



Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais

Dissertação de Mestrado

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS AROMÁTICOS COM POTENCIAL  
LEISHMANICIDA

Autora: Leticia Masako Takahashi

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Danuello Pivatto

UBERABA

2019

LETICIA MASAKO TAKAHASHI

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE DERIVADOS AROMÁTICOS COM POTENCIAL  
LEISHMANICIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Aparecido Moreto

UBERABA

2019

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

T142p

Takahashi, Leticia Masako

Planejamento e síntese de derivados aromáticos com potencial leishmanicida / Leticia Masako Takahashi. -- 2019.

159 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Química de Minas Gerais) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Aparecido Moreto

1. Química orgânica. 2. Compostos aromáticos. 3. Síntese orgânica. 4.  
Compostos bioativos. 5. Leishmaniose. I. Pivatto, Amanda Danuello. II. Uni-  
versidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 547

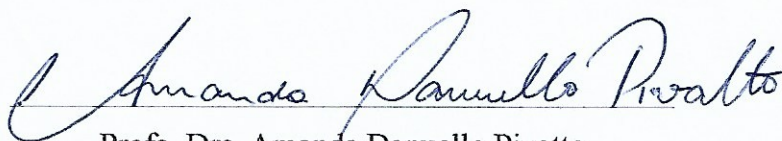
LETÍCIA MASAKO TAKAHASHI

Planejamento e síntese de derivados aromáticos com potencial leishmanicida

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química Medicinal, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

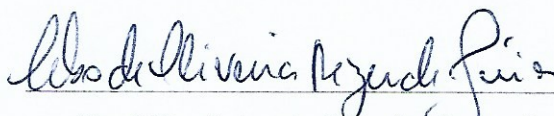
Uberaba, 15 de Março de 2019.

Banca examinadora:



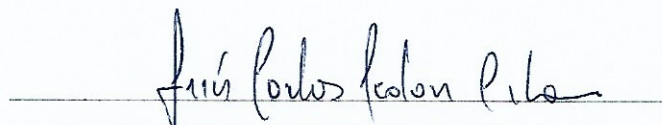
Prof. Dra. Amanda Danuello Pivatto

Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha

Instituto Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para sua realização e também para aqueles que de alguma forma ele possa vir a ser útil.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha força, dedicação e persistência no desenvolvimento deste trabalho. Só eu sei o quanto foi difícil e doloroso o caminho percorrido para chegar até aqui e estou plenamente realizada por conseguir finalizar com sucesso essa etapa.

Ao meu companheiro, Raphael, por todo apoio, força e, principalmente, por toda ajuda e gentilezas realizadas desde o início. Esses 2 anos de mestrado não teriam sido os mesmos sem você ao meu lado, tanto em casa quanto no laboratório. Obrigada pela paciência, pelos conselhos, pelas longas conversas, pela companhia, por acreditar em mim e me motivar, enfim, muito obrigada por tudo!

Aos meus mais fiéis companheiros de escrita nas madrugadas, Moti e Penélope, os melhores filhos de 4 patas que alguém poderia ter a honra de ter.

Aos meus sogros, Delma e José Henrique (*in memorian*), e ao meu cunhado e seu companheiro, Frederico e José Francisco, por todo apoio e motivação sempre. Obrigada por estarem sempre presentes e me ensinarem que família é muito mais do que laços sanguíneos, é onde o coração encontra abrigo e paz.

Aos meus queridos amigos, que não irei nomear para não correr o risco de ser injusta e esquecer de ninguém. Obrigada por todo apoio, força e, principalmente, pela compreensão dos meus longos momentos de ausência que foram necessários para a realização desta pesquisa.

Aos membros do grupo “Bolsistas CAPES”, no *Facebook*, não só por tornar mais branda a caminhada e mostrar que é possível encarar com bom humor todas as adversidades da vida acadêmica, mas também por todo conhecimento, dicas, conselhos e reflexões sobre a pós-graduação.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Amanda Danuello Pivatto, por ter sido mais do que “apenas” minha orientadora, mas também amiga, companheira, conselheira, enfim, uma verdadeira “mãe” científica! Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você e pela confiança depositada em mim durante todo esse período. Obrigada por todo conhecimento, pelas valiosas discussões, pelos conselhos e até mesmo pelos puxões de orelha! Obrigada por ter me ajudado a crescer tanto academicamente quanto pessoalmente.

Agradeço também ao seu marido, Prof. Dr. Marcos Pivatto, por ter me adotado como “filha científica” e ter me ajudado tanto no decorrer de todo o trabalho. Sou muito grata por todos os ensinamentos que tive a honra de aprender com você!

Ao Prof. Dr. Pedro Ivo, e em especial ao meu coorientador, Prof. Dr. Jeferson Moreto, por todo apoio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Alexandre Rossi, que me recebeu de braços abertos para a realização do estágio docente na disciplina de Química Orgânica II.

Aos Profs. Dr. Luiz Carlos Dias (UNICAMP) e Dr. Giuliano C. Clososki (USP) pelos reagentes doados e por todo apoio oferecido, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo J. Oliveira e sua equipe por terem realizado os estudos de *docking* molecular.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart e ao aluno de pós-doutorado Mário Machado Martins (IBTEC/UFU), pelas análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM).

Ao Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (LMIQ-UFU) pelos experimentos e análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Ao Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva (UFU) e ao aluno de doutorado Cassiano Costa pelos ensaios biológicos anti-leishmaniose.

Ao Prof. Dr. Antônio Otávio de Toledo Patrocínio (LAFOT-CM/UFU) e sua equipe, pelos espectros vibracionais na região do infravermelho.

Às alunas de pós-graduação do Lab. 07, Ana Cristina, Jackeline e, especialmente, à minha “irmã científica” Gáveni. Obrigada à todas pela companhia, ajudas, “favores”, ensinamentos e, principalmente, pelos momentos de alegria compartilhados tanto dentro quanto fora do laboratório.

Aos alunos de iniciação científica, Gabriel e Gabriela, por confiarem em mim e pelos inúmeros “favores” realizados durante todo nosso tempo juntos.

Aos alunos do NuPpEn, por terem me recebido de braços abertos em seu laboratório e também pelas análises realizadas e por toda ajuda fornecida nos momentos de dificuldades.

À UFTM, pela infraestrutura e por seus vários funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao PPGMQ-MG, em especial ao coordenador geral do programa, Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida (UFJF), pelo apoio financeiro e, também à CAPES, pela bolsa concedida.

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

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir



## RESUMO

A leishmaniose é uma das mais preocupantes doenças tropicais negligenciadas e a segunda patologia transmitida por insetos mais letal no mundo. Apesar do alto índice de novos casos de leishmaniose registrados anualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento da doença não são efetivos, seja por limitações do próprio medicamento ou pela resistência do parasita. Dessa forma, pesquisas que buscam o desenvolvimento de novos compostos anti-leishmaniose são muito relevantes. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de uma série de compostos com potencial leishmanicida a partir do planejamento de sessenta e nove derivados contendo anéis aromáticos (piridínico, pirimidínico e benzênico), utilizando as técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo na cadeia lateral entre nitrogênio, oxigênio e enxofre. Os compostos planejados foram avaliados por *docking* molecular na arginase, um importante alvo de *Leishmania*, e aqueles que apresentaram melhores interações com a enzima foram selecionados para síntese. Foram sintetizados doze compostos por substituição nucleofílica aromática, sendo que seis deles foram submetidos a reações subsequentes de redução do grupo nitro, ciclização *in situ* e hidrólise, o que levou a um total de dezoito produtos que foram purificados por cromatografia em coluna. Em seguida, todos os compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas e submetidos a avaliação da atividade leishmanicida. Os compostos 2,6-(*N,N'*-diglicinato-il de etila)-3-nitropiridina (**46**), 2-(*S*-tioglicolato-il de etila)-3-nitropiridina (**48**) e 2-(*N*-glicinato-il de etila)-3-nitropiridina (**49**) apresentaram os melhores valores de  $CI_{50}$  79,0, 59,0 e 57,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente, superiores ao controle positivo anfotericina B (0,29  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). É importante ressaltar que, dos três compostos com os melhores resultados, **46** e **49** apresentam o glicinato de etila na cadeia lateral e **48** e **49** são monossubstituídos. Os resultados obtidos até o momento são promissores e abrem novas perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: Derivados piridínicos. Leishmaniose. Hibridação molecular. Bioisosterismo.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is one of the most worrying neglected tropical diseases worldwide and the second most deadly illness transmitted by insects in the world. Despite the high rate of leishmaniasis cases registered per year, the available drugs for the treatment of this disease are not effective, because the limitations of the medicines or the parasite resistance against the drugs in use. Therefore, scientific researches aiming the development of new anti-leishmaniasis compounds are an important field. In this sense, the present work aimed to synthesize a series of compounds with leishmanicidal potential. Thus, sixty-nine aromatic compounds (pyridine, pyrimidine and benzene derivatives) were planned by molecular hybridization and classic bioisosterism of nitrogen, oxygen and sulfur on the side chain. Compounds evaluated by molecular docking that presented best interactions with arginase, an important *Leishmania* target, were synthesized through aromatic nucleophilic substitution reactions. Among them, six were selected to subsequent nitro group reduction, *in situ* cyclization and hydrolysis reactions. Eighteen products were obtained, purified by column chromatography, characterized by spectroscopic and spectrometric techniques and evaluated for leishmanicidal activity. Compounds 2,6-(ethyl *N,N'*-diglycinate-yl)-3-nitropyridine (**46**), 2-(ethyl *S*-thioglycolate-yl)-3-nitropyridine (**48**) and 2-(ethyl *N*-glycinate-yl)-3-nitropyridine (**49**) showed the best IC<sub>50</sub> values of 79.0, 59.0 and 57.0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively, higher than amphotericin B, used as positive control (0.29  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). It is noteworthy that among the three compounds with the best biological results, **49** and **46** have ethyl glycinate moiety in the side chain and **49** and **48** are monosubstituted. The results obtained in this study are promising and enable new perspectives for new drugs development that can be used in the treatment of leishmaniasis.

Keywords: Pyridine derivatives. Leishmaniasis. Molecular hybridization. Bioisosterism.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Esquema de hibridação da huperzina A com a tacrina .....	24
<b>Figura 2</b> - Regra do hidreto de Grimm .....	25
<b>Figura 3</b> - Bioisosterismo entre sildenafil e vardenafil .....	26
<b>Figura 4</b> - Hibridação molecular da tacrina com (-)-3-O-acetilspectalina .....	27
<b>Figura 5</b> - Compostos sintetizados por Valli et al. utilizando-se as técnicas de isosterismo e hibridação molecular .....	27
<b>Figura 6</b> - Os 10 fármacos mais vendidos em 2010 .....	28
<b>Figura 7</b> - Composto <b>38</b> no sítio ativo da arginase .....	30
<b>Figura 8</b> - Composto <b>39</b> no sítio ativo da CRK12 .....	31
<b>Figura 9</b> - Ciclo de transmissão da leishmaniose destacando as fases do parasita dentro do vetor transmissor e dentro do hospedeiro .....	32
<b>Figura 10</b> - Casos de Leishmaniose Visceral no mundo em 2015 .....	34
<b>Figura 11</b> - Casos de Leishmaniose cutânea no mundo em 2015.....	35
<b>Figura 12</b> - Casos notificados de Leishmaniose cutânea no Brasil entre 1980 e 2005 .....	35
<b>Figura 13</b> - Casos de leishmaniose cutânea por UF - Brasil, 2015.....	36
<b>Figura 14</b> - Fármacos utilizados atualmente no tratamento de leishmaniose.....	37
<b>Figura 15</b> - Produtos esperados das reações de $S_NAr$ .....	41
<b>Figura 16</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>45</b> .....	45
<b>Figura 17</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>46</b> .....	45
<b>Figura 18</b> - Reação do cloridrato de glicinato de etila com hidróxido de potássio .....	46
<b>Figura 19</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>47</b> .....	47
<b>Figura 20</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>48</b> .....	48
<b>Figura 21</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>49</b> .....	49
<b>Figura 22</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>50</b> .....	51
<b>Figura 23</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>51</b> .....	52
<b>Figura 24</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>52</b> .....	52
<b>Figura 25</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>53</b> .....	52
<b>Figura 26</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>54</b> .....	53
<b>Figura 27</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>55</b> .....	53
<b>Figura 28</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>56</b> .....	54
<b>Figura 29</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>57</b> .....	54
<b>Figura 30</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>58</b> .....	56

<b>Figura 31</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>59</b> .....	56
<b>Figura 32</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>60</b> .....	57
<b>Figura 33</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>61</b> .....	58
<b>Figura 34</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>62</b> .....	59
<b>Figura 35</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>63</b> .....	59
<b>Figura 36</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>64</b> .....	60
<b>Figura 37</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>65</b> .....	60
<b>Figura 38</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>66</b> .....	61
<b>Figura 39</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>67</b> .....	61
<b>Figura 40</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>68</b> .....	62
<b>Figura 41</b> - Esquema de síntese para obtenção do composto <b>69</b> .....	62
<b>Figura 42</b> - Estrutura da placa para o teste antileishmania .....	65
<b>Figura 43</b> - Reação de Substituição Nucleofílica Aromática .....	66
<b>Figura 44</b> - Mecanismo de reação de S <sub>N</sub> Ar para a 2,6-dicloro-3-nitropiridina .....	67
<b>Figura 45</b> - Mecanismo proposto para a reação do glicolato de etila com a base .....	69
<b>Figura 46</b> - Os 10 compostos que apresentaram melhores resultados de energia livre de ligação ( $\Delta G \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).....	70
<b>Figura 47</b> - Estrutura do composto <b>68</b> .....	71
<b>Figura 48</b> - Composto <b>68</b> no sítio ativo da arginase de <i>L. amasonensis</i> .....	71
<b>Figura 49</b> - Proposta de mecanismo para redução do grupo nitro .....	72
<b>Figura 50</b> - Proposta de mecanismo para obtenção do composto <b>59</b> .....	72
<b>Figura 51</b> - Proposta de mecanismo para obtenção do produto <b>68</b> .....	73
<b>Figura 52</b> - Estruturas propostas para os compostos <b>59a</b> e <b>68a</b> .....	74
<b>Figura 53</b> - Estrutura do composto <b>46</b> .....	76
<b>Figura 54</b> - Proposta de fragmentação para os picos <i>m/z</i> 281 e <i>m/z</i> 73 do composto <b>46</b> .....	78
<b>Figura 55</b> - Proposta de fragmentação para o composto <b>46</b> .....	80
<b>Figura 56</b> - Correlações H–C observadas no mapa de contorno HMBC de <b>46</b> .....	87
<b>Figura 57</b> - Estrutura do composto <b>49</b> .....	87
<b>Figura 58</b> - Proposta de fragmentação para o pico <i>m/z</i> 152 do composto <b>49</b> .....	89
<b>Figura 59</b> - Proposta de fragmentação para o composto <b>49</b> .....	90
<b>Figura 60</b> - Estrutura do composto <b>58</b> .....	91
<b>Figura 61</b> - Proposta de fragmentação do composto <b>58</b> .....	94
<b>Figura 62</b> - Estrutura do composto <b>61</b> .....	95
<b>Figura 63</b> - Proposta de fragmentação para o composto <b>61</b> .....	97

<b>Figura 64</b> - Estrutura do composto <b>64</b> .....	97
<b>Figura 65</b> - Proposta de fragmentação para o composto <b>64</b> .....	99
<b>Figura 66</b> - Estrutura do composto <b>67</b> .....	101
<b>Figura 67</b> - Proposta de fragmentação para o composto <b>67</b> .....	103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Estequiometria das reações de S <sub>N</sub> Ar .....	42
<b>Tabela 2</b> - Estequiometria das reações de redução do grupo nitro e ciclizações in situ .....	55
<b>Tabela 3</b> - Estequiometria das reações de hidrólise.....	58
<b>Tabela 4</b> - Porcentagens de conversão para os produtos obtidos.....	74
<b>Tabela 5</b> - Dados de RMN de <b>46</b> (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	86
<b>Tabela 6</b> - Valores de CI <sub>50</sub> (μg.mL <sup>-1</sup> ) obtidos para os compostos avaliados.....	103

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>59a</b> .....	75
<b>Espectro 2</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>68a</b> .....	75
<b>Espectro 3</b> - Espectro na região do IV do composto <b>46</b> .....	77
<b>Espectro 4</b> - EM-IE do composto <b>46</b> .....	77
<b>Espectro 5</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>46</b> .....	79
<b>Espectro 6</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>46</b> .....	79
<b>Espectro 7</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>46</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	80
<b>Espectro 8</b> - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>46</b> (δ 1,16–1,50; 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	81
<b>Espectro 9</b> - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de <b>46</b> (δ 4,12–4,38; 400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	81
<b>Espectro 10</b> - Espectro de RMN <sup>13</sup> C do composto <b>46</b> (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	82
<b>Espectro 11</b> - Mapa de contorno HMQC de <b>46</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	83
<b>Espectro 12</b> - Ampliação do mapa de contorno HMQC de <b>46</b> (δ 3,4–4,8; 400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	83
<b>Espectro 13</b> - Ampliação do mapa de contorno HMQC de <b>46</b> (δ 0,8–4,6; 400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	84
<b>Espectro 14</b> - Mapa de contorno HMBC de <b>46</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	84
<b>Espectro 15</b> - Ampliação do mapa de contorno HMBC de <b>46</b> (δ 3,5–9,0; 400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	85
<b>Espectro 16</b> - Ampliação do mapa de contorno HMBC de <b>46</b> (δ 0,4–2,6; 400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	85
<b>Espectro 17</b> - Ampliação do mapa de contorno HMBC de <b>46</b> (δ 3,6–5,0; 400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ).....	86
<b>Espectro 18</b> - Espectro na região do IV do composto <b>49</b> .....	88
<b>Espectro 19</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>49</b> .....	88
<b>Espectro 20</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>49</b> .....	89
<b>Espectro 21</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>49</b> .....	90
<b>Espectro 22</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>49</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	91
<b>Espectro 23</b> - Espectro na região do IV do composto <b>58</b> .....	92
<b>Espectro 24</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>58</b> .....	93
<b>Espectro 25</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>58</b> .....	93
<b>Espectro 26</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>58</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	94
<b>Espectro 27</b> - Espectro na região do IV do composto <b>61</b> .....	95
<b>Espectro 28</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>61</b> .....	96
<b>Espectro 29</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>61</b> .....	96
<b>Espectro 30</b> - Espectro na região do IV do composto <b>64</b> .....	98
<b>Espectro 31</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>64</b> .....	98

<b>Espectro 32</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>64</b> .....	99
<b>Espectro 33</b> - Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>64</b> (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	100
<b>Espectro 34</b> - Espectro na região do IV do composto <b>67</b> .....	101
<b>Espectro 35</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>67</b> .....	102
<b>Espectro 36</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>67</b> .....	102
<b>Espectro 37</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>45</b> .....	122
<b>Espectro 38</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>47</b> .....	122
<b>Espectro 39</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>48</b> .....	123
<b>Espectro 40</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>49</b> .....	123
<b>Espectro 41</b> – Espectro de EM-IE do composto <b>50</b> .....	124
<b>Espectro 42</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>52</b> .....	124
<b>Espectro 43</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>53</b> .....	125
<b>Espectro 44</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>54</b> .....	125
<b>Espectro 45</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>55</b> .....	126
<b>Espectro 46</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>56</b> .....	126
<b>Espectro 47</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>46</b> .....	127
<b>Espectro 48</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>51</b> .....	127
<b>Espectro 49</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>57</b> .....	127
<b>Espectro 50</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>58</b> .....	128
<b>Espectro 51</b> - Espectro de EM-IE do composto <b>59</b> .....	128
<b>Espectro 52</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>45</b> .....	129
<b>Espectro 53</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>46</b> .....	129
<b>Espectro 54</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>47</b> .....	130
<b>Espectro 55</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>48</b> .....	130
<b>Espectro 56</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>49</b> .....	131
<b>Espectro 57</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>50</b> .....	131
<b>Espectro 58</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>58</b> .....	132
<b>Espectro 59</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>59a</b> .....	132
<b>Espectro 60</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>60</b> .....	133
<b>Espectro 61</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>61</b> .....	133
<b>Espectro 62</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>62</b> .....	134
<b>Espectro 63</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>63</b> .....	134
<b>Espectro 64</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>64</b> .....	135
<b>Espectro 65</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>65</b> .....	135



<b>Espectro 66</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>66</b> .....	136
<b>Espectro 67</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>67</b> .....	136
<b>Espectro 68</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>68a</b> .....	137
<b>Espectro 69</b> - EM-IES-(+) alta resolução do composto <b>69</b> .....	137
<b>Espectro 70</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>45</b> .....	138
<b>Espectro 71</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>46</b> .....	138
<b>Espectro 72</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>47</b> .....	139
<b>Espectro 73</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>48</b> .....	139
<b>Espectro 74</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>49</b> .....	140
<b>Espectro 75</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>50</b> .....	140
<b>Espectro 76</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>58</b> .....	141
<b>Espectro 77</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>59a</b> .....	141
<b>Espectro 78</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>60</b> .....	142
<b>Espectro 79</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>61</b> .....	142
<b>Espectro 80</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>62</b> .....	143
<b>Espectro 81</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>63</b> .....	143
<b>Espectro 82</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>64</b> .....	144
<b>Espectro 83</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>65</b> .....	144
<b>Espectro 84</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>66</b> .....	145
<b>Espectro 85</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>67</b> .....	145
<b>Espectro 86</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>68a</b> .....	146
<b>Espectro 87</b> - EM-EM-IES-(+) do composto <b>69</b> .....	146
<b>Espectro 88</b> - Espectro na região do IV do composto <b>45</b> .....	147
<b>Espectro 89</b> - Espectro na região do IV do composto <b>46</b> .....	148
<b>Espectro 90</b> - Espectro na região do IV do composto <b>47</b> .....	148
<b>Espectro 91</b> - Espectro na região do IV do composto <b>49</b> .....	149
<b>Espectro 92</b> - Espectro na região do IV do composto <b>58</b> .....	149
<b>Espectro 93</b> - Espectro na região do IV do composto <b>60</b> .....	150
<b>Espectro 94</b> - Espectro na região do IV do composto <b>61</b> .....	150
<b>Espectro 95</b> - Espectro na região do IV do composto <b>62</b> .....	151
<b>Espectro 96</b> - Espectro na região do IV do composto <b>63</b> .....	151
<b>Espectro 97</b> - Espectro na região do IV do composto <b>64</b> .....	152
<b>Espectro 98</b> - Espectro na região do IV do composto <b>65</b> .....	152
<b>Espectro 99</b> - Espectro na região do IV do composto <b>67</b> .....	153

<b>Espectro 100</b> - Espectro na região do IV do composto <b>69</b> .....	153
<b>Espectro 101</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>45</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	155
<b>Espectro 102</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>46</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	155
<b>Espectro 103</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>47</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	156
<b>Espectro 104</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>48</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	156
<b>Espectro 105</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>49</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	157
<b>Espectro 106</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>58</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	157
<b>Espectro 107</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>60</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	158
<b>Espectro 108</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>64</b> (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	158
<b>Espectro 109</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>45</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	159
<b>Espectro 110</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>46</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	160
<b>Espectro 111</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ do composto <b>47</b> (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	160

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AcOEt – acetado de etila

calcd – calculado

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas

CI<sub>50</sub> – concentração inibitória de 50%

CLAE/EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenado ao Espectrômetro de Massas

DMF – Dimetilformamida

EM-IE – espectro de massas por ionização por elétrons

EM-IES – espectro de massas por ionização por electrospray

FDA – food and drug administration

HM – hibridação molecular

IACHe – inibidores de acetilcolinesterase

IV – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

IES – Ionização por electrospray

LC – leishmaniose cutânea

LV – leishmaniose visceral

MeOH – metanol

*m/z* – relação massa-carga

PC-MG – Polícia Civil de Minas Gerais

PDB – Protein Data Bank

R<sub>f</sub> – fator de retenção

RMN de <sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RMN de <sup>1</sup>H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

S<sub>N</sub>Ar – Substituição Nucleofílica Aromática

t.a. – temperatura ambiente

TMS – tetrametilsilano

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UFU – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

WHO – World Health Organization

$\lambda$  – comprimento de onda

$\nu$  – vibração de estiramento

$\nu_{as}$  – vibração de estiramento assimétrico

$\nu_s$  – vibração de estiramento simétrico

$\delta$  – deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 A QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS.....	23
1.2 A IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE .....	31
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
3.1 REAGENTES E SOLVENTES.....	39
3.2 METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA (S <sub>N</sub> Ar).....	41
<b>3.2.1 Preparação do composto 45 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.2 Preparação do composto 46 .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.3 Preparação do composto 47 .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.4 Preparação do composto 48 .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.5 Preparação do composto 49 .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.6 Preparação do composto 50 .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.7 Preparação do composto 51 .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.8 Preparação do composto 52 .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.9 Preparação do composto 53 .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.10 Preparação do composto 54 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.11 Preparação do composto 55 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.12 Preparação do composto 56 .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.13 Preparação do composto 57 .....</b>	<b>54</b>
3.3 METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE CICLIZAÇÃO .....	55

3.3.1	Preparação do composto 58	56
3.3.2	Tentativa de preparação do composto 59	56
3.3.3	Preparação do composto 60	57
3.4	METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE	57
3.4.1	Preparação do composto 61	58
3.4.2	Preparação do composto 62	59
3.4.3	Preparação do composto 63	59
3.4.4	Preparação do composto 64	60
3.4.5	Preparação do composto 65	60
3.4.6	Preparação do composto 66	61
3.4.7	Preparação do composto 67	61
3.4.8	Tentativa de preparação do composto 68	62
3.4.9	Preparação do composto 69	62
3.5	METODOLOGIA PARA REALIZAÇÃO DO <i>DOCKING</i> MOLECULAR	62
3.6	METODOLOGIA PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS	64
3.6.1	Preparo dos meios de cultura	64
3.6.2	Cultivo dos protozoários	64
3.6.3	Preparo das amostras	64
3.6.4	Teste de viabilidade celular	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA	66
4.2	TRIAGEM VIRTUAL DOS DERIVADOS AROMÁTICOS A PARTIR <i>DOCKING</i> MOLECULAR	69
4.3	REDUÇÃO DO GRUPO NITRO E REAÇÃO DA CICLIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	71
4.4	HIDRÓLISE DO GRUPO ÉSTER PARA ÁCIDO CARBOXILÍCO	73
4.5	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	73
4.5.1	Elucidação estrutural dos compostos 45, 46 e 47	76

4.5.2 Elucidação estrutural dos compostos 48, 49 e 50.....	87
4.5.3 Elucidação estrutural dos compostos 58, 59a e 60.....	91
4.5.4 Elucidação estrutural dos compostos 61, 62 e 63.....	95
4.5.5 Elucidação estrutural dos compostos 64, 65 e 66.....	97
4.5.6 Elucidação estrutural dos compostos 67, 68a e 69.....	100
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS.....	103
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE A – ESTRUTURAS DOS 69 COMPOSTOS PLANEJADOS .....</b>	<b>113</b>
<b>APÊNDICE B – RANKING COM OS 69 COMPOSTOS PLANEJADOS E AVALIADOS POR DOCKING MOLECULAR.....</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE C – ESPECTROS DE EM-IE .....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICE D – ESPECTROS DE EM-IES.....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE E - ESPECTROS DE EM-EM-IES.....</b>	<b>138</b>
<b>APÊNDICE F – ESPECTROS NA REGIÃO DO IV.....</b>	<b>147</b>
<b>APÊNDICE G – ESPECTROS DE RMN DE <sup>1</sup>H .....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE H – ESPECTROS DE RMN DE <sup>13</sup>C .....</b>	<b>159</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE NOVOS COMPOSTOS BIOATIVOS

A química medicinal, química biomédica ou química biológica é uma ciência de caráter multidisciplinar que envolve a pesquisa de especialistas em diversas áreas, tais como química orgânica, bioquímica, farmacologia, informática, biologia molecular e estrutural, dentre outras. O trabalho destes pesquisadores compreende a identificação de compostos com atividade biológica, a caracterização de suas propriedades físico-químicas, a elucidação ou confirmação de suas estruturas e a descrição de sua atividade farmacológica, tendo como objetivo central a determinação da relação entre a estrutura química e a atividade biológica através da hierarquização das contribuições dos diferentes grupos funcionais (MONTANARI, 1995; BARREIRO et al., 2002; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018).

Uma vez identificada a relação entre a estrutura e a atividade biológica de um novo composto, este pode ter sua eficácia otimizada através de modificações moleculares subsequentes, planejadas de maneira a preservar ou aprimorar as propriedades farmacocinéticas identificadas (BARREIRO et al., 2002; BARREIRO; FRAGA, 2008; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2018). Dentre as diferentes estratégias possíveis para tal finalidade destacam-se a hibridação molecular e o bioisosterismo.

A hibridação molecular consiste no reconhecimento de subunidades farmacofóricas nas estruturas moleculares de duas ou mais substâncias bioativas conhecidas e, por fusão dessas subunidades, novas arquiteturas moleculares são geradas, ou seja, híbridos que mantem características pré-selecionadas dos modelos originais (VIEGAS JR. et al., 2007; TAHA et al., 2017).

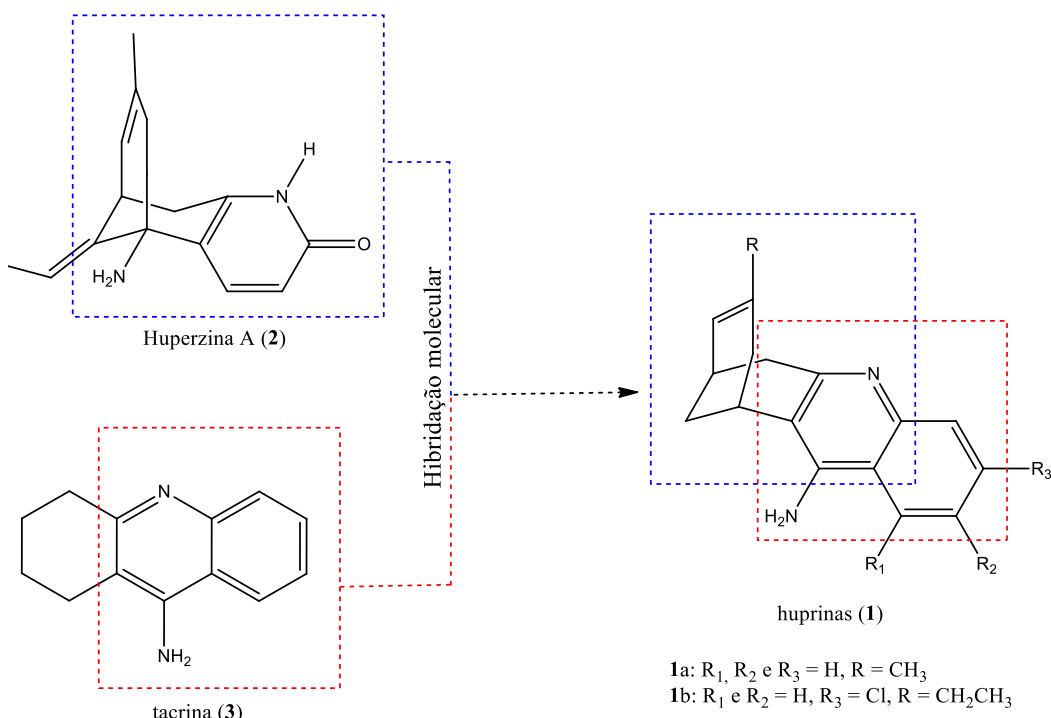
Através da hibridação molecular é possível modular as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos modelos originais, formando uma série de compostos homólogos híbridos. Estes compostos serão parte de uma biblioteca química responsável por armazenar dados sobre as moléculas híbridas aos profissionais e conseqüente, utilizarão as informações desses compostos em novas pesquisas estratégicas de modificação molecular (VIEGAS JÚNIOR et al., 2007; BARREIRO; FRAGA, 2008).

Um exemplo interessante da aplicação da técnica de hibridação molecular no planejamento e síntese de novos produtos bioativos é o caso das huprinas (**1**). Na busca por



novos e mais potentes inibidores de acetilcolinesterase (AChE), Camps e colaboradores (2000) realizaram a combinação da subestrutura 4-aminoquinolínica do derivado de um produto natural [(-)-huperzina A] (**2**) com a estrutura carbocíclica da tacrina (**3**) (Figura 1).

**Figura 1** - Esquema de hibridação da huperzina A com a tacrina



Adaptado de: Camps et al., 2000

A AChE é uma serina hidrolase responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), exercendo papel fundamental na memória e cognição. Para se criar uma nova memória no cérebro, a ACh é biossintetizada no neurônio pré-sináptico, liberada na fenda sináptica transmitindo o impulso nervoso para o neurônio pós-sináptico pelos receptores nicotínicos e muscarínicos. Portadores da Doença de Alzheimer (DA) tem deficiência de ACh resultando na hidrólise deste neurotransmissor antes que o mesmo envie a mensagem para o neurônio pós-sináptico. Tendo isso em vista, um dos tratamentos para a DA é inibir a atividade biológica da AChE de forma que haja um aumento da ACh no cérebro ajudando a melhorar a cognição (SHEN; LIU; TANG, 2007).

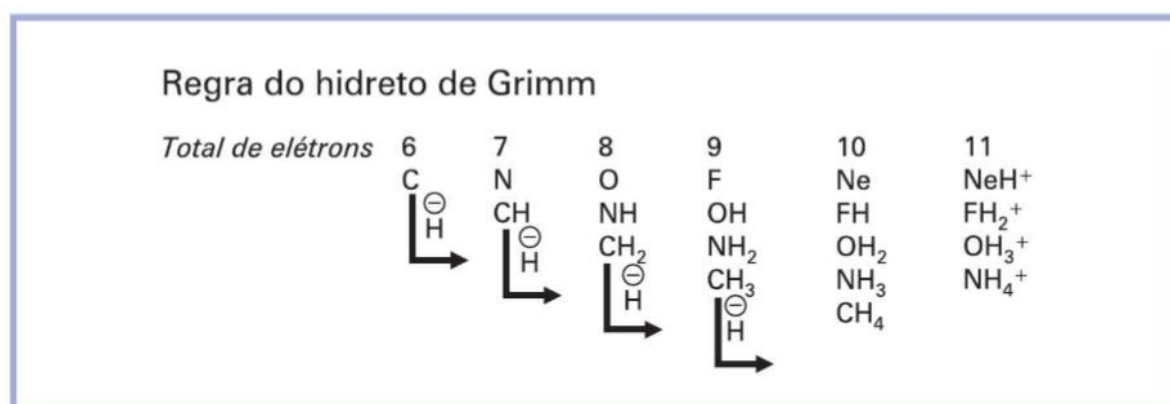
A tacrina (**3**) foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento da Doença de Alzheimer (ALMEIDA, 1998) e, apesar da sua alta toxicidade, tem apresentado um importante papel no estudo e síntese de novos protótipos mais potentes e seguros (MARCO et al., 2004). Da mesma forma a (-)-huperzina A (**2**), isolada da erva chinesa *Huperzia serrata*, também se apresenta

como um potente inibidor de AChE, sendo aprovada pelo FDA e popularmente comercializada na China como suplemento alimentar (SHEN; LIU; TANG, 2007).

A partir da síntese das huprinas, Camps e colaboradores (2000) observaram que estas eram mais potentes que a tacrina ( $IC_{50}$  130 nM) e que a huperzina A ( $IC_{50}$  74 nM) apresentando  $IC_{50}$  47 nM (**1a**) e  $IC_{50}$  1,3 nM (**1b**).

Assim como a hibridação molecular, o bioisosterismo é uma técnica de planejamento muito utilizada no desenvolvimento de novos potenciais candidatos à fármacos. Em 1919, o pesquisador Irving Langmuir, ao estudar substâncias isoeletrônicas instituiu o termo isosterismo para definir átomos ou moléculas que possuem o mesmo número de elétrons de valência. Em 1925, Grimm ampliou a compreensão sobre o conceito de isósteros através da regra do hidreto. Essa regra estabelecia que a adição de um hidrogênio com um par de elétrons (ou seja, um hidreto) a um átomo resultaria em um pseudo-átomo com propriedades físicas semelhantes àqueles presentes na coluna imediatamente posterior da tabela periódica do átomo inicial (BARREIRO; FRAGA, 2008).

**Figura 2** - Regra do hidreto de Grimm



Fonte: Barreiro; Fraga, 2008

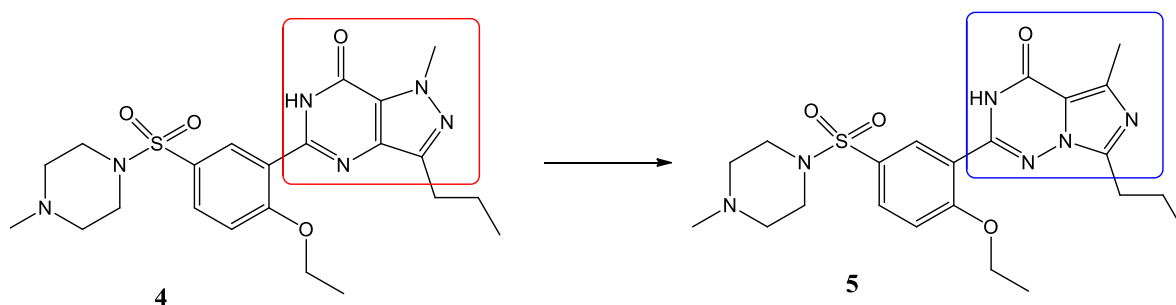
O termo bioisosterismo foi utilizado por Friedman pela primeira vez em 1951. Ele utilizou o termo para classificar substâncias que apresentavam estruturas semelhantes e que atuavam no mesmo sítio receptor apresentando propriedades biológicas similares ou antagônicas (LIMA; BARREIRO, 2005; BARREIRO; FRAGA, 2008).

Pode-se resumir então que o bioisosterismo consiste em uma estratégia de modificação estrutural através da troca de determinados fragmentos moleculares por átomos ou grupamentos funcionais com propriedades físico-química semelhantes a fim de se melhorar a farmacocinética, aprimorando as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e

eliminação, ou a farmacodinâmica, visando sua otimização (BARREIRO; FRAGA, 2008; LIU et al., 2017).

Dentre os exemplos da importância do estudo de bioisómeros na descoberta de novos fármacos pode-se destacar o caso dos inibidores de fosfodiesterase 5 (PDE-5), sildenafil (**4**) e vardenafil (**5**), indicados para o tratamento da disfunção erétil (Figura 3) (BARREIRO; FRAGA, 2008)

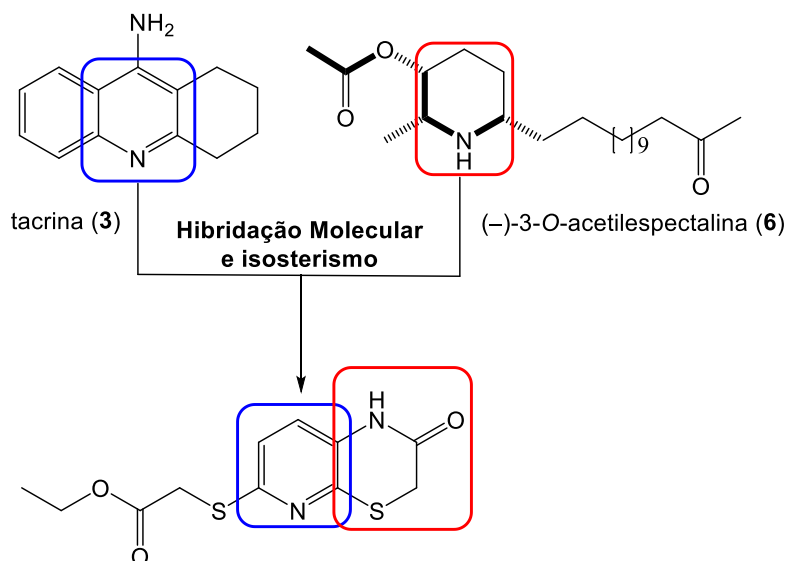
**Figura 3 - Bioisosterismo entre sildenafil e vardenafil**



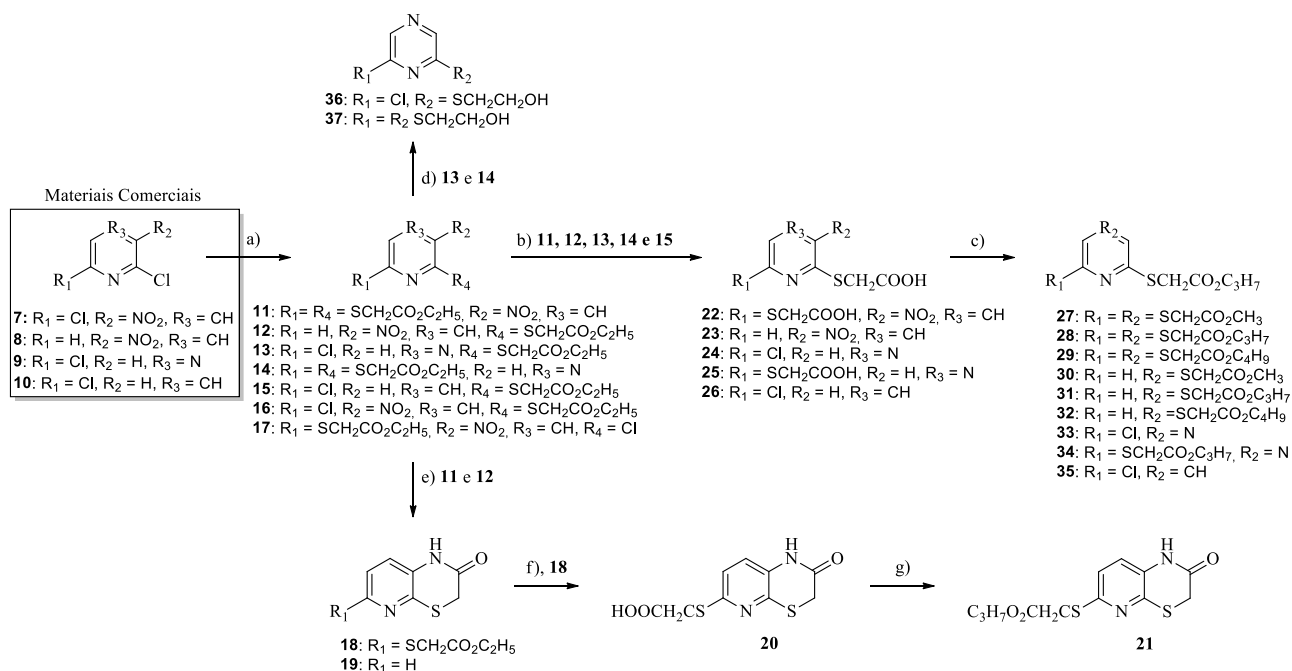
Adaptado de: Barreiro; Fraga, 2008

O vardenafil (**5**) foi lançado em 2005 baseado na troca isostérica clássica de um átomo de carbono  $sp^2$ , em um sistema heterocíclico, por um átomo de nitrogênio situado na posição cabeça de ponte do sistema heterocíclico original. Apesar da similaridade estrutural entre os dois compostos, o vardenafil (**5**) apresentou uma relação de  $IC_{50}$  para a atividade inibitória PDE-6/PDE-5 de 160 vezes, enquanto que o sildenafil (**4**) foi apenas 7 vezes mais seletivo. Essa diferença de seletividade é muito importante pois atribui-se que alguns efeitos indesejados relativos a perturbações visuais causados pelo sildenafil (**4**) sejam decorrentes à sua ação inibitória residual diante da PDE-6 (BARREIRO; FRAGA, 2008).

Além da aplicação das técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo de forma isolada, é possível ainda utilizá-las de forma combinada, a fim de se potencializar os resultados esperados. Na busca por novos inibidores de acetilcolinesterase (AChE), Valli e colaboradores (2011) sintetizaram uma série de 27 derivados piridínicos e pirazínicos utilizando-se as técnicas de hibridação molecular entre a tacrina (**3**) e a (-)-3-*O*-acetilspectalina (**6**), dois potentes inibidores da AChE, e isosterismo clássico entre nitrogênio e enxofre (Figuras 4 e 5).

**Figura 4** - Hibridação molecular da tacrina com (-)-3-O-acetilespectralina

Adaptado de: Valli et al., 2011

**Figura 5** - Compostos sintetizados por Valli et al. utilizando-se as técnicas de isosterismo e hibridação molecular

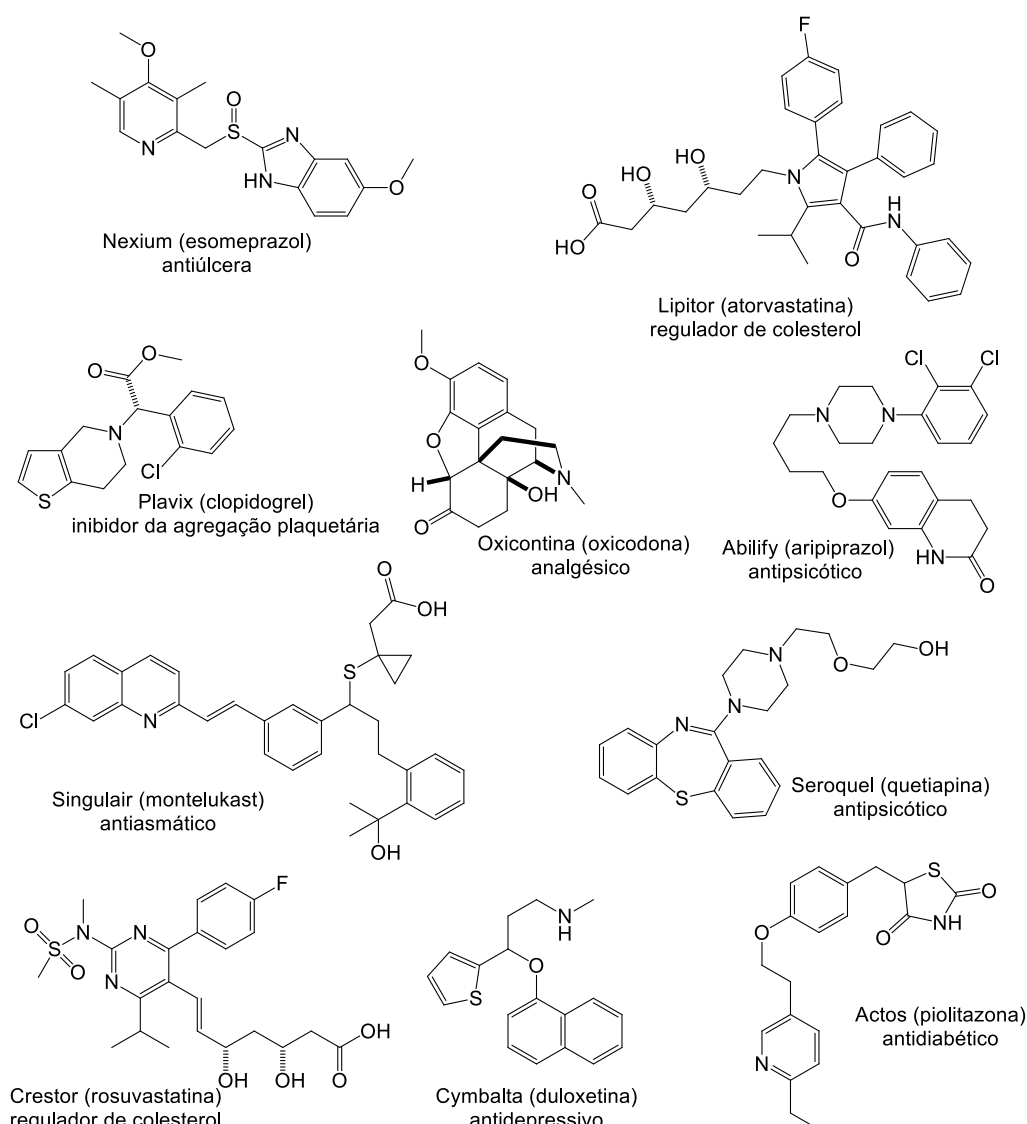
Reagentes e condições: a) Tioglicolato de etila, NaH, THF anidro, atmosfera de  $N_2$ , temperatura ambiente ou banho de gelo, dependendo da reação, durante 5 min a 12 h, dependendo do material de partida; b) NaOH, EtOH/ $H_2O$  (2:1), temperatura ambiente durante 1 h; c) Álcool (MeOH, n-PrOH ou n-BuOH),  $H_2SO_4$ , refluxo durante 12 h; d)  $LiAlH_4$ , THF anidro, atmosfera de  $N_2$ , banho de gelo durante 12 h; e)  $Fe^0$ ,  $NH_4Cl$ , EtOH/ $H_2O$  (2:1), refluxo durante 90 min.

Fonte: Valli et al., 2011

Dentre os derivados piridínicos e pirazínicos apresentados por Valli et al. (2011) é possível destacar o composto 13, que apresentou atividade antielmíntica superior ao padrão positivo albendazol, e o composto 31, que foi capaz de imobilizar 98% dos nematoides no ensaio com o fitopatógeno *Meloidogyne incógnita*. É possível destacar ainda que todos os compostos sintetizados apresentaram moderada inibição da AChE em comparação com o controle positivo fisostigmina.

É interessante observar que todos os exemplos apresentados contem heterociclos em suas estruturas, que são de elevada importância no processo de descoberta de novos compostos bioativos tendo em vista que os 10 fármacos mais vendidos em 2010 apresentavam fragmentos heterocíclicos em sua estrutura (Figura 6) (GOMSTSYAN, 2012).

**Figura 6 - Os 10 fármacos mais vendidos em 2010**



Adaptado de: Gomtsyan, 2012

Além dos fármacos apresentados na Figura 6, mais de 80% dos medicamentos comercializados em 2010 apresentavam pelo menos um fragmento heterocíclico em sua estrutura (GOMTSYAN, 2012) e 96% dos compostos bioativos em desenvolvimento apresentam pelo menos um anel em suas estruturas (LEWELL et al., 2003). Um levantamento realizado por Newman e Cragg (2016) mostrou que entre 1981 e 2014, 52% dos fármacos comercializados eram de origem sintética e 21% de origem semissintética, ressaltando a relevância das pesquisas na síntese de derivados heterocíclicos.

É possível destacar ainda a importância dos heterociclos de nitrogênio tanto em produtos de origem natural quanto em fármacos de origem sintética. Os heterociclos de nitrogênio podem ser considerados os “blocos construtores da vida”, já que são os grupos funcionais predominantes em muitas coenzimas que intermediam as transformações do metabolismo primário dos seres vivos (WALSH, 2015). Dessa forma, o estudo e síntese de derivados heterocíclicos nitrogenados continua sendo um tema de interesse atual e de alta relevância para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Assim como as técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo aplicadas ao desenvolvimento de novos candidatos à fármacos, cabe destacar a aplicação da modelagem molecular no planejamento de novos compostos bioativos. Nos últimos anos vem sendo crescente o número de fármacos que se basearam em estudos computacionais em alguma etapa do seu desenvolvimento (KITCHEN et al., 2004; AMARO et al., 2018).

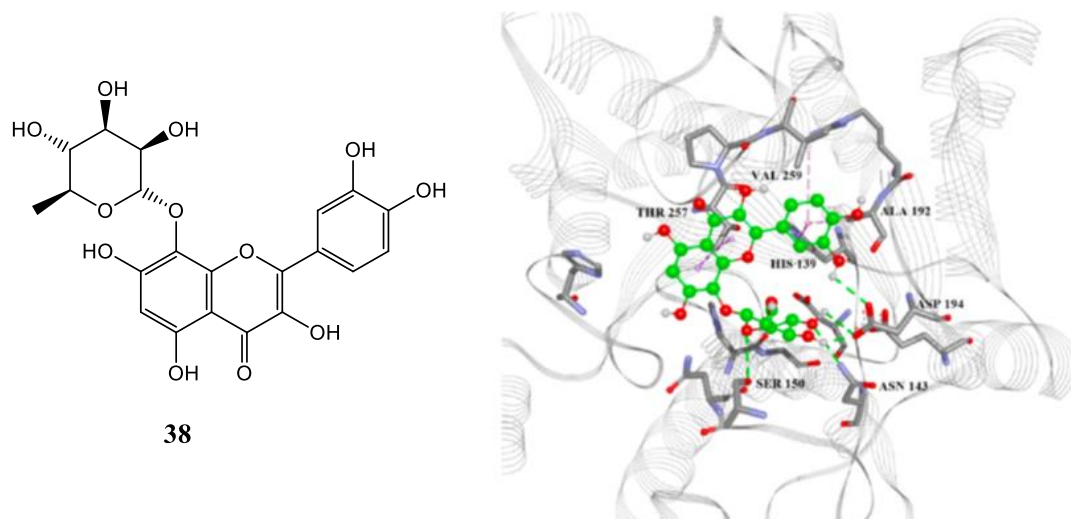
O *docking* molecular é uma técnica computacional que consiste na predição da conformação bioativa de uma molécula (ligante) no sítio de ligação da macromolécula (proteína-alvo), seguido da avaliação (pontuação) e classificação do modo de ligação proposto (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; AMARO et al., 2018).

Esta técnica é muito importante para o planejamento de novos candidatos à fármacos uma vez que permite realizar uma triagem virtual com vários compostos com potencial atividade biológica e, através dos resultados obtidos, selecionar aquele(s) com melhor(es) resultado(s) para aprofundamento dos estudos e ensaios *in vitro* e *in vivo* (RODRIGUES, 2001; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; TAHA et al., 2017).

Dentro deste contexto, é possível destacar o trabalho realizado por Glisic e colaboradores (2016) onde 5.667 compostos foram avaliados *in silico* com objetivo de identificar potenciais inibidores da arginase. A arginase é a enzima envolvida na síntese natural de poliamidas e é o principal alvo para desenvolvimento de novos tratamentos contra leishmaniose. A partir dos resultados obtidos, o composto **38** (Figura 7) foi identificado como

potencial inibidor dessa enzima merecendo destaque para posteriores estudos no desenvolvimento de novos fármacos anti-leishmaniose.

**Figura 7** - Composto **38** no sítio ativo da arginase

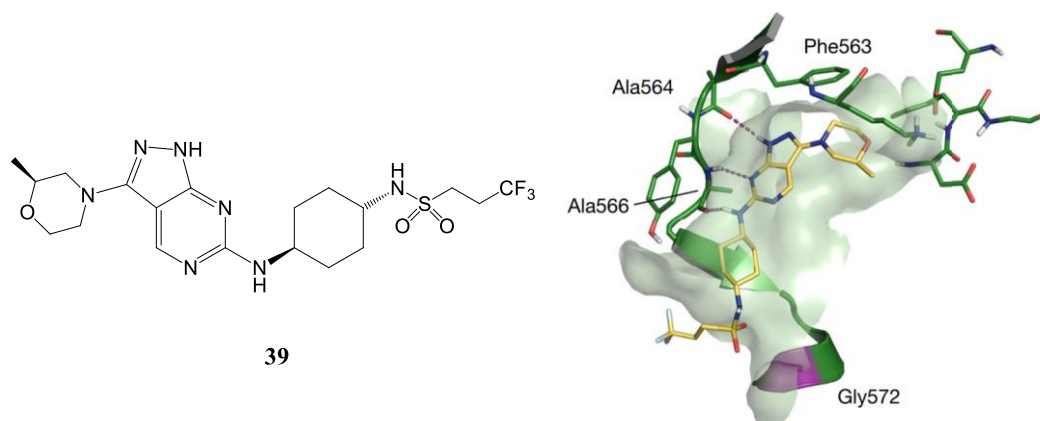


Adaptado de: Glisic et al., 2016

Outra aplicação do *docking* molecular que merece destaque no desenvolvimento de potenciais candidatos à fármacos é seu uso para auxiliar na elucidação do mecanismo de ação de moléculas que apresentem atividade biológica mas que, por algum motivo, apresentem modo de ação e/ou alvo molecular desconhecido (CATTAPRETA; MOTTRAM, 2018).

No trabalho realizado por Wyllie e colaboradores (2018) onde, através de uma série de modificações estruturais em uma pirazolopirimidina, chegaram ao composto **39** (Figura 8) que apresentou bom perfil de segurança, alta potência e propriedades adequadas para o desenvolvimento de uma nova droga para ser administrada por via oral no tratamento da leishmaniose visceral. Apesar de ser um promissor candidato para estudos adicionais, o alvo biológico e o modo de ação do composto **39** no tratamento da parasitologia eram desconhecidos.

Utilizando técnicas de modelagem molecular, Wyllie e colaboradores (2018) construíram um modelo para a enzima CRK12 a partir da estrutura da quinase 9 humana e, através de uma combinação de estudos de *docking*, simulação de dinâmica molecular e cálculos de energia livre, foi possível determinar que o modo de ligação mais provável do composto **39** com a proteína seria o apresentado na Figura 8.

**Figura 8** - Composto **39** no sítio ativo da CRK12

Adaptado de: Wyllie et al., 2018

Estudos adicionais realizados por Wyllie e colaboradores (2018) mostraram que outros compostos desta série também se ligavam à CRK12 inibindo a enzima, definindo-a assim como um alvo possível para o tratamento da leishmaniose visceral.

## 1.2 A IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Na busca por novos inibidores de acetilcolinesterase, Valli e colaboradores (2011) planejaram e sintetizaram uma série de 27 derivados piridínicos e pirazínicos através da hibridação molecular entre a tacrina e a (-)-3-*O*-acetilespectalina, dois potentes inibidores da AChE, e isosterismo clássico entre nitrogênio e enxofre. Os compostos sintetizados apresentaram moderada inibição da AChE em comparação com o controle positivo fisostigmina e também exibiram atividade antielmíntica, sendo que um dos compostos apresentou maior atividade que o padrão positivo albendazol (VALLI et al., 2011).

Posteriormente, Valli e colaboradores (2015) avaliaram o perfil de três compostos da série sintetizada como potenciais auxiliares no tratamento de patologias do sistema nervoso central e um deles foi ativo nos modelos animais para atividade antidepressiva e sintomas da esquizofrenia.

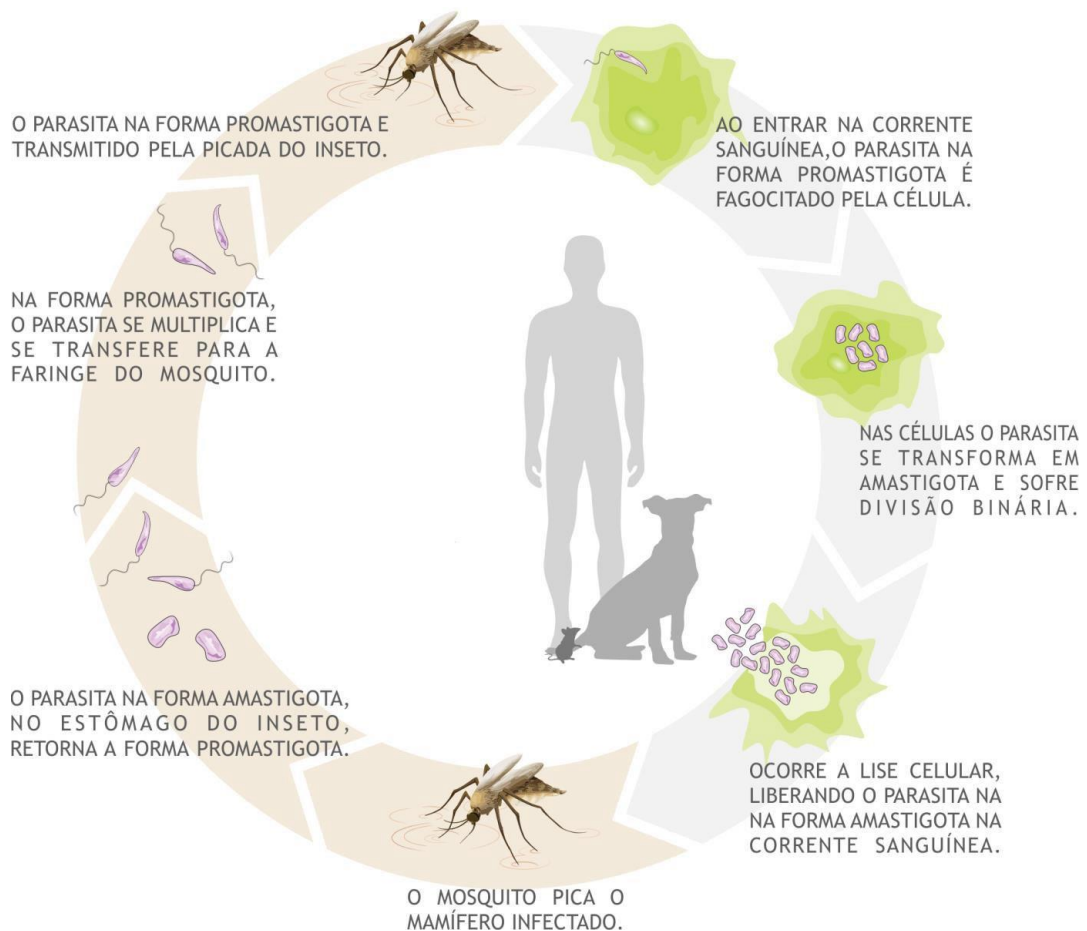
A partir disto, Silveira (2016) propôs a síntese dos derivados piridínicos utilizando os mesmos substratos descritos por Valli e colaboradores (2011), porém, alterando os nucleófilos para glicinato de etila e glicolato de etila, com intuito de comparar a atividade biológica dos



isósteros formados. Em estudos preliminares, os compostos sintetizados por Silveira (2016) foram submetidos ao ensaio leishmanicida (*Leishmania amazonensis*) e apresentaram resultados promissores, despertando o interesse pelo estudo e desenvolvimentos de novos derivados híbridos e isósteros desta série de compostos tendo em vista a importância de se desenvolver novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

A leishmaniose é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que possui mais de 20 espécies diferentes (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; WHO, 2018). Existem cerca de 70 espécies de animais, incluindo o homem, que são reservatórios naturais da *Leishmania* e o ciclo de transmissão pode variar de acordo com a região geográfica, espécie do parasita, vetor transmissor, reservatório e hospedeiros, podendo ser atribuída, de forma geral, à picada do flebotomíneo fêmea infectado, conforme apresentado na Figura 9 (BRASIL, 2010, 2014; BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017).

**Figura 9** - Ciclo de transmissão da leishmaniose destacando as fases do parasita dentro do vetor transmissor e dentro do hospedeiro



Fonte: Blanco; Nascimento-Júnior, 2017

A leishmaniose é considerada um grande problema de saúde pública mundial e é a segunda doença transmitida por insetos mais letal no mundo. Anualmente surgem entre 700 mil e 1 milhão de novos casos e em torno de 25 mil mortes (BLANCO; NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017; WHO, 2018). Existem mais de 90 espécies de flebotomíneos transmissores de leishmaniose conhecidos, sendo que no Brasil as principais espécies responsáveis pela transmissão da doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome*, *L. migonei*, *L. longipalpis* e *L. cruzi*, e são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquiras, biguiri dentre outros nomes (BRASIL, 2010, 2014; WHO, 2018).

Esta enfermidade é conhecida pela humanidade desde a antiguidade, sendo que seus registros mais antigos datam do primeiro século depois de Cristo no Peru e Equador (BRAGA, 2008; NEVES, 2011). Na Índia, a leishmaniose visceral era denominada de calazar (doença negra) devido à pigmentação escurecida na pele das pessoas infectadas e era conhecida pela sua alta letalidade (PASTORINO et al., 2002).

Apesar de ser considerada uma doença predominante de regiões de zona tropical, há também registros de casos em regiões subtropicais e zonas temperadas sendo registrados casos em mais de 88 países distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) (BRAGA, 2008; BRASIL, 2010). No entanto, apesar de estar presente em quase todo o planeta, esta enfermidade afeta principalmente as populações mais pobres sendo diretamente relacionada à mudanças ambientais como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização. Associa-se também à esta doença a desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação, fraqueza do sistema imunológico e falta de recursos (WHO, 2018).

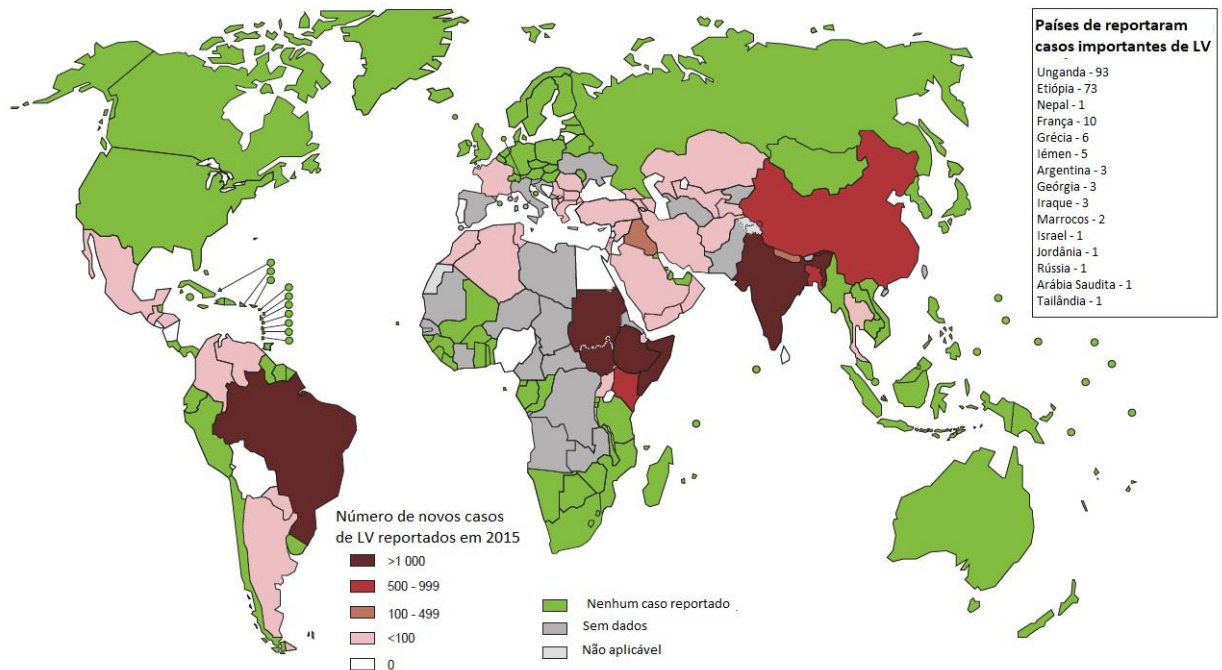
As três formas principais de manifestação da Leishmaniose são: visceral (também conhecida como calazar, a forma mais grave), cutânea e mucocutânea (WHO, 2018).

A Leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso e anemia sendo fatal em 95% dos casos se não for tratada. Estima-se que a cada ano sejam registrados entre 50.000 e 90.000 novos casos de leishmaniose visceral, sendo que 90% desse total se concentra no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (Figura 10) (WHO, 2018).

No Brasil, o primeiro caso de leishmaniose visceral foi relatado em 1913 durante um estudo para diagnóstico de febre amarela, onde foram encontrados 41 casos positivos para *Leishmania*. Desde então a doença vem se espalhando por todas as regiões do país, sendo 90% das ocorrências concentradas na Região Nordeste. A enfermidade atinge majoritariamente crianças menores de 10 anos (54%), sendo que 41% são crianças abaixo dos 5 anos de idade

(PASTORINO et al., 2002; BRASIL, 2014). Estima-se que o Brasil seja responsável por 90% dos casos de LV registrados no continente americano (WHO, 2018).

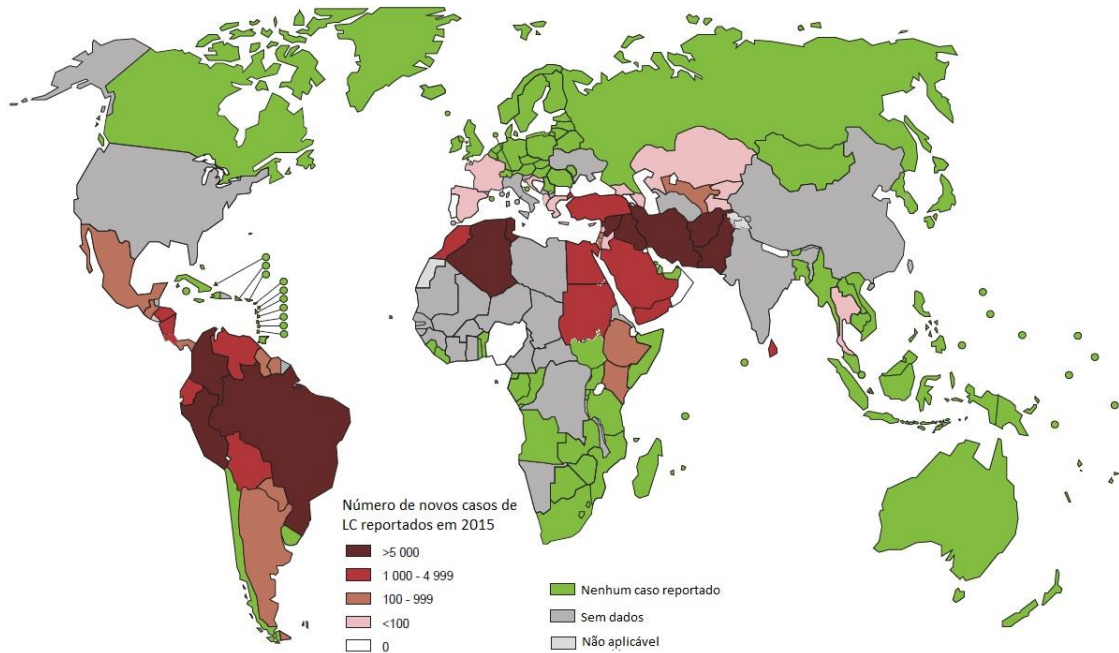
**Figura 10 - Casos de Leishmaniose Visceral no mundo em 2015**



Adaptado de: World Health Organization, 2018

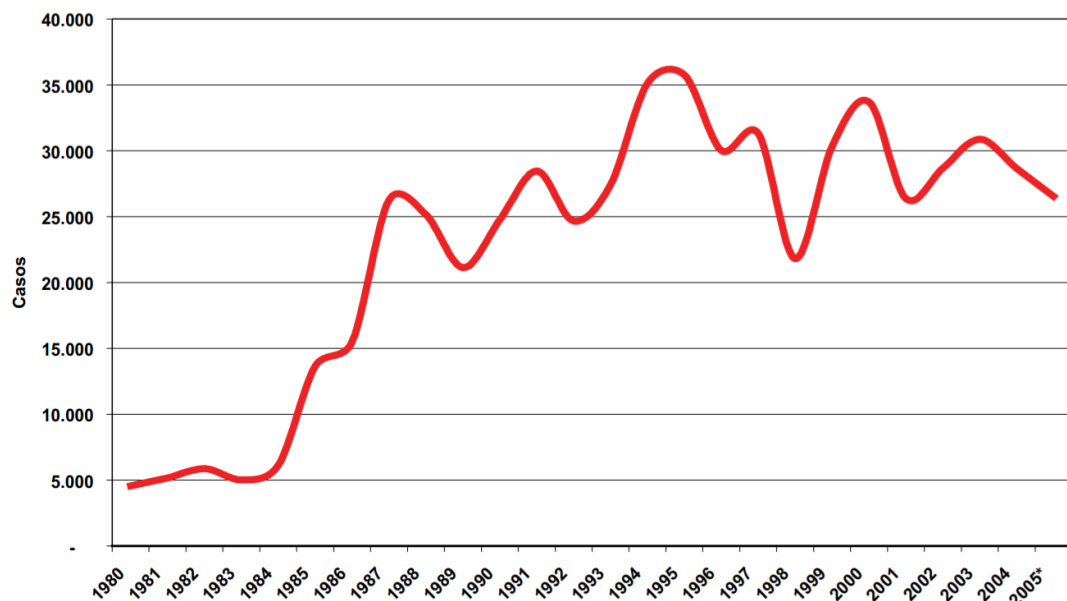
A forma mucocutânea da leishmaniose é menos letal que a LV e seus principais sintomas são desnutrição parcial ou completa das membranas mucosas do nariz, boca e garganta, 90% dos casos registrados dessa forma da doença concentram-se no Brasil, Bolívia, Etiópia e Peru (WHO, 2018).

A forma mais comum da doença é a Leishmaniose cutânea (LC), também conhecida como Leishmaniose tegumentar, responsável por causar áreas expostas de lesões da pele pelo corpo, especialmente ulceradas, capazes de deixar cicatrizes permanentes e causar incapacidade grave. Estima-se que ocorram entre 600.000 e 1 milhão de novos casos de LC por ano, sendo que 95% deste total estejam localizados nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Países como Brasil, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã e Síria são responsáveis por mais de dois terços do total casos registrados por ano (Figura 11) (WHO, 2018).

**Figura 11 - Casos de Leishmaniose cutânea no mundo em 2015**

Adaptado de: World Health Organization, 2018

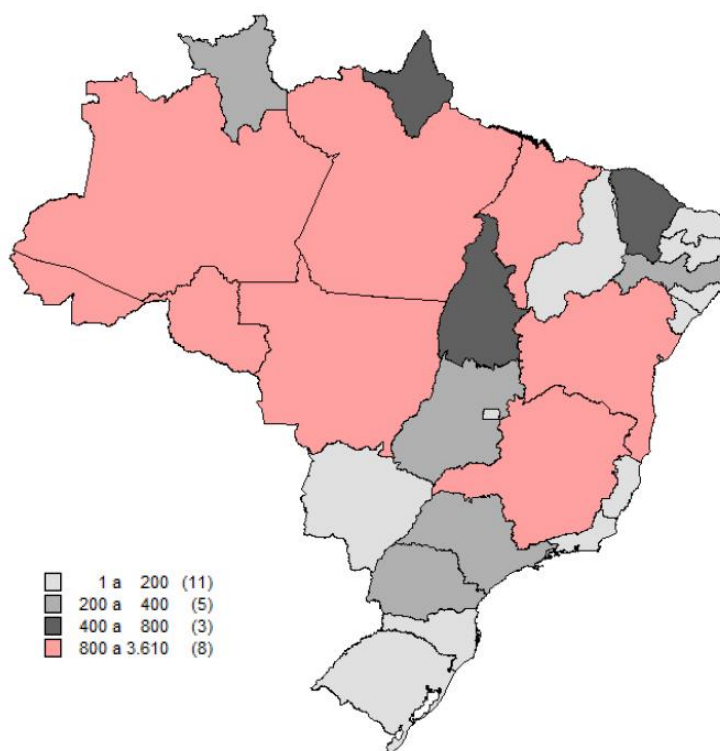
O primeiro caso de Leishmaniose cutânea no Brasil foi identificado em 1895 e, a partir da década de 80, vem sendo observado um aumento no número de casos registrados da doença (Figura 12). Somente no ano de 2016, foram registrados mais de 12.000 novos casos de LC no país (BRASIL, 2010, 2016).

**Figura 12 - Casos notificados de Leishmaniose cutânea no Brasil entre 1980 e 2005**

Fonte: Brasil, 2010

Foi observado ainda que mais de 70% dos infectados pelo protozoário eram do sexo masculino e, ao contrário do que ocorre na leishmaniose mucocutânea, 90% dos casos registrados foram de pessoas acima dos 10 anos. Observa-se ainda que o maior número de casos de LC foram registrados nos Estados da Região Norte (Figura 13), onde há a presença de várias espécies diferentes de flebotomíneos responsáveis pela difusão da doença (BRASIL, 2010, 2016).

**Figura 13** - Casos de leishmaniose cutânea por UF - Brasil, 2015



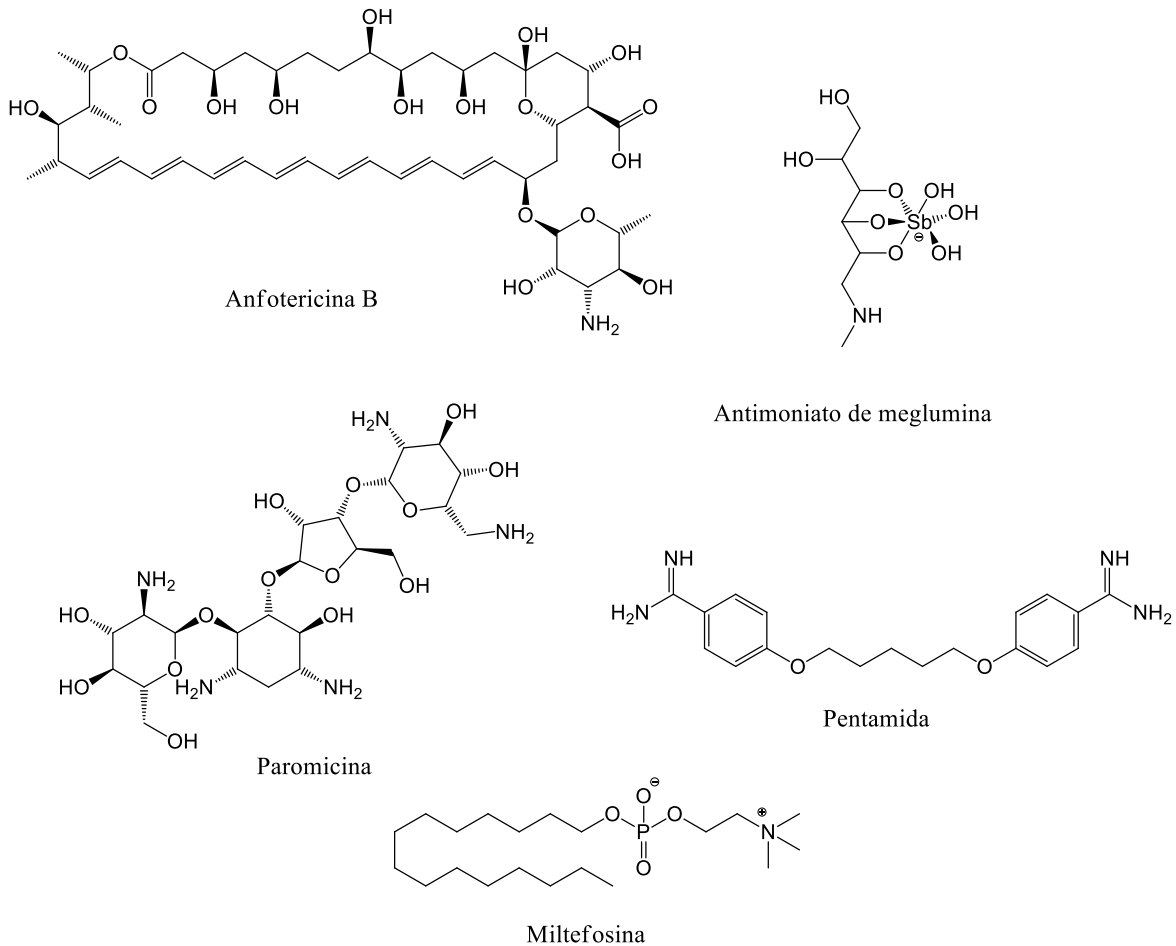
Fonte: Brasil, 2016

Apesar do alto índice de novos casos de leishmaniose registrados anualmente, em suas mais diversas formas de manifestação, existe pouco investimento da indústria farmacêutica para o estudo e desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e menos tóxicos, sobretudo para a forma visceral da doença. Ainda que existam vários fármacos disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses (Figura 14), nenhum tem se mostrado efetivo quanto a erradicação da doença, seja por limitações do próprio medicamento ou mesmo pela resistência do parasita (BRAGA, 2008; DEN BOER et al., 2009).

Além das limitações apresentadas pelos atuais tratamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, destaca-se ainda o fato de que estes fármacos não são ideais para regiões pobres em recursos devido à teratogenicidade, custo, resistência e/ou recaída clínica, esquemas

terapêuticos prolongados e administração parental (DEN BOER et al., 2009; WYLLIE et al., 2018).

**Figura 14** - Fármacos utilizados atualmente no tratamento de leishmaniose



Adaptado de: Blanco, 2017

Considerando a realidade em que vive a população majoritariamente atingida pela leishmaniose, é recomendado que o tratamento seja preferencialmente de curta duração, facilmente administrado em ambiente ambulatorial, altamente eficaz, acessível e seguro. No entanto, não é o que se observa nas opções de fármacos disponíveis atualmente para o tratamento desta enfermidade (DE BOER et al., 2009).

Dessa forma, pesquisas com o objetivo de se desenvolver novos compostos com potencial atividade contra a leishmaniose é essencial, visando a obtenção de candidatos a fármacos para o tratamento de leishmaniose, buscando diminuir os custos, a toxicidade e aumentar a eficácia do tratamento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por finalidade o planejamento e síntese de uma série de compostos aromáticos com potencial leishmanicida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reagir derivados nitroaromáticos com glicinato de etila, glicolato de etila e tioglicolato de etila;
- Caracterizar os compostos sintetizados pelas técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- Realizar *screening* virtual dos compostos planejados através da técnica de *docking* molecular na arginase;
- Sintetizar os compostos com melhor interação enzimática *in silico*;
- Realizar avaliação biológica dos compostos sintetizados contra *Leishmania amazonensis*;
- Comparar os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* e *in silico*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLVENTES

- 2-cloro-3-nitropiridina, 99% (Aldrich, CAS n° 5470-18-8)
- 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina, 97% (Aldrich, CAS n° 23056-40-8)
- 2,4-dicloro-5-nitropirimidina, 97% (Aldrich, CAS n° 49845-33-2)
- 2,6-dicloro-3-nitropiridina, 92% (Aldrich, CAS n° 16013-85-7)
- 1-cloro-2-nitrobenzeno, 99% (Aldrich, CAS n° 88-73-3)
- Acetato de Etila (PA) (Qhemis, CAS n° 141-78-6)
- Carbonato de potássio (Neon, CAS n° 584-08-7)
- Cloreto de amônio, 99% (Aldrich, CAS n° 12125-02-9)
- Dimetilformamida (Synth, CAS n° 68-12-2)
- Ferro, 99% (CAS n° 7439-89-6)
- Glicinato de etila, 99% (Aldrich, CAS n° 623-33-6)
- Glicolato de etila, 98% (Aldrich, CAS n° 623-50-7)
- Hexano (PA) (Synth, CAS n° 110-54-3)
- Tetrahidrofurano, (J.T.Baker, CAS n° 109-99-9)
- Tioglicolato de etila, 97% (Aldrich, CAS n° 623-51-8)
- Hidreto de sódio, 60% (Aldrich, CAS n° 7646-69-7)
- Hidróxido de potássio, 85% (Quemis, CAS n° 1310-58-3)

Para as separações cromatográficas em coluna aberta foi utilizada como fase estacionária Sílica gel (SiO<sub>2</sub>) para cromatografia (60–200 µm, diâmetro de poro 6 nm) Acros Organics. O desenvolvimento das reações foi acompanhado através de cromatografia em camada delgada utilizando placas de alumínio 20 cm × 20 cm impregnadas com sílica gel, Macherey-Nagel.

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

- ✓ Os pontos de fusão dos produtos sintetizados foram determinados pelo fusiômetro PF1500 FARMA-GEHAKA (ICENE-UFTM).
- ✓ Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos através do espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da Perkin Elmer, na região compreendida entre 4000–220 cm<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas com as amostras



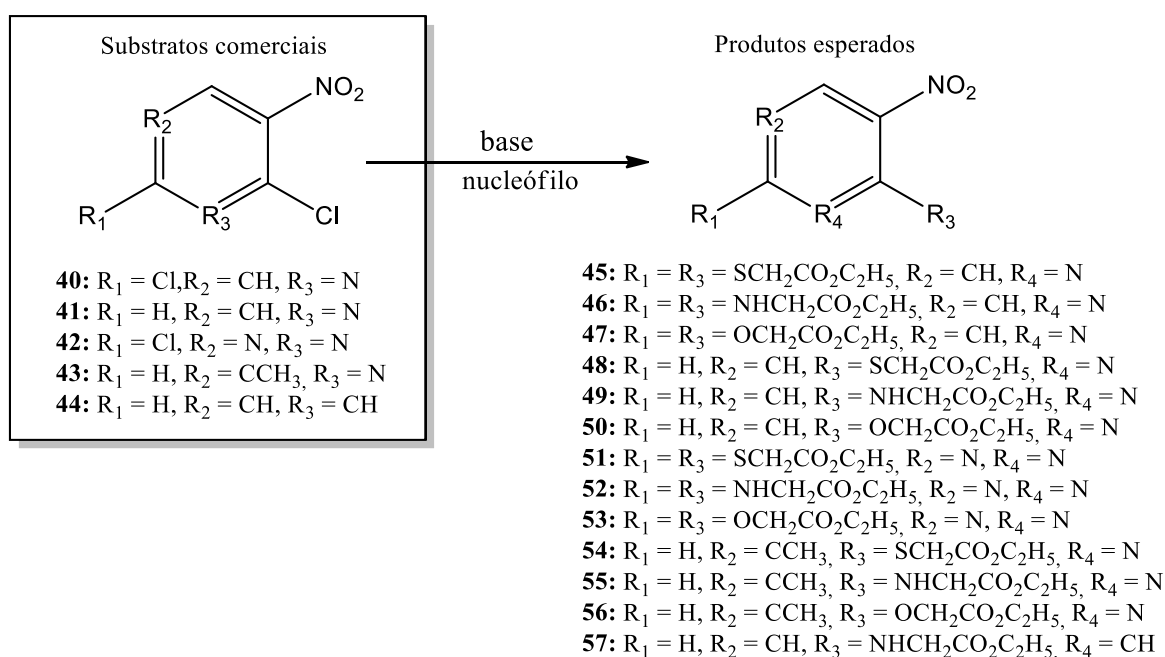
no estado sólido, com auxílio do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Equipamento este pertencente ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da UFU.

- ✓ As análises de RMN foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU em espectrômetro Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 MHz e 100 MHz, para os núcleos o sinal residual do solvente como referência para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . O solvente utilizado foi  $\text{CDCl}_3$ .
- ✓ As análises de CG-EM foram realizadas em cromatógrafos em fase gasosa acoplados a espectrômetro de massas Shimadzu QP2010 (IQ-UFU) e Agilent Technologies 5977A MSD (PC-MG), nas seguintes condições: gás transportador hélio a fluxo constante de  $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; coluna SPB-5 (30,0 m  $\times$  0,25 mm d.i.) capilar de sílica fundida com 5% fenil/ 95% dimetilpolisiloxano como a fase estacionária; temperatura do injetor ajustada a  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura do forno inicialmente mantida a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  e depois aumentada a uma velocidade de  $13 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantida durante 6 min; tempo de execução 21 min. O intervalo de massa escaneada foi de 40–650 amu.
- ✓ As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM), realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU) em um CLAE (marca Agilent modelo Infinity 1260) hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3 mm de diâmetro interno, 10,0 cm de comprimento, partículas de  $2,7 \mu\text{m}$ , a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v.v<sup>-1</sup>) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0–10 min); 100% de B (10–17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a  $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  a uma temperatura de  $220 \text{ }^\circ\text{C}$  e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV.

### 3.2 METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA ( $S_NAr$ )

A metodologia geral para as reações de Substituição Nucleofílica Aromática consiste em adicionar em um balão de 10,0 mL o nucleófilo, a base e 5,0 mL de solvente. O sistema foi mantido sob agitação e, em seguida, o substrato foi adicionado à mistura reacional (Figura 15). O desenvolvimento das reações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando sílica como fase estacionária e hexano/AcOEt (7:3) como fase móvel. As cromatoplasmas foram analisadas por irradiação ultravioleta. Ao final de cada reação, o meio foi neutralizado com solução saturada de cloreto de amônio. As fases aquosas foram particionadas três vezes com 15,0 mL de acetato de etila sendo as fases orgânicas reunidas e o solvente evaporado em evaporador rotativo. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária (15 × 2,5 cm, d.i.). A eluição foi realizada em modo gradiente utilizando hexano/AcOEt (7:3) até 100% de acetato de etila (Tabela 1).

**Figura 15** - Produtos esperados das reações de  $S_NAr$



Fonte: Da autora, 2019

**Tabela 1** - Estequiometria das reações de S<sub>N</sub>Ar

Substrato	Quantidade de substrato m(mg)/n(mmol)	Nucleófilo	Quantidade de nucleófilo m(mg)/n(mmol)	<sup>a</sup> Base	Solvente	Tempo reacional (min)	Temp. (°C)	Produto esperado	Formação de produto
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	500,0/2,6	tioglicolato de etila	1240,0/10,0	KOH	THF	120	t.a.	<b>45</b>	Sim
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	51,3/0,3	cloridrato de glicinato de etila	149,2/1,0	KOH	éter etílico	1.440	t.a.	<b>46</b>	Não
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicinato de etila	100,0/1,0	KOH	éter etílico	180	t.a.	<b>46</b>	Não
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	200,0/1,0	cloridrato de glicinato de etila	1451,6/10,4	KOH	THF	1.440	t.a.	<b>46</b>	Sim
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	500,0/2,6	cloridrato de glicinato de etila	1446,0/10,3	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	60	refluxo	<b>46</b>	Sim
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	56,3/0,3	glicolato de etila	108,3/1,0	KOH	éter etílico	1.440	t.a.	<b>47</b>	Não
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	52,0/0,3	glicolato de etila	216,0/2,1	Et <sub>3</sub> N	éter etílico	2.880	t.a.	<b>47</b>	Não
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicolato de etila	216,0/2,1	NaH	THF	180	refluxo	<b>47</b>	Não
2,6-dicloro-3-nitro-piridina	560,0/2,9	glicolato de etila	2400,0/23,2	NaH	THF	60	t.a.	<b>47</b>	Sim
2-cloro-3-nitro-piridina	52,0/0,3	tioglicolato de etila	56,0/4,7	NaH	THF	30	t.a.	<b>48</b>	Sim
2-cloro-3-nitro-piridina	800,0/5,0	tioglicolato de etila	1210,0/10,0	KOH	THF	20	t.a.	<b>48</b>	Sim

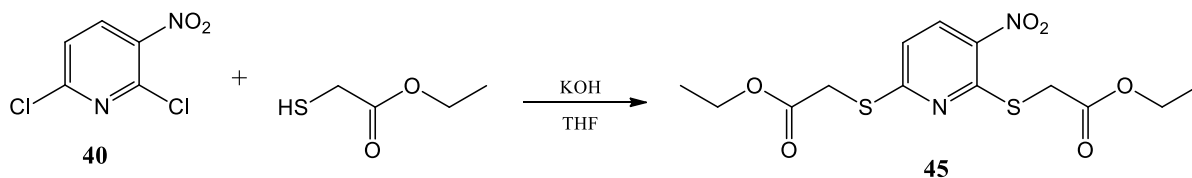
2-cloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	cloridrato de glicinato de etila	130,0/0,9	NaH	diclorometano	60	t.a.	<b>49</b>	Não
2-cloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	cloridrato de glicinato de etila	221,0/1,6	NaH	diclorometano	240	45,0°C	<b>49</b>	Não
2-cloro-3-nitro-piridina	52,6/0,3	cloridrato de glicinato de etila	218,0/1,6	KOH	éter etílico	150	45,0°C	<b>49</b>	Não
2-cloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicinato de etila	233,0/2,5	KOH	éter etílico	1.440	refluxo	<b>49</b>	Não
2-cloro-3-nitro-piridina	56,6/0,3	cloridrato de glicinato de etila	996,6/7,1	KOH	THF	1.800	refluxo	<b>49</b>	Sim
2-cloro-3-nitro-piridina	400,0/2,5	cloridrato de glicinato de etila	140,8/10,1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	60	refluxo	<b>49</b>	Sim
2-cloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicolato de etila	216,0/2,1	Et <sub>3</sub> N	THF	1.800	t.a.	<b>50</b>	Não
2-cloro-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicolato de etila	98,5/1,0	NaH	THF	60	t.a.	<b>50</b>	Sim
2-cloro-3-nitro-piridina	200,0/1,3	glicolato de etila	394,0/3,8	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMF	150	refluxo	<b>50</b>	Sim
2,4-dicloro-5-nitro-pirimidina	50,0/0,3	tioglicolato de etila	123,8/1,0	NaH	THF	30	t.a.	<b>51</b>	Sim
2,4-dicloro-5-nitro-pirimidina	50,0/0,3	cloridrato de glicinato de etila	731,6/5,2	KOH	THF	60	t.a.	<b>52</b>	Sim
2,4-dicloro-5-nitro-pirimidina	50,0/0,3	glicolato de etila	107,0/1,0	NaH	THF	60	t.a.	<b>53</b>	Sim
2-cloro-5-metil-3-nitro-piridina	50,0/0,3	tioglicolato de etila	348,0/2,9	KOH	THF	240	t.a.	<b>54</b>	Sim
2-cloro-5-metil-3-nitro-piridina	50,0/0,3	cloridrato de glicinato de etila	806,6/5,8	KOH	THF	1.560	refuxo	<b>55</b>	Sim
2-cloro-5-metil-3-nitro-piridina	50,0/0,3	glicolato de etila	90,0/0,9	NaH	THF	120	t.a.	<b>56</b>	Não

2-cloro-5-metil-3-nitropiridina	50,0/0,3	glicolato de etila	120,0/1,2	NaH	THF	480	refluxo	<b>56</b>	Sim
1-cloro-2-nitro-benzeno	50,0/0,3	Cloridrato de glicinato de etila	897,0/6,4	KOH	THF	1.680	t.a. + refluxo	<b>57</b>	Sim

<sup>a</sup> 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 Preparação do composto 45

**Figura 16** - Esquema de síntese para obtenção do composto **45**

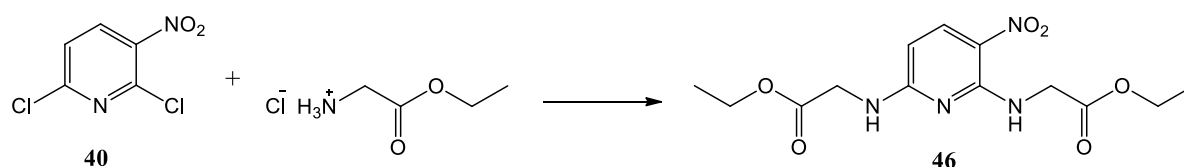


Fonte: Da autora, 2019

Foi utilizado 500,0 mg de 2,6-dicloro-3-nitropiridina (2,6 mmol), 1240,0 mg de tioglicolato de etila (10,0 mmol) e 561,0 mg de KOH (10,0 mmol). A reação foi mantida sob agitação vigorosa a temperatura ambiente por 2 horas. O produto **45** (sólido amarelo) foi obtido com 94% de rendimento. Dados RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.24 (dq, *J* = 8.2, 7.2 Hz, 4H), 4.10 (s, 2H), 4.01 (s, 2H), 1.29 (q, *J* = 7.3 Hz, 6H). Dados de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 151 MHz): δ 14,13 (CH<sub>3</sub>), 33,15 (CH<sub>2</sub>), 32,38 (CH<sub>2</sub>), 61,86 (CH<sub>2</sub>), 62,13 (CH<sub>2</sub>), 117,17 (CH), 133,33 (CH), 138,9 (C), 157,04 (C), 163,83 (C), 169,0 (C), 169,52 (C). Dados de HRESIMS (MeOH) *m/z* 361,0654 [M + H]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>, 361,0523), *m/z* 383,0351 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub>S<sub>2</sub>, 383,0342), *m/z* 743,0797 [2M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>12</sub>S<sub>4</sub>, 743,0792). Dados de IV: 1727 e 1741 ν(C=O), 1133 ν(C-O), 1549 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 1311 ν<sub>s</sub>(NO<sub>2</sub>), 1489 ν(C=C<sub>aromático</sub>), 2973 e 2979 ν(C<sub>sp3</sub>-H), 3119 e 3070 ν(C<sub>sp2</sub>-H). Temperatura de fusão: 90,8 – 91,7 °C. CCD: *R<sub>f</sub>* 0,40 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.2 Preparação do composto 46

**Figura 17** - Esquema de síntese para obtenção do composto **46**



Fonte: Da autora, 2019

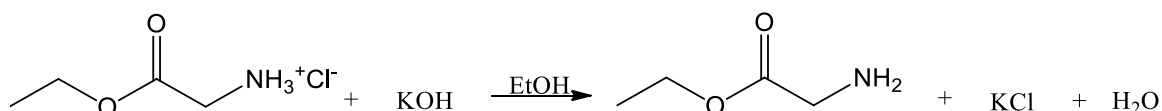
✓ **Metodologia 1:**

A reação foi realizada seguindo o procedimento descrito por Silveira (2016) para obtenção do produto **46**. Foi utilizado 51,3 mg de 2,6-dicloro-3-nitropiridina (0,3 mmol), 149,2 mg cloridrato de glicinato de etila (1,0 mmol), 124,6 mg de KOH (2,1 mmol) e éter etílico como solvente. A reação foi mantida sob agitação vigorosa a temperatura ambiente por 24 horas. Não houve formação do produto esperado.

✓ **Metodologia 2:**

O cloridrato de glicinato de etila foi reagido previamente com KOH em álcool etílico a fim de transformá-lo em glicinato de etila, conforme apresentado na Figura 18.

**Figura 18** - Reação do cloridrato de glicinato de etila com hidróxido de potássio



Fonte: Da autora, 2018

Foram colocados para reagir 100,0 mg (1,0 mmol) do produto obtido na reação anterior, 50,0 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina (0,3 mmol) e 63,0 mg de hidróxido de potássio (1,0 mmol) em éter etílico. A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 3 h. Não houve formação do produto esperado.

✓ **Metodologia 3:**

O cloridrato de glicinato de etila foi previamente tratado por recristalização em etanol absoluto (ARMAREGO; CHAI, 2003). Foram colocados para reagir 200,0 mg (1,0 mmol) de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina, 1,4 g de cloridrato de glicinato de etila (10,4 mmol) e 1,2 g de KOH em THF anidro. A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 24 h. O produto **46** (sólido amarelo) foi obtido com 86% de rendimento.

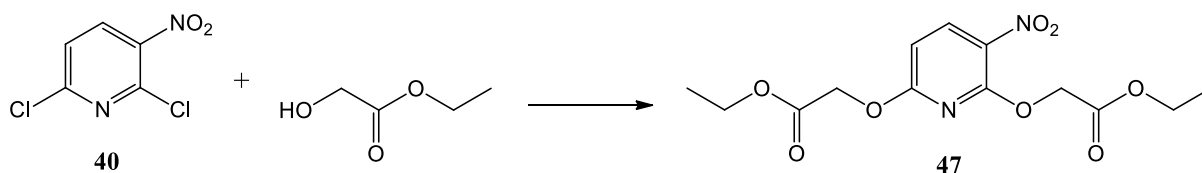
✓ **Metodologia 4:**

Substituiu-se a base e o solvente utilizados anteriormente por carbonato de potássio e DMF, respectivamente. Foram colocados para reagir 500,0 mg (2,6 mmol) de 2,6-dicloro-3-nitropiridina, 1,4 g (10,3mmol) de cloridrato de glicinato de etila e 2,9 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em DMF. A reação foi mantida sob refluxo até o consumo total do substrato (aproximadamente 1 h de

reação) e, após esse período, foi adicionada água destilada em excesso ao meio reacional para precipitação do produto. O composto **46** (sólido amarelo) foi obtido com 93% de rendimento. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,32 (t, 3H,  $J = 7,08$  Hz),  $\delta$  1,34 (t, 3H,  $J = 7,08$  Hz), 4,18 (d, 2H,  $J = 4,96$  Hz), 4,29 (d, 2H,  $J = 4,96$  Hz), 4,25 (q, 2H,  $J = 7,12$  Hz), 4,29 (q, 2H,  $J = 7,12$  Hz), 8,21 (d, 1H,  $J = 9,16$  Hz), 5,92 (d, 1H,  $J = 9,16$  Hz). Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz):  $\delta$  14,17 ( $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  14,19 ( $\text{CH}_3$ ), 43,35 ( $\text{CH}_2$ ), 43,41 ( $\text{CH}_2$ ), 61,37 ( $\text{CH}_2$ ), 61,76 ( $\text{CH}_2$ ), 136,48 (CH), 120,36 (C), 153,39 (C), 159,28 (C), 169,80 (C). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  327,1508  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_6$ , 327,1299),  $m/z$  349,1124  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{NaO}_6$ , 349,1119),  $m/z$  653,2540  $[2\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_{12}$ , 653,2525),  $m/z$  675,2364  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{NaO}_{12}$ , 675,2345). Dados de IV: 1727 e 1734  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1148  $\nu(\text{C}-\text{O})$ , 1593  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1304  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 3366  $\nu(\text{N}-\text{H})$ , 1526  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$ , 2980  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H})$ , 2949  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H})$ . Temperatura de fusão: 165,4 – 166,3 °C. CCD:  $R_f$  0,40 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.3 Preparação do composto 47

**Figura 19** - Esquema de síntese para obtenção do composto **47**



Fonte: Da autora, 2019

#### ✓ Metodologia 1:

Foram colocados para reagir 0,1 mL de glicolato de etila (1,0 mmol) com 0,1 mg de KOH (2,1 mmol) e 56,3 mg de 2,6-dicloro-3-nitropiridina em éter etílico, a temperatura ambiente, por 24 h. Não houve formação do produto esperado.

#### ✓ Metodologia 2:

Substituiu-se o hidróxido de potássio utilizado na metodologia 1 por trietilamina. Foi colocado para reagir 0,3 mL de trietilamina (2,1 mmol) com 0,2 mL de glicolato de etila (2,1 mmol) e 52,0 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina em 5,0 mL de éter etílico. A reação foi mantida por 4 h sob agitação vigorosa e refluxo. Não houve formação do produto esperado.



✓ **Metodologia 3:**

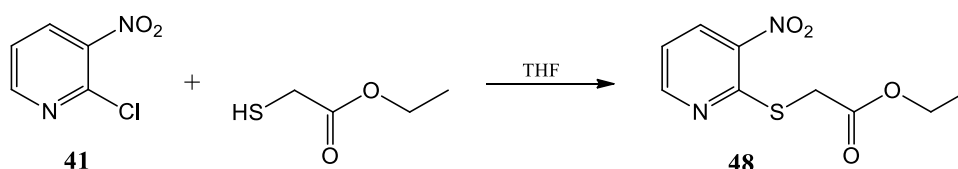
Substituiu-se a base usada nas metodologias anteriores por NaH e o solvente por THF anidro. Foi pesado 49,0 mg de hidreto de sódio (2,1 mmol) em um balão de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de THF e colocou sob agitação vigorosa em banho de gelo. Foi adicionado 0,2 mL de glicolato de etila (2,1 mmol) gota a gota e manteve a mistura sob agitação por 30 min. Adicionou-se em seguida 50,0 mg de 2,6-dicloro-3-nitro-piridina (0,3 mmol) solubilizada em THF, gota a gota, à mistura reacional. O sistema foi colocado sob refluxo por 3 h. Não houve formação do produto esperado.

✓ **Metodologia 4:**

Foi repetida a metodologia 3 alterando o tempo de reação do nucleófilo com a base para 5 min. A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 1 h. O produto **47** (sólido amarelo) foi obtido com 67% de rendimento. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.45 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.61 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.82 (s, 2H), 4.26 (qd,  $J = 7.1$ , 5.2 Hz, 4H), 1.31 (dt,  $J = 8.4$ , 7.2 Hz, 6H). Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 151 MHz):  $\delta$  14,11 ( $\text{CH}_3$ ),  $\delta$  14,13 ( $\text{CH}_3$ ), 63,64 ( $\text{CH}_2$ ), 63,72 ( $\text{CH}_2$ ), 61,55 ( $\text{CH}_2$ ), 61,62 ( $\text{CH}_2$ ), 139,54 (CH), 127,46 (C), 155,51 (C), 163,28 (C), 167,67 (C), 167,77 (C). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  329,1195 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_8$ , 329,0979),  $m/z$  351,0807 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_8$ , 351,0799),  $m/z$  679,1783 [ $2\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_{16}$ , 679,1706). Dados de IV: 1748  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1192  $\nu(\text{C}-\text{O})$ , 1586  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1326  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1519  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$ , 2914 e 2951  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H})$ , 3092  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H})$ . Ponto de fusão: 71,3 – 13,1 °C. CCD:  $R_f$  0,60 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.4 Preparação do composto 48

**Figura 20** - Esquema de síntese para obtenção do composto **48**



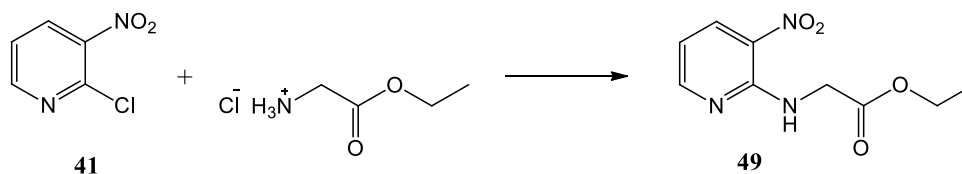
Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 800,0 mg de 2-cloro-3-nitro-piridina (5,0 mmol) com 561,0 mg de KOH (10,0 mmol) e 1210,0 mg de tioglicolato de etila (10,0 mmol) em THF a

temperatura ambiente por 20 min. O produto **48** (sólido amarelo) foi obtido com 69% de conversão observada no CG-EM. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.67 (dd,  $J = 4.6$ , 1.6 Hz, 1H), 8.55 (dd,  $J = 8.3$ , 1.6 Hz, 1H), 7.26 (dd,  $J = 8.2$ , 4.6 Hz, 1H), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  243,0452 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , 243,0434),  $m/z$  265,0262 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$ , 265,0253),  $m/z$  507,0614 [ $2\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{NaO}_8\text{S}_2$ , 507,0615). Temperatura de fusão: 59,0 – 60,0 °C. CCD:  $R_f$  0,40 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.5 Preparação do composto 49

**Figura 21** - Esquema de síntese para obtenção do composto **49**



Fonte: Da autora, 2019

#### ✓ Metodologia 1:

Foram colocados para reagir 130,0 mg de cloridrato de glicinato de etila (0,9 mmol) com 75,6 mg de NaH (1,9 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) em diclorometano, a temperatura ambiente, por 1 h. Não houve formação do produto esperado.

#### ✓ Metodologia 2:

Foram colocados para reagir 221,0 mg de cloridrato de glicinato de etila (1,6 mmol) com 120,0 mg de NaH (5,0 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) em diclorometano, em banho de ultrassom (45 °C), por 4 h. Não houve formação do produto esperado.

#### ✓ Metodologia 3:

Repetiu-se o mesmo procedimento utilizado na metodologia 2 substituindo-se o solvente por éter etílico e a base por KOH. Foram colocados para reagir 218,0 mg de cloridrato de glicinato de etila (1,6 mmol) com 280,5 mg de KOH (5,0 mmol) e 52,6 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) em éter etílico, em banho de ultrassom (45 °C), por 2h30. Não houve formação do produto esperado.

✓ **Metodologia 4:**

O cloridrato de glicinato de etila foi reagido previamente com KOH em álcool metílico a fim de transformá-lo em glicinato de etila, conforme apresentado na Figura 15. Foram colocados para reagir 233,0 mg de cloridrato de glicinato de etila (2,5 mmol) com 141,0 mg de KOH (2,5 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) em éter etílico por 24 h. Após esse período, colocou-se a reação sob refluxo por 6 h. Não houve formação do produto esperado.

✓ **Metodologia 5:**

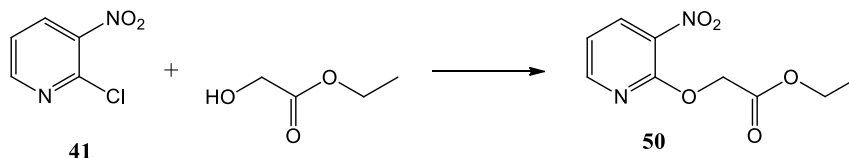
O cloridrato de glicinato de etila foi previamente tratado por recristalização em etanol absoluto (ARMAREGO; CHAI, 2003). Foram colocados para reagir 996,6 mg de cloridrato de glicinato de etila (7,1 mmol) com 827,6 mg de KOH (14,3 mmol) e 56,6 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) em THF por 24 h. Após esse período, colocou-se a reação sob refluxo por 6 h. O produto **49** (óleo amarelo) foi obtido com 94% de conversão observada no CG-EM.

✓ **Metodologia 6:**

A base e o solvente utilizados anteriormente foram substituídos por carbonato de potássio e DMF, respectivamente. Foram colocados para reagir 400,0 mg (2,5 mmol) de 2-cloro-3-nitropiridina, 1,4 g (10,1 mmol) de cloridrato de glicinato de etila e 2,8 g (20,2 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em DMF. A reação foi mantida sob refluxo até o consumo total do substrato (aproximadamente 1 h de reação). O produto **49** (óleo amarelo) foi obtido com 95% de rendimento. Dados RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 8.52 (s, 1H), 8.47 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 4.5, 1.8 Hz, 1H), 6.75 (dd, *J* = 8.3, 4.5 Hz, 1H), 4.40 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.28 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). Dados de HRESIMS (MeOH) *m/z* 226,0873 [M + H]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, 226,0822), *m/z* 248,0648 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>, 248,0642), *m/z* 473,1389 [2M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>8</sub>, 473,1319). Dados de IV: 1734 ν(C=O), 1193 ν(C-O), 1497 ν<sub>as</sub>(NO<sub>2</sub>), 3389 ν(N-H), 1193 ν(C-N), 1608 ν(C=C<sub>aromático</sub>), 2928 e 2980 ν(C<sub>sp<sup>3</sup></sub>-H), 3084 ν(C<sub>sp<sup>2</sup></sub>-H). CCD: *R<sub>f</sub>* 0,70 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.6 Preparação do composto 50

**Figura 22** - Esquema de síntese para obtenção do composto **50**



Fonte: Da autora, 2019

#### ✓ Metodologia 1:

Foram colocados para reagir 0,2 mL de glicolato de etila (2,1 mmol) com 0,3 mL de Et<sub>3</sub>N (2,1 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-3-nitro-piridina em THF, a temperatura ambiente, por 30 h. Não houve formação do produto esperado.

#### ✓ Metodologia 2:

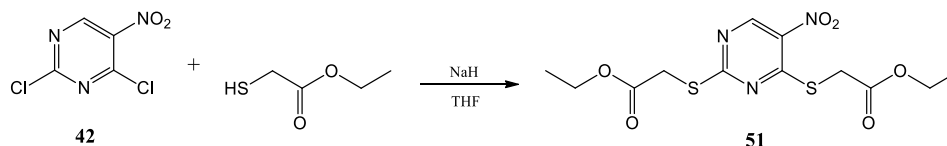
Substituiu-se a base usada na metodologia anterior por NaH. Foi pesado 22,7 mg de hidreto de sódio (0,9 mmol) em um balão de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de THF e colocou sob agitação vigorosa em banho de gelo e atmosfera inerte de nitrogênio. Foi adicionado 0,1 mL de glicolato de etila (0,9 mmol) gota a gota e manteve a mistura sob agitação por 5 min. Adicionou-se em seguida 50,0 mg de 2-cloro-3-nitropiridina (0,3 mmol) solubilizada em THF, gota a gota, à mistura reacional. A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 1 h. O produto **50** foi obtido com 40% de conversão observada no CG-EM.

#### ✓ Metodologia 3:

Substituiu-se a base e o solvente utilizados anteriormente por carbonato de potássio e DMF, respectivamente. Foram colocados para reagir 200,0 mg (1,3 mmol) de 2-cloro-3-nitropiridina, 0,4 g (3,8 mmol) de glicolato de etila e 0,5 g (3,8 mmol) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em DMF. A reação foi mantida sob refluxo até o consumo total do substrato (aproximadamente 2h30 de reação). O produto **50** (óleo amarelo) foi obtido com 21% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH) *m/z* 227,0681 [M + H]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 227,0662), *m/z* 249,0489 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub>, 249,0482), *m/z* 475,1070 [2M + Na]<sup>+</sup> (calcd para C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>16</sub>, 475,1072). CCD: *R<sub>f</sub>* 0,30 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.7 Preparação do composto 51

**Figura 23** - Esquema de síntese para obtenção do composto **51**

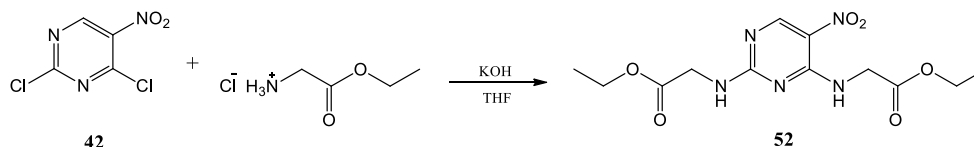


Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 0,1 mL de tioglicolato de etila (1,0 mmol) com 24,7 mg de NaH (1,0 mmol) e 50,0 mg de 2,4-dicloro-5-nitropirimidina (0,3 mmol) em THF, a temperatura ambiente, por 30 min. Foi confirmada a obtenção do produto **51** (óleo vermelho) através de análise de CG-EM. CCD:  $R_f$  0,45 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.8 Preparação do composto 52

**Figura 24** - Esquema de síntese para obtenção do composto **52**

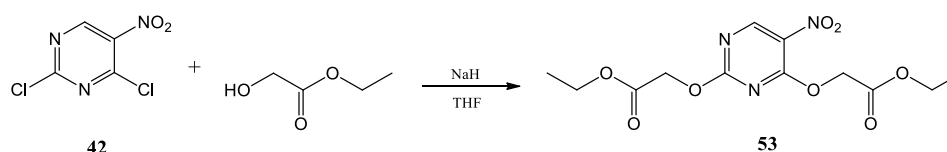


Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 731,6 mg de cloridrato de glicinato de etila (5,2 mmol) com 291,7 mg de KOH (5,2 mmol) e 50,0 mg de 2,4-dicloro-5-nitropirimidina (0,3 mmol) em THF, a temperatura ambiente, por 1 h. O produto **52** (sólido branco) foi obtido com 83% de conversão observada no CG-EM. CCD:  $R_f$  0,15 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.9 Preparação do composto 53

**Figura 25** - Esquema de síntese para obtenção do composto **53**

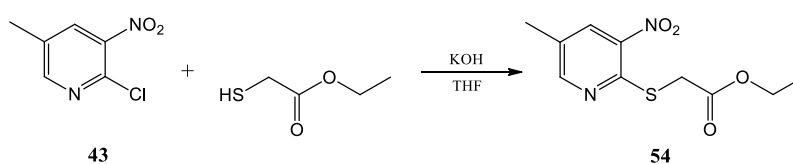


Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 0,1 mL de glicolato de etila (1,0 mmol) com 24,7 mg de NaH (1,0 mmol) e 50,0 mg de 2,4-dicloro-5-nitropirimidina (0,3 mmol) em THF, a temperatura ambiente, por 1 h. O produto **53** (óleo amarelo) foi obtido com 86% de conversão observada no CG-EM. CCD:  $R_f$  0,33 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.10 Preparação do composto **54**

**Figura 26** - Esquema de síntese para obtenção do composto **54**

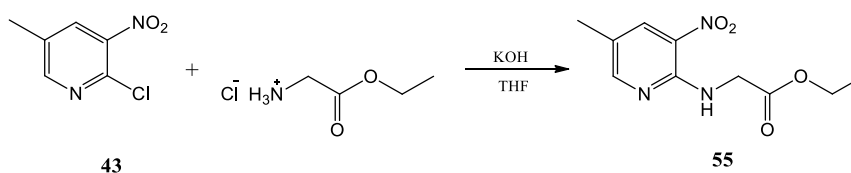


Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 0,3 mL de tioglicolato de etila (2,9 mmol) com 162,7 mg de KOH (2,9 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-5-metil-3-nitro-piridina (0,3 mmol) em THF, a temperatura ambiente, por 4 h. O produto **54** (sólido amarelo) foi obtido com 12% de conversão observada no CG-EM. CCD:  $R_f$  0,44 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.11 Preparação do composto **55**

**Figura 27** - Esquema de síntese para obtenção do composto **55**

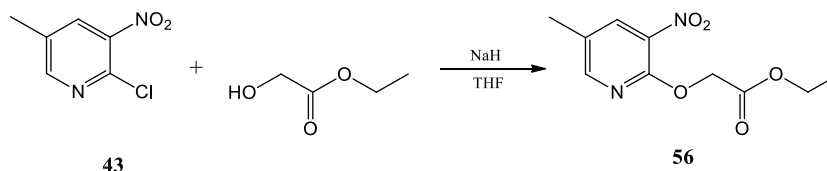


Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 806,6 mg de cloridrato de glicinato de etila (5,8 mmol) com 648,5 mg de KOH (11,6 mmol) e 50,0 mg de 2-cloro-5-metil-3-nitro-piridina (0,3 mmol) em THF sob refluxo por 26 h. O produto **55** (sólido amarelo) foi obtido com 88% de conversão observada no CG-EM. CCD:  $R_f$  0,55 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.12 Preparação do composto 56

**Figura 28** - Esquema de síntese para obtenção do composto **56**



Fonte: Da autora, 2019

#### ✓ Metodologia 1:

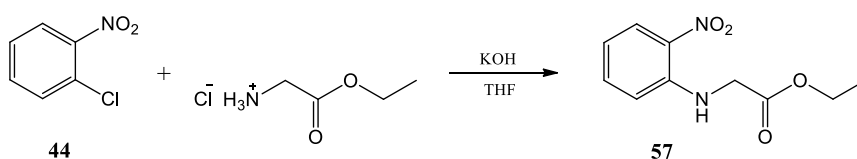
Foi pesado 20,0 mg de hidreto de sódio (0,9 mmol) em um balão de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de THF e colocou sob agitação vigorosa em banho de gelo e atmosfera inerte de nitrogênio. Foi adicionado 0,1 mL de glicolato de etila (0,9 mmol) gota a gota e manteve a mistura sob agitação por 5 min. Adicionou-se em seguida 50,0 mg de 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina (0,3 mmol) solubilizada em THF, gota a gota, à mistura reacional. A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 2 h. Não houve formação do produto esperado.

#### ✓ Metodologia 2:

Foi pesado 29,6 mg de hidreto de sódio (1,2 mmol) em um balão de 10,0 mL, adicionou-se 5,0 mL de THF e colocou sob agitação vigorosa em banho de gelo. Foi adicionado 0,1 mL de glicolato de etila (1,2 mmol) gota a gota e manteve a mistura sob agitação por 5 min. Adicionou-se em seguida 50,4 mg de 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina (0,3 mmol) solubilizada em THF, gota a gota, à mistura reacional. A reação foi colocada sob refluxo por 8 h. O produto **56** (sólido amarelo) foi obtido com 90% de conversão observada no CG-EM. CCD:  $R_f$  0,40 (hexano/AcOEt, 7:3).

### 3.2.13 Preparação do composto 57

**Figura 29** - Esquema de síntese para obtenção do composto **57**



Fonte: Da autora, 2019

Foram colocados para reagir 897,0 mg de cloridrato de glicinato de etila (6,4 mmol) com 706,9 mg de hidróxido de potássio (12,6 mmol) e 50,0 mg de 1-cloro-2-nitro-benzeno (0,3 mmol). A reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente por 24 h. Após esse período a mistura reacional foi colocada sob refluxo por 4 h. A obtenção do produto **57** (óleo amarelo) foi confirmada por CG-EM. estrutura CCD:  $R_f$  0,10 (hexano:AcOEt, 7:3).

### 3.3 METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE CICLIZAÇÃO

Em um balão de 50,0 mL foi adicionado o produto obtido na reação de  $S_NAr$  (**45**, **46** e **47**), cloreto de amônio, ferro metálico e 15,0 mL de etanol/água (2:1) (Tabela 2). A reação foi colocada sob refluxo por 24 h e, após esse período, foi adicionada água destilada à mistura reacional. A solução obtida foi filtrada e a fase aquosa foi particionada três vezes com 20,0 mL de acetato de etila sendo a fase orgânica reunida e o solvente evaporado em evaporador rotativo. A reação foi acompanhada por CCD. As cromatoplasmas foram analisadas por irradiação ultravioleta. Os produtos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária (15 × 2,5 cm, d.i.). A eluição foi realizada em gradiente de hexano/AcOEt (7:3) até 100% de acetato de etila.

**Tabela 2** - Estequiometria das reações de redução do grupo nitro e ciclizações *in situ*

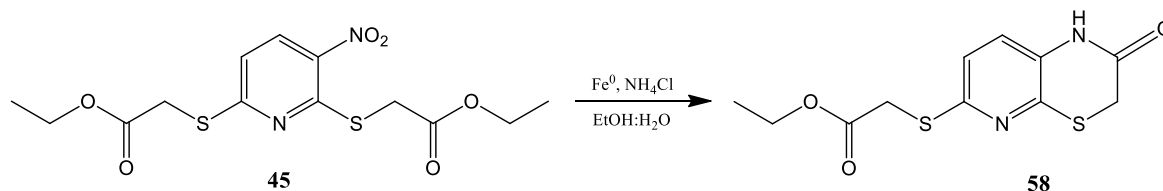
Composto	Quantidade		Cloreto de amônio		Ferro		Produto esperado
	mg	mmol	mg	mmol	mg	mmol	
<b>45</b>	200,0	0,5	20,0	0,4	184,0	3,3	<b>58</b>
<b>46</b>	200,0	0,6	21,8	0,4	182,0	3,3	<b>59</b>
<b>47</b>	200,0	0,6	23,0	0,4	204,0	3,7	<b>60</b>

Fonte: Elaborado pela autora, 2019



### 3.3.1 Preparação do composto 58

**Figura 30** - Esquema de síntese para obtenção do composto **58**

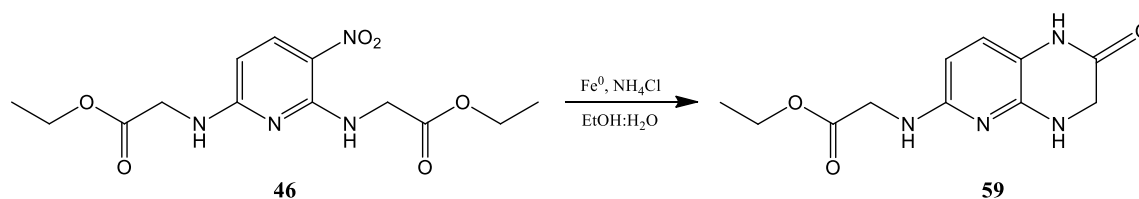


Fonte: Da autora, 2019

O produto **58** (sólido castanho) foi obtido com 24% de rendimento. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.06 (s, 1H), 7.00 (q,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.26 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.92 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.33 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  285,0433 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ , 285,0362),  $m/z$  307,0177 [ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}_2$ , 307,0182),  $m/z$  591,0459 [ $2\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$  (calcd para  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_4$ , 591,0471). Dados de IV: 1653 e 1727  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 3308  $\nu(\text{N}-\text{H})$ , 2929 e 2980  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H})$ , 3084  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H})$ . Temperatura de fusão: 156,6 – 157,7 °C. CCD:  $R_f$  0,70 (hexano/AcOEt, 1:9).

### 3.3.2 Tentativa de preparação do composto 59

**Figura 31** - Esquema de síntese para obtenção do composto **59**

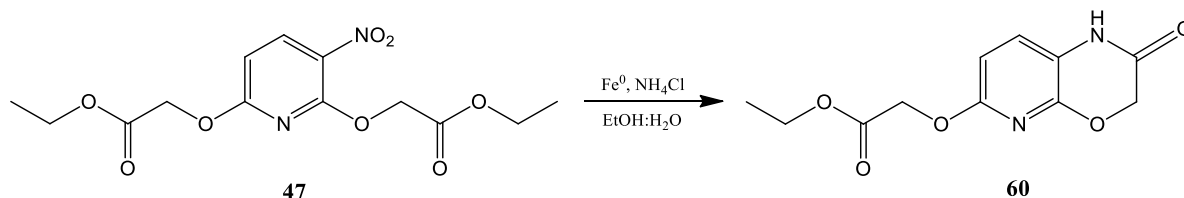


Fonte: Da autora, 2019

O produto obtido (sólido amarelo) apresentou 13,3% de rendimento. CCD:  $R_f$  0,33 (AcOEt).

### 3.3.3 Preparação do composto 60

**Figura 32** - Esquema de síntese para obtenção do composto **60**



Fonte: Da autora, 2019

O produto **60** (sólido rosáceo) foi obtido com 30,49% de rendimento. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.14 (s, 1H), 7.14 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.55 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.78 (s, 2H), 4.27 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.31 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  253,0829  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5$ , 253,0819),  $m/z$  275,0645  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaO}_5$ , 275,0638),  $m/z$  527,1385  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_{10}$ , 527,1385). Dados de IV: 1667 e 1757  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , 1193  $\nu(\text{C}-\text{O})$ , 3181  $\nu(\text{N}-\text{H})$ , 1623  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$ , 2899 e 2966  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H})$ , 3070  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H})$ . Temperatura de fusão: 197,6 – 198,4 °C. CCD:  $R_f$  0,55 (hexano/AcOEt, 1:9).

### 3.4 METODOLOGIA PARA AS REAÇÕES DE HIDRÓLISE

Em um balão de 10,0 mL foi adicionado o material de partida previamente obtido nas reações  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$  e redução (**45**, **46**, **47**, **48**, **49**, **50**, **58**, **59** e **60**), hidróxido de potássio e 5,0 mL de EtOH:H<sub>2</sub>O (2:1) (Tabela 3). A mistura reacional foi colocada sob agitação vigorosa, à temperatura ambiente até consumo completo do material de partida. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD utilizando sílica como fase estacionária e AcOEt/MeOH (7:3) como fase móvel. As cromatoplasmas foram analisadas por irradiação ultravioleta. Ao final da reação, o meio foi neutralizado com solução saturada de cloreto de amônio. As fases aquosas foram particionadas três vezes com 15,0 mL de acetato de etila sendo as fases orgânicas reunidas e o solvente evaporado em evaporador rotativo. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica como fase estacionária (15 × 2,5 cm, d.i.). A eluição foi realizada em gradiente de hexano/AcOEt (7:3) até 100% de acetato de etila.

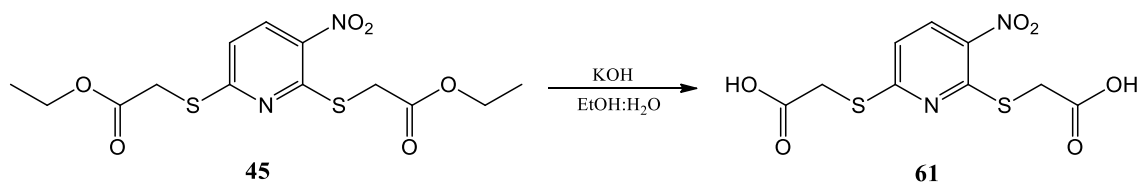
**Tabela 3** - Estequiometria das reações de hidrólise

Composto	Quantidade		Hidróxido de potássio		Tempo de reação (min)	Produto esperado
	mg	mmol	mg	mmol		
<b>45</b>	100,0	0,3	27,0	0,7	30	<b>61</b>
<b>46</b>	100,0	0,3	30,0	0,8	30	<b>62</b>
<b>47</b>	100,0	0,3	30,0	0,8	30	<b>63</b>
<b>48</b>	100,0	0,4	46,0	0,8	60	<b>64</b>
<b>49</b>	100,0	0,4	35,0	0,9	20	<b>65</b>
<b>50</b>	15,0	0,1	5,3	0,1	40	<b>66</b>
<b>58</b>	20,0	0,2	20,0	0,4	40	<b>67</b>
<b>59</b>	50,0	0,2	22,0	0,4	40	<b>68</b>
<b>60</b>	20,0	0,1	10,0	0,2	40	<b>69</b>

Fonte: Elaborado pela autora, 2019

### 3.4.1 Preparação do composto 61

**Figura 33** - Esquema de síntese para obtenção do composto **61**

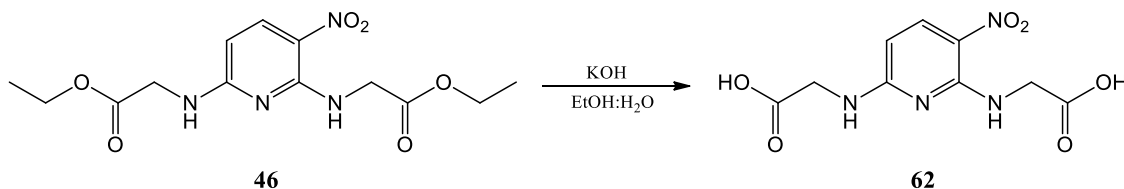


Fonte: Da autora, 2019

O produto **61** (sólido amarelo) foi obtido com 20% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  304,9898  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_9H_9N_2O_6S_2$ , 308,9497),  $m/z$  326,9710  $[M + Na]^+$  (calcd para  $C_9H_8N_2NaO_6S_2$ , 326,9716),  $m/z$  630,9524  $[2M + Na]^+$  (calcd para  $C_{18}H_{16}N_4NaO_{12}S_4$ , 630,9540). Dados de IV: 3382  $\nu(\text{O-H})$ , 1549  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1311  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1586  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$ , 2922  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$ , 3070  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar o ponto de fusão; o produto se decompôs à 226,8 °C. CCD:  $R_f$  0,20 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.2 Preparação do composto 62

**Figura 34** - Esquema de síntese para obtenção do composto **62**

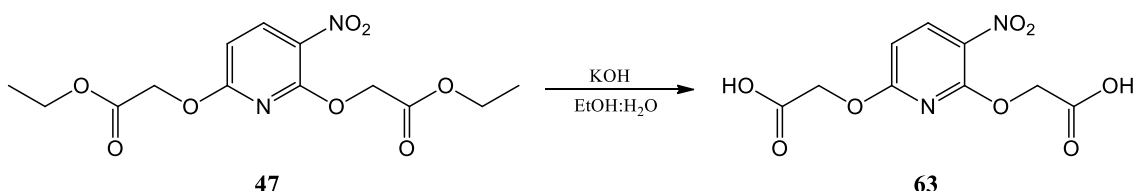


Fonte: Da autora, 2019

O produto **62** (sólido amarelo) foi obtido com 38% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  271,0689  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_9H_{11}N_4O_6$ , 271,0673),  $m/z$  541,1290  $[2M + H]^+$  (calcd para  $C_{18}H_{21}N_8O_{12}$ , 541,1273). Dados de IV: 3352  $\nu(O-H)$ , 1734  $\nu(C=O)$ , 1148  $\nu(C-O)$ , 1534  $\nu_{as}(NO_2)$ , 1385  $\nu_s(NO_2)$ , 3463  $\nu(N-H)$ , 1586  $\nu(C=C_{aromático})$ , 2922  $\nu(C_{sp^3}-H)$ , 3092  $\nu(C_{sp^2}-H)$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar o ponto de fusão; o produto se decompôs à 270,0 °C. CCD:  $R_f$  0,18 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.3 Preparação do composto 63

**Figura 35** - Esquema de síntese para obtenção do composto **63**

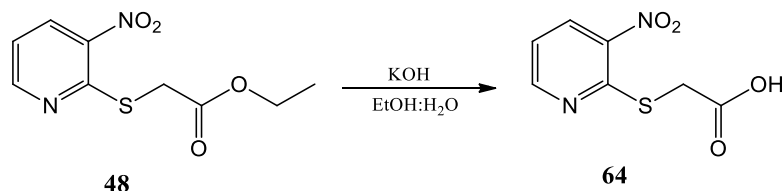


Fonte: Da autora, 2019

O produto **63** (sólido verde) foi obtido com 49% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  273,0362  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_9H_9N_2O_8$ , 273,0353),  $m/z$  295,0176  $[M + Na]^+$  (calcd para  $C_9H_8N_2NaO_8$ , 295,0173),  $m/z$  567,0458  $[2M + Na]^+$  (calcd para  $C_{18}H_{16}N_4NaO_{16}$ , 567,0454). Dados de IV: 3345  $\nu(O-H)$ , 1630  $\nu(C=O)$ , 1267  $\nu(C-O)$ , 1497  $\nu_{as}(NO_2)$ , 1334  $\nu_s(NO_2)$ , 1579  $\nu(C=C_{aromático})$ , 2959  $\nu(C_{sp^3}-H)$ , 3092  $\nu(C_{sp^2}-H)$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar a temperatura de fusão; o produto se decompôs à 250,0 °C. CCD:  $R_f$  0,30 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.4 Preparação do composto 64

**Figura 36** - Esquema de síntese para obtenção do composto **64**

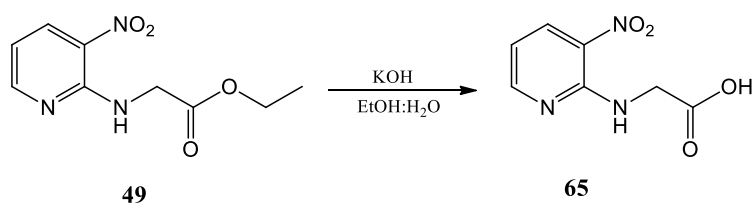


Fonte: Da autora, 2019

O produto **64** (sólido marrom) foi obtido com 51% de rendimento. Dados RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.72 (dd,  $J = 4.7, 1.6$  Hz, 1H), 8.60 (dd,  $J = 8.3, 1.6$  Hz, 1H), 7.34 (dd,  $J = 8.3, 4.7$  Hz, 1H), 3.99 (s, 2H). Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  215,0127  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd para  $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ , 215,0121),  $m/z$  236,9946  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{NaO}_4\text{S}$ , 236,9940),  $m/z$  450,9990  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{NaO}_8\text{S}_2$ , 450,9989). Dados de IV: 3441  $\nu(\text{O-H})$ , 1690  $\nu(\text{C=O})$ , 1549  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$ , 1326  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$ , 1579  $\nu(\text{C=C}_{\text{aromático}})$ , 2914 e 2988  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3\text{-H}})$ , 3092  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}})$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar a temperatura de fusão; o produto se decompôs à 222,0 °C. CCD:  $R_f$  0,22 (AcOEt/MeOH, 7:3).

### 3.4.5 Preparação do composto 65

**Figura 37** - Esquema de síntese para obtenção do composto **65**

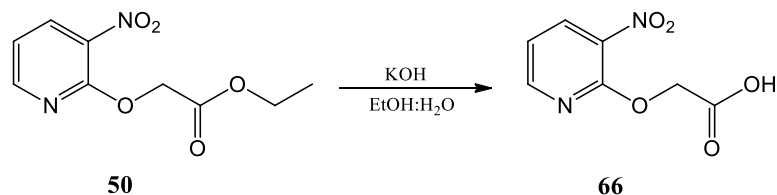


Fonte: Da autora, 2019

O produto **65** (sólido amarelo) foi obtido com 43% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  198,0546  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd para  $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4$ , 198,0509),  $m/z$  220,0335  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  (calcd para  $\text{C}_7\text{H}_7\text{N}_3\text{NaO}_4$ , 220,0329). Dados de IV: 3167  $\nu(\text{O-H})$ , 1683  $\nu(\text{C=O})$ , 3389  $\nu(\text{N-H})$ , 1572  $\nu(\text{C=C}_{\text{aromático}})$ , 2922  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3\text{-H}})$ , 3092  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2\text{-H}})$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar a temperatura de fusão; o produto se decompôs à 184,6 °C. CCD:  $R_f$  0,40 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.6 Preparação do composto 66

**Figura 38** - Esquema de síntese para obtenção do composto **66**

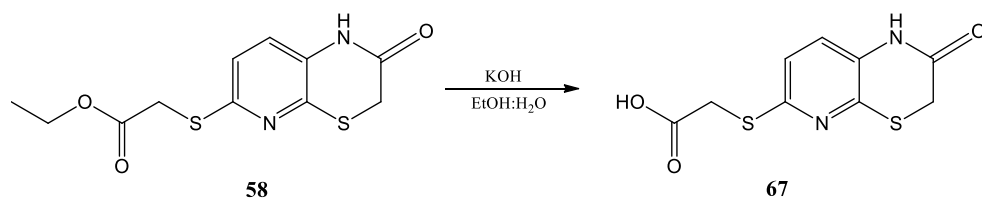


Fonte: Da autora, 2019

O produto **66** (sólido branco) foi obtido com 31% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  199,0358  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_7H_7N_2O_5$ , 199,0349),  $m/z$  221,0170  $[M + Na]^+$  (calcd para  $C_7H_6N_2NaO_5$ , 221,0169). CCD:  $R_f$  0,17 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.7 Preparação do composto 67

**Figura 39** - Esquema de síntese para obtenção do composto **67**

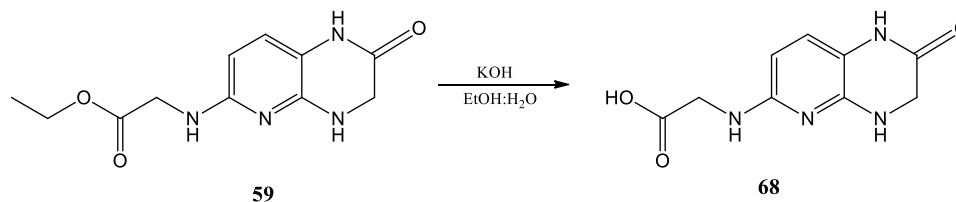


Fonte: Da autora, 2019

O produto **67** (sólido rosáceo) foi obtido com 45% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  257,0053  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_9H_9N_2O_3S_2$ , 257,0049). Dados de IV: 3367  $\nu(\text{O-H})$ , 1653  $\nu(\text{C=O})$ , 3433  $\nu(\text{N-H})$ , 1578  $\nu(\text{C=C}_{\text{aromático}})$ , 2825  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$ , 3003 e 3063  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$ . Temperatura de fusão: não foi possível determinar a temperatura de fusão; o produto se decompôs à 273,4 °C. CCD:  $R_f$  0,35 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.8 Tentativa de preparação do composto 68

**Figura 40** - Esquema de síntese para obtenção do composto **68**

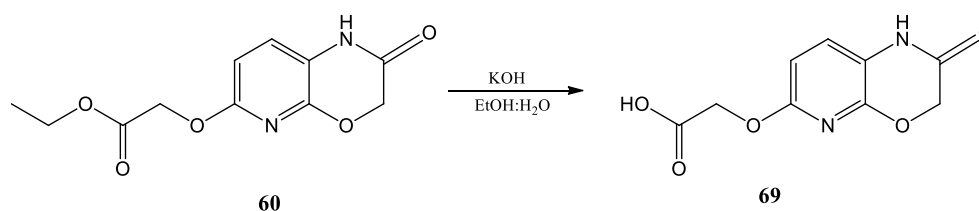


Fonte: Da autora, 2019

O produto (sólido amarelo) foi obtido com 11% de rendimento. CCD:  $R_f$  0,10 (AcOEt/MeOH, 1:1).

### 3.4.9 Preparação do composto 69

**Figura 41** - Esquema de síntese para obtenção do composto **69**



Fonte: Da autora, 2019

O produto **69** (sólido castanho rosáceo) foi obtido com 43% de rendimento. Dados de HRESIMS (MeOH)  $m/z$  225,0509  $[M + H]^+$  (calcd para  $C_9H_9N_2O_5$ , 225,0506),  $m/z$  247,0327  $[M + Na]^+$  (calcd para  $C_9H_8N_2NaO_5$ , 247,0325). Dados de IV: 3240  $\nu$ (O-H), 1667  $\nu$ (C=O), 1468  $\nu$ (C-O), 3456  $\nu$ (N-H), 1609  $\nu$ (C=C<sub>aromático</sub>), 2929  $\nu$ (C<sub>sp3</sub>-H), 3033  $\nu$ (C<sub>sp2</sub>-H). Temperatura de fusão: não foi possível determinar a temperatura de fusão; o produto se decompôs à 253,4 °C. CCD:  $R_f$  0,30 (AcOEt/MeOH, 1:1).

## 3.5 METODOLOGIA PARA REALIZAÇÃO DO DOCKING MOLECULAR

A arginase de *L. amazonensis* foi modelada usando o servidor de I-Tasser (YANG et al., 2015) com a sequência completa de arginase de *L. amazonensis* (código GenBank AAC95287) (HAI; CHRISTIANSON, 2016) e com a *L. mexicana* arginase como modelo. Os

dados recentes de cristalografia de raios X da arginase em *L. mexicana* foram extraídos do Banco de Dados de Proteínas (PDB, código 5HJ9) (BERMAN et al., 2000; DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012). O desvio médio da raiz quadrada do modelo em relação ao molde foi de 0,24 Å e a identidade na sequência foi de 99% (dois dos 323 aminoácidos diferindo próximo ao terminal de carbono) (MAQUIAVELI et al., 2016). Optou-se por utilizar a estrutura derivada de raios-X de *L. mexicana* devido à sua confiança nos dados experimentais e ao fato de o sítio de ligação não diferir entre as *L. mexicana*, *L. amazonensis* e arginases humanas modeladas (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; MANJOLIN et al., 2013; SHIN; CHRISTIANSON, 2004). Além disso, estruturas cristalinas similares com boa resolução estavam disponíveis para a arginase em *L. mexicana* e para a arginase humana complexada com inibidores, apresentando baixos desvios quadráticos médios (RMSD) entre eles (~ 0,5 Å).

As simulações de *docking* molecular foram executadas com a versão 5.6 do pacote GOLD (Otimização Genética para Acoplamento de Ligandos). A estrutura do ligante foi preparada com a versão 17.1.27 da Marvin Sketch, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), os ligantes foram verificados e os hidrogênios foram adicionados com o software Mercury da suíte GOLD. A visualização pré e pós-docagem e a configuração interativa foram realizadas com o software Hermes da suíte GOLD. Todas as moléculas de água e heteroátomos, exceto os dois átomos de manganês (Mn) foram removidos do arquivo de entrada do PDB. Resíduos dentro de 6,0 Å ao redor da molécula de ligação citada onde os manganeses estão localizados foram utilizados como sítios de cavidades ligantes. O algoritmo genético (AG) método foi usado para executar os cálculos (VERSONK et al., 2003), total flexibilidade foi permitido ao ligando e AG corridas foram realizadas com um máximo de 100.000 AG operações com uma população tamanho de 10 indivíduos por ligante. Diversas soluções foram geradas, cantos de anéis foram permitidos, diversas conformações puderam ser exploradas e nenhuma restrição foi aplicada nas simulações de *docking*. A função de fitness GoldScore com ChemScore como *rescore* foi escolhida para prever o modo de ligação do composto com a enzima. A estrutura de maior classificação para o complexo de cada composto com a enzima foi escolhida para a análise de interação.

Todos os 69 complexos (composto/enzima) foram classificados pela função de adequação do GoldScore e as energias de ligação de energia livre foram estimadas pela função ChemScore (Apêndice C).



Figuras com estrutura tridimensional foram preparadas com PyMOL (Molecular Graphics System, versão 1.8 Schrödinger, LLC). Um protocolo teórico semelhante foi empregado no trabalho de Gonçalves e colaboradores (2017).

## 3.6 METODOLOGIA PARA REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS BIOLÓGICOS

### 3.6.1 Preparo dos meios de cultura

O caldo *brain heart infusion* (BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e suplementado com 5% de soro fetal bovino e L-glutamina (2,0 mM).

### 3.6.2 Cultivo dos protozoários

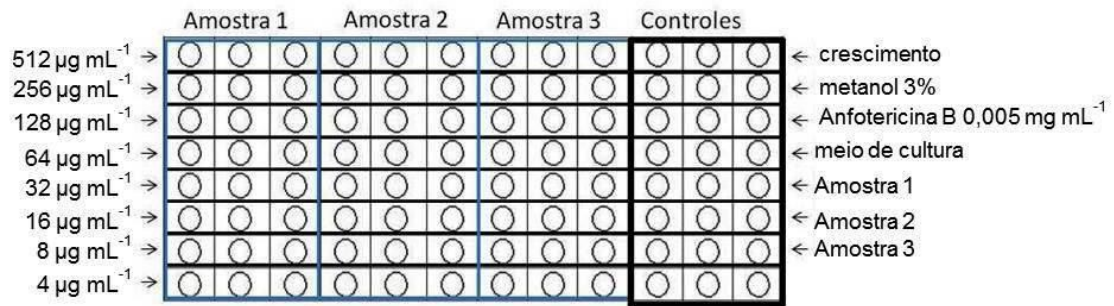
O estágio promastigotas de *Leishmania amazonensis* da cepa PH8 cultivado em BHI suplementado à temperatura de 25 °C.

### 3.6.3 Preparo das amostras

Para o teste com *L. amazonensis*, as amostras foram dissolvidas em DMSO e diluídos com BHI suplementado, formando uma solução estoque  $640 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . A concentração final de DMSO da solução estoque não excedeu 1% (v.v<sup>-1</sup>).

### 3.6.4 Teste de viabilidade celular

Este teste foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução estoque, sendo feitas as diluições com o BHI suplementado, obtendo-se as concentrações a serem testadas ( $512 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). O volume final de cada poço foi de 100  $\mu\text{L}$ , sendo 20  $\mu\text{L}$  de inóculo (solução com  $1 \times 10^8$  parasitas em 2,0 mL) com 80  $\mu\text{L}$  das soluções das amostras. Também foram realizados os controles de crescimento do inóculo, solvente (DMSO 1%), de inibição (anfotericina B  $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), meio de cultura e das amostras. A estrutura da placa de 96 poços é apresentada na Figura 42.

**Figura 42** - Estrutura da placa para o teste antileishmania

Fonte: Da autora, 2019

A placa de *L. amazonensis* foi incubada por 48 horas a 25 °C. Após esse período foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  em cada poço de uma solução de resazurina a 3 mM em phosphate buffered saline (PBS) (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e novamente incubado nas mesmas condições por 24 horas. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a 595 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

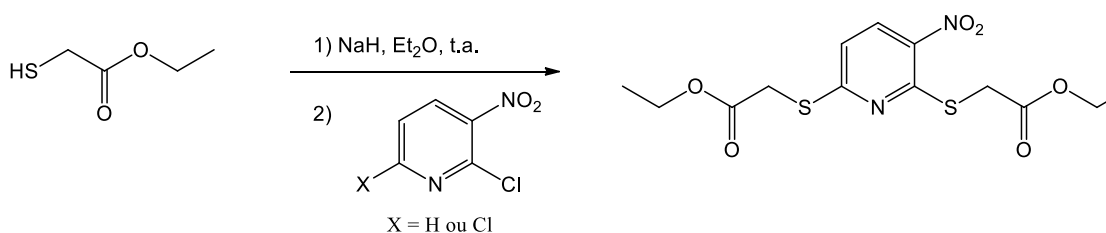
Todos os ensaios foram realizados em triplicata e a partir dos valores das absorvâncias foi calculada a viabilidade celular em função do controle de crescimento. A partir desses resultados foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não linear utilizado no cálculo do  $\text{CI}_{50}$  (concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos) (CHIBALE et al., 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 REAÇÕES DE SUBSTITUIÇÃO NUCLEOFÍLICA AROMÁTICA

A proposta sintética para a formação das substâncias **45** e **48** foi fundamentada na reação de Substituição Nucleofílica Aromática ( $S_NAr$ ) apresentada por Valli e colaboradores (2011) (Figura 43).

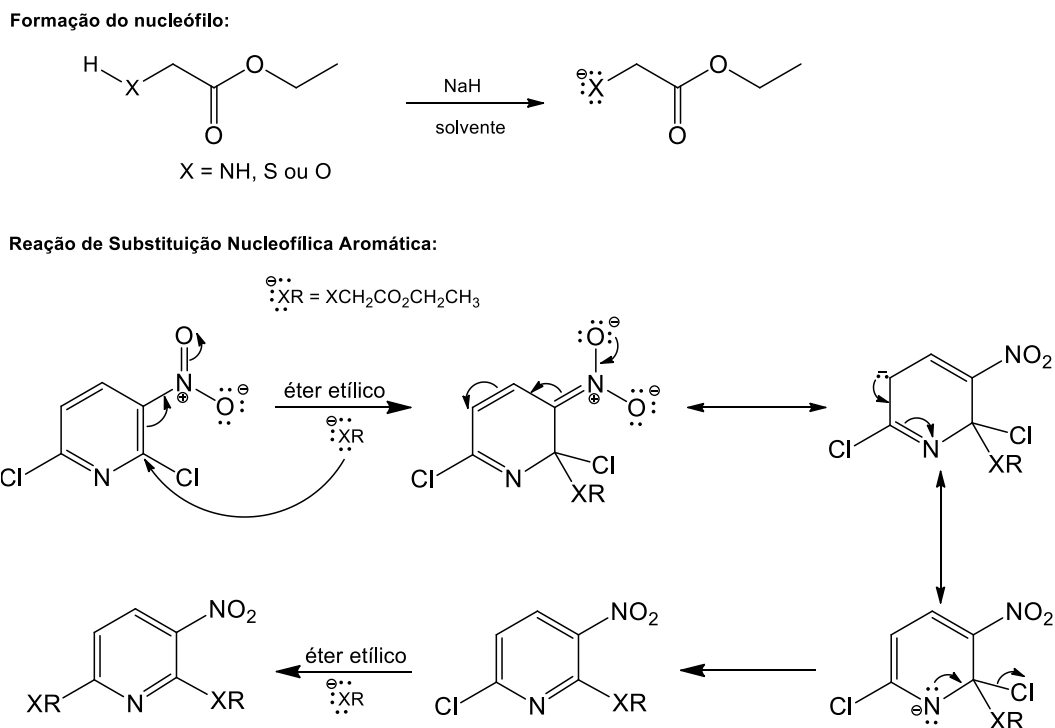
**Figura 43** - Reação de Substituição Nucleofílica Aromática



Fonte: Da autora, 2019

Estas reações são favorecidas devido ao grupo nitro, um forte eletro-receptor, orto e para em relação à posição dos grupos abandonadores, 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 (hidreto de sódio) que ficou em contato com o nucleófilo por, aproximadamente, 5–10 minutos antes da adição do substrato. Este auxiliou a captura do hidrogênio ligado ao átomo de enxofre, aumentando assim sua nucleofilicidade e permitindo que o processo reacional ocorresse com bom rendimento (Figura 44).

A partir disto, foi proposta a síntese dos derivados piridínicos utilizando os mesmos substratos utilizados por Valli e colaboradores (2011), porém, os nucleófilos foram alterados para cloridrato de glicinato de etila e glicolato de etila, respectivamente, afim de se comparar a atividade biológica dos isómeros formados.

**Figura 44** - Mecanismo de reação de S<sub>N</sub>Ar para a 2,6-dicloro-3-nitropiridina

Adaptado de: Silveira, 2016

Inicialmente foi realizado o mesmo procedimento sintético descrito por Silveira (2016) para obtenção do produto **49**, porém não foi observada a formação do produto esperado. Em uma nova tentativa de se obter o produto almejado, as metodologias 2 e 3 foram realizadas em banho de ultrassom com aquecimento. Além da substituição do agitador magnético pelo banho de ultrassom, foram alterados também, solvente, base, tempo reacional e proporção dos equivalentes estequiométricos do nucleófilo em relação ao substrato. Apesar disto, não foi observado a formação do produto **49**.

A partir destes resultados, levantou-se a hipótese de que se o nucleófilo fosse tratado reagindo-o com uma base (Figura 18) para que houvesse a transformação do cloridrato de glicinato de etila em glicinato de etila, este último purificado, poderia reagir melhor com o substrato e formar o produto esperado. Dessa forma, a reação realizada na metodologia 3, foi realizada com o glicinato de etila obtido através da reação apresentada na Figura 18. Porém, mais uma vez não houve a formação do produto esperado.

Finalmente, foi verificada a pureza do glicinato de etila. Seguindo a metodologia proposta por Armarego e Chai (2003), o cloridrato de glicinato de etila foi submetido ao processo de recristalização em etanol absoluto. Além do tratamento do nucleófilo, o solvente

foi alterado para THF anidro. Com isso, foi possível observar a formação dos produtos **46** e **49** com rendimento satisfatório.

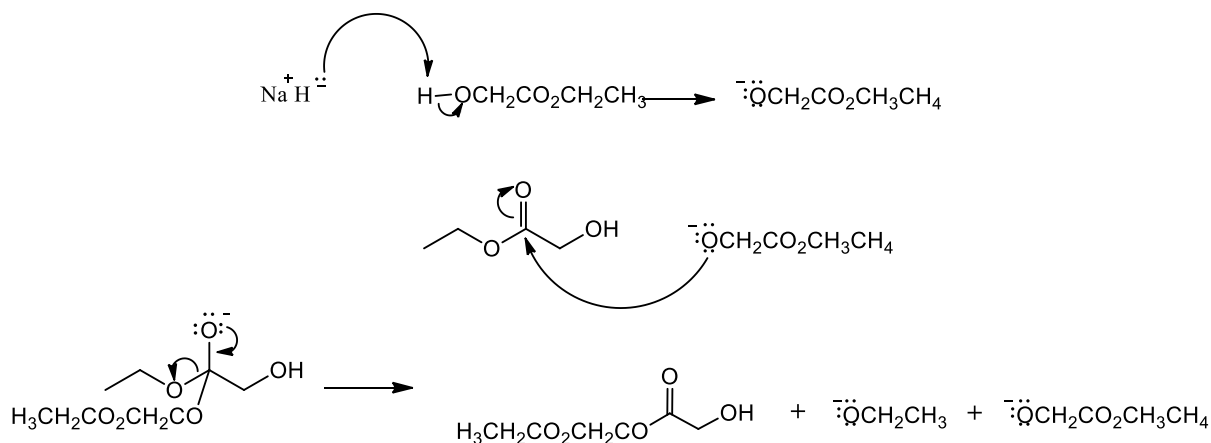
Apesar dos bons rendimentos dos produtos **46** e **49**, era interessante buscar uma nova alternativa para a realização destas sínteses que dispensasse o tratamento prévio do nucleófilo e solvente e que, principalmente, reduzisse o tempo reacional necessário para obtenção dos produtos. Dessa forma, o THF anidro foi substituído por DMF para aumentar a solubilidade do nucleófilo no meio reacional e assim favorecer seu ataque ao substrato, possibilitando a substituição do KOH por uma base mais fraca como o  $K_2CO_3$ . Nestas condições os produtos **46** e **49** foram obtidos com rendimento similar ao observado na metodologia anterior e em menor tempo reacional.

Após a otimização das condições reacionais para a formação dos produtos de interesse utilizando o cloridrato de glicinato de etila, foram realizadas as reações com o glicolato de etila como nucleófilo. Inicialmente foi realizado o procedimento experimental descrito por Silveira (2016) para a obtenção dos compostos **47** e **50**, no entanto, não foi observado a formação dos produtos esperados. Assim como foi feito para o cloridrato de glicinato de etila, na tentativa de obter os produtos desejados, foram realizadas diferentes metodologias, alterando tempo reacional, temperatura, quantidade de nucleófilo, solvente e base, porém nenhuma destas metodologias levou a um resultado satisfatório.

Assim, o glicolato de etila foi analisado por CG-EM e foi verificado que este reagente estava puro. Foi possível verificar que os produtos obtidos nas metodologias utilizando este nucleófilo, eram derivados de uma reação intermolecular que ocorria entre duas ou mais moléculas do próprio nucleófilo no momento da sua preparação com a base conforme apresentado na Figura 45.

Sabendo disto, o tempo de interação do glicolato de etila com a base foi reduzido para 5 min, para evitar a formação do etóxido responsável pela formação dos produtos indesejados. Além disto, a preparação do nucleófilo foi realizada em banho de gelo com vidraria rigorosamente seca, atmosfera inerte de nitrogênio e THF anidro. Com esses cuidados, foi possível observar a formação dos produtos **47** e **50**. Cabe ressaltar que o composto **50** apresentou atividade leishmanicida num ensaio preliminar realizado por Silveira (2016) o que despertou o interesse pelo presente trabalho.

**Figura 45** - Mecanismo proposto para a reação do glicolato de etila com a base



Fonte: Da autora, 2019

Apesar dos produtos **47** e **50** terem sido obtidos nas condições citadas anteriormente, ainda era possível observar a formação dos subprodutos indesejados. Na tentativa de evitar o uso do NaH, o qual era responsável pela formação dos produtos indesejados por ser uma base muito forte, e, ainda, evitar a utilização da atmosfera inerte de nitrogênio, foi avaliada a síntese do produto **50** utilizando DMF e carbonato de potássio em refluxo e os resultados foram satisfatórios.

Uma vez obtidos os 6 isómeros piridínicos e, a partir da habilidade adquirida de se trabalhar com os nucleófilos de enxofre, nitrogênio e oxigênio, novos substratos aromáticos que apresentavam similaridade estrutural com a 2-cloro-3-nitropiridina e com a 2,6-dicloro-3-nitropiridina foram utilizados com o intuito de ampliar a série isostérica estudada. Dessa forma a 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina, 2,4-dicloro-5-nitropirimidina, 2-cloro-5-nitropiridina e o 1-cloro-2-nitrobenzeno foram selecionados como potenciais substratos para as reações de hibridação molecular e troca isostérica subsequentes. Dessa forma foram planejados e sintetizados os produtos **51**, **52**, **53**, **54**, **55**, **56** e **57** através de reações de  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ , totalizando 13 compostos–base<sup>a</sup> para modificações estruturais.

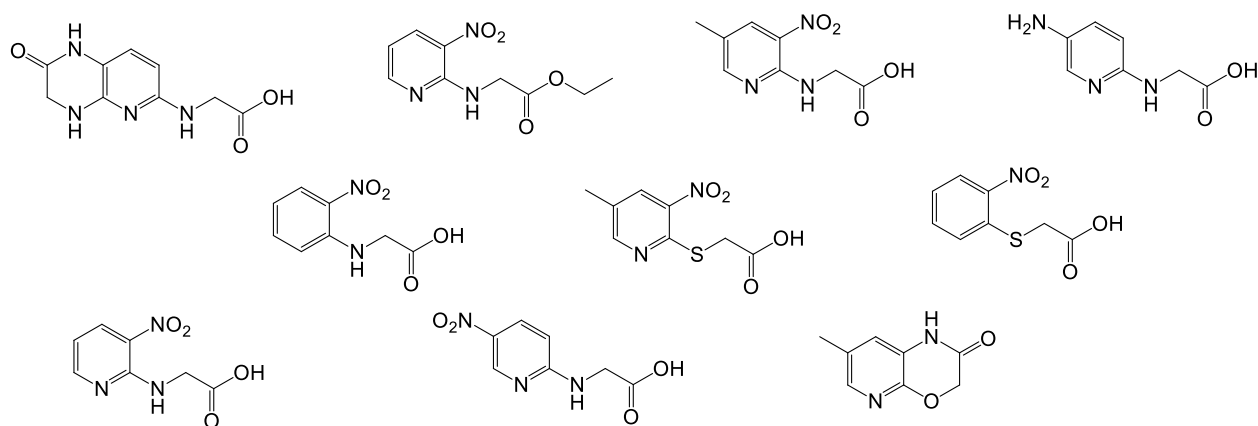
## 4.2 TRIAGEM VIRTUAL DOS DERIVADOS AROMÁTICOS A PARTIR *DOCKING* MOLECULAR

A partir dos 13 compostos–base obtidos, foram planejados mais 56 derivados aromáticos, totalizando 69 compostos (Apêndice A). Para a seleção dos novos alvos sintéticos, o trabalho foi racionalizado pelos ensaios de *docking* molecular (Apêndice B) destas moléculas

<sup>a</sup>Os derivados 2-cloro-5-nitropiridina não foram sintetizados devido a indisponibilidade do reagente.

na arginase, principal alvo das *Leishmania*, e cálculo da energia livre de ligação ( $\Delta G$ ). Os compostos com menores valores de  $\Delta G$  foram escolhidos para direcionar as próximas sínteses (Figura 46).

**Figura 46** - Os 10 compostos que apresentaram melhores resultados de energia livre de ligação ( $\Delta G$  kcal.mol<sup>-1</sup>)

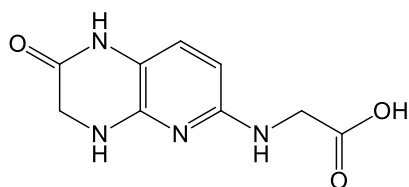


Fonte: Da autora, 2019

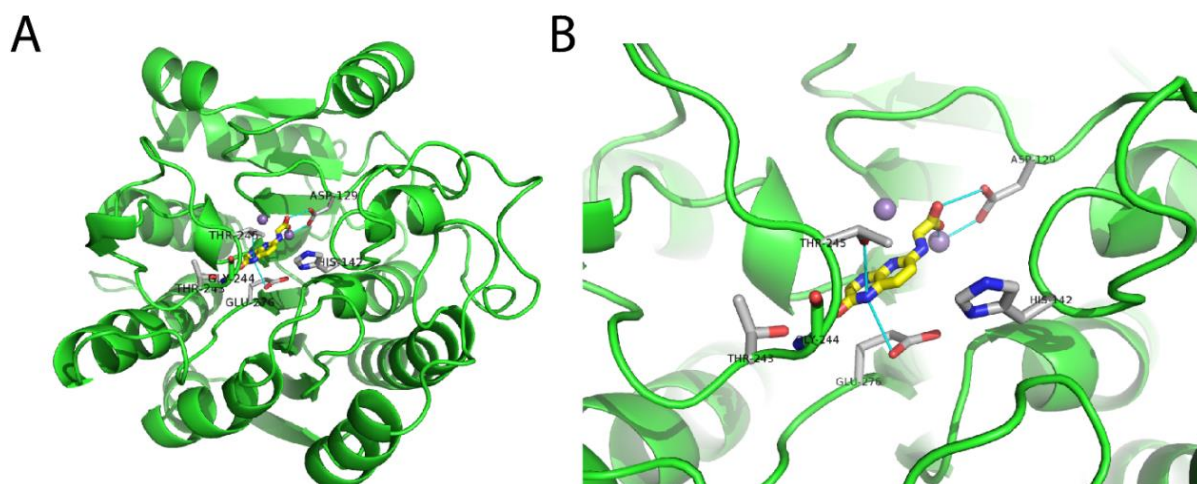
Cabe destacar que, das 69 estruturas desenhadas para realização do *docking*, nenhum composto dissustituído foi *rankeado* dentre os 10 melhores. Essa informação sugere que a segunda cadeia lateral não é importante. Ainda observando a cadeia lateral destes compostos é importante salientar que 8 deles apresentam a função ácido carboxílico terminal.

Ainda é possível observar que 7 dos 10 compostos que apresentaram os melhores resultados são derivados do cloridrato de glicinato de etila e, comparando ainda os anéis aromáticos, têm-se que 8 são derivados piridínicos. Isso sugere a importância do heteroátomo de nitrogênio na possível inibição da enzima.

O composto **68** (Figura 47) apresentou a menor energia livre de ligação ( $\Delta G = -47,5184$  kcal.mol<sup>-1</sup>) no sítio ativo da arginase de *L. amazonensis* (Figura 48). É possível observar que **68** realiza ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos THR-245, GLU-276 e ASP-129 da enzima por um dos nitrogênios do anel piperazínico e através da sua carboxila, reforçando a hipótese de que a presença desses sítios na estrutura dos potenciais candidatos à fármacos seja relevante para sua atividade.

**Figura 47** - Estrutura do composto **68**

Fonte: Da autora, 2019

**Figura 48** - Composto **68** no sítio ativo da arginase de *L. amasonensis*

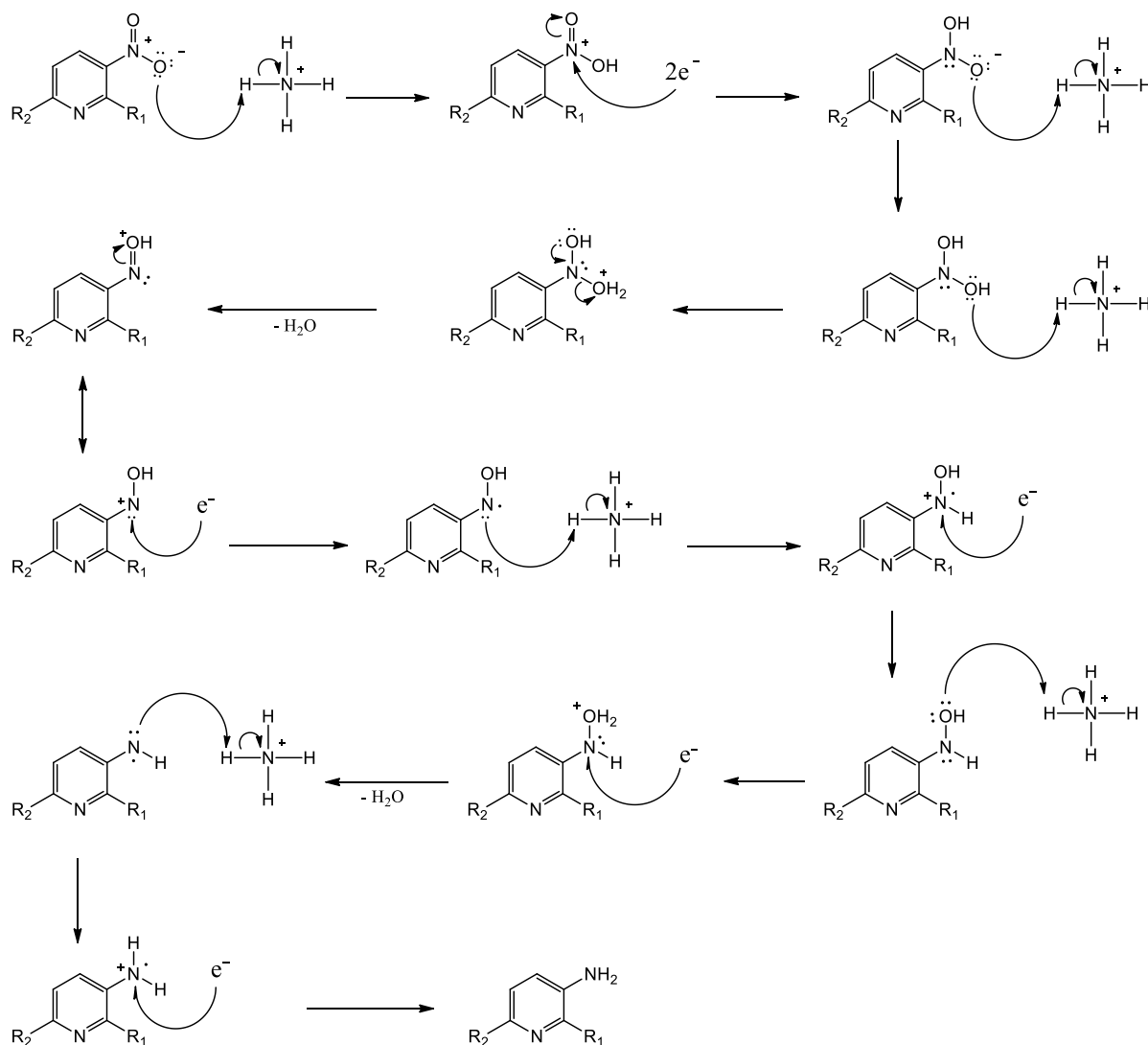
Fonte: Da autora, 2019

#### 4.3 REDUÇÃO DO GRUPO NITRO E REAÇÃO DA CICLIZAÇÃO *IN SITU*

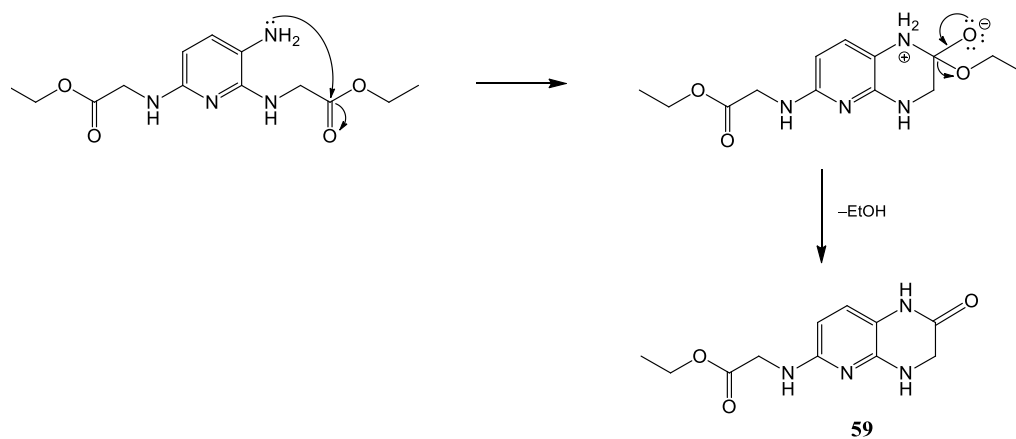
A partir dos resultados obtidos pelo *docking* molecular, decidiu-se que as próximas etapas da pesquisa seriam voltadas para a síntese dos compostos que apresentaram melhores resultados no ensaio virtual. Dessa forma, o composto **46** foi selecionado para realização da reação de redução do grupo nitro e ciclização *in situ* a fim de se obter o composto **59**. Selecionou-se ainda os compostos **45** e **47** para as reações de redução com o objetivo de comparar posteriormente os resultados biológicos dos isômeros **58**, **59** e **60**.

Para que a ciclização seja possível, o ferro metálico é oxidado à  $Fe^{2+}$  liberando dois elétrons no meio reacional, reduzindo o grupo nitro a amino. A reação é realizada em etanol/água (2:1), sob refluxo (Figura 49). Após a redução do nitro, a ciclização ocorre através do ataque do nitrogênio da amina sobre o carbono da carbonila seguida da eliminação de uma molécula de etanol (Figura 50).



**Figura 49 - Proposta de mecanismo para redução do grupo nitro**

Fonte: Da autora, 2019

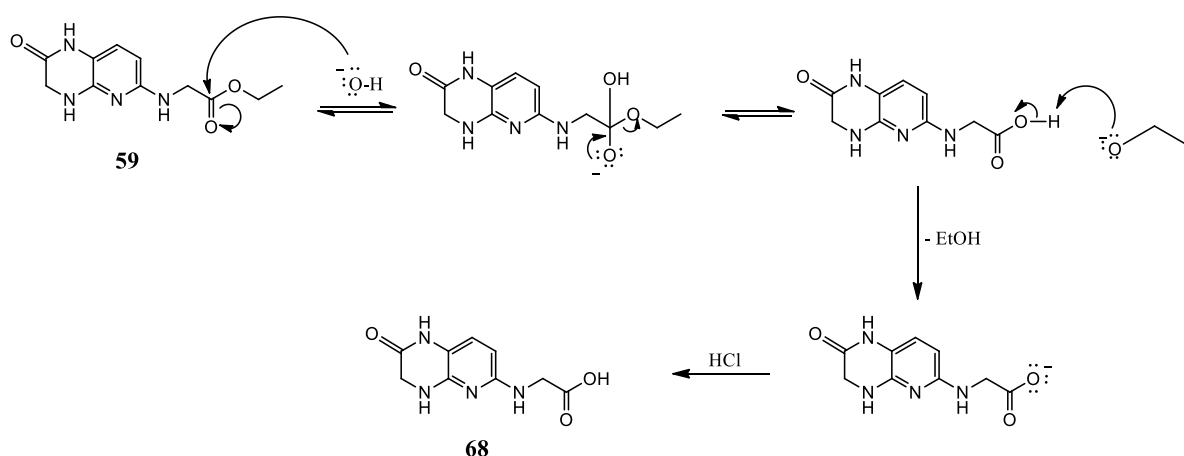
**Figura 50 - Proposta de mecanismo para obtenção do composto 59**

Fonte: Da autora, 2019

#### 4.4 HIDRÓLISE DO GRUPO ÉSTER PARA ÁCIDO CARBOXILÍCO

A reação para obtenção do produto **68** foi realizada a partir da hidrólise em meio básico (reação de saponificação) do éster da cadeia lateral do produto **59**, conforme apresentado na Figura 51.

**Figura 51** - Proposta de mecanismo para obtenção do produto **68**



Fonte: Da autora, 2019

Os compostos **45**, **46**, **47**, **48**, **49**, **50**, **58** e **60** também foram submetidos às reações de hidrólise. Os produtos obtidos (**61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67** e **69**) foram planejados com o objetivo de verificar a importância da função ácido carboxílico na cadeia lateral, como sugerido pelos resultados do *docking* molecular, e, ainda, possibilitar a comparação dos resultados biológicos entre os isómeros.

#### 4.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Os 13 compostos obtidos através das reações de  $S_NAr$  foram confirmados através da análise dos espectros obtidos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) (Apêndice C). A partir dos espectros foi possível confirmar a formação dos compostos desejados comparando-se as massas moleculares calculadas para cada composto com as massas apresentadas pelos compostos identificados pelo equipamento.

Além da identificação e confirmação da formação dos produtos, a análise dos cromatogramas permitiu ainda calcular a porcentagem de conversão do material de partida em produto através do cálculo de área dos picos (Tabela 4).

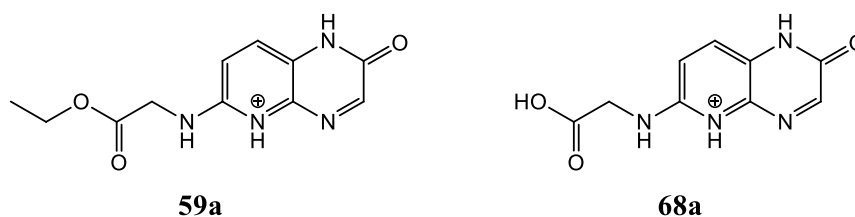
**Tabela 4** - Porcentagens de conversão para os produtos obtidos

Produto esperado	Porcentagem de conversão
<b>45</b>	94,56
<b>46*</b>	-
<b>47</b>	82,28
<b>48</b>	69,33
<b>49</b>	93,85
<b>50</b>	40,01
<b>51*</b>	-
<b>52</b>	82,88
<b>53</b>	85,81
<b>54</b>	12,0
<b>55</b>	87,83
<b>56</b>	82,92
<b>57*</b>	-

\* não foi possível determinar a porcentagem de conversão

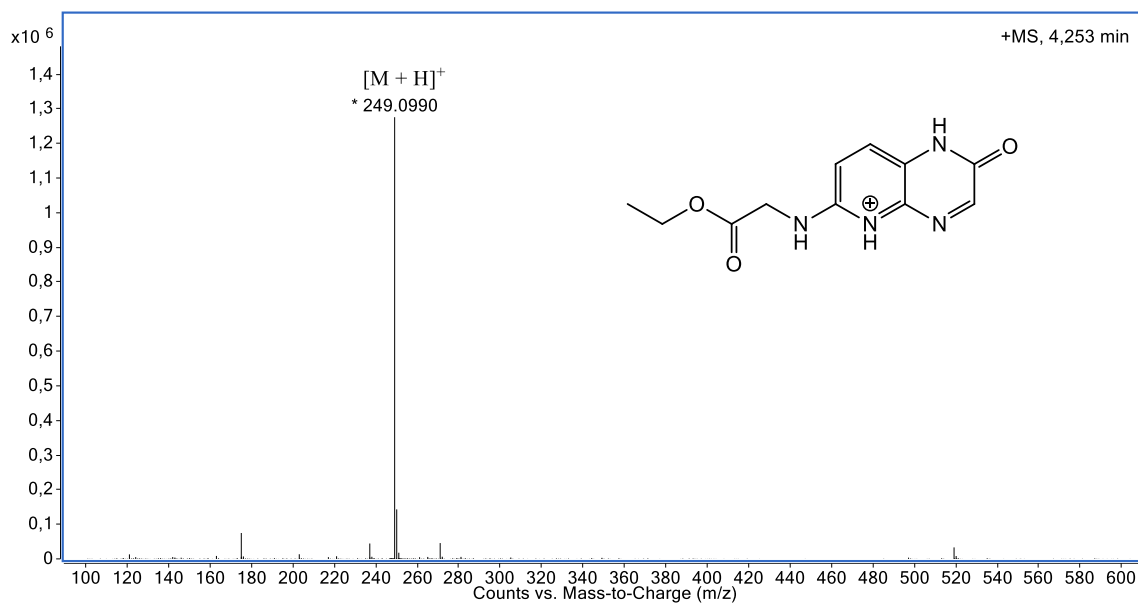
Os produtos obtidos nas reações de redução e ciclização *in situ* (**58** e **60**) e nas reações de hidrólise (**61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67** e **69**), assim como seus respectivos produtos de partida (**45**, **46**, **47**, **48**, **49** e **50**), foram confirmados através das análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifenado ao espectrômetro de massas (CLAE/EM) com ionização por electrospray (IES) no modo positivo (Apêndices D e E).

A análise dos espectros de EM-IES das amostras que acreditavam-se ser os produtos **59** (Espectro 1) e **68** (Espectro 2) permitiu observar que os compostos obtidos apresentam duas unidades de massa a menos do que o calculado teoricamente. Ou seja, os produtos obtidos **59a** e **68a** (Figura 52), não correspondem aos compostos **59** e **68**, respectivamente.

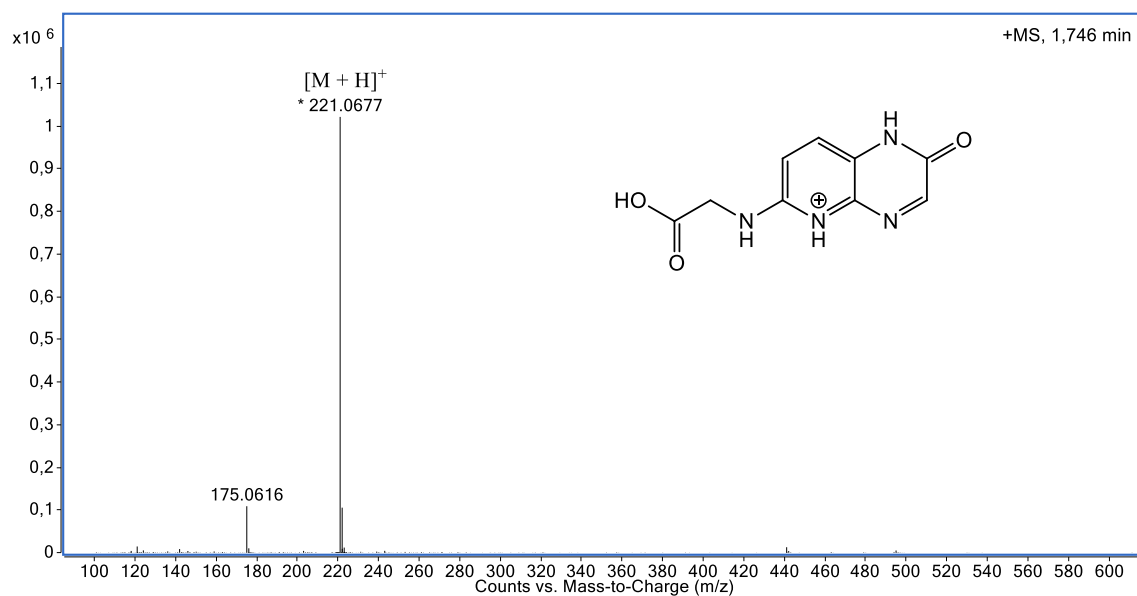
**Figura 52** - Estruturas propostas para os compostos **59a** e **68a**

Fonte: Da autora, 2019

### Espectro 1 - EM-IES-(+) alta resolução do composto **59a**



### Espectro 2 - EM-IES-(+) alta resolução do composto **68a**



No espectro de EM-IES, modo positivo, do composto **59a** (Espectro 1) é possível observar o sinal referente à molécula protonada em  $m/z$  249,0990, sendo o valor calculado para  $C_{11}H_{13}N_4O_3$ , 249,0982. Essa análise corrobora a estrutura proposta tendo em vista que o erro em ppm observado é de 3,21. De forma análoga, no espectro de EM-IES, modo positivo, do composto **68a** (Espectro 2) é possível observar o sinal referente à molécula protonada em  $m/z$  221,0677, sendo o valor calculado para  $C_9H_9N_4O_3$ , 221,0669 e o erro de 3,62 ppm.

Possivelmente, dois átomos de hidrogênio foram eliminados formando uma dupla ligação conjugada com o sistema aromático do núcleo piridínico com a carbonila. Apesar disto,

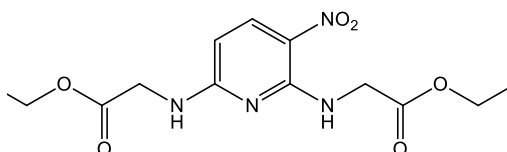
para a confirmação efetiva das estruturas dos produtos **59a** e **68a** é necessário a realização de outras análises complementares, como por exemplo,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN. Além disso, é fundamental a realização de uma investigação mais aprofundada posteriormente para a compreensão do mecanismo que levou a formação dos produtos **59a** e **68a** assim como a proposta de rotas alternativas para evitá-los, tendo em vista que o objetivo desta rota sintética é a obtenção dos produtos **59** e **68**.

Para os demais compostos sintetizados, as análises de IV (Apêndice F),  $^1\text{H}$  RMN (Apêndice G),  $^{13}\text{C}$  RMN (Apêndice H), e ponto de fusão foram realizadas para os produtos que dispunham de massa suficiente para realização das mesmas. Os resultados obtidos nestas análises e a elucidação estrutural destes compostos serão abordados a seguir.

#### 4.5.1 Elucidação estrutural dos compostos **45**, **46** e **47**

O produto **46** (Figura 53) foi selecionado como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **45**, **46** e **47**, tendo em vista que estes três isómeros apresentam alta similaridade estrutural e, conseqüentemente, apresentaram resultados muito semelhantes nas análises espectroscópicas e espectrométricas. Todos os 3 compostos foram submetidos às análises de CG/EM-IE, CLAE/EM-IES,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN e IV e todos os espectros obtidos encontram-se disponíveis nos apêndices deste trabalho.

**Figura 53** - Estrutura do composto **46**



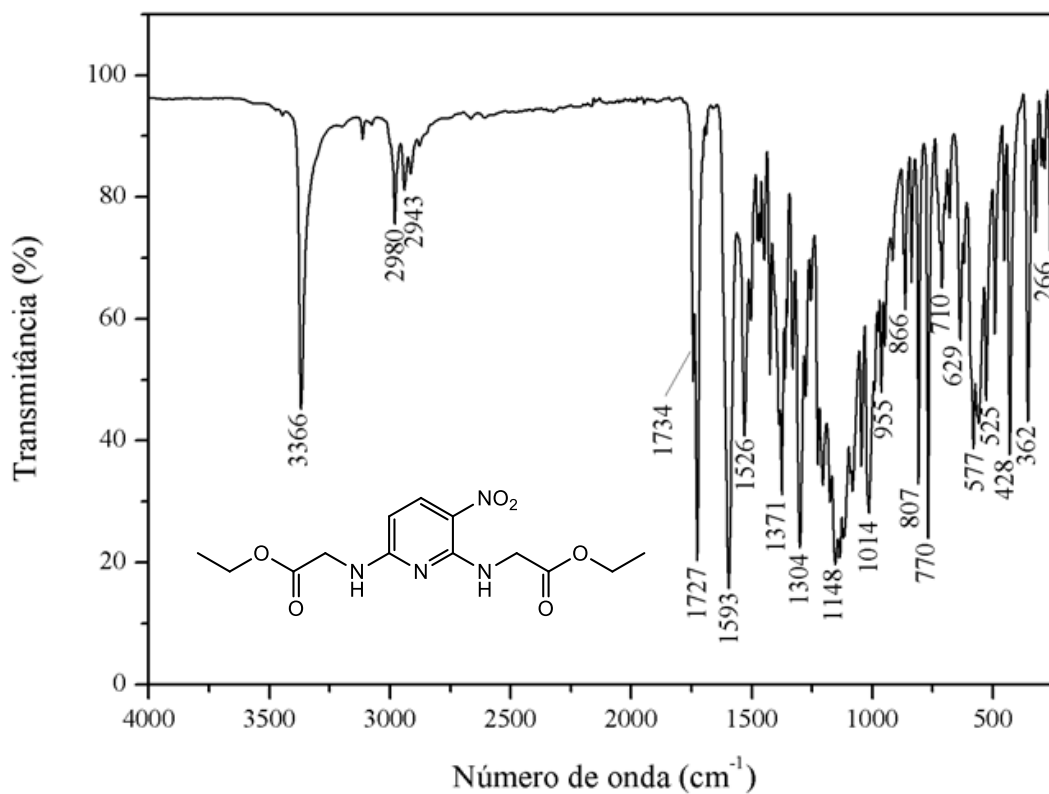
Fonte: Da autora, 2019

O composto **46** foi obtido como sólido amarelo. Apresentou  $R_f$  0,40 em CCD de sílica como fase estacionária e hexano/AcOEt (7:3) como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm). O ponto de fusão para o composto foi compreendido na faixa de 165,4 – 166,3 °C.

A análise do espectro na região do infravermelho (Espectro 3) do composto **46** permitiu identificar duas bandas referentes à  $\nu(\text{C}=\text{O})$  em 1734 e 1727  $\text{cm}^{-1}$ , região característica de carbonilas de ésteres. É possível ainda identificar  $\nu(\text{N}-\text{H})$  em 3366  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{O})$  em 1148  $\text{cm}^{-1}$ .

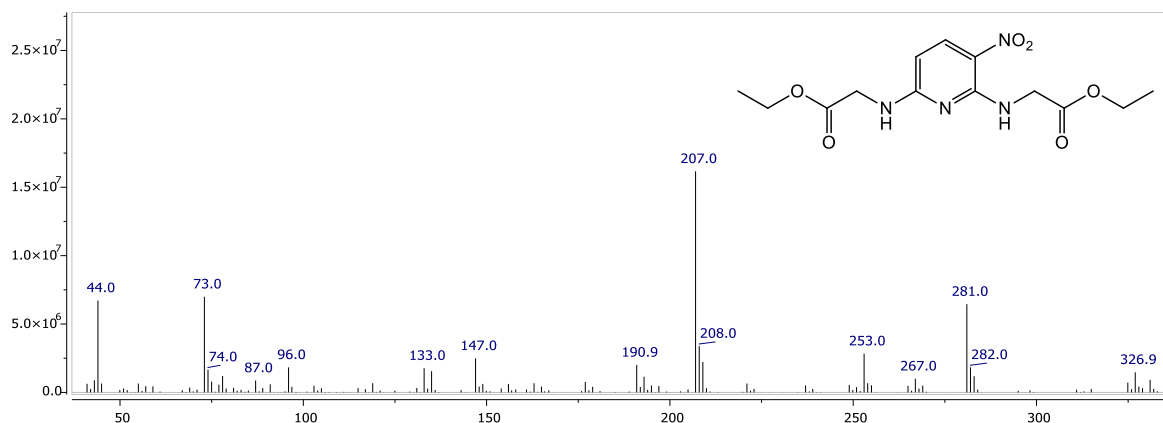
$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$  em  $1593 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$  em  $1304 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$  em  $1526 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$  em  $2980$  e  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$  em  $2949 \text{ cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

**Espectro 3** - Espectro na região do IV do composto **46**



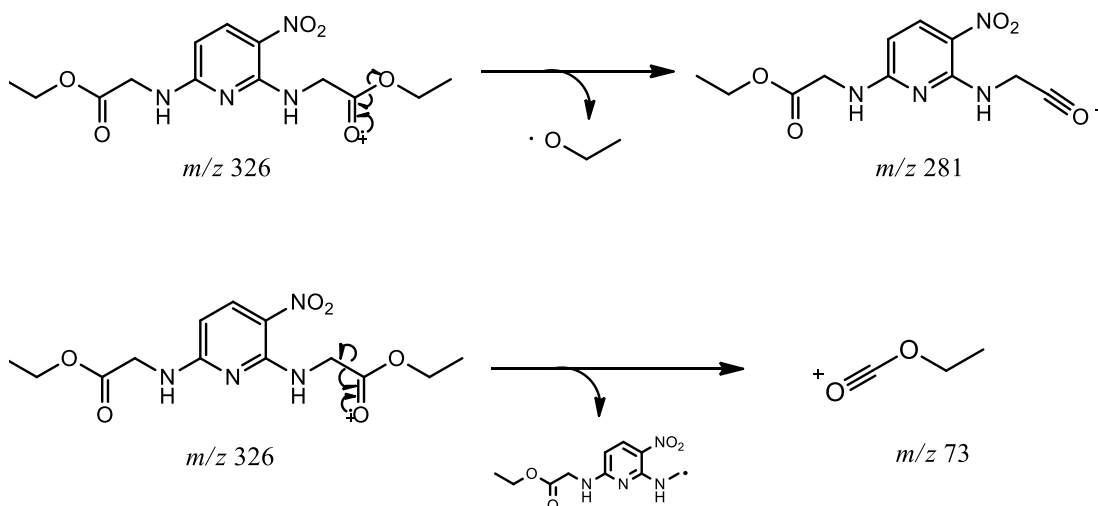
A análise do espectro de CG-IE (Espectro 4) permitiu observar o pico do íon molecular em  $m/z$  326,9 confirmando a fórmula molecular do composto **46** como  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_6$  responsável pela massa molecular de  $326,30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

**Espectro 4** - EM-IE do composto **46**



A partir dos dados obtidos por esse espectro, foram propostos dois mecanismos de fragmentação decorrentes de duas clivagens alfa carbonílicas que justificam os picos  $m/z$  281 e  $m/z$  73, conforme apresentado na Figura 54.

**Figura 54** - Proposta de fragmentação para os picos  $m/z$  281 e  $m/z$  73 do composto **46**

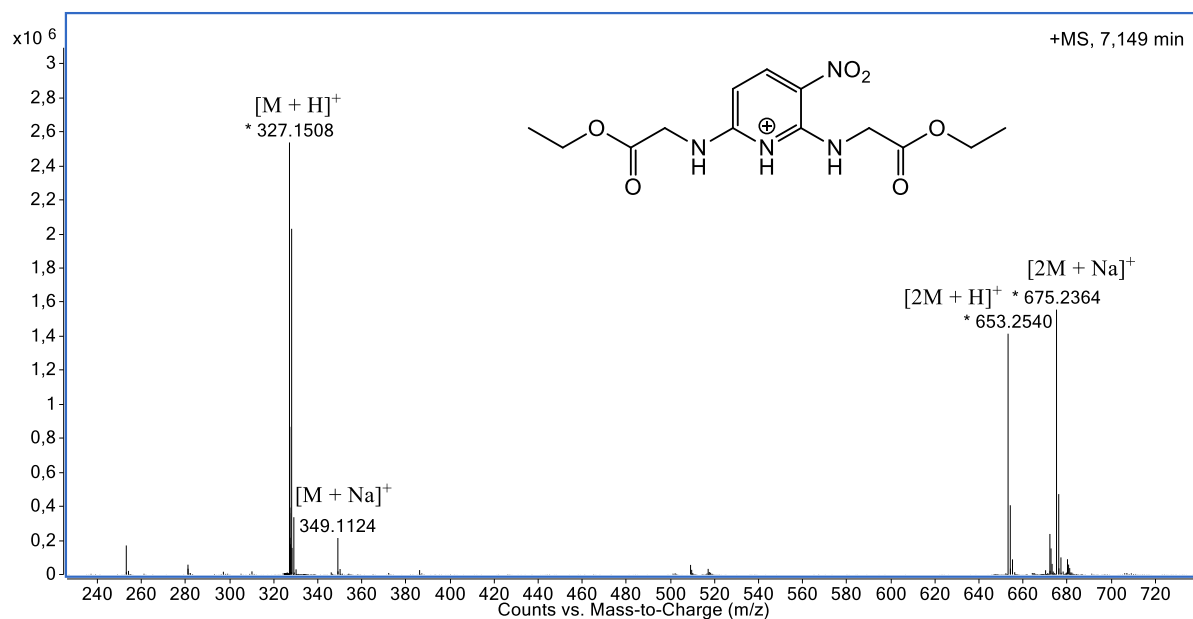


Fonte: Da autora, 2019

Apesar do espectro de EM-IE ter possibilitado a confirmação da fórmula molecular do composto **46**, o excesso de energia utilizado durante o processo de IE leva a uma fragmentação significativa da amostra, formando picos mais difíceis de serem justificados (PAVIA et al., 2010). Além disso, o fato dos espectros de EM-IE apresentarem baixa resolução pode interferir na confiabilidade dos dados extraídos dos mesmos, tornando necessária a realização de outras análises para confirmação da formação do produto esperado.

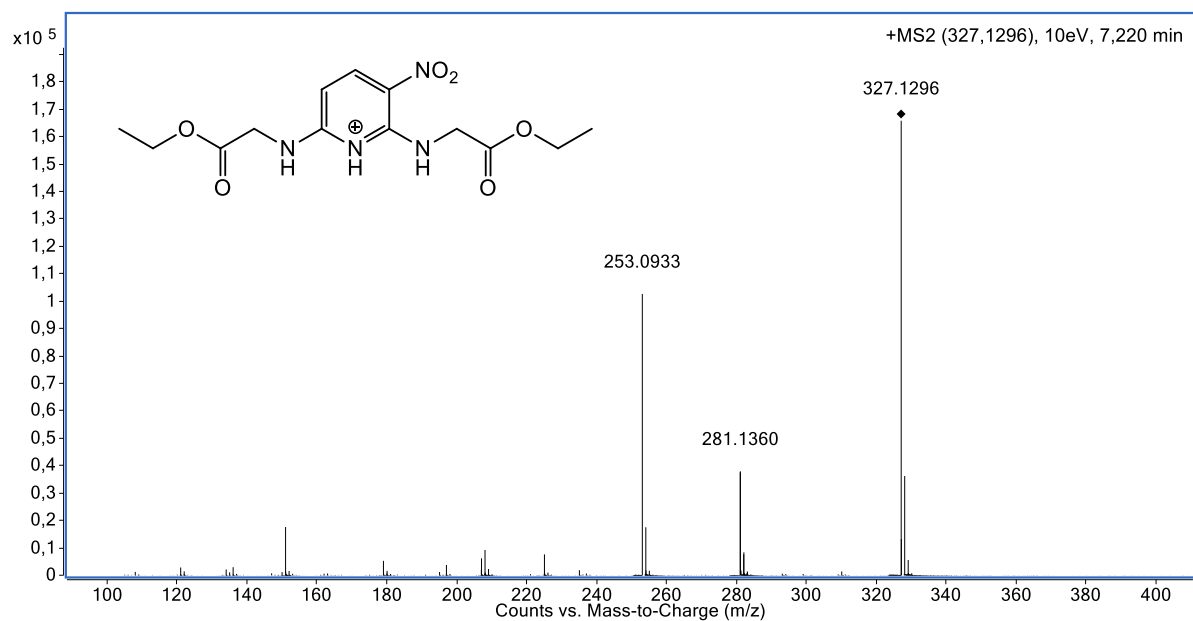
Dessa forma, realizou-se a análise de CLAE/EM-IES do composto **46**. Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $C_{13}H_{18}N_4O_6$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à sete. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  327,1508, sendo o valor calculado  $C_{13}H_{19}N_4O_6$ , 327,1299 (Espectro 5). Também foi possível observar a formação da molécula cationizada com sódio em  $m/z$  349,1124 além dos adutos  $[2M+H]^+$  em  $m/z$  653,2540 e  $[2M + Na]^+$  em  $m/z$  675,2364.

### Espectro 5 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 46

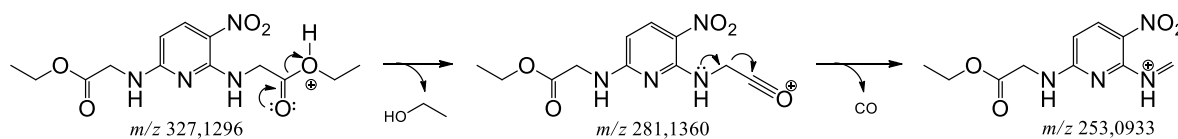


A partir do espectro de EM-EM-IES do composto 46 (Espectro 6) foram propostos dois mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  281,1360 e  $m/z$  253,0933, conforme apresentado na Figura 55.

### Espectro 6 - EM-EM-IES-(+) do composto 46

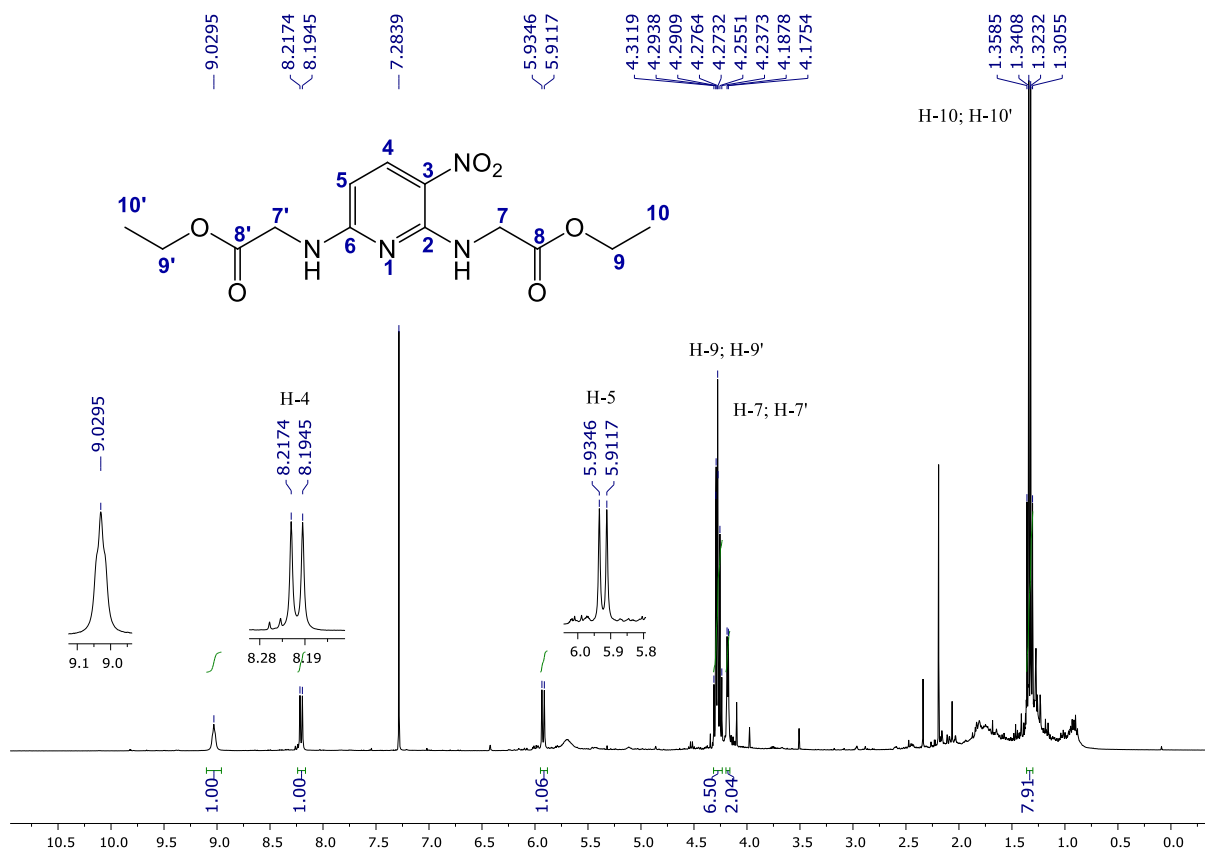


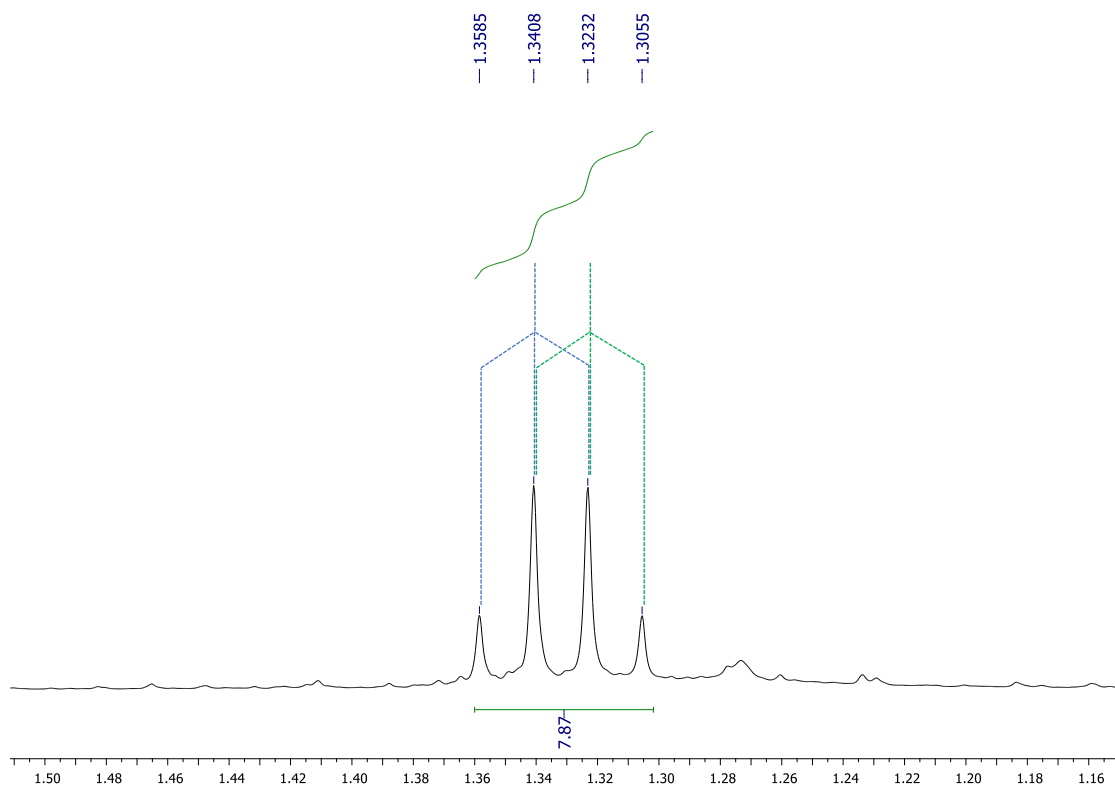
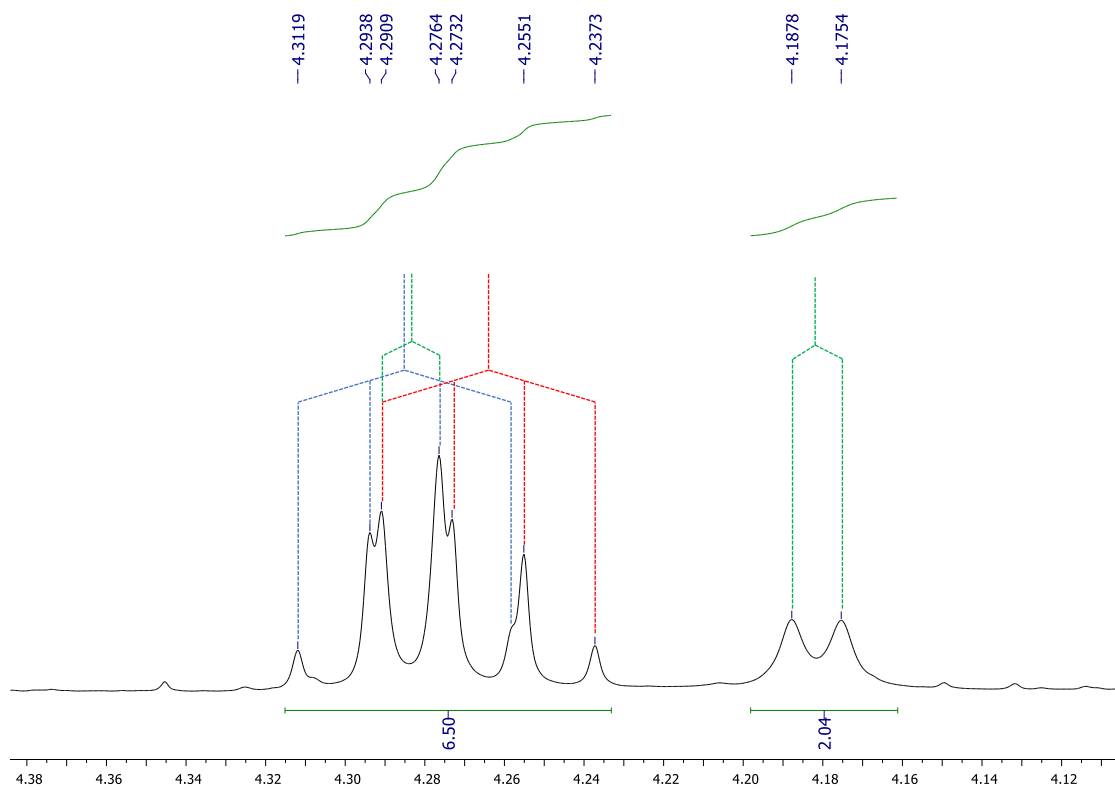


**Figura 55 - Proposta de fragmentação para o composto 46**

Fonte: Da autora, 2019

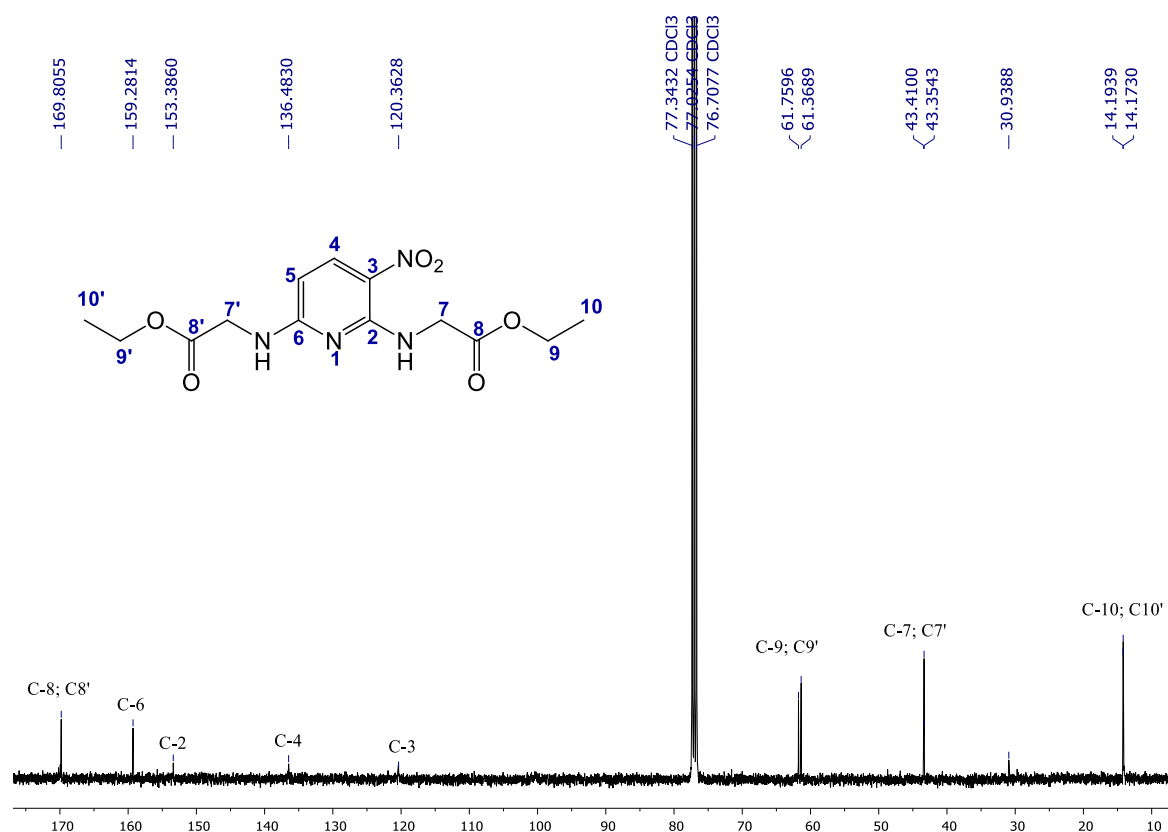
As análises dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  foram fundamentais para elucidação estrutural do produto obtido e confirmação da obtenção da nitropiridina dissustituída. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 7) foi possível observar dois tripletos sobrepostos em  $\delta$  1,32 e 1,34 correspondentes aos hidrogênios H-10 e H-10' (6H,  $J = 7,08$  Hz) (Espectro 8), dois dupletos (4H,  $J = 4,96$  Hz) e dois quadrupletos (4H,  $J = 7,12$  Hz) sobrepostos na região próxima à  $\delta$  4,25 (Espectro 9) referentes aos hidrogênios H-9, H-9', H-7 e H-7', dois dupletos referentes aos hidrogênios aromáticos H-4 e H-5 em 8,21 (1H,  $J = 9,16$  Hz) e 5,92 ppm (1H,  $J = 9,16$  Hz), respectivamente.

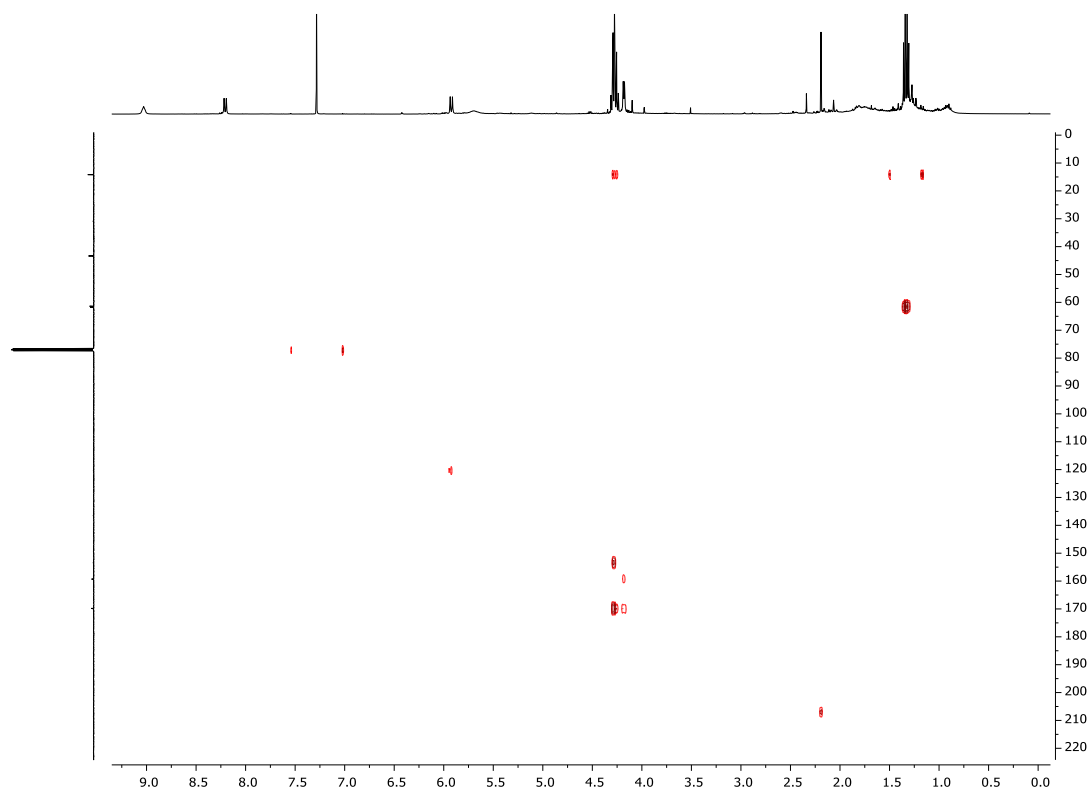
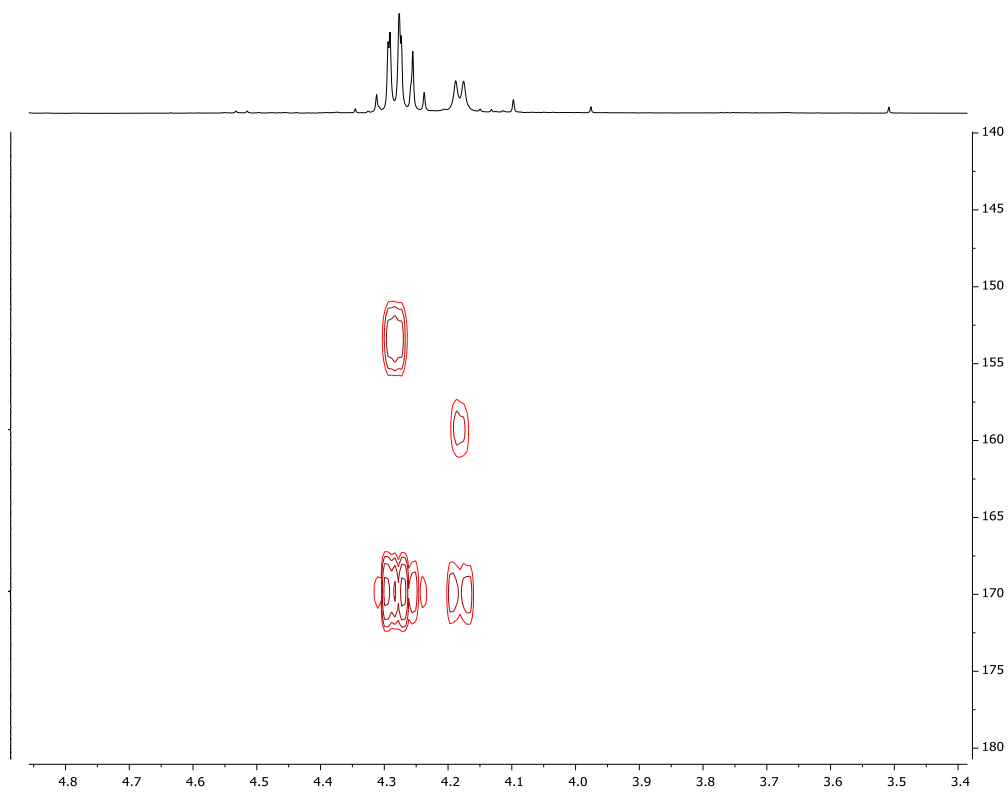
**Espectro 7 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 46 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

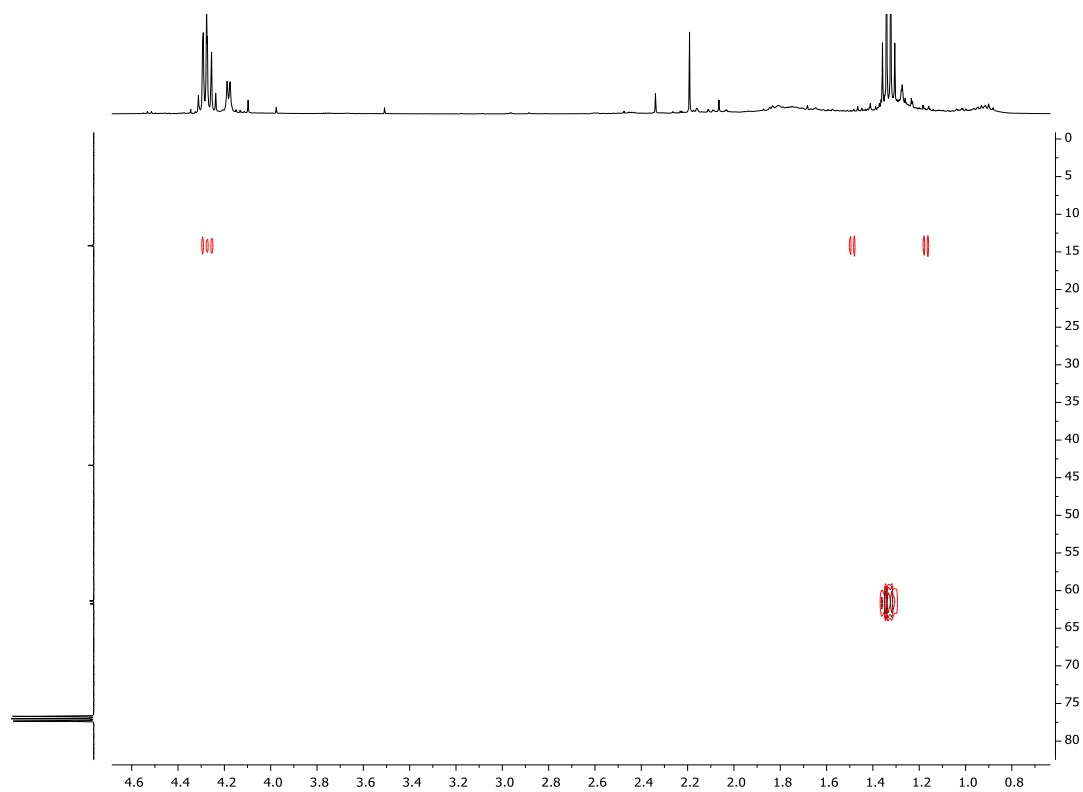
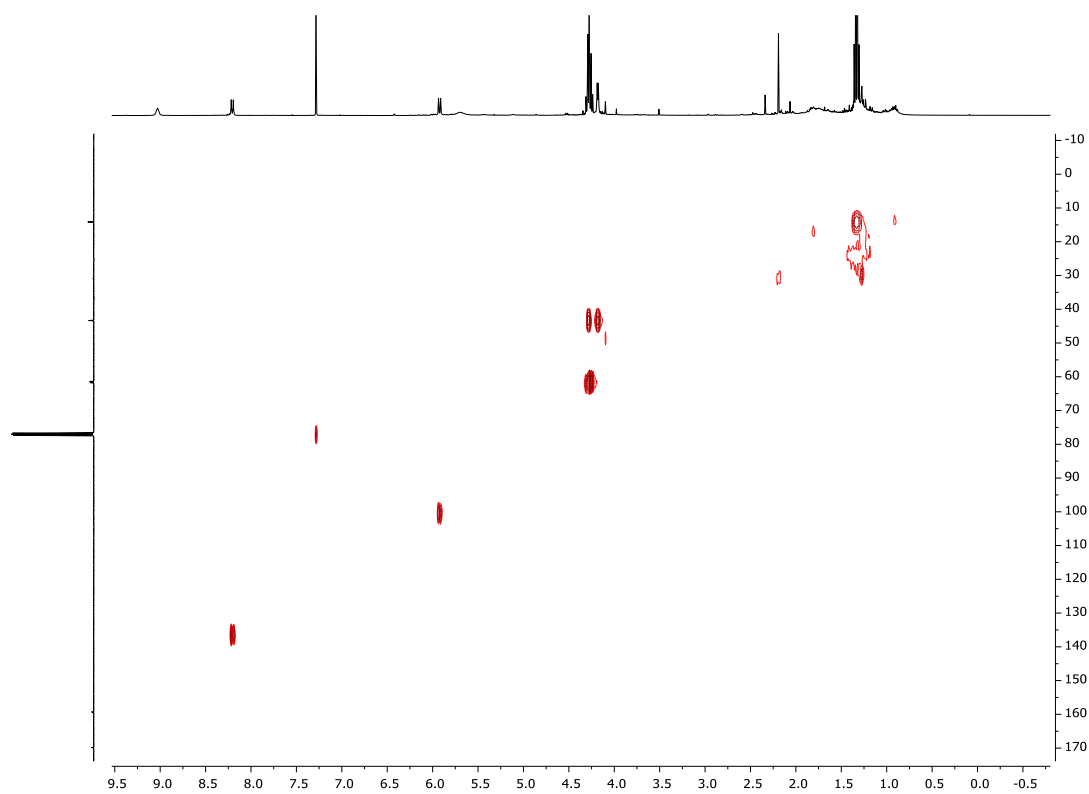
**Espectro 8** - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **46** ( $\delta$  1,16-1,50; 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**Espectro 9** - Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **46** ( $\delta$  4,12-4,38; 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

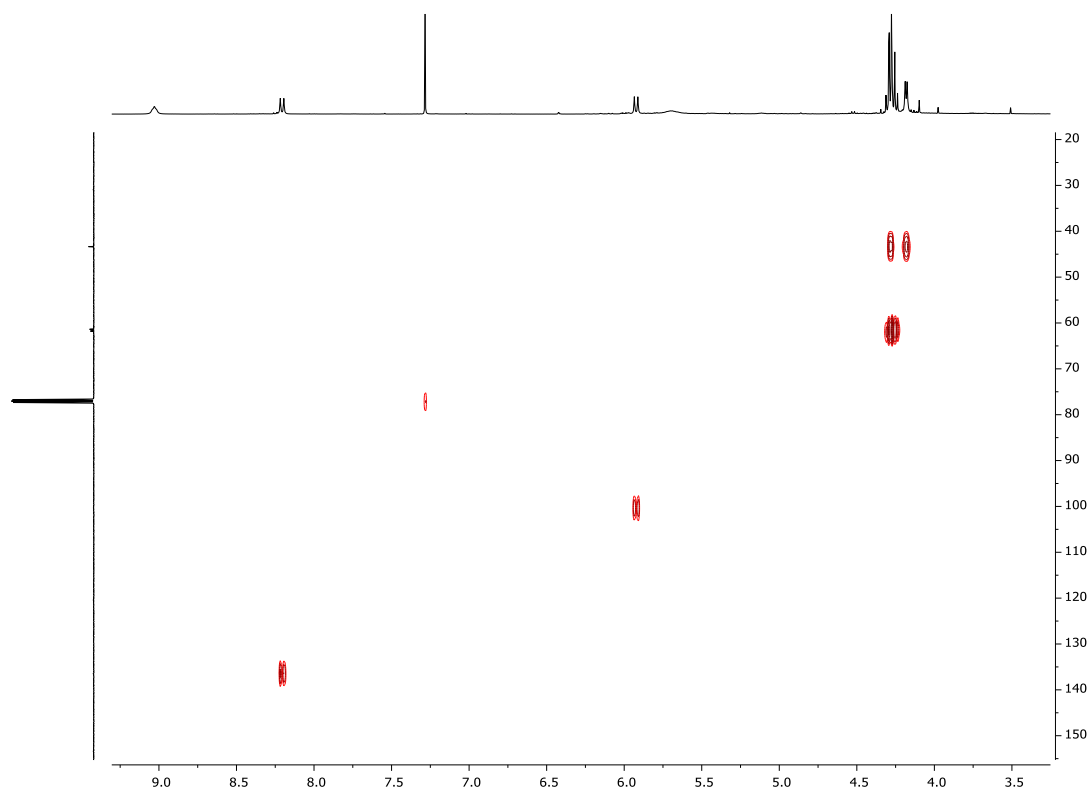
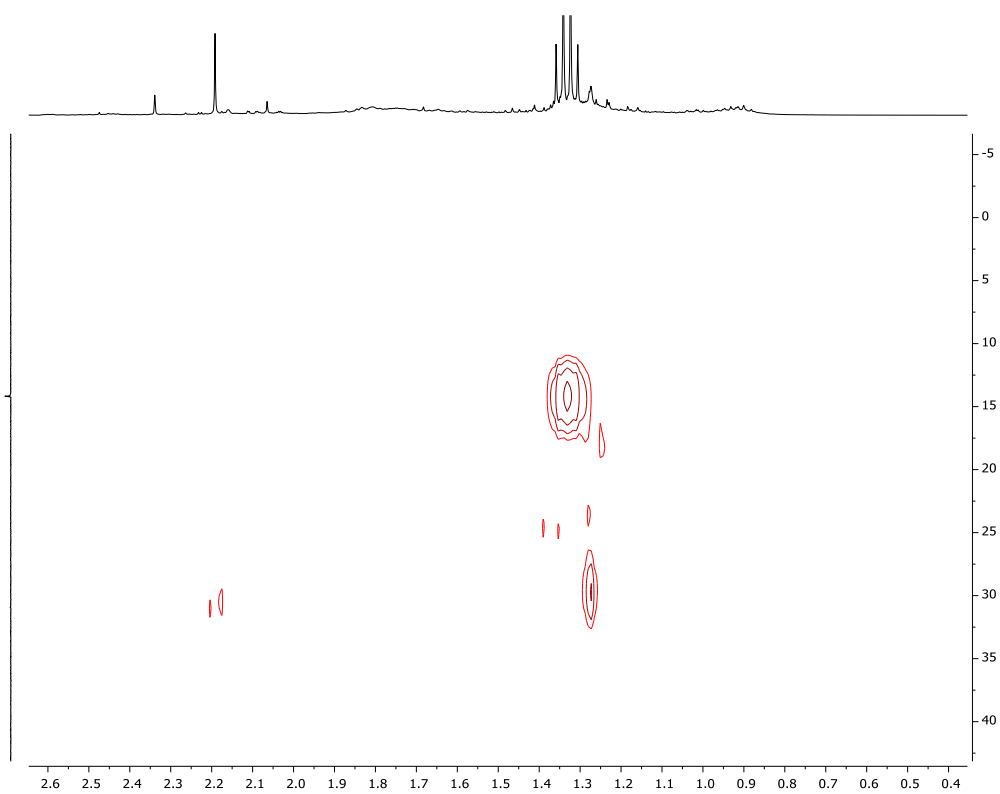
A análise do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 9) apresentou quatro sinais quaternários sendo um característico de carbonila de éster ( $\delta$  169,80) referente aos carbonos C-8 e C-8' e três referentes aos carbonos do anel piridínico C-2, C-3 e C-6 ( $\delta$  153,39; 120,36 e 159,28). Foi observada ainda a presença de quatro metilenos (C-7, C-7', C-9 e C-9') em 43,35, 43,41, 61,37 e 61,76 ppm e duas metilas (C-10 e C-10') em  $\delta$  14,17 e 14,19, característicos da cadeia linear do glicinato de etila, confirmando a formação do produto dissustituído. As atribuições dos carbonos estão descritas na Tabela 5 e foram baseadas nas correlações observadas nos mapas de contorno de HMQC (Espectros 11-13) e HMBC (Espectros 14–17 e Figura 56).

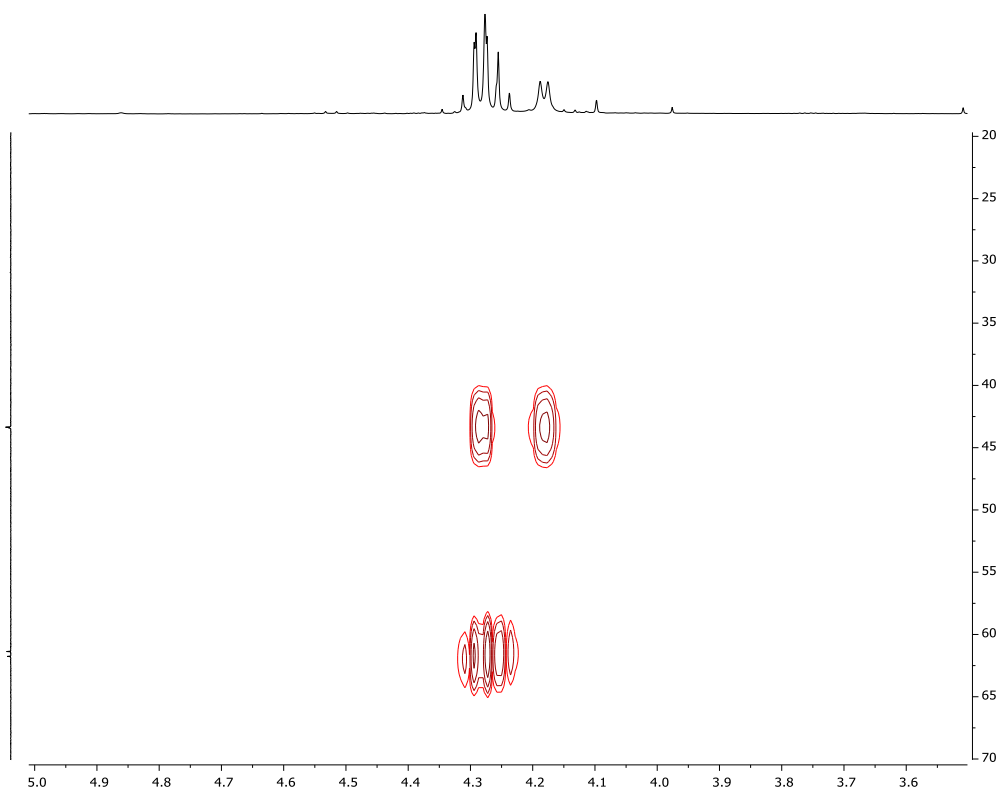
**Espectro 10** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **46** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Espectro 11 - Mapa de contorno HMQC de **46** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)****Espectro 12 - Ampliação do mapa de contorno HMQC de **46** ( $\delta$  3,4-4,8; 400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)**

**Espectro 13** - Ampliação do mapa de contorno HMQC de **46** ( $\delta$  0,8–4,6; 400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)**Espectro 14** - Mapa de contorno HMBC de **46** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Espectro 15** - Ampliação do mapa de contorno HMBC de **46** ( $\delta$  3,5–9,0; 400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )**Espectro 16** - Ampliação do mapa de contorno HMBC de **46** ( $\delta$  0,4–2,6; 400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

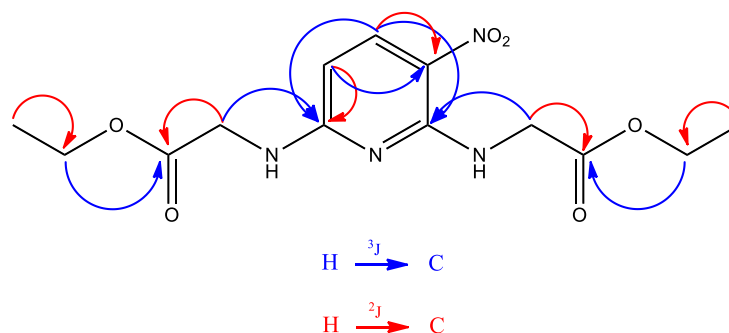
**Espectro 17** - Ampliação do mapa de contorno HMBC de **46** ( $\delta$  3,6–5,0; 400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)**Tabela 5** - Dados de RMN de **46** (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)

Posição	$\delta_C^a$	HMQC $\delta_H^a$ (m <sup>b</sup> )	HMBC
2	153,39	-	H-4; H-7
3	120,36	-	H-4; H-5
4	136,48	8,21(d)	-
5	100,0	5,92 (d)	-
6	159,28	-	H-4; H-5; H-7'
7	43,35	4,30 (d)	-
7'	43,31	4,18 (d)	-
8	169,80	-	H-7; H-9
8'	169,80	-	H-7'; H-9'
9	61,37	4,30 (q)	H-10
9'	61,76	4,30 (q)	H-10'
10	14,17	1,32 (t)	-
10'	14,19	1,34 (t)	-

<sup>a</sup> deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup> multiplicidade

**Figura 56** - Correlações H-C observadas no mapa de contorno HMBC de **46**

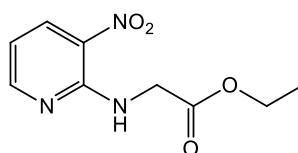


Fonte: Da autora, 2019

#### 4.5.2 Elucidação estrutural dos compostos **48**, **49** e **50**

O produto **49** (Figura 57) foi escolhido como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **48**, **49** e **50**. Todos os espectros obtidos para os 3 compostos encontram-se nos apêndices deste trabalho.

**Figura 57** - Estrutura do composto **49**



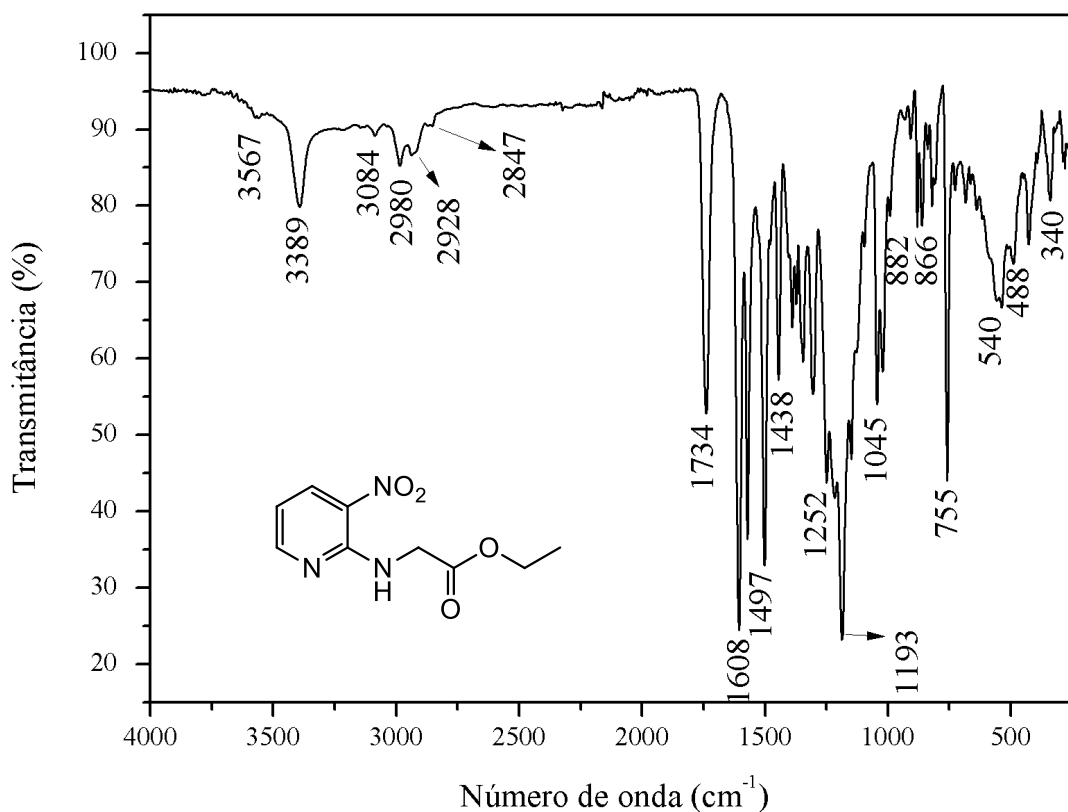
Fonte: Da autora, 2019

O composto **49** foi obtido como óleo amarelo e apresentou  $R_f$  0,70 em CCD de sílica como fase estacionária e hexano/AcOEt, 7:3 como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm).

A análise do espectro na região do infravermelho do composto **49** (Espectro 18) permitiu identificar a banda referente à  $\nu(\text{C}=\text{O})$  em  $1734\text{cm}^{-1}$ , região característica de carbonilas de ésteres. É possível ainda identificar  $\nu(\text{C}-\text{O})$  em  $1193\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$  em  $1497\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{N}-\text{H})$  em  $3389\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}-\text{N})$  em  $1193\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$  em  $1608\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}-\text{H})$  em 2928 e  $2980\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}-\text{H})$  em  $3084\text{cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

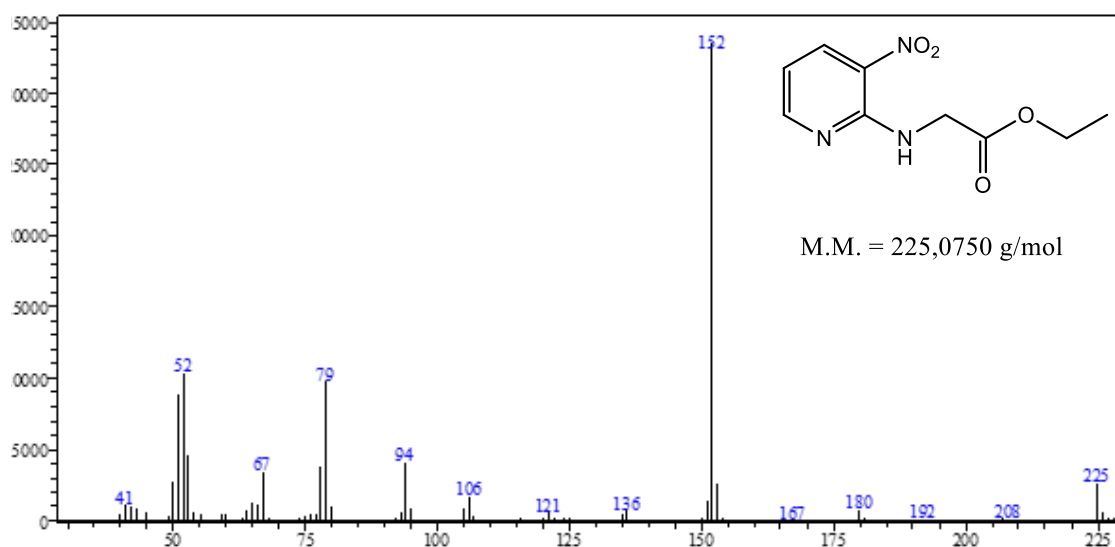


### Espectro 18 - Espectro na região do IV do composto 49



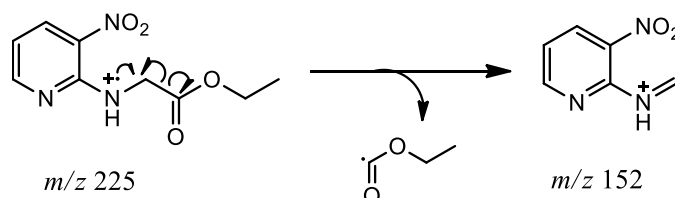
A análise do espectro de CG-IE (Espectro 19) permitiu observar o pico do íon molecular em  $m/z$  225,0 confirmando a fórmula molecular do composto **49** como  $C_9H_{11}N_3O_4$  responsável pela massa molecular de 225,1  $g \cdot mol^{-1}$ .

### Espectro 19 - Espectro de EM-IE do composto 49



Analisando o Espectro 19 é possível observar que  $m/z$  152 corresponde ao pico base do espectro, ou seja, é a fragmentação de maior intensidade observada. Para justificar a formação deste íon é proposto o mecanismo de fragmentação apresentado na Figura 58.

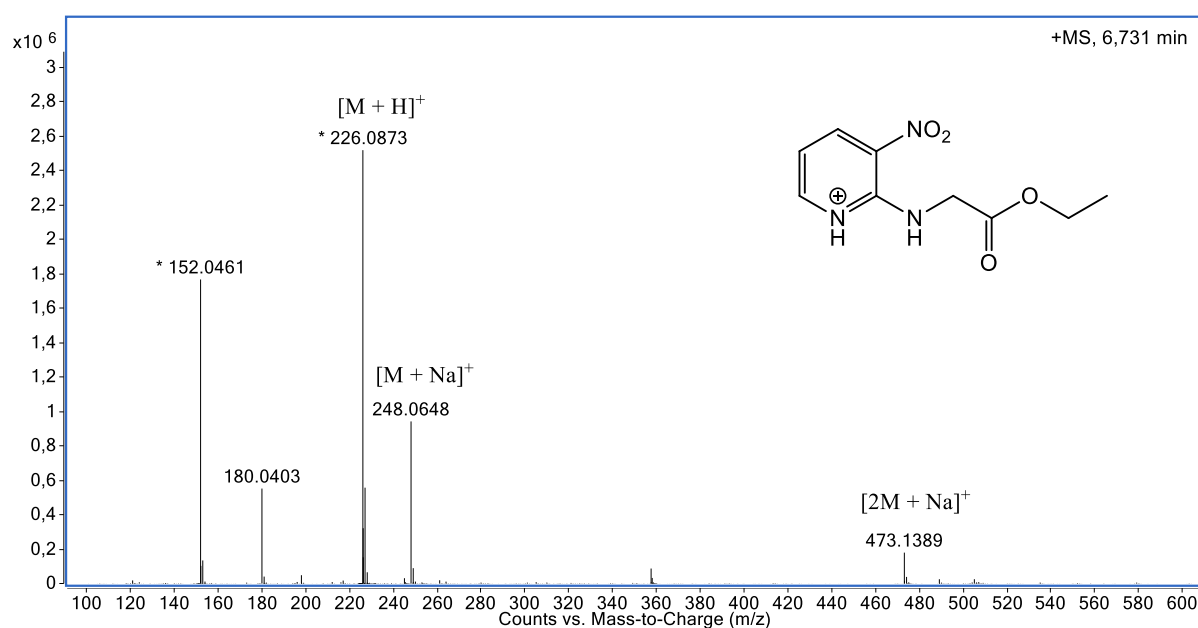
**Figura 58** - Proposta de fragmentação para o pico  $m/z$  152 do composto **49**



Fonte: Da autora, 2019

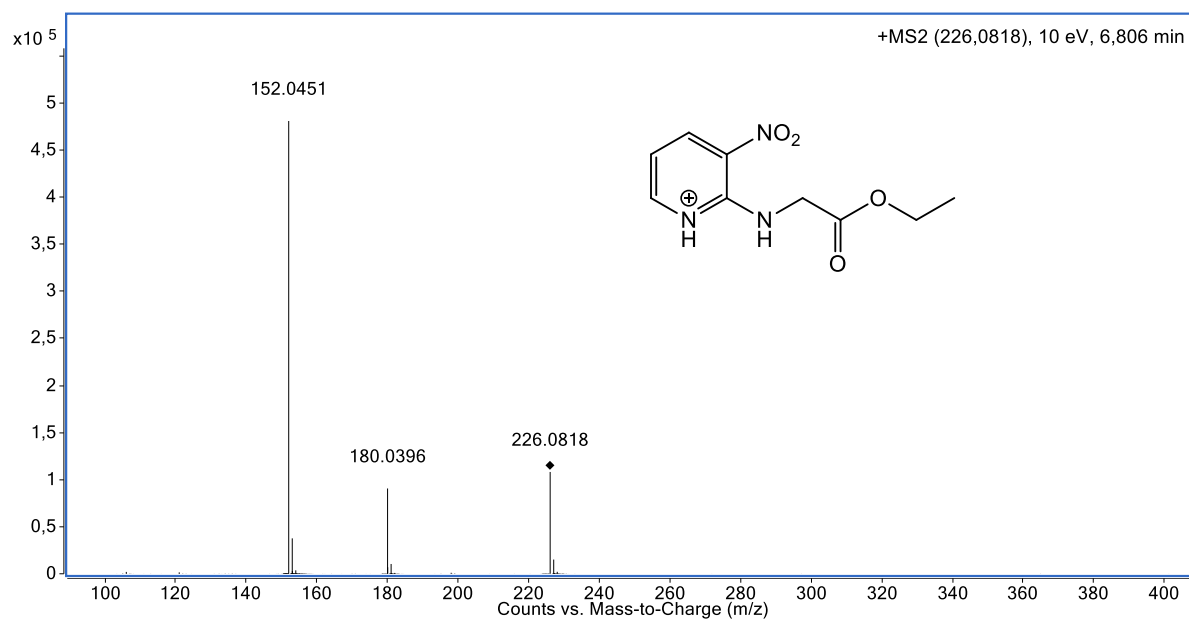
Para confirmar a massa e a fórmula molecular do composto **49** foi realizada a CLAE/EM-IES. Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $C_9H_{11}N_3O_4$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  226,0873, sendo o valor calculado para  $C_9H_{12}N_3O_4$ , 226,0822 (Espectro 20). Também foi possível observar a formação da molécula cationizada com sódio em  $m/z$  248,0648 e  $[2M + Na]^+$  em  $m/z$  473,1389.

**Espectro 20** - EM-IES-(+) alta resolução do composto **49**

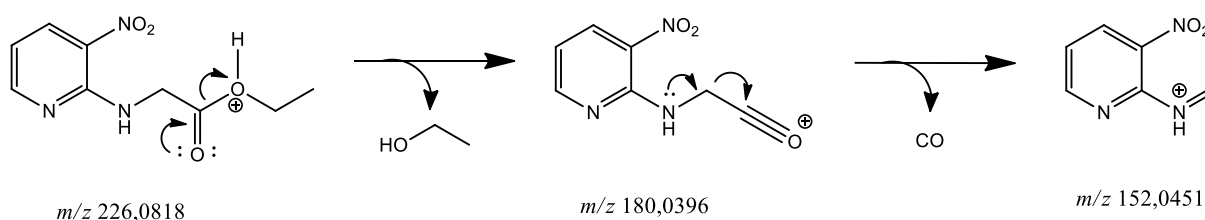


A partir do espectro de EM-EM-IES do composto **49** (Espectro 21) foram propostos dois mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  180,0396 e  $m/z$  152,0451, conforme apresentado na Figura 59.

**Espectro 21 - EM-EM-IES-(+) do composto 49**



**Figura 59 - Proposta de fragmentação para o composto 49**



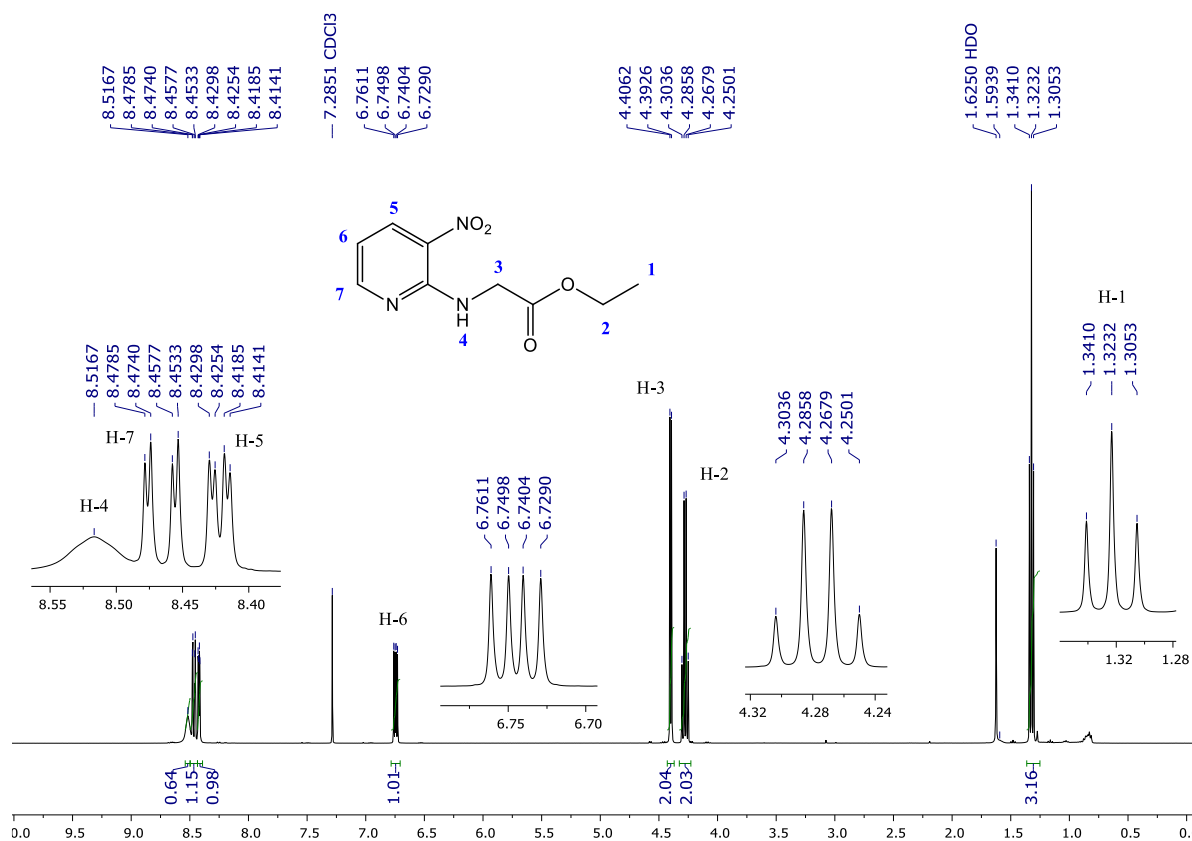
Fonte: Da autora, 2019

É interessante ressaltar que tanto na fragmentação por IE quanto na fragmentação por IES o fragmento de  $m/z$  152 corresponde ao pico base do espectro. Pode-se justificar esse fenômeno devido à estabilização da carga possível na molécula através da ressonância com o núcleo piridínico.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 22) do composto **49** permitiu caracterizar o núcleo piridínico dissubstituído através da presença de três duplos dupletos em  $\delta$  8,42, 6,75 e 8,47, atribuídos a H-5 (1H,  $J = 4,5; 1,8$  Hz), a H-6 (1H,  $J = 8,3; 4,5$  Hz) e a H-7 (1H,  $J = 8,3; 1,8$  Hz), respectivamente. A cadeia lateral referente ao glicinato de etila foi confirmada pela

presença de um duplete em  $\delta$  4,40, atribuído a H-3 (2H,  $J = 5,5$  Hz), um quadrupeto em  $\delta$  4,28 (H-2, 2H,  $J = 7,1$  Hz) e um triplete em  $\delta$  1,32 (H-1, 3H,  $J = 7,1$  Hz). É possível observar ainda um sinal em  $\delta$  8,52 (s, 1H) que pode ser atribuído ao hidrogênio ligado ao nitrogênio, H-4.

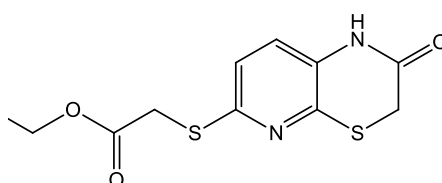
**Espectro 22** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **49** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



### 4.5.3 Elucidação estrutural dos compostos **58**, **59a** e **60**

O produto **58** (Figura 60) foi escolhido como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **58**, **59a** e **60**. Todos os espectros obtidos para estes compostos encontram-se nos apêndices deste trabalho.

**Figura 60** - Estrutura do composto **58**

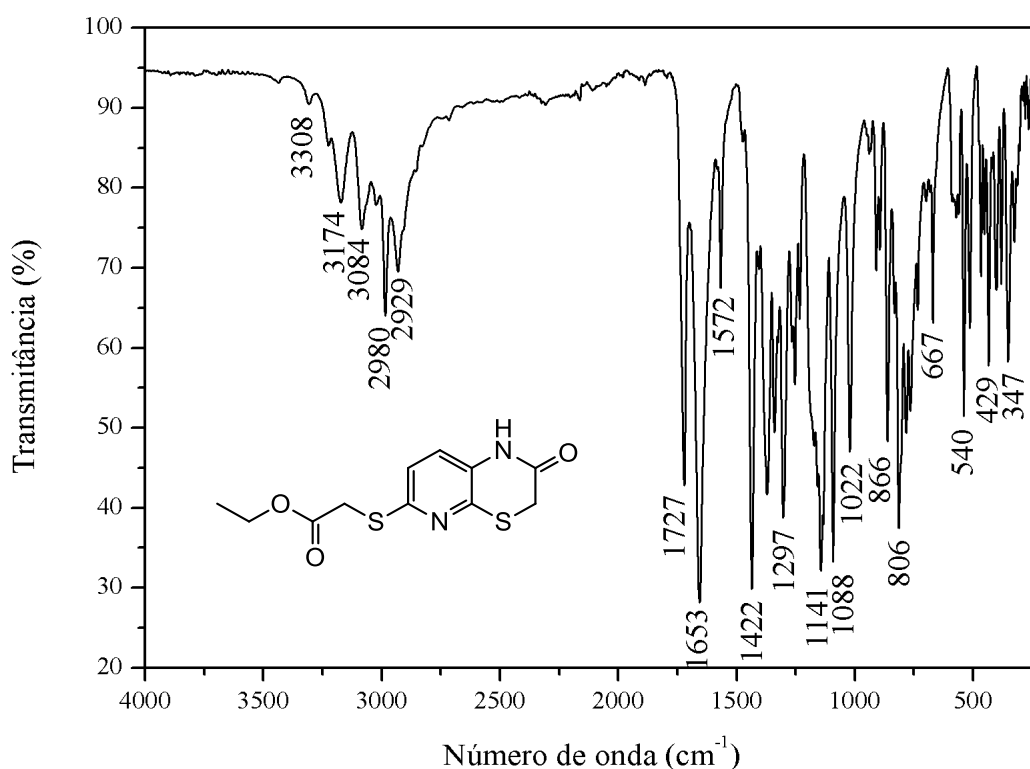


Fonte: Da autora, 2019

O composto **58** foi obtido como sólido castanho e apresentou  $R_f$  0,70 em CCD de sílica como fase estacionária e hexano/AcOEt (1:9) como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm). O ponto de fusão para o composto foi compreendido na faixa de 156,6 – 157,7 °C.

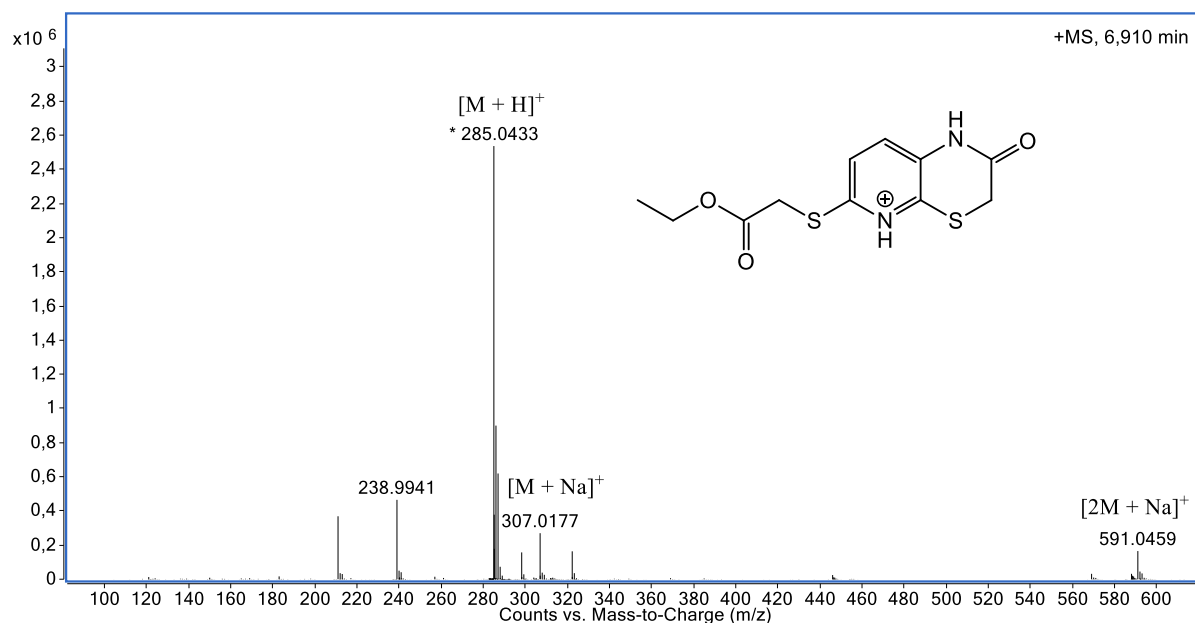
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **58** (Espectro 23) permitiu identificar duas bandas referentes à  $\nu(\text{C}=\text{O})$ , sendo uma em  $1653\text{ cm}^{-1}$ , região característica de carbonilas de amidas, e outra em  $1727\text{ cm}^{-1}$ , região característica de carbonilas de ésteres. É possível ainda identificar  $\nu(\text{N-H})$  em  $3308\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})$  em  $2929$  e  $2980\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}})$  em  $3084\text{ cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

**Espectro 23** - Espectro na região do IV do composto **58**



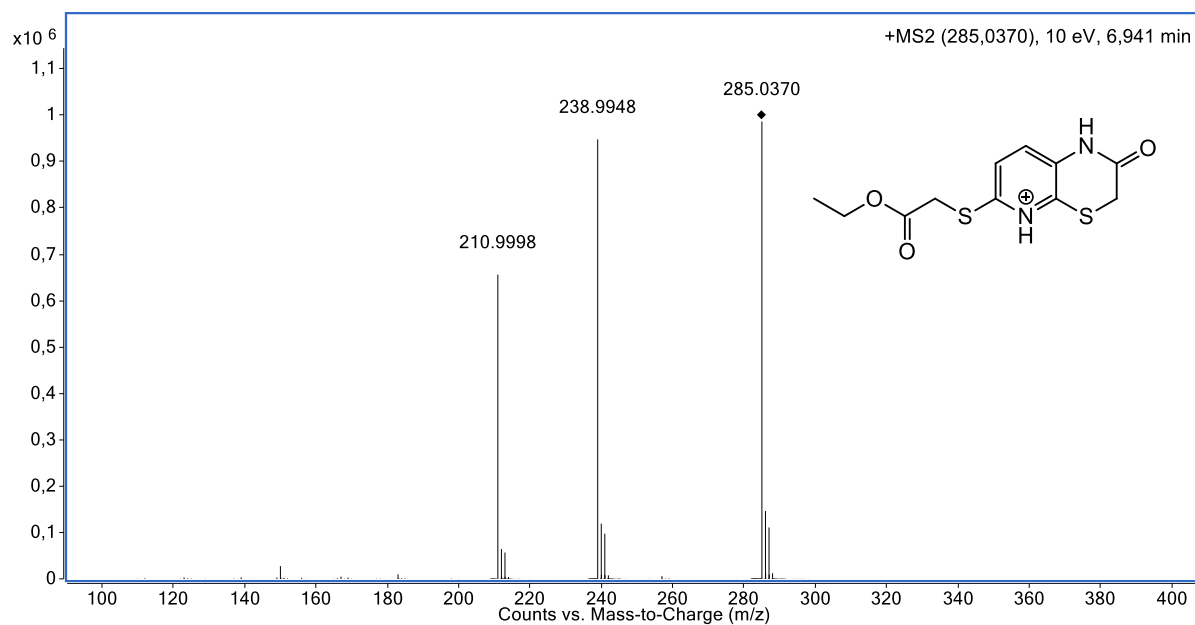
Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à sete. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  285,0433, sendo o valor calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ , 285,0362 (Espectro 24). Também foi possível observar a formação da molécula cationizada com sódio em  $m/z$  307,0177 e  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$  em  $m/z$  591,0459.

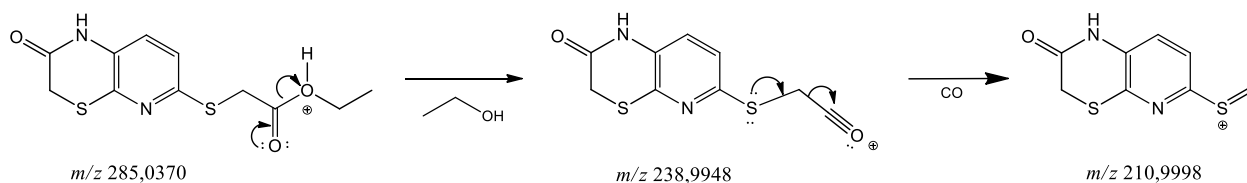
### Espectro 24 - EM-IES-(+) alta resolução do composto **58**



A partir do espectro de EM-EM-IES do composto **58** (Espectro 25) foram propostos dois mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  238,9948 e  $m/z$  210,9998, conforme apresentado na Figura 61.

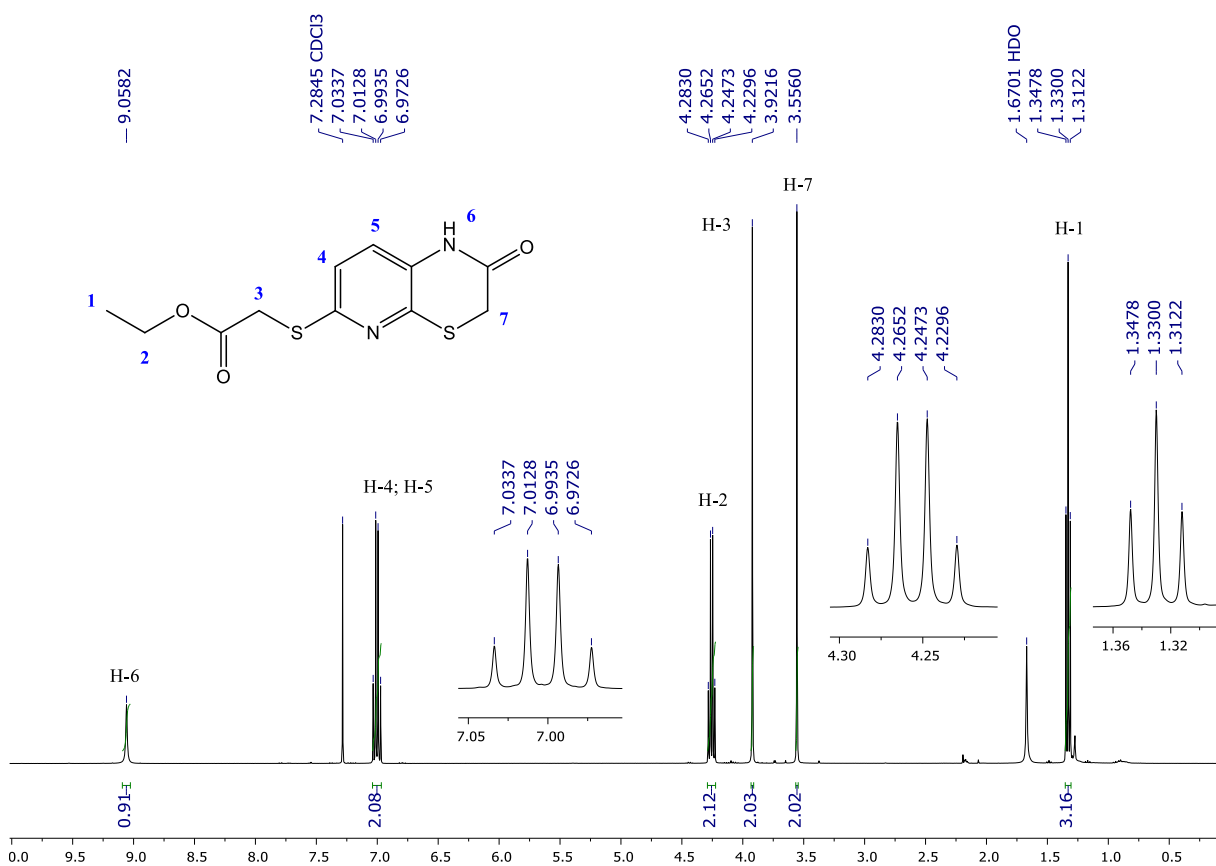
### Espectro 25 - EM-EM-IES-(+) do composto **58**



**Figura 61 - Proposta de fragmentação do composto 58**

Fonte: Da autora, 2019

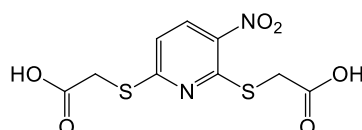
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 26) do composto **58** permitiu caracterizar o núcleo piridínico trissubstituído através da presença de dois dupletos sobrepostos em  $\delta$  7,00 atribuídos a H-4 e a H-5 (2H,  $J = 8,4$  Hz). A  $\delta$ -lactama conjugada ao anel piridínico foi confirmada pela presença de um singlete em  $\delta$  3,56, atribuído a H-7 (2H). A cadeia lateral referente ao tioglicolato de etila foi confirmada pela presença de um singlete em  $\delta$  3,92, atribuído a H-3 (2H), um quadrupletto em  $\delta$  4,26 (H-2, 2H,  $J = 7,1$  Hz) e um triplo em  $\delta$  1,33 (H-1, 3H,  $J = 7,1$  Hz).

**Espectro 26 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 58 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

#### 4.5.4 Elucidação estrutural dos compostos **61**, **62** e **63**

O produto **61** (Figura 62) foi escolhido como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **61**, **62** e **63**. Todos os espectros obtidos para os 3 compostos encontram-se nos apêndices deste trabalho.

**Figura 62** - Estrutura do composto **61**

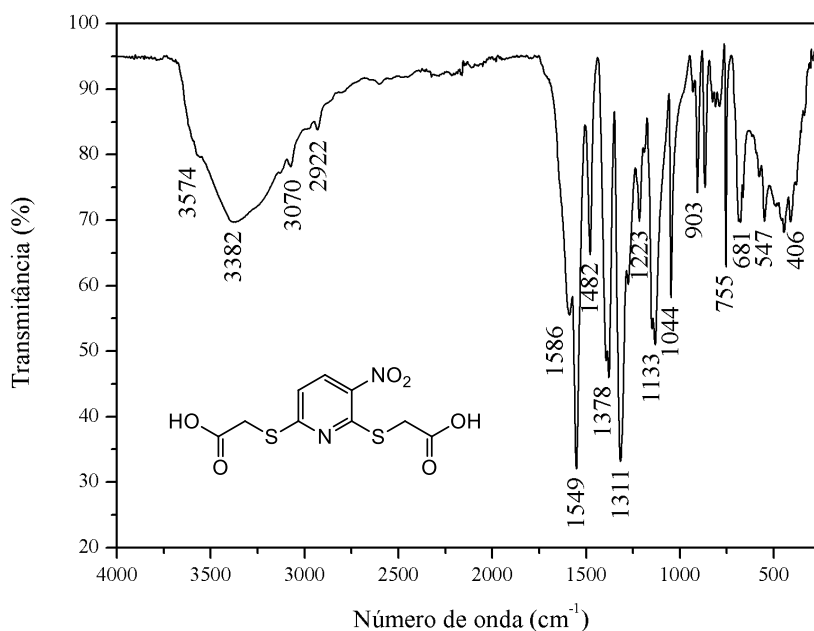


Fonte: Da autora, 2019

O composto **61** foi obtido como sólido amarelo e apresentou  $R_f$  0,20 em CCD de sílica como fase estacionária e AcOEt/MeOH (1:1) como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm). Não foi possível determinar o ponto de fusão pois o produto se decompôs à 226,8 °C.

A análise do espectro na região do infravermelho do composto **61** (Espectro 30) permitiu identificar as bandas referentes à  $\nu(\text{O-H})$  em  $3382\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$  em  $1549\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$  em  $1311\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}=\text{C}_{\text{aromático}})$  em  $1586\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$  em  $2922\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H})$  em  $3070\text{ cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

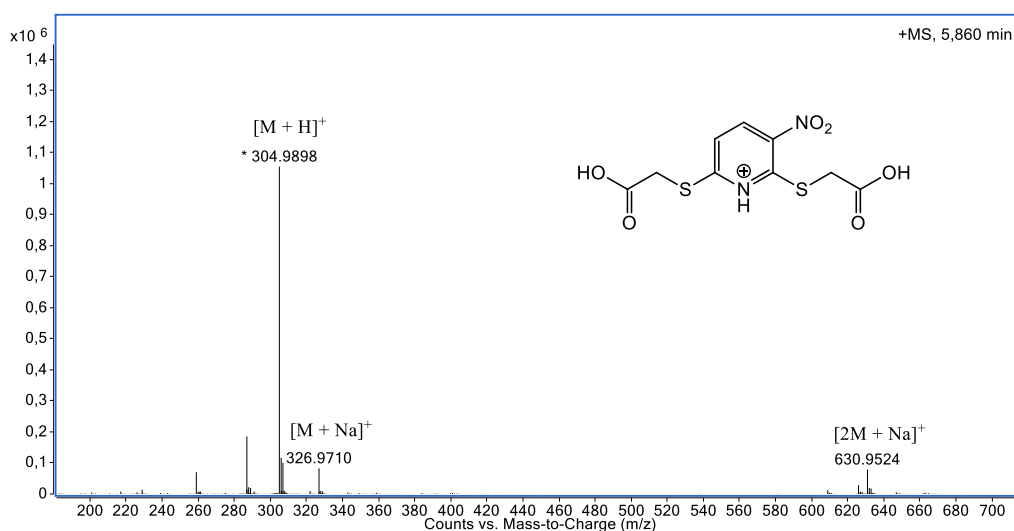
**Espectro 27** - Espectro na região do IV do composto **61**





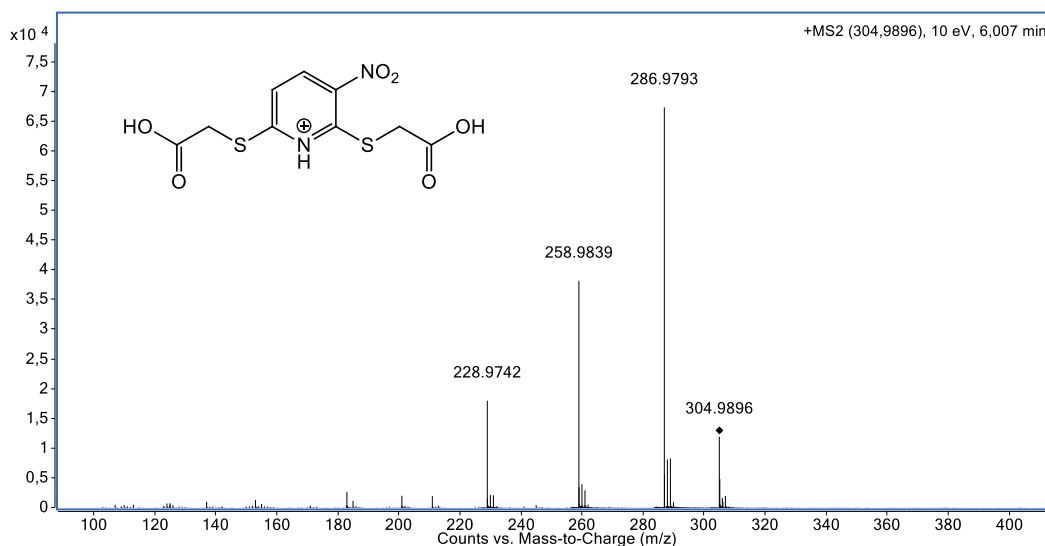
Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $C_9H_8N_2O_6S_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  304,9898, sendo o valor calculado para  $C_9H_9N_2O_6S_2$ , 308,9497 (Espectro 28). Também foi possível observar a formação da molécula cationizada com sódio em  $m/z$  326,9710 e  $[2M + Na]^+$  em  $m/z$  630,9594.

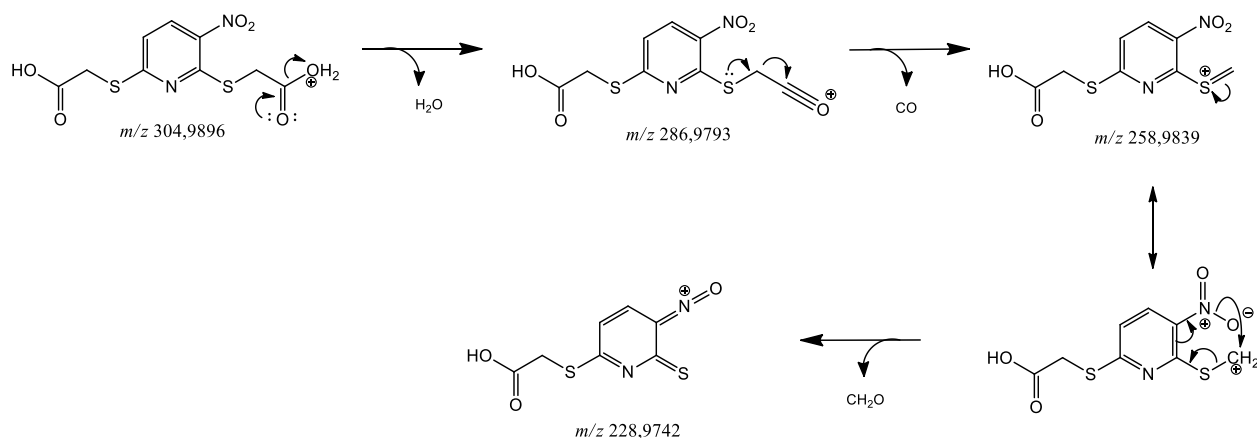
### Espectro 28 - EM-IES-(+) alta resolução do composto **61**



A partir do espectro de EM-EM-IES do composto **61** (Espectro 29) foram propostos três mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  286,9793,  $m/z$  258,9839 e  $m/z$  228,9742, conforme apresentado na Figura 63.

### Espectro 29 - EM-EM-IES-(+) do composto **61**

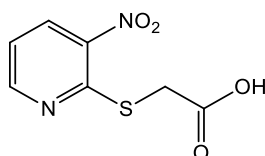


**Figura 63 - Proposta de fragmentação para o composto 61**

Fonte: Da autora, 2019

#### 4.5.5 Elucidação estrutural dos compostos 64, 65 e 66

O produto **64** (Figura 64) foi escolhido como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **64**, **65** e **66**. Todos os espectros obtidos para os 3 compostos encontram-se nos apêndices deste trabalho.

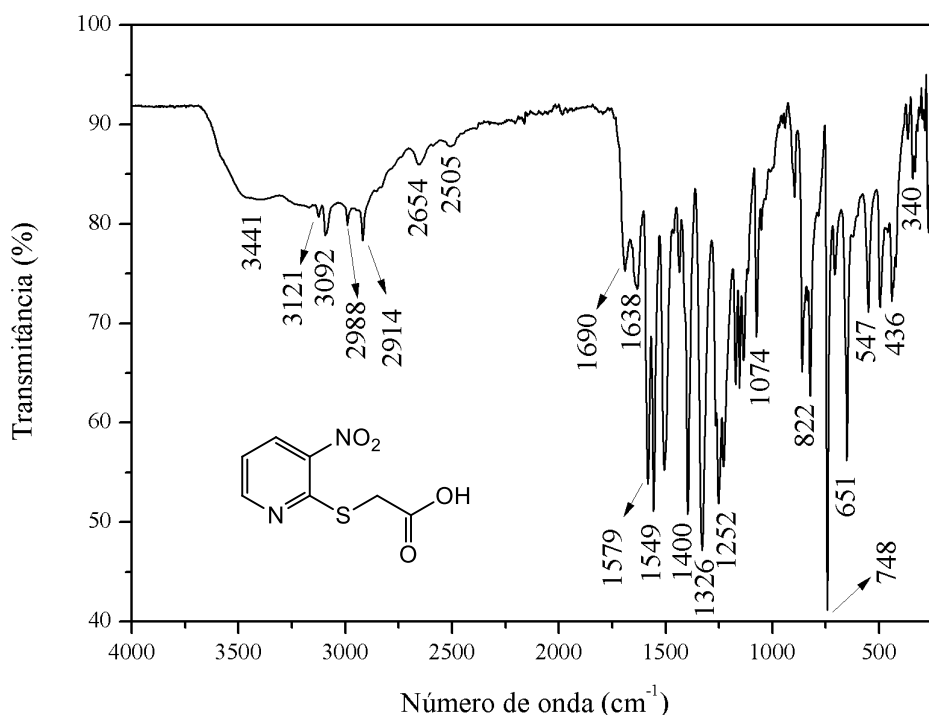
**Figura 64 - Estrutura do composto 64**

Fonte: Da autora, 2019

O composto **64** foi obtido como sólido marrom e apresentou  $R_f$  0,22 em CCD de sílica como fase estacionária e AcOEt/MeOH (7:3) como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm). Não foi possível determinar o ponto de fusão pois o composto se decompôs à 222,0 °C.

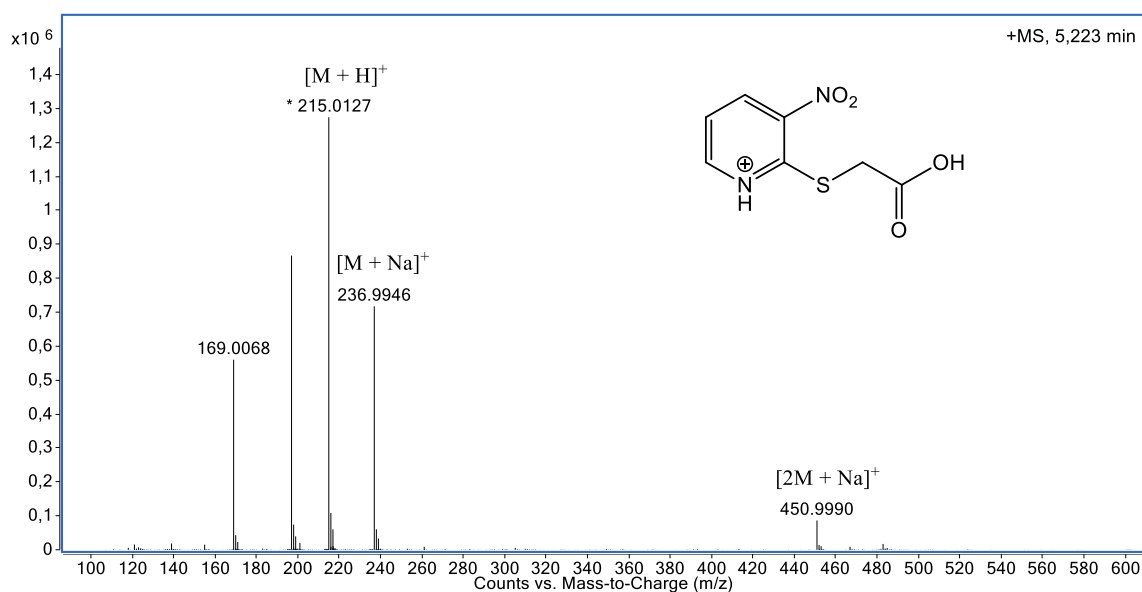
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **64** (Espectro 30) permitiu identificar a banda referente à  $\nu(O-H)$  em  $3441\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(C=O)$  em  $1690\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{as}(NO_2)$  em  $1549\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_s(NO_2)$  em  $1326\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(C=C_{\text{aromático}})$  em  $1579\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(C_{sp^3-H})$  em  $2914$  e  $2988\text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu(C_{sp^2-H})$  em  $3092\text{ cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

### Espectro 30 - Espectro na região do IV do composto 64



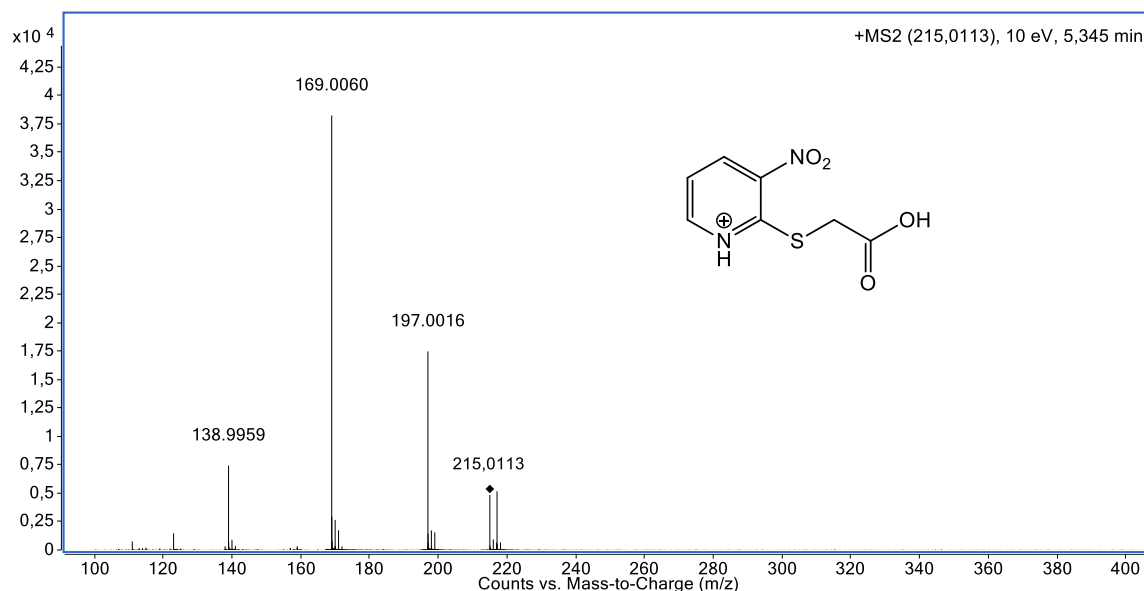
Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $C_7H_6N_2O_4S$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à seis. O sinal referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  215,0127, sendo o valor calculado para  $C_7H_7N_2O_4S$ , 215,0121 (Espectro 31). Também foi possível observar a formação da molécula cationizada com sódio em  $m/z$  236,9946 e  $[2M + Na]^+$  em  $m/z$  450,9990.

### Espectro 31 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 64

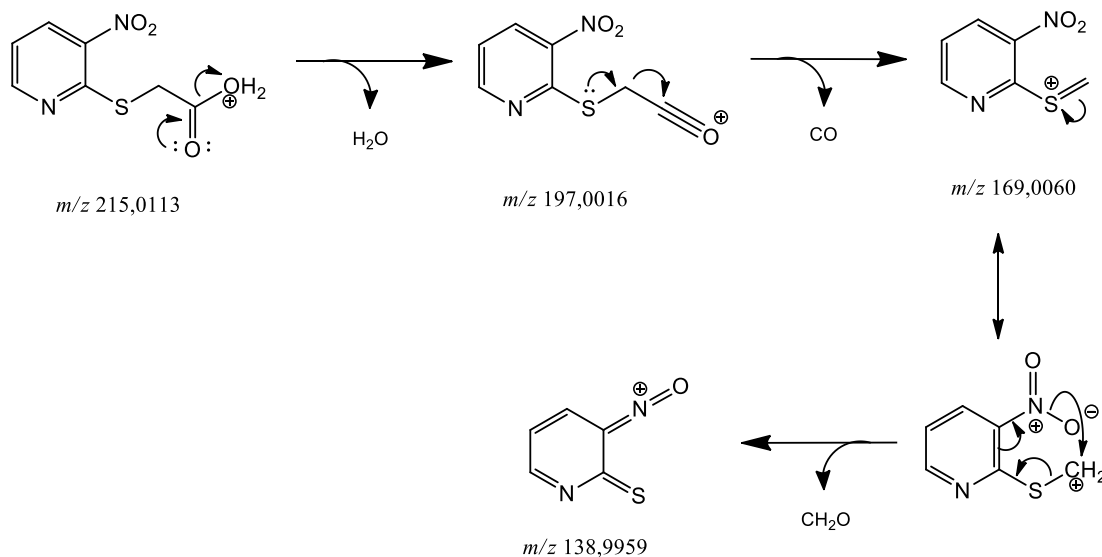


A partir do espectro de EM-EM-IES do composto **64** (Espectro 32) foram propostos dois mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  197,0016,  $m/z$  169,0060 e  $m/z$  138,9959 conforme apresentado na Figura 65.

**Espectro 32 - EM-EM-IES-(+) do composto 64**



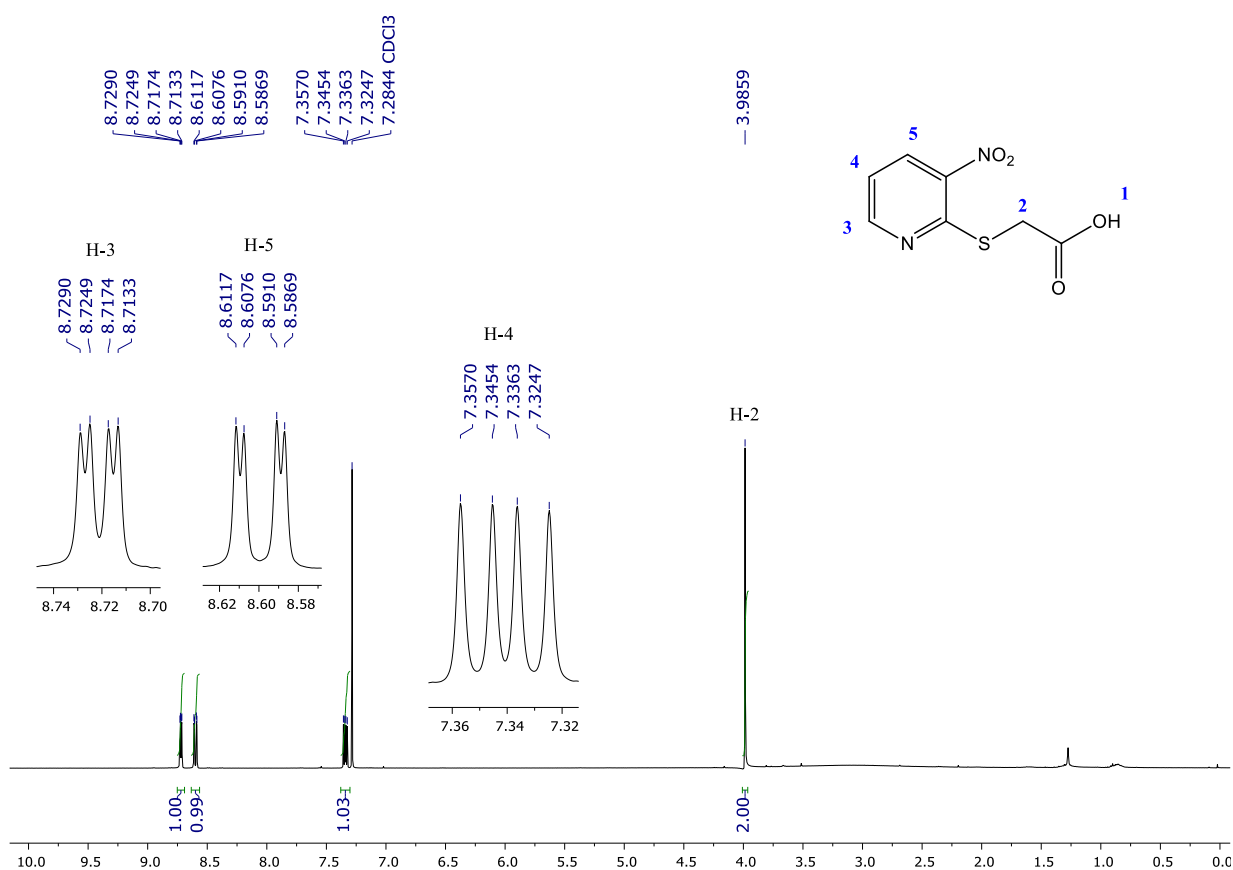
**Figura 65 - Proposta de fragmentação para o composto 64**



Fonte: Da autora, 2019

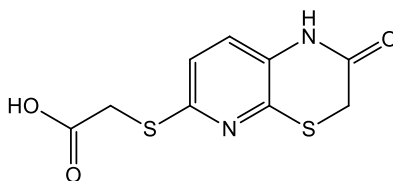
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 33) do composto **64** permitiu caracterizar o núcleo piridínico dissubstituído através da presença de três duplos dupletos em  $\delta$  8,72, 7,34 e 8,60, atribuídos a H-3 (1H,  $J = 4,7; 1,6$  Hz), a H-4 (1H,  $J = 8,3; 4,7$  Hz) e a H-5 (1H,  $J = 8,3; 1,6$  Hz), respectivamente. A cadeia lateral referente ao foi confirmada pela presença de um singlete em  $\delta$  3,99, atribuído a H-2 (2H).

**Espectro 33** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **64** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



#### 4.5.6 Elucidação estrutural dos compostos **67**, **68a** e **69**

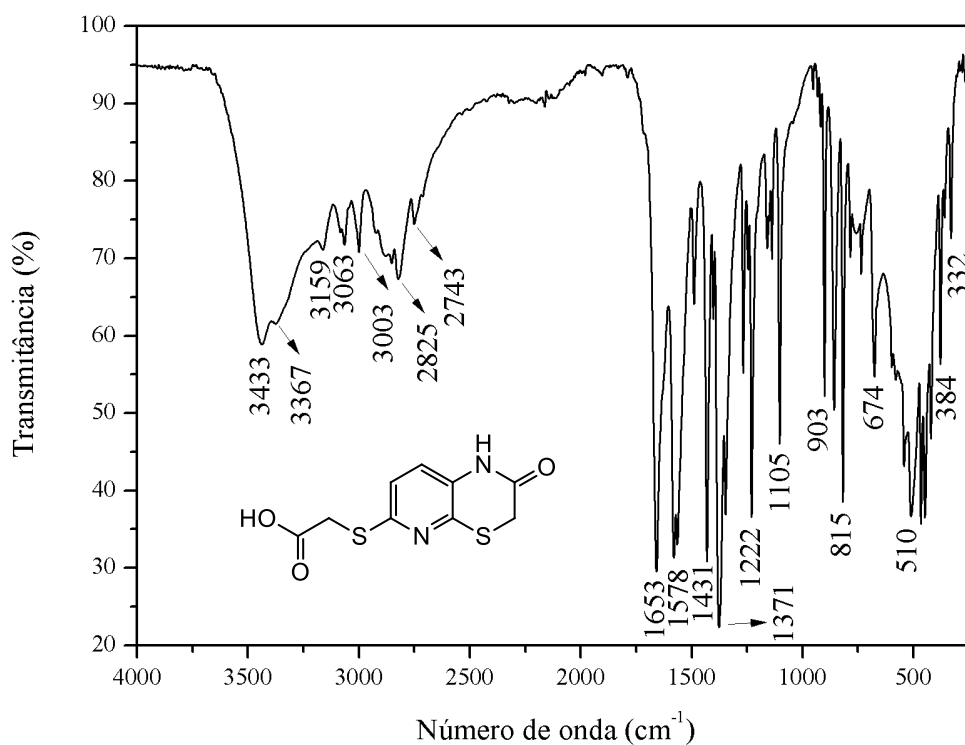
O produto **67** (Figura 66) foi escolhido como exemplo para discutir a elucidação estrutural dos compostos **67**, **68a** e **69**. Todos os espectros obtidos para estes compostos encontram-se nos apêndices deste trabalho.

**Figura 66** - Estrutura do composto **67**

Fonte: Da autora, 2019

O composto **67** foi obtido como sólido rosáceo e apresentou  $R_f$  0,35 em CCD de sílica como fase estacionária e AcOEt/MeOH, 1:1 como fase móvel. O produto pôde ser observado em câmara de UV ( $\lambda$  254 nm). Não foi possível determinar o ponto de fusão pois o produto se decompôs à 273,4 °C.

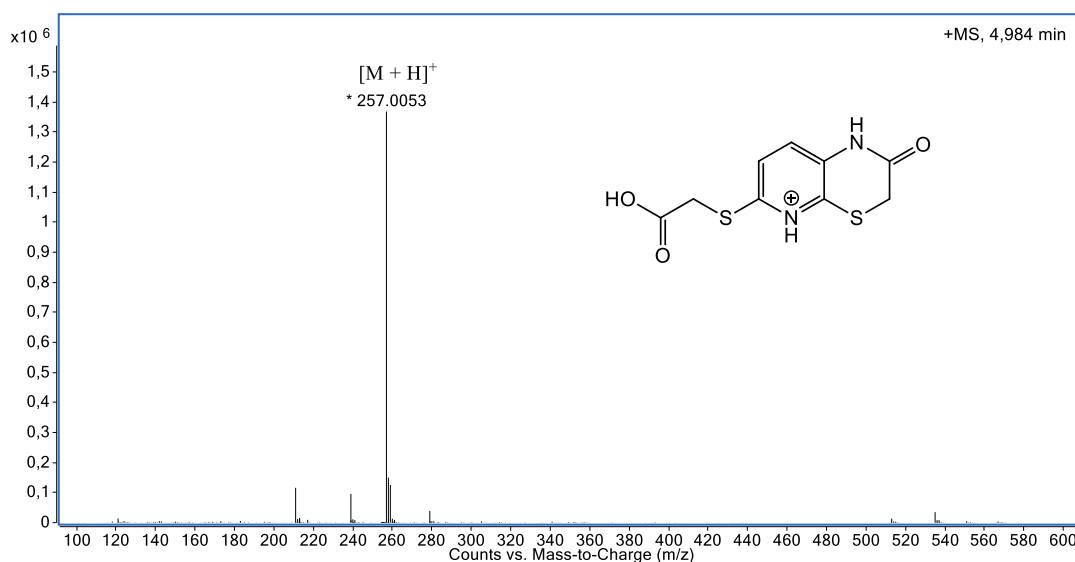
A análise do espectro na região do infravermelho do composto **67** (Espectro 34) permitiu identificar as bandas referentes à  $\nu(\text{O-H})$  em 3367  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C=O})$  em 1653  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{N-H})$  em 3433  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C=C}_{\text{aromático}})$  em 1578  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3-\text{H}})$  em 2825  $\text{cm}^{-1}$  e  $\nu(\text{C}_{\text{sp}^2-\text{H}})$  em 3003 e 3063  $\text{cm}^{-1}$  (PAVIA et al., 2010).

**Espectro 34** - Espectro na região do IV do composto **67**

Quando submetido à análise de EM-IES, modo positivo, foi possível confirmar a fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual à sete. O sinal

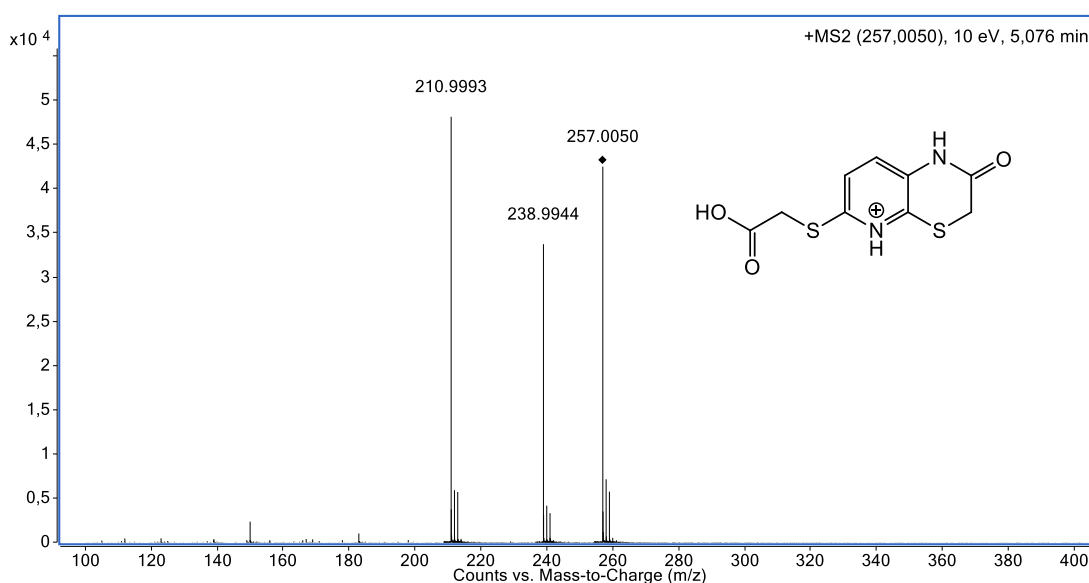
referente à molécula protonada foi observado em  $m/z$  257,0053, sendo o valor calculado para  $C_9H_9N_2O_3S_2$ , 257,0049 (Espectro 35).

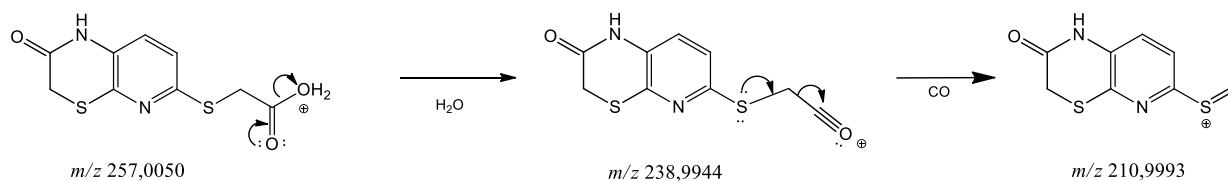
### Espectro 35 - EM-IES-(+) alta resolução do composto **67**



A partir do espectro de EM-EM-IES do composto **67** (Espectro 36) foram propostos dois mecanismos de fragmentação que justificam os picos  $m/z$  238,9944 e  $m/z$  210,9993, conforme apresentado na Figura 67.

### Espectro 36 - EM-EM-IES-(+) do composto **67**



**Figura 67** - Proposta de fragmentação para o composto **67**

Fonte: Da autora, 2019

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

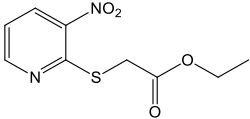
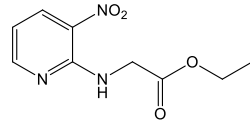
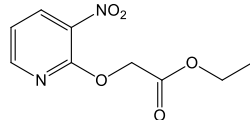
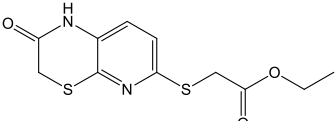
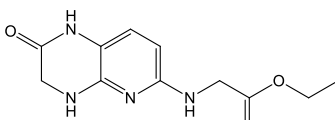
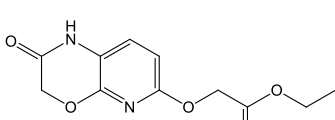
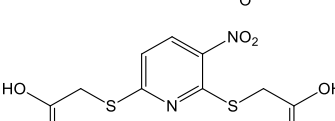
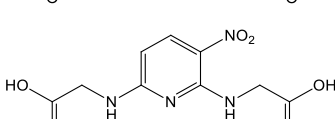
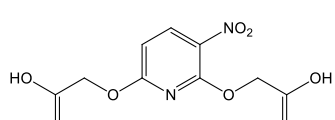
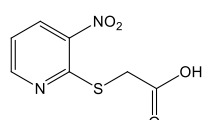
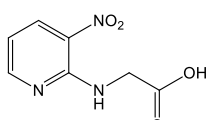
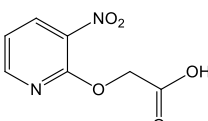
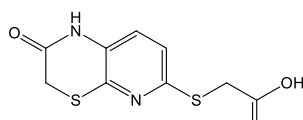
Através dos valores de absorbância obtidos foi calculada a porcentagem de viabilidade celular das formas promastigotas da cepa PH8 de *Leishmania amazonensis*. A atividade anti-leishmaniana é determinada por meio de valores de  $CI_{50}$ , concentração inibitória máxima dos parasitas, ou seja, a concentração mínima que impede 50% do crescimento do parasita *in vitro* após um determinado tempo de exposição.

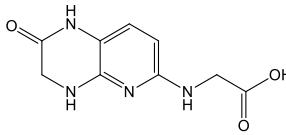
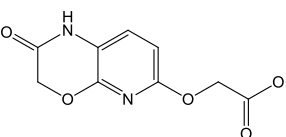
Os 18 produtos obtidos nas reações de redução e ciclização *in situ* (**58**, **59a** e **60**), nas reações de hidrólise (**61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67**, **68a** e **69**), assim como seus respectivos produtos de partida (**45**, **46**, **47**, **48**, **49** e **50**), foram enviados para avaliação da atividade contra leishmaniose, assim como para avaliação de citotoxicidade. No entanto, até a finalização deste manuscrito apenas os resultados da atividade anti-leishmaniose foram obtidos (Tabela 6).

**Tabela 6** - Valores de  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) obtidos para os compostos avaliados

Composto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Estrutura
	<i>L. amazonensis</i>	
<b>45</b>	249±24	
<b>46</b>	79±8	
<b>47</b>	>512	



48	59±16	
49	57±7	
50	141±18	
58	347±26	
59a	>512	
60	>512	
61	>512	
62	>512	
63	>512	
64	>512	
65	>512	
66	>512	
67	>512	

<b>68a</b>	>512	
<b>69</b>	>512	
Anfotericina B	0,29±0,01	

A partir dos resultados obtidos é possível observar que os produtos **47**, **60**, **61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67**, **68a** e **69** não apresentaram atividade leishmanicida nas concentrações avaliadas, enquanto que os compostos **45**, **50** e **58** apresentaram potencial anti-leishmaniose na faixa entre 140,0 e 350,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os compostos que apresentaram melhores resultados foram **46**, **48** e **49** que apresentaram atividade na faixa entre 50,0 e 80,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Estes resultados possibilitaram ainda a discussão sobre uma possível relação entre a estrutura e a atividade dos compostos avaliados. É importante ressaltar que, dos três compostos que apresentaram os melhores resultados (**46**, **48** e **49**), dois apresentam o glicinato de etila na cadeia lateral (**46** e **49**) e dois deles são monossustituídos (**48** e **49**). Cabe destacar ainda que o composto **49** apresentou a segunda menor energia livre de ligação ( $\Delta G = -39.7209 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) no ensaio de *docking* molecular realizado no sítio ativo da arginase de *L. amasonensis*.

Comparando os resultados dos três produtos de  $S_NAr$  monossustituídos (**48**, **49** e **50**) é possível observar que o derivado nitrogenado (**49**) apresentou a melhor atividade anti-leishmaniose, seguido pelo composto **48** (derivado de enxofre) e, por fim, o composto **50** (derivado de oxigênio). Isso sugere uma possível relação entre a importância da presença de cada heteroátomo na cadeia lateral que é reforçada ao observar que o mesmo padrão se repete nos produtos de  $S_NAr$  dissustituídos (**45**, **46** e **47**).

Comparando-se ainda os resultados destes compostos é possível observar ainda que os três produtos monossustituídos apresentaram melhores atividades que seus respectivos isómeros dissustituídos, o que sugere uma possível importância da ausência da segunda cadeia lateral no anel piridínico.

Outro ponto interessante a ser destacado, é o fato de que, dos compostos analisados, nenhum dos produtos com a função ácido carboxílico na cadeia lateral apresentou atividade relevante nos ensaios *in vitro*, sugerindo que a teoria levantada a partir dos resultados obtidos no *docking* molecular de que essa função pudesse estar relacionada à atividade leishmanicida

não se aplica. Tal observação pode ser confirmada ainda na perda significativa de atividade dos compostos **45, 46, 48, 49 e 50** quando comparado aos compostos **61, 62, 64, 65 e 66**.

Apesar dos compostos avaliados apresentarem  $CI_{50}$  superiores ao padrão positivo, anfotericina B, é importante salientar que os resultados obtidos com esta série de compostos são promissores e abrem novas perspectivas no desenvolvimento de novas substâncias para o tratamento da leishmaniose. Além disto, cabe destacar que o composto **68** que apresentou o melhor resultado nos ensaios *in silico* não foi obtido, assim como o seu composto de origem, **59**.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi planejada uma série de compostos aromáticos utilizando as técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo entre enxofre, nitrogênio e oxigênio. Inicialmente foram sintetizados 12 compostos por reações de  $S_NAr$  (**45** a **57**), os quais foram identificados por CG/EM-IE e serviram de base para o planejamento de 69 derivados aromáticos com potencial leishmanicida.

Os 69 compostos planejados foram submetidos a uma triagem virtual por *docking* molecular na arginase, destacando o fato de que todos os compostos avaliados apresentaram afinidade pela enzima no ensaio *in silico*. A partir dos resultados obtidos no *docking* molecular, foram selecionados os produtos **45**, **46**, **47**, **48**, **49** e **50**, obtidos nas reações de  $S_NAr$ , para serem submetidos às reações de redução e hidrólise, totalizando 24 produtos sintetizados.

Os produtos obtidos nas reações de redução e ciclização *in situ* (**58**, **59a** e **60**) e nas reações de hidrólise (**61**, **62**, **63**, **64**, **65**, **66**, **67**, **68a** e **69**), assim como seus respectivos compostos de partida (**45**, **46**, **47**, **48**, **49** e **50**), foram purificados por cromatografia em coluna e caracterizados através das técnicas de IV, CLAE/EM-IES,  $^1H$  RMN e  $^{13}C$  RMN. Após caracterizados, estes 18 produtos foram enviados para avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade.

Apesar dos compostos avaliados apresentarem  $CI_{50}$  superiores ao padrão positivo, anfotericina B, é importante salientar que os resultados obtidos com esta série de compostos são promissores e abrem novas perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, O. P. Tratamento da Doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arq Neuropsiquiatr**, 56, p. 688-696, 1998.
- AMARO, R.; BAUDRY, J.; CHODERA, J.; DEMIR, O.; McCAMMON, J. A.; MIAO, Y.; SMITH, J. C. Ensemble docking in drug discovery. **Biophysical Journal**, v. 114 (10), p. 2271-2278, 2018.
- ARMAREGO, W. E.; CHAI, C. L. L.. **Purification of Laboratory Chemicals**. 5. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2003.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129–148, 2002.
- BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
- BLANCO, V. R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos gerais relacionados com a doença, o ciclo do parasita, fármacos disponíveis, novos protótipos e vacinas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 861-876, 2017.
- BRAGA, F. G. **Atividades de derivados purínicos sobre *Leishmania amazonenses* e *Leishmania chagasi***. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose Tegumentar 2016**. Brasília, Ministério da Saúde, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, Ministério da Saúde, 2014.
- CAMPS, P.; EL ACHAB, R.; MORRAL, J.; MUÑOZ-TORRERO, D.; BADÍA, A.; BAÑOS, J. E.; VIVAS, N. M.; BARRIL, X.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. New tacrine – huperzine A hybrids (huprines): highly potent tight-binding acetylcholinesterase inhibitors of interest for

the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 4657-4666, 2000.

CATTA-PRETA, C. M. C.; MOTTRAM, J. C. Drug candidate and target for leishmaniasis. **Nature**, v. 560, p. 171-172, 2018.

CHIBALE, K; CHOUTEAU, F.; LATEGAN, C. A.; MAHARAJ, V. J.; PILLAY, P.; SMITH, P. J.; VLEGGGAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staeheleinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1200-1205, 2007.

DA SILVA, E. R.; CASTILHO, T. M.; PIOKER, F. C.; SILVA, C. H. T. P.; FLOETER-WINTER, L. M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 727-737, 2002.

DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, 130(3), 183-188, 2012.

DEN BOER, M. L.; ALVAR, J.; DAVIDSON, R. N.; RITMEIJER, K.; BALASEGARAM M. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Opin. Emerging Drugs**, v. 14 (3), p. 395-410, 2009.

FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. From Medicinal Chemistry to human health: current approaches to drug discovery for cancer and neglected tropical diseases. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p.645-661, 2018.

GLISIC, S.; SENCANSKI, M.; PEROVIC, V.; STEVANOVIC, S.; GARCÍA-SOSA, A. T. Arginase flavonoid anti-leishmanial *in silico* inhibitors flagged against anti-targets. **Molecules**, v. 21, 2016.

GÓMEZ-BARRIO, A.; VEJA, C.; ESCARIO, J. A.; ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103-107, 2006.

GOMTSYAN, A. Heterocycles in drugs and drug discovery. **Chemistry of Heterocyclic compounds**, v. 48, p. 7-10, 2012.

GONÇALVES, A. C. R.; CARNEIRO, Z. A.; OLIVEIRA, C. G.; DANUELLO, A.; GUERRA, W.; OLIVEIRA, R. J.; FERREIRA, F. B.; VELOSO-SILVA, L. L. W.; BATISTA, F. A. H.; BORGES, J. C.; ALBUQUERQUE, S.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S. Pt<sup>II</sup>, Pd<sup>II</sup> and Au<sup>III</sup> complexes with a thiosemicarbazone derived from acetylmonoxime:

structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 615-631, 2017.

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.

HAI, Y.; CHRISTIANSON, D. W. Crystal structures of *Leishmania mexicana* arginase complexed with  $\alpha,\alpha$ -disubstituted boronic amino-acid inhibitors. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 72, p. 300-306, 2016.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature: Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.

LEWELL, X. Q.; JONES, A. C.; BRUCE, C. L.; HARPER, G.; JONES, M. M.; MCLAY, I. M.; BRADSHAW, J. Drug rings database with web interface. A tool for identifying alternative chemical rings in lead discovery programs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3257-3274, 2003.

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

LIU, Q.; ZHU, R.; GAO, S.; MA, S.; TANG, H.; YANG, J.; DIAO, Y.; WANG, H.; ZHU, H. Structure-based bioisosterism design, synthesis, insecticidal activity and structure-activity relationship (SAR) of anthranilic diamide analogues containing 1,2,4-oxadiazoles ring. **Pest Management Science**, v. 73, p. 917-924, 2017.

MANJOLIN, L. C.; DOS REIS, M. B. G.; MAQUIAVELI, C. C.; SANTOS-FILHO, O. A.; DA SILVA, E. R. Dietary flavonoids fisetin, luteolin and their derived compounds inhibit arginase, a central enzyme in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2253-2262, 2013.

MAQUIAVELI, C. C.; LUCON-JÚNIOR, J. F.; BROGI, S.; CAMPANI, G.; GEMMA, S.; VIEIRA, P. C.; SILVA, E. R. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 1459-1463, 2016.

MARCO, J. L.; RÍOS, C.; GARCÍA, A. G.; VILLARROYA, M.; CARREIRAS, M. C.; MARTINS, C.; ELEUTÉRIO, A.; MORREALE, A.; OROZCO, M.; LUQUE, F. J. Synthesis, biological evaluation and molecular modelling of diversely functionalized heterocyclic derivatives as inhibitors of acetylcholinesterase/ butylcholinesterase and modulators of  $Ca^{2+}$  channels and nicotinic receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2199-2218, 2004

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: contribuições e perspectivas no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 56–64, 1995.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S.; Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 120-127, 2002.

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

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3rd ed. Oxford: Pergamon Press, 1988.

RODRIGUES, A. R. Modelagem molecular. **Química Nova na Escola**, v. 3, p. 43-49, 2001.

SILVEIRA, V. A. da. **Síntese de isómeros aromáticos visando potencial biológico**. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2016.

SHEN, L.; LIU, G.; TANG, Y. Molecular docking and 3D-QSAR studies of 2-substituted 1-indanone derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, p. 2053–2063, 2007.

SHIN, H., CAMA, E.; CHRISTIANSON, D. W. Design of Amino Acid Aldehydes as Transition-State Analogue Inhibitors of Arginase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 10278–10284, 2004.

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

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; et. al. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, p. 1762–1769, 2011.

TAVEIRA, S. F.; ARAÚJO, L. M. P. C.; SANTANA, D. C. A. S.; et. al. Development of cationic solid lipid nanoparticles with factorial design-based studies for topical administration of Doxorubicin. Developments in Biomedical Nanotechnology. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, p. 219–228, 2012.



TAHA, M.; ISMAIL, N. H.; ALI, M.; RASHID, U.; IMRAN, S.; UDDIN, N.; KHAN, K. M. Molecular hybridization conceded exceptionally potent quinolinyl-oxadiazole hybrids through phenyl linked thiosemicarbazide antileishmanial scaffolds: In silico validation and SAR studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 192-200, 2017.

VALLI, M.; BETTI, A. H.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; CENTURIÃO, F.; ANTONIO, C. B.; RATES, S. M. K.; BOLZANI, V. S. Pyridinic analog of the natural product (–)-spectaline as potential adjuvante for the treatment of central nervous system disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 2247–2250, 2015.

VALLI, M.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; SALDAÑA, J. C.; HEINZEN, H.; DOMÍNGUEZ, L.; CAMPOS, V. P.; MARQUI, S. R.; YOUNG, M. C. M.; VIEGAS JÚNIOR, 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.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 52, p. 609–623, 2003.

VIEGAS JÚNIOR, C.; DANUELLO, A.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**. v. 14, p. 1829–1852, 2007.

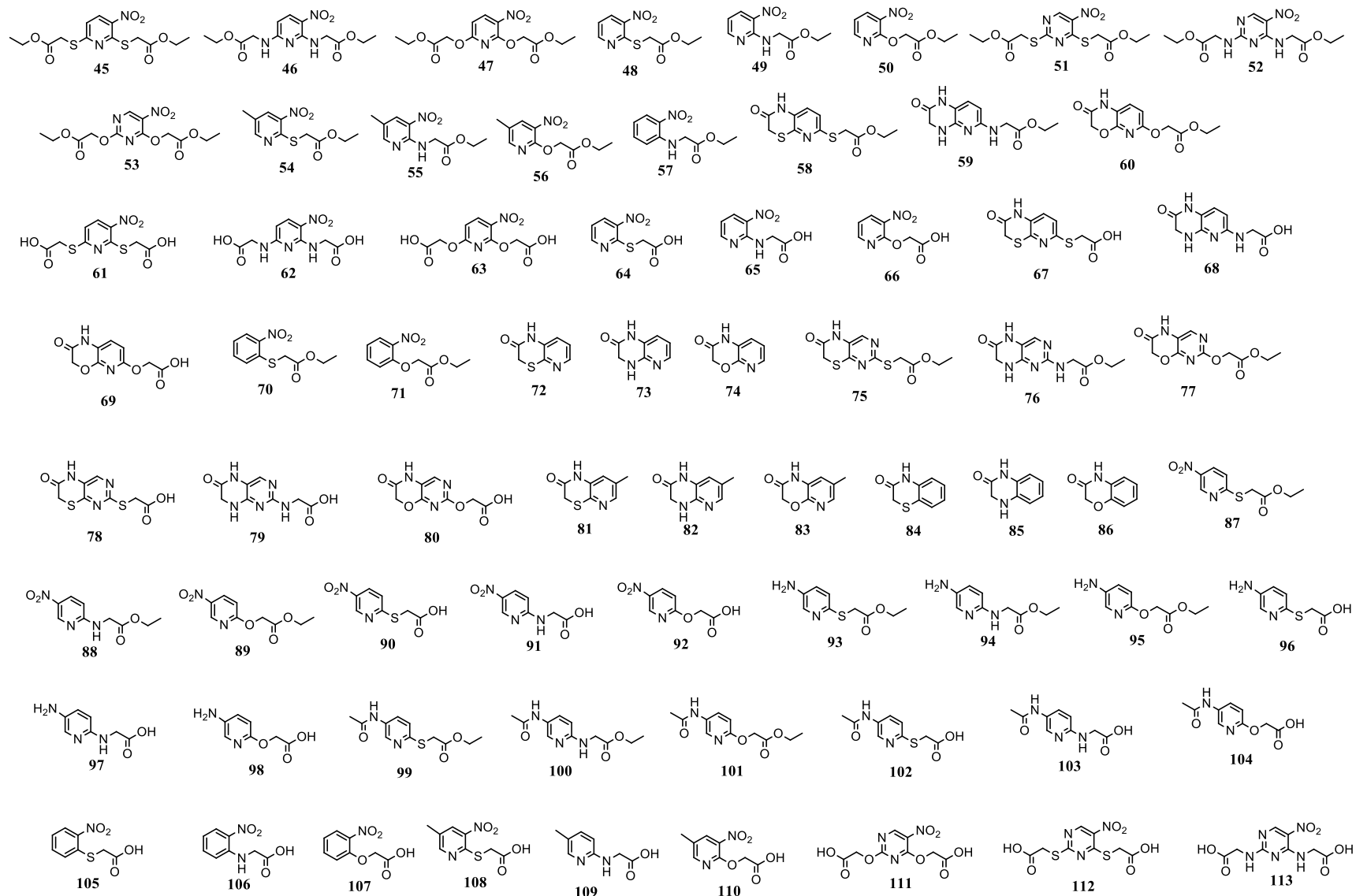
WALSH, C. T. Nature loves nitrogen heterocycles. **Tetrahedron Letters**, v. 56, p. 3075–3081, 2015.

WYLLIE, S.; THOMAS, M.; PATTERSON, S.; CROUCH, S.; DE RYCKER, M.; LOWE, R.; GRESHAM, S.; URBANIAK, M. D.; OTTO, T. D.; STOJANOVSKI, L.; SIMEONS, F. R. C.; MANTHRI, S.; MACLEAN, L. M.; ZUCCOTTO, F.; HOMEYER, N.; PFLAUMER, H.; BOESCHE, M.; SASTRY, L.; CONNOLLY, P.; ALBRECHT, S.; BERRIMAN, M.; DREWES, G.; GRAY, D. W.; GHIDELLI-DISSE, S.; DIXON, S.; FIANDOR, J. M.; WYATT, P. G.; FERGUSON, M. A. J.; FAIRLAMB, A. H.; MILES, T. J.; READ, K. D.; GILBERT, I. H. Cyclin-dependent kinase 12 is a drug target for visceral leishmaniasis. **Nature**, v. 560, p. 192-197, 2018.

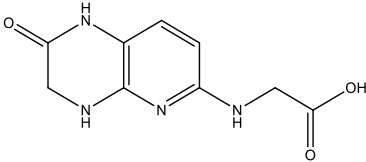
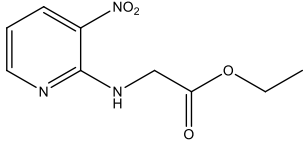
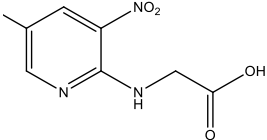
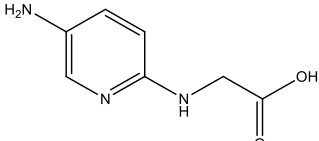
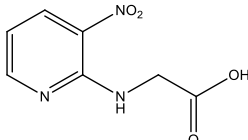
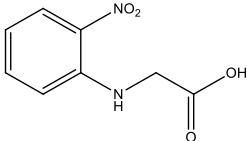
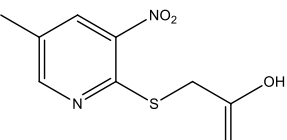
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniose**, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 22 ago. 2018.

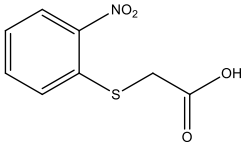
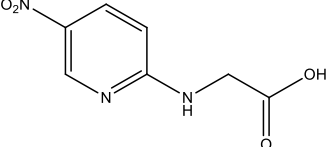
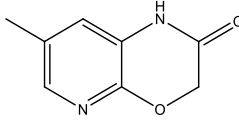
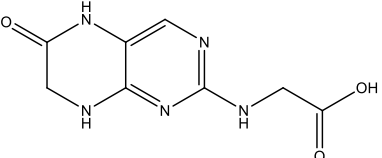
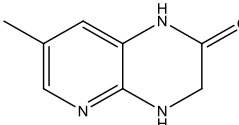
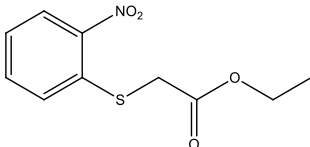
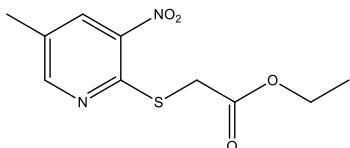
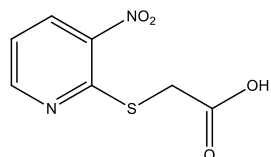
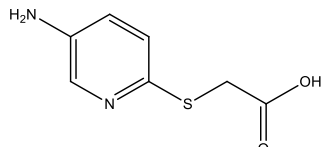
YANG, J.; YAN, R., ROY; A., XU; D., POISSON; J., ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, p. 7–8, 2015.

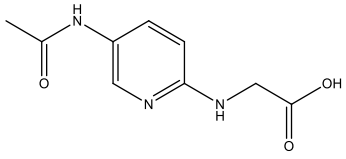
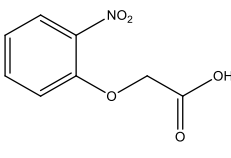
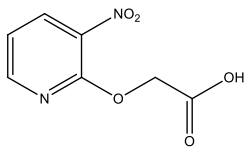
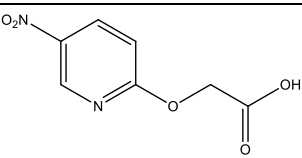
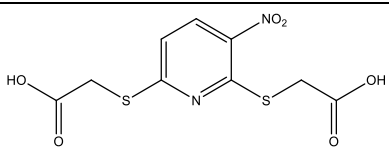
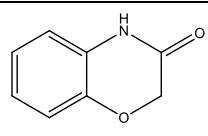
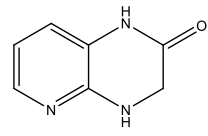
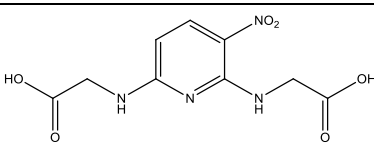
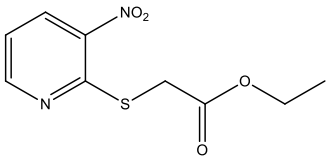
## APÊNDICE A – ESTRUTURAS DOS 69 COMPOSTOS PLANEJADOS

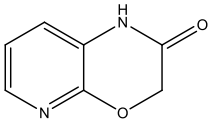
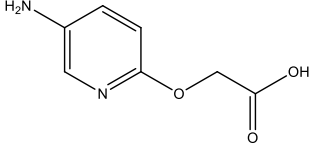
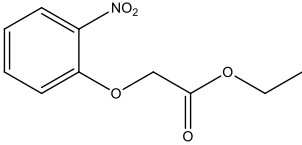
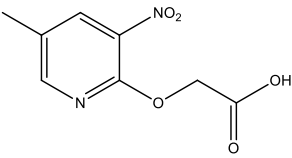
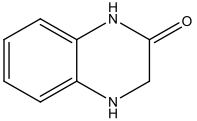
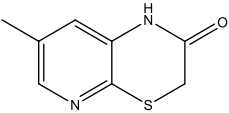
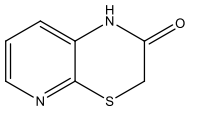
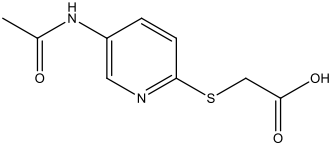
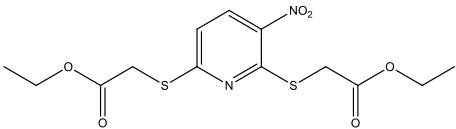
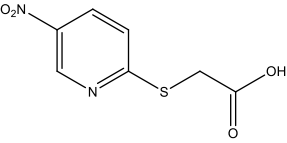


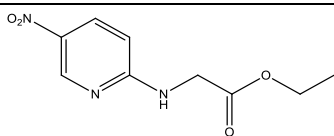
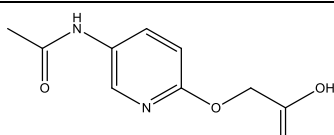
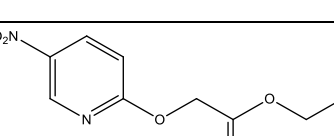
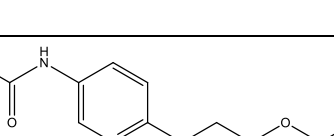
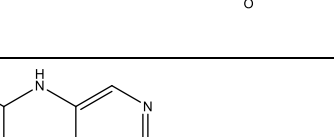
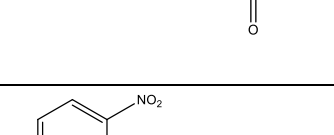
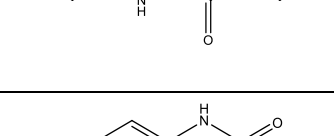
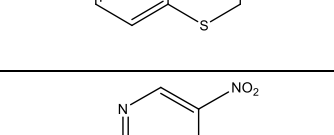
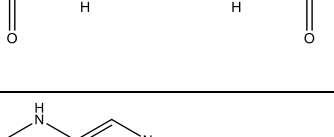
**APÊNDICE B – RANKING COM OS 69 COMPOSTOS PLANEJADOS E  
AVALIADOS POR DOCKING MOLECULAR**

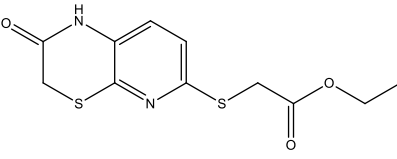
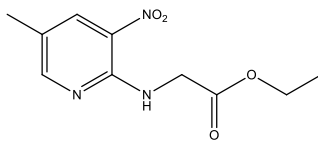
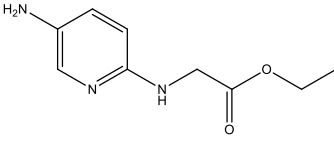
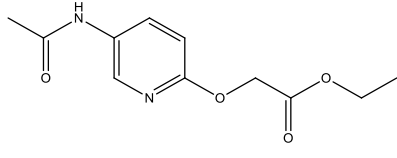
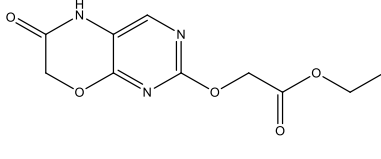
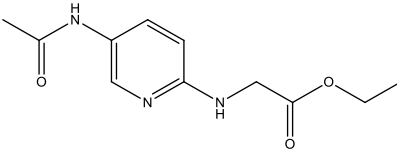
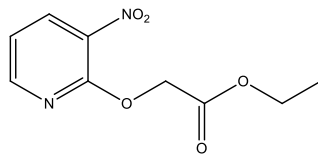
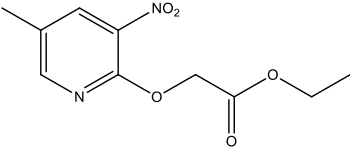
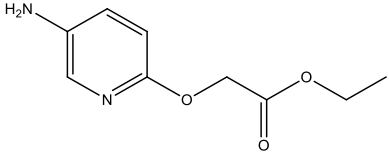
Energia livre de ligação $\Delta G$ (kca.mol <sup>-1</sup> )	Estrutura
-47.5184	
-39.7209	
-39.1008	
-38.8964	
-38.8019	
-38.7981	
-38.6228	

-37.7389	 <chem>O=C(O)CSc1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
-35.6894	 <chem>O=C(O)CSNc1ccc([N+](=O)[O-])cn1</chem>
-35.5887	 <chem>O=C(O)CSNc1cc(C)ncn1</chem>
-35.5203	 <chem>O=C(O)CSNc1nc2c(ncn2C)cc1C</chem>
-35.2402	 <chem>O=C(O)CSNc1cc2c(ncn2C)cn1</chem>
-34.9443	 <chem>CCOC(=O)CSc1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
-34.8211	 <chem>CCOC(=O)CSNc1ccc([N+](=O)[O-])cn1</chem>
-34.7302	 <chem>O=C(O)CSNc1ccncc1[N+](=O)[O-]</chem>
-34.5748	 <chem>O=C(O)CSNc1ccc(N)cn1</chem>

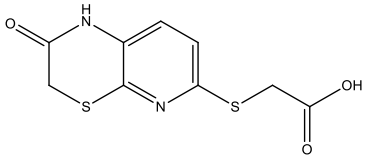
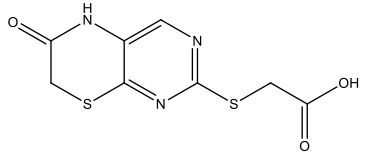
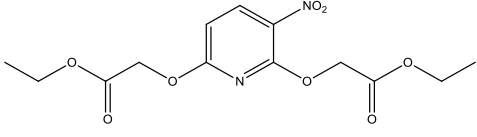
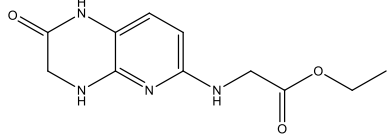
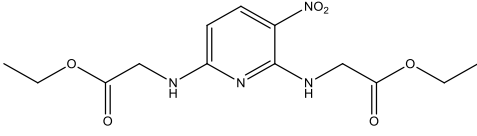
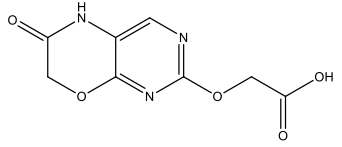
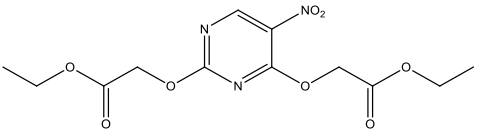
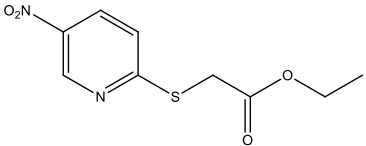
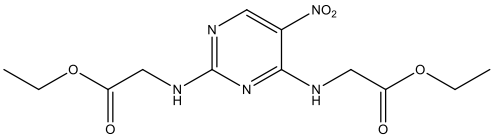
-33.9261	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(NCC(=O)O)cn1</chem>
-33.3621	 <chem>O=C(O)COc1ccccc1[N+](=O)[O-]</chem>
-33.2427	 <chem>O=C(O)COc1ccncc1[N+](=O)[O-]</chem>
-31.5605	 <chem>O=C(O)COc1ccncc1[N+](=O)[O-]</chem>
-31.4916	 <chem>O=C(O)CSc1cc(NC(=O)O)nc1SCC(=O)O</chem>
-31.4567	 <chem>O=C1NCCOC1c2ccccc2</chem>
-31.3737	 <chem>O=C1NCCNC1c2ccncc2</chem>
-31.2496	 <chem>O=C(O)NSc1cc(NC(=O)O)nc1[N+](=O)[O-]</chem>
-31.2065	 <chem>CCOC(=O)CSc1ccncc1[N+](=O)[O-]</chem>

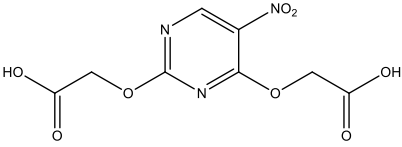
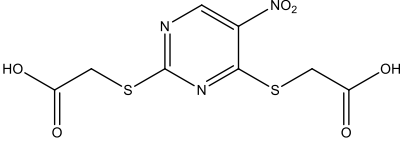
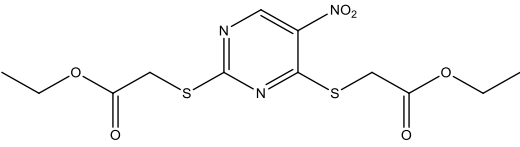
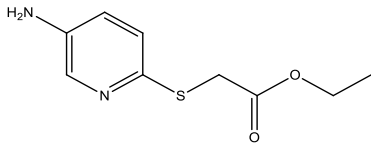
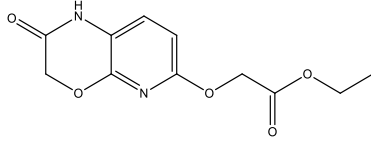
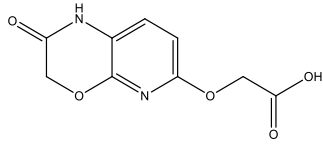
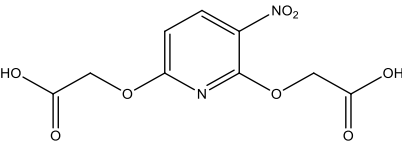
-30.9831	
-30.8972	
-30.8845	
-30.8003	
-30.0178	
-29.9809	
-29.6624	
-29.4687	
-29.1718	
-28.9141	

-28.7254	 <chem>CCOC(=O)CNc1ccc([N+](=O)[O-])cc1</chem>
-27.1067	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(OCC(=O)O)cn1</chem>
-26.7484	 <chem>CCOC(=O)COc1ccc([N+](=O)[O-])cn1</chem>
-25.3692	 <chem>CCOC(=O)CSNc1ccc(C(=O)C)cn1</chem>
-25.3091	 <chem>CCOC(=O)CSc1nc2c(nc(=O)[nH]2)s1</chem>
-25.1946	 <chem>CCOC(=O)CNc1cccc([N+](=O)[O-])c1</chem>
-24.9138	 <chem>O=C1NC2=CC=CC=C2S1</chem>
-24.3470	 <chem>OC(=O)CNc1nc([N+](=O)[O-])nc1NCC(=O)O</chem>
-24.1998	 <chem>CCOC(=O)CNc1nc2c(nc(=O)[nH]2)s1</chem>

-22.7673	 <chem>CCOC(=O)CCSC1=CN=C2C(=N1)C(=O)NCC2</chem>
-22.7047	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=CC=C(C)C([N+](=O)[O-])=N1</chem>
-22.6221	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=CC=C(N)C=C1</chem>
-22.2626	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CC=C(NC(C)=O)C=C1</chem>
-20.8762	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CN=C2C(=N1)C(=O)NCC2</chem>
-20.7317	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=CC=C(NC(C)=O)C=C1</chem>
-20.4147	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]</chem>
-19.3721	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CC=C(C)C([N+](=O)[O-])=N1</chem>
-19.0174	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CC=C(N)C=C1</chem>

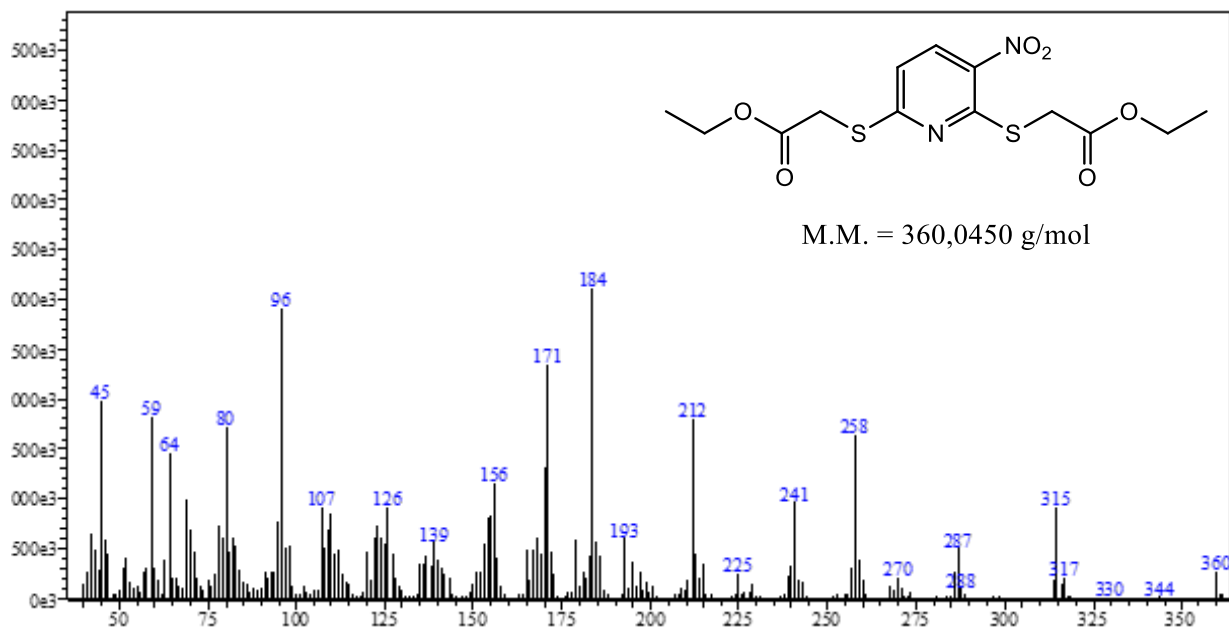


-18.8355	 <chem>O=C(O)CCSC1=NC2=C(N1)C=CC=C2</chem>
-18.6979	 <chem>O=C(O)CCSC1=NC2=C(N1)C=CC=N2</chem>
-18.5210	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]</chem>
-18.4912	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=NC2=C(N1)C=CC=C2</chem>
-17.7746	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]</chem>
-17.6262	 <chem>O=C(O)CCOC1=NC2=C(N1)C=CC=C2</chem>
-17.6095	 <chem>CCOC(=O)CCOC1=NC2=C(N1)C=CN2</chem>
-17.4592	 <chem>CCOC(=O)CCSC1=CC=C(C=C1)[N+](=O)[O-]</chem>
-17.4423	 <chem>CCOC(=O)CCNC1=NC2=C(N1)C=CN2</chem>

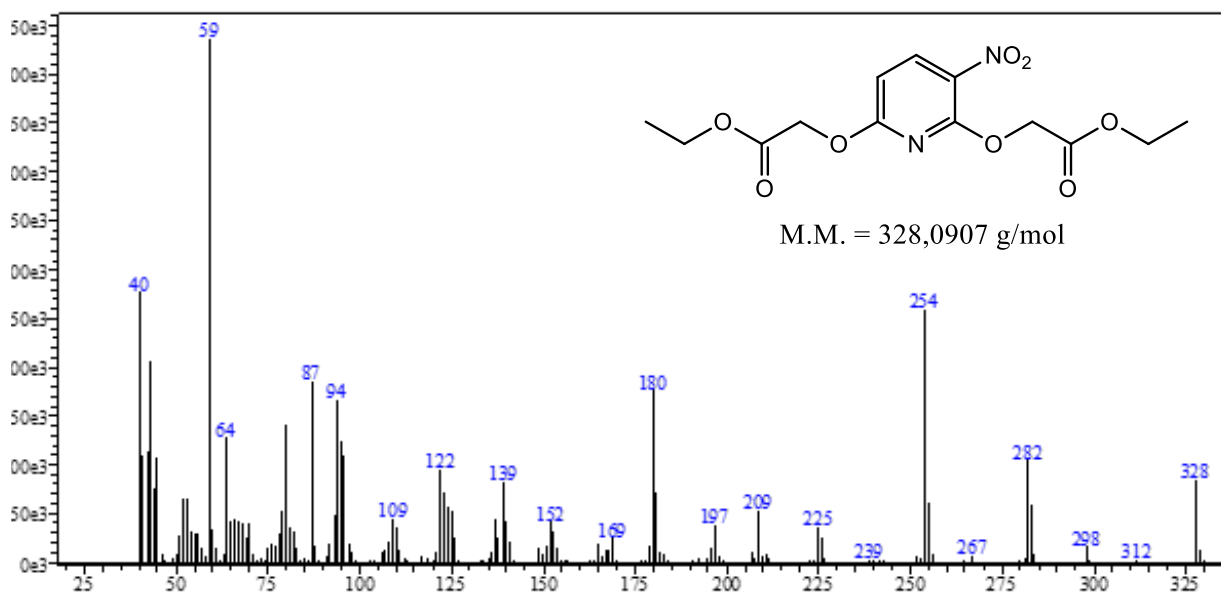
-17.2279	 <p>Chemical structure of 2,6-bis(2-hydroxyethyl)pyrimidin-4-nitro compound. It features a pyrimidine ring with a nitro group (NO<sub>2</sub>) at the 4-position and two 2-hydroxyethyl groups attached at the 2 and 6 positions.</p>
-17.0168	 <p>Chemical structure of 2,6-bis(2-hydroxyethylsulfanyl)pyrimidin-4-nitro compound. It features a pyrimidine ring with a nitro group (NO<sub>2</sub>) at the 4-position and two 2-hydroxyethylsulfanyl groups attached at the 2 and 6 positions.</p>
-16.4471	 <p>Chemical structure of 2,6-bis(2-ethoxyethylsulfanyl)pyrimidin-4-nitro compound. It features a pyrimidine ring with a nitro group (NO<sub>2</sub>) at the 4-position and two 2-ethoxyethylsulfanyl groups attached at the 2 and 6 positions.</p>
-15.0595	 <p>Chemical structure of 2-(2-ethoxyethylsulfanyl)pyridin-4-amine. It features a pyridine ring with an amino group (H<sub>2</sub>N) at the 4-position and a 2-ethoxyethylsulfanyl group attached at the 2-position.</p>
-14.4306	 <p>Chemical structure of 2-(2-ethoxyethyloxy)imidazo[1,2-a]pyridin-3(2H)-one. It features an imidazo[1,2-a]pyridin-3(2H)-one ring system with a 2-ethoxyethyloxy group attached at the 2-position.</p>
-14.2736	 <p>Chemical structure of 2-(2-hydroxyethyloxy)imidazo[1,2-a]pyridin-3(2H)-one. It features an imidazo[1,2-a]pyridin-3(2H)-one ring system with a 2-hydroxyethyloxy group attached at the 2-position.</p>
-9.6061	 <p>Chemical structure of 2,6-bis(2-hydroxyethyl)pyridin-4-nitro compound. It features a pyridine ring with a nitro group (NO<sub>2</sub>) at the 4-position and two 2-hydroxyethyl groups attached at the 2 and 6 positions.</p>

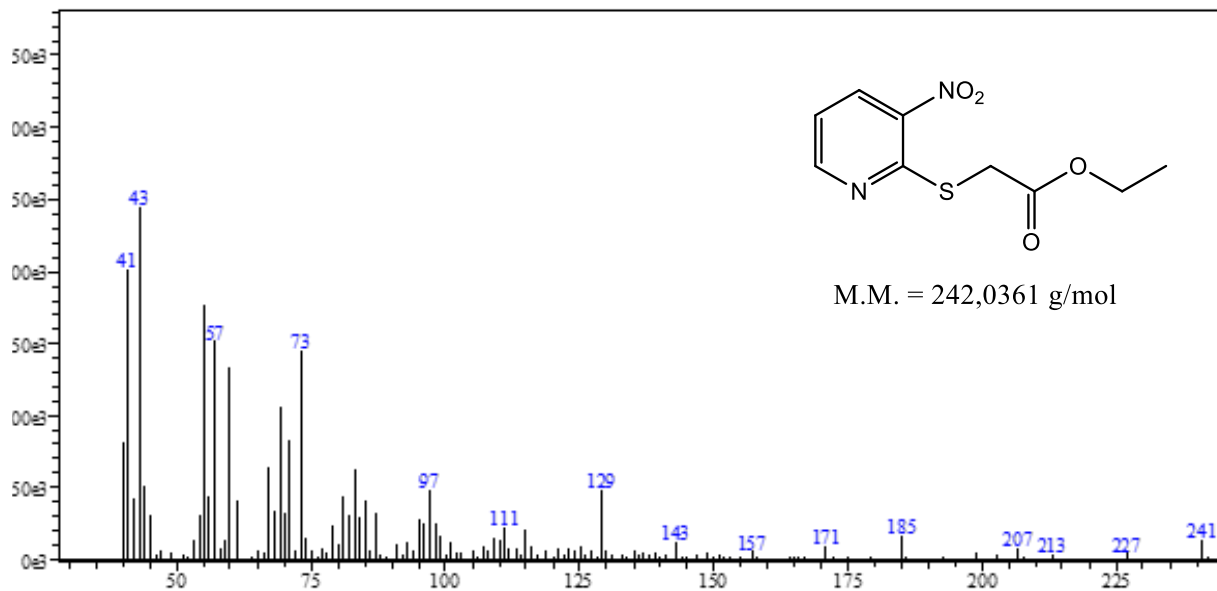
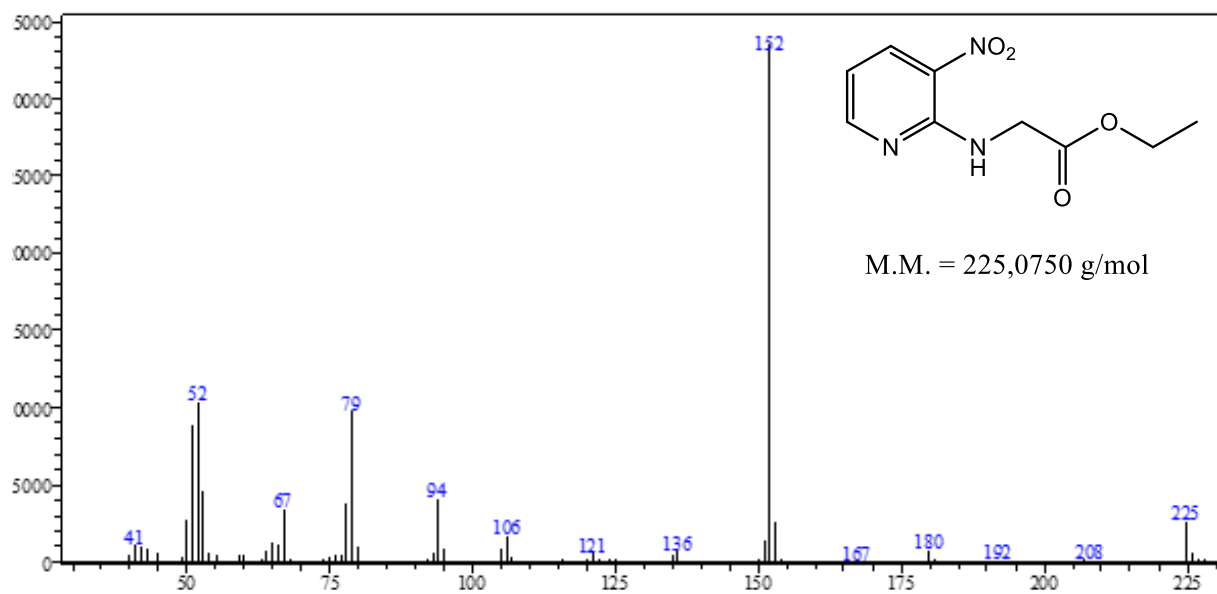
## APÊNDICE C – ESPECTROS DE EM-IE

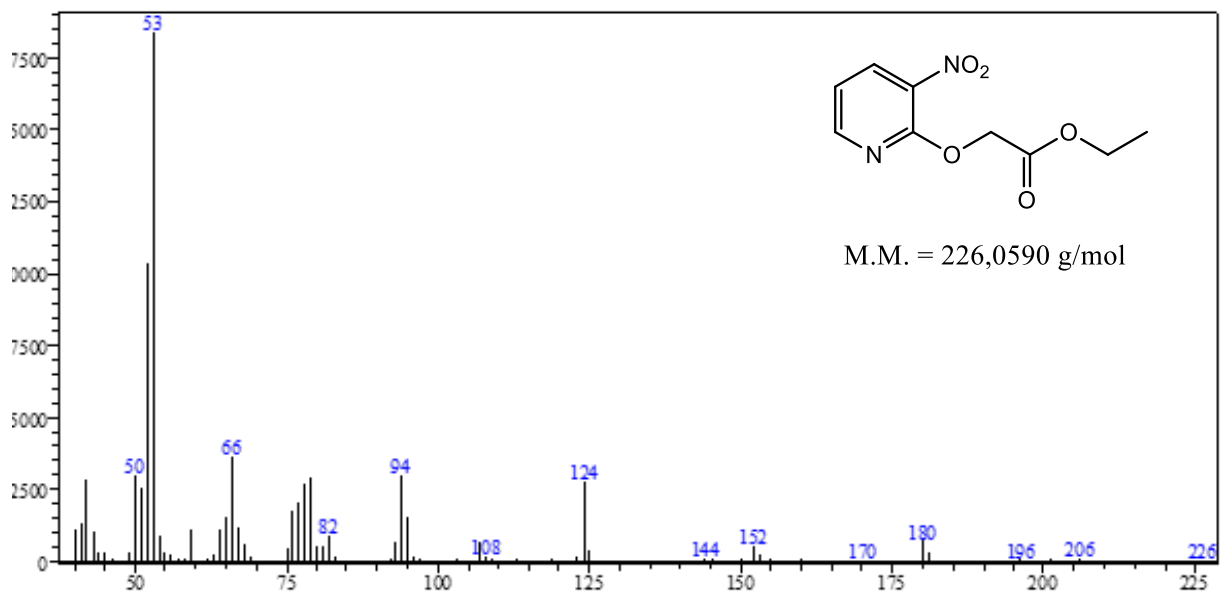
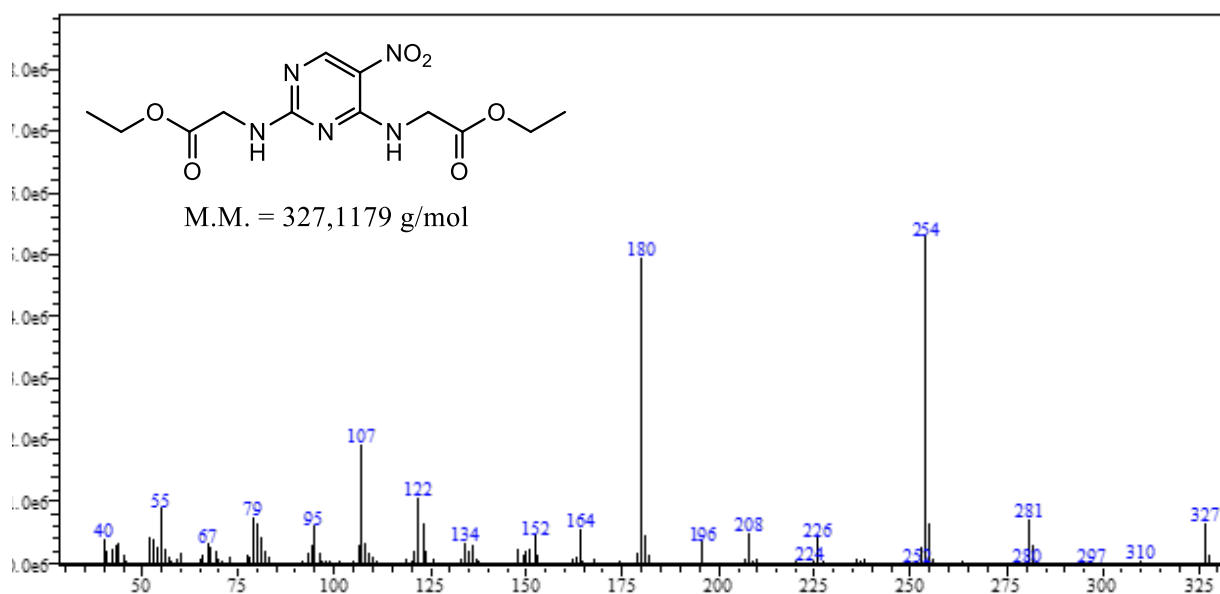
Espectro 37 - Espectro de EM-IE do composto 45

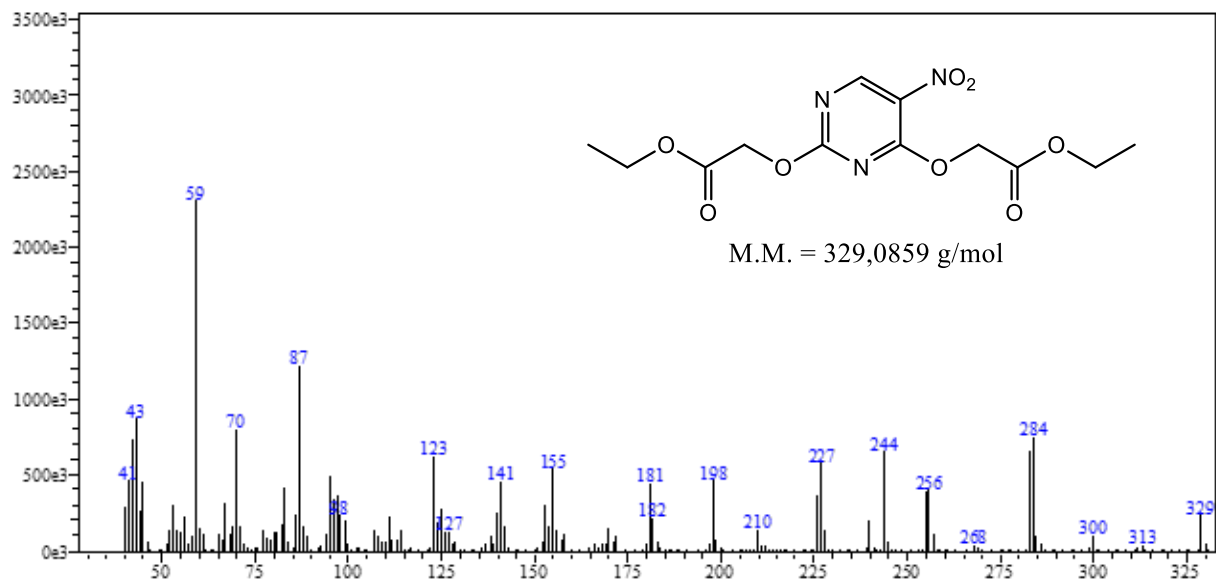
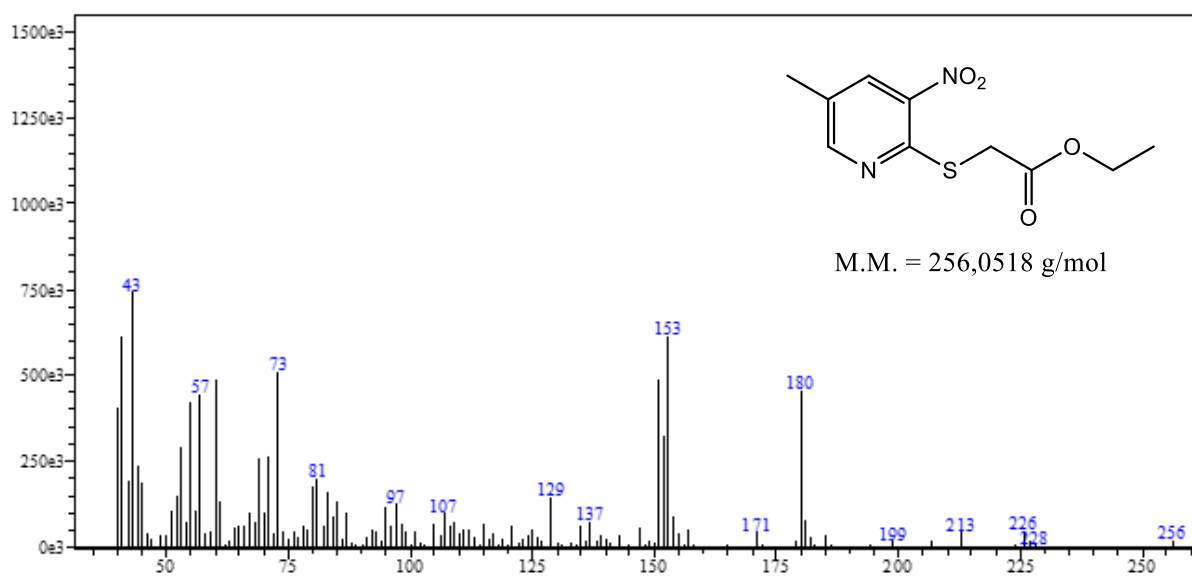


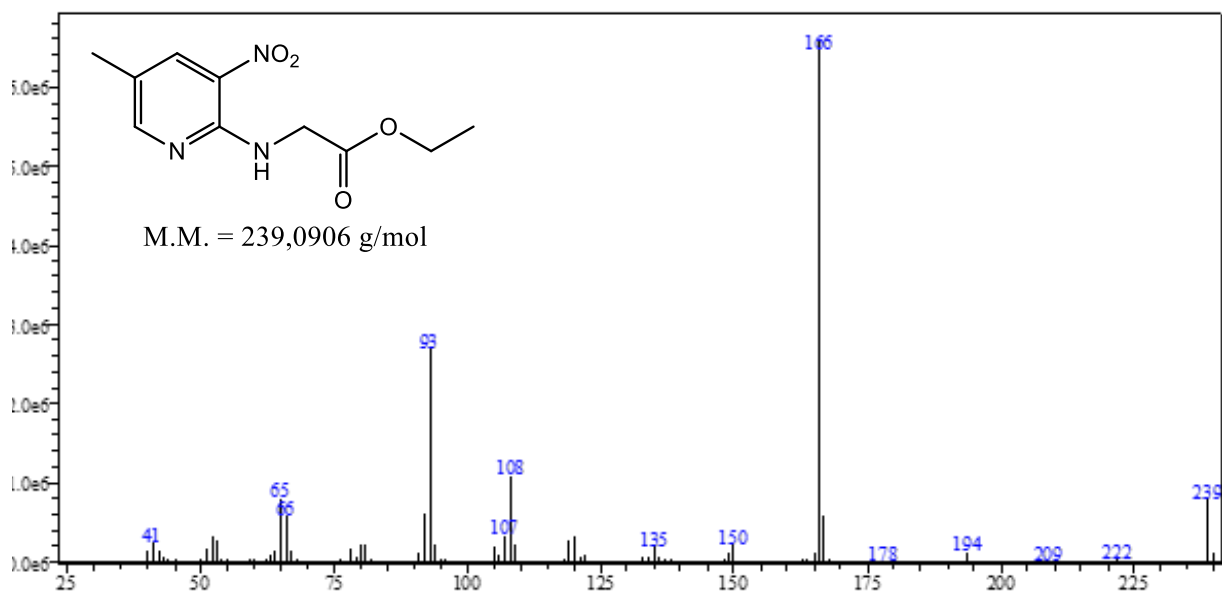
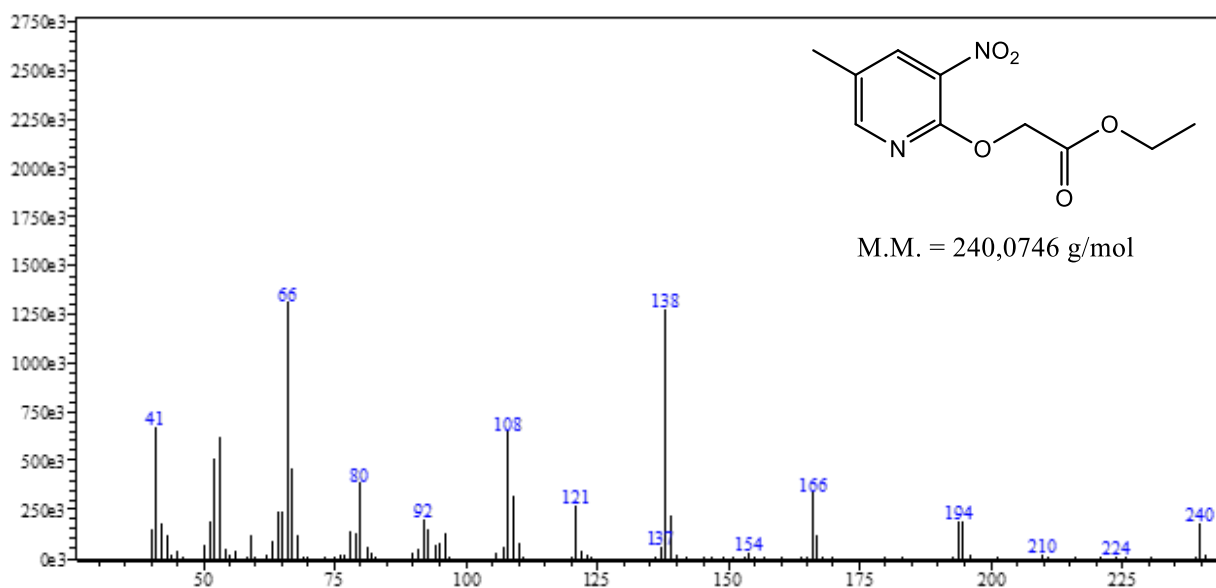
Espectro 38 - Espectro de EM-IE do composto 47



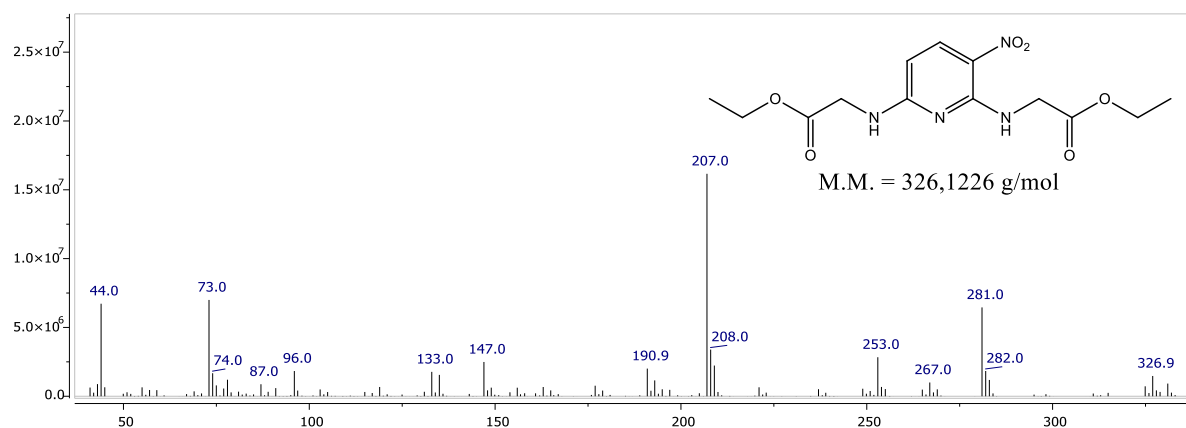
**Espectro 39** - Espectro de EM-IE do composto **48****Espectro 40** - Espectro de EM-IE do composto **49**

**Espectro 41** – Espectro de EM-IE do composto **50****Espectro 42** - Espectro de EM-IE do composto **52**

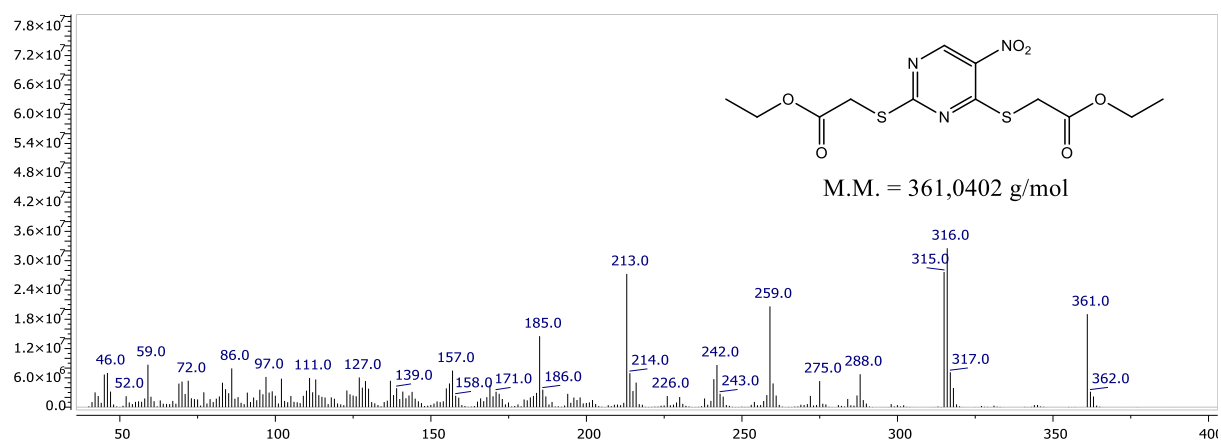
**Espectro 43** - Espectro de EM-IE do composto **53****Espectro 44** - Espectro de EM-IE do composto **54**

**Espectro 45** - Espectro de EM-IE do composto **55****Espectro 46** - Espectro de EM-IE do composto **56**

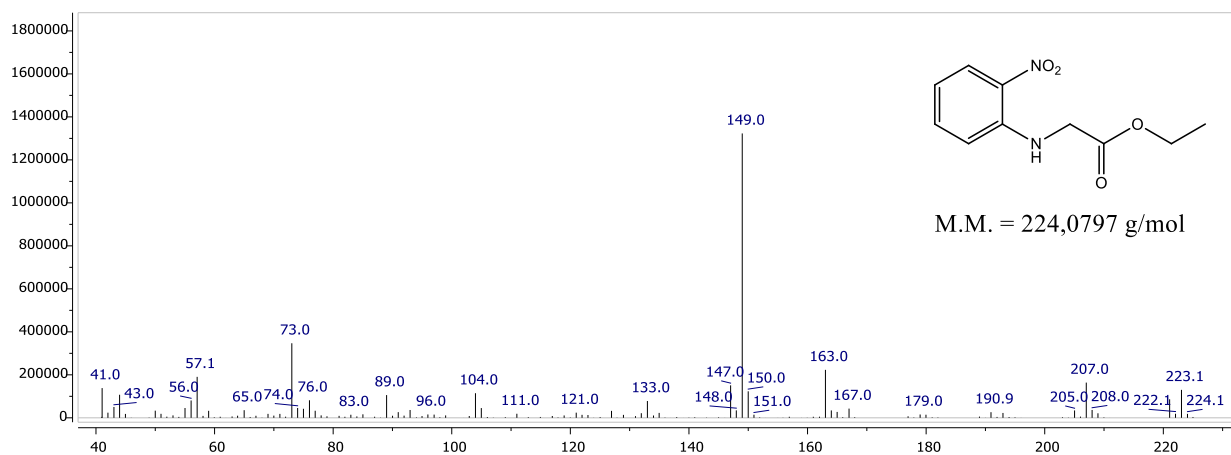
### Espectro 47 - Espectro de EM-IE do composto 46



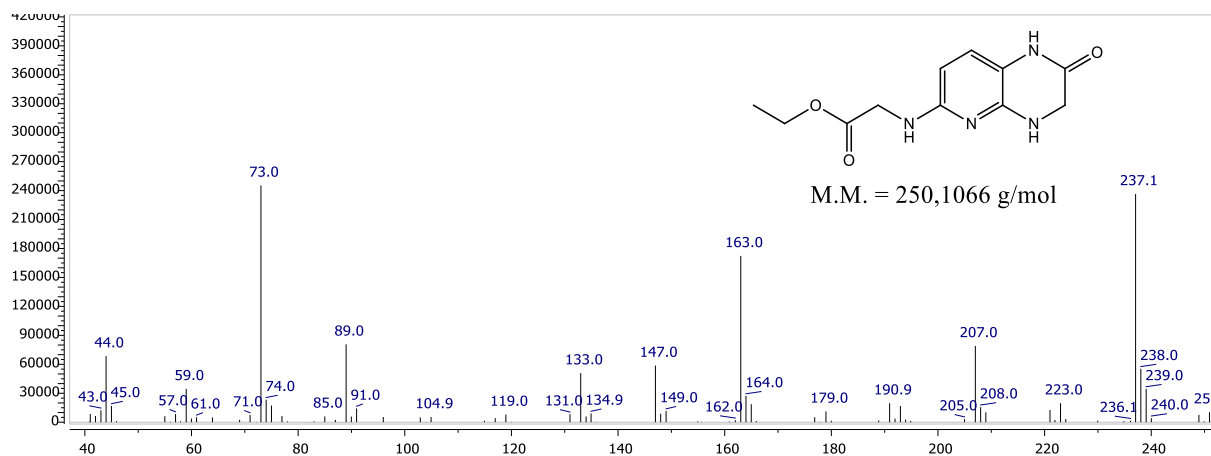
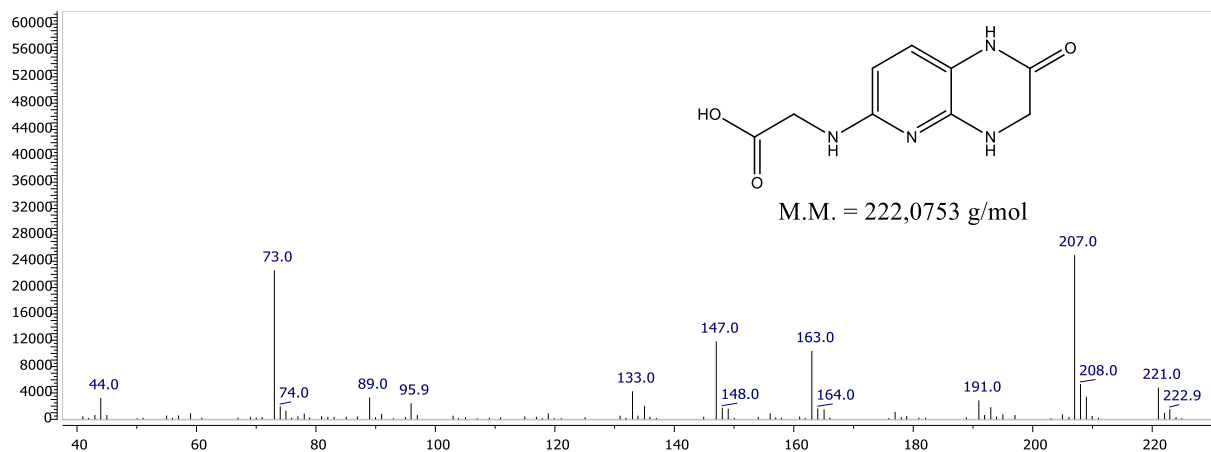
### Espectro 48 - Espectro de EM-IE do composto 51



### Espectro 49 - Espectro de EM-IE do composto 57

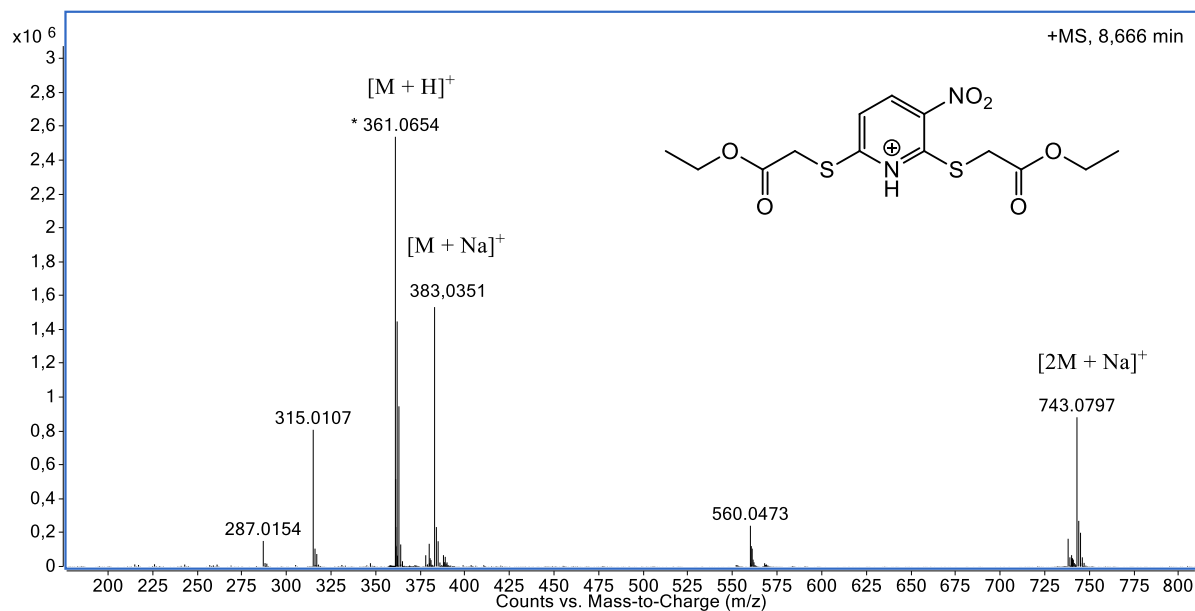




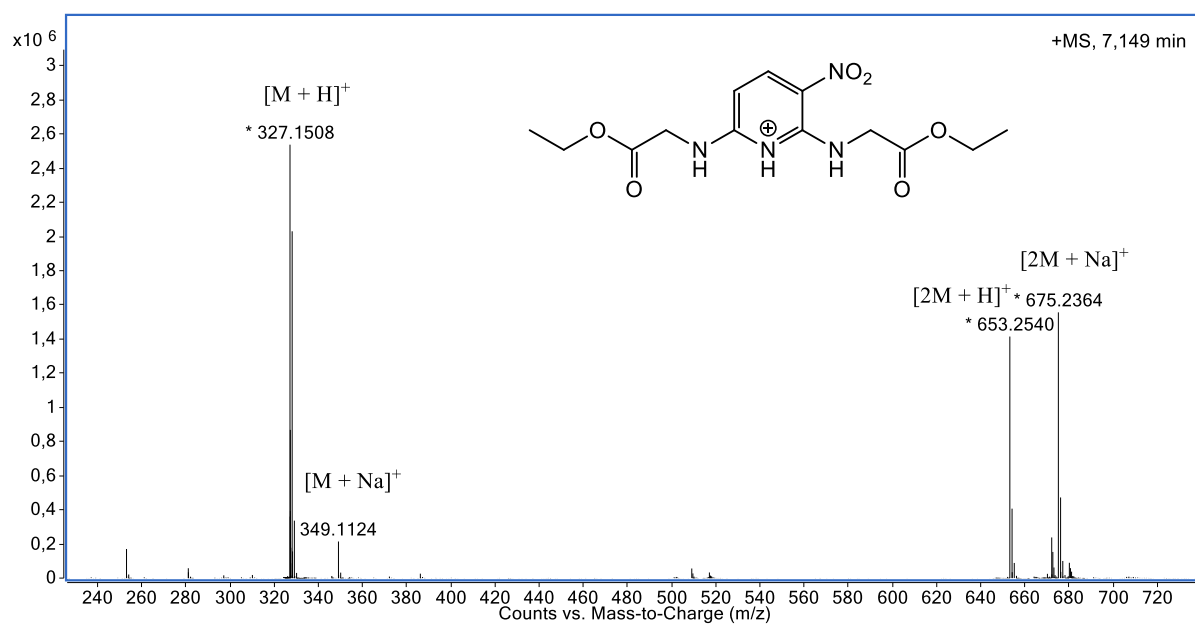
**Espectro 50 - Espectro de EM-IE do composto 58****Espectro 51 - Espectro de EM-IE do composto 59**

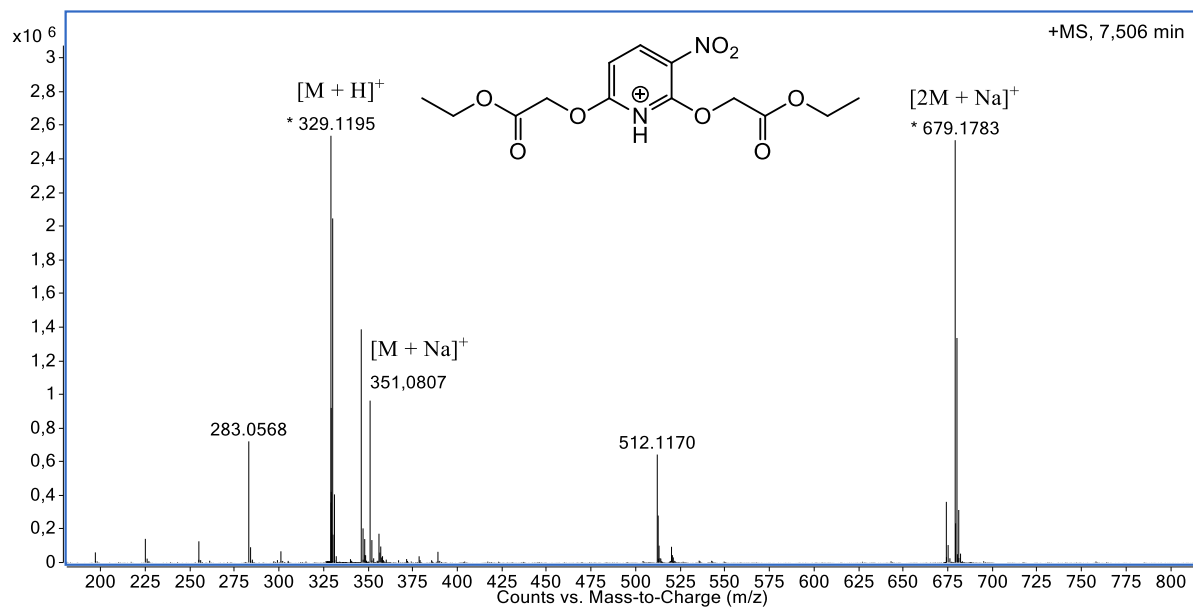
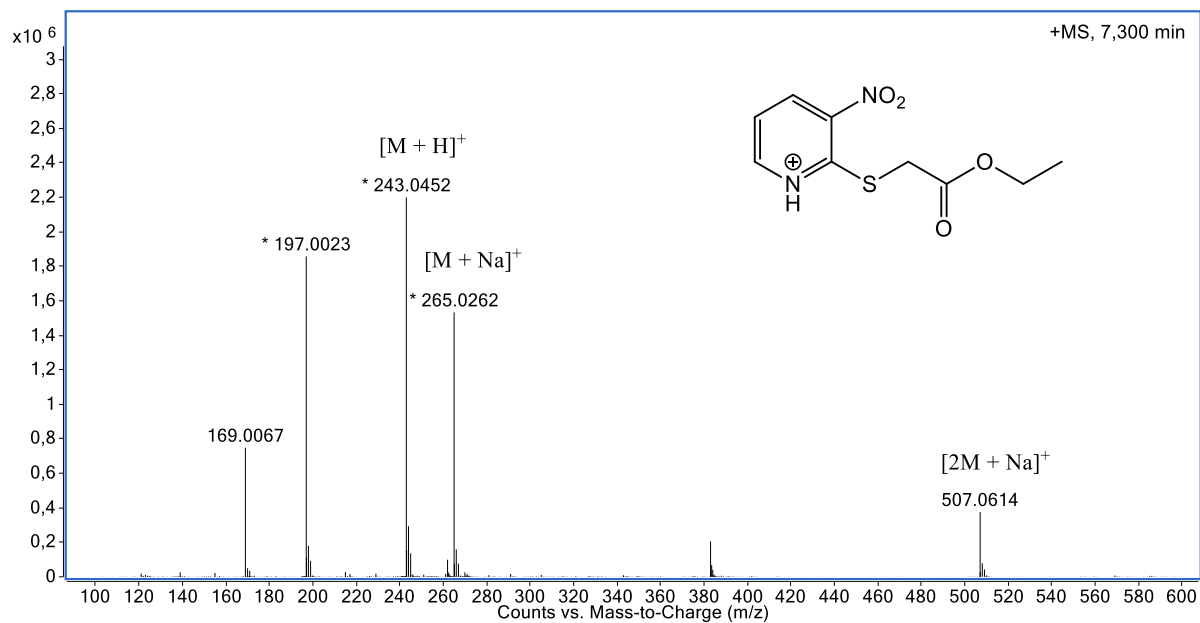
## APÊNDICE D – ESPECTROS DE EM-IES

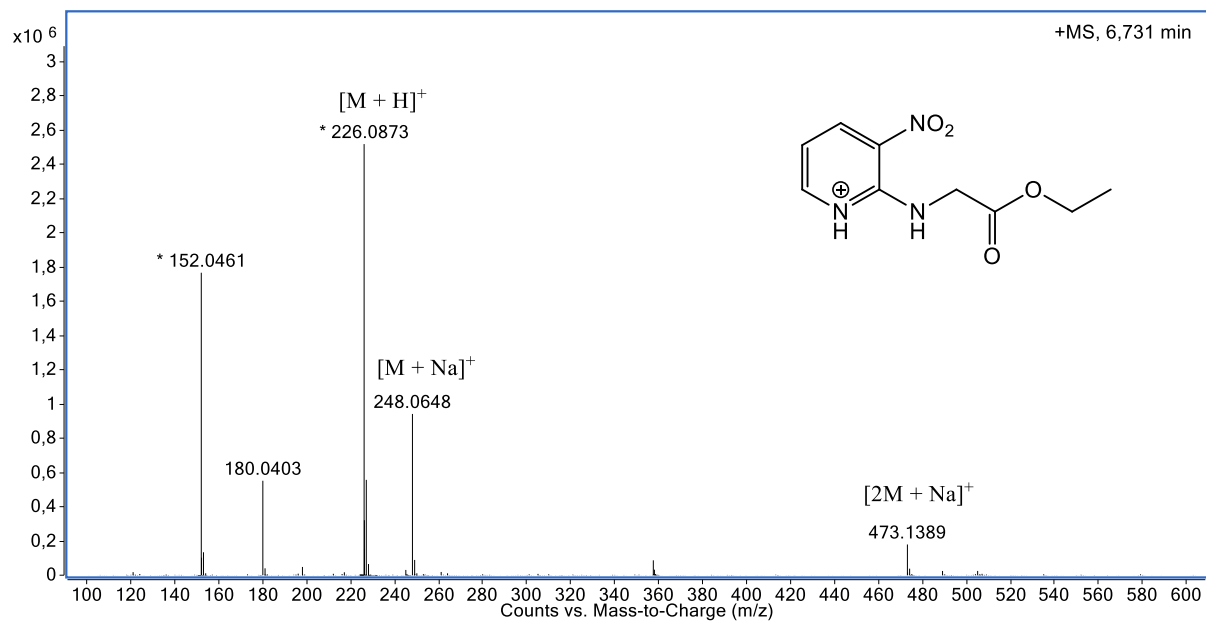
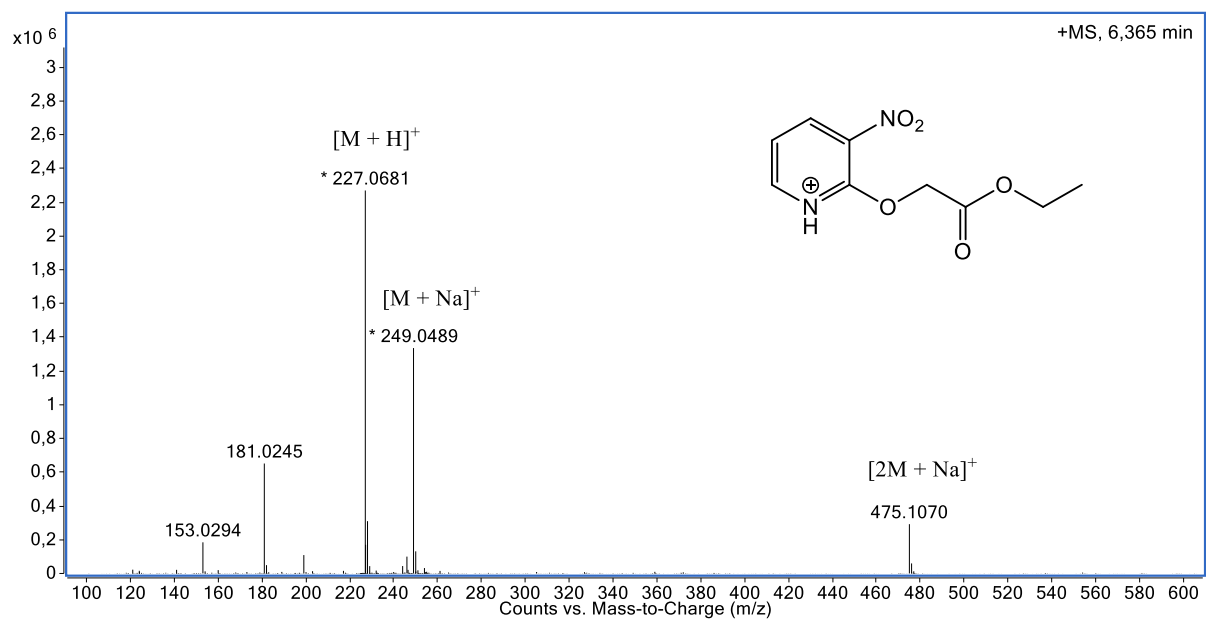
## Espectro 52 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 45

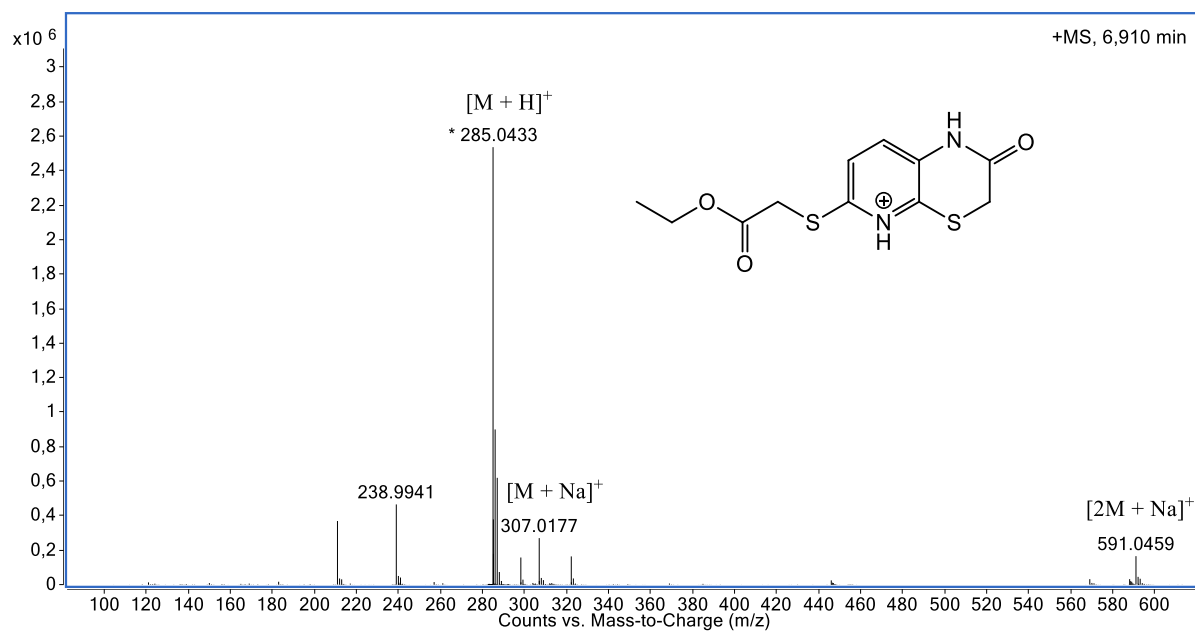
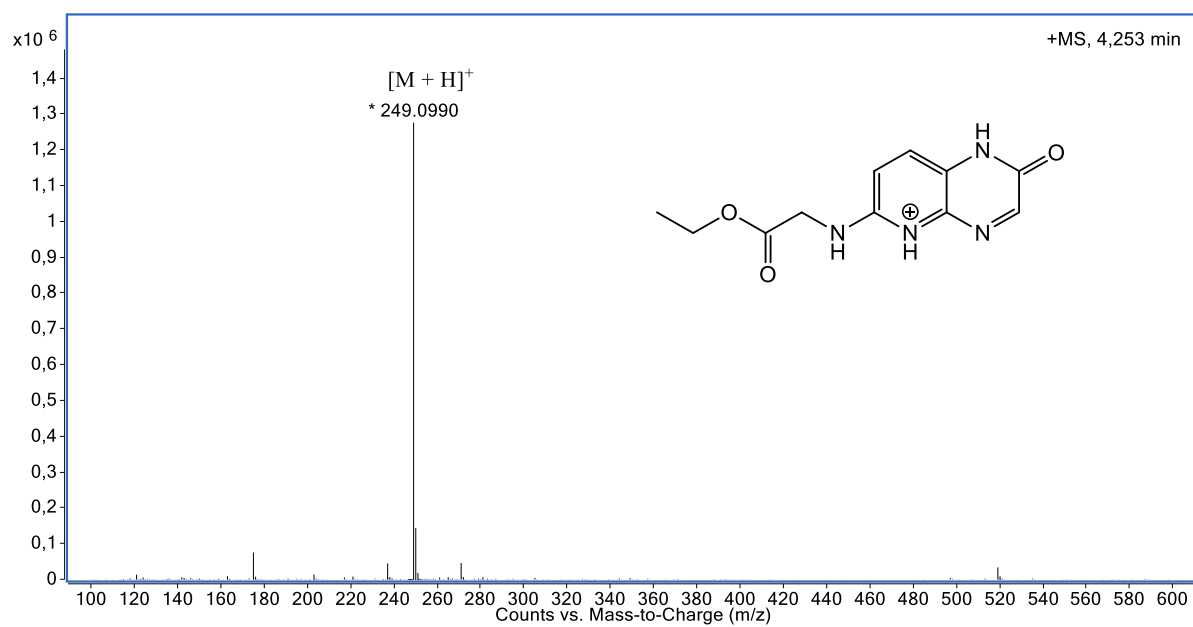


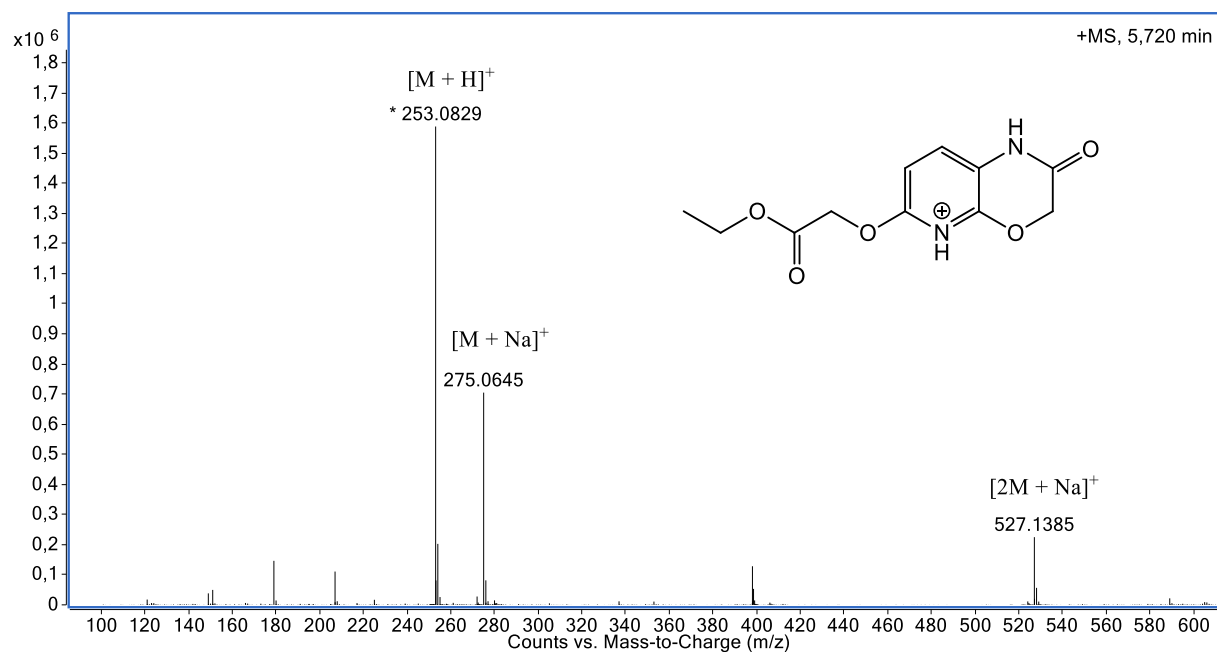
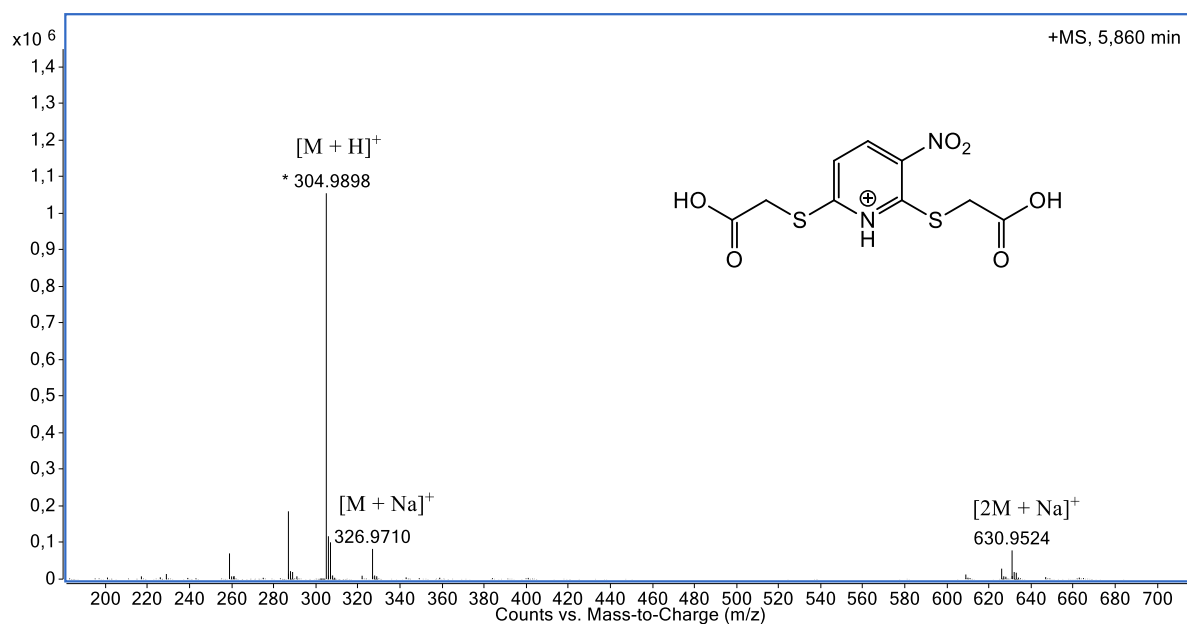
## Espectro 53 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 46

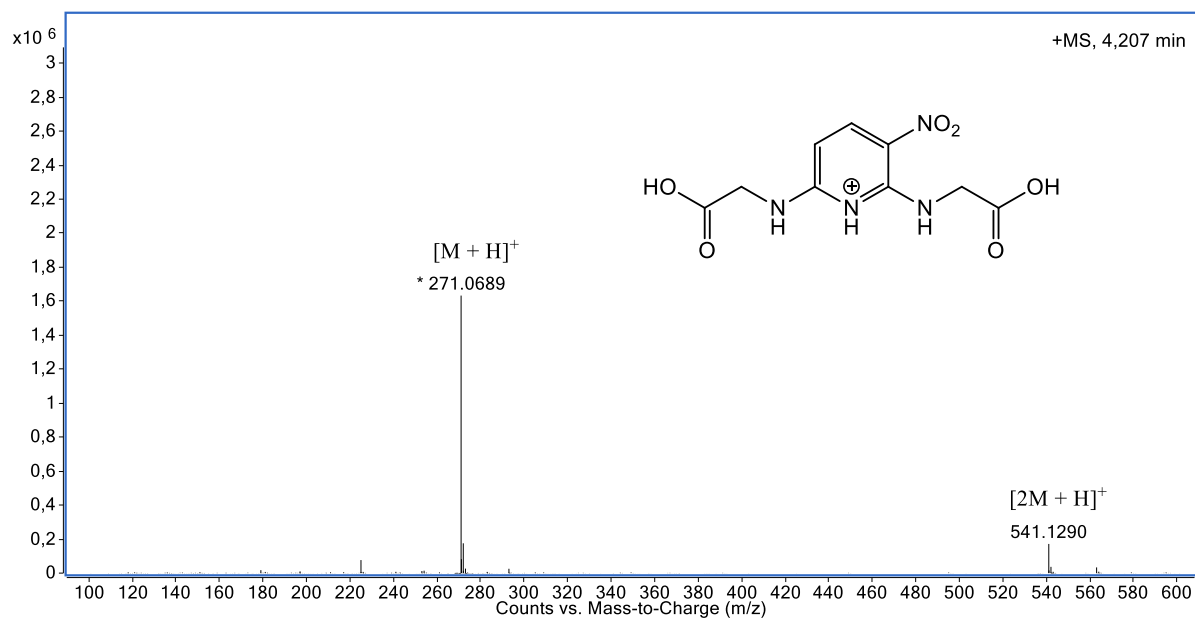
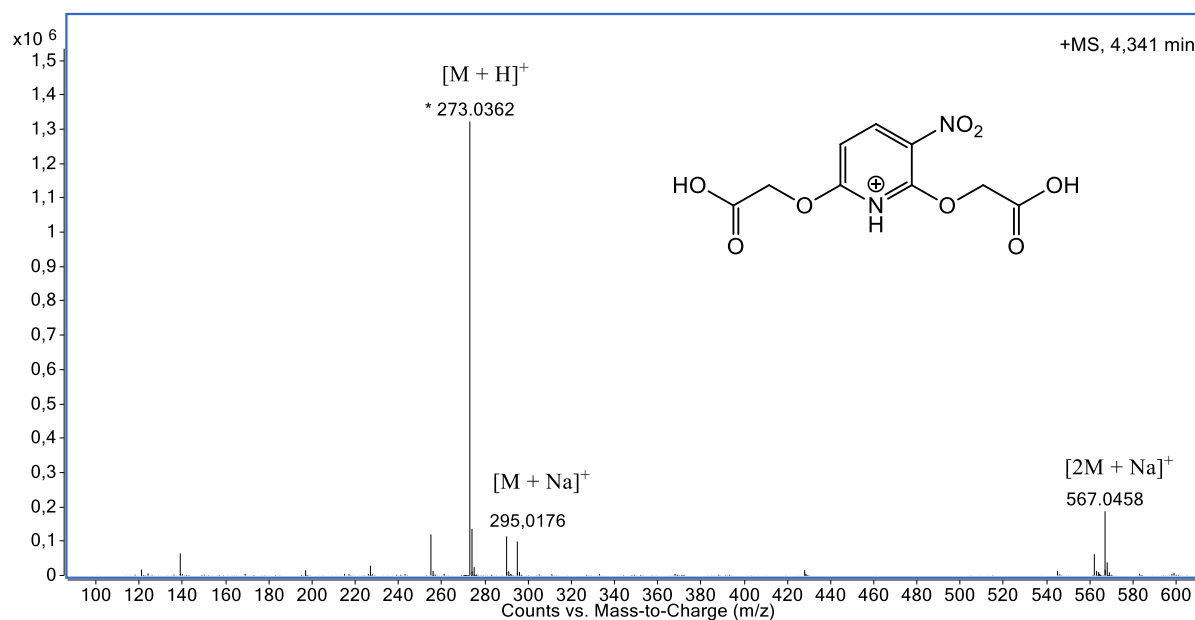


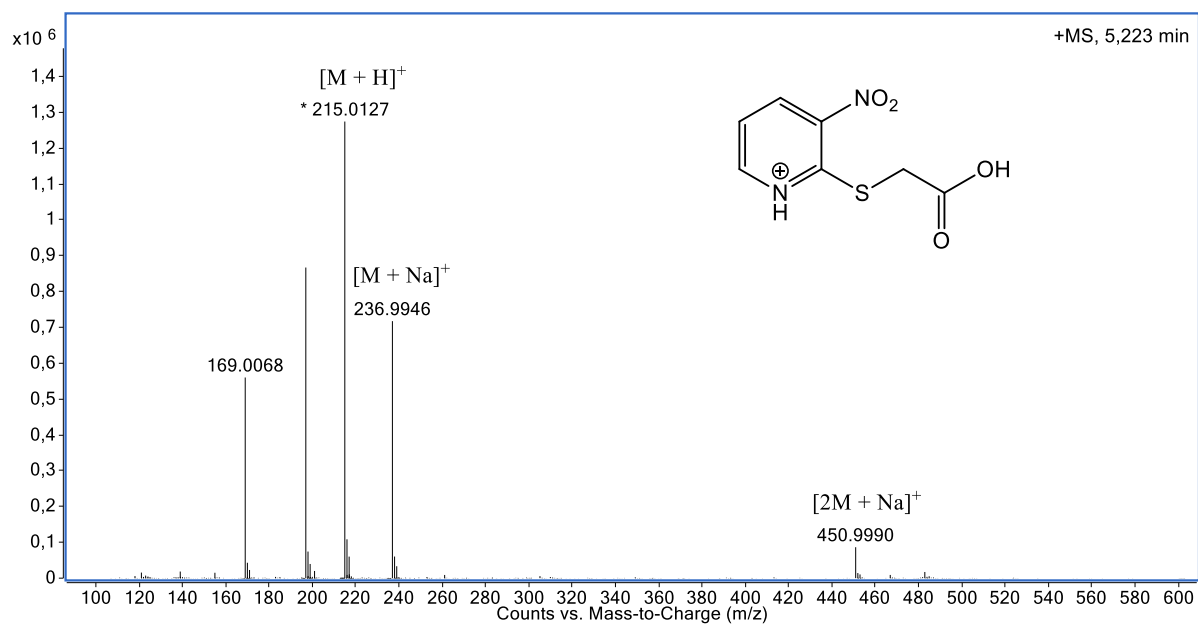
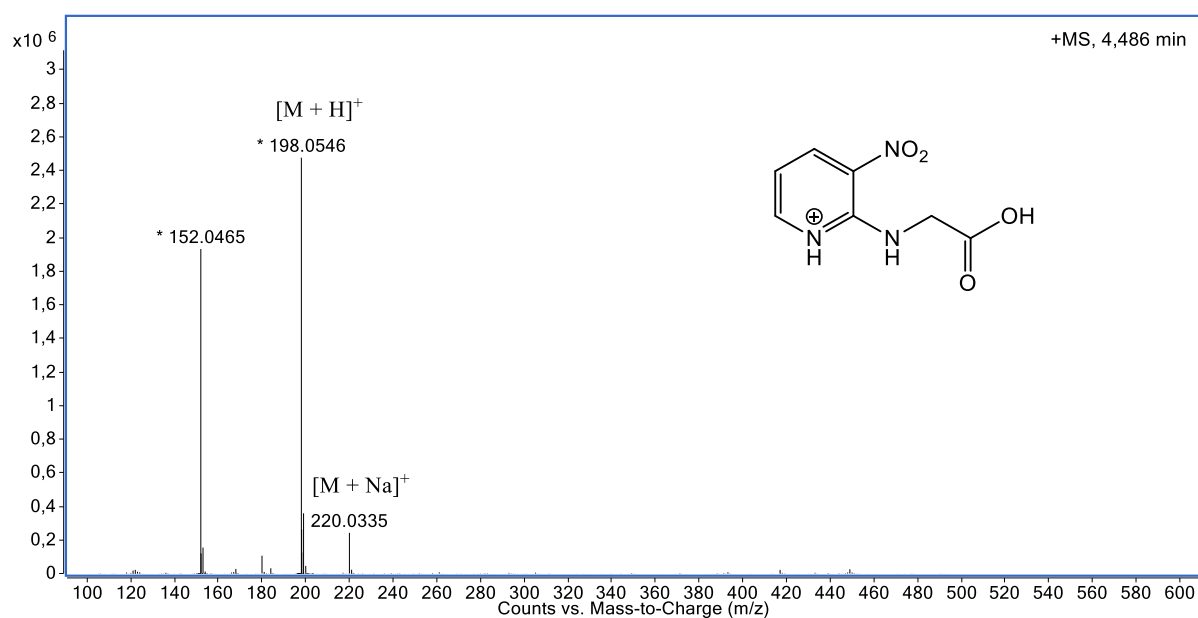
**Espectro 54 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 47****Espectro 55 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 48**

**Espectro 56 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 49****Espectro 57 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 50**

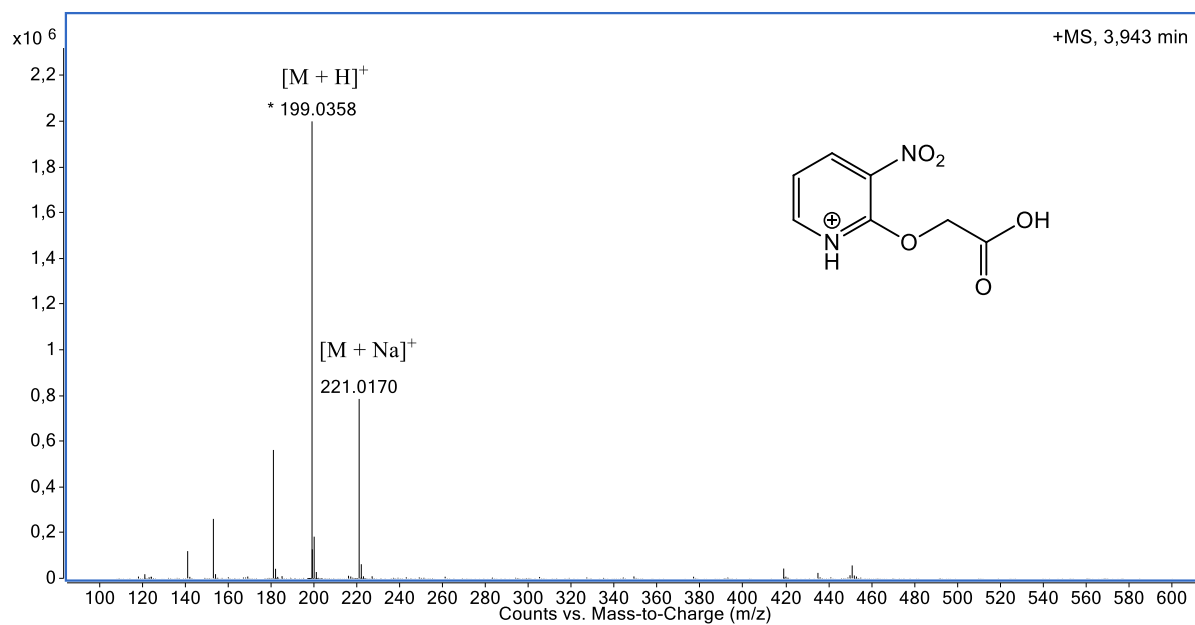
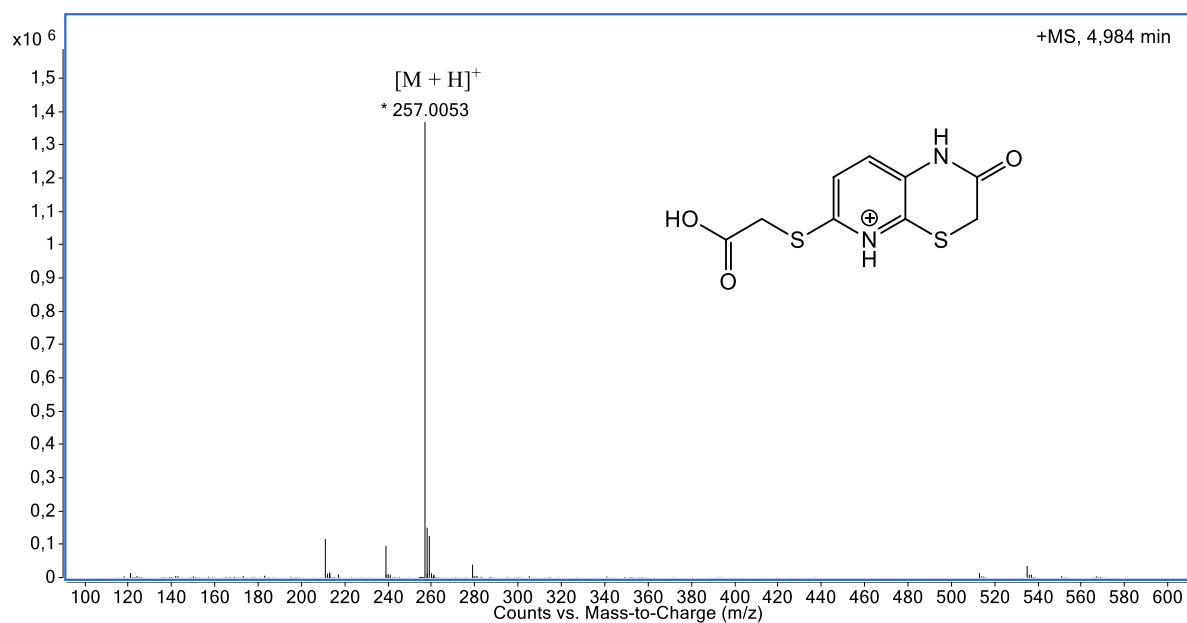
**Espectro 58 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 58****Espectro 59 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 59a**

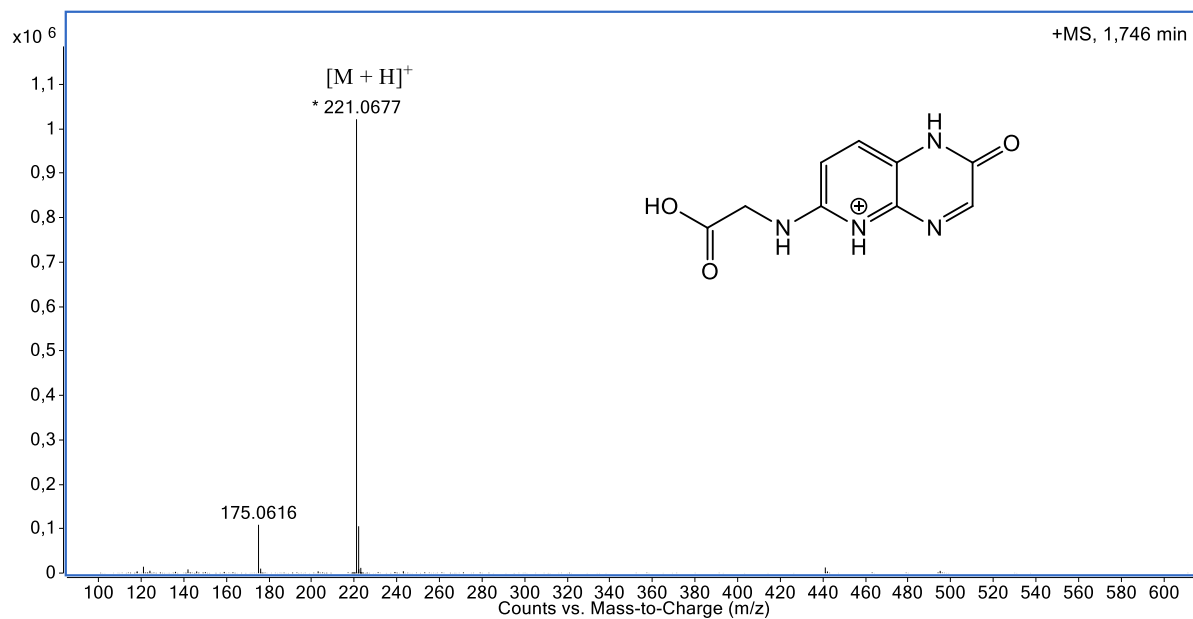
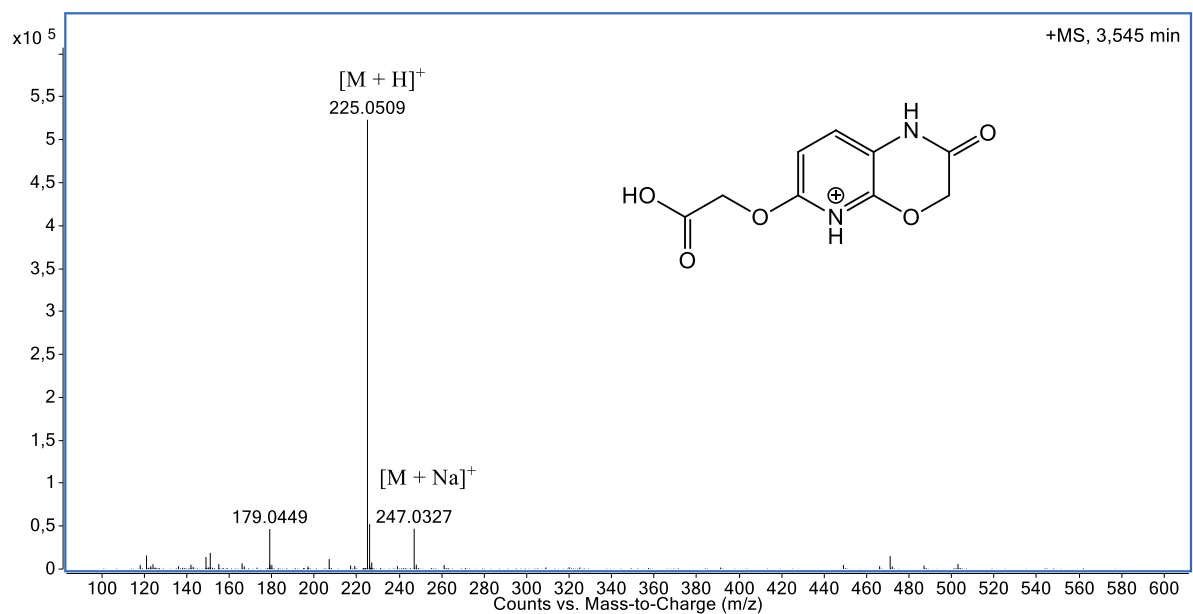
**Espectro 60 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 60****Espectro 61 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 61**

**Espectro 62 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 62****Espectro 63 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 63**

**Espectro 64 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 64****Espectro 65 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 65**

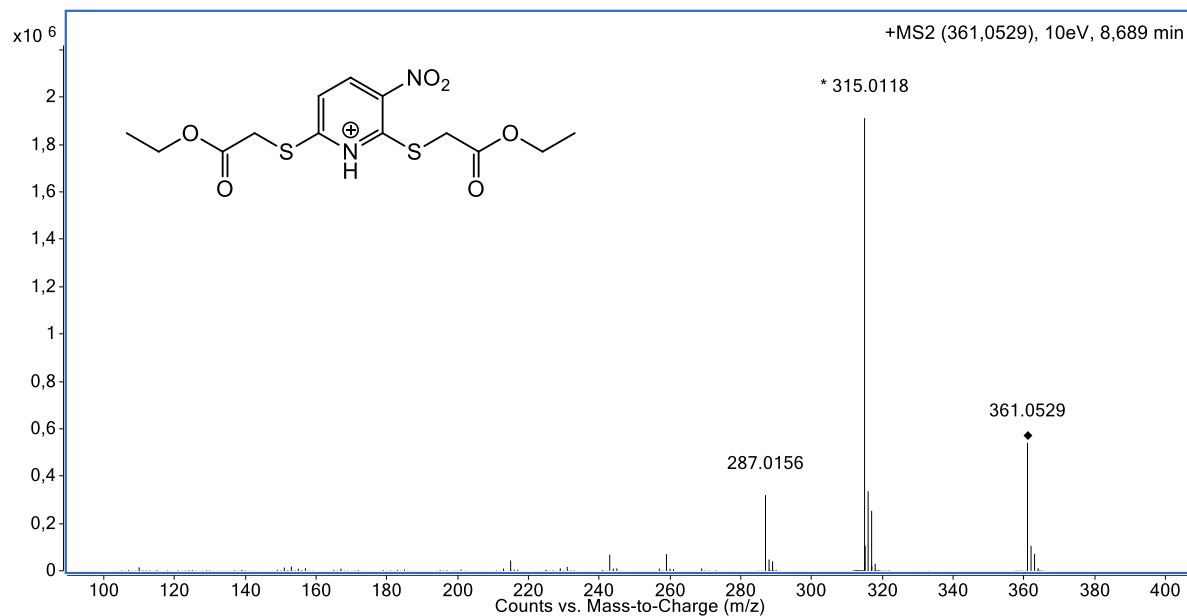


**Espectro 66 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 66****Espectro 67 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 67**

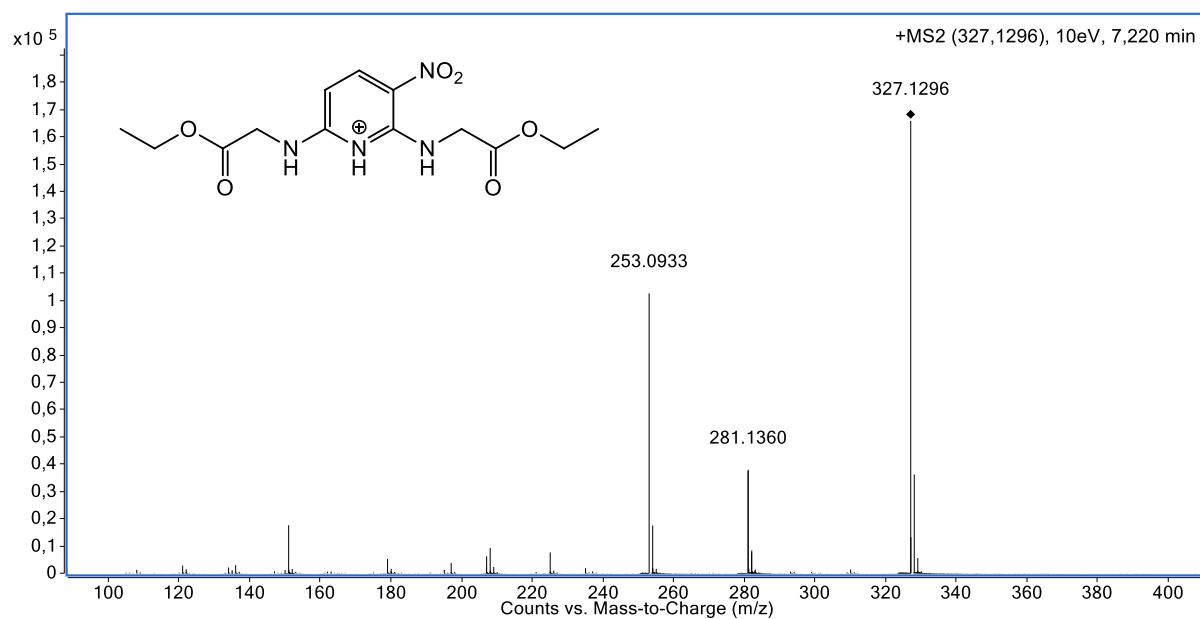
**Espectro 68 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 68a****Espectro 69 - EM-IES-(+) alta resolução do composto 69**

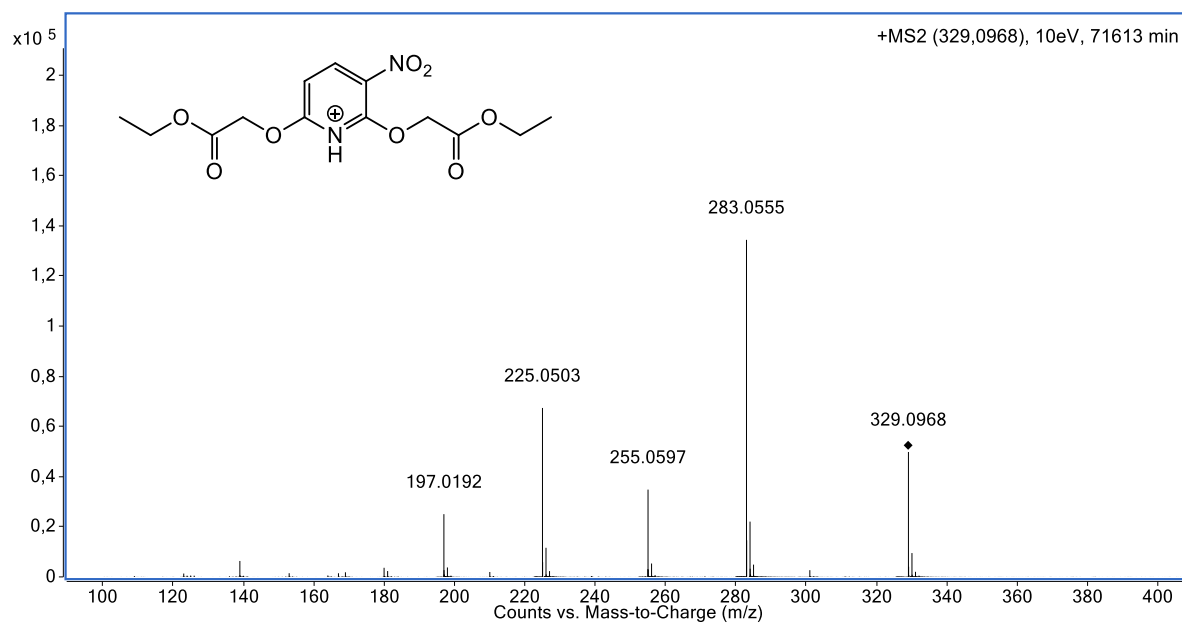
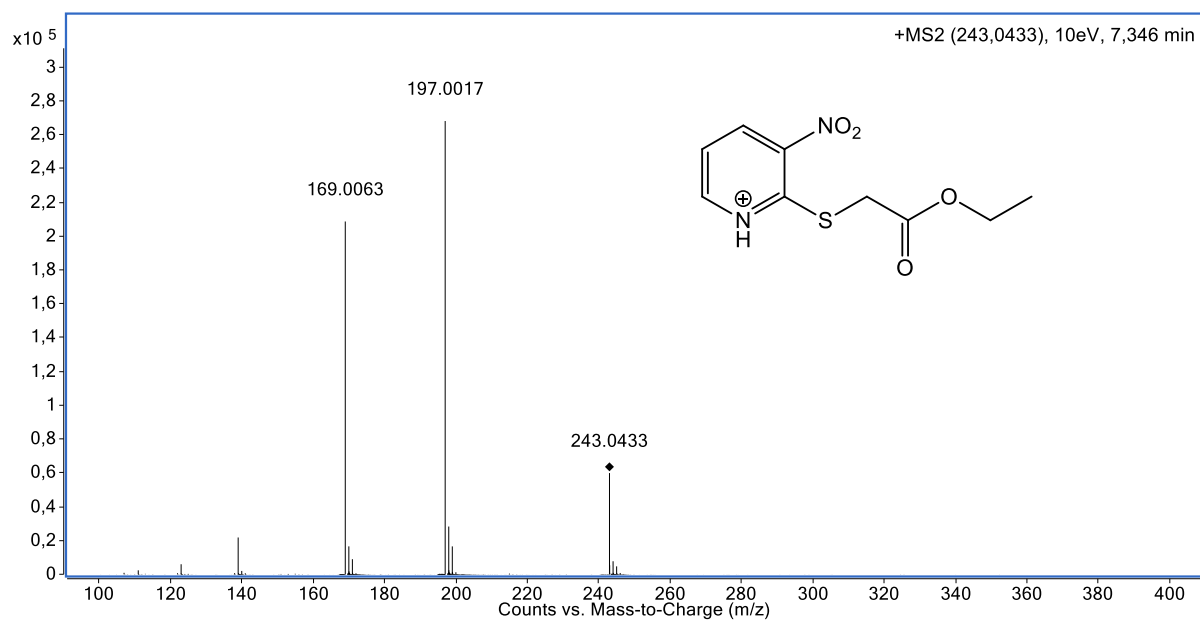
## APÊNDICE E - ESPECTROS DE EM-EM-IES

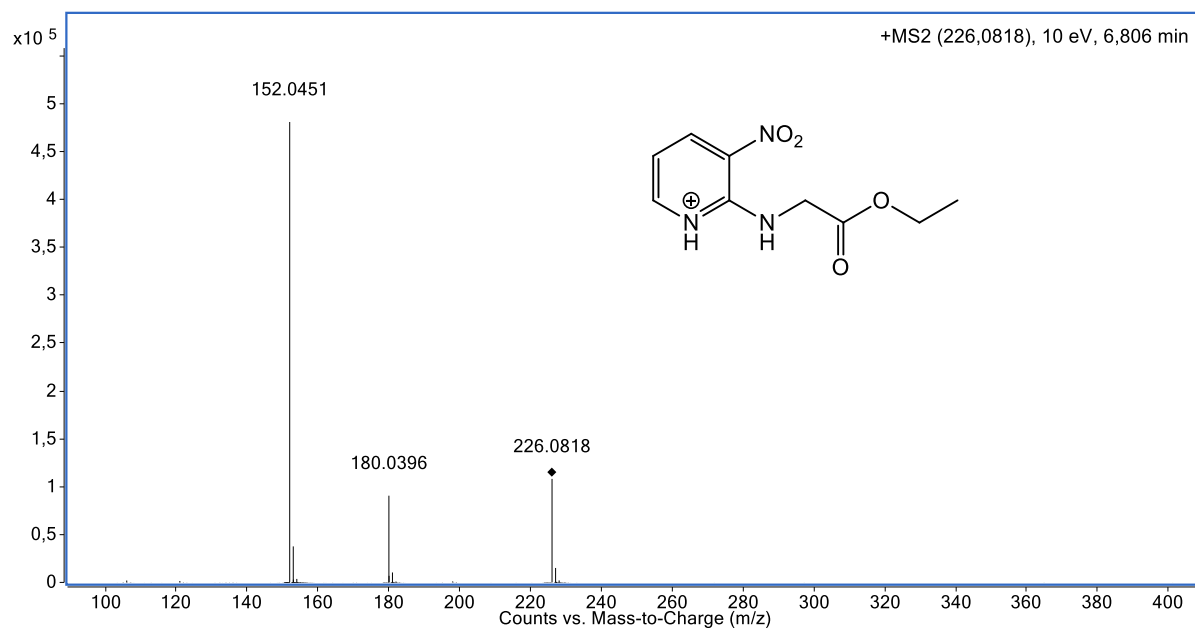
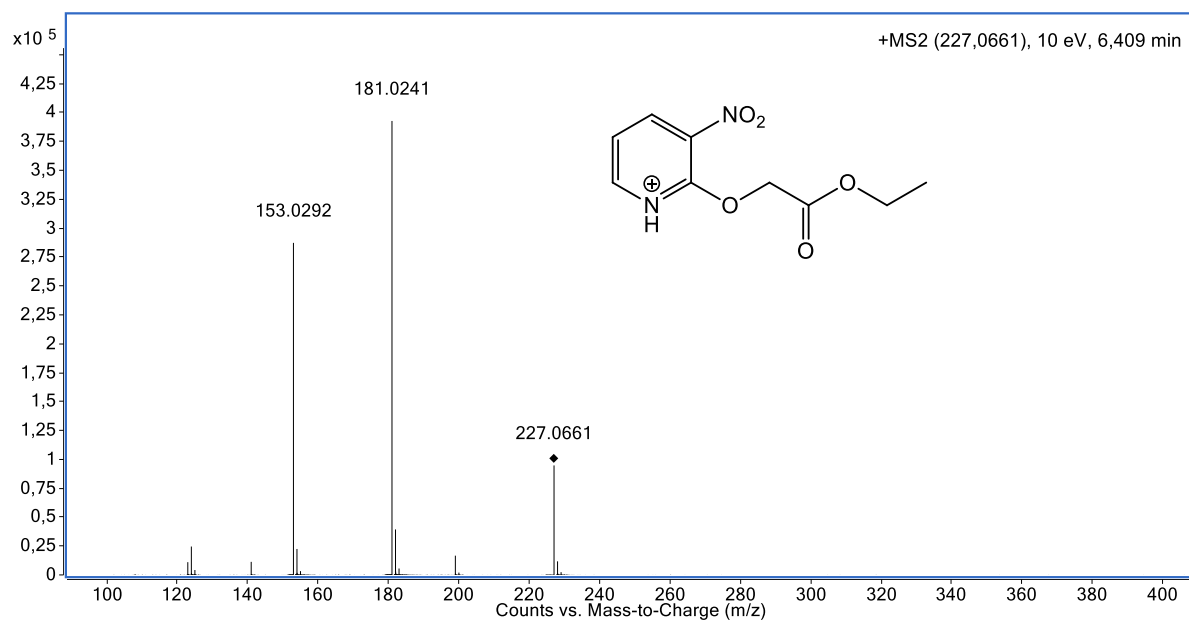
## Espectro 70 - EM-EM-IES-(+) do composto 45

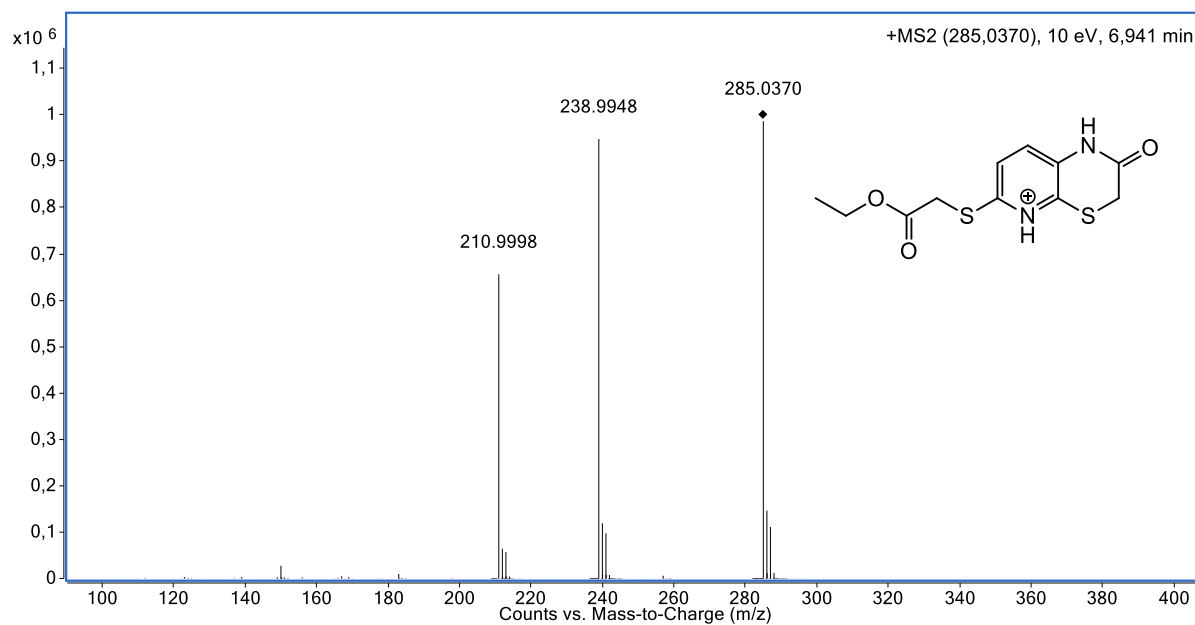
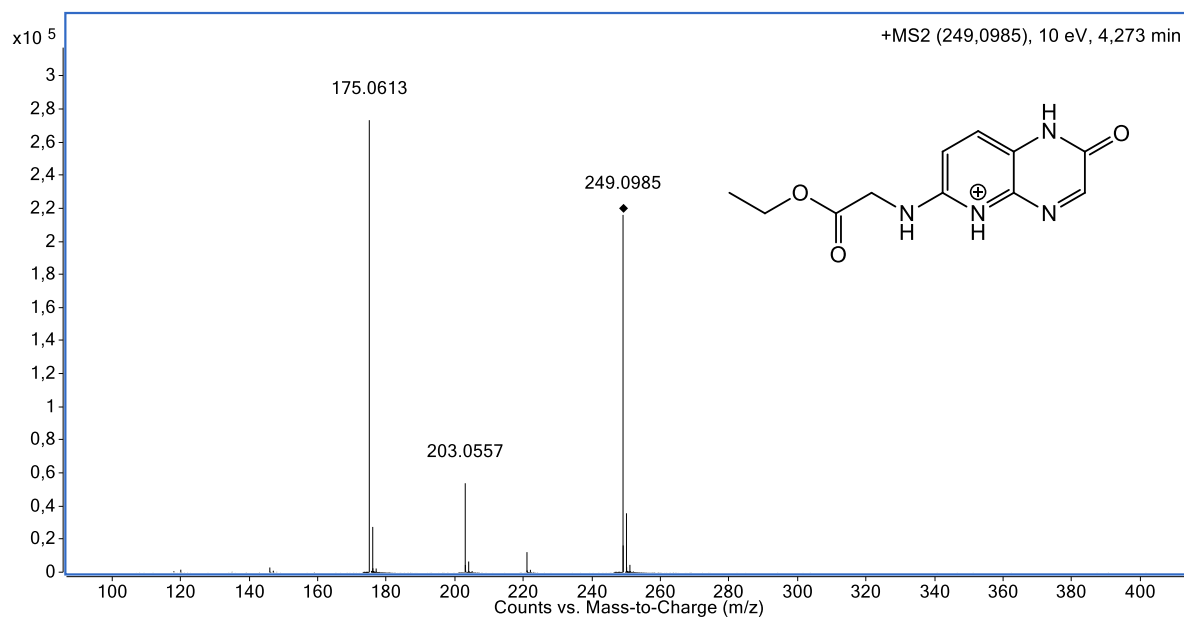


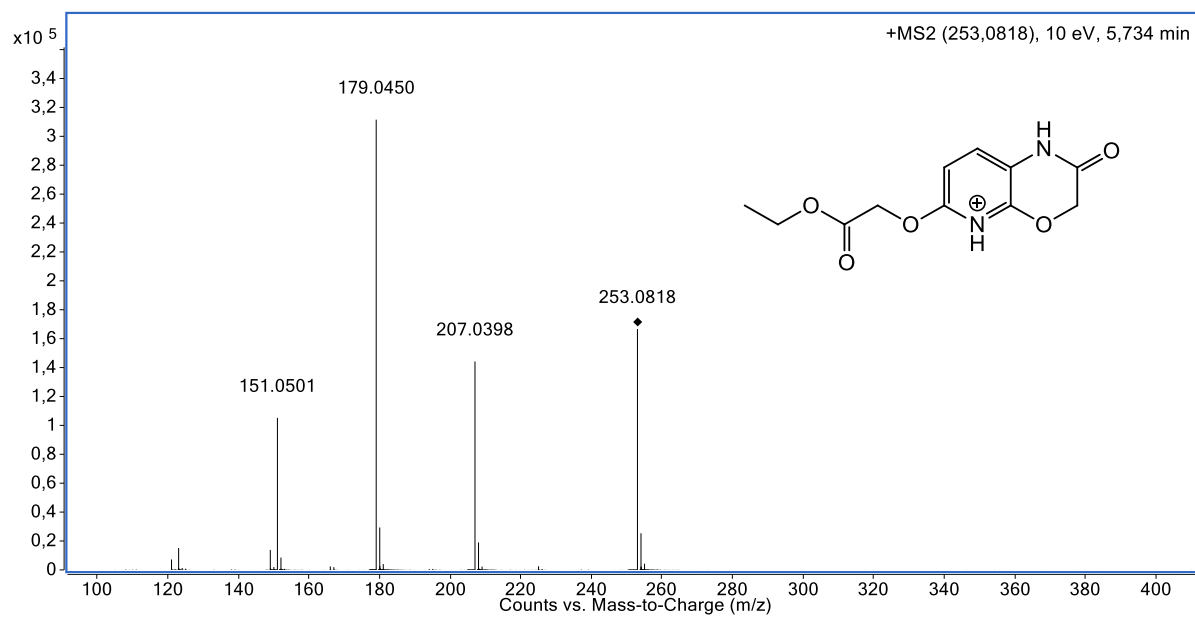
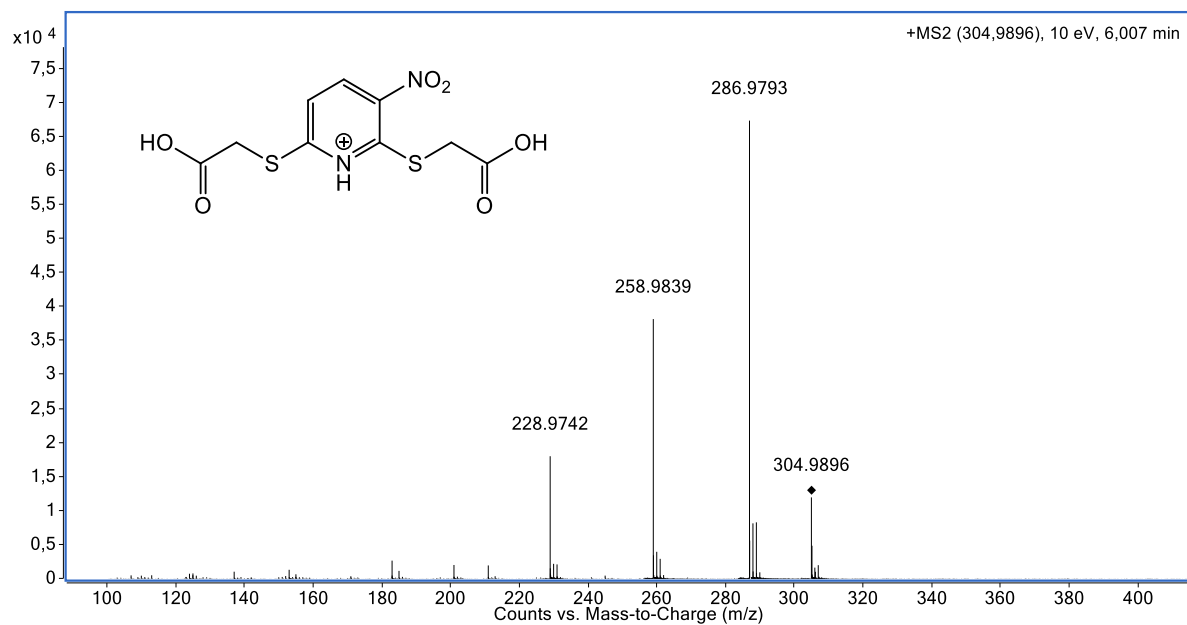
## Espectro 71 - EM-EM-IES-(+) do composto 46

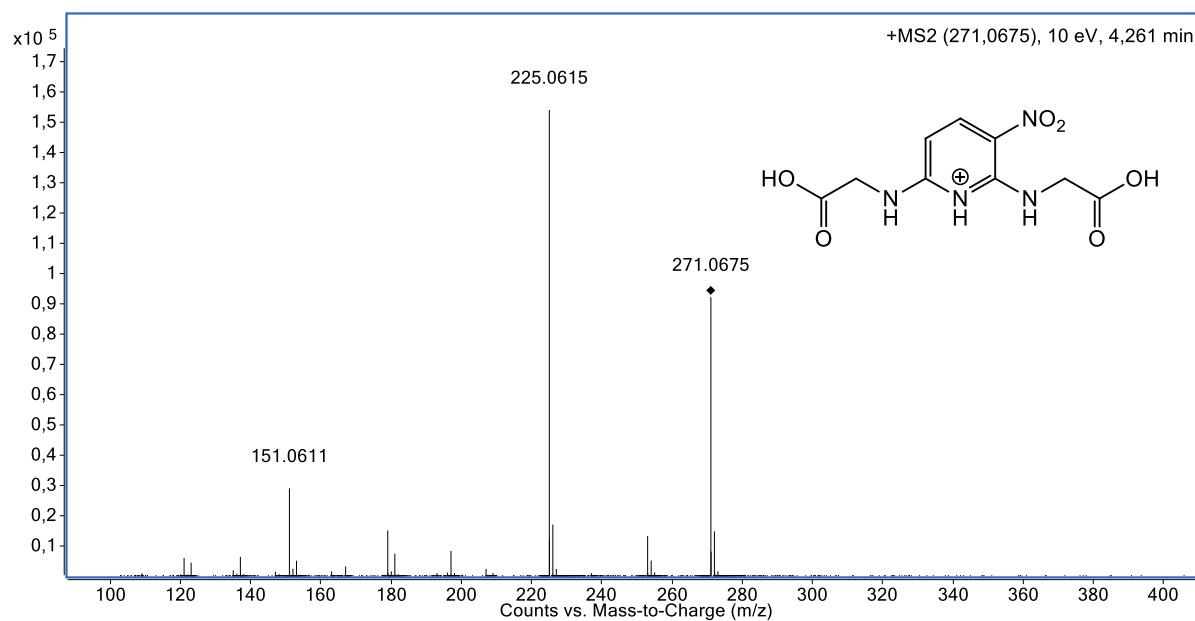
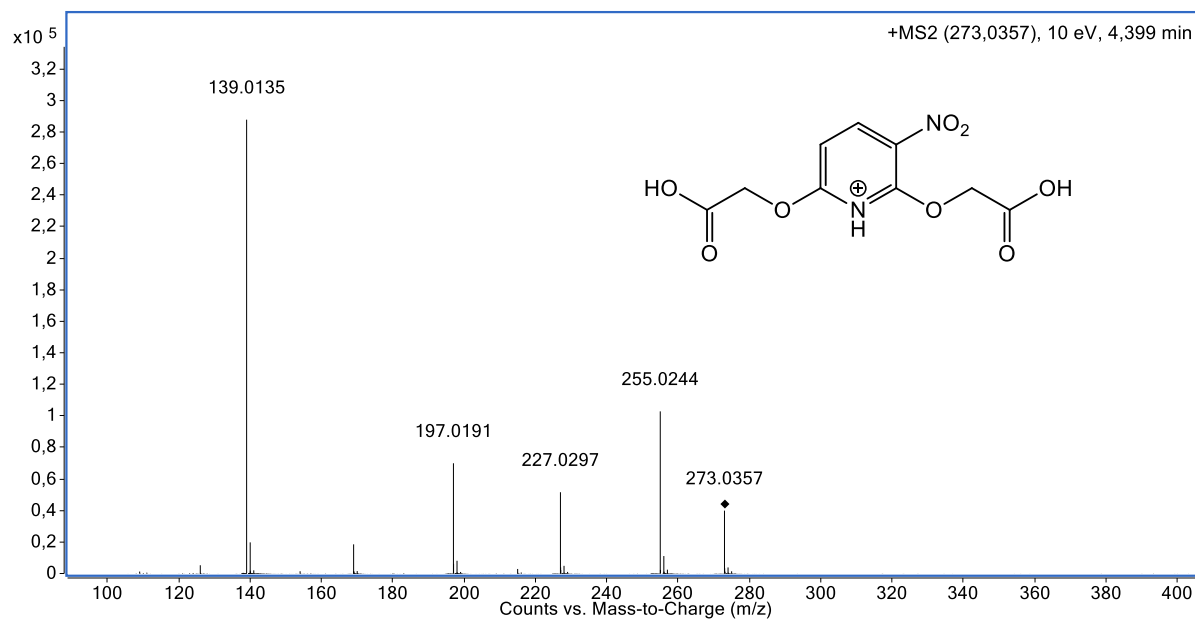


**Espectro 72 - EM-EM-IES-(+) do composto 47****Espectro 73 - EM-EM-IES-(+) do composto 48**

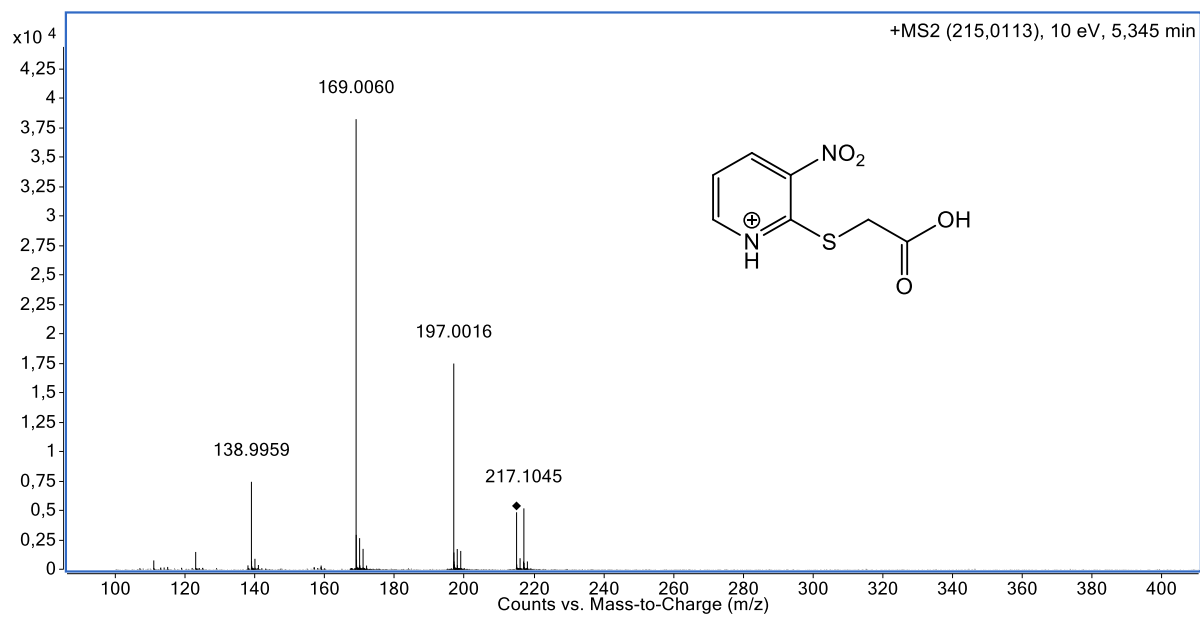
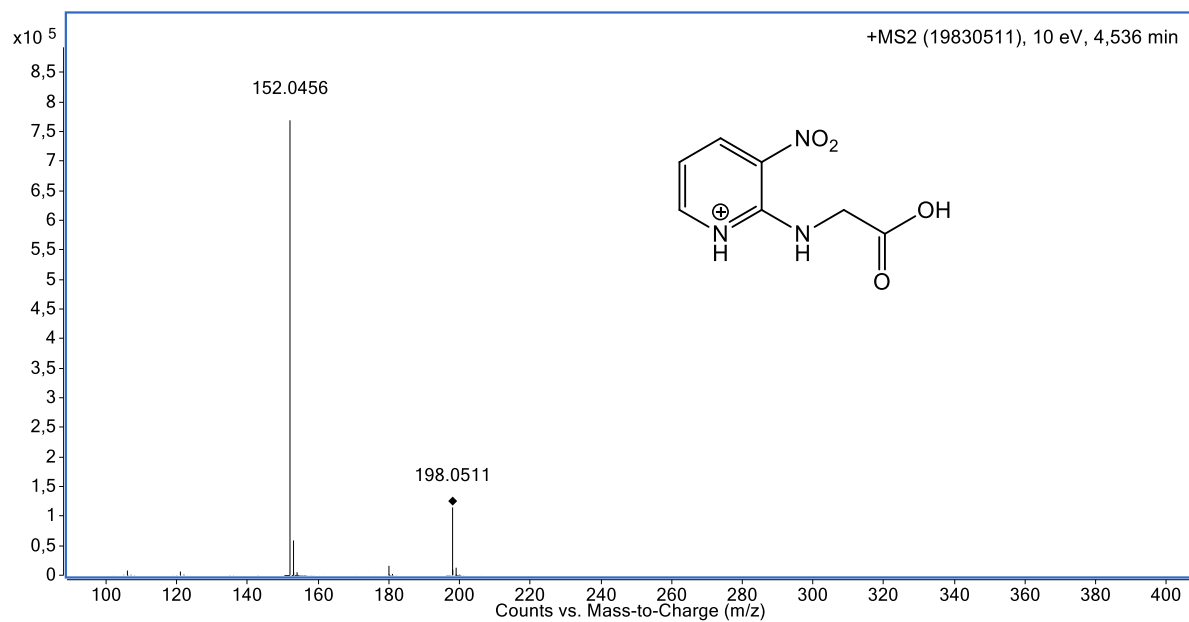
**Espectro 74 - EM-EM-IES-(+) do composto 49****Espectro 75 - EM-EM-IES-(+) do composto 50**

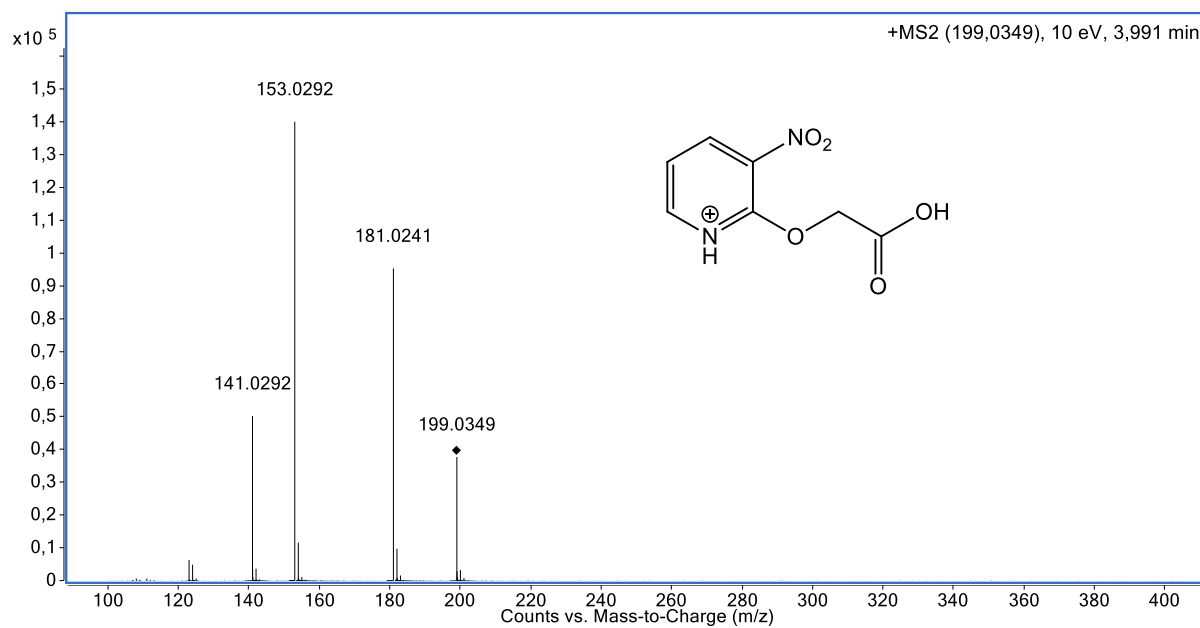
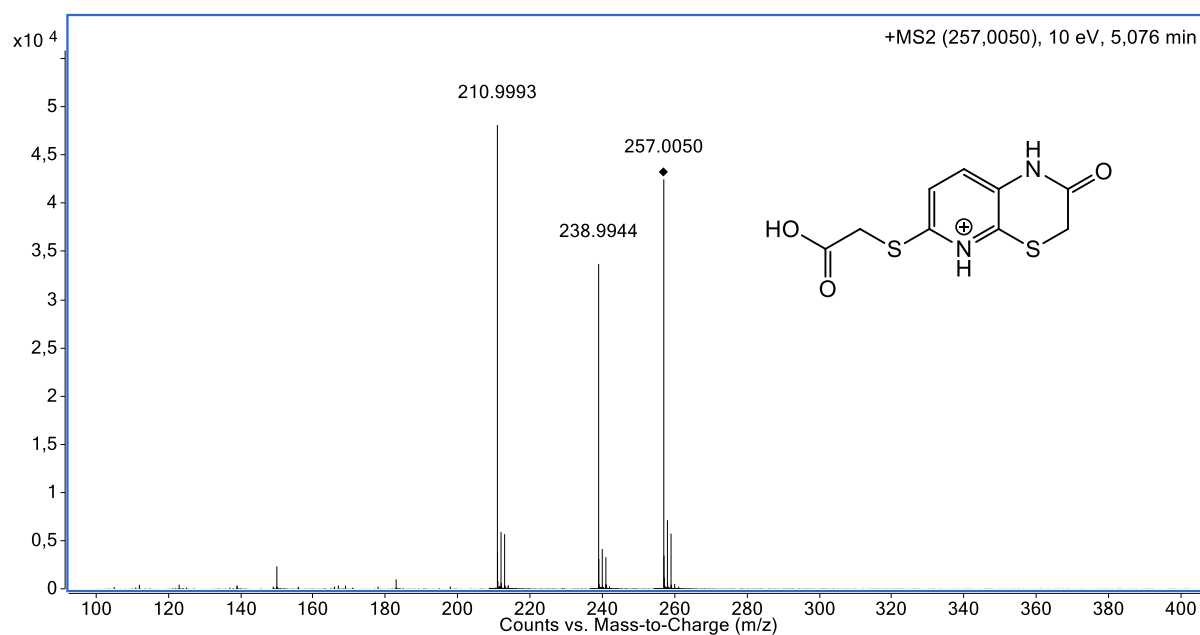
**Espectro 76 - EM-EM-IES-(+) do composto 58****Espectro 77 - EM-EM-IES-(+) do composto 59a**

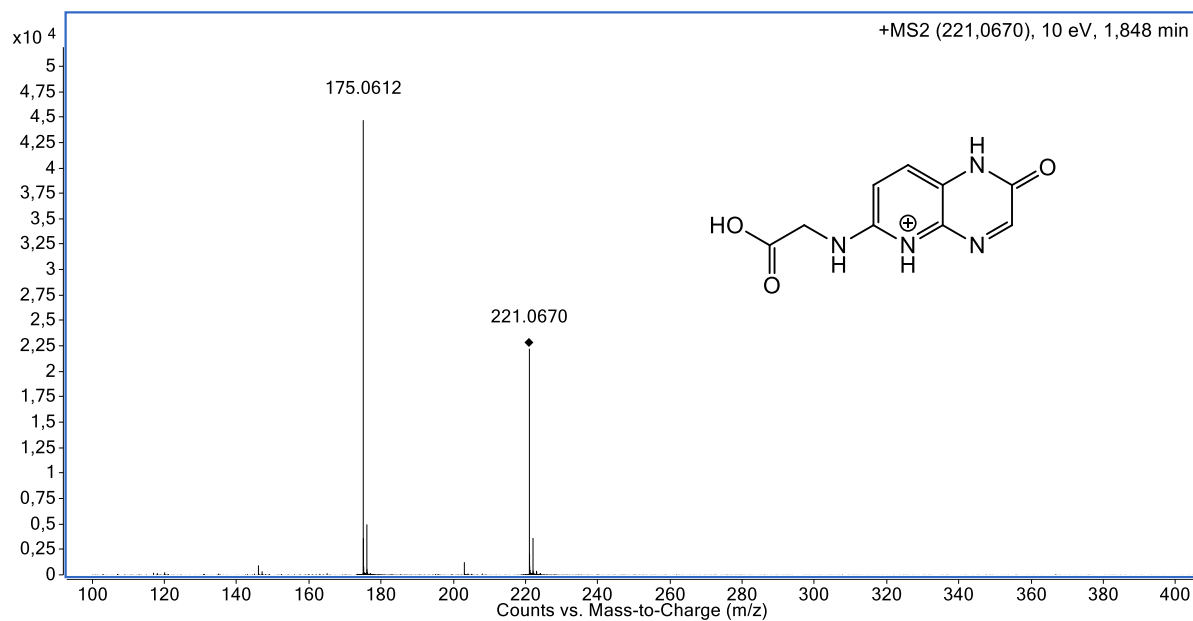
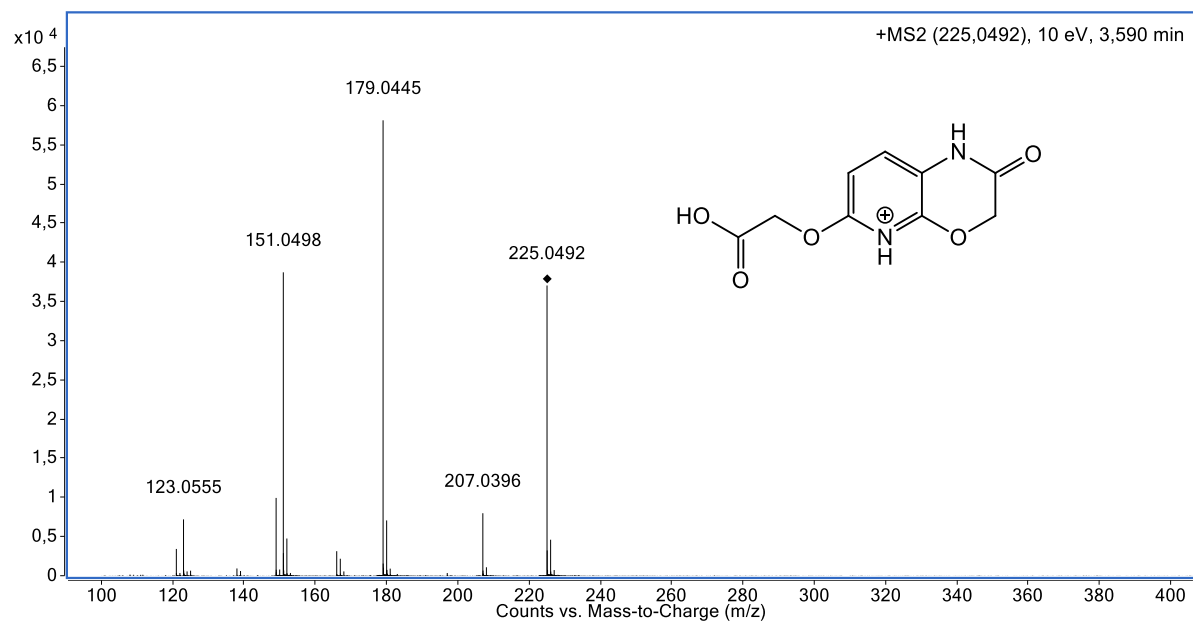
**Espectro 78 - EM-EM-IES-(+) do composto 60****Espectro 79 - EM-EM-IES-(+) do composto 61**

**Espectro 80 - EM-EM-IES-(+) do composto 62****Espectro 81 - EM-EM-IES-(+) do composto 63**



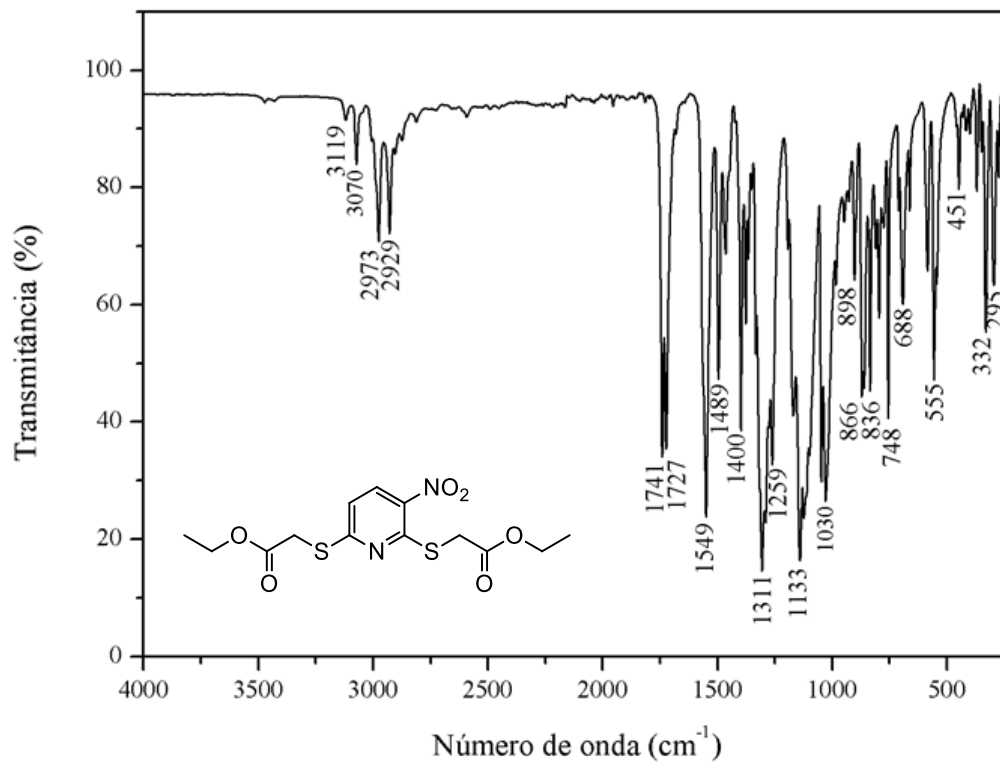
**Espectro 82 - EM-EM-IES-(+) do composto 64****Espectro 83 - EM-EM-IES-(+) do composto 65**

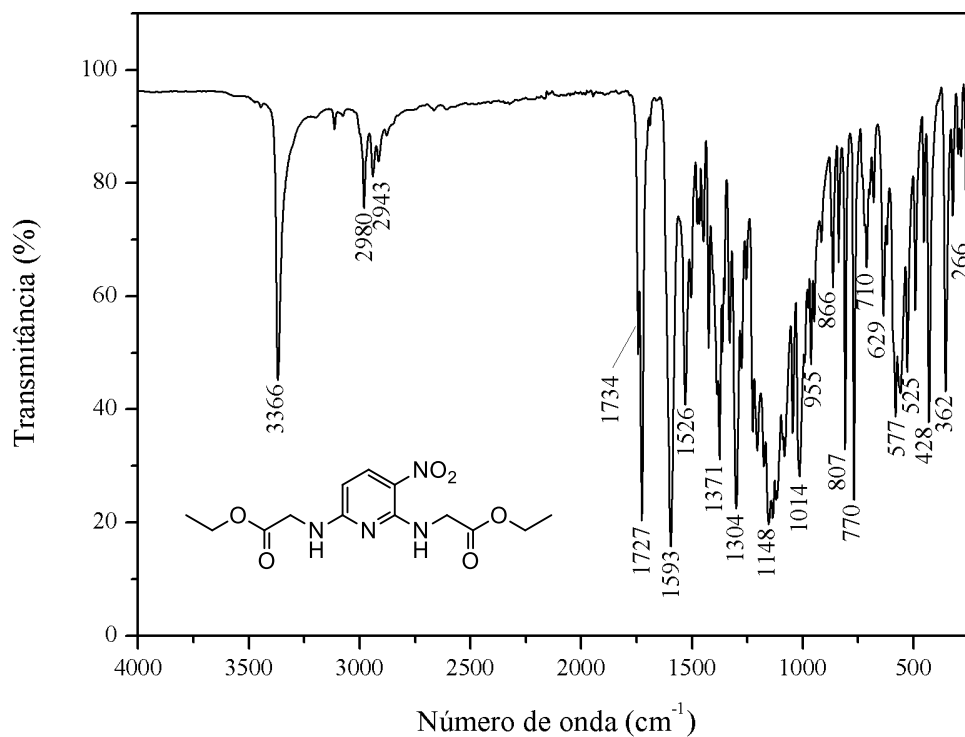
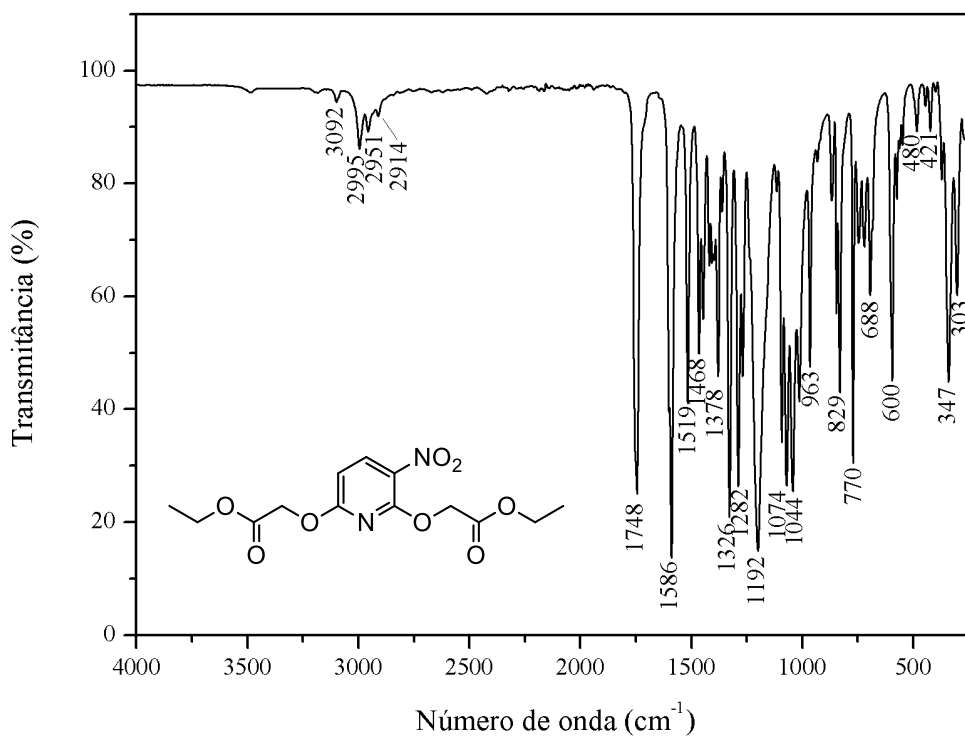
**Espectro 84 - EM-EM-IES-(+) do composto 66****Espectro 85 - EM-EM-IES-(+) do composto 67**

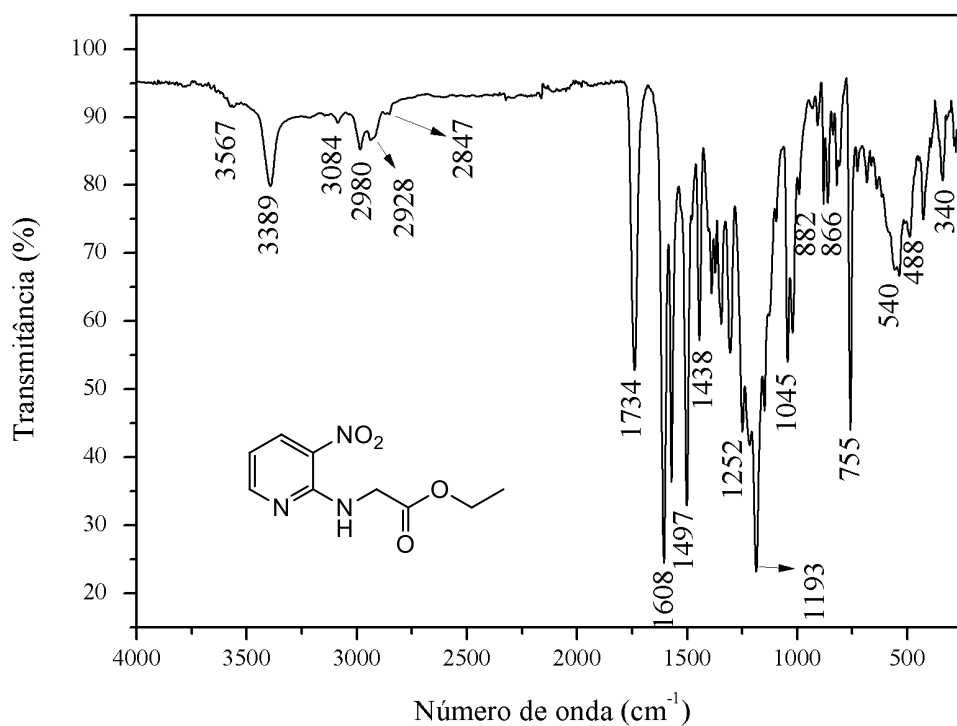
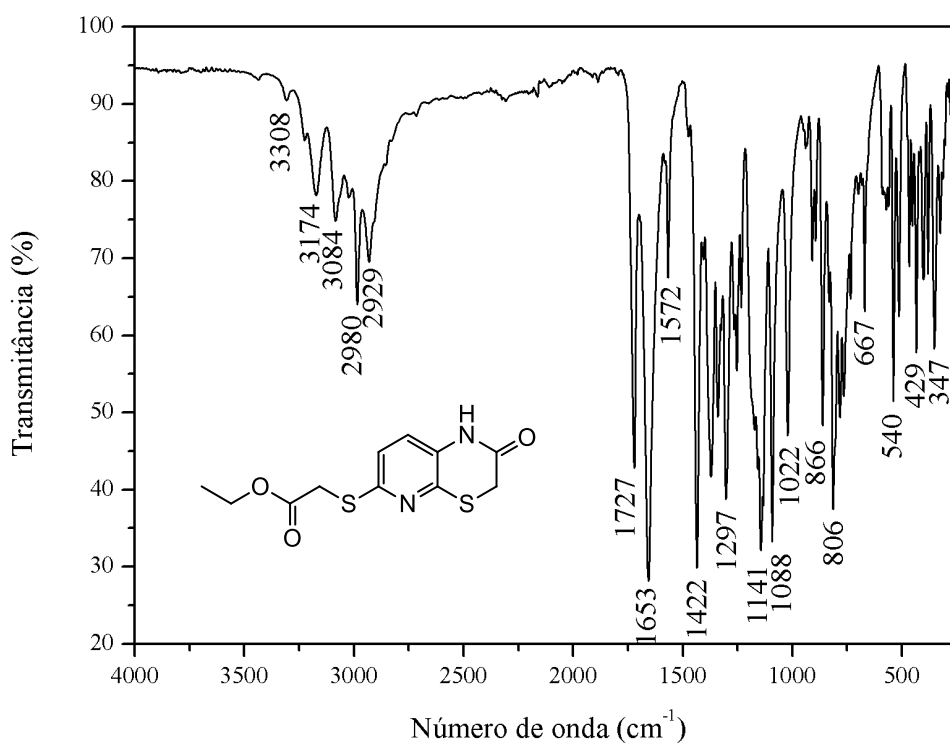
**Espectro 86 - EM-EM-IES-(+) do composto 68a****Espectro 87 - EM-EM-IES-(+) do composto 69**

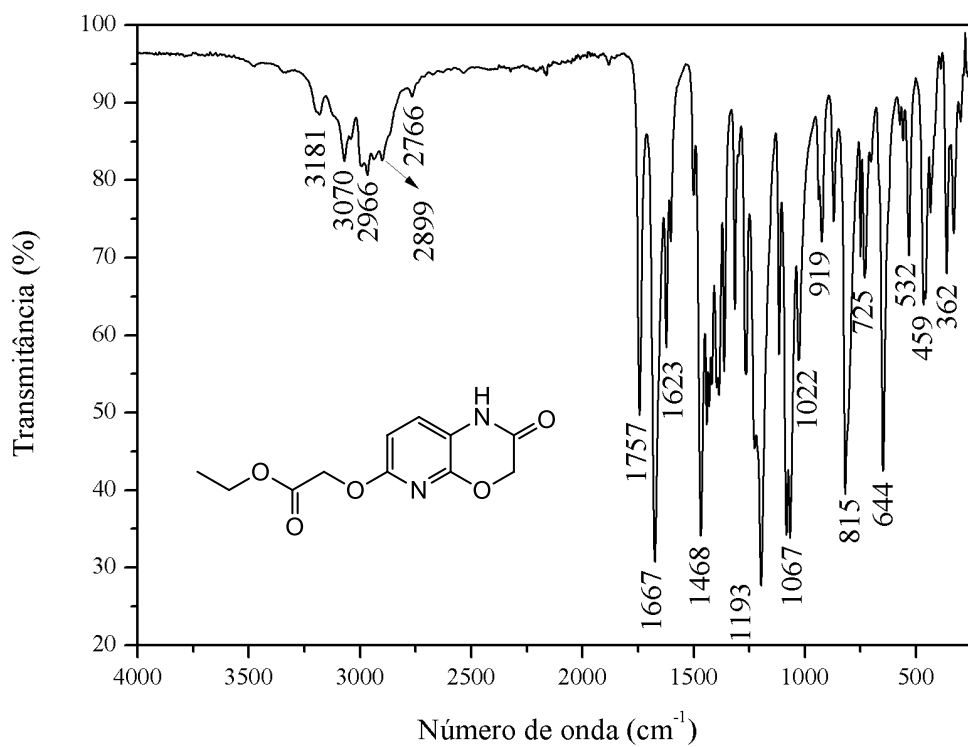
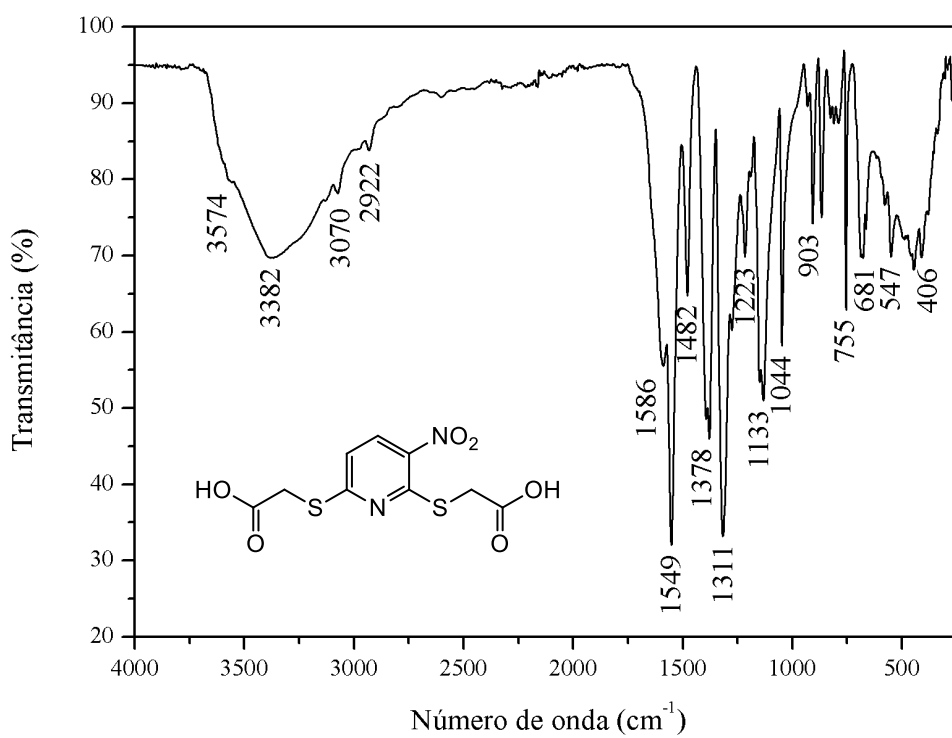
## APÊNDICE F – ESPECTROS NA REGIÃO DO IV

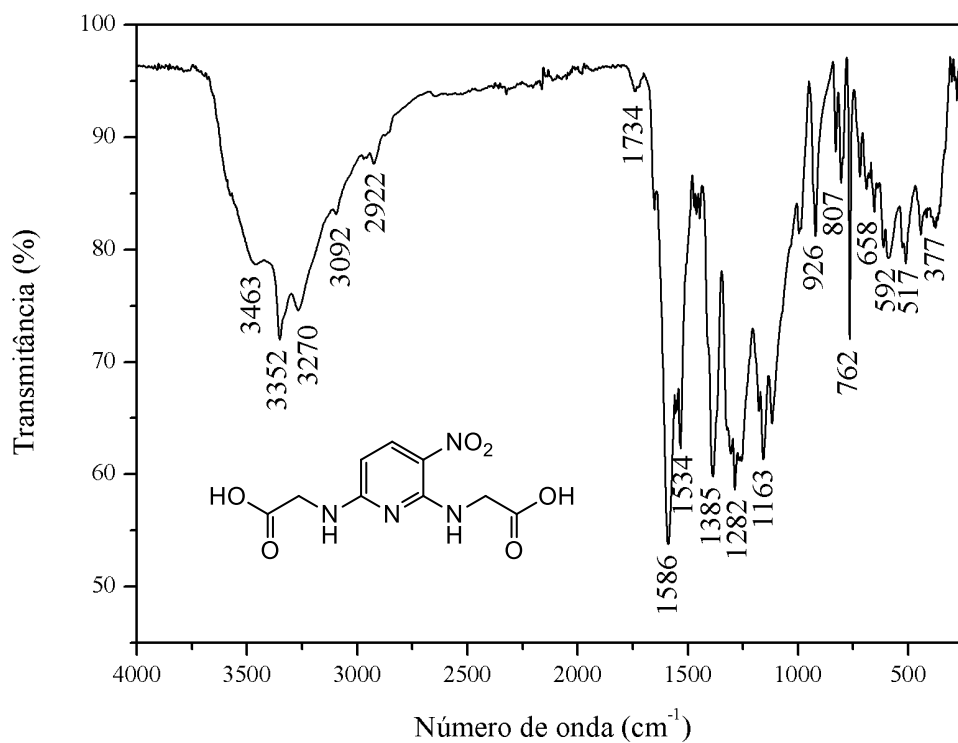
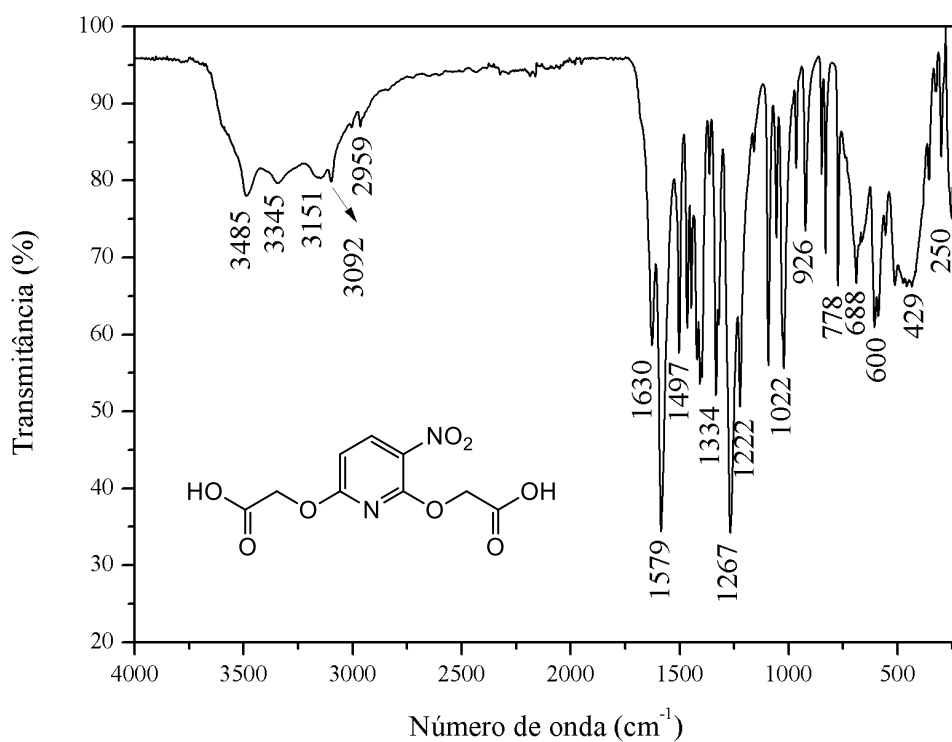
Espectro 88 - Espectro na região do IV do composto 45



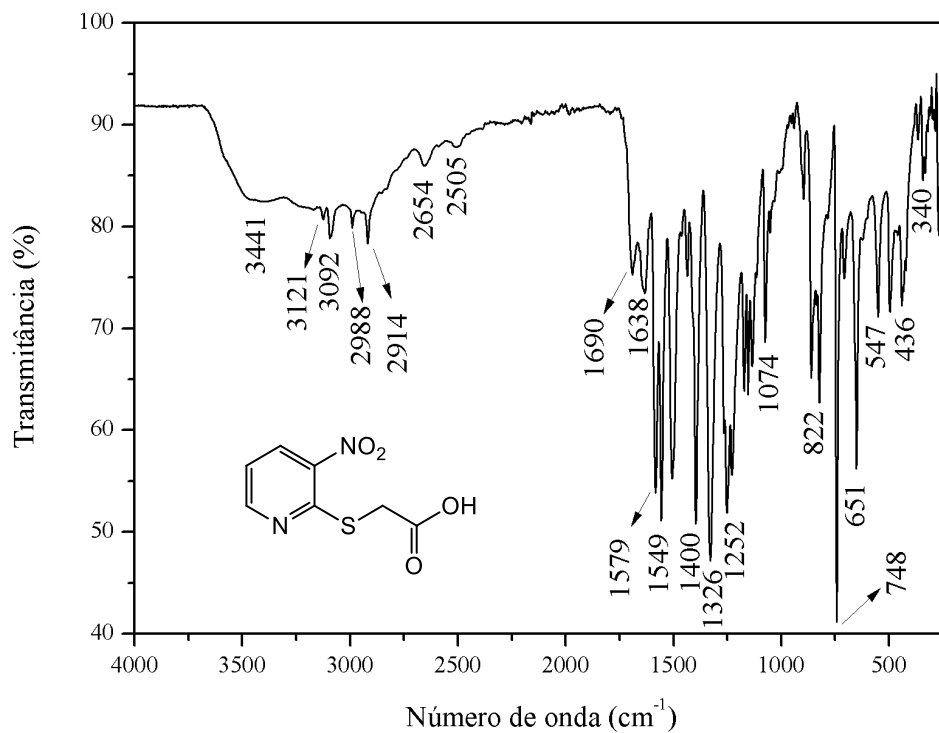
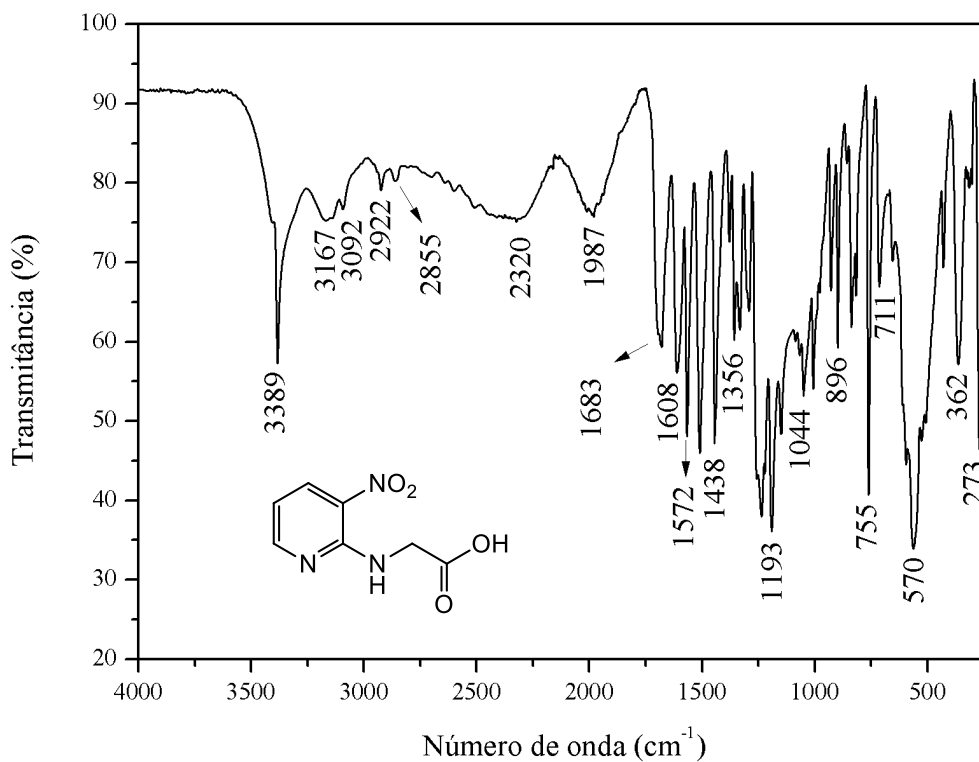
**Espectro 89** - Espectro na região do IV do composto **46****Espectro 90** - Espectro na região do IV do composto **47**

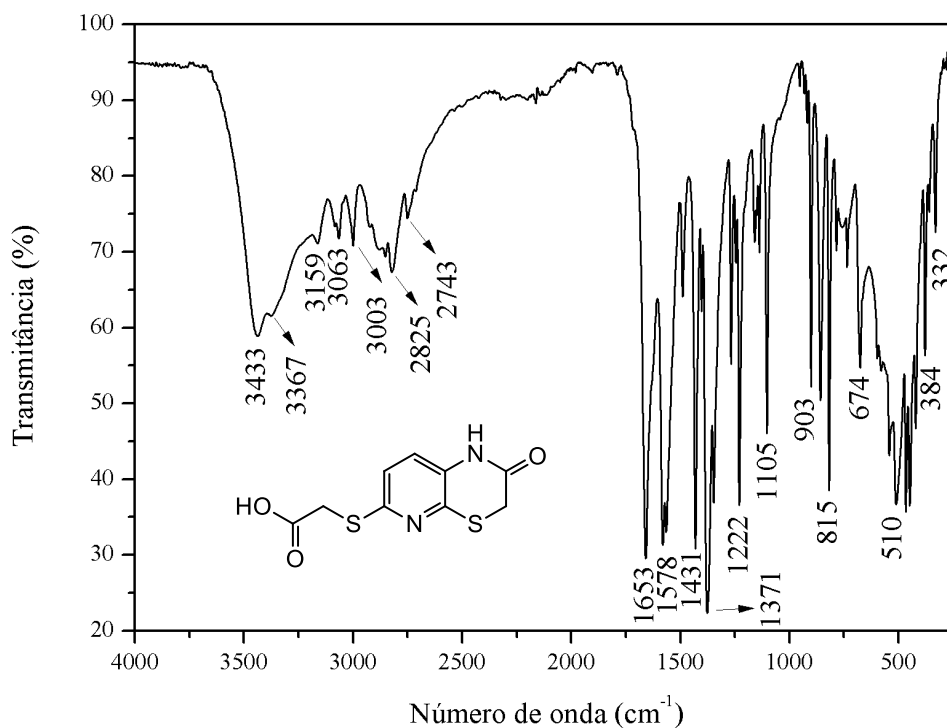
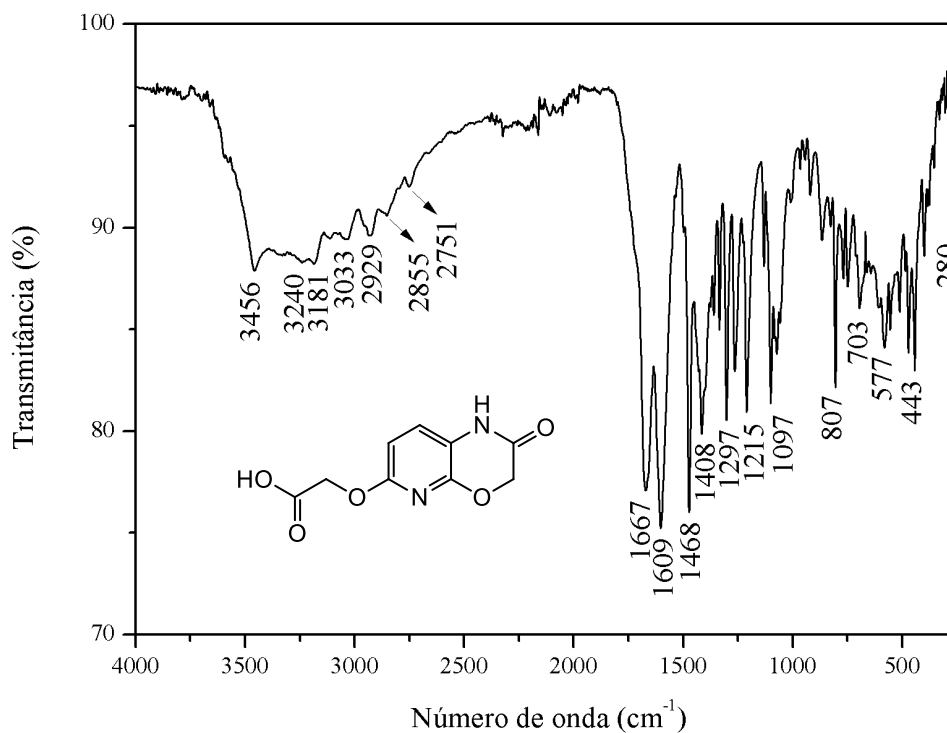
**Espectro 91** - Espectro na região do IV do composto **49****Espectro 92** - Espectro na região do IV do composto **58**

**Espectro 93** - Espectro na região do IV do composto **60****Espectro 94** - Espectro na região do IV do composto **61**

**Espectro 95** - Espectro na região do IV do composto **62****Espectro 96** - Espectro na região do IV do composto **63**



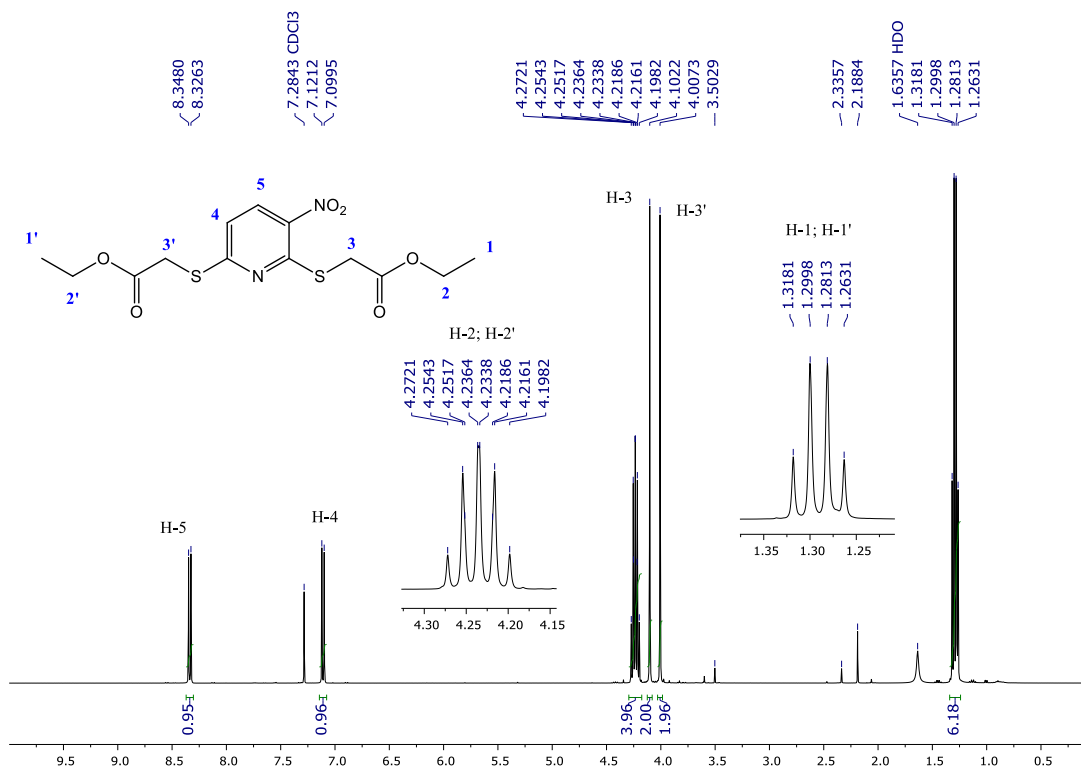
**Espectro 97** - Espectro na região do IV do composto **64****Espectro 98** - Espectro na região do IV do composto **65**

**Espectro 99** - Espectro na região do IV do composto **67****Espectro 100** - Espectro na região do IV do composto **69**

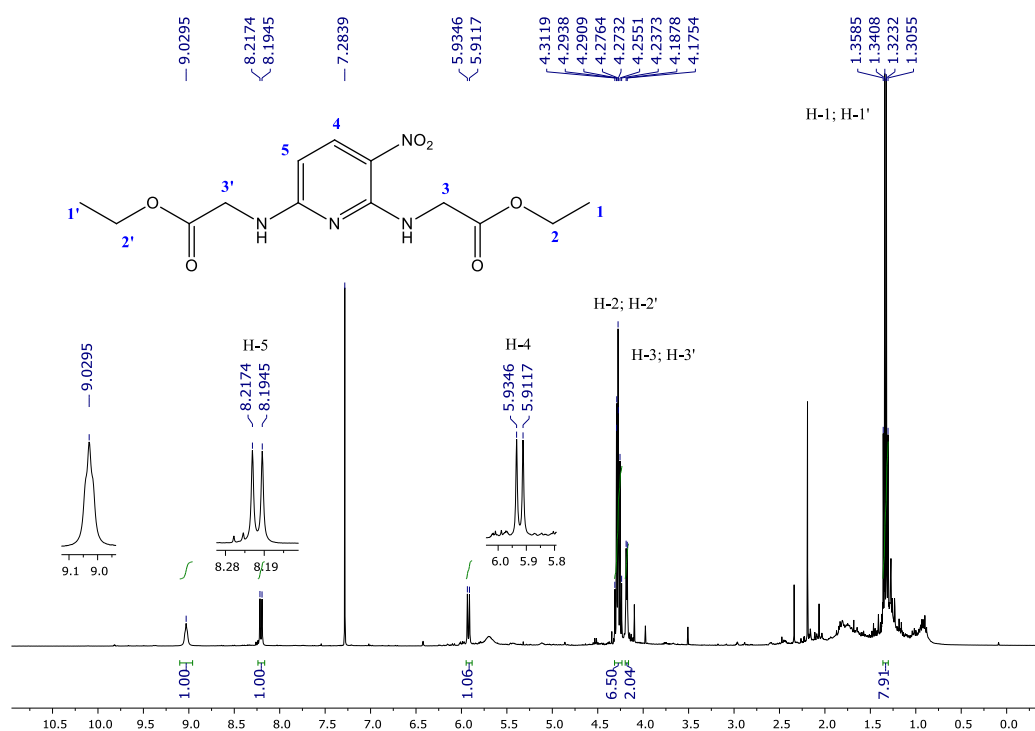


## APÊNDICE G – ESPECTROS DE RMN DE $^1\text{H}$

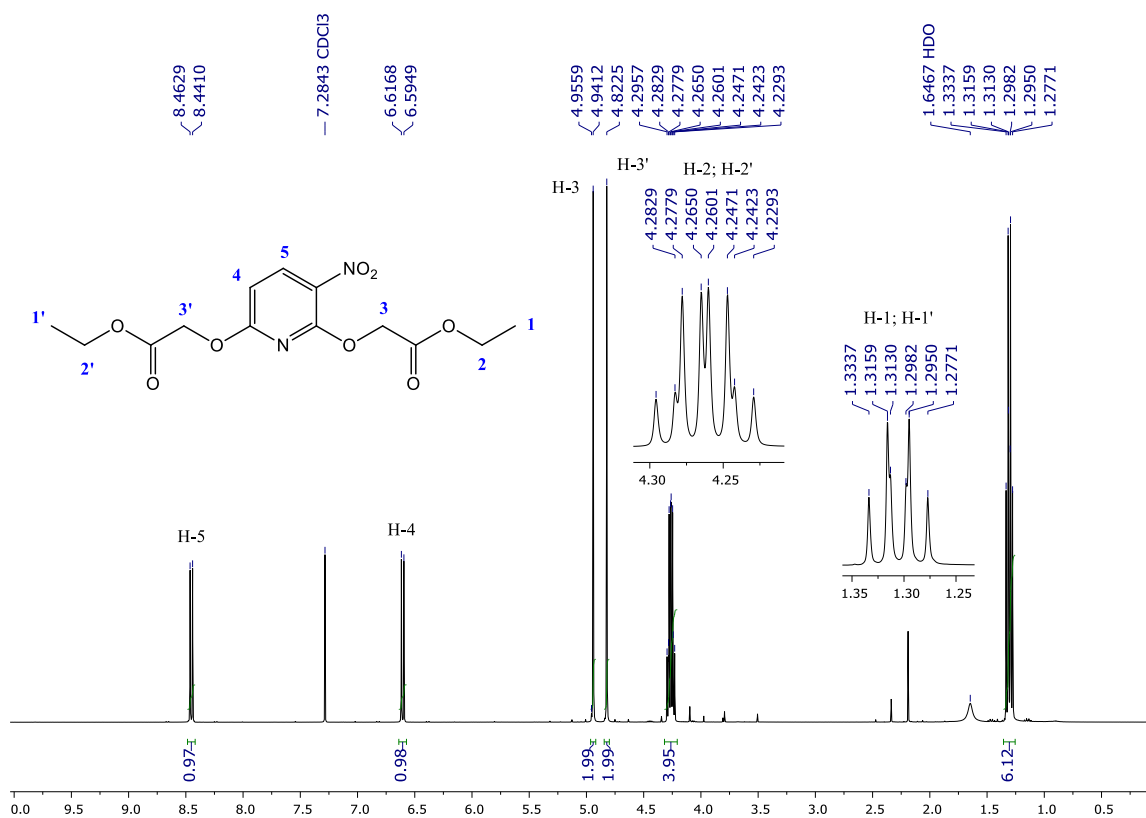
**Espectro 101** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **45** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



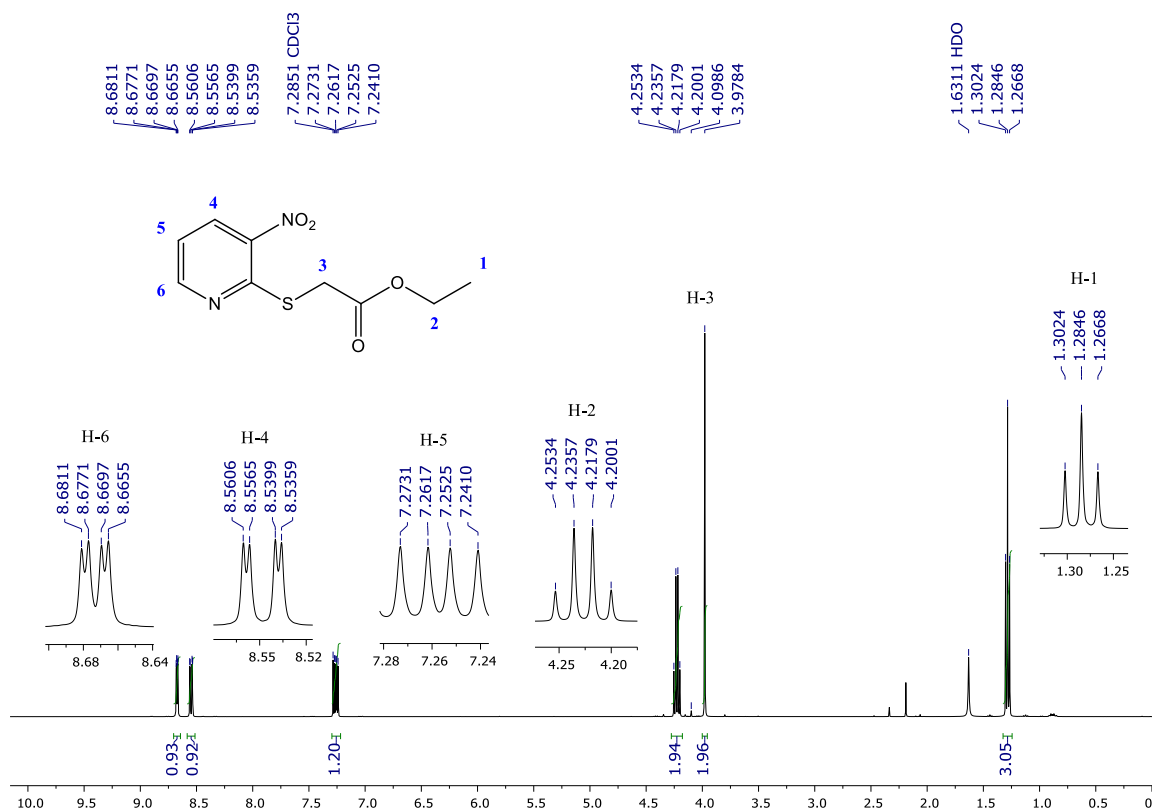
**Espectro 102** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **46** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

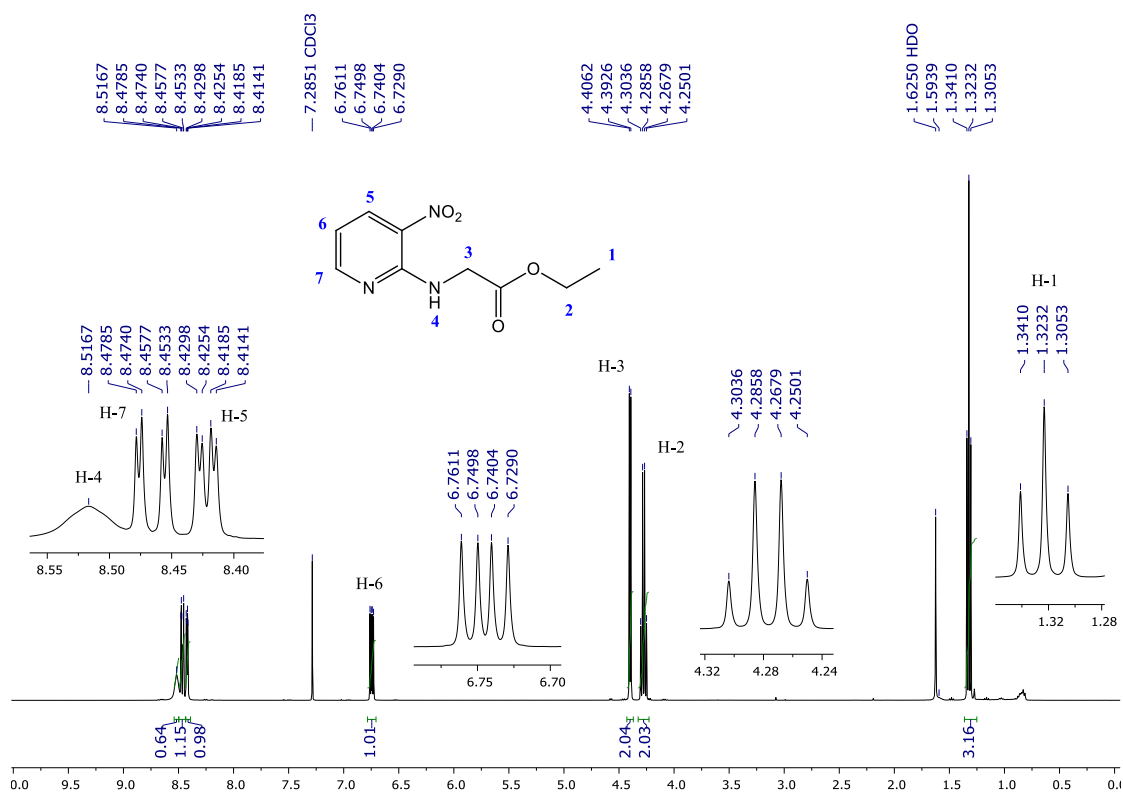
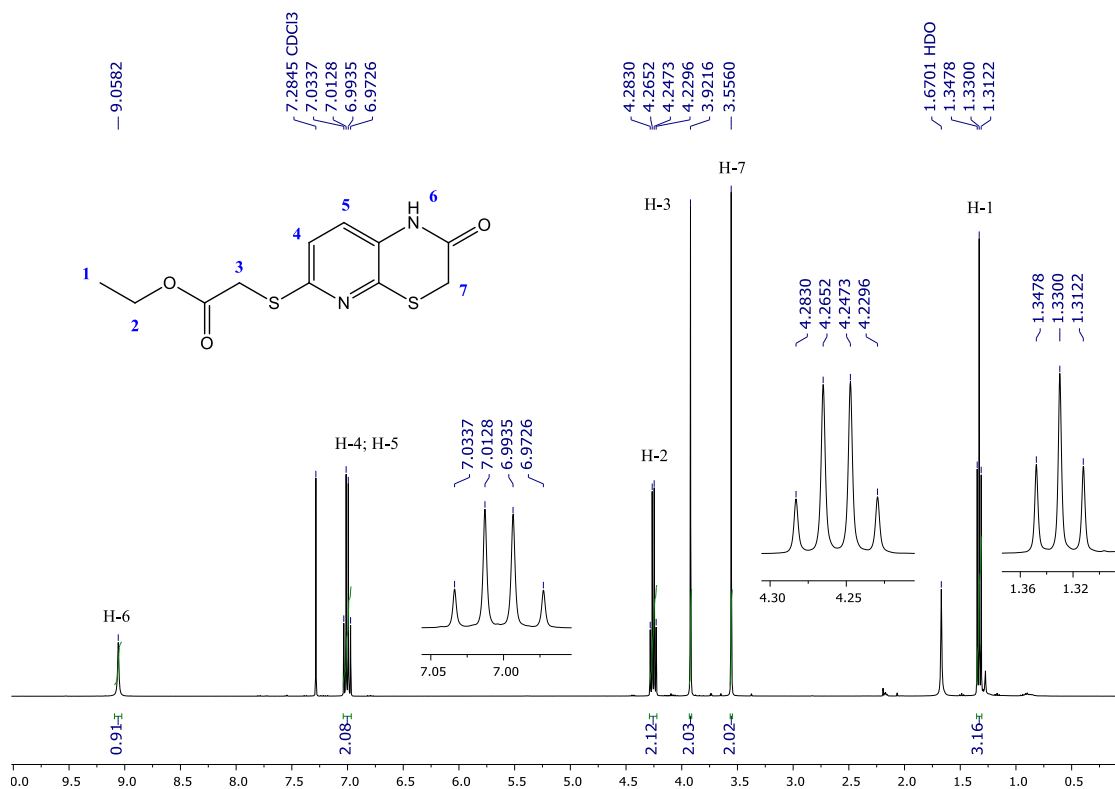


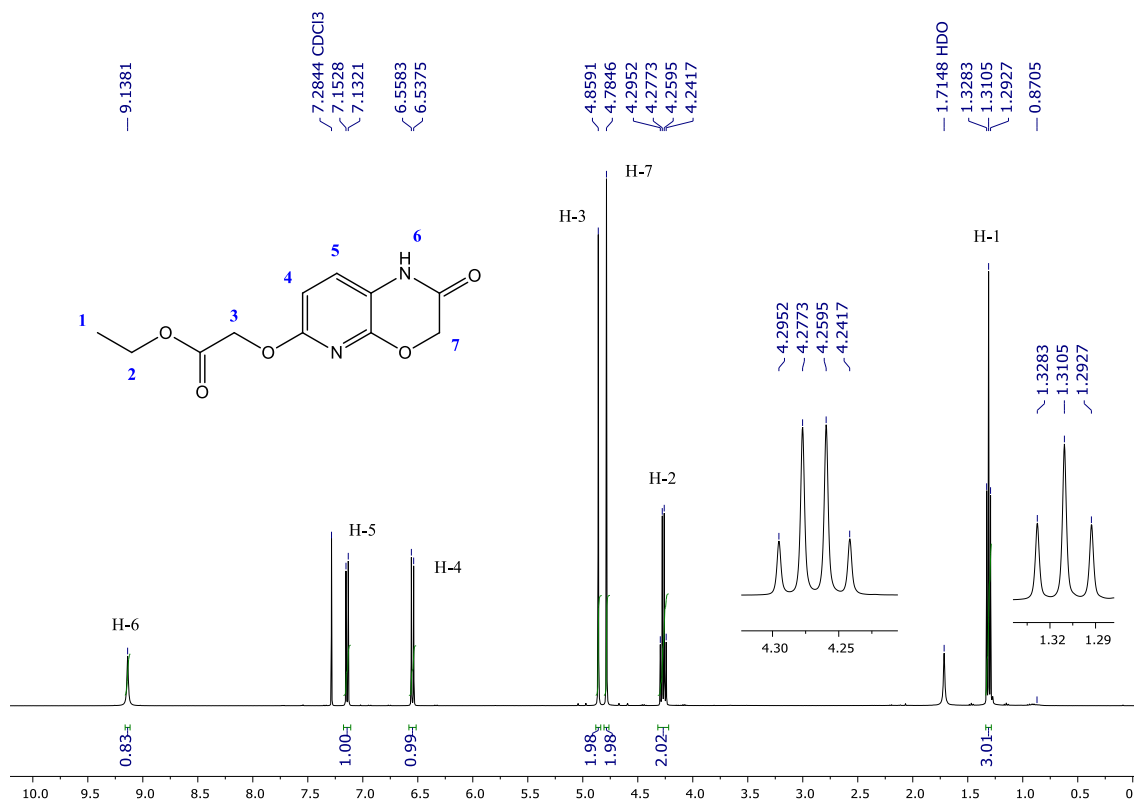
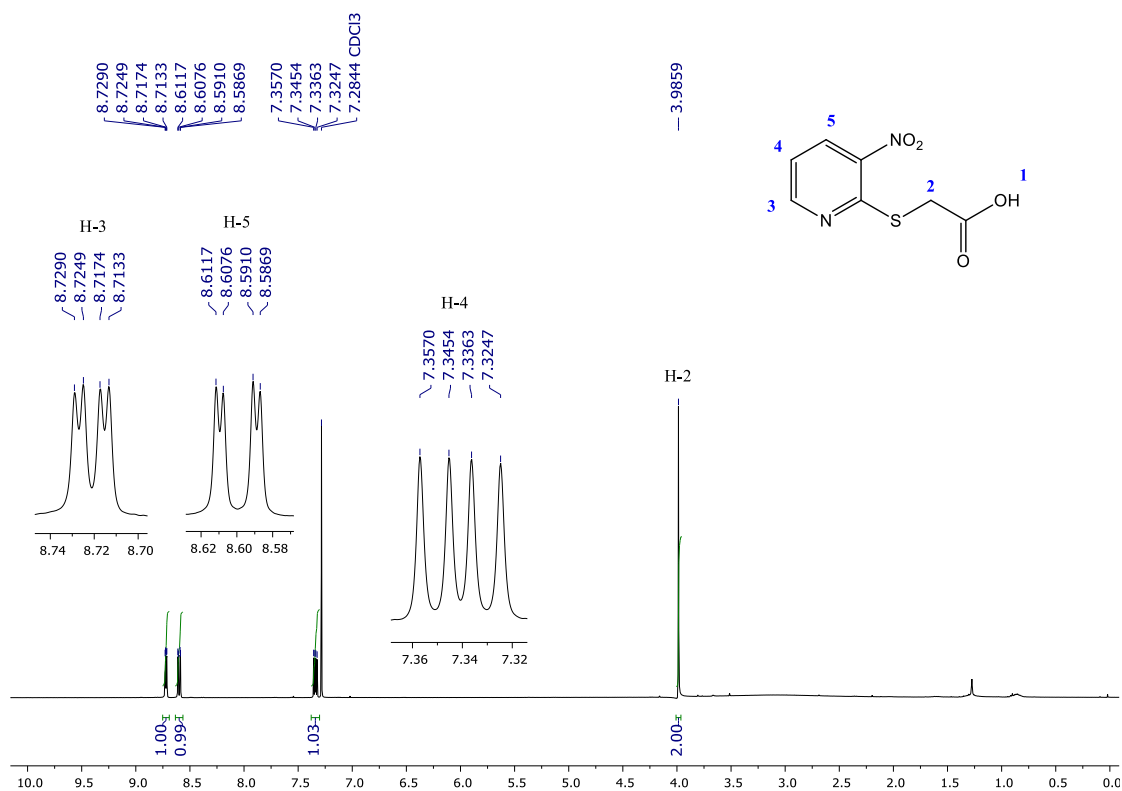
**Espectro 103 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 47 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

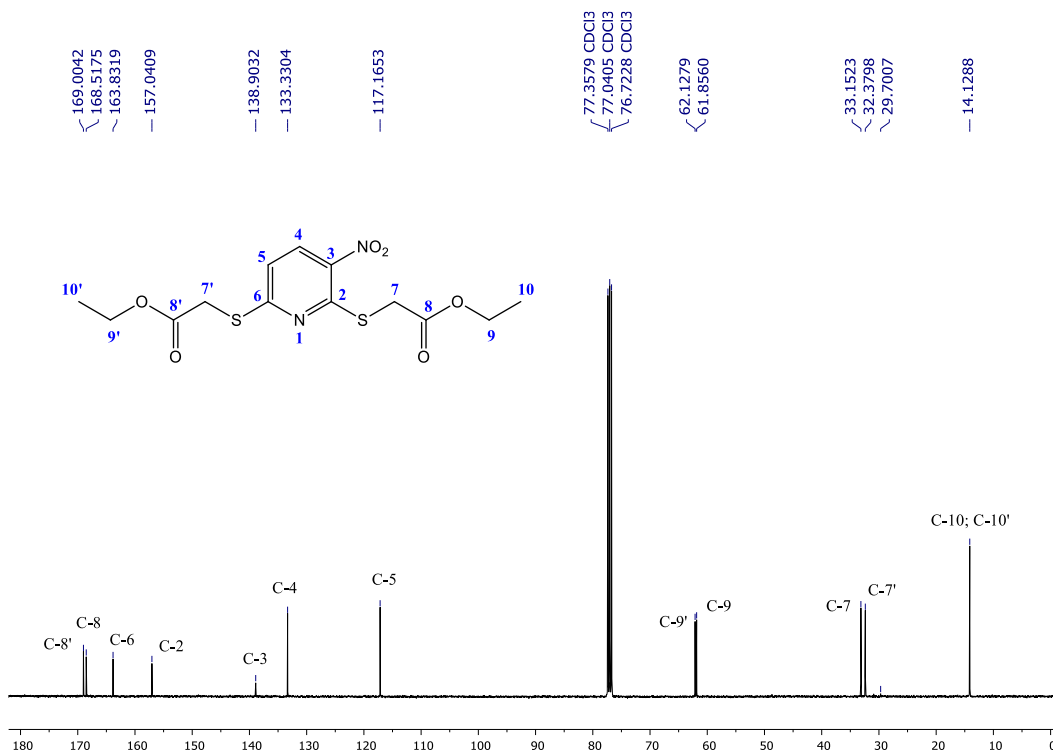


**Espectro 104 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 48 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



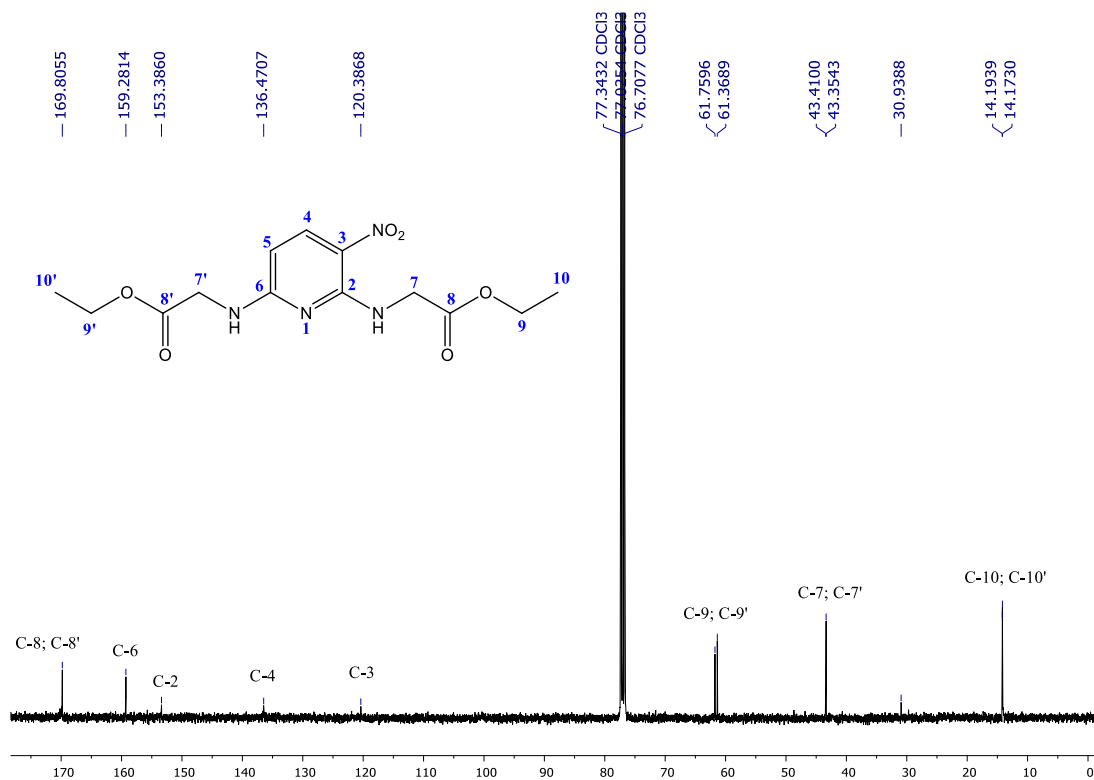
**Espectro 105 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **49** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

**Espectro 106 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **58** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**


**Espectro 107 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **60** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

**Espectro 108 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **64** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**


APÊNDICE H – ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$ Espectro 109 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **45** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Espectro 110 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **46** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**



**Espectro 111 - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **47** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**

