



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA

Viviane Aparecida da Silveira

Síntese de isósteros aromáticos visando potencial biológico

Uberaba

2016

Viviane Aparecida da Silveira

Síntese de isósteros aromáticos visando potencial biológico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* Multicêntrico em Química, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

Uberaba

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

S591s Silveira, Viviane Aparecida da
Síntese de isómeros aromáticos visando potencial biológico /
Viviane Aparecida da Silveira. -- 2016.
119 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

1. Compostos aromáticos. 2. Espectrometria de massa. 3. Compostos aromáticos - Testes de toxicidade. I. Pivatto, Amanda Danuello. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 547



PPGMQ - MG



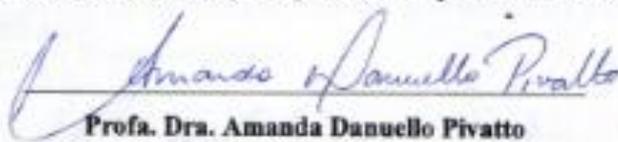
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Av. Dr. Randolpho Borges Júnior, 1400 – Univerdecidade – CEP: 38 064-200 –
UBERABA – MG –
Fone: (34) 33313144

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos vinte de dois dias do mês de março do ano de dois mil e dezesseis, das nove às treze horas, na sala N106 do Prédio "N" da Unidade II - Campus Univerdecidade, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, foi realizada a apresentação e arguição da dissertação de mestrado da aluna **VIVIANE APARECIDA DA SILVEIRA**, cujo título do trabalho foi: "Síntese de Isósteros Aromáticos com Potencial Biológico".

A banca examinadora, composta pelos Professores Doutores Amanda Danuello Pivatto, Ana Claudia Granato Malpass e Wellington de Oliveira Cruz, após avaliação e deliberação, considerou a aluna aprovada.

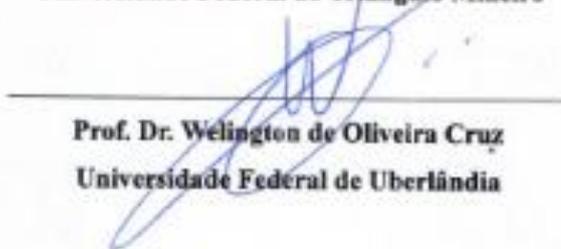
Eu, Amanda Danuello Pivatto, presidente da banca examinadora e orientadora da referente aluna, lavrei a presente ata que segue assinada por mim e demais membros:



Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz
Universidade Federal de Uberlândia

À minha mãe,
que nunca mediu
esforços para que meu
sonho se realizasse.
Aos meus avôs
com saudade!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida por terem me abençoado e protegido nesta caminhada.

Ao meu pai, Ademar, e a minha irmã, Silvania, por todo amor, apoio, dedicação e confiança.

À minha mãe, Maria Cândida, pelo zelo incansável e por seu amor incondicional. Você é minha inspiração e foi o meu incentivo para este trabalho.

A minha orientadora, Professora Doutora Amanda Danuello Pivatto, pela sua inestimável confiança, paciência, compreensão, amizade e por todo o conhecimento fornecido.

Ao meu coorientador, Professor Doutor Marcos Pivatto, por sua disponibilidade, conselhos, carinho e incentivo.

À professora Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani da UNESP de Araraquara pelos reagentes fornecidos, e juntamente com o Dr. Nivaldo Boralle pelos excelentes espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao professor Dr. Noberto Peporine Lopes e toda a equipe da Central de Espectrometria de Massas de Micromoléculas Orgânicas (CEMMO) da USP de Ribeirão Preto, principalmente ao Tomaz e a Jacqueline, pela disponibilidade e dedicação nas análises de espectrometria de massas.

Ao professor Dr. Pedro Ivo da Silva Maia, pelo estágio em docência, por todo o conhecimento fornecido e pelas análises de ponto de fusão.

À professora Dr^a. Raquel Maria Ferreira Souza da UFU, por sua dedicação e paciência em me ensinar a manusear os experimentos de infravermelho.

À aluna de pós-doutorado Dr^a. Zumira Aparecida Carneiro e ao professor Dr. João Santana da Silva do Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas da USP de Ribeirão Preto pelos ensaios biológicos anti-*Trypanosoma cruzi*.

Aos funcionários do laboratório, Ellen, Diógenes e Arthur, por poder contar com vocês no momento em que mais precisei.

Aos de alunos tcc da professora Amanda, por todo conhecimento e incentivo, principalmente a Danielle, por toda sua generosidade, companheirismo, apoio e amizade. Sua colaboração foi fundamental para o término deste trabalho.

Às amigas de mestrado, Adriana, Luiza, Rayla, e principalmente a Ana, pelo carinho, amizade, incentivo, convivência e colaborações dentro e fora da universidade.

À secretária da pós-graduação, Mayla, pela atenção e eficiência.

À Rede Mineira de Química e a Universidade Federal do Triângulo Mineiro que através do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química me proporcionaram a realização deste sonho.

Enfim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, na execução deste trabalho.

“Há duas formas para viver a sua vida:
Uma é acreditar que não existe milagre.
A outra é acreditar que todas
as coisas são um milagre”.

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização de uma série de isósteros aromáticos, que foram avaliados no ensaio anti-*Trypanosoma cruzi*. Estes compostos foram planejados utilizando estratégias de isosterismo e bioisosterismo. As substâncias **16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25** e **26** foram sintetizadas via reações de substituição nucleofílica aromática (S_NAr), utilizando como nucleófilos: cloridrato de glicinato de etila, tioglicolato de etila e glicolato de etila; e os substratos: 2,6-dicloro-3-nitropiridina, 2-cloro-3-nitropiridina e 1-cloro-2-nitropiridina. Os produtos **17, 18, 21, 22, 23, 25** e **26** foram submetidos à reação de redução do grupo nitro para amino utilizando ferro metálico (Fe^0) e cloreto de amônio (NH_4Cl). Em seguida, ocorreu uma reação intramolecular que levou a formação dos produtos ciclizados **29, 30, 31, 32** e **34**. Os compostos obtidos foram caracterizados por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas com ionização por electrospray e espectroscopia na região do infravermelho. A partir dos espectros de massas das substâncias **17, 18, 21, 22, 24** e **26**, foi possível estabelecer um padrão de fragmentação geral, sendo que o derivado oxigenado apresentou, além daquele padrão, fragmentos adicionais, o que contribuiu para a confirmação da síntese destes produtos. Depois de caracterizadas as substâncias (**18, 21, 22, 23, 26, 29, 31** e **34**) foram submetidas aos ensaios para avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade. A atividade anti-*Trypanosoma cruzi* (IC_{50}) dos compostos foi avaliada contra a cepa *CL Brener* do *T. cruzi*, sendo que nenhum dos compostos apresentou atividade anti-*Trypanosoma cruzi* nas concentrações avaliadas. A citotoxicidade foi determinada utilizando linhagens de células LLC-MK₂. De acordo com os valores de CC_{50} observados neste modelo e nas concentrações avaliadas, foi possível constatar que os produtos não apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: Isósteros aromáticos, bioisosterismo; espectrometria de massas com ionização por *electrospray*; atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade.

ABSTRACT

The goal of this research deals with the synthesis and characterization of a series of pyridinic isosteres, which were evaluated in the *anti-Trypanosoma cruzi* assays. These compounds were designed using isosterism and bioisosterism strategies. The compounds **16**, **17**, **18**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25** and **26** were synthesized by nucleophilic aromatic substitution reaction (S_NAr), using as nucleophiles: ethyl glycinate hydrochloride, ethyl thioglycolate and ethyl glycolate; and substrates: 2,6-dichloro-3-nitropyridine, 2-chloro-3-nitropyridine and 1-chloro-2-nitropyridine. The products (**17**, **18**, **21**, **22**, **23**, **25**, **26**) were submitted to the reduction reaction of nitro to amino group using metallic iron (Fe^0), and ammonium chloride (NH_4Cl). In the sequence the intramolecular reaction led to the formation of cyclized products **29**, **30**, **31**, **32** and **34**. The compounds were characterized by nuclear magnetic resonance, electrospray ionization mass spectrometry and infrared spectroscopy. From the mass spectra of compounds **17**, **18**, **21**, **22**, **24** and **26**, it was possible establish a general fragmentation, and the oxygenated derivative showed, in addition to that standard, additional fragments, which contributes to confirm the synthesis of these products. After the characterization of the compounds (**18**, **21**, **22**, **23**, **26**, **29**, **31** and **34**) tests for the evaluation of cytotoxicity and *anti-Trypanosoma cruzi* activity were performed. The *anti-Trypanosoma cruzi* activity (IC_{50}) of the compounds was evaluated against *CL Brener* strain of *T. cruzi* and neither of the compounds showed *anti-Trypanosoma cruzi* activity. Cytotoxicity was determined using strains of LLC-MK2 cells. According with the CC_{50} values observed in this model and the concentrations evaluated, it was possible conclude that the products did not shown cytotoxicity.

Keywords: Pyridinic isosteres, bioisosterism; electrospray ionization mass spectrometry; *anti-Trypanosoma cruzi* activity, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Substituição isostérica entre o fenol (1) e a anilina (2). (Fonte: LIMA; BARREIRO, 2005).	21
Figura 2 – Substituição isostérica da meperidina (3). (Fonte: WERMUTH, 2006).	21
Figura 3 – Substituição bioisostérica entre os fármacos Diazepam (6) e Alprazolam (7). (Fonte: WERMUTH, 2006).	23
Figura 4 – Representação esquemática de um espectrômetro de massas. (Fonte: DA AUTORA, 2016).	25
Figura 5 – Processo de ionização por electrospray. (Fonte: GIROLAMO et al., 2013).	26
Figura 6 – Estrutura dos bioisómeros de 8–13. (Adaptado de: VALITUTI et al., 2007).	26
Figura 7 – EM-EM-IES-(+) do composto 8 (m/z 268, $[M + H]^+$). (Adaptado de: VALITUTI et al., 2007).	27
Figura 8 – Proposta de fragmentação para 8 $[M + H]^+$. (Adaptado de: VALITUTI et al., 2007).	28
Figura 9 – Núcleos de átomos na ausência (A) e na presença (B) de um campo magnético aplicado. (Fonte: LUZYANIN; ABRANTES, 2010).	29
Figura 10 – Representação esquemática de um espectrômetro de RMN. (Fonte: BRUICE, 2014).	30
Figura 11 – Excitação vibracional de uma ligação. (Fonte: VOLLHARDT; SCHORE, 2011).	31
Figura 12 – Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (Fonte: BERN, 2015).	33
Figura 13 – Estrutura química dos fármacos Benzonidazol (14) e Nifurtimox (15). (Fonte: DIAS et al., 2009).	34
Figura 14 – Estrutura química dos fármacos Benzonidazol (14) e Nifurtimox (15). (Fonte: DIAS et al., 2009).	36
Figura 15 – Mecanismo da reação de S_NAr para a 2,6-dicloro-3-nitropiridina.	51
Figura 16 – Proposta de mecanismo para a ciclização intramolecular da 2-cloro-3-nitropiridina.	52
Figura 17 – Reação para formação do composto 16.	52
Figura 18 – Reação para formação do composto 17.	56
Figura 19 – Reação para formação do composto 18.	57
Figura 20 – Reação para formação do composto 21.	62

Figura 21 – Reação para formação do composto 22 .	67
Figura 22 – Reação para formação do composto 23 .	72
Figura 23 – Reação para formação do composto 24 .	76
Figura 24 – Reação para formação do composto 25 .	81
Figura 25 – Reação para formação do composto 26 .	85
Figura 26 – Reação para formação do composto 29 .	90
Figura 27 – Reação para formação do composto 30 .	92
Figura 28 – Reação para formação do composto 31 .	96
Figura 29 – Reação para formação do composto 32 .	98
Figura 30 – Reação para formação do composto 34 .	102
Figura 31 – Proposta de fragmentação geral para os isósteros piridínicos 17 , 18 , 21 , 22 , 24 e 26 .	109
Figura 32 – Proposta de fragmentação para os isósteros 24 e 26 .	110
Figura 33 – Porcentagem da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> dos compostos avaliados em diferentes concentrações.	112

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 – Espectro de RMN ^1H do composto 16 (600 MHz, CDCl_3).	53
Espectro 2 – Ampliação do espectro 1 (δ 6,6–8,5), do composto 16 .	53
Espectro 3 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 16 (125 MHz, CDCl_3).	54
Espectro 4 – Espectro na região do IV do composto 16 .	56
Espectro 5 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 17 .	57
Espectro 6 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 18 .	58
Espectro 7 – Espectro de RMN ^1H do composto 18 (600 MHz, CDCl_3).	59
Espectro 8 – Ampliação do espectro 7 (δ 6,7–8,5), do composto 18 .	59
Espectro 9 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 18 (125 MHz, CDCl_3).	60
Espectro 10 – Espectro na região do IV do composto 18 .	62
Espectro 11 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 21 .	63
Espectro 12 – Espectro de RMN ^1H do composto 21 (600 MHz, CDCl_3).	64
Espectro 13 – Ampliação do espectro 12 (δ 7,1–8,4), do composto 21 .	64
Espectro 14 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 21 (125 MHz, CDCl_3).	65
Espectro 15 – Espectro na região do IV do composto 21 .	67
Espectro 16 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 22 .	68
Espectro 17 – Espectro de RMN ^1H do composto 22 (600 MHz, CDCl_3).	69
Espectro 18 – Ampliação do espectro 17 (δ 7,2–8,7), do composto 22 .	69
Espectro 19 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 22 (125 MHz, CDCl_3).	70
Espectro 20 – Espectro na região do IV do composto 22 .	72
Espectro 21 – Espectro de RMN ^1H do composto 23 (600 MHz, CDCl_3).	73
Espectro 22 – Ampliação do espectro 21 (δ 7,3–8,3), do composto 23 .	74
Espectro 23 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 23 (125 MHz, CDCl_3).	75
Espectro 24 – Espectro na região do IV do composto 23 .	76
Espectro 25 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 24 .	77
Espectro 26 – Espectro de RMN ^1H do composto 24 (600 MHz, CDCl_3).	78
Espectro 27 – Ampliação do espectro 26 (δ 7,15–8,35), do composto 24 .	78
Espectro 28 – Espectro de RMN ^{13}C do composto 24 (125 MHz, CDCl_3).	79
Espectro 29 – Espectro na região do IV do composto 24 .	81
Espectro 30 – Espectro de RMN ^1H do composto 25 (600 MHz, CDCl_3).	82
Espectro 31 – Ampliação do espectro 30 (δ 6,3–8,4), do composto 25 .	82

Espectro 32 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 25 (125 MHz, CDCl ₃).	83
Espectro 33 – Espectro na região do IV do composto 25 .	85
Espectro 34 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 26 .	86
Espectro 35 – Espectro de RMN ¹ H do composto 26 (600 MHz, CDCl ₃).	87
Espectro 36 – Ampliação do espectro 35 (δ 7,0–8,6), do composto 26 .	87
Espectro 37 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 26 (125 MHz, CDCl ₃).	88
Espectro 38 – Espectro na região do IV do composto 26 .	90
Espectro 39 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 29 .	91
Espectro 40 – Espectro na região do IV do composto 29 .	91
Espectro 41 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 30 .	92
Espectro 42 – Espectro de RMN ¹ H do composto 30 (600 MHz, CDCl ₃).	93
Espectro 43 – Ampliação do espectro 42 (δ 7,0–8,6), do composto 30 .	94
Espectro 44 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 30 (125 MHz, CDCl ₃).	95
Espectro 45 – Espectro na região do IV do composto 30 .	96
Espectro 46 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 31 .	97
Espectro 47 – Espectro na região do IV do composto 31 .	98
Espectro 48 – Espectro de RMN ¹ H do composto 32 (600 MHz, CDCl ₃).	99
Espectro 49 – Ampliação do espectro 48 (δ 7,0–8,6), do composto 32 .	99
Espectro 50 – Espectro de RMN ¹³ C do composto 32 (125 MHz, CDCl ₃).	100
Espectro 51 – Espectro na região do IV do composto 32 .	101
Espectro 52 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 34 .	102
Espectro 53 – Espectro na região do IV do composto 34 .	103
Espectro 54 – EM-EM-IES-(+) do composto 17 .	105
Espectro 55 – EM-EM-IES-(+) do composto 18 .	105
Espectro 56 – EM-EM-IES-(+) do composto 21 .	106
Espectro 57 – EM-EM-IES-(+) do composto 22 .	106
Espectro 58 – EM-EM-IES-(+) do composto 24 .	107
Espectro 59 – EM-EM-IES-(+) do composto 26 .	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Regra do Hidreto de Grimm (1925). (Fonte: <i>Bioisosterism Approach in Drug Design</i>).	20
Tabela 2 – Reações de substituição nucleofílica aromática.	40
Tabela 3 – Reações de redução do grupo nitro e ciclizações <i>in situ</i> .	46
Tabela 4 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 16 (CDCl_3).	55
Tabela 5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 18 (CDCl_3).	61
Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 21 (CDCl_3).	66
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 22 (CDCl_3).	71
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 23 (CDCl_3).	75
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 24 (CDCl_3).	80
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 25 (CDCl_3).	84
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 26 (CDCl_3).	89
Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 30 (CDCl_3).	95
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto 32 (CDCl_3).	101
Tabela 14 – Substituintes eletronegativos e deslocamentos químicos.	104
Tabela 15 – Valores de CC_{50} (μM) obtidos para os compostos avaliados.	111
Tabela 16 – Valores de IC_{50} (μM) obtidos para os compostos avaliados.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

- CC – Cromatografia em coluna
CCD – Cromatografia em camada delgada
BZ – Benzonidazol
calcd – calculado
CC₅₀ – concentração citotóxica 90%
d – duplete
dd – duplo duplete
ddd – duplo duplo duplete
EM – Espectrometria de Massas
EM–EM – Espectro de massas
ESI – Espectrometria de Massas com Ionização por *Electrospray*
HRESIMS – *high-resolution electrospray ionisation mass spectrometry*
IC₅₀ – concentração inibitória de 50%
J – constante de acoplamento (em Hertz)
LLC–MK₂ – linhagem celular mantida em cultura e derivada de células epiteliais de rim de macaco *Rhesus*
LUMO – *lowest unoccupied molecular orbital*
MALDI – *Matrix-assisted laser desorption ionization*
MS/MS – Espectrometria de Massas em Tandem
m/z – relação massa-carga
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium
NFX – Nifurtimox
q – quadrupeto
R_f – fator de retenção
RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s – singleto
S_NAr – Substituição Nucleofílica Aromática
t – tripleto
t.a. – temperatura ambiente
T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TMS – tetrametilsilano

IV – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

λ – comprimento de onda

ν – vibração de estiramento

ν_{as} – vibração de estiramento assimétrico

ν_s – vibração de estiramento simétrico

δ – deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 QUÍMICA MEDICINAL	19
1.2 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS	23
1.2.1 Espectrometria de Massas	23
1.2.2 Ressonância Magnética Nuclear	28
1.2.3 Espectroscopia no Infravermelho	30
1.3 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS	31
1.3.1 Doença de Chagas	32
1.3.2 Compostos nitro aromáticos e desenvolvimento de fármacos	35
2 OBJETIVO GERAL	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 REAGENTES, SOLVENTES E INSTRUMENTAÇÃO	38
3.2 REAÇÕES	39
3.2.1 Metodologia geral para reações de substituição nucleofílica aromática	39
3.2.1.1 Preparação dos compostos 16 e 17	41
3.2.1.2 Preparação do composto 18	41
3.2.1.3 Tentativa de preparação do composto 19	42
3.2.1.4 Preparação dos compostos 20 e 21	42
3.2.1.5 Preparação do composto 22	43
3.2.1.6 Preparação do composto 23	43
3.2.1.7 Preparação dos compostos 24 e 25	44
3.2.1.8 Preparação do composto 26	45
3.2.1.9 Tentativa de preparação do composto 27	45
3.2.2 Metodologia geral para reações de ciclização	46
3.2.2.1 Tentativa de preparação do composto 28	46
3.2.2.2 Preparação do composto 29	47
3.2.2.3 Preparação do composto 30	47
3.2.2.4 Preparação do composto 31	47
3.2.2.5 Preparação do composto 32	47
3.2.2.6 Tentativa de preparação do composto 33	48

3.2.2.7 Preparação do composto 34	48
3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS	48
3.3.1 Ensaio de citotoxicidade	48
3.3.2 Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>in vitro</i> sobre as formas amastigotas	49
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	50
4.1 REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA	50
4.2 REDUÇÕES DO GRUPO NITRO PARA AMINO E REAÇÕES DE CICLIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	51
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	52
4.3.1 Determinação estrutural do composto 16	52
4.3.2 Determinação estrutural do composto 17	56
4.3.3 Determinação estrutural do composto 18	57
4.3.4 Determinação estrutural do composto 21	62
4.3.5 Determinação estrutural do composto 22	67
4.3.6 Determinação estrutural do composto 23	72
4.3.7 Determinação estrutural do composto 24	76
4.3.8 Determinação estrutural do composto 25	81
4.3.9 Determinação estrutural do composto 26	85
4.3.10 Determinação estrutural do composto 29	90
4.3.11 Determinação estrutural do composto 30	92
4.3.12 Determinação estrutural do composto 31	96
4.3.13 Determinação estrutural do composto 32	98
4.3.14 Determinação estrutural do composto 34	102
4.3.15 Deslocamentos químicos e eletronegatividade	103
4.4 ANÁLISES DOS EXPERIMENTOS DE MS/MS DOS ISÓSTEROS PIRIDÍNICOS	104
4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS	111
4.5.1 Avaliação da citotoxicidade dos compostos avaliados	111
4.5.2 Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> dos compostos avaliados	112
5 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIA	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUÍMICA MEDICINAL

A química medicinal é uma ciência multidisciplinar, que envolve áreas da farmacologia, bioquímica, informática, biologia molecular e estrutural, entre outras, visando o desenvolvimento de novos fármacos que possam melhorar a qualidade e expectativa de vida das pessoas (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; BRENK; RAUTH, 2012). O desenvolvimento de novos fármacos ocorre por meio de estratégias que vão desde a descoberta, identificação, otimização (modificação molecular) e desenvolvimento (LIMA, 2007).

O objetivo da química medicinal é a descoberta ou o aperfeiçoamento de compostos (candidatos a fármacos) a partir da síntese e do conhecimento das fases farmacodinâmica e farmacocinética (IUPAC, 1973 apud TIMMERMAN, 2013). A primeira fase para a descoberta de um composto biologicamente ativo é identificar o alvo terapêutico. Em seguida os protótipos são avaliados quanto às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, visando o aperfeiçoamento estrutural que resulte em compostos mais eficientes (maior potência e menor toxicidade) (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008).

As pesquisas com novas moléculas são fundamentais para a descoberta de novos fármacos que posteriormente se tornarão novos medicamentos que possam atuar no tratamento das doenças ou no alívio sintomático. Entretanto, um composto com atividade farmacológica desejada também pode causar efeitos colaterais indesejáveis, como toxicidade, baixa biodisponibilidade, ou ainda problemas relacionados ao metabolismo e excreção (BHATIA et al., 2011). O químico medicinal estuda a estrutura das moléculas visando aperfeiçoá-las, para garantir o desenvolvimento de fármacos mais seguros e clinicamente mais eficazes (PATANI; LAVOIE, 1996).

Uma das estratégias dos químicos medicinais é a utilização da técnica de modificação molecular que envolve mudanças nas estruturas moleculares dos potenciais candidatos a fármacos que possam resultar em alterações nas propriedades físico-químicas do alvo terapêutico e com isso otimizar as estruturas moleculares (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009). Há várias estratégias de

modificação molecular como o bioisosterismo, a hibridação molecular, a simplificação molecular, a latenciação, entre outras (DUARTE; BARREIRO; FRAGA, 2007). Neste trabalho, foi utilizado o bioisosterismo como estratégia para o planejamento de novas estruturas com potencial biológico.

O termo isosterismo foi introduzido por James Moir, em 1909 (MEANWELL, 2011), sendo que a primeira aplicação dessa terminologia só ocorreu em uma publicação realizada em 1919, pelo pesquisador Irving Langmuir, que ao estudar substâncias isoeletrônicas instituiu o termo isosterismo, para definir átomos ou moléculas que possuem o mesmo número e arranjo de elétrons (LANGMUIR, 1919).

Em 1925, Grimm ampliou a compreensão sobre o conceito de isósteros através da regra do hidreto. Esta regra afirma que a adição de um hidreto a um átomo resulta em um pseudo-átomo, sendo que este apresentará propriedades físicas semelhantes daqueles presentes na coluna imediatamente posterior da tabela periódica do átomo inicial (Tabela 1) (PATANI; LAVOIE, 1996; BARREIRO; FRAGA, 2001).

Tabela 1 - Regra do Hidreto de Grimm (1925).

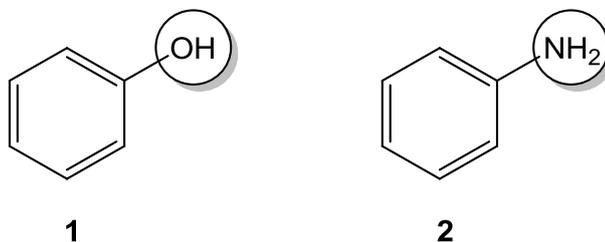
C	N	O	F	Ne	Na
	CH	NH	OH	FH	---
		CH₂	NH₂	OH₂	FH₂⁺
			CH₃	NH₃	OH₃⁺
				CH₄	NH₄⁺

Fonte: Bioisosterism: a rational approach in drug design (1996).

Em 1932, Erlenmeyer definiu que isósteros são elementos, moléculas ou íons isoeletrônicos, ou seja, átomos do mesmo grupo da tabela periódica são isósteros entre si (LIMA; BARREIRO, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2001). Alguns grupos isostéricos modificam significativamente as propriedades físico-químicas das substâncias, bem como suas atividades. Conforme a regra de Grimm, a substituição isostérica entre hidroxila (OH) e amina (NH₂) apresenta mudanças nas propriedades ácido-base dos compostos obtidos. Dessa forma, se considerarmos a substituição isostérica em compostos aromáticos como o fenol (**1**) e a anilina (**2**) (Figura 1), é possível verificar as mudanças nos valores de pKa dos compostos, que implicará na

alteração do perfil farmacocinético dos isómeros (LIMA; BARREIRO, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2001).

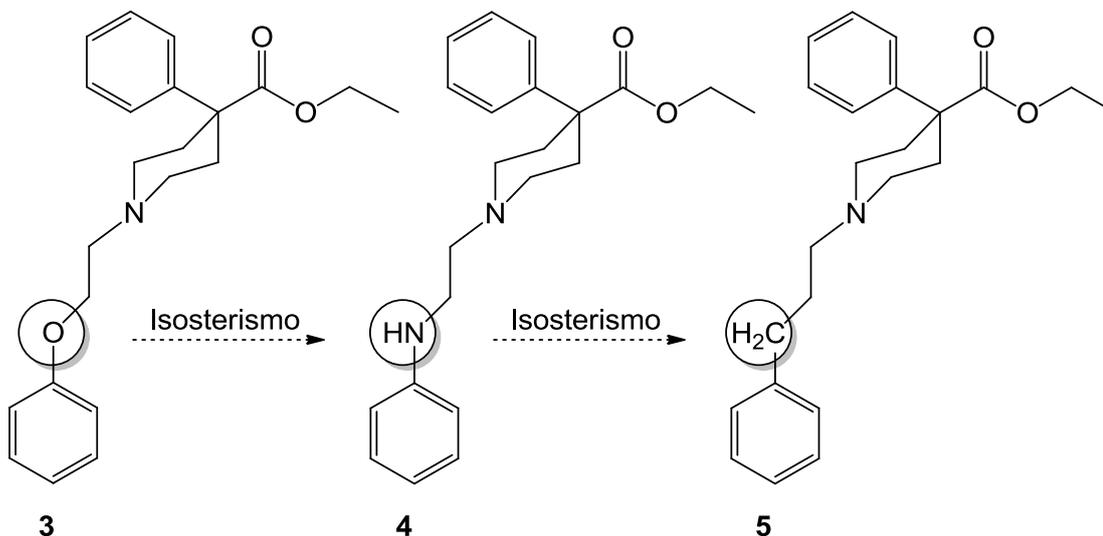
Figura 1 – Substituição isostérica entre o fenol (1) e a anilina (2).



Fonte: LIMA; BARREIRO, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2001.

O modelo descrito na Figura 2 representa um processo de substituição isostérica, onde o átomo de O de um análogo da meperidina (3) é substituído pelos grupos isostéricos NH (4) e CH₂ (5), cujo objetivo é aperfeiçoar as propriedades farmacocinéticas do fármaco inicial. A primeira alteração do O na meperidina por N potencializou seu efeito terapêutico em 80 vezes, enquanto a substituição por CH₂ diminuiu o efeito em 20 vezes (WERMUTH, 2006).

Figura 2 – Substituição isostérica da meperidina (3).



Fonte: WERMUTH, 2006.

Em 1951, Friedman definiu o termo Bioisosterismo: que é o fenômeno resultado da relação entre substâncias que apresentam propriedades biológicas

similares ou antagônicas. O bioisosterismo é resultante da aplicação do isosterismo, desenvolvido por Langmuir. Finalmente, em 1970, Alfred Burges classificou e subdividiu os bioisósteros em clássicos e não clássicos. E em 1979, Thornber complementou o termo Bioisosterismo, determinando-o como subunidades ou grupos de moléculas que possuem propriedades físico-químicas com efeitos biológicos similares (LIMA; BARREIRO, 2005).

A técnica de Bioisosterismo é uma estratégia de modificação molecular, com ênfase nas substituições das subunidades bioisostéricas de um determinado composto líder, com propriedades estruturais físico-químicas semelhantes, isto é, a substituição de um átomo ou um grupo funcional de uma determinada estrutura molecular por outra de configuração semelhante (LIMA; BARREIRO, 2005). O composto líder utilizado neste trabalho foi o composto derivado com o nucleófilo tioglicolato de etila. Como modelo para início deste estudo foi utilizado o trabalho publicado por Valli e colaboradores (2011).

A utilização da técnica de bioisosterismo pode estar associada à fase farmacocinética, melhorando as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME), ou à fase farmacodinâmica, interação entre o fármaco e o receptor de um composto com potencial biológico, visando sua otimização (LIMA; BARREIRO, 2005).

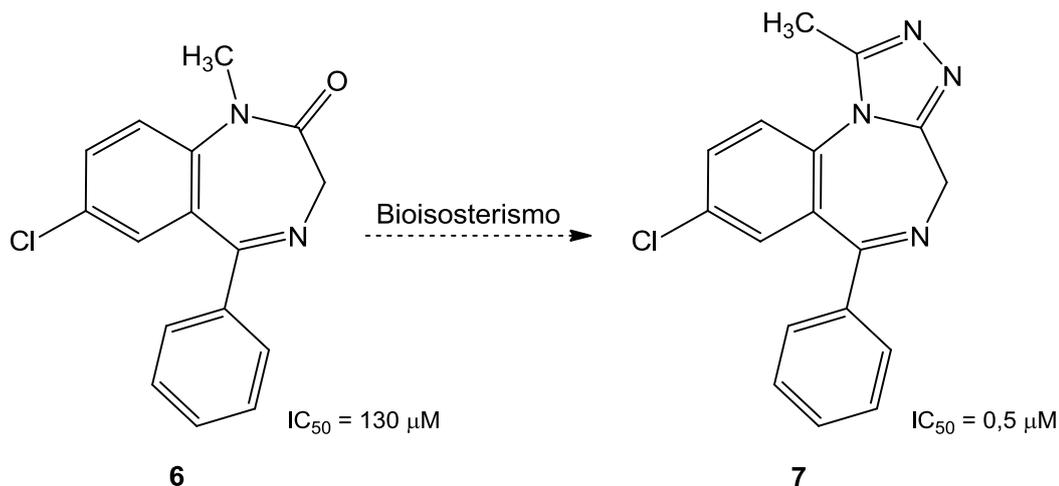
Ao planejar uma substituição bioisostérica é preciso estar atento aos parâmetros dos grupos a serem alterados, podendo ser comparados fatores como tamanho, formato, distribuição eletrônica, a solubilidade lipídica, a solubilidade em água, o pKa, a reatividade química, e a capacidade de ligação de hidrogênio (THORNER, 1979).

As substituições isostéricas resultarão em uma série de compostos congêneres, que poderão manter, potencializar ou diminuir a atividade biológica, assim serão considerados bioisósteros. Estas substituições podem ser responsáveis pela melhora das propriedades farmacocinéticas dos compostos líderes, aumento da seletividade para um determinado receptor e a redução dos efeitos adversos (biodisponibilidade oral, estabilidade metabólica, seletividade e toxicidade) (WAGENER; LOMMERSE, 2006).

Este processo de modificação molecular requer muito conhecimento sobre as propriedades químicas da molécula estudada, seus mecanismos de inativação,

efeitos secundários e biodisponibilidade, bem como seu mecanismo de ação e interação com o receptor e seus grupos farmacofóricos. Pode-se observar na Figura 3 uma típica mudança bioisostérica entre o fármaco Diazepam (**6**) e o Alprazolam (**7**), onde ambos atuam sobre o mesmo alvo terapêutico. Porém, a atividade biológica de **7** é melhor em relação ao **6** (WERMUTH, 2006).

Figura 3 – Substituição bioisostérica entre os fármacos Diazepam (**6**) e Alprazolam (**7**).



Fonte: WERMUTH, 2006.

Após o planejamento das substâncias é preciso sintetizá-las. A síntese orgânica compreende a área que estuda a criação ou transformação de substâncias orgânicas por meio de reações químicas racionais (ROCHA; FERREIRA; SANTOS, 2008). Após a síntese, a utilização de técnicas espectroscópicas e espectrométricas é fundamental para o processo de caracterização dos produtos, principalmente nas etapas de identificação do composto líder e de avaliação da pureza (HOFSTADLER; SANNES-LOWERY, 2006).

1.2 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS

1.2.1 Espectrometria de Massas

A Espectrometria de Massas (EM) é um instrumento de grande potencial durante o processo de rastreamento de compostos candidatos a fármacos. Essa técnica pode apresentar vantagens em relação aos métodos convencionais de

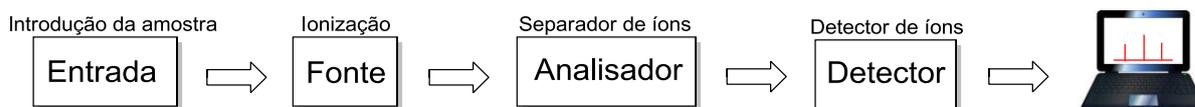
caracterização de compostos, pois fornece com grande precisão a composição molecular de uma substância baseada na análise da razão massa/carga (m/z) (HOFSTADLER; SANNES-LOWERY, 2006).

A espectrometria de massas é considerada uma importante ferramenta por apresentar alta sensibilidade e seletividade, tendo como as principais fontes de ionização o electrospray (ESI), a ionização por elétrons (IE) e a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix-assisted laser desorption ionization*) (MALDI). O uso dessa técnica analítica é observado em todas as etapas da descoberta de fármacos supracitados como a identificação e caracterização do alvo, elucidação estrutural de compostos sintéticos e produtos do metabolismo (farmacocinética) (DENG; SANYAL, 2006).

A espectrometria de massas é definida como o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa, que são posteriormente detectadas e caracterizadas por sua razão massa/carga (m/z) (IUPAC, 1974 apud MURRAY et al., 2013, p. 1565). É uma técnica analítica imprescindível para diversas áreas como a química, bioquímica, farmácia e medicina podendo ser empregada em análises de química combinatória, sequência de biomoléculas, exploração de células, análise ambiental e forense, elucidação estrutural, controle de qualidade de fármacos, alimentos e polímeros (GROSS, 2004). O fato de apresentar alta sensibilidade e seletividade, velocidade nas análises e aplicabilidade a uma ampla variedade de compostos químicos faz com que seja imprescindível num laboratório de desenvolvimento de fármacos (HENDRICKS et al., 2014).

O físico inglês, Joseph John Thomson, foi quem iniciou os estudos com raios catódicos que culminou no desenvolvimento do espectrômetro de massas (MAMYRIN, 2001). A análise por espectrometria de massas envolve três etapas principais, (Figura 4). Inicialmente, as moléculas neutras são volatilizadas e transformadas em íon na fonte de ionização. Em seguida, os íons entram no analisador aonde são separados de acordo com a relação de massa/carga. Finalmente os íons chegam no detector onde são transformados em sinal elétrico para gerar o espectro de massas (GIROLAMO et al., 2013).

Figura 4 – Representação esquemática de um Espectrômetro de Massas.



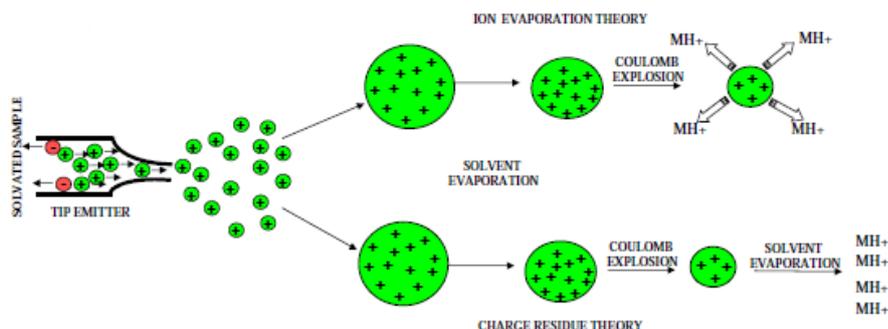
Fonte: A AUTORA, 2016.

A fonte de ionização é o primeiro componente do espectrômetro de massas. É o espaço onde ocorre a formação das espécies carregadas (íons). Há várias técnicas de ionização, mas atualmente a técnica que vem sendo mais utilizada é a ionização por electrospray por ser considerada uma técnica mais branda (*soft*) (GIROLAMO et al., 2013).

A ionização por electrospray pode ser utilizada para determinar as massas moleculares de compostos pequenos ou grandes biomoléculas, voláteis ou não-voláteis, polares ou apolares. Pode ser acoplada a um equipamento cromatográfico como a cromatografia líquida de alta eficiência, pois permite a análise da amostra dissolvida em um líquido (CECH; ENKE, 2002). É um método usual para análises de peptídeos, proteínas, carboidratos, oligonucleotídeos, polímeros sintéticos e lipídios (SIUZDAK, 2005). A espectrometria de massas por electrospray oferece vantagens como maior velocidade, sensibilidade e flexibilidade quando comparadas a outras técnicas, tais como ressonância magnética nuclear e difração de raios X (RAJI et al., 2007).

De maneira geral a ionização por electrospray ocorre quando a energia é aplicada sobre o capilar que transfere carga para as gotículas, que posteriormente são nebulizadas. Após a formação das gotículas uma corrente de gás faz com que o solvente evaporado e as gotículas sejam reduzidas, aumentando a repulsão eletrostática em sua superfície. Como resultado ocorre o fenômeno conhecido como “explosão coulômbica” que resulta na liberação dos íons (Figura 5). Essa técnica pode gerar espécies com uma única carga ou multicarregada, que vai depender do tamanho molecular do composto em análise (SIUZDAK, 2005).

Figura 5 – Processo de ionização por electrospray.

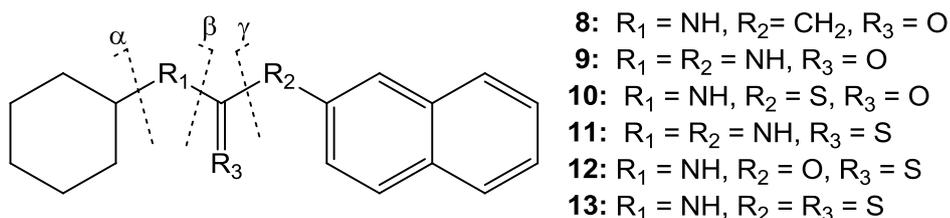


Fonte: GIROLAMO et al., 2013.

A ionização por electrospray permite a formação de íons moleculares como: moléculas protonadas ou desprotonadas resultantes de reações ácido-base ($[M + H]^+$) ou ($[M - H]^-$), moléculas coordenadas com cátions ($[M + Na]^+$) ou ($[M + K]^+$), ou ânions ($[M + Cl]^-$) e em menor proporção é possível a formação de cátions radicalares ($M^{\bullet+}$) ou ânions radicalares ($M^{\bullet-}$), através de reações de oxirredução (CROTTI, 2006).

A espectrometria de massas por electrospray tem sido aplicada para estudos de relações de estrutura-atividade de um grupo de bioisósteros (**8–13**) (Figura 6). Esse grupo de bioisósteros foi sintetizado para determinar a função do carbamato no comportamento inibidor da enzima amido hidrolase de ácido graxo (FAAH) caracterizados por éster de ácido *N*-*O*-alquilcarbamânico. Estudos de uma classe de compostos que atuam na inibição dessa enzima foram avaliados por modelagem molecular, mas a fase de inativação da enzima não pode ser explicada. Logo a espectrometria de massas aplicada para relações de estrutura-atividade, verifica a hipótese de que a reação de inativação da enzima hidrolase pode estar relacionada com a propensão de clivagem da ligação do C(O)–O (VALITUTI et al., 2009).

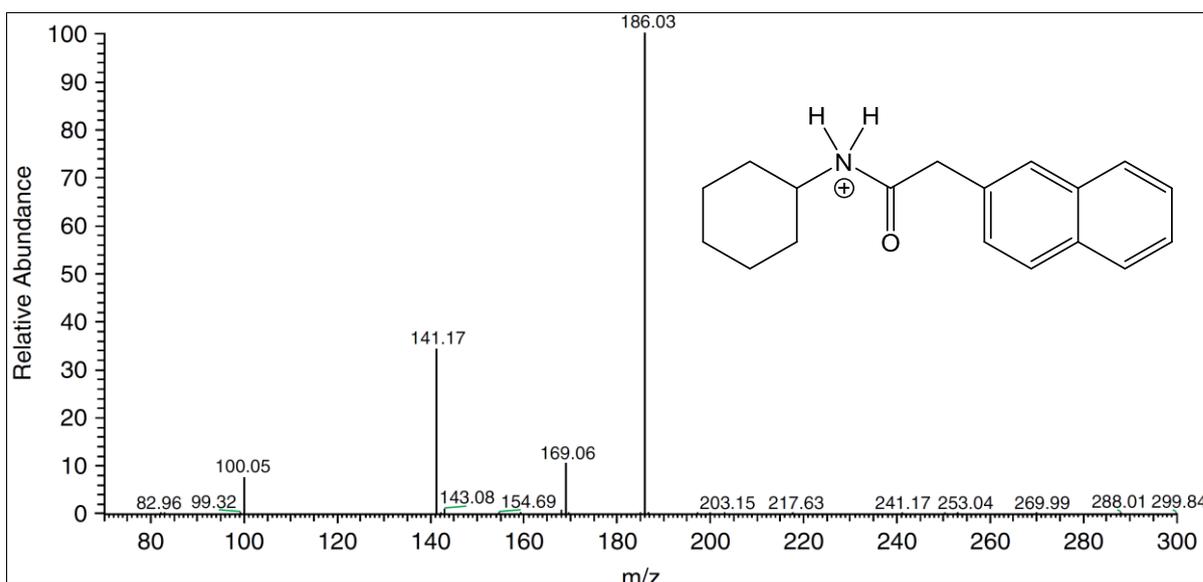
Figura 6 – Estrutura dos bioisósteros **8–13**.



Fonte: VALITUTI et al., 2009 (Adaptado).

Os bioisósteros foram estudados por espectrometria de massas por electrospray no modo positivo. Uma voltagem de 4 kV foi aplicada sobre os compostos resultando em moléculas protonadas. O estudo de fragmentação de uma série de carbamatos permitiu observar que a principal clivagem ocorria entre a ligação C(O)–O. Sendo assim o espectro de EM-EM do composto **8** (m/z 268) pode ser visualizado na Figura 7 (VALITUTI et al., 2009).

Figura 7 – EM-EM-IES-(+) do composto **8** (m/z 268, $[M + H]^+$).



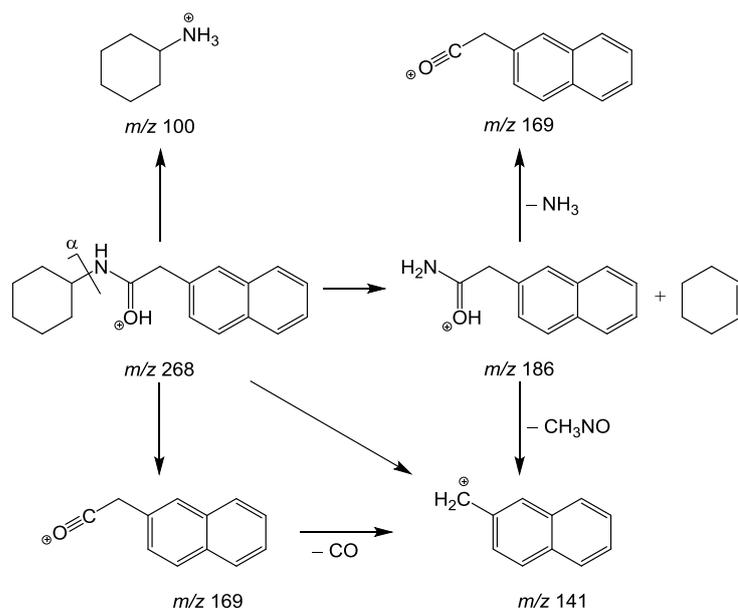
Fonte: VALITUTI et al., 2009 (Adaptado).

Com base na análise do espectro de massas e na estrutura do composto **8** foi proposto que a carga estava sobre o átomo de nitrogênio $[M + H]^+$, mas deve ser considerado que a protonação também é favorecida no grupo R₃ (Figura 6), devido à eficiência na deslocalização de elétrons, demonstrando o local mais básico da amida (ou tioamida). A protonação em R₃ é considerada favorecida para **9**, **10** e **11** (Figura 6), pois há maior densidade de carga negativa, devido os dois átomos de nitrogênio doadores de elétrons (VALITUTI et al., 2009).

O espectro de massas (EM-EM) do composto **8** (Figura 7), apresenta como pico base o sinal com razão m/z 186, cuja proposta de fragmentação é a clivagem da ligação entre o ciclo-hexil e o -NH com o rearranjo de um hidrogênio. O sinal referente ao íon de m/z 141 pode ser justificado a partir da clivagem da ligação C(OH)-CH₂. Já a clivagem da ligação NH-C(OH) pode levar a formação dos íons

com razão m/z 169 e m/z 109. O íon de m/z 186 pode se decompor levando as eliminações neutras de NH_3 e CH_3NO levando a formação dos íons de m/z 169 e m/z 141, respectivamente. O íon acílio pode sofrer eliminação neutra de CO , justificando a formação do íon m/z 141, essas fragmentações são demonstradas na Figura 8 (VALITUTI et al., 2009).

Figura 8 – Proposta de fragmentação para **8** $[\text{M} + \text{H}]^+$.

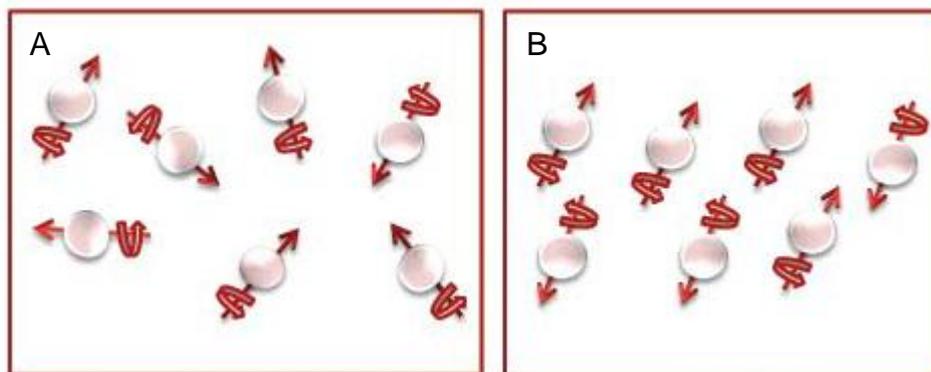


Fonte: VALITUTI et al., 2009 (Adaptado).

1.2.2 Ressonância Magnética Nuclear

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada um método de análise importante para caracterização de compostos orgânicos (DIERCKS et al., 2001). A RMN permite obter informações detalhadas sobre a estrutura molecular do composto em análise. Baseia-se na absorção de radiação eletromagnética por radiofrequência onde as moléculas são submetidas a um campo magnético nuclear. Essas radiações causam transições de *spin* nuclear em átomos, como por exemplo, H^1 ou C^{13} (PARISI; PASTA, 2015). Os núcleos dos átomos, na ausência de um campo magnético aplicado encontram-se dispostos de forma aleatória (Figura 9 A). No entanto, na presença de um campo magnético aplicado encontram-se alinhados (Figura 9 B) (LUZYANIN; ABRANTES, 2010).

Figura 9 – Núcleos de átomos na ausência (A) e na presença (B) de um campo magnético aplicado.

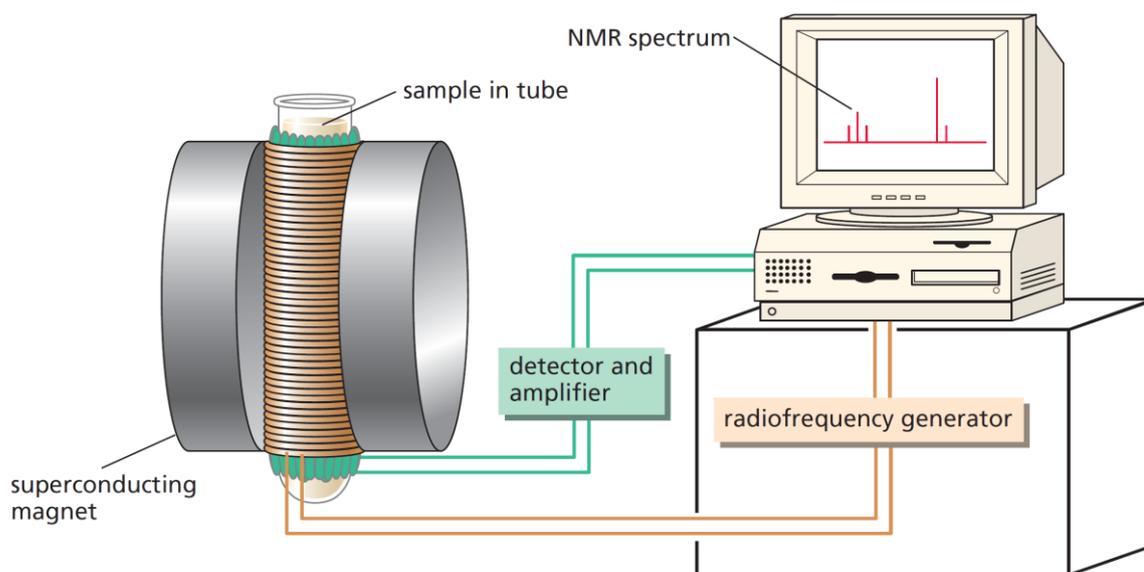


Fonte: LUZYANIN; ABRANTES, 2010.

Quando os núcleos são expostos a uma radiofrequência, pode ocorrer absorção de energia, ou seja, será possível transferir energia da radiação para o núcleo, provocando assim uma mudança de *spin*. Esse fenômeno é denominado de ressonância (LUZYANIN; ABRANTES, 2010). Alguns instrumentos modernos como o espectrômetro *pulsed Fourier transform* (FFT) admite que o campo magnético permaneça constante e que um impulso de radiação eletromagnética de curta duração, excita todos os núcleos simultaneamente. O pulso de radiação eletromagnética abrange uma gama de frequências, de maneira que cada núcleo possa absorver a frequência necessária para entrar em ressonância e produzir um sinal com uma frequência correspondente à ΔE (diferença de energia entre os estados de *spin*) (BRUICE, 2014).

Conforme os núcleos perdem a energia que ganharam do pulso da radiação eletromagnética, a intensidade do sinal decai. Um computador é utilizado para medir a mudança de intensidade desses sinais ao longo do tempo e aplicando uma operação matemática conhecida como transformação de Fourier (FT), convertê-los em dados de intensidade *versus* frequência, para gerar o espectro de RMN (Figura 10) (BRUICE, 2014).

Figura 10 – Representação esquemática de um espectrômetro de RMN.



Fonte: BRUICE, 2014.

As frequências de ressonância de um núcleo dependem da natureza e do ambiente químico deste núcleo. Essas frequências são expressas em ppm, por uma unidade chamada desvio químico (δ). Esse desvio químico indica a localização de um sinal de RMN em relação a um padrão, que possui desvio químico igual a 0 ppm (MACOMBER, 1998). A espectroscopia de RMN é uma técnica importante para obter informações sobre a estrutura das moléculas, pois permite determinar o número e o tipo de grupos químicos presentes (LUZYANIN; ABRANTES, 2010).

1.2.3 Espectroscopia no Infravermelho

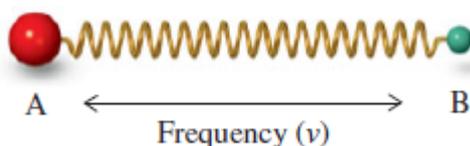
A espectroscopia no infravermelho é uma técnica instrumental simples, rápida e não destrutiva que pode destacar a presença de vários grupos funcionais (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2014). Juntamente com outros métodos físicos de análise, como a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e a Espectrometria de Massas (EM) constituem os principais recursos para a identificação e a elucidação de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

A espectroscopia no infravermelho depende da interação entre a radiação eletromagnética e as vibrações naturais das ligações químicas entre os átomos que

formam as moléculas. Não são todas as vibrações que irão resultar uma banda de absorção na região do infravermelho. Para uma substância absorver a radiação na região do infravermelho deve haver ressonância entre as frequências e as vibrações moleculares, além das vibrações naturais que deve causar alterações no momento dipolar durante as vibrações (MORAES et al., 2008).

A excitação vibracional das ligações de uma molécula é causada pela luz, em energias inferiores às da radiação visível. Essa excitação vibracional ocorre, por exemplo, quando dois átomos (A e B) estão ligados por uma ligação covalente que se estende e se comprime a uma frequência, ν , como em uma mola (Figura 11). A frequência das vibrações do átomo A e do átomo B dependerá da força de ligação entre eles e de seus respectivos pesos moleculares (VOLLHARDT; SCHORE, 2011).

Figura 11 – Excitação vibracional de uma ligação.



Fonte: VOLLHARDT; SCHORE, 2011.

Uma vantagem da espectroscopia no infravermelho é permitir que amostra a ser analisada esteja em qualquer estado físico: sólido, líquido ou gasoso (STUART, 2004). Além disso, é uma técnica muito útil na determinação de compostos orgânicos, pois consegue identificar diretamente muitos grupos funcionais, o que facilita a interpretação de espectros (VOLLHARDT; SCHORE, 2011).

1.3 DOENÇAS NEGLIGENCIADAS

Doenças negligenciadas são doenças endêmicas predominantes em países em desenvolvimento, como África, Ásia e as Américas. Exemplos de doenças negligenciadas: dengue, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, leishmaniose, malária, tuberculose, entre outras. O adjetivo “negligenciada” pode ser justificado pelo fato dessas doenças não instigarem interesse de indústrias farmacêuticas, uma vez que a população atingida é de baixa renda (SOUZA, 2010).

Diante da falta de medicamentos eficientes para essas doenças, este trabalho tem como objetivo a síntese de compostos que possam ser avaliados para o tratamento da doença de Chagas e leishmaniose, uma vez que as estruturas dos isómeros propostos apresentam similaridade com alguns fármacos utilizados no tratamento destas patologias.

1.3.1 Doença de Chagas

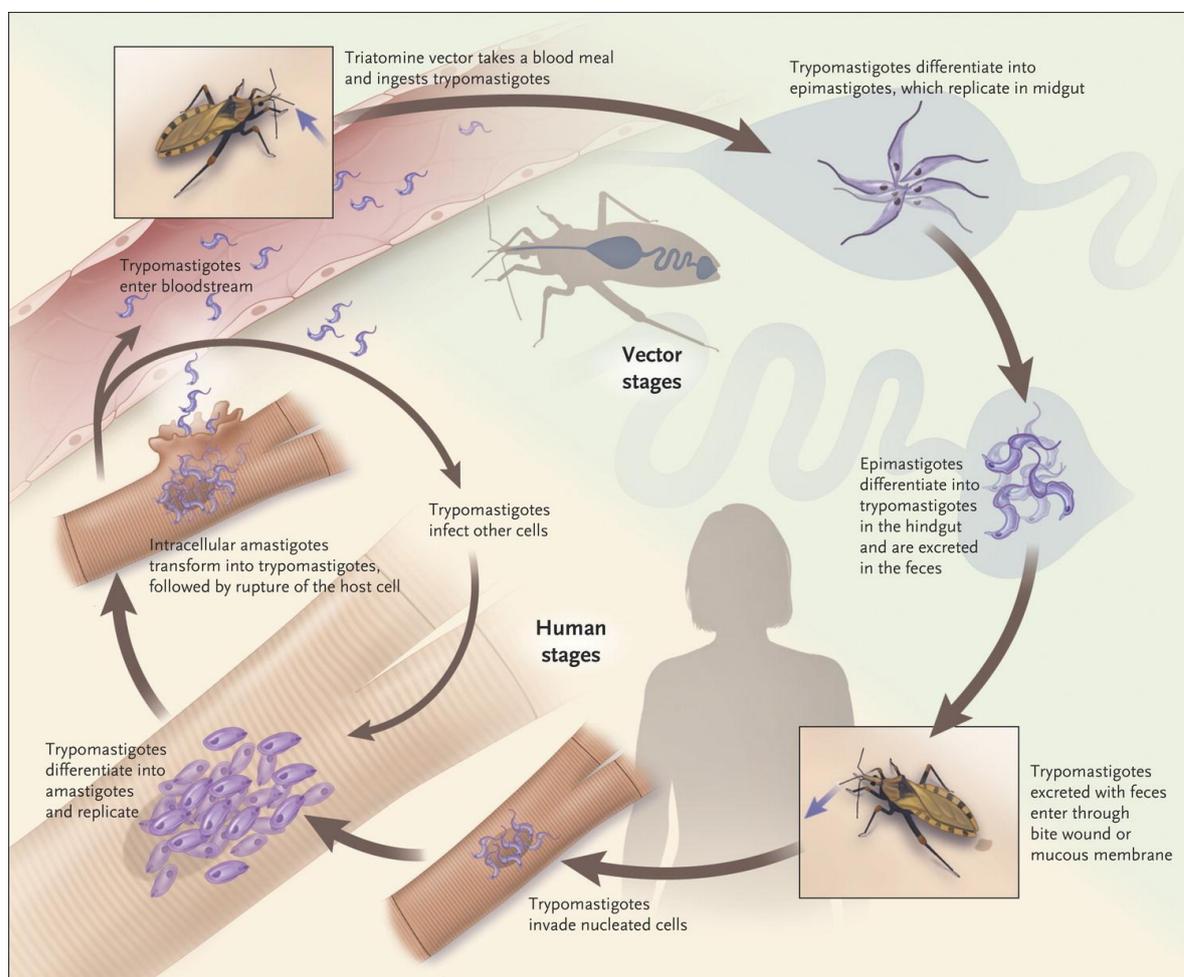
A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, foi descoberta em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas, sendo que dentre as 13 doenças tropicais existentes, ela é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a mais negligenciada. Representando ainda um grande desafio para a saúde pública da América Latina, uma vez que afeta de 8 a 10 milhões de pessoas no mundo (RASSI JR et al., 2012).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). A transmissão vetorial é a forma mais comum de transmissão desta doença na América Latina, neste caso, a transmissão ocorre por meio das fezes dos triatomíneos, popularmente chamados de barbeiros. Outras formas de transmissão da doença podem ser através de transfusão de sangue, transplante de órgãos, acidentes de laboratório, transmissão congênita, entre outras (PEREIRA; NAVARRO, 2013).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (Figura 11) se inicia através da picada do vetor triatomíneo (barbeiro) em um hospedeiro mamífero infectado pela forma tripomastigota sanguínea. Em seguida, os tripomastigotas são encaminhados para o intestino do barbeiro, onde se diferenciam na forma epimastigota. Estas formas epimastigotas começam a se multiplicar e se diferenciam em formas infectantes denominadas tripomastigotas metacíclicos. O barbeiro infectado pica o hospedeiro humano e elimina os tripomastigotas metacíclicos através de suas fezes ao redor da picada. Posteriormente, os tripomastigotas metacíclicos penetram nas células hospedeiras e se diferenciam em formas amastigotas, que se replicam com um tempo de duplicação de aproximadamente 12 horas, durante um período de 4 a 5 dias. Por fim, as formas amastigotas se transformam em tripomastigotas, seguido da

ruptura das células hospedeiras. Os tripomastigotas são liberados para circulação podendo invadir novas células e iniciar novos ciclos replicativos (BERN, 2015).

Figura 12 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.



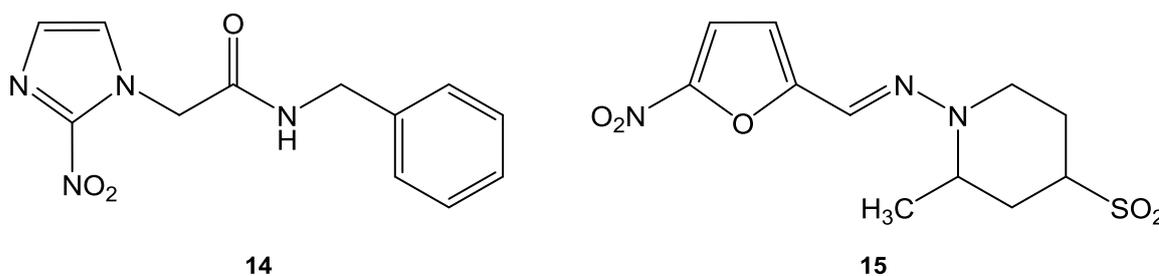
Fonte: BERN, 2015.

A forma inicial da doença de Chagas é caracterizada por uma fase aguda com duração de 30 a 60 dias. Os sintomas aparecem de 7 a 14 dias após a picada do barbeiro infectado. Normalmente a fase aguda é assintomática ou pode apresentar sintomas como febre, dores de cabeça, dores musculares, inchaço, entre outros. Nesta fase da doença a morte ocorre ocasionalmente (< 5–10% dos casos assintomáticos), em decorrência de miocardite severa ou meningoencefalite. Na fase aguda 90% dos indivíduos infectados não são diagnosticados ou tratados, pois os sintomas dificultam a identificação precoce da doença. Sendo assim, após o tempo de infecção da fase aguda o indivíduo entra na fase crônica, uma fase que se

prolonga por todo o tempo de vida do paciente. Na fase crônica, 60–70% dos pacientes não desenvolvem a doença de maneira evidente, ou seja, eles apresentam a forma indeterminada da doença. Os pacientes restantes (30–40%) após 10–30 anos da infecção inicial desenvolvem a forma determinada da doença, que pode atingir os tecidos do coração, o sistema digestivo ou o sistema nervoso (RASSI JR et al., 2010).

A quimioterapia para a doença de Chagas é limitada a dois fármacos nitroheterocíclicos: benzonidazol (BZ) (**14**) e nifurtimox (NFX) (**15**) (Figura 12), ambos são mais eficazes na fase aguda da doença. Na fase crônica da doença, o uso desses fármacos exige tratamento prolongado, possuem eficácia variável e são muitas vezes mal tolerados (ZINGALES et al., 2014). Produzido pelo Laboratório Bayer o NFX (**15**) (1,1-dióxido de tetraidro-3-metil-4[(5-nitrofurilideno)amino]-2H-1,4-tiazina) é um composto da classe dos nitrofurano teve sua comercialização cancelada em vários países devido a sua toxicidade. O BZ (**14**) (*N*-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) é um nitroheterocíclico produzido pelo Laboratório Roche (Rochagan[®]). É o único fármaco utilizado para o tratamento da doença (CERECETTO; GONZÁLEZ, 2010).

Figura 13 – Estrutura química dos fármacos benzonidazol (**14**) e nifurtimox (**15**).



Fonte: DIAS et al., 2009.

O mecanismo de ação do NFX (**15**) está associado à redução dos grupos nitro (NO₂) para grupos amino (NH₂), formando radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos. Esses radicais livres intoxicam o parasita, provocando no organismo do hospedeiro vômito, anorexia, dermatites por hipersensibilidade, polineurite e depressão da medula óssea. Por outro lado, os intermediários nitrorreduzidos do BZ (**14**) se ligam a macromoléculas, sem formação de radicais livres. O BZ causa efeitos colaterais, mas de forma menos intensa (URBINA, 1999).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas é limitado, ineficaz e representa um grande desafio mundial. A identificação de moléculas bioativas e a otimização de compostos líderes são medidas emergenciais para o desenvolvimento de novos fármacos. Porém, devido ao progresso da química medicinal e da síntese orgânica o planejamento de novas entidades químicas têm sido algo promissor (DIAS et al., 2009).

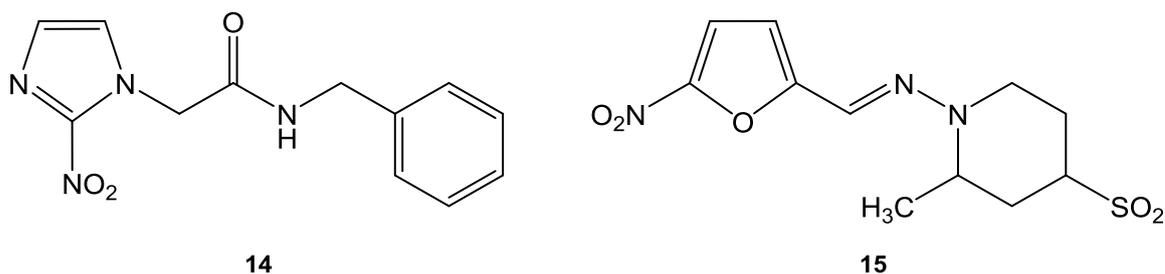
1.3.2 Compostos nitro aromáticos e desenvolvimento de fármacos

O grupo nitro apresenta uma multiplicidade de ações químicas e biológicas. Sua capacidade de atrair elétrons cria sítios eletrofílicos localizados dentro das moléculas. Através de reações de substituição nucleofílica ou reações de oxirredução, esses sítios podem reagir com uma variedade de nucleófilos intra e extracelulares, como, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas, etc (STRAUS, 1979).

Os compostos nitro aromáticos vêm sendo empregados em uma ampla variedade de indicações, como, antineoplásicos, antibióticos, antiparasitários, tranqüilizantes, entre outros. Embora, os mecanismos de ação de muitos fármacos nitro aromáticos serem desconhecidos, sabe-se que alguns fármacos somente desenvolvem suas ações farmacológicas, devido à presença do grupo nitro na estrutura (STRAUS, 1979).

As doenças causadas por tripanossomatídeos possuem fármacos limitados e ineficazes ao tratamento. Os compostos nitro aromáticos têm se apresentado como uma ferramenta de grande potencial para tratar doenças negligenciadas (PATTERSON, 2014). A doença de Chagas possui dois fármacos para tratamento: o benzonidazol e o nifurtimox (Figura 14), ambos são compostos nitro aromáticos onde o grupo nitro está envolvido em seus efeitos tripanocidas (DIAS et al., 2009).

Figura 14 – Estrutura química dos fármacos benzonidazol (**14**) e nifurtimox (**15**).



Fonte: DIAS et al., 2009.

Alguns compostos nitro aromáticos apresentam consideráveis efeitos mutagênicos, carcinogênicos e citotóxicos. Esses efeitos, raramente observados, não deve se tornar um obstáculo na utilização destes compostos para o desenvolvimento de novos fármacos. Principalmente, no desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas, onde há uma grande deficiência de alternativas terapêuticas (DIAS et al., 2009).

Sendo assim, este trabalho apresenta a síntese e a caracterização de uma série de isómeros aromáticos, onde a maioria destes compostos apresenta o grupo nitro em suas estruturas. Diante do considerável potencial biológico dos compostos nitro aromáticos para o tratamento de doenças negligenciadas, alguns compostos sintetizados neste trabalho, foram submetidos à avaliação biológica para o tratamento da doença de Chagas visando obter substâncias mais adequadas e eficazes ao tratamento.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho propõe a síntese, a elucidação estrutural e a avaliação da atividade biológica de uma série de isósteros aromáticos planejados como fármacos com potencial atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. Também propõe estabelecer uma proposta de fragmentação geral para esta série de isósteros, através dos experimentos de MS/MS.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Síntese de isósteros de oxigênio, nitrogênio e enxofre utilizando os substratos 2,6-dicloro-3-nitropiridina, 2-cloro-3-nitropiridina e 1-cloro-2-nitro-benzeno.
- ✓ Realizar a redução do grupo nitro para amino dos produtos obtidos da síntese dos isósteros aromáticos e ciclização *in situ*.
- ✓ Propor mecanismos de fragmentação para os isósteros piridínicos utilizando a espectrometria de massas com *electrospray*.
- ✓ Avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* das substâncias sintetizadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, SOLVENTES E INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ 1-cloro-2-nitro-benzeno, 99%, 1,5 g, código Aldrich: 185760.
- ✓ 2-cloro-3-nitro-piridina, 99%, 2,5 g, código Aldrich: C61607.
- ✓ 2,6-dicloro-3-nitro-piridina, 92%, 2 g, código Aldrich: 193585.
- ✓ cloreto de amônio, 99,5%, 0,150 g , código Aldrich: 213330.
- ✓ ferro, 99,98%, 1,8 g, código Aldrich: 267945.
- ✓ glicinato de etila, 99%, 15,5 g, código Aldrich: G6503.
- ✓ glicolato de etila, 98%, 8,5 mL, código Aldrich: 364843.
- ✓ tioglicolato de etila, 97%, 5 mL, código Aldrich: E34307.
- ✓ hidreto de sódio, 60%, 3,5 g, código Aldrich: 452912.
- ✓ hidróxido de potássio, 85%, 14,5 g, código Quemis: HX0269-00017.
- ✓ hidróxido de sódio, 97%, 1,5 g, código Aldrich: 221465.
- ✓ trietilamina, 99%, 0,75 mL, código Aldrich: T0886.
- ✓ acetonitrila, 99,8%, 8 mL, código Aldrich: 271004.
- ✓ álcool etílico, 100%, 180 mL, código Aldrich: 792799.
- ✓ diclorometano, 100%, 60 mL, código Synth: D1003.
- ✓ éter etílico, 100%, 450 mL, código Synth: E1017.

Os solventes utilizados foram de grau PA. Para as separações cromatográficas em coluna aberta foi utilizada Sílica gel (SiO₂) para cromatografia (0,060 – 0,200 mm, diâmetro de poro 6 nm) Acros Organics.

O método utilizado para o acompanhamento das reações foi cromatografia em camada delgada utilizando placas de alumínio 20 x 20 cm impregnadas com sílica gel, Macherey-Nagel.

Para análises espectroscópicas, espectrométricas e ponto de fusão foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics ultrOTOFG com ionização por *electrospray*. As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão

com fluxo $100 \mu\text{L h}^{-1}$. O capilar foi aquecido a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ com fluxo de gás nebulizante 4 L min^{-1} e 4kV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

- ✓ Espectrômetro de RMN Avance III Bruker (14,1 Tesla), operando em frequência de 600 MHz para os núcleos de hidrogênio e 151 MHz para o carbono.
- ✓ Espectrofotômetro Shimadzu[®] (Kyoto, Japão) modelo IRPrestige-21. A região espectral compreendida na análise foi de 4000 a 400 cm^{-1} , com intervalos de 4 cm^{-1} . Para obtenção dos espectros foram confeccionadas pastilhas de brometo de potássio – KBr.
- ✓ Aparelho de ponto de fusão PF1500 Farma-Gehaka.
- ✓ Espectrofotômetro de Microplaca Stat Fax[®] 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA).

3.2 REAÇÕES

3.2.1 Metodologia geral para reações de substituição nucleofílica aromática

Em um balão de 25 mL foi adicionado o nucleófilo, a base e 10 mL de éter etílico. O sistema foi mantido sob agitação por 15 minutos. Em seguida, o substrato foi adicionado à mistura reacional. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica como fase estacionária e hexano:acetato de etila (7:3) como fase móvel. As cromatoplasmas foram analisadas por irradiação ultravioleta e revelação com anisaldeído. Ao final de cada reação, o meio foi neutralizado com solução saturada de cloreto de amônio. As fases aquosas foram particionadas três vezes com 15 mL de acetato de etila sendo a fase orgânica reunida e o solvente retirado em um evaporador rotativo. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária ($h = 15 \text{ cm}$, $\varnothing = 2,5 \text{ cm}$). A eluição foi realizada em gradiente de hexano:acetato de etila (4:1) até 100% de acetato de etila. A tentativa de preparação dos compostos **19** e **27** necessitou da utilização de refluxo (Tabela 2).

Tabela 2 – Reações de Substituição Nucleofílica Aromática.

Substrato	Quantidade		Nucleófilo	Quantidade		^a Base	Quantidade		Tempo	Temp. (°C)	Produto(s) esperado(s)
	mg	mmol		mg ou mL	mmol		mg	mmol			
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	163	0,85	cloridrato de glicinato de etila	547	3,92	NaOH	311	7,78	30 min	t.a.	16 e 17
2-cloro-3-nitro-piridina	151,5	0,95	cloridrato de glicinato de etila	1067	7,65	NaOH	605	15,0	75 min	t.a.	18
1-cloro-2-nitro-benzeno	151,5	0,96	cloridrato de glicinato de etila	1342	9,62	KOH	1068	19,0	7 h	34,6	19
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	163	0,85	tioglicolato de etila	0,44 mL	4,00	KOH	218	3,88	40 min	t.a.	20 e 21
2-cloro-3-nitro-piridina	151,5	0,95	tioglicolato de etila	0,32 mL	2,92	KOH	159	2,83	40 min	t.a.	22
1-cloro-2-nitro-benzeno	151,5	0,96	tioglicolato de etila	0,64 mL	5,88	KOH	218	3,88	2,5 h	t.a.	23
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	163	0,85	glicolato de etila	0,76 mL	7,92	KOH	218	3,88	20 h	t.a.	24 e 25
2-cloro-3-nitro-piridina	151,5	0,95	glicolato de etila	0,28 mL	2,89	KOH	159	2,83	6 h	t.a.	26
1-cloro-2-nitro-benzeno	151,5	0,96	glicolato de etila	0,92 mL	9,71	KOH	534	9,51	21 h	34,6	27

^a A quantidade de base é o equivalente molar do nucleófilo, exceto para o cloridrato de glicinato de etila que foram utilizados dois equivalentes molares.

3.2.1.1 Preparação dos compostos 16 e 17

✓ Metodologia 1:

Foi utilizado 547 mg de cloridrato de glicinato de etila (3,9 mmol), 311 mg da base (7,8 mmol) e 163 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina (0,9 mmol), de onde foi obtido o produto **16** (sólido amarelo) com 91% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,32 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,28 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,37 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, NH-CH_2), 6,70 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Cl-C=CH), 8,38 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, CH=C-NO_2). Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 14,2 (CH_3), 43,4 (CH_2 , NH-CH_2), 61,7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 112,9 (CH , Cl-C=CH), 127,4 (C , C-NO_2), 137,7 (CH , CH=C-NO_2), 151,6 (C , N=C-NH), 156,5 (C , Cl-C=CH), 169,4 (C , C=O). IV (KBr, cm^{-1}): 3368 $\nu(\text{N-H})$, 1738 $\nu(\text{C=O})$, 1605 $\nu(\text{C=N})$, 1568 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1344 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1213 $\nu(\text{C-CO-O})$ e 1155 $\nu(\text{O-C-C})$. CCD: R_f 0,40. Ponto de fusão: 78,9 °C.

✓ Metodologia 2:

Foi utilizado 1,83 g de cloridrato de glicinato de etila (13,1 mmol), 1,45 g da base (25,9 mmol) e 109 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina (0,6 mmol). O sistema foi mantido sob agitação por 24 h. O produto **17** (sólido amarelo) foi obtido com 92% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 327,1312 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$, 327,1299). CCD: R_f 0,30. Ponto de fusão: 80,2 °C.

3.2.1.2 Preparação do composto 18

O produto **18** (óleo amarelo) foi obtido com 57% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,31 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,26 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,38 (d, 2H, $J = 5,5$ Hz, NH-CH_2), 6,73 (dd, 1H, $J = 8,3$; 4,5 Hz, CH=CH-N), 8,41 (dd, 1H, $J = 4,5$; 1,6 Hz, CH=C-NO_2), 8,45 (dd, 1H, $J = 8,3$; 1,6 Hz, CH-N). Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 14,2 (CH_3), 43,2 (CH_2 , NH-CH_2), 61,5 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 112,7 (CH , CH=CH-N), 128,8 (C , C-NO_2), 135,2 (CH , CH=C-NO_2), 151,9 (C , N=C), 155,3 (CH , CH-N), 170,0 (C , C=O). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 226,0844 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$, 226,0822).

IV (KBr, cm^{-1}): 3391 $\nu(\text{N-H})$, 1744 $\nu(\text{C=O})$, 1611 $\nu(\text{C=N})$, 1504 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1352 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1192 $\nu(\text{C-CO-O})$ e 1045 $\nu(\text{O-C-C})$. CCD: R_f 0,30.

3.2.1.3 Tentativa de preparação do composto 19

✓ **Metodologia 1:**

Nas condições da metodologia 1 o produto **19** não foi obtido.

✓ **Metodologia 2:**

Foi utilizado acetronitrila como solvente, 369 mg de cloridrato de glicinato de etila (2,6 mmol), 0,74 mL de trietilamina (5,2 mmol) e 139 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (0,9 mmol). O sistema foi mantido sob agitação por 93,5 h. O produto **19** não foi obtido.

✓ **Metodologia 3:**

Foi utilizado diclorometano como solvente, 2,01 g de cloridrato de glicinato de etila (14,4 mmol), 456 mg de hidreto de sódio (19 mmol) e 151,5 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (1,0 mmol). O sistema foi mantido sob agitação por 24 horas. O produto **19** não foi obtido.

✓ **Metodologia 4:**

Foi utilizado diclorometano como solvente, 1,79 g de cloridrato de glicinato de etila (12,8 mmol), 1,02 g de hidreto de sódio (42,5 mmol) e 101 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (0,6 mmol). O sistema foi mantido sob agitação e refluxo por 11 h. O produto **19** não foi obtido.

3.2.1.4 Preparação dos compostos 20 e 21

O produto **21** (sólido amarelo) foi obtido com 96% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,27 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R-CH}_2\text{-CH}_3$), 1,28 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 3,99 (s, 2H, $\text{R-CH}_2\text{-S}$), 4,09 (s, 2H, $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-S}$), 4,21 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R-CH}_2\text{-CH}_3$), 4,23 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-CH}_3$), 7,10 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, CH=C-N), 8,33 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, CH=C-NO_2). Dados de RMN ^{13}C

(CDCl₃, 151 MHz): δ 14,1 (CH₃), 14,1 (CH₃), 32,3 (CH₂, R-CH₂-S), 33,1 (CH₂, R₁-CH₂-S), 61,9 (CH₂, R-CH₂-CH₃), 62,1 (CH₂, R₁-CH₂-CH₃), 117,2 (CH, CH=C-N), 133,3 (CH, CH=C-NO₂), 139,2 (C, C-NO₂), 157,0 (C, N=C-S), 163,8 (C, S-C-N), 168,5 (C, R-C=O), 169,0 (C, R₁-C=O). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 361,0513 [M + H]⁺ (calcd para C₁₃H₁₇N₂O₆S₂, 361,0523), m/z 383,0316 [M + Na]⁺ (calcd para C₁₃H₁₆N₂NaO₆S₂, 383,0342) e m/z 399,0072 [M + K]⁺ (calcd para C₁₃H₁₆KN₂O₆S₂, 399,0081). IV (KBr, cm⁻¹): 1744 ν (C=O), 1566 ν (C=N), 1551 ν_{as} (NO₂), 1377 ν_s (NO₂), 1292 ν (C-CO-O) e 1146 ν (O-C-C). CCD: R_f 0,30. Ponto de fusão: 90,0 °C.

3.2.1.5 Preparação do composto 22

O produto **22** (sólido amarelo) foi obtido com 88% de rendimento. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 1,27 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH₂-CH₃), 3,96 (s, 2H, S-CH₂), 4,21 (q, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂-CH₃), 7,24 (dd, 1H, J = 8,3; 4,6 Hz, CH=CH-N), 8,54 (dd, 1H, J = 8,3; 1,6 Hz, CH-N), 8,66 (dd, 1H, J = 4,6; 1,6 Hz, CH=C-NO₂). Dados de RMN ¹³C (CDCl₃, 151 MHz): δ 14,1 (CH₃), 33,6 (CH₂, S-CH₂), 61,2 (CH₂, CH₂-CH₃), 119,2 (CH, CH=CH-N), 134,1 (CH, CH=C-NO₂), 142,0 (C, C-NO₂), 152,5 (CH, CH-N), 156,9 (C, N=C), 169,4 (C, C=O). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 243,0471 [M + H]⁺ (calcd para C₉H₁₁N₂O₄S, 243,0434). IV (KBr, cm⁻¹): 1730 ν (C=O), 1584 ν (C=N), 1553 ν_{as} (NO₂), 1400 ν_s (NO₂), 1138 ν (C-CO-O) e 1070 ν (O-C-C). CCD: R_f 0,40. Ponto de fusão: 71,4 °C.

3.2.1.6 Preparação do composto 23

O produto **23** (sólido amarelo) foi obtido com 85% de rendimento. Dados de RMN de ¹H (CDCl₃, 600 MHz): δ 1,27 (t, 3H, J = 7,1 Hz, CH₂-CH₃), 3,76 (s, 2H, S-CH₂), 4,22 (q, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂-CH₃), 7,31 (ddd, 1H, J = 8,3; 7,1; 1,4 Hz, CH-CH=C-NO₂), 7,52 (dd, 1H, J = 8,3; 1,4 Hz, CH=C-S), 7,59 (ddd, 1H, J = 8,3; 7,1; 1,4 Hz, CH-CH=C-S), 8,24 (dd, 1H, J = 8,3; 1,4 Hz, CH=C-NO₂). Dados de RMN ¹³C (CDCl₃, 151 MHz): δ 14,1 (CH₃), 35,1 (CH₂, S-CH₂), 62,2 (CH₂, CH₂-CH₃), 125,4 (CH, CH=C-S), 126,2 (CH, CH-CH=C-NO₂), 126,9 (CH, CH=C-NO₂), 133,9 (CH, CH-CH=C-S), 136,3 (C, C-S), 146,0 (C, C-NO₂), 168,9 (C, C=O). IV (KBr,

cm^{-1}): 1728 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1591 $\nu(\text{C}=\text{C})$, 1564 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1402 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1173 $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e 1107 $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$. CCD: R_f 0,40. Ponto de fusão: 48,6 °C.

3.2.1.7 Preparação dos compostos 24 e 25

✓ Metodologia 1:

O produto **24** (óleo amarelo) foi obtido com 91% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,29 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3), 4,27 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3), 5,06 (s, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2$), 7,10 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, $\text{Cl}-\text{C}=\text{CH}$), 8,34 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, $\text{CH}=\text{C}-\text{NO}_2$). Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 14,2 (CH_3), 61,6 (CH_2 , CH_2-CH_3), 64,0 (CH_2 , $\text{O}-\text{CH}_2$), 117,8 (CH , $\text{Cl}-\text{C}=\text{CH}$), 123,8 (C , $\text{C}-\text{NO}_2$), 136,6 (CH , $\text{CH}=\text{C}-\text{NO}_2$), 143,6 (C , $\text{Cl}-\text{C}$), 153,5 (C , $\text{N}=\text{C}$), 167,4 (C , $\text{C}=\text{O}$). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 261,0273 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd para $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_5$, 261,0273). IV (KBr, cm^{-1}): 1757 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1568 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1526 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1352 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1211 $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e 1088 $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$. CCD: R_f 0,60.

✓ Metodologia 2:

Foi utilizado 0,75 mL de glicolato de etila (7,9 mmol), 434 mg da base (7,7 mmol) e 55 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina (0,3 mmol). O sistema foi mantido a agitação e refluxo por 27 h. O produto **25** (óleo amarelo) foi obtido com 88% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,49 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1,50 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4,43 (s, 2H, $\text{R}-\text{CH}_2-\text{O}$), 4,45 (s, 2H, $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{O}$), 4,58 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 4,60 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 6,35 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, $\text{CH}=\text{C}-\text{N}$), 8,34 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, $\text{CH}=\text{C}-\text{NO}_2$). Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 14,7 (CH_3), 14,7 (CH_3), 63,6 (CH_2 , $\text{R}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 63,7 (CH_2 , $\text{R}_1-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 64,9 (CH_2), 64,9 (CH_2), 102,9 (CH , $\text{CH}=\text{C}-\text{N}$), 116,1 (C , $\text{C}-\text{NO}_2$), 126,4 (CH , $\text{CH}=\text{C}-\text{NO}_2$), 137,3 (C , $\text{O}-\text{C}-\text{N}$), 139,0 (C , $\text{N}=\text{C}-\text{O}$), 157,1 (C , $\text{R}-\text{C}=\text{O}$), 165,1 (C , $\text{R}_1-\text{C}=\text{O}$). IV (KBr, cm^{-1}): 1755 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1603 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1529 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1352 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1209 $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e 1096 $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$. CCD: R_f 0,60.

3.2.1.8 Preparação do composto 26

✓ **Metodologia 1:**

Nas condições da metodologia 1 o produto **26** não foi obtido.

✓ **Metodologia 2:**

Foi utilizado 1,28 mL de glicolato de etila (12,9 mmol), 708 mg da base (12,6 mmol) e 202 mg de 2-cloro-3-nitro-piridina (1,3 mmol). O tempo da reação foi 15 h. O produto **26** (óleo amarelo) foi obtido com 78% de rendimento. Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz): δ 1,19 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,16 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 4,99 (s, 2H, O-CH_2), 7,04 (dd, 1H, $J = 8,0$; 4,6 Hz, CH=CH-N), 8,17 (dd, 1H, $J = 8,0$; 1,7 Hz, CH-N), 8,57 (dd, 1H, $J = 4,7$; 1,7 Hz, CH=C-NO_2). Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 14,1 (CH_3), 61,7 (CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 63,4 (CH_2 , O-CH_2), 117,6 (CH , CH=CH-N), 134,3 (C , C-NO_2), 135,9 (CH , CH=C-NO_2), 151,2 (CH , CH-N), 155,0 (C , N=C), 167,9 (C , C=O). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 227,0703 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd para $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_5$, 227,0662). IV (KBr, cm^{-1}): 1751 $\nu(\text{C=O})$, 1472 $\nu(\text{C=N})$, 1593 $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$, 1400 $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, 1261 $\nu(\text{C-CO-O})$ e 1090 $\nu(\text{O-C-C})$. CCD: R_f 0,40 (CHCl_3 :Hex 9:1).

3.2.1.9 Tentativa de preparação do composto 27

✓ **Metodologia 1:**

Nas condições da metodologia 1 o produto **27** não foi obtido.

✓ **Metodologia 2:**

Foi utilizado diclorometano como solvente, 2,3 mL de glicolato de etila (23,8 mmol), 762 mg de hidreto de sódio (31,8 mmol) e 151,5 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (0,9 mmol). O tempo da reação foi 27 horas. O produto **27** não foi obtido.

✓ **Metodologia 3:**

Foi utilizado diclorometano como solvente, 1,2 mL de glicolato de etila (12,7 mmol), 508 mg de hidreto de sódio (21,2 mmol) e 101 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (0,6 mmol). O tempo da reação foi 11 horas. O produto **27** não foi obtido.

3.2.2 Metodologia geral para reações de ciclização

Em um balão de 50 mL foi adicionado o produto obtido da reação de S_NAr (**17**, **18**, **21**, **22**, **23**, **25** e **26**), o cloreto de amônio e 30 mL de etanol:água (2:1). A reação foi mantida sob agitação por 15 min, em seguida, foi feita a adição de ferro metálico e deixada sob refluxo por 4,5 h (Tabela 3). Ao final de cada reação, foi adicionada água destilada à mistura reacional. O meio foi filtrado e em seguida, as fases aquosas foram particionadas três vezes com 20 mL de acetato de etila sendo a fase orgânica reunida e o solvente evaporado em evaporador rotativo. A reação foi acompanhado por CCD utilizando sílica como fase estacionária e hexano:acetato de etila (7:3) como fase móvel. As cromatoplasmas foram analisadas por irradiação ultravioleta e revelação com anisaldeído. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária (h = 15 cm, Ø = 2,5 cm). A eluição foi realizada em gradiente de hexano:acetato de etila (1:1) até 100% de acetato de etila.

Tabela 3 – Reações de redução do grupo nitro e ciclizações *in situ*.

Composto	Quantidade		Cloreto de amônio		Ferro		Produto(s) esperado (s)
	mg	mmol	mg	mmol	mg	mmol	
17	150	0,46	14	0,27	144	2,04	28
18	200	0,89	28	0,52	279	4,98	29
21	200	0,56	18	0,33	176	3,14	30
22	100	0,41	13	0,24	130	2,32	31
23	168	0,69	22	0,41	219	3,91	32
25	100	0,30	10	0,19	96	1,71	33
26	100	0,44	14	0,26	139	2,48	34

3.2.2.1 Tentativa de preparação do composto **28**

Nas condições reacionais o produto **28** não foi obtido.

3.2.2.2 Preparação do composto 29

O produto **29** (sólido marrom) foi obtido com 71% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 150,0684 $[M + H]^+$ (calcd para $C_7H_8N_3O$, 150,0662). IV (KBr, cm^{-1}): 3453 $\nu(N-H)$, 3049 $\nu(C-H)$, 1747 $\nu(C=O)$, 1616 $\nu(C=N)$ e 1584 $\nu(C=C)$. CCD: R_f 0,30. Ponto de fusão: 80,0 °C.

3.2.2.3 Preparação do composto 30

O produto **30** (sólido amarelo) foi obtido com 59% de rendimento. Dados de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 1,24 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3), 3,47 (s, 2H, $S-CH_2-CO_2$), 3,83 (s, 2H, $S-CH_2-CO$), 4,17 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz, CH_2-CH_3), 6,90 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, $CH=C-N$), 6,93 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, $CH=C-NH$). Dados de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 151 MHz): δ 14,5 (CH_3), 29,8 (CH_2 , $S-CH_2-CO_2$), 33,1 (CH_2 , $S-CH_2-CO$), 61,5 (CH_2 , CH_2-CH_3), 119,7 (CH , $CH=C-N$), 124,8 (C, $C-NH$), 129,4 (CH , $CH=C-NH$), 143,4 (C, $S-C-N$), 151,2 (C, $N=C$), 165,3 (C, $C=O$), 169,9 (C, $NH-C=O$). Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 285,0384 $[M + H]^+$ (calcd para $C_{11}H_{13}N_2O_3S_2$, 285,0362). IV (KBr, cm^{-1}): 1794 $\nu(C=O)$, 1732 $\nu(C=O)$, 1661 $\nu(C=N)$, 1188 $\nu(C-CO-O)$ e 1132 $\nu(O-C-C)$. CCD: R_f 0,30. Ponto de fusão: 149,0 °C.

3.2.2.4 Preparação do composto 31

O produto **31** (óleo amarelo) foi obtido com 48% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 167,0306 $[M + H]^+$ (calcd para $C_7H_7N_2OS$, 167,0274). IV (KBr, cm^{-1}): 3069 $\nu(C-H)$, 1786 $\nu(C=O)$, 1682 $\nu(C=N)$ e 1580 $\nu(C=C)$. CCD: R_f 0,40.

3.2.2.5 Preparação do composto 32

O produto **32** (óleo amarelo) foi obtido com 49% de rendimento. Dados de RMN de 1H ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 3,46 (s, 2H, $S-CH_2$), 6,93 (dd, 1H, $J = 7,8$; 1,4 Hz, $CH-C-N$), 7,04 (ddd, 1H, $J = 8,3$; 7,8; 1,4 Hz, $CH=CH-C-S$), 7,20 (ddd, 1H, $J = 8,3$; 7,8; 1,4 Hz, $CH=CH-C-N$), 7,34 (dd, 1H, $J = 7,8$; 1,4 Hz, $CH-C-S$). Dados de RMN

^{13}C (CDCl_3 , 151 MHz): δ 30,0 (CH_2 , $\text{S}-\underline{\text{CH}_2}$), 117,4 (CH , $\underline{\text{CH}}-\text{C}-\text{N}$), 119,9 (CH , $\underline{\text{CH}}=\text{CH}-\text{C}-\text{S}$), 123,9 (C , $\underline{\text{C}}-\text{S}$), 127,3 (CH , $\underline{\text{CH}}=\text{CH}-\text{C}-\text{N}$), 127,8 (CH , $\underline{\text{CH}}-\text{C}-\underline{\text{S}}$), 136,4 (C , $\underline{\text{C}}-\text{N}$), 166,4 (C , $\underline{\text{C}}=\text{O}$). IV (KBr, cm^{-1}): 3063 $\nu(\text{C}=\text{H})$, 1734 $\nu(\text{C}=\text{O})$ e 1584 $\nu(\text{C}=\text{C})$. CCD: R_f 0,40.

3.2.2.6 Tentativa de preparação do composto 33

Nas condições reacionais o produto **33** não foi obtido.

3.2.2.7 Preparação do composto 34

O produto **34** (óleo amarelo) foi obtido com 72% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH) m/z 151,0518 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd para $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$, 151,0502). IV (KBr, cm^{-1}): 3019 $\nu(\text{C}-\text{H})$, 1755 $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1541 $\nu(\text{C}=\text{N})$ e 1458 $\nu(\text{C}=\text{C})$. CCD: R_f 0,40.

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1 Ensaios de citotoxicidade

Para avaliar os efeitos citotóxicos dos compostos foi utilizado o teste MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolium). O princípio deste método consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutases das células vivas (MOSMANN, 1983). Para o teste, $1,0 \times 10^5$ células da linhagem LLC-MK₂ (mesma linhagem utilizada para a manutenção do *T. cruzi*) foram semeadas em microplacas de 96 poços, na ausência, na presença dos compostos (0,2 a 500 μM) ou na presença de benzonidazol (0,2 a 500 μM). As células foram incubadas em estufa de 5% de CO_2 a 37°C por 72 h.

Após este período, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 μL de solução de MTT (5 mg / mL^{-1}), e as células foram incubadas por 3 h. Em seguida, foram acrescentados 50 μL DMSO (dimetilsufóxido) para dissolver os cristais azuis formados, e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 545 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata, e a porcentagem de viabilidade celular foi determinada através dos valores de absorção em células tratadas dividido pelos

valores de absorção de células não tratadas, ou seja, Viabilidade celular (%) = (Absorbância do tratamento)/(Absorbância do controle negativo) x 100. O valor de IC₅₀, concentração (μM) que inibiu 50% o crescimento celular, foi determinada por meio de curva dose-resposta utilizando o programa estatístico *GraphPad Prism 5.0* para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3.2 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* in vitro sobre as formas amastigotas

Os ensaios foram realizados conforme descrito anteriormente (BUCKNER et al., 1996). Em placas de 96 poços, células da linhagem LLCMK₂ foram plaqueadas em uma concentração de $1,0 \times 10^5$ cel.mL⁻¹(células / mL). Formas tripomastigotas da cepa *CL Brener* foram adicionadas em uma razão de 10:1 e incubadas por 24 h, a 37°C, em ambiente 5% de CO₂. Após 12 horas, as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante foram retiradas por lavagens sucessivas e permaneceram somente as formas amastigotas. Os compostos em análise foram adicionados em diferentes concentrações (0,2–500 μM, em diluições seriadas) e permaneceram em cultura por 72 h. Ao final deste período, foi adicionado 400 μM de CPRG (clorofenol vermelho-β-D-galactopirano) e 0,3% de Triton X-100, pH 7,4. Após 6 h de reincubação nas mesmas condições, a placa foi analisada em um espectrofotômetro a 570 nm. Para os controles foi utilizado o benzonidazol (controle positivo) nas mesmas concentrações dos compostos avaliados, e o solvente utilizado para a solubilização dos compostos (controle negativo).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA

A proposta sintética para a formação de todas as substâncias (**16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26**) está fundamentada na reação de Substituição Nucleofílica Aromática (S_NAr), entre os nucleófilos, glicinato de etila, glicolato de etila e tioglicolato de etila e os substratos 2,6-dicloro-3-nitro-piridina, 2-cloro-3-nitro-piridina e 1-cloro-2-nitro-benzeno. A presente reação é favorecida devido ao grupo nitro, um forte eletro-receptor, orto e para em relação à posição do grupo abandonador, no caso, os cloretos em posição C-2 e C-6 do anel piridínico ativando o anel aromático na S_NAr . O grupo nitro é o principal substituinte empregado nestes tipos de reações, pois possui uma grande capacidade de estabilização do intermediário carbânion formado. A S_NAr foi auxiliada pela base (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidreto de sódio) que ficou em contato com os nucleófilos de 5–10 minutos antes da adição do substrato. Este auxiliou a captura do(s) hidrogênio(s) ligado(s) ao átomo de nitrogênio, enxofre e oxigênio, aumentando assim sua nucleofilicidade e permitindo que o processo reacional ocorresse em um bom rendimento.

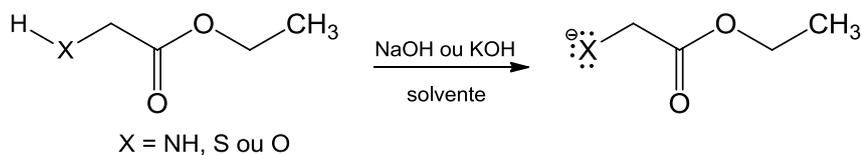
A maioria dos produtos obtidos foi sintetizada a partir de substratos piridínicos que são considerados mais reativos que o substrato 1-cloro-2-nitro-benzeno. O anel benzênico é considerado pouco reativo, devido à estabilidade do anel que possui uma nuvem ininterrupta de elétrons π , portanto suas reações não ocorrem facilmente. A baixa reatividade do benzeno também pode ser explicada pelo fato de seu orbital molecular LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) estar em um nível energético mais alto que o orbital molecular LUMO da piridina. Isso faz com que a piridina seja mais reativa frente à nucleófilos.

O tioglicolato de etila, derivado que apresenta enxofre em sua estrutura, foi o nucleófilo mais reativo em comparação ao cloridrato de glicinato de etila e o glicolato de etila, que dispõem, respectivamente, de nitrogênio e oxigênio. O enxofre apresenta maior polarizabilidade o que aumenta seu caráter nucleofílico perante o nitrogênio e o oxigênio.

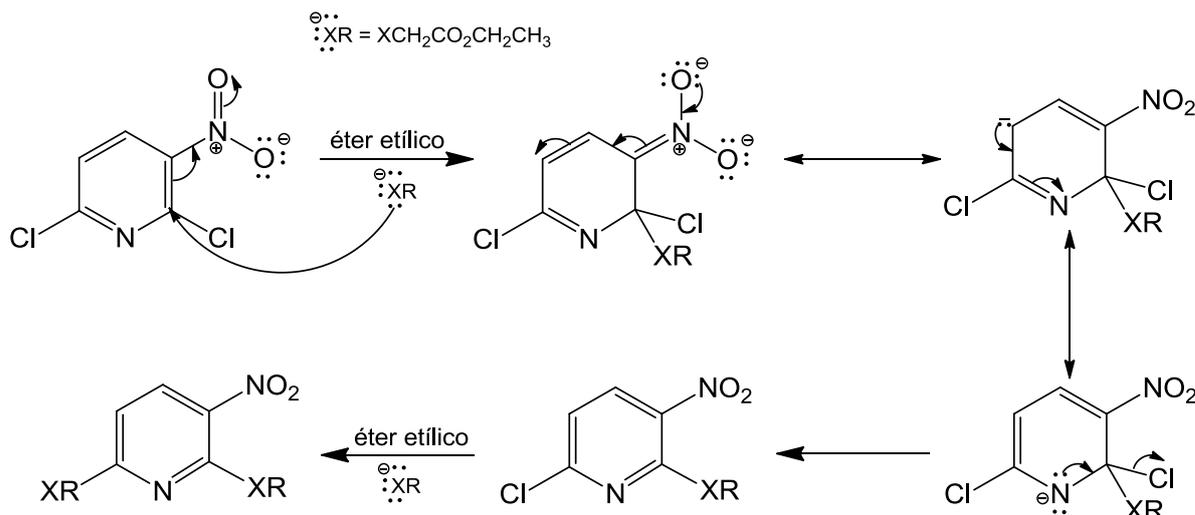
O mecanismo da reação de substituição nucleofílica aromática está descrito na Figura 15 e a formação dos produtos ocorre de forma semelhante.

Figura 15 – Mecanismo da reação de S_NAr para a 2,6-dicloro-3-nitropiridina.

Formação do nucleófilo:



Reação de Substituição Nucleofílica Aromática:



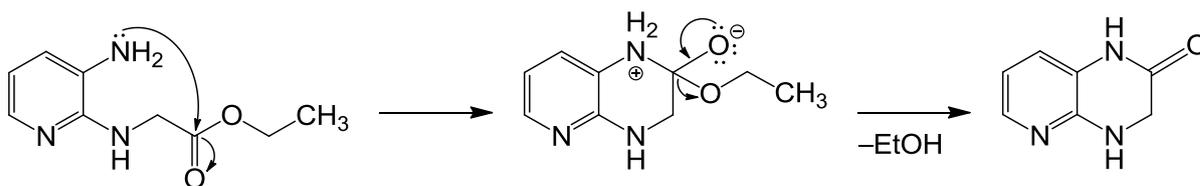
Fonte: A AUTORA, 2016.

4.2 REDUÇÕES DO GRUPO NITRO PARA AMINO E REAÇÕES DE CICLIZAÇÃO *IN SITU*

Em síntese orgânica é comum a conversão de compostos nitro aromáticos para aminas aromáticas. Existem várias metodologias e diversos tipos de agentes redutores, que variam de acordo com as posições relativas do grupo nitro e dos substituintes do anel aromático (LIU et al., 2005).

Para a redução do grupo nitro dos compostos **17**, **18**, **21**, **22**, **23**, **25** e **26** foi utilizado ferro metálico e cloreto de amônio em etanol/água (2:1) sob refluxo (LI et al., 1995). Em seguida foi feita a reação de ciclização intramolecular destes compostos resultando nos produtos **29**, **30**, **31**, **32** e **34**. A reação de ciclização ocorre através do ataque nucleofílico do nitrogênio sobre o carbono da carbonila (eletrófilo), seguida da eliminação de uma molécula de etanol (Figura 16).

Figura 16 – Proposta de mecanismo para a ciclização intramolecular da 2-cloro-3-nitropiridina.

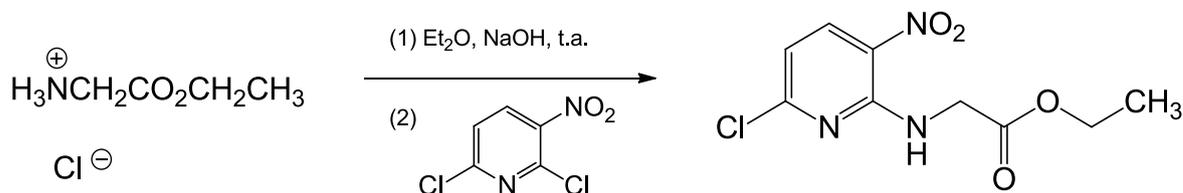


Fonte: A AUTORA, 2016.

4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

4.3.1 Determinação estrutural do composto 16

Figura 17 – Reação para formação do composto 16.

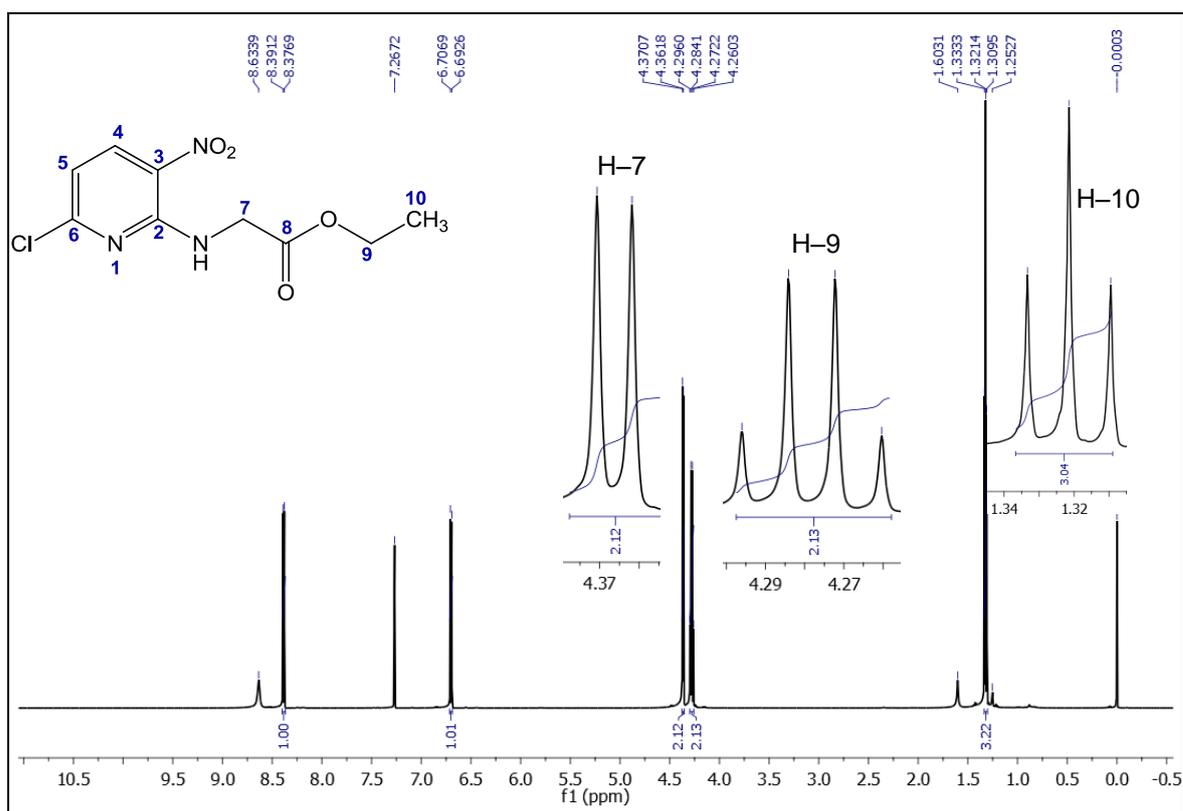


Fonte: A AUTORA, 2016.

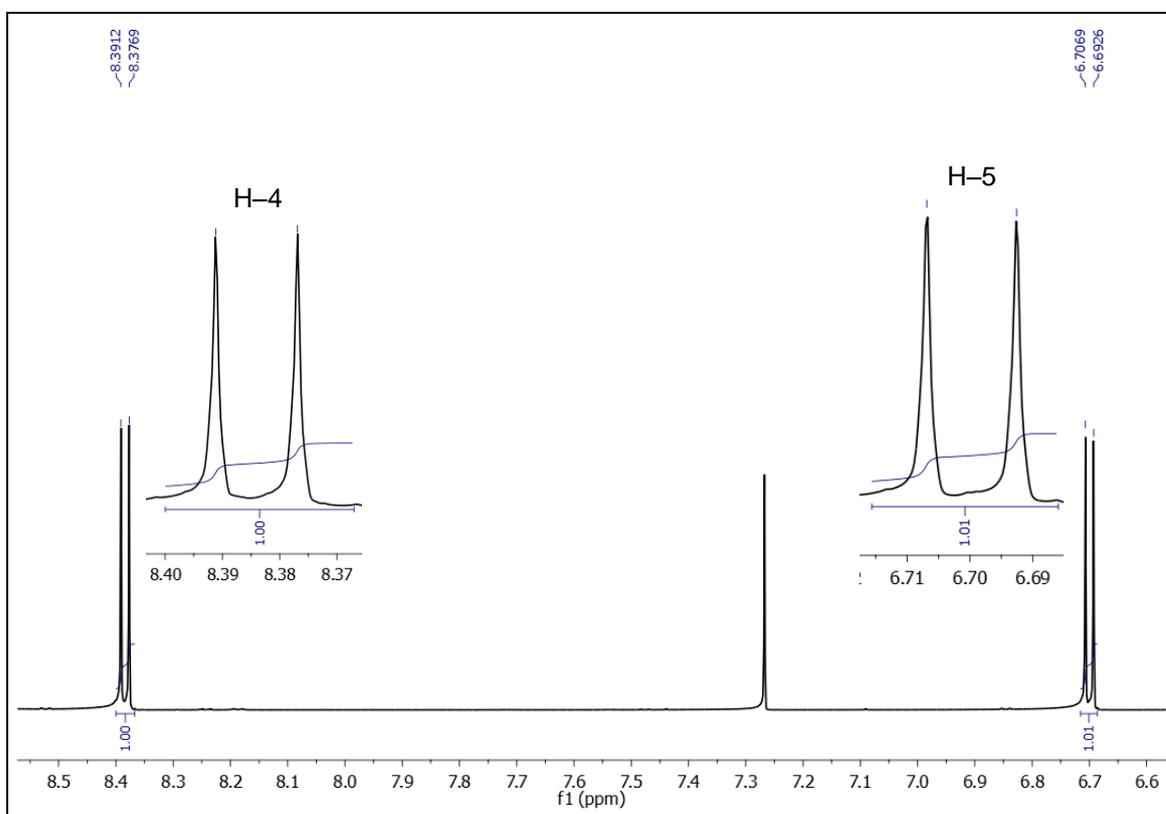
A substância **16** foi sintetizada como um sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 78,9 °C.

A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 1) do composto **16** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois dubletos em δ 8,38 e 6,70, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,6$ Hz) e H-5 (1H, $J = 8,6$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral (glicinato de etila) em C-2 do anel piridínico, introduzida a partir da reação de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, foi confirmada pela presença de um dubleto em δ 4,37, atribuído a H-7 (2H, $J = 5,3$ Hz), um quadrupeto em δ 4,28 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um tripleto em δ 1,32 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 4).

Espectro 1 – Espectro de RMN ¹H do composto **16** (600 MHz, CDCl₃).



Espectro 2 – Ampliação do espectro 1 (δ 6,6–8,5), do composto **16**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários C-2, C-3 e C-6 (δ 151,6, 127,4 e 156,5) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e dois não substituídos C-4, e C-5 (δ 137,7, e 112,9, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 43,4 e 61,7, uma carbonila (C-8) em δ 169,4 e uma metila (C-10) em δ 14,2, característico da cadeia linear do glicinato de etila (Espectro 3; Tabela 4). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico trissubstituído.

Espectro 3 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **16** (125 MHz, CDCl_3).

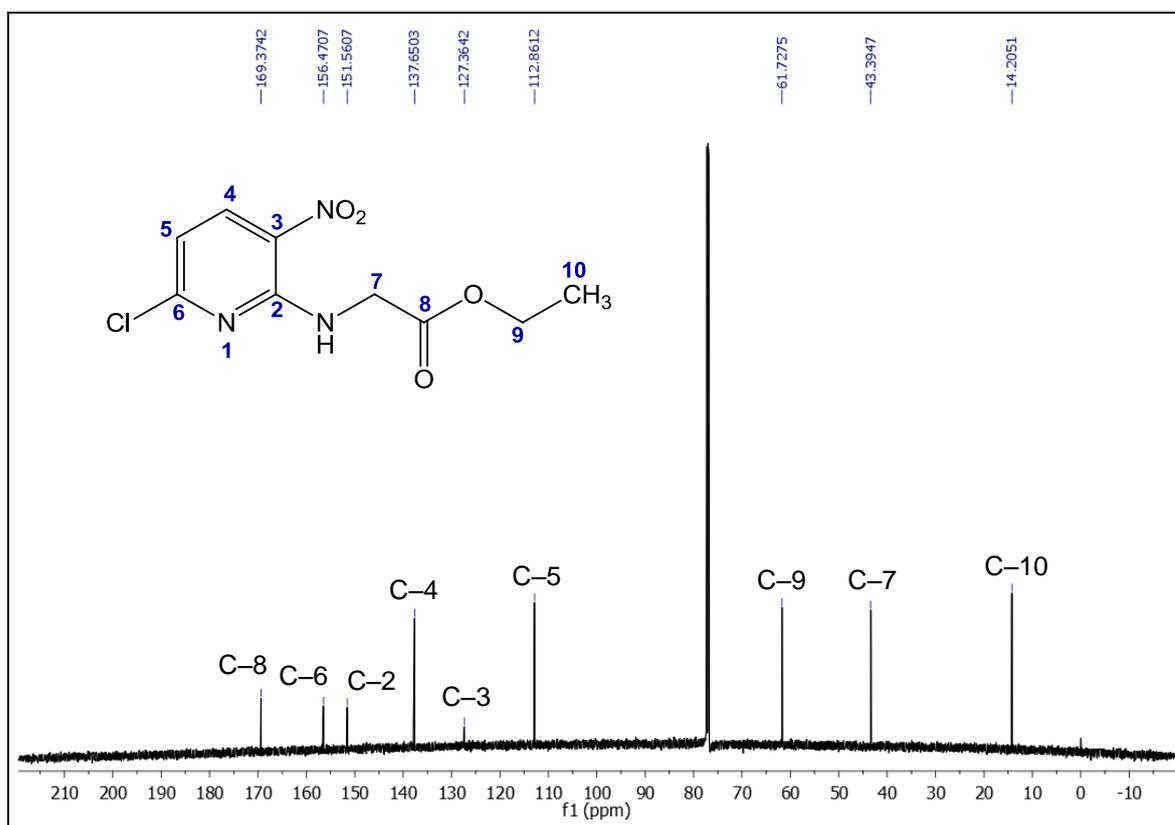


Tabela 4 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **16** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	153,6	151,6
3	–	–	127,8	127,4
4	8,58	8,38	137,5	137,7
5	6,78	6,70	114,6	112,9
6	–	–	159,9	156,5
7	4,02	4,37	42,1	43,4
8	–	–	169,5	169,4
9	4,13	4,28	61,0	61,7
10	1,29	1,32	14,1	14,2

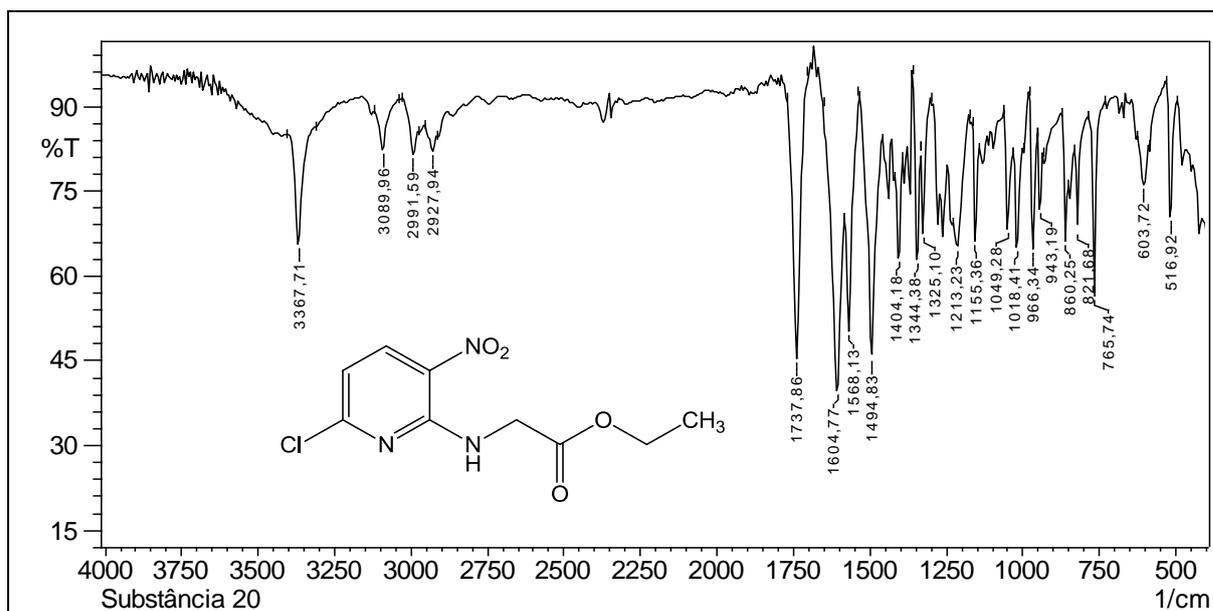
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

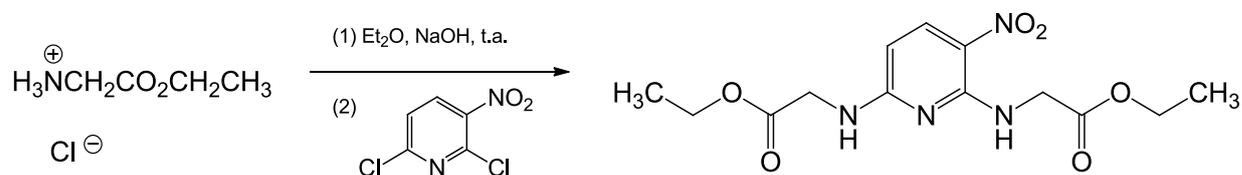
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **16** permitiu identificar uma banda em 3368 cm^{-1} , proveniente ao estiramento $\nu(\text{N-H})$. A banda relativa ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C=O})$, foi observada em 1738 cm^{-1} , e as duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C-CO-O})$ e $\nu(\text{O-C-C})$, em 1213 e 1155 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 4). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1568 e 1344 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, observou-se uma banda em 1605 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 4 – Espectro na região do IV do composto **16**.



4.3.2 Determinação estrutural do composto **17**

Figura 18 – Reação para formação do composto **17**.

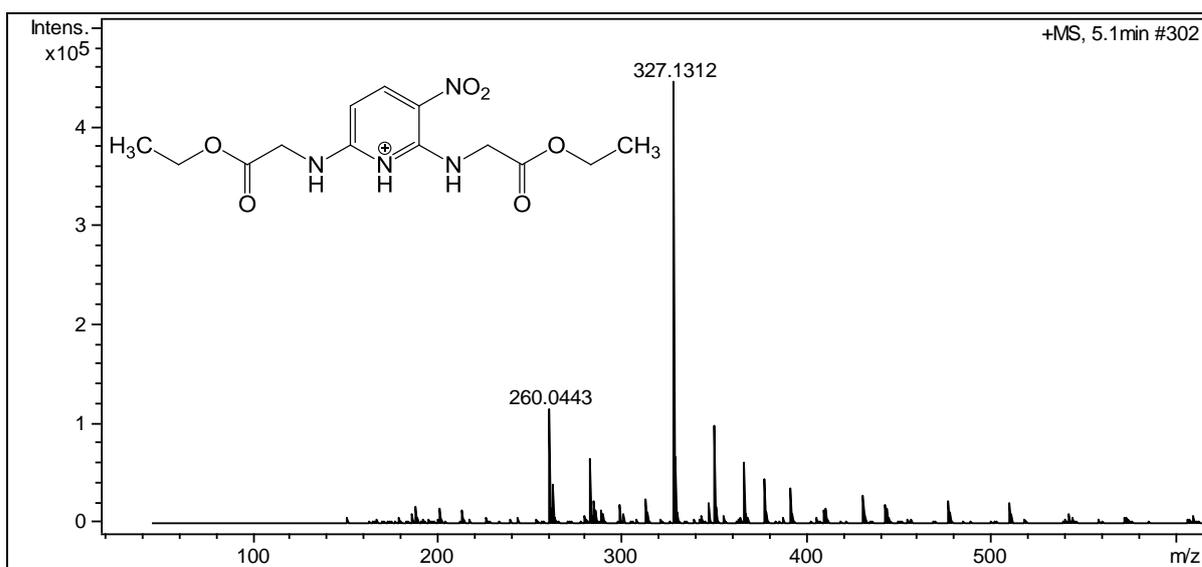


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **17**, inédita na literatura, foi sintetizada como um sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,30), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 80,2 °C.

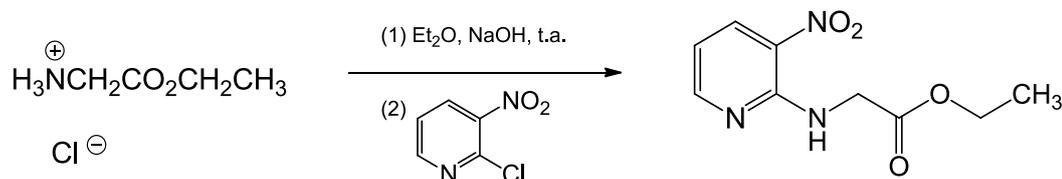
Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo C₁₃H₁₈N₄O₆, com índice de deficiência de hidrogênio igual a sete. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 327,1312 [M + H]⁺, calculado para C₁₃H₁₉N₄O₆, 327,1299 (Espectro 5). O fato da substância **17** não ter sido purificada, justifica o sinal observado em m/z 260,0443.

Espectro 5 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **17**.



4.3.3 Determinação estrutural do composto **18**

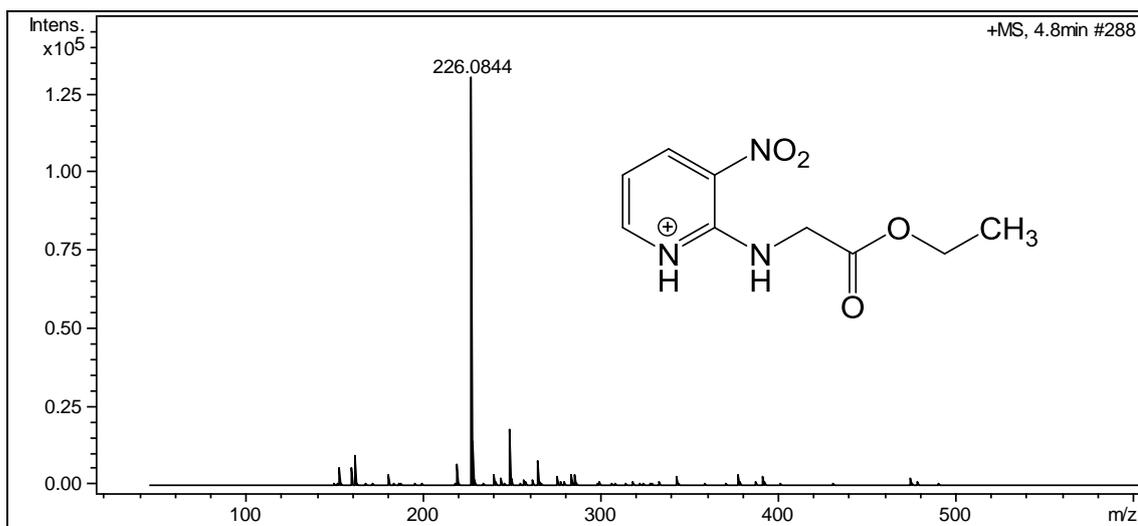
Figura 19 – Reação para formação do composto **18**.



Fonte: A AUTORA, 2016.

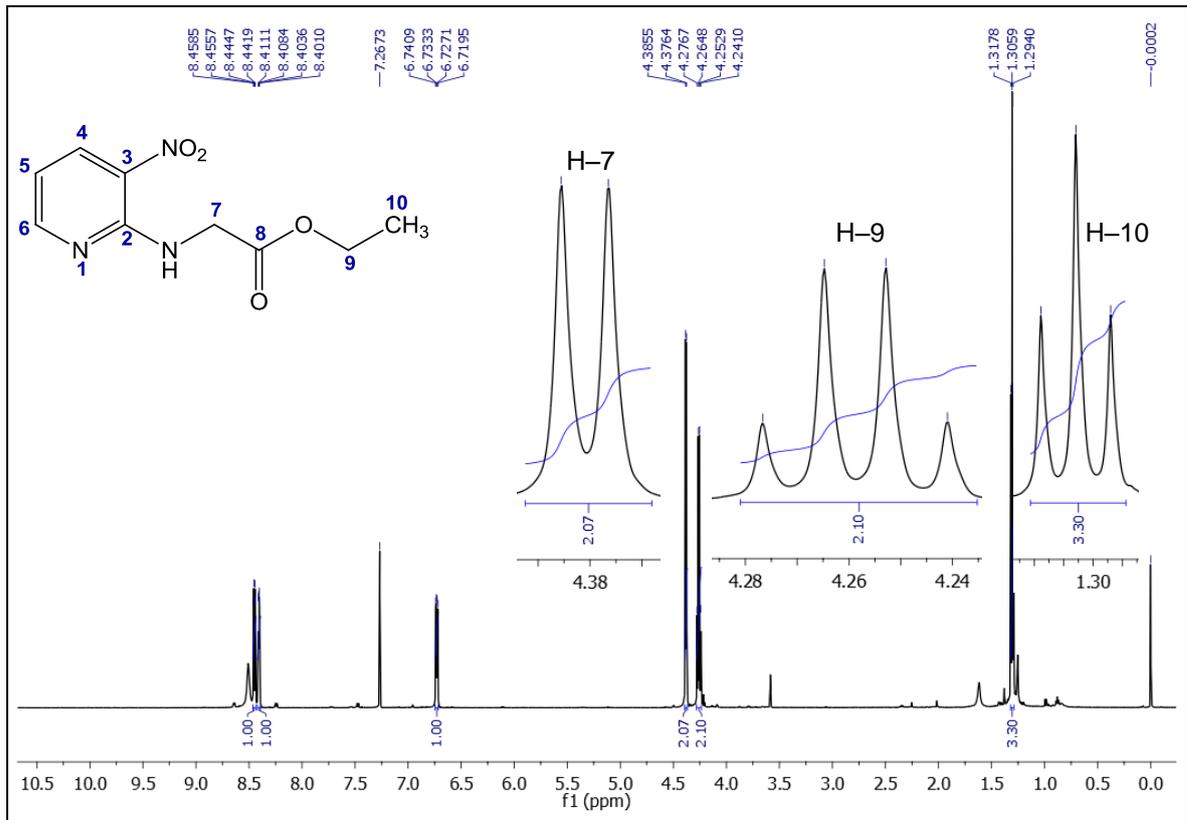
A substância **18** foi sintetizada como óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,30), também foi possível observá-la quando inspecionada em câmara de UV (λ 254 nm). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 226,0844 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4$, 226,0822 (Espectro 6).

Espectro 6 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **18**.

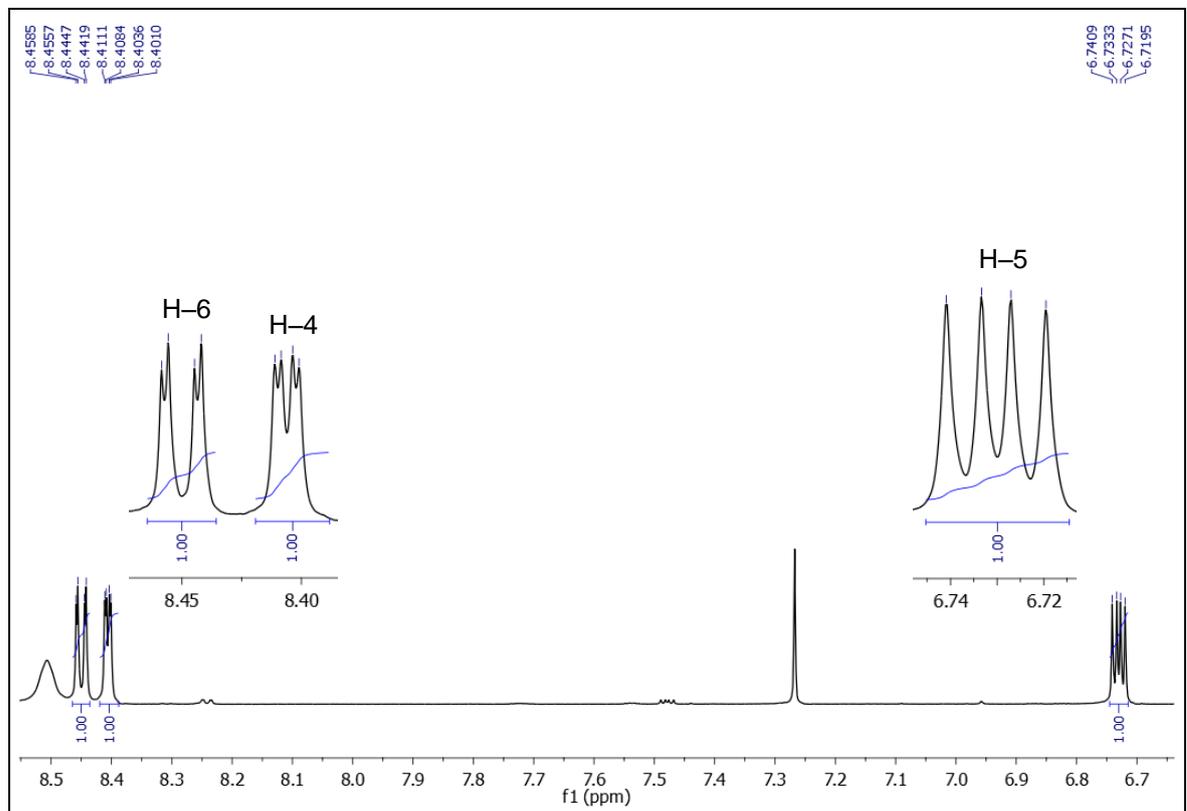


A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 7) do composto **18** permitiu caracterizar o núcleo piridínico dissustituído através da presença de três duplos dubletos em δ 8,41, 6,73 e 8,45, atribuídos a H-4 (1H, $J = 4,5; 1,6$ Hz), a H-5 (1H, $J = 8,3; 4,5$ Hz) e a H-6 (1H, $J = 8,3; 1,6$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral em C-2, referente ao glicinato de etila foi confirmada pela presença de um dubleto em δ 4,38, atribuído a H-7 (2H, $J = 5,5$ Hz), um quadrupletto em δ 4,26 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um triplete em δ 1,31 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 5).

Espectro 7 – Espectro de RMN ^1H do composto **18** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 8 – Ampliação do espectro 7 (δ 6,7–8,5), do composto **18**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo dois quaternários C-2 e C-3 (δ 151,9 e 128,8) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e três não substituídos C-4, C-5 e C-6 (δ 135,2, 112,7 e 155,3, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 43,2 e 61,5, uma carbonila (C-8) em δ 170,0 e uma metila (C-10) em δ 14,2, característico da cadeia linear do glicinato de etila (Espectro 9; Tabela 5). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico dissubstituído.

Espectro 9 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **18** (125 MHz, CDCl_3).

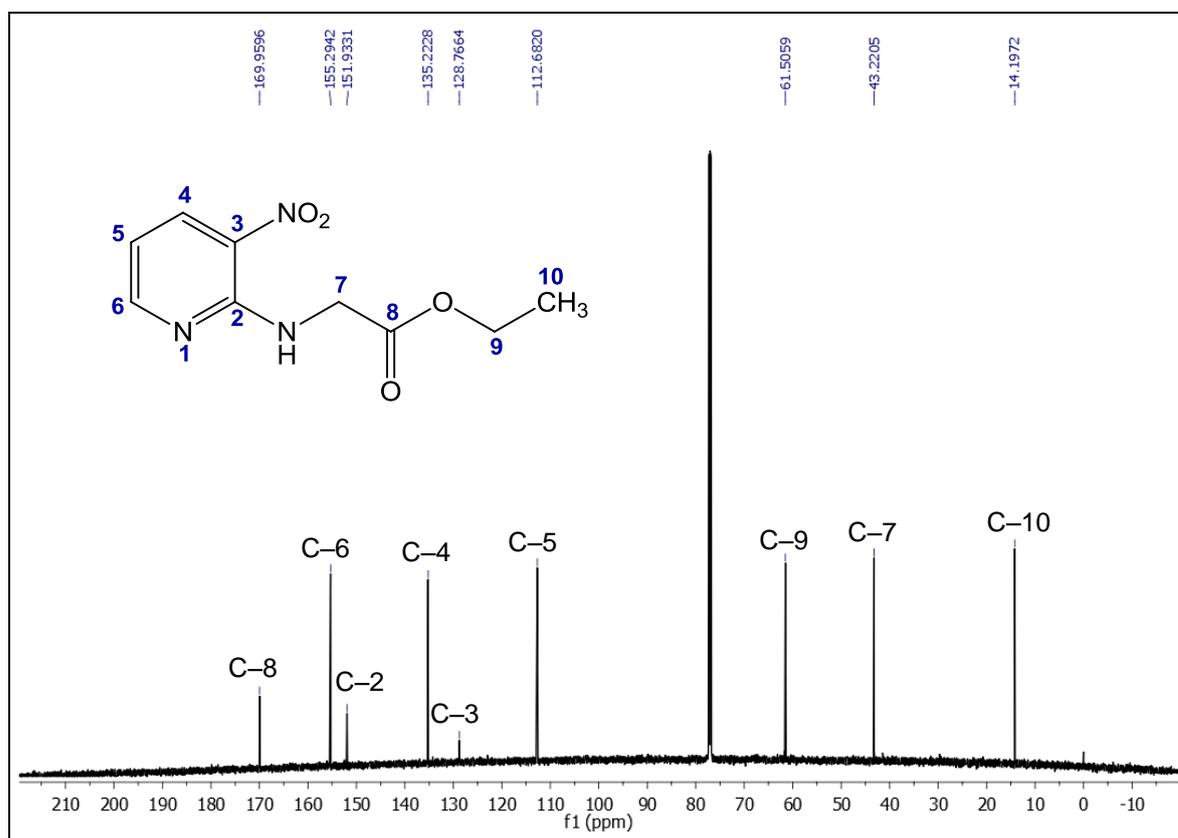


Tabela 5 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **18** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	151,5	151,9
3	–	–	129,0	128,8
4	8,41	8,41	135,2	135,2
5	6,88	6,73	113,0	112,7
6	8,46	8,45	154,2	155,3
7	4,02	4,38	42,7	43,2
8	–	–	169,5	170,0
9	4,13	4,26	61,0	61,5
10	1,26	1,31	14,1	14,2

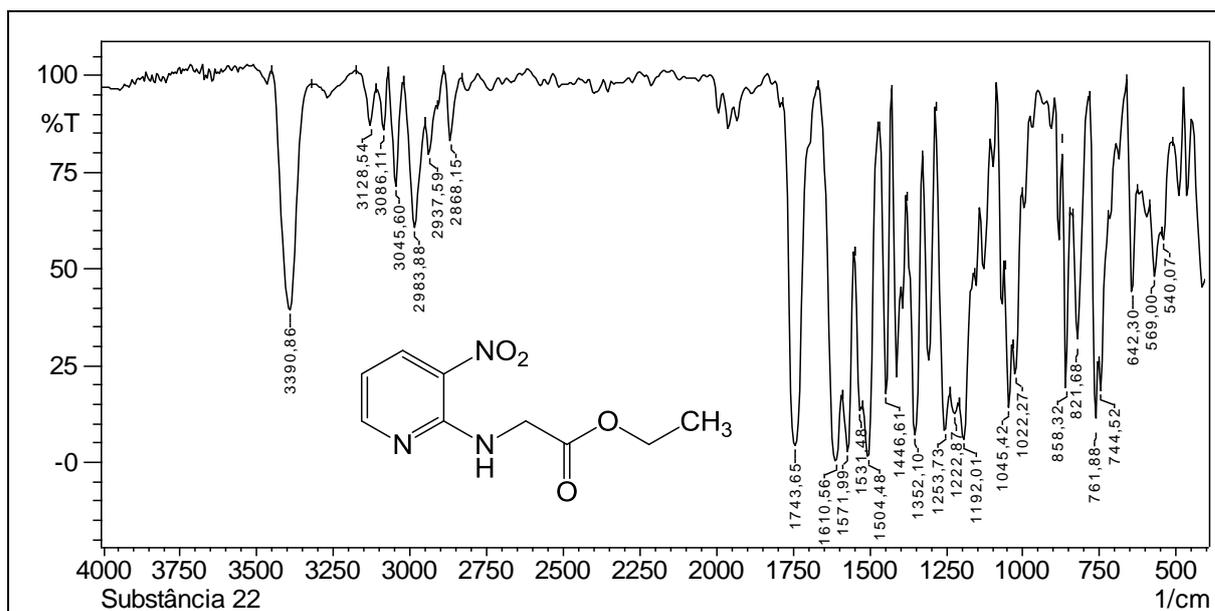
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

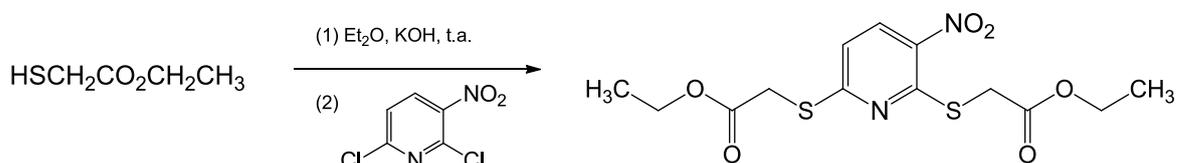
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **18** permitiu identificar uma banda em 3391 cm^{-1} , proveniente ao estiramento $\nu(\text{N-H})$. A banda relativa ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C=O})$, foi observada em 1744 cm^{-1} , e as duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C-CO-O})$ e $\nu(\text{O-C-C})$, em 1192 e 1045 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 10). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1504 e 1352 cm^{-1} , respectivamente. Além disso, observou-se uma banda em 1611 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 10 – Espectro na região do IV do composto **18**.



4.3.4 Determinação estrutural do composto **21**

Figura 20 – Reação para formação do composto **21**.

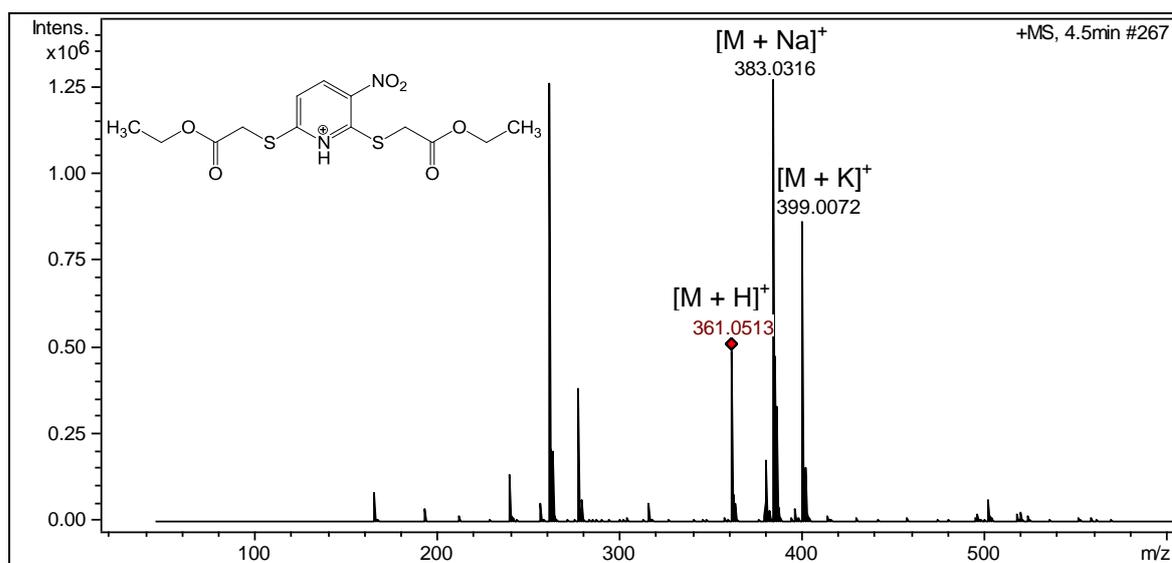


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **21** foi sintetizada como um sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,30), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 90,0 °C.

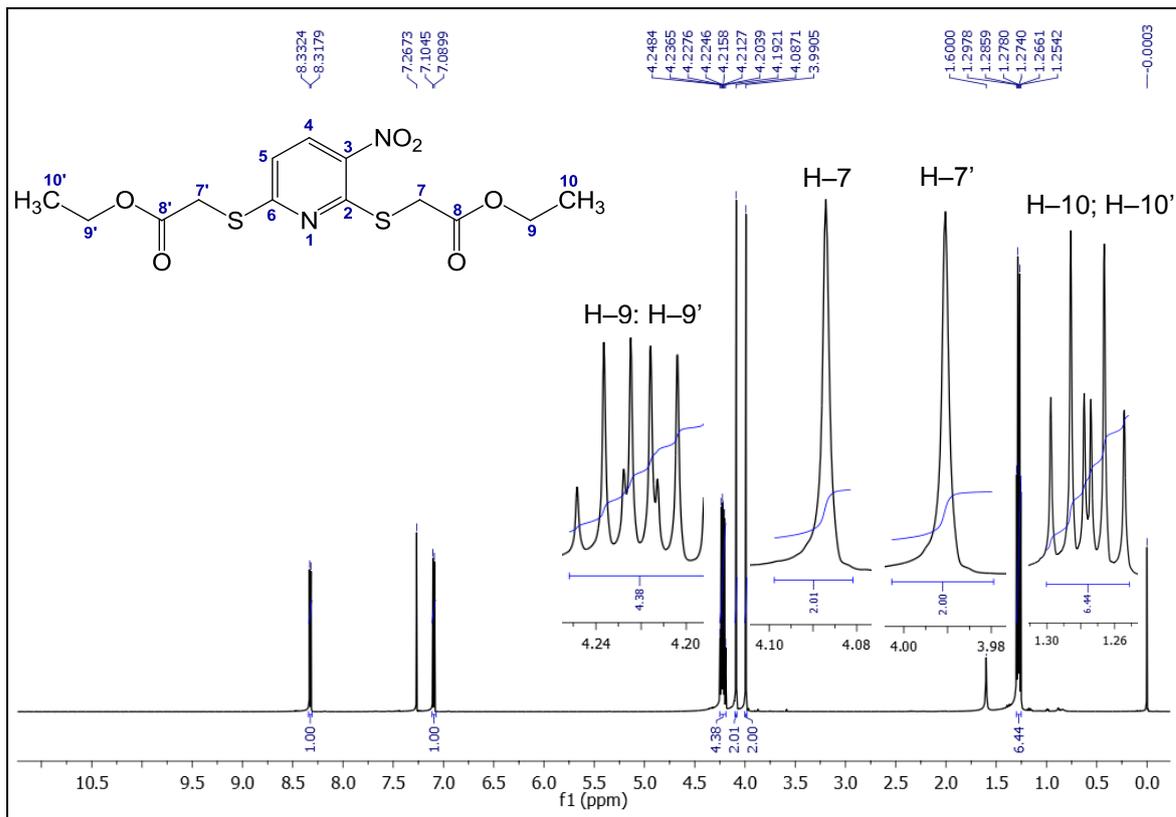
Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo C₁₃H₁₆N₂O₆S₂, com índice de deficiência de hidrogênio igual a sete. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 361,0513 [M + H]⁺, calculado para C₁₃H₁₇N₂O₆S₂, 361,0523, m/z 383,0316 [M + Na]⁺, calculado para C₁₃H₁₆N₂NaO₆S₂, 383,0342 e m/z 399,0072 [M + K]⁺, calculado para C₁₃H₁₆KN₂O₆S₂, 399,0081 (Espectro 11).

Espectro 11 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **21**.

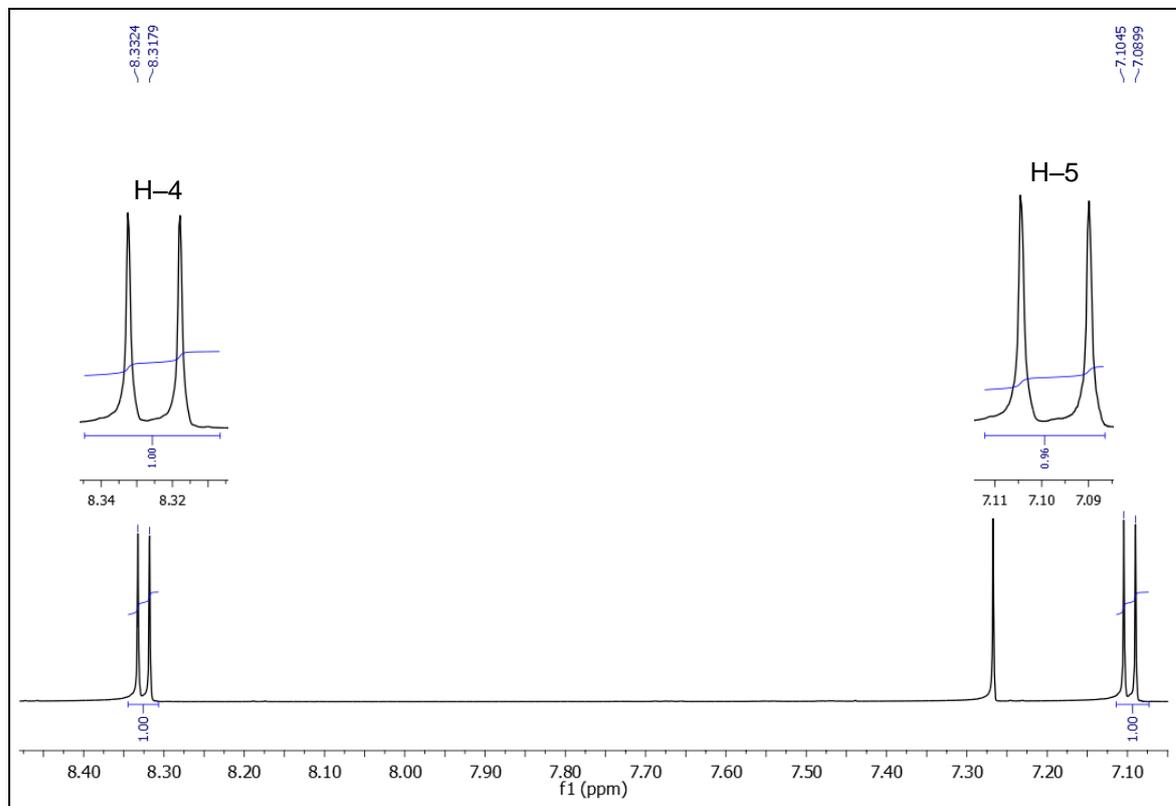


A análise do espectro de RMN ¹H (Espectro 12) do composto **21** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois dubletos com δ 8,33 e 7,10, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,7$ Hz) e H-5 (1H, $J = 8,7$ Hz), respectivamente. As duas cadeias laterais (tioglicolato de etila) em C-2 e C-6 do anel piridínico, introduzida a partir da reação de S_NAr, foram confirmadas pela presença de dois singletos em δ 4,09 e 3,99, atribuídos a H-7 (2H) e H-7' (2H), dois quadrupletos em δ 4,23 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e 4,21 (H-9', 2H, $J = 7,1$ Hz) e dois tripletos em δ 1,28 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) e 1,27 (H-10', 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 6).

Espectro 12 – Espectro de RMN ^1H do composto **21** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 13 – Ampliação do espectro 12 (δ 7,1–8,4), do composto **21**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários C-2, C-3 e C-6 (δ 157,0, 139,2 e 163,8) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e dois não substituídos C-4 e C-5 (δ 133,3 e 117,2, respectivamente). Foi observada ainda a presença de quatro metilenos (C-7, C-9, C-7' e C-9') em δ 33,1, 62,1, 32,3 e 61,9, duas carbonilas (C-8 e C-8') em δ 169,0 e 168,5, e duas metilas (C-10 e C-10') em δ iguais 14,1, característicos da cadeia linear do tioglicolato de etila (Espectro 14; Tabela 6). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico trissubstituído.

Espectro 14 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **21** (125 MHz, CDCl_3).

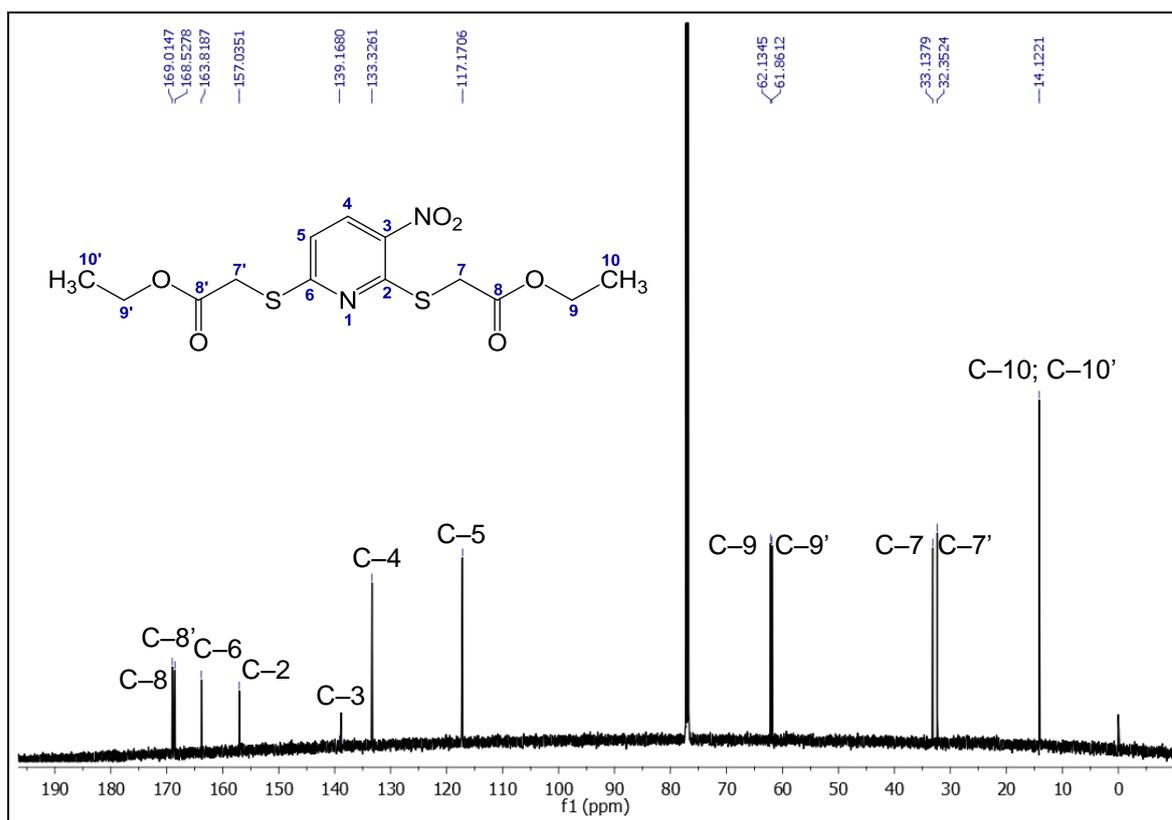


Tabela 6 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **21** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	156,3	157,0
3	–	–	138,0	139,2
4	8,59	8,33	131,9	133,3
5	7,35	7,10	116,4	117,2
6	–	–	165,5	163,8
7	4,16	4,09	30,1	33,1
8	–	–	167,9	169,0
9	4,13	4,23	60,6	62,1
10	1,29	1,28	14,1	14,1
7'	4,16	3,99	31,1	32,3
8'	–	–	167,9	168,5
9'	4,13	4,21	60,6	61,9
10'	1,29	1,27	14,1	14,1

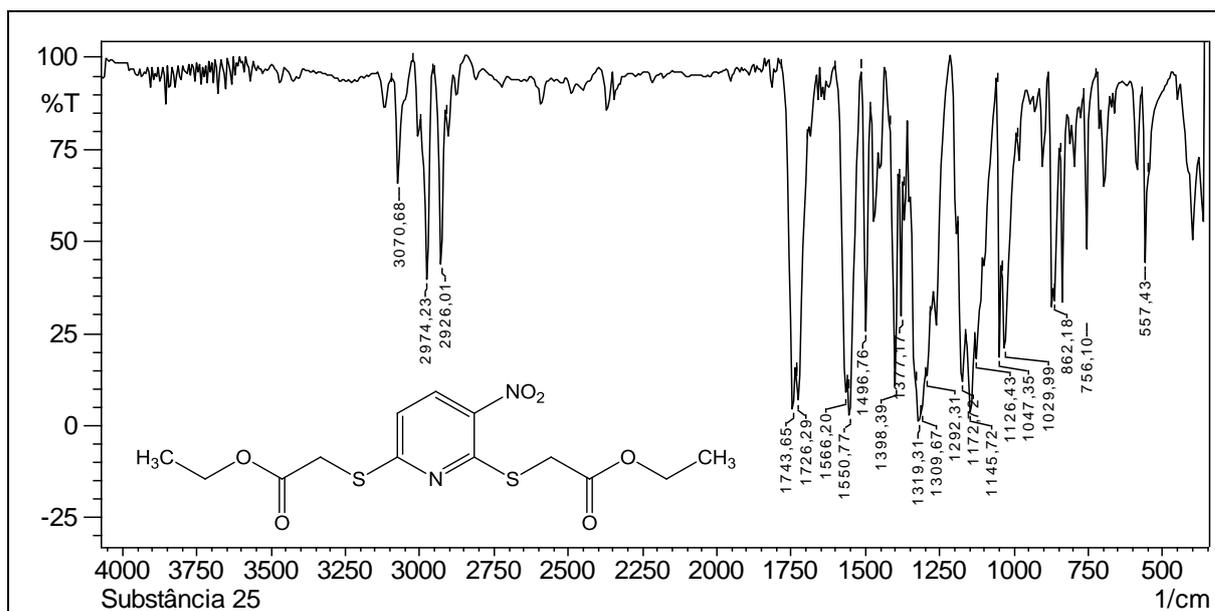
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

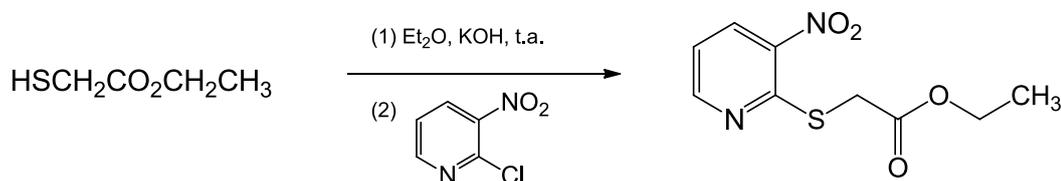
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **21** permitiu identificar uma banda em 1744 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1292 e 1146 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 15). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1551 e 1377 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1566 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 15 – Espectro na região do IV do composto **21**.



4.3.5 Determinação estrutural do composto **22**

Figura 21 – Reação para formação do composto **22**.

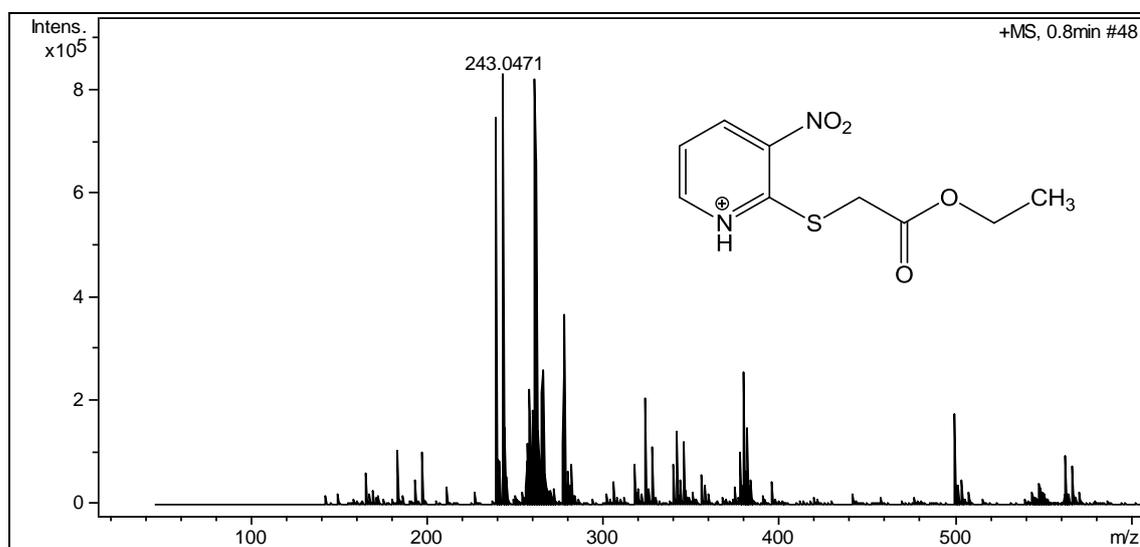


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **22** foi sintetizada como sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada em câmara de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 71,4 °C.

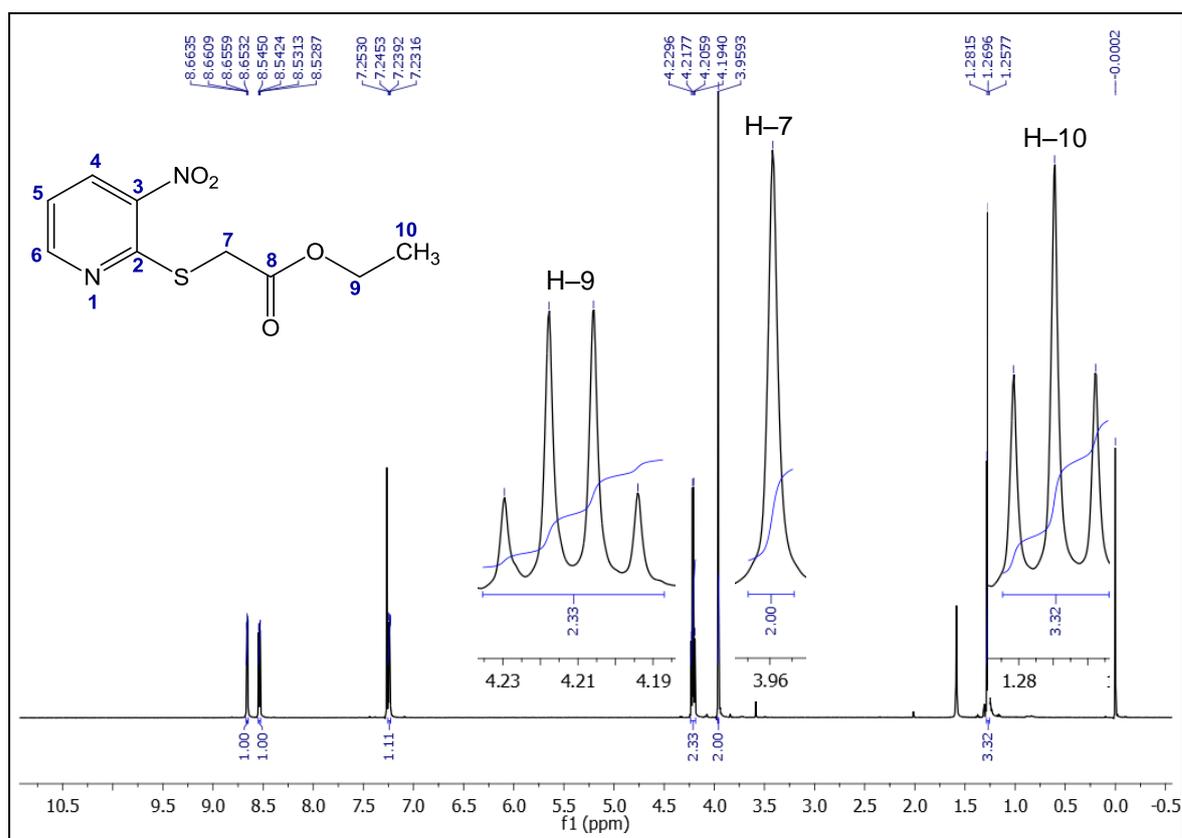
Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $C_9H_{10}N_2O_4S$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 243,0471 $[M + H]^+$, calculado para $C_9H_{11}N_2O_4S$, 243,0434 (Espectro 16).

Espectro 16 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **22**.

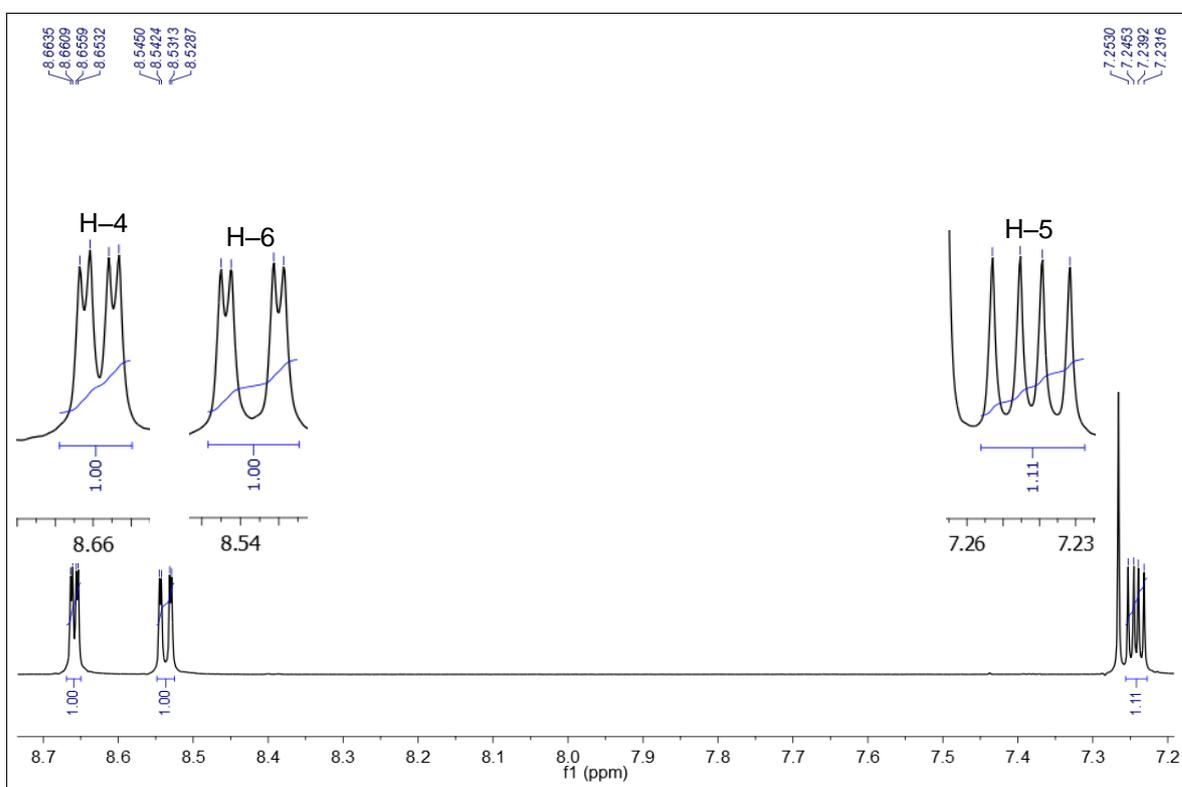


A análise do espectro de RMN ¹H (Espectro 17) do composto **22** permitiu caracterizar o núcleo piridínico dissubstituído através da presença de três duplos dubletos em δ 8,66, 7,24 e 8,54, atribuídos a H-4 (1H, $J = 4,6; 1,6$ Hz), a H-5 (1H, $J = 8,3; 4,6$ Hz) e a H-6 (1H, $J = 8,3; 1,6$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral em C-2, referente ao tioglicolato de etila foi confirmada pela presença de um singlete em δ 3,96, atribuído a H-7 (2H), um quadrupeto em δ 4,21 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um triplete em δ 1,27 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 7).

Espectro 17 – Espectro de RMN ^1H do composto **22** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 18 – Ampliação do espectro 17 (δ 7,2–8,7), do composto **22**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo dois quaternários C-2 e C-3 (δ 156,9 e 142,0) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e três não substituídos C-4, C-5 e C-6 (δ 134,1, 119,2 e 152,5, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 33,6 e 61,2, uma carbonila (C-8) em δ 169,4 e uma metila (C-10) em δ 14,1, característico da cadeia linear do tioglicolato de etila (Espectro 19; Tabela 7). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico dissubstituído.

Espectro 19 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **22** (125 MHz, CDCl_3).

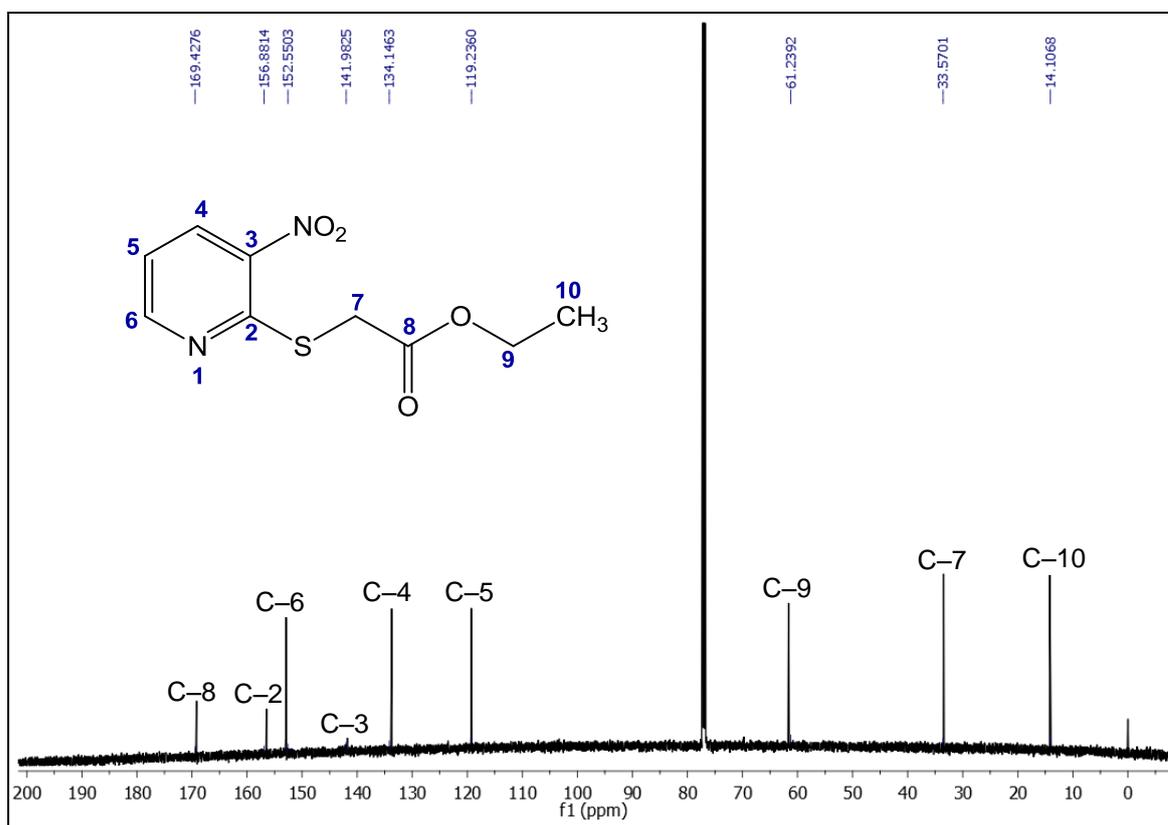


Tabela 7 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **22** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	156,8	156,9
3	–	–	142,6	142,0
4	8,71	8,66	133,3	134,1
5	7,37	7,24	119,0	119,2
6	8,69	8,54	154,6	152,5
7	4,16	3,96	30,1	33,6
8	–	–	167,9	169,4
9	4,13	4,21	60,6	61,2
10	1,29	1,27	14,1	14,1

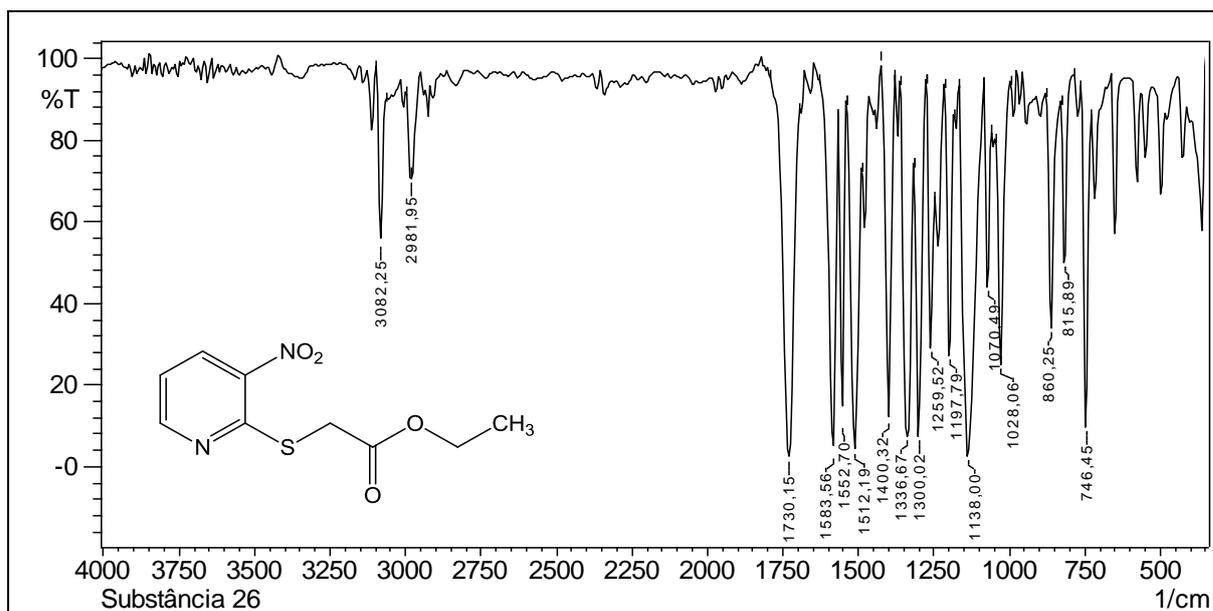
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

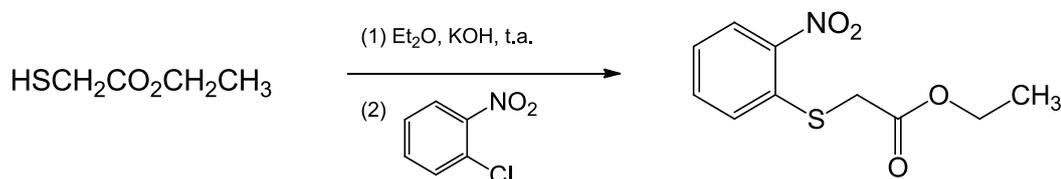
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **22** permitiu identificar uma banda em 1730 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1138 e 1070 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 20). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1553 e 1400 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1584 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 20 – Espectro na região do IV do composto **22**.



4.3.6 Determinação estrutural do composto **23**

Figura 22 – Reação para formação do composto **23**.



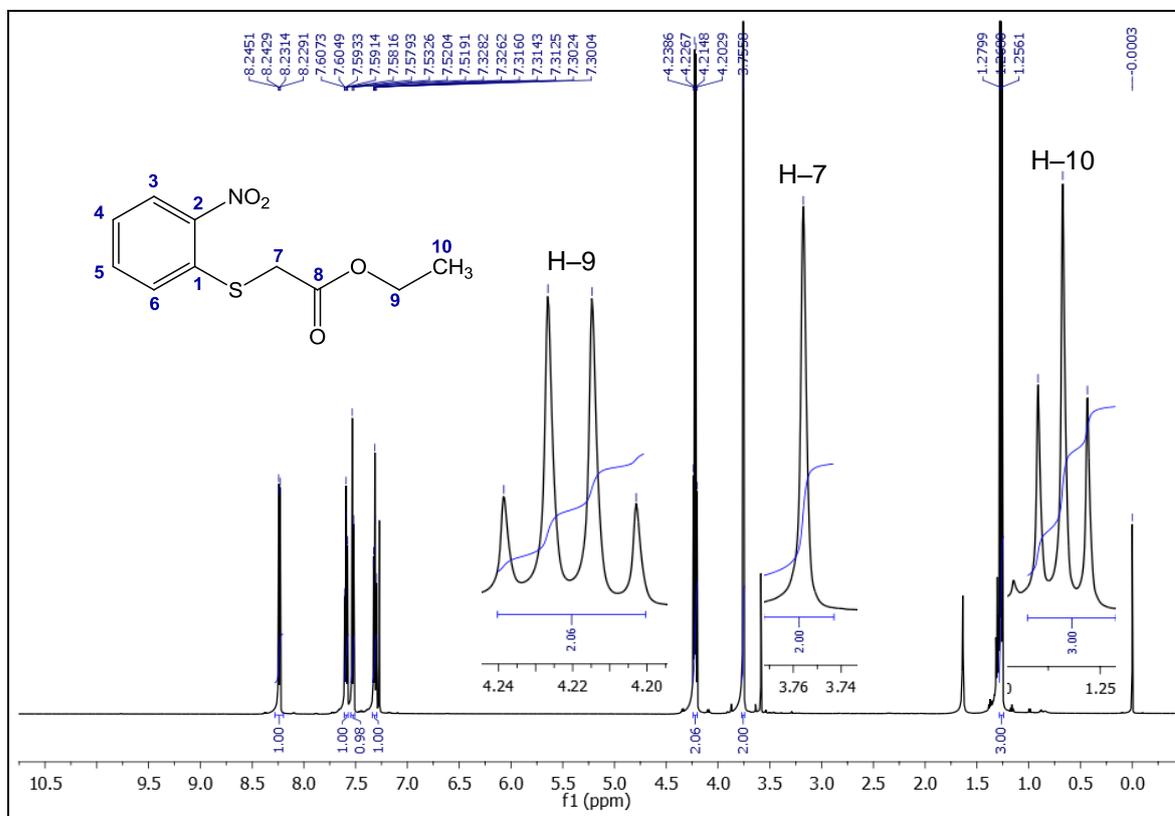
Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **23** foi sintetizada como um sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 48,6 °C.

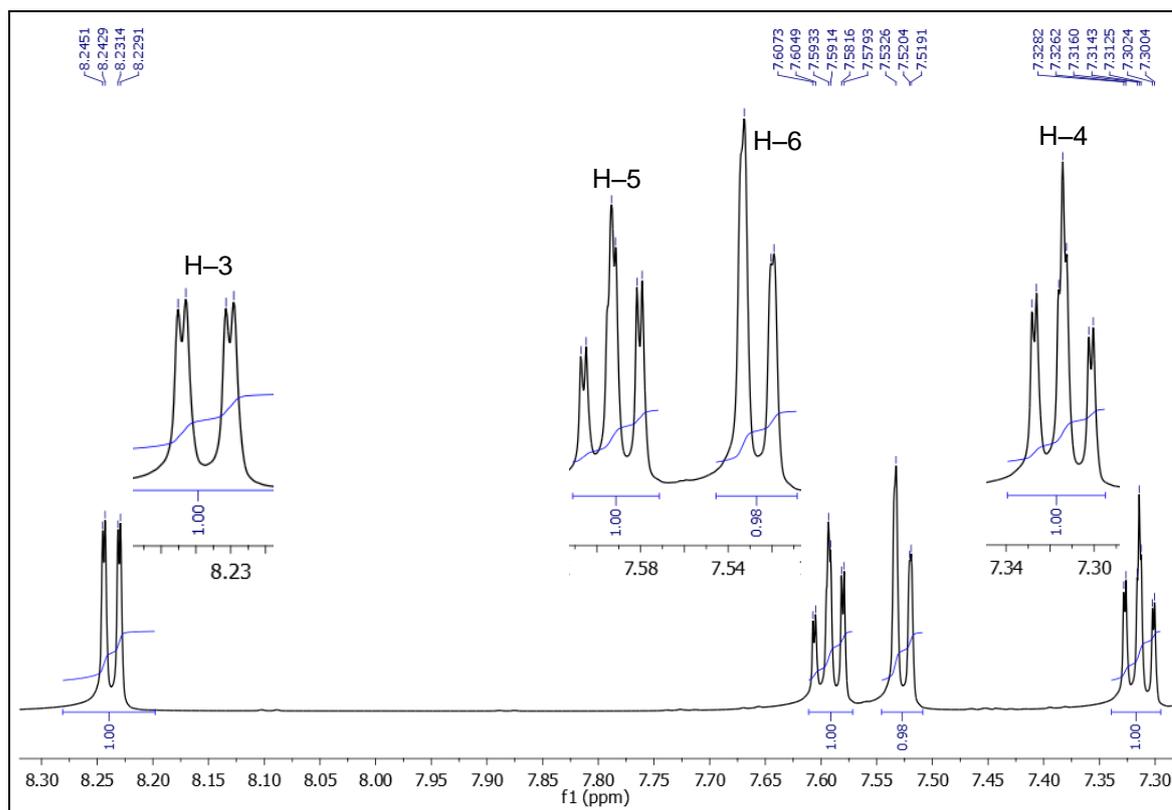
A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 21) do composto **23** permitiu caracterizar o núcleo aromático dissubstituído através da presença de dois duplos dubletos em δ 8,24 e 7,52, atribuídos a H-3 (1H, $J = 8,3; 1,4$ Hz) e a H-6 (1H, $J = 8,3; 1,4$ Hz), e dois duplos duplos dubletos em δ 7,31 e 7,59, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,3; 7,1; 1,4$ Hz) e a H-5 (1H, $J = 8,3; 7,1; 1,4$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral em C-1, referente ao tioglicolato de etila foi confirmada pela presença

de um singlete em δ 3,76, atribuído a H-7 (2H), um quadrupeto em δ 4,22 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um triplete em δ 1,27 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 8).

Espectro 21 – Espectro de RMN ^1H do composto **23** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 22 – Ampliação do espectro 21 (δ 7,30–8,30), do composto **23**.



No espectro de RMN de ¹³C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo dois quaternários C-1 e C-2 (δ 136,3 e 146,0) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e quatro não substituídos C-3, C-4, C-5 e C-6 (δ 126,9, 126,2 133,9 e 125,4, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 35,1 e 62,1, uma carbonila (C-8) em δ 168,9 e uma metila (C-10) em δ 14,1, característico da cadeia linear do tioglicolato de etila (Espectro 23; Tabela 8). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema aromático dissustituído.

Espectro 23 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **23** (125 MHz, CDCl_3).

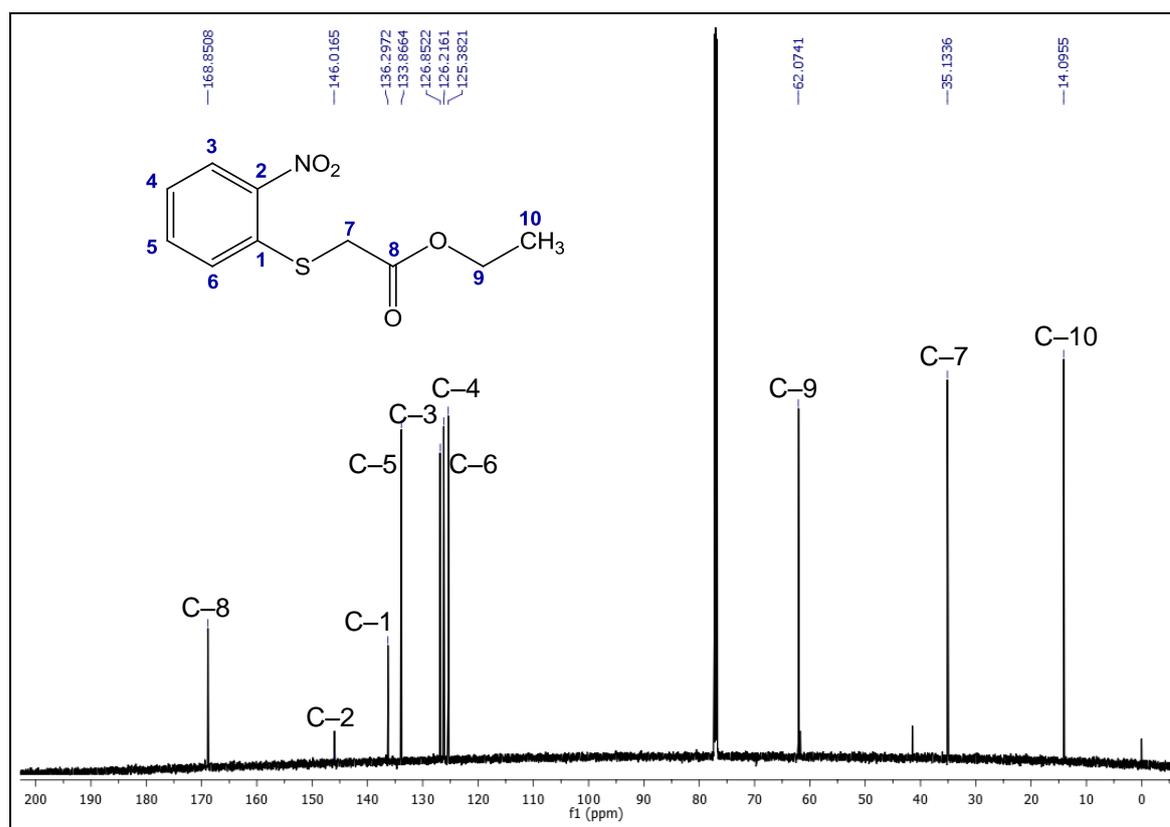


Tabela 8 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **23** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
1	–	–	135,0	136,3
2	–	–	146,4	146,0
3	8,16	8,24	126,0	126,9
4	7,47	7,31	126,0	126,2
5	7,74	7,59	135,0	133,9
6	7,65	7,52	125,4	125,4
7	4,11	3,76	31,4	35,1
8	–	–	167,9	168,9
9	4,13	4,22	60,6	62,2
10	1,29	1,27	14,1	14,1

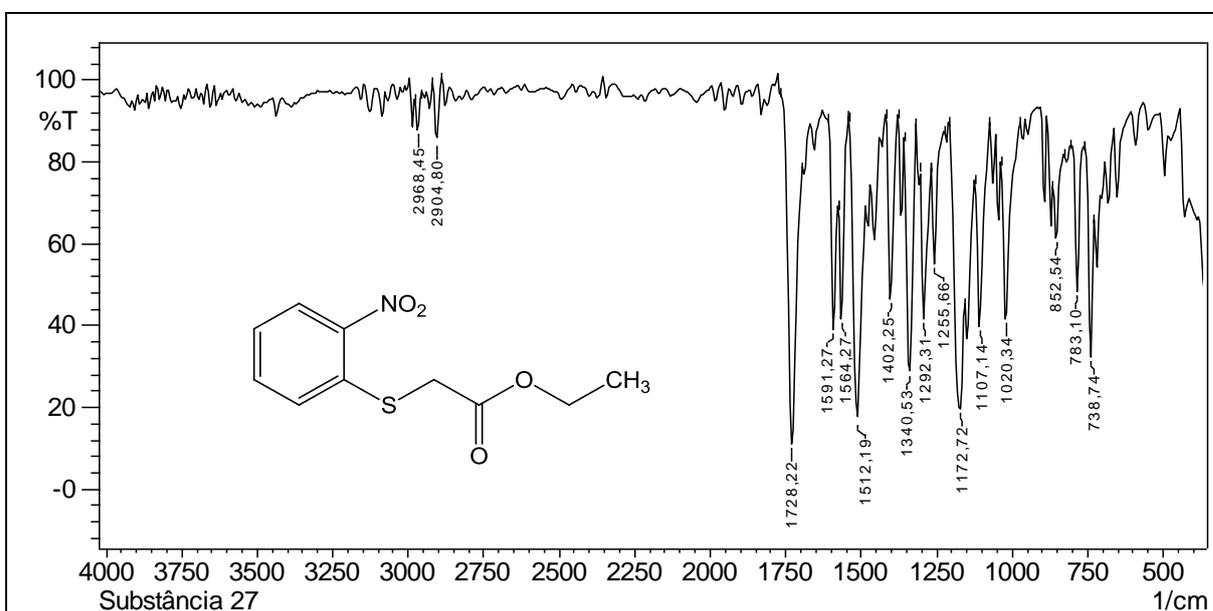
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

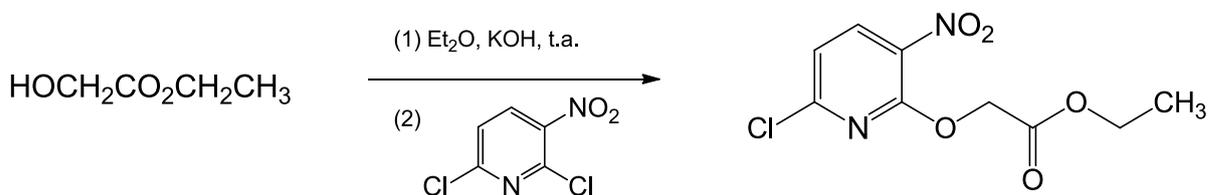
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **23** permitiu identificar uma banda em 1728 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1173 e 1107 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 24). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1564 e 1402 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1591 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{C})$ do anel aromático (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 24 – Espectro na região do IV do composto **23**.



4.3.7 Determinação estrutural do composto 24

Figura 23 – Reação para formação do composto **24**.

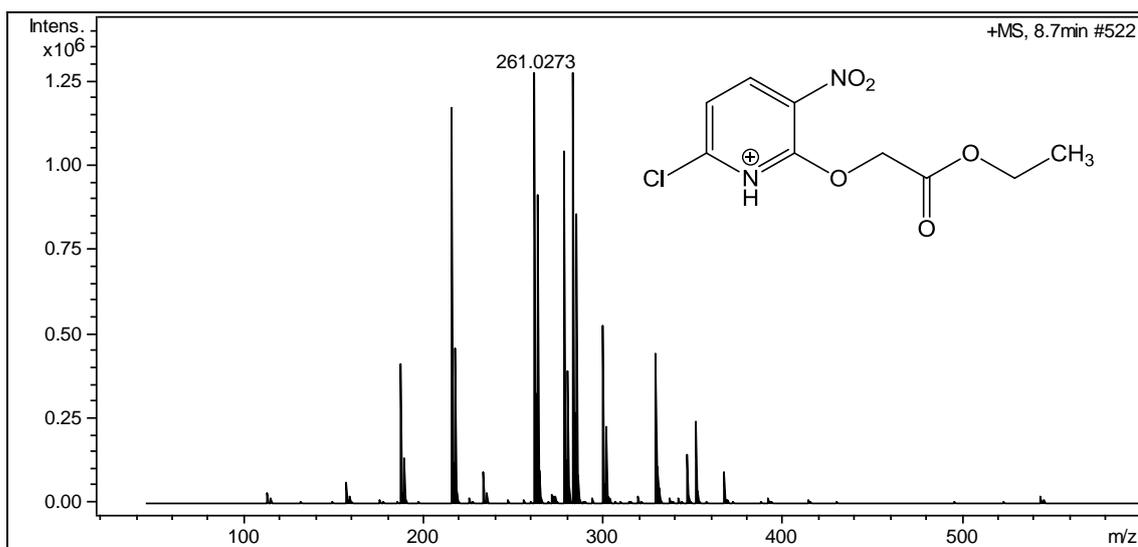


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **24** foi sintetizada como um óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,60), também foi possível

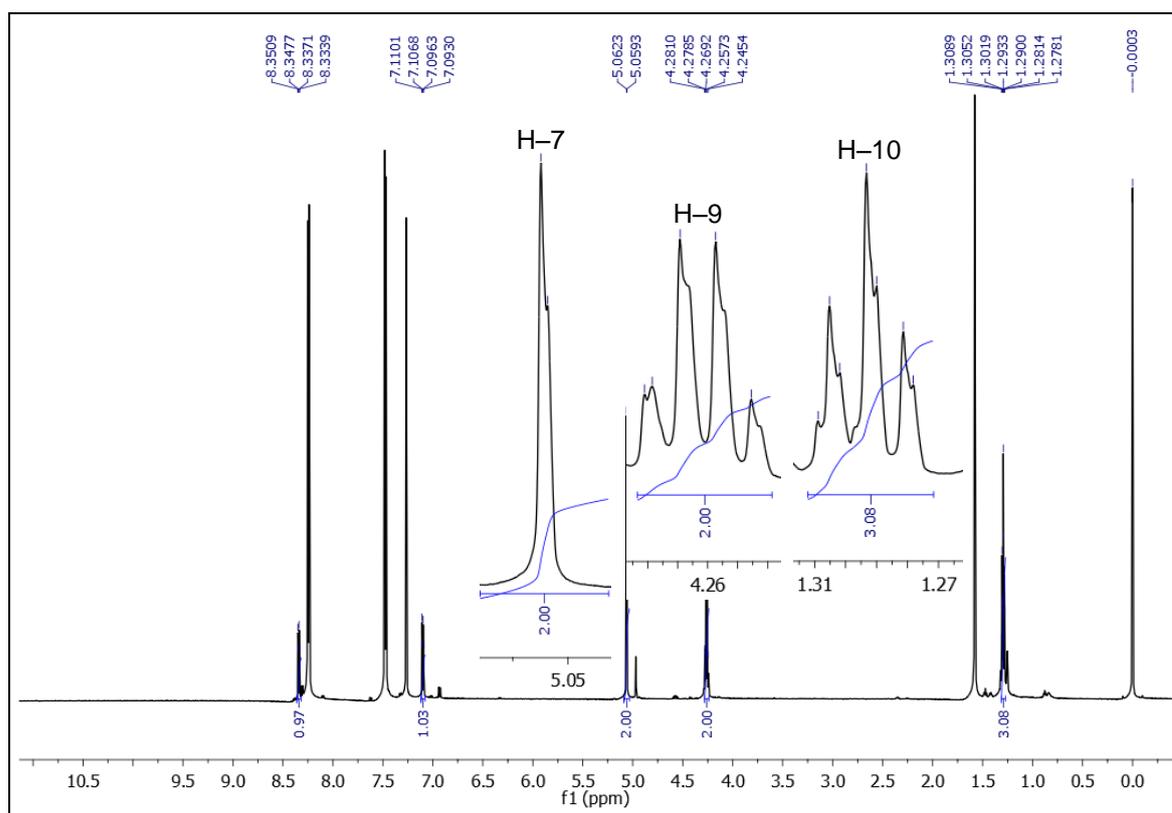
observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $C_9H_9ClN_2O_5$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 261,0273 $[M + H]^+$, calculado para $C_9H_{10}ClN_2O_5$, 261,0273 (Espectro 25).

Espectro 25 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **24**.

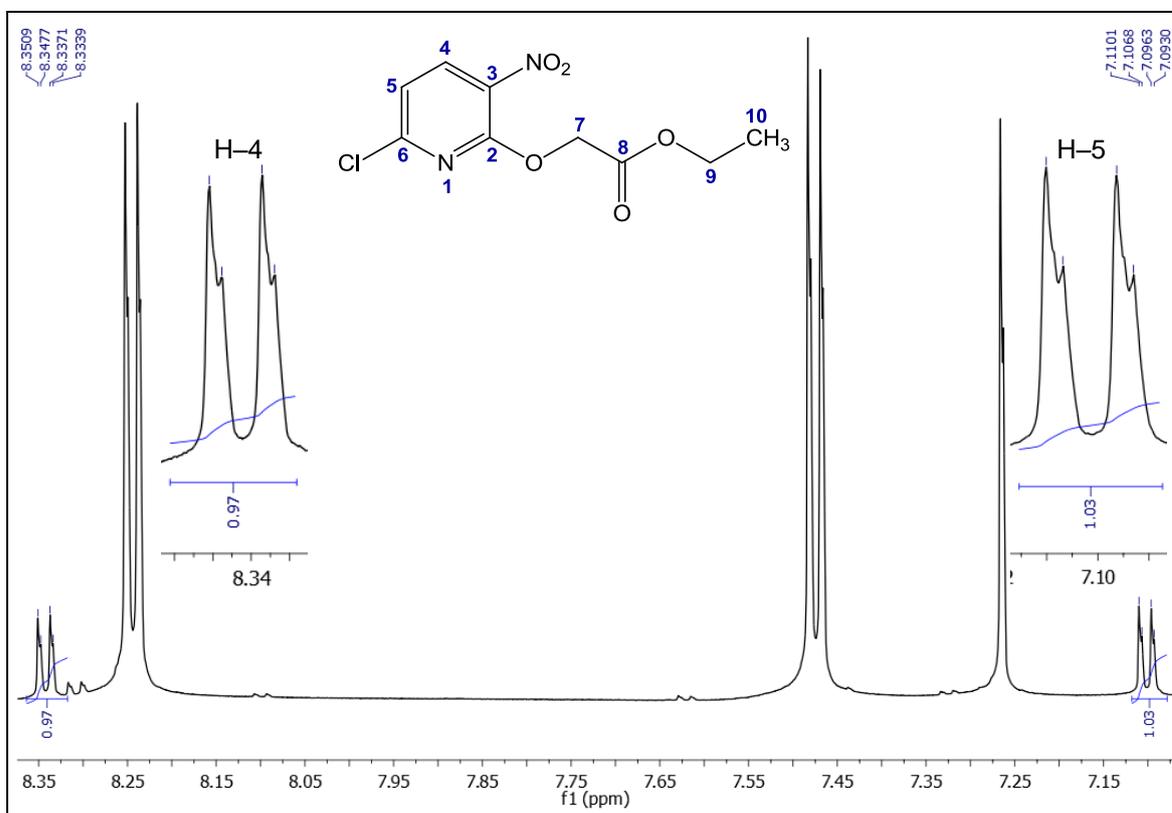


A análise do espectro de RMN 1H (Espectro 26) do composto **24** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois dubletos em δ 8,34 e 7,10, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,3$ Hz) e H-5 (1H, $J = 8,3$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral (glicolato de etila) em C-2 do anel piridínico, introduzida a partir da reação de S_NAr , foi confirmada pela presença de um singlete em δ 5,06, atribuído a H-7 (2H), um quadrupletto em δ 4,27 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um triplete em δ 1,29 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 9).

Espectro 26 – Espectro de RMN ^1H do composto **24** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 27 – Ampliação do espectro 26 (δ 7,15–8,35) do composto **24**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários C-2, C-3 e C-6 (δ 153,5, 123,8 e 143,6) e dois não substituídos C-4 e C-5 (δ 136,6 e 117,8, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 64,0 e 61,6, uma carbonila (C-8) em δ 167,4 e uma metila (C-10) em δ 14,2, característico da cadeia linear do glicolato de etila (Espectro 28; Tabela 9). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico trissubstituído.

Espectro 28 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **24** (125 MHz, CDCl_3).

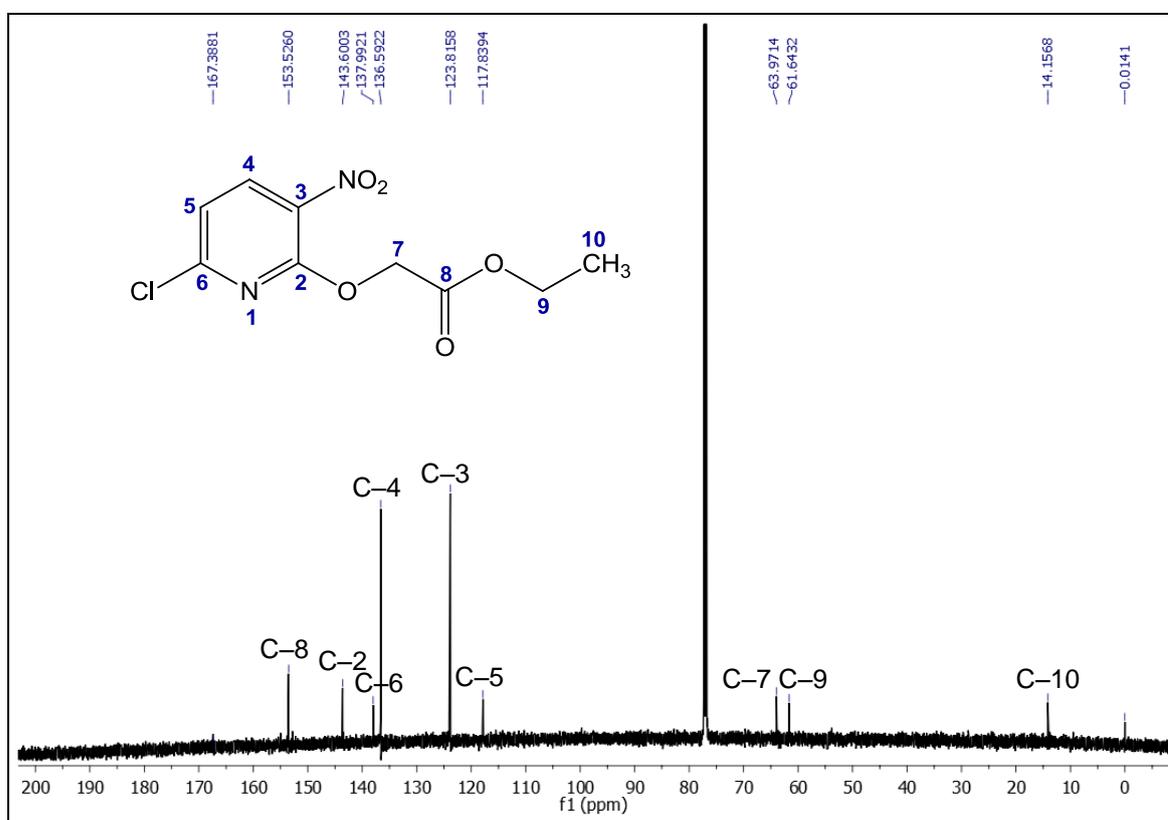


Tabela 9 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **24** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	156,6	153,5
3	–	–	132,7	123,8
4	8,89	8,34	137,3	136,6
5	6,56	7,10	112,1	117,8
6	–	–	154,7	143,6
7	4,96	5,06	62,7	64,0
8	–	–	169,2	167,4
9	4,13	4,27	61,3	61,6
10	1,29	1,29	14,1	14,2

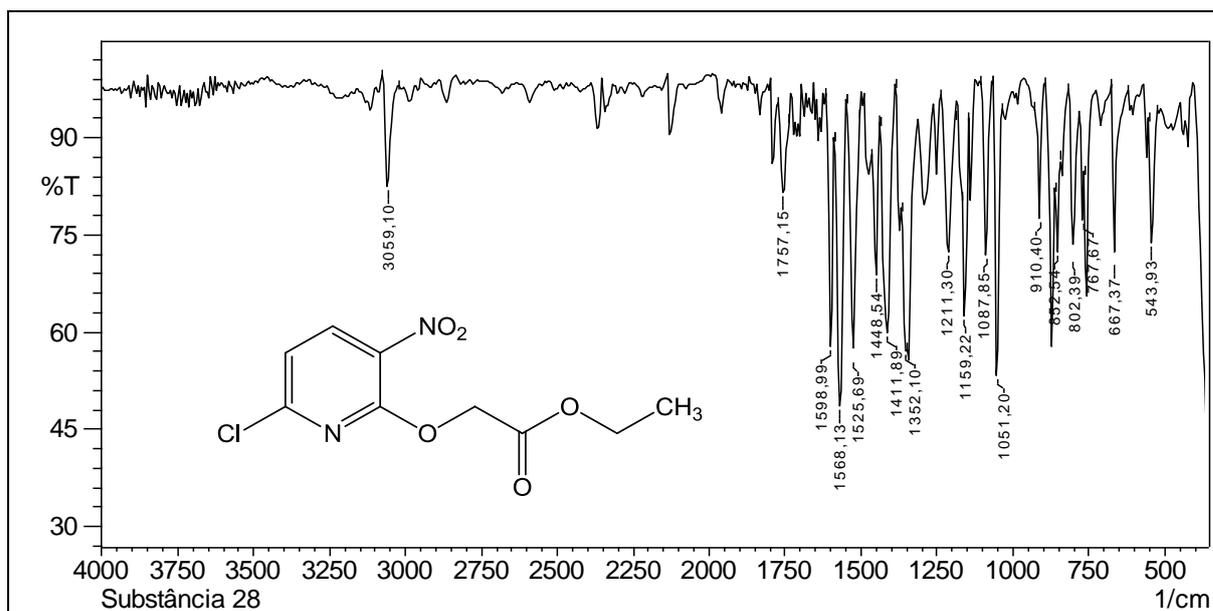
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

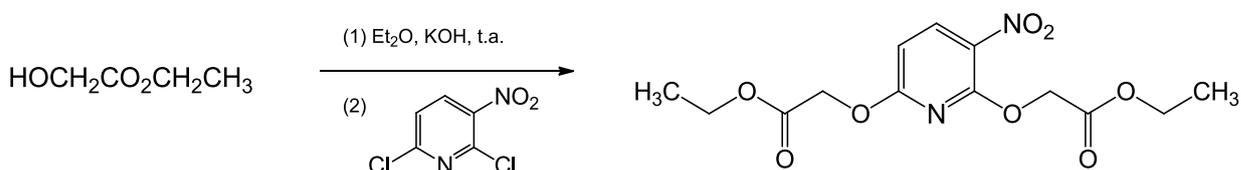
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **24** permitiu identificar uma banda em 1757 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1211 e 1088 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 29). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1526 e 1352 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1568 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 29 – Espectro na região do IV do composto **24**.



4.3.8 Determinação estrutural do composto **25**

Figura 24 – Reação para formação do composto **25**.

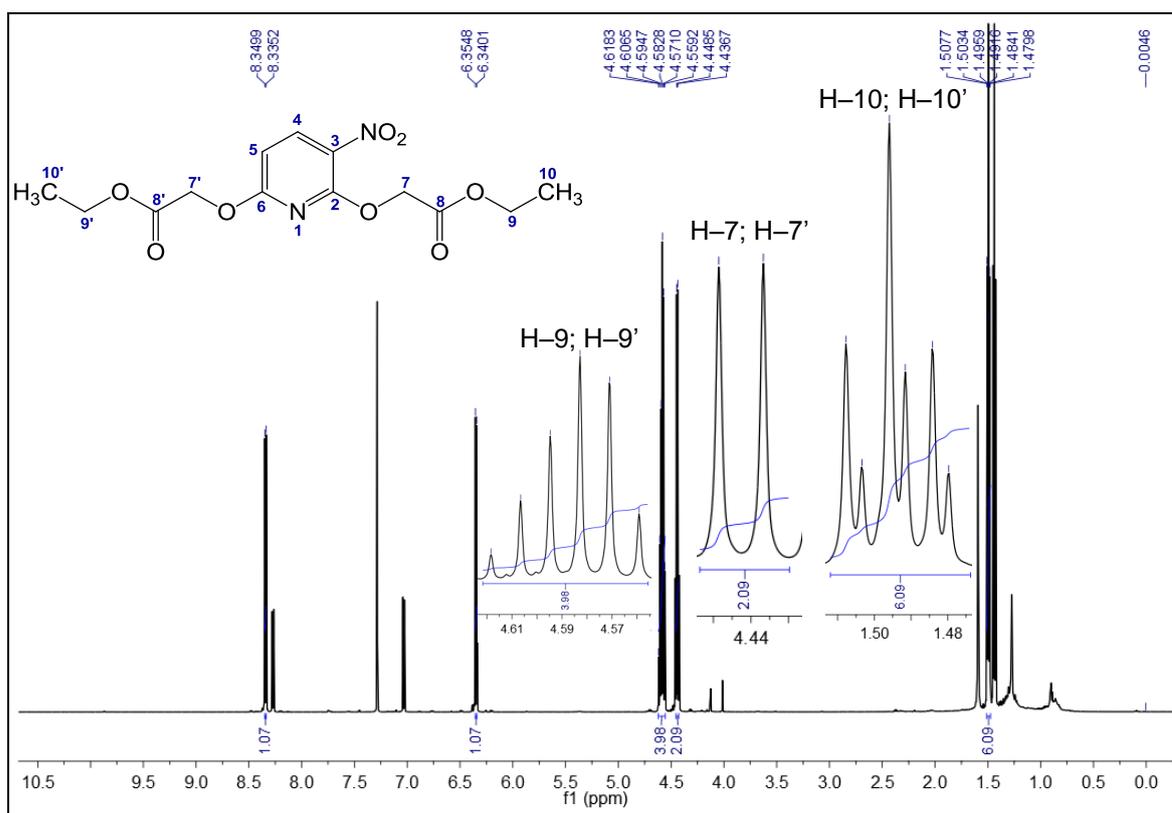


Fonte: A AUTORA, 2016.

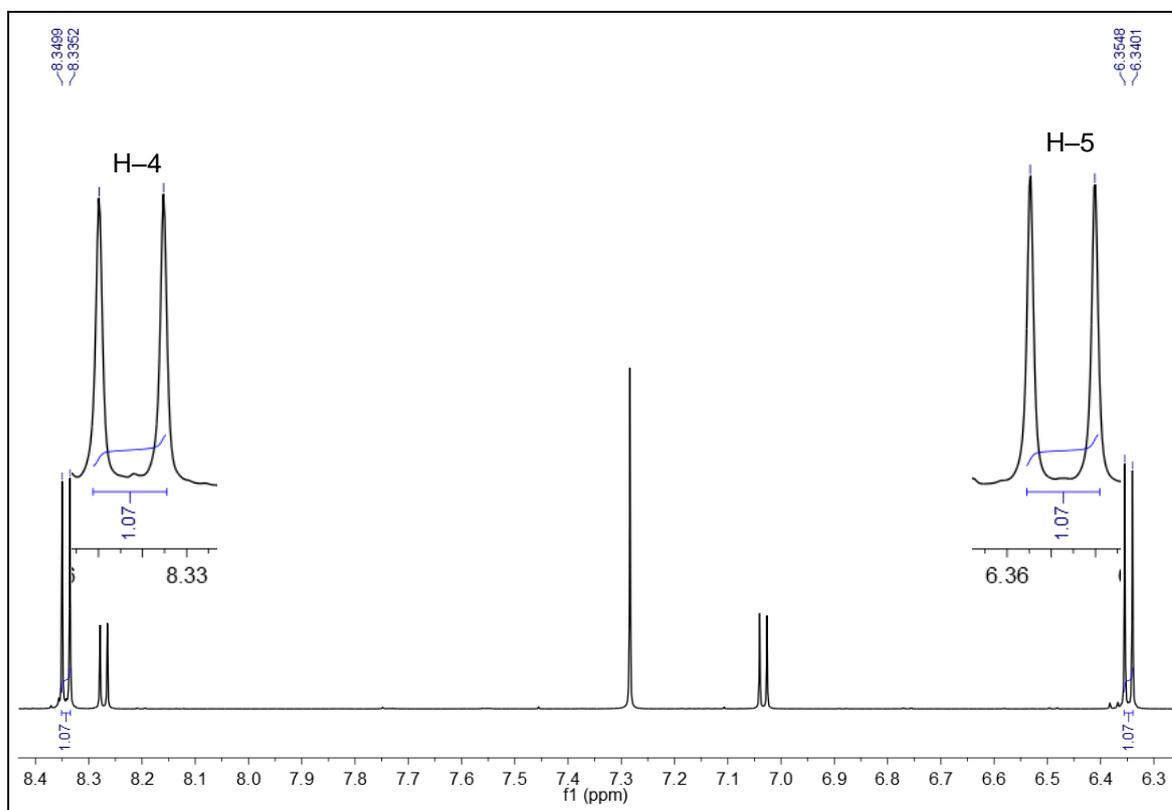
A substância **25** foi sintetizada como óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,60), também foi possível observá-la quando inspecionada em câmara de UV (λ 254 nm).

A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 30) do composto **25** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois dubletos com δ 8,34 e 6,35, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,8$ Hz) e H-5 (1H, $J = 8,8$ Hz), respectivamente. As duas cadeias laterais (glicolato de etila) em C-2 e C-6 do anel piridínico, introduzida a partir da reação de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$, foi confirmada pela presença de dois singletos em δ 4,45 e 4,43, atribuídos a H-7 (2H) e H-7' (2H), dois quadrupletos em δ 4,60 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e 4,58 (H-9', 2H, $J = 7,1$ Hz) e dois tripletos em δ 1,50 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) e 1,49 (H-10', 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 10).

Espectro 30 – Espectro de RMN ^1H do composto **25** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 31 – Ampliação do espectro 30 (δ 7,15–8,35) do composto **25**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários C-2, C-3 e C-6 (δ 139,0, 116,1 e 137,3) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e dois não substituídos C-4 e C-5 (δ 126,4 e 102,9, respectivamente). Foi observada ainda a presença de quatro metilenos (C-7, C-9, C-7' e C-9') em δ 64,9, 63,7, 64,9 e 63,6, duas carbonilas (C-8 e C-8') em δ 165,1 e 157,1, e duas metilas (C-10 e C-10') em δ iguais 14,7, característicos da cadeia linear do glicolato de etila (Espectro 32; Tabela 10). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico trissubstituído.

Espectro 32 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **25** (125 MHz, CDCl_3).

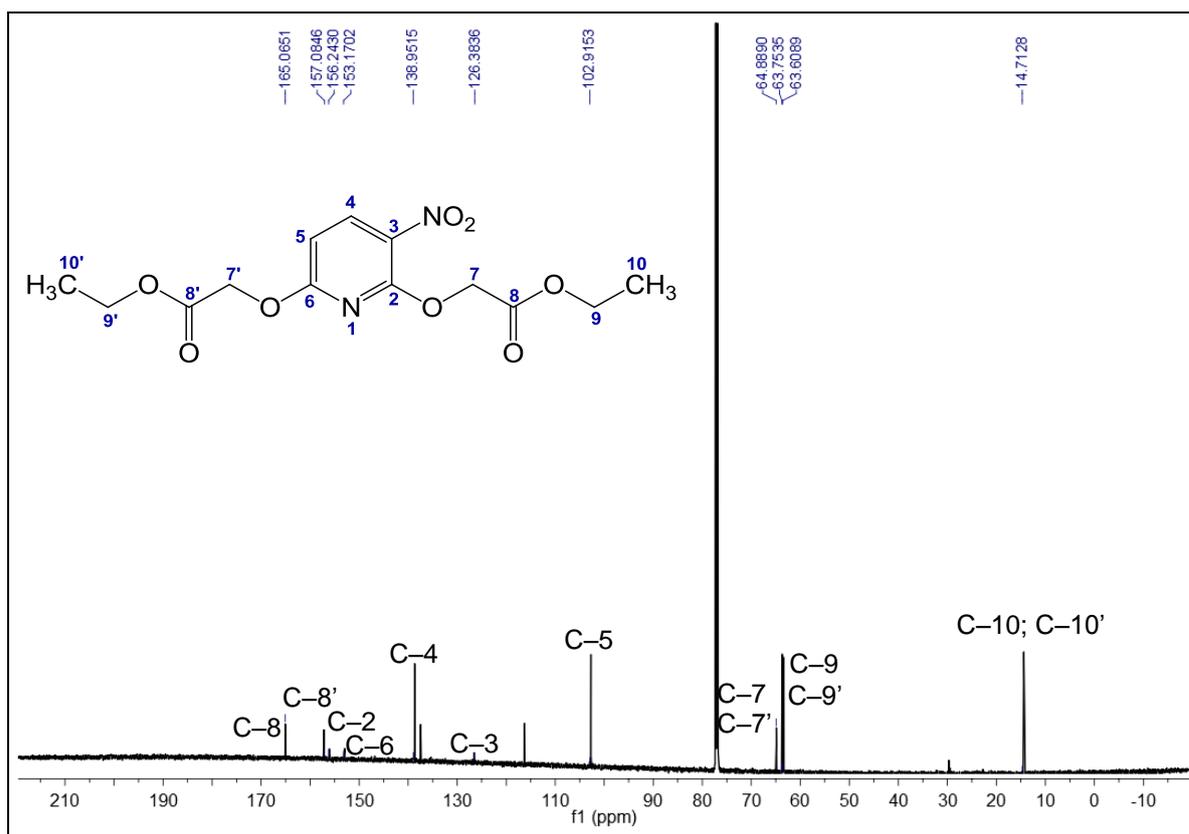


Tabela 10 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **25** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	153,8	156,2
3	–	–	120,8	126,4
4	8,60	8,34	136,1	138,9
5	5,80	6,35	98,2	102,9
6	–	–	167,3	153,2
7	4,96	4,45	62,7	64,9
8	–	–	169,2	165,1
9	4,13	4,60	61,3	63,7
10	1,29	1,50	14,1	14,7
7'	4,96	4,43	63,7	64,9
8'	–	–	169,2	157,1
9'	4,13	4,58	61,3	63,6
10'	1,29	1,49	14,1	14,7

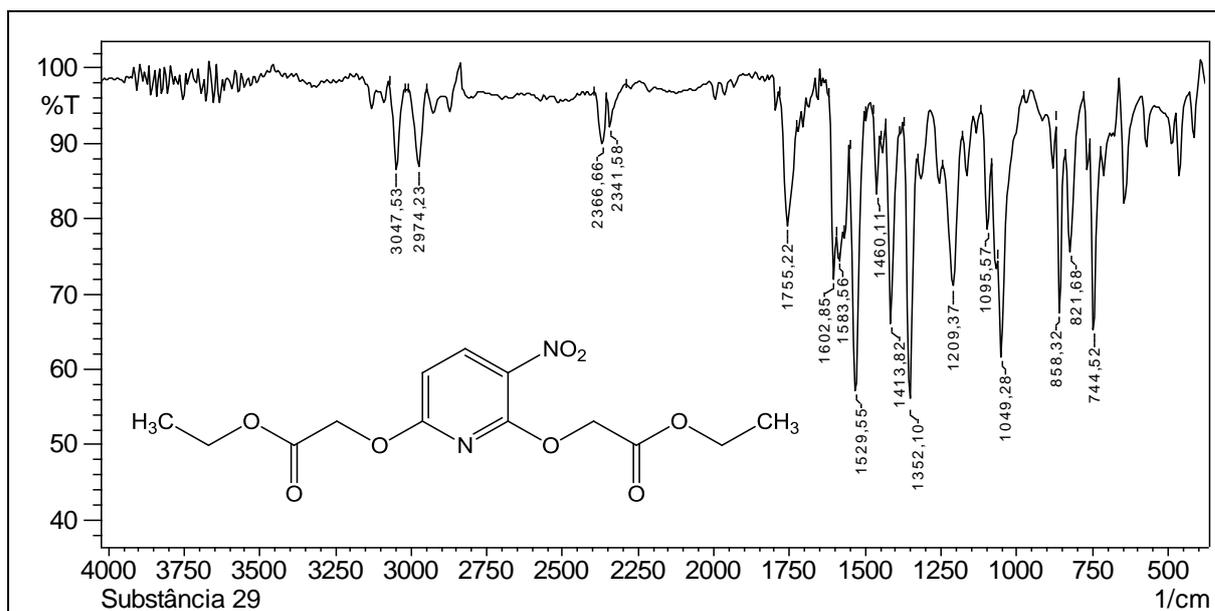
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

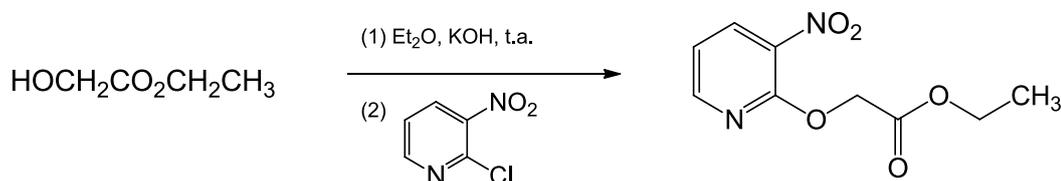
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **25** permitiu identificar uma banda em 1755 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1209 e 1096 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 33). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1529 e 1352 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1603 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 33 – Espectro na região do IV do composto **25**.



4.3.9 Determinação estrutural do composto **26**

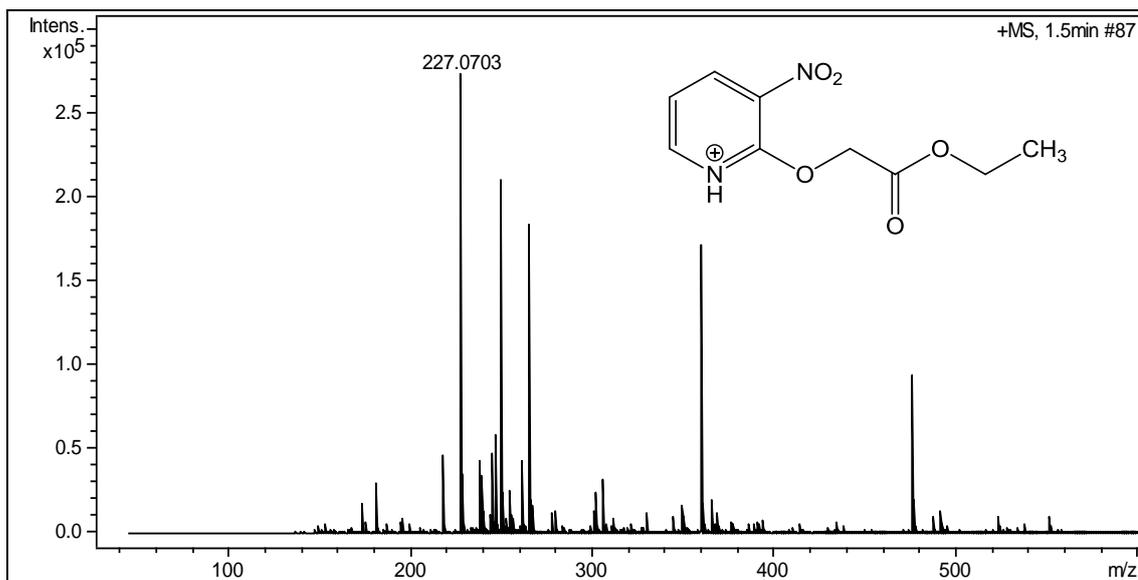
Figura 25 – Reação para formação do composto **26**.



Fonte: A AUTORA, 2016.

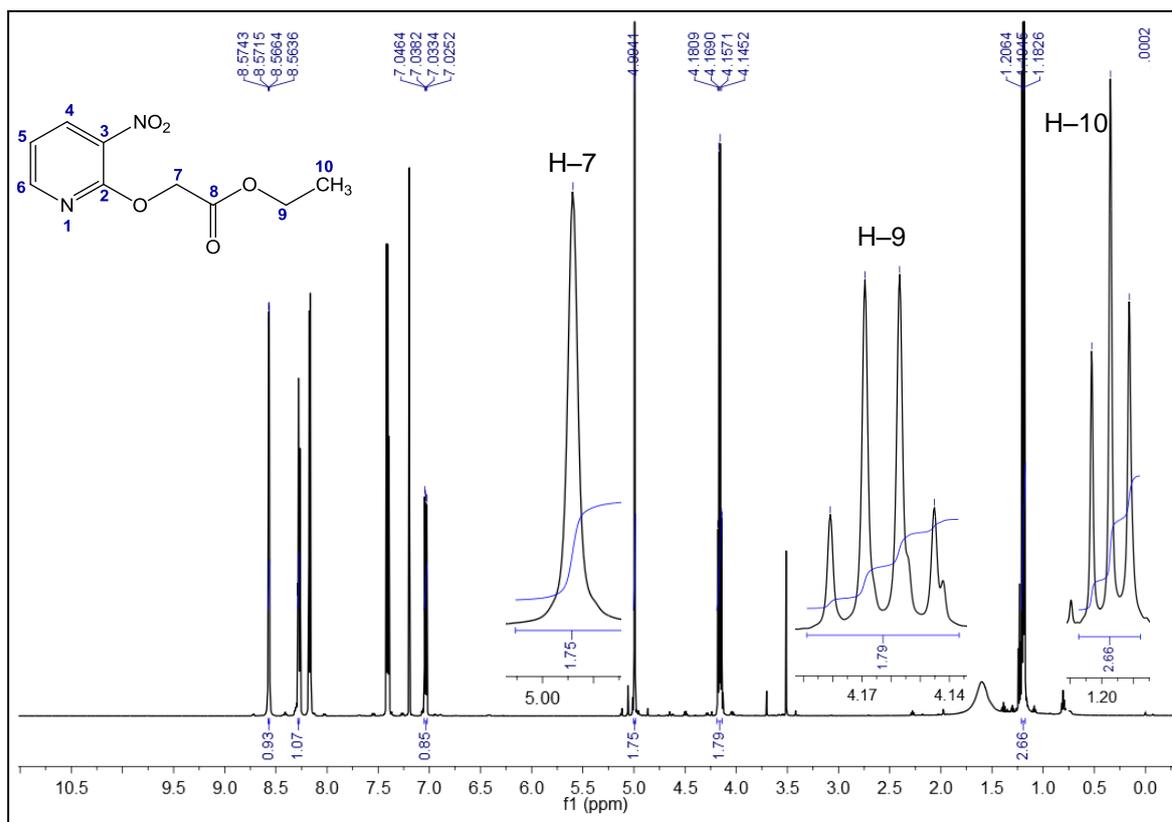
A substância **26** foi sintetizada como óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada em câmara de UV (λ 254 nm). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, foi possível estabelecer a fórmula molecular $C_9H_{10}N_2O_5$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 227,0703 $[M + H]^+$, calculado para $C_9H_{11}N_2O_5$, 227,0662 (Espectro 34).

Espectro 34 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **26**.

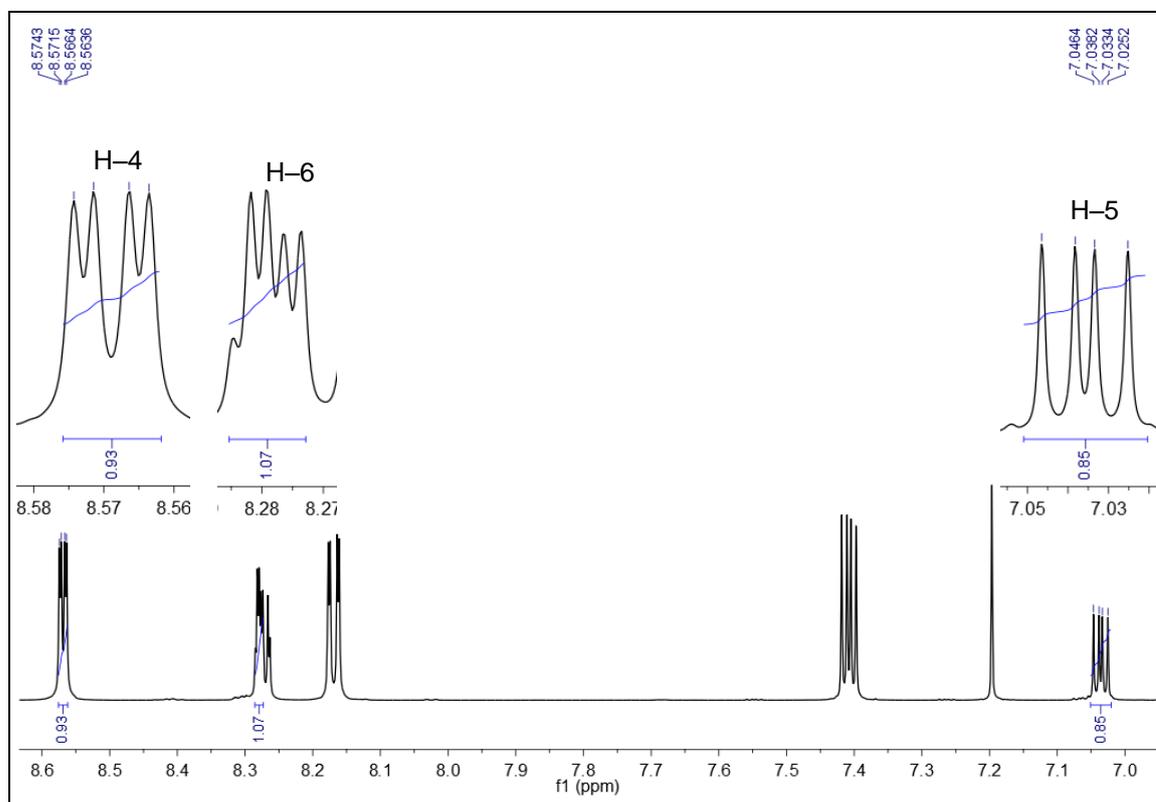


A análise do espectro de RMN ¹H (Espectro 35) do composto **26** permitiu caracterizar o núcleo piridínico dissubstituído através da presença de três duplos dubletos em δ 8,57, 7,04 e 8,17, atribuídos a H-4 (1H, $J = 4,7; 1,7$ Hz), a H-5 (1H, $J = 8,0; 4,7$ Hz) e a H-6 (1H, $J = 8,0; 1,7$ Hz), respectivamente. A cadeia lateral em C-2, referente ao glicolato de etila foi confirmada pela presença de um singlete em δ 4,99, atribuído a H-7 (2H), um quadrupeto em δ 4,16 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um tripleto em δ 1,19 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 11).

Espectro 35 – Espectro de RMN ^1H do composto **26** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 36 – Ampliação do espectro 35 (δ 7,0–8,6), do composto **26**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo dois quaternários C-2 e C-3 (δ 155,0 e 143,5) que aparecem no espectro em baixa intensidade, e três não substituídos C-4, C-5 e C-6 (δ 135,9, 117,8 e 151,2, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-7 e C-9) em δ 63,4 e 61,7, uma carbonila (C-8) em δ 167,9 e uma metila (C-10) em δ 14,1, característico da cadeia linear do glicolato de etila (Espectro 37; Tabela 11). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico dissubstituído.

Espectro 37 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **26** (125 MHz, CDCl_3).

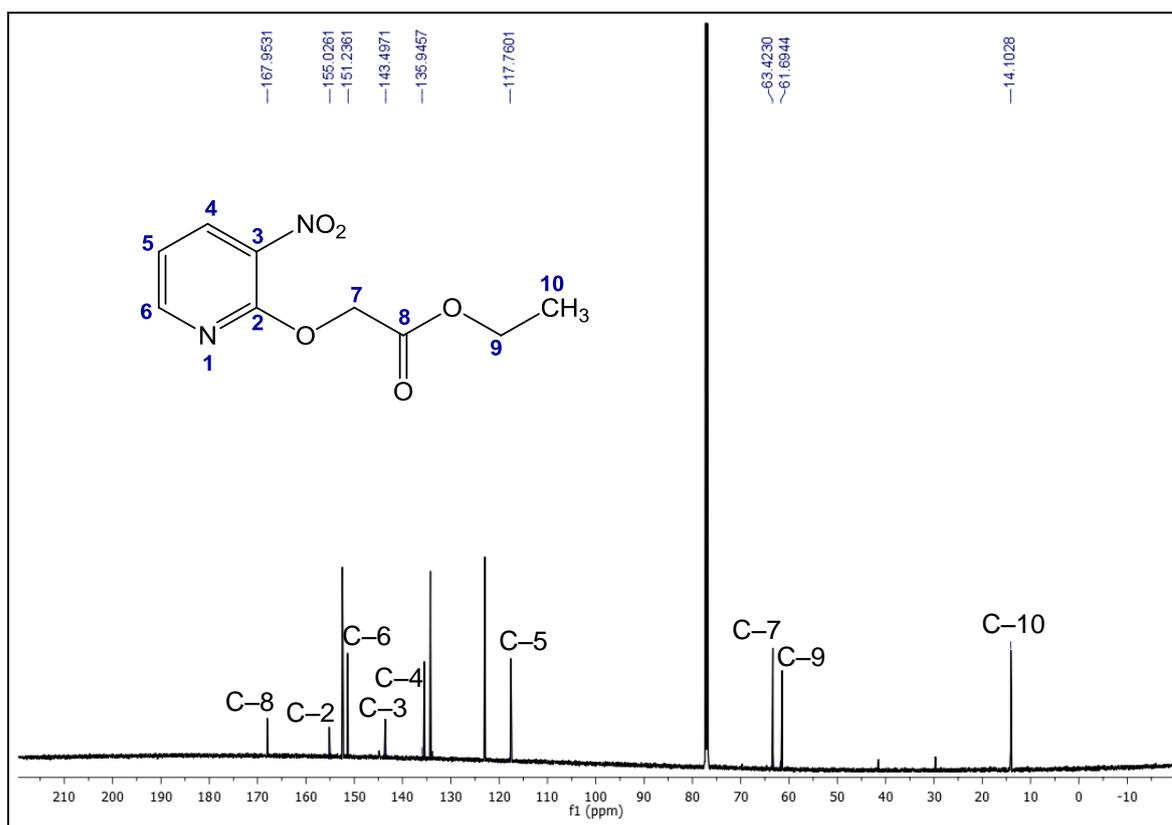


Tabela 11 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **26** (CDCl_3).

Posição	δ_{H} calculado ^b	δ_{H} ^a	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a
2	–	–	156,0	155,0
3	–	–	133,9	143,5
4	8,60	8,57	134,0	135,9
5	6,66	7,04	113,8	117,8
6	7,60	8,17	152,9	151,2
7	4,96	4,99	62,7	63,4
8	–	–	169,2	167,9
9	4,13	4,16	61,3	61,7
10	1,29	1,19	14,1	14,1

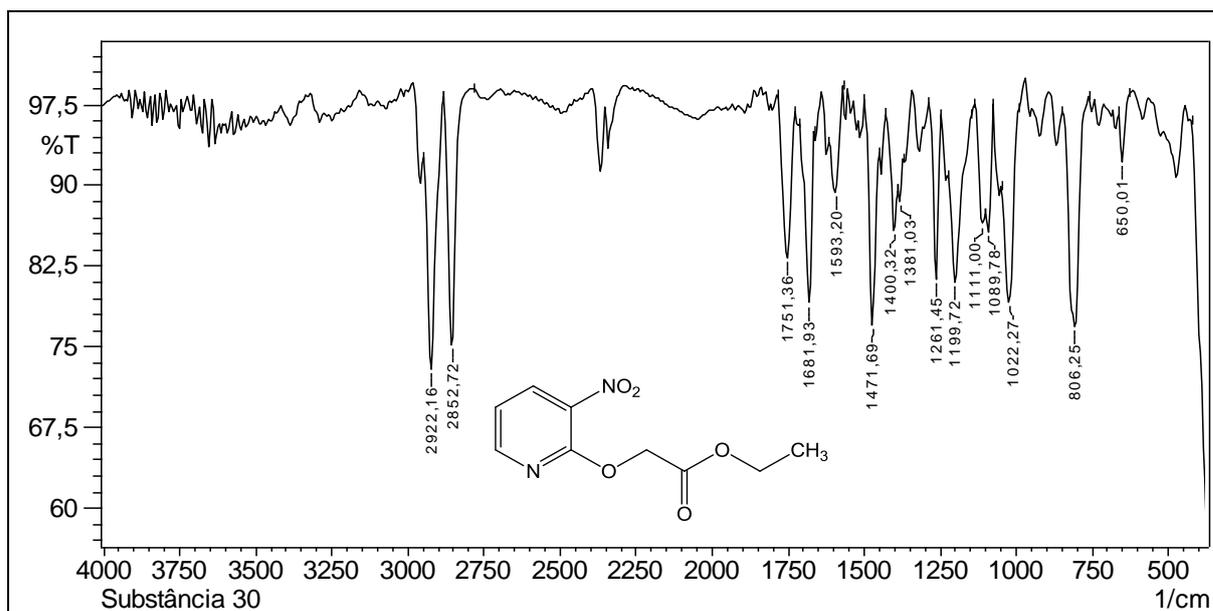
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

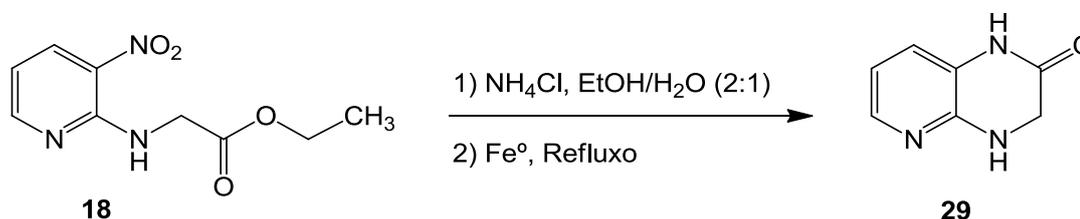
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **26** permitiu identificar uma banda em 1751 cm^{-1} , proveniente ao estiramento da carbonila do éster, $\nu(\text{C}=\text{O})$. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1261 e 1090 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 38). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ e $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$, em 1593 e 1400 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1472 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 38 – Espectro na região do IV do composto **26**.



4.3.10 Determinação estrutural do composto **29**

Figura 26 – Reação para formação do composto **29**.

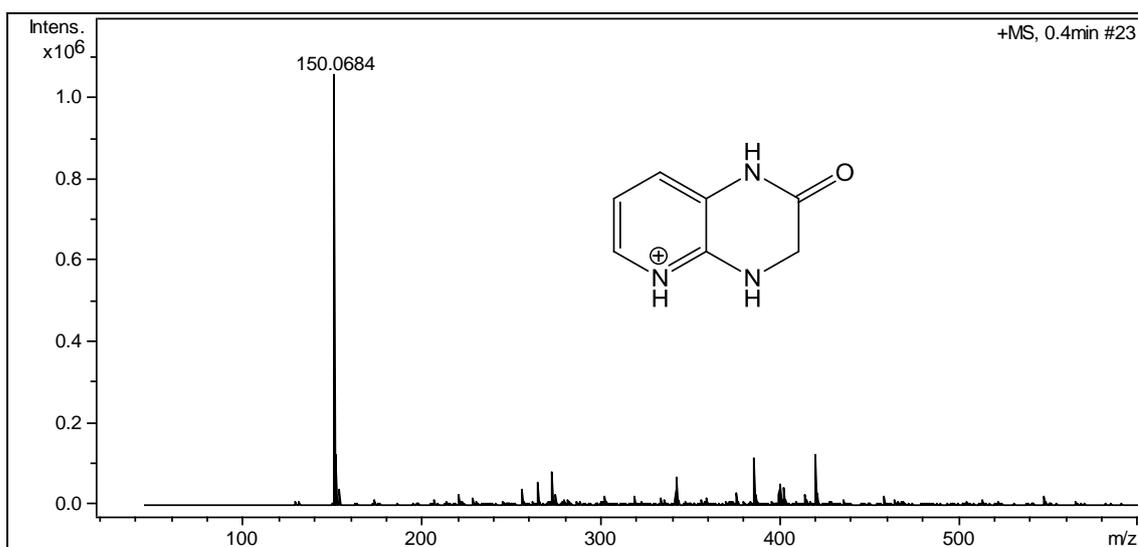


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **29** foi sintetizada como um sólido marrom que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,30), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 80,0 °C.

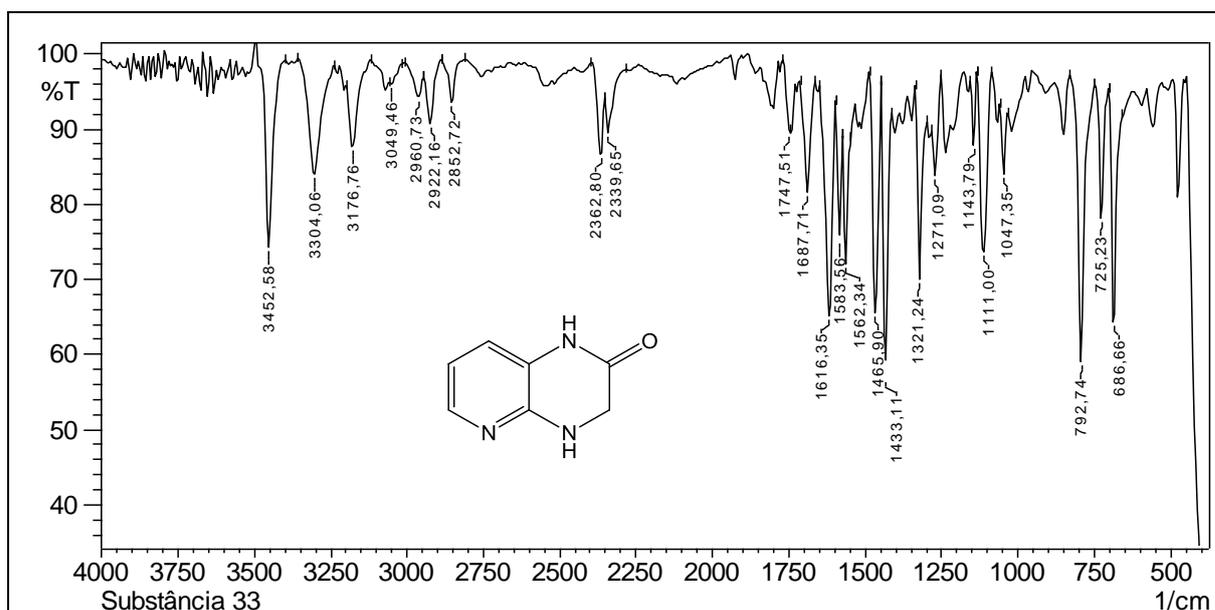
Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 150,0684 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}$, 150,0662 (Espectro 39).

Espectro 39 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **29**.



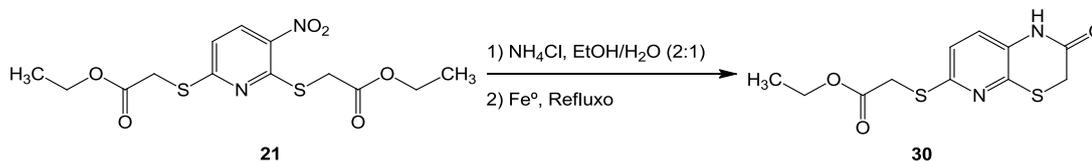
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **29** permitiu identificar uma banda em 3453 cm^{-1} , proveniente ao estiramento $\nu(\text{N-H})$. Além disso, foi observada a banda referente à absorção $\nu(\text{C=O})$ em 1747 cm^{-1} , respectivamente, atribuída a carbonila da β -lactama (Espectro 40). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu(\text{C=C})$ e $\nu(\text{C-H})$ do anel piridínico, em 1584 e 3049 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1616 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C=N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 40 – Espectro na região do IV do composto **29**.



4.3.11 Determinação estrutural do composto 30

Figura 27 – Reação para formação do composto 30.

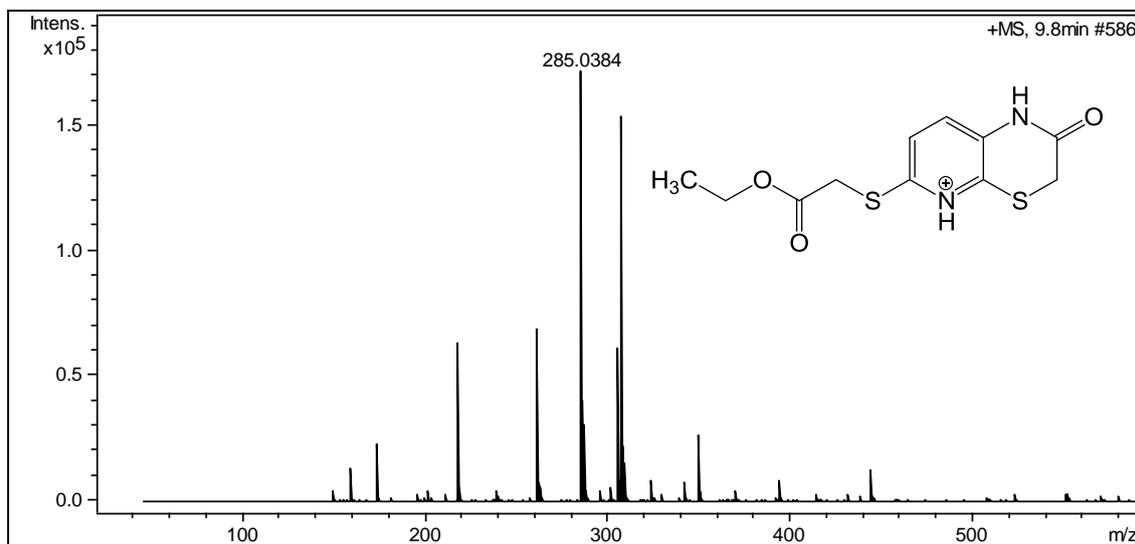


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **30** foi sintetizada como um sólido amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,30), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). O ponto de fusão para a base livre foi 149,0 °C.

Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a sete. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 285,0384 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$, 285,0362 (Espectro 41).

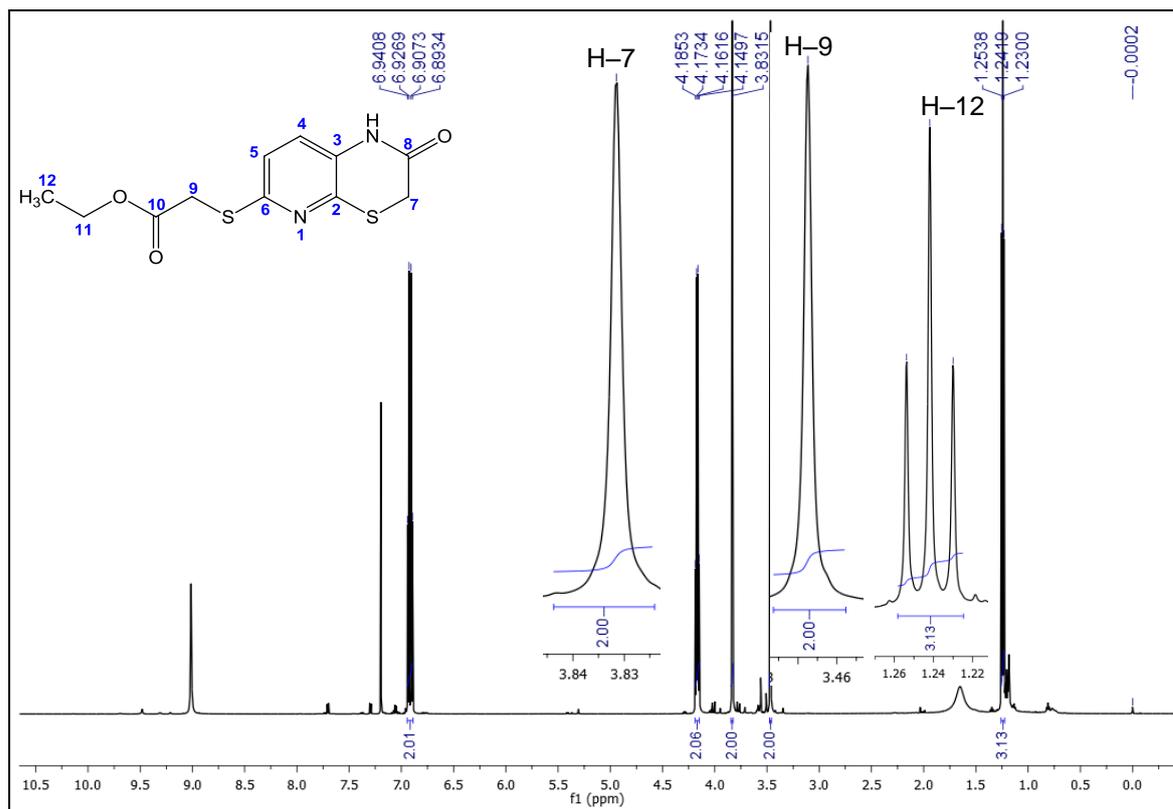
Espectro 41 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 30.



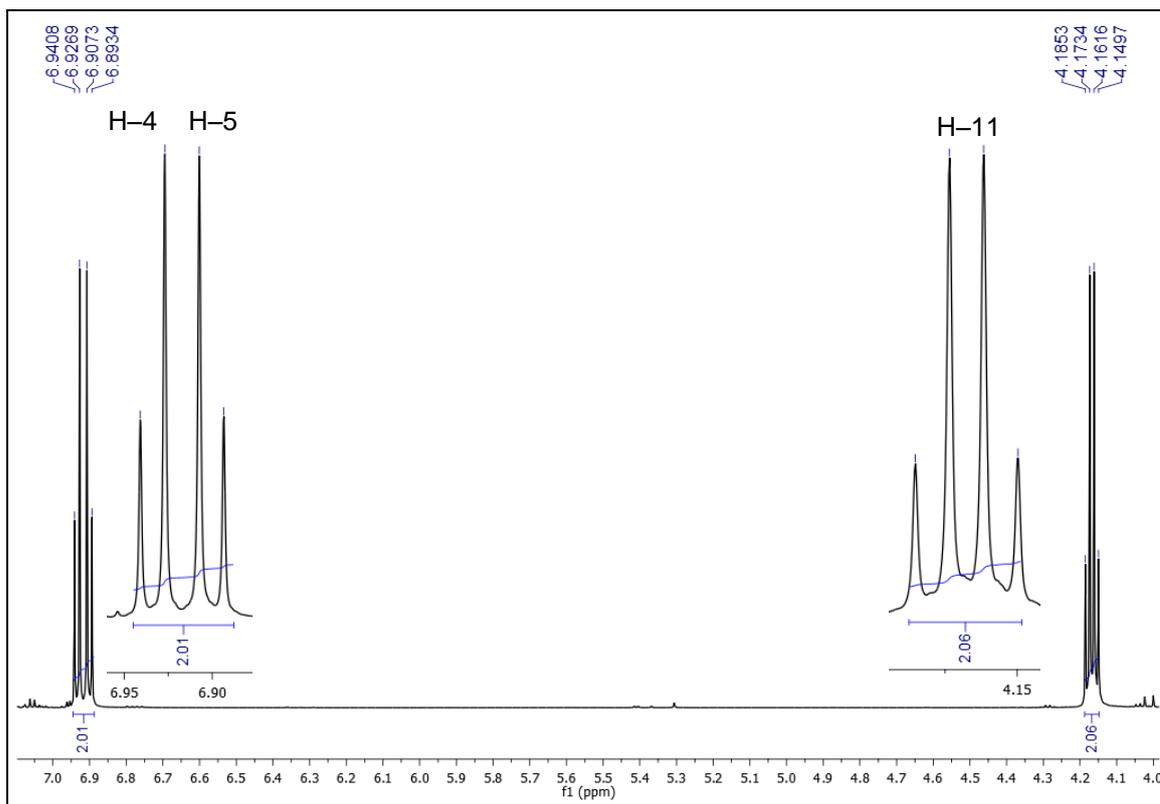
A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 42) do composto **30** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois duplos dubletos em δ 6,93 e 6,90, atribuídos a H-4 (1H, J = 8,3 Hz) e a H-5 (1H,

$J = 8,3$ Hz), respectivamente. A δ -lactama conjugada ao anel piridínico foi confirmada pela presença de um singlete em δ 3,83, atribuído a H-7 (2H). A cadeia lateral em C-6, referente ao tioglicolato de etila foi confirmada pela presença de um singlete em δ 3,47, atribuído a H-9 (2H), um quadrupeto em δ 4,17 (H-9, 2H, $J = 7,1$ Hz) e um triplete em δ 1,24 (H-10, 3H, $J = 7,1$ Hz) (Tabela 12).

Espectro 42 – Espectro de RMN ^1H do composto **30** (600 MHz, CDCl_3).



Espectro 43 – Ampliação do espectro 42 (δ 7,0–8,6), do composto **30**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários C-2, C-3 e C-6 (δ 151,2, 124,8 e 143,4) e dois não substituídos C-4 e C-5 (δ 129,4 e 119,7, respectivamente). Foi observada ainda a presença de dois metilenos (C-9 e C-11) em δ 29,8 e 61,5, uma carbonila (C-10) em δ 165,3 e uma metila (C-12) em δ 14,5, característico da cadeia linear do tioglicolato de etila. Também foi observada a presença de um CH_2 (C-8) em δ 33,1, característico da δ -lactama (Espectro 44; Tabela 12). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema piridínico trissubstituído.

Espectro 44 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **30** (125 MHz, CDCl_3).

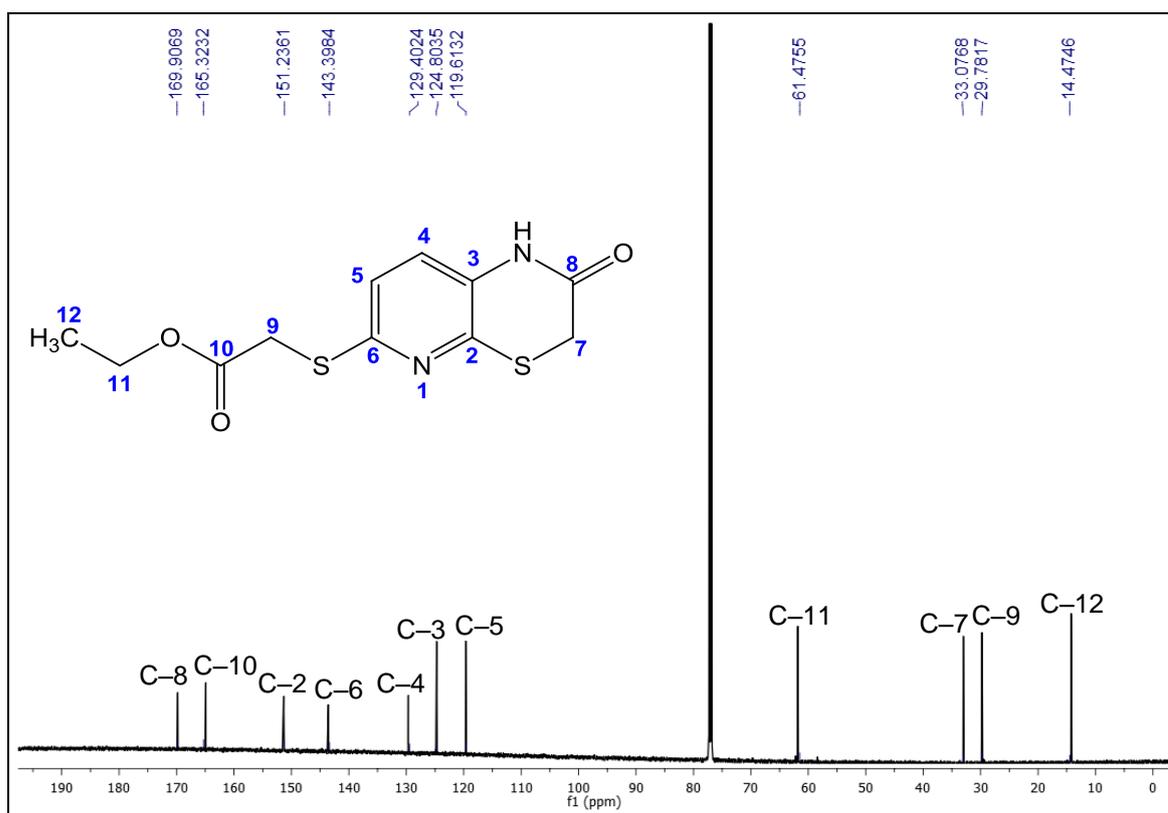


Tabela 12 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **30** (CDCl_3).

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{calculado}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{calculado}}^{\text{b}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
2	–	–	158,3	151,2
3	–	–	121,8	124,8
4	7,87	6,93	126,6	129,4
5	7,15	6,90	118,8	119,7
6	–	–	153,4	143,4
7	3,82	3,83	41,4	33,1
8	–	–	168,2	169,9
9	4,16	3,47	31,1	29,8
10	–	–	167,9	165,3
11	4,13	4,17	60,6	61,5
12	1,29	1,24	14,1	14,5

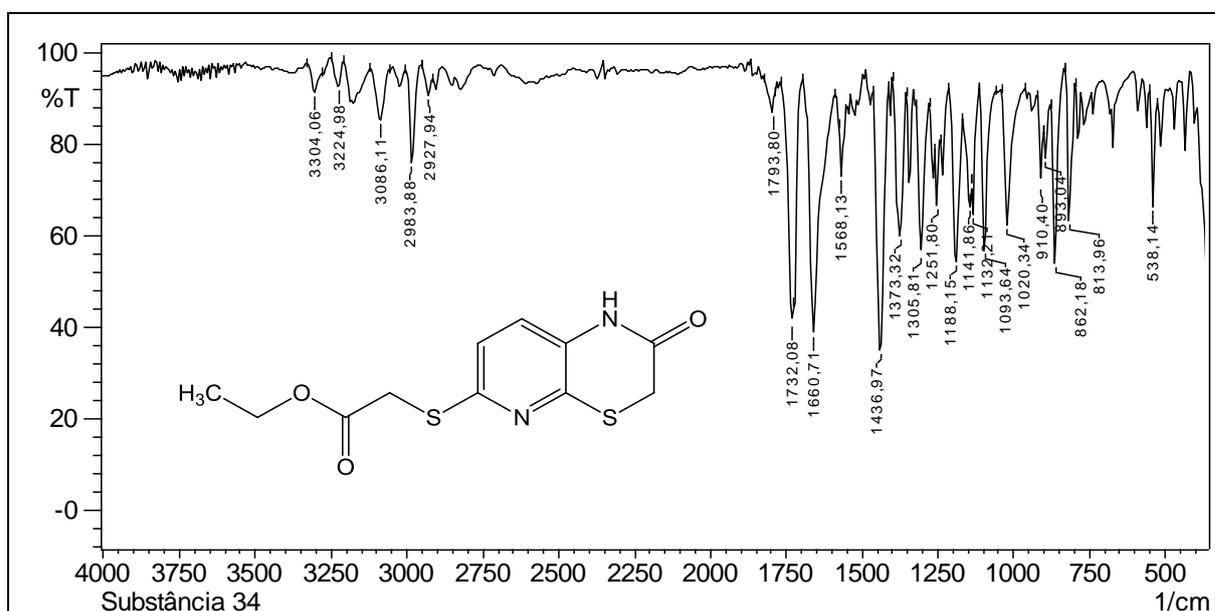
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

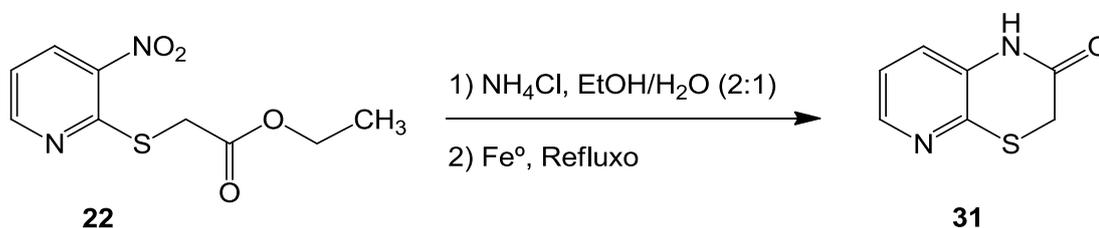
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **30** permitiu identificar duas bandas, provenientes ao estiramento da carbonila $\nu(\text{C}=\text{O})$, em 1794 cm^{-1} (δ -lactama) e 1732 cm^{-1} (éster), respectivamente. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções $\nu(\text{C}-\text{CO}-\text{O})$ e $\nu(\text{O}-\text{C}-\text{C})$, em 1188 e 1132 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 45). Também se observou uma banda em 1661 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 45 – Espectro na região do IV do composto **30**.



4.3.12 Determinação estrutural do composto **31**

Figura 28 – Reação para formação do composto **31**.

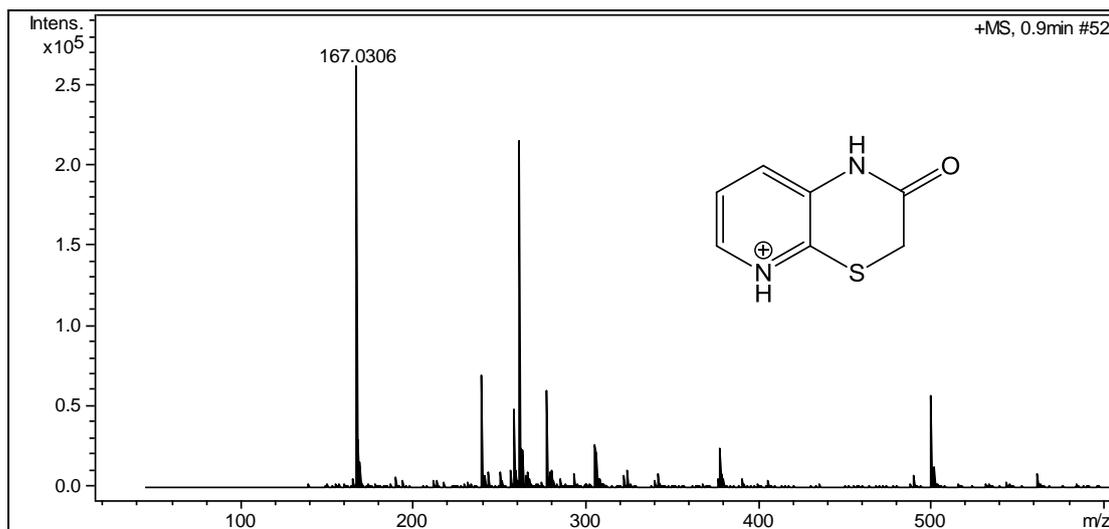


Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **31** foi sintetizada como um óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível

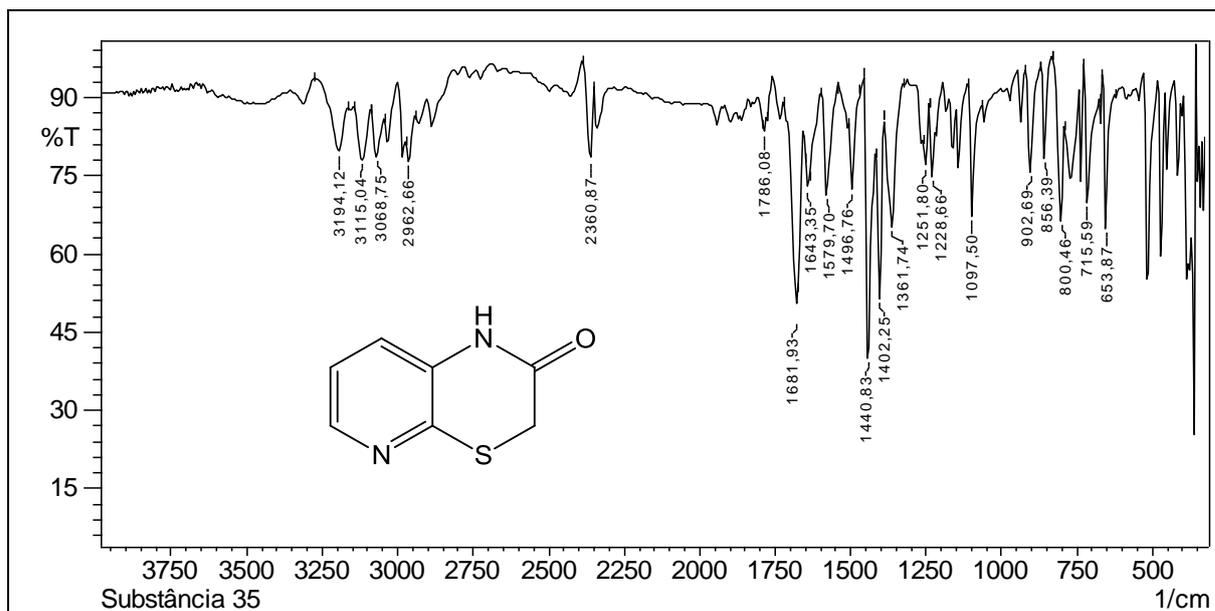
observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo $C_7H_6N_2OS$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 167,0306 $[M + H]^+$, calculado para $C_7H_7N_2OS$, 167,0274 (Espectro 46).

Espectro 46 – EM-IES-(+) alta resolução do composto **31**.



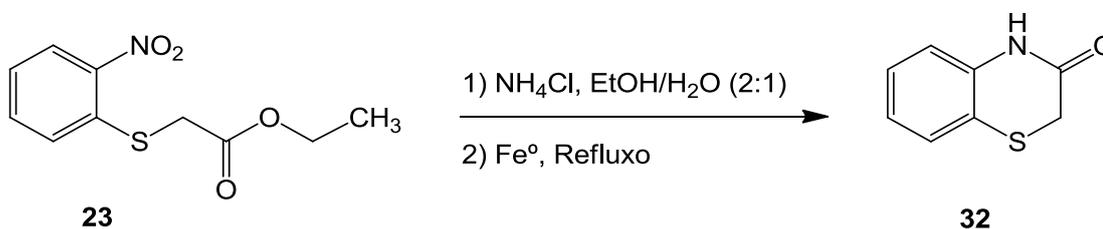
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **31** permitiu identificar uma banda, referente à absorção $\nu(C=O)$ em 1786 cm^{-1} , respectivamente, atribuída a carbonila da β -lactama (Espectro 47). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu(C=C)$ e $\nu(C-H)$ do anel piridínico, em 1580 e 3069 cm^{-1} , respectivamente. Também se observou uma banda em 1682 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(C=N)$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 47 – Espectro na região do IV do composto **31**.



4.3.13 Determinação estrutural do composto **32**

Figura 29 – Reação para formação do composto **32**.

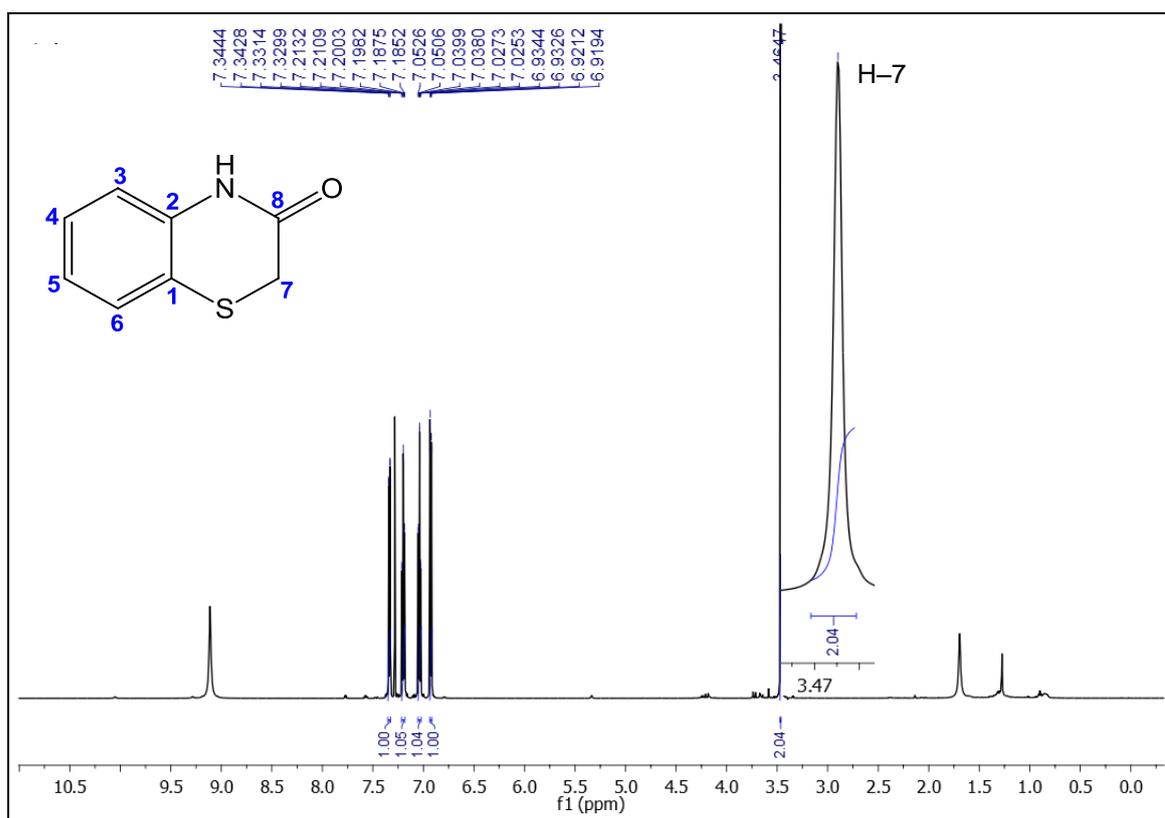


Fonte: A AUTORA, 2016.

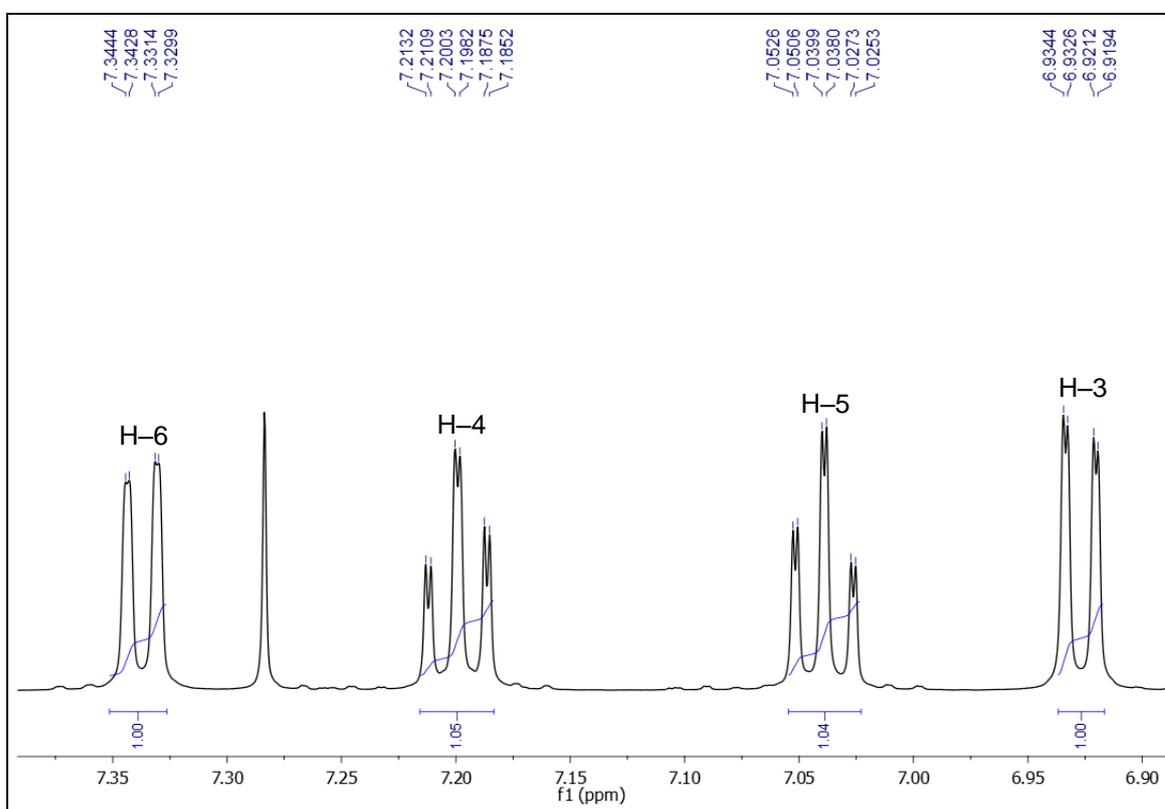
A substância **32** foi sintetizada como um óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm).

A análise do espectro de RMN ^1H (Espectro 48) do composto **32** permitiu caracterizar o núcleo aromático dissubstituído através da presença de dois duplos dubletos em δ 6,93 e 7,34, atribuídos a H-3 (1H, $J = 7,8; 1,4$ Hz) e a H-6 (1H, $J = 7,8; 1,4$ Hz), e dois duplos duplos dubletos em δ 7,20 e 7,04, atribuídos a H-4 (1H, $J = 8,3; 7,8; 1,4$ Hz) e a H-5 (1H, $J = 8,3; 7,8; 1,4$ Hz), respectivamente. A δ -lactama conjugada ao anel piridínico foi confirmada pela presença de um singlete em δ 3,46, atribuído a H-7 (2H) (Tabela 13).

Espectro 48 – Espectro de RMN ¹H do composto **32** (600 MHz, CDCl₃).



Espectro 49 – Ampliação do espectro 48 (δ 6,9–7,35), do composto **32**.



No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo dois quaternários C-1 e C-2 (δ 123,9 e 136,4) e quatro não substituídos C-3, C-4, C-5 e C-6 (δ 117,4, 127,3, 119,9 e 127,8, respectivamente). Foi observada ainda presença de um CH_2 (C-7) em δ 30,0, característico da δ -lactama (Espectro 50; Tabela 13). Quando comparados os sinais dos carbonos piridínicos com aqueles da literatura (SILVERSTEIN et al., 2006; PAVIA et al., 2010) e teóricos propostos pelo programa ChemDrawn v. 14, foi possível caracterizar o sistema aromático dissubstituído.

Espectro 50 – Espectro de RMN ^{13}C do composto **32** (125 MHz, CDCl_3).

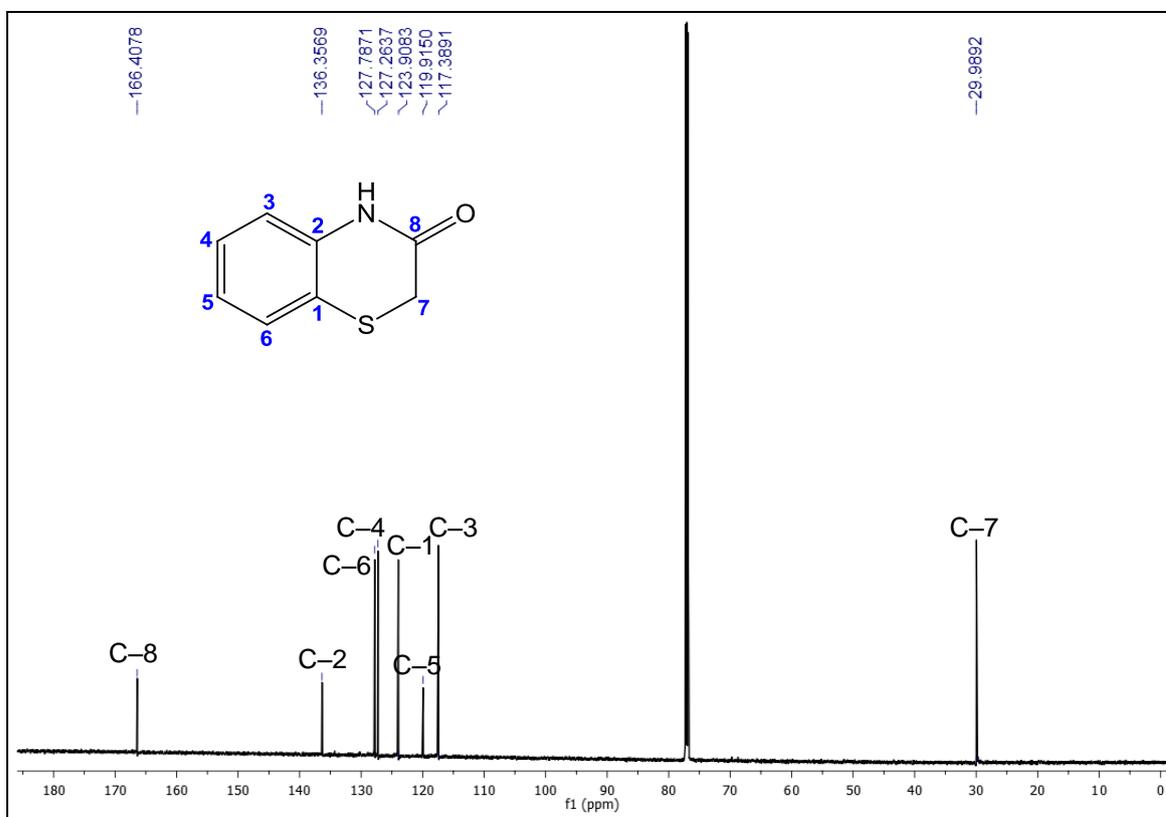


Tabela 13 – Dados de RMN ¹H e ¹³C do composto **32** (CDCl₃).

Posição	δ _H calculado ^b	δ _H ^a	δ _C calculado ^b	δ _C ^a
1	–	–	125,2	123,9
2	–	–	142,4	136,4
3	7,00	6,93	123,0	117,4
4	7,19	7,20	130,0	127,3
5	7,09	7,04	124,5	119,9
6	7,37	7,34	135,0	127,8
7	3,71	3,46	41,4	30,0
8	–	–	168,2	166,4

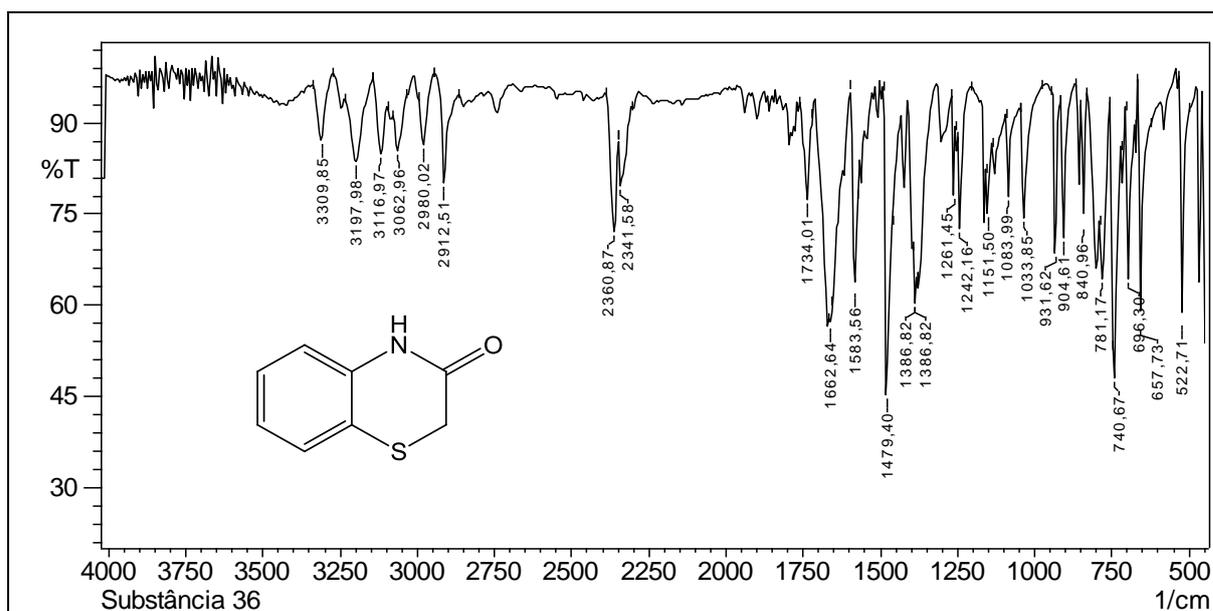
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

^b Valores calculados pelo programa ChemDraw Ultra, versão 14.

^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados.

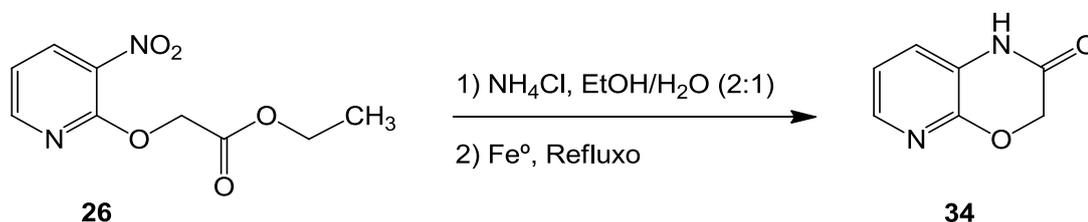
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **32** permitiu identificar uma banda, proveniente ao estiramento da carbonila ν(C=O), em 1734 cm⁻¹, respectivamente. Além disso, foram observadas duas bandas referentes às absorções ν(C=C) e ν(C–H) do anel aromático, em 1584 e 3063 cm⁻¹, respectivamente (Espectro 51) (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 51 – Espectro na região do IV do composto **32**.



4.3.14 Determinação estrutural do composto 34

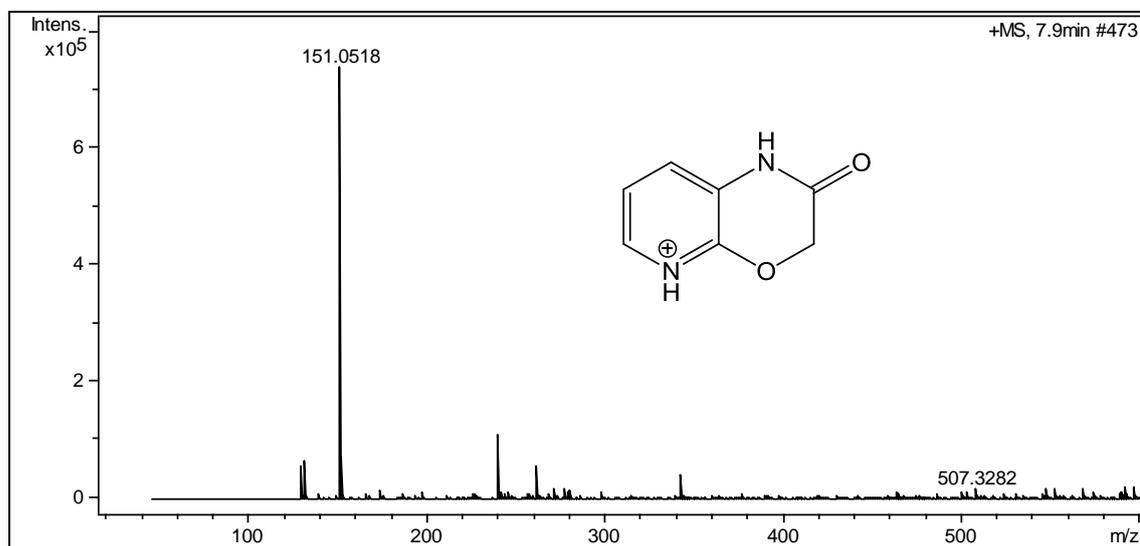
Figura 30 – Reação para formação do composto 34.



Fonte: A AUTORA, 2016.

A substância **34** foi sintetizada como um óleo amarelo que apresentou teste positivo quando revelada com o reagente anisaldeído (R_f 0,40), também foi possível observá-la quando inspecionada sob lâmpada de UV (λ 254 nm). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer a fórmula molecular como sendo $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 151,0518 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2$, 151,0502 (Espectro 52).

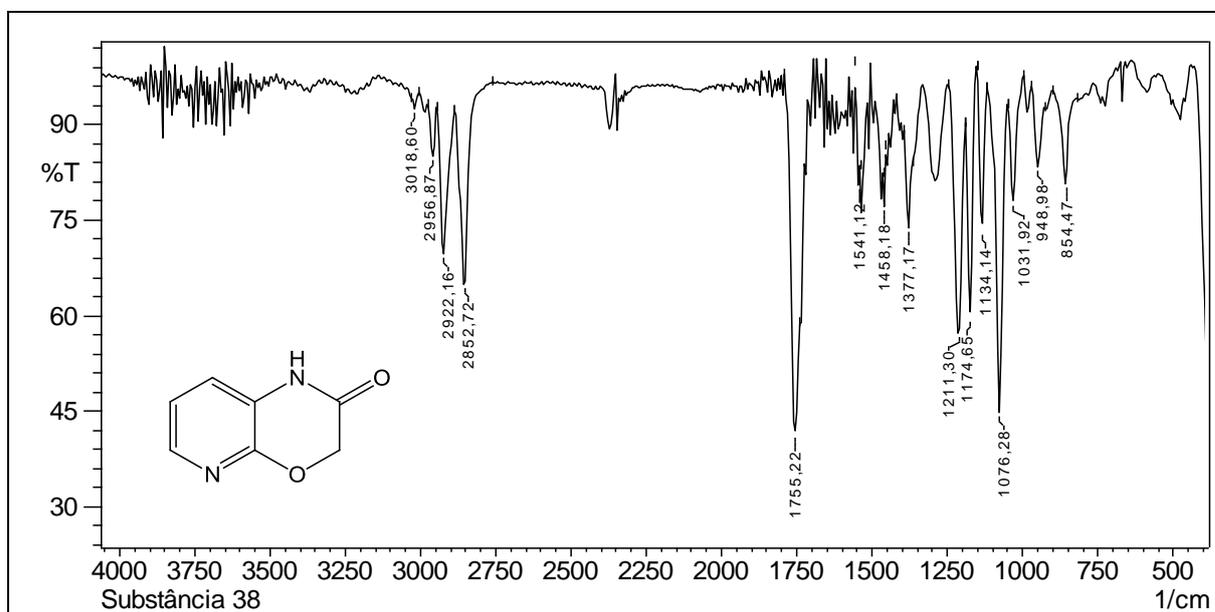
Espectro 52 – EM-IES-(+) alta resolução do composto 34.



A análise do espectro na região do infravermelho do composto **34** permitiu identificar uma banda, referente à absorção $\nu(\text{C}=\text{O})$ em 1755 cm^{-1} , respectivamente, atribuída a carbonila da β -lactama (Espectro 53). Outras duas absorções observadas são os estiramentos $\nu(\text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{C}-\text{H})$ do anel piridínico, em 1458 e 3019 cm^{-1} ,

respectivamente. Também se observou uma banda em 1541 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$ do anel piridínico (SILVERSTEIN et al., 2006; BARBOSA, 2007).

Espectro 53 – Espectro na região do IV do composto **34**.



4.3.15 Deslocamentos químicos e eletronegatividade

A eletronegatividade influencia nos deslocamentos químicos dos hidrogênios. Substituintes eletronegativos ligados a um átomo de carbono reduzem a densidade eletrônica ao redor dos hidrogênios ligados a esse átomo de carbono, devido ao fato destes substituintes possuírem o efeito de retirar elétrons. Como consequência esses átomos eletronegativos tendem a reduzir a blindagem nas proximidades do hidrogênio ligado. Quanto mais eletronegativo for o substituinte, mais este desprotege os hidrogênios, e assim, maior será o deslocamento químico desses hidrogênios.

Nos compostos elucidados, as cadeias laterais se diferenciam em três átomos: oxigênio (glicolato de etila), nitrogênio (glicinato de etila) e enxofre (tioglicolato de etila). O oxigênio é o elemento mais eletronegativo por isso seus compostos apresentaram maiores deslocamentos químicos. A influência da eletronegatividade nos deslocamentos químicos dos compostos elucidados pode ser visualizada nas atribuições referentes à H-7 e H-7' (Tabela 14).

Tabela 14 – Substituintes eletronegativos e deslocamentos químicos.

Átomo (composto)	H-7	H-7'
O (24)	5,06	–
O (25)	4,45	4,43
O (26)	4,99	–
N (16)	4,37	–
N (18)	4,38	–
S (21)	4,09	3,99
S (22)	3,96	–
S (23)	3,76	–

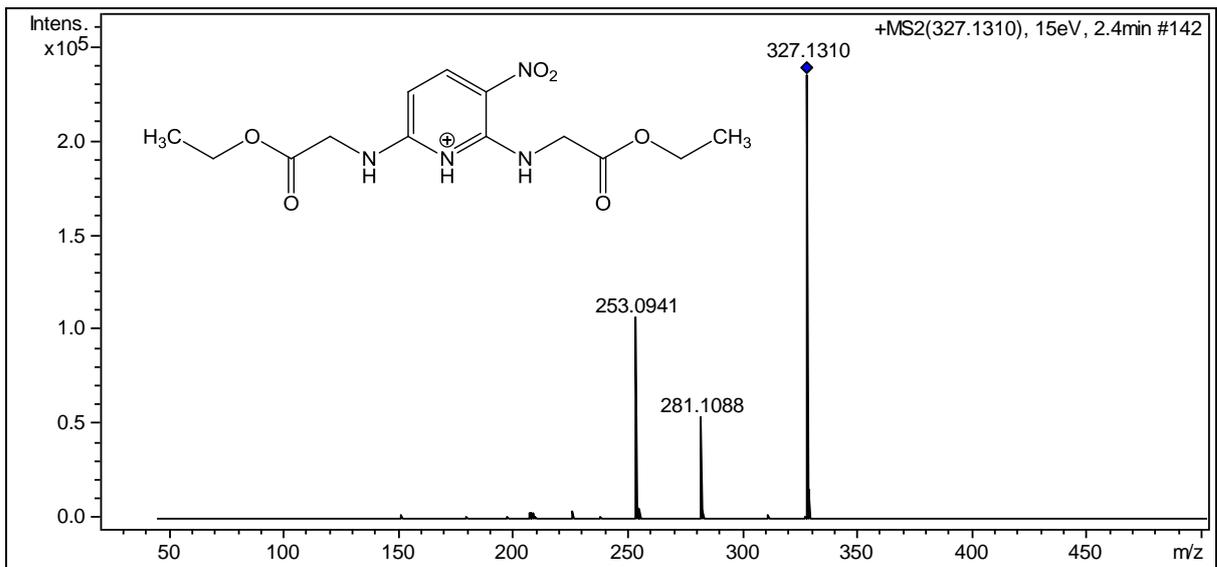
4.4 ANÁLISES DOS EXPERIMENTOS DE MS/MS DOS ISÓSTEROS PIRIDÍNICOS

A espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) estuda a geração de íons formados por colisões de um íon percussor, previamente selecionado. Assim, é possível obter maiores informações sobre a estrutura da molécula, pois todos os sinais presentes serão visualizados (FURTRELL, 2000).

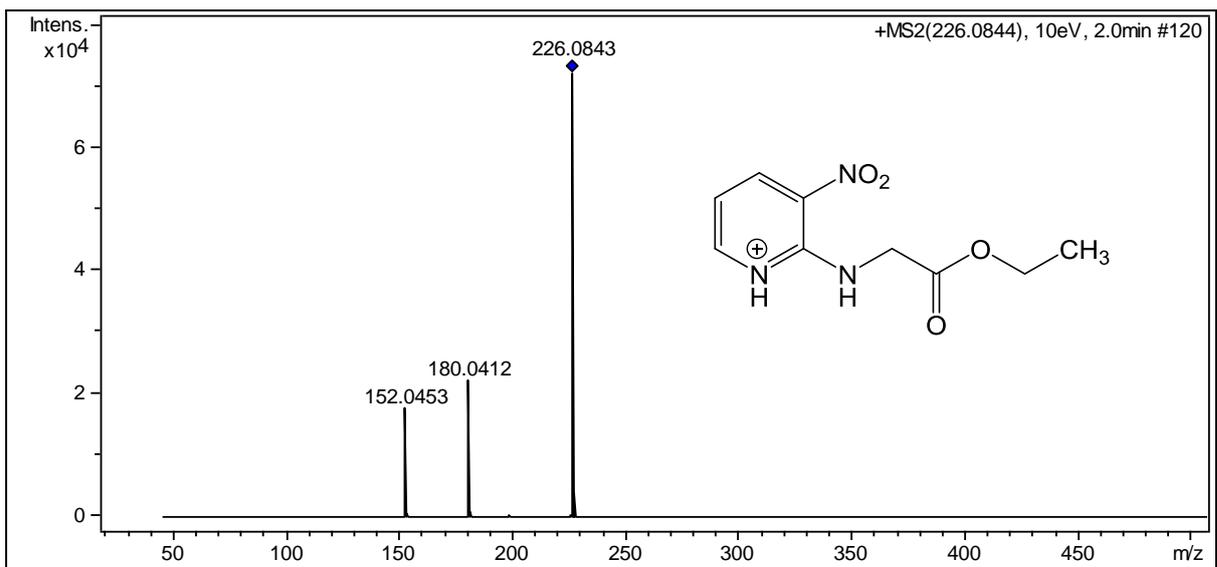
Os compostos **17**, **18**, **21**, **22**, **24** e **26** foram analisados por espectrometria de massas em *tandem*. A análise dos espectros destes compostos (Espectros 54–59) permitiu estabelecer uma proposta de fragmentação geral (Figura 31), para os fragmentos encontrados a partir do íon molecular destes compostos.

Sendo assim, as moléculas protonadas dos isósteros acima $[M + H]^+$ m/z 327, 361, 261, 243, 227 e 226, respectivamente, foram submetidas aos experimentos de MS/MS, sendo que naqueles espectros aonde foram aplicadas energias entre 10–15 eV foi observado um padrão de fragmentação com a eliminação neutra de EtOH (46 u) e CO (28 u) (Figura 31).

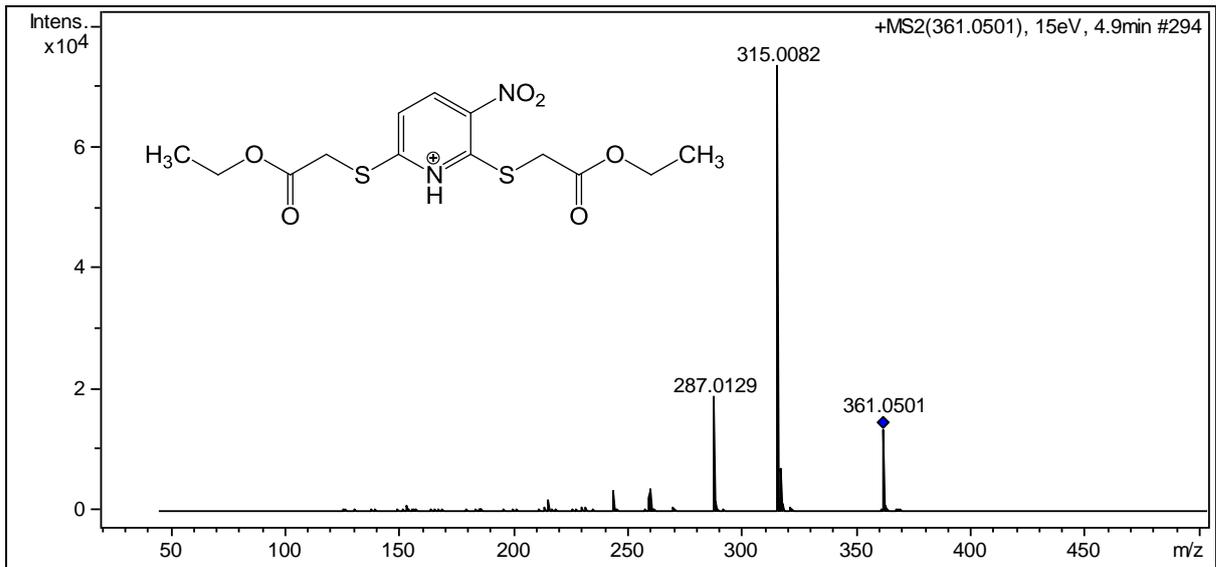
Espectro 54 – EM-EM-IES-(+) do composto 17.



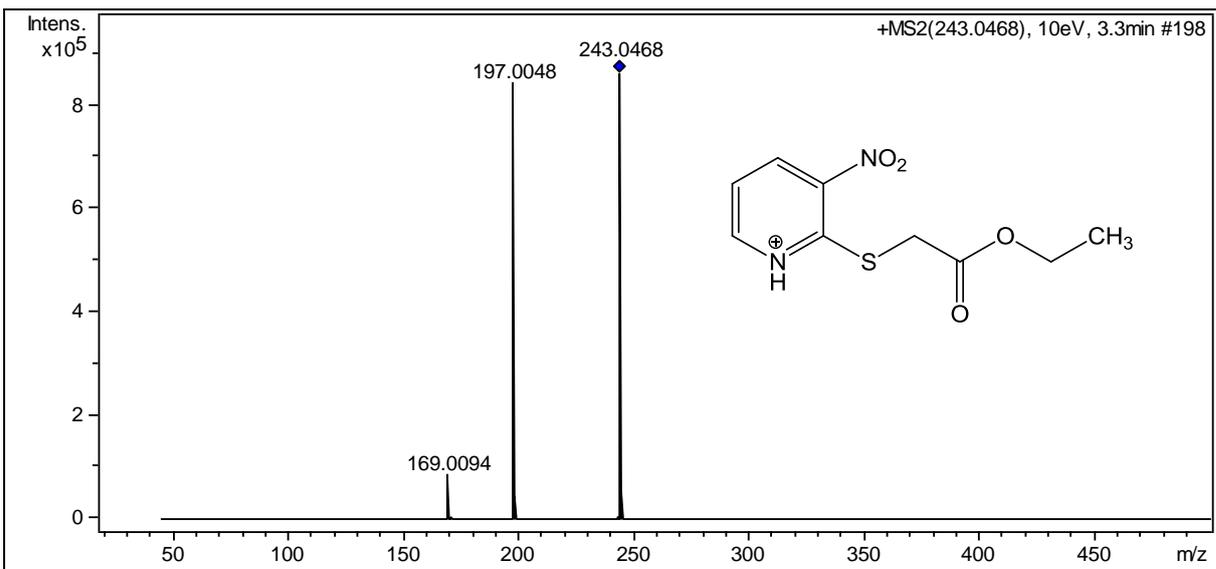
Espectro 55 – EM-EM-IES-(+) do composto 18.



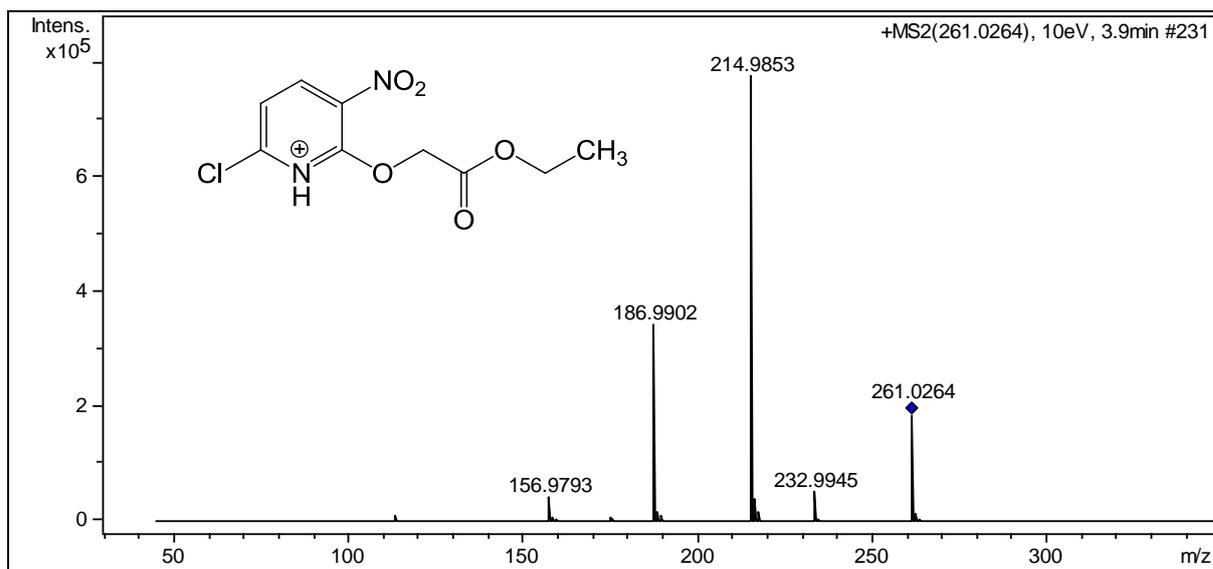
Espectro 56 – EM-EM-IES-(+) do composto 21.



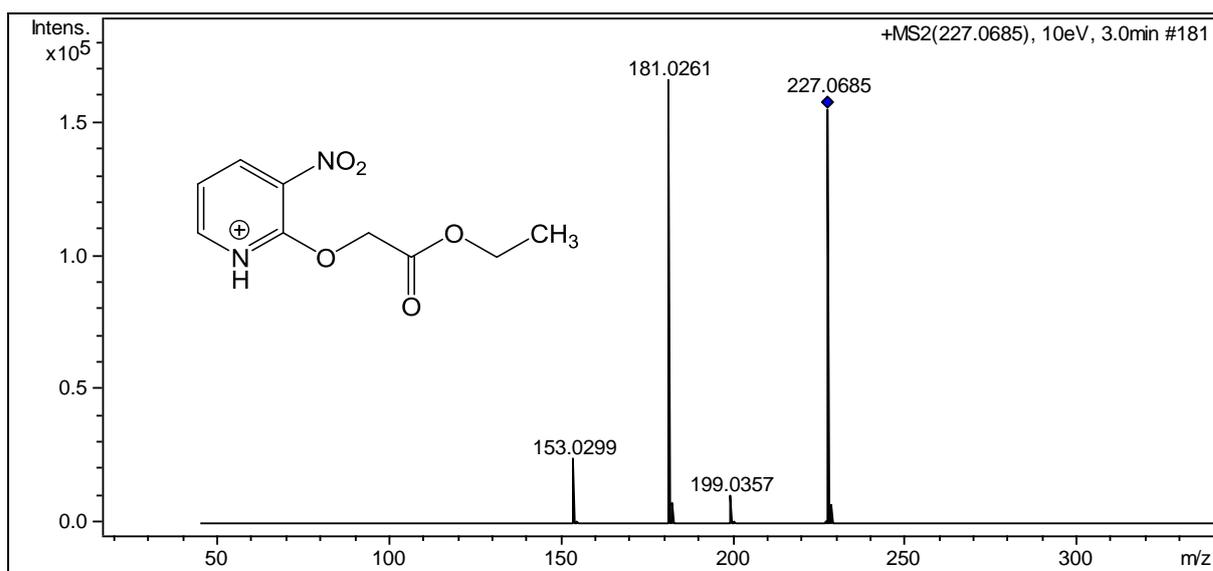
Espectro 57 – EM-EM-IES-(+) do composto 22.



Espectro 58 – EM-EM-IES-(+) do composto **24.**



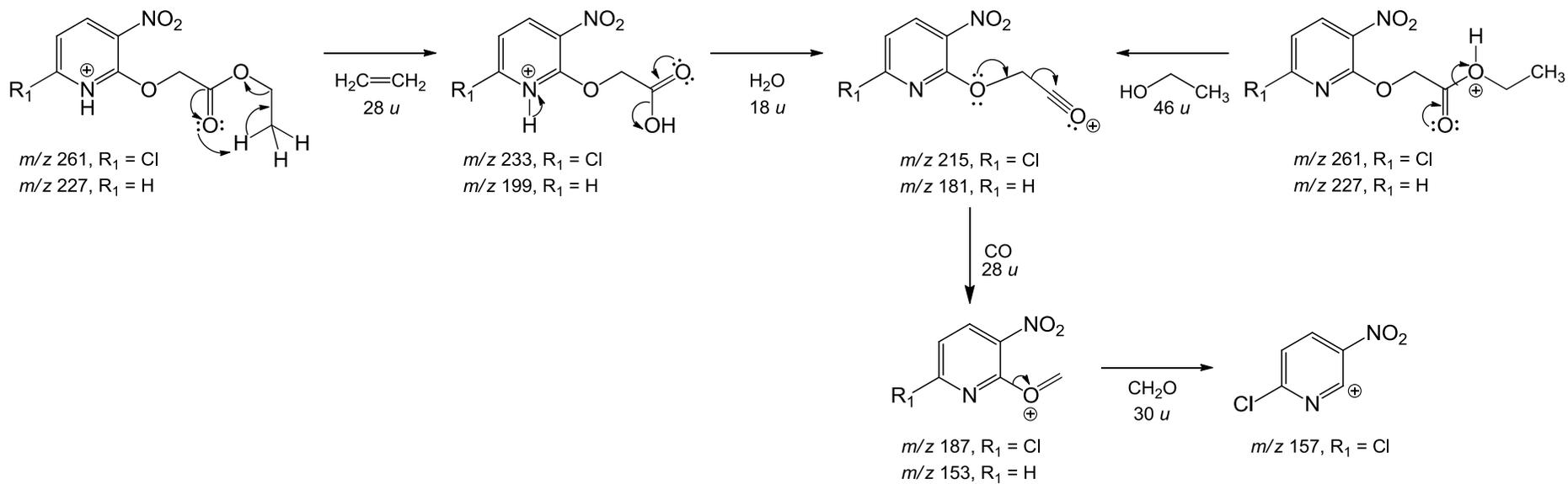
Espectro 59 – EM-EM-IES-(+) do composto **26.**



Os isómeros oxigenados (**24** e **26**) apresentaram sinais de fragmentos característicos destes compostos com m/z 233 e 157 para **24** e m/z 199 para **26**. A proposta de fragmentação para estes compostos a partir das respectivas moléculas protonadas m/z 261 e 227, foi a eliminação neutra de eteno (28 u), seguida da eliminação de água (18 u) e CO (28 u), fragmentos observados para os dois compostos. Adicionalmente o composto **24** apresentou um sinal de m/z 157 atribuído a eliminação neutra de metanal (30 u) (Figura 32).

A partir da análise dos espectros e das propostas de fragmentação dos isómeros, foi possível observar que os derivados com enxofre (**21** e **22**) e nitrogênio (**17** e **18**) não apresentaram a eliminação atribuída a metanal (30 *u*). Para os derivados ciclizados não foram observados fragmentos nos experimentos de MS/MS, mesmo quando altas energias de colisão foram aplicadas. Essa não fragmentação pode ser explicada pela alta estabilidade da δ -lactama.

Figura 32 – Proposta de fragmentação para os isómeros piridínicos **24** e **26**.



4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade dos compostos avaliados

Através dos resultados de absorvância obtidos, foi calculada a porcentagem de viabilidade celular. A citotoxicidade, expressa por meio de valores de CC_{50} , foi determinada utilizando células de rim de macaco (LLC–MK₂). Os valores de CC_{50} (concentração citotóxica máxima) são definidos pela concentração do composto necessária para matar 50% das células, após um determinado tempo de exposição. Sendo assim, maiores valores de CC_{50} apresentaram menores efeitos citotóxicos dos compostos sobre a célula estudada.

Para o ensaio de citotoxicidade foram utilizados os compostos **18, 21, 22, 23, 26, 29, 31 e 34**. Os valores de viabilidade celular dos compostos avaliados para a linhagem celular LLC–MK₂, apresentaram valores de $CC_{50} > 1000$. Esses valores foram comparados com o fármaco padrão benzonidazol que apresentou CC_{50} igual a 367,3 μ M. De acordo com os resultados, os compostos avaliados não apresentaram citotoxicidade (Tabela 15).

Tabela 15 – Valores de CC_{50} (μ M) obtidos para os compostos avaliados.

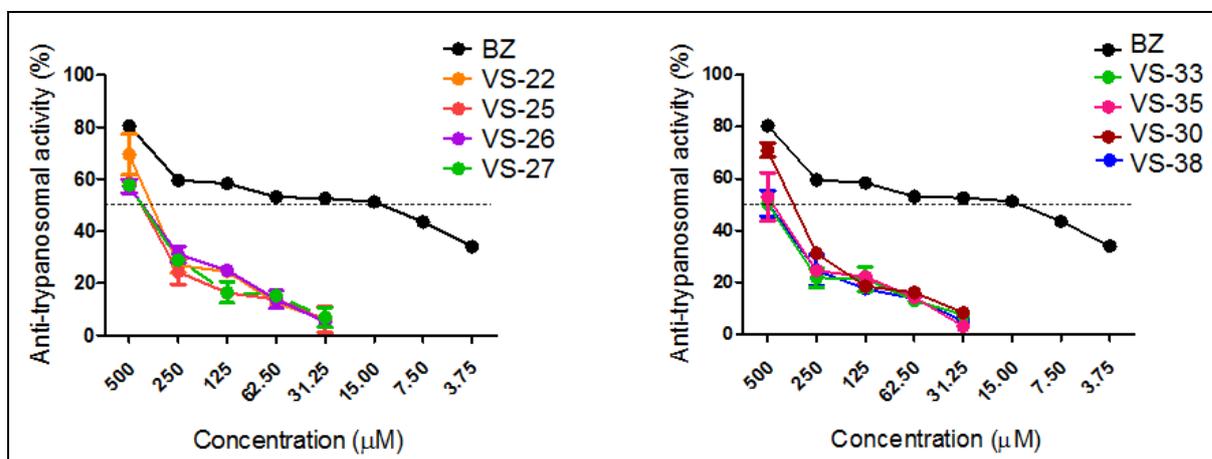
Compostos	CC_{50} (μ M)
Benzonidazol	367,3
18	>1000
21	>1000
22	>1000
23	>1000
26	>1000
29	>1000
31	>1000
34	>1000

4.5.2 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* dos compostos avaliados

Através dos resultados de absorvância obtidos, foi calculada a porcentagem de viabilidade celular das formas amastigotas da cepa *CL Brener* do *T. cruzi*. A atividade anti-*Trypanosoma cruzi* é determinada por meio de valores de IC_{50} , concentração inibitória máxima dos parasitas, ou seja, a concentração mínima que impede 50% do crescimento do parasita *in vitro*, após um determinado tempo de exposição. Dessa maneira, menores valores de IC_{50} apresentaram maiores efeitos tóxicos das substâncias sobre as formas amastigotas do *T. cruzi*.

Para a avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* foram utilizados os compostos **18, 21, 22, 23, 26, 29, 31 e 34**. Ao analisar os gráficos da Figura 33, observa-se que os compostos avaliados somente apresentaram valores consideráveis de IC_{50} na concentração de 500 μ M. Já o fármaco padrão benzonidazol, apresentou uma boa atividade em concentrações bem mais baixas.

Figura 33 – Porcentagem da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* dos compostos avaliados, em diferentes concentrações.



Fonte: A AUTORA, 2016.

Para o composto ser considerado útil no tratamento da doença de Chagas, deve apresentar menores valores de IC_{50} , quando comparado ao fármaco padrão benzonidazol. Sendo assim, analisando os valores de IC_{50} (Tabela 16) dos compostos avaliados pode-se concluir que estes não apresentaram potencial atividade anti-*Trypanosoma*.

Tabela 16 – Valores de IC₅₀ (µM) obtidos para os compostos avaliados.

Compostos	IC ₅₀ (µM)
Benzonidazol	22,4
18	347,2
21	443,4
22	421,0
23	438,7
26	331,6
29	599,5
31	514,4
34	553,9

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados 16 compostos, sendo 6 derivados de enxofre (**21**, **22**, **23**, **30**, **31**, **32**), 5 de nitrogênio (**16**, **17**, **18**, **28**, **29**) e 5 de oxigênio (**24**, **25**, **26**, **33**, **34**). Estes compostos foram caracterizados através de técnicas espectroscópicas (IV e RMN) e espectrométricas (EM).

O nucleófilo tioglicolato de etila foi o mais reativo, pois apresenta maior polarizabilidade o que aumenta seu caráter nucleofílico, quando comparado com os compostos de oxigênio e de nitrogênio.

O anel benzênico é considerado pouco reativo, devido à estabilidade do anel benzênico que possui uma nuvem ininterrupta de elétrons π . Em comparação com o anel piridínico, o anel benzênico apresenta seu orbital molecular LUMO em um nível energético maior que o orbital molecular LUMO da piridina, sendo assim, a piridina apresenta-se mais reativa frente aos nucleófilos. Isso justifica a formação de apenas um produto utilizando o substrato 1-cloro-2-nitro-benzeno.

Os compostos **17**, **18**, **21**, **22**, **23**, **25** e **26** tiveram o grupo nitro reduzido para amino. Após a redução ocorreu uma reação de ciclização intramolecular resultando nos produtos **29**, **30**, **31**, **32** e **34**. Estes produtos ciclizados obtidos possuem em sua estrutura molecular a amida cíclica δ -lactama, considerada muito estável. Quando esses compostos foram submetidos à análise de experimentos de MS/MS não foram observados fragmentos, mesmo quando foram aplicadas altas energias de colisão. Essa não fragmentação pode ser explicada pela alta estabilidade da δ -lactama.

A partir da análise dos espectros de MS/MS dos isómeros (derivados de enxofre, nitrogênio e oxigênio), foi possível propor um padrão de fragmentação comum para estes compostos, o que pode ser justificado pela similaridade estrutural. Também foi observado que os derivados oxigenados apresentaram alguns sinais referentes a fragmentos característicos destes compostos.

Os compostos (**18**, **21**, **22**, **23**, **26**, **29**, **31** e **34**) submetidos à avaliação de citotoxicidade *in vitro*, de acordo com os valores de CC_{50} obtidos, não se mostraram tóxicos frente às células de linhagem LCC–MK2. Entretanto, de acordo com os valores de IC_{50} , estes mesmos compostos não apresentaram atividade anti-*Trypanosoma cruzi in vitro* para as formas amastigotas da cepa *CL Brener* de *T. cruzi*.

Por fim, a maioria dos objetivos deste trabalho foi alcançada. Os resultados dos ensaios biológicos, embora negativos, nos abre perspectivas para novas pesquisas na investigação de candidatos a novos fármacos para a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

- ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 771-790, 2009.
- BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no infravermelho. Na caracterização de compostos orgânicos. **Editora UFV**. 2007.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- BATHIA, R.; SHARMA, V.; SHRIVASTAVA, B.; SINGLA, R. K. A review on bioisosterism: a rational approach for drug design and molecular modification. **Pharmacologyonline** 1. p. 272-299, 2011.
- BERN, C. Chagas' disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 373, p. 456-466, 2015.
- BRENK, R.; RAUHT D. Reflections of the workshop 'future in medicinal chemistry'. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 3695-3697, 2012.
- BRUICE, P. Y. Organic Chemistry. **Pearson Education**. 7th ed., 2014.
- BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L.; LA FLAMME, A. C.; VAN VOORHIS, W. C. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, p. 2592-2597, 1996.
- CECH, N. B.; ENKE, C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. **Mass Spectrometry Reviews**. v. 20, p. 362-387, 2002.
- CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: compounds at the final stage of "Hit-to-lead" phase. **Pharmaceuticals**. v. 3, p. 810-838, 2010.
- CROTTI, A. E. M.; Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 287-292, 2006.
- DENG, G.; SANYAL, G. Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 40, p. 528-538, 2006.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e

perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**. v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIERCKS, T.; COLES, M.; KESSLER, H. Applications of NMR in drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 5, p. 285-291, 2001.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 1108-1119, 2007.

FUTRELL, J. H. Development of tandem mass spectrometry: one perspective. **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 200, p. 495-508, 2000.

GIROLAMO, F.; LANTE, I.; MURACA, M.; PUTIGNANI, L. The role of mass spectrometry in the “omics” era. **Current Organic Chemistry**. v. 17, p. 2891-2905, 2013.

GROSS, J. H. Mass Spectrometry – A Textbook. **Springer, Heidelberg**. 5th ed., 2004.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Revista Processos Químicos**. v. 4, p. 24-36, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**. v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HENDRICKS, P. I.; DALGLEISH, J. K.; SHELLEY, J. T.; KIRLEIS, M. A.; McNICHOLAS, M. T.; LI, L.; CHEN, T.; CHEN, C.; DUNCAN, J. S.; BOUDREAU, F.; NOLL, R. J.; DENTON, J. P.; ROACH, T. A.; OUYANG, Z.; COOKS, G. Autonomous in situ analysis and real-time chemical detection using a backpack miniature mass spectrometer: concept, instrumentation development, and performance. **Analytical Chemistry**. v. 86, p. 2900-2908, 2014.

HOFSTADLER, S. A.; SANNES-LOWERY, K. A. Applications of ESI-MS in drug discovery: interrogation of noncovalent complexes. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 5, p. 585-595, 2006.

LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. **Journal American Chemical Society**. v. 41, p. 1543-1559, 1919.

LI, C., BLACK, C., CHAN, C.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; GAUTHIER, J.; GORDON, D.; GUAY, D.; KARGMAN, S.; LAU, C. K.; MANCINI, J.; OUIMET, N.; ROY, P.; VICKERS, P.; WONG, E.; YOUNG, R. N.; ZAMBONI, R.; PRASIT, P. Cyclooxygenase-2 inhibitors. Synthesis and Pharmacological activities of 5-methanesulfonamido-1-indatone derivatives. **Journal Medicinal Chemistry**. v. 38, p. 4897-4906, 1995.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**. v. 30, p. 1456-1468, 2007.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A useful strategy for molecular modification in drug design. **Current Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 23-49, 2005.

LIU, Y.; LU, Y.; PRASHAD, M.; REPIC, O.; BLACKLOCK, T. J. A practical and chemoselective reduction of nitroarenes to anilines using activated iron. **Advanced Synthesis & Catalysis**. v. 347, p. 217-219, 2005.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova na Escola**. v. 27, p. 670-673, 2004.

LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância magnética nuclear – ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**. n. 117, p. 25-30, 2010.

MACOMBER, R. S. A complete introduction to modern NMR spectroscopy. **John Wiley & Sons**. 2th ed., 1998.

MAMYRIN, B. A. Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects). **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 206, p. 251-266, 2001.

MEANWELL, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 54, p. 2529-2591, 2011.

MORAES, L. G. P.; ROCHA, R. S. F.; MENEGAZZO, L. M.; ARAUJO, E. B.; YUKIMITO, K.; MORAES, J. C. S. Infrared spectroscopy: a tool for determination of the degree of conversion in dental composites. **Journal of Applied Oral Science**. v. 16, p. 145-149, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**. v. 85, p. 1515-1609, 2013.

PARISI, C.; PASTA, A. New techniques of H1 spectroscopy on the liver: reworking of NMR sequences. **Radiography**. v. 21, p. 124-130, 2015.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: a rational approach in drug design. **Chemical Reviews**. v. 96, p. 3147-3176, 1996.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**. v. 30, p. 289-298, 2014.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. **Cengage Learning**. 4^a ed., 2010.

PELLECCHIA, M.; BERTINI, I.; COWBURN, D.; DALVIT, C.; GIRALT, E.; JAHNKE, W.; JAMES, T. L.; HOMANS, S. W.; KESSLER, H.; LUCHINAT, C.; MEYER, B.; OSCHKINAT, H.; PENG, J.; SCHWALBE, H.; SIEGAL, G. Perspectives on NMR in drug discovery a technique comes of age. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 7, p. 738-745, 2008.

PEREIRA, P. C.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 19, p. 1-17, 2013.

RAJI, M. A.; FRYCAK, P.; BEALL, M.; SAKROUT, M.; AHN, J. M.; BAO, Y.; ARMSTRONG, D. W.; SCHUG, K. A. Development of an ESI-MS screening method for evaluating binding affinity between integrin fragments and RGD-based peptides. **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 262, p. 232-240, 2007.

RASSI, A. JR; RASSI, A.; de REZENDE, J. M. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, p. 275-291, 2012.

RASSI, A. JR; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**. v. 375, p. 1388-1402, 2010.

ROCHA, D. R.; FERREIRA, V. F.; SANTOS, W. C. Aspectos da síntese orgânica no desenvolvimento de métodos e de moléculas biologicamente ativas. **Revista de Processos Químicos**. v. 2, p. 9-22, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. **Livros Técnicos e Científicos Editora LDTA**. 7 ed., 2006.

SIUZDAK, G. An introduction to mass spectrometry ionization: An excerpt from the expanding role of mass spectrometry in biotechnology, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. **Journal of the Association for Laboratory Automation**. v. 9, p. 50-63, 2005.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C.; SNYDER, S. Organic Chemistry. **John Wiley & Sons**. 11th ed., 2014.

SOUZA, W. Doenças Negligenciadas. **Academia Brasileira de Ciências**. 2010.

STRAUS, M. J. The nitroaromatic group in drug design. Pharmacology and toxicology (for nonpharmacologists). **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**. v. 18, n. 3, p. 158-166, 1979.

STUART, B. H. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. **John Wiley & Sons**. 2004.

THORNBUR, C. W. Isosterism and molecular modification in drug design. **Chemical Society Reviews**. v. 8, p. 563-580, 1979.

TIMMERMAN, H. Medicinal and pharmaceutical chemistry. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. Elsevier, 2013.

URBINA, J. A. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 94, p. 349-355, 1999.

VALITUTTI, G.; DURANTI, A.; MOR, M.; PIERSANTI, G.; PIOMELLI, D.; RIVARA, S.; TONTINI, A.; TARZIA, G.; TRALDI, P. The collisional behavior of ESI-generated protonated molecules of some carbamate FAAH inhibitors isostereis and its relationships with biological activity. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 44, p. 561-565, 2009.

VALLI, M.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; SALDAÑA, J. C.; HEINZEN, H.; DOMÍNGUEZ, L.; CAMPOS, V. P.; MARQUI, S. R.; YOUNG, M. C. M.; VIEGAS JR, C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Anticholinesterasic, nematostatic and anthelmintic activities of pyridinic and pyrazinic compounds. **Current Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 3423-3430, 2011.

WAGENER, M.; LOMMERSE, J. P. M. The quest for bioisosteric replacements. **Journal of Chemical Information and Modeling**. v. 46, p. 677-685, 2006.

WANG, H.; WU, Y.; ZHAO, Z. Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 36, p. 58-70, 2001.

WERMUTH, C. G. Similarity in drugs: reflections on analogue design. **Drug Discovery Today**. v. 11, n. 7/8, p. 348-354, 2006.

ZINGALES, B.; MILES, M. A.; MORAES, C. B.; LUQUETTI, A.; GUHL, F.; SCHIJMAN, A. G.; RIBEIRO, J. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 109, n. 6, p. 828-833, 2014.