UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química – Araraquara

Programa de Pós-graduação em Química

Planejamento e síntese de análogos do manogepix como agentes antifúngicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Discente: Maria Gabriela Deberaldini

Orientador: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

ARARAQUARA
2022

D286p

Deberaldini, Maria Gabriela
Planejamento e síntese de análogos do manogepix como agentes antifúngicos / Maria Gabriela Deberaldini. -- Araraquara, 2022
109 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Jean Leandro dos Santos

1. Infecções fúngicas. 2. Biossíntese. 3. Enzimas de fungos. 4. Inibidores enzimáticos. 5. Síntese orgânica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Planejamento e síntese de análogos do manogepix como agentes antifúngicos."

AUTORA: MARIA GABRIELA DEBERALDINI
ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS (Participaçao Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciencias Farmaceuticas - UNESP - Araraquara

Daniara G. Fernandes

Profª. Drª. DANIARA CRISTINA FERNANDES (Participaçao Virtual)
Campus de Matão / Instituto Federal de São Paulo - IFSP - Matão

Isabele R. Nascimento

Prof.ª Dr.ª ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participaçao Virtual)
Departamento de Bioquimica e Quimica Organica / Instituto de Quimica - UNESP - Araraquara

Araraquara, 26 de janeiro de 2022

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Maria Gabriela Deberaldini
Nome em citações bibliográficas: DEBERALDINI, M. G.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em Licenciatura em Química, pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Matão – 2018

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos:

LOURENÇO DE FREITAS, N.; DEBERALDINI, M. G.; GOMES, D.; PAVAN, A. R.; SOUZA, A.; DOS SANTOS, J. L.; SOARES, C. P. Histone Deacetylase Inhibitors as Therapeutic Interventions on Cervical Cancer Induced by Human Papillomavirus. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. 592868, 2021.

DEBERALDINI, M. G.; DOS SANTOS, J. L. Infecções Fúngicas Invasivas: Aspectos Gerais e Tratamento. **UNILAKES Journal of Medicine**, v.1, n. 3, p. 209 – 221, 2021.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS

Síntese de derivados 6- carboxibenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-*N*-óxido planejados como antifúngicos – Biotecfarma, 2020

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

Membra da mesa intitulada: *"Me formei, e agora?"* na "III Semana da Química do IFSP Câmpus Matão"

OUTROS

- Estágio docência na disciplina de "Desenvolvimento de Fármacos" ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, 1º semestre de 2020.
- Estágio docência na disciplina de "Planejamento de Fármacos" ministrada pelo prof. Dr. Jean Leandro dos Santos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, 2º semestre de 2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo, sem Ele não conseguiria ter passado por tantas coisas ao longo desses anos de pós-graduação e chegado onde eu cheguei. Pela extrema força e por sempre me mostrar o melhor caminho a ser seguido.

À minha família pelo apoio incondicional. Aos meu pais Pedro e Vera por sempre acreditarem em mim, no meu potencial e apoiarem cada decisão que eu tomei. Ao meu irmão Caio por estar sempre comigo, me apoiar e me ouvir. Vocês são tudo para mim!

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, por todo o ensinamento, paciência, amizade e apoio.

Aos meus amigos do laboratório, Aline, Bárbara, Beatriz, Diego, Guilherme, Igor, João Lucas, Juliana, pelo companheirismo, apoio, ensinamentos, amizade. Por sempre terem uma palavra de acalento, otimismo e por terem me recebido tão bem no grupo. Aqui cabe meu agradecimento em especial a Bia Urias que se disponibilizou para que eu pudesse acompanhar seu dia a dia no laboratório, foi muito importante para minha jornada.

Aos meus amigos da vida Marina, Brianda, Ana Affonso, Beatriz, João Lucas, Gabriela, Maria Luiza, Letícia, a minha prima Carol entre outros por toda amizade e apoio durante todo o processo do mestrado que, mesmo não entendendo muito bem sempre estavam dispostos a me ouvir e me ajudar. Vocês são muito importantes para mim. A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Queria agradecer também a mim mesma por não ter desistido mesmo em dias extremamente exaustivos, difíceis, tentativas erradas várias e várias vezes. Por ter entendido o processo e ter permanecido firme, embora todas circunstancias externas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – BRASIL) - Finance Code 001

Resumo: Anualmente, as infecções fúngicas invasivas (IFIs) são responsáveis pela morte de aproximadamente 1,5 – 2 milhões de pacientes. O tratamento atual com antifúngicos é limitada e o aumento da resistência aos fármacos demanda pela busca de novos agentes terapêuticos. A enzima Gwt1, envolvida na biossíntese de glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) apresenta atividade do tipo acil-transferase e está envolvida na acilação do inositol na etapa inicial da via bioquímica, e demonstra ser um alvo promissor na busca de novos antifúngicos. Neste trabalho, utilizando a estratégia de modificação molecular denominada bioisosterismo foram planejados sete compostos baseados no manogepix (**APX001A**), conhecidamente inibidor de Gwt1. Para obtenção destes compostos foi utilizada síntese convergente em sete etapas na etapa A ocorreu a obtenção dos benzofuroxanos *6-carboxibenzo[c][1,2,5]oxadiazol 1-óxido* (**8**) e *6-carboxi-[1,2,5]oxadiazol[3,4-b]piridina 1-óxido* (**9**) ; na etapa B foram obtidos os éteres *N- (3 - (fenoximetil) fenil)-acetamida* (**13**) e *N- (3 - (pridin-2-oxi) metil) fenil)-acetamida* (**14**) por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular seguida de uma hidrólise básica para obtenção dos compostos *N- (3 - (fenoximetil) anilina* (**15**) e *N- (3 - (pridin-2-oxi) metil) anilina* (**16**) , na etapa C, ocorreu a reação de acoplamento entre os compostos obtidos nos Blocos A e B para obtenção dos derivados benzofuroxanos (**17**) e (**18**); na etapa D ocorreu a obtenção do intermediário sulfonado (**22**) por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular; na etapa E ocorreu uma reação de acoplamento entre o derivado sulfonado (**22**) e os compostos obtidos no Bloco A para obtenção dos compostos (**23**) e (**24**); na etapa F ocorreu uma reação de redução de um grupo nitro aromático (**25**) para uma amina aromática (**26**). Os intermediários e os produtos finais obtidos nesse trabalho tiveram seus rendimentos variando entre 21% a 89%. A caracterização estrutural foi realizada por meio de métodos analíticos como ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional, espectroscopia na região do infravermelho e faixa de fusão. Os novos compostos (**17**,**18**, **23**, **24**, **27**, **28** e **30**) planejados como antifúngicos podem constituir uma nova alternativa ao tratamento contra infecções fúngicas invasivas.

Palavras-chaves: Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs), glicosilfofatidilinositóis (GPIs), enzima Gwt1, manogepix, APX001A, bioisosteirismo, síntese de derivados benzofuroxanos, substituição nucleofílica bimolecular, hidrólise básica, reação de acoplamento, derivado sulfonado.

Abstract: Annually, invasive fungal infections (IFIs) are responsible for the death of approximately 1.5 – 2 million patients. Current treatment with antifungals is limited and the increase in drug resistance demands the search for new therapeutic agents. The enzyme Gwt1, involved in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols (GPIs) has acyl-transferase-like activity and is involved in the acylation of inositol in the initial step of the biochemical pathway, and proves to be a promising target in the search for new antifungals. In this work, using the molecular modification strategy called bioisosterism, seven compounds based on manogepix (APX001A), known to be a Gwt1 inhibitor, were designed. To obtain these compounds, convergent synthesis was used in seven steps. In step A, 6-carboxybenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide (**8**) and 6-carboxy-[1,2,5] benzofuroxanes were obtained.]oxadiazole[3,4-b]pyridine 1-oxide (**9**); in step B, the ethers N-(3-(phenoxymethyl)phenyl)-acetamide (**13**) and N-(3-(pridin-2-oxy)methyl)phenyl)-acetamide (**14**) were obtained through a reaction of bimolecular nucleophilic substitution followed by a basic hydrolysis to obtain the compounds N-(3-(phenoxymethyl)aniline (**15**) and N-(3-(pridin-2-oxy)methyl)aniline (**16**) , in step C, the coupling reaction between the compounds obtained in Blocks A and B to obtain the benzofuroxane derivatives (**17**) and (**18**); in step D, the sulfonated intermediate (**22**) was obtained through a bimolecular nucleophilic substitution reaction; in step E there was a coupling reaction between the sulfonated derivative (**22**) and the compounds obtained in Block A to obtain compounds (**23**) and (**24**); in step F there was a reduction reaction of a nitroaromatic group (**25**) to an aromatic amine (**26**) The intermediates and final products obtained in this work had their yields ranging from 21% to 89%. Structural analysis was performed using analytical methods such as one-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy and fusion range. The new compounds (**17**, **18**, **23**, **24**, **27**, **28** and **30**) designed as antifungals may constitute a new alternative for the treatment of invasive fungal infections.

Keywords: Invasive Fungal Infections (IFIs), glycosylphosphatidylinositols (GPIs), Gwt1 enzyme, manogepix, APX001A, bioisostheirism, synthesis of benzofuroxane derivatives, bimolecular nucleophilic substitution, basic hydrolysis, coupling reaction, sulfonated derivative.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da anfotericina, antifúngico da classe dos polienos. 20
Figura 2. Estrutura química do fluconazol, antifúngico da classe dos triazóis. 22
Figura 3. Estrutura química do itraconazol, antifúngico da classe dos triazóis. 23
Figura 4. Estrutura química do posaconazol, antifúngico da classe dos triazóis. 24
Figura 5. Estrutura química do voriconazol, antifúngico da classe dos triazóis.....24
Figura 6. Estrutura química do isavuconazol, antifúngico da classe dos triazóis. 25
Figura 7. Estrutura química da caspofungina, antifúngico da classe das equinocandinas.....27
Figura 8. Estrutura química da micafungina, antifúngico da classe das equinocandinas.....27
Figura 9. Estrutura química da anidulafungina, antifúngico da classe das equinocandinas.....28
Figura 10. Estrutura química da pirimidina e seu análogo 5-fluorcitocina. 29
Figura 11. Estrutura dos tetrazóis descobertos por triagem fenotípica como promissores antifúngicos.....32
Figura 12. Estrutura química da equinocandina CD101. 33
Figura 13. Estrutura química do composto SCY-078. 33
Figura 14. Estrutura química do composto VL-2397. 34
Figura 15. Estrutura química das N-acilhidrazonas aromáticas.....34
Figura 16. Estruturas químicas do miconazol e derivados de artemisinina, compostos que demonstraram assim como a artemisinina atividades sinérgicas com o miconazol.. 36
Figura 17. Estrutura química do composto da classe das orotomidas F901318. 37
Figura 18. Estruturas químicas dos compostos Ilicolin H e T2307. 38
Figura 19. Estrutura química do inibidor de histona deacetilase MGCD90. 38
Figura 20. Estrutura química do nucleosídeo Nicomicina Z. 39
Figura 21. Estrutura química do composto AR-12. 39
Figura 22. A) Estrutura da GPI fúngica. **B)** Esquema da organização estrutural das GPIs, destacando a atividade das duas enzimas Gwt1 e Mcd4 da via de GPIs. 42
Figura 23. Estrutura química do composto BIQ (**1**) descoberto como primeiro ligante de Gwt1 em um estudo publicado pela Eisai Co. em 2003. 43
Figura* 24*. *Modificação molecular na identificação do derivado 2-aminopiridínico demonstrando aumento de atividade contra as espécies fúngicas C. albicans e A. fumigatus.* 44
Figura 25. Estruturas químicas do composto manogepix e fosmanogepix como inibidor da enzima Gwt1, demonstrando também uma melhora na atividade em comparação aos compostos anteriores, bem como o surgimento de atividade contra o fungo C. neoformans. 45
Figura 26. Bioisosterismo como estratégia na identificação do derivado 2-aminopiridínico E1210, Manogepix licenciado pela Amplyx Pharmaceuticals como protótipo. 47
Figura 27. Estrutura química dos compostos derivados de benzofuroxanos, nistatina e cetoconazol utilizados em um estudo de 2014 para demonstrar a atividade antimicrobiana. Fonte: Adaptado de Fonte: Adaptado de (GALKINA et al., 2014) 48
Figura 28. Estrutura química dos tautômeros do sistema benzofuroxano. 49
Figura 29. Estrutura química do composto (8). 49

Figura 30. Etapas sintéticas para obtenção dos compostos finais da série dos derivados fenólicos (**17**) e (**18**). 51
Figura 31. Etapas sintéticas para obtenção dos compostos finais da série dos derivados sulfonados (**23)**, (**24)**, (**27)**, (**28)** e (**30)**. 52
Figura 32. Esquema da síntese do Bloco A. 53
Figura 33. Esquema da síntese do Bloco B. 54
Figura 34. Esquema da síntese do Bloco C. 55
Figura 35. Esquema da síntese do Bloco D. 57
Figura 36. Esquema da síntese do Bloco E. 57
Figura 37. Esquema de síntese do Bloco F. 59
Figura 38. Esquema proposto para a primeira etapa de reação de Substituição Nucleofílica Aromática realizada na formação de (**8**) e (**9**). 61
Figura 39. Estrutura dos contribuintes de ressonância carregados positivamente do sistema piridínico. 62
Figura 40. Esquema proposto para reação de ciclo-condensação. 62
Figura 41. A) deslocamentos químicos dos hidrogênios do composto (**8**) demonstrando a multiplicidade de sinais na região aromática devido ao sistema tautomérico. **B)** Sinais dos hidrogênios do composto (**9**), em que não se observa essa mesma multiplicidade provavelmente devido a não ocorrência de tautomeria nas condições experimentais utilizadas. 63
Figura 42. Esquema proposto para reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular. 66
Figura 43. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**13**). 68
Figura 44. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**15**). 69
Figura 45. Esquema proposto para o mecanismo de reação envolvendo o agente acoplante CDI para formação da amida. 73
Figura 46. Esquema proposto para o mecanismo de reação envolvendo o agente acoplante HATU para formação da amida. 74
Figura 47. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**16**). 76
Figura 48. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**18**). 77
Figura 49. Esquema proposto para mecanismo de reação de tosilação. 78
Figura 50. Espectro de RMN de ^{1}H (Acetona-d_6, 300 MHz) do intermediário (**8**). 94
Figura 51. Espectro de infravermelho do intermediário (**8**). 94
Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H (Acetona-d_6, 300 MHz) do intermediário (**9**). 95
Figura 53. Espectro de infravermelho do intermediário (**9**). 95
Figura 54. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**13**). 96
Figura 55. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**14**). 96
Figura 56. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**15**). 97
Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**16**). 97
Figura 58. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**22**). 98
Figura 59. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**26**). 98
Figura 60. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**17**). 99
Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do produto final (**17**). 99
Figura 62. Espectro de infravermelho do produto final (**17**). 100
Figura 63. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**18**). 100
Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do produto final (**18**). 101
Figura 65. Espectro de Infravermelho do produto final (**18**). 101
Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**23**). 102
Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**23**). 102

Figura 68. Espectro de Infravermelho do produto final (**23**). 103
Figura 69. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do composto final (**24**). 103
Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**24**). ...104
Figura 71. Espectro de infravermelho do composto final (**24**).....104
Figura 72. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do composto final (**27**). 105
Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**27**). ...105
Figura 74. Espectro de infravermelho do composto final (**27**).....106
Figura 75. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 300 MHz) do composto final (**28**).....106
Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 600 MHz) do composto final (**28**). ..107
Figura 77. Espectro de infravermelho do composto final (**28**).....107
Figura 78. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 300 MHz) do composto final (**30**).....108
Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 600 MHz) do composto final (**30)**. ..108
Figura 80. Espectro de infravermelho do composto final (**30**).....109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados estatísticos de mortalidade das 3 mais significantes infecções fúngicas invasivas, destacando ainda a mucormicose. 16
Tabela 2. Teste comparativo de suscetibilidade in vitro relacionando alguns fármacos do tratamento atual e o composto E1210. Fonte: Adaptado de (COVEL, J. A. et al) 45
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN 1H dos compostos (**8**) e (**9**). 64
Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos compostos (**8**) e (**9**). 65
Tabela 5. Estiramentos observados nos espectros de infravermelho dos compostos (**8**) e (**9**). 66
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN 1H dos compostos (**13**), (**14**), (**15**) e (**16**). 71
Tabela 7. Propriedades físico-químicas dos compostos (**13**), (**14**), (**15**) e (**16**). 72
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H do composto (**22**).....78
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H e ^{13}C dos compostos (**17**), (**18**), (**23**) e (**24**). 82
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H e ^{13}C dos compostos (**27**), (**28**), e (**30**). 83
Tabela 11. Bandas de absorção dos compostos (**17**) e (**18**) na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho. 84
Tabela 12. Bandas de absorção dos compostos (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**) na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.....84
Tabela 13. Propriedades físico-químicas dos compostos (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**).....85
Tabela 14. Compostos obtidos no projeto. Intermediários dos blocos A e B e produtos finais do bloco C, E, G e H. 88

LISTA DE SIGLA E ABREVIAÇÕES

CDI: 1,1'-carbonildiimidazol

CIM: Concentração inibitória mínima

CCD: Cromatografia em camada delgada

Dipea: Isopropiletilamina

FICI: Índice de concentração inibitória fracionária

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EtNP: Etanolamina fosfato

GlcN: Glucosamina não *N*-acetilada (GlcN)

GPI: Glicofosfatidilinosotol

GPI-APs: Proteínas ancoradas por GPI

HATU: 1-[bis(dimetilamino) metileno] -1*H*-1,2,3-triazolo [4,5-*b*] piridínio 3-óxido hexafluorofosfato

IFIs: Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs)

IV: Infravermelho

Ino: Inositol fosfolipídeo

Man: Manose

RE: Retículo endoplasmático

RMN ^{1}H : Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

SNAr: Substituição Nucleofílica Aromática

SN_2: Substituição Nucleofílica Bimolecular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Aspectos gerais das infecções fúngicas invasivas (IFIs) 17
1.2. Resistência aos antifúngicos e a formação de biofilmes 18
1.3. Aspectos gerais do tratamento atual das infecções fúngicas invasivas (IFIs) e seus desafios 19
1.3.1. Polienos 20
1.3.2. Antifúngicos azóis 21
1.3.2.1. Fluconazol (FLC) 21
1.3.2.2. Itraconazol (ITC) 22
1.3.2.3. Posaconazol (POS) 23
1.3.2.4. Voriconazol (VOR) 24
1.3.2.5. Isavuconazol (ISV) 25
1.3.3. Equinocandinas 25
1.3.3.1. Caspofungina (CSF) 26
1.3.3.2. Micafungina (MCF) 27
1.3.3.3. Anidulafungina (ANF) 28
1.3.4. Análogo da pirimidina 5-fluorcitosina (5-FC) 29
1.4 Desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos 30
1.4.1. Compostos descobertos por triagem fenotípica 30
1.4.2. Compostos descobertos por reposicionamento de fármacos 35
1.4.3. Compostos descobertos por planejamento baseado na estrutura do alvo 36
1.4.3.1. GPIs como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos 40
2.OBJETIVOS 47
3. MATERIAL E MÉTODOS 47
3.1 Planejamento estrutural 47
3.2. Métodos de síntese 50
3.2.1. Descrição geral 50
3.2.2. Procedimentos para síntese dos compostos 53
3.2.2.1. Síntese dos compostos (8) e (9) 53
3.2.2.2. Síntese dos compostos (13), (14), (15) e (16) 54
3.2.2.3. Síntese dos compostos (17) e (18) 55
3.2.2.4. Síntese dos derivados sulfonados (22) 57
3.2.2.5. Síntese dos compostos (23), (24), (27), (28) e (30) 57
3.2.2.6. Síntese do composto (26) 59

3.3 Métodos de purificação 59
3.4. Métodos analíticos.....60
3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....60
3.4.2 Determinação da faixa de fusão.....60
3.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....60
3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 61
4.1. Bloco A – síntese dos benzofuroxanos (8) e (9) 61
4.2. Bloco B – síntese das arilaminas.....66
4.3. Reação de acoplamento para formação dos produtos finais contendo a função amida 72
5.CONCLUSÃO 87
6. REFERÊNCIAS.....89

1. INTRODUÇÃO

Fungos são microrganismos eucarióticos presentes no meio ambiente na forma de leveduras, bolores, cogumelos, pólipos e hifas (BLACKWELL, 2011; CHANG; LEVITZ, 2019). Há cerca de 100.000 espécies descritas, mas a diversidade global real de fungos parece ser maior, com alguns estudos estimando em até 5 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011; WARDLE; LINDAHL, 2014).

Os fungos desempenham papéis ecológicos fundamentais como decompositores, alguns deles são patógenos de plantas e animais, outros contribuem com o ciclo do carbono nos solos e medeiam a nutrição mineral das plantas (WARDLE; LINDAHL, 2014). No campo da biotecnologia têm aplicações industriais na produção de fármacos (antibióticos, imunossupressores, hormônios), alimentos e bebidas. Apesar desses importantes papéis, determinadas espécies são conhecidamente patogênicas ao homem podendo causar Infecções Fúngicas Invasivas (IFIs). Estima-se que as IFIs possam causar a morte de até 2 milhões de indivíduos, sendo que aqueles com sistema imunológico comprometido estão em situação de maior vulnerabilidade (DENNING; JUGESSUR, 2016; LIU et al., 2018; PIANALTO; ALSPAUGH, 2016).

O aumento no número de casos de IFIs nas últimas décadas tem sido associado a uma série de fatores, como por exemplo: doenças pré-existentes (exemplo: infecção por HIV); o uso indiscriminado e não racional de antimicrobianos e antifúngicos; maior número de procedimentos médicos que levam à imunossupressão, a exemplo do transplante de medula e órgãos; tratamento com agentes quimioterápicos e uso prolongado de corticoides (PIANALTO; ALSPAUGH, 2016). Todos os pacientes que se enquadram nestas condições, incluindo aqueles internados em unidades de tratamento intensivo, são mais vulneráveis às IFIs. Estima-se que dependendo da espécie fúngica, a taxa de mortalidade pode variar de 20-40%, demandando atenção e cuidado médico especializado (DENNING; JUGESSUR, 2016; LIU et al., 2018).

Tem sido relatado que mais de 90% das IFIs sejam causadas por três espécies de fungos, a saber: *Candida sp*, *Cryptococcus sp* e *Aspergillus sp*. Dentre estas, o fungo *Candida albicans* é descrito como sendo responsável por cerca de 40% das infecções sistêmicas (PERLROTH; CHOI; SPELLBERG, 2007). Já o *Cryptococcus neoformans* é um patógeno oportunista responsável por causar meningite, principalmente em pacientes vivendo com HIV/AIDS (PARK et al., 2009). Causa cerca de 600 mil mortes por ano, sendo que 60% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (PYRGOS et al., 2013). A aspergilose é uma doença que acomete pacientes imunocomprometidos, causado pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, cuja taxa de mortalidade pode alcançar até 95% (Tabela 1) (LATGE, 2001).

Tabela 1. Dados estatísticos de mortalidade das 3 mais significantes infecções fúngicas invasivas, destacando ainda a mucormicose. Fonte: Adaptado de (BONGOMIN et al., 2017)

Doença (espécies mais comuns)	**Localização**	**Infecções com risco de vida estimadas/ano nesse local**	**Taxa de mortalidade (% em infectados)**
Aspergilose (*Aspergillus fumigatus*)	Mundial	>300.000	30-95
Candidíase (*Candida albicans*)	Mundial	>700.000	46-75
Criptococose (*Cryptococcus neoformans*)	Mundial	>1.000.000	20-70
Mucormicose (*Rhizopus oryzae*)	Mundial	>10.000	30-90

No final de 2019, o mundo foi surpreendido com a pandemia da COVID-19, causada pelo vírus SARS-Cov-2. A necessidade de tratamento especializado em unidades de terapia intensiva, associados aos longos períodos de internação dos pacientes infectados, os tornaram mais vulneráveis às IFIs. Nessa condição, o surgimento de infecções fúngicas secundárias torna-se favorecido. Um exemplo disso é a mucormicose, também conhecida como doença do fungo negro. Uma doença oportunista séria, rara e que se espalha rapidamente causando sepse. A mucormicose é causada pela inalação desses fungos filamentosos e estudos recentes na Índia, por exemplo, documentaram um número alarmante de pacientes COVID-19 com coinfecção

por mucormicose. Em 7 de junho de 2021, o país registrou 28.252 casos de mucormicose em 28 estados. Entre esses, 24.370 casos tinha histórico de COVID-19 e 17.601 casos, histórico de diabetes, grupo que aparentemente parece ser mais propenso à doença do fungo negro durante a co-infecçao por SARS-CoV-2. (BALASOPOULOU et al., 2017; MAHALAXMI; JAYARAMAYYA; VENKATESAN, 2020). Portanto, esse cenário exemplifica a preocupação atual com as IFIs e a necessidade de tratamentos eficazes que garantam a segurança do paciente.

1.1. Aspectos gerais das infecções fúngicas invasivas (IFIs)

O diagnóstico adequado das IFIs é fundamental devido às altas taxas de morbidade e mortalidade, bem como ao substancial ônus econômico associado ao manejo dessas doenças. O reconhecimento das IFIs e a diferenciação de outras infecções com apresentações clínicas semelhantes pode ser um desafio clínico, o que pode levar a erros de diagnóstico e o surgimento de cepas resistentes. Portanto, há uma necessidade significativa de administração aprimorada relacionada aos testes diagnósticos e ao tratamento de IFIs (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020).

Uma análise feita recentemente nos Estados Unidos estimou o custo total de hospitalizações por doenças causadas por fungos em $4,6 bilhões, sendo as infecções por *Candida spp* (26.735 hospitalizações, custo total de $1,4 bilhão) e infecções por *Aspergillus spp* (14.820 hospitalizações, custo total de $1,2 bilhão) as principais responsáveis pela maioria das hospitalizações e as que demandaram maiores custos de tratamento (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020).

Esta análise, porém, não levou em consideração os custos relacionados à testes desnecessários, procedimentos médicos e aos tratamentos inadequados realizados antes do diagnóstico correto. Não apenas as dificuldades associadas ao diagnóstico de IFI provavelmente aumentam a carga econômica associada a essas doenças, mas a falha em diagnosticar adequadamente as IFI também é um dos principais fatores para as altas taxas de mortalidade. Portanto, é perceptível a necessidade em melhorar a gestão relacionada aos diagnósticos e ao tratamento de IFI, bem como aos custos e acessibilidade dos

diagnósticos fúngicos atuais (TERRERO-SALCEDO; POWERS-FLETCHER, 2020).

Além das deficiências nas técnicas de diagnóstico e dos escassos recursos terapêuticos, o uso excessivo de agentes antifúngicos aumenta a resistência ao patógeno oportunista, conforme destacado a seguir (NICOLE M. REVIE1,†, KALI R. IYER1,†, NICOLE ROBBINS1, 2018).

1.2. Resistência aos antifúngicos e a formação de biofilmes

Estudos relatam que as espécies de *Candida* e *Aspergillus* já estão resistentes aos triazóis, enquanto dados para espécies de *Cryptococcus* são escassos. No período de 1992 a 2007 foi relatado um aumento de 5% no número de casos de resistência ao fluconazol pela *Candida glabrata* . Em um estudo publicado em 2013, com fins de avaliar a resistência ao fluconazol foi observado que dentre 1846 isolados clínicos de 31 países cerca de 11,9% de *Candida glabrata* e 11,6% *de Candida tropicalis* mostraram-se resistentes ao fármaco. Em relação a isolados de *Aspergillus fumigatus* estudos apontaram que aproximadamente 3,2% deles são resistentes a um ou mais triazóis (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Quanto às equinocandinas, estima-se que a resistência a *Candida albicans* seja menor que 1%. Já em relação a *Candida glabrata*, a maioria dos estudos de prevalência epidemiológica relata resistência antifúngica em porcentagens variando de 2 a 4% (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Além do aumento da resistência aos fármacos, a formação de biofilmes é outro desafio a se vencer no tratamento das IFIs. Os biofilmes são comunidades microbianas associadas a uma determinada superfície, e são caracterizados por células organizadas em uma matriz extracelular autoproduzida. A formação do biofilme envolve diversas etapas, sendo que a primeira chamada de aderência, ocorre quando o microrganismo se fixa ao substrato, em que as células se replicam e começam a secretar matriz extracelular e formar as pseudo-hifas. Na segunda etapa, ocorre a formação do

biofilme maduro (maturação ou colonização) na presença de micro colônias, hifas e da matriz polimérica extracelular que envolve as células. Por último, as leveduras começam a dispersar do biofilme, disseminando a infecção, e iniciando novamente a ciclo (BERGAMO et al., 2018).

Os biofilmes fúngicos podem se formar em dispositivos médicos de longa permanência, tais como sondas (endotraqueal, vesical, entre outros) e cateter venoso central e urinário, sendo assim, capazes de contaminar os pacientes durante os procedimentos médicos e cirúrgicos. Os biofilmes formados pelo fungo filamentoso oportunista *Aspergillus fumigatus* estão implicados no aspergiloma e na aspergilose pulmonar invasiva. O biofilme de *Candida albicans* contribui para infecções adquiridas em hospitais e incrustações de dispositivos médicos, incluindo cateteres (RAAD; HANNA; MAKI, 2007; TREMBLAY; HATHROUBI; JACQUES, 2014). A pesquisa de novos fármacos atuando sobre biofilmes ainda é escassa, demando esforços para vencer esse grande desafio, uma vez que nem sempre fármacos/compostos ativos contra as formas planctônicas são ativos contra as estruturas organizadas dos biofilmes.

1.3. Aspectos gerais do tratamento atual das infecções fúngicas invasivas (IFIs) e seus desafios

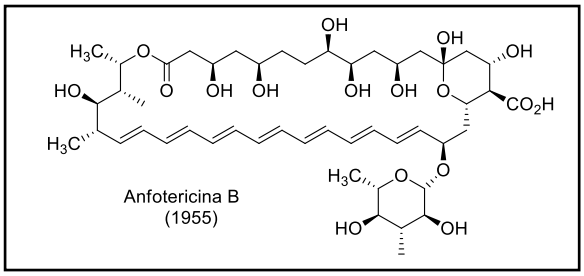
O tratamento das infecções causadas por fungos apresenta grandes desafios, pois estes agentes eucariotos apresentam semelhanças metabólicas comparada ao hospedeiro humano. Nesse aspecto, um dos maiores obstáculos da descoberta dos antifúngicos é identificar características celulares específicas desses patógenos que possam ser seletivamente inibidos, sem causar efeitos colaterais nas células do hospedeiro (ALSPAUGH, 2020).

O tratamento atual com antifúngicos é limitado e, atualmente, são quatro as principais classes de medicamentos antifúngicos utilizadas na clínica (CARMONA; LIMPER, 2017). Essas classes têm como alvo diferentes estruturas da célula fúngica. Uma descrição sobre o mecanismo de ação, bem como características gerais dos fármacos atualmente aprovados, será apresentada a seguir.

1.3.1. Polienos

A classe dos polienos, representada pela anfotericina B (AmfB) (Figura 1), interage com o ergosterol da membrana celular dos fungos - esterol específico para fungos localizado na membrana plasmática do fungo - e causa a formação de canais na membrana que permitem a liberação de íons e extravasamento de conteúdo celular. Evidências recentes sugerem que AmfB também forma grandes agregados extra membranosos que eliminam o microrganismo pela extração do ergosterol das bicamadas lipídicas (CARMONA; LIMPER, 2017). A AmfB é fungicida contra as espécies *Candida sp*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* (KUMAR et al., 2018; MELETIADIS et al., 2007). Desde a década de 1950, mais de 200 polienos com atividade antifúngica foram descobertos; no entanto, a AmfB continua sendo o único fármaco desta classe usado no tratamento de IFIs (ZOTCHEV, 2012).

Figura 1. Estrutura química da anfotericina, antifúngico da classe dos polienos.



Curiosamente, a AmfB em associação com outros agentes pode contribuir com a redução da resistência aos fármacos devido ao seu modo de ação único. Apesar disso, a AmfB é pouco absorvida e, portanto, é comumente administrado por via intravenosa (IV). Ademais, seu uso de forma continuada pode induzir nefrotoxicidade, sendo este um fator limitante no tratamento. Algumas formulações lipídicas foram desenvolvidas para tentar reduzir os inconvenientes da AmfB, dentre os quais é possível citar: complexos lipídicos não covalentes (ABLC), formas lipossomais (AmBisoma) e dispersões coloidais (anfocil) (CARMONA; LIMPER, 2017; KUMAR et al., 2018; MELETIADIS et al., 2007; ZOTCHEV, 2012).

1.3.2. Antifúngicos azóis

Os antifúngicos azóis, representados pelas classes dos imidazóis e triazóis, interrompem a biossíntese de ergosterol na etapa de desmetilação do lanosterol, através da inibição da enzima 14-alfa-demetilase. Os antifúngicos triazóis apresentam maior espectro de ação que os imidazóis, exibindo assim, efeito fungistático contra leveduras e fungicidas para *Aspergillus spp*. (GEISSEL et al., 2018) Para as IFIs, somente os triazóis são usados na clínica. Enquanto o fluconazol (Figura 2) e o itraconazol (Figura 3) são triazóis de primeira geração, a segunda geração de triazóis, com perfis farmacológicos aprimorados, inclui voriconazol (Figura 4), posaconazol (Figura 5) e isavuconazol (Figura 6) (PING et al., 2013) .

O uso não racional desses fármacos na terapia promoveu o surgimento de resistência fúngica aos medicamentos dessa classe, principalmente aos de primeira geração. O mecanismo molecular envolvido na resistência ao triazol inclui principalmente a super-expressão do gene ERG11, alterações na proteína CYP51 (enzima pertencente à superfamília dos citocromos P450), ativação de bombas de efluxo associadas à membrana e ao desenvolvimento de biofilmes fúngicos (HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020; LIU et al., 2018).

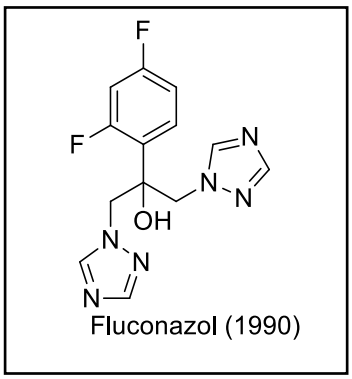
Todos os triazóis estão disponíveis para aplicações orais e intravenosas. Notavelmente, o isavuconazol é administrado por via intravenosa através do seu pró-fármaco. Os triazóis são geralmente bem tolerados e o efeito colateral mais comum é a hepatotoxicidade. Comumente relata-se interações medicamentosas aos fármacos dessa classe devido à sua capacidade de interagir com a isoenzimas do CYP450 (GEISSEL et al., 2018; MELETIADIS et al., 2007; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017) . As características gerais desses fármacos são apresentadas a seguir.

1.3.2.1. Fluconazol (FLC)

O fluconazol (Figura 2) está entre os triazóis mais usados na clínica. Possui biodisponibilidade por via oral, tolerabilidade e exibe bom perfil de segurança. É ativo contra *Cryptococcus spp e Candida spp*, exceto *Candida*

glabrata, cuja atividade é bem limitada, e *Candida krusei* em que o fármaco não se mostra ativo. Também tem atividade contra fungos endêmicos, incluindo *Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides e Paracoccidioides spp*. Ao contrário de outros triazóis, o fluconazol é um substrato fraco para as enzimas do CYP450 e, portanto, causa menor inibição dessas isoenzimas. Apesar disso, não está isenta a possibilidade de interações medicamentosas quando associado a outros fármacos, demandando atenção durante o acompanhamento pelo profissional da saúde. O fluconazol é indicado principalmente para o tratamento de esofagite por *Candida*, infecção fúngica no trato urogenital e vulvovaginite por *Candida spp* (TOON et al., 1990).

Figura 2. Estrutura química do fluconazol, antifúngico da classe dos triazóis.

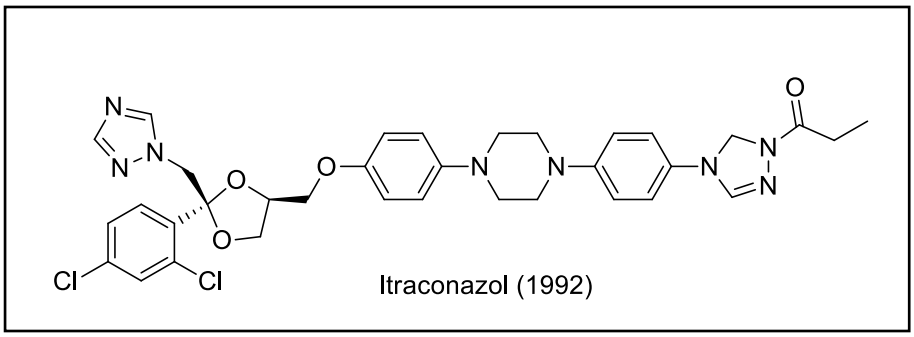


1.3.2.2. Itraconazol (ITC)

O itraconazol (Figura 3) tem espectro de atividade mais amplo do que o fluconazol, particularmente contra fungos endêmicos como *Histoplasma* e *Blastomyces*. Também é ativo contra *Aspergillus spp, Candida spp* (exceto *Candida Krusei*), *Sporothrix schenckii*. Sua biodisponibilidade difere substancialmente e a solução oral é preferível à cápsula por ser 30% mais biodisponível. Ao contrário do fluconazol, o itraconazol não é ideal para o sistema nervoso central (SNC) ou infecções oculares, pois a eficácia nessas regiões é baixa devido à sua baixa penetração nesses tecidos. O itraconazol foi aprovado pelo FDA para terapia de resgate para aspergilose invasiva e também é fármaco de escolha em histoplasmose leve e crônica, bem como em blastomicose leve a moderada (incluindo doenças de pele e ossos). Também pode ser usado para tratar coccidioidomicose, criptococose, candidíase

orofaríngea e esofágica e aspergilose broncopulmonar alérgica. Apresenta poucos efeitos colaterais, que incluem erupções cutâneas, náuseas, vômitos, diarreia, tontura, dor de cabeça e edema. Os efeitos adversos mais graves como a insuficiência cardíaca congestiva ou edema pulmonar são raros (BOELAERT et al., 1988; CLISSOLD; GRANT, 1989).

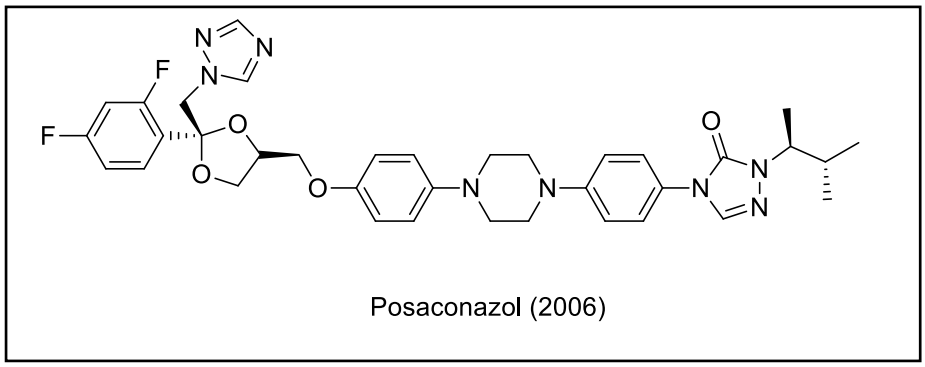
Figura 3. Estrutura química do itraconazol, antifúngico da classe dos triazóis.



1.3.2.3. Posaconazol (POS)

Entre todos os azóis, o posaconazol (Figura 4) apresenta um dos mais amplos espetros de atividade antifúngica. É ativo contra a maioria dos fungos, incluindo *Candida spp, Aspergillus fumigatus, Cryptococcus, Zygomycetes* e fungos endêmicos (*Histoplasma*, *Blastomyces* e *Coccidioides*). Apresentações em formulações orais e intravenosas podem ser encontradas na clínica. Embora tenha atividade semelhante ao voriconazol contra *Aspergillus spp* e *Candida spp*, os dados clínicos ainda são limitados e, portanto, este antifúngico não possui uma recomendação primária para o tratamento de nenhum desses fungos. As indicações aprovadas pela FDA para posaconazol são, portanto, no tratamento da aspergilose invasiva e candidíase disseminada em pessoas gravemente imunocomprometidas. Além disso, o posaconazol demonstrou ser eficaz na redução ou mesmo na cura da terapia para mucormicose, terapia de resgate na aspergilose invasiva nos pacientes intolerantes ao voriconazol e na redução de infecções intravasculares por espécies de *Candida* suscetível ao posaconazol, mas resistente ao fluconazol (COURTNEY et al., 2005).

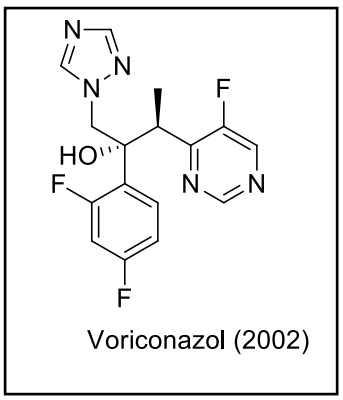
Figura 4. Estrutura química do posaconazol, antifúngico da classe dos triazóis.



1.3.2.4. Voriconazol (VOR)

O voriconazol (Figura 5), em comparação com outros triazóis, tem atividade aumentada contra *Candida spp* e *Aspergillus spp,* sendo eficaz contra *Cryptococcus spp*, *Fusarium spp* e fungos endêmicos. As principais indicações do voriconazol são o tratamento da aspergilose invasiva, meningite criptocócica, candidemia não neutropênica, candidíase esofágica, candidíase disseminada e candidíase grave. Este medicamento é geralmente bem tolerado e a maioria dos efeitos adversos comuns são distúrbios visuais (por exemplo, percepção alterada da luz, acromatopsia e fotofobia) e alucinações, variando em efeitos leves e transitórios. Eles tendem a ser dependentes da dose, com apenas alguns casos de insuficiência hepática e morte foram relatados. Portanto, é recomendado monitorar a função hepática durante o primeiro mês de terapia (MALANI; KERR; KAUFFMAN, 2015).

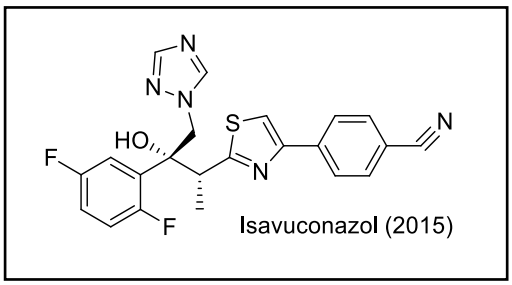
Figura 5. Estrutura química do voriconazol, antifúngico da classe dos triazóis.



1.3.2.5. Isavuconazol (ISV)

O isavuconazol (Figura 6) é um dos mais recentes inibidores da enzima 14-alfa-demetilase pertencente à classe dos triazóis. Possui amplo espectro de ação, e boa biodisponibilidade e tolerabilidade. Foi aprovado pelo FDA para o uso de aspergilose invasiva e mucormicose. Os efeitos colaterais mais comuns são náuseas, vômitos, diarréia, erupção cutânea e edema periférico. Embora seja uma reação rara, a hepatotoxicidade deve ser monitorada por meio das funções hepáticas, e atenção especial deve ser dada aos pacientes com doença hepática grave que necessitem de tratamento com isavuconazol. Ao contrário do voriconazol e posaconazol, a toxicidade renal não é um problema comumente observado durante tratamento com o isavuconazol. Comumente, é o fármaco de escolha para pacientes que não toleram o voriconazol, na aspergilose invasiva e como alternativa ao posaconazol no tratamento da mucormicose. O isavuconazol também tem atividade *in vitro* contra *Cryptococcus spp*, mas ainda há poucos estudos sobre as diferentes espécies (MICELI; KAUFFMAN, 2015).

Figura 6. Estrutura química do isavuconazol, antifúngico da classe dos triazóis.



1.3.3. Equinocandinas

As equinocandinas, representada pela caspofungina (Figura 7), micafungina (Figura 8) e anidulafungina (Figura 9), bloqueiam a síntese de *β* - *D* - glucanos localizados na parede celular dos fungos. O alvo molecular das equinocandinas é a UDP-glicose (1,3)-D-glucano-(3)-D-glucosiltransferase (comumente referido como - (1,3)-D-glucano sintase), que é responsável pela síntese de (1,3-*D*)-glucano (homopolímero de -D-glucopiranose, ligado por conexão - (1,3)-glicosídeo), um componente importante das paredes celulares de muitos

fungos, que em conjunto com a quitina, conferem a forma e integridade da parede celular. Essa classe é fungicida contra *Candida sp* e fungistática contra *Aspergillus spp*, respectivamente (PATIL; MAJUMDAR, 2017).

Equinocandinas são hexapeptídeos cíclicos, em que a homotirosina inibe a 1,3 - β - D - glucano sintase. Estruturalmente os resíduos de prolina aumentam a potência antifúngica, e a substituição por um grupo hidroxila, etilenodiamina e porções sulfatadas melhoram a solubilidade em água. Estas modificações possibilitaram o desenvolvimento de formulações para administração intravenosa.

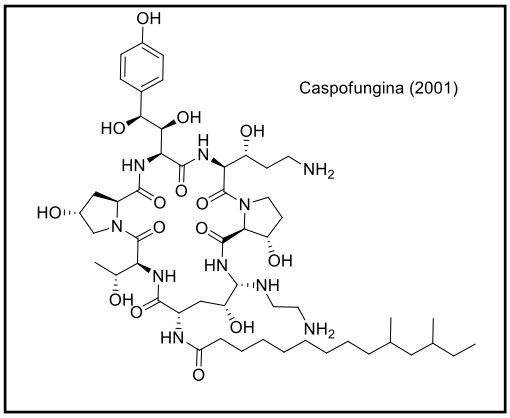
As equinocandinas causam toxicidade de forma seletiva porque a parede celular é uma estrutura celular fúngica ausente nas células humanas. Devido ao seu amplo espectro de atividade, e poucos efeitos colaterais têm sido recomendada para tratamento das IFIs, sendo o tratamento de primeira linha em pacientes com infecção invasiva por Candida, particularmente em pacientes hemodinamicamente instáveis após tratamento prévio com triazóis (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015). Dentre os representantes da classe, a anidulafungina foi descoberta em 1970, e a caspofungina e da micafungina foram descritos em 1989 e 1990, respectivamente.

1.3.3.1. Caspofungina (CSF)

A agência de regulação norte americana *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a caspofungina em janeiro de 2001 como um medicamento usado para prevenir infecções fúngicas em pacientes adultos. Em julho de 2008, foi aprovado para uso em crianças com mais de 3 meses de idade. Este fármaco é obtido pelo processo de semi-síntese a partir do derivado hexapeptídeo de ocorrência natural isolado de *Glarea lozoyensis*. A partir desse intermediário, são realizadas modificações estruturais oriundas da adição da cadeia de ácido graxo *N*-acilado na cadeia lateral. A caspofungina é usada em pacientes neutropênicos com febre alta e suspeita de infecção fúngica. Pode ser usado para tratar candidíase esofágica, peritonite, abscesso intra-abdominal e infecções cavitárias causadas por diferentes espécies de *Candida*. Além disso, a caspofungina é usada como alternativa quando a terapia padrão com triazóis

contra infecções causadas por *Aspergillus spp*. não são eficazes (SANDHU et al., 2005).

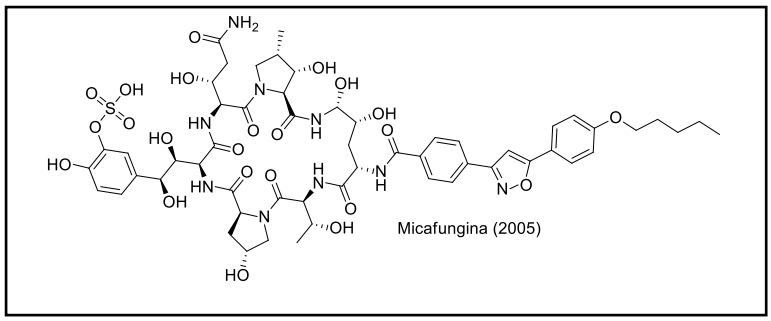
Figura 7. Estrutura química da caspofungina, antifúngico da classe das equinocandinas.



1.3.3.2. Micafungina (MCF)

Este fármaco foi aprovado pelo FDA em março de 2005 para tratar pacientes que sofrem de candidíase esofágica. Também é usada no tratamento profilático contra IFIs causados por espécies de Candida em pacientes submetidos à transplante de células-tronco hematopoéticas. Em 2013, este fármaco foi aprovado para pacientes pediátricos com 4 meses ou mais que sofrem de infecções por Candida. Além disso, foi recentemente aprovado para o tratamento de candidíase invasiva em pacientes com menos de 4 meses (“U.S. FDA Approves Supplemental New Drug Application (sNDA) for Expanded Indication of MYCAMINE® (micafungin for injection) for the Treatment of Invasive Candidiasis in Pediatric Patients Less Than 4 Months of Age”, 2020).

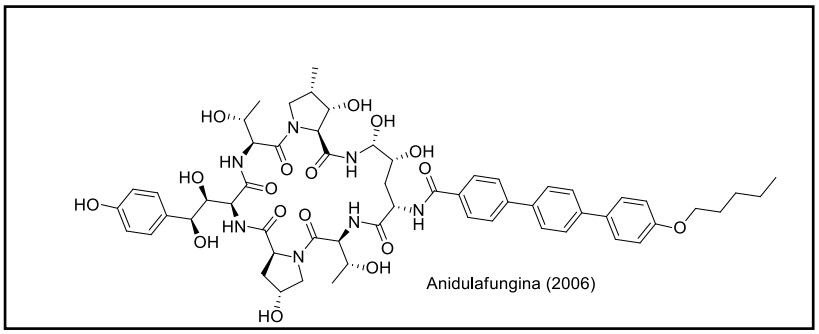
Figura 8. Estrutura química da micafungina, antifúngico da classe das equinocandinas.



1.3.3.3. Anidulafungina (ANF)

A anidulafungina foi aprovado em 2006 pelo FDA para tratamento de candidíase esofágica, candidemia e candidíase de tecidos profundos. Até o momento, não há muitos estudos sobre segurança e eficácia em crianças e pacientes com menos de 18 anos de idade. Um dos poucos estudos sobre o uso em pacientes pediátricos (de 1 mês a 2 anos) não relatou óbitos em decorrência do uso da anidulafungina, sendo os parâmetros farmacocinéticos em crianças similares ao encontrados em adultos. Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos relatam que mais de 60% dos pacientes com candidíase são tratados com esse fármaco, que também é recomendada como terapia de primeira linha contra *Candida auris* multirresistente. As equinocandinas não são utilizadas para infecções no trato renal ou urinário por *Candida auris*, devido ao fracasso em atingir concentrações terapêuticas adequadas nos rins. Nos casos de infecções causadas por *Aspergillus ssp*, as equinocandinas têm atividade fungistática (CARMONA; LIMPER, 2017). Apresenta efeitos colaterais semelhantes àqueles observados para fluconazol. As complicações mais comuns diretamente associadas podem incluir rubor, inchaço, erupção cutânea, coceira, tromboflebite, hipotensão e febre. Esses sintomas podem ser observados com as três equinocandinas, variando de paciente para paciente. As equinocandinas induzem toxicidade embrionária; e portanto, o uso desse fármaco deve ser evitado durante a gestação.

Figura 9. Estrutura química da anidulafungina, antifúngico da classe das equinocandinas.

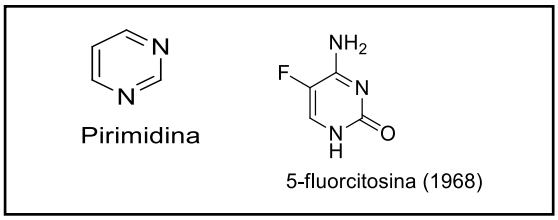


1.3.4. Análogo da pirimidina 5-fluorcitosina (5-FC)

O análogo da pirimidina, denominado 5-fluorcitosina (Figura 10) , afeta a biossíntese de proteínas e de ácido desoxirribonucleico (DNA) (CARMONA; LIMPER, 2017). A 5-fluorcitosina foi planejada como antimetabólito para o tratamento do câncer, mas devido a baixa atividade antineoplásica, foi testado em outros modelos, o que permitiu à descoberta da sua atividade na terapia antifúngica combinada (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000). Em casos de criptococcose, por exemplo, a 5-FC é preparada juntamente com a AmfB no tratamento de meningite, infecção disseminada ou infecção pulmonar moderada, associada ao fluconazol como terapia de consolidação (BADDLEY, 2020).

Quando em contato com o microrganismo, a 5-FC é transportada para o meio intracelular fúngico, onde é desaminada em 5-fluorouracil (5-FU) pela citosina desaminase. Em seguida, é incorporada ao DNA, onde interfere na síntese do DNA. Ademais, o 5-FC pode ser convertido em trifosfato de 5-fluorouridina pelo monofosfato de 5-fluorouridina e difosfato de 5-fluorouridina, sendo incorporado ao RNA do fungo e interrompendo a síntese de proteínas. Nos Estados Unidos, o 5-FC está disponível apenas na formulação oral, mas apresenta excelente biodisponibilidade com boa penetração nos ossos, fluidos peritoneal e sinovial. Deve ser evitado durante a gravidez, já que é considerado pertencente à classe C de risco para uso durante a gestação de acordo com o FDA. Também não se recomenda o uso de 5-FC durante a amamentação. Os efeitos colaterais mais comuns incluem erupção cutânea, diarréia e elevação das enzimas hepáticas (VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

Figura 10. Estrutura química da pirimidina e seu análogo 5-fluorcitocina.



1.4 Desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos

Embora nos últimos anos alguns antifúngicos apresentaram espectro de ação ampliado, questões relacionadas à toxicidade, interações medicamentosas, inconvenientes da via de administração (i.e. administração intravenosa), formação de biofilmes e surgimento de resistência demandam a busca por novos fármacos.

Diversas estratégias são exploradas na descoberta de novos fármacos, entre as quais se destacam: a triagem fenotípica, reposicionamento de fármacos e o planejamento baseado no alvo. Nesta seção serão apresentados exemplos da descoberta de novos antifúngicos utilizando cada uma dessas estratégias.

1.4.1. Compostos descobertos por triagem fenotípica

A triagem fenotípica utiliza como base para o experimento uma cultura de células. Por meio de um sistema robotizado é adicionado uma quantidade específica de células em um poço de uma placa de ensaio e logo em seguida é adicionado o composto que será testado e o patógeno. Esse experimento se encerra com a adição de corantes no poço para ser analisado o resultado no microscópio. Com a leitura dessas imagens são feitas análises para determinar se um composto teve efeito ou não. Pode acontecer dos testes indicarem “falsos positivos”, ou seja, compostos que parecem funcionar, mas na verdade não tiveram efeito, visto isso é preciso a repetição do experimento e uma análise mais aprofundada. Além disso, uma desvantagem dos ensaios fenotípicos é que não é possível saber qual o mecanismo de ação do composto usado naquele contexto.

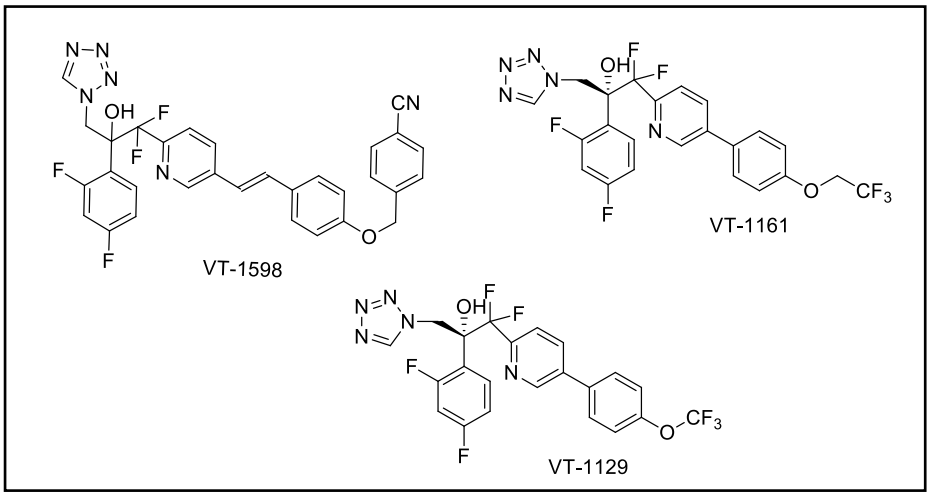
A busca por fármacos seletivos como previamente antecipado é um dos grandes desafios na descoberta de novos agentes antifúngicos. Nesse sentido, estratégias de triagem fenotípica vêm sendo utilizadas para possibilitar futura investigação de fármacos que atuem de forma seletiva contra o fungo, como por exemplo, na biossíntese de ergosterol ou da parede fúngica (1,3-β-D-glucano). Entre os agentes descobertos por triagem fenotípica com atividades

contra estruturas presentes apenas nos fungos estão os tetrazóis VT-1129, VT-1161 e VT-1598 (Figura 11) que são mais específicos para CYP51 fúngica e menos para as enzimas CYP450 de mamíferos.

VT-1129 é um novo inibidor de Cyp51 fúngica com potente atividade *in vitro* contra espécies de *Cryptococcus spp*. Em um estudo para avaliar a eficácia *in vivo* de VT-1129 contra meningite criptocócica, bem como a carga fúngica e concentrações plasmáticas e cerebrais, foi observado que em doses de ≥0,3 mg / Kg / dia , após 7 e 14 dias, VT-1129 reduziu significativamente a carga fúngica do tecido cerebral em comparação com o controle utilizado (fluconazol). A carga fúngica também foi indetectável na maioria dos camundongos tratados com uma dose de ≥3 mg / Kg / dia, mesmo após a interrupção do tratamento, demonstrando um promissor potencial do VT-1129 no tratamento da meningite criptocócica (WIEDERHOLD et al., 2018).

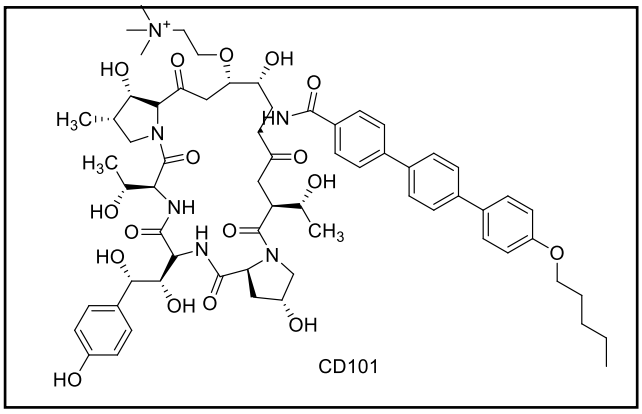
Os outros inibidores específicos da Cyp51 fúngica, VT-1161 e VT-1598 surgiram como novas terapias promissoras para combater infecções fúngicas, incluindo *Candida* spp. Para avaliar suas atividades *in vitro* em comparação com outros azólicos, foi conduzido um estudo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para VT-1161, VT-1598, fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol contra 68 isolados clínicos de *C. albicans.* Além disso, também foram avaliados contra cepas mutantes que apresentavam mecanismos individuais de resistência aos azóis. Os compostos VT-1161 e VT-1598 demonstraram atividade potente (CIM ≤0,15 µg / mL) contra isolados predominantemente resistentes ao fluconazol (≥8 µg / mL) (NISHIMOTO et al., 2019).

Figura 11. Estrutura dos tetrazóis descobertos por triagem fenotípica como promissores antifúngicos.



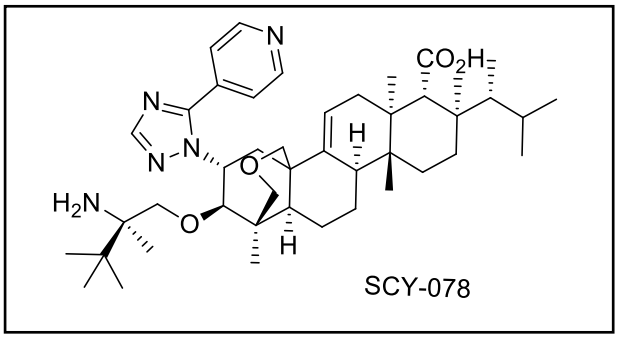
A equinocandina, CD101 (Figura 12), foi identificada como promissor protótipo antifúngico com a vantagem de apresentar meia-vida ampliada em relação às outras equinocandinas disponíveis na clínica. O CD101 se mostrou um novo composto útil tratar infecções fúngicas graves, incluindo candidíase invasiva. Nos estudos, o CD101 foi avaliado contra cepas de Candida suscetíveis e resistentes às equinocandinas. Os testes de sensibilidade antifúngica realizados em uma coleção de 95 cepas de *Candida*, incluindo 30 isolados resistentes à caspofungina contendo mutações fks, demonstraram potência antifúngica comparáveis do CD101 com a da micafungina (MCF). Em um modelo murino de candidíase invasiva, CD101 exibiu eficácia superior em relação ao MCF no tratamento de *Candida albicans*. Foi observado, também, ótimo perfil farmacocinético em camundongos após uma dose única de CD101, sugerindo assim que esse composto tem grande potencial não apenas no tratamento de infecções invasivas por *Candida*, mas também como alternativa ao tratamento com cepas resistentes às equinocandinas (KRISHNAN et al., 2017).

Figura 12. Estrutura química da equinocandina CD101.



Em relação ao inibidor da glucano sintase SCY -078 (Figura 13), foi investigado a atividade *in vitro* de SCY-078 (ibrexafungerp) contra *C. auris*. Os valores de CIM desse composto contra isolados do fungo selecionado mostraram valores de CIM de 0,5 mg / litro (0,06 a 2 mg / litro), demonstrando atividade promissora contra *C. auris,* e também isolados resistentes à equinocandinas. Atualmente esse candidato à fármaco antifúngico está em estudos clínicos de fase 2 para avaliar sua eficácia e segurança em pacientes com candidíase causada por *Candida auris* (CARES) e em pacientes com doenças fúngicas refratárias ou intolerantes (FURI). Além disso, um estudo de fase 3, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, está em andamento para avaliar a eficácia e segurança em indivíduos com candidíase vulvovaginal aguda (VANISH) (ARENDRUP; JØRGENSEN, 2020).

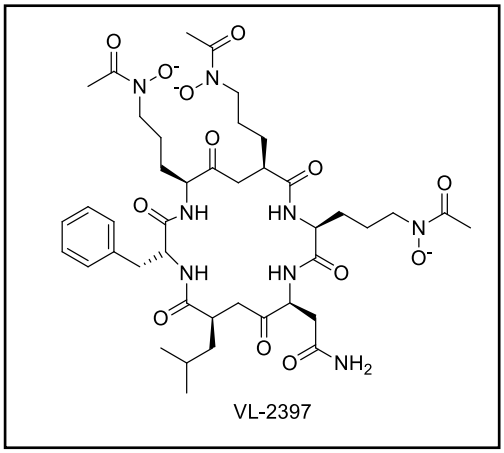
Figura 13. Estrutura química do composto SCY-078.



Agentes com novos mecanismos de ação também estão em desenvolvimento. Estes incluem o análogo do ferricromo sideróforo

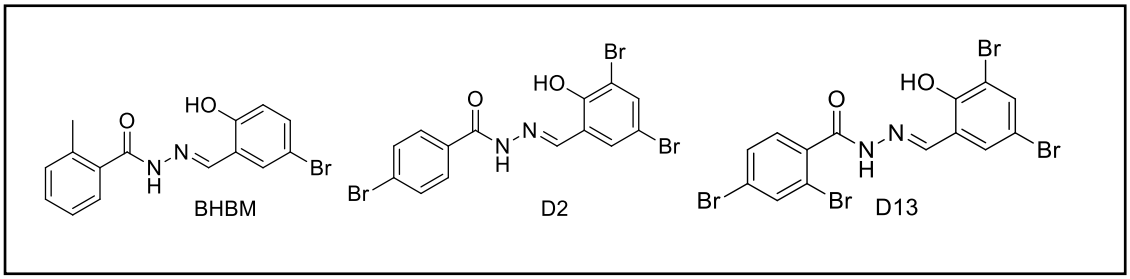
denominado VL-2397 (Figura 14). Além de possivelmente superar as limitações dos antifúngicos atualmente disponíveis, esses novos agentes podem ser menos suscetíveis aos mecanismos de resistência.

Figura 14. Estrutura química do composto VL-2397.



As N-acilhidrazonas BHBM e D2 (Figura 15) foram identificadas como inibidores de síntese de esfingolipídeos fúngicos por meio de triagem de uma biblioteca comercialmente disponível. Uma análise mais aprofundada de BHBM e derivados D2 levou à identificação de um composto mais potente, D13 (Figura 15), que foi altamente ativo *in vitro* e teve melhor desempenho do que BHBM em modelos *in vivo* de criptococose, candidíase e aspergilose pulmonar (CRISTINA LAZZARINI, KRUPANANDAN HARANAHALLI, J. BRIAN MCCARTHY, E JOHN MALLAMO, E IWAO OJIMA; MAURIZIO DEL POETAA, 2020; HARANAHALLI et al., 2020).

Figura 15. Estrutura química das N-acilhidrazonas aromáticas.

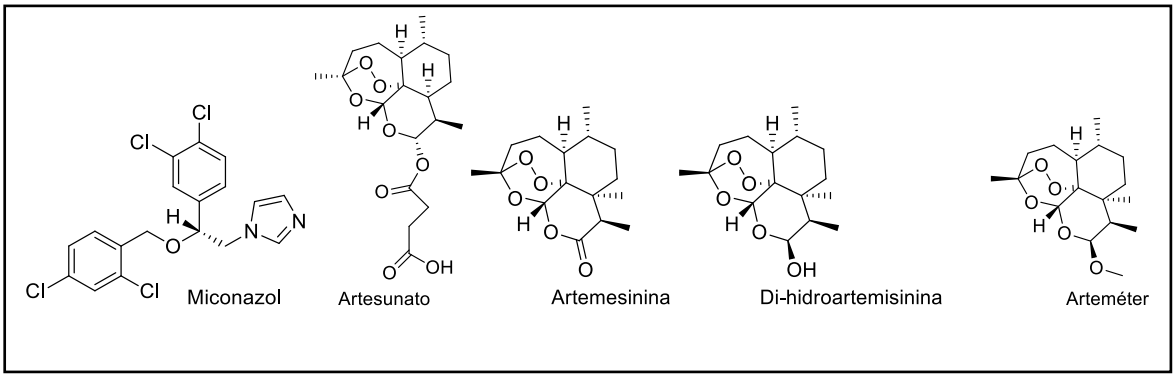


1.4.2. Compostos descobertos por reposicionamento de fármacos

Entre as estratégias usadas para descoberta de fármacos, o reposicionamento vem ganhando destaque. Essa estratégia busca testar fármacos que já existem com uma determinada finalidade para avaliar sua atividade em outra terapia. No reposicionamento de fármacos, a segurança já previamente estabelecida acelera o processo de desenvolvimento, reduzindo custos e o tempo necessário para alcançar o estágio clínico. Na área dos antifúngicos, o reposicionamento visa principalmente o sinergismo, definido pelo índice de concentração inibitória fracionária (FICI). O sinergismo mede a reposta farmacológica a partir da associação de dois ou mais fármacos para analisar a atividade resultante dos mesmos a qual é definida através do valor do FICI. Um valor de FICI ≤ 0,5 significa sinérgico, 0,5 <FICI <4 significa indiferente e um valor de FICI ≥ 4,0 significa antagônico (WU et al., 2017).

Cammue e colaboradores examinaram 1.600 compostos na "biblioteca de reposicionamento Pharmakon 1600" e identificou 8 “*hits*” que melhoraram a atividade antibiofilme do miconazol (antimicótico) contra biofilmes maduros de *C. albicans*. O artesunato (Figura 16), derivado semissintético da artemisinina usado como antimalárico, foi utilizado nesse estudo em que obtiveram ótimos resultados. Esse fármaco foi o único potenciador que teve um efeito sinérgico com o miconazol (FICI < 0,069) e sem atividade antibiofilme quando utilizado isolado. O sinergismo entre artesunato e o miconazol foi exclusivo à esta combinação, porque este fármaco não aumentou as atividades antibiofilme quando associado ao fluconazol, anfotericina B ou caspofungina. Notavelmente, os derivados de artemisinina, di-hidroartemisinina e arteméter também mostraram atividades sinérgicas com o miconazol, com valores de FICI de 0,186; 0,145 e 0,112, respectivamente (WU et al., 2017).

Figura 16. Estruturas químicas do miconazol e derivados de artemisinina, compostos que demonstraram assim como a artemisinina atividades sinérgicas com o miconazol. Fonte: Adaptado de (WU et al., 2017).



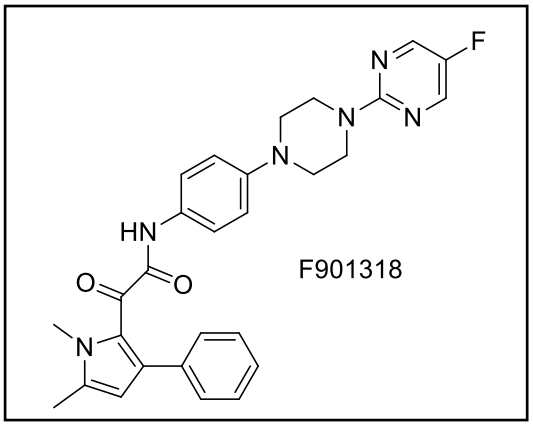
1.4.3. Compostos descobertos por planejamento baseado na estrutura do alvo

Outra abordagem utilizada no desenvolvimento de agentes antifúngicos é o planejamento de fármacos baseado na estrutura do alvo. Essa abordagem utiliza ferramentas computacionais, em que o processo de otimização pode ser conduzido a partir da estrutura do alvo. Dentre os alvos fúngicos é possível destacar aqueles envolvidos na biossíntese de pirimidina fúngica, os inibidores da função mitocondrial e glicofosfatidilinosotol (GPI) relacionado às proteínas ancoradas em membrana.

O agente investigacional F901318 (F2G, Inc., Manchester, Reino Unido) (Figura 17), membro da classe orotomida, inibe a enzima diidroorotato desidrogenase. Essa enzima é uma oxidorredutase importante para a biossíntese da pirimidina. Embora as células de mamíferos também contenham uma isoforma desta enzima, a atividade de F901318 parece ser específica para fungos, pois sua atividade contra *A. fumigatus* dihidroorotato desidrogenase (IC50 44 nM) é significativamente mais potente em comparação com a dos humanos (IC50> 100 μM). O composto F901318 demonstrou potente atividade *in vitro* contra vários fungos incluindo *Aspergillus, Scedosporium, Acremonium*, *Histoplasma capsulatum*. A potente atividade *in vitro* de F901318 contra Isolados de *A. fumigatus* resistentes a azóis também foi observada *in vivo* em

um modelo murino de aspergilose invasiva (HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020; MOTA FERNANDES et al., 2021).

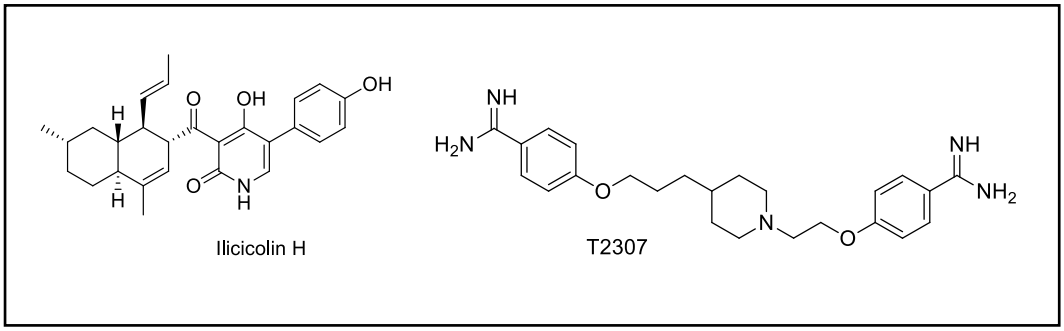
Figura 17. Estrutura química do composto da classe das orotomidas F901318.



Via mitocondrial fúngica, tem-se a arilamidina T-2307 e o ilicicolin H (Figura 18). O composto T2307, exibe atividade fungicida *in vitro* contra Candida, Aspergillus e *Cryptococcus spp*., evitando infecção disseminada em camundongos infectados. Uma vez internalizado na célula fúngica, o T-2307 inibe principalmente os complexos III e IV da cadeia respiratória, interrompendo o potencial da membrana mitocondrial (SHIBATA et al., 2012; YAMASHITA et al., 2019). Curiosamente, apenas um efeito mínimo nas mitocôndrias de ratos foi observado, destacando o potencial deste composto para atuar como um inibidor seletivo (SHIBATA et al., 2012). Inicialmente estudado pela *Fujifilm Toyama Chemical* Co., o T-2307 foi licenciado para *Appili Therapeutics* em novembro de 2019, onde foi renomeado ATI-2307. O composto foi bem tolerado em estudos de fase 1 em humanos e está atualmente sob análise pré-clínica antes da fase 2, prevista para 2021 (https: // www .appilitherapeutics.com / ati-2307). O composto Ilicicolin H é um policetídeo isolado do fungo *Cylindrocladium ilicicola* e apresenta atividade contra *Cryptococcus, Candida* e *Aspergillus spp*. O mecanismo de ação desse composto envolve a inibição da redutase do citocromo bc1 mitocondrial, apresentando concentração inibitória mínima 50% [IC_{50}] de 2 a 3 ng / mL. No modelo animal, este composto reduziu a carga fúngica em camundongos infectados com *C. albicans* e *C. neoformans*, exibindo uma baixa afinidade para

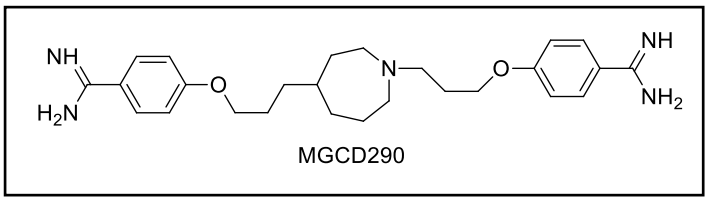
mitocôndrias de rato (GUTIERREZ-CIRLOS; MERBITZ-ZAHRADNIK; TRUMPOWER, 2004; SINGH et al., 2012).

Figura 18. Estruturas químicas dos compostos Ilicolin H e T2307.



Outros alvos avaliados pelo potencial contra fungos foi o inibidor de histona deacetilase, MGCD290 (Figura 19). Este agente, altera a estrutura da cromatina fúngica, controlando por meios de mecanismos epigenéticos o nível de acetilação das histonas. Em associação, o MGCD290 demonstrou potente sinergismo quando combinado com azóis e equinocandinas, incluindo contra isolados resistentes previamente aos antifúngicos. Infelizmente, os resultados de um estudo clínico que testou MGCD290 combinado com fluconazol contra candidíase vulvovaginal foi decepcionante, já que a terapia combinada não conseguiu demonstrar algo significativo em comparação com o fluconazol sozinho (HOUŠŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020).

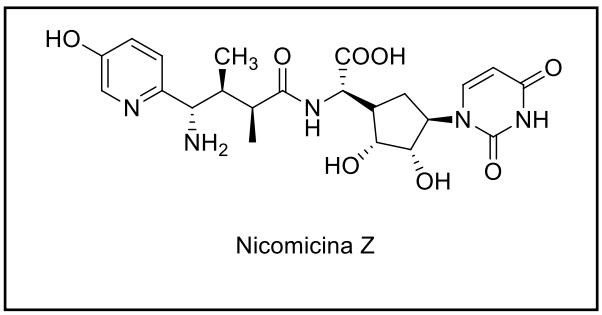
Figura 19. Estrutura química do inibidor de histona deacetilase MGCD90.



A Nicomicina (Figura 20) é um nucleosídeo isolado de *Streptomyces tendae*, inibe a síntese de quitina, um componente essencial da parede celular fúngica. Como a quitina está ausente nas células de mamíferos, ela é um excelente alvo antifúngico e, por sua vez, torna a nicomicina com menos efeitos citotóxicos ao hospedeiro. Pesquisadores da Universidade do Arizona que estiveram envolvidos no desenvolvimento deste composto para o tratamento da

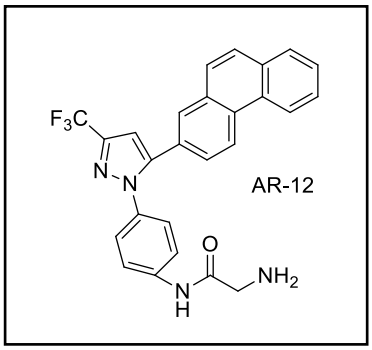
coccidiomicose pulmonar relataram em 2014 que estavam sendo feitos preparativos para um ensaio clínico de fase 2 (MOTA FERNANDES et al., 2021; VAN DYKE et al., 2019).

Figura 20. Estrutura química do nucleosídeo Nicomicina Z.



O derivado de celecoxibe AR-12 (Figura 21) (*Arno Therapeutics Inc*.) foi desenvolvido como um inibidor de proteína quinase (PKI) e foi inicialmente usado como um agente anticâncer em um ensaio de fase I (ClinicalTrials, nº de registro NCT00978523). Como as proteínas quinases compartilham semelhanças funcionais entre organismos distintos, os compostos de PKI também foram avaliados quanto à atividade antibacteriana e antifúngica. AR-12 demonstrou inibir o crescimento de vários fungos, incluindo leveduras como *Candida* e *C. neoformans* espécies filamentosas como *A. fumigatus* . Além disso, na terapia combinatória deste composto com fluconazol foi observada redução da carga fúngica no cérebro em um modelo de rato com criptococose. Embora inicialmente caracterizado como um inibidor de PK1, o AR-12 não inibe o ortólogo da quinase em *C. neoformans*. O progresso futuro do AR-12 em ensaios clínicos para terapia antifúngica permanece incerto, uma vez que a *Arno Therapeutics* declarou falência em 2017 (KOSELNY et al., 2016).

Figura 21. Estrutura química do composto AR-12.



Existem também alguns alvos que vêm sendo explorados como ciclo do glioxilato, sendo esta uma via que desempenha um papel importante a sobrevivência fúngica dentro dos macrófagos. Ademais, investigações vem sendo conduzidas para identificar compostos bioativos que interfiram na via da trealose. Esta última é importante no armazenamento de energia e serve como fonte de carbono, além de evitar a degradação de proteínas. Apesar do potencial desses alvos, a maioria dos estudos ainda são preliminares.

O ancoramento de glicofosfatidilinositol (GPI) à proteínas também é uma via promissora na busca de alvos, haja visto que as proteínas ancoradas a GPI participam de processos biológicos vitais para o fungo, incluindo aderência, virulência e biossíntese da parede celular contribuindo com o desenvolvimento do biofilme (FUJITA2, 2015). Na seção a seguir será apresentando o papel das GPIs nos fungos e a importância deste como alvo para desenvolvimento de novos fármacos.

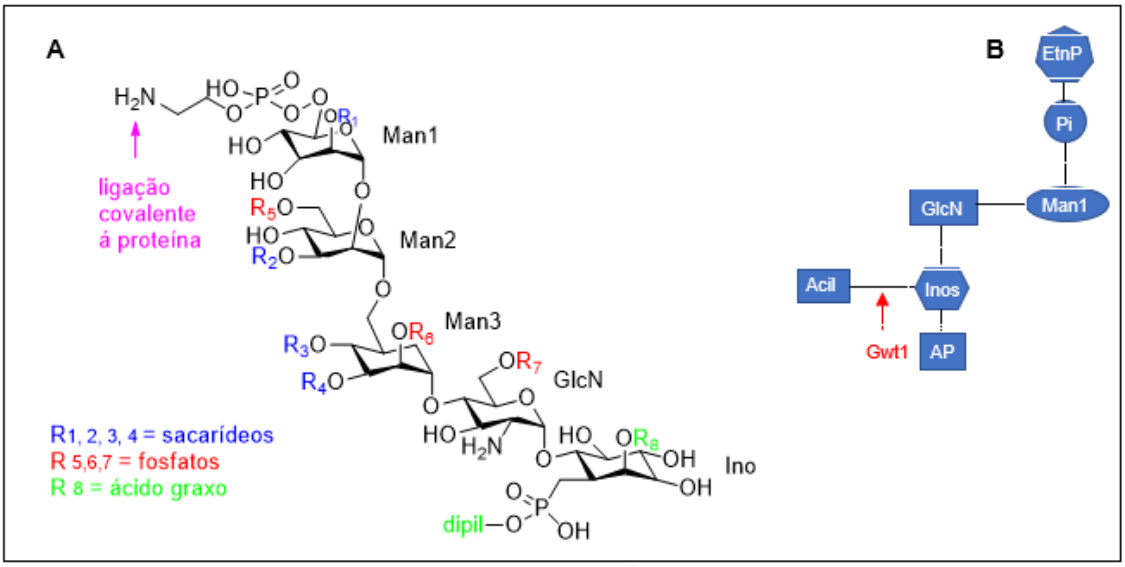
1.4.3.1. GPIs como alvos para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos

Os GPIs são uma família de glicolípidos complexos que se ligam de forma covalente ao carbono terminal das proteínas como modificação pós-traducional única em células eucarióticas. Eles compartilham uma organização estrutural comum consistindo de etanolamina fosfato (EtNP), três manoses (Man), uma glucosamina não *N*-acetilada (GlcN) e inositol fosfolipídeo (Ino) (Figura 22A) (WU et al., 2017). Os GPIs funcionam como âncoras de superfície celular para várias proteínas da parede celular em levedura via ligação amida entre o grupo amino livre de EtNP e o grupo ácido carboxílico na subunidade C-terminal da proteína ancorada. Os GPIs e as proteínas ancoradas por GPI (GPI-APs) desempenham um papel vital em diversos processos biológicos. Nos fungos, as GPI-APs pertencem à família das manoproteínas da parede celular e são essenciais para a adesão ao epitélio humano e manutenção da homeostase da parede celular (YU et al., 2013).

A biossíntese do GPI é necessária para o crescimento fúngico. Dessa forma, enzimas-chave envolvidas em etapas específicas da biossíntese de precursores de GPI podem servir como alvos antifúngicos promissores. A via biossintética do GPI nos fungos é diferente daquela nas células de mamíferos, oferecendo possibilidades para descoberta de inibidores seletivos. Especificamente, duas etapas de biossíntese têm sido investigadas como alvos para o desenvolvimento de antifúngicos, a saber: a) enzima Gwt1, responsável pela transferência de proteína de parede ancorada por GPI através da acilação dependente de inositol e; b) enzima Man1, responsável pela adição de EtNP mediada por Mcd4 (do inglês: *morphogenesis checkpoint dependent*) ao núcleo GPI (TSAI; LIU; SEEBERGER, 2012; YU et al., 2013).

A biossíntese do GPI e sua ligação às proteínas alvo ocorrem na membrana do retículo endoplasmático (RE). Nesta organela os GPIs, que possuem uma estrutura central conservada, são pré-montados através de várias etapas antes de serem transferidos para as proteínas. A porção inositol do GPI é frequentemente modificada com a inserção de uma cadeia acila. Em células de leveduras e mamíferos, a acilação do inositol ocorre em GlcN-PI para gerar GlcN- (acil) PI, e a acilação procede normalmente à primeira manosilação que gera Man-GlcN- (acil) PI (KAWAGOE et al., 1996). Uma vez adicionada, a cadeia acila ligada ao inositol permanece até o precursor GPI completo ser transferido para uma proteína alvo no RE. Em muitas células de mamíferos e em leveduras, a cadeia acil é removida pelo resíduo de inositol imediatamente após a transferência do precursor GPI completo para uma proteína no RE (VATS et al., 2005). A enzima Gwt1 (Figura 22B), então, catalisa essa etapa inicial do trabalho de glicosilfosfatidilinositol (GPI), apresentando atividade do tipo aciltransferase.

Figura 22. A) Estrutura da GPI fúngica. **B)** Esquema da organização estrutural das GPIs, destacando a atividade das duas enzimas Gwt1 e Mcd4 da via de GPIs. Fonte: Adaptado de (MANN et al., 2015).

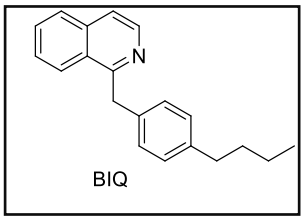


Legenda: Manose (Man); Glucosamina (GlcN); Inositol (Ino); AP (Proteína ancorada); Etalonaminafosfato (EtnP).

O bloqueio da função Gwt1, genética ou bioquimicamente, resulta em efeitos pleitrópicos devido ao mau funcionamento e à localização das manoproteínas, muitas das quais são críticas para a integridade da parede celular. Além disso, a depleção de manoproteínas da superfície celular em leveduras revela a camada subjacente de b-glucanas, que são conhecidas por serem altamente imunogênicas. Estudos também mostraram que o bloqueio de Gwt1 leva ao estresse do retículo endoplasmático, o que resulta em uma resposta desdobrada das proteínas, possivelmente devido ao acúmulo de precursor da GPI-âncora. Essa resposta ao estresse leva à ativação de muitos genes envolvidos na restauração da homeostase do retículo endoplasmático; no entanto, a falha na correção do estresse pode resultar em apoptose / morte celular. Foi demonstrado que a inibição de Gwt1 impede a localização adequada das manoproteínas da parede celular dos fungos, comprometendo a integridade da parede celular, a formação de tubos germinativos, a formação de biofilmes e o crescimento de fungos (COVEL, J. A.; SOLTOW, Q. A.; KAPOOR, M.; MOLONEY, M. K.; WEBB, P. J.; TRZOSS, M.; SHARP, M.; SHAW, 2019).

Uma pesquisa publicada pela empresa farmacêutica *Eisai Corporation* em 2003 descreveu uma combinação de ensaios que envolviam a triagem de compostos que inibem a montagem da parede celular de manoproteínas atingidas por GPI e a redução da aderência de *C. albicans* a células epiteliais de mamíferos. Este trabalho revelou a importância da proteína Gwt1, deu informações sobre o mecanismo de ação e levou à descoberta do primeiro ligante de Gwt1, conhecido como BIQ (Figura 23). A benziquinolina BIQ **(1)** foi o primeiro a diminuir a aderência de *C. albicans* a uma monocamada epitelial e preveniu o crescimento de fungos com CIM de 5.20 μM.

Figura 23. Estrutura química do composto BIQ (**1**) descoberto como primeiro ligante de Gwt1 em um estudo publicado pela Eisai Co. em 2003.



Estudos de triagem sistematizada em alta escala permitiram a identificação das aminopiridinas como compostos inibidores da enzima Gwt1.Os derivados aminopiridínicos foram identificados a partir de estudos de modificação molecular do protótipo (**1**). *In vitro*, este composto como vimos anteriormente apresentou moderada atividade contra *C. albicans* (CIM = 5.20 μM) e ausência de atividade contra *A. fumigatus.* Uma série de etapas de otimizações moleculares permitiram a identificação dos compostos (**2**) e (**3**) com valores de concentração inibitória mínima (CIM) contra *C. albicans* de 0.33 μM e 0.16 μM, respectivamente (Figura 24).

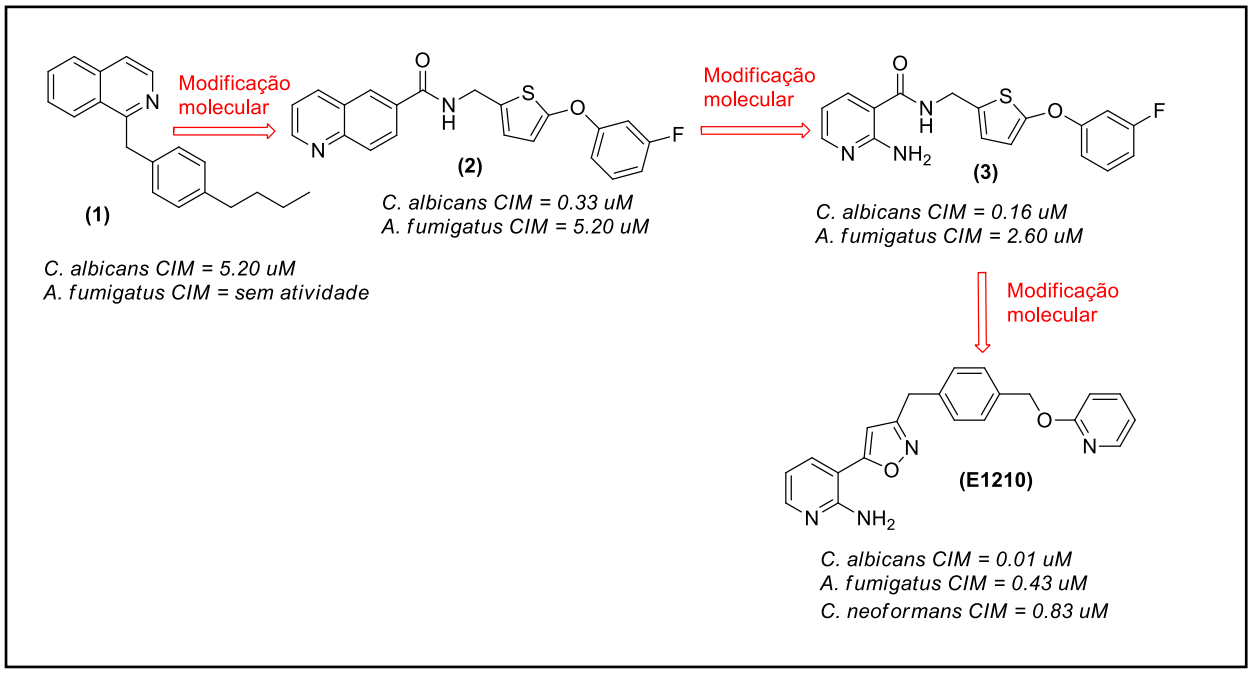
Além disso, ambos compostos apresentaram atividade contra *A. fumigatus* com valores de CIM de 5.20 μM e 2.60 μM, respectivamente. Estudos utilizando cepas de *S. cerevisae* super expressora de Gwt1 demonstraram diminuição de 128 vezes da atividade do composto (**3**) sugerindo que a enzima Gwt1 é o possível alvo de ação deste composto (CARVER, 2004).

Processos de otimização molecular também utilizando o composto (**1**) como protótipo permitiram o planejamento do **E1210** (Figura 24). Estudos

mostraram que o **E1210** inibiu a atividade de acilação do inositol de *C. albicans* e *A. fumigatus* com concentrações inibitórias de 50% (CI50) de 0,3 a 0,6 µM, surgindo atividade contra outro fungo, *Cryptococcus Neoformans,* mas não teve atividade inibitória contra o Pig-W humano, mesmo em concentrações elevadas (100 µM).

Além disso, o **E1210** inibiu a formação de tubos germinativos, a aderência às superfícies de poliestireno e a formação de biofilmes de *C. albicans* em concentrações acima da sua CIM. Esses resultados sugeriram que o **E1210** inibiu seletivamente a acilação de inositol da GPI específica do fungo, que seria catalisada por Gwt1, levando à inibição da maturação proteica ancorada por GPI.

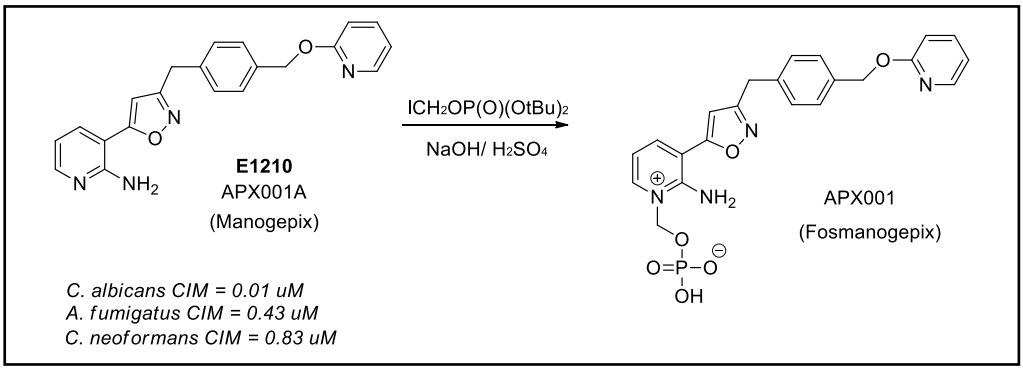
Figura 24. Modificação molecular na identificação do derivado 2-aminopiridínico demonstrando aumento de atividade contra as espécies fúngicas C. albicans e A. fumigatus. Fonte: Adaptado de (NAKAMOTO et al., 2010)



Esse promissor composto foi licenciado em 2015 pela *Amplyx Pharmaceuticals* e passou a ser chamado de ***APX001A*** *ou* ***Manogepix***. A fim de melhorar propriedades físico-químicas como a solubilidade em água foi desenvolvido o pró-fármaco Fosmanogepix (Figura 25), contendo o grupo éster de fosfato que permite incremento de solubilidade, e após metabolização pelas fosfatases *in vivo* pode ser convertido no parental Manogepix. Este pró-fármaco

está em ensaios de fase clínica 2 (COVEL, J. A. ; SOLTOW, Q. A.; KAPOOR, M.; MOLONEY, M. K.; WEBB, P. J.; TRZOSS, M.; SHARP, M.; SHAW, 2019).

Figura 25. Estruturas químicas do composto manogepix e fosmanogepix como inibidor da enzima Gwt1, demonstrando também uma melhora na atividade em comparação aos compostos anteriores, bem como o surgimento de atividade contra o fungo *C. neoformans*.



A atividade *in vitro* do Manogepix (***APX001A)*** foi avaliada em uma ampla variedade de fungos incluindo vários patógenos difíceis de tratar. A Tabela 2 mostra os resultados em relação aos fungos que mais causam as IFIs atualmente, em comparação com alguns dos agentes antifúngicos comercializados.

Tabela 2. Teste comparativo de suscetibilidade in vitro relacionando alguns fármacos do tratamento atual e o composto E1210. Fonte: Adaptado de (COVEL, J. A. *et al*)

	Concentração Inibitória Mínima (µM)					
Fungos	E1210	FLC	ITR	VRC	AMB	MIC
Candida albicans	0,01	0,83	0,05	0,01	1,6	0,05
Aspergillus fumigatus	0,43	>213,33	1,6	1,6	1,6	0,2
Cryptococcus neoformans	0,83	6,66	-	0,1	0,83	>106,66

Legenda: FLC (fluconazol); ITR (itraconazol); VRC (voriconazol); AMB (anfotericina B); MIC (micafungina).

Face aos resultados promissores deste composto, neste projeto, propomos modificações moleculares no protótipo **APX001A** visando a otimização da atividade e aumento de espectro de ação antifúngico de novos derivados aminopiridínicos. Para tal, será utilizado a estratégia de bioisosterismo, em que o sistema 2-aminopiridínico será substituído pelo sistema benzofuroxano (Figura 26).

O bioisosterismo é uma estratégia de modificação estrutural de moléculas com atividade biológica semelhante. Essa estratégia provém do isosterismo que, em 1919 foi definido por Langmuir como “substituição de um átomo ou grupo de átomos por outros semelhantes eletrônica ou estericamente”. Para isso foi estabelecida uma regra a ser aplicada em 1925 por Grimm como a Regra do Hidreto, onde diz que a adição de um hidreto a um átomo fornece um pseudo-átomo com as mesmas propriedades físicas daqueles presentes na coluna seguinte da Tabela Periódica. Em 1932, Erlenmeyer expandiu o conceito de isóstero como também todos aqueles elementos de uma mesma coluna da Tabela Periódica. E, portanto, os bioisósteros são definidos como substituintes ou grupos que apresentam similaridades químicas ou físicas e possuem propriedades biológicas semelhantes. A utilização dessa estratégia no composto sujeito a modificação molecular pode acarretar aumento da potência, seletividade, redução ou redirecionamento do metabolismo bem como a eliminação ou modificação de grupos toxicofóricos.

O bioisosterismo foi classificado em 1970 como clássico e não clássico. No primeiro caso, esse tipo obedece às regras estipuladas por Grimm e Erlenmeyer como já mencionadas anteriormente. No segundo caso, é seguida a ideia de que número diferentes de átomos exibem propriedades estéreas e eletrônicas diferentes como a troca de um sistema cíclico por um não cíclico.

Nesse projeto foi utilizado as duas classificações, onde o bioisosterismo clássico é encontrado na região em que se pode substituir o anel aromático por uma piridina ou um benzeno. E na região da troca do sistema aminopiridínico pelo sistema benzofuroxano tem-se o padrão não clássico.

2.OBJETIVOS

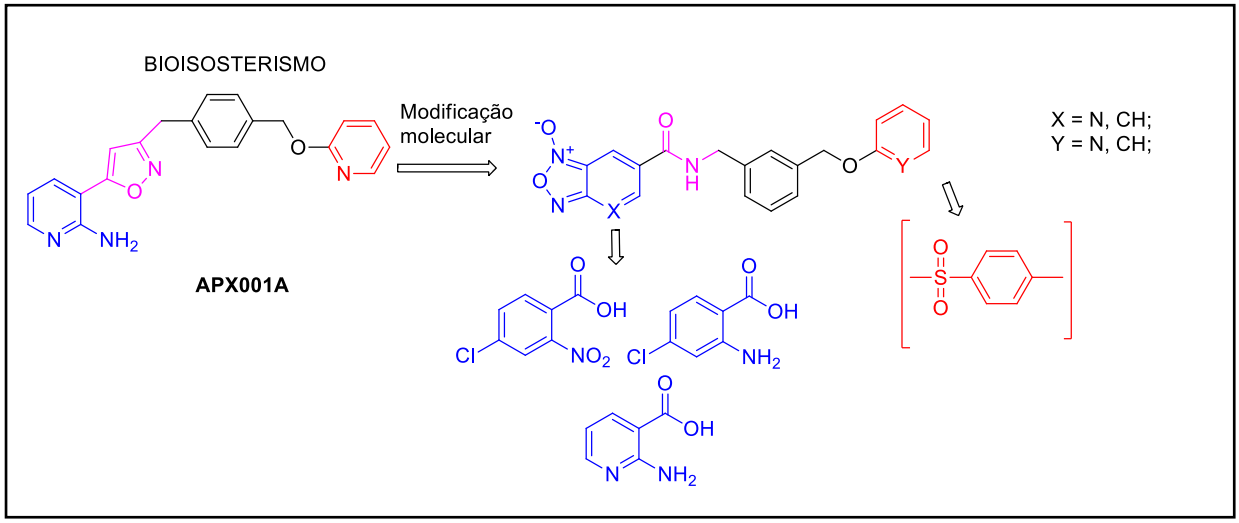
Este trabalho visa o planejamento, síntese, isolamento, purificação e caracterização estrutural de novos compostos derivados benzofuroxanos que sejam análogos do APX001A como nova alternativa no tratamento das IFIs.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Planejamento estrutural

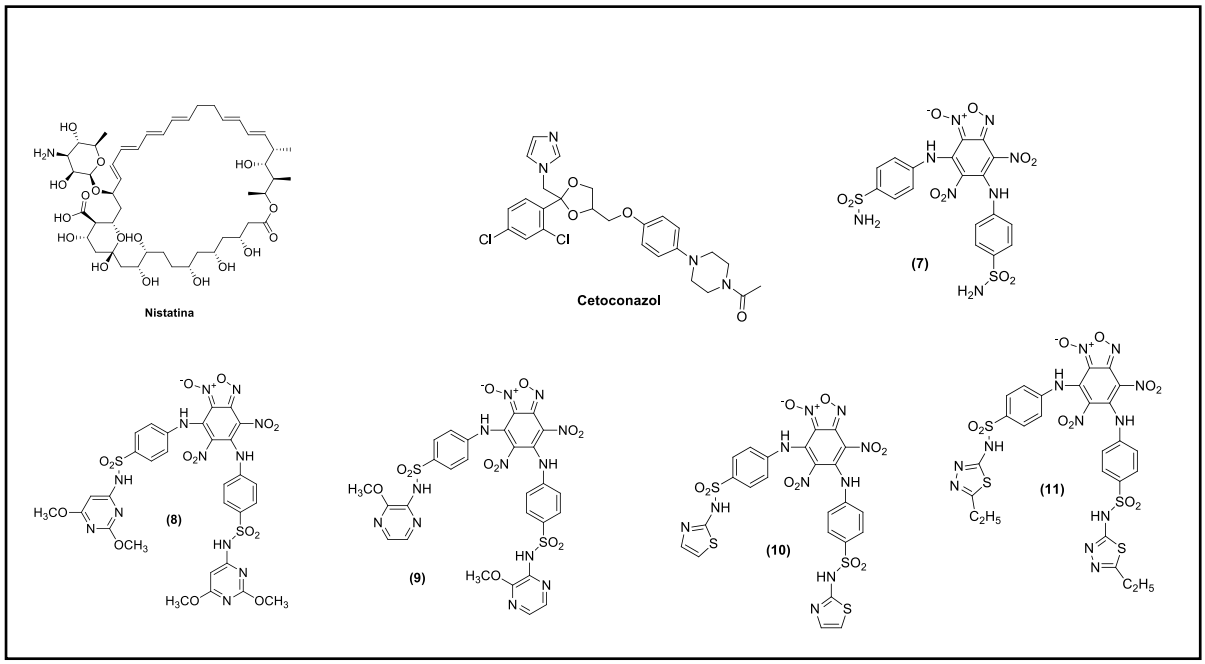
Segundo apresentado na Figura 26, o sistema 2-aminopiridínico será substituído pelo sistema benzofuroxano. No aromático azul será explorada a contribuição do benzeno e da piridina a atividade, assim como um padrão de substituição com derivados sulfonados. Além disso, a região dos benzofuroxanos será substituída por derivados de ácidos carboxílicos para investigar a contribuição eletrônica desses compostos . Aqui, a pesquisa visou explorar e investigar a relação estrutura-atividade a fim de caracterizar os requisitos estruturais necessários para a atividade e identificar protótipos benzofuroxanos com atividade antifúngica que sejam análogos ao composto **APX001A**.

Figura 26. Bioisosterismo como estratégia na identificação do derivado 2-aminopiridínico E1210, Manogepix licenciado pela Amplyx Pharmaceuticals como protótipo.



O benzofuroxano tem atraído cada vez mais a atenção da Química Medicinal devido as suas propriedades farmacológicas, entre as quais é possível citar as atividades antiparasitária, quimioterápica, antiviral, entre outras. Eles também têm sido descritos como importante para atividade de compostos antifúngicos, pois essa subunidade é capaz de aumentar o estresse oxidativo, gerando radicais livres que danificam as estruturas celulares e ativam mecanismos de morte do fungo. Foi descrito em um estudo de 2014, a atividade antimicrobiana/antifungica de compostos benzofuroxânicos (**7**-**11**) (Figura 27), contra algumas bactérias e o fungo patogênico do tipo levedura *Candida albicans.* Nesse estudo a CIM dos controles foram de 56 µM para cetoconazol e 49 µM para nistatina, enquanto para os compostos **8**,**10** e **11** foram encontrados valores de CIM de 30, 41 e 19 µM, respectivamente (GALKINA et al., 2014).

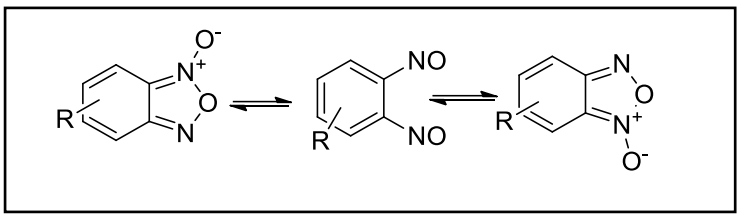
Figura 27. Estrutura química dos compostos derivados de benzofuroxanos, nistatina e cetoconazol utilizados em um estudo de 2014 para demonstrar a atividade antimicrobiana. Fonte: Adaptado de Fonte: Adaptado de (GALKINA et al., 2014)



Esse sistema sofre um tipo de isomeria de função chamada tautomeria (Figura 28), em que os isômeros coexistem em equilíbrio dinâmico numa mesma solução. No caso dos benzofuroxanos, podemos ver os dois tautômeros na figura 27, esse equilíbrio das suas estruturas pode depender de

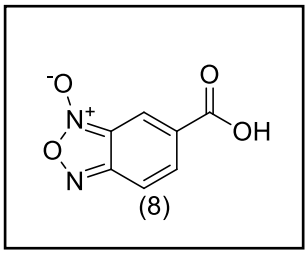
uma série de fatores como a natureza e posição do substituinte R bem como condições de temperatura e o tipo de solvente.

Figura 28. Estrutura química dos tautômeros do sistema benzofuroxano.



Além de todas informações já mencionadas anteriormente sobre esse sistema, o composto 8 (figura 29) foi submetido a algumas avaliações em pareceria com o laboratório da professora Ana Marisa Fuosco do Departamento de Análises Clínicas, onde a aluna de pós-doutorado Kaila avaliou a Concentração inibitória mínima de células planctônicas do biofilme de Paracoccidioides brasiliensis (Pb18), a fim de indicar a capacidade de reduzir pelo menos 50% das atividades metabólicas do microrganismo estudado. Os resultados foram significativos com valor de 62,5 ug/mL ~208 μM , demonstrando uma possível atividade antifúngica deste composto. Vale lembrar que o fungo Paracoccidioides brasiliensis causa uma micose dimórfica endêmica chamada paraccocidiodimicose que afeta brasileiros (em torno de 4000 infectados por ano) e a taxa de mortalidade pode chegar em 27%.

Figura 29. Estrutura química do composto (8).



Portanto, os derivados benzofuroxanos planejados neste projeto poderiam atuar por um mecanismo dual de ação, em que além da inibição da enzima Gwt1, eles poderiam aumentar o estresse oxidativo celular, causando a morte do fungo. Considerando que os resultados das atividades do composto

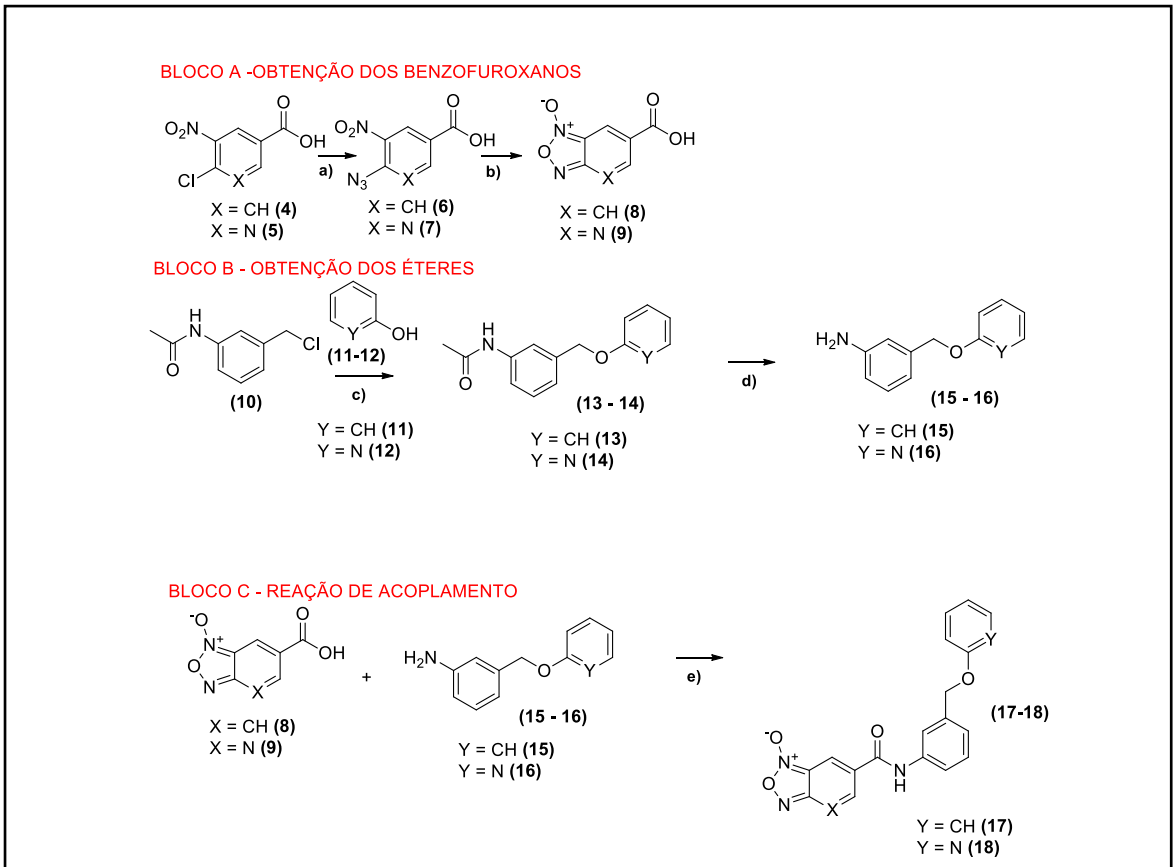
APX001A são promissoras, a modificação proposta visa ainda otimizar a atividade garantindo aos novos derivados maior efetividade contra os fungos.

3.2. Métodos de síntese

3.2.1. Descrição geral

Para obtenção dos compostos finais foi explorada a rota sintética convergente. Nessa rota, parte de um reagente interagindo com outros compostos para formação de um produto, no qual será reagente de outra reação e assim sucessivamente. As Figuras 30 e 31 esquematizam as principais reações envolvidas na síntese dos compostos. Na figura 30 podemos observar no Bloco A, uma reação de substituição Nucleofílica Aromática (SNAr), seguida de ciclocondensação para obtenção dos benzofuroxanos (**8**) e (**9**); no Bloco B, uma reação de substituição Nucleofílica Bimolecular (SN_2) envolvendo os derivados fenólicos (**10** e **11**) para obtenção dos éteres (**13** e **14**) seguida de uma reação de hidrólise do grupo acetamida em meio básico para formar os derivados aminados (**15** e **16**) e por fim, no Bloco C, a formação dos produtos finais (**17** e **18**) contendo a função amida por meio do uso de agentes acoplantes.

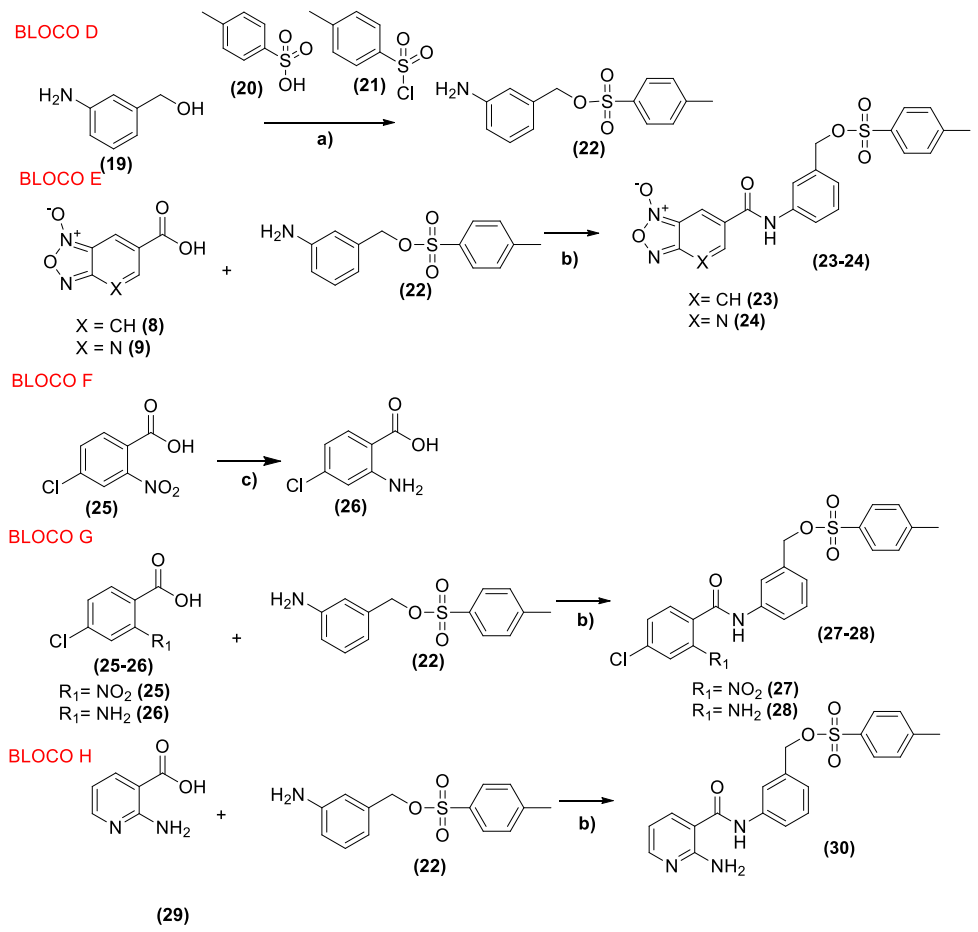
Figura 30. Etapas sintéticas para obtenção dos compostos finais da série dos derivados fenólicos (**17**) e (**18**).



a) NaN_3, DMSO, 75°C, 1h. **b)** Tolueno, 106°C, 3h. **c)** K_2CO_3, KI, butanona, overnight. **d)** NaOH ou HCl 50%. **e)** Carbonildiimidazol (CDI), acetonitrila, t.a.

A Figura 31 explora outra rota para obtenção dos produtos finais derivados sulfonados, também contemplando uma síntese convergente, em que no Bloco D ocorreu a reação SN_2 por meio do tratamento do (**19**) com cloreto de tosila (**21**) para formação do composto (**22**). Para formação dos produtos finais, o benzofuroxano (**8** ou **9**) foi acoplado como demonstra o Bloco E com a arilamina (**22**) para formar os produtos (**23** e **24**). Explorando reações similares, derivados sem o núcleo benzofuroxano (**25**, **26** e **29**) também foram acoplados com amina (**22**), utilizando agentes acoplantes como indicam nos Blocos G e H. Para o composto (**25**) contendo a função nitro aromática foi realizada a redução em meio contendo ferro metálico e cloreto de amônio como demonstrado no Bloco F.

Figura 31. Etapas sintéticas para obtenção dos compostos finais da série dos derivados sulfonados (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**).

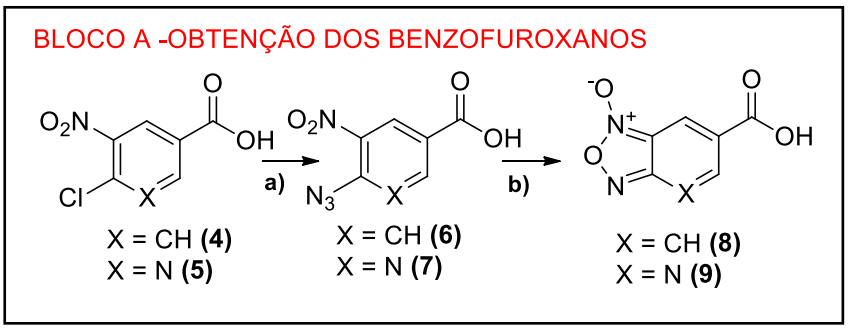


a) Tolueno, 106°C, 3h. **b)** CDI, acetonitrila, t.a, overnight. **c)** Ferro metálico, etanol, NH_4Cl/H_20, 80°C, 3 dias.

3.2.2. Procedimentos para síntese dos compostos

3.2.2.1. Síntese dos compostos (8) e (9)

Figura 32. Esquema da síntese do Bloco A.



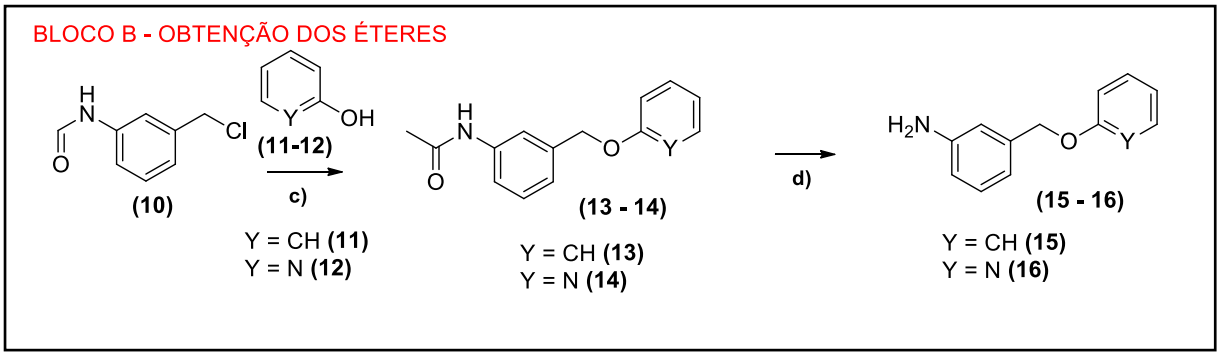
a) Em um balão de 125 mL, foi adicionado 4-cloro-3-nitro ácido benzoico (**4**) (ou 6-cloro-5-nitro ácido aminonicotínico **(5)** (5 g; 24,8 mmol) e azida de sódio (1,75g; 9,41 mmol) em 80 mL DMSO em um balão de 125 mL. A azida foi adicionada ao meio lentamente e em pequenas porções para que a temperatura não atingisse valores superiores a 75 °C. O acompanhamento reacional foi feito por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel a mistura (1:1) éter de petróleo: diclorometano + 5% ácido acético. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após 1h de reação houve consumo completo do reagente visualizado na placa cromatográfica sob luz ultravioleta (254 nm). Então, o meio reacional foi resfriado por 1h. Decorrido este tempo, foi adicionado 40 mL de água à solução. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 50 mL). Após, a fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção do composto 4-azida-3-nitro ácido benzoico (**6**) ou 6-azida-5-nitro ácido aminonicotínico **(7).**

b) Em um balão reacional de 50 mL, foi dissolvido o composto **(6** ou **7)** em 50 mL de tolueno. Em seguida, o meio reacional foi mantido sob agitação em refluxo por 3 h para formar os benzofuroxanos **(8)** e **(9)**. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado e, em seguida, foi adicionado 20 mL de acetato de etila juntamente com carvão ativado. A mistura foi filtrada a fim de remover o carvão ativado. Para o isolamento, foi adicionado 50 mL de éter de

petróleo a fim de promover a precipitação do produto. Essa mistura foi deixada em repouso no refrigerador por 12 h a fim de favorecer a precipitação do produto desejado. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a mistura (1:1) diclorometano: éter de petróleo + 5% ácido acético como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). A purificação dos produtos foi realizada por cromatografia em coluna (coluna 3 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica flash (12 cm de altura) e fase móvel éter de petróleo: diclorometano + 5% ácido acético (1:1, v/v) em modo isocrático. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, para fornecer os compostos **(8)** e **(9)**.

3.2.2.2. Síntese dos compostos (13), (14), (15) e (16)

Figura 33. Esquema da síntese do Bloco B.



Síntese dos compostos (**13**) e (**14**)

Em balão de 50 mL, foi adicionado 100 mg (0,545 mmol) do reagente cloreto de 4-acetamidobenzil **(10),** 60 mg (0,535 mmol) do fenol **(11 e 12),** 90 mg (0,542 mmol) de iodeto de potássio, 188 mg (1,36 mmol) de carbonato de potássio e 20 mL de butanona. A reação foi mantida sob agitação e refluxo overnight. Após, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, e ao balão foi adicionado água gelada a fim de precipitar os compostos desejados. Em seguida, foi realizada a filtração à vácuo. A fase aquosa, ainda contendo o produto, foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição

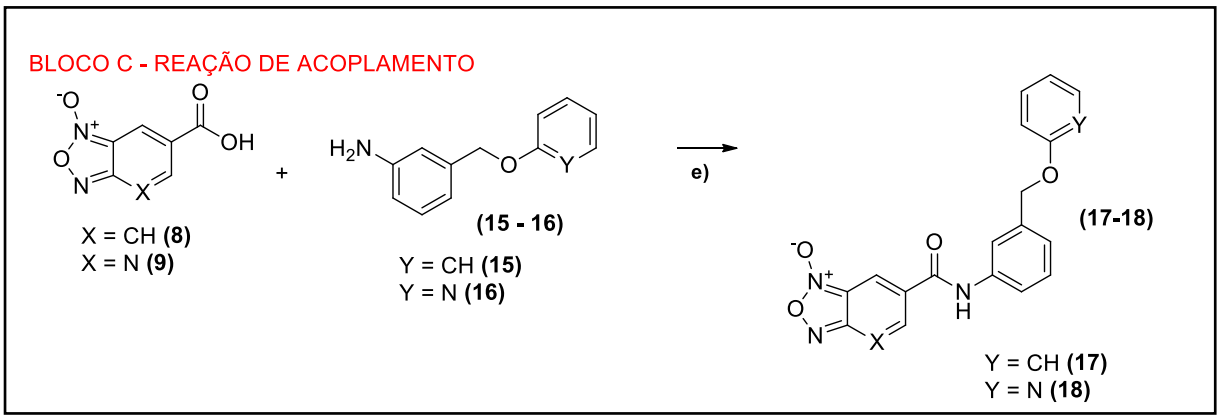
(1:1) hexano:acetato de etila como fase móvel e a visualização foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm). A purificação do composto foi conduzida por cromatografia em coluna (coluna 3 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica flash (10 cm de altura) e fase móvel hexano: acetato de etila (1:1, v/v) em modo isocrático. Por fim, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, levando à obtenção dos produtos pretendidos como um sólido branco (**13**) e amarelo (**14**).

Síntese dos compostos (**15**) e (**16**)

Em balão de 25 mL, foi adicionado 100 mg (0,414 mmol ou 0,413 mmol) do composto (**13** ou **14**, respectivamente) e 5 mL de solução de NaOH 40%. A reação foi mantida a 80 °C overnight, sob agitação. Decorrido este tempo, foi adicionado ao meio reacional cerca de 20 mL de água. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (8:2) acetato de etila:hexano como fase móvel e a visualização foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm). A purificação do composto foi conduzida por cromatografia em coluna (coluna 3 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica flash (12 cm de altura) e fase móvel hexano: acetato de etila (2:8, v/v) em modo isocrático. Por fim, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, levando à obtenção dos produtos desejados (**15**) ou (**16**).

3.2.2.3. Síntese dos compostos (17) e (18)

Figura 34. Esquema da síntese do Bloco C.



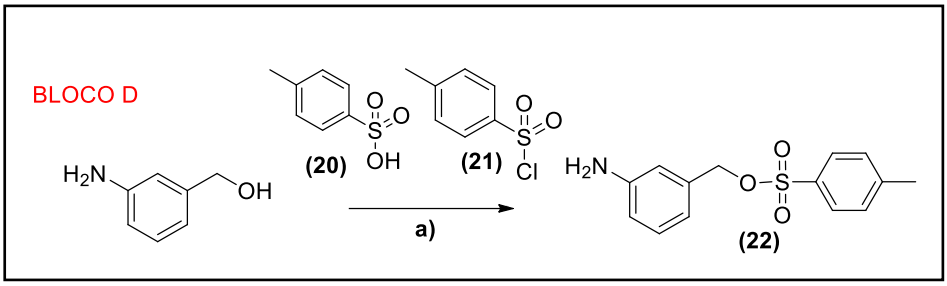
Em um balão de 10 mL, foi adicionado 100 mg do composto 7 (0,549 mmol), 232 mg do agente acoplante 1- [bis(dimetilamino) metileno] -1*H*-1,2,3-triazolo [4,5-*b*] piridínio 3-óxido hexafluorofosfato - HATU (0,610 mmol), 110 µL de *N*,*N*-Di-isopropiletilamina - Dipea (0,418 mmol) e 3 mL de dimetilformamida (DMF) anidro a temperatura ambiente sob agitação por 30 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 132 mg do composto (**15**) (0,721 mmol) nas mesmas condições por 72 horas. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a mistura (1:1) hexano: acetato de etila como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após, foi realizada a extração do produto adicionando 20 mL de água e 20 mL de solução de cloreto de sódio. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção do composto (**17**).

Síntese composto (**18**)

Em balão de 25 mL, foi adicionado 96,3 mg (0,529 mmol) do ácido (**7**) , 110 mg (0,678 mmol) do agente acoplante carbonildiimidazol (CDI) e 3 mL de acetonitrila anidra a temperatura ambiente sob agitação por 3 horas. Após, foi adicionado 70 mg (0,351 mmol) da amina (**16**) e a reação foi mantida sob agitação por 72 horas. Ao término da reação, foi realizada a adição de 20 mL de água e 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (4:6) hexano:acetato de etila como fase móvel e a visualização foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm). A purificação do composto foi conduzida por cromatografia em coluna (coluna 5 cm de diâmetro), utilizando como fase estacionária sílica flash (10 cm de altura) e fase móvel hexano: acetato de etila (4:6, v/v) em modo isocrático. Por fim, o solvente foi evaporado à pressão reduzida, levando à obtenção do produto (**18**).

3.2.2.4. Síntese dos derivados sulfonados (22)

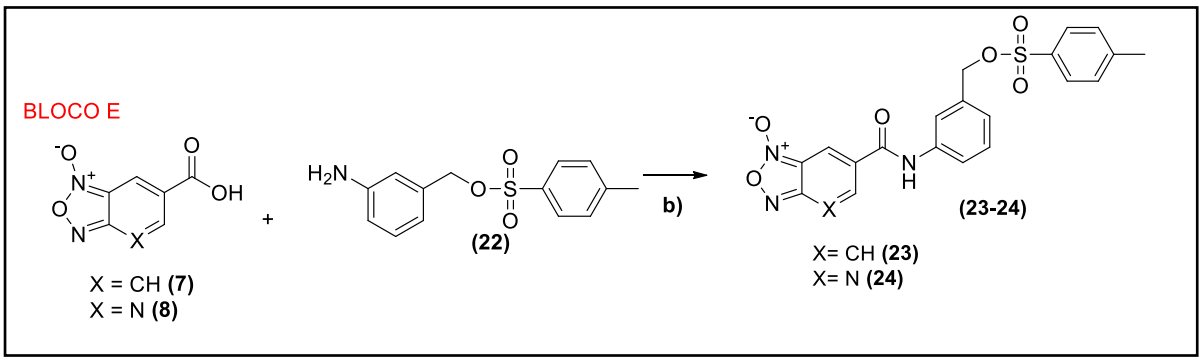
Figura 35. Esquema da síntese do Bloco D.



Em um balão de 10 mL, foi adicionado o reagente 3-aminofenil metanol (**19**) (200 mg; 1,62 mmol), em porção catalítica o ácido p-toluenossulfônico (**20**) (62 mg; 0,325 mmol), o cloreto p-toluenossulfonil (**21**) (310 mg; 1,63 mmol) em 8 mL de tolueno anidro a 106 °C agitando por 2h em refluxo. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (4:6) hexano: acetato de etila como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Após 2h de reação houve consumo completo do reagente visualizado por meio da CCD. Então, o meio reacional foi resfriado a temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi adicionado 3 mL de solução NaOH 40% para corrigir o pH; em seguida, foi adicionado 40 mL de água a essa solução. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção do composto 3-aminobenzil-4-metilbenzenossulfonato (**22**).

3.2.2.5. Síntese dos compostos (23), (24), (27), (28) e (30)

Figura 36. Esquema da síntese do Bloco E.



Nessa etapa os compostos foram obtidos através de uma reação de acoplamento usando como agentes acoplantes o HATU para o composto (**23**) e o CDI para o composto (**24**).

Síntese do composto (**23**)

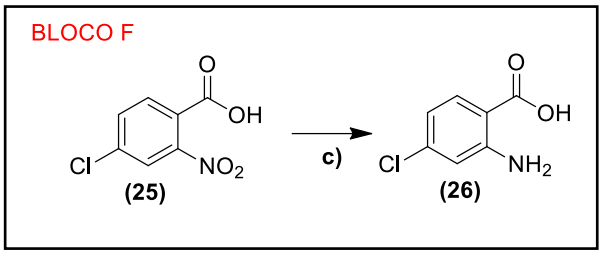
Em um balão de 10 mL, foi adicionado 100 mg do composto (**8**) (0,549 mmol), 232 mg do agente acoplante HATU (0,610 mmol), 110µL de DIPEA (0,418 mmol) e 3 mL de DMF anidro. A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido este tempo, foi adicionado 200 mg do composto (**22**) (0,721 mmol) nas mesmas condições por 6 horas. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (1:1) hexano: acetato de etila como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Ao término da reação, foi realizada a adição de 20 mL de água e 20 ml de solução saturada de cloreto de sódio. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção do (**23**).

Síntese do composto (**24**)

Em um balão de 10 mL, foi adicionado 100 mg do composto (**9**) (0,510 mmol), 94 mg do agente acoplante CDI (0,449 mmol) e 3 mL acetonitrila anidra a temperatura ambiente sob agitação por 5h. Decorrido este tempo, foi adicionado 100 mg do composto (**22**) (0,360 mmol) nas mesmas condições por 12 horas. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (1:1) hexano: acetato de atila como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Ao término da reação, foi realizada a adição de 20 mL de água e 20 ml de solução saturada de cloreto de sódio. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila (3 x 30 mL). A fase orgânica foi coletada usando funil de separação, e foi adicionado sulfato de sódio anidro, seguido de uma etapa de filtração. Por fim, o solvente foi evaporado a pressão reduzida, levando a obtenção do composto (**24**).

3.2.2.6. Síntese do composto (26)

Figura 37. Esquema de síntese do Bloco F.



Para reação de redução do grupo nitro (**25**) em amina (**26**) foi adicionado a um balão de 10 mL, solução contendo 398 mg de cloreto de amônio (7,44mmol) em 1 mL de água, 250 mg de ferro metálico (5,37 mmol) e 300 mg (1,50 mmol) do composto (**25**) previamente solubilizado em em 5 mL de etanol. Essa mistura reacional foi mantida sob agitação a 80°C por 72h. O acompanhamento reacional foi feito por CCD utilizando a eluição (2:8) hexano: acetato de etila como fase móvel. As placas cromatográficas foram posteriormente visualizadas sob luz ultravioleta (254 nm). Decorrido este tempo, filtrou-se a mistura reacional usando coluna preenchida com celite e o solvente foi evaporado à pressão reduzida. Ao sólido obtido foi adicionado água, sendo o produto precipitado nessa condição. Após a filtração a vácuo, obteve-se o composto (**26**).

3.3 Métodos de purificação

- Cromatografia em coluna

A purificação dos compostos obtidos foi realizada através de cromatografia com o uso do Biotage® Isolera ™, utilizando a coluna Biotage® SNAP ULTRA 10g (HP- Sphere 25 µm), por um método isocrático com hexano e acetato de etila como eluentes, fluxo de 18 mL/min e detecção nos comprimentos de onda variando entre 254 - 365 nm.

Outro método de purificação empregado foi o uso de cromatografia em coluna de bancada utilizando eluentes como éter de petróleo, diclorometano, hexano, acetato de etila (fase móvel) e sílica flash como fase estacionária. A

altura e diâmetro da coluna usados para cada composto foram especificados nos métodos para obtenção de cada composto.

3.4. Métodos analíticos

3.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatoplacas de alumínio (AL TLC- Merck®) de sílica-gel 60 F254 para o acompanhamento das reações. A visualização das substâncias foi realizada em câmara de luz ultravioleta (254 e 365 nm).

3.4.2 Determinação da faixa de fusão

As faixas de fusão dos compostos intermediários e finais foram determinadas em um equipamento de ponto de fusão capilar Melting Point Apparatus SMP3, Stuart Scientific®.

3.4.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

As análises de espectrofotometria foram realizadas na faixa de absorção de 4.000 a 400 cm^{-1}, região do infravermelho (IV), através de um espectrofotômetro IR Prestige-21 Shimizu®, utilizando pastilhas KBr.

3.4.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C uni e bidimensionais (Bruker 600 e Bruker 300, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de ^{1}H e TMS como referência interna e a 150 MHz e 75 MHz para ^{13}C) foram realizadas utilizando solvente deuterado (DMSO-d_6 ou acetona-d_6). O equipamento está localizado no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

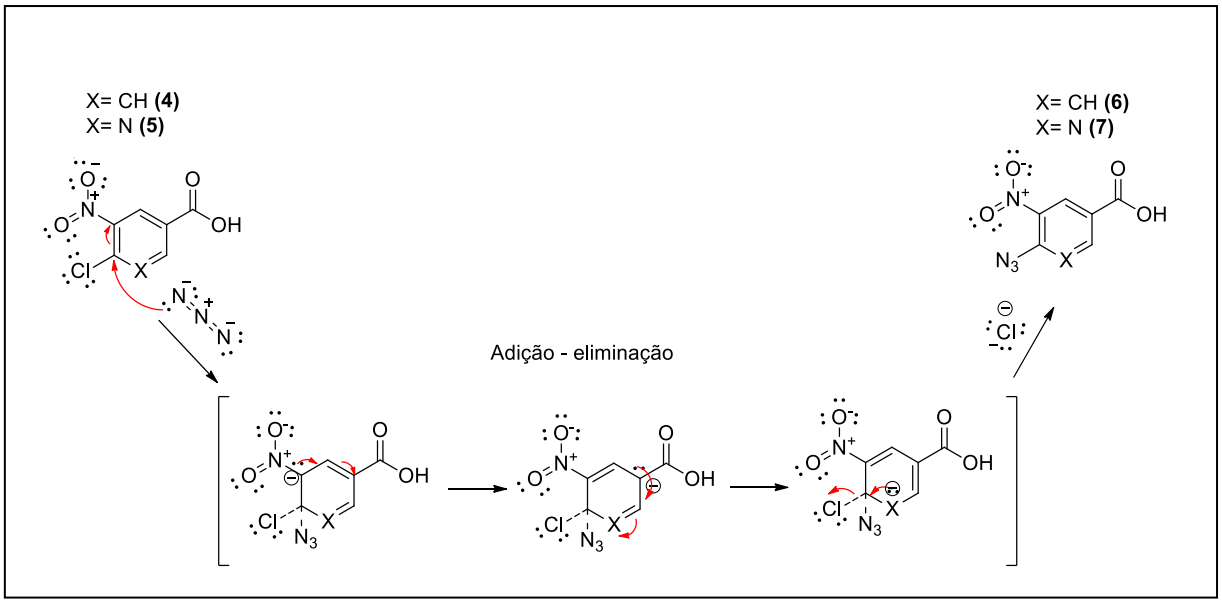
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C e de infravermelho (IV) dos compostos sintetizados foram inseridos na seção de Apêndice deste trabalho. A discussão da parte química será dividida nos sete blocos (A-H) usados para preparação dos produtos finais.

4.1. Bloco A – síntese dos benzofuroxanos (8) e (9)

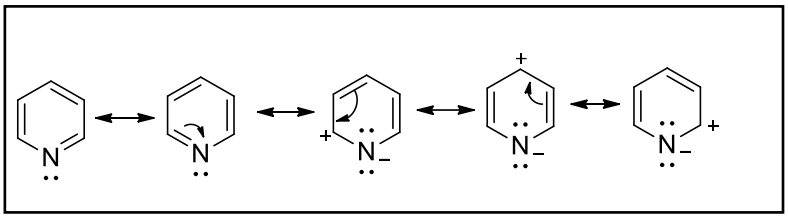
A formação do derivado 6-carboxibenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-1-*N*-óxido (**8**) ocorreu em duas etapas . A primeira etapa consiste na reação entre 4-cloro-3-nitro ácido benzoico **(4)** e azida de sódio em DMSO, levando a obtenção do ácido 4-azida-3-nitro benzóico **(6).** Esta etapa ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica aromática (SNAr), em que o átomo de cloro **(4)** é substituído por um grupo azida em uma reação do tipo adição-eliminação (Figura 38)**.** Nesse tipo de reação a presença do nitro, como forte grupo retirador de elétrons na posição *orto*, auxilia na reação por tornar o carbono ligado ao cloro mais deficiente em elétrons. O mesmo mecanismo reacional é observado para (**7**).

Figura 38. Esquema proposto para a primeira etapa de reação de Substituição Nucleofílica Aromática realizada na formação de (**8**) e (**9**).



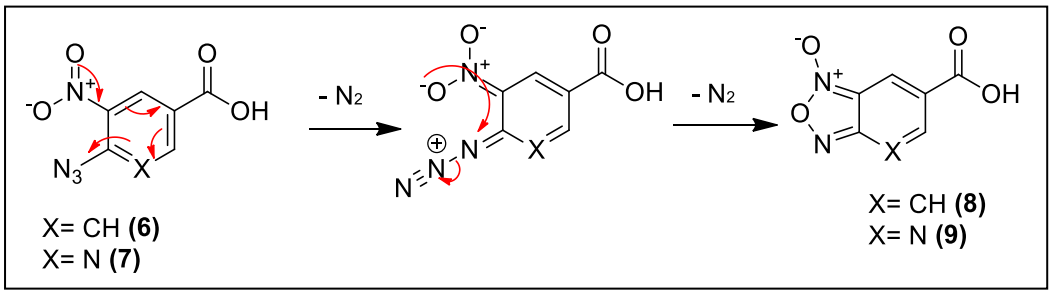
Devido a presença do heteroátomo (nitrogênio) no composto (**9**), as estruturas canônicas diferem em comparação aquela encontrada para o composto (**8**) que apresenta carbono. Além do efeito eletroatrator induzido pelo nitrogênio em (**9**), esse sistema apresenta três contribuintes de ressonância (Figura 39) carregados positivamente, diferentemente do benzeno (**8**).

Figura 39. Estrutura dos contribuintes de ressonância carregados positivamente do sistema piridínico.



Na segunda etapa reacional, os intermediários apresentando a função azida foram aquecidos sob refluxo, em meio contendo tolueno como solvente, durante 3 horas para ocorrer um rearranjo intramolecular (ciclocondensação) que levou à formação dos derivados benzofuroxânicos (**8**) **e** (**9**) (Figura 40)**.** O acompanhamento reacional foi realizado por CCD utilizando a eluição (1:1) éter de petróleo:diclorometano + 5% ácido acético como fase móvel. O benzofuroxano (**8**) apresentou nessa CCD fator de retenção (R_f) de 0,44. Após purificação, o composto **(8)** foi obtido como um sólido de coloração amarelo com rendimento de 89 %. A faixa de fusão deste composto encontrada para (**8**) foi de 98-108ºC.

Figura 40. Esquema proposto para reação de ciclo-condensação.



A caracterização química do composto (**8**) foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H). A Tabela 3 apresenta os deslocamentos químicos desse composto e o espectro

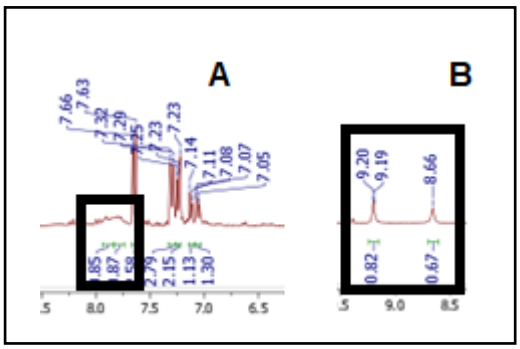
de RMN de ^1H é apresentado na seção de anexo. Os hidrogênios do anel aromático H_3 e H_6 apresentam -se como dupletos, cada um integrando para um hidrogênio em δ 7.90 (J_{orto} = 8,4 Hz) e δ 8,55 (J_{meta} = 1,9 Hz), respectivamente.

O hidrogênio H_4 apresentou-se como um duplo dupleto integrando para um hidrogênio em δ 8,29 (J_{orto} = 8,4; J_{meta} = 2,0 Hz) devido ao seu acoplamento com os hidrogênios H_3 em *orto* e H_6 em *meta*. O hidrogênio da função ácido carboxílico não aparece no espectro devido a troca com átomos de deutério do solvente deuterado.

Na Figura 41 é apresentado o espectro de RMN de ^1H dos dois benzofuroxanos (**8)** (Figura 41A) e (**9**) (Figura 41B). Além dos efeitos de desproteção induzidos pela maior eletronegatividade do nitrogênio em (**9**), observamos a definida multiplicidade dos hidrogênios aromáticos (Figura 41B), que diferentemente do benzofuroxano (**8**) (Figura 41A) não apresenta tautomeria.

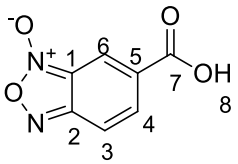
No caso, a diferença entre (**8**) e (**9**) pode estar relacionada, em partes, às estruturas canônicas dos aromáticos benzeno e piridina. A maior eletronegativade do átomo de nitrogênio faz com que os elétrons do orbital *p* estejam mais 'presos', e isso pode explicar a não ocorrência de tautomeria. Assim, a presença do par de elétrons não compartilhados no nitrogênio piridínico bloqueia a possiblidade de tautomerismo para (**9**) (Figura 41).

Figura 41. A) deslocamentos químicos dos hidrogênios do composto (**8**) demonstrando a multiplicidade de sinais na região aromática devido ao sistema tautomérico. **B)** Sinais dos hidrogênios do composto (**9**), em que não se observa essa mesma multiplicidade provavelmente devido a não ocorrência de tautomeria nas condições experimentais utilizadas.

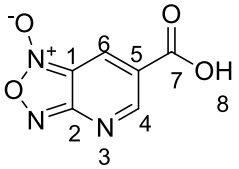


A caracterização química do composto (**9**) foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) (Tabela 3). Os hidrogênios do anel aromático H_3 e H_5 apresentam-se como dupletos, cada um integrando para um hidrogênio em δ 9,20 (J_{meta} = 1,5 Hz) e δ 8,57 (J_{meta} = 1,5 Hz), respectivamente. Em comparação ao composto (**8**), devido ao anel piridínico, não se vê mais o hidrogênio H_3 ligado ao carbono do anel. Da mesma forma que (**8**), o hidrogênio da função ácido carboxílico não aparece no espectro devido a troca com átomos de deutério do solvente deuterado. O benzofuroxano (**9**) apresentou nessa CCD fator de retenção (R_f) de 0,25. Após purificação, o composto **(9)** foi obtido como um sólido de coloração amarelo com rendimento de 40 %. A faixa do ponto de fusão deste composto foi de 157-162ºC.

Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN 1H dos compostos (**8**) e (**9**).



Composto 8

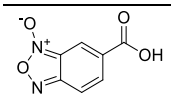
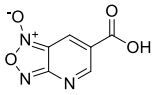


Composto 9

Posição	δ ^{1}H	δ ^{1}H
1	-	-
2	-	-
3	7,90 (d, *J*= 8,4 Hz, 1H)	-
4	8,28 (dd, *J*= 8,4 Hz, *J*= 1,9Hz, 1H)	9,20 (d, *J*= 1,5 Hz, 1H)
5	-	-
6	8,54 (d, *J*= 1,9 Hz, 1H)	8,90 (d, *J*= 1,5 Hz, 1H)
7	-	-
8	-	-

As propriedades físico-químicas dos compostos (**8**) e (**9**) estão representadas na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas dos compostos (**8**) e (**9**).

	Cor	Rendimento	Faixa de fusão	Rf*
 (8)	Amarelo	89%	98°C-108°C	0,44
 (9)	Amarelo	40%	157°C-162°C	0,25

*fase móvel: eluição (1:1) éter de petróleo:diclorometano + 5% ácido acético.

Percebe-se nesse Bloco em que se obtém os benzofuroxanos, a diferença de rendimento do composto (**8**) e (**9**), embora tenham sido submetidos a mesma metodologia. Ao fim da reação de ciclocondensação do composto (**8**), ao evaporar o solvente, o sólido foi solubilizado em acetato de etila e adicionado uma espátula de carvão ativado afim de tirar algumas impurezas como resquícios do reagente (**6**) e facilitar a purificação. Após esse procedimento, a solução foi filtrada e levada ao freezer. O composto (**9**) quando submetido ao mesmo procedimento não era obtido no filtrado, uma das justificativas é porque o nitrogênio da piridina pode estar carregado positivamente e ficar retido no carvão, com isso esse procedimento foi cortado para esse composto e isso acabou dificultando a purificação e consequentemente o rendimento não foi muito bom comparado ao do composto (**8**).

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença dos principais estiramentos relativos aos grupos químicos dos derivados benzofuroxânicos (**8**) e (**9**), representados na Tabela 5. Os espetros de infravermelho são encontrados na seção de anexo.

Tabela 5. Estiramentos observados nos espectros de infravermelho dos compostos (**8**) e (**9**).

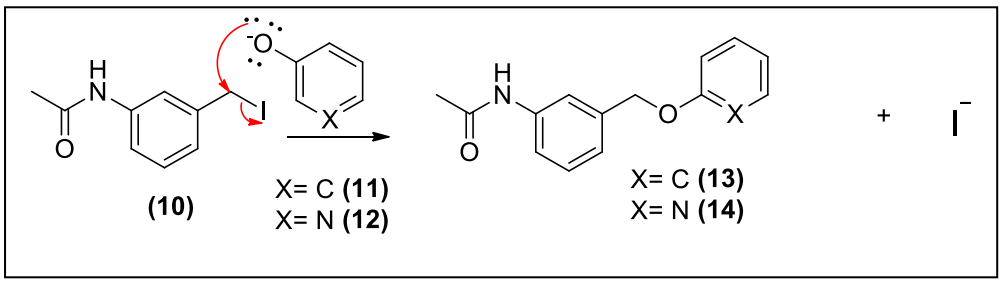
Tipos de estiramento em cm^{-1}	(8)	(9)
v C-H (aromáticos)	3012,81	3039,81
v C=C (aromáticos)	1614,42	1608,83
v C=O (ácido carboxílico)	1685,76	1697,36
v C-O (ácido carboxílico)	1301,59	1267,23
v O-H (ácido carboxílico)	3238,55	3118,90
v N-O (benzofuroxano)	1523,76	1531,48

v: estiramento axial

4.2. Bloco B – síntese das arilaminas

A síntese das arilaminas foi realizada em duas etapas. Inicialmente, a formação dos compostos (**13**) e (**14**) ocorreu por meio de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (Figura 42)**.** O carbonato de potássio, funcionando como uma base, abstrai o hidrogênio do derivado fenólico, tornando-o mais nucleofílico, o que facilita o ataque ao carbono metilênico ligado ao iodo no composto **12**. Para a reação se tornar mais efetiva, o papel do iodeto de potássio foi importante por permitir a interconversão de grupo funcional, substituindo o átomo de cloro do reagente pelo iodo. A ligação carbono-iodo é mais fraca que a ligação carbono-cloro, e ainda, o iodo acomoda melhor a carga negativa que o cloro, sendo um melhor grupo abandonador.

Figura 42. Esquema proposto para reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular.



A caracterização química dos compostos (**13**) e (**14**) foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H) . A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos do composto (**13**). A soma das integrais dos sinais apresentados é de 15 hidrogênios. Os hidrogênios da metila do grupo acetamida apresentam-se como simpleto, integrando para 3 hidrogênios em δ 2,04. O hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida apresenta-se como um simpleto integrando para 1 hidrogênio em δ 9,98. Os hidrogênios aromáticos podem ser visualizados entre δ 6,84 a δ 7,64, apresentando-se como multipletos e sem constante de acoplamento devido a sobreposição dos sinais. Por fim, temos em δ 5,04 o deslocamento dos hidrogênios do carbono metilênico, apresentando-se como um simpleto e integrando para 2 hidrogênios. Comparado aos deslocamentos dos hidrogênios do reagente cloreto de 4-acetamidobenzil que aparecem em δ 4,68, os dados sugerem a obtenção do (**12**).

A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos do composto (**14).** Para o composto (**14**), os hidrogênios da metila da função acetamida podem ser visualizados como simpleto, integrando para 3 hidrogênios em δ 2,01. O hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida apresenta-se como um simpleto integrando para 1 hidrogênio em δ 9,94. Os hidrogênios aromáticos aparecem como multipletos na região entre δ 6,19 a δ 7,8 integrando para oito hidrogênios. Somente para os hidrogênios H_{11} e H_{13}, integrando para 1 hidrogênio cada, é possível determinar as constantes de acoplamento como sendo de 6,6 Hz e 1,4 Hz, respectivamente. Em relação a multiplicidade, H_{11} e H_{13} foram encontrados como triplo dupleto e duplo dupleto. Por fim temos em δ 5,01 o deslocamento dos hidrogênios do carbono metileno, apresentando-se como um simpleto e integrando para 2 hidrogênios, sugerindo a formação do produto desejado. Esses sinais são distintos daqueles encontrados no espectro de RMN de ^{1}H para o reagente cloreto de 4-acetamidobenzil, cujo deslocamento é de δ 4,68.

A hidrólise do grupo acetamida de (**13**) e (**14**) foi conduzida em meio básico para formar as aminas desejadas (**15**) e (**16**) em rendimentos que variaram de 68 % - 75 %, respectivamente. Para o composto (**15**) a soma das integrais dos sinais apresentados é de 13 hidrogênios. Em comparação ao

composto (**13**) que tinha uma função acetamida na molécula, para (**15**) não observamos mais o sinal próximo de δ 10-11 bem como a ausência do sinal em δ 2,01 dos hidrogênios da metila, sugerindo a hidrólise desse grupo. Ademais, em (**15**) temos um sinal em δ 5,21 como singleto largo, integrando para 2 hidrogênios, relativo à formação da amina primária. A maioria dos hidrogênios aromáticos aparecem como multipletos na região entre δ 6,34 a δ 7,14, e por isso, sem constante de acoplamento definidas. Entretanto, para H_{10} e H_{11}, a constante de acoplamento encontrada foi de J_{orto}= 8,2 Hz e J_{meta}= 1,9 Hz. Por fim, em δ 4,85 foi possível visualizar o deslocamento dos hidrogênios do carbono metilênico integrando para dois hidrogênios.

As Figuras 43 e 44 mostram os espectros de ^{1}H dos compostos (**13**) e (**15**), respectivamente. Conforme previamente comentado, nestes é possível observar a ausência do sinal da amida (destacado em vermelho na Figura 43), e o surgimento na Figura 44 do sinal em δ 5,21 ppm (em vermelho), relativo à conversão do grupo funcional amida (**13**) para amina (**15**). Outro destaque é a ausência em (**15**) (Figura 44) dos 3 hidrogênios da metila do composto (**13**) (em verde; Figura 43) na região de δ 2,04 ppm.

Figura 43. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**13**).

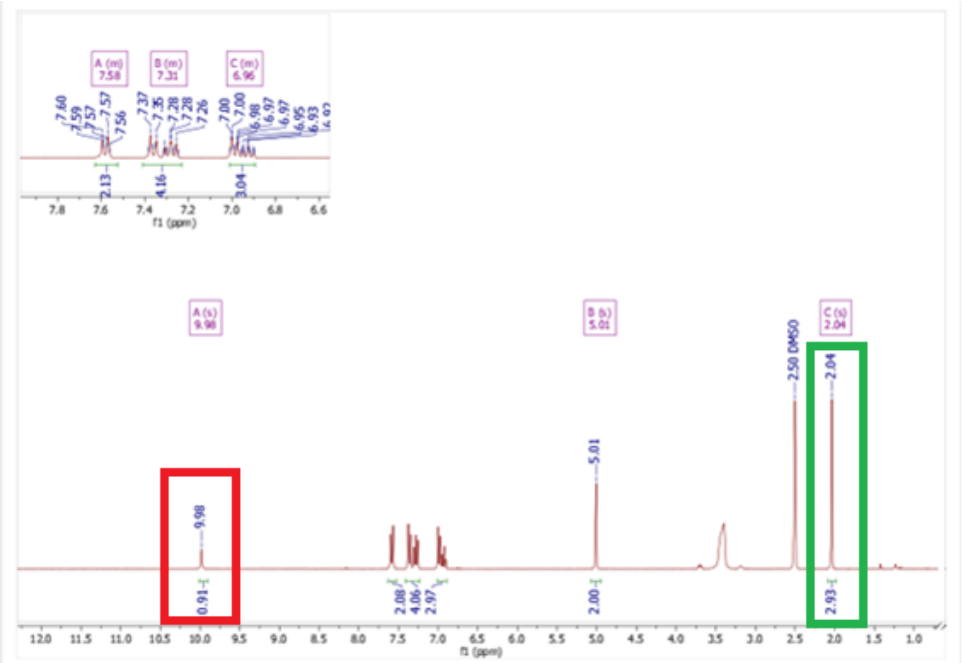
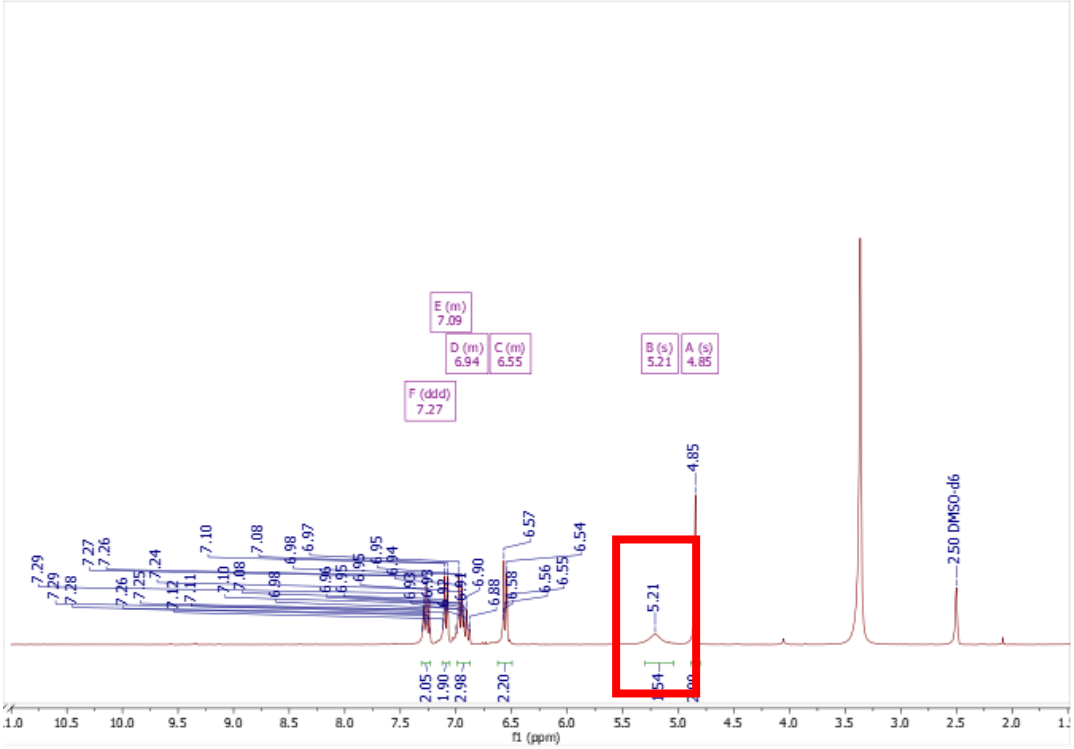


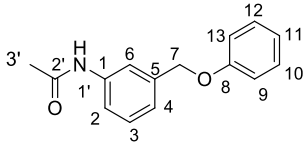
Figura 44. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**15**).



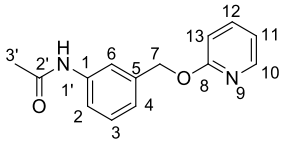
Para o composto (**16**) a soma das integrais dos sinais apresentados é de 12 hidrogênios. Os hidrogênios da amina apresentam-se como simpleto, integrando para 2 hidrogênios em δ 5,08. Alguns dos hidrogênios aromáticos estão entre δ 6,04 a 7,14, apresentando-se como multipletos e sem constante de acoplamento definidas devido a sobreposição dos sinais. Porém, assim como o composto anterior, para alguns hidrogênios foi possível identificar a constante de acoplamento, a exemplo do H_3 em δ 6,37 que apresenta-se como duplo dupleto com J_{meta}= 1,9 Hz, e o H_6 com J_{orto}= 9,1 Hz em relação ao H_4. O H_6 integra para 1 hidrogênio e apresenta-se como dupleto em δ 6,51 e com constante de acoplamento J_{meta}= 2 Hz, indicando seu acoplamento em meta com o H_4. O H_{10} integra para um hidrogênio com δ 7,67 e apresenta-se como duplo dupleto indicando seu acoplamento em orto (J_{orto}= 6,7 Hz) com o H_{11} e em meta (J_{meta}= 2,1 Hz) com H_{12}. O H_{12} é visualizado em δ 7,35 integrando para um hidrogênio, e apresenta-se como um duplo duplo dupleto com acoplamento em *orto* com os hidrogênios H_{13} e H_{11} (J_{orto}= 6,5 Hz e J_{orto}= 8,9 Hz) e em *meta* com o hidrogênio H_{10} (J_{meta}= 2,1 Hz). No anel piridínico, temos o hidrogênio H_{13} em δ 6,49 como um duplo dupleto integrando para um

hidrogênio e acoplando na posição *orto* (J_{orto}= 8,4 Hz) com o hidrogênio H_{12} e em *meta* (J_{meta}= 1,9 Hz) com o hidrogênio H_{11}. Por fim, temos em δ 4,87 o deslocamento dos hidrogênios do carbono metilênico, apresentando-se como um singleto e integrando para 2 hidrogênios. A Tabela 6 apresenta os deslocamentos deste composto.

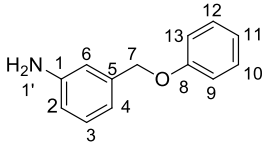
Tabela 6. Deslocamentos químicos de RMN 1H dos compostos (**13**), (**14**), (**15**) e (**16**).



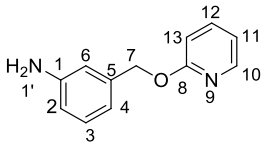
Composto (13)



Composto (14)



Composto (15)

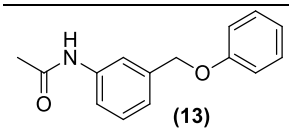
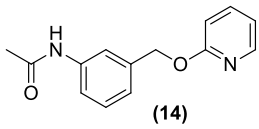
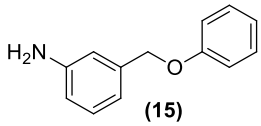
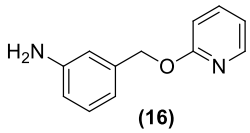


Composto (16)

Posição	δ ^{1}H	δ ^{1}H	δ ^{1}H	δ ^{1}H
1	-	-	-	-
2	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	6,66 – 6,34 (m)	6,37 (dd; J= 9,1Hz; J= 1,4 Hz, 1H)
3	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	7,14 – 7,02 (m)	7,13 – 6,66 (m)
4	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	7,14 – 7,02 (m)	7,13 – 6,86 (m)
5	-	-	-	-
6	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	6,66 – 6,34 (m)	6,51 (d; J= 2 Hz, 1H)
7	5,01(s, 2H)	5,01 (s, 2H)	4,85 (s, 2H)	4,87 (s, 2H)
8	6,84 – 7,64 (m)	-	-	-
9	6,84 – 7,64 (m)	-	7,00 – 6,81 (m)	-
10	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	7,27 (ddd; J= 8,4Hz; J= 1,9Hz; 2H)	7,67 (dd; J= 6,7Hz; J= 2,1Hz; 1H)
11	6,84 – 7,64 (m)	6,22 (td; J= 6,6Hz; J= 6,6Hz; J=1,4Hz)	7,00 – 6,81 (m)	6,26 – 6,04 (m)
12	6,84 – 7,64 (m)	7,2 – 7,8 (m)	7,27 (ddd; J= 8,4Hz; J= 1,9Hz; 2H)	7,35 (ddd; J= 6,5 Hz; J= 6,5HZ; J=2,1Hz; 1H)
13	6,84 – 7,64 (m)	6,40 (dd; J= 6,6Hz; J=1,4Hz; 1H)	7,00 – 6,81 (m)	6,49 (dd; J= 6,5Hz; J= 2,1Hz)
1’	9,98 (s, 1H)	9,94 (s, 1H)	5,21 (s, 2H)	5,08 (s, 2H)
2’	-	-		
3’	2,04 (s, 3H)	2,01 (s, 3H)		

Na Tabela 7 são apresentadas as propriedades físico-químicas dos compostos (**13**), (**14**), (**15**) e (**16**).

Tabela 7. Propriedades físico-químicas dos compostos (**13**), (**14**), (**15**) e (**16**).

	Cor	Rendimento	Faixa de fusão	Rf*
 (13)	Branco	65%	120°C-128°C	0,36
 (14)	Amarelo	72%	200,6°C-206,8°C	0,41
 (15)	Amarelo	68%	131°C-137,2°C	0,64
 (16)	Amarelo	75%	215,8°C-220,6°C	0,5

*fase móvel: eluição (1:1) hexano: acetato de etila.

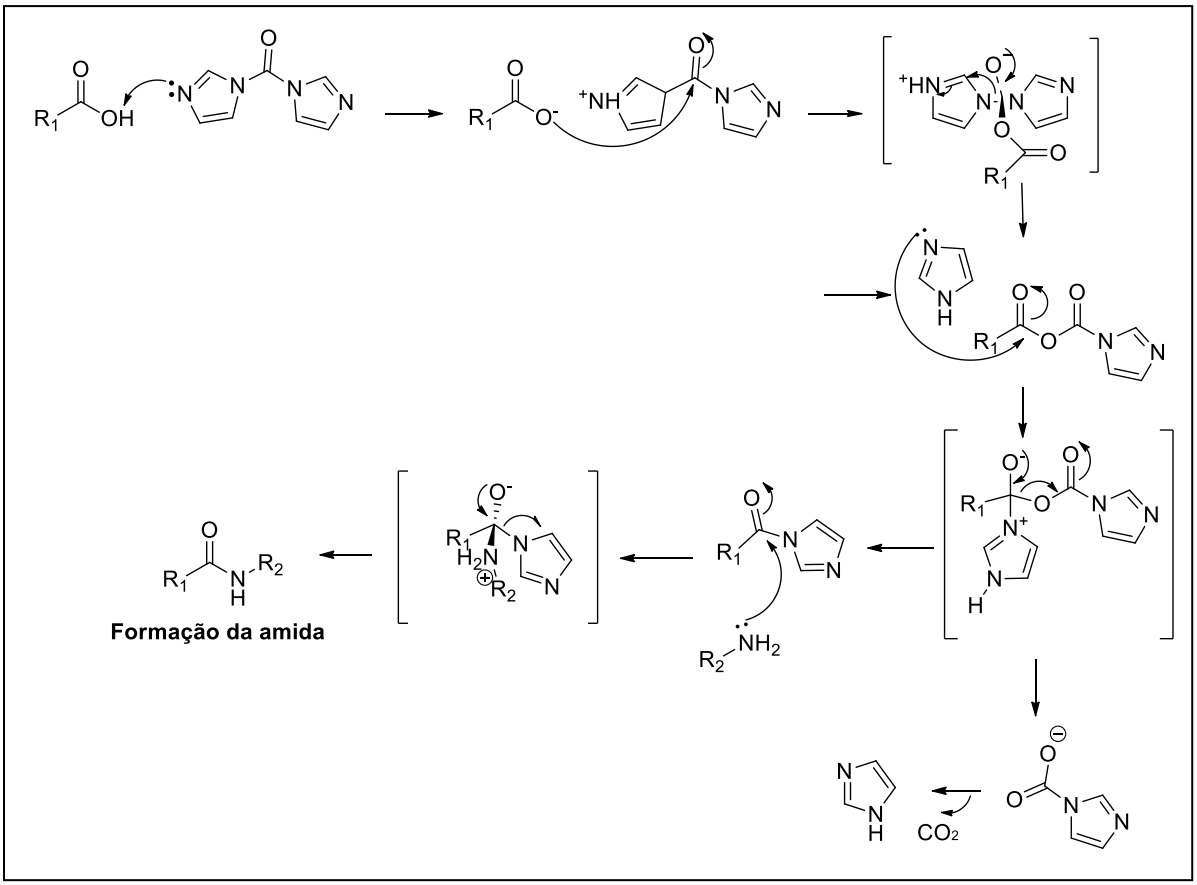
4.3. Reação de acoplamento para formação dos produtos finais contendo a função amida

Na última etapa para obtenção dos produtos finais (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**), ocorreu a reação de acoplamento entre a função ácido carboxílico dos benzofuroxanos (**8**) e (**9**) com as aminas previamente obtidas no bloco B. Os produtos finais foram obtidos como sólidos e em rendimentos que variaram de 21% a 25%. As faixas de fusão dos produtos finais foram caracterizadas e estão apresentadas na Tabela 8.

Para essas reações de acoplamento foram utilizados dois agentes acoplantes a saber, o CDI e o HATU. A diferença no uso entre esses agentes ocorreu porque durante o desenvolvimento da metodologia sintética não foi possível identificar um único agente acoplante que permitisse a obtenção dos produtos com rendimentos adequados.

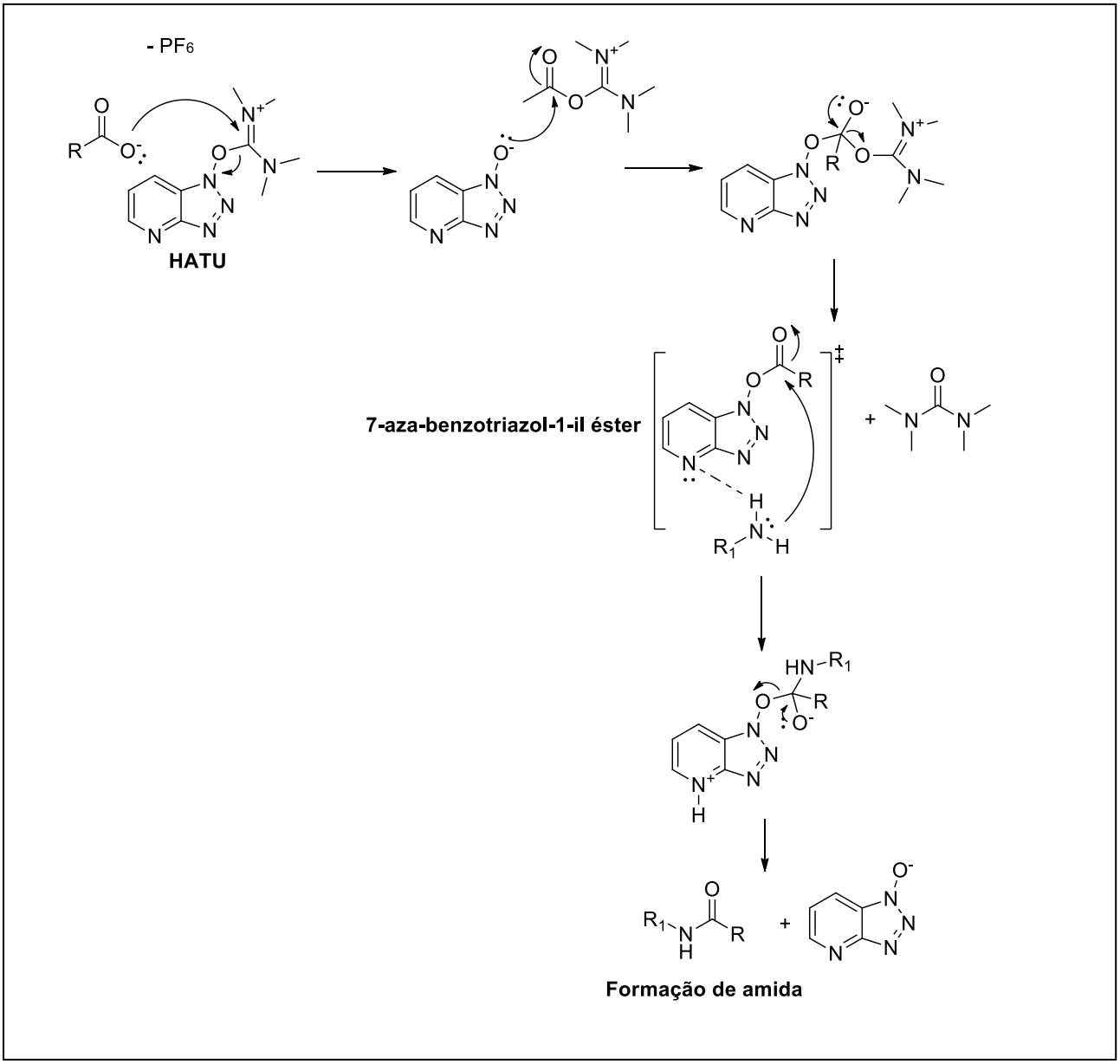
Os mecanismos reacionais envolvidos com o uso dos agentes acoplantes são apresentados a seguir nas Figuras 45 e 46. Para o agente acoplante 1,1' – carbonildiimidazole (CDI), os elétrons livres do nitrogênio imidazólico atuam como base abstraindo o próton da hidroxila do ácido. O carboxilato formado é nucleofílico e realiza o ataque à carbonila do CDI, levando a formação de um intermediário tetraédrico que sofre rearranjo para formação da amida, conforme apresentado na Figura 45 (STAAB, 1966).

Figura 45. Esquema proposto para o mecanismo de reação envolvendo o agente acoplante CDI para formação da amida.



Com agente acoplante (1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol [4,5-*b*]piridino 3-*N*-óxido hexafluorofosfato (HATU) foram obtidos os compostos (**17**), (**23**) e (**27**) com rendimentos de 21%; 21,5% e 22%, respectivamente. O HATU é um agente acoplante da classe dos sais de urônio, muito empregado em metodologias de formação de ligações peptídicas. A formação de um intermediário éster 7-aza-benzotriazol-1-il durante a reação favorece o ataque nucleofílico das aminas, sendo sua reatividade associada à capacidade de gerar uma catálise básica pela presença do anel piridínico em sua estrutura, conforme destacado na Figura 45 (MONTALBETTI; FALQUE, 2005).

Figura 46. Esquema proposto para o mecanismo de reação envolvendo o agente acoplante HATU para formação da amida.



Para o composto (**17**), a soma das integrais dos sinais apresentados é de 15 hidrogênios. Para a ligação peptídica, observa-se em δ 10,49 um simpleto integrando para 1 hidrogênio referente à amida. Os hidrogênios aromáticos aparecem como multipletos na região entre δ 6,58 a 8,07. Para estes há sobreposição, inclusive, dos hidrogênios H_4 e H_5 do sistema benzofuroxano. O H_2 pode ser visualizado em δ 8,25 como um dupleto, integrando para um hidrogênio, e acoplamento na posição *meta* com o hidrogênio H_4 (J_{meta}= 2 Hz). No espectro de RMN de ^{13}C do composto (**17**) destacam-se o carbono metilênico C_{15} com deslocamento em δ 46,36 ligado a um átomo de oxigênio, deslocamento este que normalmente encontrado entre δ 40 – δ 80. Destacam-se também no intervalo de δ112,43 – δ 138,02 os carbonos referentes aos anéis aromáticos presentes na molécula. O carbono C_7 em δ 155, 29 refere-se à carbonila do grupo funcional amida, em que a faixa de deslocamento deste grupo varia entre δ 155-185, o que sugere a formação deste grupo funcional.

Para o composto (**18**), a soma das integrais dos sinais apresentados é de 18 hidrogênios. Para a ligação peptídica, observa-se em δ 10,49 um simpleto integrando para 1 hidrogênio referente à amida. Os hidrogênios aromáticos aparecem como multipletos na região entre δ 7,26 a 7,72. Os hidrogênios do sistema benzofuroxano H_2, H_4 e H_5 também podem ser visualizados nesse espectro. Em δ 8,29 tem-se o hidrogênio H_2 como dupleto acoplando em *meta* com o hidrogênio H_4 (J_{meta}= 2Hz). Em δ 7,77 tem-se o hidrogênio H_4 como duplo dupleto acoplando em *orto* com o hidrogênio H_5 (J_{orto}= 8 Hz) e em *meta* com o hidrogênio H_2 (J_{meta}= 2 Hz). Em δ 7,79 é possível visualizar o hidrogênio H_5 como dupleto acoplando em *orto* com o H_4 (J_{orto}= 8,4 Hz). Por fim temos os hidrogênios H_{18}, H_{19} e H_{20} do anel piridínico. Em δ 6,26 é possível visualizar o hidrogênio H_{18} integrando em *orto* com os hidrogênios H_{17} e H_{19} (J_{orto}= 6,4 Hz) e em *meta* com o hidrogênio H_{20} (J_{meta}= 1,4 Hz). Em δ 7,43 tem-se o hidrogênio H_{19} como duplo duplo dupleto acoplando na posição *orto* com os hidrogênios H_{18} e H_{20} (J_{orto}= 8,9 Hz; J_{orto}= 6,6 Hz). Para o hidrogênio H_{20} é possível o visualizar em δ 6,43 como duplo dubleto acoplando em *orto* com o hidrogênio H_{19} (J_{orto}= 8,6 Hz) e em *meta* com o hidrogênio H_{18} (J_{meta}= 1,4 Hz).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto (**18**) destacam-se o carbono metilênico C_{15} com deslocamento em δ 67,17. Destacam-se também no intervalo de δ106,20 – 140,58 os carbonos referentes aos anéis aromáticos presentes na molécula. O carbono C_7 em δ 161,90 refere-se à carbonila do grupo funcional amida, o que sugere a formação deste grupo funcional.

Para ilustrar, podemos destacar alguns pontos importantes das estruturas. A Figura 47 traz o espectro de ^{1}H do intermediário aminado (**16)** e a Figura 48, o composto final (**18)**. Neste é possível identificar a ausência do sinal da amina (destacado em vermelho na Figura 46). No espectro da Figura 47, verifica-se o surgimento de um sinal na região de δ 10,49 ppm (destacado em vermelho), sugerindo a formação da amida.

Figura 47. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**16**).

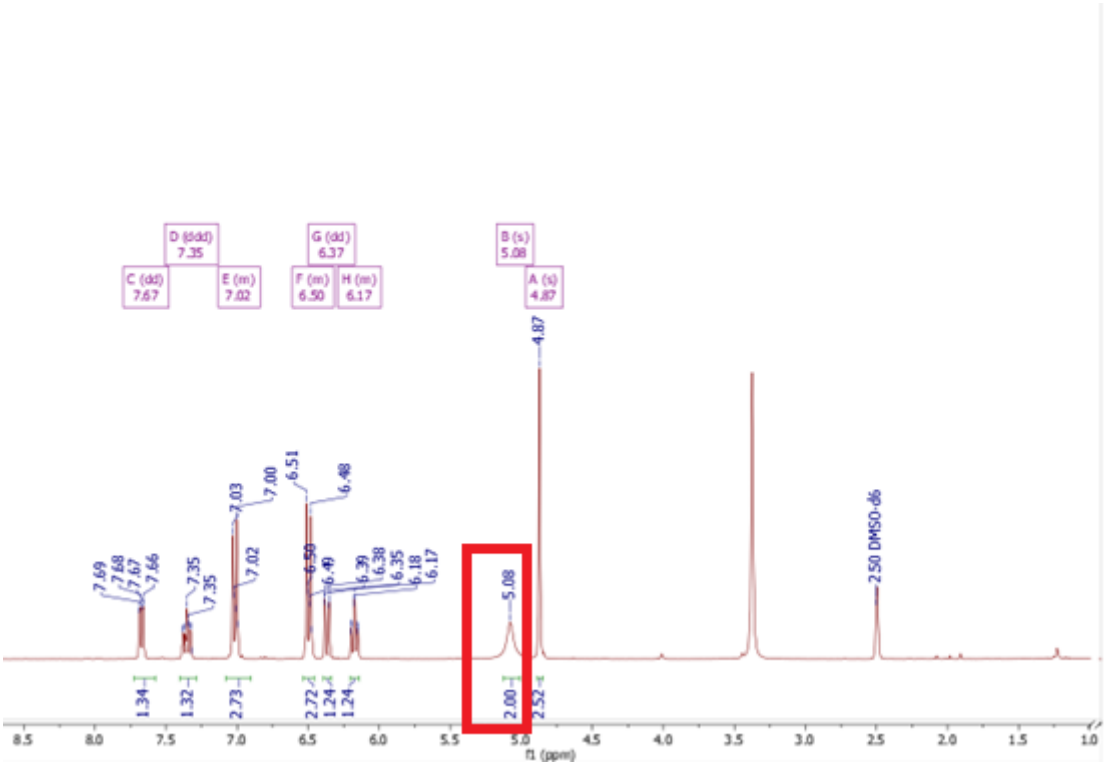
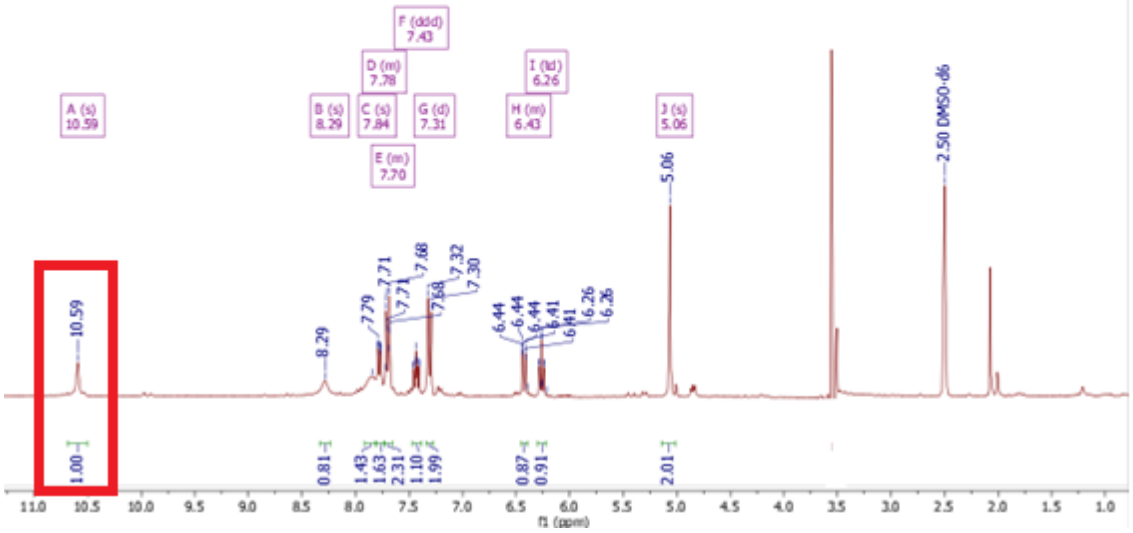


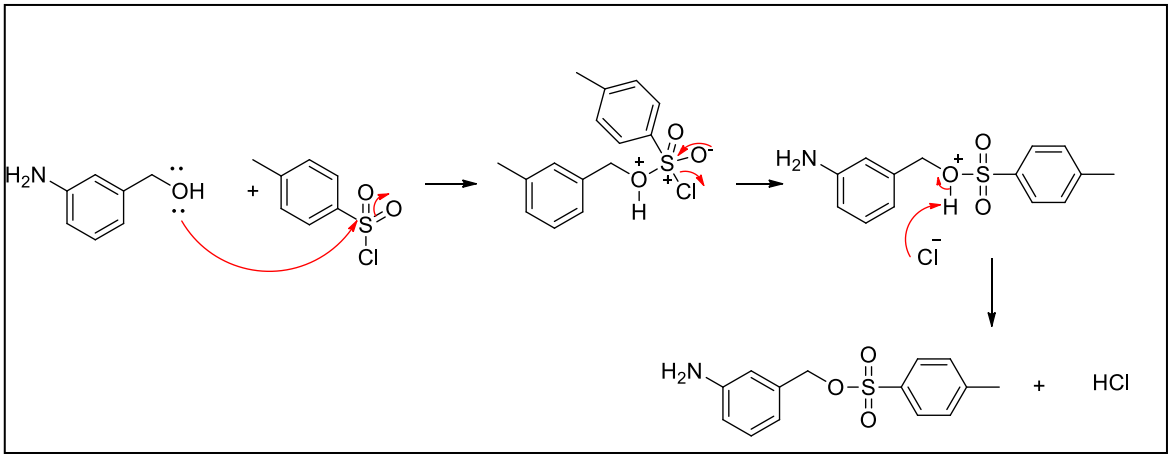
Figura 48. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**18**).



A formação do composto 3-aminobenzil-4-metilbenzenossulfonato (**22**) ocorreu por meio da reação de tosilação, cujo mecanismo está representado na Figura 49. A reação de tosilação é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, em que o nucleófilo (**19**) faz o ataque ao centro positivo representado pelo enxofre do grupo tosil, promovendo o rompimento da ligação sp^2 enxofre-oxigênio. Ao reestabelecer a dupla ligação, o cloro é eliminado como Cl-. Em seguida, este atuando como base captura o hidrogênio ligado ao O^+ para estabelecer o octeto, como apresentado no mecanismo da Figura 49.

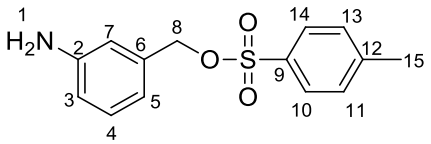
O acompanhamento reacional para formação de (**22**) foi realizado por CCD utilizando como fase móvel a eluição (4:6) hexano: acetato de etila, e a visualização das placas cromatográficas foi realizada sob luz ultravioleta (254 nm), sendo que o R_f obtido para o composto (**22**) foi de 0,76. O composto (**22**) foi obtido como um sólido de coloração marrom com rendimento de 66,7 %. A faixa do ponto de fusão deste composto foi de 95,2 - 100ºC.

Figura 49. Esquema proposto para mecanismo de reação de tosilação.



A caracterização química do composto (**22**) foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^{1}H). A Tabela 8 apresenta os deslocamentos químicos do (**22**) e o espectro de RMN de ^{1}H é apresentado na seção de anexo. Os hidrogênios do anel aromático H_3 e H_6 apresentam-se como dupletos, cada um integrando para um hidrogênio em δ 7.90 (J_{orto} = 8,4 Hz) e δ 8,55 (J_{meta} = 1,9 Hz), respectivamente. O hidrogênio H_4 apresentou-se como um duplo dupleto integrando para um hidrogênio em δ 8,29 (J = 8,4; 2,0 Hz), devido ao seu acoplamento com os hidrogênios H_3 em *orto* e H_6 *meta*. O hidrogênio da função ácido carboxílico não aparece no espectro devido troca com átomos de deutério do solvente deuterado.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H do composto (**22**).



Composto (22)

Posição	δ ^{1}H
1	5,23 (s)
2	-
3	6,92 (dd; J= 7,8 Hz;1,5Hz 1H)
4	7,12 (t; J= 7,8 Hz, 1H)

5	6,95 (dd, J= 1,5 Hz; 7,8 Hz 1H)
6	-
7	7,09 (s)
8	4,37 (s)
9	-
10	7,65 (d; J= 8,2 Hz; 1H)
11	7,29 (d; J= 8,2 Hz; 1H)
12	-
13	7,30 (d; J= 8Hz; 1H)
14	7,65 (d; J= 8 Hz, 1H)
15	2,27 (s)

A Tabela 9 apresenta os deslocamentos químicos dos compostos (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), e a Tabela 10, os deslocamentos químicos dos compostos (**27**), (**28**) e (**30**). Os espectros de RMN de ^{1}H e ^{13}C são apresentados na seção de anexo.

No composto (**23**), os hidrogênios do anel aromático do sistema *p*-toluenofenil que se encontram na posição H_{17} e H_{19} bem como H_{16} e H_{20} são visualizados como dupletos, integrando para dois hidrogênios em δ 7.66 (J_{orto} = 8,1 Hz) e δ 7,29 (J_{orto} = 8,1 Hz), respectivamente. Da mesma forma, esses hidrogênios podem ser visualizados como dupletos, integrando para dois hidrogênios em δ 7.66 (J_{orto} = 7,9 Hz) e δ 7,31 (J_{orto} = 8,1 Hz) para o composto (**24**); dupletos, integrando para dois hidrogênios em δ 7.63 (J_{orto} = 8,2 Hz) e δ 7,29 (J_{orto} = 7,9 Hz) para o composto (**27**); dupleto δ 7.62 (J_{orto} = 8 Hz) e multipleto 7,29-7,21 (m, 3H) para o composto (**28**); dupleto δ 7.62 (J_{orto} = 8 Hz) e multipleto 7,29-7,21 (m, 3H) para o composto (**30**).

O restante da molécula não é diferente do espectro anterior (**22**). A presença dos hidrogênios das amidas se apresentam como um singleto em δ 10,35 para os compostos (**23**), (**24**) e δ 10,33 para (**27**), (**28**) e (**30**). Para o composto (**23**) no sistema benzofuroxânico os hidrogênios H_3 (δ 7.24), H_4 (δ 7.79) e H_6 (δ 7.90) apresentam-se como dupleto (J_{orto}= 8 Hz), duplo dupleto (J_{orto}= 8 Hz, 2 Hz), dupleto (J_{orto}= 2 Hz).

Para o composto (**24**) os dois hidrogênios nas posições H_4 (δ 9.20) e H_6 (δ 7.66) apresentam-se como dupleto (J_{meta}= 1,9 Hz) e dupleto (J_{orto}= 8,66 Hz), respectivamente. Se compararmos com o benzofuroxano (**23**), os deslocamentos de hidrogênio do (**24**) são maiores devido a maior desblidagem induzida pelo anel piridínico, conforme previamente discutido.

Os compostos (**27**), (**28**) e (**30**) não possuem o sistema benzofuroxânico. Para o composto (**27**), tem-se presença dos hidrogênios nas posições H_1, H_3 e H_7 apresentando-se como dupletos com constantes de acoplamento J_{orto} = 8,3 Hz; J_{meta}= 1,9 Hz; J_{orto}= 8,3 Hz, respectivamente, e integrando para um hidrogênio em δ 7.91 e δ 8.28 e δ 7,95.

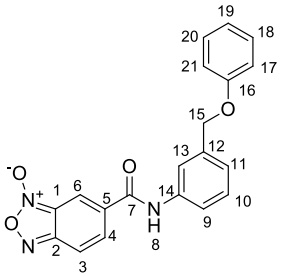
Para o (**28**), esses mesmos apresentam-se como duplo dupleto, multipleto e dupleto em δ 6.57 e δ 7.07-6.99 e δ 7,10. Para o composto (**30**), os mesmos apresentam-se como duplo dupleto, multipleto e dupleto em δ 6.57 e δ 7.07-6.99 e δ 7,10. Porém, diferente do composto (**27)**, nesses compostos (**28) e (30)** pode ser observado a presença dos hidrogênios da amina que no espectro aparecem como singletos em δ 6,90.

No espectro de RMN de ^{13}C dos compostos (**23)** e **(24)** é possível destacar o deslocamento do carbono C_{22} em δ 21,93 - mais desblindado por conta do efeito de retirada de elétrons do sistema benzofuroxânico -, e o carbono da metila em δ 21,14.

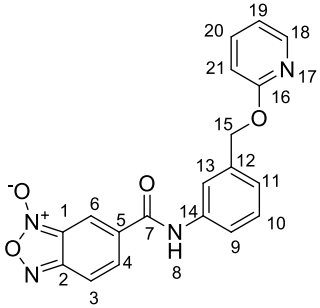
Já para os compostos (**27**), (**28**) e (**30**) o carbono C_{23} correspondente a metila pode ser visualizado nos deslocamentos em δ 21,35; δ 21,43 e δ 21,07; mais blindado por conta da presença da amina no sistema piridínico. Em δ 67,17 para o composto (**23**) e δ 67,12 para o (**24**) tem-se o carbono metilênico C_{15} ligado a um átomo de oxigênio. O correspondente a ele nas estruturas (**27**), (**28**) e (**30**) o C_{16} apresenta os deslocamentos em δ 67,92; δ 65,88 e δ 65,19 respectivamente. Destacam-se também no intervalo de δ117,57 – 144,05 (**23**); δ119,00 – 143,81 (**24**); δ119,62 – 149,34 (**27**); δ105,04 – 159,95 (**28**); δ107,61 – 152,47 (**30**) os carbonos referentes aos anéis aromáticos presentes nas moléculas. O carbono C_7 em δ 164,04 (**23**) e δ162,64 (**24**); e o C_8 em δ163,82 (**27**); δ166,66 (**28**); δ166,47 (**30**) referem-se à carbonila do grupo funcional amida, sugerindo a formação da amida nestes compostos.

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando grupos químicos característicos dos compostos derivados *p*-toluenosulfonil (**23)**, (**24)**, (**27)**, (**28)** e (**30),** como por exemplo, o surgimento de um estiramento axial por volta de 1640 – 1700 cm^{-1} representando a carbonila da amida formada bem como o estiramento axial referente a ligação S=O por volta de 1300 – 1375 $cm^{-1,}$ referente ao grupo tosil.

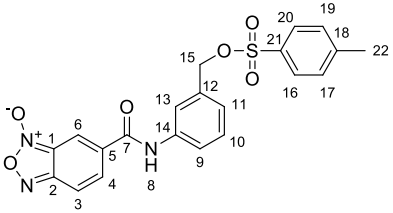
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H e ^{13}C dos compostos (**17**), (**18**), (**23**) e (**24**).



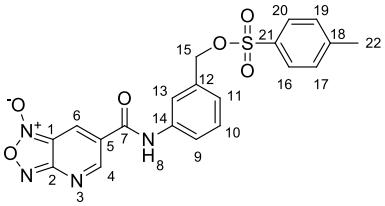
Composto (17)



Composto (18)



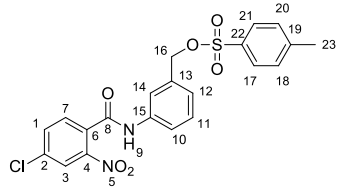
Composto (23)



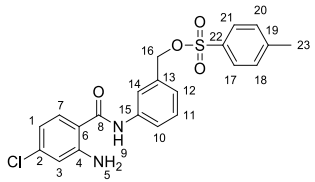
Composto (24)

Posição	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C
1	-	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 – 143,81
2	-	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 – 143,81
3	7,92 – 7,80 (m)	112,43 – 138,02	7,79(d, J= 8,4Hz; 1H)	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 – 143,81
4	8,07 – 7,92 (m)	112,43 – 138,02	7,77(dd, J= 8,4Hz,J= 2 Hz,1H)	106,20 – 140,58	7,79(dd; J= 8Hz; J= 2Hz, 1H)	117,57 – 144,08	9,20 (d; J= 1,9Hz; 1H)	119,00 – 143,81
5	-	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 - 143,81
6	8,25 (s, 1H)	112,43 – 138,02	8,29(d; J= 2Hz; 1H)	106,20 – 140,58	7,9 (d; J=2Hz; 1H)	117,57 – 144,08	8,66(d; J=1,9Hz; 1H)	119,00 – 143,81
7	-	155,29	-	161,90	-	164,04	-	162,64
8	10,49 (s)	-	10,59 (s)	-	10,35 (s)	-	10,36 (s)	-
9	6,72 – 6,58 (m)	112,43 – 138,02	7,72 – 7,67 (m)	106,20 – 140,58	7,27 – 7,22 (m)	117,57 – 144,08	7,25 (dd; J= 8,1 Hz, J= 2Hz, 1H)	119,00 – 143,81
10	7,72 – 7,58 (m)	112,43 – 138,02	7,34 – 7,26 (m)	106,20 – 140,58	7,27 – 7,22 (m)	117,57 – 144,08	7,16 (d; J= 8,1Hz; 1H)	119,00 – 143,81
11	7,23 – 7,13 (m)	112,43 – 138,02	7,34 – 7,26 (m)	106,20 – 140,58	7,11 – 7,01 (m)	117,57 – 144,08	7,06(dt; J= 7,9Hz,J=2,2 Hz; 1H)	119,00 – 143,81
12	7,72 – 7,88 (m)	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	7,60 (dt; J= 7,9Hz; J= 2,2Hz; 1H)	119,00 – 143,81
13	-	112,43 – 138,02	7,72 – 7,67 (m)	106,20 – 140,58	7,27 – 7,22 (m)	117,57 – 144,08	7,23 (d; J=1,9 Hz; 1H)	119,00 – 143,81
14	-	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	-	67,17	-	119,00 – 143,81
15	3,80 (s)	46,36	5,61 (s)	51,06	5,20 (s)	117,57 – 144,08	5,32 (s)	67,12
16	-	112,43 – 138,02	-	106,20 – 140,58	7,66(d; J= 8,1 Hz; 2H)	117,57 – 144,08	7,66 (d; J=7,9 Hz; 2H)	119,00 – 143,81
17	6,72 – 6,58 (m)	112,43 – 138,02	-	-	7,29(d; J= 8,1Hz; 2H)	117,57 – 144,08	7,31 (d; J=7,9Hz; 2H)	119,00 – 143,81
18	7,72 – 7,58 (m)	112,43 – 138,02	7,31 – 7,26 (m)	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 – 143,81
19	7,23 – 7,13 (m)	112,43 – 138,02	6,26 (td; J= 6,7Hz; J=1,4Hz; 1H)	106,20 – 140,58	7,29 (d; J= 8,1 Hz; 2H)	117,57 – 144,08	7,66(d; J= 8,1Hz; 2H)	119,00 – 143,81
20	7,04 – 6,96 (m)	112,43 – 138,02	7,43 (ddd; J= 6,7; J= 6,7Hz; J= 1,7; 1H)	106,20 – 140,58	7,66 (d; J= 8,1Hz; 2H)	117,57 – 144,08	7,31 (d; J=8,1Hz; 2H)	119,00 – 143,81
21	7,04 – 6,95 (m)	112,43 – 138,02	6,43 (dd; J= 6,7Hz; J= 1,4Hz; 1H)	106,20 – 140,58	-	117,57 – 144,08	-	119,00 – 143,81
22					2,29 (s)	21,93	2,31 (s)	21,14

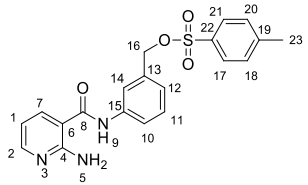
Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN ^{1}H e ^{13}C dos compostos (**27**), (**28**), e (**30**).



Composto (27)



Composto (28)



Composto (30)

Posição	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C	δ ^{1}H	δ ^{13}C
1	7,92 (dd; J= 8,3Hz; 2Hz, 1H)	119,62 – 149,34	6,57 (dd; J= 8,7Hz; J= 2,1Hz; 1H)	105,04 – 159,95	7,23 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
2	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	8,24(dd; J=7,5Hz; J=1,7Hz; 1H)	107,61 – 152,47
3	8,28 (d; J= 2Hz; 1H)	119,62 – 149,34	7,07 – 6,99 (m)	105,04 – 159,95	-	-
4	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	-	107,61 – 152,47
5	-	-	-	-	7,08 – 7,03 (m)	-
6	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	-	107,61 – 152,47
7	7,95(d; J= 8,3Hz; 1H)	119,62 – 149,34	7,19 (d; J= 8,7 Hz; 1H)	105,04 – 159,95	8,04(dd; J= 7,5Hz; J=1,7Hz; 1H)	107,61 – 152,47
8	-	163,82	-	166,66	-	166,47
9	10,33 (s)	-	10,33 (s)	-	10,34 (s)	-
10	7,05 (dt; J=7,9 Hz; J=2,2Hz; 2H)	119,62 – 149,34	7,69 (d; J=8,6Hz; 1H)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
11	7,23 (dd; J=7,9 Hz; 2H)	119,62 – 149,34	7,29 – 7,22 (m)	105,04 – 159,95	6,66 (dd; J= 8 Hz ; 1H)	107,61 – 152,47
12	7,05 (dt; J=7,9 Hz; J=2,2Hz; 2H)	119,62 – 149,34	7,07 – 6,99 (m)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
13	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	-	-
14	7,16 (d; J= 1,9Hz; 1H)	119,62 – 149,34	6,87 (d; J=2,1 Hz, 1H)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16	107,61 – 152,47
15	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	-	107,61 – 152,47
16	5,24 (s)	67,92	5,19 (s)	65,88	-	-
17	7,63 (d; J= 7,9 Hz, 2H)	119,62 – 149,34	7,62(d; J=8Hz; 2H)	105,04 – 159,95	7,61 (d; J= 8,2 Hz; 2H)	107,61 – 152,47
18	7,29 (d; J= 7,9Hz, 2H)	119,62 – 149,34	7,29 – 7,21 (m)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
19	-	119,62 – 149,34	7,29 – 7,21 (m)	105,04 – 159,95	7,61 (d; J= 8,2 Hz; 2H)	107,61 – 152,47
20	7,29 (d; J= 8,2Hz, 2H)	119,62 – 149,34	7,29 – 7,21 (m)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
21	7,63 (d; J= 8,2Hz, 2H)	119,62 – 149,34	7,62(d; J=8Hz; 2H)	105,04 – 159,95	7,29 – 7,16 (m)	107,61 – 152,47
22	-	119,62 – 149,34	-	105,04 – 159,95	-	106,61 – 152,47
23	2,29 (s)	21, 35	2,28 (s)	21,43	2,28 (s)	21,07

Hz

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho (IV) demonstrou a presença de bandas de absorção indicando os grupos químicos característicos dos compostos obtidos neste Bloco C. As tabelas 11 e 12 mostram os dados dessa caracterização.

Tabela 11. Bandas de absorção dos compostos (**17**) e (**18**) na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho.

Tipo de vibração / (cm^{-1})	(17)	(18)
vC-H (aromáticos)	2924,09	3076,46
vC=C(aromáticos)	1500,62	1606,70
vC=O (amida)	1618,28	1654,92
v N-H (amida)	3412,06	3290,56
δ N-H (amida)	1550,77	1577,77
v N-O (benzofuroxano)	1529,55	1535,34

v: estiramento axial; δ: estiramento angular.

Tabela 12. Bandas de absorção dos compostos (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**) na caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

Tipo de vibração / (cm^{-1})	(23)	(24)	(27)	(28)	(30)
vC-H (aromáticos)	2922,16	2931,80	2920,23	2924,09	2924,09
vC=C(aromáticos)	1614,42	1593,20	1597,06	1614,42	1610,56
C=O (amida)	1726,29	1735,93	1734,01	1697,36	1697,36
v N-H (amida)	3261,81	3508,52	3269,34	3500,80	3481,51
δ N-H (amida)	1614,42	1531,48	1541,12	1506,41	1466,28
S=O	1332,81	1346,31	1350,17	1338,60	1338,60
C-N (amina)				1091,71	1089,78

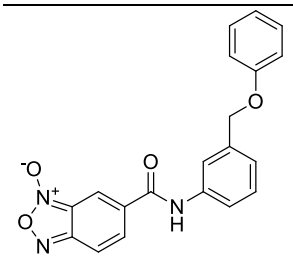
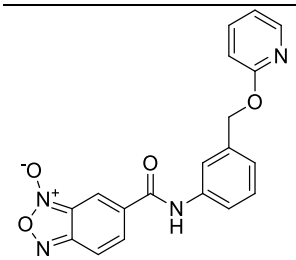
v: estiramento axial; δ: estiramento angular

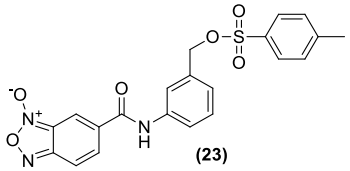
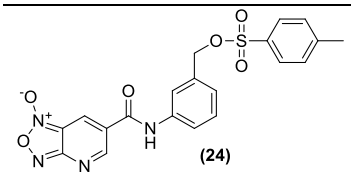
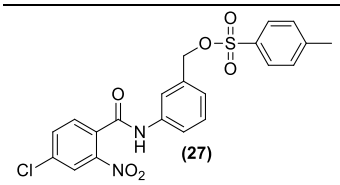
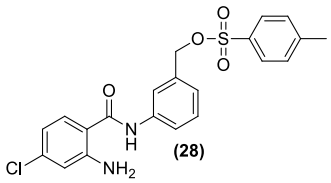
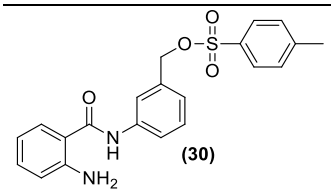
Os dados dos espectros na região do infravermelho destes compostos (**23**, **24**, **27**,**28** e **30**) são apresentados na seção de anexo. É possível destacar um estiramento axial por volta de 1700 – 1640 cm^{-1} referente à carbonila da amida. Nos intermediários do bloco A, havia nessa região a carbonila do ácido

carboxílico com estiramento axial por volta 1725 – 1700 cm^{-1}, que nos produtos finais está ausente. Também se nota a ausência do estiramento referente a ligação C-N do grupo funcional amina por volta de 1000 – 1100 cm^{-1}, sugerindo o sucesso do acoplamento desta com os ácidos, resultado da formação da amida. Esse mesmo estiramento aparece nos compostos (**28**) e (**30**), pois estes apresentam a amina na posição *orto* em relação a amida formada.

Na Tabela 13 encontram-se as propriedades físico-químicas dos 7 compostos obtidos no Bloco C. Para os compostos (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**) os rendimentos variaram de 21% a 49%. Todos foram obtidos como sólidos de coloração amarelo ou marrom. Os valores de Rf usando como fase móvel (1:1) hexano: acetato de etila, variaram de 0,45 – 0,83. O composto (**18**) foi aquele que apresentou mais alta faixa de fusão (188°C-192,6°C).

Tabela 13. Propriedades físico-químicas dos compostos (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**).

	Cor	Rendimento	Faixa de fusão	Rf
 **(17)**	Amarelo	21%	81°C-85,4°C	0,83
 **(18)**	Amarelo	25%	188°C-192,6°C	0,69

 (23)	Marrom	21,5%	58,7°C-60,4°C	0,70
 (24)	Amarelo	49%	151°C-155,5°C	0,74
 (27)	Amarelo	22%	61,7°C-65°C	0,80
 (28)	Amarelo	49%	72,3°C-76°C	0,78
 (30)	Marrom	37%	54,5°C-58,5°C	0,45

*fase móvel: eluição (1:1) hexano: acetato de etila.

Os dados de caracterização estrutural sugerem a obtenção dos produtos finais (**17**), (**18**), (**23**), (**24**), (**27**), (**28**) e (**30**). Para estes produtos finais, outros

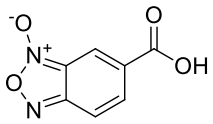
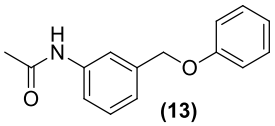
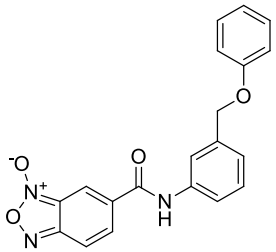
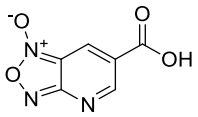
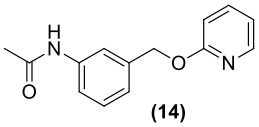
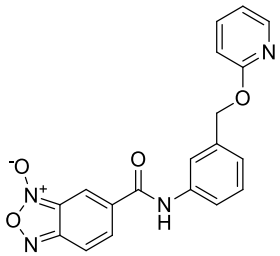
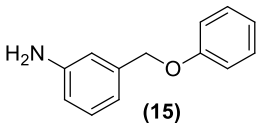
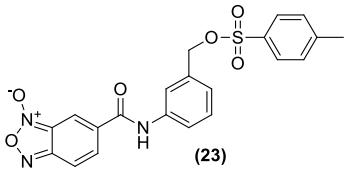
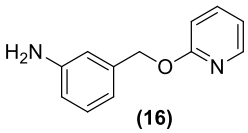
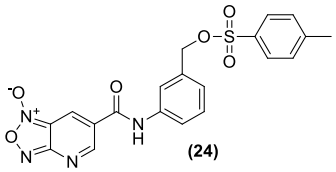
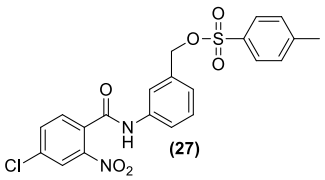
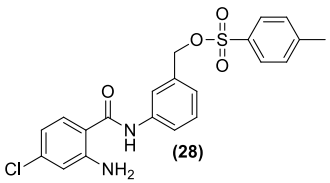
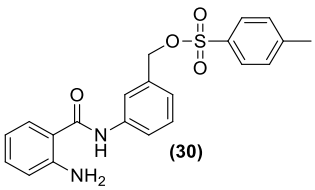
métodos de caracterização como espectrometria de massas e análise elementar serão ainda realizados.

5.CONCLUSÃO

Este trabalho visou o planejamento, síntese e caracterização estrutural de novos compostos derivados do APX001A como nova alternativa no tratamento IFIs utilizando a estratégia da estrutura baseada no alvo enzima Gwt1. Neste estudo foram obtidos 7 produtos finais baseados na estrutura do APX001A. Os produtos finais (bloco C), tiveram seus rendimentos variando de 21% a 49%. Além disso, foram sintetizados também 7 intermediários, os quais tiveram seus rendimentos variando entre 40% a 89%. A caracterização estrutural realizada por meio de RMN unidimensional e espectroscopia de infravermelho, sugere a obtenção dessas moléculas.

A Tabela 14 apresenta todas as estruturas obtidas nessa pesquisa, tanto dos intermediários quanto dos produtos finais. Como perspectiva, outros métodos de caracterização estrutural serão utilizados, e estes produtos serão avaliados quanto à atividade antifúngica em parceria com a professora Ana Marisa Fusco do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Os compostos serão testados frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Histoplasma capsulatum* (EH-315) e *Cryptococcus neoformans* para determinação da CIM e da Concentração Fungicida Mínima, bem como avaliar a atividade antibiofilme de *Candida albicans*. Para determinação da CIM e da CFM serão utilizados controles positivo (Anfotericina B, Caspofungina e Itraconazol) e negativo (sem tratamento), seguindo o Protocolo Clinical and Laboratory Standards Institute **(CLSI) M27- A3** (2008) para *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis* e *H. capsulatum* **CLSI (M27-A3) com modificações** propostas por Ren-Kai Li *et al*. (2000), Wheat *et al*. (2001) e Kathuria *et al*. (2014).

Tabela 14. Compostos obtidos no projeto. Intermediários dos blocos A e B e produtos finais do bloco C, E, G e H.

INTERMEDIÁRIOS BLOCO A	INTERMEDIÁRIOS BLOCO B	PRODUTOS FINAIS
 (8)	 (13)	 (17)
 (9)	 (14)	 (18)
	 (15)	 (23)
	 (16)	 (24)
		 (27)
		 (28)
		 (30)

6. REFERÊNCIAS

AGUILAR-ZAPATA, D.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. Suppl 6, p. S604–S611, 2015.

ALSPAUGH, J. A. New Spins on Old Drugs: Enhancing Activity of Antifungals. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 3, p. 255–256, 2020.

ARENDRUP, M. C.; JØRGENSEN, M. In Vitro Activity of Ibrexafungerp (SCY-078) against Candida auris Isolates as Determined by EUCAST Methodology and Comparison with Activity against C. albicans and C. glabrata and with the Activities of Six Comparator Agents. v. 64, n. 3, p. 1–6, 2020.

BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. 2020.

BALASOPOULOU, A. *et al*. Symposium Recent advances and challenges in the management of retinoblastoma Globe - saving Treatments. **BMC Ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 1, 2017.

BERGAMO, V. Z. *et al*. Novas tendências de combate ao biofilme de Candida em próteses dentárias. **Clinical & Biomedical Research**, v. 38, n. 2, p. 155–166, 2018.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438, 2011.

BOELAERT, J. *et al*. Itraconazole pharmacokinetics in patients with renal dysfunction. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 10, p. 1595–1597, 1988.
CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 3, p. 393–402, 2017.
CARVER, P. L. Micafungin. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 10, p. 1707–1721, 2004.

CHANG, C. C.; LEVITZ, S. M. Fungal immunology in clinical practice: Magical realism or practical reality? **Medical Mycology**, v. 57, p. S294–S306, 2019.

CLISSOLD, S. M.; GRANT, S. P. Itraconazole A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Superficial and Systemic Mycoses. **Drugs**, v. 37, p. 310–344, 1989.

COURTNEY, R. et al. Posaconazole pharmacokinetics, safety, and tolerability in subjects with varying degrees of chronic renal disease. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 185–192, 2005.

COVEL, J. A. ; SOLTOW, Q. A.; KAPOOR, M.; MOLONEY, M. K.; WEBB, P. J.; TRZOSS, M.; SHARP, M.; SHAW, K. J. **The Discovery of manogepix/fosmanogepix and other Gwt1 inhibitors for the treatment of invasive fungal infections**. Foster City, California, U.S.A.: Infectious diseases.

Gilead Sciences, Inc., 2019.

CRISTINA LAZZARINI, KRUPANANDAN HARANAHALLI, J. BRIAN MCCARTHY, E JOHN MALLAMO, E IWAO OJIMA, D.; MAURIZIO DEL POETAA. Preclinical Evaluation of Acylhydrazone SB-AF-1002 as a Novel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. 1–14, 2020.

DENNING, D.; JUGESSUR, J. Hidden crisis : How 150 people die every hour from fungal infection while the world turns a blind eye. **Global Action Fund and Fungal Infections**, p. 1–3, 2016.

FUJITA2, T. K. AND M. Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. **Journal of lipid research**, v. 57, n. 1, p. 6–24, 2015.

GALKINA, I. V *et al*. Synthesis and Antimicrobial Activity of Bis-4 , 6-sulfonamidated 5 , 7-Dinitrobenzofuroxans. v. 2014, 2014.

GEISSEL, B. *et al*. Azole-induced cell wall carbohydrate patches kill Aspergillus fumigatus. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

GUTIERREZ-CIRLOS, E. B.; MERBITZ-ZAHRADNIK, T.; TRUMPOWER, B. L. Inhibition of the Yeast Cytochrome bc1 Complex by Ilicicolin H, a Novel Inhibitor that Acts at the Qn Site of the bc1 Complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8708–8714, 2004.

HARANAHALLI, K. *et al*. SAR Studies on Aromatic Acylhydrazone-Based Inhibitors of Fungal Sphingolipid Synthesis as Next-Generation Antifungal Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 8249–8273, 2020. HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, 2020.

KAWAGOE, K. *et al*. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. **Blood**, v. 87, n. 9, p. 3600–3606, 1996.

KOSELNY, K. *et al.* The celecoxib derivative AR-12 has broad-spectrum antifungal activity in vitro and improves the activity of fluconazole in a murine model of cryptococcosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 12, p. 7115–7127, 2016.

KRISHNAN, B. R. *et al*. CD101, a novel echinocandin with exceptional stability properties and enhanced aqueous solubility. **Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 2, p. 130–135, 2017.

KUMAR, A. *et al*. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive Candida infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 116–128, 2018.

LATGE, J. P. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. **Trends in**

Microbiology, v. 9, n. 8, p. 382–389, 2001.

LIU, N. *et al*. Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5484–5511, 2018.

MAHALAXMI, I.; JAYARAMAYYA, K.; VENKATESAN, D. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . n. January, 2020.

MALANI, A. N.; KERR, L. E.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: How to Use This Antifungal Agent and What to Expect. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 786–795, 2015.

MELETIADIS, J. *et al*. Differential fungicidal activities of amphotericin B and voriconazole against Aspergillus species determined by microbroth methodology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3329–3337, 2007.

MICELI, M. H.; KAUFFMAN, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 10, p. 1558–1565, 2015.

MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827–10852, 2005.

MOTA FERNANDES, C. *et al*. The Future of Antifungal Drug Therapy: Novel Compounds and Targets. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 2, 2021.

NAKAMOTO, K. *et al*. Synthesis and evaluation of novel antifungal agents-quinoline and pyridine amide derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 15, p. 4624–4626, 2010.

NICOLE M. REVIE1,†, KALI R. IYER1,†, NICOLE ROBBINS1, AND L. E. C. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. **Curr Opin Microbiol.**, v. 45, p. 70–76, 2018.

NISHIMOTO, A. T. *et al*. In vitro activities of the novel investigational tetrazoles vt-1161 and vt-1598 compared to the triazole antifungals against azole-resistant strains and clinical isolates of Candida albicans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, 2019.

PARK, B. J. *et al*. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **Aids**, v. 23, n. 4, p. 525–530, 2009.

PATIL, A.; MAJUMDAR, S. Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 12, p. 1635–1660, 2017.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 321–346, 2007.

PIANALTO, K. M.; ALSPAUGH, J. A. New horizons in antifungal therapy. **Journal of Fungi**, v. 2, n. 4, p. 10–12, 2016.

PING, B. *et al*. Second- versus first-generation azoles for antifungal prophylaxis in hematology patients: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Hematology**, v. 92, n. 6, p. 831–839, 2013.

PYRGOS, V. *et al*. Epidemiology of Cryptococcal Meningitis in the US: 1997-2009. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

RAAD, I.; HANNA, H.; MAKI, D. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 10, p. 645–657, 2007.

SANDHU, P. *et al.* Hepatic uptake of the novel antifungal agent caspofungin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 5, p. 676–682, 2005.

SHIBATA, T. *et al*. T-2307 causes collapse of mitochondrial membrane potential in yeast. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5892–5897, 2012.

SINGH, S. B. *et al*. Antifungal spectrum, in vivo efficacy, and structure-activity relationship of ilicicolin H. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, n. 10, p. 814–817, 2012.

STAAB, H. A. Uber den Mechanismus der Reaktion von N.N’-Carbon yl- di-azolen rnit Carbonsauren. v. 4596, n. 1 960, p. 2955–2961, 1966.

TERRERO-SALCEDO, D.; POWERS-FLETCHER, M. V. Updates in laboratory diagnostics for invasive fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1–11, 2020.

TOON, S. *et al*. An assessment of the effects of impaired renal function and haemodialysis on the pharmacokinetics of fluconazole. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 221–226, 1990.

TREMBLAY, Y. D. N.; HATHROUBI, S.; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: Leur importance en santé animale et en santé publique. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, p. 110–116, 2014.

TSAI, Y. H.; LIU, X.; SEEBERGER, P. H. Chemical biology of

glycosylphosphatidylinositol anchors. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 46, p. 11438–11456, 2012.

U.S. FDA Approves Supplemental New Drug Application (sNDA) for Expanded Indication of MYCAMINE® (micafungin for injection) for the Treatment of Invasive Candidiasis in Pediatric Patients Less Than 4 Months of Age. Disponível em: <https://www.prnewswire.com/news-releases/us-fda-approves-supplemental-new-drug-application-snda-for-expanded-indication-of-mycamine-micafungin-for-injection-for-the-treatment-of-invasive-candidiasis-in-pediatric-patients-less-than-4-months-of-age-30098380>.

VAN DYKE, M. C. C. *et al*. The Rise of Coccidioides: Forces Against the Dust Devil Unleashed. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, 2019.

VATS, D. *et al*. Reduction of cell surface glycosylphosphatidylinositol conjugates in Entamoeba histolytica by antisense blocking of E. histolytica GlcNAc-phosphatidylinositol deacetylase expression: Effect on cell proliferation, endocytosis, and adhesion to target cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8381–8392, 2005.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 2000.

WARDLE, D. A.; LINDAHL, B. D. Ecology. Disentangling global soil fungal diversity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 346, n. 6213, p. 1052–1053, 2014.

WIEDERHOLD, N. P. *et al*. The fungal cyp51 inhibitor vt-1129 is efficacious in an experimental model of cryptococcal meningitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. 1–10, 2018.

WU, S. *et al*. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 2193–2211, 2017.

YAMASHITA, K. *et al*. The novel arylamidine T-2307 selectively disrupts yeast mitochondrial function by inhibiting respiratory chain complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 8, p. 1–10, 2019.

YU, S. *et al.* Recent progress in synthetic and biological studies of GPI anchors and GPI-anchored proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 17, n. 6, p. 1006–1013, 2013.

ZOTCHEV, S. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 211–223, 2012.

APÊNDICE – Caracterização dos intermediários sintéticos

Figura 50. Espectro de RMN de ^{1}H (Acetona-d_6, 300 MHz) do intermediário (**8**).

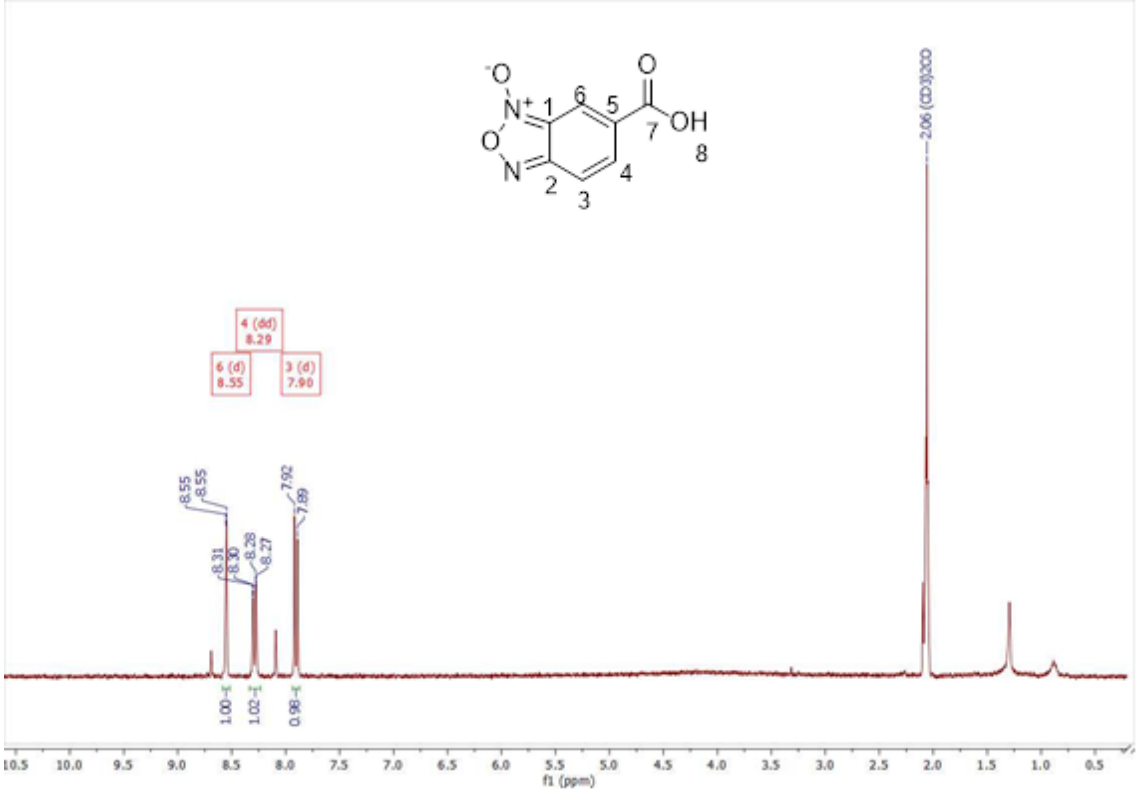


Figura 51. Espectro de infravermelho do intermediário (**8**).

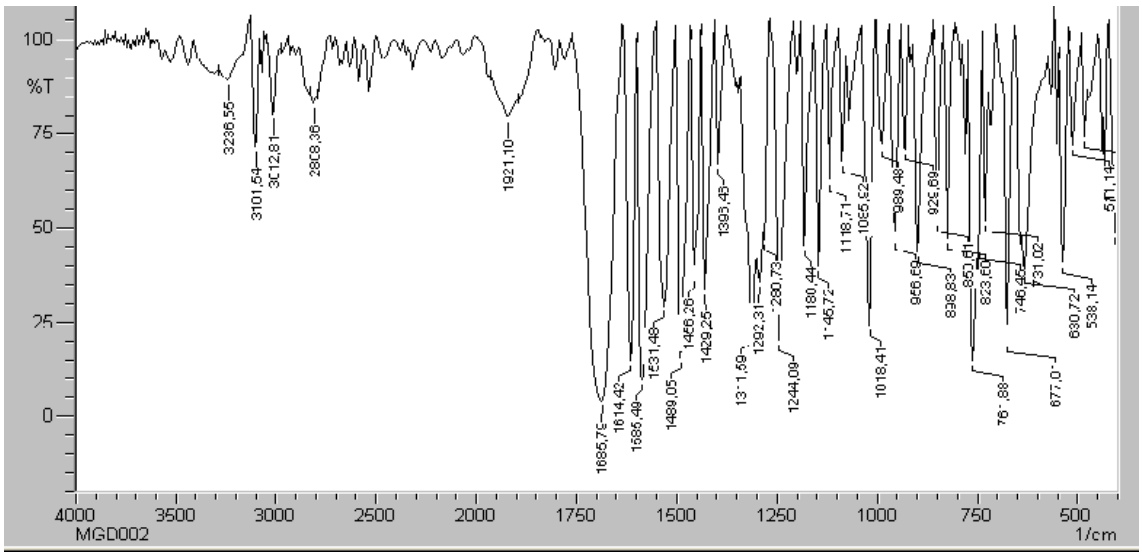


Figura 52. Espectro de RMN de ^{1}H (Acetona-d_6, 300 MHz) do intermediário (**9**).

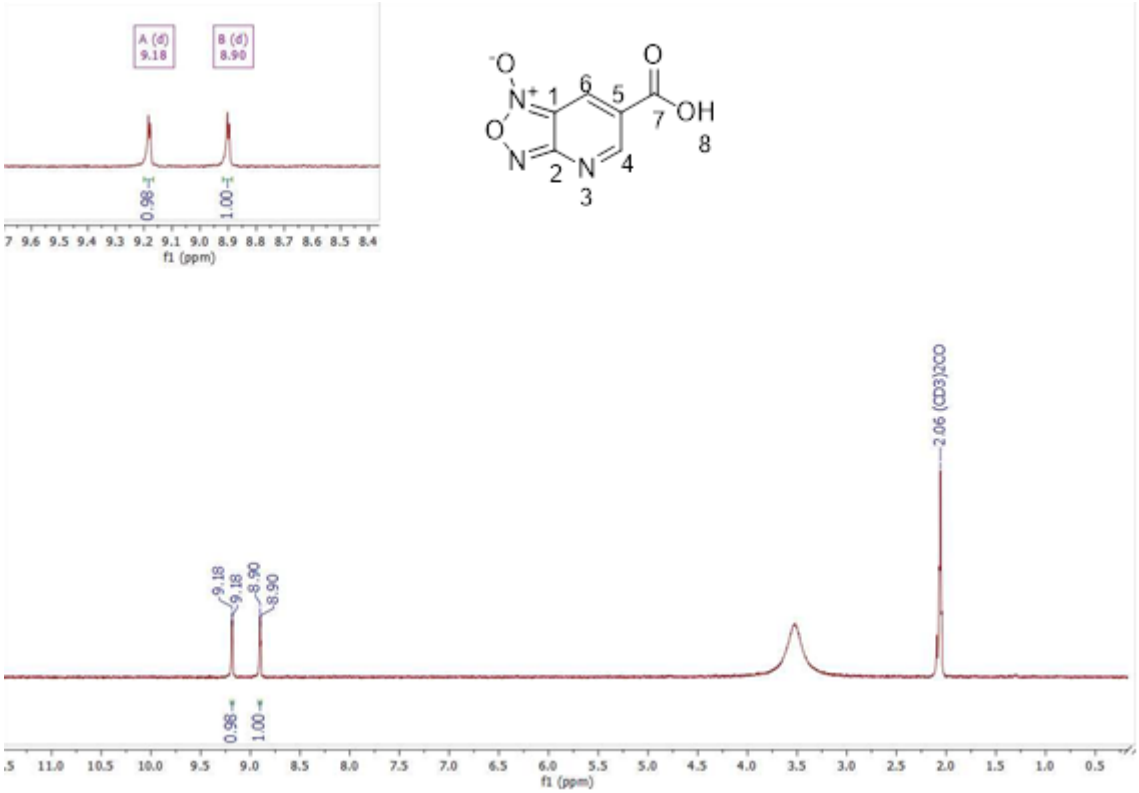


Figura 53. Espectro de infravermelho do intermediário (**9**).

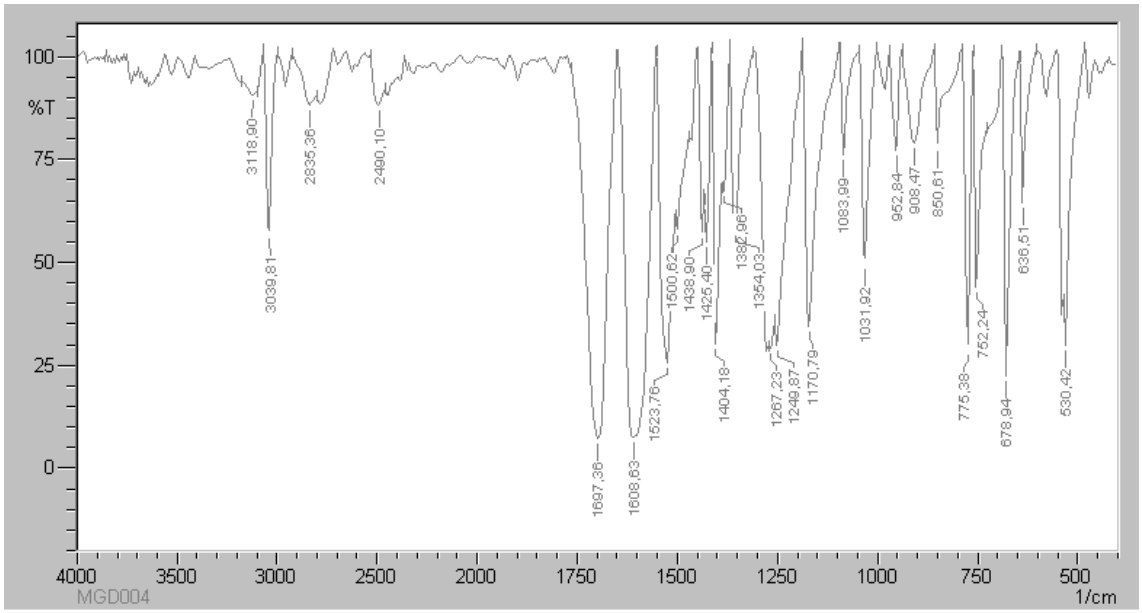


Figura 54. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**13**).

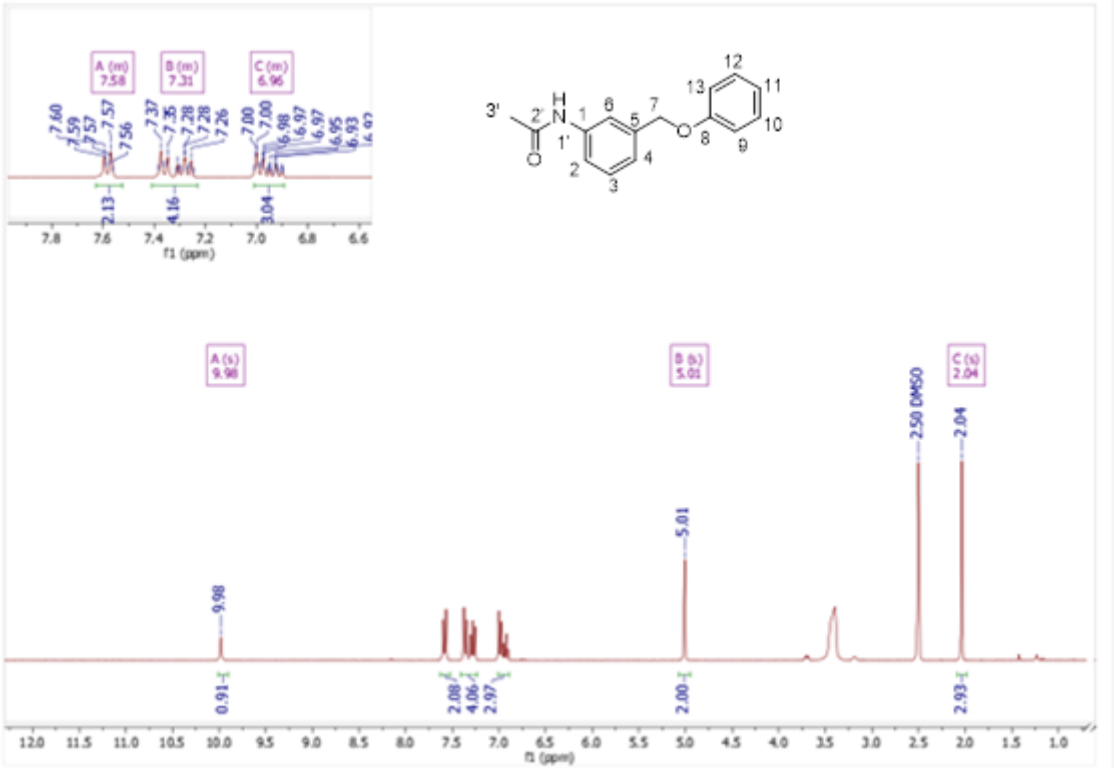


Figura 55. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**14**).

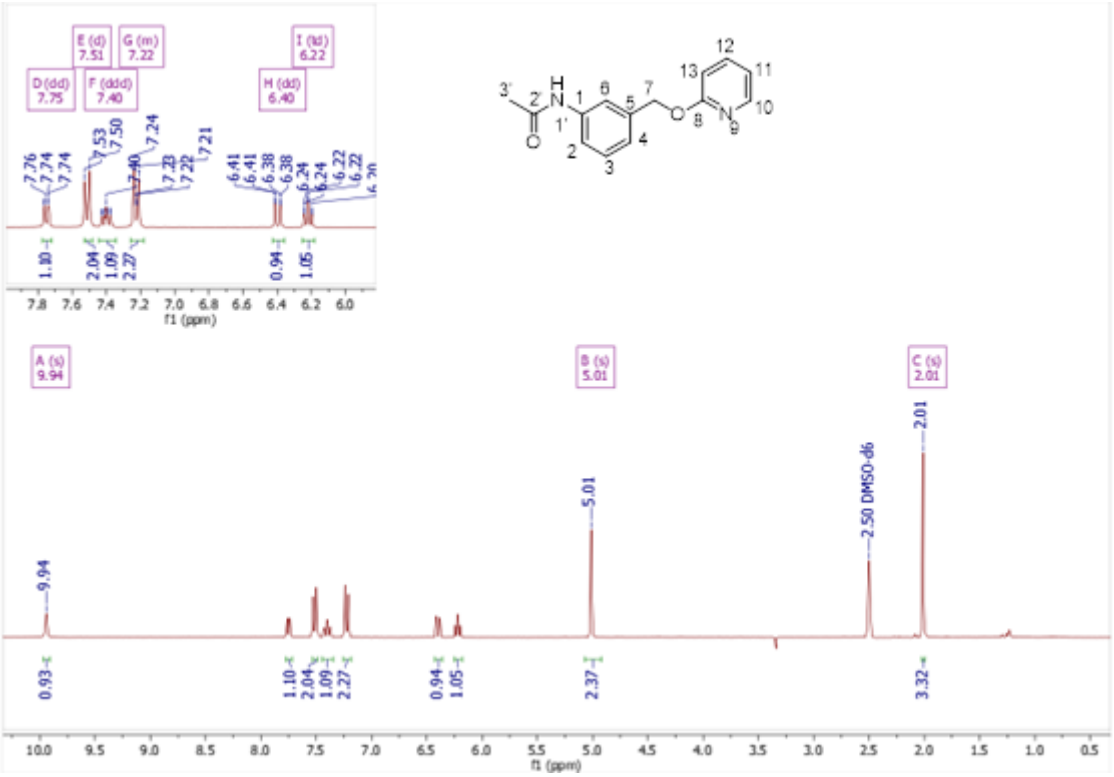


Figura 56. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**15**).

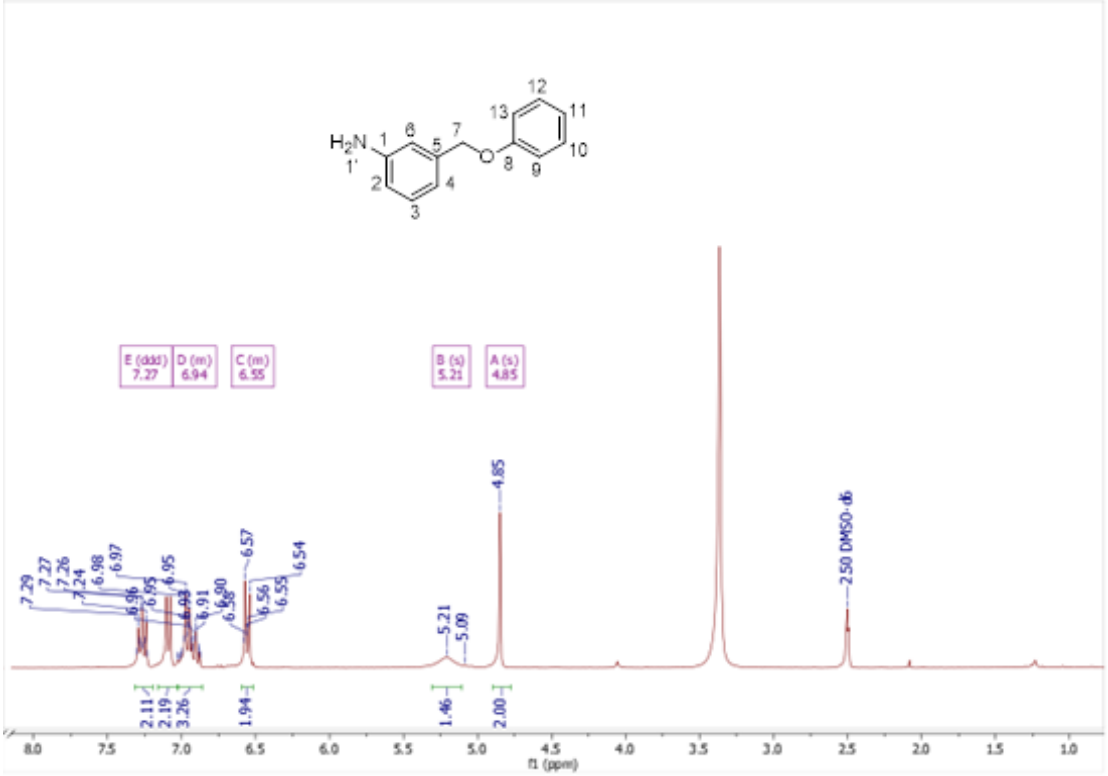


Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**16**).

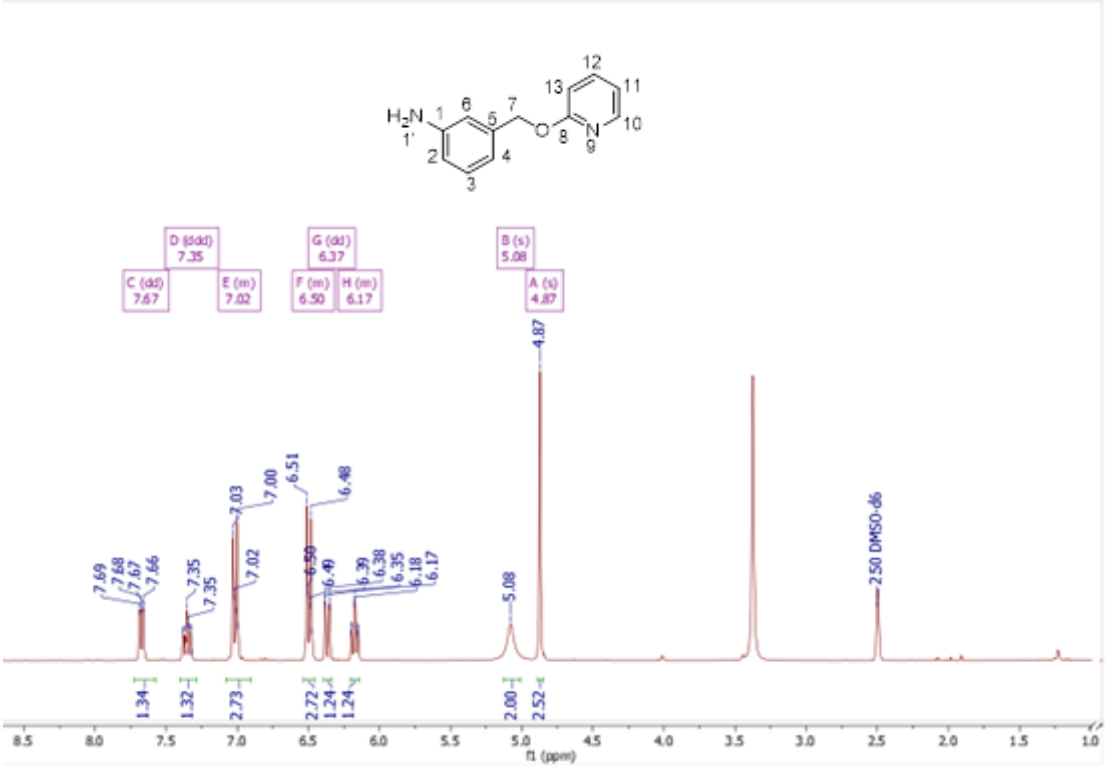


Figura 58. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**22**).

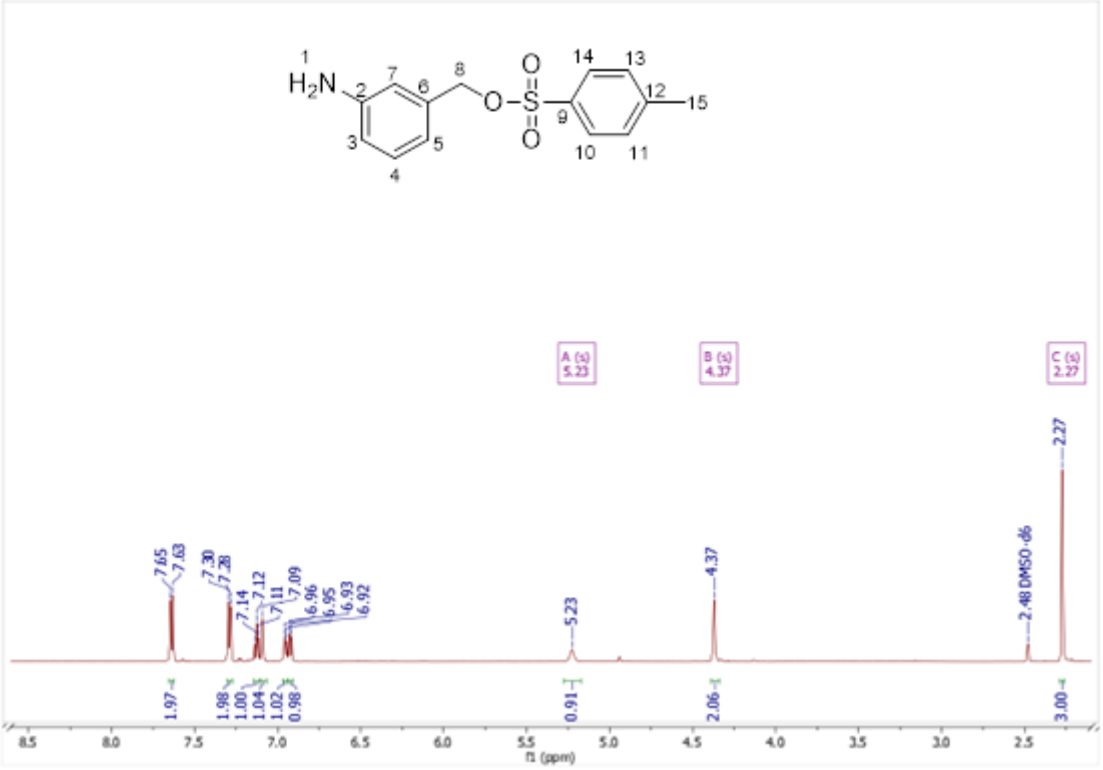


Figura 59. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do intermediário (**26**).

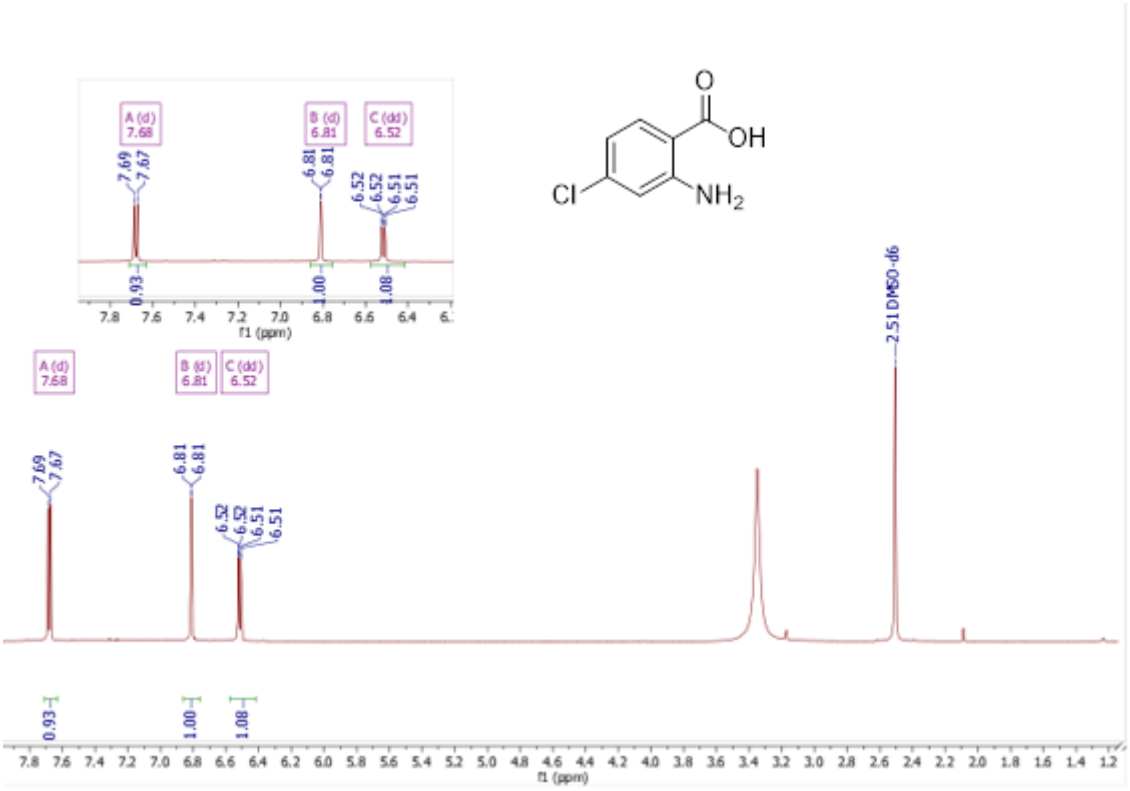


Figura 60. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**17**).

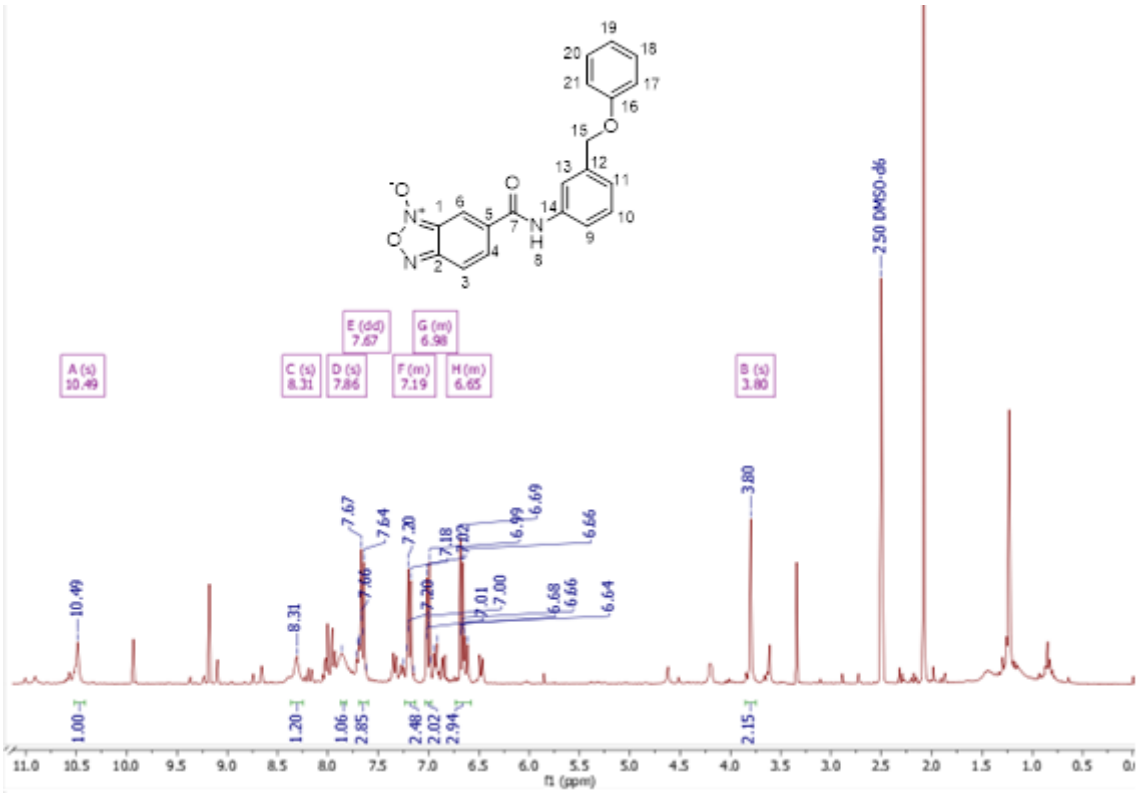


Figura 61. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do produto final (**17**).

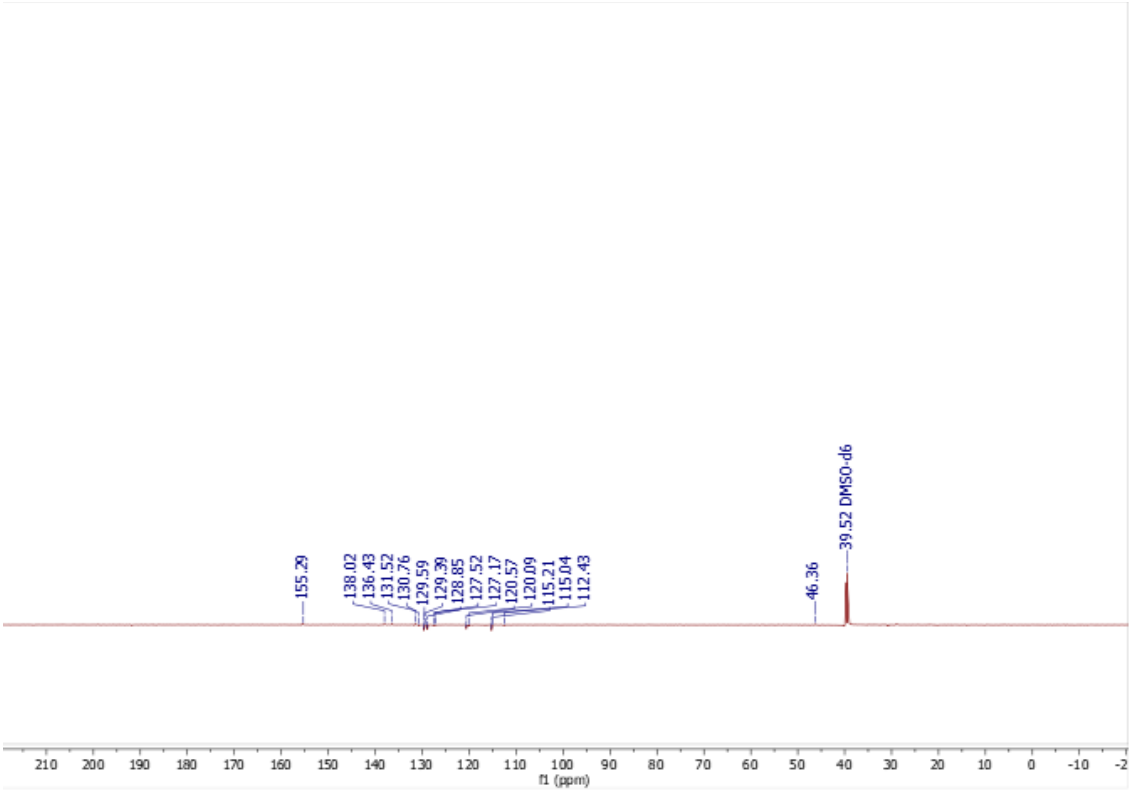


Figura 62. Espectro de infravermelho do produto final (**17**).

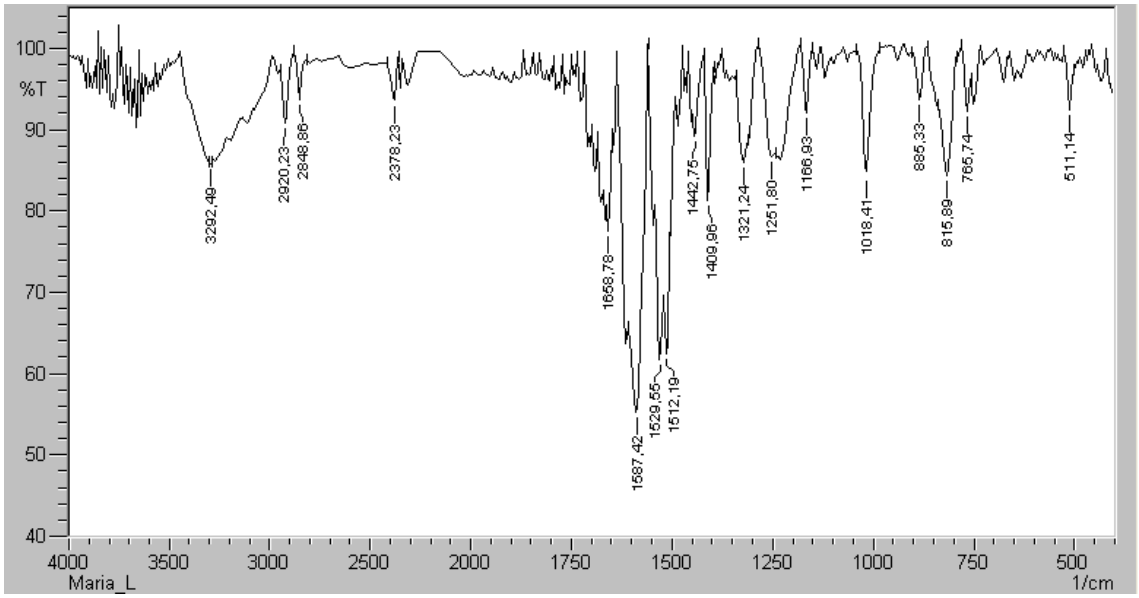


Figura 63. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**18**).

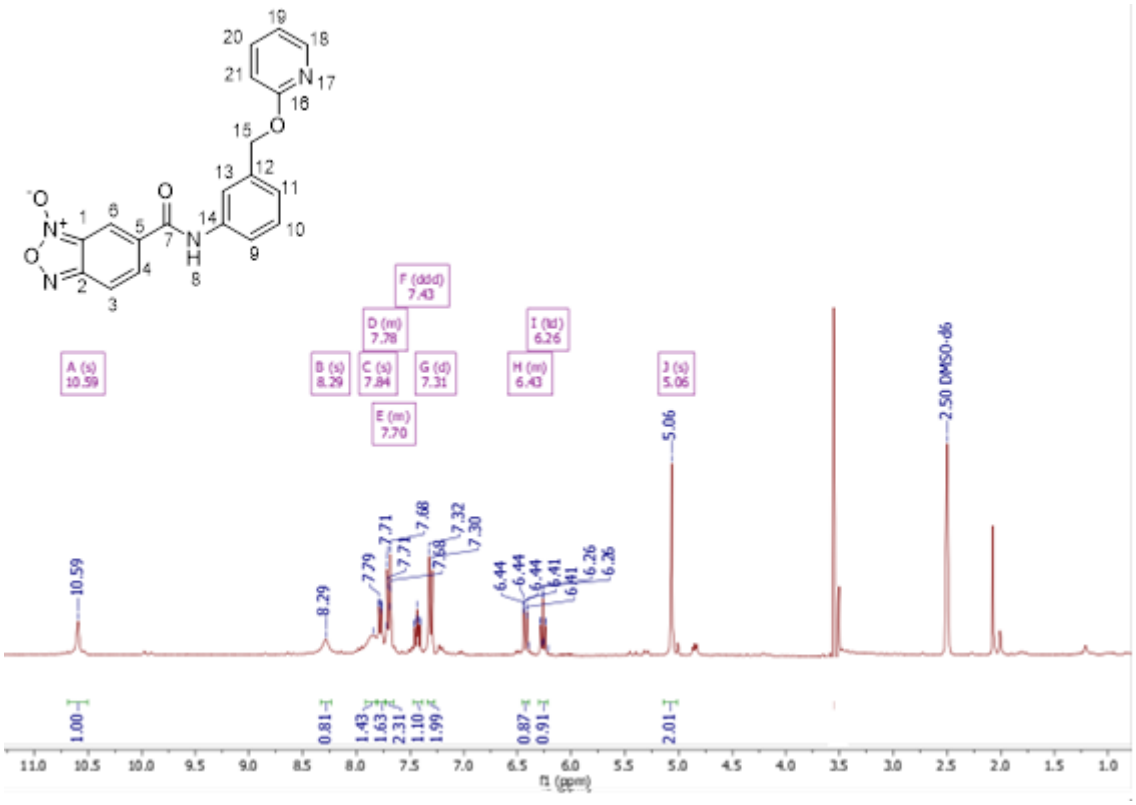


Figura 64. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do produto final (**18**).

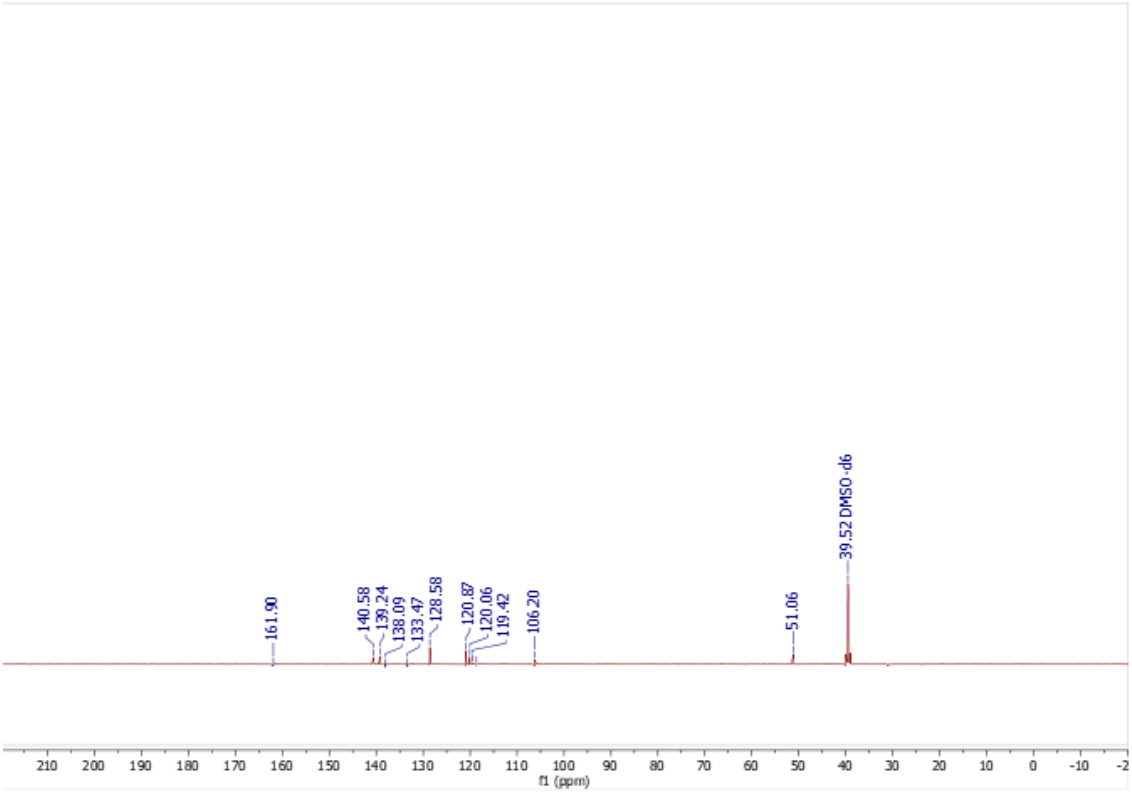


Figura 65. Espectro de Infravermelho do produto final (**18**).

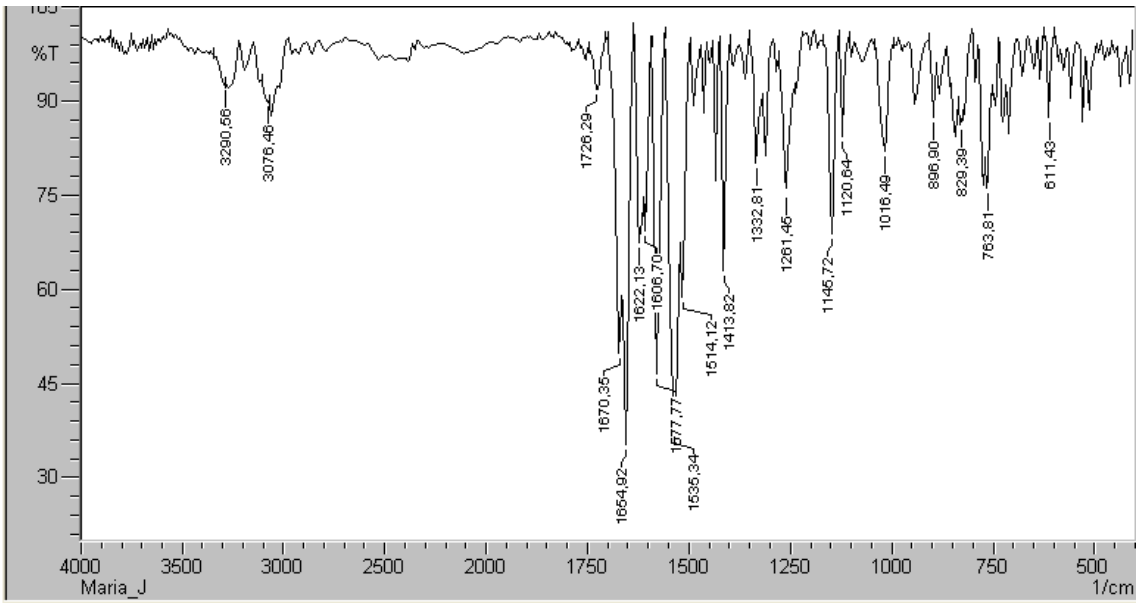


Figura 66. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do produto final (**23**).

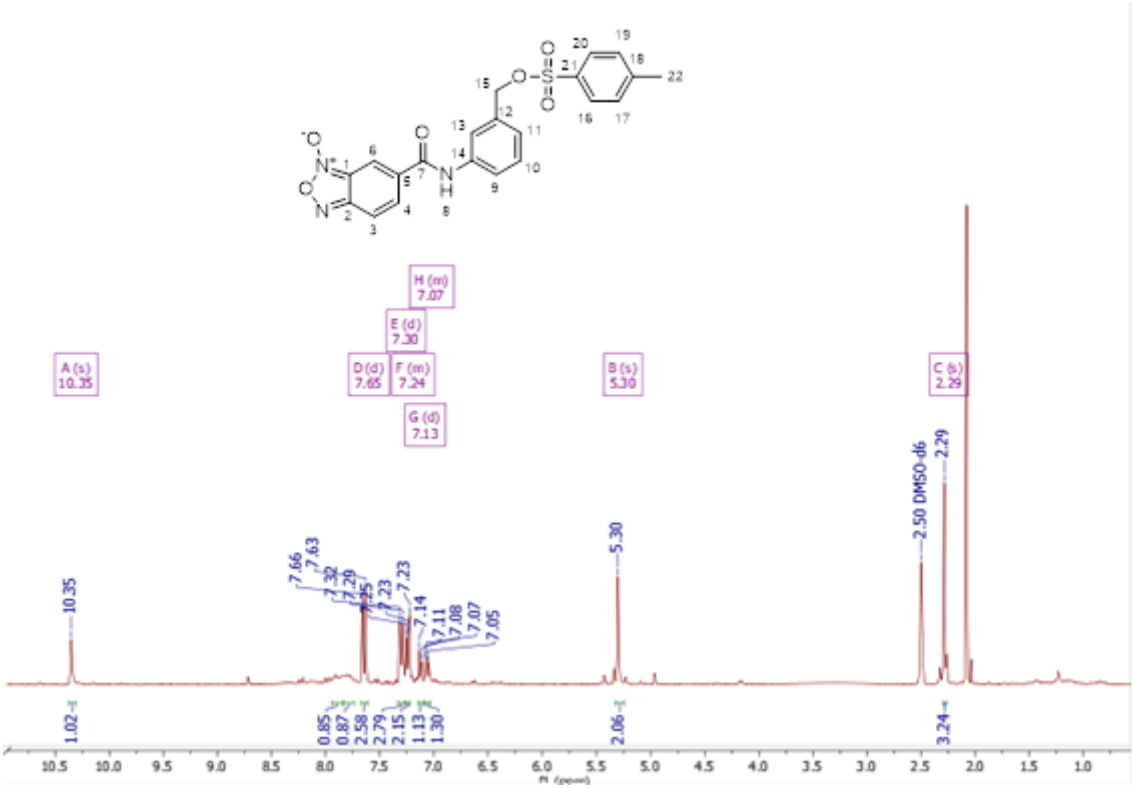


Figura 67. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**23**).

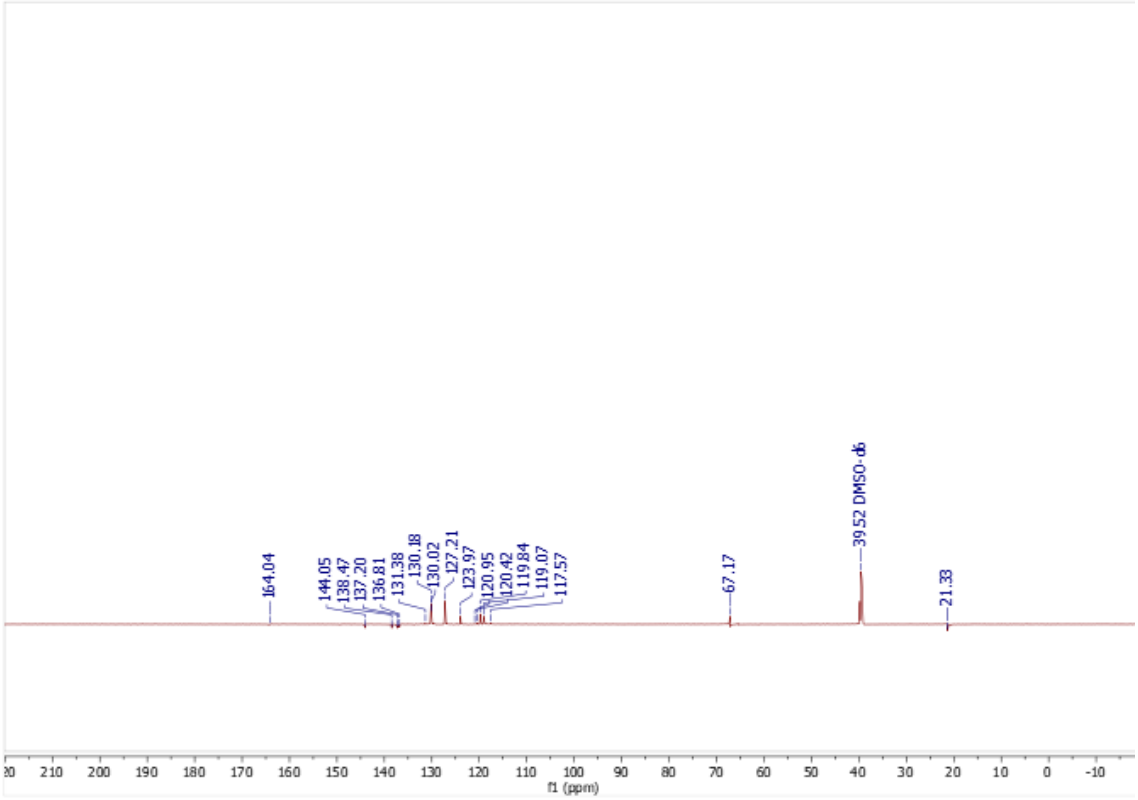


Figura 68. Espectro de Infravermelho do produto final (**23**).

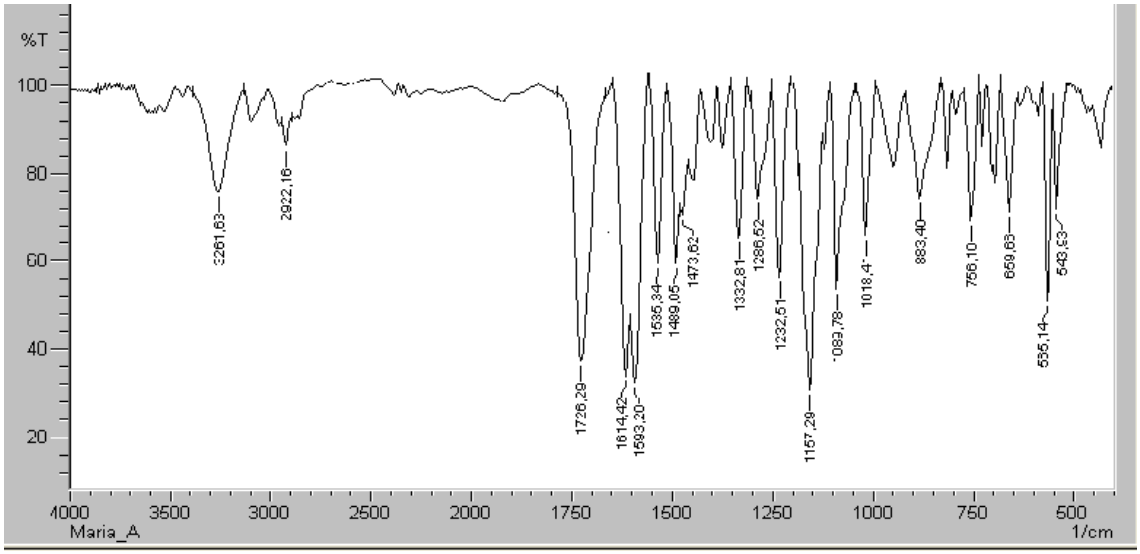


Figura 69. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do composto final (**24**).

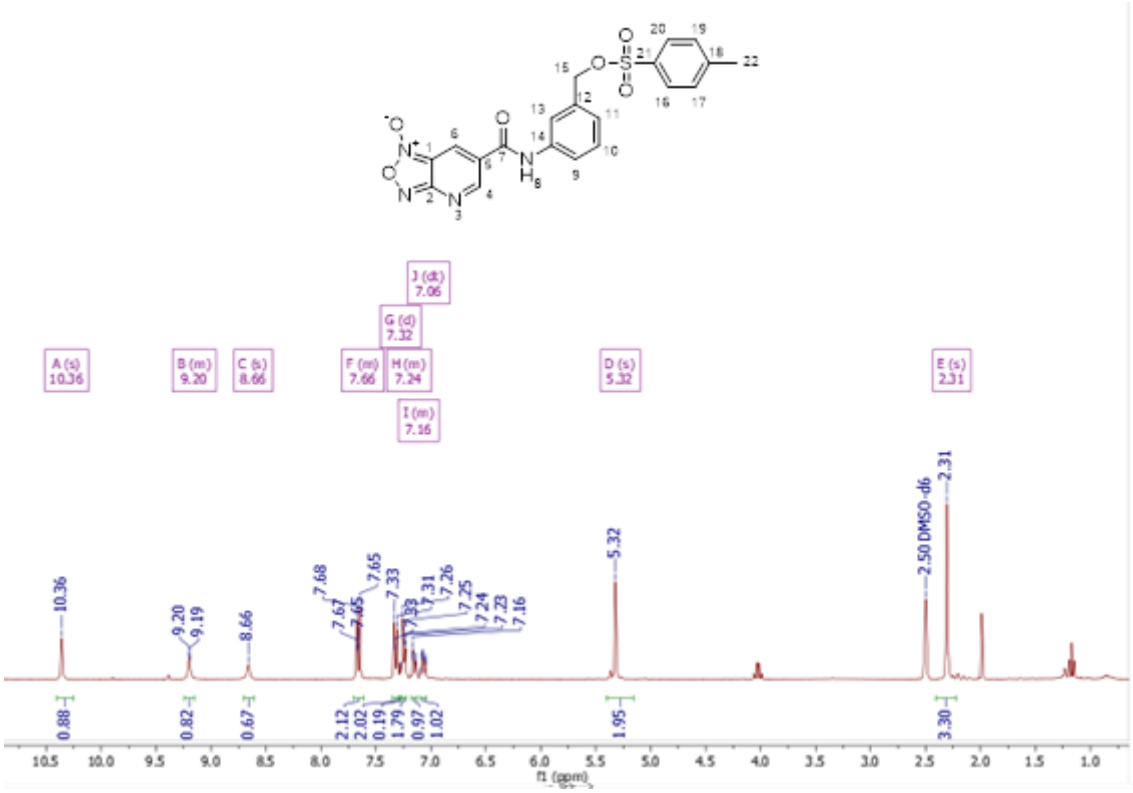


Figura 70. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**24**).

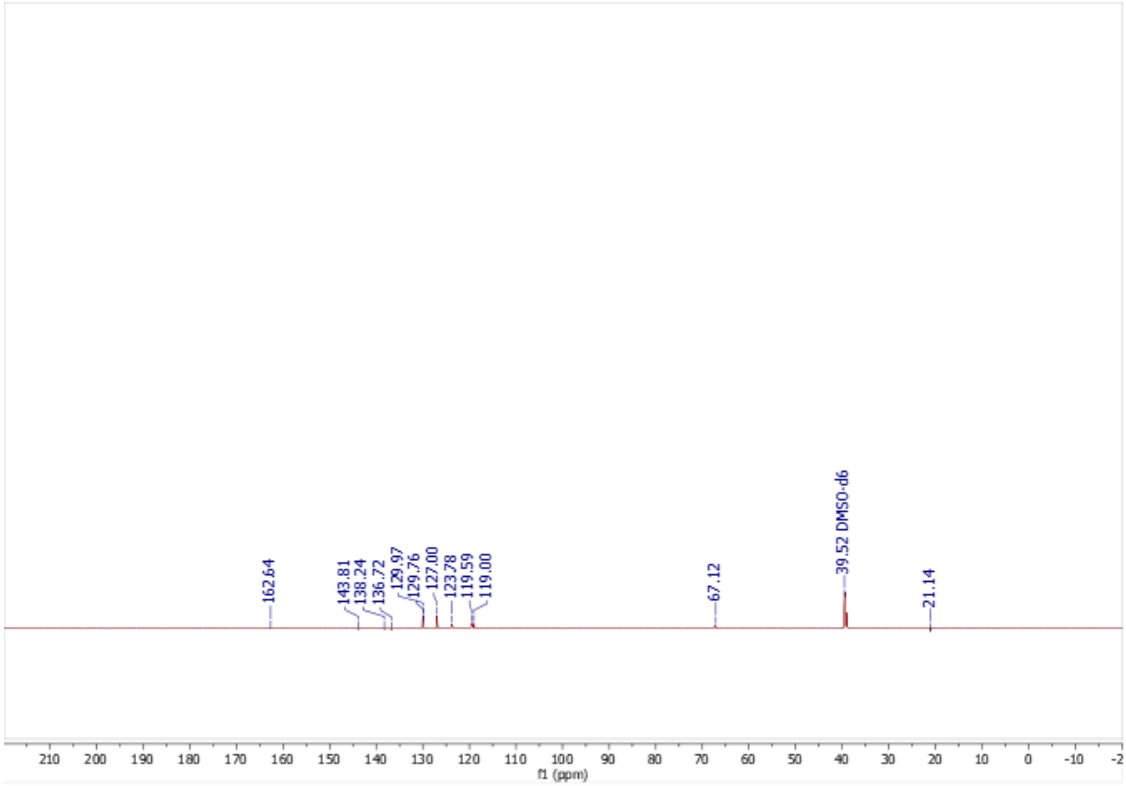


Figura 71. Espectro de infravermelho do composto final (**24**).

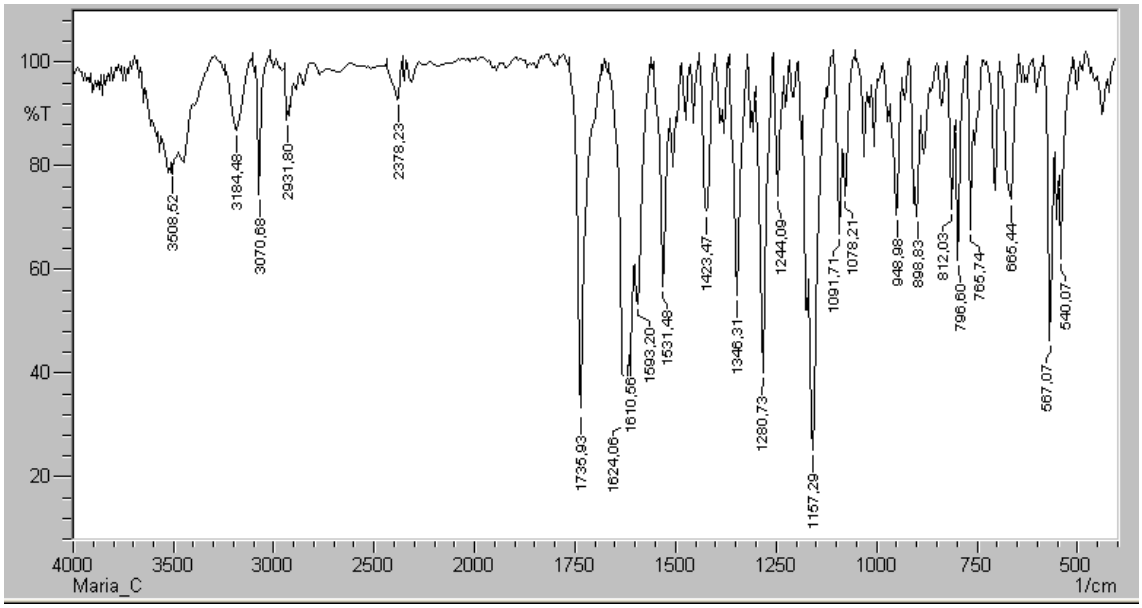


Figura 72. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d_6, 300 MHz) do composto final (**27**).

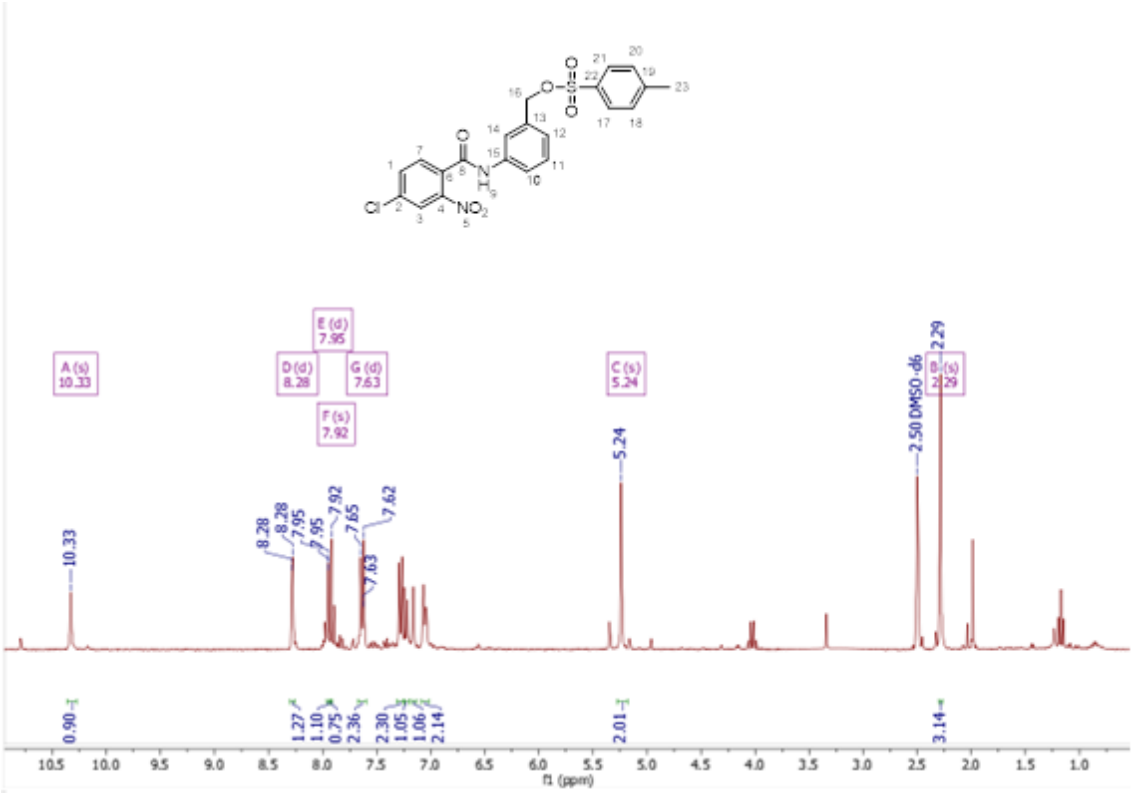


Figura 73. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 600 MHz) do composto final (**27**).

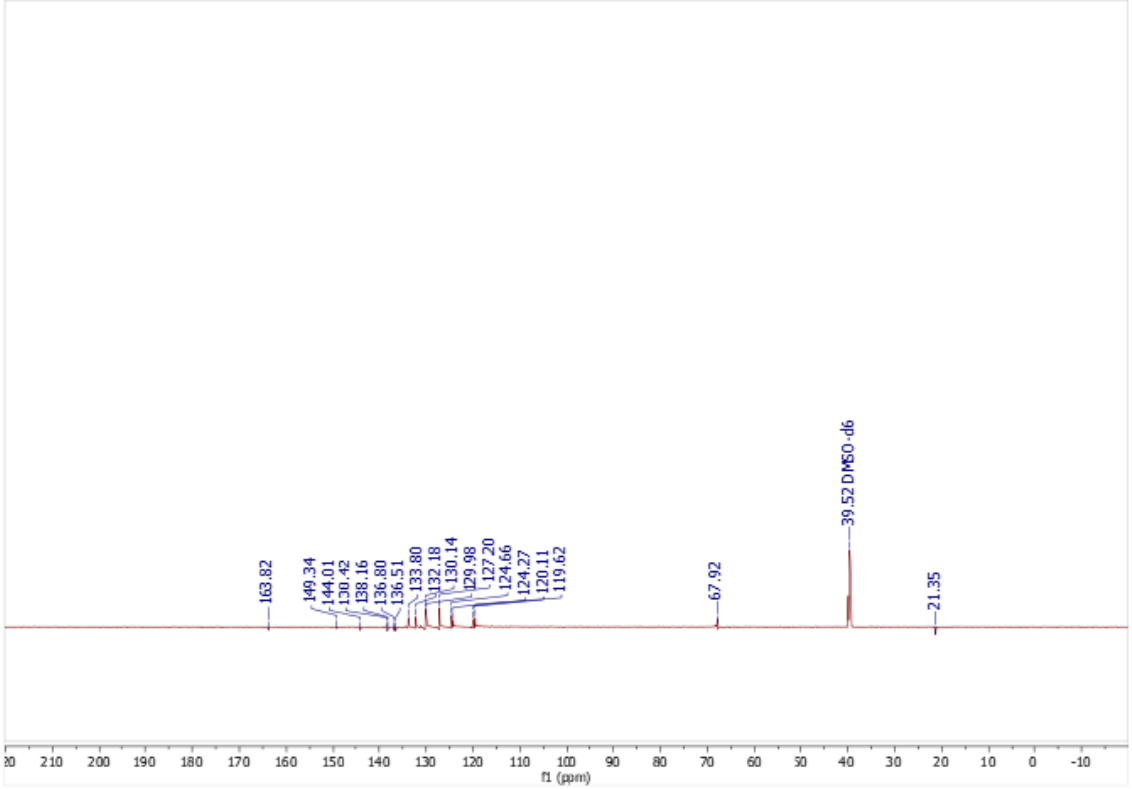


Figura 74. Espectro de infravermelho do composto final (**27**).

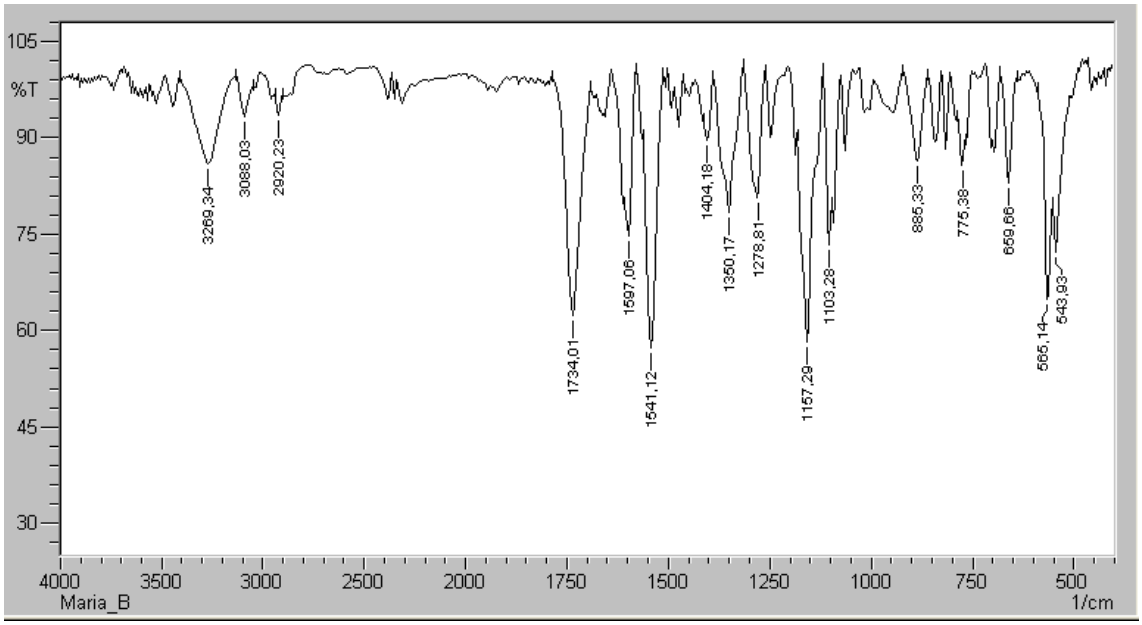


Figura 75. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 300 MHz) do composto final (**28**).

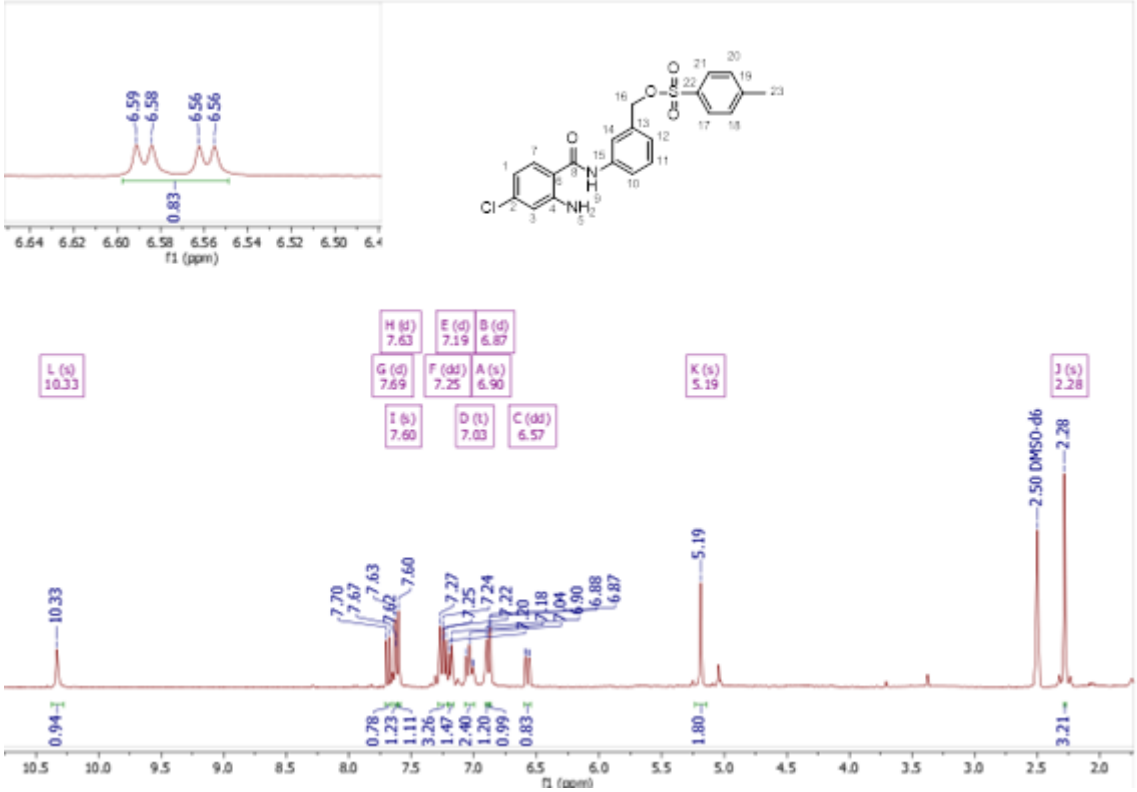


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 600 MHz) do composto final (**28**).

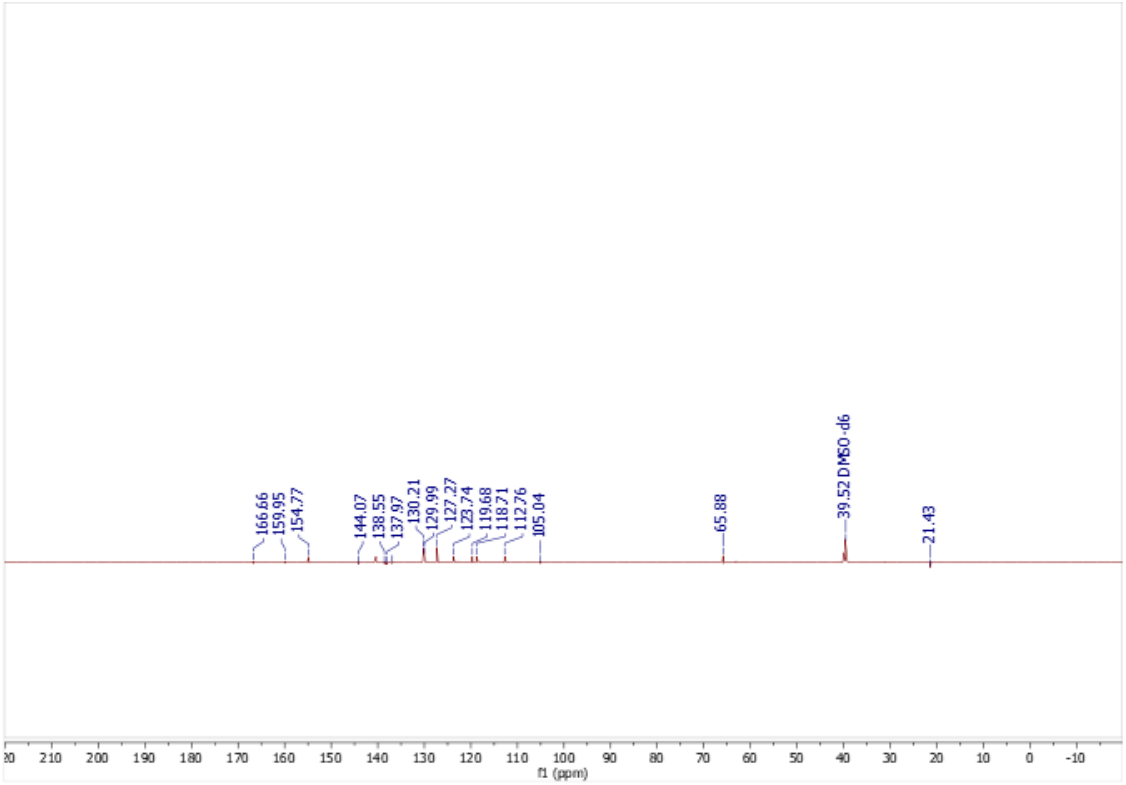


Figura 77. Espectro de infravermelho do composto final (**28**).

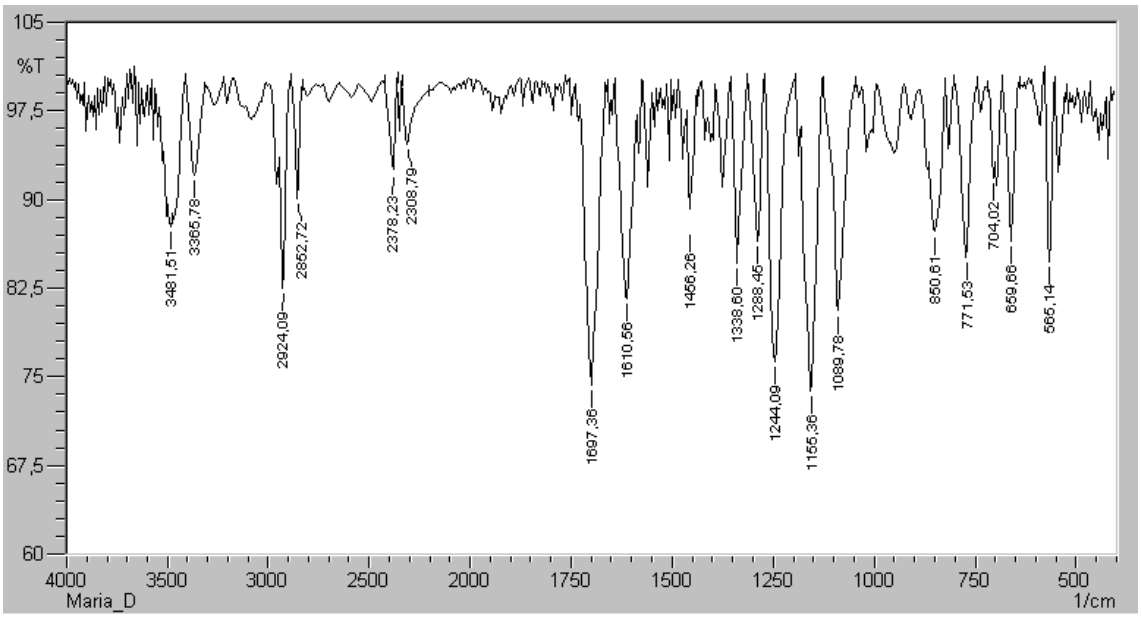


Figura 78. Espectro de RMN de ^{1}H (DMSO-d6, 300 MHz) do composto final (**30**).

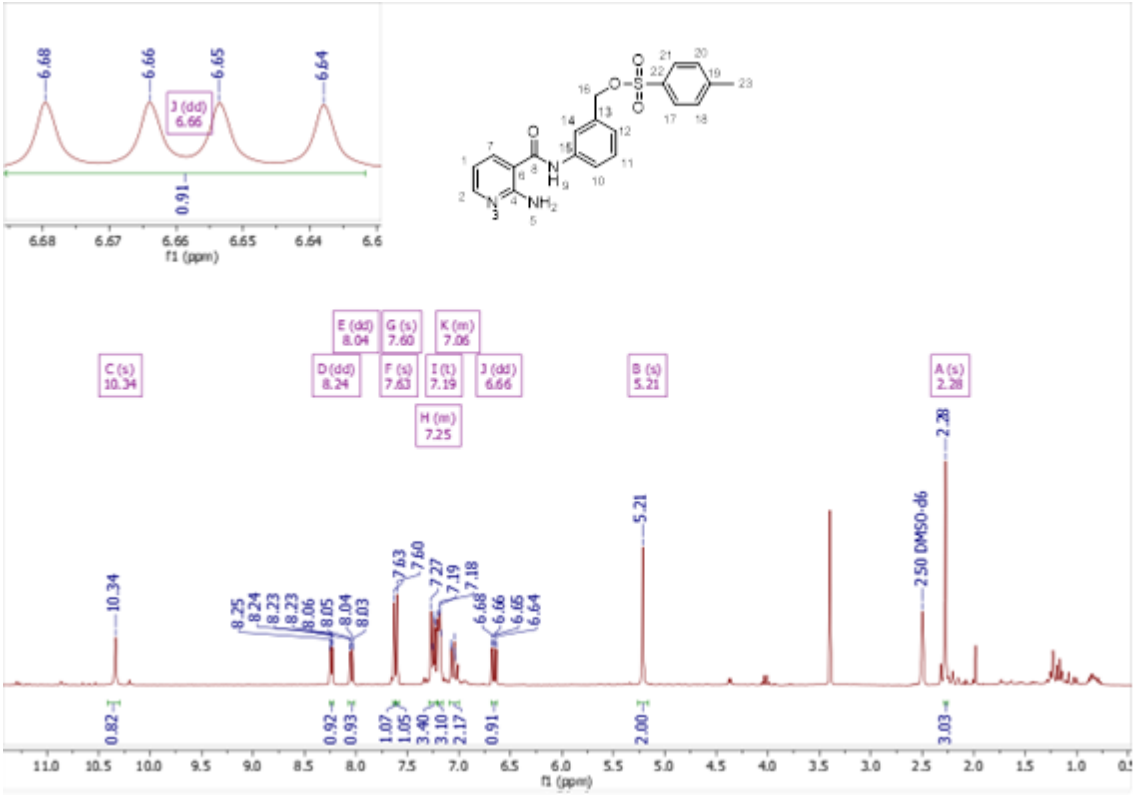


Figura 79. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO-d6, 600 MHz) do composto final (**30)**.

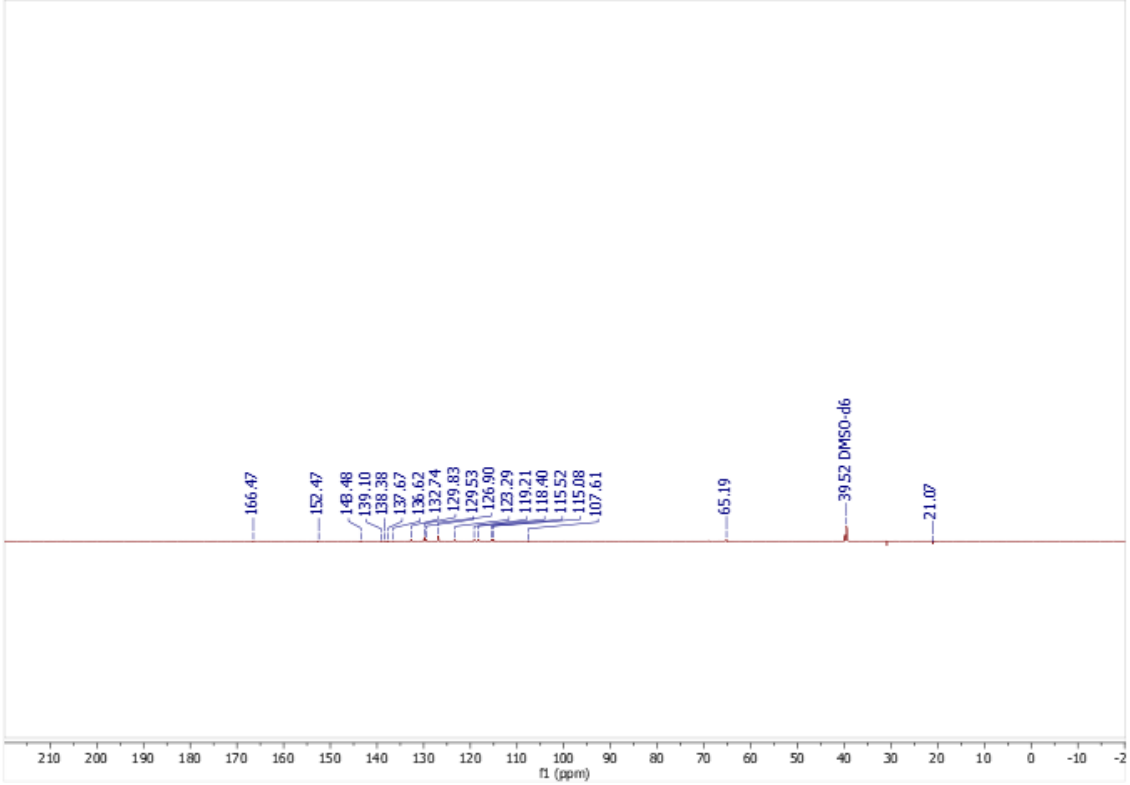
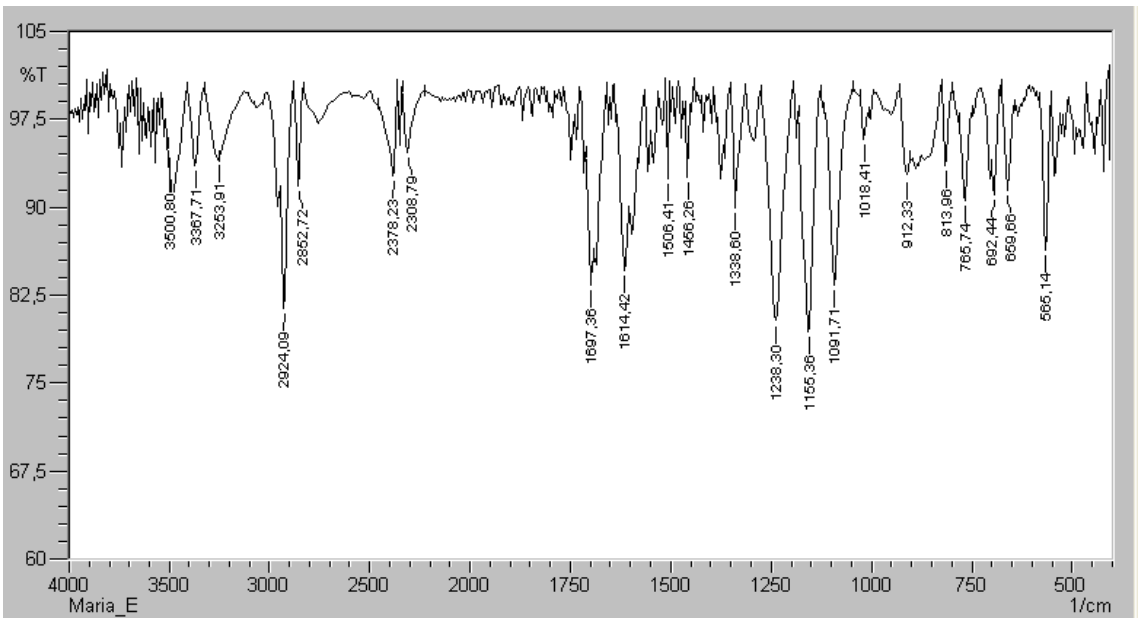



Figura 80. Espectro de infravermelho do composto final (**30**).