶ Essa proteína pertence à família das cisteíno proteases, juntamente com outras 10 proteases (B, H, L, S, C, O, F, V, X e W), sendo as cisteíno proteases L, S e V similares em constituição e sequência de aminoácidos à catepsina K (em torno de 60%).¹⁷

A catepsina K é expressa em grandes quantidades nas células dos osteoclastos, e participa do processo de degradação do colágeno do tipo I e II, componentes da matriz óssea, portanto essa proteína tem um papel importante na degradação e reabsorção óssea.¹⁸ Visto isso, pesquisas relacionadas a inibidores da catepsina K vêm ganhando destaque, sendo este atualmente um dos alvos mais promissores no desenvolvimento de novos tratamentos para pacientes atingidos pela osteoporose.

¹⁵ McClung M. R., Boonen S., Torring O., Roux C., Rizzoli R., Bone H. G., *et al.* Effect of denosumab treatment on the risk of fractures in subgroups of women with postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 27 (2012) 211–218.

¹⁶ Bromme D., Okamoto K. Human cathepsin O₂, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 376 (1995) 379–384.

¹⁷ Somoza J. R., Zhan H., Bowman K. K., *et al.* Crystal structure of human cathepsin V. *Biochem.*, 39 (2000) 12543-12551.

¹⁸ (a) Leung P, Pickarski M., Zhuo Y., Masarachi. P. J., Duong L.T. The effects of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking. *Bone.* 49(4) (2011) 623–635 (b) Schechter I., Berge A. On the size of the active site in proteases I Papain. *Biochem Biophys Res Commun.* 27 (1967) 157–162.

1.5.1. Inibidores da cathepsina K

Nos últimos anos muitas pesquisas relacionadas à busca de novos inibidores da cathepsina K, vêm crescendo no meio acadêmico. Além de pesquisas realizadas na academia, muitas indústrias farmacêuticas mostraram-se interessadas na busca de inibidores mais seletivos e seguros para o tratamento da osteoporose.

Na busca por substâncias mais seletivas é necessário inicialmente compreender melhor a relação entre a estrutura e a atividade, isto é, como ocorre a interação de uma substância com o seu alvo e quais os principais sítios de interações da enzima, neste caso da cathepsina K. Esta enzima apresenta em sua estrutura três principais sítios de interações, denominados S1, S2 e S3 (de acordo com a nomenclatura de Schechter e Berger).^{18b} O sítio S1 é composto pelos resíduos de aminoácidos Gly23, Ser24, Gly64 e Gly65, e Cys25, o resíduo catalítico da enzima. Já o sítio S2 é altamente lipofílico, tendo como resíduos Met68, Ala133, Leu157, Ala160, Leu205 e Tyr67 e o sítio S3 é formado predominantemente pelo Asp61 e compartilha o resíduo Tyr67 com S2.¹⁹

A grande maioria dos inibidores da cathepsina K relatados na literatura são derivados de peptídeos ou são peptidomiméticos. Na Figura 4 (página 10) está representada, de forma geral, a estrutura de alguns inibidores, bem como as posições dos grupos que interagem com os sítios interações da enzima, sendo que muitos inibidores apresentam em suas estruturas grupos eletrofílicos. Além de grupos eletrofílicos, outros resíduos se mostraram importantes na interação inibidor-enzima, como grupos aromáticos na posição P3 (que interagem preferencialmente com o sítio S3) sendo que esses grupos podem interagir como Tyr68 através de interações do tipo π - π ,¹⁹ e resíduos hidrofóbicos na posição P2 (interação com o sítio S2).^{20,21}

¹⁹ Cai, J., Jamieson C., Moir J., Rankovic Z. Cathepsin K inhibitors, 2000-2004. *Expert. Opin. Ther. Pat.*, 15 (2005) 33-488.

²⁰ Leung-Toung R., Zhao Y., Li W., Tam T. F., Karimian K. Thiol proteases: inhibitors and potential therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.*, 13 (2006) 547-581.

²¹ Xing-Feng R., Hong-Wei L., Xuexun F., Yuqing W., Lincong W., Shuxue Z. Highly selective azadipeptide nitrile inhibitors for cathepsin K: design, synthesis and activity assays. *Org. Biomol. Chem.*, 11 (2013) 1143-1148 |

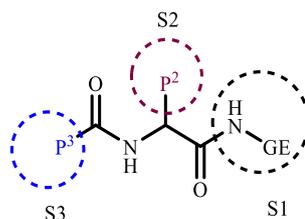
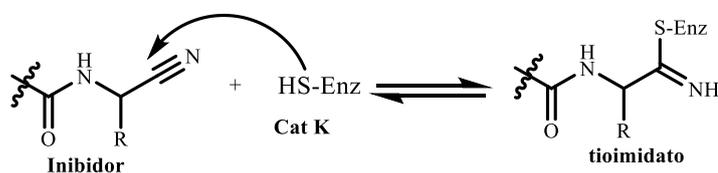


Figura 4. Representação esquemática de inibidores de catepsina K indicando os sítios de interação (S1, S2 e S3) com o qual cada grupo da molécula interage no sítio ativo da enzima..

Inibidores contendo em seu esqueleto a função nitrila vem despertando a atenção de muitos cientistas nos últimos anos, pois a presença deste grupo na estrutura destas substâncias mostrou-se eficiente na atividade de inibição, devido principalmente às características eletrofílicas da nitrila. O grupo nitrila presente na estrutura dos inibidores, ao reagir com o resíduo catalítico Cys-25 (em S1), leva à formação reversível do aduto tioimidato (Esquema 1) ocasionando assim a inibição da atividade enzimática.^{21, 22} Esse tipo de inibidor são denominados como inibidores covalentes reversíveis.



Esquema 1. Reação dos inibidores contendo o grupo nitrila com o resíduo catalítico da enzima catepsina K resultando na formação reversível do aduto tioimidato. (adaptado da ref 23).²³

A indústria farmacêutica vem mostrando bastante interesse no desenvolvimento de novos medicamentos para osteoporose, baseados em inibidores da catepsina K. Algumas substâncias com comprovada atividade de inibição passaram por testes clínicos, e dentre essas podem-se destacar o balicatib (**11**), o odanacatib (**12**), o ONO 5334 (**13**) e o relacatib (**14**) (Figura 5, página 11).

²² Moon J. B., Coleman R. S., Hanzlik R. P. Reversible covalent inhibition of papain by a peptide nitrile. Carbon-13 NMR evidence for a thioimidate ester adduct. *JACS*, 108 (1986)1350–1.

²³ Lu J., Wang M., Wang Z., Fu Z., Lu A., Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *J.Enzym .Inhib. Med. Chem.* 33 (2018) 890-904.

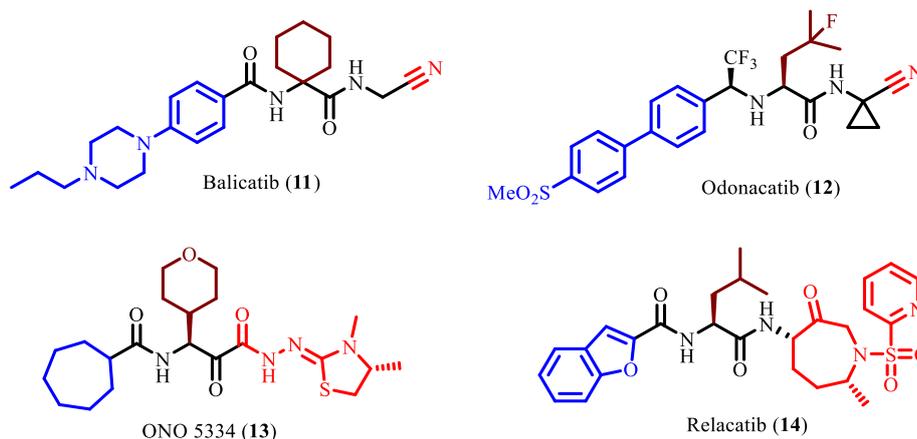


Figura 5. Inibidores da Cat K que passaram por testes clínicos para o tratamento da osteoporose.

O balicatib (**11**), um potente inibidor da catepsina K, com $IC_{50} = 2,7 \text{ nM}$,²⁴ passou por alguns ensaios clínicos realizados pela indústria Novartis,^{24b} porém devido a efeitos adversos como alterações na pele de pacientes tratados com o medicamento, os testes em fase II foram interrompidos. O odonacatib (**12**) é um inibidor covalente reversível da enzima Cat K que atua no sítio S1, se ligando ao resíduo catalítico Cys25.²⁵ Ele apresentou seletividade diante de outras catepsinas, e alguns estudos realizados apontaram que essa substância age na reabsorção óssea sem afetar o processo de diferenciação dos osteoclastos,²⁵ todavia devido a efeitos colaterais, como aumento no risco de acidente vascular cerebral, a Merck & Co, companhia que vinha realizando os ensaios clínicos, declarou descontinuidade nos testes em fase III. O ONO 5334 (**13**) e o relacatib (**14**) também se mostraram inibidores da Cat K promissores, porém ambos tiveram os testes clínicos descontinuados. Os testes clínicos de ONO 5334 foram descontinuados devido à fatores de competição e marketing relacionados à indústria farmacêutica responsável, já para o relacatib, os estudos realizados na fase I dos testes apontaram interações dessa substância com outros fármacos, como paracetamol, ibuprofeno e astorvastatina, levando à descontinuidade dos ensaios.²⁶ Até o

²⁴ Bromme D., Lecaille F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects, *Expert Opin. Investig. Drugs.*, 18 (2009) 585–600. (b) Chappard D., Libouban H., Baslé F. M., Legrand E., Audran M. The cathepsin K inhibitor AAE581 induces morphological changes in osteoclast of treated patients. *Microscopy Research and Technique* 73 (2010) 726-732.

²⁵ Gauthier J. Y., Chauret N., Cromlish W., Desmarais S., Le Duong T., Falguyet J. P. et al. The discovery of odonacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18 (2008) 923–928.

²⁶ Mukherjee K., Chattopadhyay N., Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy. *Biochemical Pharmacology* 117 (2016) 10–19.

presente momento nenhum inibidor da catepsina K foi aprovado para uso clínico no combate à osteoporose ou doenças correlatas.

Trabalhos objetivando a obtenção de novos inibidores da catepsina K vêm se destacando na literatura nos últimos anos. Em 2015 Borisek e colaboradores²⁷ relataram a síntese de substâncias inéditas, planejados como inibidores da catepsina K, baseando-se na estrutura molecular de inibidores conhecidos. Neste trabalho os autores tomaram como base o esqueleto molecular do balicatib (**11**), e variaram os grupos da posição P3, com objetivo de avaliar se diferentes resíduos aromáticos iriam afetar significativamente o a atividade inibitória dessas substâncias. Os resultados desse trabalho apontaram que os compostos **15** e **16** (Figura 6) foram altamente seletivos para Cat K em relação às catepsinas L e S, com K_i (constante de inibição) entre 10-30 nM. Estudos cinéticos realizados mostraram que essas substâncias se ligam reversivelmente à enzima Cat K.

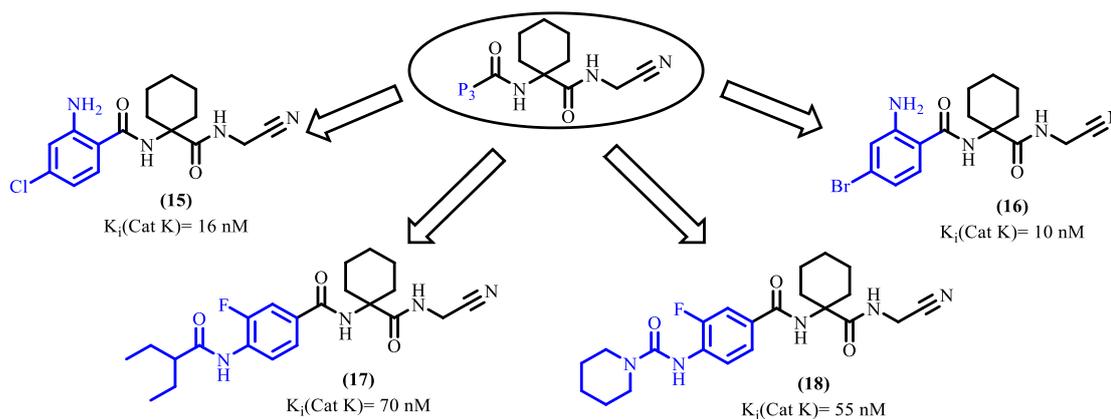


Figura 6. Inibidores da Cat K baseados no esqueleto molecular do balicatib (**11**).²⁷

Frizler e colaboradores²⁸ relataram a síntese de novos inibidores derivados de azadipeptídeos nitrílicos (Figura 7, página 13), onde foram variados os grupos das posições P2 e P3, mantendo na posição P1 o grupo carbonitrila de 1,2-dimetil-hidrazina. Em testes

²⁷ Borisek, J.; Vizovisek, M.; Sosnowski, P.; Turk, B.; Turk, D.; Mohar, B.; Novic, M.; Development of N- (Functionalized benzoyl) homocycloleucylglycinonitriles as Potent Cathepsin K Inhibitors. *J. Med. Chem.* 58 (2015) 6928–6937.

²⁸ Frizler, M.; Lohr, M.; Furtmann, N.; Klas, J.; Gutschow, M.; Structural Optimization of Azadipeptide Nitriles Strongly Increases Association Rates and Allows the Development of Selective Cathepsin Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 54 (2011) 396-400.

realizados com as novas substâncias frente a diferentes tipos de catepsina (K, L, S e B), os autores observaram que a presença do resíduo *L*-leucina na estrutura dos inibidores na posição P2 se mostrou eficiente para a inibição das enzimas, tornando as substâncias mais seletivas para catepsina K. Neste mesmo trabalho os autores também variaram os grupos da posição P3, a fim de avaliar a atividade de inibição bem como a seletividade dessas novas substâncias frente às diferentes catepsinas.

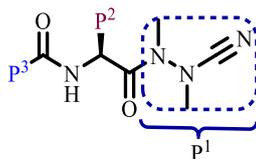


Figura 7. Esqueleto molecular dos azadipeptídeos nitrílicos.

Seguindo esta mesma linha de pesquisa, Wu e colaboradores^{29,30} publicaram em 2013 dois trabalhos, onde foram sintetizados azadipeptídeos nitrílicos com diferentes grupos nas posições P3. Nesta abordagem, os autores mantiveram no esqueleto molecular os grupos carbonitrila de 1,2-dimetil-hidrazina na posição P1 e o grupo iso-butila (cadeia lateral do aminoácido leucina) em P2, variando-se grupos nos resíduos aromáticos da posição P3. Uma série de derivados, com diferentes substituintes nas posições *meta* e *para* do anel fenila, foram obtidos. Além de pequenos substituintes no anel fenila, os autores sintetizaram também derivados contendo grupos maiores como biarilfenila e triarilfenila, nas posições *meta* e *para* (Figura 8, página 14), e todos esses derivados foram testados frente às catepsinas K, L B e S, a fim de verificar a atividade inibitória e a seletividade dos mesmos.

²⁹ Yuan Xiào-Yu, Fu Ding-Yi, Ren Xing-Feng, Fang X., Wang L., Zou S., Wu Yuqing. Highly selective azanitrile inhibitors for cathepsin K, structural optimization and molecular modeling. *Org. Biomol. Chem.* 11, (2013) 5847-5852.

³⁰ Ren Xing-Feng Li, Hong-Wei, Xuexun F., Yuqing W., Lincong W., Shuxue Z. Highly selective azadipeptide nitrile inhibitors for cathepsin K: design, synthesis and activity assays *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013)1143-1148.

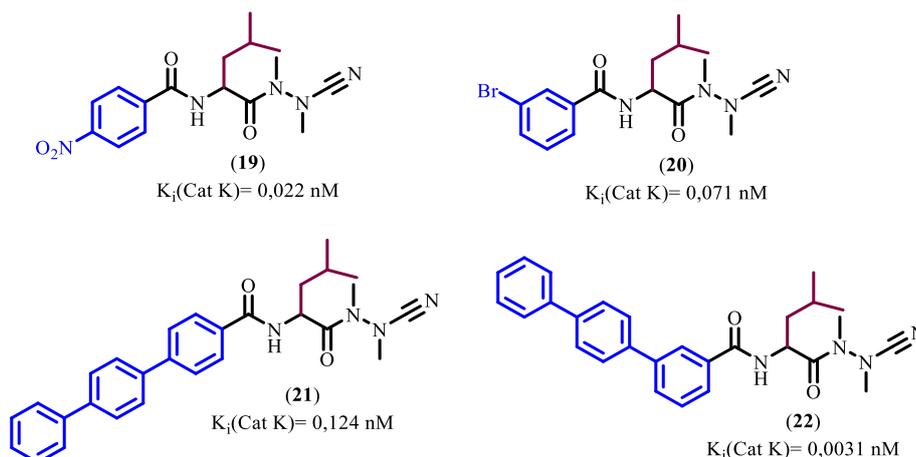


Figura 8. Derivados de nitrilo azadipetídeos com atividade inibitória da Cat K.

Além de origem sintética, alguns inibidores da catepsina K relatados na literatura são de origem natural, isolados de diversos tipos de organismos vivos. Dentre estas substâncias pode-se destacar a haploscleridamina (23),³¹ isolada de uma esponja marinha, e o derivado das furoquinonas 24,²⁴ isolado da espécie *Paulownia tomentosa stem* (Figura 9), tendo essas substâncias apresentado atividade de inibição da Cat K com valores de K_i de 26 e 21 μM , respectivamente.

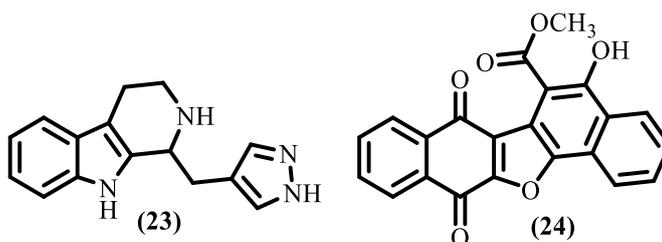


Figura 9: Inibidores da Cat K de origem natural.

Visto que a osteoporose vem atingindo a cada ano grande parte da população mundial, e que as terapias utilizadas atualmente causam diversos efeitos colaterais aos pacientes, tem-se a necessidade de busca de novas substâncias que atuem de forma mais

³¹ Patil A. D., Freyer A. J., Carte B., *et al.* Haploscleridamine, a novel tryptamine-derived alkaloid from a sponge of the order Haplosclerida: an inhibitor of cathepsin K. *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 628–629.



Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo
Capítulo I - Introdução

seletiva e causem menores danos aos indivíduos em tratamento. Diante do que foi apresentado, os inibidores da catepsina K mostram-se como alvos promissores no desenvolvimento de novas terapias para esta condição patológica. Portanto o foco deste trabalho é a síntese de novos potenciais inibidores da catepsina K, utilizando como base esqueletos moleculares de inibidores descritos na literatura, visando a obtenção de novas substâncias capazes de atuar em etapas importante do mecanismo que desencadeia os sintomas dessa doença.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo a síntese de novas substâncias capazes de atuar como inibidores da catepsina K, por meio de modificações em esqueletos moleculares de dipeptídeos e azadipeptídeos miméticos. Os grupos nas posições P1 e P2 foram mantidos variando apenas o grupo R em P3, para os dipeptídeos e azadipeptídeos. Em P1 foram escolhidos os grupos contendo nitrilas, objetivando que esta parte da molécula interaja com o sítio S1 da cat K. Para P2, grupos hidrofóbicos foram utilizados, a fim que os mesmos interajam com o sítio S2 e em P3 foram empregados diferentes substituintes R, como por exemplo, anéis aromáticos contendo grupos doadores e retiradores de elétrons, os quais poderão interagir com o sítio S3 (Figura 10).

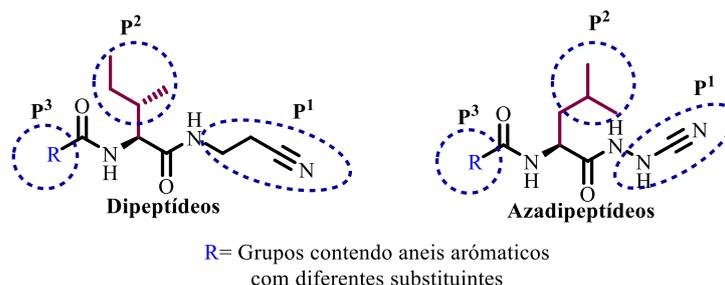


Figura 10. Estruturas gerais dos dipeptídeos e azadipeptídeos propostos neste trabalho.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Síntese e caracterização dos dipeptídeos miméticos **25a-p** contendo diferentes núcleos aromáticos (Figura 11, página 17);

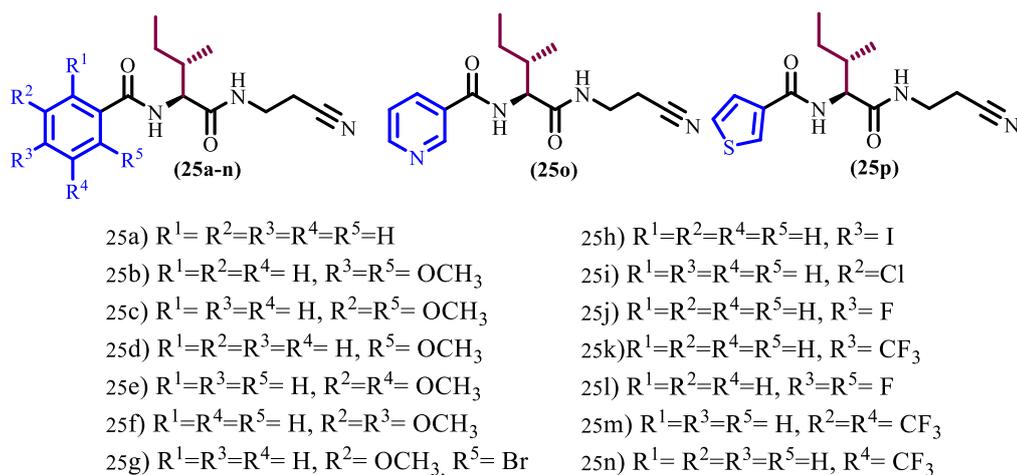


Figura 11. Estruturas dos dipeptídeos miméticos **25a-p**.

- ✓ Síntese e caracterização dos azadipeptídeos miméticos, também contendo diferentes núcleos aromáticos **26a-g** (Figura 12);

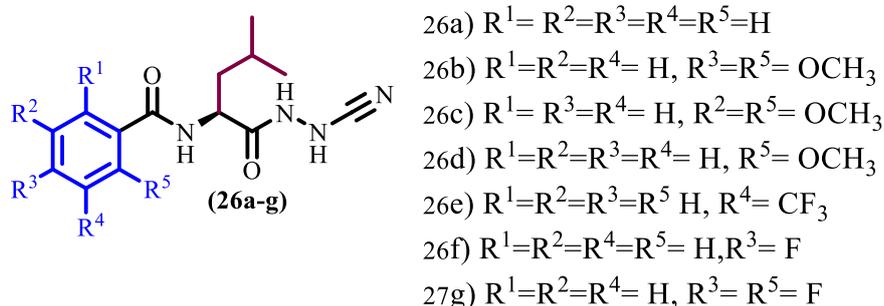


Figura 12. Estruturas dos azadipeptídeos miméticos **26a-g**.

- ✓ Avaliar o potencial de inibição dos novos derivados frente à catepsina K;
- ✓ Avaliar os efeitos dos novos compostos no processo de maturação de osteoblastos e osteoclastos de roedores e no processo de diferenciação de células-troncos mesenquimais humanas.

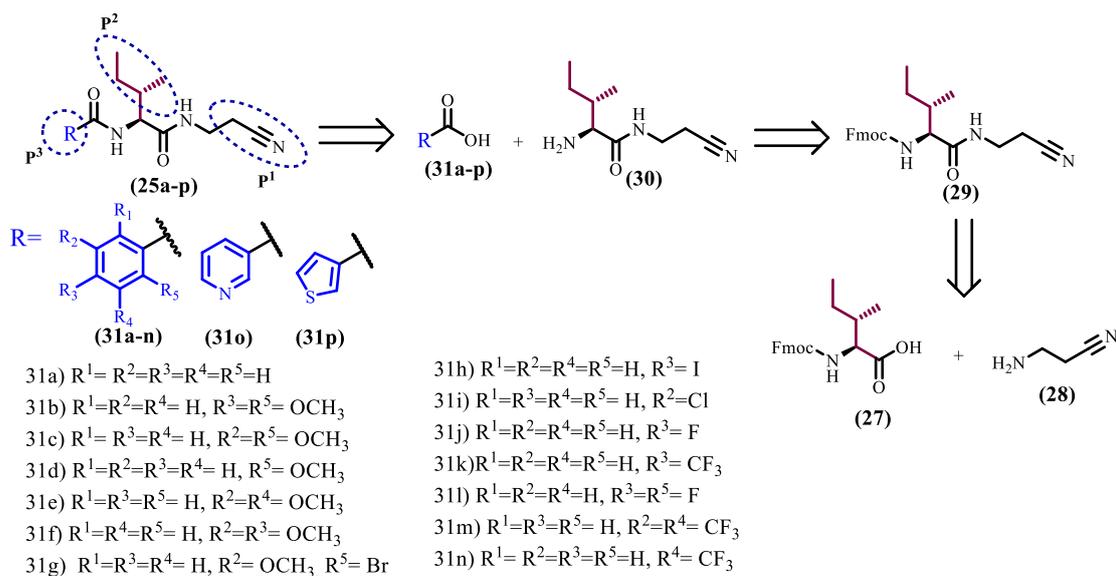


3. Resultados e discussão

A apresentação e discussão dos resultados obtidos será dividida em três partes. Na primeira parte serão apresentados e discutidos os resultados referentes à síntese e caracterização dos derivados dipeptídicos miméticos **25a-p**. Na segunda, será realizada a discussão da rota sintética planejada para a obtenção dos derivados azadipeptídicos miméticos **26a-g**, e que levou aos produtos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos bem como a caracterização dos intermediários e dos produtos finais. E por fim serão apresentados os resultados referentes aos testes biológicos realizados com os novos derivados obtidos, os ensaios de inibição da catepsina K e os testes realizados com as células de osteoblastos e osteoclastos.

3.1. Síntese e caracterização dos compostos dipeptídicos miméticos 25a-p

A obtenção dos compostos dipeptídicos miméticos **25a-p** propostos neste trabalho foi realizada de acordo com a retrossíntese representada no Esquema 2 (página 19). Pode-se observar que a síntese desses compostos foi proposta via formação de uma ligação amídica entre ácidos carboxílicos aromáticos disponíveis comercialmente **31a-p**, contendo em suas estruturas grupos doadores e retiradores de elétrons em diferentes posições, e o composto **30**, contendo em sua estrutura uma amina primária livre. O composto **30** seria obtido pela desproteção de **29**, o qual seria preparado partindo-se dos reagentes comerciais *L*-isoleucina (**27**) com o grupo amino protegido com o 9-fluoroenilmetiloxicarbonil (Fmoc) e a 3-amino-propionitrila (**28**).



Esquema 2. Retrossíntese proposta para os derivados dipeptídicos **25a-p**.

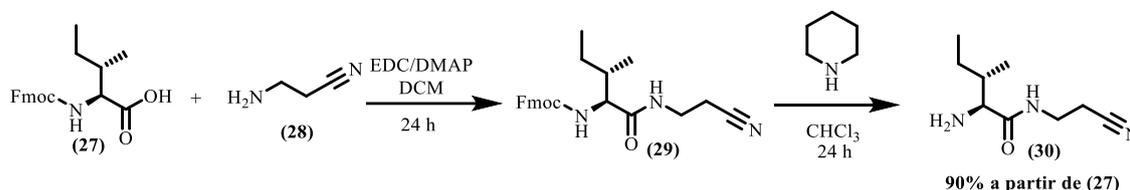
A escolha do aminoácido *L*-isoleucina (**27**), da amina **28** e dos derivados dos ácidos carboxílicos aromáticos **31a-p** foi devido às suas características estruturais pois, como já relatado na introdução deste trabalho, os inibidores da catepsina K interagem com a enzima por meio de três sítios interações principais, S1, S2 e S3, e determinadas estruturas moleculares têm maior afinidade e interagem mais seletivamente com esses sítios. A amina **28**, por exemplo, contém em sua estrutura o grupo nitrila, que pode interagir com o sítio S1, mais especificamente com o resíduo catalítico Cys-25, como discutido na introdução (Esquema 1, página 10). Já a cadeia lateral do aminoácido *L*-isoleucina ocupa a posição P2 do esqueleto molecular dos inibidores, interagindo com o sítio S2, sendo que grupos hidrofóbicos apresentam maior afinidade com ele. Como já vem sendo relatado na literatura, inibidores contendo grupos, como por exemplo, o *iso*-butila (cadeia lateral do aminoácido leucina), se mostraram bastante seletivos para catepsina K.^{29,30} Em relação à escolha dos ácidos carboxílicos aromáticos, como discutido na introdução, muitos trabalhos relataram que a presença de grupos aromáticos na posição P3 dos inibidores é de grande relevância, pois esses interagem com o resíduo Tyr68, presente no sítio S3 da enzima.^{29,30} Logo a escolha desses três grupos para a construção dos novos dipeptídeos foi baseada na estrutura molecular de inibidores conhecidos, bem como no sítio ativo da catepsina K.



UFMG

3.1.1. Síntese do composto 30

O composto **30** é o intermediário-chave para obtenção dos novos dipeptídeos miméticos **25a-p** e a sua síntese foi realizada em duas etapas, mostradas no Esquema 3.



Esquema 3. Síntese do composto **30**.

Na primeira etapa o aminoácido **27** reagiu com a aminonitrila **28** na presença do reagente de acoplamento EDC (cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) e do catalisador DMAP (*N,N*-dimetil-4-aminopiridina) em diclorometano (DCM), levando à formação de **29**, após 24 horas de reação, que foi utilizado na próxima etapa sem purificação e caracterização, devido à baixa solubilidade do composto **29** nos solventes mais utilizados como eluentes para purificação em coluna cromatográfica.^{32,33}

Na etapa da síntese do composto **29** ocorre a formação de uma ligação amídica por meio da reação de um ácido carboxílico e uma amina. Ácidos carboxílicos são poucos reativos frente a reações de substituições nucleofílicas, então é necessário o uso de reagentes capazes de ativar o grupo carboxila, transformando a hidroxila em um bom grupo abandonador e aumentando a eletrofilicidade do carbono da carbonila. Na literatura há diversos reagentes de acoplamentos empregados na síntese de amidas a partir de ácidos carboxílicos, sendo bastante explorado o uso de carbodiimidas.³⁴ Alguns reagentes de acoplamentos pertencentes a essa classe são o DCC (*N,N*-diclohexilcarbodi-imida), o DIC (*N,N*-diisopropilcarbodi-imida) e o EDC (cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodi-imida). Neste trabalho optou-se pelo uso do reagente de acoplamento EDC, uma vez que, quando utilizam-se derivados carbodiimidas em reações para formações de ligações peptídicas, ocorre a formação de subprodutos derivados da ureia, e o EDC, devidos às suas características estruturais, a presença de um grupo amino em sua estrutura, possibilita que a

³² Chen X., Lawrence J., Parekar S., Emrick T. Novel Zwitterionic Copolymers with Dihydrolipoic Acid: Synthesis and Preparation of Nonfouling Nanorods. *Macromolecules* 46 (2013)119-127.

³³ Davis T. A., Vilgem A. E., Richmond A. Johnston, J., N. Preparation of (–)-Nutlin-3 Using Enantioselective Organocatalysis at Decagram Scale. *J. Org. Chem.* 78 (2013) 10605–10616.

³⁴ Chan W., White P. D. **Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Practical Approach Series)**. Oxford University Press, USA, 2000.



UFMG

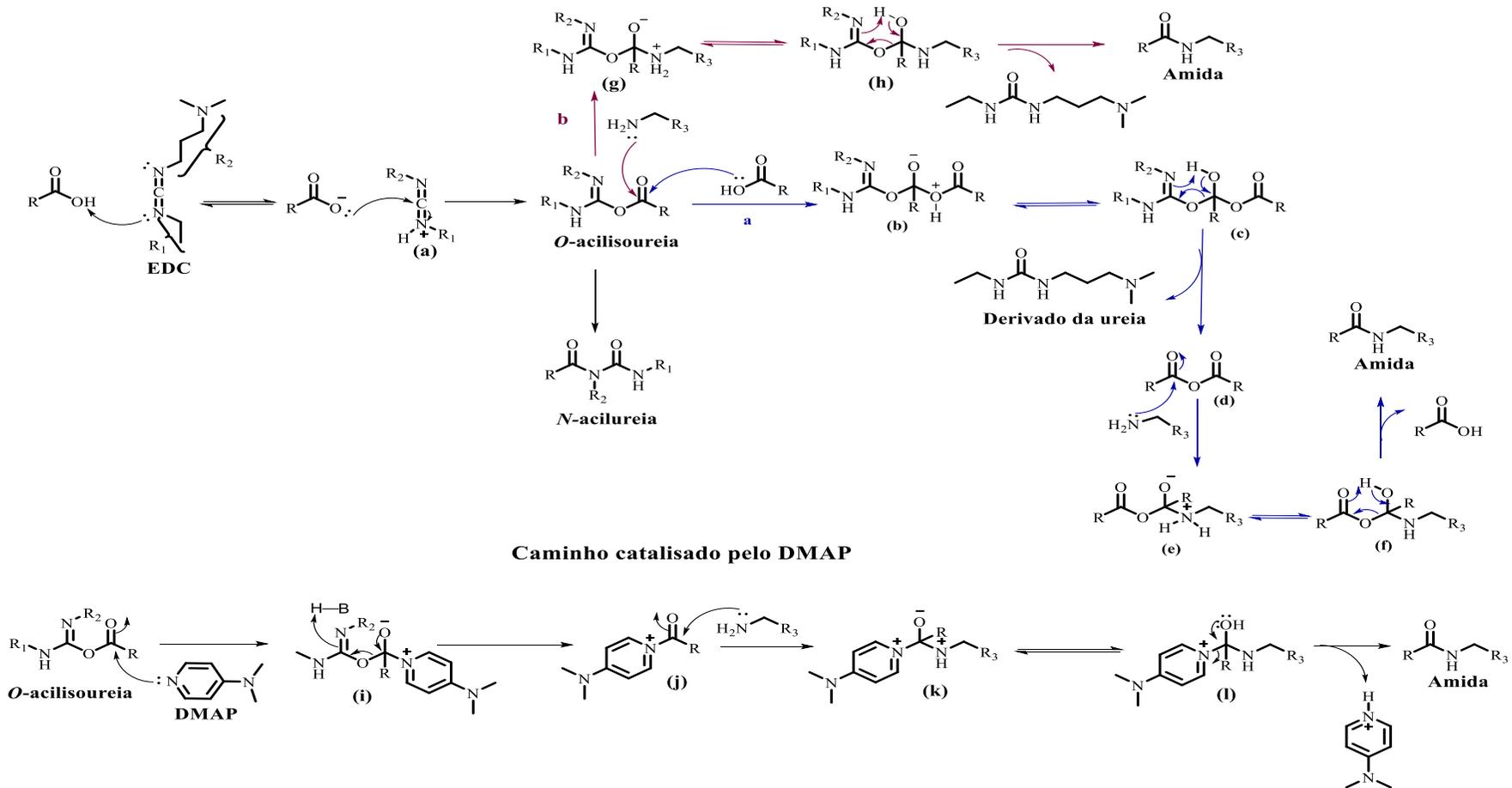
ureia formada seja facilmente separada do produto de interesse através de lavagens com uma solução aquosa de HCl 1 molL⁻¹, sem necessidade muitas vezes de posteriores purificações do produto desejado. Além do EDC, utilizou-se também o DMAP, que age como um catalisador, acelerando a reação.

O mecanismo proposto^{35,36,37} para formação de amidas a partir de ácidos carboxílicos, mediado por EDC e DMAP, está representado no Esquema 4 (página 22). Inicialmente ocorre a abstração do próton do ácido carboxílico pelo par de elétrons do nitrogênio do EDC, levando ao íon carboxilato e ao intermediário (**a**). Em seguida ocorre o ataque do átomo de oxigênio do carboxilato à carbazida (**a**), via adição nucleofílica, levando ao intermediário chave desta reação, a *O*-acilisoureira. A *O*-acilisoureira pode reagir para formar a amida desejada por diferentes caminhos (**a** ou **b**), ou também se rearranjar formando a *N*-acilureia, composto estável e não reativo, logo a obtenção desse derivado é indesejável no meio reagente. A obtenção da amida pelo caminho **a** ocorre inicialmente pelo ataque do ácido carboxílico à *O*-acilisoureira, seguido da formação do anidrido (**d**) e posterior ataque da amina presente no meio, o que leva ao produto desejado. Pelo caminho **b**, a adição nucleofílica da amina à *O*-acilisoureira conduz ao intermediário (**g**), que se encontra em equilíbrio com a espécie (**h**), a qual sofre uma reação de eliminação do derivado da ureia, levando à formação da amida desejada. Na presença de DMAP, a obtenção da amida pode ocorrer por outra via, também mostrada no Esquema 4. Nesse caso DMAP pode reagir com a *O*-acilisoureira, formando o intermediário reativo (**j**) que em seguida sofre um ataque nucleofílico da amina presente no meio, obtendo-se então a amida de interesse. O uso do DMAP pode acelerar a reação devido à formação do intermediário (**j**) no meio reagente, sendo esse mais reativo frente à nucleófilos como aminas e álcoois, quando comparado com *O*-acilisoureira. Seu uso pode também minimizar ou até mesmo impedir a formação da *N*-acilureia.

³⁵ (a) Faham A., Alberico F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* 111 (2011) 6557–6602. (b) Costa P. R. R., Pilli R. A., Pinheiro S. **Substâncias Carboniladas e Derivados**, EditSBQ, Brasil, 2019

³⁶ Pereira G. R. *Síntese de Novos Derivados Fullerênicos 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.

³⁷ Torres N. M. P. O. *O uso do ácido lipoico para obtenção de agentes antiglicantes*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.



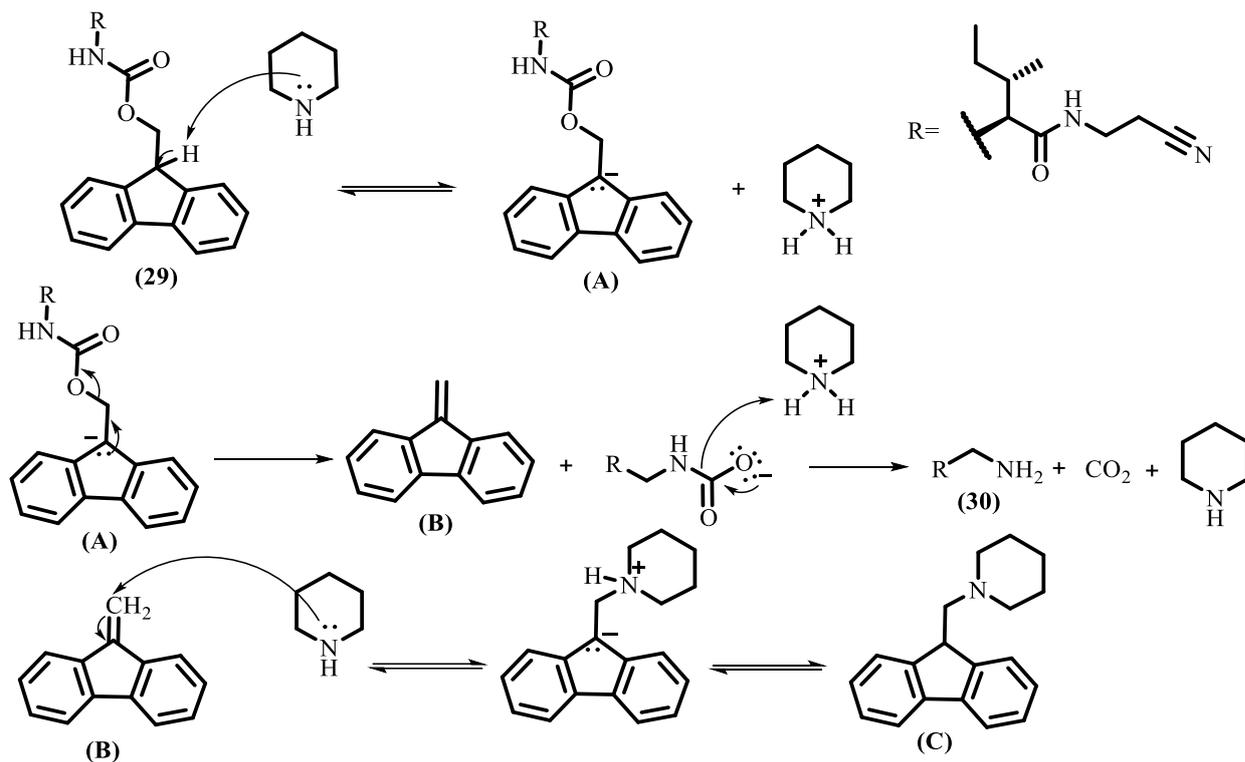
Esquema 4. Proposta mecanística para obtenção de amidas a partir de ácidos carboxílicos, utilizando reagentes de acoplamentos do tipo carbodiimidas e DMAP como catalisador (adaptado das Refs. 35,36 e 37).



A segunda etapa para obtenção do composto **30** consistiu na reação de **29** com piperidina em clorofórmio, para retirada do grupo protetor Fmoc. Inicialmente testou-se a metodologia clássica³⁵ utilizando-se uma solução de piperidina em DMF, porém, devido à dificuldade de extrair o produto do DMF, optou-se pela metodologia descrita por Jahnke e colaboradores,³⁸ na qual utiliza-se clorofórmio como solvente da reação e excesso de piperidina. Como o derivado **29** é pouco solúvel em clorofórmio, foi necessário a utilização de uma maior quantidade de solvente e um tempo de reação de 24 horas, maior quando comparado às metodologias descritas na literatura. Nestas condições obteve-se o composto **30**, após purificação em coluna, com 90% de rendimento.

Grupos protetores como o Fmoc são amplamente utilizados em reações para obtenção de peptídeos, principalmente na síntese em fase sólida,³⁵ por ser um grupo facilmente removido em meio básico, condição que na maioria das vezes não afeta outros grupos protetores das cadeias laterais de aminoácidos. No Esquema 5 (página 24) está representado o mecanismo da desproteção do grupo Fmoc, utilizando-se piperidina.³⁵ Inicialmente a piperidina abstrai o próton do anel fluoreno do derivado (**29**), formando o íon aromático (**A**). Esse, através de uma reação de eliminação do tipo E1cb leva ao dibenzofulveno (**B**) e a um aminocarboxilado que sofre uma descarboxilação, fornecendo a amina livre (**30**) e liberando CO₂ no meio. O dibenzofulveno (**B**) formado no meio reage com a piperidina, fornecendo o aduto (**C**), que apresenta intensa absorção na região do UV, propriedade bastante utilizada para acompanhar reações bem como quantificar o grau de substituição de resinas utilizadas na síntese em fase sólida.

³⁸ Jahnke E., Weiss J., Neuhaus S., Hoheisel T. N., Frauenrath H. Synthesis of Diacetylene-Containing Peptide Building Blocks and Amphiphiles, Their Self-Assembly and Topochemical Polymerization in Organic Solvents *Chem. Eur. J.* 15(2009) 388 – 404.



Esquema 5. Mecanismo de desproteção do grupo Fmoc com piperidina.

O composto **30** foi caracterizado por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, ¹³C, e experimentos por correlação em duas dimensões, COSY e HSQC. No espectro de RMN de ¹H de **30** (Figura 13, página 25) observa-se um multipletto na região entre δ 3,54-3,42 ppm, integrado para 2H, atribuído ao hidrogênio H4 e um triplete em δ 2,59 ppm ($J_{H5,H4} = 6,4$ Hz) integrado para 2H, referente ao H5. Estes dois sinais comprovam o sucesso na reação de acoplamento entre o aminoácido **27** e a amina **28**. Não são observados também sinais de hidrogênios aromáticos, o que confirma a retirada do grupo Fmoc. Outros sinais importantes observados no espectro são os dois multipletos na região entre δ 1,37-1,27 ppm e δ 1,02-0,92 ppm, referentes aos hidrogênios diastereotópicos H8 e H8', vizinhos ao carbono assimétrico C7.

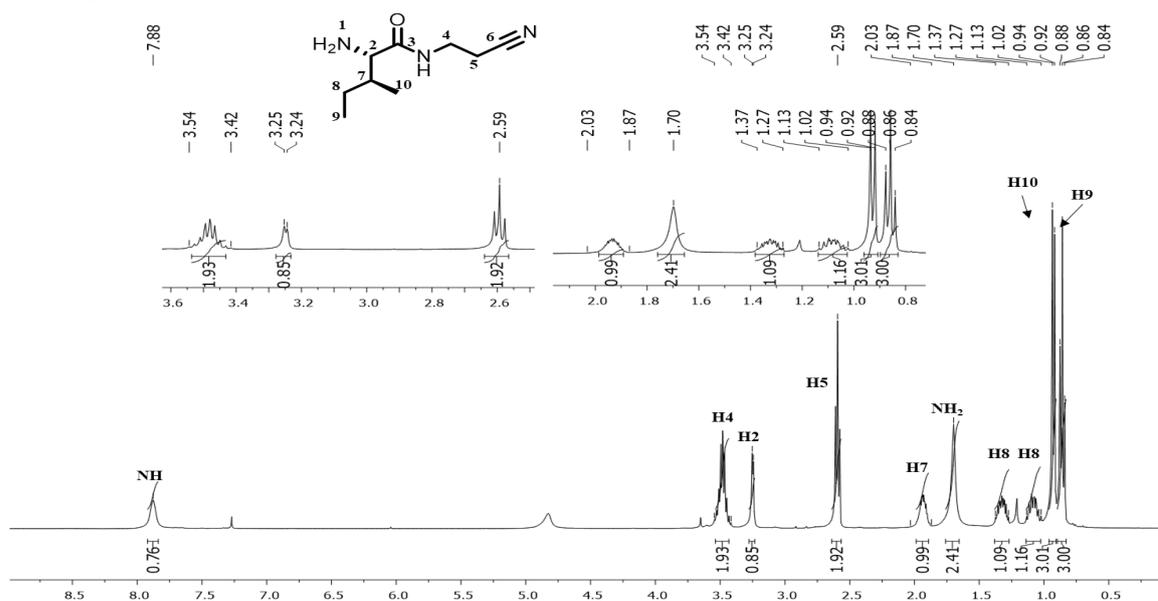


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (CDCl_3 / 400 MHz).

Os experimentos de RMN em duas dimensões, COSY e HMQC, foram realizados para auxiliar na atribuição completa dos sinais de hidrogênios e carbonos de **30** e dos compostos inéditos **26a-p**. Observa-se no mapa de contornos COSY e na sua expansão (Figura 14, página 26), a correlação do sinal do hidrogênio H4 com o simpleto largo em δ 7,88 ppm, atribuído ao hidrogênio da amida; os sinais multipletos entre δ 1,37-1,27 ppm e δ 1,02-0,92 ppm correspondem aos hidrogênios diastereotópicos, H8 e H8', pois apresentam correlação com o tripleto ($J_{\text{H9,H8}} = 8,0$ Hz) em δ 0,86 ppm, atribuído à metila terminal C9.

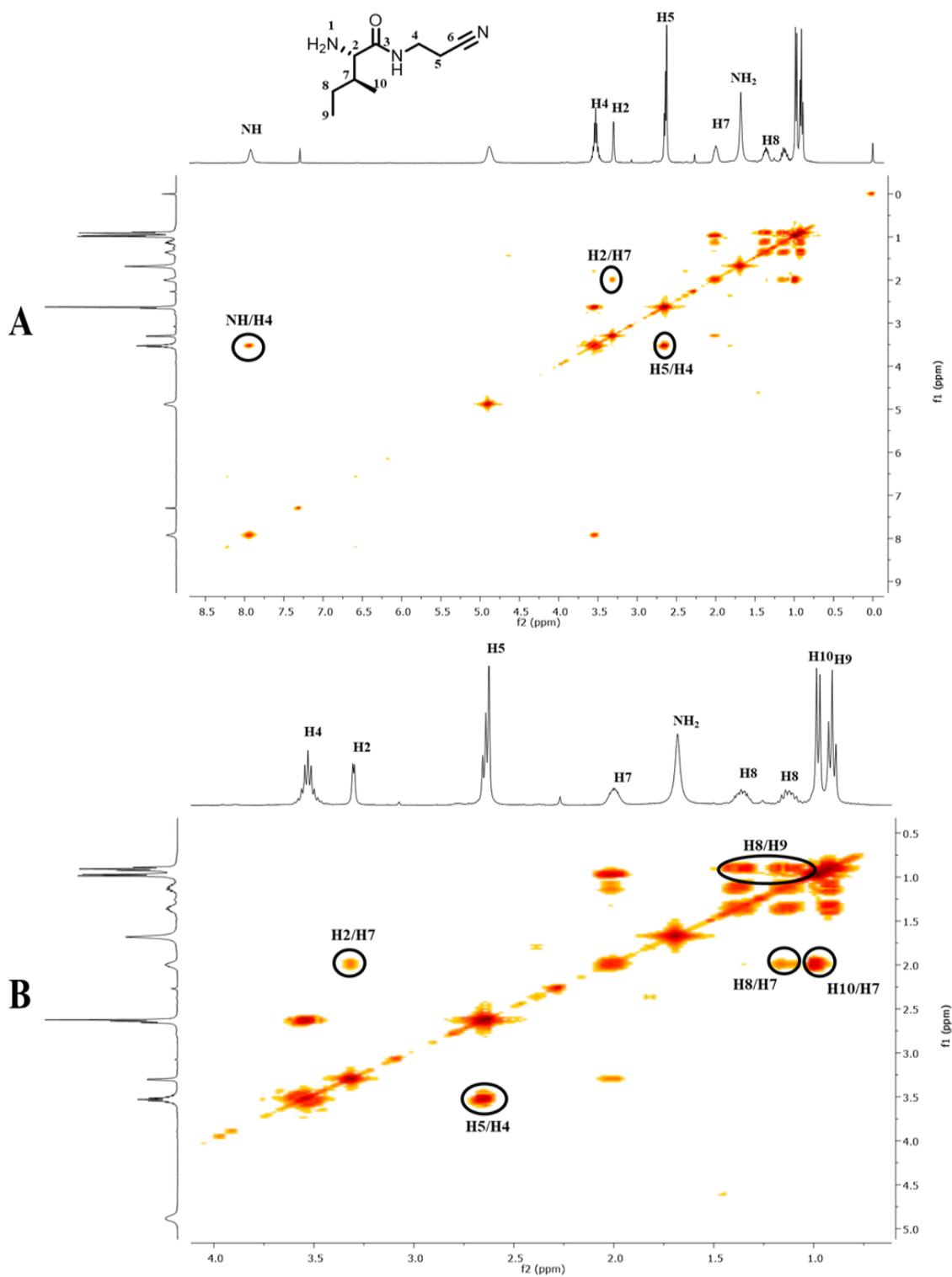


Figura 14. Mapa de contornos COSY de **30**(A), Expansão do mapa de contornos COSY de **30** (B) (CDCl₃/ 400 MHz).

No mapa de contornos HMQC (Figura 15) pode-se destacar a correlação dos sinais dos hidrogênios H8 com um sinal de carbono metilênico CH₂, em δ 23,8 ppm, comprovando a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos na estrutura do composto.

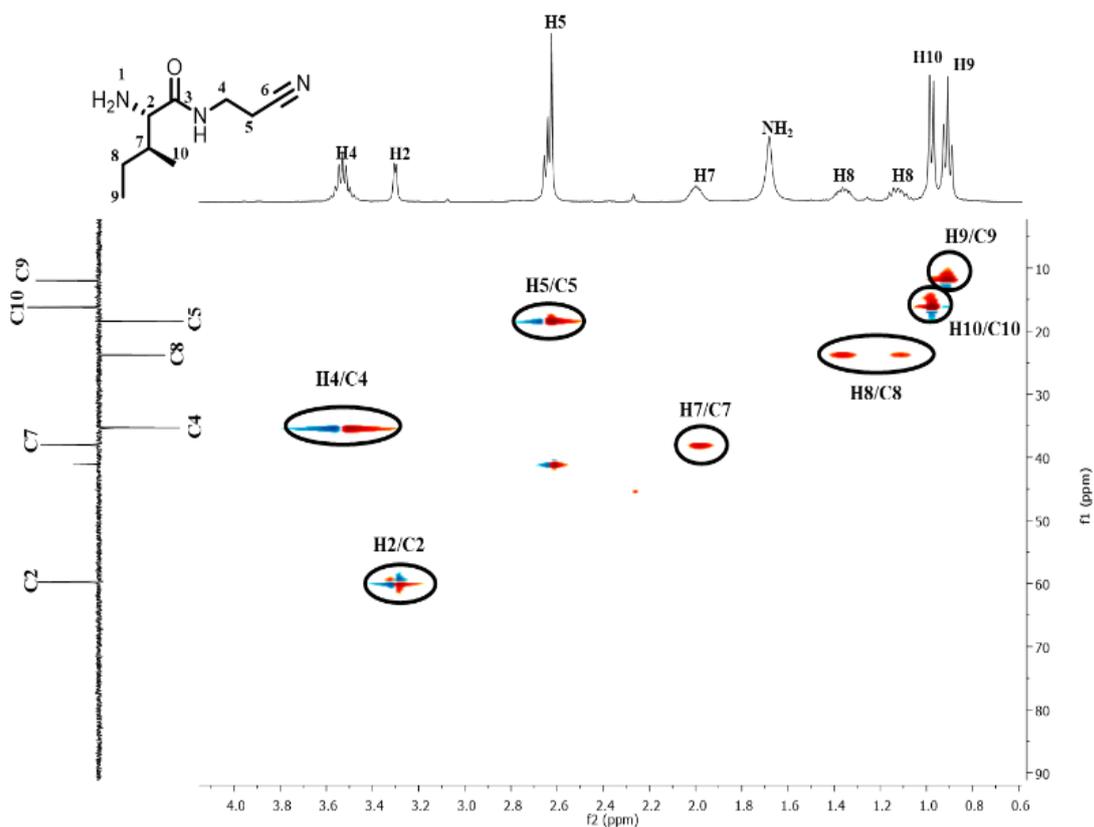


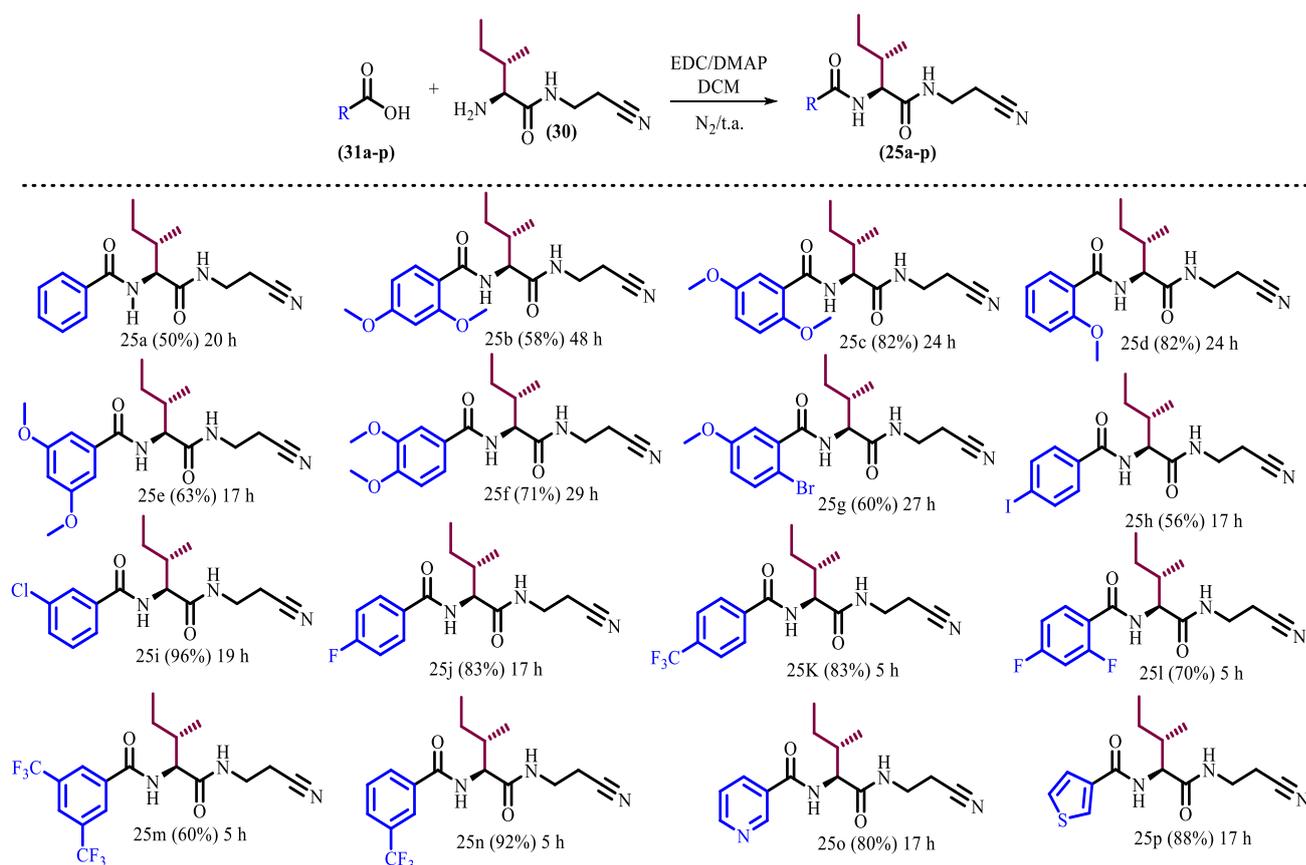
Figura 15. Expansão do mapa de contornos HMQC de **30** (CDCl₃/ 400 MHz).

Portanto, com auxílio dos mapas de contornos COSY (Figura 14, página 24) e HMQC (Figura 15) e os espectros de RMN ¹³C e DEPT 135 (encontram-se em anexo Figura 52, página 159), foi possível atribuir todos os sinais de hidrogênio e carbono do composto **30**. O espectro de massas do composto **30** (Figura 151, página 211) mostrou um sinal intenso de m/z de 182,12958 referente ao pico do íon molecular desprotonado [M-H], coerente com a massa esperada.

3.1.2. Síntese dos compostos inéditos 25a-p

Após a síntese e caracterização de **30**, realizou-se então a etapa da rota sintética para obtenção dos compostos dipeptídicos miméticos inéditos **25a-p**. Esta etapa consistiu também em uma reação de acoplamento entre um ácido carboxílico, sendo neste caso usados derivados diversamente funcionalizados do ácido benzoico **31a-n**, o ácido nicotínico **31o** e o ácido 3-tiofeno carboxílico **31p**, e o composto **30**, que contém em sua estrutura uma amina primária livre (Esquema 6).

Foram utilizadas as mesmas condições reacionais realizadas na obtenção de **30**, onde os derivados ácidos **31a-p** foram tratados com EDC e DMAP, em DCM,^{33,34} seguido da adição de uma solução da amina **30**, obtendo-se no final os dipeptídeos **25 a-p** com rendimentos que variaram entre 50 a 96%.



Esquema 6: Reação de acoplamento mediada pelo EDC/DMAP para obtenção dos novos derivados dipeptídicos **25a-p**, com seus respectivos rendimentos.

Todos os compostos dipeptídicos miméticos foram caracterizados utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de 1H e ^{13}C , espectroscopia no infravermelho e

espectrometria de massas de alta resolução. Os espectros destes derivados encontram-se no Anexo II do capítulo I e, para efeito de ilustração, será discutida a caracterização e elucidação estrutural do composto **25b**. Para este composto foram realizados experimentos de correlação em duas dimensões, COSY e HSQC, o que auxiliou na atribuição dos sinais referentes aos hidrogênios e carbonos presentes na sua estrutura.

No espectro de RMN de ^1H de **25b** (Figura 16) observam-se dois simples em δ 3,97 ppm e δ 3,85 ppm, integrados para 3H cada um, referentes aos hidrogênios das metoxilas ligadas ao anel aromático. A presença destes dois sinais no espectro é uma evidência de que ocorreu a formação do produto desejado. Observam-se também sinais de hidrogênios aromáticos, como, por exemplo, o sinal em δ 8,11 ppm, duplete ($J_{\text{H}3'/\text{H}4'}=8,0$ Hz), integrado para 1H, que pode ser atribuído ao H3', o mais desblindado dos hidrogênios aromáticos devido ao efeito retirador de densidade eletrônica da carbonila. A atribuição de todos os sinais referentes aos hidrogênios presentes neste composto foi realizada com base na comparação do espectro do produto com o do material de partida **30** (Figura 13, página 25).

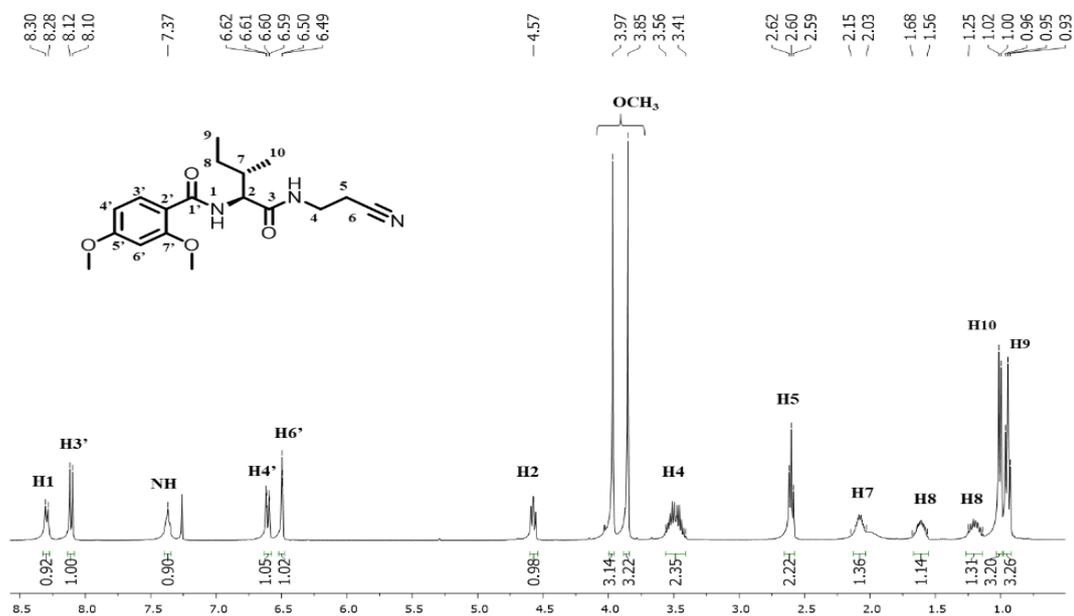


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H do composto **25b** ($\text{CDCl}_3/400$ MHz).

No mapa de contornos COSY do composto **25b** (Figura 17), observa-se a correlação do duplete em δ 8,11 ppm ($J_{\text{H}3',\text{H}4'} = 8,0$ Hz), correspondente ao H3', com o duplete em δ

6,62 ppm ($J_{H4',H3'} = 8,0$ Hz) integrado para 1H, que pode então ser atribuído ao sinal do hidrogênio H4'. Todas as correlações observadas no mapa de contornos COSY auxiliaram nas atribuições dos sinais dos hidrogênios presentes na estrutura do composto **25b**.

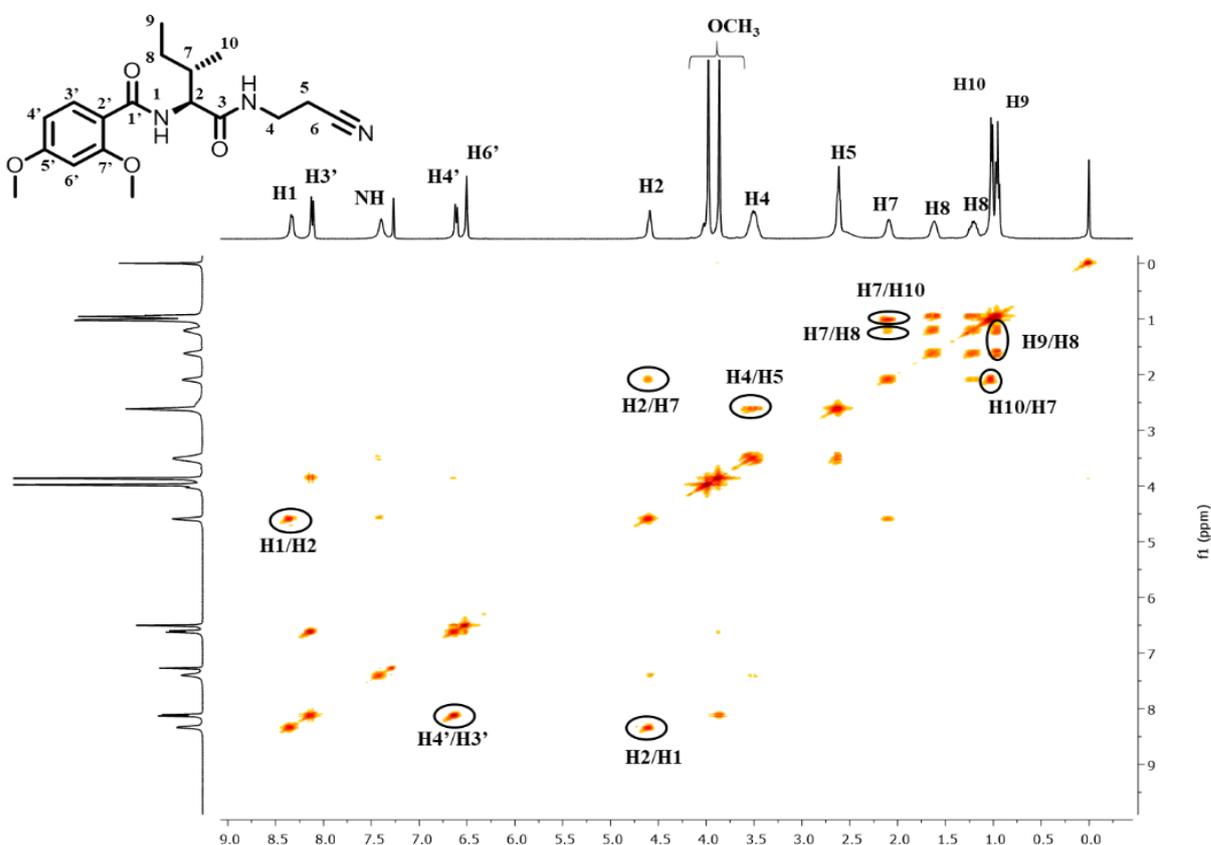


Figura 17. Mapa de contornos COSY do composto **25b** ($\text{CDCl}_3/400$ MHz)

No espectros de RMN de ^{13}C a) e DEPT 135 b) do composto **25b** (Figura 18, página 31) observam-se os sinais referentes aos carbonos aromáticos. Notam-se também os sinais das carbonilas, em δ 172,5 ppm referente à carbonila C3, e em δ 165,7 ppm atribuído ao C1'. O carbono da carbonila C1' está mais blindado, quando comparado ao C3, pelo fato de estar ligado ao anel aromático, doador de densidade eletrônica. Outro sinal importante a se destacar é em δ 118,1 ppm, referente ao carbono C6, corroborando a presença do grupo nitrila na estrutura do composto.

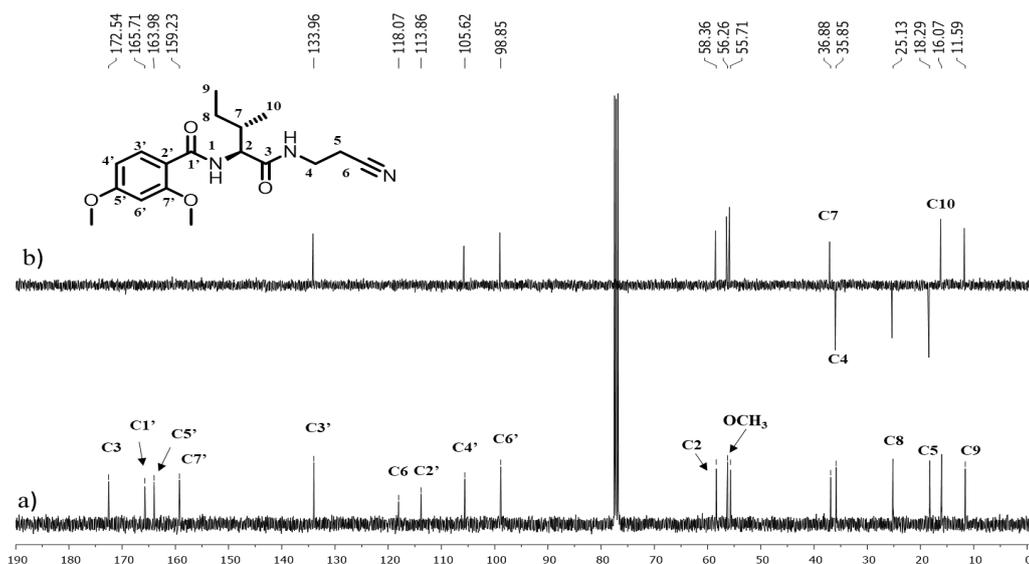


Figura 18. Espectros de RMN de ^{13}C (a) de DEPT 135 (b) do composto **25b** (100 MHz, CDCl_3)

Os sinais dos carbonos do composto **25b** foram atribuídos com o auxílio do mapa de contornos HMQC (Figura 19), e comparação com o espectro do material de partida, o composto **30**.

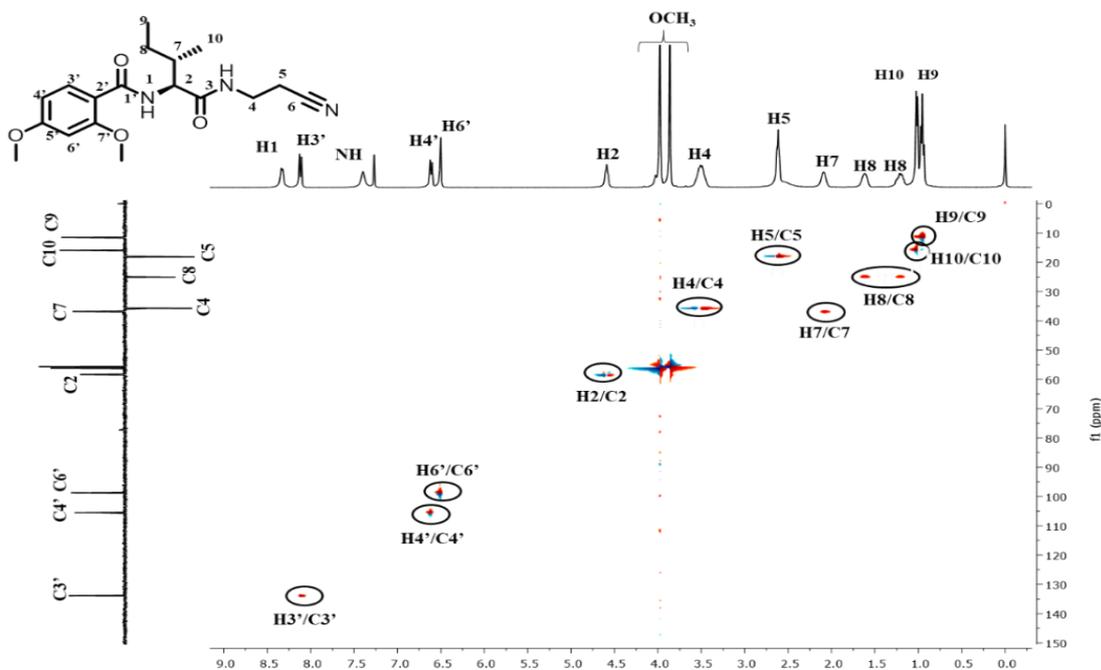


Figura 19. Mapa de contornos HMQC do composto **25b** ($\text{CDCl}_3/400$ MHz).

Na Figura 20 está apresentado o espectro na região do infravermelho, realizado usando pastilha de KBr anidro, do composto **25b**. Na região entre $3460\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$



UFMG

observam-se duas banda de absorção referente ao estiramento da ligação N-H, na região entre 2979-2987 cm^{-1} há bandas atribuídas ao estiramento das ligações C-H de carbono saturado, a banda característica do estiramento da ligação $\text{C}\equiv\text{N}$ é observada em 2231 cm^{-1} , destaca-se também uma banda em 1655 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O de carbonilas de amidas.

O espectro de massas do composto **25b** (Figura 153, página 211) mostrou um sinal de m/z de 348,1918 referente a massa do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]$, coerente com a estrutura de **25b**.

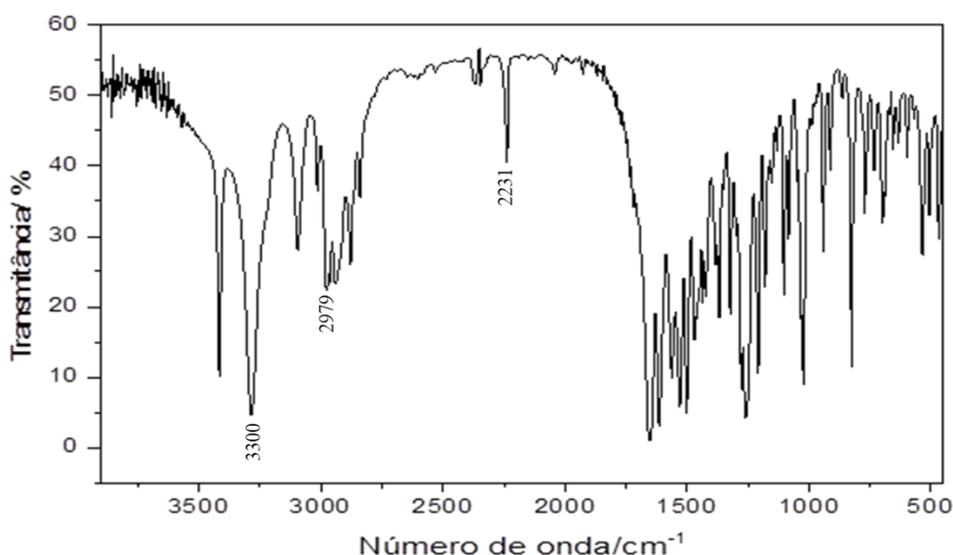


Figura 20. Espectro no IV do composto **25b**.

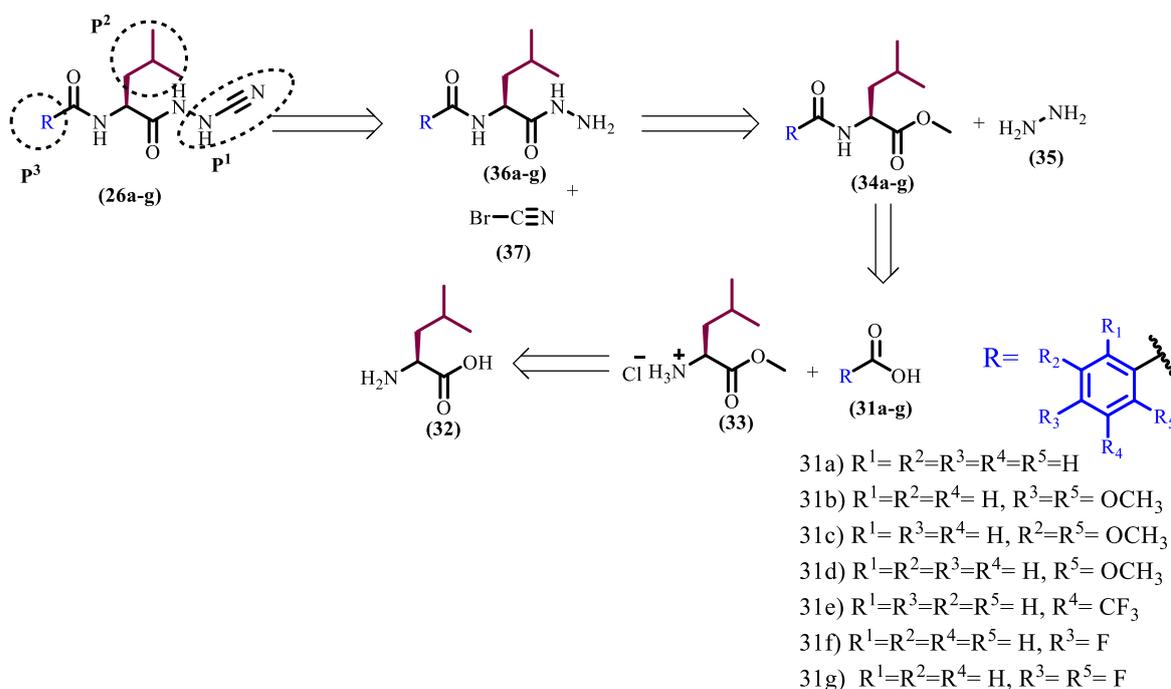
A caracterização de todos os compostos **25a-p**, com os deslocamentos químicos (δ , ppm), as atribuições dos sinais dos hidrogênios e carbonos, os valores das constantes de acoplamentos (J , Hertz) e as multiplicidades (M) encontram-se nos quadros do Anexo I do capítulo I (páginas 141-150). As atribuições dos sinais de hidrogênios e de carbonos foram feitas com auxílio de tabelas de deslocamentos,³⁹ e comparação com os espectros dos materiais de partida. Todavia não foram realizados experimentos de correlação em duas dimensões, COSY e HSQC, para os demais derivados, por isso alguns sinais de carbono e

³⁹ Pretsch E., Buhlmann P. **Badertscher, M. Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data Fourth**, springer, USA, 2009.

hidrogênio podem estar com as atribuições trocadas, principalmente os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos aromáticos, por apresentarem deslocamentos químicos próximos.

3.2. Síntese e caracterização dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos

Os compostos azadipeptídicos miméticos **26a-g** foram planejados de acordo com a retrossíntese apresentada no Esquema 7. Na estratégia, as hidrazidas **36a-g** vez reagiriam com brometo de cianogênio (**37**), fornecendo os azadipeptídeos inéditos **26a-g**. As hidrazidas **36a-g**, seriam obtidas a partir dos compostos **34a-g**, via reação com hidrazina. Os compostos **34a-g** poderiam ser obtidos, a partir da reação entre o amino éster (**33**) com diferentes ácidos carboxílicos aromáticos diversamente substituídos **31a-g**, e o amino éster (**33**) será obtido via esterificação do aminoácido *L*-leucina (**32**).



Esquema 7. Retrossíntese dos derivados azadipeptídeos **26a-p**.

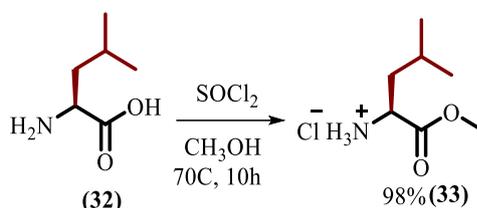
A escolha dos grupos (P^1 , P^2 e P^3) presentes nas estruturas dos derivados azadipeptídicos planejados também foi baseada em inibidores da catepsina K descritos na literatura e no sítio ativo da enzima, como discutido na introdução deste trabalho.



UFMG

3.2.1. Síntese do éster (33)

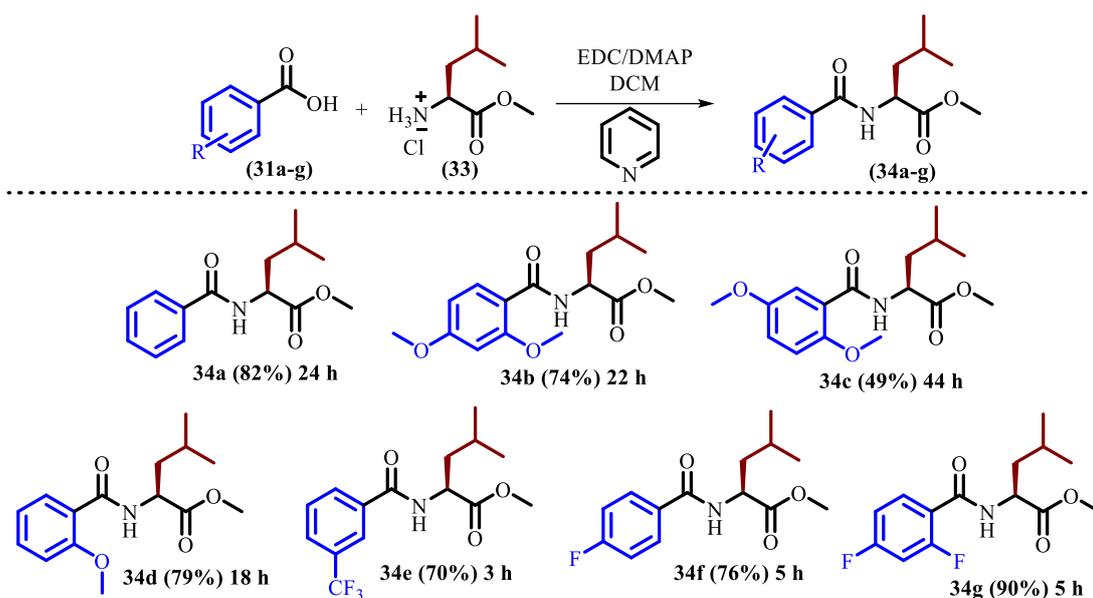
A primeira etapa de síntese para obtenção dos derivados **26a-g** consistiu na reação de proteção do grupo carboxila do aminoácido leucina (**32**), em que este foi transformado em seu derivado éster metílico **33** após tratamento com cloreto de tionila (SOCl_2) em metanol anidro, com rendimento de 98% (Esquema 8).³¹ Foi necessário proteger o grupo carboxila de **33** para evitar reações laterais envolvendo o mesmo já que a próxima etapa da síntese é uma reação de acoplamento entre uma amina, presente na estrutura de **33**, e os derivados do ácido benzoico **31a-g**. O composto **33** foi caracterizado por meio de técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , e os espectros encontram-se nas Figuras 85 e 86 (Página 175), ANEXO II do capítulo I



Esquema 8. Síntese do éster **33**.

3.2.2. Síntese dos compostos **34a-g** e **36a-g**

Na segunda etapa de síntese para obtenção dos azadipeptídeos **26a-g**, o éster **33** foi tratado com os derivados do ácido benzoico **31a-g**, na presença do reagente de acoplamento, EDC, DMAP como catalisador e piridina, em uma temperatura de 0 °C a t.a., levando aos compostos **34a-g**, com rendimentos entre 49 e 90% (Esquema 9, página 35).^{33,34}



Esquema 9. Síntese dos intermediários **34a-g**.

Todos os compostos **34a-g** foram caracterizados utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C . Os espectros destes derivados encontram-se no Anexo II do capítulo I e, para efeito de ilustração, será discutida a caracterização e elucidação estrutural do derivado **34a**.

No espectro de RMN de ^1H do composto **34a** (Figura 21, Pagina 36), podem-se observar sinais característicos de hidrogênios aromáticos, na região de deslocamento químico entre δ 7,88-7,39 ppm, com integração para 5H, o que confirma a obtenção do produto desejado. Observa-se que os H3' e H7' são quimicamente equivalente, e são os mais desblindados, devido a anisotropia da ligação C=O. Outros sinais a se destacarem, são os dupletos referentes aos hidrogênios das metilas H6 e H7, em δ 0,99 ppm ($J_{\text{H6}/\text{H5}} = 6,3$ Hz) e em δ 0,98 ppm ($J_{\text{H7}/\text{H5}} = 6,3$ Hz) respectivamente, integrado para 3H cada. Os demais sinais e a atribuição destes encontram-se na Figura 21 (Página 36).

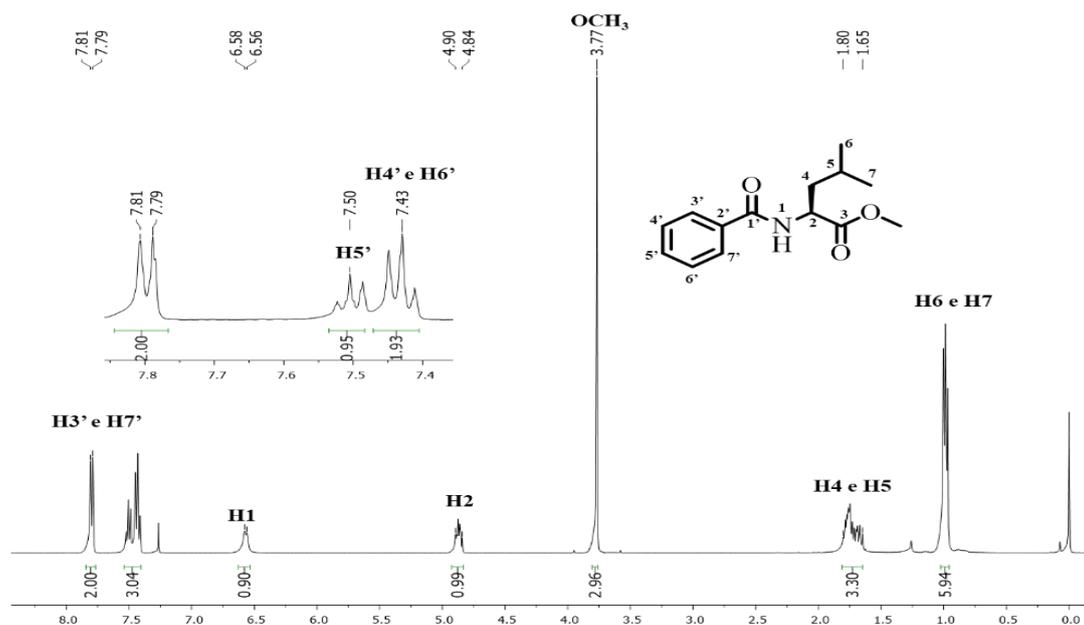


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H de do composto **34a** ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **34a** (Figura 22), observam-se os sinais referentes aos carbonos das carbonilas $\text{C}1'$ em δ 167,2 ppm e $\text{C}3'$ em δ 173,8 ppm. Notam-se também os sinais atribuídos aos carbonos aromáticos na região de deslocamento químico entre δ 135,2-126,2 ppm, outro dado que confirma o sucesso na síntese.

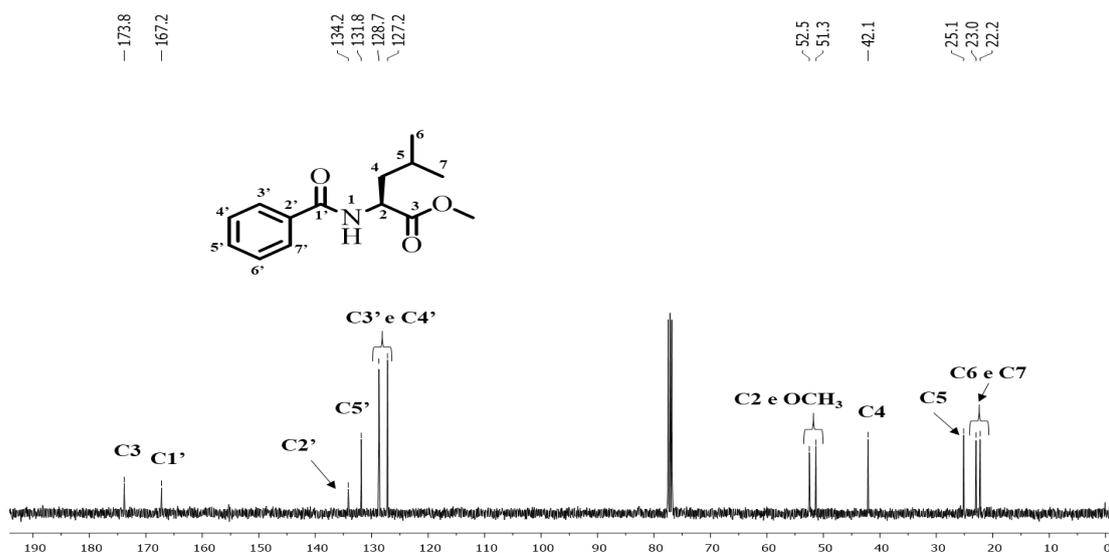
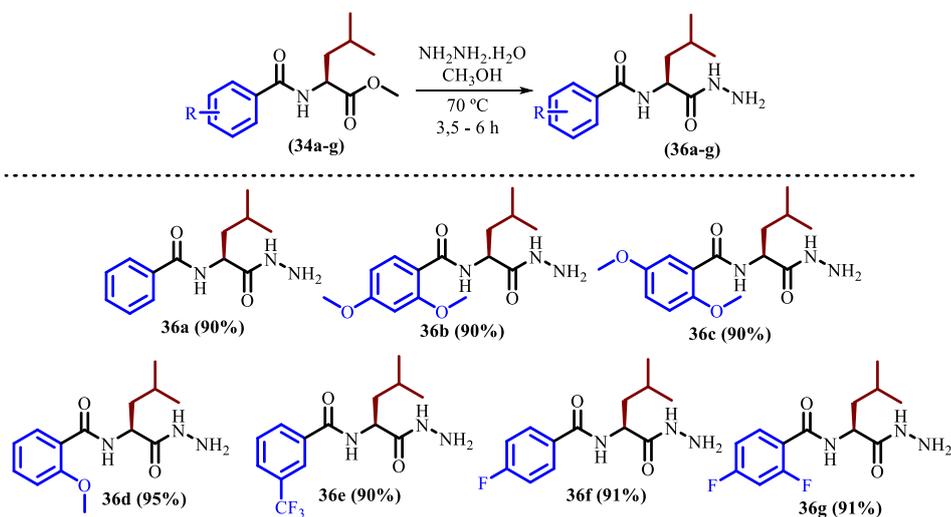


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **34a** ($\text{CDCl}_3/100\text{ MHz}$).

De posse dos compostos **34a-g**, realizou-se então a síntese das hidrazidas **36a-g**, como mostrado no Esquema 10. Os compostos **34a-g** foram tratados com excesso de hidrazina mono-hidratada em metanol, sob aquecimento à 70 °C, levando à formação dos produtos desejados, as hidrazidas **36a-g** com rendimentos entre 90-95%.⁴⁰



Esquema 10. Síntese das hidrazidas **36a-g**.

As hidrazidas **36a-g** foram caracterizadas por meio de técnicas de RMN de ¹H e de ¹³C e espectrometria de massas de alta resolução, e os respectivos espectros encontram-se no Anexo II e IV, capítulo I. A fim de ilustração, será apresentada a caracterização e elucidação apenas para o derivado **36a**. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C da hidrazida **36a** encontram-se nas Figuras 23 e 24 (página 38), respectivamente. Comparando-se o espectro de RMN de ¹H do material de partida **34a** (Figura 21, página 36) com o do produto **36a** (Figura 23), não se observa-se o sinal simpleto em δ 3,77 ppm, referente aos hidrogênios da metoxila, comprovando o sucesso da síntese.

⁴⁰ Tu G., Yan Y., Chen X., Lv Q., Wang J., Li S. Synthesis and antiproliferative assay of 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole derivatives in cancer cells *Drug Discoveries & Therapeutics*. 7(2) (2013) 58-65.

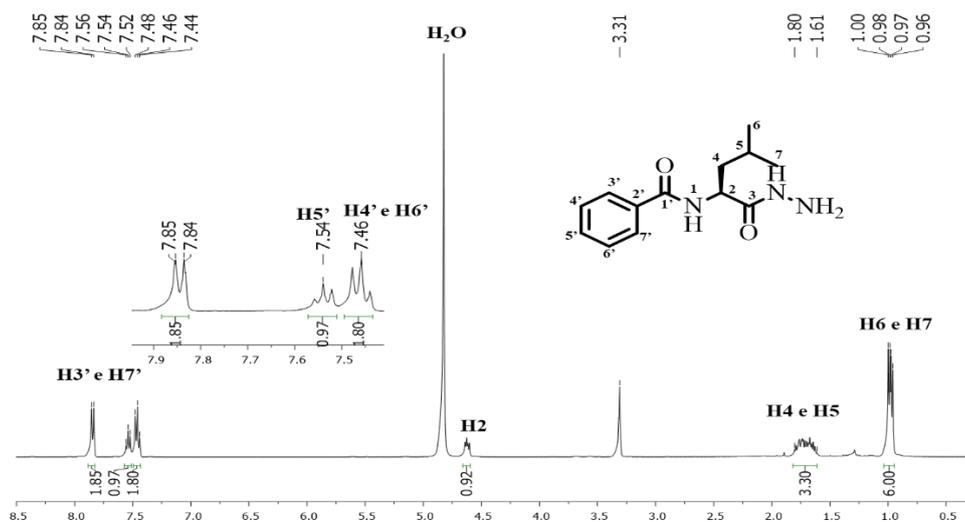


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do composto **36a** (CD_3OD , 400 MHz).

Observam-se também no espectro de RMN de ^{13}C de **36a** os sinais de carbono carbonílicos referentes às carbonilas de amidas em δ 174,0 ppm (C3) e δ 170,2 ppm (C1'), e sinais dos carbonos aromáticos na região entre δ 136,0-127,0 ppm. Os demais sinais e suas respectivas atribuições encontram-se no espectro de RMN de ^{13}C , Figura 24. No espectro de massas de **36a** (Figura 174, página 222) observa-se o sinal com m/z de 248,14092 referente a massa do íon molecular desprotonado $[\text{M}-\text{H}]$, experimento realizado no modo negativo.

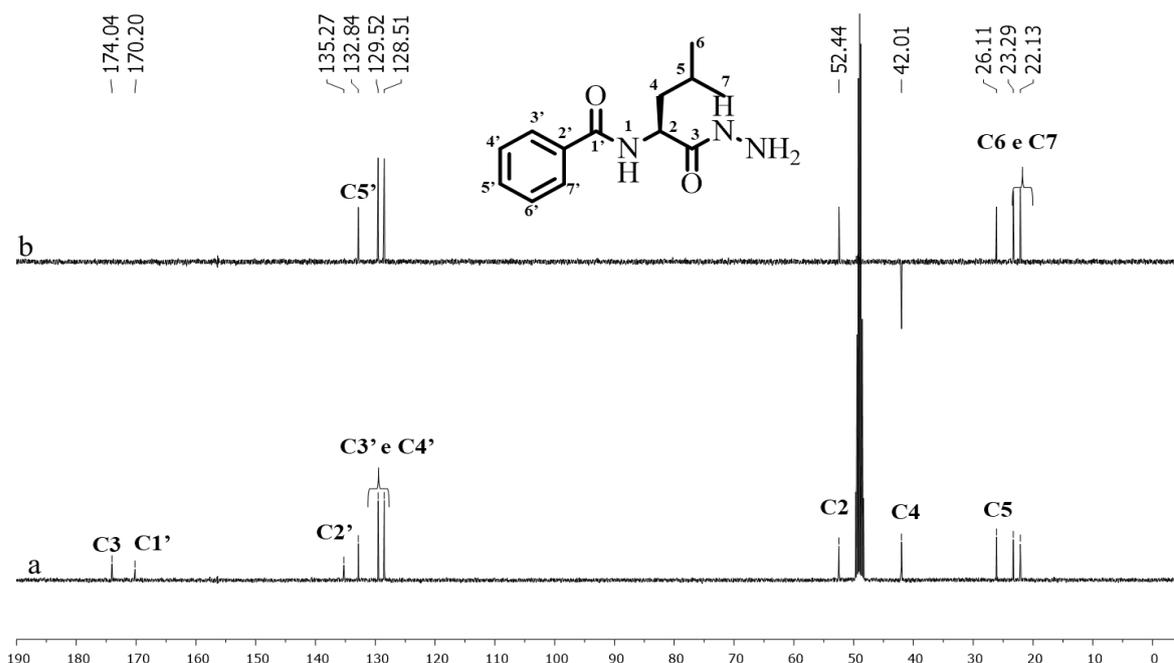
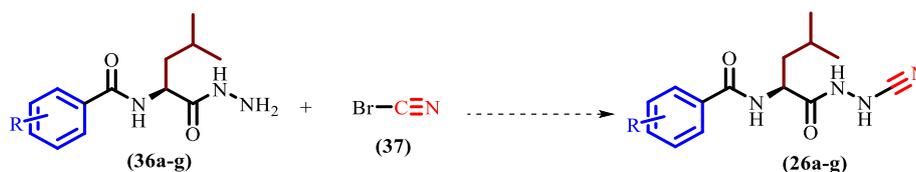


Figura 24. Espectros de RMN de ^{13}C (a) de DEPT 135 (b) do composto **36a** (CD_3OD , 100 MHz).

3.2.3. Síntese dos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis **38a-g**

Um dos objetivos iniciais deste trabalho (página 17) era a obtenção dos azadipeptídeos miméticos **26a-g**, e a última etapa da rota sintética proposta para obtenção destes seria o tratamento das hidrazidas **36a-g** com brometo de cianogênio (**37**), a fim de formar uma nova ligação N-CN (Esquema 11).



Esquema 11. Rota sintética proposta para obtenção dos derivados **26a-g** a partir das hidrazidas **36a-g** utilizando Br-CN como fonte eletrofílica de nitrila.

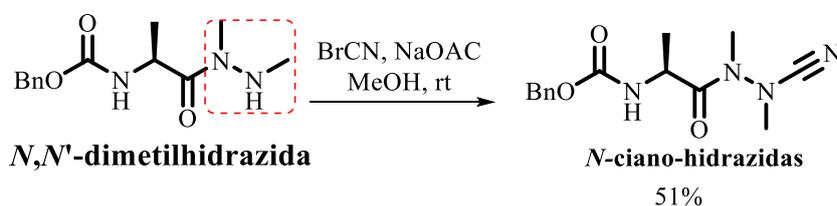
Nesta reação é necessária uma fonte eletrofílica de nitrila, sendo que na literatura podem ser encontradas metodologias que utilizam diferentes fontes para obtenção de ligações do tipo N-CN. Um método já bastante difundido é a clássica reação de Von

Braun,^{41,42} na qual derivados cianoaminas são produzidos utilizando-se aminas terciárias e uma fonte eletrofílica de nitrila, como por exemplo XCN (onde X= Cl, Br ou I) (Esquema 12). Além de aminas terciárias, é possível utilizar esta metodologia como ferramenta para construção da ligação N-CN em aminas secundárias e primárias.⁴²



Esquema 12. Reação de Von Braun.

Neste trabalho, o foco era a síntese de derivados do tipo *N*-ciano-hidrazidas, que são hidrazidas ligadas a nitrilas através do átomo de nitrogênio, formando uma ligação do tipo N-CN, uma vez que derivados contendo a presença desse grupo, com características eletrofílicas, são interessantes para atuarem como inibidores da cat K, mais especificamente no sítio de interação S1 (Esquema 11, página 39). Na literatura são descritos poucos métodos para obtenção de *N*-ciano-hidrazidas, sendo que a maioria utiliza Br-CN como fonte eletrofílica de nitrila, e empregam hidrazidas *N*-substituídas com grupos alquilas (Esquema 13). Frizler e colaboradores,²⁸ por exemplo, relataram a síntese de derivados de *N*-ciano-hidrazidas *N*-substituídas, utilizando brometo de cianogênio como fonte eletrofílica de nitrila, acetato de sódio e metanol como solvente. Logo, inicialmente optou-se por utilizar essa metodologia para realização da última etapa de síntese do azadipeptídeo **26a** porém, repetindo as condições apresentadas no trabalho de Frizler, não foi possível obter o produto de interesse, obtendo-se ao final da síntese uma mistura complexa de difícil separação.

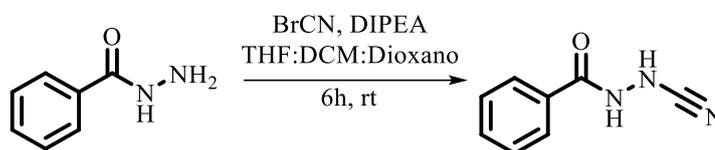


Esquema 13. Uso do BrCN para obtenção de *N*-ciano-hidrazida substituídas a partir de *N,N'*-dimetil-hidrazidas.²⁸

⁴¹ von Braun J. Ber. Synthese des symm. Diphenyl-cadaverins *Dtsch. Chem. Ges.* 40 (1907) 3914

⁴² Yu J-T., Teng F., Cheng J. The Construction of X-CN (X=N, S, O) Bonds *Adv. Synth. Catal.* (2016) 1-14

Diante disso realizou-se uma nova busca na literatura por outras metodologias de síntese de *N*-ciano-hidrazidas não metiladas, como é o caso do composto de interesse. Foram encontrados poucos trabalhos acessíveis que relatam a síntese desse tipo de derivado: apenas duas patentes, uma depositada em 1999⁴³ na qual também utilizaram BrCN, a *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) e uma mistura de três solventes, THF, DCM e dioxano (Esquema 14); e outra depositada recentemente em 2018,⁴⁴ em que utilizam BrCN, carbonato de sódio e uma mistura de dois solventes, DMF e acetonitrila. Como a execução deste trabalho iniciou-se anteriormente ao ano de 2018, a metodologia escolhida para segunda tentativa de obtenção dos derivados azadipeptídeos foi a relatada na patente depositada em 1999.



Esquema 14. Metodologia descrita na patente US09296332, 1999, para a obtenção de *N*-ciano-hidrazida não substituída.⁴³

Portanto, a hidrazida **36a** foi tratada com BrCN de acordo com as condições descritas na patente depositada em 1999⁴⁴, obtendo-se ao final um produto majoritário com 22% de rendimento. O produto obtido foi submetido às técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H e de ¹³C e no infravermelho, a fim de caracterização, porém ao analisar os dados obtidos notaram-se algumas inconsistências em relação à possível formação de um produto do tipo *N*-ciano-hidrazida. Por exemplo, no espectro no IV do produto (Figura 25, página 42), a banda característica do grupo funcional nitrila, referente ao estiramento da ligação C≡N, na faixa da absorção de 2260-2210 (cm⁻¹), não foi observada.

No espectro de RMN de ¹³C do produto (Figura 26, página 42) também notaram-se algumas incoerências em relação à estrutura inicialmente proposta para o produto **26a**, como por exemplo, esperava-se observar um sinal referente ao carbono não hidrogenado da nitrila

⁴³ Mohammad R. M., Stewart A. N. Mahesh, N., D.; Preparation of substituted benzenesulfonamide derivatives as antagonists of the neuropeptide NPY receptor subtype Y5, US09296332, 1994.

⁴⁴ Kadiyala V. S. N. M., Desai D. M. et all. Preparation of novel hydrazide containing heterocyclic compounds as Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitors WO/2018/00295, 2018.

na região de δ 123,0 -105,0, todavia, como visto no espectro, não há sinal nessa região referente a carbono não hydrogenado. Comparando o espectro de RMN de ^{13}C do material de partida **36a** (Figura 24, página 39), com o espectro de RMN de ^{13}C do produto obtido após a reação com o BrCN, notou-se a presença de um sinal a mais, referente a um carbono não hydrogenado na região de δ 170,0 – 158,0, confirmando que ocorreu a inserção deste carbono na estrutura do material de partida, todavia o deslocamento químico deste novo sinal não é compatível com carbono de nitrila.

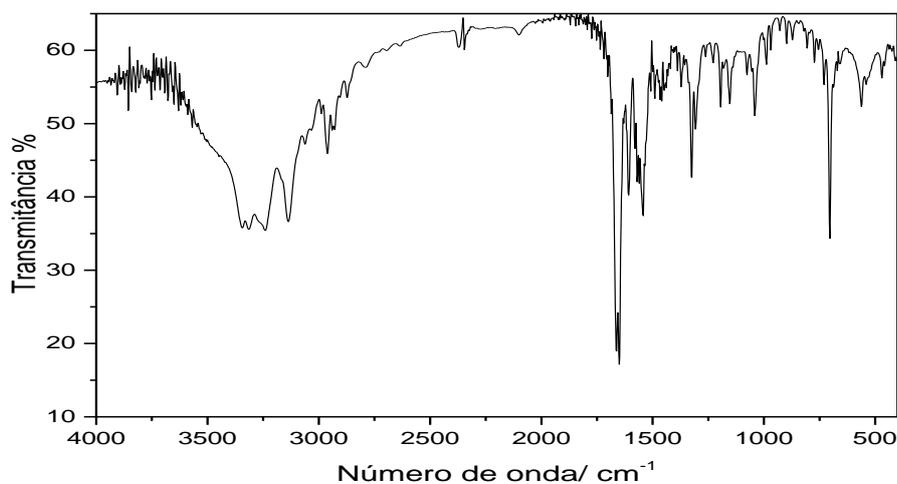


Figura 25. Espectro no IV do composto **38a**.

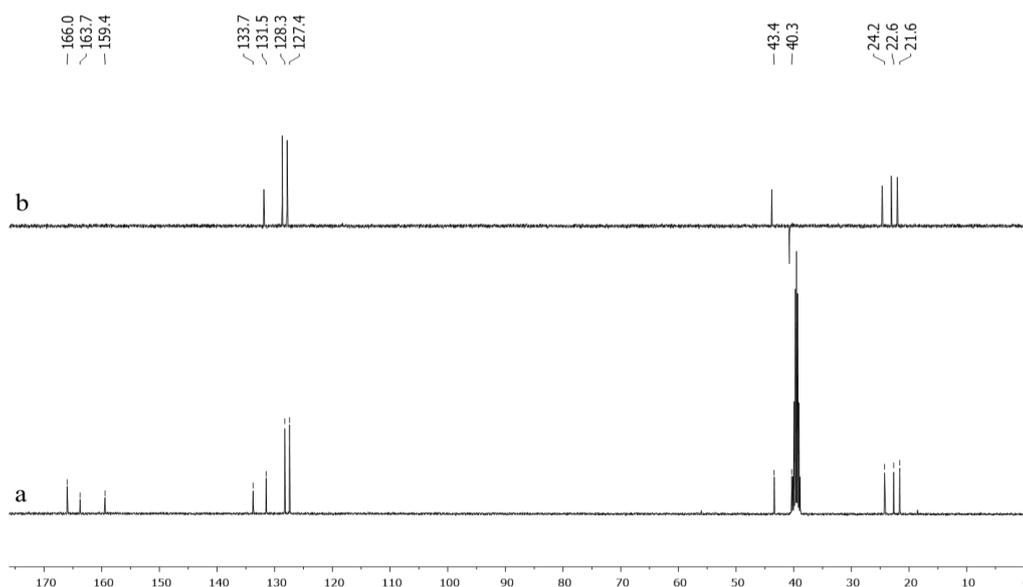
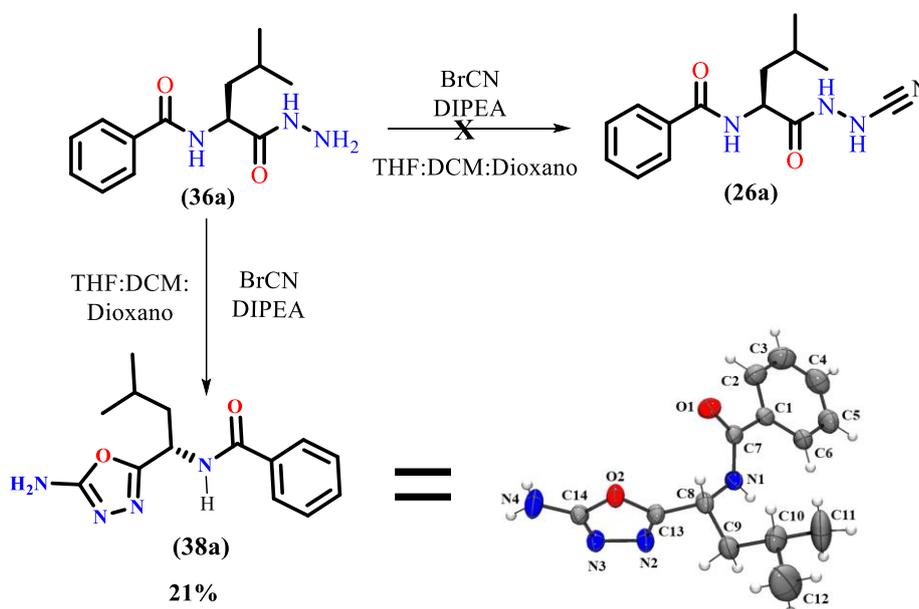


Figura 26. Espectros de RMN de ^{13}C (a) de dept 135 (b) do composto **38a** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

Diante das evidências mostradas pelas técnicas de RMN e de Infravermelho, conclui-se que o produto majoritário formado na reação entre a hidrazida não substituída **36a** e o brometo de cianogênio, não poderia ser o azadipeptídeo (**26a**) desejado (Esquema 15).

A técnica de Difração de Raios-X em monocristal foi essencial para determinação e caracterização da estrutura do sólido majoritário formado, e com as análises dos dados obtidos pelo grupo de pesquisa da Professora Renata Diniz (DQ/UFMG), conclui-se que a reação entre a hidrazida **36a** e o BrCN na presença de base levou à formação do produto **38a**, caracterizado como um derivado contendo em sua estrutura o heterociclo 2-amino-1,3,4-oxadiazol (Esquema 15).

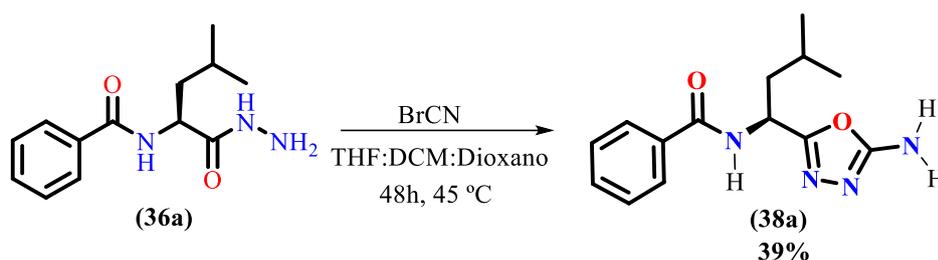


Esquema 15. Reação entre hidrazida **36a** com BrCN na presença de base levando ao derivado 2-amino-1,3,4-oxadiazolico **38a** e a representação Ortep do cristal obtido como produto majoritário.

Na literatura há trabalhos relatando a síntese de 2-amino-1,3,4-oxadiazóis via reação de hidrazidas e o BrCN, mas sempre na presença de base.⁴⁵ Como o objetivo inicial do trabalho era a obtenção de derivados azadipeptídeos com potencial para serem inibidores da

⁴⁵ (a) Patel N.B., Patel J.C. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(1,3,4-oxadiazol-2-yl)quinazolin-4(3H)-ones. *Sci. Pharm.* 78 (2010)171–193 doi: 10.3797/scipharm.0912-16 (b) Martínez R., Zamudio G.J.N., Pretelin-Castillo G., Torres-Ochoa R.O., Medina-Franco J.L., Espitia Pinzón C.I., Miranda M.S., Hernández E., Alanís-Garza B., Synthesis and antitubercular activity of new N-[5-(4-chlorophenyl)-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-(nitroheteroaryl)carboxamides, *Heterocyclic Communications*. 25 (2019) 52–59. doi:10.1515/hc-2019-0007.

cathepsina K, optou-se por testar a reação novamente sem a presença da base, na tentativa de isolar o azadipeptídeo desejado. Entretanto, ao final de um tempo longo de reação (24 horas), a CCD indicou que havia uma grande quantidade do material de partida, a hidrazida **36a**, no meio reagente. Colocou-se então o sistema reagente sob aquecimento a 45 °C por mais 24 horas, e ao final de um total de 48h de reação, o derivado 2-amino-1,3,4-oxadiazólico **38a** foi novamente isolado com 39% de rendimento (Esquema 16), após purificação em coluna cromatográfica.



Esquema 16. Reação entre a hidrazida (**36a**) e o BrCN sem a presença de base levando a formação do derivado (**38a**).

O emprego de heterociclos como blocos construtores para o desenvolvimento de inibidores da Cat K vem se destacando nos últimos anos,⁴⁶ todavia há apenas um trabalho descrito por Palmer e colaboradores que relataram o uso de derivados cetio-1,3,4-oxadiazólicos como inibidores dessa enzima.⁴⁷ Neste ponto, diante dos resultados obtidos, e não sendo possível isolar o azadipeptídeo de interesse, decidiu-se então seguir uma nova abordagem, a síntese de novos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis **38a-g**, a partir das hidrazidas **36a-g**, a fim de avaliar o potencial desses novos compostos como inibidores da cathepsina K (Esquema 17, página 46).

⁴⁶ **a)** Tavares F. X., Deaton D. N., Miller A. B., Miller L. R., Wright L. L. Ketoheterocycle-based inhibitors of cathepsin K: A novel entry into the synthesis of peptidic ketoheterocycles *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3891–3895. **(b)** Silva T. L., Bartolomeu A. A., Jesus H.C. R., Oliveira K. T., Fernandes J.B., Brömme D., Vieira P. C. New Synthetic Quinolines as CathepsinK Inhibitors *J. Braz. Chem. Soc.* 31 (2020) 1605-1613 doi: 10.21577/0103-5053.20200046 **(c)** Petek N., Štefane B., Novinec M., Svete J. Synthesis and biological evaluation of 7-(aminoalkyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine derivatives as cathepsin K inhibitors *Bioorg. Chem.* 84 (2019) 226–238.

⁴⁷ Palmer J.T., Hirschbein B. L., Cheung H. McCarter J., Janc J. W., Z. Walter Yu, Wesolowski G. Keto-1,3,4-oxadiazoles as cathepsin K inhibitors *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2909–2914. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.03.001

Como o composto 2-amino-1,3,4-oxadiazol **38a** foi obtido nessas primeiras tentativas com rendimento relativamente baixo e tempos de reação longos, foi realizado um estudo de otimização das condições reacionais, variando-se o solvente, temperatura e fonte de radiação, testando irradiação de micro-ondas e ultrassônica. Todos os experimentos de otimização da última etapa para obtenção do derivado **38a**, estão na Tabela 1, página 45.

Tabela 1. Otimização das condições de reação para obtenção de **38a** a partir da hidrazida

36a

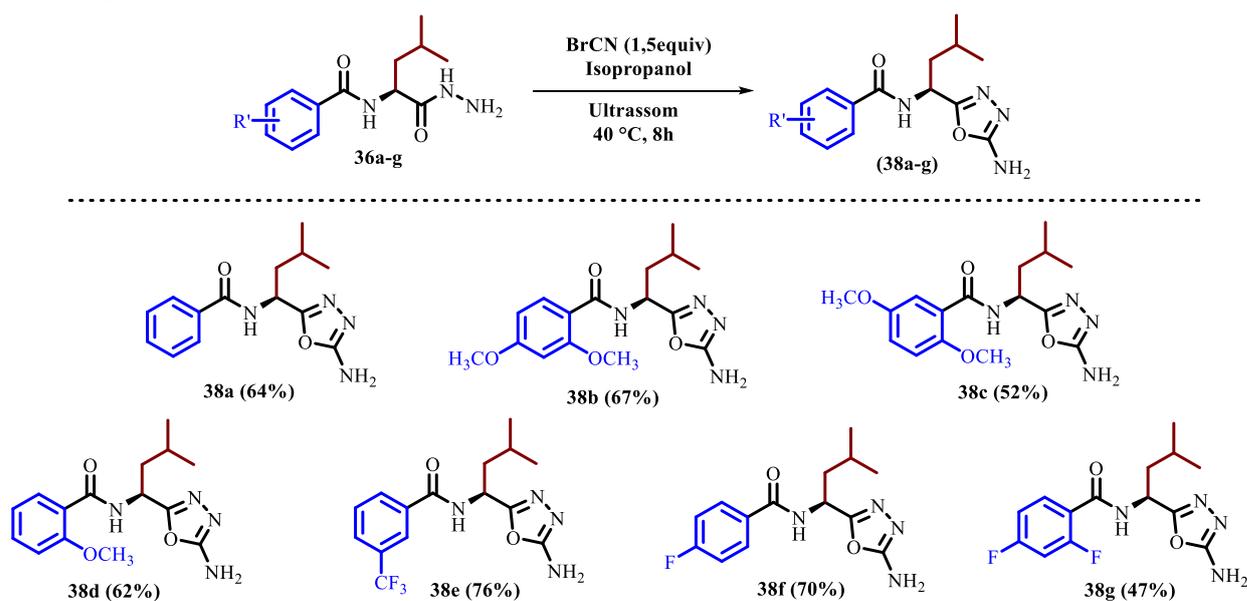


Reação	Fonte de energia	Solvente	Temperatura	Tempo (h)	Rendimento
1	Aquecimento convencional	DCM/ THF/ Dioxano (1:1:1)	50 °C	24	45%
2	MW (100 W)	DCM/ THF/ Dioxano (1:1:1)	45 °C	3,5	48%
3	Ultrassom	DCM/ THF/ Dioxano (1:1:1)	40 °C	8	52%
4	MW (100 W)	Isopropanol	50 °C	4	52%
5	Ultrassom	Isopropanol	40 °C	8	64%

Condições reacionais: **36a** (0,25 mmol), **BrCN** (0,75 mmol), solvente (3 mL). Rendimento são referentes ao produto isolado após purificação.

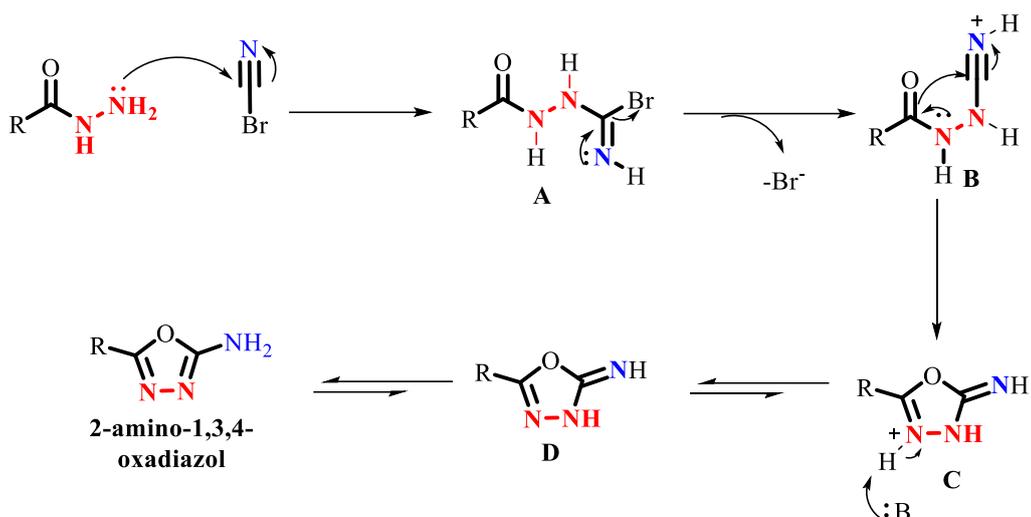
De acordo com os dados descritos na Tabela 1, os rendimentos alcançados variaram entre 45-64%, sendo a condição que apresentou melhor resultado foi a do experimento 5, na qual utilizou-se isopropanol como solvente e radiação ultrassônica, sem a presença de uma base.

Com a condição reacional otimizada, o novo método foi empregado para síntese dos novos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **38a-g**, levando à formação dos produtos desejados com rendimentos variando entre 47-76% (Esquema 17, página 46).



Esquema 17. Síntese dos novos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis **38a-g**.

Uma proposta de mecanismo para formação de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir de hidrazidas não substituídas e o brometo de cianogênio está representada no Esquema 18, página 47. Inicialmente ocorre um ataque da hidrazida ao carbono da nitrila do BrCN, levando ao intermediário (**A**), que após a saída do íon brometo, leva ao derivado *N*-ciano-hidrazida (**B**). O derivado **B** provavelmente sofre uma reação de ciclização fornecendo o cátion (**C**), que após uma reação ácido-base conduz ao heterociclo (**D**), cujo tautômero aromático é o núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol. Como observado na proposta do mecanismo, possivelmente o azadipeptídeo **26a** foi formado no meio reagente, mas a ciclização provavelmente ocorreu, gerando o produto aromático mais estável.



Esquema 18. Proposta de mecanismo para formação de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir de hidrazidas.

Os compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **38a-g** foram caracterizados utilizando as técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , espectroscopia no IV e espectrometria de massas de alta resolução. Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , no IV e massas de alta resolução encontram-se nos Anexos II e III do capítulo I. Para efeito de ilustração será discutida a caracterização do derivado **38a**, em que foram empregadas as técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C e alguns experimentos de RMN por correlações bidimensionais, HMQC e HMBC.

No espectro de RMN de ^1H do composto **38a** (Figura 27, página 48), observam-se sinais na região de δ 7,90–7,40 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos. Em δ 6,93 ppm nota-se um simpleto integrado para 2H, que pode ser atribuído aos hidrogênios do grupo amino ligados ao anel oxadiazólico, o que confirma a formação do derivado 2-amino-1,3,4-oxadiazol **38a**. Entre δ 5,26-5,20 ppm, observa-se um multipletto integrado para 1H, que pode ser atribuído ao H2. Destacam-se também os sinais multipletos na região entre δ 1,94-1,62, referentes aos hidrogênios diastereotópicos H4 e H4' e ao hidrogênio H5.

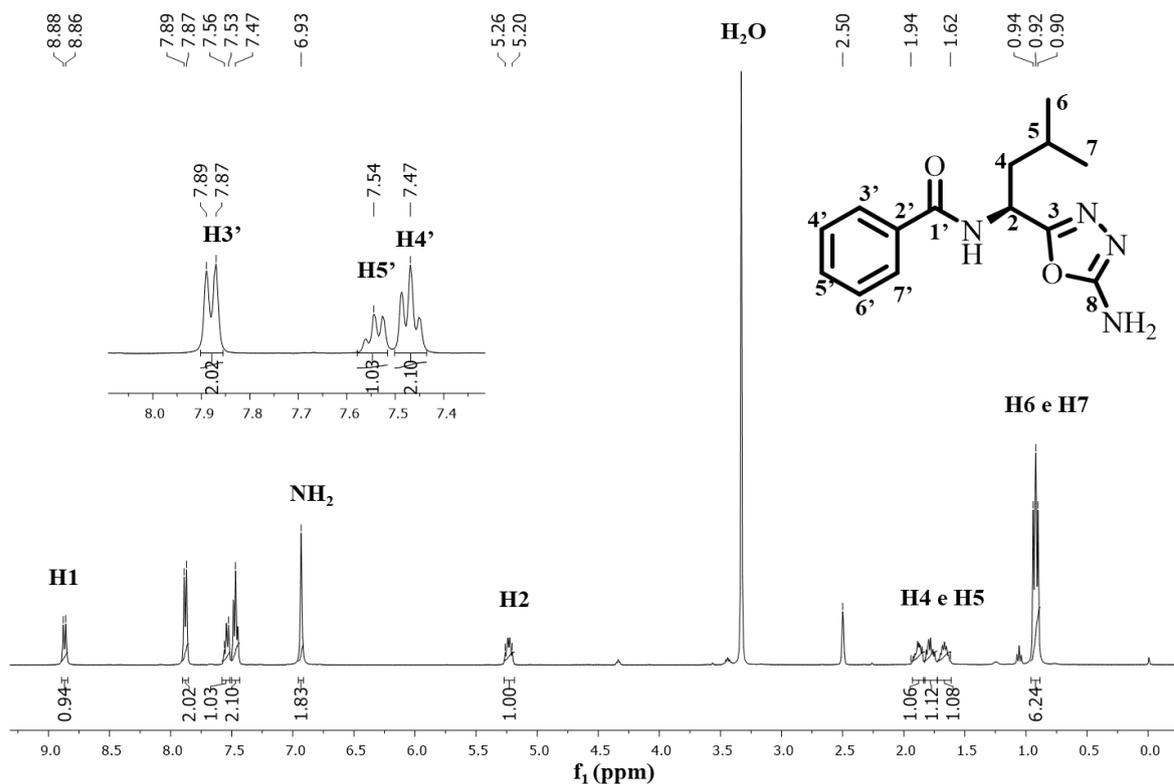


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto **38a** (DMSO-d_6 , 400 MHz).

No mapa de contornos HMQC (Figura 28, página 49), nota-se a correlação do sinal do hidrogênio H2 com um sinal de carbono CH, em δ 43,4 ppm. Destaca-se também a correlação do sinal dos hidrogênios H4 com o sinal do carbono metilênico CH₂ em δ 40,3 ppm. Na expansão da região dos aromáticos (Figura 29, página 49), é possível observar a correlação do sinal referente ao H3' em δ 7,88 com o sinal de carbono em δ 127,4 ppm, que foi então atribuído ao carbono C3'.

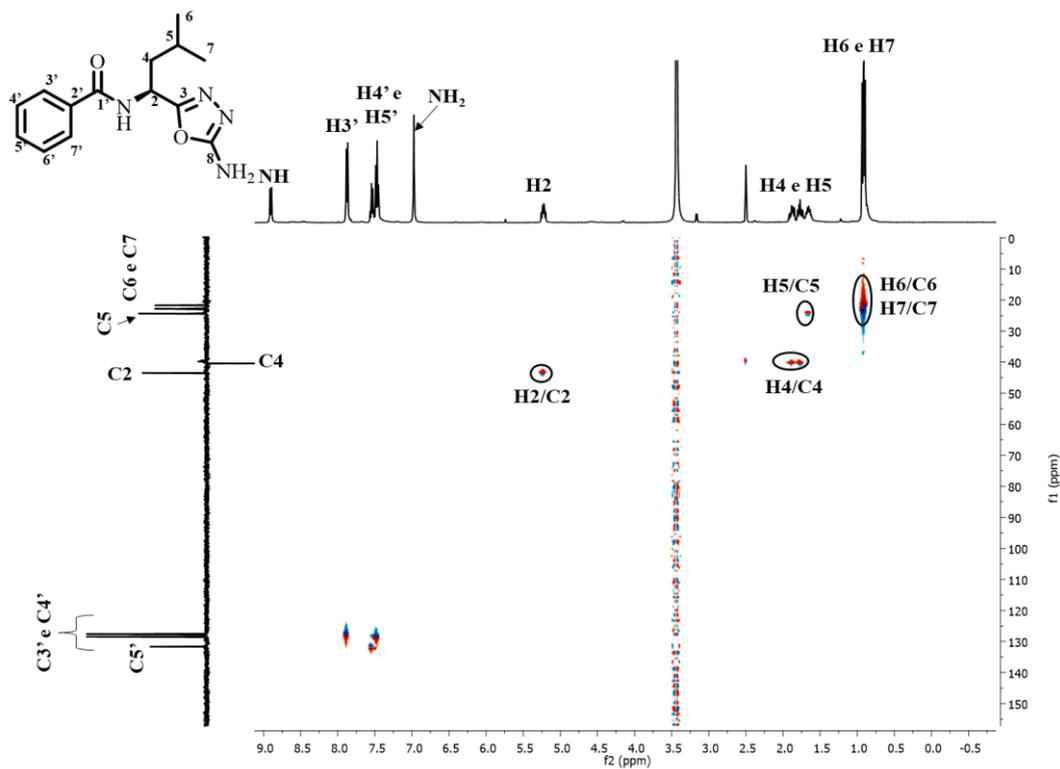


Figura 28. Mapa de contornos HMQC do composto **38a** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

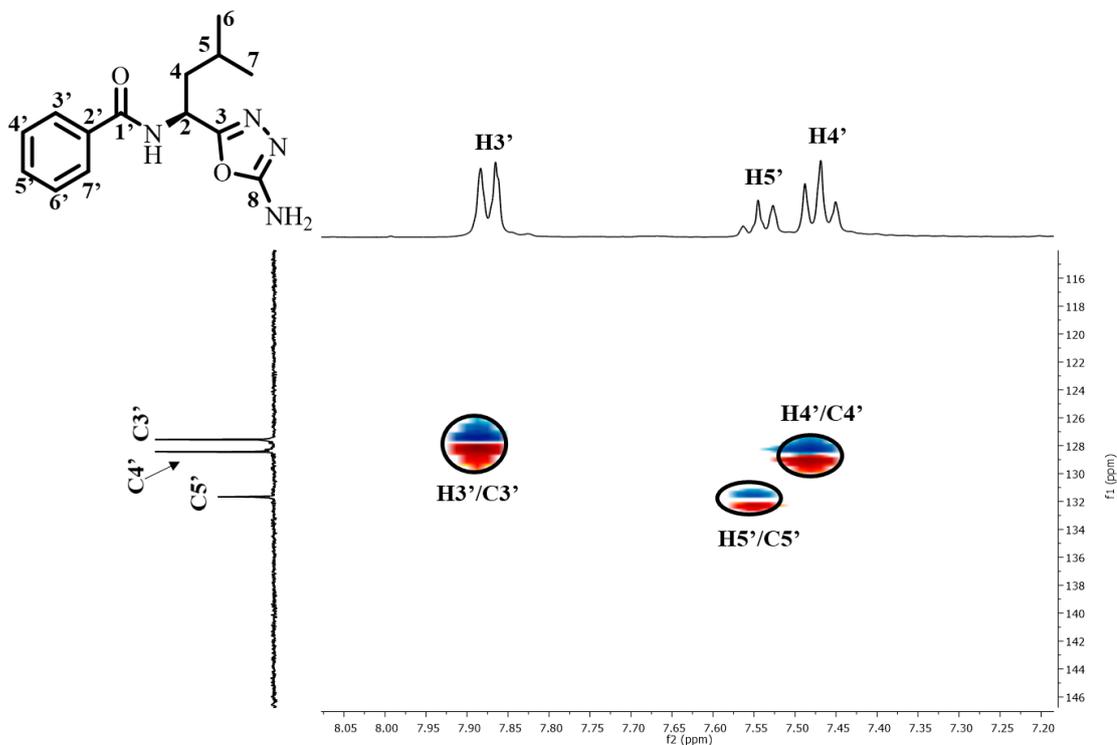


Figura 29. Expansão do mapa de contornos HMQC do composto **38a** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

No mapa de contornos HMBC (Figura 30), deve-se destacar as correlações dos sinais referentes aos hidrogênios H2 e H4 com o sinal de carbono não hydrogenado em δ 159,4 ppm, o qual pode ser atribuído ao carbono C3 do heterociclo oxadiazólico. Nota-se também a correlação dos hidrogênios H3' e NH com o sinal em δ 166,0 ppm, referente ao carbono da carbonila C1'. Pela análise dos mapa de contornos HMBC de **38a**, pode-se concluir também que o sinal em δ 163,7 ppm é referente ao carbono C8, pois este sinal de carbono não apresentou correlação com nenhum sinal de hidrogênio ligado a carbono da molécula e, como observado na estrutura do composto, o carbono C8 não é vizinho a nenhum hidrogênio ligado a outro carbono.

No espectro de massas de **38a** (Figura 180, página 225) observa-se o sinal com m/z de 248,14092 referente a massa do íon molecular mais a massa de um próton.

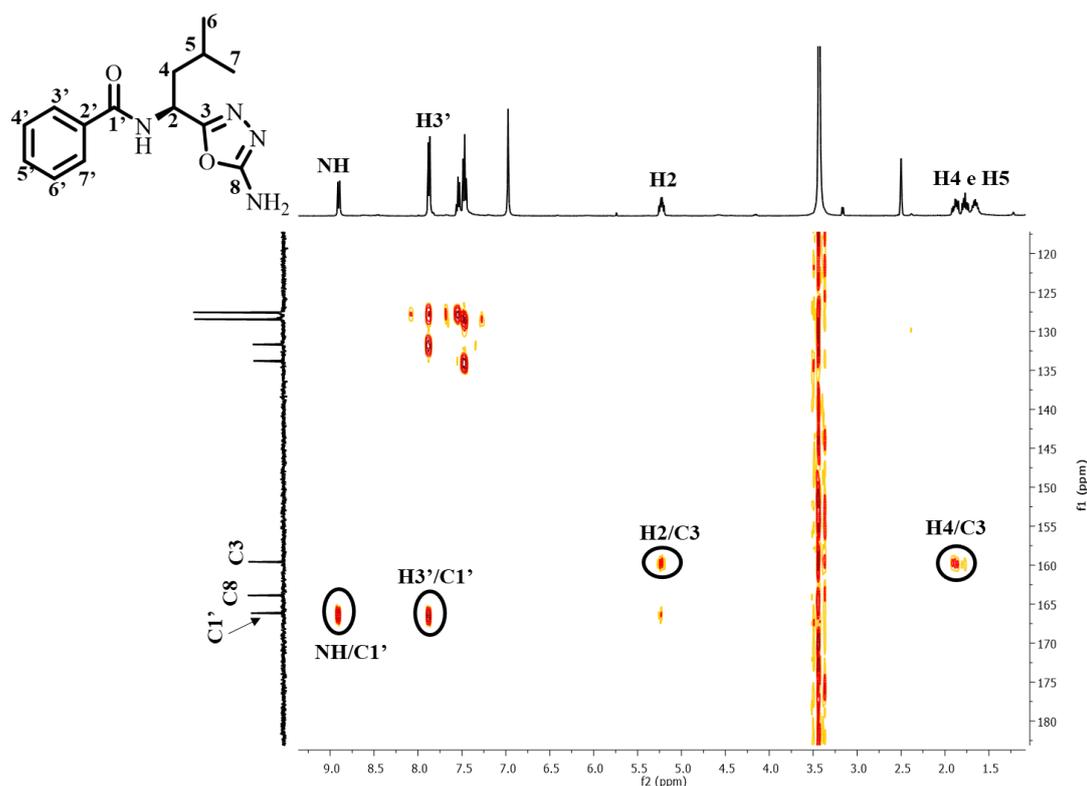


Figura 30. Mapa de contornos HMBC de **38a** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

Todos os dados referentes à caracterização dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **38a-g**, com os deslocamentos químicos (δ , ppm), as atribuições dos sinais dos hidrogênios e carbonos, os valores das constantes de acoplamentos (J , Hertz) e as multiplicidades (M)



UFMG

encontram-se nos quadros do Anexo I do capítulo I (Páginas 151-157). As atribuições dos sinais de hidrogênios e de carbonos foram feitas com auxílio de tabelas de deslocamentos,³⁹ e comparação com os espectros dos materiais de partida, todavia não foram realizados experimentos de correlação em duas dimensões, COSY e HMQC, para os demais derivados, por isso alguns sinais de carbono e hidrogênio podem estar com as atribuições trocadas, principalmente os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos aromáticos, por apresentarem deslocamentos químicos próximos.

3.3. Testes biológicos

A fim de avaliar o potencial de inibição dos novos compostos frente à catepsina K, e o seus efeitos nas principais células do tecido ósseo, que estão diretamente ligadas ao surgimento da osteoporose, foram realizados testes de inibição da cat K e testes com células de osteoblastos e osteoclastos para os compostos dipeptídicos miméticos do tipo **25** e 2-amino-1,3,4-oxadiazóis do tipo **38**.

Como todos os ensaios biológicos realizados com os compostos sintetizados neste trabalho foram feitos por colaboradores, optou-se por não os descrevê-los na parte experimental desta tese. Para maiores informações acerca dos dados e procedimentos experimentais, as seguintes referências podem ser consultadas:

Ensaio de inibição enzimática e modelagem molecular: Trabalho publicado com parte dos resultados obtidos nesta tese.⁷⁷

Ensaio com as principais células do tecido ósseo: Tese de Doutorado da estudante Rebecca Vasconcellos Botelhos de Medeiros, intitulada: Avaliação de Moduladores e Biomateriais para Aplicações em Afecções do Tecido Ósseo.^{48a}

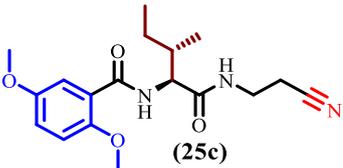
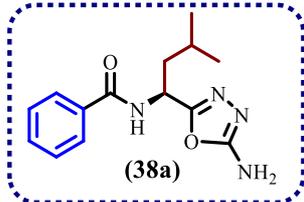
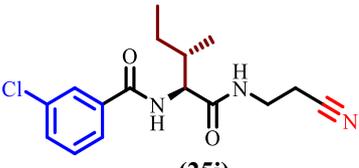
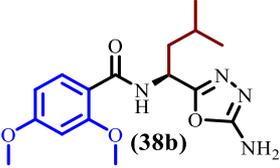
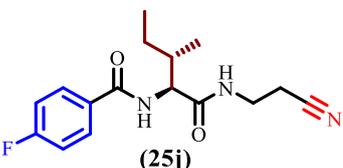
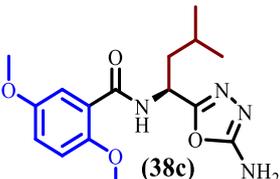
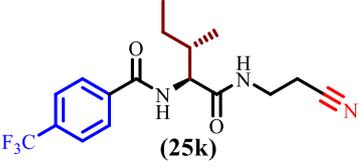
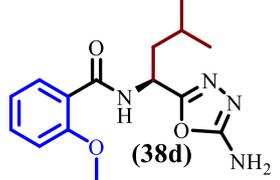
3.3.1. Inibição da Catepsina K

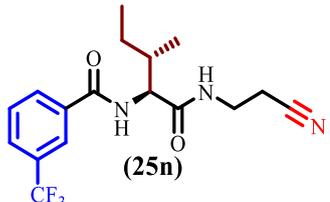
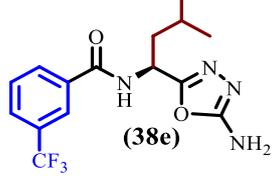
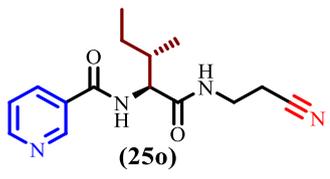
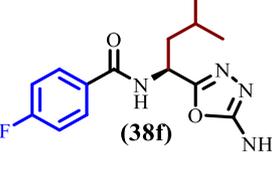
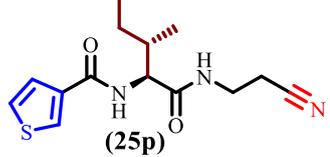
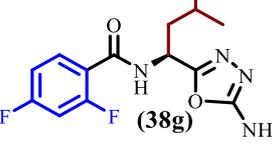
O teste de inibição enzimática com a Cat K foi realizado pelo grupo de pesquisa da Professora Dra. Adriana Carmona, da Universidade Federal de São Paulo. Dentre os 16 novos dipeptídeos **25a-p** preparados, foram escolhidos 7 compostos para o teste de inibição, **25c**, **25i**, **25j**, **25k**, **25n**, **25o** e **25p**. Em relação aos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis **38a-g**, todos os sintetizados neste trabalho foram testados frente à Cat K. As constantes de inibição (K_i)

para os novos derivados foram calculadas pelo programa GraFit e estão descritas na Tabela 2, página 52.

Nota-se que os compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **38a-g** apresentaram valores de K_i entre 2,1-61,0 μM , e que o **38a** foi o mais potente dentre os testados, com a menor constante de inibição $K_i = 2,1 \mu\text{M}$. Dentre os dipeptídeos testados, os compostos **25k** e **25p** apresentaram os menores valores de K_i : 64 e 69 μM , respectivamente. Vale ressaltar que os derivados **38a-g** se mostraram inibidores mais eficientes frente à Cat K, o que pode estar relacionado com a presença do núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol na estrutura desses compostos. Como citado no tópico anterior, há poucos trabalhos que relatam o uso de 1,3,4-oxadiazóis como inibidores da Cat K, sendo este trabalho o primeiro a relatar o uso de derivados baseados em 2-amino-1,3,4-oxadiazóis como inibidores da Cat K.

Tabela 2. Valores de K_i dos novos compostos dipeptídeos e 2-amino-1,3,4-oxadiazóis frente à Cat K

Composto	K_i (μM)	Composto	K_i (μM)
 (25c)	132 \pm 11,5	 (38a)	2,1 \pm 0,2
 (25i)	110 \pm 8,3	 (38b)	4,6 \pm 0,3
 (25j)	95 \pm 8,6	 (38c)	45 \pm 3,5
 (25k)	64 \pm 7,3	 (38d)	21 \pm 1,5

 (25n)	169 ± 12,7	 (38e)	7,3 ± 0,6
 (25o)	367 ± 22,6	 (38f)	61 ± 5,0
 (25p)	69 ± 5,7	 (38g)	6,7 ± 0,4

3.3.1.2. Modelagem Molecular

A fim de compreender melhor a interação entre inibidor-enzima, o estudo de modelagem molecular para os novos inibidores testados frente à Cat K foi realizado em parceria com grupo de pesquisa do Professor Teodorico Ramalho, da Universidade Federal de Lavras. Os cálculos de *docking* molecular foram realizados de acordo com a estrutura dos inibidores, os quais foram ajustados no sítio ativo da enzima, avaliando a afinidade entre inibidor-enzima.

Para compreender melhor os tipos de interações que ocorrem entre os inibidores e os resíduos que compõem os sítios interação da Cat K, alguns parâmetros que contribuem para essa afinidade foram investigados, como os valores de energia da interação intermolecular, e os resíduos responsáveis pelas interações do tipo ligações de hidrogênio, e estes dados estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores dos parâmetros obtidos por cálculos de docking molecular para os inibidores no sítio ativo da Cat K, por meio do software MVD®

Inibidor	Ki(μM)	Energia de interação (kcal mol ⁻¹)	Resíduos da enzima responsáveis pelas ligações de H
(25c)	131,97 ± 11,5	-106,12	Asn18, Gly20, Gly66, Cys25
(25i)	109,98 ± 8,3	-108,92	Asn18, Gly66



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo
Capítulo I – Resultados e discussão

(25j)	94,27 ± 8,6	-112,06	Asn18, Gly66
(25k)	64,06 ± 7,3	-116,32	Asn18, Gly66, His162
(25n)	169,19 ± 12,7	-96,81	Asn18, Gly64
(25o)	366,59 ± 22,6	-86,57	Asn18, Gly66, Cys25
(25p)	68,73 ± 5,7	-114,01	Asn18, Gly64
(38a)	2,13 ± 0,2	-134,36	Asn18, Gly64, Trp26, Cys25
(38b)	4,59 ± 0,3	-129,67	Asn18, Gln19, Cys25, Gly66
(38c)	45,19 ± 3,5	-119,70	Asn18, Glu186, Asn187
(38d)	20,62 ± 1,5	-122,79	Asn18, Gly64, His162
(38e)	7,33 ± 0,6	-126,62	Asn18, Tyr67, Gly66
(38f)	60,54 ± 5,0	-117,23	Asn18, Gly64
(38g)	6,74 ± 0,4	-128,62	Asn18, Ala163, Cys25, Gly66

Como mostrado na Tabela 3, todos os inibidores investigados interagiram de maneira satisfatória com os sítios de interações da Cat K, com valores de energia de interação entre $-86,57 \text{ kcal mol}^{-1}$ a $-134,36 \text{ kcal mol}^{-1}$. Nota-se que os valores de energia de estabilização encontrados para os inibidores corroboram os resultados experimentais, sendo que o inibidor **38a** apresentou a maior energia de estabilização ($-134,6 \text{ kcal mol}^{-1}$), e a menor constante de inibição $K_i = 2,13 \text{ }\mu\text{M}$, dentre os derivados testados.

De acordo com os resultados obtidos, as interações do tipo ligação de hidrogênio são essenciais para estabilização dos inibidores no sítio ativo da enzima. Além disso, outros tipos de interações também são importantes, como as eletrostáticas e as hidrofóbicas, que também contribuem para uma interação mais estável dos inibidores no sítio ativo. Observa-se que todos os inibidores testados interagem por ligações de hidrogênio com o resíduo Asn-18. Vale ressaltar que o resíduo catalítico Cys-25 interage, com os inibidores mais potentes, **38a**, **38b** e **38g**, investigados neste estudo.

Na Figura 31 (página 55), estão representadas as interações dos inibidores, **38a**, **38b**, **38e**, **38g**, **25c** e **25o**, em sua conformação mais estável com o sítio ativo da catepsina K. É interessante observar que, em relação aos compostos **38g** e **38b**, esses apresentam-se invertidos no sítio ativo. Para o **38g**, a interação com o resíduo Cys-25 é realizada através

dos átomos de nitrogênio do anel oxadiazólico, já para o composto **38b**, a interação com o resíduo Cys-25 ocorre pelo oxigênio do grupo metoxila, ligado ao anel aromático.

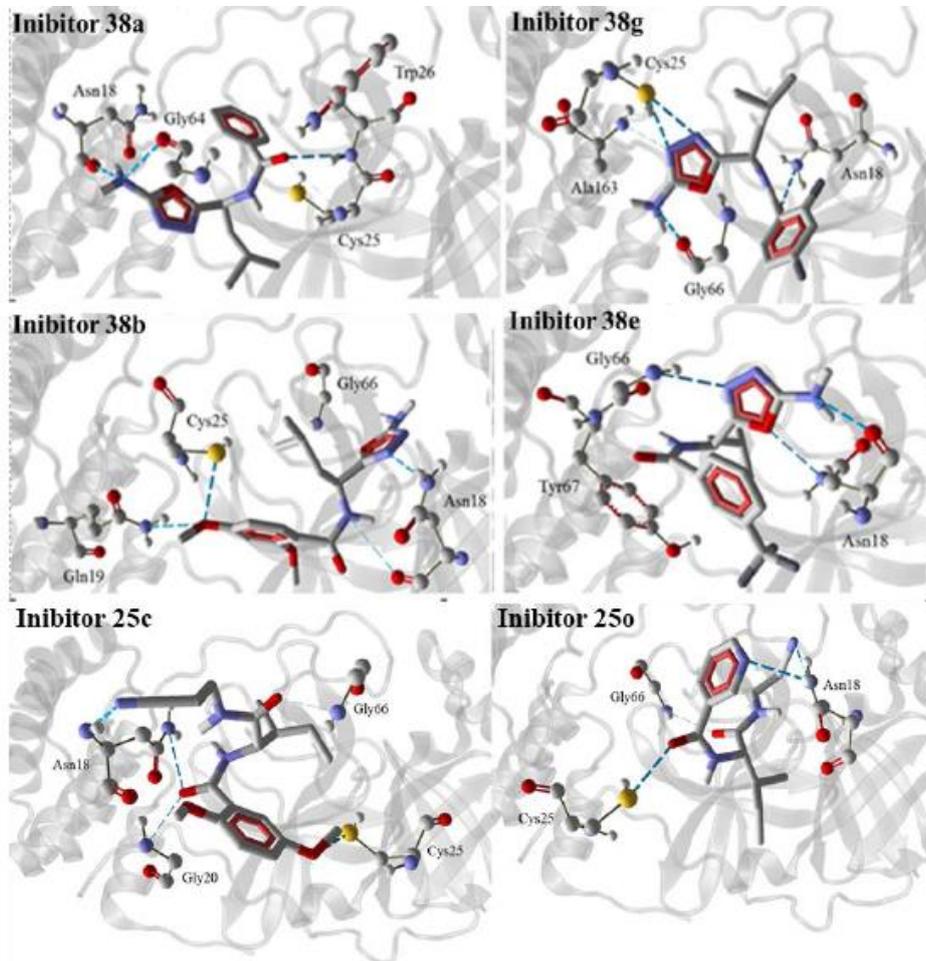


Figura 31. Representação das ligações de hidrogênio realizadas pelos inibidores mais potentes no sítio ativo da Cat K.

3.3.2. Avaliação dos efeitos dos inibidores em células de origem osteoblástica, células troncos mesenquimais humanas e precursores de osteoclastos

Os ensaios biológicos a fim de avaliar os efeitos dos inibidores da Cat K em células do tecido ósseo e células troncos foram realizados pela estudante de doutorado Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros, do Programa de Pós graduação em Biologia celular do departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da



UFMG

professora Dra. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga, e fazem parte de sua tese de doutorado.

Nestes experimentos foram utilizados diferentes tipos de linhagens celulares, osteoblastos de ratos Wistar (rOB), osteoblastos de camundongos C57b1/6 (mOB), células troncos mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) e células precursoras de osteoclastos de camundongos C57b1/6. Todos os derivados dipeptídicos **25a-p** foram testados e, dentre os amino-1,3,4-oxadiazóis, apenas o derivado **38a**. Foram realizados diferentes experimentos com as células do tecido ósseo e com as células troncos hASC, como a viabilidade celular após exposição aos compostos, a atividade da Fosfatase Alcalina (ALP), quantificação do colágeno, atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) e ensaios de co-cultura com osteoblastos e osteoclastos.

Deve-se ressaltar que os experimentos denominados “controles” realizados neste estudo foram um controle negativo, ou seja, foi usado apenas o meio de cultura ideal para o cultivo e crescimento de cada tipo celular, sem o composto estudado.

3.3.2.1. Ensaios de viabilidade celular das células rOB, mOB e hASC

Inicialmente foi realizado um ensaio de viabilidade utilizando as células rOB, mOB e hASC, com objetivo de fazer uma primeira seleção dos compostos mais promissores para os estudos subsequentes, baseado na sua falta de citotoxicidade, e padronizar a concentração ideal de cada derivado para cada tipo celular. As células foram expostas aos compostos por um período de 48 horas, e em seguida foi determinada a viabilidade celular em diferentes concentrações dos inibidores (0, 25, 50, 75, e 100 ng/mL).

Os resultados iniciais mostraram que os compostos **25a, 25b, 25d, 25e, 25m e 25o** apresentaram viabilidade celular inferior a 120% e foram consideradas não promissoras, sendo por esse motivo excluídas dos próximos ensaios. Foram determinadas também as concentrações ideais de uso para cada composto e para cada modelo celular, que são apresentadas na

Tabela 4, página 57. Foi considerada ideal a concentração em que as células apresentaram a maior viabilidade celular.

Tabela 4. Concentração ideal de uso dos derivados em cada modelo celular.

Derivados	Concentração ideal (ng/mL)		
	rOB	hASC	mOB
38a	100	50	100
25c	50	75	50
25f	50	50	100
25g	50	75	100
25h	50	75	100
25i	50	75	100
25p	100	50	25
25j	50	75	100
25k	50	50	100
25l	50	50	100
25n	75	50	50

Após a seleção inicial dos compostos e determinação da concentração ideal de uso, foi realizado um novo ensaio de viabilidade celular, onde as células foram expostas aos derivados por um tempo prolongado de 7, 14 e 21 dias. Avaliar a citotoxicidade dos compostos nas células por um período maior é importante neste caso, pois o tratamento da osteoporose geralmente é crônico ou de longo prazo.

Em relação aos testes realizados com o tipo celular rOB, avaliou-se a viabilidade celular com 7 e 14 dias de cultura, e o resultados estão expostos na Figura 32, página 58. Pode-se observar que, após 14 dias de cultura, os osteoblastos cultivados com os compostos **25h** e **25j** apresentaram viabilidade significativamente menor quando comparados ao controle, o que sugere que esses compostos são citotóxicos para esse modelo celular, não sendo atrativos para uma potencial terapia da osteoporose, uma vez que o tratamento dessa doença é de longo prazo.

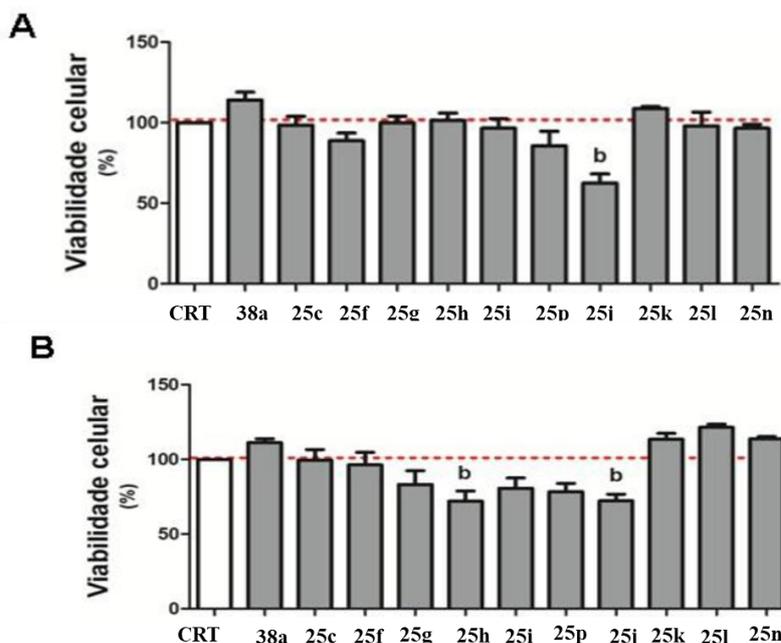


Figura 32. Viabilidade dos rOB. Viabilidade dos rOB em exposição aos compostos sintetizados durante A. 7 dias e B. 14 dias de cultivo. Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros^{48a}

Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. b: significativamente menor que o controle (CTR).

Outro modelo celular utilizado foram células troncos mesenquimais hACS, que apresentam capacidade de se autorrenovar e diferenciar-se em vários tipos celulares, como células do tecido ósseo.⁴⁸ Os ensaios realizados com essas células foram feitos em dois meios de cultura diferentes, o meio DMEM, que apresenta condições para que as células se mantenham vivas e cresçam, e o meio osteogênico, que fornece um ambiente propício para que ocorra a diferenciação celular das células troncos hASC em osteoblastos. A viabilidade celular das hASC expostas aos compostos foram avaliadas com 7, 14 e 21 dias, nos meios de cultura DMEM e osteogênico, e os resultados são apresentados nos gráficos da Figura 33, pagina 59. Os dados mostraram que os compostos **38a, 25c, 25f, 25g, 25k, 25l e 25h** foram capazes de estimular a viabilidade das hASC não diferenciadas após 7 dias de cultivo, enquanto que as células cultivadas com os compostos **25c, 25f, 25g, 25k, 25l e 25h** em meio DMEM apresentaram viabilidade significativamente maior quando comparada com o

⁴⁸ (a) M. R. V.B. Avaliação de Moduladores e Biomateriais para aplicação em afecções do tecido ósseo. Tese de Doutorado, Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021. (b) Ding D. C., Shyu W.C., Lin S. Z., Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*. 20(1) (2011) 5-14. (c) Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., Ridall A., Karsenty G. Osf2/Cbfa: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 89(5) (1997) 747-754.

controle, após um longo prazo de exposição (14 e 21 dias). Quando a célula exibe uma viabilidade celular acima de 100%, ou seja, significativamente maior que o controle, isso demonstra que as células são mais metabolicamente ativas.

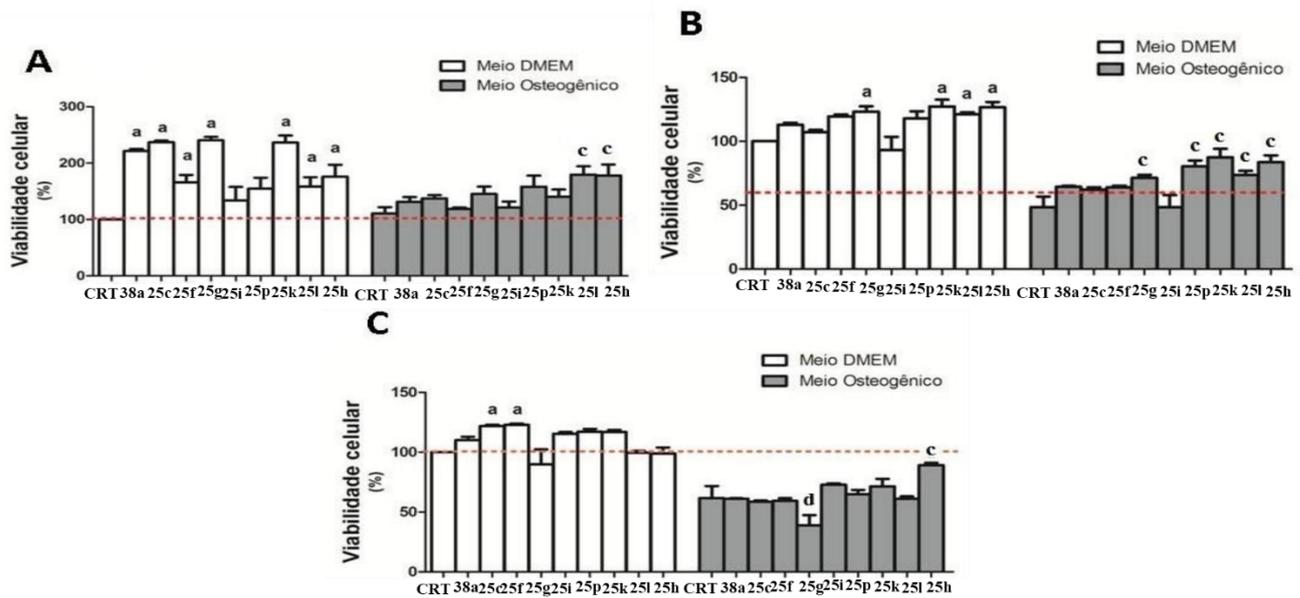


Figura 33. **Viabilidade das hASC.** Viabilidade das hASC em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias, **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo comparados aos controles. Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros^{48a}

Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. **a:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio DMEM. **b:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio DMEM. **c:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio osteogênico. **d:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio osteogênico.

A viabilidade das células mOB expostas aos compostos foi avaliada após 3, 7 e 14 dias de cultivo, e os resultados estão dispostos na Figura 34, página 60. Nota-se que a maioria dos compostos testados não se mostraram citotóxicos frente a células mOB, apenas o **25c** foi considerado citotóxico após o uso prolongado (14 dias), uma vez que a viabilidade das células tratadas com esse composto foi significativamente menor quando comparada com o controle. Vale ressaltar que os compostos **38a**, **25p** e **25l** foram os que mais estimularam a viabilidade das células, após 3, 7 e 14 dias de cultivo, respectivamente.

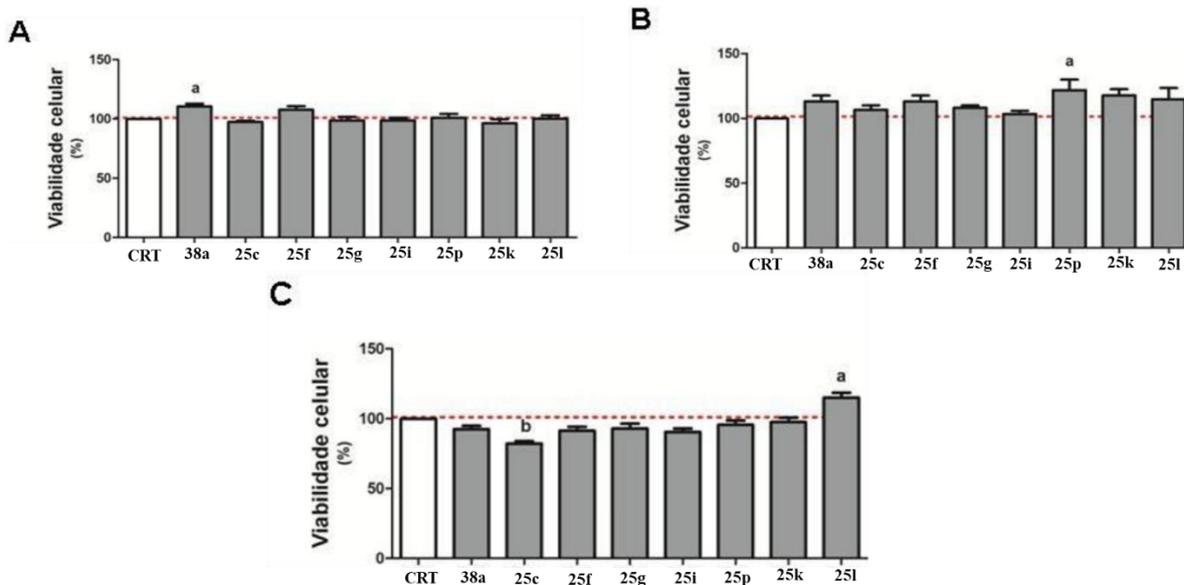


Figura 34. **Viabilidade dos mOB.** Viabilidade dos mOB expostos aos compostos durante **A.** 3 dias **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. *Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros^{48a}*

Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior quando comparadas ao CTR. b: significativamente menor quando comparado ao CTR. *Fonte: Rebecca Medeiros*

3.3.2.2. Ensaio de quantificação da atividade da fosfatase alcalina (ALP) e quantificação de colágeno expresso pelas células rOB, hASC e mOB.

A Fosfatase Alcalina (ALP) é uma enzima expressa em elevadas concentrações nas células precursoras dos osteoblastos durante o seu processo de diferenciação e maturação, e na mineralização do tecido ósseo. A ALP é responsável pela hidrólise do pirofosfato inorgânico, gerando fosfato inorgânico para produção da hidroxiapatita, que é o principal componente inorgânico da matriz óssea. Outra proteína importante que também é secretada pelos osteoblastos maduros (osteócitos) é o colágeno I, que é um importante componente orgânico da matriz óssea. Portanto a quantificação da ALP e do colágeno livre secretado está diretamente ligada à atividade e maturação dos osteoblastos.^{48b} Dito isso, a quantificação desses dois importantes marcadores biológicos foi determinada após cultivo das células rOB, hASC e mOB na presença dos derivados dipeptídeos **25c, 25f, 25g, 25h, 25i, 25p, 25h, 25k, 25l e 25n** e do amino-1,3,4-oxazidazol **38a**.

Na Figura 35, página 61, estão expostos os resultados referentes à quantificação da atividade da ALP nas células rOB tratadas com os compostos, durante 3, 7 e 14 dias. Nota-se que, após 3 dias de cultivo, as células tratadas com os compostos **25f, 25h e 25k**

apresentaram uma atividade da ALP significativamente maior quando comparado com o controle. Após 14 dias, verificou-se que as células tratadas com o derivado **38a** exibiram atividade da ALP maior quando comparada com o do controle, ou seja, o composto **38a** foi o que mais estimulou a atividade dos osteoblastos.

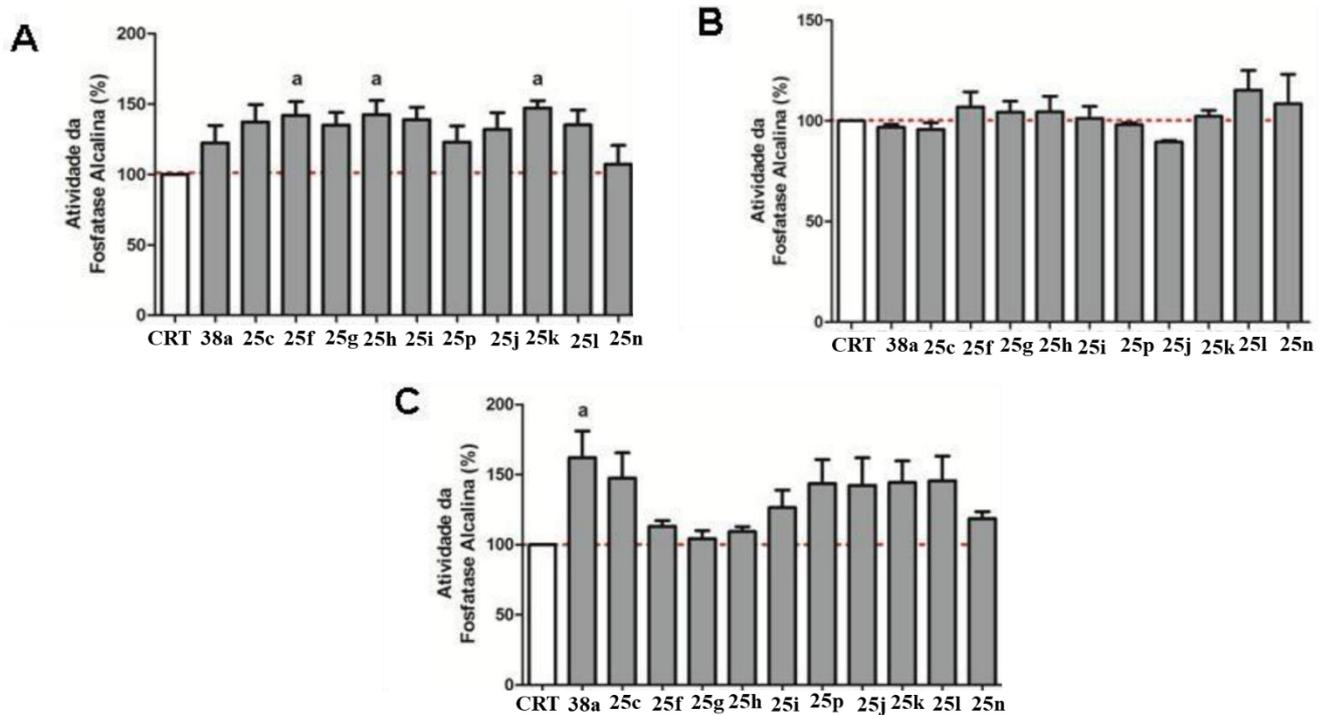


Figura 35. **Atividade da ALP em rOB.** Atividade da fosfatase alcalina em rOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros^{48a}

Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle (CTR).

O colágeno expresso pelas células rOB expostas aos compostos foi quantificado após 3, 7 e 14 dias de cultivo, e os dados estão dispostos na Figura 36. Os resultados mostraram, de forma geral, que os compostos **25f**, **25g** e **25j** estimularam significativamente a produção de colágeno pelas células dos osteoblastos, quando comparadas ao controle negativo, e o composto **25h** atuou de forma negativa na produção desse marcador biológico, quando comparado ao controle.

Com base nos resultados referentes aos ensaios realizados com as células rOB, os compostos **38a**, **25f**, **25g**, **25k** e **25j** são considerados promissores para serem estudados como potenciais agentes para o manejo da osteoporose, sendo capazes de aumentar a atividade dos osteoblastos, auxiliando de forma positiva na formação da matriz óssea.

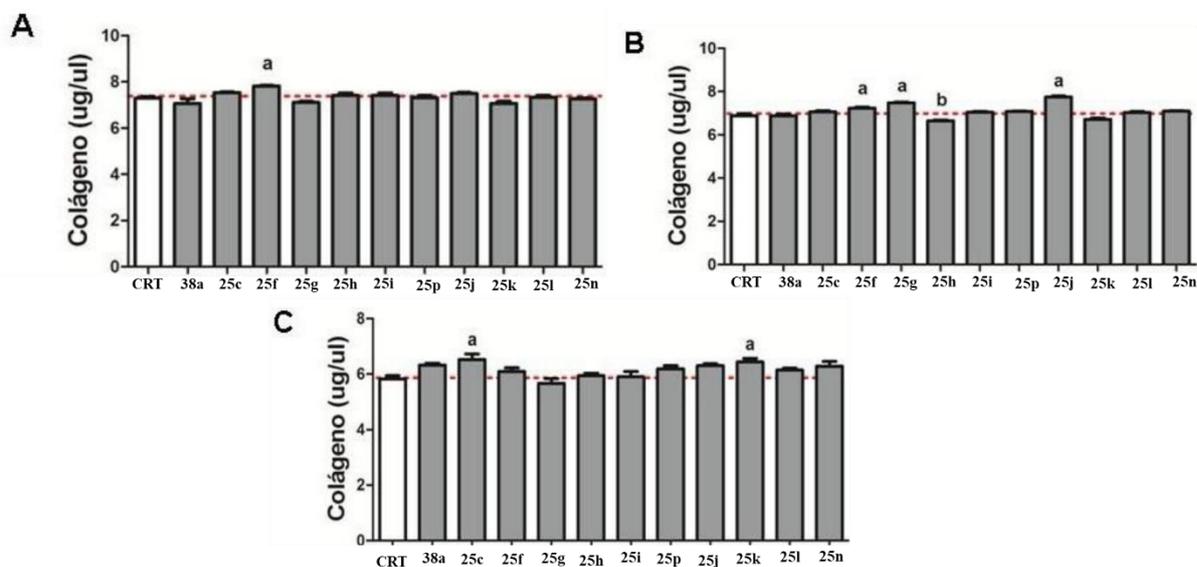


Figura 36. **Quantificação de colágeno nos rOB.** Quantificação de colágeno produzidos pelos rOB expostos aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. *Fonte: Tese de doutorado Rebecca Medeiros^{48a}*

Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que os controles; b: significativamente menor que os controles.

Os resultados referentes à quantificação da ALP e do colágeno nas células troncos hASC na presença dos compostos após 7,14 e 21 dias de cultivo, estão dispostos nas Figuras 37 e 38, respectivamente, páginas 64 e 65. Nestes experimentos, as células também foram cultivadas em dois meios de cultura diferentes, como realizado nos ensaios de viabilidade celular, o meio DMEM e o meio osteogênico.

Pode-se observar que as células hASC cultivadas em meio DMEM, não diferenciadas, exibiram atividade da ALP superior ou equivalente ao controle quando tratadas com os compostos (Figura 37, página 64). Em relação às células expostas ao meio osteogênico, nota-se que o composto **25p** estimulou a atividade da ALP após os 7, 14 e 21 dias, e os derivados **25f**, **25i** e **25p** também forneceram resultados positivos após 21 dias de cultivos (Figura 37C, página 64).

Em relação aos ensaios de quantificação de colágeno expresso pelas células hASC nos dois meios de culturas, DMEN e osteogênico, nota-se que após 7 e 14 dias não houve uma diferença significativa em relação à quantidade de colágeno produzido pelas células tanto no meio DMEM quanto no osteogênico (Figura 38, página 65). Em contrapartida, após



UFMG

os 21 dias de cultivo, a quantidade de colágeno expressa pelas células expostas ao meio osteogênico caiu drasticamente, tanto para o controle quanto para os derivados **38a**, **25c**, **25f**, **25g**, **25i** e **25l**. Já as células tratadas com os compostos **25p**, **25k** e **25n** expressaram uma quantidade de colágeno significativamente maior que o controle (Figura 38C, página 65).

De maneira geral, os dados indicam que os compostos testados apresentaram potencial osteogênico nas células troncos hASC, pois tanto as células indiferenciadas quanto as diferenciadas cultivadas na presença destes compostos apresentaram a atividade da ALP e a secreção de colágeno significativamente maior ou semelhante ao controle negativo. Sendo que a atividade da ALP é considerada um dos primeiros indícios no sucesso da diferenciação osteogênica das hASC, uma vez que o gene que é responsável pela codificação da ALP é um dos primeiros a serem expressos durante o processo de mineralização óssea e maturação dos osteoblastos.

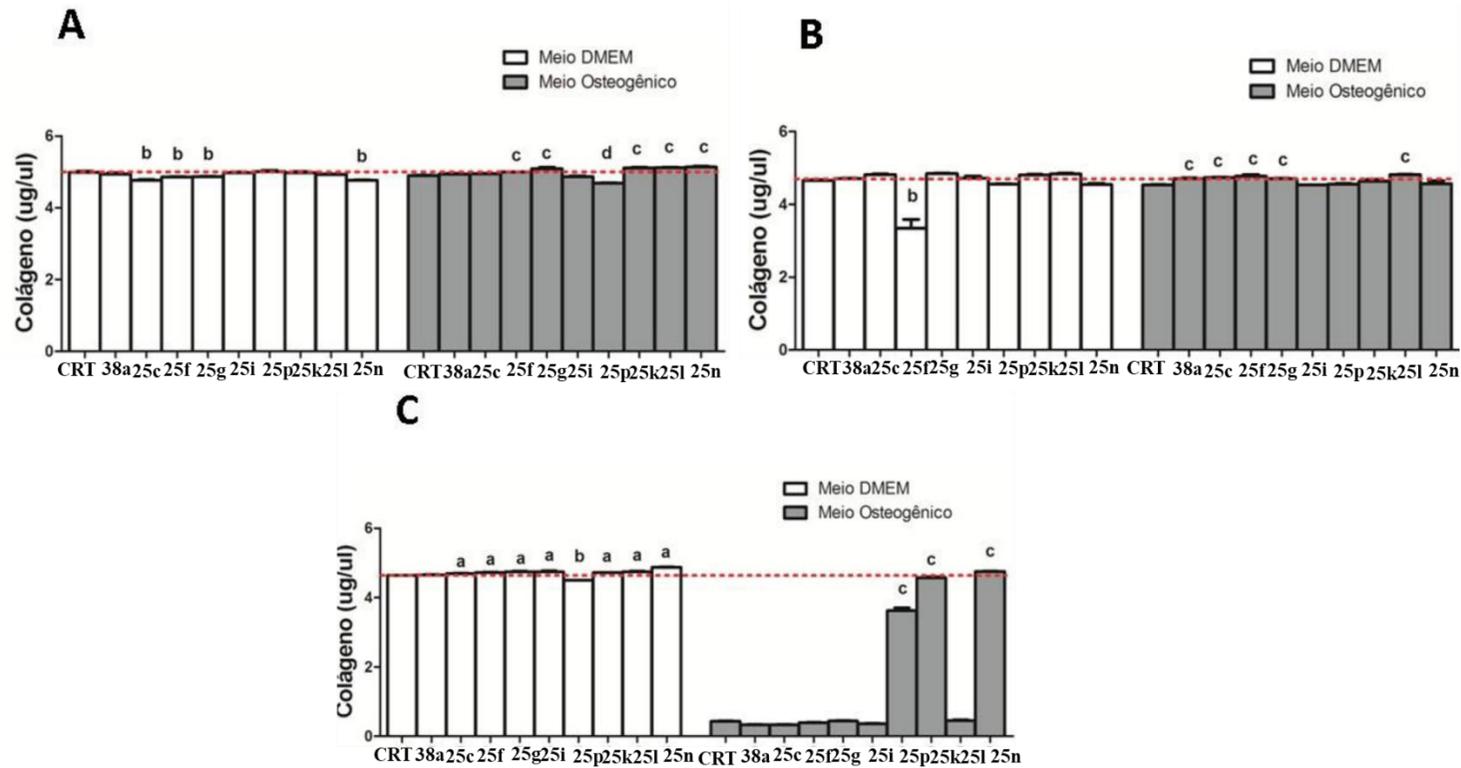


Figura 38. **Quantificação de colágeno em hASC.** Quantificação de colágeno em hASC em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias, **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo comparados aos controles. *Fonte: Tese de doutorado de Rebecca Medeiros*^{48a}

Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. **a:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio DMEM. **b:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio DMEM. **c:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio osteogênico. **d:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio osteogênico.

A quantificação da ALP e do colágeno produzido pelas células mOB também foi realizada, após o cultivo de 3, 7 e 14 dias na presença dos compostos (Figuras 39 e 40, página 66). Nota-se que, após 3 dias de cultivo, a atividade da ALP nas células mOB não foi alterada significativamente devido ao tratamento com os compostos (Figura 39A, página 66). Com 7 dias de cultivo, as células tratadas com os derivados **25g**, **25p** e **25l** apresentaram uma maior atividade da ALP, quando comparado ao controle, e ao final dos 14 dias, as células expostas aos compostos **25c**, **25f**, **25g**, **25i**, **25p** e **25k** exibiram uma atividade da ALP significativamente menor comparado ao controle, o que indica que provavelmente estas células entraram em período de maturação, ou seja, começaram a se diferenciar em outro tipo celular, os osteócitos.

Em relação aos dados referentes à quantificação do colágeno, observa-se que após 7 dias de cultivo, os compostos **25c**, **25f**, **25g**, **25i** e **25k** estimularam a produção de colágeno pelas células, já ao final dos 14 dias apenas os compostos **25c** e **25k** continuaram atuando positivamente na produção dessa proteína (Figura 40, página 66).

Mesmo que o composto **25c** tenha se mostrado eficiente para estimular a produção de colágeno e a atividade da ALP nas células mOB, nos ensaios de viabilidade ele se mostrou citotóxico após um longo período de cultivo (Figura 34A, página 59), por esse motivo decidiu-se excluir o composto **25c** dos ensaios com os **osteoclastos**.

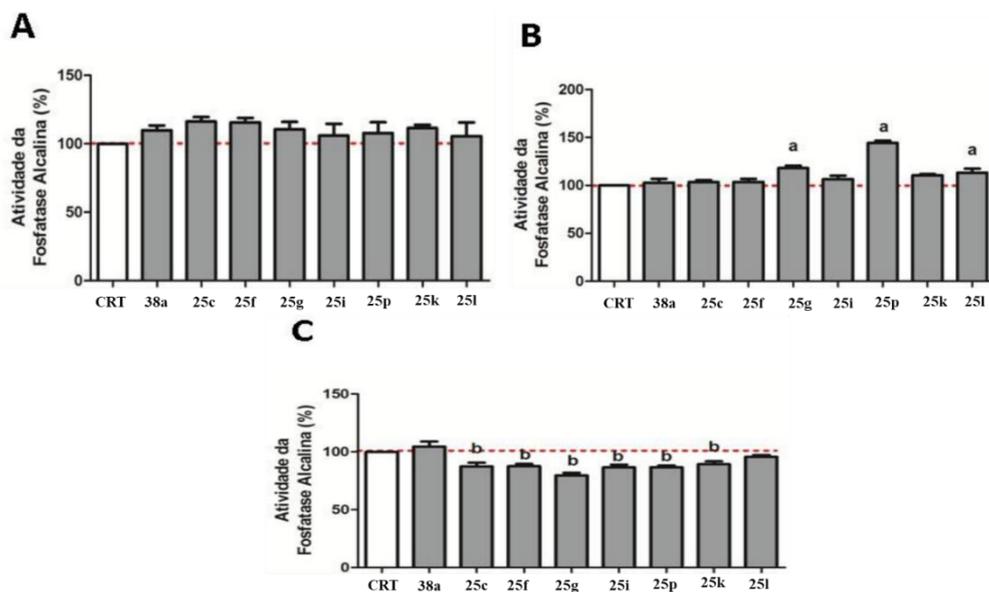


Figura 39. **Atividade da ALP nos mOB.** Atividade da fosfatase alcalina em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. *Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.*^{48a} Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que os controles. b: significativamente menor que os controles.

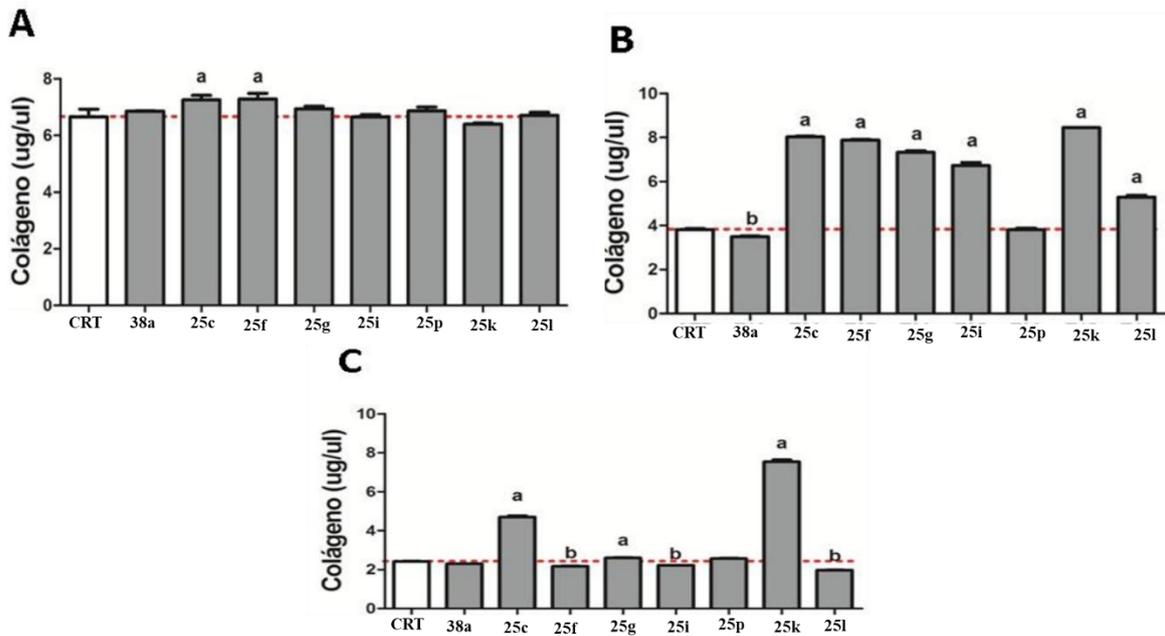


Figura 40. **Produção de colágeno em mOB.** Produção de colágeno em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. *Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.*^{48a}

Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle; b: significativamente menor que o controle.

Após análise em conjunto de todos os resultados dos ensaios com os osteoblastos rOB e mOB e as células troncos hASC, os compostos que apresentaram os resultados mais promissores foram selecionados para dar continuidade aos testes com os osteoclastos, sendo eles os compostos **38a, 25f, 25g, 25i, 25p, 25k e 25l**.

3.3.2.3. Avaliação do potencial anti-osteoclastogênico dos compostos dipeptídicos miméticos e do amino-1,3,4-oxadiazol (38a) em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl/6

Com os compostos selecionados em mãos, foi avaliado o potencial osteoclastogênico dessas moléculas durante a diferenciação de células precursoras dos osteoclastos. Ensaios de viabilidade celular dos osteoclastos e quantificação da atividade ácida tartarato-resistente (TRAP) foram realizados.

Os ensaios de viabilidade dos pré-osteoclastos durante o período de diferenciação (osteoclastogênese) na presença dos compostos selecionados foram executados. Neste



UFMG

experimento, as células foram expostas a dois meios de cultura diferentes, um contendo m-csf + RANK-L, que são fatores estimuladores para a osteoclastogênese, e outro contendo m-csf + RANK-L + OPG. Este último, além de conter os estimuladores para a diferenciação, contém a OPG, que é o regulador endógeno negativo desse processo de diferenciação, como discutido na introdução desse trabalho (Página 7).

Conforme pode ser observado na Figura 41, (página 68), após os 7 dias de cultivo, os osteoclastos expostos aos compostos **25f** e **25g** no meio (m-csf + RANK-L) apresentaram viabilidade celular significativamente maior quando comparado ao controle (m-csf+RANK-L), ou seja, esses compostos estimularam a atividade celular dos osteoclastos. Em relação às células expostas ao meio (m-csf + RANK-L + OPG), apenas o derivado **25g** exibiu um resultado de viabilidade celular significativamente maior quando comparado ao controle (m-csf+RANK-L+OPG). Comparando a viabilidade celular das células expostas nos dois meios de culturas diferentes (Figura 41B, página 68), nota-se que não houve diferenças significativas entre os resultados, apenas as células expostas ao composto **38a** no meio (m-csf + RANK-L + OPG) apresentaram maior viabilidade comparada às células tratadas também com **38a** no meio de cultura sem a OPG.

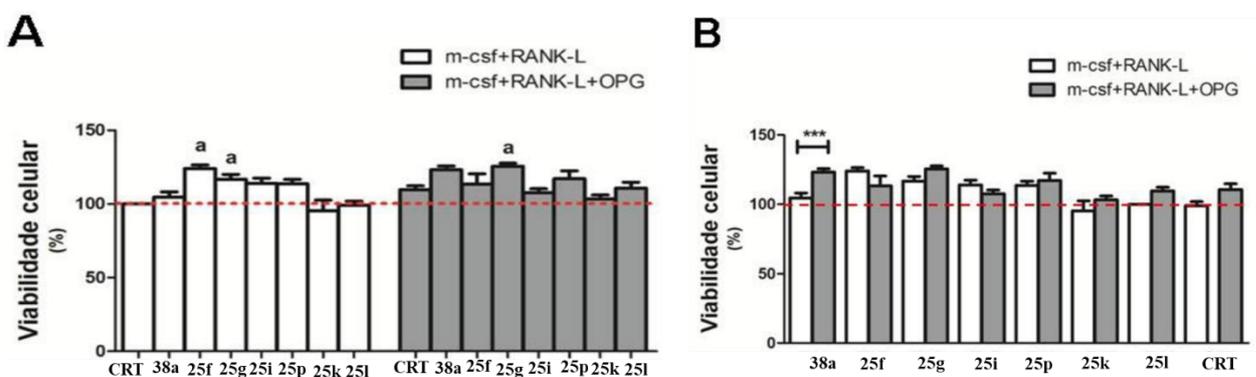


Figura 41. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas à mesma amostra
Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.^{48a}

Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0$. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente menor que os controle.

A fosfatase ácido tartarato resistente (TRAP) é uma enzima expressa nas células dos osteoclastos, participa de processos biológicos e é essencial para a reabsorção óssea, desempenhada pelos osteoclastos, sendo assim a TRAP tem sido utilizada como um



UFMG

marcador da atividade dos osteoclastos.⁴⁹ Foi quantificada a atividade da TRAP nos osteoclastos cultivados nos meio de cultura (m-csf + RANK-L) e (m-csf + RANK-L + OPG), juntamente com os compostos, e os resultados desta análise estão apresentados na Figura 42 (página 69). Observa-se que não houve diferenças significativas na atividade da TRAP na ausência ou presença dos compostos.

Em conjunto, os resultados dos testes com as células dos osteoclastos mostram que os compostos testados não estão interferindo na atividade dessas células. Como os dipeptídeos e o derivado amino-1,3,4-oxadiaxol foram planejados para inibir a catepsina K, eles parecem não afetar diretamente a atividade osteoclastogênica, embora estejam exercendo papel importante na maturação dos osteoblastos. Outros ensaios, como por exemplo o de reabsorção óssea, devem ser investigados para jogar luz sobre o mecanismo de ação dos novos compostos sintetizados na complexa cascata de processos envolvidos no remodelamento ósseo.

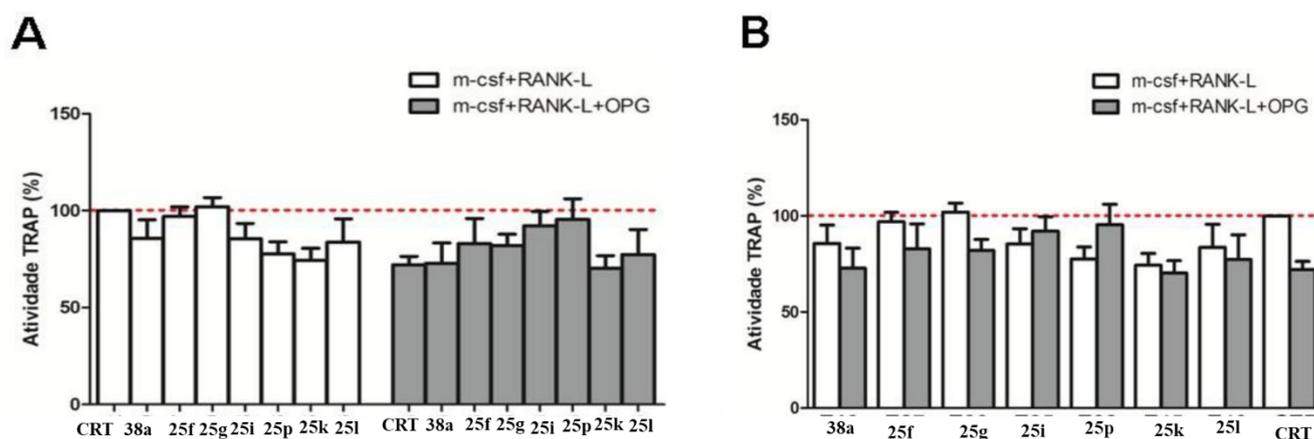


Figura 42 A Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) em osteoclastos expostos aos compostos.. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas à mesma amostra. Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.^{48a}

Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

⁴⁹ Habermann B., Eberhardt C., Feld M., Zichner L., Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthop.* 78(2) (2007) 221-225.

3.3.3. Ensaios de co-cultura de pré-osteoclastos e osteoblastos mOB

No tecido ósseo as principais células que atuam no processo de remodelamento são os osteoblastos e osteoclastos, e estas células atuam em conjunto para manutenção desse tecido. Portanto, foi avaliado o efeito dos compostos **38a**, **25f**, **25g**, **25i**, **25p**, **25k** e **25l** nos osteoblastos e osteoclastos em um ensaio de co-cultura, onde esses dois tipos celulares foram cultivados em conjunto. O objetivo desse ensaio de co-cultura foi simular um meio mais próximo do real para avaliar a atividade dos compostos estudados nas células dos osteoblastos.

Foram determinadas a atividade da ALP e a quantificação do colágeno dos mOB cultivados em co-cultura com os osteoclastos e, nestes experimentos, as células também foram cultivadas em dois meios (m-csf + RANK-L) e (m-csf + RANK-L+OPG) (Figuras 43 e 44).

Pode-se observar que os compostos **38a** e **25k** estimularam a atividade da ALP dos mOB cultivados (Figura 43, página 70). Em contrapartida, as células cultivadas com estes compostos apresentaram menor concentração de colágeno quando comparadas ao controle (Figura 44, página 71).

Os resultados indicam que a atividade da ALP dos osteoblastos não foi afetada de forma negativa pelos compostos testados, e que os compostos **38a** e **25k** favoreceram a maturação óssea dos osteoblastos e estimularam a atividade osteoblástica em co-cultura com os osteoclastos.

Em resumo, estes ensaios biológicos com diferentes células derivadas do tecido ósseo e células troncos mesenquimais humanas mostraram que os compostos **38a**, **25f**, **25g**, **25i**, **25p**, **25k** e **25l** são candidatos promissores para o tratamento da osteoporose, uma vez que atuaram positivamente na atividade dos osteoblastos não interferindo negativamente na atividade dos osteoclastos. Todavia, outros ensaios ainda são necessários, principalmente para compreender melhor como os compostos **38a**, **25k** e **25p**, que apresentaram uma inibição da Cat K satisfatória (Tabela 2, página 52), estariam atuando no processo de remodelamento e manutenção do tecido ósseo.

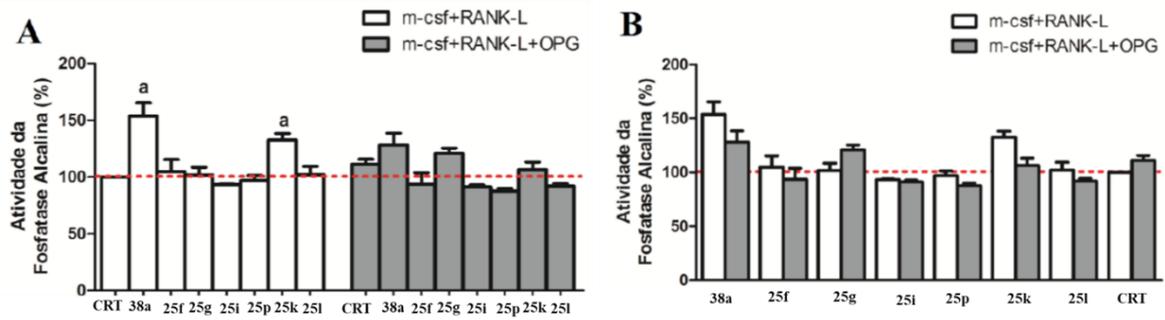


Figura 43. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas á mesma amostra *Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.*^{48a} Foi aplicado oneway ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

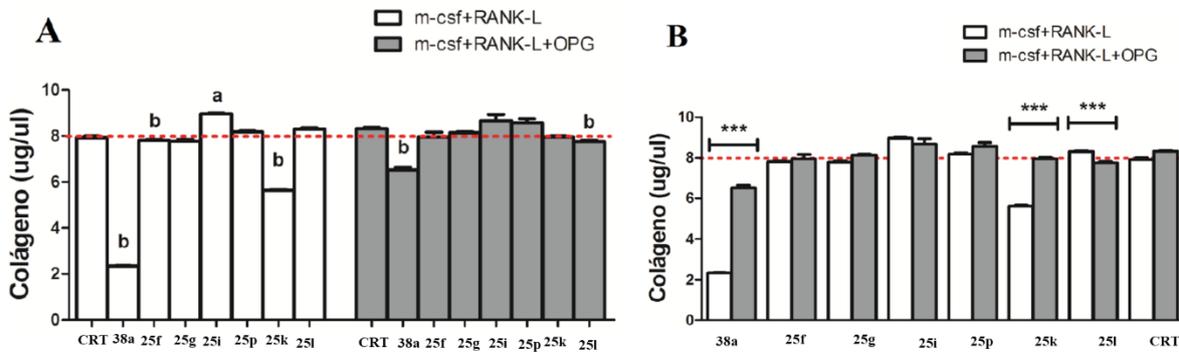


Figura 44. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. B. Comparação entre as células expostas a mesma amostra. *Fonte: Tese de doutorado da Rebecca Medeiros.*^{48a} Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.



4. Parte experimental

4.1. Materiais e Equipamentos

A determinação estrutural dos compostos sintetizados foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , espectroscopia na região do infravermelho (IV) e espectrometria de massas de alta resolução. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos mediante a utilização de espectrômetro Bruker AVANCE DPX400 (Departamento de Química, UFMG). Os valores de deslocamentos químicos foram listados em partes por milhão (ppm) em relação ao TMS e ao sinal residual de H do solvente deuterado, e as constantes de acoplamento (J) dadas em Hertz (Hz).

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro PerkinElmer FT-IR de feixe duplo, em pastilhas de KBr anidro. Os valores para as absorções estão expressos em número de onda, utilizando-se como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}).

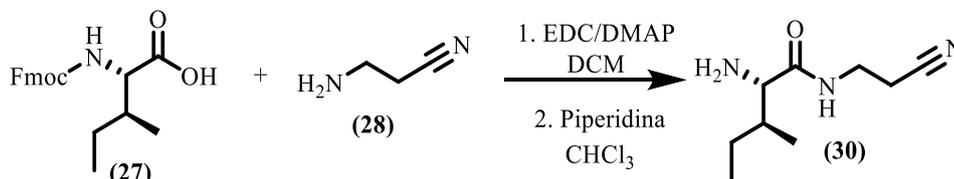
Os espectros de Massas de alta resolução foram obtidos usando o espectrômetro Bruker maXis e *Q-Exactive* (ThermoScientific), no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Büchi (Departamento de Química, UFMG) e não são corrigidos.

As substâncias foram nomeadas segundo regras da IUPAC com o auxílio do programa CS ChemDraw Ultra.

4.2. Síntese dos dipeptídeos 26a-p e dos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g

4.2.1. Síntese de (2*S*,3*S*)-2-amino-*N*-(2-cianoetil)-3-metilpentanamida (**30**)^{33,34}



Em um balão de fundo redondo adicionaram-se Fmoc-*L*-isoleucina (**27**) (3 mmol, 1,060g), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida (EDC) (3,3 mmol, 630 mg) e 4-dimetilaminopiridina-(DMAP) (1,2 mmol, 146 mg). O sistema foi resfriado a 0 °C e mantido sob atmosfera de N₂, quando então adicionaram-se 10 mL de diclorometano. Após 15 minutos sob agitação adicionou-se 3-aminopropionitrila (3,3 mmol, 0,250 mL). A mistura de reação ficou sob agitação por 24hrs, observando-se após este tempo, consumo total do material de partida, por meio de CCD, e a formação de um precipitado branco. À mistura de reação foram adicionados 30 mL de diclorometano, para solubilizar todo o sólido branco formado e então foram realizadas lavagens sequenciais da fase orgânica com soluções de HCl 1M (2 x 30 mL) e NaHCO₃ saturada (1 x 30 mL), em um funil de separação. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e o solvente evaporado com auxílio do rotaevaporador, obtendo-se 1,352 g de um sólido branco.

O sólido branco, sem purificação, foi transferido para um balão de fundo redondo e então foram adicionados 30 mL de clorofórmio e piperidina (15 mmol, 1,5 mL). A reação ficou sob agitação magnética e foi acompanhada por CCD, observando-se consumo total do material de partida, após 24 horas. O solvente da reação foi evaporado sob pressão reduzida, e o material bruto foi então purificado em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel e como eluente: hexano: acetato de etila (1:1), acetato de etila e acetato de etila: metanol (8:2), obtendo-se ao final 494 mg (2,7 mmol) do composto (**30**) puro, como um óleo amarelo.

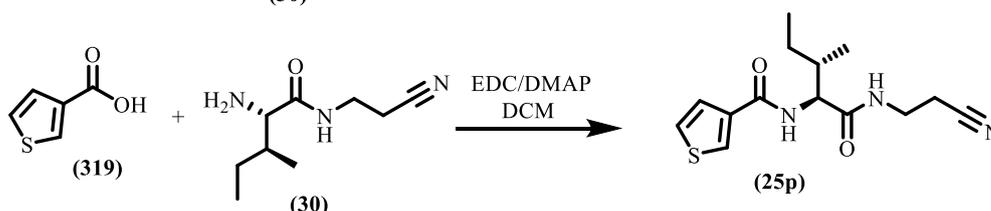
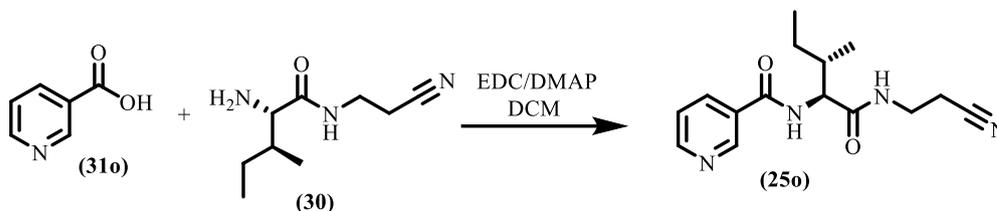
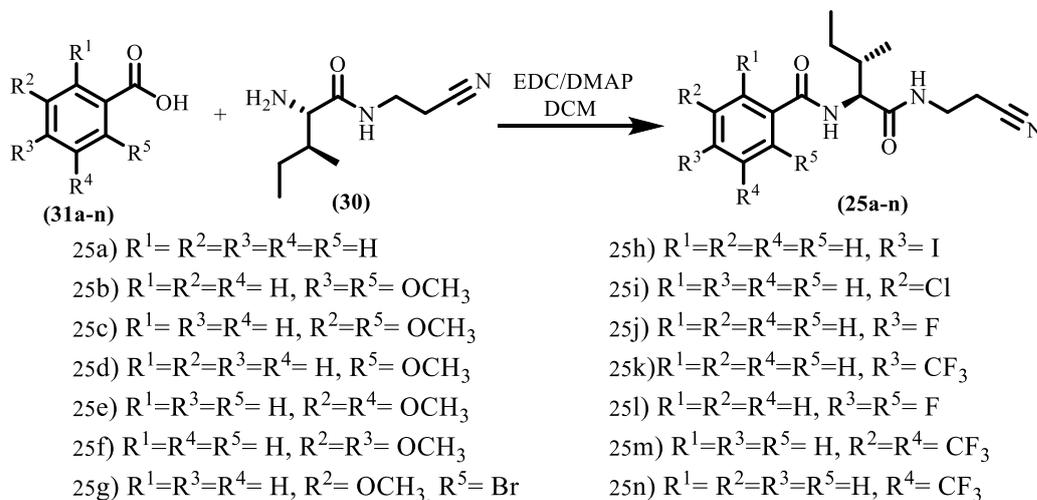
Fórmula molecular: C₉H₁₇N₃O

Massa molar: 183,25 gmol⁻¹

Aspecto: óleo amarelo

Rendimento: 90%

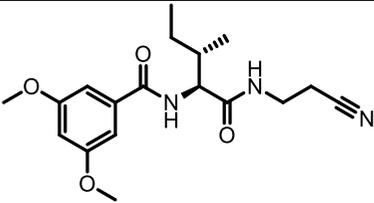
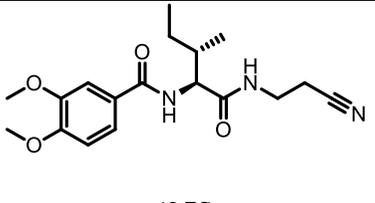
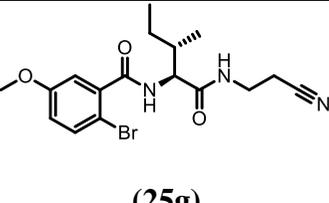
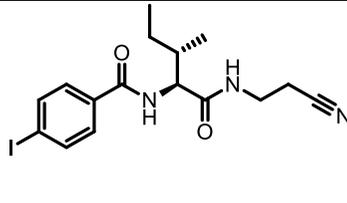
4.2.2. Síntese dos dipeptídeos (25a-p)^{33,34}



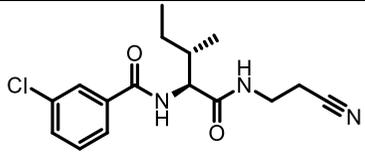
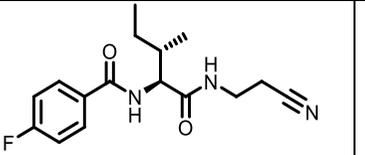
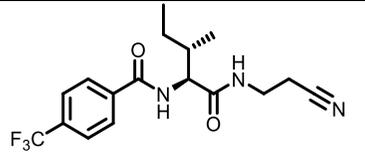
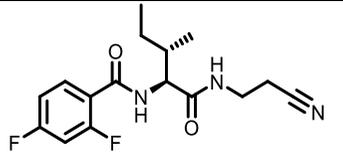
Procedimento geral:

Em um balão de fundo redondo foram adicionados 0,5 mmol do ácido aromático ou derivado substituído, EDC (0,5 mmol, 105 mg) e DMAP (0,3 mmol, 37 mg). O sistema foi resfriado a 0 °C e mantido sob atmosfera de N₂ e então foram adicionados 5 mL de diclorometano. A mistura reagente ficou sob agitação magnética por 15 minutos, e em seguida foi adicionado à reação uma solução do composto **30** (0,5 mmol, 91 mg) em 5 mL de diclorometano. A mistura foi mantida sob agitação, à temperatura ambiente, e o progresso da reação foi acompanhado por CCD. Após o fim da reação, foram realizadas lavagens sequenciais, com soluções de HCl 1M (2 x 10 mL) e NaHCO₃ saturada (1 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado. O material obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando-se como eluente hexano: acetato de etila (100:0, 80:20, 70:30, 50:50, 0:100).

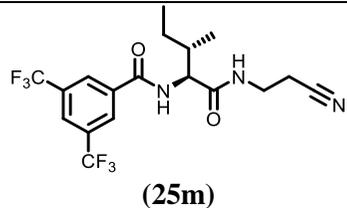
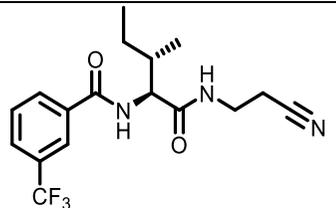
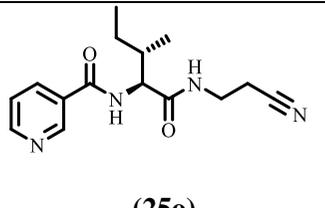
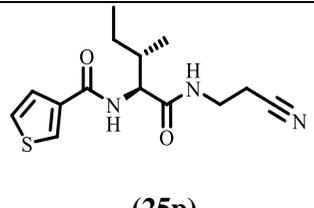
Quadro 2. Dados referente aos compostos **25e-h**

Dipeptídeo	 (25e)	 (25f)	 (25g)	 (25h)
Nomenclatura	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-3,5-dimetoxibenzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-3,5-dimetoxibenzamida	2-bromo- <i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-5-metoxibenzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-4-iodobenzamida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	170,9 – 173,9 °C	177,8 – 180,4 °C	151,7 – 152,7 °C	236,9 – 237,8 °C
Tempo de reação	17 horas	29 horas	27 horas	17 horas
Rendimento	82%	71%	60%	56%
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹)	3283 (v NH), 2972-2840 (v C-H), 2235 (v C≡N), 1663 e 1633 (v C=O)	3293 (v NH), 2967-2843 (v C-H alifático), 2247 (v C≡N), 1662 e 1623 (v C=O)	3287 (v NH), 2961 (v C-H), 2254 (v C≡N), 1669 e 1641 (v C=O)	3284 (v NH), 2974 (v C-H), 2247 (v C≡N), 1666 e 1640 (v C=O)
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 348,1918, massa calculada para [C ₁₈ H ₂₆ N ₃ O ₄] ⁺ : 348,1923	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 348,1918, massa calculada para [C ₁₈ H ₂₆ N ₃ O ₄] ⁺ : 348,1923	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 396,0918, massa calculada para [C ₁₇ H ₂₃ BrN ₃ O ₃] ⁺ : 396,0923	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 414,0673, massa calculada para [C ₁₆ H ₂₁ IN ₃ O ₂] ⁺ : 414,0678
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

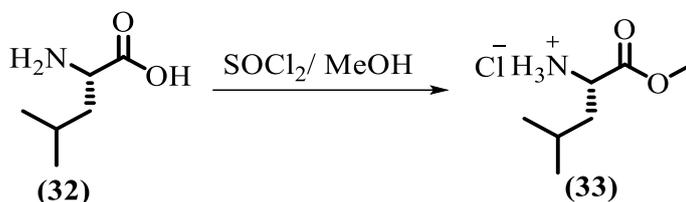
Quadro 3. Dados referente aos compostos **25i-l**

I Dipeptídeo	 (25i)	 (25j)	 (25k)	 (25l)
Nomenclatura	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-3-cloro-benzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-4-fluorobenzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-4-(trifluorometil)benzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-2,4-difluorobenzamida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	179,7– 181,5 °C	189,4 – 191,0 °C	217,5 – 218,3 °C	169,9 – 171,0 °C
Tempo de reação	19 horas	17 horas	5 horas	5 horas
Rendimento	96%	83%	83%	70%
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹)	3293 (ν NH), 2961 (ν C-H), 2250 (ν C≡N), 1659 e 1640 (ν C=O)	3283 (ν NH), 2972 (ν C-H), 2249 (ν C≡N), 1663 e 1633 (ν C=O)	3291 (ν NH), 2964 (ν C-H), 2241(ν C≡N), 1634 (ν C=O)	3295 (ν NH), 2965 (ν C-H), 2252 (ν C≡N), 1627 (ν C=O)
HRMS (ESI⁺)	<i>(m/z)</i> [M+H] ⁺ encontrada: 322,1317, massa calculada para [C ₁₆ H ₂₁ ClN ₃ O ₂] ⁺ : 322,1322	<i>(m/z)</i> [M+H] ⁺ encontrada: 306,1612, massa calculada para [C ₁₆ H ₂₁ FN ₃ O ₂] ⁺ : 306,1618	<i>(m/z)</i> [M+H] ⁺ encontrada: 356,1580, massa calculada [C ₁₇ H ₂₁ F ₃ N ₃ O ₂] ⁺ : 356,1586	<i>(m/z)</i> [M+H] ⁺ encontrada: 324,1518, massa calculada [C ₁₆ H ₂₀ F ₂ N ₃ O ₂] ⁺ : 324,1524
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

Quadro 4. Dados referente aos compostos **25m-o**

Dipeptídeo	 (25m)	 (25n)	 (25o)	 (25p)
Nomenclatura	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-3,5-bis(trifluorometil)benzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)-3-(trifluorometil)benzamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)nicotinamida	<i>N</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1-((2-cianoetil)amino)-3-metil-1-oxopentan-2-il)tiofeno-3-carboxamida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	211,9 – 213,2 °C	157,2 – 159,4 °C	160,7 – 161,3 °C	185,3 – 187,9 °C
Tempo de reação	5 horas	5 horas	17 horas	17 horas
Rendimento	60%	92%	80%	88%
IV ($\bar{\nu}$, cm⁻¹)	3280 (ν NH), 2972 (ν C-H), 2254 (ν C≡N), 1657 (ν C=O)	3293 (ν NH), 2972 (ν C-H), 2247 (ν C≡N), 1663 e 1637 (ν C=O)	3281 (ν NH), 2961 (ν C-H), 2247 (ν C≡N), 1669 e 1630 (ν C=O)	3293 (ν NH), 2974 (ν C-H), 2250 (ν C≡N), 1666 e 1626 (ν C=O)
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 424,1454, massa calculada para [C ₁₈ H ₂₀ F ₆ N ₃ O ₂] ⁺ : 424,1454	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 356,1578, massa calculada para [C ₁₇ H ₂₁ F ₃ N ₃ O ₂] ⁺ : 356,1586	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 289,1659, massa calculada para [C ₁₅ H ₂₁ N ₄ O ₂] ⁺ : 289,1665	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 294,1271, massa calculada para [C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₂ S] ⁺ : 294,1276
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

4.2.3. Síntese do cloridrato de (*S*)-1-metoxi-4-metil-1-oxopentan-2-amina³¹



Em um balão bitubulado de 50 mL foi adicionado a *L*-leucina **32** (8 mmol, 1,045g) e em uma das saídas do balão foi conectado um condensador e na outra um septo de borracha. O sistema foi resfriado a 0 °C e mantido sob atmosfera de N₂, e em seguida adicionaram-se 20 mL de metanol anidro e o cloreto de tionila (27,2 mmol, 3,2 mL), lentamente, com auxílio de uma seringa. A reação ficou sob agitação e banho de gelo por 30 minutos, e em seguida colocou-se a mistura reagente à 70 °C, por 6 horas. Após este tempo a solução ficou sob agitação a temperatura ambiente por 10 horas.

Após as 10 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, e ao sólido obtido foram adicionados 10 mL de éter etílico, formando uma suspensão. A suspensão foi deixada no congelador por 2 horas, e em seguida o precipitado formado foi filtrado e lavado com éter etílico gelado, obtendo-se 1,43 g do composto (**33**) como um sólido cristalino branco.

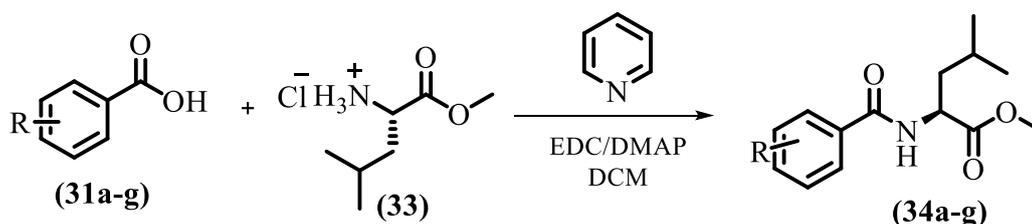
Fórmula molecular: C₇H₁₆ClNO₂

Massa molar: 181,66 g mol⁻¹

Aspecto: sólido branco

Rendimento: 98%

4.2.4. Síntese dos compostos **34a-g**^{33,34}



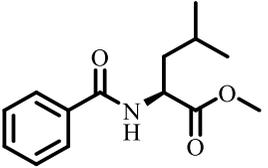
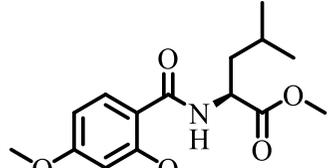
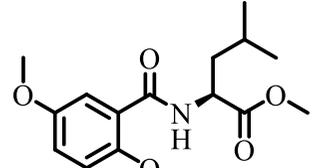
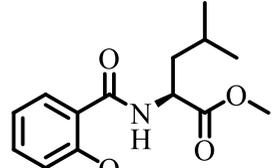


Procedimento geral:

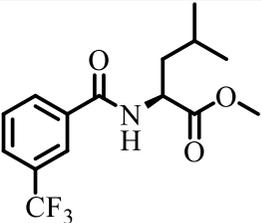
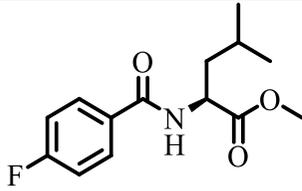
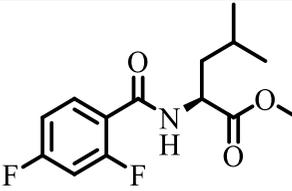
Em um balão de fundo redondo foram adicionados o ácido benzoico ou o derivado substituído **31a-g** (2 mmol, 244 mg), EDC (2,4 mmol, 458 mg) e DMAP (1,2 mmol, 146 mg). O sistema foi resfriado a 0 °C e mantido sob atmosfera de N₂ e então foram adicionados 10 mL de diclorometano, deixando a mistura sob agitação e banho de gelo por 15 minutos. Em outro balão de fundo redondo adicionaram-se o cloridrato **33** (2,4 mmol, 434mg), 5 mL de diclorometano, e piridina (2,6 mmol, 0,210 mL). A mistura ficou sob agitação por 15 minutos e então o conteúdo desse balão foi adicionado, com auxílio de uma seringa, à mistura reagente contendo o ácido benzoico ou o derivado substituído e os demais reagentes.

A mistura foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e agitação à temperatura ambiente, e o progresso da reação foi acompanhado por CCD, observando consumo total do reagente de partida (o ácido benzoico ou o derivado substituído) após 24 horas de reação. Posteriormente ao fim da reação, foram realizadas lavagens sequenciais com soluções de HCl 1M (2 x 10 mL) e NaHCO₃ saturada (1 x 10 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e o solvente evaporado. O material obtido foi purificado em coluna cromatográfica utilizando-se como eluente hexano: acetato de etila (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50).

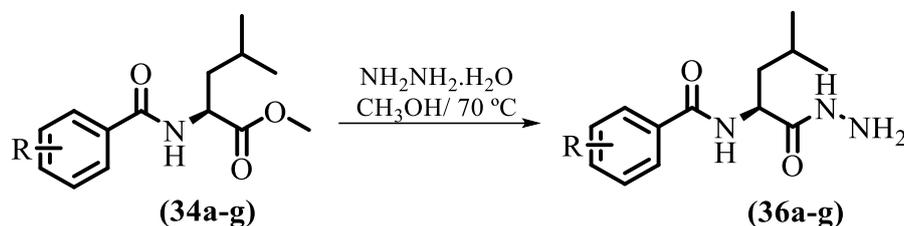
Quadro 5. Dados referente aos compostos **34a-d**

Derivado éster				
	(34a)	(34b)	(34c)	(34d)
Nomenclatura	benzoil- <i>L</i> -leucinato de metila	2,4-dimetoxibenzoil- <i>L</i> -leucinato de metila	2,5-dimetoxibenzoil- <i>L</i> -leucinato de metila	2-metoxibenzoil- <i>L</i> -leucinato de metila
Aspecto físico	Sólido branco	Óleo amarelo	Óleo incolor	óleo incolor
Rendimento	82%	74%	49%	79%
Tempo de reação	24 horas	22 horas	44 horas	18 horas
HRMS (ESI⁺)	-	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 310,16572 , massa calculada para [C ₁₆ H ₂₄ NO ₅] ⁺ : 310,16545.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 310,16572 , massa calculada para [C ₁₆ H ₂₄ NO ₅] ⁺ : 310,16545.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 280,15527 , massa calculada para [C ₁₅ H ₂₂ NO ₄] ⁺ : 280,15488.
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

Quadro 6. Dados referente aos compostos **34e-g**

Derivado éster	 (34e)	 (34f)	 (34g)
Nomenclatura	3-(trifluorometil)benzoil- <i>L</i> -leucinato de metila	4-fluorobenzoil- <i>L</i> -leucinato de metila	2,4-difluorobenzoil-<i>L</i>-leucinato de metila
Aspecto físico	Óleo incolor	Óleo amarelo	Óleo incolor
Rendimento	70%	76%	90%
Tempo de reação	3 horas	5 horas	5 horas
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 316,11750 , massa calculada para [C ₁₅ H ₁₇ F ₃ NO ₃]: 316.11605.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 266,12056 , massa calculada para [C ₁₄ H ₁₇ FNO ₃]: 266.11925	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 284,11124 , massa calculada para [C ₁₄ H ₁₆ F ₂ NO ₃]: 284,10982.
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

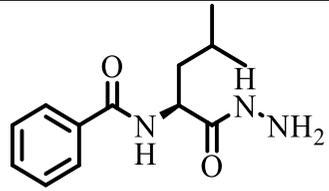
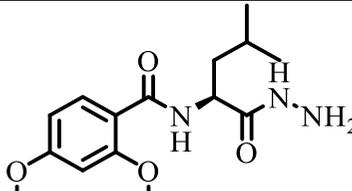
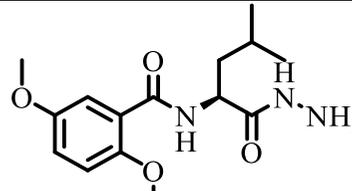
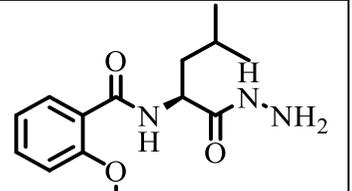
4.2.5. Síntese das hidrazidas **36a-g**⁴¹



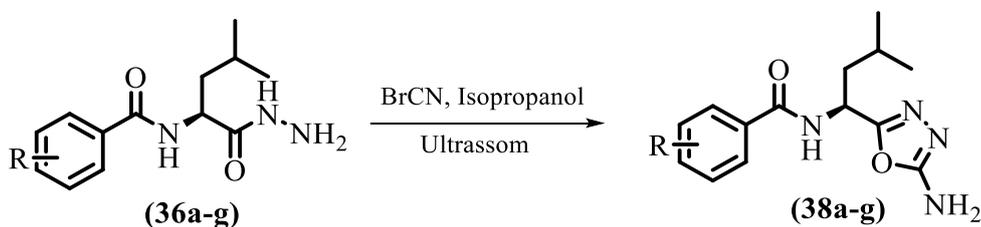
Em um balão de fundo redondo foram adicionados os derivados esterificados **(34a-g)** (1 mmol, 249 mg), 25 mL de metanol e a hidrazina mono-hidratada (25 mmol, 2 mL). A mistura reagente ficou sob agitação magnética e aquecimento à 70°C e o progresso da reação foi acompanhado com CCD, observando-se consumo total do material de partida após 5 horas.

Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, levando à obtenção do produto de interesse, que não sofreu purificação adicional. Os dados referentes as hidrazidas **36a-g**, estão descritos nos quadros a seguir.

Quadro 7. Dados referente aos compostos **36a-d**

Derivado hidrazida	 (36a)	 (36b)	 (36c)	 (36d)
Nomenclatura	(S)-N-(1-hidrazinil-4-metil-1-oxopentan-2-il)benzamida	(S)-N-(1-hidrazinil-4-metil-1-oxopentan-2-il)-2,4-dimetoxibenzamida	(S)-N-(1-hidrazinil-4-metil-1-oxopentan-2-il)-2,5-dimetoxibenzamida	(S)-N-(1-hidrazinil-4-metil-1-oxopentan-2-il)-2-metoxibenzamida
Aspecto físico	Sólido branco	óleo amarelo	óleo amarelo	óleo amarelo
Rendimento	90%	90%	90%	95%
Faixa de Fusão	142,3-144,8 °C	-	-	-
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M-H] ⁺ encontrada: 248,14092, massa calculada para [C ₁₃ H ₁₈ N ₃ O ₂] ⁺ : 248,13990.	-	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 310,17721, massa calculada para [C ₁₅ H ₂₄ N ₃ O ₄] ⁺ : 310,17668	(<i>m/z</i>) [M-H] ⁺ encontrada: 278.15169, massa calculada para [C ₁₄ H ₂₀ N ₃ O ₃] ⁺ : 278.15047.
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C

4.2.6. Síntese dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 38a-g



Procedimento Geral:

Em um balão de fundo redondo foram adicionados as hidrazidas **36a-g** (0,28 mmol), 8 mL de isopropanol e o brometo de cianogênio (0,33 mmol, 35 mg). A mistura foi mantida sob irradiação ultrassônica, a 40 °C, em uma potência de 40 Hz. O progresso foi acompanhado por CCD e após 8 horas de reação observou-se consumo do material de partida, as hidrazidas **36a-g**. Em seguida o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, o material bruto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel o eluente clorofórmio: metanol (100:0; 97,5:2,5; 95:5; 90:10; 50:50; 0:100), obtendo ao final os produtos desejados **38a-g**.

5. Conclusões e perspectivas

Neste trabalho foi desenvolvida a síntese de novos dipeptídeos miméticos com atividade inibitória da catepsina K, uma enzima diretamente ligada ao processo de reabsorção óssea e no desenvolvimento de algumas patologias, como a osteoporose.

Foram sintetizados dezesseis dipeptídeos miméticos **25a-p** inéditos cujas estruturas moleculares foram baseadas em inibidores da Cat K relatados na literatura. A síntese desses novos derivados foi realizada utilizando metodologias clássicas para formação de ligações peptídicas.

Inicialmente foi proposta a síntese de novos derivados do tipo azadipeptídeos a partir de hidrazidas *N,N*-não substituídas **36a-g**, todavia, devido às características estruturais desses substratos, a etapa para inserção de um grupo nitrila na estrutura das hidrazidas levou a produtos do tipo 2-amino-1,3,4-oxadiazóis. Foram preparados **7** novos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **38a-g**.

O potencial de inibição dos dipeptídeos do tipo **25** e dos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis do tipo **38** frente à catepsina K foi avaliado, e o composto **38a**, contendo o núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol em sua estrutura, foi o mais potente dos inibidores testados, apresentando um valor de $K_i = 2,13 \mu\text{M}$. Destaca-se que este é o primeiro trabalho a relatar a síntese e avaliação de derivados contendo o heterociclo 2-amino-1,3,4-oxadiazol como inibidores da Cat K.

Foram realizados ensaios biológicos com os dipeptídeos **25a-p** e o derivado 2-amino-1,3,4-oxadiazólico **38a**, para avaliar os efeitos desses novos compostos em células do tecido ósseo (osteoblastos e osteoclastos), e em células troncos mesenquimais humanas. Os derivados **38a**, **25f**, **25g**, **25i**, **25p**, **25k** e **25l** foram considerados candidatos promissores para estudos visando o desenvolvimento de novos tratamentos da osteoporose, visto que estimularam positivamente a atividade dos osteoblastos, atuando na formação óssea, e não interferiram negativamente na atividade dos osteoclastos. Outras investigações ainda serão realizadas, a fim de compreender melhor como os derivados mais promissores estariam atuando em um processo de remodelamento ósseo.



**CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma nova metodologia
sintética para a construção do heterociclo 2-amino-1,3,4-
oxadiazol**

1. Introdução

1.1. O heterociclo 1,3,4-oxadiazol

Oxadiazóis são heterociclos aromáticos de 5 membros, contendo dois átomos de nitrogênio (N) e um de oxigênio (O). Devido às diferentes posições que os heteroátomos podem estar arrançados no anel, existem quatro isômeros pertencentes à classe dos oxadiazóis, que são: 1,3,4-oxadiazol (**1**), 1,2,4-oxadiazol (**2**), 1,2,3-oxadiazol (**3**) e 1,2,5-oxadiazol (**4**) (Figura 45A, página 93). Dentre esses isômeros, o núcleo 1,3,4-oxadiazol vem se destacando nos últimos anos, principalmente nas áreas com aplicações biológicas e tecnológicas.⁵⁰

O heterociclo 1,3,4-oxadiazol é, por exemplo, um importante núcleo e bloco construtor para o desenvolvimento de novos fármacos, devido à vasta gama de compostos contendo esse núcleo e possuindo propriedades biológicas, incluindo atividades antitumoral, antimicrobiana, antitubercular, antiviral, anticonvulsivante, analgésica,⁵¹ dentre outras. Além dessas atividades biológicas citadas, compostos contendo o núcleo 1,3,4-oxadiazol se mostraram inibidores eficientes em testes *in vitro* frente à catepsina K (Cat K),⁵² uma protease que desempenha um importante papel em vários processos biológicos relacionados a diversas patologias, como por exemplo a osteoporose. Atualmente é possível encontrar

⁵⁰ Lelyukh M., Demchuk I., Harkov S., Chaban T., Drapak I., Chaban I., Shelepeten L., Matiychuk V. A review on synthetic routes for obtaining of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles *via* cyclodehydration and oxidative cyclization reactions. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 10, (2020) 5960 -5971.

⁵¹ (a) Bansal S., Bala M., Suthar S K, Choudhary S., Bhattacharya S., Bhardwaj V., Singla S., Joseph A. Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2 inhibitors with potent anti-inflammatory activity. *Eur.J. Med. Chem.* 80 (2014) 167-174 (b) Husain, A., Ajmal M., Synthesis of novel 1,3,4-oxadiazole derivatives and their biological properties *Acta Pharm.* 59 (2009) 223–233 (c) Altıntop M. D., Sever B., Turan-Zitouni G., Kaplancıklı Z. A., Özdemir A. Design, synthesis, in vitro and in silico evaluation of a new series of oxadiazole-based anticancer agents as potential Akt and FAK inhibitors *Eur. J. Med. Chem.* 155 (2018) 905-924 (d) Hannouna M. H, Hagraza M., Kotba A., El-Attarb Abdul-Aziz M. M., Abulkhair H. S. Synthesis and antibacterial evaluation of a novel library of 2-(thiazol-5-yl)- 1,3,4-oxadiazole derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Bioorganic Chemistry* 94 (2020) 103364 (e) Abd-Ellah H. S., Abdel-Aziz M., Shoman Mai E., Beshr E. A. M., Kaoud T. S., Ahmed Al-Shaimaa F.F. Novel 1,3,4-oxadiazole/oxime hybrids: Synthesis, docking studies and investigation of anti-inflammatory, ulcerogenic liability and analgesic activities. *Bioorganic Chemistry* 69 (2016) 48–63 (d) Caneschi W. et al. Synthesis and anticancer evaluation of new lipophilic 1,2,4 and 1,3,4-oxadiazoles *Eur. J. Med. Chem.* 165 (2019) 18-30

⁵² Palmer J.T., Hirschbein B. L., Cheung H. McCarter J., Janc J. W., Z. Walter Yu, Wesolowski G. Keto-1,3,4-oxadiazoles as cathepsin K inhibitors *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 2909–2914. 1

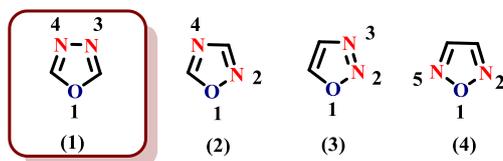


alguns medicamentos aprovados e disponíveis no mercado que contém o núcleo 1,3,4-oxadiazol, como por exemplo, o raltegravir (antirretroviral), o nesapidil (agente vasodilatador) e o furamizol (agente antimicrobiano) (Figura 45B, página 93).

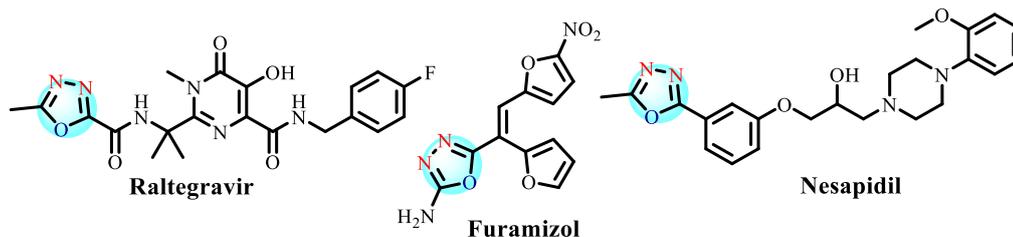
Compostos contendo o núcleo 1,3,4-oxadiazol apresentam também propriedades físico-químicas, fotofísicas e óticas relevantes, como fotoluminescência, altos rendimentos quânticos, estabilidade térmica e química, e características de cristais líquidos, o que vem atraindo a atenção de diversos pesquisadores na área de desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente na busca por materiais baseados em pequenas moléculas para aplicação na construção de OLEDs (Diodos Orgânicos Emissores de Luz). Compostos não poliméricos contendo o heterociclo 1,3,4-oxadiazol tem sido empregados como materiais na construção de OLEDs, destacando-se os derivados PBD, BND e OXD-4, representados na Figura 45C (página 93).⁵³

⁵³(a) Paun A., Hadade N. D., Paraschivescu C. C., Matache M. 1,3,4-Oxadiazoles as luminescent materials for organic light emitting diodes via cross-coupling reactions *J. Mater. Chem.* 4 (2016) 8596 -8610. (b) Filho Neves R. A. W. *Síntese e propriedades fotofísicas de novos cristais líquidos luminescentes contendo os heterociclos 1,2,3-e/ou 1,3,4-oxadiazóis*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química Fundamental do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

(A) Heterociclos Oxadiazóis



(B) Fármacos contendo o núcleo 1,3,4-oxadiazol:



(C) Derivados não poliméricos contendo o anel 1,3,4-oxadiazol aplicados na construção de OLEDs:

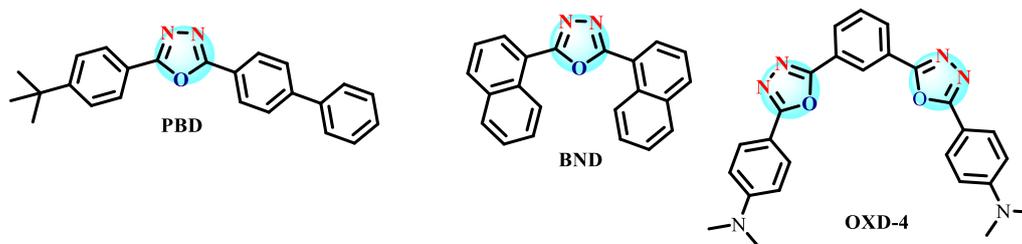
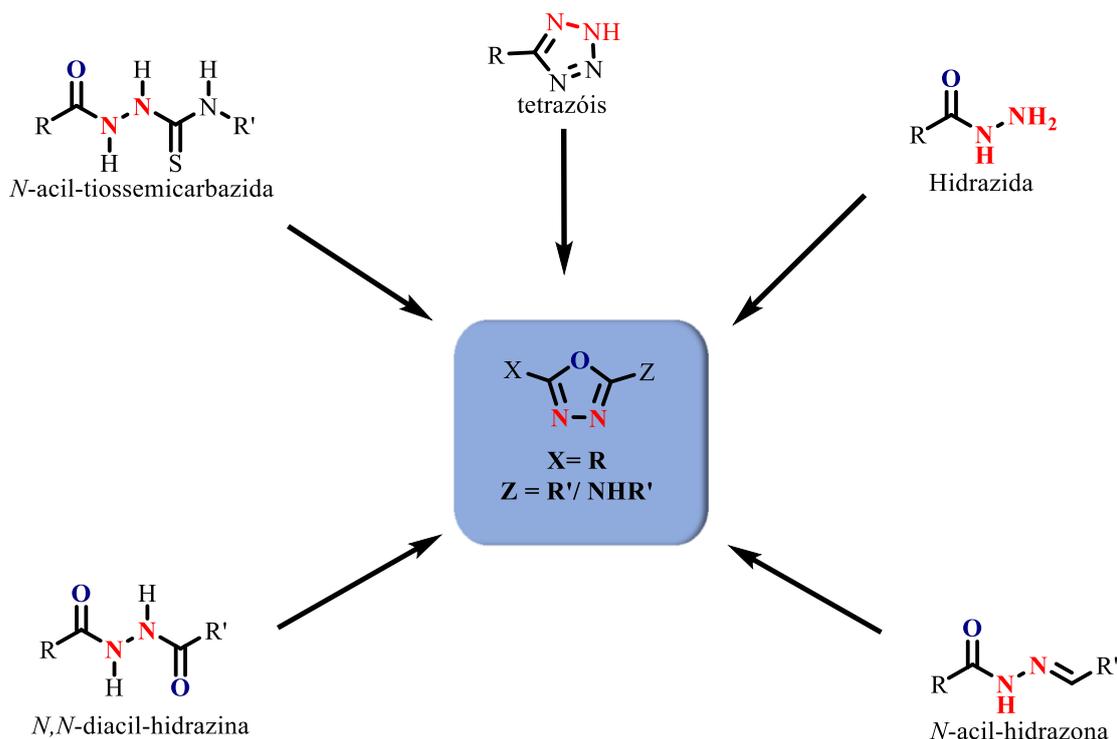


Figura 45. Estrutura química dos 4 isômeros de oxadiazóis (A) e aplicações no campo da química medicinal (B) e tecnológica do isômero 1,3,4-oxadiazol (C).

1.2. Metodologias de síntese do núcleo 1,3,4-oxadiazol

Na literatura é possível encontrar diversas metodologias para síntese do heterociclo 1,3,4-oxadiazol e seus derivados. Os principais métodos envolvem reações de ciclização de *N*-acil-hidrazonas, *N*-acil-tiossemicarbazidas, *N,N*-diacil-hidrazinas e hidrazidas, e o rearranjo de Huisgen de tetrazóis na presença de algum agente acilante (Esquema 19, página 94).⁵⁰



Esquema 19: Síntese do heterociclo 1,3,4-oxadiazol a partir de diferentes substratos.

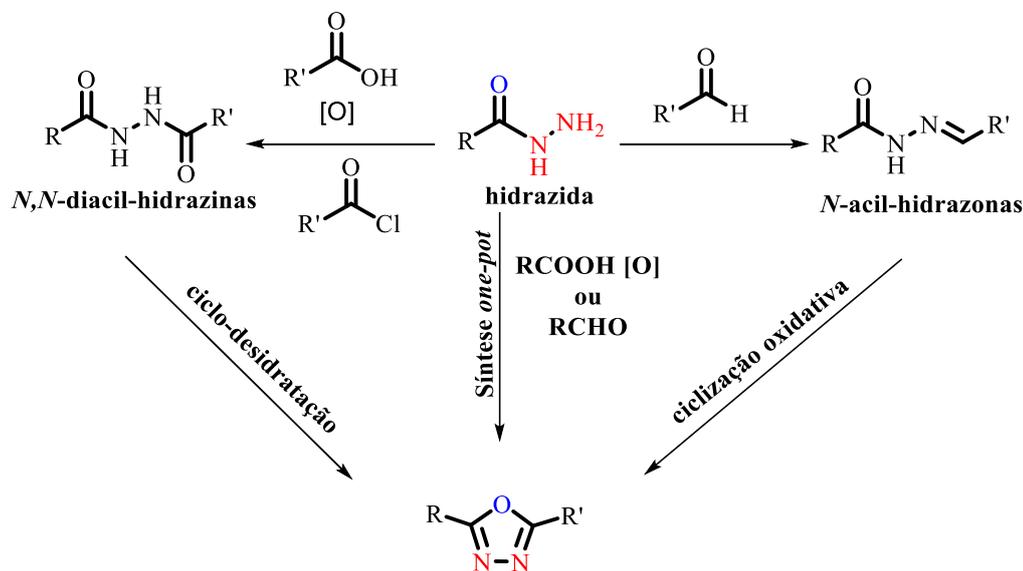
A seguir serão abordadas as metodologias sintéticas para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos do tipo mono e dissustituídos e derivados amino-1,3,4-oxadiazóis.

1.2.1. Metodologias sintéticas para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos mono e dissustituídos

As metodologias sintéticas utilizadas para a construção de derivados 1,3,4-oxadiazóis-dissustituídos se baseiam em reações de ciclo-desidratação ou ciclizações oxidativas de *N,N*-diacil-hidrazinas e *N*-acil-hidrazonas, por meio de agentes oxidantes ou desidratantes (Esquema 20, página 95).⁵⁴ A obtenção desses derivados pode ocorrer em duas etapas de síntese, que inclui inicialmente a condensação entre hidrazidas e cloreto de ácidos, aldeídos ou ácidos carboxílicos para a formação e purificação dos substratos *N,N*-diacil-

⁵⁴ Oliveira C. S., Lira B. F., Barbosa-Filho J. M., Lorenzo J. G. F., Athayde-Filho P. F. Synthetic Approaches and Pharmacological Activity of 1,3,4-Oxadiazoles: A Review of the Literature from 2000–2012 *Molecules* 17 (2012)10192-10231.

hidrazinas e *N*-acil-hidrazonas e subsequente etapa de ciclização. Há exemplos também de reações do tipo *one-pot*, em que os substratos são formados *in situ*, sem necessidades de etapas de purificações (Esquema 20).



Esquema 20. Diferentes rotas sintéticas para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos dissustituídos.

Uma das metodologias mais abrangentes e aplicadas para construção de derivados 1,3,4-oxadiazóis dissustituídos é a ciclo-desidratação de *N,N*-diacil-hidrazinas tratadas com agentes desidratantes, como cloreto de fosforila ($POCl_3$), pentóxido de fósforo (P_2O_5), cloreto de tionila ($SOCl_2$), dentre outros. Por exemplo, Zeng e colaboradores⁵⁵ relataram a síntese de derivados 2,5-aryl-1,3,4-oxadiazóis não simétricos, a partir do tratamento de *N,N*-diacil-hidrazinas com $POCl_3$, em temperatura de refluxo por 2-3 h, obtendo os compostos de interesse com rendimentos acima de 90% (Esquema 21a, página 97). O cloreto de fosforila tem sido um dos agentes desidratantes mais utilizados na ciclização de *N,N*-diacil-hidrazinas para construção do núcleo 1,3,4-oxadiazol, todavia são necessários certos cuidados ao realizar esse procedimento, uma vez que o $POCl_3$ é altamente tóxico e corrosivo.⁵⁴

⁵⁵ Zheng X., Li Z., Wang Y., Chen W., Huang Q., Liu C., Song G. Synthesis and Insecticidal activities of novel 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazoles. *J. Fluorine Chem.* 123 (2003) 163–169.



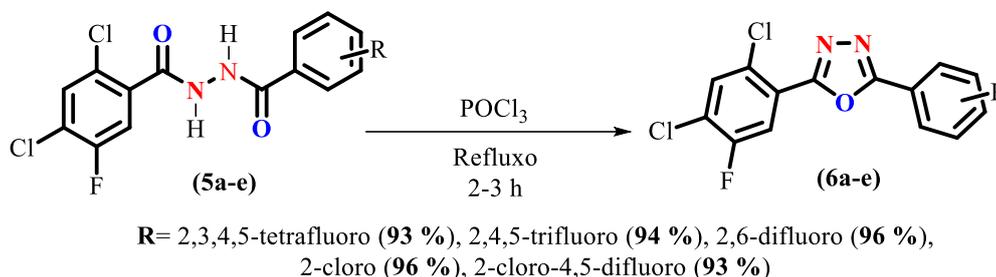
O uso de *N*-acil-hidrazonas também é bastante difundido para a construção de derivados 1,3,4-oxadiazol dissustituídos, via reações de ciclização oxidativa por meio de ação de um agente oxidante. Por exemplo, Chang e colaboradores⁵⁶ desenvolveram uma metodologia livre de metal para obtenção de derivados oxadiazólicos a partir da ciclização de *N*-acil-hidrazonas dissustituídas, utilizando iodo molecular como agente oxidante, na presença de uma base, carbonato de potássio, a 100 °C, obtendo os derivados de interesse com rendimentos entre 53 – 97% (Esquema 21b, página 97).

Outra abordagem utilizada para a construção desse núcleo é a reação de Huisgen, em que ocorre a decomposição térmica de tetrazóis na presença de algum agente acilante (cloretos de ácidos ou anidridos), levando à formação de derivados 1,3,4-oxadiazol dissustituídos. Por exemplo, em 2019 Domling e colaboradores reportaram um novo protocolo de síntese para a construção de derivados 1,3,4-oxadiazol 2,5-dissustituídos, em que a reação de Huisgen foi a etapa chave para a obtenção desse heterociclo. Neste novo protocolo de síntese, os autores inicialmente construíram o tetrazol via reação multicomponente de Ugi (U-4CR, *Ugi four-component reaction*) e em seguida os derivados tetrazólicos obtidos foram reagidos com diferentes cloretos de ácidos na presença de uma base, sob aquecimento, levando à formação dos compostos 1,3,4-oxadiazóis 2,5-dissustituídos (Esquema 21c, página 97).⁵⁷

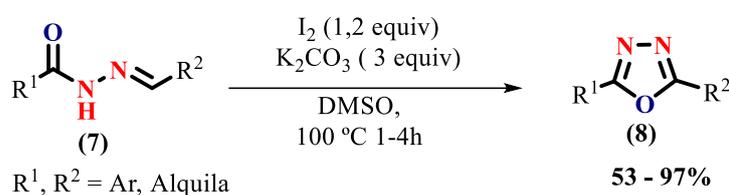
⁵⁶ Yu W., Huang G., Zhang Y., Liu H., Dong L., Yu X., Li Y., Chang J. I₂-Mediated Oxidative C–O Bond Formation for the Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles from Aldehydes and Hydrazides *J. Org. Chem.* 78 (2013) 10337-10343.

⁵⁷ Wang Q., Mgingpatsang K. C., Konstantinidou M., Shishkina Svitlana V., Domling, A. 1,3,4-oxadiazoles by Ugi-Tetrazoles and Huisgen Reaction. *Org. Lett.* 21 (2019) 7320–7323.

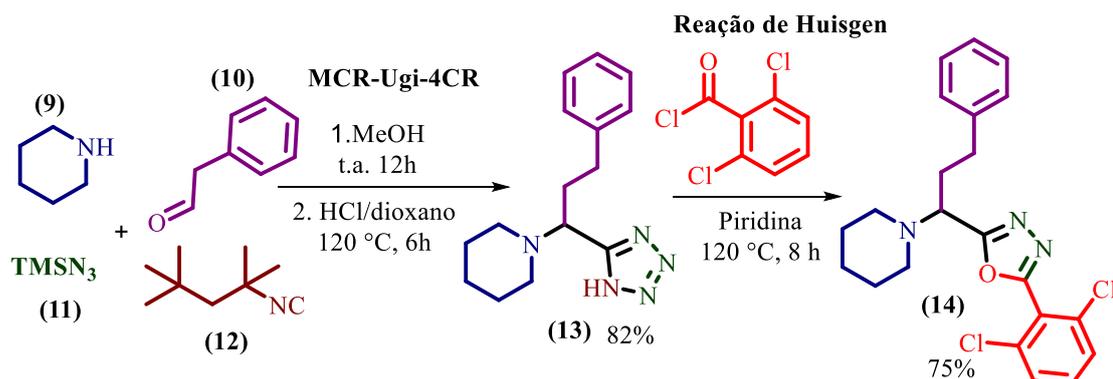
(a) Obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazóis via ciclodesidratação de *N,N*-diacil-hidrazinas (ref. 55)



(b) Obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazóis via ciclização oxidativas de *N*-acil-hidrazonas (Ref. 56)



(c) Obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazóis via Reação de Huisgen (Ref. 57)

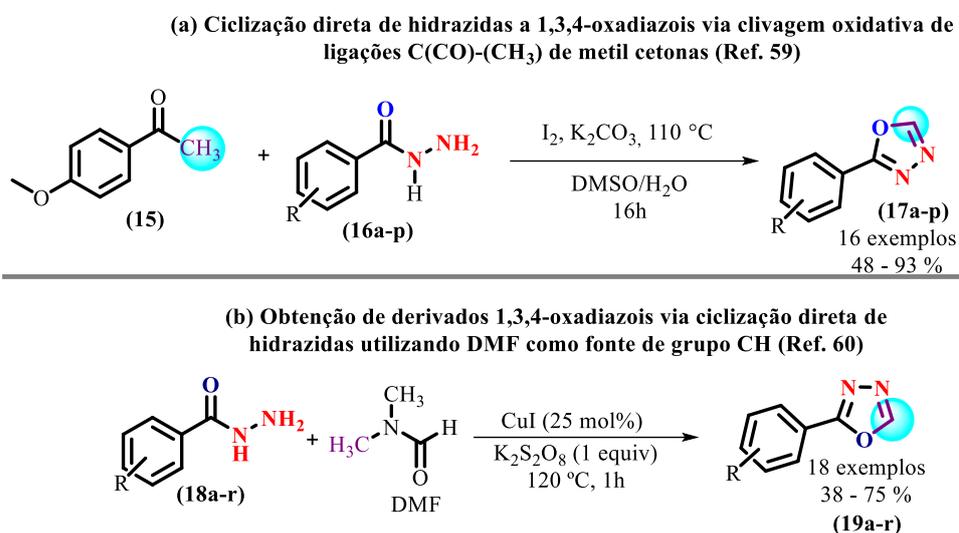


Esquema 21. Síntese de derivados 1,3,4-oxadiazóis dissustituídos.

Em relação às metodologias sintéticas empregadas na síntese de derivados 1,3,4-oxadiazóis monossustituídos, destacam-se o uso de reações de ciclização direta de hidrazidas na presença de alguma fonte de grupo metino (CH). Atualmente abordagens como a clivagem de ligações do tipo C-C, C-H, C(CO)-C e C-N vêm se destacando na área como um método atrativo para obtenção de fontes de grupos CH.⁵⁸

⁵⁸ (a) Fan Y., He Y., Liu X., Hu T., Ma H., Yang X., Luo X., Huang G. Iodine-Mediated Domino Oxidative Cyclization: One-Pot Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles via Oxidative Cleavage of C(sp²)-H or C(sp)-H Bond *J. Org. Chem.* 81 (2016) 6820. (b) Yu W., Huang G., Zhang Y., Liu H., Dong L., Yu X., Li, Y., Chang J. I₂-Mediated Oxidative C-O Bond Formation for the Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles from Aldehydes and Hydrazides *J. Org. Chem.* 78 (2013) 10337.

Em 2015, por exemplo, Wu reportou⁵⁹ a obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos monossustituídos via ciclização direta de hidrazidas, utilizando a clivagem oxidativa da ligação C(CO)-CH₃ de metil-cetonas gerando uma fonte de grupo metino, na presença de iodo molecular como catalisador e uma base (Esquema 22a). Nesta mesma linha de pesquisa, Ji e colaboradores relataram⁶⁰ a utilização de *N,N*-dimetilformamida (DMF) como fonte de grupo CH em reações de ciclização direta de hidrazidas via catálise de Cu, para obtenção de derivados 1,3,4-oxadiazólicos monossustituídos (Esquema 22b).



Esquema 22. Síntese de derivados 1,3,4-oxadiazóis monossustituídos via ciclização direta de hidrazidas.

1.2.2. Metodologias sintéticas aplicadas para obtenção de amino-1,3,4-oxadiazóis

Na literatura é possível encontrar diversos métodos para a construção do núcleo amino-1,3,4-oxadiazol, como por exemplo, a ciclodessulfurização de *N*-aciltiossemicarbazidas, as reações de ciclização de hidrazidas tratadas com reagentes contendo fontes eletrofílicas de grupo CN, dentre outros.⁵⁶

⁵⁹ Gao, Q.; Liu, S.; Wu, X.; Zhang, J.; Wu, A. Direct Annulation of Hydrazides to 1,3,4-Oxadiazoles via Oxidative C(CO)-C(Methyl) Bond Cleavage of Methyl Ketones *Org. Lett.* 17 (2015) 2960.

⁶⁰ Wang S., Wang K., Kong X., Zhang S., Jiang G., Ji F. DMF as Methine Source: Copper-Catalyzed Direct Annulation of Hydrazides to 1,3,4-Oxadiazoles *Adv. Synth. Catal.* 361 (2019) 3986– 3990

Metodologias que utilizam *N*-acil-tiossemicarbazidas como materiais de partida para a construção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis se baseiam em reações de ciclodesulfurização, por intermédio de um agente dessulfurizante. Um exemplo de síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos via ciclodesulfurização foi relatado no trabalho de Guin e colaboradores,⁶¹ em que diferentes *N*-acil-tiossemicarbazidas não simétricas foram tratadas com iodo molecular, carbonato de potássio, em uma mistura de acetato de etila e água como solvente levando à obtenção dos derivados oxadiazólicos de interesse com rendimentos de 65-92%. Neste exemplo o iodo molecular foi o agente dessulfurizante que promoveu a ciclização (Esquema 23a, página 100).

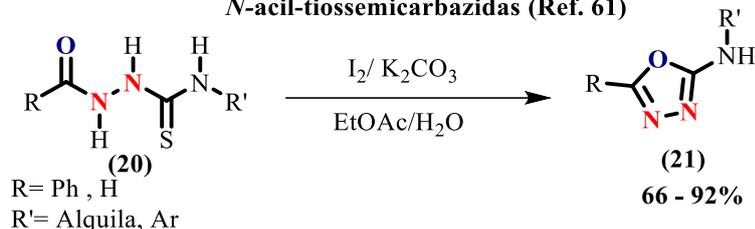
Destacam-se também as hidrazidas como uma classe importante para a construção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis, via utilização de alguma fonte eletrofílica de grupo nitrila, CN. Um exemplo de fonte eletrofílica de CN é o reagente brometo de cianogênio (BrCN), que tem sido largamente empregado na síntese deste núcleo (Esquema 23b, página 100).^{54,62} Uma outra abordagem relatada por Lee e colaboradores para a síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis, via uso de uma fonte de grupo CN, é a reação entre benzo-hidrazidas e o reagente isotiocianato de trimetilsilila (TMSNCS) (**26**), na presença de I₂, KI e hidróxido de sódio (Esquema 23c, página 100),⁶³ o que levou à obtenção de compostos do tipo 2-amino-1,3,4-oxadiazóis com rendimentos entre 79 e 94%. É importante ressaltar que ambos os reagentes utilizados como fonte de grupo CN nos exemplos citados apresentam algumas preocupações e desvantagens em relação ao seu uso por exemplo, são altamente tóxicos, causam danos ao meio ambiente (no caso do BrCN) e são inflamáveis e irritantes (em relação ao TMSNCS).

⁶¹ Guin S., Rout S. K., Ghosh T., Khatun N., Patel B. K. A one pot synthesis of [1,3,4]-oxadiazoles mediated by molecular iodine. *RSC Adv.* 2 (2012) 3180–3183

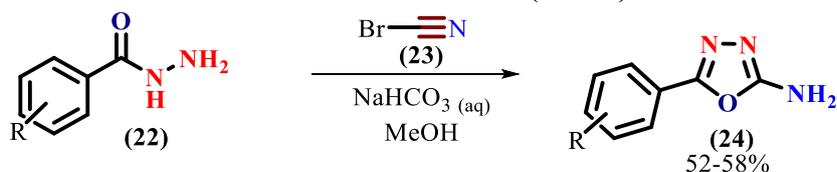
⁶² Patel, N.B.; Patel, J.C. Synthesis and antimicrobial activity of 3-(1,3,4-oxadiazol-2-il)quinazolin-4(3H)-ones. *Sci. Pharm.* 78 (2010) 171–193.

⁶³ Gudán D. R., Mo Cho H., Lee M. E. Mild and convenient one-pot synthesis of 2-amino-1,3,4-oxadiazoles promoted by trimethylsilyl isothiocyanate (TMSNCS). *RSC Advances* 3 (2013) 7684

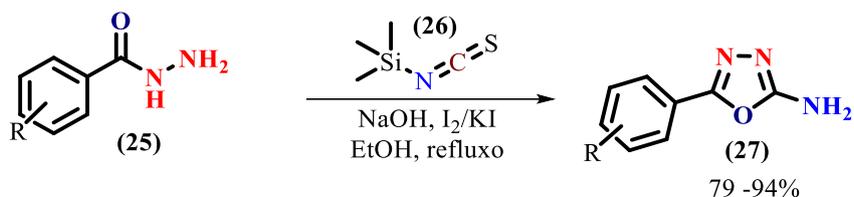
(a) Obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis via ciclodessulfurização de *N*-acil-tiossemicarbazidas (Ref. 61)



(b) Obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis via uso de BrCN como fonte eletrofílica de CN (Ref. 62)



(c) Obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis via uso de TMSNCS como fonte eletrofílica de CN (Ref. 63)



Esquema 23. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis.

1.3. Fontes eletrofílicas de grupo CN

Fontes eletrofílicas do grupo CN são de grande relevância na síntese orgânica, principalmente para inserção de nitrilas em variadas moléculas, sendo que derivados contendo esta função apresentam inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e agroquímica, além de ser um grupo de grande importância sintética, pois pode ser facilmente convertido em outros grupos funcionais como amidas, amins, ácidos carboxílicos, tetrazóis, dentre outros.⁶⁴ Outra aplicação relevante de reagentes que são fontes eletrofílicas de grupo CN é a preparação de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis, como citado no tópico anterior.

⁶⁴ Chaitanya M., Anbarasan P. Recent Development and Application of Cyanamides in Electrophilic Cyanation *Org. Biomol. Chem.* **16** (2018) 7084-7103

Atualmente há variadas fontes eletrofílicas de CN disponíveis. Além do BrCN e TMSNCS, relatados anteriormente, outros exemplos que também se destacam nessa área são os derivados cianoimidazol (**28**) e o 2-ciano-4,5-dicloropiridazin-3(2H)-ona (**29**) (Figura 46), amplamente utilizados em reações de cianação eletrofílica,⁶⁵ porém para a construção desses compostos são utilizados reagentes do tipo XCN (X=Br ou Cl), como o próprio brometo de cianogênio, que são altamente tóxicos. Neste contexto, devido às dificuldades relacionadas ao uso e preparo desses reagentes, muitos pesquisadores estão estudando e desenvolvendo outras fontes eletrofílicas de nitrilas mais eficientes e com menor toxicidade e um exemplo que vem se destacando nos últimos anos é o uso do derivado *N*-ciano-*N*-fenil-*p*-toluenossulfonamida (NCTS) (**30**).

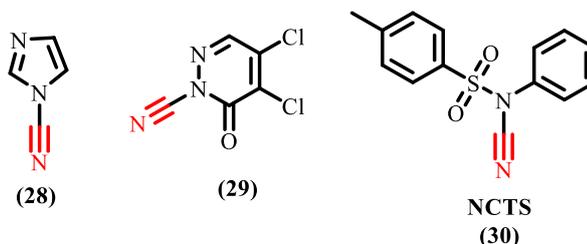
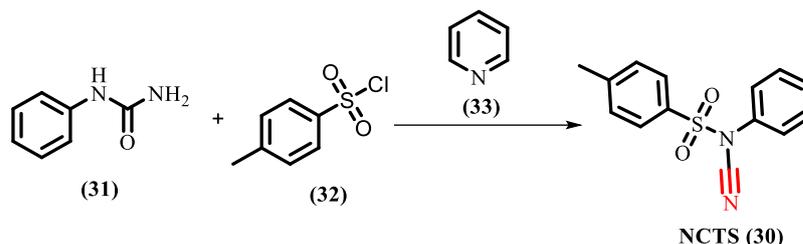


Figura 46. Fontes eletrofílicas de nitrila.

NCTS é um sólido branco estável e não tóxico de fácil preparação. Foi sintetizado pela primeira vez por Kurzer em 1949, via reação da fenilureia com cloreto de *para*-toluenossulfonila na presença de piridina como solvente (Esquema 24, página 102).⁶⁶ É disponível comercialmente, pode ser sintetizado em larga escala pelo método desenvolvido por Kurzer.⁶⁶ Diante de tais características, o NCTS vem sendo explorado como uma fonte eletrofílica de nitrila em diversas metodologias sintéticas.

⁶⁵ (a) Y. Wu, Limburg D. C., Wilkinson D. E., Hamilton G. S. 1-Cyanoimidazole as a Mild and Efficient Electrophilic Cyanating Agent *Org. Lett.* 2 (**2000**) 795-797 (b) J.-J. Kim, D.-H. Kweon, S.-D. Cho, H.-K. Kim, E.-Y. Jung, S.-G. Lee, J. R. Falck, Y.-J. Yoon, *Tetrahedron* 61 (**2005**) 5889

⁶⁶Kurzer, F. Cyanamides. Part I. The synthesis of substituted arylsulphonylcyanamides *J. Chem. Soc.* **1949**, 1034 - 1038.



Esquema 24. Síntese do NCTS via método de Kurzer.

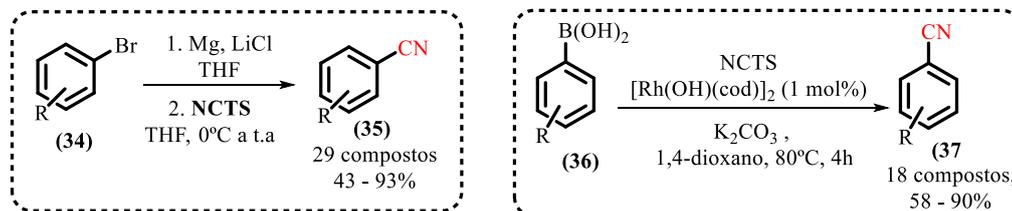
Neste contexto destaca-se, por exemplo, o uso do NCTS como fonte eletrofílica de nitrila em reações de cianação de derivados aromáticos via catálise metálica, a partir de brometos de arilas e ácidos arilborônicos⁶⁷ (Esquema 25a, página 103), nos trabalhos de Beller e colaboradores. O NCTS foi também empregado em reação de ativação de ligação C-H via catálise metálica de Ru e Rh para inserção do grupo nitrila em diferentes derivados. Como exemplo, Fu e colaboradores desenvolveram um método para a síntese de nitrilas aromáticas via ativação de ligação C-H catalisada por Rh, utilizando o NCTS como a fonte do grupo CN (Esquema 25b, página 103).⁶⁸ Nesta mesma linha de pesquisa, nota-se a metodologia reportada por Liu e Ackermann, relatando a cianação de derivados aromáticos e heterociclos aromáticos via catálise de Ru. Neste trabalho os autores empregaram amidas como grupo diretor para ativação da ligação C-H e inserção da nitrila no anel aromático, proveniente do reagente NCTS (Esquema 25c, página 103).⁶⁹

⁶⁷ (a) Anbarasan P., Neumann H., Beller M. A Novel and Convenient Synthesis of Benzonitriles: Electrophilic Cyanation of Aryl and Heteroaryl Bromides *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 4217–4222. (b) Anbarasan P., Neumann H., Beller M. A General Rhodium-Catalyzed Cyanation of Aryl and Alkenyl Boronic Acids *Angew. Chem.* 50 (2011) 519–522

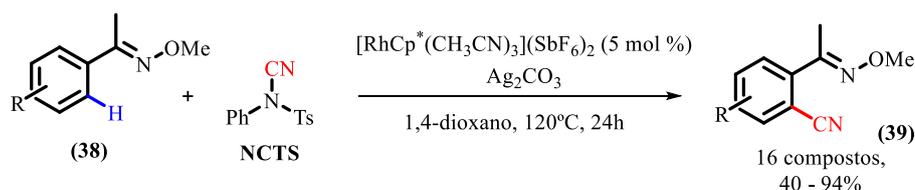
⁶⁸ Gong T.-J., Xiao B., Cheng W.-M., Su W., Xu J., Liu Z.-J., Liu L., Fu Y. Rhodium-Catalyzed Directed C–H Cyanation of Arenes with N-Cyano-N-phenyl-p-toluenesulfonamide *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 10630

⁶⁹ Liu W., Ackermann L. Versatile ruthenium(II)-catalyzed C–H cyanations of benzamides *Chem. Commun.* 50 (2014) 1878

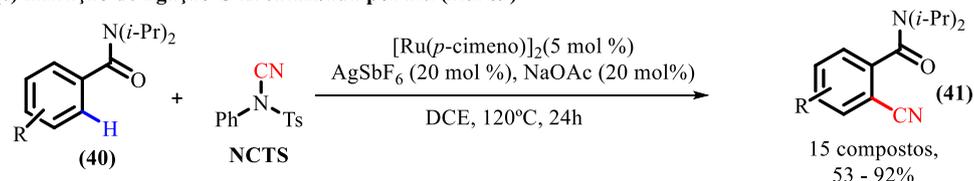
(a) Cianação de derivados aromáticos (Ref 67)



(b) Ativação de ligação C-H catalisada por Rh (Ref 68)



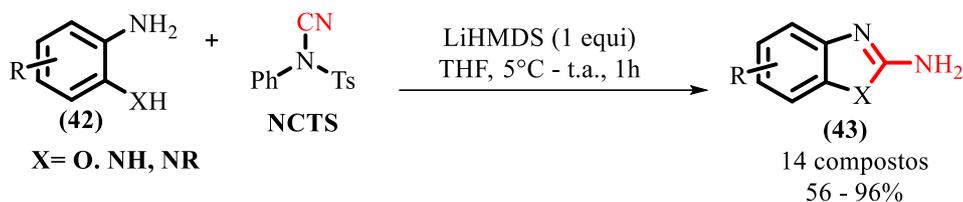
(c) Ativação de ligação C-H catalisada por Ru (Ref 69)



Esquema 25. Uso do NCTS como fonte eletrofílica de CN para síntese de nitrilas aromáticas.

Uma outra abordagem para o uso do NCTS como fonte de nitrila é a construção de heterociclos do tipo benzoxazóis e benzoimidazóis, relatado por Kasthuri e colaboradores (Esquema 26, página 104).⁷⁰ Neste trabalho os autores sintetizaram derivados amino-benzoxazóis e amino-benzoimidazóis a partir de reações entre substratos do tipo 2-aminofenol ou benzeno-1,2-diamina e NCTS na presença da base bis(trimetilsilil)amido de lítio (LiHMDS), levando à formação dos heterociclos de interesse com rendimentos variando de 52 a 96%.

⁷⁰ Kasthuri M., Babu H. S., Kumar K. S., Sudhakar Ch., Kumar P. V. N. A Facile Synthesis of 2-Aminobenzoxazoles and 2-Aminobenzimidazoles Using *N*-Cyano-*N*-phenyl-*p* toluenesulfonamide (NCTS) as an Efficient Electrophilic Cyanating Agent *Synlett* 26 (2015) 897–900



Esquema 26. Uso do NCTS para construção de derivados amino-benzoxazóis e amino-benzoimidazóis.

Considerando a importância de derivados 1,3,4-oxadiazóis tanto na área biológica como em aplicações tecnológicas, e visto que as metodologias sintéticas descritas na literatura para construção desse núcleo, em destaque os derivados do tipo 2-amino-1,3,4-oxadiazóis, apresentam algumas desvantagens, principalmente em relação ao uso de reagentes tóxicos e danosos ao ambiente, nota-se a necessidade de desenvolvimento de novos métodos de síntese para este núcleo, via o uso de reagentes estáveis, menos tóxicos e de fácil manuseio. Neste contexto, o foco deste trabalho é desenvolver uma nova metodologia sintética para a obtenção de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazóis, via uso de NCTS como fonte eletrofílica de nitrila. Deve-se destacar que este trabalho é, ao nosso conhecimento, o primeiro a relatar o emprego do NCTS como fonte de nitrila para a construção do núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol.

2. Objetivos

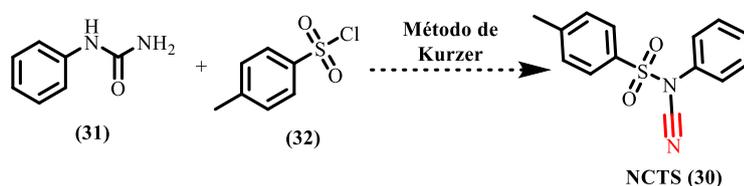
2.1. Objetivo geral

Esta parte do trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma nova metodologia eficaz para a construção do núcleo amino-1,3,4-oxadiazol, a partir de reagentes de fácil acesso e baixa toxicidade, como hidrazidas e o NCTS.

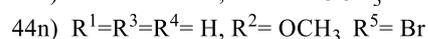
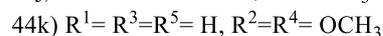
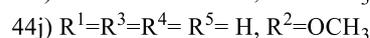
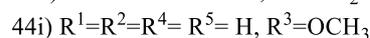
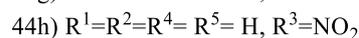
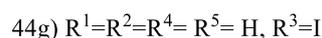
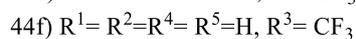
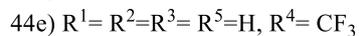
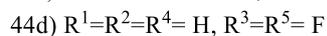
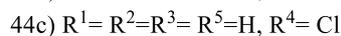
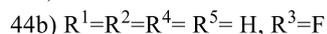
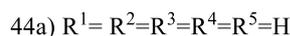
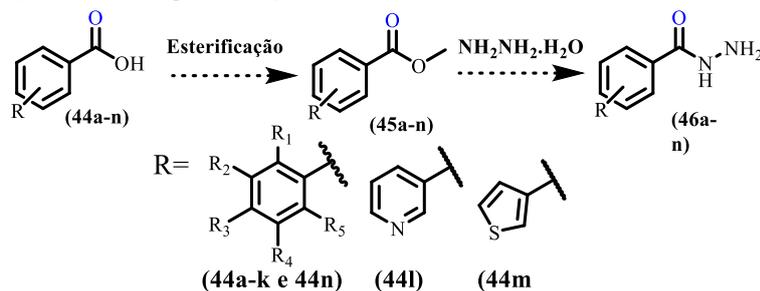
2.2. Objetivos específicos

Síntese dos substratos, NCTS e benzo-hidrazidas **46a-n**, empregados no desenvolvimento e aplicação do novo método. O NCTS será preparado utilizando o método de Kurzer, a partir da fenilureia (**31**) e do cloreto de *para*-toluenossulfonila (**32**) (Esquema 27a). As benzo-hidrazidas **46a-n** serão obtidas a partir de derivados de ácido carboxílicos aromáticos **44a-n** em duas etapas: reação de esterificação seguida do tratamento com hidrazina hidratada (Esquema 27b).

(a) Rota sintética para obtenção do NCTS

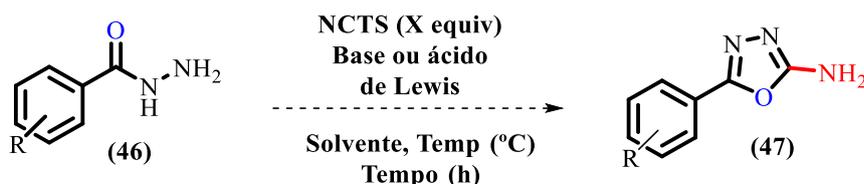


(b) Rota sintética para obtenção das benzo-hidrazidas



Esquema 27. Rota sintética para obtenção dos substratos NCTS e benzo-hidrazidas.

De posse dos substratos, será realizado um estudo de otimização para construção do núcleo amino-1,3,4-oxadiazol, via uso do NCTS como uma fonte eletrofílica de nitrila. Neste estudo serão analisados diferentes parâmetros, como o efeito da temperatura, solvente, tempo e o emprego de uma base ou ácido de Lewis para catalisar a reação (Esquema 28).



Esquema 28. Estudo de otimização do método para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos utilizando NCTS como fonte de nitrila.

Com o método otimizado, benzo-hidrazidas contendo grupos doadores e retiradores de elétrons ligados ao anel aromático serão submetidas à nova condição reacional para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis, a fim de avaliar o escopo dessa nova metodologia. O novo método também será aplicado para construção de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos com atividade biológica.

3. Resultados e Discussões

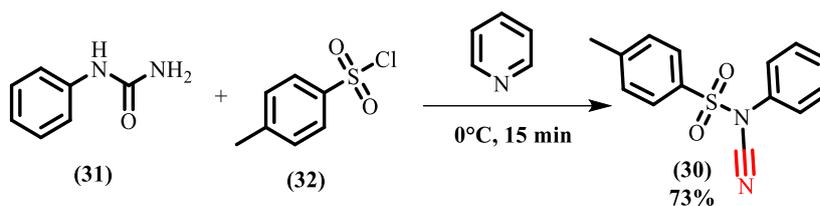
Os resultados obtidos referentes ao segundo capítulo deste trabalho serão apresentados e discutidos em dois tópicos. Na primeira parte serão apresentados e discutidos os resultados referentes à síntese dos substratos NCTS, benzo-hidrazidas e seus derivados. No segundo tópico serão apresentados e discutidos os resultados referentes ao desenvolvimento e estudo de otimização do novo método para construção do núcleo amino-1,3,4-oxadiazol. Além disso, serão abordadas as aplicações desse novo método usando derivados benzo-hidrazidas contendo diferentes grupos no anel aromático, para avaliar a influência desses na eficiência da metodologia desenvolvida, e também a aplicação dessa metodologia para a síntese de derivados com atividade biológica.

3.1. Síntese dos substratos: NCTS (30) e hidrazidas

Os substratos utilizados neste trabalho foram sintetizados a partir de derivados disponíveis comercialmente, via metodologia sintética de fácil execução, fornecendo rendimentos satisfatórios. Ressalta-se também que o NCTS (30) e a benzo-hidrazida (46a) são disponíveis comercialmente, porém, devido à maior praticidade (custo e tempo para acessar os reagentes), optou-se pela síntese destes. Todos os substratos foram caracterizados pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , e os espectros encontram-se no ANEXO II do capítulo II (Páginas 236-250).

3.1.1 Síntese do NCTS (30)

O NCTS, como relatado anteriormente, é um sólido branco e estável, facilmente sintetizado via o método de Kurzer,⁶⁶ em uma única etapa de síntese. Neste método, a fenilureia (31) foi tratada com cloreto de *para*-toluenossulfonila (32) em excesso, na presença de piridina como solvente, a 0°C, por um período de 15 minutos, levando à formação de um sólido branco, caracterizado como o NCTS com rendimento de 73%, sem necessidade de purificação em coluna (Esquema 29, página 108).

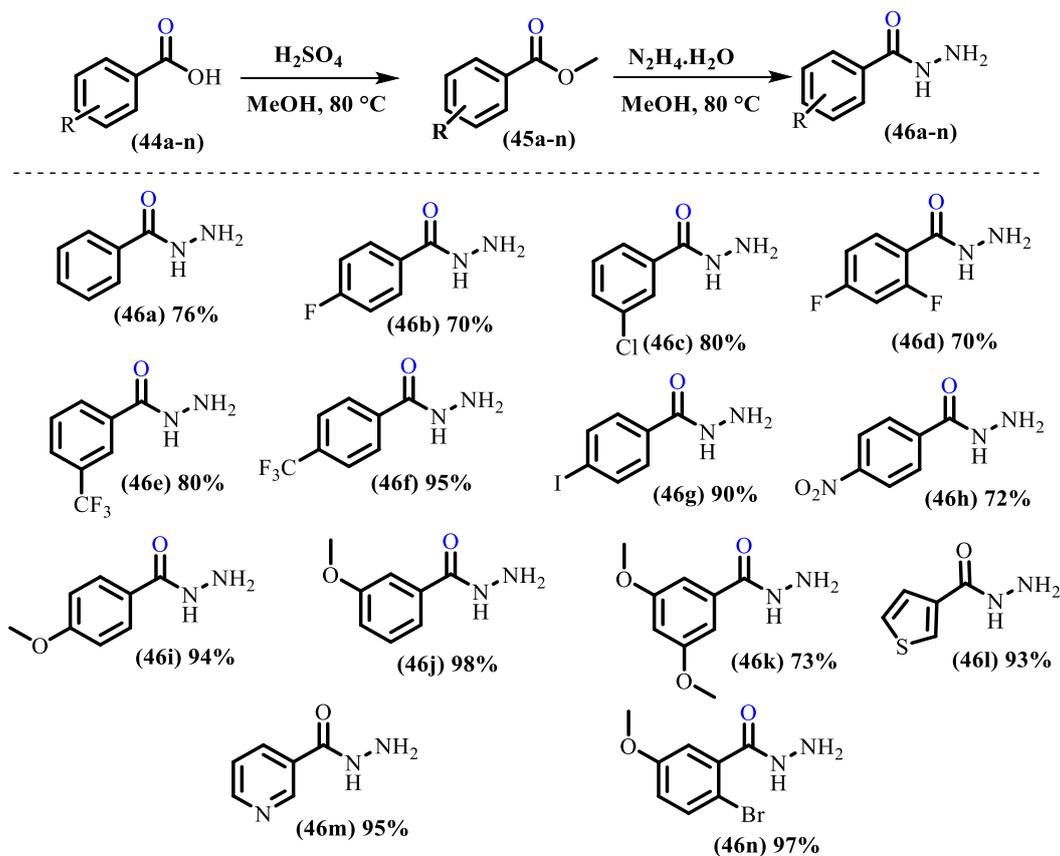


Esquema 29: Síntese do NCTS via método de Kurzer.

3.1.2. Síntese das hidrazidas 46a-n

As benzo-hidrazidas utilizadas neste trabalho foram sintetizadas em duas etapas, como representado no Esquema 30 (página 109). Na primeira etapa os ácidos carboxílicos comerciais **44a-n** foram convertidos em seus derivados ésteres metílicos **45a-n**, via esterificação de Fischer, catalisada pelo ácido sulfúrico (H₂SO₄). Em seguida, os ésteres **45a-n**, sem purificação prévia, foram reagidos com hidrazina hidratada (NH₂NH₂.H₂O), em metanol sob refluxo, levando à formação das hidrazidas **46 a-n**, com rendimentos entre 70 e 98%.⁷¹

⁷¹ Jorge S. D., Palace-Berl F., Masunari A., Cechinel C. A., Ishii M, Pasqualoto K. F. M., Tavares L. C. Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 5031–5038.



3.2. Otimização e aplicação do novo método

Como citado anteriormente, inspirados nos trabalhos que relatam o emprego do NCTS como uma fonte eletrofílica de nitrila, para construção de heterocíclis como amino-benzoxazóis e amino-benzoimidazóis,⁷⁰ e para inserção do grupo nitrila em diferentes substratos aromáticos via ativação da ligação C-H,⁶⁷⁻⁶⁹ avaliou-se a possibilidade do uso do NCTS para formação de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir das hidrazidas obtidas.

Inicialmente foi avaliada a viabilidade da proposta. Para isso, a benzo-hidrazida **46a** foi reagida com NCTS na presença do trietilamina como base, em metanol a 70 °C (tubo selado), levando à formação do derivado amino-1,3,4-oxadiazólico com apenas 13% de rendimento, após 72 h de reação (Tabela 5, entrada 1, página 111). A escolha do uso de uma base e um solvente prótico como o metanol, foi baseada em metodologias relatadas na literatura para a síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos.^{54,62} Provada a formação do produto desejado, mesmo com baixo rendimento, foi realizado o estudo de otimização do



UFMG

método, sendo necessário fixar alguns parâmetros, como o tipo de substrato empregado, por exemplo. Optou-se pelo uso da benzo-hidrazida **46a**, devido principalmente à facilidade de sua síntese e por esse composto não conter nenhum grupo no anel aromático. Foi fixado o uso de uma quantidade de 0,5 mmol deste substrato ao longo de todo processo de otimização e, deve-se ressaltar também, todos os experimentos foram realizados em um tubo selado, para alcançar temperaturas acima da temperatura de ebulição dos solventes empregados neste estudo.

Uma segunda tentativa envolveu testar a reação utilizando uma base oxigenada, o acetato de sódio, o que levou à formação do produto com 17% de rendimento (Tabela 5, entrada 2, página 111). Posteriormente, avaliou-se a quantidade da base e do NCTS, bem como o efeito do solvente na reação (Tabela 5, entradas 3-7, página 111). Foram testados diferentes solventes neste primeiro momento, como metanol, isopropanol, THF, DMSO e DCM. DMSO se mostrou ineficiente, não havendo a formação do produto de interesse (Tabela 5, entrada 6, página 111). Entre os solventes testados inicialmente, DCM foi o mais eficiente, levando à formação do produto com 30% de rendimento (Tabela 5, entrada 7, página 111).

Em seguida, outras bases foram empregadas, como NaHCO₃, KOAc e NaOPiv (Tabela 5, entradas 8-10, página 111), porém os resultados obtidos mostraram que o acetato de sódio foi o mais eficiente entre as bases testadas. Com a elevação da temperatura de 100 para 120 °C, observou-se um pequeno aumento no rendimento para 33% (Tabela 5, entrada 11, página 111). O tempo de reação foi um parâmetro também avaliado nesta primeira fase do estudo, alterando o tempo de 55h para 24 horas de reação, sob as mesmas condições reacionais, e obteve-se o produto com apenas 5% de rendimento (Tabela 5, entrada 12, página 111).

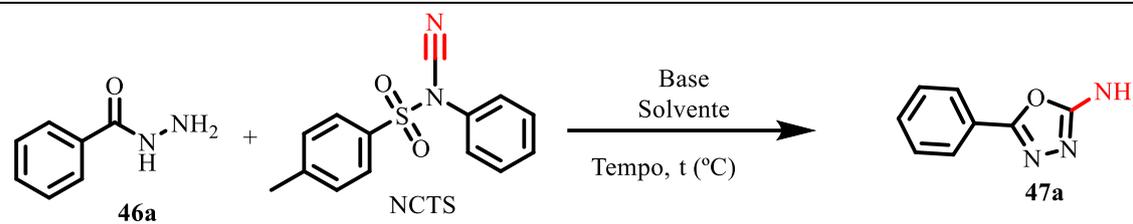
Após realizar experimentos com bases relativamente mais fracas, e visto que o rendimento alcançado pelo uso de NaOAc foi pouco satisfatório, um estudo empregando bases mais fortes foi considerado, como NaOMe, NaOtBu, K₂CO₃ e Cs₂CO₃, todavia nenhum das bases testadas se mostrou efetiva para fornecer melhores rendimentos (Tabela 5, entradas 13-16, página 111).

Nesta primeira parte de um extensivo estudo de otimização, via uso de uma base, observou-se que a melhor condição foi aquela que usou acetato de sódio (1,5 equiv) como base, 2 equivalentes de NCTS, DCM como solvente, temperatura de 120 °C em um tempo reacional de 55h, levando à formação do derivado amino-1,3,4-oxadiazol com 33%.

Deve-se ressaltar que nos experimentos 1 a 12 apresentados na Tabela 5, o material de partida **46a** era recuperado após o tempo reacional descrito. Em relação aos experimentos

13 e 14, além do produto desejado, observou-se a formação de diversos outros subprodutos de difícil separação.

Tabela 5. Estudo de otimização da reação para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazol, a partir da benzo-hidrazida **46a**, e NCTS, via uso de base*



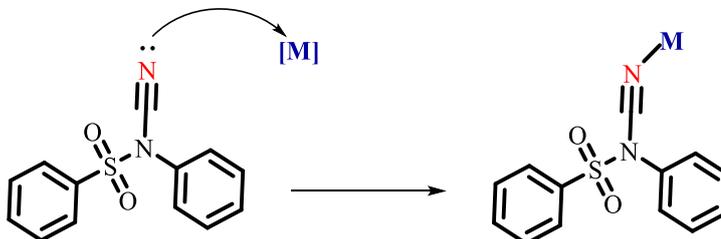
Exp.	NCTS (equiv.)	Base	Solvente	T (h)	T (°C)	47a (%) ^[a]
1	1,5	Et ₃ N (1,1 equiv)	MeOH	72h	70	13%
2	1,5	NaOAc (1,1 equiv)	MeOH	55h	100	17%
3	2	NaOAc (2 equiv)	MeOH	55h	100	18%
4	2	NaOAc (2 equiv)	Isopropanol	55h	100	28%
5	2	NaOAc (2 equiv)	THF	55h	100	24%
6	2	NaOAc (2 equiv)	DMSO	48h	100	–
7	2	NaOAc (2 equiv)	DCM	55h	100	30%
8	2	NaHCO ₃ (2 equiv)	DCM	55h	100	26%
9	2	KOAc (2 equiv)	DCM	55h	100	26%
10	2	NaOPiv (2 equiv)	DCM	55h	100	12%
11	2	NaOAc (1,5 equiv)	DCM	55h	120	33%
12	2	NaOAc (1,5 equiv)	DCM	24h	120	5%
13	2	NaOMe (1,5 equiv)	DCM	55h	120	20%
14	2	NaOtBu (1,5 equiv)	DCM	55h	120	21%
15	2	K ₂ CO ₃ (1,5 equiv)	DCM	24h	120	Mistura complexa
16	2	Cs ₂ CO ₃ (1,5 equiv)	DCM	24h	120	Mistura complexa

[a] Produto isolado após purificação *todas as reações realizadas em tubo selado. 4mL de solvente utilizado

Visto que o uso de base como uma estratégia para essa nova metodologia não se mostrou muito eficiente, sendo necessário um tempo de reação longo para obtenção do derivado de interesse com rendimentos relativamente baixos, uma nova abordagem foi considerada, aumentar a eletrofilia do carbono da nitrila presente na estrutura do NCTS. Para isso foi realizado um novo estudo de otimização empregando ácidos de Bronsted-Lowry e/ou ácidos de Lewis como catalisadores, a fim de acelerar e aumentar os rendimentos da reação (Tabela 6, página 115).

Inicialmente utilizou-se o ácido acético e ácido sulfúrico como catalisadores ácidos e, após um período de 24 horas de reação, verificou-se por CCD consumo total do material de partida, a benzo-hidrazida **46a**. No entanto, os resultados obtidos nestes experimentos foram pouco promissores, levando a formação do produto desejado com baixo rendimento, e subprodutos indesejáveis (Tabela 6, entradas 1 e 2, página 115).

Diante da baixa eficiência em utilizar ácidos de Bronsted-Lowry, optou-se então pelo emprego de catalisadores metálicos que possam atuar como um ácido de Lewis, capazes de complexar com o nitrogênio da nitrila e ativar o carbono para reações com nucleófilos (Esquema 31).



Esquema 31. Uso de catalisador metálico como ácido de Lewis para aumentar a reatividade do NCTS.

Inicialmente, catalisadores à base de cobre (Cu) e zinco (Zn) foram testados. O experimento realizado com o CuI forneceu o produto com rendimento de 12% (Tabela 6, entrada 3, página 115). Então se avaliou a possibilidade do uso do cloreto de zinco, mas ao reagir diretamente a benzo-hidrazida **46a** e o NCTS com o ZnCl₂ (1,2 equivalente), observou-se a formação de uma mistura complexa (Tabela 6, entrada 4, página 115). Como hidrazidas também tem capacidade de complexar com catalisadores de zinco⁷², fornecendo

⁷² (a) Yunusova S. N., Bolotin D. S., Suslonov, V. V., Vovk M. A., Tolstoy P. M., Kukushkin V. Y., 3-Dialkylamino-1,2,4-triazoles via ZnII-Catalyzed Acyl Hydrazide– Dialkylcyanamide Coupling *ACS Omega*. 3 (2018) 7224–7234. (b) Koksharova T. V., Mandzii T. V., Stoyanova I. V., Polishchuk A. A. Coordination



UFMG

subprodutos indesejáveis e diminuindo a eficácia do método, decidiu-se então tratar inicialmente o NCTS com o catalisador por um período de 45 minutos, e posterior a esse tempo adicionar a benzo-hidrazida ao meio reacional. O objetivo nessa mudança de procedimento foi garantir que todo $ZnCl_2$ fosse complexado com o NCTS, tornando-o mais reativo, impedindo que parte desse catalisador complexasse com a hidrazida e diminuísse a eficácia da reação (Tabela 6, entrada 5, página 115).

A escolha do cloreto de zinco para atuar como catalisador nessa reação foi devido ao seu baixo custo e toxicidade, à sua disponibilidade e pelo fato de derivados cianamidas apresentarem afinidade por complexos de $Zn(II)$ ⁷³ já citadas na literatura. Por exemplo, Kukushkin e colaboradores^{73b} relataram a síntese e estudos teóricos de complexos do tipo $[ZnX_2(NCNR_2)_2]$ contendo ligantes do tipo cianamidas. Além da síntese os autores estudaram reações de hidratação de cianamidas complexadas ao Zn^{II} , e os resultados mostraram que as cianamidas complexadas ao centro metálico foram mais reativas frente a reações de hidrólise.

Visto que complexos de Zn apresentam-se como boa estratégia para aumentar a reatividade de cianamidas frente a nucleófilos, nos demais experimentos realizados neste estudo de otimização, via catalise ácida, foram empregados catalisadores de Zn, como por exemplo o $ZnCl_2$, a fim de obter uma condição reacional mais eficiente para obtenção do derivado amino-1,3,4-oxadiazol **47a**. Assim, reagindo 1,5 equivalentes do NCTS com 0,1 equiv de $ZnCl_2$, por 45 min, seguido da adição da benzo-hidrazida **46a**, utilizando DCM como solvente e 120 °C por 24 h, observou-se a formação do derivado amino-1,3,4-oxadiazol com 31% de rendimento (Tabela 6, entrada 5, página 115). Diante do resultado observado, aumentou-se a quantidade de catalisador para 0,25 equivalente, o que elevou rendimento da reação para 57% (Tabela 6, entrada 6, página 115). Com esse resultado promissor em mãos, decidiu-se avaliar a influência da natureza do solvente no método. Os solventes, clorofórmio, 1,4-dioxano, tolueno e misturas de solventes como 1,4-

Compounds of Cobalt(II), Nickel(II), and Zinc(II) Valerates and Benzoates with Benzohydrazide *Russ. J. Gen. Chem.* 86(10) (2016) 2361–2366

⁷³ (a) Jochims J. C., Abu-El-Halawa R., Zsolnai L., and Huttner G., Metal Complexes of Cyanamides and their Alkylation to Cyanamidium Salts. A General Synthesis of Highly Substituted Ureas, Isoureas, and Guanidines *Chem. Ber.* 117 (1984) 1161–1177 (b) Smirnov A. S., Butukhanova E. S., Bokach, N. A., Starova G. L., Gurzhiy V. V., Kuznetsov M. L., Kukushkin V. Yu. Novel (cyanamide)ZnII complexes and zinc(II)- mediated hydration of the cyanamide ligands *Dalton Trans.* 43 (2014) 15798 -15811



UFMG

dioxano/DCM e tolueno/DCM, foram testados (Tabela 6, entradas 7, 9-12, página 115), e dentre os solventes estudados, o DCM apresentou melhor resultado (57%, Tabela 6, entrada 6, página 115), seguido da mistura DCM/dioxano com 54% de rendimento (Tabela 6, entrada 10, página 115).

Os parâmetros como a quantidade de NCTS e do catalisador de Zn também foram avaliados: ao aumentar a quantidade de NCTS para 2 equivalentes, mantendo 0,25 de $ZnCl_2$, o novo rendimento alcançado foi 60% (Tabela 6, entrada 13, página 115), e no experimento empregando o dobro da quantidade de catalisador, 0,5 equivalente, observou-se uma queda significativa no rendimento para 25% (Tabela 6, entrada 14, página 115).

Diante dos resultados obtidos até o momento, fixou-se a quantidade de NCTS e de $ZnCl_2$ em 2 e 0,25 equivalentes respectivamente, DCM como solvente, e os parâmetros como temperatura e tempo reacional foram estudados. Foram realizados experimentos em diferentes temperaturas, como 140, 120, 100 e 80 ° C (Tabela 6, entradas 13, 15-17, página 115). Os resultados mostraram que 120 ° C foi a melhor temperatura, fornecendo o produto com rendimento de 60%. Tempos reacionais de 30, 24, 16, e 8 horas foram testados, todavia 24 horas de reação levaram a melhores resultados.

Outro parâmetro também estudado foi o tempo de reação entre o NCTS e o catalisador de zinco, antes da adição do substrato **46a**. Inicialmente esse tempo era de 45 minutos, mas ao realizar um novo experimento, deixando o NCTS e o $ZnCl_2$ reagirem por um período mais longo de 2h, seguido da adição da benzo-hidrazida, não observou-se ganhos nem perdas no rendimento da reação, obtendo-se ao final o produto com 60% (Tabela 6, entrada 21, página 115). O experimento com ausência do catalisador de zinco foi realizado, levando à formação do produto de interesse com 23% de rendimento (Tabela 6, entrada 22, página 115). Esse resultado mostrou que o $ZnCl_2$ age realmente como um catalisador nessa reação, aumentando a eletrofilicidade e reatividade do NCTS.

Como pode-se verificar pelos resultados obtidos referentes ao estudo de otimização da reação entre a benzo-hidrazida **46a** e NCTS, via catalise ácida, para formação do derivado amino-1,3,4-oxadiazol **47a**, a melhor condição reacional encontrada foi a descrita no experimento 13 da Tabela 6, empregando-se de 2 equiv. de NCTS, 0,25 equiv. do catalisador $ZnCl_2$, DCM como solvente a 120 ° C por um período de 24 h, levando ao derivado oxadiazólico com 60% rendimento (Tabela 6, entrada 13, página 115).

Tabela 6. Estudo de otimização da reação para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos, a partir da benzo-hidrazida **46a**, e NCTS, via uso de ácido de Lewis*

Exper	NCTS (equiv.)	Ácido de Lewis	Solvente	T(h)	T (°C)	47a (%) ^[a]
1	2	AcOH (0,1equiv)	Dioxano/DCM	24h	120	21%
2	2	H ₂ SO ₄ (0,1equiv)	Dioxano/DCM	24h	120	[d]
3	1,5	CuI(0,1 equiv)	DCM	24h	120	12%
4	1,5	ZnCl ₂ (0,1 equiv)	DCM	24h	120	[d]
5 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,1 equiv)	DCM	24h	120	31%
6 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	120	57%
7 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	CHCl ₃	24h	120	36%
8 ^[b]	1,5	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (0,25 equiv)	DCM	24h	120	[d]
9 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	Dioxano	24h	120	42%
10 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM/ Dioxano	24h	120	54%
11 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	Tolueno	24h	120	26%
12 ^[b]	1,5	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	Tolueno/DCM	24h	120	30%
13 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	120	60%
14 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,5 equiv)	DCM	24h	120	25%
15 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	100	19%
16 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	80	traços
17 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	140	51%
18 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	8h	120	20%



UFMG

19 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	16h	120	54%
20 ^[b]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	30h	120	30%
22 ^[c]	2	ZnCl ₂ (0,25 equiv)	DCM	24h	120	60%
21 ^[b]	2	-	DCM	24h	120	23%

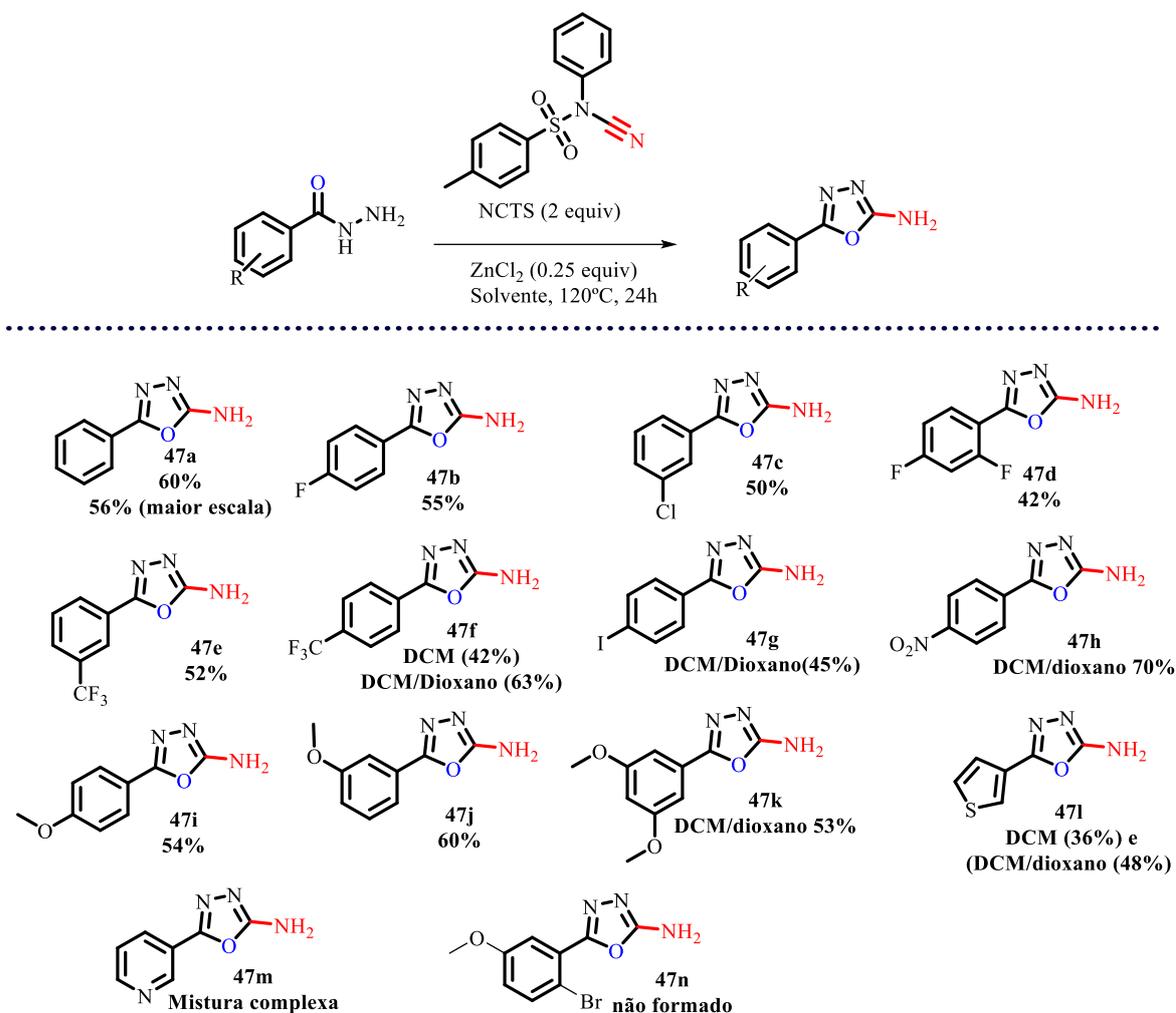
[a] Produto isolado após purificação. [b] NCTS e o sal de Zn foram adicionados, o sistema ficou sob aquecimento por 45 min, em seguida adicionou-se hidrazida **46a**. [c] NCTS e o sal de Zn foram adicionados, o sistema ficou sob aquecimento por 2h, em seguida adicionou-se hidrazida **46a**. [d] mistura complexa. * todas as reações realizadas em tubo selado

Com a condição reacional otimizada, aplicou-se então este novo método para a síntese de diferentes derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir das benzo-hidrazidas **46a-n**, previamente sintetizadas (Esquema 30, página 109). Foram obtidos 12 compostos **47a-l**, com rendimentos variando de **36 – 70%** sendo que tanto benzo-hidrazidas contendo grupos retiradores e doadores de elétrons no anel aromático foram compatíveis com o novo método estabelecido (Esquema 32, página 117).

Devido às diferenças de solubilidade dos substratos benzo-hidrazidas (alguns não sendo totalmente solúveis em DCM), as reações para obtenção dos derivados **47f**, **47g**, **47h**, **47k**, e **47l** foram realizadas em uma mistura de solventes DCM/dioxano. Para os derivados **47f** e **47l** testou-se o método original, utilizando apenas DCM como solvente, e observou-se rendimentos significativamente menores quando comparado com as reações realizadas com a mistura de solvente.

Não foi possível observar a formação dos produtos **47m-n** após aplicação do novo método para a síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos a partir das benzo-hidrazidas **46m-n**, observando-se a obtenção de uma mistura complexa para o derivado **47m**, e a não formação do produto ou subprodutos para o derivado **47n**, recuperando o material de partida ao final da reação. Possivelmente a formação de uma mistura complexa na reação que utilizou-se a hidrazida **46m**, pode ser explicada pelo fato de que o nitrogênio do anel piridinico teria também afinidade pelo catalisador de Zn, complexando a algum intermediário formado durante a reação, levando a formação de outros subprodutos. Em relação a não formação do produto **47n**, pode ser considerado possivelmente um efeito de impedimento estérico, devido a presença do átomo volumoso de bromo na posição *orto* à carbonila da hidrazida, presente na estrutura do material de partida.

Experimento em escala maior empregando o método desenvolvido também foi realizado, utilizando-se 3 mmol da benzo-hidrazida **46a** levando à formação do derivado **47a** com 56% de rendimento.



Esquema 32. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos **47a-n** a partir de benzo-hidrazidas e NCTS como fonte eletrofílica de nitrila.

Os derivados **47a-l** foram caracterizados por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C e espectrometria de massas de alta resolução, os dados foram comparados com a literatura⁷⁴ e os espectros encontram-se no Anexo II e III do capítulo II

⁷⁴ (a) Pretsch, E.; Buhlmann, P.; Badertscher, M. Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data Fourth, Springer, USA, 2009. (b) Shinde, V. N., Ugarkar B. G., Ghorpade S. R. A convenient synthesis of 5-substituted 2-amino-1,3,4-oxadiazoles from corresponding acylthiosemicarbazides using iodine and Oxone® *J. Chem. Res.* (2013) 53-54. (c) Borsoi A. F., Coldeira M. E., Pissinate K., Macchi F. S., Basso L. A., Santos D. S., Machado P. Ultrasound-Assisted Synthesis of 2-Amino-1,3,4-Oxadiazoles via NBS-

(Páginas 251- 271). Para efeito de ilustração, será discutida a caracterização e elucidação estrutural do derivado **47i**.

No espectro de RMN de ^1H do derivado **47i** (Figura 47), observa-se o simpleto em δ 7,13 ppm integrado para 2H, referente aos hidrogênios do grupo NH_2 , o que corroboram com a formação do produto desejado. Nota-se também os dois dupletos em δ 7,72 ppm e δ 7,07 ppm com constantes de acoplamento de 8,9 Hz, atribuídos aos hidrogênios $\text{H}2'$ e $\text{H}3'$ respectivamente. O $\text{H}3'$ é o hidrogênio mais blindado, conseqüentemente apresenta o sinal com menor valor de deslocamento químico, devido ao fato de estar ligado ao carbono em posição orto ao grupo metoxila, doador de densidade eletrônica por ressonância. Observa-se também um simpleto em 3,81 ppm referentes aos hidrogênios metoxílicos.

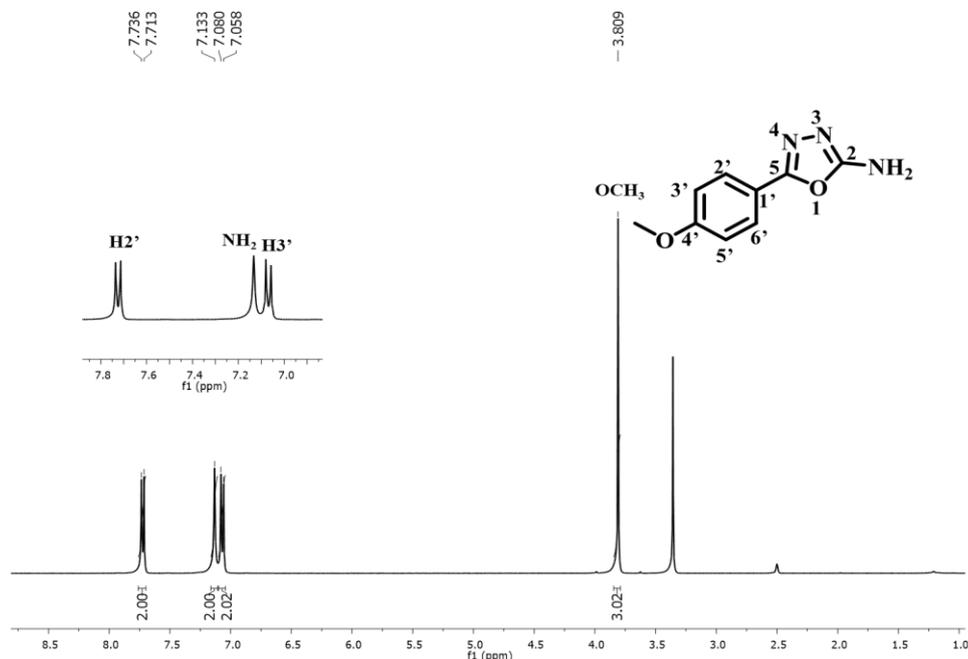


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H de **47i** (DMSO-d_6 , 400 MHz).

No mapa de contornos HMQC do derivado **47i** (Figura 48, página 119), observa-se a correlação do sinal referente ao $\text{H}2'$ com o sinal de carbono hidrogenado em δ 126,9 ppm referente ao $\text{C}2'$, e destaca-se também a correlação entre $\text{H}3'$ e $\text{C}3'$ em δ 114,7 ppm.

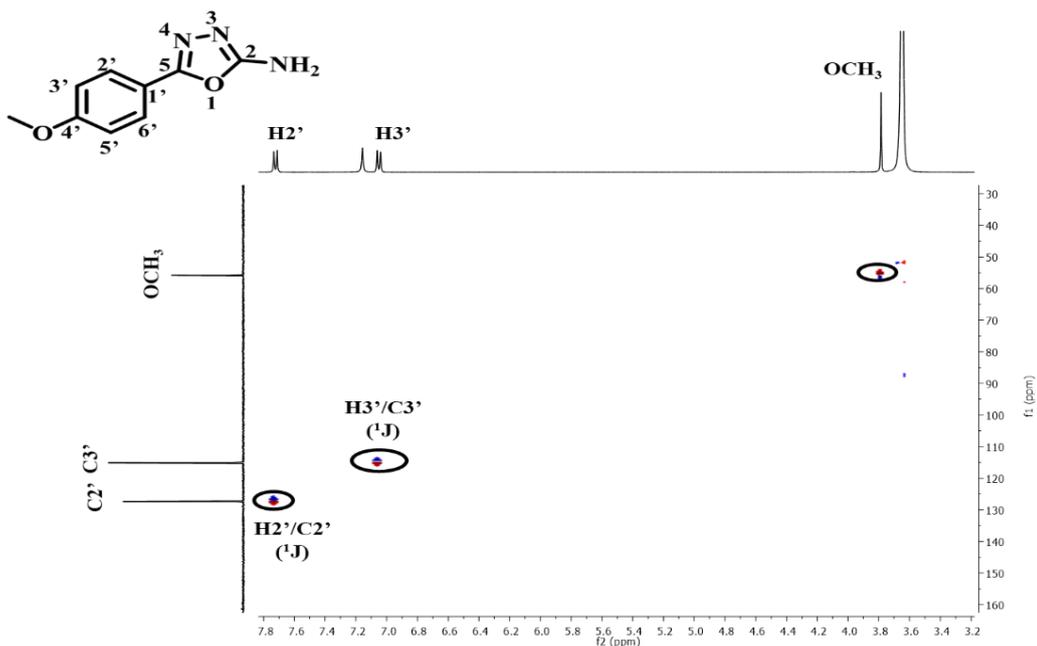


Figura 48. Mapa de contornos HMQC de **47i** (DMSO-d₆, 400 MHz).

Pelo experimento HMBC, no mapa de contornos (Figura 49, página 120), nota-se a correlação do sinal referente ao H2' com o sinal de carbono não hydrogenado em δ 157,4, o qual pode ser atribuído ao carbono C5 do anel oxadiazólico. Nota-se também a correlação de H2' com outro sinal de carbono não hydrogenado em δ 160,9, referente ao carbono C4', ligado ao grupo metoxila. O mesmo sinal referente ao carbono C4' também se correlaciona com o sinal do H3', em um $^2J_{CH}$ (duas ligações). O H3' se correlaciona com outro sinal de carbono não hydrogenado em δ 117,0, neste caso está havendo um acoplamento $^3J_{CH}$ (três ligações), entre o H3' e o carbono C1'.

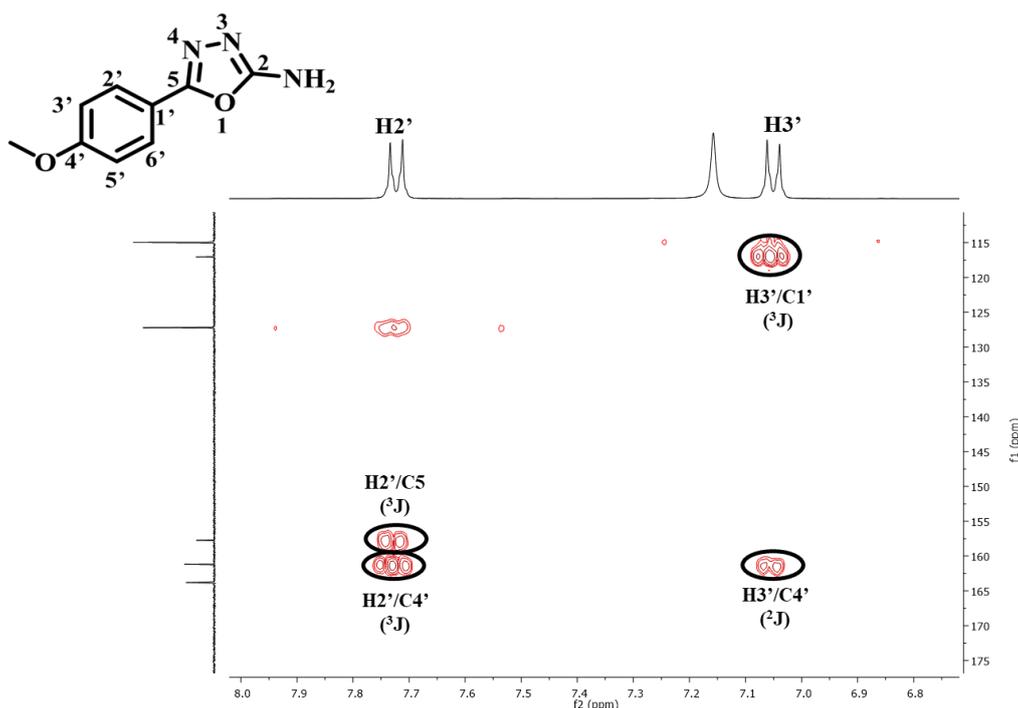


Figura 49. Mapa de Contornos HMBC de **47i** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 do derivado **47i** (Figura 50, página 121), observam-se todos os sinais atribuídos dos carbonos presentes na estrutura do derivado. A atribuição foi feita com o auxílio de tabelas de deslocamentos químicos²⁵ e os experimentos de HSQC e HMBC.

No espectro de massas do derivado **47i** (Figura 253, página 269), observa-se um sinal com m/z de 192,07646, referente ao pico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]$, coerente com a estrutura do produto.

Todos os dados referente à caracterização dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos **47a-l**, com os deslocamentos químicos (δ , ppm), as atribuições dos sinais dos hidrogênios e carbonos, os valores das constantes de acoplamentos (J , Hertz) e as multiplicidades (M) encontram-se nos quadros do Anexo I do capítulo II (Páginas 230-234). As atribuições dos sinais de hidrogênios e de carbonos foram feitas com auxílio de tabelas de deslocamentos^{26a}, todavia não foram realizados experimentos de correlação em duas dimensões, HSQC e HMBC, para os demais derivados, por isso alguns sinais de carbono e hidrogênio podem estar com as atribuições trocadas, principalmente os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos aromáticos, por apresentarem deslocamentos químicos próximos.

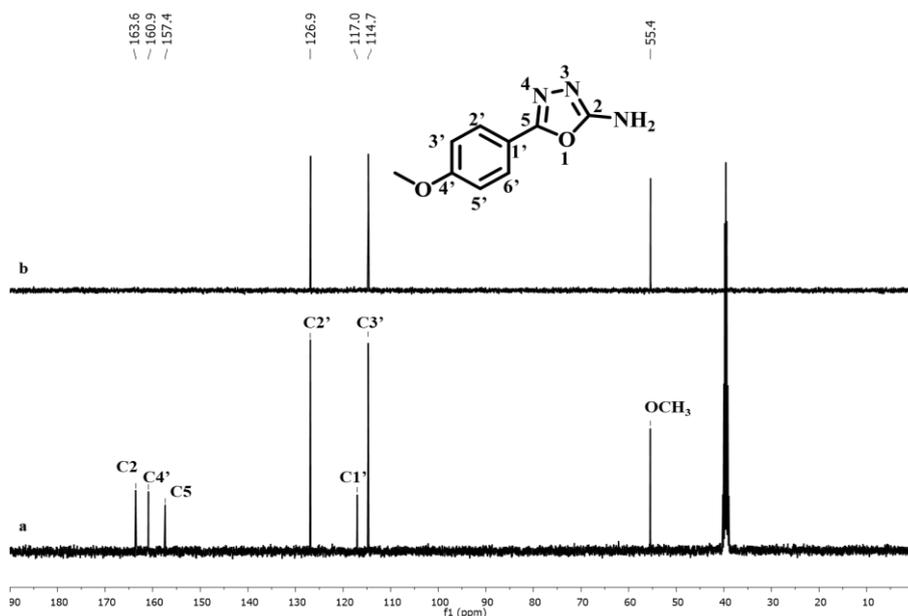


Figura 50 . Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) de **47i** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

O novo método desenvolvido também foi empregado para síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazóis que apresentam atividade biológica, como anti-inflamatória e inibição da Cat K. O derivado oxadiazólico do naproxeno **49**, foi preparado a partir da hidrazida **48** via uso do NCTS como fonte eletrofílica de nitrila, alcançando o rendimento de 63% (Esquema 33a, página 122). O naproxeno é um anti-inflamatório disponível no mercado com atividade analgésica, usado no tratamento de dores e doenças reumáticas,⁷⁵ e seu derivado **49** foi sintetizado pela primeira vez por Mohammad e colaboradores,⁷⁶ utilizando como a fonte eletrofílica de nitrila o brometo de cianogênio, com 69% de rendimento. Neste trabalho, os autores utilizaram da estratégia do bioisosterismo, substituindo o ácido carboxílico, presente na estrutura do naproxeno, pelo grupo amino-1,3,4-oxadiazol, e os resultados de atividade anti-inflamatória indicaram que o derivado **49** apresentou ação anti-inflamatória.

Outra aplicação deste novo método na construção de derivados com propriedades biológicas notáveis, foi a síntese do derivado **51**, reportado no primeiro capítulo desta Tese

⁷⁵ Ammar, Y. A., Salem M. A., Fayed E. A., Helal M. H., El-Gaby M. S. A., Thabet H. K. Naproxen derivatives: Synthesis, reactions, and biological applications *Synthetic Communications* 47 (2017) 1341–1367

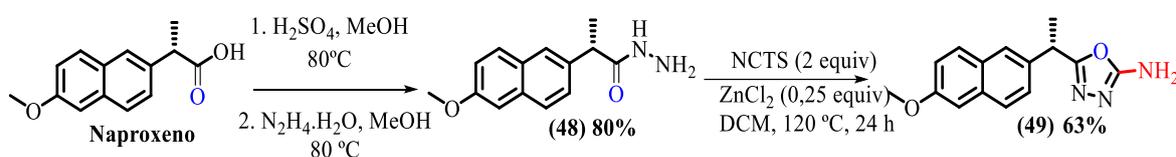
⁷⁶ Mohammad, A.; Antu, O.; Shah, A. *Ind. J. Chem. Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* 38 (1999) 237–239



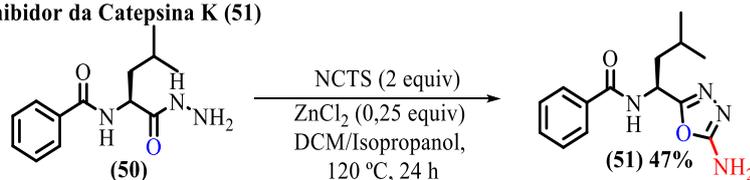
UFMG

(descrito com composto **38a**), a partir da hidrazida **50**, com rendimento de 47% (Esquema 33b). Mesmo que **51** tenha sido obtido com rendimento menor do que o descrito no capítulo I, este novo método emprega reagentes não tóxicos e de fácil manuseio quando comparados com o brometo de cianogênio. Deve-se ressaltar que o derivado **51** apresentou uma boa atividade inibitória frente à catepsina K, uma enzima relacionada diretamente à doença de osteoporose, sendo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessa patologia.⁷⁷

(a) Síntese do derivado Naproxeno-amino-1,3,4-oxadiazol (**49**)



(b) Síntese do inibidor da Catepsina K (**51**)



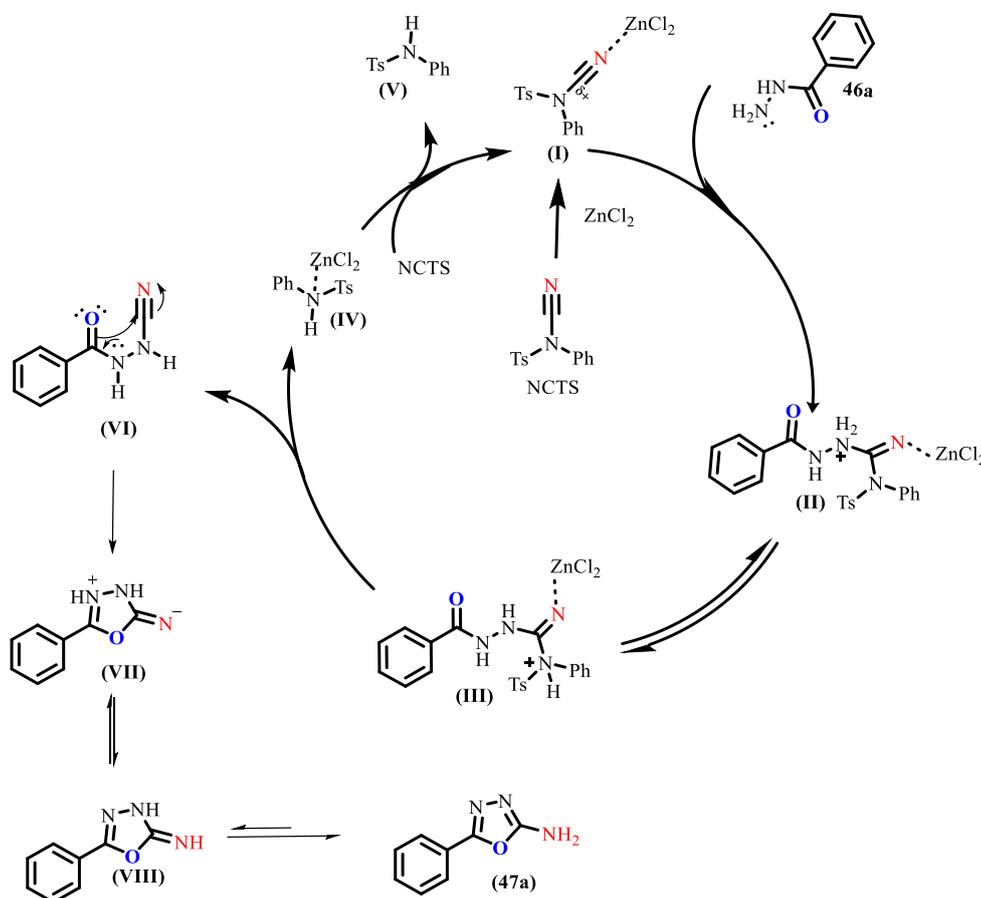
Esquema 33. Síntese de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos estruturalmente privilegiados via o uso de NCTS.

Baseados nos experimentos realizados no estudo de otimização e em trabalhos que relatam o uso do NCTS como uma fonte eletrofílica de nitrila,⁶⁷⁻⁶⁹ uma proposta de mecanismo para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazólicos via o uso deste novo método está representada no Esquema 34 (página 123). Em uma primeira etapa, ocorre a ativação do NCTS, através reação de complexação entre o ácido de Lewis, ZnCl_2 , e o nitrogênio da nitrila contendo um par de elétrons livres, levando à formação do complexo (I). A benzo-hidrazida **46a**, presente no meio reacional, atuando como um nucleófilo, interage com o complexo NCTS (I), formando o intermediário (II) que, a partir de um prototropismo se transforma em (III). O intermediário (III) sofre uma reação de eliminação da espécie (IV) e regeneração da tripla ligação do grupo nitrila, levando à formação do derivado *N*-cianobenzo-hidrazida (VI). Em seguida, o derivado (VI) sofre uma ciclização, fornecendo o

⁷⁷ Gontijo, T. B., Lima P. S., Icimoto, Y. M., Neves R. L., Alvarenga E. C., Carmona A. K., de Castro A. A., Ramalho, T. C., Da Silva Júnior E. N., Freitas R. P. Cathepsin K inhibitors based on 2-amino-1,3,4-oxadiazoles derivatives *Bioorganic Chemistry* 109 (2021) 104662.

heterociclo (VII) que, após uma reação ácido/base e posterior tautomerização, leva ao núcleo amino-1,3,4-oxadiazol. A espécie (IV) ao interagir com NCTS, libera a amina (V) e o complexo (I) para o meio, iniciando novamente o ciclo catalítico.

O mecanismo representado no Esquema 34 é apenas uma proposta baseada em observações feitas no estudo de otimização, a formação e isolamento da amina (V) após purificação em coluna dos produtos das reações realizadas (Ver Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C , Figura 243 e 244, página 264) e trabalhos relacionados na literatura.⁶⁷⁻⁶⁹ Nenhum estudo experimental ou teórico mais aprofundado para elucidação das etapas do mecanismo foram realizados.



Esquema 34. Proposta de mecanismo para obtenção de derivados amino-1,3,4-oxadiazol via o uso de NCTS como fonte eletrofílica de nitrila.

Neste ponto, deve-se ressaltar as vantagens do novo método desenvolvido para a síntese de amino-1,3,4-oxadiazóis empregando uma fonte eletrofílica de nitrila: o NCTS é um reagente não tóxico, estável, de fácil manuseio e acesso. Além disso, o método que emprega reagentes de baixo custo e sem necessidade de condições especiais, como o



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo
Capítulo II- Resultados e discussão

tratamento prévio de solventes e atmosfera inerte, se mostrou eficiente e aplicável para diferentes substratos, alcançando rendimentos de moderados a bons.



4. Parte Experimental

4.1. Materiais e Equipamentos

A determinação estrutural dos compostos sintetizados foi realizada por meio de métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , e espectrometria de massas de alta resolução. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos mediante a utilização de espectrômetro Bruker AVANCE DRX200 e Bruker AVANCE DPX400 (Departamento de Química, UFMG). Os valores de deslocamentos químicos foram listados em partes por milhão (ppm) em relação ao TMS e ao sinal residual de H do solvente deuterado, e as constantes de acoplamento (J) dadas em Hertz (Hz).

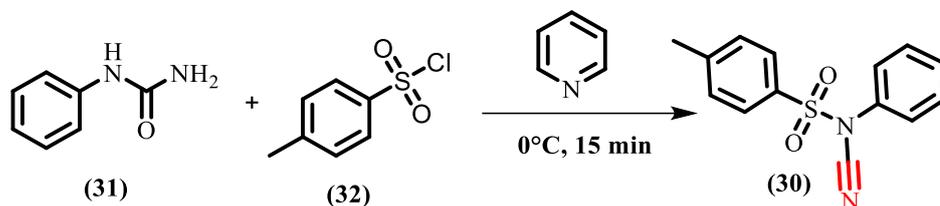
Os espectros de Massas de alta resolução foram obtidos usando o espectrômetro *Q-Exactive (ThermoScientific)*, no Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI) da Universidade Federal de Goiás

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho Büchi (Departamento de Química, UFMG) e não são corrigidos

As substâncias foram nomeadas segundo regras da IUPAC com o auxílio do programa CS ChemDraw Ultra.

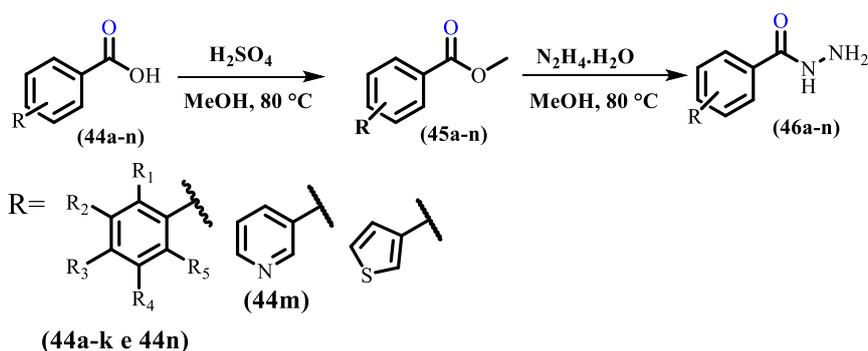
4.2. Síntese do NCTS (30) e das hidrazidas 46a-n

4.2.2. Síntese de *N*-ciano-*N*-fenil-*p*-toluenossulfonamida NCTS (30)⁶⁶



Em um balão de fundo redondo de 200 mL contendo uma barra magnética, foram adicionados 5g de fenilureia (**31**) (36 mmol) e 25 mL de piridina. O sistema ficou em banho de gelo e sob agitação e, em seguida, a esta solução, pequenas porções de cloreto de toсила (**32**) (23g, 126 mmol) foram adicionadas vagarosamente durante 3 minutos, sob agitação vigorosa do sistema reagente. A mistura reagente ficou sob agitação por 15 minutos em banho de gelo, e posteriormente 30 mL de água destilada gelada foram adicionados ao meio, levando à formação de um precipitado amarelo. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com água gelada, e em seguida tratado com etanol gelado (40 mL) e novamente filtrado, obtendo-se ao final o produto de interesse como um sólido branco com 73% de rendimento (6,8g, 25 mmol).

4.2.3. Síntese das benzo-hidrazidas 46a-n e 48⁷¹



- (44a-k e 44n)
- 44a) $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = H$
 44b) $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H, R^3 = F$
 44c) $R^1 = R^2 = R^3 = R^5 = H, R^4 = Cl$
 44d) $R^1 = R^2 = R^4 = H, R^3 = R^5 = F$
 44e) $R^1 = R^2 = R^3 = R^5 = H, R^4 = CF_3$
 44f) $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H, R^3 = CF_3$

- 44g) $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H, R^3 = I$
 44h) $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H, R^3 = NO_2$
 44i) $R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = H, R^3 = OCH_3$
 44j) $R^1 = R^3 = R^4 = R^5 = H, R^2 = OCH_3$
 44k) $R^1 = R^3 = R^5 = H, R^2 = R^4 = OCH_3$
 44n) $R^1 = R^3 = R^4 = H, R^2 = OCH_3, R^5 = Br$



UFMG

Procedimento Geral:

Em um tubo selado de 15 mL foram adicionados o ácido carboxílico correspondente **44a-n** (6 mmol), 4 mL de metanol e 333 μ L (6 mmol) de H_2SO_4 concentrado. A mistura reagente ficou sob refluxo e agitação até o consumo total do ácido carboxílico de partida, e o desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD. Após verificar o término da reação, a mistura reagente foi transferida para um funil de separação e em seguida adicionaram-se 15 mL de solução saturada de $NaHCO_3$, e foram realizadas sucessivas extrações líquido-líquido com DCM (3 x 15 mL). A fase orgânica foi separada e seca com sulfato de sódio, o solvente foi evaporado com auxílio do rota-evaporador, obtendo-se ao final o derivado éster correspondente.

O éster correspondente **45a-n** (6 mmol), sem purificação por coluna, foi então transferido para o tubo selado de 15 mL, e 4 mL de metanol e 1,2 mL de hidrazina monohidratada (25 mmols) foram adicionados. A mistura reagente ficou sob refluxo e agitação até consumo total do material de partida, o derivado éster. Após verificar o término da reação por CCD, a mistura reagente foi transferida para um balão de fundo redondo de 50 mL, e o excesso de metanol e hidrazina foram destilados a vácuo, obtendo-se ao final a hidrazida correspondente, que foi usada na próxima etapa sem purificação adicional. Os dados como aspecto físico e rendimentos brutos para cada hidrazida sintetizada encontram-se nos quadros abaixo. Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C das hidrazidas **46a-n** e encontram-se no anexo II, Figura 189 a Figura 215 e Figura 239 e Figura 240.

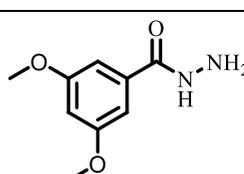
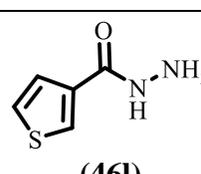
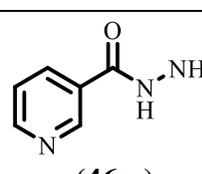
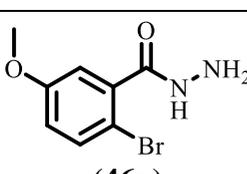
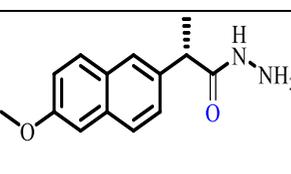


UFMG

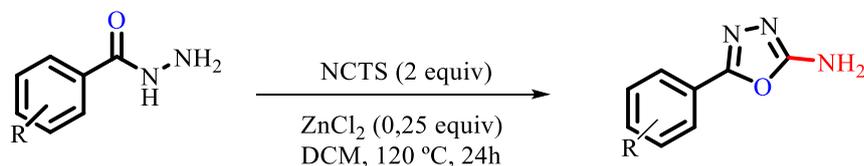
Quadro 11. Dados das hidrazidas **46a-j**

Hidrazida	 (46a)	 (46b)	 (46c)	 (46d)	 (46e)
Nomenclatura	Benzo-hidrazida	4-fluorobenzo-hidrazida	3-clorobenzo-hidrazida	2,4-difluorobenzo-hidrazida	3-(trifluorometil) Benzo-hidrazida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Rendimento (%)	76%	70%	80%	70%	80%
Hidrazida	 (46f)	 (46g)	 (46h)	 (46i)	 (46j)
Nomenclatura	4-(trifluorometil) Benzo-hidrazida	4-iodobenzo-hidrazida	4-nitrobenzo-hidrazida	4-metoxibenzo-hidrazida	4-metoxibenzo-hidrazida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido amarelo claro	Sólido amarelo claro	Sólido branco	Sólido branco
Rendimento (%)	95%	90%	72%	94%	98%

Quadro 12. Dados das hidrazidas **46k-n** e **48**

Hidrazida	 (46k)	 (46l)	 (46m)	 (46n)	 (48)
Nomenclatura	3,5-dimetoxibenzo- hidrazida	tiofeno-3-hidrazida	piridina-3-hidrazida	2-bromo-5- metoxibenzo- hidrazida	(S)-2-(6-metoxinaftalen- 2-il)propano-hidrazida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido amarelo claro	Sólido amarelo claro	Sólido branco
Rendimento (%)	73%	93%	90%	97%	80%

4.3. Síntese dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos

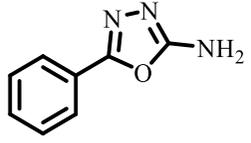
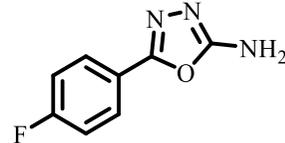
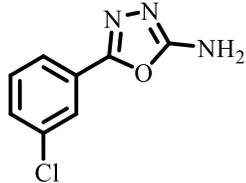
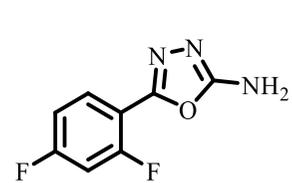
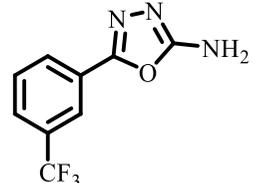


Procedimento Geral:

Em um tubo selado de 15 mL foram adicionados NCTS (272 mg, 1 mmol), cloreto de zinco (0,125 mmol, 17 mg) e 1 mL de DCM, sendo a mistura reagente deixada sob agitação magnética a 120 °C por 45 minutos. Após os 45 minutos a solução foi resfriada a temperatura ambiente e o sistema foi aberto, e então uma solução contendo a hidrazida correspondente em 3 mL de solvente (DCM ou 1,4-dioxano ou isopropanol), foi adicionada à mistura reagente que ficou sob agitação, neste mesmo tubo selado, a 120 °C por 24 h.

Após o fim da reação, o solvente foi evaporado com auxílio do rota-evaporador e a mistura bruta foi purificada por coluna cromatográfica em sílica gel, utilizando como fase móvel a mistura *n*-hexano: acetato de etila 1:1 e acetato de etila 100%), obtendo ao final os derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos desejados **47a-1**, **49** e **51**.

Quadro 13. Dados referentes aos compostos **47a-e**

Derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólico	 (47a)	 (47b)	 (47c)	 (47d)	 (47e)
Nomenclatura	2-amino-1,3,4-oxadiazol- 5-fenil	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(4-fluorofenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(3-clorofenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol- 5-(2,4-difluorofenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(3-(trifluorometil)fenil)
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	227 – 230 °C	242 – 244 °C	235 - 238 °C	103-106 °C	194 – 195 °C
Solvente utilizado	Diclorometano	diclorometano	diclorometano	diclorometano	diclorometano
Rendimento	60%	55%	50%	42%	53%
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 162,06606, massa calculada para [C ₈ H ₈ N ₃ O] ⁺ :162,0667	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 180,05644, massa calculada para [C ₈ H ₇ FN ₃ O] ⁺ : 180,05237.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 196,02699, massa calculada para [C ₈ H ₇ ClN ₃ O] ⁺ : 196,02776.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 198,04720, massa calculada para [C ₈ H ₆ F ₂ N ₃ O] ⁺ :198,04789	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 230,05325, massa calculada para [C ₉ H ₇ F ₃ N ₃ O] ⁺ : 230,05412.
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l



UFMG

Quadro 14. Dados referentes aos compostos **47d-j**

Derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólico	 (47d)	 (47g)	 (47h)	 (47i)	 (47j)
Nomenclatura	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(4-(trifluorometil)fenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(4-iodofenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(4-nitrofenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(4-metoxifenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(3-metoxifenil)
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido marrom claro	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	195 - 196 °C	240-242 °C	225 – 228 °C	230 - 232 °C	182 – 183 °C °C
Solvente utilizado	1,4-dioxano	1,4-dioxano	1,4-dioxano	diclorometano	1,4-dioxano
Rendimento	63%	45%	70%	54%	60%
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 198,04720, massa calculada para [C ₈ H ₆ F ₂ N ₃ O] ⁺ :198,04789.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 287,96231, massa calculada para [C ₈ H ₇ IN ₃ O] ⁺ : 287,96338.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 287,96231, massa calculada para [C ₈ H ₇ IN ₃ O] ⁺ : 287,96338.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 192,07663, massa calculada para [C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺ : 192,07730.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 192,07663, massa calculada para [C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺ : 192,07730..
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l



UFMG

Quadro 15. Dados referentes aos compostos **47k-l**, **49** e **51**

Derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólico	 (47k)	 (47l)	 (49)	
Nomenclatura	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(3,5-dimetoxifenil)	2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(tiofen-3-il)	(S)-2-amino-1,3,4-oxadiazol-5-(1-(6-metoxinaftalen-2-il)etil)	(S)-N-(1-(5-amino-1,3,4-oxadiazol-2-il)-3-metilbutil)benzamida
Aspecto físico	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco	Sólido branco
Faixa de Fusão	179 – 180 °C	198-201 °C	193 – 194°C	227,9 – 231,9 °C
Solvente utilizado	1,4-dioxano	1,4-dioxano	diclorometano	isopropanol
Rendimento	53%	48%	63%	47%
HRMS (ESI⁺)	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 222,08708, massa calculada para [C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃] ⁺ : 222,08787.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 168,02252, massa calculada para [C ₆ H ₆ N ₃ OS] ⁺ :168,02316.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 222,08708, massa calculada para [C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃] ⁺ : 222,08787.	(<i>m/z</i>) [M+H] ⁺ encontrada: 275,1496, massa calculada para [C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₂] ⁺ : 275,1508.
Dados de RMN de ¹H e ¹³C	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	ANEXO I: Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C dos derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos 47a-l	RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,79 (dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, 2H), 7,70 (sl, 1H), 7,34 (dd, <i>J</i> = 8,5, 1,4 Hz, 1H), 7,29 (d, <i>J</i> = 2,2 Hz, 1H), 7,16 (dd, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Hz, 1H), 6,88 (s, NH ₂), 4,36 (q, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1H), 3,86 (s, OCH ₃), 1,62 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H), RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) δ: 163,7, 161,5, 157,3,	ANEXO I (Capítulo I): Quadros de RMN de ¹ H e ¹³ C



UFMG

Instituto de Ciências Exatas - DQ UFMG
Tese de Doutorado – Talita B. Gontijo
Capítulo II- Parte experimental

			136,4, 133,4, 129,2, 128,4, 127,3, 125,9, 125,4, 118,9, 105,8, 55,2, 36,3, 19,2.	
--	--	--	---	--



5. Conclusão

Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma nova e eficiente metodologia sintética para a obtenção de derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos empregando reagentes menos tóxicos, acessíveis e de fácil manuseio. Neste novo método, o núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol pôde ser obtido a partir da ciclização de hidrazidas via o uso do *N*-ciano-*N*-fenil-*p*-toluenossulfonamida (NCTS) como uma fonte eletrofílica de nitrila, catalisada pelo cloreto de zinco.

Foi realizado um extenso estudo de otimização, e a melhor condição encontrada, levou a formação os derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos com rendimentos bons e moderados (42-70%).

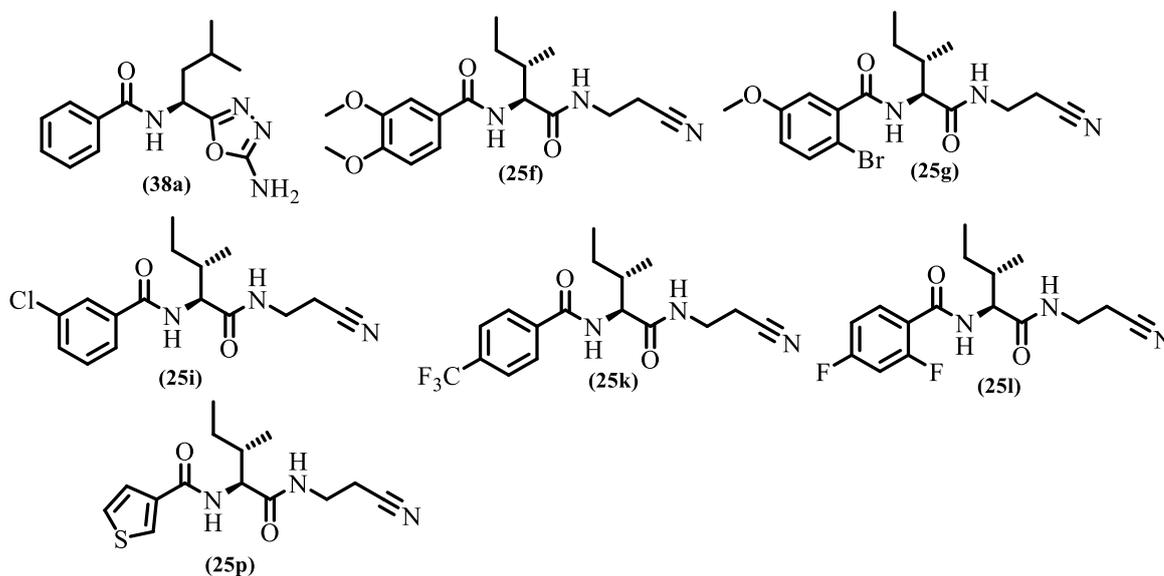
Empregando esta nova metodologia sintética foi possível obter 12 derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos, a partir de benzo-hidrazidas contendo diferentes grupos no anel aromático, e o efeito eletrônico dos substituintes no anel não afetou significativamente o rendimento da reação. A nova metodologia sintética também foi empregada para síntese de derivados contendo o núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol que apresentam atividades biológicas relevantes, como a obtenção de um derivado do naproxeno **49**, que apresenta atividade anti-inflamatória, e a síntese de um inibidor da catepsina K, o composto **51**.

Conclusão Geral

Como conclusão geral deste trabalho, tem-se que:

*16 nitrilo-dipeptídeos e 7 derivados 2-amino-1,3,4-oxadiazólicos inéditos foram sintetizados e testados *in vitro* como inibidores da catepsina K e frente a células do tecido ósseo e células troncos mesenquimais humanas. O composto **38a** apresentou uma notável atividade inibitória frente à Cat K, com valor de $K_i=2,13 \mu\text{M}$. Os resultados dos ensaios realizados com as células do tecido ósseo indicaram que os derivados **38a**, **25f**, **25g**, **25i**, **25p**, **25k** e **25l** são promissores candidatos para o desenvolvimento de novas terapias para osteoporose, e outros estudos ainda são necessários para a melhor compreensão de como esses novos derivados atuam no processo de remodelamento ósseo.

*Uma nova metodologia sintética para a construção do heterociclo 2-amino-1,3,4-oxadiazol foi desenvolvida, utilizando o *N*-ciano-*N*-fenil-*p*-toluenossulfonamida (NCTS) com fonte eletrofílica de nitrila de baixa toxicidade, fácil manuseio e acesso. Aplicando esse novo protocolo foi possível sintetizar 14 derivados contendo o núcleo 2-amino-1,3,4-oxadiazol, com rendimento variando entre 42-70%.



Anexos Capítulo I

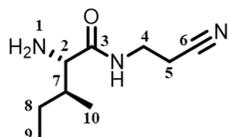
ANEXO I: Quadros de RMN de ^1H e ^{13}C

ANEXO II: Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos

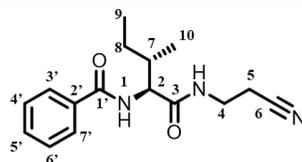
ANEXO III: Espectros na região do IV dos produtos finais

ANEXO IV: Espectros de Massas

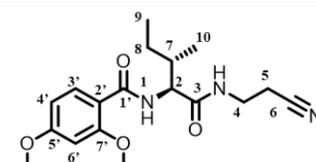
ANEXO I: Quadros de RMN de ^1H e ^{13}C



Composto (30) (CDCl₃/400 MHz)

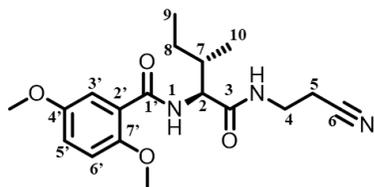


Composto (25a) (CDCl₃/400 MHz)

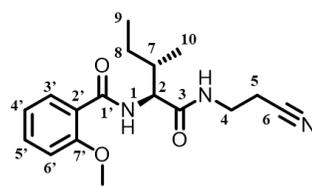


Composto (25b) (CDCl₃/400 MHz)

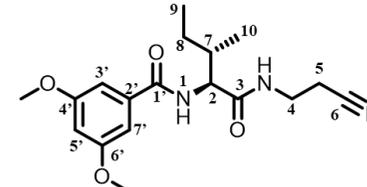
Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
1	1,70	sl	-	-	-	7,08	d	H1/H2= 8	-	-	8,29	d	H1/H2= 6,4	-	-
2	3,25	d	H2/7= 4	59,8	CH	4,63	t	H2/H1=8 H2/H7= 8	58,3	CH	4,56	t	H2/H1=6,4 H2/H7=6,4	58,3	CH
3	-	-	-	175,6	C	-	-	-	172,5	C	-	-	-	172,5	C
4	3,54-3,42	m	-	35,3	CH ₂	3,63-3,43	m	-	35,9	CH ₂	3,56-3,41	m	-	35,8	CH ₂
5	2,59	t	H5/H4= 6,4	18,4	CH ₂	2,67-2,49	m	-	18,2	CH ₂	2,60	t	H5/H4= 6,4	18,3	CH ₂
6	-	-	-	118,3	C	-	-	-	118,3	C	-	-	-	118	C
7	1,98-1,88	m	-	38,0	CH	2,08-1,97	m	-	37,7	CH	2,15-2,03	m	-	36,9	CH
8	1,37-1,27	m	-	23,8	CH ₂	1,72-1,59	m	-	25,3	CH ₂	1,68-1,56	m	-	25,3	CH ₂
8'	1,13-1,02	m	-	23,8	CH ₂	1,29-1,18	m	-	25,3	CH ₂	1,25-1,14	m	-	25,3	CH ₂
9	0,86	t	H9/H8= 8	11,9	CH ₃	0,93	t	H9/H8= 8	11,3	CH ₃	0,96	t	H9/H8= 7,6	11,6	CH ₃
10	0,95	d	H10/H7= 8	16,2	CH ₃	1,02	d	H10/H7= 8	15,7	CH ₃	1,01	d	H10/H7= 6,8	16,1	CH ₃
NH	7,88	sl	-	-	-	7,71	sl	-	-	-	7,37	sl	-	-	-
1'	-	-	-	-	-	-	-	-	167,9	C	-	-	-	165,7	C
2'	-	-	-	-	-	-	-	-	133,9	C	-	-	-	113,8	C
3'	-	-	-	-	-	7,80	d	H3'/H4'=8	128,8	CH	8,11	d	H3'/H4'=8	133,9	CH
4'	-	-	-	-	-	7,42	t	H4'/H3'=8 H4'/H5'=8	127,3	CH	6,60	dd	H4'/H3'=8 H4'/H6'= 4	105,6	CH
5'	-	-	-	-	-	7,51	t	H5'/H4'=8 H5'/H6'=8	132,1	CH	-	-	-	159,2	C
6'	-	-	-	-	-	7,42	t	H4'/H3'=8 H4'/H5'=8	127,3	CH	6,49	d	H4'/H6'= 4	98,8	CH
7'	-	-	-	-	-	7,80	d	H3'/H4'=8	128,8	CH	-	-	-	163,9	C
OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,97	s	-	56,2	CH ₃
OCH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,85	s	-	55,7	CH ₃



Composto (25c) (CDCl₃/400 MHz)

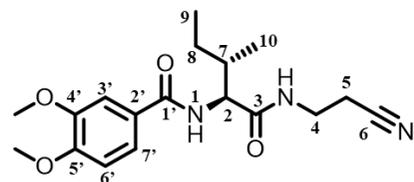


Composto (25d) (CDCl₃/400 MHz)

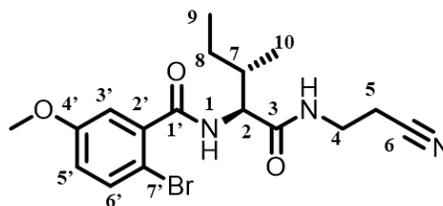


Composto (25e) (CDCl₃/400 MHz)

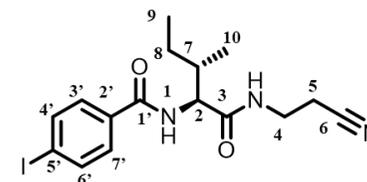
Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo
1	8,50	d	H1/H2= 8	-	-	8,41	d	H1/H2= 8	-	-	6,93	d	H1/H2= 8,4	-	-
2	4,25	dd	H2/H1=8 H2/H7=6,4	58,6	CH	4,63	dd	H2/H1=8 H2/H7= 6,8	58,5	CH	4,56	dd	H2/H1=8 H2/H7=8	58,5	CH
3	-	-	-	172,3	C	-	-	-	172,4	C	-	-	-	172,6	C
4	3,58-3,44	m	-	35,9	CH ₂	3,59-3,40	m	-	35,9	CH ₂	3,59-3,50 3,43-3,34	m	-	35,9	CH ₂
5	2,61	t	H5/H4= 6,4	18,3	CH ₂	2,62-2,57	m	-	18,3	CH ₂	2,66-2,49	m	-	18,4	CH ₂
6	-	-	-	118	C	-	-	-	118,3	C	-	-	-	118,1	C
7	2,15-2,05	m	-	36,8	CH	2,12-2,04	m	-	37,2	CH	2,04-1,93	m	-	37,4	CH
8	1,68-1,55	m	-	25,1	CH ₂	1,68-1,59	m	-	25,3	CH ₂	1,63-1,53	m	-	25,3	CH ₂
8'	1,28-1,15	m	-	25,1	CH ₂	1,28-1,16	m	-	25,3	CH ₂	1,23-1,12	m	-	25,3	CH ₂
9	0,96	t	H9/H8= 7,4	11,6	CH ₃	0,95	t	H9/H8= 7,4	11,6	CH ₃	0,89	t	H9/H8= 7,4	11,3	CH ₃
10	0,95	d	H10/H7= 6,8	16,2	CH ₃	1,02	d	H10/H7= 6,8	16	CH ₃	0,96	d	H10/H7= 6,8	15,8	CH ₃
NH	7,11	sl	-	-	-	7,39	sl	-	-	-	7,41	sl	-	-	-
1'	-	-	-	165,6	C	-	-	-	165,8	C	-	-	-	167,8	C
2'	-	-	-	121,5	C	-	-	-	121,1	C	-	-	-	136,1	C
3'	7,68	d	H3'/H5'=3,2	119,8	CH	8,14	dd	H3'/H5'=1,6 H4'/H3'=7,6	133,5	CH	6,87	d	H3'/H5'=2,4	105,3	CH
4'	-	-	-	152,1	C	7,09	t	H4'/H3'=8 H4'/H5'=8	121,6	CH	-	-	-	161,2	C
5'	7,02	dd	H5'/H3'=3,2 H5'/H6'=8	115,8	CH	7,50-7,44	m	-	132,3	CH	6,54	t	H5'/H3'=2,4 H5'/H7'=2,4	104,0	CH
6'	6,93	d	H6'/H5'=8	113,2	CH	7,00	d	H6'/H5'=8	157,9	CH	-	-	-	161,2	C
7'	-	-	-	154,1	C	-	-	-	157,9	C	6,87	d	H7'/H5'=2,4	105,3	CH
OCH ₃	3,96	s	-	56,8	CH ₃	4,00	s	-	56,3	CH ₃	3,77	s	-	55,8	CH ₃
OCH ₃	3,81	s	-	56	CH ₃	-	-	-	-	-	3,77	s	-	55,8	CH ₃



Composto (25f) (CDCl₃/400 MHz)

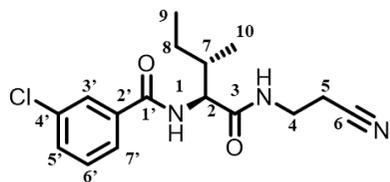


Composto (25g) (CDCl₃/400 MHz)

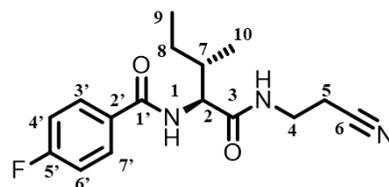


Composto (25h) (DMSO /400 MHz)

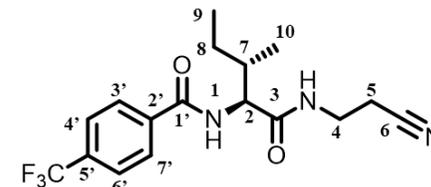
Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
1	6,94	d	H1/H2= 8	-	-	7,04	d	H1/H2=3,2	-	-	8,45-8,40	m	-	-	-
2	4,54	t	H2/H1=8 H2/H7=8	58,9	CH	4,60-4,56	m	-	58,4	CH	4,27	t	H2/H1=8,4 H2/H7=8,4	57,9	CH
3	-	-	-	173,2	C	-	-	-	171,6	C	-	-	-	171,5	C
4	3,63-3,53 3,48-3,37	m	-	36,5	CH ₂	3,55-3,43	m	-	35,8	CH ₂	3,28-3,19	m	-	34,5	CH ₂
5	2,70-2,53	m	-	18,9	CH ₂	2,59	t	H5/H4= 6,6	18,2	CH ₂	2,68-2,60	m	-	17,5	CH ₂
6	-	-	-	118,7	C	-	-	-	118,1	C	-	-	-	119,2	C
7	2,07-1,95	m	-	37,9	CH	2,04-1,94	m	-	37,3	CH	1,95-1,86	m	-	35,7	CH
8	1,67-1,59	m	-	25,9	CH ₂	1,70-1,60	m	-	25,3	CH ₂	1,53-1,44	m	-	24,8	CH ₂
8'	1,27-1,18	m	-	25,9	CH ₂	1,29-1,18	m	-	25,3	CH ₂	1,22-1,10	m	-	24,8	CH ₂
9	0,92	t	H9/H8= 7,2	11,9	CH ₃	0,94	t	H9/H8= 7,2	11,3	CH ₃	0,83	t	H9/H8= 7,4	10,9	CH ₃
10	1,00	d	H10/H7= 6,8	16,4	CH ₃	1,00	d	H10/H7= 6,8	15,8	CH ₃	0,88	d	H10/H7= 6,8	15,4	CH ₃
NH	7,48	sl	-	-	-	7,45-7,43	m	-	-	-	8,45-8,40	m	-	-	-
1'	-	-	-	168	C	-	-	-	167,7	C	-	-	-	165,7	C
2'	-	-	-	127	C	-	-	-	121,1	C	-	-	-	133,6	C
3'	7,39-7,34	m	-	111,3	CH	7,45-7,43	m	-	133,5	CH	7,84	d	H3'/H4'=8,4	129,3	CH
4'	-	-	-	149,8	C	-	-	-	159,1	C	7,84	d	H3'/H4'=8,4	129,3	CH
5'	-	-	-	152,9	C	6,84-6,80	m	-	132,3	CH	-	-	-	98,6	C
6'	6,84	d	H6'/H7'= 8	111,1	CH	6,84-6,80	m	-	118,1	CH	7,67	d	H6'/H7'= 8	137,0	CH
7'	7,39-7,34	m	-	120,7	CH	-	-	-	157,9	C	7,67	d	H6'/H7'= 8	137,0	CH
OCH ₃	3,91	s	-	56,8	CH ₃	3,79	s	-	55,8	CH ₃	-	-	-	-	-
OCH ₃	3,90	s	-	56,8	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Composto (25i) (CD₃OD/400 MHz)

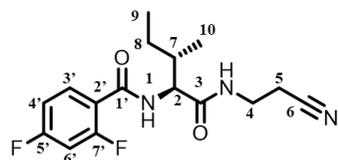


Composto (25j) (CD₃OD/400 MHz)

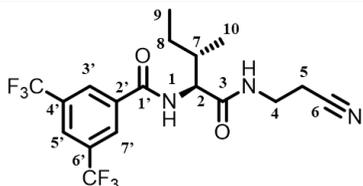


Composto (25k) (CD₃OD/400 MHz)

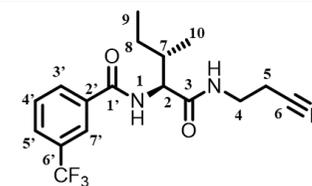
N ^o	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	<i>J</i> (Hz)	δ	Tipo	δ	M	<i>J</i> (Hz)	δ	Tipo	δ	M	<i>J</i> (Hz)	δ	Tipo
2	4,37	d	H2/H7=8,4	58,9	CH	4,38	d	H2/H7= 8	60,0	CH	4,40	t	H2/H7=8,4	60,1	CH
3	-	-	-	173,1	C	-	-	-	174,4	C	-	-	-	174,2	C
4	3,57-3,51 3,44-3,38	m	-	35,4	CH ₂	3,60-3,40 3,44-3,37	m	-	36,6	CH ₂	3,60-3,50 3,45-3,37	m	-	36,6	CH ₂
5	2,74-2,64	m	-	17,2	CH ₂	2,70-2,62	m	-	18,3	CH ₂	2,76-2,63	m	-	18,4	CH ₂
6	-	-	-	118,3	C	-	-	-	119,4	C	-	-	-	119,4	C
7	2,03-1,92	m	-	36,5	CH	2,07-1,93	m	-	37,8	CH	2,06-1,96	m	-	37,7	CH
8	1,68-1,58	m	-	25,1	CH ₂	1,72-1,58	m	-	26,3	CH ₂	1,71-1,58	m	-	26,3	CH ₂
8'	1,33-1,22	m	-	25,1	CH ₂	1,37-1,20	m	-	26,3	CH ₂	1,37-1,24	m	-	26,3	CH ₂
9	0,93	t	H9/H8= 7,4	10	CH ₃	0,94	t	H9/H8= 7,2	11,2	CH ₃	0,95	t	H9/H8= 7,2	11,2	CH ₃
10	1,00	d	H10/H7= 6,8	14,8	CH ₃	1,00	d	H10/H7= 6,8	16	CH ₃	1,02	d	H10/H7= 6,8	16	CH ₃
1'	-	-	-	167,9	C	-	-	-	169,1	C	-	-	-	169,0	C
2'	-	-	-	134,4	C	-	-	-	131,7	C	-	-	-	134,0	C
3'	7,85	sl	-	131,5	CH	7,90	d d	H3'/H4'= 8,8 H3'/F= 5,6	131,2	CH	8,01	d	H3'/H4'=8,4	129,4	CH
4'	-	-	-	136,1	C	7,19	t	H4'/H3'= 8,8 H4'/F= 8,8	116,2	CH	7,79	d	H4'/H3'=8,4	126,5	CH
5'	7,55	d	H5'/H6'=8	129,9	CH	-	-	-	167,5	C	-	-	-	139,2	C
6'	7,45	t	H6'/H5'= 8 H6'/H7'= 8	127,5	CH	7,19	t	H4'/H3'= 8,8 H4'/F= 8,8	116,2	CH	8,01	d	H3'/H4'=8,4	129,4	CH
7'	7,76	d	H7'/H6'= 8	125,8	CH	7,90	d d	H3'/H4'= 8,8 H3'/F= 5,6	131,2	CH	7,79	d	H4'/H3'=8,4	126,5	CH
CF 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Composto (25l) (CD₃OD/ 400 MHz)



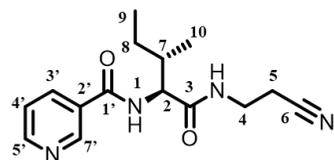
Composto (25m) (CD₃OD/400 MHz)



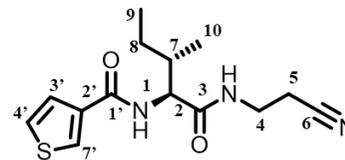
Composto (25n) (CD₃OD,/400 MHz)

Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
2	4,44	d	H2/H7=7,2	59,6	CH	4,40	d	H2/H7= 8,4	60,4	CH	4,41	t	H2/H7=8,4	60,1	CH
3	-	-	-	173,9	C	-	-	-	174,1	C	-	-	-	174,3	C
4	3,60-3,40 3,46-3,37	m	-	36,6	CH ₂	3,58-3,50 3,46-3,39	m	-	36,6	CH ₂	3,62-3,45 3,38-3,31	m	-	36,6	CH ₂
5	2,77-2,61	m	-	17	CH ₂	2,76-2,64	m	-	18,3	CH ₂	2,76-2,63	m	-	18,4	CH ₂
6	-	-	-	119,4	C	-	-	-	119,4	C	-	-	-	119,5	C
7	2,01-1,89	m	-	38,1	CH	2,07-1,97	m	-	37,5	CH	2,06-1,93	m	-	37,7	CH
8	1,69-1,57	m	-	26,0	CH ₂	1,72-1,59	m	-	26,6	CH ₂	1,69-1,58	m	-	26,4	CH ₂
8'	1,33-1,20	m	-	26,0	CH ₂	1,37-1,24	m	-	26,6	CH ₂	1,37-1,23	m	-	26,4	CH ₂
9	0,95	t	H9/H8= 7,4	11,3	CH ₃	0,96	t	H9/H8= 7,4	11,2	CH ₃	0,95	t	H9/H8= 7,4	11,2	CH ₃
10	1,01	d	H10/H7= 6,8	16,0	CH ₃	1,02	d	H10/H7= 6,8	16,0	CH ₃	1,02	d	H10/H7= 6,8	16,0	CH ₃
1'	-	-	-	165,6	C	-	-	-	167,0	C	-	-	-	168,7	C
2'	-	-	-	120,3- 120,4	C	-	-	-	137,8	C	-	-	-	136,4	C
3'	7,88-7,78	m	-	133,9- 133,5	CH	8,46	s	-	129,4	CH	8,10	d	H3'/H4'=8	132,2/ 130,5	CH
4'	7,14-7,04	m	-	113,1- 112,9	CH	-	-	-	123,2	CH	7,67	t	H4'/H3'=8 H4'/H5'= 7,6	132,2/ 130,5	CH
5'	-	-	-	167,4- 160,8	C	8,16	s	-	152,9	CH	7,84	d	H5'/H4'= 7,6	129,3 ou 125,5	CH
6'	7,14-7,04	m	-	105,4	CH	-	-	-	123,2	C	-	-	-	132,0 - 131,7	C
7'	-	-	-	167,4 - 160,8	C	8,46	s	-	129,4	CH	8,16	s	-	129,3/ 125,5	CH

CF 3	-	-	-	-	-	-	-	-	133,5- 132,5	C	-	-	-	126,5- 124,0	C
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	-----------------	---	---	---	---	-----------------	---

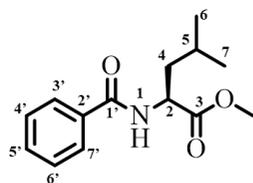


Composto (25o) (CDCl₃/400 MHz)

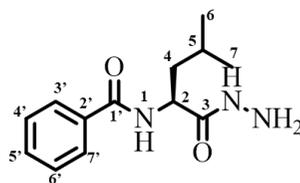


Composto (25p) (CD₃OD/400 MHz)

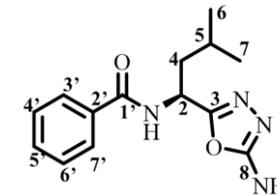
Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo
1	7,65	d	H1/H2= 8	-	-	-	-	-	-	-
2	4,59	dd	H2/H1=8 H2/H7=8	58,5	CH	4,37	d	H2/H7= 8,4	59,6	CH
3	-	-	-	172,5	C	-	-	-	174,4	C
4	3,67-3,57 3,47-3,37	m	-	35,8	CH ₂	3,57-3,50 3,43-3,37	m	-	36,6	CH ₂
5	2,79-2,51	m	-	18,4	CH ₂	2,75-2,62	m	-	18,3	CH ₂
6	-	-	-	118,2	C	-	-	-	119,3	C
7	2,10-1,95	m	-	37,1	CH	2,01-1,92	m	-	37,7	CH
8	1,71-1,58	m	-	25,3	CH ₂	1,67-1,58	m	-	26,3	CH ₂
8'	1,27-1,14	m	-	25,3	CH ₂	1,30-1,20	m	-	26,3	CH ₂
9	0,89	t	H9/H8= 7,4	11,1	CH ₃	0,94	t	H9/H8= 7,4	11,2	CH ₃
10	1,00	d	H10/H7= 6,4	15,7	CH ₃	1,01	d	H10/H7= 6,8	16,0	CH ₃
NH	7,90	Sl	-	-	-	-	-	-	-	-
1'	-	-	-	166,1	C	-	-	-	165,4	C
2'	-	-	-	129,7	C	-	-	-	137,9	C
3'	8,12	d	H3'/H4'=8	135,5	CH	7,53	dd	H3'/H7'=1,2 H3'/H4'=5,6	130,3/ 127,4/ 127,7	CH
4'	7,35	dd	H4'/H3'=8 H4'/H5'= 4,8	123,6	CH	7,47-7,45	m	-	130,3/ 127,4/ 127,7	CH
5'	8,71	d	H5'/H4'=4,8	148,6	CH	-	-	-	-	-
6'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7'	9,06	s	-	152,6	CH	8,13-	dd	H7'/H3'= 1,2 H7'/H4'= 2,8	130,3/ 127,4/ 127,7	CH



Composto (34a) (CDCl₃/400 MHz)



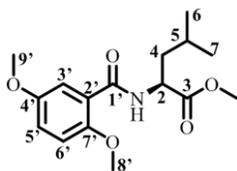
Composto (36a) (CD₃OD/400 MHz)



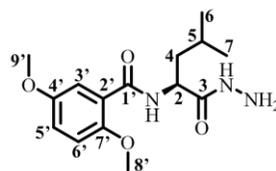
Composto (38a) (DMSO/ 400 MHz)

Nº	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo
1	6,57	d	H1/H2= 7,2	-	-	-	-	-	-	-	8,87	d	H1/H2= 8	-	-
2	4,90-4,84	m	-	52,1 ou 51,3	CH	4,64-4,60	m	-	52,4	CH	5,26-5,20	m	-	43,4	CH
3	-	-	-	173,8	C	-	-	-	174,0	C	-	-	-	166,0	C
4	1,80-1,65	m	-	42,1	CH ₂	1,80-1,61	m	-	42,0	CH ₂	1,94-1,62	m	-	40,3	CH ₂
5	1,80-1,65	m	-	25,1	CH	1,80-1,61	m	-	26,1	CH	1,94-1,62	m	-	24,4	CH
6	0,99	m	-	23,0/ 22,2	CH ₃	1,00	d	H6/H5= 6,4	23,3/ 22,1	CH ₃	0,92	m	-	22,6/ 21,6	CH ₃
7	0,99	m	-	23,0/ 22,2	CH ₃	0,97	d	H7/H5= 6,4	23,3/ 22,1	CH ₃	0,92	m	-	22,6/ 21,6	CH ₃
OCH ₃	3,77	s	-	52,1/ 51,3	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2'	-	-	-	134,2	C	-	-	-	135,3	C	-	-	-	133,7	C
3'	7,80	d	H3'/H4'= 7,2	128,7 /127,2	CH	7,85	d	H3'/H4'= 7,2	129,5/ 128,5	CH	7,88	d	H3'/H4'= 8	128,3/ 127,4	CH
4'	7,43	t	H4'/H3'= 7,2 H4'/H5'= 7,2	128,7 /127,2	CH	7,46	t	H4'/H3'= 7,2 H4'/H5'= 7,2	129,5/ 128,5	CH	7,47	t	H4'/H3'= 8 H4'/H5'= 8	128,3/ 127,4	CH
5'	7,51	t	H5'/H4'= 7,2 H5'/H6'= 7,2	131,8	C	7,56	t	H5'/H4'= 7,2 H5'/H6'= 7,2	132,8	CH	7,56-7,53	m	-	131,5	CH
6'	7,43	t	H4'/H3'= 7,2 H4'/H5'= 7,2	128,7 /127,2	CH	7,46	t	H4'/H3'= 7,2 H4'/H5'= 7,2	129,5/ 128,5	CH	7,47	t	H4'/H3'= 8 H4'/H5'= 8	128,3/ 127,4	CH
7'	7,80	d	H7'/H6'= 7,2	128,7/ 127,2	CH	7,85	d	H3'/H4'= 7,2	129,5/ 128,5	CH	7,88	d	H3'/H4'= 8	128,3/ 127,4	CH
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	159,4	C

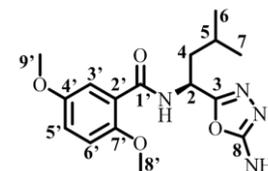
Composto (34b) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (36b) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (38b) (CDCl ₃ /400 MHz)					
Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos		
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo		
1	8,19	d	H1/H2= 7,3	-	-	8,34	sl	-	-	-	8,15-7,95	m	-	-	-		
2	4,85-4,74	m	-	51,4	CH	4,74-4,58	m	-	50,7	CH	5,42-5,29	m	-	42,2	CH		
3	-	-	-	173,9	C	-	-	-	173,0	C	-	-	-	164,9	C		
4	1,78-160	m	-	41,8	CH ₂	1,85-1,58	m	-	40,9	CH ₂	1,88-1,57	m	-	43,9	CH ₂		
5	1,78-160	m	-	25,3	CH	1,85-1,58	m	-	25,0	CH	1,88-1,57	m	-	24,9	CH		
6	0,95	d	H6/H5= 6,0	22,9/ 22,2	CH ₃	0,95	d	H6/H5= 6,3	23,0/ 22,3	CH ₃	0,99-0,78	m	-	22,8/ 22,3	CH ₃		
7	0,95	d	H7/H5= 6,0	22,9/ 22,2	CH ₃	0,92	d	H7/H5= 6,3	22,3/ 23,0	CH ₃	0,99-0,78	m	-	22,8/ 22,3	CH ₃		
8	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	159,1	C		
1'	-	-	-	164,9	C	-	-	-	165,4	C	-	-	-	163,9	C		
2'	-	-	-	114,2	C	-	-	-	113,8	C	-	-	-	113,8	C		
3'	8,08	d	H3'/H4'= 8,8	134,0	CH	8,08	d	H3'/H4'= 8,8	134,0	CH	8,15-7,95	m	-	134,2	CH		
4'	6,56	dd	H4'/H3'= 8,8 H4'/H6'= 2,3	105,4	CH	6,56	t	H4'/H3'= 8,8 H4'/H6'= 2,3	105,6	CH	6,48	dd	H4'/H3'= 8,8 H4'/H6'= 1,9	105,6	CH		
5'	-	-	-	163,6	C	-	-	-	163,9	C	-	-	-	161,3	CH		
6'	6,46	d	H6'/H4'= 2,3	98,7	C	6,45	d	H6'/H3'= 2,3	98,7	CH	6,37	d	H6'/H4'= 1,8	98,8	CH		
7'	7,80	d	H7'/H6'= 7,2	159,2	C	-	-	-	159,1	C	-	-	-	163,5	CH		
OCH ₃	3,93	s	-	56,1	CH ₃	3,92	s	-	56,1	-	3,83	s	-	55,6	C		
OCH ₃	3,81	s	-	55,6	CH ₃	3,82	s	-	55,6	-	3,74	s	-	56,2	-		
OCH ₃	3,72	s	-	56,1	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		



Composto (34b) (CDCl₃/400 MHz)



Composto (36b) (CDCl₃/400 MHz)

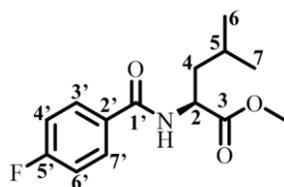


Composto (38b) (CDCl₃/400 MHz)

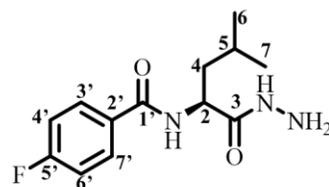
Hidrogênios						Carbonos						Hidrogênios						Carbonos						Hidrogênios						Carbonos					
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo					
NH	8,46	d	H1/H2= 7,1	-	-	NH	d	H1/H2=7,8	-	-	8,38	d	H1/H2=8,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
2	4,86-4,77	m	-	51,5	CH	4,74-4,60	m	-	50,7	CH	5,51-5,42	m	-	44,0	CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
3	-	-	-	173,8	C	-	-	-	172,5	C	-	-	-	163,4	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
4	1,79-1,64	m	-	41,8	CH ₂	1,80-1,50	m	-	41,2	CH ₂	2,01-1,70	m	-	42,1	CH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
5	1,79-1,64	m	-	25,2	CH	1,80-1,50	m	-	24,8	CH	2,01-1,70	m	-	24,9	CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
6	1,03-0,92	m	-	23,0	CH ₃	1,0-0,77	m	-	22,7	CH ₃	1,01-0,93	m	-	22,8	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
7	1,03-0,92	m	-	22,3	CH ₃	1,0-0,77	m	-	22,1	CH ₃	1,01-0,93	m	-	22,3	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	161,3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
1'	-	-	-	164,8	C	-	-	-	165,0-	C	-	-	-	164,9	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
2'	-	-	-	121,8	C	-	-	-	121,1	C	-	-	-	121,2	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
3'	7,74	d	H3'/H5'= 3,2	119,9	CH	7,58	d	H3'/H5'=2,8	119,4	CH	7,73	d	H3'/H5'=3,2	120,1	CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
4'	-	-	-	154,1	C	-	-	-	153,6	C	-	-	-	152,1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
5'	7,00	dd	H5'/H6'= 9,0 H5'/H3'= 3,2	115,6	CH	6,88	dd	H5'/H3'= 2,8 H5'/H6'=8,9	115,4	CH	7,00	dd	H5'/H6'=9,0 H5'/H6'=3,2	115,7	CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
6'	6,9	d	H6'/H5'=9,0	113,5	CH	6,79	d	H6'/H5'=8,9	112,9	CH	6,91	d	H6'/H5'=9,0	113,3	CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
7'	-	-	-	152,2	C	-	-	-	151,8	C	-	-	-	154,1	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
OCH ₃	3,80	s	-	56,9	CH ₃	3,82	s	-	56,4	CH ₃	3,91	s	-	56,8	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
OCH ₃	3,75	s	-	55,9	CH ₃	3,69	s	-	55,6	CH ₃	3,80	S	-	55,9	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
OCH ₃	3,94	s	-	52,3	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Composto (34d) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (36d) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (38d) (DMSO-d ₆ /400 MHz)					
Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos		
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo		
NH	8,34	d	H1/H2=6,7	-	-	8,19	d	H1/H2=7,6	-	-	8,51	d	H1/H2=8,2	-	-		
2	4,88-4,76	m	-	51,4	CH	4,72-4,63	m	-	50,2	CH	5,24-5,11	m	-	43,4	CH		
3	-	-	-	173,8	C	-	-	-	172,0	C	-	-	-	159,3	C		
4	1,83-1,59	m	-	41,8	CH ₂	1,83-1,61	m	-	41,1	CH ₂	1,89-1,60	m	-	40,8	CH ₂		
5	1,83-1,59	m	-	25,2	CH	1,83-1,61	m	-	24,3	CH	1,89-1,60	m	-	24,3	CH		
6	1,11-0,90	m	-	22,9	CH ₃	0,96	d	H6/H5=6,2	22,4	CH ₃	0,89-0,83	m	-	22,7	CH ₃		
7	1,11-0,90	m	-	22,2	CH ₃	0,93	d	H7/H5=6,2	21,6	CH ₃	0,89-0,83	m	-	21,7	CH ₃		
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,7	C		
1'	-	-	-	165,0	C	-	-	-	164,5	C	-	-	-	165,0	C		
2'	-	-	-	121,1	C	-	-	-	-	C	-	-	-	123,0	C		
3'	8,17	dd	H3'/H4'=8,0 H3'/H5'=1,4	133,1	CH	8,13	dd	H3'/H4'=7,8 H3'/H5'=1,7	132,4	CH	7,65	d	H3'/H4'=8,0	132,4	CH		
4'	7,05	t	8,0	121,4	CH	7,05	t	H4'/H3'=7,8	120,5	CH	7,06-6,96	m	-	120,5	CH		
5'	7,50-7,39	m	-	132,4	CH	7,48-7,40	m	-	131,2	CH	7,48	t	H5'/H4'=8,0 H5'/H6'=8,0	130,2	CH		
6'	6,97	d	H6'/H5'=8,0	111,5	CH	6,96	d	H6'/H5'=8,3	110,9	CH	7,14	d	H6'/H5'=8,0	112,1			
7'	-	-	-	157,8	C	-	-	-	157,0	C	-	-	-	156,9			
8'	3,97	s	-	56,1	CH ₃	3,95	s	-	55,4	CH ₃	3,86	s	-	56,0	CH ₃		
OCH ₃	3,74	s	-	52,3	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,06-6,96	m	-	-	-		
NNH ₂	-	-	-	-	-	3,20	sl	-	-	-	-	-	-	-	-		

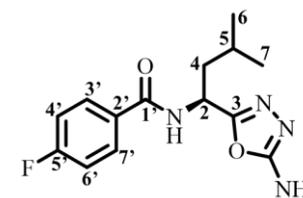
Composto (34e) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (36e) (DMSO-d ₆ /400 MHz)						Composto (38e) (DMSO-d ₆ /400 MHz)					
Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos		
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo		
NH	6,81	d	H1/H2=8,1	-	-	8,78	d	H1/H2=8,1	-	-	9,19	d	H1/H2=8,2	-	-		
2	4,92-4,82	m	-	51,4	CH	4,57-4,44	m	-	50,7	CH	5,30-5,18	m	-	43,6	CH		
3	-	-	-	173,9	C	-	-	-	171,2	C	-	-	-	159,2	C		
4	1,80-1,61	m	-	41,8	CH ₂	1,76-1,44	m	-	40,6	CH ₂	1,94-1,58	m	-	40,3	CH ₂		
5	1,80-1,61	m	-	25,1	CH	1,76-1,44	m	-	24,4	CH	1,94-1,58	m	-	24,3	CH		
6	0,98	t	H6/H5= 5,9	23,0	CH ₃	0,90	d	H6/H5= 6,4	23,0	CH ₃	0,93	d	H6/H5= 6,7	22,7	CH ₃		
7	0,98	t	H6/H5= 5,9	22,1	CH ₃	0,86	d	H7/H5= 6,4	21,5	CH ₃	0,91	d	H7/H5= 6,7	21,7	CH ₃		
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,9	C		
1'	-	-	-	165,8	C	-	-	-	164,8	C	-	-	-	164,5	C		
2'	-	-	-	134,7	C	-	-	-	135,0	C	-	-	-	134,5	C		
3'	7,74	d	H3'/H4'=7,8	130,4	CH	7,90	d	H3'/H4'=7,8	131,8	CH	7,94	d	H3'/H4'=8,0	131,7	CH		
4'	7,54	t	H4'/H3'=7,8 H4'/H5'=7,8	129,3	CH	7,71	t	H4'/H3'=7,8 H4'/H5'=7,8	129,5	CH	7,74	t	H4'/H3'=8,0 H4'/H5'=8,0	129,8	CH		
5'	7,94	d	H5'/H4'=7,8	124,3	CH	8,19	d	H5'/H4'=7,8	124,3	CH	8,19	d	H5'/H4'=8,0	124,1-123,8	CH		
6'	-	-	-	131,3	C	-	-	-	129,0	C	-	-	-	129,3	C		
7'	8,04	s	-	128,5	CH	9,31	s	-	127,8	CH	8,24	s	-	128,2	CH		
CF ₃	-	-	-	123,8	C	-	-	-	124,1	C	-	-	-	124,0	C		
OCH ₃	3,78	s	-	52,7	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,99	s	-	-	-		
NNH ₂						4,24	sl	-	-	-	-	-	-	-	-		
HNN						8,26	s	-	-	-	-	-	-	-	-		



Composto (34f) (CDCl₃/400 MHz)



Composto (36f) (CDCl₃/400 MHz)



Composto (38f) (DMSO-d₆/400 MHz)

N°	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
NH	6,52	d	H1/H2=7,6	-	-	7,17-6,98	m	-	-	-	8,93	d	H1/H2=8,3	-	-
2	4,93-4,78	m	-	51,3	CH	4,80-4,66	m	-	50,9	CH	5,27-5,16	m	-	43,5	CH
3	-	-	-	173,9	C	-	-	-	173,1	C	-	-	-	159,4	C
4	1,89-1,58	m	-	42,0	CH ₂	1,84-1,61	m	-	41,3	CH ₂	1,93-1,58	m	-	40,3	CH ₂
5	1,89-1,58	m	-	25,1	CH ₂	1,84-1,61	m	-	25,1	CH	1,93-1,58	m	-	24,3	CH
6	1,09-0,91	m	-	23,0	CH ₃	1,06-0,85	m	-	22,9	CH ₃	0,93	d	H6/H5=6,4	22,7	CH ₃
7	1,09-0,91	m	-	22,2	CH ₃	1,06-0,85	m	-	22,4	CH ₃	0,90	d	H7/H5=6,4	21,6	CH ₃
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,8	C
1'	-	-	-	166,2	C	-	-	-	166,7	C	-	-	-	165,0	C
2'	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C
3'	7,81	dd	H3'/H4'= 8,5 H3'/F=5,4	129,6	CH	7,87-7,73	m	-	129,7	CH	7,96	dd	H3'/H4'= 8,8 H3'/F=5,4	130,2	CH
4'	7,11	t	H4'/H3'=8,5 H4'/F=8,5	115,8	CH	7,17-6,98	m	-	115,8	CH	7,31	t	H4'/H3'=8,8 H4'/F=8,8	115,3	CH
5'	-	-	-	-	C	-	-	-	-	C	-	-	-	164,1	C
6'	7,11	t	H6'/H7'=8,5 H6'/F=8,5	115,8	CH	7,17-6,98	m	-	129,7	CH	7,31	t	H6'/H7'=8,8 H6'/F=8,8	115,3	CH
7'	7,81	dd	H7'/H6'= 8,5 H7'/F=5,4	129,6	CH	7,87-7,73	m	-	115,8	CH	7,96	t	H7'/H6'=8,8 H3'/F=8,8	130,2	CH
OCH ₃	3,77	s	-	52,6	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,97	s	-	-	-
NNH ₂	-	-	-	-	-	3,30	sl	-	-	-	-	-	-	-	-

Composto (34g) (CDCl ₃ /400 MHz)						Composto (36g) (DMSO-d ₆ /400 MHz)						Composto (38g) (DMSO-d ₆ /400 MHz)					
Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos			Hidrogênios			Carbonos		
Nº	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo	δ	M	J(Hz)	δ	Tipo		
NH	7,15-6,78	m	-	-	-	8,34	d	H1/H2= 6,7	-	-	8,89	d	H1/H2= 8,2	-	-		
2	4,91-4,74	m	-	51,5	CH	4,50-4,40	m	-	50,4	CH	5,21-5,10	m	-	43,9	CH		
3	-	-	-	173,3	-	-	-	-	171,0	C	-	-	-	159,6	C		
4	1,86-1,60	m	-	41,6	CH ₂	1,69-1,40	m	-	41,1	CH ₂	1,87-1,60	m	-	40,7	CH ₂		
5	1,86-1,60	m	-	25,0	CH	1,69-1,40	m	-	24,3	CH	1,87-1,60	m	-	24,5	CH		
6	1,10-082	m	-	22,8	CH ₃	0,90	d	H6/H5=6,4	23,0	CH ₃	0,98-0,82	m	-	22,9	CH ₃		
7	1,10-082	m	-	22,0	CH ₃	0,87	d	H7/H5=6,4	21,7	CH ₃	0,98-0,82	m	-	21,9	CH ₃		
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	163,6	C		
1'	-	-	-	162,2	C	-	-	-	162,7	C	-	-	-	164,2	C		
2'	-	-	-	117,2	C	-	-	-	120,6	C	-	-	-	120,7	C		
3'	8,18-7,97	m	-	133,9	CH	7,72-7,63	m	-	131,9	CH	7,68-7,57	m	-	132,0	CH		
4'	7,15-6,78	m	-	112,4	CH	7,37-7,28	m	-	111,6	CH	7,40-7,28	m	-	112,2	CH		
5'	-	-	-	165,0	C	-	-	-	165,4-157,7	C	-	-	-	163,9	C		
6'	7,15-6,78	m	-	104,4	CH	7,20-7,12	m	-	104,5	CH	7,22-7,11	m	-	105,0	CH		
7'	-	-	-	161,2	C	-	-	-	165,4-157,7	C	-	-	-	160,0	C		
OCH ₃	3,73	s	-	52,4	CH ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
NH ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,00	s	-	-	-		
NNH ₂	-	-	-	-	-	4,28	Sl	-	-	-	-	-	-	-	-		
HNN	-	-	-	-	-	9,25	s	-	-	-	-	-	-	-	-		

ANEXO II: Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

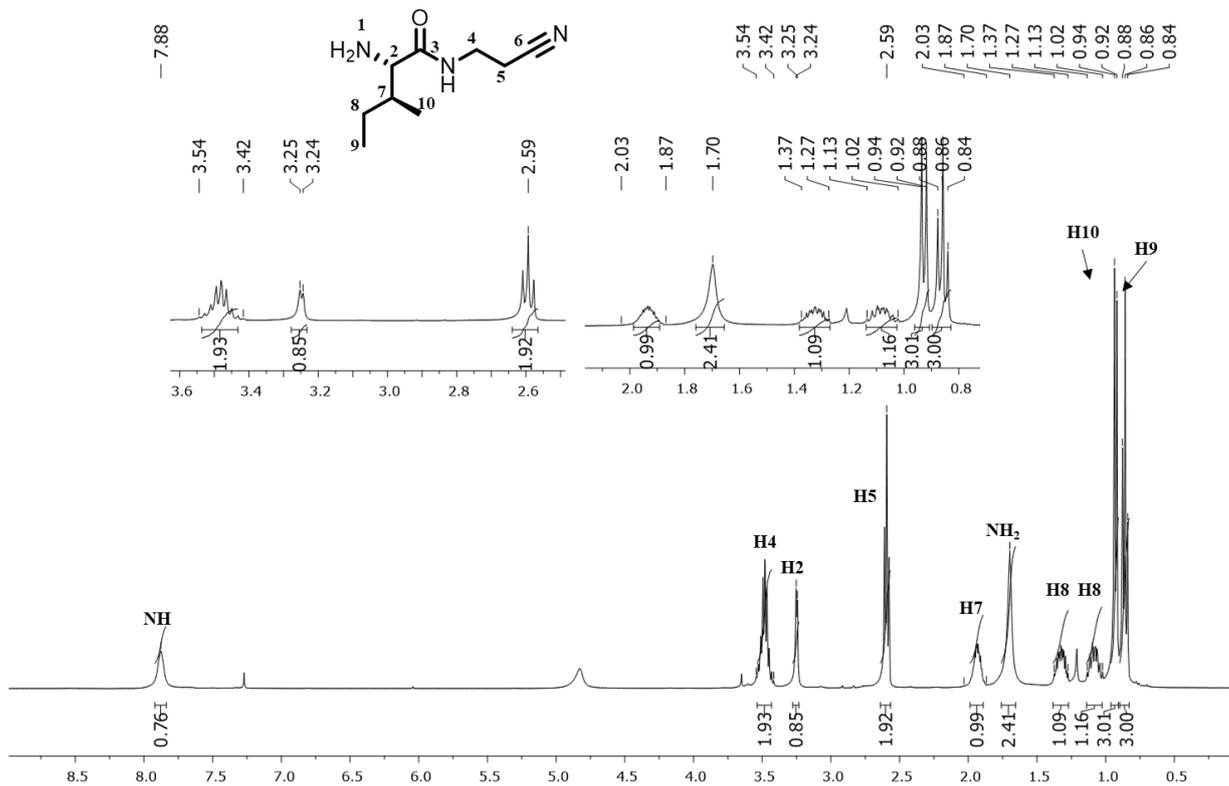


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H do composto **30** (CDCl₃, 400 MHz).

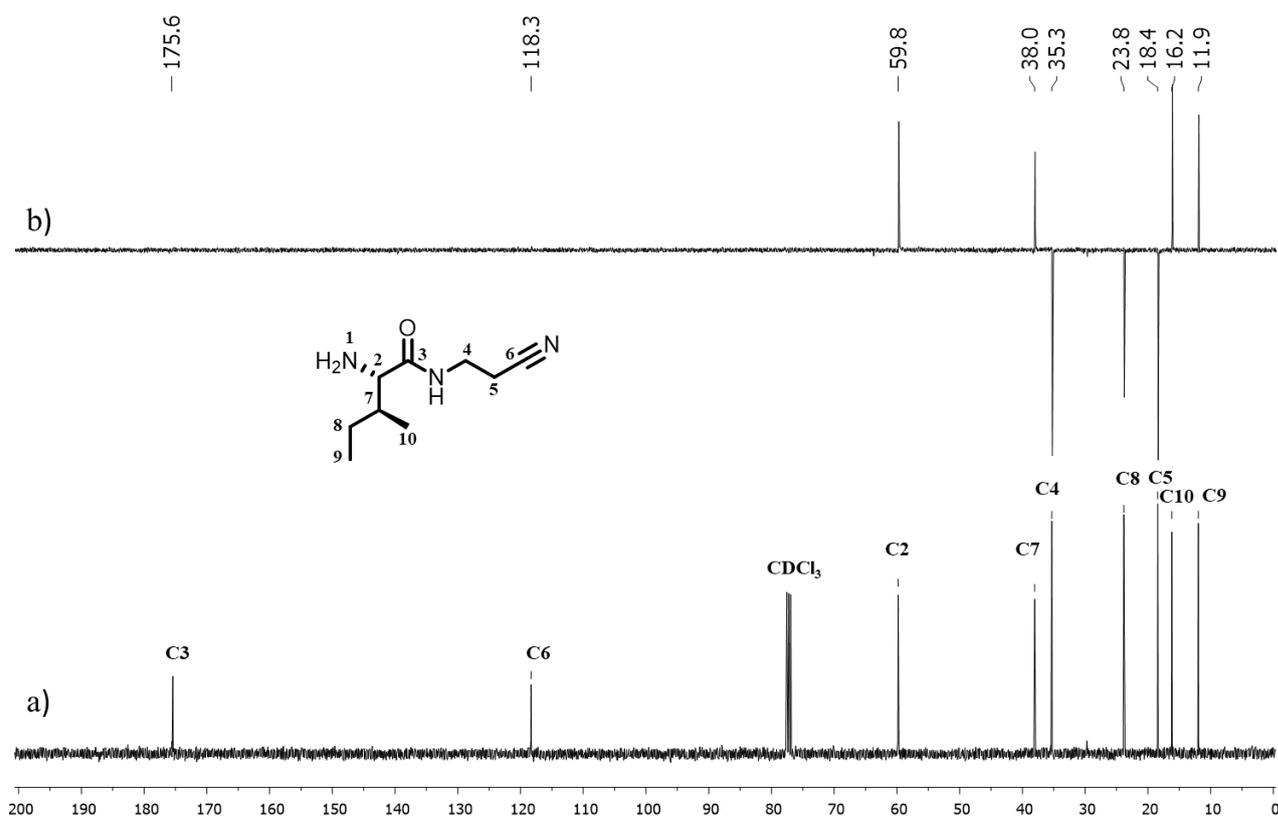


Figura 52. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **30** (CDCl₃, 100 MHz).

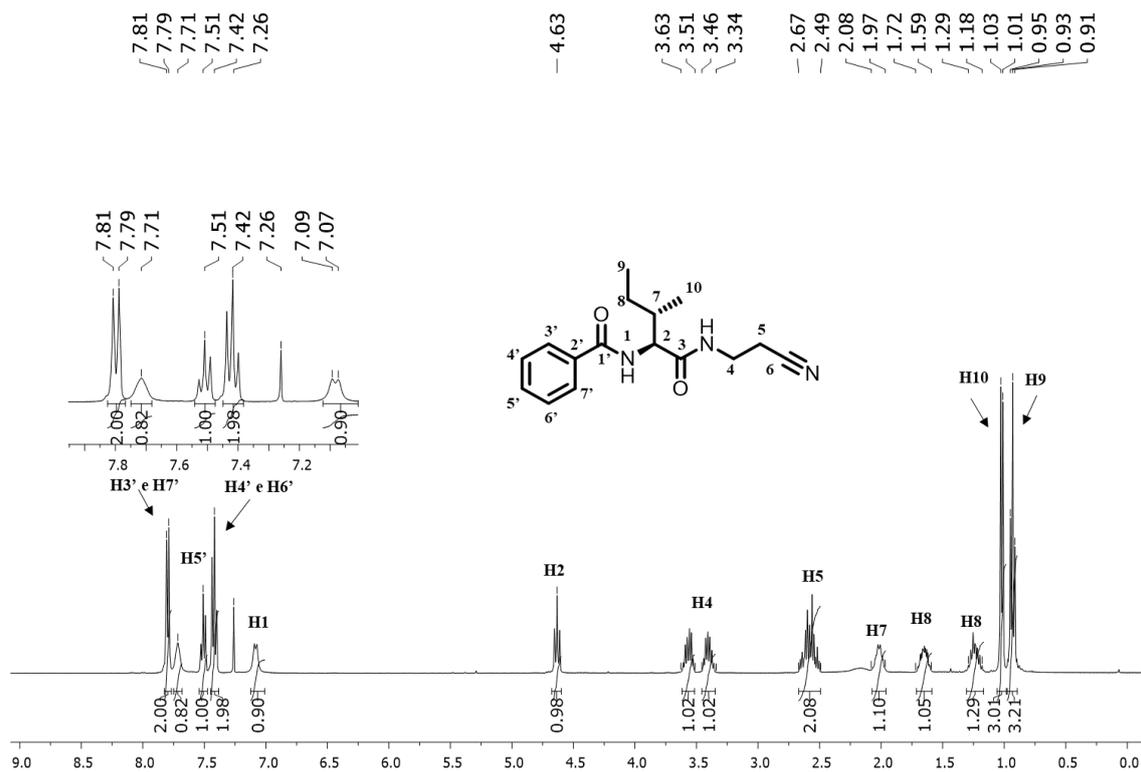


Figura 53. Espectro de RMN de ¹H do composto **25a** (CDCl₃, 400 MHz).

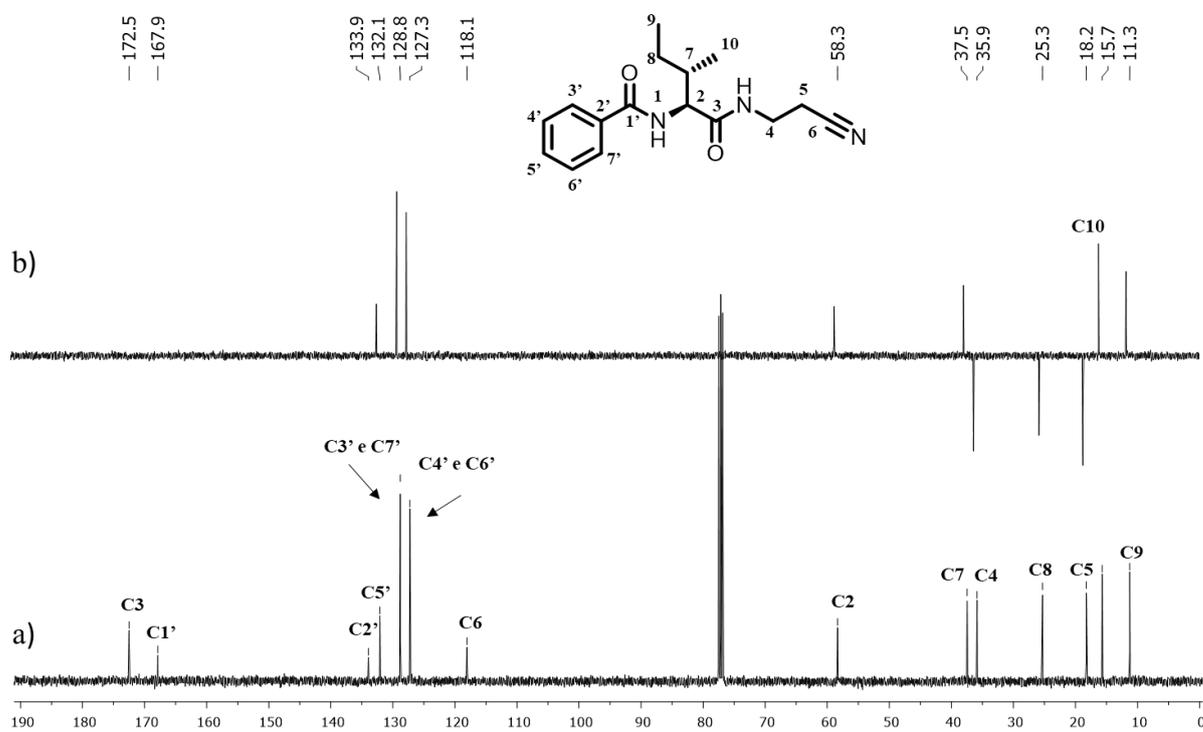


Figura 54. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25a** (CDCl₃, 100 MHz).

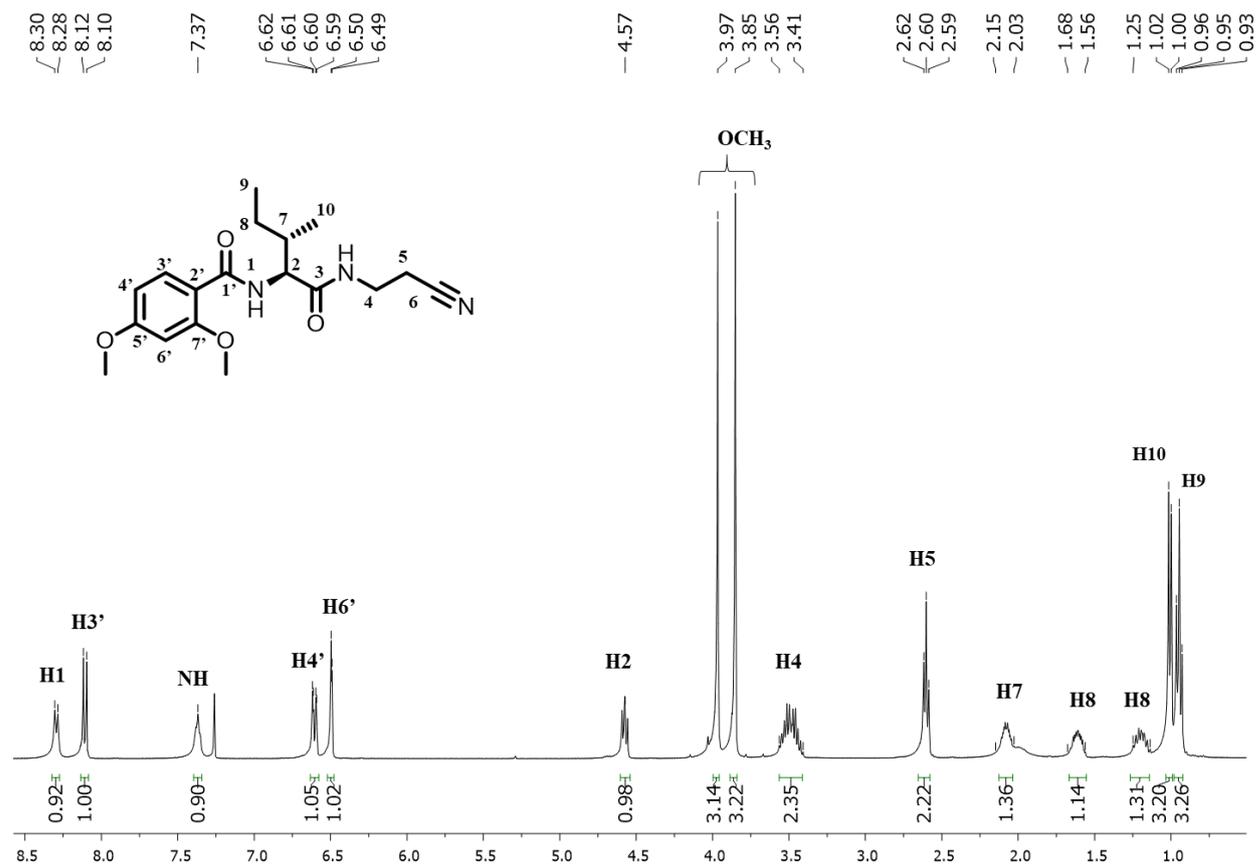


Figura 55. Espectro de RMN de ¹H do composto **25b** (CDCl₃, 400 MHz).

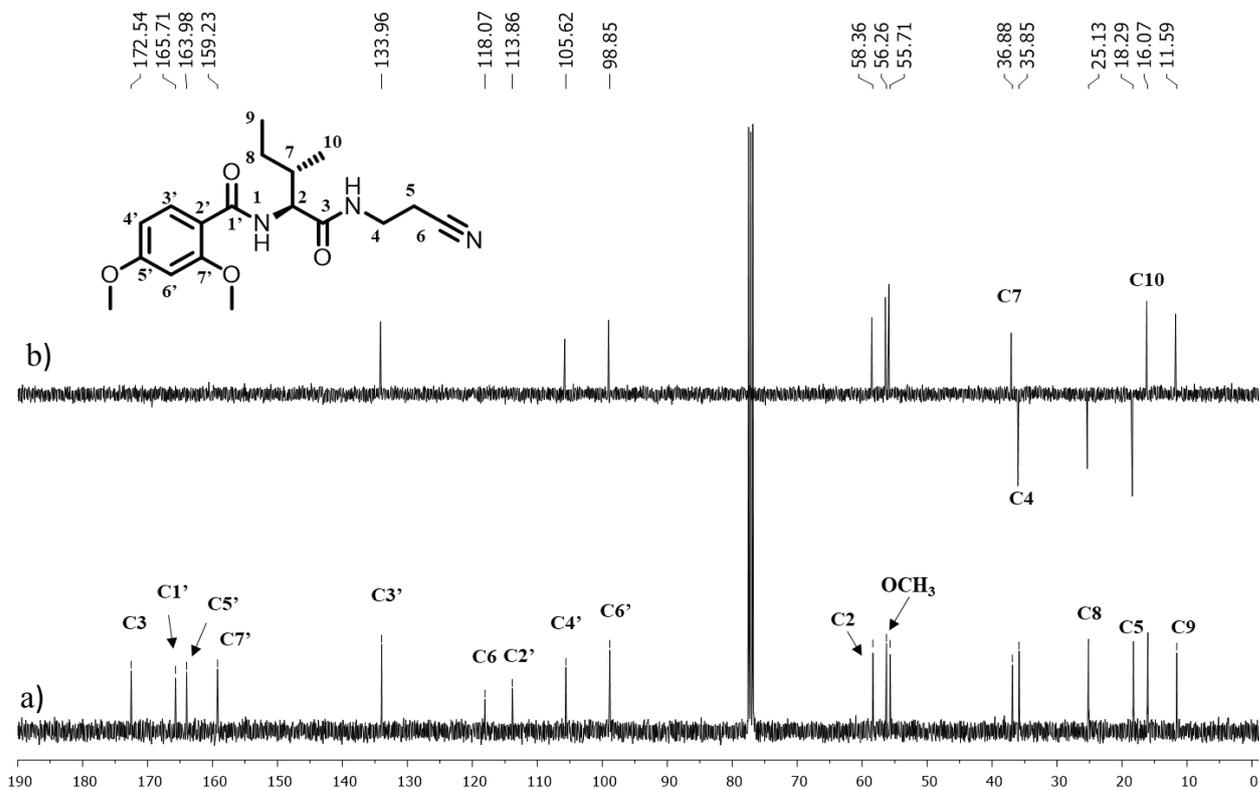


Figura 56. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **26b** (CDCl₃, 100 MHz).

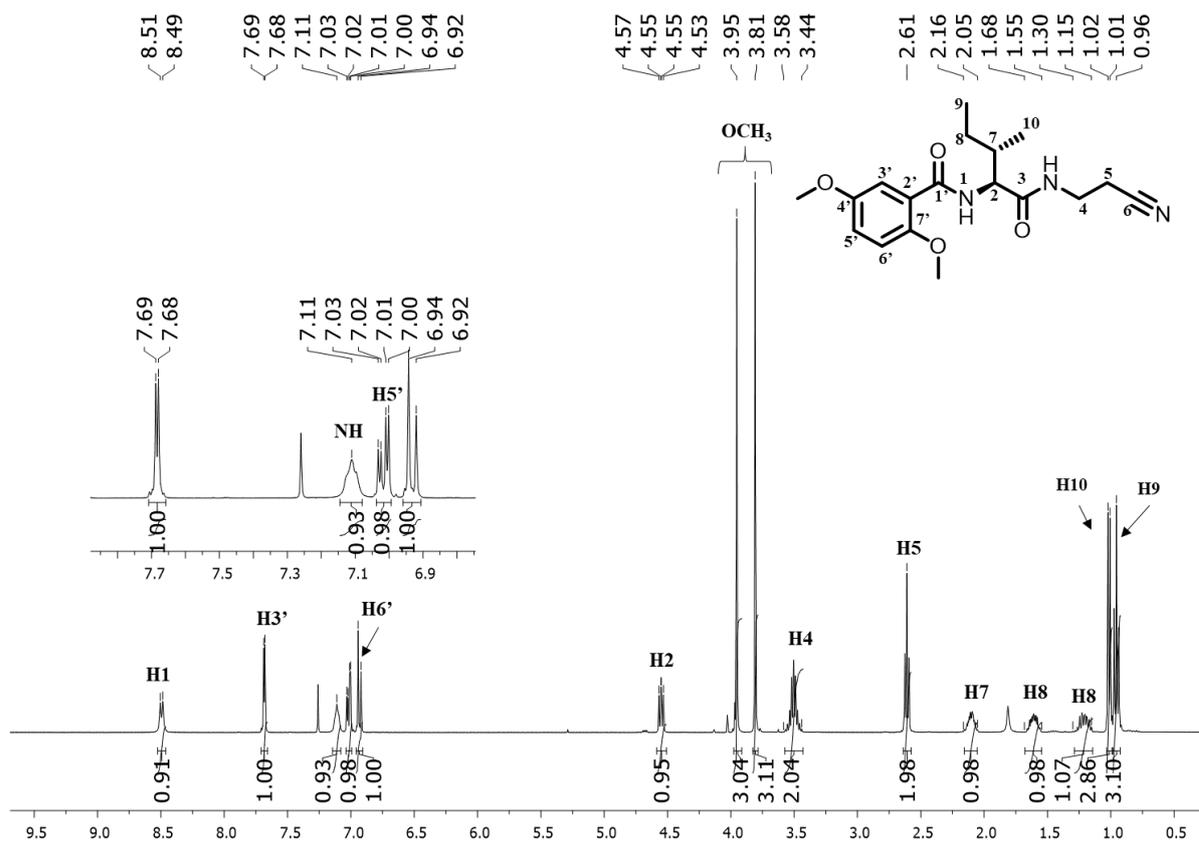


Figura 57. Espectro de RMN de ^1H do composto **25c** (CDCl_3 , 400 MHz).

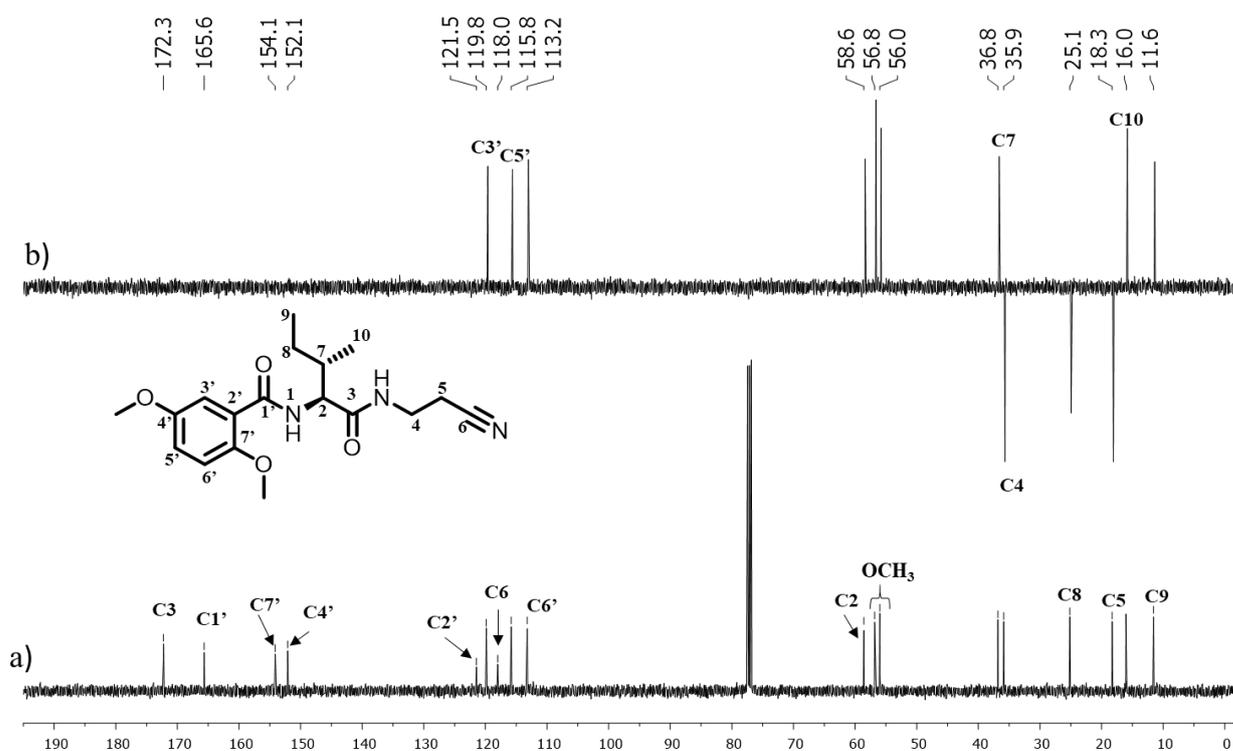


Figura 58. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25c** (CDCl_3 , 100 MHz).

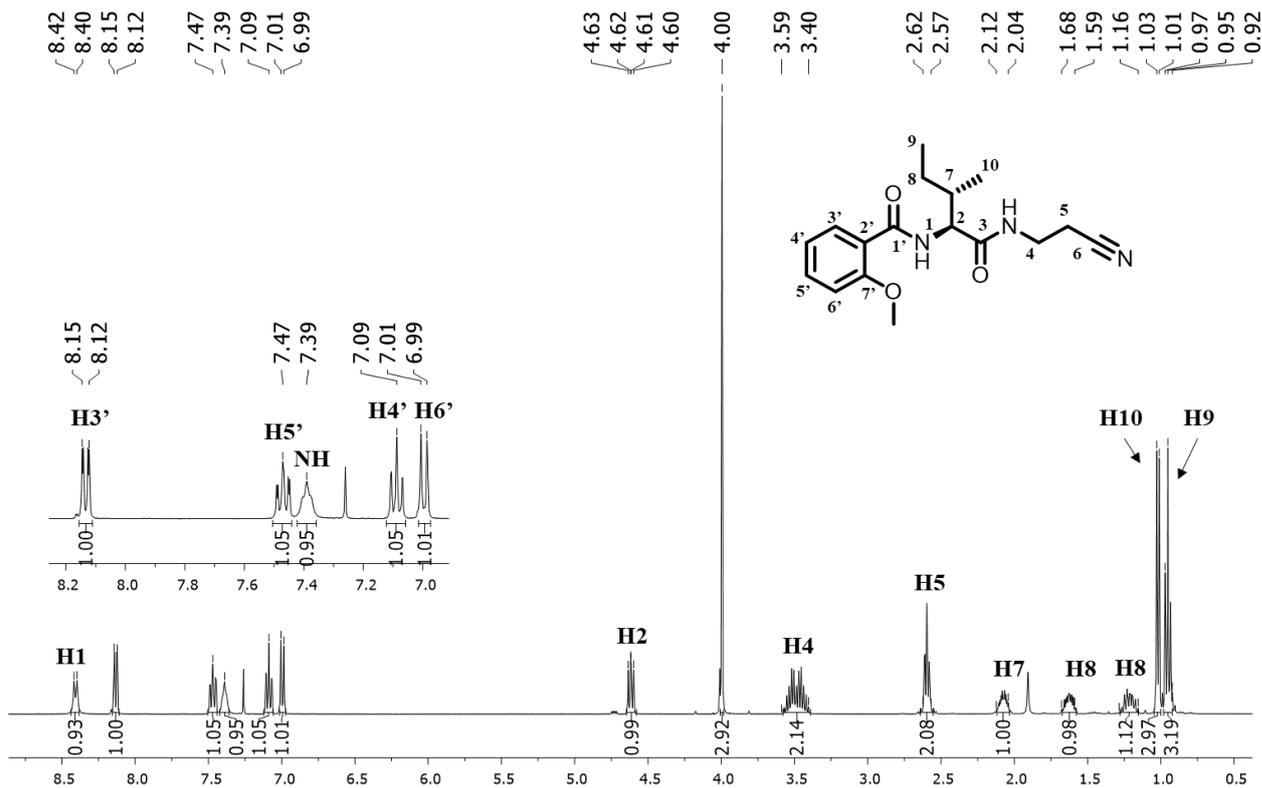


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H do composto **25d** (CDCl_3 , 400 MHz).

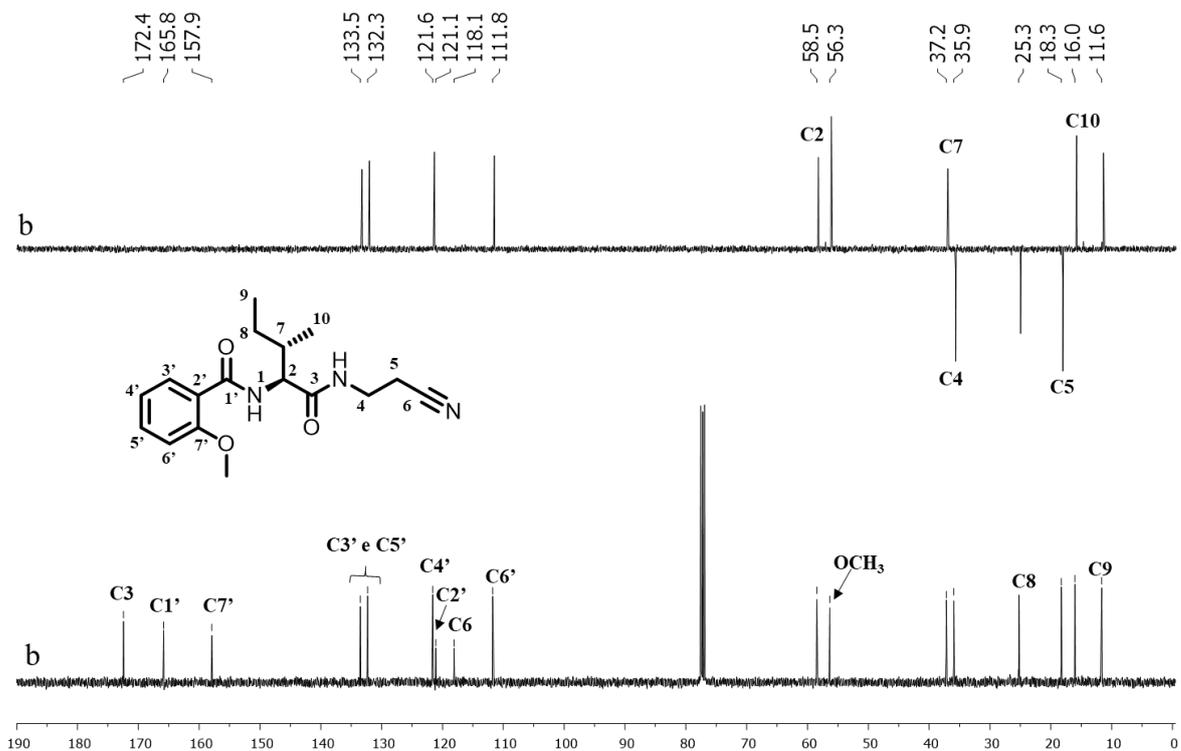


Figura 60. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25d** (CDCl_3 , 100 MHz).

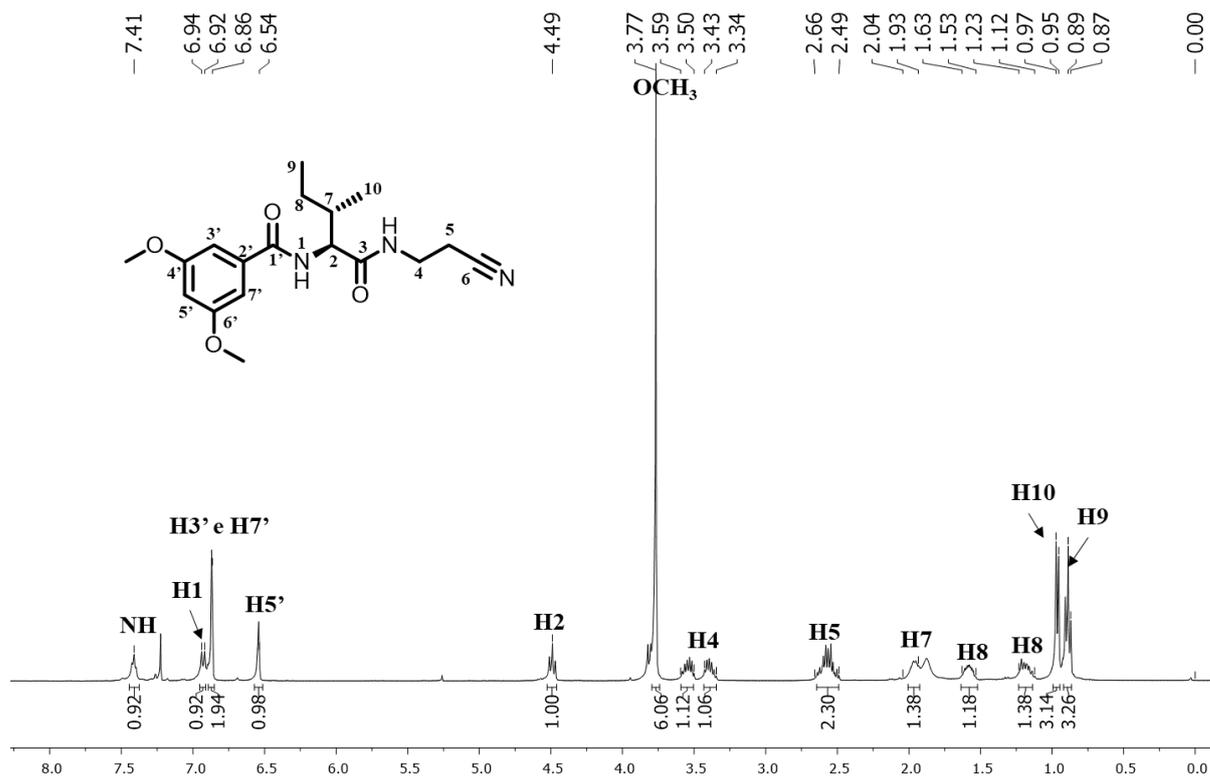


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H do composto **25e** (CDCl₃, 400 MHz).

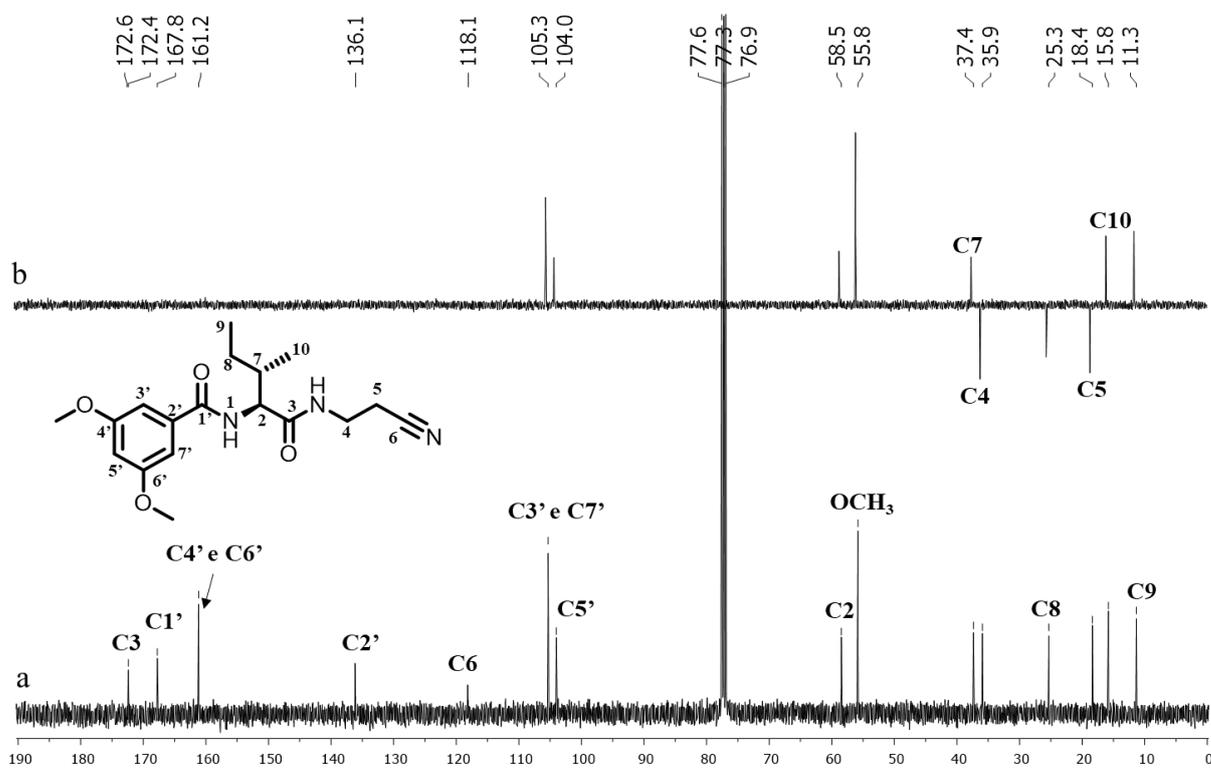


Figura 62. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25e** (CDCl₃, 100 MHz).

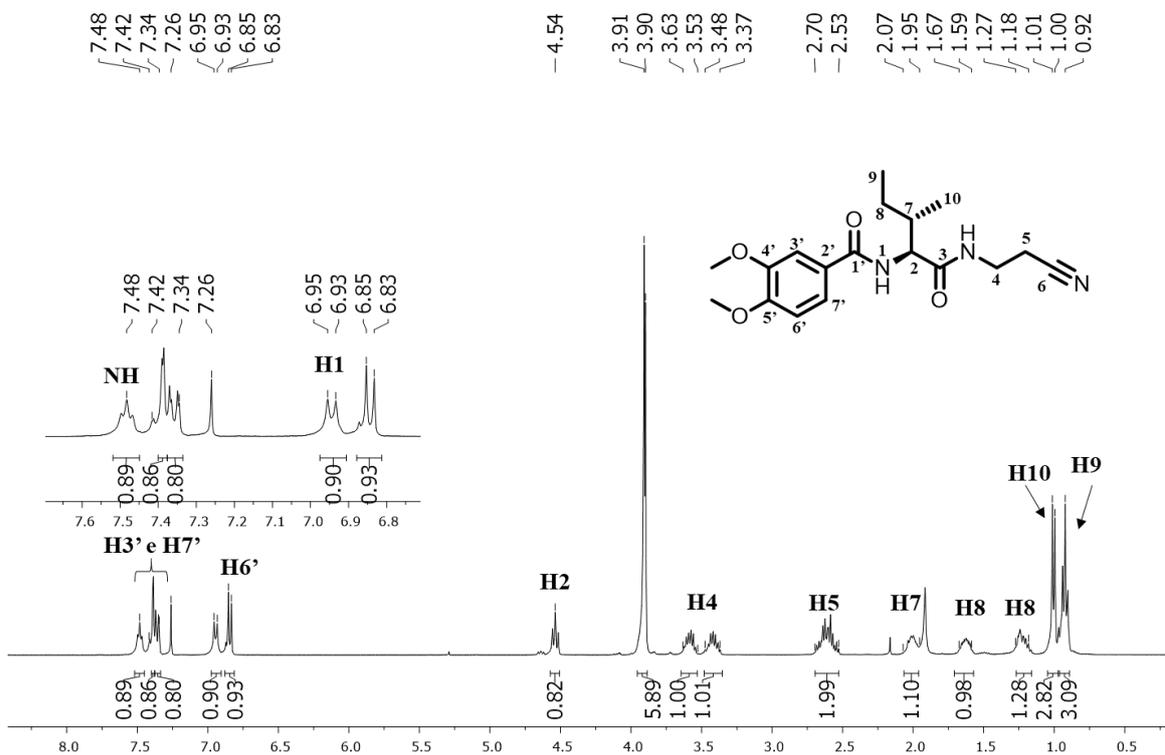


Figura 63. Espectro de RMN de ¹H do composto **25f** (CDCl₃, 400 MHz).

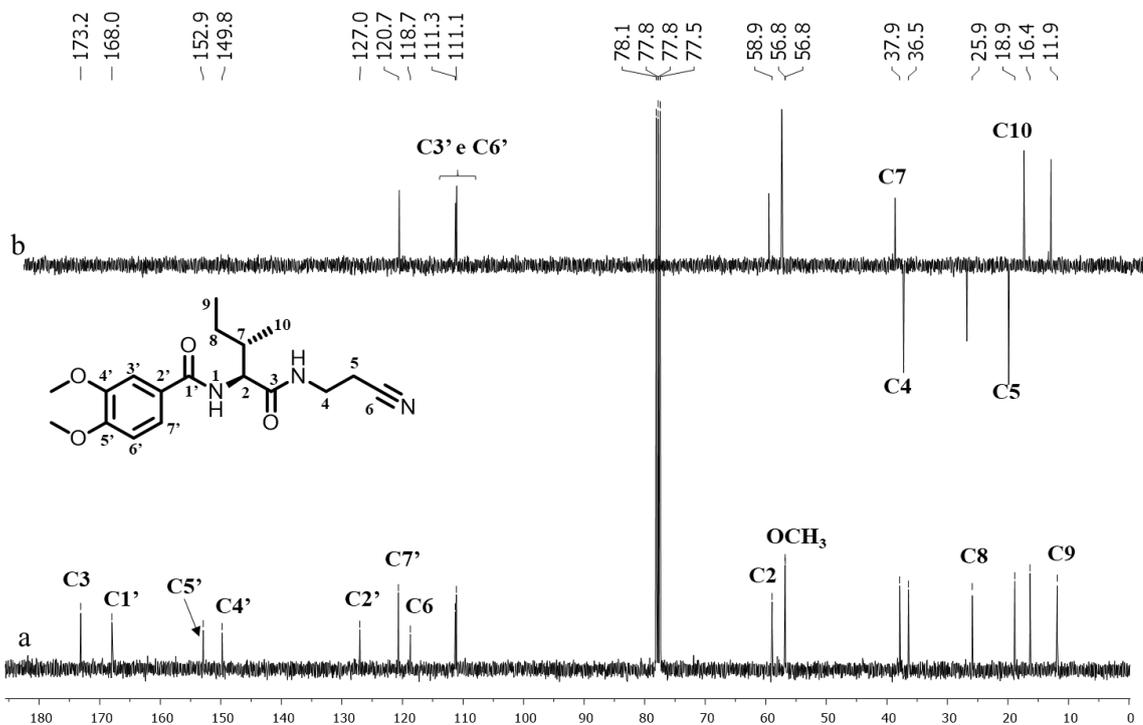


Figura 64. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25f** (CDCl₃, 100 MHz).

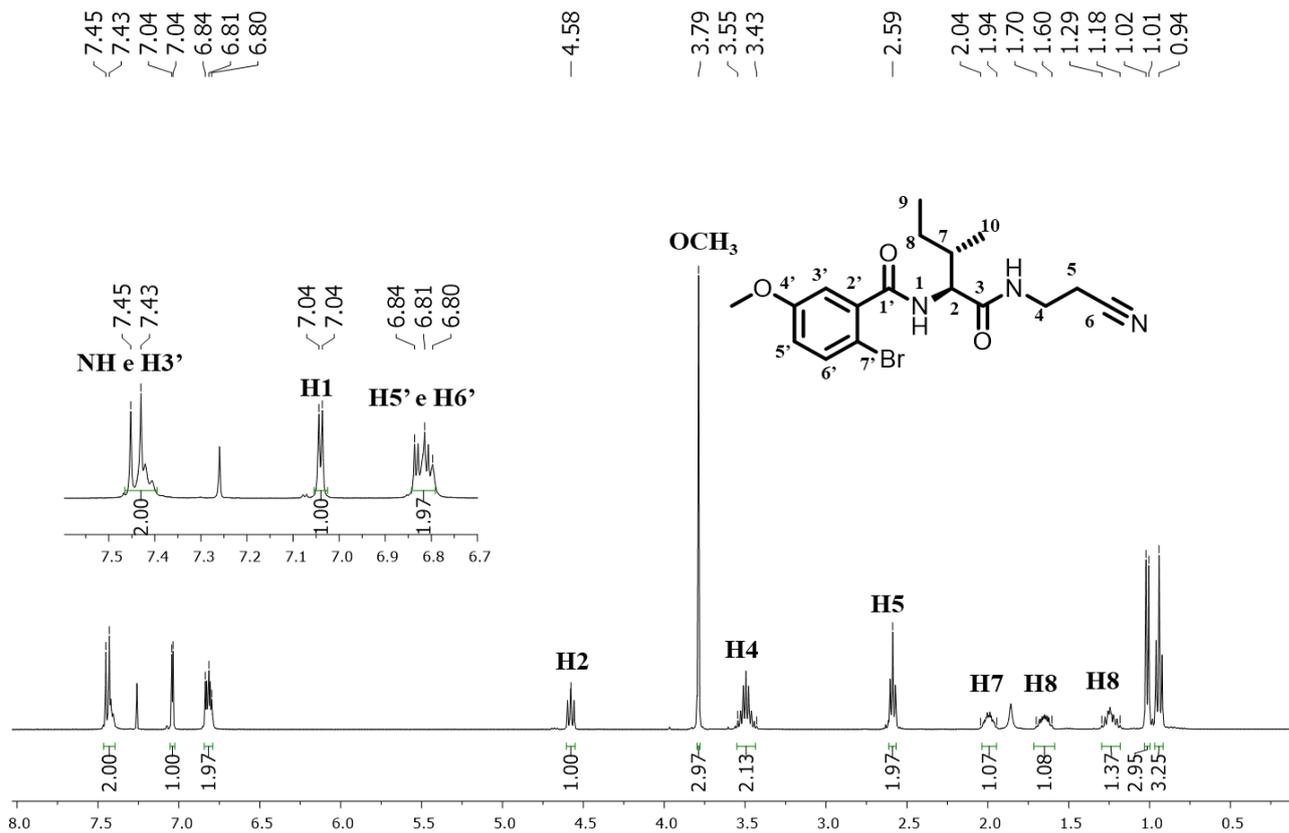


Figura 65. Espectro de RMN de ¹H do composto **25g** (CDCl₃, 400 MHz).

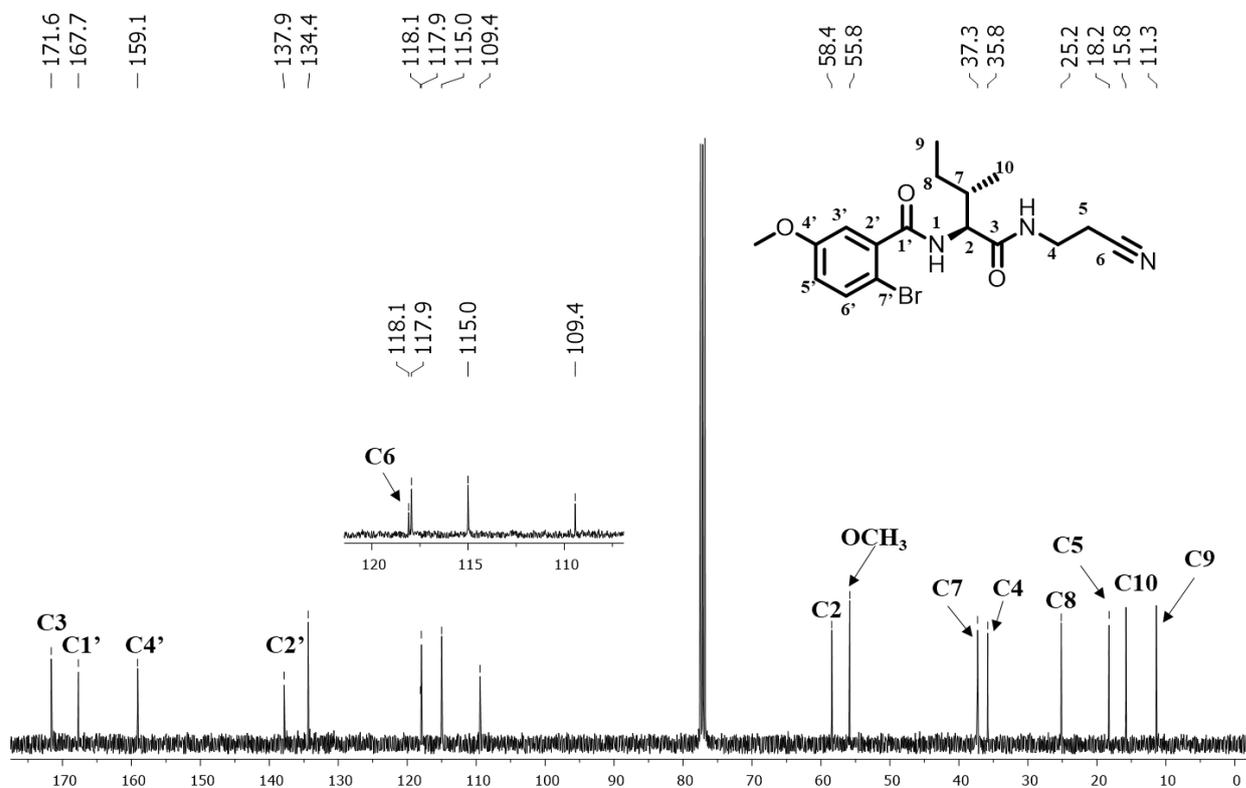


Figura 66. Espectro de RMN de ¹³C do composto **25g** (CDCl₃, 100 MHz).

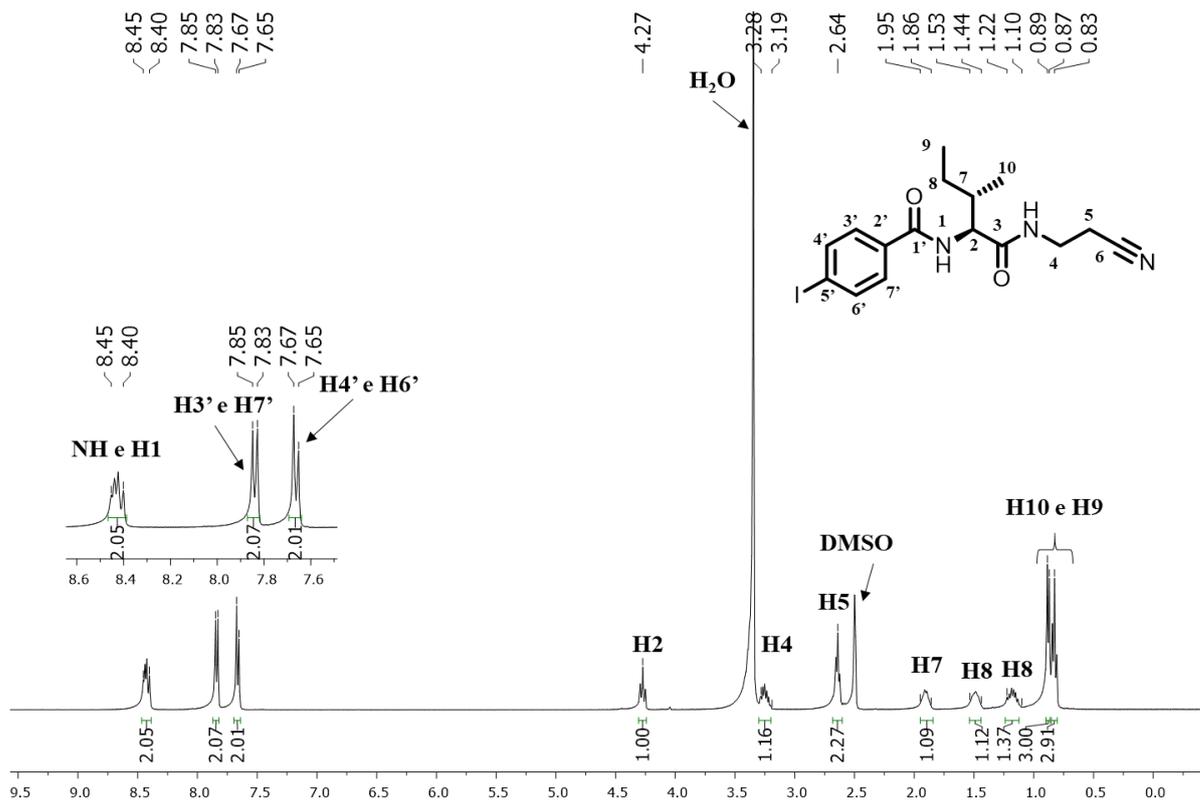


Figura 67. Espectro de RMN de ^1H do composto **25h** (DMSO, 400 MHz).

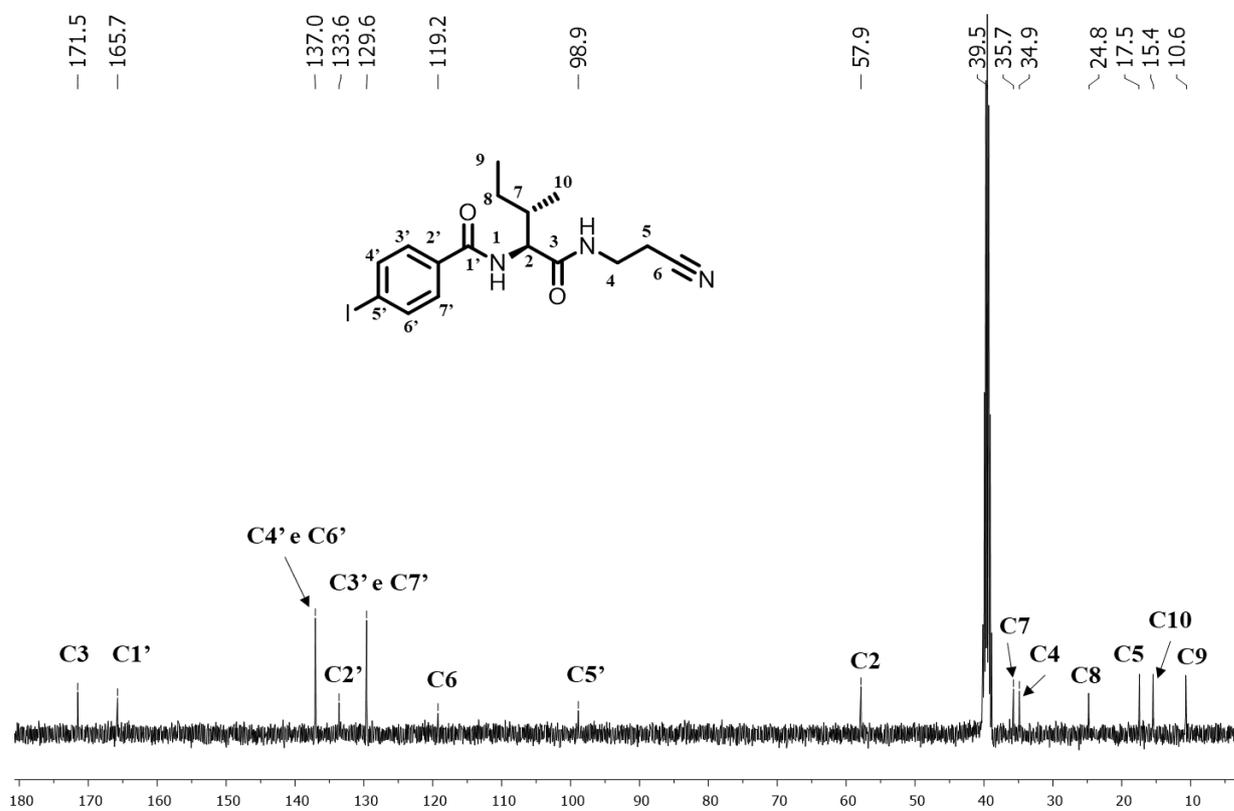


Figura 68. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **25g** (CDCl_3 , 100 MHz).

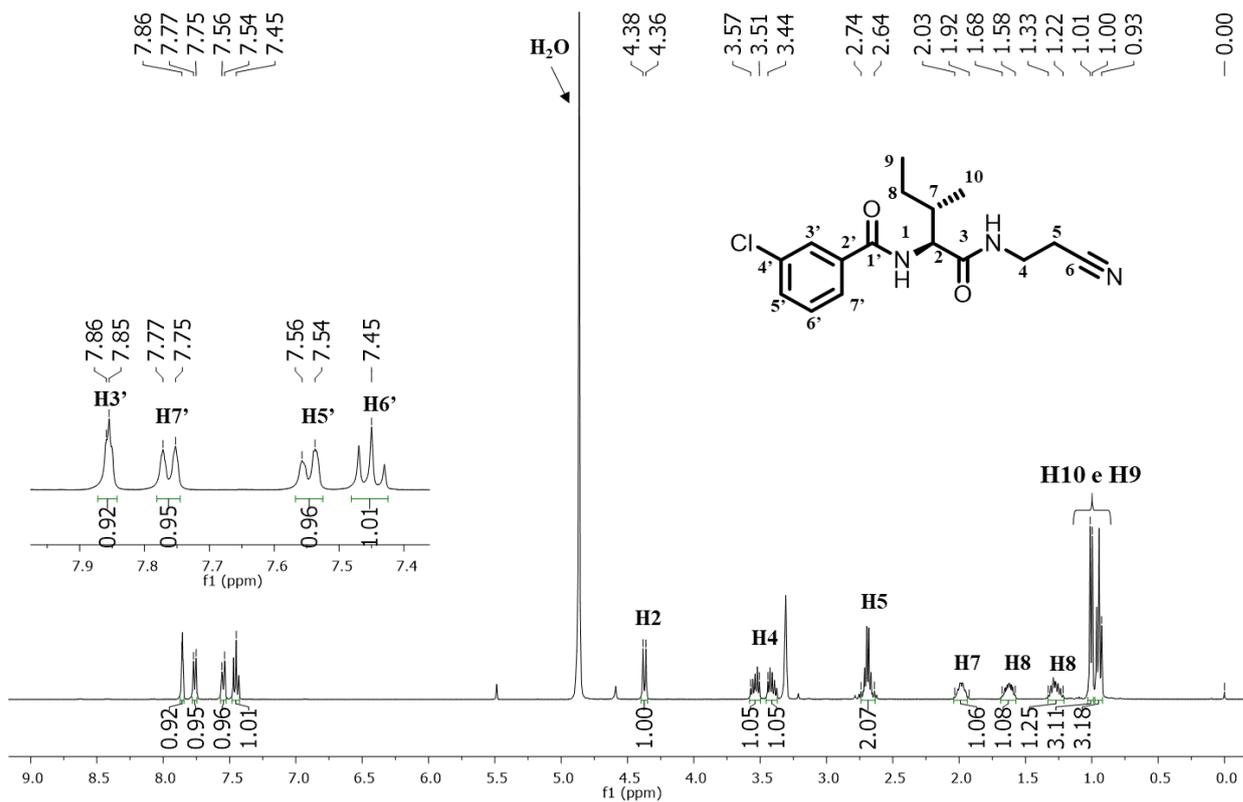


Figura 69. Espectro de RMN de ^1H do composto **25i** (CD_3OD , 400 MHz).

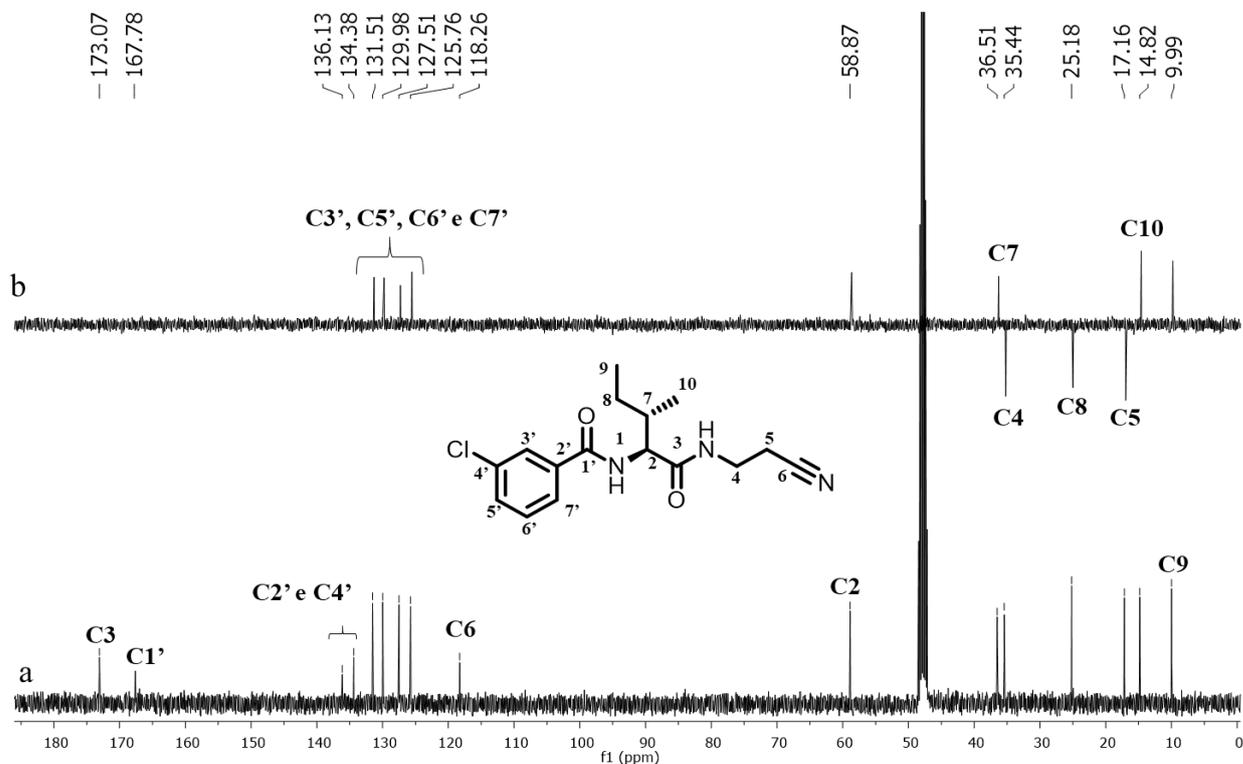


Figura 70. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25i** (CD_3OD , 100 MHz).

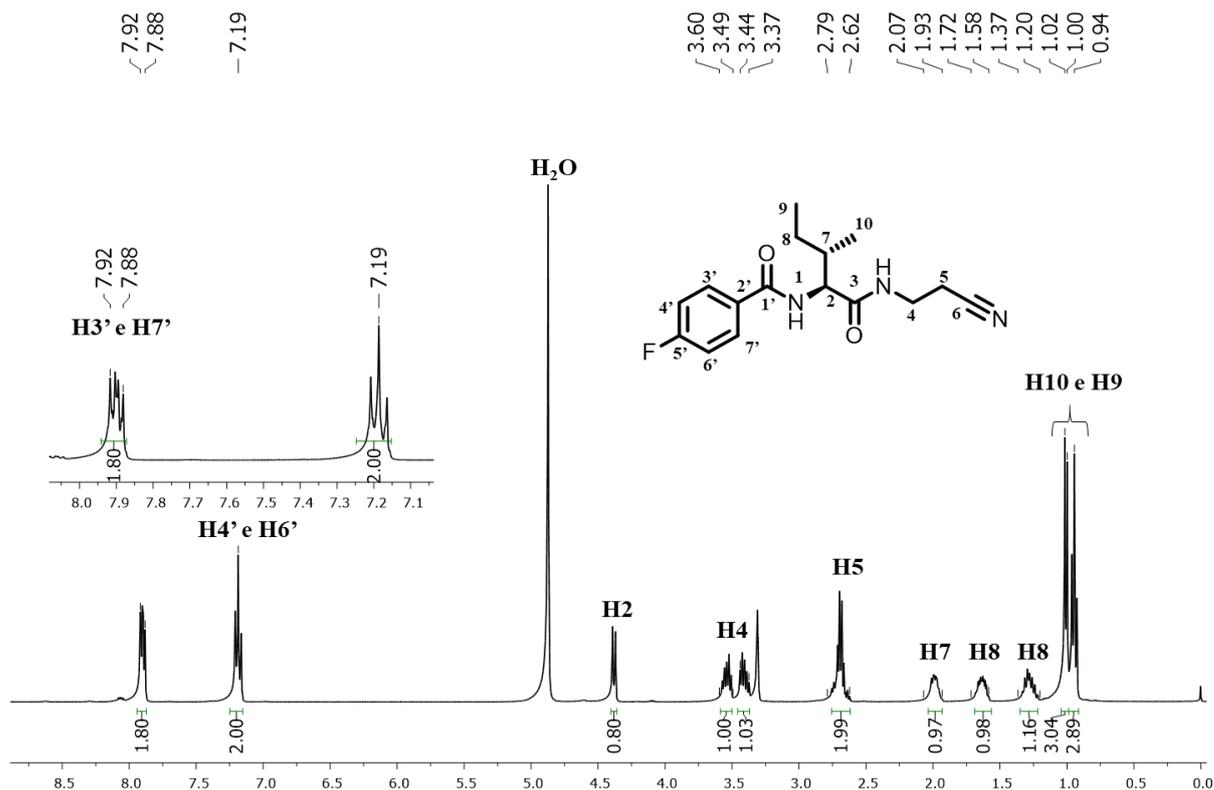


Figura 71. Espectro de RMN de ^1H do composto **25j** (CD₃OD, 400 MHz).

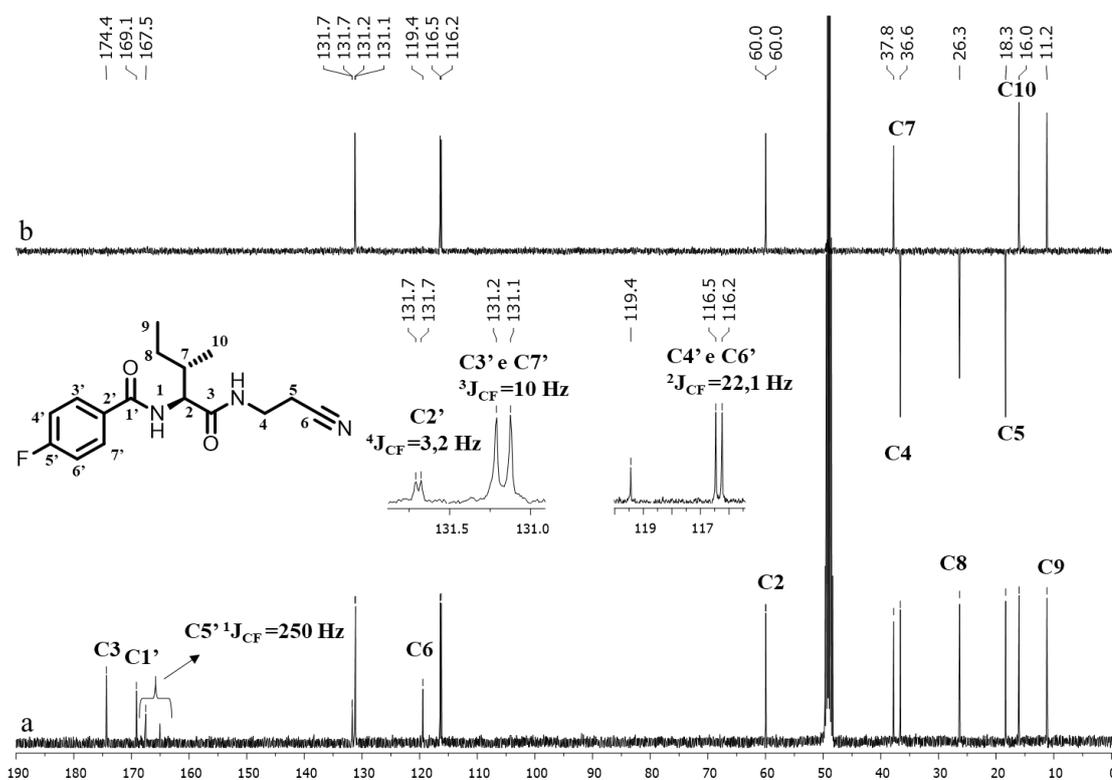


Figura 72. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25j** (CD₃OD, 100 MHz).

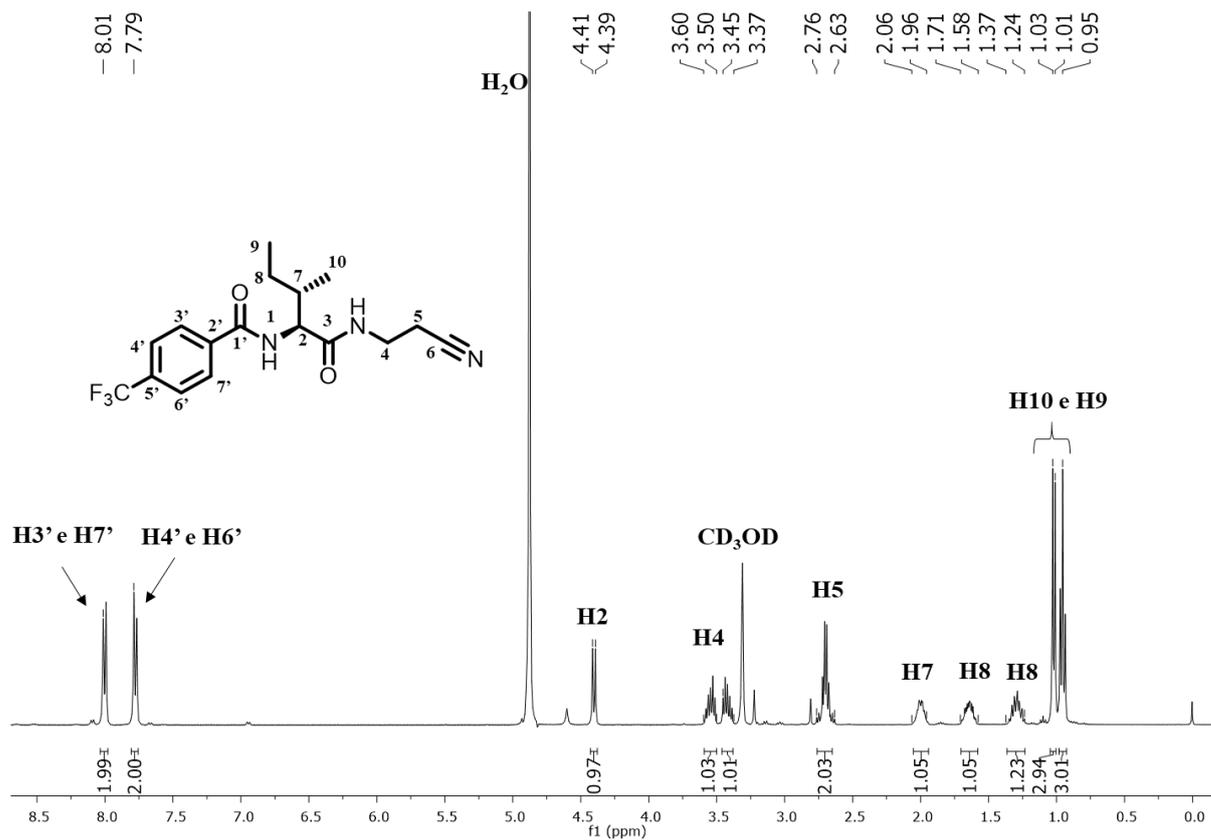


Figura 73. Espectro de RMN de ¹H do composto **25k** (CD₃OD, 400 MHz).

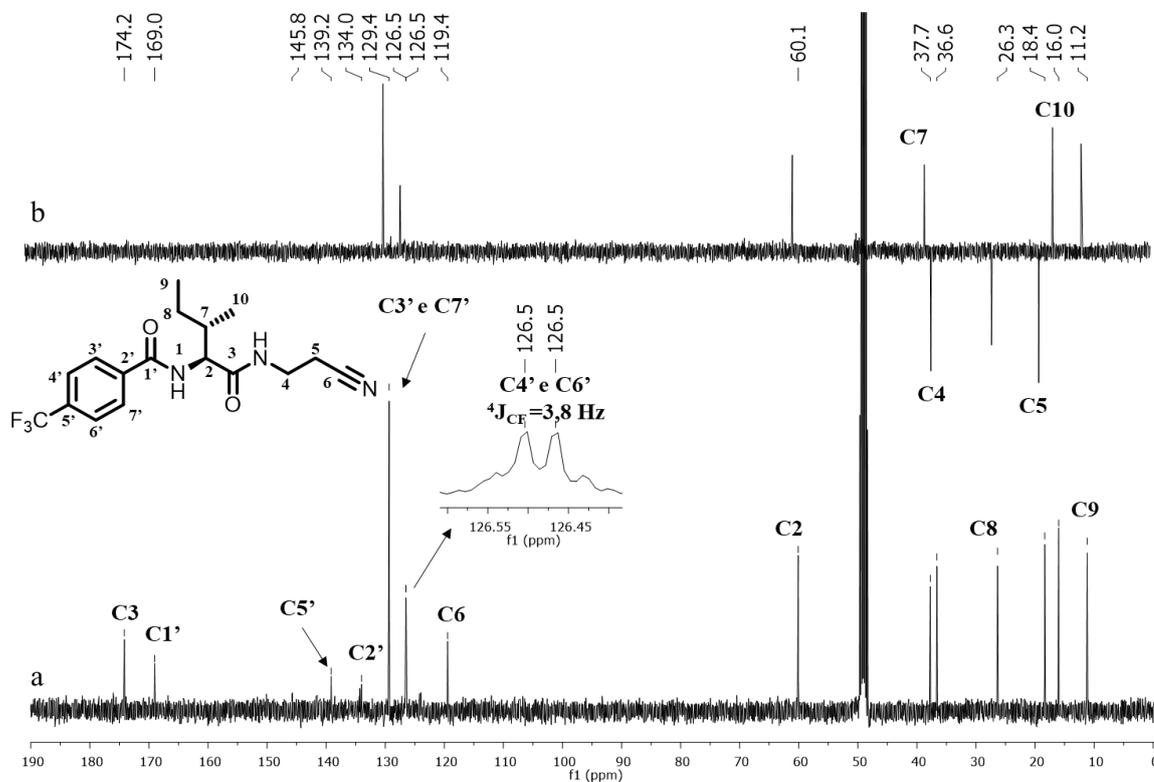


Figura 74. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25k** (CD₃OD, 100 MHz).

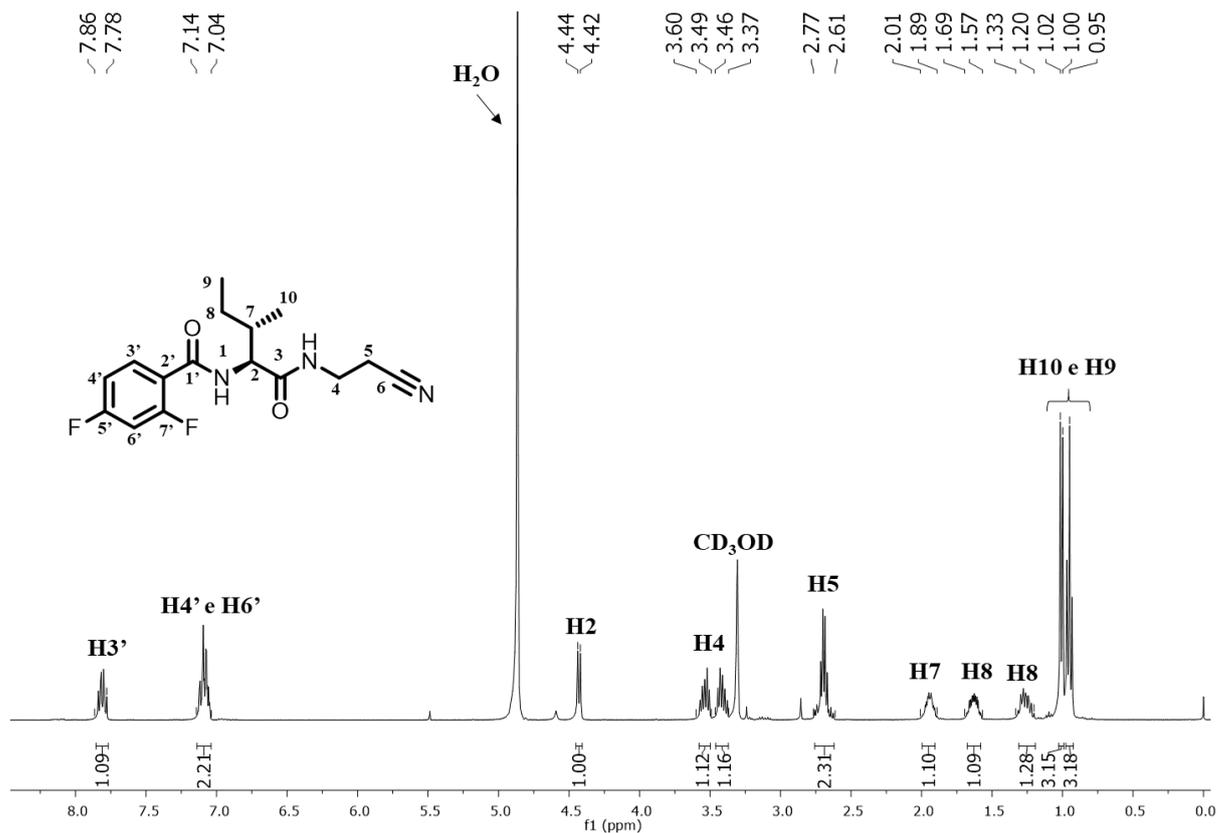


Figura 75. Espectro de RMN de ¹H do composto 251 (CD₃OD, 400 MHz).

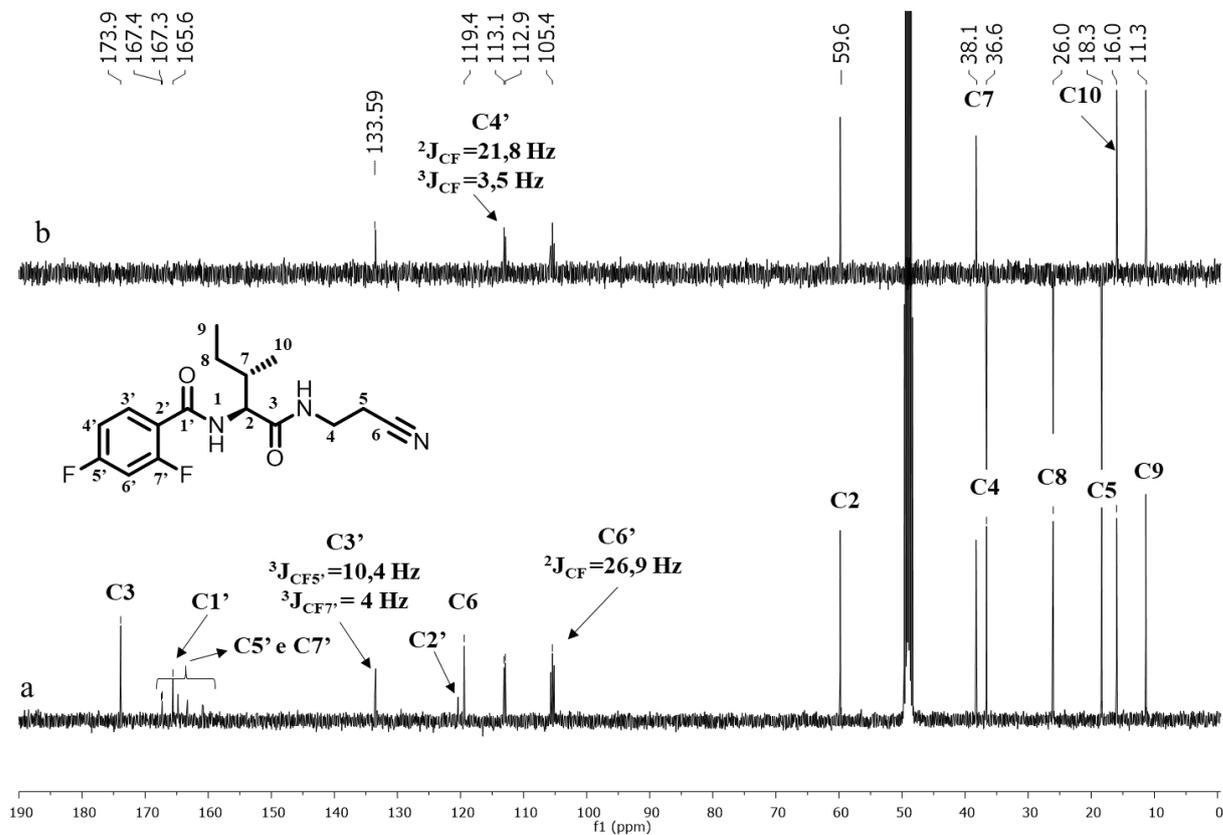


Figura 76. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto 251 (CD₃OD, 100 MHz).

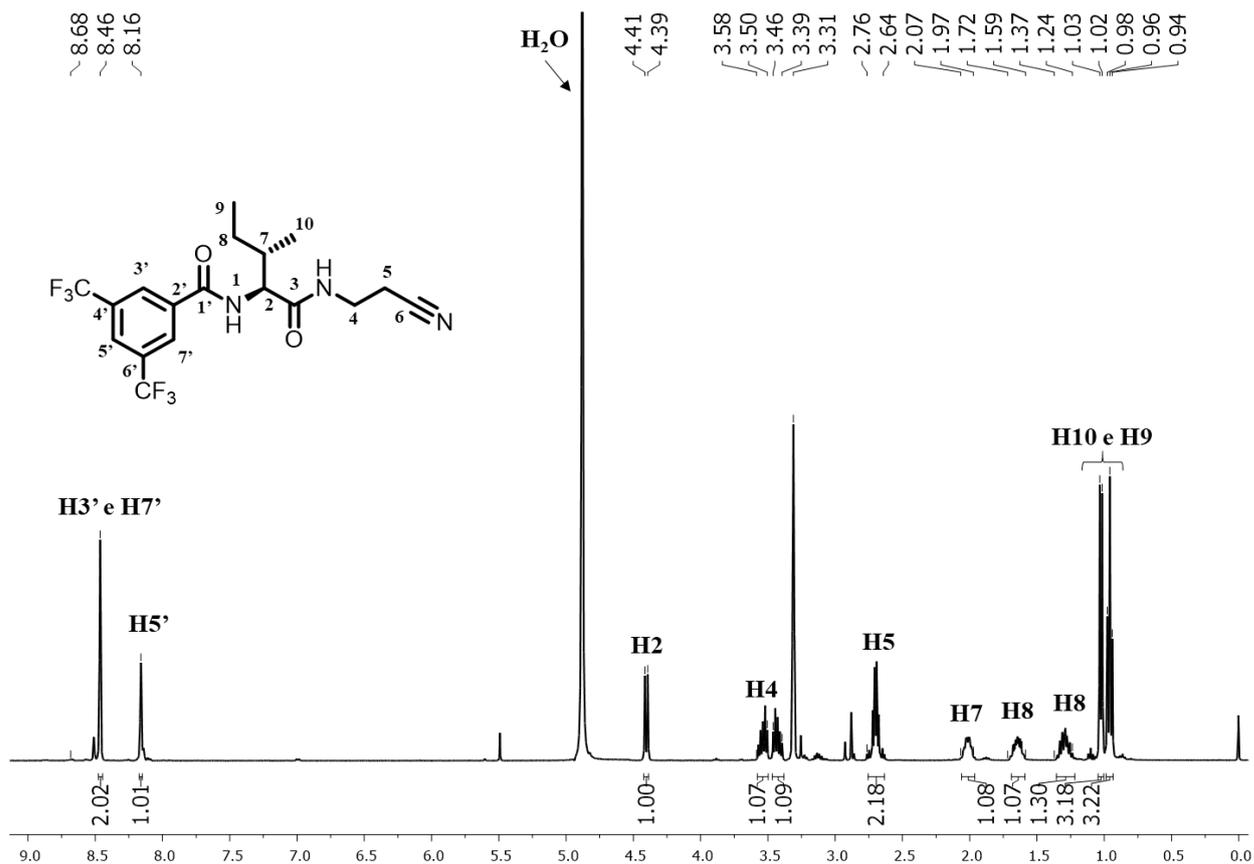


Figura 77. Espectros de RMN de ^1H do composto **25m** (CD₃OD, 400 MHz).

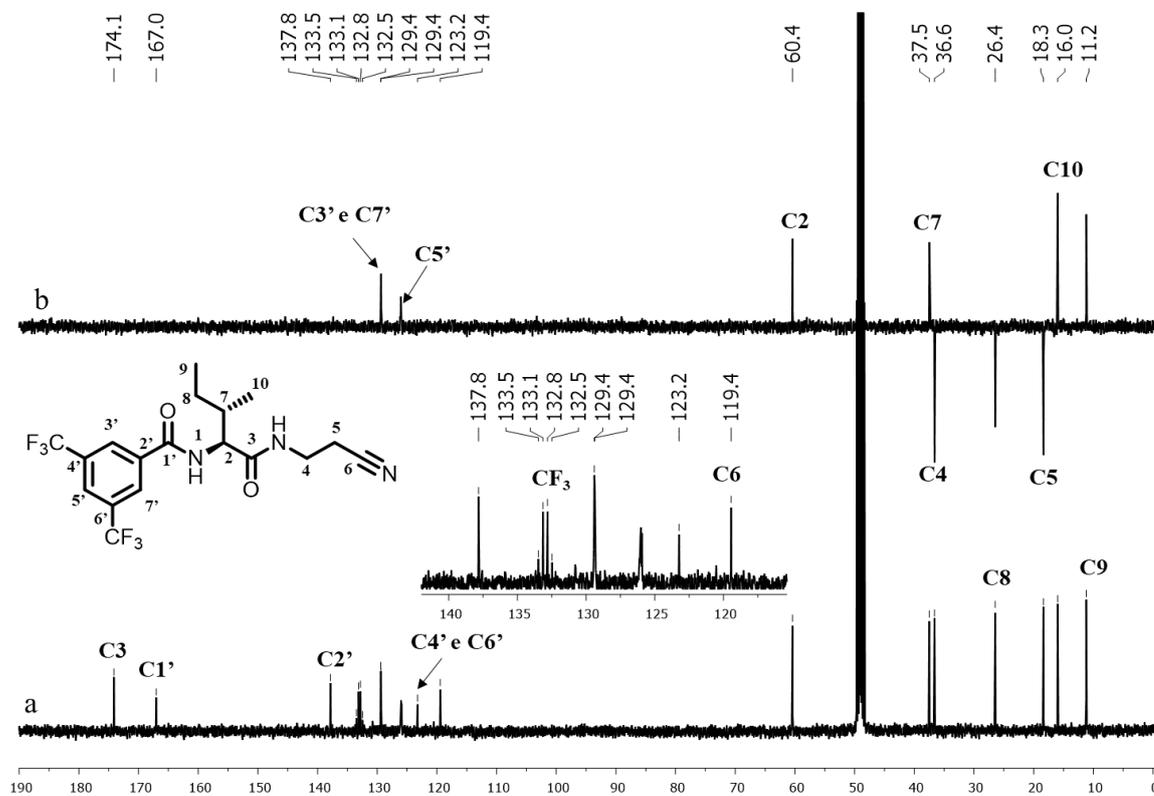


Figura 78. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25m** (CD₃OD, 100 MHz).

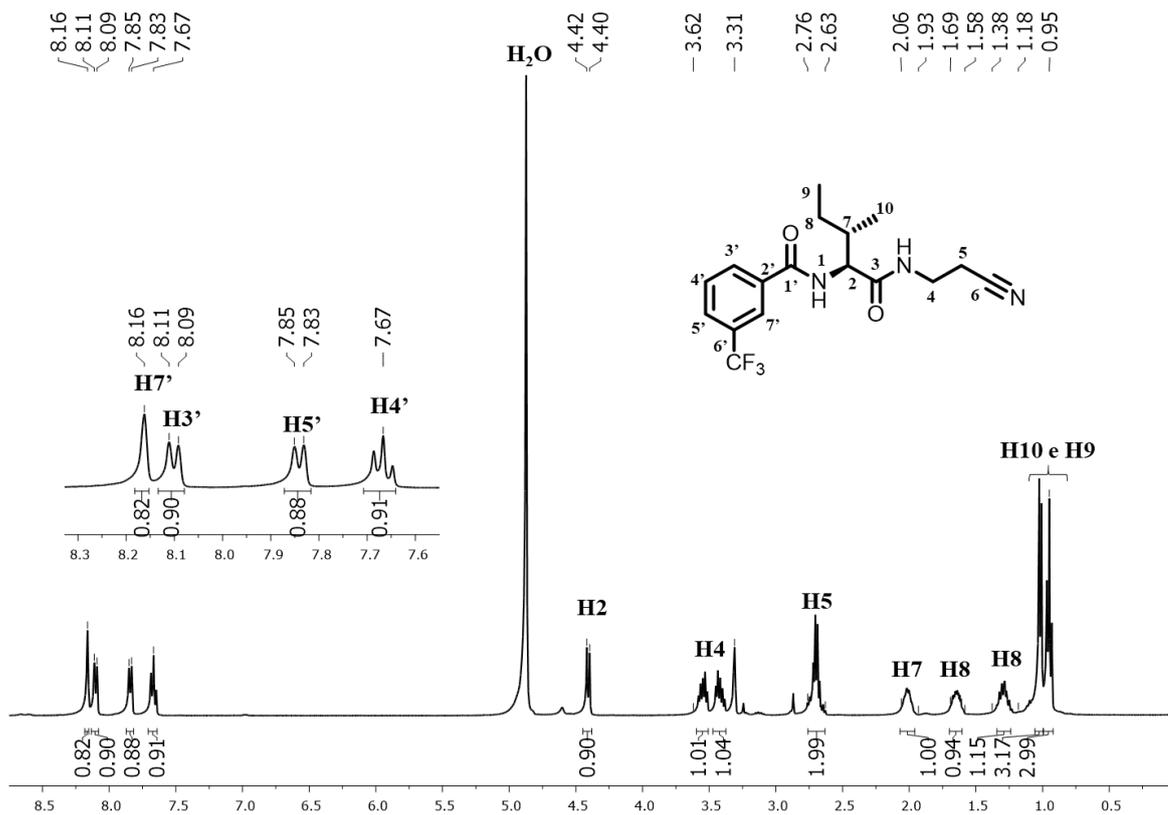


Figura 79. Espectro de RMN de ¹H do composto **25n** (CD₃OD, 400 MHz).

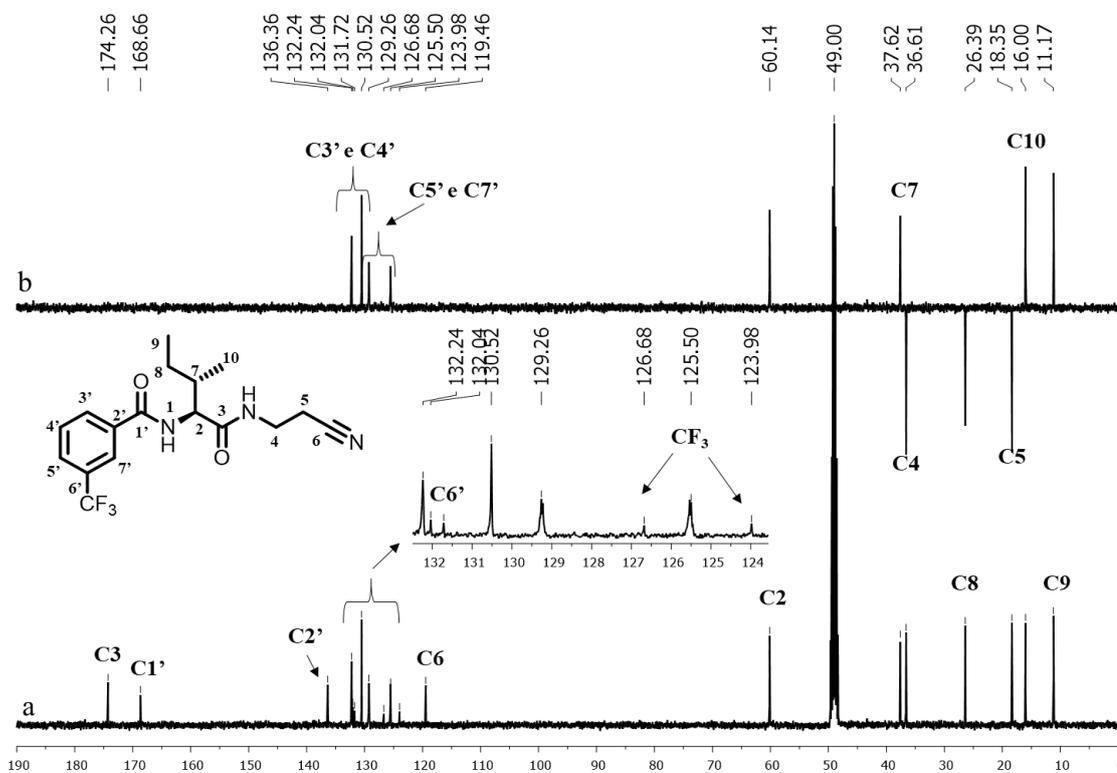


Figura 80. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25n** (CD₃OD, 100 MHz).

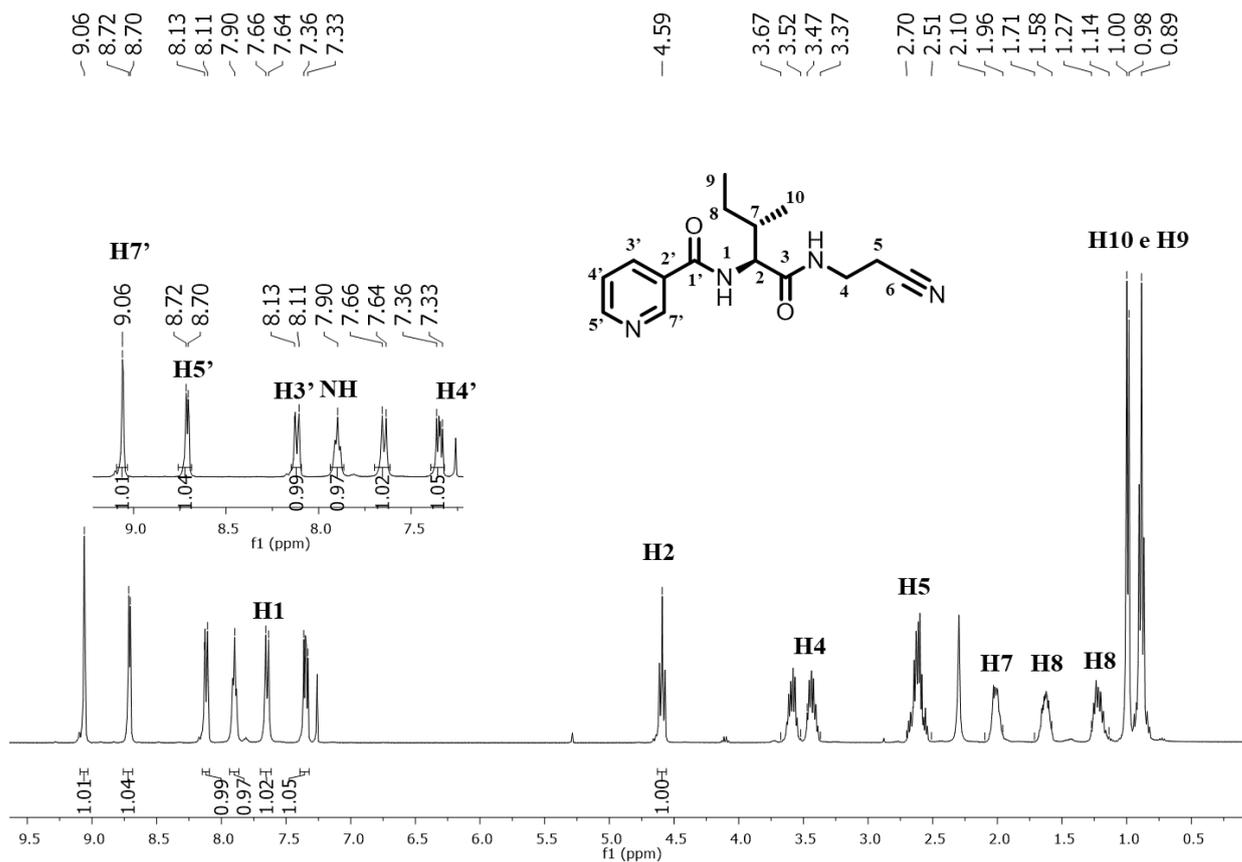


Figura 81. Espectro de RMN de ^1H do composto **25o** (CDCl_3 , 400 MHz).

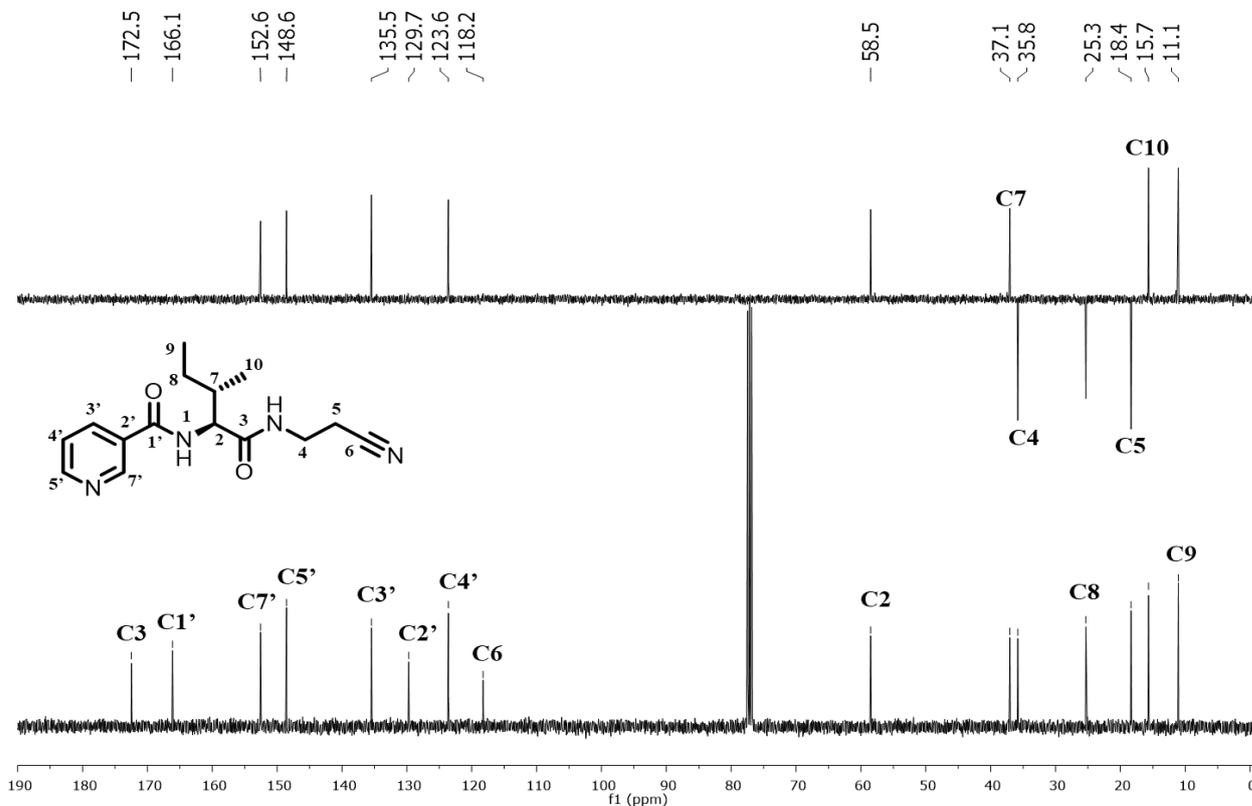


Figura 82. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **25o** (CDCl_3 , 100 MHz).

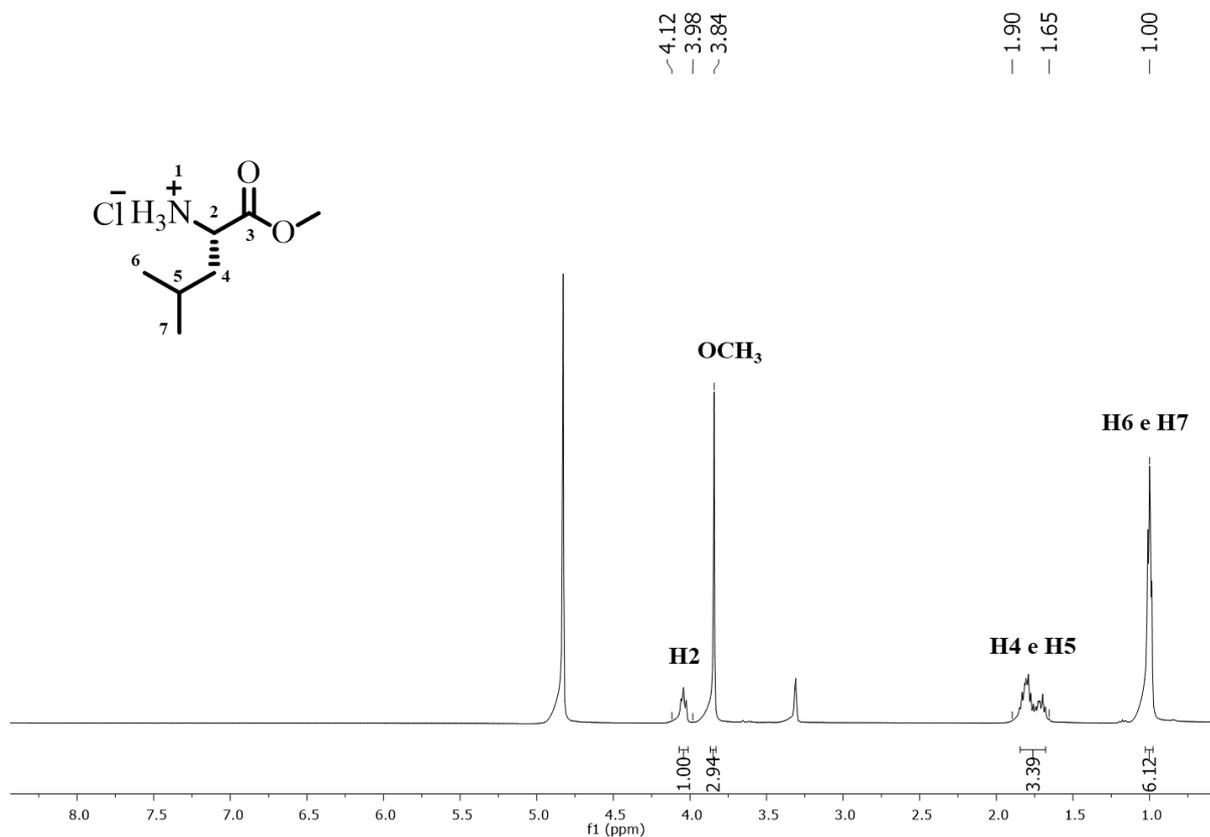


Figura 85. Espectro de RMN de ^1H do composto **33** (CD_3OD , 400 MHz).

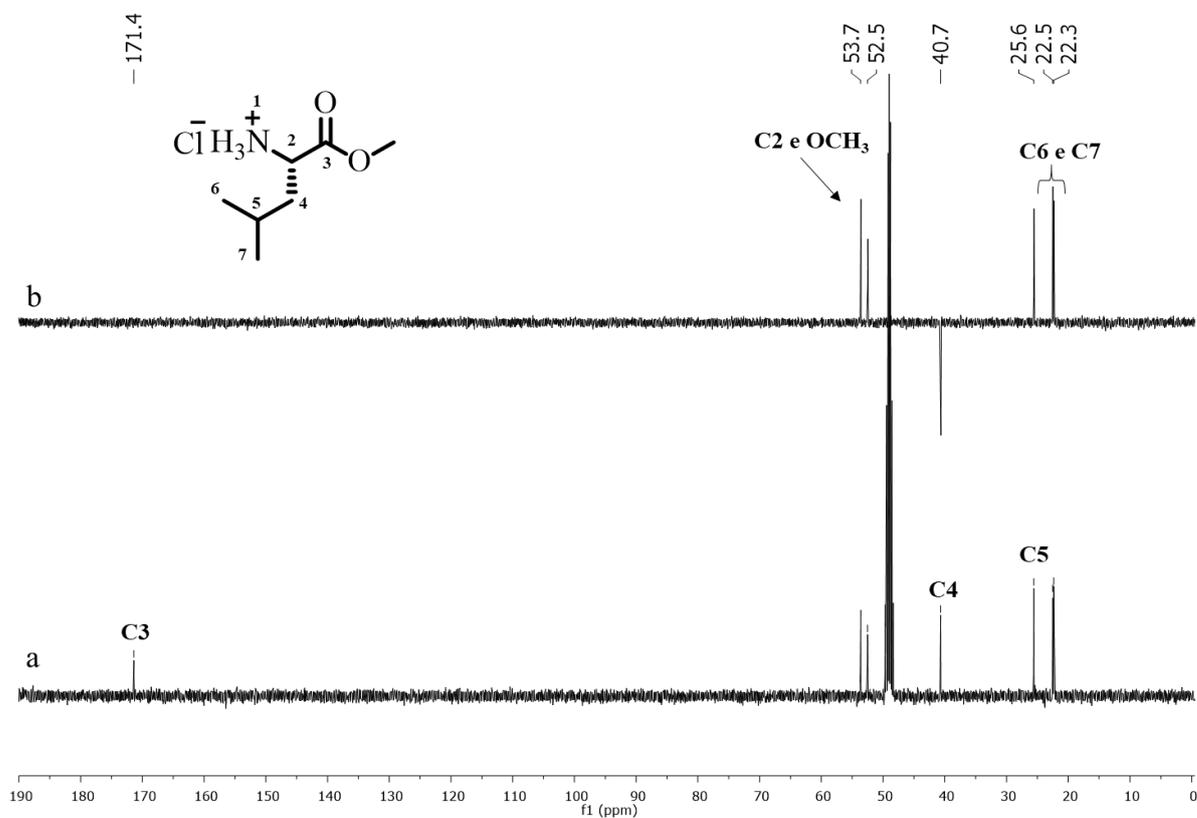


Figura 86. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **33** (CD_3OD , 100 MHz).

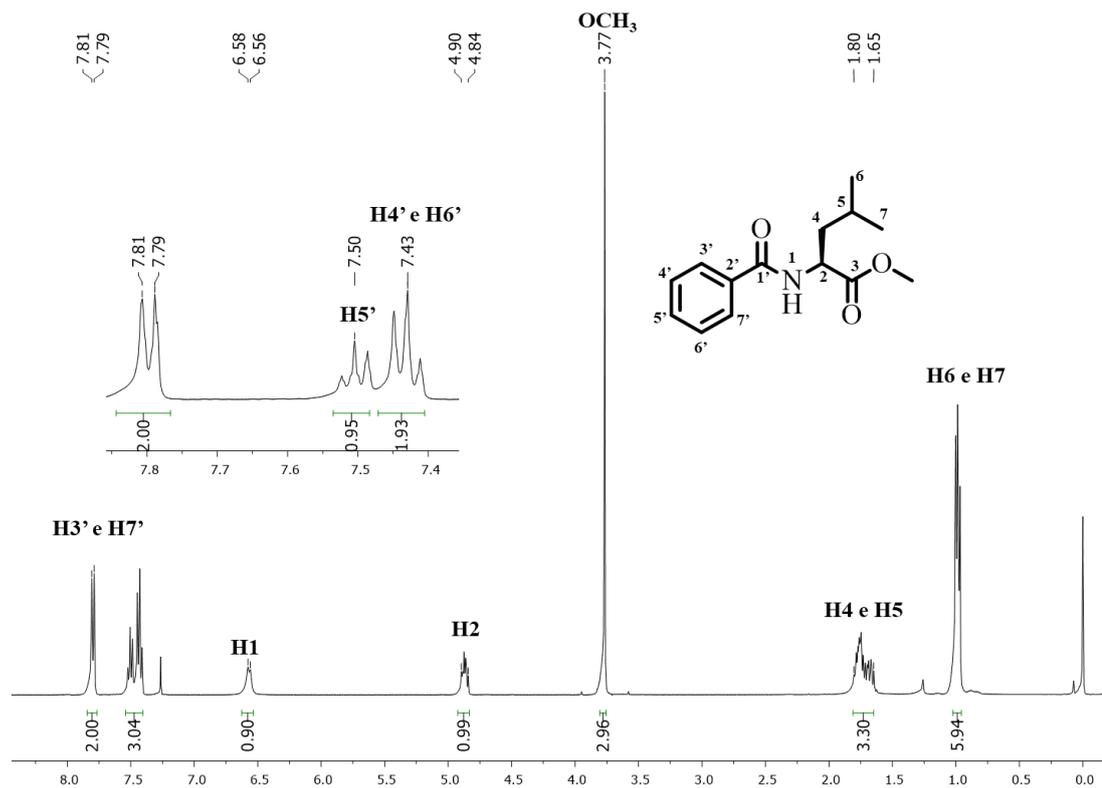


Figura 87. Espectro de RMN de ^1H do composto **34a** (CDCl_3 , 400 MHz).

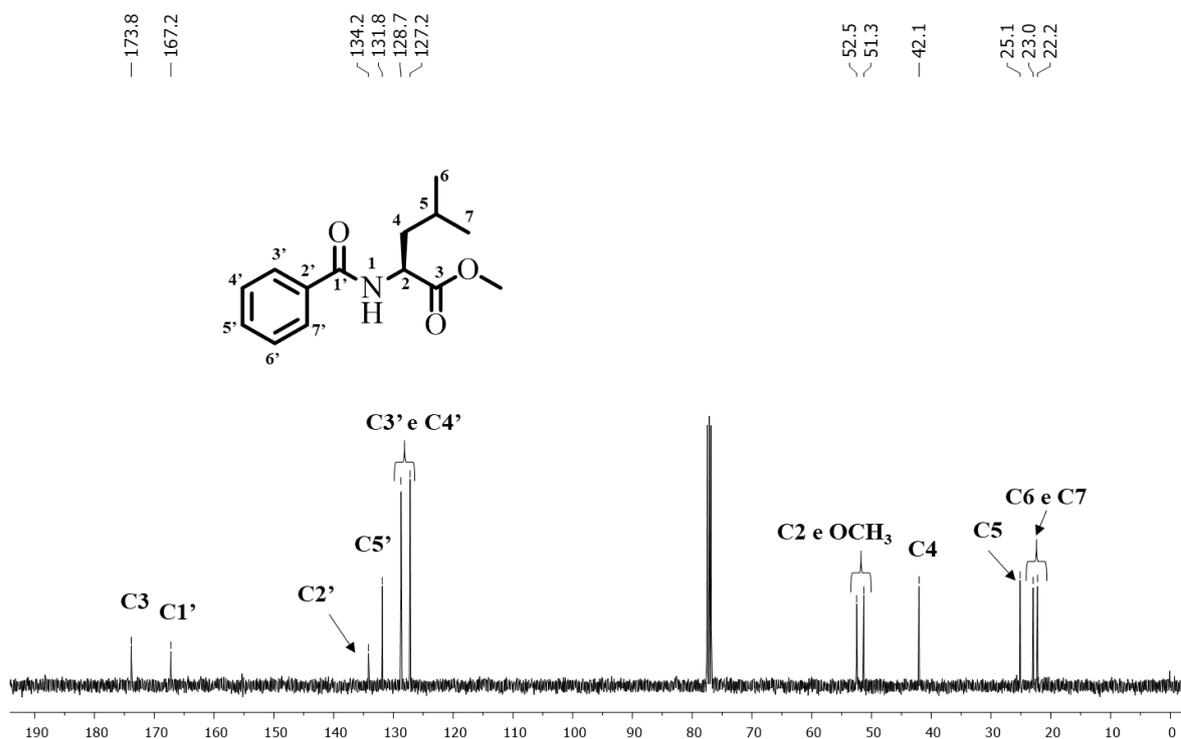


Figura 88. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **34a** (CDCl_3 , 100 MHz).

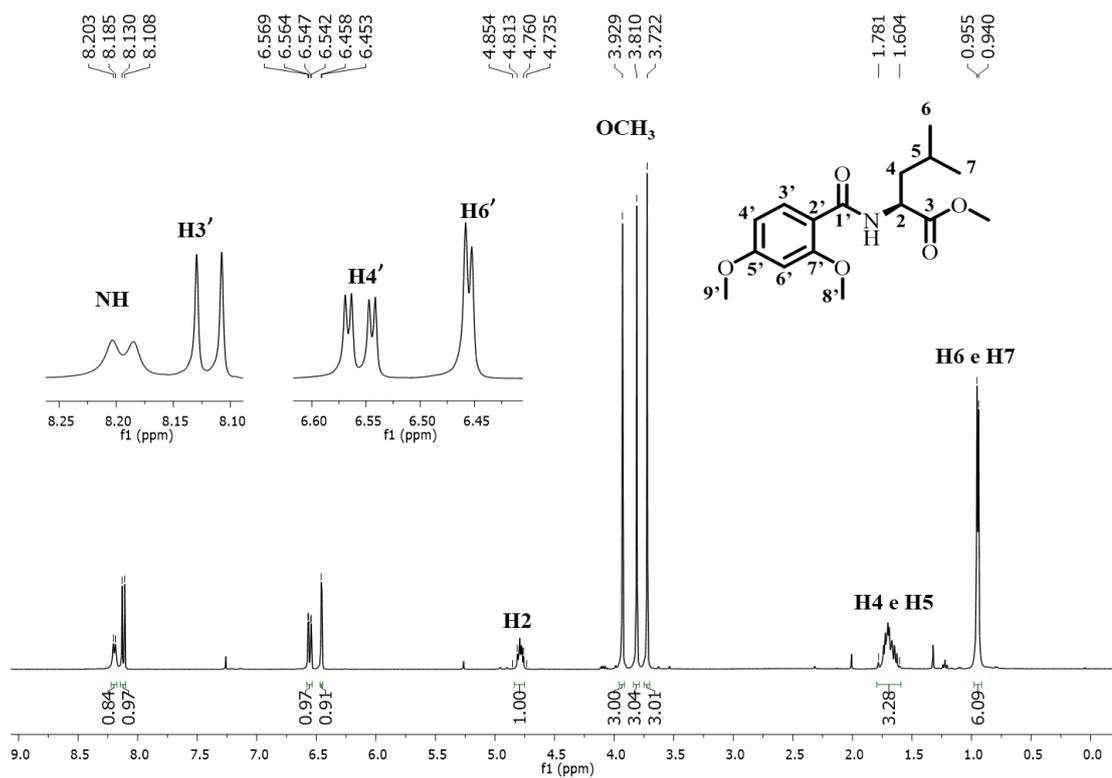


Figura 89. Espectro de RMN de ¹H do composto **34b** (CDCl₃, 400 MHz).

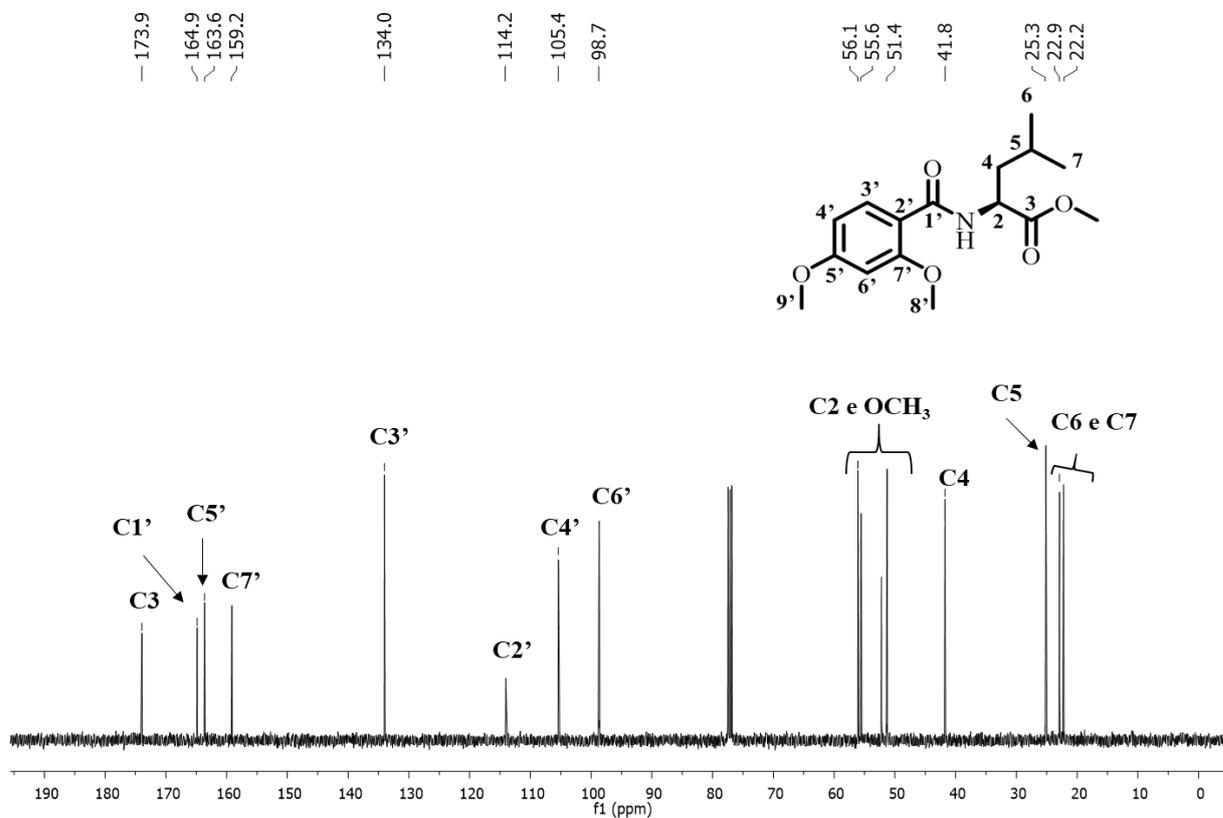


Figura 90. Espectro de RMN de ¹³C do composto **34b** (CDCl₃, 100 MHz).

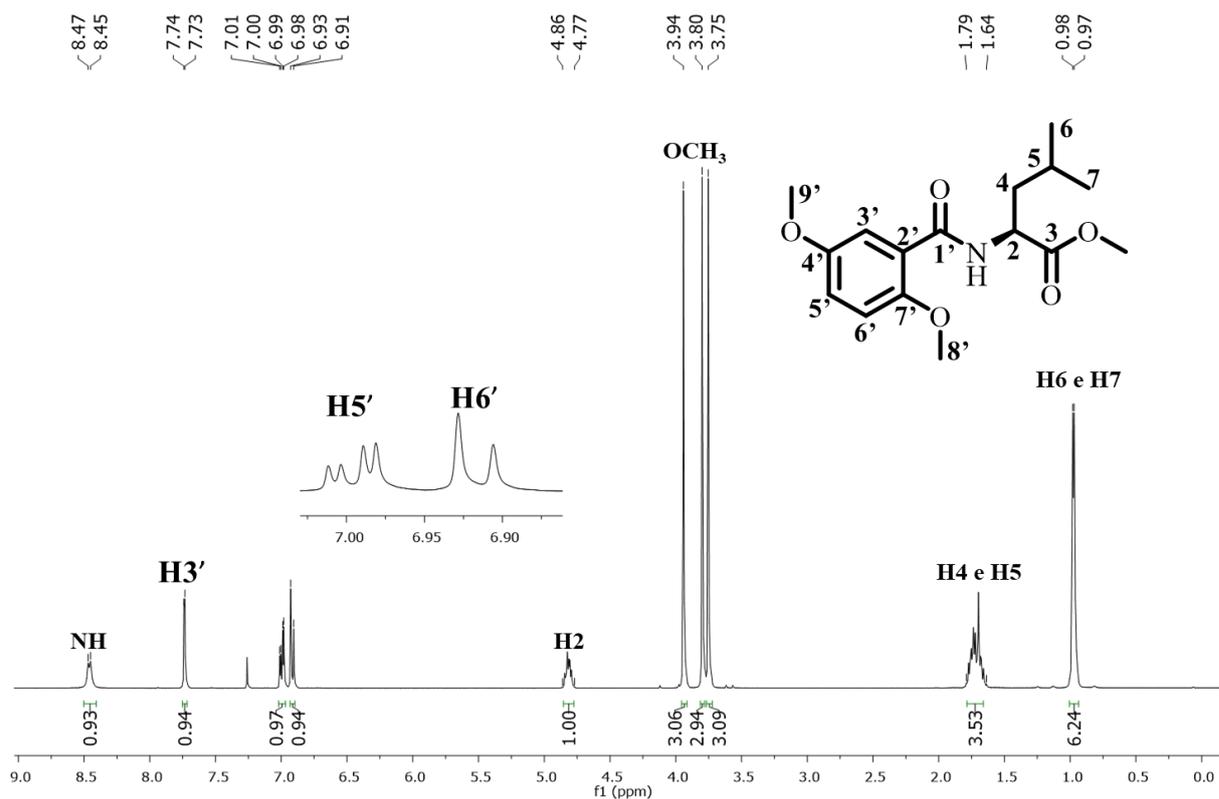


Figura 91. Espectro de RMN de ^1H do composto **34c** (CDCl₃, 400 MHz).

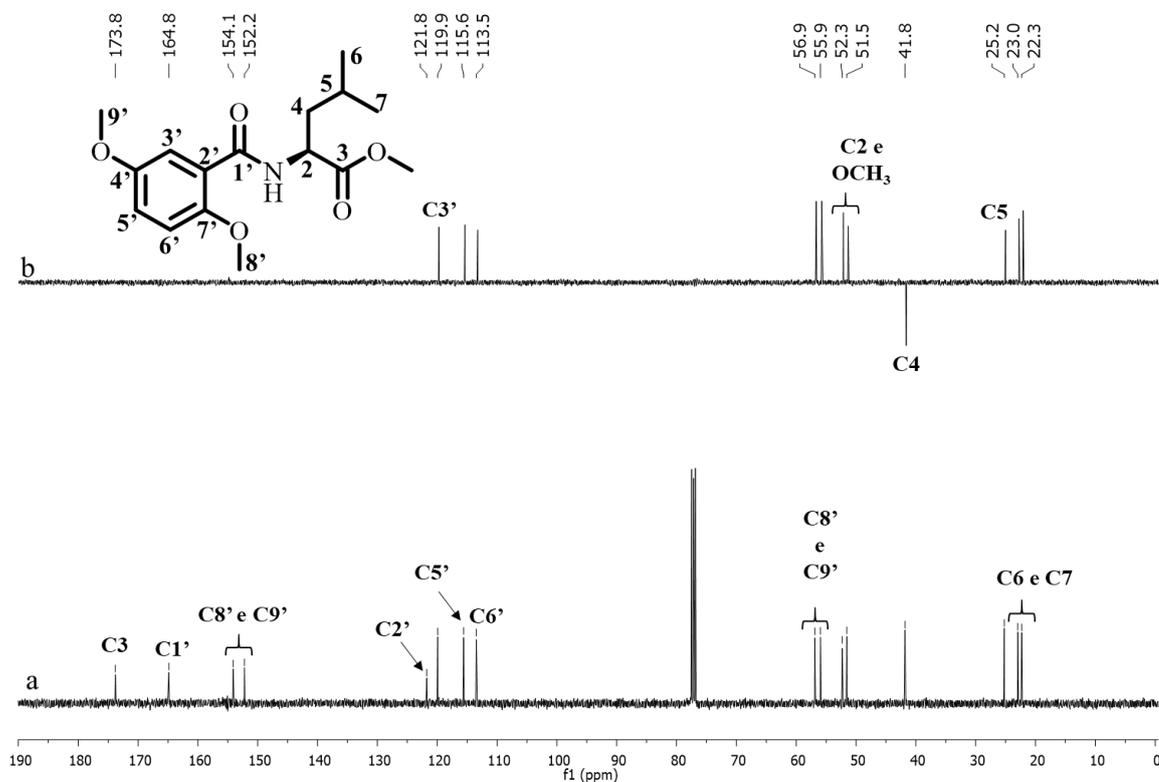


Figura 92. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **34c** (CDCl₃, 100 MHz).

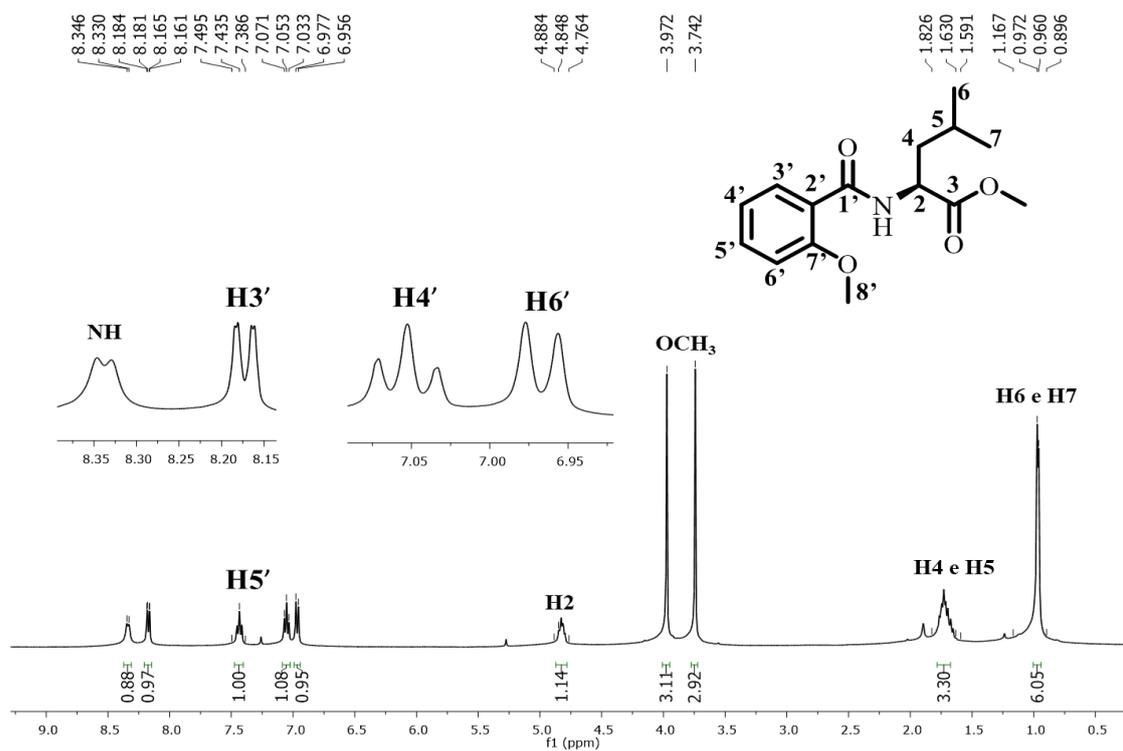


Figura 93. Espectro de RMN de ^1H do composto **34d** (CDCl₃, 400 MHz).

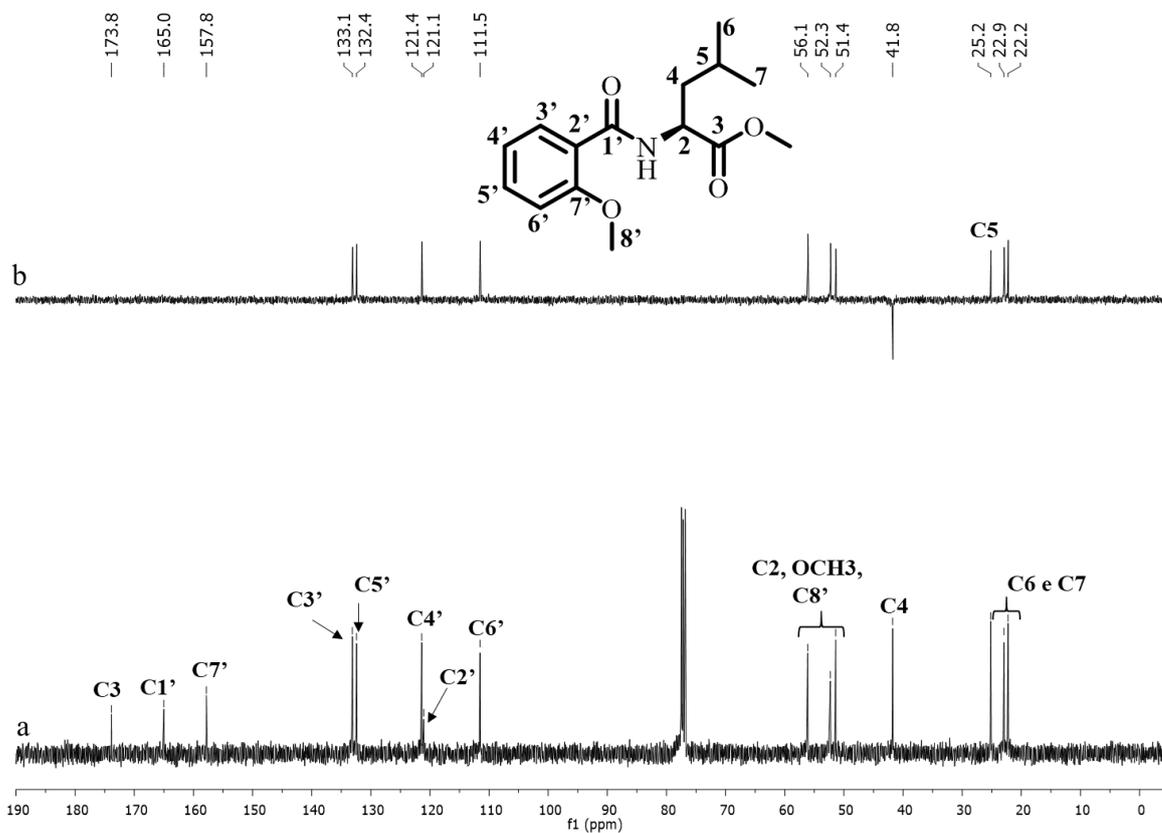


Figura 94 Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **34d** (CDCl₃, 100 MHz).

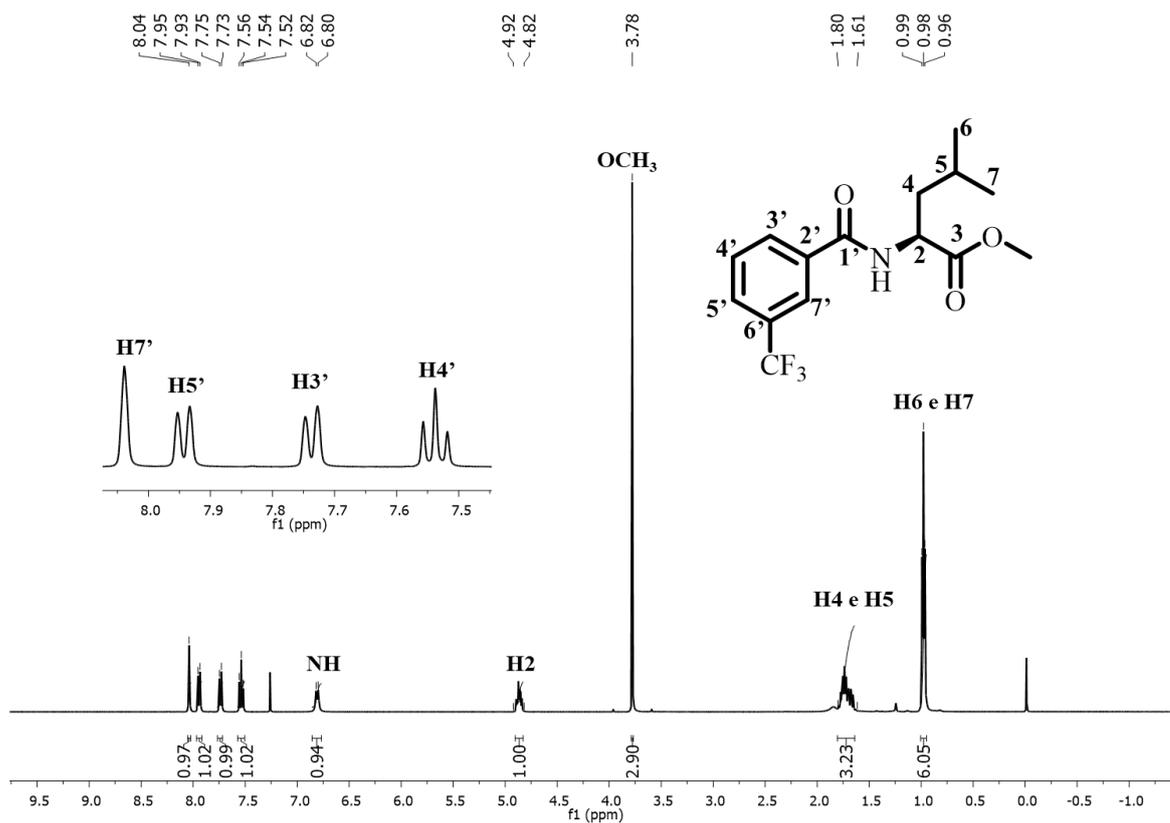


Figura 95. Espectro de RMN de ^1H do composto **34e** (CDCl₃, 400 MHz).

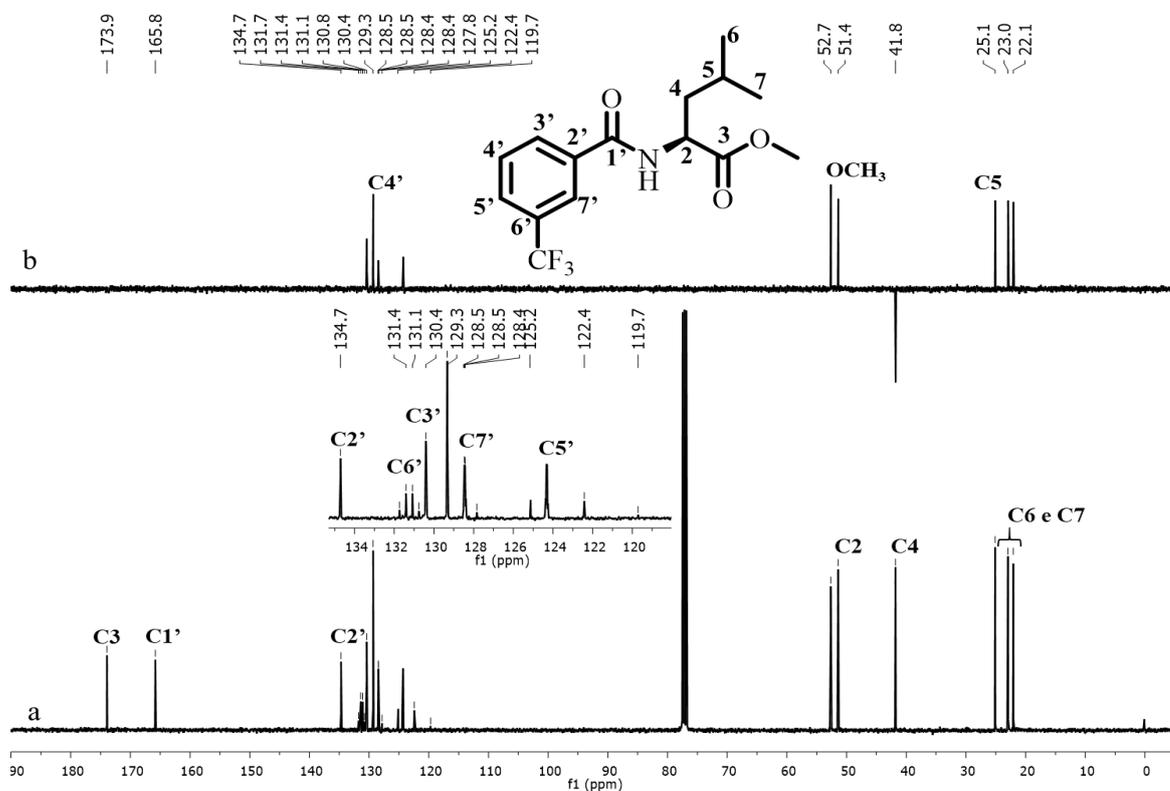


Figura 96. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **34e** (CDCl₃, 100 MHz).

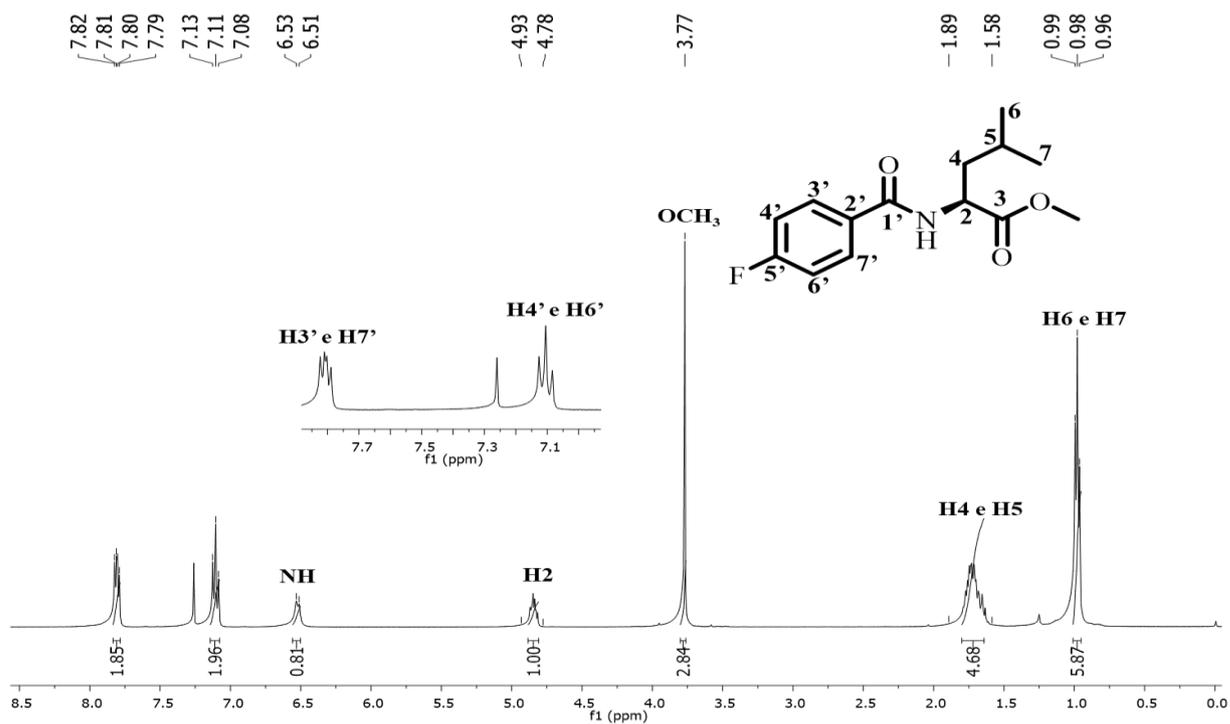


Figura 97. Espectro de RMN de ^1H do composto **34f** (CDCl_3 , 400 MHz).

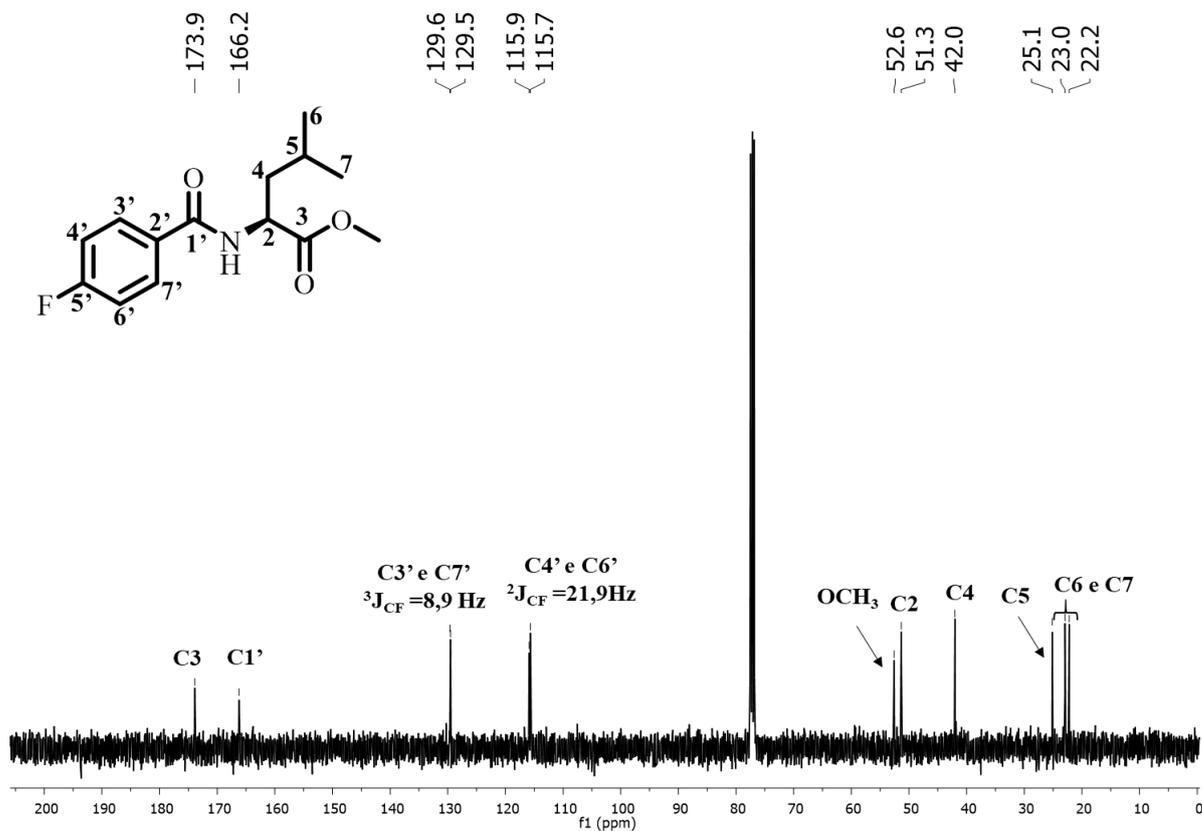


Figura 98. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **34f** (CDCl_3 , 100 MHz).

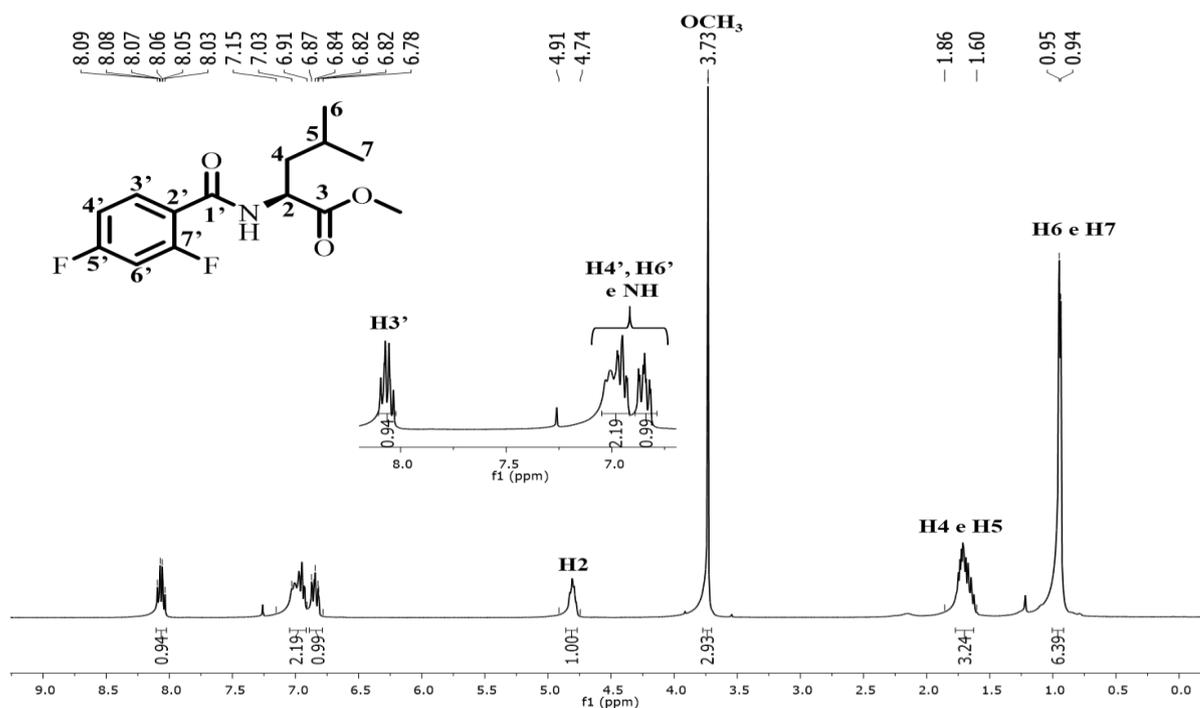


Figura 99. Espectro de RMN de ¹H do composto **34g** (CDCl₃, 400 MHz).

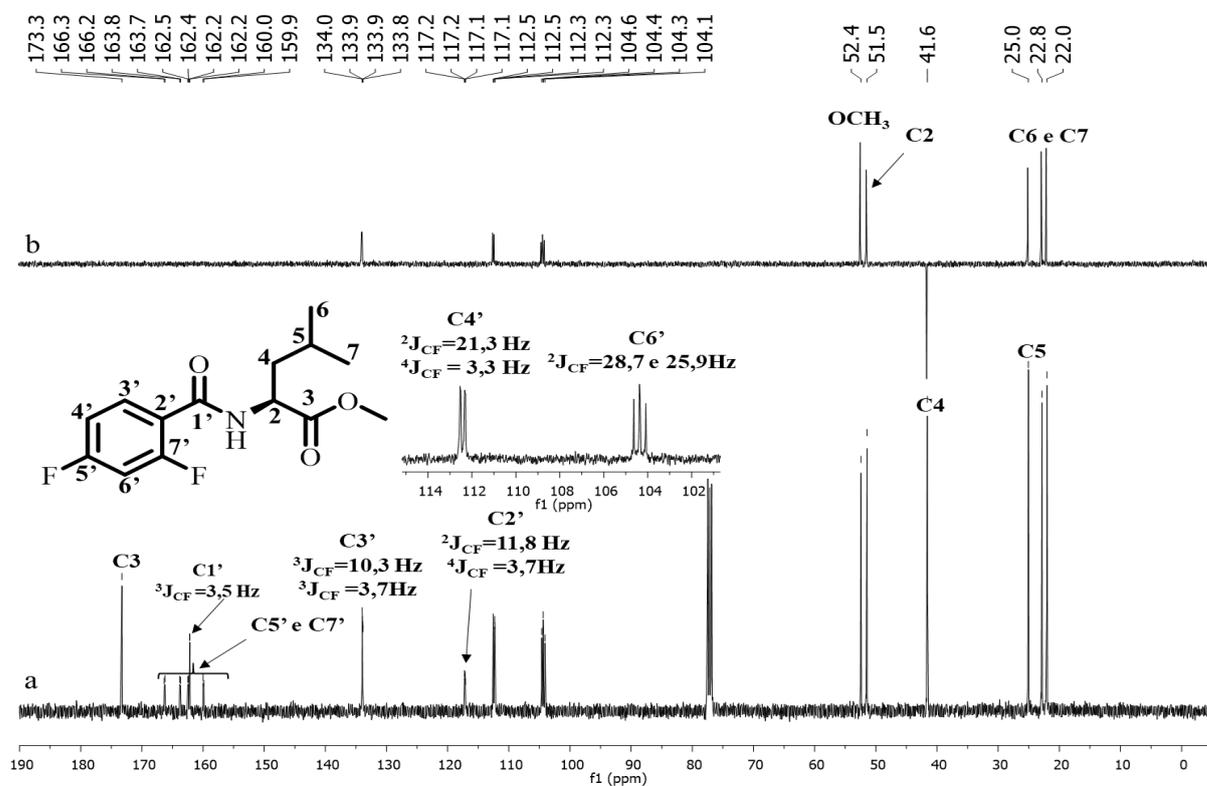


Figura 100. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT135 (b) do composto **34f** (CDCl₃, 100 MHz).

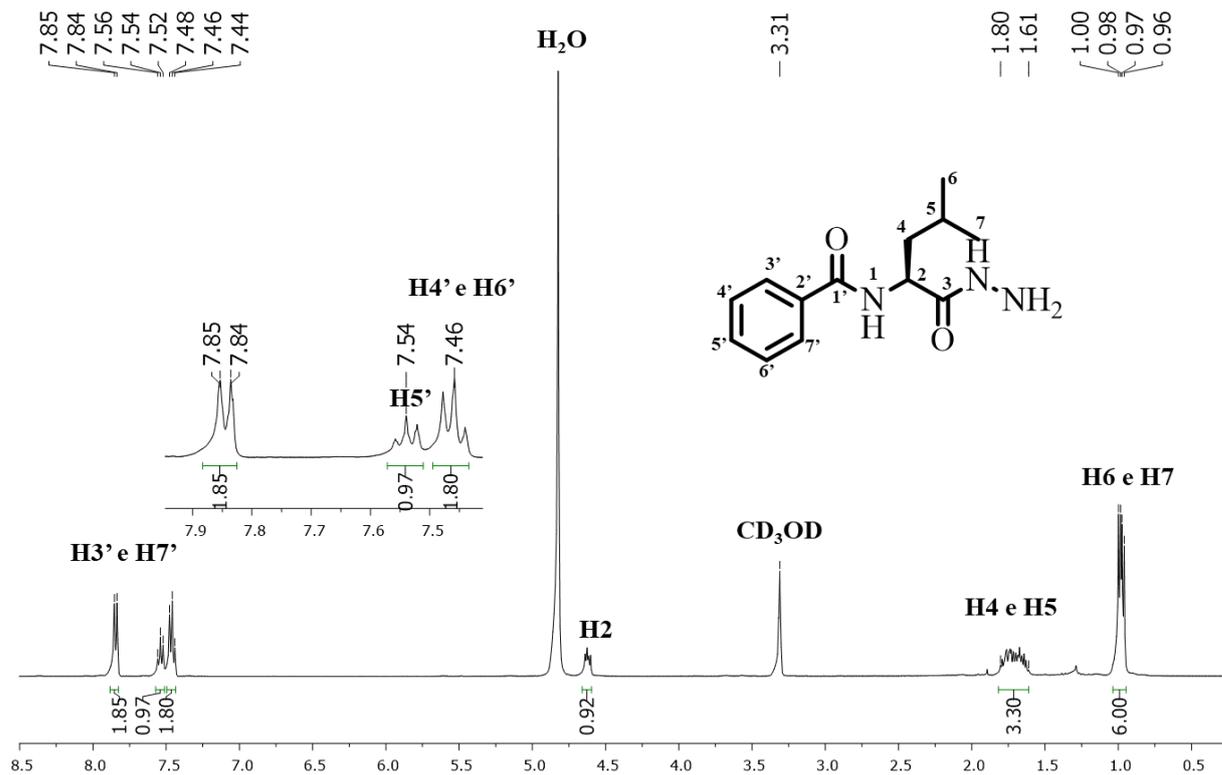


Figura 101. Espectro de RMN de ¹H do composto **36a** (CD₃OD, 400 MHz).

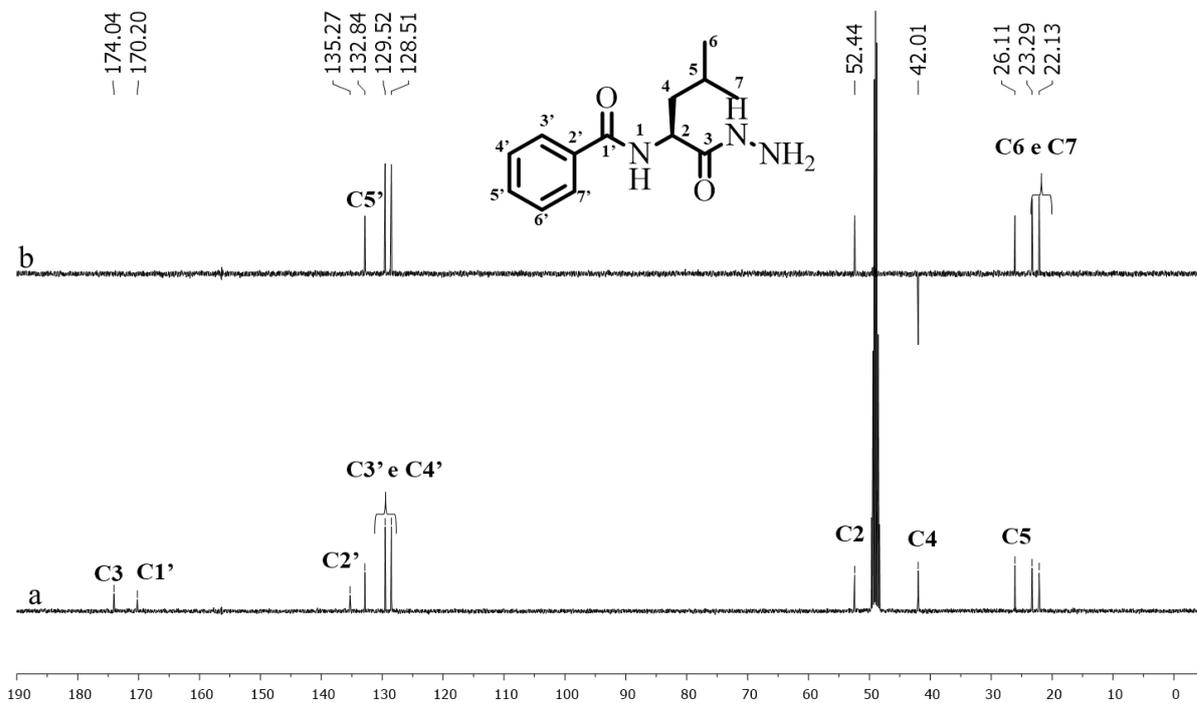


Figura 102. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36a** (CD₃OD, 100 MHz).

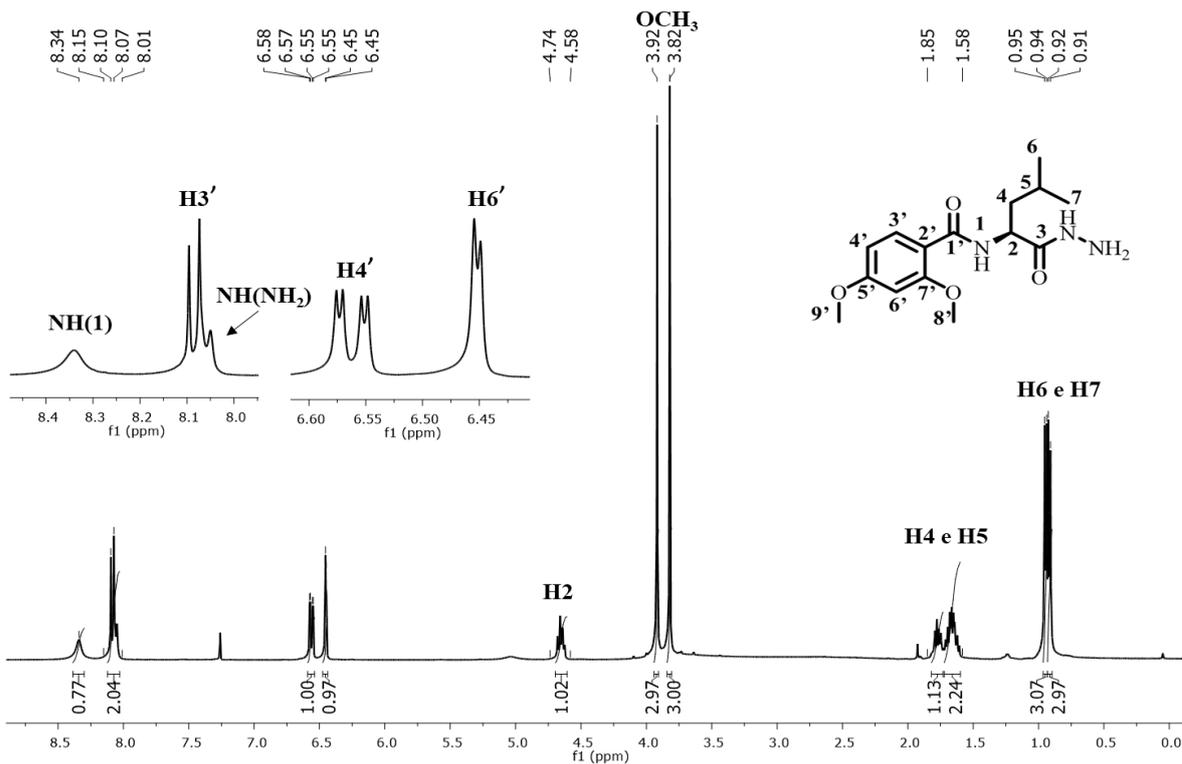


Figura 103. Espectro de RMN de ^1H do composto **36b** (CDCl₃, 400 MHz).

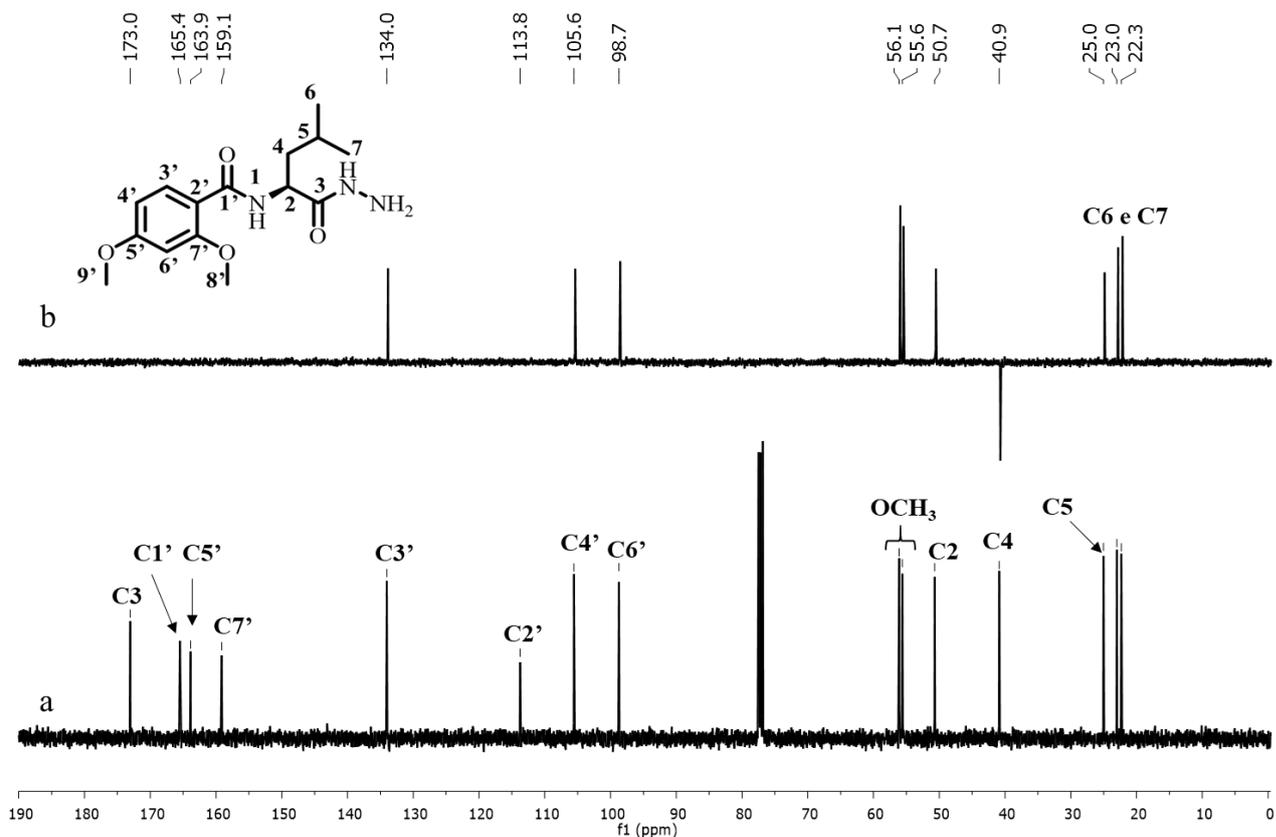


Figura 104. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36b** (CDCl₃, 100 MHz).

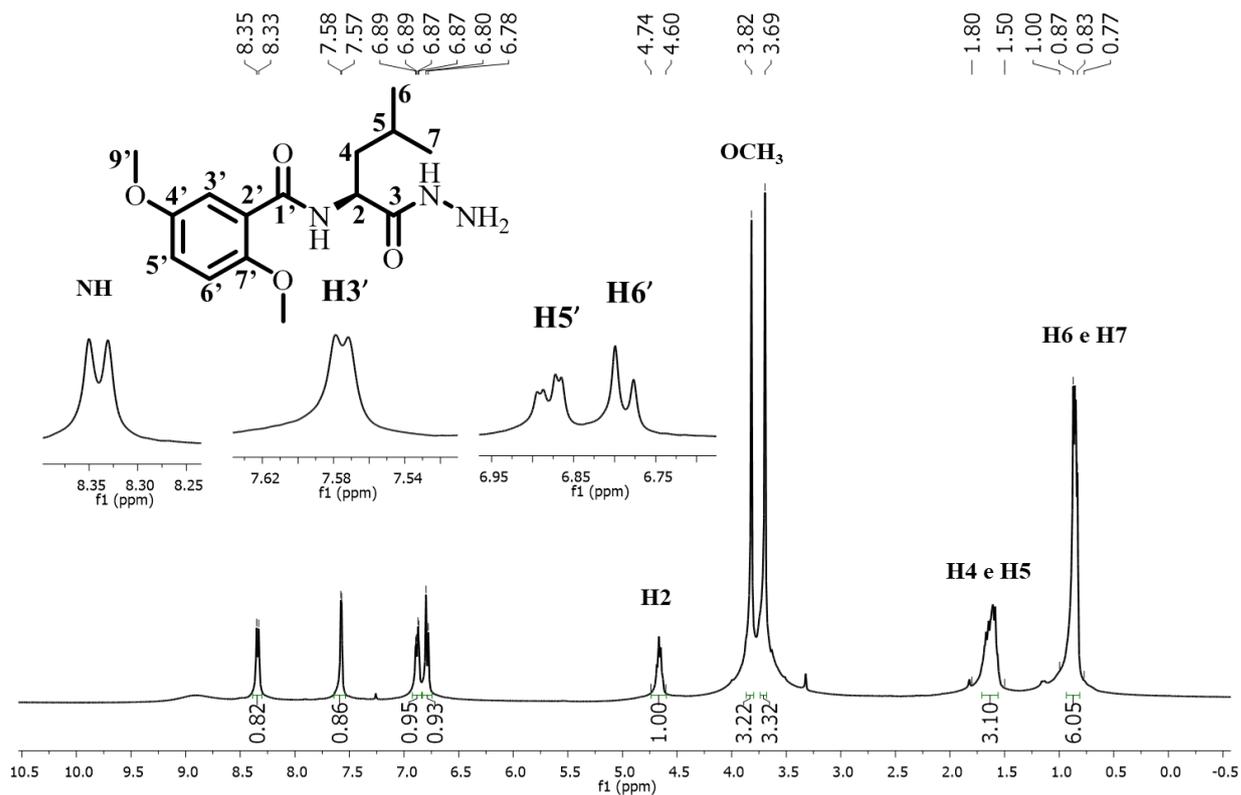


Figura 105. Espectro de RMN de ^1H do composto **36c** (CDCl₃, 400 MHz).

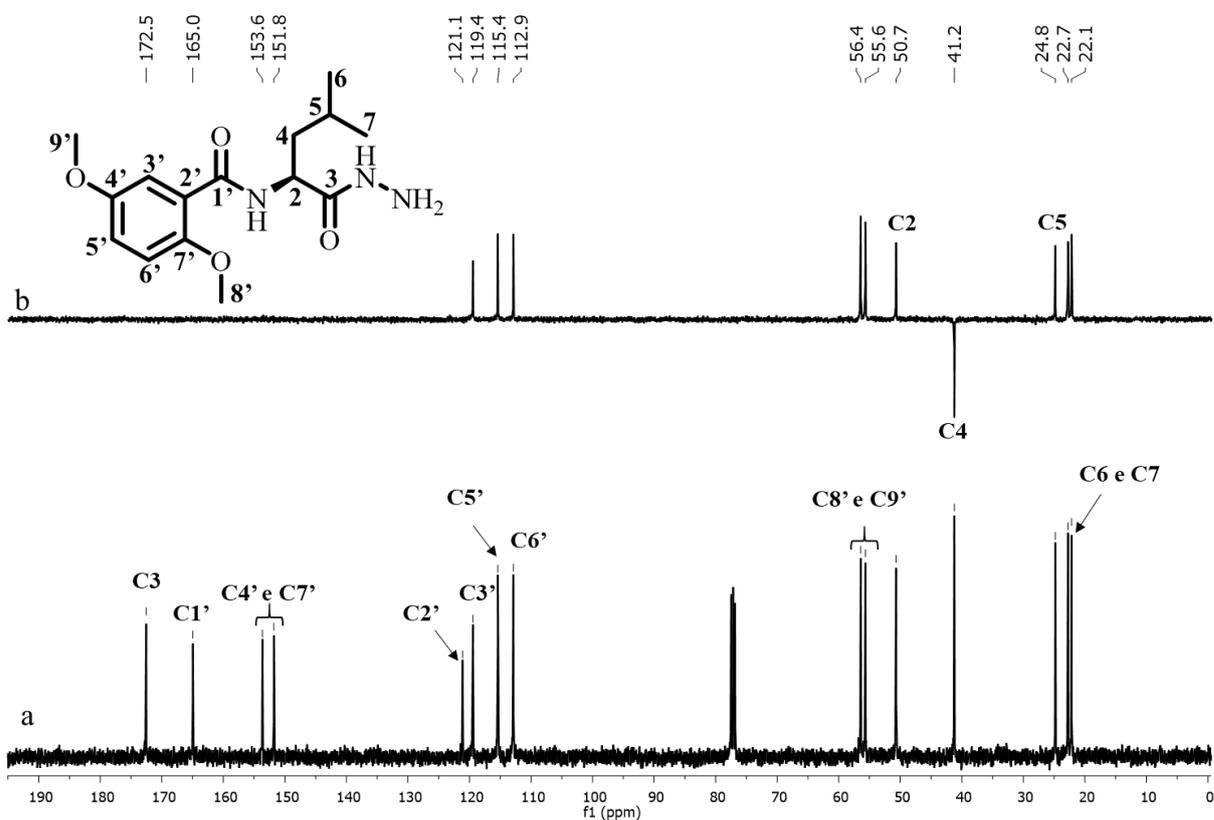


Figura 106. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36c** (CDCl₃, 100 MHz).

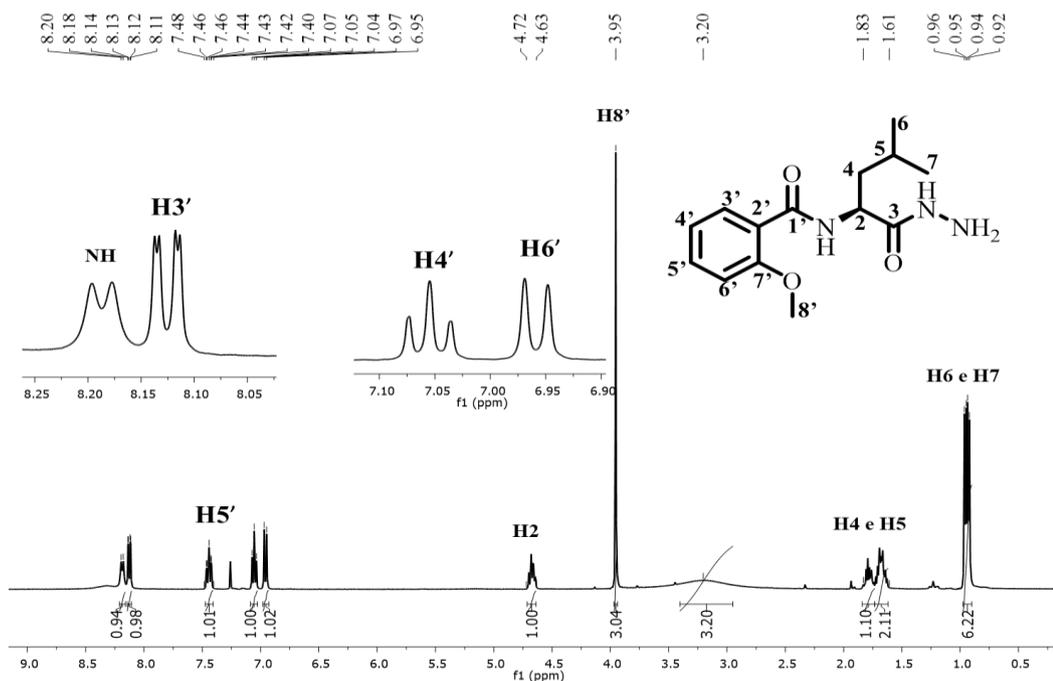


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H do composto **36d** (CDCl₃, 400 MHz).

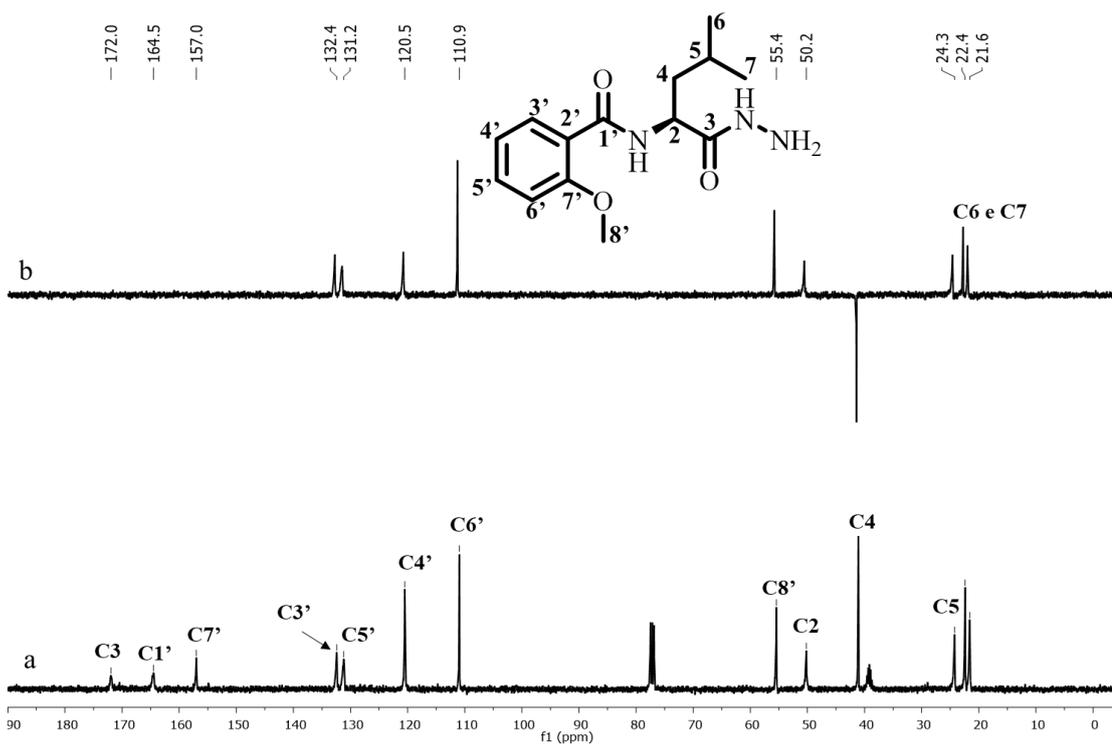


Figura 108. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36d** (CDCl₃, 100 MHz).

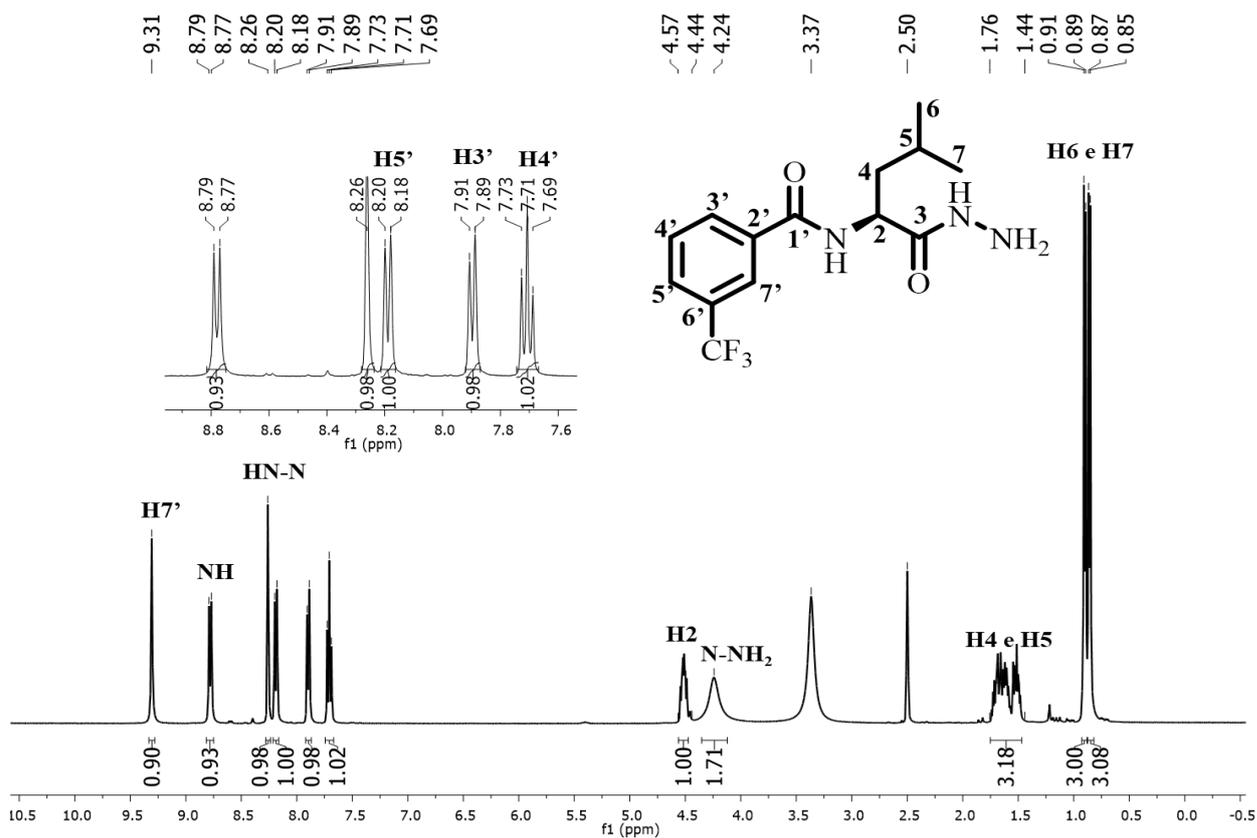


Figura 109. Espectro de RMN de ¹H do composto **36e** (DMSO-d₆, 400 MHz).

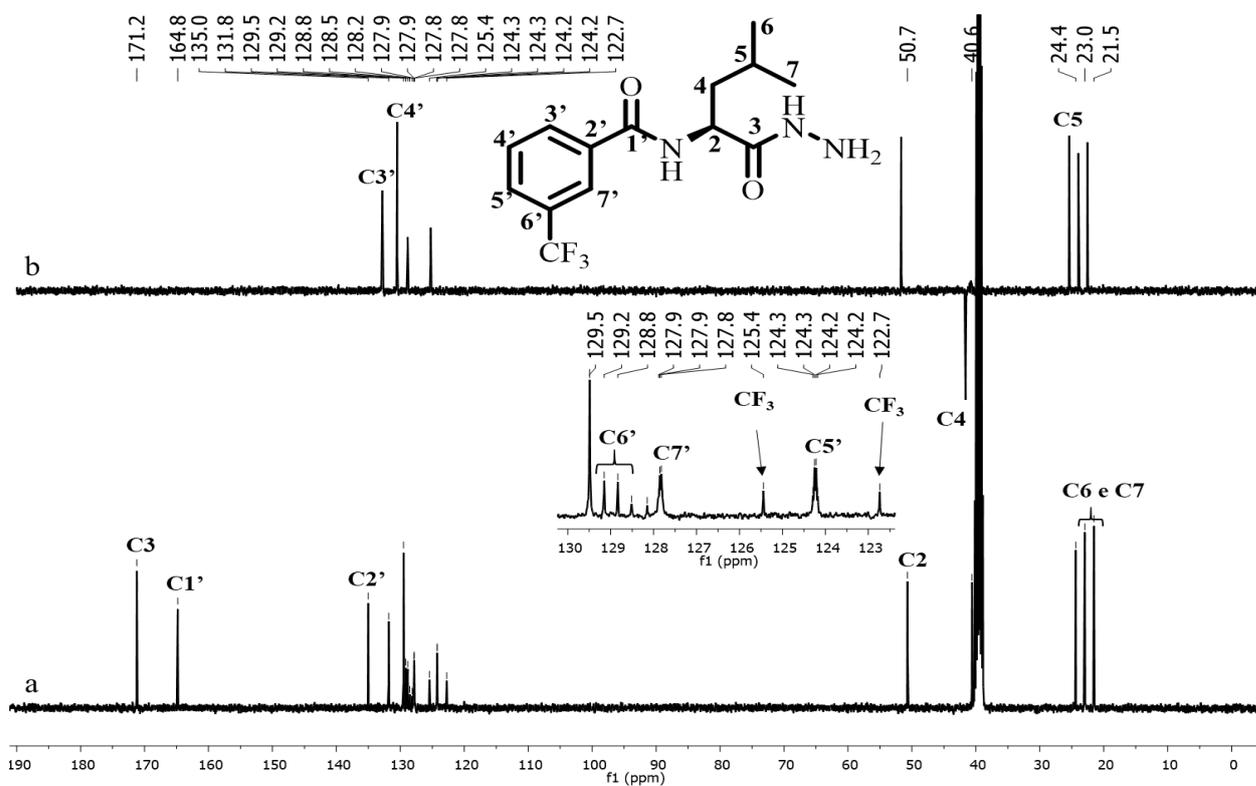


Figura 110. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36e** (DMSO-d₆, 100 MHz).

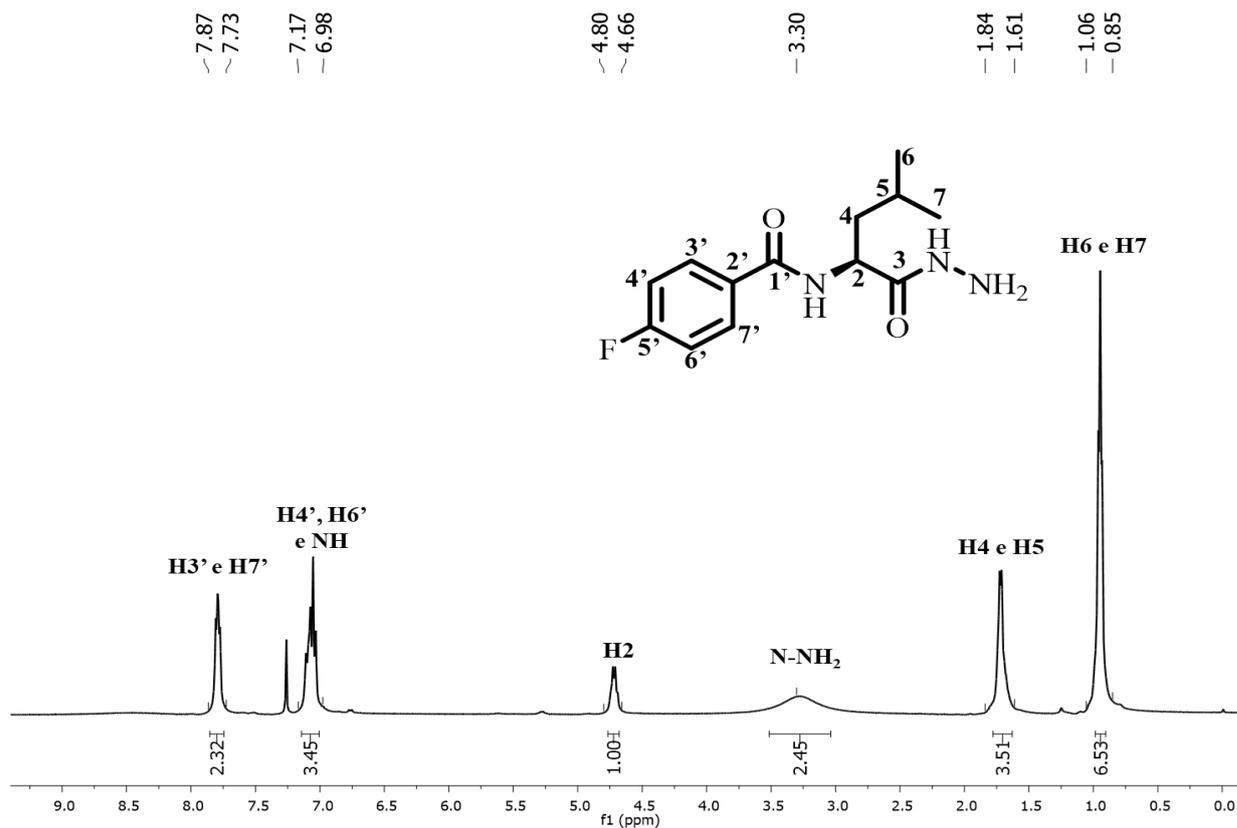


Figura 111. Espectro de RMN de ^1H do composto **36f** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

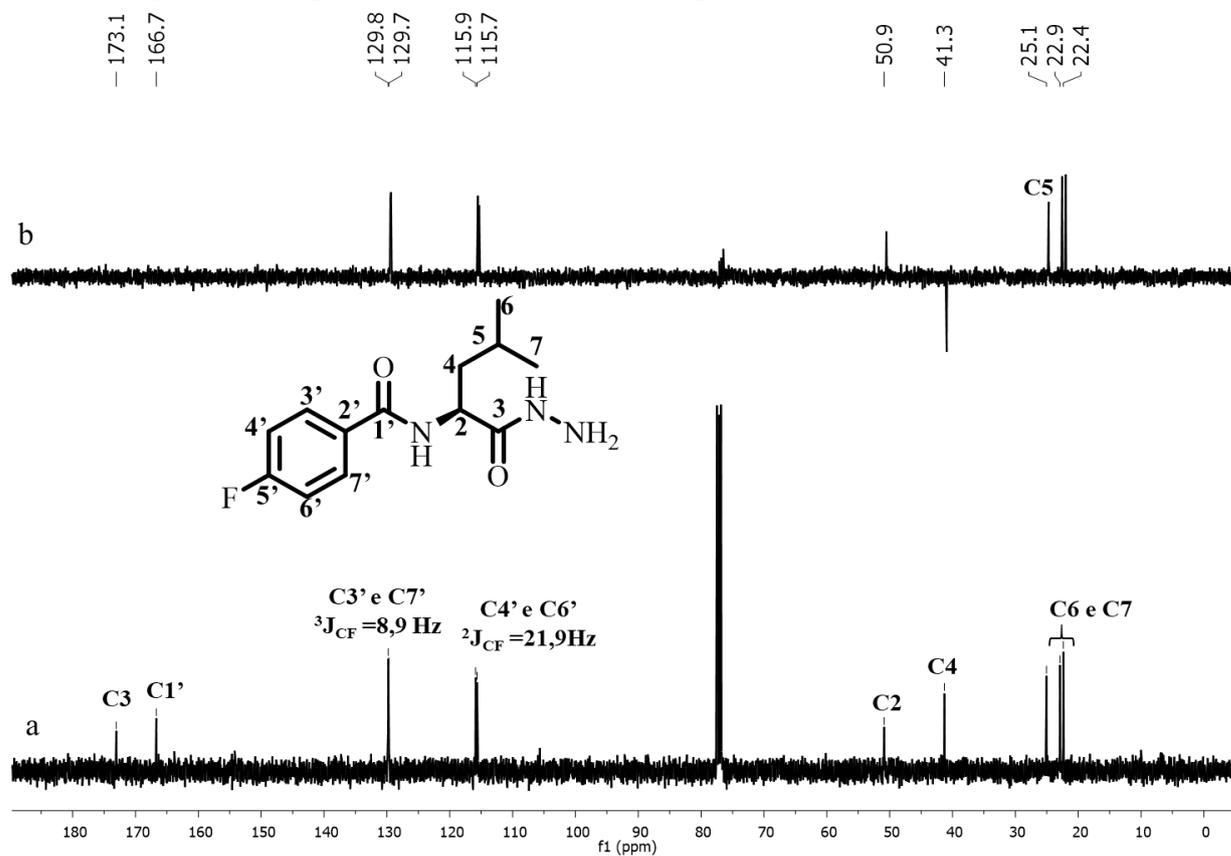


Figura 112. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **36f** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

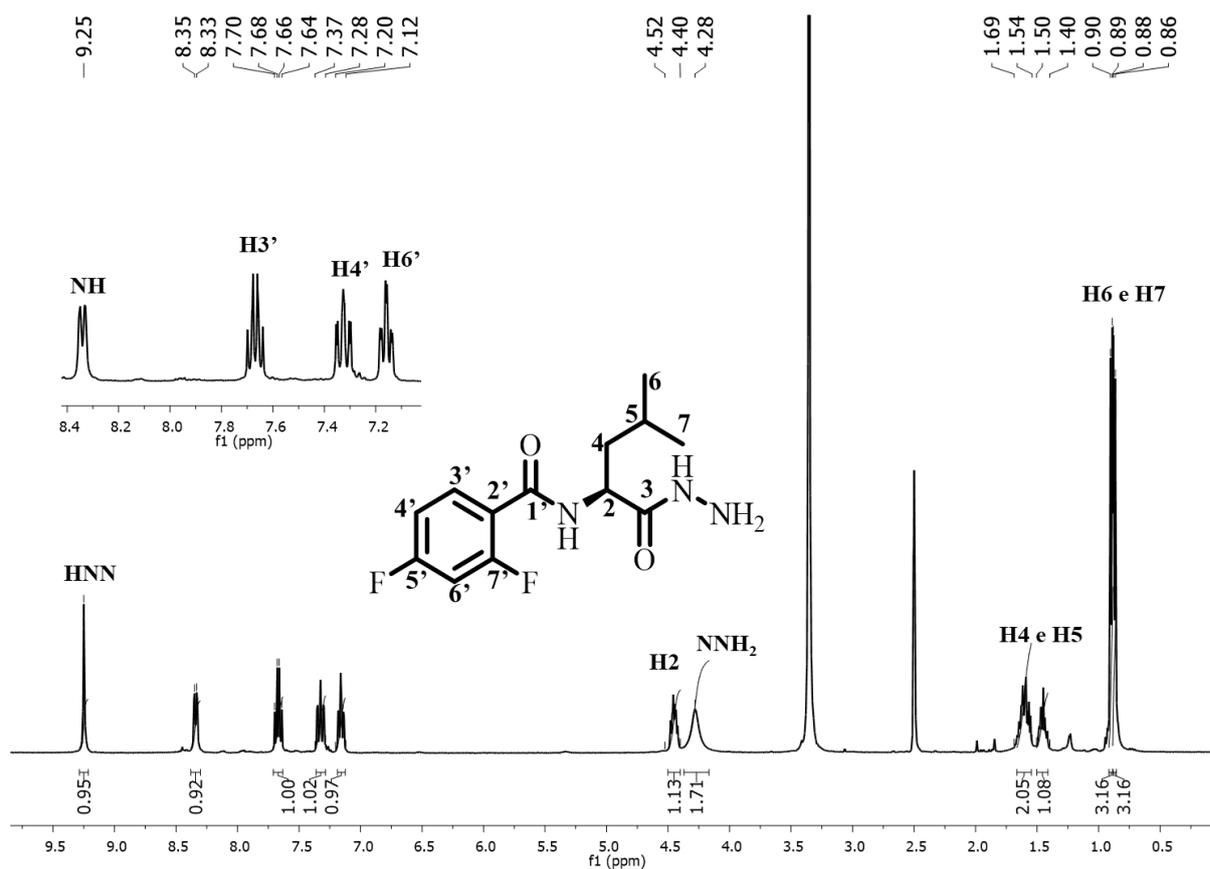


Figura 113. Espectro de RMN de ¹H do composto **36g** (DMSO-d₆, 400 MHz).

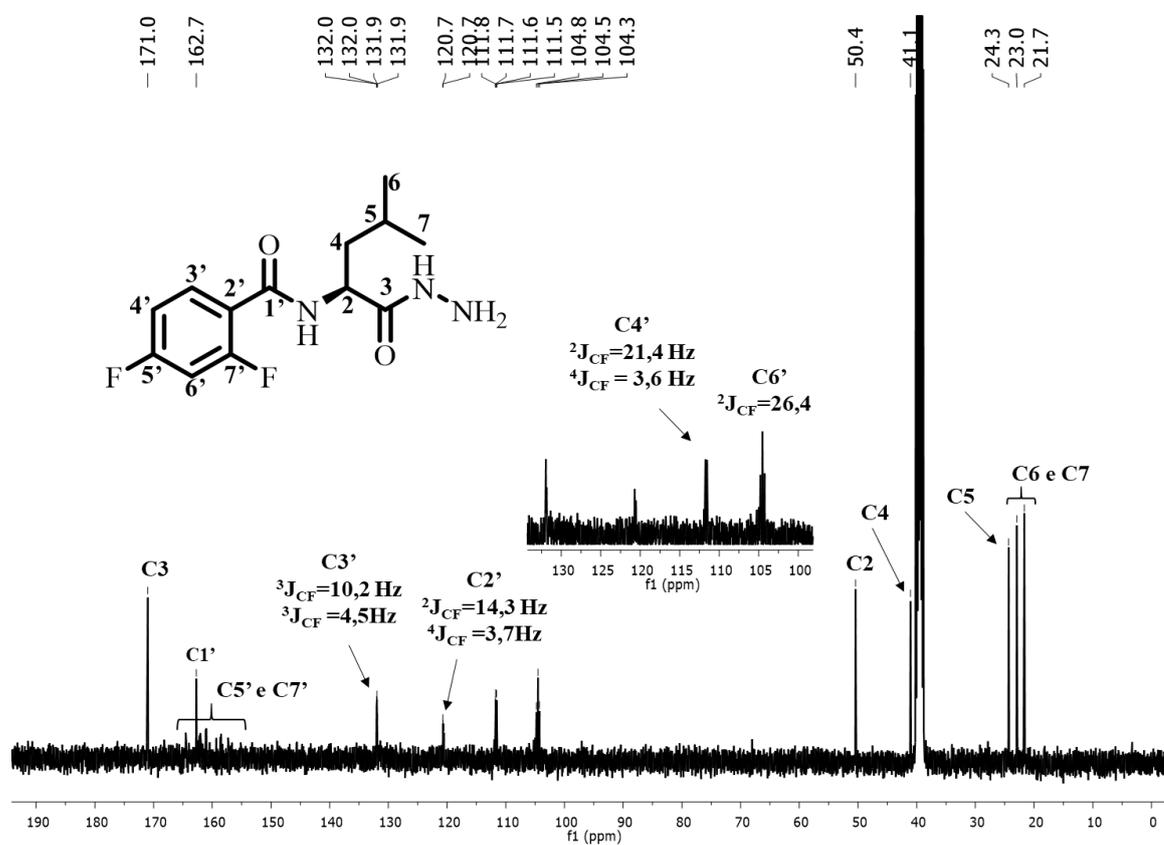


Figura 114. Espectro de RMN de ¹³C do composto **36g** (DMSO-d₆, 100 MHz).

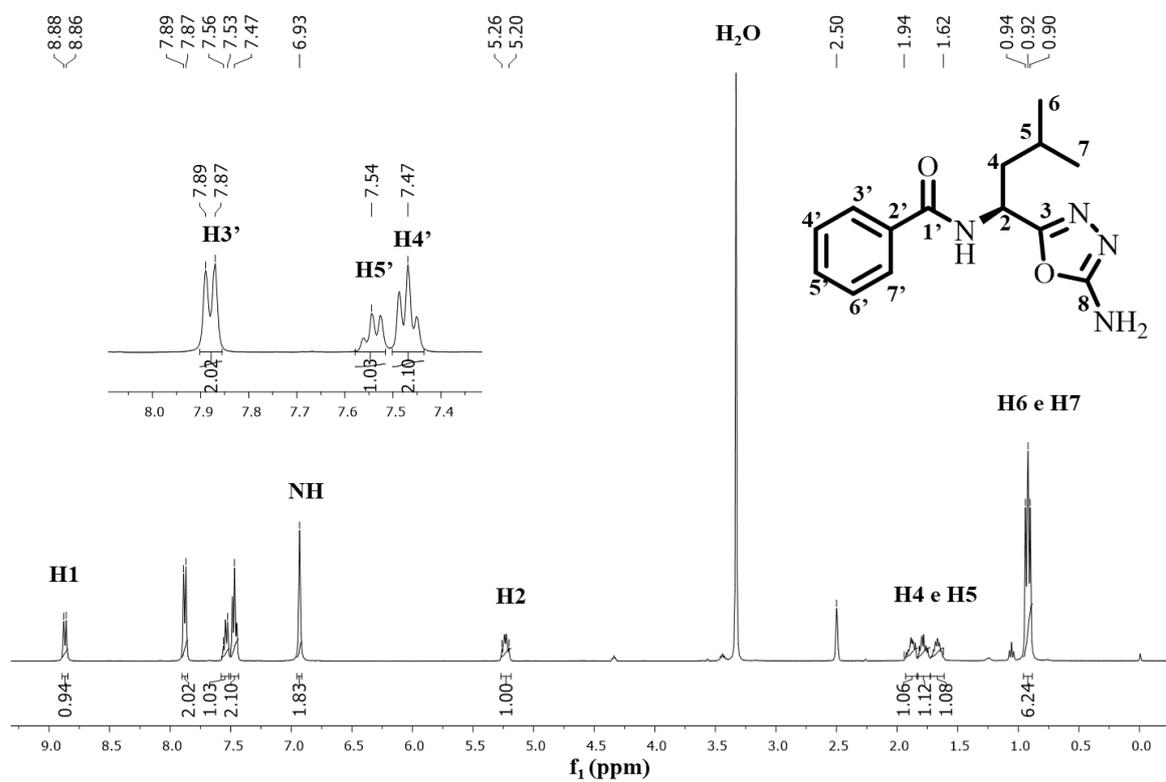


Figura 115. Espectro de RMN de ^1H do composto **38a** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

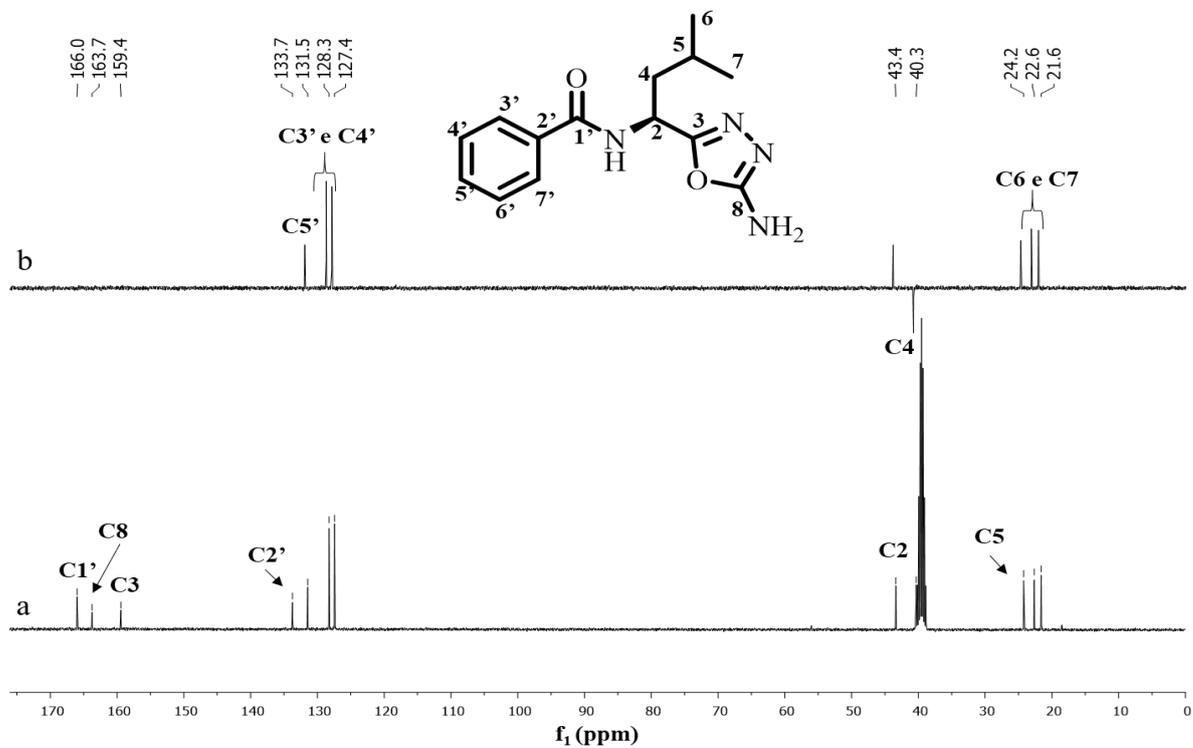


Figura 116. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38a** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

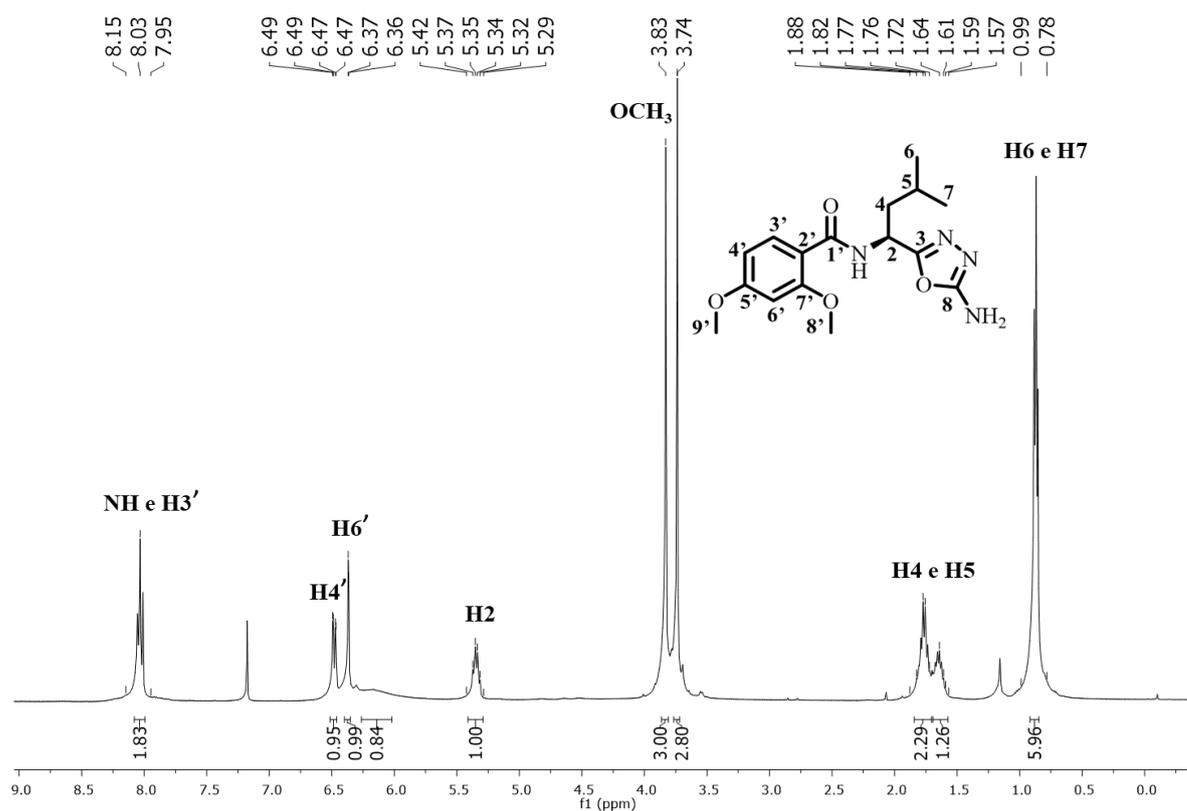


Figura 117. Espectro de RMN de ^1H do composto **38b** (CDCl_3 , 400 MHz).

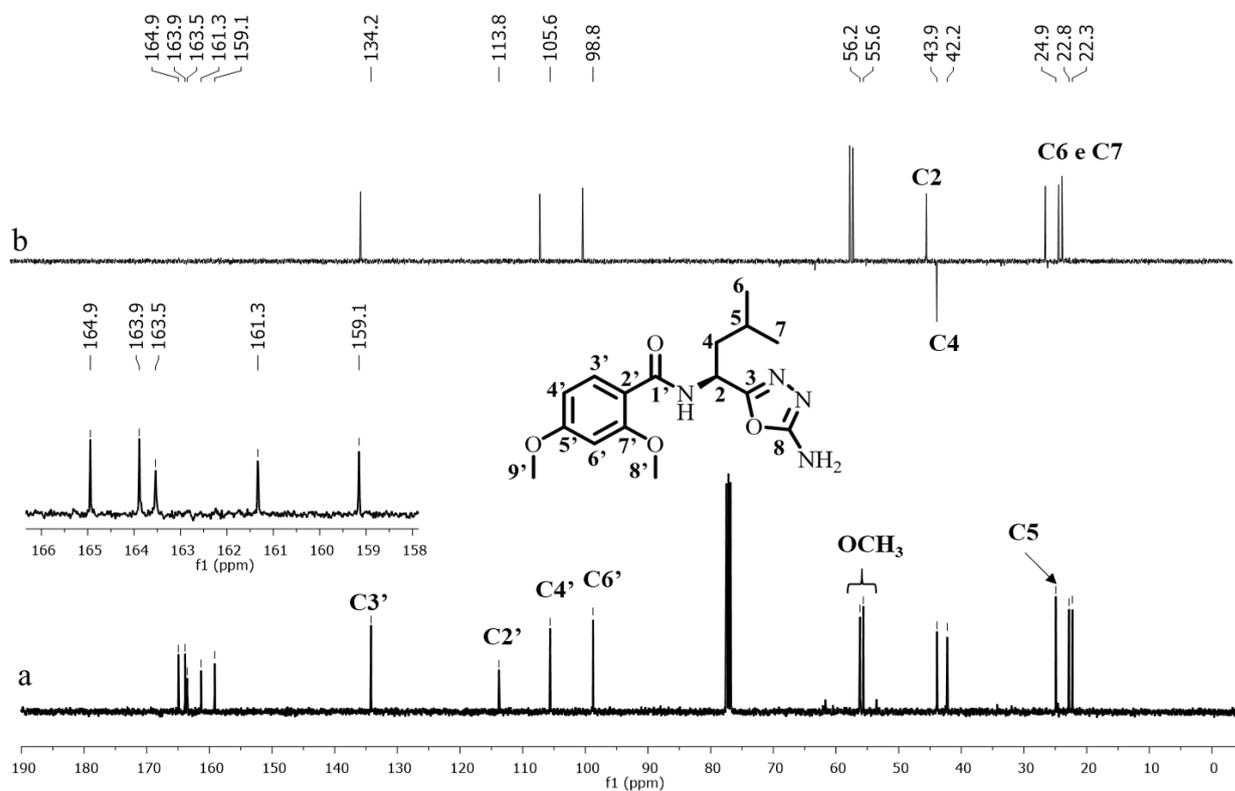


Figura 118. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38b** (CDCl_3 , 100 MHz).

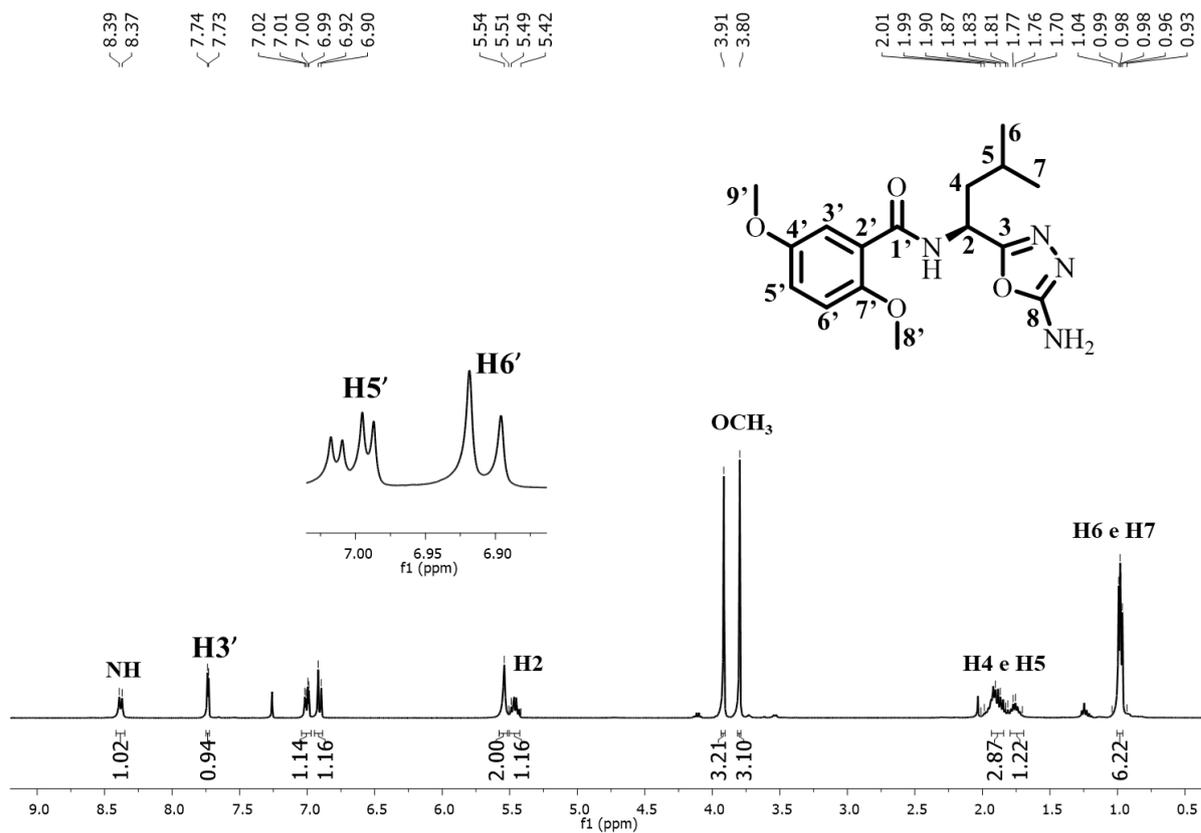


Figura 119. Espectro de RMN de ¹H do composto **38c** (CDCl₃, 400 MHz);

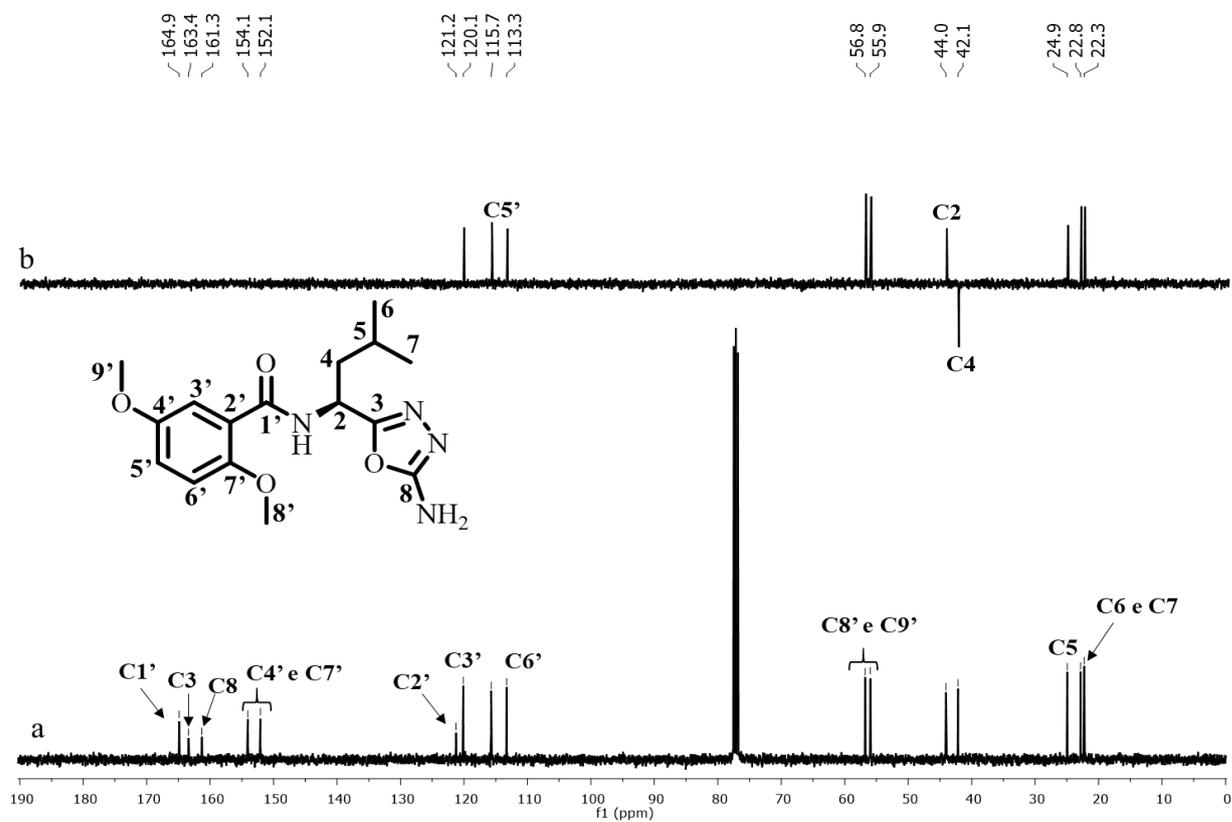


Figura 120. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38c** (CDCl₃, 100 MHz)

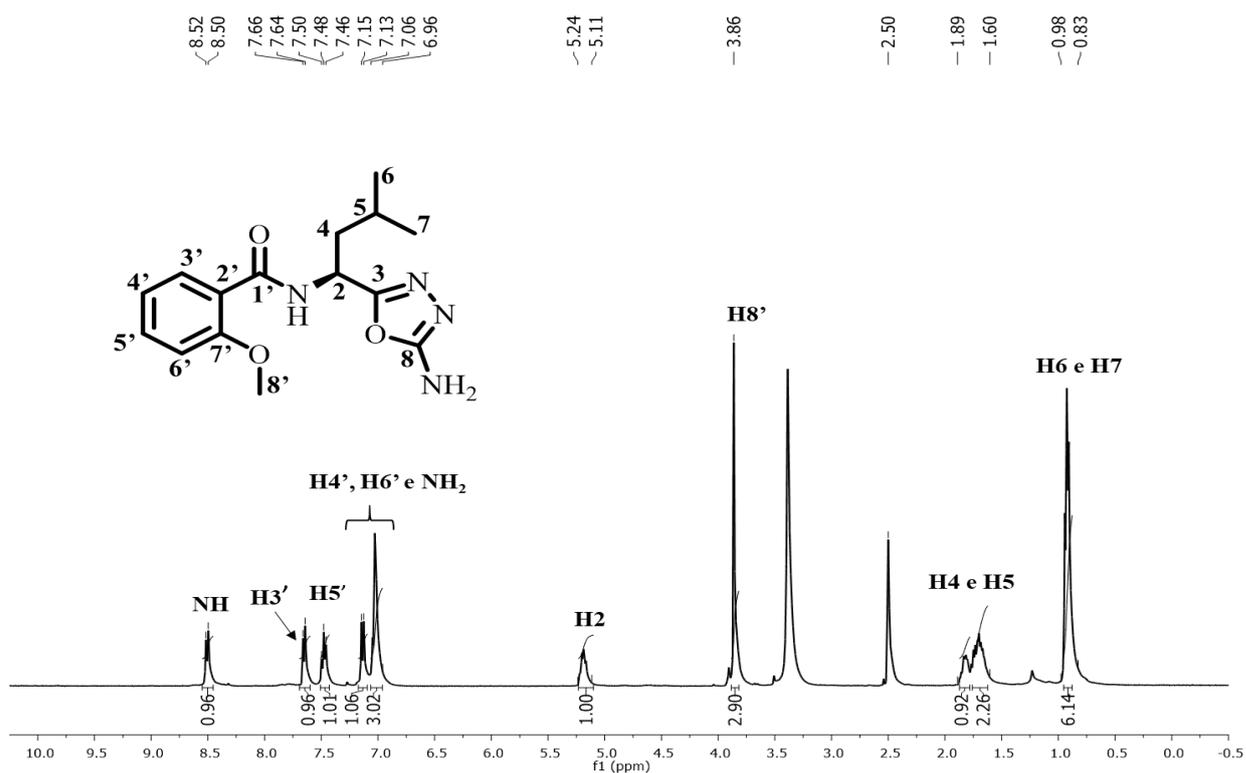


Figura 121 Espectro de RMN de ¹H do composto **38d** (DMSO-d₆, 400 MHz).

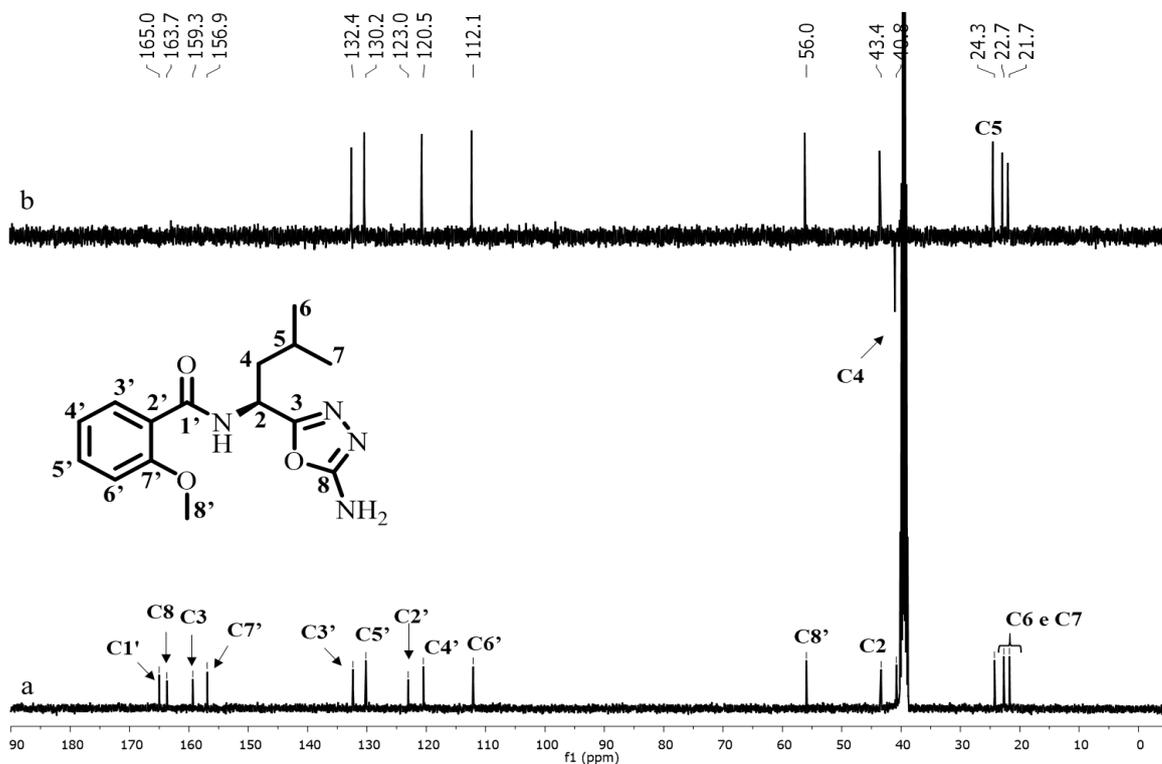


Figura 122. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38d** (DMSO-d₆, 100 MHz).

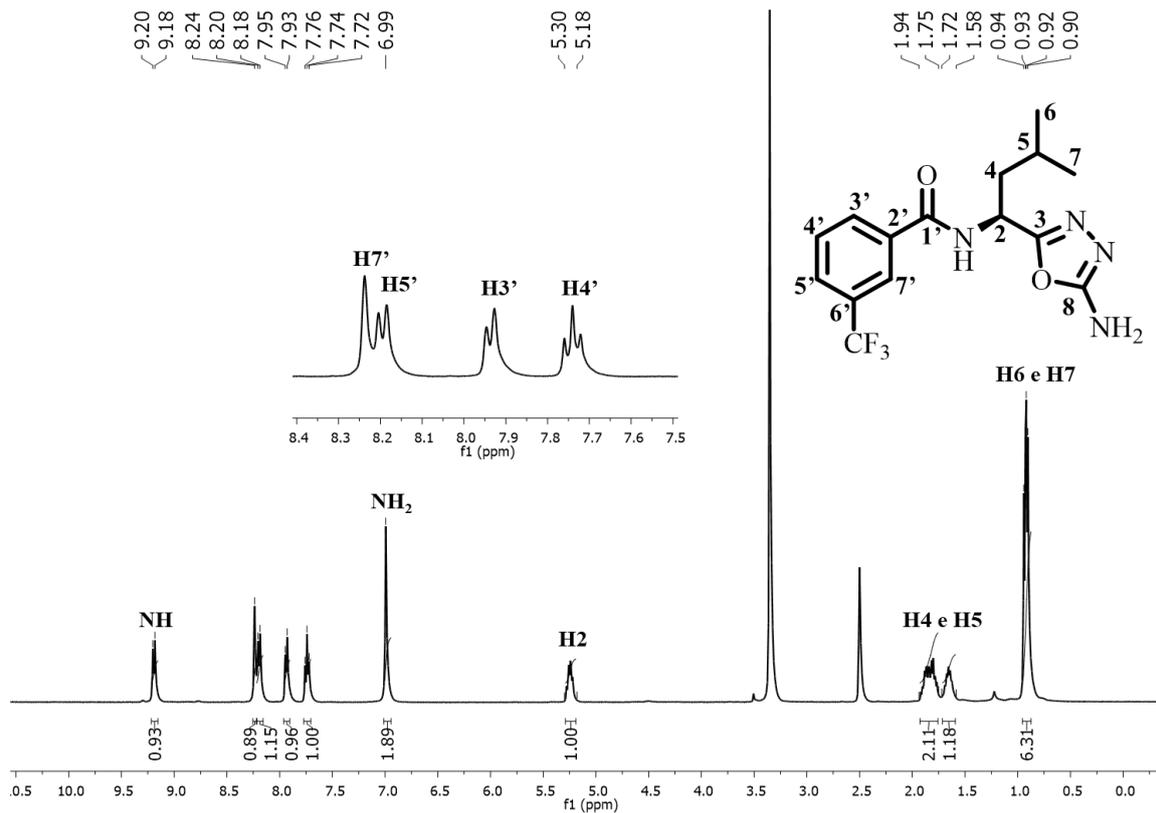


Figura 123. Espectro de RMN de ¹H do composto **38e** (DMSO-d₆, 400 MHz).

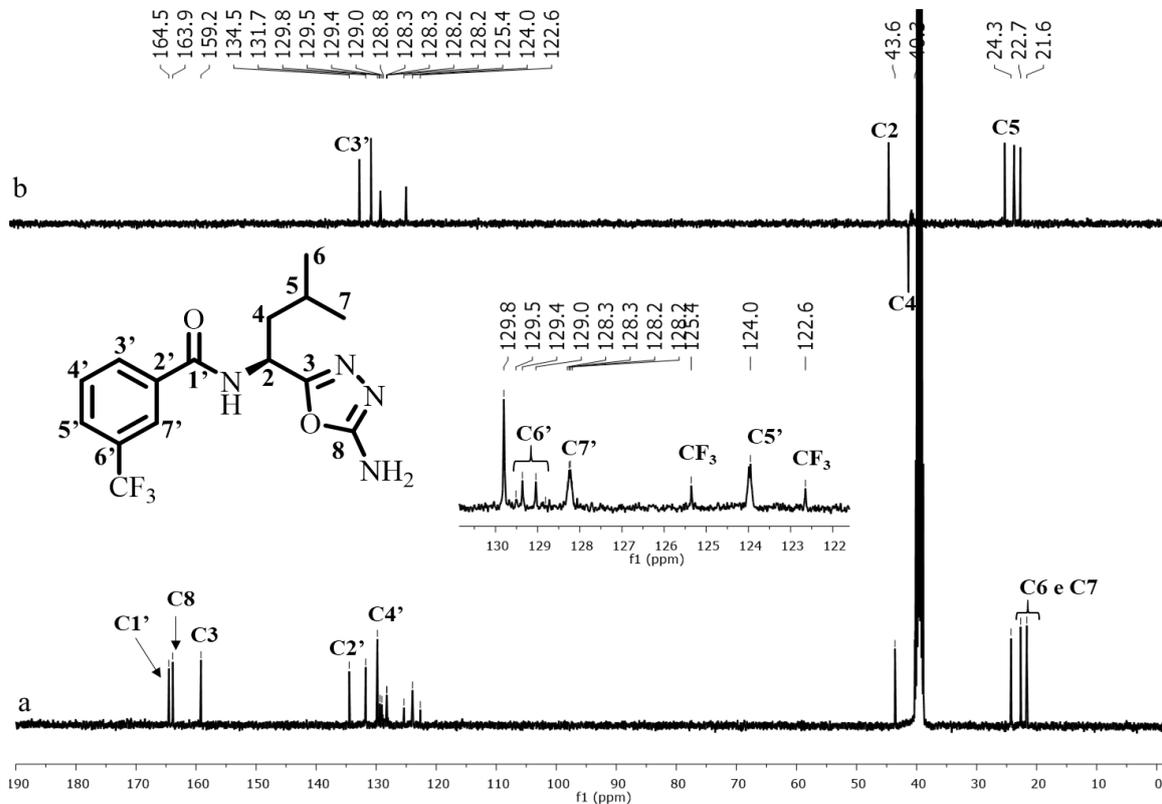


Figura 124. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38e** (DMSO-d₆, 100 MHz).

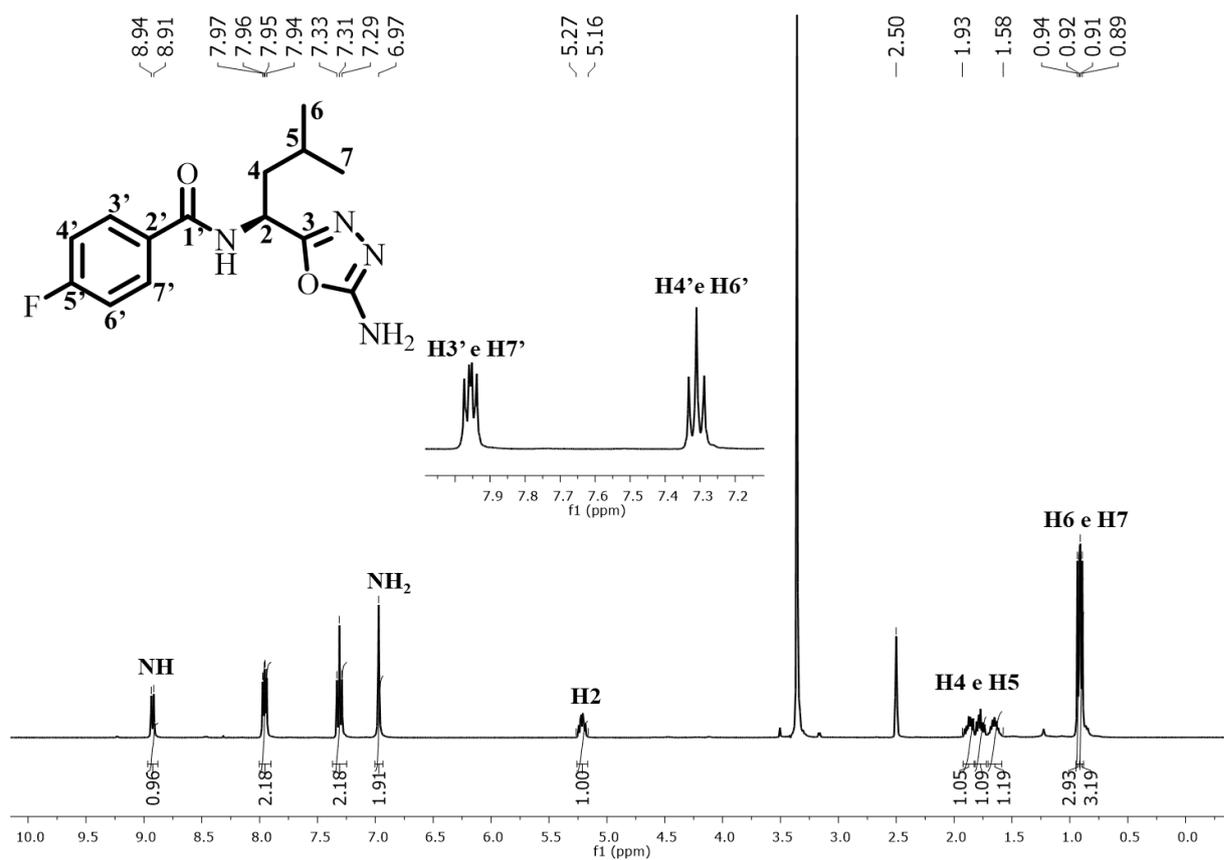


Figura 125. Espectro de RMN de ^1H do composto **38f** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

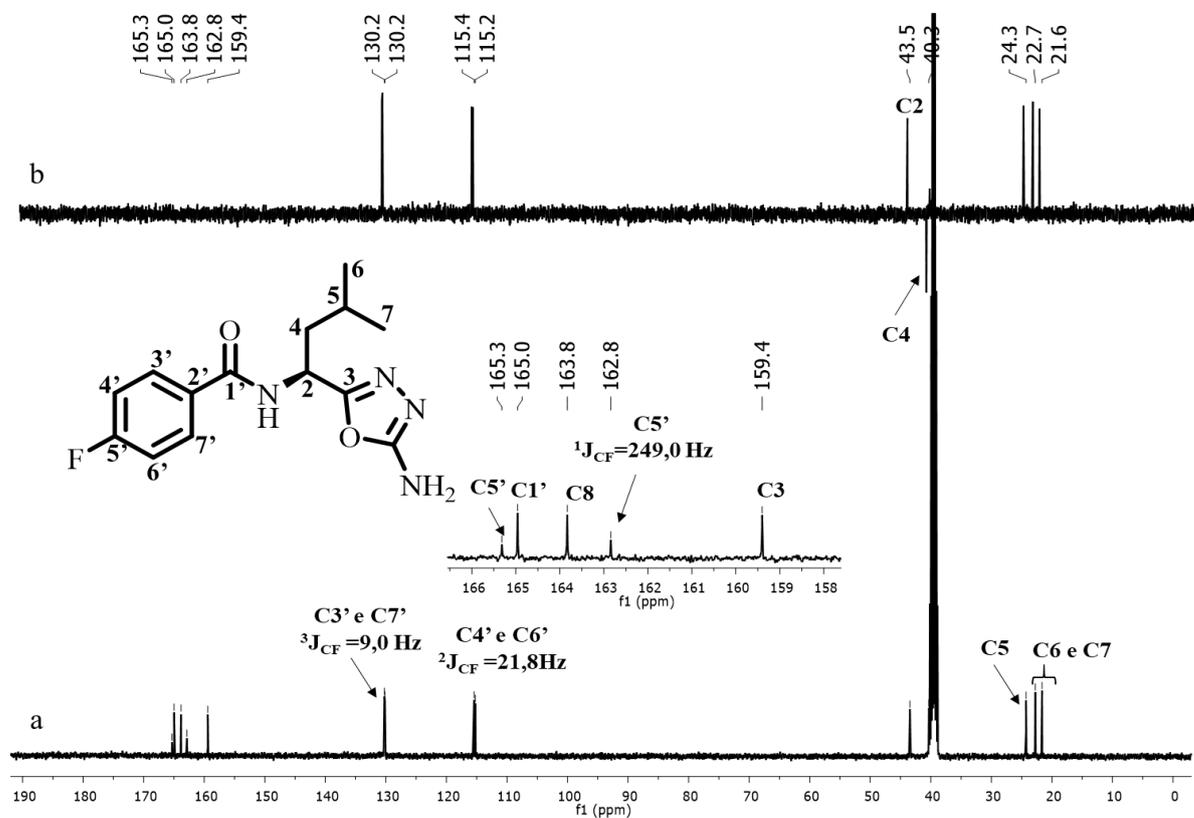


Figura 126. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38f** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

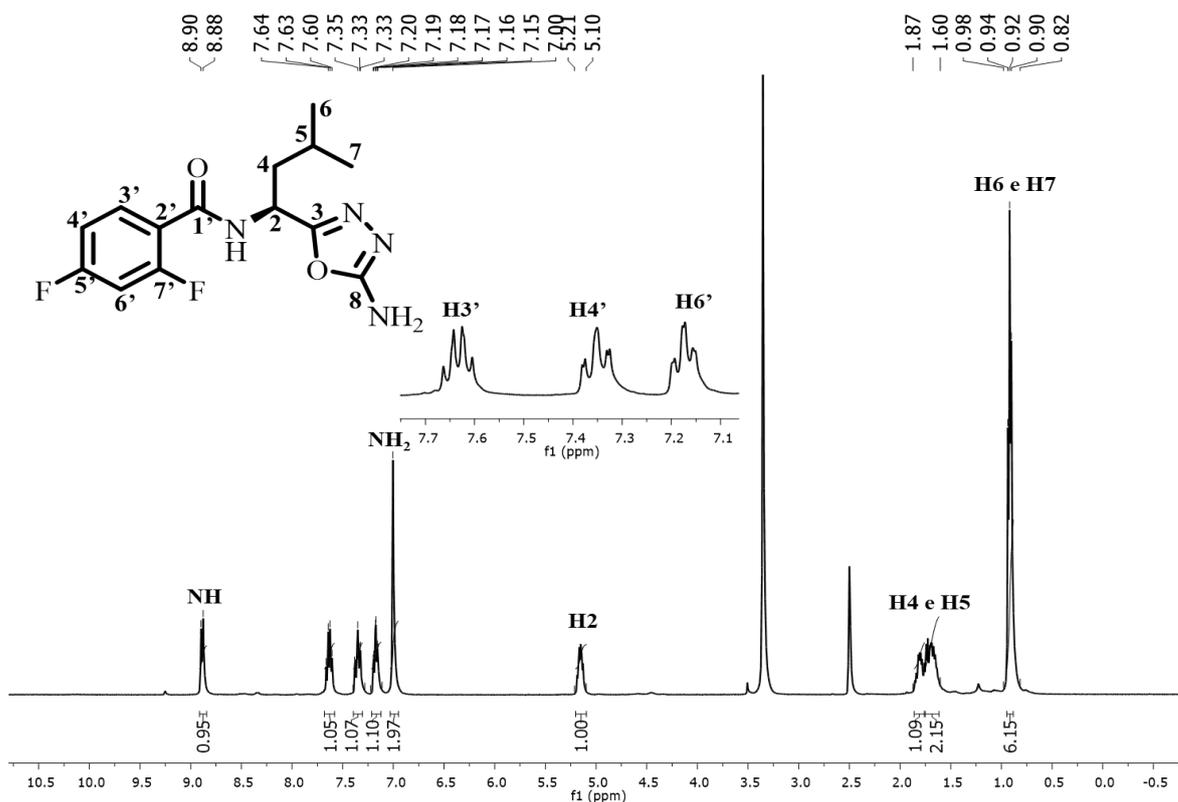


Figura 127. Espectro de RMN de ¹H do composto **38g** (DMSO-d₆, 400 MHz).

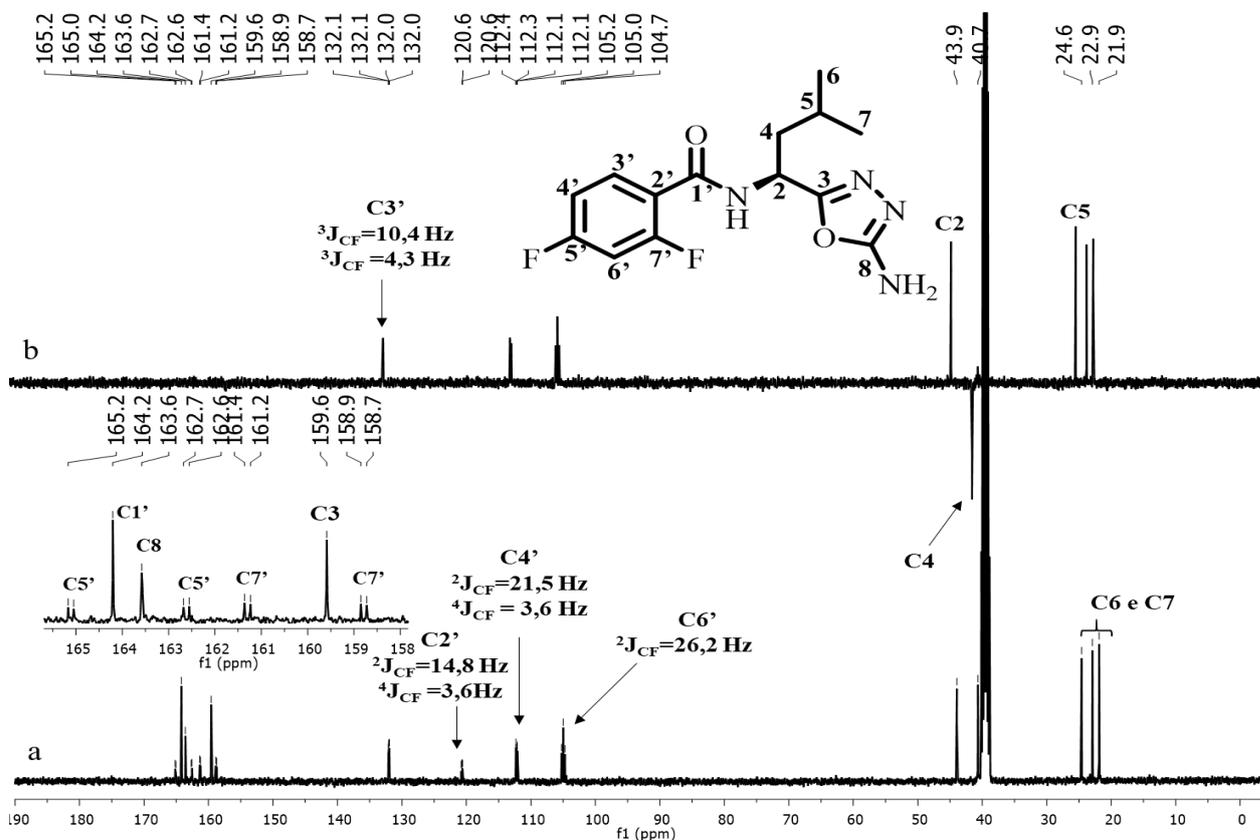


Figura 128. Espectros de RMN de ¹³C (a) e DEPT 135 (b) do composto **38g** (DMSO-d₆, 100 MHz).

ANEXO III: Espectros no IV dos compostos finais

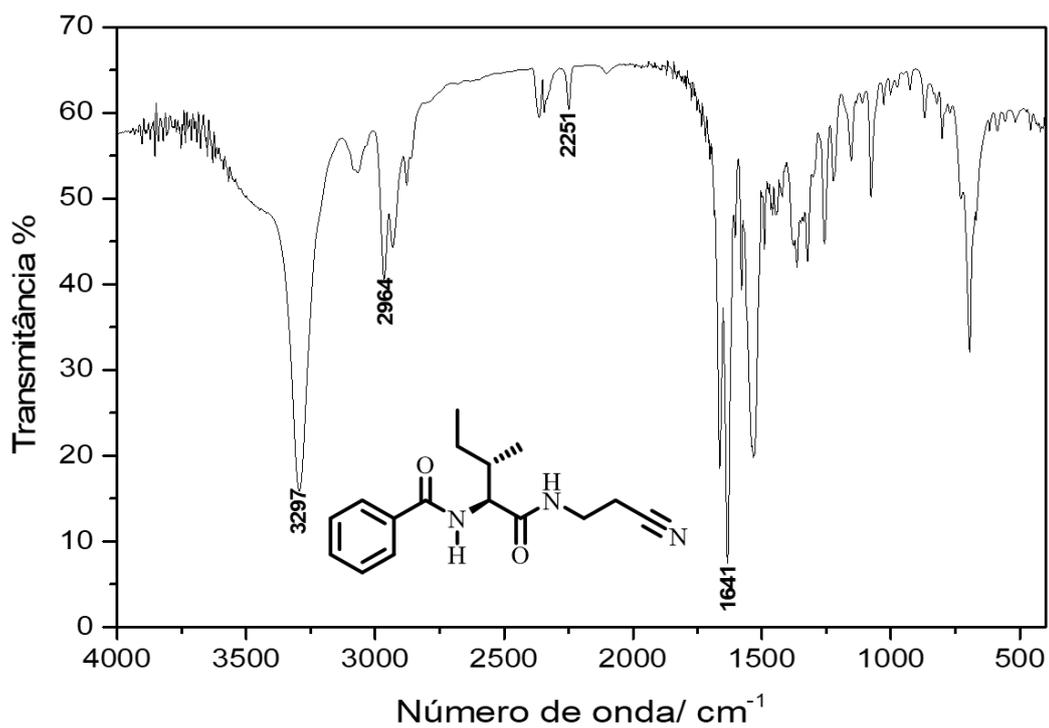


Figura 129. Espectro no IV do composto **25a** (Pastilha de KBr).

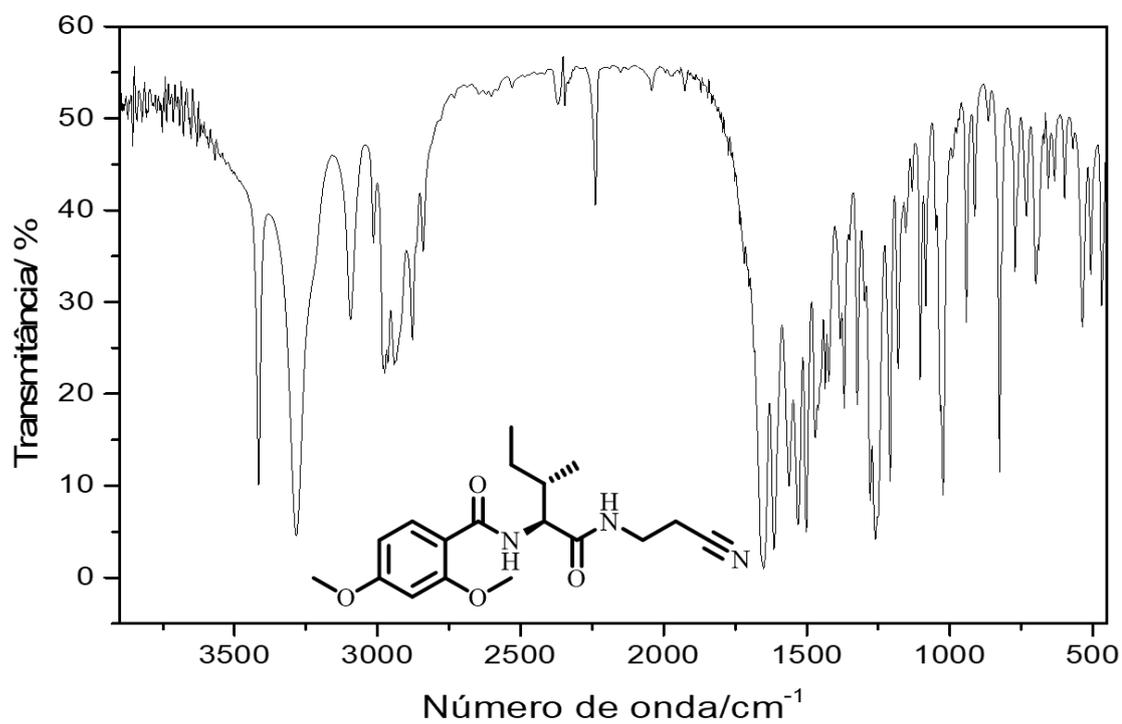


Figura 130. Espectro no IV do composto **26b** (Pastilha de KBr).

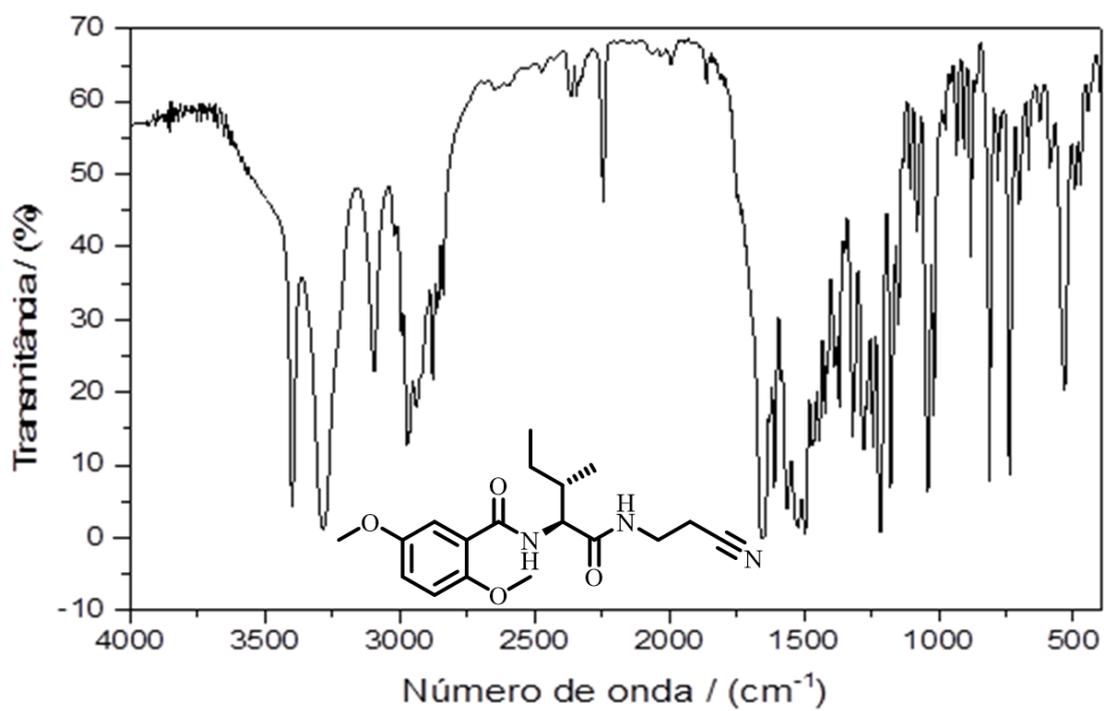


Figura 131. Espectro no IV do composto **26c** (Pastilha de KBr).

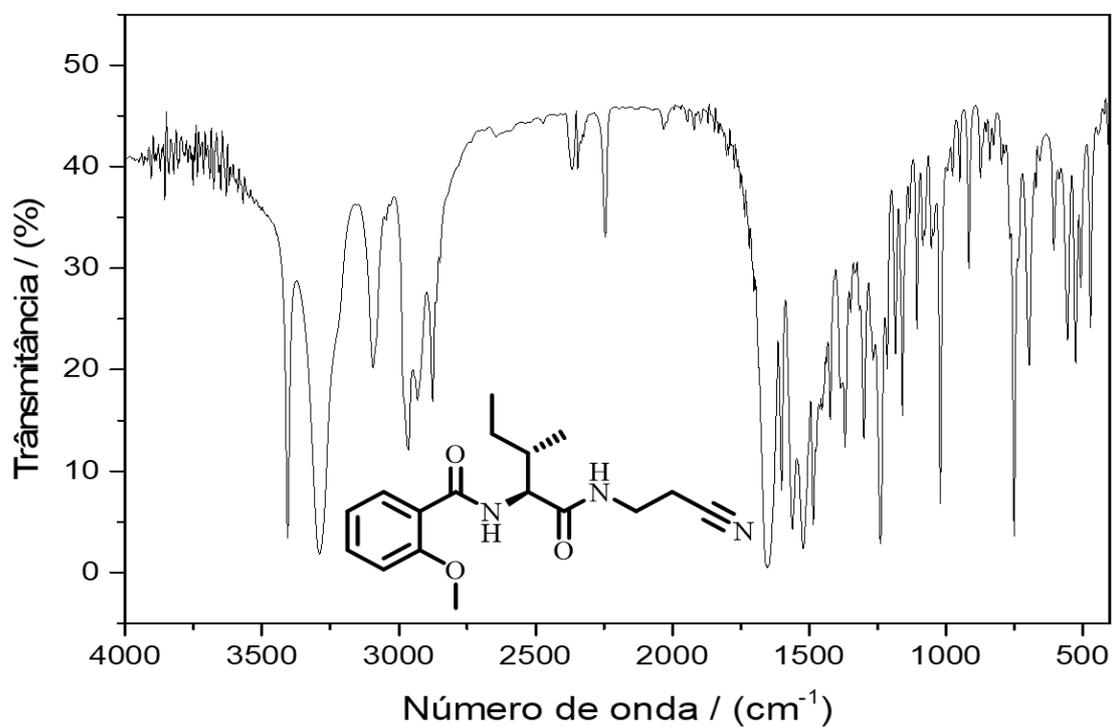


Figura 132. Espectro no IV do composto **26d** (Pastilha de KBr).

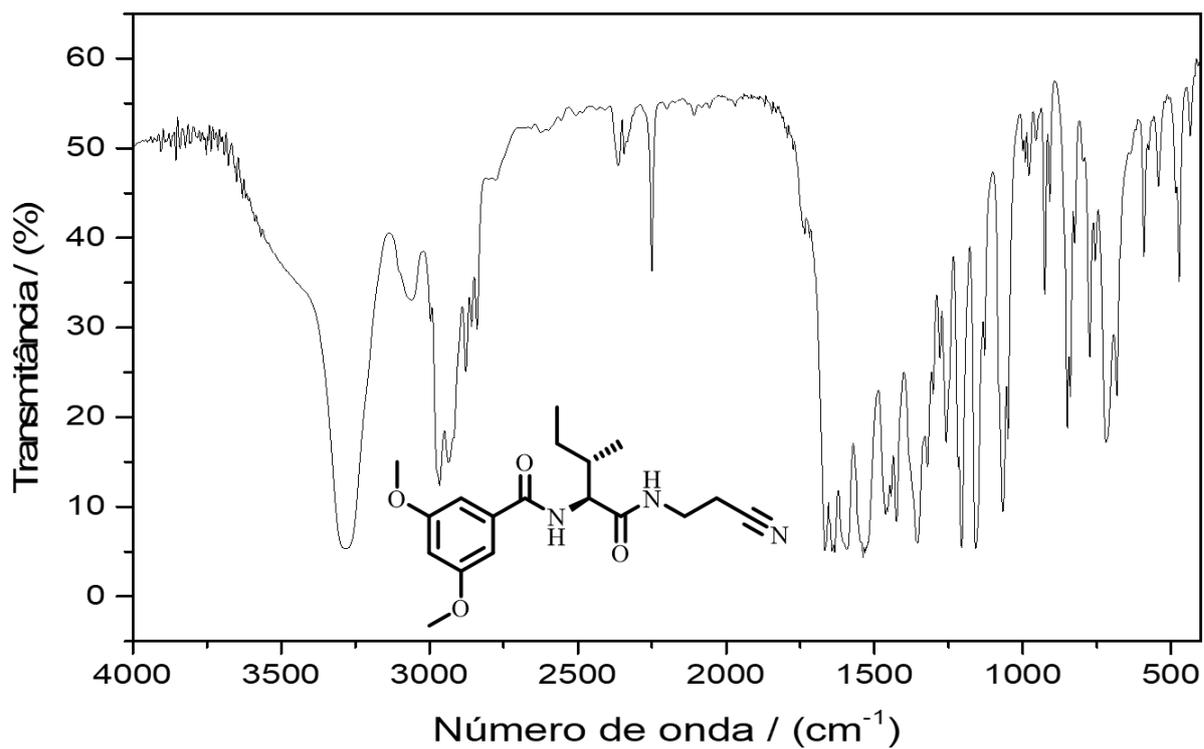


Figura 133. Espectro no IV do composto **26e** (Pastilha de KBr).

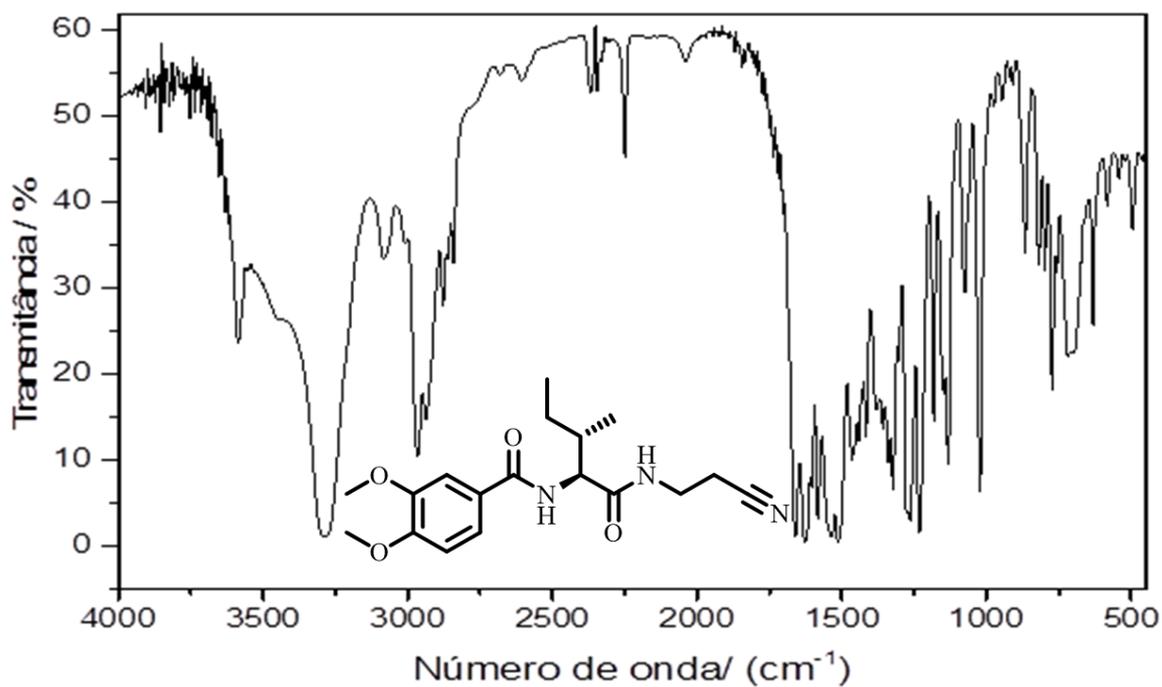


Figura 134. Espectro no IV do composto **26f** (Pastilha de KBr).

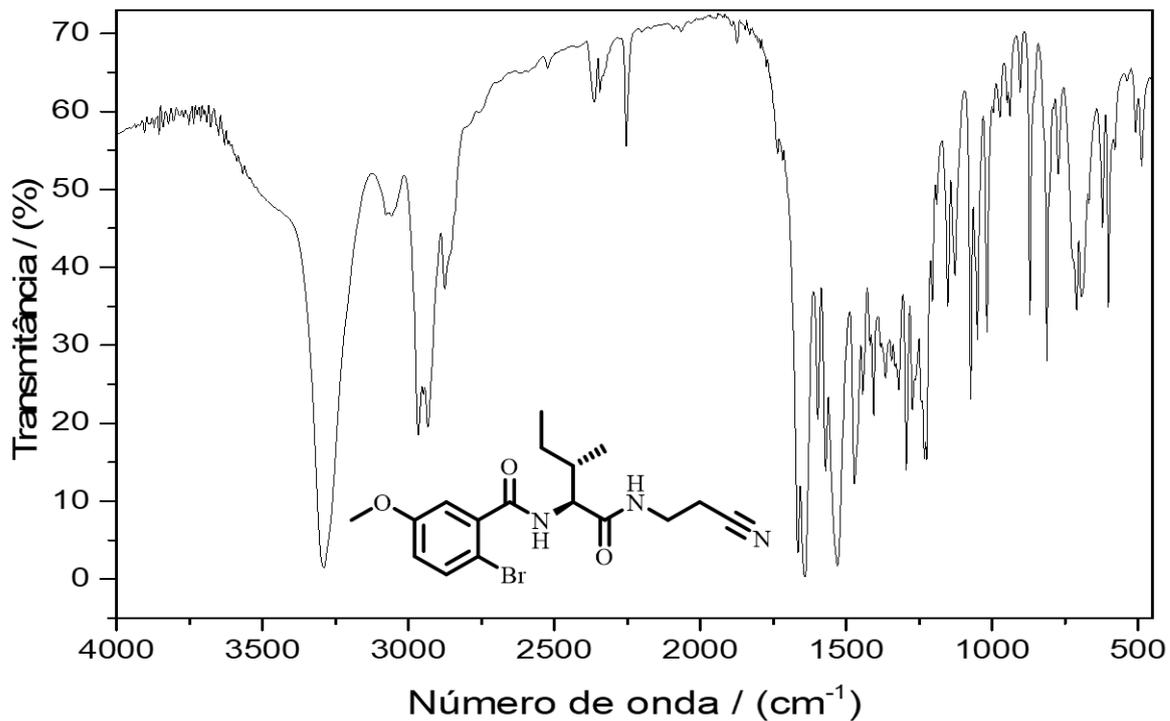


Figura 135. Espectro no IV do composto **26g** (Pastilha de KBr).

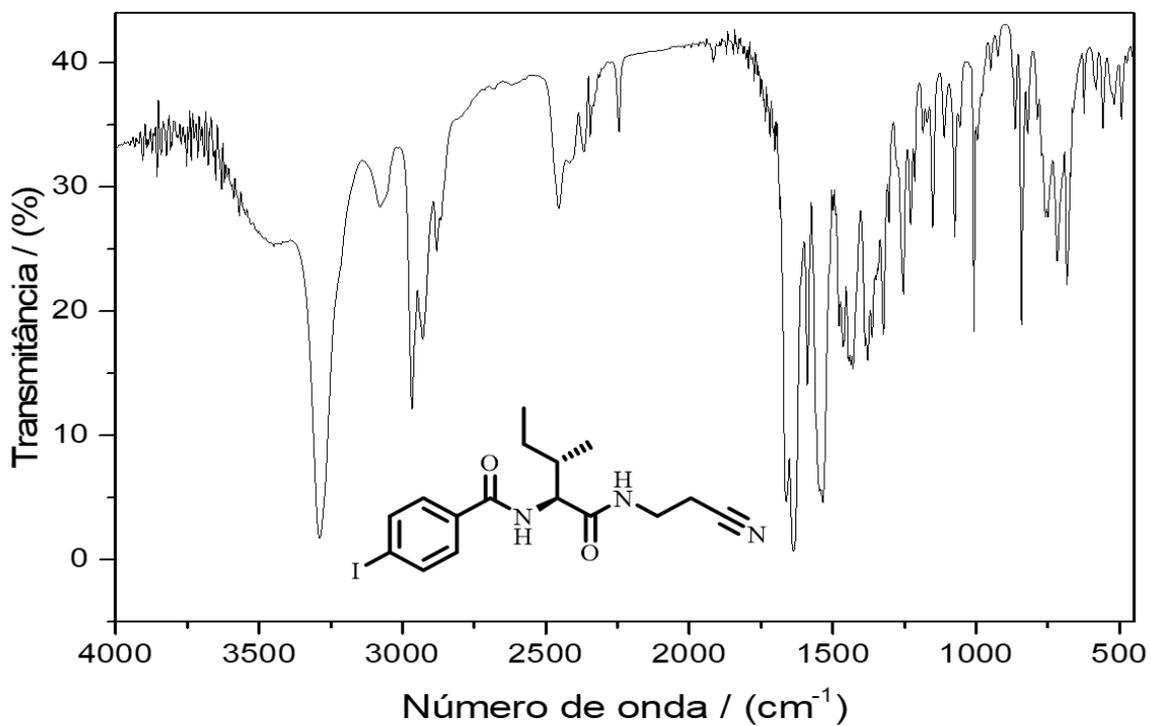


Figura 136. Espectro no IV do composto **26h** (Pastilha de KBr).

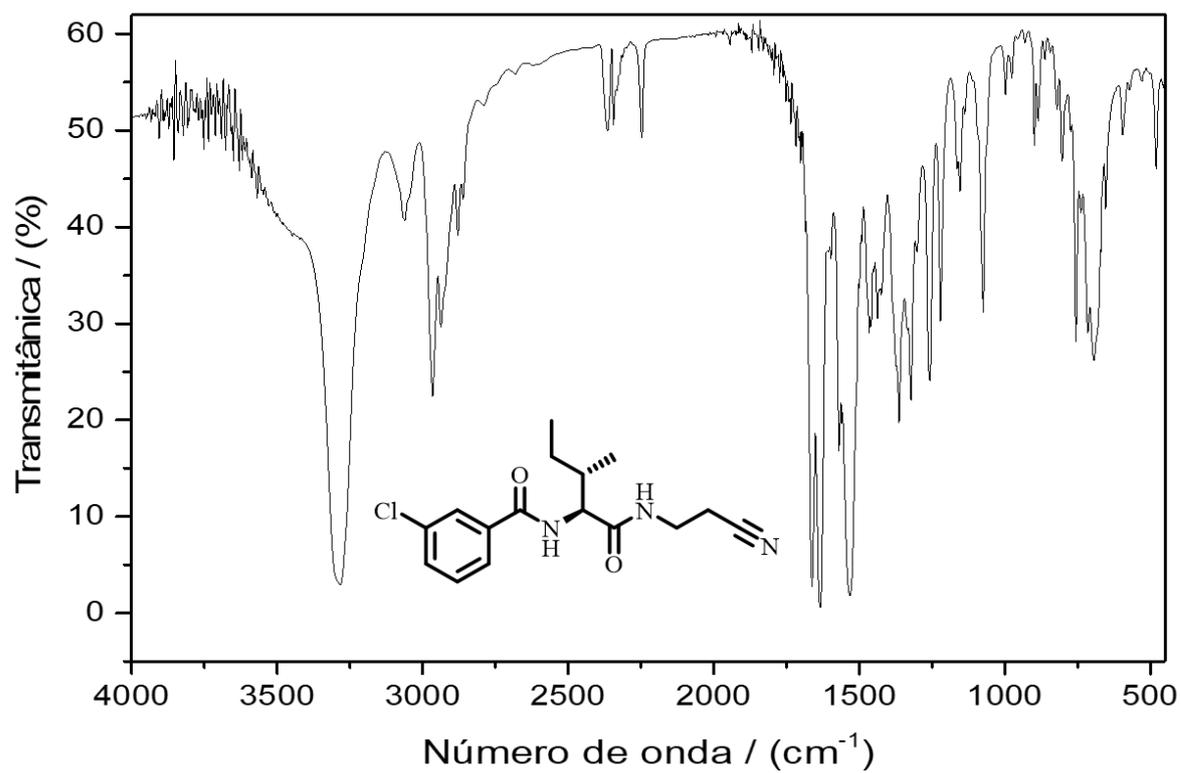


Figura 137. Espectro no IV do composto **26i** (Pastilha de KBr).

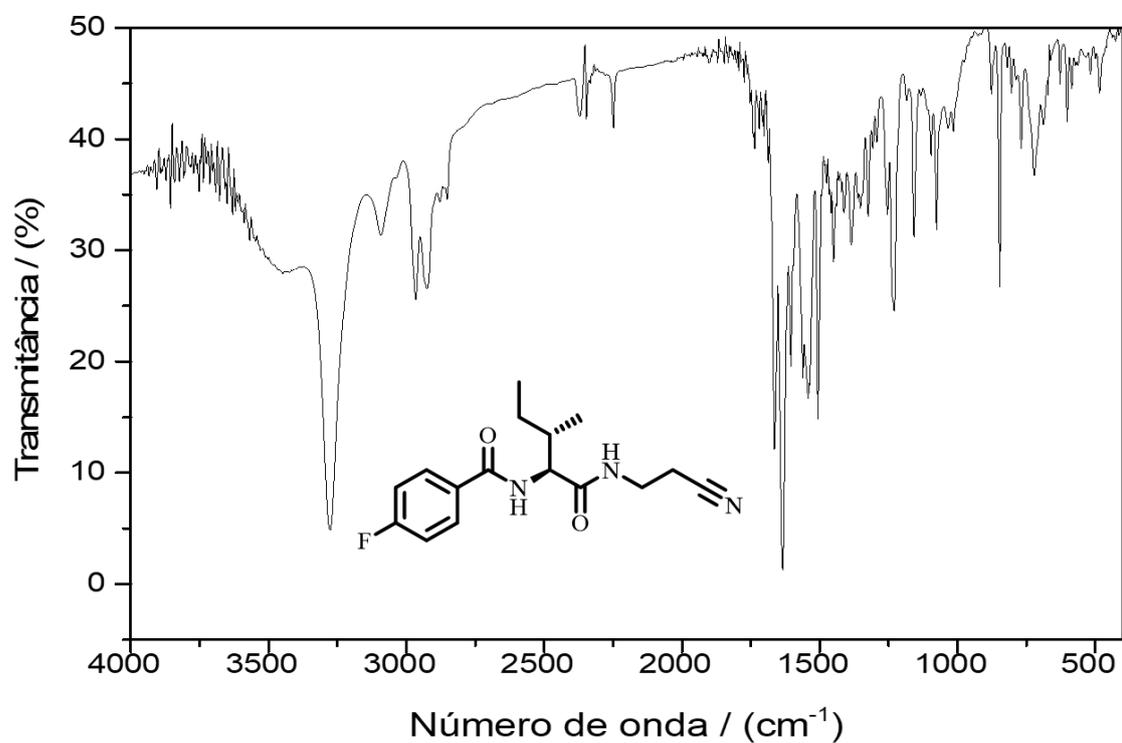


Figura 138. Espectro no IV do composto **26j** (Pastilha de KBr).

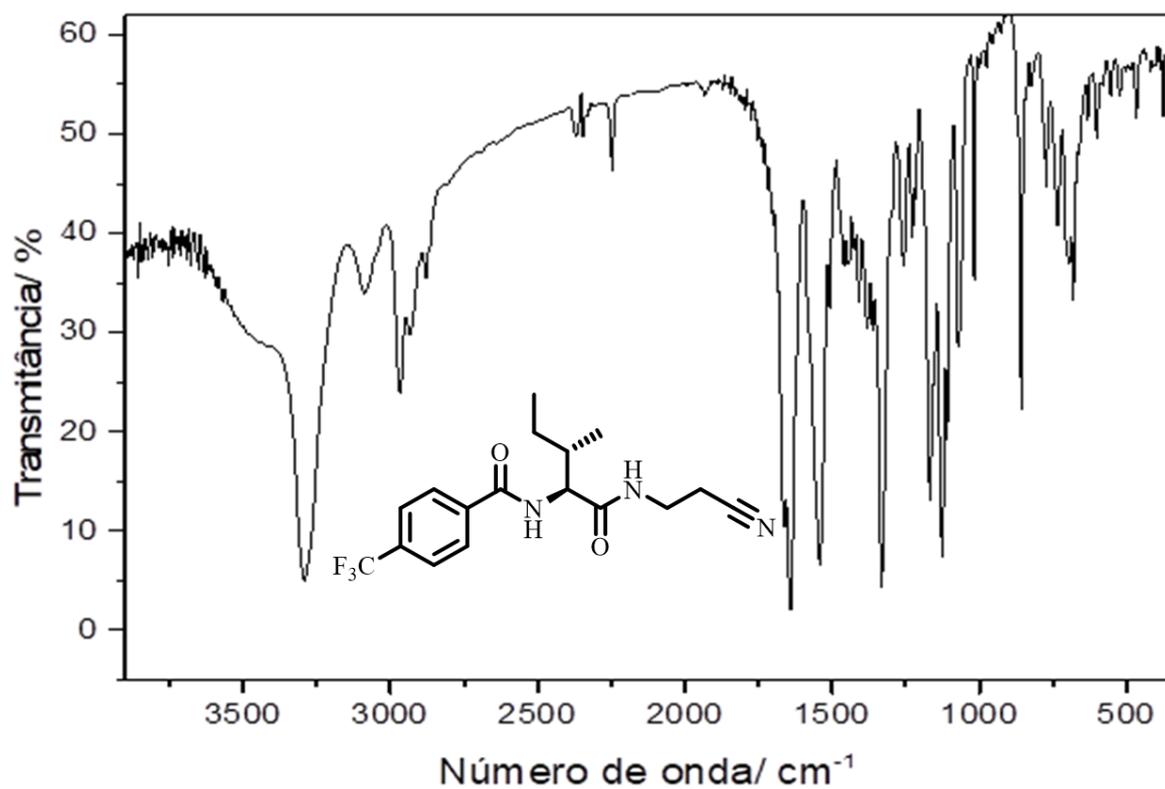


Figura 139. Espectro no IV do composto **26k** (Pastilha de KBr).

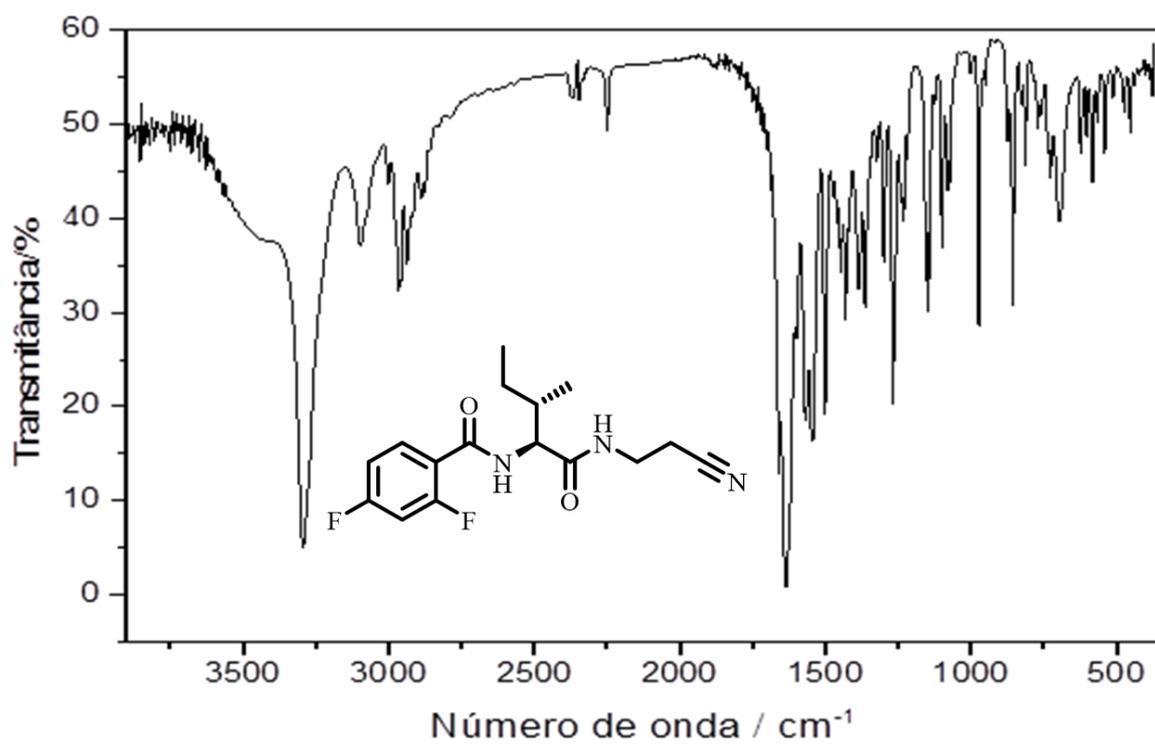


Figura 140. Espectro no IV do composto **26l** (Pastilha de KBr).

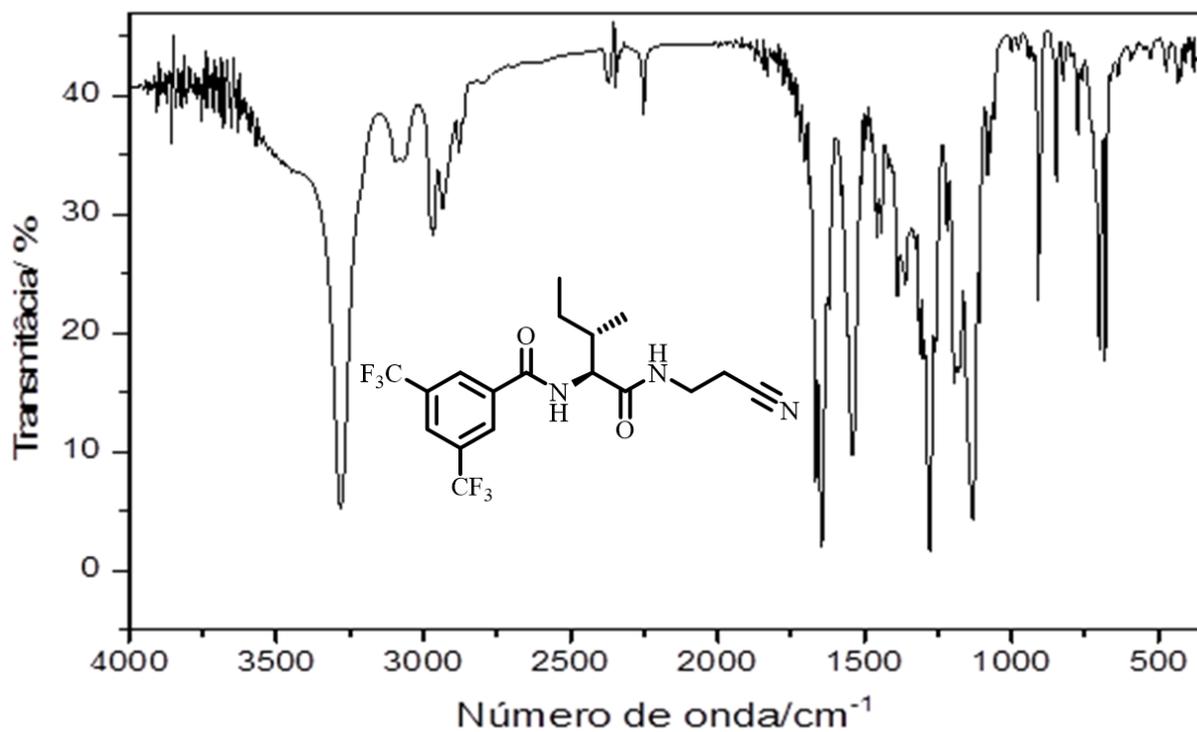


Figura 141. Espectro no IV do composto **26m** (Pastilha de KBr).

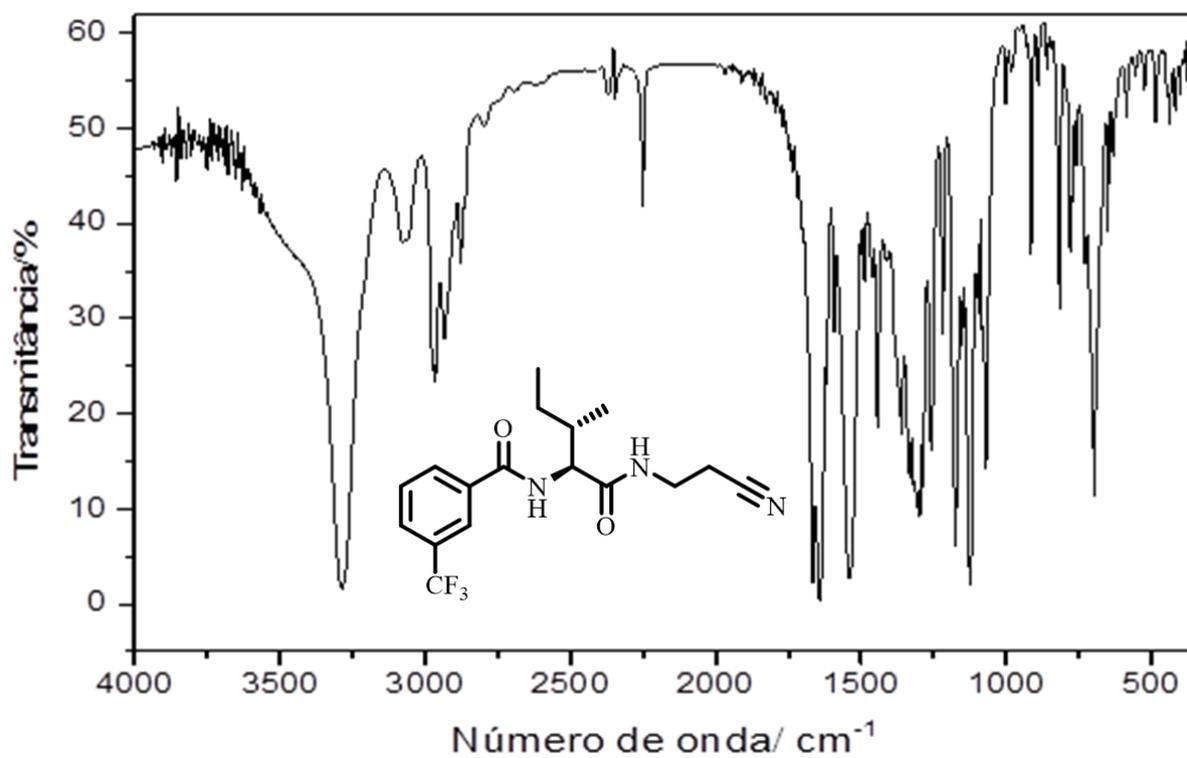


Figura 142. Espectro no IV do composto **26n** (Pastilha de KBr).

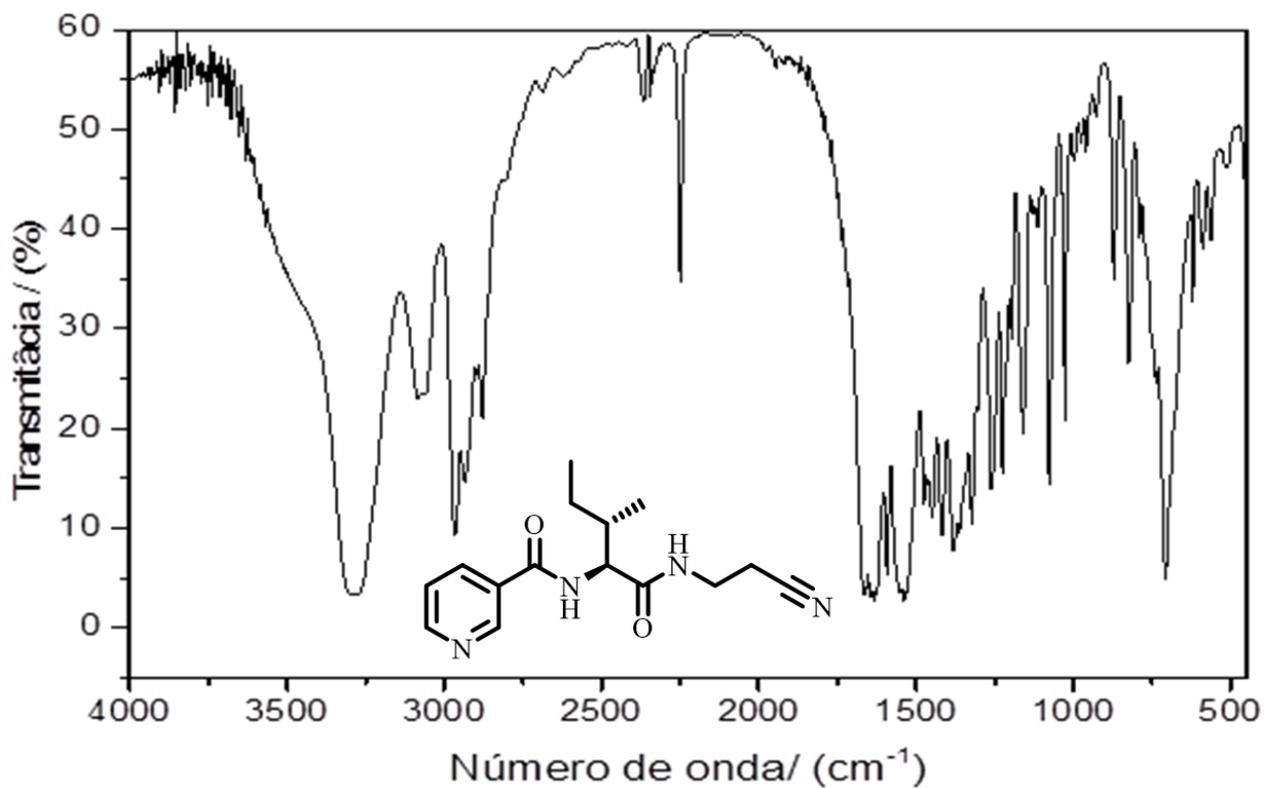


Figura 143. Espectro no IV do composto **26o** (Pastilha de KBr).

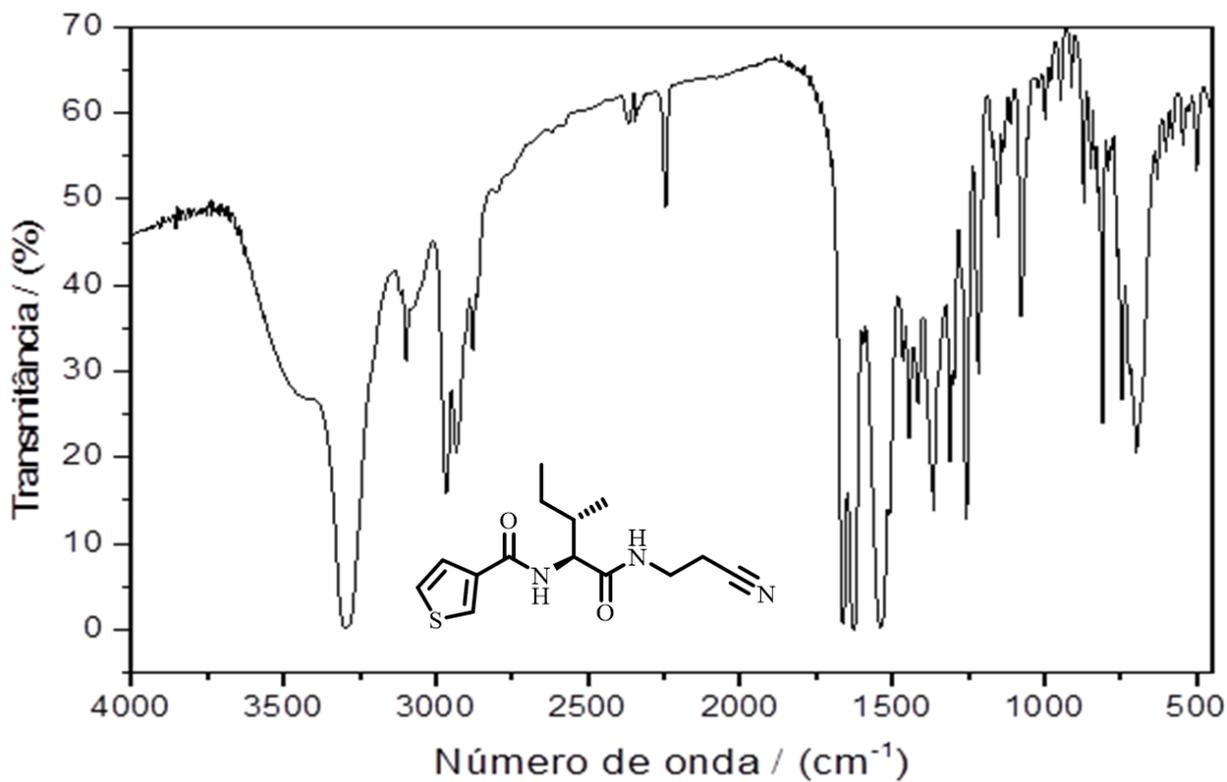


Figura 144. Espectro no IV do composto **26p** (Pastilha de KBr).

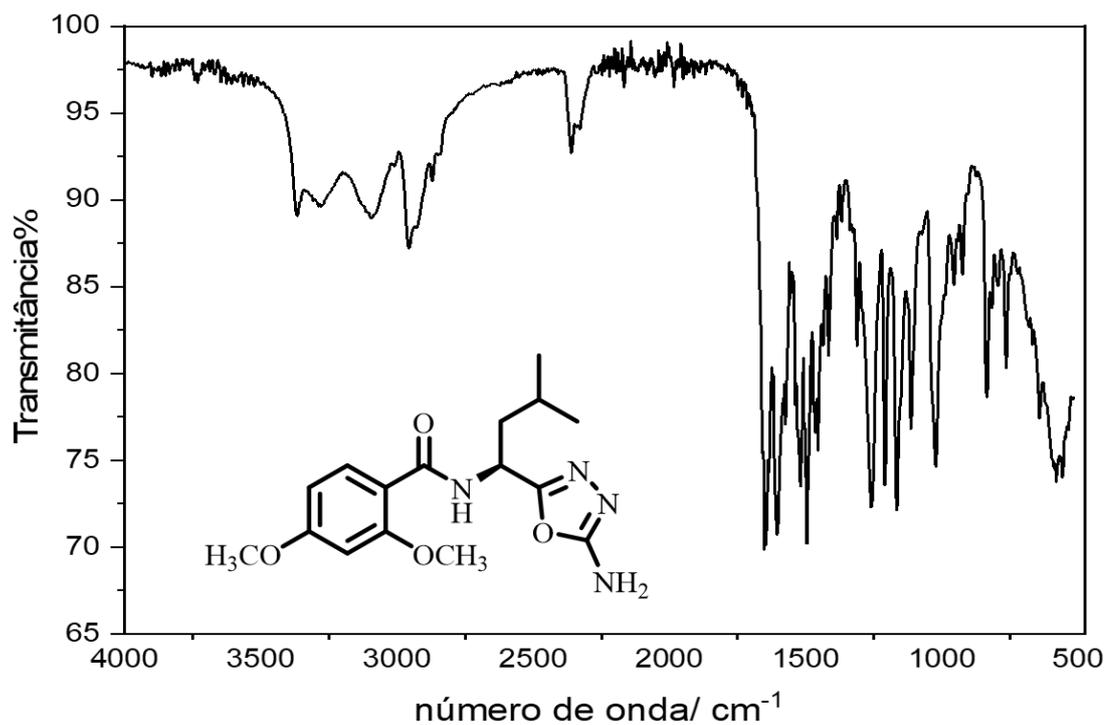


Figura 145. Espectro no IV do composto **38b** (Pastilha de KBr).

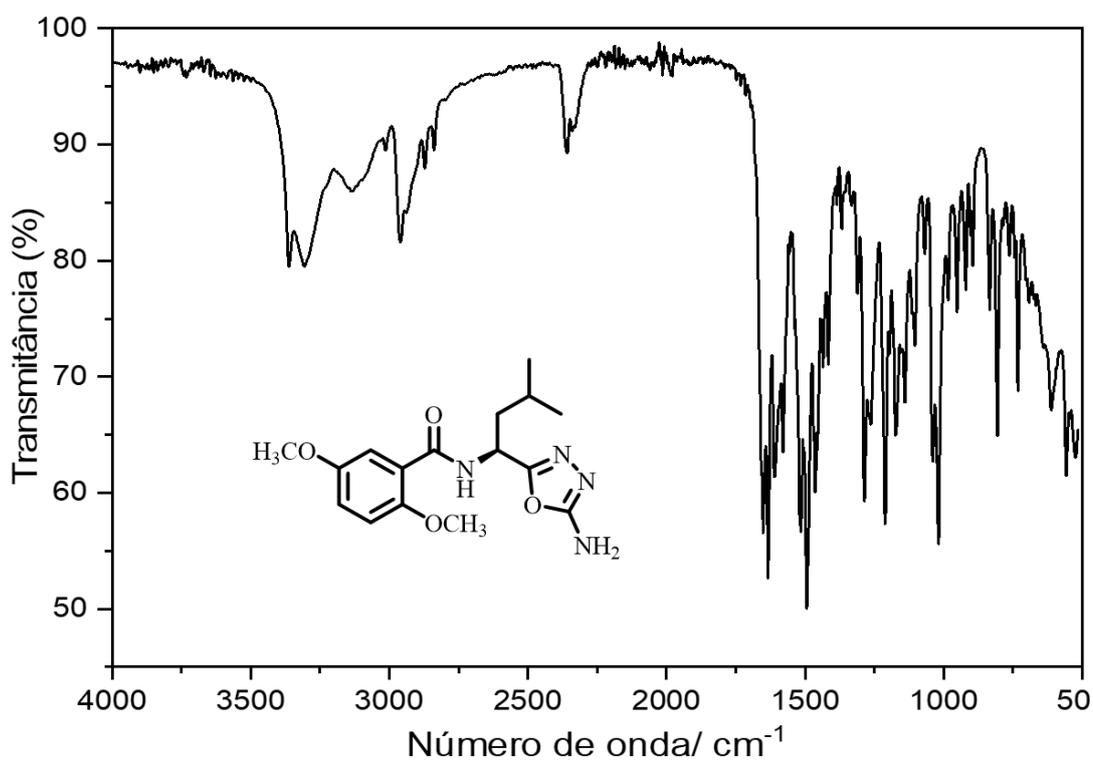


Figura 146. Espectro no IV do composto **38c** (Pastilha de KBr).

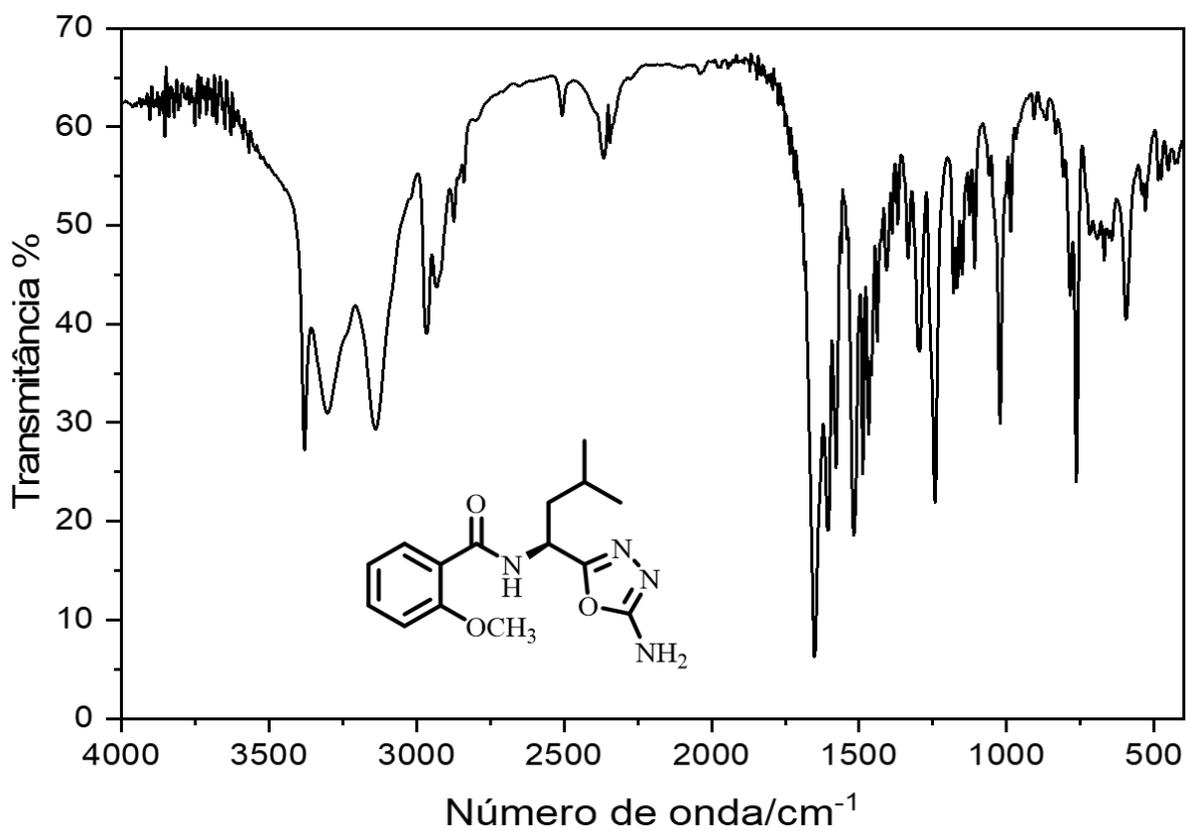


Figura 147. Espectro no IV do composto **38d** (Pastilha de KBr).

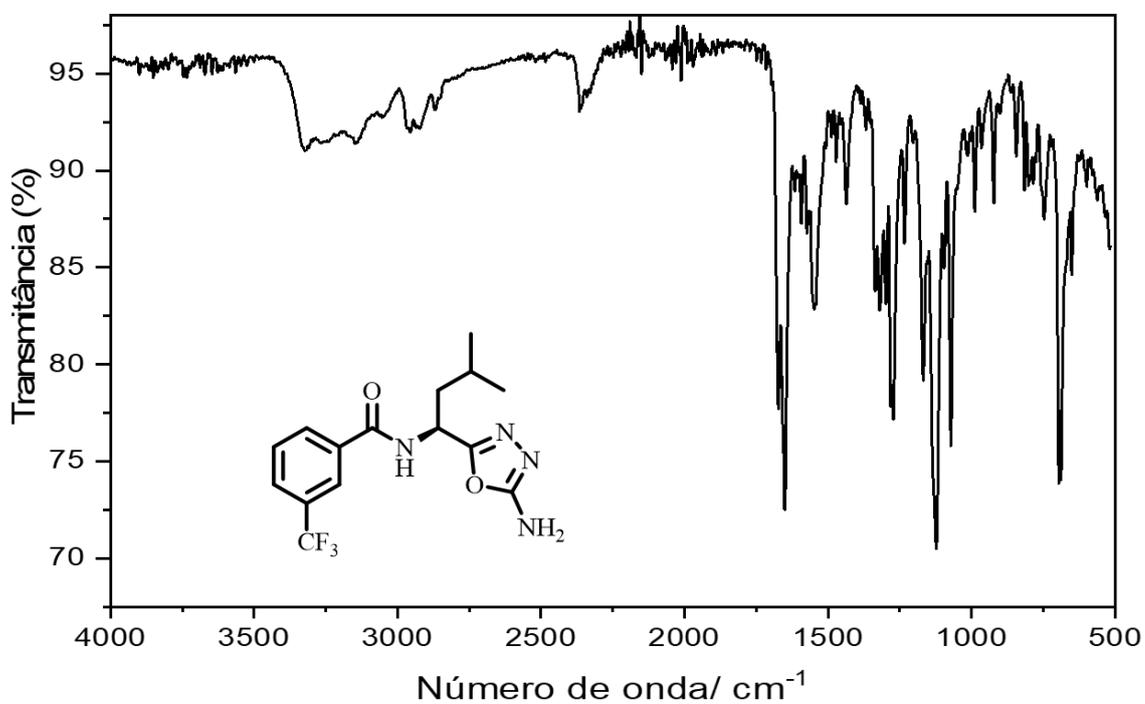


Figura 148. Espectro no IV do composto **38e** (Pastilha de KBr).

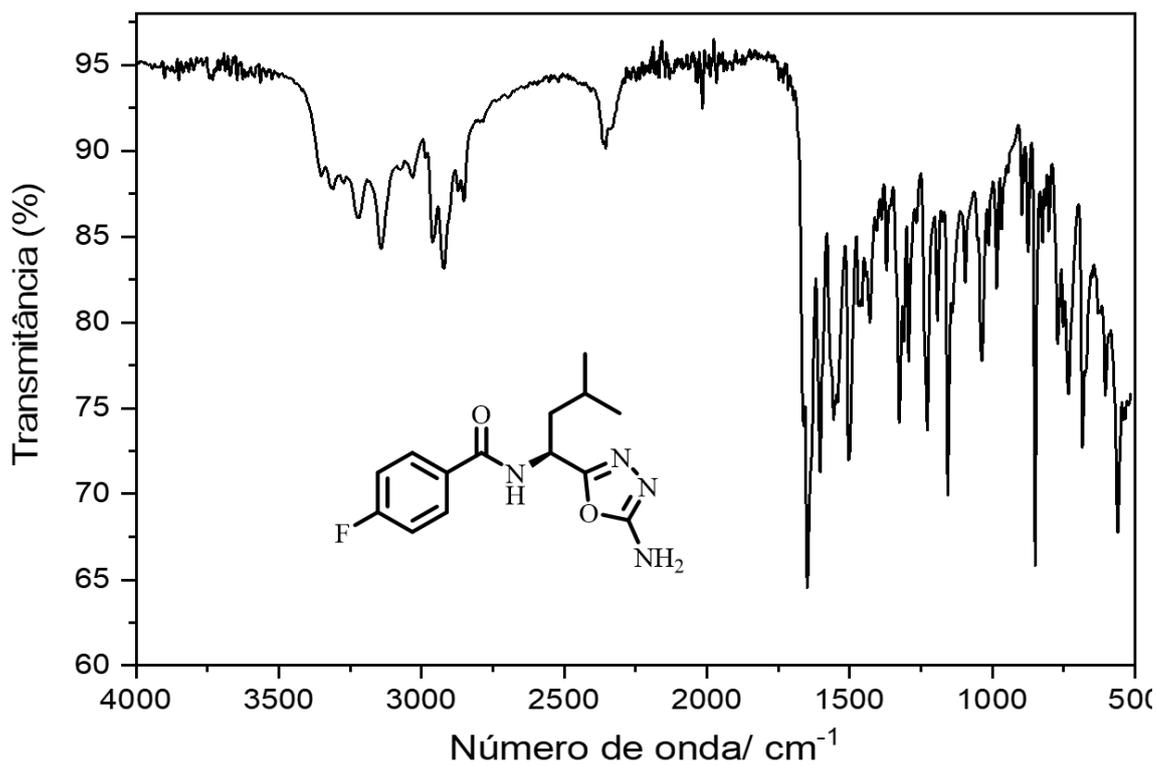


Figura 149. Espectro no IV do composto **38f** (Pastilha de KBr).

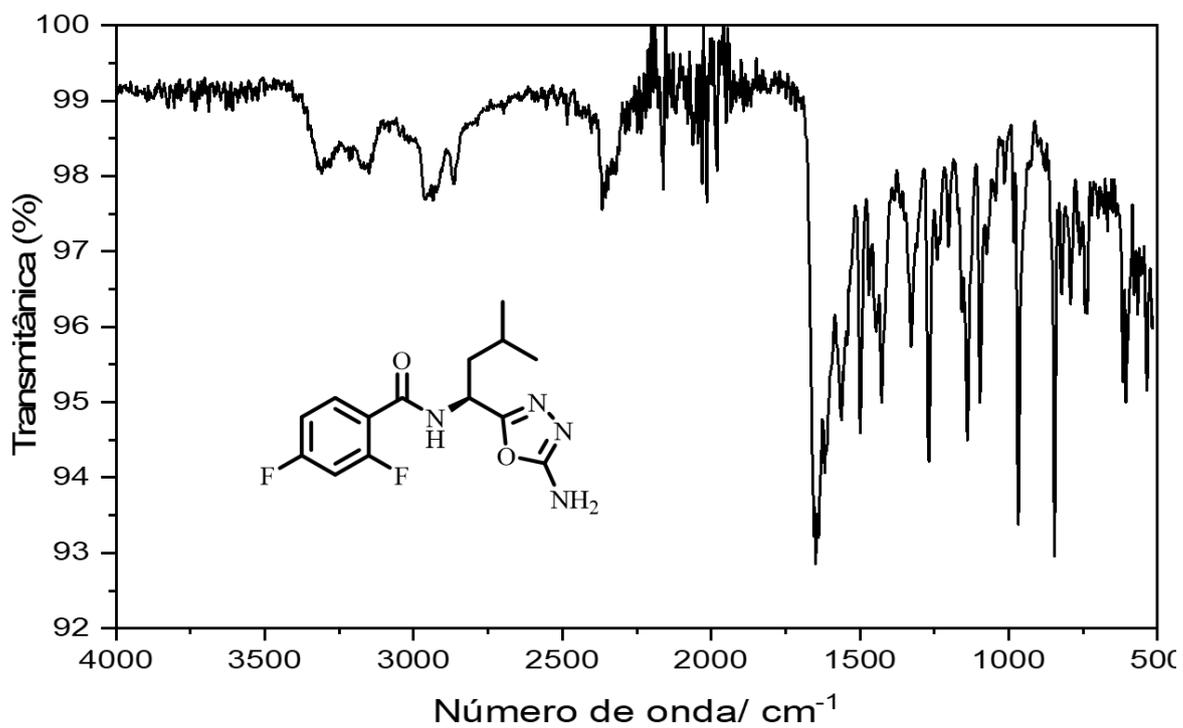


Figura 150. Espectro no IV do composto **38g** (Pastilha de KBr).

ANEXO IV: Espectros de Massas

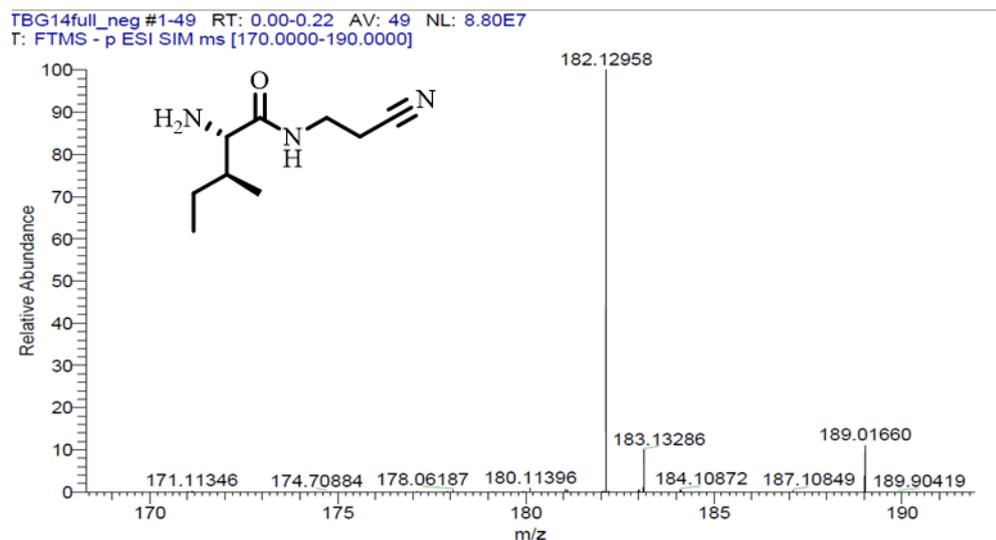


Figura 151. Espectro de Massas do composto **30** (ESI modo negativo).

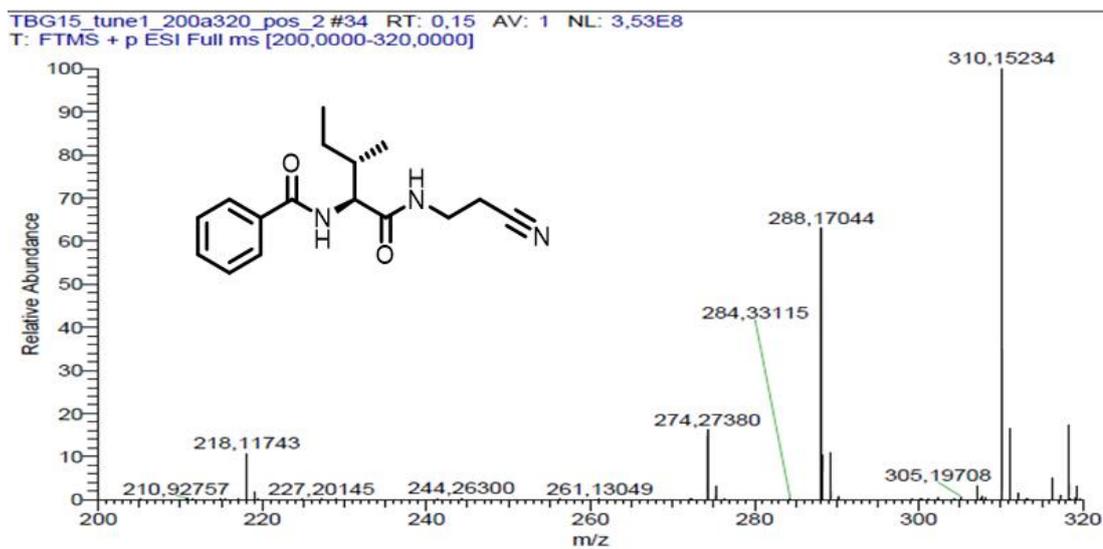


Figura 152. Espectro de Massas do composto **25a** (ESI modo positivo).

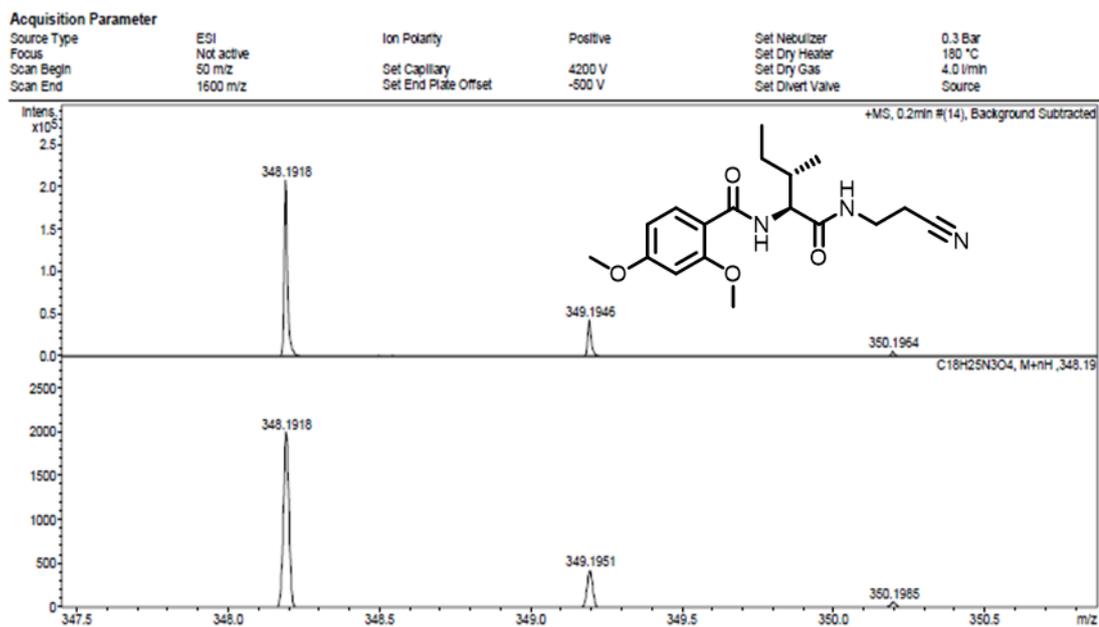


Figura 153. Espectro de Massas do composto **25b** (ESI modo positivo).

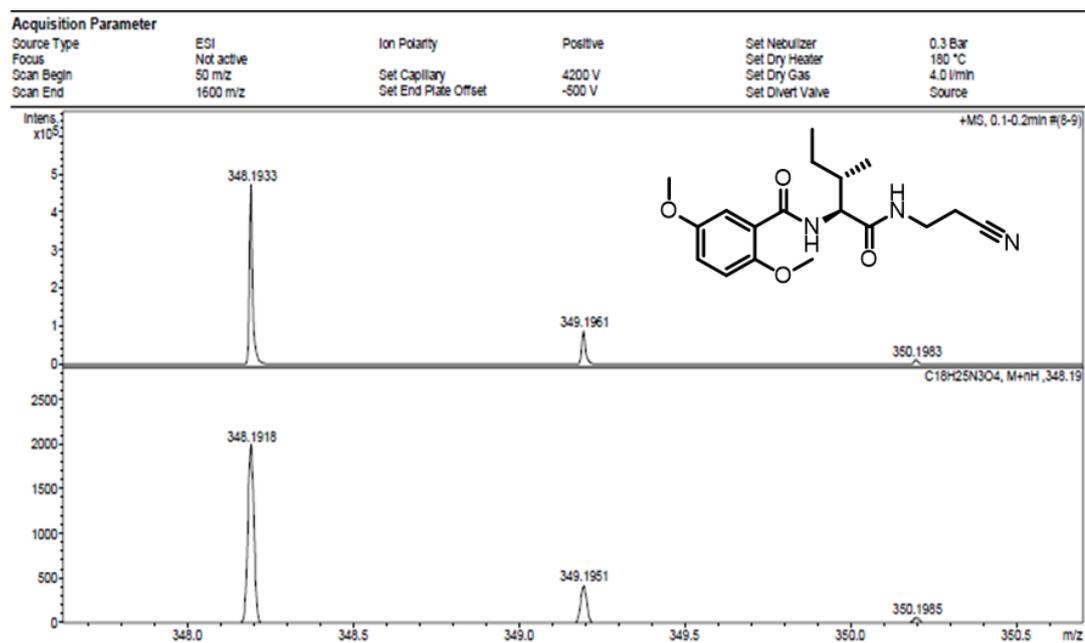


Figura 154. Espectro de Massas do composto **25c** (ESI modo positivo).

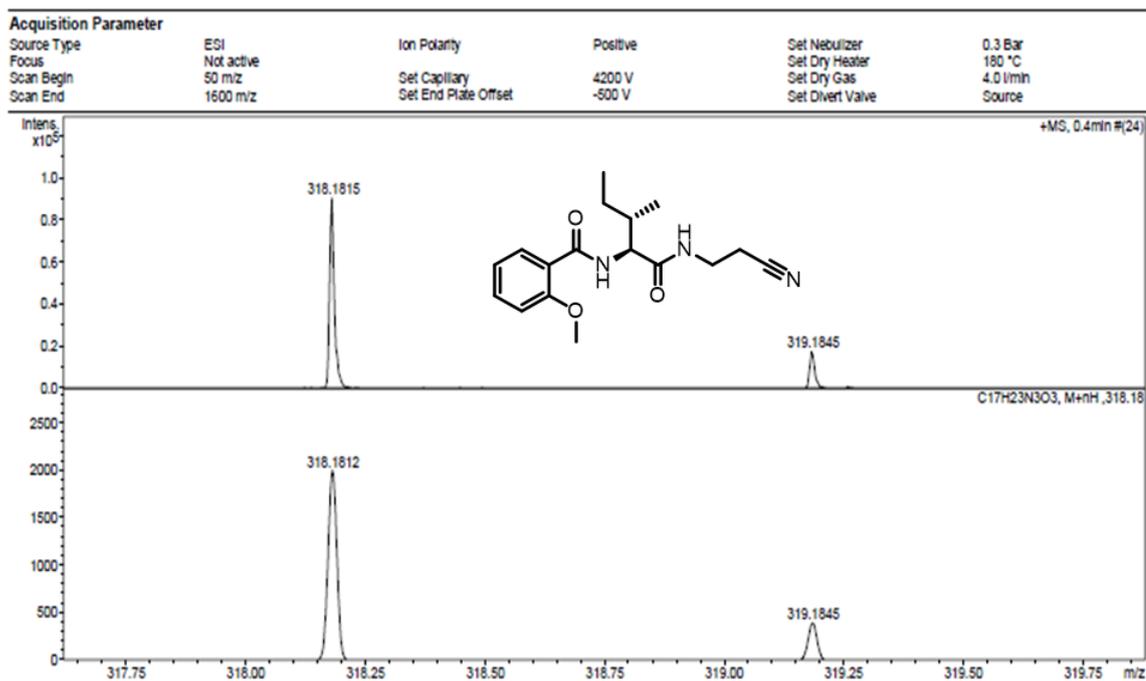


Figura 155. Espectro de Massas do composto **25d** (ESI modo positivo).

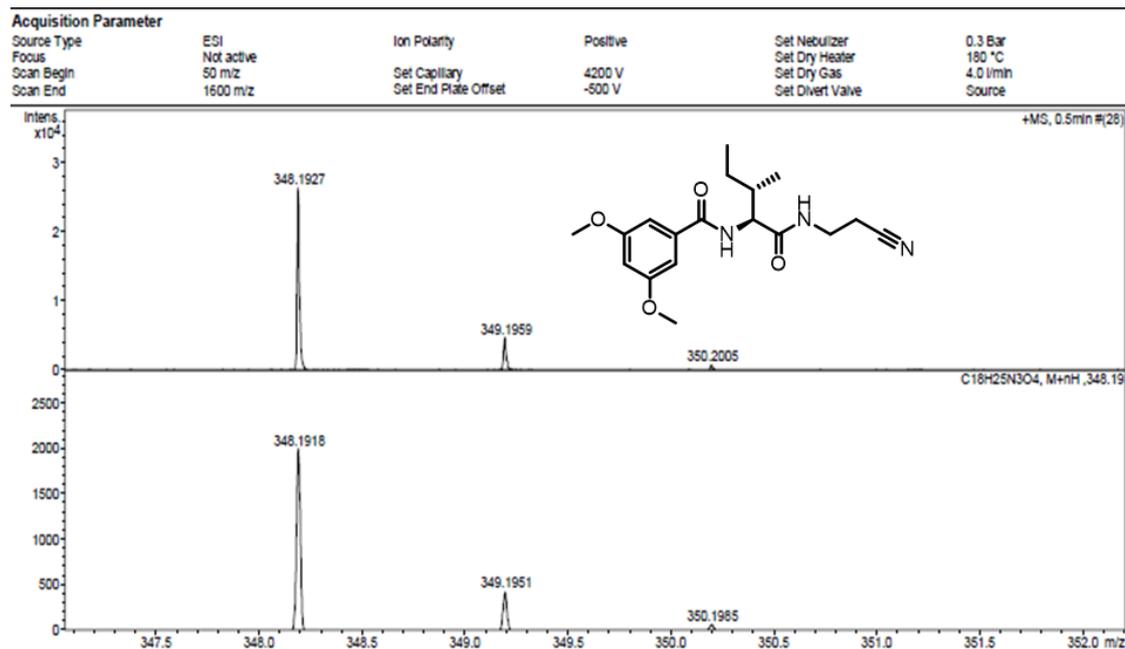


Figura 156. Espectro de Massas do composto **25e** (ESI modo positivo).

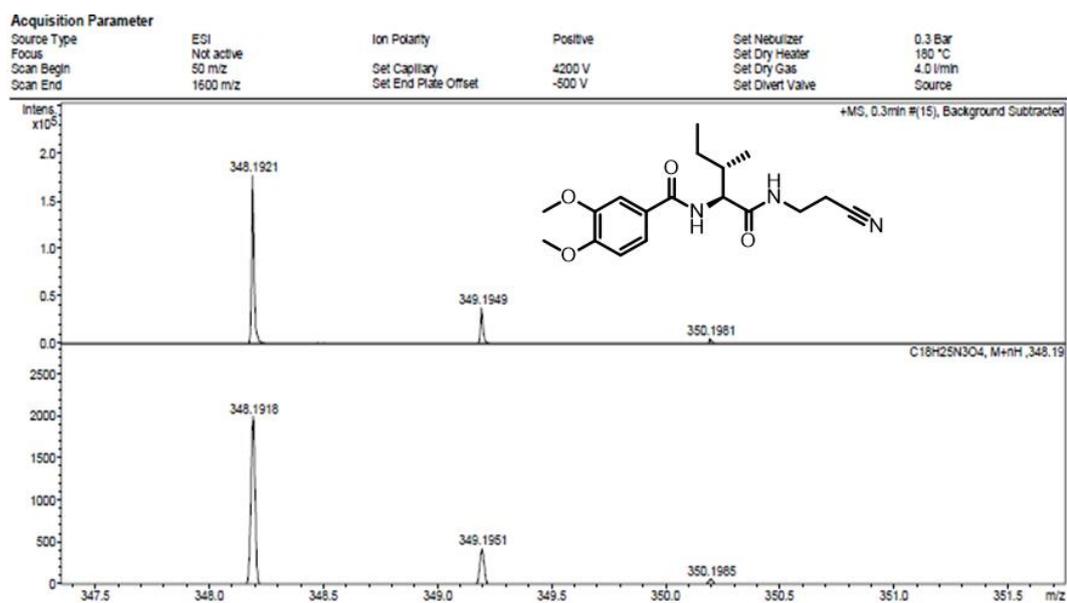


Figura 157. Espectro de Massas do composto **25f** (ESI modo positivo).

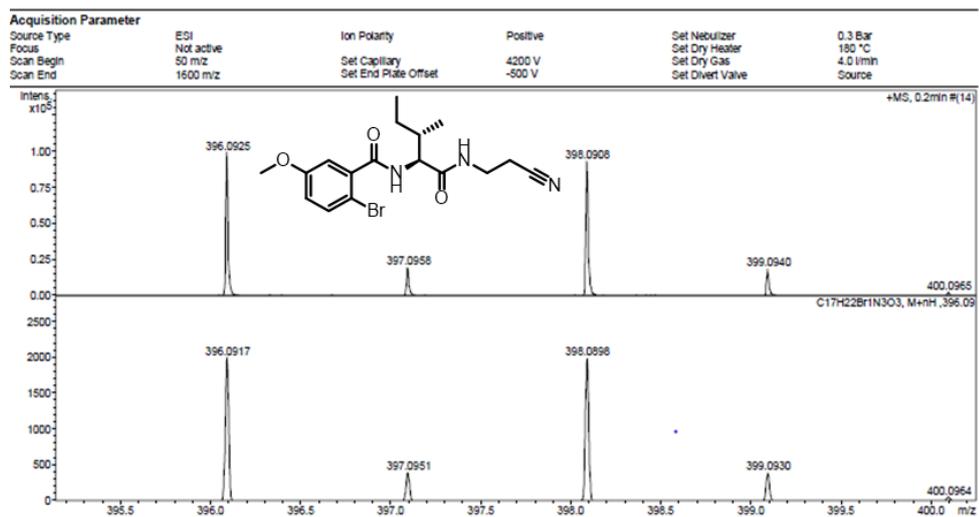


Figura 158. Espectro de Massas do composto **25g** (ESI modo positivo).

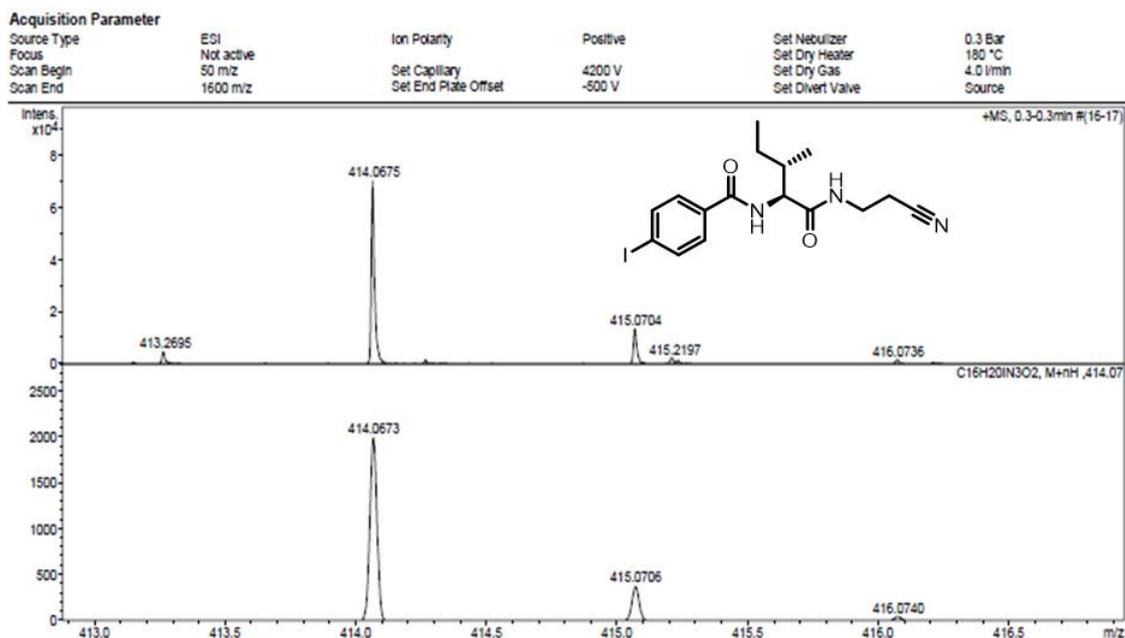


Figura 159. Espectro de Massas do composto **25h** (ESI modo positivo).

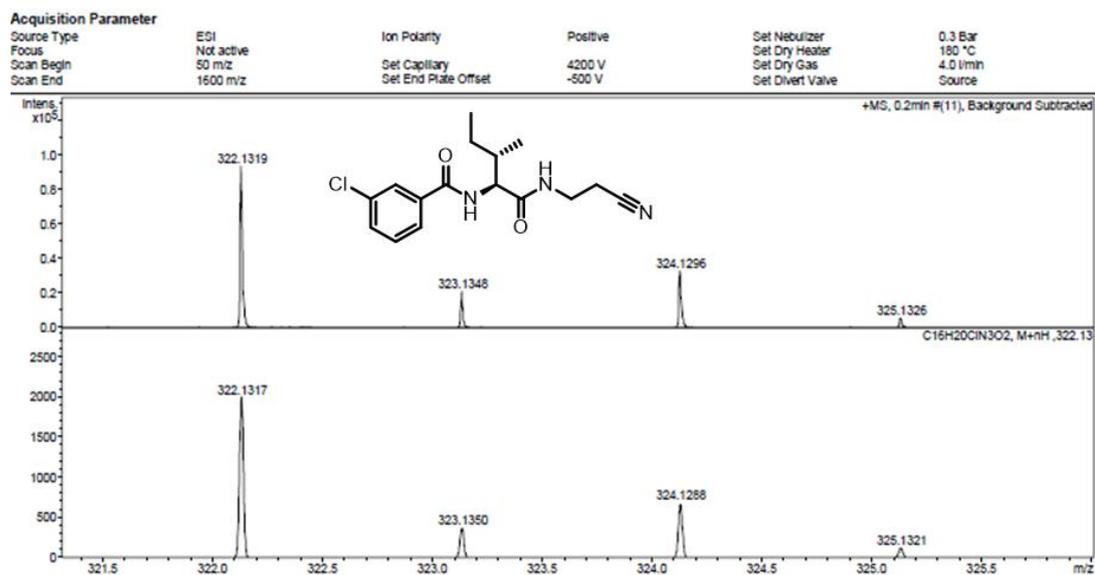


Figura 160. Espectro de Massas do composto **25i** (ESI modo positivo).

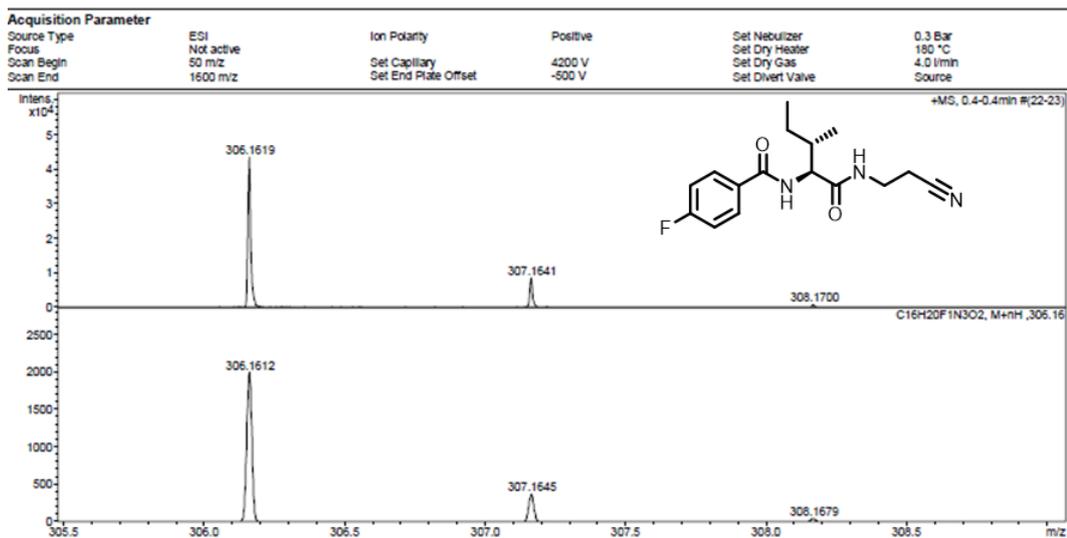


Figura 161. Espectro de Massas do composto **25j** (ESI modo positivo).

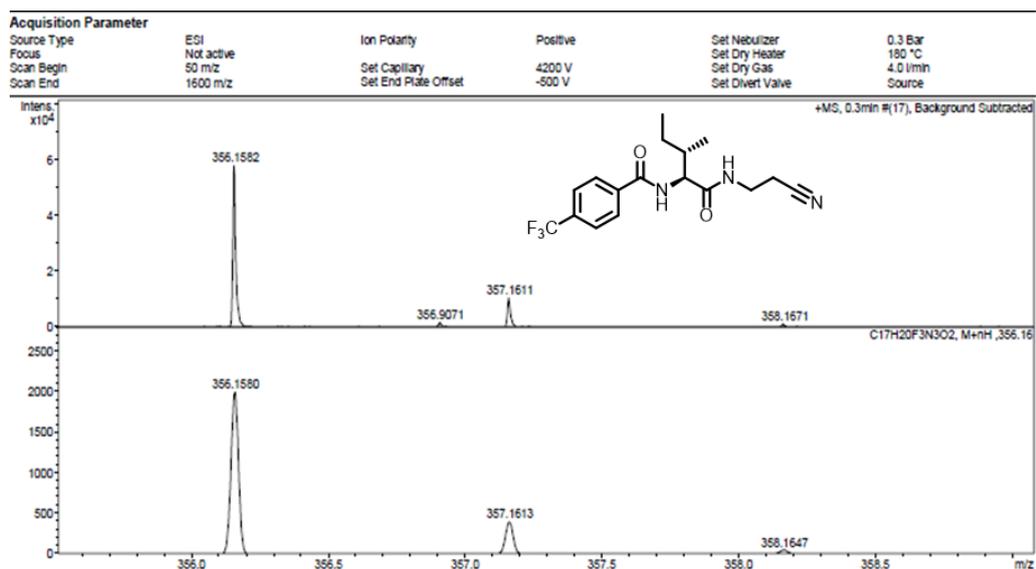


Figura 162. Espectro de Massas do composto **25k** (ESI modo positivo).

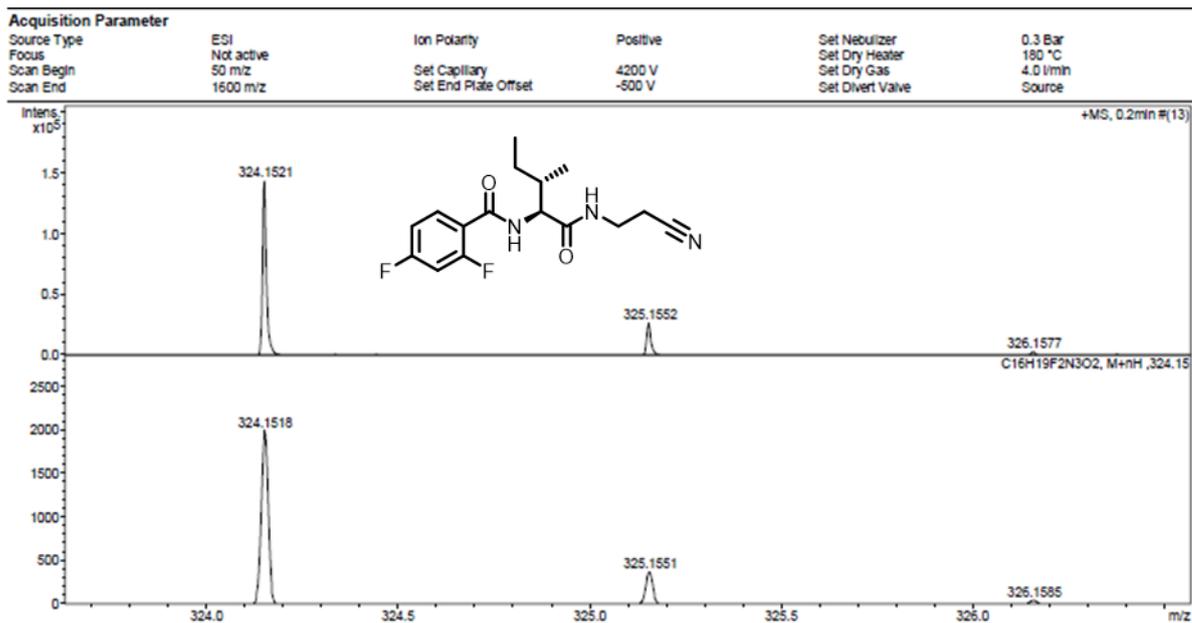


Figura 163. Espectro de Massas do composto **25I** (ESI modo positivo).

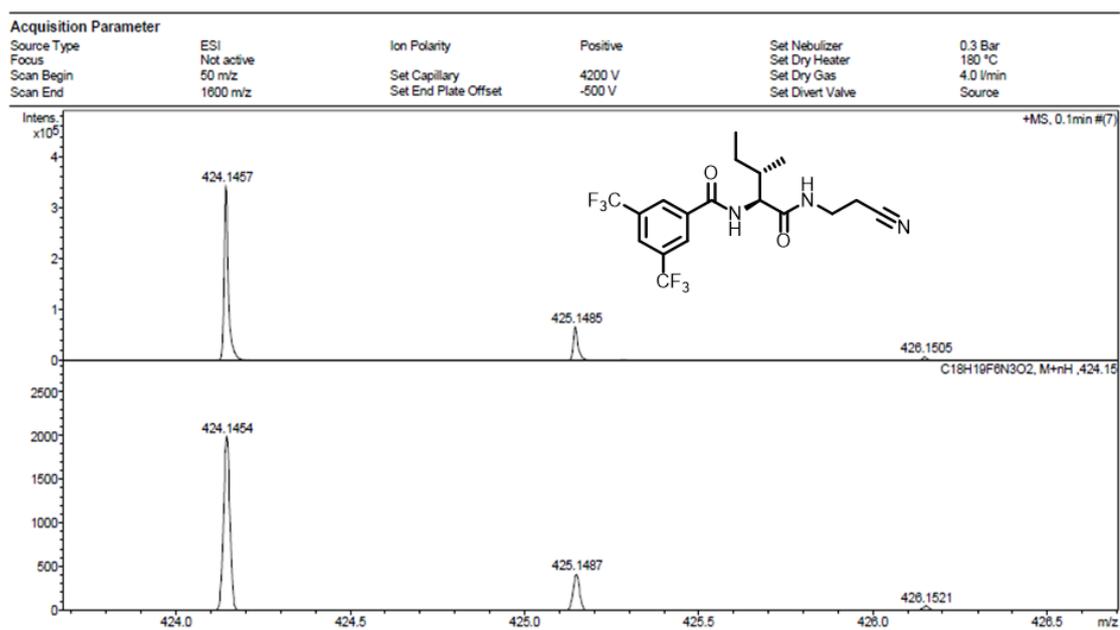


Figura 164. Espectro de Massas do composto **25m** (ESI modo positivo).

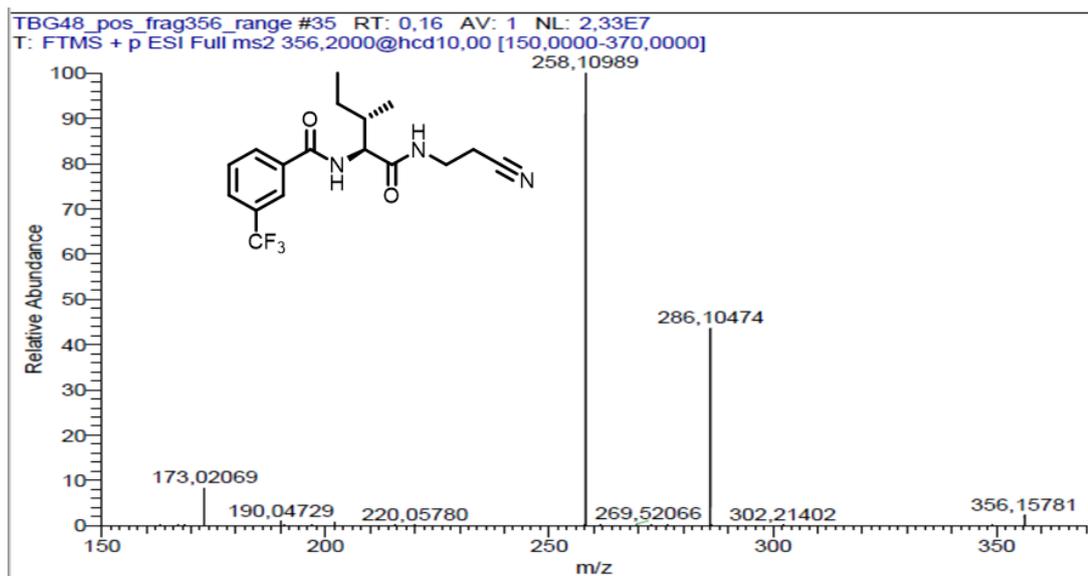


Figura 165. Espectro de Massas do composto **25n** (ESI modo positivo).

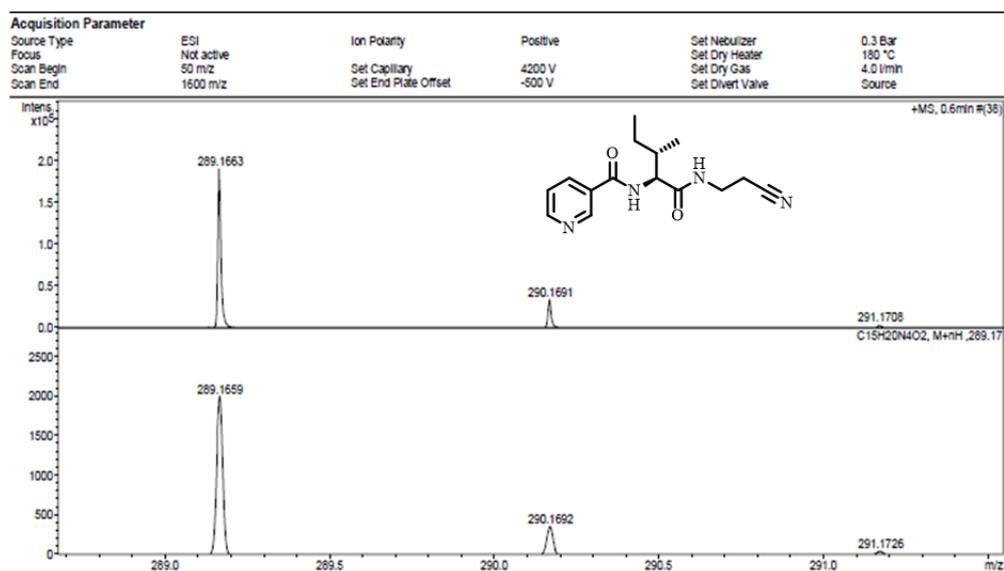


Figura 166. Espectro de Massas do composto **25o** (ESI modo positivo).

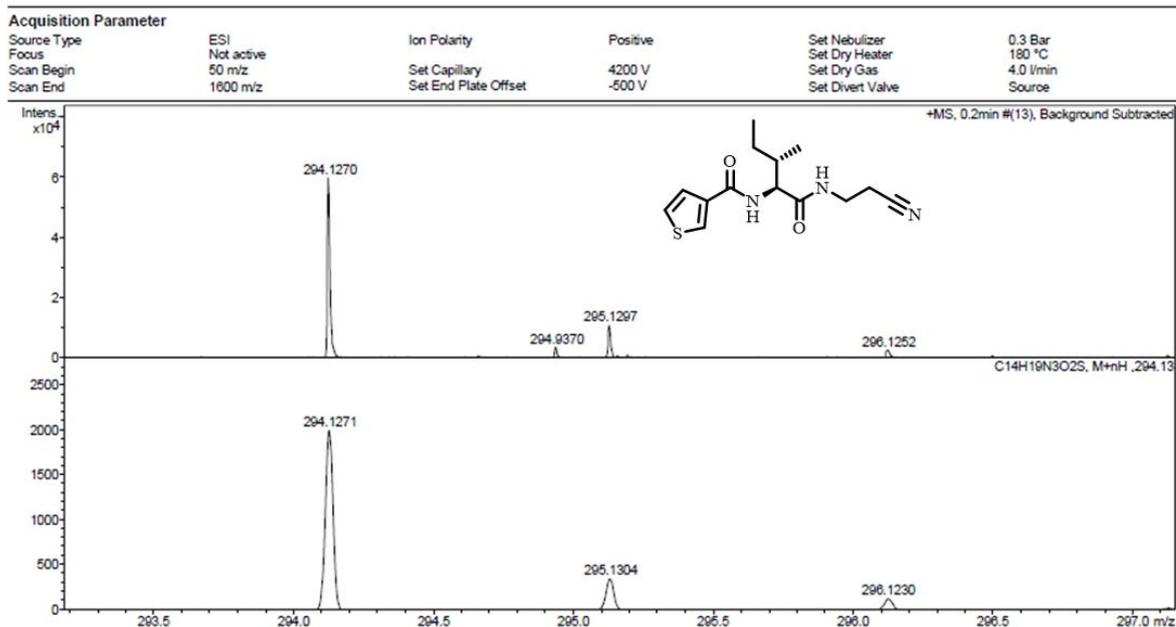


Figura 167. Espectro de Massas do composto **25p** (ESI modo positivo).

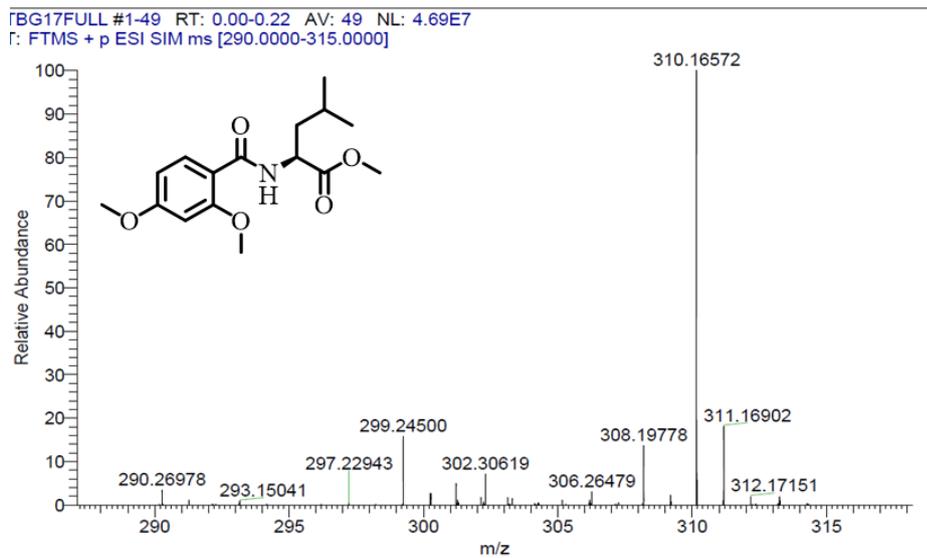


Figura 168. Espectro de Massas do composto **34b** (ESI modo positivo).

TBG22_FULL_POS #1-50 RT: 0.00-0.22 AV: 50 NL: 3.96E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [300.0000-315.0000]

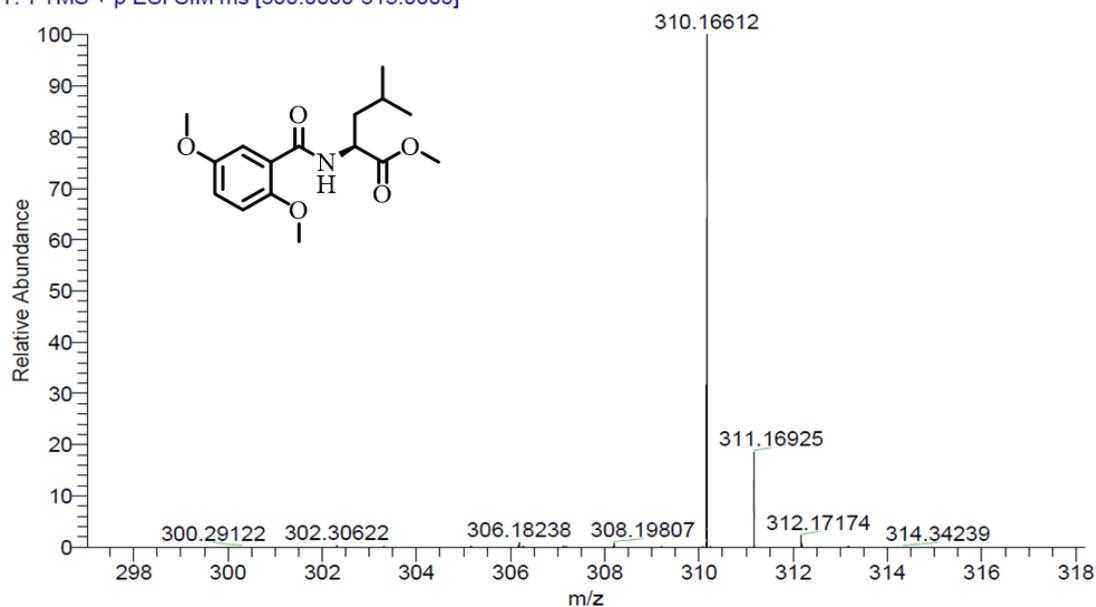


Figura 169. Espectro de Massas do composto **34c** (ESI modo positivo).

TBG25FULL #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 1.68E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [270.0000-290.0000]

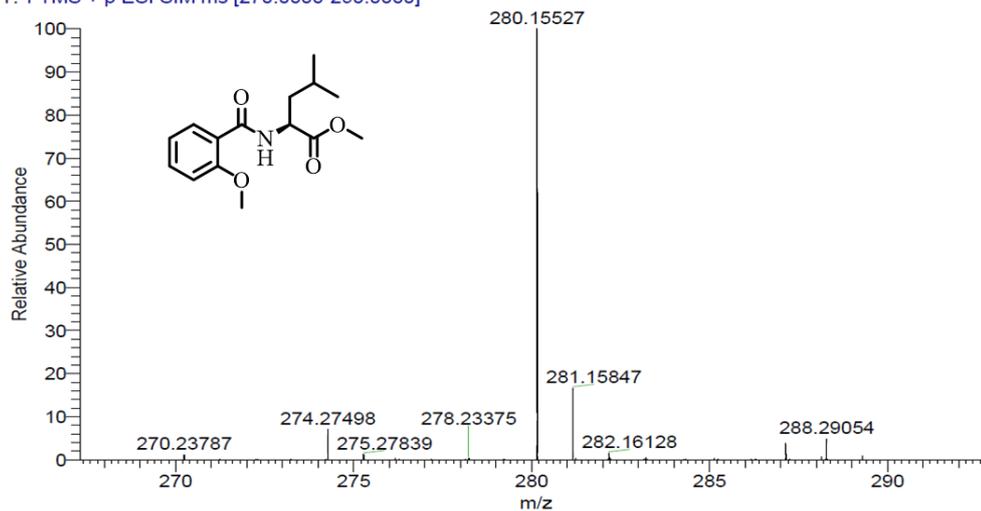


Figura 170. Espectro de Massas do composto **34d** (ESI modo positivo).

TBG55FULLNEG #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 2.21E7
T: FTMS - p ESI SIM ms [310.0000-320.0000]

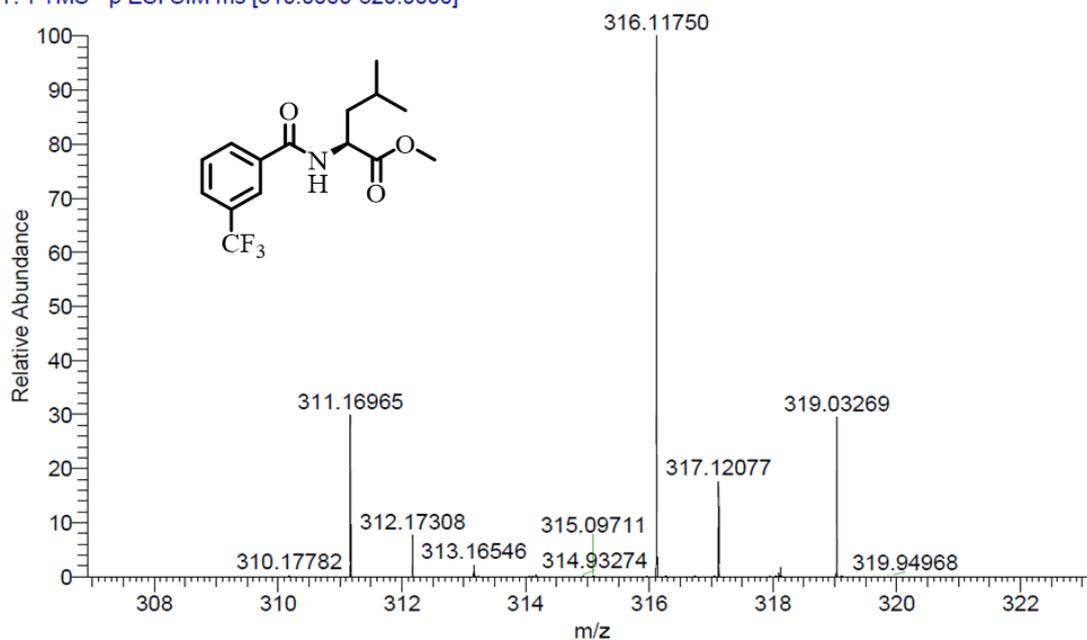


Figura 171. Espectro de Massas do composto **34e** (ESI modo negativo).

TBG58FULL_NEG #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 1.32E8
T: FTMS - p ESI SIM ms [255.0000-290.0000]

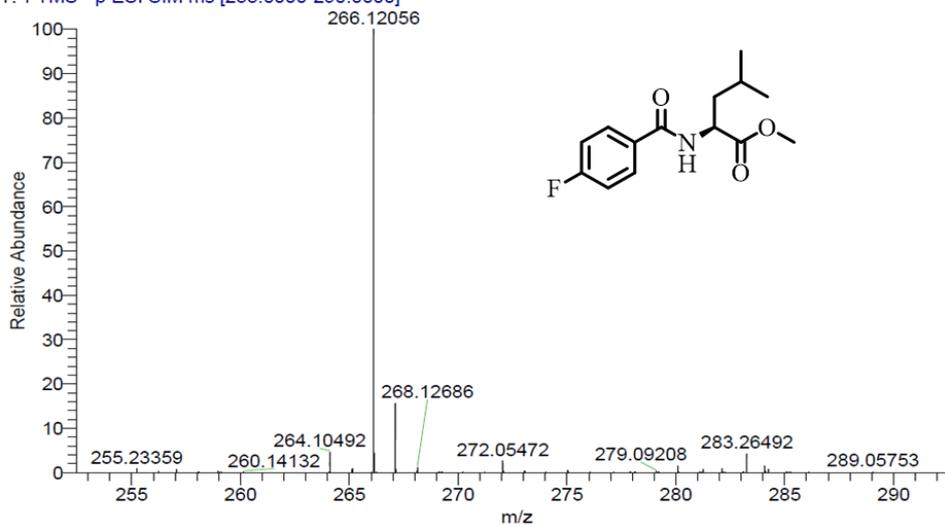


Figura 172. Espectro de Massas do composto **34f** (ESI modo negativo).

TBG59_full_neg_2 #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 4.89E7
T: FTMS - p ESI SIM ms [280.0000-290.0000]

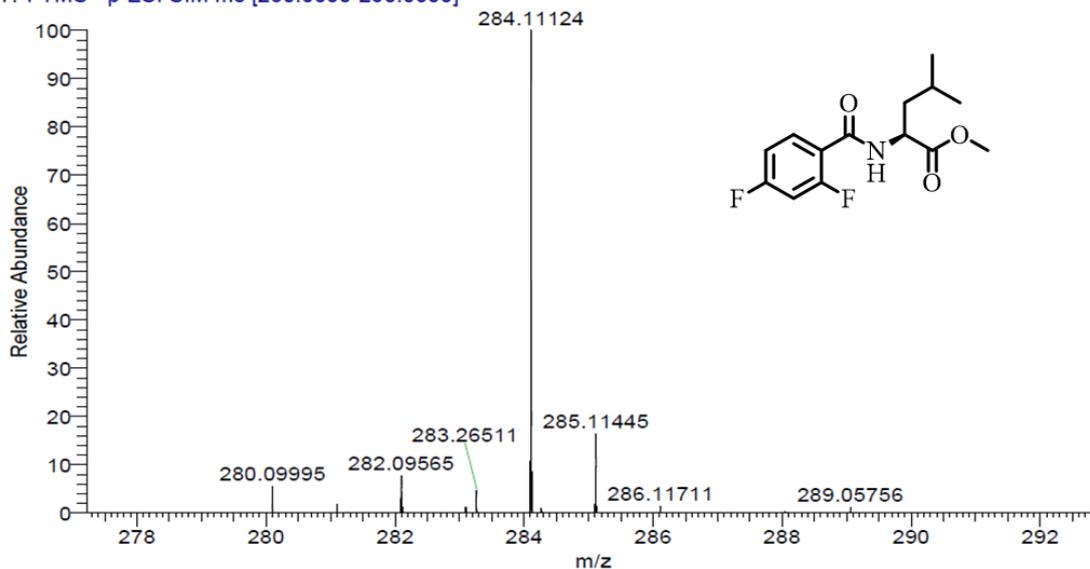


Figura 173. Espectro de Massas do composto **34g** (ESI modo negativo).

TBG09_FULLSCAN_NEG #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 1.28E8
T: FTMS - p ESI SIM ms [240.0000-260.0000]

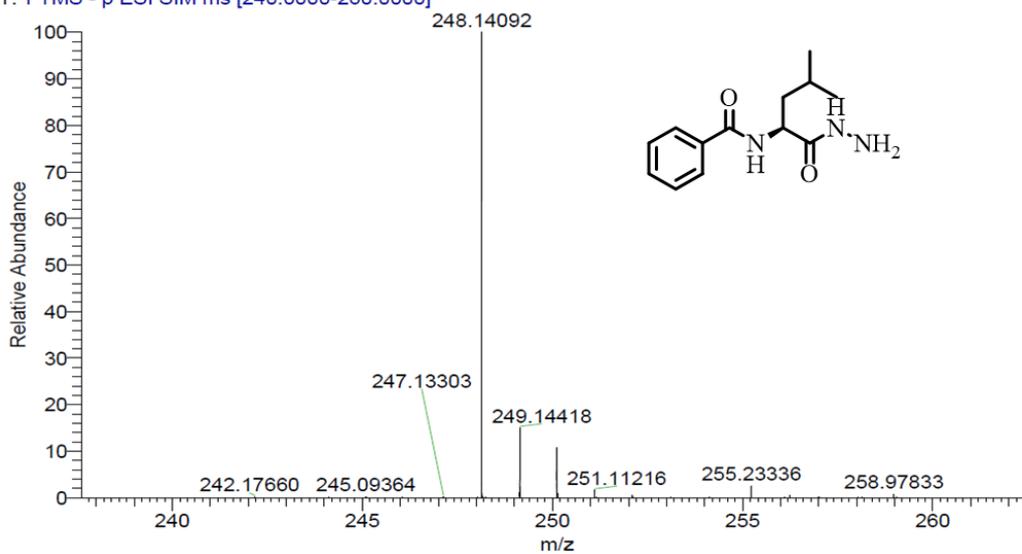


Figura 174. Espectro de Massas do composto **36a** (ESI modo negativo).

tbg26_2_POS #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 2.90E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [300.0000-320.0000]

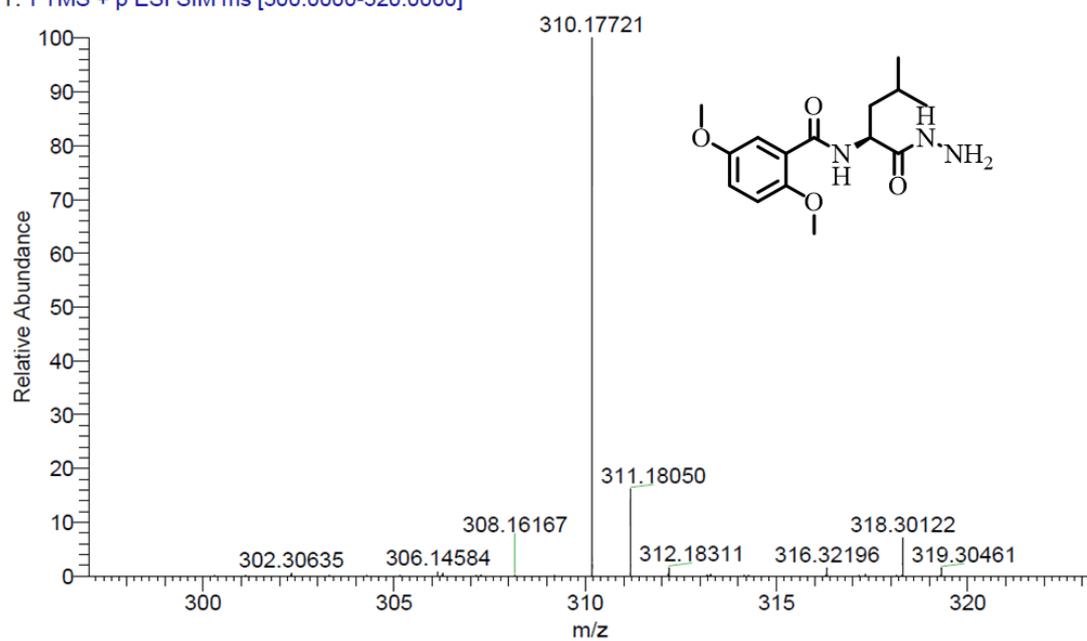


Figura 175. Espectro de Massas do composto **36c** (ESI modo negativo).

tbg31_full_neg #1-49 RT: 0.00-0.22 AV: 49 NL: 6.67E7
T: FTMS - p ESI SIM ms [275.0000-280.0000]

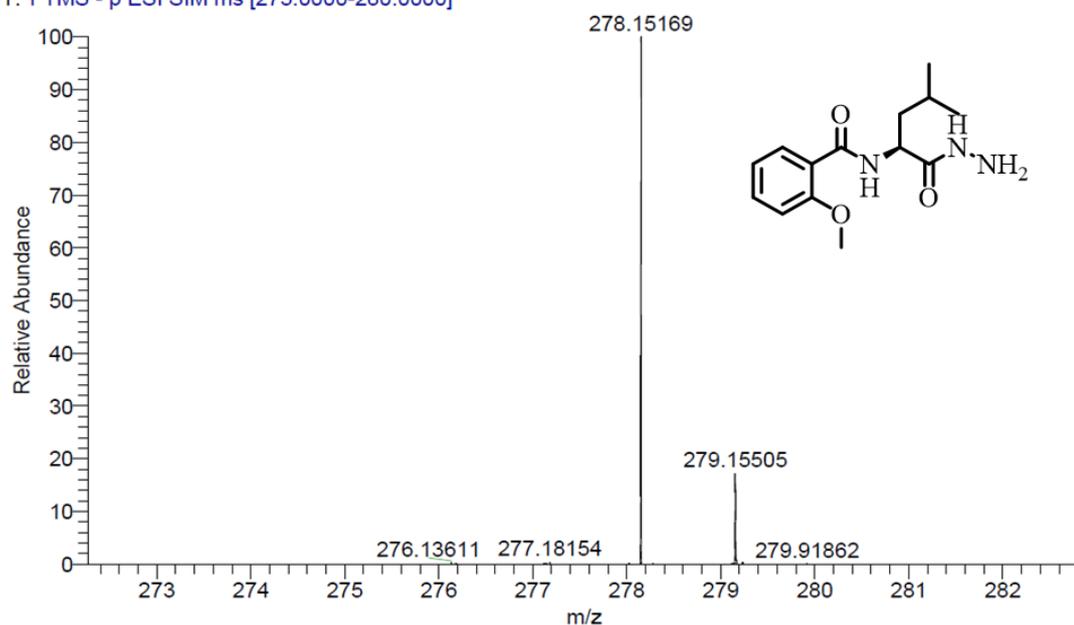


Figura 176. Espectro de Massas do composto **36d** (ESI modo negativo).

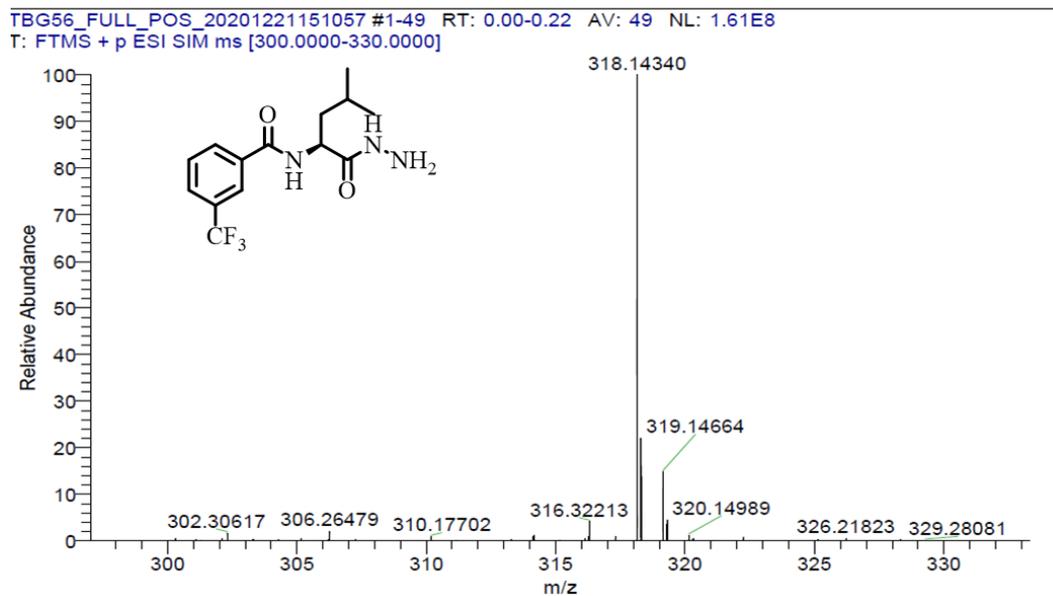


Figura 177. Espectro de Massas do composto **36e** (ESI modo positivo).

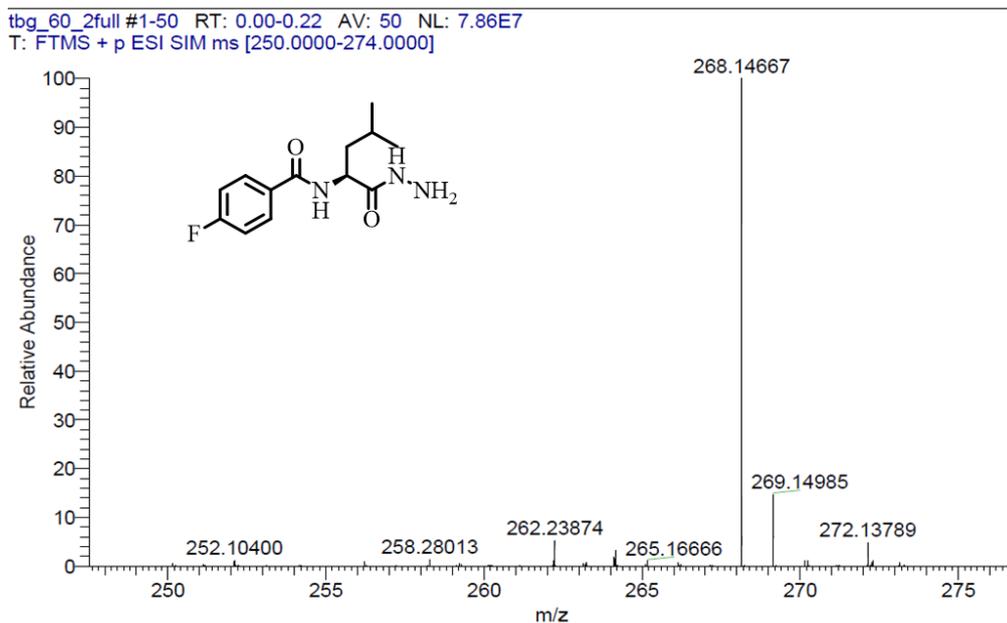


Figura 178. Espectro de Massas do composto **36f** (ESI modo positivo).

:bg62_full_neg_20201221171044 #1-50 RT: 0.00-0.22 AV: 50 NL: 3.25E8
T: FTMS - p ESI SIM ms [280.0000-288.0000]

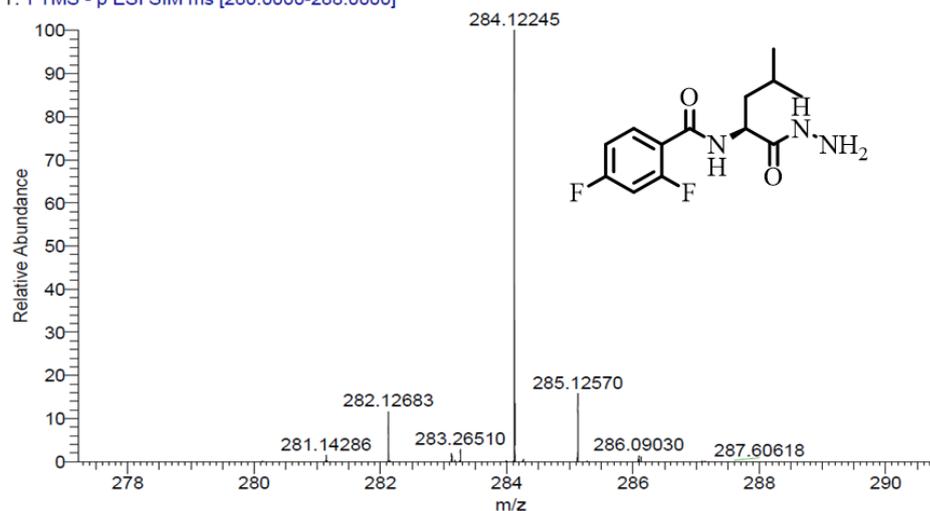
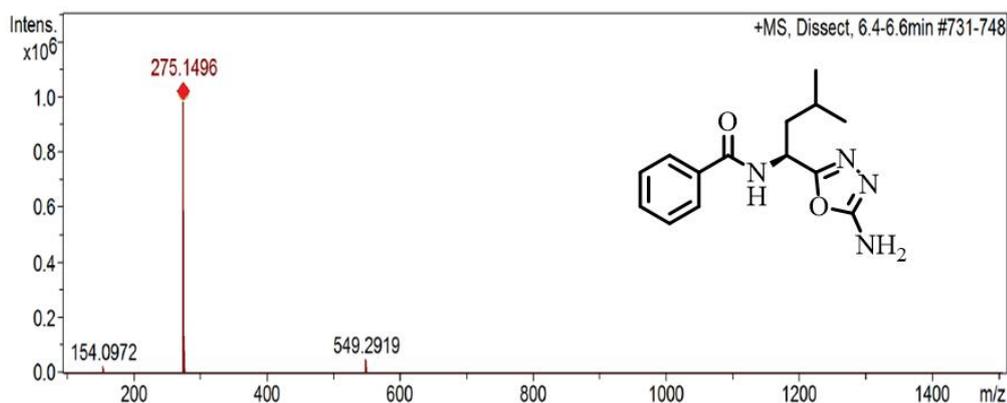


Figura 179. Espectro de Massas do composto **36g** (ESI modo positivo).



Meas. m/z	#	Ion Formula	Adduct	Sum Formula	Score	mSigma	m/z	err [mDa]	err [ppm]	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
275.1496	1	C ₁₃ H ₂₃ O ₆	M+H	C ₁₃ H ₂₂ O ₆	100.00	13.1	275.1489	-0.7	-2.4	2.5	even	ok
	2	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₂	M+H	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₂	88.53	19.4	275.1503	0.7	2.4	7.5	even	ok
	1	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₂	2M+H	C ₇ H ₉ N ₂ O	88.53	19.4	275.1503	0.7	2.4	7.5	even	ok

Figura 180. Espectro de Massas do composto **38a** (ESI modo positivo).

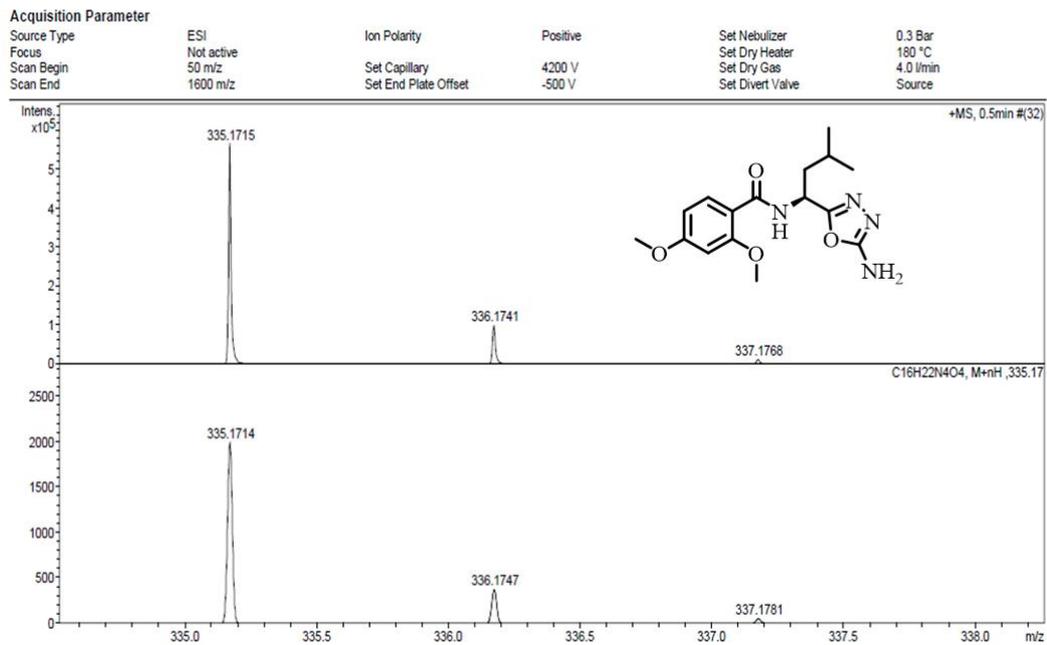


Figura 181. Espectro de Massas do composto **38b** (ESI modo positivo).

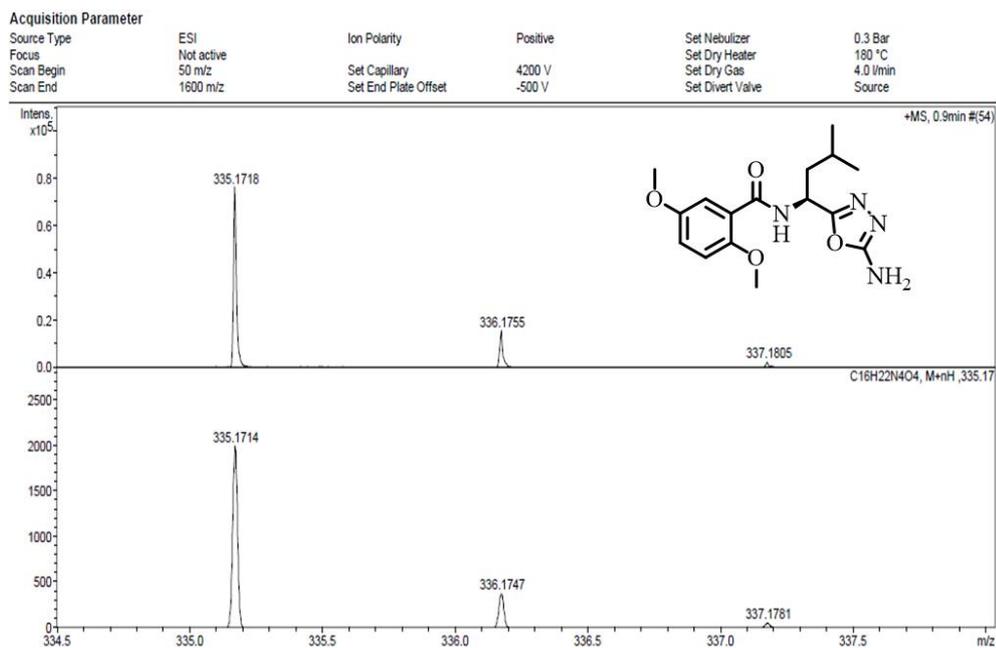


Figura 182. Espectro de Massas do composto **38c** (ESI modo positivo).

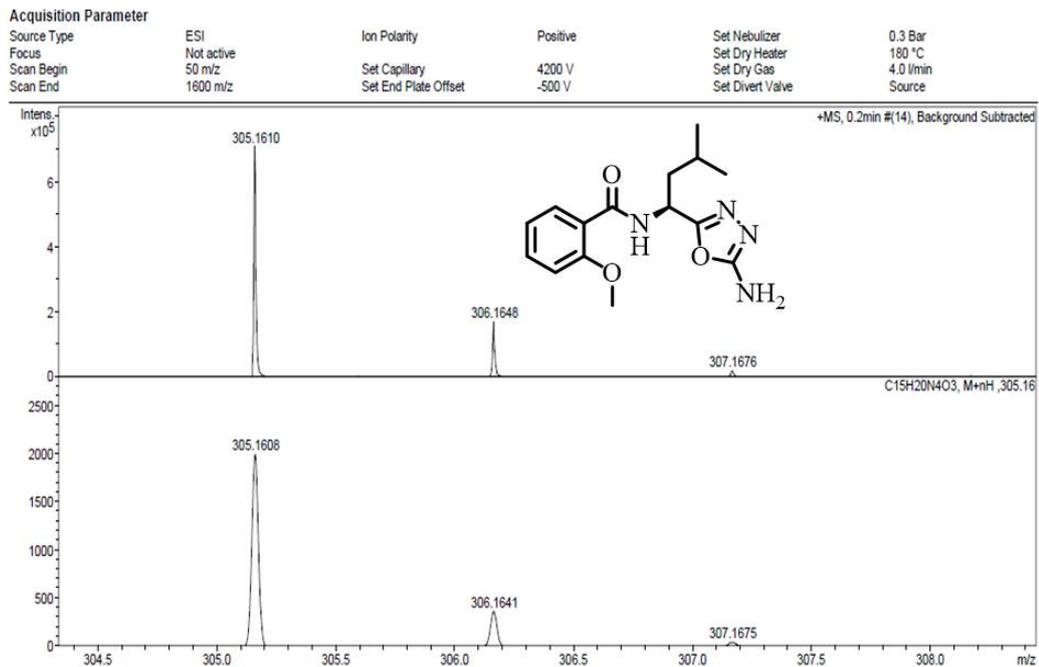


Figura 183. Espectro de Massas do composto **38d** (ESI modo positivo).

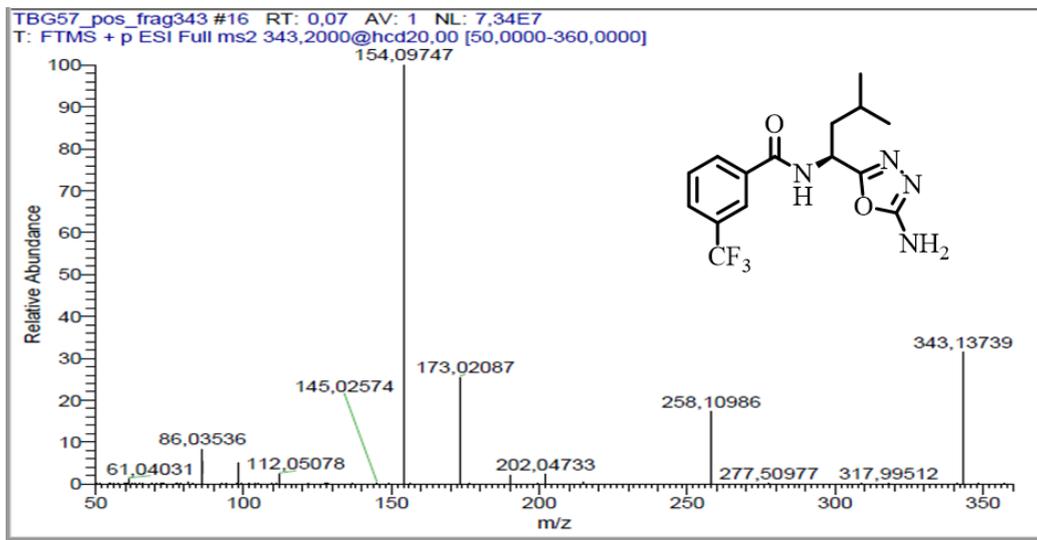


Figura 184. Espectro de Massas do composto **38e** (ESI modo positivo).

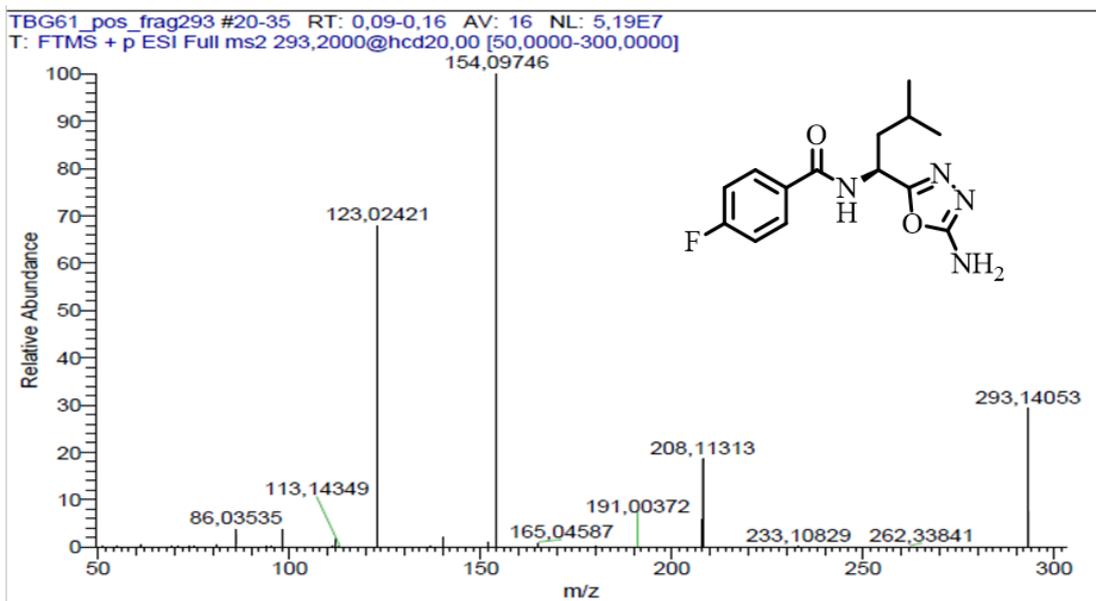


Figura 185. Espectro de Massas do composto **38f** (ESI modo positivo).

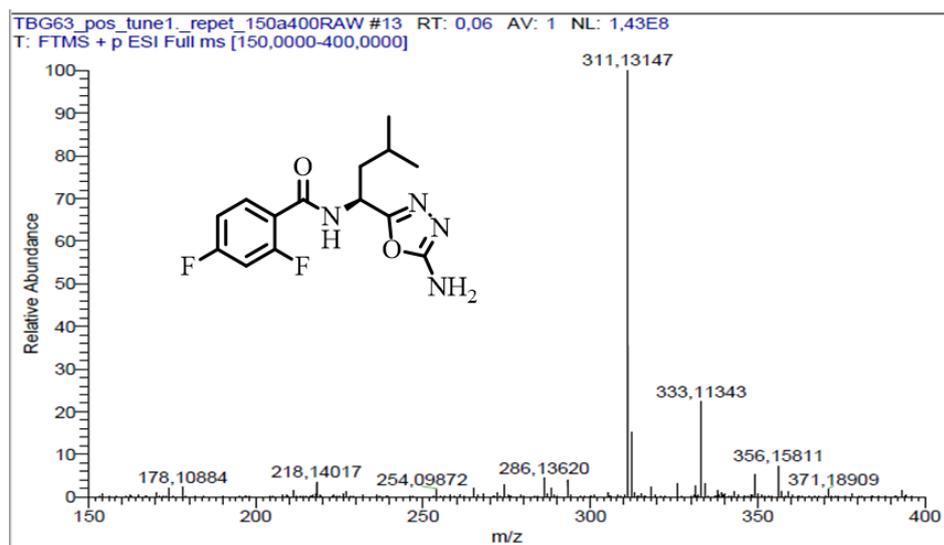


Figura 186. Espectro de Massas do composto **38g** (ESI modo positivo).

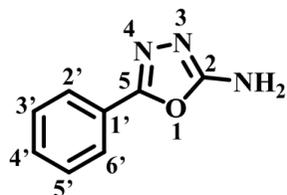
ANEXOS CAPÍTULO II

**ANEXO I: Quadros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis
47a-l**

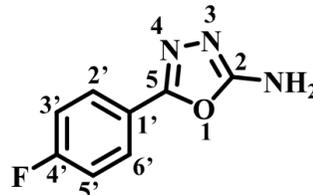
ANEXO II: Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos

ANEXO III: Espectros de Massas

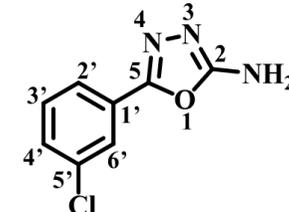
ANEXO I: Quadros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos 2-amino-1,3,4-oxadiazóis 47a-l



Composto 47a (DMSO-d₆, 400 MHz)

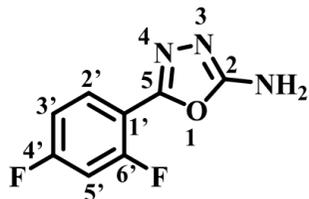


Composto 47b (DMSO-d₆, 400 MHz)

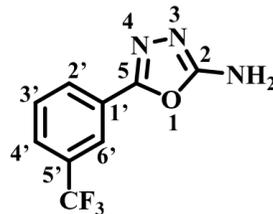


Composto (47c) (DMSO-d₆, 400 MHz)

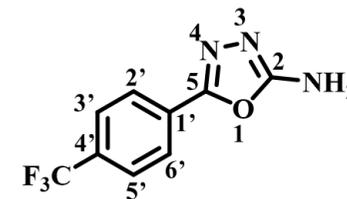
N°	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
NH ₂	7,25	s	-	-	-	7,25	s	-	-	-	7,35	s	-	-	-
2	-	-	-	163,9	C	-	-	-	163,9	C	-	-	-	164,1	C
5	-	-	-	157,4	C	-	-	-	156,7	C	-	-	-	156,2	C
1'	-	-	-	124,4	C	-	-	-	121,1	C	-	-	-	126,3	C
2'	7,79	dd	H2'/H3'=7,3 H2'/H4'=1,9	129,3	CH	7,83	dd	H2'/H3'=8,9 H2'/F=5,4	127,5	CH	7,80-7,71	m	-	131,3	CH
3'	7,56-7,48	m	-	125,1	CH	7,35	t	H3'/H2'=8,9 H3'/F=8,9	116,4	CH	7,60-7,53	m	-	123,6	CH
4'	7,56-7,48	m	-	130,4	CH	-	-	-	163,1	C	7,60-7,53	m	-	124,5	CH
5'	7,56-7,48	m	-	125,1	CH	7,35	t	H5'/H6'=8,9 H5'/F=8,9	116,4	CH	-	-	-	133,9	C
6'	7,79	dd	H6'/H5'=7,3 H6'/H4'=1,9	129,3	CH	7,83	dd	H6'/H5'=8,9 H6'/F=5,4	127,5	CH	7,80-7,71	m	-	130,1	CH



Composto 47d (DMSO-d₆ / 400 MHz)

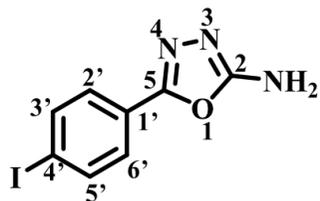


Composto 47e (DMSO-d₆ / 400 MHz)

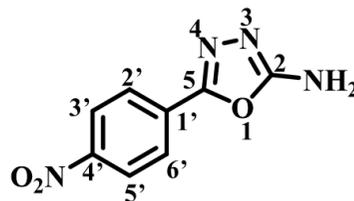


Composto (47f) (DMSO-d₆ / 400 MHz)

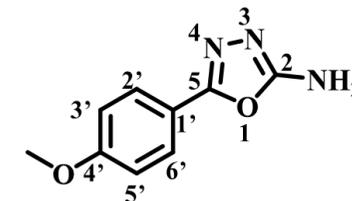
N°	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
NH ₂	7,33	s	-	-	-	7,39	s	-	-	-	7,43	s	-	-	-
2	-	-	-	164,1	C	-	-	-	164,2	C	-	-	-	164,3	C
5	-	-	-	153,1	C	-	-	-	156,2	C	-	-	-	156,3	C
1'	-	-	-	109,6	C	-	-	-	125,4	C	-	-	-	128,0	C
2'	7,94- 7,83	m	-	130,0	CH	8,07	d	H2'/H3'=7,8	130,7	CH	7,99	d	H2'/H3'=8,2	125,7	CH
3'	7,53- 7,43	m	-	112,7	CH	7,77	t	H3'/H2'= 7,8 H3'/H4'=7,8	128,8	CH	7,88	d	H3'/H2'=8,2	126,3	CH
4'	-	-	-	159,0	C	7,86	d	H4'/H3'=7,8	121,2	CH	-	-	-	130,0	C
5'	7,30- 7,22	m	-	105,5	CH	-	-	-	129,9	C	7,88	d	H3'/H2'=8,2	126,3	CH
6'	-	-	-	163,3	C	8,00	s	-	126,8	CH	7,99	d	H2'/H3'=8,2	125,7	CH
CF ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	123,9	C



Composto 47g (DMSO-d₆, 400 MHz)

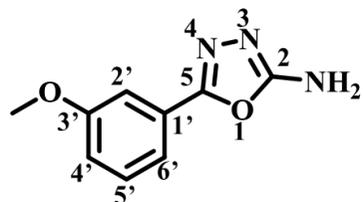


Composto 47h (DMSO-d₆, 400 MHz)

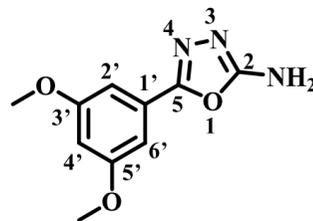


Composto (47i) (DMSO-d₆, 400 MHz)

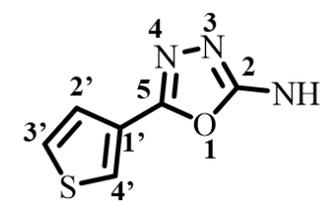
N°	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
NH ₂	7,32	s	-	-	-	7,53	m	-	-	-	7,13	s	-	-	-
2	-	-	-	164,0	C	-	-	-	164,6	C	-	-	-	163,6	C
5	-	-	-	156,9	C	-	-	-	156,1	C	-	-	-	157,4	C
1'	-	-	-	123,8	C	-	-	-	129,2	C	-	-	-	117,0	C
2'	7,90	d	H2'H3'=8,3	126,8	CH	8,02	d	H2'H3'=8,9	124,6	CH	7,72	d	H2'H3'=8,9	126,9	CH
3'	7,56	d	H3'/H2'=8,3	138,1	CH	8,36	d	H3'/H2'=8,9	126,0	CH	7,07	d	H3'/H2'=8,9	114,7	CH
4'	-	-	-	97,2	C	-	-	-	147,9	C	-	-	-	160,9	C
5'	7,56	d	H3'/H2'=8,3	138,1	CH	8,36	d	H3'/H2'=8,9	126,0	CH	7,07	d	H3'/H2'=8,9	114,7	CH
6'	7,90	d	H2'H3'=8,3	126,8	CH	8,02	d	H2'H3'=8,9	124,6	CH	7,72	d	H2'H3'=8,9	126,9	CH
OCH ₃											3,81	s	-	55,4	CH ₃



Composto 47j (DMSO-d₆, 400 MHz)



Composto 47k (DMSO-d₆, 400 MHz)



Composto (47l) (DMSO-d₆, 400 MHz)

N°	Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos		Hidrogênios			Carbonos	
	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo	δ	M	$J(\text{Hz})$	δ	Tipo
NH ₂	7,28-7,24	m	-	-	-	7,26	s	-	-	-	7,19	s	-	-	-
2	-	-	-	163,9	C	-	-	-	163,9	C	-	-	-	163,3	C
5	-	-	-	157,2	C	-	-	-	157,2	C	-	-	-	154,7	C
1'	-	-	-	159,6	C	-	-	-	126,0	C	-	-	-	125,5	C
2'	7,28-7,24	m	-	117,4	CH	6,90	d	H2'/H4'=2,2	102,8	CH	7,74	dd	H2'/H3'=5,0 H2'/H4'=2,9	128,5	CH
3'	-	-	-	159,6	C	-	-	-	160,9	C	7,47	dd	H3'/H2'=5,0 H3'/H4'=1,1	125,0	CH
4'	7,08	ddd	H4'/H5'=8,2 H4'/H6'=1,0 H4'/H2'=2,6	109,9	CH	6,63	t	H4'/H2'=2,2 H4'/H6'=2,2	102,4	CH	7,98	dd	H4'/H2'=2,9 H4'/H3'=1,1	125,2	CH
5'	7,44	t	H5'/H4'=8,2 H5'/H6'=8,2	130,6	CH	-	-	-	160,9	C					
6'	7,40-7,34	m	-	116,4	CH	6,90	d	H6'/H4'=2,2	102,8	CH					
OCH ₃	3,81	s	-	55,3	CH ₃	3,80	s	-	55,4	CH ₃					

ANEXO II: Espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos



Figura 187. Espectro de RMN de ¹H do composto **30** (CDCl₃, 400 MHz).

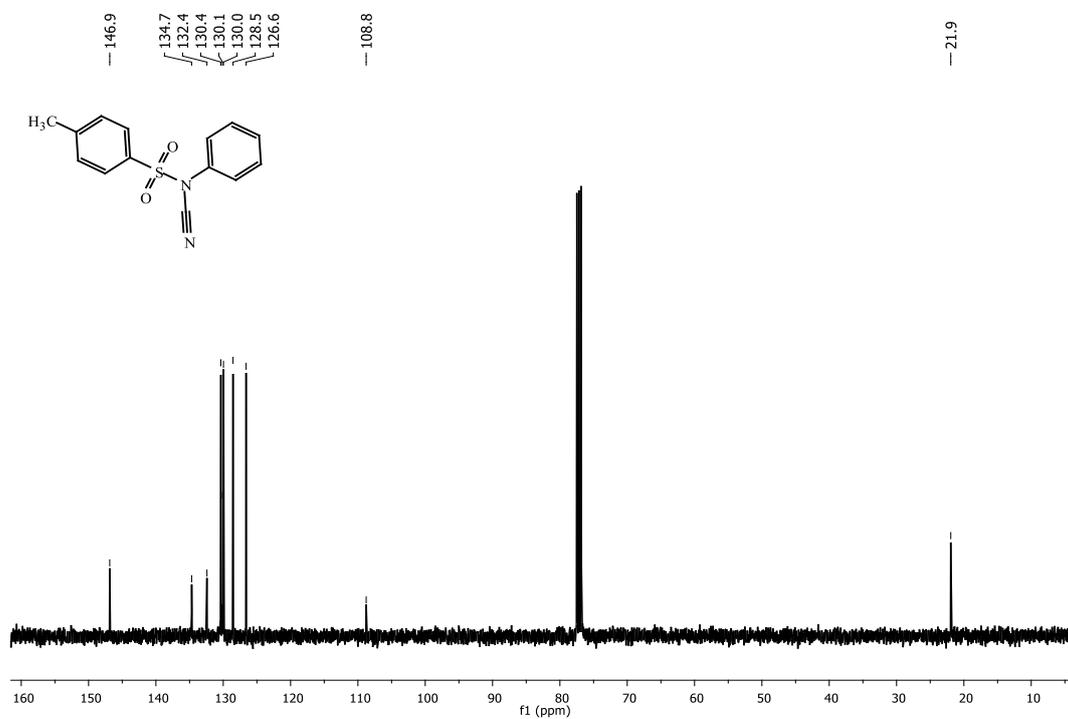


Figura 188. Espectro de RMN de ¹³C do composto **30** (CDCl₃, 100 MHz).

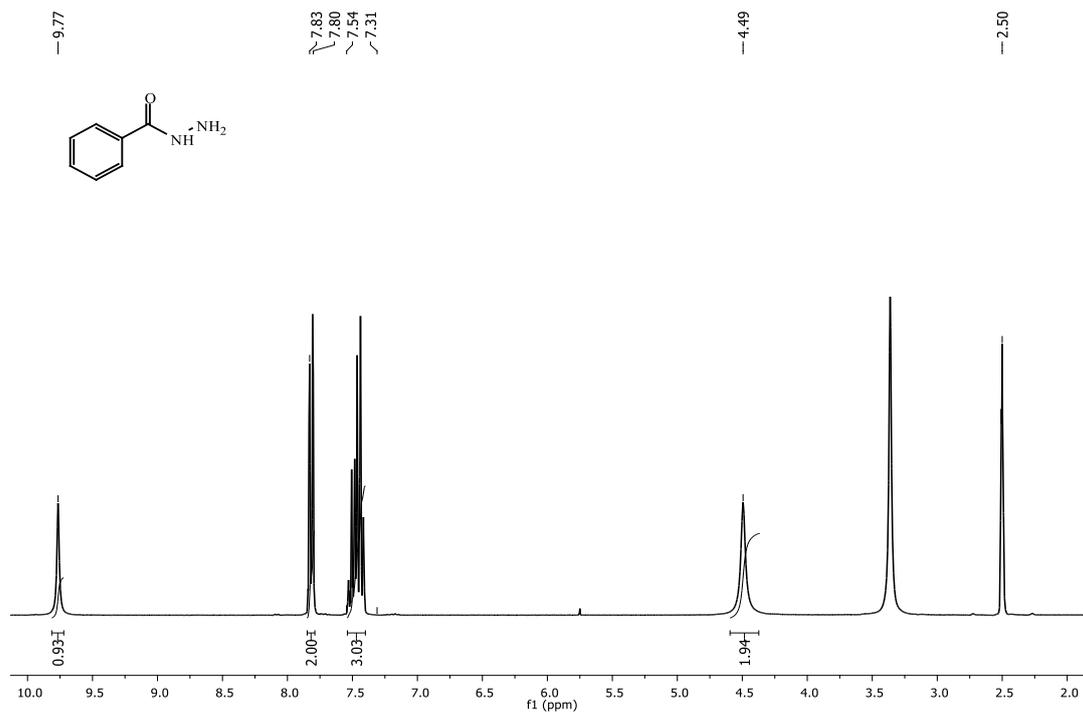


Figura 189. Espectro de RMN de ^1H do composto **46a** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

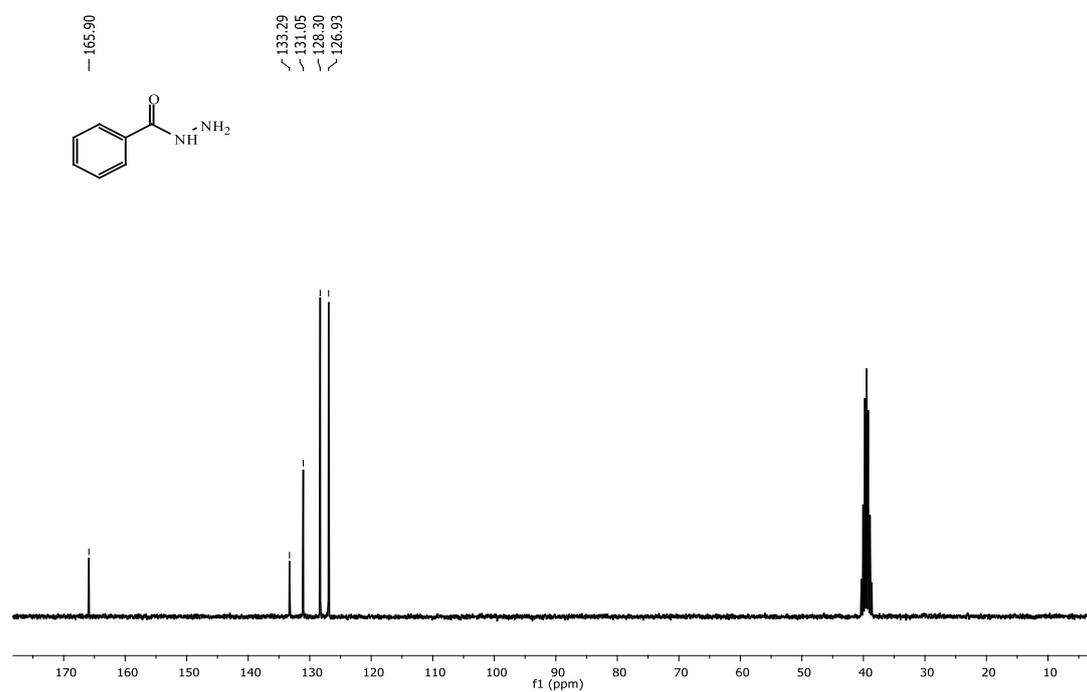


Figura 190. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46a** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

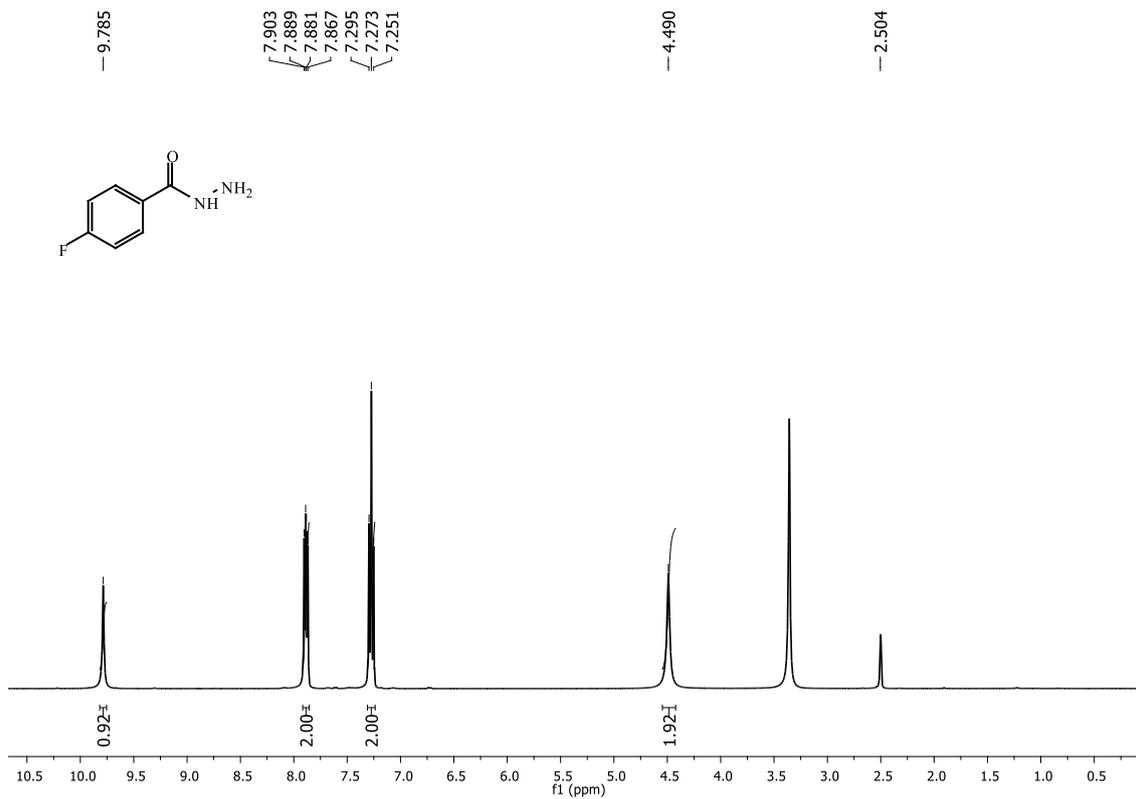


Figura 191. Espectro de RMN de ^1H do composto **46b** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

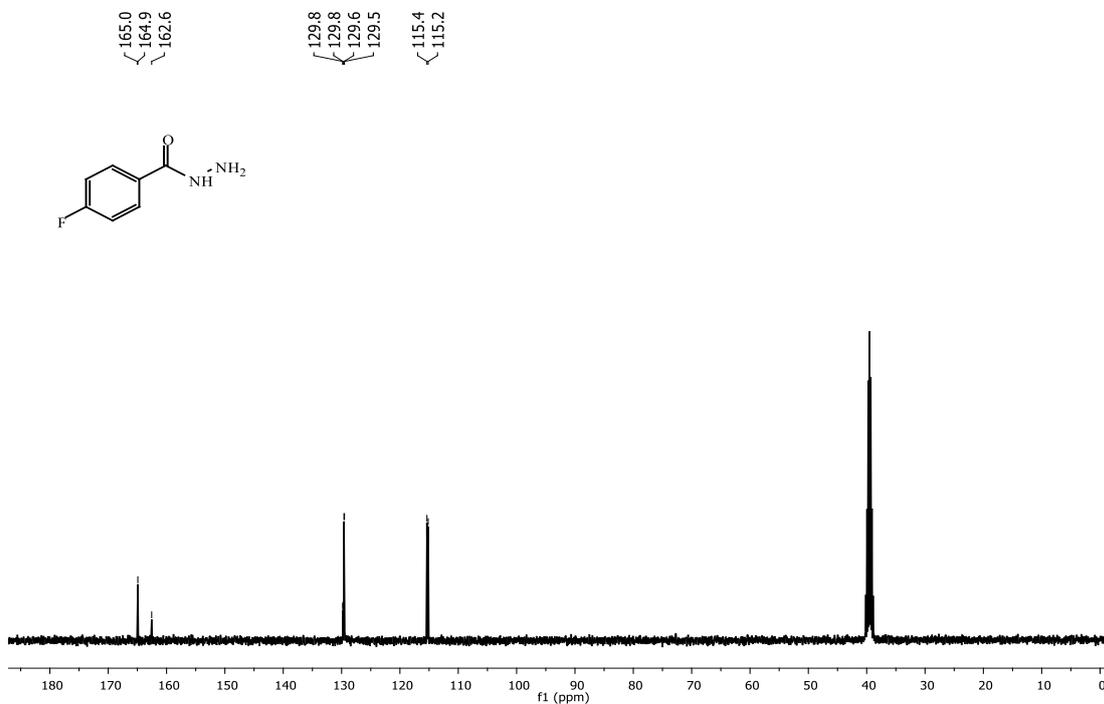


Figura 192. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46b** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

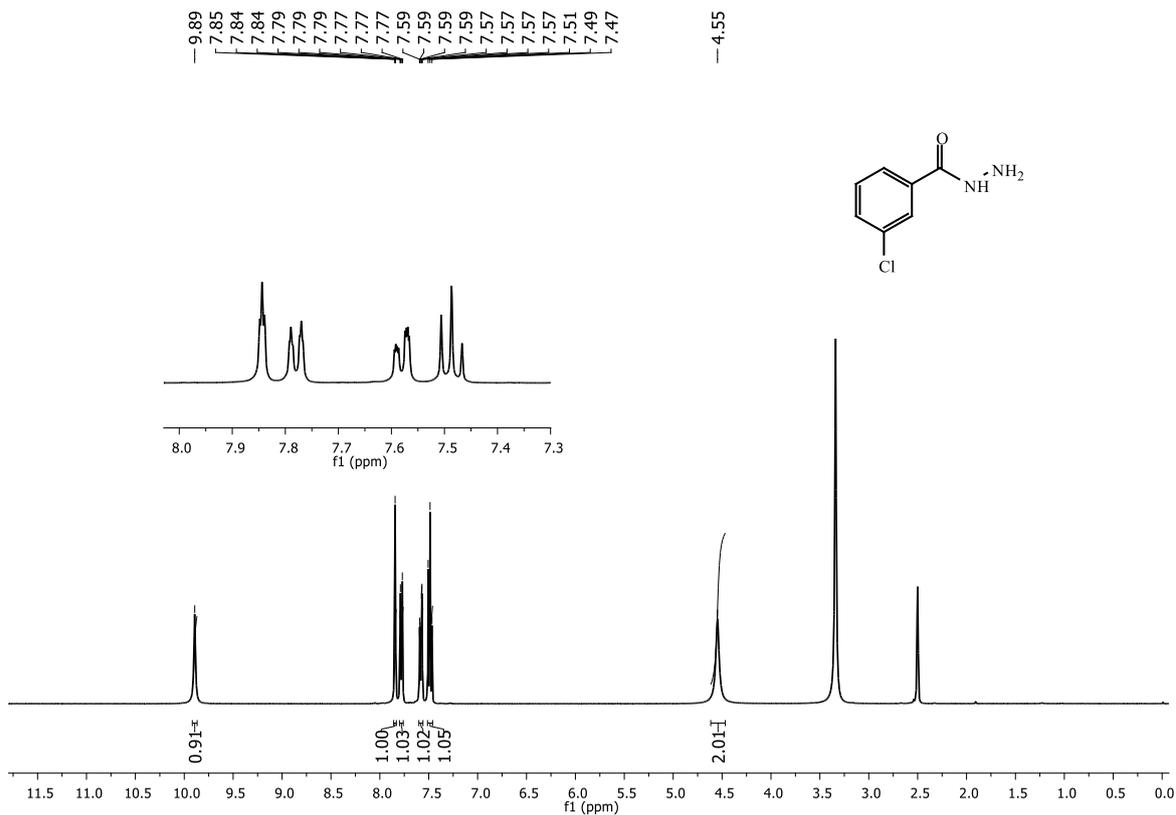


Figura 193. Espectro de RMN de ^1H do composto **46c** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

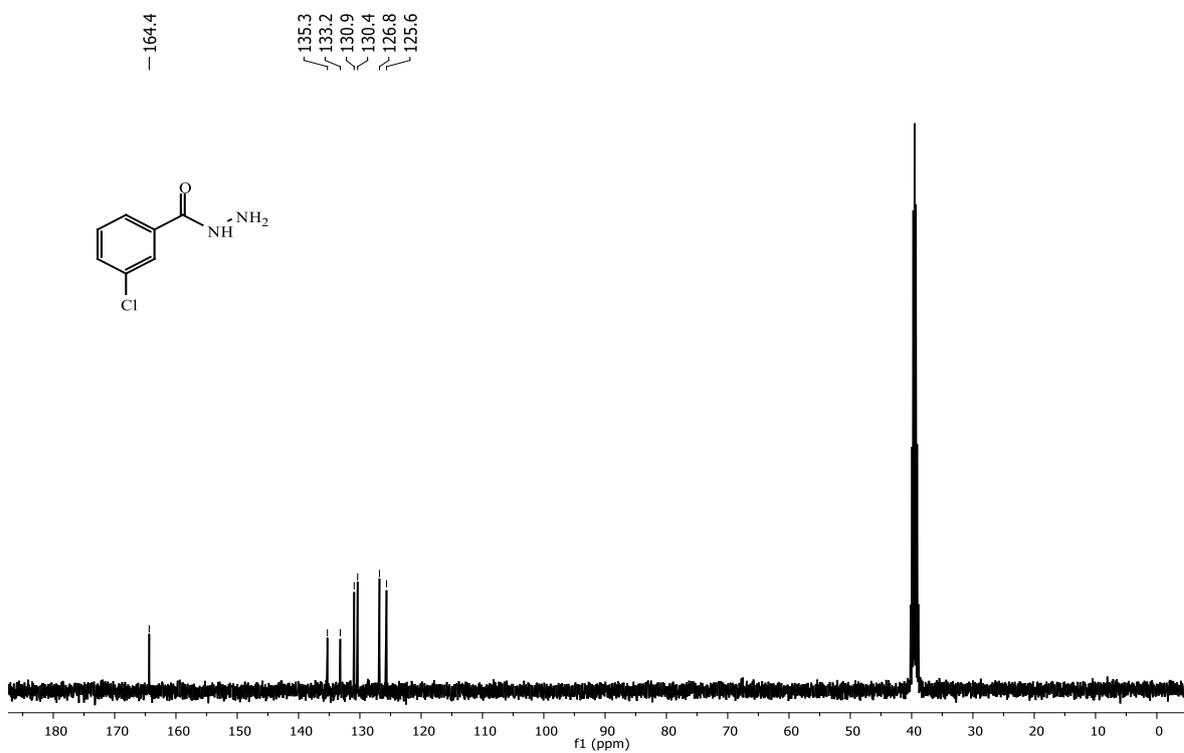


Figura 194. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46c** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

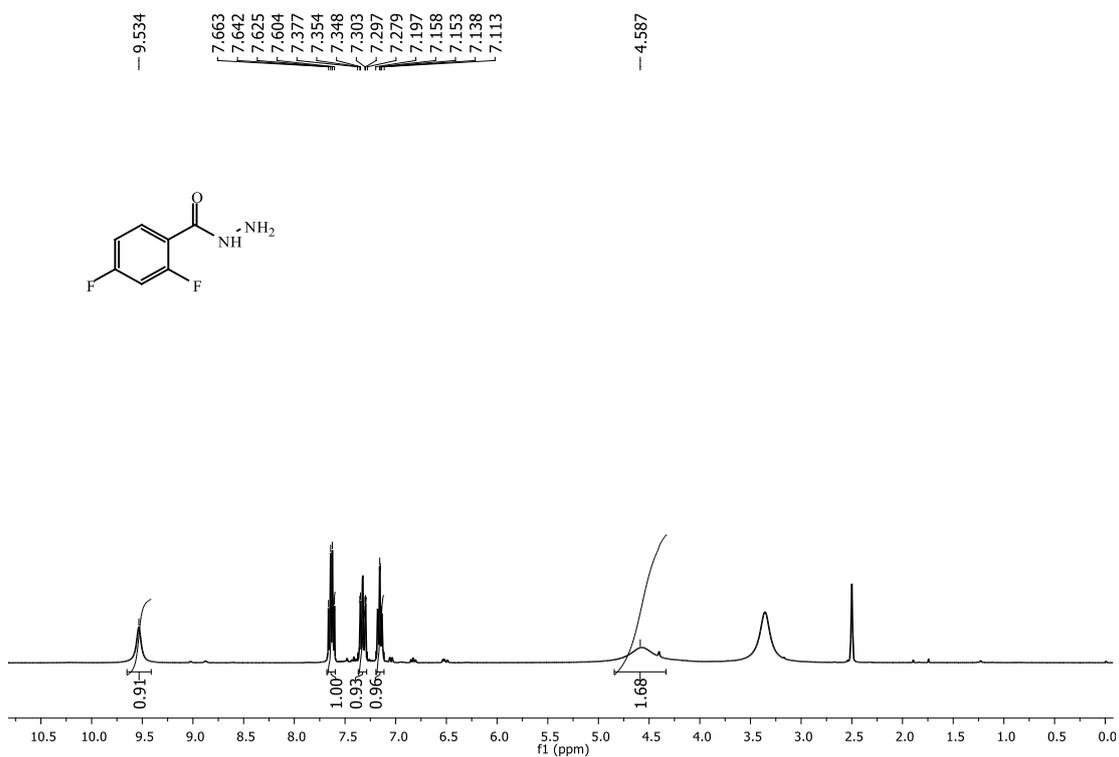


Figura 195. Espectro de RMN de ^1H do composto **46d** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

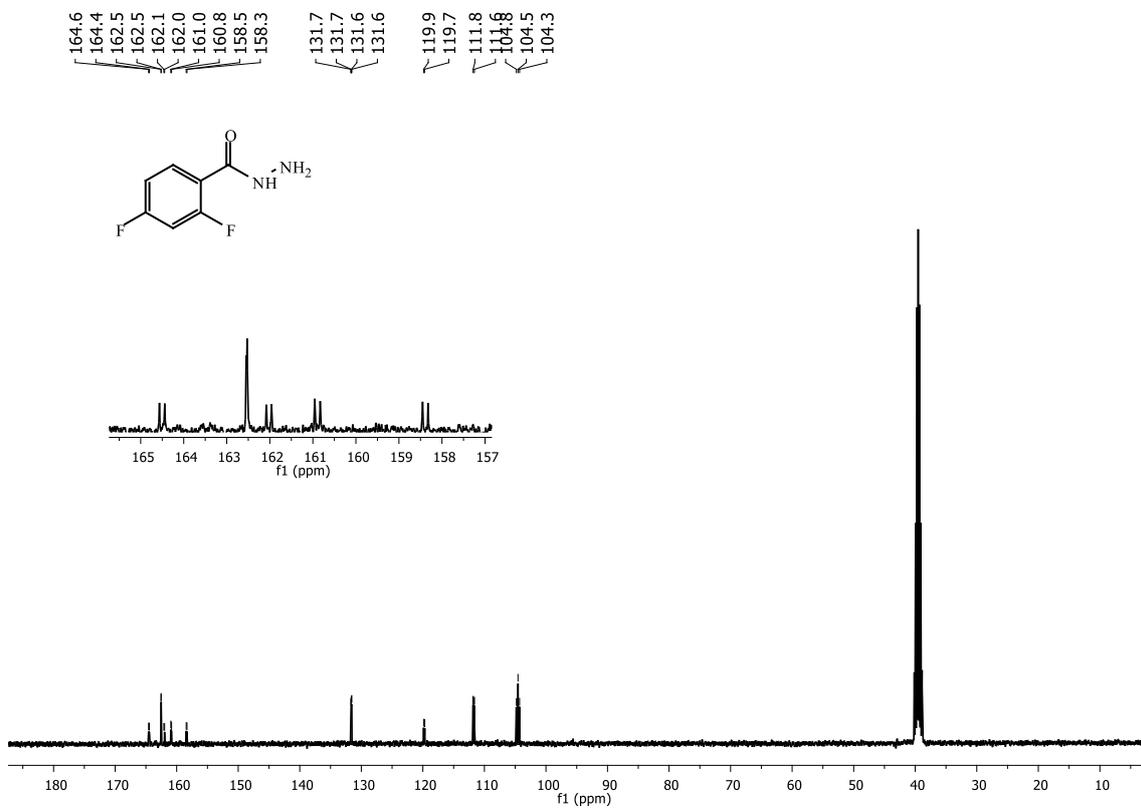


Figura 196. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46d** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

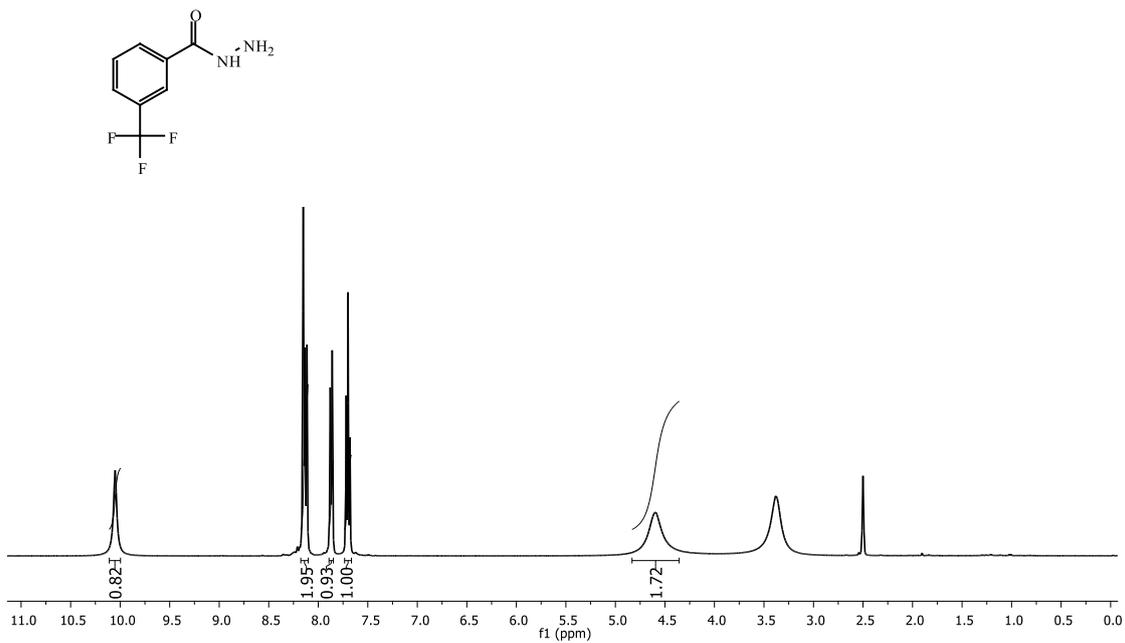


Figura 197. Espectro de RMN de ^1H do composto **46e** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

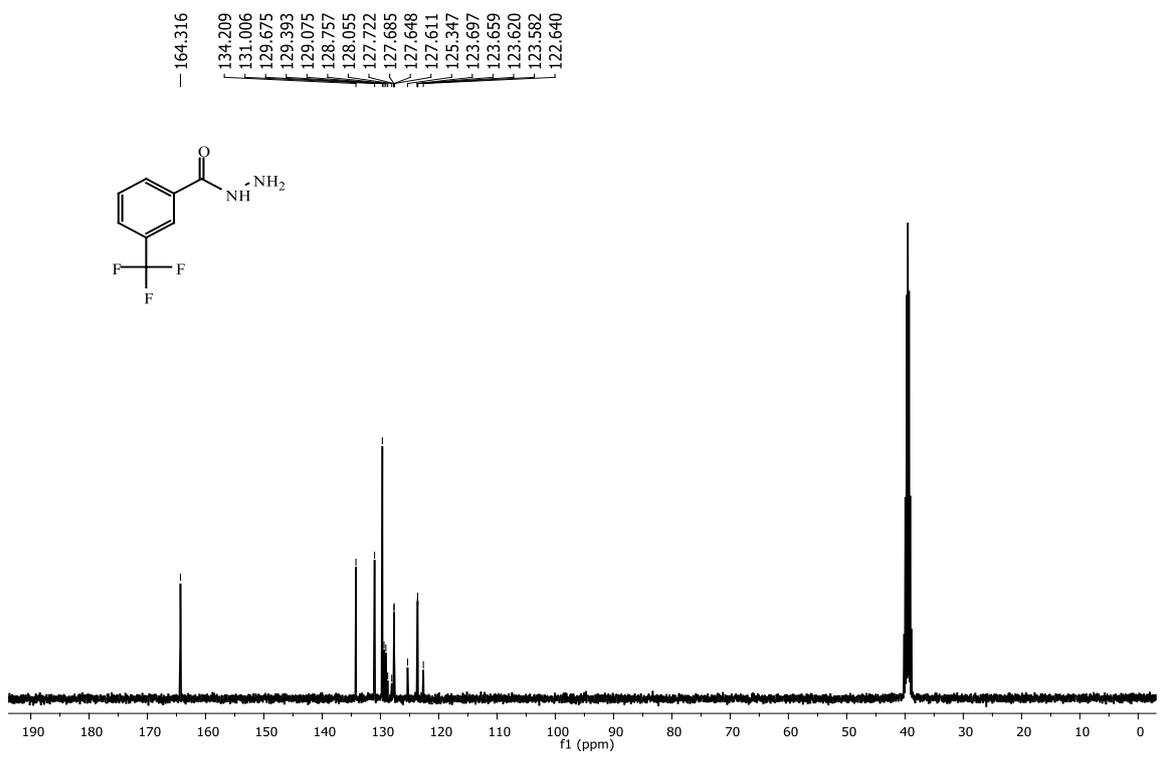


Figura 198. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46e** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

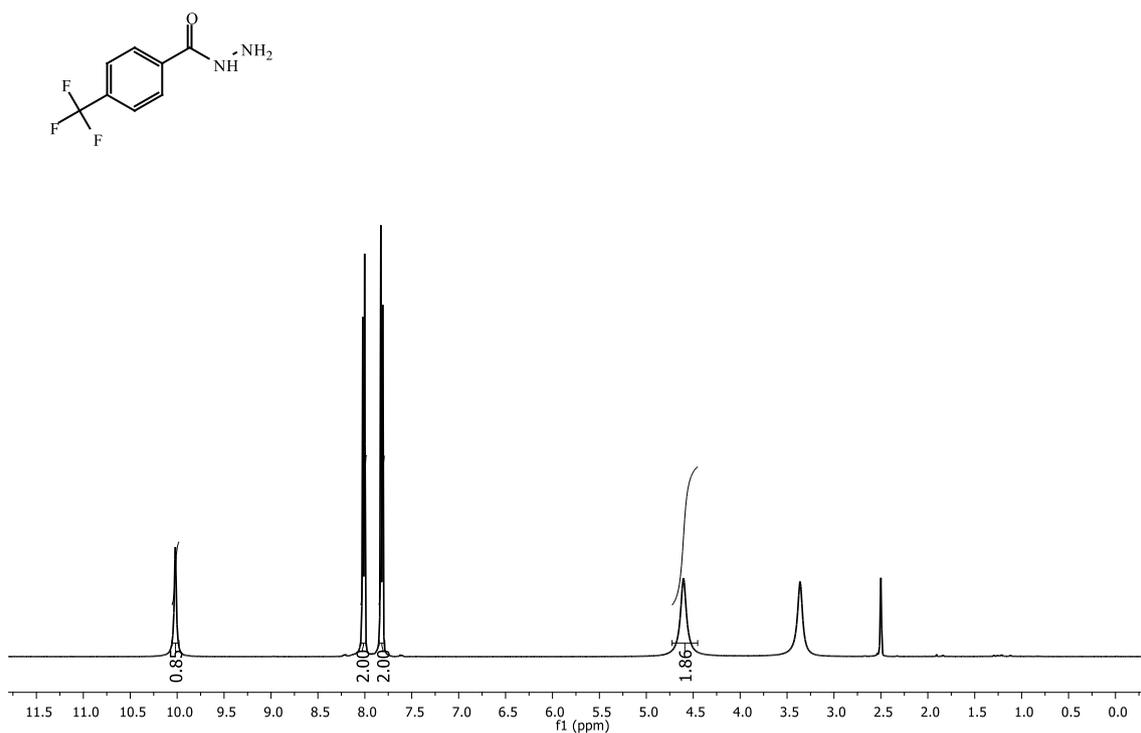


Figura 199. Espectro de RMN de ¹H do composto **46f** (DMSO-d₆, 400 MHz).

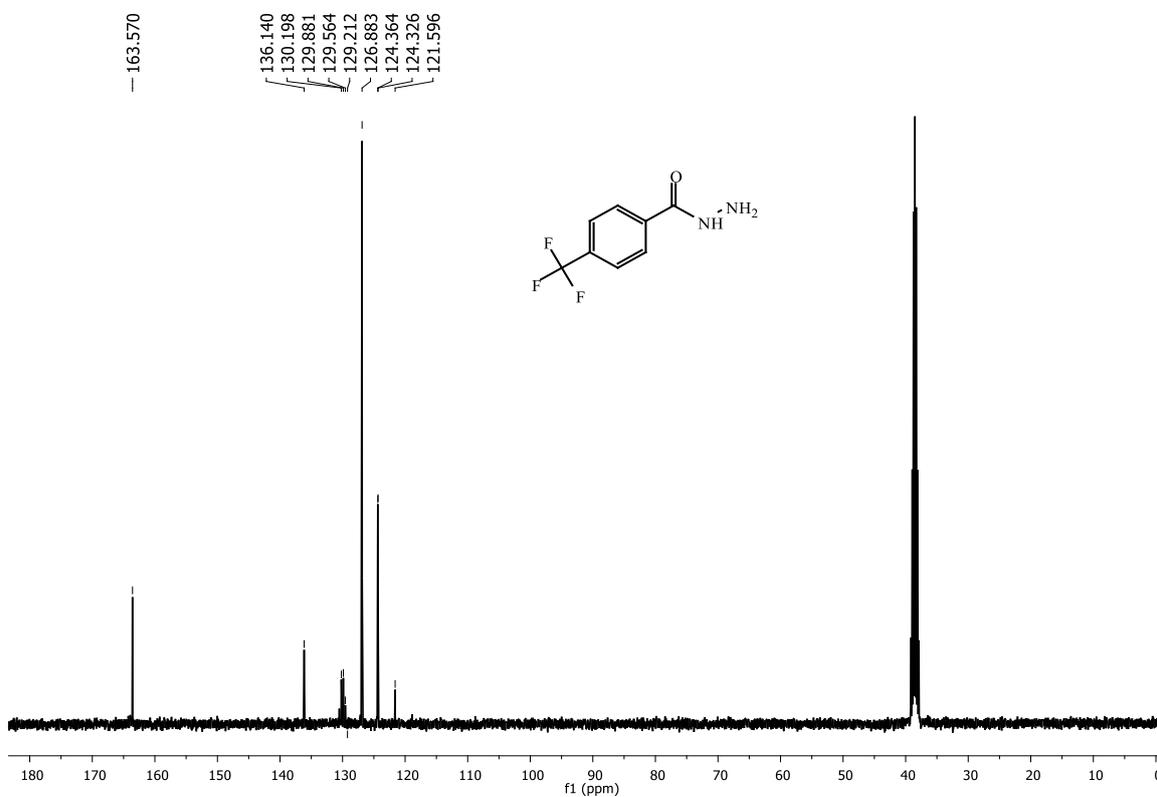


Figura 200. Espectro de RMN de ¹³C do composto **46f** (DMSO-d₆, 100 MHz).

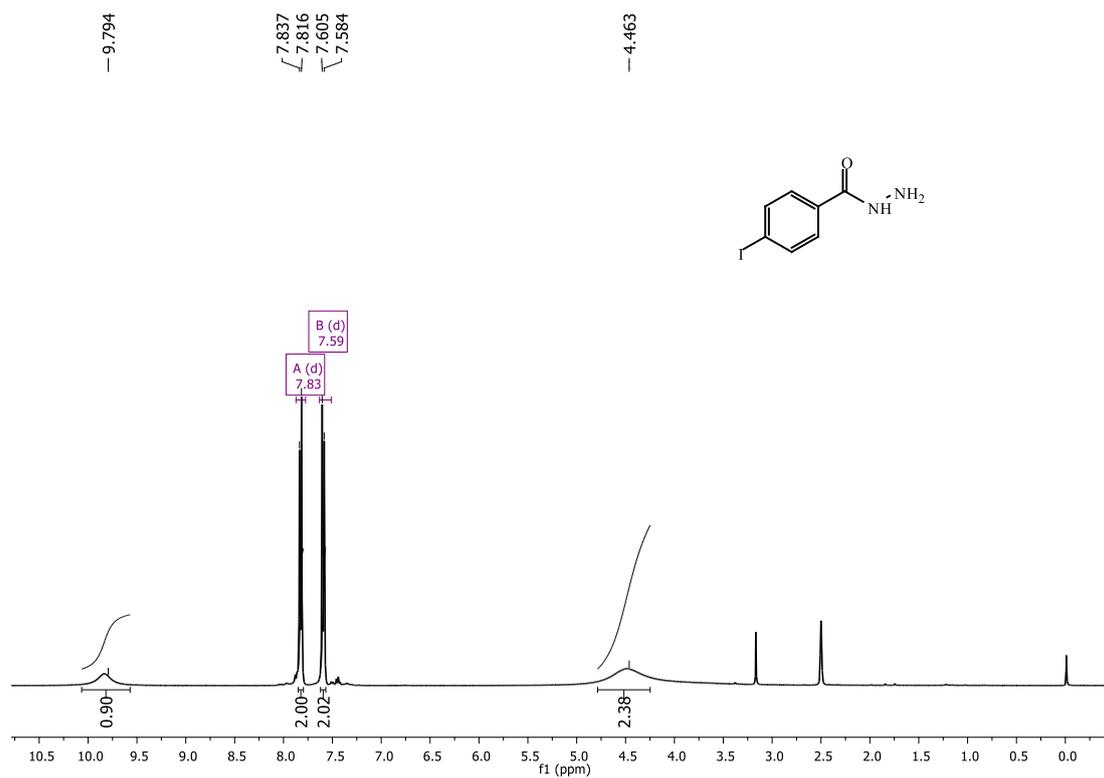


Figura 201. Espectro de RMN de ^1H do composto **46g** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

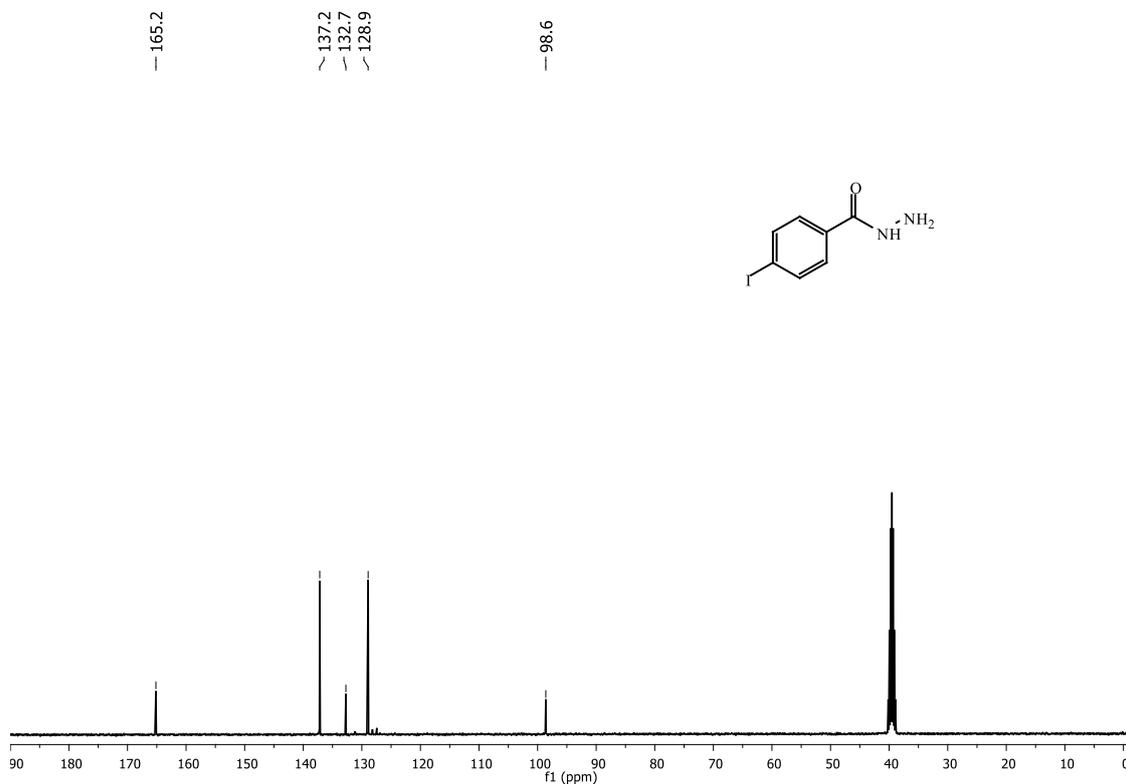
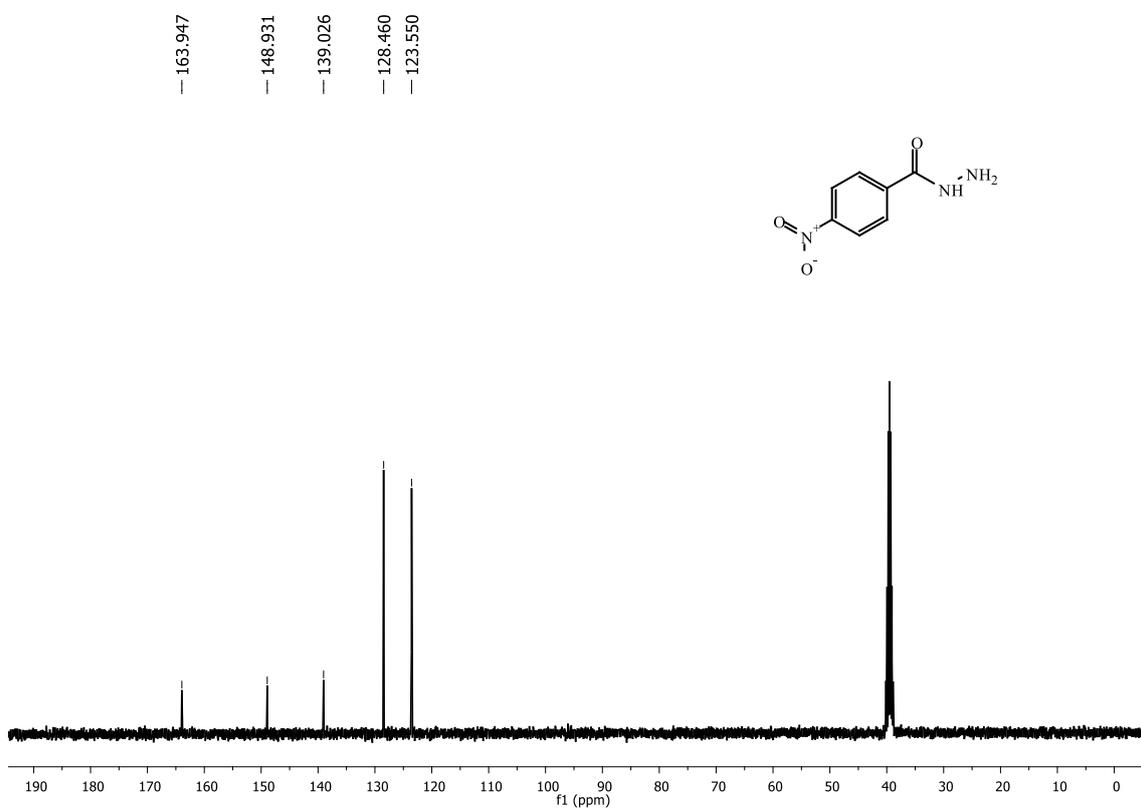
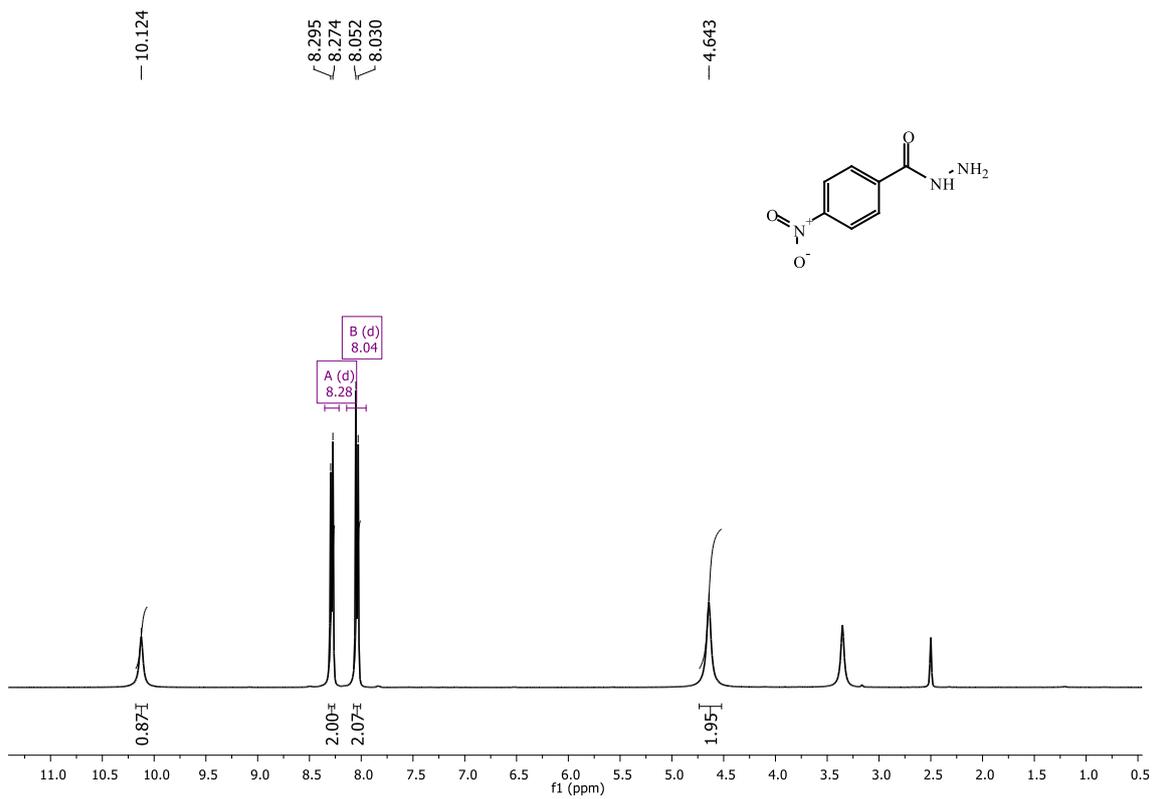


Figura 202. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46g** (DMSO- d_6 , 100 MHz).



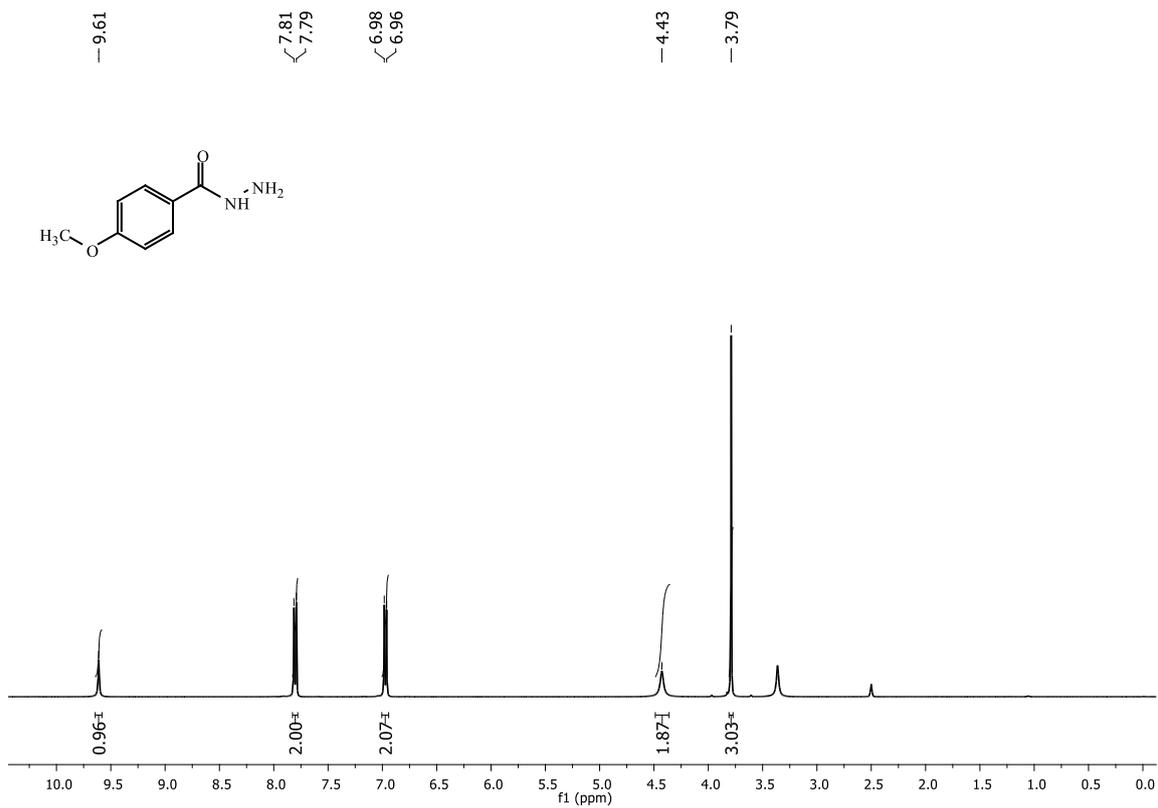


Figura 205. Espectro de RMN de ^1H do composto **46i** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

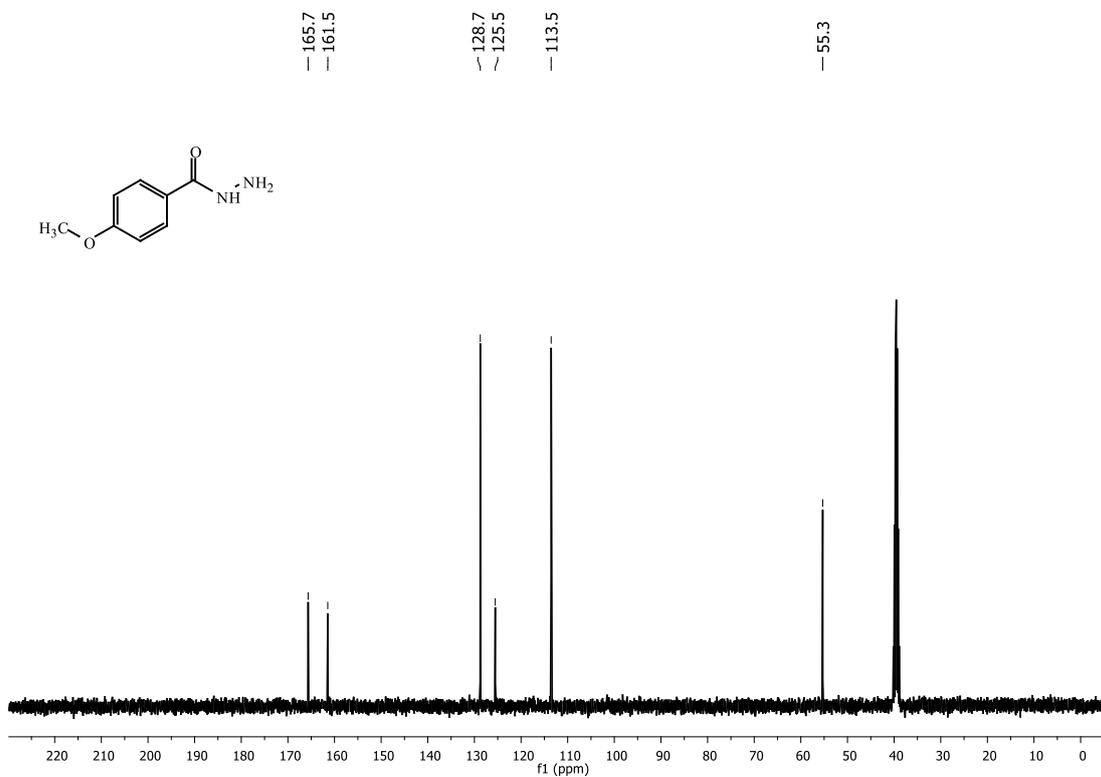


Figura 206. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46i** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

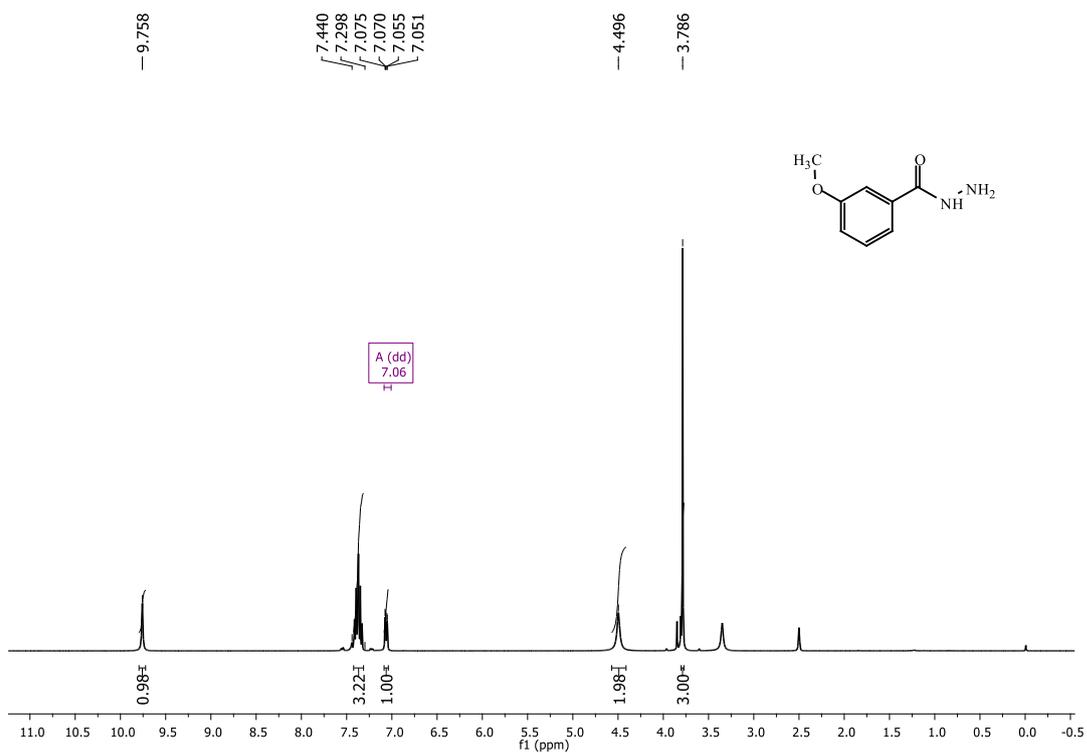


Figura 207. Espectro de RMN de ^1H do composto **46j** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

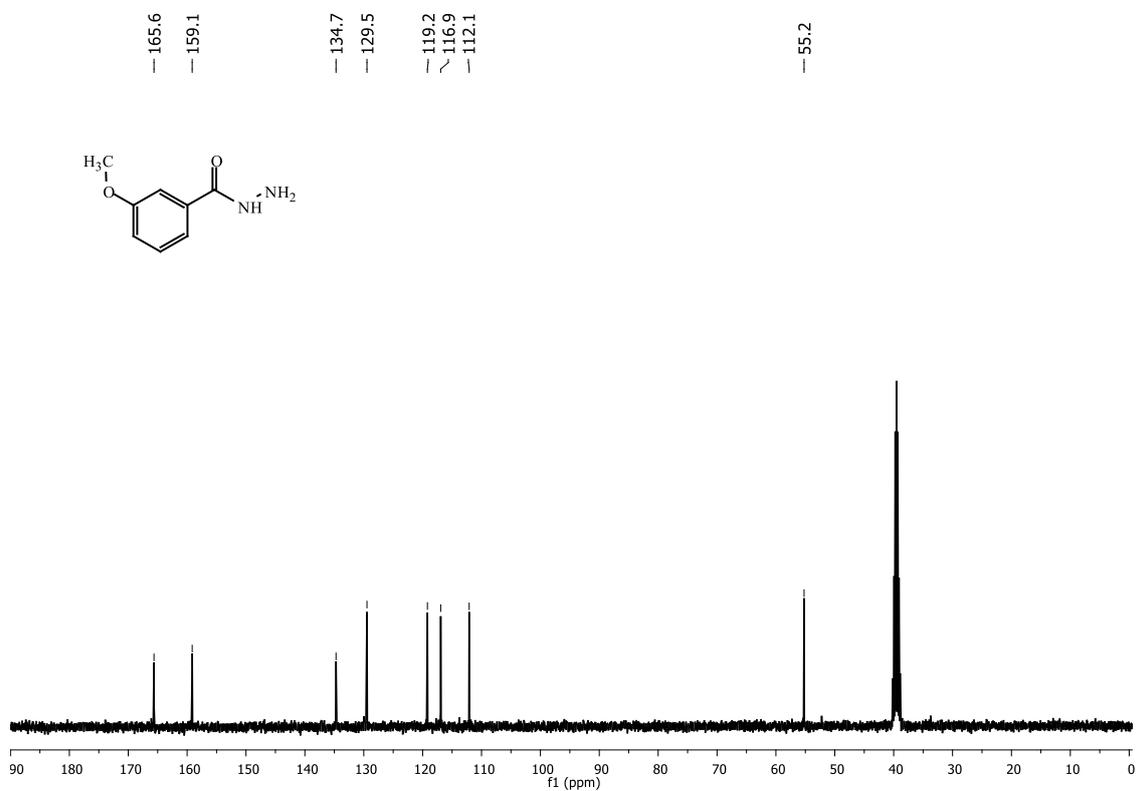


Figura 208. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46j** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

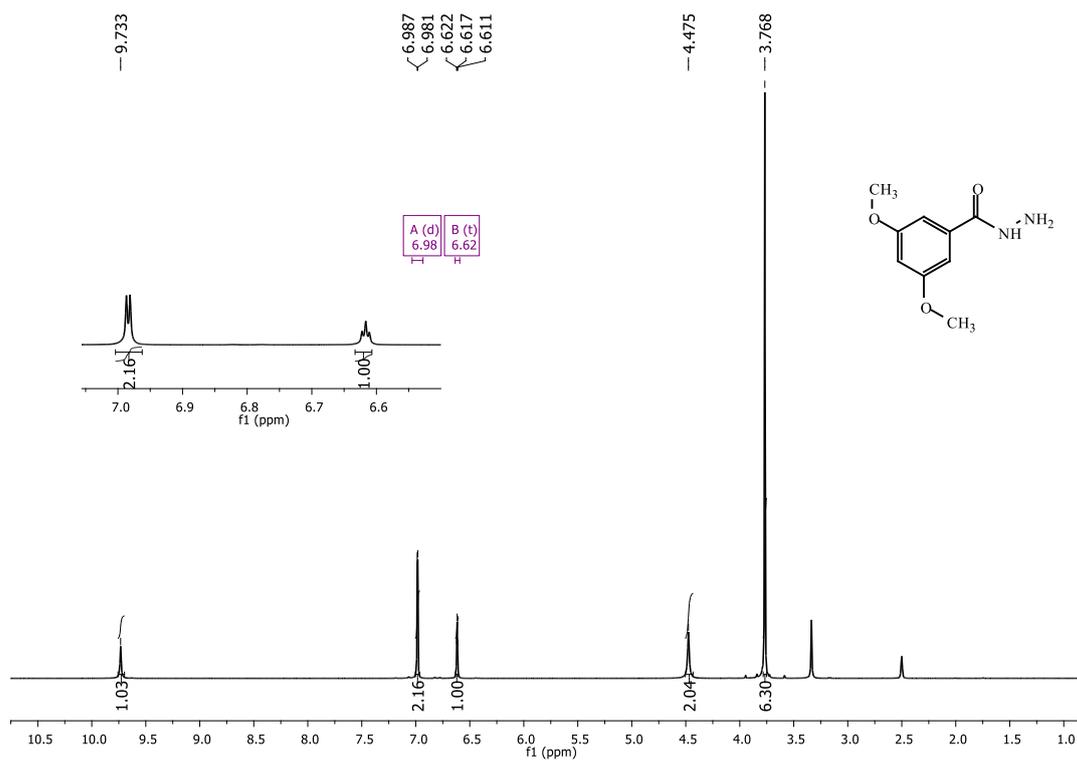


Figura 209. Espectro de RMN de ^1H do composto **46k** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

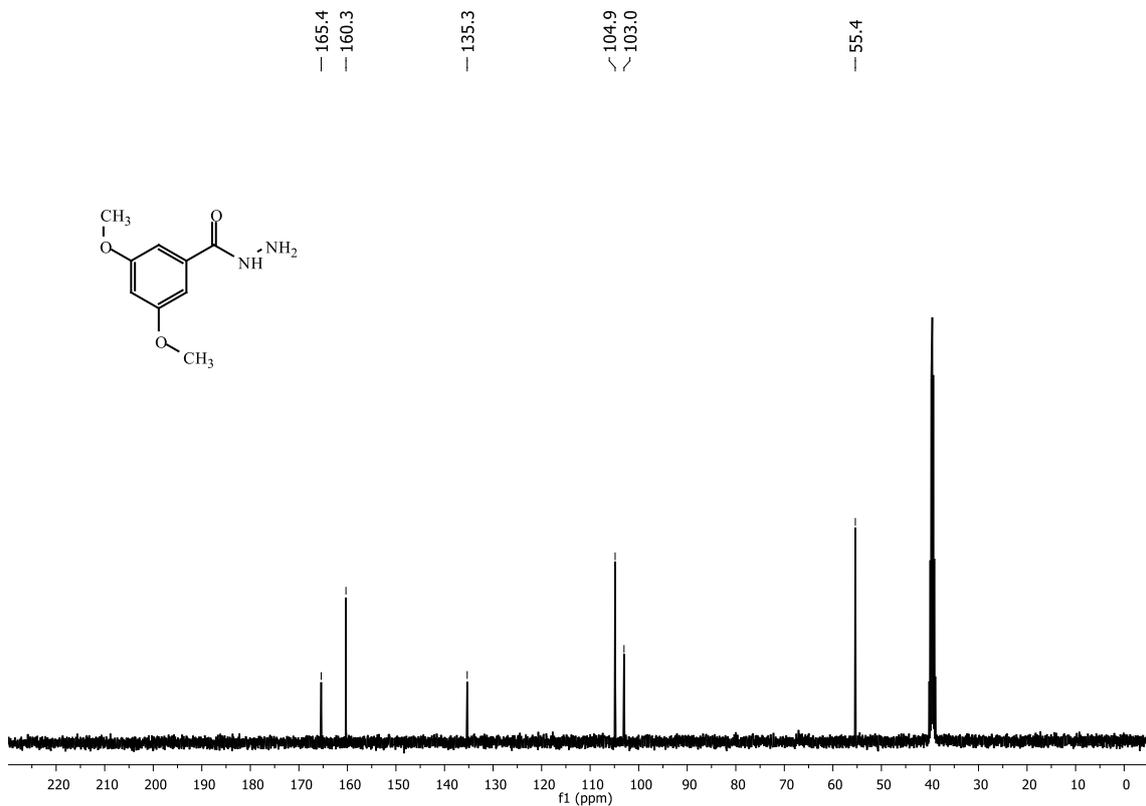


Figura 210. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46k** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

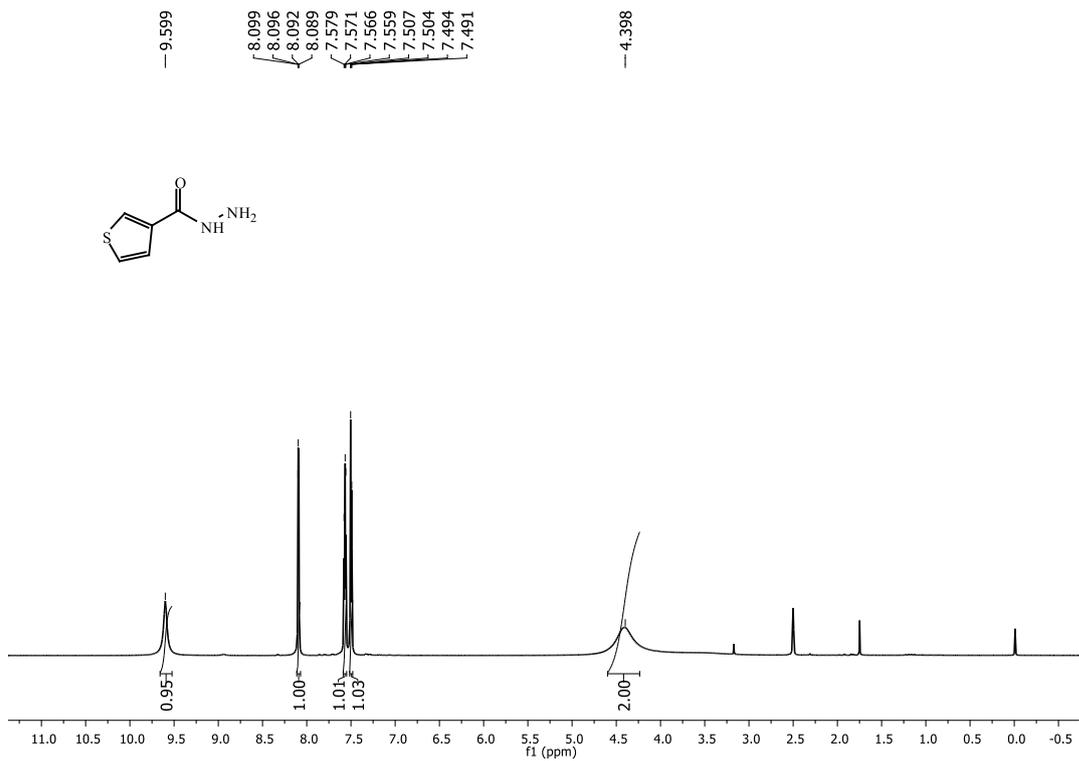


Figura 211. Espectro de RMN de ¹H do composto **461** (DMSO-d₆, 400 MHz).

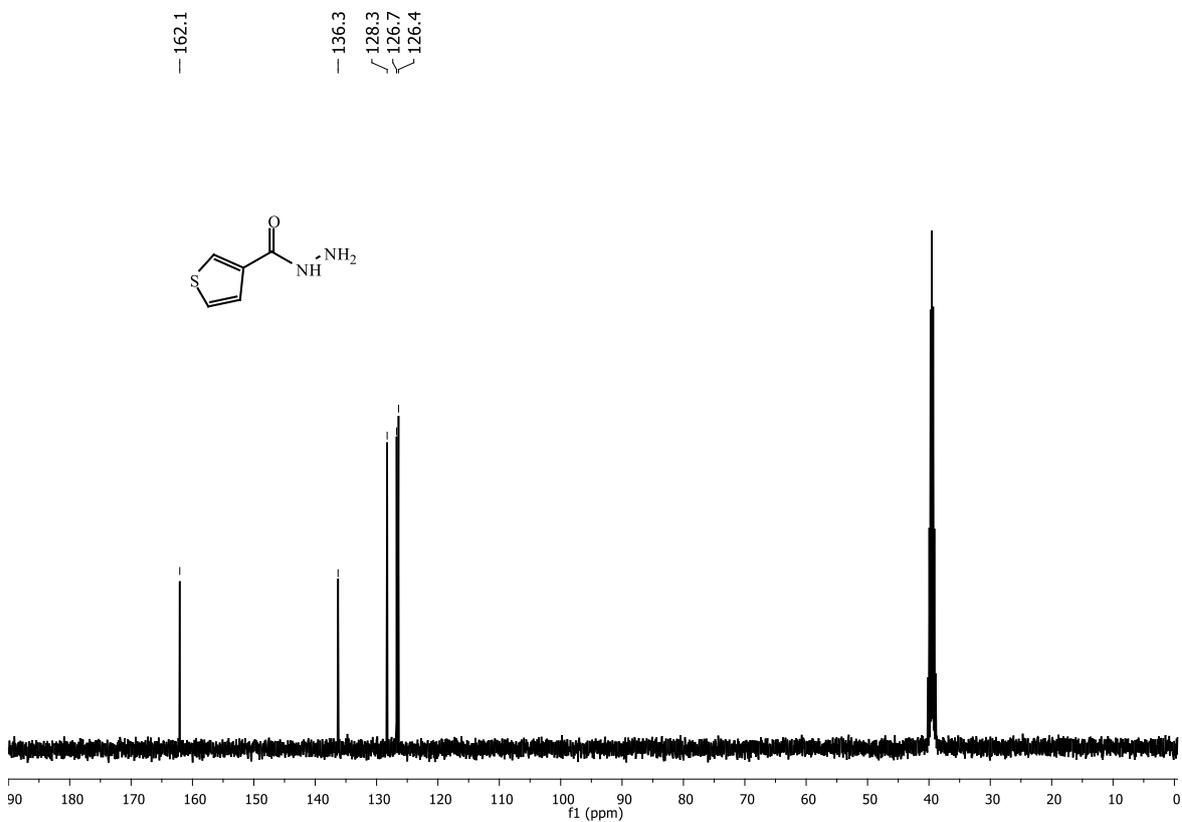


Figura 212. Espectro de RMN de ¹³C do composto **461** (DMSO-d₆, 100 MHz).

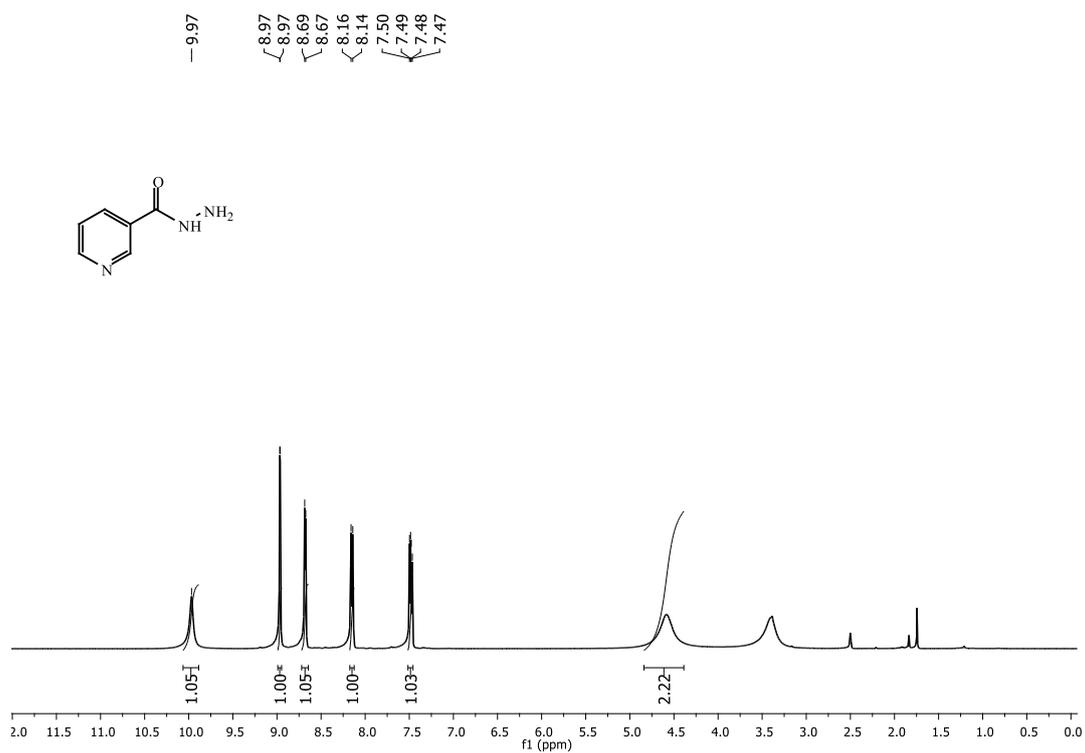


Figura 213. Espectro de RMN de ^1H do composto **46m** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

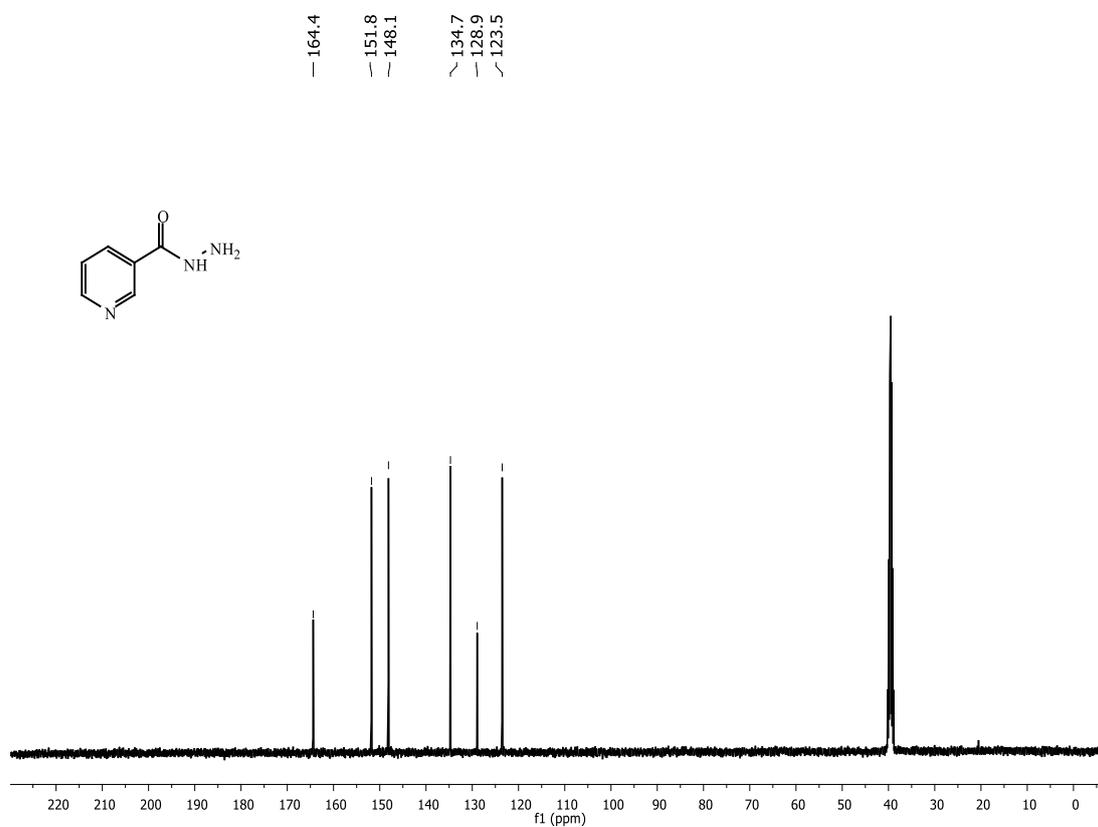


Figura 214. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46m** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

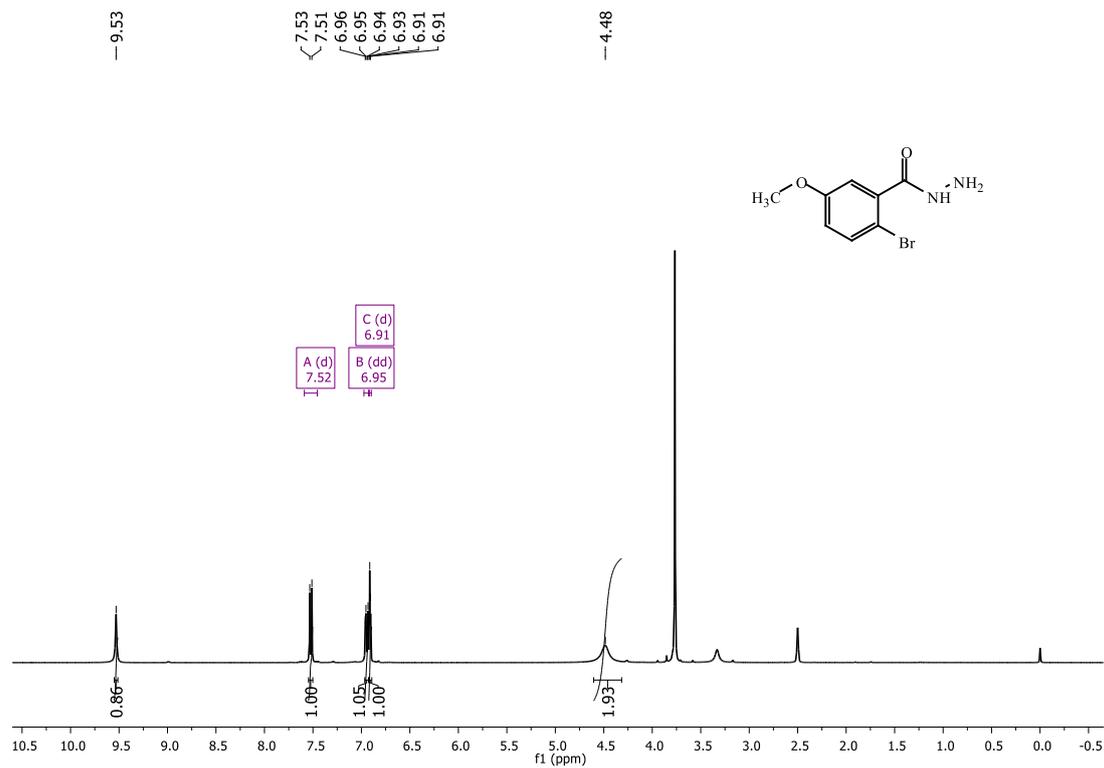


Figura 215. Espectro de RMN de ^1H do composto **46n** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

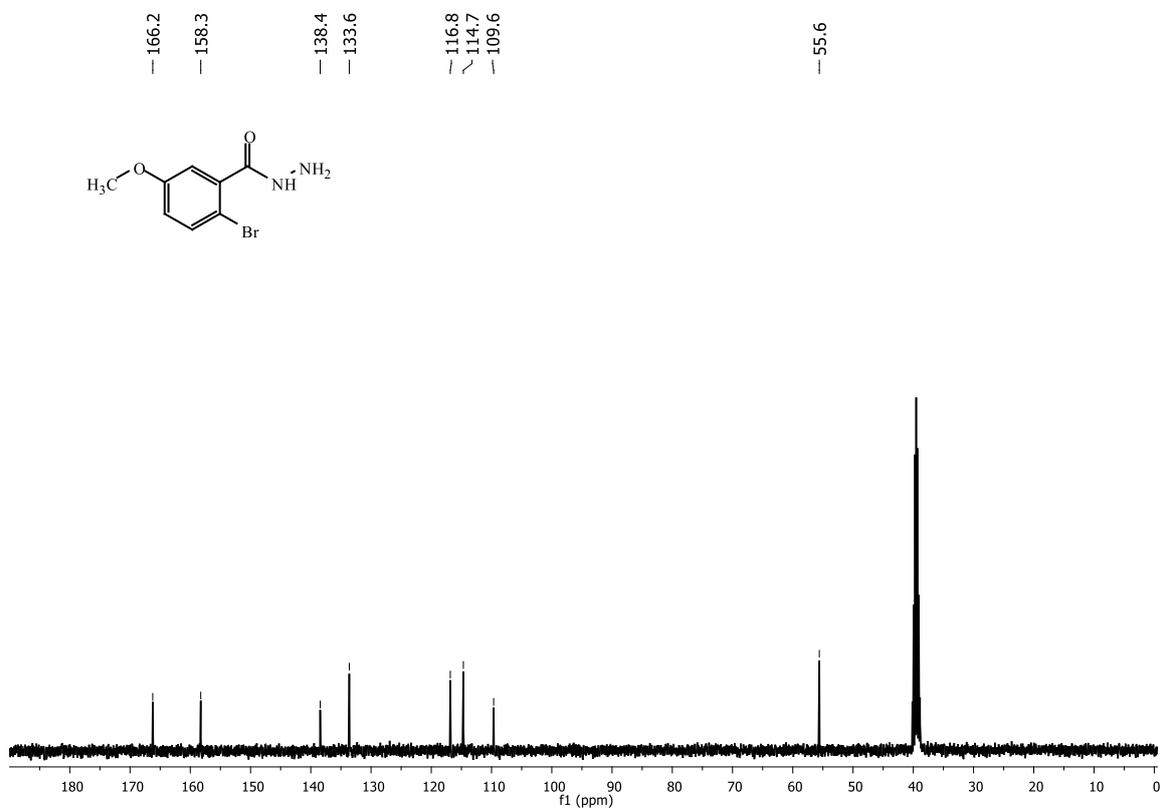


Figura 216. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **46n** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

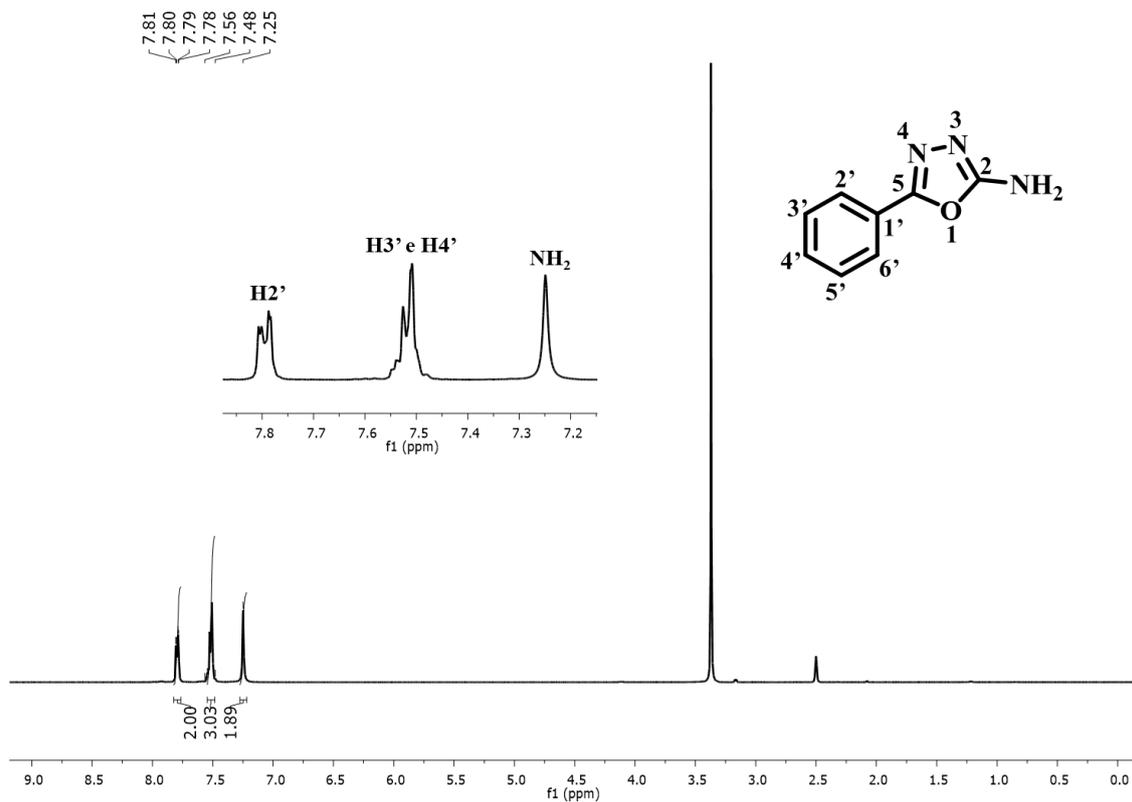


Figura 217. Espectro de RMN de ¹H do composto **47a** (DMSO-d₆, 400 MHz).

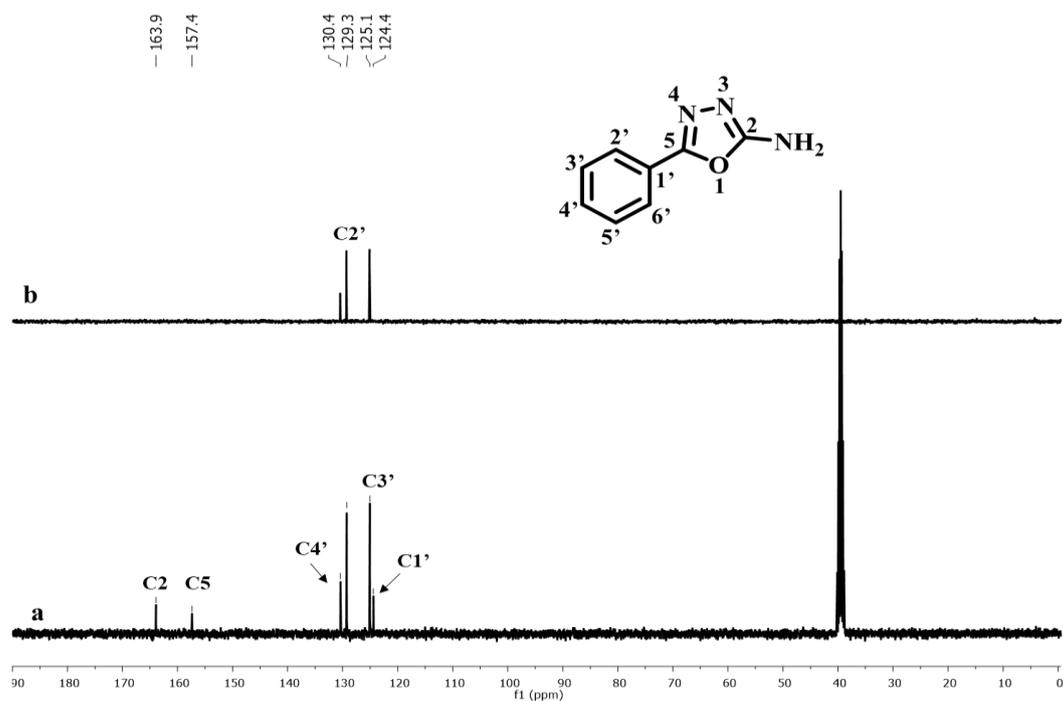


Figura 218. Espectros de RMN de ¹³C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47a** (DMSO-d₆, 100 MHz).

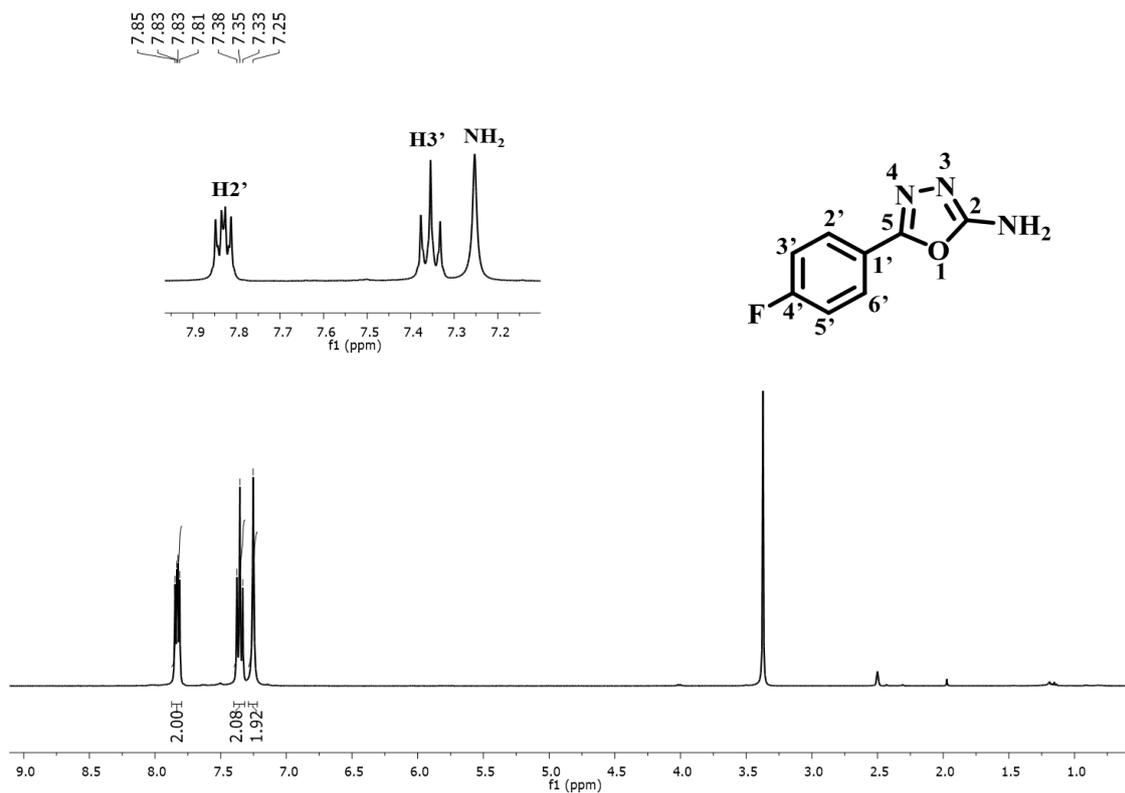


Figura 219. Espectro de RMN de ^1H do composto **47b** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

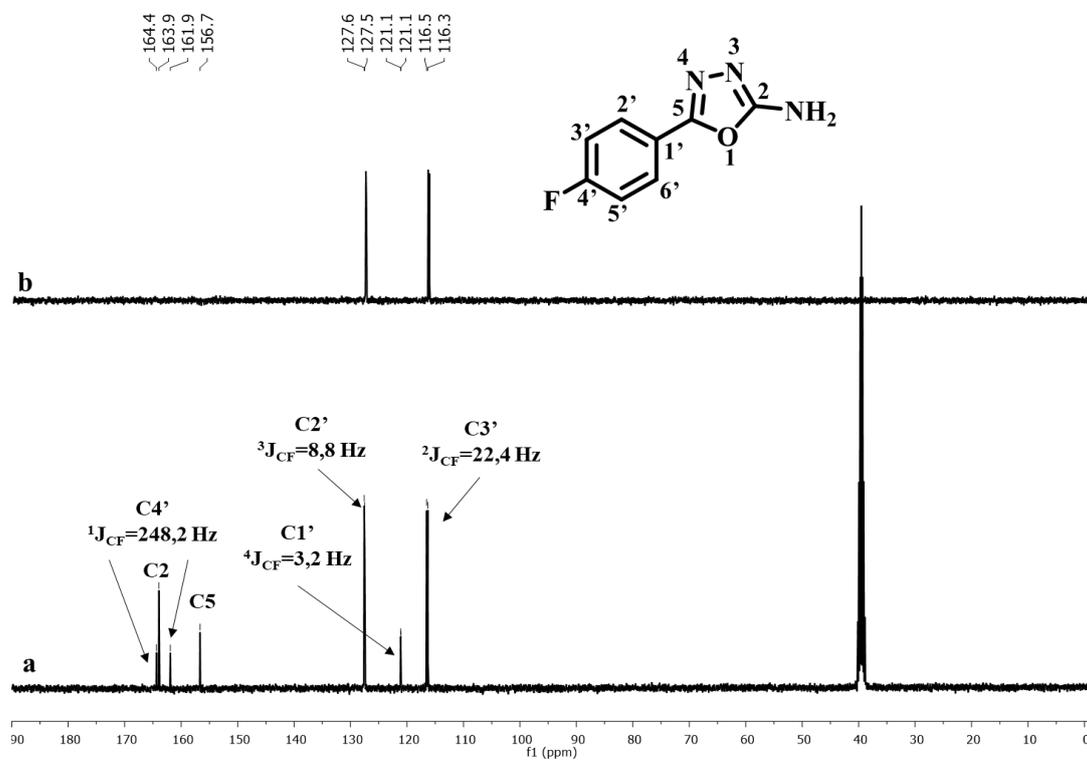


Figura 220. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47b** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

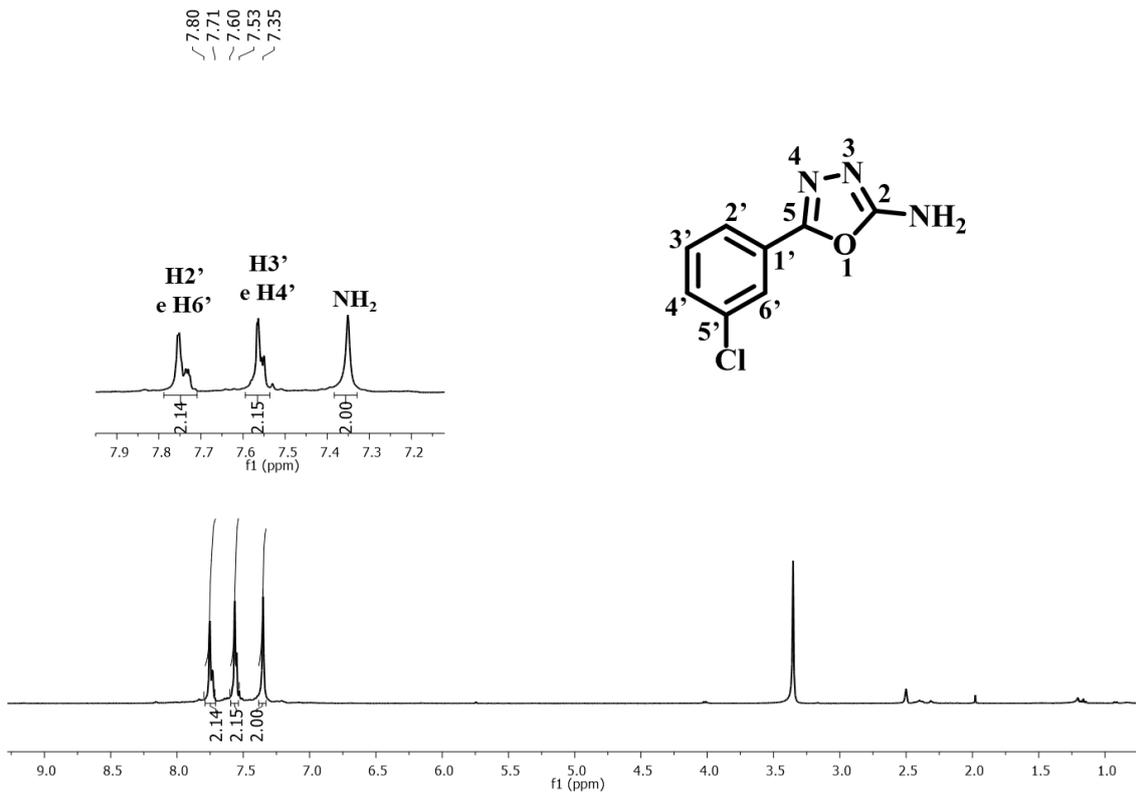


Figura 221. Espectro de RMN de ^1H do composto **47c** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

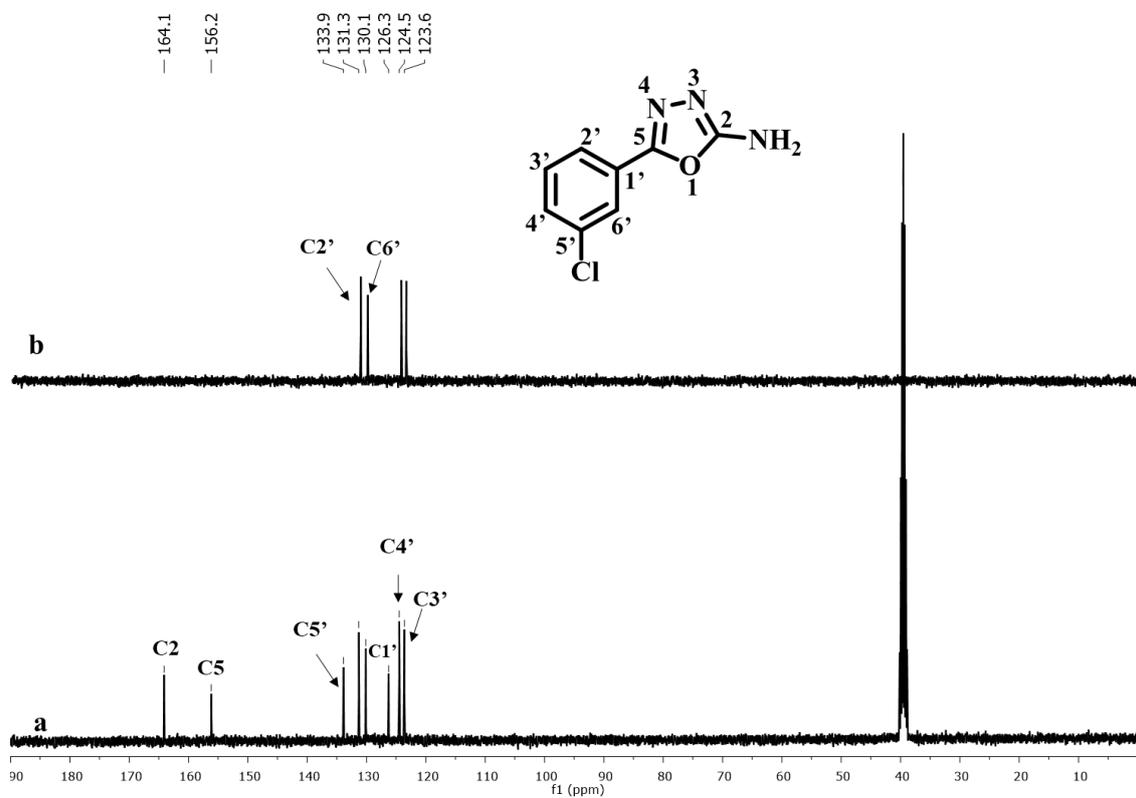


Figura 222. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47c** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

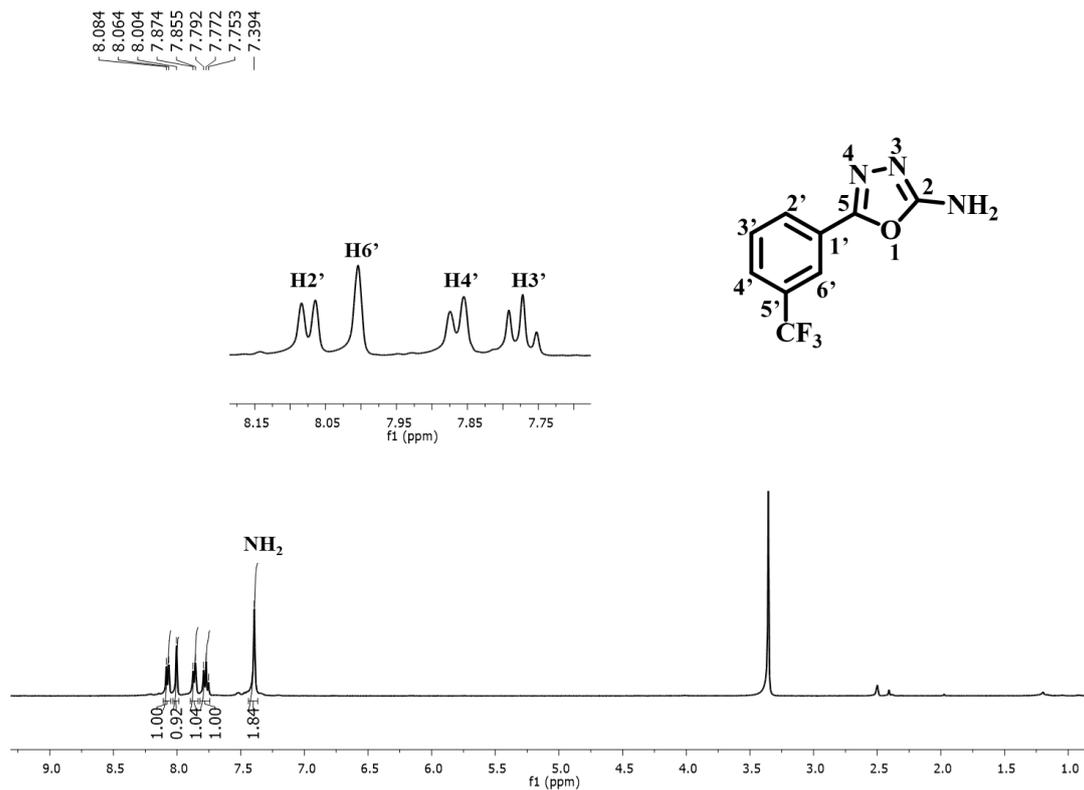


Figura 223. Espectro de RMN de ¹H do composto **47e** (DMSO-d₆, 400 MHz).

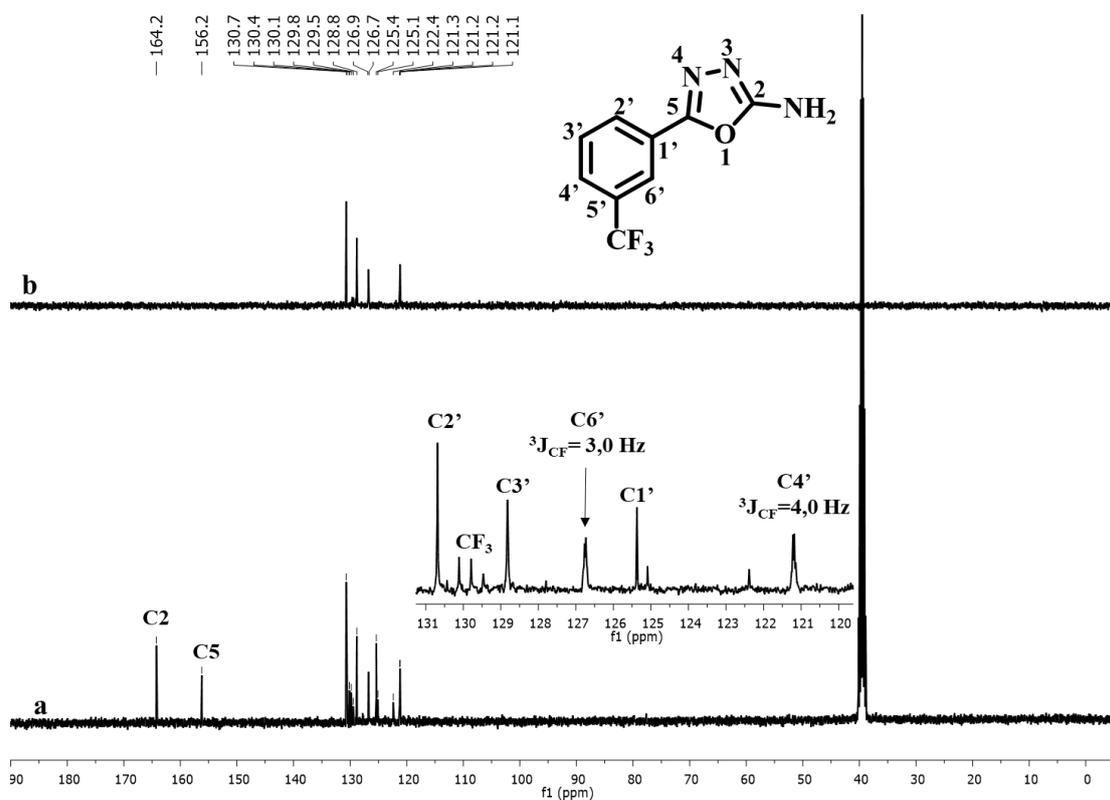


Figura 224. Espectro de RMN de ¹³C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47e** (DMSO-d₆, 100 MHz).

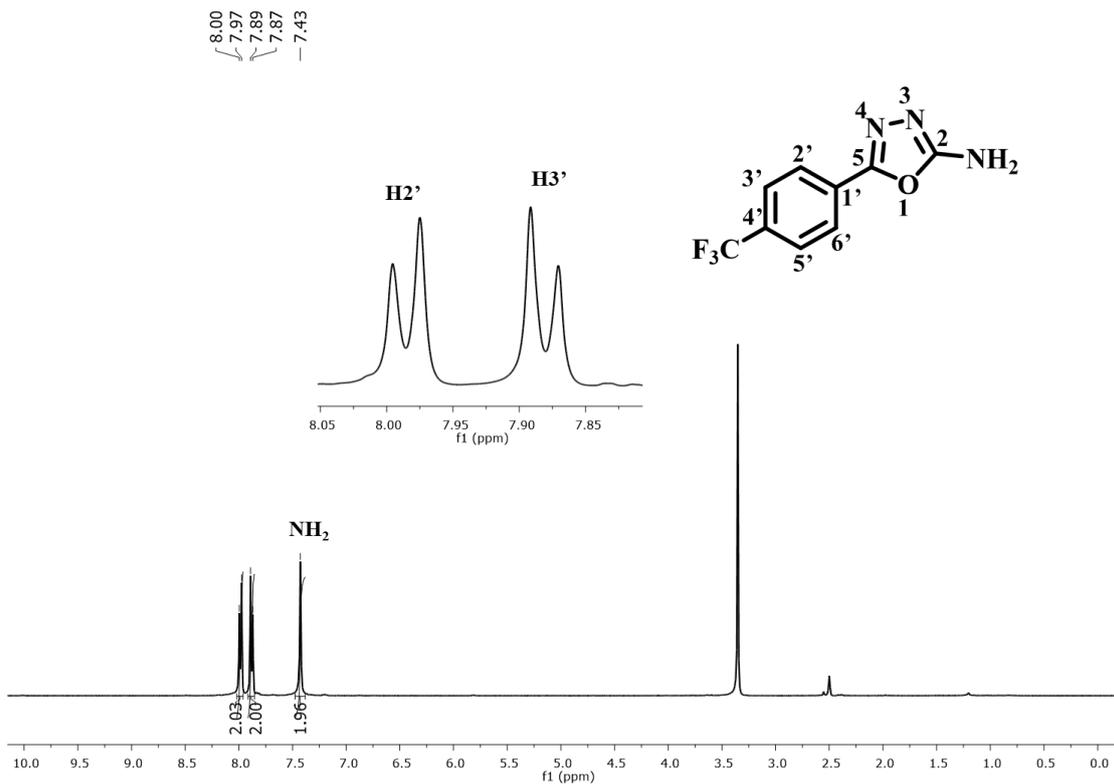


Figura 225. Espectro de RMN de ¹H do composto **47f** (DMSO-d₆, 400 MHz).

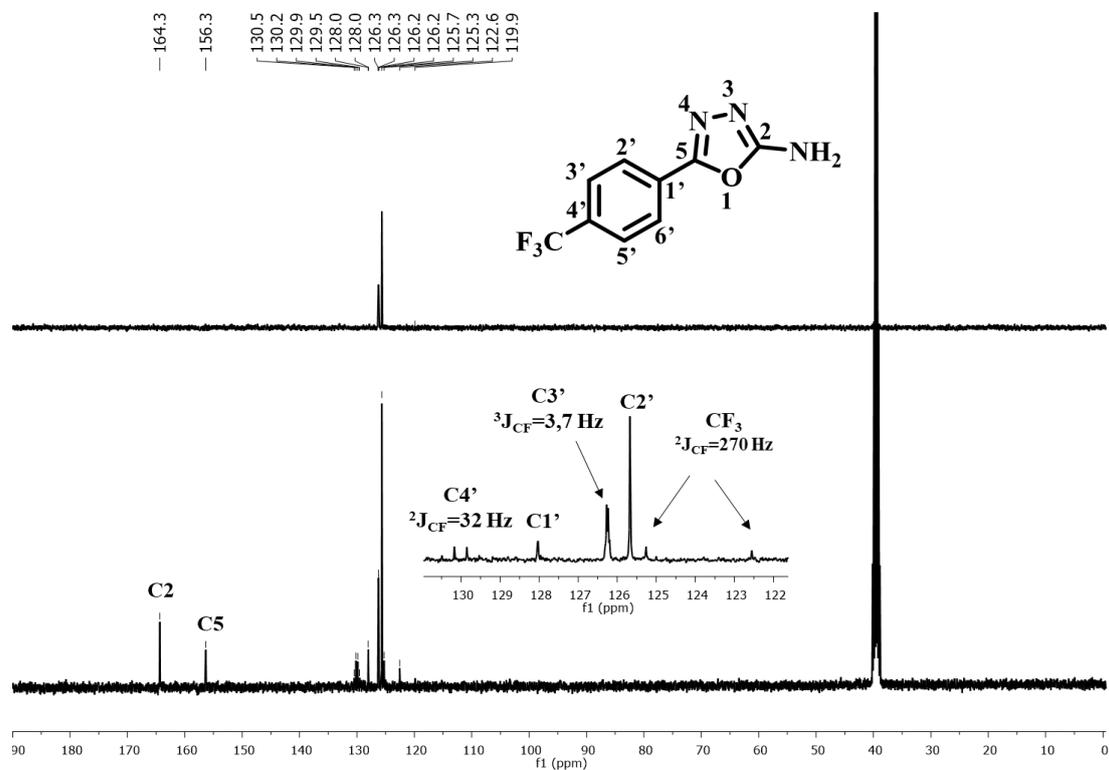


Figura 226. Espectros de RMN de ¹³C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47e** (DMSO-d₆, 100 MHz).

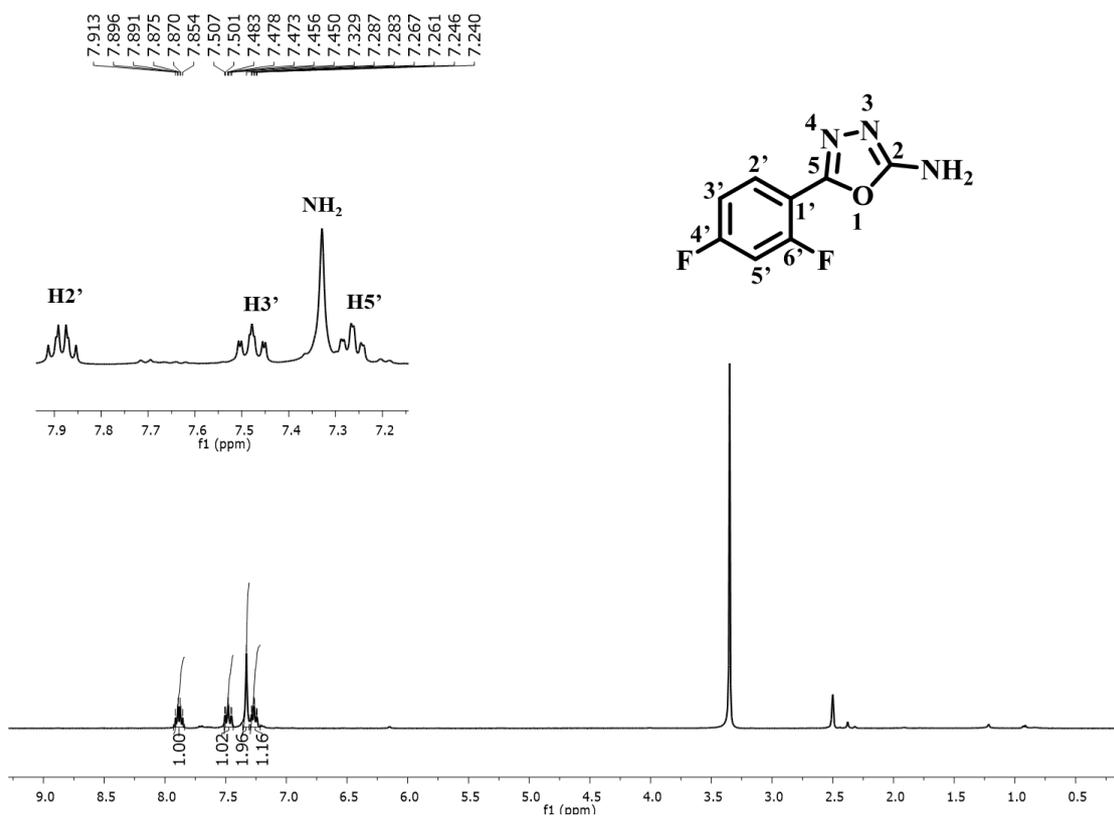


Figura 227. Espectro de RMN de ^1H do composto **47d** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

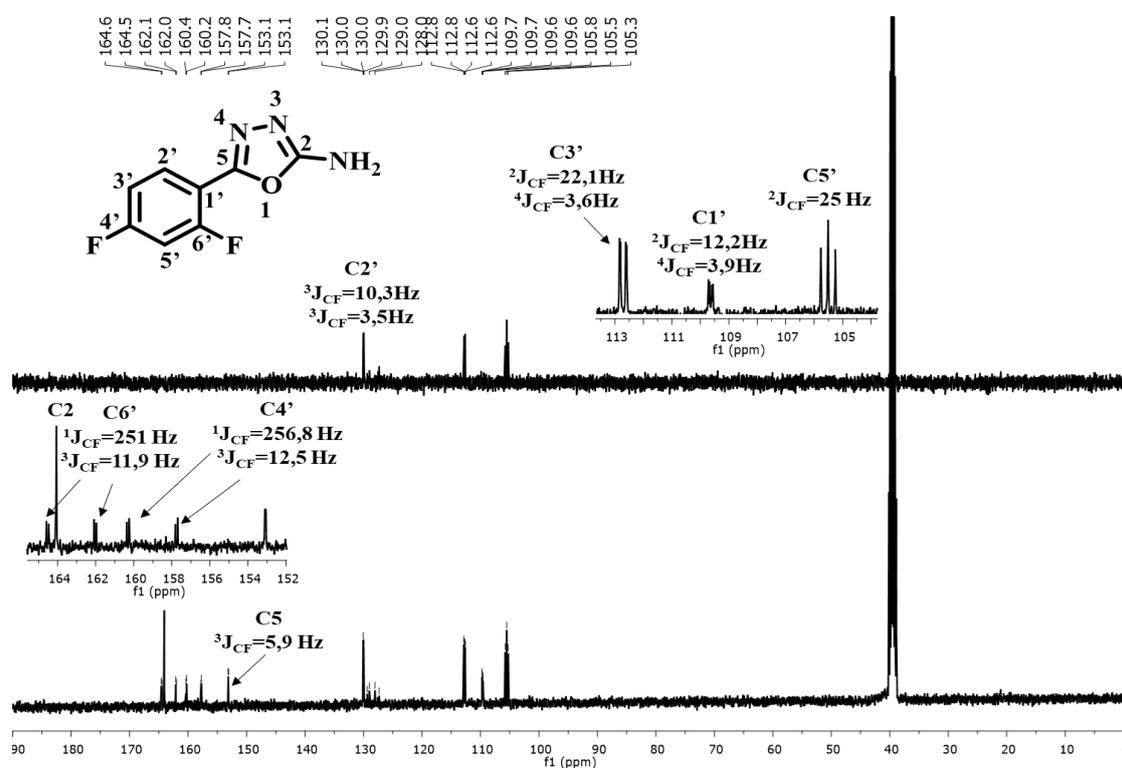


Figura 228. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47d** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

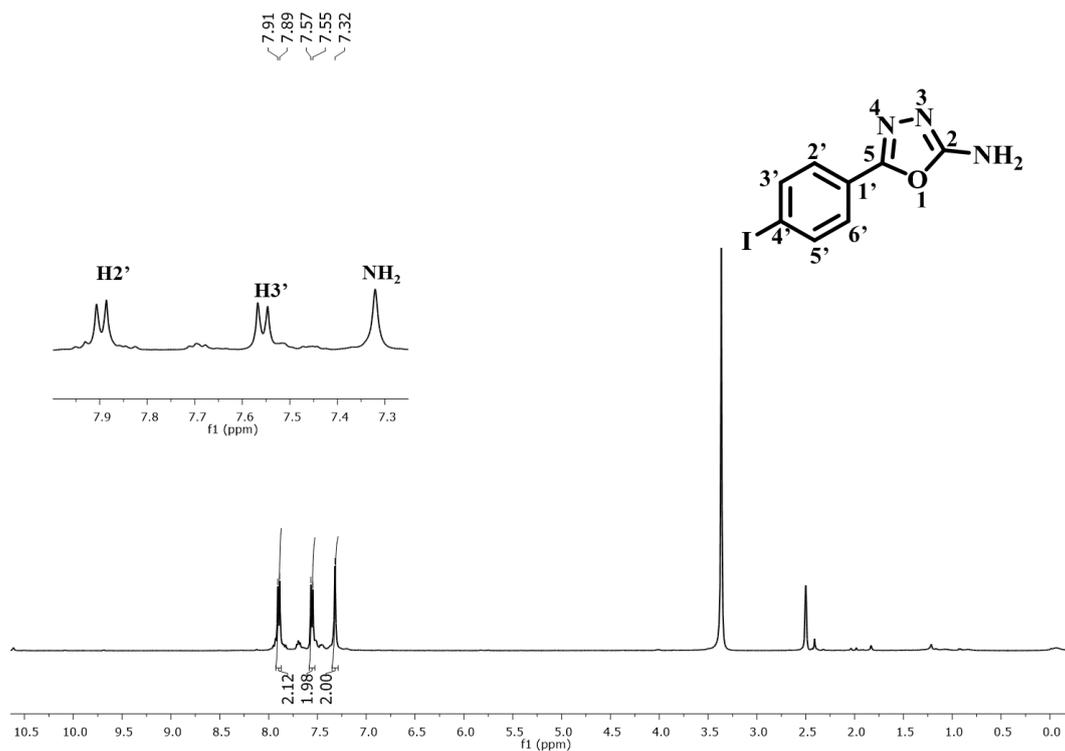


Figura 229. Espectro de RMN de ^1H do composto **47g** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

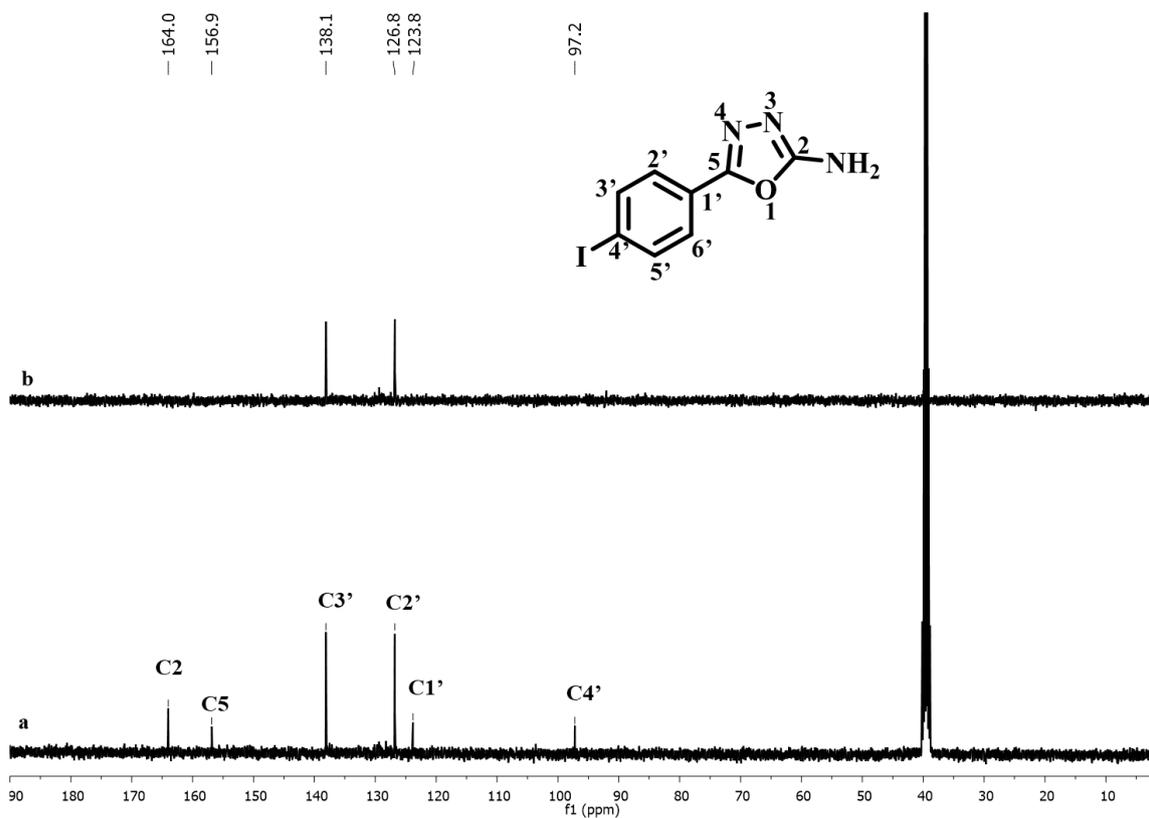


Figura 230. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47g** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

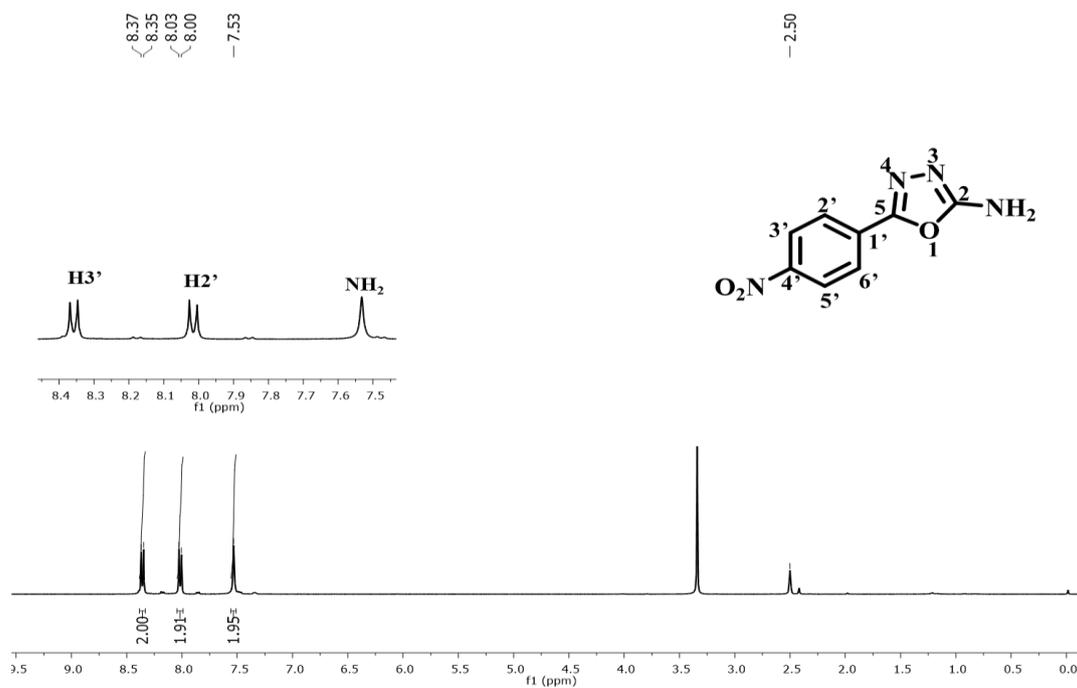


Figura 231. Espectro de RMN de ^1H do composto **47h** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

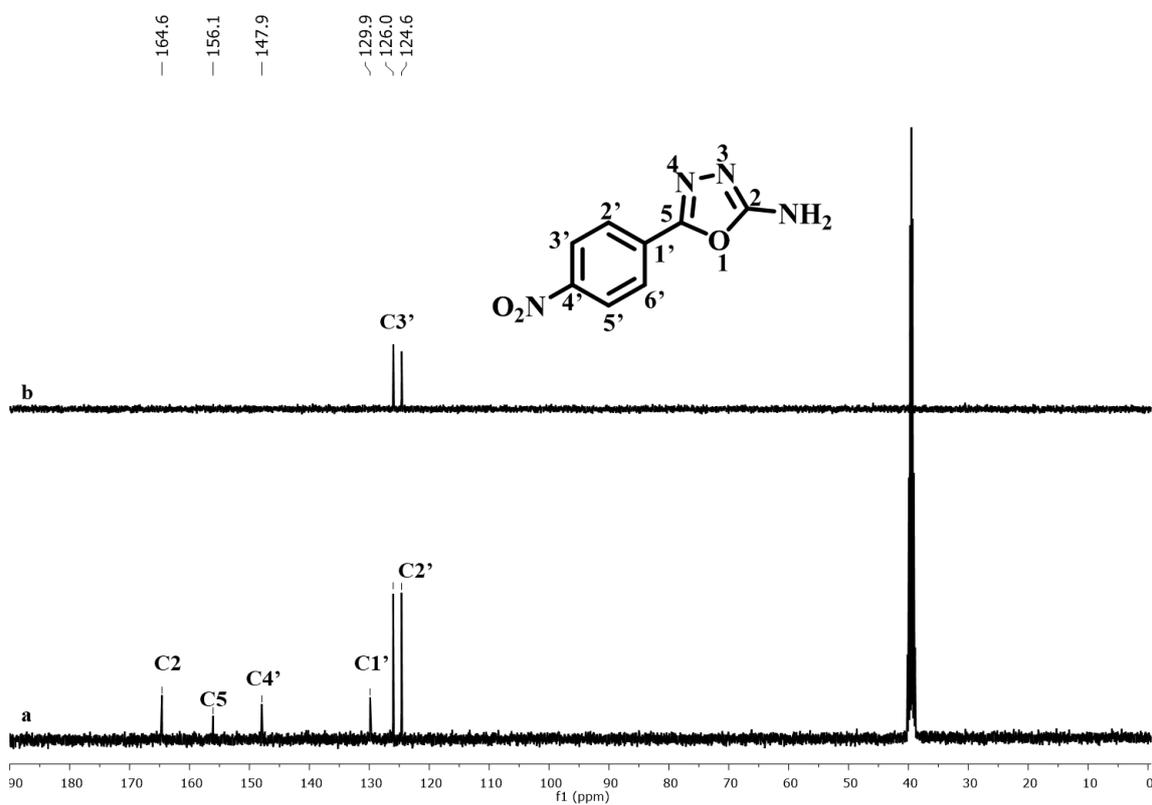


Figura 232. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47h** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

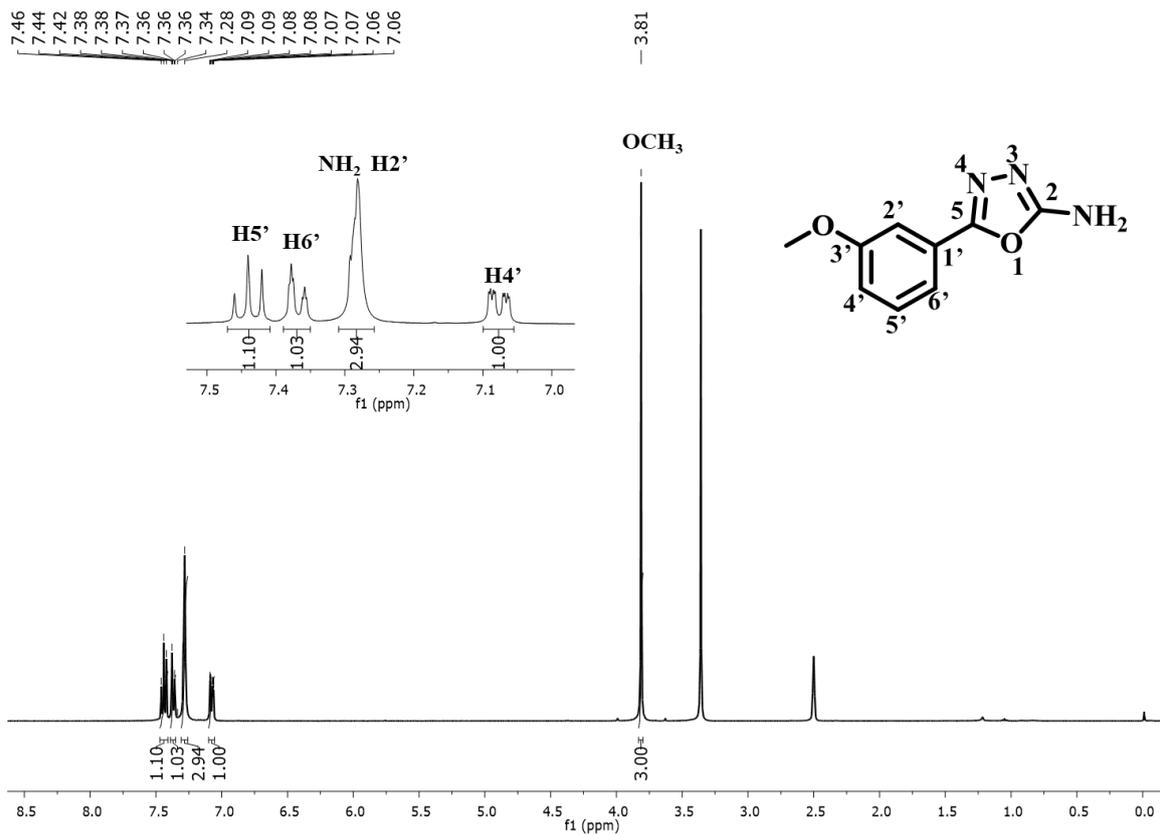


Figura 233. Espectro de RMN de ^1H do composto **47j** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

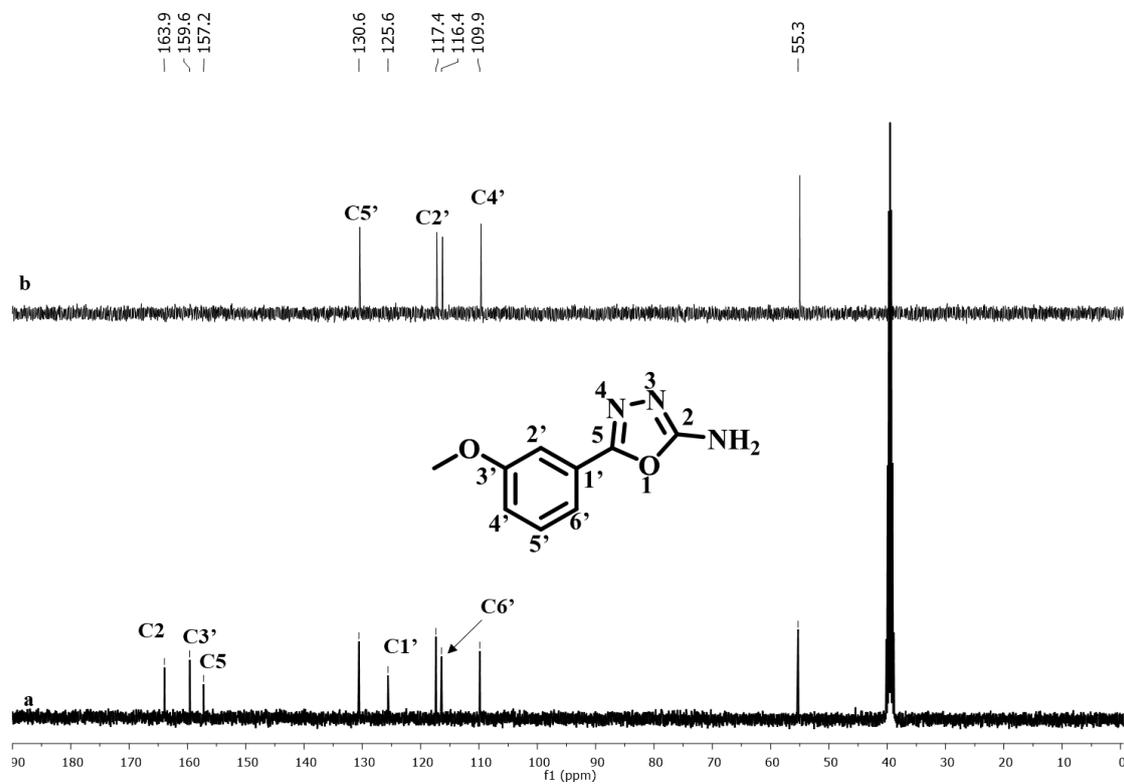


Figura 234. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47j** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

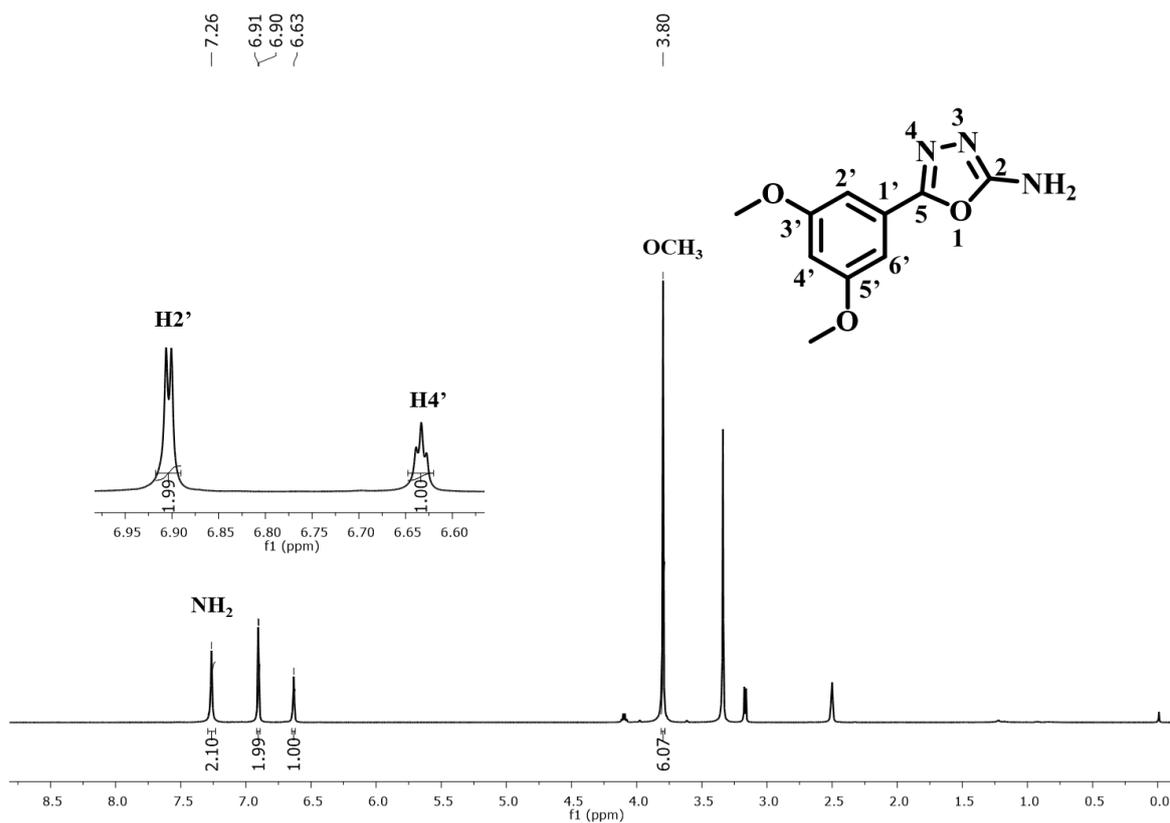


Figura 235. Espectro de RMN de ^1H do composto **47k** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

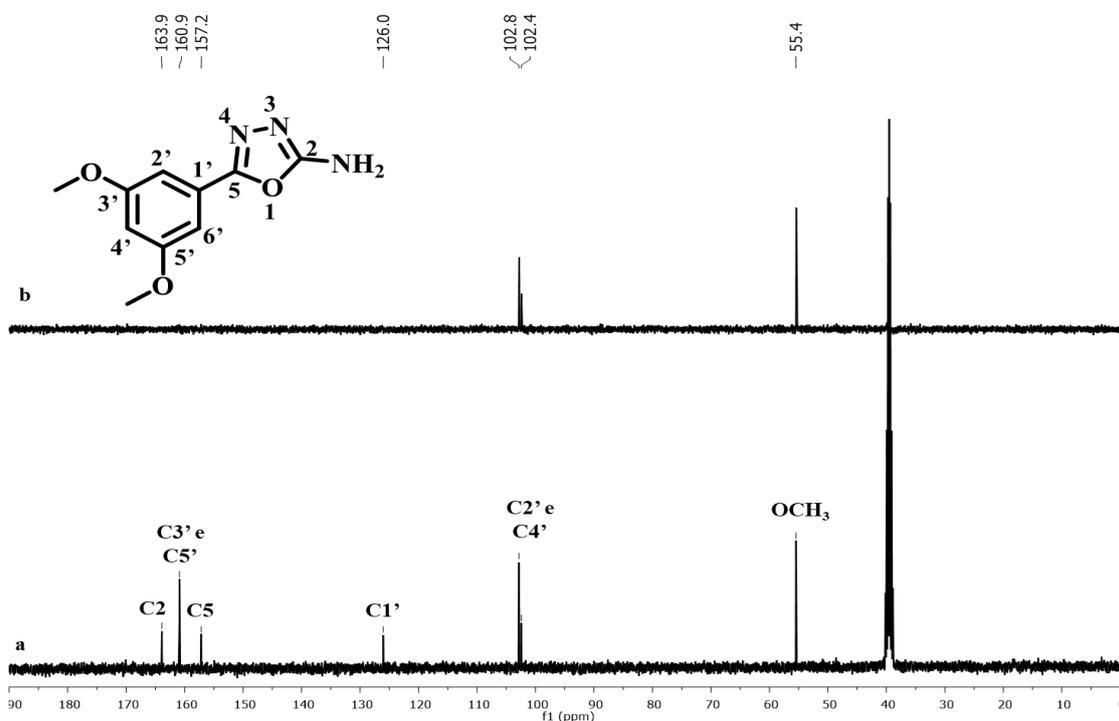


Figura 236. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **47k** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

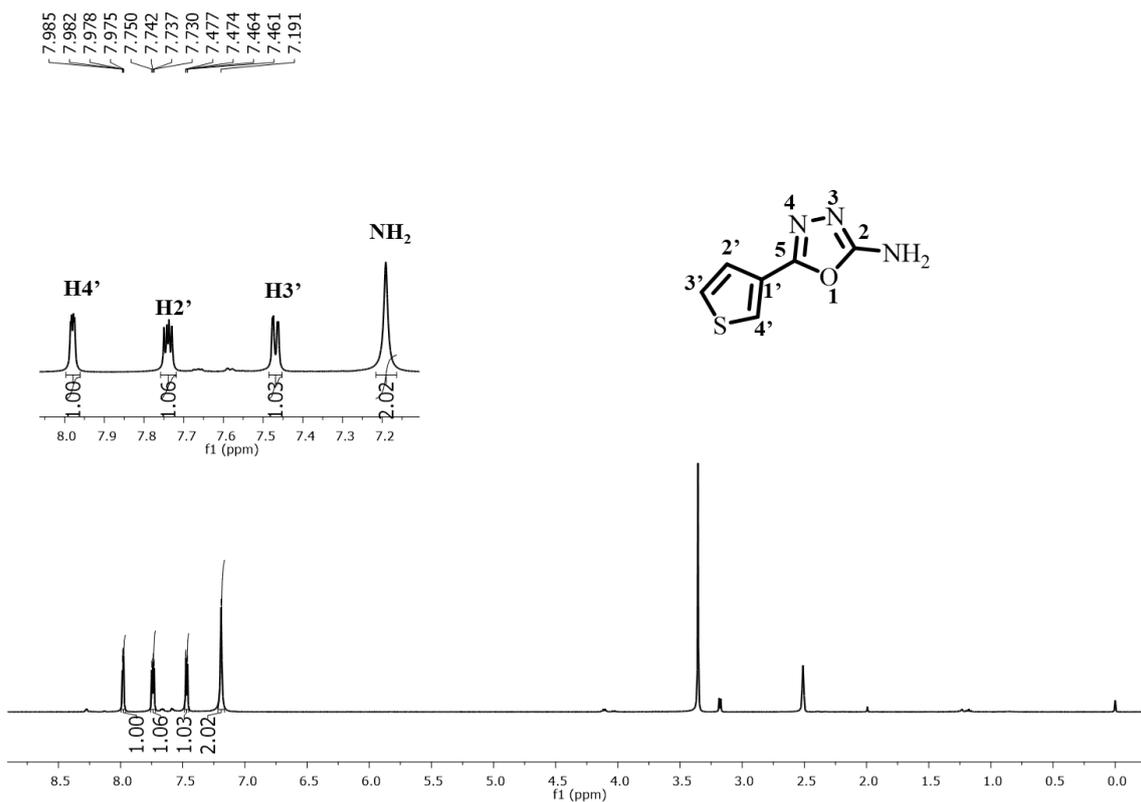


Figura 237. Espectro de RMN de ^1H do composto **471** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

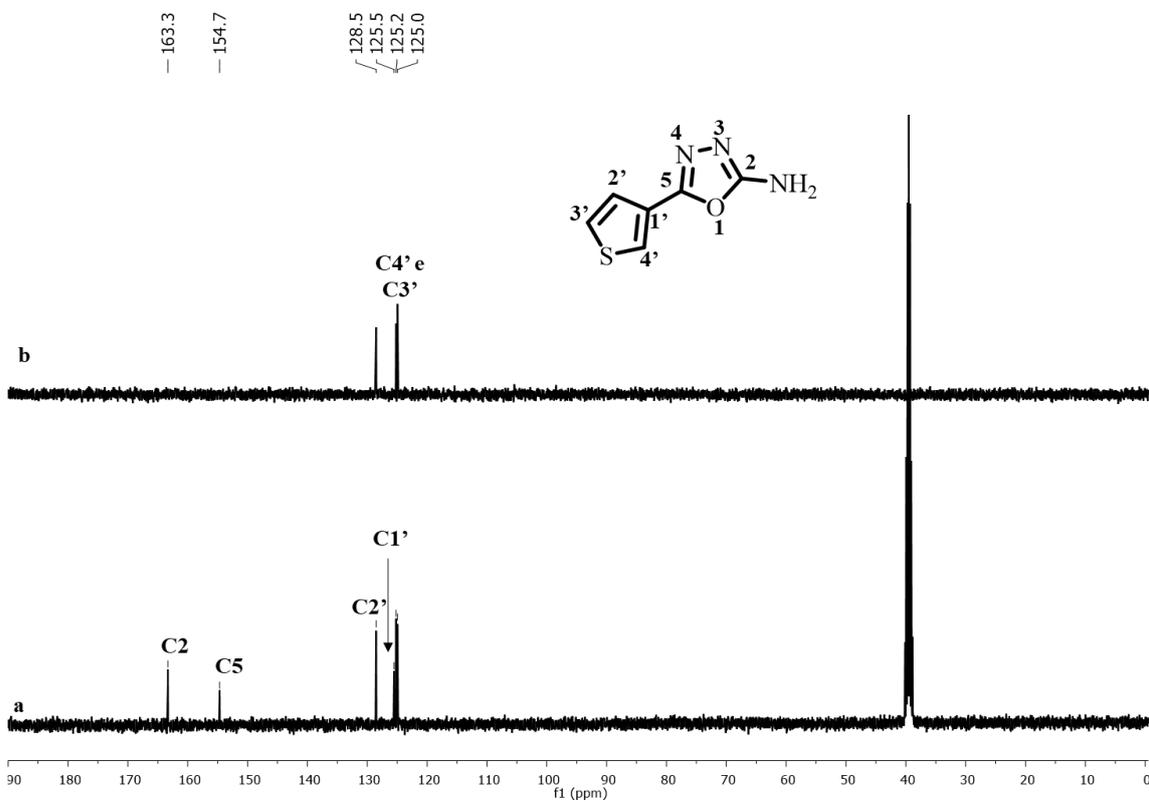


Figura 238. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **471** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

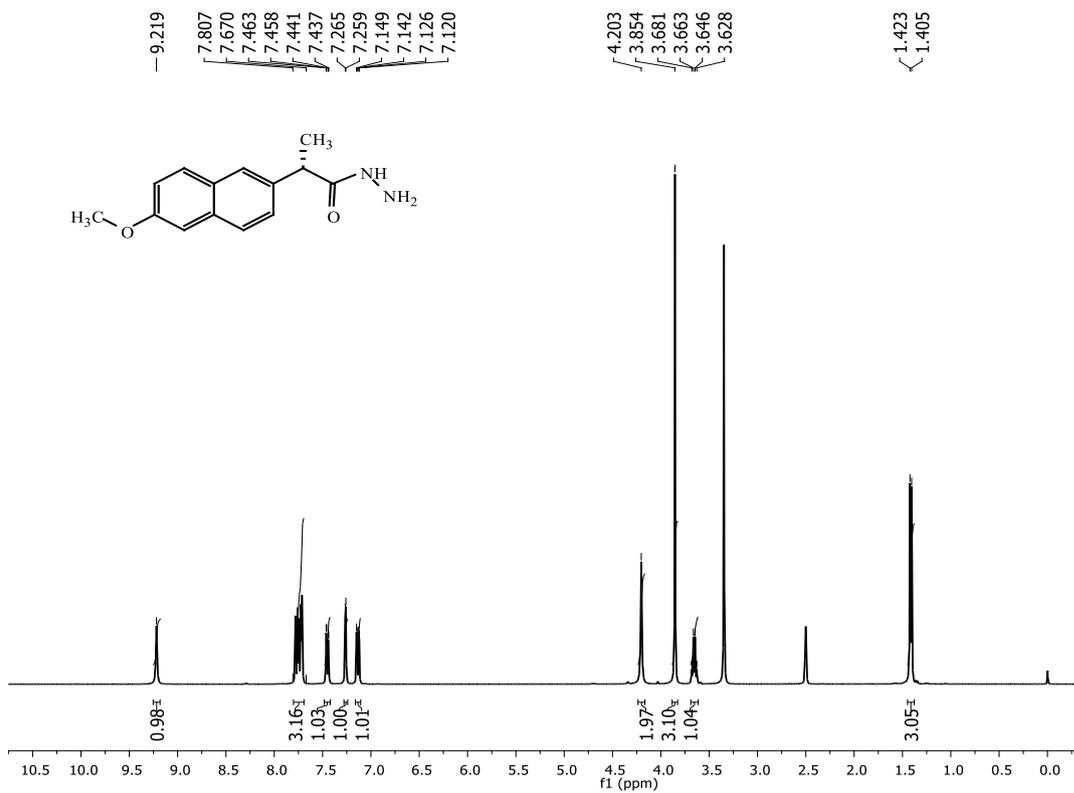


Figura 239. Espectro de RMN de ^1H do composto **48** (DMSO- d_6 , 400 MHz).

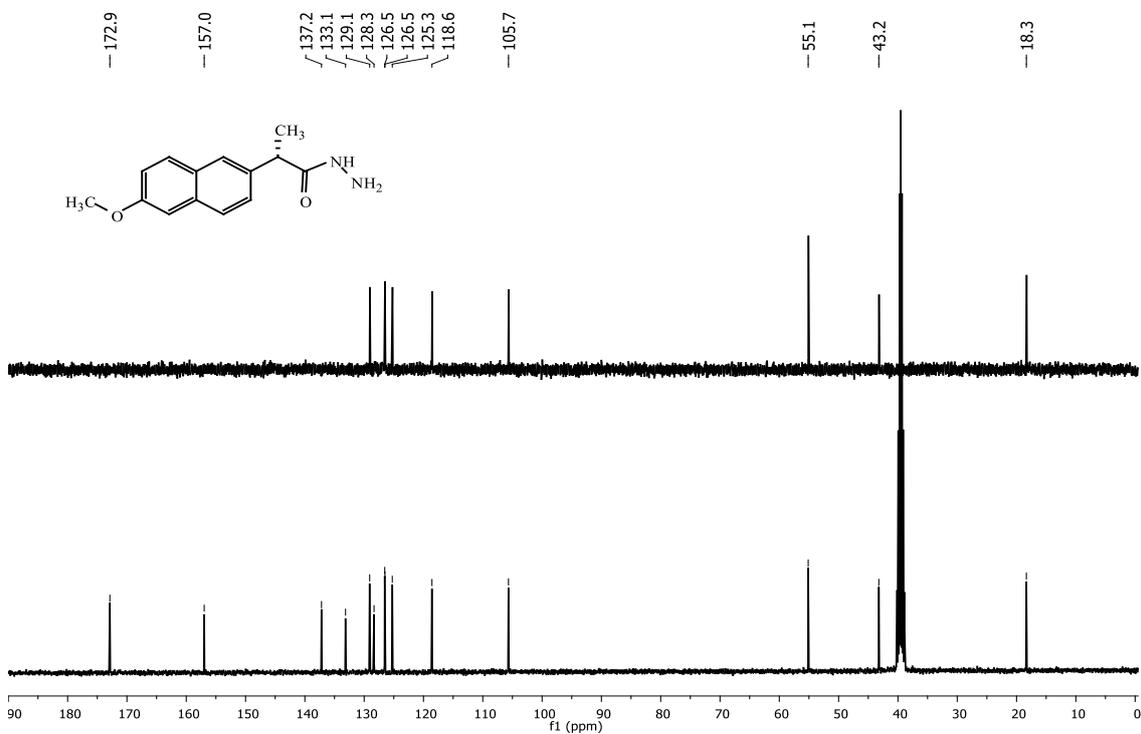


Figura 240. Espectros de RMN de ^{13}C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **48** (DMSO- d_6 , 100 MHz).

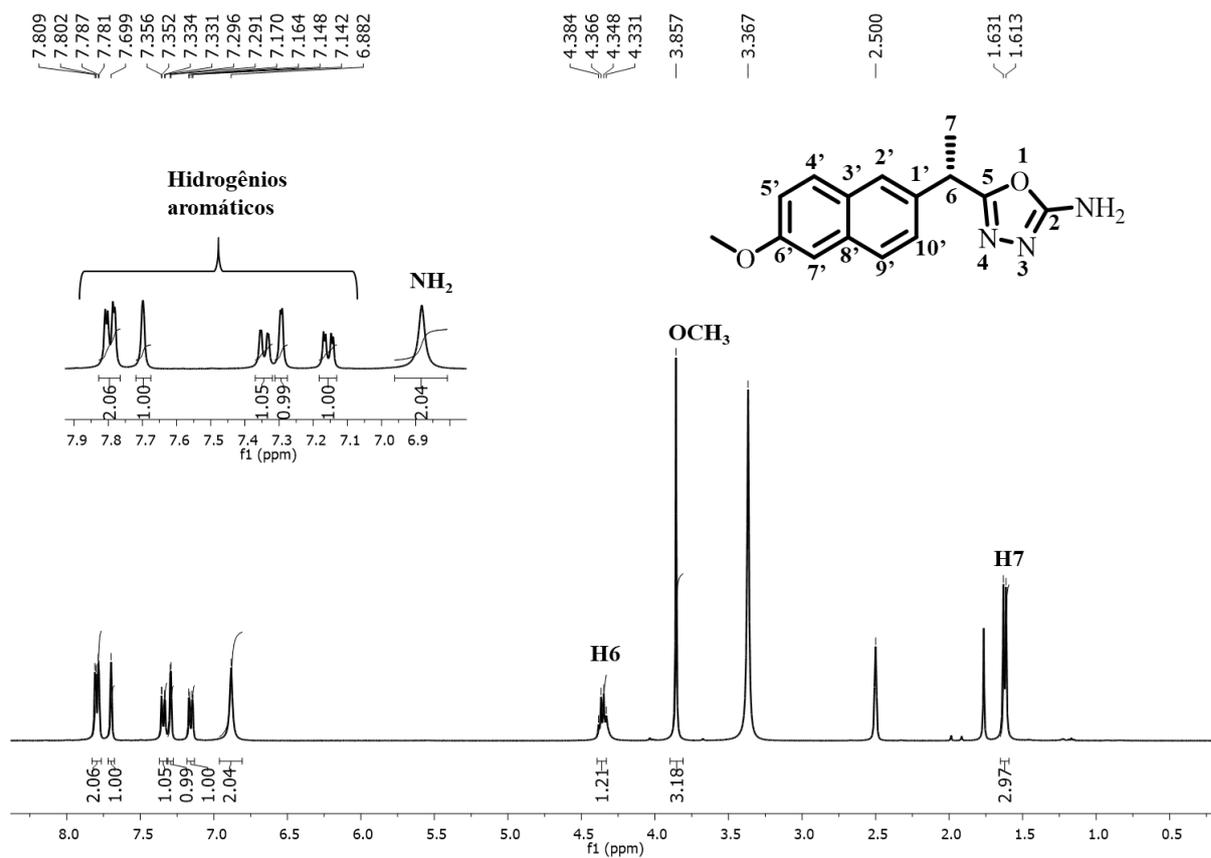


Figura 241. Espectro de RMN de ¹H do composto **49** (DMSO-d₆, 400 MHz).

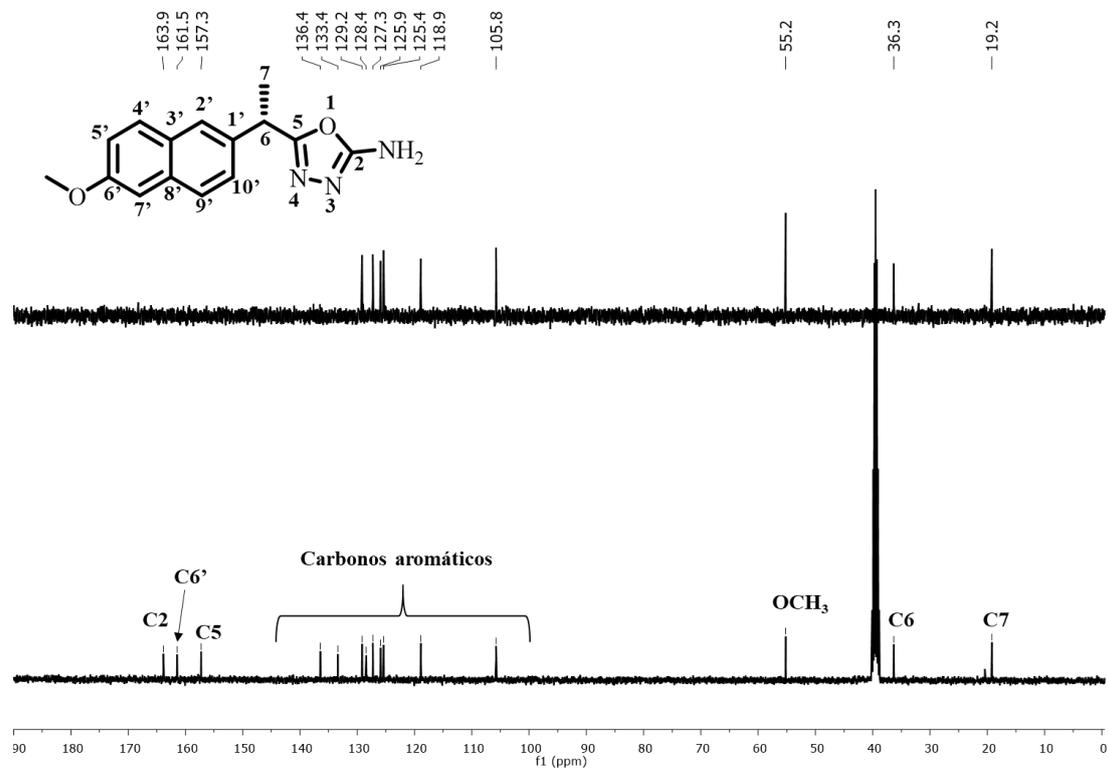


Figura 242. Espectros de RMN de ¹³C (a) e de DEPT 135 (b) do composto **49** (DMSO-d₆, 100 MHz).

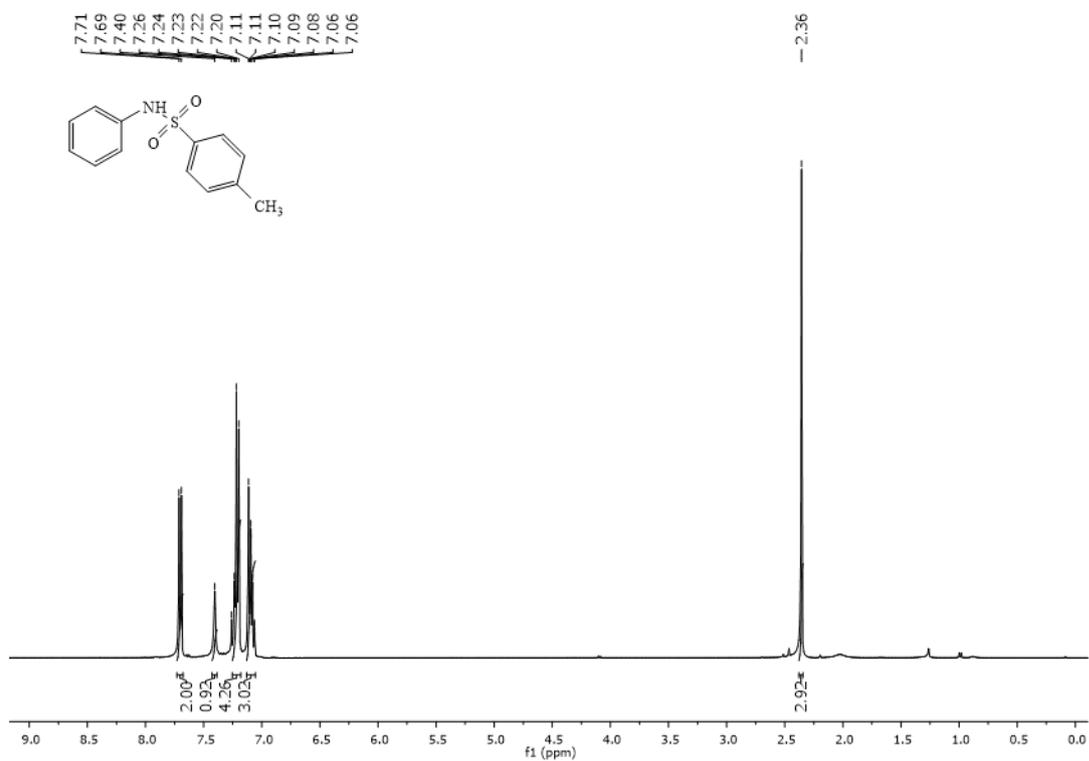


Figura 243. Espectro de RMN de ^1H da amina **V** (CDCl_3 , 400 MHz).

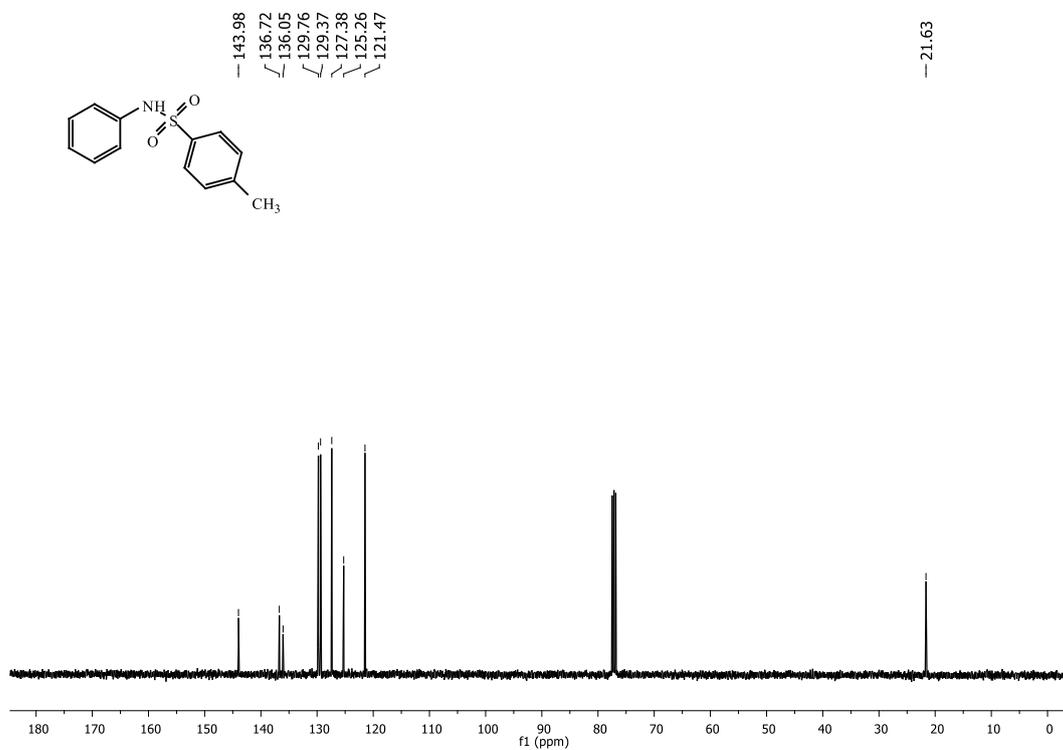


Figura 244. Espectro de RMN de ^{13}C da amina **V** (CDCl_3 , 100 MHz).

ANEXO III: Espectros de Massas

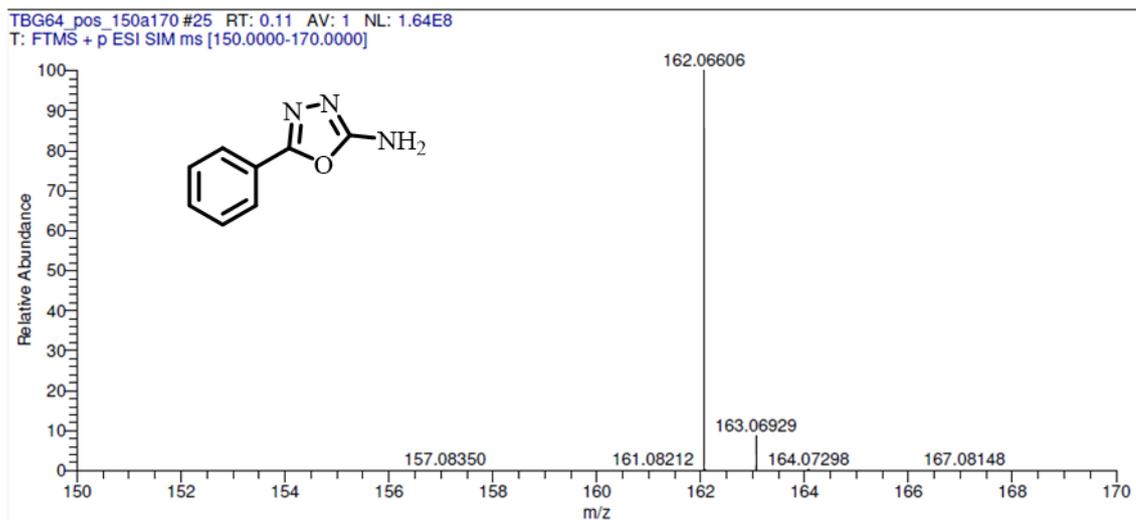


Figura 245. Espectro de Massas do composto **47a** (ESI modo positivo).

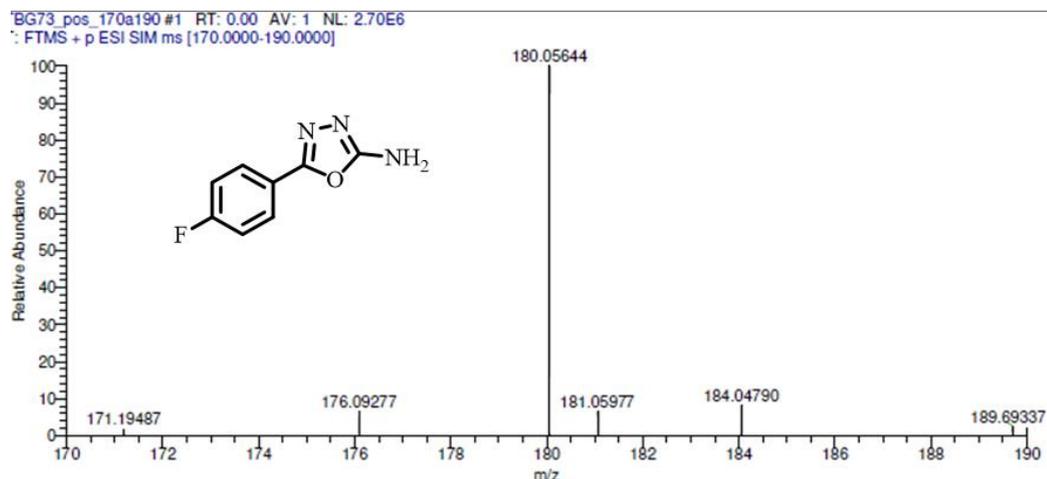


Figura 246. Espectro de Massas do composto **47b** (ESI modo positivo).

IBG74_pos_190a210 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.48E8
F: FTMS + p ESI SIM ms [190.0000-210.0000]

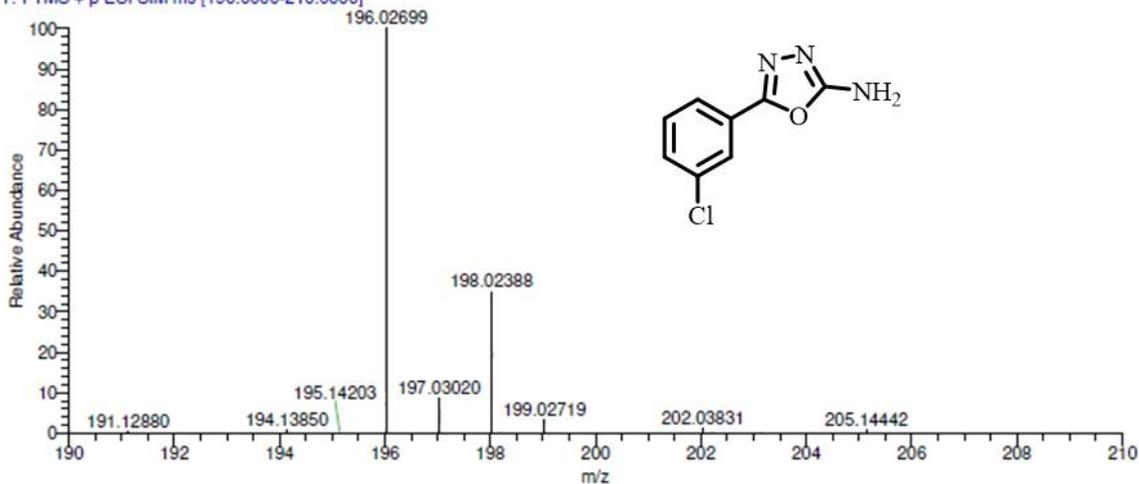


Figura 247. Espectro de Massas do composto **47c** (ESI modo positivo).

BG94_pos_220a240 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.08E8
F: FTMS + p ESI SIM ms [220.0000-240.0000]

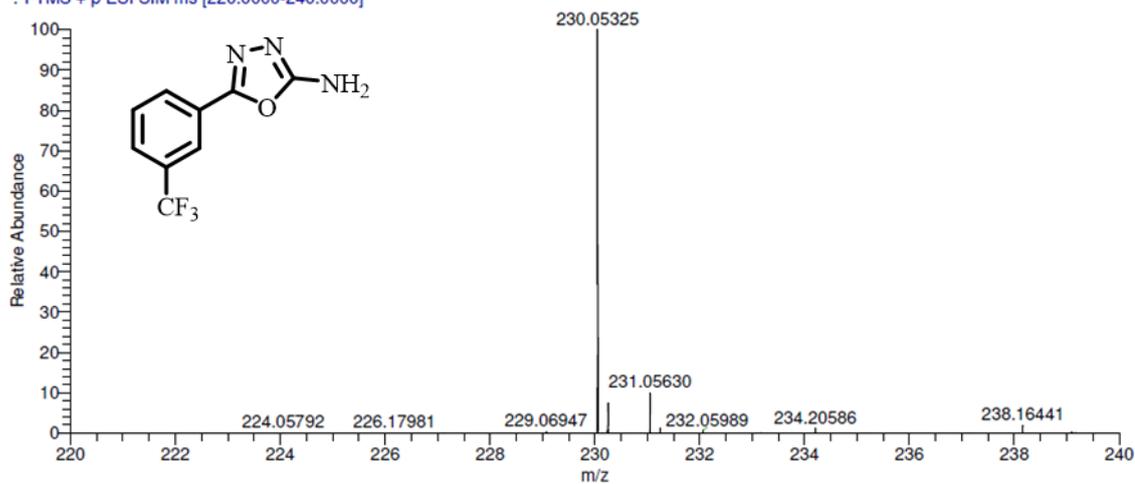


Figura 248. Espectro de Massas do composto **47e** (ESI modo positivo).

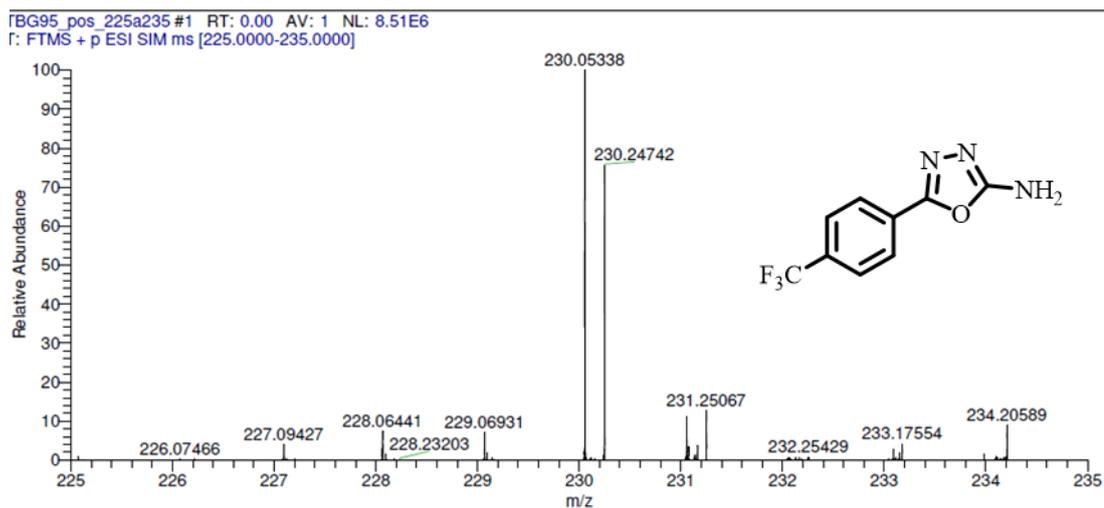


Figura 249. Espectro de Massas do composto **47f** (ESI modo positivo).

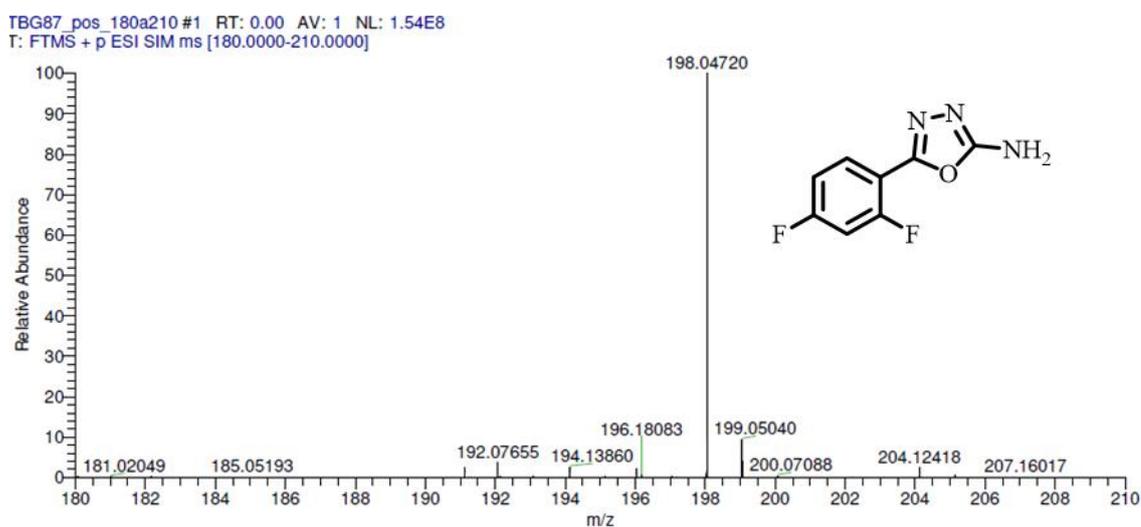


Figura 250. Espectro de Massas do composto **47d** (ESI modo positivo).

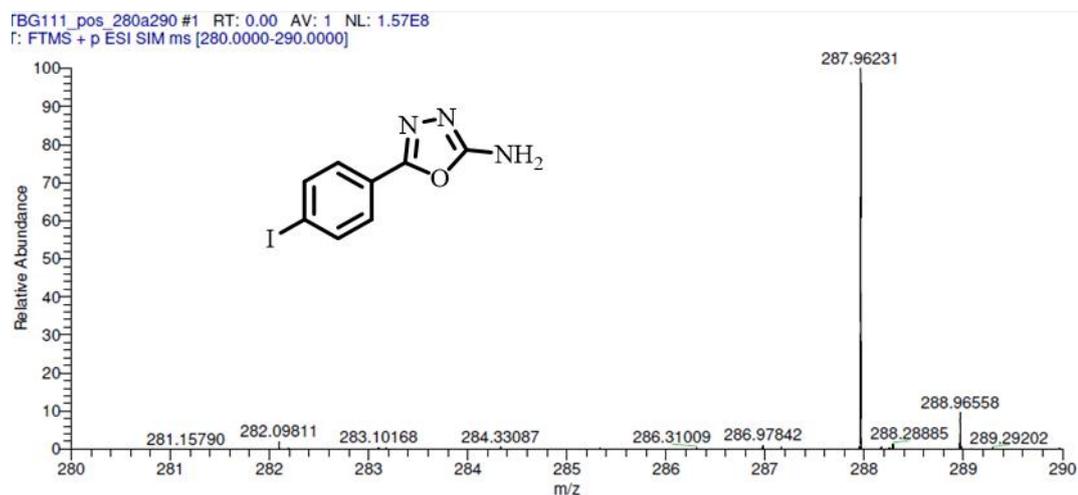


Figura 251. Espectro de Massas do composto **47g** (ESI modo positivo).

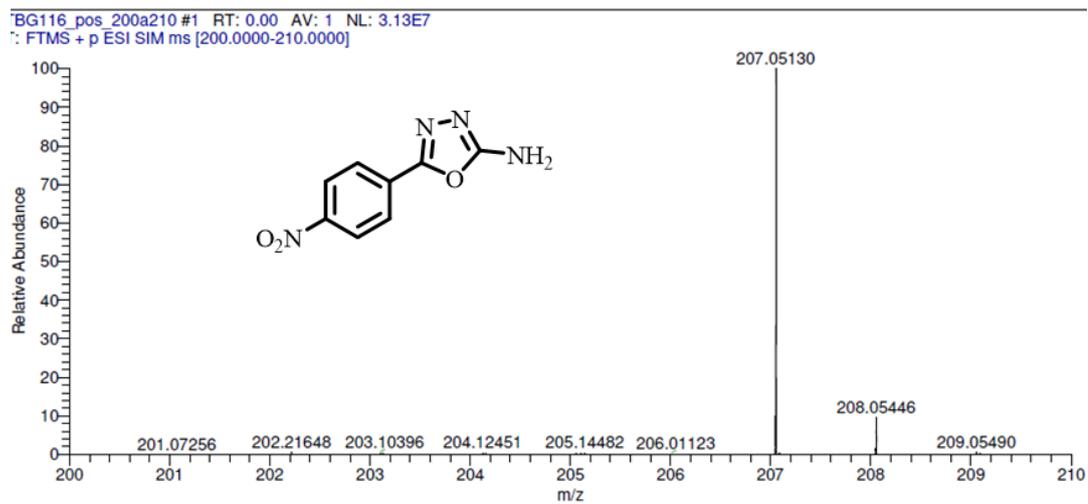


Figura 252. Espectro de Massas do composto **47h** (ESI modo positivo).

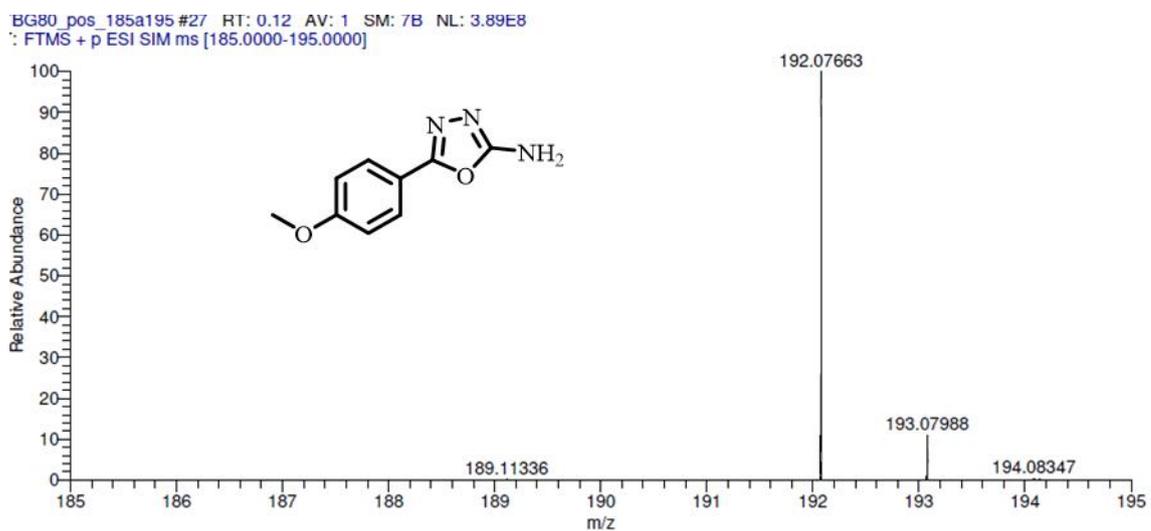


Figura 253. Espectro de Massas do composto **47i** (ESI modo positivo).

TBG122_pos_180a200 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.88E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [180.0000-200.0000]

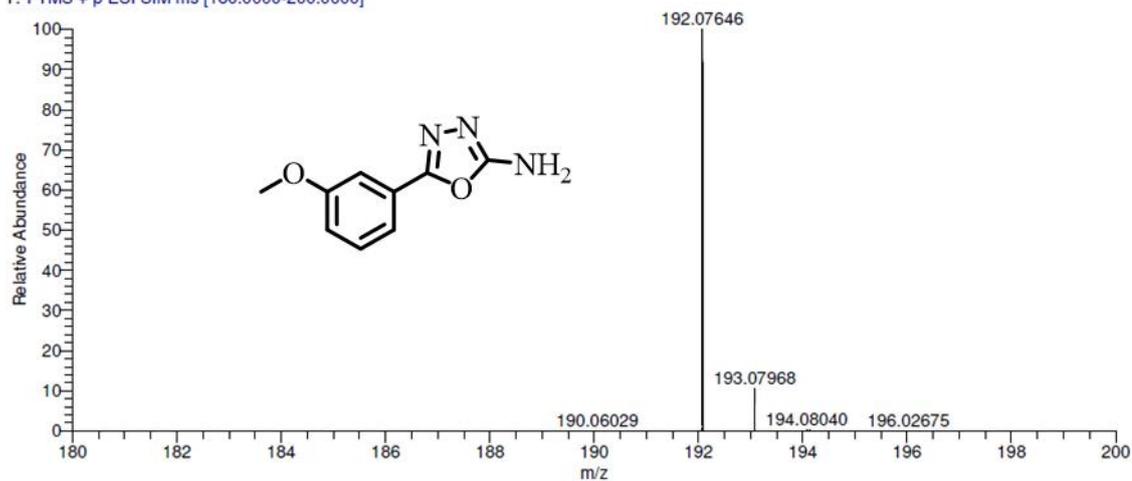


Figura 254. Espectro de Massas do composto **47j** (ESI modo positivo).

TBG117_pos_220a225 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.39E8
T: FTMS + p ESI SIM ms [220.0000-225.0000]

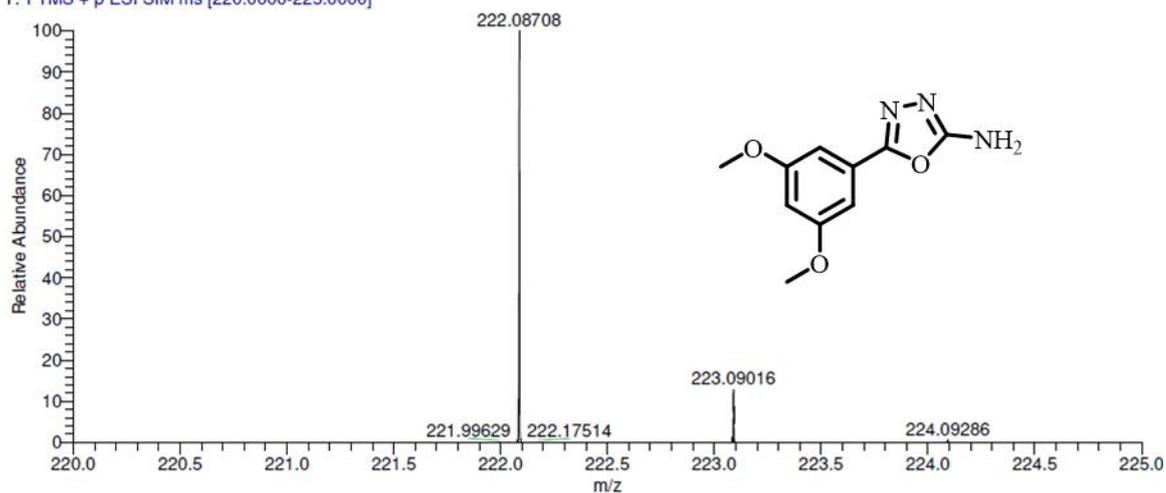


Figura 255. Espectro de Massas do composto **47k** (ESI modo positivo).

BG105_pos_165a175 #48 RT: 0.21 AV: 1 NL: 6.16E7
: FTMS + p ESI SIM ms [165.0000-175.0000]

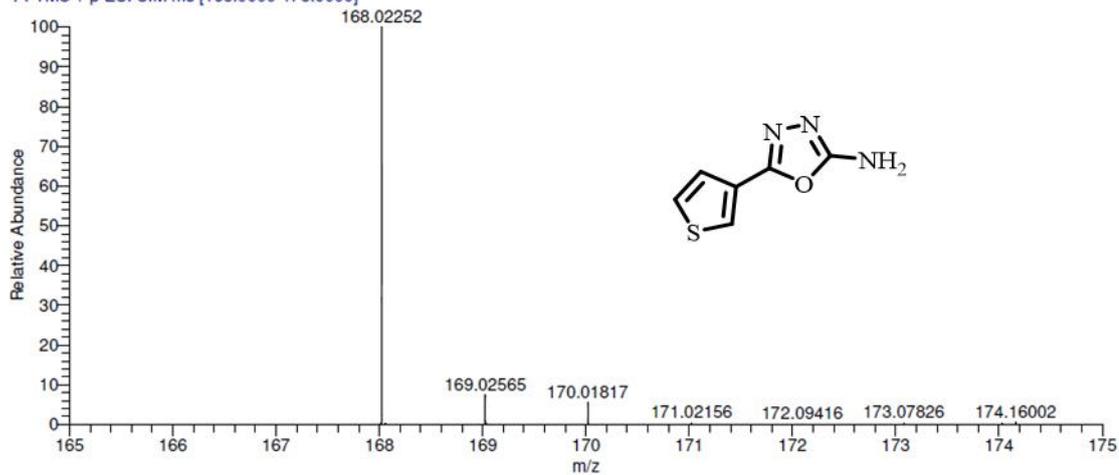


Figura 256. Espectro de Massas do composto **471** (ESI modo positivo).

FBG123_pos_270a273 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.84E8
Γ: FTMS + p ESI SIM ms [265.0000-273.0000]

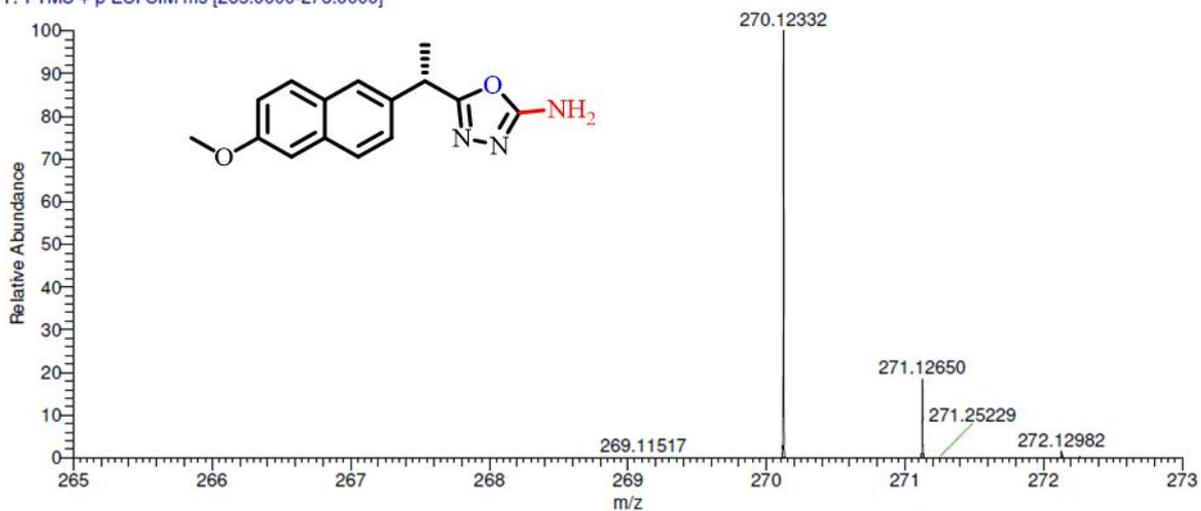


Figura 257. Espectro de Massas do composto **49** (ESI modo positivo).