

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SAULO FEHELBERG PINTO BRAGA

**SÍNTESE DE INIBIDORES POTENCIAIS DA TRIPANOTIONA REDUTASE: BASE
PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO
DA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE**

Belo Horizonte – MG

2012

SAULO FEHELBERG PINTO BRAGA

**SÍNTESE DE INIBIDORES POTENCIAIS DA TRIPANOTIONA REDUTASE: BASE
PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO
DA DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.
Orientadora: Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Thaïs Horta Álvares da Silva

Belo Horizonte – MG

2012


FOLHA DE APROVAÇÃO

SAULO FEHELBERG PINTO BRAGA

**"Síntese de Inibidores Potenciais da Tripanotiona Redutase:
base para o desenvolvimento de novos fármacos para
tratamento da Doença de Chagas e Leishmaniose"**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e oito de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



Profa. Dra. Rosemeire Brondi Alves - UFMG



Profa. Dra. Rafaela Salgado Ferreira - UFMG



Profa. Dra. Thais Horta Alvares da Silva - UFMG



Profa. Dra. Renata Barbosa de Oliveira - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial aos meus pais, por toda a luta e carinho que me fizeram chegar até aqui. Aos meus irmãos pelo companheirismo. A minha mãe mineira, Nete, pelo apoio e pelo feijão.

A minha querida orientadora, Renata, pela dedicação, otimismo, incentivo e pelo exemplo de paixão pela profissão.

Aos professores do laboratório Ricardo, pelo brilhantismo e filosofia, Thaís, pelo apoio e atenção, e Basílio pela ajuda com as normas.

Ao prof. Gilson pelo direcionamento e a prof.^a Rose pelo apoio com os espectros de RMN nos momentos de maior necessidade e pelo uso do micro-ondas.

Agradeço imensamente a Marcela, irmã de mestrado, por toda ajuda, companheirismo, amizade, conselhos, risos e desabafos.

Aos colegas Stefânia, pela alegria e “aulas” de modelagem, ao Saulo, pelos ensinamentos e questionamentos, ao Bruno, pelos papos e esclarecimentos, e ao Thiago, pelo exemplo, teto e boa convivência.

A Tati, que me treinou no início e a Nayara e Érika pela ajuda e pela paciência de terem me acompanhado. Ao Dudu, Isadora e Gi pelo esforço na reta final. Aos demais alunos de IC: Ana, Bárbara, Larissa, Luiza, Isabela, Mário e Dimas, “o cara”, pelas altas.

Aos demais colegas do laboratório, Lucas e suas aventuras, Carol, Camila, Flávia, Mara, Rachelzinha e ao Andrei, que ainda nos faz rir.

A Raquel, pela amizade e por ajudar a manter o nosso laboratório funcionando e a Lavina, pela diversão e quitutes que não nos deixam emagrecer. Aos demais

AGRADECIMENTOS (Conclusão)

profissionais envolvidos no nosso dia-dia: Ayeska, Kênia, Eduardo, Ludmila e Soninha.

Ao prof. Armando, por lutar pela excelência do Programa de Pós-graduação.

Aos colaboradores do projeto que ajudaram a tornar moléculas em resultados.

Aos meus grandes amigos caóticos e do ES pelo apoio, companheirismo e válvula de escape. Ao Muse pela trilha sonora.

E a quem já voou para longe, mas bons ventos nunca a impedirão de retornar e fazer um novo fim.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

Ao Químico Farmacêutico cabe o papel de trabalhar como um cupido, possibilitando o encontro, e afortunadamente a união, de dois elementos, que ao acaso, talvez sequer teriam se encontrado. O fruto dessa união, nem sempre é alcançado com êxito, o que não significa que seu trabalho foi em vão, pelo contrário, além de todo aprendizado, fica o registro de que foi possível eliminar algumas dezenas, entre milhões de combinações possíveis, na incansável busca pelo alívio do próximo.

RESUMO

A tripanotiona redutase (TR) é uma enzima presente em tripanossomatídeos e está envolvida na redução da tripanotiona dissulfeto T[S]₂ em tripanotiona ditiol T[SH], etapa essencial para manutenção de um ambiente redutor nesses parasitos e de extrema importância para sua sobrevivência. Apesar da semelhança do sistema TR-T[S]₂ com o sistema glutationa redutase (GR)-glutationa presente nos seres humanos, a TR possui diferenças marcantes no seu sítio ativo que podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores seletivos. No presente trabalho foram planejados potenciais inibidores da TR utilizando o 2,5-bis-(4-aminometilfenil)furano, como protótipo. A obtenção dos compostos foi realizada pela condensação aldólica entre uma cicloalcanona e diversos aldeídos, permitindo assim a realização de estudos de relação estrutura-atividade. A seletividade dos compostos foi avaliada frente às enzimas TR e GR. Avaliou-se, também, a ação dos compostos contra formas amastigotas de *Trypanossoma cruzi*, promastigotas de *Leishmania amazonensis*, além da citotoxicidade considerando fibroblastos não infectados. No ensaio com *T. cruzi*, cinco compostos mostraram-se ativos e seis apresentaram atividade leishmanicida considerável. O diamino **13** se destacou por apresentar atividade leishmanicida significativa (CI₅₀ 13,7 µM), baixa citotoxicidade (CI₅₀ > 83,7 µM) e, ainda, ser capaz de inibir a atividade da TR (CI₅₀ 40,4 µM). Além de **13**, dois outros compostos (**1b** e **5b**) apresentaram uma boa correlação entre a inibição da TR e atividade leishmanicida. Entretanto, **1b** e **5b** foram citotóxicos para as células de fibroblastos de camundongos. Somente o derivado diazido **12** inibiu 50% da atividade da GR, demonstrando a considerável seletividade dessa classe de compostos. Paralelamente, estudos de ancoragem molecular foram realizados para avaliar o modo de interação dos ligantes com a TR. Dentre os compostos sintetizados, **13** e **7a** podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas e tripanocidas, respectivamente.

Palavras-chave: Tripanotiona redutase, bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas, ancoragem molecular.

ABSTRACT

Trypanothione reductase (TR) is an enzyme found in trypanosomatids, which is involved in the reduction of trypanothione disulfide T[S]₂ to the dithiol T[SH] and represents a key enzyme for the parasite antioxidant defense. Despite the similarity of the TR-T[S]₂ system with its analogue glutathione-glutathione reductase (GR), there are significant differences in the active sites of these two enzymes that can be exploited in the development of selective inhibitors. In the present work, a series of the bis-(arylmethylidene) cycloalkanones was designed as potential inhibitors of TR, taking the 2,5-bis(4-aminomethylphenyl)furan as lead compound. The compounds were synthesized by aldol condensation of cycloalkanones with a variety of aldehydes, in order to establish the relationship between structure and activity. The selectivity of the compounds was tested by determining their inhibitory activity against TR and GR. The activity of the compounds was evaluated against amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* and promastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. The cytotoxicity of the compounds to non-infected fibroblasts was also determined. Five compounds displayed activity against *T. cruzi* and six showed leishmanicidal activity. The diamine **13** exhibited significant anti-leishmanial activity (IC₅₀ 13.7 μM), low cytotoxicity (IC₅₀ > 83.7 μM) and was also able to inhibit the TR activity (IC₅₀ 40.4 μM). Besides compound **13**, two compounds (**1b** and **5b**) showed a good correlation between enzyme inhibition and anti-leishmanial activity. However, these compounds were cytotoxic to mouse fibroblast L929 cell line. Only the diazide derivative **12** was able to inhibit GR activity by about 50%, suggesting considerable selectivity for this class of compounds. Furthermore, docking studies were performed to investigate the mode of interaction of the ligands to the TR. Among the synthesized compounds, **13** and **7a** can be considered as lead candidates for the further development of new antiprotozoal agents against leishmaniasis and Chagas' disease, respectively.

Key-words: Trypanothione reductase, bis-(arylmethylidene) cycloalkanones, docking.

LISTA DE FIGURAS

1	Ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	24
2	Compostos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento das leishmanioses.....	25
3	Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	26
4	Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	26
5	Cascata enzimática da neutralização de espécies reativas de oxigênio em tripanossomatídeos.....	28
6	Estruturas da tripanotiona e glutaciona na forma de dissulfeto. É destacada a porção espermidina e as ramificações (I e II) na tripanotiona.....	29
7	Estrutura tridimensional da TR mostrando o domínio de ligação do FAD, o sítio de ligação da tripanotiona e a interface do dímero. O FAD é mostrado em amarelo, enquanto a tripanotiona é mostrada em roxo.....	31
8	Diagrama de superfície do sitio ativo da tripanotiona redutase proposto por Bond e colaboradores com potencial eletrostático.....	31
9	Síntese de novo da tripanotiona a partir (a) da espermidina e glutaciona e (b) pela redução da sua forma dissulfeto pela TR (b) (BOND <i>et al.</i> , 1999).....	34
10	Estrutura da mepacrina (i) e estrutura geral dos seus derivados sulfonamida (ii) e uréia (iii).....	34
11	Estruturas da fenotiazina (iv), da imipramina (v) e do composto vi, com destaques das porções originadas do anel fenotiazínico.....	35
12	Estrutura das substâncias vii, viii, ix e x.....	36
13	Equação da geração de ânions radicais superóxidos pela reação de substratos subversivos (X) com NADPH.....	37
14	Estrutura dos inibidores da TR Chinifur e o composto xi.....	37
15	Estrutura dos diarilfuranos xii e xiii.....	38
16	Estrutura geral das 3,4-di-hidroquinazolininas e xiv.....	39
17	Estrutura química das substâncias a serem sintetizadas.....	44
18	Montagem para geração de HCl _(g)	89
19	Esquema de síntese proposto por Abaee e colaboradores utilizando dietilamina (ABAEE <i>et al.</i> , 2009).....	94
20	Obtenção de 1a e 1c.....	95
21	Esquema de síntese proposto por Das e colaboradores utilizando I ₂ (DAS <i>et al.</i> , 2006).....	95

LISTA DE FIGURAS (Continuação)

22	Técnica utilizada na condensação aldólica para obtenção das substâncias 1-5 (HATHAWAY, 1987)	95
23	Mecanismo geral proposto para a reação de condensação aldólica em meio básico (COSTA, <i>et al.</i> , 2003).....	97
24	Obtenção de 3a e 3c	99
25	Estruturas de ressonância para o <i>p</i> -dimetilaminobenzaldeíd	99
26	Rota de síntese para a obtenção de 12	104
27	Mecanismo para reação de Wohl-Ziegler para bromação da posição benzílica (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).....	105
28	Mecanismo proposto para a formação de 10	106
29	Reação do aldeído 10 com o revelador 2,4-dinitrofenil-hidrazina	107
30	Reação para a obtenção de 12	108
31	Proposta mecanística simplificada para a reação tipo “click” entre uma azida orgânica e um alcino terminal utilizando Cu(I) como catalisador (FREITAS <i>et al.</i> , 2011).....	110
32	Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ¹ H de 13	111
33	Mecanismo proposto para a redução do grupo azido à amina utilizando trifenilfosfina (CLAYDEN <i>et al.</i> , 2001).....	112
34	Redução do derivado 11 com trifenisfosfina	113
35	Rota de síntese alternativa para a obtenção de 13, com a proteção do grupo amino	114
36	Formação de 20b e 20c	116
37	Metodologias utilizadas na obtenção de 22	116
38	Mecanismo proposto para a remoção do grupo <i>N</i> -Boc (ASHWORTH, COX e MEYRICK, 2010).....	117
39	Espectro de RMN de ¹ H de 13 obtido a partir de 22.....	140
40	Espectro de RMN de ¹³ C 13 e DEPT 135 obtido a partir de 22, pela remoção do grupo <i>N</i> -Boc	141
41	Sobreposição do substrato cristalográfico com as poses de <i>redocking</i> da tripanotona com 12 ligações rotacionáveis.....	147
42	Sobreposição do substrato cristalográfico com as poses de <i>redocking</i> da tripanotona com 10, 8 e 6 ligações rotacionáveis.....	147
43	Principais pontos de ancoragem visualizados no <i>docking</i> dos ligantes	148
44	Estrutura das substâncias 1-8, 13, 16 e 17	149

LISTA DE FIGURAS (Conclusão)

- 45 Principais resíduos hidrofóbicos de interação na região A. As conformações de menor energia encontrada no *docking* de 1a (azul claro) e 6a (verde) são mostradas como referência para os ligantes ancorados nessa região.....149
- 46 Conformações de menor energia encontradas no *docking* de 1a, 1b, 2b, 5a e 5b (sobrepostos) (A); 1c (B); 8a e 8b (C) e conformação de menor energia do 1º (em amarelo) e 2º (em laranja) *cluster* de 3c (D). Em todas as imagens a tripanotona é mostrada em roxo.....150
- 47 Conformações de menor energia encontradas no *docking* de 6a (A) e 7a (B)151
- 48 Resíduos hidrofóbicos na região B. A conformação de menor energia encontrada no *docking* de 2a é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região152
- 49 Conformações de menor energia de 3a (A), 2a (B – em verde) e 4 (B – em rosa)153
- 50 Resíduos hidrofóbicos da região C. A conformação de menor energia de 17 é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região153
- 51 Conformação de menor energia de 3b (A – em azul), do cluster mais populoso de 6a (A – em amarelo) e de menor energia do 1º, 3º e 5º *cluster* de 13 (B – em verde, amarelo e azul, respectivamente)154
- 52 Conformações de menor energia de 16 (em verde) e 17 (em laranja)155
- 53 Resíduos hidrofóbicos na região D. A conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de 6b é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região...155
- 54 Conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de 7a (A – em laranja), do *cluster* mais populoso de 7b (A – em amarelo) e de 6b (B – em ciano).....156
- 55 Resíduos hidrofóbicos próximos à conformação de menor energia encontrada para o ligante 6b156
- 56 Resíduos hidrofóbicos na região de atracamento dos ligantes protonados 3a, 3b e 13. Somente as conformações de menor energia do 1º *cluster* de 3b (em vermelho) e do *cluster* mais populoso de 13 (em verde) são mostrados157
- 57 Conformação de menor energia dos ligantes protonados 3b (A – em vermelho), 3a (A – em laranja) e conformação de menor energia do 1º *cluster* de 13 (B – em ciano) e do *cluster* mais populoso (C – em verde).....158
- 58 Valores de energia de ligações (em Kcal/mol) das conformações de menor energia dos ligantes, encontrados pelo AutoDock, em cada uma das regiões161
- 59 Superposição entre o xiii e 13. O derivado furânico xiii é mostrado em rosa e 13 em azul163

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A

A.1	Espectro no infravermelho de 1a.....	173
A.2	Espectro de RMN de ^1H de 1a (200 MHz, CDCl_3).....	173
A.3	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1a (50 MHz, CDCl_3).....	174
A.4	Espectro no infravermelho de 1c.....	174
A.5	Espectro de RMN de ^1H de 1c (200 MHz, DMSO-d_6).....	175
A.6	Mapa de contornos COSY de 1c (200 MHz, DMSO-d_6).....	175
A.7	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1c (50 MHz, DMSO-d_6).....	176
A.8	Espectro no infravermelho de 1b.....	176
A.9	Espectro de RMN de ^1H de 1b (200 MHz, CDCl_3).....	177
A.10	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1b (50 MHz, CDCl_3).....	177
A.11	Espectro no infravermelho de 2a.....	178
A.12	Espectro de RMN de ^1H de 2a (200 MHz, CDCl_3).....	178
A.13	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2a (50 MHz, CDCl_3).....	179
A.14	Espectro no infravermelho de 2b.....	179
A.15	Espectro de RMN de ^1H de 2b (200 MHz, CDCl_3).....	180
A.16	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2b (50 MHz, CDCl_3).....	180
A.17	Espectro no infravermelho de 3a.....	181
A.18	Espectro de RMN de ^1H de 3a (200 MHz, CDCl_3).....	181
A.19	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3a (50 MHz, CDCl_3).....	182
A.20	Espectro no infravermelho de 3c.....	182
A.21	Espectro de RMN de ^1H de 3c (200 MHz, CDCl_3).....	183
A.22	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3c (50 MHz, CDCl_3).....	183
A.23	Espectro no infravermelho de 3b.....	184
A.24	Espectro de RMN de ^1H de 3b (200 MHz, CDCl_3).....	184
A.25	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3b (50 MHz, CDCl_3).....	185
A.26	Espectro no infravermelho de 4.....	185
A.27	Espectro de RMN de ^1H de 4 (200 MHz, CDCl_3).....	186
A.28	Espectro no infravermelho de 5a.....	186
A.29	Espectro de RMN de ^1H de 5a (200 MHz, CDCl_3).....	187
A.30	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5a (50 MHz, CDCl_3).....	187
A.31	Espectro no infravermelho de 5b.....	188

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Continuação)

A.32	Espectro de RMN de ^1H de 5b (200 MHz, CDCl_3).....	188
A.33	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5b (50 MHz, CDCl_3).....	189
A.34	Espectro no infravermelho de 6a	189
A.35	Espectro de RMN de ^1H de 6a (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$).....	190
A.36	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 6a (50 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$).....	190
A.37	Espectro no infravermelho de 6b	191
A.38	Espectro de RMN de ^1H de 6b (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$).....	191
A.39	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 6b (50 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$)	192
A.40	Espectro no infravermelho de 7a	192
A.41	Espectro de RMN de ^1H de 7a (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$)	193
A.42	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 7a (50 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$).....	193
A.43	Espectro no infravermelho de 7b	194
A.44	Espectro de RMN de ^1H de 7b (200 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$).....	194
A.45	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 7b (50 MHz, $\text{DMSO-d}_6+\text{TFA}$)	195
A.46	Espectro no infravermelho de 8a	195
A.47	Espectro de RMN de ^1H de 8a (200 MHz, piridina- d_5)	196
A.48	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 8a (50 MHz, piridina- d_5).....	196
A.49	Espectro no infravermelho de 8b	197
A.50	Espectro de RMN de ^1H de 8b (200 MHz, DMSO-d_6)	197
A.51	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 8b (50 MHz, DMSO-d_6).....	198
A.52	Espectro no infravermelho de 9	198
A.53	Espectro de RMN de ^1H de 9 (200 MHz, CDCl_3).....	199
A.54	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 9 (50 MHz, CDCl_3)	199
A.55	Espectro no infravermelho de 10	200
A.56	Espectro de RMN de ^1H de 10 (200 MHz, CDCl_3).....	200
A.57	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 10 (50 MHz, CDCl_3)	201
A.58	Espectro no infravermelho de 11	201
A.59	Espectro de RMN de ^1H de 11 (200 MHz, CDCl_3).....	202
A.60	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 11 (50 MHz, CDCl_3)	202
A.61	Espectro no infravermelho de 11b	203
A.62	Espectro de RMN de ^1H de 11b (200 MHz, CDCl_3).....	203

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Continuação)

A.63	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 11b (50 MHz, CDCl_3)	204
A.64	Espectro no infravermelho de 12	204
A.65	Espectro de RMN de ^1H de 12 (200 MHz, CDCl_3)	205
A.66	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 12 (50 MHz, CDCl_3)	205
A.67	Espectro no infravermelho de 13	206
A.68	Espectro no infravermelho de 14	206
A.69	Espectro de RMN de ^1H de 14 (200 MHz, CDCl_3)	207
A.70	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 14 (50 MHz, CDCl_3)	207
A.71	Espectro no infravermelho de 15	208
A.72	Espectro de RMN de ^1H de 15 (200 MHz, CDCl_3)	208
A.73	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 15 (50 MHz, CDCl_3)	209
A.74	Espectro no infravermelho de 16	209
A.75	Espectro de RMN de ^1H de 16 (200 MHz, CDCl_3)	210
A.76	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 16 (50 MHz, CDCl_3)	210
A.77	Espectro no infravermelho de 17	211
A.78	Espectro no infravermelho de 18	211
A.79	Espectro de RMN de ^1H de 18 (200 MHz, CDCl_3)	212
A.80	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 18 (50 MHz, CDCl_3)	212
A.81	Espectro no infravermelho de 19	213
A.82	Espectro no infravermelho de 20	213
A.83	Espectro de RMN de ^1H de 20 (200 MHz, CDCl_3)	214
A.84	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20 (50 MHz, CDCl_3)	214
A.85	Espectro no infravermelho de 20b	215
A.86	Espectro de RMN de ^1H de 20b (200 MHz, CDCl_3)	215
A.87	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20b (50 MHz, CDCl_3)	216
A.88	Espectro no infravermelho de 20c	216
A.89	Espectro de RMN de ^1H de 20c (200 MHz, DMSO-d_6)	217
A.90	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20c (50 MHz, DMSO-d_6)	217
A.91	Espectro no infravermelho de 21	218
A.92	Espectro de RMN de ^1H de 21 (200 MHz, CDCl_3)	218
A.93	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 21 (50 MHz, CDCl_3)	219

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (Conclusão)

A.94	Espectro no infravermelho de 22	219
A.95	Espectro de RMN de ^1H de 22 (200 MHz, CDCl_3).....	220
A.96	Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 21 (50 MHz, CDCl_3)	220

LISTA DE TABELAS

1	Condições reacionais empregadas na síntese das substâncias 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 5a e 5b	98
2	Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos produtos 1-5	119
3	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 1-5	120
4	Dados do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 1-5	122
5	Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos produtos 6-7	124
6	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 6a e 6b	125
7	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 7a e 7b	125
8	Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 6-7	126
9	Comparação entre as principais bandas no espectro no IV dos produtos 8a e 8b	127
10	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 8a e 8b	127
11	Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 8a e 8b	128
12	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 9, 10 e 11	130
13	Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 9, 10 e 11	131
14	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 14 e 16	134
15	Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 18, 20 e 21	137
16	Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 18, 20 e 21	138
17	Dados obtidos nos ensaios biológicos com os compostos sintetizados	142
18	RMSD dos ligantes de <i>redocking</i> em relação a tripanotona cristalográfica.....	146
19	Comparação entre o ΔG e K_i calculados pelo AutoDock e os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos, na concentração de 100 μM	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Algoritmo genético
AGL	Algoritmo genético Lamarckiano
Ala	Alanina
Arg	Arginina
arom.	Aromático
Asn	Asparagina
assim.	Assimétrico
Boc	<i>tert</i> -butóxi-carbonila
(Boc) ₂ O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butila
CI ₅₀	Concentração de um inibidor requerida para inibir a atividade de uma enzima em 50%
CCD	Cromatografia de camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
CPRGA	Vermelho de clorofenil-β-D-galactopiranosídeo
Cys	Cisteína
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DIBAL-H	Hidreto de diisobutilalumínio
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FF	Faixa de Fusão
FM	Fórmula molecular
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GR	Glutaciona redutase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Continuação)

GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa dissulfeto
HBA	<i>Hydrogen bond acceptor</i>
HBD	<i>Hydrogen bond donor</i>
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IV	Infravermelho
Leu	Leucina
lit.	Literatura
Lys	Lisina
m	Mutipleto
Met	Metionina
MM	Massa molar
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.	Página
p/v	Peso por volume
Pd/C	Paládio 5% (p/p) em carvão ativado
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
pKa	Constante de dissociação ácida
ppm	Partes por milhão
Pro	Prolina
q	Quarteto
qt	Quinteto
Rend.	Rendimento
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (Conclusão)

s	Simpleto
Ser	Serina
sim.	Simétrico
sl	Sinal largo
S _N 1	Substituição nucleofílica unimolecular
S _N 2	Substituição nucleofílica bimolecular
Subst.	Substâncias
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
T[S] ₂	Tripanotiona dissulfeto
T[SH] ₂	Tripanotiona ditiol
Temp.	Temperatura
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetraidrofurano
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
TNB	2-nitro-5-tiobenzoato
TR	Tripanotiona redutase
Trp	Triptofano
TXN	Triparedoxina
TXPNx	Triparedoxina peroxidase
Tyr	Tirosina
v/v	Volume por volume
Val	Valina

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
J	Constante de acoplamiento escalar
K_i	Constante de inibição
δ	Deslocamento químico
ΔG	Energia libre de Gibbs
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
$\bar{\nu}$	Número de onda
™	<i>Trademark</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Tripanotona redutase como alvo molecular na busca de novos fármacos	27
1.2	Uso de ferramentas computacionais no desenvolvimento de fármacos ..	39
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	46
4	PLANO DE SÍNTESE	47
5	MATERIAIS E MÉTODOS	49
5.1	Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)cicloalcanonas 2a, 2b, 5a	50
5.2	Síntese de 2,5-dibenzilideno-ciclopentanona (1a)	51
5.3	Síntese de 2,6-dibenzilideno-cicloexanona (1b)	53
5.4	Síntese de 2,5-bis-(4-metil-benzilideno)-ciclopentanona (2a)	54
5.5	Síntese de 2,6-bis-(4-metil-benzilideno)-cicloexanona (2b)	55
5.6	Síntese de 2,5-bis-(4-(dimetilamino)benzilideno)-ciclopentanona (3a)	56
5.7	Síntese de 2,6-bis-(4-(dimetilamino)benzilideno)-cicloexanona (3b)	59
5.8	Síntese de 2,5-bis-(4-nitro-benzilideno)-ciclopentanona (4)	60
5.9	Síntese de 2,5-bis-(piridin-4-ilmetilideno)-ciclopentanona (5a)	61
5.10	Síntese de 2,6-bis-(piridin-4-ilmetilideno)-cicloexanona (5b)	62
5.11	Síntese de 2,5-bis-(quinolin-4-ilmetilideno)-ciclopentanona (6a)	63
5.12	Síntese de 2,6-bis-(quinolin-4-ilmetilideno)-cicloexanona (6b)	64
5.13	Síntese de 2,5-bis-(isoquinolin-5-ilmetilideno)-ciclopentanona (7a)	65
5.14	Síntese de 2,6-bis-(isoquinolin-5-ilmetilideno)-cicloexanona (7b)	66
5.15	Síntese de 2,5-bis((1<i>H</i>-pirrol-2-il)metilideno)-ciclopentanona (8a)	67
5.16	Síntese de 2,6-bis((1<i>H</i>-pirrol-2-il)metilideno)-cicloexanona (8b)	68
5.17	Síntese da 4-(bromometil)benzonitrila (9)	69
5.18	Síntese do 4-(bromometil)benzaldeído (10)	70
5.19	Síntese de 4-(azidometil)benzaldeído (11)	71
5.20	Síntese de 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (12)	74
5.21	Síntese de 4-((4-(2-hidroxietil)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzaldeído (14)	75

SUMÁRIO (Continuação)

5.22	Síntese de 4-((4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil)benzaldeído (15)	76
5.23	Síntese de 2,5-bis(4-((4-(2-hidroxietil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil)benzilideno)ciclopentanona (16)	77
5.24	Síntese de 2,5-bis-(4-((4-fenil-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)metil)benzilideno)-ciclopentanona (17)	78
5.25	Síntese de 4-(azidometil)benzocianidra (18)	79
5.26	Síntese de 4-(aminometil)benzocianidra (19)	80
5.27	Síntese de <i>tert</i> -butil-(4-cianobenzil)carbamato (20)	81
5.28	Síntese de <i>tert</i> -butil (4-formilbenzil)carbamato (21)	84
5.29	Síntese de 2,5-bis-(4- <i>N-tert</i> -butoxicarbonilaminometilbenzilideno)-ciclopentanona (22)	86
5.30	Síntese de 2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona	88
5.31	Ensaio biológico	90
5.31.1	<u>Ensaio in vitro com enzima tripanotona redutase e glutatona redutase</u>	90
5.31.2	<u>Ensaio in vitro com <i>Trypanosoma cruzi</i></u>	91
5.31.3	<u>Ensaio in vitro com <i>Leishmania amazonensis</i></u>	92
5.32	Estudos de ancoragem molecular	92
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
6.1	Síntese	94
6.1.1	<u>Síntese das bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 5a e 5b</u>	94
6.1.2	<u>Síntese de 2,5-bis-(4-nitro-benzilideno)-ciclopentanona (4)</u>	100
6.1.3	<u>Síntese das bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 6a, 6b, 7a e 7b</u>	101
6.1.4	<u>Síntese das bis((1<i>H</i>-pirrol-2-il)metileno)-cicloalcanonas 8a e 8b</u>	102
6.1.5	<u>Síntese de 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (12)</u>	103
6.1.6	<u>Síntese derivados triazólicos 16 e 17</u>	109
6.1.7	<u>Síntese de 2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona (13)</u>	111
6.2	Caracterização dos compostos sintetizados	118
6.2.1	<u>Bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, 3b, 5a e 5b</u>	118
6.2.2	<u>Bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 6a, 6b, 7a e 7b</u>	124

SUMÁRIO (Conclusão)

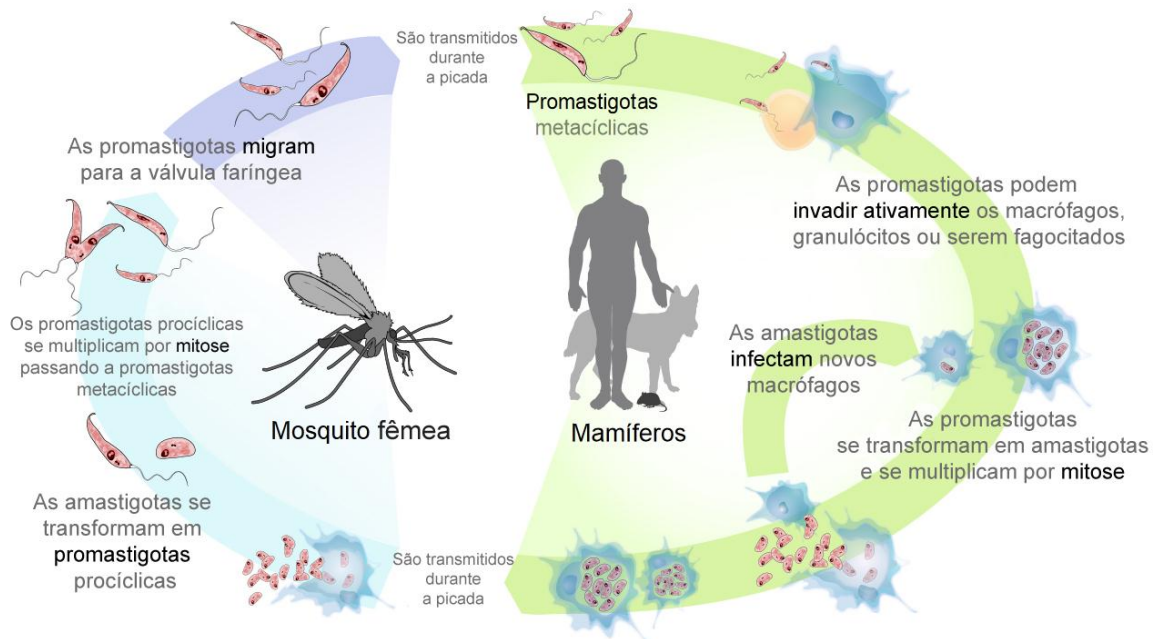
6.2.3	<u>Bis((1<i>H</i>-pirrol-2-il)metileno)-cicloalcanonas 8a e 8b</u>	126
6.2.4	<u>2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (12)</u>	128
6.2.5	<u>Derivados triazólicos 16 e 17</u>	133
6.2.6	<u>2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona (13)</u>	135
6.3	Ensaio biológico	141
6.4	Estudo de ancoragem molecular	145
7	CONCLUSÃO	164
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	166
	APÊNDICE A.....	173

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a doença de Chagas e as Leishmanioses fazem parte das doenças endêmicas parasitárias reconhecidas como prioritárias pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e representam grave problema de saúde pública, afetando vários países da América Latina, principalmente o Brasil. Em relação à doença de Chagas, estima-se que mais de 150 milhões de pessoas vivam em regiões de risco de infecção e, destas, 12-14 milhões podem estar infectadas pelo *T. cruzi* (OMS, 2010). O número de pessoas que vivem em regiões de risco de infecção por *Leishmania sp.* é ainda mais alarmante: 350 milhões (DESJEUX, 2001). Estima-se que, anualmente, 1,5 milhão de pessoas adquiram leishmaniose cutânea e 500.000 leishmaniose visceral. As estatísticas, ainda, apontam para uma tendência de crescimento desses números, em parte justificado pelo desenvolvimento não-planejado ou mal estruturado das áreas suburbanas desses países (DESJEUX, 2004).

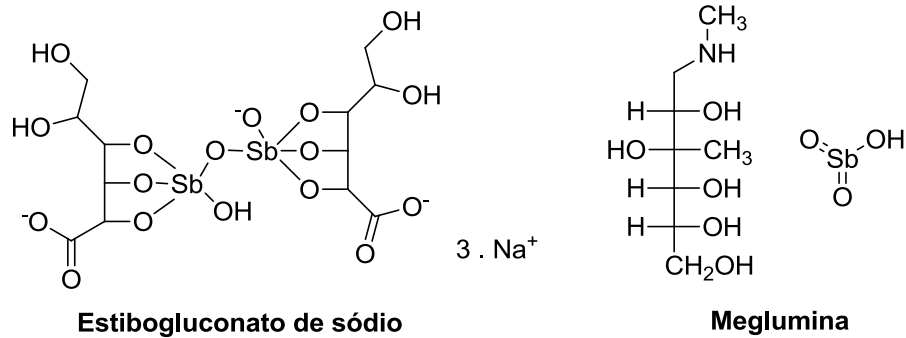
A leishmaniose é transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos infectados por *Leishmania sp.* Durante a picada do inseto são transmitidas formas promastigotas do parasito que invadem células fagocitárias, se transformando em amastigotas e se multiplicando. As amastigotas deixam as células infectadas, causando destruição das mesmas e podendo, então, infectar novas células ou serem transmitidas ao mosquito durante uma picada. No mosquito, as amastigotas se transformam em promastigotas, se multiplicam e migram para a válvula faríngea do inseto, podendo ser liberadas na corrente sanguínea de mamíferos durante a picada (**Figura 1**).

Figura 1 – Ciclo de vida da *Leishmania sp.*



Os compostos antimoniais pentavalentes (Sb^V), estibogluconato de sódio (PentostamTM) e antimoniato de meglumina (GlucantimeTM), vêm sendo utilizados como fármaco de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (**Figura 2**). Este regime apresenta taxas de cura de aproximadamente 90% (GREVELINK e LERNER, 1996; WORTMANN *et al.*, 2002), embora evidências recentes demonstrem uma eficácia variável, dependendo das espécies, região geográfica, presença de cepas resistentes e esquema terapêutico (CROFT e COOMBS, 2003; ROMERO *et al.*, 2001). Além disso, vários fatores limitam a utilidade desses fármacos, a saber: necessidade de administração parenteral durante um período longo, alta incidência de reações adversas tais como mialgia, artralgia, febre e urticária associada à toxicidade hepática, renal e cardíaca.

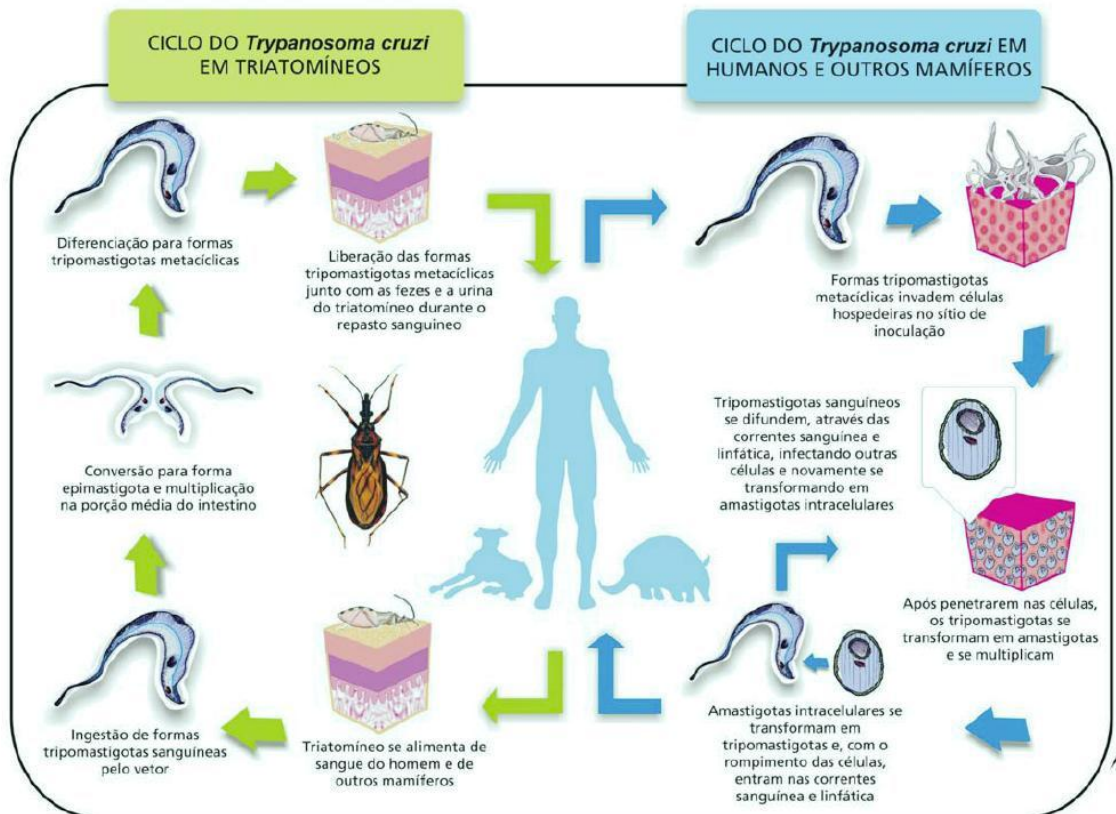
Figura 2 – Compostos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento das leishmanioses.



Quando os pacientes não respondem aos antimoniais pentavalentes, fármacos alternativos podem ser empregados, tais como anfotericina B, pentamidina, cetoconazol, itraconazol e paromomicina (BARRAL-NETO, MACHADO e BARRAL, 1995).

O contágio pelo *Trypanossoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, se dá pelo contato com fezes e urina contaminadas do triatomíneo, como o barbeiro, pois o inseto defeca enquanto suga o sangue. No contágio há liberação das formas tripomastigotas que invadem as células hospedeiras, diferenciando-se em amastigotas, capazes de se multiplicar. As amastigotas se transformam em tripomastigotas podendo infectar novas células. No vetor as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas para se multiplicarem e se diferenciarem novamente na forma infectante tripomastigota (**Figura 3**).

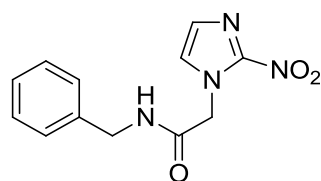
Figura 3 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



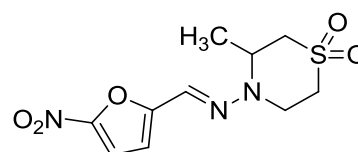
Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Em relação à quimioterapia da doença de Chagas, o cenário também representa um desafio a ser superado. Atualmente, apenas dois fármacos nitroaromáticos, o nifurtimox, comercializado como nome de Lampit® e o benznidazol, comercializado com o nome de Rochagan®, são usados, sendo que no Brasil só está disponível o benznidazol (**Figura 4**). Apesar de ter sido um avanço para o tratamento da doença de Chagas, o nifurtimox e o benznidazol estão longe de serem considerados fármacos ideais, devido aos efeitos colaterais provocados e à ineficácia na fase crônica da doença (URBINA, 1999).

Figura 4 – Fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.



Benznidazol



Nifurtimox

Assim sendo, os fármacos atualmente considerados como primeira escolha no tratamento das Leishmanioses e Doença de Chagas estão longe de serem satisfatórios e a busca de novos fármacos mais efetivos e seletivos é de extrema importância.

De um modo geral, o desenvolvimento de uma quimioterapia antiparasitária ocorre: (i) pelo isolamento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular, (ii) pela investigação de fármacos já aprovados para o tratamento de outras doenças, uma vez que eles já foram submetidos a ensaios clínicos muito dispendiosos, ou, (iii) por meio da determinação de alvo(s) específico(s) identificado(s) em vias metabólicas chave para o parasito (FRIES e FAIRLAMB, 2003).

Agentes terapêuticos podem ter diversas biomacromoléculas como alvo de ação, tais como polissacarídeos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas. No entanto, calcula-se que inibidores de proteínas, sobretudo enzimas, totalizem cerca de 47% dos fármacos de interesse comercial com alvo molecular definido (CAPRILES *et al.*, 2010).

Diversas estruturas de enzimas de *T. cruzi*, tais como a 2,4-dienoil-CoA redutase e a triacilglicerol lipase, foram descobertas por técnica de modelagem comparativa e, com maiores estudos, sobretudo sobre seu papel fisiológico, essas enzimas podem ser futuramente reconhecidas como potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos no combate ao *T. cruzi* (CAPRILES *et al.*, 2010).

A tripanotiona redutase (TR) representa um alvo molecular validado, presente nos tripanossomatídeos e, portanto, o planejamento de inibidores dessa enzima é uma alternativa relevante na busca por novos fármacos tripanocidas e leishmanicidas.

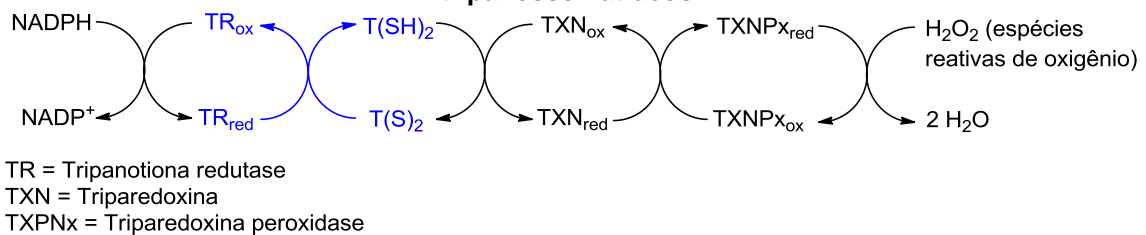
1.1 Tripanotiona redutase como alvo molecular na busca de novos fármacos

A tripanotiona redutase é uma enzima encontrada nos protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, causadores de doenças severas em humanos como a doença do sono (*T. brucei gambiense* e *T. brucei rhodiensei*), doença de Chagas (*T. cruzi*) e várias formas de leishmanioses (*Leishmania braziliensis* e

Leishmania amazonensis), e exerce um papel fundamental no combate ao estresse oxidativo, regenerando o principal antioxidante presente nesses protozoários, a tripanotiona (GALARRETA *et al.*, 2008).

É sabido que tripanossomas são sensíveis ao estresse oxidativo, provavelmente pela ausência de uma glutatona peroxidase. Uma cascata enzimática dependente de tripanotiona foi elucidada e a ela atribuída a capacidade dos tripanossomatídeos de tolerar baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. Essa cascata é formada pela tripanotiona ($T[SH]_2$), tripanotiona redutase (TR), triparedoxina (TXN) e triparedoxina peroxidase (TXPNx) (**Figura 5**). A TXPNx é capaz de reduzir peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos orgânicos em uma taxa razoável, porém glutatona peroxidases reagem 10-100 vezes mais rápido. Essa relativamente baixa atividade da TXPNx pode ser compensada por altas concentrações da enzima nas células (6% do total das proteínas solúveis em *Crithidia fasciculata*) e essa tendência foi encontrada também em *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* e *L. donovani*, indicando um sistema comum nos tripanossomatídeos para a neutralização de hidroperóxidos (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002).

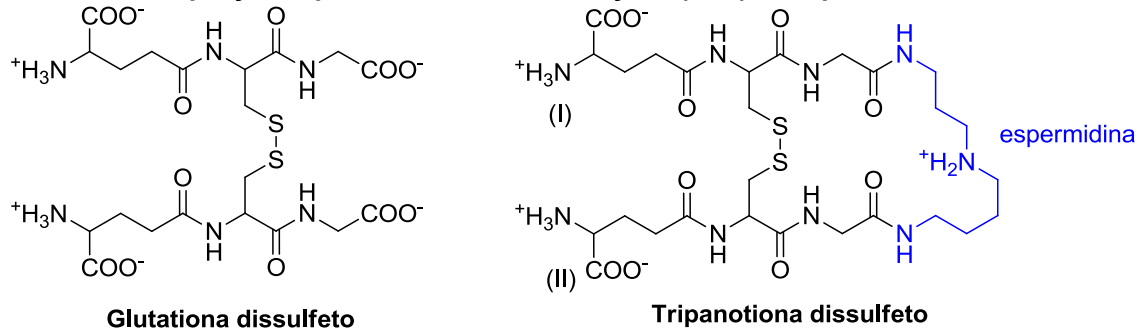
Figura 5 – Cascata enzimática da neutralização de espécies reativas de oxigênio em tripanossomatídeos.



O tripeptídeo glutatona (L - γ -glutamil- L -cisteinilglicina) (**Figura 6**) é responsável por manter o ambiente redox nas células. A forma ditiol da glutatona (GSH) tem o potencial de reagir com espécies radicalares e oxidantes, prejudiciais para as células, originando a glutatona dissulfeto (GSSG). A enzima glutatona redutase (GR), presente no homem, tem como papel reduzir a forma dissulfeto à forma ditiol, regenerando assim a glutatona e garantindo que um nível adequado de GSH seja mantido. Tripanossomatídeos possuem baixos níveis de glutatona, porém, não possuem a enzima GR e, portanto dependem de outro sistema protetor, utilizando, no lugar da glutatona, adutos de poliamina-glutatona como a glutationilespermidina,

a homotripanotiona e a tripanotiona (**Figura 6**). Similarmente a GR, a enzima tripanotiona redutase (TR), descoberta em 1985 por Fairlamb, é responsável pela redução da tripanotiona em sua forma dissulfeto (T[S]₂) para a forma ditiol, dihidrotripanotiona (T[SH]₂) que pode regenerar a GSH por meio de uma troca tiol-dissulfeto com a GSSG (BOND *et al.*, 1999). Além disso, é sabido que a tripanotiona ditiol reage mais rápido que a glutatona, pois, além de ser mais reativo, ditióis são cineticamente superiores a monotióis como redutores de dissulfetos (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002).

Figura 6 – Estruturas da tripanotiona e glutatona na forma de dissulfeto. É destacada a porção espermidina e as ramificações (I e II) na tripanotiona.



Foi demonstrado por Dumas e colaboradores a importância da presença da tripanotiona redutase para a sobrevivência dos tripanossomatídeos. Desativando um dos alelos que codifica a enzima obtiveram-se células com diminuição da atividade enzimática em 56% em relação às células com o alelo selvagem, o que resultou numa diminuição para 20% de macrófagos infectados por *L. donovani* e 6% do número de parasitos por macrófagos. Esse resultado não foi observado usando uma linhagem de macrófagos de murinos incapazes de produzir ânions superóxidos (DUMAS *et al.*, 1997).

No trabalho de Tovar e colaboradores foi demonstrado que um *downregulation* para 15% da tripanotiona redutase em *L. donovani* ocasionou uma diminuição para 20% na taxa de redução da tripanotiona dissulfeto, no entanto as concentrações do ditiol foram mantidas (TOVAR *et al.*, 1998). Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a síntese *de novo* de tripanotiona ditiol e níveis residuais de tripanotiona redutase são capazes de manter o nível de ditióis na célula dos parasitos (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002).

Similarmente, Krieger e colaboradores verificaram o papel vital da tripanotiona redutase com base em um trabalho envolvendo sua expressão gênica e observaram que *T. brucei* com 10% da atividade de TR em relação às células selvagens foram incapazes de crescer, apesar dos níveis de tripanotiona (T[SH]₂) e tióis terem permanecido constantes. Foi constatada também uma redução na DL₅₀ de H₂O₂ de 223 µM nas células selvagem para 3,5 µM nas células mutantes, mostrando a sensibilidade do parasito com baixa atividade de TR, quando sob estresse oxidativo (KRIEGER *et al.*, 2000).

Tanto a TR quanto a GR são enzimas homodiméricas, formadas por subunidades com massa de 52-54 kDa, compartilhando cerca de 30% da sequência de aminoácidos. Essas enzimas são dissulfeto oxidoredutases contendo flavina, NADPH-dependentes. Bond e colaboradores determinaram a estrutura, por cristalografia de raios-X, da TR de *T. cruzi* com 2.3 Å de resolução e da TR complexada com o substrato fisiológico T[S]₂ com 2.4 Å, permitindo elucidar o modo de interação entre as duas moléculas e explicar como TR e GR conseguem diferenciar entre seus substratos (BOND *et al.*, 1999).

A estrutura da TR, localização dos domínios de ligação dos cofatores e sítio de ligação do substrato são ilustrados na **Figura 7**. Cada subunidade do dímero possui um domínio de ligação para o FAD, para o NADPH e a interface do dímero, responsável pela junção das duas subunidades. O sítio de ligação do substrato possui dimensões aproximadas de 15x15x20 Å e é composto por resíduos do domínio de ligação do FAD e o domínio de interface da subunidade vizinha, a saber: resíduos 15-22, 53-62, 103-114 e 335-343 de uma subunidade e resíduos 396'-399' e 461'-470' da outra subunidade (**Figura 8**). Os resíduos responsáveis pela catálise são Cys53, Cys58 e o resíduo básico His461'. Não há grandes mudanças conformacionais da estrutura após a ligação do substrato, fato observado pela comparação das estruturas cristalográficas (BOND *et al.*, 1999).

Figura 7 – Estrutura tridimensional da TR mostrando o domínio de ligação do FAD, o sítio de ligação da tripanotona e a interface do dímero. O FAD é mostrado em amarelo, enquanto a tripanotona é mostrada em roxo.

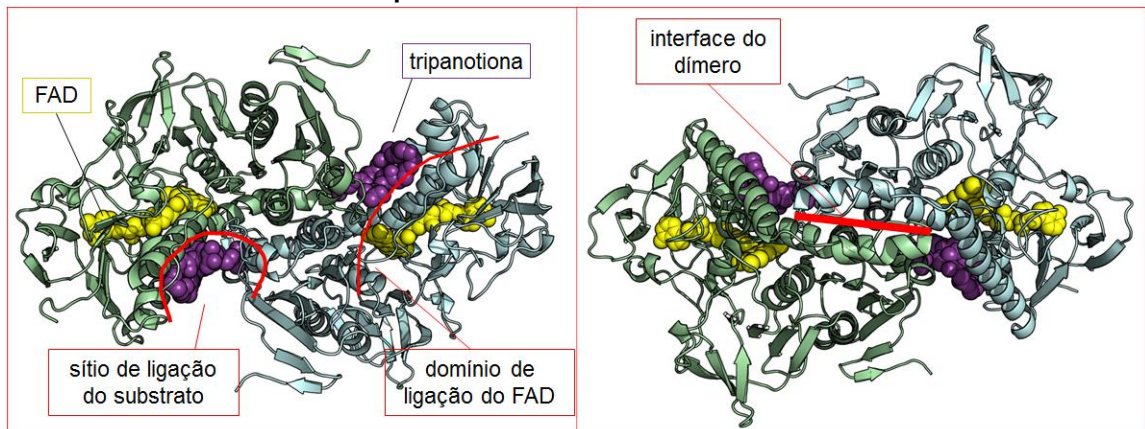
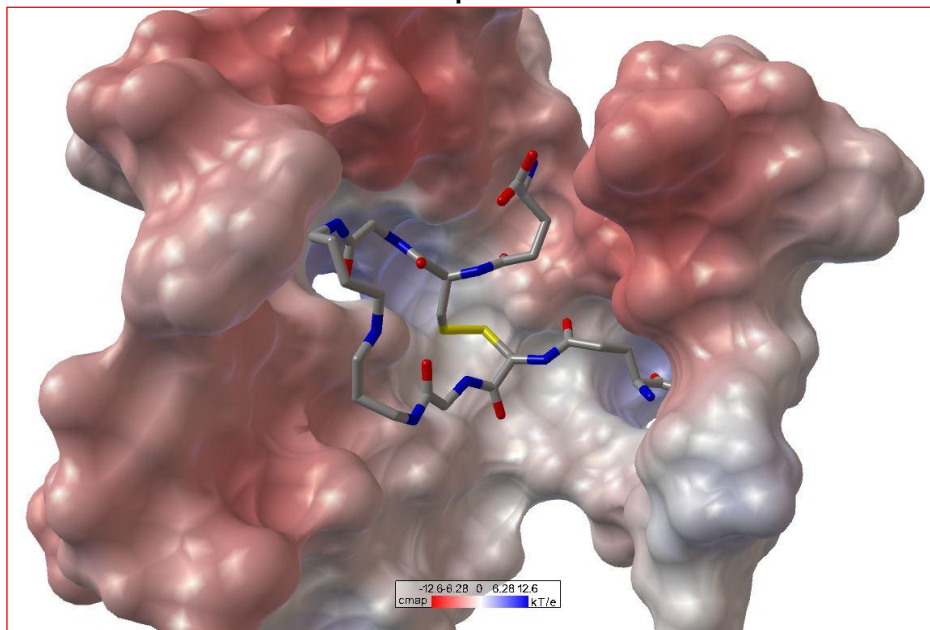


Figura 8 - Diagrama de superfície do sítio ativo da tripanotona redutase proposto por Bond e colaboradores com potencial eletrostático.



Na ligação da tripanotona com a TR, 25 resíduos de aminoácidos estão envolvidos por ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Os resíduos responsáveis pelas ligações de hidrogênio são o Glu19 e o Tyr111 e, aparentemente, Ser15 mediado por solvente. A ligação da porção espermidina da tripanotona à TR é mediada por interações de van der Waals e interações do tipo cátion- π com a cadeia lateral dos resíduos Leu18, Trp22, Tyr111 e Met114, formando uma linha de resíduos hidrofóbicos no interior do sítio da enzima. A área acessível ao solvente foi calculada para a T[S]₂ isolada e ligada com a TR, revelando que 87% do substrato é encoberto quando o complexo é formado o que, em termos energéticos,

corresponde a um componente hidrofóbico na energia de ligação de 85 kJ mol^{-1} (BOND *et al.*, 1999).

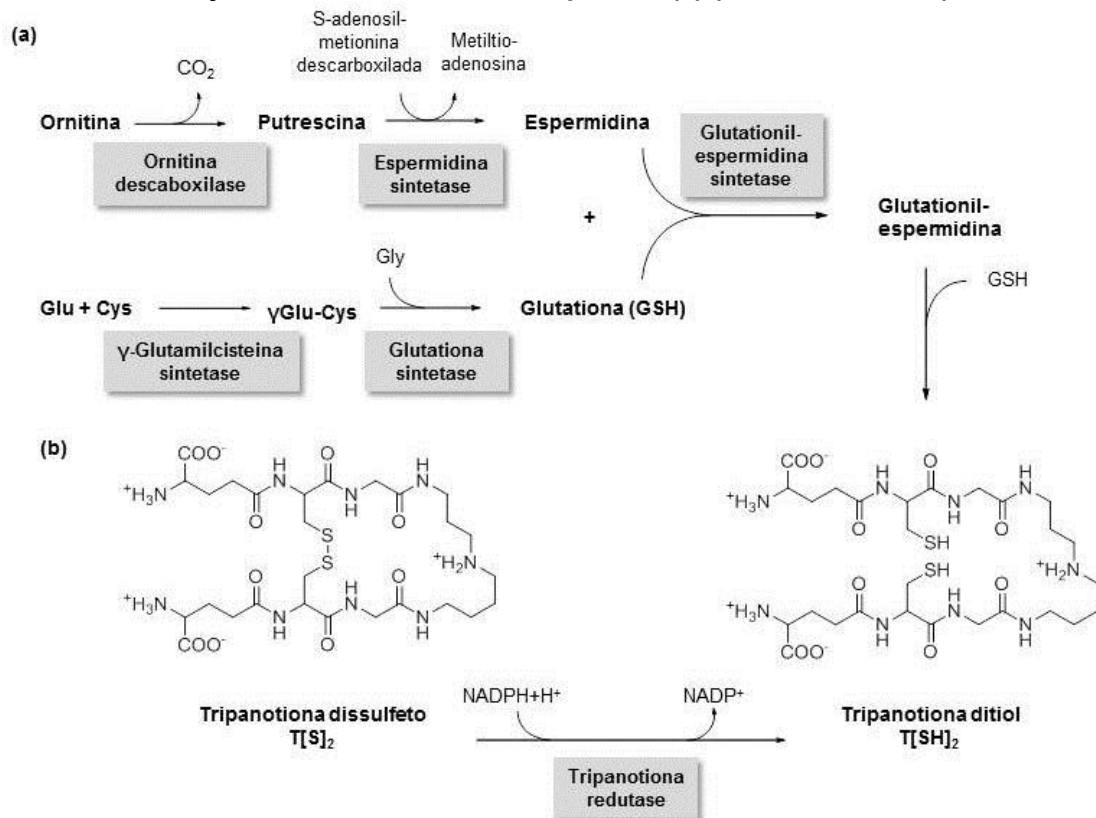
A GSSG se liga a GR de maneira similar a T[S]_2 na TR. Enquanto uma cadeia peptídica adota uma conformação em U, a outra se estende no sítio da enzima. Uma das grandes diferenças entre os dois sítios de ligação é o conjunto de argininas encontrado na GR, formado pelos resíduos Arg37, Arg38 e Arg347, que tornam o sítio carregado positivamente, propício para a interação com a GSSG, que possui carga formal de -2 em pH fisiológico. Os resíduos Arg37 e Arg347 formam interações eletrostáticas importantes com os carboxilatos presentes na GSSG, assim como o resíduo Asn117, mediado por solvente. Este fato, somado ao fator estérico (T[S]_2 possui sete grupos metilênicos na porção espermidina e carga formal de +1 em pH fisiológico), tornam TR e GR mutuamente exclusivas, no que diz respeito ao seus substratos. A diferença na orientação nos domínios da GR e TR faz com que a TR tenha um sítio mais largo que a GR, com tamanho adequado para acomodar o seu substrato. Portanto, a tripanotiona é muito grande para encaixar perfeitamente no sítio da GR. Entre os 19 aminoácidos envolvidos na ligação da GSSG ao sítio da GR, 14 são idênticos ou homólogos na TR e grande parte deles está envolvida com a catálise e a interação com a parte peptídica, comum aos 2 substratos. Uma exceção é o resíduo Arg347 que interage com a γGlu no complexo GR-GSSG e na TR é substituído pelo resíduo Ala343, resultando na perda de uma interação eletrostática, dando maior liberdade à porção γGlu de uma das ramificações da T[S]_2 . As demais diferenças na interação da GSSG estão relacionadas aos resíduos Ala34, Arg37, Ile113 e Asn117 que na TR de *T. cruzi* correspondem, respectivamente, a Glu19, Trp22, Ser110 e Met114 e estão situados em um lado no sítio ativo, indicando que a discriminação dos substratos ocorre principalmente por essa porção, pois essas substituições tornam o sítio estreito, carregado positivamente e hidrofílico na GR, enquanto o sítio na TR é mais largo e contém uma superfície de resíduos hidrofóbicos adjacentes ao resíduo negativo Glu19 (BOND *et al.*, 1999).

A tripanotiona também está envolvida em outras funções celulares, como a síntese de desoxirribonucleotídeos, regeneração de ascorbato, conjugação e sequestro de metais e fármacos (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002).

A tripanotiona tem como precursores o tripeptídeo glutationa e a poliamina espermidina. A primeira etapa na biossíntese da glutationa consiste na formação do dipeptídeo γ -glutamilcisteína pela união dos aminoácidos L-Cys e L-Glu, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase. Estudos com um inibidor dessa enzima, butionina sulfoximina (BSO), mostraram que sua inibição levou a um esgotamento de glutationa no parasito e cura parcial de ratos infectados com *T. brucei*. A etapa subsequente da síntese da glutationa consiste na formação de uma ligação entre a L-Gly e a γ -glutamilcisteína, catalisada pela enzima glutationa sintetase (**Figura 9**). No entanto, esta enzima ainda não foi caracterizada em nenhum tripanossomatídeo (BOND *et al.*, 1999).

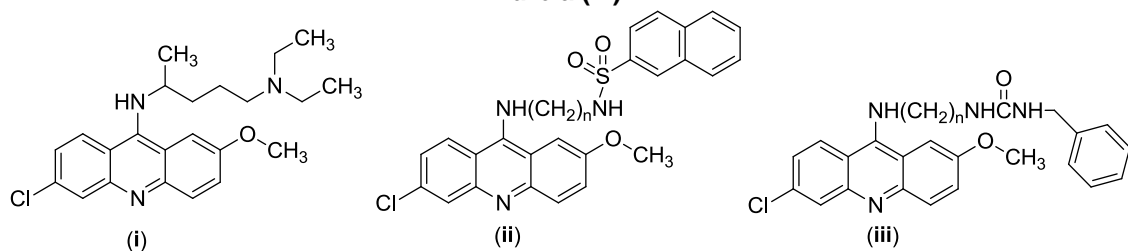
A síntese da espermidina, molécula precursora da tripanotiona, difere entre tripanossomatídeos. Na *Leishmania*, a espermidina é sintetizada a partir da ornitina, que é descarboxilada pela ornitina descarboxilase a putrescina, substrato para a espermidina sintase (**Figura 9**). *Trypanosoma cruzi*, no entanto, sendo incapaz de sintetizar putrescina e cadaverina, precisa adquiri-las do meio, para convertê-las em tripanotiona e homotripanotiona, respectivamente. As formas promastigota e amastigota de *Leishmania* também são capazes de transportar poliaminas do meio (BOND *et al.*, 1999).

Figura 9 – Síntese de novo da tripanotona a partir (a) da espermidina e glutaciona e (b) pela redução da sua forma dissulfeto pela TR (b) (BOND *et al.*, 1999).



Compostos tricíclicos foram relatados como inibidores da TR. Entre eles a mepacrina (i - **Figura 10**) foi o primeiro composto identificado como inibidor competitivo específico da TR, com K_i de 25 μM , e cristalografado com a enzima (KRAUTH-SIEGEL *et al.*, 1991). Derivados sulfonamida (ii) e uréia (iii) da mepacrina mostraram ser inibidores mais potentes que a mepacrina e tiveram atividade significativa contra *L. donovani* e *T. brucei in vitro* (CHIBALE *et al.*, 2001).

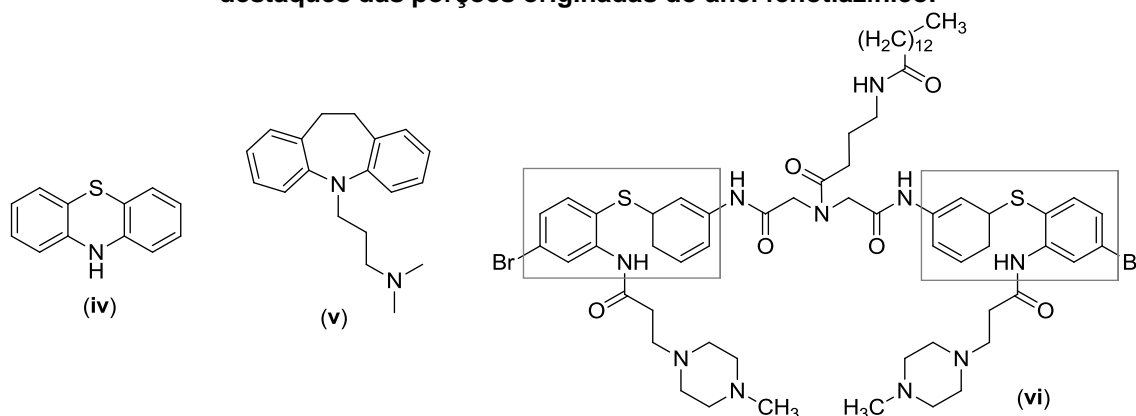
Figura 10 – Estrutura da mepacrina (i) e estrutura geral dos seus derivados sulfonamida (ii) e uréia (iii).



O planejamento racional de fármacos, por estudos de ancoragem molecular, possibilitou a descoberta da atividade inibitória de TR, em concentração micromolar

baixa, de fármacos como a fenotiazina (iv), imipramina (v) e outros antidepressivos tricíclicos (**Figura 11**) (FRIES e FAIRLAMB, 2003). Posteriormente, a abertura do anel central das fenotiazinas levou a uma nova classe de inibidores, os aminodifenilssulfetos, mais potentes que seu análogo rígido e cuja potência foi ainda aumentada pela dimerização da estrutura, originando o derivado vi (**Figura 11**) com K_i de 200 nM. No entanto, a constante de inibição não teve relação com os resultados obtidos nos testes *in vitro* com amastigostas de *T. cruzi* e *L. infantum* e tripomastigotas de *T. brucei*. Este resultado foi atribuído a provável alteração, detectada por espectrometria de massas do meio após 1h de incubação, na porção aminodifenilssulfeto. Esse inibidor, porém, demonstra a capacidade da TR em acomodar grupos volumosos em seu sítio ativo (GIRAULT *et al.*, 2001).

Figura 11 – Estruturas da fenotiazina (iv), da imipramina (v) e do composto vi, com destaques das porções originadas do anel fenotiazínico.

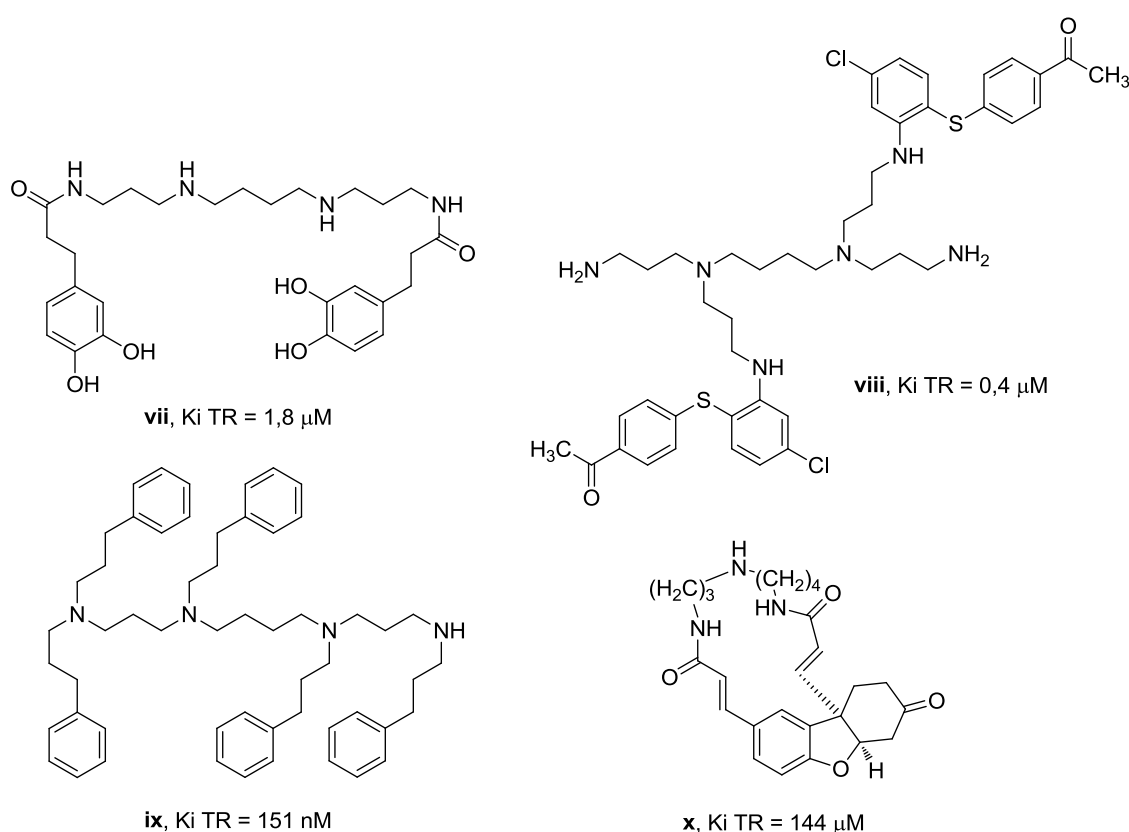


Diversos inibidores foram planejados com base na porção espermidina da tripanotona e possuem uma cadeia poliaminada em sua estrutura. A Kukoamina A (vii - **Figura 12**), uma espermina de origem natural isolada das raízes de *Lycium chinense* foi descoberta como inibidor da TR. Vários compostos derivados da espermina e espermidina foram sintetizados e testados e inibidores com constante de inibição de 0,4 μM e 3,5 μM foram descobertos (viii e ix - **Figura 12**). Apesar de serem potentes inibidores da TR, a atividade antiparasitária desses compostos não correspondeu aos resultados da inibição enzimática (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002).

Baseados na estrutura da TR e no seu modo de interação com a tripanotona, Bond e colaboradores investigaram possíveis inibidores para a enzima. Foram escolhidas

duas substâncias de origem natural, de proporções semelhantes a tripanotona e contendo a porção espermidina em suas estruturas. Estudos de *docking* no AutoDock 3.0 mostraram que as substâncias poderiam ser potenciais inibidores seletivos para a TR. Ensaios enzimáticos com uma das substâncias, lunarina (**x** - **Figura 12**), na concentração de 500 μM , mostraram que ela inibiu 97% da atividade da TR e não apresentou atividade no ensaio com a GR, indicando boa seletividade (BOND *et al.*, 1999).

Figura 12 – Estrutura das substâncias vii, viii, ix e x.



Outra classe de inibidores da TR é a dos substratos subversivos. Os substratos subversivos sofrem redução de um elétron pela reação com o NADPH de uma flavoenzima (como a TR), formando uma espécie radicalar que reage com oxigênio molecular dando origem a ânions radicais superóxido e regenerando o substrato subversivo (**Figura 13**). Concomitantemente, a redução fisiológica do substrato natural da TR (tripanotona dissulfeto) é inibida, pois a enzima está envolvida na redução dos radicais livres formados. Os primeiros representantes dessa classe são os nitrofuranos, como o Chinifur e as naftoquinonas, tal como **xi**, mostrados na

Figura 14 (CENAS *et al.*, 1994; SALMON-CHEMIN *et al.*, 2001; SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002)

Figura 13 – Equação da geração de ânions radicais superóxidos pela reação de substratos subversivos (X) com NADPH.

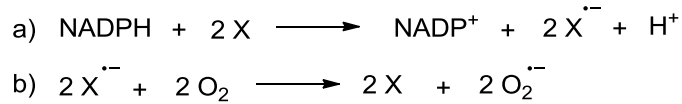
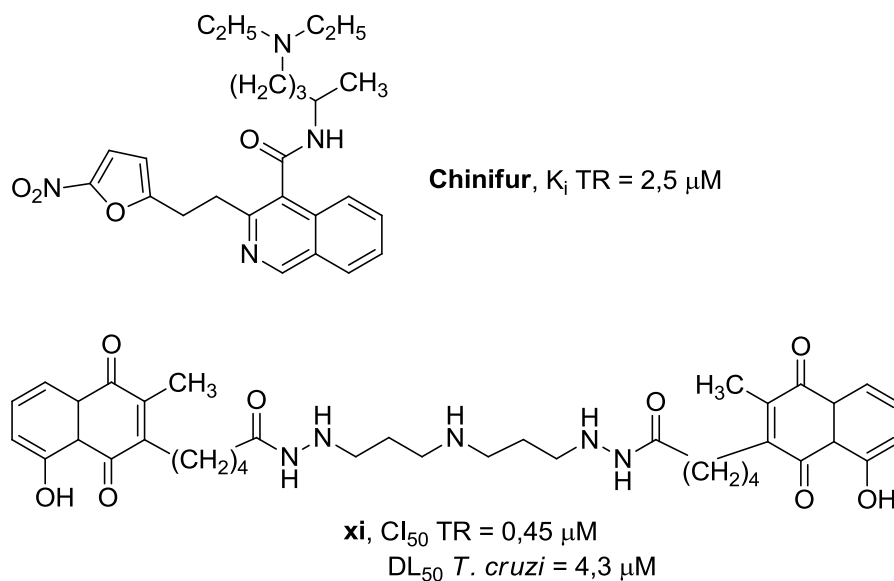
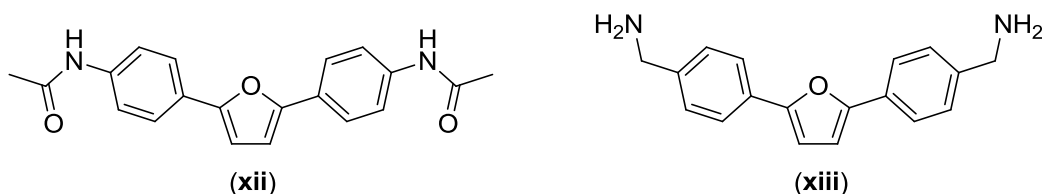


Figura 14 – Estrutura dos inibidores da TR Chinifur e o composto xi.



Oliveira e colaboradores sintetizaram uma série de diarilfuranos e avaliaram como inibidores da TR (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Dentre os compostos sintetizados, destaca-se o 2,5-bis-(4-acetilaminofenil)furano **xii** (**Figura 15**), que apresentou uma Cl_{50} de 48 μM no ensaio com TR, porém mostrou-se inativo, na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, nos ensaios *in vitro* contra formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*. Uma explicação para este fato pode estar relacionada com a baixa solubilidade de **xii**, o que dificulta sua penetração no parasito e, conseqüentemente, o impede de alcançar o seu alvo de ação em concentrações significativas.

Figura 15 – Estrutura dos diarilfuranos **xii e **xiii**.**



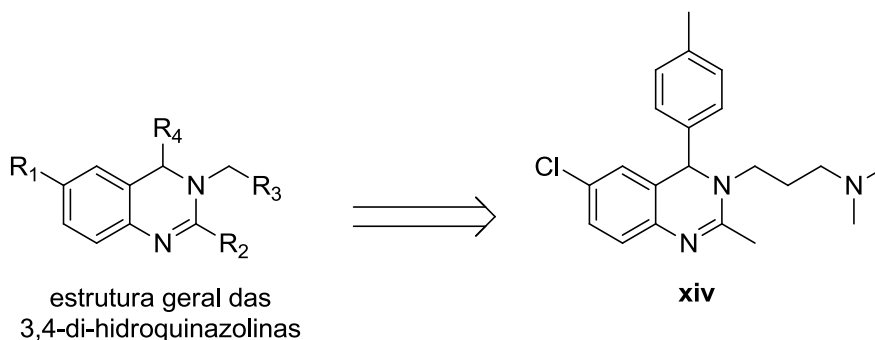
Na tentativa de se obter análogos de **xii** apresentando melhores características físico-químicas, uma nova série de diarilfuranos foi sintetizada (OLIVEIRA *et al.*, 2008). O derivado mais ativo dessa nova série foi a diamina **xiii** (**Figura 15**), que inibiu 63 % da atividade da TR na concentração de 100 μM . *In vitro*, a diamina **xiii** foi capaz de eliminar o parasito do sangue murino infectado na dose de 250 $\mu\text{g/mL}$, o que representa uma atividade 20 vezes maior que a de **xii**. A maior atividade apresentada por **xiii** pode estar relacionada, além da sua maior afinidade pela TR, à sua melhor solubilidade e facilidade de penetração no parasito (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Esses resultados evidenciam que a melhoria da atividade das substâncias planejadas vem sendo alcançada, entretanto, a busca de novos inibidores mais ativos é ainda fundamental.

A atividade leishmanicida dos diarilfuranos **xii** e **xiii** também foi avaliada *in vitro* contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* (dados não publicados). Na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, a diacetamida **xii** provocou apenas 14% de morte do parasito, enquanto que a diamina **xiii**, nessa mesma concentração, foi capaz de eliminar 85% do parasito. Esses resultados estão em concordância com aqueles descritos sobre a avaliação da atividade tripanocida dessas substâncias. Essa concordância já era esperada, já que se acredita que **xii** e **xiii** atuem inibindo a TR, enzima presente em ambos os parasitos.

Recentemente, uma nova classe de inibidores foi descoberta por Patterson e colaboradores (PATTERSON *et al.*, 2011). Uma série de compostos foi sintetizada baseada na estrutura de 3,4-di-hidroquinazolininas e a atividade inibitória da TR e tripanocida desses compostos foram testadas. Entre os compostos avaliados, o composto **xiv** (**Figura 16**) apresentou melhor atividade no ensaio com a TR de *T. brucei* (Cl_{50} : 0,23 μM) e no ensaio *in vitro* com o parasito (Cl_{50} : 0,73 μM). Análise das estruturas cristalográficas desses compostos complexados com a enzima revelou

uma inovação no modo de interação com a TR - a interação inicial dos ligantes causa uma mudança conformacional na enzima, criando um pequeno bolso que é ocupado pelo grupo arila do ligante.

Figura 16 – Estrutura geral das 3,4-di-hidroquinazolininas e xiv.



Com base na estrutura química dos inibidores de TR relatados na literatura, em conjunto com o conhecimento estrutural adquirido a partir da estrutura cristalográfica da enzima, novos inibidores podem ser planejados racionalmente, utilizando ferramentas computacionais.

1.2 Uso de ferramentas computacionais no desenvolvimento de fármacos

Em virtude da grande expansão da área computacional ocorrida nas últimas décadas, diversas técnicas têm sido desenvolvidas visando a descoberta de novos fármacos. Essas técnicas objetivam reduzir o tempo gasto no desenvolvimento de um fármaco, bem como o seu custo (GONÇALVES, 2008). Esse desenvolvimento é de grande valia na área do desenho racional de fármacos baseado em estruturas (DRBE), em que se utilizam métodos de ancoragem molecular (*docking*) para estudar as interações receptor-ligante, possibilitando o desenho de novos fármacos a partir de compostos protótipos (MAGALHÃES, BARBOSA e DARDENNE, 2007).

Um grande número de estruturas têm sido obtidas, graças aos avanços na área da genômica, por cristalografia de raios-X e disponibilizadas em grandes bancos de dados públicos, como o *Protein Data Bank* (PDB), podendo ser utilizadas em tais estudos (ERICKSON *et al.*, 2004). Dessa maneira, o *docking* tem se tornado uma valiosa ferramenta, pois possibilita a avaliação de milhares de compostos e

diferentes receptores em poucos dias, permitindo a descoberta de novos compostos protótipos (GANE e DEAN, 2000). É importante ressaltar que esta ferramenta deve ser utilizada em conjunto com os resultados obtidos na avaliação da atividade das substâncias sintetizadas, pois os resultados obtidos no *docking* são aproximações matemáticas que, apesar de apresentarem boa predição, nem sempre correspondem à realidade.

A ancoragem molecular consiste em um processo matemático em que em uma primeira etapa são previstas diversas conformações de interação de um dado ligante com um receptor por um algoritmo de busca e, em uma segunda etapa, é realizado o cálculo da energia de interação envolvendo a formação do complexo ligante-receptor por meio de uma função de avaliação (*scoring*), podendo ser deduzida a afinidade do ligante pelo receptor (TERAMOTO e FUKUNISHI, 2007).

O programa de *docking* AutoDock traz implementado como algoritmo de busca conformacional o algoritmo genético Lamarckiano (AGL) (MORRIS *et al.*, 1998). Algoritmos genéticos (AG) são algoritmos de busca que se baseiam na teoria evolutiva postulada por Darwin, na qual os indivíduos mais aptos a um ambiente possuem maior chance de sobreviver e propagar as suas características para as gerações futuras. Os AGs trabalham com uma população inicial de indivíduos (soluções para um problema de *docking*) e as informações referentes aos graus de liberdade translacional, rotacional e orientacional desses indivíduos são tratadas como genes constituintes de cromossomos, passíveis de sofrerem mutações e recombinações randômicas a cada geração, de acordo com os critérios especificados no programa. Uma nova geração é criada com base na seleção dos melhores indivíduos da geração anterior. O processo é repetido, permitindo que uma população evolua para melhores soluções, até que um critério de parada seja atingido (número máximo de avaliações, por exemplo) (MAGALHÃES, BARBOSA e DARDENNE, 2004). A aleatoriedade nesse processo classifica os AGs como métodos de busca estocástica ou randômica, de forma que diferentes saídas podem ser obtidas utilizando uma mesma entrada inicial. Além disso, os AGs são considerados vantajosos por poderem trabalhar em paralelo, realizando buscas em diferentes regiões do espaço simultaneamente, diminuindo o custo operacional e consequentemente o tempo de busca (GONÇALVES, 2008).

O algoritmo genético Lamarckiano é um método híbrido que une a busca global do AG a uma busca local. Após a geração de uma nova população pelo AG, alguns indivíduos são submetidos, aleatoriamente, a uma minimização de energia local e os novos indivíduos gerados substituem os indivíduos originais, em uma alusão à desacreditada teoria evolutiva de Lamarck sobre a hereditariedade de características obtidas durante a vida de um indivíduo. A busca local realizada trabalha de maneira adaptativa: os incrementos são dobrados após um número sucessivo de falhas (aumento na energia) ou diminuídos a metade após um número sucessivo de acertos (diminuição na energia) (MORRIS *et al.*, 1998). Os AGs híbridos com busca local são considerados métodos de busca otimizados e capazes de encontrar melhores soluções do que os AGs padrões (HART, 1994).

O algoritmo de busca, porém, é apenas a primeira etapa na solução de um problema de *docking*. A função *scoring* avalia o encaixe entre enzima e o ligante e é de grande impacto no resultado final do *docking*, sendo considerado um dos pontos fracos da metodologia (WANG, LU e WANG, 2003).

Atualmente várias dessas funções se baseiam nas equações de campo de força, adicionadas de termos que reproduzam as constantes de ligação observadas experimentalmente, como demonstrado pela função (1):

$$\Delta G = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{ligH} + \Delta G_{elet} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tors} + \Delta G_{dissol} \quad (1)$$

em que os quatro primeiros termos estão relacionados com termos típicos de mecânica molecular (dispersão/repulsão de Lennard-Jones, ligação de hidrogênio, potencial eletrostático e desvios da geometria, respectivamente) e os dois últimos, ΔG_{tors} , relacionado à restrição do grau de liberdade conformacional, e ΔG_{dissol} , relacionada à energia de dessolvatação. Diferentes pesos podem ser atribuídos a cada componente baseando-se em valores de constantes de ligação encontradas experimentalmente. No AutoDock 3.0 a função *scoring* usada para calcular a energia livre de ligação foi calibrada com base na comparação entre os resultados encontrados no docking de 30 complexos proteína-ligante e suas constantes de ligação (MORRIS *et al.*, 1998). O AutoDock 4.0 possui uma função *scoring* otimizada

em relação à usada no AutoDock 3.0 e foi calibrada usando um campo amostral de 188 complexos, mais de seis vezes o número utilizado no AutoDock 3.0, aumentando a confiabilidade do método. Entre as diferenças está a inclusão de um modelo termodinâmico melhorado que permite a inclusão de termos intramoleculares à função, por uma nova abordagem: a energia livre de ligação é calculada pela diferença entre a energia do ligante e do receptor não-ligados separados e a energia do complexo ligante-receptor. A segunda diferença está no campo de força, que no AutoDock 4.0 inclui um modelo de dessolvatação completo, considerando termos para todos tipos de átomos, incluindo energias de dessolvatação favoráveis para átomos de carbonos e desfavoráveis para átomos polares ou com carga (HUEY *et al.*, 2007).

A conversão entre a energia livre de ligação observada e a constante de inibição (K_i) pode ser feita pela equação (2):

$$\Delta G_{obs} = RT \ln K_i \quad (2)$$

onde R é a constante dos gases, $1,987 \text{ Kcal}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ e T a temperatura absoluta, presumidamente a ambiente, $298,15 \text{ K}$, podendo, então, ser comparados valores obtidos no *docking* com valores de K_i experimentais. Deve-se ressaltar que o sinal positivo da equação deve-se ao fato da constante K_i se tratar de uma constante de dissociação. Essa comparação serve apenas para validar a função *scoring* do programa.

Para a realização da busca na superfície do receptor o programa AutoDock utiliza mapas de afinidade pré-calculados em grade (*grid*), que permitem a avaliação das interações de van der Waals e eletrostáticas entre os átomos do ligante e do receptor. Esses mapas são constituídos por uma rede de pontos, espaçados por um intervalo definido, formando uma malha tridimensional que envolve toda área a ser buscada pelo programa de *docking* e permitem uma grande diminuição do custo computacional, pois substituem a avaliação de energia entre ligante-receptor envolvendo centenas de átomos do receptor por uma interpolação dos valores

armazenados nos vértices do cubo que envolve um dado átomo do ligante (GONÇALVES, 2008).

O programa AutoDock obtém, em cada corrida realizada, uma pose (conformação) que representa a solução para o problema encontrada naquela corrida e ao final compara, ordena e agrupa essas soluções de acordo com a variação média da posição dos átomos do ligante em referência à solução de menor energia. Esta comparação é feita pelo desvio médio quadrático (*root mean square deviation*, RMSD) e o AutoDock ordena as soluções encontradas em cada corrida em grupos (*clusters*) com conformações variando até 2,0 Å da conformação de menor energia do grupo. Na equação (3) é demonstrado como é calculado o RMSD, onde x_i , y_i e z_i correspondem às coordenadas x, y e z do átomo i da estrutura encontrada no *docking* e x_{iref} , y_{iref} , z_{iref} as coordenadas da estrutura de referência a que se deseja comparar e N o número de átomos da estrutura.

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - x_{iref})^2 + (y_i - y_{iref})^2 + (z_i - z_{iref})^2}{N}}$$
(3)

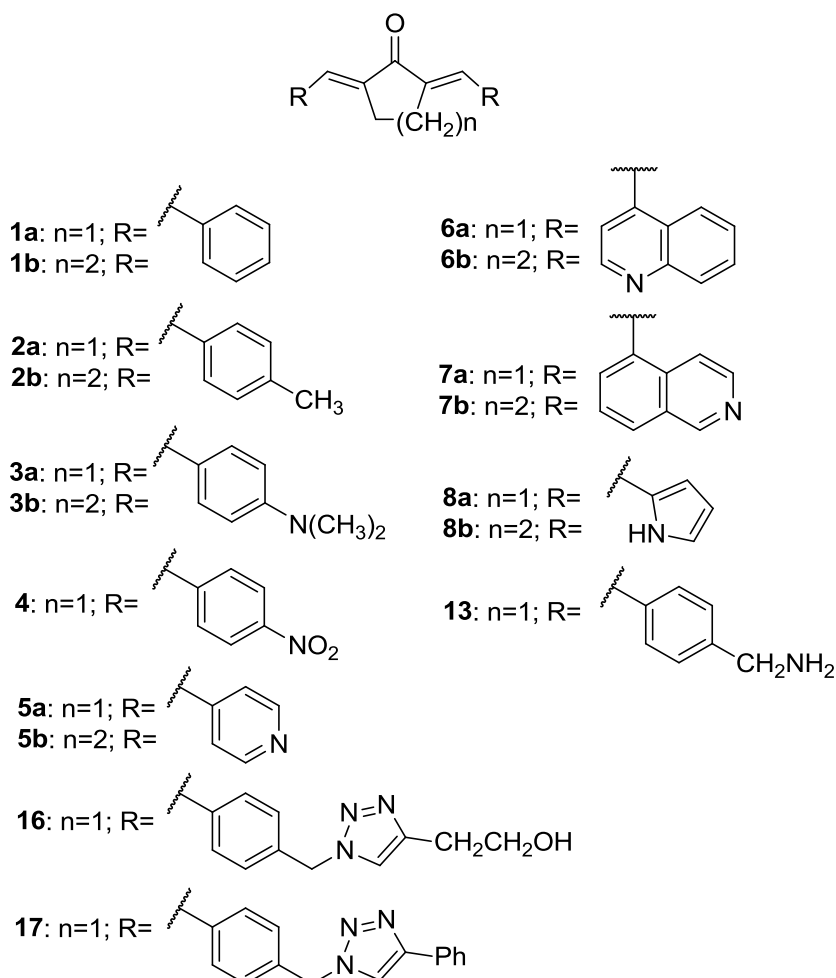
Para avaliar a acurácia do *docking* em prever a correta conformação do ligante na formação do complexo, as conformações geradas devem ser comparadas com estruturas de cristalografia de raios-X, num procedimento conhecido como *redocking*. Para isso, o ligante complexado com seu receptor é removido de uma estrutura cristalográfica e submetido ao *docking* para tentar reproduzir a pose encontrada na estrutura cristalográfica, sendo a metodologia considerada validada quando encontradas conformações variando 1,0-3,0 Å de RMSD da estrutura cristalográfica (ERICKSON *et al.*, 2004). Nos estudos de *redocking* o mais importante é a pose do ligante prevista pelo programa e não os valores de energia de interação.

2 JUSTIFICATIVA

Dando continuidade aos trabalhos de pesquisa desenvolvidos por nosso grupo na busca de novos agentes tripanocidas e inibidores da TR (OLIVEIRA *et al.*, 2003, 2006 e 2008), objetivou-se no presente trabalho, a síntese e avaliação biológica de novos inibidores potenciais da TR. A estrutura desses inibidores foi planejada utilizando-se a diacetamida **xii** e a diamina **xiii** como protótipos.

As estruturas das substâncias a serem sintetizadas estão apresentadas na **Figura 17**.

Figura 17 – Estrutura química das substâncias a serem sintetizadas.



A substituição do anel furano pela ciclopentanona será avaliada em função de sua maior facilidade de síntese. A obtenção dos derivados diarilfuranos envolve etapas de síntese que necessitam de solventes anidros, uso de atmosfera inerte e catalisadores de alto custo. Ao contrário, os análogos sintetizados no presente trabalho serão obtidos a partir de materiais de partida baratos e reações mais fáceis de serem conduzidas. Além disso, estudos preliminares de modelagem molecular sugeriram que a inclusão de um carbono metilênico entre o ciclo central e o anel aromático resulta em derivados apresentando maior afinidade pela enzima. O derivado **13** foi planejado para fins de comparação com o análogo diarilfurano **xiii**, utilizado como protótipo. Além disso, a presença dos grupos amino propicia uma modulação da solubilidade dos derivados propostos devido à possibilidade de formação de diversos sais e pode, também, mimetizar a porção espermidina presente na estrutura da tripanotona. De acordo com os estudos teóricos realizados em trabalhos anteriores (OLIVEIRA *et al.* 2008), a presença de grupos mais volumosos ligados ao anel aromático dos diarilfuranos é importante para uma ocupação do sítio ativo da TR em maior extensão, o que justifica a síntese dos compostos **6** e **7** e dos triazóis **16** e **17**.

A substituição do anel central ciclopentanona pela ciclohexanona foi proposta de forma a se obter uma maior diversidade estrutural para estudos de relação estrutura-atividade e para fins de comparação.

3 OBJETIVOS

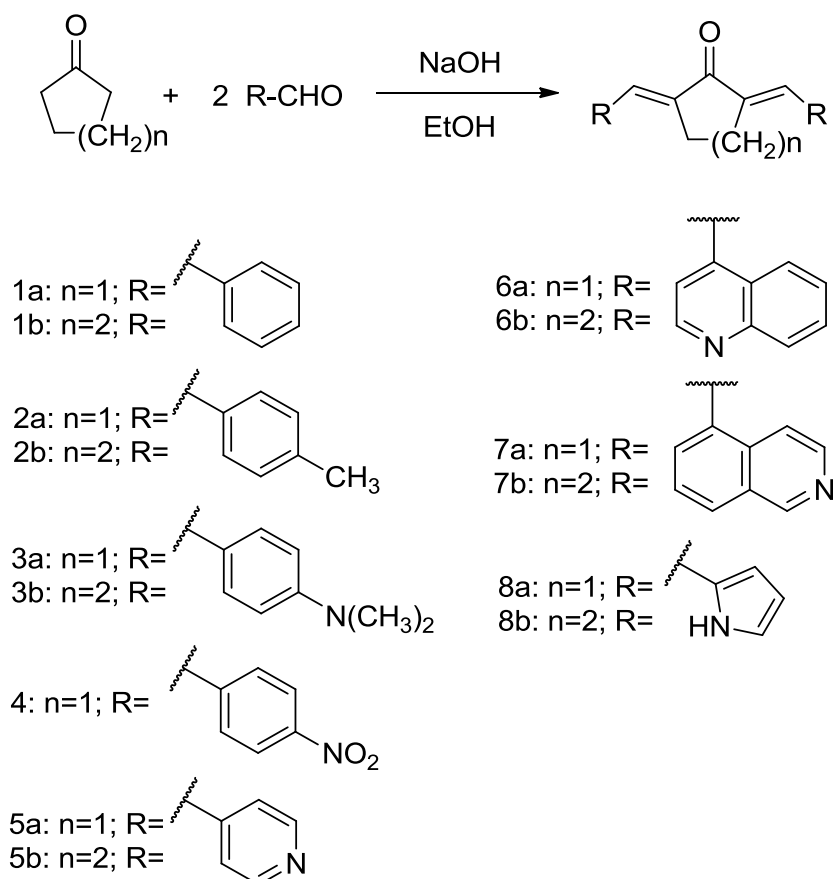
Objetivou-se nesse trabalho o desenvolvimento de novas substâncias com atividade tripanocida e leishmanicida, com base nas estruturas do 2,5-bis(acetilaminofenil)furano (xii) e 2,5-bis-(4-aminometilfenil)furano (xiii). Para que este objetivo fosse alcançado, objetivou-se, especificamente:

- a) sintetizar 2,5-bisarilmetilideno-ciclopentanonas e 2,6-bisarilmetilideno-cicloexanonas, análogas de xii e xiii;
- b) realizar estudos de ancoragem molecular a fim de se estabelecer a relação estrutura atividade e compreender o modo de interação destas substâncias com a TR;
- c) avaliar *in vitro* a capacidade das substâncias sintetizadas em inibir a atividade da enzima tripanotiona redutase;
- d) avaliar *in vitro* a capacidade das substâncias sintetizadas em inibir a atividade da enzima glutationa redutase, para fins de estudo de seletividade;
- e) avaliar a atividade *in vitro* das substâncias sintetizadas contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- e) avaliar a citotoxicidade das substâncias sintetizadas.

4 PLANO DE SÍNTESE

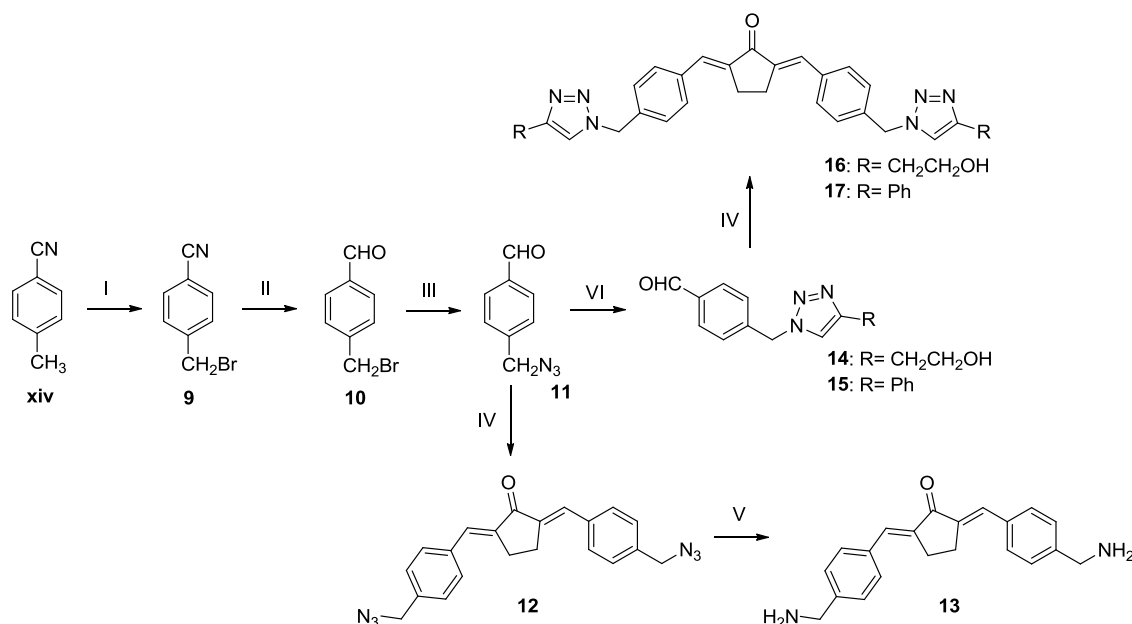
A metodologia de síntese para obtenção das substâncias **1-8**, **13**, **16** e **17** (**Figura 17**, p. 44) foi proposta, utilizando materiais de partida de fácil acesso, conforme as rotas de sínteses apresentadas nos **Esquema 1** e **2**.

Esquema 1 - Plano de síntese para obtenção das bisarilmetilideno-cicloalcanonas 1-8.



Condensação aldólica cruzada dos aldeídos comerciais correspondentes com ciclopentanona ou ciclohexanona, em meio básico, resultará na obtenção das bisarilidenocicloalcanonas **1-8** (**Esquema 1**).

Esquema 2 – Plano de síntese para obtenção da diamina 13 e dos triazóis 16 e 17.



I = NBS, (PhCOO)₂, benzeno, refluxo; II = 1) DIBAL-H, tolueno, N₂/0° C, 2) HCl 5% v/v, CHCl₃; III = NaN₃, THF/H₂O; IV = NaOH 2 M, EtOH 95%; V = PPh₃, THF; VI = Cu¹⁺, butinol ou fenilacetileno, CH₂Cl₂/H₂O.

Para a obtenção da diamina **13**, inicialmente, a *p*-tolunitrila será convertida no derivado bromado **9**, utilizando-se *N*-bromosuccinimida (NBS) como fonte de bromo e peróxido de benzoíla como iniciador radicalar. A redução quimiosseletiva do grupo ciano em **9**, utilizando-se DIBAL-H como fonte de hidreto, dará origem ao aldeído **10**. Reação de **10** com azida de sódio resultará na obtenção do derivado azido **11**. Condensação aldólica cruzada do aldeído **11** com ciclopentanona resultará no composto **12**, que, após redução quimiosseletiva do grupo azido, utilizando trifenilfosfina, resultará na obtenção do diamino **13** (Esquema 2).

Cicloadição 1,3-dipolar, catalisada por Cu¹⁺, utilizando o azido **11** e butinol ou fenilacetileno, fornecerá os compostos **14** e **15**, respectivamente que, utilizados na condensação aldólica cruzada com a ciclopentanona, resultará na obtenção de **16** e **17**.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As temperaturas das faixas de fusão foram determinadas em aparelho Microquímica MQAPF 301 no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG e não foram corrigidas.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro com transformada de Fourier Spectrum One Perkin Elmer, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e demais experimentos foram registrados em aparelho Bruker AVANCE DPX200, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução – LAREMAR, no Departamento de Química da UFMG. O programa TOPSPIN 1.3 – Bruker foi utilizado no processamento dos espectros.

As atribuições das bandas dos espectros no IV e dos sinais dos espectros de RMN foram fundamentadas utilizando-se como referência Silverstein e colaboradores e Pavia e colaboradores (PAVIA, LAMPMAN e KRIZ, 2001; SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). Todas as deformações descritas para o espectro no infravermelho das substâncias são referentes a deformações axiais, exceto quando especificado.

As reações conduzidas utilizando-se irradiação por micro-ondas foram realizadas usando-se um reator CEM Discover, no Departamento de Química da UFMG.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica gel 60 G Merck® em camadas de 0,25 mm de espessura sobre placas de vidro. Para cromatografia em coluna de sílica (CCS) utilizou-se sílica gel 60 (0,063-0,200 mm/70-230 mesh) Merck®.

Como reveladores utilizou-se vapor de iodo, solução etanólica de H_2SO_4 15% v/v, solução etanólica de ninhidrina 0,3% p/v e solução de 2,4-dinitrofenilidrazina 2,5% p/v em álcool etílico contendo 10% de ácido clorídrico concentrado.

O tolueno foi tratado com pequenas lascas de sódio metálico, sob refluxo, até que a coloração da mistura se tornasse azul intensa, utilizando benzofenona como indicador. O solvente foi, então, destilado e utilizado logo em seguida.

Os ensaios com as enzimas tripanotona redutase e glutatona redutase foram realizados pela equipe do Professor Dr. Mário Steindel do Centro Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

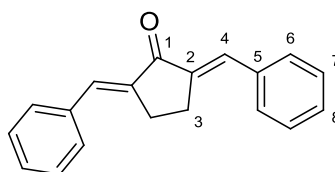
Os ensaios com *T. cruzi* foram realizados pela equipe do Dr. José Alvaro Romanha do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ.

Os ensaios com *L. amazonensis* foram realizados pela equipe da Professora Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

5.1 Metodologia geral para a síntese das bis-(arilmetilidenos)cicloalcanonas 2a, 2b, 5a, 6a, 7a, 7b, 8a e 8b

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 2 equivalentes do aldeído correspondente, 1 equivalente da cicloalcanona e 2 mL por equivalente da cicloalcanona de álcool etílico 95%, adicionou-se, lentamente, 1,5 mL por equivalente de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol/L (0,3 equivalente). Após a adição do hidróxido de sódio, a reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente até que o consumo de todo aldeído de partida fosse observado por CCD. Após o término da reação, elaborou-se da seguinte maneira, exceto quando especificado: parte do solvente foi eliminada em evaporador rotatório e o precipitado formado foi filtrado à vácuo e lavado com água gelada.

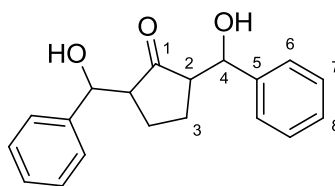
5.2 Síntese de 2,5-dibenzilideno-ciclopentanona (**1a**)



1a

Método A

Em balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,46 mL (4,52 mmol) de benzaldeído, 1,15 mL de água destilada e aproximadamente 0,05 mL de dietilamina (0,48 mmol), adicionou-se 0,2 mL (2,26 mmol) de ciclopentanona. A mistura reagente foi mantida sob agitação à temperatura ambiente. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). O consumo completo do benzaldeído foi observado após 18 horas de reação. Adicionaram-se, então, 3 mL de solução de ácido clorídrico 5% v/v e o precipitado formado foi filtrado à vácuo e recristalizado em acetato de etila, fornecendo 0,213 g da 2,5-bis-(hidroxi(fenil)metil)-ciclopentanona (**1c**) (29% de rendimento) na forma de um sólido branco. O produto desejado (**1a**) não foi isolado utilizando essa técnica.



1c

1c (2,5-bis(hidroxi(fenil)metil)ciclopentanona):

FM: C₁₉H₂₀O₃

MM: 296 g/mol

FF: 160,9-162,7 °C; FF lit.: 144-145 °C (BILLIMORIA, 1955).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3330 (O-H), 3087, 3031 (sp^2 C-H), 2971, 2864 (sp^3 C-H), 1714 (C=O), 1494, 1447 (C=C arom.), 1002 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 7,33-7,20 (10 H, m, H-aromáticos); 5,34 (2 H, d, OH, $J_{\text{OH},4} = 4,4$ Hz); 5,13-5,12 (2 H, m, H-4); 2,36-2,28 (2 H, m, H-2); 1,85-1,76 (2 H, m, H-3); 1,50 (2 H, sl, H-3').

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) e DEPT 135, δ/ppm : 216,8 (C=O); 144,7 (C-5); 127,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 126,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 125,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 69,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 57,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-2); 19,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

Método B

Em um balão de fundo redondo contendo 20 mL de álcool etílico e 15 mL de uma solução previamente preparada contendo 1,20 g (30 mmol) de hidróxido de sódio em água destilada foram adicionados 4 mL (39,3 mmol) de benzaldeído. Em seguida, adicionou-se, lentamente, 1 mL (11,3 mmol) de ciclopentanona, e a mistura foi mantida sob agitação magnética. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Após 30 minutos, a mistura reagente foi colocada em banho de gelo. O precipitado foi filtrado à vácuo, lavado com 10 mL de etanol 95% gelado, 10 mL de uma solução 4% de ácido acético em etanol 95% gelada e por fim, 10 mL de etanol 95% gelado e mantido em dessecador por 12 horas. Foram obtidos 2,94 g (100% de rendimento) de **1a** na forma de um sólido amarelo.

1a

FM: $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}$

MM: 260 g/mol

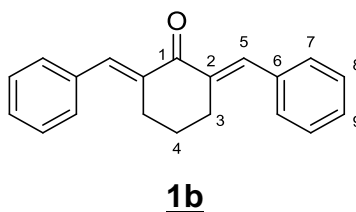
FF: 187,5-188,9 °C; FF lit.: 196 °C (VATSADZE *et al.*, 2006); 186-187 °C (ABAEE *et al.*, 2009).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3055, 3020 (sp^2 C-H), 2954, 2911 (sp^3 C-H), 1687 (C=O), 1624 (C=C), 1600, 1568, 1489, 1444 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,61-7,38 (12 H, m, H-4 e H-aromáticos); 3,11 (4 H, s, H-3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 196,3 (C=O); 137,2 (C-2); 135,7 (C-5); 133,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 130,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 129,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 128,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 26,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.3 Síntese de 2,6-dibenzilideno-cicloexanona (**1b**)



Em um balão de fundo redondo contendo 0,102 g (1,04 mmol) de cicloexanona, adicionaram-se 0,424 g (4 mmol) de benzaldeído e 2 mL de álcool etílico 95%. Adicionou-se, em seguida, gota a gota, 1,5 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (3 mmol) e manteve-se a reação sob agitação magnética à temperatura ambiente. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Após 30 minutos, a mistura reagente foi colocada em banho de gelo e o precipitado foi filtrado à vácuo e lavado com 2 mL de etanol 95% gelado, 2 mL de uma solução 4% de ácido acético em etanol 95% gelada e, novamente, 2 mL de etanol 95% gelado. O filtrado foi submetido a uma nova filtração, e os sólidos obtidos foram reunidos e mantidos em dessecador por 24 horas. Foi obtido 0,223 g (78% de rendimento) de **1b** na forma de um sólido amarelo.

FM: $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}$

MM: 274 g/mol

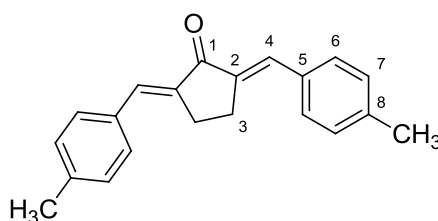
FF: 113,2-114,4 °C; FF lit.: 113-114 °C (ABAE *et al.*, 2009); 116-117 °C (BIGDELI *et al.*, 2007).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3056 (sp^2 C-H), 2932, 2862 (sp^3 C-H), 1665 (C=O), 1604 (C=C), 1574, 1488, 1443 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,83 (2 H, s, H-5); 7,50-7,31 (10 H, m, H-aromáticos); 2,95 (4 H, t, H-3, $J_{3,4} = 6,1$ Hz); 1,80 (2 H, qt, H-4, $J_{4,3} = 6,1$ Hz).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 190,3 (C=O); 136,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-5); 136,1 (C-2 ou C-6); 135,9 (C-6 ou C-2); 130,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 128,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9); 128,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 28,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 22,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

5.4 Síntese de 2,5-bis-(4-metil-benzilideno)-ciclopentanona (2a)



2a

Obteve-se 0,275 g (92% de rendimento) de **2a**, na forma de um sólido amarelo, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 2 horas de reação. Utilizou-se como eluentes para CCD hexano/acetato de etila 6:4 e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}$

MM: 288 g/mol

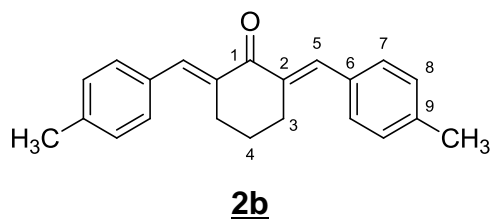
FF: 244,1-244,9 °C; FF lit.: 241-243 °C (CAI, XIE e GUO, 2006); 248-250 °C (ZIARANI *et al.*, 2009).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3024 (sp^2 C-H), 2912 (sp^3 C-H), 1687 (C=O), 1621 (C=C), 1602, 1589, 1561, 1509 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,58 (2 H, s, H-4); 7,51 (4 H, d, H-6, $J_{6,7} = 8,0$ Hz); 7,25 (4 H, d, H-7, $J_{7,6} = 8,0$ Hz); 3,09 (4 H, s, H-3); 2,40 (6 H, s, CH_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 196,6 (C=O); 139,9 (C-2); 136,7 (C-8); 133,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 133,3 (C-5); 130,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6 ou C-7); 129,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7 ou C-6); 26,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 21,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$).

5.5 Síntese de 2,6-bis-(4-metil-benzilideno)-cicloexanona (2b)



Obteve-se 0,426 g (93% de rendimento) de **2b**, na forma de um sólido amarelo, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 2 horas de reação. Utilizou-se como eluentes para CCD hexano/acetato de etila 6:4 e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}$

MM: 302 g/mol

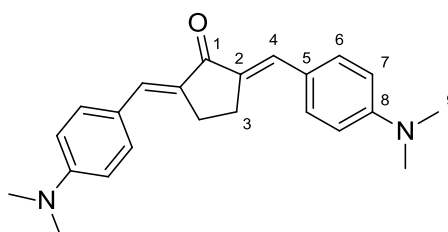
FF: 163,4-164,7°C; FF lit.: 163-165 °C (ZIARANI *et al.*, 2009)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3024 (sp^2 C-H), 2939, 2915, 2859, 2834 (sp^3 C-H), 1660 (C=O), 1599 (C=C), 1562, 1508, 1443 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ /ppm: 7,79 (2 H, s, H-5); 7,39 (4 H, d, H-7, $J_{7,8} = 8,0$ Hz); 7,23 (4 H, d, H-8, $J_{8,7} = 8,0$ Hz); 2,94 (4 H, t, H-3, $J_{3,4} = 6,1$ Hz); 2,40 (6 H, s, CH_3); 1,80 (2 H, qt, H-4, $J_{4,3} = 6,1$ Hz).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ /ppm: 190,6 (C=O); 139,0 (C-9); 137,1 (CH , C-5); 135,7 (C-2); 133,3 (C-6); 130,7 (CH , C-7 ou C-8); 129,3 (CH , C-8 ou C-7); 28,7 (CH_2 , C-3); 23,2 (CH_2 , C-4); 21,6 (CH_3).

5.6 Síntese de 2,5-bis-(4-(dimetilamino)benzilideno)-ciclopentanona (3a)



3a

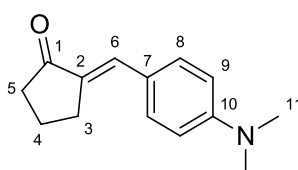
Método A

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,373 g (2,5 mmol) de *p*-dimetilamino-benzaldeído, 0,095 g (1,13 mmol) de ciclopentanona e 4 mL de álcool etílico 95%. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, 2 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (4 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Após 2 horas de reação, observou-se, por CCD, a formação de dois produtos e a presença do aldeído de partida. Adicionaram-se, então, 6 gotas de ciclopentanona e, após 1 hora, observou-se o consumo completo do aldeído de partida. Adicionaram-se 50 mL de clorofórmio e extraiu-se com água destilada (3 x 20 mL). A fase aquosa foi extraída com clorofórmio (3 x 20 mL) e as fases orgânicas foram reunidas. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório e obteve-se 0,478 g de uma mistura de produtos. O sólido foi, em seguida, purificado por CCS (eluentes: hexano/acetato de etila, 9:1; hexano/acetato de etila, 8:2; hexano/acetato de etila, 7:3 e hexano/acetato de etila, 1:1) e foi obtido 0,195 g (80% de rendimento)

do produto **3c** na forma de um sólido amarelo. O produto **3a** não foi isolado, pois degradou na coluna.

Método B

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,083 g (0,98 mmol) de ciclopentanona, adicionaram-se 4 mL de álcool etílico 95% e 0,367 g (2,45 mmol) de *p*-dimetilamino-benzaldeído. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, 2 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (4 mmol) e deixou-se a reação sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após 1 hora, observou-se por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento) a formação de dois produtos. Acrescentou-se, então, à mistura reacional, 0,087 g (0,58 mmol) do aldeído e, após 1 hora, observou-se, por CCD, a formação de apenas um produto. Após adição de gelo e água, a mistura reagente foi transferida para o congelador por 12 horas. Extraíu-se com diclorometano (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram reunidas, adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O sólido resultante foi mantido em dessecador e, após completa secagem, adicionou-se etanol, aqueceu-se em banho-maria e filtrou-se o sólido insolúvel à quente, obtendo-se 0,193 g (57% de rendimento) de **3a** na forma de um sólido laranja-avermelhado.



3c

3c (2-(4-(dimetilamino)benzilideno)ciclopentanona) :

FM: C₁₄H₁₇NO

MM: 215 g/mol

FF: 151,3-153,1°C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2901, 2820 (sp^3 C-H), 1687 (C=O), 1582 (C=C), 1525, 1447 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,47 (2 H, d, H-8, $J_{8,9} = 8,8$ Hz); 7,36 (1 H, t, H-6, $J_{6,3} = 2,4$ Hz); 6,71 (2 H, d, H-9, $J_{9,8} = 8,8$ Hz); 3,03 (6 H, s, H-11); 2,96 (2 H, dt, H-3, $J_{3,4} = 7,4$ Hz e $J_{3,6} = 2,4$ Hz); 2,38 (2 H, t, H-5, $J_{5,4} = 7,4$ Hz); 2,02 (2 H, qt, H-4, $J_{4,5} = J_{4,3} = 7,4$ Hz).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 208,3 (C=O); 151,1 (C-10); 133,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 132,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 131,2 (C-2); 123,5 (C-7); 112,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9); 40,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, C-11); 38,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-5); 29,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 20,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

3a:

FM: $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$

MM: 346 g/mol

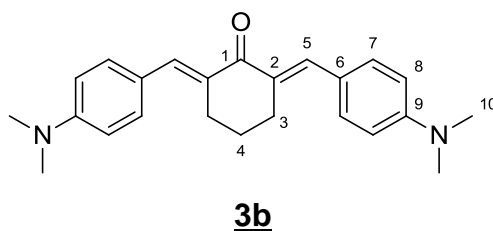
FF: 301,2-305,8 $^\circ\text{C}$; FF lit.: 298 $^\circ\text{C}$ (VATSADZE *et al.*, 2006); 271-273 $^\circ\text{C}$ (BIGDELI *et al.*, 2007).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2896 (sp^2 C-H), 1672 (C=O), 1594 (C=C), 1568, 1542 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,54 (4 H, d, H-6, $J_{6,7} = 8,6$ Hz); 7,53 (2 H, s, H-4); 6,74 (4 H, d, H-7, $J_{7,6} = 8,6$ Hz); 3,07 (4 H, s, H-3); 3,04 (12 H, s, H-9).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 150,6 (C-8); 133,4 (C-2); 133,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 132,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 124,2 (C-5); 111,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 40,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, C-9); 26,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.7 Síntese de 2,6-bis-(4-(dimetilamino)benzilideno)-cicloexanona (**3b**)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,098 g (1 mmol) de cicloexanona, 0,373 g (2,5 mmol) de *p*-dimetilaminobenzaldeído e 2 mL de álcool etílico 95%. Sob agitação magnética e aquecimento à 50 °C, adicionou-se, gota a gota, 1,5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (3 mmol). O progresso da reação foi monitorado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento), até consumo total da cicloexanona. Após 18 horas de reação, filtrou-se o precipitado formado e lavou-se com álcool etílico absoluto gelado. Foi obtido 0,206 g (57% de rendimento) de **3b** na forma de um sólido alaranjado.

FM: C₂₄H₂₈N₂O

MM: 360 g/mol

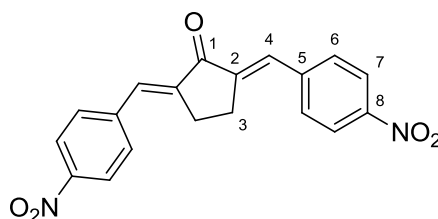
FF: 246,7-248,1 °C; FF lit.: 250-252 °C (BIGDELI *et al.*, 2007); 251-253 °C (ZIARANI *et al.*, 2009).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3041 (sp^2 C-H), 2912, 2853, 2807 (sp^3 C-H), 1644 (C=O), 1608 (C=C), 1578, 1537, 1515 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 7,77 (2 H, s, H-5); 7,46 (4 H, d, H-7, $J_{7,8} = 7,8$ Hz); 6,72 (4 H, d, H-8, $J_{8,7} = 7,8$ Hz); 3,02 (12 H, s, H-10); 2,94 (4 H, sl, H-3); 1,82 (2 H, sl, H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 190,2 (C=O); 150,5 (C-9); 137,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-5); 132,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 132,6 (C-2); 124,5 (C-6); 111,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 40,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, C-10); 28,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 23,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

5.8 Síntese de 2,5-bis-(4-nitro-benzilideno)-ciclopentanona (**4**)



4

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram adicionados 0,079 g (0,94 mmol) de ciclopentanona e 0,284 g (1,88 mmol) de *p*-nitrobenzaldeído em 1 g de alumina básica e misturou-se com um bastão de vidro até obter-se um pó homogêneo. A mistura reagente foi levada ao reator de micro-ondas e aquecida a 100 °C, usando uma potência de 80 W por 4 minutos. O desenvolvimento da reação foi monitorado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; revelador: vapor de iodo). Após resfriamento do sistema, adicionou-se CH_2Cl_2 à mistura, filtrou-se e lavou-se com CH_2Cl_2 à fim de extrair todo o produto da alumina básica. O solvente foi removido em evaporador rotatório e ao resíduo adicionou-se etanol à quente e filtrou-se. Obteve-se 0,056 g (17% de rendimento) de **4** na forma de um sólido amarelo. Quantidades adicionais foram produzidas pela mesma técnica.

FM: $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$

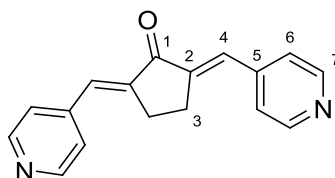
MM: 350 g/mol

Fusão com decomposição em 236,0 °C; FF lit.: 229-230 °C (BIGDELI *et al.*, 2007); 230 °C (SALEHI *et al.*, 2004).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3083 (sp^2 C-H), 2908 (sp^3 C-H), 1685 (C=O), 1620 (C=C); 1520 e 1343 (NO_2 assim. e sim.), 1494, 1445 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 8,31 (2 H, d, H-7, $J_{7,6} = 8,6$ Hz); 7,75 (1 H, d, H-6, $J_{6,7} = 8,6$ Hz); 7,65 (2 H, s, H-4); 3,21 (4 H, s, H-3).

5.9 Síntese de 2,5-bis-(piridin-4-ilmetilideno)-ciclopentanona (5a)



5a

Obteve-se 0,091 g (68% de rendimento) de **5a**, na forma de um sólido amarelo, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 1 hora de reação. A adição do hidróxido foi feita em banho de gelo. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$

MM: 262 g/mol

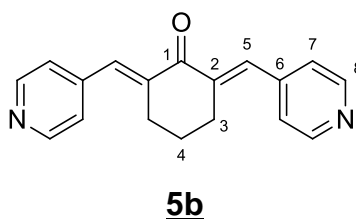
FF: 234,7-236,5 $^\circ\text{C}$; FF lit.: 239 $^\circ\text{C}$ (VATSADZE *et al.*, 2006).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3023 (sp^2 C-H), 2953, 2914 (sp^3 C-H), 1693 (C=O), 1631 (C=C), 1607, 1593, 1540, 1447 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 8,70 (4 H, d, H-7, $J_{7,6} = 5,6$ Hz); 7,50 (2 H, s, H-4); 7,42 (4 H, d, H-6, $J_{6,7} = 5,6$ Hz); 3,17 (4 H, s, H-3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 195,3 (C=O); 150,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 142,4 (C-2); 140,7 (C-5); 131,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 124,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 26,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.10 Síntese de 2,6-bis-(piridin-4-ilmetilideno)-cicloexanona (**5b**)



A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,096 g (0,98 mmol) de cicloexanona foram adicionados 0,211 g (1,91 mmol) de piridina-4-carboxaldeído 97% e 4 mL de álcool etílico 95%. Sob agitação e banho de gelo, adicionou-se, lentamente, 0,25 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (0,5 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2; reveladores: 1) vapor de iodo; 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento) e seu término determinado pelo consumo completo do aldeído. Após 1 hora de reação, o precipitado formado foi filtrado à vácuo obtendo-se 0,233 g (86% de rendimento) de **5b** na forma de um sólido amarelo.

FM: C₁₈H₁₆N₂O

MM: 276 g/mol

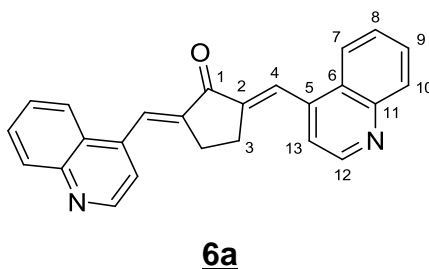
FF: 142,3-144,5 °C; FF lit.: 150 °C (VATSADZE *et al.*, 2006).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3052, 3020 (sp^2 C-H), 2941, 2890, 2837 (sp^3 C-H), 1666 (C=O), 1611 (C=C), 1590, 1576, 1542 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 8,62 (4 H, d, H-8, $J_{8,7} = 5,0$ Hz); 7,62 (2 H, s, H-5); 7,26 (4 H, d, H-7, $J_{7,8} = 5,0$ Hz); 2,88 (4 H, t, H-3, $J_{3,4} = 5,1$ Hz); 1,79 (2 H, qt, H-4, $J_{4,3} = 5,1$ Hz).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) e DEPT 135, δ/ppm : 189,3 (C=O); 150,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 143,2 (C-6); 139,3 (C-2); 134,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-5); 124,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 28,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 22,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

5.11 Síntese de 2,5-bis-(quinolin-4-ilmetilideno)-ciclopentanona (**6a**)



Método A

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,028 g (0,33 mmol) de ciclopentanona, 0,108 g (0,67 mmol) de quinolina-4-carboxaldeído 97% em 1,4 mL de água destilada, sob agitação magnética e banho de gelo, adicionou-se, lentamente, 0,08 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (0,16 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 17 horas, até que o aldeído fosse completamente consumido, o que foi observado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; acetato de etila/metanol 3:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Ao final da reação, neutralizou-se o meio, em banho de gelo, adicionando solução aquosa de ácido clorídrico 5% v/v. O precipitado foi filtrado à vácuo e seco em dessecador por 1 dia, fornecendo 0,089 g (74% de rendimento) de **6a** na forma de um sólido amarelo-esverdeado.

Método B

Obteve-se 0,146 g (84% de rendimento) de **6a**, na forma de um sólido amarelo, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 3 horas de reação. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: C₂₅H₁₈N₂O

MM: 362 g/mol

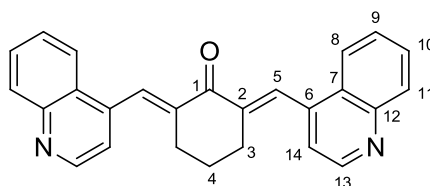
FF: 181,8-183,5 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3044 (sp^2 C-H), 2923 (sp^3 C-H), 1690 (C=O), 1602 (C=C), 1602, 1562, 1504 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 + TFA), δ/ppm : 9,32 (2 H, d, H-12, $J_{12,13} = 5,6$ Hz); 8,48 (2 H, d, H-10, $J_{10,9} = 7,4$ Hz); 8,32 (2 H, d, H-7, $J_{7,8} = 7,4$ Hz); 8,22-8,10 (6 H, m, H-4 + H-9 + H-13); 7,96 (2 H, t, H-8; $J_{8,7} = J_{8,9} = 7,4$ Hz); 3,12 (4 H, s, H-3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6 + TFA) e DEPT 135, δ/ppm : 194,3 (C=O); 149,4 (C-5); 147,1 (C-2); 145,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-12); 139,4 (C-11); 134,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 130,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 127,1 (C-6); 125,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9 ou C-10); 125,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-10 ou C-9); 122,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7 ou C-13); 121,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-13 ou C-7); 26,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.12 Síntese de 2,6-bis-(quinolin-4-ilmetilideno)-cicloexanona (**6b**)



6b

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,020 g (0,2 mmol) de cicloexanona foram adicionados 0,079 g (0,49 mmol) de quinolina-4-carbaldeído 97% e 0,5 mL de álcool etílico 95%. Posteriormente, adicionou-se, lentamente, 0,3 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol/L (0,06 mmol) e a reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 50 minutos, quando foi observado o completo consumo da cicloexanona por CCD (eluente: acetato de etila/metanol 8:2; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Ao final da reação, o precipitado foi filtrado à vácuo e lavado com água destilada gelada. Obteve-se 0,059 g (78% de rendimento) de **6b** na forma de um sólido amarelo.

FM: $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$

MM: 376 g/mol

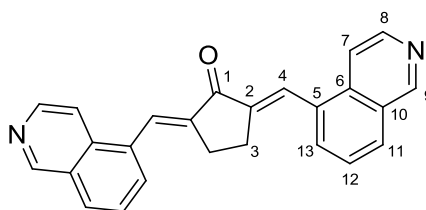
FF: 153,4-154,3 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3056 (sp^2 C-H); 2957 (sp^3 C-H); 1672 (C=O); 1613 (C=C); 1580, 1562, 1504 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 + TFA), δ/ppm : 9,31-9,29 (2 H, m, H-13); 8,32-8,23 (4 H, m, H-8 + H-11); 8,17-8,08 (4 H, m, H-5 + H-10); 7,99-7,89 (4 H, m, H-9 + H-14); 2,74 (4 H, sl, H-3); 1,68 (2 H, sl, H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6 + TFA) e DEPT 135, δ/ppm : 187,7 (C=O); 150,4 (C-6); 145,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-13); 143,1 (C-12); 139,7 (C-2); 134,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-5); 130,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-10 ou C-11); 129,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-11 ou C-10); 127,0 (C-7); 126,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9); 123,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 122,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-14); 28,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 22,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

5.13 Síntese de 2,5-bis-(isoquinolin-5-ilmetilideno)-ciclopentanona (7a)



7a

Método A

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,026 g (0,30 mmol) de ciclopentanona, 0,100 g (0,61 mmol) de isoquinolina-5-carboxaldeído 96% em 1,3 mL de água destilada, sob agitação e banho de gelo, adicionou-se, lentamente, 0,08 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol/L (0,16 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas, quando se observou o consumo total do material de partida por CCD (elute: acetato de etila/metanol 3:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Ao final da reação, filtrou-se a mistura reagente à vácuo, lavando o sólido obtido com água gelada. Obteve-se 0,096 g (87% de rendimento) de **7a** na forma de um sólido esverdeado.

Método B

Obteve-se 0,098 g (80% de rendimento) de **7a**, na forma de um sólido esverdeado, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 1 hora de reação. A adição do hidróxido foi feita em banho de gelo. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: C₂₅H₁₈N₂O

MM: 362 g/mol

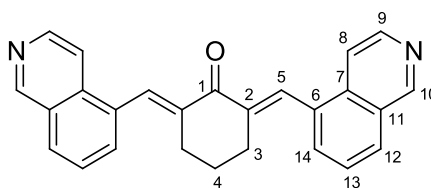
FF: 239,0-240,0 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3068 (sp^2 C-H), 2908 (sp^3 C-H), 1680 (C=O), 1621 (C=C), 1594, 1568, 1490, 1443 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆ + TFA), δ/ppm : 9,96 (2 H, s, H-9); 8,76 (2 H, d, H-8, $J_{8,7} = 6,6$ Hz); 8,68 (2 H, d, H-7, $J_{7,8} = 6,6$ Hz); 8,57 (2 H, d, H-11, $J_{11,12} = 8,2$ Hz); 8,39 (2 H, d, H-13, $J_{13,12} = 8,2$ Hz); 8,16 (2 H, s, H-4); 8,08 (2 H, t, H-12, $J_{12,13} = J_{12,11} = 8,2$ Hz); 3,06 (4 H, s, H-3).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆ + TFA) e DEPT 135, δ/ppm : 194,6 (C=O); 148,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9); 142,8 (C-2); 137,3 (C-5); 136,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 133,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 132,3 (C-6); 131,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-11); 130,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-13); 127,9 (C-10); 126,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-12); 121,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 26,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.14 Síntese de 2,6-bis-(isoquinolin-5-ilmetilideno)-ciclohexanona (**7b**)



7b

Obteve-se 0,171 g (88% de rendimento) de **7b**, na forma de um sólido esverdeado, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 30 minutos de reação. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: C₂₆H₂₀N₂O

MM: 376 g/mol

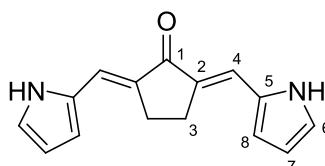
FF: 192,1-193,3 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3030 (sp^2 C-H), 2931, 2918, 2860, 2842 (sp^3 C-H); 1660 (C=O); 1615 (C=C); 1603, 1579, 1567, 1488 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-*d*₆ + TFA), δ/ppm : 9,96 (2 H, s, H-10); 8,73 (2 H, d, H-9, $J_{9,8} = 6,4$ Hz); 8,54 (2 H, d, H-12, $J_{12,13} = 8,0$ Hz); 8,41 (2 H, d, H-8, $J_{8,9} = 6,4$ Hz); 8,17-8,14 (4 H, m, H-14 e H-5); 8,04 (2 H, t, H-13, $J_{13,14} = J_{13,12} = 8,0$ Hz); 2,71 (4 H, sl, H-3); 1,63 (2 H, sl, H-4).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-*d*₆ + TFA) e DEPT 135, δ/ppm : 188,5 (C=O); 148,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-10); 141,0 (C-2); 137,1 (C-6); 136,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-5); 133,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-9); 133,0 (C-7); 131,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-12; C-13 ou C-14); 131,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-13; C-14 ou C-12); 130,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-14; C-12 ou C-13); 127,9 (C-11); 122,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-8); 28,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3); 22,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-4).

5.15 Síntese de 2,5-bis((1*H*-pirrol-2-il)metilideno)-ciclopentanona (**8a**)



8a

Obteve-se 0,126 g (44% de rendimento) de **8a**, na forma de um sólido vermelho, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 1 hora de reação.

Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: C₁₅H₁₄N₂O

MM: 238 g/mol

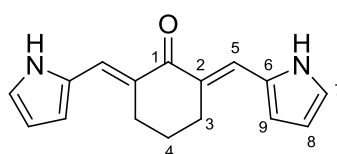
FF: 265,2-267,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3261 (N-H); 3101 (sp^2 C-H), 2962, 2914, 2837 (sp^3 C-H); 1670 (C=O); 1604 (C=C); 1583, 1538, 1454 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, piridina-*d*₅), δ/ppm : 12,53 (2 H, s, NH); 8,00 (2 H, s, H-4); 7,30 (2 H, sl, H-6); 6,84 (2 H, sl, H-8); 6,59-6,58 (2 H, m, H-7); 3,00 (4 H, s, H-3).

RMN de ¹³C (50 MHz, piridina-*d*₅) e DEPT 135, δ/ppm : 194,7 (C=O); 133,8 (C-2); 131,2 (C-5); 123,6 (CH, C-4 ou C-6); 122,9 (CH, C-6 ou C-4); 115,0 (CH, C-8); 112,3 (CH, C-7); 27,0 (CH₂, C-3).

5.16 Síntese de 2,6-bis((1*H*-pirrol-2-il)metilideno)-cicloexanona (**8b**)



8b

Obteve-se 0,126 g (45% de rendimento) de **8b**, na forma de um sólido vermelho, seguindo a metodologia geral descrita na **seção 5.1**, após 24 horas de reação. A adição do hidróxido foi feita em banho de gelo. Utilizou-se como eluente para CCD acetato de etila e como reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento.

FM: C₁₆H₁₆N₂O

MM: 252 g/mol

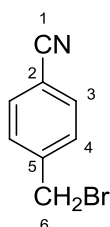
FF: 204,1-205,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3254 (N-H); 3093 (sp^2 C-H), 2954, 2930, 2911, 2854 (sp^3 C-H); 1644 (C=O); 1588 (C=C); 1558, 1490, 1449 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 11,41 (2 H, s, NH); 7,61 (2 H, s, H-5); 7,05 (2 H, sl, H-7); 6,52 (2 H, sl, H-9); 6,25 (2 H, sl, H-8); 2,75-2,73 (4 H, m, H-3); 1,77 (2 H, sl, H-4).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) e DEPT 135, δ/ppm : 186,9 (C=O); 129,4 (C-2 ou C-6); 129,0 (C-6 ou C-2); 125,9 (CH, C-5); 122,2 (CH, C-7); 113,2 (CH, C-9); 110,8 (CH, C-8); 27,8 (CH₂, C-3); 21,6 (CH₂, C-4).

5.17 Síntese da 4-(bromometil)benzonitrila (**9**)



9

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram adicionados 120 mL de benzeno, 6,59 g (56,25 mmol) de *p*-tolunitrila e 0,272 g (1,12 mmol) de peróxido de benzoíla. A mistura foi mantida sob refluxo e agitação magnética e, em seguida, adicionaram-se 10,0 g (56,18 mmol) de NBS. Após 4 horas foi observado o final da reação, caracterizado pela mudança da coloração da mistura reagente de alaranjada para amarela clara e por meio de CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; revelador: vapor de iodo). A mistura foi resfriada até temperatura ambiente, filtrou-se e evaporou-se o filtrado em evaporador rotatório. O sólido obtido foi recristalizado em metanol, resultando em 6,35 g (58% de rendimento) de **9** na forma de cristais brancos. Quantidades adicionais de **9** foram produzidas pela mesma técnica.

FM: C₈H₆BrN

MM: 196 g/mol

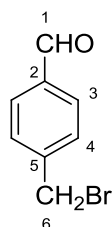
FF: 111,7-112,9 °C; FF lit.: 113-116 °C (WEN, LI e SCHLENOFF, 1997).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3092, 3068 (sp^2 C-H); 2226 (C \equiv N) 1934, 1810 (harmônicas anel aromático *para*-dissubstituído); 1606, 1503 (C=C arom.); 846 (deformação angular C-H. anel aromático *para*-dissubstituído).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 7,64 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 8,0$ Hz); 7,50 (2 H, d, H-4, $J_{4,3} = 8,0$ Hz); 4,48 (2 H, s, CH₂Br).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) e DEPT 135, δ/ppm : 143,0 (C-5); 132,7 (CH, C-3); 129,9 (CH, C-4); 118,5 (C \equiv N); 112,3 (C-2); 31,7 (CH₂, C-6).

5.18 Síntese do 4-(bromometil)benzaldeído (10)



10

A um balão bitubulado de 50 mL contendo 6 mL de tolueno anidro, adicionou-se 0,600 g (3,06 mmol) de **9**. O sistema foi fechado com rolhas de borracha acoplado a um tubo de nujol e mantido sob agitação magnética, atmosfera de nitrogênio e banho de gelo à 0°C. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, com auxílio de uma seringa de vidro, 4 mL (4 mmol) de uma solução de DIBAL-H 0,1 mol/L em tolueno. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento) e, após 2 horas, adicionaram-se 8 mL de clorofórmio, seguido de adição lenta de 20 mL de uma solução de ácido clorídrico 10% v/v. A mistura

reagente foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por 1 hora. A mistura foi transferida para um funil de separação e a fase orgânica foi recolhida, lavada com água destilada (2 x 10 mL) e secada com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e eliminou-se quase completamente o solvente em evaporador rotatório. O resíduo foi filtrado e lavado com hexano gelado, obtendo-se 0,429 g (71% de rendimento) de **10** como um sólido branco. Quantidades adicionais de **10** foram produzidas pela mesma técnica.

FM: C₈H₇BrO

MM: 199 g/mol

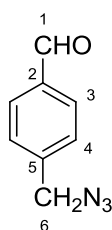
FF: 95,5-96,0 °C; FF lit.: 97-100 °C (WEN, LI e SCHLENOFF, 1997).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3032 (sp^2 C-H), 2855 (sp^3 C-H); 2752 (C-H de aldeído); 1928 (harmônicas anel aromático *para*-dissubstituído); 1682 (C=O); 1604, 1577 (C=C arom.), 831 (deformação angular C-H anel aromático *para*-dissubstituído).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 10,01 (1 H, s, CHO); 7,86 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 8,2$ Hz); 7,56 (2 H, d, H-4, $J_{4,3} = 8,2$ Hz); 4,52 (2 H, s, CH₂Br).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) e DEPT 135, δ/ppm : 191,7 (CHO); 144,4 (C-5); 136,2 (C-2); 130,3 (CH, C-3 ou C-4); 129,8 (CH, C-4 ou C-3); 32,2 (CH₂, C-6).

5.19 Síntese de 4-(azidometil)benzaldeído (**11**)



11

Método A:

A um balão de fundo redondo de 250 mL contendo 55 mL de THF e 27,5 mL de água destilada foram adicionados 4,17 g (20,95 mmol) de **10** e 2,72 g (41,85 mmol) de azida de sódio. Deixou-se a reação sob agitação magnética à 60 °C por 21 horas, quando foi observado consumo total do material de partida por CCD (eluente: diclorometano/hexano 8:2; reveladores: 1) vapor de iodo; 2) sol. de H₂SO₄, seguido de aquecimento). A mistura foi transferida para um funil de separação e extraiu-se com éter etílico (3 x 20 mL). A fase orgânica foi lavada com água destilada (2 x 30 mL) e secada com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e removeu-se o solvente orgânico em evaporador rotatório, obtendo-se 3,26 g (97% de rendimento) de **11**, na forma de um óleo amarelado. Quantidades adicionais de **11** foram produzidas utilizando a técnica descrita acima.

Método B:

A um balão de fundo redondo de 50 mL foram misturados 0,192 g (0,96 mmol) de **10** e 0,125 g (1,93 mmol) de azida de sódio em 3,3 mL de DMF. Deixou-se a mistura reagente a temperatura ambiente e sob agitação magnética por 1 hora, quando adicionaram-se 2 mL de acetona para solubilizar os reagentes e aumentou-se a temperatura da reação para 50 °C, mantendo-se agitação magnética por 24 horas. Procedeu-se a elaboração da reação da mesma forma que na técnica anterior, obtendo-se, ao final, uma mistura de produtos na forma de um óleo viscoso alaranjado. O produto bruto foi submetido à CCS (eluentes: diclorometano/hexano 85:15; diclorometano) obtendo-se 0,024 g (15% de rendimento) do produto desejado **11**, sob a forma de um óleo amarelado. Isolou-se, também, o subproduto **11b** na forma de um sólido branco.

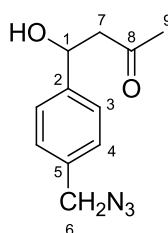
11:FM: C₈H₇N₃O

MM: 161 g/mol

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2931, 2834 (sp^3 C-H); 2740 (C-H aldeído); 2095 (N_3); 1696 (C=O), 1608, 1578 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 10,02 (1 H, s, CHO); 7,91 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 8,2$ Hz); 7,49 (2 H, d, H-4, $J_{4,3} = 8,2$ Hz); 4,46 (2 H, s, CH_2N_3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 191,9 (CHO); 142,3 (C-5); 136,3 (C-2); 130,4 (CH , C-3 ou C-4); 128,6 (CH , C-4 ou C-3); 54,4 (CH_2 , C-6).



11b

11b (4-(4-(azidometil)fenil)-4-hidroxi-2-butanona):

FM: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2$

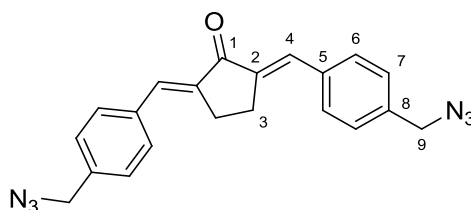
MM: 205 g/mol

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3425 (O-H); 2926 (sp^3 C-H); 2093 (N_3); 1704 (C=O), 1610, 1513 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,37 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 8,0$ Hz); 7,28 (2 H, d, H-4, $J_{4,3} = 8,0$ Hz); 5,17-5,11 (1 H, m, H-1); 4,31 (2 H, s, CH_2N_3 , H-6); 3,42 (1 H, sl, OH); 2,86-2,80 (2 H, m, H-7 + H-7'); 2,17 (3 H, s, H-9).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 209,1 (C=O); 143,1 (C-5); 134,9 (C-2); 128,5 (CH , C-4); 126,2 (CH , C-3); 69,6 (CH , C-1), 54,6 (CH_2 , C-6), 52,0 (CH_2 , C-7), 30,9 (CH_3 , C-9).

5.20 Síntese de 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (**12**)



12

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,261 g (3,11 mmol) de ciclopentanona e 1,0 g (6,21 mmol) de **11** em 6 mL de álcool etílico 95%, adicionaram-se, lentamente, 4,6 mL de uma solução 0,2 mol/L de hidróxido de sódio (0,92 mmol). A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 horas, quando foi observado por CCD (eluente: diclorometano/hexano 8:2; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de H₂SO₄) consumo completo de **11**. O precipitado formado na reação foi filtrado à vácuo e lavado com água gelada. Deixou-se o sólido obtido no dessecador durante 48 horas, obtendo-se 1,15 g (100% de rendimento) de **12** na forma de um sólido amarelo. Quantidades adicionais de **12** foram produzidas pela mesma técnica.

FM: C₂₁H₁₈N₆O

MM: 370 g/mol

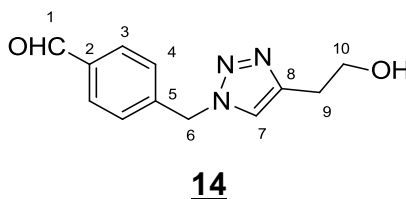
FF: 155,2-158,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3030 (*sp*² C-H); 2912, 2848 (*sp*³ C-H); 2093 (N₃); 1698 (C=O); 1615 (C=C); 1600, 1561, 1509 (C=C arom.).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 7,64-7,60 (6 H, m, H-4 e H-6); 7,40 (4 H, d, H-7, *J*_{7,6} = 8,0 Hz); 4,39 (4 H, s, H-9); 3,13 (4 H, s, H-3).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 196,3 (C=O); 137,8 (C-2); 136,9 (C-5 ou C-8); 135,9 (C-8 ou C-5); 133,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 131,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 128,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 54,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-9); 26,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.21 Síntese de 4-((4-(2-hidroxi-etil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzaldeído (**14**)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,200 g (1,24 mmol) de **11**, 0,089 g (1,24 mmol) de but-3-in-1-ol 97%, 0,030 g (0,12 mmol) de sulfato de cobre penta-hidratado em 4 mL de diclorometano, adicionaram-se 4 mL de uma solução aquosa recém-preparada de 0,065 g (0,37 mmol) de ácido ascórbico e 0,031 mg (0,37 mmol) de bicarbonato de sódio. A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética por 20 horas, quando foi observado o consumo completo do aldeído de partida **11** por CCD (eluente: diclorometano/hexano, 7:3; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de H_2SO_4 , seguido de aquecimento). Após o término da reação, adicionou-se à mistura reagente 1 mL de água destilada e extraiu-se com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica reunida foi lavada com 10 mL de água destilada e secada com sulfato de magnésio anidro. Após filtração, eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se 0,175 g (61% de rendimento) de **14** sob a forma de um sólido amarelo pálido.

FM: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$

MM: 231 g/mol

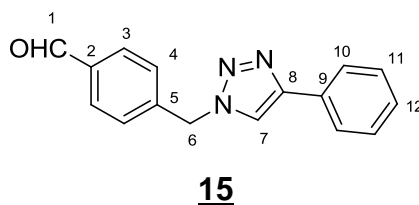
FF: 88,3-89,7 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3454 (O-H); 3144 (sp^2 C-H), 2953, 2859 (sp^3 C-H); 2747 (C-H de aldeído); 1686 (C=O); 1606, 1578, 1553 (C=C arom.); 1042 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 9,99 (1 H, s, CHO); 7,86 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 8,0$ Hz); 7,41-7,37 (3 H, m, 2 x H-4 e H-7); 5,58 (2 H, s, H-6); 3,91 (2 H, t, H-10, $J_{10,9} = J_{10,9'} = 5,9$ Hz); 2,93 (2 H, t, H-9, $J_{9,10} = J_{9,10'} = 5,9$ Hz); 2,90 (1 H, sl, OH).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 191,7 ($\text{C}=\text{O}$); 146,4 (C-8); 141,4 (C-5); 136,6 (C-2); 130,5 (CH , C-3 ou C-4); 128,5 (CH , C-4 ou C-3); 122,0 (CH , C-7); 61,6 (CH_2 , C-10); 53,7 (CH_2 , C-6); 28,9 (CH_2 , C-9).

5.22 Síntese de 4-((4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzaldeído (**15**)



Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,100 g (0,62 mmol) de **11**, 0,065 g (0,62 mmol) de fenilacetileno, 0,017 g (0,06 mmol) de sulfato de cobre penta-hidratado em 2 mL de diclorometano, adicionaram-se 2 mL de uma solução aquosa recém-preparada de 0,033 g (0,19 mmol) de ácido ascórbico e 0,016 g (0,19 mmol) de bicarbonato de sódio. O sistema foi mantido à temperatura ambiente sob agitação por 22 horas, tempo em que foi observado consumo de todo aldeído de partida **11** por CCD (eluente: diclorometano/hexano, 7:3; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). Adicionaram-se então, à mistura reagente, 3 mL de água destilada e extraiu-se com diclorometano (3 x 5 mL). A fase orgânica foi reunida, lavada com 10 mL de água destilada, secada com sulfato de magnésio anidro, filtrada e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. Obteve-se 0,141 g (86% de rendimento) de **15** sob a forma de um sólido amarelo pálido.

FM: $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$

MM: 263 g/mol

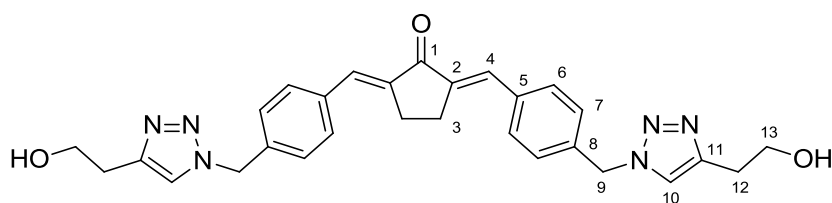
FF: 125,3-127,0 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3082 (sp^2 C-H), 2828 (sp^3 C-H); 2741 (C-H de aldeído); 1691 (C=O); 1607, 1578 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 10,01 (1 H, s, CHO); 7,88 (2 H, d, H-3, $J_{3,4} = 7,8$ Hz); 7,83-7,76 (3 H, m, H-10 e H-12); 7,45-7,32 (5 H, m, H-4; H-7 e H-11); 5,66 (2 H, s, H-6).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 191,6 (C=O); 141,4 (C-5); 136,6 (C-2); 130,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-3 ou C-4); 130,4 (C-9); 129,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4 ou C-3 + C-7); 128,55 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-11); 128,51 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-12); 125,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-10); 53,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-6).

5.23 Síntese de 2,5-bis(4-((4-(2-hidroxietil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzilideno)ciclopentanona (**16**)



16

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,119 g (0,52 mmol) de **14** e 0,022 g (0,26 mmol) de ciclopentanona em 5 mL de álcool etílico 95%, adicionou-se, lentamente, 0,4 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol/L (0,08 mmol). A reação foi mantida à temperatura ambiente sob agitação magnética. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluente: acetato de etila; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de H_2SO_4 , seguido de aquecimento), sendo observado o consumo total de **14** após 19 horas de reação. Ao final da reação, reduziu-se o volume do solvente em evaporador rotatório e a mistura resultante foi filtrada em papel filtro (poros de 8 μm), lavando o precipitado com água gelada. O sólido obtido foi mantido em dessecador. Obteve-se 0,070g (53% de rendimento) de **16** na forma de um sólido amarelo.

FM: $\text{C}_{29}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_3$

MM: 510 g/mol

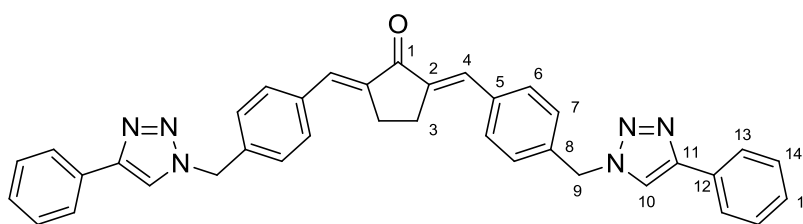
Fusão com decomposição em 170 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3273 (O-H); 3136 (sp^2 C-H), 2917 (sp^3 C-H); 1691 (C=O); 1625 (C=C); 1598, 1565, 1511 (C=C arom.); 1050 (C-O).

RMN de ^1H (200 MHz, DMSO- d_6), δ/ppm : 7,94 (2 H, s, H-4); 7,68 (4 H, d, H-6, $J_{6,7} = 8,0$ Hz); 7,40-7,36 (6 H, m, H-10 e H-7); 5,60 (4 H, s, H-9); 4,72 (2 H, s, O-H); 3,63-3,61 (4 H, m, H-13); 3,06 (4 H, s, H-3); 2,76 (4 H, t, H-12, $J_{12,13} = J_{12,13'} = 6,7$ Hz).

RMN de ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6) e DEPT 135, δ/ppm : 195,3 (C=O); 144,8 (C-11); 138,1 (C-2); 137,6 (C-8); 135,0 (C-5); 132,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 131,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-7); 128,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-6); 122,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-10); 60,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-13); 52,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-9); 29,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-12); 26,0 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-3).

5.24 Síntese de 2,5-bis-(4-((4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)benzilideno)-ciclopentanona (17)



17

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,100 g (0,38 mmol) de **15** e 0,016 g (0,19 mmol) de ciclopentanona em 4 mL de álcool etílico 95%, adicionou-se, lentamente, 0,3 mL de uma solução aquosa de hidróxido de sódio 0,2 mol/L (0,06 mmol) e manteve-se a reação à temperatura ambiente sob agitação magnética. A evolução da reação foi monitorada por CCD (eluyente: hexano/acetato de etila, 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento) e o consumo total de **15** pôde ser visualizado após 4 horas de reação. Ao final da reação, reduziu-se o volume do solvente em evaporador rotatório e a mistura

reagente resultante foi filtrada, lavando-a com água gelada. O sólido obtido foi mantido em dessecador, fornecendo 0,080g (73% de rendimento) de **17** na forma de um sólido amarelado.

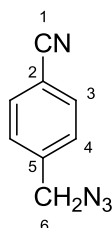
FM: C₃₇H₃₀N₆O

MM: 574 g/mol

Fusão com decomposição em 301,7 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3125, 3093 (sp^2 C-H), 2949 (sp^3 C-H); 1695 (C=O); 1628 (C=C), 1602, 1566, 1512 (C=C arom.).

5.25 Síntese de 4-(azidometil)benzonitrila (**18**)



18

A um balão de fundo redondo de 100 mL contendo 20 mL de THF e 10 mL de água destilada foram adicionados 1,5 g (7,65 mmol) de **9** e 1,0 g (15,3 mmol) de azida de sódio. A reação foi mantida sob agitação magnética à 60 °C e acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de H₂SO₄, seguido de aquecimento). Após 20 horas, resfriou-se o sistema até temperatura ambiente e, em seguida, extraiu-se com éter etílico (2 x 10 mL). A fase orgânica reunida foi lavada com 10 mL de água destilada e secada com sulfato de magnésio anidro. Filtrou-se e removeu-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se 1,10 g (91% de rendimento) de **18**, na forma de um óleo amarelado.

FM: C₈H₆N₄

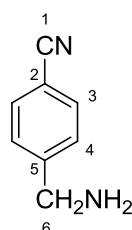
MM: 158 g/mol

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 2930 (sp^3 C-H); 2229 (C \equiv N); 2095 (N₃); 1609, 1505 (C=C arom.).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,60 (2 H, d, $J_{3,4} = 8,2$ Hz, H-3); 7,38 (2 H, d, $J_{4,3} = 8,2$ Hz, H-4); 4,40 (2 H, s, H-6).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 140,7 (C-5); 132,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-3); 128,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 118,3 ($\underline{\text{C}}\text{N}$); 111,7 (C-2); 53,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-6).

5.26 Síntese de 4-(aminometil)benzonitrila (**19**)



19

Método A

A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 1,1 g (6,96 mmol) de **18** dissolvidos em 25 mL de THF, adicionaram-se 2,7 g (10,44 mmol) de trifenilfosfina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 1 hora, quando se observou o consumo completo de **18** por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Ao término da reação, reduziu-se o volume de THF à metade em evaporador rotatório, adicionaram-se 20 mL de uma mistura 1:1 de CHCl_3 /hexano e extraiu-se com solução aquosa de ácido clorídrico 0,1 mol/L (3 x 20 mL). A fase aquosa foi acidificada até pH 1, reunida novamente à fase orgânica anterior e recolhida após separação de fases. A fase orgânica foi, então, lavada com mais 20 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico 0,2 mol/L. As fases aquosas foram, então, reunidas e alcalinizadas com solução aquosa de hidróxido de sódio 1 mol/L e extraída com acetato de etila (3 x 30 mL). Secou-se a fase orgânica reunida com sulfato de magnésio anidro, filtrou-se e o solvente foi evaporado em evaporador

rotatório. O procedimento foi repetido com a fase aquosa resultante, obtendo-se 1,598 g de uma mistura de **19** contaminada com óxido de trifetilfosfina que foi submetida a próxima etapa de síntese sem purificação prévia.

Método B

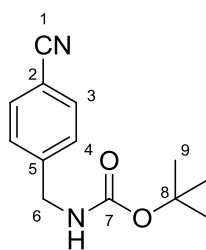
A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,107 g (0,67 mmol) de **18** em 5 mL de THF, adicionou-se 0,021 g de paládio 5% em carvão ativado. O balão foi vedado com rolha de borracha e mantido sob fluxo de N₂ por 5 minutos. Em seguida, o sistema vedado foi acoplado a um balão de borracha contendo H₂ e permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 24 horas. O consumo do material de partida **18** foi observado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 8:2 e acetato de etila/metanol 9:1; reveladores: 1) vapor de iodo 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Ao final da reação, a mistura reagente foi filtrada utilizando 2 papéis filtro de 8 µm de porosidade e o solvente eliminado em evaporador rotatório. Obteve-se 0,074 g (83% de rendimento) de um óleo incolor que foi submetido à próxima etapa de síntese sem purificação prévia.

FM: C₈H₈N₂

MM: 132 g/mol

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3370 (NH₂); 3052 (*sp*² C-H); 2842 (*sp*³ C-H); 2226 (C≡N); 1607, 1504 (C=C arom.).

5.27 Síntese de *tert*-butil-(4-cianobenzil)carbamato (**20**)



20

A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,920 g (6,97 mmol) de **19**, 5,5 mL de água destilada e 11,5 mL de THF, adicionaram-se 6,6 mL de uma solução aquosa 2 mol/L de hidróxido de sódio (13,2 mmol). A mistura foi resfriada a 0 °C em banho de gelo e, sob agitação magnética, adicionaram-se 3,04 g (13,94 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butila. Após 15 minutos, retirou-se o banho de gelo e manteve-se a reação sob agitação magnética à temperatura ambiente por 17 horas. Adicionou-se, então, mais 2,28 g (10,45 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butila, e deixou-se reagir por mais 1 hora, quando foi observado o consumo completo de **19** por CCD (eluente: diclorometano/hexano 7:3; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Ao término da reação, reduziu-se o volume do solvente em evaporador rotatório e acidificou-se a mistura reagente com uma solução aquosa de HCl 5 mol/L até pH 2. Adicionaram-se 50 mL de acetato de etila e extraiu-se com 30 mL de água destilada. A fase orgânica foi recolhida, seca com sulfato de magnésio, filtrada e o solvente eliminado em evaporador rotatório. O resíduo resultante foi incorporado em sílica para purificação por CCS (eluentes: hexanos/diclorometano, 7:3→2:8). Obteve-se 0,490 g (30% de rendimento) de **20**, 0,029 g (2% de rendimento) do subproduto **20b** e 0,378 g (16% de rendimento) do subproduto **20c**.

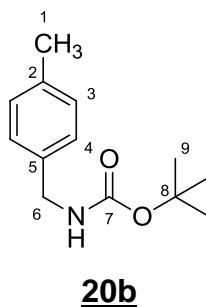
20:FM: C₁₃H₁₆N₂O₂

MM: 232 g/mol

FF: 94,3-99,1 °C; FF lit.: 90-92 °C (ILAS e KIKELJ, 2008).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3351 (N-H); 2978, 2934 (sp^3 C-H); 2228 (C≡N); 1682 (C=O); 1609, 1505 (C=C arom.); 1365 (deformação angular CH₃).RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 7,60 (2 H, d, $J_{3,4} = 8,0$ Hz, H-3); 7,37 (2 H, d, $J_{4,3} = 8,0$ Hz, H-4); 5,12 (1 H, sl, NH); 4,35 (2 H, d, $J_{6,\text{NH}} = 5,6$ Hz, H-6); 1,44 (9 H, s, H-9).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 156,1 (C=O); 144,8 (C-5); 132,5 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-3); 127,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 118,9 ($\underline{\text{C}}\text{N}$); 111,1 (C-2); 80,2 (C-8); 44,3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-6); 28,5 (C-9).



20b (*tert*-butil 4-metilbenzilcarbamato):

FM: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_2$

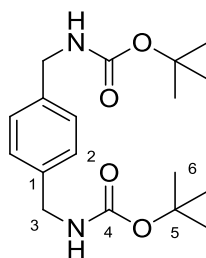
MM: 221 g/mol

FF: 63,4-65,5 $^\circ\text{C}$; FF lit.: 72,5-73 $^\circ\text{C}$ (TANAKA, TOSHIFUJI e NITTA, 1988).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3358 (N-H); 2974, 2921 (sp^3 C-H); 1682 (C=O); 1504, 1465 (C=C arom.); 1364 (deformação. angular CH_3).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,16-7,15 (4 H, m, H-3 + H-4); 4,88 (1 H, sl, $\underline{\text{N}}\text{H}$); 4,27 (2 H, d, $J_{6,\underline{\text{N}}\text{H}} = 5,6$ Hz, H-6); 2,34 (3 H, s, H-1); 1,47 (9 H, s, H-9).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 156,1 (C=O); 137,1 (C-2); 136,1 (C-5); 129,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-3); 127,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$, C-4); 79,5 (C-8); 44,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$, C-6); 28,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, C-9); 21,23 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$, C-1).

**20c**

20c (di-*tert*-butil (1,4-fenileno-bis(metileno))dicarbamato):

FM: C₁₈H₂₈N₂O₄

MM: 336 g/mol

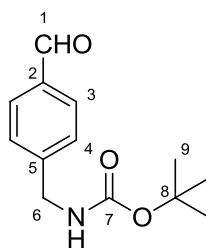
FF: 145,9-148,6 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3330 (N-H); 2978, 2959, 2931 (sp^3 C-H); 1682 (C=O); 1536, 1505 (C=C arom.); 1363 (deformação. angular CH₃).

RMN de ¹H (200 MHz, DMSO-d₆), δ/ppm : 7,16 (4 H, s, H-2); 4,28 (2 H, sl, NH); 4,08 (4 H, d, $J_{3,\text{NH}} = 6,0$ Hz, H-3); 1,38 (18 H, s, H-6).

RMN de ¹³C (50 MHz, DMSO-d₆) e DEPT 135, δ/ppm : 155,8 (C=O); 138,5 (C-1); 126,8 (CH, C-2); 77,7 (C-5); 43,1 (CH₂, C-3); 28,2 (CH₃, C-6).

5.28 Síntese de *tert*-butil (4-formilbenzil)carbamato (21)

**21**

A um balão bitubulado de 50 mL contendo 0,199 g (0,90 mmol) de **20**, adicionaram-se 5 mL de tolueno anidro. O sistema foi fechado com rolha de borracha, acoplou-se um tubo de nujol e manteve-se sob agitação magnética, atmosfera de nitrogênio e banho de gelo à 0°C. Em seguida, adicionaram-se, lentamente, com auxílio de uma seringa de vidro, 1,3 mL (1,3 mmol) de uma solução de DIBAL-H 0,1 mol/L em tolueno. A formação de **21** foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento) e, após 2 horas, adicionaram-se 4,6 mL de clorofórmio seguido de adição lenta de 12 mL de uma solução de ácido clorídrico 5% v/v, removendo a atmosfera de N₂ e o banho de gelo. A mistura reagente permaneceu sob agitação por 1 hora. A mistura foi transferida para um funil de separação, lavada com água destilada (2 x 10 mL) e a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. Filtrou-se e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório, obtendo-se 0,143 g (67% de rendimento) de **21** na forma de um sólido branco.

FM: C₁₃H₁₇NO₃

MM: 235 g/mol

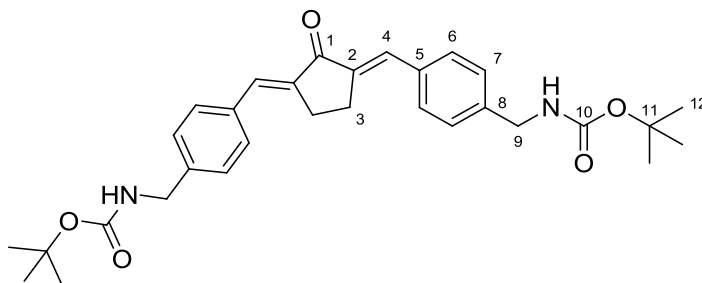
FF: 71,8-76,4 °C; FF lit.: 83-84 °C (VAREDIAN *et al.*, 2008).

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3350 (N-H); 2979, 2928 (sp^3 C-H); 2739 (C-H de aldeído); 1699 (C=O de carbamato); 1673 (C=O de aldeído); 1608, 1578, 1505 (C=C arom.); 1365 (deformação. angular CH₃).

RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃), δ/ppm : 9,98 (1 H, s, CHO); 7,83 (2 H, d, $J_{3,4} = 8,0$ Hz, H-3); 7,43 (2 H, d, $J_{4,3} = 8,0$ Hz, H-4); 5,11 (1 H, sl, NH); 4,38 (2 H, d, $J_{6,\text{NH}} = 6,0$ Hz, H-6); 1,45 (9 H, s, H-9).

RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) e DEPT 135, δ/ppm : 192,1 (CHO); 156,1 (C=O); 146,4 (C-5); 135,7 (CH, C-3); 130,3 (CH, C-4); 127,9 (C-2); 80,1 (C-8); 44,5 (CH₂, C-6); 28,5 (CH₃, C-9).

5.29 Síntese de 2,5-bis-(4-*N*-*tert*-butoxicarbonilaminometilbenzilideno)-ciclopentanona (**22**)



22

Método A

Em um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,024 g (0,29 mmol) de ciclopentanona e 0,143 g (0,61 mmol) de **21** em 0,6 mL de álcool etílico 95%, adicionou-se, lentamente, 0,45 mL de uma solução aquosa 0,2 mol/L de hidróxido de sódio (0,09 mmol). A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos, tempo em que foi observado o consumo do aldeído de partida **21** por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 1:1; reveladores: 1) vapor de iodo 2) sol. de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, seguido de aquecimento). O precipitado formado foi filtrado à vácuo utilizando-se papel filtro (poros de 8 μm) e lavado com água gelada. Obteve-se 0,078 g (52% de rendimento) de **22** na forma de um sólido amarelo.

Método B

Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 0,100 g (0,27 mmol) do diazido **12**, 0,210 g (0,80 mmol) de trifenilfosfina e 15 mL de THF. Ao balão foi acoplado um tudo de cloreto de cálcio e a mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, sendo o desenvolvimento da reação acompanhado por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 4:6; reveladores: 1) vapor de iodo; 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Após consumo de todo material de partida (3 horas), adicionaram-se 5 mL de água destilada, 0,4 mL de uma solução aquosa de NaOH 10% p/v e 0,13 g (0,6 mmol) de dicarbonato de di-*tert*-butila, sob banho de gelo. A mistura foi mantida sob agitação magnética e banho de gelo por 40 minutos e, em seguida, agitou-se por mais 30 minutos à temperatura

ambiente. A mistura foi, então, transferida para a geladeira, onde foi deixada por 12 horas. Removeu-se o solvente em evaporador rotatório e ao resíduo resultante adicionou-se uma solução aquosa de HCl 0,1 mol/L até pH 2,0. Adicionaram-se, então, 50 mL de acetato de etila, transferiu-se a mistura para um funil de separação e extraiu-se com água destilada (2 x 10 mL). O sólido insolúvel na fase orgânica foi filtrado, lavado com 6 mL de uma mistura clorofórmio:hexano 1:2 e filtrado novamente, obtendo-se 0,041 g de um sólido amarelo. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio, filtrou-se e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi lavado com 8 mL de uma mistura clorofórmio:hexano 1:2 e, em seguida, filtrado. Obteve-se 0,0163 g de um sólido amarelo. Os sólidos obtidos foram reunidos, obtendo-se 0,058 g (41% de rendimento) de **22**.

FM: $C_{31}H_{38}N_2O_5$

MM: 518 g/mol

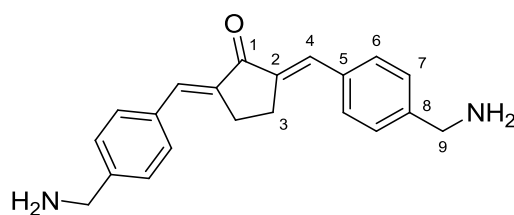
Fusão com decomposição em 207,8 °C

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3356 (N-H); 2975, 2928 (sp^3 C-H); 1685 (C=O cetona + C=O carbamato); 1625 (C=C); 1606, 1505 (C=C arom.); 1365 (deformação. angular CH_3).

RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3), δ/ppm : 7,57-7,54 (6 H, m, H-4 + H-6); 7,34 (2 H, d, $J_{7,6} = 7,8$ Hz, H-7); 4,98 (1 H, sl, NH); 4,34 (4 H, d, $J_{9,\text{NH}} = 5,6$ Hz, H-9); 3,09 (4 H, s, H-3); 1,47 (18 H, s, H-12).

RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) e DEPT 135, δ/ppm : 156,1 (C=O, carbamato); 140,7 (C-2); 137,4 (C-8); 135,0 (C-5); 133,6 (CH, C-4); 131,2 (CH, C-6); 127,9 (CH, C-7); 79,9 (C-11); 44,6 (CH₂, C-9); 28,6 (CH₃, C-12); 26,7 (CH₂, C-3).

5.30 Síntese de 2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona

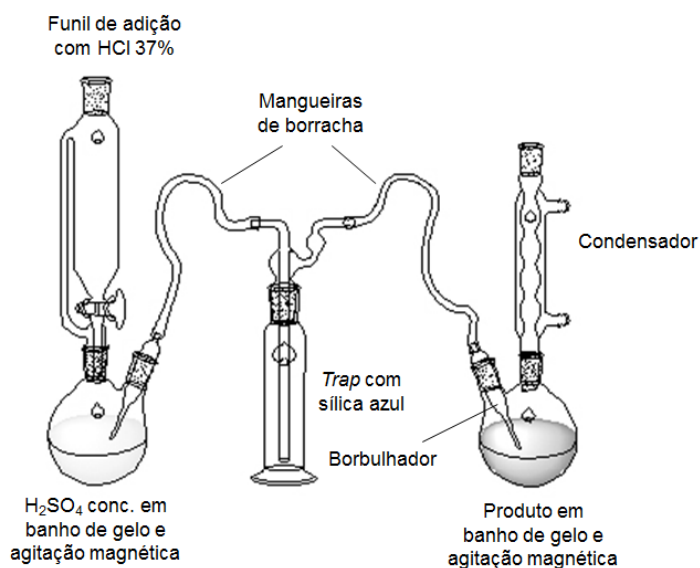


13

Método A

A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,200 g (0,52 mmol) de **12** dissolvidos em 10 mL de THF, adicionou-se 0,424 g (1,62 mmol) de trifetilfosfina. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 2 horas, quando observou-se o consumo completo de **12** por CCD (eluente: diclorometano; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Ao término da reação, a mistura reagente foi transferida para um balão bitubulado de 125 mL. Um sistema para geração de HCl gasoso, pela adição de HCl concentrado em ácido sulfúrico concentrado, foi montado conforme mostrado na **Figura 18**. Borbulhou-se HCl na mistura reagente, sob agitação magnética e banho de gelo, por 5 minutos, observando a formação de um precipitado. Filtrou-se, obtendo-se 0,165 g (79% de rendimento) de um produto que, ao ser caracterizado, revelou contaminação por óxido de trifetilfosfina.

Figura 18 – Montagem para geração de HCl_(g).



Método B

A um balão de fundo redondo de 50 mL contendo 0,066 g (0,13 mmol) de **22** dissolvidos em 2 mL de CH₂Cl₂ grau HPLC, adicionou-se 0,3 mL (3 mmol) de ácido trifluoroacético (TFA). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos, quando se observou o consumo completo de **22** por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 6:4; reveladores: 1) vapor de iodo, 2) sol. de ninhidrina, seguido de aquecimento). Ao término da reação, eliminou-se o solvente e o excesso de TFA com o auxílio de jato de ar comprimido. Ao resíduo resultante foi adicionado éter etílico na tentativa de solidificar o produto e, ao final, obteve-se 0,076 g de um óleo amarelado.

FM: C₂₁H₂₂N₂O.2HCl (método A); C₂₁H₂₂N₂O.2CF₃COOH (método B)

MM: 391 g/mol (método A); 546g/mol (método B)

IV, $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$: 3369 (N-H); 2969, 2859 (sp^3 C-H); 1689 (C=O); 1621 (C=C); 1602, 1562, 1509 (C=C arom.).

5.31 Ensaios biológicos

5.31.1 Ensaios *in vitro* com enzima tripanotiona redutase e glutationa redutase

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob coordenação do Prof. Mário Steindel. A enzima TR foi expressa e purificada conforme protocolo descrito na literatura (BRADFORD, 1976; HAMILTON *et al.*, 2003). O ensaio enzimático foi conduzido em placas de 96 poços em um volume final de 250 μ L contendo: 40 mM de tampão Hepes (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 150 μ M de NADPH, 1 μ M de tripanotiona (Bachem, Torrance), 25 μ M de DTNB (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 230 ng da enzima TR de *T. cruzi* e diferentes concentrações (10 a 100 μ M) dos compostos testados em uma concentração máxima de 1% de DMSO. Como controles foram utilizados a clomipramina, como controle positivo, (Sigma-Aldrich, Saint Louis) em diferentes concentrações e o solubilizante DMSO 1%, como controle negativo. Como branco foram utilizados os compostos na maior concentração (100 μ M) incubados com todos os reagentes, menos a enzima. A mistura foi pré-incubada a 30°C durante 30 minutos e a leitura, em λ 412 nm, foi iniciada após a adição de 25 μ M de DTNB. O aumento de absorbância, devido à formação de TNB, é proporcional a atividade enzimática, medindo-se a inclinação da curva durante 30 minutos (δ Abs/ δ t). Este valor foi comparado ao controle (DMSO 1%), para fornecer o percentual de inibição da enzima e determinação do valor de CI_{50} . Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes e os resultados expressos como o percentual de redução na atividade enzimática. Na triagem foram considerados ativos os compostos que inibiram pelo menos 50% da atividade enzimática na concentração de 100 μ M.

Os testes de inibição da GR humana (Sigma-Aldrich, Saint Louis) foram realizados de acordo com o método descrito por Carlberg e Mannervik (1985). A atividade enzimática foi representada pela diminuição da absorbância a medida que o NADPH vai sendo consumido na reação, resultando em um coeficiente de correlação negativo. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços em um volume final de 250 μ L contendo: 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 1 mM de EDTA, 400

μM de NADPH, 1 mM de glutathiona oxidada (Sigma-Aldrich, Saint Louis), 10 mU da enzima (GR – Sigma-Aldrich, Saint Louis) e diferentes concentrações (10 a 100 μM) dos compostos testados em uma concentração máxima de 1% de DMSO. Controles com 10 μM do inibidor Becenun® carmustina - BCNU (Bristol-Myers Squibb, New York) e sem amostra foram realizados em paralelo. A mistura foi pré-incubada a 30°C durante 30 minutos e a leitura, em λ 340 nm, foi iniciada após a adição de 1 mM de substrato (glutathiona oxidada) medindo-se a inclinação da curva durante cinco minutos ($\delta\text{Abs}/\delta t$). Este valor foi comparado com o controle sem amostra para fornecer o percentual de inibição da enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes. Foram considerados ativos os compostos que inibiram pelo menos 50% da atividade enzimática.

5.31.2 Ensaio *in vitro* com *Trypanosoma cruzi* e ensaio de citotoxicidade

Os ensaios foram realizados pela equipe do Dr. José Alvaro Romanha do Centro de Pesquisas René Rachou. Foi utilizada uma cepa de *T. cruzi* (Tulahuen) transformada para expressar β -galactosidase, enzima que é capaz de catalisar uma reação colorimétrica quando o vermelho de clorofenil- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) é utilizado como substrato (BUCKNER *et al.*, 1996). Células de fibroblastos L929 foram semeadas em placas de 96 poços, 4.000 células por poço, seguido de incubação *overnight* em estufa a 37°C para a adesão da célula à superfície. Após incubação, a infecção foi feita com 10 parasitas/célula durante 2 h. Após esse período, o meio contendo os parasitos extracelulares foi substituído por um novo meio e a placa novamente incubada a 37° C durante 48 h. O meio de cultura foi substituído por 160 μL de meio novo, além dos compostos diluídos numa concentração de 100 μM em 40 μL de DMSO 5% em meio, e a placa incubada a 37° C por 96 h. Após esse período, foi adicionado o substrato CPRG aos poços, a placa incubada a 37°C, e a leitura realizada após 16-20 h em espectrofotômetro utilizando um filtro de 570 nm. Em paralelo, foram utilizados os seguintes controles: células não infectadas, para avaliação da citotoxicidade dos compostos, células infectadas não tratadas, Benznidazol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo e DMSO diluído em meio a uma concentração final de 1 % (controle negativo). Os resultados foram expressos como a porcentagem de redução da absorbância dos poços

experimentais em comparação com a absorbância dos poços com células infectadas não tratadas.

5.31.3 Ensaio *in vitro* com *Leishmania amazonensis*

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* foi realizada pela equipe da Professora Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFMG. O método envolve a conversão de um sal de tetrazolium, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), em um produto colorido (formazan), cuja quantidade produzida é proporcional ao número de células viáveis. As substâncias testadas foram adicionadas à suspensão de *Leishmania amazonensis* em diferentes concentrações e incubados por 48 horas. A reação enzimática foi parada pela adição de 100 µL de solução 10% dodecilssulfato de sódio / 50% isopropanol. A densidade óptica foi medida a 570 nm usando um leitor de ELISA (BioSource, Inc., EUA). Foram realizados três experimentos independentes, em duplicata. Os resultados foram processados utilizando-se MiniTab®.

5.32 Estudos de ancoragem molecular

Os estudos de ancoragem molecular foram realizados utilizando-se o programa Autodock 4.0, auxiliado pela interface gráfica do AutoDockTools (MORRIS *et al.*, 1998).

A estrutura cristalográfica da tripanotiona redutase, de 2.4 Å de resolução, foi obtida do *Protein Data Bank*, código identificador 1BZL (BOND *et al.*, 1999). As moléculas de água e os ligantes foram removidos. Às estruturas terciárias da enzima e do FAD foram, separadamente, adicionados hidrogênio e submetidas a cálculos de carga atômica Gasteiger e, posteriormente, as duas moléculas foram reunidas em um único arquivo PDB.

Os mapas de grade de potencial (*grid*) foram calculados pelo programa Autogrid 4.0. A caixa criada para a geração dos *grids* foi centralizada em um dos átomos de

enxofre da estrutura da tripanotona no complexo cristalográfico, com dimensões de 62x62x62 pontos e com espaçamento de 0,375 Å entre os pontos.

As estruturas dos ligantes foram desenhadas e otimizadas no programa Hyperchem 7.5 (FROIMOWITZ, 1993), utilizando o método de mecânica molecular (campo de força Amber, gradiente de convergência de 0,01 Kcal/mol.Å e algoritmo Steepest Descent), seguido pela otimização usando o método semi-empírico PM3 (gradiente de convergência de 0,05 Kcal/mol.Å e algoritmo Steepest Descent). As ligações rotacionáveis e não-rotacionáveis foram determinadas no programa AutoDockTools. As aminas **3a**, **3b** e **13** foram analisadas considerando o nitrogênio básico ionizado e não-ionizado e os demais ligantes foram analisados na forma neutra.

Para fins de validação do método, o substrato natural tripanotona também foi avaliado no *redocking*. O substrato foi extraído da estrutura cristalográfica da enzima, código 1BZL. As ligações duplas foram completadas, os hidrogênios foram adicionados, as cargas foram calculadas considerando o ligante completamente ionizado e os hidrogênios não-polares foram unidos aos respectivos carbonos. Utilizando o programa AutoDockTools, foram encontradas doze ligações rotacionáveis para a tripanotona, sendo seis em cada uma das ramificações da molécula. O ciclo formado pela porção espermidina e a ponte dissulfeto foi considerado rígido. Foram utilizados quatro protocolos de cálculo no *redocking*, com 12, 10, 8 e 6 ligações rotacionáveis, bloqueando a rotação das ligações, uma a uma em cada ramificação, no sentido da cadeia de espermidina para as extremidades.

Para os cálculos do *docking*, realizaram-se cem corridas de algoritmo genético Lamarckiano, considerando a macromolécula rígida, com um número máximo de avaliações de energia de 15.000.000, 27.000 gerações e uma população de 150 indivíduos. Os demais parâmetros foram mantidos nos valores padrão do programa.

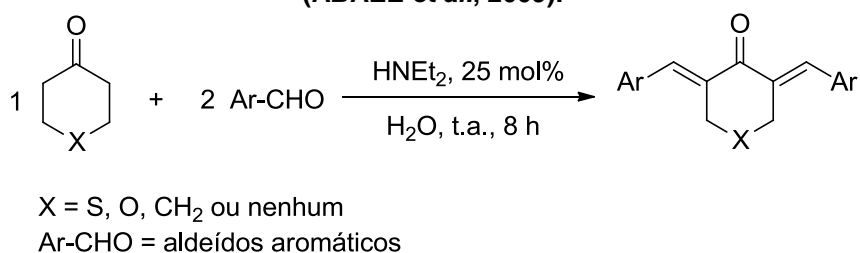
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Síntese

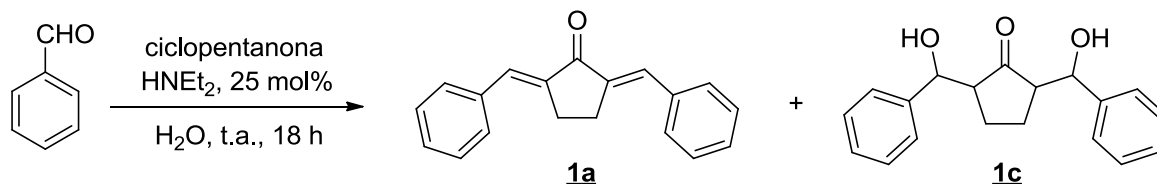
6.1.1 Síntese das bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 5a e 5b

Inicialmente, tentou-se a obtenção das bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas por uma técnica descrita por Abaee e colaboradores, utilizando dietilamina em meio aquoso, baseando-se nos princípios da *green chemistry* (**Figura 19**) (ABAEE *et al.*, 2009).

Figura 19 – Esquema de síntese proposto por Abaee e colaboradores utilizando dietilamina (ABAEE *et al.*, 2009).

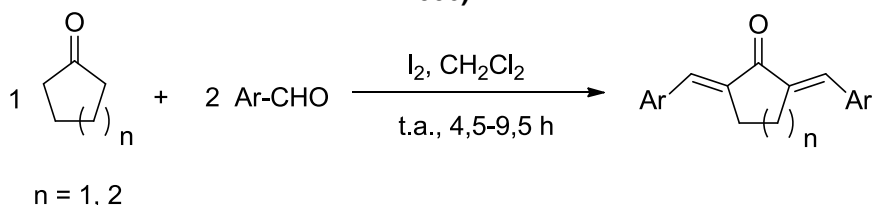


Primeiramente, tentou-se a condensação aldólica entre a ciclopentanona e o *p*-dimetilaminobenzaldeído. Após 8 horas de reação, não foi observada a formação de nenhum produto e todo material de partida foi recuperado. Decidiu-se, então, utilizar um aldeído aromático sem substituintes (benzaldeído), para avaliar a influência do substituinte na reação. Utilizando dietilamina na proporção de 0,25 equivalente, isolou-se o composto **1c** com 29% de rendimento, após recristalização em acetato de etila (**Figura 20**). A técnica foi, então, modificada, utilizando-se 0,5 equivalente de dietilamina e mantendo-se a reação sob aquecimento a 50 °C. Ao final da reação, a formação de 2 produtos pôde ser observada por CCD, sendo a mancha de um deles de mesmo R_f de **1c**. No espectro no infravermelho da mistura observaram-se bandas compatíveis com a presença de **1c** (1714 cm⁻¹, C=O) e de **1a** (1690 cm⁻¹, C=O). A mistura foi recristalizada em acetato de etila, obtendo-se **1a** com 36% de rendimento.

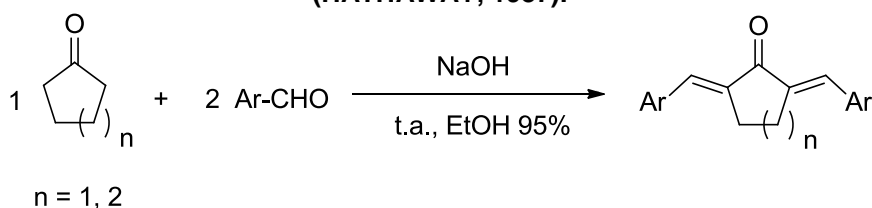
Figura 20 – Obtenção de 1a e 1c.

O composto **1c** trata-se do produto resultante da condensação aldólica que não sofreu a etapa final de desidratação. Acredita-se que as condições mais brandas utilizadas nessa técnica tenham favorecido a formação desse produto.

Alternativamente, testou-se a metodologia proposta por Das e colaboradores, utilizando iodo molecular como catalisador das reações de condensação aldólica entre um aldeído aromático e uma cetona cíclica (**Figura 21**) (DAS *et al.*, 2006). A reação foi testada utilizando os aldeídos benzaldeído e *p*-dimetilaminobenzaldeído e as cetonas ciclopentanona e ciclohexanona. Em todos os casos, recuperou-se todo o material de partida após 24 horas de reação.

Figura 21 – Esquema de síntese proposto por Das e colaboradores utilizando I₂ (DAS *et al.*, 2006).

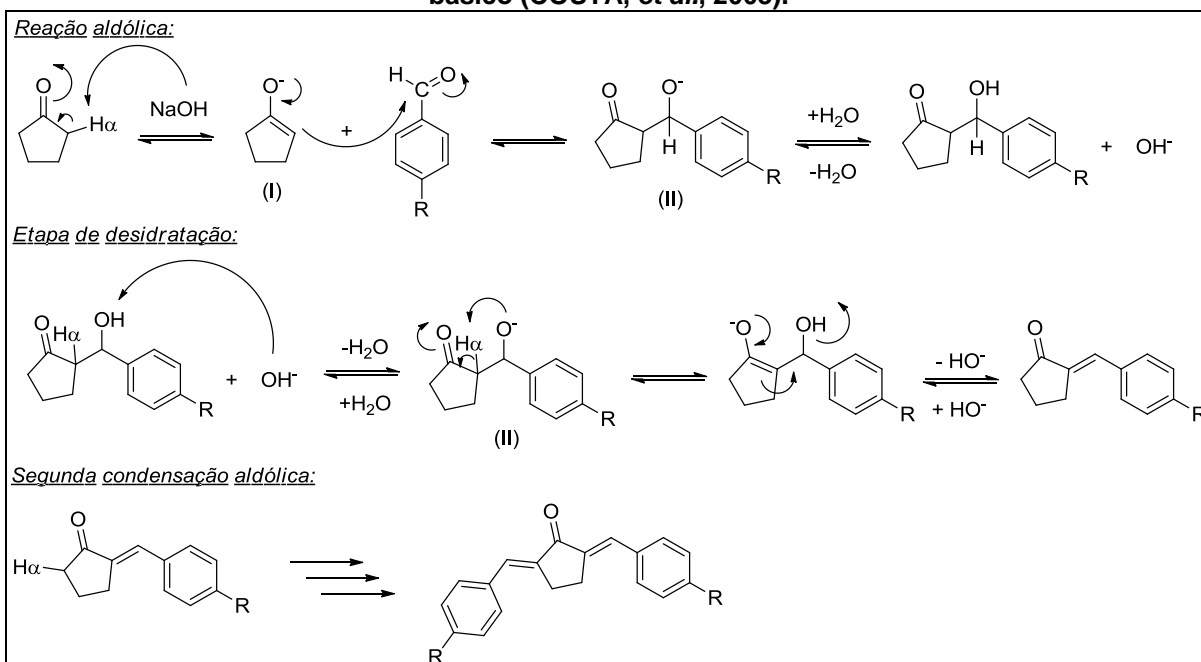
Decidiu-se, então, utilizar, para a obtenção de **1a**, a técnica clássica descrita na literatura que envolve condensação entre um aldeído aromático e uma cetona, utilizando hidróxido de sódio (**Figura 22**) e obteve-se o produto com rendimento quantitativo (HATHAWAY, 1987).

Figura 22 – Técnica utilizada na condensação aldólica para obtenção das substâncias 1-5 (HATHAWAY, 1987).

O mecanismo da reação envolve, primeiramente, a abstração de um hidrogênio α à carbonila da cetona por um íon hidróxido, formando o íon enolato (I). O enolato, em equilíbrio com a cetona, promove um ataque nucleofílico à carbonila do aldeído aromático, resultando na formação de uma ligação carbono-carbono. O íon aldolato formado (II), então, capta um próton de uma molécula de água, regenerando a base e formando o produto da adição aldólica (**Figura 23**). O meio básico e a maior estabilidade do produto conjugado favorecem a desidratação do produto de adição aldólica. Numa primeira etapa, a base capta o hidrogênio da hidroxila, formando o íon aldolato novamente. O próton que é removido na próxima etapa de eliminação é adjacente ao grupo carbonila e, portanto, relativamente ácido ($pK_a \sim 20$). Isso significa que o íon aldolato (II) pode remover esse próton ($H\alpha$) sem a saída concomitante do grupo abandonador, já que o ânion resultante é estável o suficiente para existir, pois é estabilizado por ressonância com a carbonila. Embora o ânion formado seja estabilizado por ressonância, a saída do grupo abandonador (ânion hidroxila) é favorecida em razão da formação de um sistema conjugado. Essa é a etapa determinante da reação. A eliminação é unimolecular (E1), entretanto, o grupo abandonador não é eliminado a partir da molécula inicial, mas sim a partir de sua base conjugada. Esse tipo de eliminação que inicia com a desprotonação da molécula ocorre por um mecanismo chamado de E1cB (cB = base conjugada) (CLAYDEN *et al.*, 2001; COSTA, *et al.*, 2003).

Vale ressaltar que as reações estão em equilíbrio, portanto é imprescindível que todo o hidróxido de sódio seja removido na etapa de elaboração para que a reação de retroadição aldólica não ocorra.

Figura 23 – Mecanismo geral proposto para a reação de condensação aldólica em meio básico (COSTA, *et al.*, 2003).



Devido ao sucesso desta metodologia, resolveu-se empregá-la na síntese das outras bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas, fazendo as modificações adequadas para otimizar a reação. As condições empregadas na síntese de **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **5a** e **5b** estão resumidas na **Tabela 1** e as modificações realizadas, discutidas no texto a seguir.

Para a obtenção de **2a**, inicialmente, utilizou-se excesso do aldeído (4 equivalentes para 1 da ciclopentanona) e obteve-se **2a** com um rendimento de 61%. Com o objetivo de otimizar o rendimento, reduziu-se a proporção do aldeído para 2:1 em relação à cetona. Dessa maneira, **2a** foi obtido com rendimento de 92%. O aumento do rendimento pode ser atribuído ao menor volume de solvente utilizado na lavagem do precipitado. Quando se utilizou excesso do aldeído, o precipitado obtido foi lavado várias vezes com o solvente para garantir a eliminação do excesso do reagente.

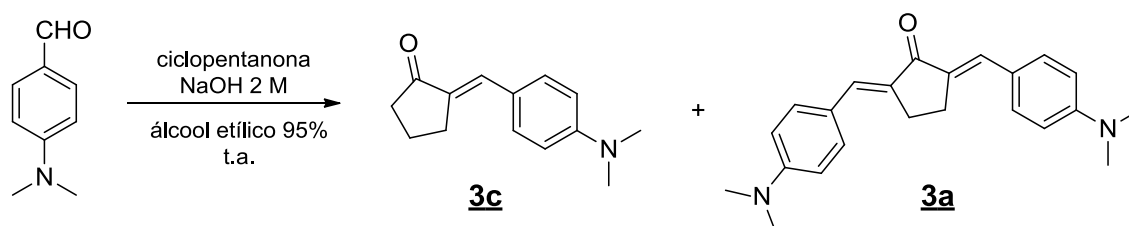
Tabela 1 – Condições reacionais empregadas na síntese das substâncias 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 5a e 5b.

Substância	Proporção			Tempo (horas)	Temp.	Rend. (%)
	cetona	aldeído	NaOH			
1a	1	4	3	0,5	t.a.	100%
1b	1	4	3	0,5	t.a.	78%
2a	1	2	0,3	2	t.a.	92%
2b	1	2.2	0,3	2	t.a.	93%
3a	1	3	4	2	t.a.	57%
3b	1	2.5	3	18	50 °C	57%
5a	1	2	0,3	1	t.a.	68%
5b	1	2	0,5	1	t.a.	86%

A síntese de **2b** foi realizada utilizando a técnica descrita para **2a** com rendimento de 66%. Na tentativa de se otimizar o rendimento, algumas modificações na etapa de elaboração foram realizadas. O precipitado foi lavado somente com água gelada a fim de se remover o hidróxido de sódio da mistura reagente, uma vez que os reagentes estavam presentes em quantidades estequiométricas e o produto é insolúvel no meio aquoso, diminuindo assim perdas de rendimento. Além disso, percebeu-se que parte da perda do produto se devia ao fato do mesmo solubilizar, em parte, no álcool etílico usado na reação. Decidiu-se, então, reduzir o volume do álcool etílico da mistura reagente em evaporador rotatório antes da filtração, o que levou ao aumento do rendimento na obtenção de **2b** para 93%.

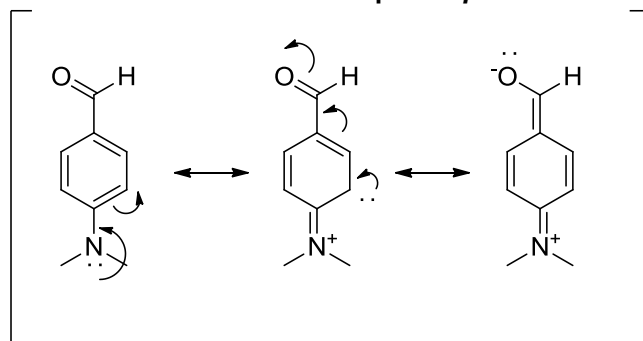
Na tentativa de se obter **3a** foi utilizada a mesma técnica para **2a**, utilizando um pequeno excesso do aldeído. Após 2 horas de reação, a formação de dois produtos e a presença do material de partida foi detectada por CCD e decidiu-se adicionar mais ciclopentanona para consumir o aldeído em excesso. O produto bruto da reação foi submetido a CCS para purificação, sendo o primeiro produto isolado correspondente a **3c** (80% de rendimento) (**Figura 24**).

Figura 24 – Obtenção de 3a e 3c.



Especula-se que a formação de dois produtos, monossustituído e dissustituído, deve-se a menor reatividade do aldeído em questão, o *p*-dimetilaminobenzaldeído, e da menor acidez do hidrogênio α no produto monossustituído. Esta menor reatividade pode estar relacionada à possibilidade de ressonância do par de elétrons não ligantes do nitrogênio com o anel aromático, aumentando assim a densidade eletrônica no carbono da carbonila, tornando-a menos reativa. As estruturas de ressonância são mostradas na **Figura 25**.

Figura 25 – Estruturas de ressonância para o *p*-dimetilaminobenzaldeído



Baseando-se neste resultado, optou-se por aumentar a proporção do aldeído na reação, utilizando inicialmente 2,5 equivalentes em relação à cetona. Após a primeira hora de reação, observou-se a formação de dois produtos por CCD, que, com base em experiências anteriores, atribuiu-se à formação dos produtos

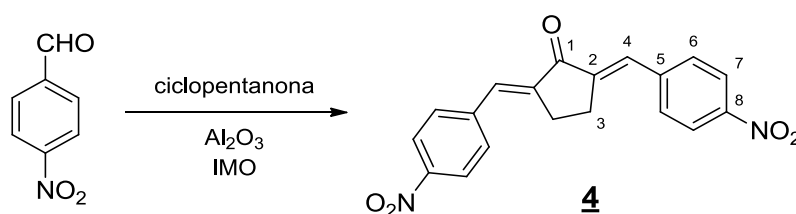
monossustituído **3c** e dissustituído **3a**. Decidiu-se adicionar mais 0,5 equivalente do aldeído, o que levou ao consumo do subproduto **3c** e posterior obtenção de **3a** com 57% de rendimento.

Na síntese do derivado da cicloexanona **3b** foi utilizada a técnica modificada utilizada na síntese de **3a**, mantendo-se a proporção de 2,5 equivalentes do aldeído para 1 equivalente da cicloexanona. Observou-se, por CCD, que o aldeído de partida não estava sendo consumido, ou, consumido muito lentamente, então, optou-se por conduzir a reação sob aquecimento a 50 °C. Dessa maneira, obteve-se **3b** com 57% de rendimento.

Os derivados **5a** e **5b** foram sintetizados com 68% e 86% de rendimento, respectivamente, utilizando as condições descritas na **Tabela 1**.

Os produtos foram caracterizados com base no seu ponto de fusão e análise de seus espectros no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C (**seção 6.2, p. 118**).

6.1.2 Síntese de 2,5-bis-(4-nitro-benzilideno)-ciclopentanona (4)



Inicialmente, tentou-se a obtenção de **4** a partir da técnica utilizando dietilamina em água destilada. Análise de CCD e espectro no infravermelho deram indícios da formação do produto, que foi submetido à purificação por CCS. O produto formado, porém, se mostrou instável em CCS e degradou.

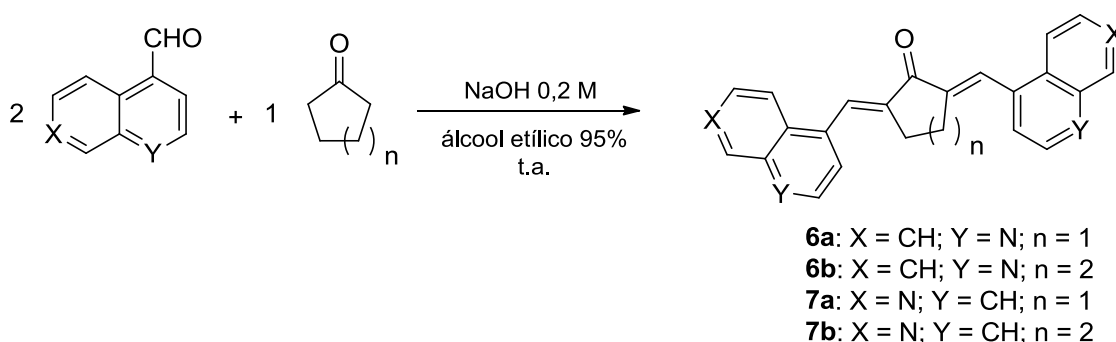
Uma alternativa encontrada foi a obtenção de **4** por uma técnica utilizando irradiação por micro-ondas em suporte sólido. O número de reações orgânicas que utilizam irradiação por micro-ondas tem crescido muito nos últimos anos e seu sucesso se deve em parte a diminuição do tempo de reação, a possibilidade da menor formação

de subprodutos e maiores rendimentos (LIDSTRÖM *et al.*, 2001). A eliminação da necessidade de se usar um solvente pelo uso de um suporte sólido, em geral reutilizável, está em concordância com os princípios da *green chemistry*, uma tendência na área da química orgânica (ESMAEILI *et al.*, 2005).

Para a síntese de **4** utilizou-se uma técnica descrita por Esmaeili e colaboradores, empregando-se alumina básica como suporte sólido e catalisador da reação, obtendo-se **4** com 17% de rendimento. Apesar dos relatos de baixo rendimento com a utilização da alumina básica, a mesma foi escolhida pela disponibilidade (ESMAEILI *et al.*, 2005). Para isolamento do produto, lavou-se a alumina com CH₂Cl₂. A baixa solubilidade do produto em CH₂Cl₂ e nos diversos outros solventes disponíveis no laboratório, também pode ter contribuído para o baixo rendimento, uma vez que parte do produto pode ter ficado retido na alumina.

O produto foi caracterizado com base na comparação do seu ponto de fusão (236 °C, com decomposição) com o relatado na literatura (229-230 °C (BIGDELI *et al.*, 2007); 230 °C (SALEHI *et al.*, 2004)) e com base nos espectros no infravermelho e de RMN (seção 6.2, p. 118).

6.1.3 Síntese das bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas **6a**, **6b**, **7a** e **7b**



Na síntese do derivado quinolínico **6a** foi utilizada, primeiramente, a técnica descrita por Vatsadze e colaboradores, que utiliza água destilada como solvente (VATSADZE *et al.*, 2006). Por essa técnica obteve-se **6a** com 74% de rendimento. O produto **6a** também foi obtido (73% de rendimento) utilizando-se outra técnica, substituindo o solvente por álcool etílico 95%. Apesar da insignificante diferença no

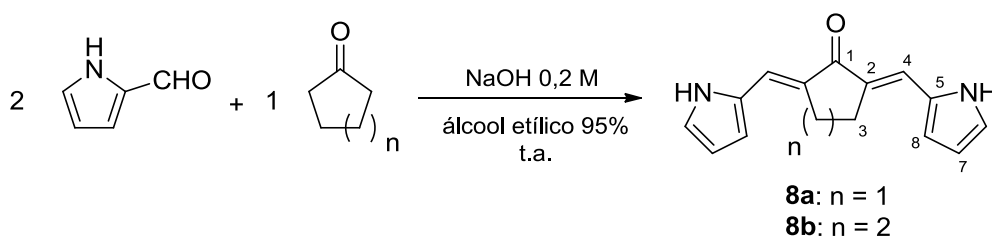
rendimento, observou-se que o tempo de reação utilizando a segunda técnica (3 horas), foi menor do que a primeira técnica (17 horas). Esta diferença pode ser explicada pela melhor solubilização dos reagentes em álcool etílico.

A diisoquinolina **7a** também foi sintetizada utilizando a técnica já estabelecida variando-se somente o solvente da reação, água destilada ou álcool etílico 95%. Novamente, a reação utilizando etanol decorreu em menor tempo quando comparada à técnica que utiliza água.

Os derivados quinolínicos e isoquinolínicos de condensação aldólica com a cicloexanona, **6b** e **7b**, foram obtidos pela técnica utilizando álcool etílico 95% como solvente, uma vez que esta técnica provou-se ser a mais adequada.

Os produtos foram caracterizados com base na análise de seus espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C (seção 6.2, p. 118). As moléculas **7a** e **7b** são inéditas.

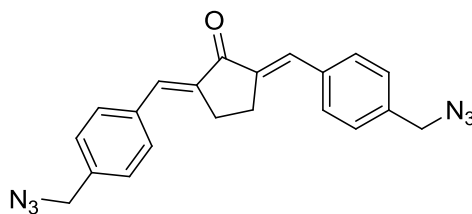
6.1.4 Síntese das bis((1*H*-pirrol-2-il)metileno)-cicloalcanonas **8a** e **8b**



Os derivados pirrólicos **8a** e **8b** foram sintetizados, utilizando o método já estabelecido, com 46% e 45% de rendimento, respectivamente. Na obtenção de **8b**, optou-se pela elaboração da reação, ainda que se pudesse observar o aldeído de partida por CCD, após 24 horas de reação.

Os produtos foram caracterizados com base na análise de seus espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C (seção 6.2, p. 118). As moléculas **8a** e **8b** são inéditas.

6.1.5 Síntese de 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (12)

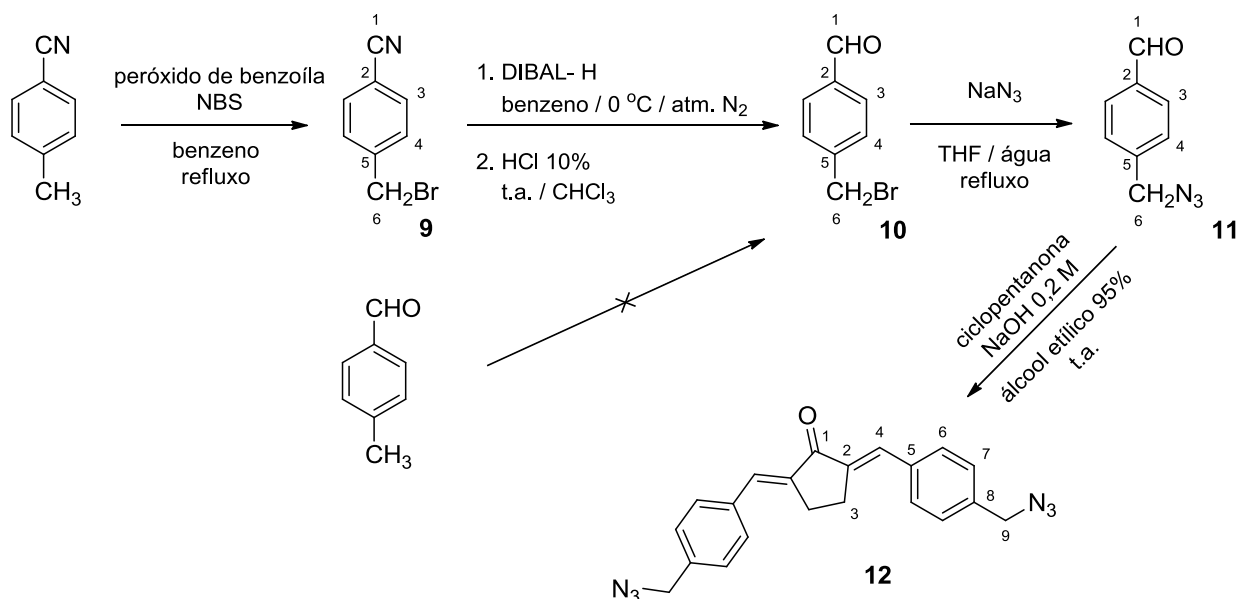


12

Para a obtenção de **12**, se fez necessária a síntese do *p*-azidometilbenzaldeído **11** para ser utilizado na reação de condensação aldólica com a ciclopentanona. O diazido **12** é um intermediário-chave para a obtenção do derivado diamino **13**. Inicialmente, tentou-se a obtenção do derivado bromado partindo do *p*-tolualdeído (**Figura 26**). Utilizou-se para tal, a técnica descrita por Wen e colaboradores, utilizando NBS como fonte de bromo, peróxido de benzoíla como agente iniciador radicalar e benzeno como solvente da reação. A técnica mostrou-se inviável, pois, nessas condições, o aldeído foi oxidado ao ácido carboxílico correspondente, fato que pôde ser observado pela presença das bandas no espectro no infravermelho de deformação axial de O-H de ácido carboxílico ($3100\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$), de C=O (1681 cm^{-1}) e de C-O (1179 cm^{-1}), coerentes com a presença da função ácido carboxílico na molécula.

Diante desse resultado, a rota de síntese foi alterada, utilizando a *p*-tolunitrila como material de partida, conforme ilustrado na **Figura 26**.

Figura 26 – Rota de síntese para a obtenção de 12.

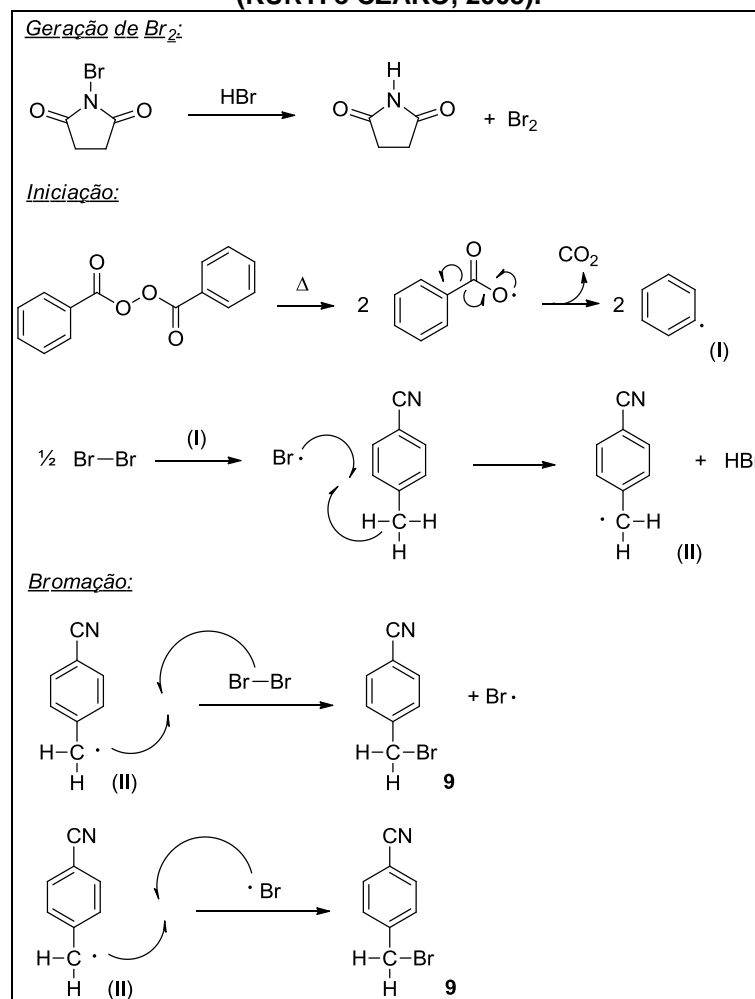


A estratégia utilizada, então, foi a de obter o composto bromado a partir da *p*-tolunitrila, para, posteriormente, reduzir a nitrila a aldeído e, por fim, deslocar o bromo benzílico com azida de sódio, obtendo-se ao final o *p*-(azidometil)benzaldeído (**11**).

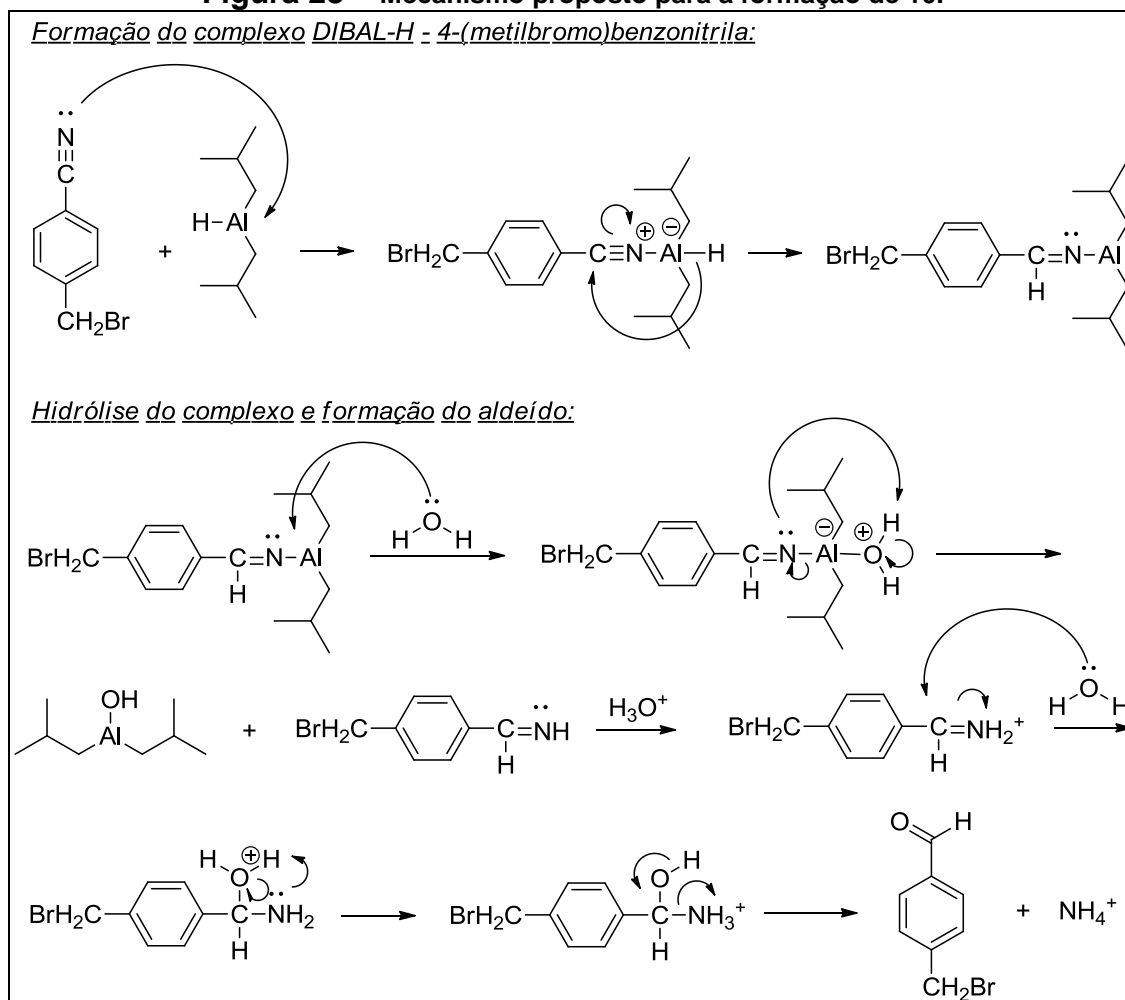
A síntese de **9** foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Wen e colaboradores (WEN, LI e SCHLENOFF, 1997). A reação é conhecida como reação de Wohl-Ziegler e seu mecanismo está esquematizado na **Figura 27** (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).

O peróxido de benzoíla é utilizado como agente iniciador radicalar e cliva, homoliticamente, a ligação Br-Br do Br₂ gerado pela NBS, responsável pela coloração alaranjada da solução. O radical gerado abstrai um hidrogênio da posição benzílica da *p*-tolunitrila, gerando um radical benzílico (II) estabilizado por ressonância e ácido bromídrico, que por sua vez reage com NBS para formar mais Br₂ e succinimida. O radical benzílico formado (II) abstrai um átomo de bromo do Br₂, levando a formação de 4-(bromometil)benzonitrila e bromo radical. O bromo radical pode reagir com o radical benzílico (II), formando mais 4-(bromometil)benzonitrila.

Figura 27 – Mecanismo para reação de Wohl-Ziegler para bromação da posição benzílica (KÜRTI e CZAKÓ, 2005).



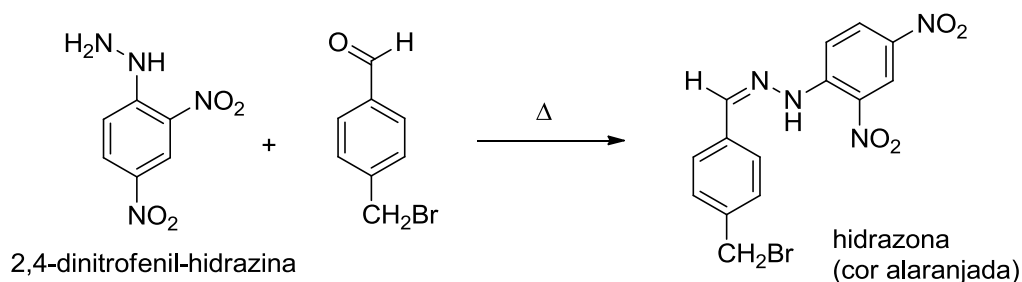
Na síntese do 4-(bromometil)benzaldeído (**10**), segunda etapa da rota sintética, foi utilizada a técnica descrita por Wen e colaboradores, utilizando DIBAL-H como fonte de hidreto, sob atmosfera de N₂ (WEN, LI e SCHLENOFF, 1997). A reação foi realizada a 0 °C para evitar a redução adicional do aldeído ao álcool correspondente. Dessa forma, o derivado bromado **10** foi obtido com 71% de rendimento e, a partir das análises da CCD e do espectro no IV do bruto da reação, não se observou a formação do álcool correspondente. O mecanismo proposto para a reação está ilustrado na **Figura 28**.

Figura 28 – Mecanismo proposto para a formação de 10.

Na primeira etapa da reação ocorre a formação de um complexo entre o DIBAL-H e o composto **9**, por uma ligação entre o átomo de alumínio do DIBAL-H e o nitrogênio da nitrila (CLAYDEN *et al.*, 2001). O complexo formado é hidrolisado, então, em meio aquoso ácido e o excesso de DIBAL-H é destruído no processo, levando a formação do aldeído **10**.

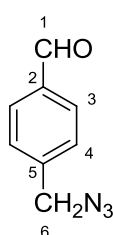
A primeira evidência da obtenção do aldeído desejado **10** foi a formação de uma mancha amarela na CCD, após revelação com 2,4-dinitrofenil-hidrazina. A 2,4-dinitrofenil-hidrazina é um reagente clássico para a caracterização de aldeídos e cetonas, resultando na formação da hidrazona correspondente **Figura 29**.

Figura 29 – Reação do aldeído **10 com o revelador 2,4-dinitrofenil-hidrazina.**

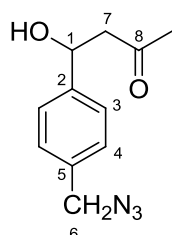


Para a obtenção de **11** foi utilizada, primeiramente, a técnica descrita por Barbe e colaboradores, utilizando azida de sódio em uma mistura de acetona e água (BARBE *et al.*, 2005). Observou-se, por CCD, o consumo total do material de partida e a formação de 2 produtos que não foram inicialmente isolados.

Tentou-se uma modificação da técnica anterior utilizando DMF como solvente. Entretanto, como o material de partida **10** não estava totalmente solúvel no meio de reação, adicionou-se acetona para facilitar a dissolução e aqueceu-se a 50 °C. Observou-se, então, novamente, a formação de dois produtos com o mesmo Rf dos produtos formados utilizando-se a técnica descrita anteriormente. Os produtos foram, então, isolados por CCS e identificados como sendo o produto desejado **11** (15 % de rendimento) e o subproduto **11b**, resultante da reação do aldeído com a acetona utilizada como solvente da reação.



11



11b

A reação utilizando DMF como solvente foi repetida, então, sem a adição de acetona e, dessa forma, após purificação por CCS obteve-se **11** com 80% de rendimento.

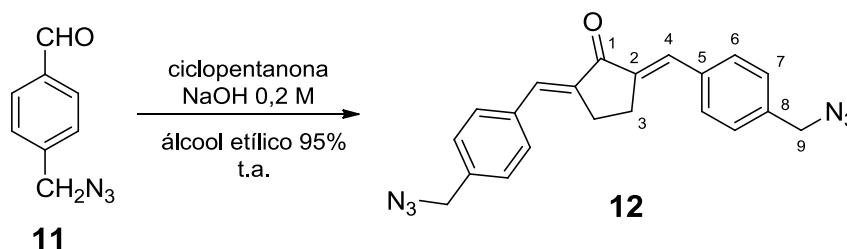
Por fim, a técnica foi modificada substituindo-se a DMF por uma mistura de THF/água, a fim de facilitar a elaboração da reação, uma vez que não era possível

remover completamente a DMF no evaporador rotatório, o que dificultava o isolamento do produto. Dessa forma, foi possível a obtenção de **11** com rendimento de 97%.

A substituição do bromo pela azida ocorre *via* reação de substituição nucleofílica do tipo S_N1 , onde o bromo atua como grupo abandonador, resultando na formação de um carbocátion benzílico que é, em seguida, atacado pelo nucleófilo (azida de sódio) (CLAYDEN *et al.*, 2001). Apesar de a reação poder ocorrer também *via* S_N2 , em um processo bimolecular, sem a formação do carbocátion, acredita-se que a estabilização do carbocátion formado, por ressonância, permite sua existência por tempo suficiente para que haja a aproximação do nucleófilo, favorecendo a reação por mecanismo S_N1 (SMITH e MARCH, 2007).

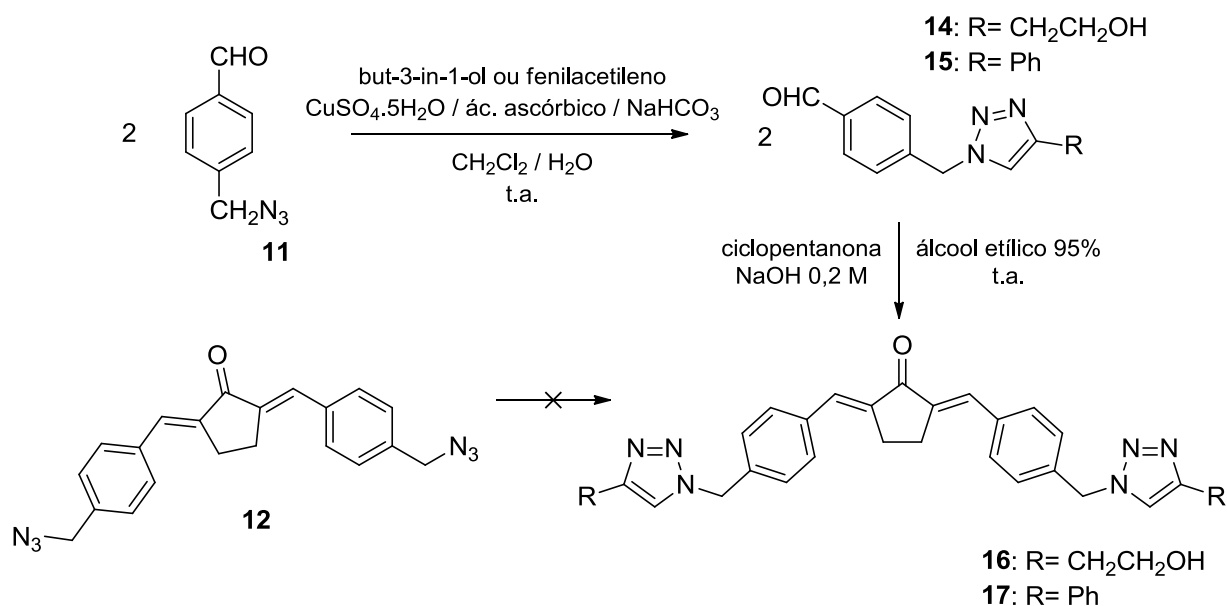
Por fim, obteve-se a 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (**12**) com rendimento quantitativo, pela técnica já estabelecida, utilizando o aldeído sintetizado na reação anterior (**Figura 30**).

Figura 30 – Reação para a obtenção de 12.



Os produtos foram caracterizados com base no seu ponto de fusão, e análise de seus espectros no IV e de RMN de ^1H e ^{13}C (**seção 6.2, p. 118**). A molécula **12** é inédita na literatura até o presente momento.

6.1.6 Síntese dos derivados triazólicos 16 e 17

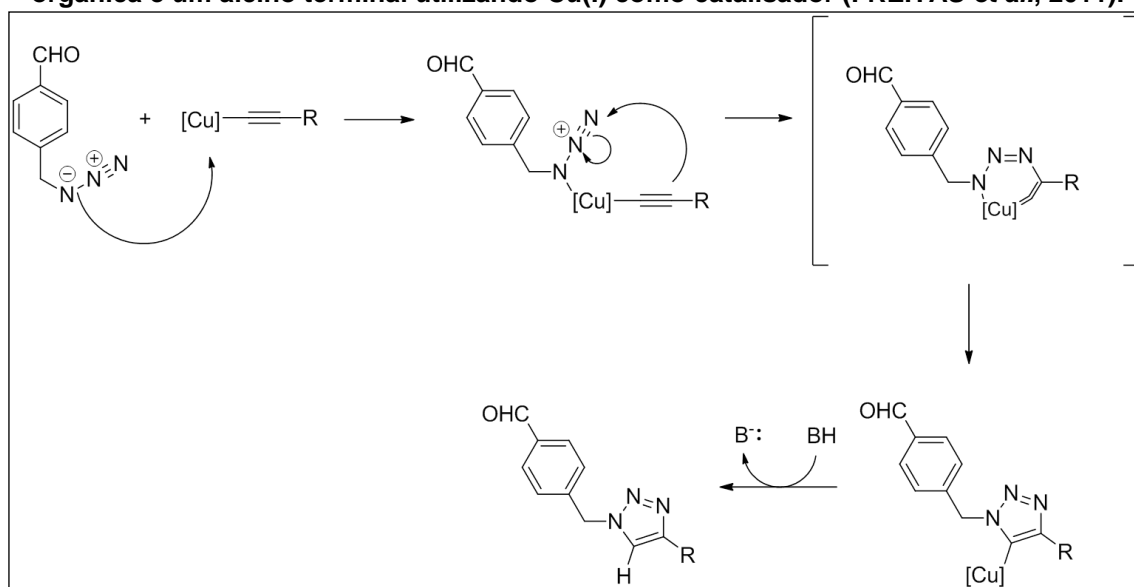


Inicialmente, tentou-se a síntese dos derivados triazólicos **16** e **17** a partir da azida orgânica **12**, por reação com um alcino terminal, utilizando a técnica descrita por Freitas e colaboradores, com base nos princípios da química “click” introduzidos por Sharpeless. A química “click” tem como princípio o uso de reações rápidas, com altos rendimentos, estereoespecíficas e com geração de produtos secundários inócuos e de fácil remoção (FREITAS, *et al.*, 2008). A reação entre a azida **12** e o fenilacetileno ou butinol foi realizada em uma mistura de diclorometano e água, utilizando ácido ascórbico, bicarbonato de sódio e sulfato de cobre pentaidratado. O ascorbato de sódio formado é responsável pela redução *in situ* do Cu(II) do sulfato de cobre pentaidratado em Cu(I). Após 48 horas de reação, não foi detectada por CCD a formação de nenhum produto e, após elaboração, recuperou-se todo o material de partida.

Optou-se, então, pela síntese do anel triazólico a partir do *p*-(azidometil)benzaldeído (**11**). Na síntese de **14** e **15** repetiu-se a técnica utilizada na tentativa da síntese descrita acima. Para a obtenção de **14** utilizou-se a azida orgânica **11** e o alcino butinol. O triazol **14** foi obtido com rendimento de 61%. Na síntese de **15**, substituiu-se o butinol pelo fenilacetileno, e obteve-se o produto com 86% de rendimento.

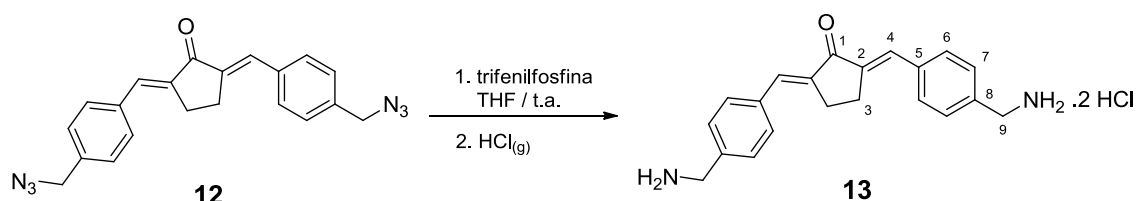
O uso de Cu(I) diminui o tempo de reação e leva a formação exclusiva de um produto 1,4-dissubstituído. O mecanismo para a reação ainda está em discussão e envolve a formação de um metalociclo instável. Uma proposta mecanística simplificada é descrita na literatura e está esquematizada na **Figura 31** (FREITAS *et al.*, 2011).

Figura 31 – Proposta mecanística simplificada para a reação tipo “click” entre uma azida orgânica e um alcino terminal utilizando Cu(I) como catalisador (FREITAS *et al.*, 2011).



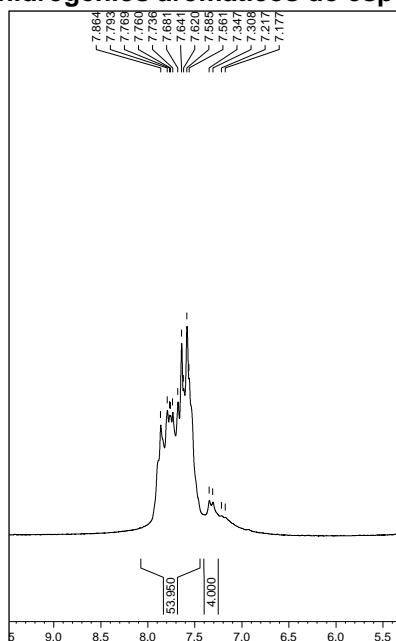
A etapa seguinte da rota de síntese consistiu na condensação aldólica dos aldeídos triazólicos com a ciclopentanona utilizando a técnica já estabelecida, obtendo-se **16** e **17** com 53% e 73% de rendimento, respectivamente. O melhor rendimento na obtenção de **17** em relação à obtenção de **16** pode ser explicado pela menor solubilidade do composto **17** no meio reagente, o qual precipita, facilitando seu isolamento por filtração.

6.1.7 Síntese de 2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona (**13**)



Inicialmente a diamina **13** foi sintetizada pela redução dos grupos azido de **12**, utilizando trifenilfosfina em THF, sem tratamento prévio. A redução do grupo azido a amina pôde ser visualizada em CCD, utilizando ninhidrina como revelador. Borbulhou-se ácido clorídrico gasoso na mistura reagente com a finalidade de obter-se o cloridrato da amina formada, que precipitou no meio reagente, facilitando assim a separação do produto. Após filtração, obteve-se o produto com 79% de rendimento. A análise dos espectros no infravermelho e de RMN, porém, revelou que o produto ainda estava contaminado com o óxido de trifenilfosfina formado na reação, em razão da presença de uma banda de deformação angular P-C (1437 cm^{-1}) no espectro no infravermelho e a presença de diversos sinais na região de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H (**Figura 32**).

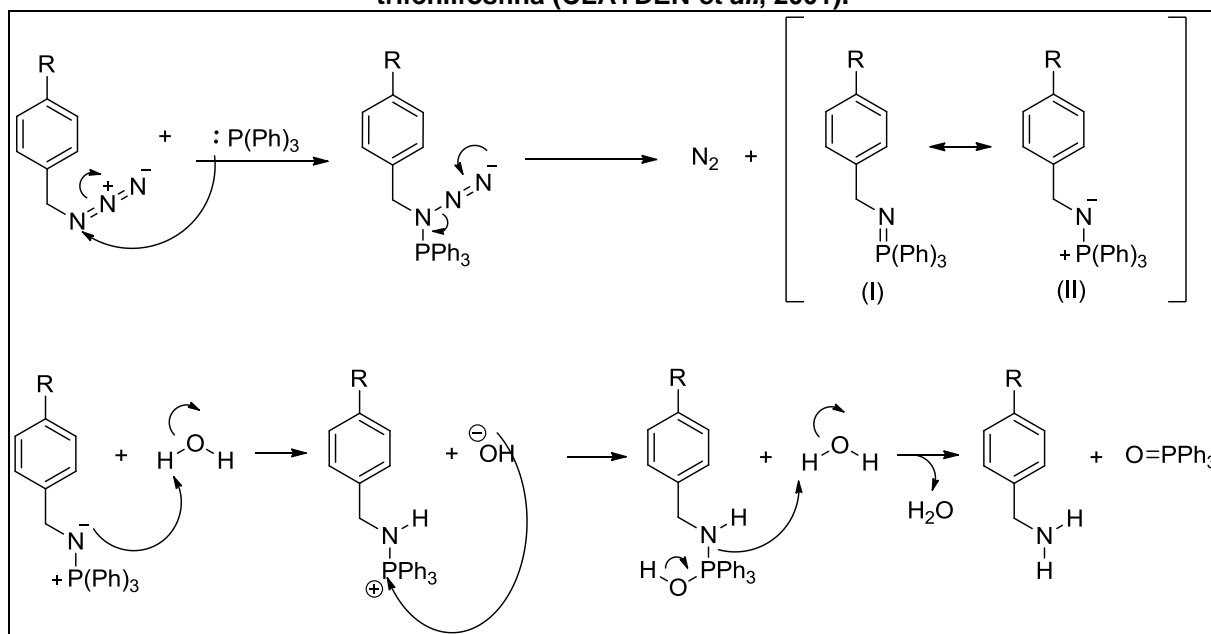
Figura 32 – Região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H de **13**.



Um mecanismo proposto para a redução do grupo azido pela trifenilfosfina está ilustrado na **Figura 33**. Primeiramente, o par de elétrons não-ligante do fósforo ataca um dos nitrogênios do grupo azido, levando a posterior eliminação de uma molécula de N_2 e formação da fosfina imina (I), cuja estrutura de ressonância é o ílideo (II). A ligação dupla da fosfina imina (I) ataca um hidrogênio de uma molécula de água, enquanto um ânion hidroxila ataca o fósforo carregado positivamente. A ligação N-P é desfeita pela abstração de outro hidrogênio de uma molécula de água, assistida pela formação da dupla ligação entre oxigênio e fósforo. Desta maneira há a formação da amina com eliminação de uma molécula de água e do óxido de trifenilfosfina (CLAYDEN *et al.*, 2001). A utilização de THF sem tratamento prévio se faz necessária pois esse possui pequenas quantidades de água, necessária a reação.

Escolheu-se a redução utilizando trifenilfosfina, pois ela é seletiva para a redução do grupo azido. Outros agentes redutores, tais como $LiAlH_4$ e H_2 em Pd/C, poderiam levar a redução da olefina e/ou da carbonila.

Figura 33 – Mecanismo proposto para a redução do grupo azido à amina utilizando trifenilfosfina (CLAYDEN *et al.*, 2001).

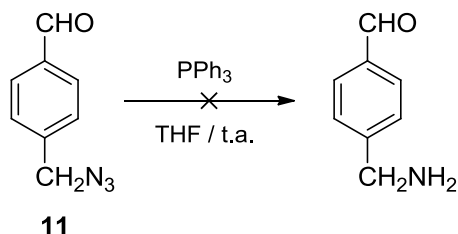


Alternativamente, a reação foi repetida sem borbulhar o ácido clorídrico. A mistura reagente foi extraída com solução aquosa de ácido clorídrico 5% v/v, para formar o cloridrato da diamina, recolhido na fase aquosa, separando-o do óxido de

trifenilfosfina. Obteve-se o produto com 5% de rendimento. Acredita-se que adição de ácido em meio aquoso tenha favorecido a reação retro-aldólica, diminuindo o rendimento, levando a formação de subprodutos.

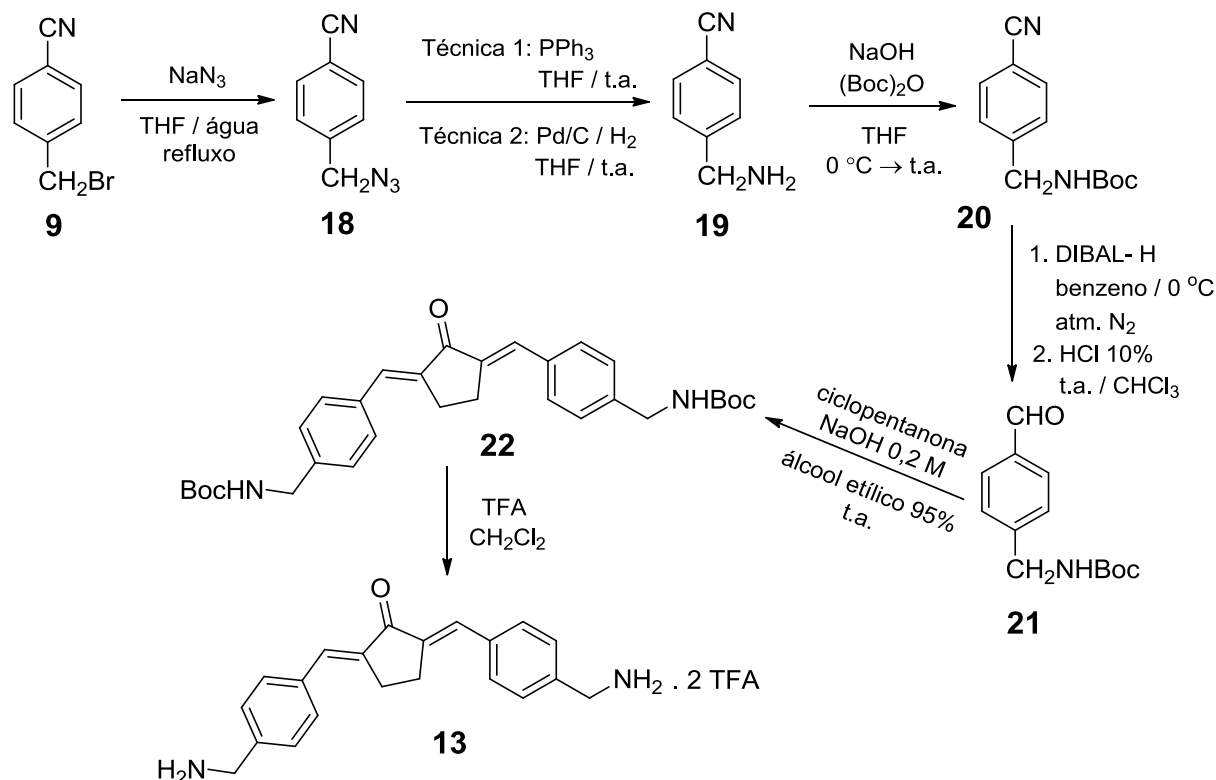
Uma nova rota sintética foi planejada, considerando-se a redução do grupo azido do aldeído **11**, para se obter o derivado amina antes da etapa de condensação aldólica, acreditando-se que a maior diferença de solubilidade entre o aldeído e o óxido de trifenilfosfina pudesse facilitar a purificação, além da maior estabilidade do derivado amino **19** em relação à diamina **13**, a qual pode, dependendo das condições, sofrer uma reação retro-aldólica. Entretanto, quando se tentou reduzir o grupo azido de **11** (**Figura 34**), ocorreu uma autocondensação entre a amina formada e o aldeído. O produto da autocondensação foi identificado com base na análise do espectro no infravermelho que, no lugar das esperadas bandas de deformação axial características de aldeído e amina, foi observada uma banda de deformação axial compatível com imina (1637 cm^{-1}). Além disso, não foi observada nenhuma banda relacionada ao grupo azido, indício que o material de partida foi reduzido.

Figura 34 – Redução do derivado **11** com trifenilfosfina.



Optou-se, então, por proteger o grupo amina com o grupo protetor *tert*-butóxi-carbonila (*t-Boc*), antes da redução da nitrila a aldeído, conforme ilustrado na **Figura 35**. Após redução da nitrila **20**, a condensação aldólica foi conduzida, seguida da remoção do grupo protetor, obtendo-se, ao final, a amina desejada **13**.

Figura 35 – Rota de síntese alternativa para a obtenção de 13, com a proteção do grupo amino.



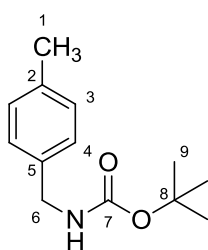
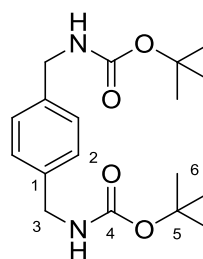
O derivado azido **18** foi sintetizado utilizando azida de s\u00f3dio como nucle\u00f3filo em uma mistura 2:1 de THF e \u00e1gua. A rea\u00e7\u00e3o foi conduzida sob refluxo e o produto foi obtido com 91% de rendimento.

Inicialmente, a amina **19** foi obtida utilizando trifetilfosfina em THF. O produto bruto da rea\u00e7\u00e3o, com poss\u00edvel contamina\u00e7\u00e3o por \u00f3xido de trifetilfosfina, foi utilizado nas etapas seguintes sem purifica\u00e7\u00e3o pr\u00e9via.

Alternativamente, o derivado amino **19** foi obtido por redu\u00e7\u00e3o de **18** por hidrogena\u00e7\u00e3o catal\u00edtica, utilizando Pd 5% em carv\u00e3o ativado como catalisador e THF como solvente. Uma vez que o grupo nitrila tamb\u00e9m \u00e9 pass\u00edvel de redu\u00e7\u00e3o por hidrogena\u00e7\u00e3o catal\u00edtica, a forma\u00e7\u00e3o de subprodutos relacionados \u00e0 redu\u00e7\u00e3o deste grupo foi detectada por CCD. Ap\u00f3s elabora\u00e7\u00e3o, o produto bruto da rea\u00e7\u00e3o foi utilizado na pr\u00f3xima etapa de s\u00edntese, sem purifica\u00e7\u00e3o pr\u00e9via.

O derivado *N*-protegido **20** foi sintetizado de acordo com a t\u00e9cnica descrita por Schweinitz e colaboradores, utilizando dicarbonato de di-*tert*-butila (Boc_2O) e

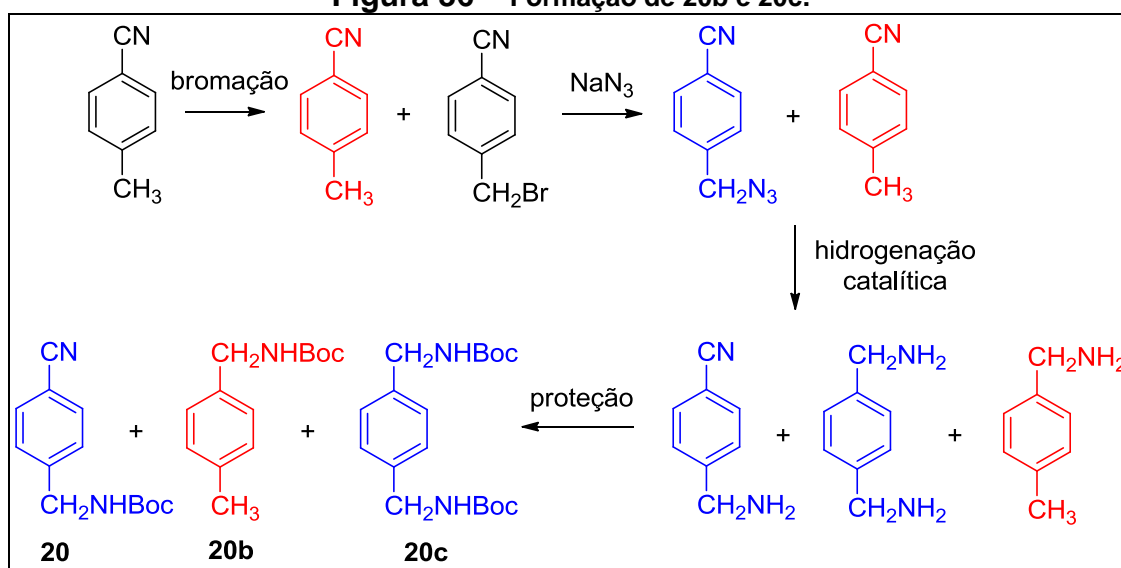
hidróxido de sódio (SCHWEINITZ *et al.*, 2004). A proteção do grupo amino com Boc₂O leva à formação de um grupo carbamato, estável em diversas condições reagentes como meio básico e frente à reagentes redutores como o DIBAL-H. A proteção da amina **19** se fez necessária, pois a reação subsequente leva a formação de um aldeído (redução da nitrila com DIBAL-H), o qual pode reagir como amina resultando na formação de uma imina e possível polimerização, conforme descrito anteriormente. O derivado **20** foi obtido com rendimento de 30%, após purificação por CCS. Os subprodutos **20b** e **20c** também foram isolados com rendimentos de 2 e 16 %, respectivamente.

**20b****20c**

O subproduto **20b** foi originado a partir da redução do grupo ciano da *p*-tolunitrila utilizada como material de partida na primeira etapa da rota sintética (**Figura 36**) e, por apresentar o mesmo R_f do produto bromado **9**, não foi detectada por CCD. Traços desse material permaneceram contaminando todos os produtos das etapas posteriores.

O subproduto **20c** advém da reação do *t*-Boc com a diamina formada a partir da redução do grupo ciano e do grupo azido por hidrogenação catalítica. A rota representando a formação desses subprodutos está ilustrada na **Figura 36**.

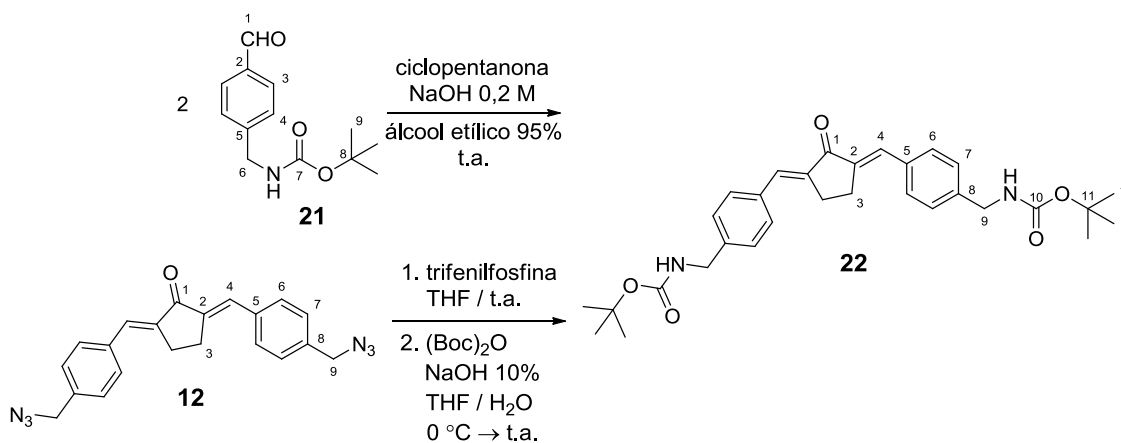
Figura 36 – Formação de 20b e 20c.



Para a redução da nitrila a aldeído e obtenção de **21**, utilizou-se o DIBAL-H como fonte de hidreto em atmosfera de N_2 e baixa temperatura, conforme já descrito na síntese de **10** (p. 106). O grupo protetor *N*-Boc mostrou-se estável frente às condições da reação, mesmo após a adição da solução de HCl 5% v/v, utilizado na elaboração. O derivado protegido **21** foi obtido com 67% de rendimento.

O produto **22** foi obtido de duas maneiras: a) condensação aldólica, pelo método estabelecido, utilizando 2 equivalentes do aldeído **21** para cada equivalente da ciclopentanona e, b) redução do diazido **12**, utilizando trifenilfosfina, seguido da proteção do grupo amino com Boc_2O , em uma reação *one pot* (Figura 37).

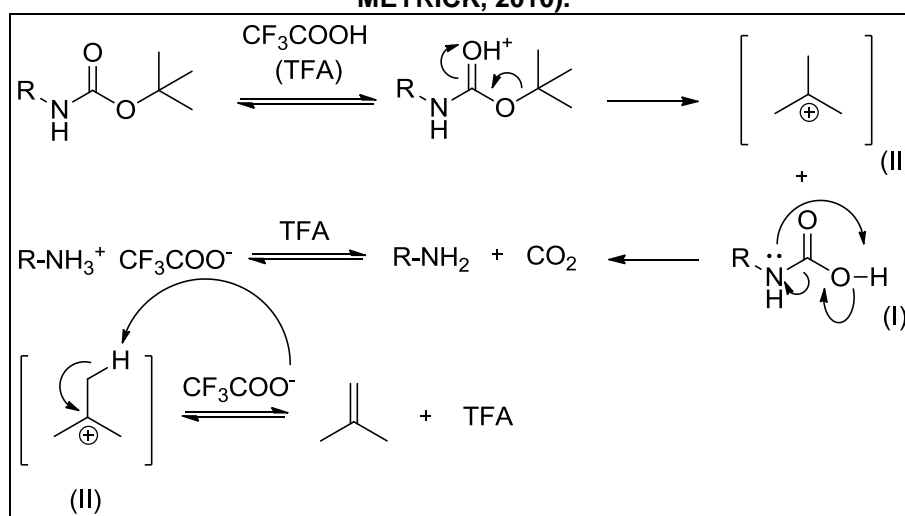
Figura 37 – Metodologias utilizadas na obtenção de 22.



Obteve-se **22** por reação de condensação aldólica com 52% de rendimento, enquanto na segunda metodologia **22** foi obtido com 41% de rendimento.

A última etapa da rota alternativa para a obtenção de **13** (**Figura 35**) consistiu na remoção do grupo protetor *N*-Boc. A remoção foi realizada pela técnica de Manetti e colaboradores, utilizando excesso de TFA, obtendo-se o produto na forma de um sal de trifluoroacetato (MANETTI *et al.*, 2009). Diversos mecanismos são propostos na literatura para essa reação. Um dos mecanismos mais aceitos é ilustrado na **Figura 38**. Inicialmente o TFA promove ativação da carbonila do carbamato por protonação, seguido de eliminação do grupo *tert*-butila na forma de um carbocátion (II) e formação de um ácido carbâmico (I). Posteriormente, o par de elétrons do nitrogênio abstrai o próton ácido, formando a amina e eliminando CO₂. Uma vez em meio ácido, a amina formada é protonada pelo TFA. A formação de isobuteno a partir de II é acompanhada pela regeneração de um próton (ASHWORTH, COX e MEYRICK, 2010). A presença do isobuteno no meio está relacionada com a formação de subprodutos por adição eletrofílica (ROUTIER *et al.*, 2002). Acredita-se que o meio ácido, na presença de pequenas quantidades de água, tenha favorecido a reação retro-aldol, degradando parte do produto formado, o que foi evidenciado no espectro de RMN de ¹H do produto formado (**seção 6.2, p. 118**).

Figura 38 – Mecanismo proposto para a remoção do grupo *N*-Boc (ASHWORTH, COX e MEYRICK, 2010).

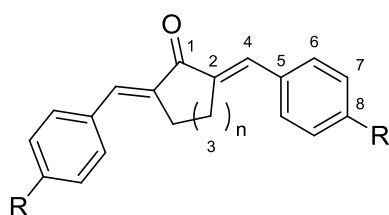


Os produtos e subprodutos obtidos por essa rota (**Figura 35**) foram caracterizados a partir de seus espectros no infravermelho, espectros de RMN de ¹H e ¹³C (**seção**

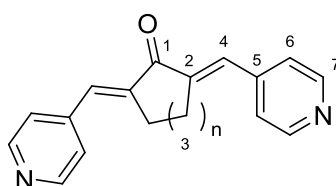
6.2, p. 118) e comparação com os pontos de fusão relatados na literatura. As substâncias **13** e **22** são inéditas.

6.2 Caracterização dos compostos sintetizados

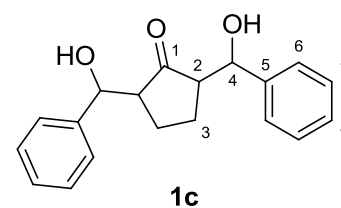
6.2.1 Bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas **1a**, **1b**, **1c**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **3c**, **4**, **5a** e **5b**



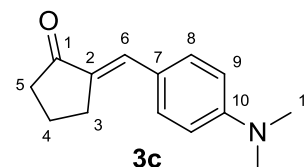
- 1a:** $n = 1$, **1b:** $n = 2$; $R = H$
2a: $n = 1$, **2b:** $n = 2$; $R = CH_3$
3a: $n = 1$, **3b:** $n = 2$; $R = N(CH_2)_2$
4: $n = 1$; $R = NO_2$



- 5a:** $n = 1$
5b: $n = 2$



1c



3c

No espectro no infravermelho de **1a** são observadas bandas correspondentes a deformação axial de C=O de cetona conjugada (1687 cm^{-1}) e deformação axial de C=C da olefina (1624 cm^{-1}), essenciais para a caracterização do produto (**Figura A.1, p. 173**). Na **Tabela 2** são comparados os números de onda das bandas de deformação axial da carbonila e da olefina dos produtos **1-5**.

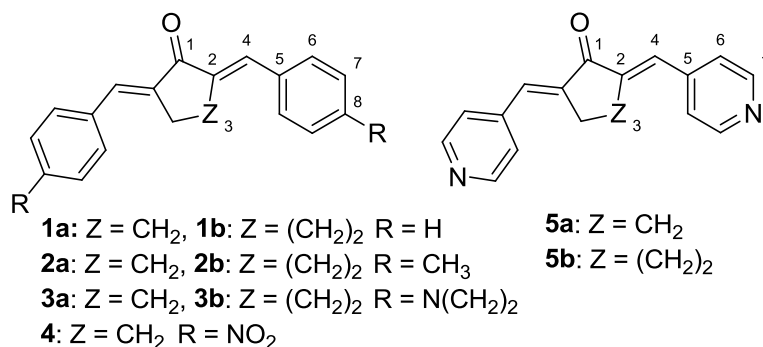
Tabela 2 – Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos produtos 1-5.

Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
	C=O	C=C
1a	1687	1624
1b	1665	1604
1c	1714	-
2a	1687	1621
2b	1660	1599
3a	1672	1594
3b	1644	1608
3c	1687	1582
4	1685	1620
5a	1693	1631
5b	1666	1611

Pode-se observar que todas as carbonilas, exceto **1c**, possuem número de onda compatível com uma carbonila de cetona α,β -insaturada ($<1700\text{ cm}^{-1}$) e que, as carbonilas de anéis de 6 membros, devido a influência da tensão do anel, estão em número de onda menor do que as dos correspondentes anéis de 5 membros. A banda de C=C aparece em número de onda mais baixo que o esperado para um alceno ($1670\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$), devido ao aumento do seu caráter de ligação simples pela conjugação com a carbonila. Sua intensidade também é aumentada, resultado da presença do forte dipolo da carbonila vizinha, o que é válido para todas as substâncias, exceto **1c** (PAVIA, LAMPMAN e KRIZ, 2001). No espectro no infravermelho do diol **1c** não foi observada a banda de deformação axial de olefina e a banda da cetona está em número de onda compatível com uma cetona não conjugada, conforme descrito anteriormente (**Figura A.4, p. 174**).

No espectro no infravermelho de **4** também foram observadas as bandas características de deformação axial simétrica (1343 cm^{-1}) e assimétrica (1520 cm^{-1}) do grupo nitro (**Figura A.26, p.185**).

Uma comparação entre os deslocamentos químicos dos sinais observados nos respectivos espectros de RMN de ^1H das substâncias **1-5** está mostrada na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Dados do espectro de RMN de ¹H das substâncias 1-5.

Subst.	Anel cetônico ^a		Olefina ^b	Hidrogênios aromáticos			H do substituinte ^c
	H-3	H-4		orto	meta	para	
1a	3,11	-	7,61-7,38	7,61-7,38	7,61-7,38	7,61-7,38	-
1b	2,95	1,80	7,83	7,50-7,31	7,50-7,31	7,50-7,31	-
2a	3,09	-	7,58	7,51	7,25	-	2,40
2b	2,94	1,80	7,79	7,39	7,23	-	2,40
3a	3,07	-	7,53	7,54	6,74	-	3,04
3b	2,94	1,82	7,77	7,24	6,37	-	3,02
4	3,21	-	7,65	7,75	8,31	-	-
5a	3,17	-	7,50	7,22	8,36	-	-
5b	2,88	1,85-1,76	7,62	7,26	8,62	-	-

^aSomente H-3 para derivados da ciclopentanona; H-3 e H-4 para derivados da ciclohexanona. ^bH-4 em **1a**, **2a**, **3a**, **4** e **5a**; H-5 em **1b**, **2b**, **3b** e **5b**. ^cCH₃ em **2a** e **2b**. N(CH₃)₂ em **3a** e **3b**.

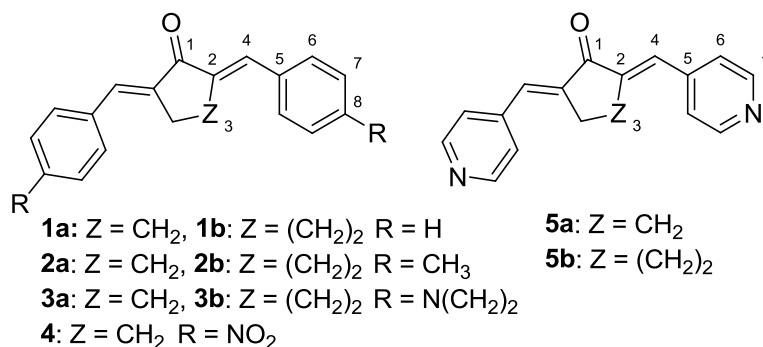
No espectro de RMN de ¹H de **1a** são observados sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos na forma de um multipletto (δ 7,61-7,38) (**Figura A.2, p. 173**). Nesta região também se observa um simpleto referente aos hidrogênios olefínicos (H-4), sobreposto ao sinal dos hidrogênios aromáticos. O deslocamento químico do hidrogênio olefínico permite inferir que os compostos obtidos tratam-se dos isômeros *E, E*, uma vez que isômeros *Z* apresentam o sinal do hidrogênio olefínico em aproximadamente δ 6,8 (VATSADZE *et al.*, 2006). Este fato pôde ser observado nos espectros de todos os produtos de condensação aldólica sintetizados (**Tabela 3**).

O sinal referente aos hidrogênios metilênicos H-3 nas ciclopentanonas, apresentam-se sob a forma de um simpleto, pois, devido a natureza simétrica da molécula, seu hidrogênio vizinho é idêntico a si mesmo, não havendo assim acoplamento entre eles. Para os derivados da ciclohexanona é observado um tripleto na faixa entre δ

2,88 e δ 3,17, atribuído ao hidrogênio H-3 e um quinteto na faixa entre δ 1,76 e δ 1,85 correspondente ao hidrogênio H-4. Devido a fatores como a resolução do espectro (200 MHz), concentração e solubilidade da amostra no solvente deuterado utilizado, alguns desses sinais não estão bem resolvidos.

Na **Tabela 3** ainda é possível observar a influência dos grupos *p*-substituintes retiradores de elétrons (**4**: -NO₂) e doadores de elétrons por efeito indutivo (**2a** e **2b**: -CH₃) e ressonância (**3a** e **3b**: -N(CH₃)₂), sobre o deslocamento químico dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos. Os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos de **4** encontram-se bastante afastados do sinal do TMS (δ 7,75-8,31) quando comparado aos sinais correspondentes nos espectros dos derivados **1-3**. Nas estruturas **5a** e **5b**, contendo um anel piridínico, observa-se também a forte influência da eletronegatividade do átomo de nitrogênio sobre o hidrogênio vizinho, deslocando o seu sinal para uma região mais desblindada do espectro.

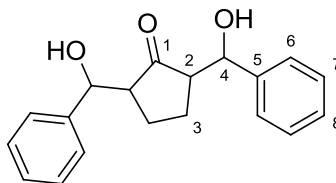
Na **Tabela 4** estão descritos os valores de deslocamento químico dos sinais de carbono das substâncias **1-5**. Devido a baixa solubilidade de **3a** nos solventes deuterados disponíveis (< 2 mg/mL em CDCl₃) e ao elevado tempo de relaxação de alguns carbonos, não foi possível registrar os sinais de todos os carbonos, mesmo com um número de corridas de 1024. As atribuições dos sinais de carbono nos espectros de todas as substâncias foram auxiliadas pela análise do respectivo espectro de DEPT 135.

Tabela 4 – Dados do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 1-5.

Subst.	Anel cetônico ^a				Olefina ^b	Carbonos aromáticos				C substituído ^c
	C=O	C-2	C-3	C-4		<i>ipso</i>	<i>orto</i>	<i>meta</i>	<i>para</i>	
1a	196,3	137,2	26,5	-	133,4	135,7	128,7	130,7	129,3	-
1b	190,3	136,1*	28,4	22,9	136,9	135,9*	128,3	130,3	128,5	-
2a	196,6	139,9	26,7	-	133,9	133,3	130,9*	129,7*	136,7	21,7
2b	190,6	135,7	28,7	23,2	137,1	133,3	130,7*	129,3*	139,0	21,6
3a	-	-	26,5	-	133,4	124,2	132,5	111,8	150,6	40,0
3b	190,2	132,6	28,9	23,6	137,2	124,5	132,6	111,8	150,5	40,4
5a	195,3	142,4	26,3	-	131,5	140,7	124,0	150,3	-	-
5b	189,3	139,3	28,3	22,5	134,4	143,2	124,2	150,1	-	-

^aC=O, C-2 e C-3 para derivados da ciclopentanona; C=O, C-2 a C-4 para derivados da ciclohexanona; ^bC-4 em **1a**, **2a**, **3a** e **5a**; ^cCH₃ em **2a** e **2b**. N(CH₂)₂ em **3a** e **3b**. *intercambiáveis

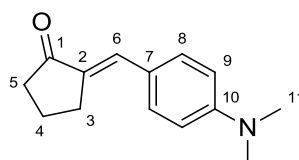
Os sinais mais característicos no espectro de RMN de ^{13}C de **1-5** são os referentes aos carbonos da carbonila α,β -insaturada em δ 189,3 a 196,6 e da olefina em δ 131,5 a 137,2.

**1c**

No espectro de RMN de ^1H de **1c** foram observados, além dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos, um sinal do hidrogênio da hidroxila (δ 5,34), um multiplete correspondente ao sinal de H-4 (δ 5,13-5,12), um multiplete correspondente ao sinal de H-2 e dois multipletos correspondentes aos sinais dos

hidrogênios diastereotópicos H-3 e H-3' (δ 1,85-1,76 e 1,50) (**Figura A.5, p. 175**). Com auxílio dos mapas de contornos obtidos no experimento COSY foi possível atribuir cada sinal de hidrogênio (**Figura A.6, p. 175**).

O deslocamento químico do sinal referente à carbonila de **1c** (δ 216,8) (**Figura A.7, 176**) está de acordo com os valores encontrados para uma cicloalcanona não conjugada (δ 220-210) e foi fundamental para a caracterização do produto (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). Além disso, não é observado sinal de carbono de olefina e sim um sinal com deslocamento químico compatível com carbono ligado a oxigênio (C-4, δ 69,5).

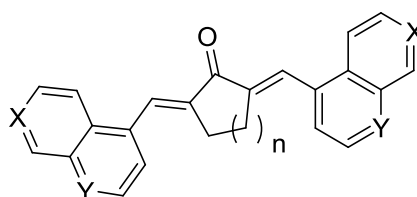


3c

No espectro de RMN de ^1H de **3c** foi observado um duplete em δ 7,47, atribuído a H-8, um tripleto em δ 7,36, com constante de acoplamento de 2,3 Hz, atribuído ao hidrogênio olefínico H-6 e um duplete em δ 6,71, atribuído a H-9 (**Figura A.21, 183**). O sinal correspondente a H-3 foi atribuído ao duplete triplo em δ 2,96 e o sinal atribuído a H-4 foi observado em δ 2,02, na forma de um quinteto. O tripleto em δ 2,38 foi atribuído a H-5 e o simpleto em δ 3,03 atribuído a H-11. O hidrogênio H-6 acopla a longa distância com H-3, devido à rigidez da estrutura dada pela conjugação do sistema (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005).

O subproduto **3c** possui somente substituição em um dos carbonos α à carbonila da ciclopentanona. No espectro de RMN de ^{13}C de **3c**, o sinal referente à carbonila está mais blindado (δ 208,3) (**Figura A.22, p. 183**) em comparação a uma cetona não conjugada ($\sim\delta$ 215), mas não tão intensamente quanto ao sinal das carbonilas dos compostos dissustituídos ($\sim\delta$ 190). A presença de três sinais de carbonos metilênicos (C-3, C-4 e C-5 em δ 20,3, 29,6 e 38,0, respectivamente) no espectro de DEPT 135 também foi essencial para a caracterização do produto (**Figura A.22, p. 183**).

6.2.2 Bis-(arilmetilideno)cicloalcanonas 6a, 6b, 7a e 7b



6a: X = CH; Y = N; n = 1

6b: X = CH; Y = N; n = 2

7a: X = N; Y = CH; n = 1

7b: X = N; Y = CH; n = 2

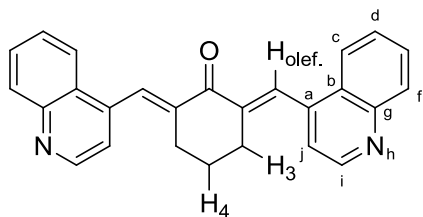
No espectro no infravermelho dessas substâncias são observadas as bandas correspondentes a deformação axial de C=O de cetona conjugada, e a deformação axial de C=C olefínica, característica desses produtos de condensação aldólica (**Figura A.34**, **Figura A.37**, **Figura A.40** e **Figura A.43**). Uma comparação entre essas bandas pode ser encontrada na **Tabela 5**. Mais uma vez pode-se observar a diferença no número de onda entre as bandas dos compostos derivados da cicloexanona e da cicloexanona.

Tabela 5 - Comparação entre as bandas de C=O e C=C dos produtos 6-7.

Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$	
	C=O	C=C
6a	1690	1615
6b	1672	1611
7a	1680	1621
7b	1660	1615

Em razão da baixa solubilidade dessas substâncias nos solventes deuterados disponíveis em nosso laboratório (DMSO- d_6 , CDCl_3 , acetona- d_6 , metanol- d_4 e piridina- d_5), as amostras para RMN foram preparadas dissolvendo as substâncias em DMSO- d_6 , acrescido de três gotas de TFA.

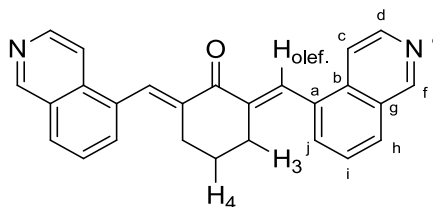
Os dados de RMN de ^1H das quinolinas **6a** e **6b** encontram-se resumidos na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 6a e 6b.

Subst.	Anel cetônico ^a		H _{olefina} ^b	Hidrogênios do anel quinolínico					
	H-3	H-4		H _c	H _d	H _e	H _f	H _i	H _j
6a	3,12	-	8,22- 8,10	8,32	7,96	8,22- 8,10	8,48	9,32	8,22- 8,10
6b	2,74	1,68	8,17- 8,08	8,32- 8,23	7,99- 7,89	8,17- 8,08	8,32- 8,23	9,31- 9,29	7,99- 7,89

^aSomente H-3 para **6a**, H-3 e H-4 em **6b**; ^bH-4 em **6a** e H-5 em **6b**.

Os dados de RMN de ^1H das isoquinolinas **7a** e **7b** encontram-se resumidos na Tabela 7.

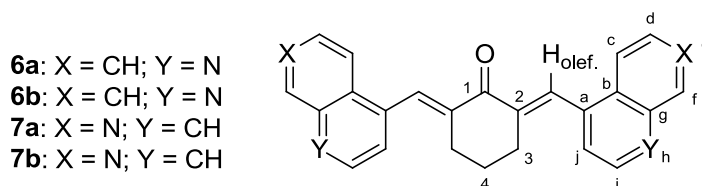
Tabela 7 - Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 7a e 7b.

Subst.	Anel cetônico ^a		H _{olefina} ^b	Hidrogênios do anel isoquinolínico					
	H-3	H-4		H _c	H _d	H _f	H _h	H _i	H _j
7a	3,06	-	8,16	8,68	8,76	9,96	8,57	8,08	8,39
7b	2,71	1,63	8,17-8,14	8,41	8,73	9,96	8,54	8,04	8,17-8,14

^aSomente H-3 para **7a**, H-3 e H-4 em **7b**; ^bH-4 em **6a** e H-5 em **6b**.

O resumo dos dados de RMN de ^{13}C das quinolinas **6a** e **6b** e isoquinolinas **7a** e **7b** está apresentado na Tabela 8. Pode-se observar que os deslocamentos químicos dos sinais referentes aos carbonos de **6-7** mantêm o mesmo padrão observado nos compostos **1-5**. As atribuições foram auxiliadas com base na análise dos respectivos espectros de RMN de DEPT 135.

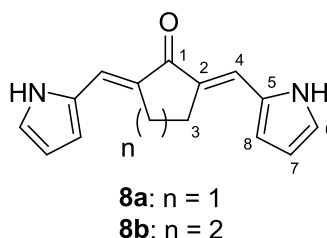
Tabela 8 - Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 6-7.



Substância					
6a	6b	7a	7b		
194,3	187,7	194,6	188,5	C=O	Anel cetônico^a
147,1	139,7	142,8	141,0	C-2	
26,4	28,0	26,6	28,2	C-3	
-	22,1	-	22,8	C-4	
134,2	134,0	136,6	136,9	Olefina^b	
149,4	150,4	137,3	137,1	C_a	Carbonos aromáticos
127,1	127,0	132,3	133,0	C_b	
122,9***	123,2**	121,9	122,4	C_c	
130,0	126,0	133,2	133,1	C_d	
125,9**	130,2*	N	N	C_e	
125,6**	129,8*	148,6	148,5	C_f	
139,4	143,1	127,9	127,9	C_g	
N	N	131,9	131,3*	C_h	
145,7	145,8	126,7	131,2*	C_i	
121,7***	122,1**	130,5	130,4*	C_j	

^aC=O, C-2 e C-3 para derivados da ciclopentanona; C=O, C-2 a C-4 para derivados da ciclohexanona; ^bC-4 em **6a** e **7a**. *intercambiáveis. **intercambiáveis. ***intercambiáveis.

6.2.3 Bis((1*H*-pirrol-2-il)metileno)-cicloalcanonas **8a** e **8b**



No espectro no infravermelho dos derivados pirrólicos são observadas as bandas correspondentes à deformação axial N-H do anel pirrólico, deformação axial de C=O de cetona conjugada e deformação axial de C=C olefínica (**Figura A.46, p. 195** e

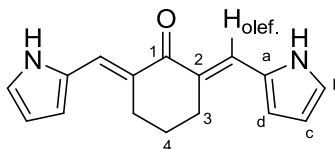
Figura A.49, p. 197). Os números de ondas dessas bandas, fundamentais para a caracterização dos produtos, estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Comparação entre as principais bandas no espectro no IV dos produtos 8a e 8b.

Substância	$\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$		
	N-H	C=O	C=C
8a	3261	1670	1604
8b	3254	1644	1588

Na **Tabela 10** está ilustrado um resumo dos dados de RMN de ^1H de **8a** e **8b**.

Tabela 10 – Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 8a e 8b.



Subst.	Anel cetônico ^a		Olefina ^b	Anel pirrólico ^c			NH
	H-3	H-4		H _b	H _c	H _d	
8a	3,00	-	8,00	7,30	6,59	6,84	12,53
8b	2,75-2,73	1,77	7,61	7,05	6,25	6,52	11,41

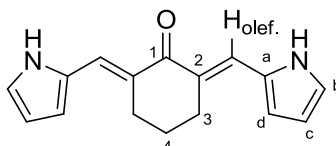
^aSomente H-3 para **8a**, H-3 e H-4 em **8b**; ^bH-4 em **8a** e H-5 em **8b**.

No espectro de RMN de ^1H de **8a** e **8b**, os sinais correspondentes aos sinais de NH do anel pirrólico foram observados na região acima de δ 11,00 (**Figura A.47, 196** e **Figura A.50, p. 197**). O sinal do hidrogênio da olefina foi atribuído ao sinal mais afastado do TMS da região de hidrogênios aromáticos, seguido de H_b, H_d e H_c. O acoplamento entre H_b e H_c com H_d, pôde ser confirmado pelo experimento COSY, já que os sinais correspondentes no espectro de RMN de ^1H apresentam uma constante de acoplamento muito pequena, aparentando tratar-se de um simpleto.

No espectro de RMN de ^{13}C de **8a** foram observados os sinais referentes ao carbono da carbonila (δ 194,7), ao C-2 (δ 133,8), ao C-3 (δ 27,0), ao carbono olefínico e C_b (δ 123,6 e 122,9, intercambiáveis) e aos demais carbonos do anel pirrólico C_a, C_c e C_d (δ 131,2, 112,3 e 115,0, respectivamente) (**Figura A.48, p. 196**).

No espectro de RMN de ^{13}C de **8b** foram observados sinais com deslocamentos químicos próximos ao dos descritos para **8a** (**Figura A.51, p. 198**), conforme mostrado na **Tabela 11**. As atribuições foram auxiliadas com base na análise dos respectivos espectros de RMN de DEPT 135.

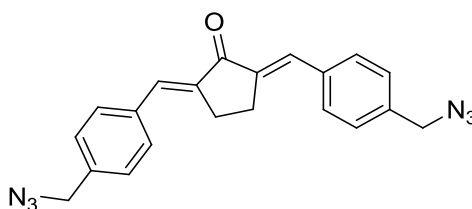
Tabela 11 - Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 8a e 8b.



Subst.	Anel cetônico ^a				Olefina ^b	Anel pirrólico ^c			
	C=O	C-2	C-3	C-4		C _a	C _b	C _c	C _d
8a	194,7	133,8	27,0	-	123,6*	131,2	122,9*	112,3	115,0
8b	186,9	129,4*	27,8	21,6	125,9	129,0*	122,2	110,8	113,2

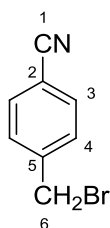
^aC=O, C-2 e C-3 para **8a**; C=O, C-2 a C-4 para **8b**; ^bC-4 em **8a**. *intercambiáveis.

6.2.4 2,5-bis-(4-(azidometil)benzilideno)-ciclopentanona (12)



12

O primeiro intermediário da rota de síntese utilizada para obtenção de **12** foi o derivado bromado **9** obtido por reação de bromação benzílica da *p*-tolunitrila.

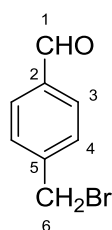


9

O espectro no infravermelho de **9** (**Figura A.52, p. 198**) pouco revela sobre o sucesso da reação, uma vez que a deformação axial da ligação C-Br formada encontra-se em número de onda abaixo da capacidade do espectrofotômetro utilizado ($650\text{-}510\text{ cm}^{-1}$) (PAVIA, LAMPMAN e KRIZ, 2001).

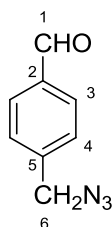
A caracterização inequívoca do produto se deu com base na análise de seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (**Tabela 12 e 13**).

A próxima etapa de síntese consistiu na redução da nitrila a aldeído, originando o aldeído **10**.

**10**

No espectro no infravermelho de **10** observa-se a presença de duas bandas características de aldeído: a banda de deformação axial C-H de aldeído em 2752 cm^{-1} e a banda de deformação axial de C=O da carbonila de aldeído aromático em 1682 cm^{-1} (**Figura A.55, p. 200**).

Reação de substituição nucleofílica do derivado bromado **10** com azida de sódio originou o derivado azido **11**.

**11**

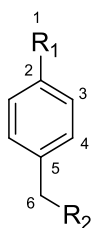
No espectro no infravermelho de **11** foi observada a banda característica de deformação axial de grupo azido em 2095 cm^{-1} , evidenciando o sucesso da reação (**Figura A.58, p. 201**).

Finalmente, reação de condensação aldólica entre **11** e a ciclopentanona, originou o derivado desejado **12**.

O produto da condensação aldólica **12** pôde ser caracterizado com base na análise de seu espectro no infravermelho onde se observam as bandas características da deformação axial de C=O de cetona conjugada (1698 cm^{-1}) e da deformação axial de C=C olefínica (1615 cm^{-1}) (**Figura A.64, p. 204**).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H das substâncias **9**, **10** e **11** estão resumidos na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 9, 10 e 11.



Substância	R ₁	R ₂	δ (ppm)			
			CHO	H-3	H-4	H-6
9	CN	Br	-	7,64	7,50	4,48
10	CHO	Br	10,01	7,86	7,56	4,52
11	CHO	N ₃	10,02	7,91	7,49	4,46

No espectro de RMN de ^1H de **9** observa-se a presença de um simpleto em δ 4,48, com integral para dois hidrogênios, correspondente aos hidrogênios benzílicos (**Figura A.53, p. 199**).

Os sinais referentes ao hidrogênio do aldeído de **10** e **11** são observados próximos de δ 10,00 (**Figura A.56, p. 200** e **Figura A.59, p. 202**). Os sinais dos hidrogênios benzílicos foram observados, na forma de um simpleto, entre δ 4,46-4,52. Observa-

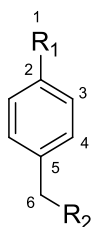
se pequena diferença entre o deslocamento químico do sinal referente aos hidrogênios benzílicos do derivado bromado **10** (δ 4,52) e do derivado azido **11** (δ 4,46). Entretanto, no espectro de RMN de ^{13}C , a diferença no deslocamento químico do sinal referente ao carbono benzílico ligado ao bromo (δ 32,2) ou ao grupo azido (δ 54,4) é significativa e característica (**Tabela 13**).

No espectro de RMN de ^1H de **12** o sinal referente aos hidrogênios olefínicos H-4 foi observado como um multipeto, sobreposto ao sinal de H-6 (δ 7,64-7,60) (**Figura A.65, p. 205**). No seu espectro de RMN de ^{13}C (**Figura A.66, p. 205**) foram observados os sinais referentes ao carbono da carbonila conjugada (δ 196,3) e ao carbono olefínico C-4 (δ 133,4), coerentes com os deslocamentos químicos das substâncias similares previamente discutidas na **seção 6.2.1**.

No espectro de RMN de ^{13}C de **9**, o sinal de C-6 em δ 31,7 é característico de carbono benzílico ligado à bromo e, no espectro de DEPT 135, esse sinal corresponde a um carbono metilênico (**Tabela 13**).

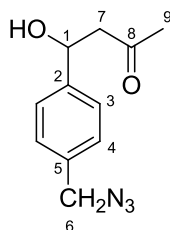
No espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **9**, **10** e **11** é possível observar a presença da nitrila ou aldeído pelo deslocamento químico de seus carbonos, bem como a diferença no deslocamento químico entre o carbono benzílico ligado ao bromo ao ligado ao grupo azido, como citado anteriormente e mostrado na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias 9, 10 e 11.



Substância	R ₁	R ₂	δ (ppm)					
			C1	C2	C3	C4	C5	C6
9	CN	Br	118,5	112,3	132,7	129,9	143,5	31,7
10	CHO	Br	191,7	136,2	130,3	129,8	144,4	32,2
11	CHO	N ₃	191,9	136,3	130,4	128,6	142,3	54,4

O subproduto de reação **11b**, oriundo da reação do aldeído **11** com a acetona, foi caracterizado com base nos seus espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e de ^{13}C .

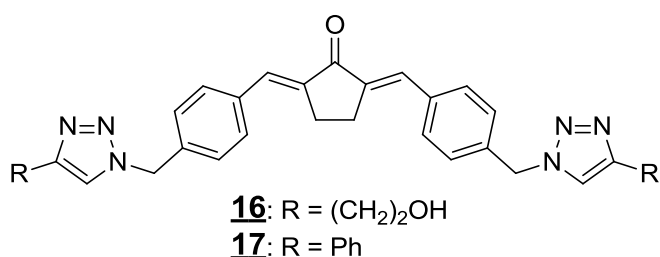


11b

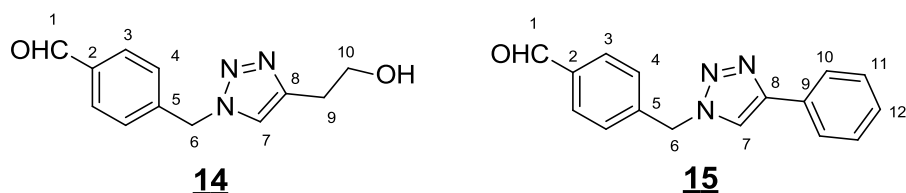
No espectro no infravermelho é observado uma banda referente a hidroxila de álcool (3425 cm^{-1}) e de carbonila de cetona não-conjugada (1704 cm^{-1}), indicando se tratar de uma possível produto de adição aldólica (**Figura A.61, p. 203**).

No espectro de RMN de ^1H de **11b** é observado um simpleto em δ 4,31, referente à H-6 (**Figura A.62, p. 203**) e, no espectro de RMN de ^{13}C , um sinal referente ao carbono C-6 em δ 54,6, mostrando que a substância sofreu a substituição do bromo pelo azido (**Figura A.63, p. 204**). No entanto, não há indícios da presença de um grupo aldeído no produto. No espectro de RMN de ^1H não se observa nenhum sinal próximo a 10, característico de hidrogênio de aldeído, e o carbono da carbonila aparece com descolamento químico típico de cetona no espectro de RMN de ^{13}C (δ 209,1). Além disso, no espectro de RMN de ^1H de **11b** observam-se um multipletto em δ 5,17-5,11 referente ao sinal de H-1, um multipletto em δ 2,86-2,80 referente aos sinais dos hidrogênios diastereotópicos H-7 e H-7' e um simpleto em δ 2,17, com integral para três hidrogênios, correspondente ao sinal de H-9. No espectro de RMN de ^{13}C de **11b** são observados os sinais em δ 69,6, δ 52,0, δ 30,9, que foram atribuídos aos carbonos C-1, C-7 e C-9, respectivamente.

6.2.5 Derivados triazólicos **16** e **17**



A obtenção dos heterociclos **16** e **17** foi possível a partir dos aldeídos triazólicos **14** e **15**, respectivamente.



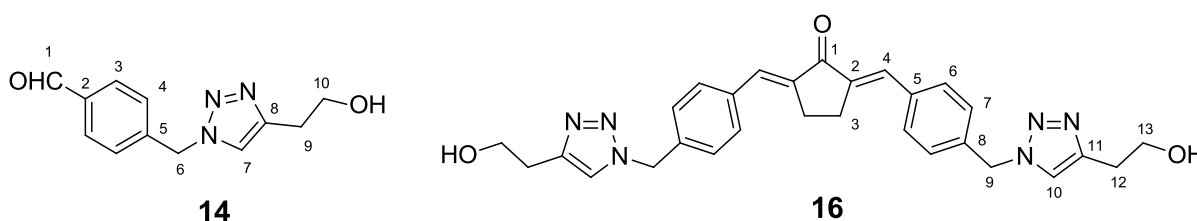
No espectro no infravermelho de **14** são observadas bandas correspondentes à deformação axial de O-H (3454 cm^{-1}), deformação axial C-H de aldeído (2747 cm^{-1}), deformação axial de C=O da carbonila de aldeído aromático (1686 cm^{-1}) e banda de deformação axial de C-O do álcool primário (1042 cm^{-1}) (**Figura A.68, p. 206**). A ausência da banda característica do grupo azido já é um indício da formação do produto desejado. No espectro no infravermelho de **15** também são observadas as bandas correspondentes à deformação axial C-H de aldeído (2741 cm^{-1}) e à deformação axial de C=O da carbonila de aldeído aromático (1691 cm^{-1}) e ausência da banda do grupo azido (**Figura A.71, p. 208**). Os espectros dos produtos da condensação aldólica **16** e **17** exibiram as bandas características da deformação axial de C=O de cetona conjugada (1691 e 1695 cm^{-1}) e da deformação axial de C=C olefínica (1625 e 1628 cm^{-1}) (**Figura A.74, p. 209** e **Figura A.77, p. 211**). No espectro de **16** foi possível observar as bandas de deformação axial de O-H (3273 cm^{-1}) e de deformação axial de C-O do álcool primário (1050 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **14** e **15** foi observado um sinal próximo à δ 10,00 referente ao hidrogênio do aldeído (**Figura A.69, p. 207** e **Figura A.72, p. 208**). O sinal atribuído ao hidrogênio do anel triazólico aparece sobreposto ao sinal de H-4 (δ

7,41-7,37) em **14** e aos sinais de H-4 e H-11 (δ 7,45-7,32) em **15**. O substituinte fenílico de **15** pode ser identificado pela presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos H-10, H-12 (δ 7,83-7,76) e H-11 (δ 7,45-7,32). Os sinais do substituinte hidroxietil em **14** são observados como dois tripletos em δ 3,91 e δ 2,93 referentes aos hidrogênios metilênicos H-10 e H-9, respectivamente. O sinal em δ 2,93 tem integral para três hidrogênios e está sobrepondo o sinal referente ao hidrogênio da hidroxila. O simpleto referente aos hidrogênios benzílicos foi observado em δ 5,58, no espectro de **14** e δ 5,66, no espectro de **15**.

No espectro de RMN de ^1H de **16** foi observado um simpleto em δ 7,94 referente ao hidrogênio H-4 da olefina (**Figura A.75, p. 210**). O sinal correspondente aos hidrogênios das hidroxilas foi observado em δ 4,72 e o sinal correspondente aos hidrogênios metilênicos do anel cetônico foi observado como um simpleto em δ 3,06. Os demais sinais foram observados com deslocamento químico semelhante aos sinais dos seus respectivos hidrogênios no espectro do aldeído de partida. Na **Tabela 14** está apresentado um resumo dos dados dos espectros de RMN de ^1H de **14** e **16**.

Tabela 14 - Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias **14** e **16**.



Subst.	Anel cetônico	CHO	Olefina	Anel aromático		H benzílico	Anel triazólico	Hidroxietil		
				orto	meta			H-9 / H-12	H-10 / H-13	OH
14	-	9,99	-	7,86	7,41 - 7,37	5,58	7,41 - 7,37	2,93	3,91	2,93
16	3,06	-	7,94	7,68	7,40 - 7,36	5,60	7,40 - 7,36	2,76	3,63 - 3,61	4,72

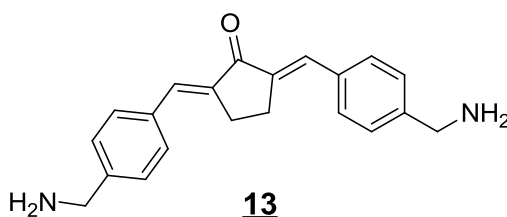
Em razão da baixíssima solubilidade de **17** em todos os solventes deuterados disponíveis no laboratório (DMSO- d_6 , CDCl_3 , acetona- d_6 , metanol- d_4 e piridina- d_5), não foi possível caracterizá-lo por RMN.

No espectro de RMN de ^{13}C de **14** foram observados, além de outros, os sinais referentes aos carbonos da carbonila do aldeído (δ 191,7), do anel heterocíclico C-8 (δ 146,4) e C-7 (δ 122,0), e aos carbonos metilênicos provenientes do butinol C-9 e C-10 (δ 28,9 e 61,6, respectivamente) (**Figura A.70, p. 207**).

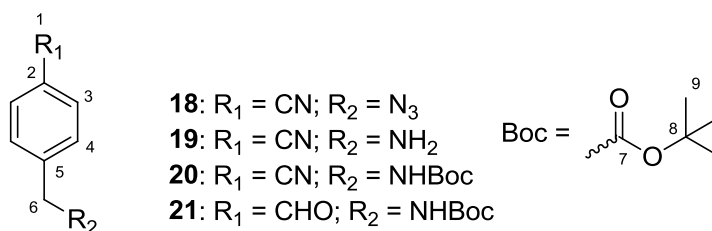
No espectro de RMN de ^{13}C de **15** foram observados os sinais referentes ao carbono da carbonila (δ 191,6) e ao carbono do anel heterocíclico C-7 em δ 129,0 (**Figura A.73, p. 209**). Não foi observado o sinal referente ao carbono C-8. Acredita-se que o número de corridas do experimento não foi o suficiente para que o sinal deste carbono fosse detectado.

No espectro de RMN de ^{13}C de **16** foi observada uma mudança no deslocamento químico do carbono carbonílico, em relação ao aldeído de partida, para δ 195,3, além do sinal referente ao carbono da olefina C-4 (δ 132,0), permitindo inferir a formação do produto (**Figura A.76, p. 210**). Além de outros, também foram observados os sinais referentes aos carbonos do anel heterocíclico C-11 (δ 144,8) e C-10 (δ 122,7), e aos carbonos metilênicos do seu substituinte C-12 e C-13 (δ 29,2 e 60,3, respectivamente). Todas as atribuições de carbono foram auxiliadas com o espectro de RMN de DEPT 135.

6.2.6 2,5-bis-(4-(aminometil)benzilideno)-ciclopentanona (13)



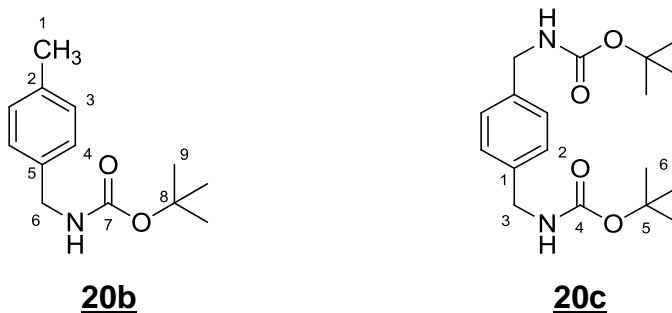
Na rota de síntese alternativa utilizada para obtenção de **13** foi necessária a síntese dos intermediários **18** a **21**.



Um indício da formação de **18** foi o aparecimento, no espectro no infravermelho, da banda de deformação axial do grupo azido (2095 cm⁻¹) (**Figura A.78, p. 211**).

No espectro no infravermelho de **19** observa-se uma banda de deformação axial de N-H em 3370 cm⁻¹ (**Figura A.81, p. 213**). Ainda no espectro do derivado amino **19**, obtido por hidrogenação catalítica, é possível observar uma banda em 2226 cm⁻¹ referente a deformação axial do grupo ciano, o que demonstra que a nitrila não foi totalmente reduzida durante a reação, mesmo quando proveniente da hidrogenação catalítica de **18**.

O espectro no infravermelho de **20** revela a formação do carbamato pela presença das bandas características de deformação axial da carbonila (1682 cm⁻¹) e a deformação angular *umbrela* das metilas (1365 cm⁻¹) (**Figura A.82, p. 213**), observada também nos outros compostos contendo o grupo *tert*-butila: **20b**, **20c**, **21** e **22** (1363-1365 cm⁻¹).



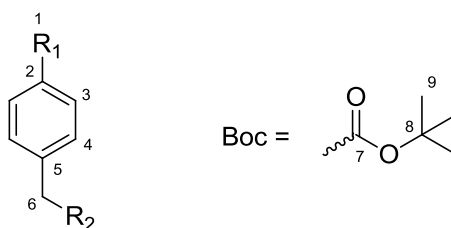
No espectro no infravermelho de **20b** (**Figura A.85, p. 215**), subproduto da reação de formação de **20**, não é observada banda de nitrila e o mesmo ocorre no espectro de **20c** (**Figura A.88, p. 216**).

No espectro no infravermelho de **21** são observadas as bandas de deformação axial de C-H de aldeído (2739 cm^{-1}) e deformação axial da carbonila de aldeído aromático (1673 cm^{-1}), indícios da redução do grupo ciano a aldeído (**Figura A.91, p. 218**).

O padrão do produto de condensação aldólica é observado no espectro no infravermelho de **22**, com a presença das bandas de deformação axial da carbonila conjugada (1685 cm^{-1}) e da olefina (1625 cm^{-1}) (**Figura A.94, p. 219**). Essas bandas também são observadas no espectro no IV de **13** (1689 cm^{-1} e 1621 cm^{-1} , respectivamente) (**Figura A.67, p. 206**). No espectro desse composto ainda é detectada a presença do cloridrato da amina por uma banda de deformação axial larga de N-H em 3369 cm^{-1} .

Os dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias **18**, **20** e **21** estão resumidos na (**Tabela 15**).

Tabela 15 – Dados do espectro de RMN de ^1H das substâncias 18, 20 e 21.



Subst.	R_1	R_2	δ (ppm)					
			CHO	H-3	H-4	H-6	NH-Boc	Boc (CH ₃)
18	CN	N ₃	-	7,60	7,38	4,40	-	-
20	CN	NHBoc	-	7,60	7,37	4,35	5,12	1,44
21	CHO	NHBoc	9,98	7,83	7,43	4,38	5,11	1,45

No espectro de RMN de ^1H de **18**, **20** e **21** os sinais dos hidrogênios benzílicos foram observados, na forma de um simpleto, entre δ 4,40-4,35 (**Figura A.79, Figura A.83 e Figura A.92**). Observa-se pequena diferença entre o deslocamento químico do sinal referente aos hidrogênios benzílicos do derivado bromado **9** (δ 4,48) e do derivado azido **18** (δ 4,40). Entretanto, no espectro de RMN de ^{13}C , a diferença no deslocamento químico do sinal referente ao carbono benzílico ligado ao bromo (δ 31,7) ou ao grupo azido (δ 53,7) foi fundamental para a caracterização do produto

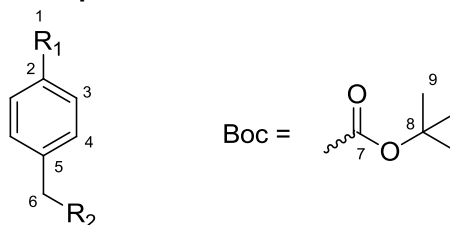
(Tabela 16). No espectro de RMN de ^1H de **20** e **21** é possível observar os sinais dos hidrogênios do grupo *N*-Boc incorporado à molécula. O hidrogênio do aldeído formado em **21** é observado em δ 9,98 (Tabela 15).

Observa-se no espectro de RMN de ^1H de **20b** um sinal em δ 2,34, com integral para 3 hidrogênios, compatível com o sinal de hidrogênios metílicos ligado a anel aromático (Figura A.86, p. 215).

No espectro de RMN de ^1H de **20c** é observado somente um simpleto na região de hidrogênios aromáticos o que é compatível com uma substância *para*-dissubstituída por grupos idênticos (Figura A.89, p. 217). Além disso, os sinais correspondentes aos outros hidrogênios (H-3, δ 4,08; N-H, δ 4,28 e H-6, δ 1,38) são observados com integrais dobradas em relação a **20**, considerando a integral dos hidrogênios aromáticos de 4.

Os dados do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **18**, **20** e **21** estão resumidos na Tabela 16.

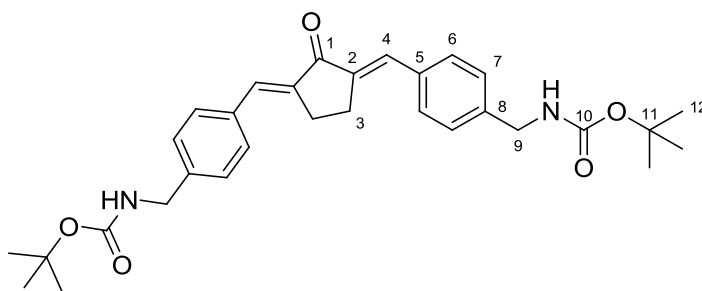
Tabela 16 - Sinais do espectro de RMN de ^{13}C das substâncias **18**, **20** e **21**.



Subst.	R ₁	R ₂	δ (ppm)								
			C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
18	CN	N ₃	118,3	111,7	132,3	128,3	140,7	53,7	-	-	-
20	CN	NHBoc	118,9	111,2	132,5	127,9	144,8	44,3	156,1	80,2	28,5
21	CHO	NHBoc	192,1	127,9	135,7	130,3	146,4	44,5	156,1	80,1	28,5

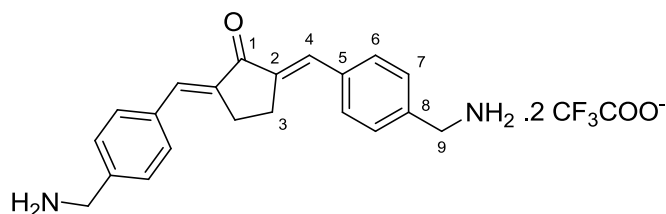
Observa-se o sinal do carbono do grupo ciano em aproximadamente δ 118,0 em **18** e **20**, enquanto o sinal da carbonila de aldeído é observado em δ 192,1, no espectro de **21**. Os sinais referentes à porção *N*-Boc da molécula são observados em **20** e **21**, indicando o sucesso na proteção do grupo amino.

No espectro de RMN de ^{13}C de **20b** (Figura A.87, p. 216) foi observado um sinal em δ 21,23, atribuído ao sinal de C-1 e não foi observado o sinal do carbono da nitrila, enquanto no espectro de **20c** (Figura A.90, p. 217) foram observados, além dos sinais referentes à porção *N*-Boc e do carbono benzílico, e apenas dois sinais de carbonos aromáticos C-1 (δ 138,5) e C-2 (δ 126,8), reflexo da simetria da molécula.



22

Nos espectros de RMN de ^1H (Figura A.95, p. 220) e ^{13}C (Figura A.96, p. 220) de **22** são observados os sinais de hidrogênio e de carbono referentes ao grupo protetor (NH : δ 4,98; CH_3 : δ 1,47 e C-10: δ 156,1; C-11: δ 79,9 e C-12: δ 28,6), indicando que este grupo não foi removido durante a reação de condensação aldólica. São ainda observados os sinais característicos do produto de condensação aldólica do hidrogênio e do carbono da olefina (δ 7,57-754 e δ 133,6, respectivamente). O sinal correspondente ao carbono da carbonila conjugada não aparece no espectro de RMN de ^{13}C , porém, sua presença pode ser inferida pela presença da banda em 1685 cm^{-1} no espectro no infravermelho. Esta banda aparece alargada devido à sobreposição da banda da carbonila conjugada com a banda da carbonila do carbamato.

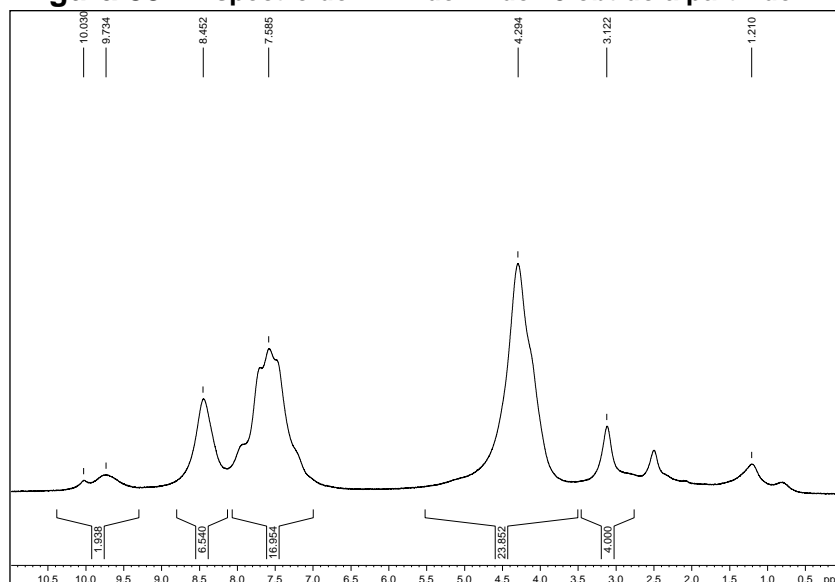


13

No espectro de RMN de ^1H do diamino **13** obtido a partir **22** pela remoção do grupo *N*-Boc, é observado um sinal em δ 10,0 e em δ 9,7 que poderiam estar associados

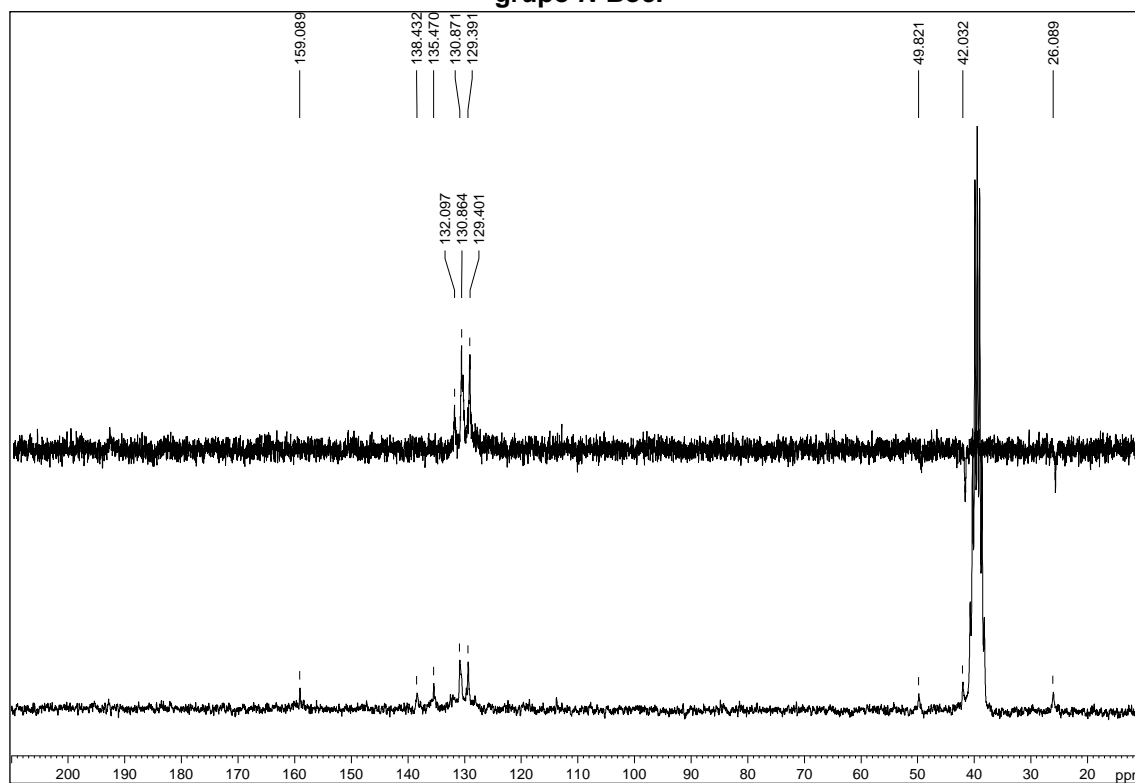
com a presença de um hidrogênio de aldeído, resultante da reação retro-aldólica do produto em meio ácido (**Figura 39**).

Figura 39 – Espectro de RMN de ^1H de 13 obtido a partir de 22.



No espectro de RMN de ^{13}C dessa mesma amostra são observados um sinal em δ 159,1 que foi atribuído à carbonila do TFA, os sinais em δ 138,4 (C-8), δ 135,5 (C-5), δ 130,9 e δ 129,4 (C-6 e C-7, intercambiáveis). Ainda foram observados os sinais em δ 26,1, atribuído ao metileno do anel de cinco membros, e dois sinais, um em δ 49,8 e outro em δ 42,0, que foram atribuídos aos carbonos C-9, da amina protonada e desprotonada, respectivamente. O sinal da carbonila conjugada não foi observado, porém sua presença pôde ser inferida pela banda de carbonila presente no espectro no infravermelho. O sinal de C-2 também não foi observado e há a possibilidade dele ter sido sobreposto por outros sinais. O sinal referente ao carbono C-4 (δ 132,1) foi observado somente no espectro de DEPT 135 (**Figura 40**).

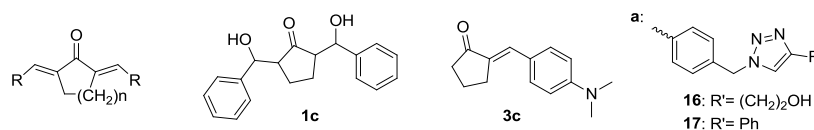
Figura 40 – Espectro de RMN de ^{13}C 13 e DEPT 135 obtido a partir de 22, pela remoção do grupo *N*-Boc.



6.3 Ensaios biológicos

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos com a TR de *T. cruzi* e GR, ensaios *in vitro* com a *L. amazonensis*, *T. cruzi* e de citotoxicidade em fibroblastos não infectados estão sumarizados na **Tabela 17**.

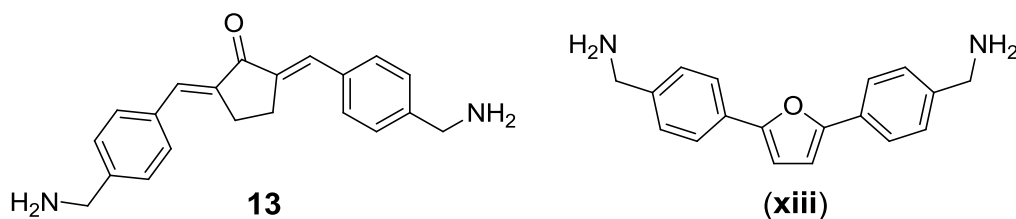
Tabela 17 – Dados obtidos nos ensaios biológicos com os compostos sintetizados.



Subst.	n	R	CI ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)	<i>Leishmania amazonensis</i>		Citotoxicidade CI ₅₀ (μM)	Inibição enzimática		
				Inib. do crescimento*	CI ₅₀ (μM)		TR (%)*	CI ₅₀ TR (μM)	GR (%)*
1a	1	Ph	250	inativo	ND	> 250	0	ND	10,83
1b	2	Ph	inativo	77,0%	ND	> 9,2 e < 27,7	69,2	68,3	ND
1c	-	-	inativo	inativo	ND	> 250	0	ND	8,3
2a	1	4-MeC ₆ H ₄	inativo	inativo	ND	> 250	0	ND	29,88
2b	2	4-MeC ₆ H ₄	54,5	inativo	ND	> 250	0	ND	13,85
3a	1	4-Me ₂ NC ₆ H ₄	inativo	inativo	ND	> 83,3 e < 250	0	ND	7,36
3b	2	4-Me ₂ NC ₆ H ₄	inativo	inativo	ND	> 83,3 e < 250	0,7	ND	10
3c	-	-	inativo	inativo	ND	> 83,3 e < 250	0	ND	8,36
4	1	4-NO ₂ C ₆ H ₄	inativo	inativo	ND	> 250	0	ND	13,44
5a	1	4-piridina	inativo	inativo	ND	> 83,3 e < 250	2,2	ND	0
5b	2	4-piridina	inativo	53,4%	ND	> 9,2 e < 250	96,4	15,3	ND
6a	1	4-quinolina	6,15	62,4%	ND	> 9,2 e < 250	18,6	ND	29,24
6b	2	4-quinolina	inativo	48,8%	5,81 ± 1,0	> 3,1 e < 250	18,52	ND	12,55
7a	1	5-isoquinolina	15,62	inativo	ND	> 83,3 e < 250	9	ND	11,64
7b	2	5-isoquinolina	6,25	inativo	ND	> 9,2 e < 250	17,39	ND	1,35
8a	1	2-pirrol	inativo	ND**	6,85 ± 0,67	< 7,8	0	ND	9,73
8b	2	2-pirrol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	1	4-CH ₂ N ₃ C ₆ H ₄	inativo	inativo	ND	> 250	2,47	ND	54,12
13	1	4-CH ₂ NH ₂ C ₆ H ₄	inativo	60,0%	13,74 ± 0,23	> 83,3 e < 250	97	40,45	3,26
16	1	a	inativo	inativo	ND	> 250	ND	ND	ND
17	1	a	inativo	inativo	ND	> 125 e < 250	ND	ND	ND

*substâncias testadas na concentração de 100 μM. ND: não determinado. **A coloração intensa desenvolvida pelo produto no meio ter impossibilitado a leitura dos resultados na concentração de 100 μM

Nos ensaios enzimáticos, os compostos que inibiram mais de 50% da atividade da TR na concentração de 100 μM , **1b**, **5b** e **13**, tiveram a sua CI_{50} determinada, destacando-se **5b**, com CI_{50} de 15,3 μM . Quando testado na concentração de 100 μM , o composto **13** inibiu 97% a atividade da TR, valor superior ao encontrado por Oliveira e colaboradores para o análogo **xiii** (60% de inibição na mesma concentração) (OLIVEIRA *et al.*, 2008), demonstrando que a substituição do anel furano pela ciclopentanona foi importante na otimização da atividade.



Apenas o composto **12** inibiu, significativamente, a GR (54,12% de inibição). Todos os outros compostos testados apresentaram inibição da atividade da GR menor do que 30%, demonstrando uma baixa afinidade dos compostos por essa enzima. Os ensaios de inibição da GR com as substâncias **1b** e **5b**, ativas contra a TR, estão em andamento e os resultados obtidos serão importantes para avaliar a seletividade desses compostos. O derivado diamino **13** apresentou excelente seletividade quando se compara, na mesma concentração (100 μM), a sua capacidade em inibir a TR (97 % de inibição) e a GR (3,26 % de inibição). Esse resultado pode ser ainda mais relevante, se for considerado que essa substância estava contaminada com o óxido de trifetilfosfina, oriundo da etapa de síntese de **13**. Portanto, se faz necessária a reavaliação da atividade do diamino **13**, utilizando uma amostra mais pura.

A avaliação da atividade da substância **8b** e dos triazóis **16** e **17** contra a TR e GR também está em andamento.

Como controle positivo foram utilizadas a clomipramina, no ensaio com a TR (CI_{50} 6,8 μM) e a carmustina, no ensaio com a GR. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos por, no mínimo, duas vezes. Os resultados estão expressos como o percentual de redução na atividade enzimática (**Tabela 17**).

No ensaio para avaliar a atividade tripanocida dos compostos, foram utilizadas cepas de *T. cruzi* (Tulahuen) e, paralelamente, um ensaio de citotoxicidade, utilizando células não infectadas, foi conduzido. Benznidazol foi utilizado como controle positivo (CI_{50} 3,8 μ M).

Entre os compostos testados, quatro apresentaram atividade relevante: **2b** (CI_{50} 54,5 μ M), **6a** (CI_{50} 6,15 μ M), **7a** (CI_{50} 15,6 μ M) e **8a** (CI_{50} 6,25 μ M) e **1a** apresentou uma atividade apenas moderada (CI_{50} 250 μ M). Vale ressaltar que **6a** e **8a** foram quase tão ativos quanto o controle positivo utilizado no ensaio (Benznidazol - CI_{50} 3,8 μ M), mas, infelizmente, mostraram-se tóxicos no ensaio de citotoxicidade (CI_{50} entre 9,2 e 28 μ M). Apesar de não ter sido o mais ativo, o composto **7a** se destaca como um potencial agente tripanocida, pois apresentou uma CI_{50} de 15,62 μ M e mostrou-se menos tóxico que os demais (CI_{50} entre 83,3 e 250 μ M). Esses compostos inibiram a TR apenas discretamente e é provável que o mecanismo da ação tripanocida deva-se a outro(s) mecanismo(s). Observa-se que três dos compostos mais ativos (**6a**, **7a** e **7b**) possuem em sua estrutura um anel quinolínico ou isoquinolínico e, portanto, essas estruturas devem ser consideradas para futuras modificações moleculares com o propósito de aumentar a atividade tripanocida e diminuir a toxicidade.

Durante o teste de avaliação tripanocida, foi relatado que algumas das substâncias não foram solúveis na solução estoque preparada em DMSO (**2a**, **5a**, **6a**, **7a**, **7b**, **8a**, **16** e **17**) e outras precipitaram no meio do ensaio (**3a** e **3b**), o que pode ter levado ao um resultado subestimado da atividade dessas substâncias, uma vez que a concentração final da substância no meio não corresponde a sua concentração real. Os compostos **16** e **17** apresentaram valores de K_i calculados no docking da ordem de nanomolar baixa e, portanto a atividade biológica deles era promissora.

Na avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* com *L. amazonensis*, seis compostos mostraram-se ativos (**1b**, **5b**, **6a**, **6b**, **8a** e **13**), sendo o melhor deles, **6b**, com uma CI_{50} de 5,81 μ M. Apesar do bom resultado obtido, os compostos com atividade leishmanicida mostraram-se tóxicos no ensaio com fibroblastos. O composto **13**, porém, teve a menor toxicidade (CI_{50} entre 83,3 e 250 μ M). O composto **13** manteve atividade a leishmanicida verificada para seu análogo **xiii**, o que demonstra que a substituição do anel furânico não foi deletéria. Novamente,

devido à impureza da amostra, este composto deve ser reavaliado. Acredita-se que a atividade leishmanicida de **1b**, **5b** e **13** possa estar relacionada a inibição da TR, uma vez que esses compostos inibiram a TR durante o ensaio enzimático.

6.4 Estudos de ancoragem molecular

Nos estudos de ancoragem molecular (*docking*), utilizando o programa AutoDock 4.0, um total de 20 moléculas foram avaliadas, sendo que três delas, **3a**, **3b** e **13**, foram avaliadas tanto na forma ionizada quanto na forma não-ionizada. O objetivo nesses estudos foi determinar a afinidade das substâncias sintetizadas e avaliar o modo de interação com a TR, possibilitando identificar os principais grupos de interação dos ligantes com a enzima pela análise das conformações dos ligantes no complexo enzima-ligante.

No *docking* os ligantes foram considerados flexíveis, enquanto a macromolécula foi considerada rígida. Estudos de *docking* considerando a macromolécula flexível são de grande custo computacional devido ao grande número de átomos do sistema e graus de liberdade que devem ser considerados nos cálculos.

O AutoDock é considerado um programa robusto, que consegue balancear acurácia e rapidez, graças a um algoritmo de busca efetivo, o algoritmo genético Lamarckiano, e a uma excelente função *scoring* usada nos cálculos para estimativa das energias de ligação (GAI *et al.*, 2010). No trabalho de Bursulaya e colaboradores, o Autodock conseguiu reproduzir a estrutura cristalográfica, considerando conformações com RMSD de até 2,0 Å, de 46% de 37 estruturas utilizando onze receptores diferentes (BURSULAYA *et al.*, 2003). Wang e colaboradores realizaram um estudo com diversos programas de *docking* considerando cem complexos proteína-ligante, formados por 43 proteínas, moléculas de diversos pesos moleculares e número de ligações rotacionáveis variando de zero a 20. Nesse estudo, o AutoDock obteve uma taxa de sucesso de 62%, considerando um RMSD menor ou igual a 2,0 Å (WANG, LU e WANG, 2003). Uma das limitações dos programas de *docking* está relacionada com o número de ângulos diedros da molécula ligante. Moléculas altamente flexíveis aumentam o

tamanho do campo de busca, aumentando a complexidade do problema (MAGALHÃES, BARBOSA e DARDENNE, 2007).

Para a validação do método e avaliação da capacidade preditiva do programa, foi realizado o *redocking* do substrato natural tripanotiona, extraída da própria estrutura cristalográfica. Foram determinadas doze ligações rotacionáveis para a tripanotiona, sendo seis em cada ramificação da molécula. A cadeia espermidina, que faz parte de um ciclo na tripanotiona oxidada, foi considerada rígida, assim como as ligações das amidas, devido à possibilidade de ressonância. O *redocking* com a tripanotiona foi realizado com o ligante com 12, 10, 8 e 6 ligações rotacionáveis. Os resultados são exibidos na **Tabela 18** e as poses que mais se aproximaram do substrato cristalográfico nas **Figura 41** e **42**.

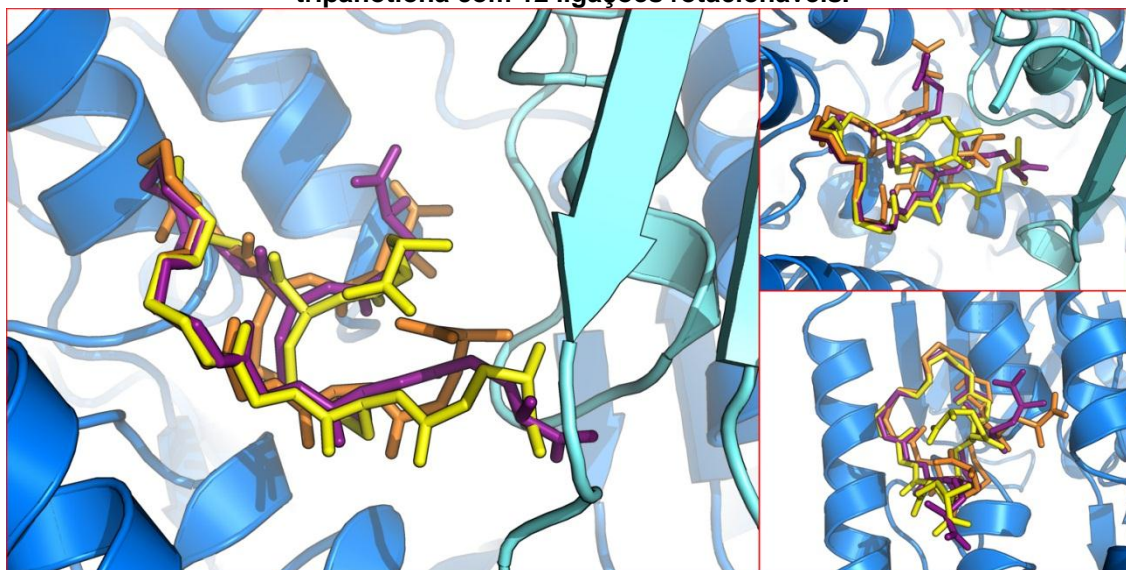
Tabela 18 – RMSD dos ligantes de *redocking* em relação a tripanotiona cristalográfica.

n° de ligações rotacionáveis	RMSD (tripanotiona cristalográfica)
12 ^a	2,364 Å
12 ^b	2,297 Å
10	1,996 Å
8	1,171 Å
6	0,586 Å

^aConformação de menor energia. ^bConformação de menor energia do 2º *cluster*.

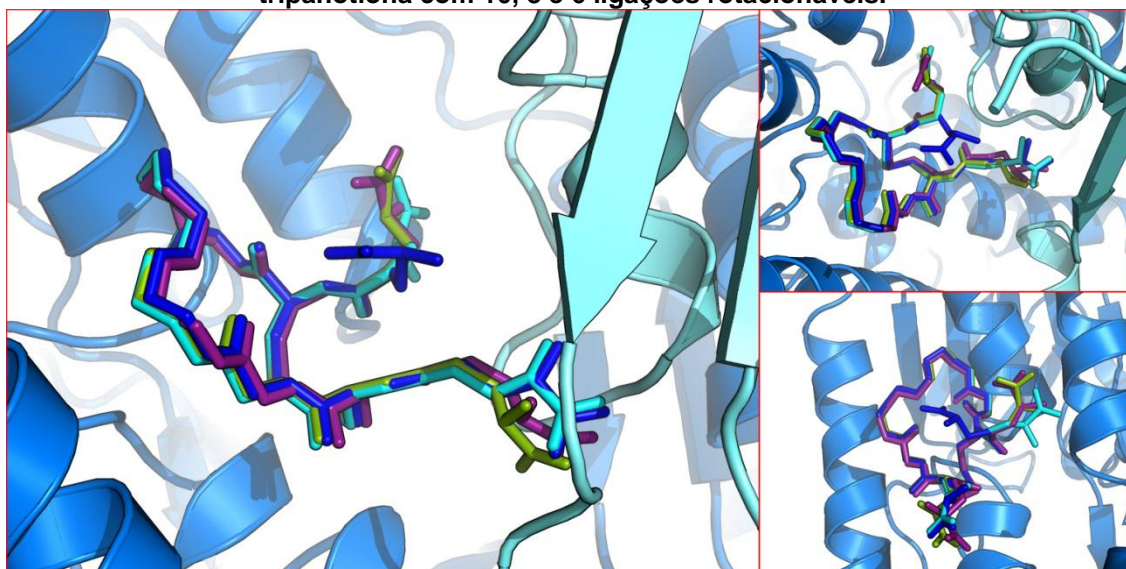
Observa-se que, quanto menor o grau de liberdade do ligante, mais próximo do substrato cristalográfico foi a solução do *docking*. Essa comparação foi feita com base no desvio médio quadrático (RMSD) e a predição do método foi considerada boa, uma vez que o valor do RMSD não excedeu o valor de 2,5 Å (MAGALHÃES, BARBOSA e DARDENNE, 2007).

Figura 41 – Sobreposição do substrato cristalográfico com as poses de *redocking* da tripanotona com 12 ligações rotacionáveis.



Tripanotona cristalográfica (roxo) e solução de *redocking* com 12 ligações rotacionáveis: conformação de menor energia do primeiro *cluster* (amarelo) e do segundo *cluster* (laranja).

Figura 42 - Sobreposição do substrato cristalográfico com as poses de *redocking* da tripanotona com 10, 8 e 6 ligações rotacionáveis.

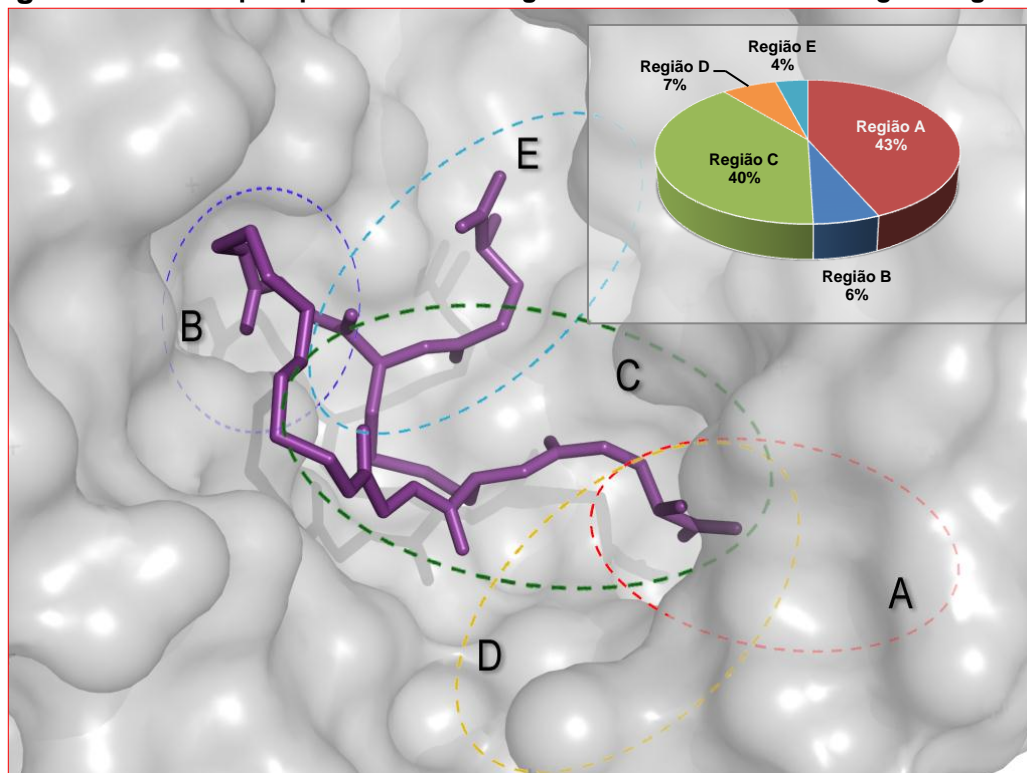


Tripanotona cristalográfica (roxo) e conformação de menor energia do *redocking* com 10 ligações rotacionáveis (azul), 8 ligações rotacionáveis (ciano) e 6 ligações rotacionáveis (verde).

A análise das conformações dos ligantes obtidos nos cálculos do ancoramento molecular revelou áreas de atracamento comuns. Essas regiões estão destacadas na **Figura 43**, utilizando o substrato cristalográfico tripanotona como referência. Na **Figura 43** também é mostrado um gráfico ilustrando a distribuição das conformações de menor energia encontradas em cada corrida de *docking* nessas regiões. É

possível notar uma grande tendência das conformações de menor energia encontrarem-se ancoradas nas regiões A e C (43% e 40% das conformações de menor energia de cada corrida, respectivamente).

Figura 43 – Principais pontos de ancoragem visualizados no *docking* dos ligantes.



As poses mais significantes para cada um dos ligantes analisados, considerando as cinco regiões, serão abordadas a seguir.

Na região A foram encontradas as soluções de menor energia para as moléculas **1a**, **1b**, **1c**, **2b**, **3c**, **5a**, **5b**, **6a**, **7a**, **8a** e **8b**. Observa-se uma grande afinidade dessas moléculas pela região ocupada parcialmente pela ramificação II da tripanotona (Região A - **Figura 43**), uma cavidade hidrofóbica composta pelos resíduos Phe396', Thr397', Pro398', Leu399', Met400' e Lys62. Esta afinidade pode ser em parte explicada pelo padrão estrutural hidrofóbico formado pelos anéis aromáticos, comum nas moléculas analisadas (**Figura 44** e **Figura 45**).

Figura 44 – Estrutura das substâncias 1-8, 13, 16 e 17.

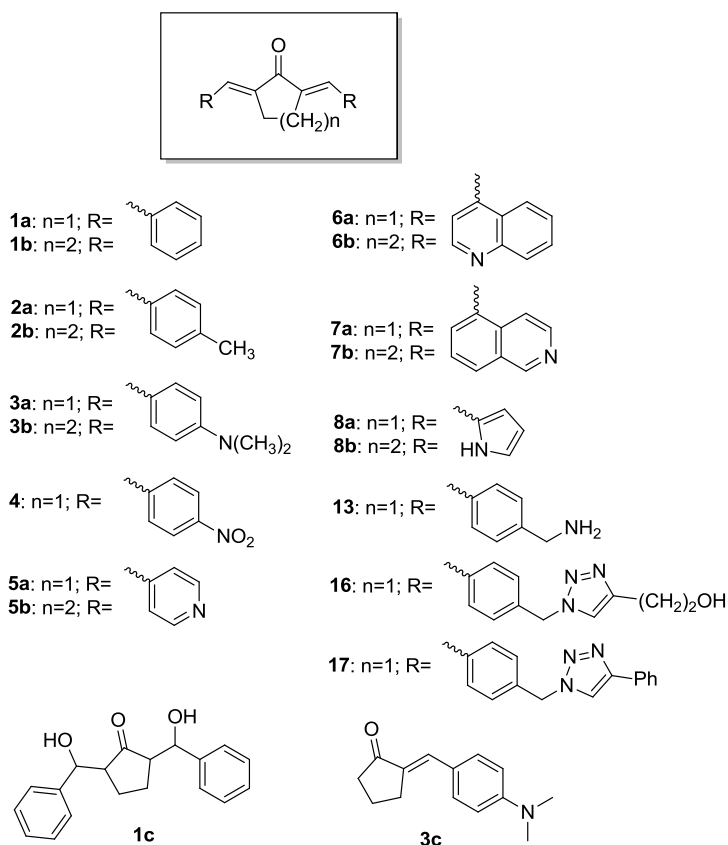
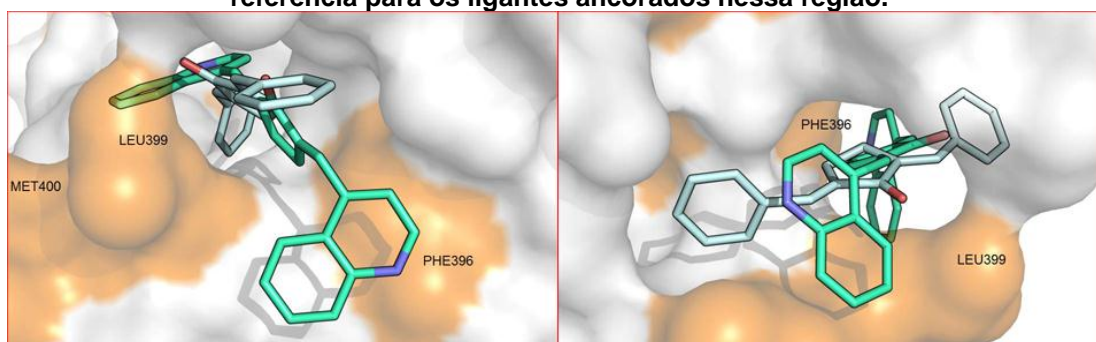


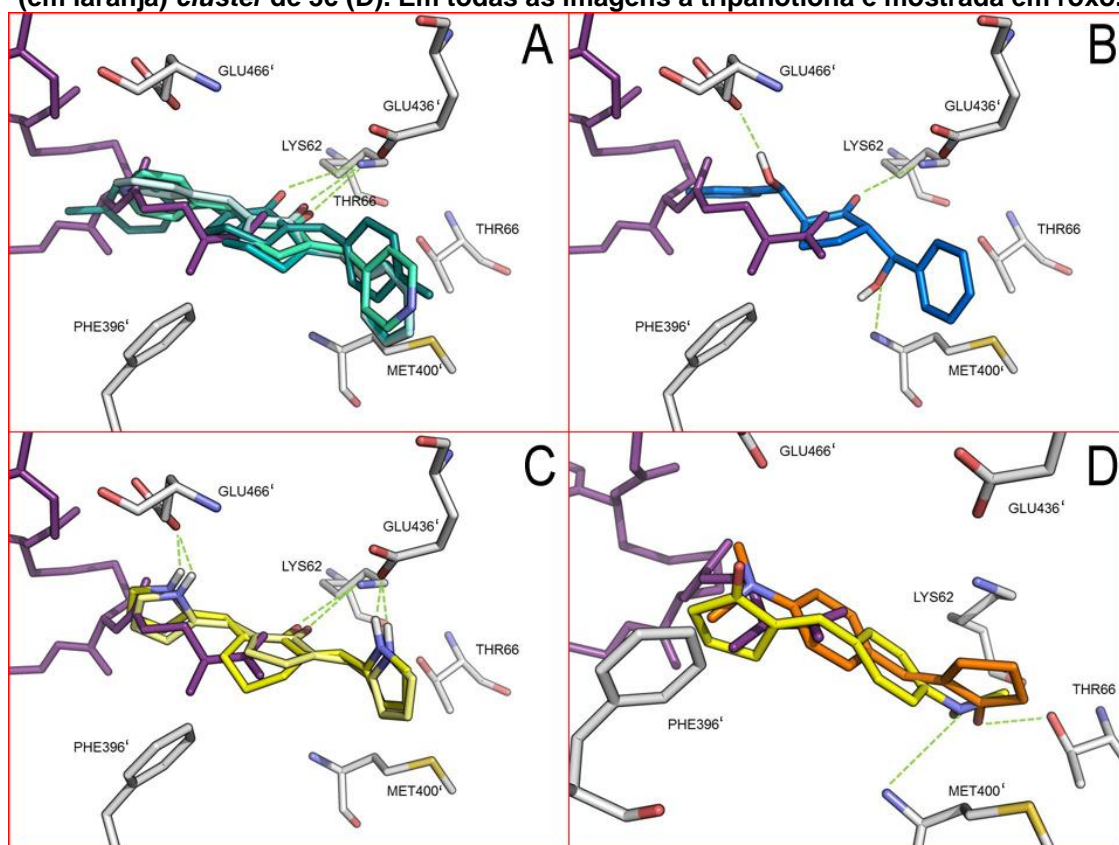
Figura 45 – Principais resíduos hidrofóbicos de interação na região A. As conformações de menor energia encontrada no *docking* de 1a (azul claro) e 6a (verde) são mostradas como referência para os ligantes ancorados nessa região.



Grande parte dos ligantes nessa região têm uma interação possível entre o oxigênio carbonílico, atuando como aceptor de ligação de hidrogênio (HBA), e o resíduo Lys62 (**Figura 46 – A**). Além dessa interação, o ligante **1c** possui duas hidroxilas que podem formar ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal da Met400' e com um dos oxigênios do carboxilato da cadeia lateral do resíduo de Glu466' (**Figura 46 – B**). Os ligantes **8a** e **8b**, semelhantes estruturalmente, podem ter dois pontos de interações adicionais dos hidrogênios polares dos anéis pirrólicos,

via ligação de hidrogênio, com os grupos carboxilato de Glu436' e Glu466' (**Figura 46 – C**). A molécula **3c**, devido ao seu menor volume, tem maior liberdade dentro do sítio enzimático, e pode adotar diversas posições no mesmo. A solução de menor energia e a conformação de menor energia do *cluster* mais populoso possuem valores próximos de energia de ligação. Enquanto a conformação do primeiro *cluster* tem o seu nitrogênio posicionado a 3,5 Å do nitrogênio da cadeia principal do resíduo Met400', a do segundo *cluster* adota uma posição contrária, possibilitando o oxigênio carbonílico interagir com o resíduo de Thr66 (**Figura 46 – D**). O pequeno número de pontos de interações com a biomacromolécula torna-a um dos piores ligantes avaliados, em termos de energia.

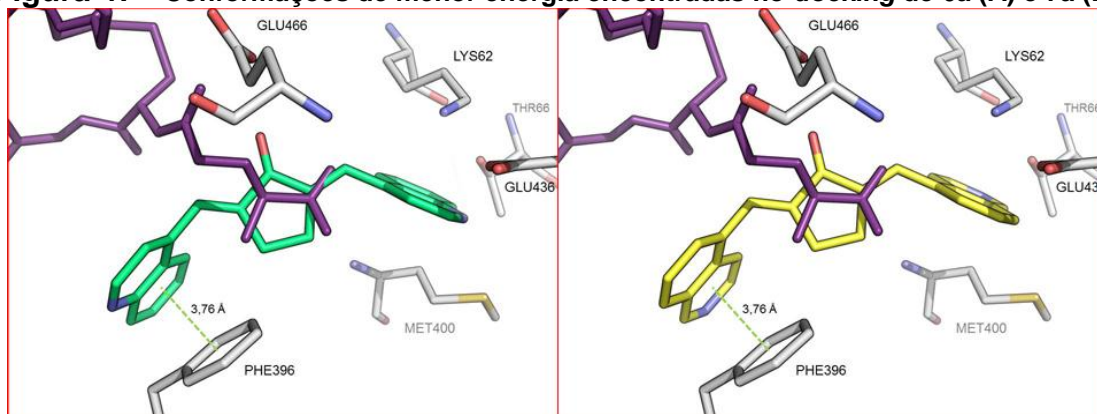
Figura 46 – Conformações de menor energia encontradas no *docking* de 1a, 1b, 2b, 5a e 5b (sobrepostos) (A); 1c (B); 8a e 8b (C) e conformação de menor energia do 1º (em amarelo) e 2º (em laranja) *cluster* de 3c (D). Em todas as imagens a tripanotona é mostrada em roxo.



Os resultados do *docking* com os derivados da quinolina **6a** e isoquinolina **7a** com anel cetônico de cinco membros apresentaram as conformações de menor energia praticamente justapostas, também localizados na região A, com uma das cadeias quinolínicas deslocada, em relação aos outros ligantes dessa região, devido ao

maior volume desse substituinte e a possível interação do tipo π *stacking* com o resíduo de Phe396', situado a 3,76 Å de distância desse anel (**Figura 47**).

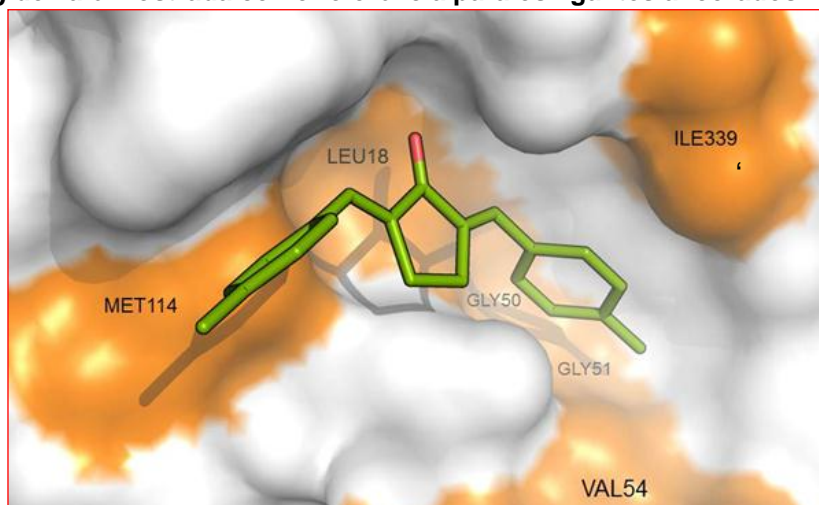
Figura 47 - Conformações de menor energia encontradas no *docking* de **6a** (A) e **7a** (B).



Observa-se que a conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de **6a** tem posicionamento diferente, encontrando-se na região C. O anel aromático no resíduo Phe396', se posicionado corretamente, pode gerar um ponto de interação com **6a**, nessa região, por meio de uma interação π *stacking* (**Figura 51 – A**).

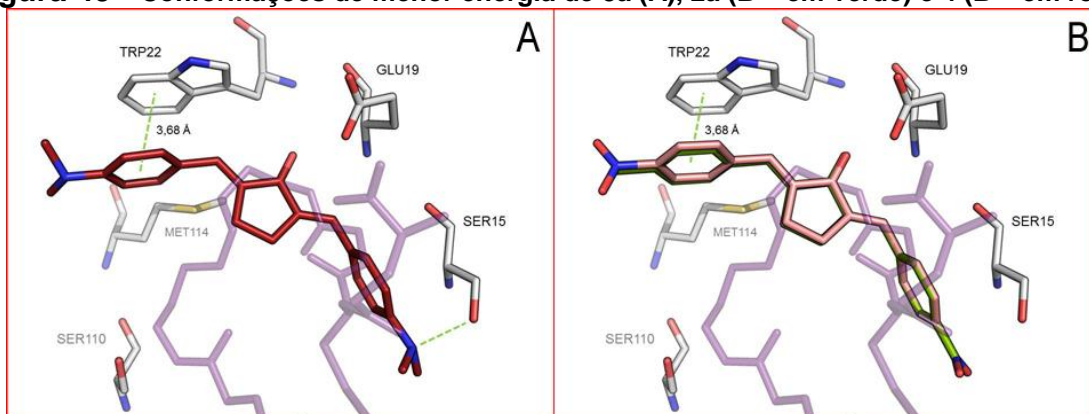
Três dos ligantes analisados, **2a**, **3a** e **4**, tiveram a conformação de menor energia encontrada atracada na região B do sítio (**Figura 43**). Observa-se que os ligantes se orientam sobre os resíduos hidrofóbicos Met114, Leu18, Gly50 e Gly51 (**Figura 48**). Essa região é ocupada pela porção espermidina da tripanotona cristalográfica, porção ausente na glutaciona, e, por esse motivo, é a região onde é encontrada a maioria dos resíduos não conservados em relação à GR como Glu19, Trp22, Ser110 e Met114.

Figura 48 - Resíduos hidrofóbicos na região B. A conformação de menor energia encontrada no *docking* de **2a** é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região.



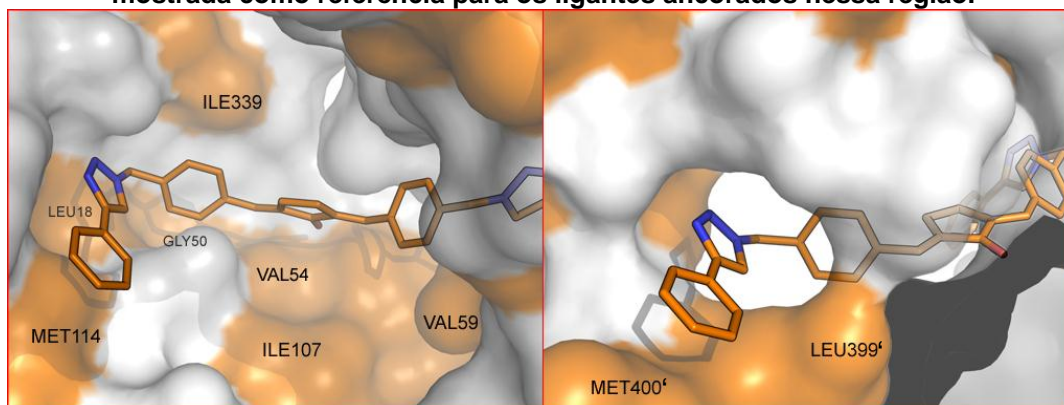
O resíduo Glu19 é responsável pela interação com o nitrogênio positivo da porção espermidina da tripanotona, uma diferença estrutural marcante em relação à GR e que permite a diferenciação entre os dois substratos. Conseqüentemente, esta região pode ser potencialmente explorada na busca de ligantes mais seletivos. A conformação de menor energia do ligante **3a**, quando analisado com carga neutra, foi encontrada com um de seus nitrogênios a 1,66 Å do hidrogênio polar do resíduo Ser15 e com um de seus anéis aromáticos a 3,68 Å de distância do anel indólico do resíduo Trp22, possibilitando uma interação do tipo π *stacking* (**Figura 49** – A). O posicionamento do anel aromático em relação ao resíduo Trp22 é similar nas conformações encontradas em **2a** e **4** (**Figura 49** – B). Apesar do elevado valor de K_i estimado pelo AutoDock para o ligante **4** (313,9 μ M), somente a afinidade do ligante pela TR não seria suficiente para explicar um possível efeito biológico deste ligante com precisão, uma vez que esse possui um grupo nitro, podendo atuar como substrato subversivo da enzima.

Figura 49 - Conformações de menor energia de 3a (A), 2a (B – em verde) e 4 (B – em rosa).



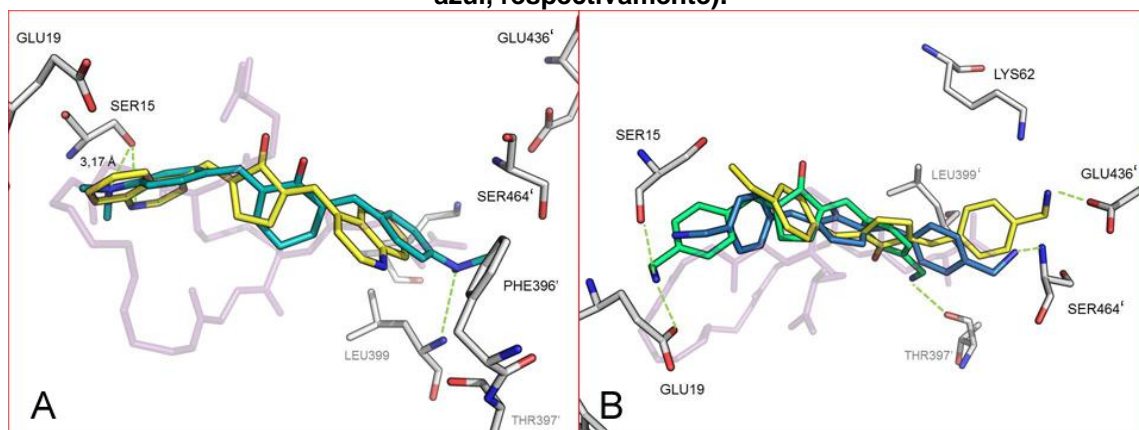
Alguns ligantes, como **3b**, **6a**, **13**, **16** e **17**, ocuparam uma região central do sítio ativo da enzima, explorando com eficiência a grande extensão do sítio, estendendo-se da região ocupada pela porção inicial da espermidina à região ocupada pela ramificação II da tripanotona (região C - **Figura 43** e **Figura 50**). Esses ligantes, portanto, interagem com resíduos de duas extremidades do sítio enzimático, o que pode ser benéfico no sentido de impedir a ligação do substrato natural ao sítio.

Figura 50 – Resíduos hidrofóbicos da região C. A conformação de menor energia de 17 é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região.



A conformação de menor energia de **3b** mostra a possibilidade de uma ligação de hidrogênio entre um de seus nitrogênios ao nitrogênio da cadeia principal de Leu399' a 3,1 Å de distância, em ângulo favorável (**Figura 51 – A**). O outro nitrogênio, no entanto, está em posição desfavorável para formação de ligação de hidrogênio com o resíduo de Ser15. A flexibilidade da cadeia lateral desse resíduo poderia aumentar a chance de interação.

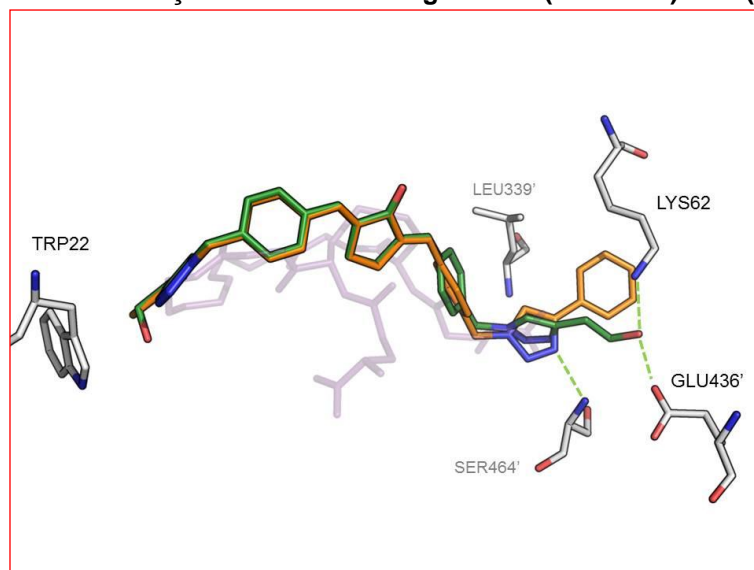
Figura 51 - Conformação de menor energia de 3b (A – em azul), do cluster mais populoso de 6a (A – em amarelo) e de menor energia do 1º, 3º e 5º *cluster* de 13 (B – em verde, amarelo e azul, respectivamente).



A região C foi, também, a região de preferência para o ligante **13**, analisado na sua forma neutra, onde foram encontradas, além da conformação de menor energia, as conformações de menor energia dos *clusters* mais populosos, 3º e 5º no *ranking*. A conformação de menor energia mostrou ser capaz de formar ligações de hidrogênio com o oxigênio carbonílico dos resíduos Ser15 e Thr397' e com o carboxilato de Glu19, exclusivo da TR (**Figura 51** – B). As conformações de menor energia do 3º e 5º *cluster* encontram-se mais deslocadas, portanto, podem interagir com os resíduos Glu436' e Ser 464', respectivamente (**Figura 51** – B).

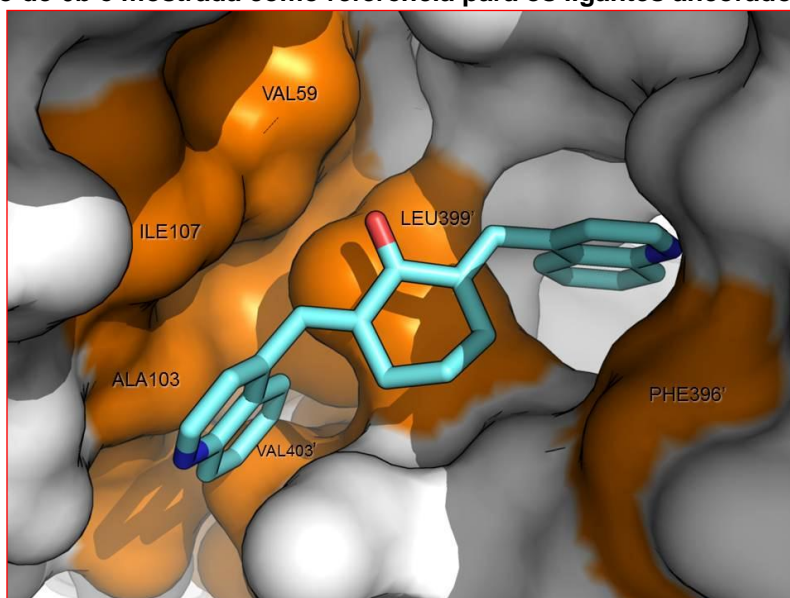
Devido ao grande comprimento dos ligantes **16** e **17**, estes se encontram centrados na região C. O maior número de pontos de interações possíveis e grupos hidrofóbicos presentes nesses ligantes diminuíram consideravelmente os valores estimados de seus K_i , sendo os melhores ligantes encontrados no estudo. As conformações de menor energia dos dois ligantes se sobrepõem em grande extensão das moléculas, variando na posição de um dos anéis triazólicos, que no caso de **16** se posiciona de forma a favorecer a interação entre a hidroxila, atuando como HBA e HBD (doador de ligação de hidrogênio), e os resíduos Lys62 e Glu436' (**Figura 52**). A posição diferente dos anéis triazólicos entre os ligantes faz com que apresentem pontos de interação diferentes com a biomacromolécula. Um dos nitrogênios o anel triazólico de **17** pode interagir com o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Ser464' (**Figura 52**).

Figura 52 - Conformações de menor energia de **16** (em verde) e **17** (em laranja).



A região D se sobrepõe em parte à região A e, portanto, os ligantes nela encontrados interagem também com os resíduos encontrados na região A, Lys62 e Ser464', e estão posicionados próximos a resíduos hidrofóbicos como Leu399' (Figura 53).

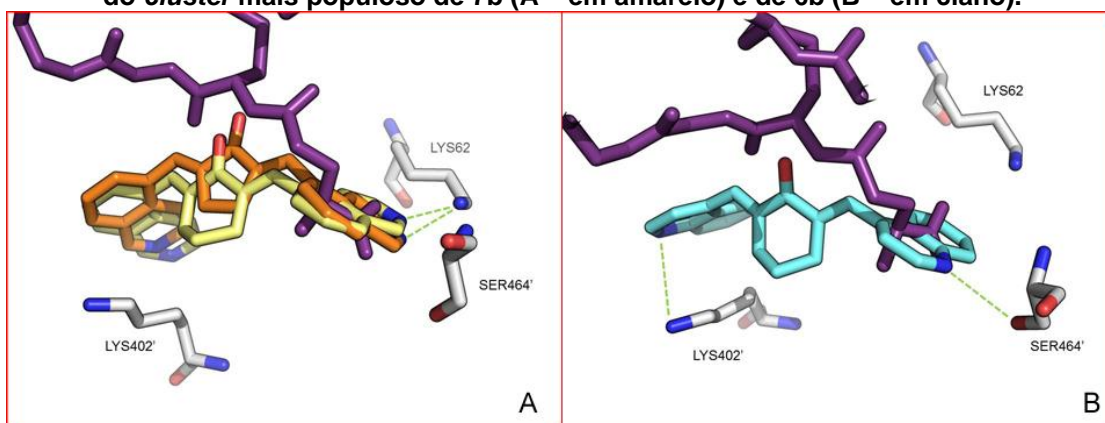
Figura 53 – Resíduos hidrofóbicos na região D. A conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de **6b** é mostrada como referência para os ligantes ancorados nessa região.



A conformação de menor energia de **7b** e a conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de **7a** tem o nitrogênio do anel em posição favorável para

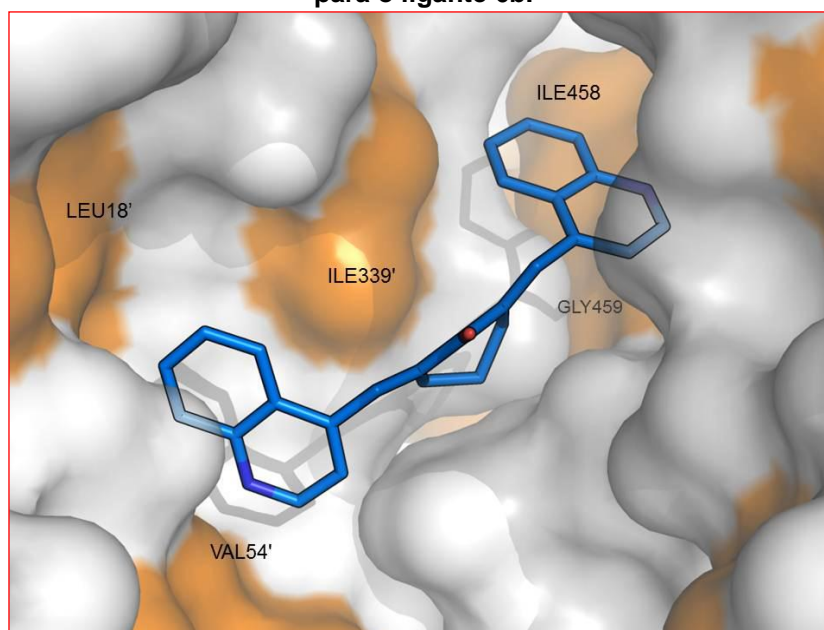
interagir com o resíduo Lys62 (**Figura 54 – A**). A conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de **6b** pode interagir com o resíduo Ser464' (**Figura 54 – B**).

Figura 54 – Conformação de menor energia do *cluster* mais populoso de 7a (A – em laranja), do *cluster* mais populoso de 7b (A – em amarelo) e de 6b (B – em ciano).



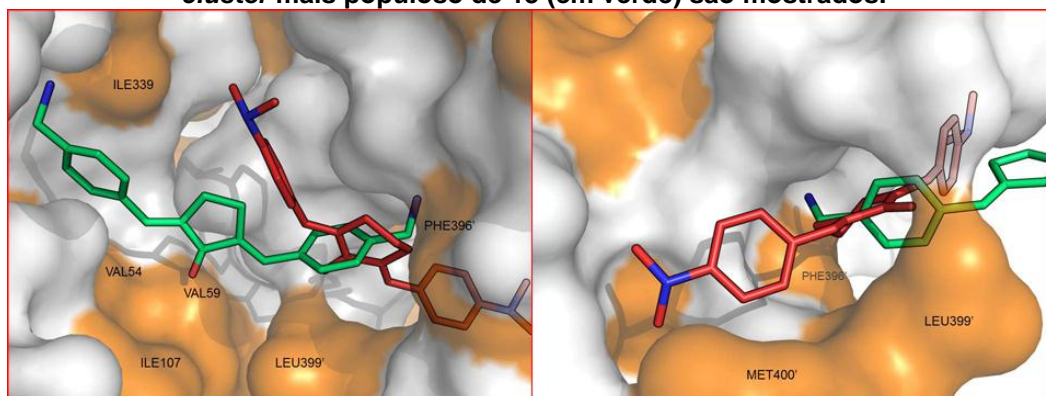
A conformação de menor energia encontrada no *docking* do ligante **6b**, no entanto, atracou em uma região isolada dos demais ligantes (região E - **Figura 43**). Esse ligante apresentou um dos menores K_i entre os ligantes avaliados, da ordem de nanomolar, e sua afinidade pela enzima pode ser explicada pela proximidade dos resíduos hidrofóbicos Leu18', Val54', Ile339 e Ile458' (**Figura 55**).

Figura 55 – Resíduos hidrofóbicos próximos à conformação de menor energia encontrada para o ligante 6b.



Todas as soluções de menor energia encontradas para as aminas analisadas no *docking* na sua forma protonada (**3a**, **3b** e **13**), revelaram um posicionamento em uma região comum no sítio da enzima, entre as regiões A e C - **Figura 43** e **Figura 56**).

Figura 56 - Resíduos hidrofóbicos na região de atracamento dos ligantes protonados **3a**, **3b** e **13**. Somente as conformações de menor energia do 1º *cluster* de **3b** (em vermelho) e do *cluster* mais populoso de **13** (em verde) são mostrados.

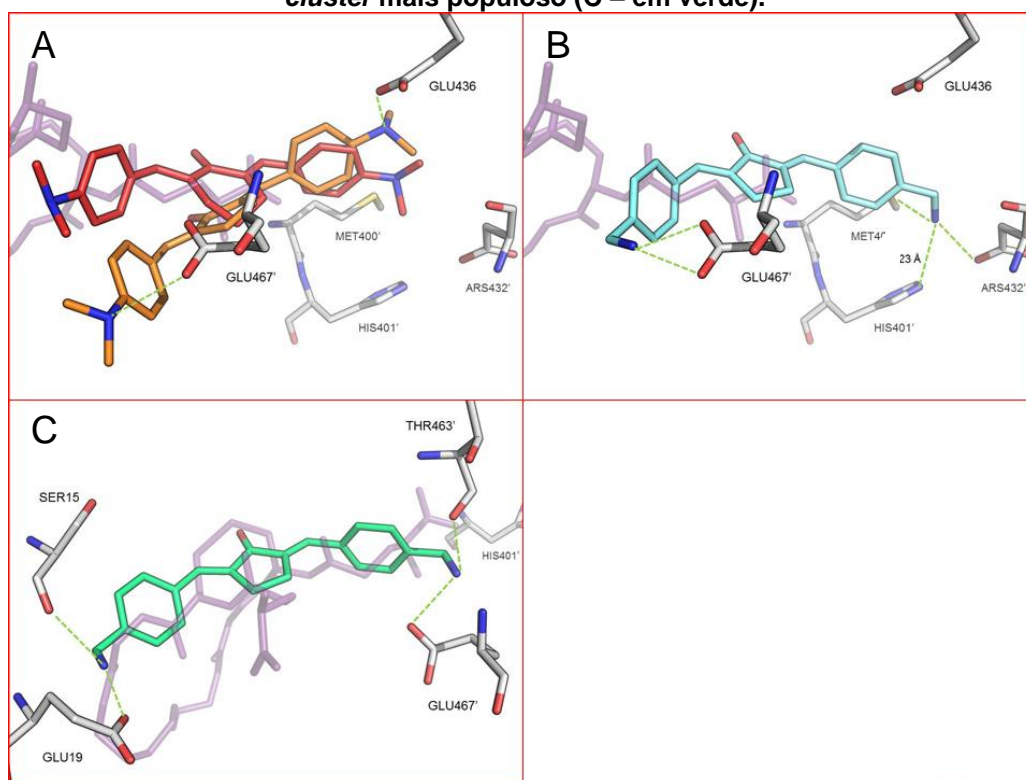


Os nitrogênios protonados de **3a** mostraram ser capazes de realizar uma interação iônica com os grupos carboxilatos dos resíduos Glu467' e Glu436' (**Figura 57 – A**), enquanto a solução de menor energia encontrada para **3b**, apesar de situar-se na mesma região, tem seus nitrogênios em posições mais distantes dos grupos carboxilatos dos resíduos Glu436' (4,3 Å) e Glu467' (4,2 Å) (**Figura 57 – A**). Novamente, a flexibilidade das cadeias laterais desses resíduos, pode levar a uma melhor interação com o ligante.

A conformação de menor energia de **13** pode interagir, além do resíduo Glu467', com o carboxilato do resíduo Ars432', devido à distância adequada proporcionada pela presença do grupo metilênico entre a amina e o anel aromático (**Figura 57 – B**). A maior extensão da molécula **13** também coloca um dos seus hidrogênios do grupo amino em posição adequada para realizar ligação de hidrogênio com o nitrogênio do anel pirrolidínico do resíduo His401', considerando a flexibilidade da cadeia lateral desse resíduo. O enxofre do resíduo Met400' pode ainda atuar como HBA, apesar de este ser considerado um fraco HBA, pois o par de elétrons não ligante do enxofre encontra-se difuso em um volumoso orbital da terceira camada (PATRICK, 2009).

A conformação de menor energia encontrada no *cluster* mais populoso de **13**, 2º em posição no ranking dos *clusters* criado pelo AutoDock, encontra-se na região C (**Figura 43 e Figura 56**), ocupando a região central do sitio da TR, estendendo-se de uma extremidade à outra e interagindo, por ligação iônica, com o grupo carboxilato do resíduo Glu19 e, por ligação de hidrogênio com: a) o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo Ser15, na extremidade ocupada pela porção espermidina da tripanotona, b) o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo Thr463' e c) o carboxilato do resíduo Glu467' (**Figura 57 – C**).

Figura 57 - Conformação de menor energia dos ligantes protonados **3b** (A – em vermelho), **3a** (A – em laranja) e conformação de menor energia do 1º *cluster* de **13** (B – em ciano) e do *cluster* mais populoso (C – em verde).



Na **Tabela 19** estão listados os valores de ΔG e K_i calculados pelo AutoDock com os resultados obtidos nos ensaios de inibição enzimática dos ligantes com a TR e a GR, testados na concentração de 100 μM .

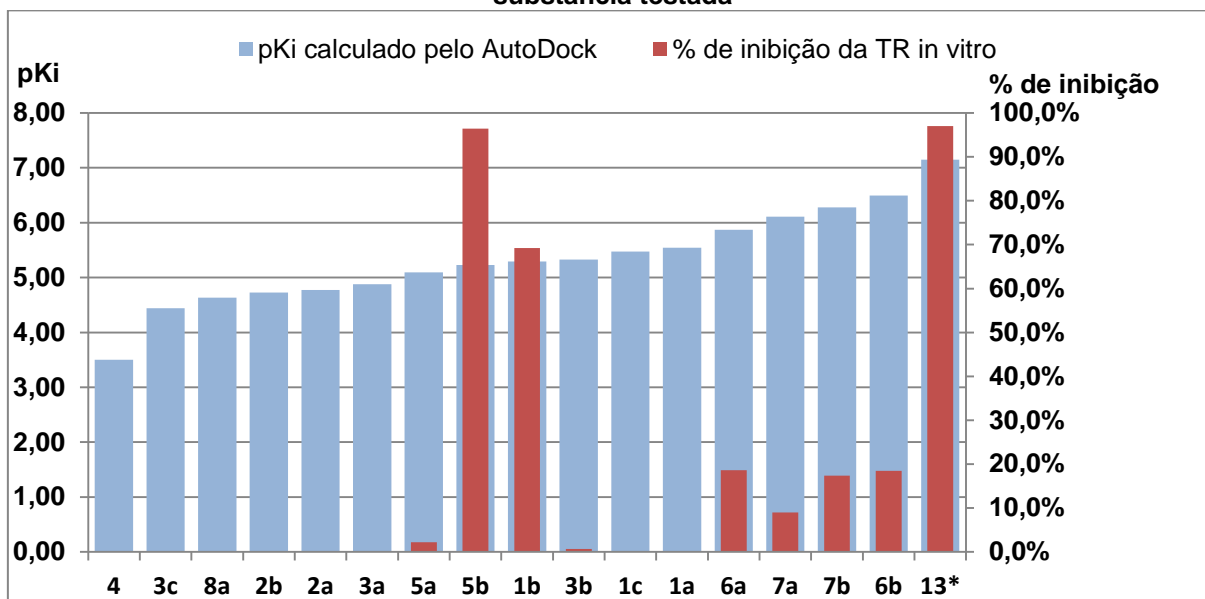
Tabela 19 – Comparação entre o ΔG e K_i calculados pelo AutoDock e os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos, na concentração de 100 μM .

Substância	ΔG (Kcal mol ⁻¹)	K_i (μM)	TR (% inibição)	GR (% inibição)
1a	-7,56	2,86	0	10,83
1b	-7,22	5,12	69,2	ND
1c	-7,47	3,35	0	8,3
2a	-6,51	16,83	0	29,88
2b	-6,45	18,68	0	13,85
3a	-6,66	13,16	0	7,36
3a*	-8,39	0,706		
3b	-7,27	4,68	0,7	10,0
3b*	-8,24	0,909		
3c	-6,06	36,3	0	8,36
4	-4,78	313,9	0	13,44
5a	-6,95	8,02	2,2	0
5b	-7,13	5,89	96,4	ND
6a	-8,01	1,35	18,6	29,24
6b	-8,86	0,320	18,5	12,55
7a	-8,33	0,780	9,0	11,64
7b	-8,57	0,525	17,4	1,35
8a	-6,32	23,34	0	9,73
8b	-6,93	8,36	ND	ND
13	-6,84	9,71	97,0	3,26
13*	-9,75	0,071		
16	-9,33	0,145	ND	ND
17	-11,41	0,004	ND	ND
tripanotiona	-13,19	$2,1 \times 10^{-4}$	0	ND

*analisados na forma protonada. ND: não determinado.

Observa-se que as substâncias que apresentaram K_i estimado na faixa de nanomolar alto (320 a 1350 nM) **6a**, **6b**, **7a**, e **7b**, inibiram discretamente a TR (9,0 a 18,6% de inibição da atividade enzimática). Esta tendência está melhor ilustrada no **Gráfico 1**, onde é possível observar que as substâncias com maior pK_i calculado (menor K_i) mostraram atividade inibitória, ainda que discreta, no ensaio *in vitro* com a TR.

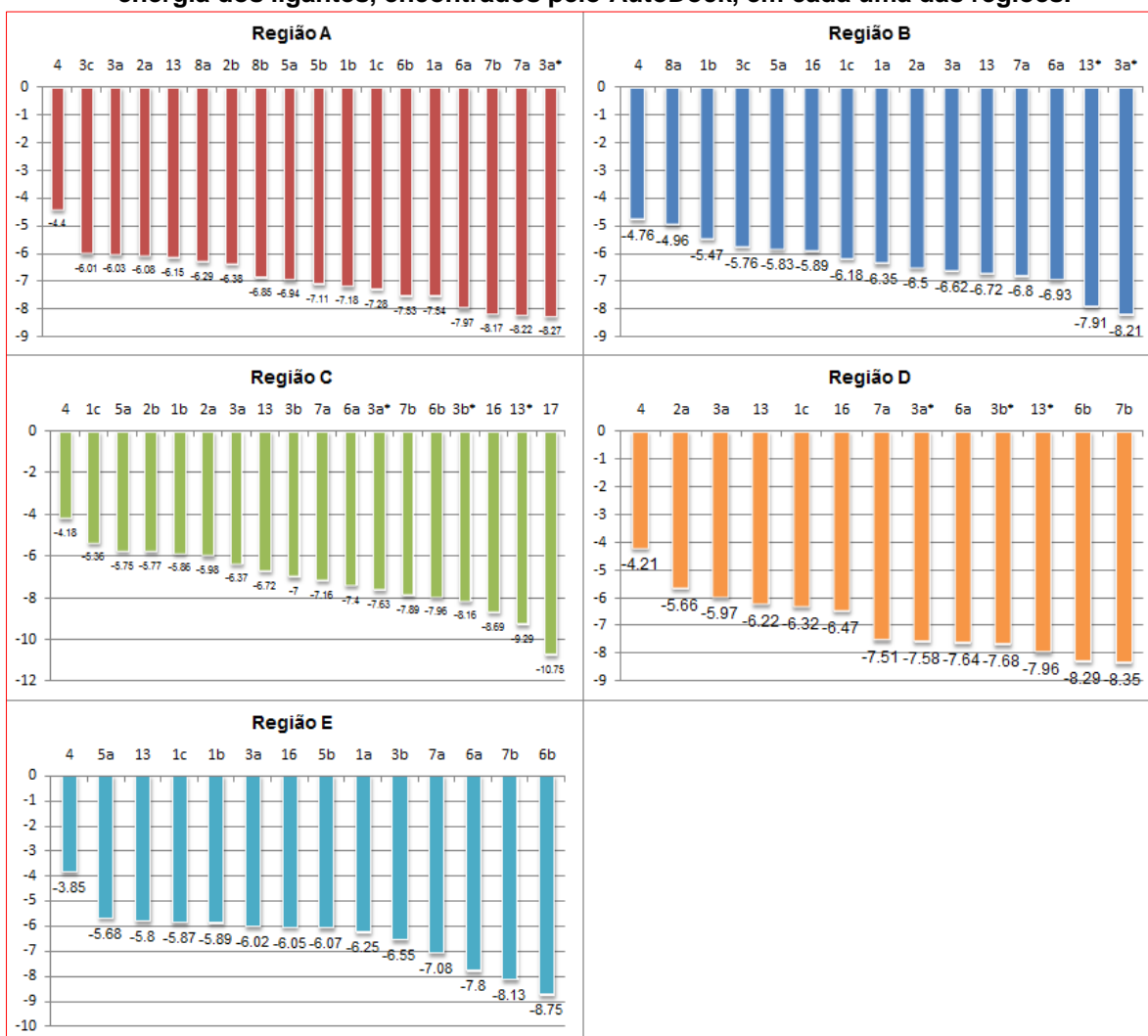
Gráfico 1 – pKi estimado pelo AutoDock e % de inibição da TR no ensaio *in vitro* para cada substância testada



*analisado na forma protonada

A análise dos valores de energia de ligação estimados pelo AutoDock para cada ligante, considerando-se cada região independentemente, evidencia uma maior afinidade pela enzima dos ligantes **6-7** e dos ligantes **3a, 3b e 13** analisados em sua forma protonada, em relação aos demais ligantes, o que reforça a premissa de que ligantes volumosos e/ou carregados positivamente teriam maior afinidade pelo sítio ativo da TR (**Figura 58**).

Figura 58 – Valores de energia de ligações (em Kcal/mol) das conformações de menor energia dos ligantes, encontrados pelo AutoDock, em cada uma das regiões.



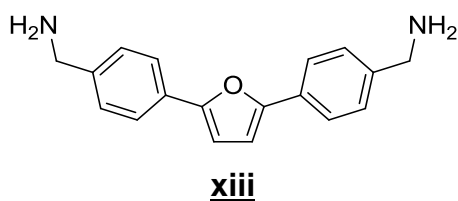
A substância **13** apresentou um dos menores valores de K_i , quando analisada na sua forma protonada (71 nM) e foi a substância com maior atividade inibitória no ensaio com a TR (97% de inibição – CI_{50} 40,4 μ M). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os ligantes com ciclohexanona ou ciclopentanona como anel central, exceto entre **3a** e **3b** e entre **6a** e **6b**.

A interação iônica é o tipo de interação intermolecular mais forte existente entre ligantes e as biomacromoléculas e, portanto, de grande peso na função *scoring* do AutoDock, quando analisada em conjunto com a energia de dessolvatação, motivo pelo qual as aminas protonadas apresentaram valores de energia livre de ligação relativamente baixos (**Tabela 19**).

Vale ressaltar, porém, que a amostra do diamino **13** enviada para o ensaio não estava totalmente pura, pois havia contaminação com óxido de trifetilfosfina. As substâncias **1b** e **5b**, apesar de terem inibido a atividade da TR (69,2%, Cl_{50} 68,3 μ M e 96,4%, Cl_{50} 15,3 μ M, respectivamente), não tiveram esse resultado reproduzido pelo AutoDock, apresentando valores de energia de ligação e conformações semelhantes às encontradas para seus análogos derivados da ciclopentanona, que não apresentaram atividade inibitória considerável.

A substância **13**, testada na forma de cloridrato, demonstrou ser seletiva para a TR, uma vez que teve baixa inibição no ensaio com a GR (3,26%). Essa seletividade pode ser explicada pela presença dos dois grupos aminos protonados na molécula, incompatíveis com o sítio carregado positivamente da GR. Outras substâncias mostraram-se pouco seletivas para a TR, pois inibiram a GR mais eficientemente. Acredita-se que o volume dessas moléculas não foi grande o suficiente para impedi-las de interagir com o sítio da GR. Uma análise da interação dessas substâncias com a GR se faz necessária para uma melhor compreensão.

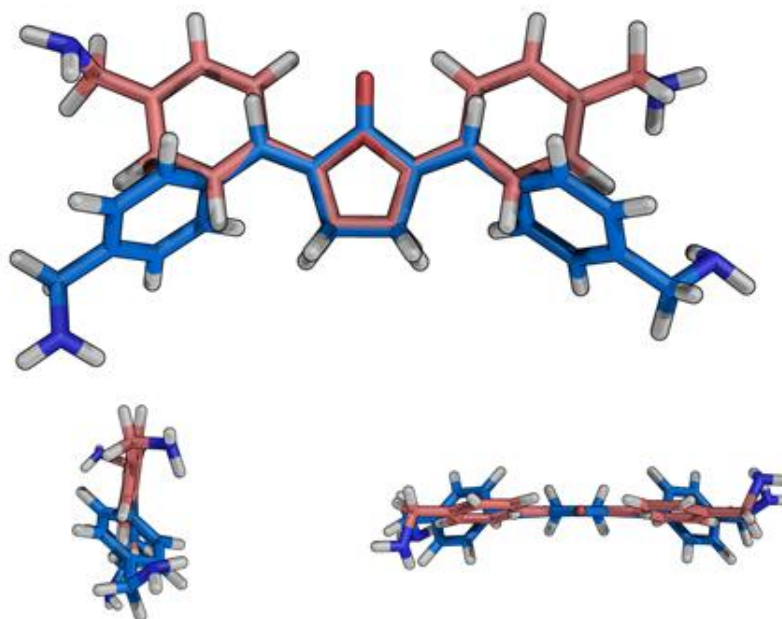
As demais aminas (**3a** e **3b**), apesar de terem o K_i estimado no *docking* na faixa de nanomolar, quando analisadas na forma protonada, não apresentaram atividade inibitória no ensaio com a enzima. Essas aminas são consideradas bases fracas, devido à ressonância do par de elétrons do nitrogênio com o anel aromático e, portanto encontram-se majoritariamente na forma neutra no pH do meio usado no ensaio (pH 7,5), perdendo interações importantes com a enzima. Este fato pode ser observado comparando-se as diferenças de energia de interação estimadas para as formas protonadas e não-protonadas.



No trabalho de Oliveira e colaboradores, o 2,5-bis-(4-aminometil-fenil)furano (**xiii**) inibiu 63,0% da atividade da TR em ensaio *in vitro* e no estudo de ancoragem molecular observou-se possíveis pontos de interação eletrostática com os resíduos

Glu19, Glu113 e Asp117 e uma interação do tipo π *stacking* do anel furano com o resíduo Trp22 (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Apesar dos valores de energia de ligação encontrados para **13** ($-9,75 \text{ kcal mol}^{-1}$) e **xiii** ($-9,07 \text{ kcal mol}^{-1}$) serem próximos, as conformações de menor energia dessas duas substâncias interagem em locais distintos no sítio da tripanotona, o que pode ser explicado pela diferença na posição dos grupos de interação nas duas moléculas (**Figura 59**). No entanto, percebe-se a importância do grupo amino protonado na interação com a TR, pois, além de aumentar a afinidade do ligante com a TR, conforme demonstrado nos cálculos de *docking*, reflete em uma baixa afinidade do ligante pelo sítio carregado positivamente da GR, aumentando assim a seletividade.

Figura 59 – Superposição entre o **xiii** e **13**. O derivado furânico **xiii** é mostrado em rosa e **13** em azul.



7 CONCLUSÃO

As 2,5-bisarilmetilideno-cicloalcanonas **1-8**, **16** e **17** foram sintetizadas com bons rendimentos, empregando técnicas bem estabelecidas na literatura, utilizando materiais de partida de fácil acesso. A 2,5-bisarilmetilideno-ciclopentanona **13**, no entanto, apesar dos esforços, não foi isolada pura, e sua identificação foi baseada em evidências espectroscópicas.

Esses compostos foram testados a 100 µM em ensaio de inibição enzimática com a TR e GR. No ensaio com a TR de *T. cruzi*, os compostos **1b**, **5b** e **13** se mostram ativos (inibição > 50%), destacando-se **5b** (CI₅₀ 15,3 µM).

Apenas o composto **12** apresentou inibição significativa da GR (54,12%). Os ensaios com as substâncias **1b** e **5b** estão em andamento, assim como os ensaios com a TR e GR com as substâncias **8b**, **16** e **17**.

No ensaio com cepas de *T. cruzi*, entre os compostos testados, cinco mostraram-se ativos, destacando-se os compostos **6a**, **7a** e **7b** (CI₅₀ de 6,15 µM, 15,62 µM e 6,25 µM, respectivamente), porém os compostos **6a** e **7b** exibiram toxicidade. Como esses compostos inibiram a TR apenas discretamente, é provável que o mecanismo da ação tripanocida se deva a outro mecanismo.

Seis compostos foram ativos contra *Leishmania amazonensis*, sendo o melhor deles, **6b**, com uma CI₅₀ de 5,81 µM. Dentre os compostos ativos, o composto **13** mostrou-se o mais seletivo, por apresentar menor toxicidade. Acredita-se que a atividade leishmanicida de **1b**, **5b** e **13** possa estar relacionada com a inibição da TR.

O composto **13** manteve atividade leishmanicida verificada para seu análogo furano e ainda foi um inibidor mais potente da TR, o que demonstra que a substituição do anel furano por uma ciclopentanona é uma estratégia viável para a obtenção de compostos ativos de fácil obtenção, aumentando as possibilidades de modificações estruturais, a fim de melhorar o perfil dessa classe de inibidores da TR.

Os estudos de ancoragem molecular mostraram, ainda, resultados que estão de acordo com os encontrados nos ensaios enzimáticos, o que demonstra a utilidade do uso do *docking* como uma ferramenta no desenvolvimento de fármacos. O composto **13** apresentou um dos menores valores de K_i , (71 nM), superior apenas aos triazóis, e foi a substância com maior atividade inibitória no ensaio com a TR (97% de inibição – CI_{50} 40,4 μ M).

O sítio ativo da TR possui inúmeros resíduos que podem ser explorados como possíveis pontos de interação com os inibidores. Ligantes com grupos volumosos hidrofóbicos, como os anéis quinolínicos e isoquinolínicos de **6** e **7** e grupos carregados positivamente, como a amina secundária de **13** parecem representar substituintes adequados para serem utilizados no planejamento de novos inibidores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAE, M. S. *et al.* A Green, Inexpensive and Efficient Organocatalyzed Procedure for Aqueous Aldol Condensations. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, p. 1895-1900, 2009.

ASHWORTH, I. W.; COX, B. G.; MEYRICK, B. Kinetics and Mechanism of N-Boc Cleavage: Evidence of a Second-Order Dependence upon Acid Concentration. **J. Org. Chem.**, v. 75, p. 8117-8125, 2010.

BARBE, J.-M. *et al.* Synthesis and Physicochemical Characterization of meso-Functionalized Corroles: Precursors of Organic-Inorganic Hybrid Materials. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 21, p. 4601-4611, 2005.

BARRAL-NETO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis: recent advances in physiopathology and treatment. **Eur. J. Dermatol.**, v. 5, p. 104-113, 1995.

BIGDELI, M. A. *et al.* Wet 2,4,6-trichloro[1,3,5]triazine (TCT) an efficient catalyst for synthesis of α,α' -bis(substituted-benzylidene) cycloalkanones under solvent-free conditions. **Catal. Commun.**, v. 8, p. 2229-2231, 2007.

BILLIMORIA, J. D. Simple Analogues of Cortisone. Part IV. Some Benzyl-substituted Glycolcyclohexanols. **J. Chem. Soc.**, p. 1126-1129, 1955.

BOND, C. S. *et al.* Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, p. 81-89, jan. 1999.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCKNER, F. S. *et al.* Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. **Antim. Agents Chemother.**, v. 40, p. 2592-2597, 1996.

BURSULAYA, B. D. *et al.* Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 17 (11), p. 755-763, nov. 2003.

CAI, X. H.; XIE, B.; GUO, H. Synthesis of α,α' -Bis(R-benzylidene)cycloalkanones Catalyzed by Potassium Hydrogen Sulfate under Solvent-Free Conditions. **Chem. Pap.**, v. 60 318-320(4), 2006.

CAPRILES, P. V. S. Z. *et al.* Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for Chagas' disease treatment. **BMC Genomics**, v. 11, p. 610, out. 2010.

CENAS, N. *et al.* Chinifir, a Selective Inhibitor and Subversive Substrate for *Trypanosoma congolense* Trypanothione Reductase. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 204 (1), p. 224-229, 1994.

CHIBALE, K. *et al.* Antiprotozoal and Cytotoxicity Evaluation of Sulfonamide and Urea Analogues of Quinacrine. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 2655-2657, 2001.

CLAYDEN, J. *et al.* **Organic Chemistry**. New York: Oxford University Press, 2001.

COSTA, P. *et al.* **Substâncias carboniladas e derivados**. Porto Alegre: Bookman, 2003.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 502-508, 2003.

DAS, B. *et al.* Convenient and facile cross-Aldol condensation catalyzed by molecular iodine: An efficient synthesis of α,α' -bis(substituted-benzylidene)cycloalkanones. **J. Mol. Catal. A-Chem.**, v. 247(1-2), p. 182-185, jan. 2006.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microb.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DUMAS, C. *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO J.**, v. 16 (10), p. 2590-2598, 1997.

ERICKSON, J. A. *et al.* Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 45-55, 2004.

ESMAEILI, A. A. *et al.* Solvent-Free Crossed Aldol Condensation of Cyclic Ketones with Aromatic Aldehydes Assisted by Microwave Irradiation. **Monatsh. Chem.**, v. 136, p. 571-576, jan. 2005.

FREITAS, L. B. D. O. *et al.* A Reação “click” na Síntese de 1,2,3-Triazóis: Aspectos Químicos e Aplicações. **Quim. Nova**, v. 34, p. 1791-1804, 2011.

FREITAS, R. P. D. *et al.* Synthesis of fullerene building blocks bearing alkyne or azide groups and their subsequent functionalization by the copper mediated Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition. **Tetrahedron**, v. 64, p. 11409-11419, 2008.

FRIES, D. S.; FAIRLAMB, A. H. Antiprotozoal Agents. In: ABRAHAM, D. J. **Burguer's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. 6th. edition. Richmond: John Wiley and Sons, v. V, 2003. p. 1033-1087.

FROIMOWITZ, M. HyperChem: a software package for computational chemistry and molecular modeling. **Biotechniques**, v. 14 (6), p. 1010-1013, 1993.

GAI, W. *et al.* Screening of HMG-CoA Reductase Inhibitors from Composite Salvia Miltiorrhiza Using Autodock. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8 (1), p. 51-56, 2010.

GALARRETA, B. C. *et al.* The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 6689-6695, 2008.

GANE, P. J.; DEAN, P. M. Recent advances in structure-based rational drug design. **Curr. Opin. Struc. Bio.**, v. 10 (4), p. 401-404, 2000.

GIRAULT, S. *et al.* Potent and Specific Inhibitors of Trypanothione Reductase From *Trypanosoma cruzi*: Bis(2-aminodiphenylsulfides) for Fluorescent Labeling Studies. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 9, p. 837-846, 2001.

GONÇALVES, R. B. **Desenvolvimento e Validação de Novos Métodos de Distribuição da População Inicial em Algoritmos Genéticos para o Problema de Docking Proteína-Ligante**. 2008. 130p. Dissertação de Mestrado. LNCC, Petrópolis, 2008.

GREVELINK, S. A.; LERNER, E. A. Leishmaniasis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 34, p. 257-272, 1996.

HAMILTON, C. J. *et al.* Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **Biochem. J.**, v. 369, p. 529-537, 2003.

HART, W. E. **Adaptive Global Optimization with Local Search**. 1994. 135 p. Tese de Doutorado. University of San Diego. San Diego, 1994.

HATHAWAY, B. A. An Aldol Condensation Experiment Using a Number of Aldehydes and Ketones. **J Chem Educ**, v. 64, p. 367-368, abr. 1987.

HUEY, R. *et al.* A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. **J. Comput. Chem.**, v. 28, p. 1145-1152, 2007.

ILAS, J.; KIKELJ, D. Ring Opening of 2-(Benzylamino)-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ones and 2-Bromo-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ones. **Helv. Chim. Acta**, v. 91, p. 654-664, 2008.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. *et al.* The Antioxidant Enzymes Glutathione Reductase and Trypanothione Reductase as Drug Targets. In: COOMBS, G.; NORTH, M. **Biochemical Protozoology**. Londres: Taylor & Francis, 1991. p. 493-506.

KRIEGER, S. *et al.* Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Mol. Microbiol.**, v. 35 (3), p. 542-552, 2000.

KÜRTI, L.; CZAKÓ, B. **Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.

LIDSTRÖM, P. *et al.* Microwave assisted organic synthesis - a review. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9225-9283, 2001.

MAGALHÃES, C. S. D.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27(4), p. 605-610, 2004.

MAGALHÃES, C. S. D.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. Métodos de Docking Receptor-Ligante para o Desenho Racional de Compostos Bioativos. In: MORGON, N. H.; KALINE, C. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007. p. 489-527.

MANETTI, F. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Guanidino Compounds Endowed with Subnanomolar Affinity as Competitive Inhibitors of Maize Polyamine Oxidase. **J. Med. Chem.**, v. 52, p. 4774-4785, 2009.

MORRIS, G. M. *et al.* Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. **J. Comput. Chem.**, v. 19 (14), p. 1639-1662, 1998.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* In Vitro Evaluation of the Activity of Aromatic Nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98 (1), p. 141-144, 2003.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101(2), p. 169-173, mar. 2006.

OLIVEIRA, R. B. *et al.* Síntese, Avaliação Biológica e Modelagem Molecular de Arilfuranos Como Inibidores da Enzima Tripanotiona Redutase. **Quim. Nova**, v. 31 (2), p. 261-267, 2008.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdrnews/tdr-news-issue-84>> Acesso em 22 de fevereiro de 2010.

PATTERSON, S. *et al.* Dihydroquinazolines as a Novel Class of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Reductase Inhibitors: Discovery, Synthesis, and Characterization of their Binding Mode by Protein Crystallography. **J. Med. Chem.**, v. 54, p. 6514-6530, 2011.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4th edition. New York: Oxford University Press, 2009.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 3rd edition. Toronto: Nelson Thomson Learning, 2001.

ROMERO, G. A. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 456-465, 2001.

ROUTIER, S. *et al.* A mild and selective method for N-Boc deprotection. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 589-591, 2002.

SALEHI, P. *et al.* Silica Sulfuric Acid as an Efficient and Reusable Reagent for Crossed-Aldol Condensation of Ketones with Aromatic Aldehydes under Solvent-Free Conditions. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, p. 773-776, 2004.

SALMON-CHEMIN, L. *et al.* 2- and 3-Substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives as Subversive Substrates of Trypanothione Reductase and Lipoamide Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Synthesis and Correlation between Redox Cycling Activities and in Vitro Cytotoxicity. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 548-565, 2001.

SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, L. R. Enzymes of the Trypanothione Metabolism as Targets for Antitrypanosomal Drug Development. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, p. 1239-1259, 2002.

SCHWEINITZ, A. *et al.* Design of Novel and Selective Inhibitors of Urokinase-type Plasminogen Activator with Improved Pharmacokinetic Properties for Use as Antimetastatic Agents. **J. Biol. Chem.**, v. 279 (32), p. 33613-33622, ago. 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th edition. Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry**. 6th edition. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.

TANAKA, K.-I.; TOSHIFUJI, S.; NITTA, Y. A New Method for the Synthesis of Amides from Amines: Ruthenium Tetroxide Oxidation of N-Protected Alkylamines. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 36 (8), p. 3125-3129, 1988.

TERAMOTO, R.; FUKUNISHI, H. Supervised Consensus Scoring for Docking and Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 526-534, 2007.

TOVAR, J. *et al.* Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 5311-5316, abr. 1998.

URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 (Suppl. I), p. 349-355, 1999.

VAREDIAN, M. *et al.* An unexpected triethylsilane-triggered rearrangement of thioaurones to thioflavonols under SPPS conditions. **Tetrahedron Lett.**, v. 49, p. 6033-6035, 2008.

VATSADZE, S. Z. *et al.* Synthesis and spectroscopic and structural studies of cross-conjugated dienones derived from cyclic ketones and aromatic aldehydes. **Russ.Chem.Bull.**, v. 55 (7), p. 1184-1194, jul. 2006.

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative Evaluation of 11 Scoring Functions for Molecular Docking. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 2287-2303, 2003.

WEN, L.; LI, M.; SCHLENOFF, J. B. Polyporphyrin Thin Films from the Interfacial Polymerization of Mercaptoporphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 119, p. 7726-7733, 1997.

WORTMANN, G. *et al.* A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10 or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clin. Infect. Dis.**, v. 35, p. 261-267, 2002.

ZIARANI, G. M. *et al.* Cross-aldol Condensation of Cycloalkanones and Aromatic Aldehydes in the Presence of Nanoporous Silica-based Sulfonic Acid (SiO₂-Pr-SO₃H) under Solvent Free Conditions. **Chin. J. Chem.**, v. 27 (8), p. 1537-1542, 2009.

APÊNDICE A – Espectros na região do infravermelho e de RMN de ^1H e de ^{13}C

Figura A.1 - Espectro no infravermelho de 1a.

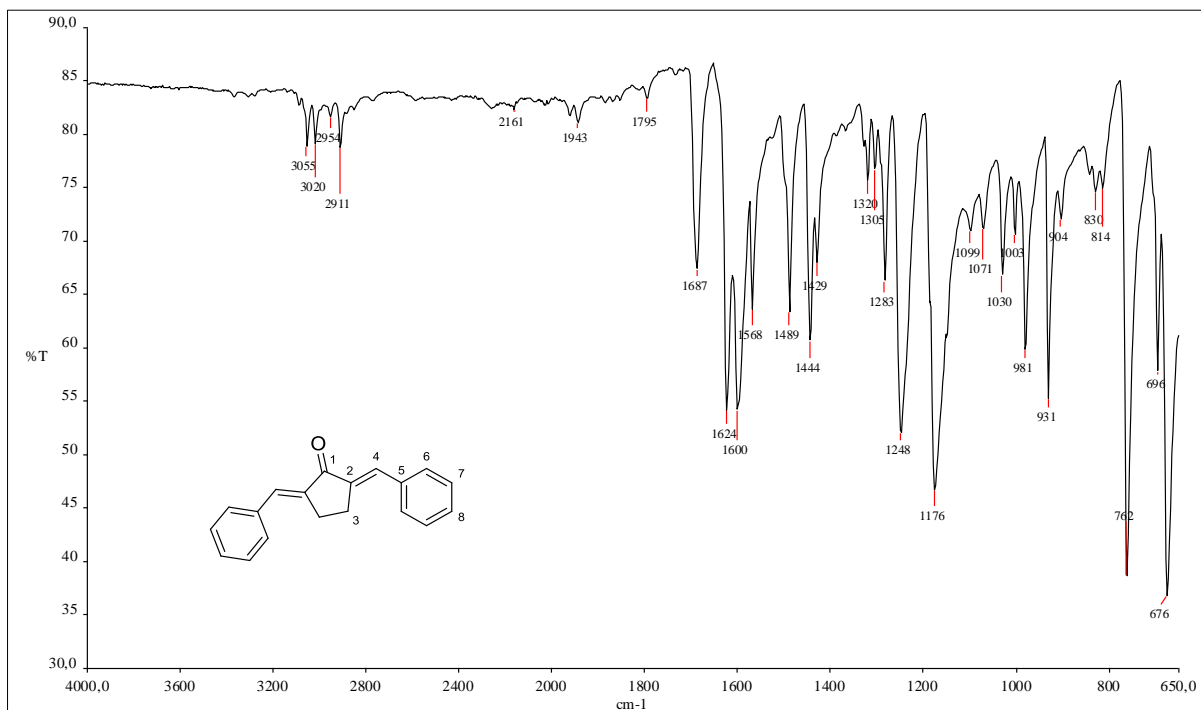


Figura A.2 - Espectro de RMN de ^1H de 1a (200 MHz, CDCl_3).

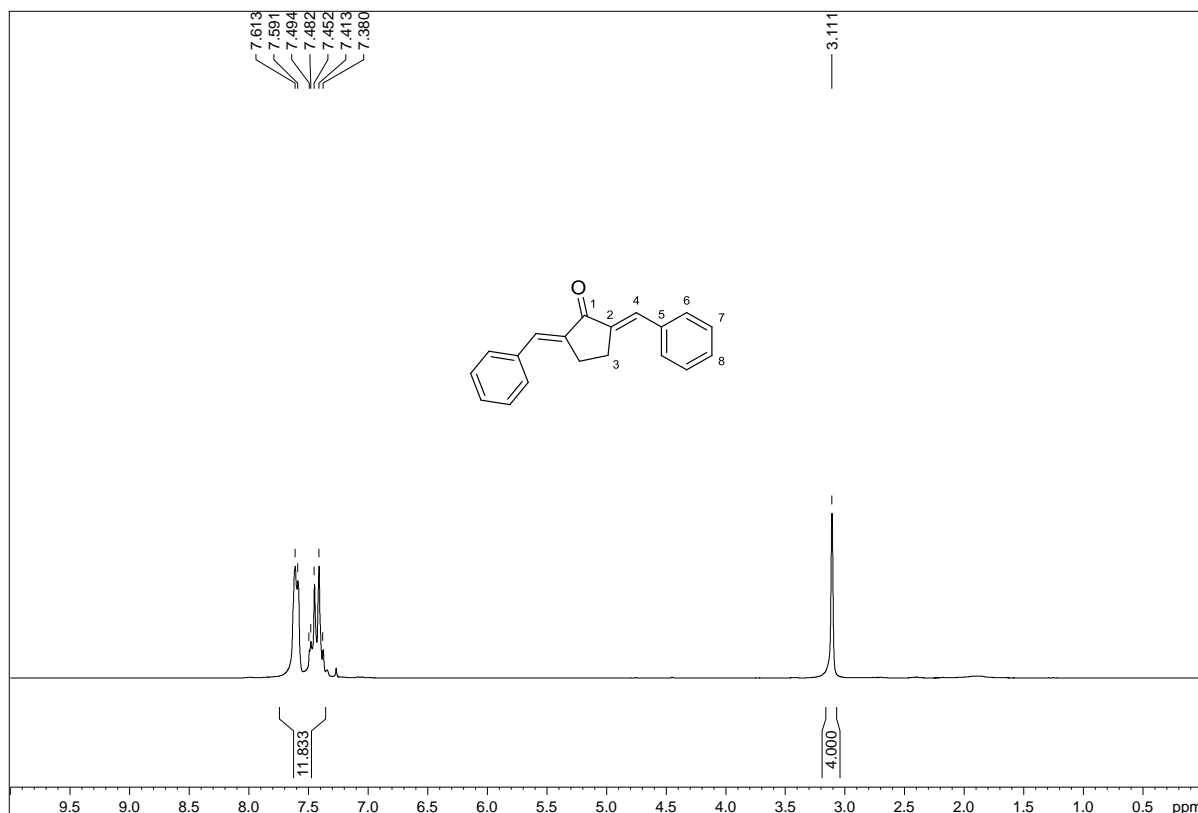


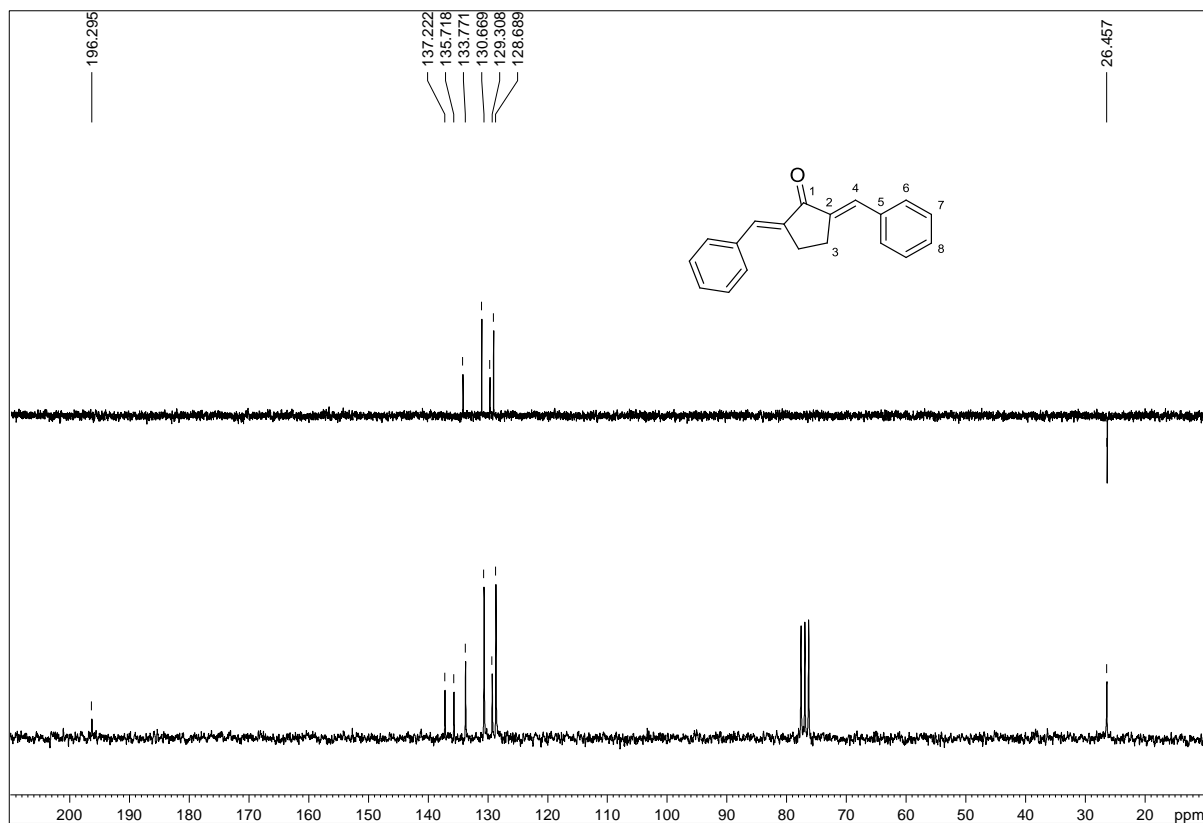
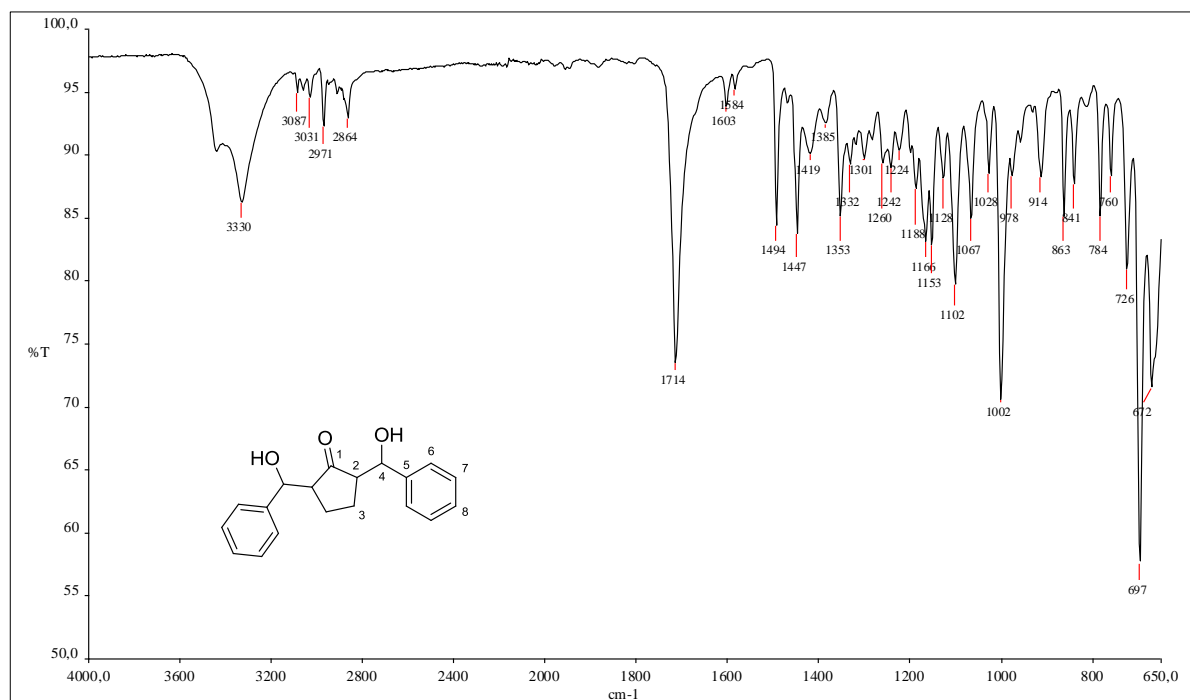
Figura A.3 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1a (50 MHz, CDCl_3).**Figura A.4 - Espectro no infravermelho de 1c.**

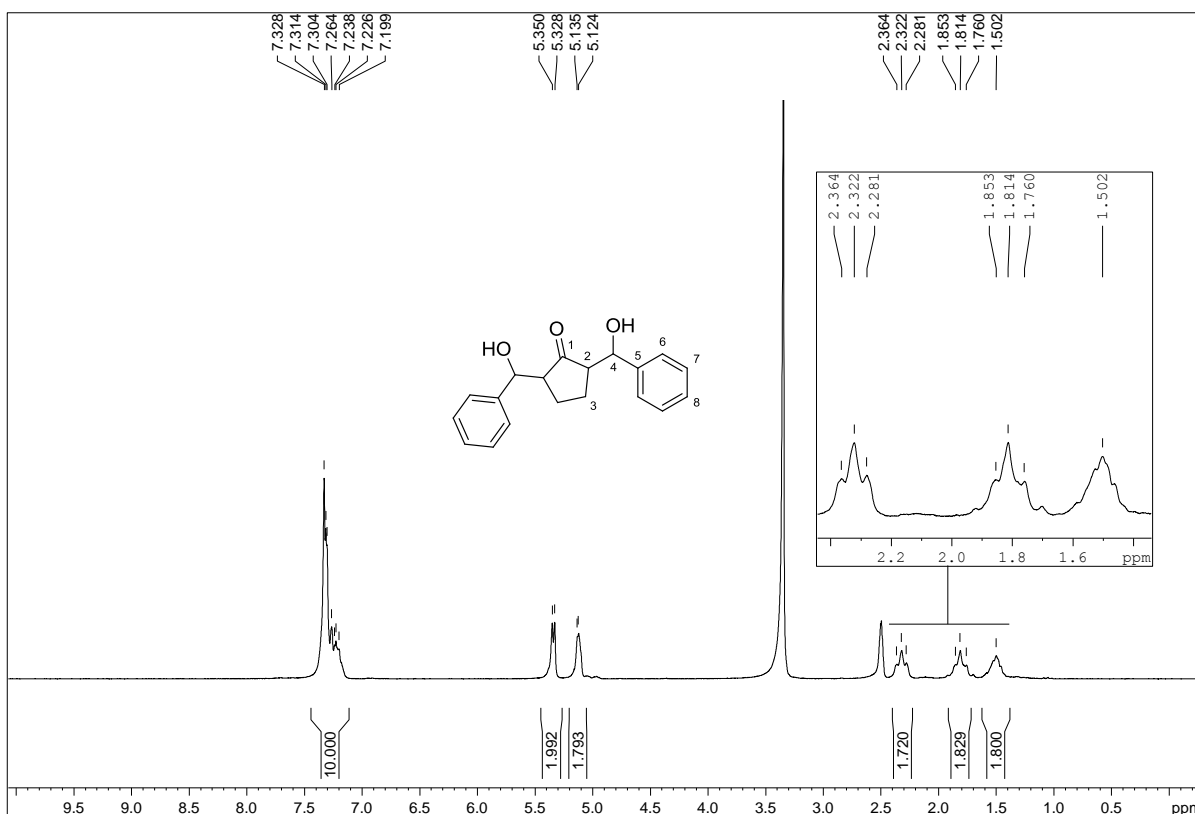
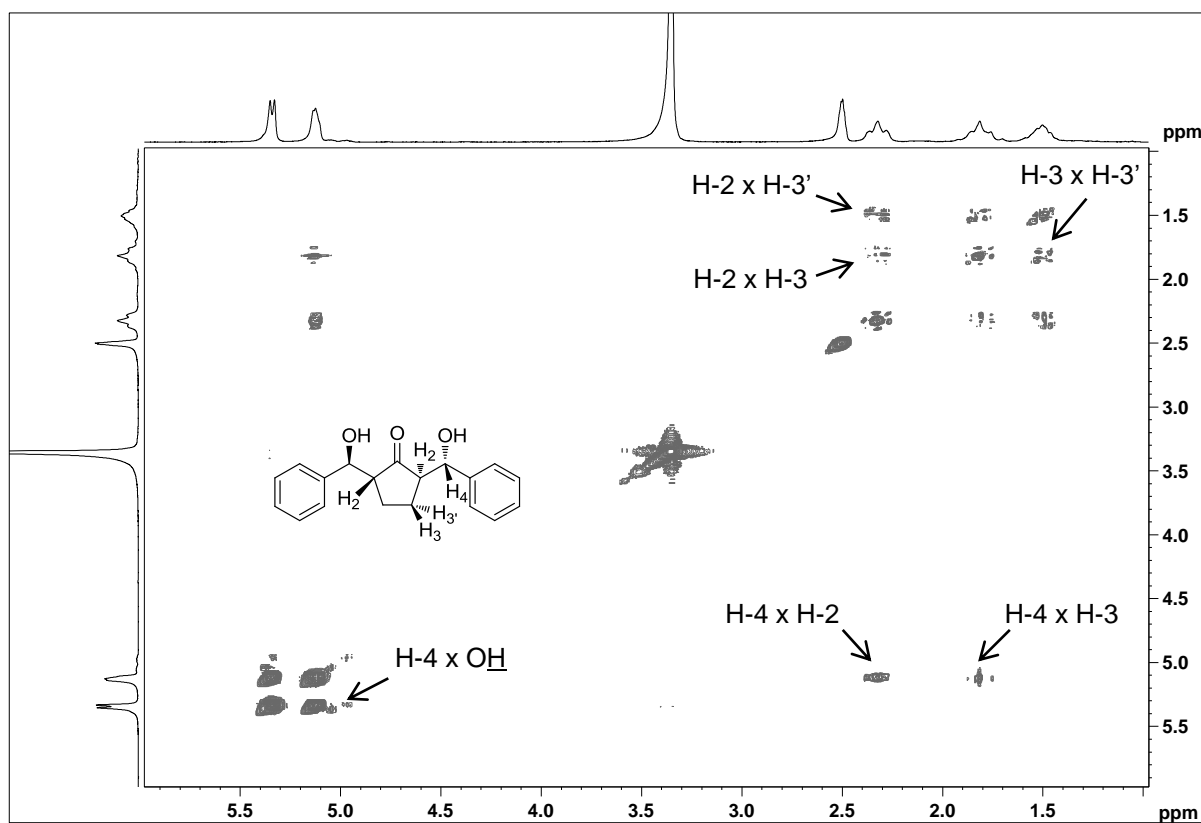
Figura A.5 - Espectro de RMN de ^1H de 1c (200 MHz, DMSO-d_6)Figura A.6 – Mapa de contornos COSY de 1c (200 MHz, DMSO-d_6)

Figura A.7 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1c (50 MHz, DMSO-d_6).

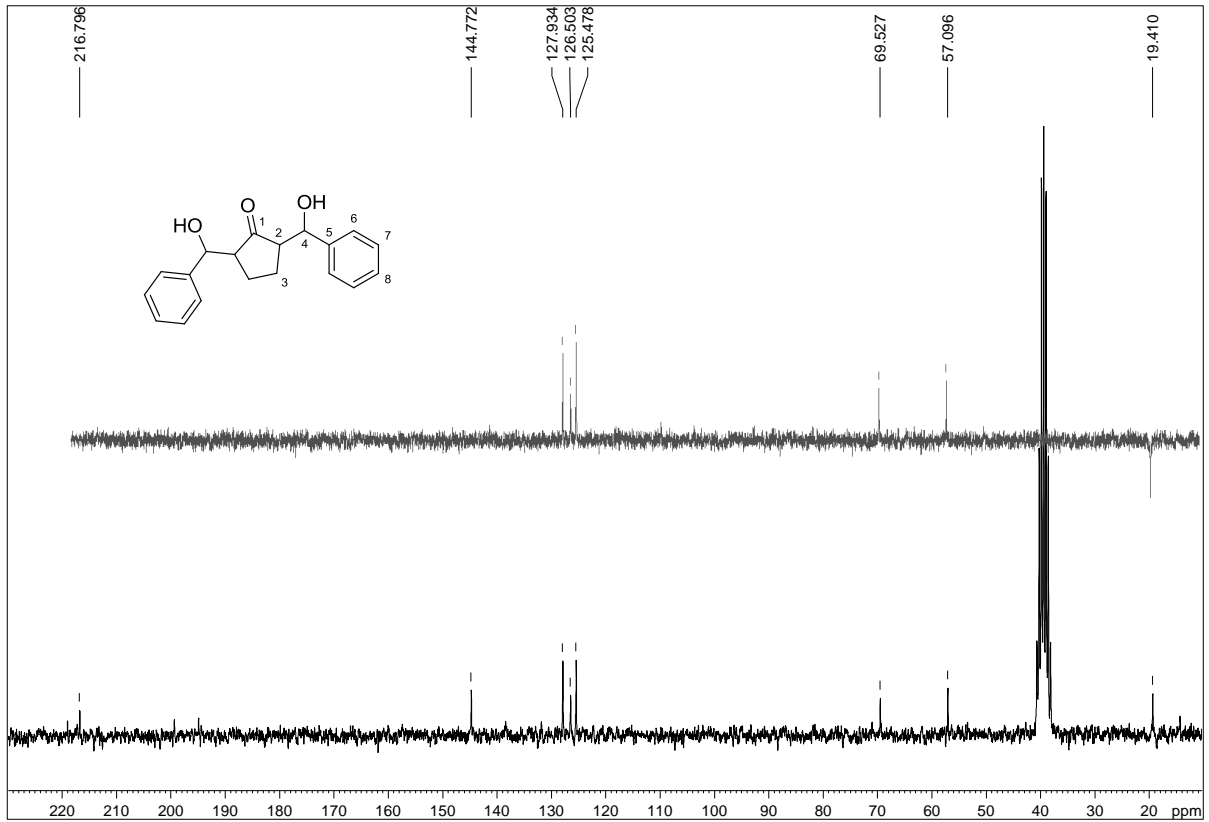


Figura A.8 - Espectro no infravermelho de 1b.

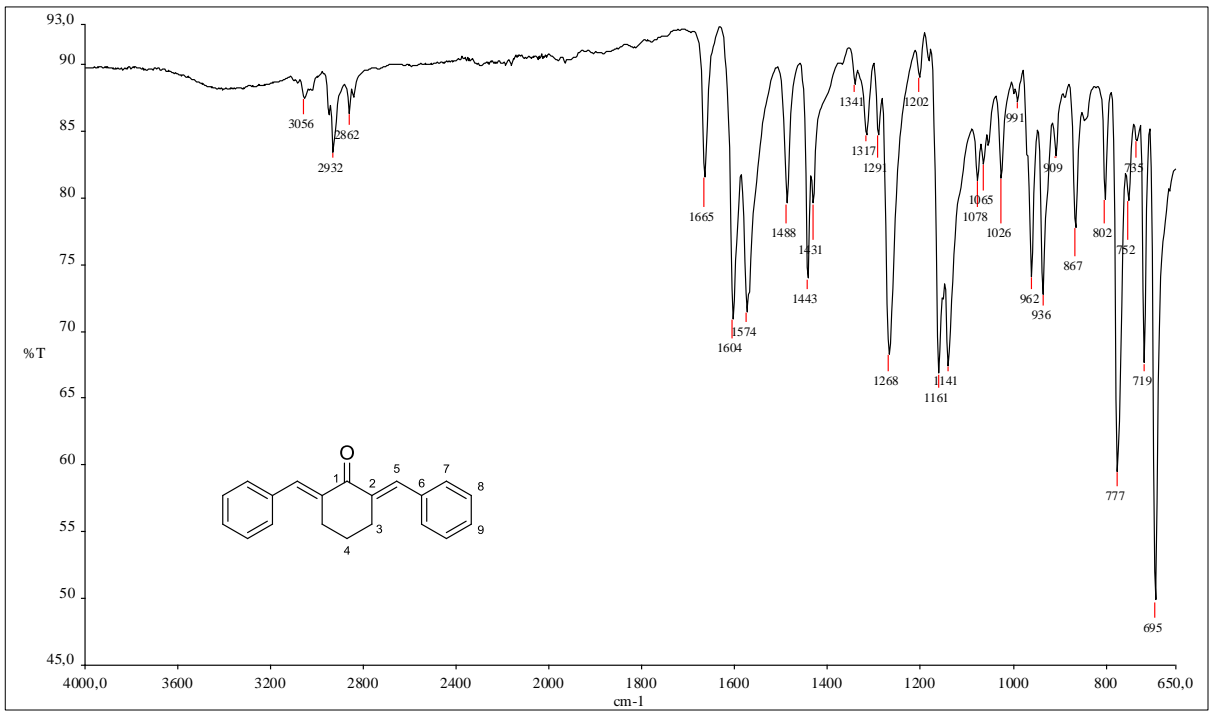


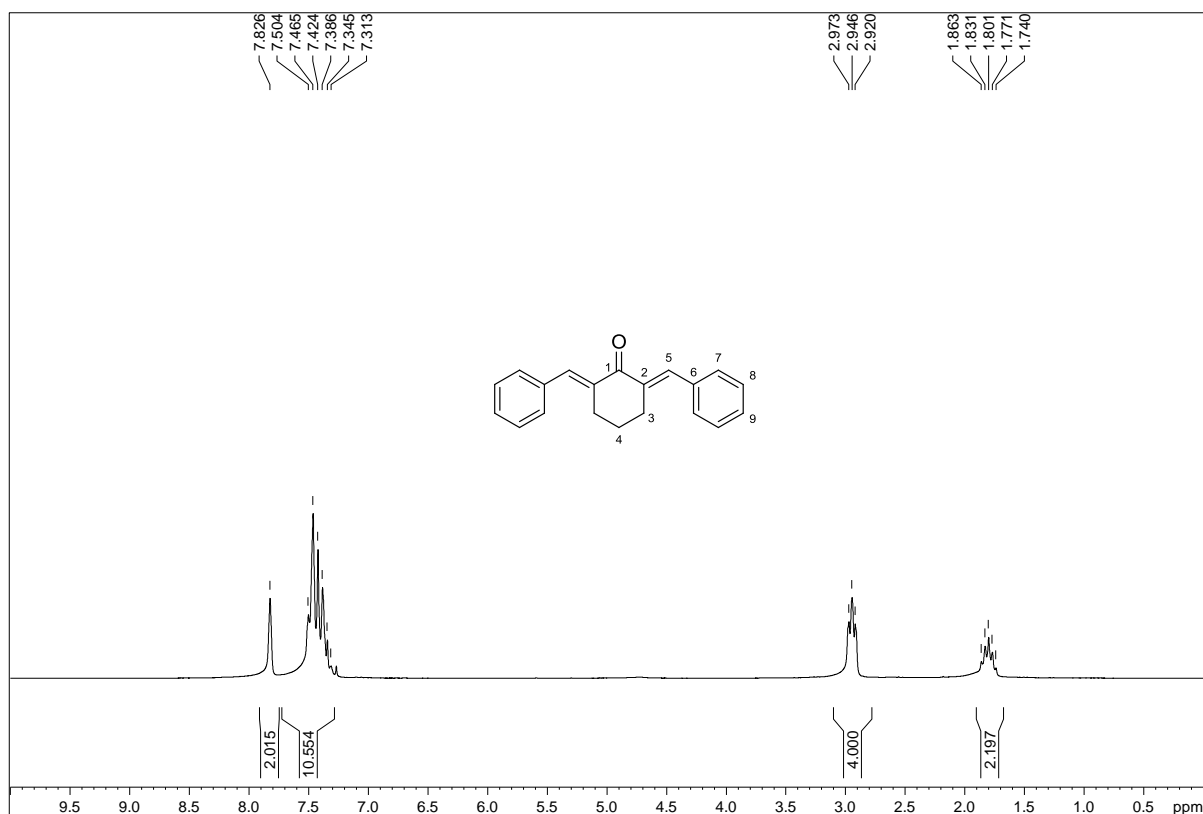
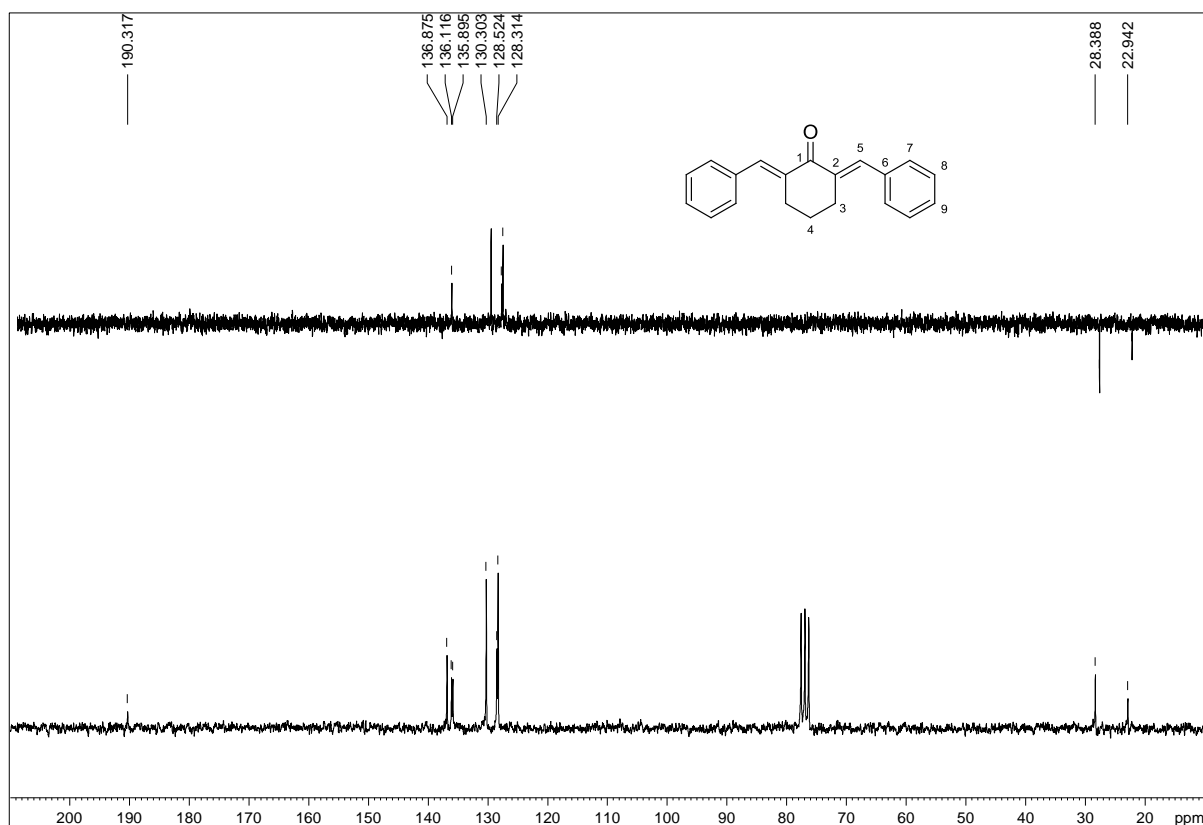
Figura A.9 - Espectro de RMN de ^1H de 1b (200 MHz, CDCl_3)Figura A.10 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 1b (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.11 - Espectro no infravermelho de 2a.

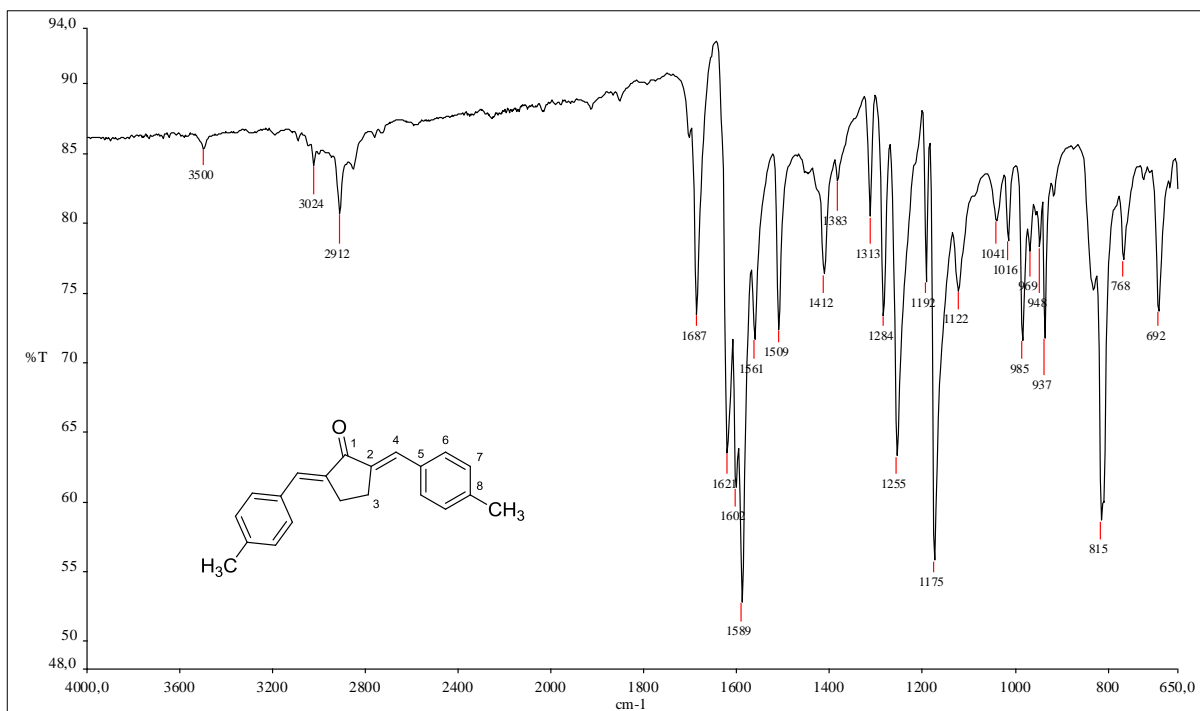
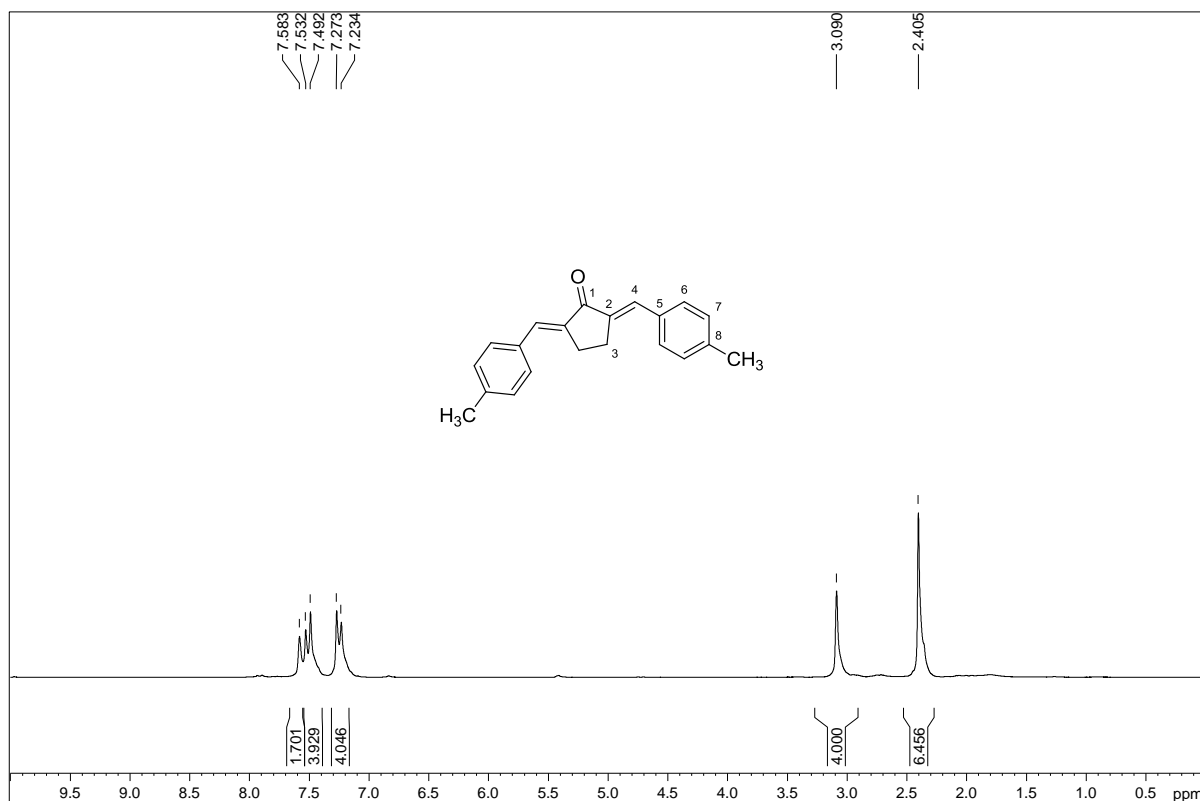
Figura A.12 - Espectro de RMN de ^1H de 2a (200 MHz, CDCl_3).

Figura A.13 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2a (50 MHz, CDCl_3).

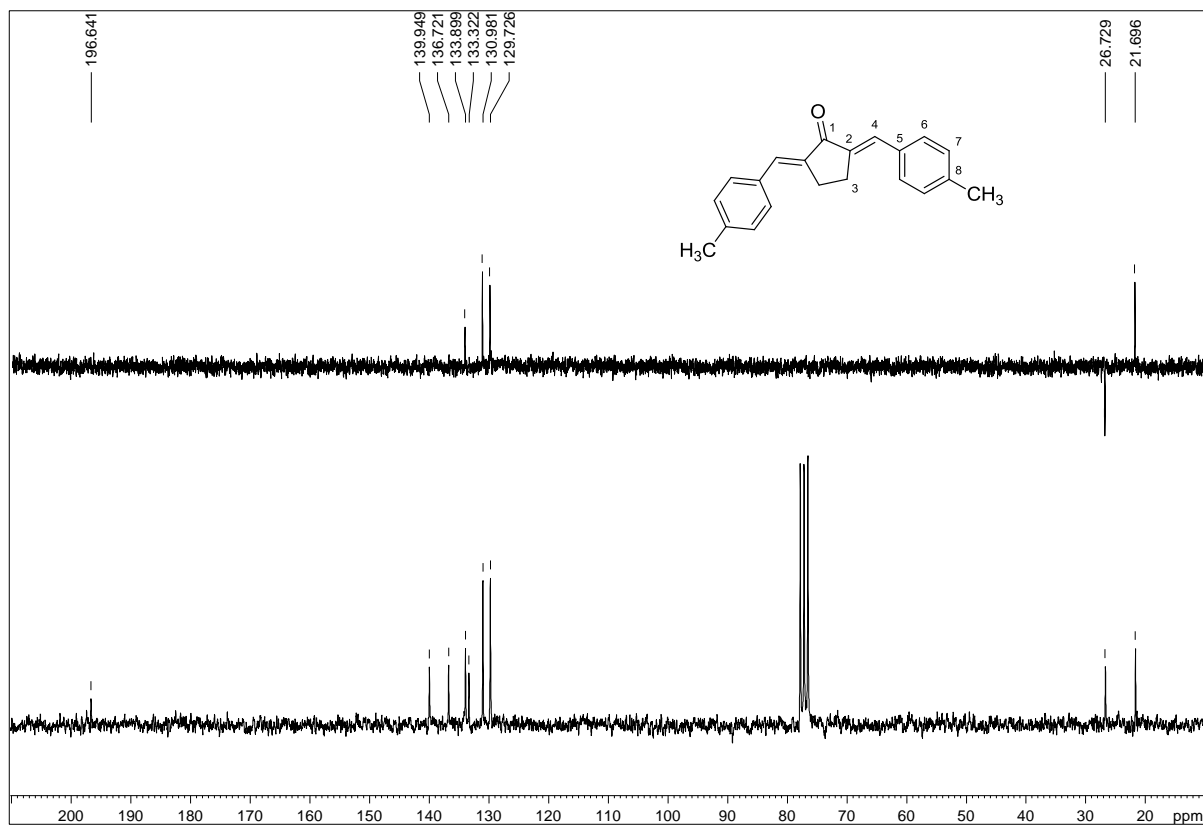


Figura A.14 - Espectro no infravermelho de 2b.

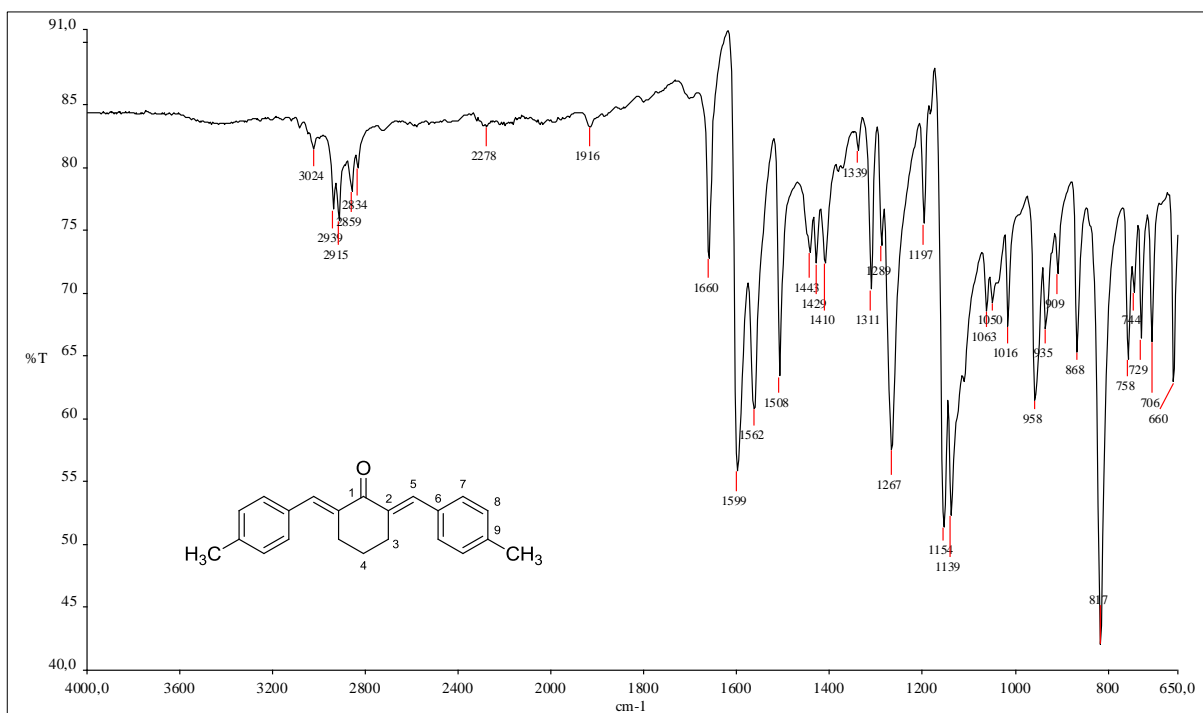


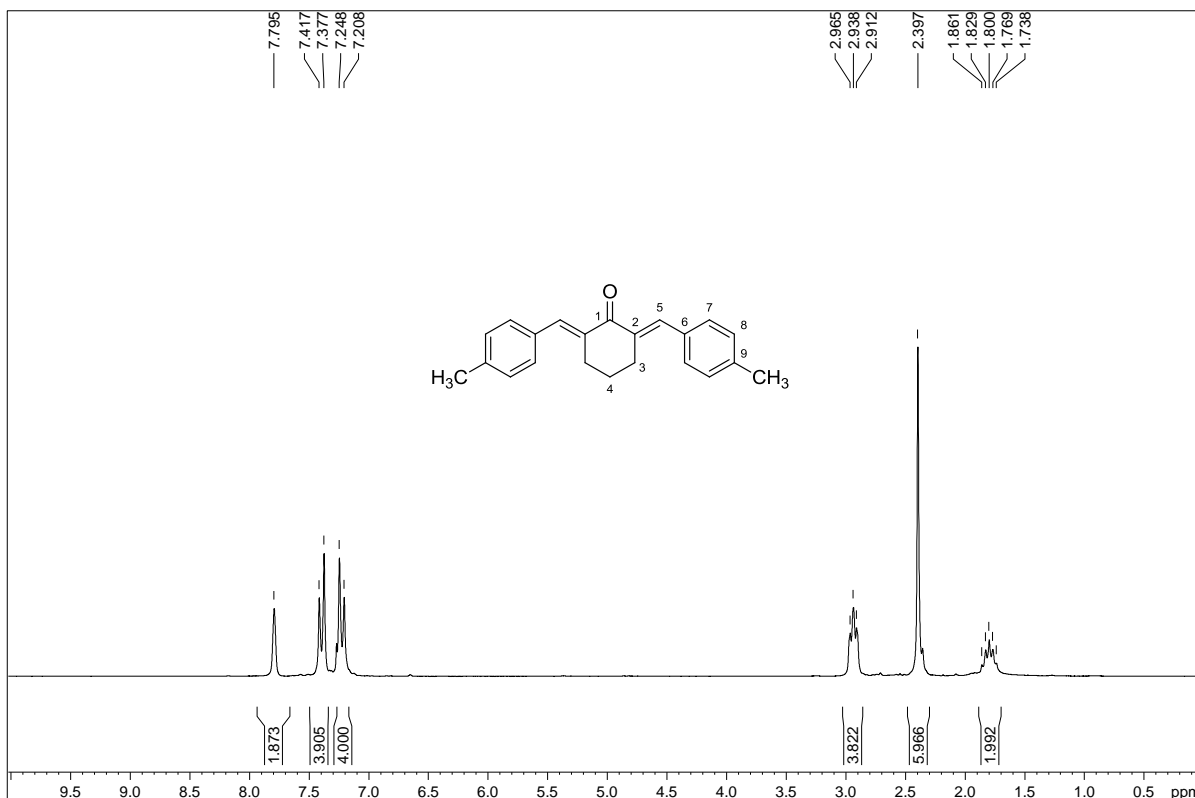
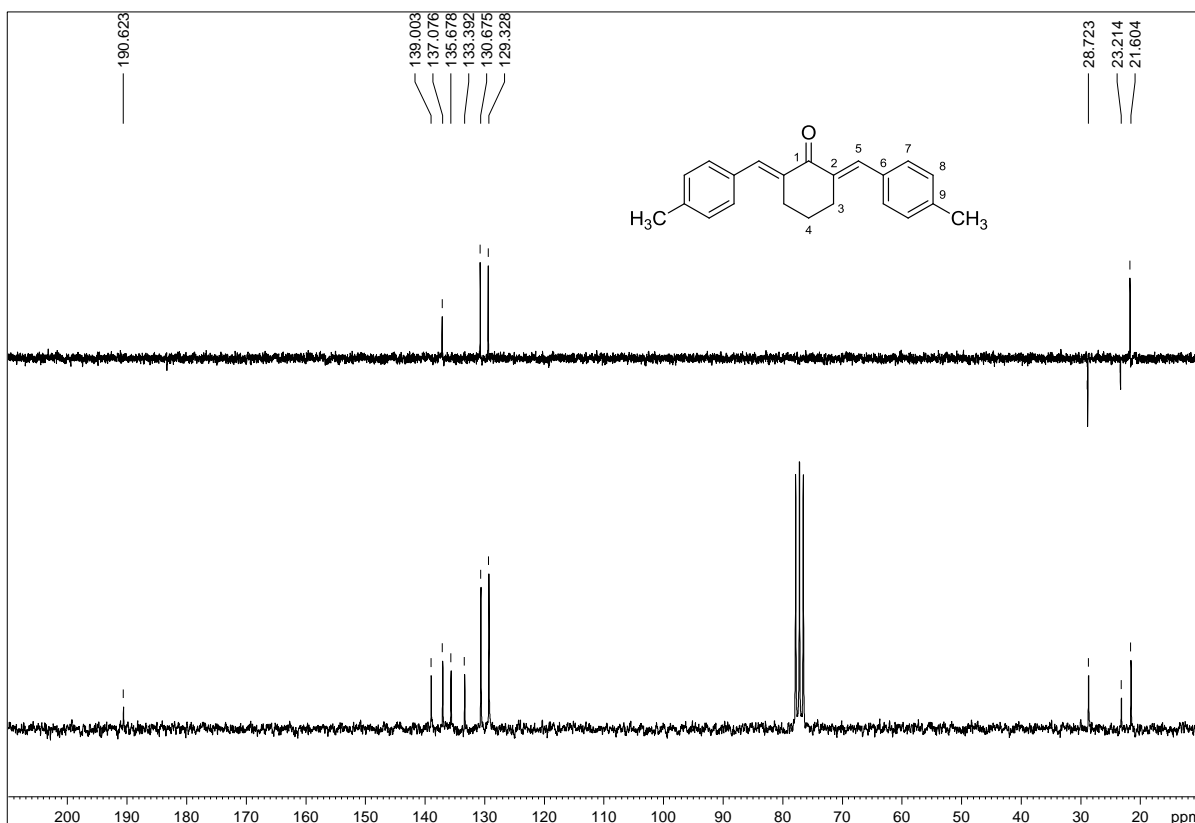
Figura A.15 - Espectro de RMN de ^1H de 2b (200 MHz, CDCl_3).Figura A.16 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 2b (50 MHz, CDCl_3)

Figura A.17 - Espectro no infravermelho de 3a.

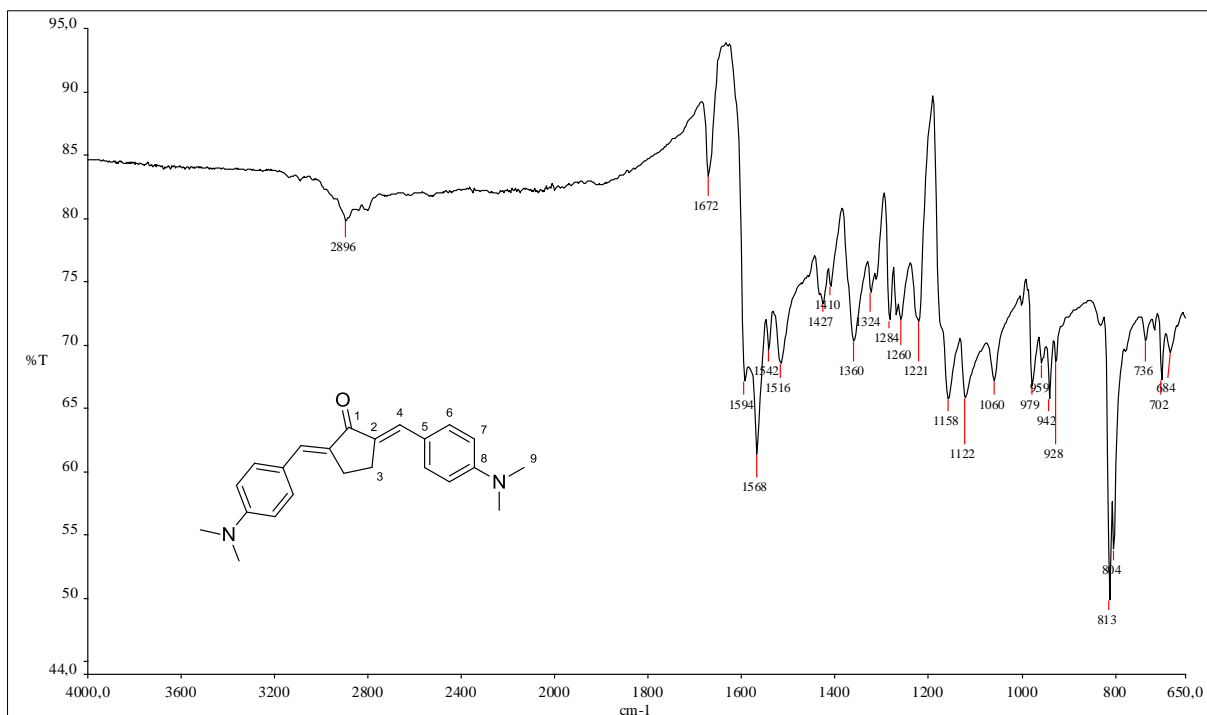
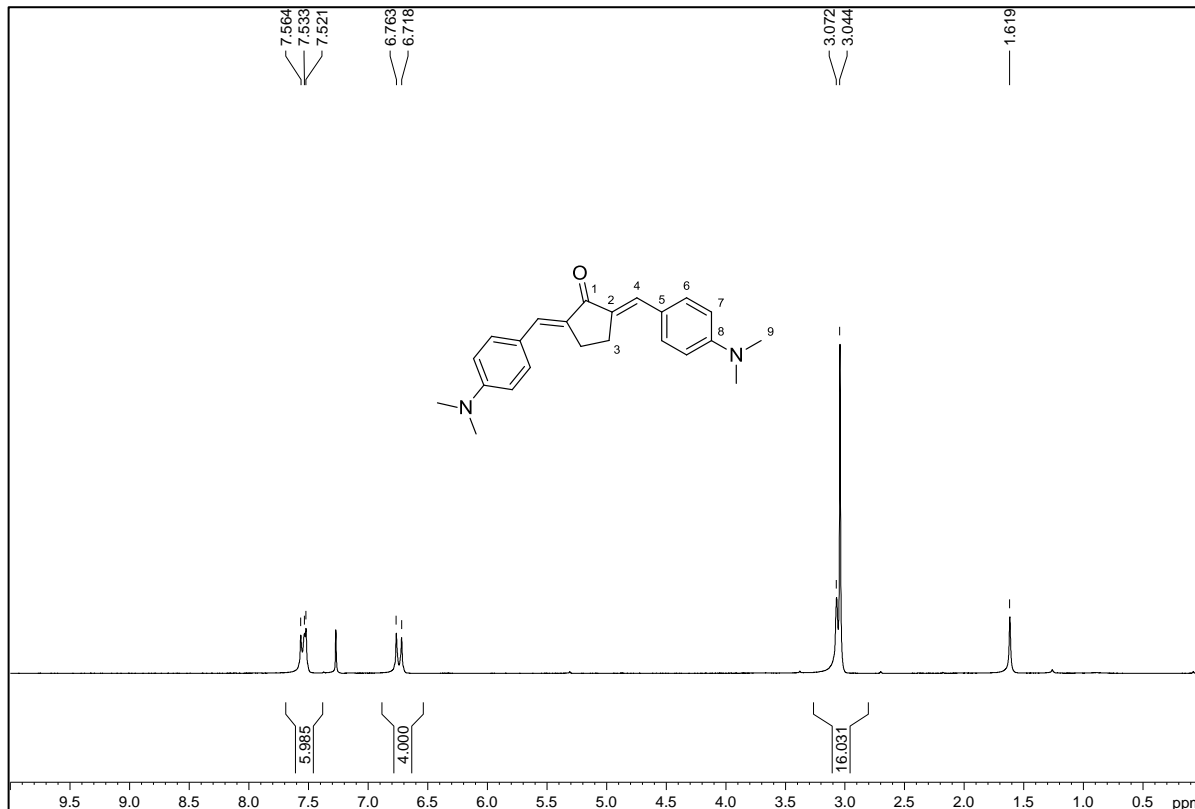
Figura A.18 - Espectro de RMN de ¹H de 3a (200 MHz, CDCl₃).

Figura A.19 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3a (50 MHz, CDCl_3).

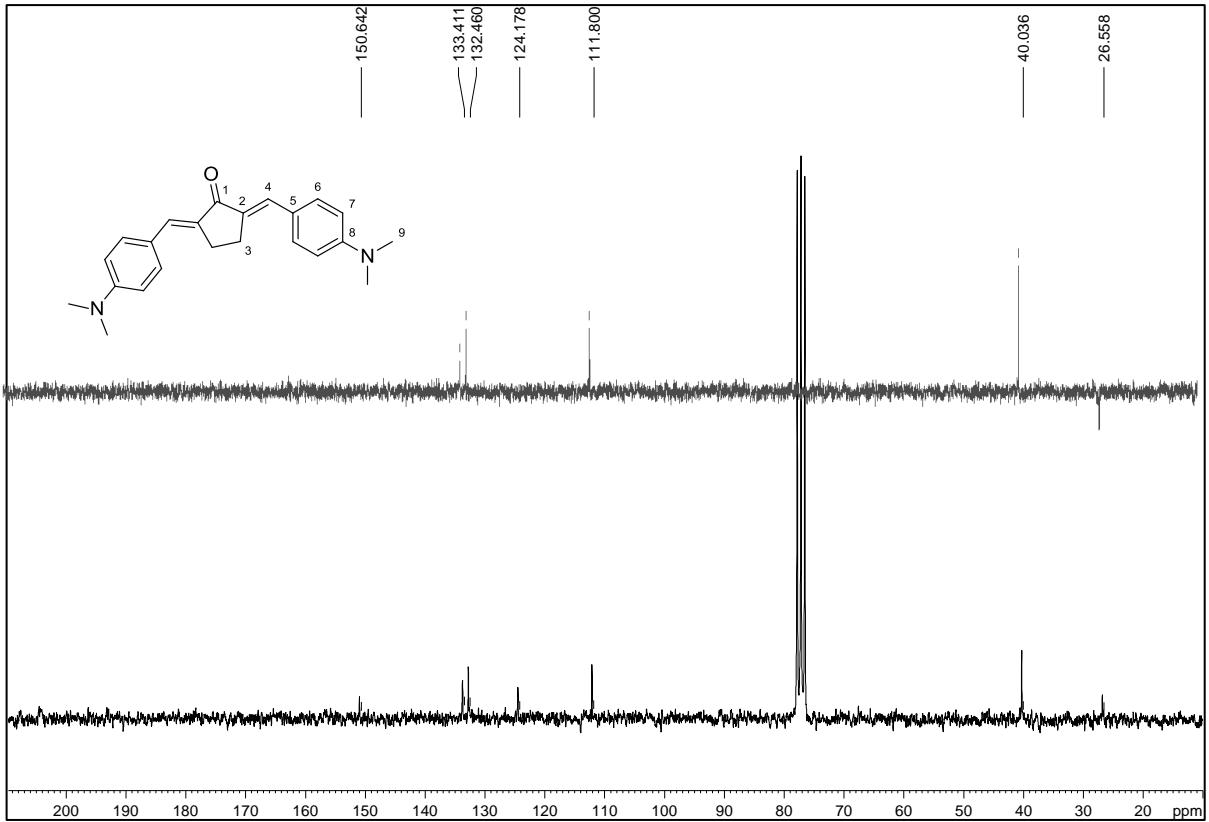


Figura A.20 - Espectro no infravermelho de 3c.

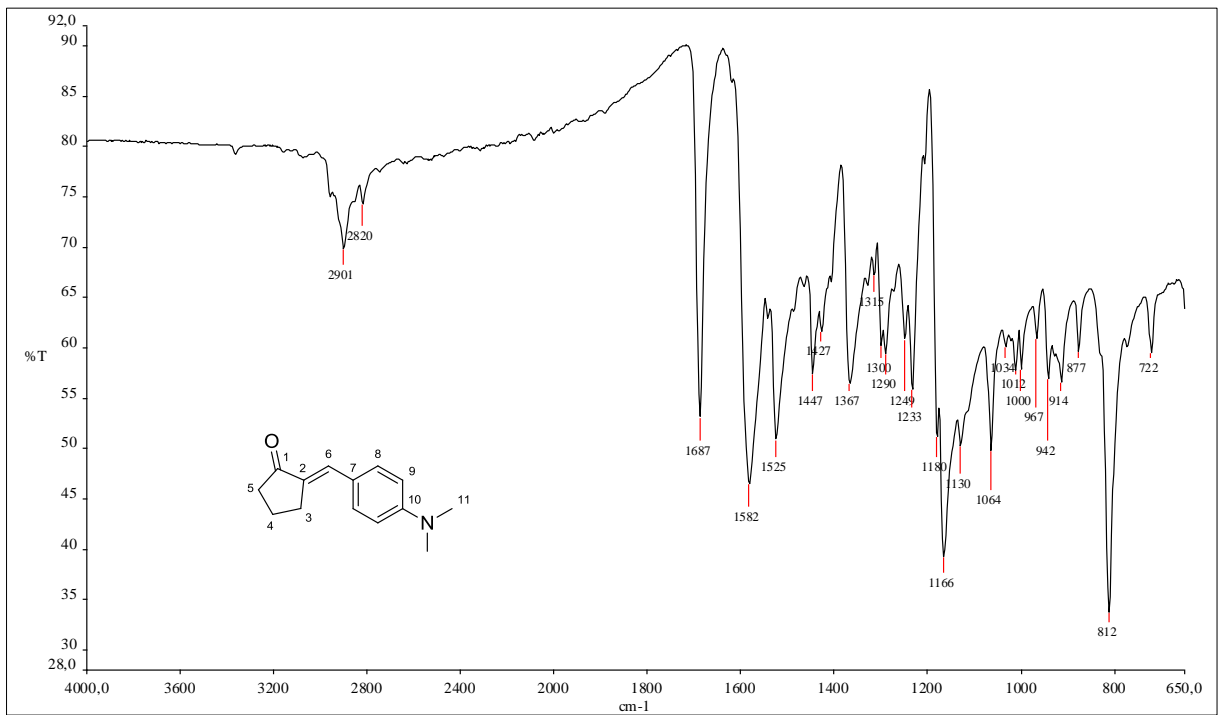


Figura A.21 - Espectro de RMN de ^1H de 3c (200 MHz, CDCl_3).

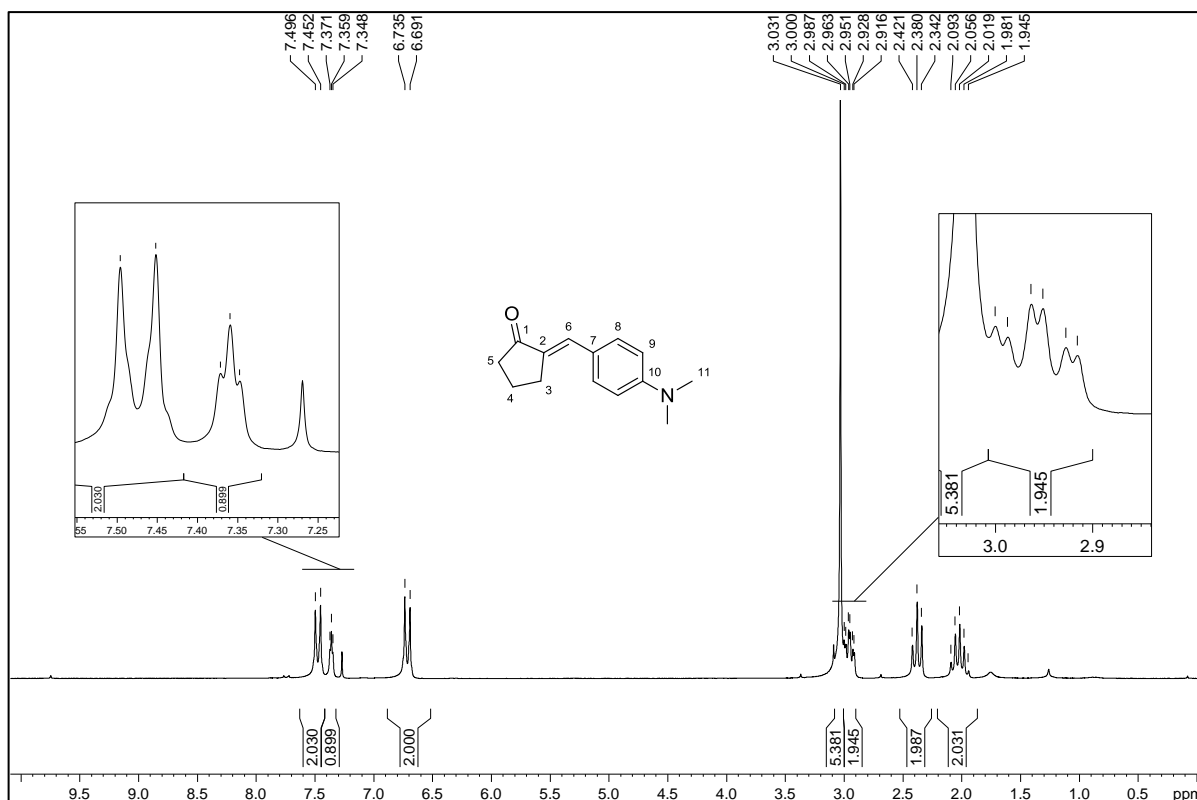


Figura A.22 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3c (50 MHz, CDCl_3).

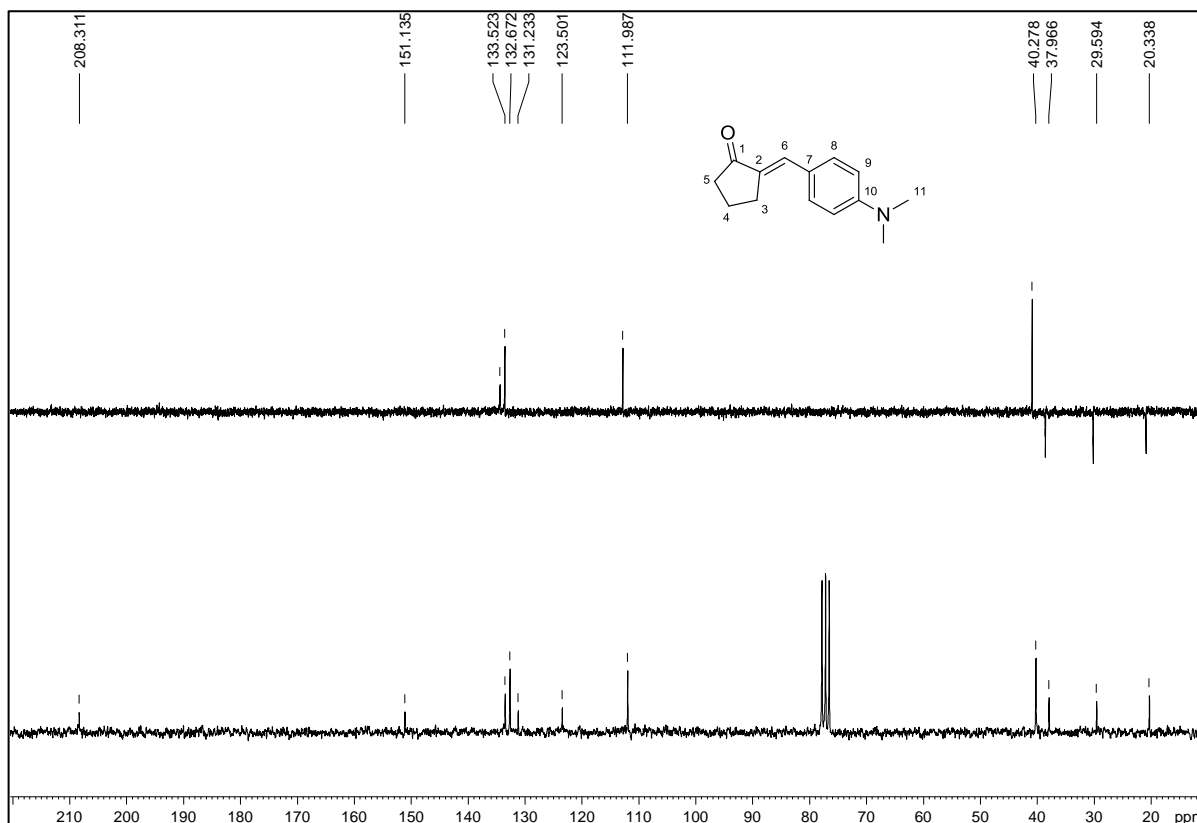


Figura A.23 - Espectro no infravermelho de 3b.

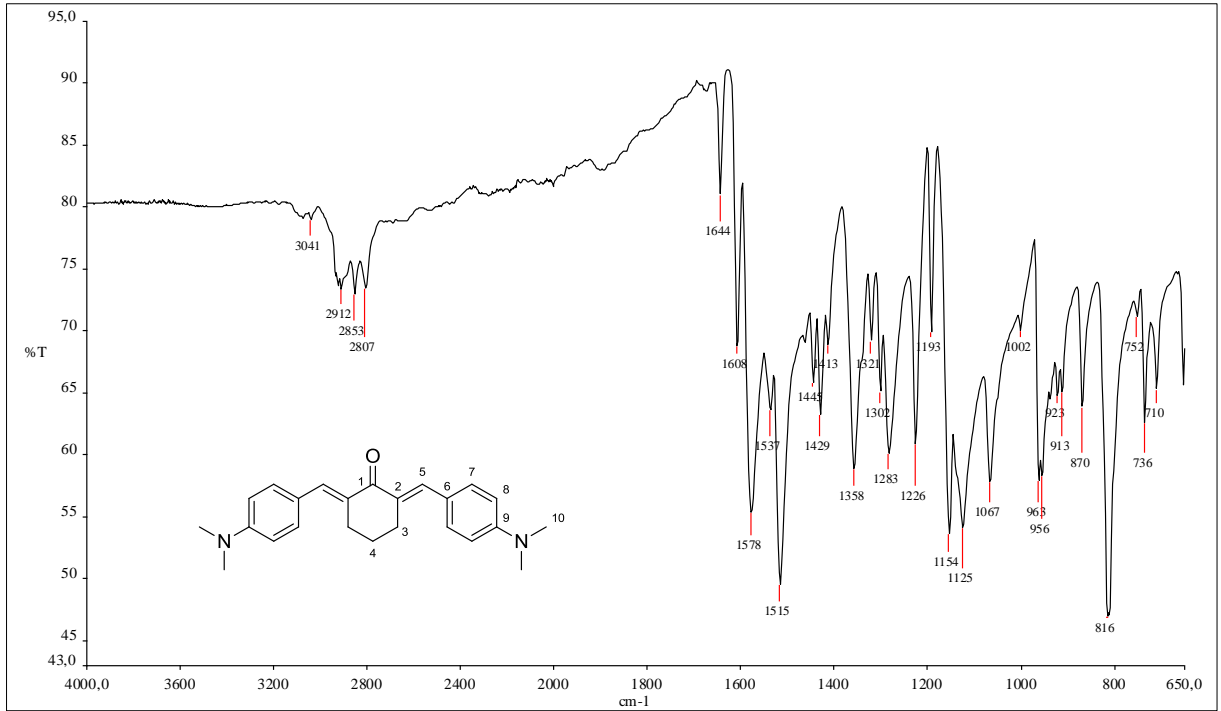
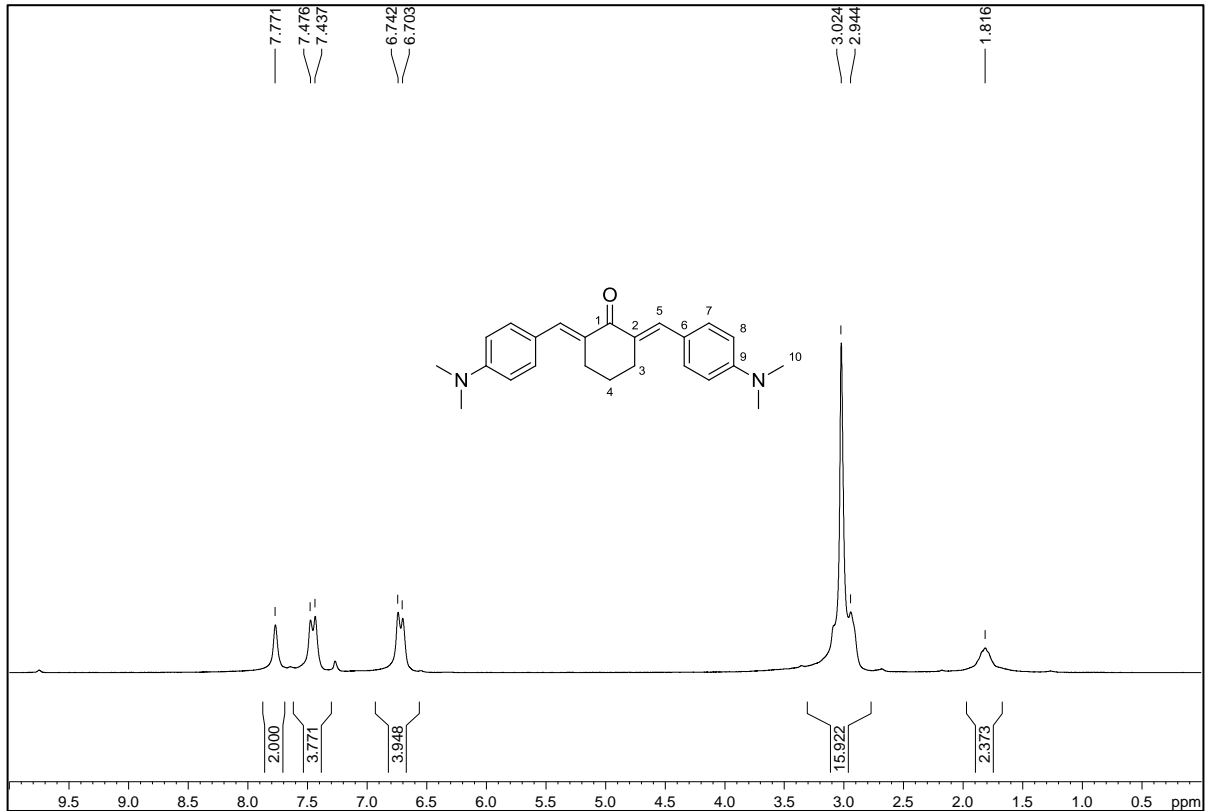
Figura A.24 - Espectro de RMN de ^1H de 3b (200 MHz, CDCl_3).

Figura A.25 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 3b (50 MHz, CDCl_3).

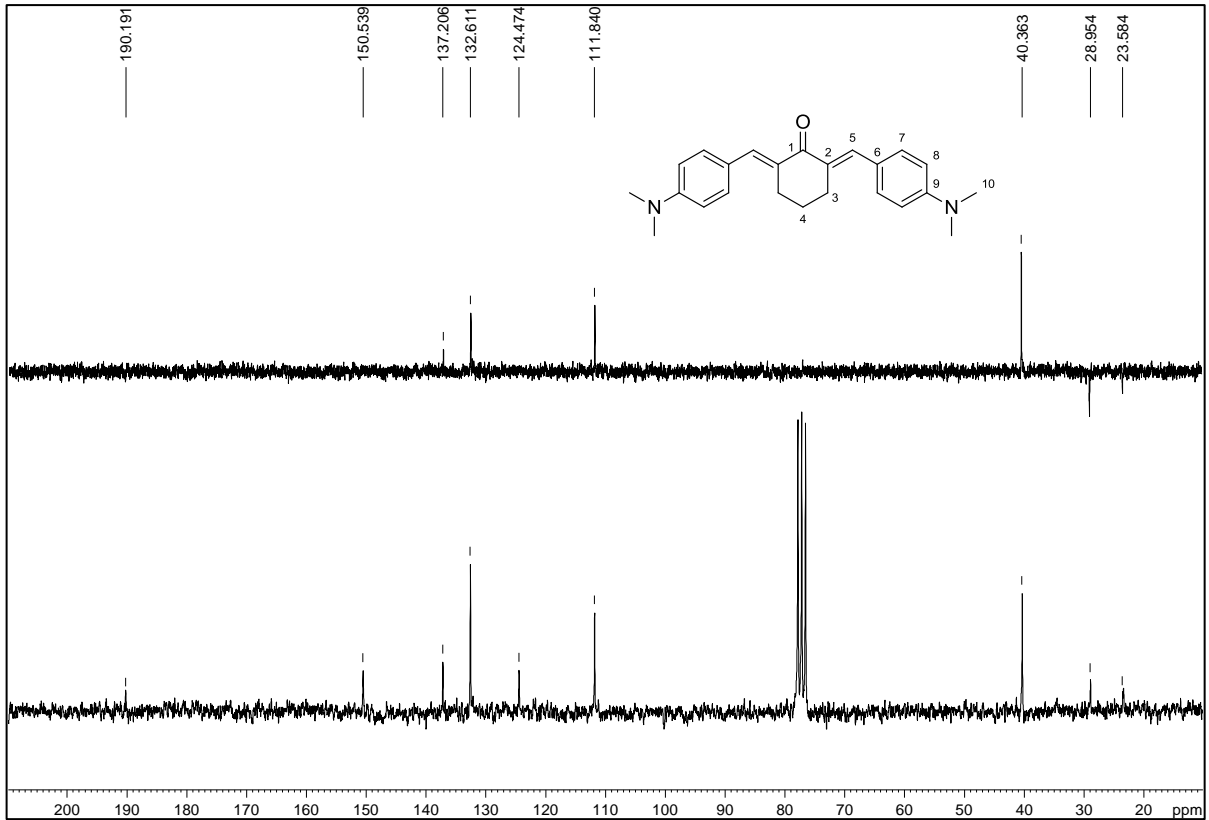


Figura A.26 - Espectro no infravermelho de 4.

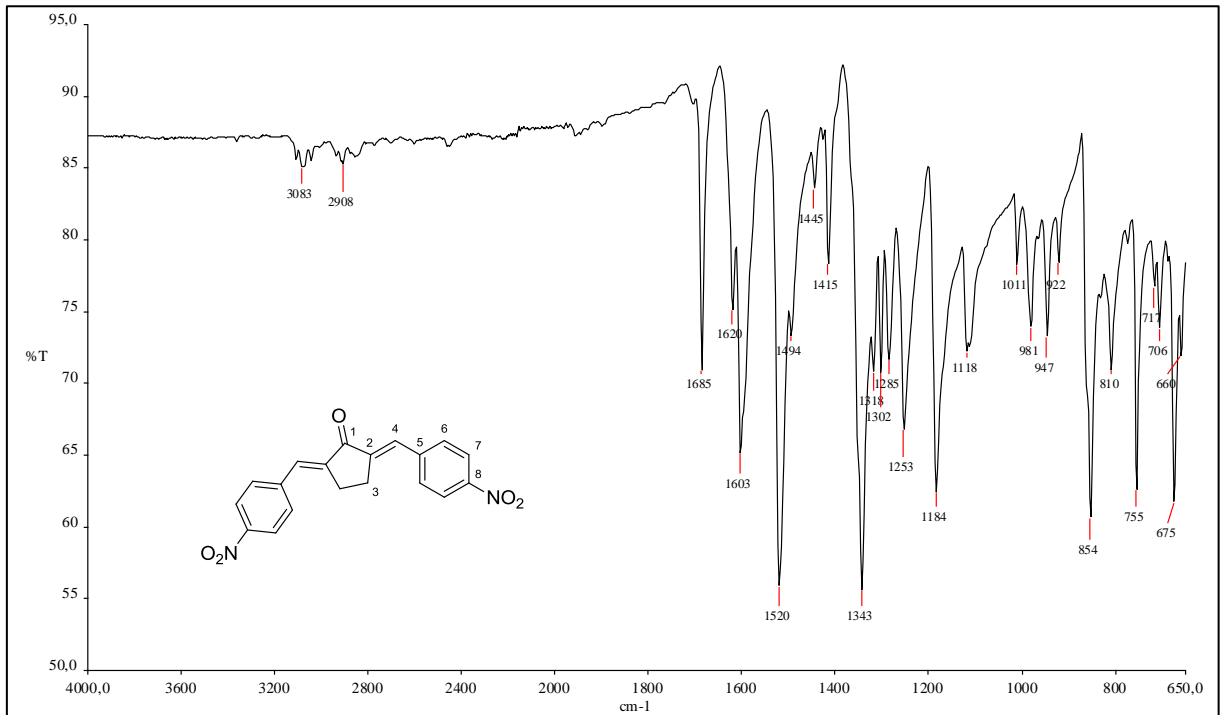


Figura A.27 - Espectro de RMN de ^1H de 4 (200 MHz, CDCl_3).

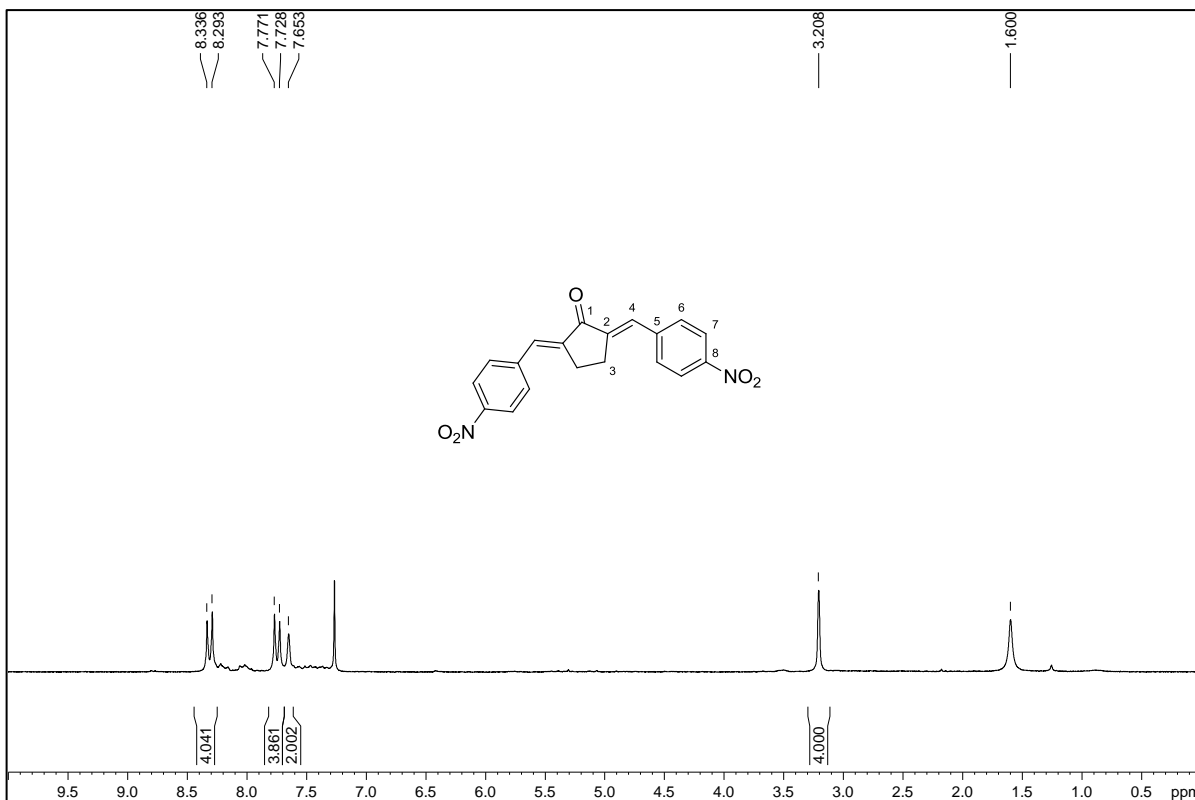


Figura A.28 - Espectro no infravermelho de 5a.

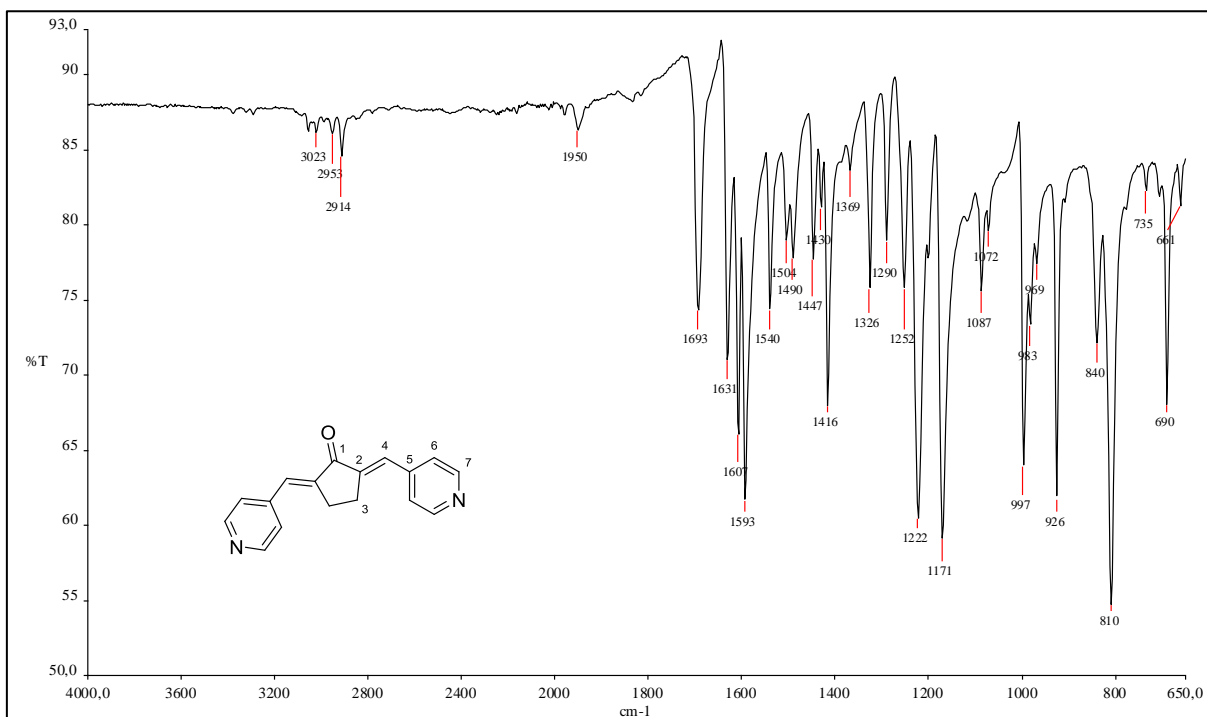


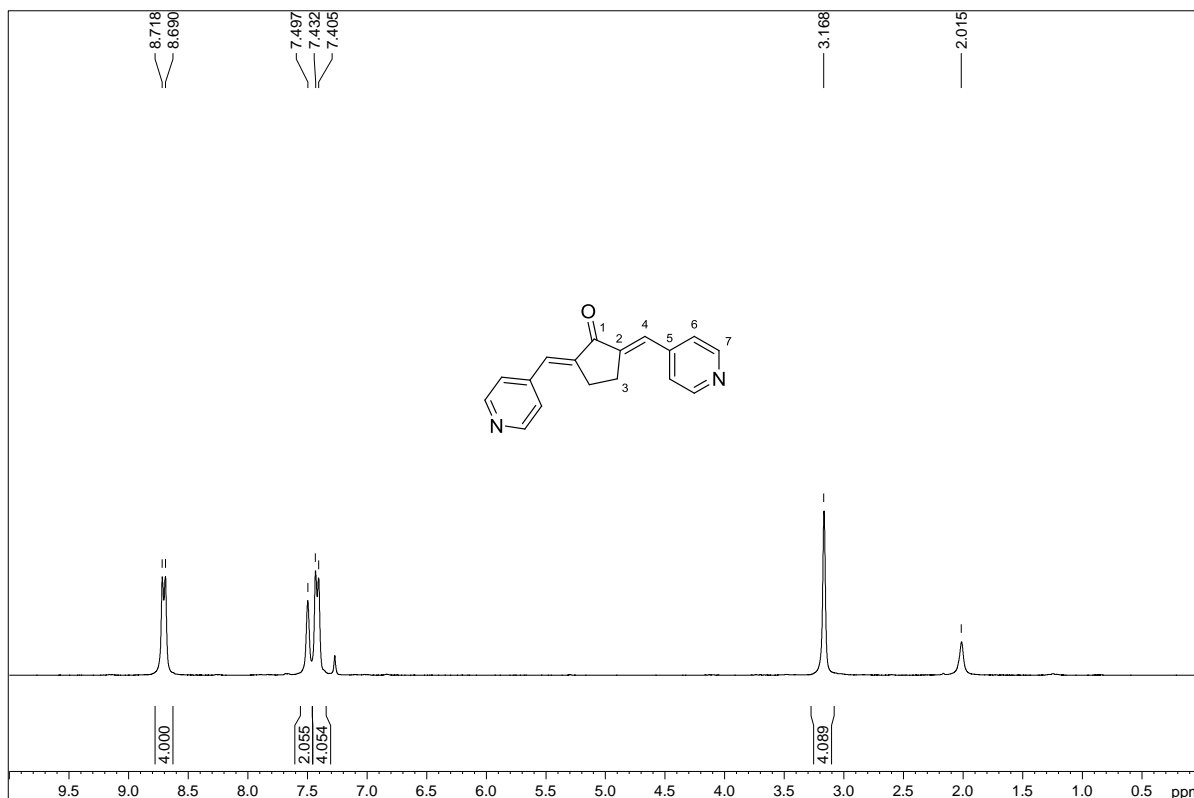
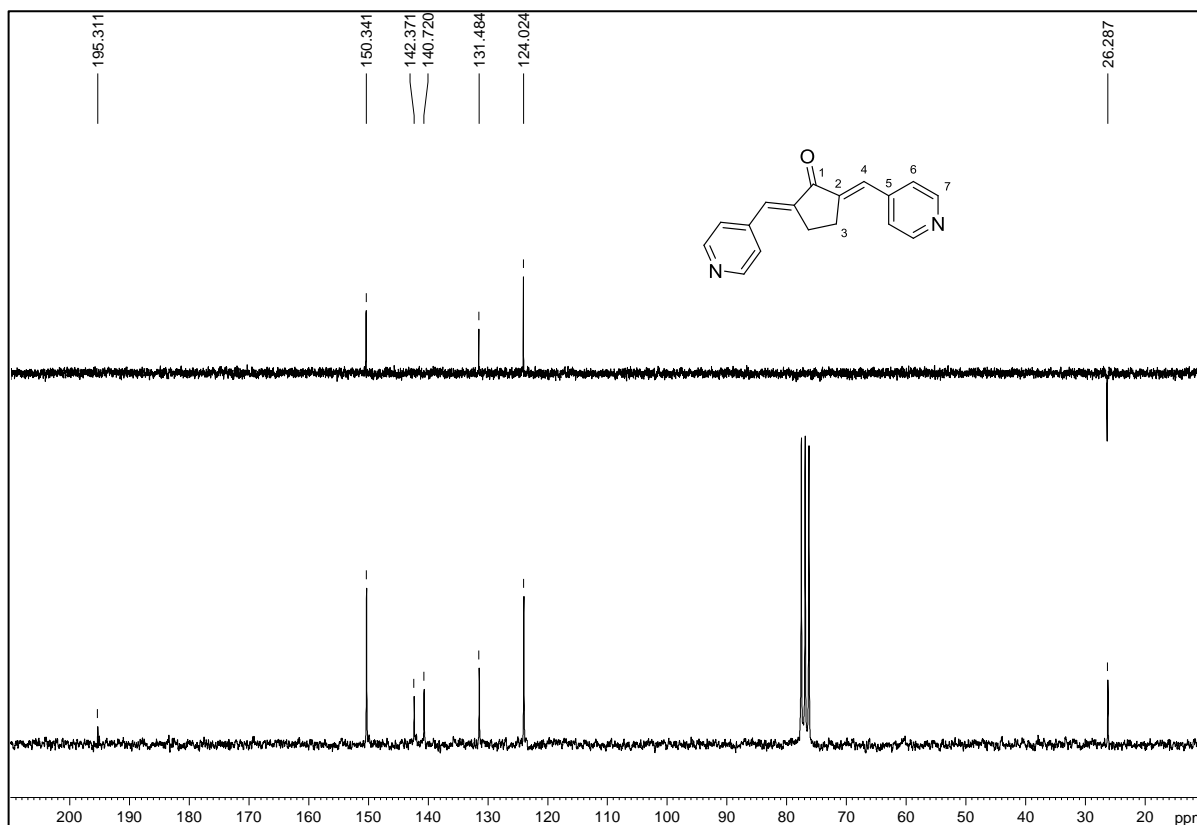
Figura A.29 - Espectro de RMN de ^1H de 5a (200 MHz, CDCl_3).Figura A.30 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5a (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.31 - Espectro no infravermelho de 5b.

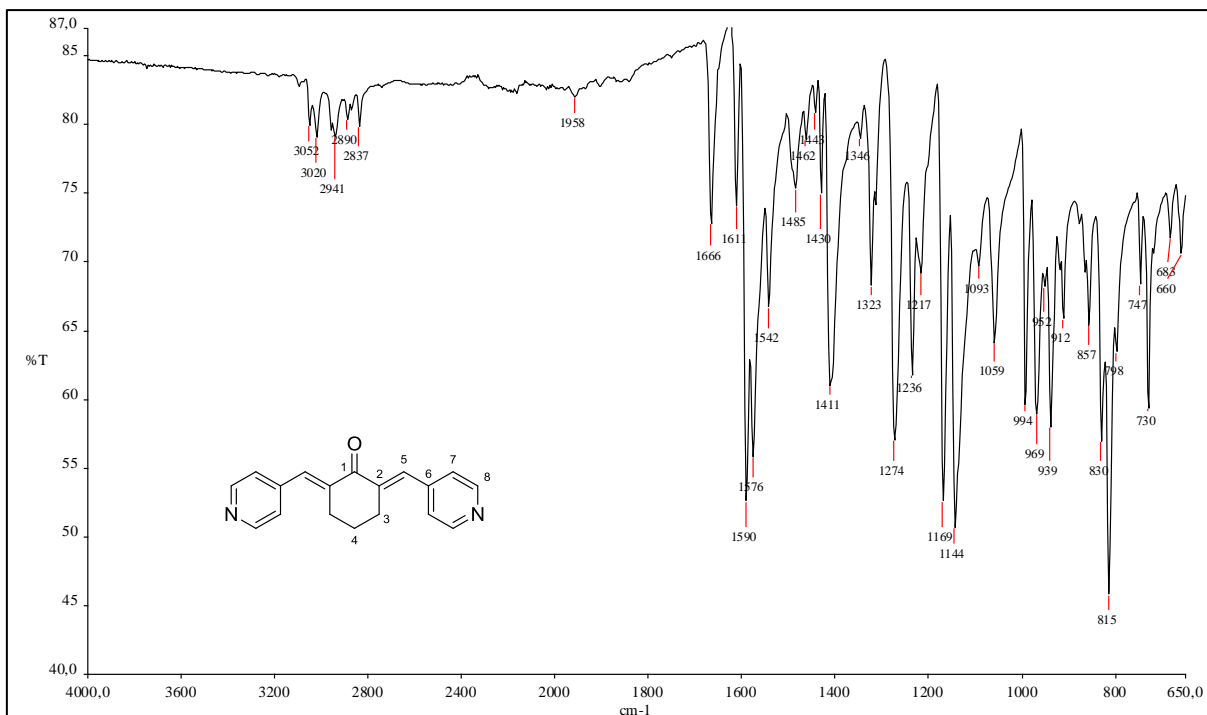
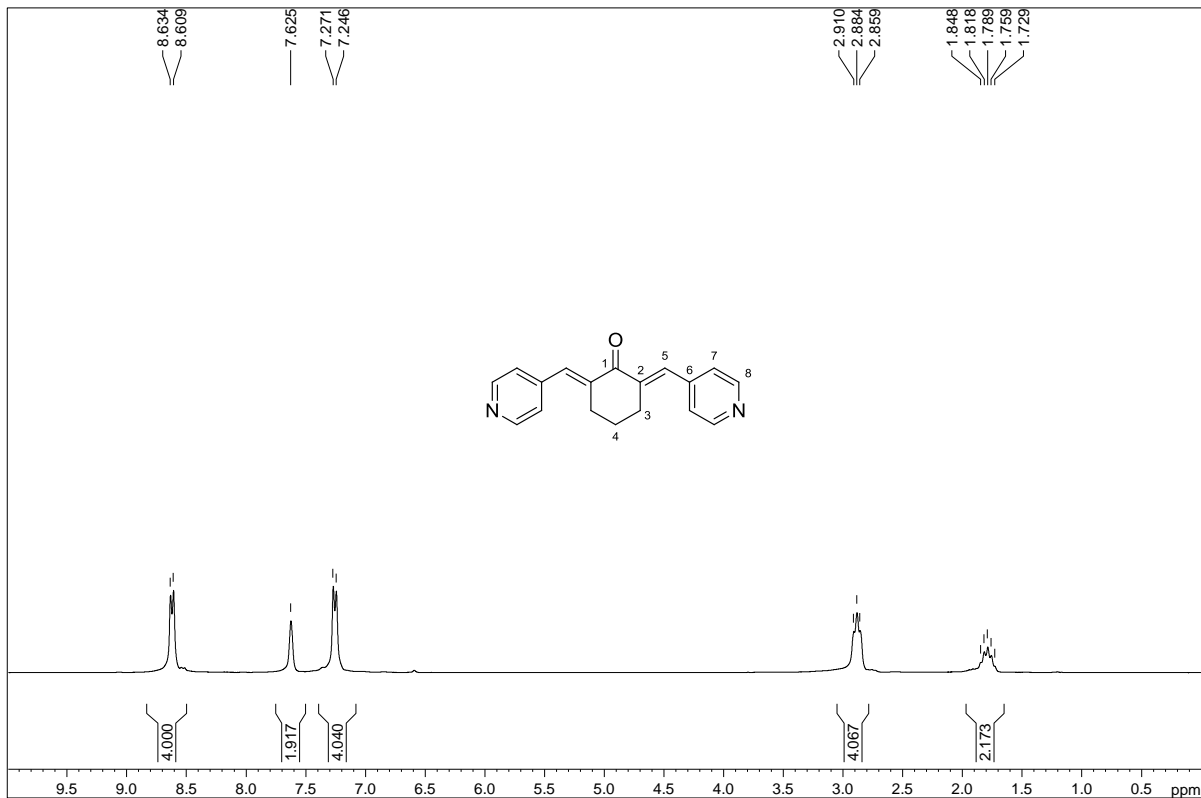
Figura A.32 - Espectro de RMN de ¹H de 5b (200 MHz, CDCl₃).

Figura A.33 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 5b (50 MHz, CDCl_3).

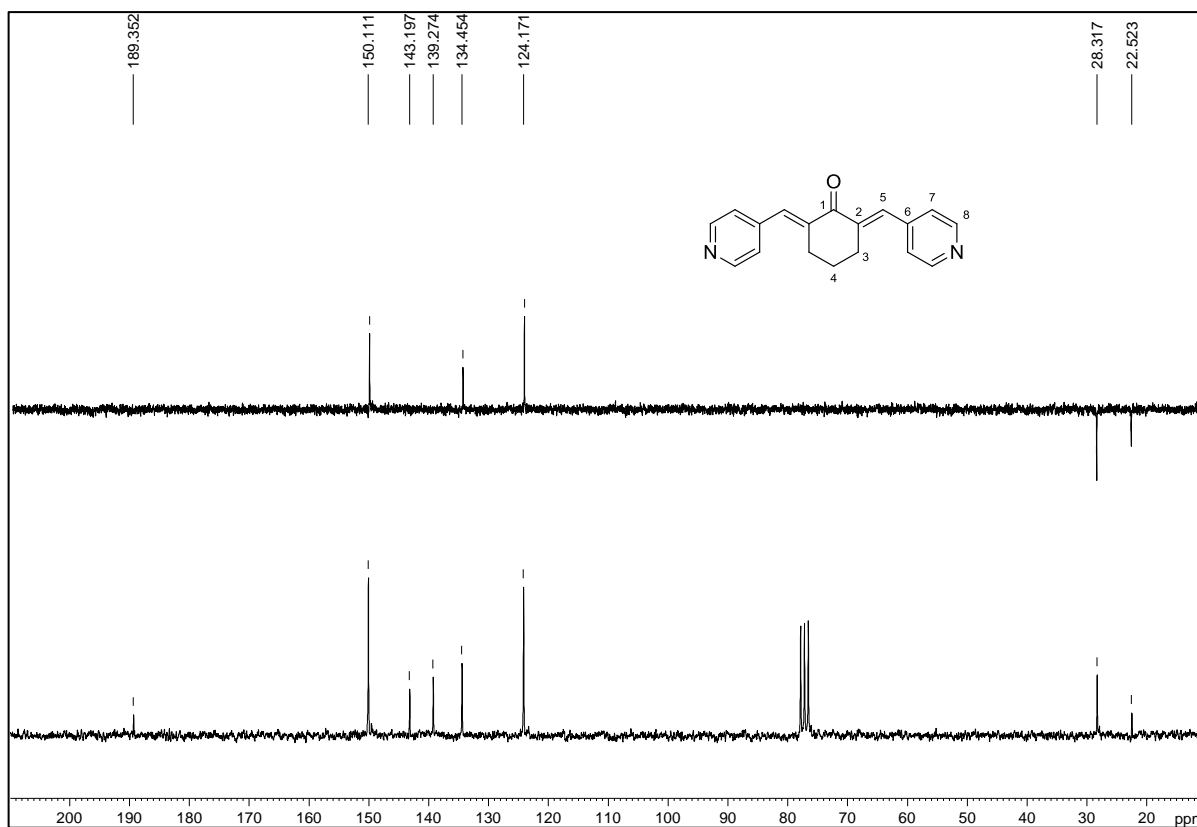


Figura A.34 - Espectro no infravermelho de 6a.

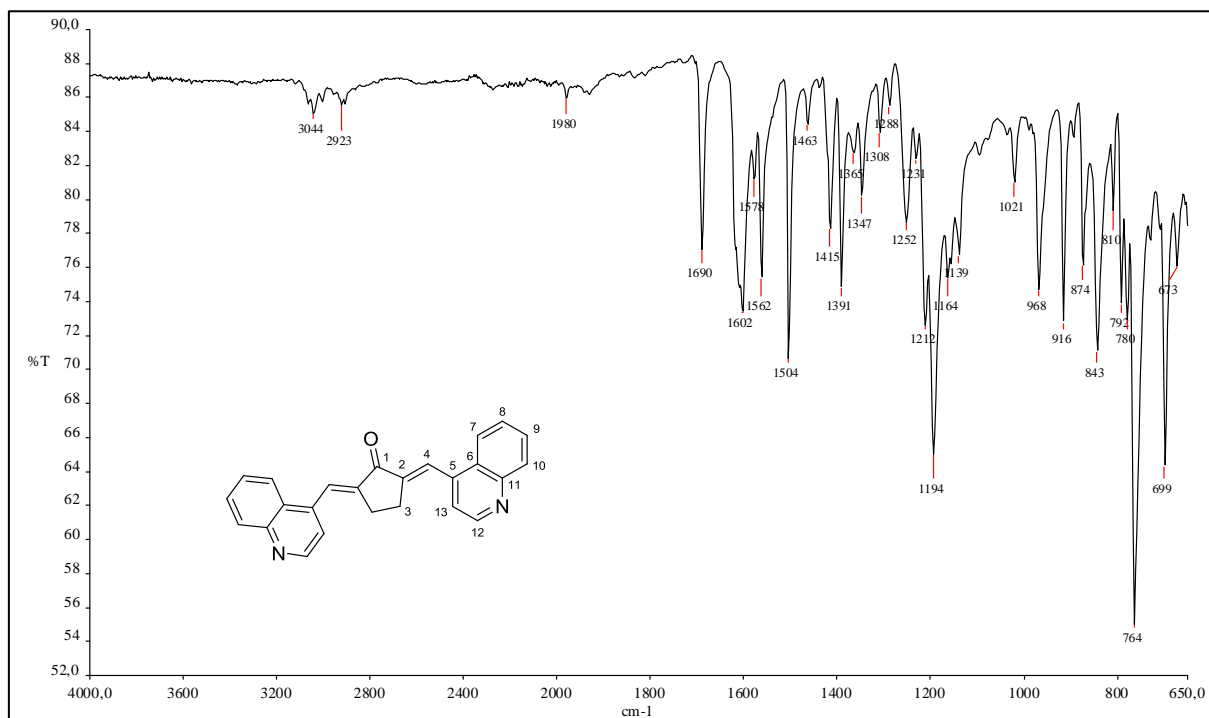


Figura A.35 - Espectro de RMN de ^1H de 6a (200 MHz, DMSO-d_6 +TFA).

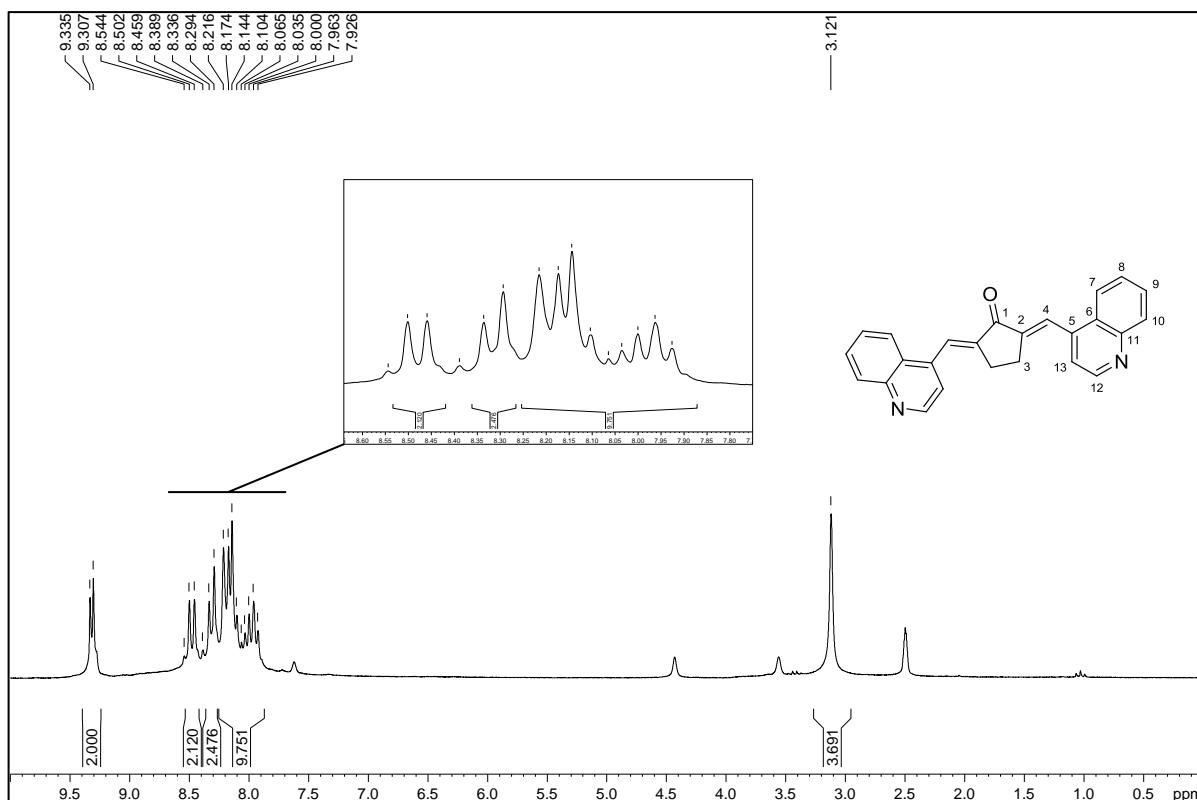


Figura A.36 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 6a (50 MHz, DMSO-d_6 +TFA).

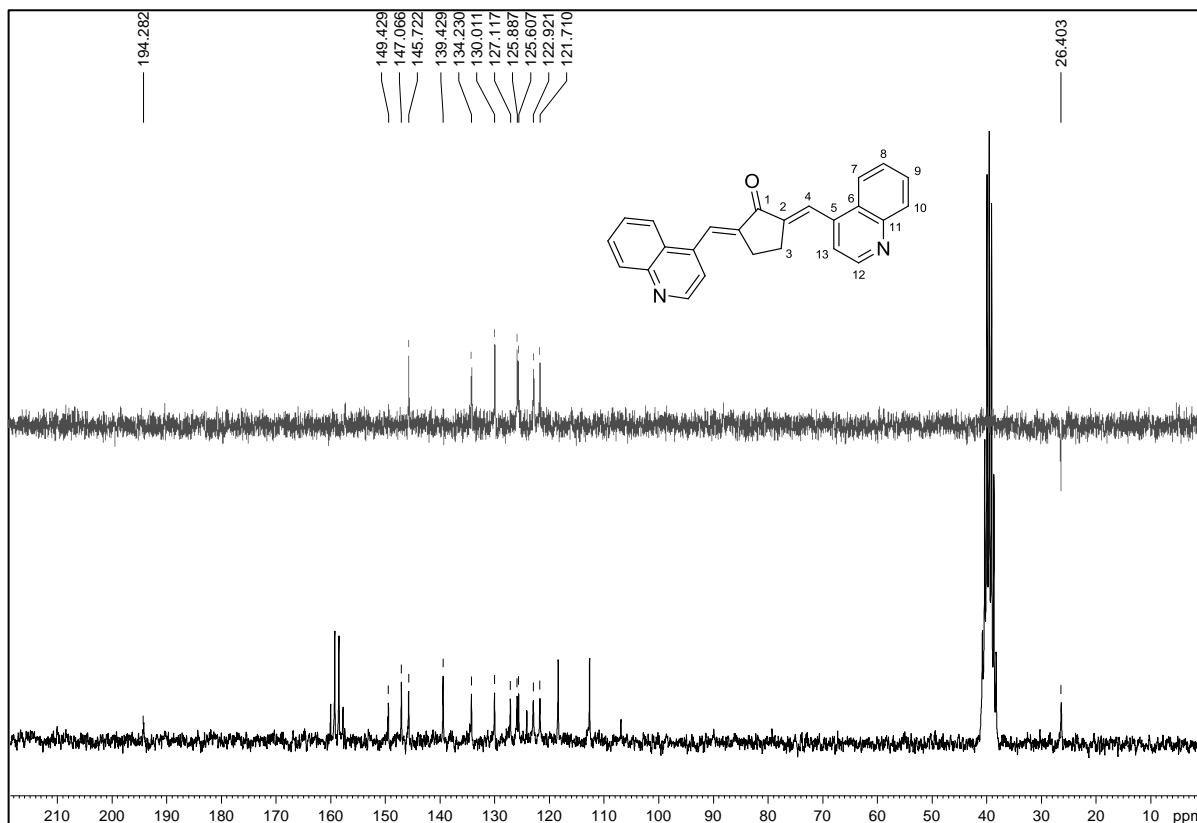


Figura A.37 - Espectro no infravermelho de 6b.

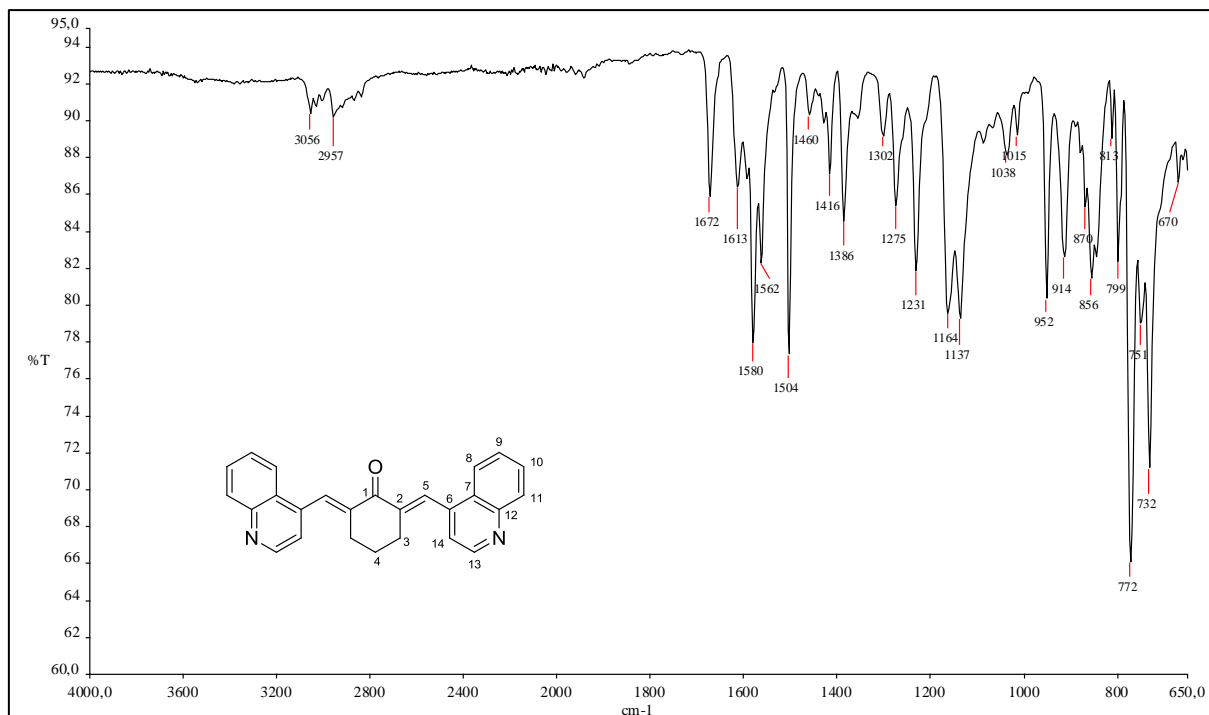
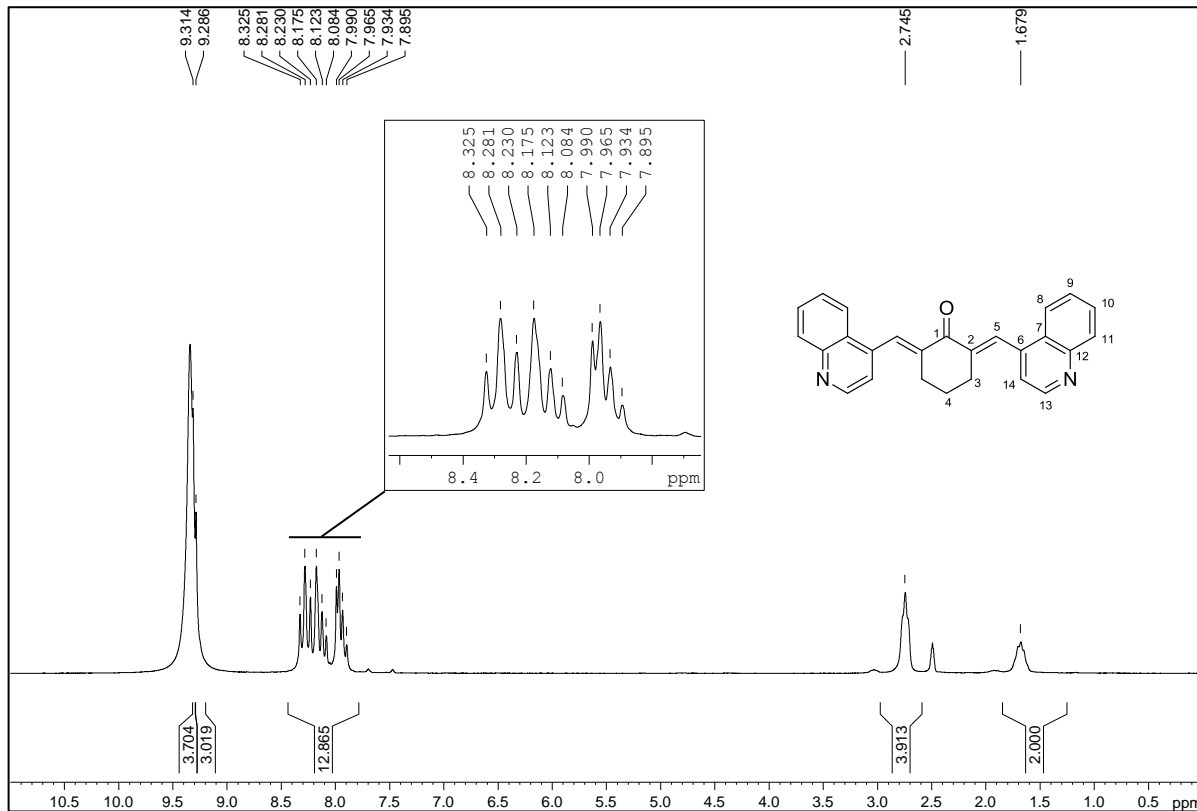
Figura A.38 - Espectro de RMN de ¹H de 6b (200 MHz, DMSO-d₆+TFA).

Figura A.39 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 6b (50 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ +TFA).

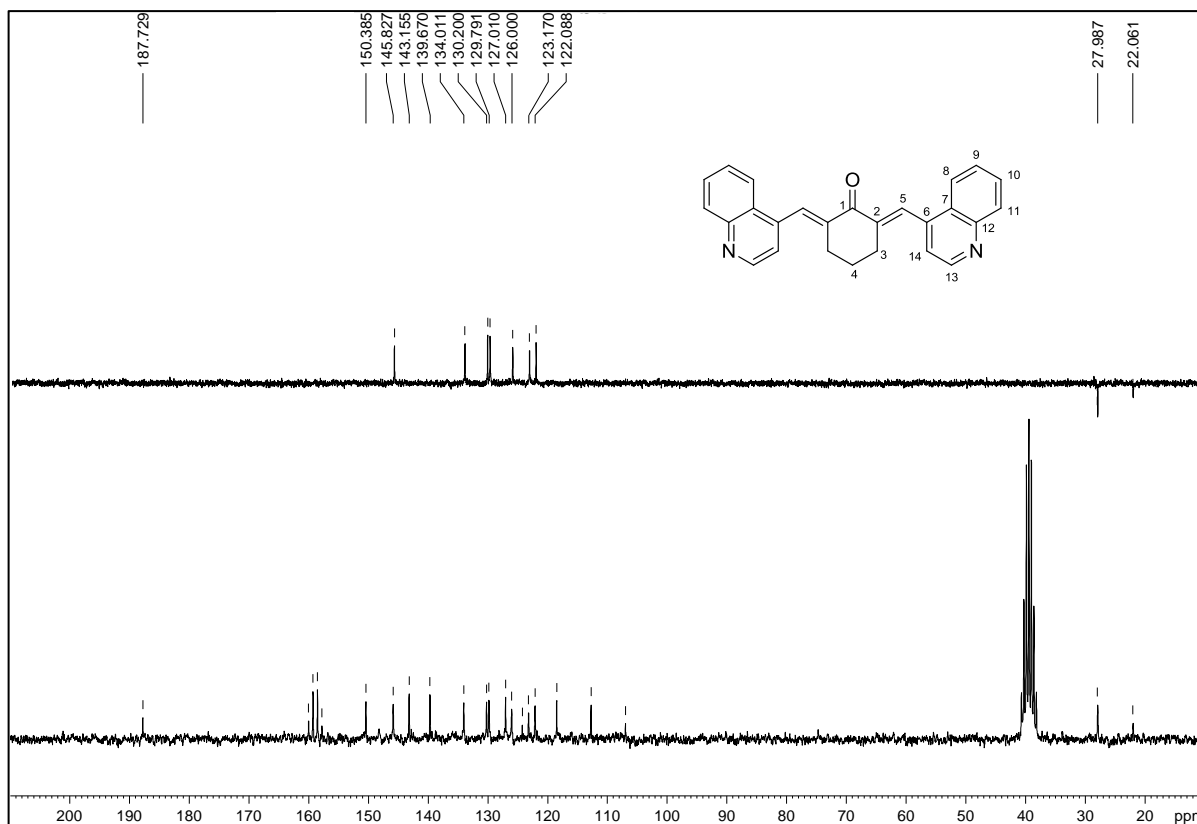


Figura A.40 - Espectro no infravermelho de 7a.

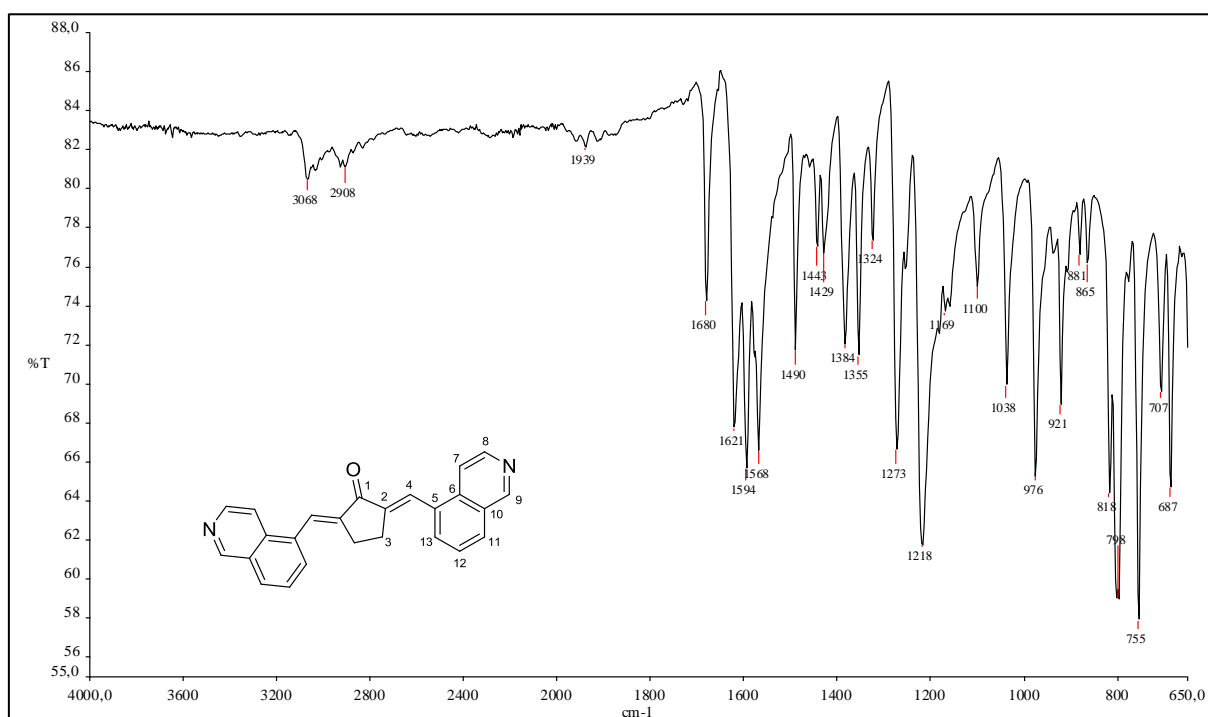


Figura A.41 - Espectro de RMN de ^1H de 7a (200 MHz, DMSO-d_6 +TFA).

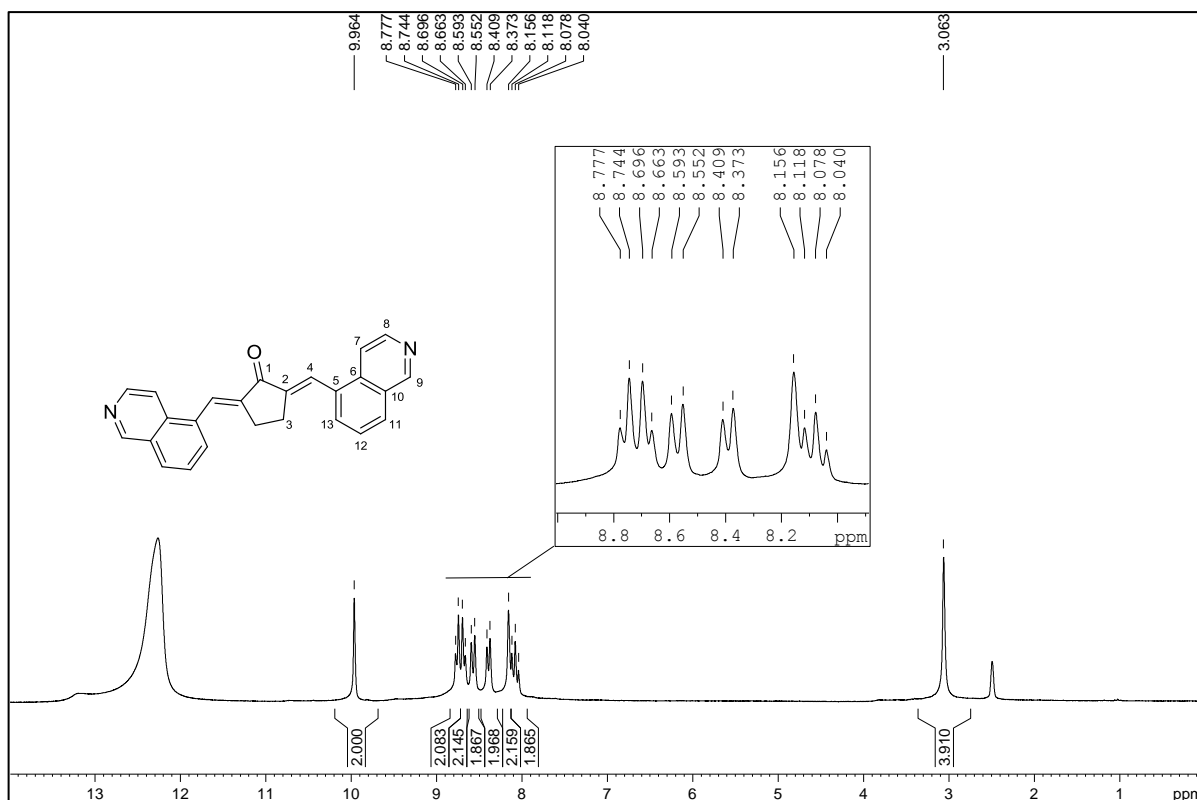


Figura A.42 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 7a (50 MHz, DMSO-d_6 +TFA).

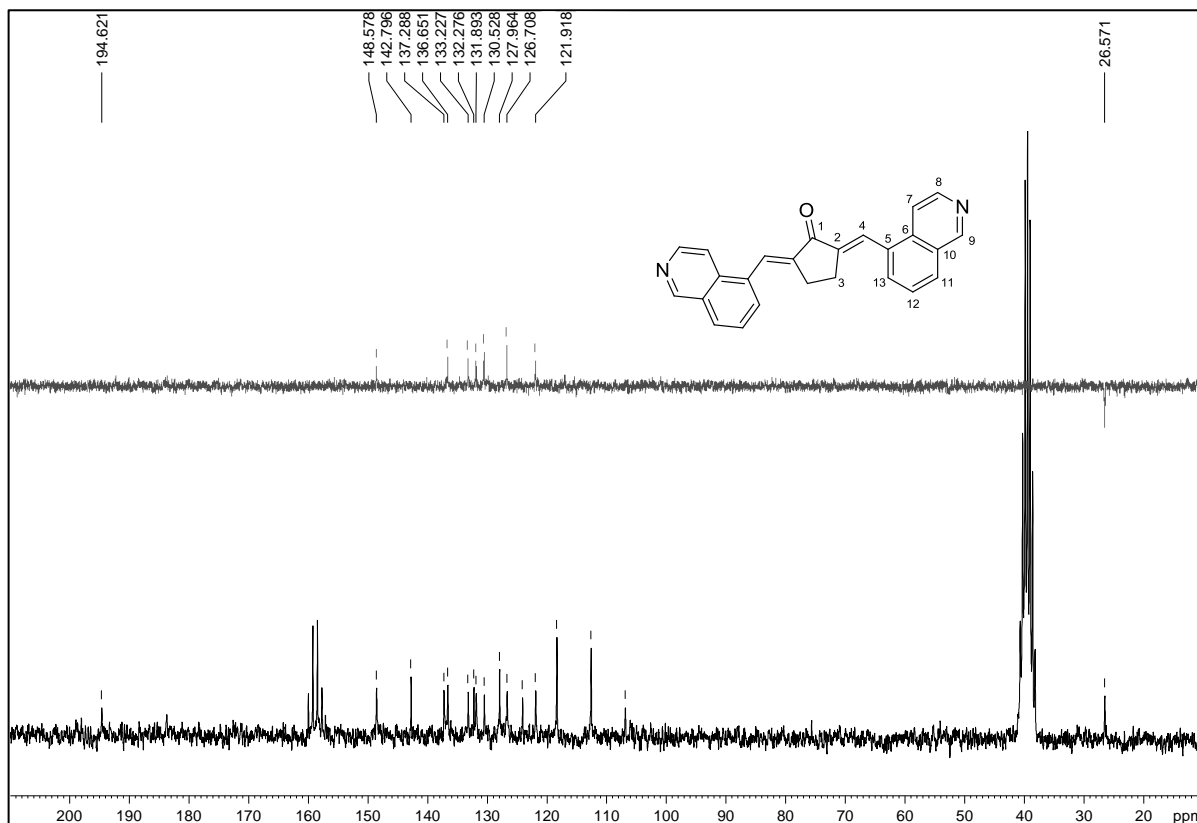


Figura A.43 - Espectro no infravermelho de 7b.

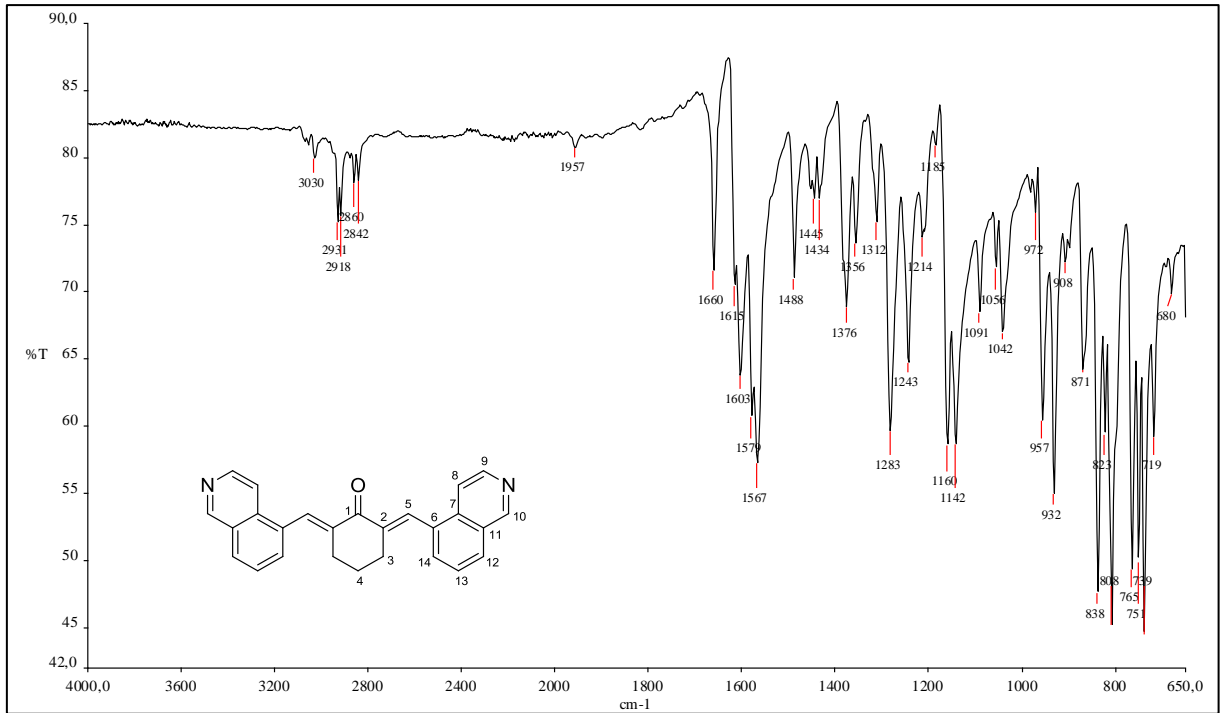
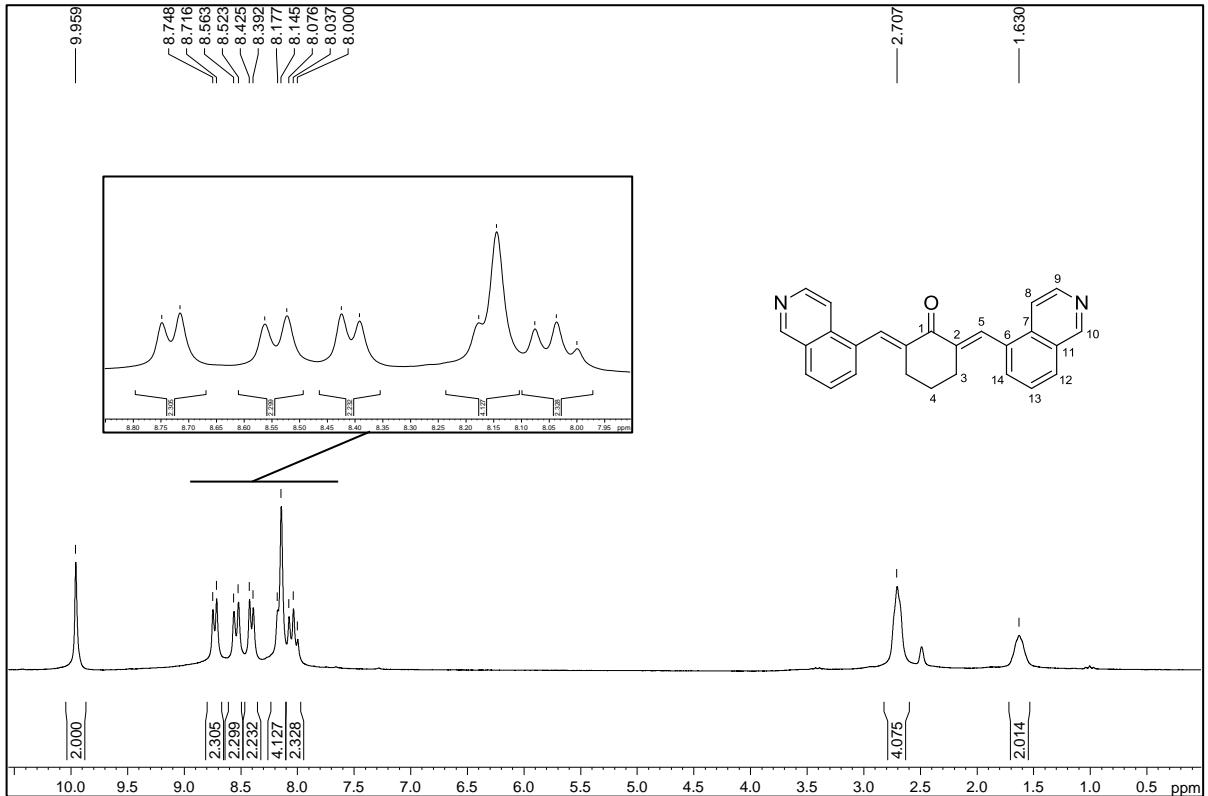
Figura A.44 - Espectro de RMN de ¹H de 7b (200 MHz, DMSO-d₆+TFA).

Figura A.45 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 7b (50 MHz, DMSO-d_6 +TFA).

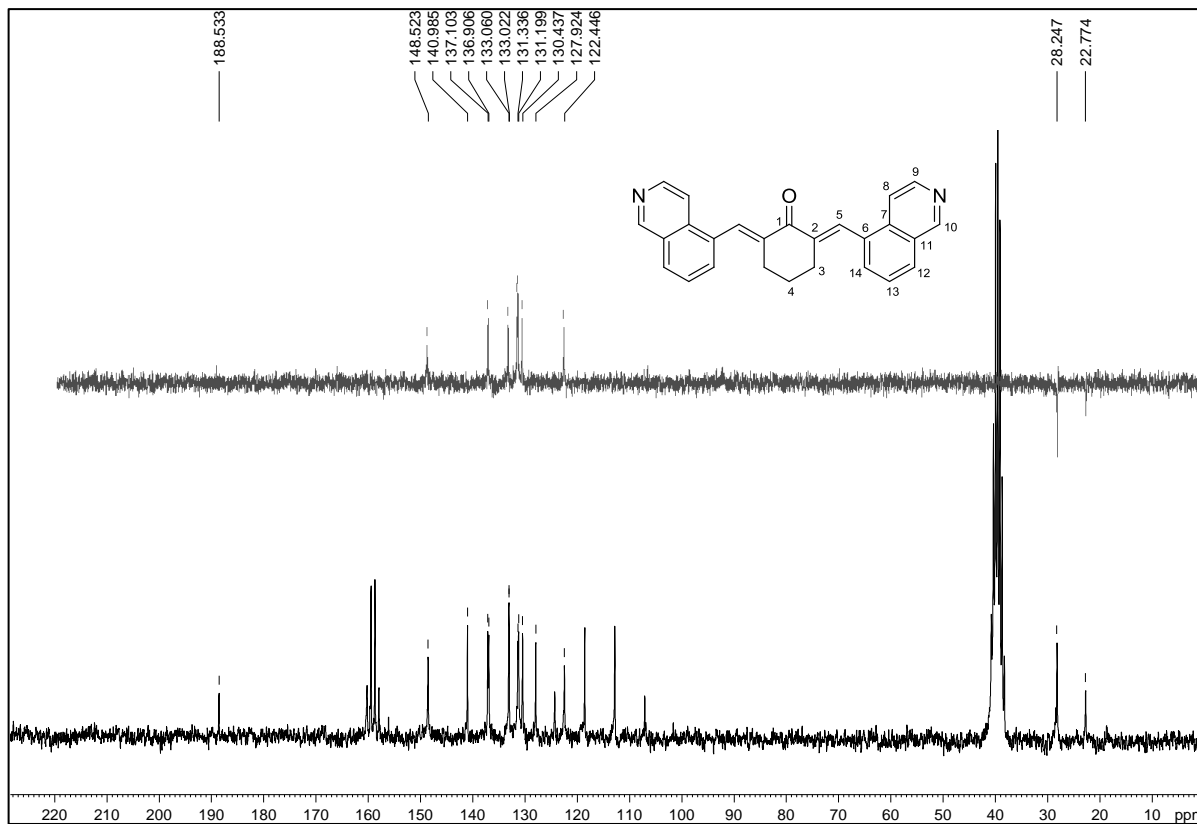


Figura A.46 - Espectro no infravermelho de 8a.

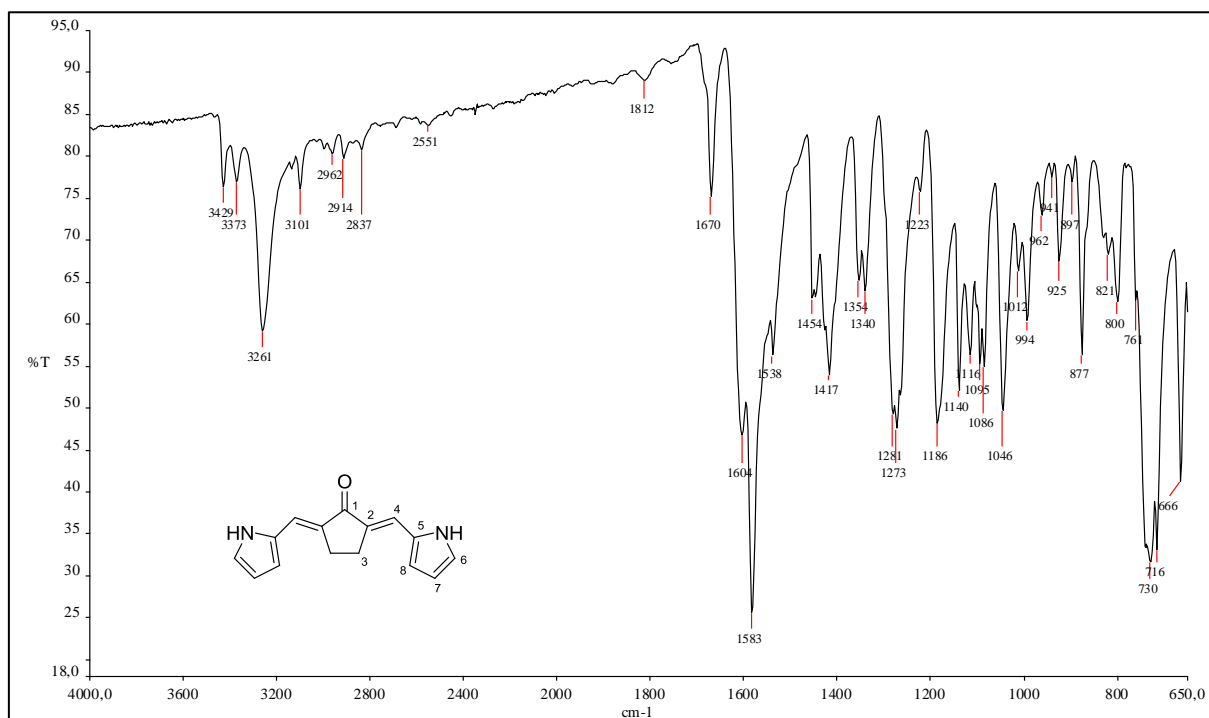


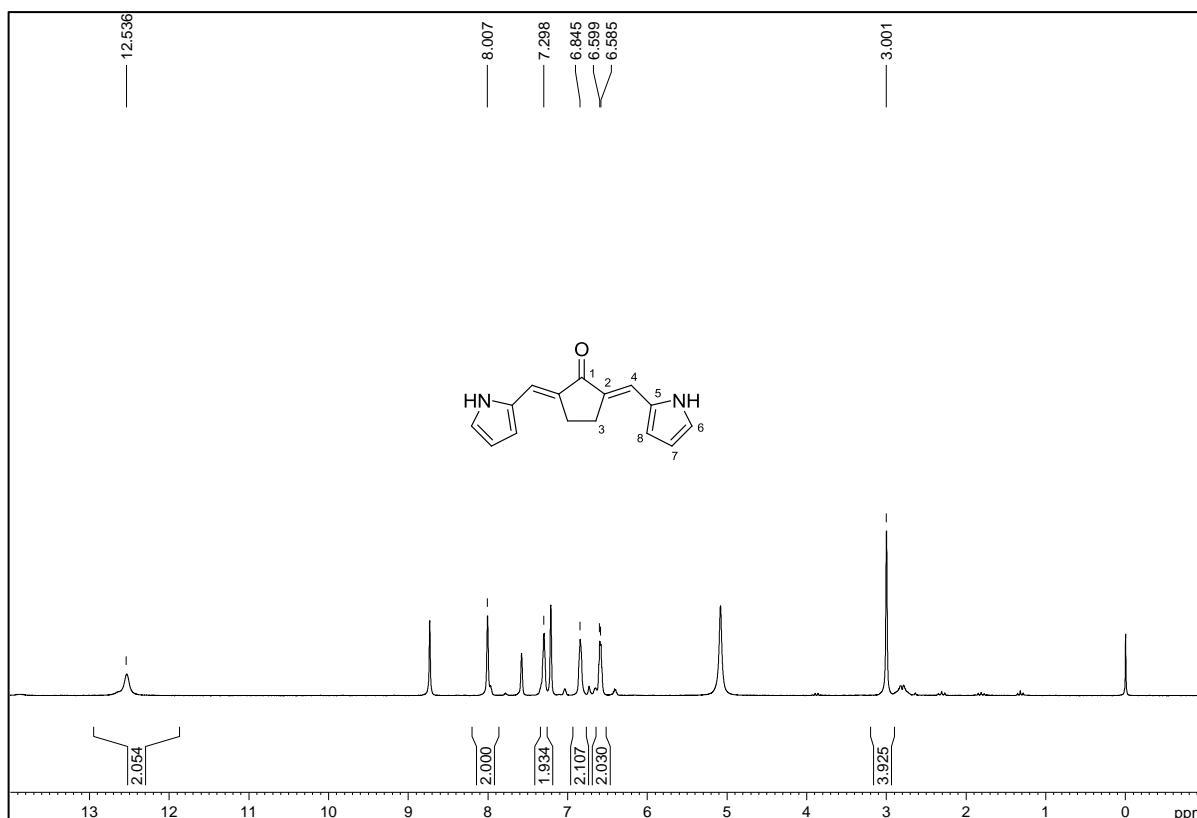
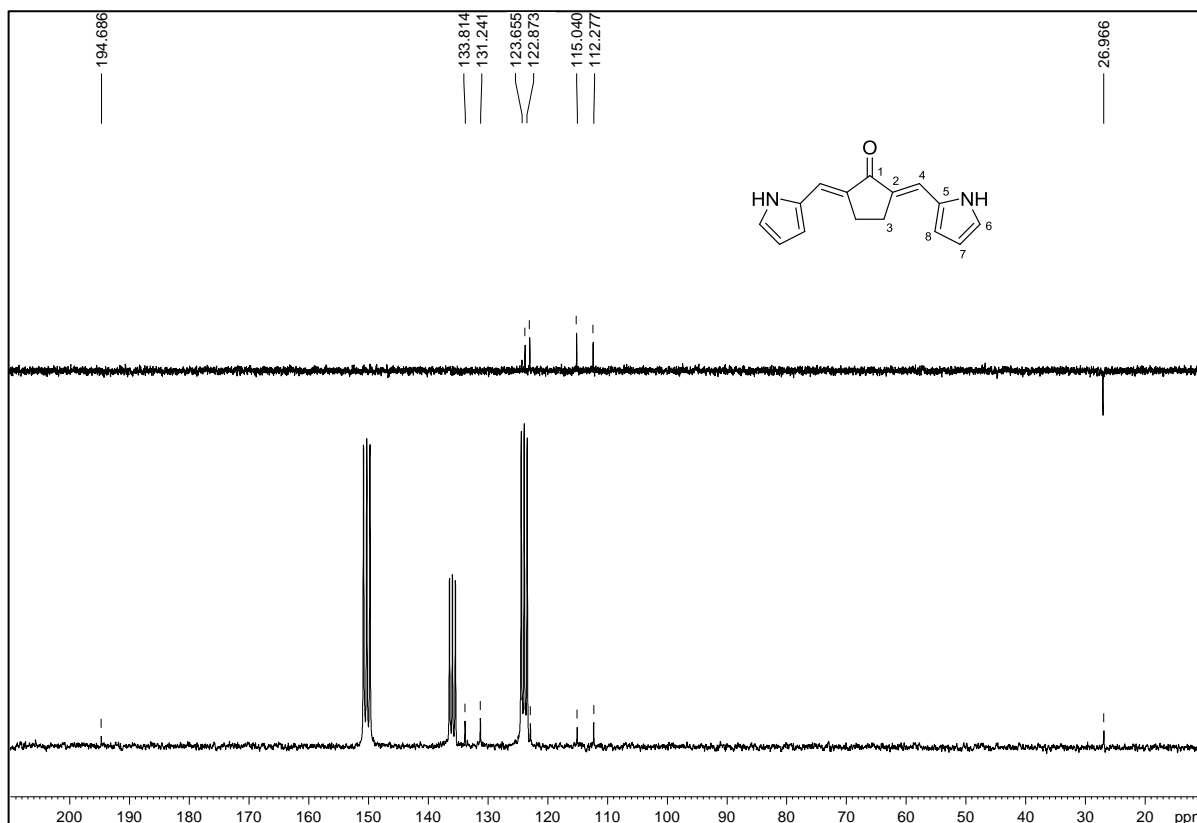
Figura A.47 - Espectro de RMN de ^1H de 8a (200 MHz, piridina- d_5).Figura A.48 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 8a (50 MHz, piridina- d_5).

Figura A.49 - Espectro no infravermelho de 8b.

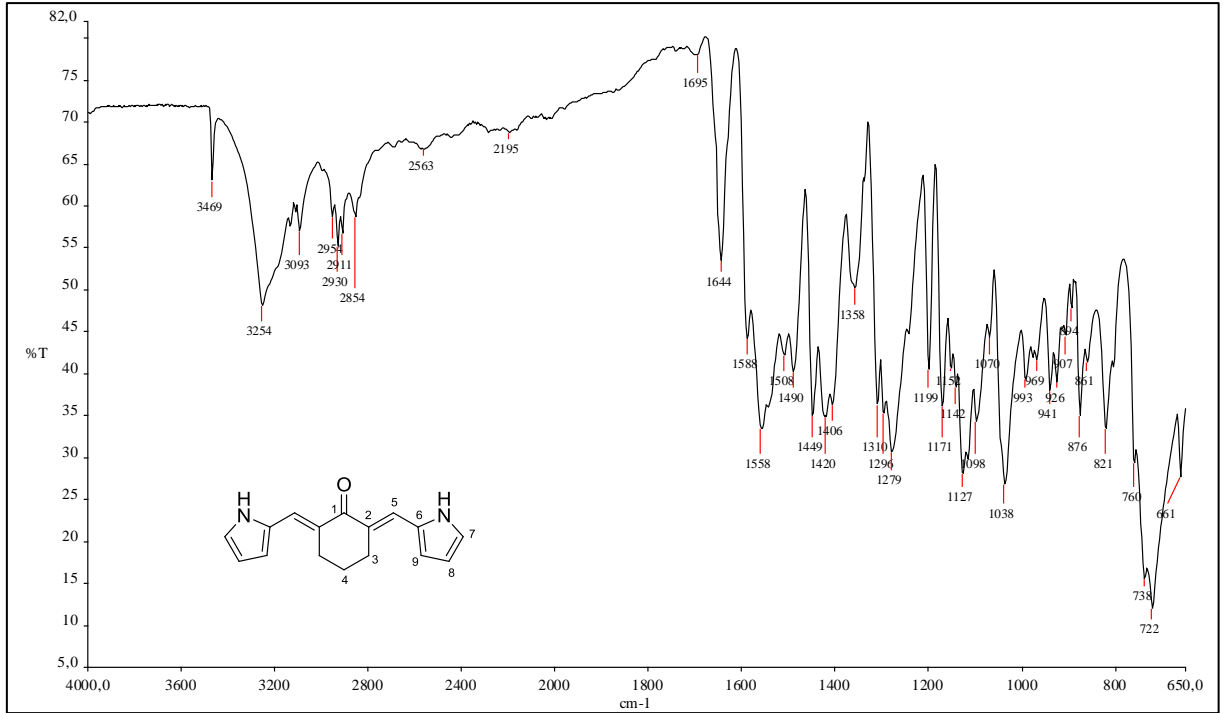
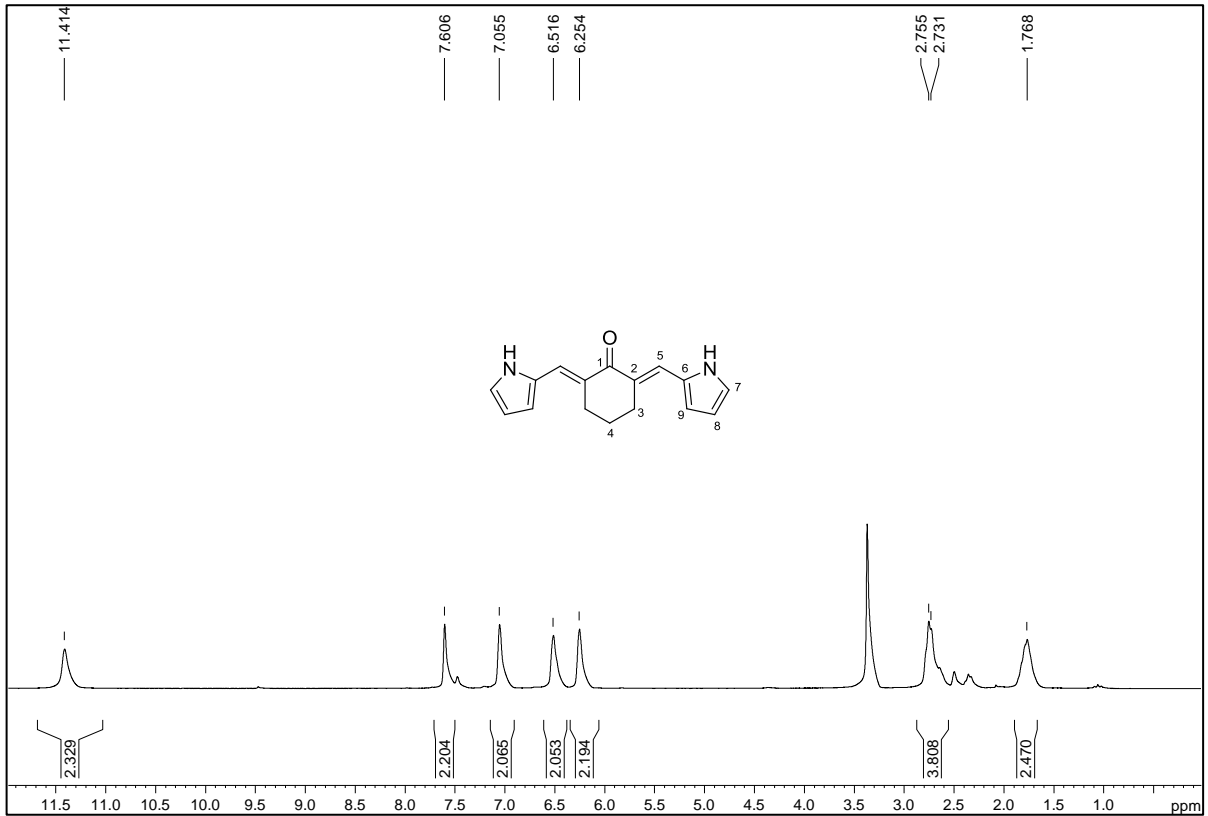
Figura A.50 - Espectro de RMN de ^1H de 8b (200 MHz, DMSO-d_6).

Figura A.51 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 8b (50 MHz, DMSO-d_6).

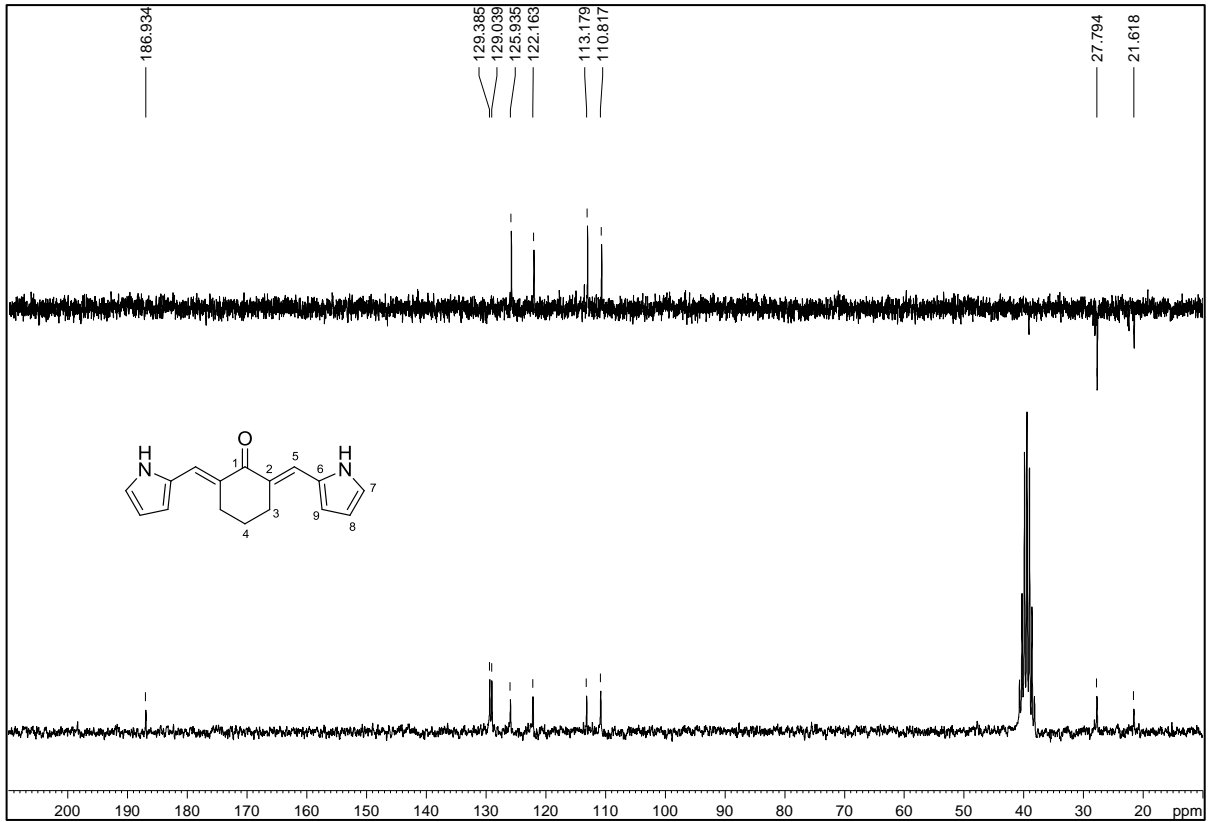


Figura A.52 - Espectro no infravermelho de 9.

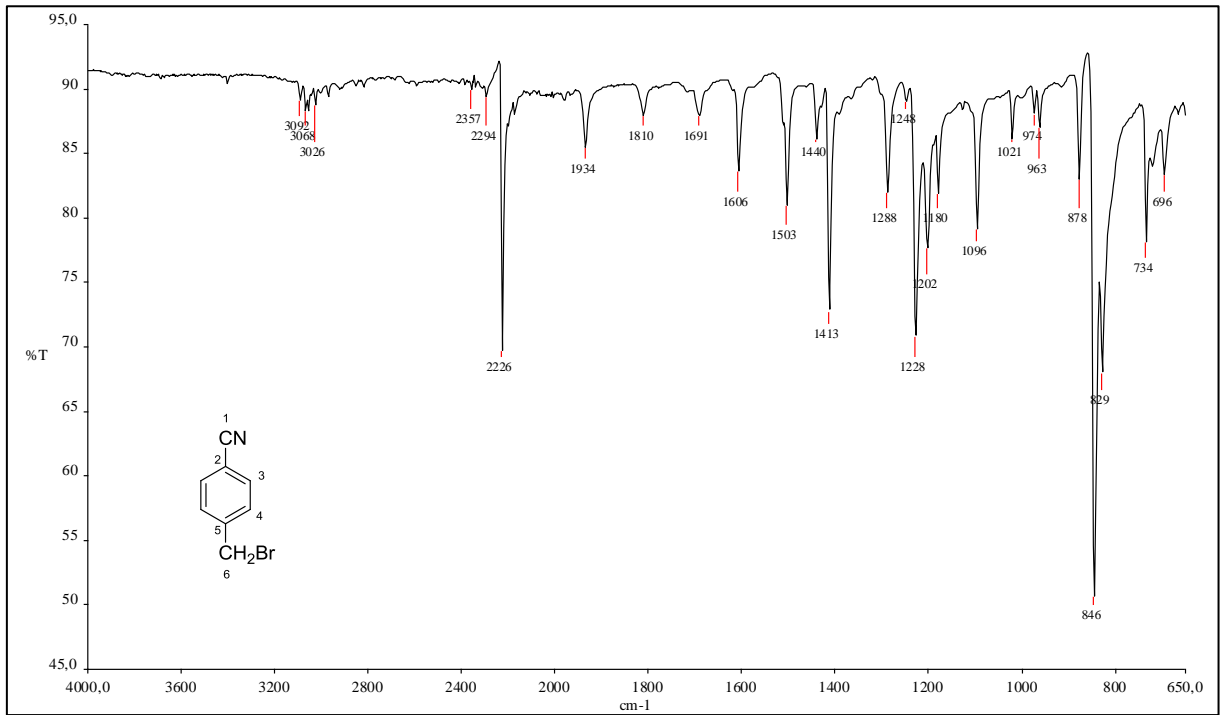


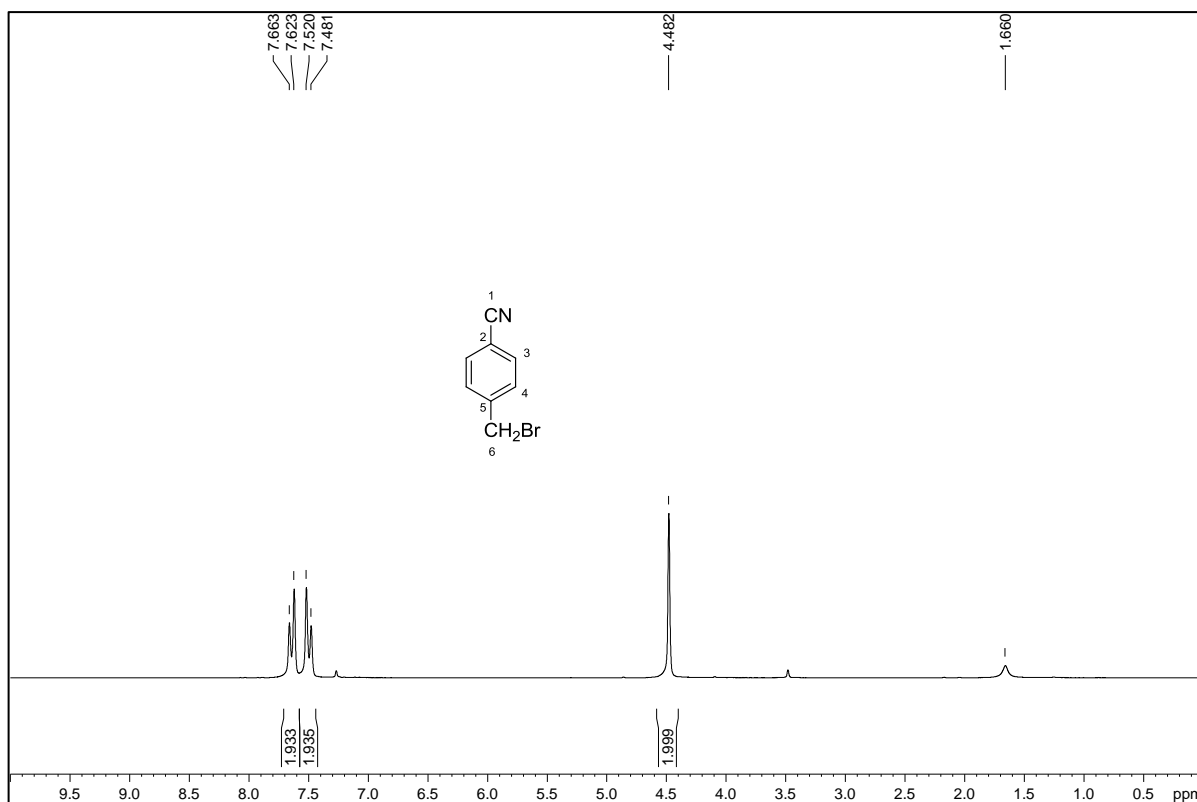
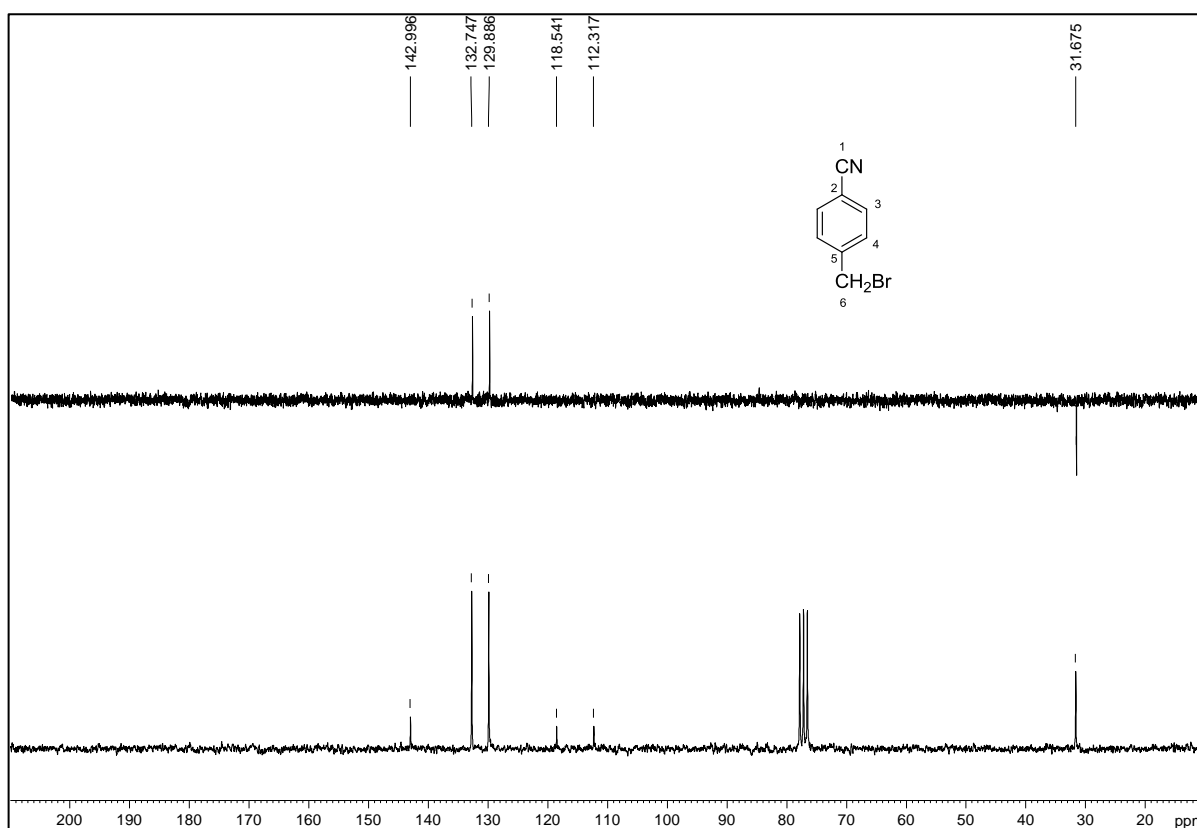
Figura A.53 - Espectro de RMN de ^1H de 9 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.54 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 9 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.55 - Espectro no infravermelho de 10.

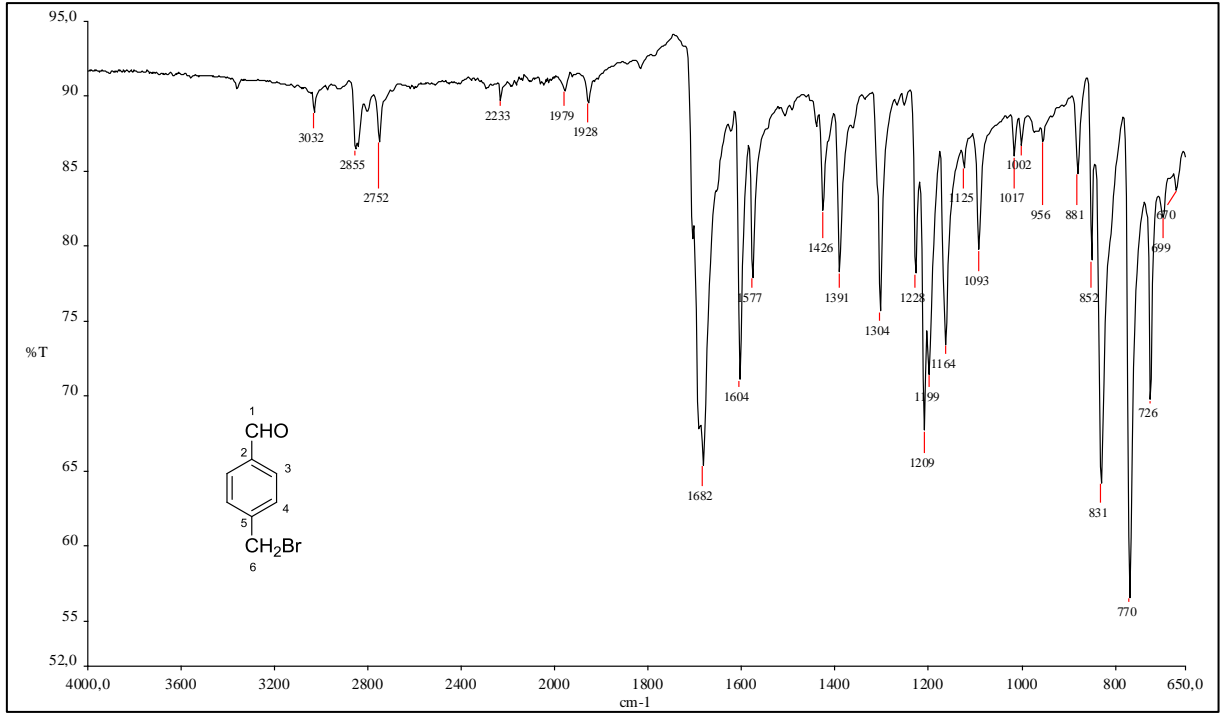
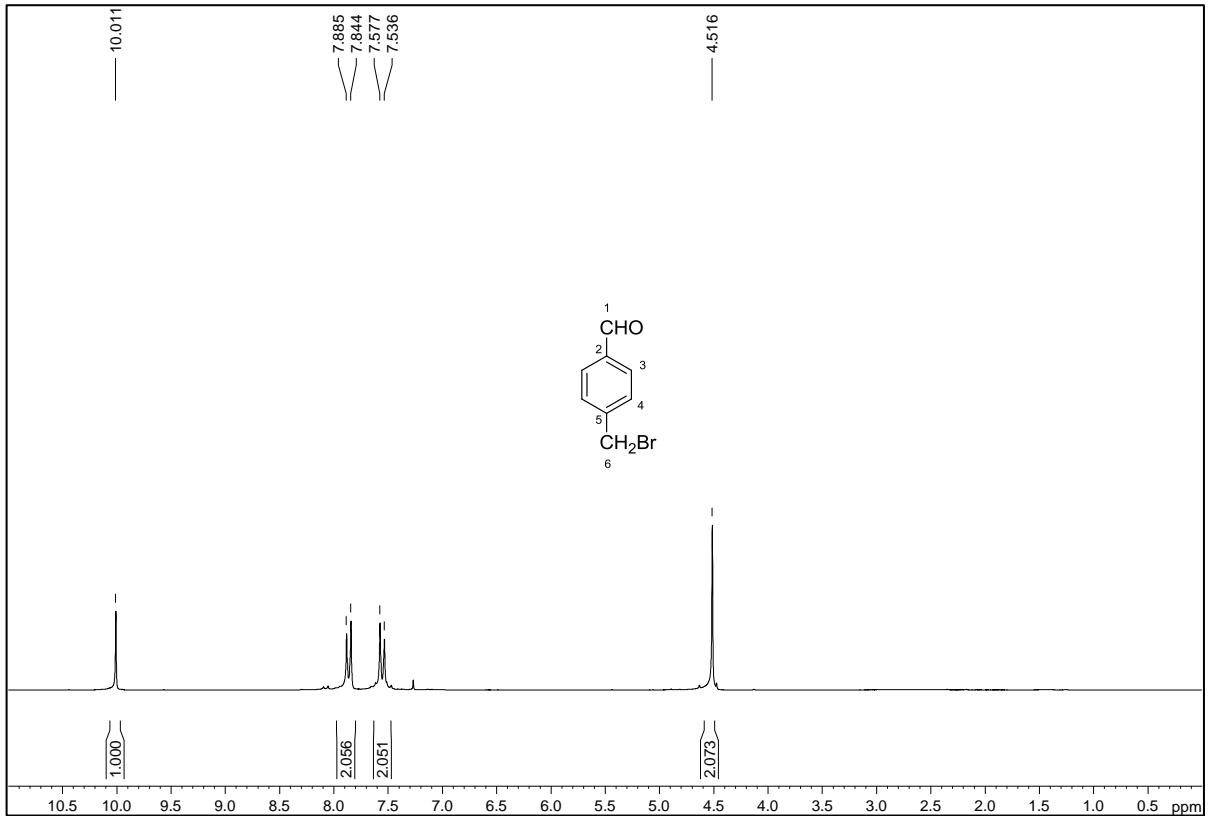
Figura A.56 - Espectro de RMN de ¹H de 10 (200 MHz, CDCl₃).

Figura A.57 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 10 (50 MHz, CDCl_3).

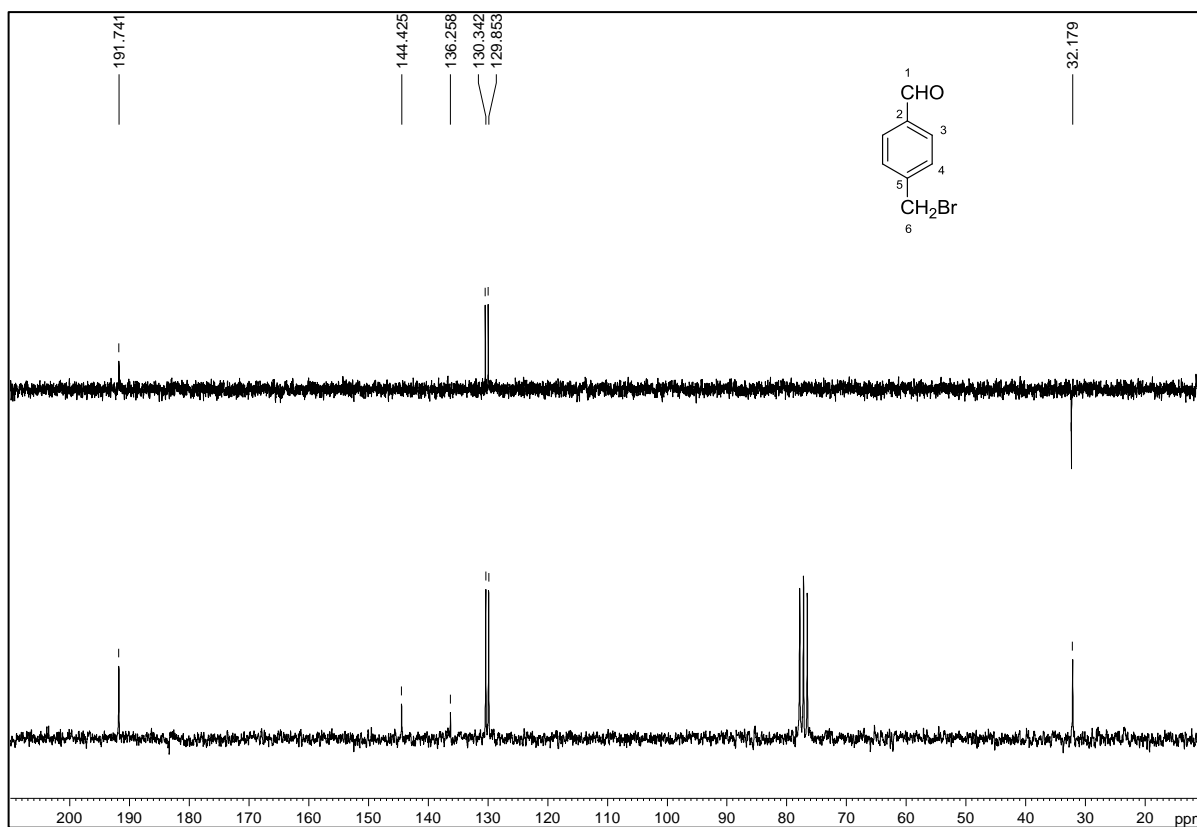


Figura A.58 - Espectro no infravermelho de 11.

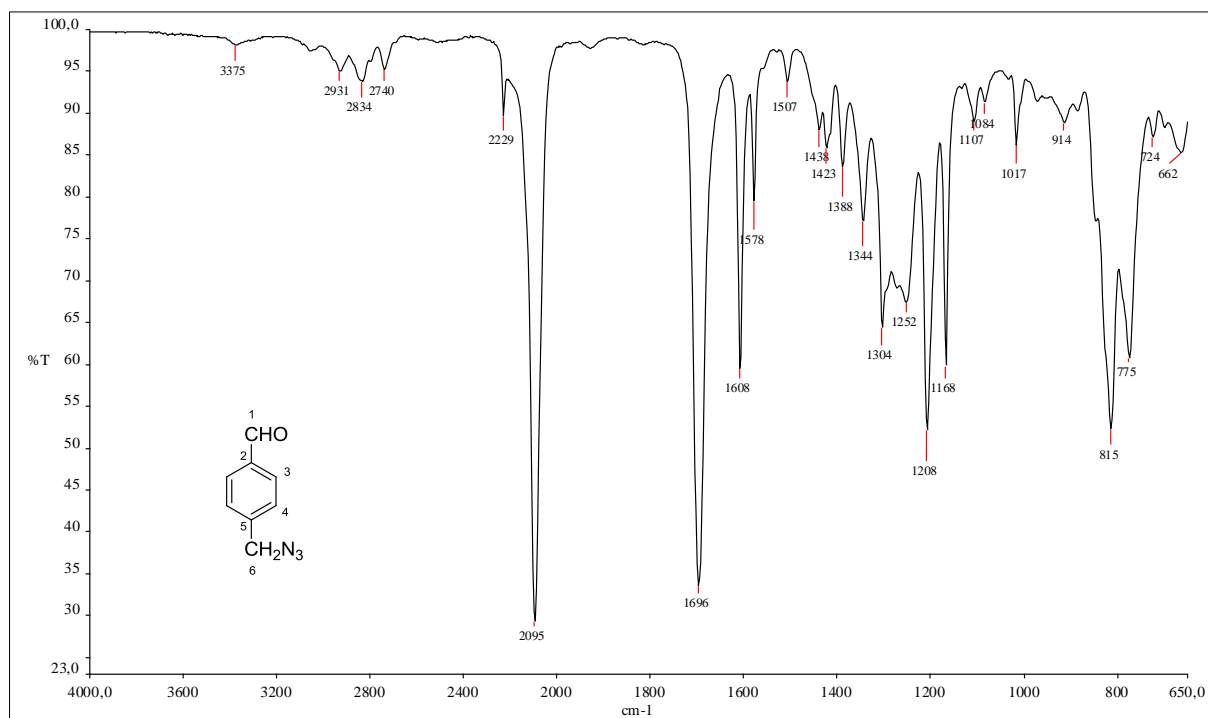


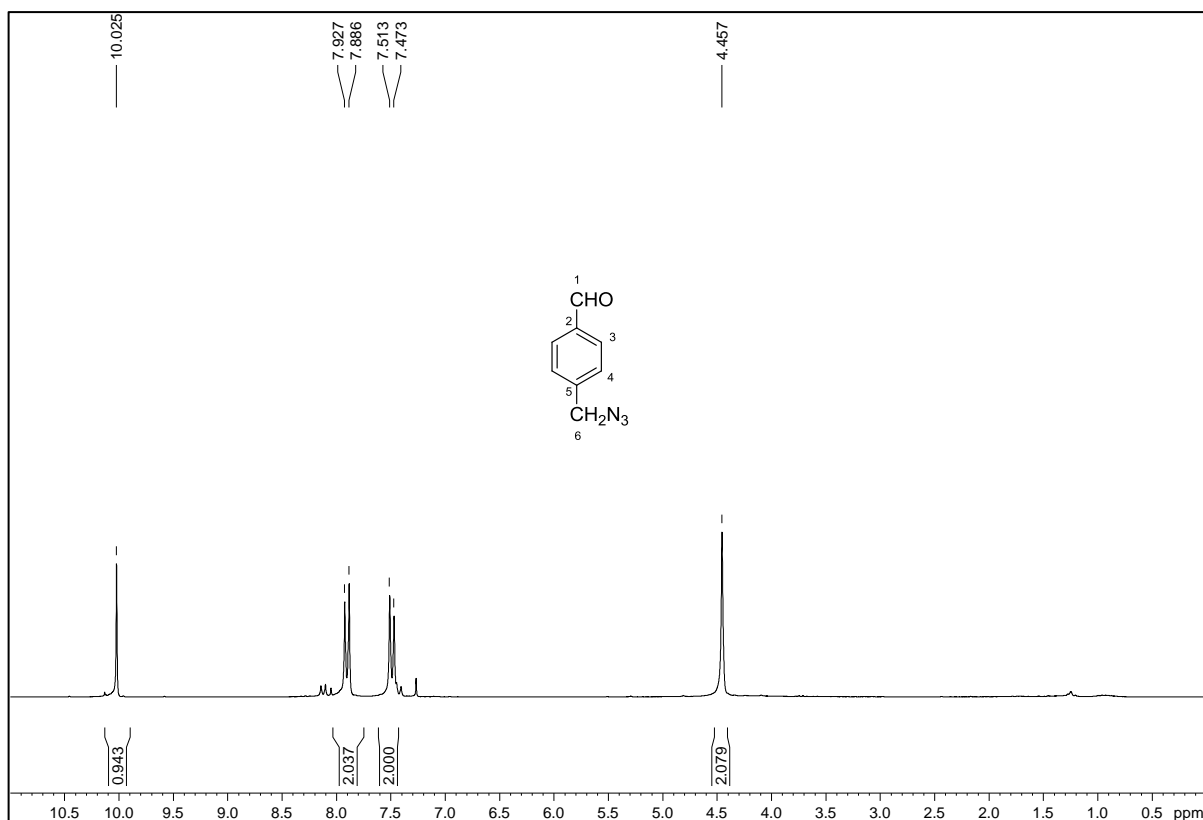
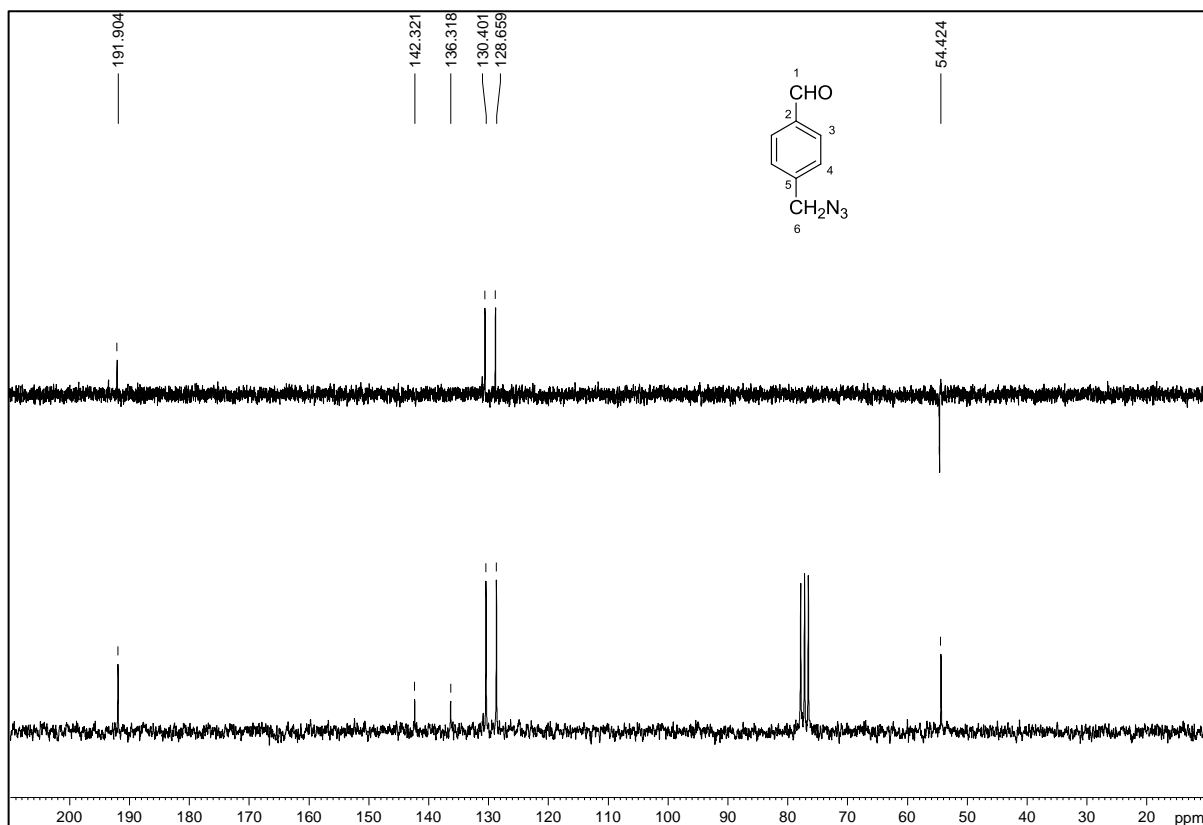
Figura A.59 - Espectro de RMN de ^1H de 11 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.60 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 11 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.61 - Espectro no infravermelho de 11b.

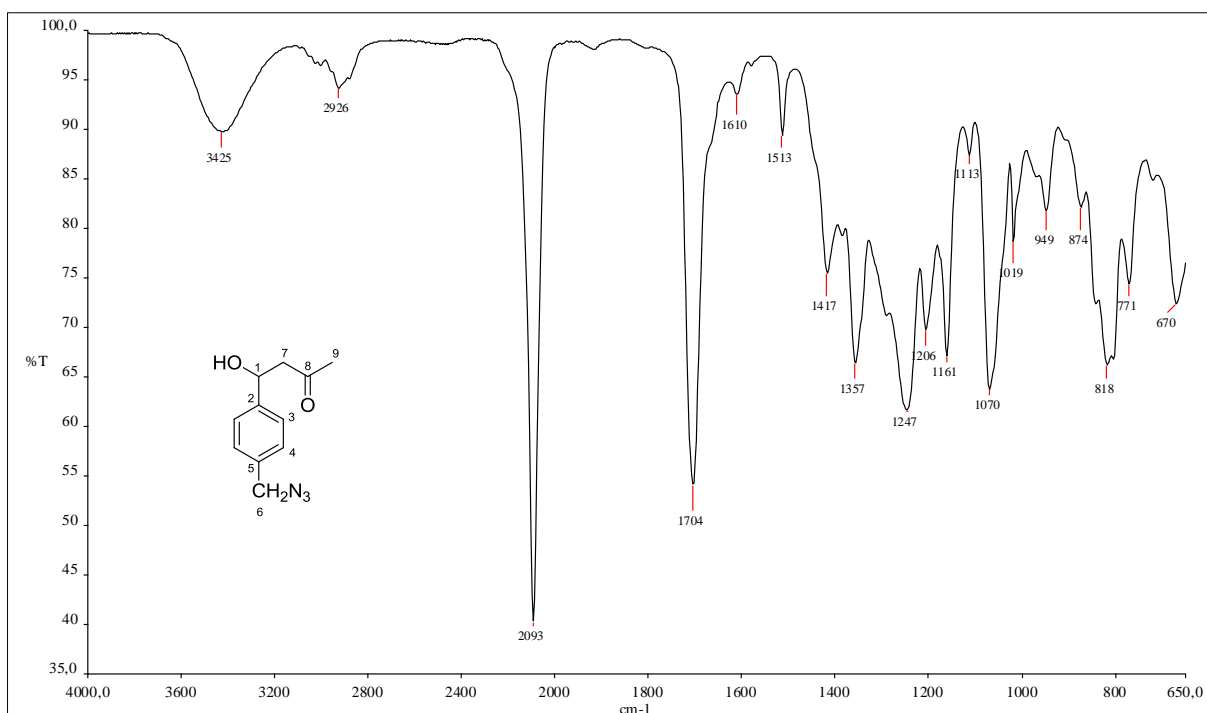
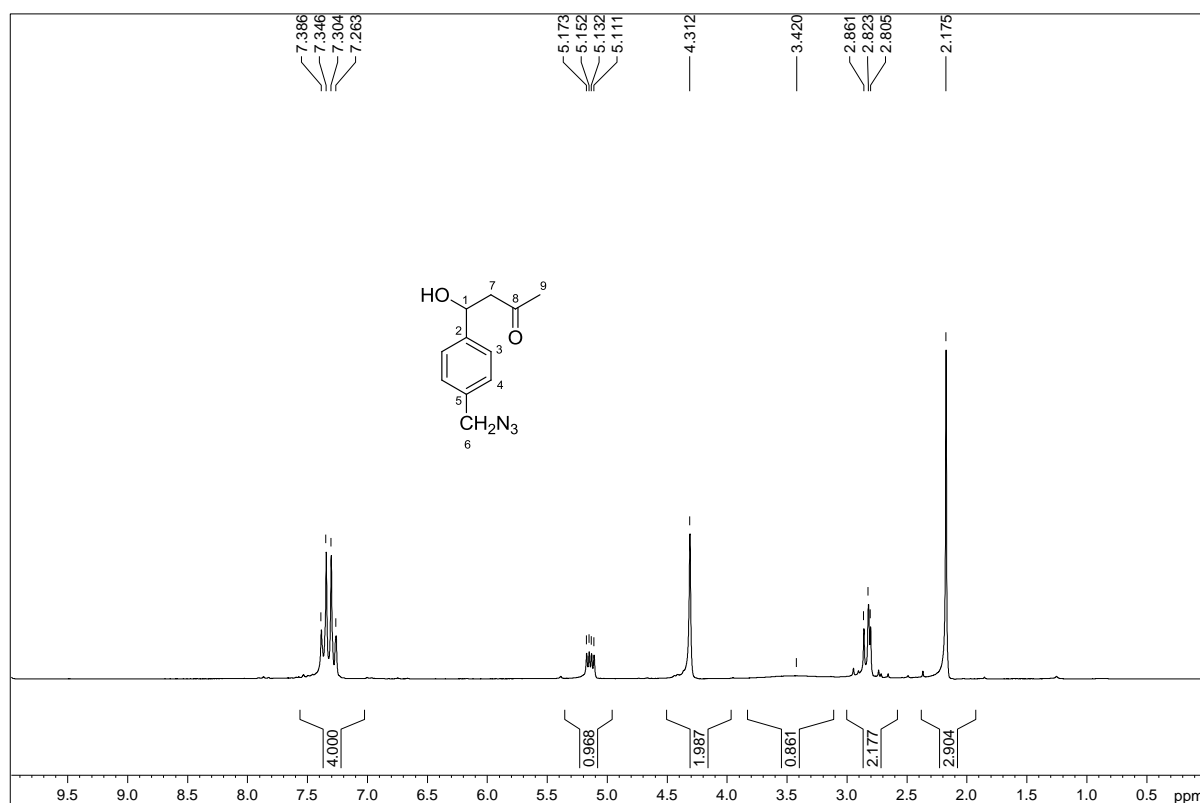
Figura A.62 - Espectro de RMN de ¹H de 11b (200 MHz, CDCl₃).

Figura A.63 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 11b (50 MHz, CDCl_3).

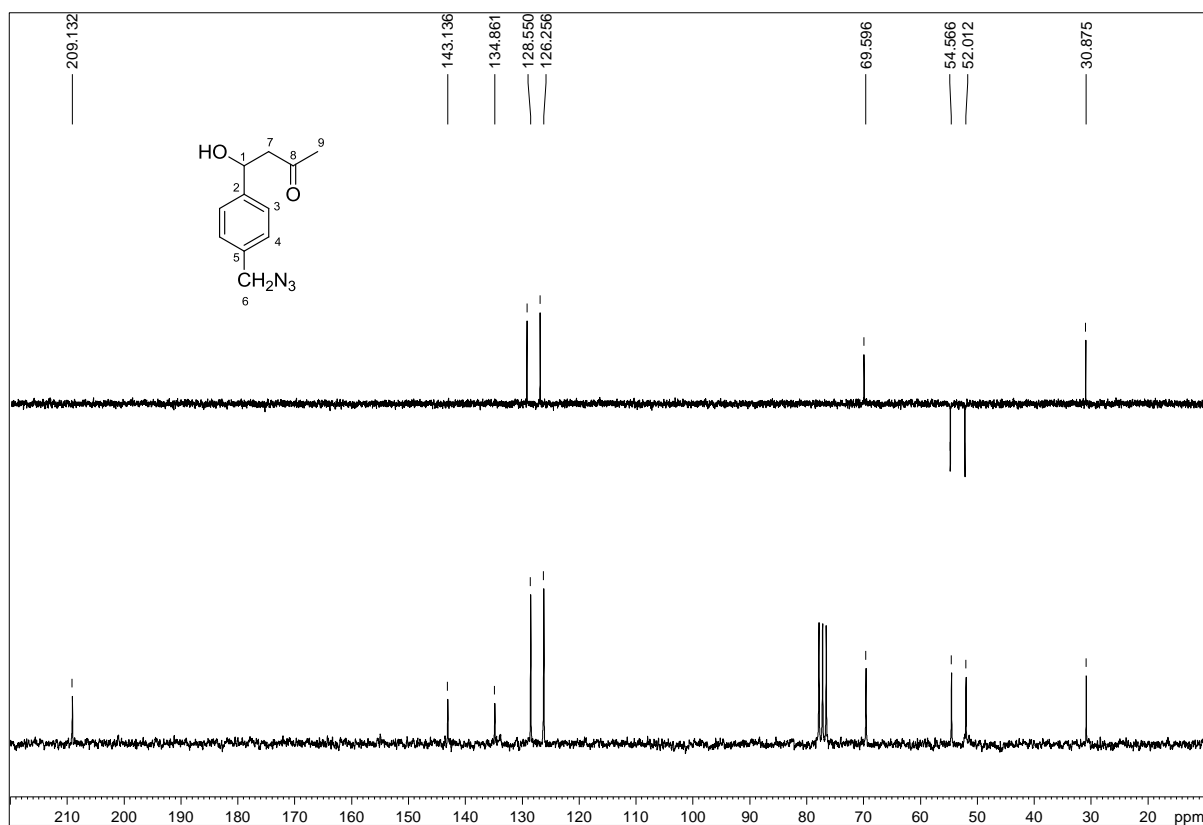


Figura A.64 - Espectro no infravermelho de 12.

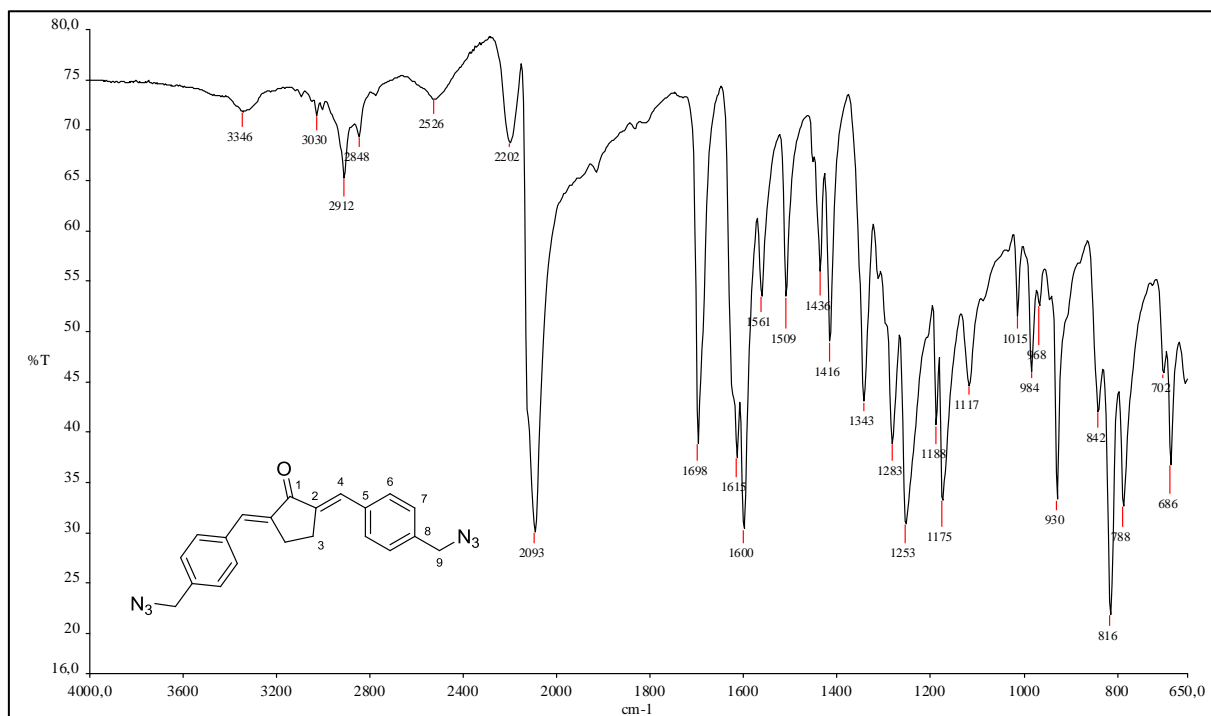


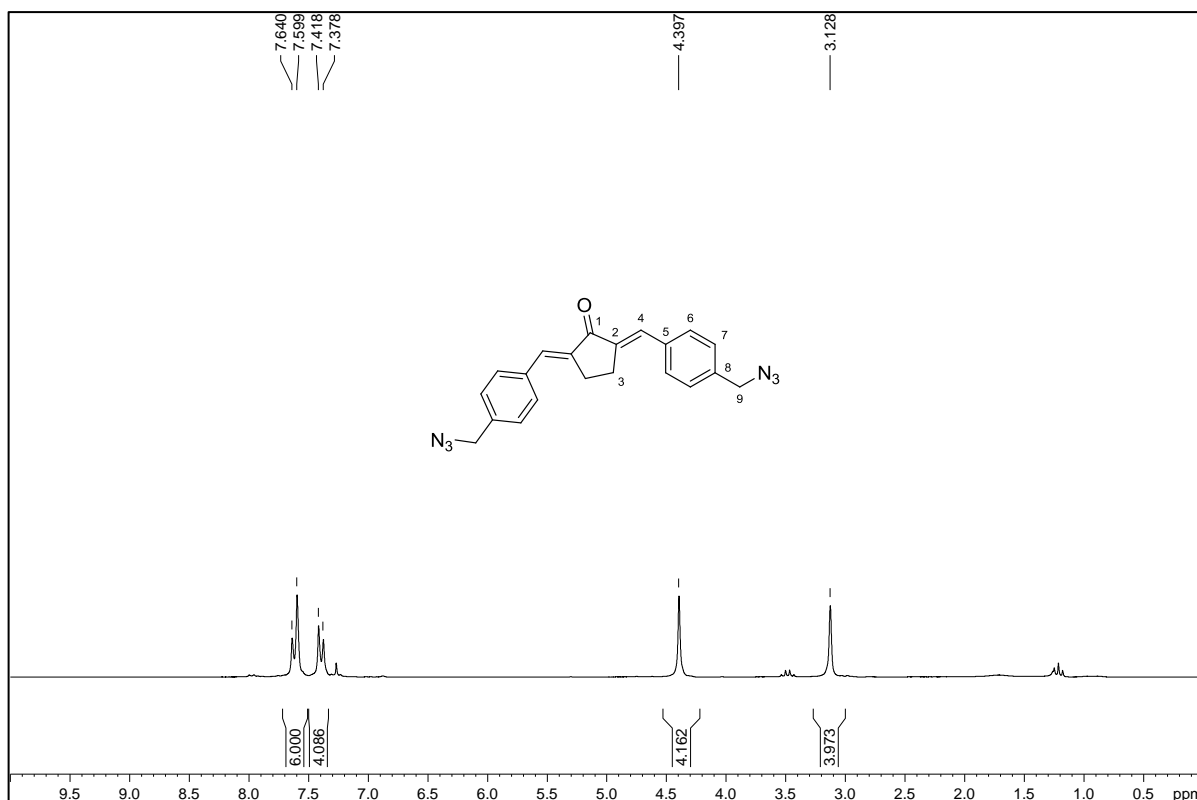
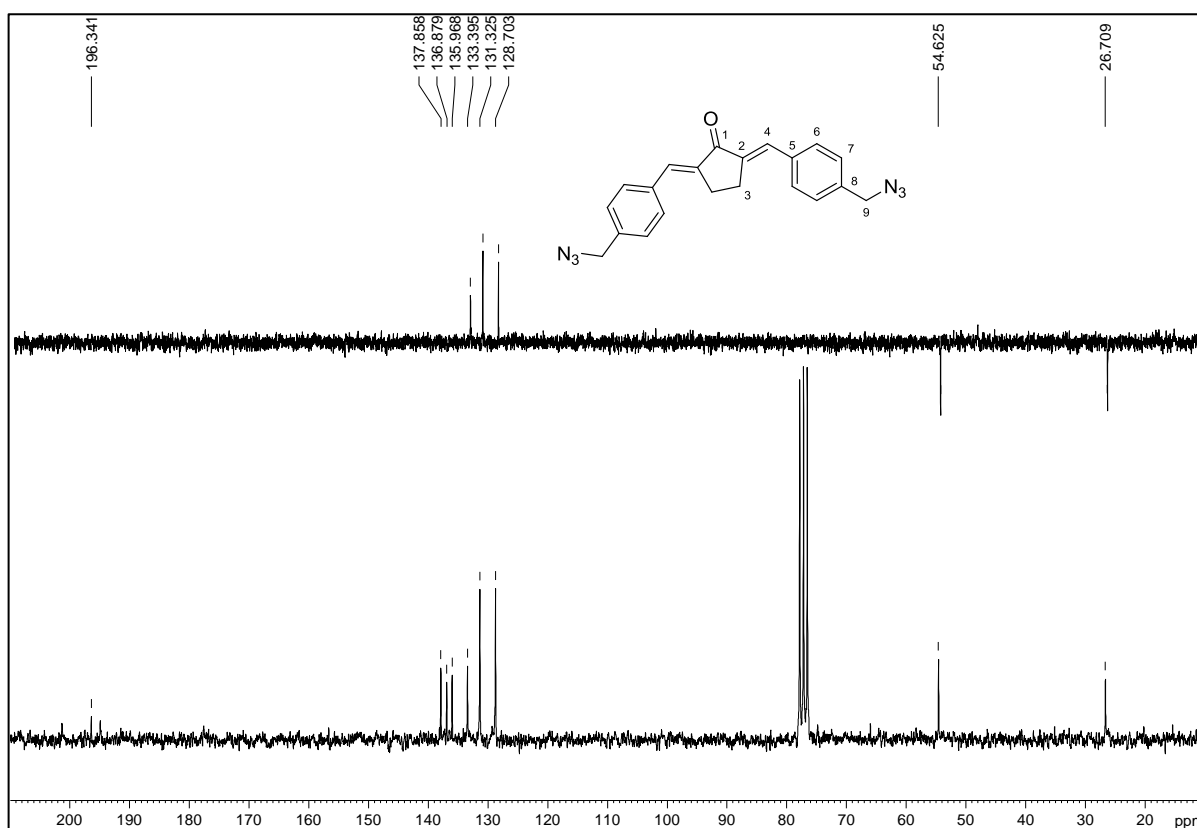
Figura A.65 - Espectro de RMN de ^1H de 12 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.66 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 12 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.67 - Espectro no infravermelho de 13.

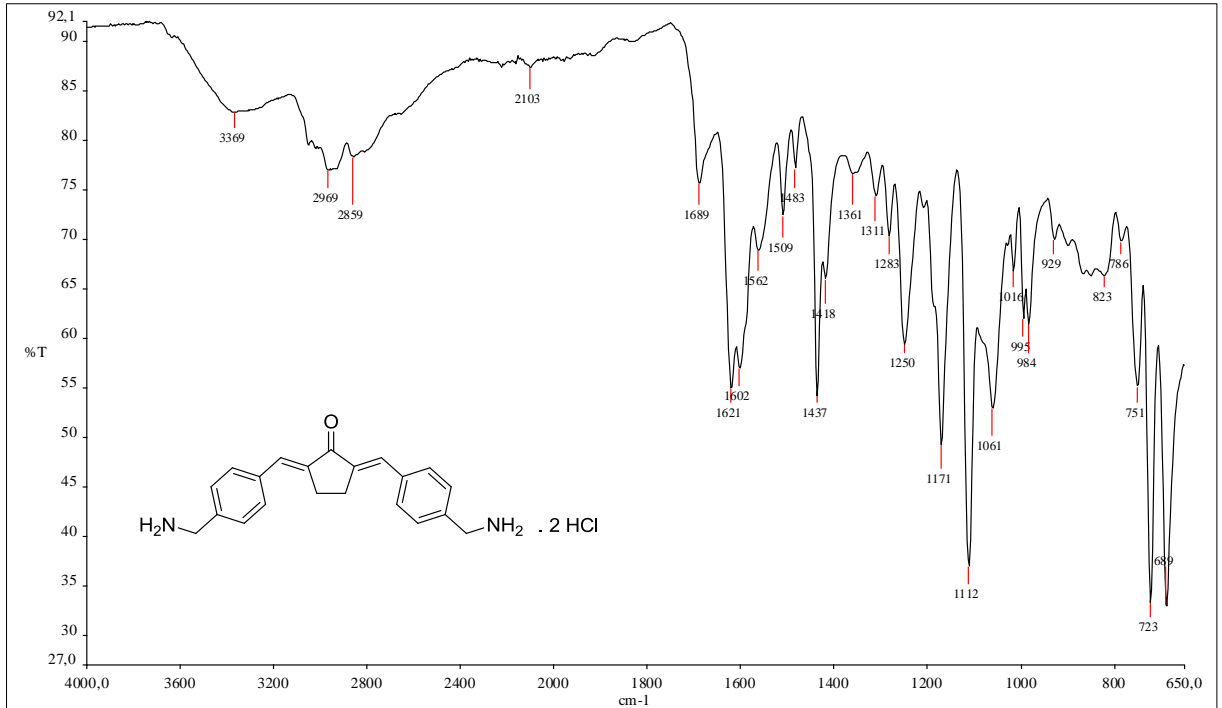


Figura A.68 - Espectro no infravermelho de 14.

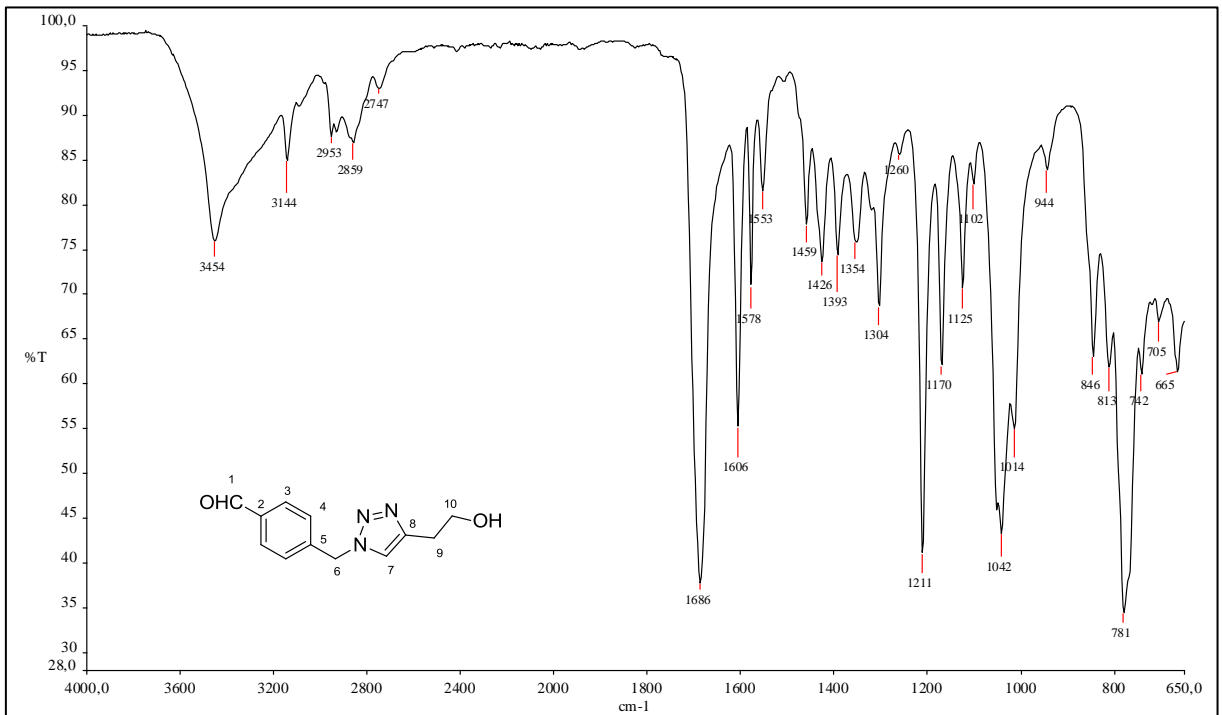


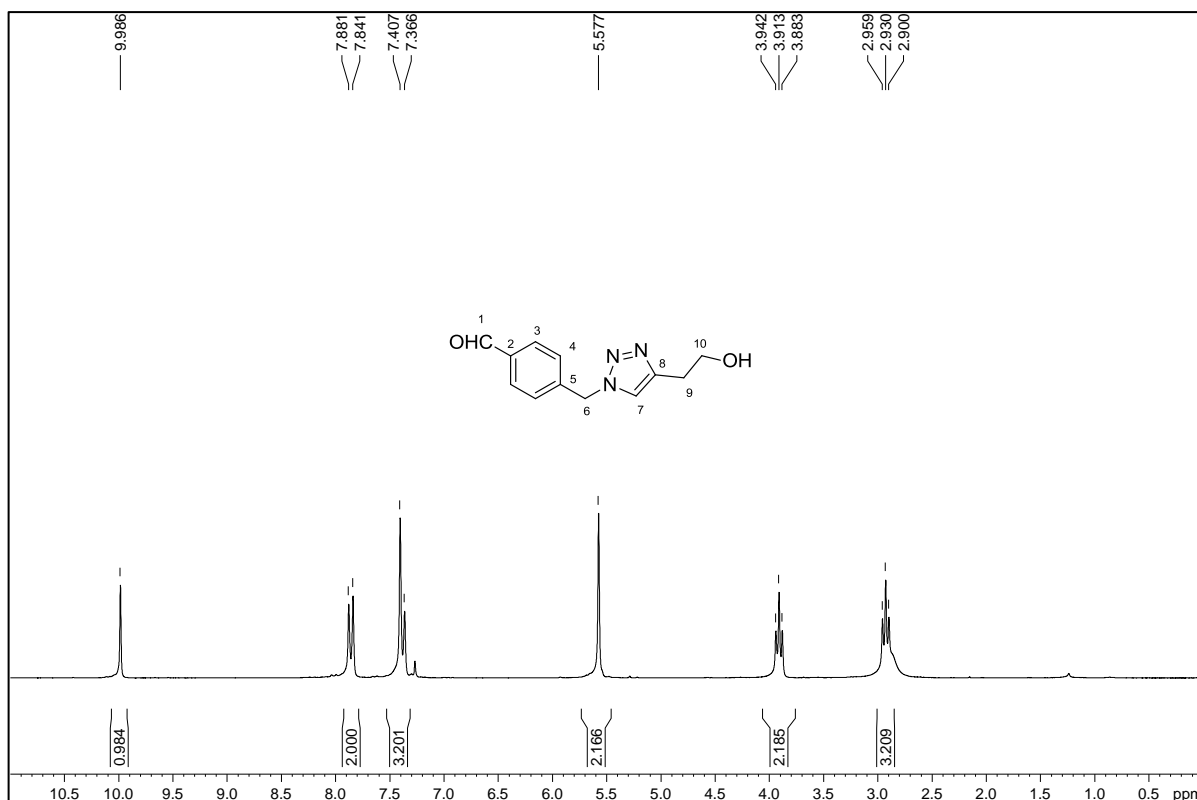
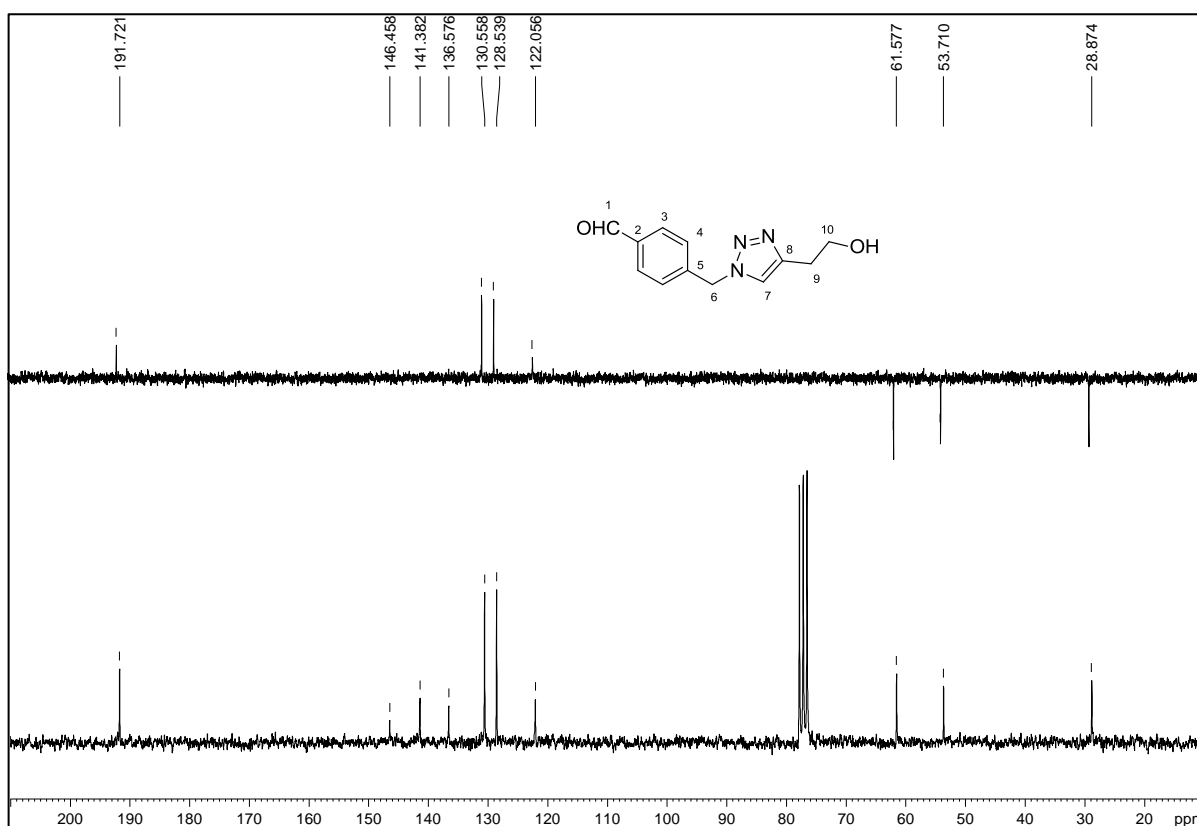
Figura A.69 - Espectro de RMN de ^1H de 14 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.70 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 14 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.71 - Espectro no infravermelho de 15.

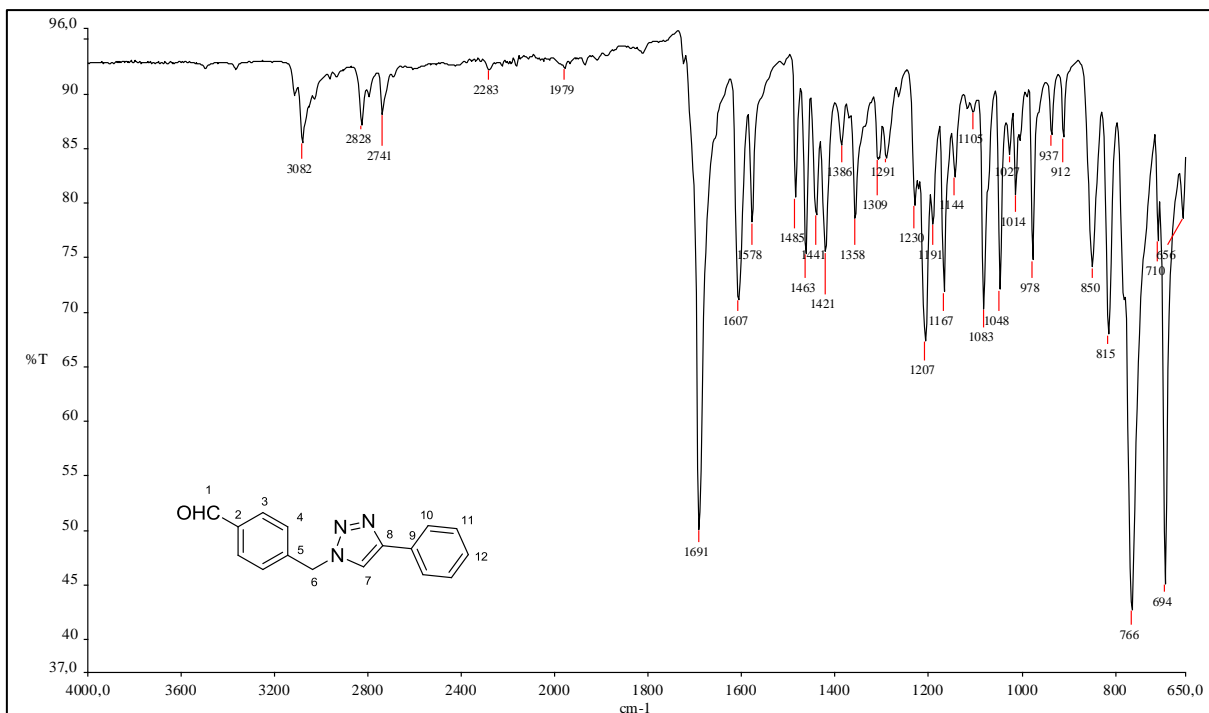
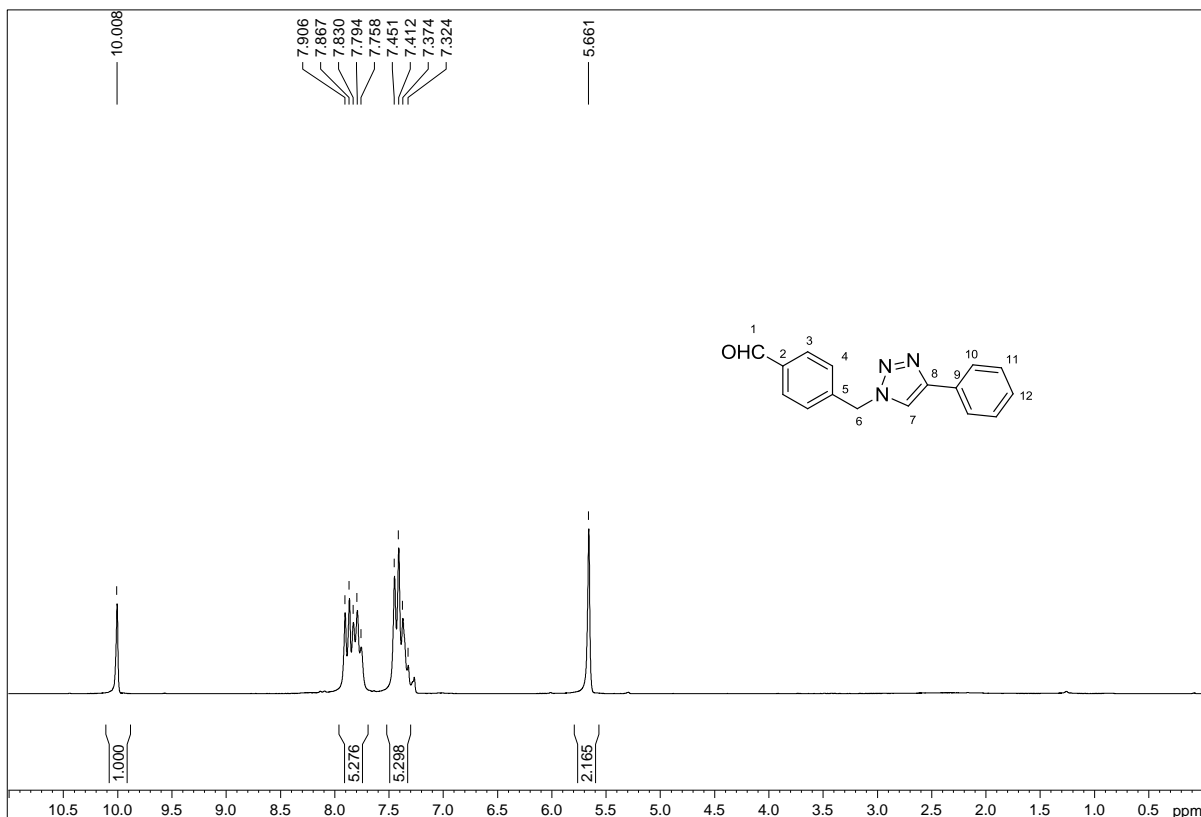
Figura A.72 - Espectro de RMN de ¹H de 15 (200 MHz, CDCl₃).

Figura A.73 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 15 (50 MHz, CDCl_3).

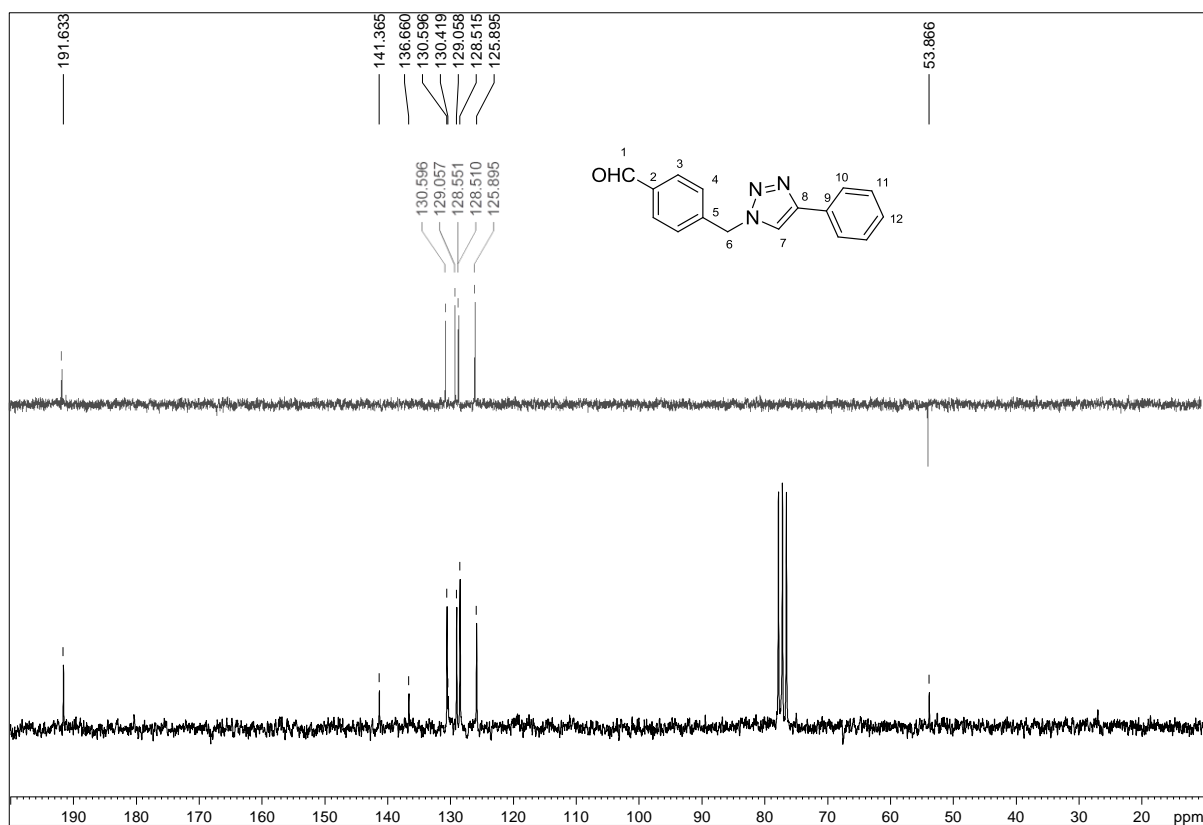


Figura A.74 - Espectro no infravermelho de 16.

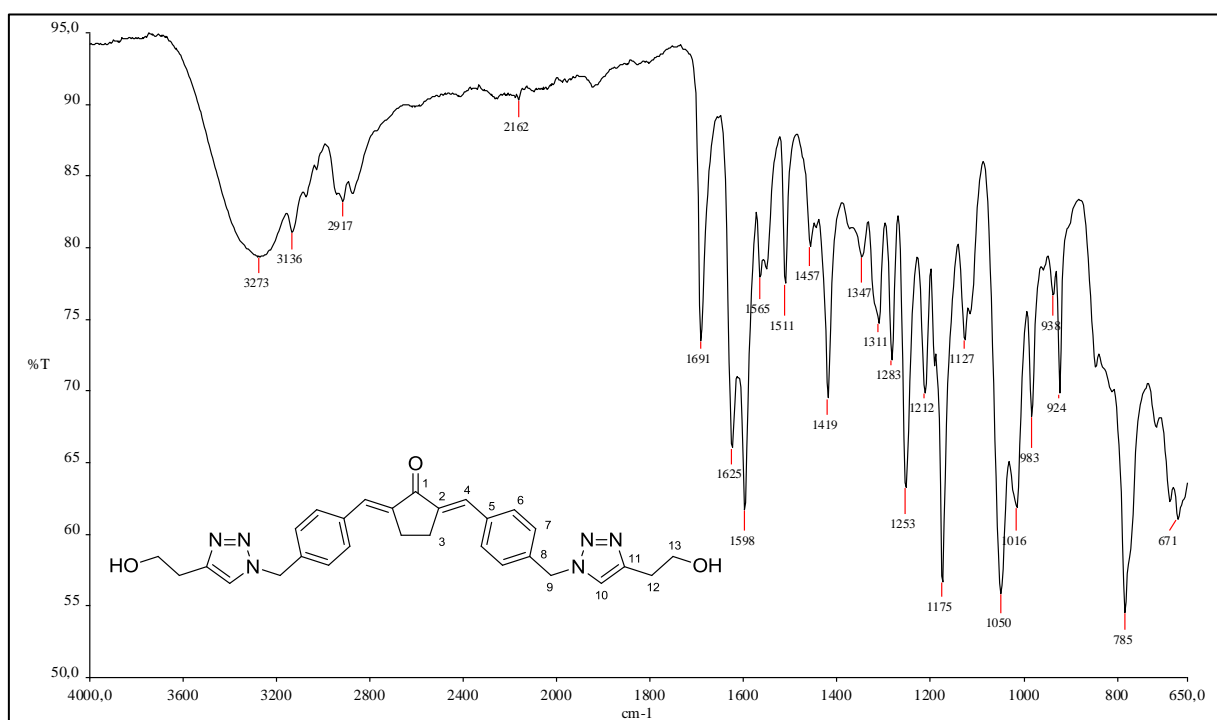


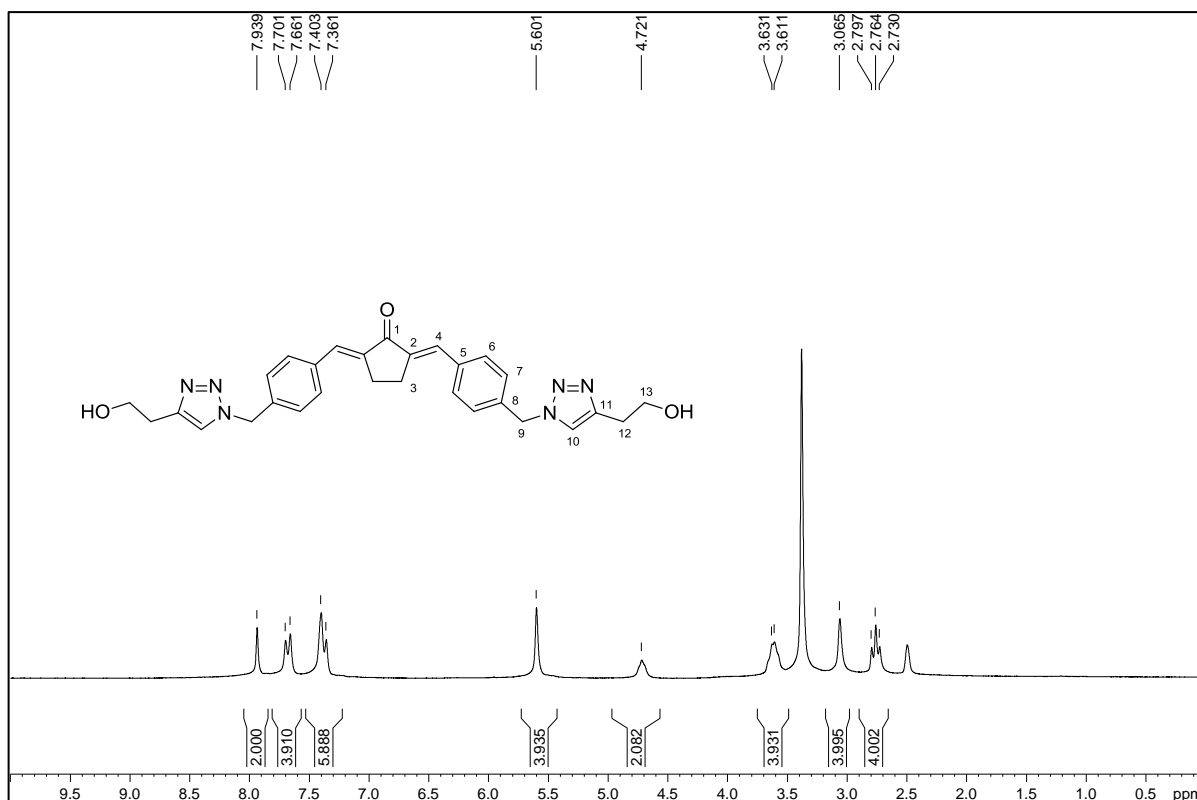
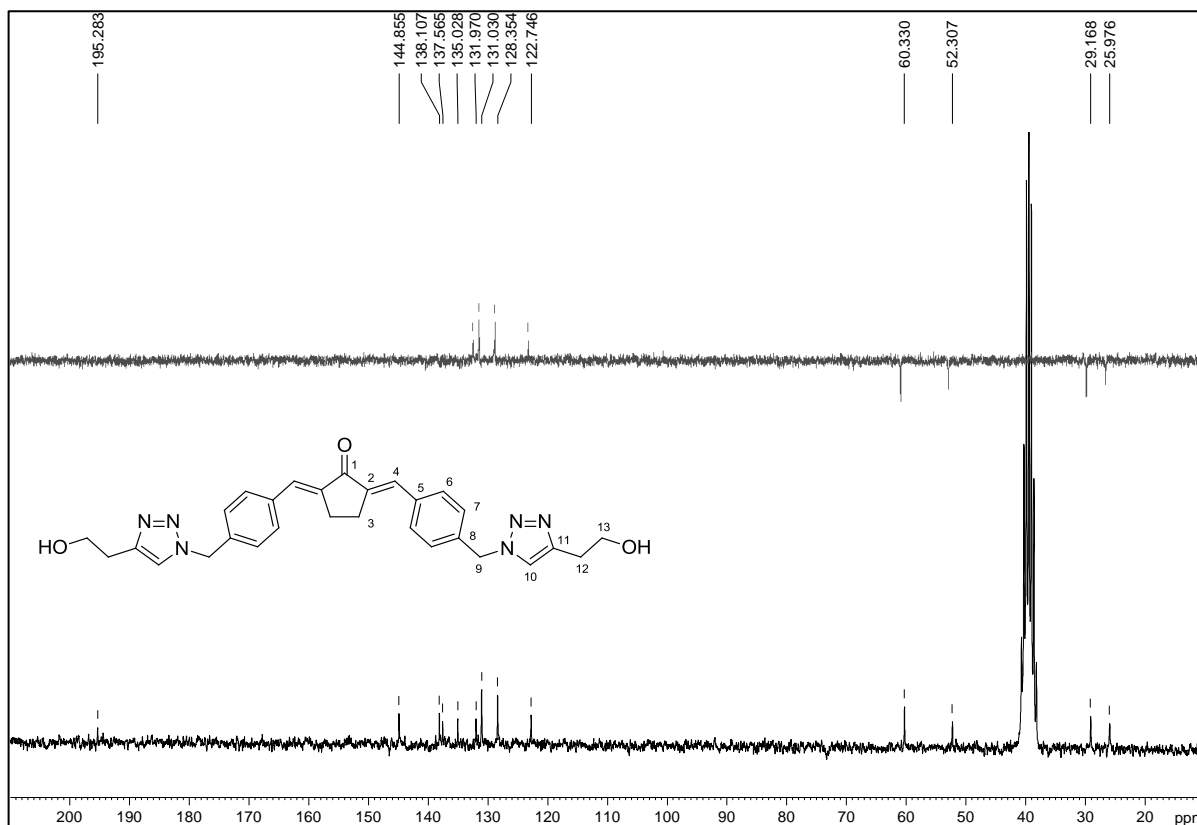
Figura A.75 - Espectro de RMN de ^1H de 16 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.76 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 16 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.77 - Espectro no infravermelho de 17.

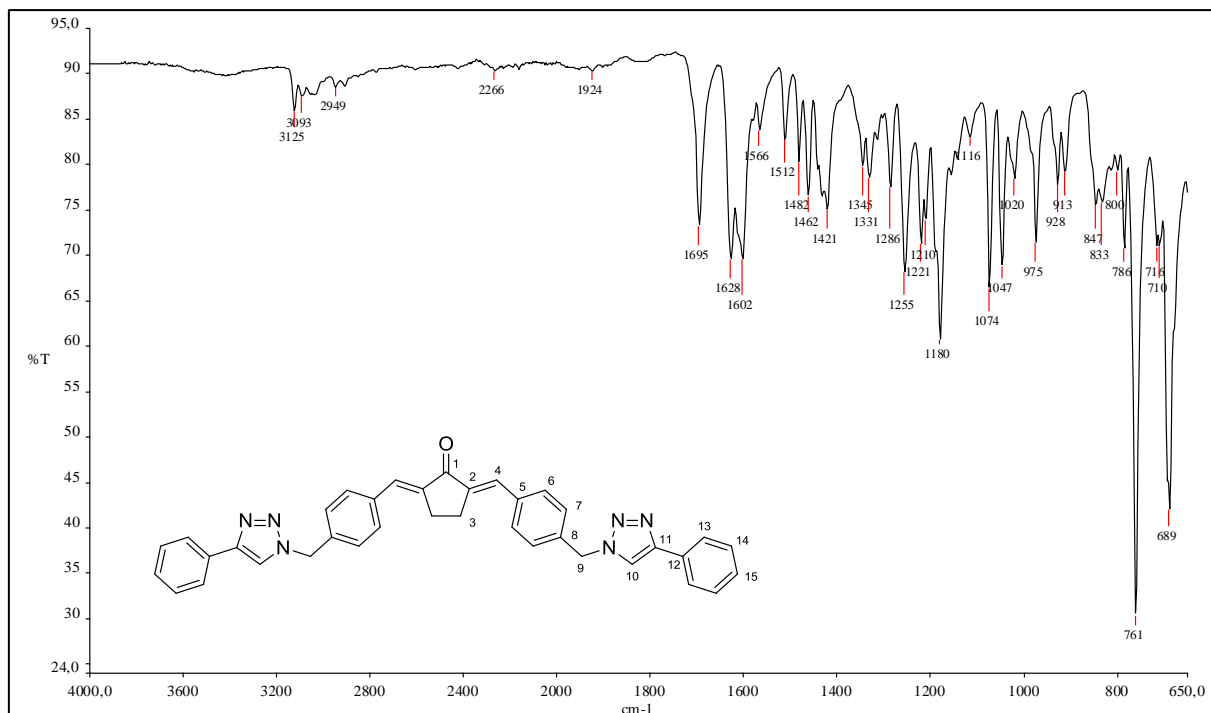


Figura A.78 - Espectro no infravermelho de 18.

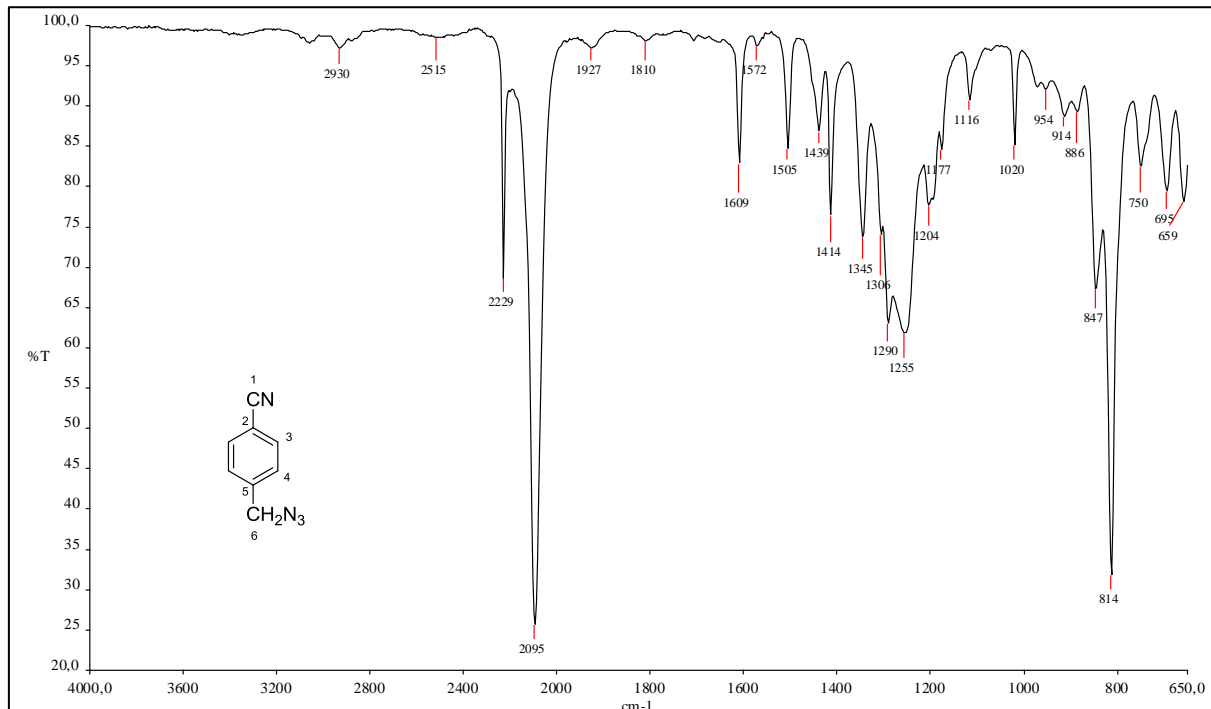


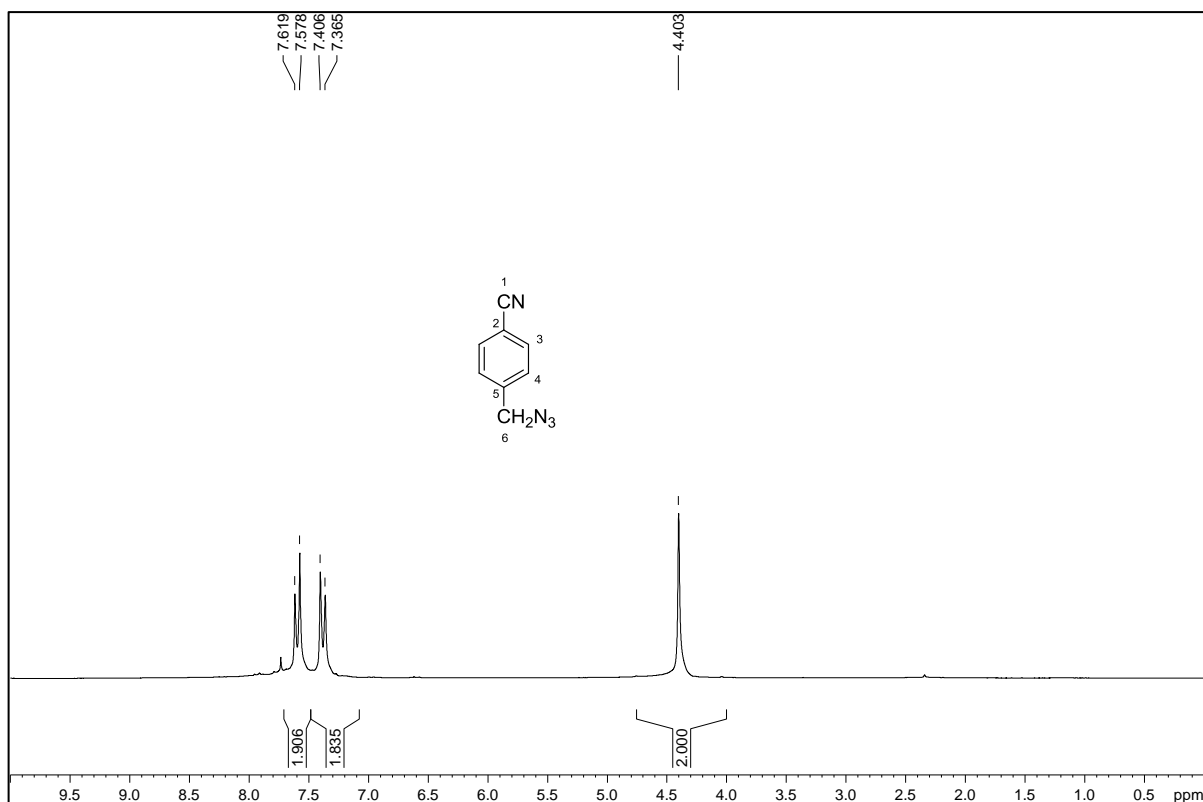
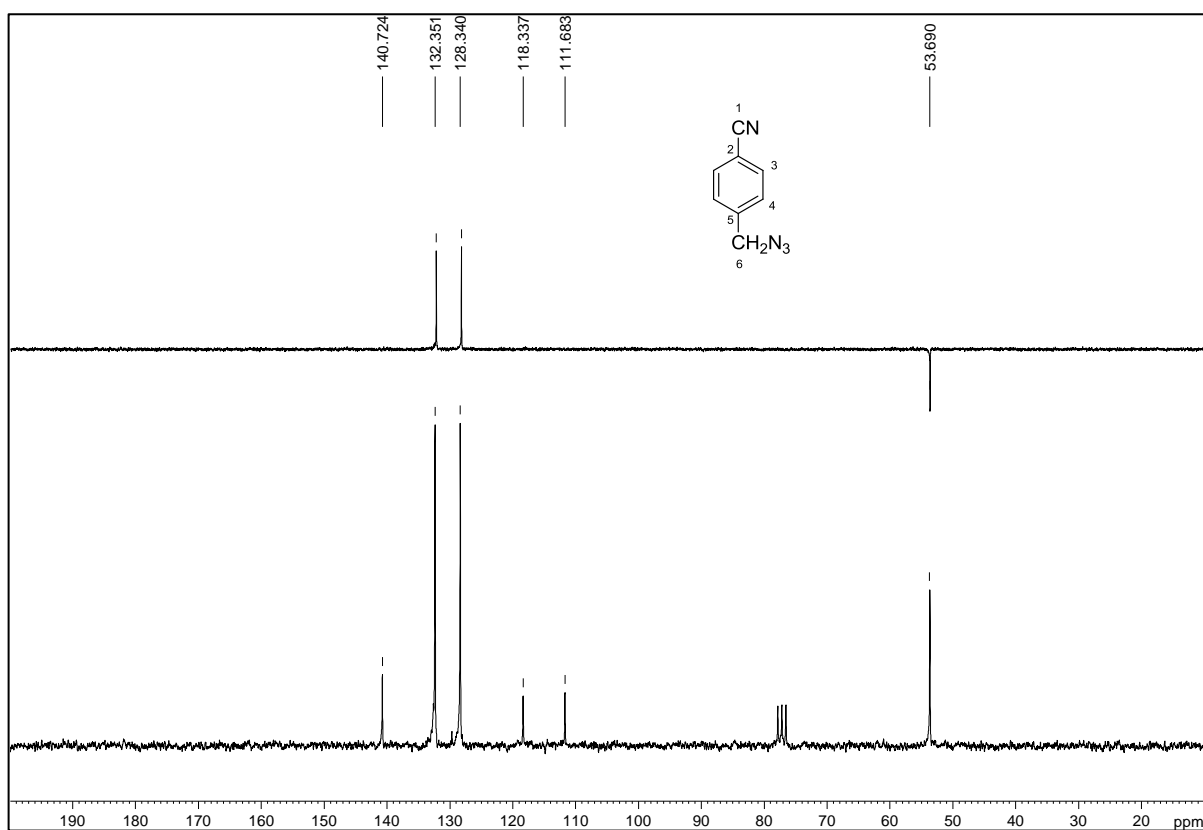
Figura A.79 - Espectro de RMN de ^1H de 18 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.80 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 18 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.81 - Espectro no infravermelho de 19.

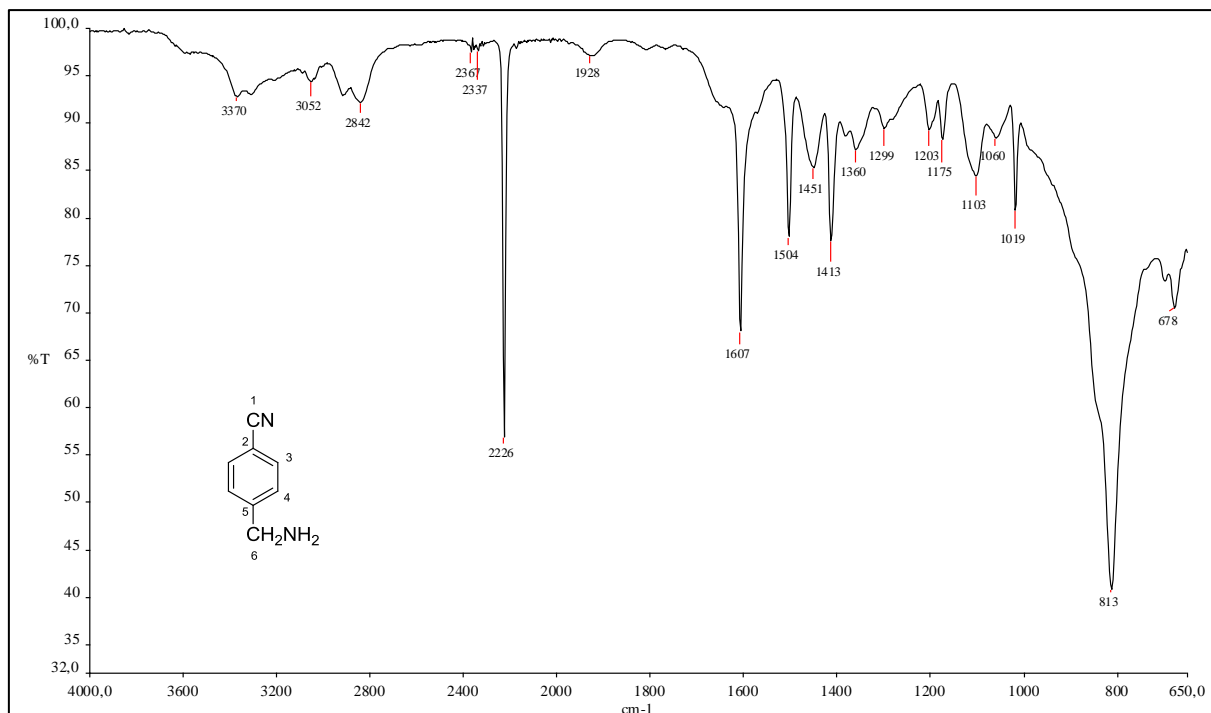


Figura A.82 - Espectro no infravermelho de 20.

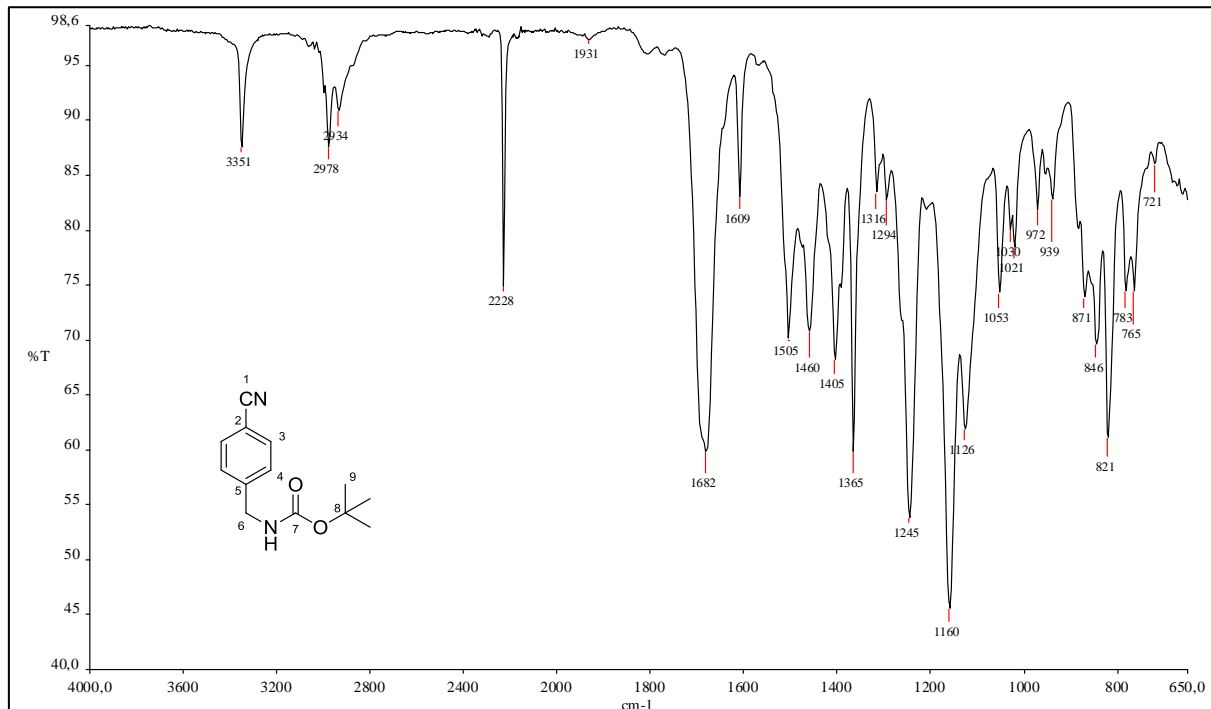


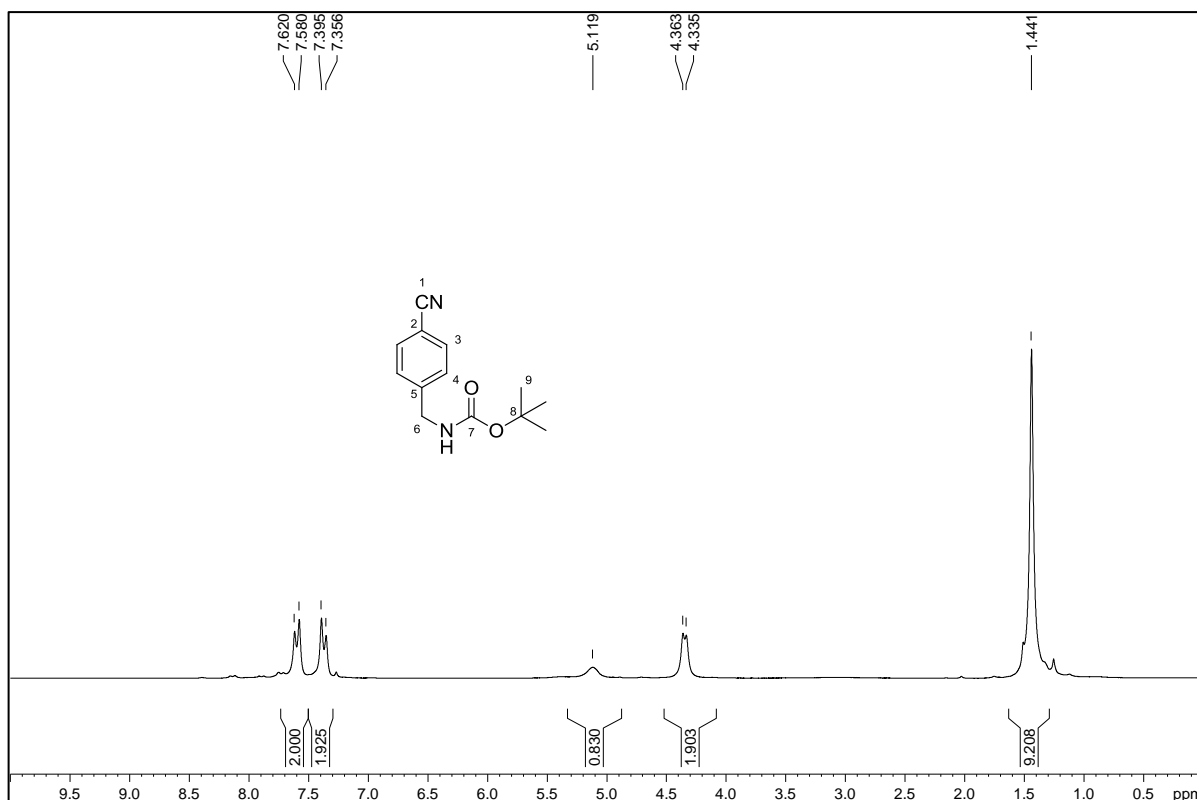
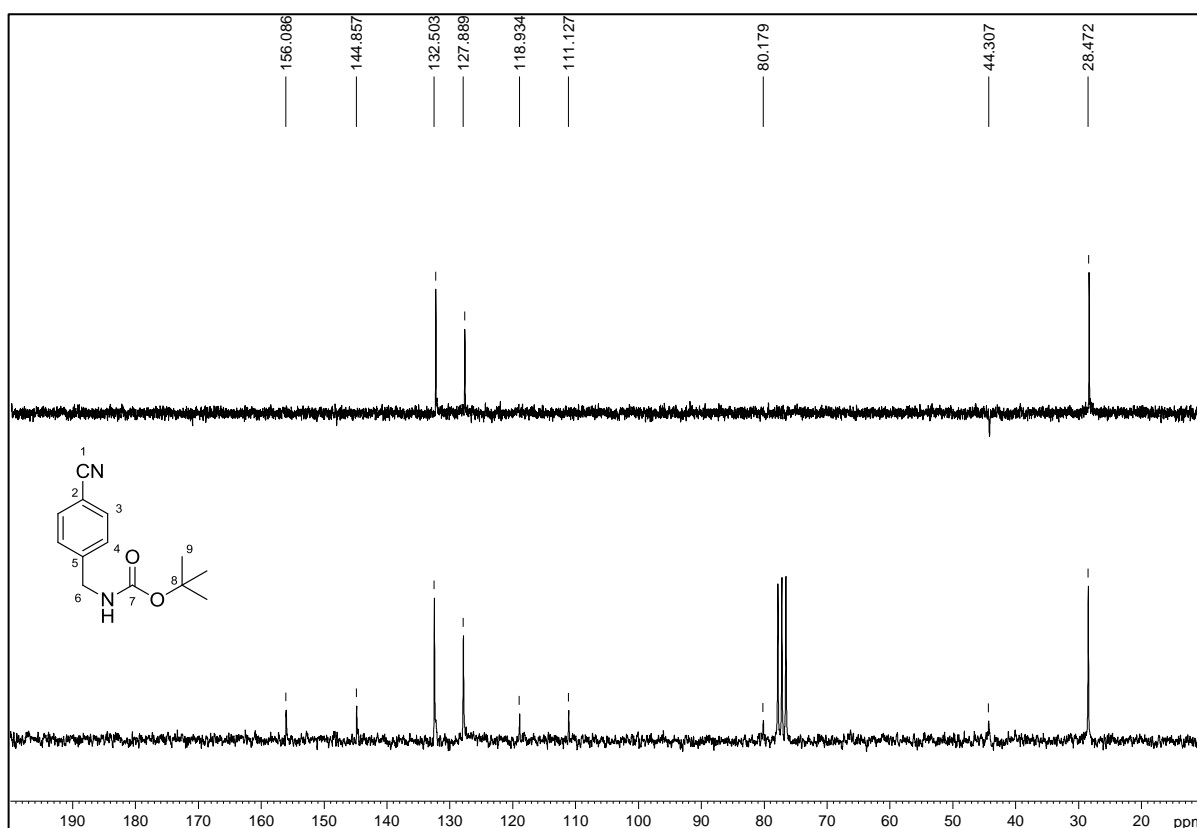
Figura A.83 - Espectro de RMN de ^1H de 20 (200 MHz, CDCl_3).Figura A.84 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20 (50 MHz, CDCl_3).

Figura A.85 - Espectro no infravermelho de 20b.

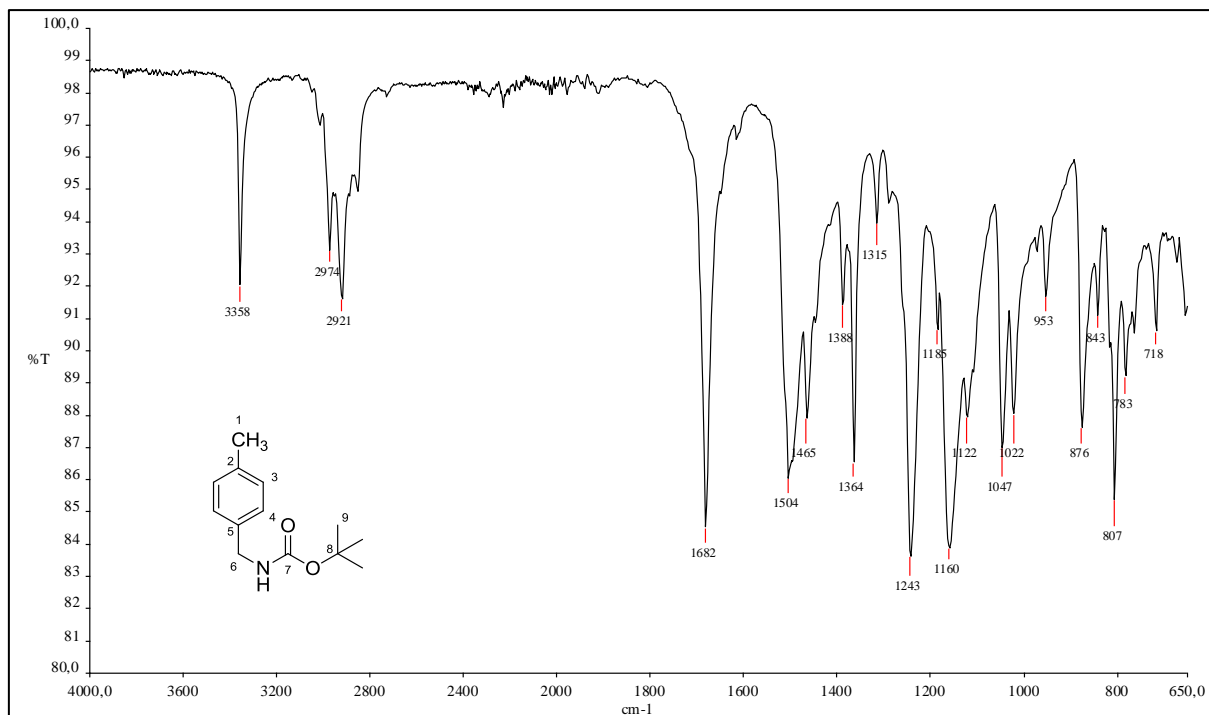
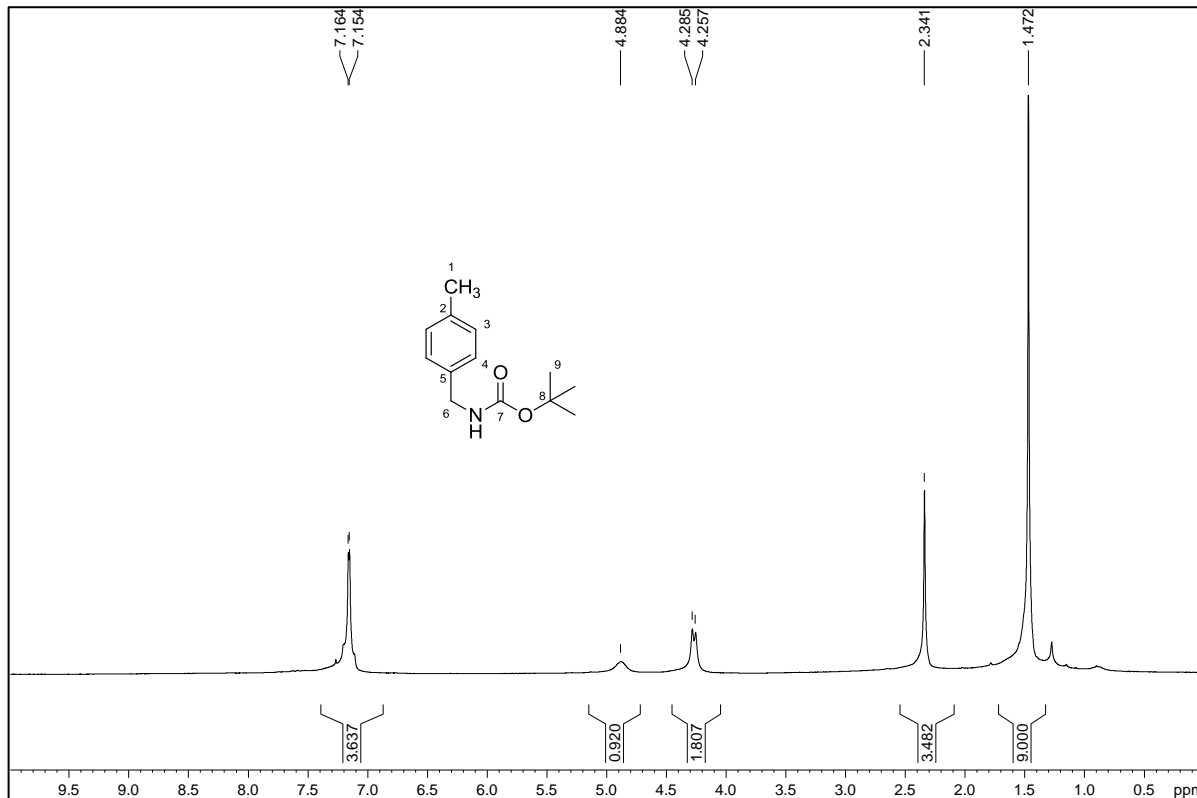
Figura A.86 - Espectro de RMN de ^1H de 20b (200 MHz, CDCl_3).

Figura A.87 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20b (50 MHz, CDCl_3).

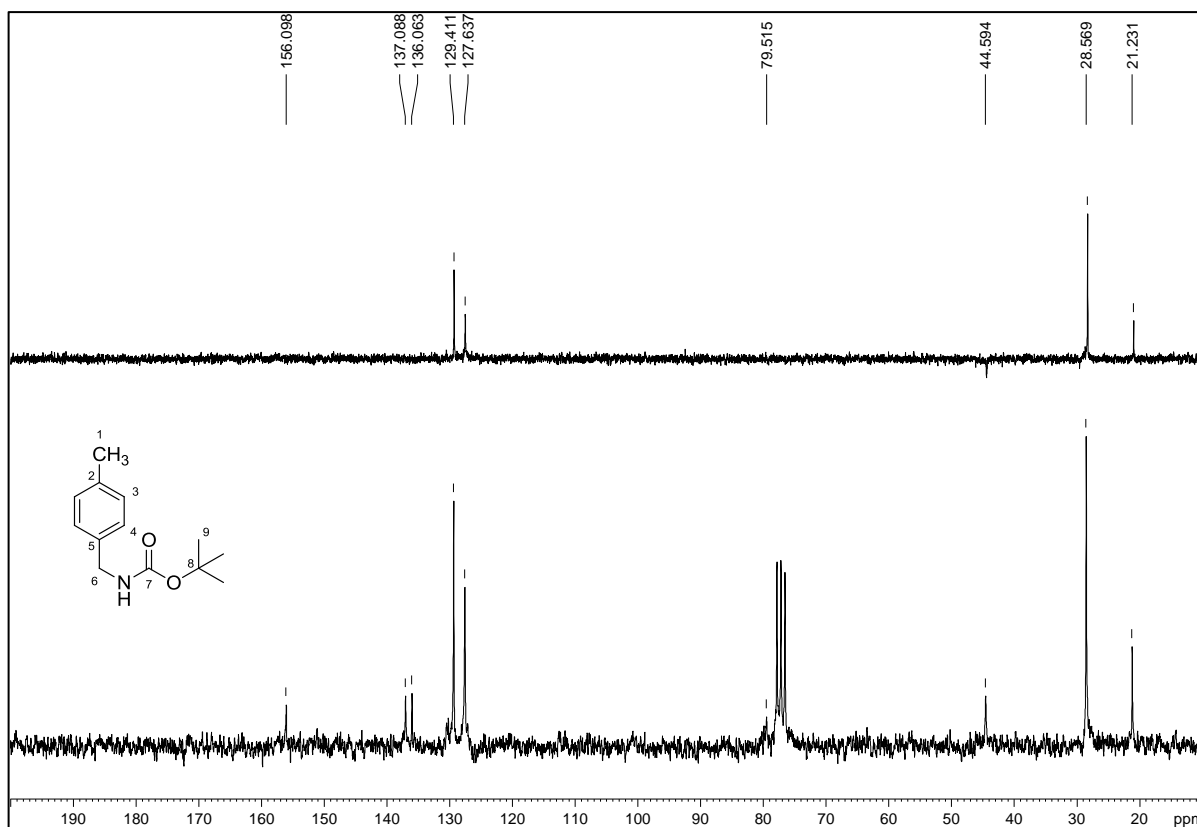


Figura A.88 - Espectro no infravermelho de 20c.

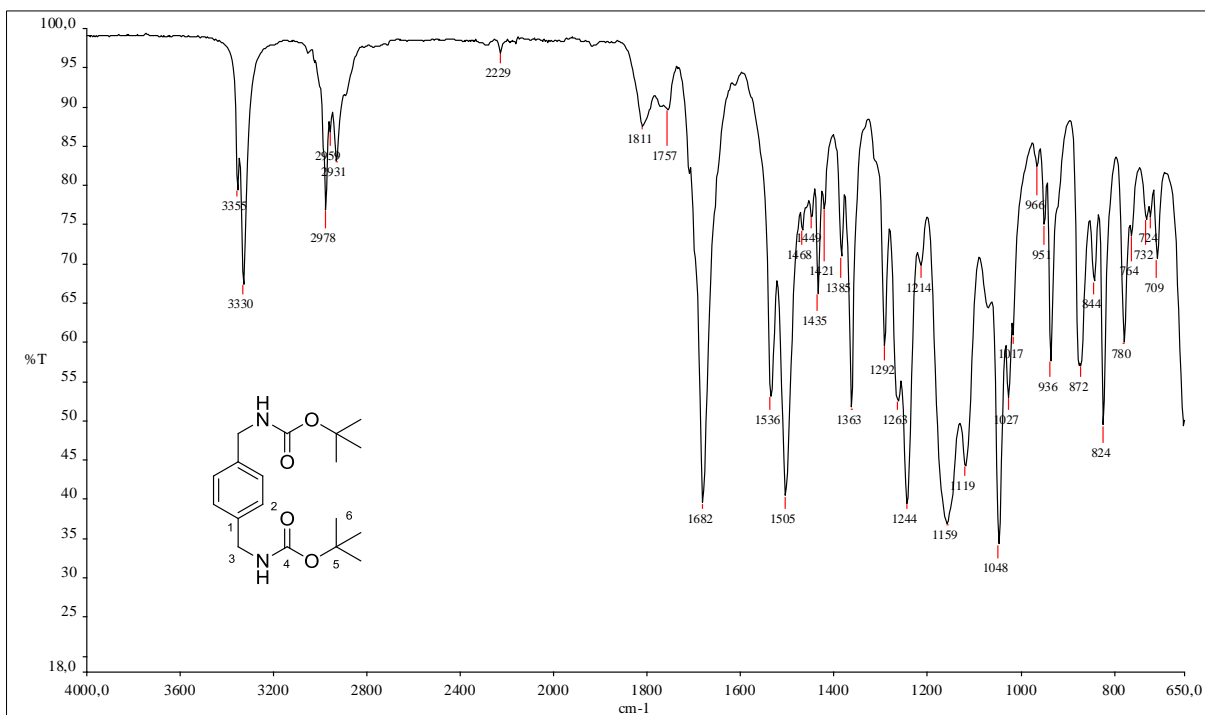


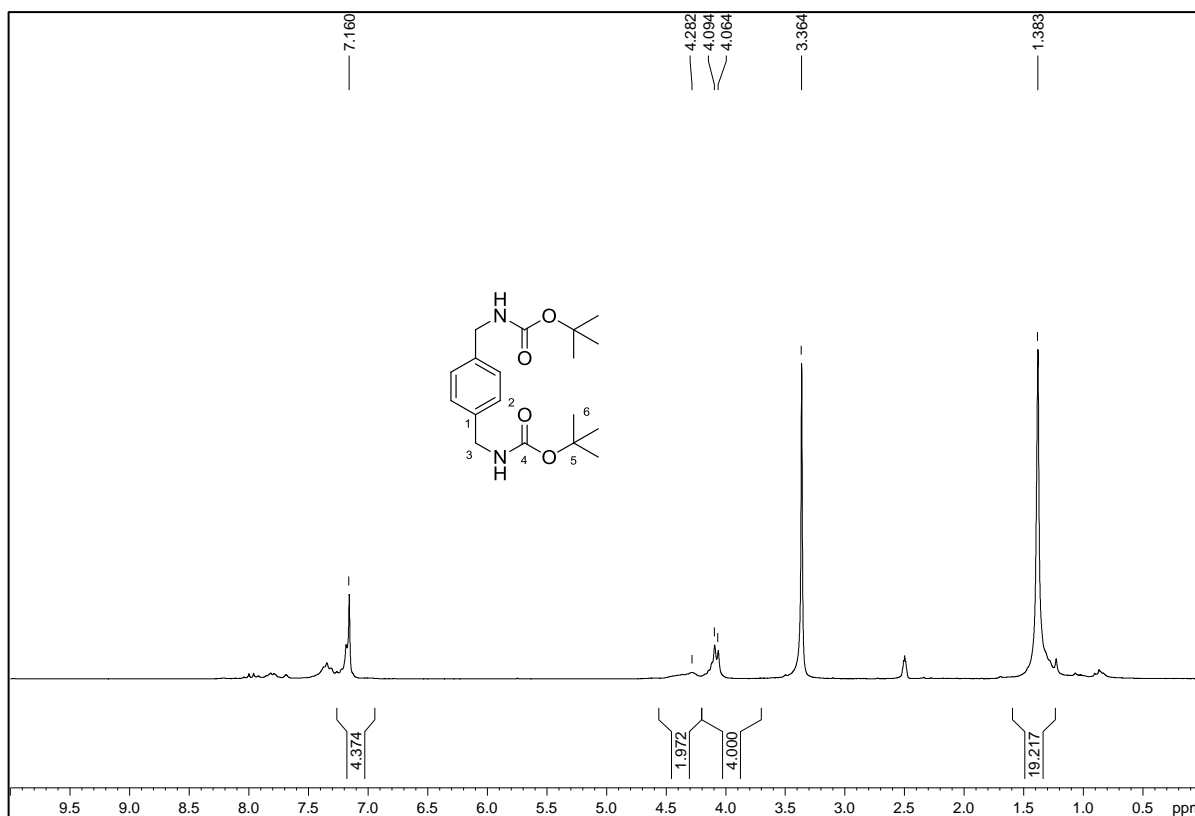
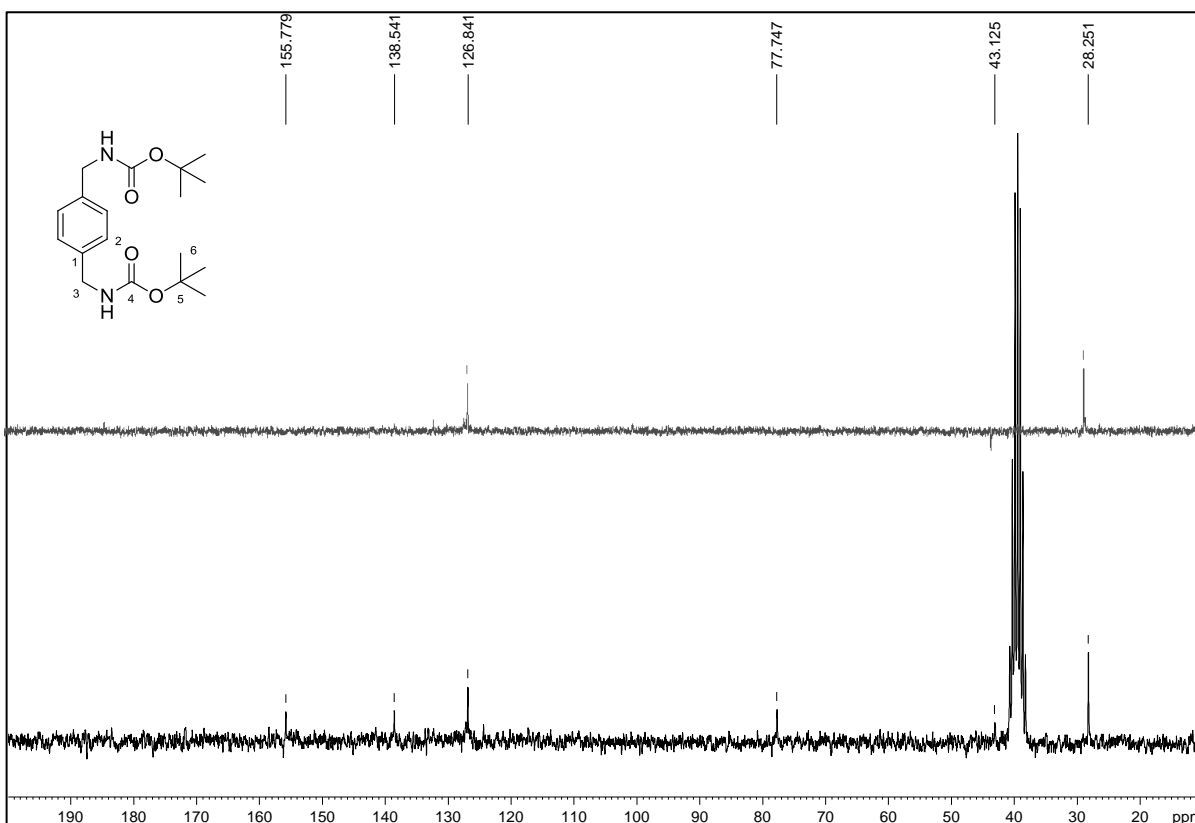
Figura A.89 - Espectro de RMN de ^1H de 20c (200 MHz, DMSO- d_6).**Figura A.90 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 20c (50 MHz, DMSO- d_6).**

Figura A.91 - Espectro no infravermelho de 21.

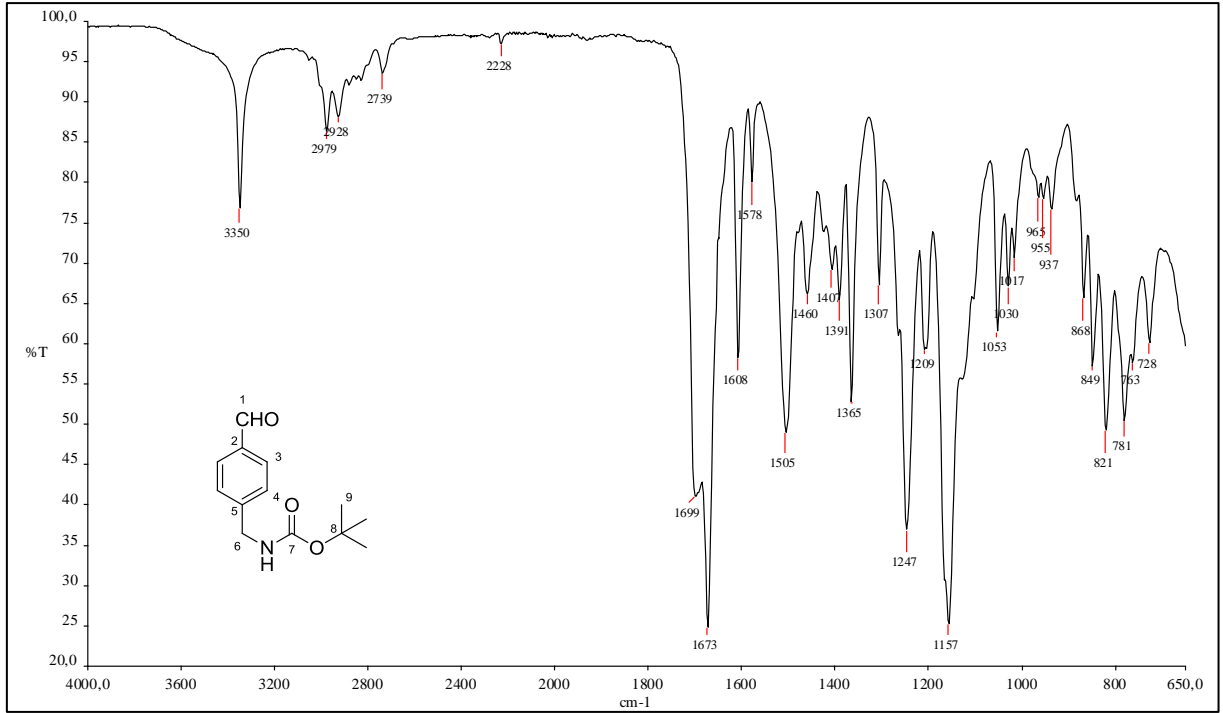
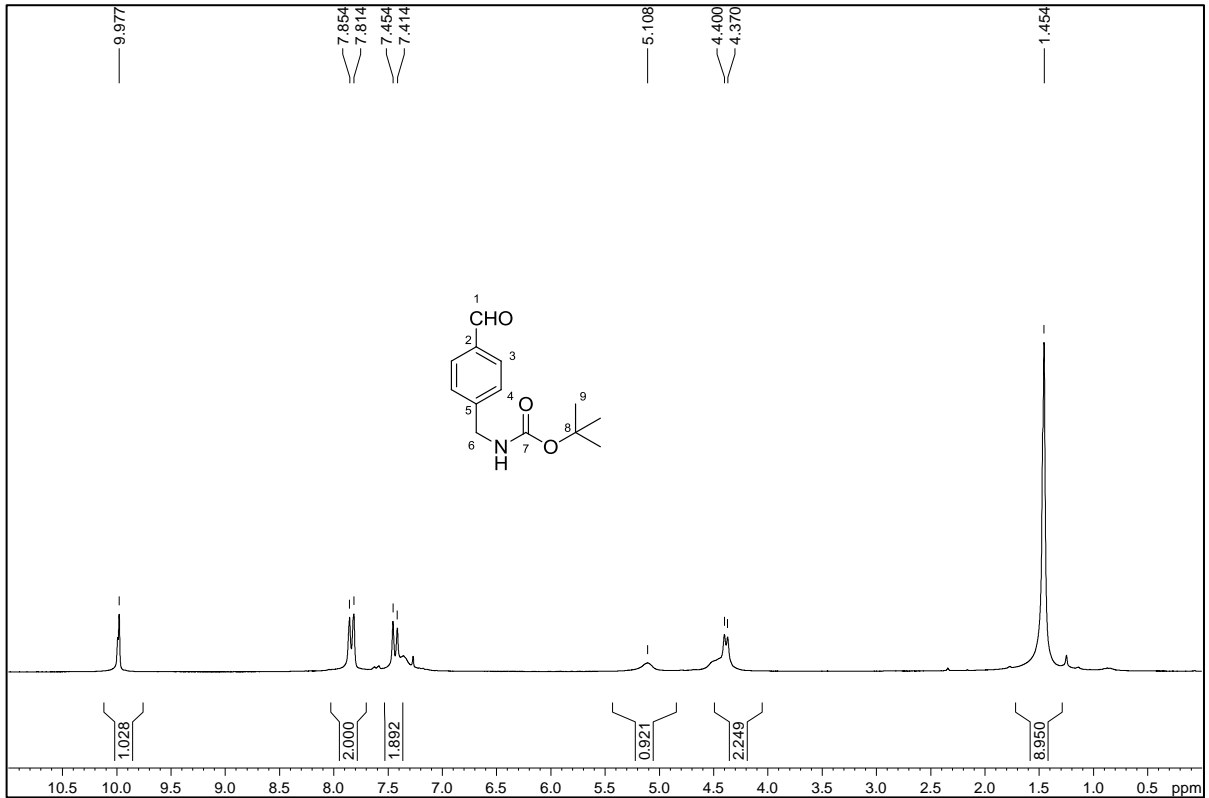
Figura A.92 - Espectro de RMN de ^1H de 21 (200 MHz, CDCl_3).

Figura A.93 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 21 (50 MHz, CDCl_3).

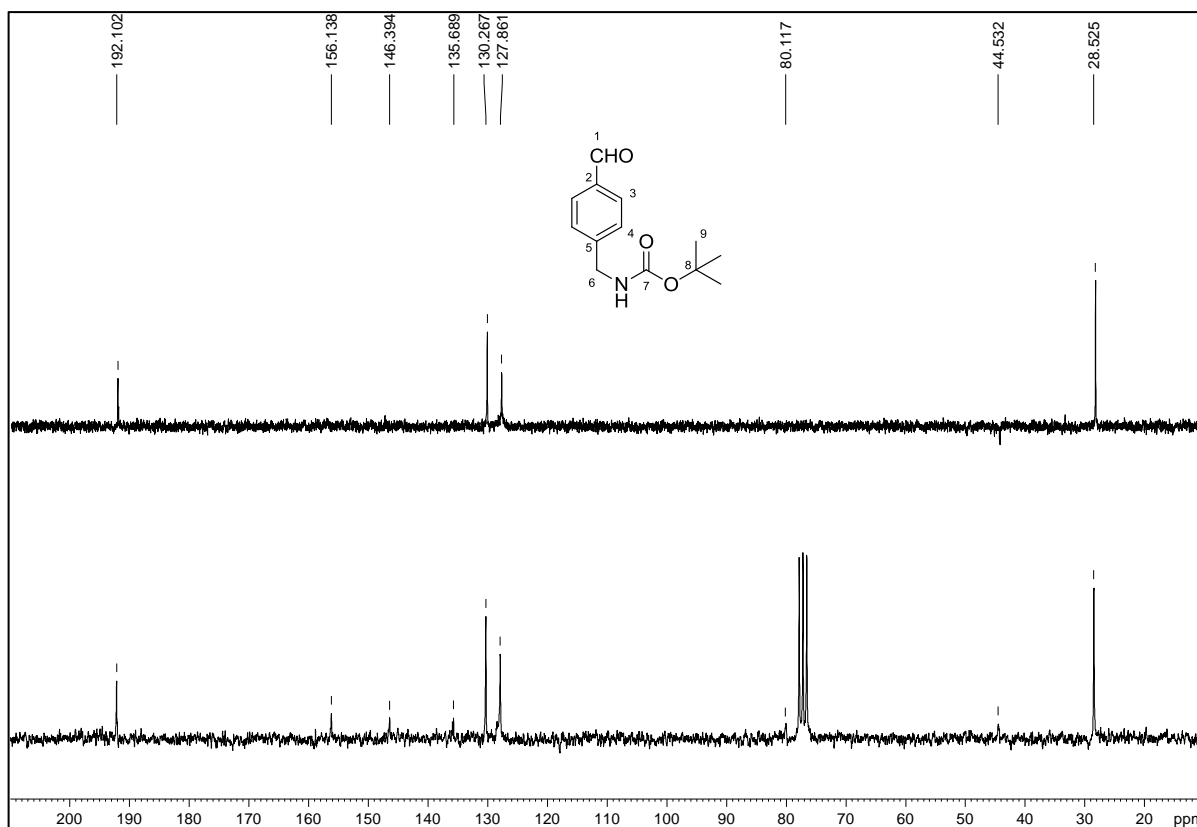


Figura A.94 - Espectro no infravermelho de 22.

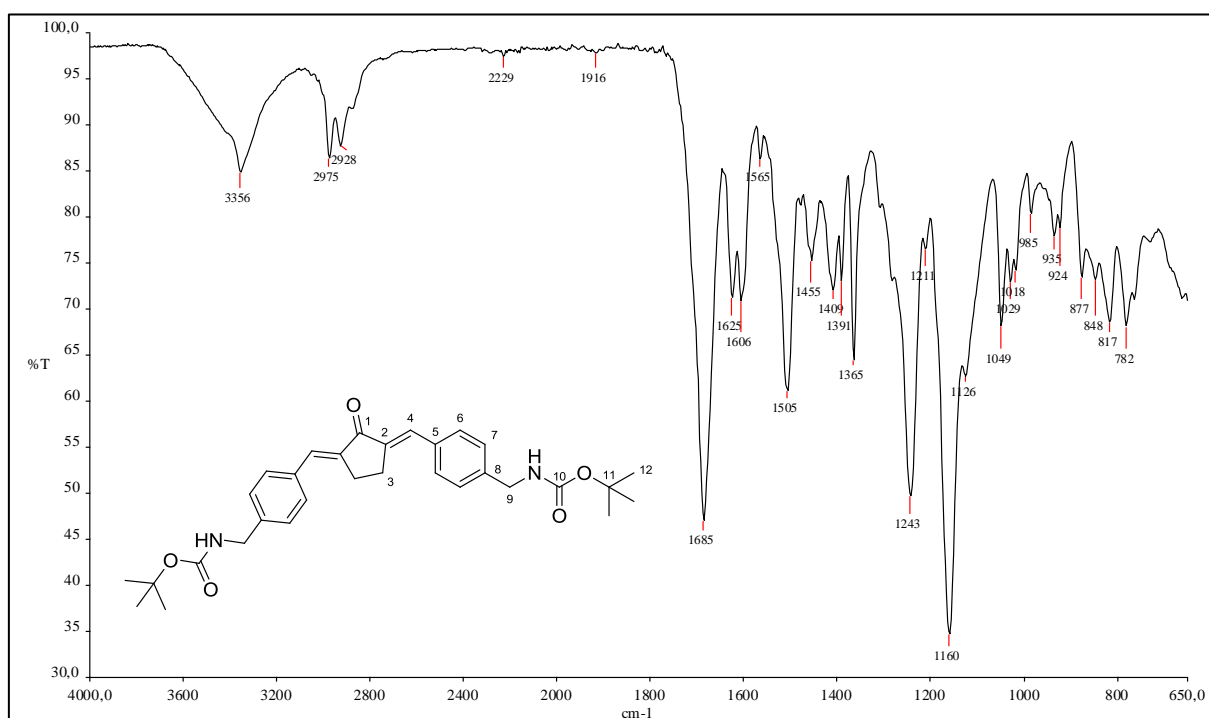


Figura A.95 - Espectro de RMN de ^1H de 22 (200 MHz, CDCl_3).

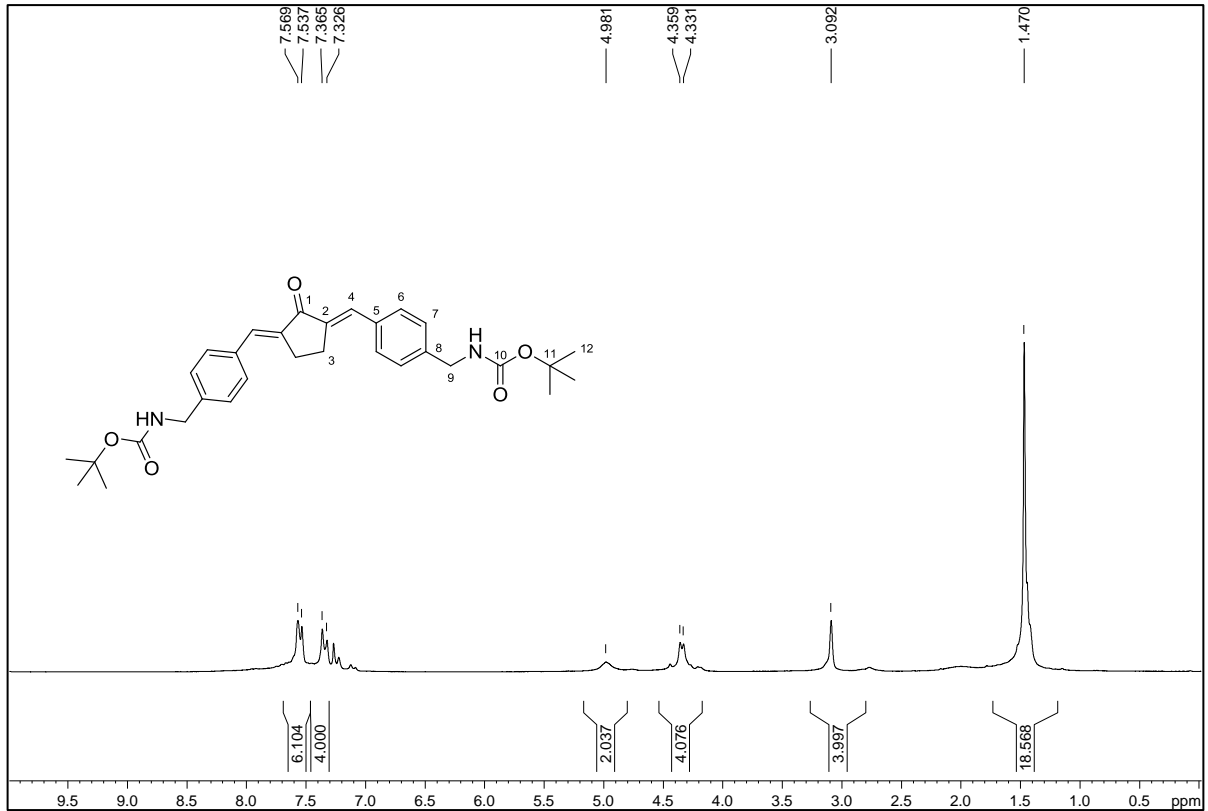


Figura A.96 - Espectro de RMN de ^{13}C e experimento DEPT 135 de 21 (50 MHz, CDCl_3).

