



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara

PAMELA SOUZA TADA DA CUNHA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS
CONTENDO CARBONILAS α,β -INSATURADAS COMO INIBIDORES DA
CRUZAÍNA**

Araraquara, SP

2024

PAMELA SOUZA TADA DA CUNHA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS
CONTENDO CARBONILAS α,β -INSATURADAS COMO INIBIDORES DA
CRUZAÍNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica.

Orientador: Prof. Dr. Cauê Benito Scarim

Araraquara, SP

2024

C972p

Cunha, Pamela Souza Tada da.

Planejamento, síntese e caracterização de derivados contendo carbonilas α,β -insaturadas como inibidores da cruzaina / Pamela Souza Tada da Cunha. – Araraquara, 2024.
54 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Cauê Benito Scarim.

1. Carbonilas α,β -insaturadas . 2. Benzofuroxanos. 3. Inibidores da cruzaina. 4. Doença de Chagas. I. Scarim, Cauê Benito, orient.
II. Título.

PAMELA SOUZA TADA DA CUNHA

**PLANEJAMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE DERIVADOS
CONTENDO CARBONILAS α,β -INSATURADAS COMO INIBIDORES DA
CRUZAÍNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da defesa: 10/12/2024

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Cauê Benito Scarim
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dr. Diego Eidy Chiba
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Ma. Andressa Franciéli Bonjorno
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dra. Cynhtia Nathalia Pereira
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dr. João Lucas Bruno Prates
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

DEDICATÓRIA

Neste espaço para dedicatória noto meu pai, minha mãe e minha irmã como os fundadores desta trajetória, pois nada sou sem as grandes personalidades deste primeiro núcleo. Também dedico essa conquista ao meu ímpeto quase insistente demais em abraçar projetos e desejos. Então, dedico este trabalho à teimosia do Balacobaco: eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é claramente um resultado do investimento do meu pai e da minha mãe, que ativamente financiaram esta graduação, bem como supriram com amor e boas intenções esse processo; e principalmente conheço e reconheço os danos à saúde física e mental nessa ambição de suprir minhas necessidades. A verdade é que nenhum diploma e título vão devolver este tempo investido em mim, e, portanto, eu espero plantar e colher bons frutos nesta instituição pública.

Não posso deixar de mencionar meus sinceros agradecimentos à minha irmã por ser essa base (in)sustentável de inspiração e alento que a Família evoca a mim. Agradeço ao Hugo Alexandre, meu parceiro de jornada, que manteve a serenidade e otimismo em presença de Atreus e Thrúd nessa bagunça que é viver; e também - óbvio - à família Siqueira que me acolheu como boa filha. Também agradeço aos colegas e amigos da turma 91N que foram um amparo significativo nessa jornada densa e visceral para o diploma.

E finalmente, é impossível resumir um projeto delineado pelo Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos à boa vontade de realizar pesquisa na ciência pública brasileira, e por isso agradeço e enalteço meu orientador Cauê, a Juliana pelo imensurável suporte, e aos demais servidores da UNESP pela competência prestada. Obviamente, agradeço à Fapesp pelo financiamento 2023/02276-5 dessa pesquisa, pois o capitalismo é duro.

Resumos me cabem melhor, e não caberiam caracteres aos envolvidos desse feito que tanto sonhei, afinal, essa conquista é compartilhada.

RESUMO

A doença de Chagas, após mais de um século de sua descoberta (1909), ainda é um grande problema de saúde pública. Estima-se que aproximadamente 6-7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). No entanto, a situação é mais crítica na América Latina e em outras regiões onde a doença é endêmica. O maior número de casos ocorre no Brasil, Bolívia, Argentina e México, pois mais de 75 milhões de pessoas nessas regiões estão localizadas em áreas com alto risco de contaminação pelo vetor. A necessidade de novas alternativas terapêuticas é urgente, pois os fármacos como benznidazol e nifurtimox apresentam limitações severas como baixa eficácia e alta toxicidade. A partir desse cenário, neste trabalho, empregamos uma técnica de triagem virtual usando a cisteína protease do *T. cruzi* (cruzaína), como alvo biológico, chave para a sobrevivência do parasita. A partir de derivados de carbonilas α,β -insaturadas, que se configuram como promissores e importantes compostos na química medicinal, este projeto propõe a síntese de compostos, que a partir de modificações moleculares baseadas em métodos computacionais visam a inibição da cruzaína. Foram sintetizados 7 intermediários provenientes do acoplamento de Suzuki, com rendimentos de até 85%, e 2 intermediários derivados de chalconas provenientes da condensação de Claisen-Schmidt, com rendimentos de 70 a 80%. Os dados de *docking* molecular entre os derivados de carbonilas α,β -insaturadas contendo benzofuroxano e a cruzaína (PDB: 2OZ2) apresentaram valores de *docking score* de DS = -4,96 e -4,07 indicando interação promissora com a cisteína protease do parasita. A descoberta e o estudo de novos compostos são fundamentais para a elucidação das interações da molécula com seu alvo, otimizando a compreensão dos inibidores específicos e a compreensão de grupos químicos chave frente ao tratamento da doença de Chagas.

Palavras-chave: carbonilas α,β -insaturadas; benzofuroxanos; inibidores da cruzaína; doença de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), remains a significant public health concern despite over a century since its discovery (1909). An estimated 6-7 million individuals worldwide harbor *T. cruzi* infection, with the most severe impact observed in Latin America and other endemic regions. The highest burden of disease is concentrated in Brazil, Bolivia, Argentina, and Mexico, where over 75 million people reside in areas at high risk of vector-borne transmission. The development of novel therapeutic strategies is urgently needed, as current medications are hampered by limitations such as low efficacy and severe toxicity. In this context, we employed a virtual screening approach targeting *T. cruzi* cysteine protease (cruzipain), a key enzyme for parasite survival, using α,β -unsaturated carbonyl derivatives, which have emerged as promising and valuable compounds in medicinal chemistry. Based on computational methods and molecular modifications, this project aims to synthesize compounds that inhibit cruzipain. Thus, seven intermediates have been synthesized through Suzuki-Miyaura coupling reactions, with yields of up to 85%, and two chalcones derivatives have been obtained via Claisen-Schmidt condensation, with yields of up to 80%. Molecular docking studies of α,β -unsaturated carbonyl derivatives containing benzofuroxan with cruzipain (PDB: 2OZ2) revealed docking scores ranging from DS = -4.96 to -4.07, indicating favorable interactions with the parasite cysteine protease. The discovery and investigation of novel compounds are essential for elucidating molecular interactions with their targets, optimizing the understanding of specific inhibitors, and unraveling key chemical groups for Chagas disease treatment.

Keywords: α,β -unsaturated carbonyls; benzofuroxanes; cruzain inhibitors; Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Planejamento estrutural a partir do composto A.....	18
Figura 2 - Rota sintética.....	20
Figura 3 - RMN de ^1H do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	23
Figura 4 - RMN de ^1H do intermediário S2 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	23
Figura 5 - RMN de ^1H do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	24
Figura 6 - RMN de ^1H do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	24
Figura 7 - RMN de ^1H do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	25
Figura 8 - RMN de ^1H do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	25
Figura 9 - RMN de ^1H do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	26
Figura 10 - RMN de ^1H do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).....	30
Figura 11 - RMN de DEPTQ do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).....	30
Figura 12 - RMN de ^1H do intermediário C2: (E)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).....	31
Figura 13 - RMN de DEPTQ do intermediário C2: (E)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).....	31
Figura 14 - Compostos sintetizados e caracterizados por RMN ^1H , DEPTQ, HSQC e HMBC.....	34
Figura 15 - <i>Docking</i> molecular entre os derivados de carbonilas α,β insaturadas contendo benzofuroxano e a cruzaína (PDB: 2OZ2).....	35
Figura 16 - <i>Docking</i> molecular entre a carbonila α,β insaturada contendo o núcleo benzofuroxano, substituída com um grupo fenil (verde) e o composto K777 (roxo).....	36
Figura A1 - RMN de DEPTQ do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).....	42

Figura A2 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	42
Figura A3 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	43
Figura A4 - RMN de DEPTQ do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	43
Figura A5 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	44
Figura A6 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	44
Figura A7 - RMN de DEPTQ do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	45
Figura A8 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	45
Figura A9 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	46
Figura A10 - RMN de DEPTQ do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	46
Figura A11 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	47
Figura A12 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	47
Figura A13 - RMN de DEPTQ do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	48
Figura A14 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	48
Figura A15 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	49
Figura A16 - RMN de DEPTQ do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	49
Figura A17 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	50
Figura A18 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	50

Figura A19 - RMN de DEPTQ do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	51
Figura A20 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	51
Figura A21 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d ₆).....	52
Figura A22 - Mapa de contorno de HSQC do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO-d ₆).....	52
Figura A23 - Mapa de contorno de HMBC do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO-d ₆).....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo dos dados de rendimento parcial e aspecto dos compostos provenientes da reação de Suzuki-Miyaura.....	22
Tabela 2 - Caracterização estrutural dos intermediários provenientes da reação de Suzuki.....	27
Tabela 3 - Resumo dos dados de rendimento parcial e aspecto dos compostos provenientes da reação de Claisen-Schmidt.....	29
Tabela 4 - Caracterização estrutural dos intermediários provenientes da reação de Claisen-Schmidt.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O QUE É A DOENÇA DE CHAGAS?	13
1.2 CICLO EVOLUTIVO E FISIOPATOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS	13
1.3 QUIMIOTERAPIA CHAGÁSICA	15
1.4 CRUZAÍNA PROTEASE COMO ALVO TERAPÊUTICO	15
1.5 INIBIDORES DE CRUZAÍNA PROTEASE	16
1.6 PLANEJAMENTO DE NOVOS INIBIDORES DA CRUZAÍNA PROTEASE	17
2 OBJETIVO	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 METODOLOGIA SINTÉTICA	19
3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	21
3.2.1 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA	21
3.2.2 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	21
3.3 <i>DOCKING</i> MOLECULAR	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38
APÊNDICE A - ESPECTROS ADICIONAIS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1. O que é a doença de Chagas?

A doença de Chagas (tripanossomíase americana) é uma doença tropical negligenciada (DTN) causada pelo parasito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Chagas, 1909). Essa enfermidade é, comumente, transmitida por meio das fezes do inseto da família Reduviidae e subfamília Triatominae, popularmente conhecido como “barbeiro”, uma vez que este esteja infectado pelo *T. cruzi*. É uma das doenças infecciosas de mais importância da América Latina, sendo estimados cerca de 6-7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, e aproximadamente 75 milhões estão sob o risco de contaminação (WHO, 2023; Coura *et. al.*, 2010). É uma doença endêmica em 21 países da América Latina, da Argentina ao México, e nas últimas décadas, devido a globalização, tornou-se um problema de saúde pública mundial devido a presença de quadros infecciosos em países da América do Norte, Europa, Oceania e Ásia (DNDi, 2023; Lidani *et. al.*, 2019).

1.2. Ciclo evolutivo e fisiopatologia da doença de Chagas

Para compreender o ciclo de vida do *T. cruzi* é importante salientar que o protozoário pode ser encontrado em três formas: a forma epimastigota, presente apenas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado; tripomastigota metacíclico, forma infectante presente em ambos os hospedeiros vertebrado e invertebrado; e a forma amastigota, forma intracelular presente apenas em células do hospedeiro vertebrado (Moretti *et. al.*, 2020; Rassi *et. al.*, 2013). Durante o ciclo de vida do protozoário, a primeira etapa da transmissão vetorial é dada pelo repasto sanguíneo entre o vetor contaminado (inseto) e o hospedeiro mamífero (ex. humanos). Ao mesmo tempo em que o vetor se alimenta do sangue do hospedeiro, ele elimina suas fezes infectadas com tripomastigotas metacíclicos próximo da região da ferida causada pela picada. Por consequência, a picada causa irritação na pele levando o indivíduo a coçar a área ferida, e parte das fezes contaminadas entra em contato com o ferimento, atingindo a corrente sanguínea e ocorrendo assim a infecção. Nessa etapa, algumas formas infectantes do *T. cruzi* são fagocitadas pelas células de defesa do organismo, que se transforma de tripomastigota para amastigota e evade do processo de digestão intracelular (Moretti *et. al.*, 2020; Rassi *et. al.*, 2013).

No meio intracelular a forma amastigota pode permanecer em latência durante décadas, ou mesmo sofrer divisões binárias até causar a lise celular retornando à sua forma

tripomastigota quando são novamente liberadas na circulação sanguínea. Neste momento, o parasito pode infectar outra célula do hospedeiro vertebrado ou infectar o hospedeiro invertebrado saudável por repasto sanguíneo. Quando o inseto ingere a forma tripomastigota metacíclica (através do hospedeiro vertebrado ou do invertebrado, uma vez que existe canibalismo nestas espécies) os protozoários se alojam em seu intestino onde se transformam em formas epimastigotas e se reproduzem (Moretti *et. al.*, 2020; Rassi *et. al.*, 2013). As formas epimastigotas se transformam novamente na forma infectante tripomastigota fechando o ciclo.

Embora haja um intenso combate ao vetor, particularmente no Brasil, a infecção apresenta sua disseminação, especialmente, por via vetorial. No entanto, em países endêmicos, além da transmissão vetorial, as infecções podem ocorrer por meio de ingestão de alimentos contaminados e acidentes laboratoriais. Para países não endêmicos, geralmente as infecções ocorrem através da doação de sangue e transplantes de órgãos. Por fim, a transmissão congênita, de mãe para filho, também já foi reportada, bem como durante o período de lactação (Moretti *et. al.*, 2020; Rassi *et. al.*, 2013; Abad-Franch *et. al.*, 2013).

A fisiopatologia da doença de Chagas é dividida em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda ocorre de 1-2 semanas após entrada do parasita na circulação sanguínea, tendo duração de 4-8 semanas, pode ser assintomática ou causar febre, dependendo da quantidade de parasitas no sangue e também da resposta imune do hospedeiro. Devido à grande concentração de parasitos durante a transmissão por via oral, existe uma grande possibilidade de óbito durante a fase aguda (Lewis *et. al.*, 2018). A fase aguda tem sua regressão espontânea em 90% dos casos mesmo na ausência de tratamento, o que dificulta bastante o diagnóstico durante esta fase da doença, sendo possível somente através de análise microscópica direta do sangue (Moretti *et. al.*, 2020; Rassi *et. al.*, 2013; Abad-Franch *et. al.*, 2013).

Com a regressão da fase aguda, ocorre a transição para a fase crônica, onde o parasita assume principalmente sua forma intracelular. As características desta fase da doença de Chagas são determinadas pelo equilíbrio entre a resposta imune do indivíduo e o dano tecidual causado pelo parasita. Quando há uma harmonia entre os fatores citados, o que ocorre em 70% dos casos, o paciente desenvolve uma forma indeterminada da doença onde não há quadro clínico, também denominado período de latência (fase indeterminada, assintomática). Nos outros 30% dos casos, os pacientes desenvolvem a fase determinada (sintomática) que é dividida em cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. As fases sintomáticas levam de 10 a 30 anos para se desenvolverem (latência e o tipo de órgão afetado depende da virulência da cepa de *T. cruzi*, que causa a infecção (Abad-Franch *et. al.*, 2013), levando, por consequência, a morbidade

crônica, como cardiomiopatia e/ou danos digestivos graves, que por sua vez podem ser fatais, causando mais de 12.000 mortes por ano. (DNDi, 2023; Perez-Molina *et. al.*, 2018).

1.3. Quimioterapia Chagásica

Além da implementação de intervenções de saúde pública para prevenção e diagnóstico precoce, um dos maiores obstáculos para o enfrentamento da doença de Chagas é a falta de tratamento eficaz e seguro. A quimioterapia consiste em apenas dois compostos, o benznidazol e nifurtimox, que, embora possuam certa eficácia na fase aguda, são limitados em pacientes cronicamente infectados, com estimativas de eficácia variando entre 2% e 40% com base em avaliações sorológicas ou parasitológicas (Martín-Escolano *et. al.*, 2020; Perez-Molina *et. al.*, 2020).

O benznidazol pertence à classe dos nitroimidazóis, sua ação é devido a nitrorredução que atuam nas macromoléculas do parasita e que perdem sua função levando consequentemente a sua morte, este fármaco é ativo principalmente na fase aguda, e utilizado na crônica da doença de Chagas, a posologia consiste na administração via oral de 5mg/kg/dia em 2-3 doses durante 60-120 dias. Portanto, devido ao longo período de tratamento bem como toxicidade do composto, existe uma grande taxa de descontinuação do tratamento devido a inúmeros efeitos colaterais, como hepatotoxicidade, dermatites, dentre outros. No Brasil, o benznidazol é o único composto utilizado para o tratamento dessa enfermidade (Martín-Escolano *et. al.*, 2022; Ruiz-Lancheros *et. al.*, 2019); e o nifurtimox, embora descontinuado no Brasil devido a fortes efeitos colaterais, é um tratamento de escolha quando há resistência ao benznidazol.

1.4. Cruzaína protease como alvo terapêutico

A enzima cruzaína é a principal protease do *T. cruzi*, tendo sido amplamente estudada como alvo terapêutico no tratamento da doença de Chagas. A cruzaína é uma endoprotease da superfamília da cisteína protease do tipo papaína, na qual se incluem também as Catepsina-Ls, é encontrada em todas as formas do protozoário (Eakin *et. al.*, 1992). Na epimastigota, se encontra em organelas semelhantes a lisossomos, na tripomastigota fica próxima ao flagelo e na amastigota próxima a parede celular. Sua localização nas células reflete o fato que esta enzima participa não só da obtenção de aminoácidos através de proteólise, mas também está envolvida em processos imunogênicos e de evasão da resposta imune (Doyle *et. al.*, 2011). Isso faz com que a cruzaína seja tratada como um alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Graul *et. al.*, 2013; Engel *et. al.*, 1998).

A forma recombinante da cruzaína madura é um monômero que possui 215 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, estes aminoácidos se organizam enovelando-se em dois domínios, o primeiro com a estrutura predominantemente helicoidal e o segundo com folhas betas antiparalelas formando uma estrutura semelhante a um barril beta. Entre os domínios se encontra o sítio de interação com o substrato que pode ser dividido em sete subsítios, dos quais apenas quatro são alvos para estudos visando a desenvolvimento de inibidores, os subsítios S1, S1', S2 e S3 (nos substratos as partes que interagem com respectivos sítios são denominados P1, P1', P2 e P3). Entre o sítio S1 e o S1' está a cisteína catalítica (Cys25), assim como His162 e Asp182 que formam a tríade catalítica da enzima, sendo esses dois últimos aminoácidos responsáveis pela região conhecida como cavidade do oxiânion que tem importância no mecanismo da reação catalisada pela enzima (Eakin *et. al.*, 1993; Cazzulo *et. al.* 2001).

O sítio S2 é responsável pela seletividade ao substrato, possuindo uma cavidade predominantemente hidrofóbica, mas que possui também o resíduo Glu208 mais ao fundo da cavidade, permitindo desta forma interações com aminoácidos hidrofóbicos (Phe) e com peptídeos carregados positivamente como a arginina. Entre os subsítios S1 e S3 há uma região hidrofílica que atua como ponto de reconhecimento para a ligação peptídica através da interação com a Gly66. O S3 e S1' são regiões hidrofóbicas pouco exploradas, contudo são alvos promissores para estudos de seletividade de inibidores. Os subsítios S1, S1' e S2 responsáveis pela interação com o substrato enquanto o S3 responsável pela sua especificidade.

1.5. Inibidores de cruzaína protease

Os inibidores de cisteína protease, assim como de outras proteases, podem ser divididos de uma maneira simplificada: quanto a sua estrutura em peptídeo-miméticos e não peptídicos; e também quanto ao seu tipo de inibição em reversível e irreversível. Independentemente de sua classificação, os inibidores seguem o mesmo padrão estrutural, uma sequência de reconhecimento (peptídica ou não peptídica) e um grupo de interação com o sítio ativo. Inibidores que se ligam covalentemente de maneira reversível ou irreversível com a cisteína catalítica apresentam um grupo eletrofílico, conhecido como *warhead* (Sajid *et. al.*, 2011; Lombardino *et. al.*, 2004).

A cruzaína possui classes de inibidores não peptídicos irreversíveis, sendo a em sua maioria modificações de inibidores de outras proteases. Inicialmente inibidores das classes das *N*-acil-hidrazonas e chalconas foram testadas contra a enzima, resultando na identificação de novos inibidores com potência significativa, contudo restrita. Baseado nestes resultados outras classes de inibidores de proteases reversíveis foram testados, moléculas das classes das

ariluréias e as tiouréias que também apresentaram bons resultados. Outra estratégia utilizada foi a junção de isatinas com as tiossemicarbazonas. A hibridização desses dois grupos resultou em compostos potentes, mas com atividade inibitória significativamente superior à outras tiossemicarbazonas sem esta modificação (Utzinger *et. al.*, 2012; Fujii *et. al.*, 2005).

1.6. Planejamento de novos inibidores da cruzaina protease

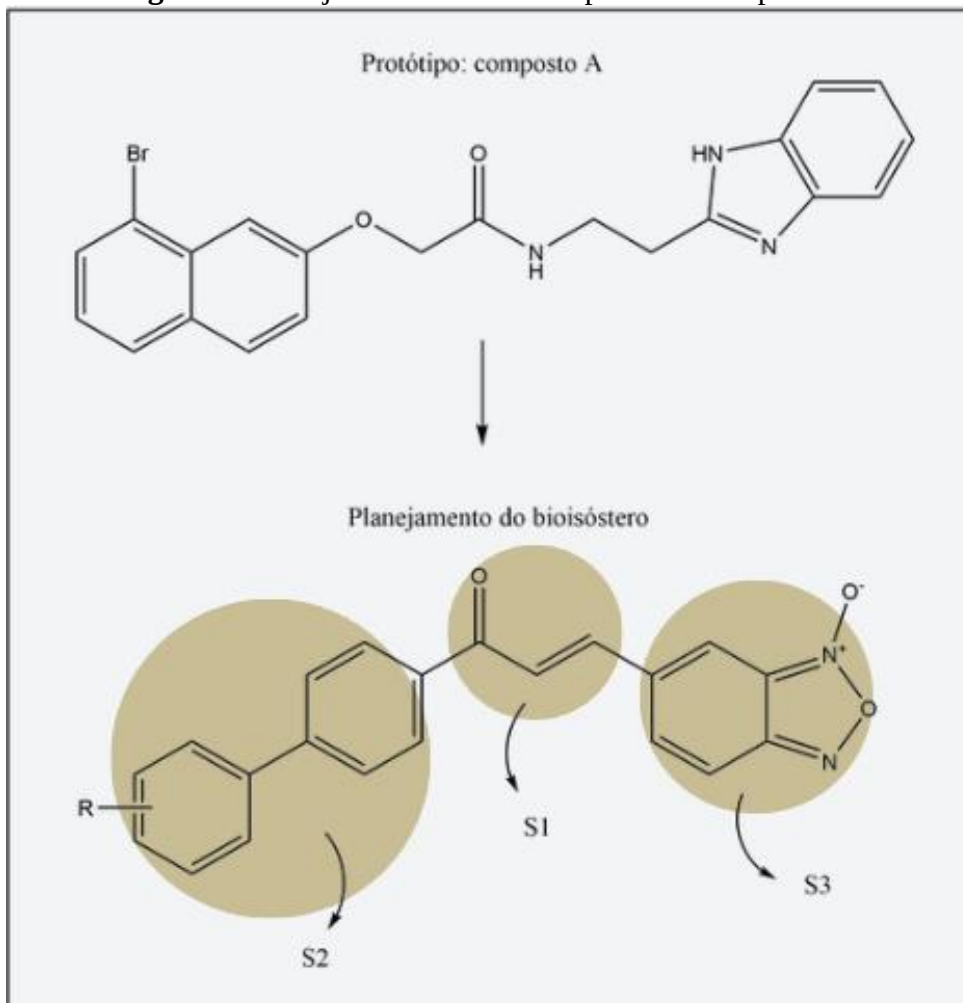
Nos últimos anos, muitos inibidores de proteases têm sido descritos. Em comum, esses compostos apresentam grupos eletrofílicos como semicarbazonas, tiossemicarbazonas, nitrilas, N-acil-hidrazonas, carbonilas α,β -insaturadas e chalconas (Avelar *et. al.*, 2015; Mane *et. al.*, 2013; Schroder *et. al.*, 2013; Steert *et. al.*, 2010). A química combinatória dinâmica direcionada ao alvo surgiu como uma estratégia para a identificação de inibidores de alvos terapêuticos considerados relevantes. Trabalhar com estratégias de modificação molecular, acrescido da intuição do pesquisador e conhecimento de bioisosterismo permite o desenho de uma série de novas moléculas e a “reciclagem” de substâncias antes descartadas por problemas de toxicidade, farmacocinéticos ou farmacotécnicos, possibilitando a inovação tecnológica de candidatos a fármacos de forma inteligente, simples, criativa e barata (Lima *et. al.* 2017).

O desenvolvimento de inibidores da cruzaina tem sido impulsionado pela necessidade urgente de desenvolver fármacos novos e mais eficazes para o tratamento da doença de Chagas. Aqui, relataremos a otimização de um potente inibidor que faz parte de uma classe de inibidores não covalentes da cruzaina, a partir de um inibidor previamente co-cristalizado com a enzima ($K_i = 0,8 \mu\text{M}$, composto A, Figura 1). Com o objetivo de obter uma melhor compreensão das relações estrutura-atividade, planejamos uma série de análogos bioisósteros. Como proposta inicial para o desenvolvimento de novos inibidores de cisteína protease do *T. cruzi*, da classe dos benzofuroxanos, será realizada a síntese bioisostérica do composto A (Figura 1) (Pauli *et. al.*, 2017; Ferreira *et. al.*, 2014), pois temos a hipótese de que a inversão da estrutura do ligante posicione os grupos lipofílicos na região S2 do sítio catalítico das cisteína proteases. A partir dessa estrutura, serão realizadas substituições nas porções visando otimizar as interações dos novos ligantes com os subsítios S2 que é uma região explorada, principalmente para seletividade frente a HsCatL e tem a capacidade de acomodar grupos hidrofóbicos e volumosos. Serão realizadas alterações também nas regiões de S1 e *warhead*.

No desenvolvimento do trabalho foi avaliado a influência do *warhead* na afinidade da enzima pelos ligantes. Foram sintetizados compostos contendo o grupo carbonila α,β -insaturadas. Abaixo, na Figura 1, encontram-se as substituições propostas para as regiões e também o novo *warhead*. Sabe-se que em S2, grupos volumosos e hidrofóbicos são bem

acomodados. Dessa forma, com base no resultado preliminar obtido no experimento de modelagem molecular, modificações estruturais em S2 foram propostas para o composto A com objetivo de otimizar sua atividade, e aproximação da porção da carbonila α,β -insaturada (novo *warhead*) à serina, na região S1 do sítio catalítico da cruzaina, favorecendo o ataque nucleofílico

Figura 1. Planejamento estrutural a partir do composto A.



Fonte: adaptado de Rodriguez Gini *et. al.* (2024)

2 OBJETIVO

O objetivo é a obtenção da série de moléculas das carbonilas α,β -insaturadas capazes de inibir a cruzaina, podendo caracterizar novos fármacos candidatos ao tratamento da doença de Chagas.

2.1. Objetivos específicos

- Síntese dos derivados de carbonilas α,β -insaturadas.
- Purificação e caracterização estrutural das moléculas sintetizadas.
- *Docking* molecular das moléculas sintetizadas.

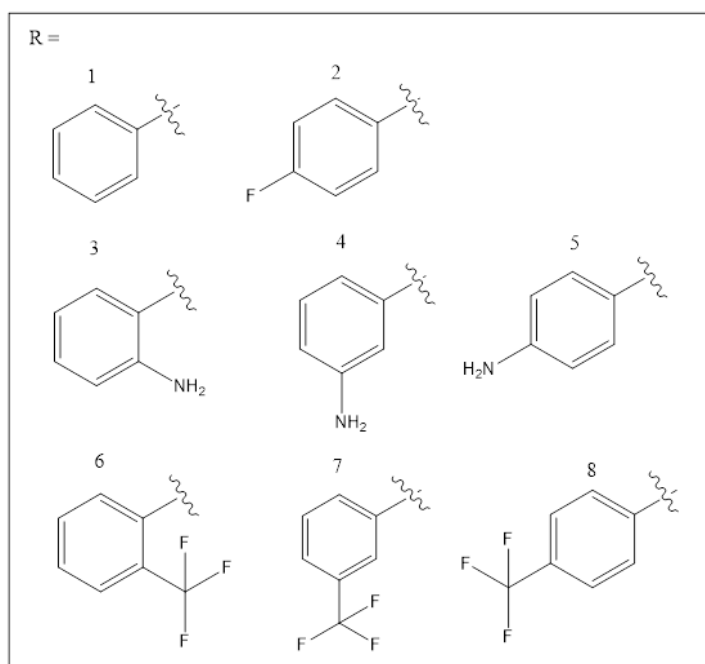
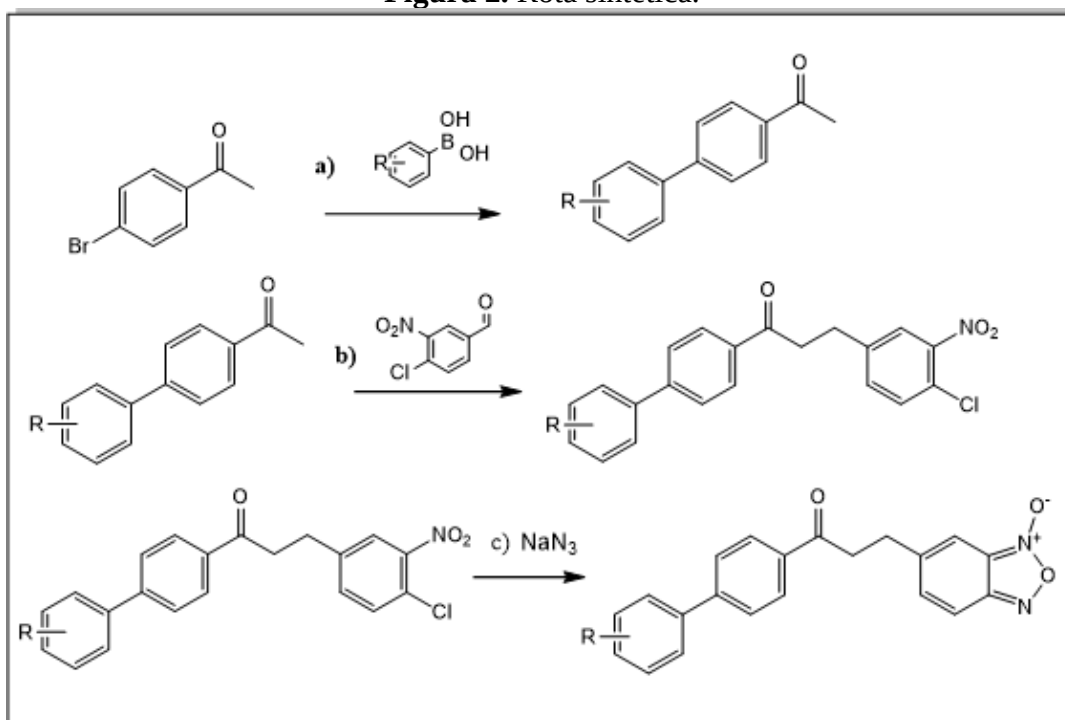
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Metodologia sintética

A síntese dos compostos ocorreu em 3 etapas como ilustrado na Figura 2. Primeiramente, foi realizado um acoplamento por meio da reação de Suzuki-Miyaura. Nesta etapa utilizou-se 1 mmol (200 mg) de 4-bromocetofenona e 1 mmol (360 mg) de carbonato de cézio (Cs_2CO_3) em mínimo de água para reagir em excesso com derivados de ácido borônico. A reação ocorre com 10 mL de dioxano, e o catalisador paládio tetrakis ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) é adicionado imediatamente antes de iniciar um refluxo a 90 °C em banho de óleo e agitação por até 24h. Ao fim, reteve-se o catalisador em celite utilizando metanol e filtração à vácuo para, após, seguir com a secagem da fase oleosa.

Na segunda etapa, ocorreu uma condensação de Claisen-Schmidt, utilizando seu intermediário anterior, e na mesma proporção de 4-cloro-3-nitrobenzaldeído, para reagir em meio básico e anidro por até 6h. A reação foi mantida à temperatura ambiente em balão de fundo redondo sob agitação. Após a formação das chalconas, o produto passou pela precipitação em gelo e enfim filtração à vácuo para retê-lo.

Na última etapa obtém-se o núcleo benzofuroxano com azida de sódio na mesma proporção do intermediário anterior e 10 mL de DMSO sob refluxo a 75 °C por 1h; então o produto passou por extração com gelo e secagem desta fase oleosa. Enfim adicionou-se 40 mL de tolueno ao balão de fundo redondo e manteve-se a reação a 120 °C sob refluxo e agitação por 1h30. Após, seguiu para secagem do solvente e filtração com acetato de etila e carvão ativado. O produto foi precipitado em éter de petróleo. A caracterização dos compostos ocorreu por RMN ^1H , DEPTQ, HSQC e HMBC que estão disponíveis na seção 4 e no Apêndice deste trabalho.

Figura 2. Rota sintética.

Fonte: autoria própria.

a) $Pd(PPh_3)_4$, dioxano, 110 °C, 2-24h

b) etanol anidro, NaOH, 2-6h

c) DMSO, 75 °C, 1h; tolueno, 120°C, 90 min

3.2. Caracterização estrutural

3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

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

3.2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN uni e bidimensionais (Bruker 600 e Bruker 300, operando a 600 MHz e 300 MHz, respectivamente, para o núcleo de ^1H e TMS como referência interna e a 150 MHz para ^{13}C) foram realizadas utilizando solvente deuterado (DMSO- d_6).

3.3. Docking molecular

As etapas dos estudos *in silico* foram desenvolvidas em uma estação de trabalho em ambiente Windows 7 equipada com processador i7-4790, 16 GB de memória RAM, 1 TB de disco rígido e placa de processamento gráfico Nvidia GTX 980. Os programas utilizados no projeto foram o ambiente de modelagem molecular Maestro contendo os pacotes Prime, Protein Preparation Wizard, Lig Prep, Covalent Dock e Glide. Para o estudo computacional, a estrutura cristalográfica da cruzaina foi obtida do banco de dados do Protein Data Bank (PDB) sob o código 2OZ2 (Kerr, *et. al.* 2009). A estrutura foi importada para o software isoladamente e preparadas para o estudo de ancoragem molecular utilizando a função *Protein Preparation Wizard*. O seguinte protocolo foi executado: (i) remoção das moléculas de água; (ii) adição de átomos de hidrogênio; (iii) preenchimento de cadeias laterais incompletas; (iv) minimização de energia utilizando o campo de força OPLS3. A caixa de interação (“*grid*”) foi definida pelo *Receptor Grid Generation* (Schrödinger, 2017b), com dimensões de 10 Å x 10 Å x 10 Å. Com a conclusão do preparo da proteína, os ligantes foram desenhados e importados no formato SDF para o software Maestro® e sua preparação se deu através da função *Ligand Preparation (LigPrep)* a fim de realizar a minimização de energia utilizando campo de força OPLS3, e obter a simulação dos possíveis estados de ionização em pH 7 ± 2 . Para a realização do ancoramento molecular utilizou-se a função *Glide* em modo *Extra Precision (XP)* gerando de 10 a 20 poses por molécula.

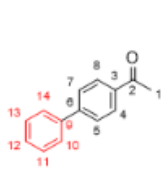
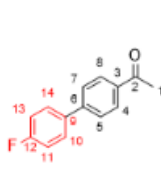
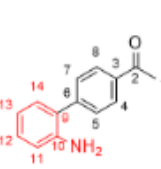
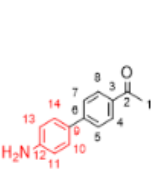
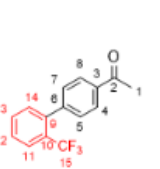
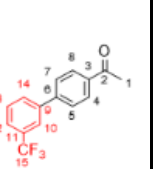
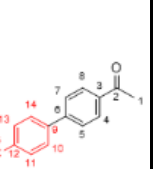
Para determinar a eficiência de todos os parâmetros utilizados neste estudo, o modelo foi validado por *redocking*, em que os ligantes originais das proteínas foram removidos e

seguidamente, ancorados no mesmo sítio enzimático. A qualidade deste resultado foi analisada pelo cálculo *Root Mean Square Deviation* (RMSD) entre o ligante co-cristalizado e o “redocado”. O valor obtido é considerado de confiança quando o RMSD for inferior a 2 Å (Yusuf *et. al.*, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

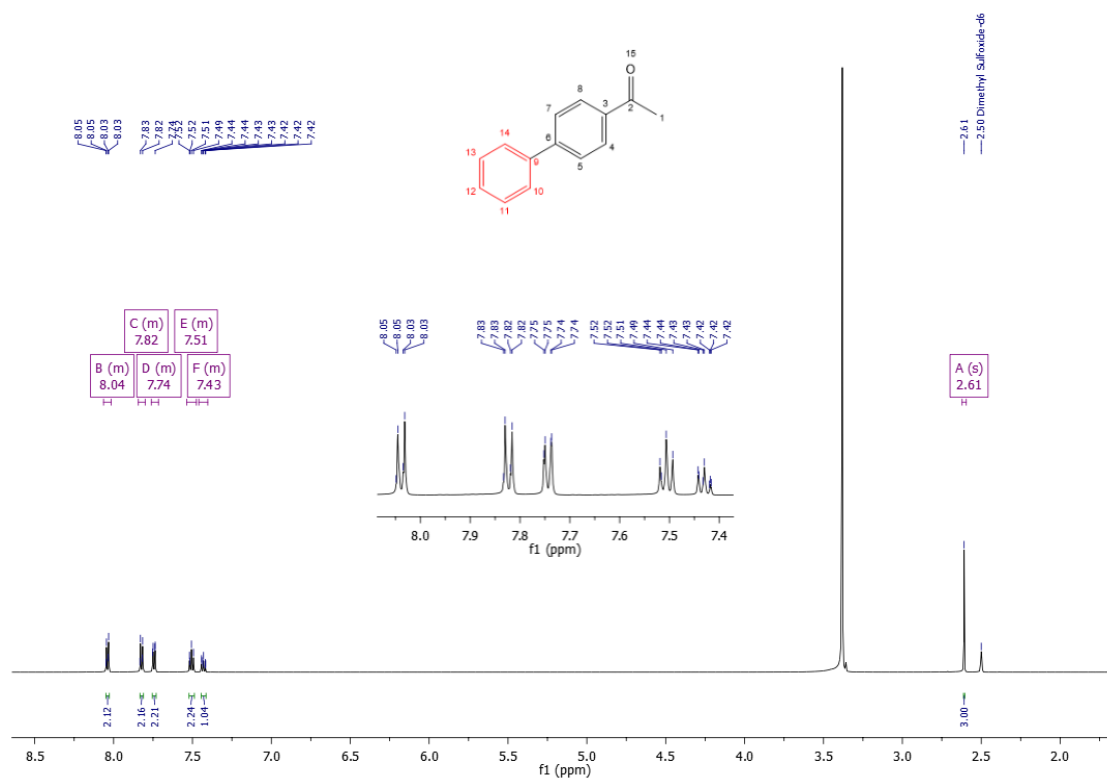
Quanto à obtenção dos compostos, a primeira etapa consiste na síntese dos intermediários provenientes da reação de Suzuki. Estes foram purificados em coluna de bancada (CC), com fase móvel na proporção 7:3, 8:2 ou 9:1 hexano e acetato de etila apresentando rendimentos de 25 a 85%, indicado pela Tabela 1. Foi possível notar que a discrepância entre tempo reacional e rendimentos frente aos substituintes amino ocorreu por fotossensibilidade e reatividade do par de elétrons livres do nitrogênio; especificamente, o composto S4 não foi obtido devido ao baixo rendimento reacional. Optou-se por apresentar o espectro de RMN de ^1H nesta seção (Figuras 3 a 9) e destacar parte da Tabela 2 quanto aos resultados dos deslocamentos químicos obtidos.

Tabela 1. Resumo dos dados de rendimento parcial e aspecto dos compostos provenientes da reação de Suzuki-Miyaura.

							
	S1	S2	S3	S5	S6	S7	S8
Rendimento parcial (%)	85	75	25	35	40	41	41
Aspecto	sólido branco	sólido cinza	sólido amarelo	óleo laranja	óleo amarelo	óleo amarelo	sólido branco

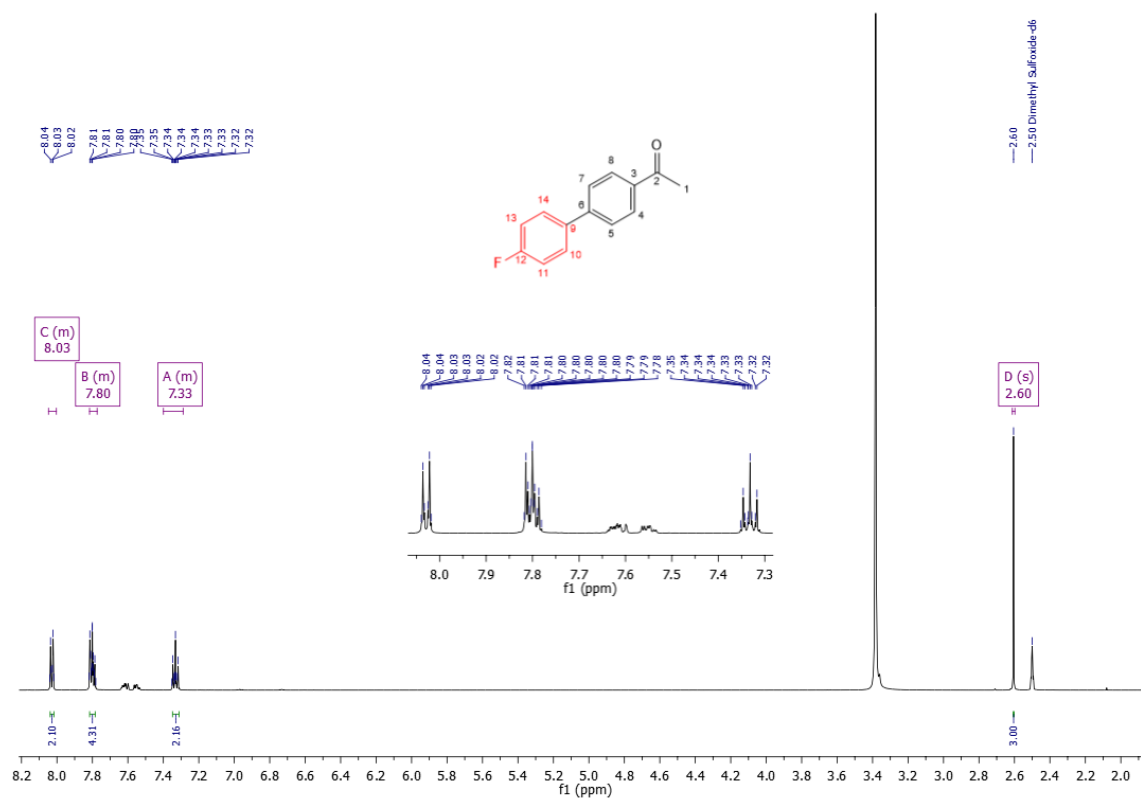
Fonte: autoria própria.

Figura 3. RMN de ^1H do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



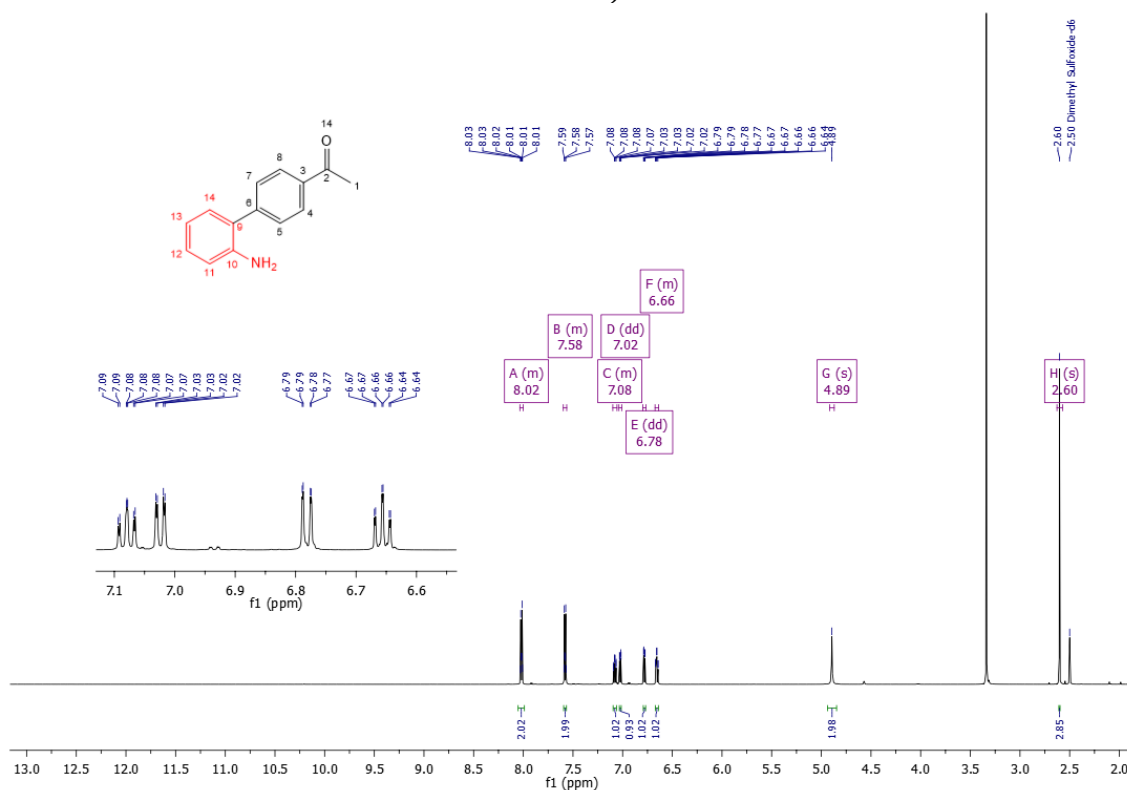
Fonte: autoria própria.

Figura 4. RMN de ^1H do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



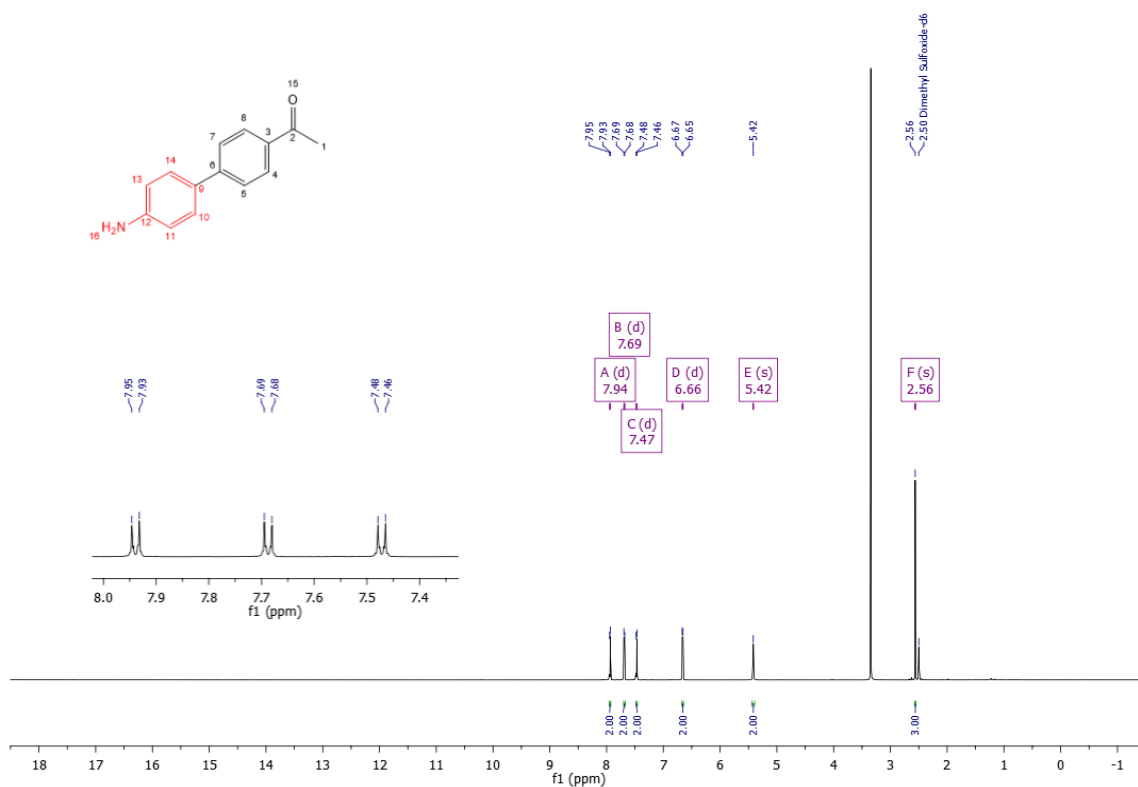
Fonte: autoria própria.

Figura 5. RMN de ^1H do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



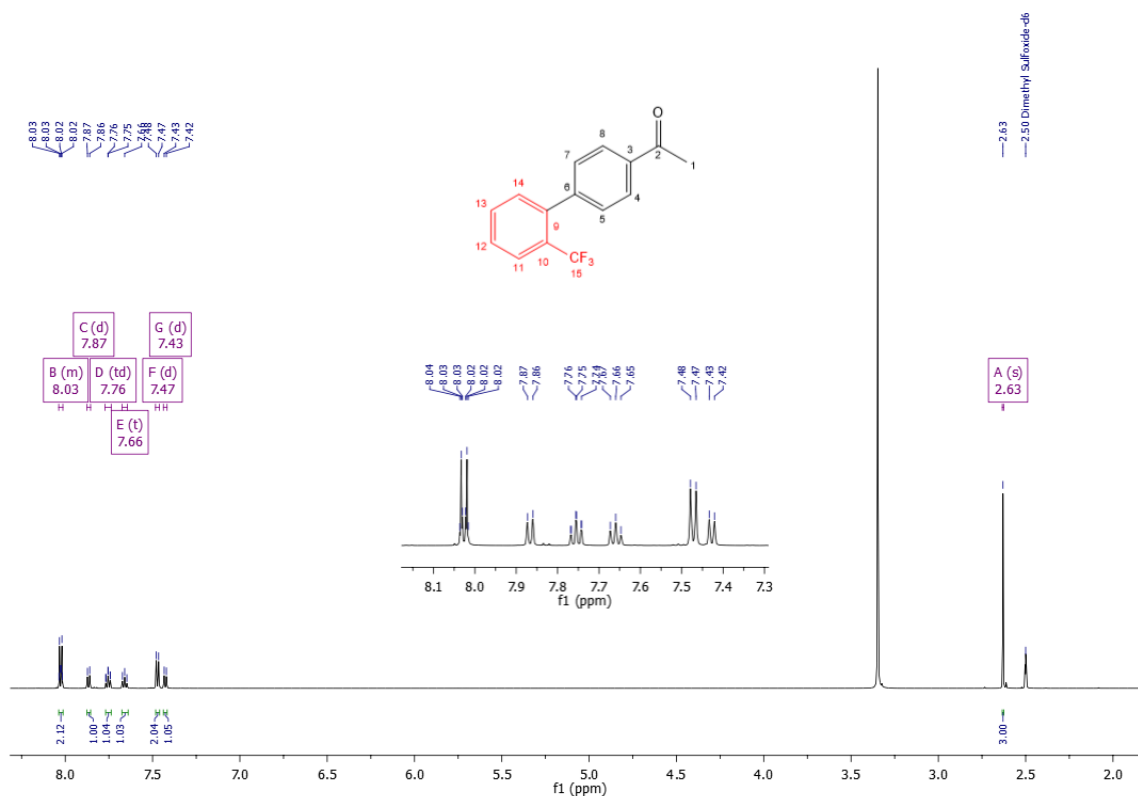
Fonte: autoria própria.

Figura 6. RMN de ^1H do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



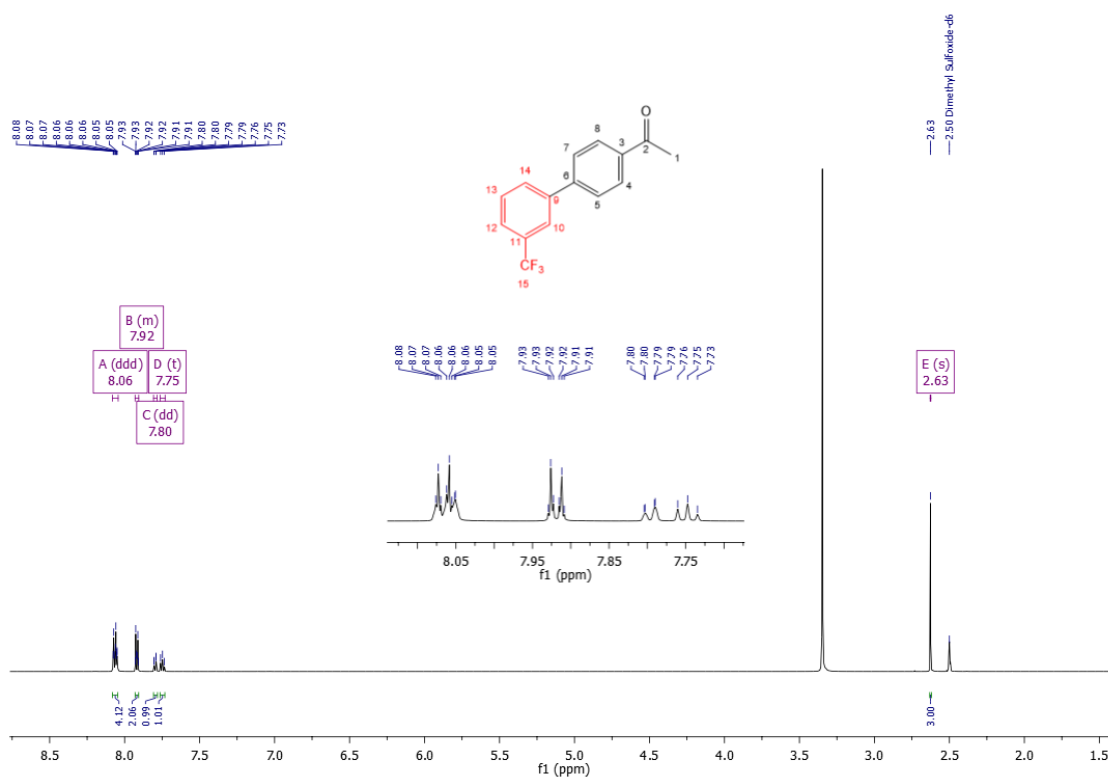
Fonte: autoria própria.

Figura 7. RMN de ^1H do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



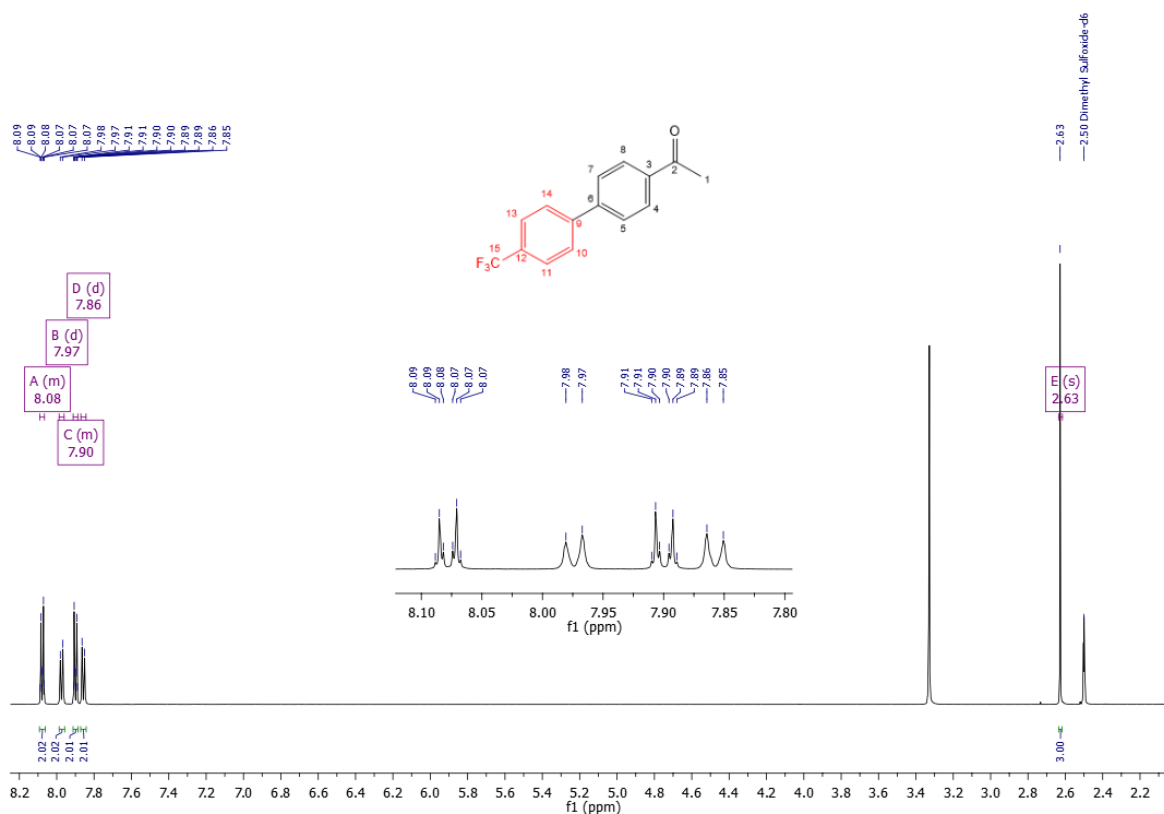
Fonte: autoria própria.

Figura 8. RMN de ^1H do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



Fonte: autoria própria.

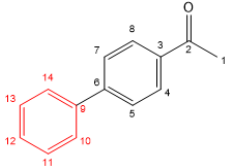
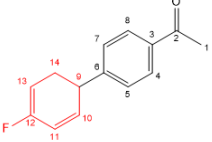
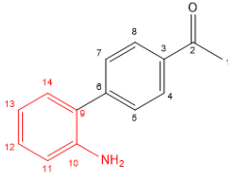
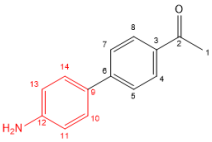
Figura 9. RMN de ^1H do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



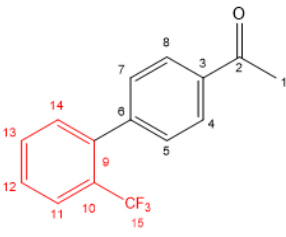
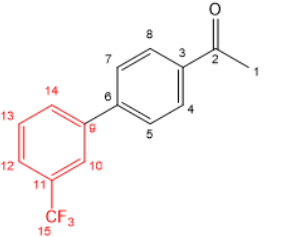
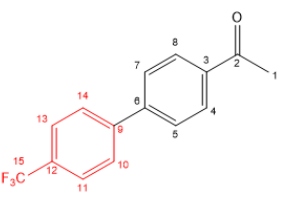
Fonte: autoria própria.

Nos espectros acima pôde-se observar a quantidade total de hidrogênios das moléculas sendo os sinais característicos dos hidrogênios da região dos aromáticos (entre 8,0 e 7,0 ppm). O simpleto na faixa de 2,61 ppm com integração para 3 hidrogênios indica o sinal proveniente da metila da cetona. Os hidrogênios aromáticos 4 e 8 indicaram multipletos mais desblindados do espectro e que integraram para 2, proveniente do acoplamento com a carbonila.

Tabela 2. Caracterização estrutural dos intermediários provenientes da reação de Suzuki.

								
	S1		S2		S3		S5	
Posição	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1	2,61 (s, 3H)	26,42	2,60 (s, 3H)	26,83	2,60 (s, 3H)	26,72	2,56 (s, 3H)	26,61
2	-	197,61	-	197,59	-	197,49	-	197,20
3	-	144,59	-	135,65	-	145,16	-	149,48
4	8,05 - 8,03 (m, 2H)	129,16	8,04 - 8,02 (m, 2H)	128,98	8,03 - 8,01 (m, 2H)	128,70	7,95 - 7,93 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	128,90
5	7,83 - 7,82 (m, 2H)	128,96	7,82 - 7,78 (m, 4H)	126,87	7,59 - 7,57 (m, 2H)	128,85	7,48 - 7,46 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	127,65
6	-	138,95	-	143,50	-	135,07	-	133,94
7	7,83 - 7,82 (m, 2H)	128,96	7,82 - 7,78 (m, 4H)	126,87	7,59 - 7,57 (m, 2H)	128,85	7,48 - 7,46 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	127,65
8	8,05 - 8,03 (m, 2H)	129,16	8,04 - 8,02 (m, 2H)	128,98	8,03 - 8,01 (m, 2H)	128,70	7,95 - 7,93 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	128,90
9	-	135,69	-	135,42 (d, J = 28,0 Hz)	-	144,74	-	145,13
10	7,75 - 7,74 (m, 2H)	127,04	7,82 - 7,78 (m, 4H)	129,17 (d, J = 8,4 Hz)	-	124,47	7,69 - 7,68 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	124,98
11	7,52 - 7,49 (m, 2H)	126,93	7,35 - 7,32 (m, 2H)	116,00 (d, J = 21,4 Hz)	6,67 - 6,64 (m, 1H)	116,82	6,67 - 6,65 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	114,17
12	7,44 - 7,42 (m, 1H)	128,44	-	162,45 (d, J = 245,8 Hz)	6,79 - 6,77 (dd, J = 8,07 e 0,94 Hz, 1H)	115,57	-	125,58
13	7,52 - 7,49 (m, 2H)	126,93	7,35 - 7,32 (m, 2H)	116,00 (d, J = 21,4 Hz)	7,09 - 7,06 (m, 1H)	128,89	6,67 - 6,65 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	114,17
14	7,75 - 7,74 (m, 2H)	127,04	7,82 - 7,78 (m, 4H)	129,17 (d, J = 8,4 Hz)	7,03 - 7,02 (dd, J = 7,57 e 1,53 Hz, 1H)	130,01	7,69 - 7,68 (d, J = 8,6 Hz, 2H)	124,98
15	-	-	-	-	-	-	-	-
NH2	-	-	-	-	4,89 (s, 2H)	-	5,42 (s, 2H)	-

Continuação da Tabela 2

						
	S6		S7		S8	
Posição	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1	2,63 (s, 3H)	26,82	2,63 (s, 3H)	26,86	2,63 (s, 3H)	26,85
2	-	197,64	-	197,60	-	197,57
3	-	143,94	-	142,82	-	142,94
4	8,09 - 8,02 (m, 2H)	127,86	8,08 -8,05 (ddd, J = 1,3, 3,3 e 6,9 Hz, 4H)	128,99	8,09 - 8,07 (m, 2H)	128,99
5	7,48 - 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	129,16	7,93 - 7,91 (m, 2H)	127,32	7,91 - 7,89 (m, 2H)	127,89
6	-	136,13	-	136,28	-	136,43
7	7,48 - 7,47 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	129,16	7,93 - 7,91 (m, 2H)	127,32	7,91 - 7,89 (m, 2H)	127,89
8	8,09 - 8,02 (m, 2H)	127,86	8,08 -8,05 (ddd, J = 1,3, 3,3 e 6,9 Hz, 4H)	128,99	8,09 - 8,07 (m, 2H)	128,99
9	-	139,67	-	140,01	-	142,85
10	-	126,73 (d, J = 29,9 Hz),	8,08 -8,05 (ddd, J = 1,3, 3,3 e 6,9 Hz, 4H)	124,96	7,86 - 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	127,89
11	7,87 - 7,86 (d, J = 7,8 Hz, 1H)	126,19 (q, J = 5,0 Hz)	-	129,94 (d, J = 31,8 Hz)	7,98 - 7,97 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	125,91 (m)
12	7,43 - 7,42 (d, J = 7,5 Hz, 1H)	131,82	8,08 -8,05 (ddd, J = 1,3, 3,3 e 6,9 Hz, 4H)	123,47	-	128,61 (d, J = 31,1 Hz)
13	7,77 - 7,74 (td, J = 7,5 e 0,5 Hz, 1H)	132,47	7,76 - 7,73 (t, J = 7,7 Hz, 1H)	130,26	7,98 - 7,97 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	125,91 (m)
14	7,67 - 7,65 (t, J = 7,8 Hz, 1H)	128,60	7,80 - 7,79 (dd, J = 7,8 e 0,6 Hz, 1H)	131,19	7,86 - 7,85 (d, J = 8,1 Hz, 2H)	127,89
15	-	124,11 (d, J = 274,01 Hz)	-	124,16 (d, J = 274,99)	-	124,27 (d, J = 271,9 Hz)
NH2	-	-	-	-	-	-

Fonte: autoria própria.

Especificamente, a molécula S2 indicou sinais sobrepostos em 7,82 - 7,78 ppm (m, 4H) referentes às posições 5, 7, 10 e 14, confirmado pelo experimento de HMBC, em que acopla com dois carbonos terciários provenientes de cada sistema aromático. Sendo assim, o $\delta H = 7,35 - 7,32$ integrando para 2 hidrogênios refere-se às posições 11 e 13 provenientes do anel destacado em vermelho. A partir do experimento de DEPTQ, pôde-se inferir que os dois carbonos quaternários deste anel em vermelho, 9 e 12, são dupletos com $J = 28,0$ e $245,8$ Hz respectivamente, caracterizando acoplamento com o flúor; paralelamente os carbonos terciários que acoplaram com o flúor em dupletos se sobrepuseram com $J = 8,4$ Hz para as posições 10 e 14 e $J = 21,4$ Hz, para 11 e 13. Já as posições dos carbonos 5 e 7 foram identificadas sobrepostas utilizando o experimento HSQC, enquanto os quaternários 3 e 6, pelo HMBC, uma vez que a posição 3 acoplou com a metila - diferente da posição 6.

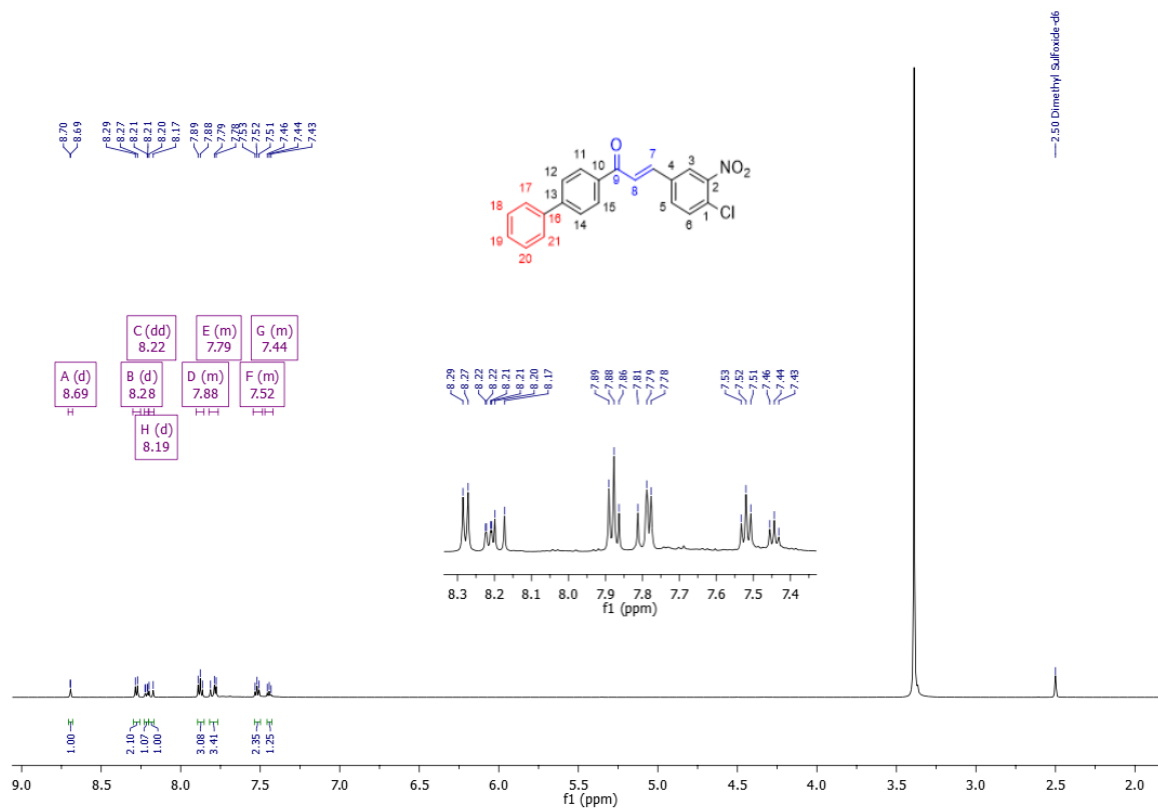
Para a etapa seguinte, foram realizadas reações de Claisen-Schmidt. Com isso, houve a obtenção dos intermediários chalcona que foram purificados em CC na proporção 8:2 hexano-acetato e com rendimento parcial de 70 a 80%, indicado pela Tabela 3. Optou-se por apresentar os espectros de RMN de 1H e DEPTQ nesta seção (Figuras 10 a 13) e destacar parte da Tabela 4 quanto aos resultados dos deslocamentos químicos obtidos.

Tabela 3. Resumo dos dados de rendimento parcial e aspecto dos compostos provenientes da reação de Claisen-Schmidt.

	C1	C2
Rendimento parcial (%)	80	70
Aspecto	sólido amarelo	sólido laranja

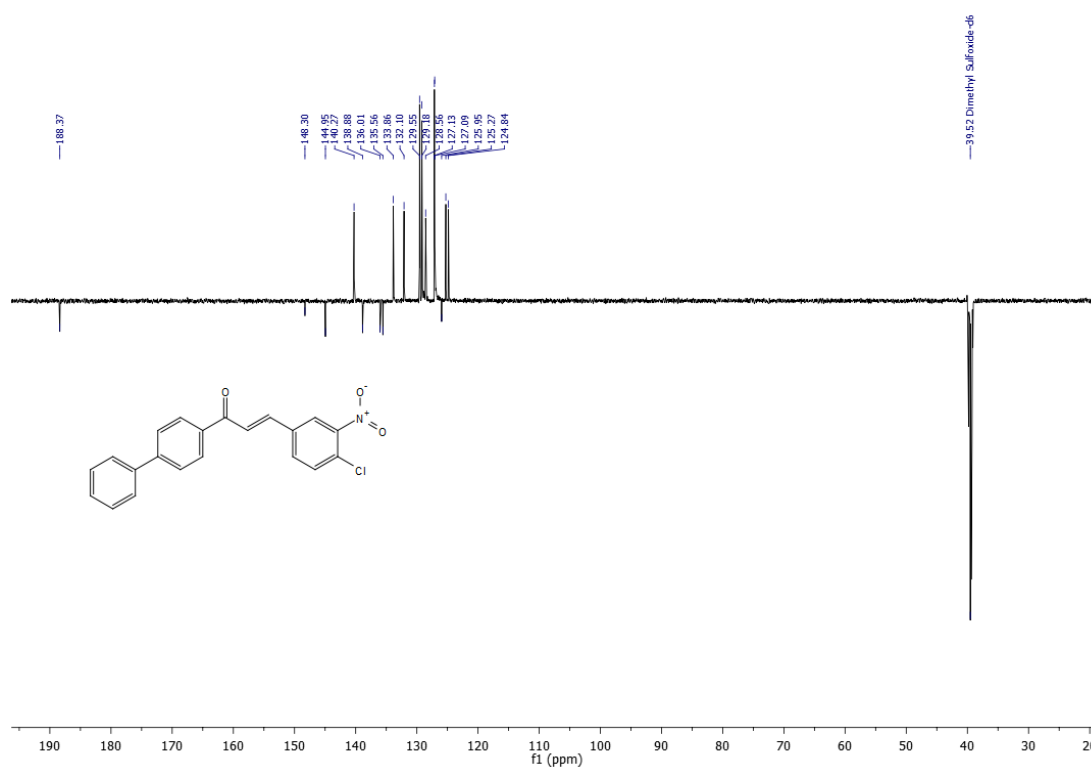
Fonte: autoria própria.

Figura 10. RMN de ^1H do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).



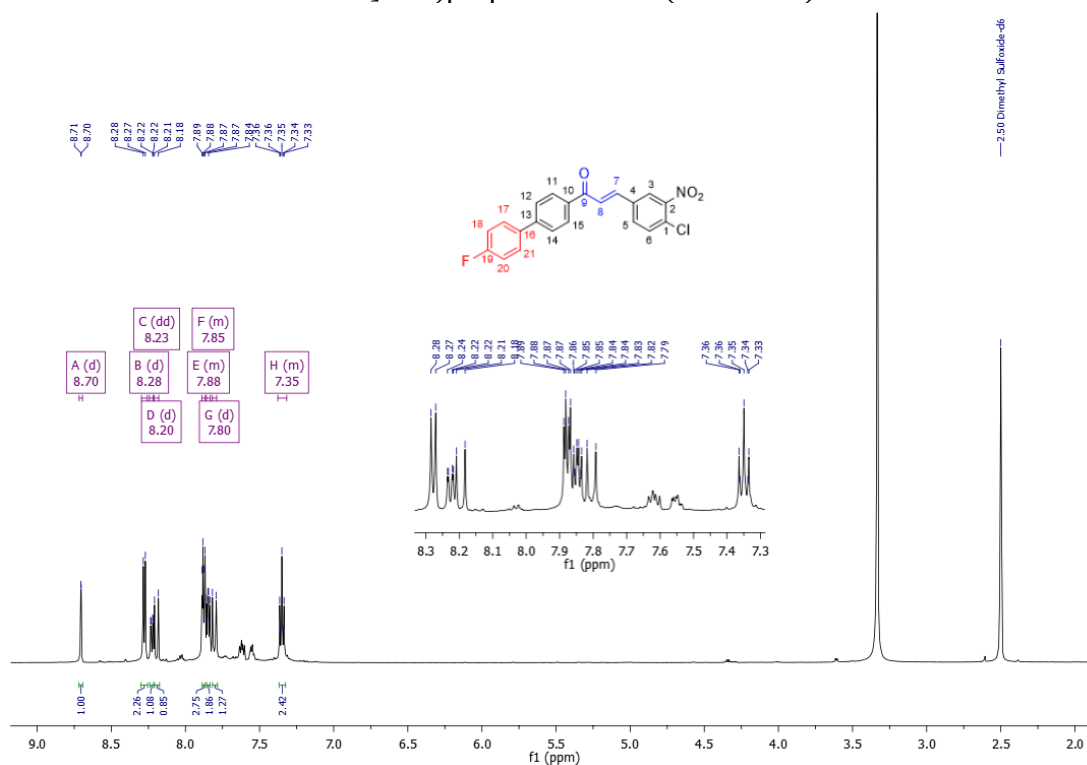
Fonte: autoria própria.

Figura 11. RMN de DEPTQ do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).



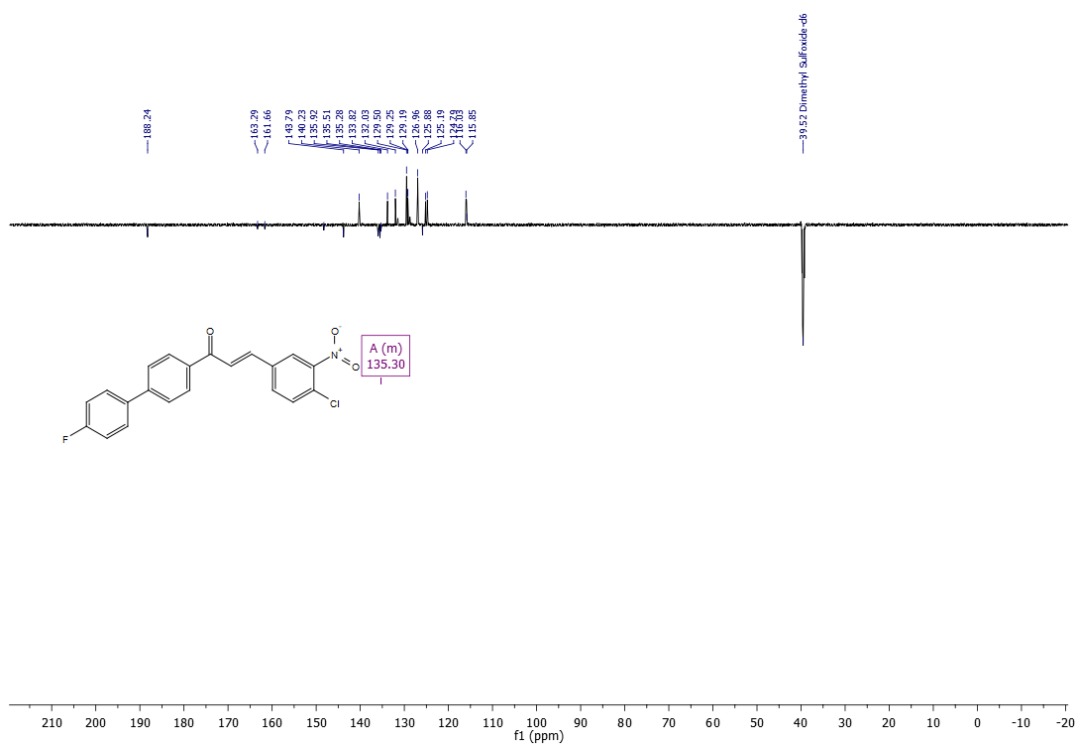
Fonte: autoria própria.

Figura 12. RMN de ^1H do intermediário C2: (E)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).



Fonte: autoria própria.

Figura 13. RMN de DEPTQ do intermediário C2: (E)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)-1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)prop-2-en-1-ona (DMSO- d_6).



Fonte: autoria própria.

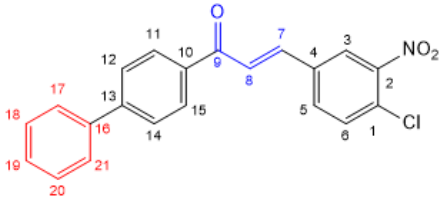
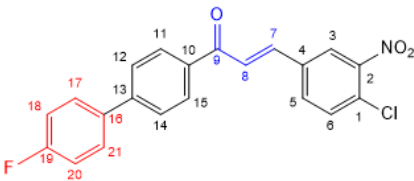
Em ambos os espectros de ^1H , foi possível observar a presença de um sinal mais deslocado em 8,70 ppm (d , $J = 1,9$ Hz, 1H), sendo justificado pelo deslocamento da nuvem eletrônica proveniente dos grupos eletronegativos, NO_2 e Cl , que desblindam este H. A constante de acoplamento sugeriu que a posição 3 acoplou em *meta* com a posição 5. Destacase ainda, o sinal em 8,20 ppm, sendo um duplete com $J = 15,7$ Hz e integração para 1 hidrogênio, caracterizando a obtenção da cetona α,β -insaturada, com isomeria *trans*, o qual foi confirmado ser referente ao H da posição 8.

Especificamente na molécula C2, os hidrogênios das posições 11 e 15 foram identificados em 8,28 - 8,27 ppm, devido ao acoplamento com a carbonila ($\delta\text{C} = 188,37$) observado no HSQC. Outro sinal $\delta\text{H} = 8,23$ (dd , $J = 8,4$ e $1,9$ Hz, 1H) indica a posição 5 acoplado tanto em *orto* quanto *meta* com 6 e 3, respectivamente. Foi identificado que o anel contendo o flúor apresentou dois multipletos com integração para dois hidrogênios cada, esperados pela blindagem do F e simetria da substituição em *para*, e confirmado por DEPTQ quando verificado acoplamento com flúor nas posições 17, 18, 20 e 21 (d , $J = 8,4$ e $21,4$ Hz). Por fim, os três hidrogênios restantes são multipletos localizados nas posições 6, 12 e 14, carbonos terciários, que acoplam tanto com o anel próximo à carbonila quanto com o do grupo nitro.

Os carbonos quaternários de C2 foram caracterizados considerando desproteção do carbono carbonílico da posição 9 em 188,24 ppm para a carbonila, na posição 19 com sinal 162,47 ppm (d , $J = 245,55$ Hz) proveniente do acoplamento direto com flúor, e a posição 2 em 148,25 ppm, proporcional ao deslocamento gerado do grupo nitro. O carbono quaternário 13 apresentou deslocamento 143,79 ppm, e o 16, o sinal 135,29 ppm (d , $J = 3,0$ Hz). Já os sinais das posições 4 e 10 estão na faixa de 135 ppm, justificado pelo espaçador da carbonila α,β -insaturada. Por fim, os carbonos da posição 1 e 8 indicou faixa aproximada em 125 ppm, confirmado pelo acoplamento com hidrogênios a longa distância do experimento HMBC, enquanto a posição 7 refere-se ao sinal 140,23 ppm.

Na reação de Claisen-Schmidt observou-se que o fator de retenção entre o reagente e o produto na CCD eram muito próximos e dessa forma as tentativas de purificação em CC não resultaram em quantidades suficientes para caracterização elementar de demais compostos que tentou-se sintetizar.

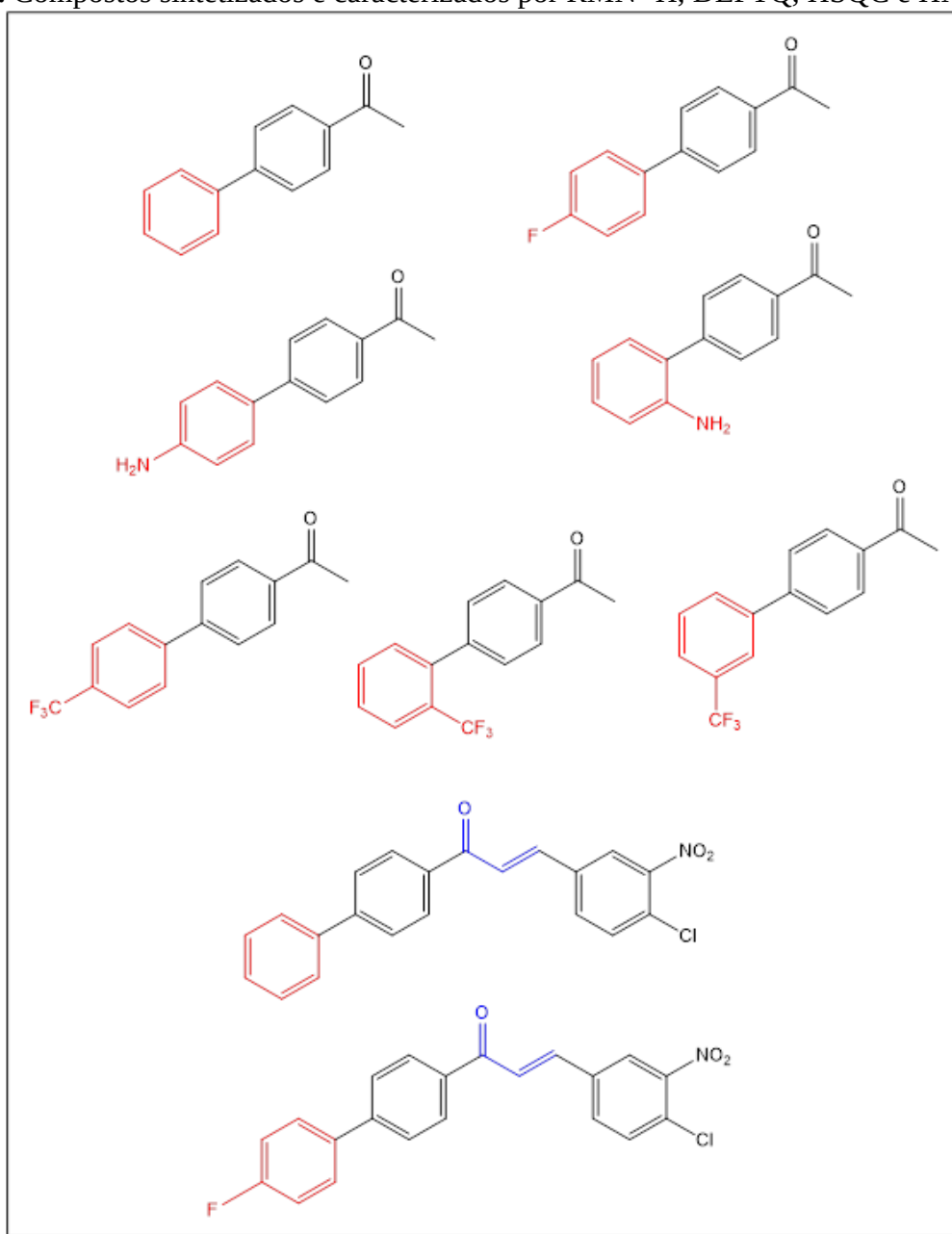
Tabela 4. Caracterização estrutural dos intermediários provenientes da reação de Claisen-Schmidt.

				
	C1		C3	
Posição	δH (ppm)	δC (ppm)	δH (ppm)	δC (ppm)
1	-	125,95	-	125,88
2	-	148,30	-	148,25
3	8,70 - 8,69 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H)	124,84	8,71 - 8,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H)	124,79
4	-	135,56	-	135,51
5	8,22 - 8,21 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 1,8 Hz, 1H)	133,86	8,24 - 8,23 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 8,4 e 1,9 Hz, 1H)	133,82
6	7,89 - 7,86 (<i>m</i> , 3H)	132,10	7,89 - 7,87 (<i>m</i> , 3H)	132,03
7	7,81 - 7,78 (<i>m</i> , 3H)	140,27	7,82 - 7,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,6 Hz, 1H)	140,23
8	8,20 - 8,17 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,7 Hz, 1H)	125,27	8,21 - 8,18 (<i>d</i> , <i>J</i> = 15,7 Hz, 1H)	125,19
9	-	188,37	-	188,24
10	-	136,01	-	135,92
11	8,29 - 8,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)	129,55	8,28 - 8,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)	129,50
12	7,89 - 7,86 (<i>m</i> , 3H)	127,09	7,89 - 7,87 (<i>m</i> , 3H)	126,96
13	-	144,95	-	143,79
14	7,89 - 7,86 (<i>m</i> , 3H)	127,09	7,89 - 7,87 (<i>m</i> , 3H)	126,96
15	8,29 - 8,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)	129,55	8,28 - 8,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H)	129,50
16	-	138,88	-	135,29 (<i>d</i> , <i>J</i> = 3,0 Hz)
17	7,81 - 7,78 (<i>m</i> , 3H)	127,13	7,85 (<i>m</i> , 2H)	129,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)
18	7,53 - 7,51 (<i>m</i> , 2H)	129,18	7,36 - 7,33 (<i>m</i> , 2H)	115,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 21,4 Hz)
19	7,46 - 7,43 (<i>m</i> , 1H)	128,56	-	162,47 (<i>d</i> , <i>J</i> = 245,55 Hz)
20	7,53 - 7,51 (<i>m</i> , 2H)	129,18	7,36 - 7,33 (<i>m</i> , 2H)	115,96 (<i>d</i> , <i>J</i> = 21,4 Hz)
21	7,81 - 7,78 (<i>m</i> , 3H)	127,13	7,85 (<i>m</i> , 2H)	129,22 (<i>d</i> , <i>J</i> = 8,4 Hz)

Fonte: autoria própria.

A síntese final visando o fechamento do anel benzofuroxano foi conduzida de acordo com a metodologia previamente estabelecida, porém não foi possível isolar o produto final desejado em sua forma pura. As tentativas de purificação realizadas não resultaram na obtenção do composto em quantidades suficientes para a realização das análises elementares necessárias à caracterização molecular. Dessa forma, a Figura 14 indica um resumo dos compostos sintetizados no trabalho.

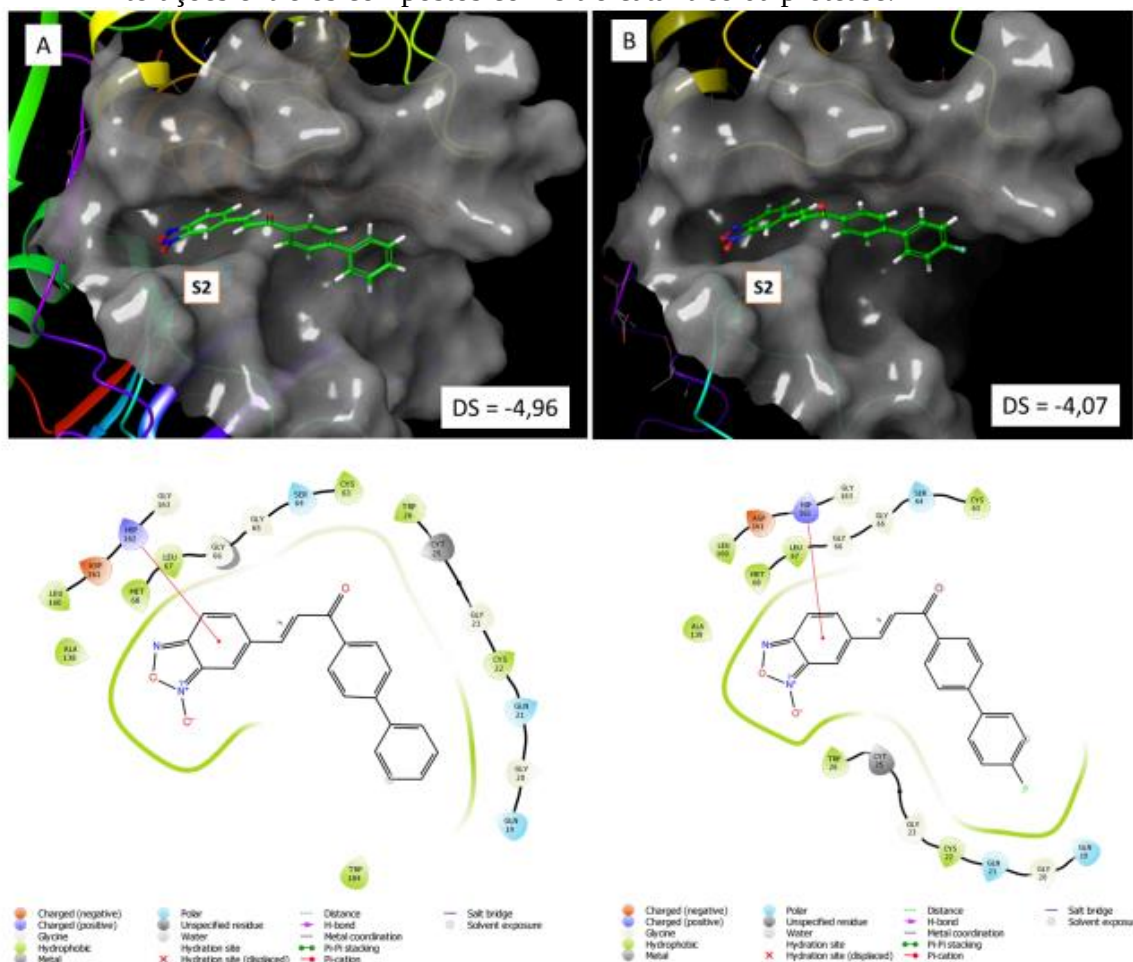
Figura 14. Compostos sintetizados e caracterizados por RMN ^1H , DEPTQ, HSQC e HMBC.



Fonte: autoria própria.

Quanto à avaliação dos compostos por meio da modelagem molecular, de maneira geral, apresentaram poses similares frente a cisteína protease de *T. cruzi*, cruzaina, em que o anel benzofuroxano ocupou na maior parte das poses a cavidade S2 (Figura 15). As moléculas representadas nas figuras A) e B) apresentaram DS = -4,96 e -4,07, respectivamente. A principal interação entre as moléculas e a cruzaina ocorre por uma interação do tipo cátion-pi com a histidina catalítica (His162). Além disso, as moléculas apresentam uma proximidade favorável da cisteína catalítica (Cys25), o que poderia favorecer a formação de uma ligação covalente entre o tiolato e a carbonila α, β insaturada. Nos últimos anos, diversos inibidores de proteases têm sido descritos. Em comum, esses compostos apresentam grupos eletrofílicos, que atuam como warhead no sítio catalítico, como semicarbazonas, tiosemicarbazonas (Schroder *et. al.*, 2013), carbonilas (Steert *et. al.*, 2010), nitrilas (Avelar *et. al.*, 2015), N-acil-hidrazonas e carbonilas α, β -insaturadas (Silva *et. al.*, 2017).

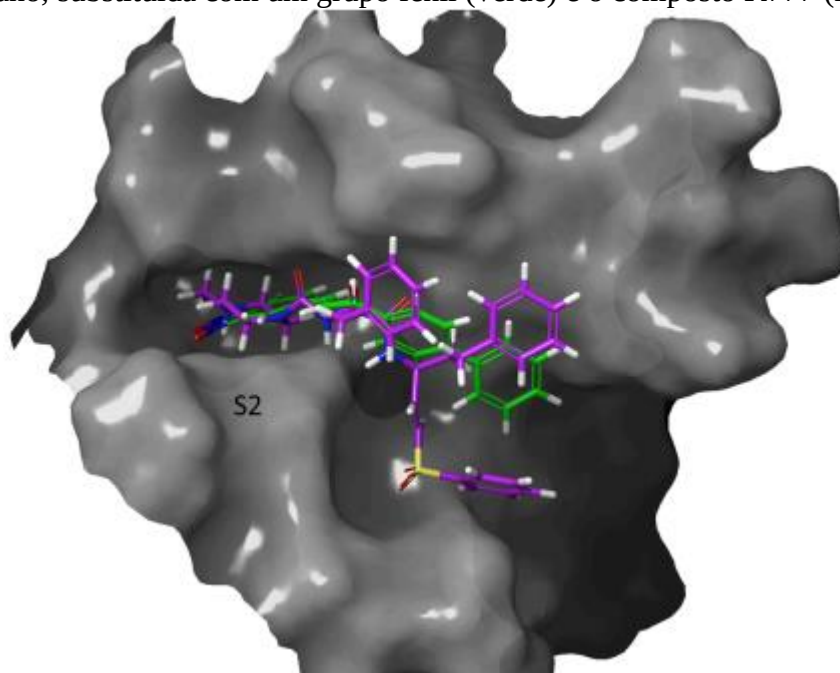
Figura 15. Docking molecular entre os derivados de carbonilas α, β -insaturadas contendo benzofuroxano e a cruzaina (PDB: 2OZ2). As imagens em 2D representam as interações entre os compostos com sítio catalítico da protease.



Fonte: autoria própria.

Como comparativo, realizou-se o *docking* convencional entre o composto K777, um inibidor de cruzaína vastamente explorado na literatura (Silva *et. al.* 2020; Choy *et. al.*, 2013). Ao comparar o composto K777 com a molécula mais ativa, foi possível observar uma semelhança entre a sobreposição dos compostos, indicando um perfil similar de ocupação da cavidade de interesse na cruzaína (Figura 16). O valor de *docking score* obtido para o K777 foi de -6,39, havendo comparativo considerável considerando a ocupação de um peptidomimético.

Figura 16. *Docking* molecular entre a carbonila α,β -insaturada contendo o núcleo benzofuroxano, substituída com um grupo fenil (verde) e o composto K777 (roxo).



Fonte: autoria própria.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A etapa sintética para obtenção do anel benzofuroxano apresentou problemas como a dificuldade na solubilização do extrato bruto em diferentes solventes orgânicos, impossibilitando a purificação por meio de coluna cromatográfica. Outrossim, é possível afirmar que as rotas sintéticas utilizadas são eficazes para obtenção dos produtos com rendimentos aceitáveis para a maioria dos intermediários. No total foram obtidas 2 chalconas inéditas, sendo que nenhuma delas foi, ainda, caracterizada acoplada ao benzofuroxano devido à falta de massa durante o processo de purificação.

Com base nos resultados obtidos, os dados de *docking* molecular entre os derivados de carbonilas α,β -insaturadas contendo benzofuroxano e a cruzaina (PDB: 2OZ2) apresentaram interessantes valores de *docking score* de DS = -4,96 e -4,07, respectivamente, indicando interação promissora com a cisteína protease do parasita. Foram sintetizados 7 intermediários provenientes do acoplamento de Suzuki, com rendimentos de até 85%, e 2 intermediários derivados de chalconas provenientes da condensação de Claisen-Schmidt, com rendimentos de até 80%.

Apesar da falta da espectrometria de massa para fechamento da caracterização estrutural, os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram essenciais para elucidação e confirmação de obtenção dos produtos ao longo do projeto, permitindo assim o avanço da síntese e, posterior, avaliação *in vitro* das moléculas obtidas. O presente trabalho também deixa como perspectiva a finalização das purificações, caracterização estrutural, o cálculo experimental do LogP e a avaliação das moléculas frente a enzima cruzaina, bem como acende a luz para uma investigação mais profunda acerca das chalconas acopladas a benzofuroxanos e sua real atividade frente ao cisteína protease de *T. cruzi*, a cruzaina, ao mesmo tempo que abre a possibilidade de busca de novos alvos terapêuticos para esses compostos.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FRANCH, F. *et. al.* Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors *cui bono*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 251–254, abr. 2013.
- AVELAR, L. A. A. *et. al.* Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–24, 2015.
- CAZZULO, J.J.; STOKA, V.; TURK, V. Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: a target for chemotherapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1151-1164, 2001.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, p. 218, 1909.
- CHOY, J. W. *et. al.* Chemical-biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 9, p. 15–25, 4 jan. 2013.
- DE BRITO, D. H. A. *et. al.* Synthesis, structural and spectroscopic analysis, and antiproliferative activity of chalcone derivate (E)-1-(4-aminophenyl)-3-(benzo[b]thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Structure**, v. 1253, 5 abr. 2022.
- Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi). Chagas Disease [S.I.]: DNDi, [2023]. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/>. Acesso em: 19 fev. 2023.
- DOYLE, P. S. *et. al.* The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, set. 2011.
- EAKIN, A. E. *et. al.* The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 11, p. 7411–7420, 15 abr. 1992.
- EAKIN, A. E. *et. al.* Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 9, p. 6115–6118, 25 mar. 1993.
- ENGEL, J. C. *et. al.* Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, n. 111, p. 597–606, 9 fev. 1998.
- FERREIRA, R. S. *et. al.* Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of potent noncovalent and nonpeptidic cruzain inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2380–2392, 27 mar. 2014.
- FUJII, N. *et. al.* Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 1, p. 121–123, 3 jan. 2005.
- GALVÃO, C. (org.). **Vetores da doença de chagas no Brasil** [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. (Zoologia: guias e manuais de identificação series).

GRAUL, A. I. *et. al.* 2012 In review - Part I: The year's new drugs and biologics. **Drugs of Today**, v. 49, n. 1, p. 33, 2013.

LEWIS, M. D. *et. al.* Imaging the development of chronic Chagas disease after oral transmission. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

LIDANI, K. C. F. *et. al.* Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. **Journal of Physical Oceanography American Meteorological Society**, , 2019.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Beyond Bioisosterism: New Concepts in Drug Discovery. Em: Comprehensive Medicinal Chemistry III. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2017. v. 1–8p. 186–210.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, out. 2004.

MAGALHÃES, E. P. *et. al.* Chloride substitution on 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-Biological Interactions**, v. 361, 1 jul. 2022.

MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K.; ASATI, V. Chalcone scaffolds as anti-infective agents: Structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry Elsevier Masson**, v. 101, p. 496 - 524, 17 jul. 2015.

MANE, U. R. *et. al.* Falcipain inhibitors as potential therapeutics for resistant strains of malaria: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, fev. 2013.

MARTÍN-ESCOLANO, J. *et. al.* An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 10 jun. 2022.

MARTÍN-ESCOLANO, J.; MEDINA-CARMONA, E.; MARTÍN-ESCOLANO, R. Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. **ACS Infectious Diseases American Chemical Society**, , 13 nov. 2020.

MORETTI, N. S.; MORTARA, R. A.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 36, n. 4, p. 404–405, abr. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Chagas disease day. [S.I.]: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/campaigns/world-chagas-disease-day/2023>. Acesso em 19 fev. 2023

PAULI, I. *et. al.* Molecular modeling and structure-activity relationships for a series of benzimidazole derivatives as cruzain inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 641–657, 1 mai. 2017.

PAVIA, Donald L. **Introdução à espectroscopia**. 5. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet Lancet Publishing Group**, , 6 jan. 2018.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet Elsevier B.V.**, , 2010.

Rodriguez Gini *et. al.* Advances in Cysteine Protease B Inhibitors for Leishmaniasis Treatment. **Current Drug Targets**, v. 26, n. 1, p. 88-108, 2024. DOI: 10.2174/0113894501324437240919064715.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, jul. 2010.

SCHRÖDER, J. *et. al.* Identification of Semicarbazones, Thiosemicarbazones and Triazine Nitriles as Inhibitors of *Leishmania mexicana* Cysteine Protease CPB. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 16 out. 2013.

SILVA, D. G. *et. al.* A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 22, p. 5031–5035, 15 nov. 2017.

SILVA, J. R. A. *et. al.* Assessment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible and Irreversible Covalent Inhibition Mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 3, p. 1666–1677, 23 mar. 2020.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBER, F. X.; KIEFER, J. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2017

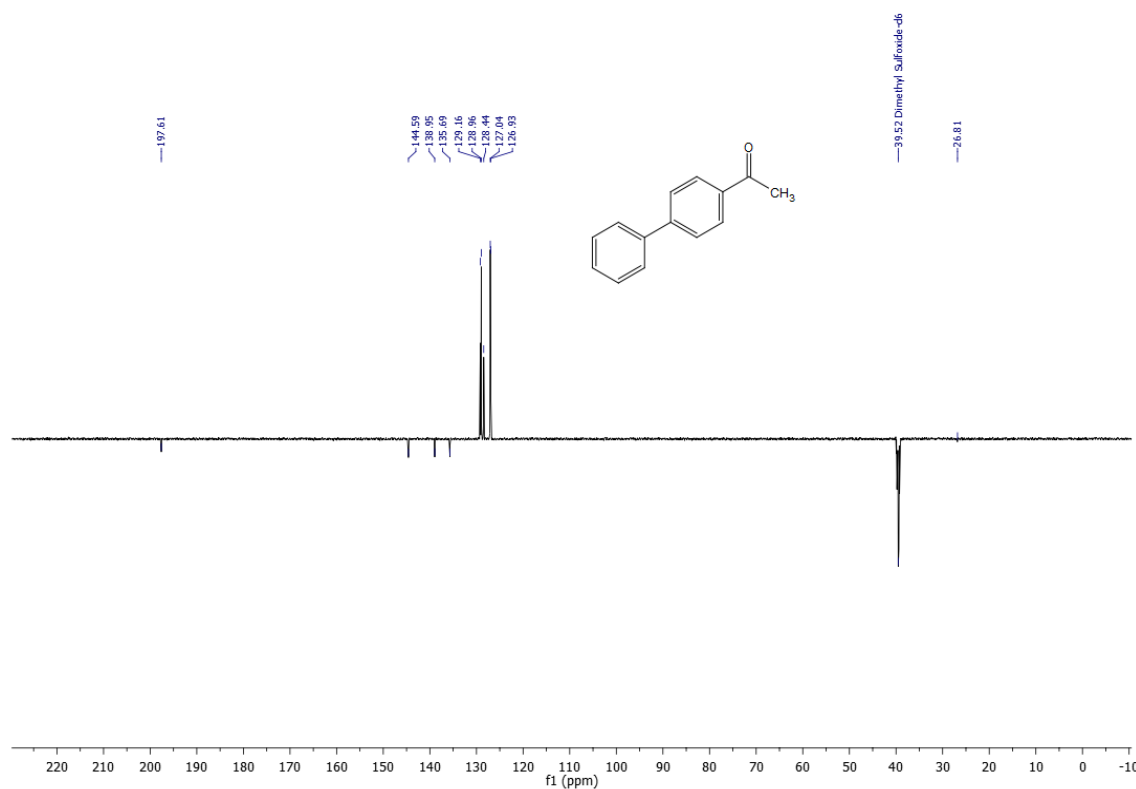
STEERT, K. *et. al.* α -ketoheterocycles as inhibitors of *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB. **ChemMedChem**, v. 5, n. 10, p. 1734–1748, 4 out. 2010.

UTZINGER, J. *et. al.* Neglected tropical diseases: Diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly** **SMW supporting association**, , 22 nov. 2012.

VAN HEEKEN, Peter. **Cysteine proteases in pathogenic organisms**. In: Cysteine proteases of pathogenic organisms. 1. ed. New York: Springer, 2011. cap. 7, p. 100-115.

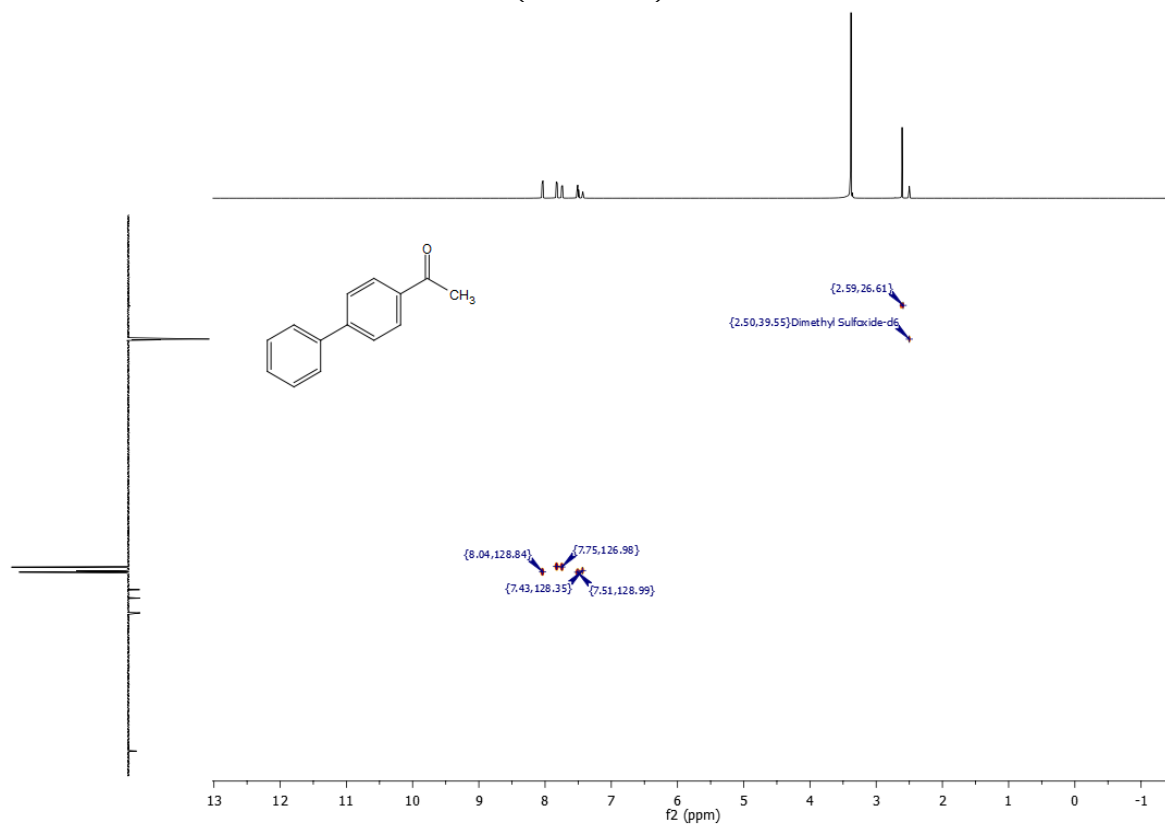
APÊNDICE A – Espectros Adicionais

Figura A1. RMN de DEPTQ do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



Fonte: autoria própria.

Figura A2. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



Fonte: autoria própria.

Figura A3. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S1: 1-([1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).

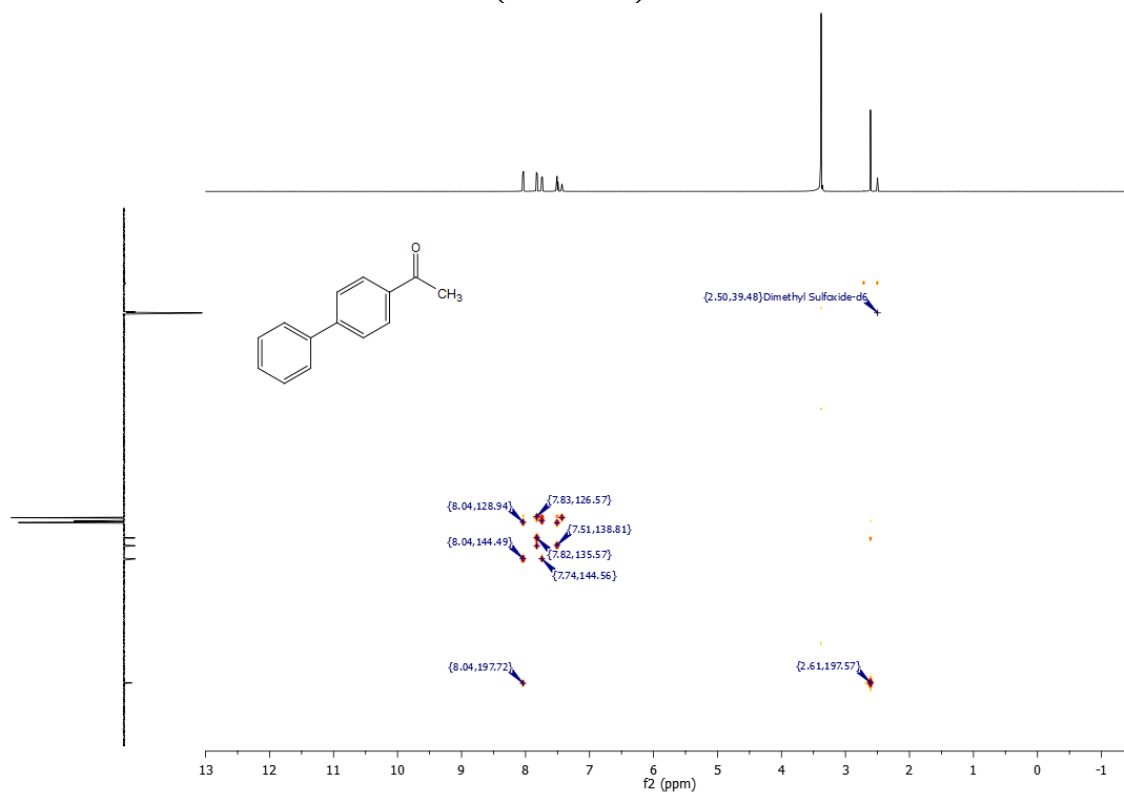


Figura A4. RMN de DEPTQ do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).

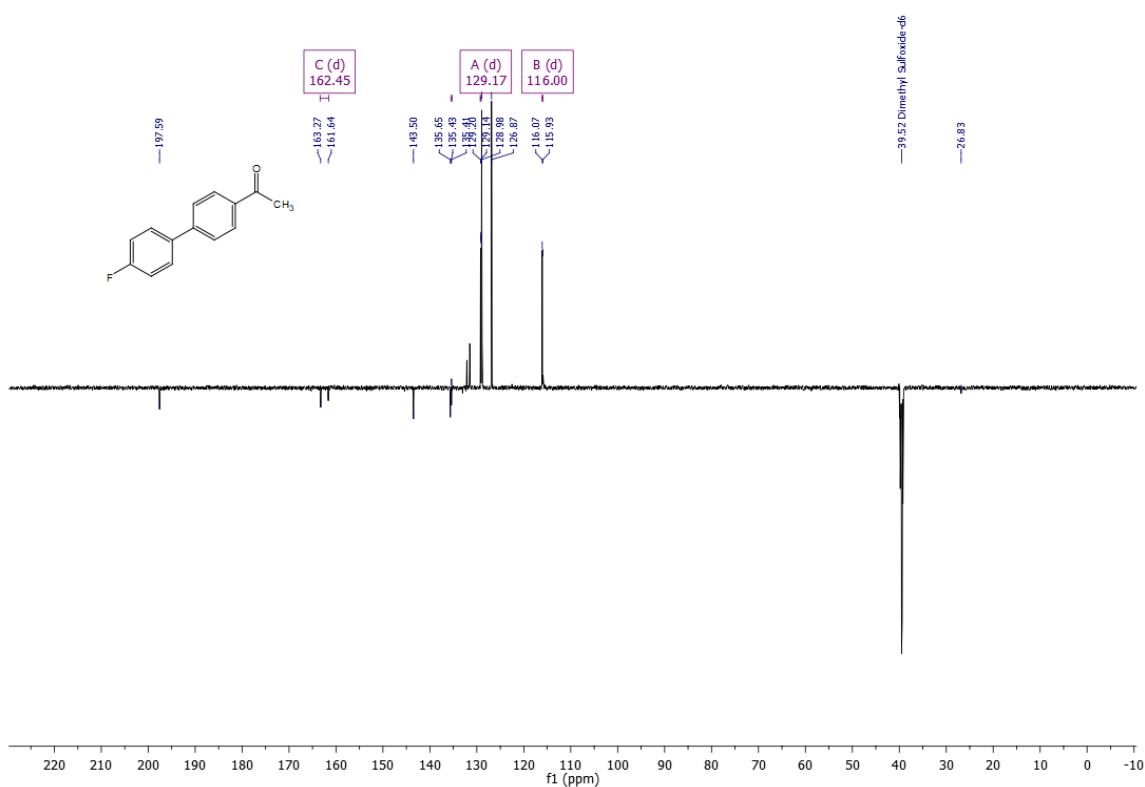
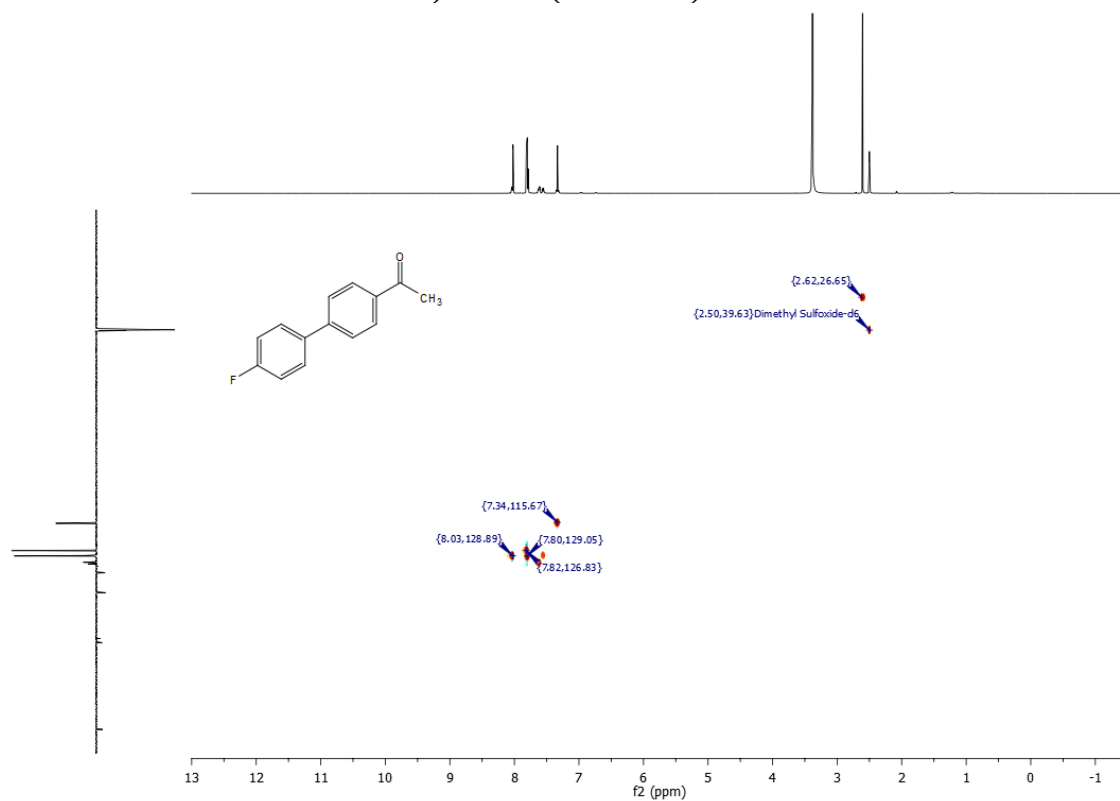
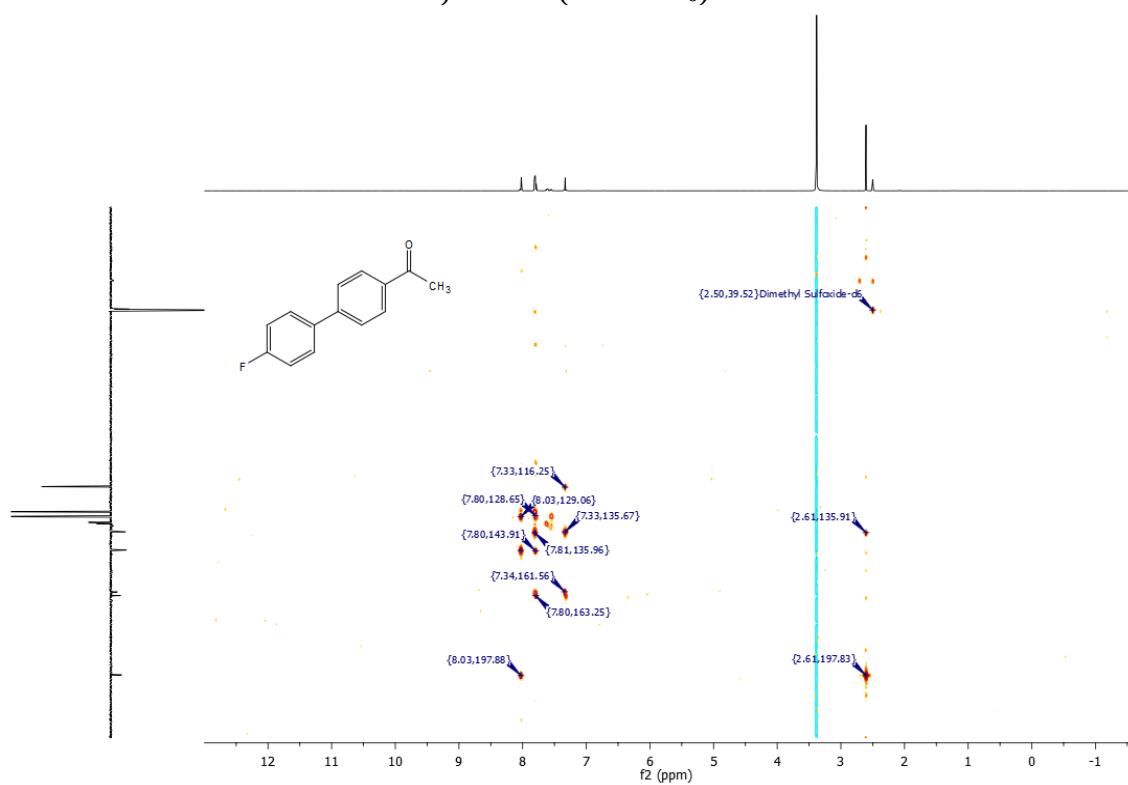


Figura A5. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



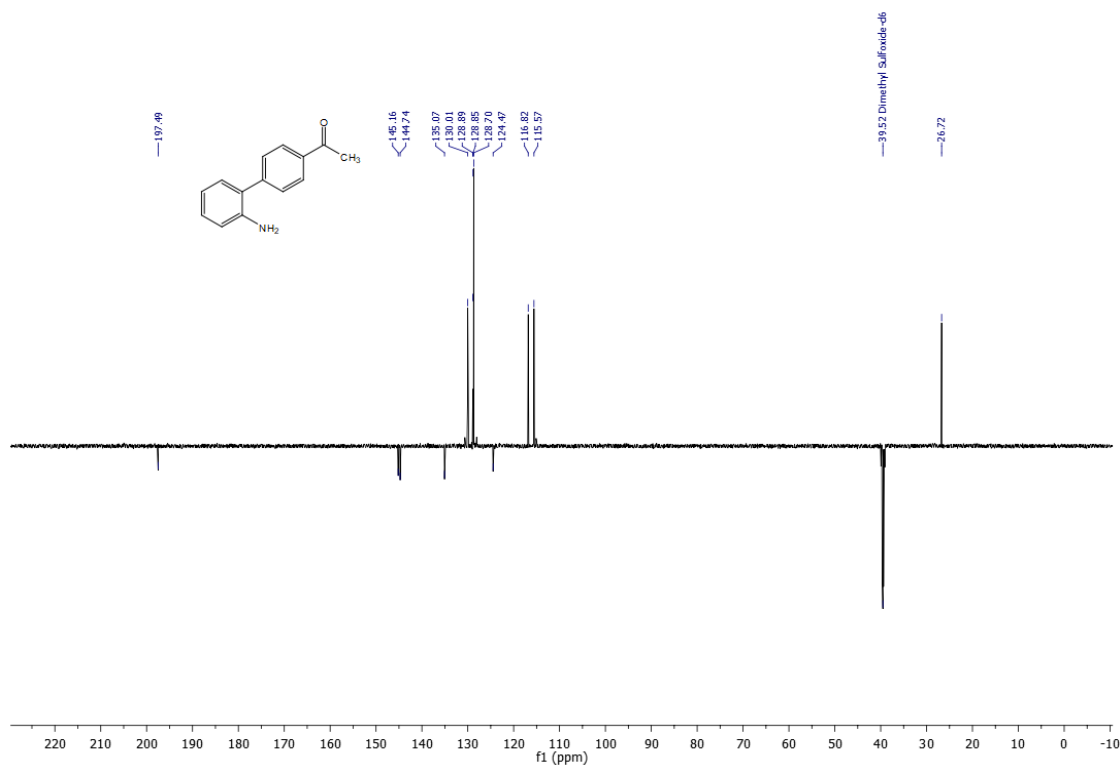
Fonte: autoria própria.

Figura A6. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S2: 1-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



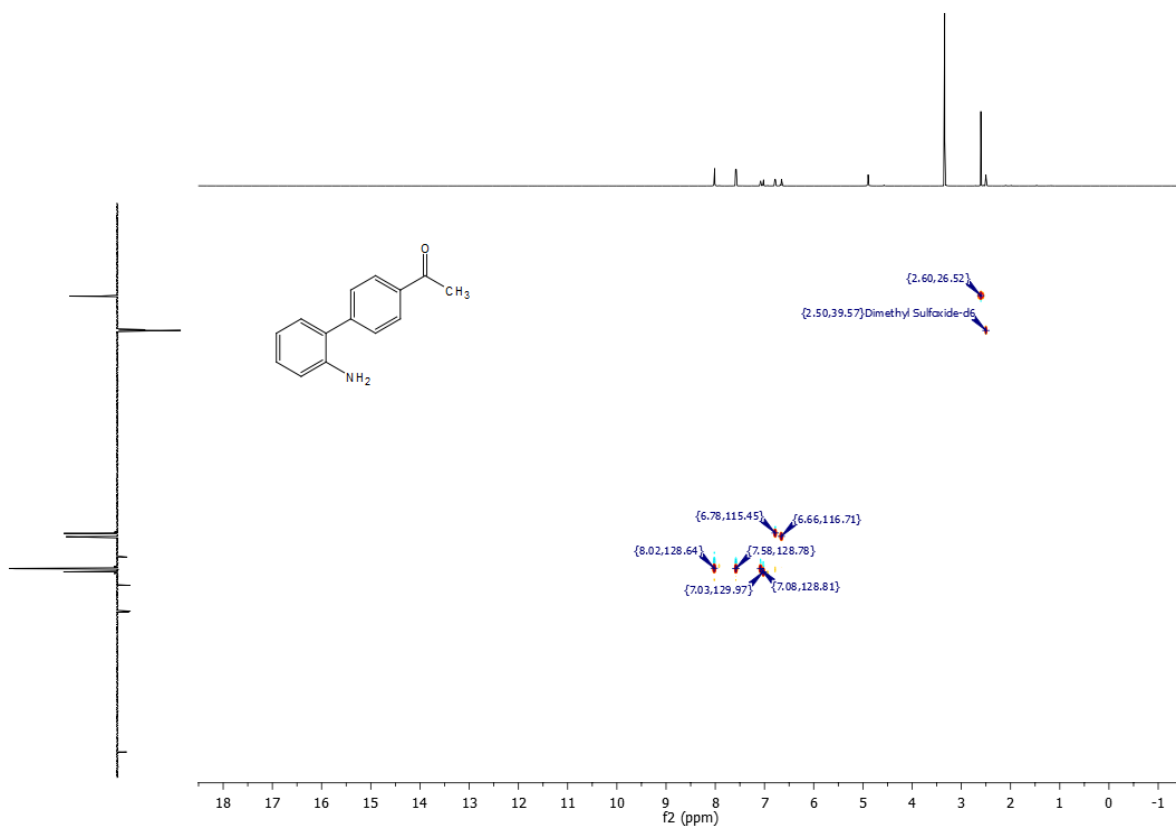
Fonte: autoria própria.

Figura A7. RMN de DEPTQ do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



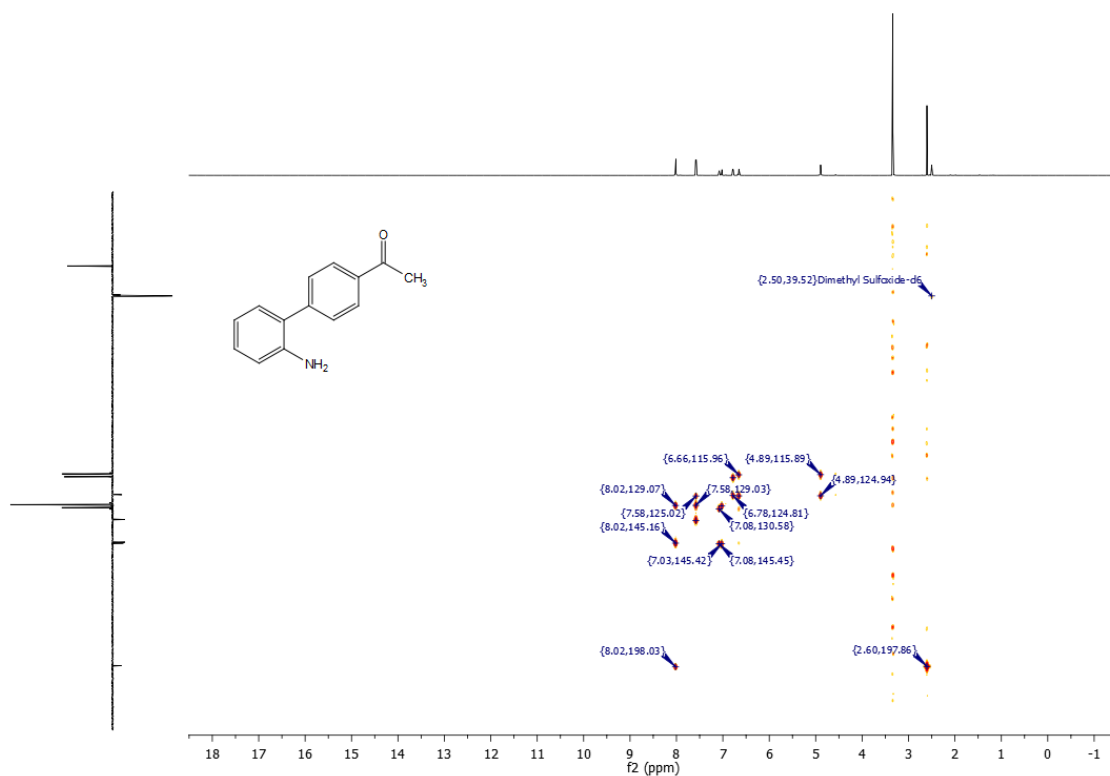
Fonte: autoria própria.

Figura A8. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



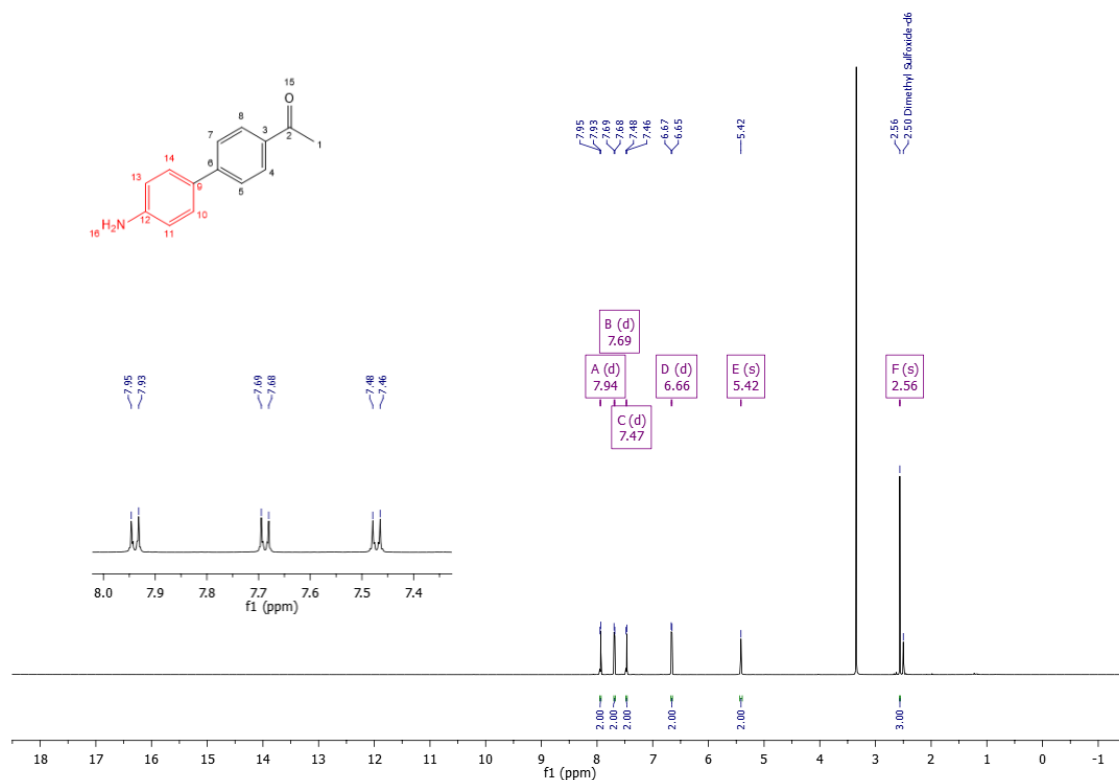
Fonte: autoria própria.

Figura A9. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S3: 1-(2'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



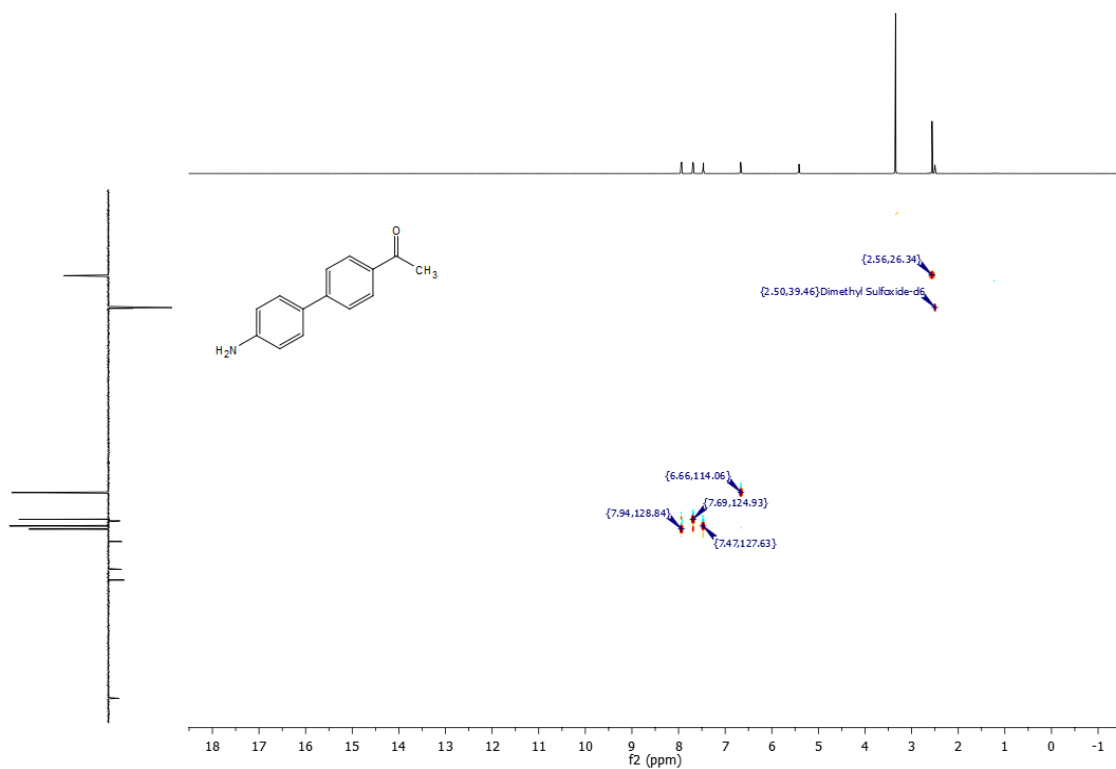
Fonte: autoria própria.

Figura A10. RMN de DEPTQ do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO- d_6).



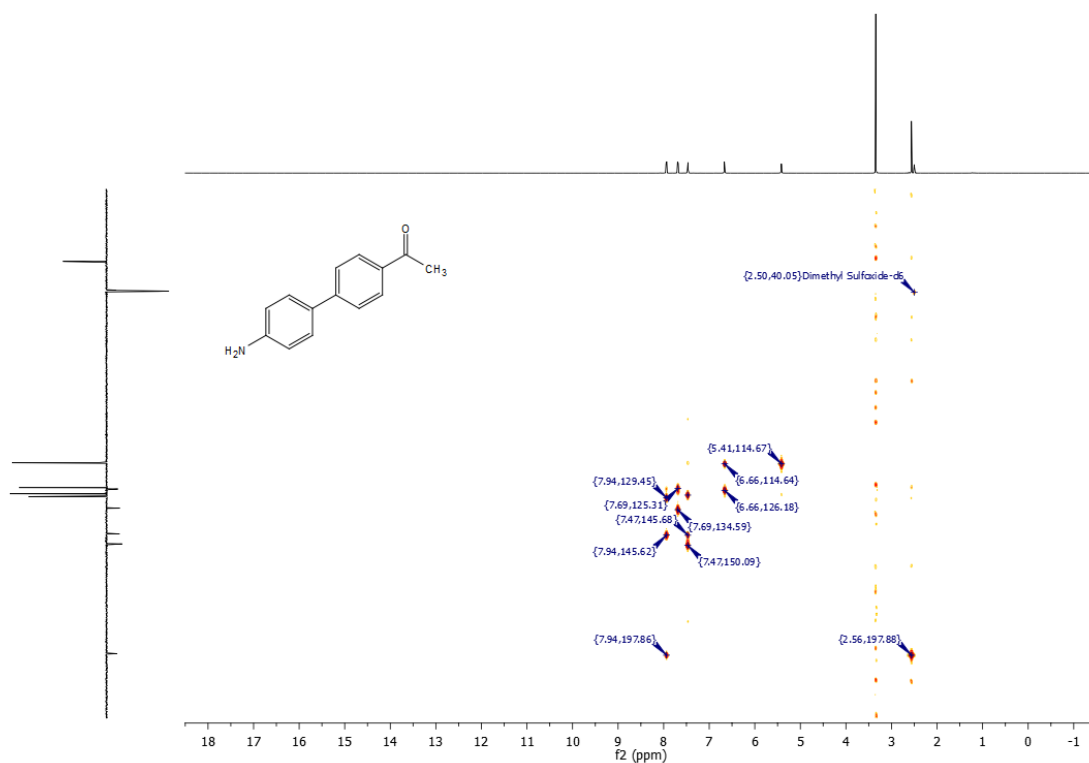
Fonte: autoria própria.

Figura A11. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



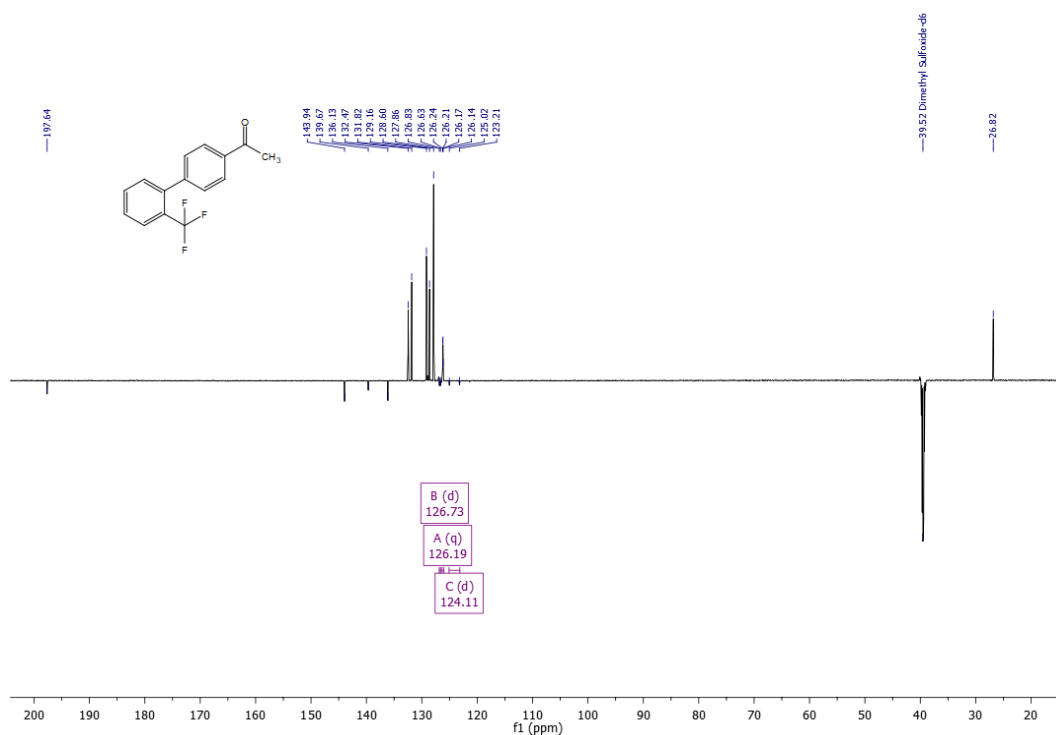
Fonte: autoria própria.

Figura A12. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S5: 1-(4'-amino-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



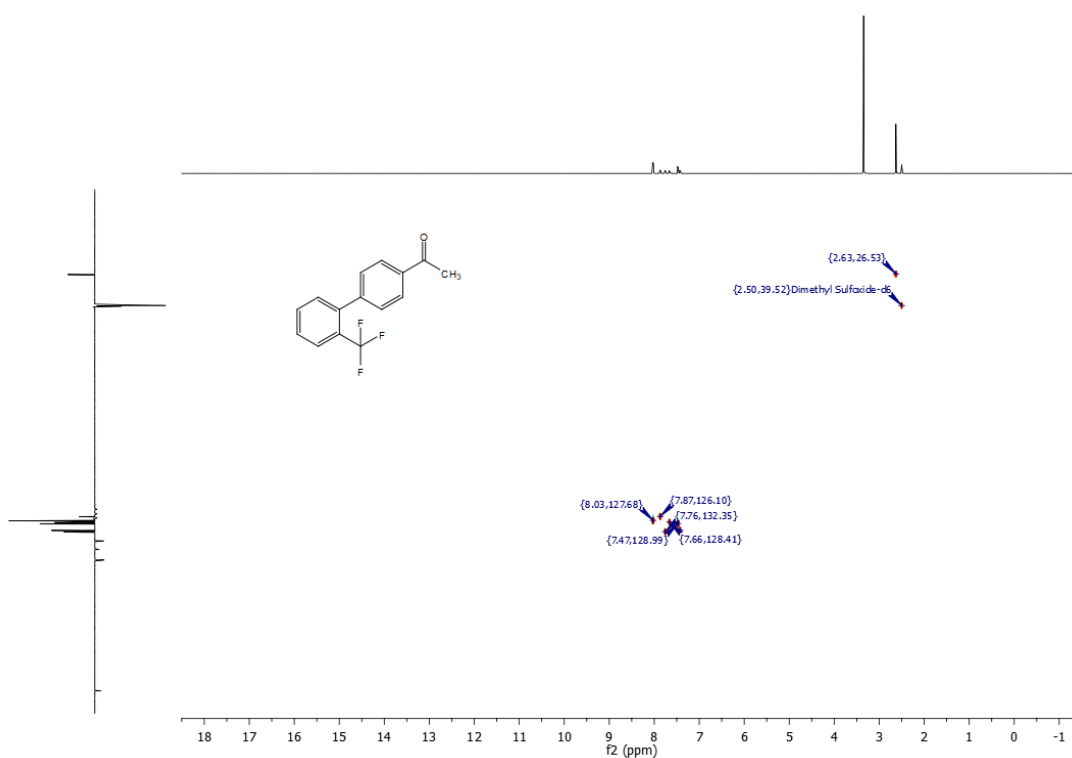
Fonte: autoria própria.

Figura A13. RMN de DEPTQ do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



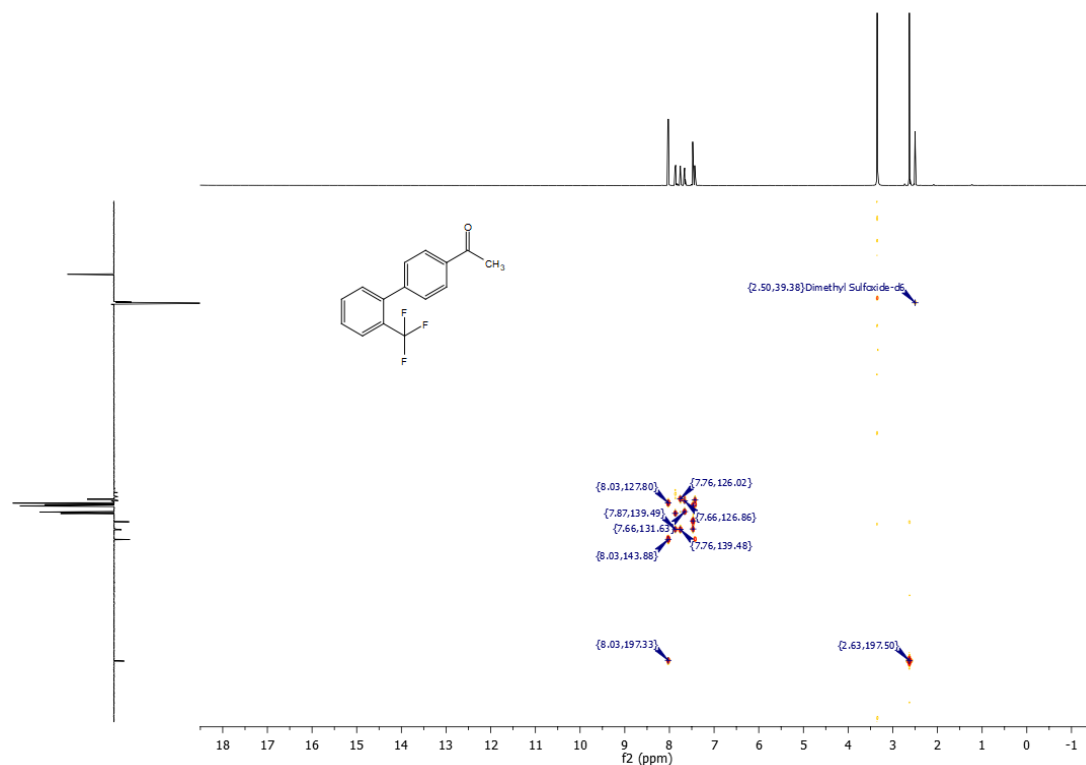
Fonte: autoria própria.

Figura A14. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆)



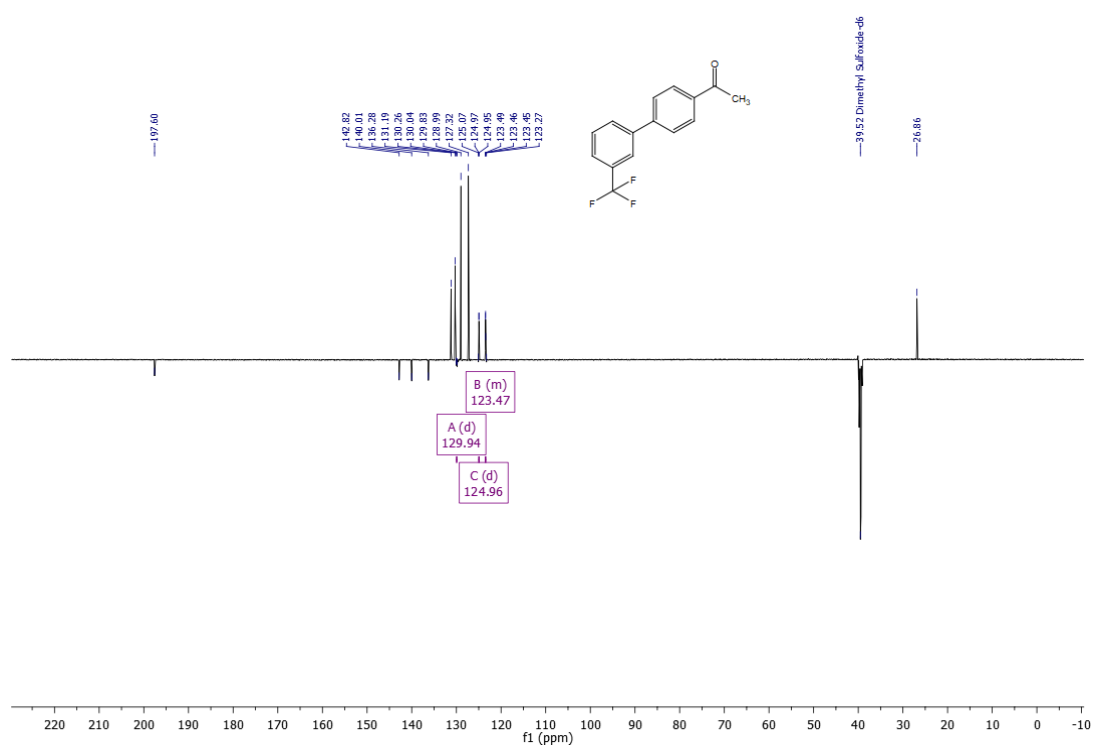
Fonte: autoria própria.

Figura A15. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S6: 1-(2'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



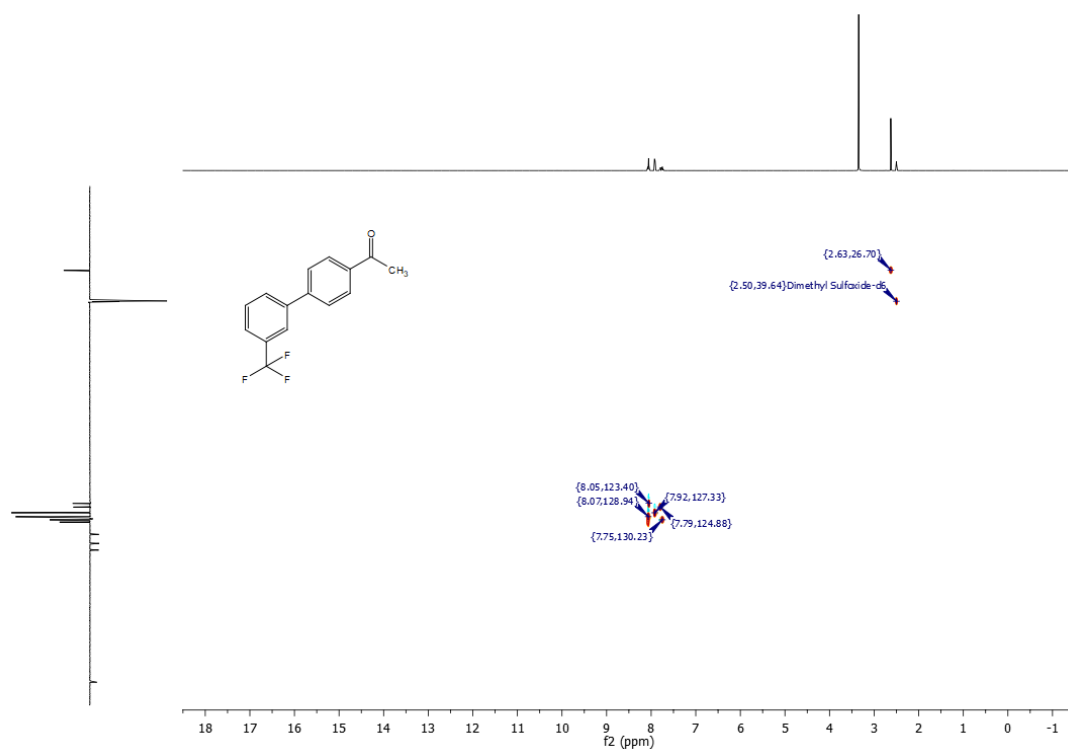
Fonte: autoria própria.

Figura A16. RMN de DEPTQ do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



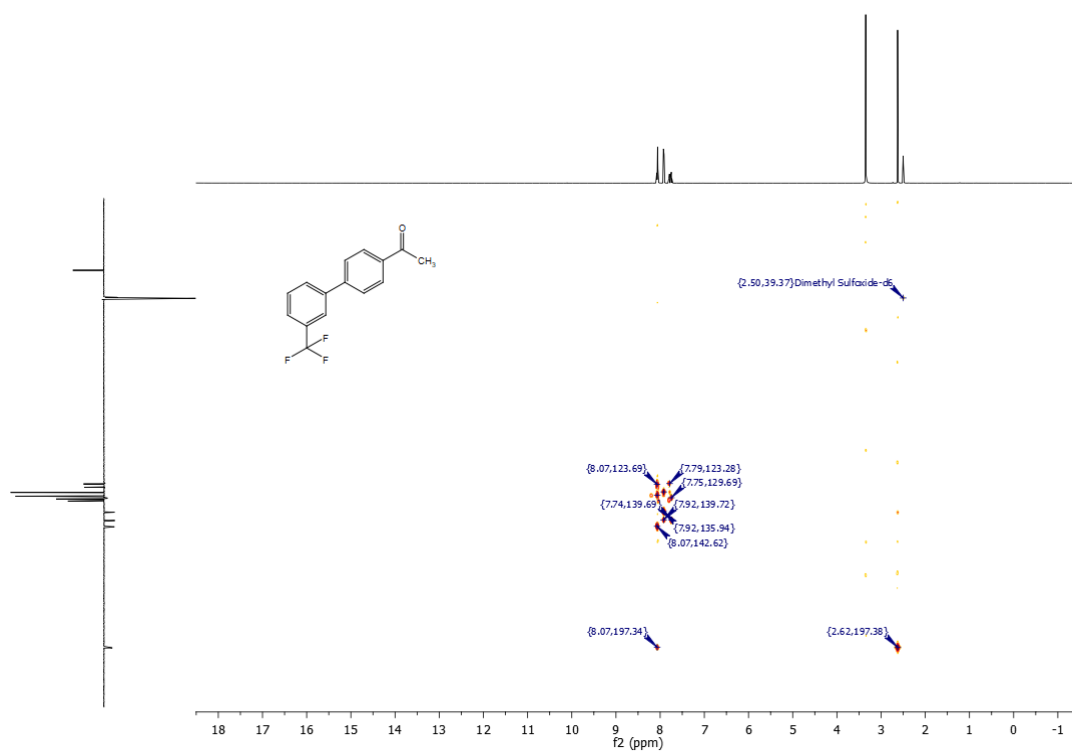
Fonte: autoria própria.

Figura A17. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



Fonte: autoria própria.

Figura A18. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S7: 1-(3'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



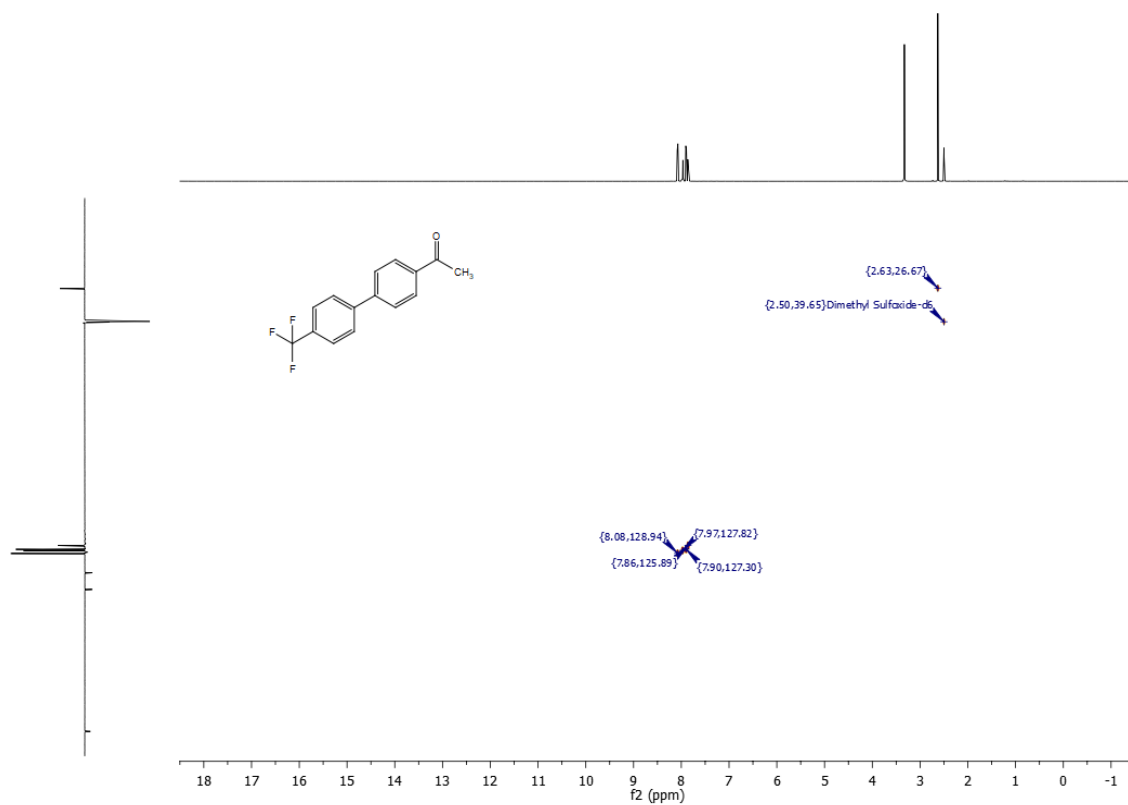
Fonte: autoria própria.

Figura A19. RMN de DEPTQ do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



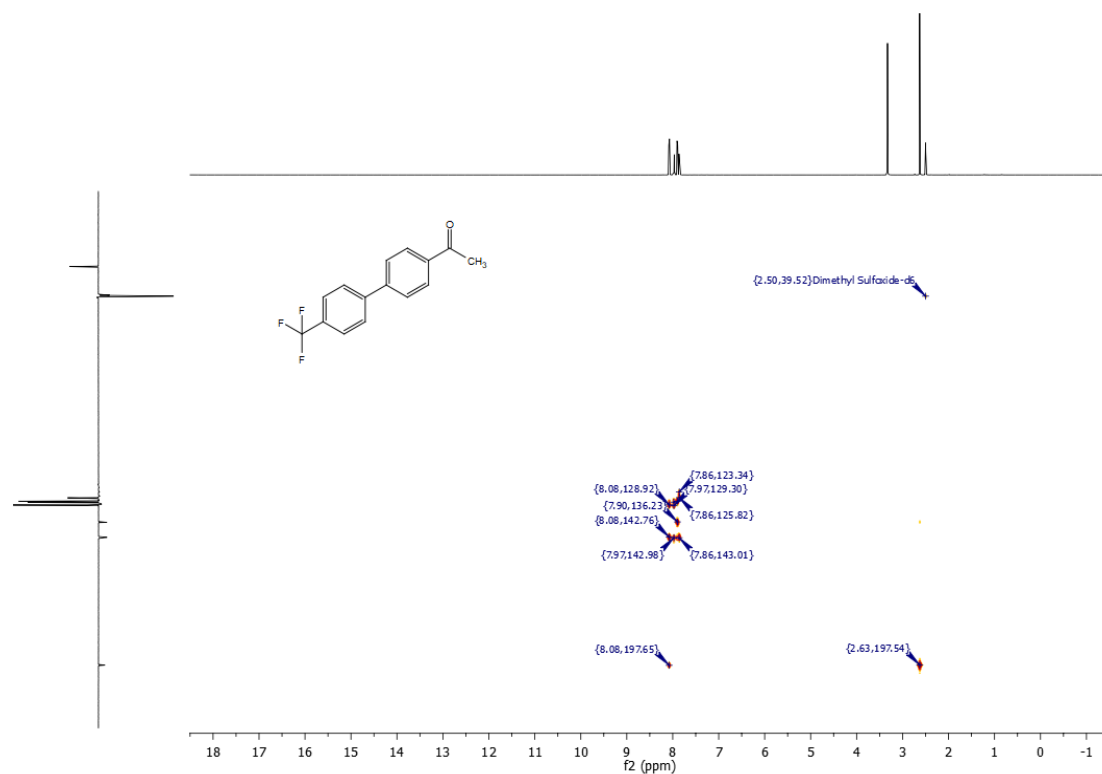
Fonte: autoria própria.

Figura A20. Mapa de contorno de HSQC do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



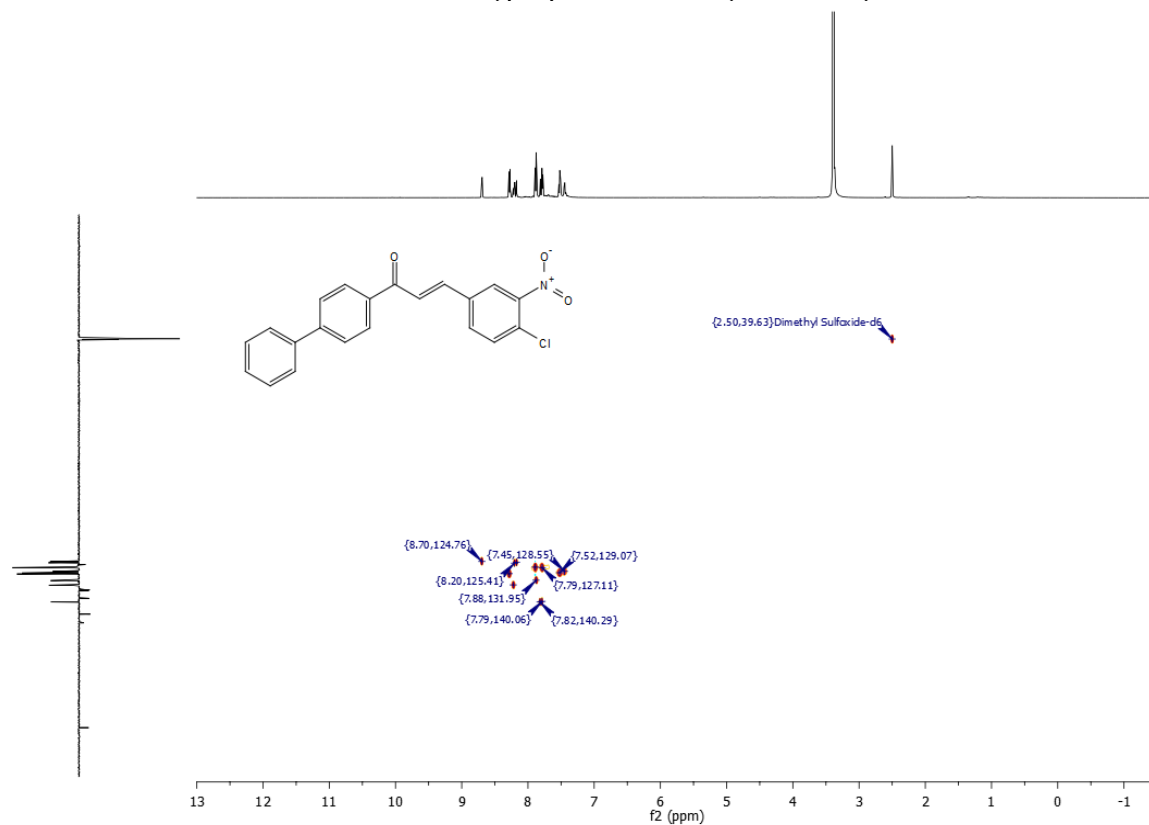
Fonte: autoria própria.

Figura A21. Mapa de contorno de HMBC do intermediário S8: 1-(4'-(trifluorometil)-[1,1'-bifenil]-4-il)etanona (DMSO-d₆).



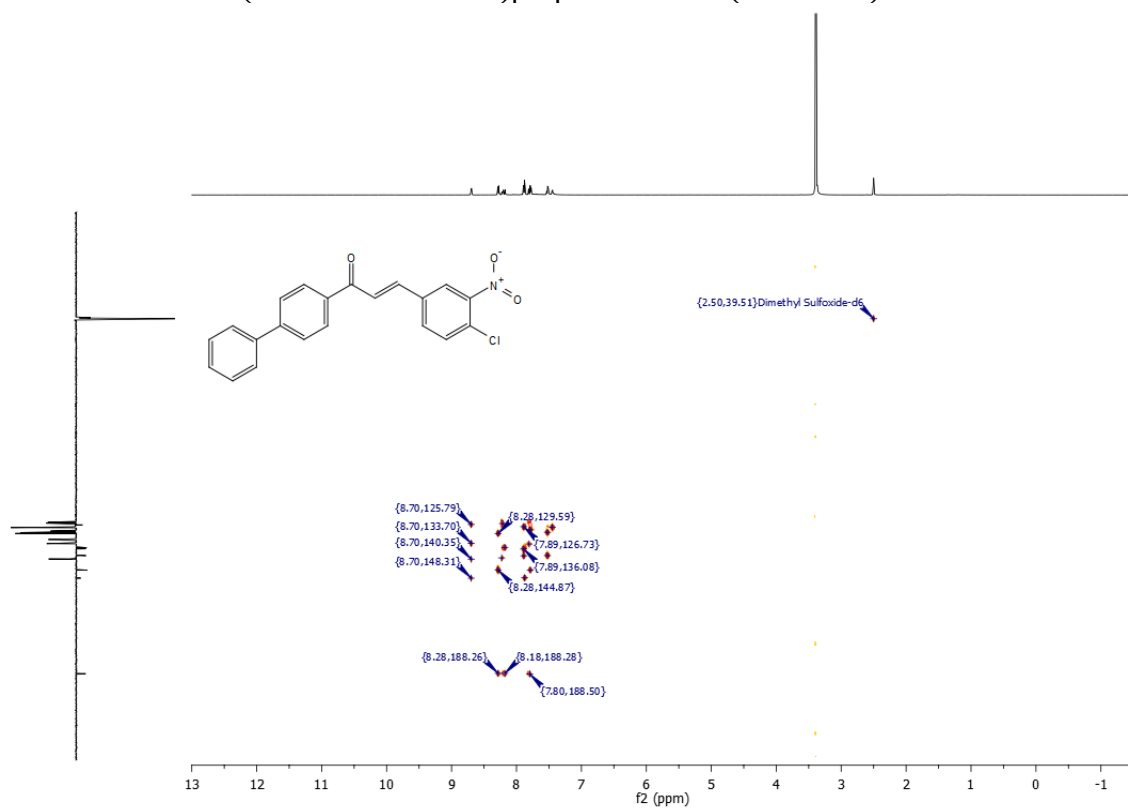
Fonte: autoria própria.

Figura A22. Mapa de contorno de HSQC do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO-d₆).



Fonte: autoria própria.

Figura A23. Mapa de contorno de HMBC do intermediário C1: (E)-1-([1,1'-bifenil]-4-il)-3-(4-cloro-3-nitrofenil)prop-2-en-1-ona (DMSO-d₆).



Fonte: autoria própria.