

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

DANILO NASCIMENTO FARAGO

INVESTIGAÇÃO DE UMA CLASSE DE ARILMORFOLINAS CONTRA A DOENÇA DE
CHAGAS E LEISHMANIOSE: PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E
AVALIAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*

Uberlândia, MG

2025

INVESTIGAÇÃO DE UMA CLASSE DE ARILMORFOLINAS CONTRA A DOENÇA DE
CHAGAS E LEISHMANIOSE: PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E AVALIAÇÃO
BIOLÓGICA *IN VITRO*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química

Linha de Pesquisa: Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Uberlândia, MG

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F219 Farago, Danilo Nascimento, 1997-
2025 INVESTIGAÇÃO DE UMA CLASSE DE ARILMORFOLINAS CONTRA A
DOENÇA DE CHAGAS E LEISHMANIOSE [recurso eletrônico] :
PLANEJAMENTO MOLECULAR, SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN
VITRO / Danilo Nascimento Farago. - 2025.

Orientador: Celso de Oliveira Rezende Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.450>
Inclui bibliografia.

1. Química. I. Rezende Júnior, Celso de Oliveira ,1987-, (Orient.).
II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química.
III. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 51 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.ig.ufu.br - cpquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 410, PPGQUI				
Data:	Vinte e quatro de julho de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	16:50
Matrícula do Discente:	12322QMI008				
Nome do Discente:	Danilo Nascimento Farago				
Título do Trabalho:	“Investigação de uma classe de arilmorfolinas contra a doença de chagas e leishmaniose: planejamento molecular, síntese e avaliação biológica <i>in vitro</i> ”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de novos agentes antiparasitários para tratamento das Leishmanioses e Doença de Chagas				
ODS 03	ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bemestar para todos, em todas as idades				

Reuniu-se,	por	webconferência,	no	link
https://teams.microsoft.com/l/meetupjoin/19%3aGj29xNYfu3n3ilSwRf3jElBmanw7oMuQ0KrlNfJcvs1%40thread.tacv2/1749115799587?context=%7b%22Tid%22%3a%22cd5e6d23-cb99-4189-88ab-1a9021a0c451%22%2c%22Oid%22%3a%222ecde213-61de4c81-b9def777fb029a7%22%7d,	a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: Raquel Maria Ferreira de Sousa , da Universidade Federal de Uberlândia - UFU/IQUFU; Rafael Mafrá de Paula Dias , da Universidade Federal de São João del-Rei - UFSJ e Celso de Oliveira Rezende Júnior , orientador(a) do candidato(a).			

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr(a). **Celso de Oliveira Rezende Júnior**, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2025, às 16:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do **Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015**.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2025, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do **Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015**.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Mafrá de Paula Dias, Usuário Externo**, em 24/07/2025, às 22:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do **Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015**.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6429653** e o código CRC **55DEE0AD**.

Referência: Processo nº 23117.041037/2025-42

SEI nº 6429653

Dedico este trabalho a minha família, pelo
estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família: ao meu pai, Cariolano; à minha irmã Karollyne; e aos meus sobrinhos, Júlia e Theo, pelo amor, carinho e compreensão. Sem vocês, eu não estaria onde estou.

Um agradecimento especial à minha mãe, Luciene, que partiu desta vida, mas que sempre estará em meu coração. Sempre me lembrarei de todo o seu carinho.

Agradeço ao professor e amigo Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior pelo incentivo e orientação, fundamentais para o desenvolvimento do meu conhecimento e da minha trajetória acadêmica. Sua dedicação e paciência foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do LaSFar — Douglas Davison, Ieda, Meiry, Rafaela, Júlia e Ana Paula — agradeço por me acompanharem e ajudarem ao longo dessa jornada. Aos meus amigos, em especial ao Guilherme e a Déborah, sou grato pelo apoio constante durante todos esses anos de mestrado. Sem o suporte de vocês e os momentos de descontração que tivemos, certamente eu já teria enlouquecido há muito tempo.

Agradeço imensamente à Dra. Silvana Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ, em Belo Horizonte, pela realização dos ensaios biológicos contra os parasitas e de citotoxicidade. Também agradeço ao Prof. Leonardo L. G. Ferreira, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP), pela realização dos ensaios de perfil farmacocinético *in vitro*. Ao técnico Magayver e à Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), agradeço a coleta dos dados de RMN.

Sou grato, ainda, aos técnicos, professores e demais funcionários do Instituto de Química e da Universidade Federal de Uberlândia. Sem o apoio de vocês, este trabalho não seria possível.

Agradeço aos membros da banca, Prof. Dr. Rafael Mafra de Paula Dias e Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Por fim, agradeço aos órgãos de financiamento: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa; ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio essencial ao desenvolvimento deste projeto.

Obrigado!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos alguma coisa.”
(Freire, 2002, p. 69)

RESUMO

Neste trabalho foi investigada a atividade biológica de 25 compostos da classe das arilmorfolinas contra as formas amastigotas dos parasitas *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e *L. infantum* (*L. infantum*), causadores da doença de Chagas e da leishmaniose visceral, respectivamente. Esses compostos foram obtidos por meio de uma rota sintética simples, iniciando pela reação de Substituição Nucleofílica Aromática, seguida pela redução do grupo nitro por hidrogenação catalítica e finalizando com a amidação, e foram caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C APT. O *hit 1* apresentou alta potência contra *T. cruzi* (IC_{50} 0,76 μM e IS 109,5) e moderada contra *L. infantum* (IC_{50} 10,7 μM e IS 36,3). Entretanto, foram identificadas algumas limitações no perfil farmacocinético *in vitro*, como baixa solubilidade cinética, alta instabilidade metabólica e baixa permeabilidade TGI, atribuídas ao alto caráter lipofílico do composto. Dessa forma, com base na análise da relação estrutura-atividade (SAR), foram feitas modificações estruturais nos fragmentos benzoil, aril central e morfolina, com o objetivo de superar essas limitações, por meio da avaliação dos valores teóricos de clogP . Foi feita a investigação da remoção dos grupos metoxila, a introdução de um nitrogênio endocíclico aos anéis aromáticos, a remoção da morfolina e a troca do grupo trifluorometil (CF_3) por outros substituintes. O derivado mais promissor contra *T. cruzi* no fragmento benzoil foi o **10** (IC_{50} 2,1 μM e clogP 2,26), com o nitrogênio endocíclico na posição *orto* e a hidroxila na posição *para*, enquanto no fragmento aril central foi o derivado **21** (IC_{50} <4,3 μM e clogP 2,66) com o flúor diretamente ligado ao anel aromático. Já contra *L. infantum*, dois derivados apresentaram atividades equipotentes ao *hit 1*, sendo eles os derivados **9** (IC_{50} 10,8 μM e clogP 2,85) e **19** (IC_{50} 10,0 μM e clogP 3,12). O derivado **21** (IC_{50} 12,8 μM e clogP 2,66) apresentou também atividade próxima a do composto *hit 1*. Apesar disso, a atividade anti-*L. infantum* foi, em geral, de moderada a baixa, sugerindo que essa classe seja mais promissora contra o parasita *T. cruzi*. Ensaio complementares serão realizados para avaliação da melhoria do perfil farmacocinético *in vitro*, além de ensaios de atividade antiparasitária *in vivo*.

Palavras-chave: doença de Chagas; leishmaniose; arilmorfolinas.

ABSTRACT

In this work, the biological activity of 25 compounds from the arylmorpholine class was investigated against the amastigote forms of the parasites *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and *Leishmania infantum* (*L. infantum*), responsible for Chagas disease and visceral leishmaniasis, respectively. These compounds were obtained through a simple synthetic route, starting with a Nucleophilic Aromatic Substitution reaction, followed by catalytic hydrogenation of the nitro group, and finalized with an amidation reaction, and they were characterized by ¹H and ¹³C APT NMR spectroscopy. Hit **1** showed high potency against *T. cruzi* (IC₅₀ 0.76 μM and SI = 109.5) and moderate against *L. infantum* (IC₅₀ 10.7 μM and SI 36.3). However, some limitations were identified in its in vitro pharmacokinetic profile, such as low kinetic solubility, high metabolic instability, and low gastrointestinal permeability, all attributed to the compound's high lipophilicity. Therefore, based on structure–activity relationship (SAR) analysis, structural modifications were made to the benzoyl, central aryl, and morpholine fragments to overcome these limitations, through the evaluation of the theoretical clogP values. The investigation included the removal of methoxy groups, the introduction of an endocyclic nitrogen into the aromatic rings, the removal of the morpholine moiety, and the replacement of the trifluoromethyl (CF₃) group with other substituents. The most promising derivative against *T. cruzi* in the benzoyl fragment was compound **10** (IC₅₀ 2.1 μM and clogP 2.26), featuring an endocyclic nitrogen at the *ortho* position and a hydroxyl group at the *para* position. For the central aryl fragment, the most active compound was derivative **21** (IC₅₀ < 4.3 μM and clogP = 2.66), bearing a fluorine atom directly attached to the aromatic ring. Against *L. infantum*, two derivatives showed equivalent activities to hit **1**, compound **9** (IC₅₀ 10.8 μM and clogP 2.85) and compound **19** (IC₅₀ 10.0 μM and clogP 3.12). Compound **21** (IC₅₀ = 12.8 μM and clogP = 2.66) also exhibited activity close to that of the reference compound. Nonetheless, the anti-*L. infantum* activity observed in this series was generally moderate to low, suggesting that this class is more promising against *T. cruzi*. Additional studies will be conducted to evaluate improvements in the in vitro pharmacokinetic profile, as well as in vivo antiparasitic activity of the most potent and pharmacokinetically favorable compounds.

Keywords: Chagas disease; leishmaniasis; arylmorpholines.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Análise retrossintética para a obtenção do <i>hit 1</i>	27
Esquema 2 – Rota sintética para a obtenção da anilina 5a	27
Esquema 3– Proposta de mecanismo para a reação de S _N Ar.	28
Esquema 4 – Síntese do <i>hit 1</i> utilizando a condição de amidação a.....	28
Esquema 5 – Proposta de mecanismo para a reação de amidação com HBTU.....	29
Esquema 6 – Síntese do <i>hit 1</i> utilizando condição de amidação b.	29
Esquema 7 – Proposta de mecanismo para formação do cloreto de acila.	30
Esquema 8– Proposta de mecanismo para reação de amidação com cloreto de acila.	30
Esquema 9 – Representação geral da rota sintética dos derivados.....	36
Esquema 10 – Síntese dos derivados 8-14 utilizando HBTU.....	37
Esquema 11 – Síntese dos derivados 15-17 utilizando cloreto de acila.	37
Esquema 12 – Síntese do derivado 18 utilizando EDC.....	38
Esquema 13 – Reação de desmetilação do <i>hit 1</i> para obtenção do derivado 19	38
Esquema 14 – Reação de metilação do composto 10 para obtenção do derivado 20	40
Esquema 15 – Reação de S _N Ar para obtenção dos intermediários 4b-e	40
Esquema 16 – Reação de S _N Ar para obtenção do intermediário 4f	40
Esquema 17 – Proposta de mecanismo para a seletividade da substituição na posição <i>orto</i> . ..	41
Esquema 18 – Reação de redução do grupo nitro para obtenção dos intermediários 5b-d	41
Esquema 19 – reação de redução do intermediário 4e	42
Esquema 20- Reação de redução do grupo nitro do intermediário 4f	42
Esquema 21 – Reação de amidação para obtenção dos derivados 21-24	42
Esquema 22 – Reação de amidação para o composto 25	43
Esquema 23 – Reação de amidação com o cloreto de acila para derivado 26	43
Esquema 24 – Reação de S _N Ar para obtenção dos intermediários 4g-i	43
Esquema 25 – Reação de proteção com Boc ₂ O do intermediário 4j	44
Esquema 26 – Reação de redução do grupo nitro dos intermediários 5g-i	44
Esquema 27 – Reação de amidação com o cloreto de acila dos derivados 27 e 28	45
Esquema 28 – Reação de amidação com HBTU dos derivados 29 e 30	45
Esquema 29 – Reação desproteção com TFA do derivado 29	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo evolutivo do parasita <i>T. cruzi</i>	19
Figura 2 – Ciclo evolutivo do parasita <i>T. cruzi</i>	20
Figura 3 – Estrutura dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.	20
Figura 4 – Estrutura dos principais fármacos contra a leishmaniose.	22
Figura 5 – Estrutura do <i>hit 1</i> reportado por Peña e colaboradores (2015).	25
Figura 6– Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do <i>hit 1</i>	32
Figura 7– Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do <i>hit 1</i>	33
Figura 8 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 19	39
Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto 8	46
Figura 10 – Espectro de RMN de ^{13}C Figura 11 (101 MHz, CDCl_3) do composto 8	47
Figura 12 – Conformações espaciais das metoxilas nos derivados 15 e 11	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de atividade antiparasitária e citotoxicidade do <i>hit 1</i>	34
Tabela 2 – Resultados dos ensaios <i>in vitro</i> de ADME do <i>hit 1</i>	35
Tabela 3. Resultados de atividade dos derivados benzoil.	49
Tabela 4. Resultados de atividade dos derivados com o anel heterocíclico.	51
Tabela 5 – Resultados dos ensaios biológicos das modificações no anel central.....	53
Tabela 6 – Resultados dos ensaios biológicos do derivado 25	55
Tabela 7 - Resultados dos ensaios biológicos dos derivados com modificação na morfolina.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AmB	Anfotericina B
APT	<i>Attached Proton Test</i>
Bzn	Benznidazol
CCC	Cardiomiopatia Chagásica Crônica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CPP	Coluna de Placa Preparativa
DCM	Diclorometano
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DMAP	4-DiMetilAminioPiridina
DMF	Dimetilformamida
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)Carbodiimida
Et ₃ N	Trietilamina
HBTU	Hexafluorofosfato de Benzotriazolil-Tetrametil-Urônio
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HTS	Triagem Automatizada em Larga Escala (<i>High throughputScreening</i>)
MeOH	Metanol
N.D.	Não Determinados
N.T.	Não Testados
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	Partes Por Milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAR	Relação Estrutura-Atividade (<i>Structure-Activity Relationship</i>)
S _N Ar	Substituição Nucleofílica Aromática
TFA	Ácido Tricloroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas	17
1.2	Doença de Chagas	17
1.3	Leishmaniose	21
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos específicos	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	Planejamento, síntese e caracterização do <i>hit</i> 1	27
4.2	Ensaio biológico <i>in vitro</i> do <i>hit</i> 1.....	33
4.3	Desenvolvimento dos derivados do <i>hit</i> 1	35
4.3.1	<i>Planejamento, síntese e caracterização dos derivados</i>	<i>35</i>
4.3.1.1	<i>Síntese dos derivados com modificações no fragmento benzoil.....</i>	<i>36</i>
4.3.1.2	<i>Síntese dos derivados com modificação no fragmento aril central.....</i>	<i>40</i>
4.3.1.3	<i>Síntese dos derivados com modificação no fragmento morfolina</i>	<i>43</i>
4.3.2	<i>Resultados dos ensaios biológicos.....</i>	<i>48</i>
4.3.2.1	<i>Resultados das modificações no fragmento Benzoil.....</i>	<i>48</i>
4.3.2.2	<i>Resultados das modificações no fragmento aril central.....</i>	<i>52</i>
4.3.2.3	<i>Resultados das modificações no fragmento Morfolina</i>	<i>55</i>
5	METODOLOGIA.....	58
5.1	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	58
5.2	Procedimento experimental de síntese.....	58
5.2.1	<i>Procedimento geral A: para a reação de S_NAr</i>	<i>58</i>
5.2.1.1	<i>Síntese do intermediário 4a</i>	<i>59</i>
5.2.1.2	<i>Síntese do intermediário 4b</i>	<i>59</i>
5.2.1.3	<i>Síntese do intermediário 4c</i>	<i>59</i>
5.2.1.4	<i>Síntese do intermediário 4d</i>	<i>60</i>
5.2.1.5	<i>Síntese do intermediário 4e</i>	<i>60</i>
5.2.1.6	<i>Síntese do intermediário 4g</i>	<i>61</i>
5.2.1.7	<i>Síntese do intermediário 4h</i>	<i>61</i>
5.2.1.8	<i>Síntese do intermediário 4i</i>	<i>61</i>

5.2.2 Procedimento de síntese do intermediário 4f.....	62
5.2.3 Procedimento para a síntese do intermediário 4j	62
5.2.4 Procedimento geral B para reação de redução do grupo nitro.....	63
5.2.4.1 Síntese do intermediário 5a	63
5.2.4.2 Síntese do intermediário 5b	64
5.2.4.3 Síntese do intermediário 5c	64
5.2.4.4 Síntese do intermediário 5d	64
5.2.4.5 Síntese do intermediário 5e	65
5.2.4.6 Síntese do intermediário 5g	65
5.2.4.7 Síntese do intermediário 5h	66
5.2.4.8 Síntese do intermediário 5i	66
5.2.5 Procedimento para a síntese do intermediário 5f.....	66
5.2.6 Procedimento geral C para a reação de amidação com HBTU.....	67
5.2.7 Procedimento geral D para a reação de amidação via cloreto de acila.....	75
5.2.7.1 Síntese do Hit 1	75
5.2.7.2 Síntese do composto 15.....	76
5.2.7.3 Síntese do composto 16.....	76
5.2.7.4 Síntese do composto 17.....	77
5.2.7.5 Síntese do composto 26.....	77
5.2.7.6 Síntese do composto 27.....	78
5.2.7.7 Síntese do composto 28.....	79
5.2.8 Procedimento para a síntese do composto 18	79
5.2.9 Procedimento para a síntese do composto 19	80
5.2.10 Procedimento para a síntese do composto 20	81
5.2.11 Procedimento para a síntese do composto 31	81
5.2.12 Procedimento dos ensaios biológicos contra <i>L. infantum</i>.....	82
5.2.12.1 Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i>	82
5.2.12.2 Avaliação da citotoxicidade.....	83
5.2.13 Procedimento dos ensaios biológicos contra o <i>T. cruzi</i>.....	83
5.2.13.1 Avaliação <i>in vitro</i> da potência	83
5.2.13.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da célula L929	84
5.2.14 Procedimento dos ensaios farmacocinéticos	84
5.2.14.1 Determinação experimental do coeficiente de distribuição (eLogD pH 7.4)	85
5.2.14.2 Estabilidade metabólica.....	85

5.2.14.3	<i>Ensaaios de permeabilidade</i>	86
5.2.14.4	<i>Solubilidade cinética</i>	87
6	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um subconjunto de infecções causadas por diversos patógenos, estando, muitas vezes, relacionadas a comunidades de baixas condições sociais em regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece cerca de 20 infecções e condições como DTNs (entre elas, as causadas por parasitas, vermes, bactérias e toxinas), porém alguns autores expandem essa lista para mais de 40 infecções (Hotez *et al.*, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), [s.d.]).

Com um importante impacto socioeconômico ao redor do mundo, as DTNs são um grande problema de saúde pública, sendo um risco para mais de 1,7 bilhão de pessoas no mundo e causando a morte de aproximadamente 200 mil pessoas por ano. Entre 2016-2020 foram detectados mais de 500 mil casos de DTNs no Brasil, com média de 116 mil casos por ano, sendo cerca de 43% na região Nordeste (Ministério Da Saúde, 2024a; Santos *et al.*, 2020).

Além disso, as mudanças climáticas têm causado um grande impacto nas DTNs, em especial, devido ao aumento das temperaturas. Esse impacto está relacionado principalmente ao aumento no número de casos, periodicidade e tempo de contágio, surgimento de novos casos em regiões não endêmicas, entre outros fatores. Entretanto, essas questões podem ser atribuídas também a outros fatores humanos, como a globalização, o crescimento populacional, a urbanização e a migração humana (Tidman; Abela-Ridder; De Castañeda, 2021).

Dentro desse grupo de doenças, se encontram a doença de Chagas e a leishmaniose, causadas por protozoários parasitas da família *Trypanosomatidae*, responsável por diversas infecções classificadas como doenças negligenciadas (Lapierre *et al.*, 2024)

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas (também conhecida como tripanossomíase americana), é uma infecção causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), com mais de sete milhões de pessoas infectadas e 25 milhões de pessoas em risco de infecção ao redor do mundo. Apesar de endêmica na América Latina, essa infecção tem sido mais consistentemente detectada, nas últimas décadas, em regiões não endêmicas como a Europa (com pelo menos 180 mil casos) e América do Norte (com 350 mil casos). Em países endêmicos, a principal

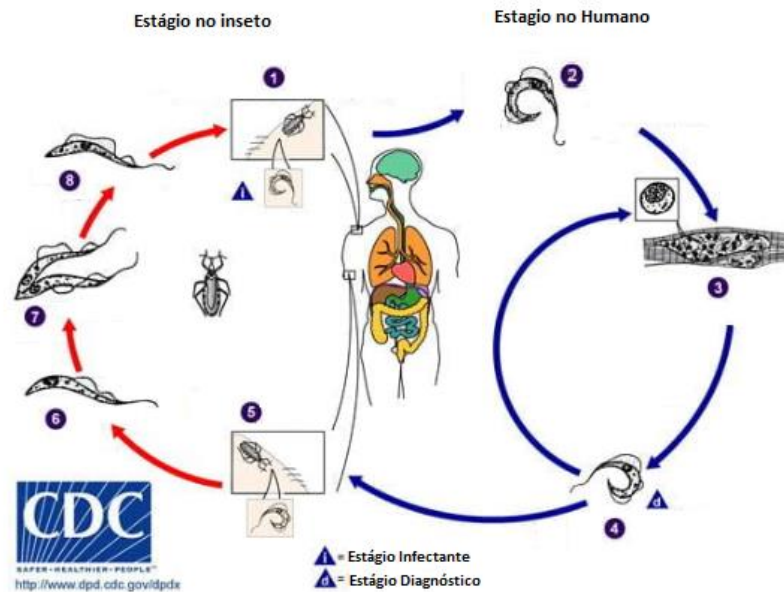
forma de transmissão do parasita ocorre de forma oral ou por meio dos vetores, sendo o principal vetor o mosquito barbeiro (Caldas; Santos; Novaes, 2019).

Pertencente a ordem Kinetoplastida e a família *Trypanosomatidae*, o *T. cruzi* é caracterizado pela presença de um flagelo, sendo a sua identificação relativamente fácil devido a seu cinetoplasto (estrutura contendo DNA dentro da mitocôndria) volumoso. Para o desenvolvimento de seu ciclo evolutivo, são necessários dois hospedeiros, um invertebrado (vetor) e um vertebrado. Ele se apresenta em três formas: a tripomastigota (sendo o estágio contaminante), a epimastigota (forma replicativa não infecciosa no vetor) e a amastigota (forma replicativa na célula do hospedeiro vertebrado) (Avelar, 2008).

Na transmissão vetorial clássica (figura 1), o ciclo biológico se inicia quando um inseto se alimenta de um mamífero contaminado e incorpora o parasita tripomastigota circulante. Ele irá se diferenciar na forma amastigota, se proliferar no trato gastrointestinal e voltar para a forma tripomastigota metacíclica no reto do vetor. Ao realizar um novo repasto sanguíneo em um indivíduo não contaminado, o vetor irá liberar o parasita, através das fezes, chegando até o sistema circulatório por meio de lesões na pele, iniciando o ciclo no hospedeiro mamífero (Martín-Escolano *et al.*, 2022; Martinho, 2021; Urbina, 1999).

Ao penetrar o sistema circulatório, o parasita irá se diferenciar na forma amastigota e invadir o citoplasma da célula, onde se multiplicará por fissão binária, até ser convertido novamente a forma tripomastigota e romper a membrana celular, através do movimento contínuo e intenso. Ao romper a membrana, o parasita poderá invadir células adjacentes ou entrar na corrente sanguínea ou linfática para serem disseminados. Uma vez na corrente sanguínea, os parasitas podem contaminar novos vetores que realizarem o repasto sanguíneo, continuando o seu ciclo evolutivo (Martín-Escolano *et al.*, 2022; Martinho, 2021).

Figura 1 – Ciclo evolutivo do parasita *T. cruzi*.



Fonte: Imagem adaptada do Manual MSD (2023).

Vale lembrar que o ciclo evolutivo clássico é superficial e que o processo em hospedeiros mamíferos é mais complexo do que o relatado acima. O comportamento biológico do parasita pode variar de acordo com a proporção das formas dos parasitas no hospedeiro, que por sua vez pode ser dependente com a cepa do *T. cruzi* (Martín-Escolano *et al.*, 2022).

A infecção por *T. cruzi* se desenvolve inicialmente pela fase aguda, caracterizada pela alta presença de parasita no sangue (podendo ser facilmente detectada pela observação em microscópio), geralmente, assintomática ou com poucos sintomas como febre, anorexia ou taquicardia. Na maioria das vezes, essas manifestações desaparecem espontaneamente e os indivíduos infectados não desenvolvem os sintomas relacionados a doença de Chagas. Entretanto, cerca de 30% dos indivíduos irão progredir para a fase crônica da doença, apresentando complicações neurológicas, digestivas e/ou cardíacas, sendo a mais severa delas (e a principal causa de mortalidade da doença), a Cardiomiopatia Chagásica Crônica (CCC), caracterizada pela inflamação crônica do coração. Esse processo de desenvolvimento da doença está representado na Figura 2 (Caldas; Santos; Novaes, 2019; Fleau *et al.*, 2019; Lidani *et al.*, 2019).

Figura 2 – Ciclo evolutivo do parasita *T. cruzi*.

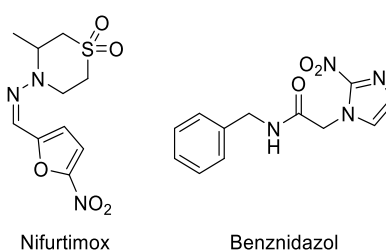


Fonte: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2023).

Os medicamentos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas incluem o Nifurtimox e Benznidazol (Figura 3), compostos nitro heterocíclicos com efeitos colaterais graves (DE SOUZA et al., 2020; HERCOS et al., 2024).

O Nifurtimox foi o primeiro medicamento utilizado contra a doença de Chagas e possui baixa eficácia na fase crônica, sendo mais eficaz em crianças com a fase aguda da doença ou em adultos recentemente infectados. Com um longo tempo de tratamento (60-90 dias), apresenta alguns efeitos colaterais frequentes como anorexia, perda de peso, parestesia, náusea, vomito e cólicas intestinais. Entretanto, o seu uso clínico foi substituído pelo Benznidazol, uma vez que esse último apresenta efeitos colaterais menos intensos com eficácia similar ao do Nifurtimox. Os efeitos colaterais mais frequentes do Benznidazol são manifestações na pele, parestesia, neuropatia periférica, anorexia e perda de peso, com a diminuição da medula óssea, surgimento de manchas roxas na pele e agranulocitose sendo as manifestações mais graves (Sales Junior *et al.*, 2017).

Figura 3 – Estrutura dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol.



Fonte: Autor

Os mecanismos de ação desses dois medicamentos estão associados à enzima nitro-redutase, responsável pela bioativação de compostos nitroheterociclos em *T. cruzi*, gerando espécies reativas que causam a morte do parasita. Dessa forma a diminuição da atividade dessa enzima gera resistência ao Nifurtimox e ao Benznidazol (Santos *et al.*, 2020). O Benznidazol atua modificando covalentemente macromoléculas como DNA, proteína e lipídeos, diminuindo a proliferação do parasita. Por sua vez, o Nifurtimox, produz radicais nitro-aniônicos que podem

sofrer oxidação e originar metabólitos contendo espécies reativas de oxigênios altamente tóxicas (Sales Junior *et al.*, 2017).

1.3 Leishmaniose

As leishmanioses, por sua vez, são um conjunto de DTNs causadas por diversas espécies de protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*. Com mais de um milhão de novos casos de infecção por ano e causando a morte de 20 a 40 mil pessoas anualmente, está em segundo lugar no rank de mortalidade entre as doenças negligenciadas (Lal *et al.*, 2023; McNamara *et al.*, 2022).

Esses parasitas são transmitidos para os mamíferos hospedeiro por meio de vetores, sendo o principal deles as fêmeas do mosquito-palha. Diversas espécies de *Leishmania* podem causar diferentes tipos de manifestações clínicas das leishmanioses, onde a forma mais severa é a leishmaniose visceral, geralmente fatal caso não seja tratada (Burza; Croft; Boelaert, 2018). No subcontinente Indiano e no leste da África, o principal causador da leishmaniose visceral (também chamada de calazar) é a espécie *L. donovani*, enquanto na Europa e América Latina, é causada principalmente pela espécie *L. infantum* (Mishra *et al.*, 2021).

Em 2024, o Ministério da Saúde lançou um painel para o monitoramento da situação epidemiológica da leishmaniose no Brasil, permitindo o monitoramento e avaliação mais precisa das tendências e áreas com maior ocorrência. Através dessa ferramenta foi possível identificar o registro de mais de 13 mil casos de leishmaniose tegumentar em 2023 (com os estados da Região Norte sendo os mais afetados), e uma média de 2 mil casos de leishmaniose visceral por ano com surtos localizados, especialmente na Norte e Nordeste (Ministério Da Saúde, 2024b).

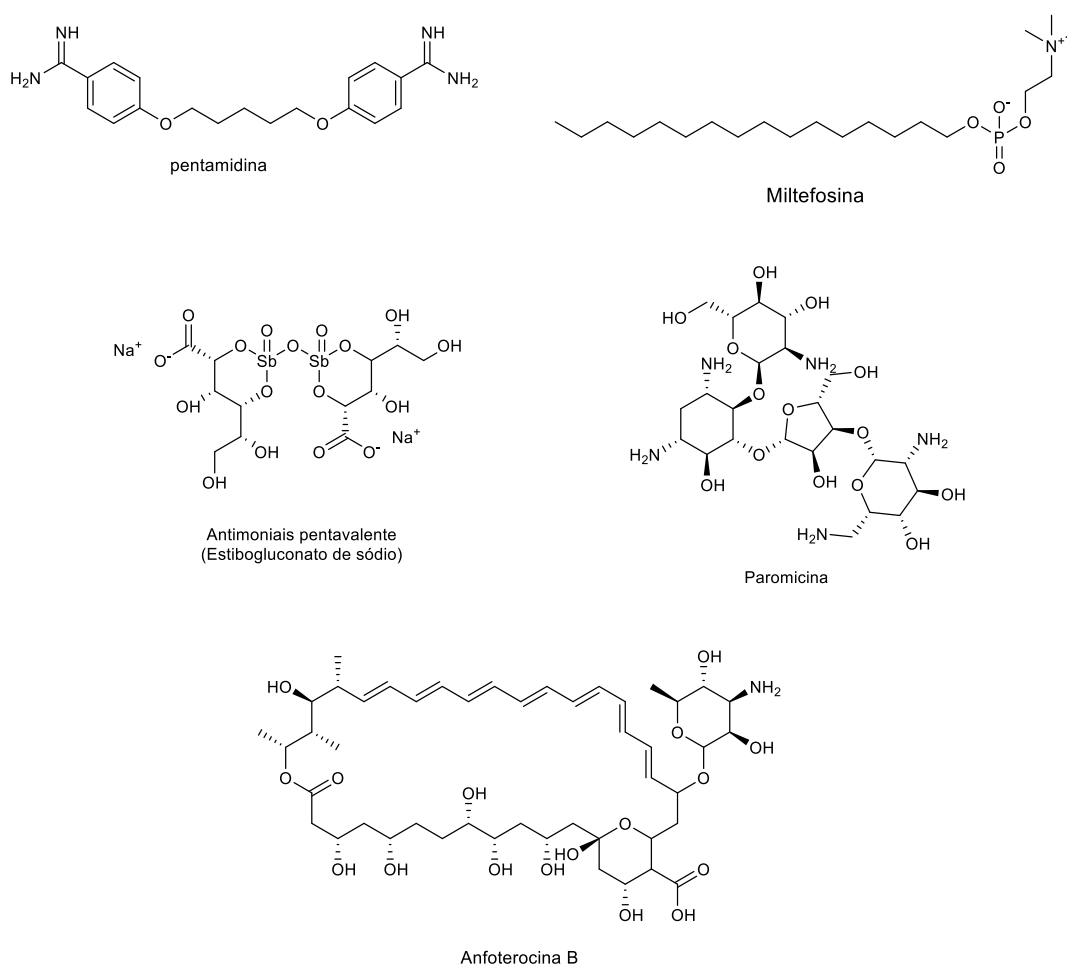
A transmissão vetorial da leishmaniose se inicia quando as fêmeas realizam o repasto sanguíneo, se alimentando de indivíduos infectados e ingerindo macrófagos com a forma amastigota do parasita. Em seguida, ao atingir o intestino do inseto, ocorre o rompimento dos macrófagos e a liberação da forma amastigota, que irá se multiplicar por divisão binária e se diferenciar em promastigota (forma flagelada). As promastigotas irão colonizar o esôfago e a faringe do vetor até se diferenciarem na forma promastigota metacíclicas, as formas infectantes do parasita (Boechat, 2015).

Quando o vetor realizar um novo repasto sanguíneo, ele irá regurgitar a forma promastigota metacíclica e os macrófagos irão fagocitar o parasita, na derme do hospedeiro. Em seguida, irá ocorrer a diferenciação para a forma amastigota e a replicação por divisão

binária até o rompimento do macrófago. Uma vez no espaço intercelular, as amastigotas liberadas serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo, de forma que ocorra a disseminação hematogênica.

Atualmente, existem diversos medicamentos disponíveis para o tratamento contra a leishmaniose visceral, dentre eles: os antimoniais pentavalentes (Pentostam e Glucantime), miltefosina, paromicina, pentamidina e a anfotericina B (Figura 2). Esses fármacos possuem mecanismos de ação distintos um do outro, sendo que alguns desses mecanismos ainda não são bem definidos (HERCOS et al., 2024; MISHRA et al., 2021).

Figura 4 – Estrutura dos principais fármacos contra a leishmaniose.



Fonte: Autor

Porém, cada um desses medicamentos possui uma série de limitações, como a alta toxicidade, que gera efeitos colaterais graves, eficácia limitada, resistência dos parasitas, além do alto custo e longo tempo de tratamento. Além disso, desconforto e dor devido a aplicação por via parental de alguns desses medicamentos também são preocupações no tratamento das leishmanioses. Para superar essa limitação, investigações estão sendo feitas para o desenvolvimento de novas formulações que possibilitem o uso tópico de medicamentos contra

a leishmaniose cutânea, além da busca de novos fármacos capazes de atuar por via oral contra a leishmaniose visceral e cutânea (Santos *et al.*, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Como apontado por Lal et al. (2023) e McNamara et al. (2022), o longo tempo de tratamento, o elevado nível de toxicidade e o surgimento de espécies resistentes aos medicamentos atualmente disponíveis, são alguns dos principais obstáculos enfrentados para o controle e erradicação da leishmaniose. Além disso, a administração por via parental (ou seja, diretamente na corrente sanguínea) e o alto custo tornam a acessibilidade ao tratamento ainda mais escasso, especialmente em áreas de baixa infraestrutura e recursos limitados, onde a doença é mais prevalente.

A doença de Chagas possui um tratamento com maior eficácia na fase aguda – que geralmente ocorre sem o diagnóstico do paciente, por não apresentar sintomas característicos – e eficácia limitada na fase crônica, momento em que os sintomas característicos da doença costumam aparecer. Além disso, a duração prolongada do tratamento e os efeitos adversos severos associados à alta toxicidade dos fármacos acabam levando muitos pacientes a interromper o tratamento antes da conclusão, comprometendo ainda mais o controle da doença (Brak *et al.*, 2010; Fleau *et al.*, 2019).

Todos esses fatores aliados ao aparecimento de casos em regiões que antes não eram endêmicas, o aumento na periodicidade e no tempo dos surtos epidemiológicos – resultantes das mudanças climáticas e da globalização – evidenciam a urgência para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra as DTNs, em especial a doença de Chagas e a leishmaniose (Fleau *et al.*, 2019; Tidman; Abela-Ridder; De Castañeda, 2021).

Assim, existe uma intensa colaboração entre a indústria farmacêutica e a academia em busca de desenvolver novos compostos que possam atuar como novos fármacos contra essas doenças, com diversos trabalhos sendo publicados dentro desse tema. As duas principais formas utilizadas para a identificação de novos compostos capazes de agirem como fármacos são: a abordagem fenotípica (na qual, não se tem nenhuma informação sobre o alvo molecular) e a abordagem baseada no alvo (em que se tem conhecimento do alvo molecular específico do composto). Além disso, outra abordagem bastante utilizada é a de reposicionamento de fármacos, onde um medicamento já utilizado contra uma doença é avaliado contra outra doença, podendo economizar tempo uma vez que os efeitos colaterais do medicamento no corpo já são conhecidos (J; Musuvathi; Chanda, 2021; McNamara *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2020).

A abordagem por alvo molecular tem sido utilizada na busca de novos compostos contra a doença de Chagas, onde diversos alvos já foram estudados e identificados, dentre eles: a via de biossíntese do ergosterol, a cruzaina e tripanotiona redutase, estando essa última presente

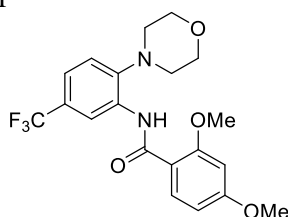
também nos parasitas do gênero *Leishmania*, com alguns antidepressivos, ansiolíticos e antipsicóticos tendo demonstrado atividade tripanocida pela inibição da enzima. Outra estratégia nessa busca é a utilização de complexos fármaco-metal e a combinação de terapias com pacientes na fase crônica da doença de Chagas.

Para a leishmaniose, novas formulações de compostos já utilizados foram avaliadas, além da utilização de tratamentos tópicos, nanotubos de carbono como carregadores de fármacos. A estratégia mais utilizada para a leishmaniose é o reposicionamento de fármaco, com grande parte dos fármacos disponível atualmente sendo resultado de reposicionamento (Santos *et al.*, 2020).

Dentre esses diversos trabalhos publicados, nosso grupo selecionou o trabalho realizado por Peña e colaboradores (2015), onde foram testados, através de uma triagem automatizada em larga escala (do inglês *High Throughput Screening*, HTS), cerca de 1,8 milhões de compostos da biblioteca Glaxo Smith Kline contra os parasitas *T. cruzi* e *L. donovani*.

Dentre esses compostos avaliados, o *hit 1* (Figura 4) foi selecionado por apresentar uma atividade biológica interessante, com uma potência adequada contra os dois parasitas (com IC_{50} de até 5,0 μM) e baixa citotoxicidade (CC_{50} HepG2 > 100 μM). Além disso, o composto possui uma estrutura simples, com a possibilidade de realização de modificações estruturais, permitindo a exploração da relação estrutura-atividade dessa classe de compostos, obtendo-os por meio de reações relativamente simples.

Figura 5 – Estrutura do *hit 1* reportado por Peña e colaboradores (2015).



Hit 1

IC_{50} *L. donovani*: 5,0 μM

IC_{50} *T. cruzi*: 1,0 μM

CC_{50} HepG2: > 100 μM

Fonte: Autor

O *hit 1* foi, portanto, selecionado para este trabalho, a fim de investigar e otimizar a potência contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*, através da realização de modificações estruturais. Além disso, foi realizada também a investigação do perfil farmacocinético *in vitro* dos compostos mais promissores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar e otimizar a atividade biológica de uma série de compostos da classe arilmorfolinas contra o *T. cruzi* e a *L. infantum*.

3.2 Objetivos específicos

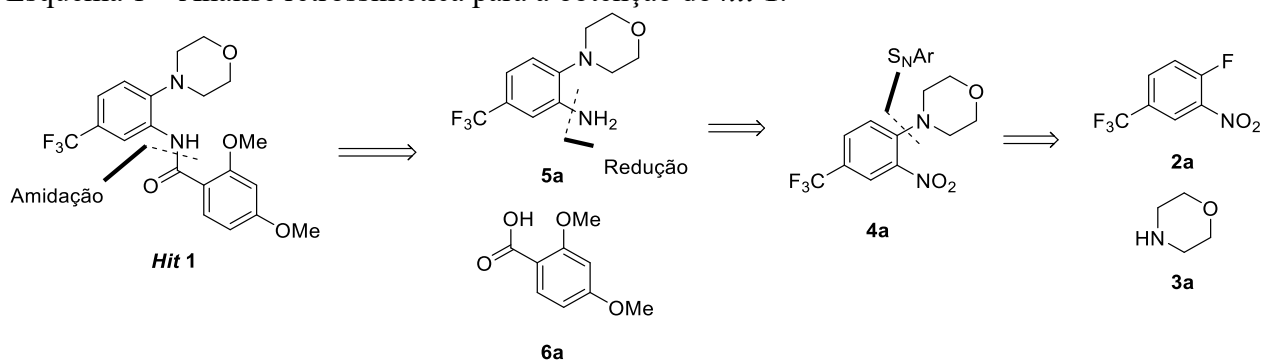
- Sintetizar, purificar e caracterizar o *hit 1*.
- Determinar a atividade biológica do *hit 1* contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*, além da sua citotoxicidade e perfil farmacocinético *in vitro*.
- Planejar, sintetizar e caracterizar derivados com modificações estruturais no *hit 1*.
- Avaliar a potência e citotoxicidade dos derivados sintetizados contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*.
- Avaliar o perfil farmacocinético dos compostos mais potentes, através de ensaios *in vitro* de Absorção, Distribuição e Metabolismo (ADME).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento, síntese e caracterização do *hit 1*

A primeira etapa do projeto foi a síntese e caracterização do *hit 1*, para validar a potência contra os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*. Para isso, foi feita uma análise retrossintética do composto, onde foi possível observar que o mesmo poderia ser obtido através de uma reação de amidação com o ácido carboxílico **6a** e a anilina **5a**, obtida da redução do grupo nitro do composto **4a**. O composto **4a**, por sua vez, poderia ser obtido por uma reação de Substituição Nucleofílica Aromática (S_NAr) entre o fluoreto **2a** e a morfolina **3a** (Esquema 1).

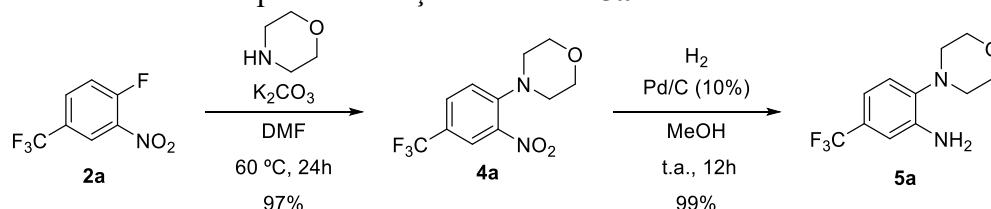
Esquema 1 – Análise retrossintética para a obtenção do *hit 1*.



Fonte: Autor

Com a rota sintética definida, iniciou o processo de síntese do *hit 1*, primeiro pela reação de S_NAr com o fluoreto **2a** e a morfolina **3a**, na presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) como base em dimetilformamida (DMF) a 60 °C, obtendo o intermediário **4a** com 97% de rendimento após 24 horas de reação. Em seguida, o grupo nitro do intermediário **4a** foi reduzido por hidrogenação catalítica em metanol (MeOH), a temperatura ambiente e 12 horas de reação, levando à obtenção da anilina **5a** com 99% de rendimento (Esquema 2).

Esquema 2 – Rota sintética para a obtenção da anilina **5a**.

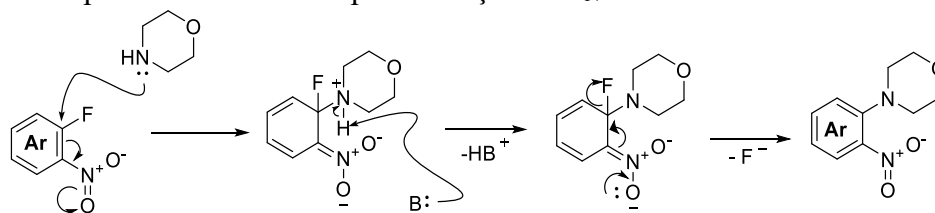


Fonte: Autor.

O grupo nitro presente na reação de S_NAr desempenha um papel extremamente importante nesse mecanismo, pois ele é responsável por estabilizar a carga após o ataque nucleofílico da amina. Assim quando a base desprotonar o hidrogênio da morfolina, o grupo

nitro irá reestabelecer a aromaticidade do anel e o halogênio irá ser removido formando o produto (Esquema 3).

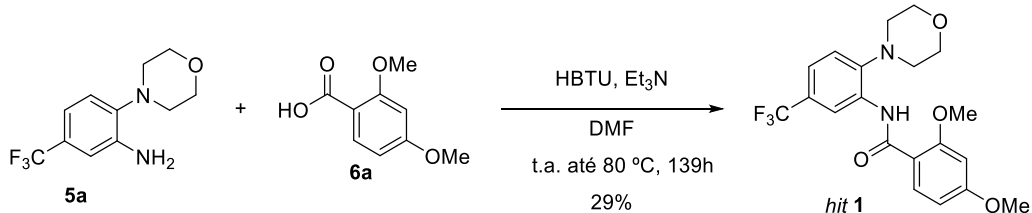
Esquema 3– Proposta de mecanismo para a reação de S_NAr .



Fonte: Autor.

Com a anilina **5a** obtida, o *hit 1* poderia ser obtido através de uma reação de amidação, porém, devido à baixa reatividade da anilina (cujo pares de elétrons estão em ressonância com o anel aromático), duas condições de amidação foram avaliadas. Na primeira condição (a), a anilina **5a** foi reagida com o ácido carboxílico **6a**, utilizando o Hexafluorofosfato de Benzotriazolil-Tetrametil-Urônio (HBTU) como reagente de acoplamento e a trietilamina (Et_3N) como base, em DMF. A reação ficou em agitação, inicialmente a temperatura ambiente, aumentando gradativamente a temperatura até 80 °C. Após 139 horas de reação, o *hit 1* foi obtido com 29% de rendimento (Esquema 4).

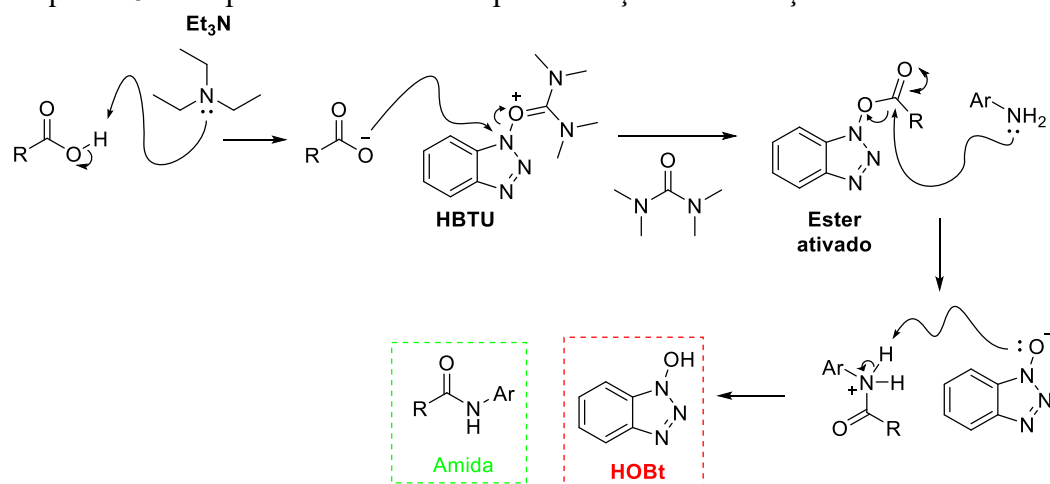
Esquema 4 – Síntese do *hit 1* utilizando a condição de amidação a.



Fonte: Autor

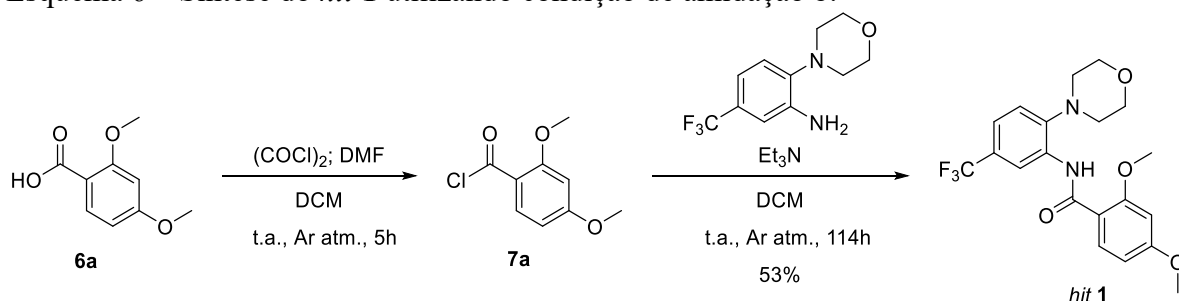
Nessa condição, o HBTU funcionaria como um reagente de acoplamento, realizando uma reação de condensação com o ácido carboxílico, formando o éster ativado como intermediário. Esse éster ativado, por sua vez, possuiria um melhor grupo abandonador quando a anilina realizasse o ataque a carbonila, formando o intermediário que pode ser desprotonado, levando a obtenção da amida e do 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) (Esquema 5).

Esquema 5 – Proposta de mecanismo para a reação de amidação com HBTU.



Fonte: Autor

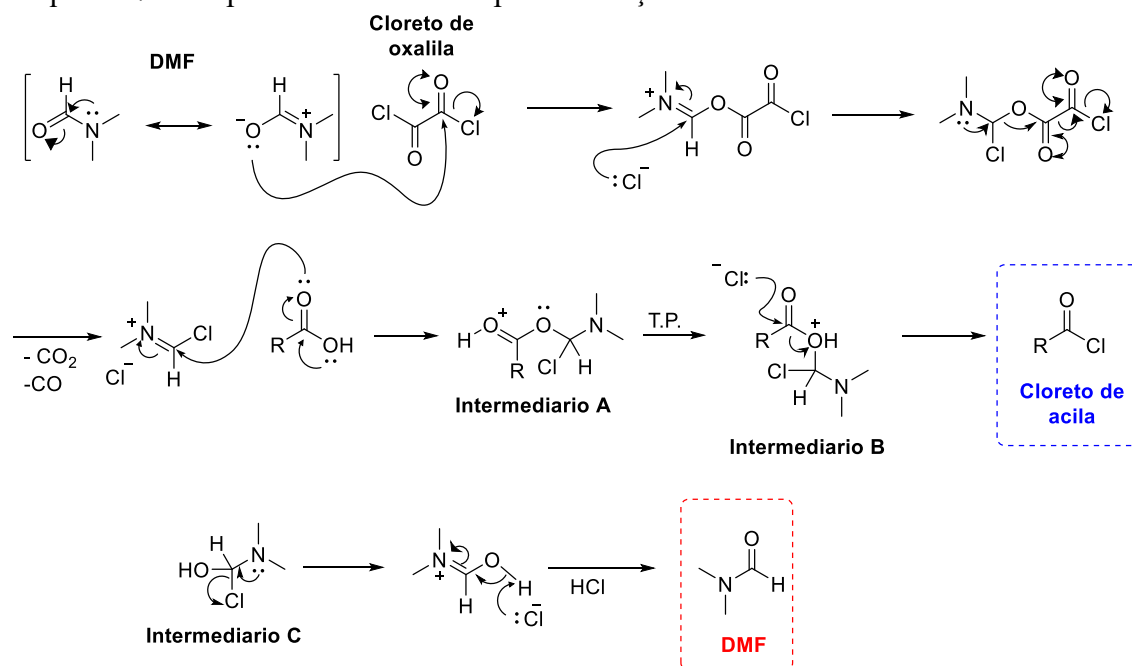
Na segunda condição (b), o ácido carboxílico foi convertido no cloreto de acila correspondente, através da reação com o cloreto de oxalila e DMF anidro como catalisador em diclorometano (DCM) anidro, a temperatura ambiente e atmosfera de argônio. Em seguida, o cloreto de acila foi submetido a uma reação de amidação com a anilina **5a**, na presença de Et_3N anidra em diclorometano anidro, a temperatura ambiente e atmosfera de argônio por 114 horas, levando a obtenção do *hit 1* com 53% de rendimento (Esquema 6).

Esquema 6 – Síntese do *hit 1* utilizando condição de amidação b.

Fonte: Autor

Aqui o mecanismo iria ocorrer em duas etapas, com a primeira etapa sendo a formação do cloreto de acila, com o DMF catalítico reagindo com o cloreto de oxalila para formar o sal intermediário, que sofreria o ataque do ácido carboxílico. Em seguida, o intermediário A iria realizar uma transferência de prótons gerando o intermediário B, que seria atacado pelo cloreto gerando o cloreto de acila e o intermediário C, que seria convertido a DMF, com a liberação de HCl (Esquema 7).

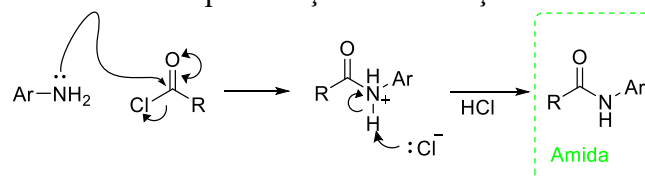
Esquema 7 – Proposta de mecanismo para formação do cloreto de acila.



Fonte: Autor

A segunda etapa seria a formação da amida, através do ataque do par de elétrons da anilina a carbonila e a saída do cloro. A formação do cloreto de acila resultaria em um material altamente reativo que seria facilmente atacado pela anilina, resultando na formação da amida com a liberação de HCl (Esquema 8).

Esquema 8– Proposta de mecanismo para reação de amidação com cloreto de acila.



Fonte: Autor

As duas condições levaram à obtenção do *hit 1* com rendimentos satisfatórios. Contudo a reação utilizando o cloreto de acila resultou em um rendimento superior àquela com o HBTU, além de possibilitar a realização em condições mais brandas de temperatura. Esses resultados já eram esperados, uma vez que o cloro é um grupo de saída mais eficiente, por suportar melhor a carga eletronegativa, tornando o cloreto de acila mais reativo que o éster ativado. Entretanto, devido a sua alta reatividade, o cloreto de acila possui uma alta instabilidade, podendo ser facilmente hidrolisado de volta ao ácido carboxílico, tornando-o mais difícil de manusear do que o HBTU.

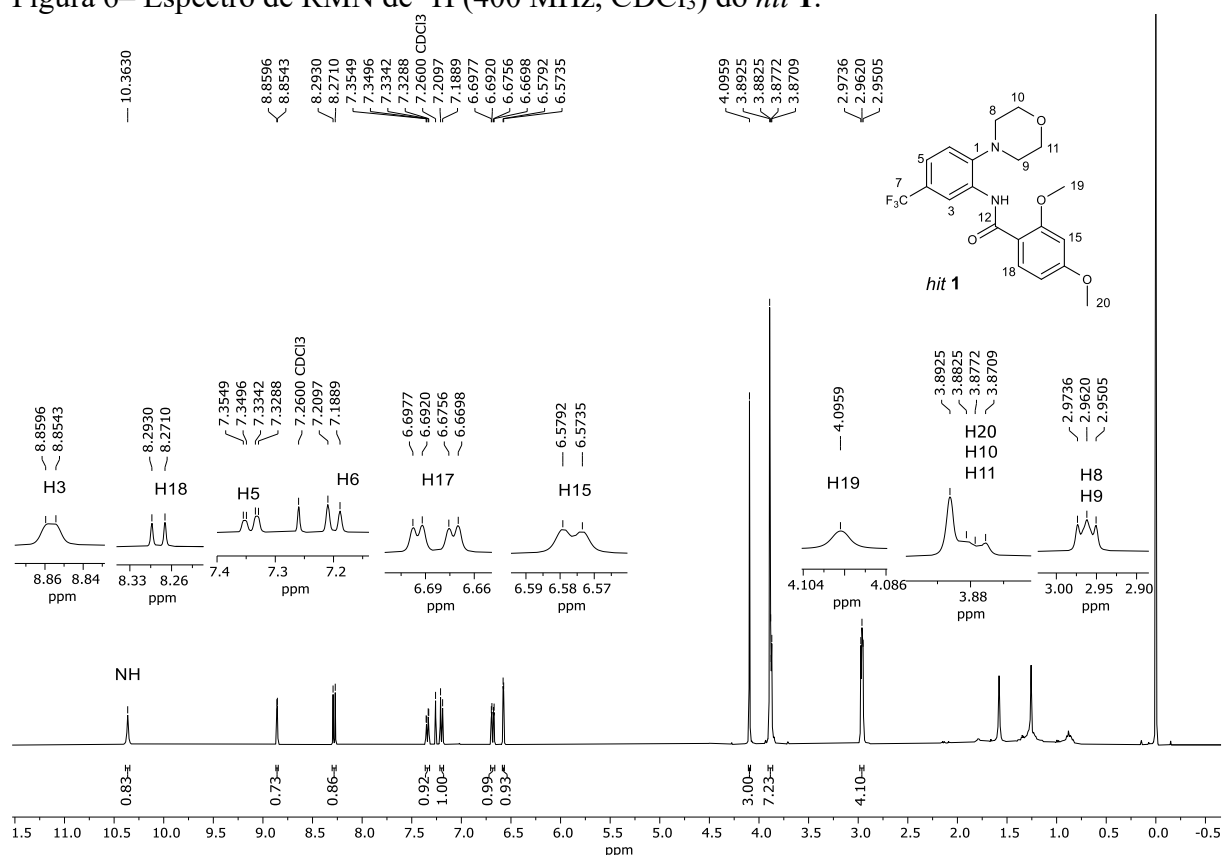
Por fim, o *hit 1* foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C, utilizando clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente. Nos espectros de RMN de ¹H

(Figura 6), foi possível observar dez sinais referentes aos hidrogênios do *hit 1*, com os deslocamentos expressos em parte por milhão (ppm) e as integrais representando a quantidade de hidrogênios no sinal. As atribuições desses sinais podem ser observadas no espectro com os hidrogênios acima do sinal ou dentro das expansões.

O singlete em 10.36 ppm foi atribuído ao hidrogênio do NH e os sinais situados entre 9.00 ppm e 6.00 ppm, foram atribuídos aos hidrogênios dos anéis aromáticos. Na região dos aromáticos, o duplete mais deslocado em 8.86 ppm ($J = 2.1$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio H3, por ser o mais desprotegido, devido a sua proximidade ao CF₃ e ao nitrogênio, que podem retirar elétrons por indução. Esse hidrogênio é um duplete com baixa multiplicidade, resultante do seu acoplamento *meta* com o hidrogênio H5, um duplete duplo em 7.34 ppm ($J = 8.3, 2.1$ Hz), que por sua vez, realiza também um acoplamento *orto* com o hidrogênio H6, um duplete em 7.20 ppm ($J = 8.3$ Hz). Em relação aos hidrogênios aromáticos do fragmento benzoyl, o sinal referente ao hidrogênio H15 foi atribuído ao duplete mais protegido em 6.58 ppm ($J = 2.3$ Hz), por estar entre dois grupos doadores de elétrons por ressonância. Já o hidrogênio H17 foi atribuído ao duplete duplo em 6.68 ppm ($J = 8.8, 2.3$ Hz), por causa do seu acoplamento *meta* com o H15 e do seu acoplamento *orto* com o H18, atribuído ao duplete em 8.28 ppm ($J = 8.8$ Hz).

Nos alifáticos, foi possível observar o singlete em 4.10 ppm referente aos hidrogênios H19 da metoxila, um triplete em 2.96 ppm ($J = 4.6$ Hz) dos hidrogênios H8 e H9 da morfolina. Os sinais referentes aos hidrogênios H20 da metoxila, H10 e H11 da morfolina, eram esperados serem um singlete e um triplete, respectivamente, porém, devido à proximidade dos dois sinais, foi observado um único multiplete 3.91 – 3.86 ppm para os sete hidrogênios. As duas metoxilas foram diferenciadas pelo deslocamento de seus respectivos sinais, uma vez que o par de elétrons da metoxila H19 pode realizar uma interação intermolecular de ligação de hidrogênio com o NH da amida, o que causaria uma diminuição na blindagem dos hidrogênios e, conseqüentemente, um maior deslocamento. Os hidrogênios H10 e H11 da morfolina, por sua vez, estão mais deslocados no espectro devido à proximidade do oxigênio, que atrai a nuvem eletrônica por causa da sua maior eletronegatividade. Esses deslocamentos corroboram com os dados obtidos através da predição teórica do espectro pelo MestReNova.

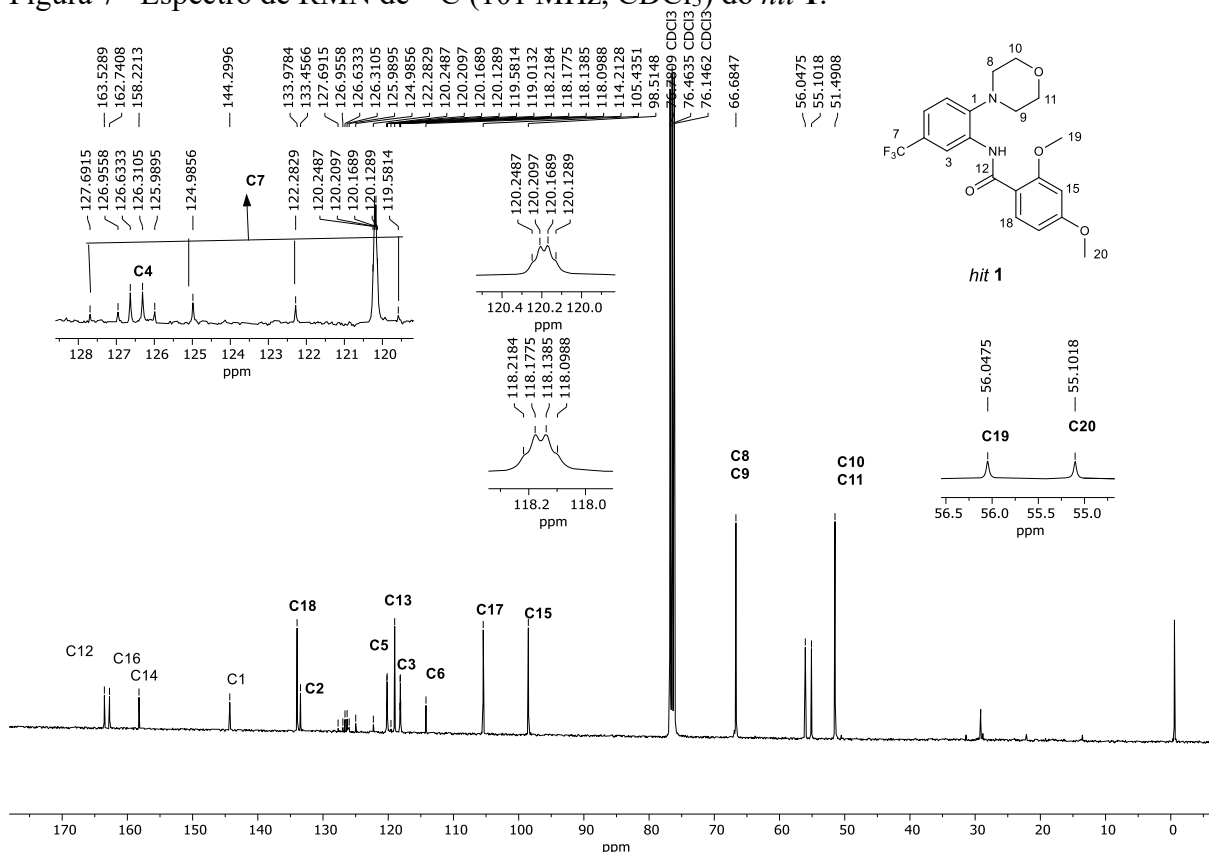
Figura 6— Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *hit 1*.



Fonte: Autor

No RMN de ^{13}C (Figura 7), foi possível observar os sinais referentes a carbonila (163.53 ppm), aos carbonos dos anéis aromáticos e do CF_3 entre 163.0 ppm e 90 ppm, além dos sinais da morfolina (56.1 ppm e 55.1 ppm) e das metoxilas (66.7 ppm e 51.5 ppm). Nesse espectro, alguns sinais apresentaram multiplicidade, devido ao acoplamento C-F, sendo os sinais referentes: ao carbono do CF_3 , C7 (123.6 ppm, q, $J = 272.0$ Hz), ao carbono do anel aromático diretamente ligado a ele, C4 (126.5 ppm, q, $J = 32.4$ Hz), e aos carbonos do anel aromático adjacentes, C5 (120.2 ppm, q, $J = 4.0$ Hz) e C4 (118.2 ppm, q, $J = 4.1$ Hz).

Figura 7– Espectro de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do *hit 1*.



Fonte: Autor

Dessa forma, após a caracterização do composto, seguiu para a próxima etapa do projeto, com a realização dos ensaios biológicos.

4.2 Ensaios biológicos *in vitro* do *hit 1*

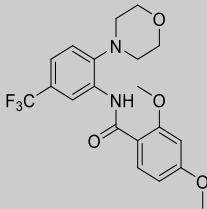
Com a obtenção do *hit 1*, foram realizados os ensaios fenotípicos de atividade antiparasitária e citotoxicidade *in vitro*, feitos pela dra. Silvana Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte. O composto foi avaliado contra a forma amastigota dos parasitas *T. cruzi* e *L. infantum*, seguido dos ensaios de citotoxicidade contra as respectivas células hospedeiras dos parasitas, a L929 e a THP-1.

A atividade antiparasitária do composto foi medida e sua potência foi expressa através do IC_{50} que indica a concentração necessária para reduzir 50% da população do parasita. Assim, quanto menor esse valor, maior a potência do composto. De forma similar, a citotoxicidade do composto é medida pelo CC_{50} , que representa a concentração necessária para diminuir em 50% da viabilidade celular, assim, quanto maior for esse valor, menor a citotoxicidade do composto. Com esses dois dados, é possível calcular a seletividade do composto pelo parasita por meio do

Índice de Seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$), onde quanto maior esse valor, mais seletivo é o composto.

Esses dados de potência podem ser observados na tabela 1. O composto demonstrou ser mais ativo contra o parasita *T. cruzi*, com uma alta potência e baixa citotoxicidade. O *hit 1* apresentou também atividade contra *L. infantum*, apesar de não ser tão alta quanto a potência contra o *T. cruzi*.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios de atividade antiparasitária e citotoxicidade do *hit 1*.

Composto	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μ M)	CC ₅₀ L929 (μ M)	IS <i>T. cruzi</i>	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μ M)	CC ₅₀ THP-1 (μ M)	IS <i>L. infantum</i>
 Hit 1	0,76±0,02	82,7	109,5	10,7±1,2	390,4±1,6	36,3
Bzn	3,8	2381	627	N.T.	N.T.	N.D.
AmB	N.T.	N.T.	N.D.	0,25±0,04	363,8	1455

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado.

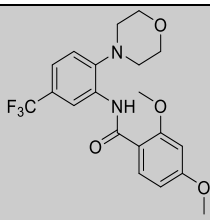
Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.

Esses resultados indicaram uma boa potência e seletividade do composto, o que motivou a realização de ensaios farmacocinéticos *in vitro* de ADME. O perfil farmacocinético de um composto desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Esse parâmetro é o responsável por definir o custo, a eficácia, a segurança e adesão ao tratamento. Diversos autores consideram o perfil farmacocinético impróprio como o responsável por grande parte das falhas no processo de desenvolvimento de novos fármacos (Pantaleão *et al.*, 2022).

Esses ensaios foram realizados pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do professor Leonardo L. G. Ferreira. Os resultados desses ensaios podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos ensaios *in vitro* de ADME do *hit 1*

Composto	e _{log} (D) ^a (pH 7,4)	e _{log} (S) ^b	Solubilidade cinética ^c	Permeabilidade TGI ^d e classificação	t _{1/2} ^e e Cl _{int} ^f em MLM com NADPH
 Hit 1	4,60	-5,39 (pH = 2,0)	4,10 µM (pH 2.0) 6,15 µM (pH 7.4)	0,78 x 10 ⁻⁶ cm/s	15,61 min
		-5,21 (pH = 7,4)		Baixa permeabilidade	177,60 µL/min/mg

(a) coeficiente de partição experimental em pH fisiológico, indicando a lipofilicidade do composto; (b) coeficiente de solubilidade em água calculado experimentalmente em pH 2.0 e 7.4; (c) solubilidade experimental do composto em água; (d) permeabilidade gastrointestinal, capacidade de atravessar a barreira do intestino e atingir a circulação sistêmica; (e) tempo de meia-vida, tempo necessário para diminuir em 50% a concentração do composto; (f) clearance intrínseco com microsossomos de fígado de camundongo.

Os resultados dos ensaios *in vitro* do perfil farmacocinético do composto evidenciam algumas limitações, como o alto caráter lipofílico e baixa solubilidade do composto em água. Além disso, o composto apresentou também baixa estabilidade metabólica, sendo facilmente excretado pelo organismo, como pode ser observado pelo seu tempo de meia vida (t_{1/2}) e pelo *clearance* em MLM com NADPH.

Portanto, torna-se evidente a necessidade de realização de modificações estruturais no composto, visando a melhoria do perfil farmacocinético e a otimização da potência, por meio da análise da relação estrutura-atividade para identificar os grupos farmacofóricos.

4.3 Desenvolvimento dos derivados do *hit 1*

4.3.1 Planejamento, síntese e caracterização dos derivados

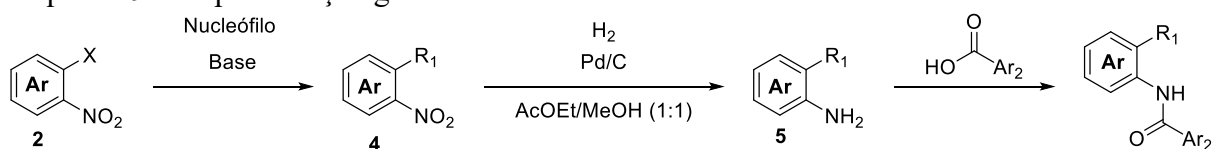
Assim, modificações químicas no *hit 1* foram planejadas e desenvolvidas com o objetivo de superar essas limitações, além de realizar uma análise da Relação Estrutura-Atividade (do inglês *Structure-Activity Relationship*, SAR), por meio da substituição, adição e remoção de substituintes que possam estar relacionados aos mecanismos de metabolização, ao caráter lipofílico e a solubilidade em água.

A lipofilicidade de um composto contribui imensamente para o seu perfil ADME, contribuindo para a sua solubilidade, permeabilidade, potência e seletividade, além de impactar em sua metabolização e excreção. Uma alta lipofilicidade do composto pode resultar em uma baixa solubilidade e alta instabilidade metabólica, porém se for muito baixa isso pode resultar em um baixo perfil farmacocinético. Com isso, é necessário um balanço no caráter lipofílico de compostos candidatos a fármacos, com valores de coeficiente de distribuição (logD)

considerados ideais na faixa de 1-3. Dessa forma, as limitações farmacocinéticas do composto *hit 1* podem estar associadas a seu alto caráter lipofílico. Assim, um dos parâmetros avaliados para o desenvolvimento dos derivados foi a lipofilicidade teórica dos compostos, expressa pelo valor do coeficiente de partição teórico (clogP), obtidos através da plataforma swissADME (Arnott; Planey, 2012).

Para a síntese dos derivados, foi utilizada a mesma rota sintética da síntese do *hit 1*, iniciando pela reação de S_NAr , com uma amina como nucleófilo e uma base, seguida de uma reação de redução por hidrogenação catalítica. Por fim, a síntese dos derivados foi finalizada com uma reação de amidação (Esquema 9).

Esquema 9 – Representação geral da rota sintética dos derivados.



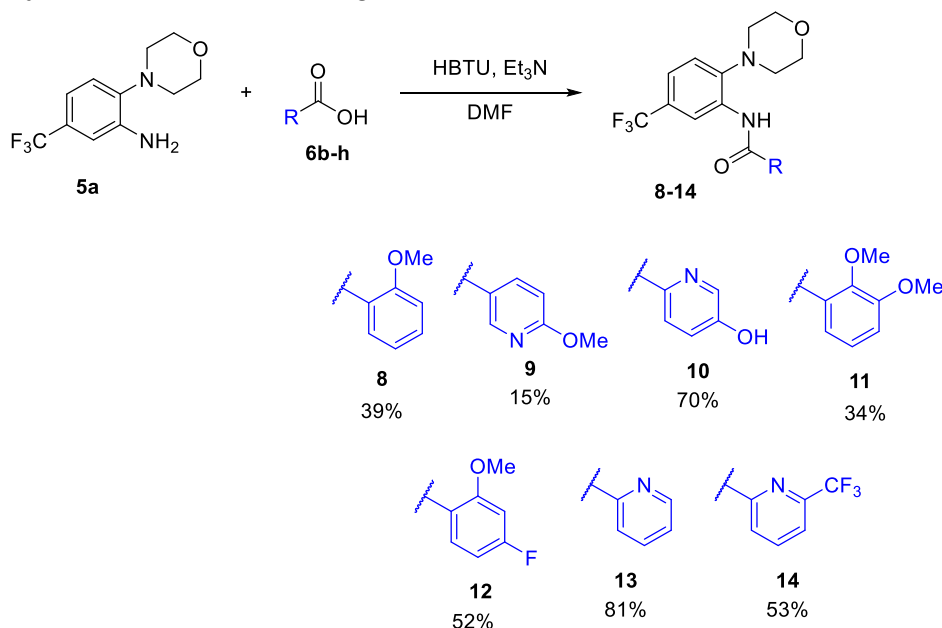
Fonte: Autor

4.3.1.1 Síntese dos derivados com modificações no fragmento benzoil

Dessa forma, as modificações foram iniciadas no fragmento benzoil e após selecionados, os derivados **8-18** foram sintetizados por meio de reações de amidação, utilizando a anilina **5a**, obtida previamente (Esquema 2).

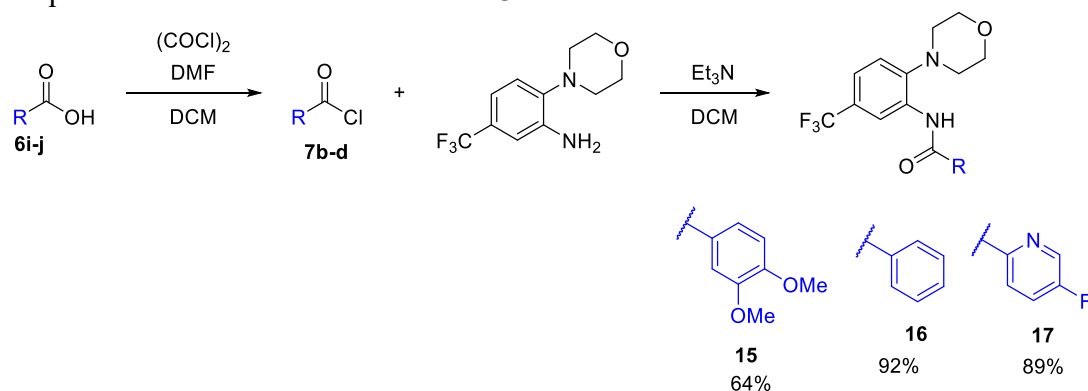
Como dito anteriormente, tanto a condição com o cloreto acila quanto a condição com o HBTU, resultaram em rendimentos satisfatórios, porém devido a facilidade do manuseio, foi utilizada a condição com HBTU para a maioria das reações de amidação. Entretanto, essa condição não foi eficaz para alguns dos compostos almejados, sendo utilizada então a condição com o cloreto de acila. Além disso, mais uma condição foi testada para o **9**, na tentativa de aumentar o rendimento utilizando uma reação de fácil manuseio.

Na primeira condição (a), utilizada para a maioria dos derivados, a reação foi feita com a anilina **5a** e o ácido carboxílico **6b-h**, utilizando o HBTU como reagente de acoplamento e Et_3N como base, em DMF com aquecimento (Esquema 10).

Esquema 10 – Síntese dos derivados **8-14** utilizando HBTU.

Fonte: Autor.

Para os compostos **15-17**, foi utilizada a condição (b) com o cloreto de acila. Para o derivado **16** foi utilizado o cloreto de acila comercial, enquanto para os outros dois foi necessário preparar os cloretos de acila. Eles foram preparados a partir da reação do ácido carboxílico correspondente com o cloreto de oxalila catalisada por DMF em DCM, com condições anidras em atmosfera de argônio a temperatura ambiente. O cloreto de acila **7b-d** reagiu com a anilina e Et_3N como base, em DCM, com condições anidras a temperatura ambiente e atmosfera de argônio (Esquema 11).

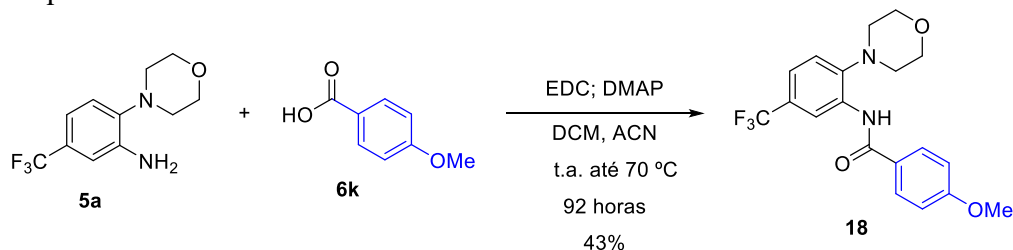
Esquema 11 – Síntese dos derivados **15-17** utilizando cloreto de acila.

Fonte: Autor.

Para o composto **18**, foi avaliada uma terceira condição (c), na busca por uma condição mais branda e de manuseio simples, como opção a condição com HBTU. Aqui a anilina **5a** foi reagida com o ácido carboxílico **6k**, na presença de 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)Carbodiimida (EDC) como reagente de acoplamento e 4-

DiMetilAminioPiridina (DMAP) como catalisador. Inicialmente a reação estava a temperatura ambiente em DCM em seguida, adicionou acetonitrila (ACN) com aquecimento aumentando gradativamente até 70 °C. Após 92 horas de reação, obtive o composto com 43% de rendimento (Esquema 12).

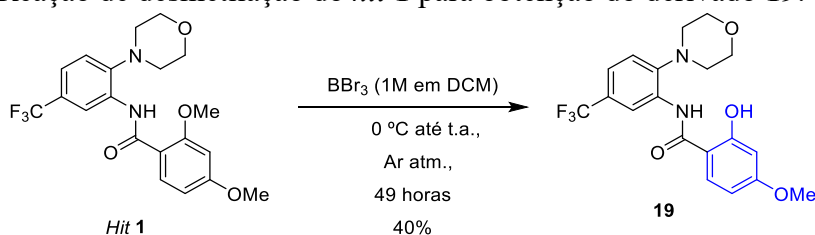
Esquema 12 – Síntese do derivado **18** utilizando EDC.



Fonte: Autor.

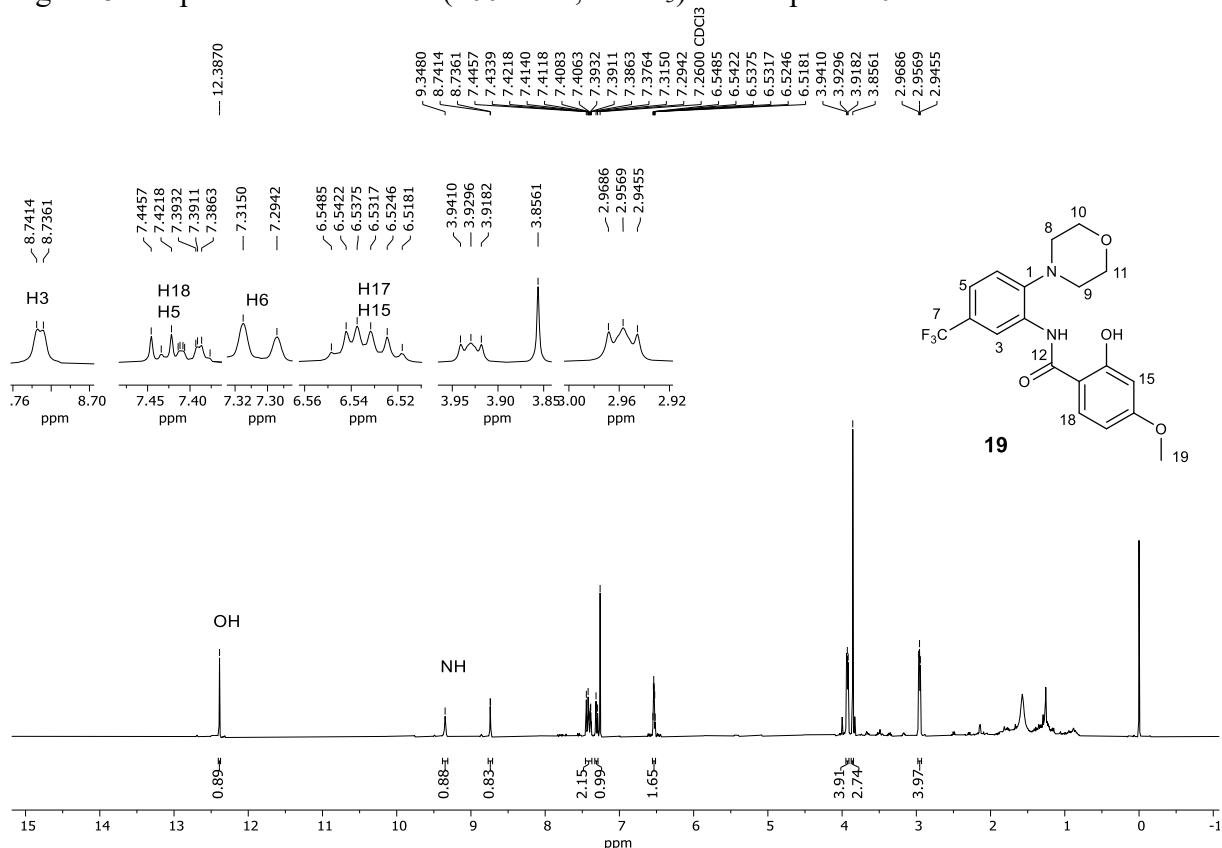
O composto **19** foi sintetizado a partir do *hit 1*, por meio de uma reação de desmetilação com BBr₃ (1M em DCM), sob atmosfera de argônio, com o meio reacional em banho de gelo até atingir a temperatura ambiente (Esquema 13).

Esquema 13 – Reação de desmetilação do *hit 1* para obtenção do derivado **19**.



Fonte: Autor

A confirmação do produto e da seletividade da desmetilação da metoxila na posição *orto*, em detrimento da metoxila na posição *para*, foi realizada por meio da análise de RMN de ¹H. A substituição do grupo metila por um hidrogênio na posição *orto* possibilita a formação de uma interação intramolecular por ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila, promovendo maior desproteção e, conseqüentemente, um maior deslocamento no espectro. Por outro lado, a hidroxila na posição *para* não permite tal interação, o que confere maior proteção e deslocamento químico inferior. Esses efeitos podem ser observados pela comparação entre os deslocamentos químicos teóricos, obtidos pela predição teórica no programa MestReNova, que indicaram valores de 11.61 ppm para a hidroxila na posição *orto* e 9,99 ppm para a hidroxila na posição *para*. Dessa forma, o produto foi evidenciado com o aparecimento do singlete referente a hidroxila na posição *orto* em 12.39 ppm.

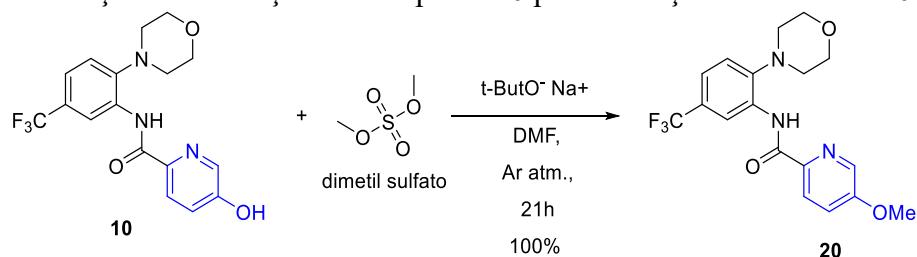
Figura 8 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **19**.

Fonte: Autor

Como mencionado anteriormente, a hidroxila na posição *orto* pode estabelecer uma ligação de hidrogênio intramolecular com o oxigênio da carbonila, o que confere maior estabilidade ao produto formado. Além disso, a presença de uma metoxila na posição *orto* provoca uma repulsão estérica com o grupo amida, enquanto a substituição por uma hidroxila reduz significativamente essa interação desfavorável. Caso a desmetilação ocorresse na posição *para*, nenhum desses efeitos estaria presente, o que não contribuiria para o aumento da estabilidade do produto.

Dessa forma, a regioseletividade favorável à posição *orto* resulta na formação de um composto termodinamicamente mais estável do que o derivado obtido pela desmetilação na posição *para*. No entanto, este último pode ser cineticamente mais favorável, uma vez que os pares de elétrons da metoxila na posição *para* estão mais disponíveis por não participarem de interações intramoleculares por ligação de hidrogênio e devido ao menor impedimento estérico nessa posição.

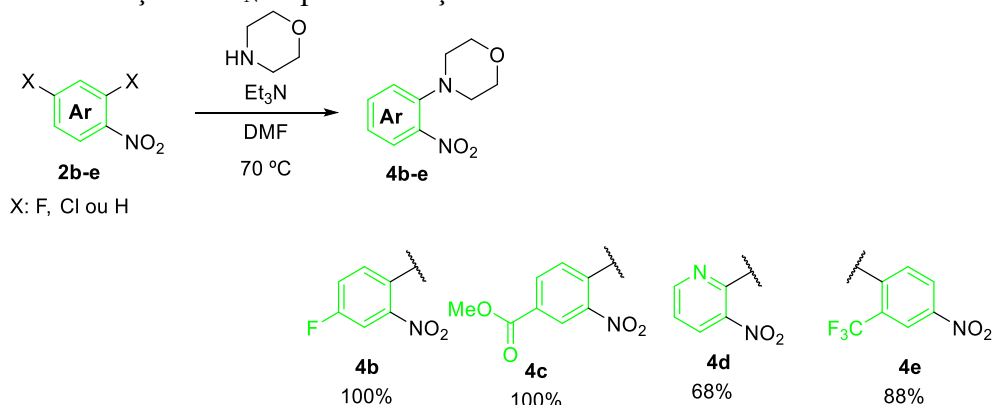
Para a obtenção do composto **20**, foi feita uma reação de metilação (Esquema 14), utilizando o fenol **10** com o dimetil sulfato e o *tert*-butoxido de sódio, em DMF, a temperatura ambiente e atmosfera de argônio, obtendo o composto com 100% de rendimento.

Esquema 14 – Reação de metilação do composto **10** para obtenção do derivado **20**.

Fonte: Autor

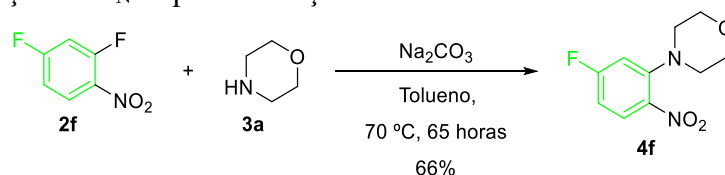
4.3.1.2 Síntese dos derivados com modificação no fragmento aril central

A síntese dos derivados com modificações estruturais no fragmento aril central iniciou pela reação de S_NAr , utilizando um haleto de arila com um grupo nitro na posição *orto* ou *para* em relação ao haleto, e a morfolina, na presença de Et_3N como base e DMF como solvente, com aquecimento a aproximadamente 70 °C, com 68 a 100% de rendimento (Esquema 15).

Esquema 15 – Reação de S_NAr para obtenção dos intermediários **4b-e**.

Fonte: Autor

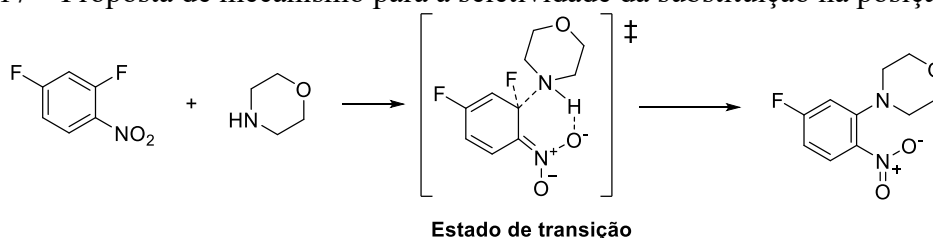
O intermediário **4f**, entretanto, foi sintetizado utilizando a condição descrita por Sythana et al. (2014) com o 2,4-difluornitrobenzeno e morfolina, na presença de carbonato de sódio (Na_2CO_3) como base e tolueno como solvente a 70 °C, levando a obtenção do composto com 66% de rendimento (Esquema 16)

Esquema 16 – Reação de S_NAr para obtenção do intermediário **4f**.

Fonte: Autor.

No trabalho realizado por Sythana et al. (2014), foi analisado o papel do solvente na seletividade da substituição, uma vez que a mesma poderia ocorrer tanto na posição *orto* quanto na posição *para* ao grupo nitro. Na proposta do mecanismo de reação realizada por eles, a seletividade ocorreria pela formação de um estado de transição com um complexo polar de seis membros formado pelo cátion metálico, o substrato nitrobenzeno e o nucleófilo. Dessa forma, quanto menor a polaridade do solvente maior a seletividade, uma vez que não iria ocorrer a solvatação do cátion. Aqui, como o Na_2CO_3 não é básico o suficiente para desprotonar a morfolina, outra opção seria formação desse anel no estado de transição com o hidrogênio da amina (Esquema 17).

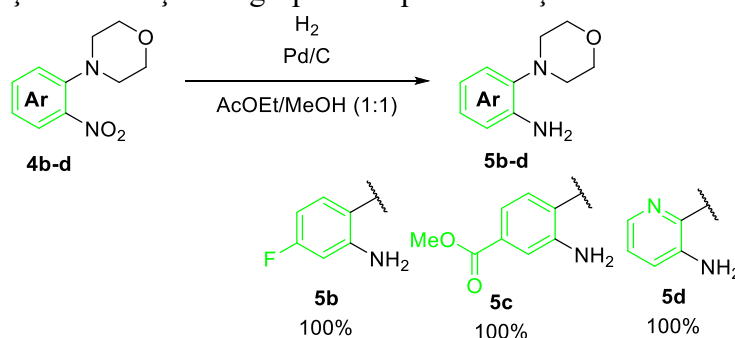
Esquema 17 – Proposta de mecanismo para a seletividade da substituição na posição *orto*.



Fonte: Autor, baseado em Sythana et al. (2014).

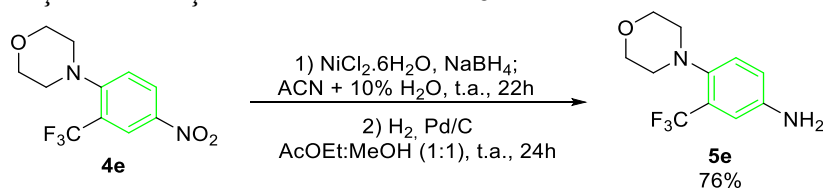
Em seguida, o grupo nitro dos intermediários **4b-d** foi reduzido, através de uma reação de hidrogenação catalítica Pd/C, em acetato de etila e metanol (1:1) como solvente (Esquema 18). As anilinas foram obtidas em até 2 horas e meia com 100% de rendimento.

Esquema 18 – Reação de redução do grupo nitro para obtenção dos intermediários **5b-d**.



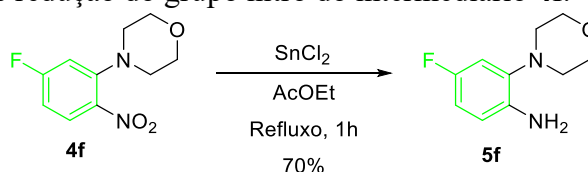
Fonte: Autor.

Para a redução do intermediário **4e**, foi utilizada a junção de duas condições distintas de redução. Inicialmente, a reação foi colocada utilizando uma adaptação da condição proposta por Prathap et al. (2017) com cloreto de níquel aquoso e boro hidreto de sódio, utilizando como solvente uma mistura de ACN com mais 10% de água. Porém, mesmo após 22 horas de reação, o material de partida não foi completamente consumido, sendo necessário então colocar a reação de redução por hidrogenação catalítica com Pd/C, em AcOEt/MeOH (1:1) (Esquema 19).

Esquema 19 – reação de redução do intermediário **4e**.

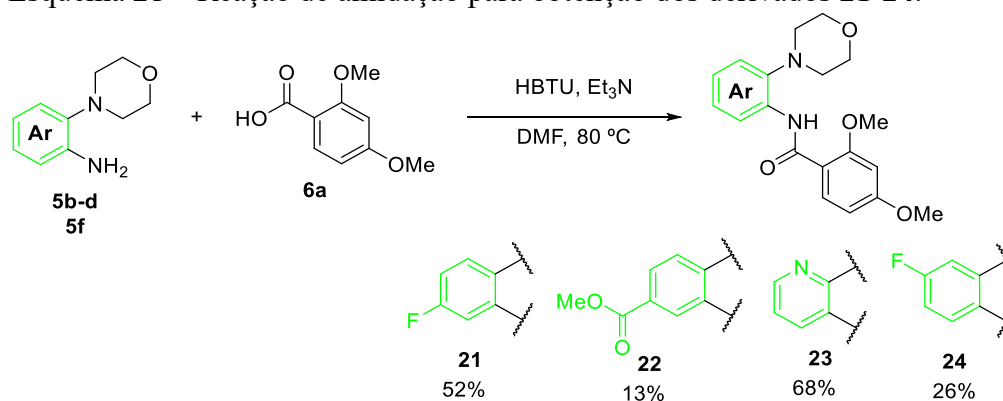
Fonte: Autor.

O intermediário **4f**, por sua vez, foi reduzido utilizando uma adaptação da condição utilizada por Bates; Li (2002) cloreto de estanho (SnCl_2) em AcOEt em refluxo, levando a obtenção da anilina **5e** após 1 hora de reação com 70% de rendimento (Esquema 20).

Esquema 20- Reação de redução do grupo nitro do intermediário **4f**.

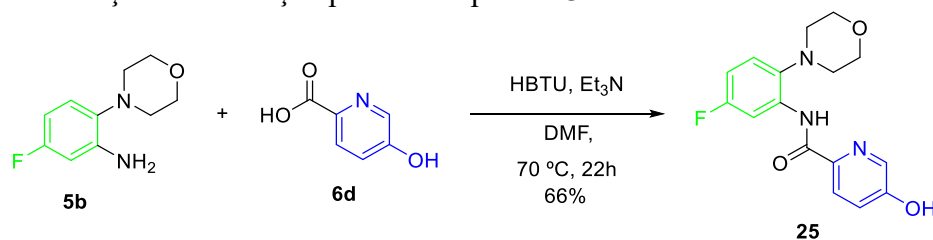
Fonte: Autor.

Os derivados finais **21-24** foram sintetizados utilizando reações de amidação, por meio da condição com o ácido carboxílico **6a** e o HBTU como reagente de acoplamento, na presença de Et_3N como base e DMF como solvente, com aquecimento por volta de 80°C (Esquema 21).

Esquema 21 – Reação de amidação para obtenção dos derivados **21-24**.

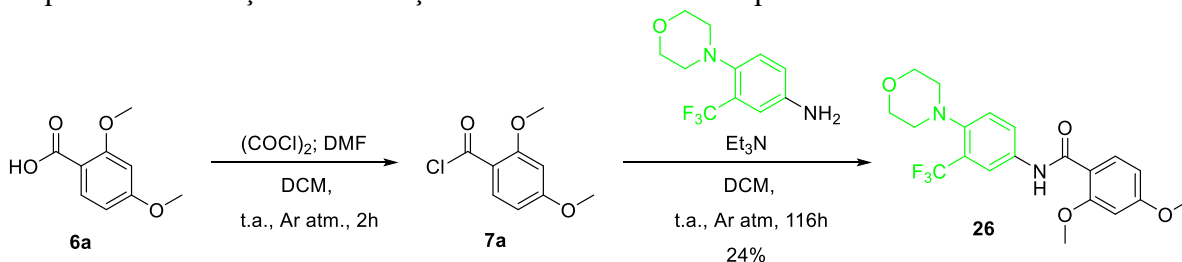
Fonte: Autor

O derivado **25** foi sintetizado utilizando a mesma condição descrita acima com o ácido carboxílico **6d** e HBTU, na presença de Et_3N como base em DMF a 70°C , obtendo o composto com 66% de rendimento após aproximadamente 22 horas de reação (Esquema 22).

Esquema 22 – Reação de amidação para o composto **25**.

Fonte: Autor.

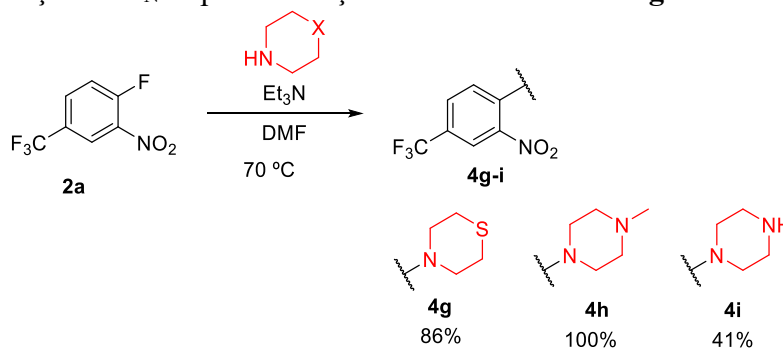
Para o derivado **26**, foi utilizada a reação de amidação com o cloreto de acila (Esquema 23) primeiramente reagindo o ácido carboxílico com cloreto de oxalila catalisada por DMF anidro em DCM anidro. Com a obtenção do cloreto de acila, o composto foi secado e submetido a reação de amidação com a anilina **5d** na presença de Et₃N anidra como base e DCM anidro como solvente, obtendo o composto com 24% de rendimento após 116 horas.

Esquema 23 – Reação de amidação com o cloreto de acila para derivado **26**.

Fonte: Autor.

4.3.1.3 Síntese dos derivados com modificação no fragmento morfolina

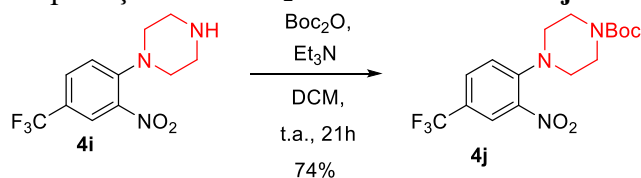
Para a síntese dos derivados com modificações na morfolina, novamente iniciou pela reação de S_NAr, utilizando o fluoreto de arila **2a** e a amina correspondente, na presença de Et₃N como base e DMF como solvente, com aquecimento a 70 °C, obtendo os intermediários **4g-i** com rendimentos entre 41% e 100% (Esquema 24).

Esquema 24 – Reação de S_NAr para obtenção dos intermediários **4g-i**

Fonte: Autor.

Em seguida, foi feita a proteção do nitrogênio da piperazina do intermediário **4i**, utilizando o Boc_2O e Et_3N em DCM, obtendo o composto com 74% de rendimento a temperatura ambiente após 21 horas de reação (Esquema 25).

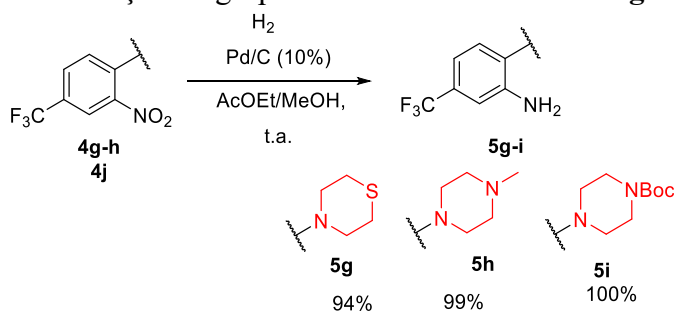
Esquema 25 – Reação de proteção com Boc_2O do intermediário **4j**.



Fonte: Autor.

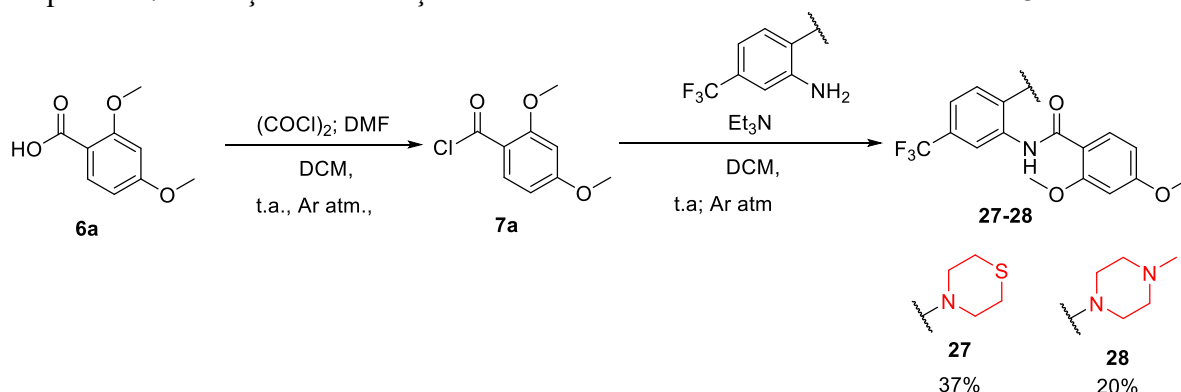
Com a obtenção dos intermediários **4g-j**, foi feita a redução do grupo nitro por meio de hidrogenação catalítica com Pd/C em DCM a temperatura ambiente, obtendo os intermediários **5g-i** com rendimentos superiores a 94% (Esquema 26).

Esquema 26 – Reação de redução do grupo nitro dos intermediários **5g-i**.



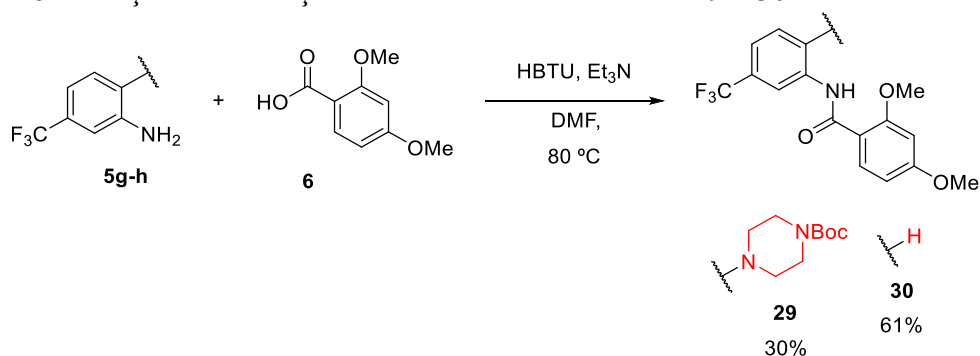
Fonte: Autor.

Com a obtenção das anilinas, foram realizadas reações de amidação para a obtenção dos derivados **27-30**. Para os compostos **27** e **28**, foi utilizada a condição de amidação com o cloreto de acila, reagindo primeiramente o ácido carboxílico em condições anidras com cloreto de oxalila catalisada por DMF em DCM. Em seguida, o cloreto de acila foi submetido a reação de amidação com a anilina correspondente, levando a obtenção dos produtos com 37% e 20% de rendimento (Esquema 27).

Esquema 27 – Reação de amidação com o cloreto de acila dos derivados **27** e **28**.

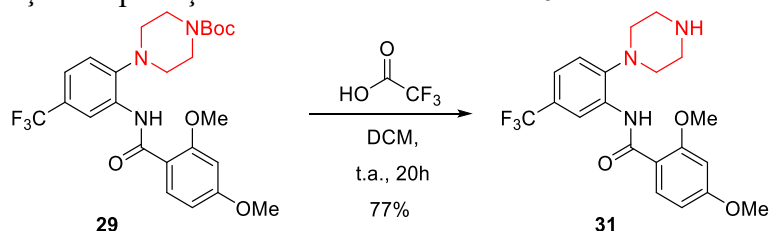
Fonte: Autor.

Já os compostos **26** e **27** foram sintetizados utilizando a reação de amidação com o ácido carboxílico e o HBTU, na presença de Et_3N em DMF com aquecimento, obtendo os derivados com rendimentos de 30% e 61% (Esquema 28).

Esquema 28 – Reação de amidação com HBTU dos derivados **29** e **30**.

Fonte: Autor.

Por fim, o derivado **31** foi desprotegido, utilizando o ácido tricloroacético (TFA) em DCM a temperatura ambiente, obtendo o produto neutralizado com 77% de rendimento, após 20 horas de reação (esquema 29).

Esquema 29 – Reação desproteção com TFA do derivado **29**.

Fonte: Autor.

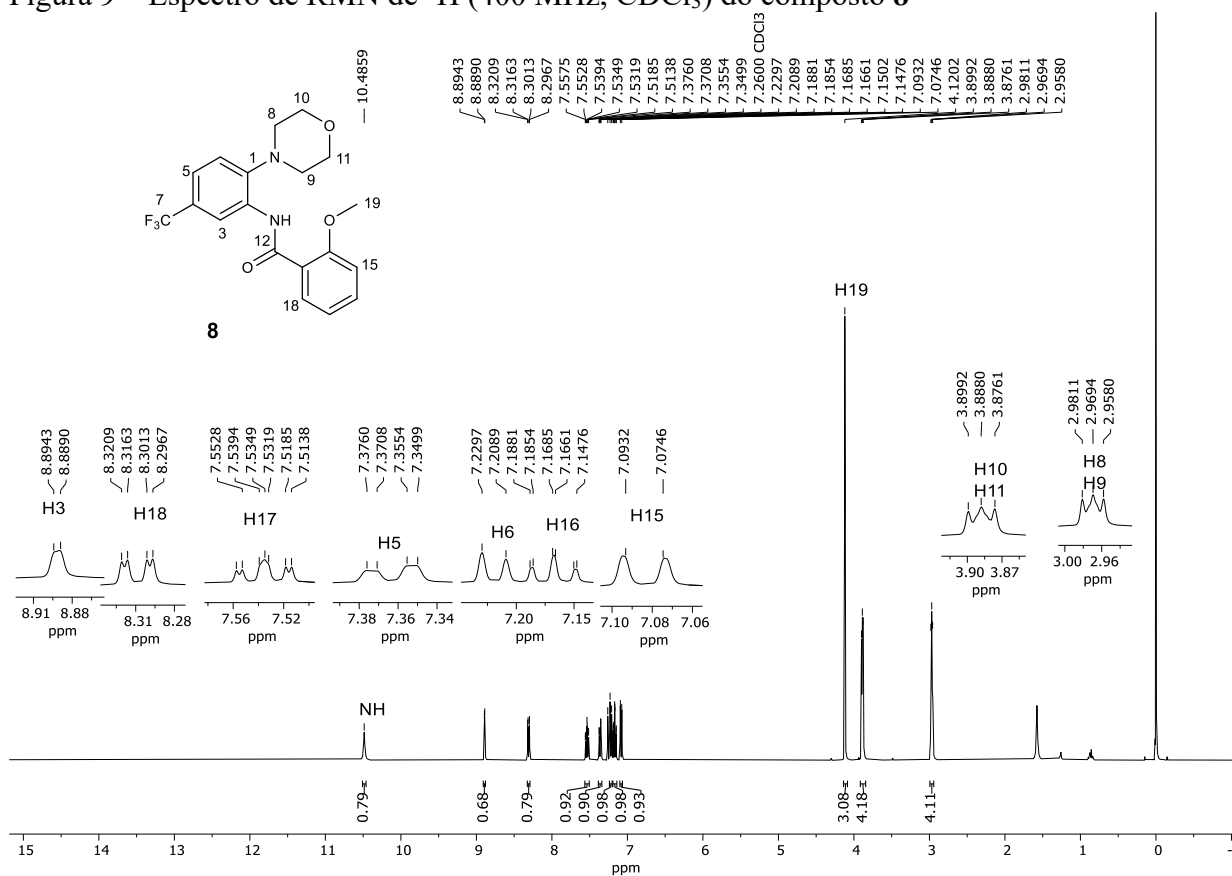
Os compostos foram purificados por coluna cromatográfica e caracterizados por RMN de ^1H e ^{13}C , sendo esse último feito utilizando a técnica de *Attached Proton Test* (APT), na qual os sinais que estão para baixo no espectro são referentes aos carbonos não hidrogenados e dihidrogenados (C e CH_2), enquanto os sinais que estão para cima são referentes aos carbonos

monohidrogenados e trihidrogenados (CH e CH₃). Abaixo, encontram-se os espectros do derivado **8**, como representação dos RMN's dos derivados sintetizados.

No RMN de ¹H (figura 9), foi possível observar 11 sinais referentes aos 19 hidrogênios do composto, com o singlete em 10.49 ppm do NH, os sete sinais referentes aos sete hidrogênios dos anéis aromáticos entre 9.00 ppm e 6.5 ppm. Na região dos aromáticos, os hidrogênios do anel central foram atribuídos da seguinte forma: o hidrogênio H3 ao duplete mais deslocado em 8.89 ppm ($J = 2.1$ Hz), o H5 foi atribuído ao duplete duplo em 7.36 ppm ($J = 8.3, 2.1$ Hz) e o H6 ao duplete em 7.22 ppm ($J = 8.3$ Hz). Enquanto isso, os hidrogênios aromáticos do fragmento benzóil foram atribuídos aos sinais: o hidrogênio H18 ao duplete duplo em 8.31 $J = 7.8, 1.9$ Hz), o H17 ao multipeto em 7.56 – 7.51 ppm, o H16 ao tripleto duplo em 7.17 ppm ($J = 7.6, 1.1$ Hz) e o H15 ao duplete em 7.08 ppm ($J = 7.5$ Hz).

Já na região dos alifáticos, observou o singlete em 4.12 ppm referente aos 3 hidrogênios OCH₃ (H19), o tripleto em 3.89 ppm ($J = 4,6$ Hz) dos hidrogênios H10 e H11 e o tripleto em 2.97 ppm ($J = 4,6$ Hz) dos hidrogênios H8 e H9 da morfolina.

Figura 9 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **8**

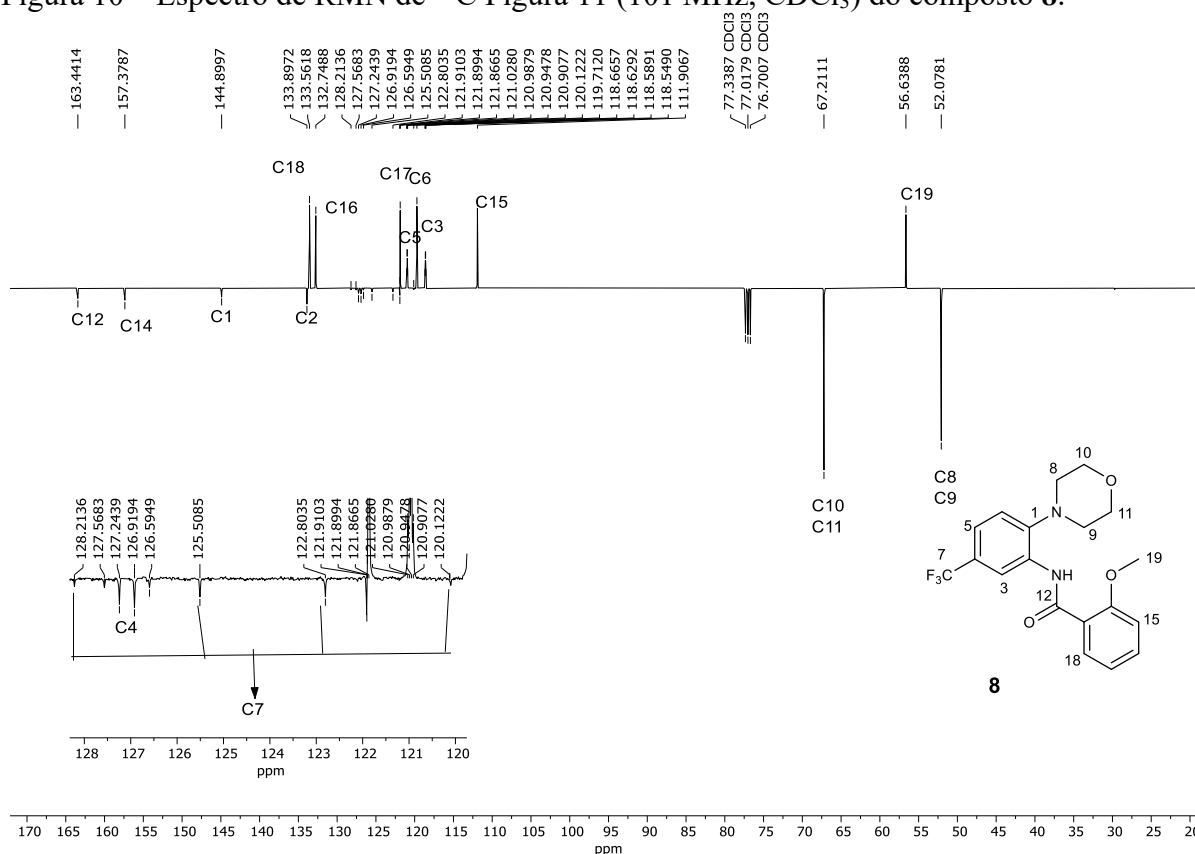


Fonte: Autor

Já no RMN de C APT (Figura 10), é possível observar o sinal referente ao carbono da carbonila em 163.4 ppm, os sinais dos carbonos dos anéis aromáticos entre 160.0 ppm e 100.0

ppm, com destaque para os sinais em 127.1 ppm, 121.0 ppm e 118.6 ppm (referentes aos carbonos C4, C5 e C3 do anel aromático central) por serem quadrupletos, devido à proximidade com o CF₃, além de seu próprio sinal em 124.2 ppm. Já os dois sinais para baixo na região entre 70 ppm e 50 ppm são os sinais referentes aos carbonos da morfolina, com o sinal em 67.2 ppm para os carbonos C10 e C11 e o sinal em 52.1 ppm para os carbonos C8 e C9. Por fim, o sinal para cima em 56.6 ppm é o sinal referente ao carbono da metoxila C19.

Figura 10 – Espectro de RMN de ¹³C Figura 11 (101 MHz, CDCl₃) do composto 8.



Fonte: Autor

Os quadrupletos observados no espectro de RMN de carbono se devem a presença do flúor na estrutura, realizando um acoplamento e resultando no desdobramento do sinal em um quadrupletos, sendo mais intenso conforme a proximidade do flúor. Dessa forma, o sinal referente ao CF₃ é o que mais sente esse efeito, porém ele apresenta baixa intensidade, de forma que, para a maioria dos compostos, não foi possível identificar esse sinal de forma clara.

Uma vez purificados e caracterizados, os derivados foram submetidos aos ensaios biológicos de atividade antiparasitária e de citotoxicidade.

4.3.2 Resultados dos ensaios biológicos

Foram realizados ensaios de potência e citotoxicidade contra as formas amastigotas dos parasitas *T. cruzi* e *L. infantum* e as suas respectivas células hospedeiras, L929 e THP-1. Esses resultados podem ser observados em suas respectivas tabelas, com a potência dos compostos sendo expressa pelo valor de IC₅₀ e a citotoxicidade pelo CC₅₀, além disso, as tabelas contêm também as respectivas seletividades (IS) e os valores dos coeficientes de partição teórico (clogP) desses compostos.

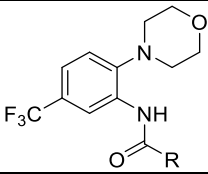
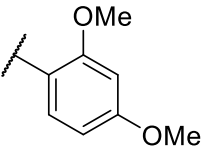
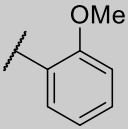
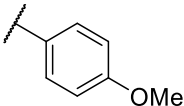
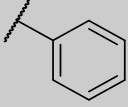
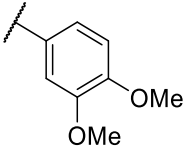
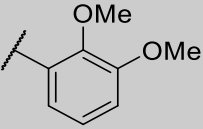
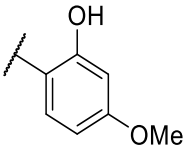
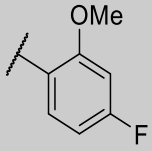
Os compostos com valores de IC₅₀ maiores que 200 µM foram aqueles que até a concentração máxima avaliada não reduziram 50% da carga parasitária. Compostos com baixa atividade (IC₅₀ > 30 µM) não foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade, estando classificados como não testados (N.T.) nas tabelas e, conseqüentemente, sua seletividade não foi determinada. A atividade antiparasitária de alguns dos derivados ainda não foi avaliada, sendo esses derivados marcados também como N.T.

4.3.2.1 Resultados das modificações no fragmento Benzoil

As investigações de SAR iniciaram pelo fragmento benzoil, explorando modificações nas metoxilas deste fragmento. De forma geral, as metoxilas costumam desempenhar um papel importante para a atividade biológica de compostos bioativos, podendo realizar diversos tipos de interações com os sítios ativos das proteínas responsáveis pela atividade biológica. Essas interações podem ocorrer com esse substituinte funcionando como um aceptor de ligação de hidrogênio ou como fraco doador de ligação de hidrogênios (através da ligação C-H fracamente polarizada do CH₃), ou realizando interações dipolo-dipolo, parcial cátion- π . Embora essas interações possam favorecer a atividade biológica do composto, as metoxilas também são pontos suscetíveis de metabolização de fármacos, podendo sofrer a reação de O-desmetilação na fase 1 (Chiodi; Ishihara, 2024).

Assim, a importância desse substituinte no fragmento benzoil do *hit* 1 foi avaliada, tentando identificar quais delas eram essenciais e o efeito da posição para a atividade biológica do composto. Para isso, um desses substituintes foi selecionado e mantido fixo, enquanto o outro foi removido, alterado de posição ou até mesmo trocado por outro substituinte. Os resultados dessas modificações podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados de atividade dos derivados benzoil.

					
Composto	C log P	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ L929 (μM)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ THP-1 (μM)
 hit 1	3,32	0,76±0,02 (109,5)	82,7	10,7±1,2 (36,3)	390,4±1,6
 8	3,35	>200	N.T.	191,7±5,9	N.T.
 18	3,36	98,7	N.T.	27,2±1,8	N.T.
 16	3,46	>200	N.T.	>200	N.T.
 15	3,35	>200	N.T.	>200	N.T.
 11	3,35	>200	N.T.	27,6±4,1	N.T.
 19	3,12	>200	N.T.	10,0±0,5 (9,2)	91,8
 12	3,73	>200	N.T.	101,4±2,0	N.T.
Bzn	N.D.	3,8 (625)	2381	N.T.	N.T.
AmB	N.D.	N.T.	N.T.	0,25±0,04 (1455)	363,8

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado. IS – Índice de Seletividade (CC₅₀/IC₅₀).Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

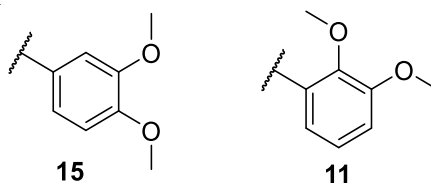
AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.
Fonte: os dados de clogP foram obtidos do site swissADME.

Essas modificações resultaram na perda da atividade contra o *T. cruzi*, com a potência diminuindo em cerca de 130 vezes com a remoção da metoxila na posição *orto* (**18**), enquanto as outras modificações resultaram na inibição completa da atividade na concentração mínima avaliada (**8**, **16**, **15**, **11**, **12** e **19**), indicando a importância desses grupos nessas posições para a atividade biológica.

Já para a *L. infantum*, a remoção da metoxila na posição *para* (**8**) e a remoção das duas metoxilas (**16**), resultaram em uma perda drástica da atividade antiparasitária, enquanto a remoção da metoxila em *orto* (**18**) diminuiu em 2,5 a potência do composto, indicando que a remoção desse substituinte é tolerada, desde que seja mantida a metoxila em posição *para*.

Embora a metoxila da posição *para* pareça desempenhar um papel importante para a atividade biológica, a troca do substituinte da posição *orto* para a posição *meta* (**15**), resultou na perda completa da atividade. Por outro lado, a troca do substituinte da posição *para* com a posição *meta* (**11**) foi parcialmente tolerada, levando a diminuição da potência em 2,5 vezes em relação ao *hit* **1**. Esse comportamento pode estar relacionado à conformação espacial da molécula, uma vez que a presença das duas metoxilas em posições próximas resultaria na repulsão eletrostática das metilas, fazendo com que elas fiquem em direções opostas (Figura 12).

Figura 12 – Conformações espaciais das metoxilas nos derivados **15** e **11**.



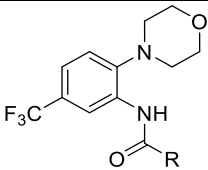
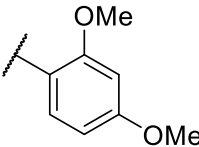
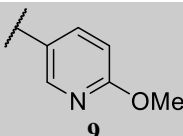
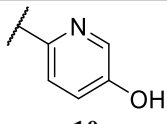
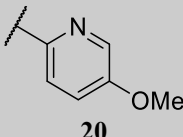
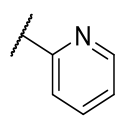
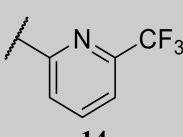
Fonte: Autor.

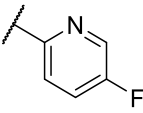
Essa conformação espacial poderia dificultar a aproximação adequada do fragmento ao sítio ativo do alvo, comprometendo a interação responsável pela atividade biológica. No composto **15**, esse efeito parece ter sido mais pronunciado, resultando na perda total da atividade. Já no derivado **11**, a ausência da metoxila em *para* foi parcialmente compensada pela presença da metoxila em *meta*, o que pode ter permitido um arranjo conformacional mais favorável e, conseqüentemente, alguma preservação da atividade.

A substituição da metoxila por um flúor na posição *para* (**12**) resultou na diminuição da potência em 10 vezes contra o *L. infantum*, enquanto a substituição por uma hidroxila na posição *orto* (**19**) resultou na potência contra o parasita sendo mantida, porém com a diminuição da seletividade com o aumento da citotoxicidade.

As modificações subsequentes no fragmento benzoíla envolveram a introdução de um nitrogênio endocíclico ao anel aromático, acompanhada da remoção da metoxila da posição *orto*. Outros substituintes foram também avaliados, como a hidroxila (permitindo a doação de ligação de hidrogênio), o hidrogênio e o flúor, além do CF₃ na posição *meta*. A presença do nitrogênio endocíclico, além de diminuir a lipofilicidade do composto, torna mais difícil a reação de O-desmetilação que ocorre no metabolismo de fase 1, de forma que, somada a remoção da metoxila, pode representar uma melhoria na estabilidade metabólica do composto (Chiodi; Ishihara, 2024). Os resultados dessas modificações estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Resultados de atividade dos derivados com o anel heterocíclico.

					
Composto	clog P	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ L929 (μM)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ THP-1 (μM)
 hit 1	3,32	0,76±0,02 (109,5)	82,7	10,7±1,2 (36,3)	390,4±1,6
 9	2,85	82,1±23,9 (1,9)	157,3	10,8±1,7	N.T.
 10	2,26	2,1 (25)	53,1	17,9±0,1	N.T.
 20	2,83	31,0	N.T.	17,1±0,6	N.T.
 13	2,87	>200	N.T.	179,4±7,4	N.T.
 14	3,81	>200	N.T.	58,9±6,0	N.T.

	2,97	90,6	N.T.	>200	N.T.
17					
Bzn	N.D.	3,8 (625)	2381	N.T.	N.T.
AmB	N.D.	N.T.	N.T.	0,25±0,04 (1455)	363,8

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado. IS – Índice de Seletividade (CC_{50}/IC_{50}).

Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.

Fonte: os dados de clogP foram obtidos do site swissADME.

A adição do nitrogênio endocíclico ao anel aromático na posição *meta* (**9**), resultou na perda da atividade contra *T. cruzi*, entretanto, ao mover o nitrogênio para a posição *orto* (**20**) ocorreu uma pequena melhora da atividade (quando comparado ao derivado **9**), o que pode indicar uma preferência do nitrogênio nessa posição. Já a substituição da metoxila por uma hidroxila (**10**) resultou em uma melhora significativa na atividade, com esse derivado possuindo uma potência próxima a do *hit* **1**, mantendo uma seletividade aceitável. Contudo, a troca da hidroxila pelo hidrogênio (**13**) e pelo flúor (**17**), além da troca por um CF₃ na posição *meta* (**14**), resultou na perda da atividade.

Por sua vez, contra o parasita *L. infantum*, ao adicionar o nitrogênio endocíclico ao anel aromático na posição *meta* (**9**), a potência foi mantida, porém ao mover o nitrogênio para a posição *orto* (**20**) ocorreu a diminuição da potência, o que sugere uma preferência do nitrogênio nessa posição.

A troca da metoxila pela hidroxila (**10**) manteve a potência (quando comparado ao derivado **20**), enquanto a troca por um hidrogênio (**13**), por um flúor (**17**) e por CF₃ na posição *meta* (**14**) resultou na perda de atividade contra o parasita, sendo essa perda menos intensa para o derivado **14**. Isso pode indicar que a metila não é essencial para a atividade biológica, mas que a presença do substituinte doador de elétrons na posição *para* é de extrema importância.

4.3.2.2 Resultados das modificações no fragmento aril central

As modificações seguintes foram feitas no anel central, substituindo o CF₃ do *hit* **1** por outros grupos, avaliando o efeito de retirada de elétrons e o tamanho do substituinte para a atividade, além de substituir o anel aromático por outro anel heterocíclico aromático com nitrogênio. Outra modificação importante, porém, ainda não avaliada, foi a troca da morfolina da posição *para* em relação ao CF₃ para a posição *orto* (**26**) e a troca do flúor para a posição *para* em relação a amida (**24**).

Tabela 5 – Resultados dos ensaios biológicos das modificações no anel central.

Composto	clogP	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)	CC ₅₀ L929 (μM)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μM)	CC ₅₀ THP-1 (μM)
 Hit 1	3,32	0,76±0,02 (109,5)	82,7	10,7±1,2 (36,3)	390,4±1,6
 22	2,30	>200	N.T.	89,8±1,3	N.T.
 21	2,66	<4,33 (128)	>555	12,8±1,3	N.T.
 23	1,87	>200	N.T.	>200	N.T.
 26	3,39	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
 24	2,66	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Bzn	N.D.	3,8 (625)	2381	N.T.	N.T.
AmB	N.D.	N.T.	N.T.	0,25±0,04 (1455)	363,8

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado. IS – Índice de Seletividade (CC₅₀/IC₅₀).

Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.

Fonte: os dados de clogP foram obtidos do site swissADME.

A troca do CF₃ pelo grupo éster (**22**) levou à perda de atividade contra o parasita *T. cruzi*. Por outro lado, a troca pelo flúor diretamente ligado ao anel aromático (**21**) resultou no aumento da seletividade, com os resultados iniciais indicando uma alta potência contra o

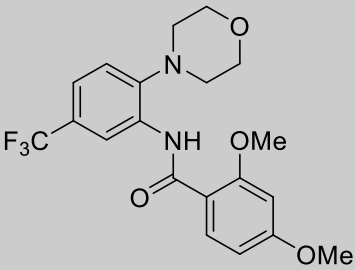
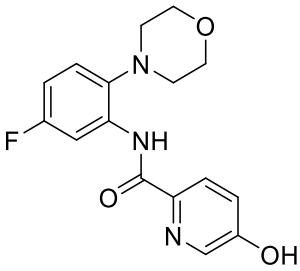
parasita e baixa citotoxicidade. Esses resultados indicam que o tamanho do substituinte tem maior influência na atividade contra *T. cruzi* do que o efeito de retirada de elétrons.

A substituição do anel aromático pelo anel com o nitrogênio endocíclico sem o CF₃, por sua vez, resultou na perda da atividade. Isso sugere que a presença do nitrogênio endocíclico por si só não contribui significativamente para a potência. Entretanto, essa hipótese ainda precisaria ser confirmada, através da avaliação de um derivado sem a presença do CF₃.

Resultados similares foram observados contra o parasita *L. infantum*, com a atividade sendo mantida quando realizou a substituição pelo flúor diretamente ligado ao anel (**21**), mas com a diminuição da potência em cerca de nove vezes quando substituiu pelo éster (**22**) e a perda da atividade quando anel aromático foi substituído pelo anel heterocíclico com o nitrogênio (**23**). A seletividade do derivado **21** ainda precisa ser analisada através da avaliação da citotoxicidade do composto, porém esse composto representa uma melhoria em seu caráter lipofílico.

Como os compostos **10** e **21** foram os que apresentaram as melhores atividades anti-*T. cruzi* (IC₅₀ 2,1 e <4,33, respectivamente) em seus respectivos fragmentos – benzoíla e aril central – foi feita a combinação das duas modificações em único derivado. O objetivo foi verificar se a junção das duas modificações iria resultar no aumento da atividade antiparasitária (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados dos ensaios biológicos do derivado **25**.

Composto	clogP	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μ M)	CC ₅₀ L929 (μ M)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μ M)	CC ₅₀ THP-1 (μ M)
 Hit 1	3,32	0,76 $\pm$ 0,02 (109,5)	82,7	10,7 $\pm$ 1,2 (36,3)	390,4 $\pm$ 1,6
 25	1,61	136,6 (N.D.)	N.T.	124,3 $\pm$ 0,3 (N.D.)	N.T.
Bzn	N.D.	3,8 (625)	2381	N.T.	N.T.
AmB	N.D.	N.T.	N.T.	0,25 $\pm$ 0,04 (1455)	363,8

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado. IS – Índice de Seletividade (CC₅₀/IC₅₀).

Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.

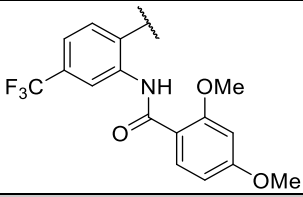
Fonte: os dados de clogP foram obtidos do site swissADME.

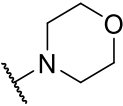
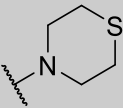
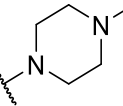
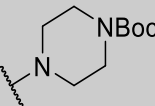
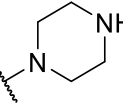
Entretanto, o que observou foi a perda significativa da atividade contra o *T. cruzi*, sendo esse resultado contrário ao que se esperava, mas que talvez possa ser justificado quando uma das alterações é feita de forma individual o outro fragmento da molécula pode compensar essa modificação mantendo a atividade. Contudo, quando as modificações são feitas simultaneamente, o outro fragmento da molécula não consegue realizar as interações necessárias para compensar a atividade antiparasitária.

4.3.2.3 Resultados das modificações no fragmento Morfolina

As últimas modificações foram feitas no fragmento da morfolina, onde foram feitas substituições por outros ciclos, mantendo a quantidade de membros do ciclo com o nitrogênio conectado ao anel aromático, mas trocando o oxigênio por outros substituintes. Outra modificação realizada foi a remoção total da morfolina, substituindo por um hidrogênio (Tabela 7). Todos esses compostos foram sintetizados, porém alguns deles ainda não foram avaliados contra os parasitas.

Tabela 7 - Resultados dos ensaios biológicos dos derivados com modificação na morfolina.



Composto	clog P	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ L929 (μM)	IC ₅₀ <i>L. infantum</i> (μM) (IS)	CC ₅₀ THP-1 (μM)
 hit 1	3,32	0,76±0,02 (109,5)	82,7	10,7±1,2 (36,3)	390,4±1,6
 27	3,96	>200	N.T.	83,2±3,1	N.T.
 28	3,28	99,8	N.T.	>200	N.T.
 29	3,99	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
 31	2,99	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
 30	3,63	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
Bzn	N.D.	3,8 (625)	2381	N.T.	N.T.
AmB	N.D.	N.T.	N.T.	0,25±0,04 (1455)	363,8

N.T. – Não Testado; N.D. – Não Determinado. IS – Índice de Seletividade (CC₅₀/IC₅₀).

Bzn – Benznidazol, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *T. cruzi*.

AmB – Anfotericina B, utilizado como fármaco de referência (controle positivo) nos ensaios contra *L. infantum*.

Fonte: os dados de clogP foram obtidos do site swissADME.

Contra *T. cruzi*, as duas modificações avaliadas resultaram na perda da atividade antiparasitária, com a substituição do oxigênio pelo *N*-metil (**28**) diminuindo em cerca de 131 vezes a potência, enquanto a substituição pelo enxofre (**27**) ocorreu a perda total da atividade até a concentração máxima avaliada.

Para atividade anti-*L. infantum*, a troca do oxigênio pelo enxofre (**27**) diminuiu em aproximadamente 8 vezes a potência, e pelo N-metil (**28**) resultou na perda da atividade até a concentração máxima avaliada.

Esses resultados podem indicar que a morfolina é de extrema importância para a atividade biológica, porém ainda é necessário avaliar outras modificações estruturais nesse fragmento.

5 METODOLOGIA

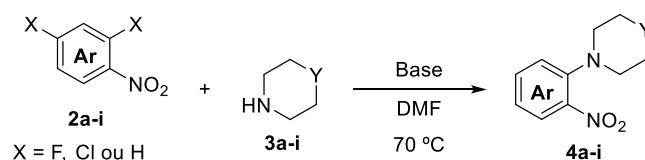
Todos os reagentes comerciais foram utilizados sem purificação prévia. Os solventes hexano, acetato de etila e metanol foram destilados previamente. Para algumas reações o DMF, Et₃N e o DCM foram secos utilizando peneira molecular. Todas as reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Alugram sílica gel 60 F254, Sigma Aldrich) reveladas através de luz ultravioleta (254 nm) e/ou atmosfera de iodo. Os compostos sintetizados foram purificados por cromatografia de adsorção em coluna utilizando sílica gel Aldrich (flash).

5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono 13 (RMN de ¹³C) foram obtidos no aparelho Bruker Ascend 400 (400 MHz para RMN de ¹H e 101 MHz para RMN de ¹³C) da Rede de Laboratórios Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (Relam-IQUFU). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna resíduos de solvente não deuterado: (CDCl₃ em 7,26 ppm, DMSO-*d*₆ em 2,50 ppm e TMS em 0,00 ppm para RMN de ¹H e CDCl₃ em 77,16 ppm, DMSO-*d*₆ em 39,52 ppm para RMN de ¹³C). Os valores das constantes de acoplamento foram medidos diretamente nos espectros de RMN de ¹H utilizando o programa MestReNova.

5.2 Procedimento experimental de síntese

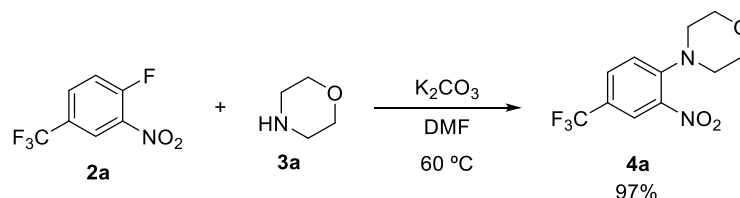
5.2.1 Procedimento geral A: para a reação de S_NAr



Em uma solução de amina **3a-i** em DMF, adicionou a base e o haleto de arila **2a-i**. As condições, reagentes e concentrações específicas de cada reação estão descritas nos subtópicos abaixo. A reação ficou em agitação com aquecimento, sendo acompanhada por CCD e foi finalizada adicionando água destilada gelada (25 mL), a temperatura ambiente. O precipitado formado foi filtrado e foi feita uma extração da solução aquosa com AcOEt (2x 30 mL). Em

seguida, juntou a fase orgânica ao sólido, secando a solução com Na₂SO₄ anidro, filtrando, concentrando e secando na bomba de vácuo. Em seguida, o produto foi recristalizado com hexano, levando a obtenção do produto desejado.

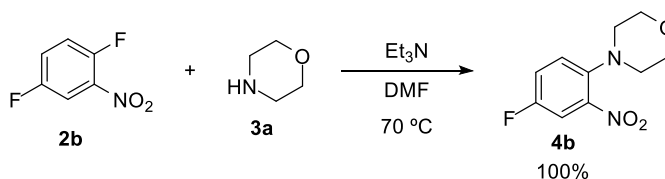
5.2.1.1 Síntese do intermediário **4a**



Em uma solução do fluoreto **2a** (1,51g, 7,22 mmol), em DMF (2 mL), foi adicionada a morfolina **3a** (638,4 mg, 7,32 mmol) e o carbonato de potássio (1,98 g, 14,32 mmol). A reação ficou em agitação a 60 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4a** com 97% de rendimento após 24 horas de reação.

(**4a**) óleo alaranjado, 1,99 g, 97%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃):** ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.06 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.85 (t, *J* = 4.7, 4H), 3.14 (t, *J* = 4.7, 4H).

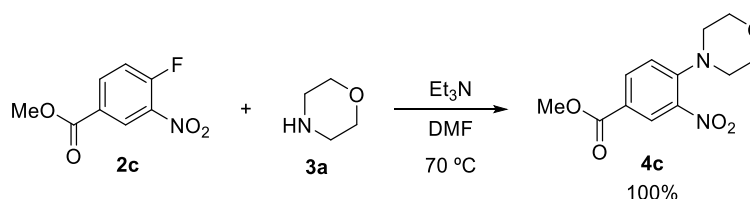
5.2.1.2 Síntese do intermediário **4b**



Em uma solução da morfolina **3a** (193,4 mg, 2,22 mmol) em DMF (2 mL), adicionou a Et₃N anidra (3,33 mmol, 337 mg) e o haleto de arila **2b** (177,2 mg, 1,11 mmol). A reação ficou em agitação a 70 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4b** com 100% de rendimento após 4 horas de reação.

(**4b**) óleo laranja, 252,7 mg, 100%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.52 (dd, *J* = 7.9, 2.9 Hz, 1H), 7.30 – 7.24 (m, 1H), 7.21 (dd, *J* = 9.0, 4.9 Hz, 1H), 3.84 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 3.02 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H).

5.2.1.3 Síntese do intermediário **4c**

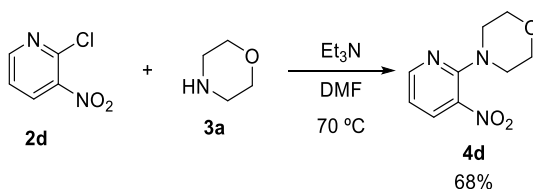


Em uma solução da morfolina **3a** (144,3 mg, 1,66 mmol) em DMF (2 mL), adicionou a Et₃N anidra (2,26 mmol, 228,6 mg) e o haleto de arila **2c** (150,0 mg, 0,753 mmol). A reação

ficou em agitação a 70 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4c** com 100% de rendimento após 24 horas de reação.

(**4c**) óleo laranja avermelhado, 222 mg, 100%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 7.81 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.83 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.08 (t, J = 4.7 Hz, 4H).

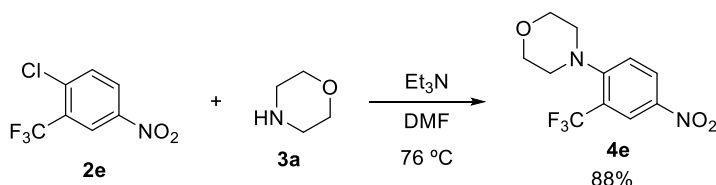
5.2.1.4 Síntese do intermediário **4d**



Em uma solução da morfolina **3a** (48,0 mg, 0,551 mmol) em DMF (2 mL), adicionou a Et₃N anidra (0,909 mmol, 92,0 mg) e o haleto de arila **2d** (70,0 mg, 0,442 mmol). A reação ficou em agitação a 70 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4d** com 68% de rendimento após 48 horas de reação.

(**4d**) sólido amarelo, 62,8 mg, 68%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.34 (dd, J = 4.5, 1.7 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 8.0, 4.6 Hz, 1H), 3.80 (t, J = 4.8 Hz, 4H), 3.46 (t, J = 4.8 Hz, 4H).

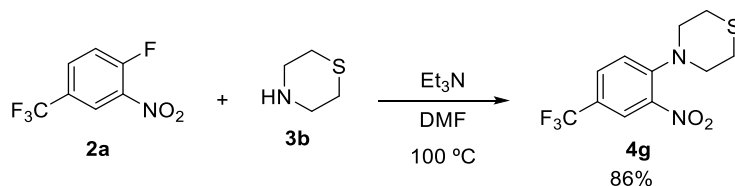
5.2.1.5 Síntese do intermediário **4e**



Em uma solução da morfolina **3a** (0,906 mg, 9,56 mmol) em DMF (2 mL), adicionou a Et₃N anidra (14,34 mmol, 1,45 g) e o haleto de arila **2d** (1,0 g, 4,78 mmol). A reação ficou em agitação a 76 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4e** com 88% de rendimento após 25 horas de reação.

(**4e**) sólido marrom, 1,16 g, 88%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.53 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.35 (dd, J = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 3.86 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.12 (t, J = 4.6 Hz, 4H).

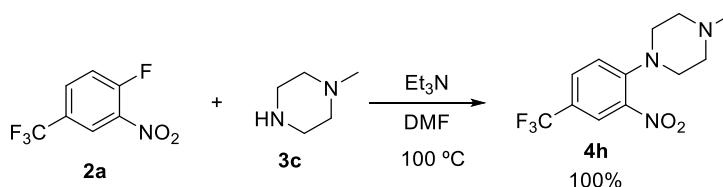
5.2.1.6 Síntese do intermediário **4g**



Em uma solução da tiomorfolina **3b** (136,2 mg, 1,08 mmol) em DMF (2 mL), adicionou a Et₃N anidra (2,15 mmol, 217,6 mg) e o haleto de arila **2a** (150,0 mg, 0,717 mmol). A reação ficou em agitação a 100 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4g** com 86% de rendimento após 18 horas de reação.

(**4g**) sólido, 180,6 mg, 86%. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.41 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.79 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H).

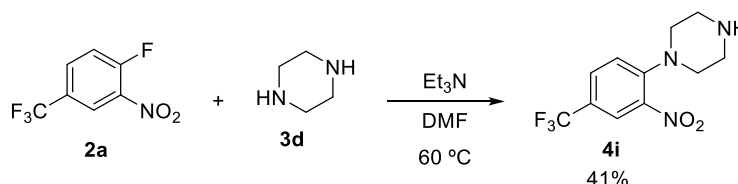
5.2.1.7 Síntese do intermediário **4h**



Em uma solução da N-metilpiperazina **3c** (287,3 mg, 2,87 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o Na₂CO₃ (3,23 mmol, 342,3 mg) e o haleto de arila **2a** (150,0 mg, 0,717 mmol). A reação ficou em agitação a 100 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4h** com 100% de rendimento após 23 horas de reação.

(**4h**) óleo laranja, 218,0 mg, 100%. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (dd, *J* = 2.3, 0.7 Hz, 1H), 7.67 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 3.19 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 2.58 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H), 2.37 (s, 3H).

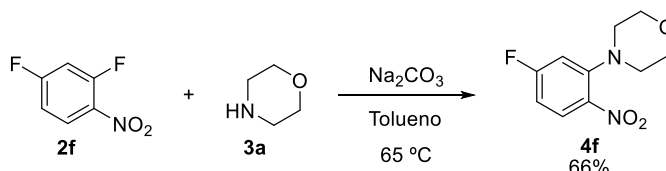
5.2.1.8 Síntese do intermediário **4i**



Em uma solução do haleto de arila **2a** (275,0 mg, 1,32 mmol) em DMF (3,0 mL) adicionou a piperazina **3d** (227,4 mg, 2,64 mmol) e a Et₃N (3,96 mmol, 400,7 mg). A reação ficou em agitação a 60 °C e seguiu o procedimento geral A, levando a obtenção do produto **4i** com 41% de rendimento após 3 horas de reação.

(**4i**) óleo amarelo, 150,0 mg, 41%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8.05 – 8.00 (m, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 3.16 – 3.12 (m, 4H), 3.05 – 3.01 (m, 4H), 2.95 (s, 1H).

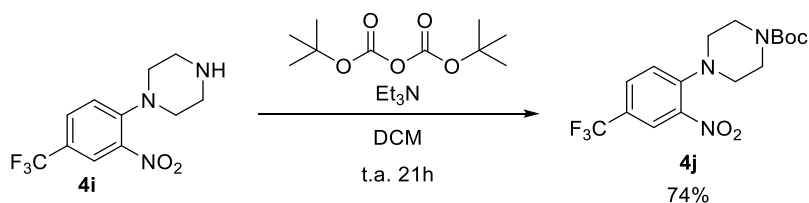
5.2.2 Procedimento de síntese do intermediário **4f**



Em uma solução do fluoreto **2f** (170,1 mg, 1,07 mmol) em tolueno (2 mL), adicionou a morfolina **3a** (92,5 mg, 1,07 mmol) e, após 10 minutos, o Na_2CO_3 (0,535 mmol, 56,7 mg), em banho de gelo. Após 10 minutos, colocou aquecimento 75°C e deixou a reação agitando por 45 horas, acompanhando a reação por CCD (7:3 Hex/AcOEt). A reação foi finalizada resfriando até a temperatura ambiente, adicionando água destilada (25 mL) e extraíndo com tolueno (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada, concentrada e seca. O material obtido foi solubilizado em tolueno (2 mL) e colocado para reagir novamente com a morfolina **3a** (0,214 mmol, 18,6 mg) e Na_2CO_3 (0,535 mmol, 56,7 mg). A reação ficou em agitação por 20 horas a 65°C e foi finalizada resfriando a solução até a temperatura ambiente, adicionando água destilada, extraíndo primeiro com tolueno (25 mL), em seguida com DCM (2x 20 mL). As três fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro, filtradas e evaporadas sob pressão reduzida. O material foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash com eluente 9:1 Hex/AcOEt, levando a obtenção do produto **4f** com 66% de rendimento.

(**4j**) óleo amarelado, 158,7 mg, 66%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.90 (dd, $J = 9.0, 6.0$ Hz, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 6.80 – 6.69 (m, 2H), 3.88 – 3.83 (m, 4H), 3.08 – 3.04 (m, 4H).

5.2.3 Procedimento para a síntese do intermediário **4j**

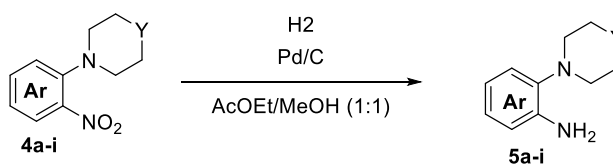


Em uma solução do intermediário **4i** (150,0 mg, 0,545 mmol) em DCM (2 mL), adicionou a Et_3N (0,600 mmol, 60,7 mg) e Boc_2O (0,545 mmol, 119,0 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e foi acompanhada por CCD (9:1 DCM/MeOH). Após 21 horas, a reação foi finalizada evaporando o solvente e adicionando água destilada (50 mL), ficando um óleo insolúvel, que foi lavado com 50 mL de água destilada, concentrado e seco. O sobrenadante foi transferido para um funil de extração, extraiu com AcOEt (30 mL) e a fase

orgânica foi juntada ao óleo concentrada e lavada com solução básica de NaOH (2M, 2x 25 mL). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada e seca, levando a obtenção do produto **4j** com 74% de rendimento.

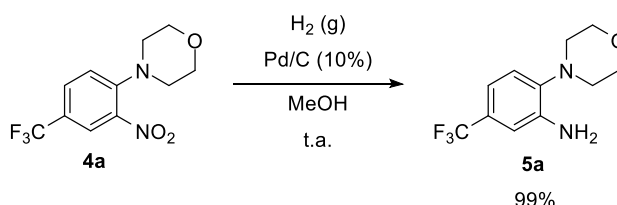
(4j) óleo vermelho, 150,0 mg, 74%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 8.08 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.69 (dd, *J* = 9.1, 1.9 Hz, 1H), 7.17 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.61 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 3.12 (s, 4H), 1.48 (s, 9H).

5.2.4 Procedimento geral B para reação de redução do grupo nitro



Em uma solução do composto nitro, em AcOEt/MeOH (1:1), adicionou o Pd/C, em seguida, foram borbulhados balões de H₂ na solução até o consumo total do composto nitro de partida. As massas dos reagentes, bem como o volume de solventes, utilizados para obtenção de cada composto se encontra nos subtópicos abaixo. A reação foi acompanhada por CCD e foi finalizada filtrando o Pd com celite. O sólido foi então concentrado no rotaevaporador e secado na bomba de vácuo, levando a obtenção do produto.

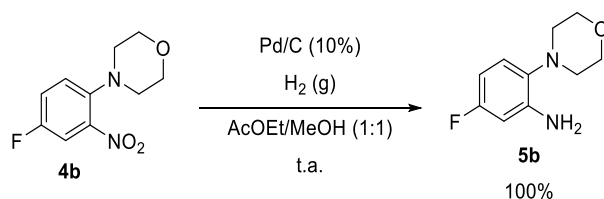
5.2.4.1 Síntese do intermediário **5a**



Em uma solução do composto nitro **4a** (2,0836 g; 7,54 mmol) em MeOH (50 mL), adicionou Pd/C (208 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5a** com 99% de rendimento após 12h de reação.

(5a) sólido laranja, 1,851 g, 99%. **RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)**: 7.01 (dd, *J* = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 6.97 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.84 (ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.8 Hz, 1H), 5.18 (s, 2H), 3.76 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 2.83 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H).

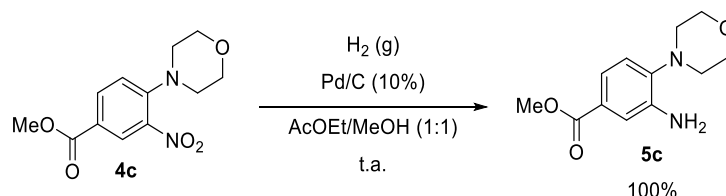
5.2.4.2 Síntese do intermediário **5b**



Em uma solução do composto nitro **4b** (198,8 mg, 0,879 mmol) em AcOEt/MeOH (20 mL), adicionou Pd/C (19,8 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5b** com 100% de rendimento após 2,5 horas de reação.

(5b) sólido vermelho, 172 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 6.93 (dd, $J = 8.5, 5.7$ Hz, 1H), 6.46 – 6.38 (m, 2H), 4.14 (s, 2H), 3.83 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 2.88 – 2.82 (m, 4H).

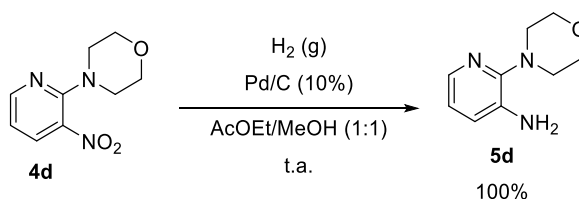
5.2.4.3 Síntese do intermediário **5c**



Em uma solução do composto nitro **4c** (295,2 mg, 1,109 mmol) em AcOEt/MeOH (14 mL), adicionou Pd/C (29,5 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5c** com 100% de rendimento após 1,5 horas de reação.

(5c) sólido rosa pálido, 263,9 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.70 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.87 – 3.83 (m, 7H), 2.92 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H).

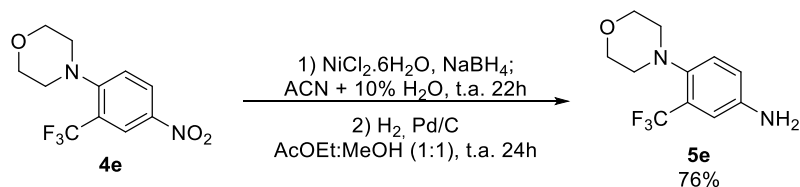
5.2.4.4 Síntese do intermediário **5d**



Em uma solução do composto nitro **4d** (58,3 mg, 0,279 mmol) em AcOEt/MeOH (10 mL), adicionou Pd/C (5,8 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5d** com 100% de rendimento após 45 minutos de reação.

(5d) sólido, 52,3 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 8.34 (dd, $J = 4.5, 1.7$ Hz, 1H), 8.13 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J = 8.0, 4.6$ Hz, 1H), 3.80 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 3.46 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H).

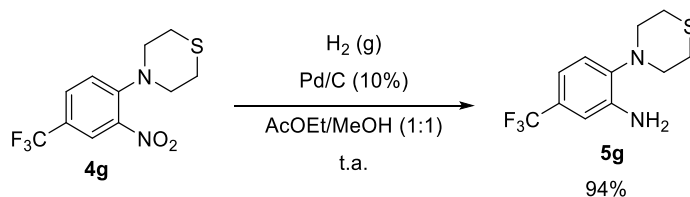
5.2.4.5 Síntese do intermediário **5e**



Em uma solução do composto nitro **4e** (103,0 mg, 0,373 mmol) em ACN (3 mL) e H_2O (0,3 mL), adicionou o $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,187 mmol, 44,3 mg), deixou agitando por 10 minutos e adicionou o NaBH_4 (1,12 mmol, 42,3 mg) aos poucos. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente por 19 horas, adicionando em seguida mais $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,0373 mmol, 8,9 mg) e NaBH_4 (0,124 mmol, 14,1 mg). Após mais 2 horas de reação, a mesma foi finalizada filtrando a solução com papel filtro, diluindo o sobrenadante com AcOEt (30 mL) e lavando com água (20 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada, concentrada e seca, obtendo um material impuro, com intermediários e material de partida. A mistura foi então colocada para reagir por hidrogenação catalítica seguindo o procedimento geral B, obtendo composto com 76% de rendimento após 24 horas de reação.

(5e) sólido marrom escuro, 70,0 mg, 76%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 6.81 (dd, $J = 8.4, 3.0$ Hz, 1H), 3.79 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.73 (s, 2H), 2.83 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H).

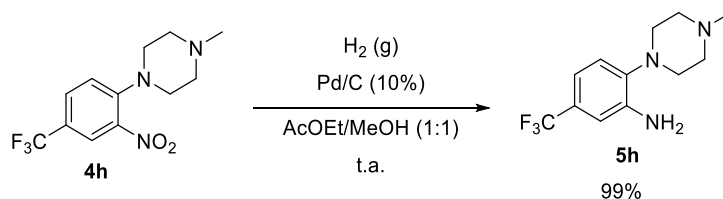
5.2.4.6 Síntese do intermediário **5g**



Em uma solução do composto nitro **4g** (173,8 mg, 0,595 mmol) em AcOEt/MeOH (20 mL), adicionou Pd/C (17,4 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5g** com 94% de rendimento após 24 horas de reação.

(5g) sólido laranja, 147,2 mg, 94%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.02 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.07 (s, 2H), 3.18 – 3.12 (m, 4H), 2.83 – 2.78 (m, 4H).

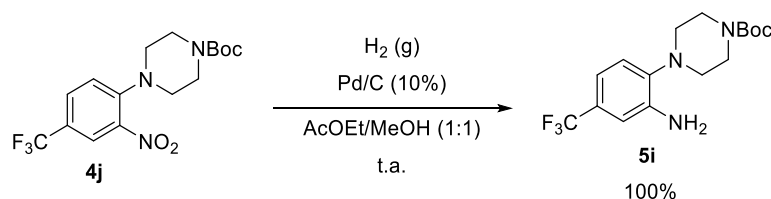
5.2.4.7 Síntese do intermediário **5h**



Em uma solução do composto nitro **4h** (192,8 mg, 0,667 mmol) em AcOEt/MeOH (22 mL), adicionou Pd/C (19,3 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5h** com 99% de rendimento após 24 horas de reação.

(**5h**) sólido vermelho, 172,9 mg, 99%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7.04 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.3, 2.6$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 4.06 (s, 2H), 2.97 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 2.65 – 2.54 (m, 4H), 2.37 (s, 3H).

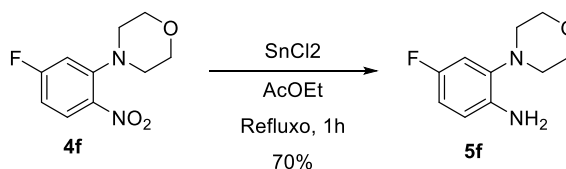
5.2.4.8 Síntese do intermediário **5i**



Em uma solução do composto nitro **4j** (135,0 mg, 0,360 mmol) em AcOEt/MeOH (7,2 mL), adicionou Pd/C (13,5 mg). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e seguiu o procedimento geral B, levando a obtenção do produto **5i** com 100% de rendimento após 29 horas de reação.

(**5i**) óleo vermelho, 116,1 mg, 100%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 6.99 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.61 – 3.52 (m, 4H), 2.87 (t, $J = 5.2$ Hz, 4H), 1.49 (s, 9H).

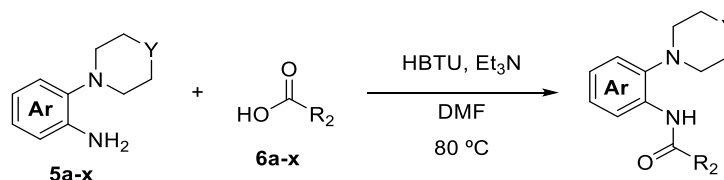
5.2.5 Procedimento para a síntese do intermediário **5f**



Em uma solução do composto nitro **4f** (158,7 mg, 0,702 mmol) em AcOEt (5 mL), adicionou o cloreto de estanho (1,1 g, 5,62 mmol). A reação ficou em agitação com refluxo por 1 hora e foi acompanhada por CCD (9:1 AcOEt/Hex). A reação foi finalizada resfriando até temperatura ambiente, adicionando 10 mL de solução básica de bicarbonato de potássio (KHCO_3). O precipitado formado foi filtrado e o sobrenadante foi diluído com 15 mL de água

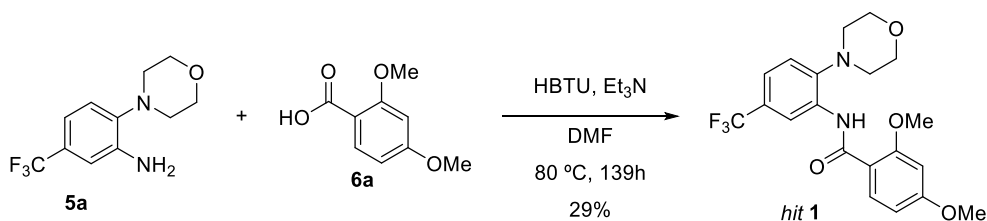
destilada e extraído com AcOEt (2x 20 mL). As fases orgânicas foram secas com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada e seca, levando a obtenção do produto **5f** com 70% de rendimento. (**5f**) óleo vermelho escuro, 96,0 mg, 70%. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 6.73 (ddd, *J* = 10.1, 2.0, 1.1 Hz, 1H), 6.68 – 6.66 (m, 1H), 6.65 – 6.64 (m, 1H), 3.89 – 3.72 (m, 6H), 2.93 – 2.86 (m, 4H).

5.2.6 Procedimento geral C para a reação de amidação com HBTU



Em uma solução da anilina em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico, o HBTU e a trietilamina. As massas dos reagentes utilizados para obtenção de cada composto se encontram nos subtópicos a seguir. A reação ficou em agitação entre 60 e 90 °C, sendo acompanhada por CCD, e foi finalizada adicionando água destilada gelada (25 mL) a temperatura ambiente, ocorrendo a formação de precipitado, que foi filtrado. Em seguida, o sólido foi solubilizado em DCM (25 mL) e extraído com solução básica de NaOH (2M, 2x 20 mL), a fase orgânica foi secada com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada e seca no rotaevaporador. O produto foi submetido a uma recristalização com metanol e água, filtrado e seco. Em seguida, o sólido foi purificado por coluna cromatográfica, utilizando sílica flash com uma mistura de 70% hexano e 30% AcOEt como eluente. Por fim, foi feito o tratamento da graxa com hexano, secando o composto na bomba de alto vácuo, levando a obtenção do produto.

5.2.6.1 Síntese do composto hit 1

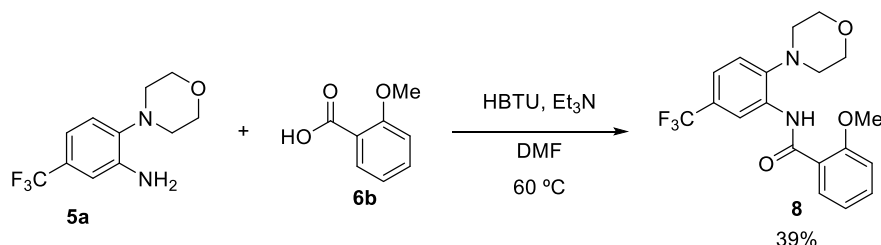


Em uma solução da anilina **5a** (30,0 mg, 0,122 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,244 mmol, 44,5 mg), o HBTU (0,244 mmol, 92,0 mg) e a trietilamina (0,366 mmol, 37,0 mg, 51 µL). A reação ficou em agitação a 80 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto *hit 1* com 29% de rendimento após 139 horas de reação.

(**1**) sólido branco, 14,6 mg, 29%. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 10.36 (s, 1H), 8.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.91 – 3.86 (m, 7H), 2.96 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H). RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 163.5, 162.7, 158.2, 144.3, 134.0, 133.5,

126.5 (q, $J = 32.4$ Hz), 123.6 (q, $J = 272.0$ Hz), 120.2 (q, $J = 4.0$ Hz), 119.0, 118.2 (q, $J = 4.1$ Hz), 114.2, 105.4, 98.5, 66.7, 56.0, 55.1, 51.5.

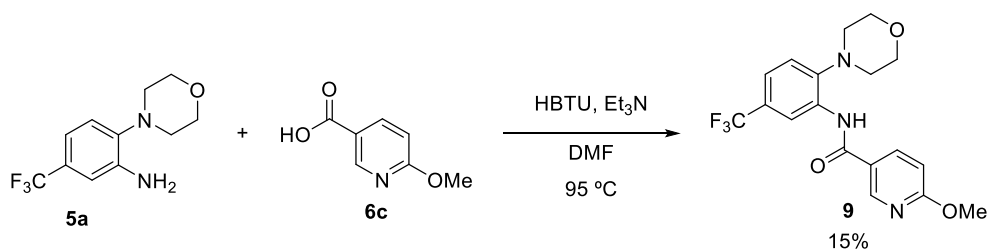
5.2.6.2 Síntese do composto 8



Em uma solução da anilina **5a** (50,0 mg, 0,20 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6b** (0,4 mmol, 60,9 mg), o HBTU (0,40 mmol, 151,7 mg) e a trietilamina (0,6 mmol, 60,7 mg, 84 μ L). A reação ficou em agitação a 60 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **8** com 39% de rendimento após 125 horas de reação.

(8) sólido branco, 30,1 mg, 39% de rendimento. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ** 10.49 (s, 1H), 8.89 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.31 (dd, $J = 7.8, 1.9$ Hz, 1H), 7.56 – 7.51 (m, 1H), 7.36 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.17 (td, $J = 7.6, 1.1$ Hz, 1H), 7.08 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.12 (s, 3H), 3.89 (t, $J = 4,6$ Hz, 4H), 2.97 (t, $J = 4,6$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) δ** 163.4, 157.4, 144.9, 133.9, 133.6, 132.8, 127.1 (q, $J = 32,8$ Hz), 124.2 (q, $J = 272,4$ Hz), 121.9, 121.9, 121.0 (q, $J = 4.0$ Hz), 119.7, 118.6 (q, $J = 3.9$ Hz), 67.2, 56.6, 52.1.

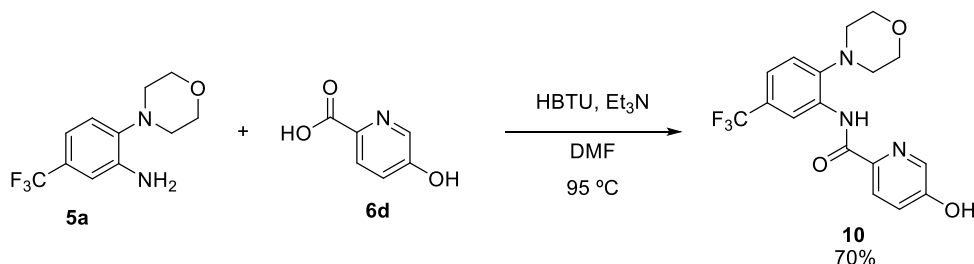
5.2.6.3 Síntese do composto 9



Em uma solução da anilina **5a** (50,0 mg, 0,20 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6c** (0,30 mmol, 45,9 mg), o HBTU (0,30 mmol, 113,8 mg) e a trietilamina (0,6 mmol, 60,7 mg, 85 μ L). A reação ficou em agitação a 95 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **9** com 15% de rendimento após 147 horas de reação.

(9) sólido branco, 11,3 mg, 15%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ** 9.29 (s, 1H), 8.88 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.73 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 4.04 (s, 3H), 3.95 – 3.91 (m, 4H), 2.98 – 2.93 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) δ** 166.7, 163.3, 146.3, 144.0, 138.0, 134.1, 123.9, 121.1 (d, J = 4.6 Hz), 117.0, 111.7, 67.7, 54.3, 52.6.

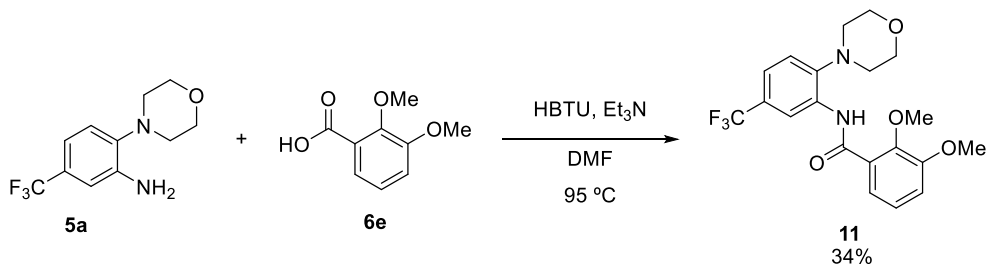
5.2.6.4 Síntese do composto 10



Em uma solução da anilina **5a** (50,0 mg, 0,20 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6d** (0,579 mmol, 80,5 mg), o HBTU (0,609 mmol, 231,0 mg) e a trietilamina (0,812 mmol, 82,2 mg, 110 μL). A reação ficou em agitação a 95 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **10** com 70% de rendimento após 94 horas de reação.

(10) solido marrom escuro, 52,4 mg, 70%. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10.87 (s, 1H), 8.89 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.19 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.03 – 3.99 (m, 4H), 3.03 – 2.97 (m, 4H). RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) δ 162.2, 155.4, 144.5, 142.7, 136.8, 133.3, 124.0, 123.4, 120.8 (d, $J = 3.7$ Hz), 119.9, 116.6 (d, $J = 4.0$ Hz), 67.4, 52.1.

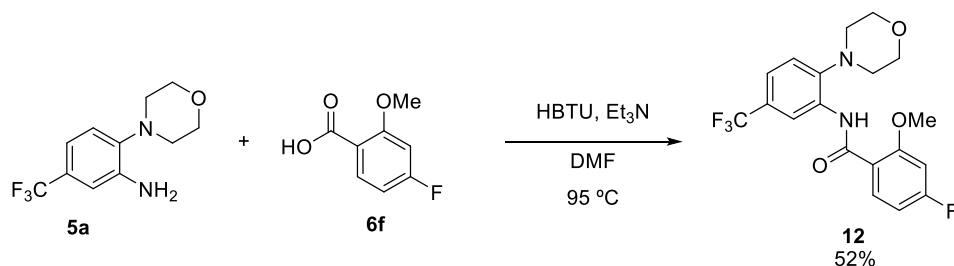
5.2.6.5 Síntese do composto **11**



Em uma solução da anilina **5a** (30,0 mg, 0,122 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6e** (0,183 mmol, 33,3 mg), o HBTU (0,183 mmol, 69,4 mg) e a trietilamina (0,366 mmol, 37,0 mg, 51 μL). A reação ficou em agitação a 95 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **11** com 34% de rendimento após 120 horas de reação.

(11) solido branco, 17,0 mg, 34% RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10.99 (s, 1H), 9.05 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 7.13 (dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, 1H), 4.01 (s, 3H), 3.97 – 3.93 (m, 7H), 2.97 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H). RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3) δ 163.3, 152.8, 147.7, 144.4, 134.5, 127.5, 127.2, 126.8, 124.6, 123.1, 120.8 (d, $J = 4.0$ Hz), 120.1, 117.7 – 117.5 (m), 116.1, 67.0, 61.4, 56.2, 52.3.

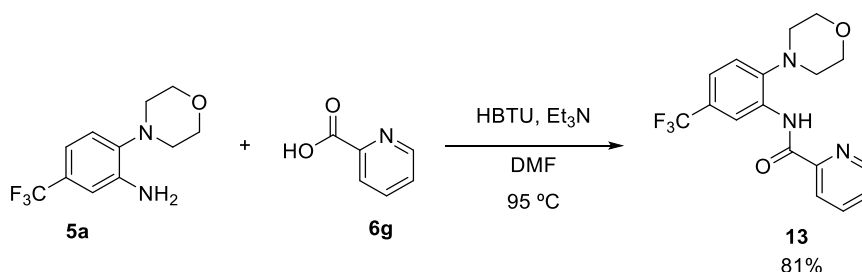
5.2.6.6 Síntese do composto 12



Em uma solução da anilina **5a** (30,0 mg, 0,122 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6f** (0,244 mmol, 41,5 mg), o HBTU (0,244 mmol, 92,5 mg) e a trietilamina (0,488 mmol, 49,4 mg, 68 μL). A reação ficou em agitação a 95 $^\circ\text{C}$ e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **12** com 52% de rendimento após 51 horas de reação.

(**12**) solido amarelo, 25,4 mg, 52% **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.34 (s, 1H), 8.85 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.33 (dd, $J = 8.8, 7.0$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.3, 2.8$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.87 (ddd, $J = 8.7, 7.5, 2.3$ Hz, 1H), 6.79 (dd, $J = 10.4, 2.4$ Hz, 1H), 4.12 (s, 3H), 3.90 – 3.87 (m, 4H), 2.98 – 2.94 (m, 5H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.8 (d, $J = 465.8$ Hz), 164.6, 158.7, 144.8, 134.9 (d, $J = 10.6$ Hz), 133.8, 127.2 (d, $J = 32.6$ Hz), 121.1 (t, $J = 4.0$ Hz), 119.8, 118.7 (d, $J = 3.7$ Hz), 108.9 (d, $J = 21.3$ Hz), 100.0 (d, $J = 26.4$ Hz), 67.2, 57.0, 52.1.

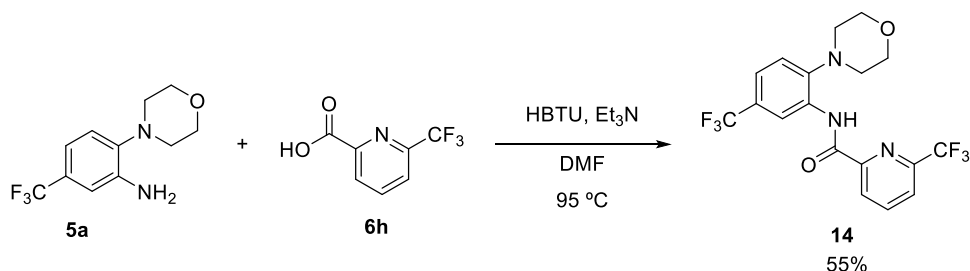
5.2.6.7 Síntese do composto 13



Em uma solução da anilina **5a** (32,7 mg, 0,133 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6g** (0,400 mmol, 49,0 mg), o HBTU (0,400 mmol, 151,7 mg) e a trietilamina (0,532 mmol, 53,8 mg, 75 μL). A reação ficou em agitação a 95 $^\circ\text{C}$ e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **13** com 81% de rendimento após 68 horas de reação.

(**13**) solido marrom, 37,8 mg, 81% **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 11.09 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.69 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.96 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 7.7, 4.7$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.26 (d, $J = 15.7$ Hz, 1H), 4.03 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H), 3.02 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 162.1, 150.0, 148.3, 144.6, 137.8, 133.2, 127.2 (d, $J = 33.0$ Hz), 126.6, 124.1 (d, $J = 272.2$ Hz), 122.5, 121.0 (q, $J = 3.9$ Hz), 120.0, 116.7 (q, $J = 4.0$ Hz), 67.4, 52.1.

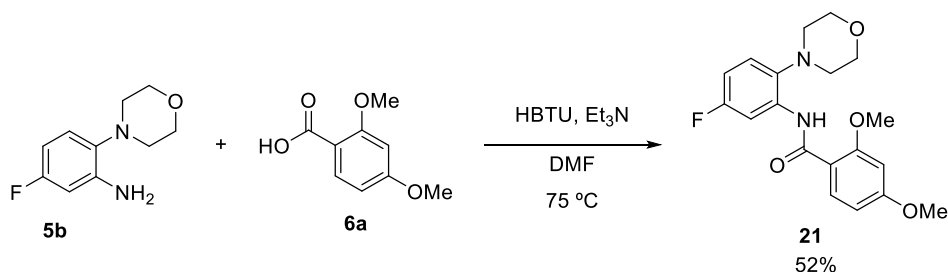
5.2.6.8 Síntese do composto **14**



Em uma solução da anilina **5a** (34,3 mg, 0,139 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6h** (0,556 mmol, 106,3 mg), o HBTU (0,556 mmol, 210,8 mg) e a trietilamina (0,695 mmol, 70,5 mg, 97 μL). A reação ficou em agitação a 95 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **14** com 55% de rendimento após 42 horas de reação.

(14) solido marrom escuro, 32,3 mg, 55% **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 11.03 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.16 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.92 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.02 – 3.96 (m, 4H), 3.00 – 2.94 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 160.7, 150.6, 147.1 (d, $J = 35.9$ Hz), 144.8, 139.6, 133.3, 127.6 (d, $J = 32.6$ Hz), 125.3, 123.1 (d, $J = 2.6$ Hz), 121.4 (q, $J = 4.0$ Hz), 120.8, 116.8 – 116.4 (m), 67.1, 52.4.

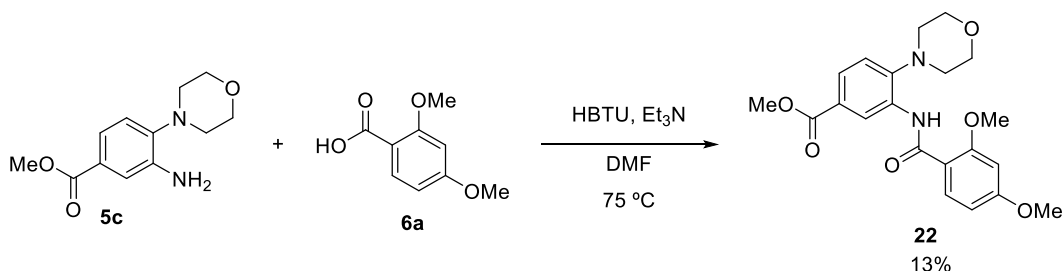
5.2.6.9 Síntese do composto **21**



Em uma solução da anilina **5b** (29,6 mg, 0,150 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,300 mmol, 54,7 mg), o HBTU (0,300 mmol, 113,8 mg) e a trietilamina (0,45 mmol, 45,5 mg, 63 μL). A reação ficou em agitação a 75 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **21** com 52% de rendimento após 26 horas de reação.

(21) solido bege, 28 mg, 52%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.45 (s, 1H), 8.40 (dd, $J = 11.3, 3.2$ Hz, 1H), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 8.9, 5.6$ Hz, 1H), 6.76 (td, $J = 8.3, 3.0$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.90 – 3.84 (m, 7H), 2.89 (t, $J = 4.5$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 163.9, 163.3, 161.2, 158.8 (d, $J = 8.5$ Hz), 137.7 (d, $J = 2.9$ Hz), 135.4 (d, $J = 12.1$ Hz), 134.4, 120.8 (d, $J = 9.6$ Hz), 115.2, 109.8 (d, $J = 22.7$ Hz), 108.7 (d, $J = 28.7$ Hz), 105.9, 99.0, 67.4, 56.6, 55.6, 52.8.

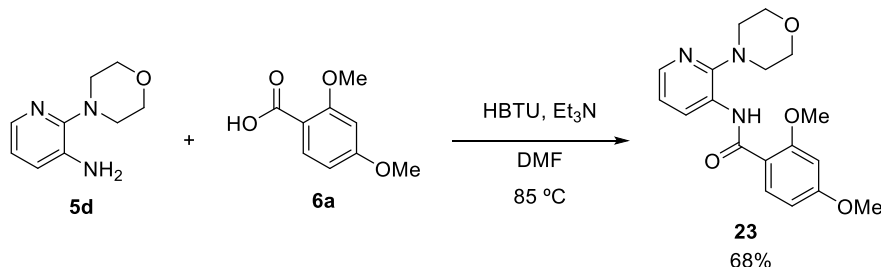
5.2.6.10 Síntese do composto 22



Em uma solução da anilina **5c** (50,0 mg, 0,212 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,424 mmol, 77,2 mg), o HBTU (0,424 mmol, 160,8 mg) e a trietilamina (0,636 mmol, 160,8 mg, 221 μL). A reação ficou em agitação a 75 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **22** com 13% de rendimento após 23 horas de reação.

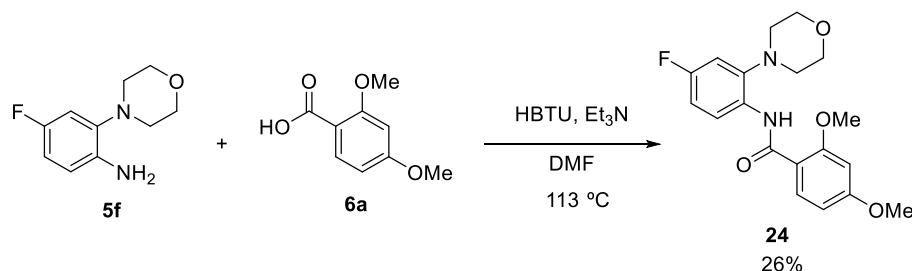
(22) sólido amarelo, 11,1 mg, 13%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.53 (s, 1H), 8.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), .26 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.89 – 7.83 (m, 2H), 6.68 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.90 (dd, $J = 5.9, 3.9$ Hz, 10H), 2.96 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 166.8, 164.1, 163.4, 158.8, 141.6, 138.3, 134.5, 127.2, 125.1, 121.3, 120.5, 115.0, 106.0, 99.0, 67.3, 56.7, 55.6, 52.4, 52.0.

5.2.6.11 Síntese do composto 23



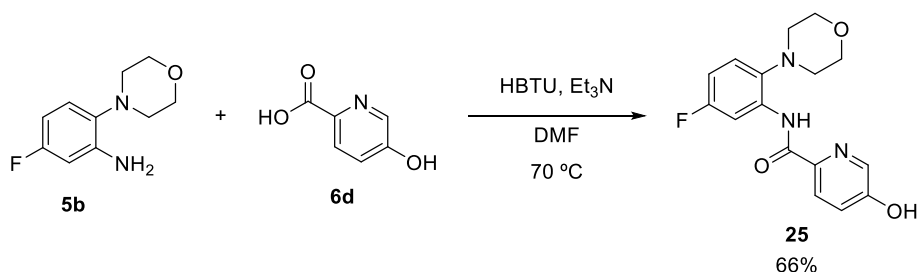
Em uma solução da anilina **5d** (48,5 mg, 0,271 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,813 mmol, 148,1 mg), o HBTU (0,813 mmol, 316,0 mg) e a trietilamina (1,36 mmol, 137,1 mg, 189 μL). A reação ficou em agitação a 85 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **23** com 65% de rendimento após 75 horas de reação.

(23) sólido vermelho escuro, 63,6 mg, 68%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.18 (s, 1H), 8.73 (dd, $J = 8.0, 1.8$ Hz, 1H), 8.27 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.09 (dd, $J = 4.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 8.1, 4.8$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.11 (s, 3H), 3.89 (d, $J = 4.2$ Hz, 7H), 3.17 – 3.11 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.1, 163.4, 158.8, 153.4, 142.4, 134.4, 128.9, 128.3, 119.9, 114.5, 105.9, 98.9, 67.2, 56.5, 55.6, 50.3.

5.2.6.12 Síntese do composto **24**

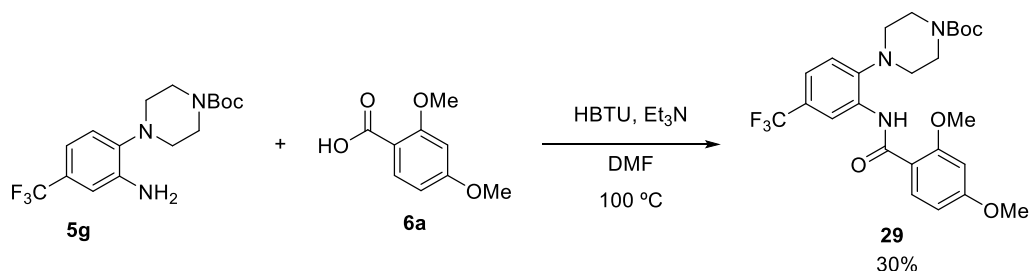
Em uma solução da anilina **5f** (33,1 mg, 0,169 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,507 mmol, 92,4 mg), o HBTU (0,507 mmol, 192,0 mg) e a trietilamina (0,845 mmol, 85,5 mg, 118 μ L). A reação ficou em agitação a 113 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **24** após 46 horas, porém o material ainda está impuro.

(24) sólido amarelo, 16,0 mg, 26%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.19 (s, 1H), 8.46 – 8.40 (m, 1H), 8.29 (s, 1H), 6.89 – 6.83 (m, 2H), 6.67 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.09 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 2.91 (t, $J = 4.7$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 163.5 (d, $J = 83.6$ Hz), 160.6, 158.8, 158.2, 143.9 (d, $J = 7.3$ Hz), 134.6, 129.8 (d, $J = 2.9$ Hz), 123.1 (d, $J = 8.8$ Hz), 115.1, 111.2 (d, $J = 21.6$ Hz), 107.2 (d, $J = 23.5$ Hz), 105.9, 99.1, 67.4, 56.6, 55.8, 52.3.

5.2.6.13 Síntese do composto **25**

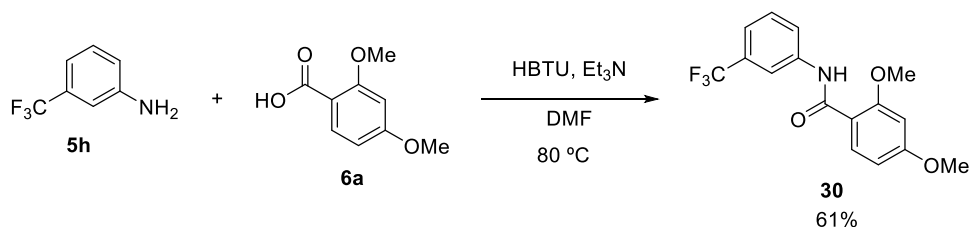
Em uma solução da anilina **5b** (32,4 mg, 0,165 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6b** (0,495 mmol, 68,9 mg), o HBTU (0,495 mmol, 187,7 mg) e a trietilamina (0,660 mmol, 66,8 mg, 92 μ L). A reação ficou em agitação a 70 °C e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **25** com 66% de rendimento após 71 horas de reação.

(25) sólido marrom, 34,4 mg, 66%. **RMN de ^1H (400 MHz, DMSO)** δ 10.97 (s, 1H), 8.30 – 8.20 (m, 2H), 8.04 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.38 (dd, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 8.8, 5.8$ Hz, 1H), 6.91 (td, $J = 8.5, 3.0$ Hz, 1H), 3.84 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 2.84 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO)** δ 161.8, 159.1 (d, $J = 238.8$ Hz), 157.1, 140.5, 137.8 (d, $J = 2.9$ Hz), 137.2, 134.3 (d, $J = 12.5$ Hz), 123.8, 123.2, 122.3 (d, $J = 9.9$ Hz), 109.5 (d, $J = 22.4$ Hz), 105.3 (d, $J = 28.6$ Hz), 66.9, 52.2.

5.2.6.14 Síntese do composto **29**

Em uma solução da anilina **5g** (27,0 mg, 0,078 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (0,310 mmol, 56,8 mg), o HBTU (0,310 mmol, 117,6 mg) e a trietilamina (0,39 mmol, 39,0 mg, 54 μL). A reação ficou em agitação a 100 $^{\circ}\text{C}$ e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **29** com 30% de rendimento após 114 horas de reação.

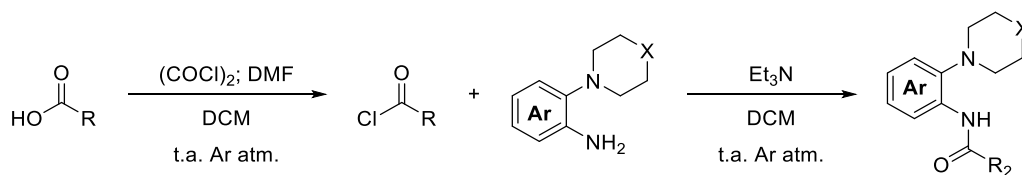
(29) óleo avermelhado, 12 mg, 30%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.36 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 1H), 7.17 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.61 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 2.90 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 1.49 (s, 9H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.2, 163.4, 158.9, 154.8, 145.0, 134.6, 134.1, 127.1 (q, $J = 32.6$ Hz), 125.4, 124.3 (q, $J = 273.0$ Hz), 120.8 (q, $J = 3.9$ Hz), 119.8, 118.8 (q, $J = 3.9$ Hz), 114.9, 106.2, 99.2, 56.7, 55.8, 51.8, 29.8, 28.6.

5.2.6.15 Síntese do composto **30**

Em uma solução da anilina **5h** (60,4 mg, 0,375 mmol) em DMF (2 mL), adicionou o ácido carboxílico **6a** (1,46 mmol, 265,3 mg), o HBTU (1,46 mmol, 567,0 mg) e a trietilamina (1,88 mmol, 189,8 mg, 262 μL). A reação ficou em agitação a 80 $^{\circ}\text{C}$ e seguiu o procedimento geral C, levando a obtenção do produto **30** com 61% de rendimento após 89 horas de reação.

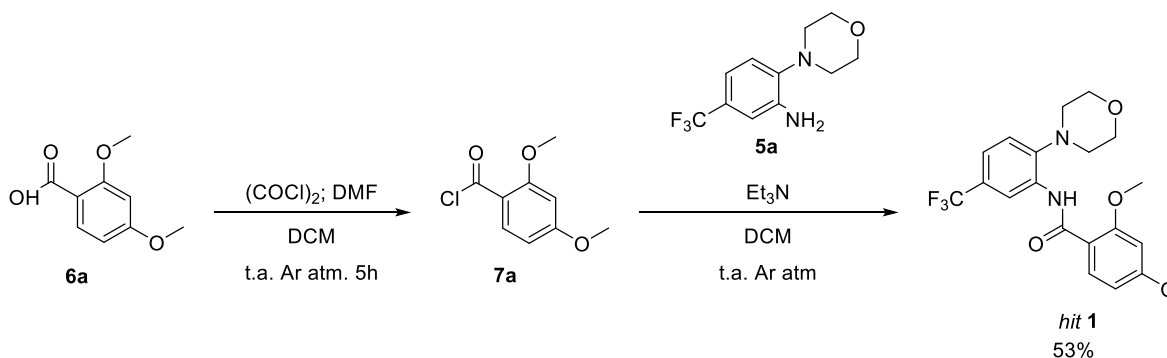
(30) sólido vermelho, 74,3 mg, 61%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9.83 (s, 1H), 8.26 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 7.8, 0.7$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.06 (s, 3H), 3.88 (s, 3H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.2, 163.5, 158.8, 139.3, 134.5, 129.6, 123.6, 120.8, 120.5 (d, $J = 3.7$ Hz), 117.1 (d, $J = 4.0$ Hz), 114.4, 106.0, 99.0, 56.5, 55.8.

5.2.7 Procedimento geral D para a reação de amidação via cloreto de acila



Em um balão, o ácido carboxílico (1 eq. do cloreto de acila desejado) ficou em atmosfera de argônio, em seguida, foi solubilizado em DCM anidro (2 mL) e adicionou-se o cloreto de oxalila (5 eq. do ácido carboxílico) e duas gotas de DMF anidro. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e atmosfera de argônio por 2 horas, e foi finalizada evaporando e secando o solvente juntamente com o cloreto de oxalila residual, partindo para a próxima etapa da reação. Em uma solução do cloreto de acila em DCM anidro (2 mL), adicionou a solução da anilina **5** com a trietilamina anidra em DCM anidro (2 mL). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente com atmosfera de argônio e foi acompanhada por CCD. A reação foi finalizada adicionando 25 mL de água destilada e a mistura foi transferida para um funil de extração, onde foi feita uma extração com diclorometano (15 mL). Em seguida, a fase orgânica foi lavada com solução básica de NaOH (2 M, 25 mL), secada com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada e seca. O produto foi então purificado por coluna cromatográfica utilizando sílica flash utilizando uma mistura de 70% hexanos e 30% de AcOEt como eluente.

5.2.7.1 Síntese do Hit 1

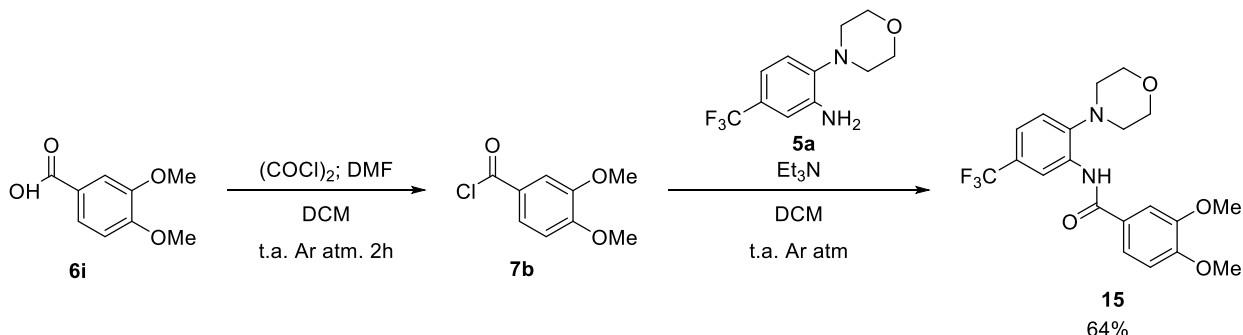


Para a síntese do *hit 1*, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5a** (30,0 mg, 0,122 mmol), o cloreto de acila **7a** (0,487 mmol, 97,8 mg) e a Et₃N (0,24 mmol, 24,7 mg, 34 µL) em DCM anidro (2 mL). Após 114 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto *hit 1* foi obtido com 53% de rendimento.

(1) sólido branco, 26,5 mg, 53%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 10.36 (s, 1H), 8.86 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1H), 6.58 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.91 – 3.86 (m, 7H), 2.96 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** δ 163.5, 162.7, 158.2, 144.3, 133.9, 133.5,

126.5 (q, $J = 32.4$ Hz), 123.6 (q, $J = 272.0$ Hz), 120.2 (q, $J = 4.0$ Hz), 119.0, 118.2 (q, $J = 4.1$ Hz), 114.2, 105.4, 98.5, 66.7, 56.0, 55.1, 51.5.

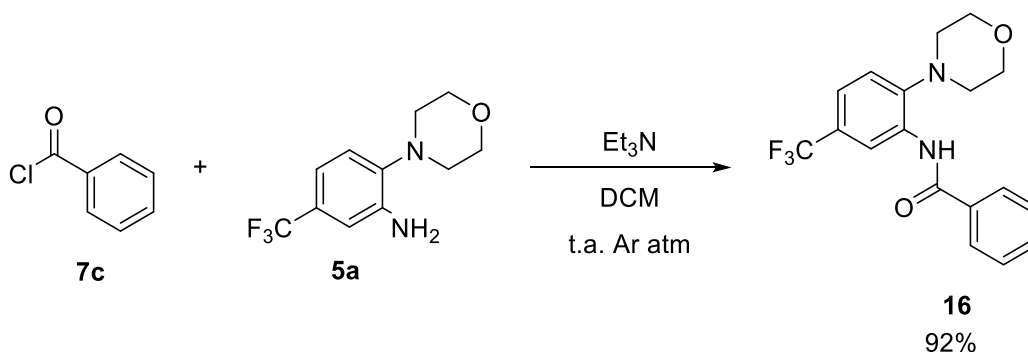
5.2.7.2 Síntese do composto **15**



Para a síntese do composto **15**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5a** (50,0 mg, 0,200 mmol), o cloreto de acila **7b** (0,600 mmol, 120,4 mg) e a Et₃N (0,200 mmol, 20,2 mg, 27 μ L) em DCM anidro (2 mL). Após 91 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto **15** foi obtido com 64% de rendimento.

(15) sólido branco, 52 mg, 64% **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.33 (s, 1H), 8.90 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.94 – 3.90 (m, 4H), 2.99 – 2.93 (m, 4H). **RMN de ¹³C (101 MHz, CDCl₃)** δ 164.4, 152.5, 149.5, 143.7, 134.1, 127.1, 129.3 – 122.2 (m), 120.8, 120.7 – 120.4 (m), 119.0, 116.7 (d, $J = 4.1$ Hz), 110.8, 110.6, 67.7, 56.1 (d, $J = 1.7$ Hz), 52.4.

5.2.7.3 Síntese do composto **16**

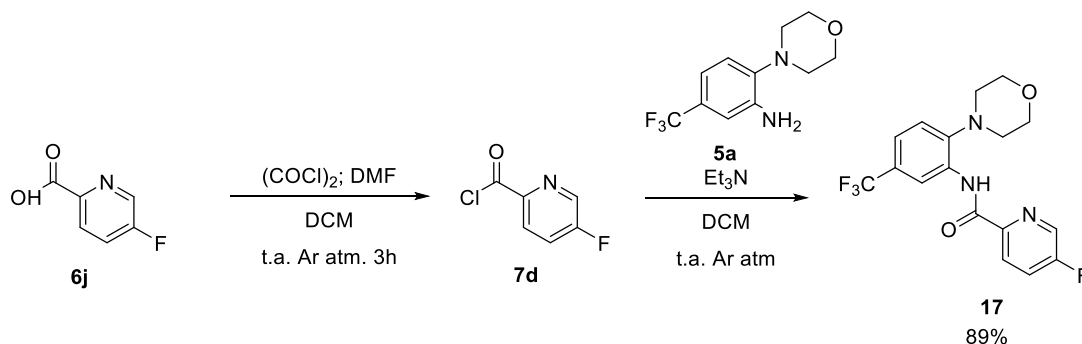


Para a síntese do composto **16**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5a** (20,0 mg, 0,081 mmol), o cloreto de acila, obtido comercialmente, **7c** (0,162 mmol, 23,0 mg) e a Et₃N (0,200 mmol, 20,2 mg, 27 μ L) em DCM anidro (2 mL). Após 150 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto **16** foi obtido com 92% de rendimento.

(16) sólido branco, 26,1 mg, 92%. **RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃)** δ 9.38 (s, 1H), 8.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 8.13 – 8.08 (m, 1H), 7.95 – 7.90 (m, 2H), 7.63 – 7.52 (m, 3H), 7.47 (t, $J = 7.7$ Hz,

1H), 7.41 – 7.36 (m, 1H), 7.30 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 3.94 – 3.89 (m, 4H), 2.98 – 2.94 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 169.9, 164.9, 143.8, 134.5, 134.0, 133.6, 132.2, 130.2, 129.1, 128.5, 128.2, 127.9, 126.9, 120.9, 120.9, 120.8, 120.8, 116.9, 116.8, 116.8, 116.8, 67.6, 52.4.

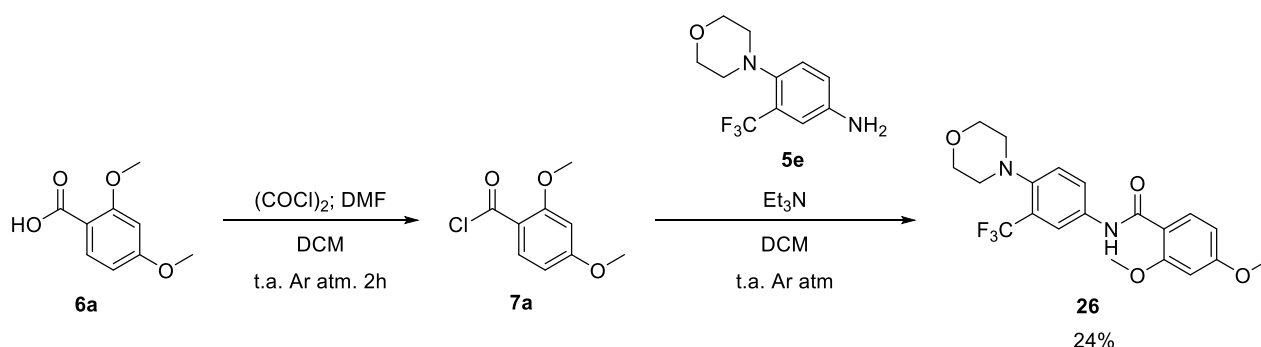
5.2.7.4 Síntese do composto 17



Para a síntese do composto **17**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5a** (30,0 mg, 0,122 mmol), o cloreto de acila **7d** (0,487 mmol, 77,7 mg) e a Et_3N (0,365 mmol, 37,0 mg, 50 μL) em DCM anidro (2 mL). Após 19 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto **17** foi obtido com 89% de rendimento.

(**17**) sólido branco 39,9 mg, 88%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9 10.87 (s, 1H), 8.88 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.51 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 8.34 (dd, $J = 8.6, 4.6$ Hz, 1H), 7.62 (td, $J = 8.3, 2.8$ Hz, 1H), 7.37 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.01 – 3.96 (m, 4H), 3.01 – 2.95 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 162.7, 160.6 (d, $J = 92.1$ Hz), 146.4 (d, $J = 4.0$ Hz), 144.6, 136.9 (d, $J = 25.3$ Hz), 133.1, 127.3 (q, $J = 32.6$ Hz), 128.3 – 122.6 (m), 124.6 – 124.3 (m), 124.2, 121.1 (q, $J = 3.9$ Hz), 120.1, 116.6 (q, $J = 4.0$ Hz), 67.4, 52.2.

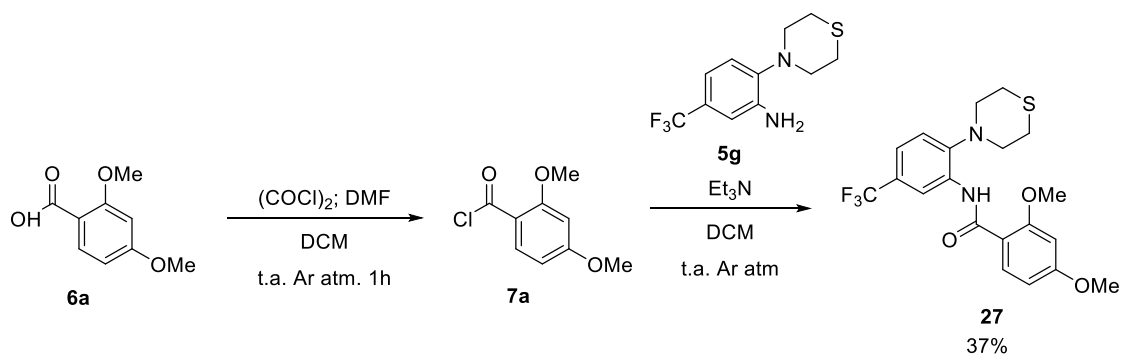
5.2.7.5 Síntese do composto 26



Para a síntese do composto **26**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5e** (33,0 mg, 0,134 mmol), o cloreto de acila **7a** (0,536 mmol, 107,5 mg) e a Et_3N (0,268 mmol, 27,1 mg, 37 μL) em DCM anidro (2 mL). Após 116 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto **26** foi obtido com 24% de rendimento.

(**26**) sólido branco, 13 mg, 24% **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9.74 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.95 (dd, $J = 8.2, 2.7$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.66 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.84 – 3.81 (m, 4H), 2.92 – 2.88 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.2, 163.4, 158.8, 147.9, 135.9, 134.5, 128.7 – 127.7 (m), 124.9, 124.9, 128.0 – 119.7 (m), 119.4, 119.3, 119.3, 119.2, 106.0, 99.0, 67.6, 56.5, 55.8, 54.0.

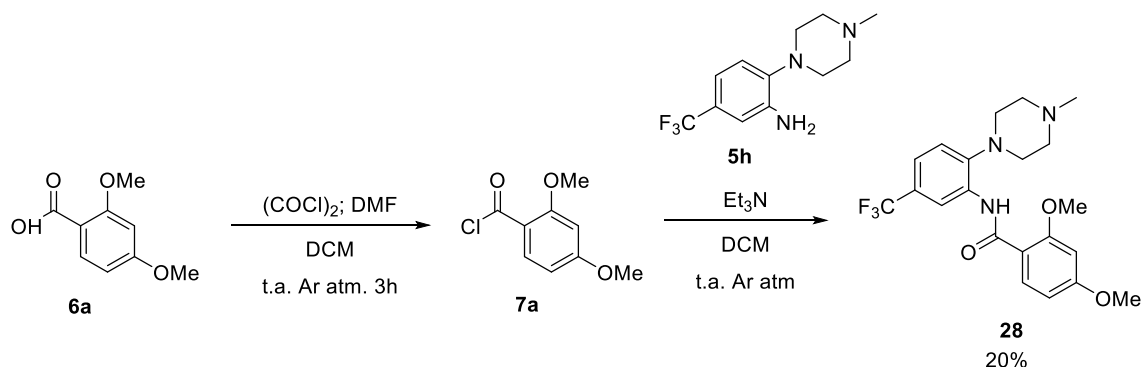
5.2.7.6 Síntese do composto **27**



Para a síntese do composto **27**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5g** (40,0 mg, 0,153 mmol), o cloreto de acila **7a** (0,612 mmol, 122,8 mg) e a Et_3N (0,46 mmol, 46,5 mg, 64 μL) em DCM anidro (2 mL). Após 28 horas a temperatura ambiente e atmosfera de argônio, o produto **27** foi obtido com 37% de rendimento.

(**27**) sólido amarelo claro, 24,4 mg, 37%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.33 (s, 1H), 8.88 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 8.29 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.10 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.22 – 3.14 (m, 4H), 2.88 – 2.78 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.2, 163.5, 158.8, 146.1, 134.7, 134.4, 127.4 (d, $J = 32.3$ Hz), 120.7 (q, $J = 4.0$ Hz), 120.6, 120.3, 118.7 (q, $J = 4.0$ Hz), 114.9, 106.1, 99.2, 56.6, 55.8, 54.4, 28.4.

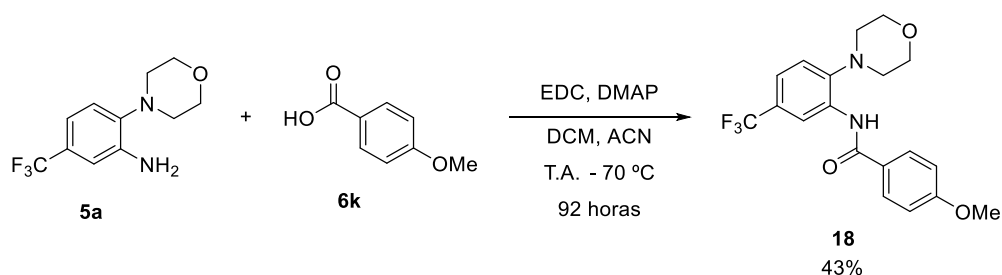
5.2.7.7 Síntese do composto **28**



Para a síntese do composto **28**, foi utilizado o procedimento geral D, com a anilina **5h** (52,2 mg, 0,201 mmol), o cloreto de acila **7a** (0,804 mmol, 161,3 mg) e a Et_3N (0,603 mmol, 61,0 mg, 84 μL) em DCM anidro (2 mL). Após 45 horas a temperatura ambiente e atmosfera de Argônio, o produto **28** foi obtido com 20% de rendimento.

(28) sólido marrom claro, 17,2 mg, 20%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.34 (s, 1H), 8.85 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.35 – 7.30 (m, 1H), 7.21 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.68 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H), 2.62 (s, 4H), 2.38 (s, 3H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.0, 163.3, 158.8, 145.2, 134.5, 134.0, 127.4 – 126.2 (m), 121.5 (d, $J = 271.8$ Hz), 120.6 (q, $J = 4.0$ Hz), 119.6, 118.6 – 118.3 (m), 114.9, 105.8, 98.9, 56.6, 55.6, 55.4, 51.6, 46.2.

5.2.8 Procedimento para a síntese do composto **18**

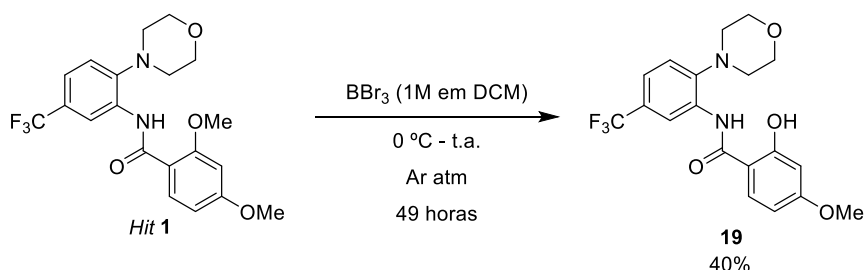


Em uma solução da anilina **5a** (20,0 mg, 0,0812 mmol) em DCM (2 mL), foi adicionado o ácido carboxílico **6k** (16,1 mg, 0,106 mmol), o EDC (20,3 mg, 0,106 mmol) e o DMAP (3,0 mg, 0,025 mmol). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente, acompanhada por CCD, e, após 16 horas constatou pouca evolução da reação, sendo logo em seguida colocada em refluxo a 40°C . Após 24 horas, tinha aumentado um pouco a quantidade de produto, porém a amina de partida ainda estava em maior quantidade, dessa forma, foi adicionado mais DMAP (4,0 mg). Ao constatar que a reação não tinha evoluído, após 18 horas, adicionou 4 mL de acetonitrila e aumentou a temperatura para 70°C . A reação foi finalizada resfriando-a e adicionando água destilada gelada (20 mL) em banho de gelo, não ocorrendo a formação de

precipitado. A solução foi extraída com DCM (5 mL), em seguida, a fase orgânica foi lavada com uma solução de NaOH (4 M, 25 mL). O sólido obtido foi purificado através de uma coluna de placa preparativa (CPP), levando a obtenção do produto **18** com 43% de rendimento.

(18) sólido branco, 13,4 mg, 43%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9.28 (s, 1H), 8.90 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.36 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.03 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.95 – 3.89 (m, 7H), 2.98 – 2.93 (m, 4H). **RMN de ^{13}C APT (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.4, 162.8, 143.7, 134.2, 128.8, 126.7, 120.7, 120.6 (d, J = 4.0 Hz), 116.8 (d, J = 4.1 Hz), 114.3, 67.6, 55.5, 52.4.

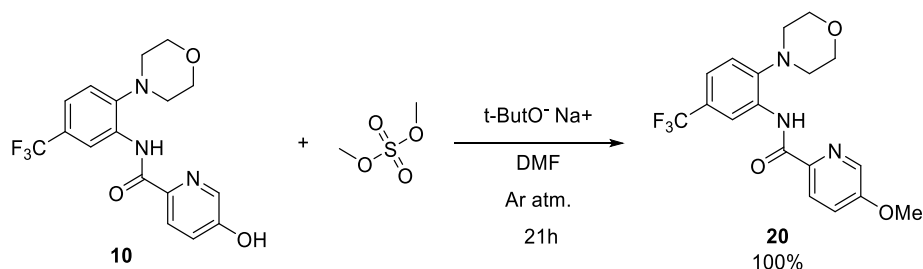
5.2.9 Procedimento para a síntese do composto 19



Em um balão contendo o hit **1** (20,0 mg, 0,0487 mmol), foi adicionado 1,0 mL de uma solução de BBr_3 1M em DCM (aproximadamente 10 eq. para cada metoxila, totalizando 20 eq.), em banho de gelo e atmosfera de argônio. A reação ficou em agitação a temperatura ambiente e foi acompanhada por CCD (6:4 hexano/acetato de etila, revelando no iodo). A reação foi finalizada adicionando água destilada (20 mL), seguida de uma extração com diclorometano (2 x 25 mL), a fase orgânica foi secada com Na_2SO_4 anidro, filtrada, concentrada e seca. Por fim, foi feita uma coluna cromatográfica utilizando como eluente 6:4 hexano/acetato de etila, seguido de recristalização com hexano, levando a obtenção do composto com 40% de rendimento.

(19) 7,3 mg, 40%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 12.39 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.74 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 2H), 7.30 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.53 (dq, J = 5.4, 2.6 Hz, 2H), 3.93 (t, J = 4.6 Hz, 4H), 3.86 (s, 3H), 2.96 (t, J = 4.6 Hz, 4H).

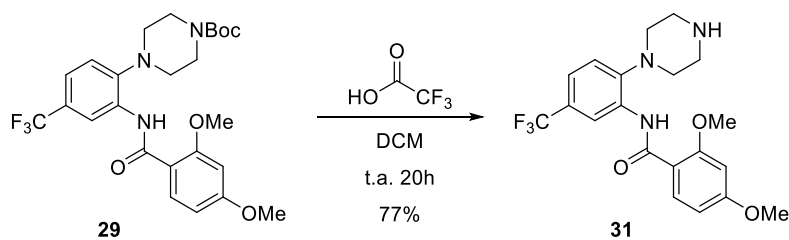
5.2.10 Procedimento para a síntese do composto 20



Em uma solução do dimetil sulfato (16,7 mg, 0,132 mmol), em DMF (1 mL), com atmosfera de argônio, adicionou a solução do fenol (20,5 mg, 0,056 mmol), em DMF (1 mL), e o *tert*-butoxido de sódio (19,4 mg, 0,202 mmol). A reação foi acompanhada por CCD (7:3 hexano/acetato de etila) e, após 21 horas, foi finalizada adicionando água destilada gelada (20 mL) em banho de gelo, formando um pouco de precipitado. O precipitado formado foi filtrado e secado, seguido de recristalização com DCM e hexano (1:3) A solução aquosa da primeira filtração foi extraída com acetato de etila (30 mL), em seguida lavando a fase orgânica com 20 mL de solução básica de NaOH (2M) e 20 mL de água destilada. Por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, concentrada e seca na bomba de vácuo.

(**20**) solido vermelho escuro, 21,3 mg, 100%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.88 (s, 1H), 8.91 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.32 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H), 8.26 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.36 (dt, $J = 8.3, 2.4$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.00 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 4.6$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.1, 158.3, 144.5, 142.7, 136.6, 133.4, 127.3, 127.0, 123.8, 120.8 – 120.6 (m), 120.6, 119.9, 116.7 – 116.5 (m), 67.4, 55.9, 52.1.

5.2.11 Procedimento para a síntese do composto 31



Em uma solução de Boc-piperazina (7,0 mg, 0,0137 mmol), em DCM (1 mL), adicionou o TFA (70 μL). A reação ficou em agitação a temperatura ambiente por 20 horas, acompanhada por CCD (7:3 Hex/AcOEt), e foi finalizada secando o solvente. O sal obtido foi neutralizado por extração básica com solução de NaOH (2M, 4 mL) e AcOEt (6 mL). A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e seca, levando a obtenção do produto **31** com 77% de rendimento.

(**31**) solido branco, 4,3 mg, 77%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.39 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.33 (ddd, $J = 8.3, 2.2, 0.8$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.3, 0.8$ Hz,

1H), 6.68 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.08 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.09 – 3.05 (m, 4H), 2.91 (t, $J = 4.8$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 164.2, 163.5, 158.9, 145.7, 134.6, 134.2, 126.9 (d, $J = 32.3$ Hz), 128.5 – 120.2 (m), 120.9 – 120.6 (m), 119.8, 118.7 – 118.5 (m), 115.0, 106.0, 99.1, 56.7, 55.8, 53.3, 46.5.

5.2.12 *Procedimento dos ensaios biológicos contra L. infantum*

Esses ensaios foram realizados pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte.

5.2.12.1 *Avaliação da suscetibilidade in vitro*

Células derivadas da linhagem monocítica humana THP-1 foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina). Os monócitos foram diferenciados em macrófagos pela adição de 20 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA). Após 72 horas, os macrófagos (5×10^5), em placas de microtitulação pretas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY), foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) transfectadas com o gene tdTomato, no segundo dia da fase estacionária (20 parasitas por macrófago) por 4 horas.

Os parasitas que não infectaram os macrófagos foram removidos (três lavagens com PBS 1X), e os macrófagos infectados foram incubados por 72 horas em meio RPMI-1640 contendo diferentes concentrações dos compostos (80, 40, 20, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$). A concentração do composto que inibe 50% do crescimento do parasita (IC_{50}) foi determinada pela diminuição da fluorescência do parasita na ausência e presença do composto, após 72 horas de exposição, usando um leitor de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com valores de excitação e emissão: 554 e 581 nm, respectivamente.

Os valores de IC_{50} foram determinados por regressão não linear usando um modelo de inclinação variável (log (concentração) vs. inibição do crescimento) com o software GraphPad Prism v8.2.0 (CA, EUA). Foram utilizados controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas, células infectadas tratadas com anfotericina B a 0,25 μM (controle positivo) ou DMSO 1%. Quadruplicatas foram realizadas na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

5.2.12.2 Avaliação da citotoxicidade

Macrófagos THP-1 ($5,0 \times 10^4$) foram diferenciados em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado à 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após o período de diferenciação das células, o meio de cultura foi removido, e adicionado meio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente, os macrófagos foram tratados com os compostos, empregando-se diluições seriadas, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% de CO₂. Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue (Invitrogen™). Foram adicionados aos poços 20 µL de uma solução de Alamar Blue em uma diluição de 1:1 e após quatro horas de incubação a leitura foi realizada através dos seguintes comprimentos de onda: 570 e 600nm. Os resultados foram expressos como o percentual diferença na redução entre células tratadas e não tratadas. A concentração do composto que inibe 50% da viabilidade da célula THP-1 (CC₅₀) foi obtida por análise de regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 8.0, Inc. Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata de cada amostra.

5.2.13 Procedimento dos ensaios biológicos contra o *T. cruzi*

Esses ensaios foram realizados pela dra. Silvane Maria Fonseca Murta, do Instituto René Rachou da FIOCRUZ de Belo Horizonte.

5.2.13.1 Avaliação *in vitro* da potência

A atividade anti-*T. cruzi* *in vitro* foi avaliada em células L929 (fibroblastos de camundongo) infectadas com a cepa Tulahuen do parasita, expressando a β-galactosidase de *Escherichia coli* como gene repórter. Para o bioensaio, 4000 células L929 foram adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Após uma incubação durante a noite, 40.000 tripomastigotas foram adicionados às células e incubados por 2 horas. Em seguida, o meio contendo os parasitas extracelulares foi substituído por 200 µL de meio fresco, e a placa foi incubada por mais 48 horas para estabelecer a infecção.

Para determinar o IC₅₀ dos compostos previamente sintetizados, as células foram expostas a cada composto em concentrações decrescentes sucessivas (100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µg/mL), e a placa foi incubada por 96 horas. Após esse período, 50 µL de 500 µM de clorofenol vermelho beta-D-galactopiranosídeo (CPRG) em 0,5% de Nonidet P40 foram

adicionados a cada poço, a placa foi incubada por mais 16–20 horas, e a absorbância a 570 nm foi medida.

Foram utilizados controles com células não infectadas, células infectadas não tratadas e células infectadas tratadas com benznidazol a 3,8 μ M (controle positivo) ou 1% de DMSO. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição do crescimento de *T. cruzi* nas células tratadas com o composto testado em comparação com células infectadas não tratadas.

Os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão não linear usando um modelo de inclinação variável (log (concentração) vs. inibição do crescimento) com o software GraphPad Prism v8.2.0 (CA, EUA). Quadruplicatas foram realizadas na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

5.2.13.2 Avaliação da citotoxicidade in vitro da célula L929

Para este bioensaio, 4000 células L929 em 200 μ L de meio RPMI-1640 (pH 7,2–7,4) (Gibco BRL) com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de glutamina foram adicionadas a cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços, que foi incubada por 3 dias a 37°C. O meio foi então substituído por meio fresco, e as células foram expostas a cada composto em concentrações crescentes, começando pelo valor de IC₅₀ contra *T. cruzi*.

Após 96 horas de incubação com os compostos, foi adicionado o alamarBlue™, e a absorbância foi medida em 570 e 600 nm após 4–6 horas. Controles com células não tratadas e células tratadas com 1% de DMSO foram executados em paralelo.

Os resultados foram expressos como a diferença percentual na redução entre as células tratadas e não tratadas. A concentração do composto que inibe 50% da viabilidade celular das células L929 (CC₅₀) foi determinada. Quadruplicatas foram realizadas na mesma placa, e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez.

5.2.14 Procedimento dos ensaios farmacocinéticos

Esses ensaios foram realizados pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC), da Universidade de São Paulo (USP), sob a supervisão do professor Leonardo L. G. Ferreira.

5.2.14.1 Determinação experimental do coeficiente de distribuição (eLogD pH 7.4)

Para a determinação do coeficiente de distribuição (eLogD), foi utilizada uma metodologia baseada no tempo de retenção das moléculas na fase estacionária. O cromatograma foi obtido em uma coluna HPLC Supelco Ascentis Express RP Amide (5 cm × 2,1 mm, 2,7 µM) e fases móveis de 5% de metanol em 10 mM de acetato de amônio pH 7,4 (A) e 100% de metanol (B). A fase móvel foi eluída em modo de gradiente binário, conforme segue: 0 min., 95% A; 0,3 min 100% A; 5,2 min 0% A; 5,6 min 0% A; 5,8 min 100% A; 7,0 min 100% A. O tempo total de execução foi de 7 minutos, e o volume de injeção da amostra foi de 5 µL.

Os compostos de teste foram preparados a 1,0 mg/mL, adicionando-se a solução estoque nas fases móveis A:B (1:1) (padrão interno a 200 nM), e a concentração de DMSO foi inferior a 2%. A lipofilicidade dos compostos foi avaliada injetando individualmente os compostos de teste e uma série de oito fármacos comerciais, cobrindo uma faixa de LogD de -1,86 a 6,1 (aciclovir -1,86; atenolol 0,16; antipirina 0,38; fluconazol 0,50; metoprolol 1,88; cetoconazol 3,83; tolnaftato 5,40; amiodarona 6,10) (Alelyunas *et al.*, 2010; Lombardo *et al.*, 2002, 2004).

O tempo de retenção (em minutos) de cada um dos oito padrões foi plotado em relação aos seus valores de LogD. A equação resultante da curva de calibração ($y = mx + b$) foi utilizada para calcular os valores de eLogD dos compostos.

5.2.14.2 Estabilidade metabólica

A estabilidade metabólica foi avaliada em microssomas hepáticos de camundongos CD1 (20 mg/mL, GIBCO) agrupados. Os compostos foram preparados em uma concentração de 0,5 µM e incubados com microssomas hepáticos a 0,25 mg/mL em solução tampão fosfato pH 7,4, com concentração de DMSO inferior a 1%. A reação foi iniciada pela adição do cofator NADPH a 0,5 µM. Amostras foram coletadas nos seguintes tempos: 0 (imediatamente após a adição do cofator), 5, 10, 20, 30 e 60 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de uma solução de parada contendo acetonitrila:metanol (1:1) (padrão interno a 50 nM). As amostras foram centrifugadas (3500 rpm/30 min.) para obter o pellet de proteína microssomal precipitada. As frações do sobrenadante foram quantificadas por LC-MS/MS.

As razões das áreas dos picos (analisado/padrão interno) foram convertidas para % remanescente, utilizando a razão da área no tempo 0 como 100%. A meia-vida ($t_{1/2} = \ln(2)/k$) em minutos e o clearance intrínseco ($Cl_{int} = k \times 1000 / (0,25)$) em µL/min/mg foram calculados

usando uma regressão não linear do % remanescente versus o tempo de incubação. A partir deste gráfico, a inclinação (k) foi determinada.

Os cromatogramas para análise foram obtidos em uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (3 cm × 2,1 mm, 5 µM). As fases móveis consistiram em água + 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (B). A fase móvel foi eluída em modo de gradiente binário, com o gradiente conforme segue: 0 min., 95% A; 0,05 min., 95% A; 0,3 min., 2% A; 0,7 min., 2% A; 0,8 min., 95% A; 1,15 min., 95% A; 2,0 min., 95% A.

O tempo de execução foi de 2 minutos, o volume de injeção da amostra foi de 10 µL, e a taxa de fluxo foi de 0,7 mL/min. Todos os testes de estabilidade microssomal foram realizados em triplicatas.

5.2.14.3 Ensaios de permeabilidade

O ensaio de permeabilidade por membrana artificial paralela (PAMPA) foi realizado em um sistema de placas de 96 poços pré-revestidas (Corning Gentest #353015). As soluções dos compostos foram preparadas diluindo-se as soluções estoques (10 mM) em tampão fosfato salino (PBS) pH 6,5, em uma concentração final de 10 µM, e adicionadas à porção doadora da placa (300 µL/poço), enquanto a porção receptora recebeu PBS pH 7,4 (200 µL/poço). A concentração de DMSO foi inferior a 1%.

As duas porções da placa foram então montadas, e o sistema foi incubado (5 h/37°C). Amostras da solução inicial do doador (T0) foram coletadas e armazenadas a -20°C. Ao final da incubação, amostras foram coletadas das placas doadora e receptora, e adicionadas a placas contendo solução de parada (10% de água e 90% de metanol: acetonitrila (50:50) + 50 nM de tolbutamida). As amostras T0 foram tratadas de maneira semelhante.

As concentrações finais dos compostos nos poços do doador, receptor e T0 foram quantificadas por LC-MS/MS. Os cromatogramas para análise foram obtidos em uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (3 cm × 2,1 mm, 5 µM). As fases móveis consistiram em água + 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico (B).

A fase móvel foi eluída em modo de gradiente binário, com o gradiente conforme segue: 0 min., 95% A; 0,05 min., 95% A; 0,3 min., 2% A; 0,7 min., 2% A; 0,8 min., 95% A; 1,15 min., 95% A; 2,0 min., 95% A. O tempo total de execução foi de 2 minutos, o volume de injeção da amostra foi de 10 µL, e a taxa de fluxo foi de 0,7 mL/min.

Os resultados foram utilizados para calcular o valor de permeabilidade efetiva (Pe). Todos os ensaios de PAMPA foram realizados em triplicatas.

5.2.14.4 Solubilidade cinética

Para determinar a solubilidade cinética, soluções estoques dos compostos de teste e controles (10 mM em DMSO) foram transferidas para duas placas de 96 poços (placa de incubação) em duplicata. Para cada amostra nas placas, foram adicionados PBS pH 7,4 ou 2,0 (concentração final de 250 μ M), com concentração de DMSO inferior a 2,5%. A placa foi selada e agitada por 24 h (200 rpm/25°C). Os precipitados na placa de incubação foram removidos por centrifugação (15 min/3000 rpm/25°C).

As frações do sobrenadante foram quantificadas por LC–MS/MS. A partir de uma solução padrão de 10 mM, foi preparada uma diluição padrão intermediária a 0,5 mM em solução de acetonitrila:água (1:1). Curvas de calibração foram preparadas para cada composto de teste e controles, diluindo-se várias vezes a solução padrão intermediária para atingir as concentrações desejadas de 50, 40, 20, 2 e 1 μ M. A equação resultante da curva de calibração ($y = mx + b$) foi usada para calcular os valores de concentração experimental dos compostos.

Os cromatogramas para análise foram obtidos em uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (3 cm $\times$ 2,1 mm, 5 μ M). As fases móveis consistiram em água + 0,05% de ácido fórmico (A) e acetonitrila + 0,05% de ácido fórmico (B). A fase móvel foi eluída em modo de gradiente binário, com o gradiente conforme segue: 0 min, 98% A; 1,2 min, 2% A; 2,0 min, 2% A; tempo de reequilíbrio: 0,6 min, 98% A.

O tempo total de execução foi de 2 minutos, o volume de injeção da amostra foi de 5 μ L, e a taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram sintetizados 24 compostos finais, sendo um deles o *hit 1* e os outros derivados desse composto com modificações estruturais nos fragmentos benzoil, aril central e morfolina. Esses compostos foram purificados, caracterizados e tiveram a sua atividade biológica contra o *T. cruzi* e o *L. Infantum*, causadores da doença de Chagas e leishmaniose visceral, avaliada. Esses compostos foram obtidos com rendimentos satisfatórios, através de três principais tipos de reação: S_NAr , redução de grupo nitro e reação de amidação. Foram utilizadas três condições de amidação, sendo a reação com o cloreto de acila a que apresentou maior eficácia.

Os ensaios biológicos demonstraram uma alta potência do *hit 1* contra o *T. cruzi* (IC_{50} 0,76 μM) e uma alta seletividade contra o parasita (IS 109,5), enquanto os ensaios contra *L. infantum* mostraram uma potência e seletividade moderada, mas ainda promissora (IC_{50} 10,7 μM e IS 36,3). Entretanto, esse composto apresentou algumas limitações relacionadas ao seu perfil farmacocinético, como, a baixa solubilidade em água, alta lipofilicidade e instabilidade metabólica. Dessa forma, foram realizadas uma série de modificações estruturais nesse composto, com o objetivo de estabelecer os melhores grupos farmacóforicos e de superar as limitações encontradas.

Assim, foram explorados os fragmentos benzoil, aril central e morfolina do *hit 1*. As modificações realizadas nesses fragmentos resultaram, em sua maioria, na perda significativa de atividade contra o *T. cruzi*, com exceção dos compostos **10** e **21** que apresentaram alta potência (IC_{50} de 2,1 μM e < 4,3 μM). O composto **21** apresentou também o aumento da seletividade (IS > 555), enquanto o derivado **10** apresentou a diminuição da seletividade (IS 25). A potência exata do derivado **18** será obtida em ensaios complementares utilizando concentrações mais diluídas do composto, podendo chegar a valores próximos do *hit* inicial **1** (< 1 μM).

Esses resultados são promissores, uma vez que os dois derivados apresentaram uma diminuição do caráter lipofílico em relação ao *hit 1*, expressos pelo valor teórico de clogP (2,26 do **10** e 2,66 do **21** versus 3,32 do *hit 1*). Isso pode indicar um potencial de melhoria nas limitações encontradas nos ensaios de perfil farmacocinético *in vitro* do *hit 1*. Entretanto, os dois derivados ainda precisam ser submetidos aos ensaios de perfil farmacocinético *in vitro* para confirmar essas melhorias.

O derivado **25** foi também avaliado, unindo as melhores modificações nos dois fragmentos, com o objetivo de verificar se iria ocorrer o aumento da potência. Entretanto, o que se observou foi a perda da potência contra o parasita.

Para *L. infantum*, os compostos **9** e **19** apresentaram a mesma potência contra o parasita (IC_{50} 10,8 μ M e 10,0 μ M, respectivamente, *versus* 10,7 μ M do *hit 1*), porém ocorreu o aumento da citotoxicidade para o composto **19** e, conseqüentemente, a diminuição da seletividade do composto (CC_{50} 91,8 μ M e IS 9,2). Ambos os compostos (**9** e **19**) também possuem menores valores de $clogP$ que o *hit 1* (2,85 e 3,12, respectivamente, *versus* 3,32 do *hit 1*), sendo promissores para melhorar as limitações farmacocinéticas do *hit 1*. No fragmento aril central, o derivado **21** também foi o que apresentou a maior atividade antiparasitária (IC_{50} 12,8 $\pm$ 1,3), sendo ela ligeiramente menor do que a do *hit 1*.

No fragmento da morfolina, todas as modificações avaliadas até o momento resultaram na perda da atividade contra os dois parasitas, o que pode indicar que o fragmento desempenha um papel essencial para atividade biológica. Entretanto, novos derivados ainda precisam ser avaliados para confirmar essa hipótese.

Novas modificações estão sendo avaliadas no fragmento aril central, investigando a posição dos substituintes, para compreender melhor a importância desse fragmento. Além disso, o grupo amida ainda precisa ser explorado, substituindo por outros grupos, como sulfonamidas e aminas.

Dessa forma, dos 23 derivados avaliados, os compostos **10** e **21** foram os mais promissores contra *T. cruzi*. Já contra o parasita *L. infantum*, os compostos **9**, **19** e **21** apresentaram atividades próximas a do *hit 1*, sendo os mais promissores devido a diminuição do valor teórico de $clogP$.

Ensaio de atividade antiparasitária *in vivo* contra *T. cruzi* e *L. infantum* serão realizados com os compostos mais potentes e com perfil farmacocinético *in vitro* adequado. Além disso, ensaios de atividade contra os alvos moleculares estão sendo realizados, para compreender melhor o mecanismo de ação dessa classe de compostos.

REFERÊNCIAS

ALELYUNAS, Y. W. *et al.* A high throughput dried DMSO LogD lipophilicity measurement based on 96-well shake-flask and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 12, p. 1950–1955, 2010. ISSN: 00219673. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.071>.

ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 863–875, 2012. ISSN: 1746-0441. DOI: <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.

AVELAR, J. B. **Caracterização molecular de isolados de Trypanosoma cruzi obtidos de mulheres durante a fase crônica da doença de Chagas**. 2008. xvii-69f f. Dissertação - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

BATES, D. K.; LI, K. Stannous Chloride-Mediated Reductive Cyclization–Rearrangement of Nitroarenyl Ketones. **The Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 67, n. 24, p. 8662–8665, 2002. ISSN: 0022-3263. DOI: <https://doi.org/10.1021/jo0259921>.

BOECHAT, V. C. **Ocorrência de Leishmania infantum e alterações histológicas associadas no trato genital e glândula mamária de cães naturalmente infectados**. 2015. 1–78 f. Dissertação - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2015.

BRAK, K. *et al.* Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas Disease Chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1763–1773, 2010. ISSN: 0022-2623. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm901633v>.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. ISSN: 01406736. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).

CALDAS, I. S.; SANTOS, E. G.; NOVAES, R. D. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 20, n. 15, p. 1797–1807, 2019. ISSN: 1465-6566. DOI: <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1650915>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Chagas Disease – Lesson 2: Epidemiology, Vectors, Transmission, & Life Cycle**. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/cme/chagas/course1.html>. Acesso em: 19 jun. 2025.

CHIODI, D.; ISHIHARA, Y. The role of the methoxy group in approved drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 273, p. 116364, 2024. ISSN: 02235234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116364>.

DE SOUZA, M. L. *et al.* Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 2020. ISSN: 1549-9596. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00802>.

FLEAU, C. *et al.* Chagas Disease Drug Discovery: Multiparametric Lead Optimization against *Trypanosoma cruzi* in Acylaminobenzothiazole Series. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 22, p. 10362–10375, 2019. ISSN: 0022-2623. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01429>.

HERCOS, G. F. de L. *et al.* Optimization of benzenesulfonyl derivatives as anti-Trypanosomatidae agents: Structural design, synthesis, and pharmacological assessment against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 105, p. 117736, 2024. ISSN: 09680896. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117736>.

HOTEZ, P. J. *et al.* What constitutes a neglected tropical disease? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e0008001, 2020. ISSN: 1935-2735. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>.

J, B.; MUSUVATHI, B. M.; CHANDA, K. An Overview on the Therapeutics of Neglected Infectious Diseases—Leishmaniasis and Chagas Diseases. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 9, 2021. ISSN: 2296-2646. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.622286>.

LAL, J. *et al.* Design and synthesis of novel halogen rich salicylanilides as potential antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 246, p. 114996, 2023. ISSN: 02235234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114996>.

LAPIERRE, T. J. W. J. D. *et al.* Evaluation and discovery of novel benzothiazole derivatives as promising hits against *Leishmania infantum*. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 103, n. 4, 2024. ISSN: 1747-0277. DOI: <https://doi.org/10.1111/cbdd.14525>.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 7, 2019. ISSN: 2296-2565. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.

LOMBARDO, F. *et al.* Prediction of Human Volume of Distribution Values for Neutral and Basic Drugs. 2. Extended Data Set and Leave-Class-Out Statistics. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1242–1250, 2004. ISSN: 0022-2623. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm030408h>.

LOMBARDO, F. *et al.* Prediction of Volume of Distribution Values in Humans for Neutral and Basic Drugs Using Physicochemical Measurements and Plasma Protein Binding Data. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 45, n. 13, p. 2867–2876, 2002. ISSN: 0022-2623. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm0200409>.

MARTÍN-ESCOLANO, J. *et al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 2022. ISSN: 2373-8227. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00123>.

MARTINHO, A. **Planejamento, síntese e estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de uma classe de sulfonilpiperazinas potente contra o Trypanosoma cruzi.** 2021. Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2021. DOI: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.456>.

MCNAMARA, N. *et al.* Hit-to-lead optimization of novel phenyl imidazole carboxamides that are active against *Leishmania donovani*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 240, p. 114577, 2022. ISSN: 02235234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114577>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico de Doenças Tropicais Negligenciadas no Brasil**. Brasília, Brasil.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde lança painéis para monitorar Leishmanioses no Brasil**. 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 9 jul. 2025.

MISHRA, S. *et al.* Design, synthesis, in vitro and in vivo biological evaluation of pyranone-piperazine analogs as potent antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 221, p. 113516, 2021. ISSN: 02235234. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113516>.

PANTALEÃO, S. Q. *et al.* Recent Advances in the Prediction of Pharmacokinetics Properties in Drug Design Studies: A Review. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 17, n. 1, 2022. ISSN: 1860-7179. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100542>.

PEÑA, I. *et al.* New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 8771, 2015. ISSN: 2045-2322. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep08771>.

PRATHAP, K. J. *et al.* Catalytic Reductions and Tandem Reactions of Nitro Compounds Using in Situ Prepared Nickel Boride Catalyst in Nanocellulose Solution. **Organic Letters**, [s. l.], v. 19, n. 18, p. 4746–4749, 2017. ISSN: 1523-7060. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b02090>.

SALES JUNIOR, P. A. *et al.* Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 97, n. 5, p. 1289–1303, 2017. ISSN: 0002-9637. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.

SANTOS, S. S. *et al.* Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 105906, 2020. ISSN: 09248579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105906>.

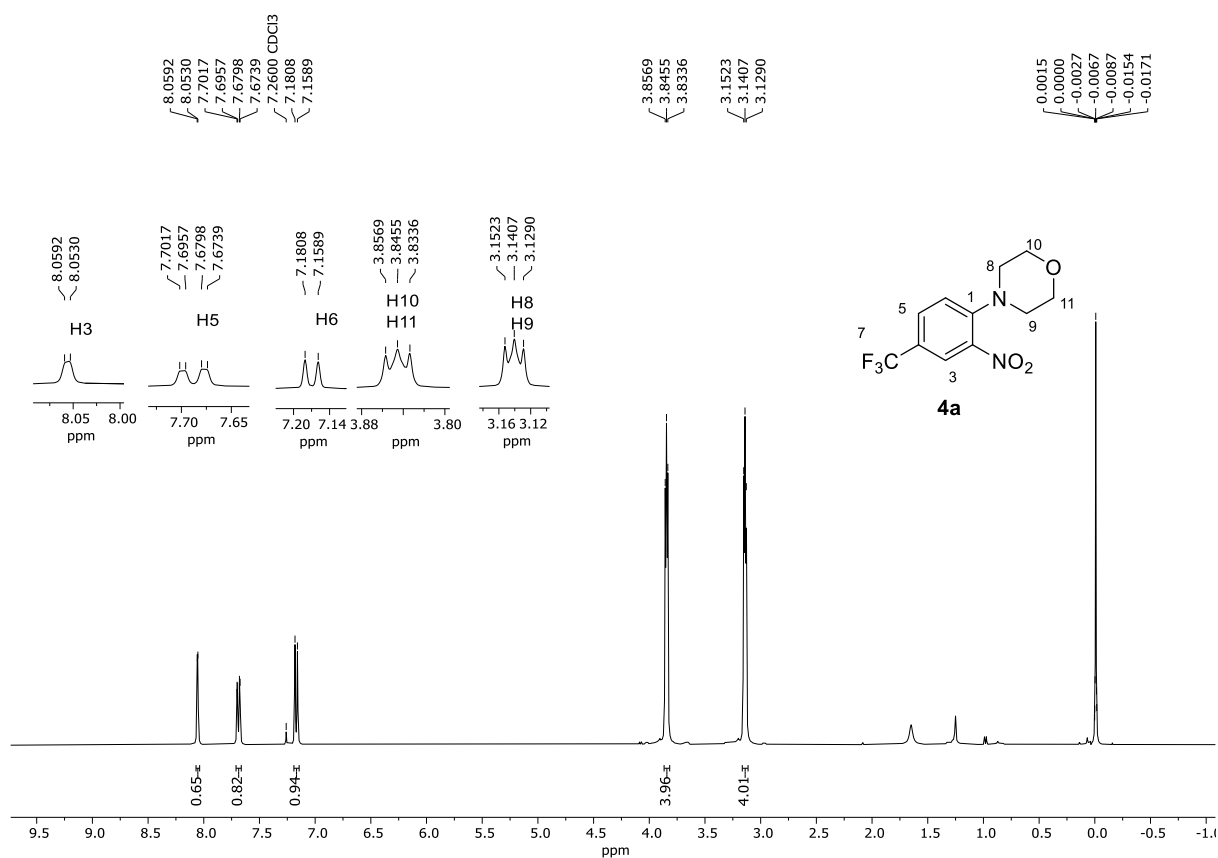
SYTHANA, S. K. *et al.* Nonpolar Solvent a Key for Highly Regioselective S_NAr Reaction in the Case of 2,4-Difluoronitrobenzene. **Organic Process Research & Development**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 912–918, 2014. ISSN: 1083-6160. DOI: <https://doi.org/10.1021/op500120z>.

TIDMAN, R.; ABELA-RIDDER, B.; DE CASTAÑEDA, R. R. The impact of climate change on neglected tropical diseases: a systematic review. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 147–168, 2021. ISSN: 0035-9203. DOI: <https://doi.org/10.1093/trstmh/traa192>.

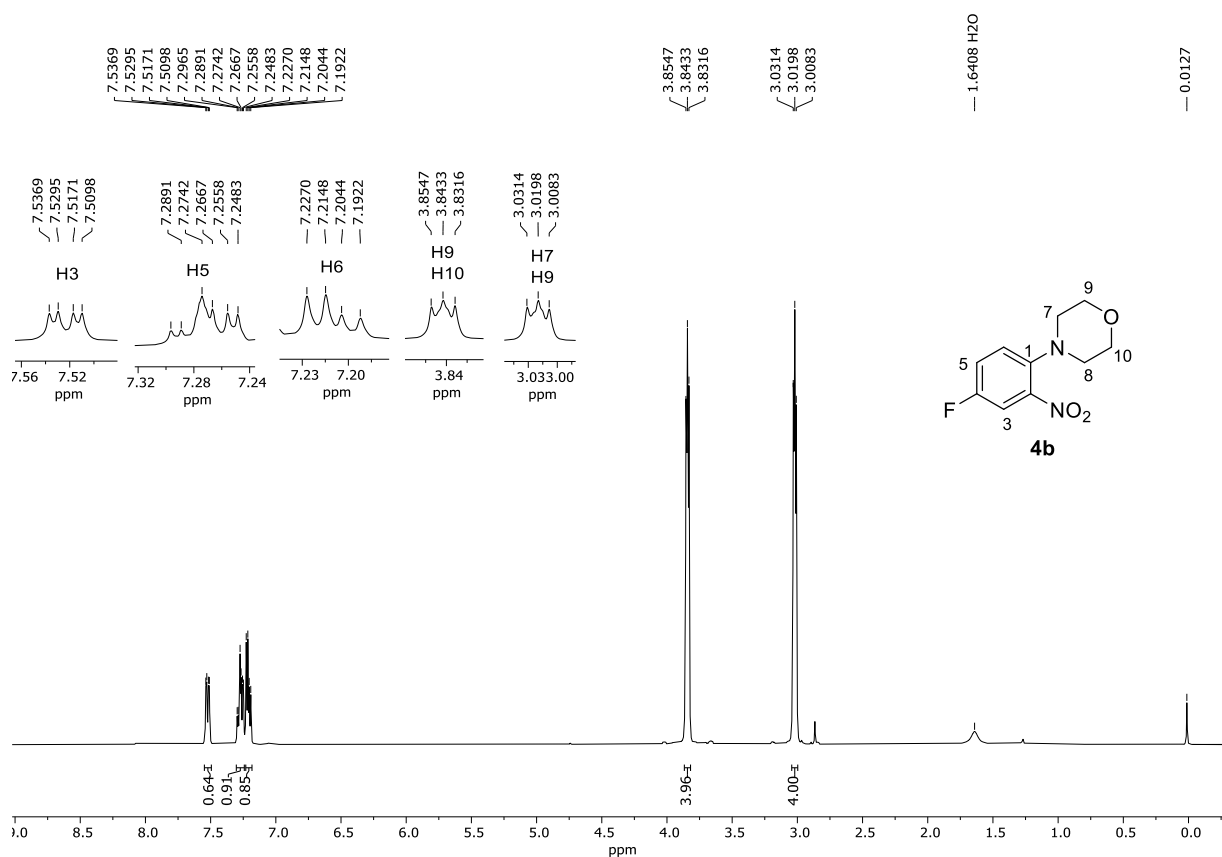
URBINA, J. A. **Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why** J Mol Med. [S. l.: s. n.], .

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Neglected tropical diseases**. [s.d.]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1. Acesso em: 15 jun. 2025.

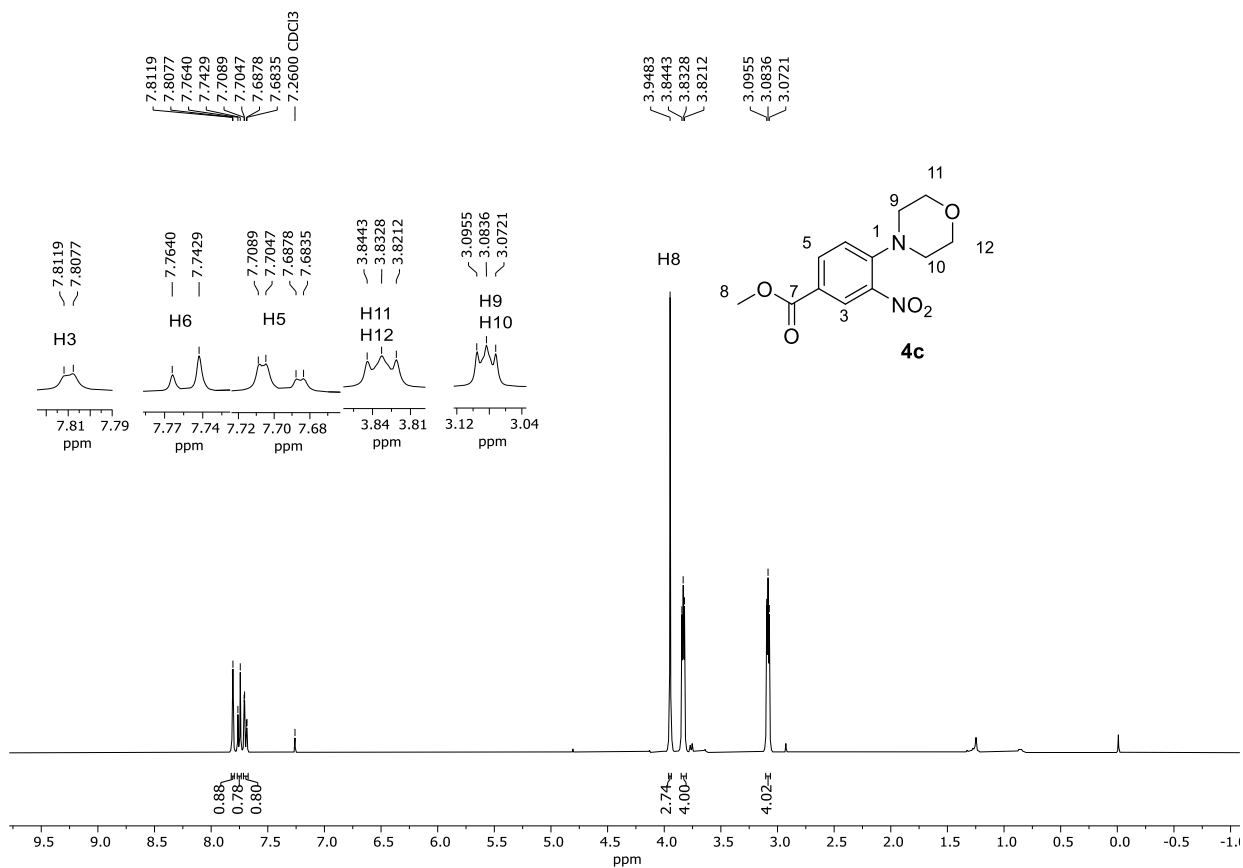
Anexo 1 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4a**.



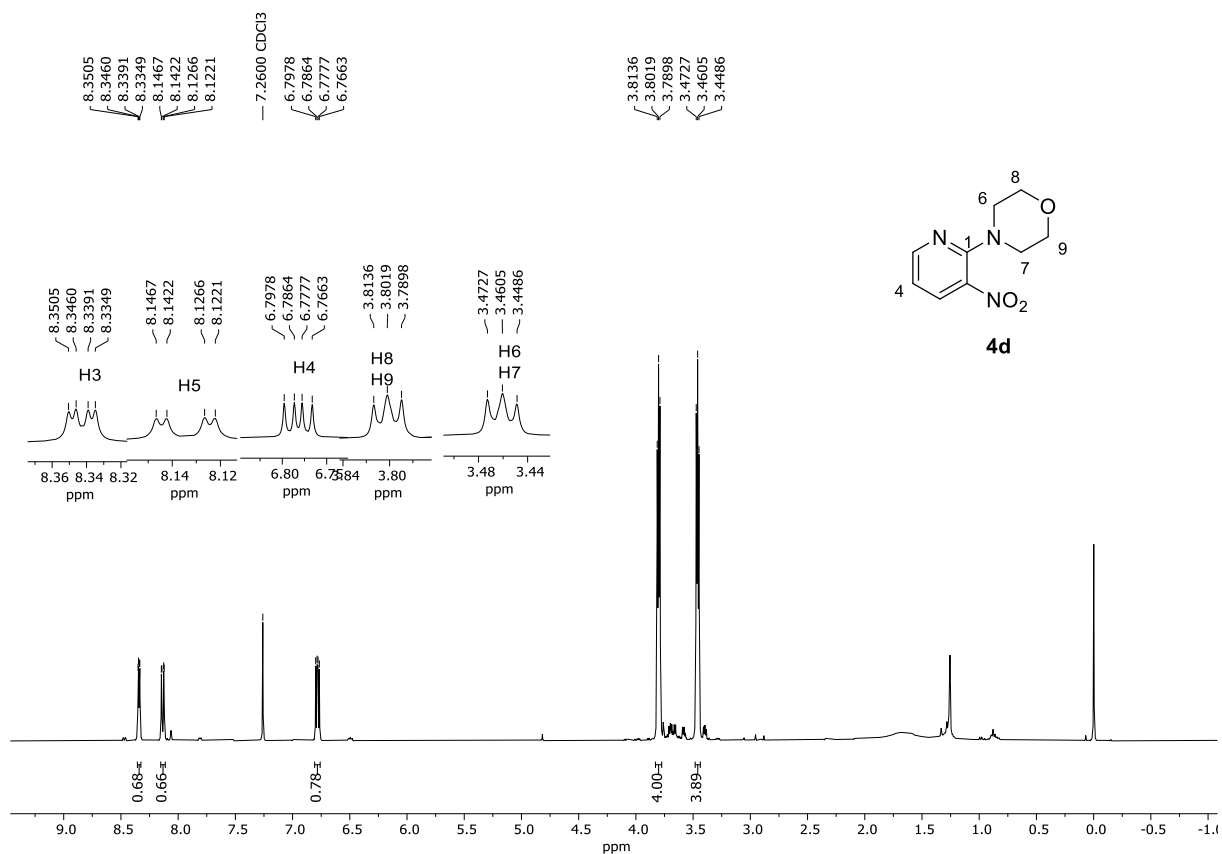
Anexo 2 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4b**.



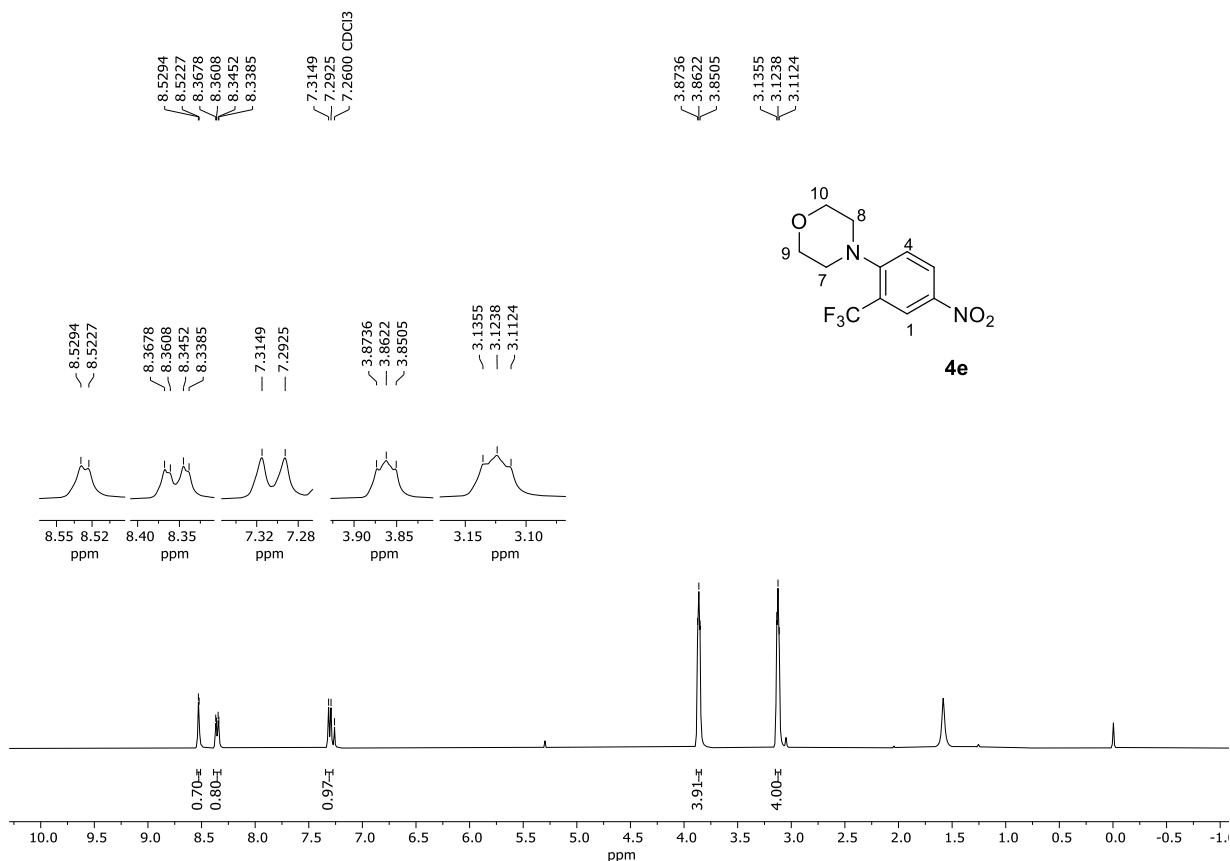
Anexo 3 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4c**.



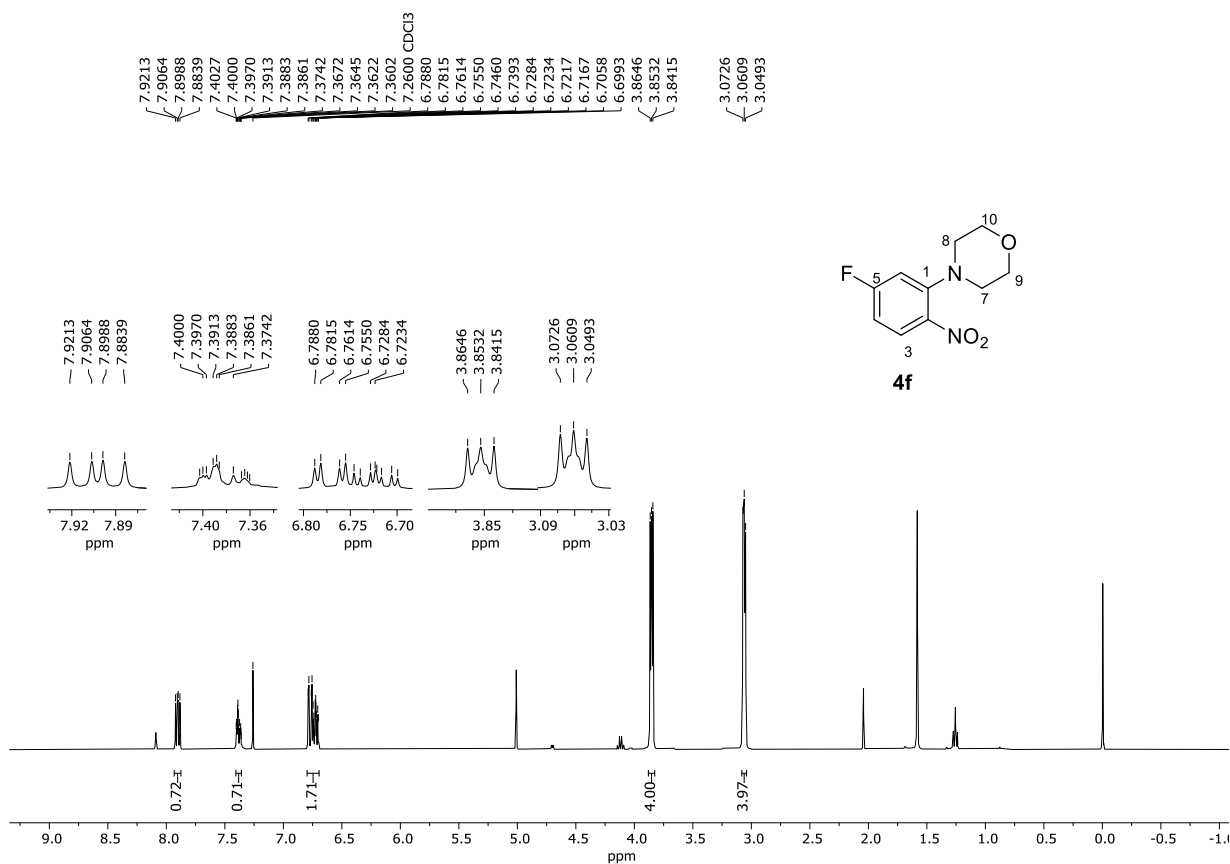
Anexo 4 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4d**.



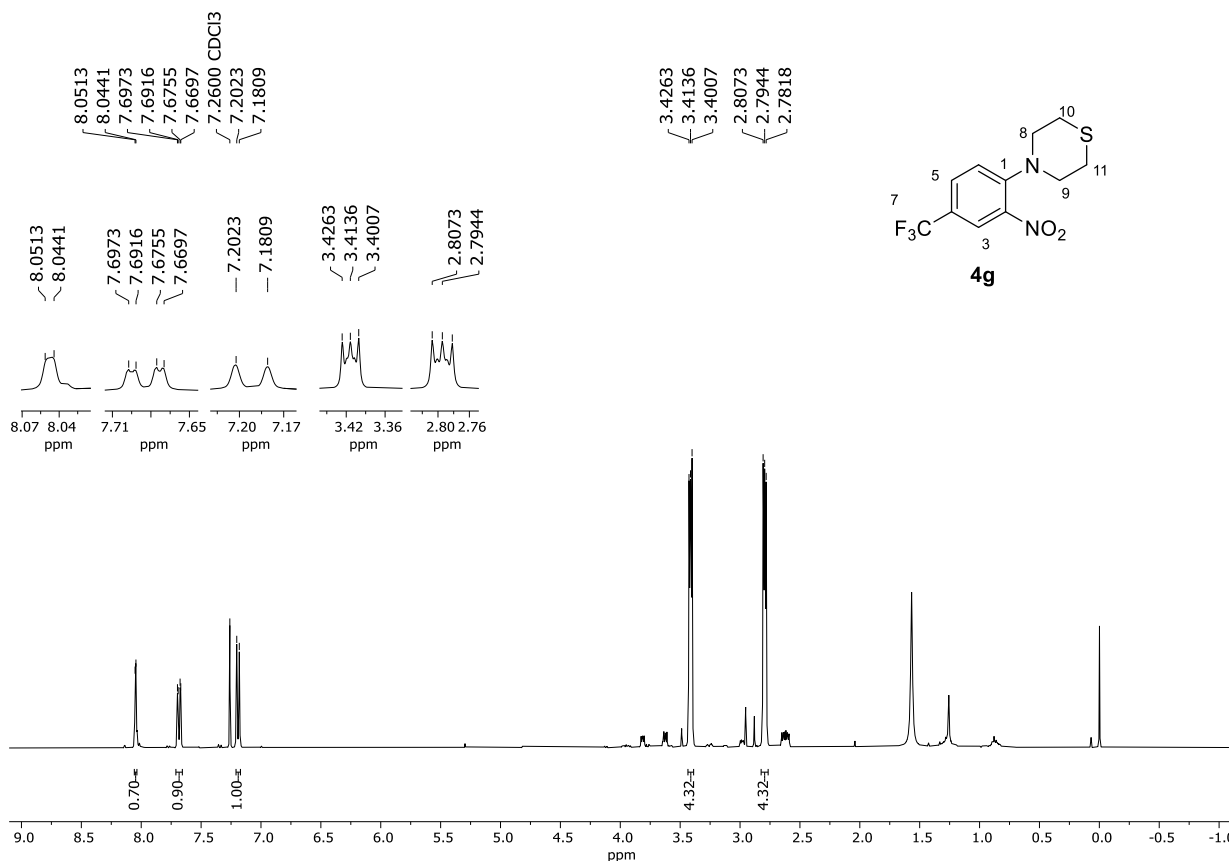
Anexo 5 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4e**.



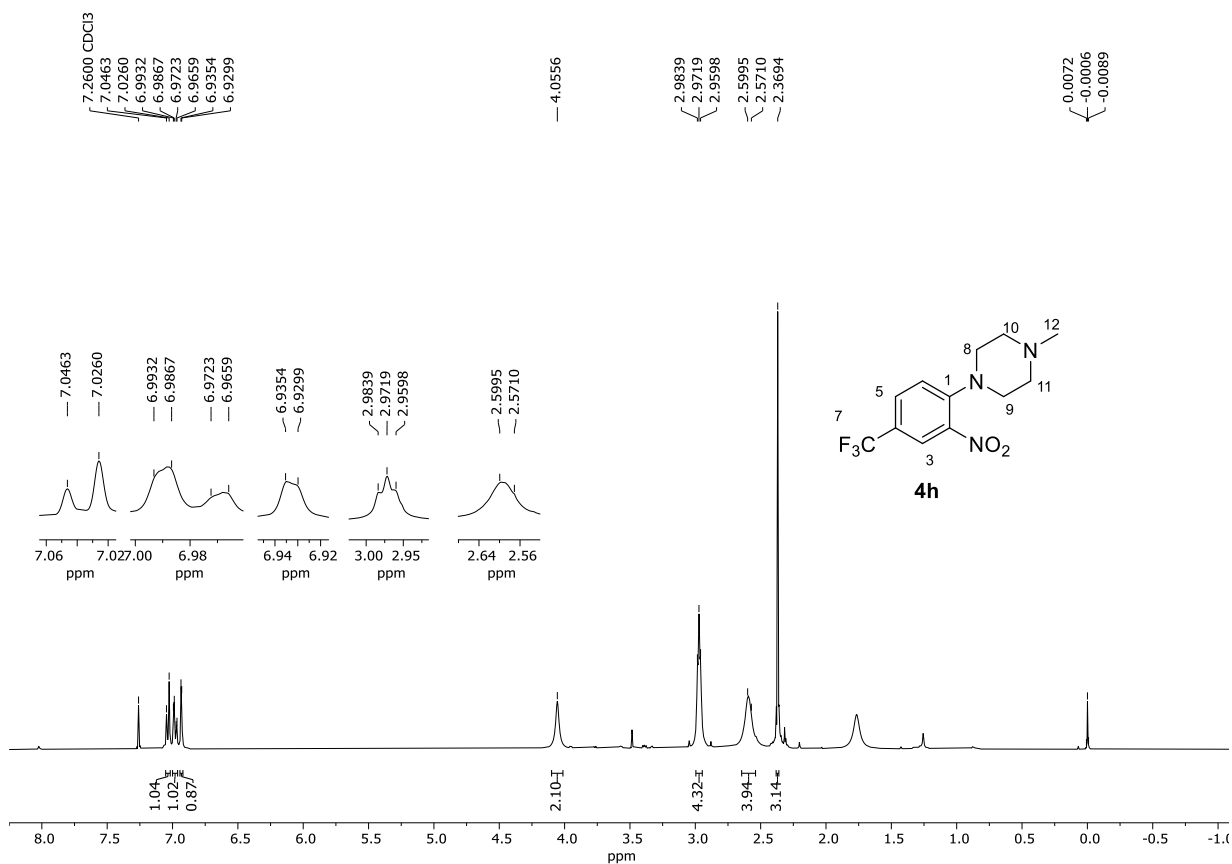
Anexo 6 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4f**.



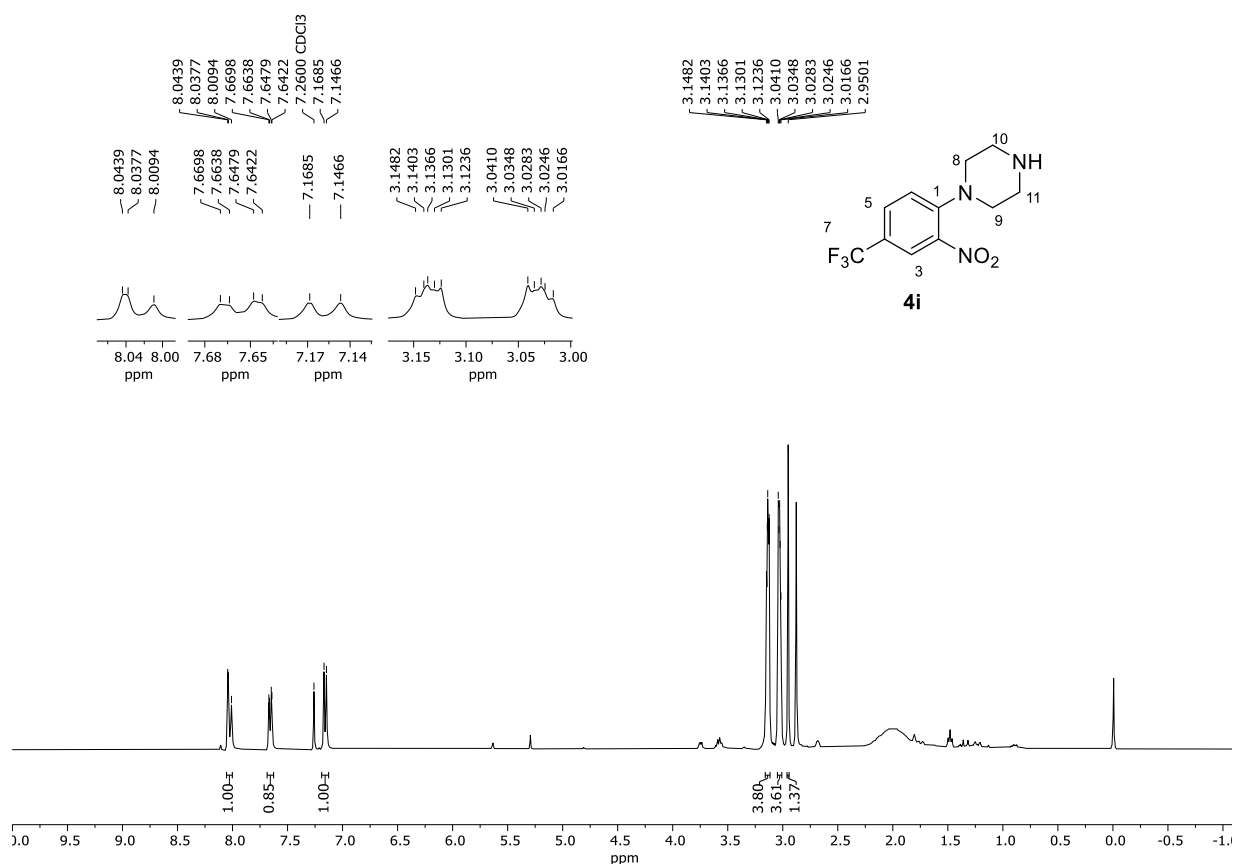
Anexo 7 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4g**.



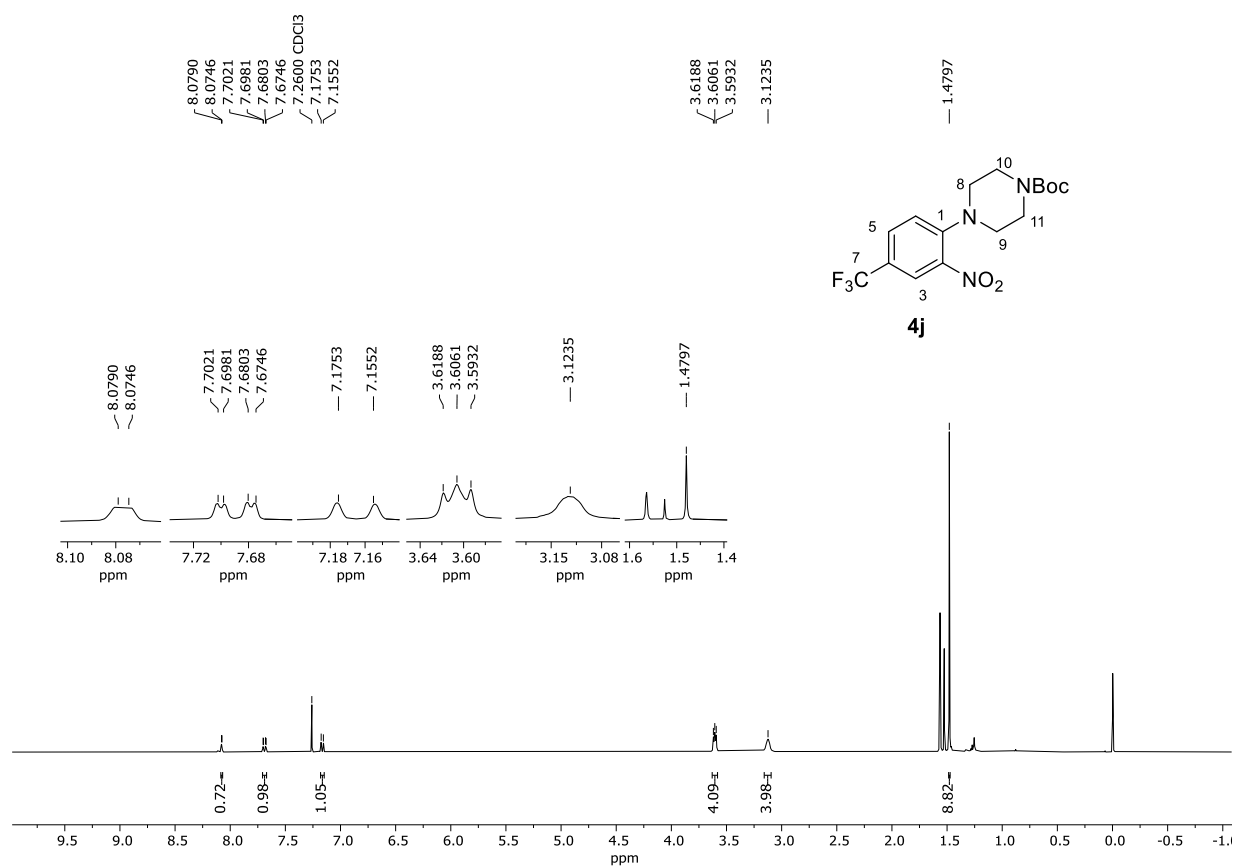
Anexo 8 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4h**.



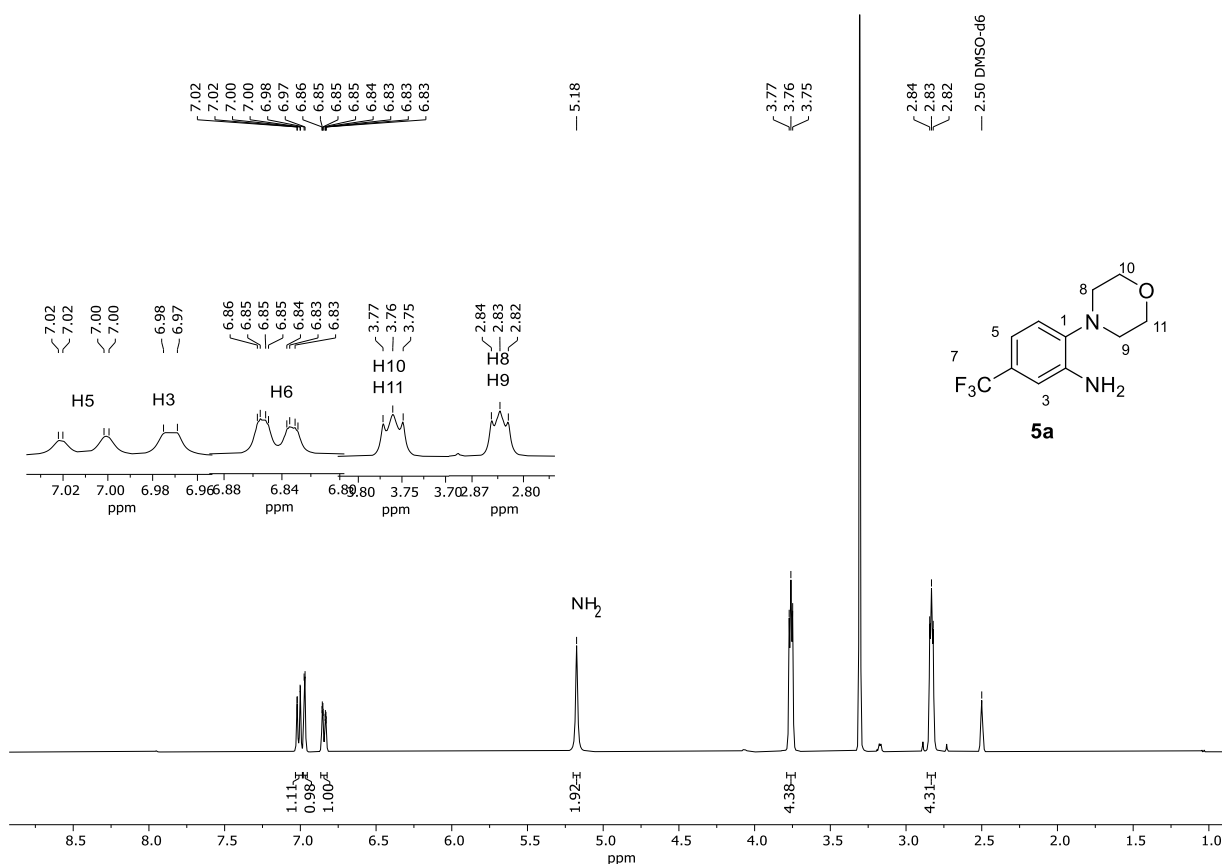
Anexo 9 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4i**.



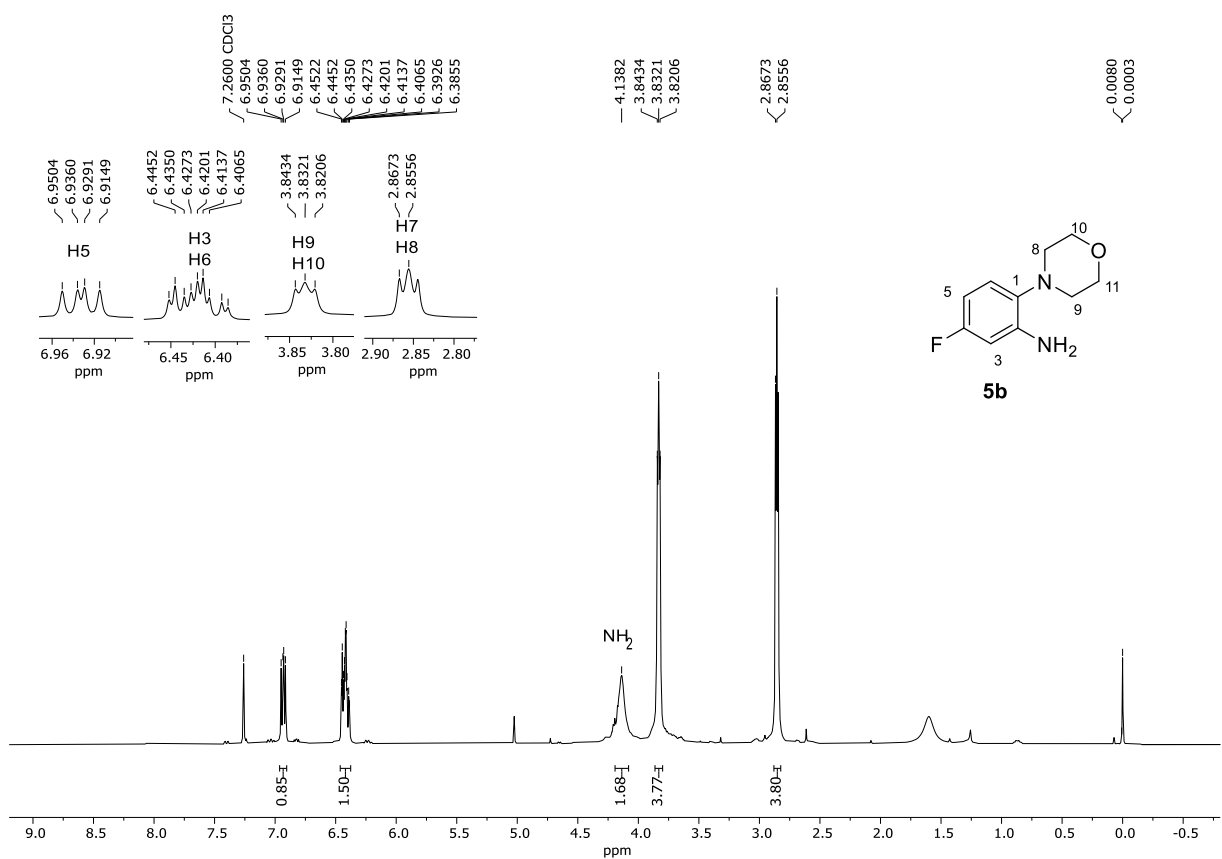
Anexo 10 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **4j**.

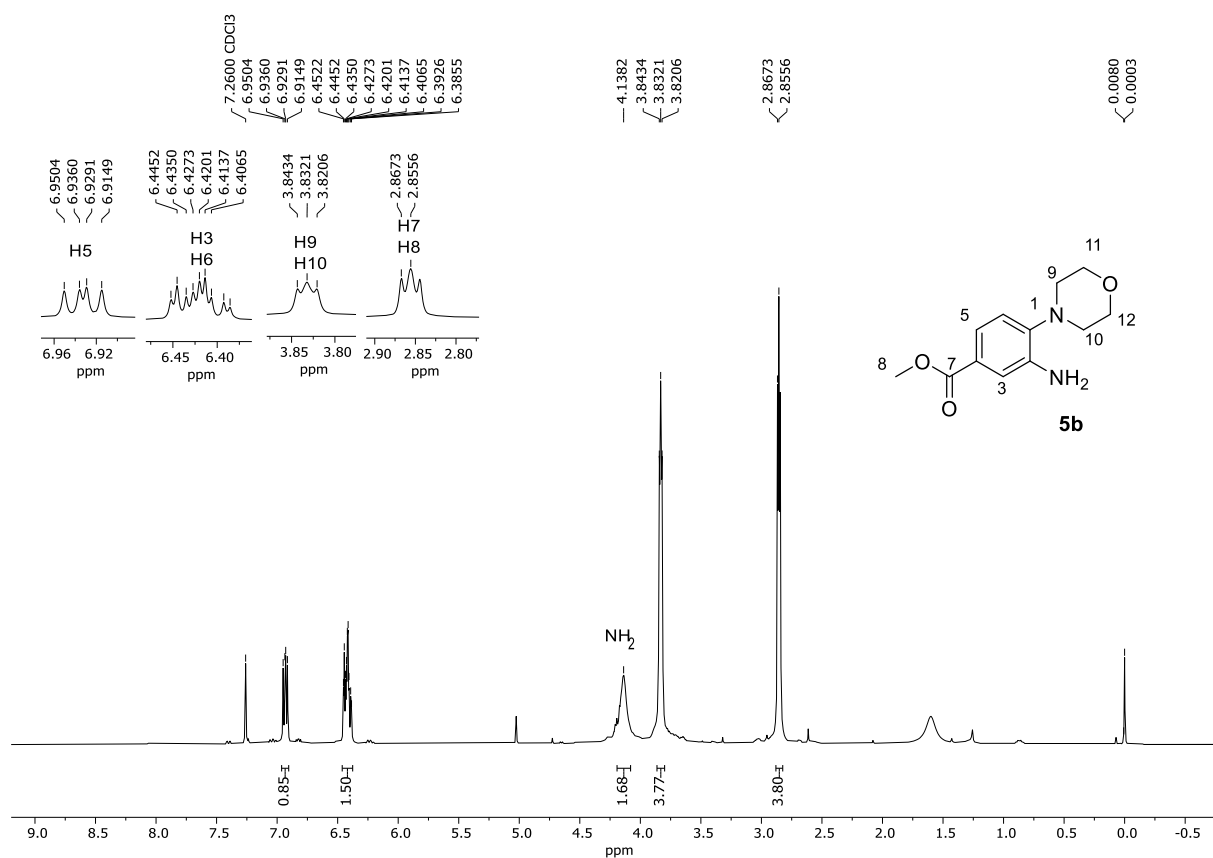
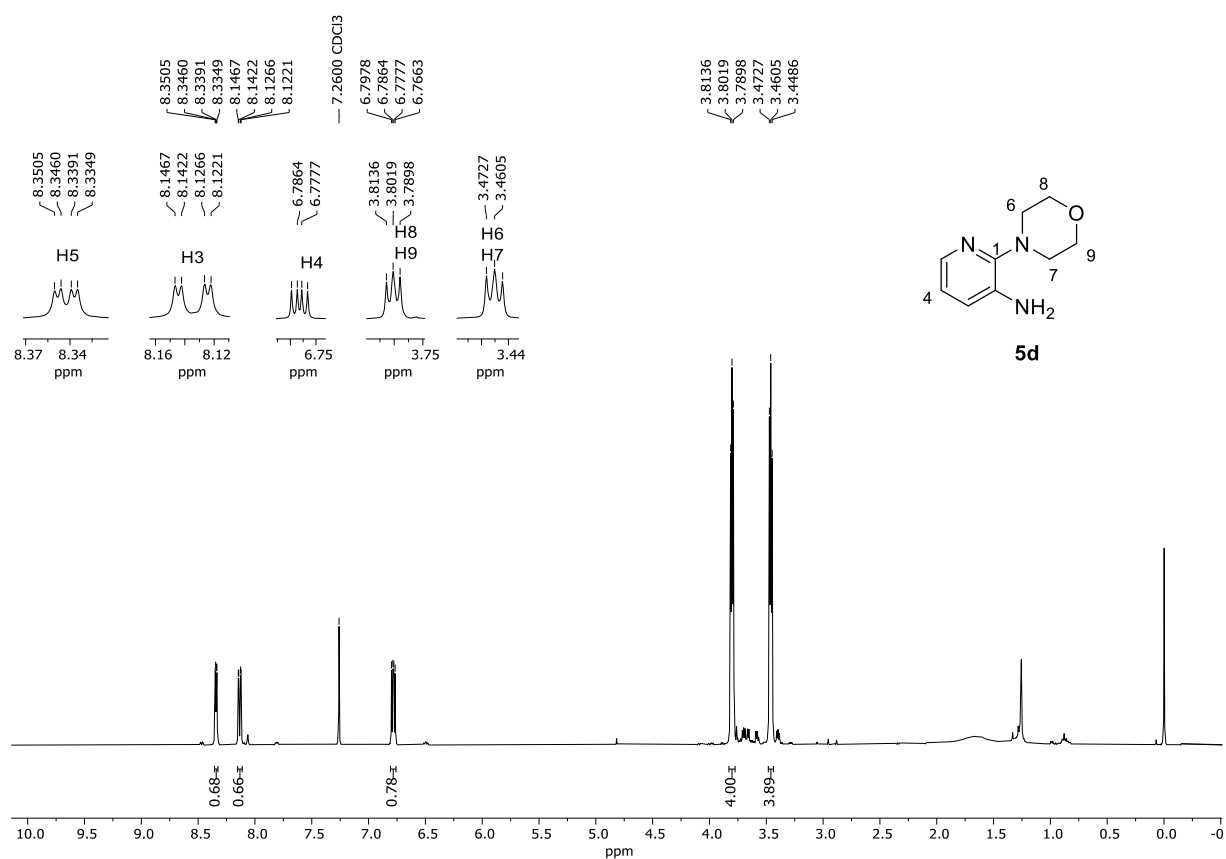


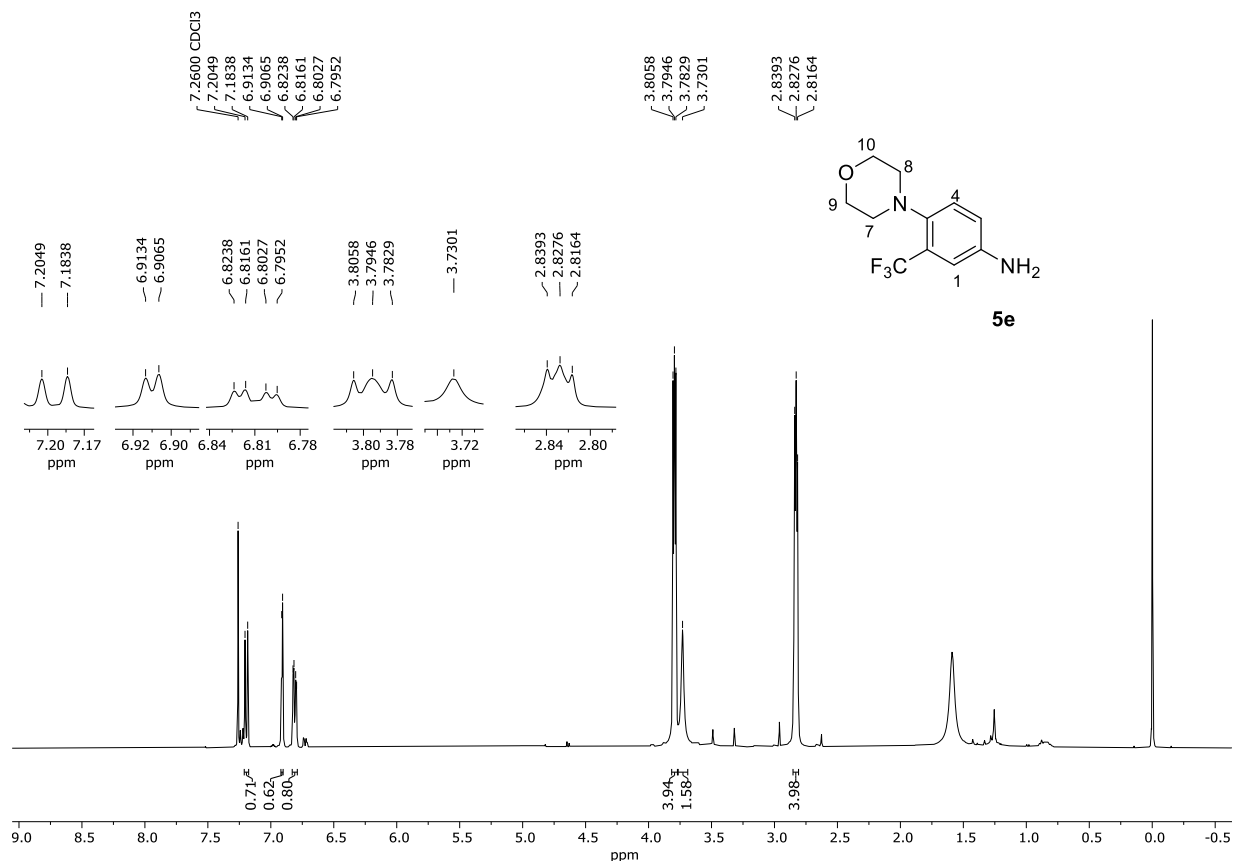
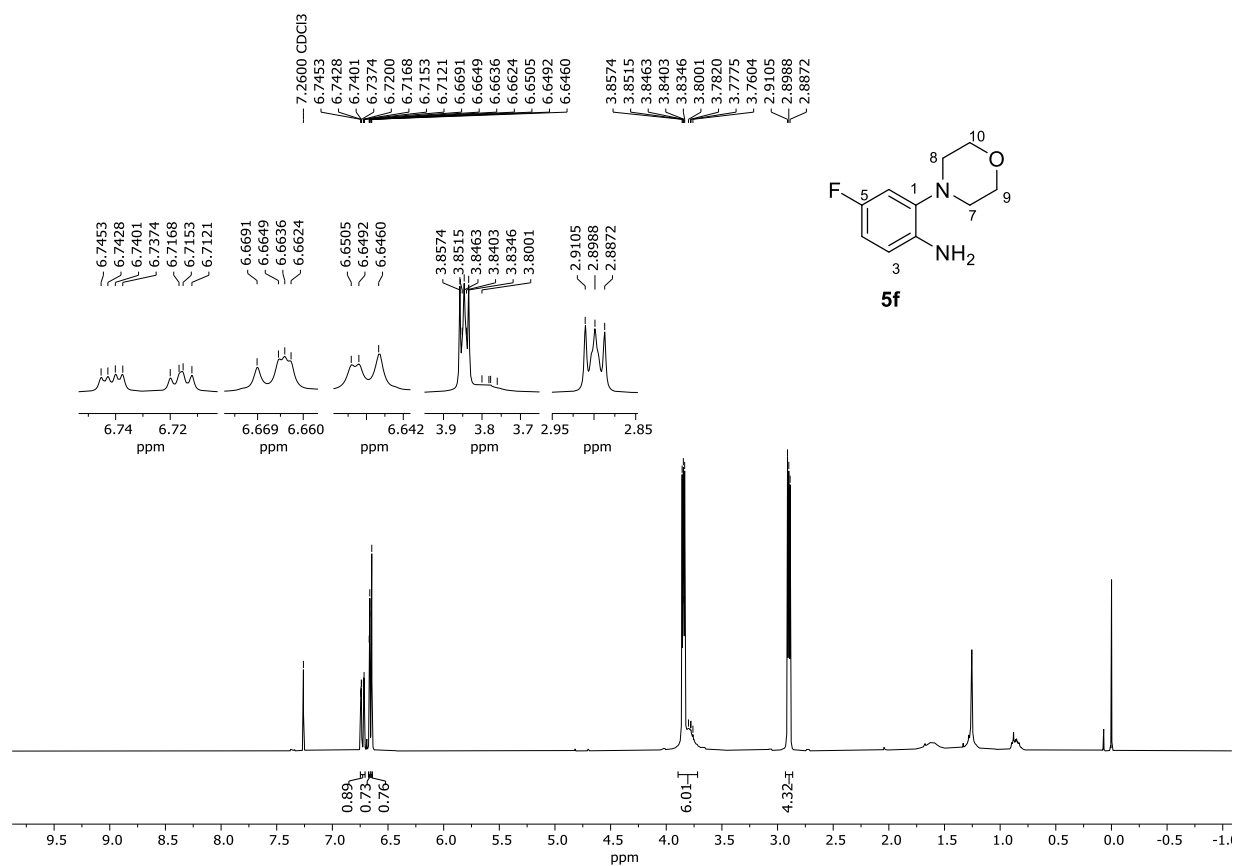
Anexo 10 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5a**.



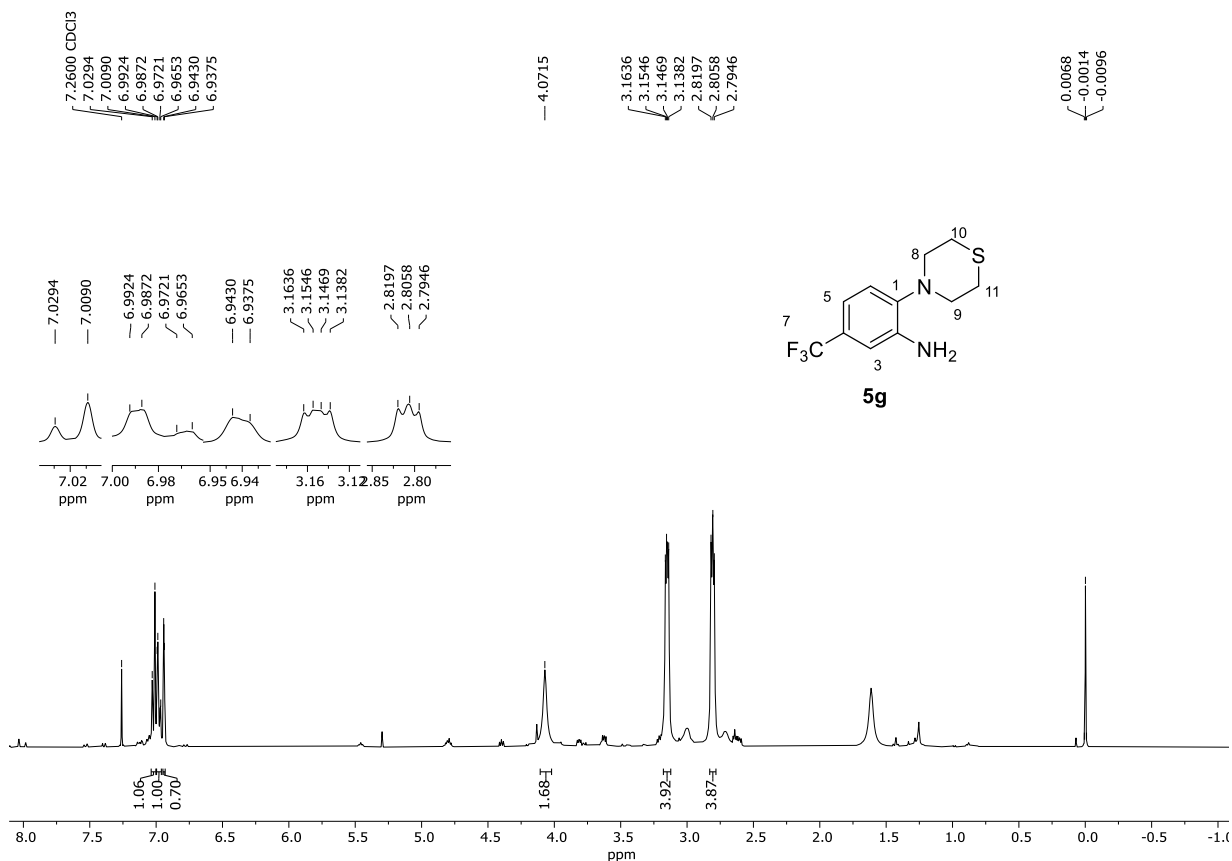
Anexo 11 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5b**.



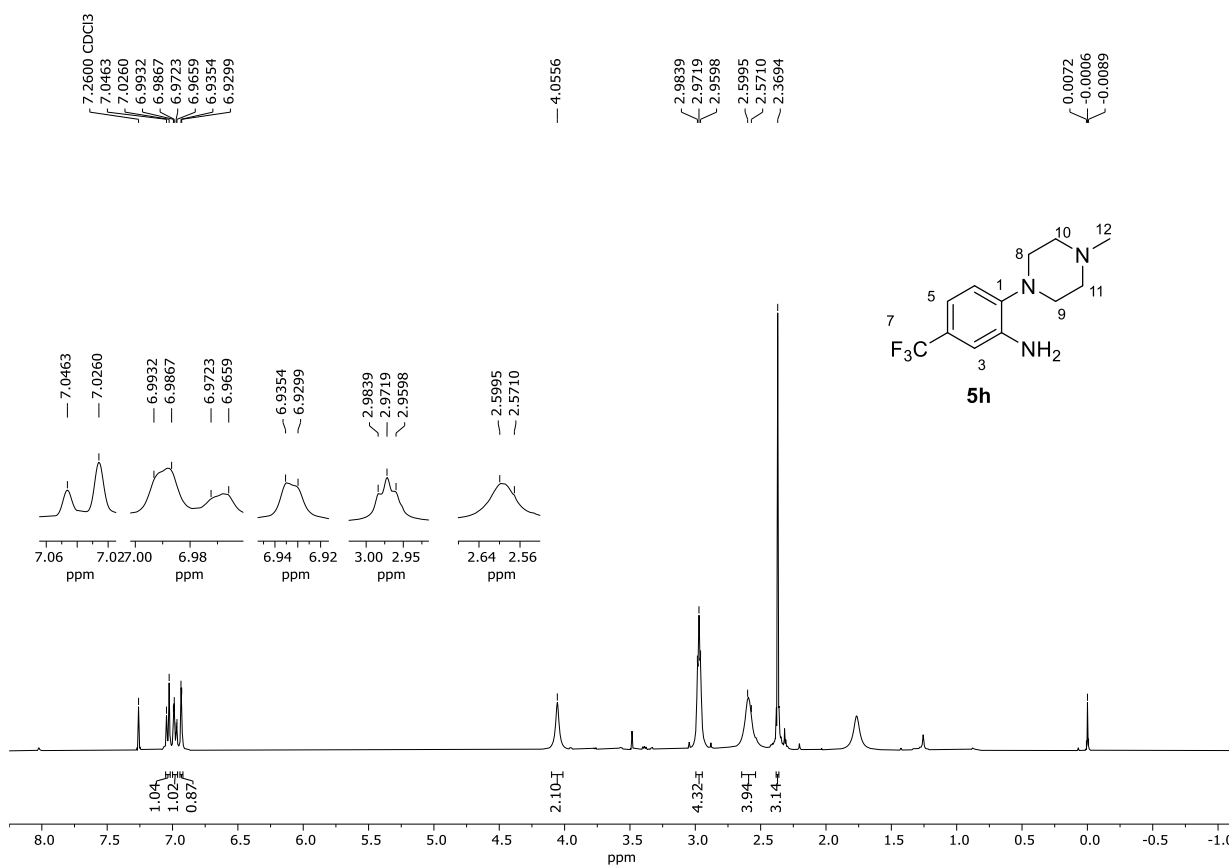
Anexo 12 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5c**.Anexo 13 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5d**.

Anexo 14 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5e**.Anexo 15– Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5f**.

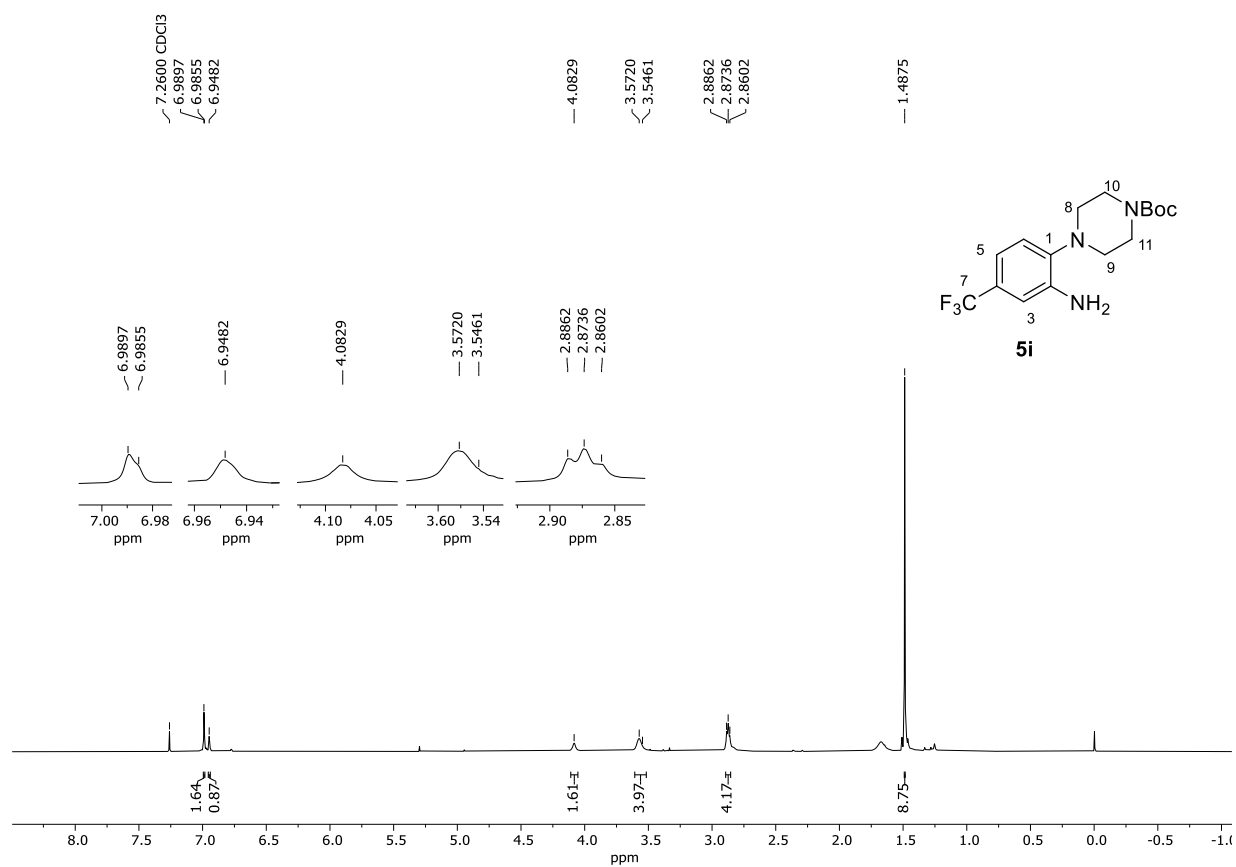
Anexo 16– Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5g**.



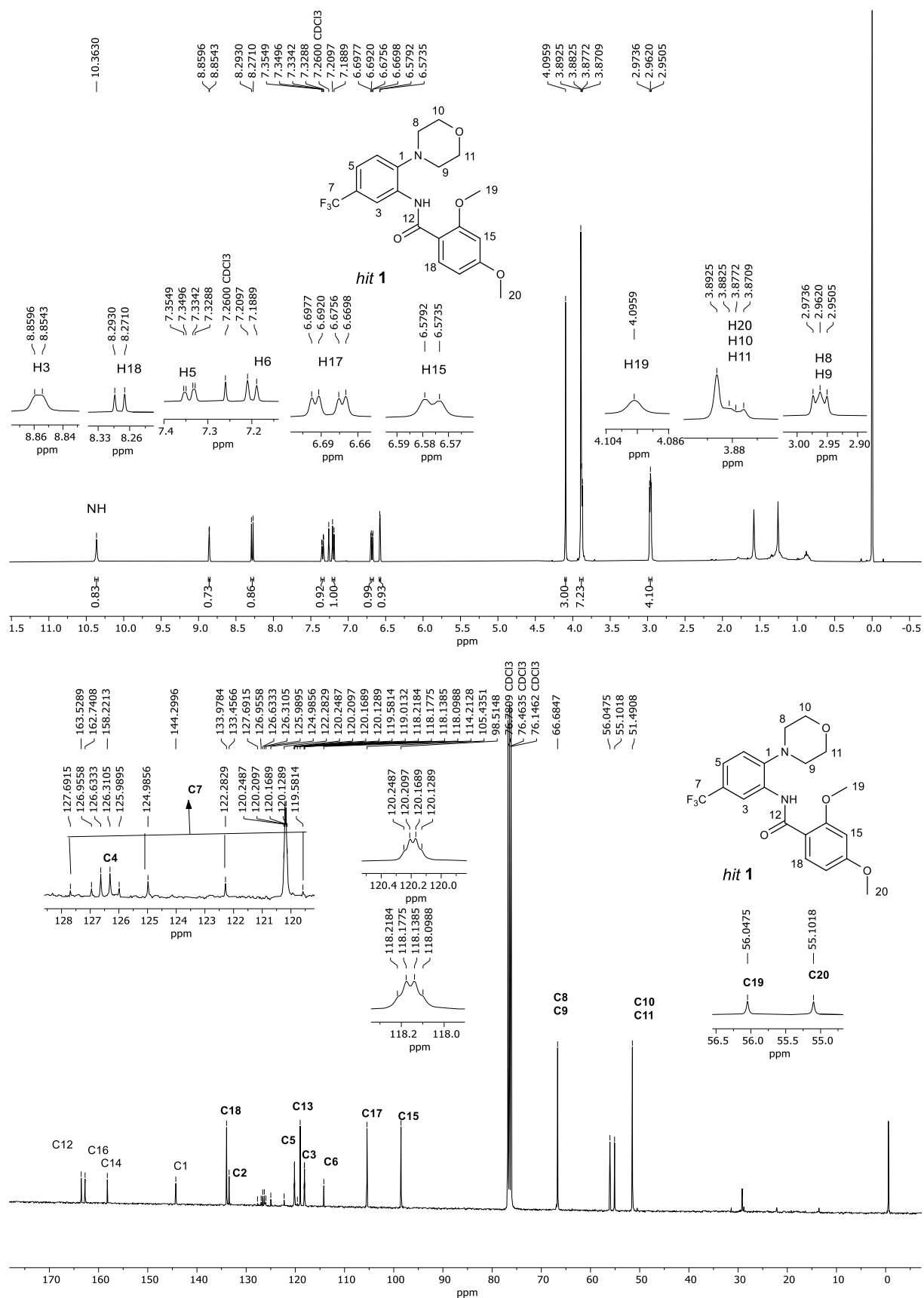
Anexo 17 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5h**.



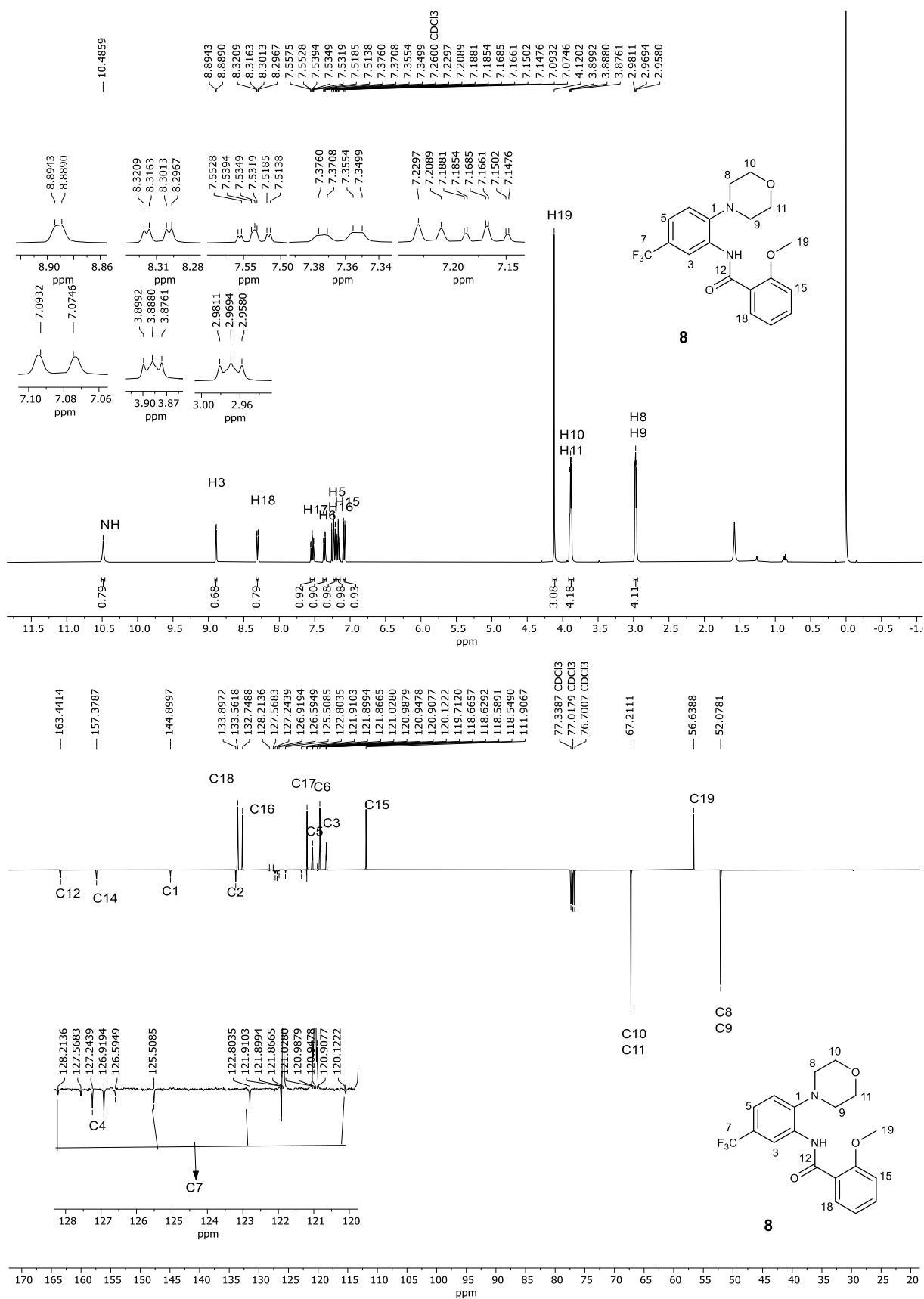
Anexo 18 – Espectros de RMN H (400 MHz, CDCl₃) do intermediário **5i**.



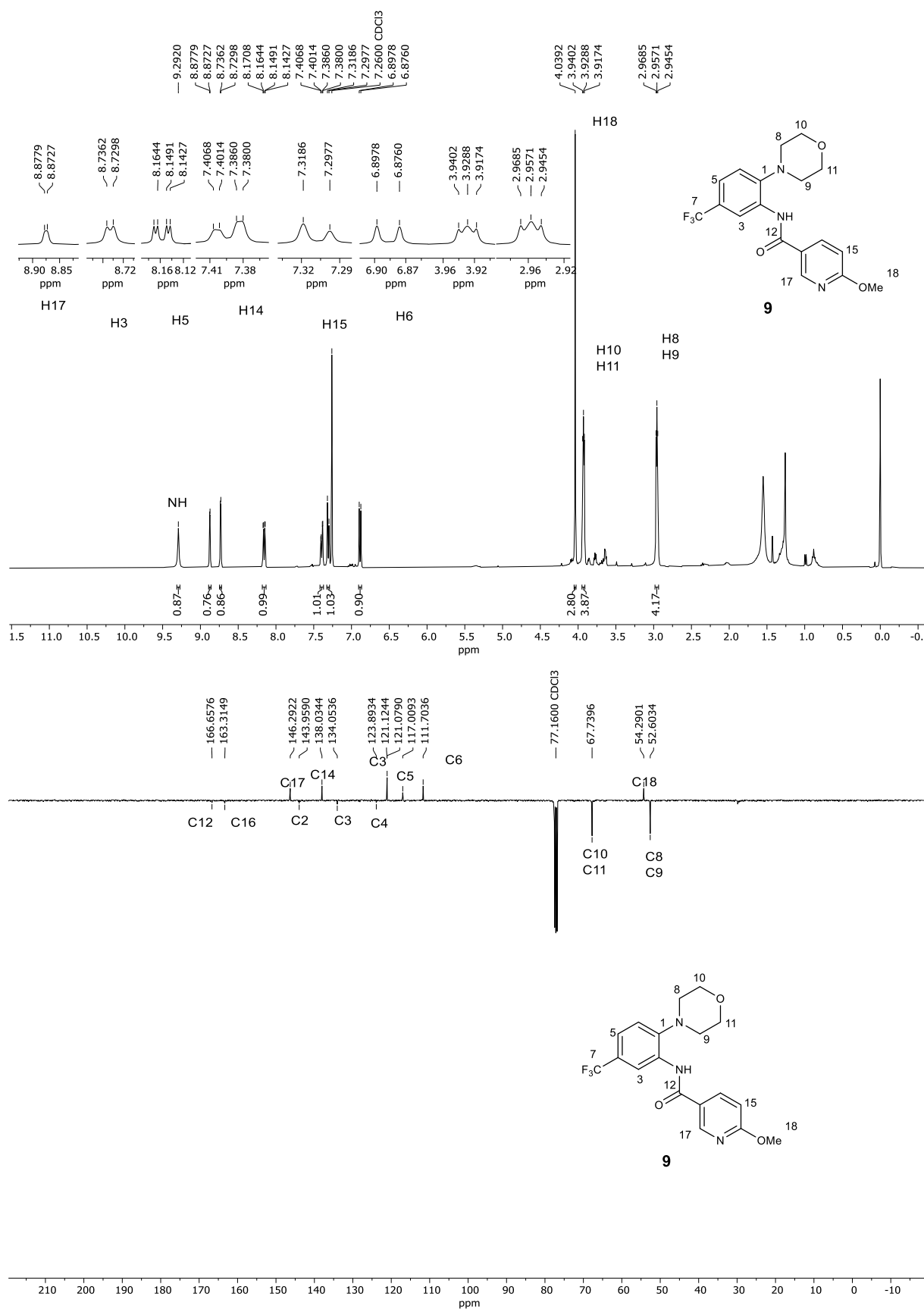
Anexo 19 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto *hit 1*.



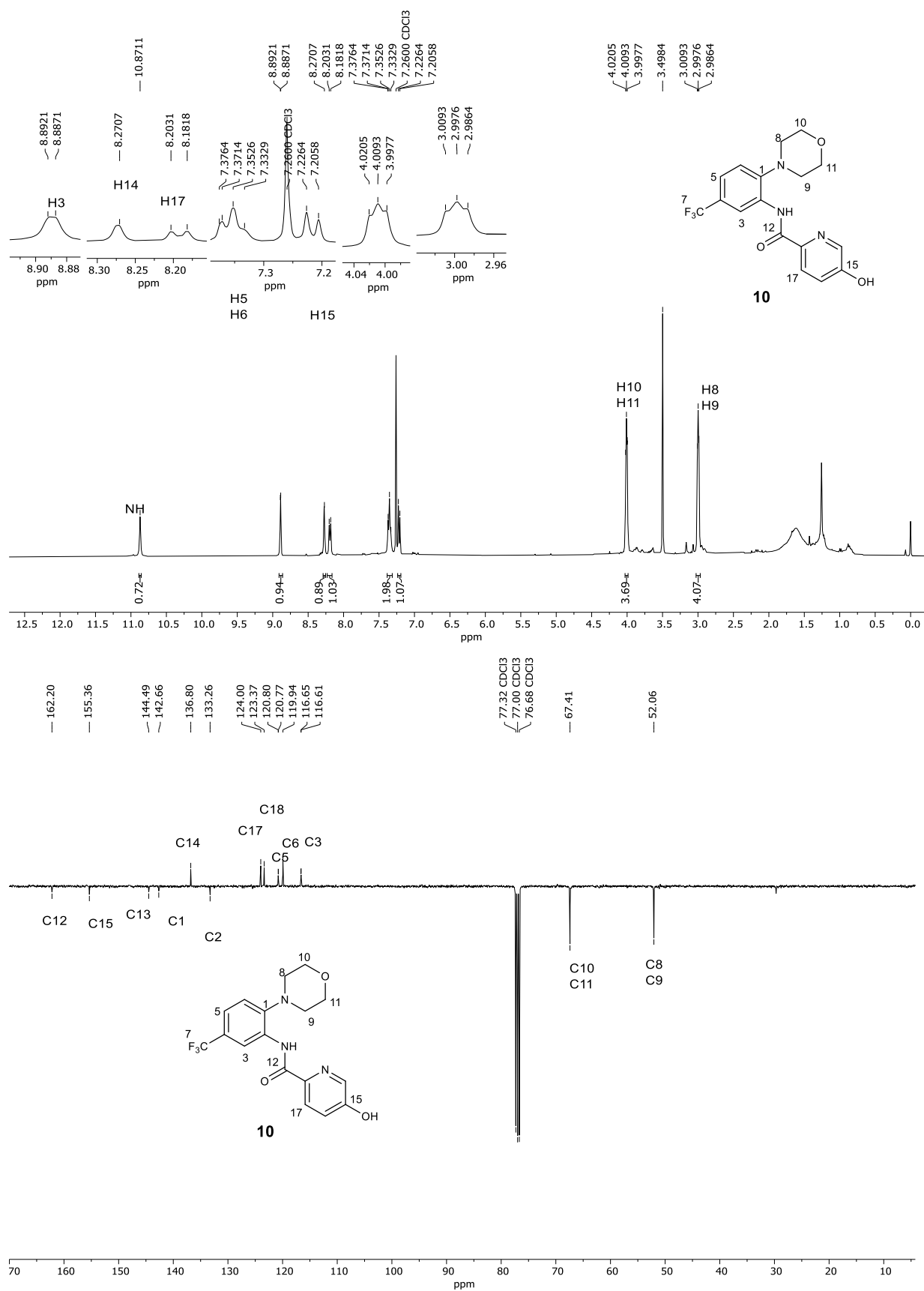
Anexo 20 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **8**.



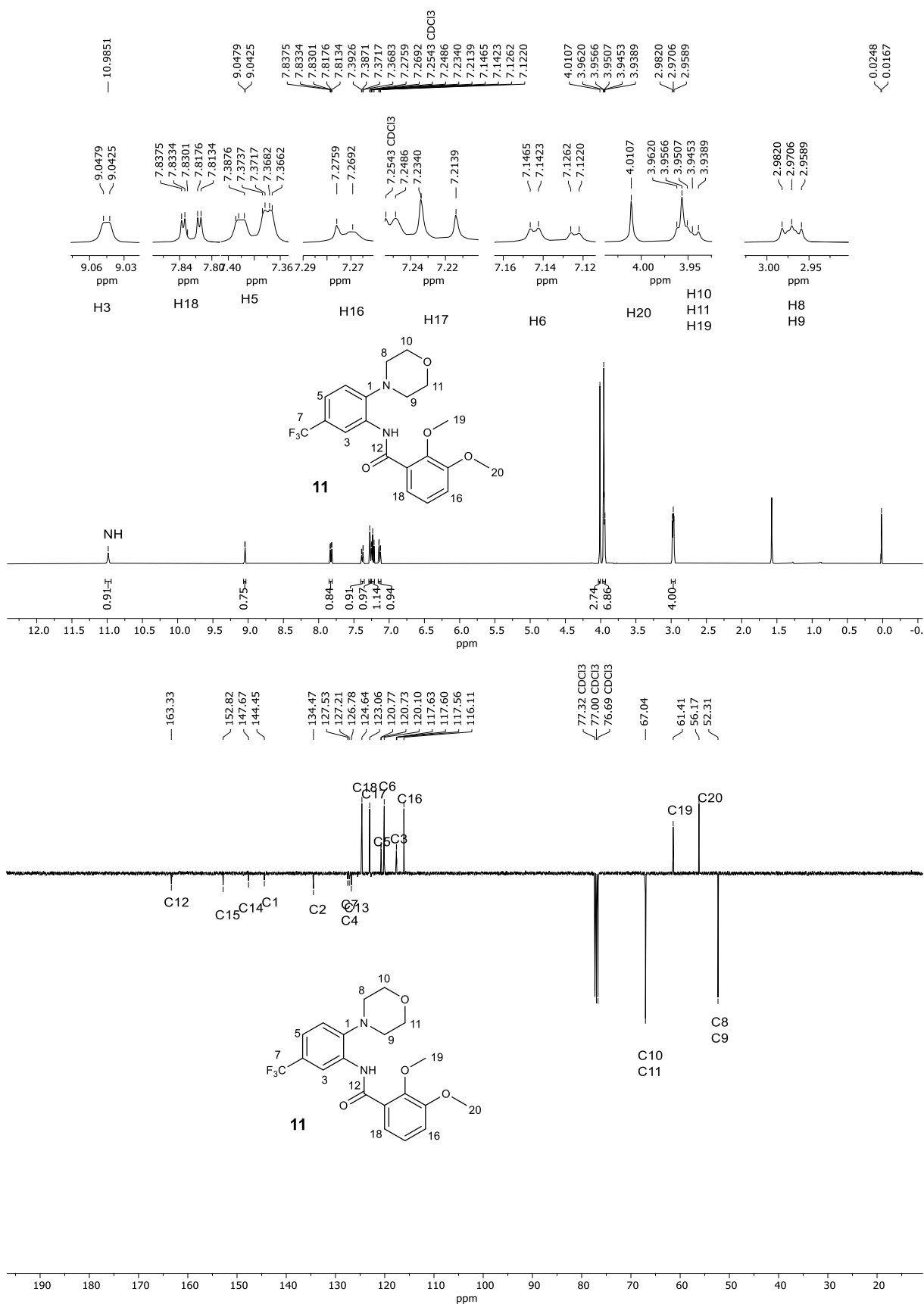
Anexo 21 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **9**.



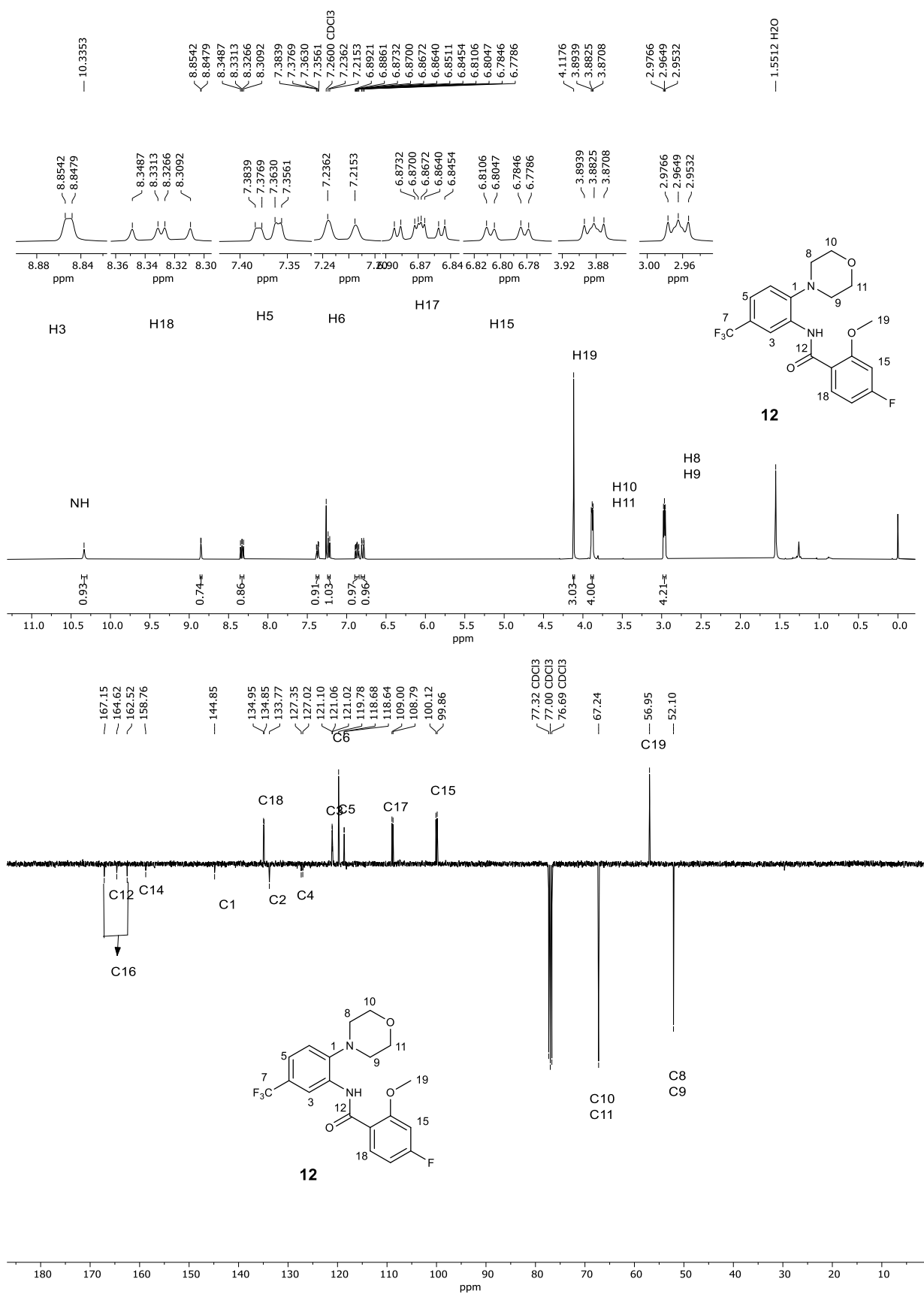
Anexo 22 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **10**.



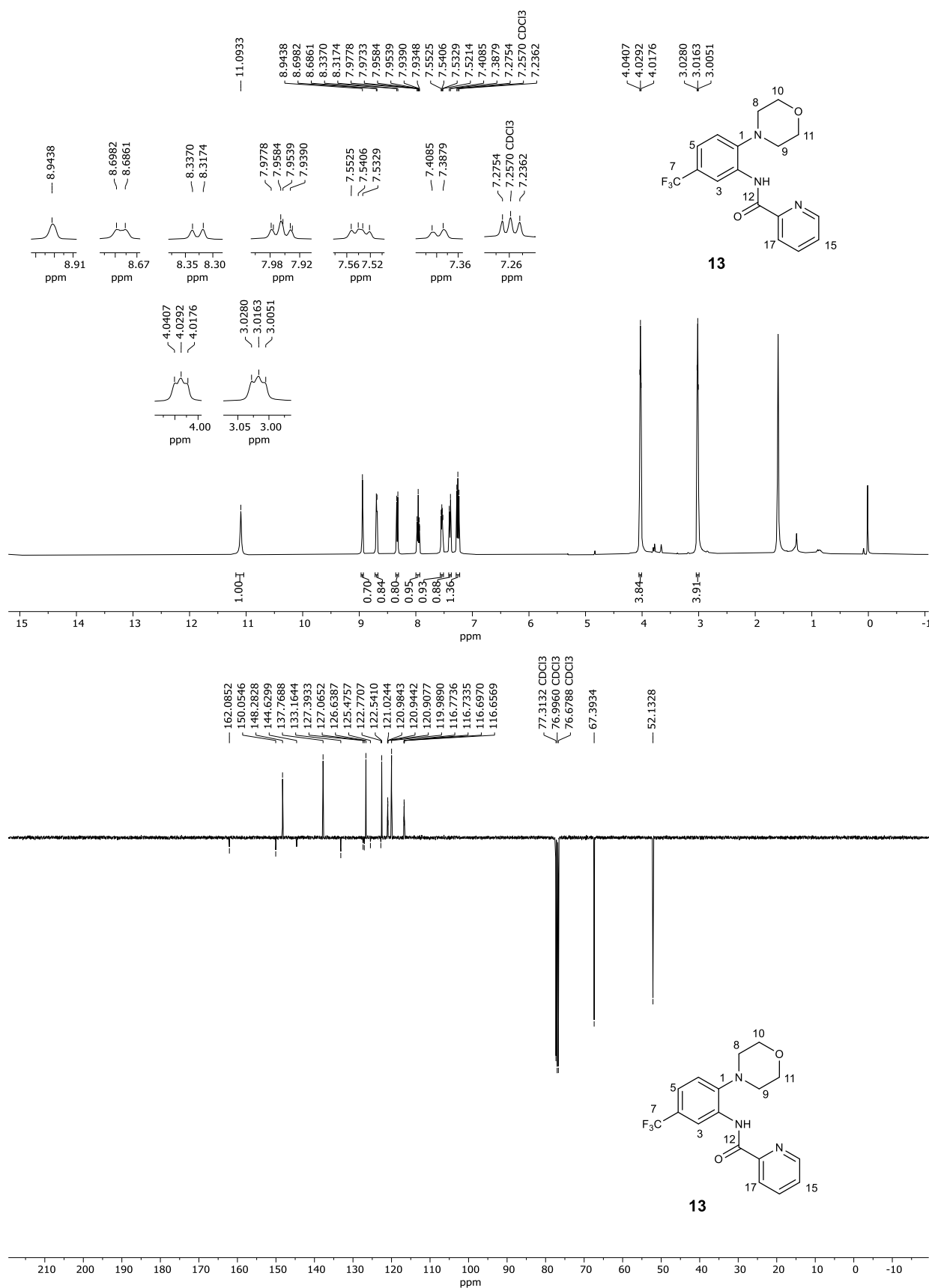
Anexo 23 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **11**.



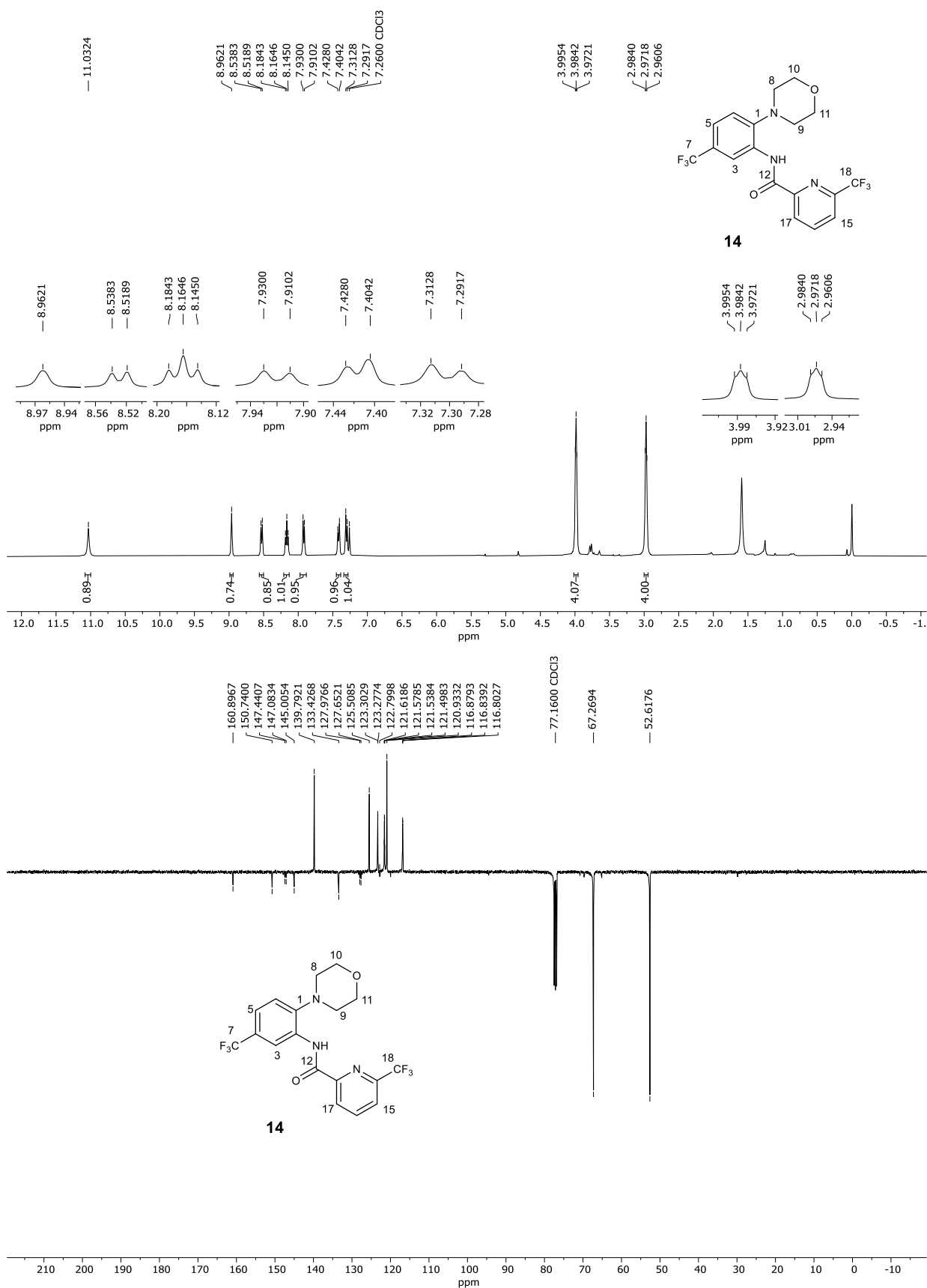
Anexo 24 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **12**.



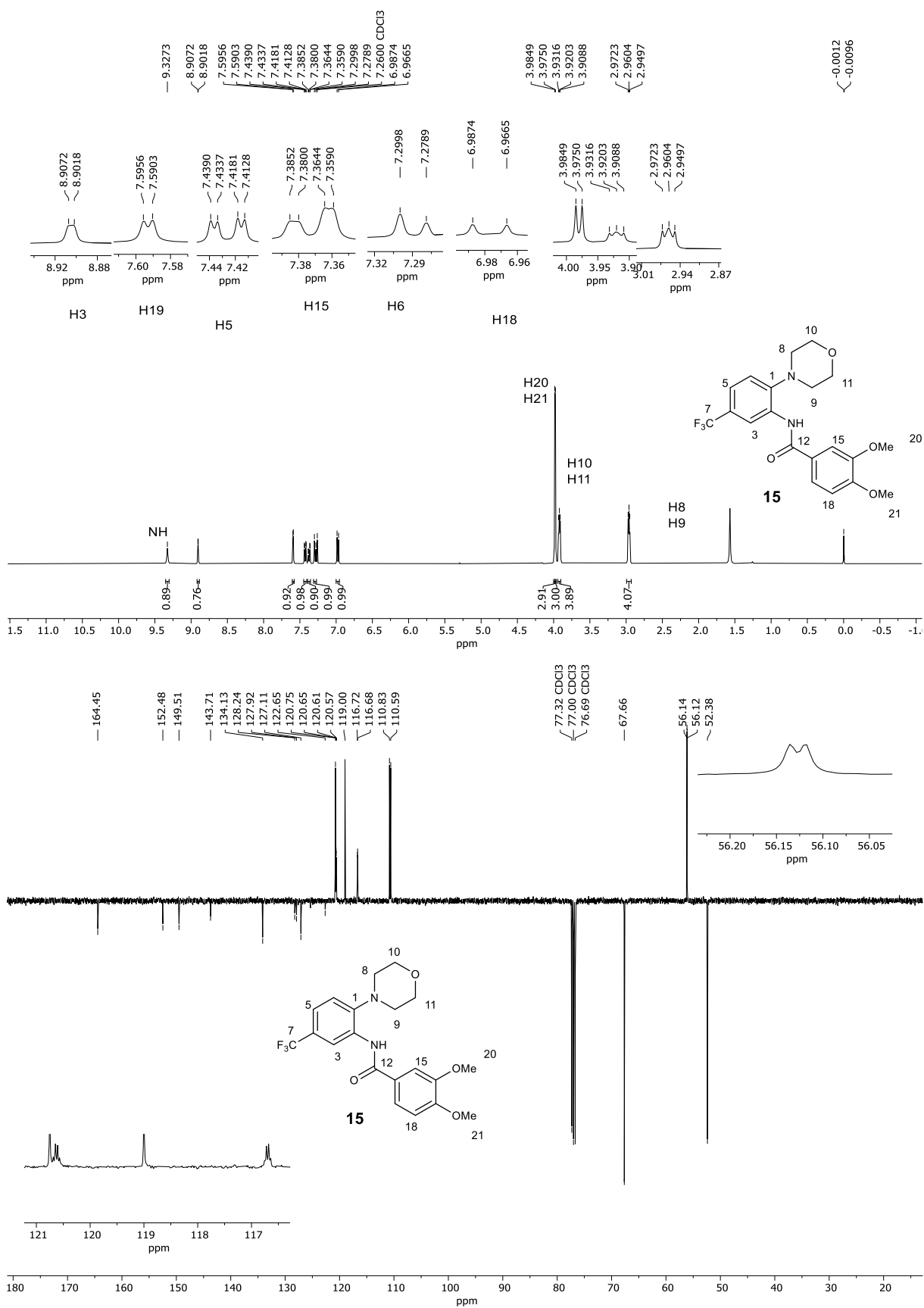
Anexo 25 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **13**.



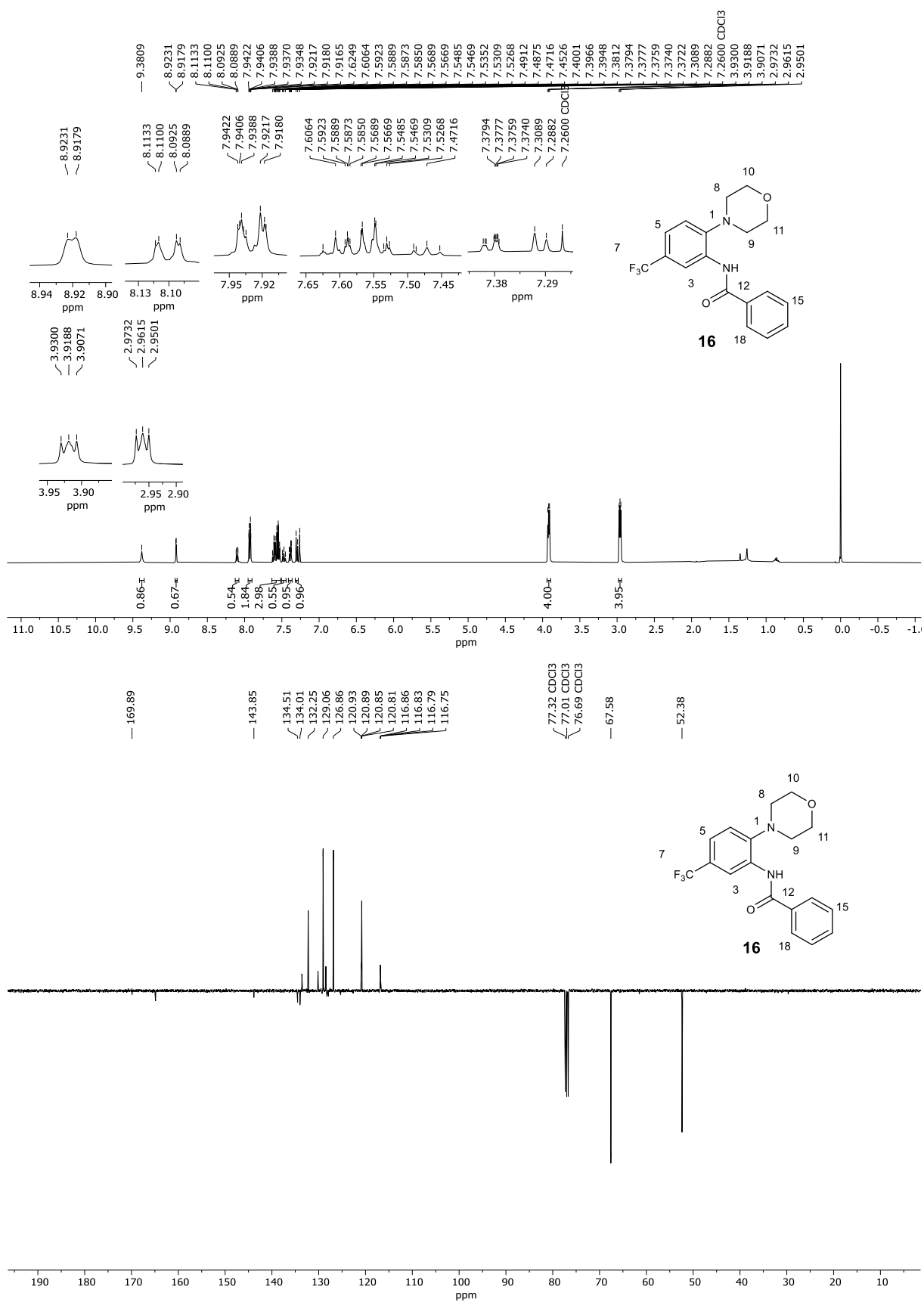
Anexo 26 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **14**.



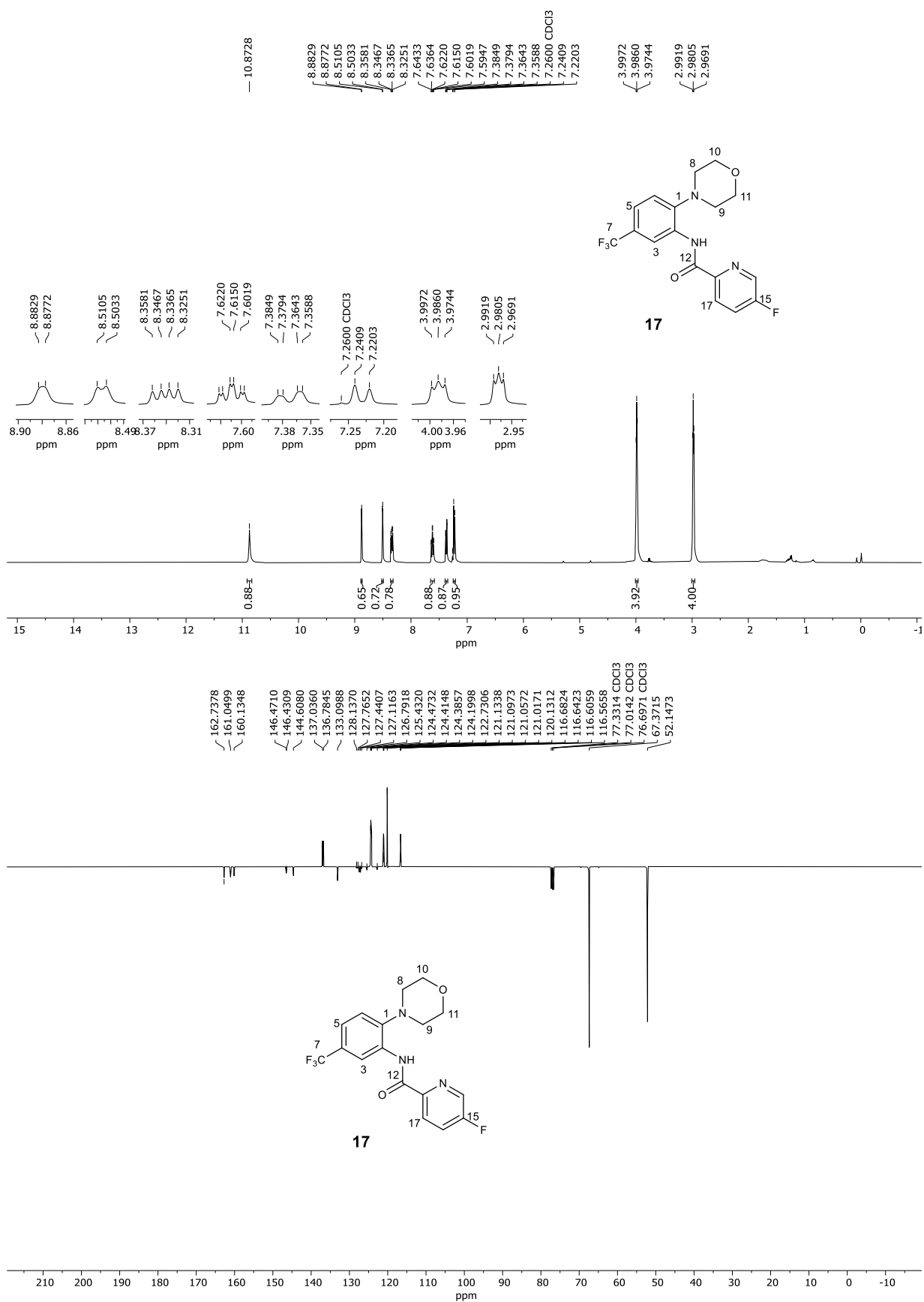
Anexo 27 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **15**.



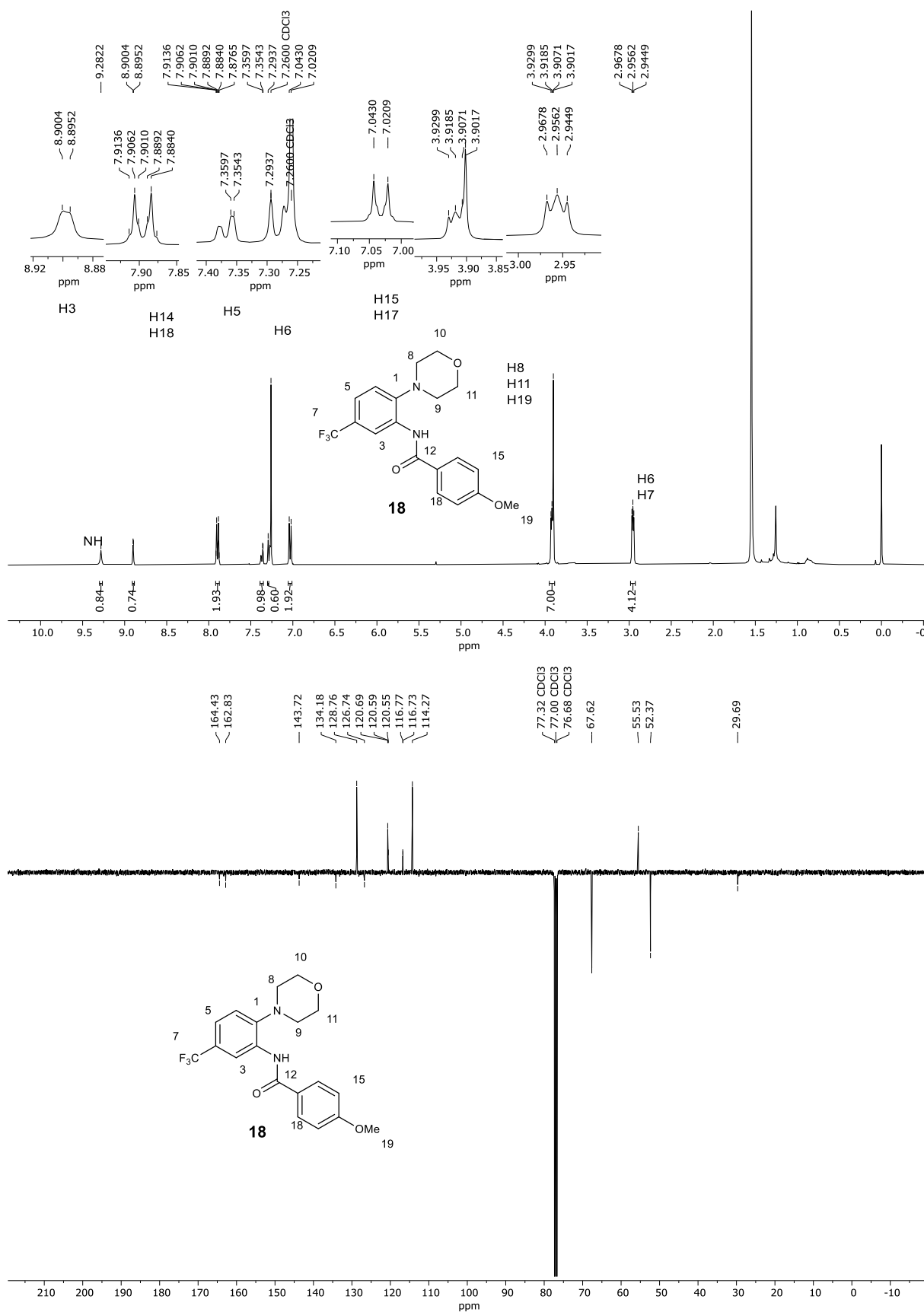
Anexo 28 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **16**.



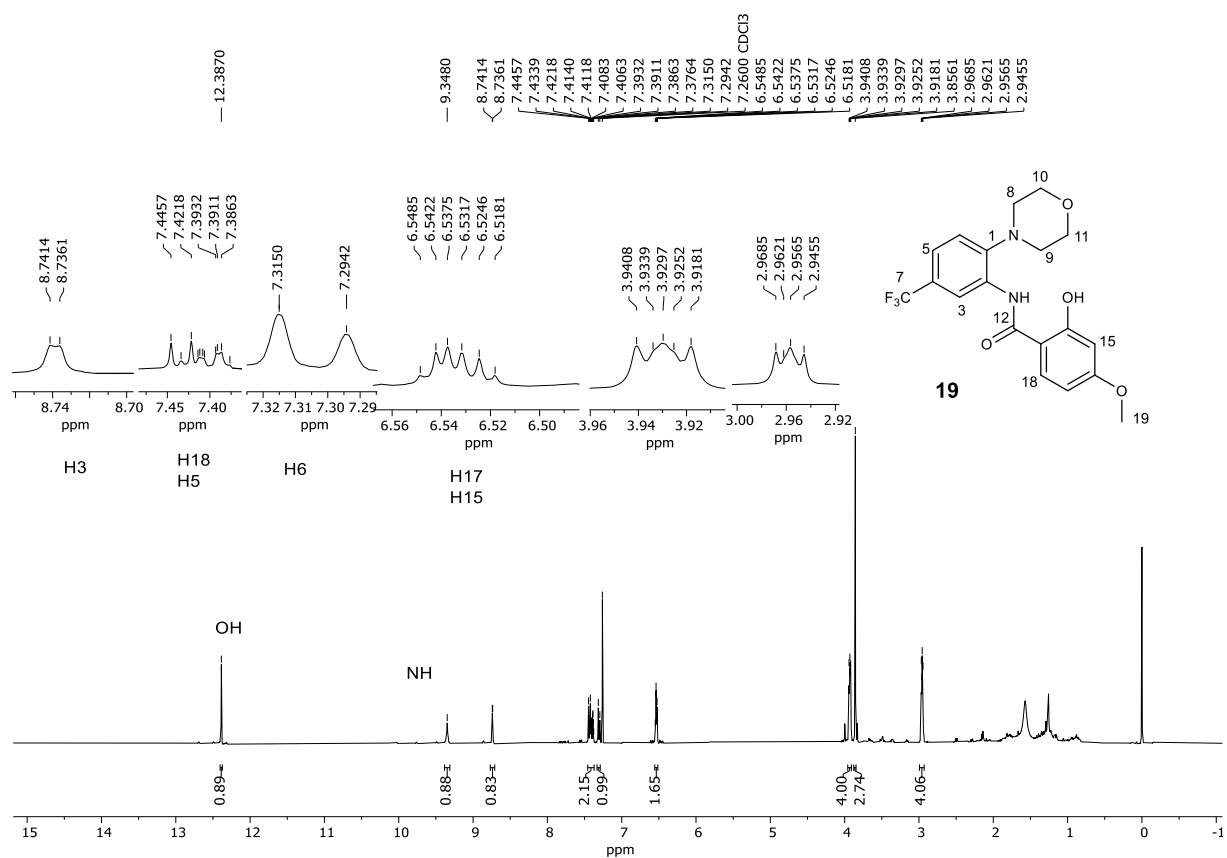
Anexo 29 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **17**.



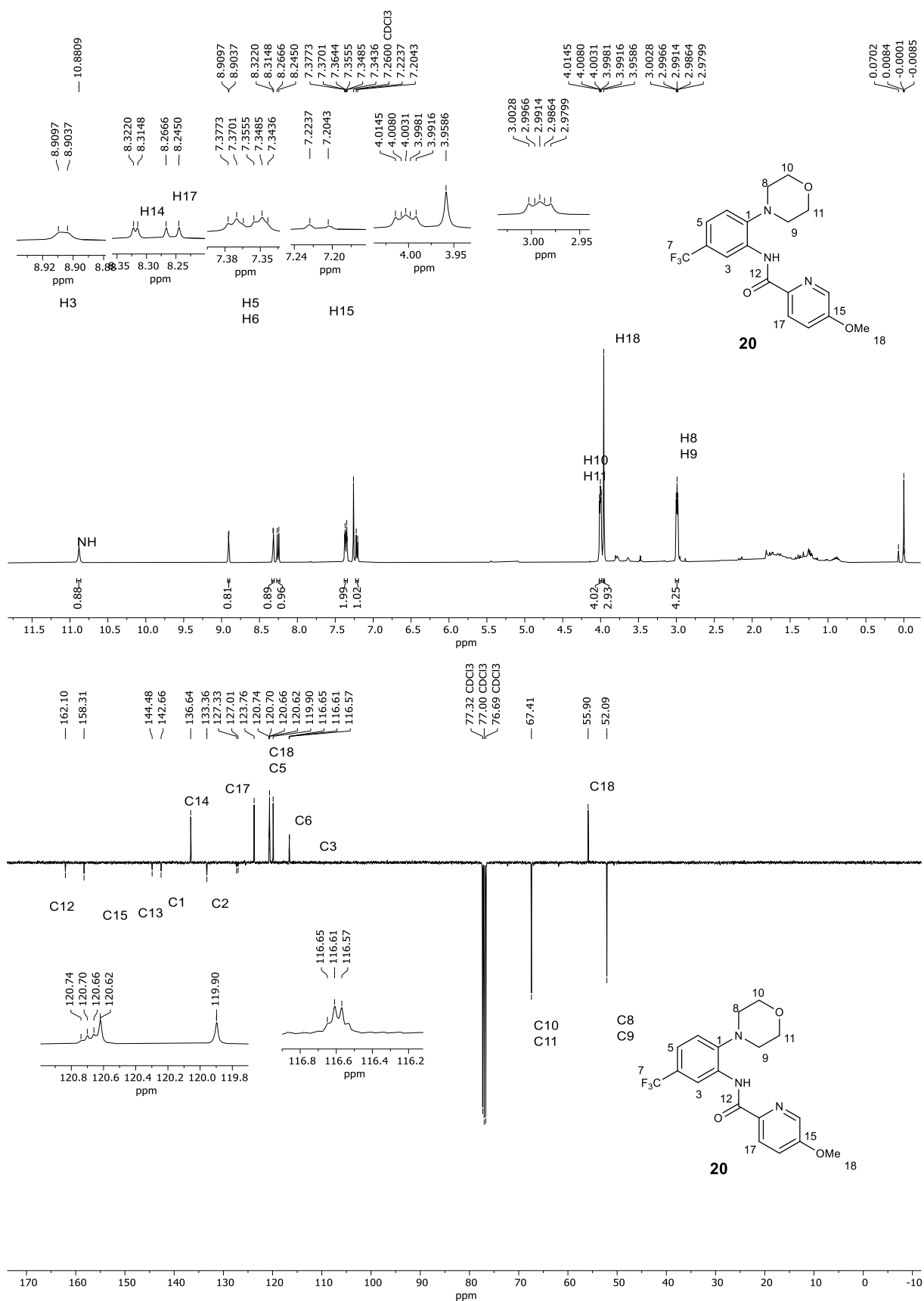
Anexo 30 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **18**.



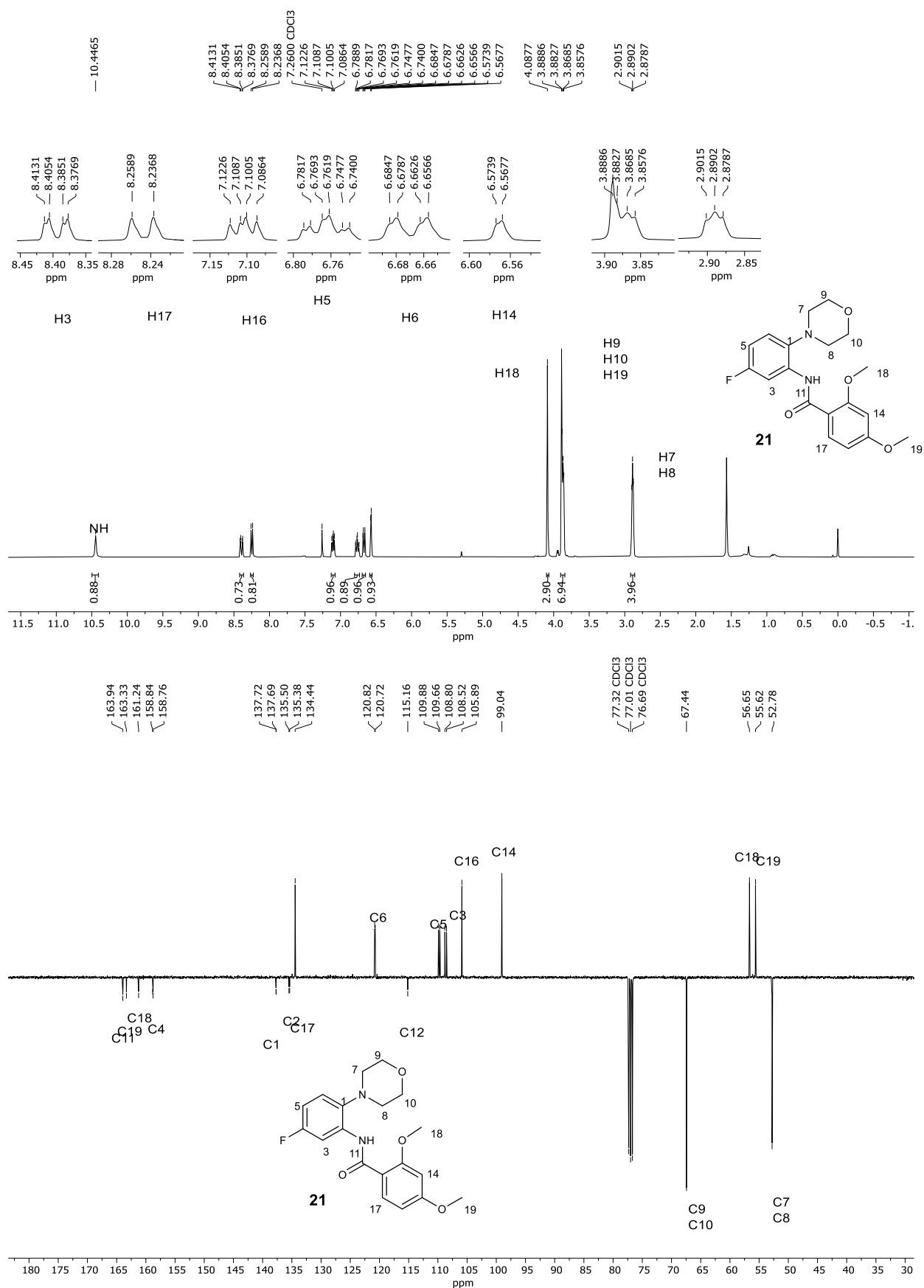
Anexo 31 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **19**.



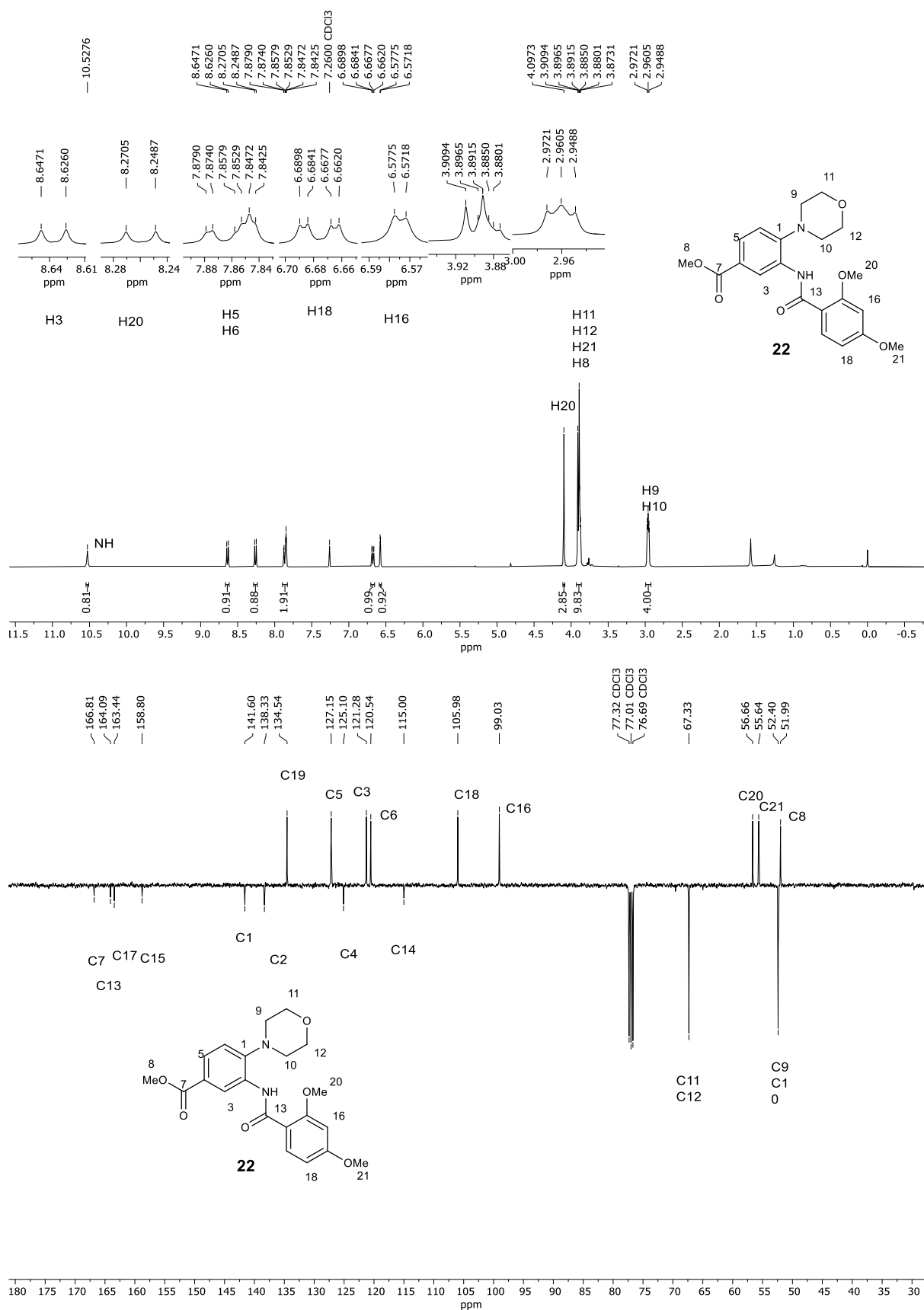
Anexo 32 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **20**.



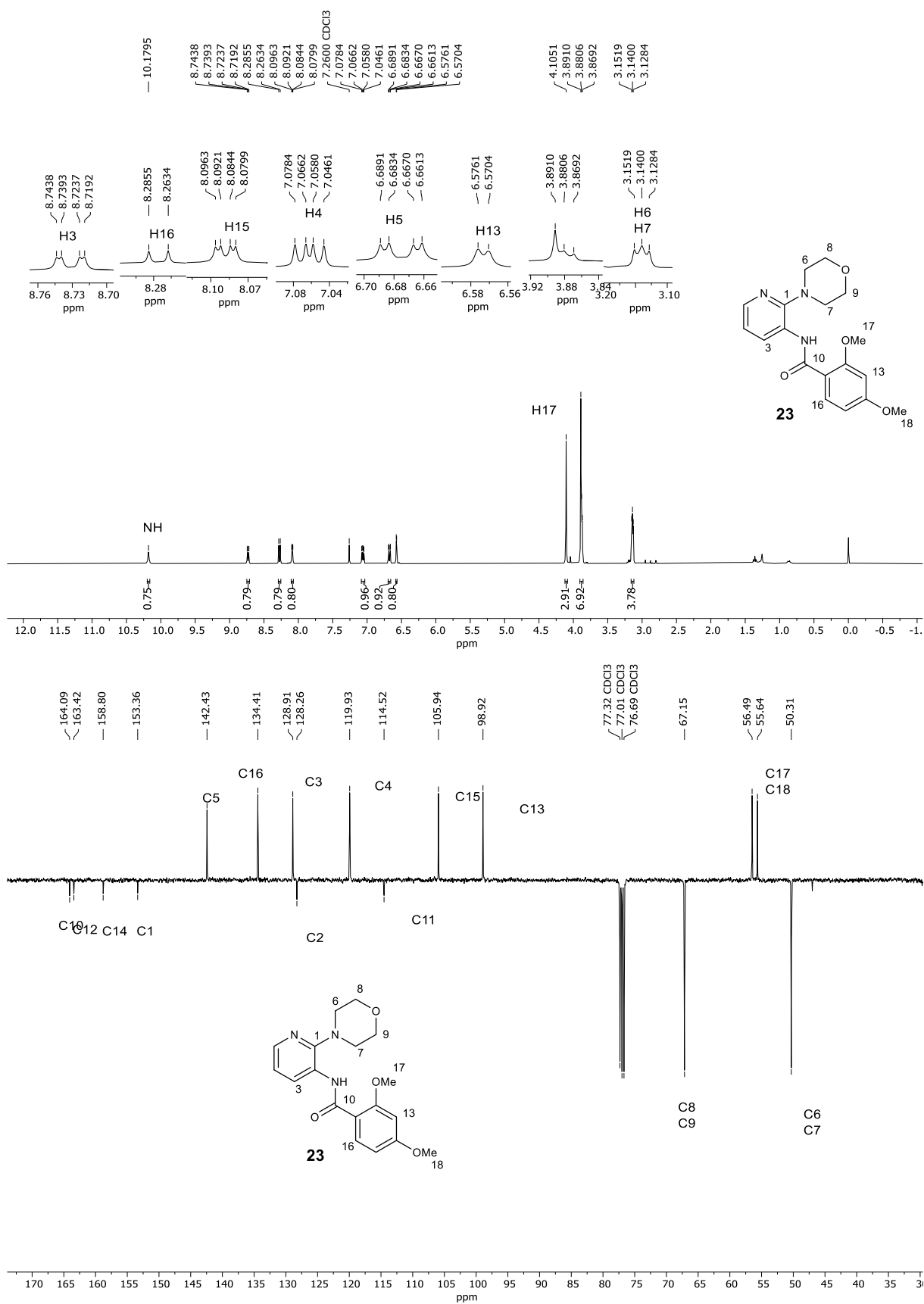
Anexo 33 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **21**.



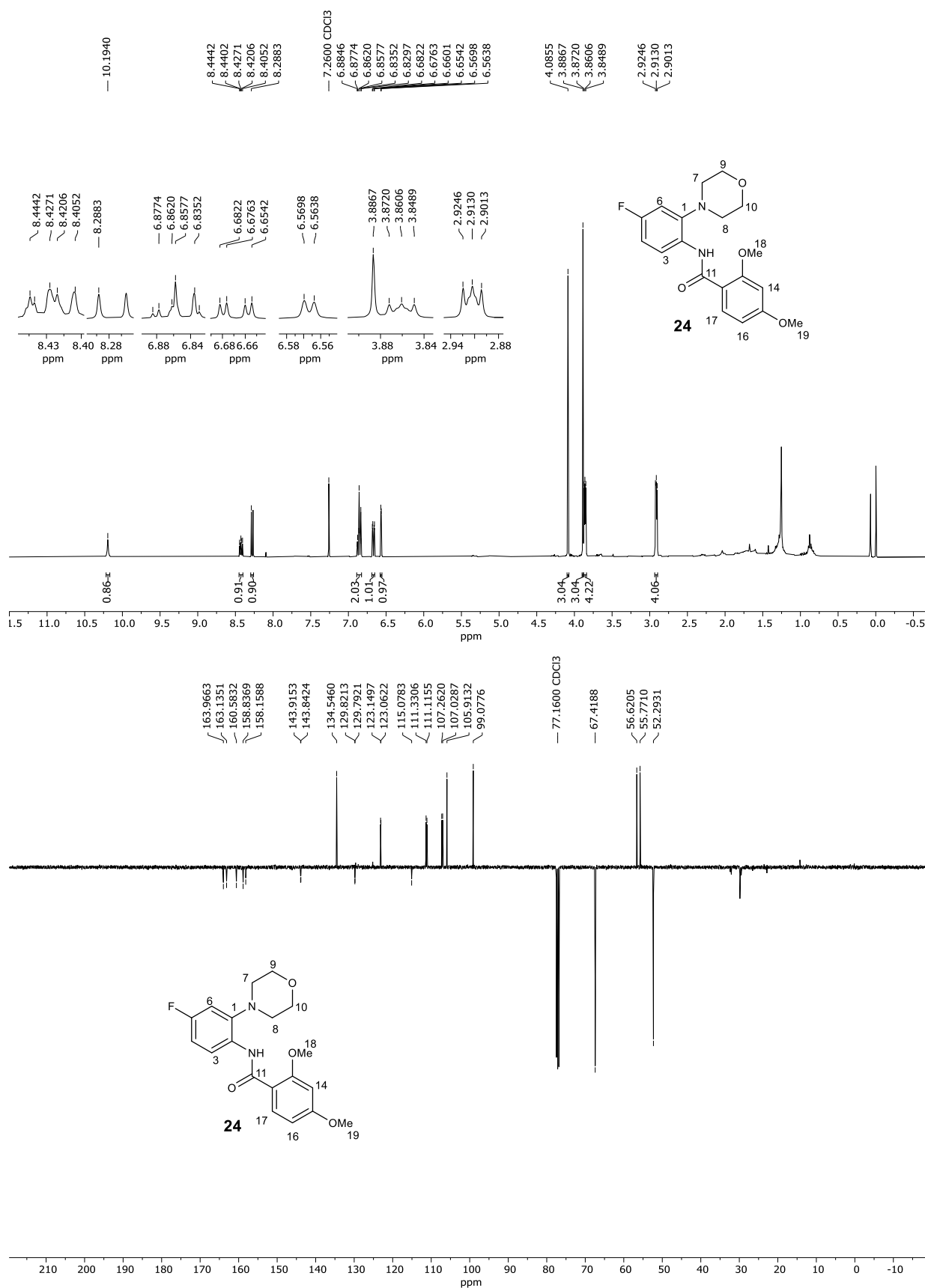
Anexo 34 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **22**.



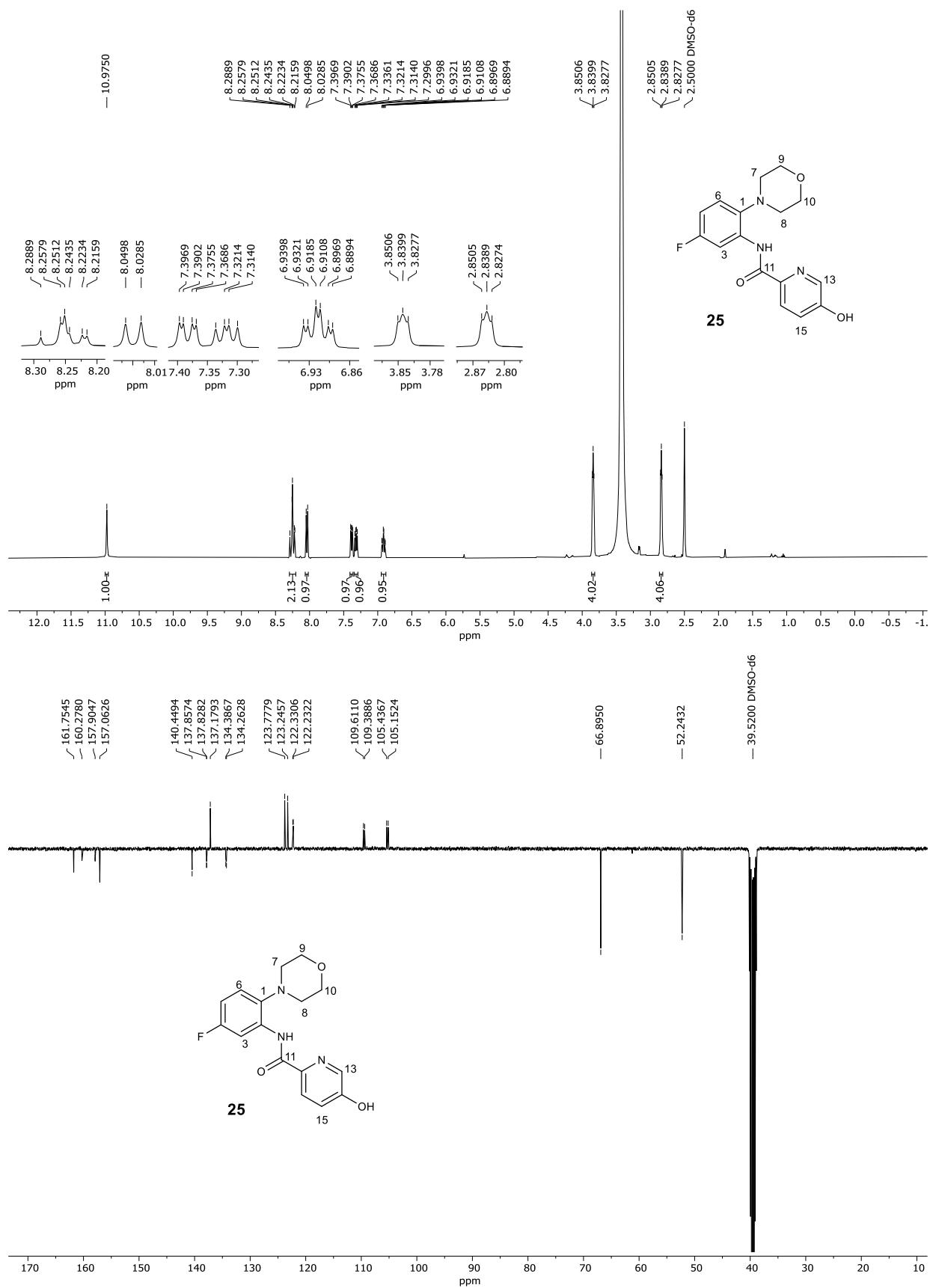
Anexo 35 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **23**.



Anexo 36 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **24**.

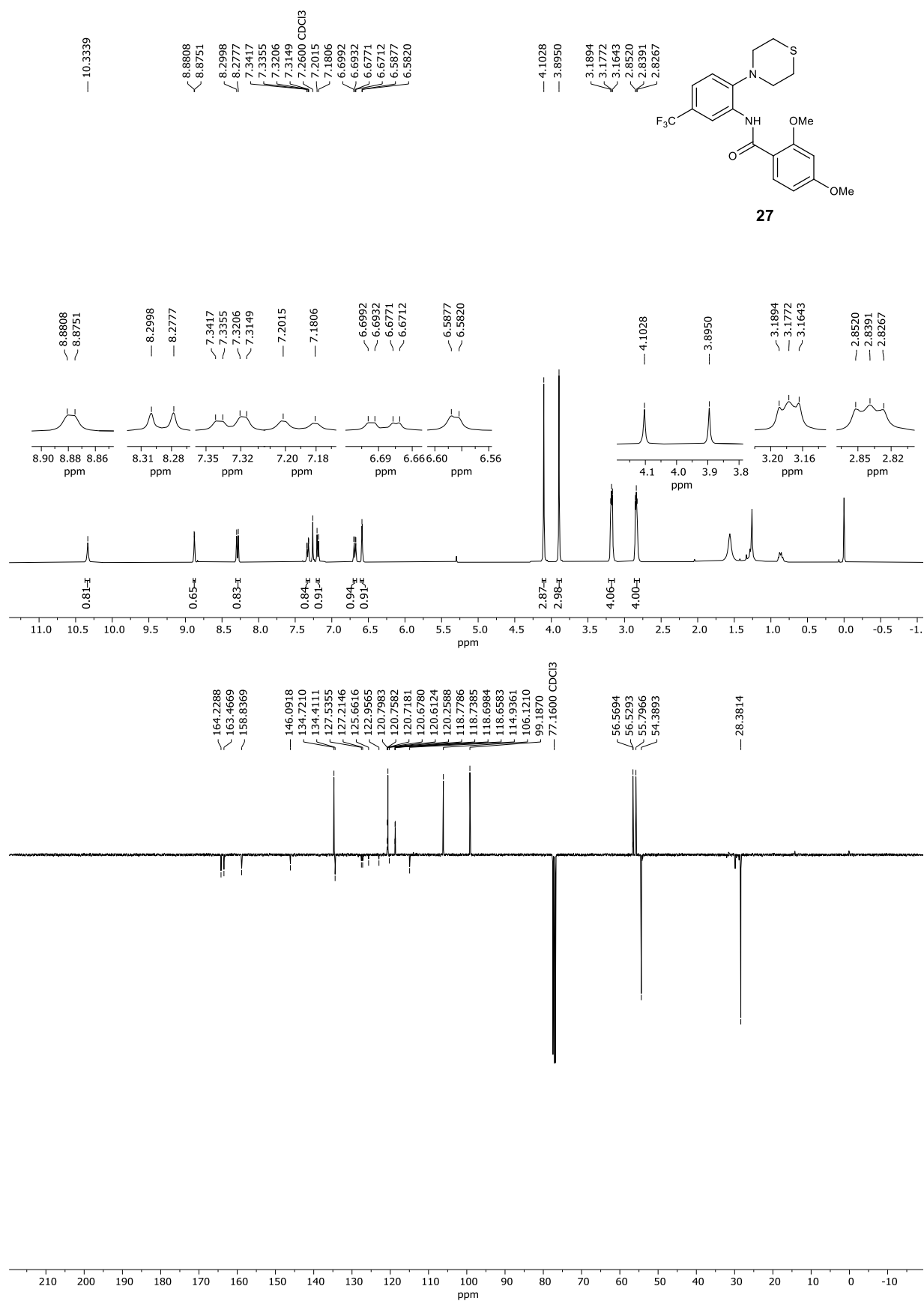


Anexo 37 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, DMSO) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, DMSO) do composto **25**.

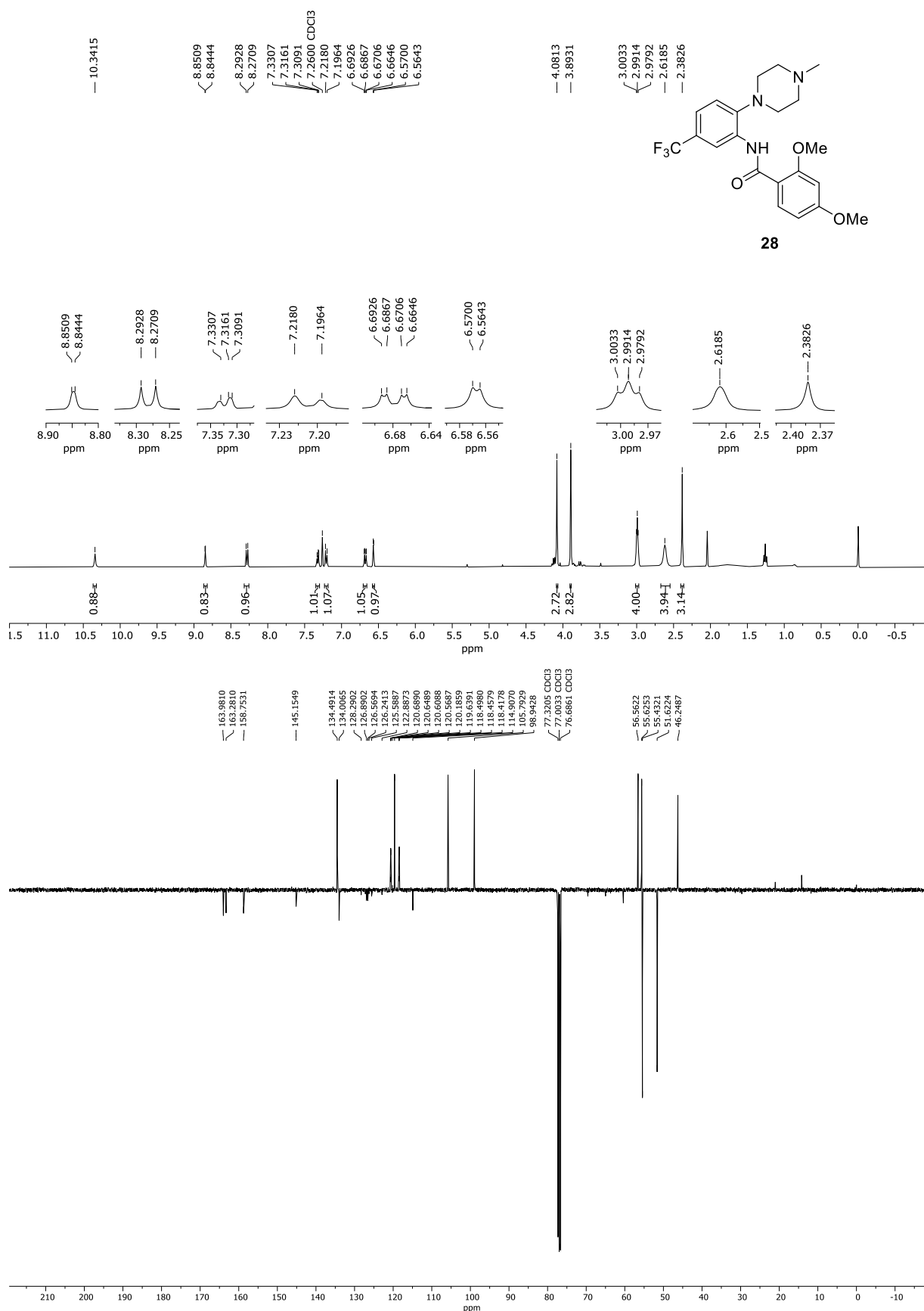


Anexo 38 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **26**.

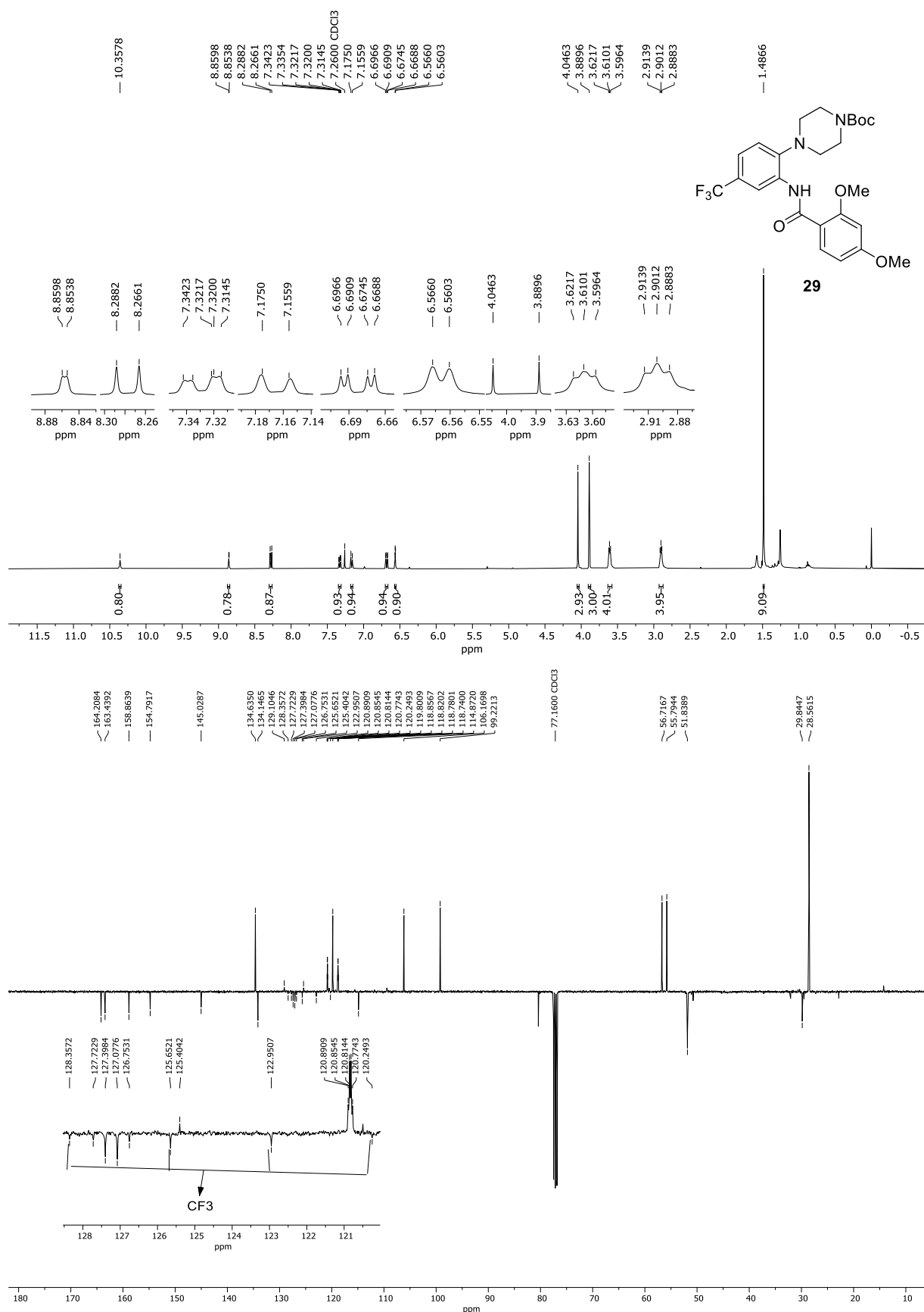




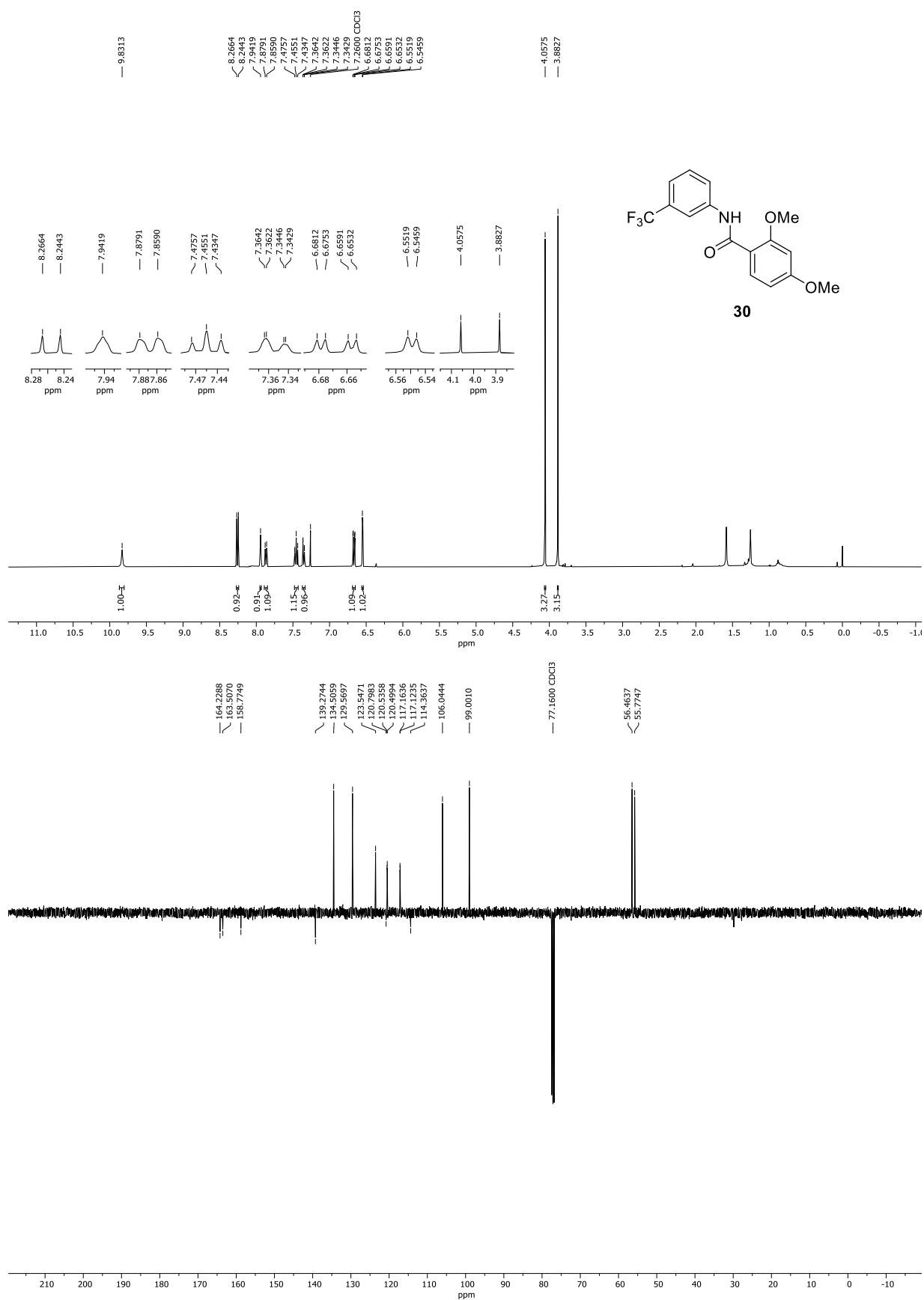
Anexo 40 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **28**.



Anexo 41 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **29**.



Anexo 42 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3) do composto **30**.



Anexo 43 – Espectros de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e de RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)
do composto **31**.

