



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ PROFESSOR ALOÍSIO TEIXEIRA

BACHARELADO EM QUÍMICA



FELIPE COSTA CARDOSO

**SÍNTESE E AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DE ANÁLOGOS
TRIAZÓLICOS METOXILADOS DA LAVENDUSTINA-A CONTRA *T. cruzi*.**

Macaé, RJ

2021

FELIPE COSTA CARDOSO

SÍNTESE E AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DE ANÁLOGOS TRIAZÓLICOS METOXILADOS DA LAVENDUSTINA-A CONTRA *T. cruzi*.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé, como requisito parcial necessário à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Lara de Carvalho

Macaé, RJ

2021

C268s

Cardoso, Felipe Costa

Síntese e avaliações biológicas preliminares de análogos triazólicos metoxilados da Lavendustina A contra *T. cruzi*. / Felipe Costa Cardoso. -- Macaé, 2021.

79 f.

Orientador: Leandro Lara de Carvalho.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Química, 2021.

1. Síntese orgânica. 2. Produtos naturais. 3. Antiparasitário. I. Carvalho, Leandro Lara de, orient. III. Título.

CDD 547.2

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)
Campus UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira
Bibliotecária Rosangela Ribeiro Magnani Diogo CRB7/3719

FELIPE COSTA CARDOSO

SÍNTESE E AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS PRELIMINARES DE ANÁLOGOS TRIAZÓLICOS METOXILADOS DA LAVENDUSTINA-A CONTRA *T. cruzi*.

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé como requisito parcial necessário à obtenção do título de Bacharel em Química.

Trabalho aprovado por:

Prof. Dr. Leandro Lara de Carvalho – orientador
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Prof. Dr. Evanoel Crizanto de Lima
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Profa. Dra. Nelilma Correia Romeiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Macaé

Macaé – RJ, 08 de junho de 2021

Agradecimentos

Gostaria de começar dizendo que ainda que eu esteja trilhando o caminho da ciência, sou humano e um homem de fé, e agradeço primeiramente a Deus pela minha existência; em seguida, tento demonstrar, por meio destas palavras, meus profundos agradecimentos:

Aos meus amigos que ingressaram comigo na **Universidade Federal do Rio de Janeiro** e estiveram presentes em quase toda essa caminhada: Juliana Araújo, Igor Luiz, Vitor Mendes, Ana Beatriz, Robert Maiory. Aos outros – especiais – companheiros de curso, Keila Cavalcante, Isabela Segundo e Matheus Gomes, que construíram momentos memoráveis especialmente fora do ambiente acadêmico;

Aos professores doutores Robson Matos, Nelilma Romeiro, Juliana Milanez, Rodrigo Siqueira, Cid Pereira, cada qual em sua área, que com grande talento desmitificaram o aprendizado da Química; à prof.^a Dr.^a Angélica Soares, por ter me permitido ingressar em seu grupo de Iniciação Científica em Produtos Naturais, com o qual muito me identifiquei, e em especial ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Lara, que foi extremamente solícito e atencioso em todo o curso, cumprindo com maestria tanto o papel de educador quanto o de orientador;

A todos os colegas de laboratório do LACASB (Laboratório de Catálise e Síntese de Substâncias Bioativas) UFRJ e do Instituto de Biodiversidade e Sustentabilidade (NUPEM) que também muito me ajudaram em diversos momentos da graduação e contribuíram de alguma forma para a pesquisa desenvolvida;

Aos meus amigos de vida, Nathalia Mesquita, Gabriela Garrido, Lucas Monteiro, Priscila Pires, Rafael Leal, que acreditaram em mim e sempre me encorajaram a seguir em frente, mesmo nos momentos difíceis. E assim como compartilho com eles meu sucesso, eles também o fazem comigo;

Às políticas públicas, sobretudo as de ensino, criadas pelos Governos Lula e Dilma, que permitiram não só a mim, mas muitos outros cientistas em potencial a cursarem o ensino superior gratuito e terem uma educação de qualidade;

E sou extremamente grato a minha avó, Dona Zenilda, por ter me criado e feito incontáveis esforços, mesmo quando não podia, para me manter na universidade; reafirmando a força da mulher brasileira! Sem ela, eu não teria chegado até aqui, ainda mais neste momento de pandemia, onde só as vacinas salvam! E hoje, poder me ver formado na maior Universidade Federal do Brasil, representa a maior realização dela, como também minha maior realização pessoal até agora, e – se posso dizer – a realização do sonho de várias outras famílias brasileiras.

Muito obrigado!

“O nitrogênio em nosso DNA, o cálcio em nossos dentes, o ferro em nosso sangue, o carbono em nossas tortas de maçã foram feitos nos interiores de estrelas em colapso. Somos feitos de material estelar.”

(Carl Sagan, Cosmos, 1980).

Resumo

CARDOSO, Felipe Costa. **Síntese e avaliações biológicas preliminares de análogos triazólicos metoxilados da Lavendustina-A contra *T. cruzi***. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação). Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Química, Macaé, RJ, 2021.

A Lavendustina A (**12a**), um produto natural isolado de extratos de bactérias *Streptomyces griseolavendus*, é um potente inibidor da proteína tirosina quinase (PTQ) do receptor de fator de crescimento epidérmico (RFCE), que é um importante alvo no tratamento contra o câncer. Adicionalmente, alguns análogos de **12a** também foram descritos como inibidores da polimerização de tubulina, uma proteína alvo importante para o tratamento contra o câncer e doenças negligenciadas, como a leishmaniose e Doença de Chagas. Tais enfermidades são consideradas um grave problema de saúde pública no Brasil. A maioria dos trabalhos publicados com análogos de **12a** investigaram a citotoxicidade contra células cancerígenas e, em raros casos, esses análogos foram avaliados como antiparasitários. Em um estudo anterior feito pelo nosso grupo de pesquisa, uma família de análogos triazólicos de **12a** (hidroxilas livres) foi sintetizada e avaliada biologicamente, onde os ensaios de citotoxicidade contra *T. cruzi* e células epiteliais de primata (células VERO) mostraram ambos baixos valores de IC₅₀ em escala micromolar. Embora esses análogos tenham sido promissores contra o parasito, sua citotoxicidade contra células de primatas mostrou ser um fator desvantajoso. A fim de contornar esse problema, o presente trabalho propôs novos análogos triazólicos onde as porções hidroxiladas da **12a** foram metoxiladas. Como metodologia de síntese, a subunidade farmacofórica da **12a** foi obtida pela reação do 2-hidroxi-5-aminobenzoato de metila com o 2,5-dimetoxibenzaldeído, por meio de aaminação redutiva, para fornecer o produto **47** em bom rendimento. Em seguida, **47** sofre alquilação com brometo de propargila para fornecer o respectivo alcino intermediário **44**. Com este em mãos, são feitas reações de cicloadições 1,3-dipolares com fenilazidas para dar origem aos análogos finais **45a-c**. Os produtos de síntese tiveram suas estruturas indubitavelmente elucidadas por espectroscopia 1D e 2D de RMN, sendo obtidos em ótimos rendimentos químicos. As avaliações biológicas preliminares mostraram atividade inibitória promissora contra formas tripomastigota de *T. cruzi*, com citotoxicidade moderada. Na forma epimastigota, os análogos não foram bioativos. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão e/ou melhoras das atividades observadas.

Palavras-chave: Lavendustina; análogos metoxilados; 1,2,3-triazol; *T. cruzi*; antiparasitário.

Abstract

CARDOSO, Felipe Costa. **Síntese e avaliações biológicas preliminares de análogos triazólicos metoxilados da Lavendustina-A contra *T. cruzi***. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação). Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus* Macaé Professor Aloísio Teixeira, Bacharel em Química, Macaé, RJ, 2021.

Lavendustine A (**12a**), a natural product isolated from extracts of bacteria *Streptomyces griseolavendus*, is a potent inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) protein tyrosine kinase (PTK), which is an important target in cancer treatment. In addition, some analogs of **12a** have also been described as inhibitors of tubulin polymerization, an important target protein for the treatment of cancer and neglected diseases, such as leishmaniasis and Chagas disease. Such illnesses represent a serious public health problem in Brazil. Most studies published with **12a** analogs investigated the cytotoxicity in cancer cells and, in rare cases, these analogs were evaluated as antiparasitic. In a previous study carried out by our research group, a series of **12a** triazole analogs was synthesized and biologically evaluated, where both cytotoxicity assays against *T. cruzi* and primate epithelial cells (VERO cells) showed low IC₅₀ values on a micromolar scale. Whilst these analogs have been promising against the parasite, their cytotoxicity in primate cells has shown to be a disadvantage. To overcome this problem, the present project proposed new triazole analogues where the hydroxylated portions of **12a** were methoxylated. For the synthesis methodology, the pharmacophoric subunit of **12a** was obtained by the reaction of methyl 2-hydroxy-5-aminobenzoate with 2,5-dimethoxybenzaldehyde, through reductive amination, to provide the product **47** in good yield. Then, **47** undergoes alkylation with propargyl bromide to provide the respective intermediate alkyne **44**. With this last in hand, 1,3-dipolar cycloaddition reactions with phenyl azides take place to give rise to the final analogs **45a-c**. The synthesis products had their structures undoubtedly elucidated by 1D and 2D NMR spectroscopy, being obtained in excellent chemical yields. Preliminary biological evaluations showed promising inhibitory activity against *T. cruzi* trypomastigote with moderate cytotoxicity values. In the epimastigote form, the analogs were not bioactive. However, more studies need to be carried out to better understand and / or improve the observed activities.

Keywords: Lavendustine; methoxylated analogues; 1,2,3-triazole; *T. cruzi*; antiparasitic.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AcOEt	Acetato de etila
d	duplete
dd	duplo duplete
dd	dduplo duplo duplete
dt	duplo triplete
s	simpleto
t	tripleto
AcOH	Ácido acético
AscNa	Ascorbato de sódio
CCF	Cromatografia em Camada Fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CuAAc por cobre(I))	<i>copper(I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition</i> (cicloadição de azidas e alcinos catalisada por cobre(I))
DCM	Diclorometano
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
equiv.	Equivalente
EtOH	Etanol
Hex	Hexano
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação heteronuclear de ligação múltipla)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> (Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples)
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i> (metade da concentração inibitória máxima)
Int.	Integração de sinais
M.	Multiplicidade de sinais
MeO	Metoxila
MeOH	Metanol
ppm	Partes por milhão
PTQ	Proteína Tirosina Quinase
PTQ-RFCE	Proteína Tirosina Quinase do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>t</i> -BuOH	terc-butanol

Lista de Símbolos e suas Unidades de Medida

Símbolo	Nome	Unidade
μM	concentração molar	$10^{-6} \text{ mol. L}^{-1}$
Hz	hertz (frequência)	s^{-1}
MHz	mega-hertz	10^6 Hz
nJ	constante de acoplamento <i>spin</i> nuclear através de n ligações	Hz
δ	deslocamento químico	ppm

Lista de Figuras

Figura 1: Microfotografia de esfregaço sanguíneo revelando a presença de cinco parasitos flagelados tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 2: Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
Figura 3: Principais espécies de triatomíneos (inseto vetor barbeiro) e suas localizações nas diferentes regiões do Brasil e América Latina. (A) <i>Triatoma infestans</i> . (B) <i>Panstrongylus megistus</i> . (C) <i>Triatoma brasiliensis</i> . (D) <i>Triatoma sordida</i>	16
Figura 4: Presença de casos de doença de Chagas no mundo.	16
Figura 5: Estrutura dos medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas.	17
Figura 6: Representação da estrutura de microtúbulo.	20
Figura 7: Corte ampliado de um dímero de tubulina da estrutura de microtúbulo, mostrando os cinco diferentes sítios de ligação. Adaptado de Alejandro Porto, CC BY-SA 3.0. via Wikimedia Commons.	21
Figura 8: (A) Esquema representando os microtúbulos na matriz subpelicular na forma tripomastigota pró-cíclica em um <i>T. brucei</i> (no topo), e na forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> (ao centro), e forma promastigota de <i>Leishmania mexicana</i> – tripanossomatídeo causador da leishmaniose (inferior). (B) Esquema de reticulação das fibrilas que unem os microtúbulos da matriz – zoom a partir do recorte em (A). Adaptado de SINCLAIR, A. N., GRAFFENRIED, C. L., 2019.	22
Figura 9: Estrutura de alguns fármacos anti-tubulina como Colchicina (9a), Vimblastina (9b) e Vincristina (sítio ligante dos alcaloides da vinca) (9c), Paclitaxel (sítio ligante do taxol) (9d), Benzimidazóis (9e).	24
Figura 10: Estrutura de análogo de 1,4-naftoquinona (IMNDQ3) com atividade anti <i>T. cruzi</i> . Adaptado de OGINDO et al., 2016.	25
Figura 11: Estrutura química da curcumina e outros curcuminoides.	26
Figura 12: Estrutura do produto natural Lavendustina A (12a), Lavendustina B (12b) e sua subunidade farmacofórica Lavendustina C (12c).	27
Figura 13: Estrutura de análogos da Lavendustina A com respectivos valores de inibição (IC ₅₀). (13a) Análogo O-metilado e esterificado; (13b) Estrutura parcial modificada de 12c, composto SDZ 281-977; (13c-c”) Derivados sintéticos da Lavendustina C.	28
Figura 14: Série de derivados da Lavendustina testados para SAR (relação estrutura-atividade). Adaptado de NUSSBAUMER e WINISKY, 2008.	29
Figura 15: Estrutura do fármaco Benznidazol e estratégia utilizada para a produção dos seus derivados 1,2,3-triazólicos. Adaptado de ANDRADE et al, 2015.	34
Figura 16: Estrutura numerada do intermediário 44 para análise de RMN.	60
Figura 17: Estrutura numerada dos análogos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos 45a-c para análise de RMN.	61

Lista de Esquemas

Esquema 1: Síntese de análogos da Lavendustina avaliados com atividade antiparasitária. Adaptado de GHIANO et al, 2011.	30
Esquema 2: Síntese de análogos da Lavendustina B com atividade anti HIV-1 integrase. Adaptado de AGHARBAOUI et al., 2016	31
Esquema 3: Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. A cicloadição induzida termicamente leva à formação de uma mistura de estereoisômeros 1,4 e 1,5-triazol na proporção de 1:1. A cicloadição catalisa por Cu(I) leva à formação exclusiva do 1,2,3-triazol 1,4 dissusbtituído. Adaptado de MOSES e MOORHOUSE, 2007.....	32
Esquema 4: Síntese de análogos da Lavendustina com a porção 1,2,3-triazol pelo método Click Chemistry. Adaptado de YOON e RYU, 2010.	33
Esquema 5: Rota sintética da produção de derivados do Benznidazol contendo as porções 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituídos (em rosa) e 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituídos (em amarelo). Adaptado de ANDRADE et al., 2015.	35
Esquema 6: Rota sintética para obtenção dos novos análogos 1,2,3-triazólicos do Benznidazol. Adaptado de LEITE et al., 2018.....	36
Esquema 7: Planejamento da síntese dos novos análogos 1,2,3-triazólicos da Lavendustina A, mostrando as porções modificadas que conferem um caráter mais lipofílico às novas estruturas.....	39
Esquema 8: Rota retrossintética para obtenção dos novos análogos 1,2,3-triazólicos da Lavendustina A.....	41
Esquema 9: Reação de Esterificação de Fischer, entre um ácido carboxílico e um álcool catalisada por ácido.	49
Esquema 10: Reação de esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzóico (50) para obtenção do éster 5-amino-2-hidroxibenzoato de metila (48).....	49
Esquema 11: Mecanismo de formação dos íons arildiazônios a partir das anilinas 46a-c	50
Esquema 12: Reação do sal de diazônio com NaN_3 levando à formação de um intermediário pentazeno e posterior decomposição, liberando o produto azida 43a-c e gás nitrogênio.....	51
Esquema 13: Reação de aminação redutiva entre um composto carbonílico e uma amina primária, levando à formação de uma amina secundária.	52
Esquema 14: Reações de aminação redutiva de 48 e 49	53
Esquema 15: Reação de N-propargilação do intermediário 47 para fornecer o intermediário 44 com a porção alcino terminal.	55
Esquema 16: Reação dos alcinos 44 com as azidas 43a-c formando os análogos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos 45a-c	56
Esquema 17: Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar formando os triazóis 1,4-dissubstituídos. Adaptado de WORREL, MALIK, FOKIN., 2013.	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Características dos análogos 1,2,3-triazólicos formados.....	58
Tabela 2: Resultados dos ensaios preliminares de avaliação biológica.	63
Tabela 3: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de 45a	68
Tabela 4: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de 45b	69
Tabela 5: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de 45c	70
Tabela 6: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de 44	71

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Aspectos Gerais e Panorama de Distribuição da Tripanossomíase americana.....	13
1.2	Tubulina como Alvo Molecular	20
1.3	O Produto Natural Lavendustina: Atividades Biológicas e Prospecções	27
1.4	Núcleos 1,2,3-triazólicos e Obtenção de Novos Compostos Bioativos	32
2	Justificativa	37
3	Objetivos	39
3.1	Objetivo Geral	39
3.2	Objetivos Específicos	39
4	Metodologia	40
4.1	Materiais e Equipamentos	40
4.2	Procedimentos	41
4.2.1	<i>Planejamento da Síntese</i>	41
4.2.2	<i>Esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico</i>	42
4.2.3	<i>Procedimento geral para a síntese das azidas halogenadas</i>	42
4.2.3.1	<i>Síntese de 1-azido-4-bromobenzeno (43a)</i>	42
4.2.3.2	<i>Síntese de 1-azido-4-clorobenzeno e 1-azido-4-fluorobenzeno (43b, 43c)</i>	42
4.2.4	<i>Obtenção dos Intermediários Reacionais</i>	43
4.2.4.1	<i>Reação de Aminoação Redutiva</i>	43
4.2.4.2	<i>Reação de N-propargilação</i>	43
4.3	Procedimento geral para a síntese dos análogos triazólicos: Cicloadições 1,3-dipolares	45
4.4	Ensaio de atividade biológica contra <i>T. cruzi</i>	47
5	Resultados e Discussão	49
5.1	Esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico.....	49
5.2	Síntese das azidas	50
5.3	Obtenção dos Intermediários Reacionais	52
5.3.1	<i>Reação de Aminoação Redutiva</i>	52
5.3.2	<i>Reação de N-propargilação</i>	55
5.4	Obtenção dos Análogos Triazólicos: Reação de Cicloadição 1,3-dipolar.....	56
5.5	Análise Estrutural dos Intermediários e dos Análogos Triazólicos.....	59
5.6	Avaliação Biológica Preliminar dos Produtos Contra <i>T. cruzi</i>	62
6	Conclusões	64
	Referências	65
	APÊNDICES	68
	ANEXOS	72

1 Introdução

1.1 Aspectos Gerais e Panorama de Distribuição da Tripanossomíase americana

As tripanossomíases são doenças tropicais que podem atingir pessoas e animais domésticos devido à infecção por um dos muitos protozoários do gênero *Trypanosoma*, família Trypanosomatidae (TEIXEIRA *et al.*, 2011; GALVÃO, 2014). Esses protozoários são organismos uniflagelados (**Figura 1**) e possuem cinetoplasto, uma organela com estrutura mitocondrial que contém parte do DNA (*deoxyribonucleic acid*) do parasito (COTZER; TUSTIN, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2011).



Figura 1: Microfotografia de esfregaço sanguíneo revelando a presença de cinco parasitos flagelados tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Public Health Image Library (PHIL), Centers for Disease Control and Prevention (CDC). #ID545, 1970. Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=545>>. Acesso: 09 dez. 2019

Existem duas espécies principais que são capazes de infectar o homem: *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*). De maneira primitiva, a circulação de *T. cruzi* estava restrita aos mamíferos e insetos triatomíneos do meio silvestre, porém, a invasão do ser humano a esses ambientes facilitou a adaptação de algumas espécies desses insetos aos domicílios (GALVÃO, 2014).

As duas espécies do parasito, tanto o *T. brucei* quanto o *T. cruzi*, apresentam formas evolutivas tipicamente descritas, sendo elas: i) **tripomastigota** (de forma longa e delgada, altamente infectante e encontrada no sangue do hospedeiro mamífero); ii) **amastigota** (forma arredondada encontrada no interior do sistema mononuclear fagocitário – SMF); iii) **epimastigota** (forma alongada encontrada do tubo digestivo do inseto vetor) (**Figura 2**). (COTZER; TUSTIN, 2005).

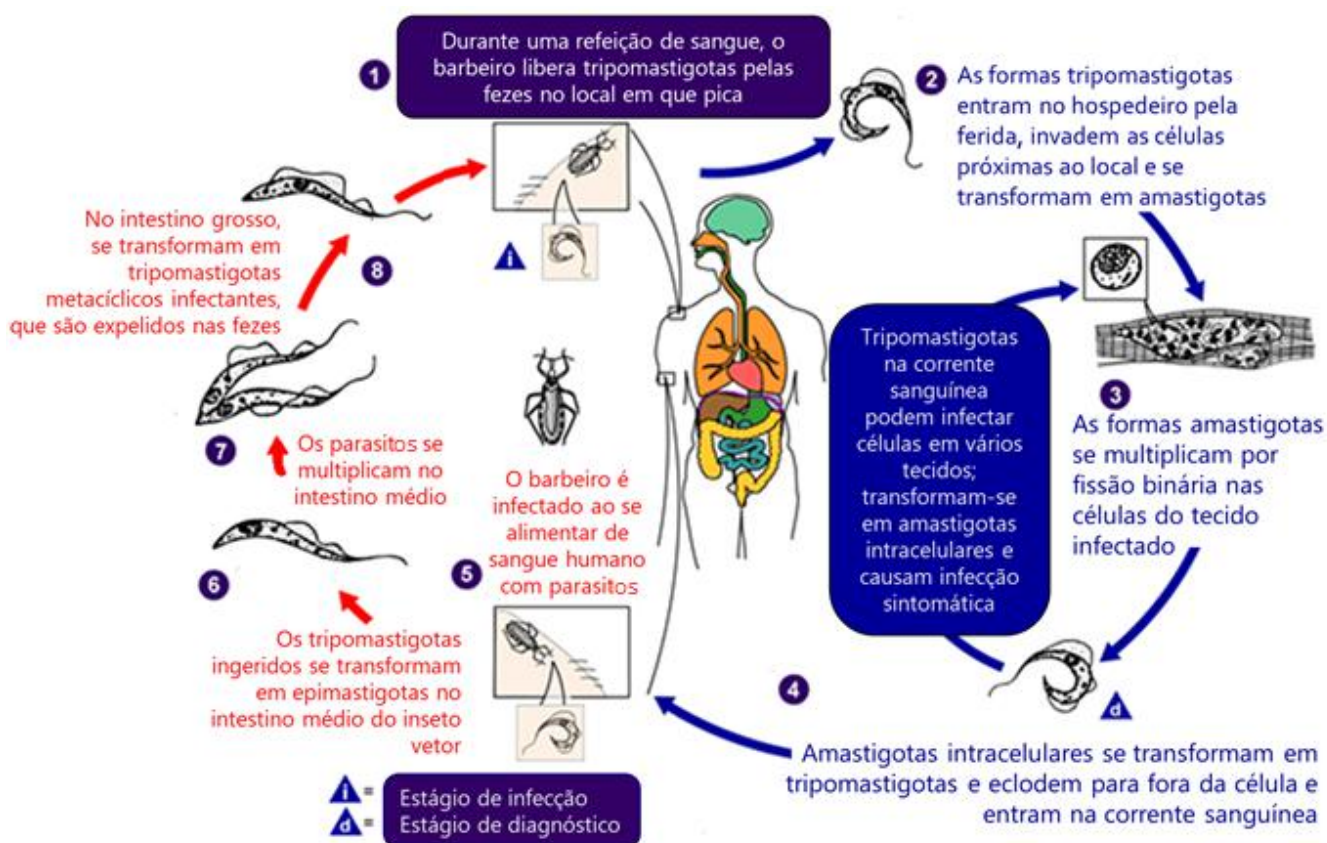


Figura 2: Ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Fonte: Adaptado de Wikimedia Commons, the free media repository. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Trypanosoma_cruzi_lifecycle_dumb.png&oldid=368135738>. Acesso: 24 mar. 2020

O gênero *Trypanosoma* é causador de: **(i) tripanossomíase americana** (nas Américas), também chamada de doença de Chagas (em homenagem ao pesquisador brasileiro Carlos Chagas); causada pelo *T. cruzi* e transmitida principalmente pelas fezes do inseto vetor barbeiro; **(ii) tripanossomíase africana ou doença do sono**, causada pelo *T. brucei* e transmitida pela saliva da mosca tsé-tsé (*Glossina palpalis*). Embora tenham possivelmente compartilhado um ancestral em comum por volta de 100 milhões de anos atrás, algumas diferenças fundamentais e o meio de transmissão foram importantes para separar a classificação desses organismos (STEVENS *et al.*, 1999; GALVÃO, 2014; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019)

A tripanossomíase americana (doença de Chagas) apresenta, comumente, duas fases: uma fase aguda e outra crônica. Na fase aguda, os sintomas característicos são febre prolongada (por mais de 7 dias); dor de cabeça; fraqueza intensa; inchaço no rosto e pernas (COTZER; TUSTIN, 2005; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019). Na fase crônica, geralmente não há o aparecimento dos outros sintomas, mas alguns pacientes apresentam problemas cardíacos, como insuficiência cardíaca e problemas digestivos, como megacólon e megaesôfago (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

As principais formas de transmissão da doença são:

- I. Vetorial (quando há o contato com fezes de insetos contaminados, após picada);
- II. Oral (por ingestão de alimentos contaminados com os parasitos);
- III. Vertical (passagem dos parasitos de mulheres infectadas por *T. cruzi* para seus bebês durante a gravidez ou o parto);
- IV. Por transfusão de sangue ou transplante de órgãos provenientes de doadores infectados.

Os vetores da doença de Chagas recebem diversos nomes vulgares, dependendo da região ou país onde são encontrados. No Brasil, o nome mais conhecido é o “barbeiro”; nas regiões Sudeste e Centro-Oeste são conhecidos como percevejo do mato, percevejão, vum-vum e cascudo; nas regiões Norte e Nordeste como percevejo de parede, percevejo francês, furão, rondão entre outros; e no Sul como chupão, fincão e bicho-de-frade (GALVÃO, 2014).

Dentre as diferentes espécies catalogadas dos vetores, a mais importante e mais antiga das Américas é a *Triatoma infestans* (**Figura 3**). No ano de 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional da eliminação desta espécie através do **Programa de Controle da Doença de Chagas**, mas a alta precariedade das moradias em áreas rurais tem reforçado o contato das outras espécies dos insetos vetores com os seres humanos, o que cria condições favoráveis à infestação das casas pelos insetos triatomíneos e conseqüentemente a progressão de casos da doença (GALVÃO, 2014; PROGRAMA INTEGRADO DE DOENÇA DE CHAGAS DA FIOCRUZ (PIDC), 2017).

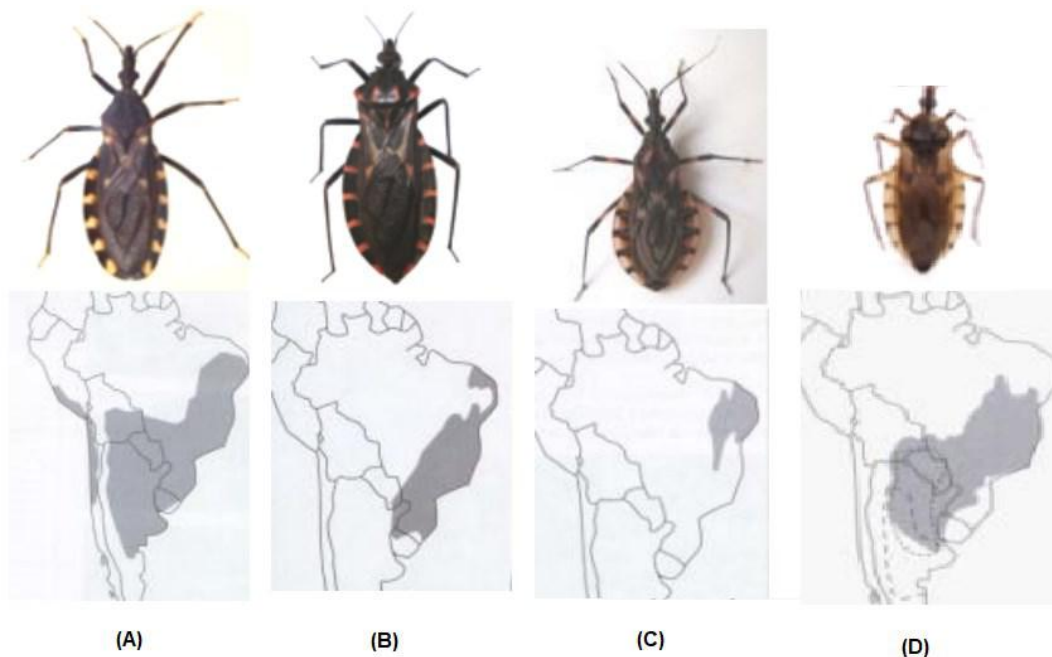


Figura 3: Principais espécies de triatomíneos (inseto vetor barbeiro) e suas localizações nas diferentes regiões do Brasil e América Latina. (A) *Triatoma infestans*. (B) *Panstrongylus megistus*. (C) *Triatoma brasiliensis*. (D) *Triatoma sordida*.

Adaptado de: Vetores da doença de Chagas. Laboratório de Triatomíneos e Epidemiologia da doença de Chagas (LATEC). Centro de Pesquisa René Rachou Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2018/08/05-folder-3-vetores-da-doenca-de-chagas.pdf>>. Acesso: 15 mar. 2021.

A doença de Chagas é endêmica da América Latina, ou seja, específica dessa região, mas apresenta, também, casos nos EUA, Canadá, Europa, Japão e Austrália devido ao grande fluxo migratório de pessoas que acabam se infectando em viagens aos países atingidos e depois retornam aos seus países de origem (Figura 4). A doença de Chagas apresenta o quarto maior impacto social entre todas as doenças infecciosas e parasitárias na América Latina, atrás das doenças respiratórias, diarreias e AIDS (GALVÃO, 2014; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

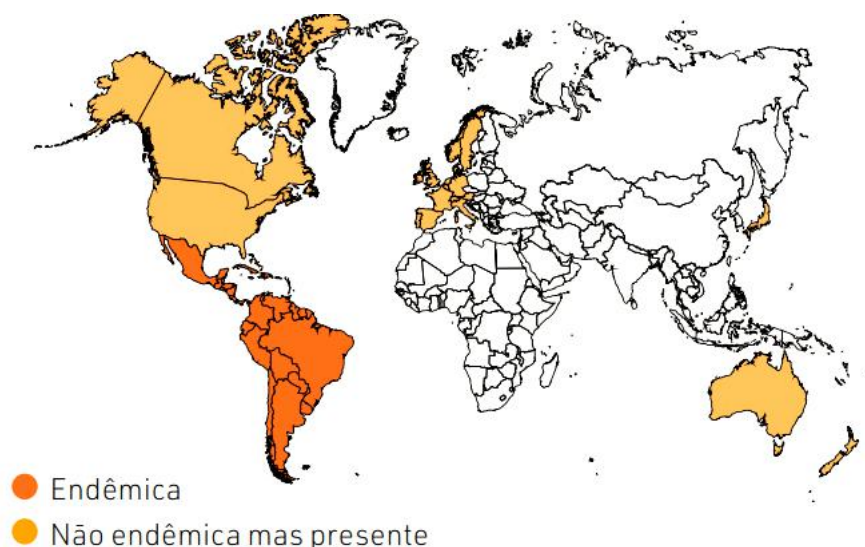


Figura 4: Presença de casos de doença de Chagas no mundo.

Adaptado de Organização Pan-Americana da Saúde. Neglected infectious diseases: Chagas disease. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-chagas-factsheet-work.pdf>. Acesso: 09 dez. 2019.

Segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o número de pessoas infectadas chega a 6 milhões somente na América Latina, com 14.000 mortes ao ano (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019). Dessa maneira, a doença de Chagas caracteriza um grave problema de saúde pública negligenciada pelo setor privado, devido à natureza da população acometida, que em sua maioria é de pessoas pobres, vivendo em zonas rurais, com baixo acesso à água e saneamento básico, e conhecedor de pouca ou nenhuma informação acerca da doença. Assim, grandes empresas e laboratórios não investem em pesquisas e no tratamento da doença, cabendo ao setor público tomar essa responsabilidade.

Atualmente, o tratamento dessas doenças causadas por tripanossomatídeos é baseado em apenas dois medicamentos que foram desenvolvidos há mais de cinquenta anos e que apresentam inúmeros efeitos colaterais, sendo eles o Nifurtimox e Benznidazol (**Figura 5**) dois compostos nitroheterocíclicos. No Brasil, somente o Benznidazol é utilizado, produzido pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do estado de Pernambuco “Governador Miguel Arraes”), sendo o único produtor no país (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

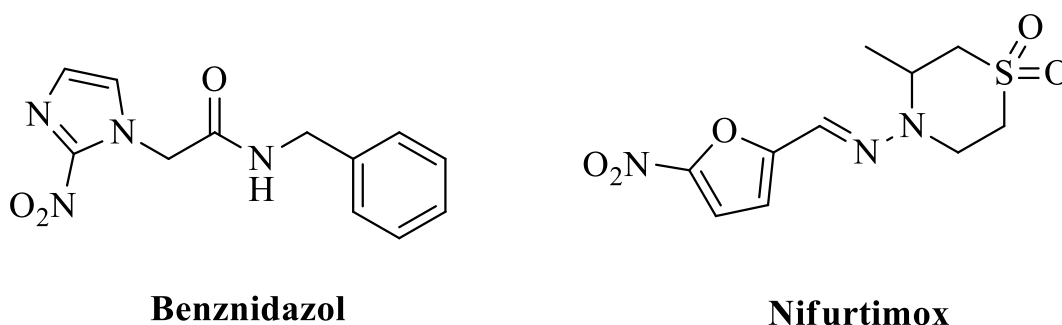


Figura 5: Estrutura dos medicamentos utilizados no tratamento da doença de Chagas

Ambos os fármacos utilizados no tratamento possuem o grupo nitro ($-NO_2$) em sua estrutura, que é reduzido a um grupo amino pela ação de nitro-redutases, formando vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofilicos (MAYA *et al.*, 2007). Resumidamente, o mecanismo de ação do Nifurtimox envolve a produção de radicais nitro-aniônicos que, em presença de oxigênio molecular, deixam as células de *T. cruzi* incapazes de desintoxicarem os radicais livres. O mecanismo de ação do Benznidazol relaciona-se à nitro-redução de componentes do parasito, à ligação de metabólitos do DNA nuclear e k-DNA (DNA do cinetoplasto) de *T. cruzi* e lipídios e proteínas do parasito. Devido a sua alta reatividade, os metabólitos eletrofilicos que se formam pela ação dos medicamentos podem atuar também em outros sistemas, incluindo os do hospedeiro mamífero, que acabam contribuindo para efeitos citotóxicos no tratamento dos pacientes (MAYA *et al.*, 2007; COURA; BORGES-PEREIRA, 2011; SANTOS, 2012).

Apesar de apresentarem resultados excelentes na fase aguda da doença (80% de cura), os medicamentos têm custos elevados, baixa segurança e baixa tolerabilidade causada pelos tratamentos longos, que na maioria das vezes levam os infectados a desistirem de seguir adiante, o que causa, assim, recorrência de casos que uma vez estiveram curados clinicamente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

Os grandes desafios presentes atualmente no Brasil com relação à doença se dão pela ocorrência de casos agudos de Chagas nos estados da Amazônia Legal, com predominância de casos crônicos decorrentes de infecções passadas. Menos de 10% das pessoas infectadas recebem o diagnóstico correto da doença nas Américas e somente cerca de 1% recebe o tratamento antiparasitário e segue até o final (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

A ineficiência e falta de agentes quimioterapêuticos que sejam baratos no combate à doença torna extremamente necessária a pesquisa e desenvolvimento de tratamentos seguros e de via oral, preferencialmente. Apesar dos avanços tecnológicos vivenciados atualmente, até o ano de 2011, por exemplo, somente dois candidatos a fármacos (posaconazol e ravuconazol) estavam na fase 2 do desenvolvimento clínico para tratamento da doença do sono e de Chagas. E enquanto novos tratamentos ainda estão longe de virar realidade, o controle das populações dos insetos vetores ou programas de vigilância que possam reduzir o risco de infecções se tornam a principal arma contra a doença de Chagas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012; GALVÃO, 2014; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE, 2019).

As análises e estudos metabólicos dos tripanossomatídeos e posteriormente o sequenciamento genômico e proteômico do *T. cruzi*, bem como outros estudos bioquímicos, revelaram alvos hipotéticos para o tratamento da doença de Chagas, como a trans-liadase, a histidina amônio-liase e a urocano hidratase, que são algumas enzimas presentes no metabolismo do parasito; além de outros alvos biológicos como algumas organelas celulares exclusivas, proteases, enzimas como as DNA topoisomerases I e II, proteínas envolvidas na síntese de lipoproteínas, ou enzimas que participam da produção de ATP (adenosina tri fosfato) através da via glicolítica – todos estes foram levantados como alvos na busca de fármacos contra o *T. cruzi* (PITA; PASCUTI, 2011).

Um alvo interessante que tem emergido no desenvolvimento de antiparasitários, pesticidas e anticancerígenos é a tubulina, uma proteína globular. Embora não seja tão explorada como alvo contra *T. Cruzi*, alguns trabalhos têm mostrado que inibidores de polimerização da tubulina apresentam atividades promissoras frente ao parasito (ZHOU; GIANNAKAKOU, 2005; FENNEL *et al.*, 2008; OGINDO *et al.*, 2016). Por este motivo, a tubulina tem se tornando um alvo molecular importante no tratamento da doença de Chagas.

Por este motivo, a fim de se compreender melhor o papel da tubulina em processos biológicos, a seguir, serão dadas as principais informações e atividade da tubulina na seção 1.2

1.2 Tubulina como Alvo Molecular

A tubulina é um dos vários membros de uma família de proteínas globulares responsável pela formação básica de microtúbulos. Sendo constituídos de um dímero de alfa e beta tubulina, que formam 13 protofilamentos, os microtúbulos (**Figura 6**) têm papel significativo na geração do fuso mitótico durante o processo de formação celular (LIU *et al.*, 2014). Além disso, eles estão envolvidos na determinação da forma e polaridade celular, movimentos celulares e transporte intracelular, manutenção da integridade estrutural das organelas celulares; – atividades essas essenciais para a sobrevivência celular (LIU *et al.*, 2014; BHARGAVA; CHATTERJI, 2014).

No campo de estudo para descoberta de fármacos anticancerígenos, a tubulina tem se tornado alvo importante e mostrado que inúmeros agentes interferentes de tubulina são os primeiros fármacos quimioterápicos utilizados para o tratamento de cânceres (BOBBAA *et al.*, 2017).

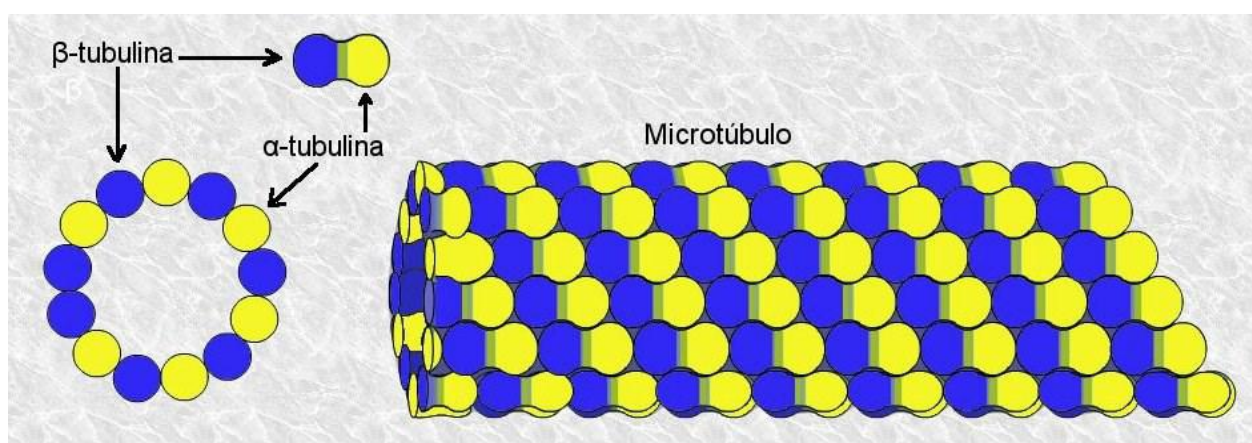


Figura 6: Representação da estrutura de microtúbulo.

Fonte: Alejandro Porto, CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Microtubulos.jpg&oldid=479063485>> Acesso: 04 jan. 2021.

A tubulina é uma proteína altamente conservada dentro de diversas espécies. No entanto, é descrito que organismos diferentes apresentam níveis distintos de sensibilidade a agentes antimitóticos, indicando que há diferenças estruturais em tubulinas entre espécies diferentes. Desse modo, infere-se que as tubulinas de determinados alvos podem ser mais seletivas do que outros (BOBBAA *et al.*, 2017).

Assim, os agentes com alvo em microtúbulos podem promover a polimerização ou despolimerização de tubulinas, os processos que formam ou desfazem os microtúbulos, agindo diretamente no seu comprimento e, conseqüentemente, em sua estabilidade. Esses agentes podem se ligar através de diferentes sítios de ligação (**Figura 7**) presentes nas estruturas dos microtúbulos, sendo classificados em cinco: alcalóides da vinca, colchicina, taxanos, epotilonas e laulimalida (FOSKET, 1992; LIU *et al.*, 2014; SINCLAIR; DE GRAFFENRIED, 2019).

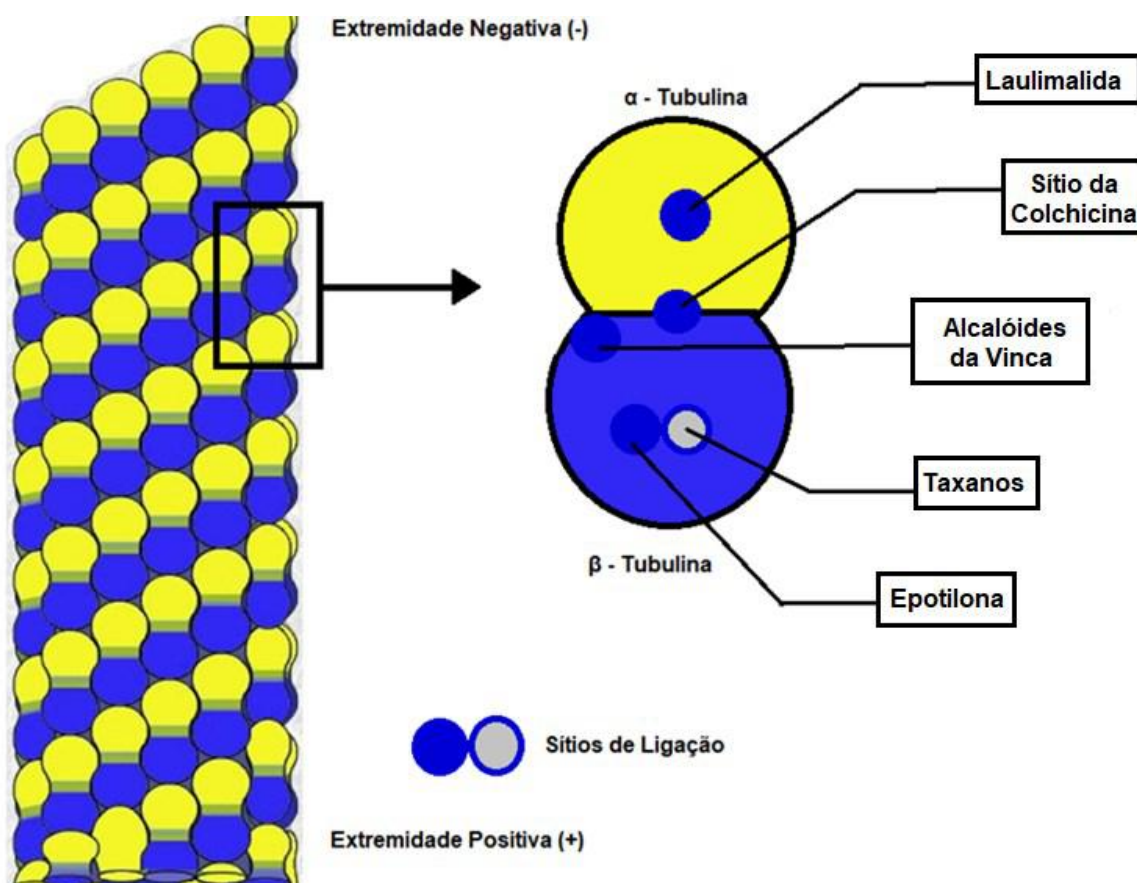


Figura 7: Corte ampliado de um dímero de tubulina da estrutura de microtúbulo, mostrando os cinco diferentes sítios de ligação. Adaptado de Alejandro Porto, CC BY-SA 3.0. *via* Wikimedia Commons.

Os microtúbulos são, de certa forma, diretamente responsáveis pela forma dos tripanossomatídeos cujos corpos são envoltos por uma única camada de microtúbulos, chamada de matriz subpelicular. Diversas abordagens mostraram que a matriz de microtúbulos em *T. brucei*, por exemplo, são altamente organizadas e notavelmente estáveis, com o crescimento de suas extremidades positivas direcionadas para a parte posterior da célula (**Figura 8**) (SINCLAIR; DE GRAFFENRIED, 2019).

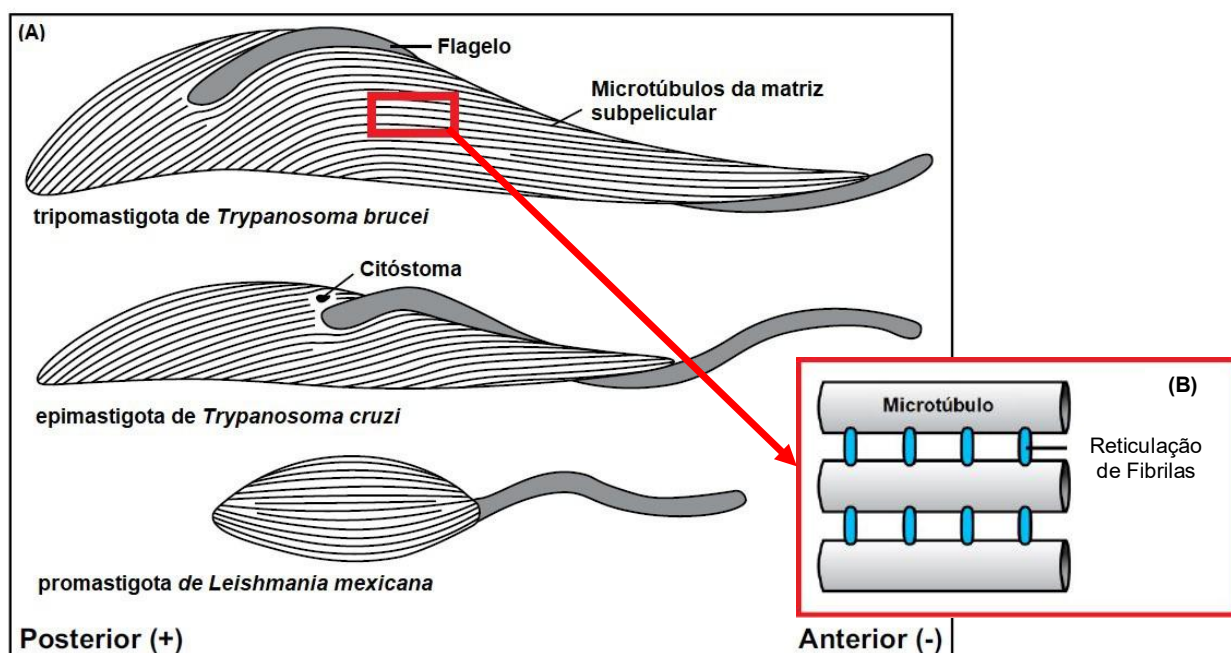


Figura 8: (A) Esquema representando os microtúbulos na matriz subpelicular na forma tripomastigota pró-cíclica em um *T. brucei* (no topo), e na forma epimastigota de *T. cruzi* (ao centro), e forma promastigota de *Leishmania mexicana* – tripanossomatídeo causador da leishmaniose (inferior). (B) Esquema de reticulação das fibrilas que unem os microtúbulos da matriz – zoom a partir do recorte em (A). Adaptado de SINCLAIR, A. N., GRAFFENRIED, C. L., 2019

Os tripanossomatídeos acabam sofrendo uma série de mudanças morfológicas à medida que percorrem o corpo dos insetos infectados e hospedeiros mamíferos, adotando as formas epimastigota e promastigota principalmente. Essas mudanças se ajustam aos diferentes ambientes em que os tripanossomatídeos habitam a fim de que possam garantir sua sobrevivência. Os microtúbulos subpeliculares, por sua vez, conferem estabilidade adicional para o parasito, dando-lhe as habilidades locomotivas de que necessita para percorrer o corpo de seu hospedeiro (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013; SINCLAIR; DE GRAFFENRIED, 2019).

As estruturas que contêm tubulina são responsáveis pela maioria das atividades celulares, como transporte intracelular, manutenção e desenvolvimento celular, mobilidade celular e distribuição de moléculas nas membranas celulares. A tubulina tem sido descrita como tendo papel importante na divisão celular de tripanossomas, onde a taxa de duplicação da população desses parasitos é altamente dependente da polimerização/despolimerização da tubulina. Neste caso, inibidores de tubulina podem romper o processo mitótico, ocasionando uma parada do ciclo celular, limitando, assim, a proliferação celular e podendo levá-las à morte. Arelada ao bloqueio de divisão de células de tripanossomatídeos, a inibição de tubulina também afeta a função locomotora do flagelo que, como consequência, pode apresentar deformações, dificultando a mobilidade do parasito (LAMA *et al.*, 2012).

Nos tripanossomas, a tubulina é descrita como possuindo características bioquímicas interessantes, podendo sofrer modificação química da cadeia proteica após sua tradução (chamada modificação pós-transducional/translacional) através de mecanismos de acetilação, tirosinação e poliglutamilação, alterando assim sua atividade, localização, e interação com outras proteínas. Os níveis de poliglutamilação (adição de cadeias laterais de glutamato às proteínas), por exemplo, podem ser responsáveis por um “código” das tubulinas e dessa forma regular sua polimerização e/ou alteração com proteínas motoras. Além disso, as tubulinas de tripanossomas têm diferenças das tubulinas de mamíferos no que diz respeito às suas sensibilidades a determinados fármacos. Elas são relativamente insensíveis à colchicina **9a**, com afinidade reduzida, e aos alcaloides da vinca vimblastina **9b** e vincristina **9c**, no entanto, apresentam sensibilidade a alguns compostos anti-tubulina como taxol **9d** e benzimidazóis **9e** (Figura 9) (FOSKET, 1992; STEVERDING; TYLER, 2005).

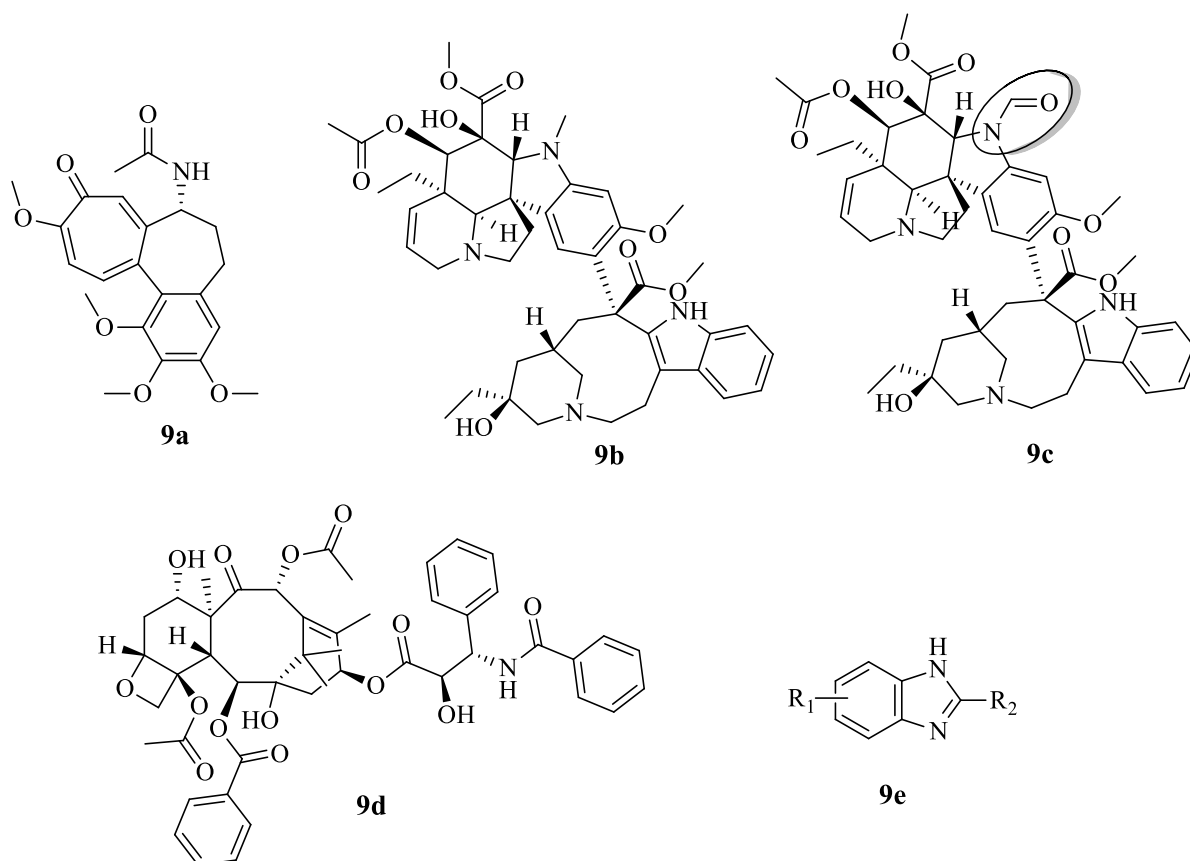
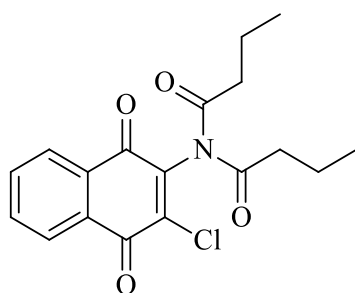


Figura 9: Estrutura de alguns fármacos anti-tubulina como Colchicina (**9a**), Vinorelbina (**9b**) e Vincristina (sítio ligante dos alcaloides da vinca) (**9c**), Paclitaxel (sítio ligante do taxol) (**9d**), Benzimidazóis (**9e**).

A inibição de tubulina vem sendo descrita na literatura em variados trabalhos com produtos naturais, sobretudo em estudos analisando as atividades tripanocidas de certas substâncias. Como exemplo, Ogindo *et al.* (2016) analisou alguns derivados sintéticos 1,4-naftoquinonas imido-substituídas que mostraram ser potentes agentes anti-tripanosomas, mais ainda que o fármaco de tratamento Nifurtimox, através do controle da proliferação de células de *T. cruzi* na fase G2/M do ciclo celular. O composto **IMNDQ3** (**Figura 10**) quando analisado por Ogindo *et al.* apresentou um valor de concentração necessária para inibir 50% do parasito (chamada de metade da concentração inibitória máxima ou IC₅₀) igual a 0,70 μM contra um IC₅₀¹ de 10,67 μM para o fármaco Nifurtimox (KHRAIWESH *et al.*, 2012; OGINDO *et al.*, 2016).

¹ Um valor de IC₅₀ baixo significa que a substância é potente em baixas concentrações. Desse modo, apresentará menor toxicidade sistêmica quando for administrado ao paciente, no caso de um fármaco, por exemplo.



IMNDQ3

IC ₅₀ (μM)	
Atividade Anti-tripanosoma	0,70
Atividade Anti tubulina <i>T. cruzi</i>	3,2

Figura 10: Estrutura de análogo de 1,4-naftoquinona (**IMNDQ3**) com atividade anti *T. cruzi*. Adaptado de OGINDO et al., 2016.

Quando testado para a inibição de tubulina de *T. cruzi*, embora o fármaco Nifurtimox não tenha sido avaliado nesse quesito para comparação, o composto **IMNDQ3** mostrou uma atividade interessante, com IC₅₀ de 3,2 μM, apontando, dessa forma, para um processo disruptivo de tubulina, provavelmente por inibição de polimerização da tubulina (OGINDO *et al.*, 2016).

Seguindo nos estudos de substâncias com possíveis atividades tripanocidas, em 2016, Sueth-Santiago e colaboradores investigaram os efeitos citotóxicos do produto natural curcuma (**CUR**) e de outros curcuminoides em diferentes formas de *T. cruzi*. Sendo o componente majoritário dos rizomas de uma planta, a *Curcuma longa* (*C. longa*), a curcuma tem sido amplamente investigada por suas propriedades quimioterapêuticas, sobretudo contra alguns parasitos como *Leishmania sp.*, *T. brucei* e *Plasmodium falciparum*. Em estudos anteriores, **CUR** se mostrou ativa contra *Leishmania amazonensis* possivelmente pela sua estrutura similar ao fármaco pentamidina, utilizado no tratamento da leishmaniose (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2016).

Nas investigações de Sueth-Santiago (2016), foram utilizados quatro compostos naturais, a **CUR** e outros curcuminoides, desmetoxicurcuma (**DMC**), bisdesmetoxicurcuma (**BDMC**) e ciclocurcuma (**CC**) (**Figura 11**), contra as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Com exceção da **CC**, todos os outros foram ativos nesta forma, sendo o mais potente a **CUR** com IC₅₀ = 10,13 μM. Os compostos não apresentaram atividade citotóxica em dois tipos de células de roedores testados, mostrando citotoxicidade seletiva para as células de *T. cruzi*. O tratamento feito com **CUR** provocou a formação de múltiplos flagelos encurtados nas células de *T. cruzi*,

sugerindo uma divisão celular incompleta do parasito, indicando distúrbios nos microtúbulos por mecanismo de interação com a tubulina (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2016).

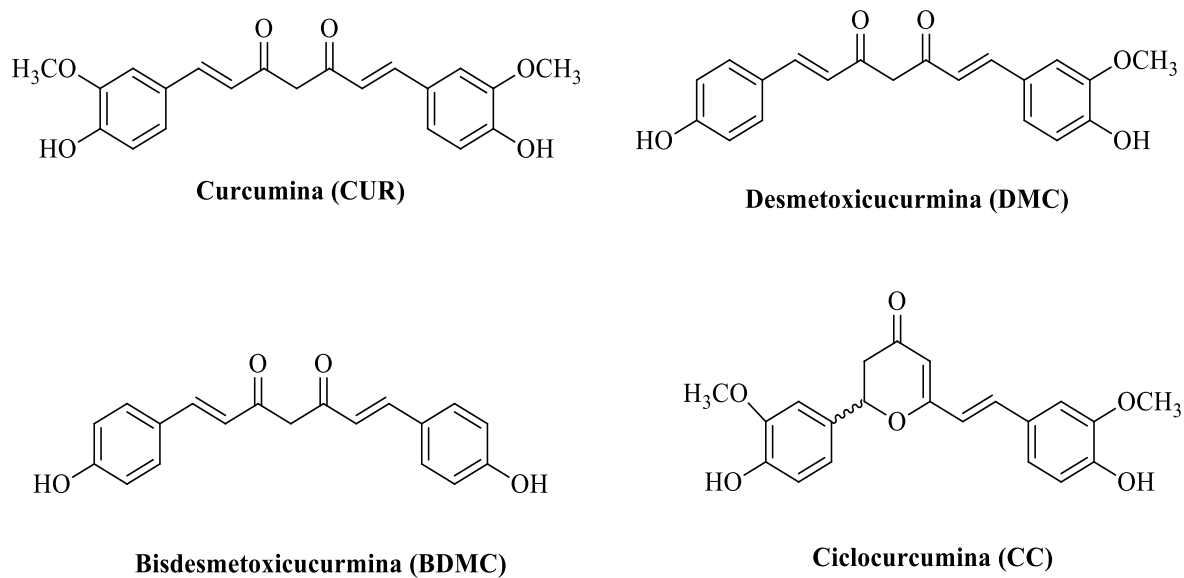


Figura 11: Estrutura química da curcumina e outros curcuminoides.

1.3 O Produto Natural Lavendustina: Atividades Biológicas e Prospecções

A busca por tratamentos de doenças parasitárias tem mostrado agentes com promissoras atividades contra tripanossomatídeos, dentre eles podemos citar os inibidores de cisteína proteases (enzimas responsáveis pelo ciclo de vida dos parasitos), inibidores de proteassoma (um complexo proteico responsável pela degradação de proteínas intracelulares), inibidores de DNA topoisomerasas (enzimas essenciais que catalisam mudanças topológicas na molécula de DNA), os agentes direcionados à tubulina (como supracidato), inibidores da síntese de lipídios, inibidores de lipoilação, dentre outros compostos e os produtos naturais (STEVERDING; TYLER, 2005).

Muitos dos fármacos utilizados hoje são produtos naturais ou compostos sintéticos derivados de produtos naturais. Alguns trabalhos já mostraram vários compostos naturais como alcaloides, derivados fenólicos, quinonas e terpenos com boas atividades inibitórias *in vitro* no crescimento de tripanossomas (HOET *et al.*, 2004; STEVERDING; TYLER, 2005). A diversidade dos produtos naturais com atividades antiprotozoárias tem sido reportada em várias análises de moléculas ativas, principalmente, nos agentes etiológicos da malária, leishmaniose ou doença de Chagas (HOET *et al.*, 2004).

Como exemplo, em 1989, Onoda *et al* isolou um metabólito natural, a Lavendustina A (Figura 12), extraído de células de bactérias *Streptomyces griseolavendus*. Este produto natural foi posteriormente descrito como um potente inibidor de proteína tirosina quinase (PTQ), uma proteína altamente responsável por diversas atividades das células, dentre elas a proliferação, diferenciação, mobilidade, sobrevivência e morte celular. Devido as PTQs atuarem não somente como reguladores-chave de processos celulares normais, mas também no desenvolvimento e na progressão de vários tipos de câncer, estas têm se tornado excelentes alvos na terapia de doenças cancerígenas (NUSSBAUMER *et al.*, 1994; ROMEIRO; AVILA, 2010).

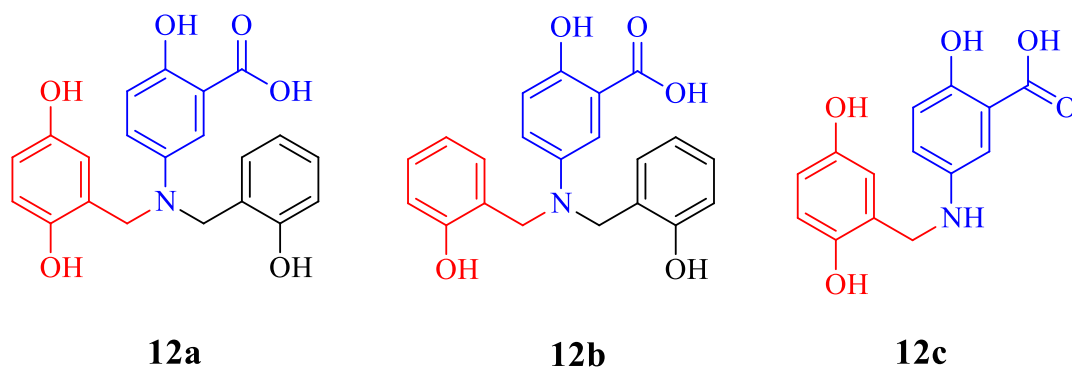


Figura 12: Estrutura do produto natural Lavendustina A (12a), Lavendustina B (12b) e sua subunidade farmacofórica Lavendustina C (12c).

Adicionalmente, a lavendustina A (**12a**) e sua subunidade farmacofórica (porção biologicamente ativa), a Lavendustina C (**12c**) (**Figura 12c**), apresentaram inibição contra a proteína tirosina quinase do receptor do fator de crescimento epidérmico (PTQ-RFCE). No entanto, devido à alta polaridade e pobre permeabilidade celular, ambos perdem significativamente a atividade biológica, em grande parte devido à porção carboxílica ($-\text{COOH}$). Assim, diversos grupos de pesquisa iniciaram investigações em química medicinal modificando a estrutura de **12c**, como forma de melhorar a penetração celular e conseqüentemente a sua bioatividade (ONODA *et al.*, 1989; NUSSBAUMER *et al.*, 1994; MU *et al.*, 2001, 2002, 2003).

Por meio de um estudo da atividade antiproliferativa contra células de linhagem não-tumoral de queratinócitos (HaCat) com vários análogos da Lavendustina, Nussbaumer *et al.* (1994) mostrou que o composto **13b** (**Figura 13**) foi um potente inibidor apresentando um IC_{50} de $0,04 \mu\text{M}$. Quando testados contra a PTQ-RFCE em condições livres de células, **12a** e **12b** apresentaram valores semelhantes de inibição com IC_{50} em torno de $4,1 \mu\text{M}$, contudo, muitos dos seus derivados, incluindo **13b**, foram inativos, inferindo que a porção hidroquinona (1,4-di-hidroxi-benzeno) era necessária para uma inibição eficiente de PTQ-RFCE. A O-metilação da porção hidroquinona de **12c** produziu um análogo dimetoxilado (diOCH_3 ou diOMe) desprovido de atividade antiproliferativa. No entanto, esse mesmo análogo depois de sofrer uma reação de esterificação na porção ácido carboxílico converteu-se a **13a** (**Figura 13**) que apresentou significativa atividade antiproliferativa contra os queratinócitos (HaCat) com IC_{50} de $1,5 \mu\text{M}$. A substituição do nitrogênio (espaçador) nessas estruturas gerou outros análogos que tiveram suas atividades frente aos queratinócitos aumentada (**13b**, **13c-13c''**) (**Figura 13**); um deles, **13b**, apresentou valor de IC_{50} menor que $1 \mu\text{M}$. As modificações estruturais mostraram que o

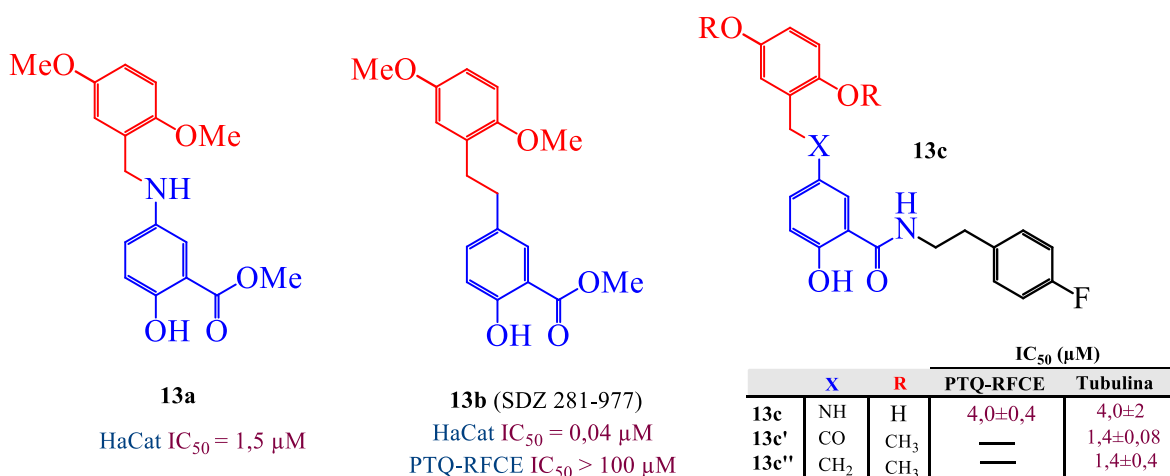
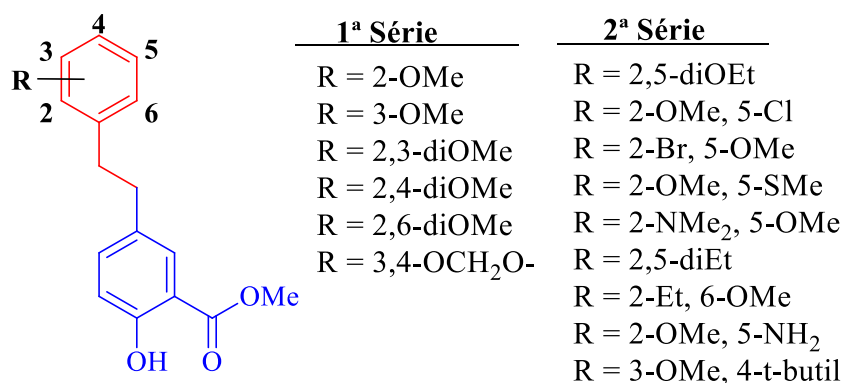


Figura 13: Estrutura de análogos da Lavendustina A com respectivos valores de inibição (IC_{50}). (**13a**) Análogo O-metilado e esterificado; (**13b**) Estrutura parcial modificada de **12c**, composto SDZ 281-977; (**13c-c''**) Derivados sintéticos da Lavendustina C.

alto grau de flexibilidade relacionado à substituição do átomo central e o aumento da lipofilicidade podem ter sido as causas para as boas atividades vistas. Posteriormente, **13b** e **13c** também foram descritos como inibidores do processo de polimerização de tubulina, atuando como bloqueadores do ciclo celular na mitose através da perturbação dos microtúbulos do fuso mitótico. Em suma, os efeitos antiproliferativos dos análogos mencionados se deram, em grande parte, pela inibição de polimerização da tubulina mais do que qualquer outro efeito de inibição de PTQ. (NUSSBAUMER *et al.*, 1994; CAMMISULI *et al.*, 1996; MU *et al.*, 2001; GHIANO *et al.*, 2011).

Os resultados dos ensaios biológicos conduzidos por Mu *et al* (2003), mostraram que os análogos **13c'** e **13c''**, que possuem dois grupos metoxila no anel benzílico, foram os mais potentes inibidores de polimerização de tubulina (ambos com $IC_{50} = 1,4 \mu M$). Esses valores se mostraram até melhores ou muito semelhantes a alguns agentes já conhecidos como inibidores de tubulina como combrestatina A-4 ($IC_{50} = 1,9 \mu M$), podofilotoxina ($IC_{50} = 2,1 \mu M$) e tiocolchicina ($IC_{50} = 1,4 \mu M$) (MU *et al.*, 2003).

Em estudos posteriores, Nussbaumer e Winisky (2008) também investigaram as relações de estrutura-atividade (SAR, do inglês *structure–activity relationship*) do então inibidor de PTQ-RFCE **13b** devido a efeitos de modificações no anel contendo a porção 2,5-dimetoxifenil, produzindo, principalmente, duas séries de outros derivados (**Figura 14**). As análises biológicas mostraram que a alta atividade desses compostos era atingida quando ao menos um dos substituintes era o grupo metoxila. Embora os compostos tivessem o mesmo mecanismo de ação antimitótica, havia um potente decréscimo da atividade antiproliferativa quando as modificações ocorriam na posição 5 do anel em relação à mesma substituição na posição 2, na qual os efeitos estéricos eram mais pronunciados do que os efeitos eletrônicos do anel (NUSSBAUMER; WINISKI, 2008).

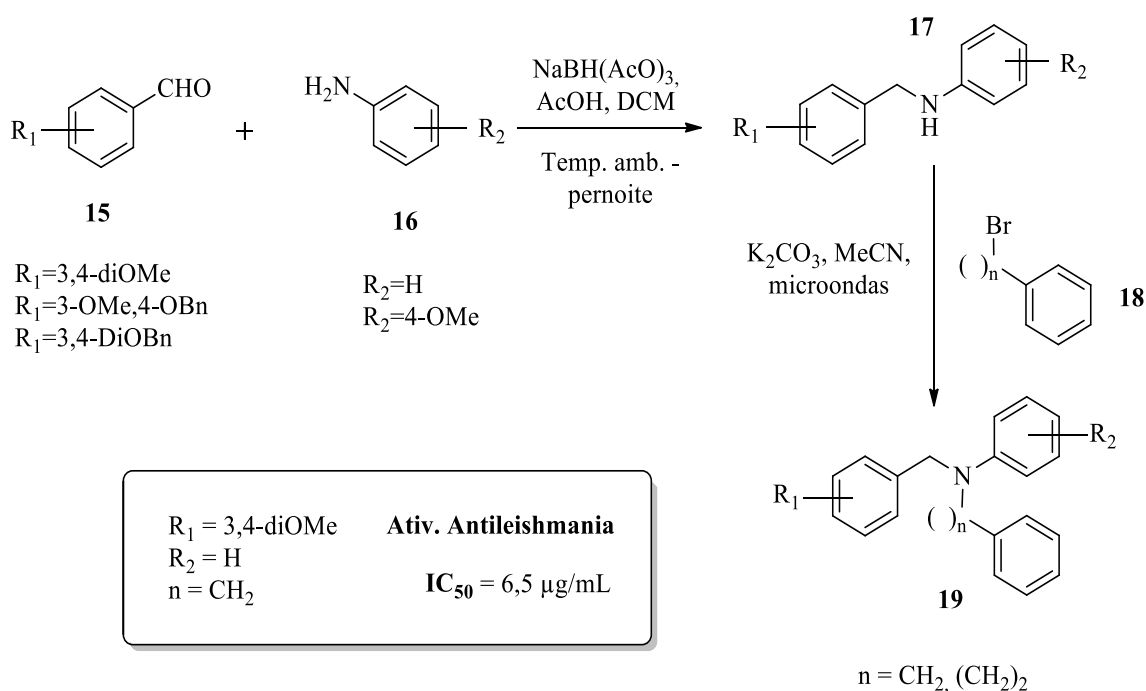


14

Figura 14: Série de derivados da Lavendustina testados para SAR (relação estrutura-atividade). Adaptado de NUSSBAUMER e WINISKY, 2008.

As atividades promissoras da Lavendustina A e C têm estimulado diversos estudos destes compostos com diferentes alvos moleculares, criando uma variedade de análogos, muitas vezes, com atividade biológica potencializada, como visto até agora. Contudo, a maioria dos trabalhos publicados com análogos da Lavendustina A investigaram a citotoxicidade contra células cancerígenas e, em raros casos, esses análogos foram avaliados como antiparasitários (GHIANO *et al.*, 2011).

Visando, então, desenvolver novos agentes contra doenças parasitárias, Ghiano e colaboradores (2011) publicaram um trabalho envolvendo uma série de análogos N,N-dissubstituídos utilizando como base a estrutura da Lavendustina A (**12a**), através de uma síntese de duas etapas sendo uma aminação redutiva de aldeídos substituídos **15** e anilinas **16** (intermediários), e N-alkilação das amins secundárias **17** (**Esquema 1**) (GHIANO *et al.*, 2011).

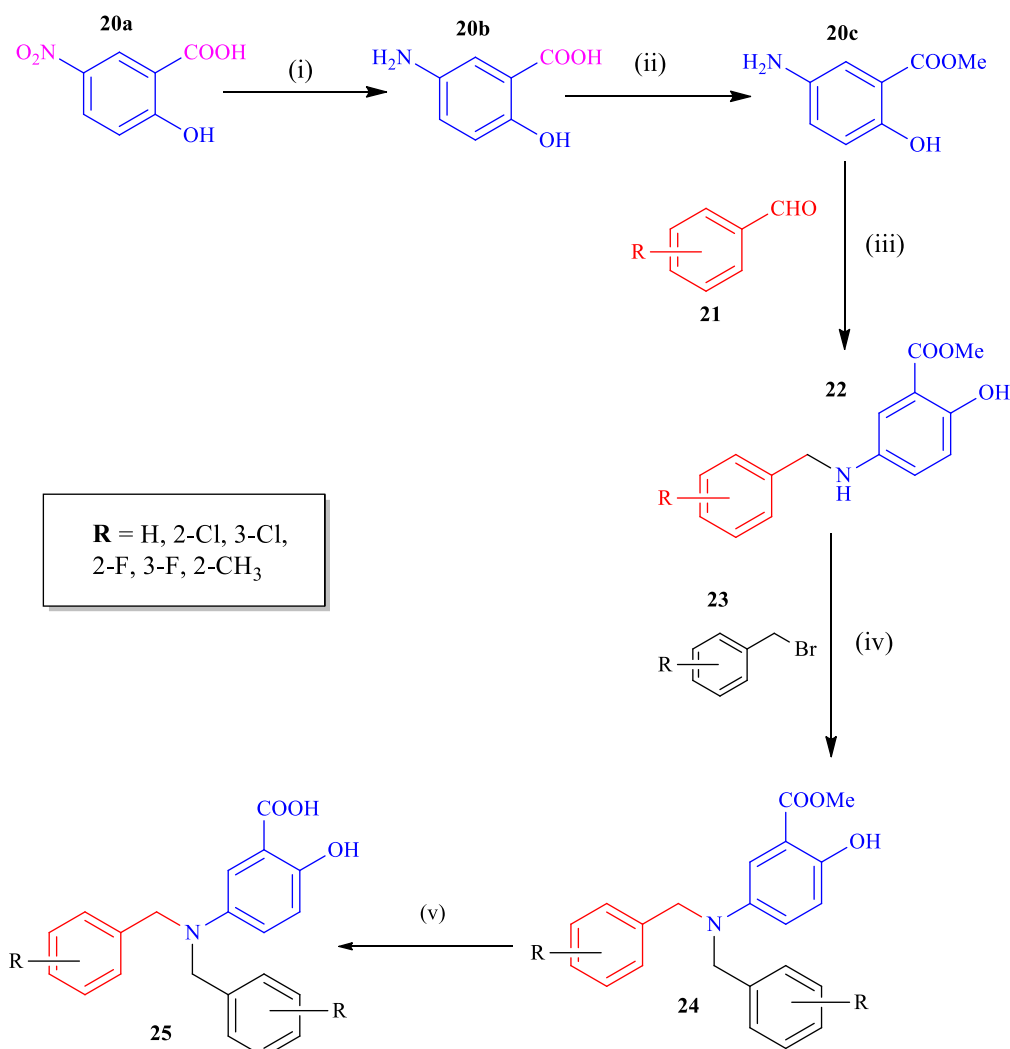


Esquema 1: Síntese de análogos da Lavendustina avaliados com atividade antiparasitária. Adaptado de GHIANO *et al.*, 2011.

Os compostos tiveram suas atividades avaliadas *in vitro* contra células promastigotas de *Leishmania donovani* (protozoário também da família Trypanosomatidae e causador da leishmaniose). O análogo **19** com o substituinte 3,4-diOMe foi o que apresentou maior atividade antileishmania, com IC₅₀ de 6,5 µg/mL (aproximadamente 19,4 µM). Em comparação, o antifúngico Anfotericina B, que também é utilizado como antiprotozoário, apresentou IC₅₀ de 0,15 µg/mL (aprox. 0,16 µM) para atividade antileishmania (GHIANO *et al.*, 2011).

Em estudos com triagem virtual baseada em estrutura e ensaios de atividade biológica de uma seleção de produtos naturais, **12b** foi identificado como inibidor da interação da proteína

HIV-1 integrase (IN) com o fator de transcrição p75 e fator de crescimento derivado do cristalino (denominada LEDGF/p75). Tal fato levou Agharbaoui e colaboradores (2016) a desenvolverem estudos *in silico* de derivados de **12b** com atividade melhorada. Os análogos foram sintetizados removendo-se a porção 2-hidroxi e colocando átomos de halogênio (como Cl e F) e substituintes metila, a fim de que as áreas hidrofóbicas da estrutura fossem exploradas (**Esquema 2**). O análogo **25** produzido com o substituinte 2-Cl apresentou a melhor atividade com $IC_{50} = 3,78 \mu M$, mostrando boas correlações com os dados computacionais e experimentais, abrindo caminho para uma promissora nova classe de inibidores de HIV-1 integrase (AGHARBAOUI *et al.*, 2016).



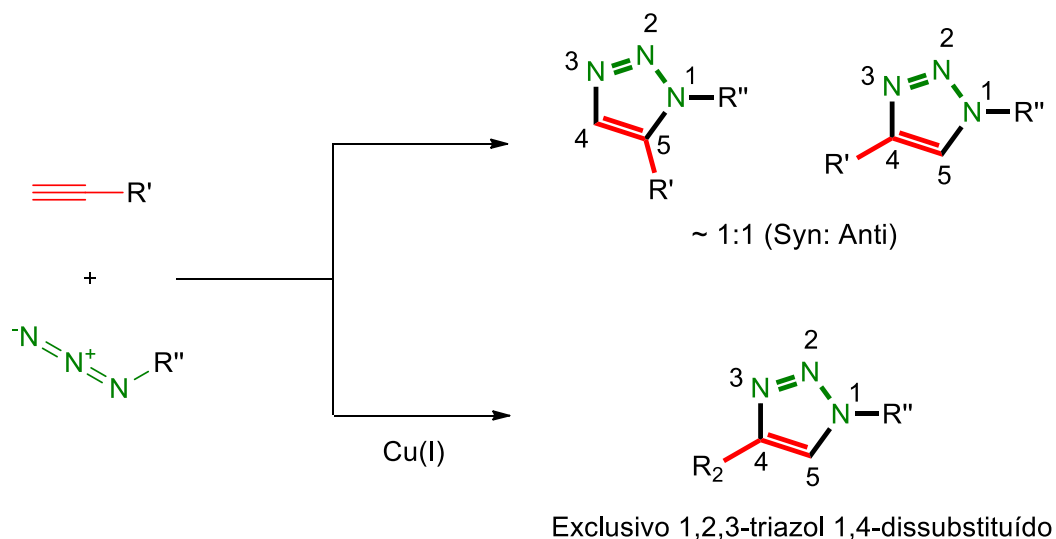
(i) Zinco em pó, 0-5 °C, $\text{HCl}_{\text{conc.}}$, refluxo, 4h; (ii) MeOH, H_2SO_4 , 0 °C, 80 °C, 24h; (iii) MeOH, AcOH, 0.5h, 40 °C, temp. amb. 1h, 5 -10 °C, NaCNBH_3 , 2h temp. amb.; (iv) NaH, DMF, Argônio 3h temp. amb.; (v) NaOH, MeOH, THF, 60 °C, 24 h, HCl 2 N.

Esquema 2: Síntese de análogos da Lavendustina B com atividade anti HIV-1 integrase. Adaptado de AGHARBAOUI *et al.*, 2016

1.4 Núcleos 1,2,3-triazólicos e Obtenção de Novos Compostos Bioativos

O planejamento e a síntese de novos compostos bioativos enfrentam diversos desafios que vão desde a busca por bons rendimentos reacionais até à chegada desses promissores compostos às farmácias. Grande parte de compostos bioativos sintetizados em laboratórios não têm muito sucesso nas etapas pré-clínicas. Assim, muitos pesquisadores recorrem a novas estratégias como forma de melhorar as atividades biológicas desses compostos ou mesmo variá-las (LEITE *et al.*, 2018; LESSA, 2021).

Uma dessas estratégias, muito utilizada na química medicinal, utiliza grupos 1,2,3-triazólicos como conectores (ou *linkers*) entre dois outros grupos farmacofóricos de um composto. Os grupos 1,2,3-triazólicos também são chamados de bioisómeros dos grupos amida por apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes. Para se obter esses grupos 1,2,3-triazólicos podem ser feitas reações do tipo *Click Chemistry*, um processo rápido de conexão de unidades menores. A melhor aplicação da *Click Chemistry* são as cicloadições 1,3-dipolares de Huisgen de alcinos e azidas catalisadas por Cu(I) para produzir 1,2,3-triazóis 1,4 dissustituídos (também conhecidas como CuAAC do inglês *copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*) (**Esquema 3**) (MOSES; MOORHOUSE, 2007; HOLUB; KIRSHENBAUNM, 2010; LEITE *et al.*, 2018).

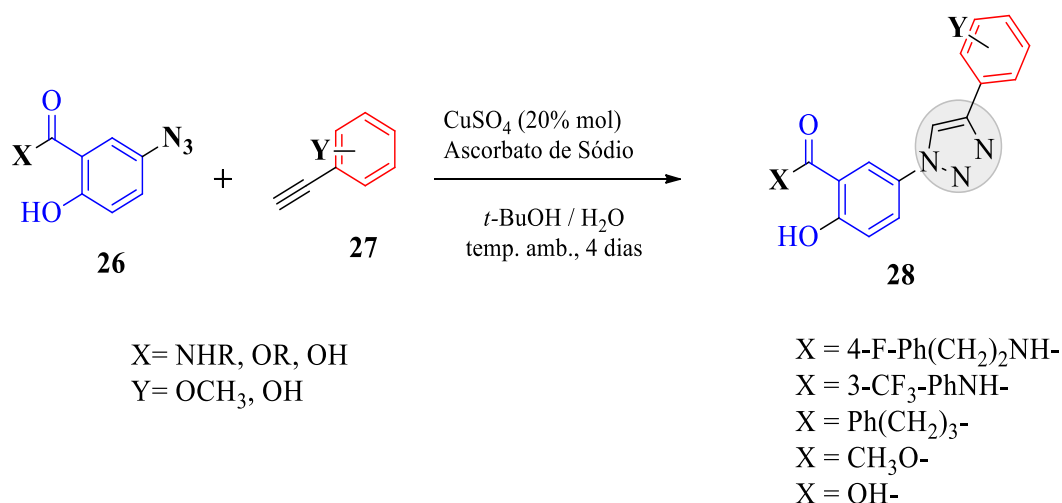


Esquema 3: Reação de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen. A cicloadição induzida termicamente leva à formação de uma mistura de estereoisômeros 1,4 e 1,5-triazol na proporção de 1:1. A cicloadição catalisada por Cu(I) leva à formação exclusiva do 1,2,3-triazol 1,4 dissustituído. Adaptado de MOSES e MOORHOUSE, 2007.

O processo para a obtenção dos 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos não requer grupos de proteção e se dá de maneira regioselectiva. Além disso, o anel gerado é quimicamente inerte a algumas condições reativas como oxidação, redução e hidrólise, apresentando uma polaridade intermediária de aproximadamente 5 Debye ($\approx 1,7 \times 10^{-29} \text{ C} \cdot \text{m}$) (MELDAL; TORNØE, 2008). Todas essas características tornam estes cicloadutos extremamente versáteis e amplamente explorados como “linkers” e/ou porção farmacofórica (MOSES; MOORHOUSE, 2007; YOON; RYU, 2010; LEITE *et al.*, 2018).

Na literatura, são encontradas substituições similares por triazóis (bioisosteísmo) que podem ser visualizados em diversos compostos como antiparasitários, anticancerígenos, antivirais, bactericidas, antiepilépticos, inibidores de enzimas e compostos reguladores de sono (FERNANDES *et al.*, 2012; LEITE *et al.*, 2018).

Como exemplo, em 2010, Yoon e Ryu publicaram um trabalho envolvendo a síntese de diversas moléculas análogas à Lavendustina C (**28**), por meio da *Click Chemistry*. No trabalho, a porção ácido salicílico e a porção hidroxibenzeno de **12c** foram variadas estruturalmente, substituindo a ligação $-\text{CH}_2\text{-NH}-$ por um anel triazol lipofílico. Neste contexto, a metodologia *Click Chemistry* permitiu aos substituintes do anel 1,2,3-triazol que fossem variados com o uso de diferentes azidas orgânicas **26** ou de alcinos **27** (**Esquema 4**) (YOON; RYU, 2010).



Esquema 4: Síntese de análogos da Lavendustina com a porção 1,2,3-triazol pelo método *Click Chemistry*. Adaptado de YOON e RYU, 2010.

Os ensaios biológicos dos análogos gerados mostraram bioatividades contra duas linhagens de células cancerígenas: a HCT116 (câncer de cólon humano) e CCRF-CEM (leucemia), obtendo valores de GI_{50} (metade da concentração máxima para inibição da proliferação celular) que variaram de 4,37 – 20,4 μM para HCT116, e de 0,93 – 22,87 μM para CCRF-CEM (YOON; RYU, 2010).

Em 2015, como forma de descobrir novos análogos potentes do Benznidazol, utilizado para o tratamento da doença de Chagas, Andrade e colaboradores sintetizaram e avaliaram biologicamente uma série de derivados do fármaco, contendo a porção 1,2,3-triazol (**Figura 15**). Para tais investigações, usaram as reações de cicloadição de azidas e alcinos catalisadas por Cu(I) (CuAAC) assistida por micro-ondas, e reações de cicloadição de azidas e alcinos catalisadas por rutênio (RuAAC). A *N*-benzil-2-azidoacetamida e uma série de alcinos terminais comerciais foram reagidos para gerar os desejados triazóis 1,4- e 1,5-dissubstituídos, respectivamente (**Esquema 5**) (ANDRADE *et al.*, 2015).

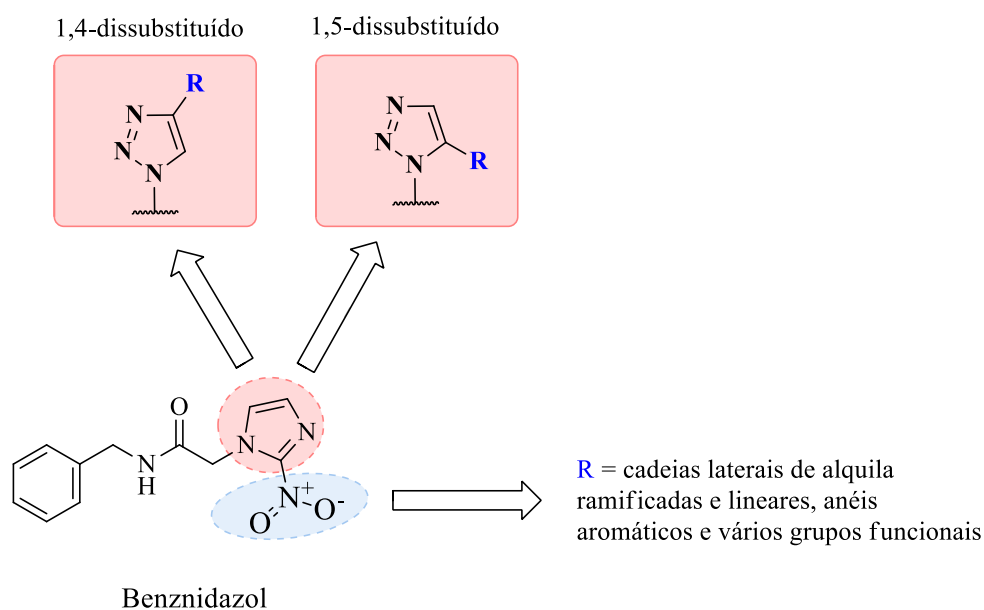
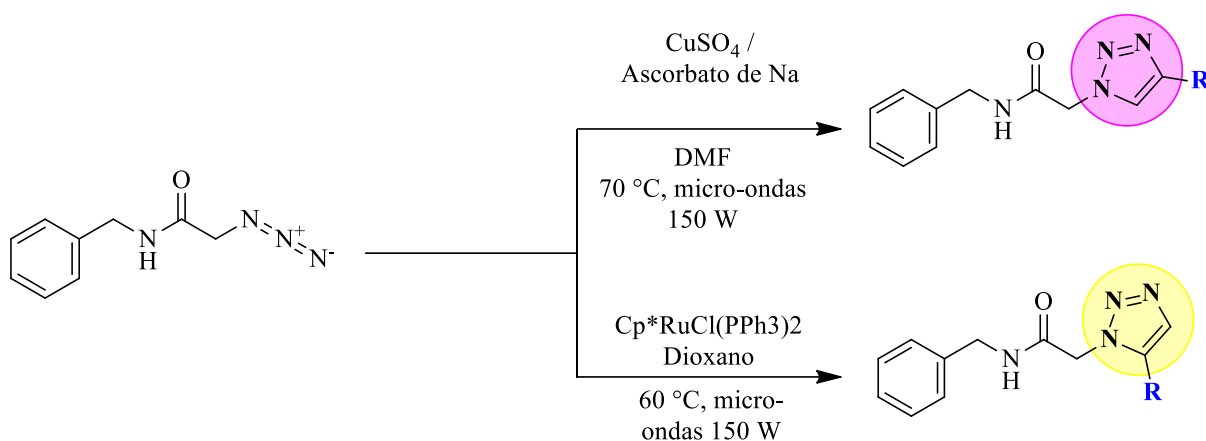


Figura 15: Estrutura do fármaco Benznidazol e estratégia utilizada para a produção dos seus derivados 1,2,3-triazólicos. Adaptado de ANDRADE *et al.*, 2015.



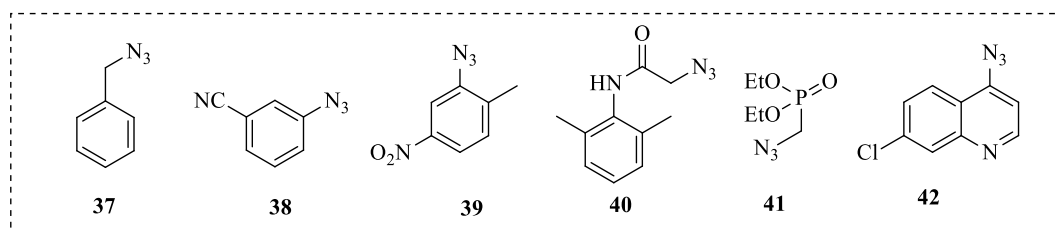
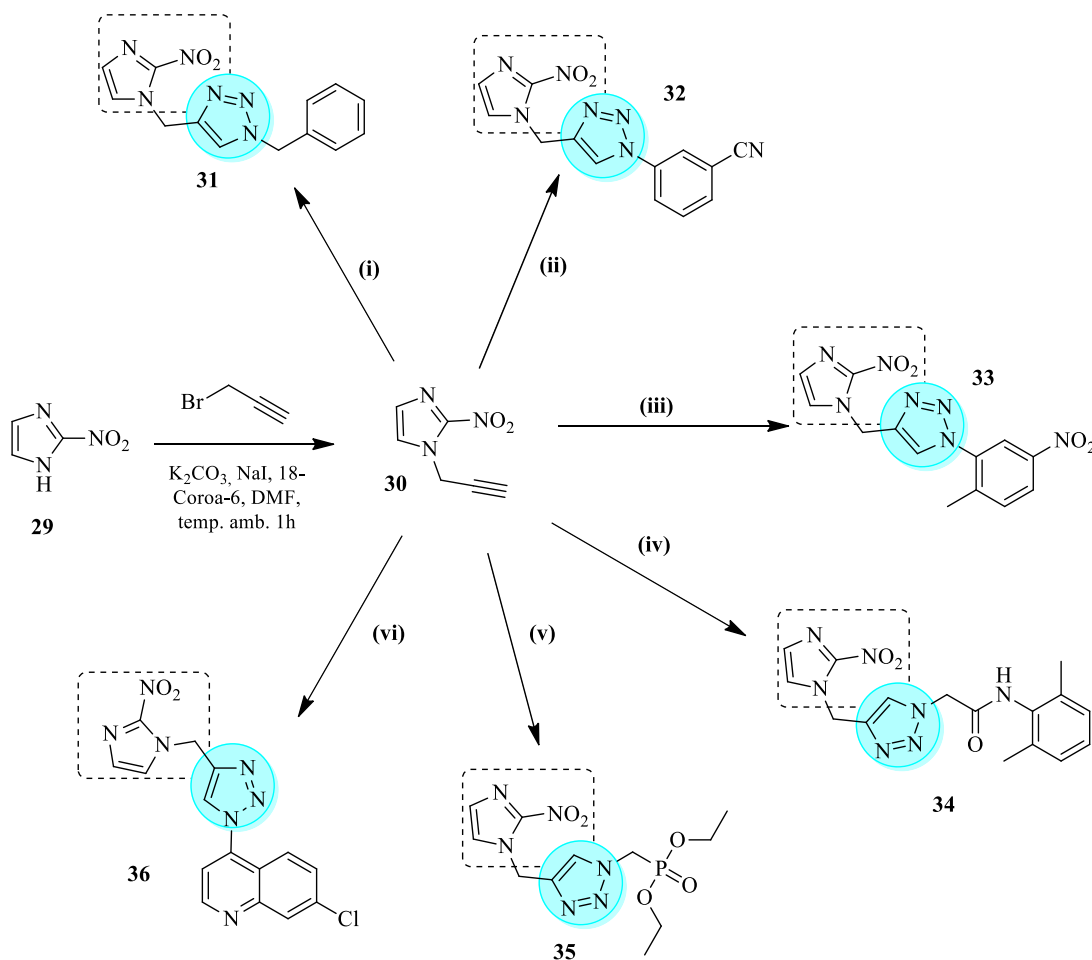
Esquema 5: Rota sintética da produção de derivados do Benznidazol contendo as porções 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituídos (em rosa) e 1,2,3-triazol-1,5-dissubstituídos (em amarelo). Adaptado de ANDRADE *et al.*, 2015.

Os análogos foram avaliados contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A maioria deles mostrou-se inativa, com valores de $IC_{50} > 100 \mu M$. Contudo, alguns poucos análogos mostraram atividades tripanocidas em escalas variando de 7 – 80 μM , comparáveis ao do fármaco Benznidazol ($IC_{50} = 34 \mu M$, 48h); sendo o análogo mais potente o que continha o substituinte 4-nitrofenil; (*N*-benzil-2-[4-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il] acetamida), apresentando $IC_{50} = 7 \mu M$ (ANDRADE *et al.*, 2015).

Semelhantemente, baseados nas atividades dos análogos anteriores, em 2018, Leite e colaboradores também sintetizaram uma série de seis novos análogos do Benznidazol e avaliaram suas atividades *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi*, a fim de alcançarem atividades melhoradas. Todos os compostos 1,2,3-triazólicos foram obtidos através de cicloadições 1,3-dipolares envolvendo um dipolarófilo, no caso, um alcino terminal com uma molécula 1,3-dipolar, o grupo azido, gerando um heterociclo de cinco membros. O intermediário **30** foi reagido com as azidas **37-42** por meio de *Click Chemistry* (CuAAC) gerando os produtos **31-36** (Esquema 6) (LEITE *et al.*, 2018).

As avaliações biológicas mostraram que todos os compostos obtidos, exceto **35**, foram ativos *in vitro* contra as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Os resultados foram expressos em termos de EC_{50} (*half maximal effective concentration*), ou seja, da concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo. Assim, os compostos **31** e **32** mostravam valores de EC_{50} de 7,9 μM e 8,0 μM , respectivamente. O composto **33** foi o mais promissor, apresentando EC_{50} de 4,4 μM com potência similar ao fármaco Benznidazol, cuja EC_{50} é de $4 \pm 1,5 \mu M$, (96h). Já os resultados *in vitro* contra as formas tripomastigotas da corrente sanguínea, mostraram que **32**, **33** e **36** foram os mais ativos, com EC_{50} de $3 \pm 1 \mu M$, $2,2 \pm 0,3 \mu M$ e $14 \pm 4 \mu M$, respectivamente, ainda mais que o Benznidazol (EC_{50} de $13 \pm 2 \mu M$, 96h), avaliados

nesse estágio do parasito. Devido às atividades significativas, os compostos foram posteriormente avaliados *in vivo* em um modelo de ratos, e somente **33** apresentou atividade, porém, também apresentou alta toxicidade, levando à conclusão de que otimizações posteriores se tornam necessárias para identificar agentes mais potentes e menos citotóxicos (LEITE *et al.*, 2018).



Esquema 6: Rota sintética para obtenção dos novos análogos 1,2,3-triazólicos do Benzimidazol. Adaptado de LEITE *et al.*, 2018.

2 Justificativa

As doenças parasitárias como a doença de Chagas, leishmaniose, malária entre outras são classificadas como doenças negligenciadas, ou seja, aquelas doenças que atingem tipicamente populações de baixa renda. Essas doenças contribuem também para manutenção do quadro de desigualdade, tendo em vista que se tornam grandes entraves no desenvolvimento dos países atingidos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas no mundo estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas. Contudo, não existe um interesse eminente da indústria farmacêutica em produzir medicamentos e tratamentos para essa população, já que o retorno financeiro não é muito atraente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

No Brasil, a doença de Chagas, que é uma doença específica do continente americano causada pelo parasito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), já chegou a atingir 36% de todo o território nacional, de norte a sul. A principal via de transmissão da doença acontece em áreas rurais por meio de insetos vetores “barbeiros”. Apesar de medidas de controle desses insetos terem diminuído significativamente as infecções, grande parte dos casos recentes provêm de reinfecções que não foram tratadas adequadamente com os atuais medicamentos disponíveis, que apresentam muitos efeitos colaterais. Há ainda aumento de infecções causadas por outras formas menos frequentes como transfusão de sangue e transplante de órgãos de doadores infectados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os estudos para entendimento e novos tratamentos seguros e eficazes da doença vêm ganhando espaço com diversos grupos de pesquisa, sobretudo os que visam à descoberta e/ou síntese de novas substâncias com atividades biológicas promissoras inspirados em produtos naturais. Alguns produtos naturais têm mostrado potentes atividades biológicas, especialmente como anticancerígenos, como a Lavendustina A. Diversos trabalhos com a Lavendustina A mostraram atividades contra algumas linhagens de células tumorais, e ao menos dois deles investigaram as atividades antiparasitárias desse produto natural (LEE *et al.*, 2006; YOON e RYU, 2010; MU *et al.*; 2001-2003, ARKIVOC, 2011; AGHARBAOUI *et al.*, 2016).

Baseados nesses trabalhos, o nosso grupo de pesquisa conduziu anteriormente um estudo de síntese e avaliação biológica de análogos hidroxilados inéditos da Lavendustina A contra formas de *T. cruzi*, que mostraram atividades promissoras frente ao parasito e com valores de citotoxicidade em células de primatas na escala micromolar. Contudo, a citotoxicidade observada se mostrou um fator desvantajoso (PENA; CARVALHO, 2018).

Como forma de melhorar as atividades e contornar o problema de citotoxicidade, o presente trabalho foi desenvolvido, onde novos análogos triazólicos da Lavendustina A com porções metoxiladas foram sintetizados. Essa ação foi imaginada embasada em resultados descritos na literatura, nos quais análogos O-metilados da Lavendustina A foram inativos como inibidores de PTQ-RFCE, porém, mantiveram sua atividade de inibição frente à polimerização de tubulina. Devido ao *T. cruzi* não possuir PTQ associada ao RFCE, espera-se que a supressão deste alvo não faça diferença na atividade antiparasitária, mas diminua a ação citotóxica dos novos análogos para células de mamíferos.

4 Metodologia

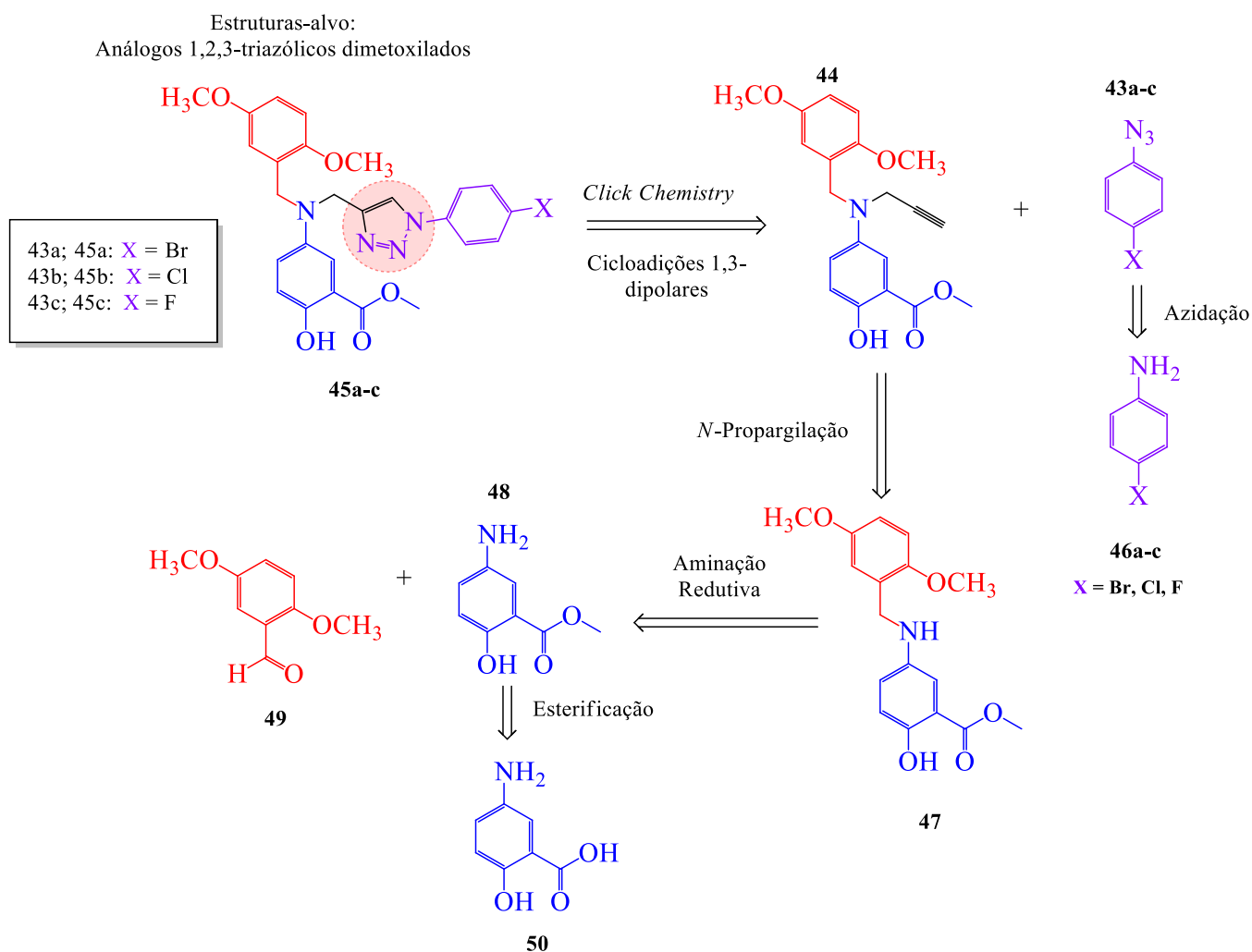
4.1 Materiais e Equipamentos

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Merck (Sigma-Aldrich®) e os solventes da extinta Vetec®, sem purificação adicional. Os solventes deuterados CDCl_3 (clorofórmio deuterado) e DMSO-d_6 (dimetilsulfóxido) foram adquiridos da extinta Tédia do Brasil, também sem purificação adicional. As reações foram realizadas em balões de fundo redondo de vidro, sob pressão positiva de N_2 , com agitação magnética. O monitoramento por cromatografia em camada fina (CCF) foi realizada em cromatoplasmas de 0,25 mm de Sílica gel 60 F254 e visualizada sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm ou 365 nm, ou por coloração com I_2/SiO_2 . A cromatografia líquida clássica (CLC) foi realizada em gel de sílica 60 230-400 mechs da SiliaFlash®. Os pontos de fusão (p.f.) dos produtos foram aferidos sem correção em um aparelho determinador de ponto de fusão analógico modelo 431 Fisatom 60 W. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram registrados em instrumentos *Varian Unity* 400 ou 500 MHz a 25 °C. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm (partes por milhão) em relação ao tetrametilsilano (TMS) utilizado como padrão interno, e as constantes de acoplamento (nJ) foram expressas em Hz (hertz). Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos com um aparelho JEOL JMS-AX 505WA.

4.2 Procedimentos

4.2.1 Planejamento da Síntese

Os análogos 1,2,3-triazólicos da Lavendustina A foram planejados a partir de uma síntese contendo, basicamente, cinco etapas reacionais. Assim, as estruturas-alvo **45a-c** seriam obtidas através de reações de cicloadições 1,3-dipolares, *via* metodologia *Click Chemistry*, empregando os alcinos terminais **44** e as fenilazidas halogenadas **43a-c**. As respectivas fenilazidas seriam obtidas através de reações de azidação de sais de diazônio, oriundos das anilinas *p*-substituídas **46a-c**. Os alcinos intermediários **44** seriam obtidos através de reações de *N*-propargilação das arilbenzilaminas **47** com brometo de propargila. As arilbenzilaminas **47**, por sua vez, seriam os produtos de reações de aminação redutiva de 5-aminosalicilato de metila **48** com 2,5-dimetoxibenzaldeído comercial **49**. Por fim, **48** seria obtido através de uma reação de esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxi-benzoico comercial **50** (Mesalazina) (**Esquema 8**).



Esquema 8: Rota retrossintética para obtenção dos novos análogos 1,2,3-triazólicos da Lavendustina A.

4.2.2 Esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 1,0 g de ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (**50**), 17 mL de metanol (MeOH), 1,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e 1,6 g de sulfato de sódio anidro (NaSO₄). A reação foi protegida da luz e mantida em refluxo por 19 horas, a 85 °C. Decorrido o tempo, a mistura foi neutralizada com NaHCO_{3(s)}, filtrada e em seguida os solventes foram evaporados a vácuo. O remanescente foi diluído em diclorometano (DCM), transferido para um funil de separação e lavado com 15 mL de uma solução de NH₄Cl, seguido de duas extrações com 10 mL de DCM. Ao final, o solvente foi evaporado e o produto **48** (5-amino-2-hidroxibenzoato de metila) obtido com boa pureza química no estado bruto com rendimento de 99%.

4.2.3 Procedimento geral para a síntese das azidas halogenadas

4.2.3.1 Síntese de 1-azido-4-bromobenzeno (**43a**)

Em um balão de fundo redondo acondicionado em banho de gelo a 0 °C, verteu-se 6,5 mL de uma solução de HCl 6 M, e adicionou-se 1,75 g de 4-bromoanilina 97%. Em seguida foi adicionada uma solução aquosa resfriada, previamente preparada com 917,4 mg de NaNO₂ (1,3 equiv.). A mistura reacional foi mantida a 0 °C sob agitação magnética por 10 minutos. Decorrido o tempo, foi adicionada à mistura reacional uma solução aquosa, previamente preparada com 731,4 mg de NaN₃ (1,1 equiv.), ainda sob agitação magnética a 0 °C por mais 1 hora. A mistura foi deixada descansando à temperatura ambiente por aproximadamente mais 20 minutos, então neutralizada com NaHCO₃ e em seguida extraída três vezes com acetato de etila (AcOEt). O isolamento rendeu 0,895 g do produto **43a** (1-azido-4-bromobenzeno) em estado líquido, coloração marrom/âmbar, com boa pureza química, em 93% de rendimento químico. Não se realizou purificação adicional.

4.2.3.2 Síntese de 1-azido-4-clorobenzeno e 1-azido-4-fluorobenzeno (**43b**, **43c**)

Os produtos **43b** e **43c** foram obtidos de maneira similar a **43a**, empregando-se, porém, a 4-cloroanilina e 4-fluoroanilina, respectivamente. **43c** obtido em 73% de rendimento químico

4.2.4 Obtenção dos Intermediários Reacionais

4.2.4.1 Reação de Aminoação Redutiva

5-((2,5-dimetoxibenzil)amino)-2-hidroxi-benzoato de metila (48): 181 mg de borohidreto de sódio (NaBH_4) (2,0 equiv.), 1,41 mL de ácido acético (AcOH) (10 equiv.) e 9,5 mL de DCM foram misturados em um balão de fundo redondo, durante 3h em banho de gelo a 0 °C, sob agitação magnética, até dissolução parcial do sólido. Uma bola contendo N_2 foi utilizado para equalizar a pressão de hidrogênio no processo. O balão contendo a mistura foi retirado do banho de gelo e deixado à temperatura ambiente até completa dissolução do sólido restante (aproximadamente 1h). Em seguida, 400 mg do éster **48** (1,0 equiv.) dissolvido em DCM foram adicionados ao meio reacional, a mistura foi novamente posta em banho de gelo até 0 °C. Foram então adicionados 330 mg de 2,5-dimetoxibenzaldeído **50** (1,0 equiv.) à mistura que foi deixada para reagir sob agitação magnética vigorosa por 24h. Ao término do tempo, os voláteis da reação foram evaporados a vácuo. Uma pequena quantidade de água destilada foi então adicionada ao meio para hidrólise do agente redutor, restando o pH a 4 unidades. Em seguida, o meio foi alcalinizado com $\text{NaHCO}_3(\text{s})$ até elevação do pH a 7 unidades. A mistura foi submetida à extração com AcOEt (3x de 15 mL). As fases orgânicas recolhidas foram combinadas e tratadas com sulfato de sódio anidro e carvão ativado, filtradas por gravidade e em seguida concentradas a vácuo. O produto bruto **48** foi obtido como um sólido amarelo, em 78% de rendimento químico, e utilizado na etapa seguinte sem purificação.

4.2.4.2 Reação de N-propargilação

5-((2,5-dimetoxibenzil)(prop-2-in-1-il)amino)-2-hidroxi-benzoato de metila (44): 570 μL de uma solução de brometo de propargila (3-bromoprop-1-ino) (2,5 equiv.) a 80% (p/p) em tolueno foram adicionados a uma suspensão em MeOH (24 mL) contendo 583,7 mg do produto **48** (1,0 equiv.) e 512 mg de NaHCO_3 . (3,0 equiv.) A mistura foi deixada para reagir à temperatura ambiente, sob agitação magnética, sendo monitorada por cromatografia em camada fina (CCF) durante 48h. Ao término da reação, os voláteis foram eliminados a vácuo (temperatura do banho não ultrapassar 45 °C), e a mistura remanescente foi lavada com alíquotas de uma solução de NH_4Cl e de uma solução diluída de HCl , tendo seu pH corrigido para 4 unidades. Em seguida, a mistura foi sub-

metida à extração com AcOEt (4x de 15 mL). As fases orgânicas recolhidas foram combinadas e tratadas com sulfato de sódio anidro e carvão ativado, filtradas por gravidade e em seguida concentradas sob vácuo. O material bruto obtido foi purificado por cromatografia líquida clássica (CLC) em sílica gel (fase estacionária) na proporção 1:60 (60 partes de sílica para 1 parte do produto), empacotada utilizando como eluente mistura de Hex:AcOEt 5%, e um gradiente de Hex:AcOEt nas proporções 9:1, 4:1, 7:3, 3:2, obtendo-se 524,2 mg de **44** ; sólido amarelo pálido, 80% de rendimento químico, ponto de fusão (p.f.): 81 – 82 °C.

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.56 (s, 1 C), 154.89 (s, 1 C), 153.59 (s, 1 C), 151.54 (s, 1 C), 141.79 (s, 1 C), 127.37 (s, 1 C), 124.69 (s, 1 C), 117.95 (s, 1 C), 115.02 (s, 1 C), 114.99 (s, 1 C), 112.08 (s, 1 C), 111.99 (s, 1 C), 111.18 (s, 1 C), 79.61 (s, 1 C), 72.51 (s, 1 C), 55.82 (s, 1 C), 55.60 (s, 1 C), 52.17 (s, 1 C), 51.01 (s, 1 C), 40.64 (s, 1 C);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.29 (s, 1 H), 7.41 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 7.13 (dd, *J*=9.19, 2.93 Hz, 1 H), 6.89 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 6.89 (d, *J*=9.00 Hz, 1 H), 6.82 (d, *J*=8.61 Hz, 1 H), 6.76 (dd, *J*=8.80, 2.93 Hz, 1 H), 4.42 (s, 2 H), 3.97 (d, *J*=2.35 Hz, 2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 3.70 - 3.73 (m, 3 H), 2.25 (t, *J*=2.15 Hz, 1 H)

4.3 Procedimento geral para a síntese dos análogos triazólicos: Cicloadições 1,3-dipolares **5-(((1-(4-bromofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)(2,5-dimetoxibenzil)amino)-2-hidroxibenzoato de metila (45a)**: Uma mistura de 39,3 mg de sulfato de cobre anidro (CuSO₄) (0,4 equiv.), 97,4 mg de ascorbato de sódio (AscNa) (0,8 equiv.) e 200 mg do alcino **44** (1 equiv.) foi adicionada a uma solução de 133,9 mg de 1-azido-4-bromobenzeno **43a** (1,1 equiv.) em 1,5 mL de terc-butanol (*t*-BuOH), num balão sob agitação magnética. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL de água (H₂O) destilada. O balão foi posto em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, o meio foi protegido da luz, e deixado reagir em temperatura ambiente, sob agitação magnética, sendo monitorado por CCF durante 48h. Decorrido o tempo, a mistura foi lavada com 15 mL de uma solução de NH₄Cl, acidificada com alíquotas de solução diluída de HCl, tendo o pH ajustado para 4-5 unidades. Essa mistura foi, então, submetida à extração com AcOEt (4x de 15 mL). As fases orgânicas recolhidas foram combinadas e tratadas com sulfato de sódio anidro e carvão ativado, filtradas por gravidade e em seguida concentradas sob vácuo. O material bruto obtido foi purificado por CLC em sílica gel na proporção 1:40, empacotada utilizando como eluente mistura de Hex:AcOEt 15% e um gradiente de Hex:AcOEt 15%-30%, obtendo-se 225 mg de **45a**; sólido verde fluorescente, 72% de rendimento químico, p.f.: 127 – 128 °C.

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.45 (s, 1 C), 154.04 (s, 1 C), 153.59 (s, 1 C), 151.34 (s, 1 C), 146.70 (s, 1 C), 141.35 (s, 1 C), 135.88 (s, 1 C), 132.72 (s, 1 C), 127.21 (s, 1 C), 122.99 (s, 1 C), 122.14 (s, 1 C), 121.68 (s, 1 C), 119.65 (s, 1 C), 118.12 (s, 1 C), 114.67 (s, 1 C), 113.20 (s, 1 C), 112.16 (s, 1 C), 111.65 (s, 1 C), 110.96 (s, 1 C), 55.65 (s, 1 C), 55.57 (s, 1 C), 52.17 (s, 1 C), 50.54 (s, 1 C), 47.18 (s, 1 C)

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.17 (s, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.59 (d, *J*=8.61 Hz, 2 H), 7.54 (d, *J*=9.00 Hz, 2 H), 7.28 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 7.01 (dd, *J*=9.00, 3.13 Hz, 1 H), 6.82 (d, *J*=9.78 Hz, 1 H), 6.80 - 6.81 (m, 1 H), 6.79 (d, *J*=8.61 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=8.61, 2.74 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.50 (s, 2 H), 3.85 - 3.87 (m, 3 H), 3.77 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)

5-(((1-(4-clorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)(2,5-dimetoxibenzil)amino)-2-hidroxibenzoato de metila (45b): Obtido similarmente a **45a** utilizando-se, 29,5 mg de CuSO₄, 73,08 mg AscNa, 150 mg de **44**, 78 mg de 1-azido-4-clorobenzeno, 1,1 mL de *t*-BuOH, 1,1 mL H₂O; sólido amarelo, 70% de rendimento químico, p.f.: 113 – 114 °C.

¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.48 (s, 1 C), 154.07 (s, 1 C), 153.62 (s, 1 C), 151.37 (s, 1 C), 146.70 (s, 1 C), 141.38 (s, 1 C), 135.43 (s, 1 C), 134.32 (s, 1 C), 129.78 (s, 1 C), 127.24 (s, 1 C), 123.03 (s, 1 C), 121.49 (s, 1 C), 119.75 (s, 1 C), 118.15 (s, 1 C), 114.71 (s, 1 C), 113.25 (s, 1 C), 112.20 (s, 1 C), 111.69 (s, 1 C), 110.99 (s, 1 C), 55.67 (s, 1 C), 55.60 (s, 1 C), 52.20 (s, 1 C), 50.58 (s, 1 C), 47.23 (s, 1 C);

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.19 (s, 1 H), 7.66 (s, 1 H), 7.61 (dt, *J*=9.29, 2.74, 2.45 Hz, 2 H), 7.44 (dt, *J*=9.39, 2.74, 2.35 Hz, 2 H), 7.27 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 7.01 (dd, *J*=9.39, 3.13 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J*=9.00 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J*=9.00 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=8.80, 2.93 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.50 (s, 2 H), 3.87 (s, 3 H), 3.78 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)

5-(((1-(4-fluorofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)(2,5-dimetoxibenzil)amino)-2-hidroxi benzoato de metila (45c): Obtido similarmente a **45a** utilizando-se, porém, 26,1 mg de CuSO₄, 64,9 mg AscNa, 133,1 mg de **44**, 61,7 mg de 1-azido-4-fluorobenzeno, 1 mL de *t*-BuOH, 1 mL H₂O; sólido amarelo-esverdeado, 95% de rendimento químico, p.f.: 110 – 111 °C.

¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ ppm 170.47 (s, 1 C), 162.23 (d, *J*=248.92 Hz, 1 C), 153.98 (s, 1 C), 153.56 (s, 1 C), 151.32 (s, 1 C), 146.54 (s, 1 C), 141.34 (s, 1 C), 133.19 (s, 1 C), 127.20 (s, 1 C), 122.92 (s, 1 C), 122.31 (d, *J*=7.63 Hz, 1 C), 120.01 (s, 1 C), 118.11 (s, 1 C), 116.55 (d, *J*=22.89 Hz, 1 C), 114.61 (s, 1 C), 113.11 (s, 1 C), 112.16 (s, 1 C), 111.59 (s, 1 C), 110.91 (s, 1 C), 55.62 (s, 1 C), 55.56 (s, 1 C), 52.19 (s, 1 C), 50.52 (s, 1 C), 47.18 (s, 1 C);

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 10.19 (s, 1 H), 7.65 (s, 1 H), 7.62 (ddd, *J*=6.97, 4.52, 2.20 Hz, 2 H), 7.27 (s, 1 H), 7.16 (ddd, *J*=8.31, 6.36, 1.96 Hz, 2 H), 7.01 (dd, *J*=8.80, 1.96 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H), 6.81 (dd, 1 H), 6.79 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=9.05, 3.18 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.49 - 4.52 (m, 2 H), 3.86 (s, 3 H), 3.77 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)

4.4 Ensaios de atividade biológica contra *T. cruzi* e avaliação de citotoxicidade

Os ensaios de atividade biológica foram realizados *in vitro* contra as formas epimastigota de *T. cruzi* (encontrada no interior do inseto vetor) pelo colaborador Prof. Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva no Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda – UFRJ Macaé. Os ensaios na forma tripomastigota de *T. cruzi* (encontrada no sangue do hospedeiro mamífero) e de citotoxicidade foram realizados também *in vitro* pela colaboradora Profa. Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva, no Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária – UERJ.

Foram utilizadas as formas epimastigotas da cepa Y e do clone Dm28c de *T. cruzi* cultivados axenicamente a 28 °C em meio LIT (infusão de fígado-triptose) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab) e com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As passagens das células eram feitas a cada 4 dias para manutenção das culturas, adicionado 10% da cultura prévia em fase logarítmica de crescimento em um volume final de 5 mL de meio.

Estoques de epimastigotas de ambas as linhagens eram mantidos criopreservados a – 80 °C, em meio LIT contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 30% de SFB. Todos os experimentos foram realizados com culturas entre a segunda e a quinta passagem após o congelamento.

A inibição da proliferação celular de epimastigotas de *T. cruzi* foi avaliada *via* teste colorimétrico com o reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) em placas de microtitulação de 96 poços contendo: i) células dos parasitos; ii) células dos parasitos e soluções diluídas das moléculas sintetizadas; iii) somente meio LIT (controle negativo); iv) meio LIT e o fármaco Benznidazol (tratamento) nas mesmas concentrações das soluções das moléculas sintetizadas (controle positivo); vi) meio LIT e células dos parasitos. O teste se baseia na redução do reagente MTT, um sal amarelo, causada pela atividade metabólica dos parasitos, formando cristais insolúveis de formazana, de cor azul ou roxa. A mudança de cor é um quantitativo da viabilidade celular, que pode ser mensurado posteriormente por técnica de espectrofotometria.

Assim, a ação antiparasitária (%I) sobre as formas testadas foi determinada através do seguinte cálculo:

$$\%I = \frac{(A_c - A_m) - (A_p - A_m)}{(A_c - A_m)} * 100\%$$

Sendo:

A_c = absorvância dos poços controle, contendo células, sem tratamento

A_m = absorvância dos poços com meio de cultura somente;

A_p = absorvância dos poços contendo células, com tratamento;

A_{pm} = absorvância dos poços contendo meio de cultura e moléculas testadas.

Os valores de IC_{50} foram obtidos através de regressão não-linear das curvas sigmóides de dose-resposta para cada molécula testada, plotando os valores de sobrevivência (%S) contra os valores das concentrações das moléculas testadas transformados para a escala logarítmica (base 10), em *software GraphPad Prism*, versão 5,0. Os valores de %S foram calculados através da fórmula:

$$\%S = 100\% - \%I$$

Na avaliação de citotoxicidade, foram utilizadas as linhagens NIH3T3 e LLC-MK2 para verificar efeitos tóxicos das moléculas testadas sobre a viabilidade das células hospedeiras. As células animais foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $5 * 10^4$ células/poço, em 200 μ L meio DMEM (Meio Eagle Modificado Por Dulbecco) completo. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por um período de 24 horas para poderem aderir ao fundo dos poços e retomar o crescimento.

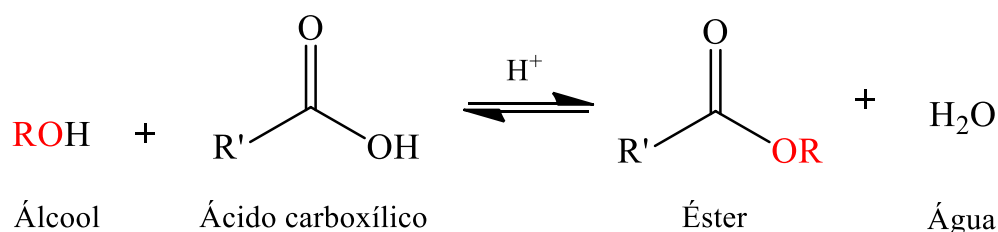
Após 24h, o meio foi trocado por meio DMEM completo fresco com presença das moléculas testadas em variadas concentrações. Foi empregado como controle negativo somente meio DMEM completo e como controle positivo DMEM adicionado do fármaco Benznidazol. As placas sob tratamento foram incubadas a 37 °C por 48 horas e após esse período, 20 μ L do reagente MTT (na concentração de 5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. As células foram mantidas na presença do MTT por um período de 4 horas a 37 °C e ao final desse período o meio de cultura foi removido e as células, contendo cristais de formazana, solubilizadas por incubação em 80 μ L de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, por 18 horas a 37 °C. Ao final desse tempo, a densidade óptica (OD) de cada poço foi estimada por meio de leitura da absorvância a 595 nm, em leitor de microplacas do tipo ELISA.

Cada experimento foi realizado com triplicata dos tratamentos e repetido três vezes. A ação citotóxica e o cálculo do IC_{50} para as substâncias testadas foram obtidos de forma semelhante ao método descrito anteriormente para inibição de *T. cruzi*.

5 Resultados e Discussão

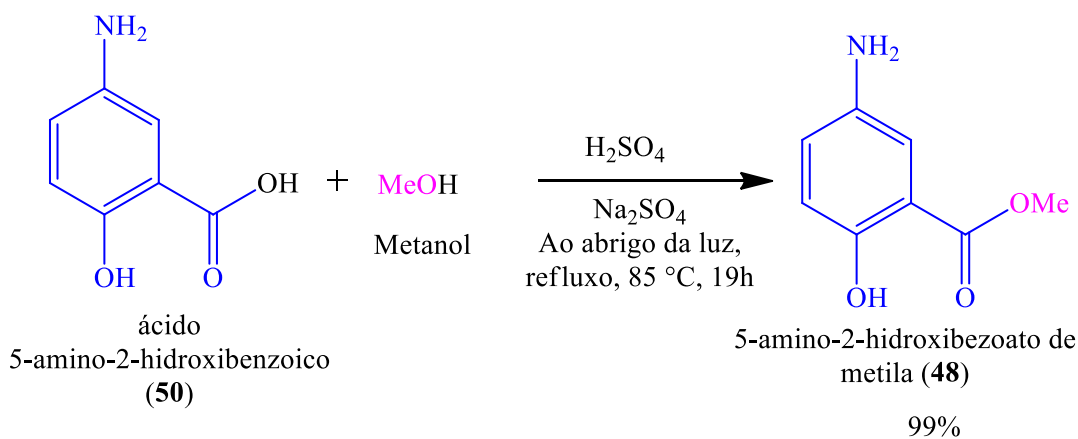
5.1 Esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico

A esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico é uma reação de condensação de um álcool (ROH) e um ácido carboxílico catalisada por um ácido (H^+), conduzindo à formação de um éster e de água, segundo o esquema geral abaixo (**Esquema 9**). Ela também é conhecida como **esterificação de Fischer** (CAREY, 2011).



Esquema 9: Reação de Esterificação de Fischer, entre um ácido carboxílico e um álcool catalisada por ácido.

É um processo reversível onde, em geral, a posição de equilíbrio fica a favor dos produtos, porém, a remoção da água formada pode favorecer a produção do éster desejado. Outra maneira de favorecer a posição de equilíbrio é utilizar um excesso de álcool ou de ácido carboxílico (CAREY, 2011). No procedimento realizado neste trabalho, foi utilizado um excesso de álcool (0,41 mol), enquanto o ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico foi utilizado em menor quantidade (0,0065 mol), e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) como catalisador. O sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), um sal de sódio do ácido sulfúrico, foi utilizado por ser um agente higroscópico, ou seja, que tem a propriedade de absorver água do meio. Desse modo, a formação do produto foi fortemente favorecida e o rendimento baseado no ácido como o reagente limitante (**Esquema 10**) sendo obtido com alto grau de rendimento e pureza, que não precisou de purificação adicional.



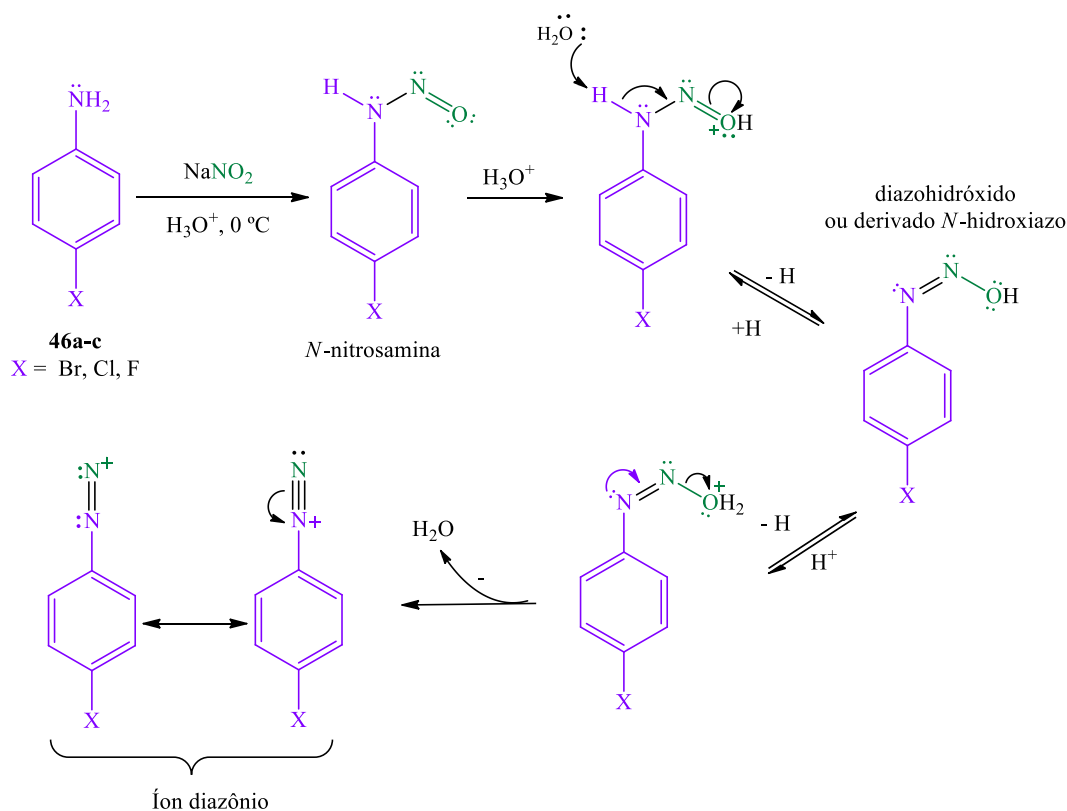
Esquema 10: Reação de esterificação do ácido 5-amino-2-hidroxibenzoico (50) para obtenção do éster 5-amino-2-hidroxibenzoato de metila (48).

5.2 Síntese das azidas

As azidas utilizadas nas etapas de cicloadição foram obtidas a partir de reações de azidação dos sais de diazônio oriundos de anilinas *p*-substituídas com átomos de halogênios (Br, Cl, F), que foram escolhidas de forma a variar os efeitos eletrônicos e a lipofilicidade das estruturas alvo.

Desse modo, a primeira etapa da reação ocorreu *via* formação de um sal de diazônio, através da reação da arilamina primária *p*-substituída **46** com ácido nitroso (HNO₂), este último gerado *in situ* através da acidificação com HCl de uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) em baixas temperaturas (0 – 5 °C) (**Esquema 11**) (BRUICE, 2006; CAREY, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

Na presença do ácido forte, o ácido nitroso se dissocia, produzindo íons nitrosila (ou nitrosônio) (⁺NO), que reagem com o nitrogênio da arilamina para formar um íon *N*-nitrosoamônio instável. Este intermediário instável perde um próton para formar uma *N*-nitrosoamina que sofre tautomerização, formando um diazoidróxido (ou um derivado *N*-hidroxiazó). Em seguida, o diazoidróxido perde água na presença do ácido do meio, formando o íon arildiazônio com duas formas estabilizadas pela deslocalização dos pares de elétrons livres do nitrogênio (**Esquema 11**) (BRUICE, 2006; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

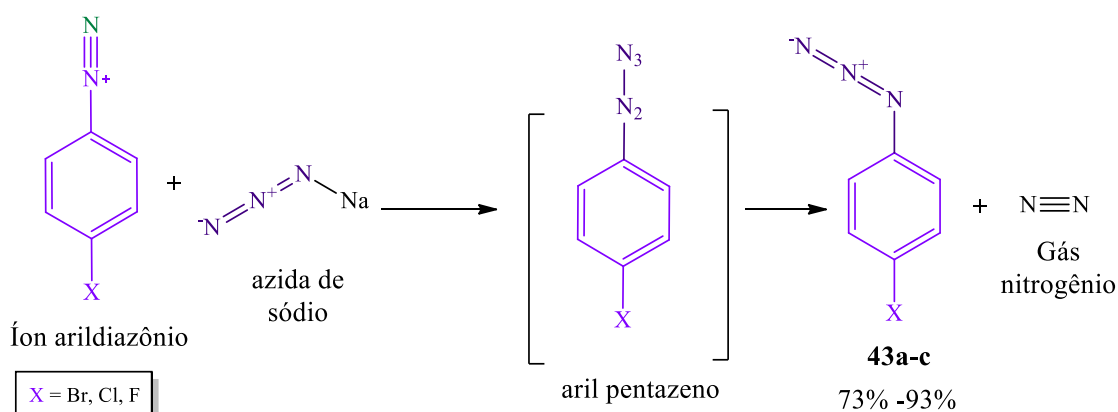


Esquema 11: Mecanismo de formação dos íons arildiazônios a partir das anilinas **46a-c**.

O grupo diazônio formado nessa reação pode ser substituído por átomos ou diversos outros grupos funcionais, através de reações de substituições de sais de arenodiazônios, tornando os íons arildiazônios intermediários versáteis na preparação de compostos aromáticos substituídos (BRUICE, 2006; CAREY, 2011).

Na próxima etapa da reação, o íon arildiazônio foi transformado em uma azida orgânica através de uma substituição nucleofílica, após a adição da azida de sódio (NaN_3) à mistura anterior.

Existem alguns mecanismos gerais que levam à substituição nucleofílica em aromáticos através de sais de diazônio. Um desses mecanismos, que embora não tenha sido estudado em detalhe, tem fortes evidências quanto à formação de um intermediário arilpentazeno a partir do sal de diazônio, que depois é decomposto liberando gás nitrogênio (N_2) e o produto; como nesse caso em que o íon azida (N_3^-) reagiu com o diazônio produzindo as azidas **43a-c** (Esquema 12) (BUTLER *et al.*, 1998; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; JOSHI *et al.*, 2015).



Esquema 12: Reação do sal de diazônio com NaN_3 levando à formação de um intermediário pentazeno e posterior decomposição, liberando o produto azida **43a-c** e gás nitrogênio.

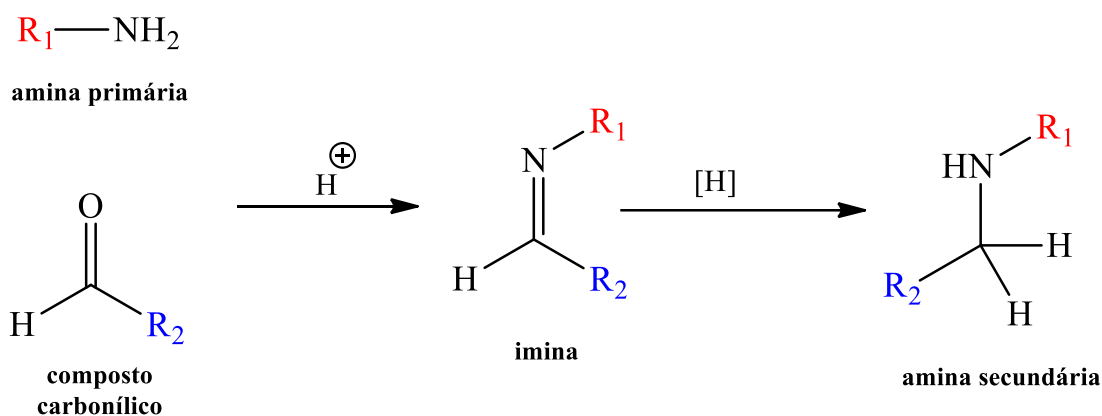
Após as reações com o íon arildiazônio formado, o rendimento obtido para as azidas foi bem satisfatório, acima de 70%, sem necessidade de purificação. Todas as azidas apresentaram boa estabilidade, na forma de um líquido viscoso, de coloração marrom, sendo utilizadas diretamente na etapa da cicloadição dipolar para obtenção dos análogos desejados.

5.3 Obtenção dos Intermediários Reacionais

5.3.1 Reação de Aminoação Redutiva

O intermediário **47**, bastante similar à porção farmacofórica do produto natural Lavendustina A, tem em sua estrutura uma porção nitrogenada que é uma amina secundária.

A obtenção da amina secundária, como a do intermediário **47**, pôde ser feita através de uma reação de aminoação redutiva, que é um procedimento de uma ou duas etapas onde uma amina primária e um composto carbonílico (como um aldeído ou cetona) se condensam para produzir uma imina ou íon imínico, que então sofre redução *in situ* levando à formação do produto amina, conforme o esquema geral abaixo (**Esquema 13**) (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012):



Esquema 13: Reação de aminoação redutiva entre um composto carbonílico e uma amina primária, levando à formação de uma amina secundária.

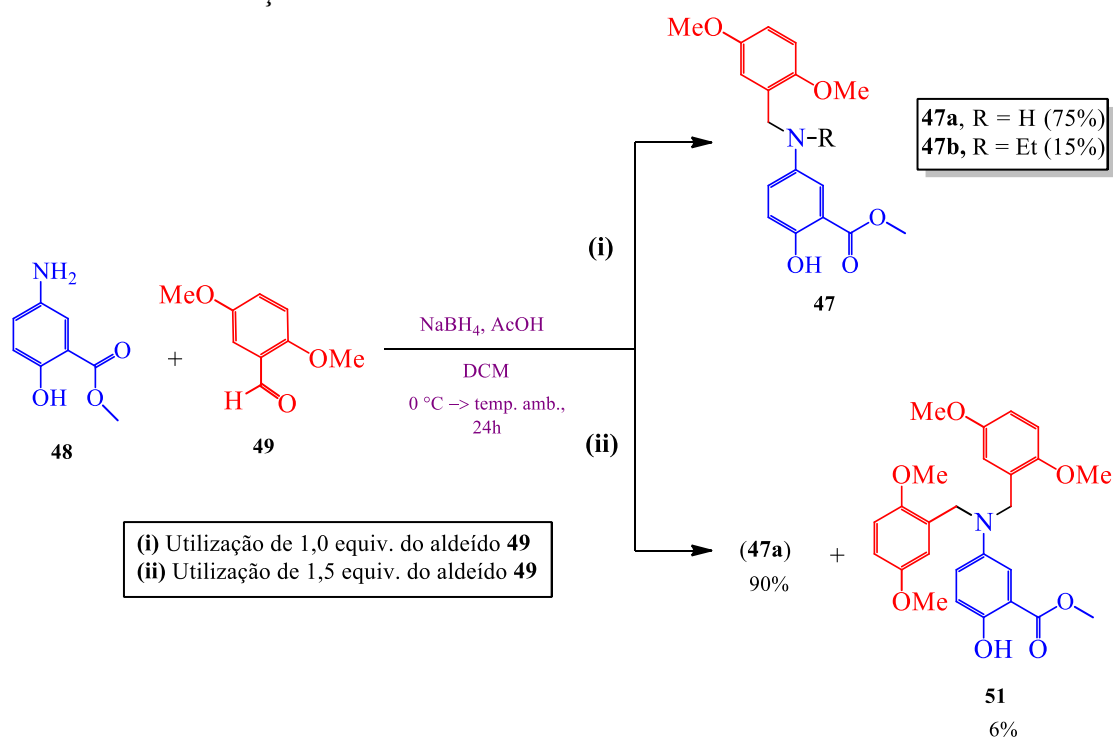
Deste modo, o 5-amino-2-hidroxibenzoato de metila **48** produzido na etapa de esterificação foi reagido com o 2,5-dimetoxibenzaldeído **49** para render o intermediário **47**. Nesse caso, o agente redutor necessário triacetoxiboro-hidreto de sódio $Na(CH_3COO)_3BH$ foi gerado *in situ* através da reação entre boroidreto de sódio ($NaBH_4$) e ácido acético glacial ($AcOH$), diluído em DCM (**Esquema 13**).

Na reação, o par de elétrons livre do nitrogênio da amina faz um ataque ao carbono do aldeído, formando uma ligação C-N, gerando um intermediário tetraédrico. Este intermediário, sob as condições ácidas, sofre algumas transferências de prótons (H^+) e perda de H_2O , formando a respectiva imina. A imina fica em equilíbrio com a sua forma protonada, o íon imínio, que, na presença do agente redutor, sofre a redução

para produzir a nova amina (**Esquema 13**) (CAREY, 2011; CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

A condição reacional para a formação da imina e consequentemente da amina é que o pH esteja entre 4 e 6, para permitir que a carbonila seja protonada e haja eliminação de água; impedir que amina não seja totalmente protonada, e que haja o ataque nucleofílico (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

Tendo em mente essas condições e para que a reação fosse bem-sucedida, foram testados dois procedimentos, conforme esquema abaixo (**Esquema 14**) para a formação do intermediário **47**: **(i)** Utilização de 1,0 equiv. de **49**, ou seja, mesma quantidade de mol (x1) utilizado do reagente **48**, 10 equiv. de AcOH, 2,0 equiv. de NaBH₄, DCM como solvente e banho de gelo a 0 °C; **(ii)** Utilização de excesso de **49** (1,5 equiv.), sob as mesmas condições anteriores.



Esquema 14: Reações de aminação redutiva de **48** com **49**.

No procedimento **(i)**, houve a formação do produto desejado **47a** em maior porcentagem (75%), mas também houve formação de pequena quantidade (15%) de um coproduto (**47b**) menos polar, que foram identificados através do acompanhamento da reação por CCF e posterior separação e purificação por CLC.

Já no procedimento **(ii)**, com um excesso do aldeído **49**, foi observada a formação de misturas do produto **47a** (que desta vez foi produzido em maior quantidade) com

um coproduto **51**, em menor porcentagem (em torno de 6%). Ainda que este coproduto **51** fosse produzido em menor quantidade, sua polaridade era muito semelhante a **47a**, quando foram comparados por CCF. Este fato foi comprovado após tentativa de separação e purificação por CLC, que não foi bem-sucedida, visto que os dois produtos tinham uma diferença ínfima de polaridade, dificultando a obtenção de **47a** puro.

Os produtos e coprodutos obtidos, em ambos os procedimentos, foram caracterizados posteriormente por ressonância magnética nuclear uni e bidimensional (RMN 1D e 2D). A análise estrutural mostrou que **47b** continha um substituinte etil – não desejado – ligado ao nitrogênio da amina, e que **51** apresentava dois substituintes arila. Por serem intermediários reacionais com estruturas semelhantes já encontradas na literatura, os dados espectroscópicos não foram apresentados nesse trabalho.

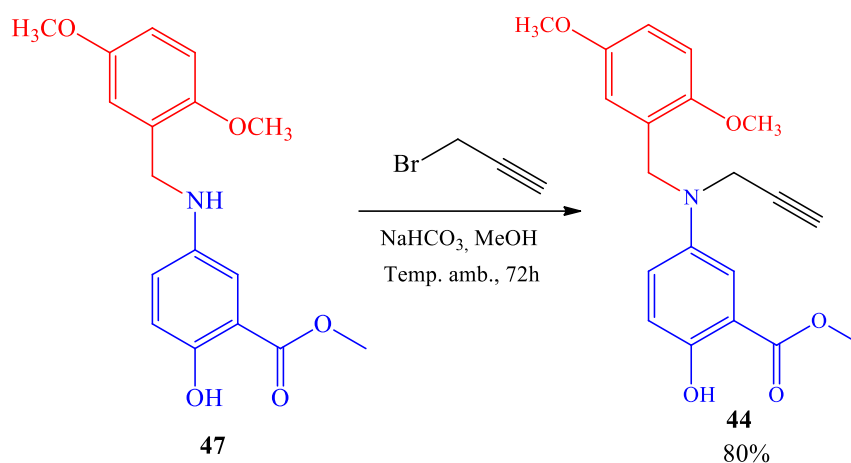
A explicação mais plausível da alquilação encontrada nessa etapa da síntese é também reportada na literatura, com alguns poucos estudos envolvendo reações de aminação redutiva de indóis e alquilação de aminas aromáticas com ácidos carboxílicos, com o uso de NaBH_4 em meio ácido. No caso do procedimento (i), o ácido carboxílico (AcOH) reage com o NaBH_4 para formar espécies $\text{Na}(\text{AcO})_3\text{BH}$ no meio reacional. A transferência intramolecular de hidreto do boro ao grupo carbonila forma o acetaldeído (CH_3COH) que, em seguida, reage com a amina secundária formando o cátion imínio (ou a imina na forma protonada). Esta espécie, por sua vez, sofre redução na presença do agente redutor produzindo a amina alquilada. O controle da temperatura reacional também pode favorecer a formação do produto amina mono – (a $20\text{ }^\circ\text{C}$) ou dialquilado (a $60\text{ }^\circ\text{C}$) (GRIBBLE *et al.*, 1974; QUADRI *et al.*, 2018).

Isso explica a formação do produto colateral **47b**, já que no procedimento (i), a mistura reacional precisou ser deixada em descanso até à temperatura ambiente ($25\text{ }^\circ\text{C}$), e com a utilização de apenas 1,0 equiv. de **49** houve a formação em pequena quantidade da amina monoalquilada, contendo o substituinte etila proveniente do acetaldeído reduzido. Já no procedimento (ii), o uso do excesso de **49** (1,5 equiv.) permitiu a entrada de mais uma porção deste reduzido, formando o coproduto **51** indesejado.

Sendo assim, ressaltamos que o procedimento (ii) não se mostrou vantajoso, e o procedimento (i) foi o adotado para dar prosseguimento à síntese.

5.3.2 Reação de *N*-propargilação

Depois de sintetizado o intermediário **47**, este foi reagido com brometo de propargila ($\text{Br}-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ ou CHCCH_2Br), através de uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), em meio contendo base e utilizando MeOH como solvente, para fornecer o respectivo intermediário **44**, portador de um alcino terminal, (**Esquema 15**):



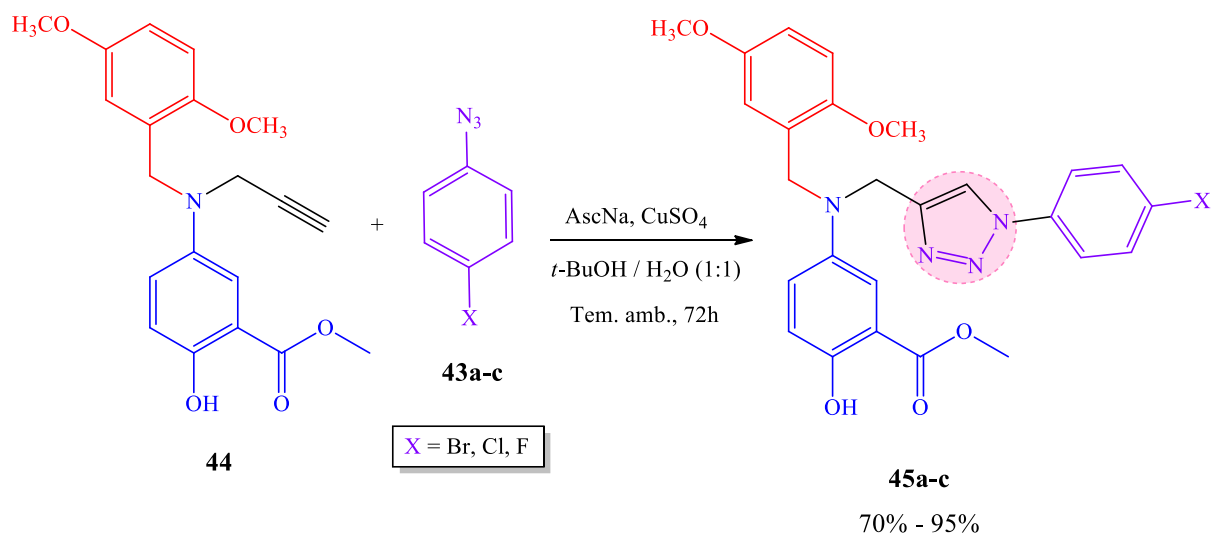
Esquema 15: Reação de *N*-propargilação do intermediário **47** para fornecer o intermediário **44** com a porção alcino terminal.

Alcinos terminais geralmente apresentam caráter mais ácido do que outros hidrocarbonetos. Nesse caso, na presença da base inorgânica hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO_3), há abstração do próton do carbono terminal, formando ânion acetileno. O átomo de nitrogênio da porção amina de **47** faz então um ataque nucleofílico ao carbono acetilênico levando à formação do produto **44**.

Após purificação por CLC utilizando um eluente de Hex:AcOEt 5% - 25%, o produto **44** foi obtido no estado sólido, de coloração amarelada, com um rendimento de 80%.

5.4 Obtenção dos Análogos Triazólicos: Reação de Cicloadição 1,3-dipolar

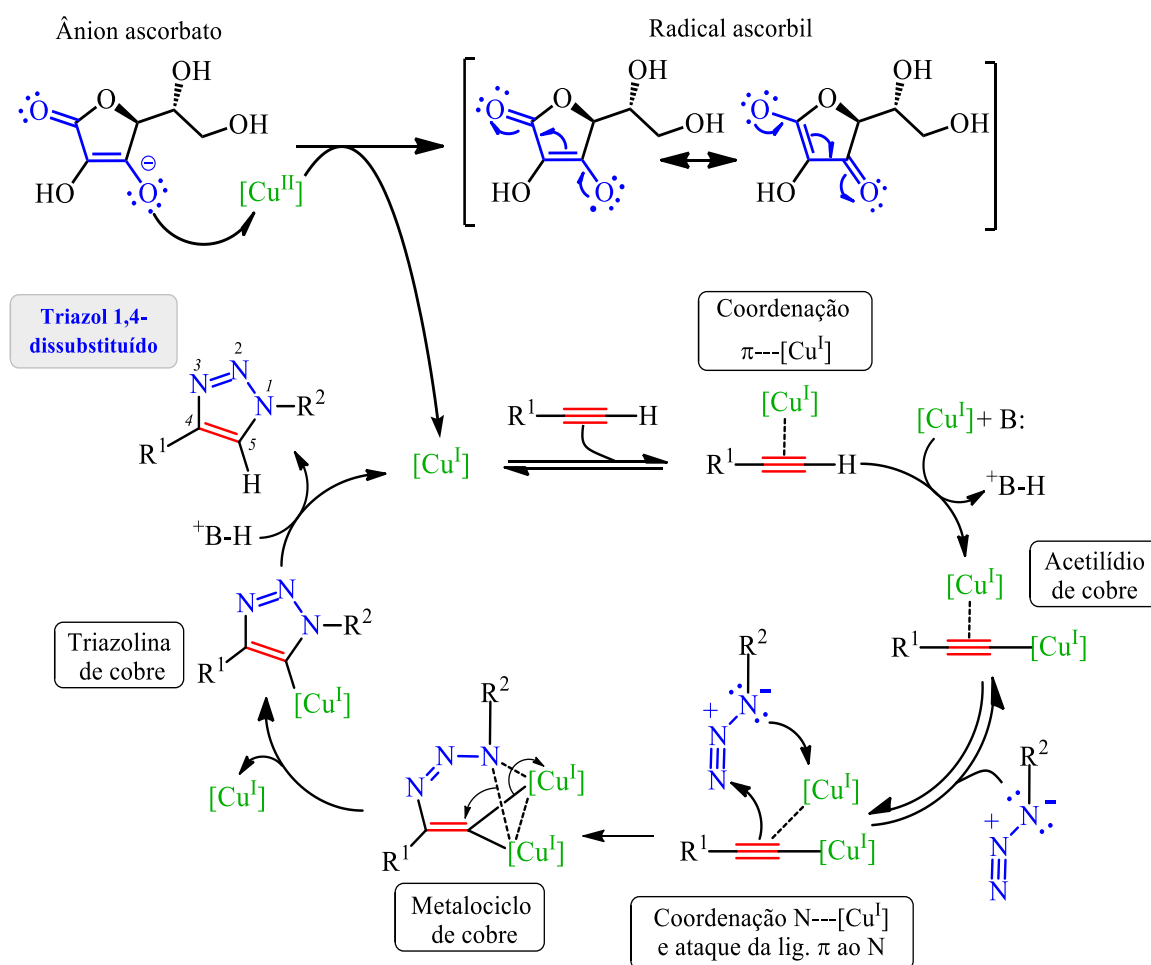
A produção dos análogos 1,2,3-triazólicos da Lavendustina A se deu pela reação do intermediário **44** portador do alcino terminal com as fenilazidas **43a-c** *p*-substituídas contendo os respectivos átomos de halogênio (Br, Cl e F), através de reações de cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen catalisada por Cu(I). O ascorbato de sódio (AscNa) foi o reagente utilizado para promover a redução do Cu(II), proveniente do sulfato de cobre(II) (CuSO₄), a Cu(I) *in situ* (**Esquema 16**) (HIMO *et al.*, 2005).



Esquema 16: Reação dos alcinos **44** com as azidas **43a-c** formando os análogos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos **45a-c**.

Assim, no meio reacional, o cobre II converte-se a cobre I pela transferência de um elétron do ânion ascorbato ao metal. Neste processo gera-se o radical ascorbil, sendo este bastante estabilizado por efeito de ressonância. O cobre I gerado é a espécie reativa e se complexa com a ligação pi (π) do alcino, tornando o seu hidrogênio em C-1 bastante ácido ($pK_a \sim 10$). Desta maneira, uma espécie com par de elétrons pode funcionar como uma base e abstrai-lo para então ser formado um acetilídeo de cobre coordenado com outro núcleo de cobre I. Esta espécie reage de maneira a promover um ataque nucleofílico do carbono beta da porção alcino ao N-3 do grupo azida, e neste momento há então o fechamento concomitante de um metalociclo de seis membros, dinucleado com átomos de cobre I. Tal evidência tem sido relatada na literatura mais atual e foi mostrada com fortes evidências em um trabalho pioneiro publicado por Forkins, Worrell e cols., em 2013, onde os autores associam uma mistura isotópica de Cu⁶³/Cu⁶⁵ monovalentes para identificar intermediários reacionais por espectrometria de massas, e assim proporem um mecanismo com a participação de dois núcleos de cobre coordenados, ao invés de um. Em seguida, a contração do metalociclo formado leva à triazolina de cobre, que ao sofrer

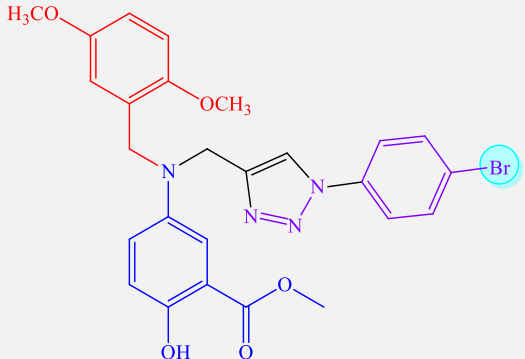
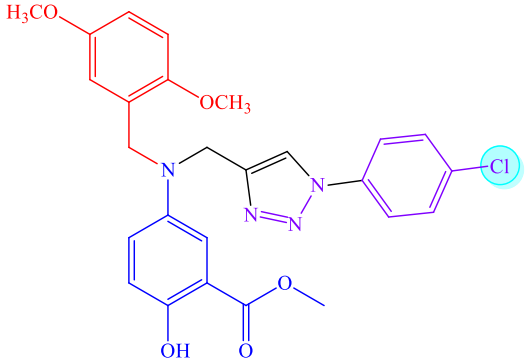
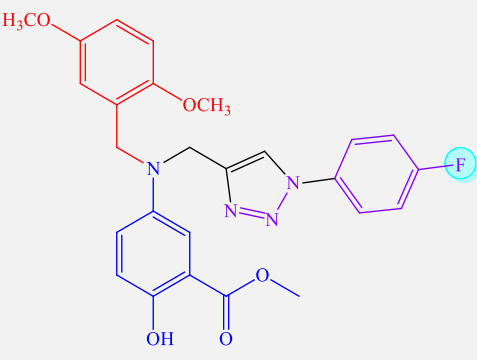
protólise no meio fornece o triazol 1,4-dissubstituído com total regioseletividade (**Esquema 17**) (WORREL; MALIK; FOKIN, 2013).



Esquema 17: Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar formando os triazóis 1,4-dissubstituídos. Adaptado de WORREL, MALIK, FOKIN., 2013.

Assim, três diferentes análogos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos da Lavendustina A foram produzidos conforme o mecanismo acima. Após isolamento com AcOEt e posterior purificação por CLC, os três produtos se apresentaram no estado sólido com diferentes colorações, em ótimos rendimentos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Características dos análogos 1,2,3-triazólicos formados

Análogo	Fórmula Estrutural	Rendimento	P.F.	AlogP*
45a		72%	127-128 °C	4,75
45b		70%	113-114 °C	4,64
45c		95%	110-111 °C	4,12

* Coeficiente de partição octanol-água calculado

5.5 Análise Estrutural dos Intermediários e dos Análogos Triazólicos

Os intermediários reacionais e os produtos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos mostrados nas seções acima tiveram suas estruturas avaliadas através de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Uni e Bidimensional (RMN 1D e 2D) de próton ou hidrogênio (RMN ^1H), carbono-13 (RMN ^{13}C), *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC), e *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC); os produtos também foram analisados por espectroscopia de massas de alta resolução (EMAR).

A RMN é uma técnica espectroscópica de pesquisa, altamente utilizada, que explora as propriedades magnéticas de certos núcleos atômicos a fim de se determinar propriedades físicas ou químicas de átomos ou moléculas nos quais eles estão contidos (JACOBSEN, 2007; PAVIA *et al.*, 2010). Diferentemente das técnicas de espectroscopia no ultravioleta (UV) visível e infravermelho (IV), que revelam os tipos de grupos funcionais presentes em uma molécula, a RMN fornece informações acerca do número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado (PAVIA *et al.*, 2010). Isso se baseia nas propriedades de certos núcleos absorverem radiação eletromagnética na região de radiofrequência (rf) quando submetidos a um campo eletromagnético. Ao sofrerem relaxamento, isto é, retornarem a seus estados de origem, esses núcleos emitem sinais eletromagnéticos que são detectadas pelo espectrômetro de RMN, que apresenta esses sinais como um registro da frequência do sinal *versus* sua intensidade (o espectro de RMN). Dentre esses, os núcleos atômicos mais estudados na RMN são os de hidrogênio (^1H) e de carbono-13 (^{13}C) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005; PAVIA *et al.*, 2010).

A EMAR é uma técnica analítica que qualifica e quantifica moléculas de interesse por meio da medição de sua massa com uma alta resolução (em torno de 4 ou mais casas decimais). O instrumento analítico utilizado, o espectrômetro de massas, bombardeia a molécula na fase gasosa com um feixe de elétrons de alta energia e grava o resultado do impacto de elétrons na forma de um espectro de íons positivos, que são separados com base na relação massa/carga (m/z) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Desse modo, a RMN e EMAR em conjunto com outras técnicas podem ser utilizadas para se determinar a estrutura completa de uma molécula desconhecida.

Com a utilização das técnicas descritas, os intermediários reacionais e os análogos triazólicos da Lavendustina A tiveram suas estruturas indubitavelmente elucidadas como segue:

Analisando-se os dados espectroscópicos do intermediário **44**, junto à técnica de HMBC ([APÊNDICE D](#)), observa-se que o hidrogênio da hidroxila, de deslocamento químico de hidrogênio ($\delta^1\text{H}$) em 10.29 ppm, se correlaciona com o carbono **C-2** de deslocamento químico de

carbono-13 ($\delta^{13}\text{C}$) em 154.89 ppm, com o carbono **C-3** de $\delta^{13}\text{C}$ em 117.95 ppm e com o carbono **C-1** de $\delta^{13}\text{C}$ em 111.99 ppm (**Figura 16**). Observando-se as multiplicidades dos sinais (M.) e as constantes de acoplamento (J), vê-se que os hidrogênios de **CH₂-8** de $\delta^1\text{H}$ em 3.97 ppm (d, $J=2.35$ Hz) se correlacionam com o hidrogênio de **C-10** de $\delta^1\text{H}$ em 2.25 ppm (t, $J=2.15$ Hz). Além disso, os hidrogênios de **CH-3** de $\delta^1\text{H} = 6,89$ ppm (d, $J=9,00\text{Hz}$) e de **CH-6** ($\delta^1\text{H} = 7,41$ ppm, d, $J=3,13\text{Hz}$) se correlacionam com o hidrogênio de **CH-4** de $\delta^1\text{H} = 7,13$ ppm (dd, $J=9,19/2,93\text{Hz}$). E o hidrogênio de **CH-4'** ($\delta^1\text{H} = 6,76$ ppm, dd, $J=8,80/2,93\text{Hz}$) se correlaciona com o hidrogênio de **CH-3'** ($\delta^1\text{H} = 6,81$ ppm, d, $J=8,61\text{Hz}$) e com o de **CH-6'** ($\delta^1\text{H} = 6,90$ ppm, d, $J=3,13\text{Hz}$).

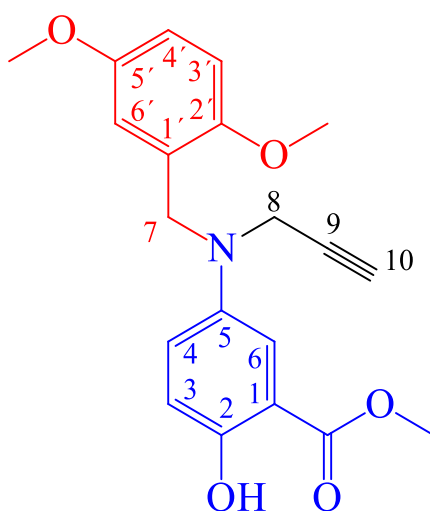


Figura 16: Estrutura numerada do intermediário **44** para análise de RMN.

Além disso, o grupo propargil de **44** também teve sua posição determinada a fim de avaliar se somente a porção amino da molécula ($-\text{NH}$) sofreu alquilação, eliminando a hipótese de que a hidroxila livre da porção salicilato de metila em **C-2**, com caráter nucleofílico, pudesse ter sofrido alquilação. Sendo assim, com os dados de HMBC, observou-se que os hidrogênios do metileno (**CH₂-8**) de $\delta^1\text{H}$ em 3,97 ppm (d, $J=2.35$ Hz) se correlacionam com o carbono ligado ao anel benzílico (**CH₂-7**) de $\delta^{13}\text{C}$ em 51.01 ppm e com o carbono *ipso* **C-5** de $\delta^{13}\text{C}$ em 141.79 ppm. Já o átomo de carbono de **CH₂-8** de $\delta^{13}\text{C}$ em 40.64 ppm, este se correlaciona com o hidrogênio do carbono benzílico (**CH₂-7** em $\delta^1\text{H} = 4.42$ ppm (s)).

Nas moléculas **45a-c** (**Figura 17**), analisando os dados espectroscópicos junto à técnica de HMBC (**APÊNDICE A**), é vista a correlação de **C-5** com os hidrogênios de **CH₂-14** ($\delta^1\text{H}$ em 4.52 ppm) e de **CH₂-7** ($\delta^1\text{H}$ em 4.72 ppm). Interessantemente, a regioseletividade da cicloadição pôde ser justificada pela correlação de **C-10** ($\delta^{13}\text{C}$ em 135.88 ppm) com o hidrogênio de **CH-9** ($\delta^1\text{H}$ em 7.69 ppm). Adicionalmente, C-10 se correlaciona com o hidrogênio de **CH-11** ($\delta^1\text{H}$ em 7.61 ppm) e com o hidrogênio de **CH-12** ($\delta^1\text{H}$ em 7.56 ppm). As multiplicidades e

constantes de acoplamento também mostram estas correlações entre os hidrogênios de **CH-11** (d, $J=8.61$ Hz) e **CH-12** (d, $J= 9.00$ Hz). O carbono **C-13**, diretamente ligado ao átomo de bromo, apresenta $\delta^{13}\text{C}$ em 122.14 ppm, correlacionando-se com os hidrogênios de **CH-11** e **CH-12**.

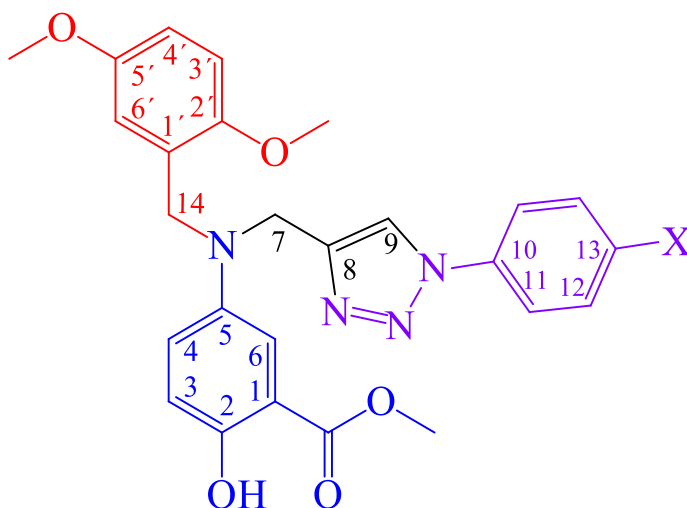


Figura 17: Estrutura numerada dos análogos 1,2,3-triazólicos 1,4-dissubstituídos **45a-c** para análise de RMN.

Nas demais moléculas, **45b** e **45c**, são vistas as mesmas correlações com variações nos deslocamentos químicos dos carbonos ligados próximos ao átomo de halogênio (“X”), provocadas pelas diferenças de eletronegatividade desse substituinte, que aumentam o deslocamento em ppm. Sendo que em **45b** os dados espectroscópicos do carbono **C-13** ([APÊNDICE B](#)), diretamente ligado ao átomo de cloro, apresentou $\delta^{13}\text{C}$ em 134.32 ppm, correlacionando-se com os hidrogênios de **CH-11** ($\delta^1\text{H}$ em 7.43) e com **CH-12** ($\delta^1\text{H}$ em 7.61 ppm).

Em **45c**, a utilização da técnica de RMN 2D não gerou espectros de fácil visualização. Contudo, os deslocamentos químicos observados na técnica de RMN 1D $\delta^1\text{H}$ e $\delta^{13}\text{C}$ ([APÊNDICE C](#)), mostram as mesmas relações vistas nas moléculas anteriores, sendo que o carbono **C-13**, diretamente ligado ao átomo de flúor, apresentou $\delta^{13}\text{C}$ em 162.23 ppm. Esse mesmo carbono apresentou um duplete (d) com uma constante de acoplamento através de uma ligação $^1J_{\text{C-F}} = 248.92$ Hz, atribuída ao acoplamento com o núcleo de flúor. Do mesmo jeito, o **CH-12** ($\delta^{13}\text{C}$ em 116.55 ppm) apresentou um duplete com $^2J_{\text{C-F}} = 22.89$ Hz e **CH-11** ((d) com $^3J_{\text{C-F}} = 7.63$ Hz).

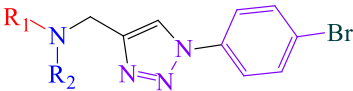
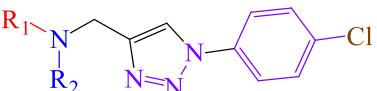
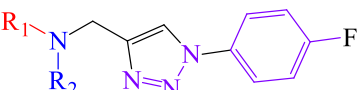
5.6 Avaliação Biológica Preliminar dos Produtos Contra *T. cruzi*

Os análogos triazólicos da Lavendustina A **45a-c** tiveram suas atividades biológicas avaliadas *in vitro* frente às formas epimastigota (que infecta o inseto vetor) da Cepa Y e do Clone Dm28c, e tripomastigota (presente na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero) da Cepa Y de *T. cruzi* via ensaio colorimétrico com MTT. A análise inicial da citotoxicidade foi realizada em duas linhagens de células de mamíferos: macrófagos, e fibroblastos (NIH3T3) de camundongos. O Benznidazol foi utilizado como controle, já que é o fármaco de escolha para tratamento contra *T. cruzi*.

As substituições de “X” por átomos de halogênios nos análogos **45a-c** foram imaginadas de forma a variar a lipofilicidade e efeitos eletrônicos gerados e estudar as correlações com a bioatividade dos produtos obtidos. Os análogos também foram sintetizados possuindo a subunidade farmacofórica da Lavendustina A/C tendo a porção hidroquinona da molécula metoxilada nas duas posições, de maneira que houvesse melhoras potenciais na permeabilidade celular e atividade de inibição do processo de polimerização de tubulina (NUSSBAUMER *et al.*, 1994; MU *et al.*, 2001).

O análogo **45a**, com substituinte bromo (Br), se mostrou inativo contra as duas cepas da forma epimastigota de *T. cruzi* avaliadas, com IC₅₀ acima de 100 µM. O análogo **45b** foi inativo contra a cepa Clone Dm28c. Já nas formas tripomastigotas, tanto **45a** quanto **45b** mostraram atividade interessante, com IC₅₀ na faixa de 10 µM. **45c** não teve suas bioatividades avaliadas, e somente **45a** e **45b** tiveram suas citotoxicidades testadas em células de mamíferos, apresentando, ambas, valores médios acima de 20 µM, ou seja, as moléculas só seriam tóxicas em concentrações duas vezes maior que a concentração necessária para inibição do parasito (**Tabela 2**).

Tabela 2: Resultados dos ensaios preliminares de avaliação biológica.

Molécula	Atividade Anti <i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μ M)		Citotoxicidade IC ₅₀ (μ M)		
	Epimastigota		Tripomastigota Cepa Y	NIH3T3	Macrófago Murino
	Cepa Y	Clone Dm28c			
<p>45a</p> 	>100	>100	10,19	NA*	>20
<p>45b</p> 	80	>100	9,88	NA	>20
<p>45c</p> 	NA	NA	NA	NA	NA
Benznidazol	13	7	NA	NA	NA

* Não avaliado

Com base nesses resultados preliminares, a possível atividade tripanocida imaginada para os análogos triazólicos da Lavendustina A não apresentou melhoras significativas em relação a outros compostos avaliados presentes na literatura, sendo moderadamente ativos somente na forma tripomastigota de *T. cruzi*. Contudo, os poucos resultados em mãos sugerem que a bioatividade observada não apresenta maiores correlações com o grau de lipofilicidade ([AlogP calculado](#)) ou efeitos eletrônicos provenientes dos substituintes halogenados, pois os resultados foram bem similares nos dois casos avaliados.

Devido ao isolamento social nos anos de 2020 e 2021 para a mitigação da propagação do SARS-CoV-2 (COVID-19), as avaliações biológicas na forma amastigota (infectante de células), bem como as avaliações de citotoxicidade em células de mamíferos não puderam prosseguir. Sendo assim, as avaliações biológicas dos análogos aqui apresentados deverão ser continuadas para uma melhor resposta sobre as correlações estrutura-atividade.

6 Conclusões

Neste trabalho, três novos análogos triazólicos metoxilados da Lavendustina A **45a**, **45b** e **45c** foram exitosamente produzidos em bons rendimentos (>70%).

O processo de síntese foi realizado em cinco etapas com diferentes reações orgânicas comumente estudadas no curso de graduação, envolvendo algumas espécies já presentes na literatura. As espécies inéditas como os análogos finais foram indubitavelmente elucidadas pelas técnicas espectroscópicas de RMN 1D e 2D em conjunto com a EMAR.

Na etapa de aminação redutiva para obtenção da subunidade farmacofórica metoxilada (**47**) da Lavendustina A, foram observados alguns desdobramentos como a formação de produtos colaterais indesejados (**47b** e **51**) que dificultaram a obtenção do produto almejado puro. Este problema pôde ser suprimido adotando-se o **procedimento (i)** descrito, utilizando quantidades equimolares dos reagentes que, embora ainda formasse coproduto, permitiu a separação e obtenção do desejado **47** puro em maior quantidade.

O uso das reações de cicloadições 1,3-dipolares de Huisgen pelo método *Click Chemistry* permitiu que os análogos triazólicos fossem produzidos num processo particularmente barato, rápido (em comparação com outros processos de síntese) com bastante economia de átomos, reagentes, e com pouca ou nenhuma purificação final necessária.

As avaliações biológicas preliminares aqui conduzidas mostraram atividades promissoras dos análogos triazólicos **45a-c** para inibição das formas tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ na faixa de 10 µM). Esses resultados indicam uma possível inibição de tubulina do parasito provocada pelos análogos avaliados.

Tendo em vista que as formas tripomastigotas de *T. cruzi* são as formas altamente infectantes que estão presentes na corrente sanguínea do infectado, as atividades dos novos análogos triazólicos **45a-c** da Lavendustina A contribuem para o enriquecimento da quimioteca de compostos e produtos naturais com atividades tripanocidas potenciais no tratamento de doenças parasitárias. No entanto, estudos futuros envolvendo a relação estrutura-atividade desses compostos devem ser realizados para melhor compreensão e possíveis melhoras ou mesmo modulação das bioatividades aqui apresentadas. Adicionalmente, a forma amastigota deverá ser avaliada para validação dos compostos como potenciais anti *T. cruzi*.

Referências

AGHARBAOUI, F. E. et al. Computational and synthetic approaches for developing Lavendustin B derivatives as allosteric inhibitors of HIV-1 integrase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 123, 2016. 673-683.

ANDRADE, P. D. et al. 1,2,3-Triazole-based analogue of benzimidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 23, 2015. 6815-6826.

BHARGAVA, S. R.; CHATTERJI, B. P. Emergence of Tubulin as a Vaccine against Parasitic Infections. **Intellectual Properties Rights**, 2, n. 4, 2014. 7.

BOBBAA, V. et al. Synthesis and biological evaluation of selective tubulin inhibitors as anti-trypanosomal agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, 25, n. 12, 2017. 3215-3222.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, v. 1 e 2, 2006.

BUTLER, R. N. et al. Pentazole Chemistry: the mechanism of the reaction of aryl diazonium chlorides with azide ion at -80 °C: concerted versus stepwise formation of arylpentazoles, detection of a pentazene intermediate, a combined ¹H and ¹⁵N NMR experimental and ab initio [..]. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions**, 2, 1998. 2243-2247.

CAMMISULI, S. et al. SDZ 281-297: A modified partial structure of Lavendustin A that exerts potent and selective antiproliferative activities in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, 65, n. 3, 1996. 351-359.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Tradução de Kátia A. Roque; Jane de Moura Menezes e Telma Regina Matheus. 7ª. ed. Porto Alegre: AMGH, v. 1, 2011. 769 p. ISBN 978-85-8055-053-5.

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. Tradução de Kátia A. Roque; Jane de Moura Menezes e Telma Regina Matheus. 7ª. ed. Porto Alegre: AMGH, v. 2, 2011. 591 p. ISBN 978-85-8055-054-2.

CHEN, H. et al. Structure-Activity Relationships in a Series of 5-[(2,5-Dihydroxybenzyl)amino]salicylate Inhibitors of EGF-Receptor-Associated Tyrosine Kinase: Importance of Additional Hydrophobic Aromatic Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, 37, n. 6, 1994. 845-859.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2012. 1260 p.

COTZER, J. A. W.; TUSTIN, R. C. **Infectious Diseases of Livestock**. 2. ed. [S.l.]: Oxford University Press, v. 2, 2005.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 106, n. 6, 2011. 641-645.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. Informativo nº 9, Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas, 2019. Disponível em: <https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2019/08/informativo_chagas_9_portugues.pdf?x36557>. Acesso em: 24 março 2020.

FENNEL, B. et al. Microtubule as antiparasitic drug targets. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 3, n. 5, 2008. 501-518.

FERNANDES, M. C. et al. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, 139, 2012. 23-36.

FOSKET, D. E. Structural and Functional Organization of Tubulin. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, 43, n. 1, 1992. 201-240.

GALVÃO, C. **Vetores da doença de chagas no Brasil [online]**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014. 289 p. ISBN 978-85-98203-09-6. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/mw58j>>. Zoologia: guias e manuais de identificação series.

GHIANO, D. G. et al. Parallel solution synthesis of lavendustin analogs as antileishmanial agents. **ARKIVOC**, 2011, n. VII, 2011. 297-311.

GRIBBLE, G. W. et al. Reactions of sodium Borohydride in Acidic Media. I. Reduction of Indoles and Alkylation of Aromatic Amines with Carboxylic Acids. **Journal of the American Chemical Society**, 96, n. 25, 1974. 7812-7814.

HIMO, F. et al. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **Journal of American Chemical Society**, 127, 2005. 210-216.

- HOET, S. et al. Natural products active against African trypanosomes. **Natural Product Reports**, 3, n. 21, 2004. 353-364.
- HOLUB, J. M.; KIRSHENBAUM, K. Tricks with clicks: modification of peptidomimetic oligomers via copper-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. **Chemical Society Reviews**, 39, 2010. 1325-1337.
- JACOBSEN, N. E. **Fundamentals of NMR Spectroscopy in Liquids. In NMR Spectroscopy Explained.** [S.l.]: John Wiley and Sons, 2007. 1-38 p. ISBN 9780470173350.
- JOSHI, S. M. et al. Synthesis of radiolabelled aryl azides from diazonium salts: experimental and computational results permit the identification of the preferred mechanism. **Chemical Communications**, 51, 2015. 8954.
- KHRAIWESH, M. H. et al. Antitrypanosomal Activities and Cytotoxicity of Some Novel Imido-substituted 1,4-Naphthoquinone Derivatives. **Archives of Pharmacal Research**, 35, n. 1, 2012. 27-33.
- LAMA, R. et al. Identification of selective tubulin inhibitors as potential anti-trypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 22, n. 17, 2012. 5508-5516.
- LEITE, D. I. et al. New 1,2,3-triazole-based analogues of benznidazole for use against *Trypanosoma cruzi* infection: in vitro and in vivo evaluations. **Chemical Biology and Drug Design**, 92, 2018. 1670-1682.
- LESSA, C. D. S. Núcleos 1,2,3-Triazólicos como uma Versátil Ferramenta para a Obtenção de Novos Compostos Bioativos: uma Visão Geral. **Revista Virtual de Química**, 13, n. 1, 2021. No prelo.
- LIU, Y.-M. et al. Tubulin inhibitors: a patent review. **Expert opinion on therapeutic patents**, 24, n. 1, 2014. 69-88.
- MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 146, n. 4, 2007. 601-620.
- MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. **Chemical Reviews**, 108, n. 8, 2008. 2952-3015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso.** 4ª. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. ISBN 85-334-0840-4. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_bolso_4ed.pdf>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, 44, n. 1, 2010. 200-202.
- MOSES, J. E.; MOORHOUSE, A. D. The growing applications of click chemistry. **Chemical Society Reviews**, 36, 2007. 1249-1262.
- MU, F. et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of Lavendustin A Analogues That Inhibit EGFR and Syk Tyrosine Kinases, as Well as Tubulin Polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, 44, n. 3, 2001. 441-452.
- MU, F. et al. Synthesis and Investigation of Conformationally Restricted Analogues of Lavendustin A as Cytotoxic Inhibitors of Tubulin Polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45, n. 21, 2002. 4774-4785.
- MU, F. et al. Synthesis, Anticancer Activity, and Inhibition of Tubulin Polymerization by Conformationally Restricted Analogues of Lavendustin A. **Journal of Medicinal Chemistry**, 46, n. 9, 2003. 1670-1682.
- NUSSBAUMER, P. et al. Novel Antiproliferative Agents Derived from Lavendustin A. **Journal of Medicinal Chemistry**, 37, n. 24, 1994. 4079-4084.
- NUSSBAUMER, P.; WINISKI, A. P. Structure-activity relationship studies on a novel class of antiproliferative agents derived from Lavendustin A. Part I: Ring A modifications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, n. 16, 2008. 7552-7560.
- OGINDO, C. O. et al. Novel drug design for Chagas disease via targeting *Trypanosoma cruzi* tubulin: Homology modeling and binding pocket prediction on *Trypanosoma cruzi* tubulin polymerization by naphthoquinone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2016.
- ONODA, T. et al. Isolation of a novel tyrosine kinase inhibitor, Lavendustin A, from *Streptomyces griseolavendus*. **Journal of Natural Products**, 52, n. 6, 1989. 1252-1257.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia.** [S.l.]: Cengage Learning, 2010. 716 p. Tradução da 4ª edição Norte Americana.

- PENA, R. B.; CARVALHO, L. L. Síntese de Propargil-Arilbenzilaminas Inéditas e Elucidação Estrutural, via Espectroscopia de RMN 1D E 2D: Intermediários-Chave Para a Obtenção de Análogos da Lavendustina A Com Potencial Atividade Anticâncer e Antiparasitária. **Projeto de final de curso, Campus UFRJ Macaé**, 2018.
- PITA, S. S. D. R.; PASCUTI, P. G. Alvos Terapêuticos na Doença de Chagas: A Tripanotiona Redutase como Foco. **Revista Virtual de Química**, 3, n. 4, 2011. 307-324.
- PROGRAMA INTEGRADO DE DOENÇA DE CHAGAS DA FIOCRUZ (PIDC). Vetores da Doença de Chagas. **Portal da Doença de chagas**, 2017. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/sessao/vetor/>>. Acesso em: 15 Março 2021.
- RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, 375, n. 9723, 2010. 1388-1402.
- ROMEIRO, N. C.; AVILA, C. M. Proteínas Tirocinas Quinases: Desafios do Desenvolvimento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, 2, n. 1, 2010. 59-82.
- SANTOS, M. Síntese e caracterização de complexos híbridos de rutênio e medida da atividade biológica contra Trypanosoma cruzi. **Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2012.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7th. ed. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, 2005.
- SINCLAIR, A. N.; DE GRAFFENRIED, C. L. More than Microtubules: The Structure and Function of the Subpellicular Array in Trypanosomatids. **Trends in parasitology**, 35, n. 10, 2019. 760-777.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 10ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 2, 2012.
- SOUZA, M. V. N. D. Novos Produtos Naturais Capazes de Atuar na Estabilização de Microtúbulos , um Importante Alvo no Combate ao Câncer. **Química Nova**, 27, n. 2, 2004. 308-312.
- STEVENS, J. R. et al. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, Trypanosoma brucei and T. cruzi. **Parasitology**, 118, n. 1, Jan 1999. 107-116.
- STEVERDING, D.; TYLER, K. M. Novel antitrypanosomal agents. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 14, n. 8, 2005. 939-955.
- SUETH-SANTIAGO, V. et al. The Effectiveness of Natural Diarylheptanoids against Trypanosoma cruzi: Cytotoxicity, Ultrastructural Alterations and Molecular Modeling Studies. **PLoS ONE**, 11, n. 9, 2016.
- TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 592-630, Julho 2011.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. **PLoS ONE**, 8, n. 11, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Geneva: WHO Technical Report Series, v. 975, 2012. ISBN 978 92 4 120975 5.
- WORREL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. **Science**, 340, 2013. 457-460.
- YOON, J.; RYU, J.-S. A rapid synthesis of lavendustin-mimetic small molecules by click fragment assembly. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 20, 2010. 3930-3935.
- ZHOU, J.; GIANNAKAKOU, P. Targeting Microtubules for Cancer Chemotherapy. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, 5, n. 1, 2005. 65-71.

APÊNDICES

APÊNDICE A — Dados Espectroscópicos de **45a**

Tabela 3: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de **45a**

Fórmula Química: $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{BrN}_4\text{O}_5$ Massa Exata: 553,1062						
Assinalamento	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Int.	M./J (Hz)	gHSQC	gHMBC
OH	- ²	10.19	1H	(s)	-	112.16/154.04
C=O	170.45	-	-	-	-	3.88/ 6.84/ 7.30/ 10.19
C(2)	154.04	-	-	-	-	6.84/ 7.03/ 10.19
C(5')	153.59	-	-	-	-	3.79/ 6.82/ 6.83
C(2')	151.34	-	-	-	-	3.70/ 4.52/ 6.75/ 6.82/ 6.83
C(8)	146.70	-	-	-	-	4.72/ 7.69
C(5)	141.35	-	-	-	-	4.52/ 4.72/ 6.84/ 7.03/ 7.30
C(10)	135.88	-	-	-	-	7.56/ 7.61/ 7.69
CH(11)	132.72	7.61	2H	(d)/ 8.61	7.61	121.68/ 122.14/ 132.72/ 135.88
C(1')	127.21	-	-	-	-	4.52/ 6.82/ 6.83
CH(4)	122.99	7.03	1H	(dd) / 9.0/ 3.13	7.03	113.20/ 118.12/141.35/ 154.04
C(13)	122.14	-	-	-	-	7.56/ 7.61
CH(12)	121.68	7.56	2H	(d)/ 9.00	7.56	121.68/ 122.14/ 135.88/ 132.72
CH(9)	119.65	7.69	1H	(s)	7.69	135.88/ 146.70
CH(3)	118.12	6.84	1H	(d)/ 9.39	6.84	112.16/ 122.99/ 141.35/ 154.04/ 170.45
CH(6')	114.67	6.83	1H	Pico sobreposto	6.83	111.65/ 127.21/ 151.34/ 153.59
CH(6)	113.20	7.30	1H	(d) / 3.13	7.30	112.16/ 122.99/ 141.35/ 154.04/ 170.45
C(1)	112.16	-	-	-	-	6.84/ 7.30/ 10.19
CH(4')	111.65	6.75	1H	(dd) / 8.61/2.74	6.75	110.96/ 114.67/ 151.34/ 153.59
CH(3')	110.96	6.82	1H	(d)/ 8.60	6.82	111.65/ 127.21/ 151.34/ 153.59
2'-OCH ₃	55.65	3.70	3H	(s)	3.70	151.34
5'-OCH ₃	55.57	3.79	3H	(s)	3.79	153.59
COOCH ₃	52.17	3.88	3H	(s)	3.88	170.45
CH ₂ (14)	50.54	4.52	2H	(s)	4.52	47.18/ 114.67/ 127.21/ 141.35/ 151.34
CH ₂ (7)	47.18	4.72	2H	(s)	4.72	50.54/ 119.65/ 141.35/ 146.70

² Sem correlação

APÊNDICE B — Dados Espectroscópicos de **45b**

Tabela 4: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de **45b**

Fórmula Química: $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{ClN}_4\text{O}_5$
 Massa Exata: 507,1456

Assinalamento	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Int.	M. /J (Hz)	gHSQC	gHMBC
OH	- ³	10.19	1H	(s)	-	-
C=O	170.48	-	-	-	-	6.83/ 3.87
C(2)	154.07	-	-	-	-	6.83
C(5')	153.62	-	-	-	-	3.68
C(2')	151.37	-	-	-	-	3.78/ 6.73
C(8)	146.70	-	-	-	-	4.70
C(5)	141.38	-	-	-	-	4.70/ 4.50
C(10)	135.43	-	-	-	-	7.61/ 7.43
C(13)	134.32	-	-	-	-	7.61/ 7.43
CH(11)	129.78	7.43	2H	(dt) / 9.39/ 2.74/ 2.35	7.43	134.32/ 129.78/ 121.49
C(1')	127.24	-	-	-	-	6.79/ 4.50
CH(4)	123.03	7.00	1H	(dd) / 9.39/ 3.13	7.00	118.15
CH(12)	121.49	7.61	2H	(dt) / 9.28/ 2.74/ 2.45	7.61	135.43/ 129.78/ 121.49
CH(9)	119.75	7.65	1H	(s)	7.65	129.78
CH(3)	118.15	6.83	1H	(d)/ 9.00	6.83	170.48/ 154.07/ 112.20
CH(6')	114.71	6.80	1H	(d)/ 9.00	6.80	6.73
CH(6)	113.25	7.27	1H	(d) / 3.13	7.27	-
C(1)	112.20	-	-	-	-	6.83/ 3.87
CH(4')	111.69	6.73	1H	(dd) / 8.80/ 2.93	6.73	151.37/ 114.71
CH(3')	110.99	6.79	1H	(d)/ 9.00	6.79	153.62/ 151.37/ 127.24
2'-OCH ₃	55.67	3.78	3H	(s)	3.78	151.37
5'-OCH ₃	55.60	3.68	3H	(s)	3.68	153.62
COOCH ₃	52.20	3.87	3H	(s)	3.87	170.48/ 112.20
CH ₂ (14)	50.58	4.50	2H	(s)	4.50	151.37/ 141.38/ 127.24/ 114.71/ 47.23
CH ₂ (7)	47.23	4.70	2H	(s)	4.70	146.70/ 141.38/ 119.75/ 50.58

³ Sem correlação

APÊNDICE C — Dados Espectroscópicos de **45c**
Tabela 5: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de **45c**

Fórmula Química: $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{FN}_4\text{O}_5$
 Massa Exata: 493,1883

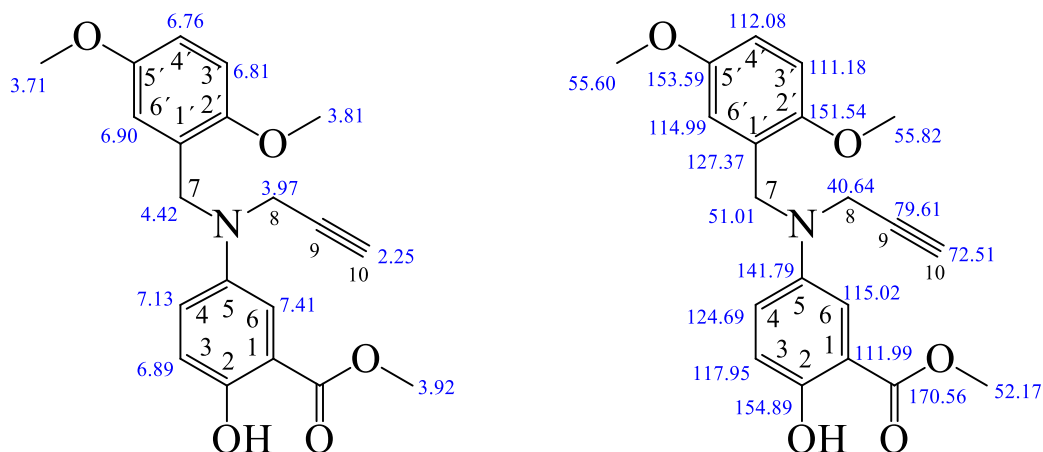
Assinalamento	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Int.	M. / J (Hz)	
				^1H	^{13}C
OH	- ⁴	10.19	1H	(s)	(s)
C=O	170.47	-	-	-	(s)
C(13)	162.23	-	-	-	(d)/ $^1J_{\text{C-F}} = \mathbf{248.92}$
C(2)	153.98	-	-	-	(s)
C(5')	153.56	-	-	-	(s)
C(2')	151.32	-	-	-	(s)
C(8)	146.54	-	-	-	(s)
C(5)	141.34	-	-	-	(s)
C(10)	133.19	-	-	-	(s)
C(1')	127.20	-	-	-	(s)
CH(4)	122.92	7.01	1H	(dd)/ 8.80/ 1.96	(s)
CH(11)	122.31	7.62	2H	(ddd)/ $J_{\text{H-H}} = 6.97/ ^4J_{\text{H-F}} = \mathbf{4.52}/ J_{\text{H-H}} = 2.20$	(d)/ $^3J_{\text{C-F}} = \mathbf{7.63}$
CH(9)	120.01	7.65	1H	(br. s)	(s)
CH(3)	118.11	6.83	1H	(d)/ 8.80	(s)
CH(12)	116.55	7.16	2H	(ddd)/ $^3J_{\text{H-F}} = \mathbf{8.31}/ J_{\text{H-H}} = 6.36/ 1.96$	(d)/ $^2J_{\text{C-F}} = \mathbf{22.89}$
CH(6')	114.61	6.81	1H	Pico sobreposto	(s)
CH(6)	113.11	7.27	1H	(br. s)	(s)
C(1)	112.16	-	-	-	(s)
CH(4')	111.59	6.73	1H	(dd)/ 9.05/ 3.18	(s)
CH(3')	110.91	6.79	1H	(d)/ 8.80	(s)
2'-OCH ₃	55.62	3.77	3H	(s)	(s)
5'-OCH ₃	55.56	3.68	3H	(s)	(s)
COOCH ₃	52.19	3.86	3H	(s)	(s)
CH ₂ (14)	50.52	4.50	2H	(s)	(s)
CH ₂ (7)	47.18	4.70	2H	(s)	(s)

⁴ Sem correlação

APÊNDICE D — Dados Espectroscópicos do Intermediário 44

Tabela 6: Dados Espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H de 44

Fórmula Química: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5$
 Massa Exata: 355,1420



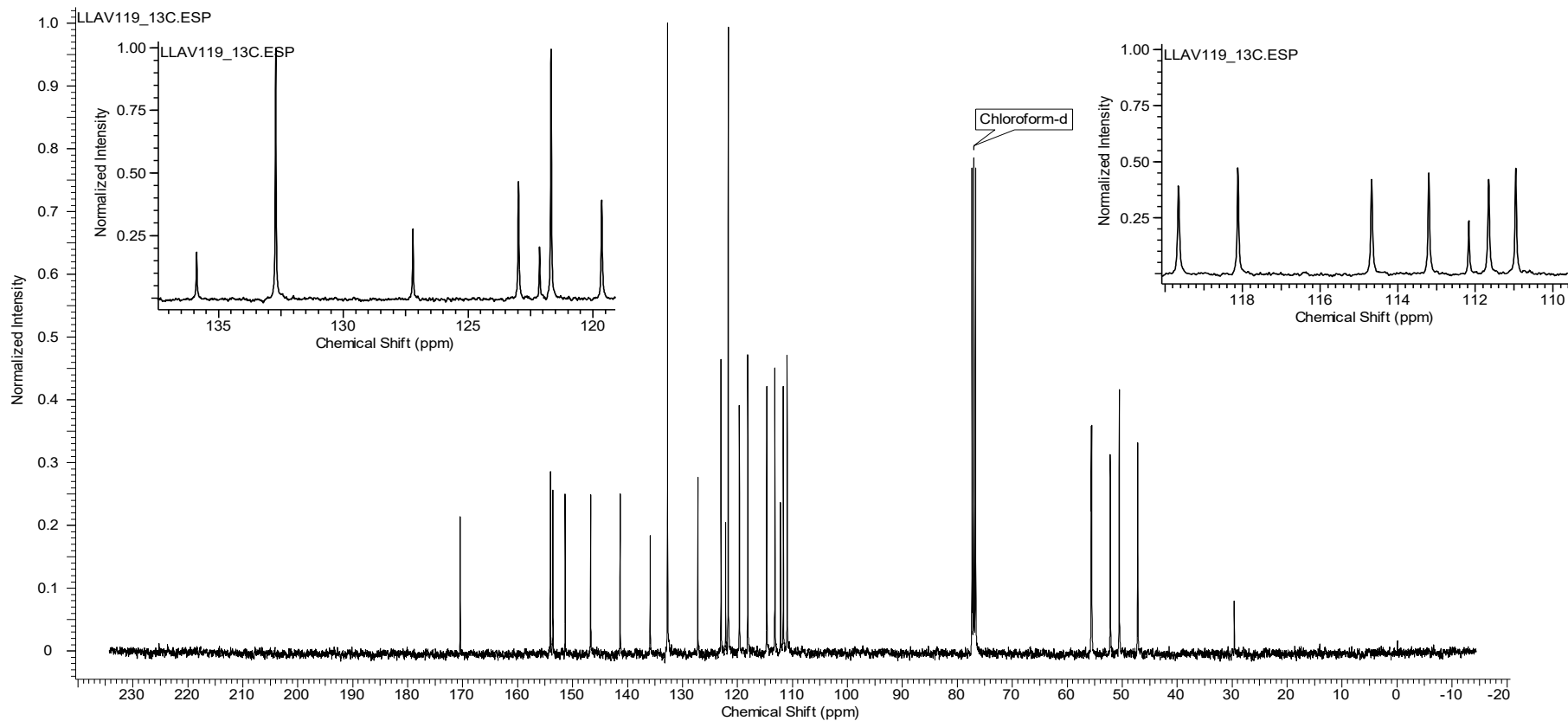
Assinalamento	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Int.	M./ J (Hz)	gHSQC	gHMBC
C=O	170.56	- ⁵	-	-	-	7.41/ 6.90/ 3.92
C(2)	154.89	-	-	-	-	10.29/ 7.41/ 7.13/ 6.89
C(5')	153.59	-	-	-	-	6.81/ 3.71
C(2')	151.54	-	-	-	-	6.81/ 4.42/ 3.81
C(5)	141.79	-	-	-	-	7.13/6.89/4.42/ 3.97
C(1')	127.37	-	-	-	-	6.81/ 4.42
CH(4)	124.69	7.13	1H	(dd)/ 9.19/2.93	7.13	154.89/ 141.79/ 115.02
CH(3)	117.95	6.89	1H	(d)/ 9.00	6.89	170.56/ 154.89/ 141.79/ 124.69/ 111.99
CH(6)	115.02	7.41	1H	(d)/ 3.13	7.41	170.56/ 154.89/ 124.69/ 117.95
CH(6')	114.99	6.90	1H	(d)/ 3.13	6.90	153.59/ 112.08
CH(4')	112.08	6.76	1H	(dd)/ 8.80/2.93	6.76	153.59/ 127.37/ 114.99
C(1)	111.99	-	-	-	-	10.28/ 6.89
CH(3')	111.18	6.81	1H	(d)/ 8.61	6.81	153.59/ 127.37/ 112.08
C(9)	79.61	-	-	-	-	3.97
CH(10)	72.51	2.25	1H	(t)/ 2.15	2.25	52.17/ 40.64
2'-OCH ₃	55.82	3.81	3H	(s)	3.81	151.54
5'-OCH ₃	55.60	3.71	3H	(s)	3.71	153.59
CO ₂ CH ₃	52.17	3.92	3H	(s)	3.92	170.56
CH ₂ (7)	51.01	4.42	2H	(s)	4.42	151.54/ 141.79/ 127.37/ 114.99/ 111.18/ 40.64
CH ₂ (8)	40.64	3.97	2H	(d)/ 2.35	3.97	141.79/ 79.61/72.51/ 51.01
OH	-	10.29	1H	(s)	-	154.89/ 117.95/ 111.99

⁵ Sem correlação

ANEXOS

Acquisition Time (sec)	1.3107	Comment	LAV119	Date	Jul 31 2019
File Name	C:\Users\Leandro\Downloads\LLAV118-119\fid5 01-08-19\LLAV119_13c			Frequency (MHz)	100.52
Nucleus	13C	Number of Transients	14464	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	11050.5381
Sweep Width (Hz)	25000.00	Temperature (degree C)	3.000		

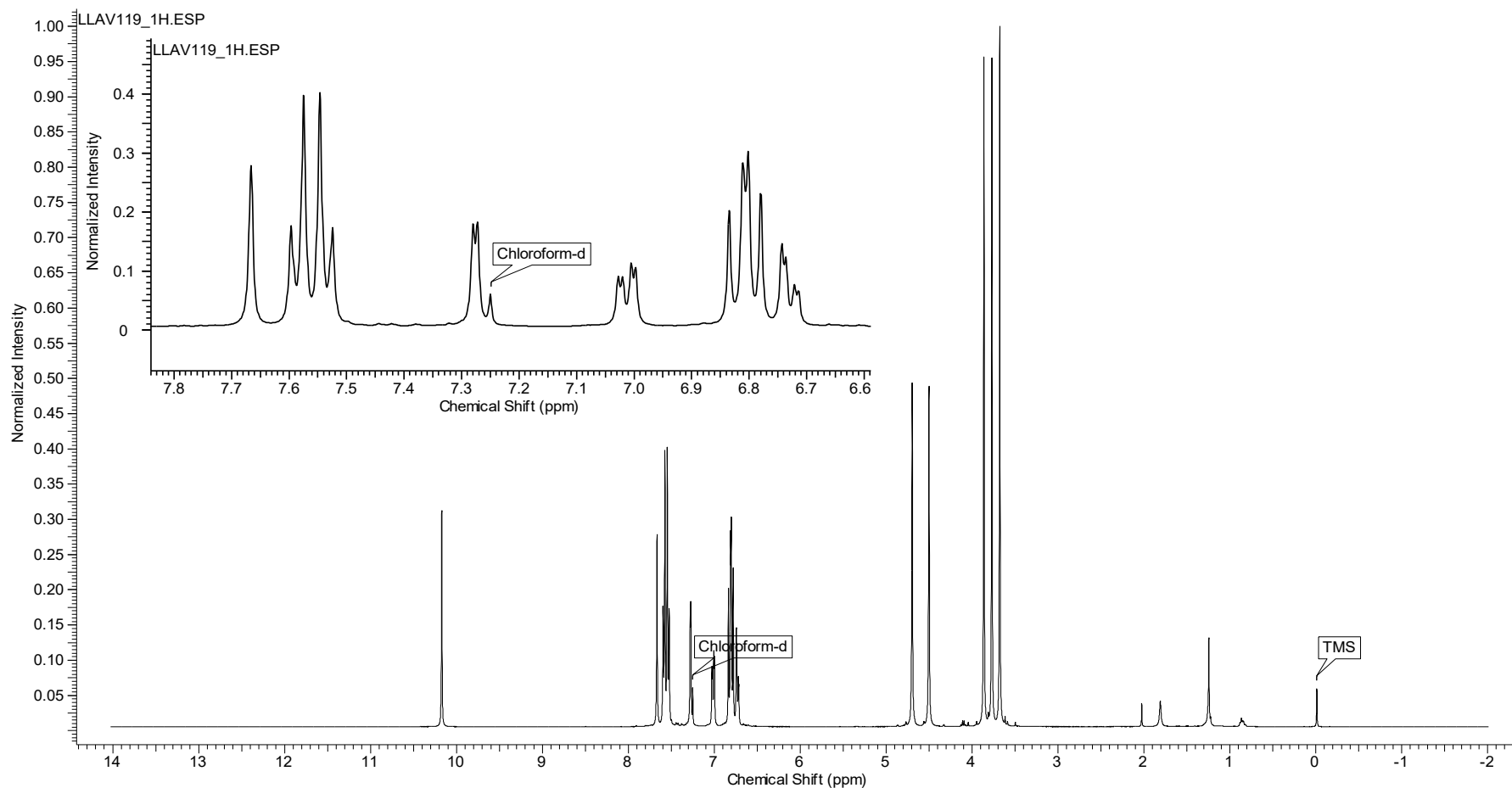
¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 170.45 (s, 1 C), 154.04 (s, 1 C), 153.59 (s, 1 C), 151.34 (s, 1 C), 146.70 (s, 1 C), 141.35 (s, 1 C), 135.88 (s, 1 C), 132.72 (s, 1 C), 127.21 (s, 1 C), 122.99 (s, 1 C), 122.14 (s, 1 C), 121.68 (s, 1 C), 119.65 (s, 1 C), 118.12 (s, 1 C), 114.67 (s, 1 C), 113.20 (s, 1 C), 112.16 (s, 1 C), 111.65 (s, 1 C), 110.96 (s, 1 C), 55.65 (s, 1 C), 55.57 (s, 1 C), 52.17 (s, 1 C), 50.54 (s, 1 C), 47.18 (s, 1 C)



Anexo A — Espectro de RMN ¹³C de 45a

Acquisition Time (sec)	2.5559	Comment	LAV119	Date	Jul 31 2019		
File Name	C:\Users\Leandro\Downloads\LLAV118-119\fid5 01-08-19\LLAV119_1h			Frequency (MHz)	399.74	Nucleus	1H
Number of Transients	8	Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul
Solvent	CHLOROFORM-d		Spectrum Offset (Hz)	2401.3870	Sweep Width (Hz)	6410.26	Temperature (degree C) 3.000

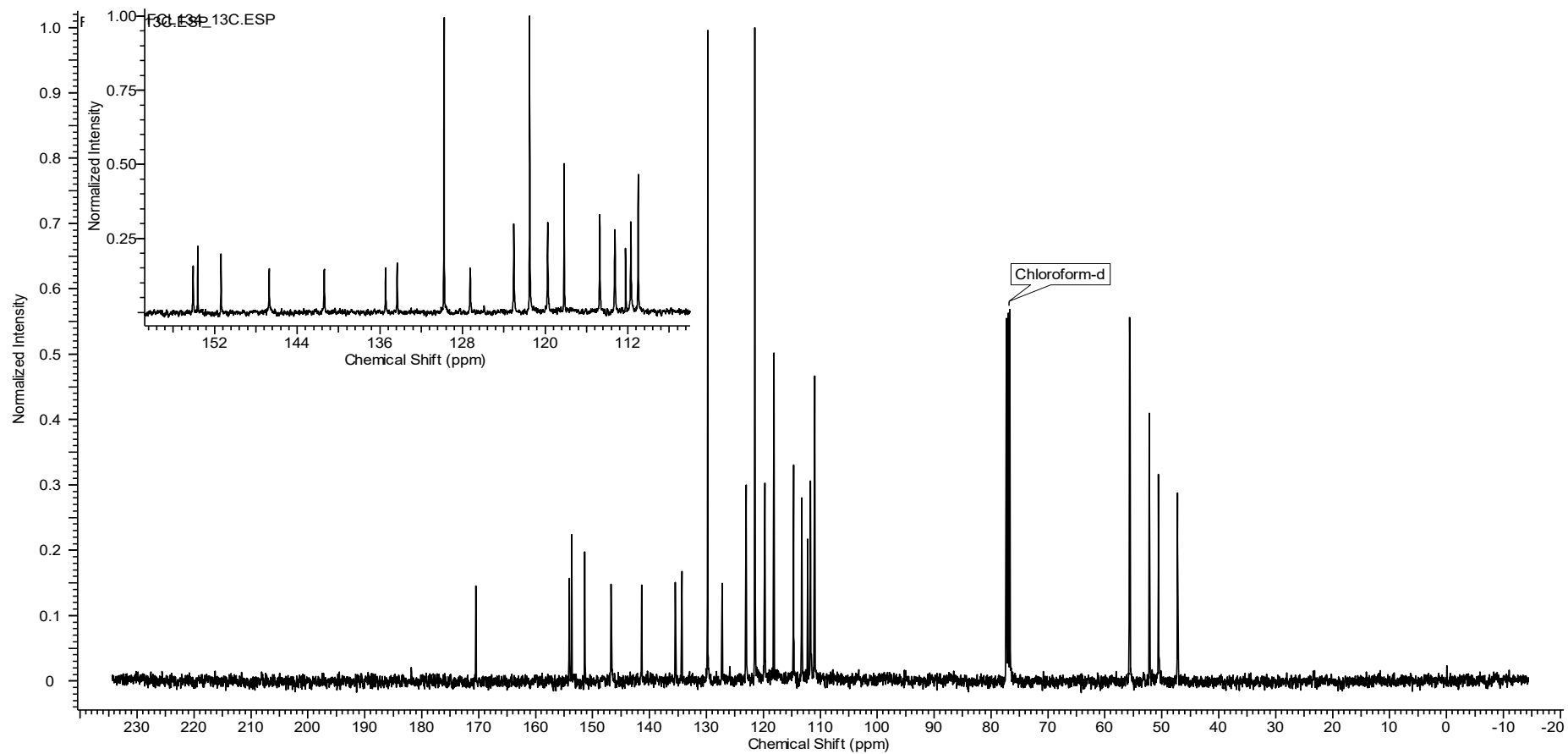
¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 10.17 (s, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.59 (d, *J*=8.61 Hz, 2 H), 7.54 (d, *J*=9.00 Hz, 2 H), 7.28 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 7.01 (dd, *J*=9.00, 3.13 Hz, 1 H), 6.82 (d, *J*=9.78 Hz, 1 H), 6.80 - 6.81 (m, 1 H), 6.79 (d, *J*=8.61 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=8.61, 2.74 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.50 (s, 2 H), 3.85 - 3.87 (m, 3 H), 3.77 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)



Anexo B — Espectro de RMN ¹H de 45a

Acquisition Time (sec)	1.3107	Comment	FCL134	Date	Nov 1 2019
File Name	E:\2-APQ1 2014 (Lavendustina)\1-ESECTROS DE RMN-LAVENDUSTINA\LLAV134\FCL134_13C			Frequency (MHz)	100.52
Nucleus	13C	Number of Transients	14464	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	11053.5898
Sweep Width (Hz)	25000.00	Temperature (degree C)	3.000		

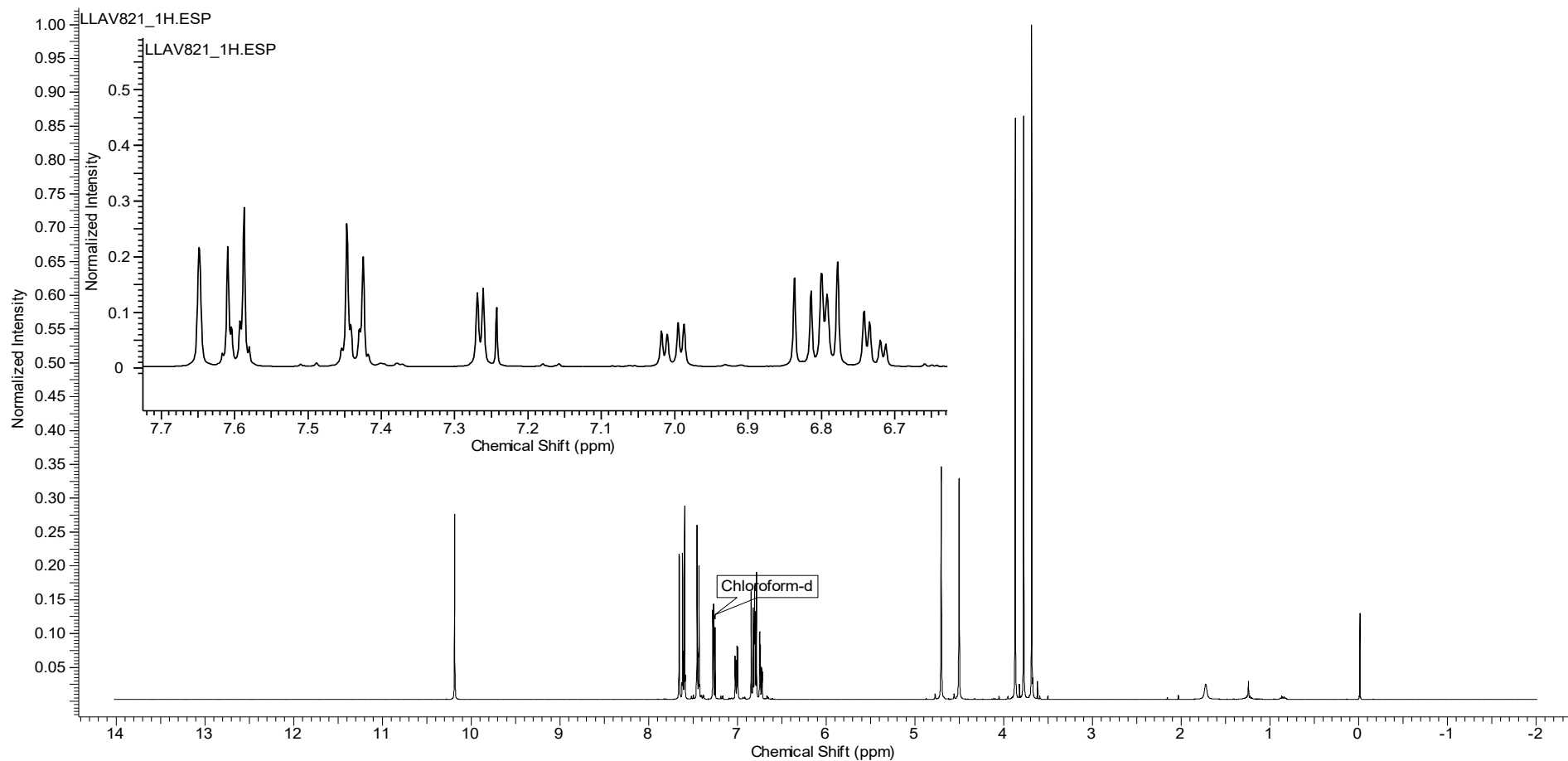
¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 170.48 (s, 1 C), 154.07 (s, 1 C), 153.62 (s, 1 C), 151.37 (s, 1 C), 146.70 (s, 1 C), 141.38 (s, 1 C), 135.43 (s, 1 C), 134.32 (s, 1 C), 129.78 (s, 1 C), 127.24 (s, 1 C), 123.03 (s, 1 C), 121.49 (s, 1 C), 119.75 (s, 1 C), 118.15 (s, 1 C), 114.71 (s, 1 C), 113.25 (s, 1 C), 112.20 (s, 1 C), 111.69 (s, 1 C), 110.99 (s, 1 C), 55.67 (s, 1 C), 55.60 (s, 1 C), 52.20 (s, 1 C), 50.58 (s, 1 C), 47.23 (s, 1 C)



Anexo C — Espectro de RMN ¹³C de 45b

Acquisition Time (sec)	2.5559	Comment	LLAV821	Date	Oct 15 2019
File Name	F:\2-APQ1 2014 (Lavendustina)\1-ESPECTROS DE RMN-LAVENDUSTINALLAV821_Aduto_OMe_CILLAV821_1h				
Frequency (MHz)	399.74	Nucleus	1H	Number of Transients	32
Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d
Sweep Width (Hz)	6410.26	Temperature (degree C)	3.000	Original Points Count	16384
				Spectrum Offset (Hz)	2401.3870

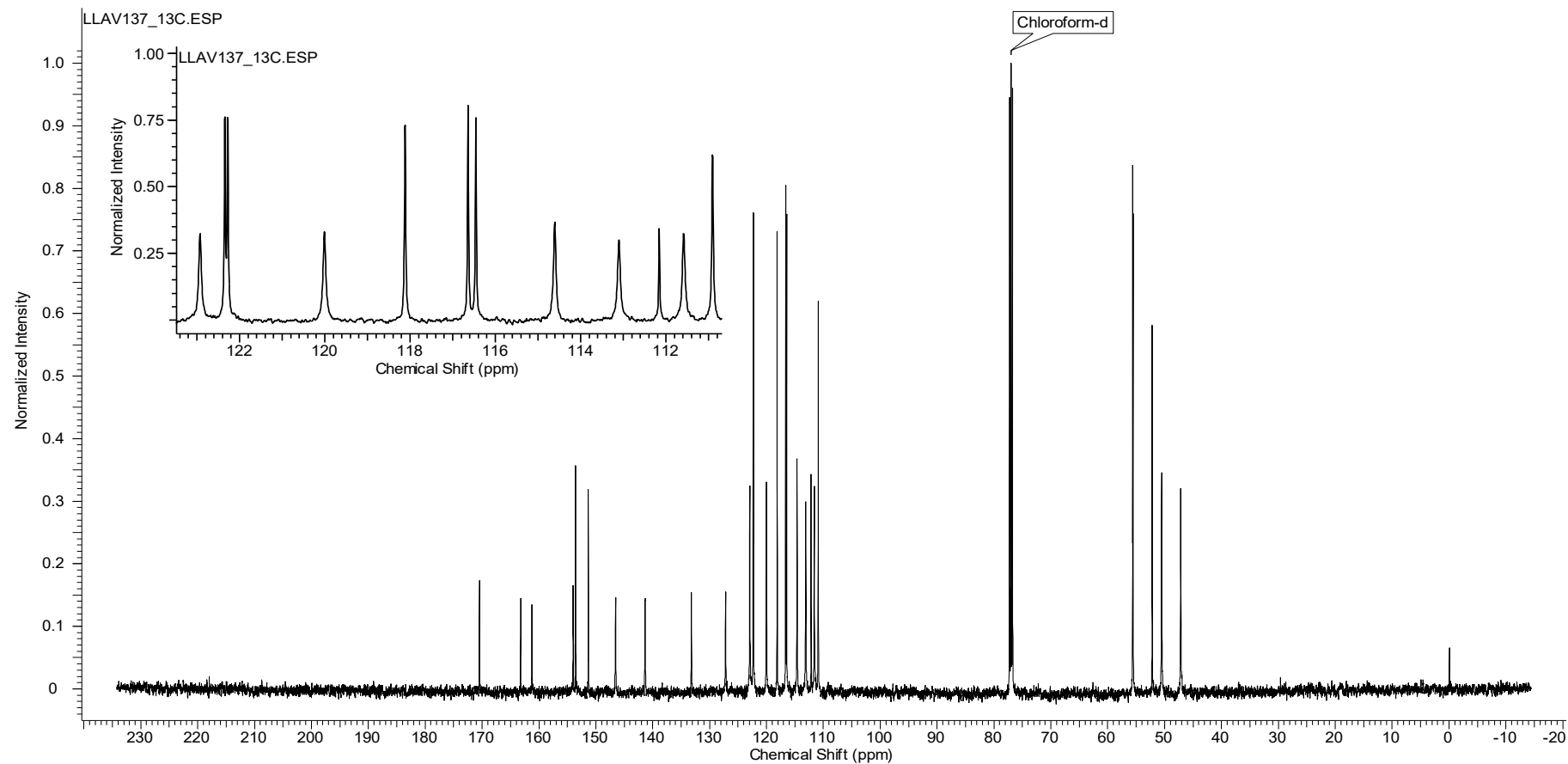
¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 10.19 (s, 1 H), 7.66 (s, 1 H), 7.61 (dt, *J*=9.29, 2.74, 2.45 Hz, 2 H), 7.44 (dt, *J*=9.39, 2.74, 2.35 Hz, 2 H), 7.27 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 7.01 (dd, *J*=9.39, 3.13 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J*=9.00 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J*=3.13 Hz, 1 H), 6.80 (d, *J*=9.00 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=8.80, 2.93 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.50 (s, 2 H), 3.87 (s, 3 H), 3.78 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)



Anexo D — Espectro de RMN ¹H de **45b**

Acquisition Time (sec)	1.0486	Comment	LLAV137	Date	Nov 28 2019
File Name	F:\2-APQ1 2014 (Lavendustina)\1-ESPECTROS DE RMN-LAVENDUSTINA\LLAV137 (Aduto_OMe_Fluorado)\LLAV137_13C				
Frequency (MHz)	125.68	Nucleus	13C	Number of Transients	14464
Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d
Sweep Width (Hz)	31250.00	Temperature (degree C)	25.000	Original Points Count	32768
				Spectrum Offset (Hz)	13814.0830

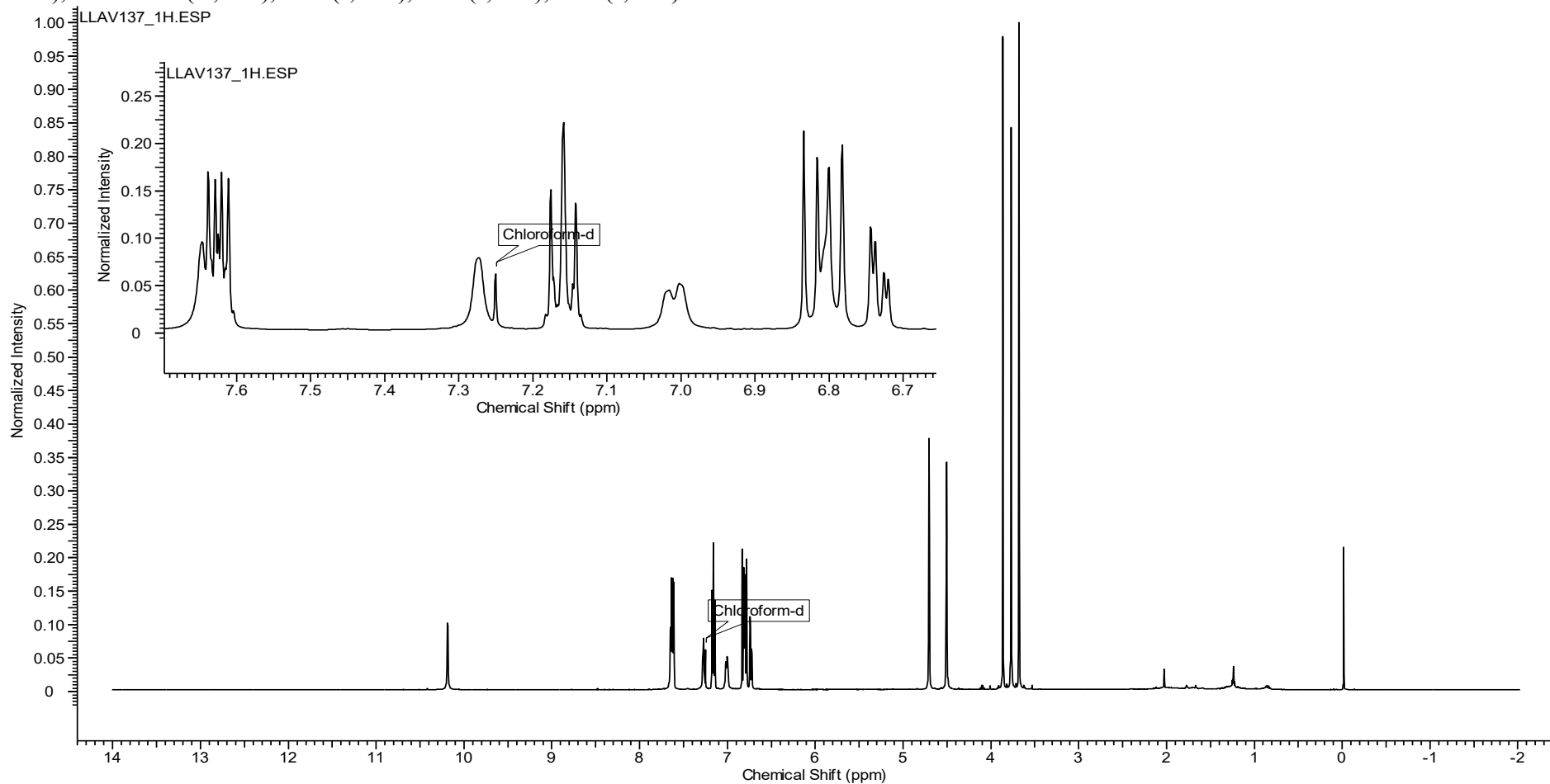
¹³C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 170.47 (s, 1 C), 162.23 (d, *J*=248.92 Hz, 1 C), 153.98 (s, 1 C), 153.56 (s, 1 C), 151.32 (s, 1 C), 146.54 (s, 1 C), 141.34 (s, 1 C), 133.19 (s, 1 C), 127.20 (s, 1 C), 122.92 (s, 1 C), 122.31 (d, *J*=7.63 Hz, 1 C), 120.01 (s, 1 C), 118.11 (s, 1 C), 116.55 (d, *J*=22.89 Hz, 1 C), 114.61 (s, 1 C), 113.11 (s, 1 C), 112.16 (s, 1 C), 111.59 (s, 1 C), 110.91 (s, 1 C), 55.62 (s, 1 C), 55.56 (s, 1 C), 52.19 (s, 1 C), 50.52 (s, 1 C), 47.18 (s, 1 C)



Anexo E — Espectro de RMN ¹³C de 45c

Acquisition Time (sec)	2.0447	Comment	LLAV137	Date	Nov 28 2019
File Name	E:\2-APQ1 2014 (Lavendustina)\1-ESPECTROS DE RMN-LAVENDUSTINA\LLAV137 (Aduto OMe Fluorado)\LLAV137_1H				
Frequency (MHz)	499.77	Nucleus	1H	Number of Transients	8
Points Count	16384	Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d
Sweep Width (Hz)	8012.82	Temperature (degree C)	25.000	Original Points Count	16384
				Spectrum Offset (Hz)	2994.1167

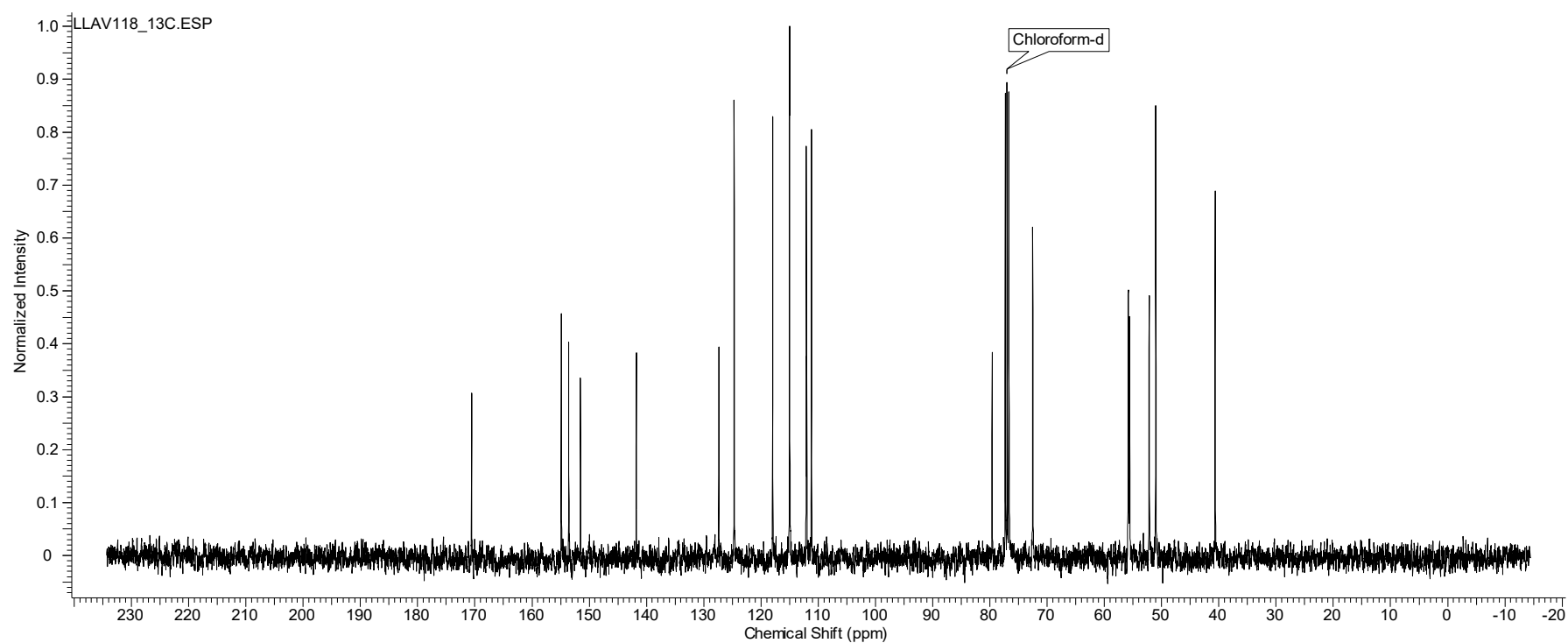
¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 10.19 (s, 1 H), 7.65 (s, 1 H), 7.62 (ddd, *J*=6.97, 4.52, 2.20 Hz, 2 H), 7.27 (s, 1 H), 7.16 (ddd, *J*=8.31, 6.36, 1.96 Hz, 2 H), 7.01 (dd, *J*=8.80, 1.96 Hz, 1 H), 6.83 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H), 6.81 (dd, 1 H), 6.79 (d, *J*=8.80 Hz, 1 H), 6.73 (dd, *J*=9.05, 3.18 Hz, 1 H), 4.70 (s, 2 H), 4.49 - 4.52 (m, 2 H), 3.86 (s, 3 H), 3.77 (s, 3 H), 3.68 (s, 3 H)



Anexo F — Espectro de RMN ¹H de 45c

Acquisition Time (sec)	1.3107	Comment	LAV118	Date	Aug 1 2019
File Name	C:\Users\Leandro\Downloads\FIDs 07-08-19\FIDs 07-08-19\LLAV118_13c			Frequency (MHz)	100.52
Nucleus	13C	Number of Transients	14464	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	11052.0635
Sweep Width (Hz)	25000.00	Temperature (degree C)	3.000		

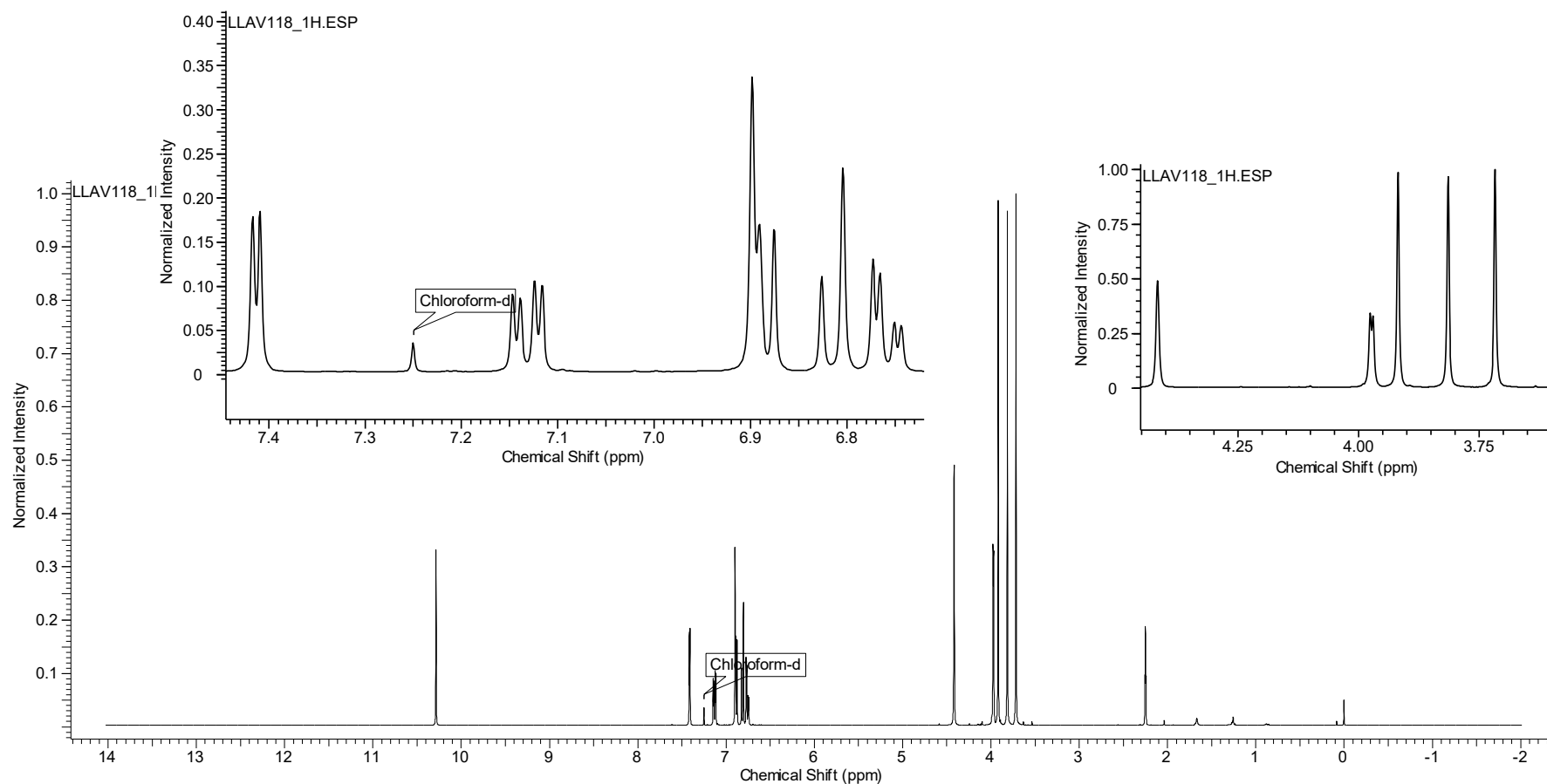
¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 170.56 (s, 1 C), 154.89 (s, 1 C), 153.59 (s, 1 C), 151.54 (s, 1 C), 141.79 (s, 1 C), 127.37 (s, 1 C), 124.69 (s, 1 C), 117.95 (s, 1 C), 115.02 (s, 1 C), 114.99 (s, 1 C), 112.08 (s, 1 C), 111.99 (s, 1 C), 111.18 (s, 1 C), 79.61 (s, 1 C), 72.51 (s, 1 C), 55.82 (s, 1 C), 55.60 (s, 1 C), 52.17 (s, 1 C), 51.01 (s, 1 C), 40.64 (s, 1 C)



Anexo G — Espectro de RMN ¹³C e ¹H de 44

Acquisition Time (sec)	2.5559	Comment	LAV118	Date	Aug 1 2019
File Name	F:\2-APQ1 2014 (Lavendustina)\ESPECTROS DE RMN-LAVENDUSTINA\LLAV118-Alcino_OMe\LLAV118_1h	Frequency (MHz)	399.74		
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Original Points Count	16384
Pulse Sequence	s2pul	Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2401.3870
Sweep Width (Hz)	6410.26	Temperature (degree C)	3.000		

^1H NMR (400 MHz, *CHLOROFORM-d*) δ ppm 10.29 (s, 1 H), 7.41 (d, $J=3.13$ Hz, 1 H), 7.13 (dd, $J=9.19, 2.93$ Hz, 1 H), 6.89 (d, $J=3.13$ Hz, 1 H), 6.89 (d, $J=9.00$ Hz, 1 H), 6.82 (d, $J=8.61$ Hz, 1 H), 6.76 (dd, $J=8.80, 2.93$ Hz, 1 H), 4.42 (s, 2 H), 3.97 (d, $J=2.35$ Hz, 2 H), 3.92 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 3.70 - 3.73 (m, 3 H), 2.25 (t, $J=2.15$ Hz, 1 H)



Anexo H — Espectro de RMN de ^1H de 44