

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

WELLINGTON NEGRI TONDATO

ESTUDO SOBRE A SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR
DE LACTONAS BENZODIAZEPÍNICAS

Ilha Solteira

2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS-

PPGCM

WELLINGTON NEGRI TONDATO

ESTUDO SOBRE A SÍNTESE E MODELAGEM MOLECULAR
DE LACTONAS BENZODIAZEPÍNICAS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciência dos Materiais.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz

Ilha Solteira

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

T663e Tondato, Wellington Negri.
Estudo sobre a síntese e modelagem molecular de lactonas
benzodiazepínicas / Wellington Negri Tondato. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020
155 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais,
2020

Orientador: Rosangela da Silva de Laurentiz
Inclui bibliografia

1. Benzodiazepinas. 2. Lactonas. 3. Reação dominó. 5. Docking molecular.
6. Fluoróforos.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo sobre a síntese e modelagem molecular de Lactonas Benzodiazepínicas

AUTOR: WELLINGTON NEGRI TONDATO

ORIENTADORA: ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIA DOS MATERIAIS, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROSANGELA DA SILVA DE LAURENTIZ

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP



Prof. Dr. ALEXANDRE BORGES

Departamento de Bioquímica / UNIFUNEC



Prof. Dr. VANESSA DE ANDRADE ROYO

Departamento de Biologia / Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes



Ilha Solteira, 29 de julho de 2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elenice Negri Tondato e Luiz Carlos Tondato que, com afeto me ensinaram coisas importantes, valores que carrego subconscientemente em minha interação humana, dos quais me orgulho por terem uma grande culpa nesta incrível realização.

À minha irmã Ligia, pela paciência e compreensão dos insights compartilhados, mesmo em conversas unilaterais, devido à sua falta de afinidade pela minha área, porém, sempre com um semblante inerte para não me deixar desconfortável durante meu raciocínio.

À minha namorada Ingrid, que tem sido minha companheira em todos os momentos, pela paciência com minhas explicações científicas que, com destreza conseguiu não se interessar por eventos físicos e químicos, denominados por ela de “mentiras quânticas”.

Às minhas células, que durante uma guerra psíquica, liberaram insistentemente adrenalina em momentos onde havia mais sinapses inibitórias me mantendo parado, serotonina em momentos que o cortisol tomava conta e dopamina em cada desafio concluído, que me impulsionou a me apaixonar cada vez mais pela pesquisa produzida, conhecimento científico e experiência de vida adquirida no processo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela compreensão e suporte admirável, onde devo muito além de agradecimentos.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rosangela da Silva de Laurentiz que, além de acreditar na minha capacidade, me aceitando para este trabalho, me ofereceu todo o suporte disponível, com paciência e empolgação em cada explicação científica, e em demonstrações de humildade para com as pessoas, onde sou muito grato por ter compartilhado essas experiências.

Ao Prof. Dr. Alexandre Borges por ter cedido seu tempo com uma excelente didática para dividir suas habilidades e conhecimentos sobre Docking Molecular.

Ao Departamento de Física e Química e seus funcionários pela estrutura cedida no desenvolvimento da pesquisa.

Ao GPNSO por terem me recebido de braços abertos desde o início, pelo apoio na passagem dos conhecimentos adquiridos, pela disposição e companhia laboratorial oferecida.

À cafeína, que há tempos vem enganando meus receptores de adenosina, e me dando a dose diária de dopamina para me sentir capaz.

Aos amigos da república Deselegância, tanto pelas conversas movidas a crises existenciais, quanto pelas conversas científicas, ou não, utilizadas para eventos de total irrelevância acadêmica, porém, de total relevância para saúde mental.

À CAPES pela bolsa concedida.

À FAPESP pelo apoio financeiro do processo: 2018/00544-4

“The good thing about science is that is true whether or not
you believe in it”.

Neil deGrasse Tyson.

RESUMO

As benzodiazepinas são compostos que contêm estruturas heterocíclicas bicíclicas onde o termo refere-se a uma fusão entre anel benzênico com um anel diazepínico. A classe é de extrema importância para a química medicinal, pois, são utilizadas principalmente como fármacos psicotrópicos no auxílio do tratamento da depressão, do transtorno de ansiedade, do sono, de convulsões e como relaxante muscular. Devido à importância biológica desses compostos, nas últimas décadas várias rotas sintéticas foram propostas e otimizadas para a obtenção de novos derivados. Desta forma, este trabalho teve por objetivo propor uma rota sintética mais eficiente para a obtenção de lactonas benzodiazepínicas através de uma reação dominó realizada sob catálise heterogênea. A primeira etapa da síntese foi a obtenção da butenolida intermediária, não isolada, resultante da reação assistida por micro-ondas entre o ácido tetrônico e a *orto*-fenilenodiamina, seguida pela adição do aldeído aromático ao mesmo frasco reacional, para então fornecer a lactona benzodiazepínica. A reação dominó forneceu o composto de interesse em maior rendimento do que a reação realizada por etapas com isolamento da butenolida intermediária. O uso de vários aldeídos aromáticos forneceu treze derivados benzodiazepínicos, em rendimentos variando 71 a 94% com tempos totais de reação de 55 a 75 min. A eficiência da amberlite IR-120 usada como catalizador na mesma reação foi verificada até quatro usos sem diminuição significativa nos rendimentos. Todos os produtos obtidos tiveram estruturas confirmadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e por Espectrometria de Massas. Os compostos obtidos foram avaliados quanto às propriedades luminescentes, onde os resultados observados mostram padrões semelhantes de absorção e de emissão. Os compostos tem interessantes espectros de emissão onde é possível observar as bandas de Raman, primeira e segunda harmônicas e uma intensa banda de reemissão. As características luminescentes desses compostos podem ser estudadas para possíveis aplicações como fluoróforos. A estrutura dos derivados **5a-m** e estruturas modeladas foram submetidas à estudos de *docking* molecular utilizando a proteína GABA_A- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$. Estes estudos demonstraram que os compostos **5b**, **5c**, **5l** e as estruturas modeladas **8l** e **5a(7-Cloro)** apresentaram similaridades nas interações com a proteína em comparação com o Alprazolam que foi usado como modelo de interação. Os resultados evidenciaram características que classificam esses compostos como possíveis alvos para a realização *in vivo* utilizando modelos de sedação.

Palavras-chave: benzodiazepinas, lactonas, reação dominó, docking molecular, fluoróforos.

ABSTRACT

The benzodiazepines are compounds that contain bicyclic heterocyclic structures where the term refers to a fusion between benzene aromatic ring and diazepine ring. The class is extremely important for medicinal chemistry as it is mainly used as psychotropic drugs to aid in the treatment of depression, treatment of anxiety disorder, sleep, seizures and as a muscle relaxant. Due to the biological importance of these compounds, in the last decades several synthetic routes have been proposed and optimized for obtaining new compounds. Thus, this work aimed to propose a more efficient synthetic route for to obtaining of benzodiazepine lactones using domino reaction under heterogenous catalysis. The first step of the synthesis was to obtaining the butanolide intermediate, not isolated, by the Microwaves-assisted reaction between tetronic acid and *ortho*-phenylenediamine followed of the aromatic aldehyde addition to the same reaction flask to provide the benzodiazepine lactones. The domino reaction provided the compound of interest in higher yield than the reaction performed in stages with isolation of butanolide intermediate. The use of various aromatic aldehydes provided thirteen benzodiazepine derivatives, in yields ranging from 71 to 94% with total reaction times of 55 to 75 min. The efficiency of the amberlite IR-120, used as catalyst in the same reaction, was verified for up to four uses without drop in yields. All products obtained had their structures confirmed by Nuclear Magnetic Resonance of ^1H and ^{13}C and by Mass Spectrometry. The compounds obtained were evaluated for their luminescent properties and showed similar patterns of absorption and emission. These compounds presented interesting emission spectra where it is possible to observe the Raman bands, first and second harmonics and an intense re-emission band. The luminescent characteristics of these compounds can be studied for possible applications as fluorophores. The structure of the 5a-m derivatives and modeled structures were subjected to molecular docking studies using the GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ protein. These studies demonstrated that compounds **5b**, **5c**, **5l** and the modeled structures **8l** and **5a(7-Cloro)** showed similarities in interactions with the protein compared to Alprazolam which was used as an interaction model. These results showed characteristics that classify these compounds as possible targets for in vivo sedation assays.

Keywords: benzodiazepines, lactones, domino reaction, docking, fluorophores.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos núcleos 1,4 e 1,5-benzodiazepínicos.....	19
Figura 2. Representação esquemática da relação entre a concentração e efeitos clínicos dos benzodiazepínicos.....	20
Figura 3. Dados do WOS publicações por ano com o termo "Benzodiazepine*".....	21
Figura 4. Dados do WOS publicação (%) por área de pesquisa com o termo "Benzodiazepine*".....	22
Figura 5. Estruturas das benzodiazepinas e nomenclaturas seguindo o sistema Hantzsch-Widman	24
Figura 6. (A) Estrutura do neurônio (B) Transmissão do impulso nervoso através de uma sinapse química.....	27
Figura 7. Representação dos receptores GABA-A.....	29
Figura 8. Representação esquemática de um estudo de docking baseado no programa GOLD.....	31
Figura 9. Modelo de interação de dois compostos analisados por docking molecular (A) NSC659829 e (B) NSC35839 que demonstraram semelhança com os inibidores AChE.....	32
Figura 10. Diagrama de Jablonski - processos dos estados excitados singlete (fluorescência) e tripleto (fosforescência).....	35
Figura 11. Comportamento das sondas fluorescentes: (a) Representação esquemática do funcionamento das sondas, (b) Sondas baseadas em funcionamento PeT e (c) Sondas baseadas em funcionamento FRET.....	36
Figura 12. Imagem de um tumor in vivo marcado por um anticorpo ligado à SiR700: (a) representação do fluoróforo ligado ao anticorpo, (b) imagem de fluorescência do tumor implantado, o círculo branco indica o tumor antes da injeção de anticorpos e (c) imagem 24h após a injeção de anticorpos.....	37
Figura 13. Estruturas de derivados benzodiazepínicos fluorescentes.....	38
Figura 14. Estrutura da proteína GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ complexada com Alprazolam (A) e após preparação (B).....	48
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de 5a	53
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C de 5a	53
Figura 17. Espectro de RMN DEPT-135 de 5a	54
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de 4	56

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H de 6a	59
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de 6a	59
Figura 21. Rendimentos obtidos na reciclagem da amberlite.....	59
Figura 22. Espectros de UV-vis dos derivados 5a , 5c , 5d , 5f , 5h , 5j e 5l	62
Figura 23. Espectros de UV-vis dos derivados 5b , 5e , 5g , 5i , 5k e 5m	67
Figura 24. Espectro de emissão das amostras 5a-m excitadas a $\lambda = 322$ nm.....	67
Figura 25. Espectro de emissão convencional de moléculas denominadas fluoróforas (ou fluoróchromas), contendo a dispersão de Rayleigh-Tyndall ($\lambda = 360$ nm), espalhamentos Raman ($\lambda = 310$ e 410 nm), banda de emissão ($\lambda = 540$ nm) e a segunda dispersão harmônica ($\lambda = 720$ nm).....	69
Figura 26. Espectros de emissão das amostras 5a-m excitadas com $\lambda_{\text{exc}} = 322$ nm. A) amostras com emissão detectada B) amostras sem emissão detectada, apenas a banda da dispersão Raman.....	70
Figura 27. Resultado para a validação da simulação. Sobreposição do Alprazolam originário da estrutura cristalográfica (referência), em vermelho, e o Alprazolam resultante do processo de docking, em cinza.....	73
Figura 28. Resultado do processo de docking molecular do Alprazolam no receptor GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$	73
Figura 29. Sobreposições entre o Alprazolam da simulação (cinza) e os melhores resultados entre os compostos ligantes.....	74
Figura 30. Conformação dos ligantes 5b , 5c , 5e , 5g , 5j e 5l com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$	756
Figura 31. Estruturas idealizadas 7l e 8l , obtidas a partir de 5l	79
Figura 32. Conformação dos ligantes 7l e 8l com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$	80
Figura 33. Esqueletos idealizados: 5a-m(lactâmico) e 5a-m(7-Cloro)	81
Figura 34. Conformação dos ligantes 5b(lactâmico) , 5c(lactâmico) , 5a(7Cloro) e 5c (7Cloro) com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABAA- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota para a obtenção do Clordiazepóxido	23
Esquema 2. Reações de obtenção do núcleo 1,5- benzodiazepínico. a) o-fenilenodiamina com composto dicarbonílico, b) o-fenilenodiamina com composto carbonílico α,β -insaturado e c) o-fenilenodiamina com duas moléculas de cetonas e com uma dicetona e um aldeído	39
Esquema 3. Esquema reacional desenvolvido por Muños et al. (2019) para a síntese de 1,5-benzodiazepínico.....	40
Esquema 4. Esquema reacional desenvolvido por Shaikh et al (2019), para obtenção de derivados benzodiazepínicos.....	40
Esquema 5. Síntese desenvolvida por Isaeva et al., (2019) para obter 1,5-benzodiazepinas. 41	
Esquema 6. Síntese de 1,5-benzodiazepinas por Zhu et al. (2014).....	41
Esquema 7. Síntese de 1,4-benzodiazepin-2-ona.....	42
Esquema 8. Reação de Sasiambarrena et al., (2019).	42
Esquema 9. Síntese de triazolo-benzodiazepinas por Shafie et al., (2019).....	43
Esquema 10. Esquema geral para obtenção dos derivados benzodiazepínicos 5	43
Esquema 11. Reação multicomponente para obtenção do composto 5a	45
Esquema 12. Reação para obtenção do intermediário 4	45
Esquema 13. Reação de obtenção do derivado 5a através do intermediário 4 isolado.	46
Esquema 14. Reação dominó para a síntese do produto 5a	47
Esquema 15. Síntese de 5a via reação multicomponente	51
Esquema 16. Mecanismo de formação do derivado benzimidazol 6a	57
Esquema 17. Mecanismo proposto para a formação do produto 5	63
Esquema 18. Mecanismo proposto para a formação do produto 6 a partir do intermediário II	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes estruturas e nomes para compostos Benzodiazepínicos e análogos comercializados como fármacos	25
Tabela 2. Resumo dos principais subtipos dos GABA- _A Rs e suas características	30
Tabela 3. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto 5a (400 MHz, DMSO-d6).	52
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H de 4 (400 MHz, DMSO-d6).	56
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de 6a (400 MHz, DMSO-d6).	58
Tabela 6. Resultado da otimização das reações para a obtenção de 4 em função do solvente e catalisador	60
Tabela 7. Reações de otimização para obtenção de 5a a partir da reação entre 4 e 3a	61
Tabela 8. Rendimentos das reações para formação dos produtos 5a-m	63
Tabela 9. Dados de UV-vis e Fluorescência dos compostos benzodiazepínicos 5	71
Tabela 10. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das estruturas virtuais, Alprazolam, 5b , 5c , 5e , 5g , 5j e 5l	77
Tabela 11. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das simulações, Alprazolam e estruturas teóricas 7l e 8l	79
Tabela 12. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das simulações com o Alprazolam e estruturas teóricas 5b(lactâmico) , 5c(lactâmico) , 5a(7Cloro) e 5c (7Cloro)	83

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BDZ's	Benzodiazepinas
SNC	Sistema Nervoso Central
WOS	<i>Web of Science</i>
BET	<i>BromoDomain Extra Terminal</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsufóxido Deuterado
EM	Espectrometria de Massa
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-A _{Rs}	Receptores GABA-A
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
MO	Micro-ondas
PF	Ponto de Fusão
REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	singleto
dl	duplete largo
dd	duplo duplete
d	duplete
dt	duplo tripleto
t	tripleto
m	multiplete
UV-Vis	Ultravioleta visível
R _f	Fator de retenção

LISTA DE ESPECTROS – APÊNDICE

Figura 1. Espectro de RMN de ^1H de 5a em DMSO-d ₆	102
Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C de 5a em DMSO-d ₆	103
Figura 3. Espectro de RMN DEPT-135 de 5a em DMSO-d ₆	104
Figura 4. Espectro de HRMS de 5a	105
Figura 5. Espectro de RMN de ^1H de 4 em DMSO-d ₆	106
Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de 6a em DMSO-d ₆	107
Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C de 6a em DMSO-d ₆	108
Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de 5b em DMSO-d ₆	109
Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C de 5b em DMSO-d ₆	110
Figura 10. Espectro de RMN DEPT-135 de 5b em DMSO-d ₆	111
Figura 11. Espectro de HRMS de 5b	112
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de 5c em DMSO-d ₆	113
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de 5c em DMSO-d ₆	114
Figura 14. Espectro de RMN DEPT-135 de 5c em DMSO-d ₆	115
Figura 15. Espectro de HRMS de 5c	116
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H de 5d em DMSO-d ₆	117
Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de 5d em DMSO-d ₆	118
Figura 18. Espectro de RMN DEPT-135 de 5d em DMSO-d ₆	119
Figura 19. Espectro de HRMS de 5d	120
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de 5e em DMSO-d ₆	121
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de 5e em DMSO-d ₆	122
Figura 22. Espectro de RMN DEPT-135 de 5e em DMSO-d ₆	123
Figura 23. Espectro de HRMS de 5e	124
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H de 5f em DMSO-d ₆	125
Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C de 5f em DMSO-d ₆	126
Figura 26. Espectro de RMN DEPT-135 de 5f em DMSO-d ₆	127
Figura 27. Espectro de HRMS de 5f	128
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de 5g em DMSO-d ₆	129
Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C de 5g em DMSO-d ₆	130
Figura 30. Espectro de RMN DEPT-135 de 5g em DMSO-d ₆	131
Figura 31. Espectro de HRMS de 5g	132
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H de 5h em DMSO-d ₆	133

Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C de 5h em DMSO-d6	134
Figura 34. Espectro de RMN DEPT-135 de 5h em DMSO-d6	135
Figura 35. Espectro de HRMS de 5h	136
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de 5i em DMSO-d6.....	137
Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C de 5i em DMSO-d6	138
Figura 38. Espectro de RMN DEPT-135 de 5i em DMSO-d6	139
Figura 39. Espectro de HRMS de 5i	140
Figura 40. Espectro de RMN de ^1H de 5j em DMSO-d6	141
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C de 5j em DMSO-d6	142
Figura 42. Espectro de RMN DEPT-135 de 5j em DMSO-d6	143
Figura 44. Espectro de RMN de ^1H de 5k em DMSO-d6	144
Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C de 5k em DMSO-d6	145
Figura 46. Espectro de RMN DEPT-135 de 5k em DMSO-d6	146
Figura 47. Espectro de HRMS de 5k	147
Figura 48. Espectro de RMN de ^1H de 5l em DMSO-d6.....	148
Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C de 5l em DMSO-d6	149
Figura 50. Espectro de RMN DEPT-135 de 5l em DMSO-d6	150
Figura 51. Espectro de HRMS de 5l	151
Figura 52. Espectro de RMN de ^1H de 5m em DMSO-d6	152
Figura 53. Espectro de RMN de ^{13}C de 5m em DMSO-d6	153
Figura 54. Espectro de RMN DEPT-135 de 5m em DMSO-d6.....	154
Figura 54. Espectro de HRMS de 5m	155

SUMÁRIO

1.	Introdução	19
1.1.	<i>Apresentação</i>	19
1.2.	<i>Contexto Histórico</i>	22
1.3.	<i>Estruturas e nomenclatura dos BZD's</i>	23
1.4.	<i>Propriedades Biológicas</i>	26
1.4.1.	<i>Mecanismo de ação</i>	26
1.5.	<i>Docking Molecular</i>	30
1.6.	<i>Principais atividades biológicas</i>	33
1.7.	<i>Fluorescência</i>	34
1.7.1.	<i>Sondas biológicas</i>	35
1.8.	<i>Sínteses</i>	38
2.	Objetivos	43
2.1.	<i>Gerais</i>	43
2.2.	<i>Objetivos específicos</i>	44
3.	Metodologia	44
3.1.	<i>Reagentes e Equipamentos</i>	44
3.2.	<i>Sínteses</i>	44
3.2.1.	<i>Reação Multicomponente para obtenção de 5a</i>	45
3.2.2.	<i>Procedimento para a obtenção de 4</i>	45
3.2.3.	<i>Procedimentos para a otimização da reação de obtenção de 4</i>	46
3.2.4.	<i>Otimização do procedimento para a obtenção dos compostos 5a através do intermediário 4 isolado</i>	46

3.2.5. <i>Reação dominó para obtenção do produto 5a</i>	47
3.3. <i>Estudo de reciclabilidade do catalisador</i>	48
3.4. <i>Estudo de Docking Molecular</i>	48
3.5. <i>Análises de UV/Vis e Fluorescência</i>	50
4. Resultados e Discussão	51
5. Conclusão	85
6. Referências	87
APÊNDICE	96
<i>Dados de caracterização dos derivados 5a-m</i>	97
<i>Espectros de HRMS e RMN dos derivados 5a-m</i>	102

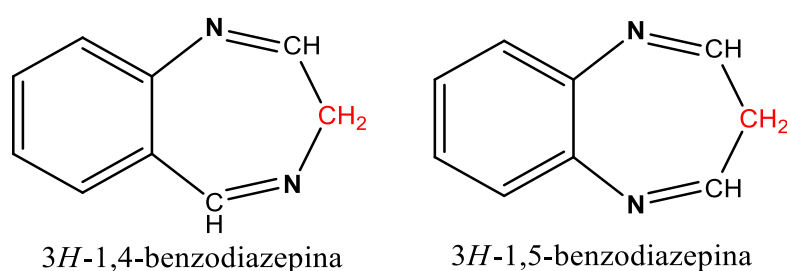
1. Introdução

1.1. Apresentação

As Benzodiazepinas (BDZ's) são substâncias utilizadas como drogas psicotrópicas com ação no Sistema Nervoso Central (SNC) e causam potencialização nas atividades depressoras do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). Essa inibição resulta em efeitos terapêuticos, principalmente na diminuição do transtorno de ansiedade (ansiolítico)^{1,2}, transtornos do sono (hipnótico e sedativo)^{3,4}, atenuação de sintomas depressivos (antidepressivo)⁵, crises epiléticas (anticonvulsivante)⁶, dores e espasmos musculares (relaxante muscular)⁷.

As BDZ's são compostos heterocíclicos que possuem um núcleo benzodiazepínico constituído de um anel benzênico fundido a um anel de 7 membros que contem 2 átomos de nitrogênio. A posição desses átomos de nitrogênio no anel de 7 membros dá origem a vários núcleos benzodiazepínicos (Figura 1). Entretanto, maior ênfase nas pesquisas sobre as propriedades biológicas dessa classe são encontradas para derivados que possuem os núcleos 1,4 e 1,5 benzodiazepínico⁸.

Figura 1. Estruturas dos núcleos 1,4 e 1,5-benzodiazepínicos

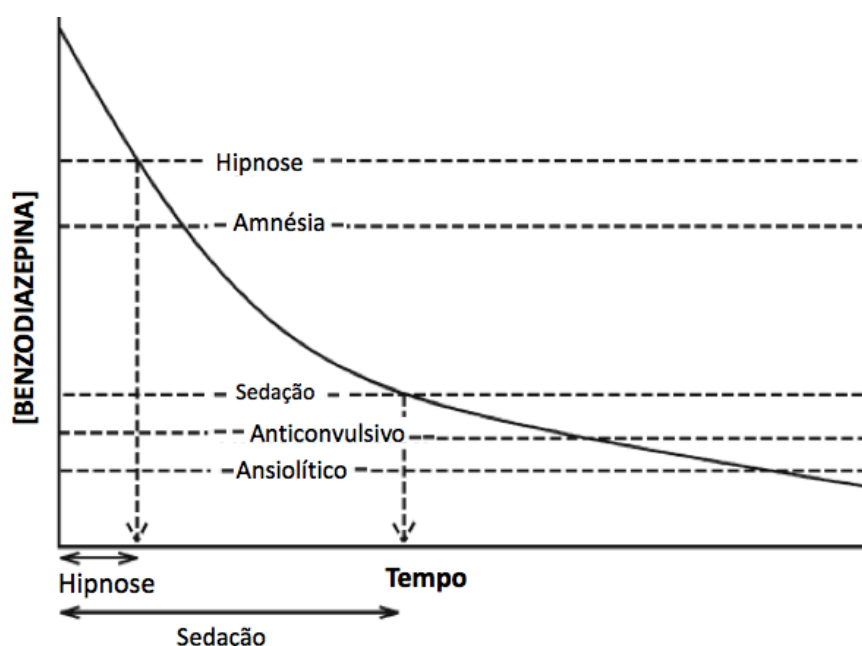


Fonte: Próprio autor

O interesse nesta classe de compostos também se deve ao fato de que os efeitos terapêuticos são dose-dependente, ou seja, em baixas dosagens os benzodiazepínicos produzem efeitos

ansiolíticos e anticonvulsivantes, entretanto, com o aumento da concentração, causam sedação, amnésia e por fim, hipnose (sono)⁴ (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática da relação entre a concentração e efeitos clínicos dos benzodiazepínicos



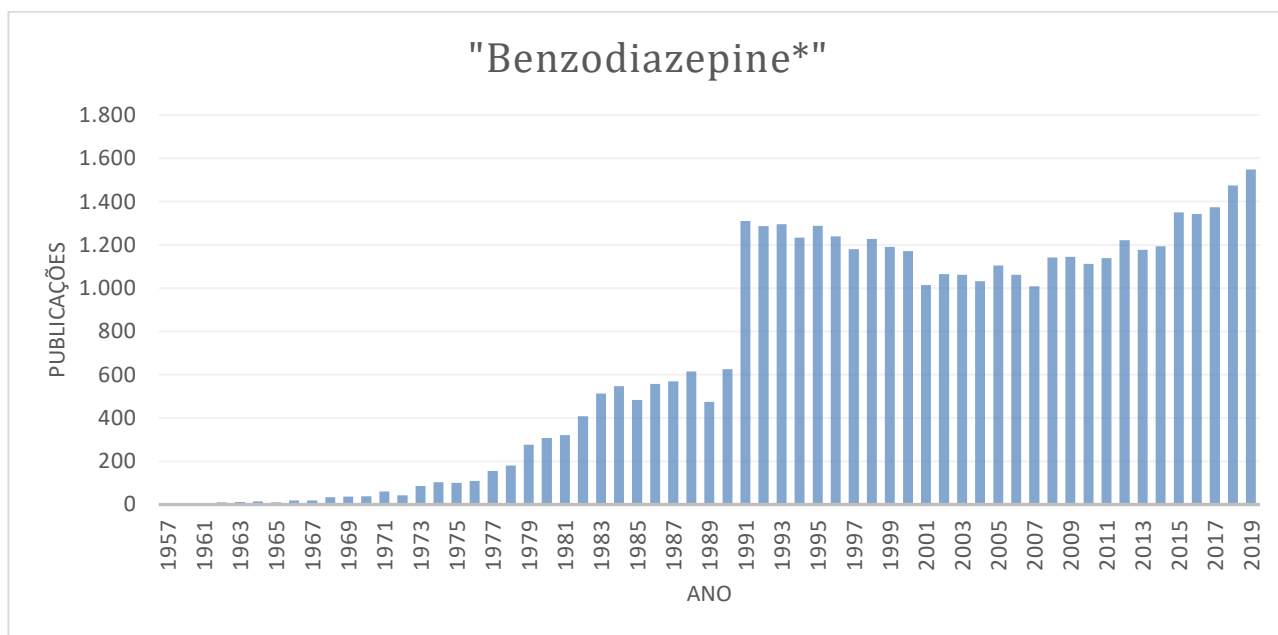
Fonte: Adaptado de Olkkola K.T., Ahonen J. (2008)

O uso das BDZ's tem como vantagens a maior eficácia e menor toxicidade, gera menos efeitos adversos em relação ao uso de outros medicamentos utilizados para mesma finalidade, como é o caso dos brometos de sódio e potássio e os barbitúricos⁹.

A descoberta das BZD's revolucionou o tratamento dos distúrbios psicológicos¹⁰ devido aos estudos sobre seu mecanismo de ação, a classe revolucionou até mesmo o conhecimento sobre o transtorno de ansiedade, distúrbios do sono e as convulsões¹¹ e, por isso, tem merecido especial atenção de vários grupos de pesquisa tanto pelas atividades biológicas quanto pela descoberta de novos derivados, a partir do desenvolvimento de novas rotas sintéticas¹².

Segundo pesquisas com a base de dados do *Web of Science* a primeira publicação com o termo em Inglês “Benzodiazepine*” surgiu em 1957, com o artigo de Archer, S. et al., intitulado “1-Ethyl-4-(3-tropanyl)-tetrahydro-1*H*-1,4-benzodiazepine”¹³, a partir de então, houve um aumento gradativo até 1991, onde houve um salto para 1.311 publicações, e a partir desse ponto, até 2019 manteve-se acima de 1.000 publicações/ano, chegando em 1.510 publicações em 2019 (Figura 3).

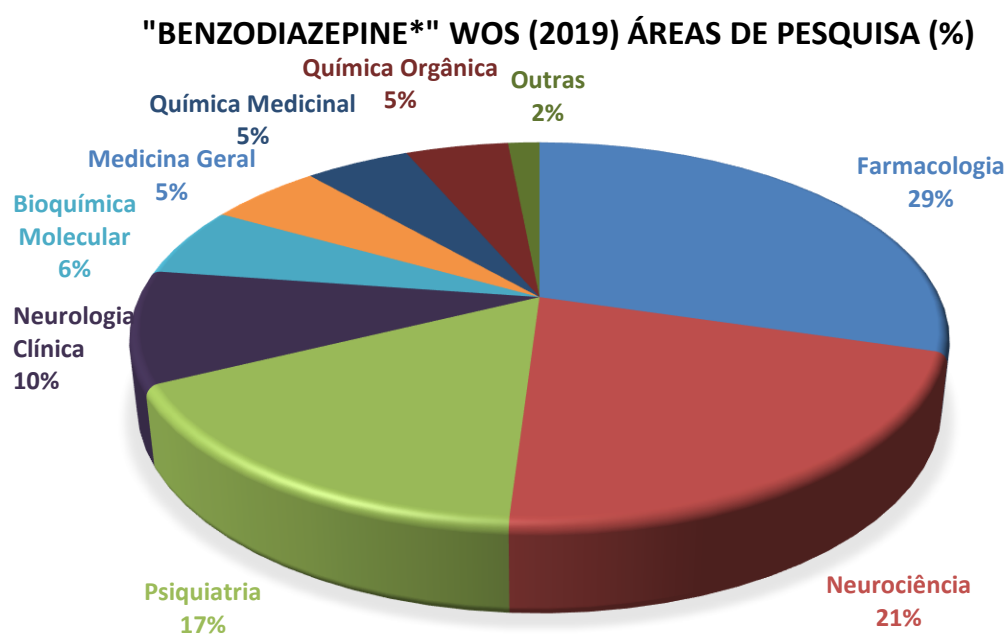
Figura 3. Dados do WOS publicações por ano com o termo "Benzodiazepine*"



Fonte: Próprio autor

No total são 41.716 publicações até o ano de 2019 citando as BDZ's, essas publicações encontram-se distribuídas em várias áreas de pesquisa, sendo observado na área de Farmacologia o maior número de artigos com 29,2% do volume de estudos publicados (Figura 4). Contudo, estudos sobre o desenvolvimento de rotas sintéticas para a obtenção de BDZ's com maior seletividade em ações biológicas e menos efeitos colaterais têm crescido nas últimas décadas. Neste contexto, a Química Orgânica e a Química Medicinal tem papéis estratégicos e juntas somam 10% de todas a pesquisa sobre essa classe de compostos^{13,14}.

Figura 4. Dados do WOS publicação (%) por área de pesquisa com o termo “Benzodiazepine*”



Fonte: Próprio autor

1.2. Contexto Histórico

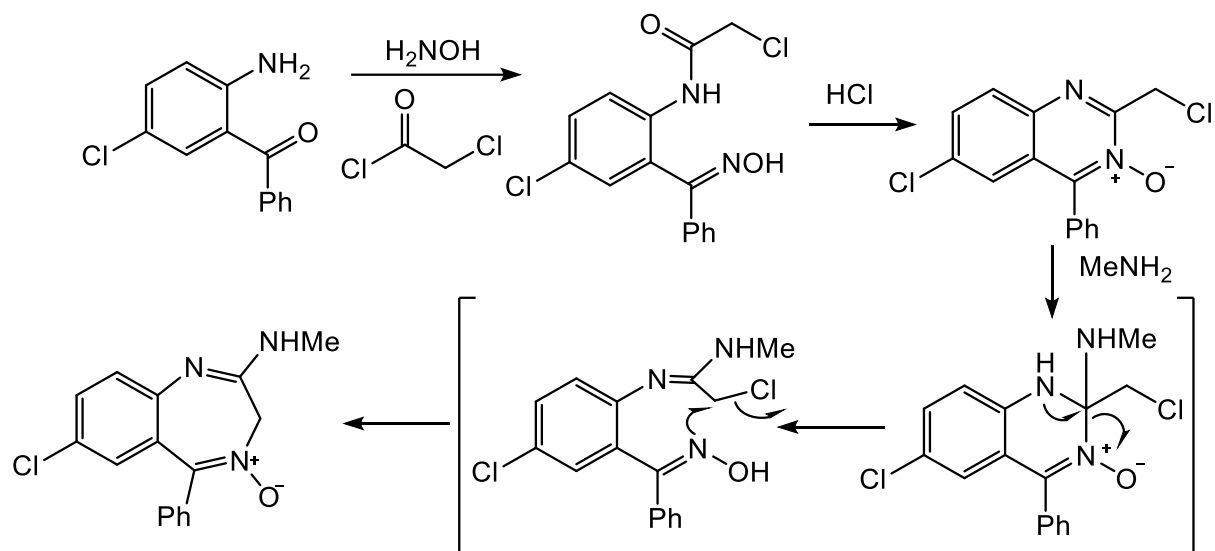
Entre os anos de 1920 a 1950, os barbitúricos, como o fenobarbital (Gardenal®), eram praticamente as únicas drogas utilizadas no tratamento de distúrbios psicológicos¹⁵. Também era comum o uso do álcool (bebidas alcóolicas), alcaloides do ópio (papoula), beladona e outras plantas com propriedades analgésicas, narcóticas e hipnóticas¹⁰.

No início da década de 1960, com a descoberta de Leo Henryk Sternbach (Hoffmann-La Roche), a indústria farmacêutica introduziu uma nova classe de psicotrópicos com propriedades biológicas para o tratamento de distúrbios psicológicos chamados então de benzodiazepínicos. Sternbach procurava compostos com propriedades tranquilizantes e sintetizou o primeiro benzodiazepínico em 1955, o Clordiazepóxido, comercializado como Librium® nos Estados Unidos¹⁶. Após alguns anos, foram feitas modificações estruturais na molécula com a obtenção do Diazepam, que foi comercializado em 1963 como Valium®¹⁷.

Sternbach obteve os compostos que ele idealizou a partir da rota sintética descrita no esquema

1. A descoberta do Clordiazepóxido deu origem à classe dos BDZ's que até hoje são os fármacos mais utilizados para o tratamento de transtornos de ansiedade¹⁸.

Esquema 1. Rota para a obtenção da estrutura do Clordiazepóxido



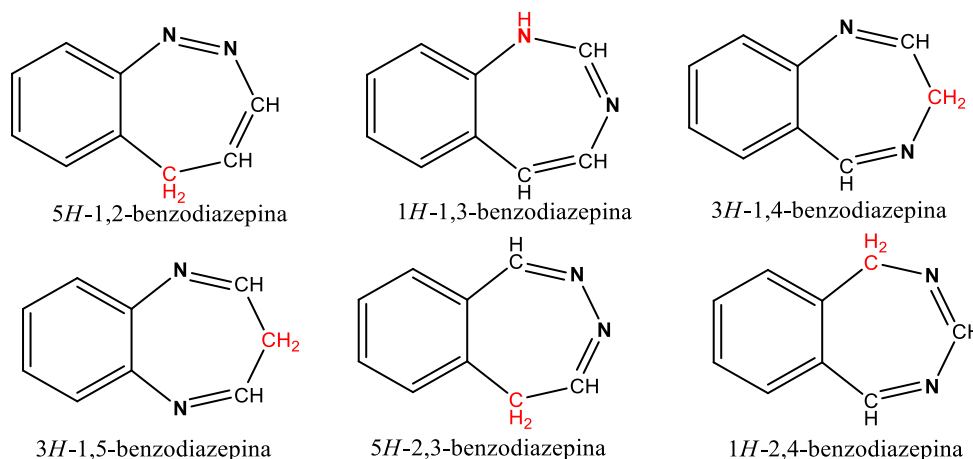
Fonte: Adaptado de Sternbach, L. H., (1978)

1.3. Estruturas e nomenclatura dos BZD's

Nos derivados BZD's os dois átomos de nitrogênio podem estar em diferentes posições um em relação ao outro dentro do anel de 7 membros, por isso vários tipos de estruturas são possíveis com os nitrogênios configurados nas posições: 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 2,3 e 2,4, (Figura 5).

Segundo regras da IUPAC, os compostos heterocíclicos são nomeados através do sistema Hantzsch-Widman¹⁹, onde o *Prefixo* diz respeito ao heteroátomo. Compostos contendo o elemento nitrogênio no anel, recebem a denominação “Azo” e a multiplicidade do mesmo heteroátomo é indicado anteriormente pelo prefixo “Di” (2), “Tri” (3), etc. Quando o heteroátomo aparece mais de uma vez no anel, é escolhida a numeração para fornecer os locais em que ele se encontra.

Figura 5. Estruturas das benzodiazepinas e nomenclaturas seguindo o sistema Hantzsch-Widman

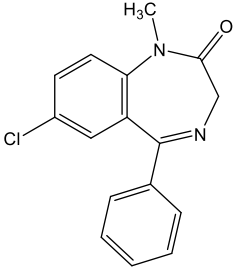
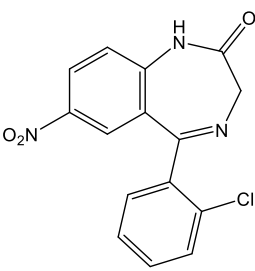
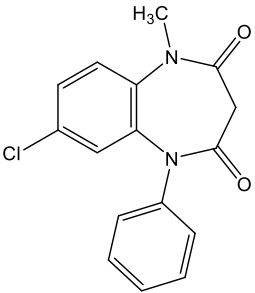
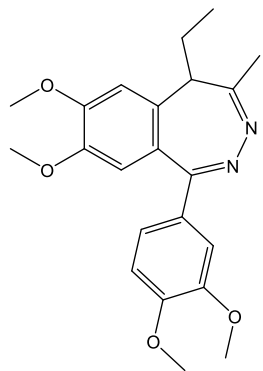


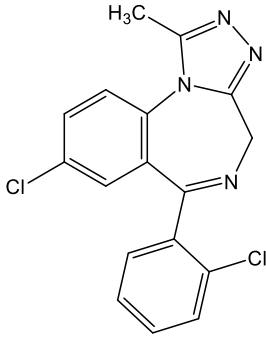
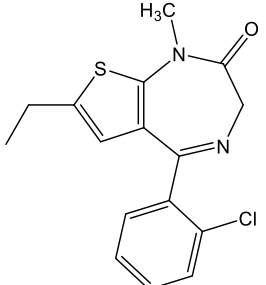
Fonte: Próprio autor

O *Infíxo* diz respeito ao número de elementos, onde 7 átomos se referem a “-ep” e o *Sufixo* se refere ao anel insaturado da quantidade de átomos “-epina”. O anel diazepínico fundido ao anel benzênico, fornece o anel heterocíclico bicíclico benzodiazepínico. Quando há isômeros, o nome precisa ser especificado utilizando a indicação do hidrogênio, ou radicais que estão entre os elementos com ligações duplas (π), ou seja, no elemento com apenas ligações simples (σ) do anel, indicando a numeração da localização do átomo seguido de um H maiúsculo e itálico, ex.: 3*H*-1,4-Benzodiazepina indicando o H no C-3, 5*H*-1,2-Benzodiazepina indicando o H no C-5, em casos onde o átomo com ligação simples no anel e outro grupo além do Hidrogênio, também será indicado da mesma maneira²⁰.

Além do Clordiazepóxido, Diazepam, Bromazepam, Nitrazepam, Oxazepam, Clonazepam, Lorazepam, Temazepam²¹, que foram os primeiros BDZ's existem muitos outros derivados das BDZ's, (Tabela 1), com diferentes configurações nos átomos de Nitrogênio^{22,23,24,25}.

Tabela 1. Diferentes estruturas e nomes para compostos Benzodiazepínicos e análogos comercializados como fármacos

Classificação	Estrutura	Nome genérico	Nome IUPAC
1,4-Benzodiazepinas		Diazepam	7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-3 <i>H</i> -1,4-benzodiazepin-2-ona
		Clonazepam	5-(2-clorofenil)-7-nitro-1,3-dihidro-1,4-benzodiazepin-2-ona
1,5-Benzodiazepinas		Clobazam	7-cloro-1-metil-5-fenil-1,5-benzodiazepin-2,4-diona
2,3-Benzodiazepinas		Tofisopam	-(3,4-dimetoxifenil)-5-etil-7,8-dimetoxi-4-metil-5 <i>H</i> -2,3-benzodiazepina

Triazolobenzodiazepinas		Triazolam	8-cloro-6-(2-clorofenil)- 1-metil-4 <i>H</i> - [1,2,4]triazolo[4,3- <i>a</i>][1,4]benzodiazepina
Tienodiazepinas		Clotiazepam	5-(2-clorofenil)-7-etil-1- metil-3 <i>H</i> -tieno[2,3- <i>e</i>][1,4]diazepin-2-ona

Fonte: Ashton, C. H., (2007)²⁶, Taylor et al., (2000)²⁷, Niwa T et al., (2005)²⁸

1.4. Propriedades Biológicas

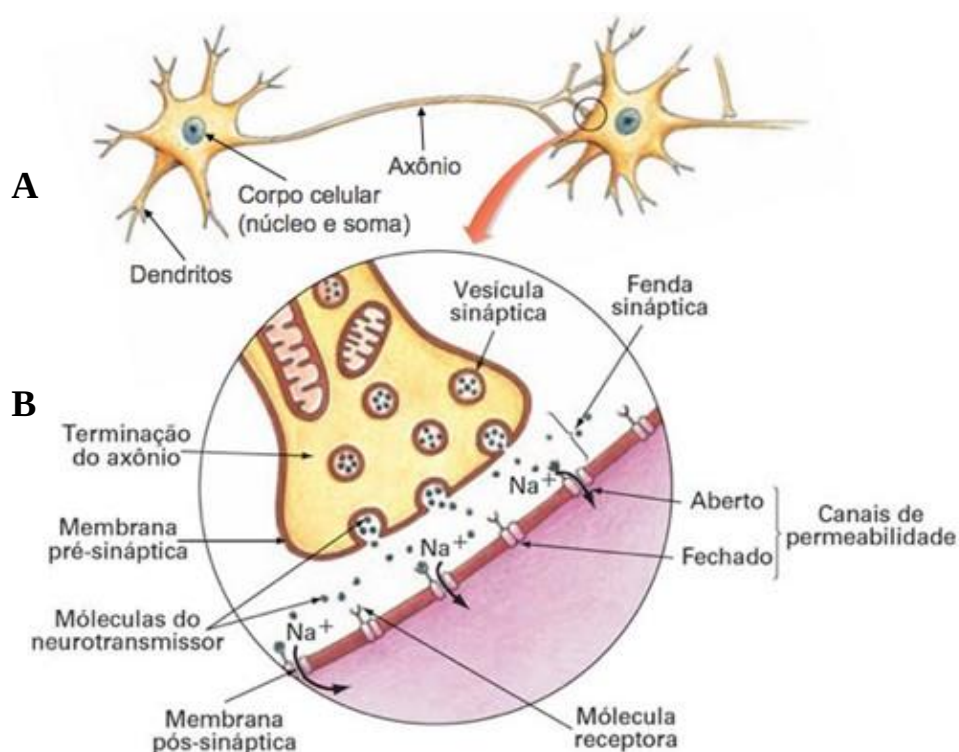
1.4.1. Mecanismo de ação

Benzodiazepínicos são drogas psicotrópicas ou psicoativas, ou seja, elas agem principalmente nos neurônios do Sistema Nervoso Central (SNC), alteram algumas funções cerebrais como, o humor, a percepção, o comportamento e a consciência²⁹.

Os neurônios são células nervosas que se excitam eletricamente e se comunicam com as outras células por dois meios, o meio elétrico, que ocorre quando há somente cargas elétricas passando de um neurônio para outro, e o meio químico, que ocorre quando as informações são passadas a outros neurônios através de substâncias químicas (neurotransmissores), essa transferência de informação chama-se sinapse³⁰. A estrutura do neurônio é definida resumidamente por um corpo celular (soma) onde fica o núcleo e ocorre a síntese proteica, o axônio, por onde passa a informação e o terminal do axônio, que se liga a outro neurônio vizinho³¹ (Figura 6A).

Nas sinapses químicas, a partir da vesícula sináptica que fica no terminal do axônio são liberados os neurotransmissores para a fenda sináptica, onde há o fluido extracelular que contém íons, então, os neurotransmissores vão para o citoplasma do corpo celular ou dendritos. No citoplasma os neurotransmissores se ligam aos neuroreceptores específicos e, então mudam a conformação da proteína responsável da membrana plasmática da célula pré-sináptica que abre (ou fecha) os canais de permeabilidade, onde o íon (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) que tem afinidade com esse canal entra no outro neurônio, nesse momento acontece a troca de informação, a sinapse, que será modulada no núcleo, e através do axônio, mais neurotransmissores serão transportados a outros neurônios vizinhos³² (Figura 6B).

Figura 6. (A) Estrutura do neurônio (B) Transmissão do impulso nervoso através de uma sinapse química



Fonte: Adaptado de Tonel, D., (2013)³³

Há dois tipos de estímulos com forças opostas nas sinapses, a excitação e a inibição^{34,35}. As sinapses feitas pelos neurônios no SNC, utilizando os neurotransmissores como um análogo à função de códigos binários em um computador, podemos atribuir que *zero (0)* significa cortar energia (desligado) ao neurotransmissor GABA, inibidor do SNC, e *um (1)*, que significa fornecer energia (ligado), atribui-se ao neurotransmissor Glutamato, excitador do SNC.

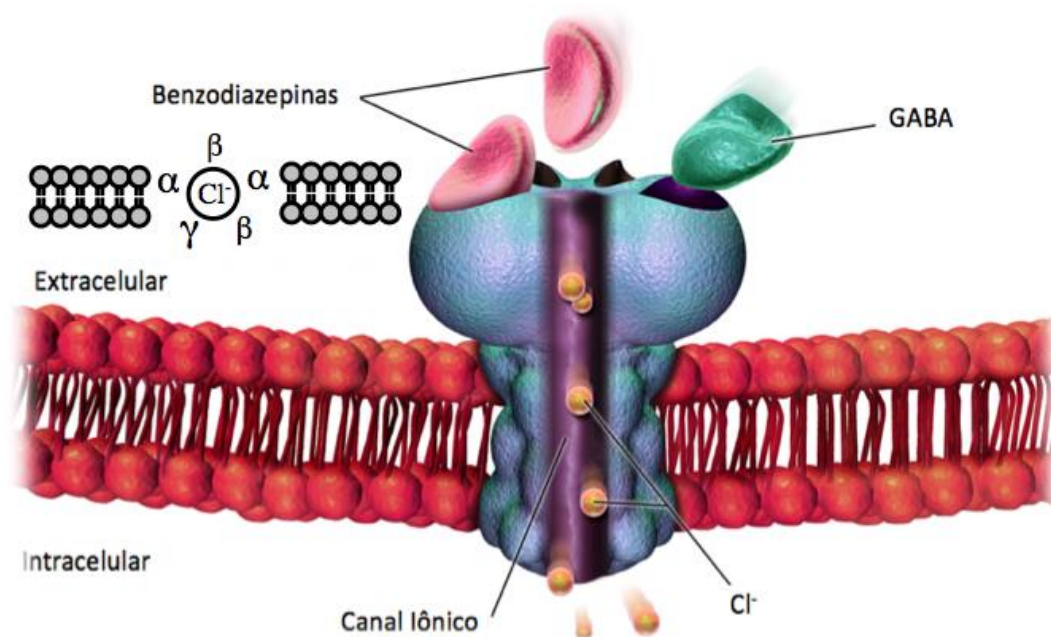
Em síntese o cérebro através de vários neurotransmissores, neuroreceptores e tipos de sinapses desenvolvem atividades motoras, sensitivas e associativas para modular as ações desse sistema, refletindo-as para o corpo como um todo através das células nervosas.^{36,37}

As BDZ's são agonistas e moduladores alostéricos positivos dos neuroreceptores do GABA os GABA-A_{Rs}³⁸. A exceção a esse mecanismo de ação é o flumazenil, a imidazobenzodiazepina que se ligam com alta afinidade a locais específicos nos receptores GABAérgicos e inibem as propriedades hipnóticas e sedativas dos demais benzodiazepínicos³⁹.

Os GABA-A_{Rs} são proteínas transmembranares ionotrópicas, ou seja, elas ficam localizadas entre a membrana neuronal e a fenda sináptica, e são responsáveis pela permeabilidade dos íons Cloreto (Cl⁻) entre a fenda sináptica e o citoplasma do outro neurônio. Há pelo menos 19 subunidades e 8 subtipos de GABA-A_{Rs} no cérebro dos mamíferos (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ , ρ 1-3), porém, a maioria são compostos por cinco subtipos, sendo uma γ (1-3), duas β (1-3) e duas α (1-6)⁴⁰ (Figura 7).

A função das BDZ's nos GABA-A_{Rs} é mudar a conformação do sitio ativo da proteína para fazer com que haja a abertura no canal iônico, isso permite o aumento da passagem de íons Cl⁻, que resulta na diferença de potencial elétrico negativo, a hiperpolarização da membrana neuronal que causa a potencialização dos efeitos depressores do SNC característicos das sinapses inibitórias⁴¹.

Figura 7. Representação dos receptores GABA-A



Fonte: Adaptado de Blaus B., (2014)⁴²

Cada composto benzodiazepínico tem afinidade a subtipos e subunidades específicas dos GABA-A_Rs por meio de resíduos dos aminoácidos que formam a sequência da proteína alvo (Tabela 2).

Essa condição diz respeito a propriedades biológicas características, como por exemplo, a presença de um resíduo de histidina na posição 101 da sequência primária de aminoácidos do subtipo α na subunidade 1 (há a mesma sequência em α2, α3 e α5), oferece alta afinidade ao Diazepam, induzindo efeitos sedativos, entretanto, a presença de um resíduo de arginina em α4 e α6, oferece baixa afinidade. Nem todos os subtipos e as subunidades são sensíveis as BDZ's, porém, diferentes composições resultam em propriedades biológicas distintas⁴³.

Estas observações são comumente utilizadas em estudos computacionais, como de *docking* molecular, para comparar as interações feitas entre a molécula e a proteína em simulações que visam prever possíveis propriedades biológicas⁴⁴.

Tabela 2. Resumo dos principais subtipos dos GABA-_ARs e suas características

Subtipo e subunidade ou composição	Características relatadas
α_1	Responsável pelos efeitos sedativos e de amnésia anterógrada relacionados ao Diazepam
α_2	Responsável pelos efeitos ansiolíticos do Diazepam
α_4 ou α_6 e δ	Necessário para inibição tônica
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	A composição de subtipos e subunidades mais comum
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_n\gamma_2$, $\alpha_5\beta_{1/3}\gamma_2$	Sensíveis às benzodiazepinas
$\alpha_4\beta_n\delta$, $\alpha_4\beta_n\gamma$, $\alpha_6\beta_n\delta$, $\alpha_6\beta_{2,3}\gamma$	Insensíveis às benzodiazepinas
$\alpha_3\beta_3\delta$	Insensível para 1,4 e 1,5-benzodiazepinas
$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	Relacionado à sedação e ataxia
$\alpha_{2/3}\beta_3\gamma_2$	Relacionado às atividades ansiolíticas
$\alpha_5\beta_3\gamma_2$	Possivelmente relacionado à sedação

Fonte: Adaptado de Sankar, R. (2012)⁴⁵

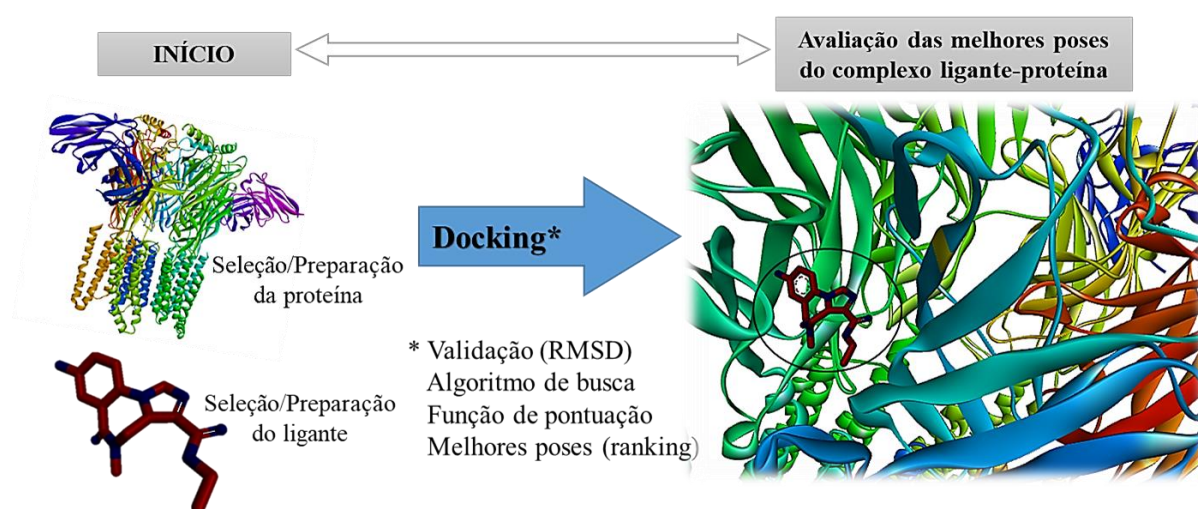
1.5. Docking Molecular

O *docking* molecular é uma importante ferramenta de *virtual screening*⁴⁶, essencialmente para a química medicinal com foco na descoberta de novos fármacos, pois, auxilia no refinamento e na modelagem de estruturas com potenciais ações biológicas, através de simulações que preveem o comportamento que a molécula estudada (ligante) terá em complexo estabilizado com a proteína alvo⁴⁷, ou seja, isso faz com que sejam escolhidas as moléculas que demonstrarem, *in silico*, ter maior afinidade com o receptor antes mesmo da realização de ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*.

O estudo de *docking* molecular, sucintamente, é feito através de programas que realizam simulações computacionais, como DOCK⁴⁸, AUTODOCK⁴⁹, GOLD⁵⁰ e FlexX⁵¹, estes buscam soluções baseadas em algoritmos com métodos probabilísticos, que podem ser determinísticos ou estocásticos, como no programa GOLD, que é regido por um Algoritmo Genético (AG) de método

estocástico, no qual, aplica conceitos da teoria da evolução e seleção natural. Por funções de pontuação, como a *ChemScore* que leva em consideração o ΔG (energia livre de Gibbs), a área de contato hidrofóbico-hidrofóbico, ligação de hidrogênio, a flexibilidade do ligante e a interação do metal⁵² para estimar a pontuação de cada solução (pose) gerada pela simulação, fazem assim um ranking de melhores poses dos modelos de interação proteína-ligante obtidos⁵³. O resumo de um estudo de *docking* molecular baseado no programa GOLD é mostrado na representação esquemática da Figura 8.

Figura 8. Representação esquemática de um estudo de *docking* baseado no programa GOLD.

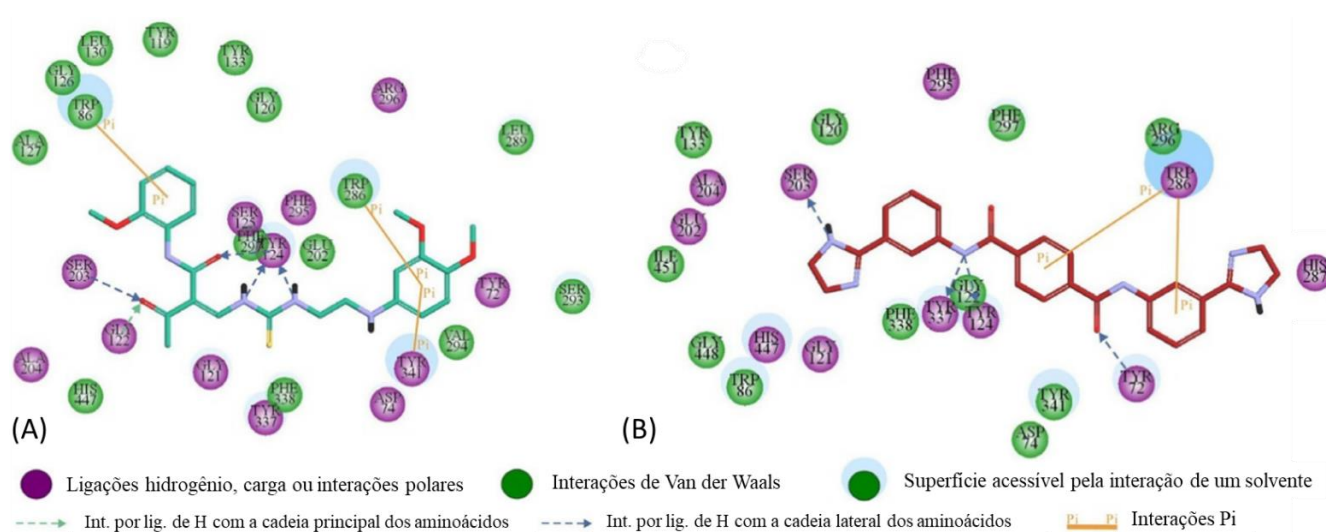


Fonte: Próprio Autor

Geralmente, no estudo de *docking* o ligante é selecionado para ter ação agonista ou antagonista da proteína alvo, que foi selecionada cujas propriedades biológicas são conhecidas, e o objetivo é modificar o “*modus operandi*” deste sistema endógeno, para obter o efeito desejado. Citando como exemplo o estudo de Shin-Hua Lu et al., (2011), que descreveram um *virtual screening* utilizando *docking* molecular que resultou na descoberta de potenciais inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que desempenha um papel fundamental na memória e na cognição, a deficiência de acetilcolina no sistema colinérgico é a causa de doenças cognitivas como o Alzheimer. Os autores, utilizando a proteína humana

acetilcolinesterase do PDB ID: 1B41 realizaram o refinamento de 252 moléculas com potenciais propriedades biológicas encontradas na base de dados do NCI (*National Cancer Institute*). A análise dos resultados obtidos pelo programa LibDock sugeriu, interações hidrofóbicas π - π com os resíduos Trp86 ou Trp286 (Figura 9), de 9 estruturas ligantes que são as mesmas do modelo de interação dos inibidores da AChE já existentes⁵⁴.

Figura 9. Modelo de interação de dois compostos analisados por *docking* molecular (A) NSC659829 e (B) NSC35839 que demonstraram semelhança com os inibidores AChE.



Fonte: Adaptado de Shin-Hua Lu et al., (2011).

O *docking* também vai de encontro com estudos da relação estrutura-atividade dos compostos estudados, pois há a opção de modelar as estruturas previamente analisadas, e com isso, novas interações são observadas, fazendo com que a saída ou entrada de novos grupos químicos na molécula modifiquem os potenciais propriedades biológicas.

1.6. Principais atividades biológicas

As BDZ's são indicadas para o gerenciamento a curto prazo de vários tipos de transtornos de ansiedade como, Transtorno do Pânico (Ansiedade Paroxística Episódica⁵⁵), Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), Transtorno de Ansiedade Social (TAS), além de serem adjuvantes dos ISRS's para o tratamento de Transtorno obsessivo-compulsivo (TOC)^{56,57}.

A classe é frequentemente utilizada para atenuar sintomas ansiosos no gerenciamento de quadros depressivos, com a inclusão de outras terapias, entretanto, faltam dados que afirmem a ação antidepressiva específica na monoterapia. No entanto, as BDZ's podem ser prescritas no tratamento da depressão ansiosa⁵⁸. Também possuem ação hipnótica e sedativa, pois diminuem o tempo para adormecer, aumentando o tempo de sono, com a diminuição do número de despertares. Entretanto, reduzem o sono REM, por isso devem ser utilizadas por curto período de tempo ou com uso intermitente⁵⁹. Sua ação músculo relaxante ocorre pela redução do tônus muscular esquelético produzindo um efeito miorrelaxante, podendo ajudar a aliviar dores de espasmos musculares ocasionados por patologias neurológicas.

A ação anticonvulsivante das BDZ's ocorre mais especificamente em convulsões por síndrome de abstinência alcoólica ou por agentes tóxicos e são indicados em altas doses e longos prazos para se obter altas concentrações no cérebro com a finalidade de prevenir convulsões crônicas^{60,61}.

Nos últimos anos, os benzodiazepínicos vêm sendo investigados pela possível ação como inibidores BET. As proteínas Domínio Bromo e Extraterminal (BET), são proteína com dois domínios (D1 e D2) e estão envolvidas na regulação e transcrição da cromatina (complexo de DNA), as BET fazem ligações de hidrogênio com as histonas H3 e H4, que são proteínas que empacotam e ordenam o DNA nos nucleossomos da cromatina. A função descoberta das moléculas denominadas inibidores BET é que elas bloqueiam a ligação com as histonas, e vários estudos demonstraram que a inibição da interação BET-histona pode resultar em profunda interrupção dos

programas de transcrição, resultando em atividade anticâncer e anti-inflamatória, entre outros⁶². Em recente estudo⁶³ foi comprovado que 1,2,3-triazolobenzodiazepinas inibem as BET. Os compostos sintetizados tem valores de CI_{50} em nM, ou seja, extremamente ativos em bloquear a ligação BET-histona o que demonstra um possível caminho para o desenvolvimento de fármacos anticâncer com base nos 1,2,3-triazolobenzodiazepinas⁵⁴.

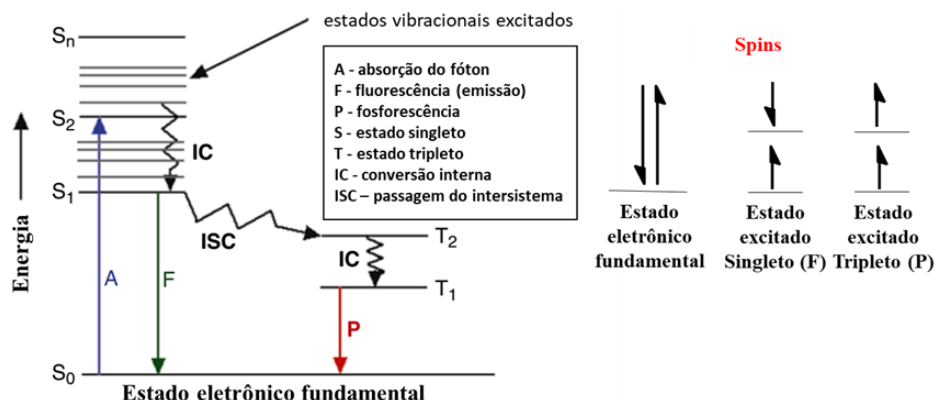
As BDZ's devido às características estruturais podem emitir luz pelo fenômeno da fluorescência, e com isso, além de participar diretamente em processos biológicos, também pode auxiliar indiretamente, se comportando como ferramenta biológica, como marcadores fluorescentes⁷⁵.

1.7. Fluorescência

As substâncias que emitem luz através de estados eletronicamente excitados, sofrem um fenômeno chamado de luminescência, esse efeito é especificamente dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência, a diferença entre ambos é a natureza do estado eletrônico excitado. O diagrama de Jablonski (Figura 10) mostra quando uma molécula absorve um fóton, os elétrons são excitados e a configuração do seu spin mantém-se no emparelhamento original ao estado fundamental, essa condição é nomeada como estado excitado singlete, onde há a emissão do fóton após a conversão interna do estado $S_1 \rightarrow S_0$, isso caracteriza a fluorescência, em que essa ação é realizada na escala de 10 nanosegundos.

Na fosforescência, o elétron é excitado pelo fóton, e após há a passagem do intersistema, mecanismo que converte a orientação do spin, resultando na condição denominada de estado excitado tripleto, posteriormente, $T_1 \rightarrow S_0$ e será emitido o fóton com um atraso de tempo maior do que o estado singlete, devido a essa conversão do spin para o estado fundamental novamente, o processo leva de milissegundos a segundos⁶⁴.

Figura 10. Diagrama de Jablonski - processos dos estados excitados singlete (fluorescência) e tripleto (fosforescência)



Fonte: Adaptado de Menéndez, G. O., et al., (2015)⁶⁵.

Durante o processo da fluorescência, parte da energia do fóton absorvido será dissipado através de vias não radiativas, essa perda de energia resulta na diferença entre os comprimentos de onda (λ) de absorção e de emissão, onde o fóton será emitido em maiores λ ⁶⁶.

A fluorescência em compostos orgânicos se desenvolve em moléculas que apresentam estruturas rígidas com abundância de elétrons π em suas ligações. A fluorescência molecular é usada extensivamente em ciências médicas, químicas, físicas e biológicas como ferramentas com o poder de detectar e analisar, visualizar, investigar propriedades locais e diagnosticar. Além dessas aplicações de visualização, os compostos fluorescentes também são utilizados como sondas, indicadores, rastreadores e sensores que fornecem informações sobre parâmetros químicos e físicos locais como pressão, temperatura, viscosidade, pH, entre outras⁶⁷.

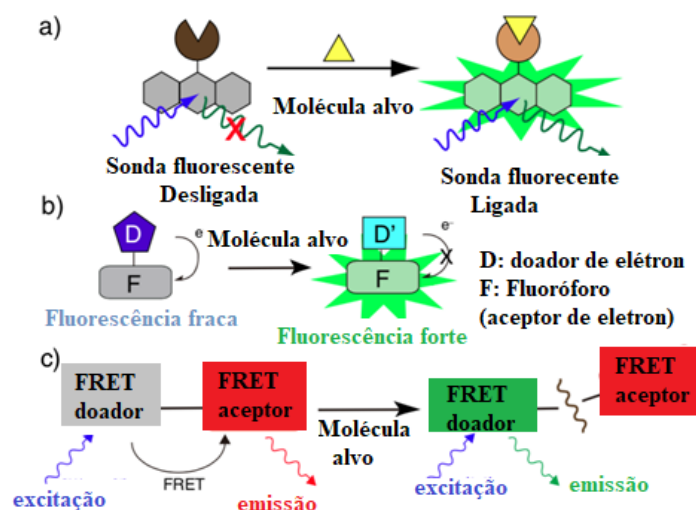
1.7.1. Sondas biológicas

As sondas biológicas são moléculas fluorescentes também nomeadas de fluoróforos, são utilizadas como ferramentas essenciais para estudar moléculas biológicas, a vantagem dessa técnica de microscopia fluorescente em comparação com microscopias como a eletrônica é a compatibilidade com células, tecidos e animais vivos, além de promover imagens dinâmicas minimamente invasivas⁶⁸. As sondas são capazes de marcar posicionalmente células, agir na

coloração de organelas, avaliar morfologias celulares⁶⁹, entre outras aplicações, como a ligação de fluoróforos a uma macromolécula purificada, no intuito de detectar alterações conformacionais^{70,71}. Os fluoróforos tem aplicabilidades não apenas no espectro visível, comumente as aplicações de sondas fluorescentes em imagens com alto poder de penetração nos tecidos são feitas por compostos cuja emissão é próxima ao comprimento de onda infravermelho⁷².

Os fluoróforos podem ser classificados como proteínas e peptídeos, pequenos compostos orgânicos, polímeros sintéticos e sistemas multicomponentes. As moléculas fluoróforas podem ser utilizadas sozinhas ou ligadas à uma outra molécula para formar um sistema funcional, como PeT (*Photoinduced electron transfer*) e FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) (Figura 11).

Figura 11. Comportamento das sondas fluorescentes: (a) Representação esquemática do funcionamento das sondas, (b) Sondas baseadas em funcionamento PeT e (c) Sondas baseadas em funcionamento FRET.

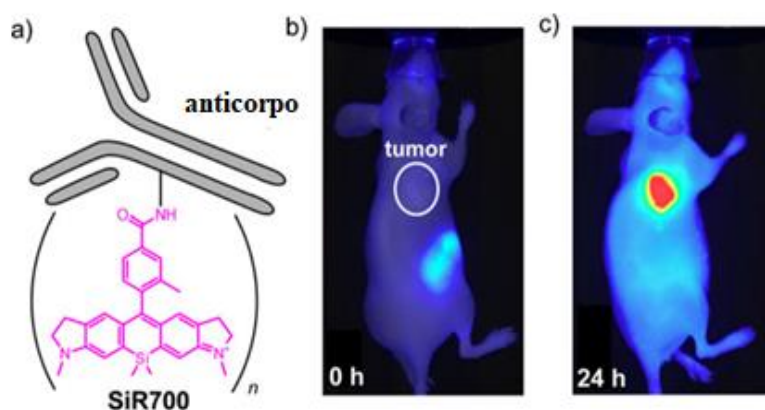


Fonte: Terai, Takuya et al., (2013).

Moléculas que contêm essas propriedades óticas estão sendo utilizadas comumente como marcadores ou sondas fluorescentes como uma técnica não invasiva em tempo real para detecção de imagens de células vivas como o uso do fluoróforo à base de Rodamina substituída por Silício

“SiR700”. Este fluoróforo tem alta afinidade pelo anticorpo (Anti-Tenascina C), o fluoróforo consegue demarcar *in vivo* tumores específicos de camundongos (Figura 12). Após 24 h da injeção de anticorpo as moléculas do fluoróforo se ligam ao anticorpo se comportando como um corante fluorescente para marcar a área do tumor^{73,74}.

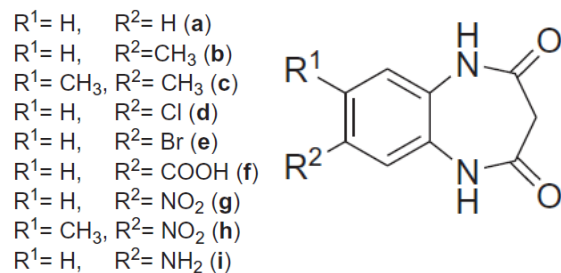
Figura 12. Imagem de um tumor *in vivo* marcado por um anticorpo ligado à SiR700: (a) representação do fluoróforo ligado ao anticorpo, (b) imagem de fluorescência do tumor implantado, o círculo branco indica o tumor antes da injeção de anticorpos e (c) imagem 24h após a injeção de anticorpos.



Fonte: Terai, Takuya et al. (2013).

Entretanto, para que um composto possa ser usado como sonda biológica é necessário que tenha alta afinidade pelo receptor biológico que vai marcar. Por exemplo, as BDZ's têm alta afinidade por receptores GABA e com base nessa afinidade é possível medir a distribuição e a mobilidade lateral desses receptores em células nervosas vivas através da fluorescência⁷⁴.

Outro trabalho envolvendo a síntese e propriedades fluorescentes das BDZ's foi desenvolvido por Qomi et al., (2017)⁷⁵ que sintetizaram BDZ's com diferentes substituintes (Figura 13) e encontraram que derivados contendo grupos doadores de elétrons apresentaram maiores intensidades e maiores deslocamentos de emissão.

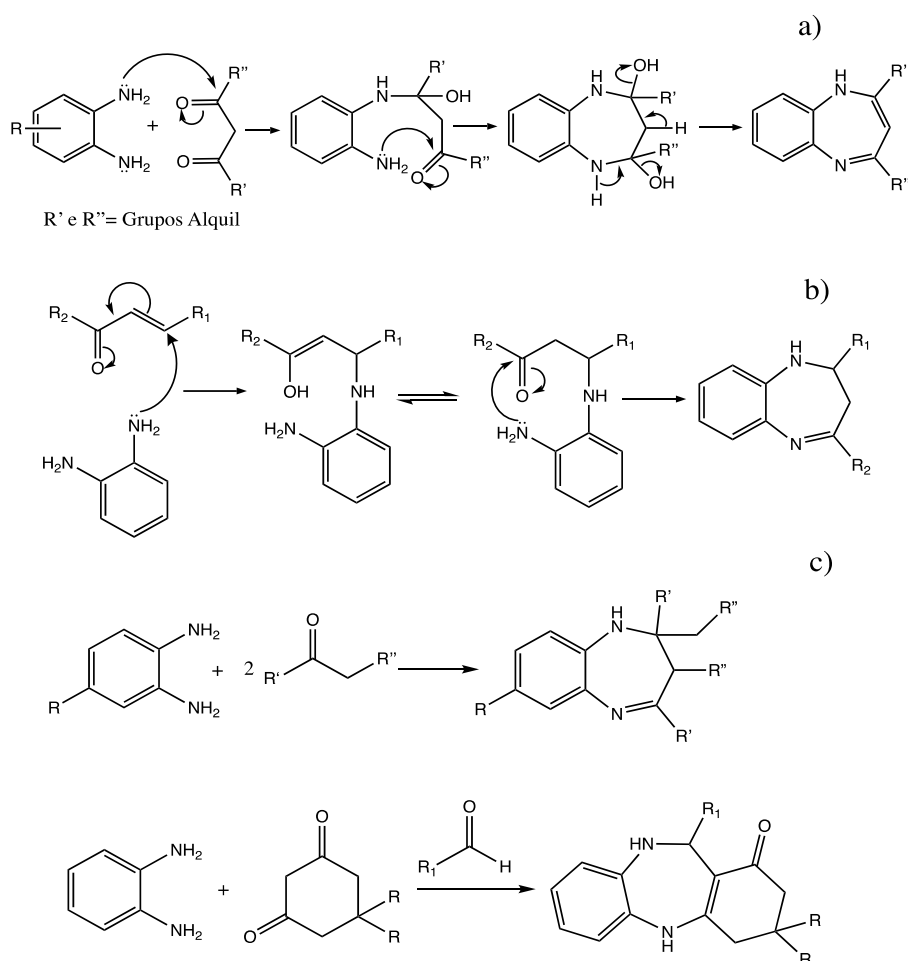
Figura 13. Estruturas de derivados benzodiazepínicos fluorescentes

Fonte: Qomi, H. R., Habibi, et al., (2017)

Apesar das BDZ's não terem bandas de emissão com grande intensidade ou λ de emissão em regiões acima de 400 nm, como as descritas pelos autores⁷⁵, o interesse neste tipo de molécula como sonda biológica está na sua alta afinidade com os receptores GABA e na facilidade de introdução de grupos com capacidade de aumentar a fluorescência da molécula sem alterar a afinidade por esses receptores.

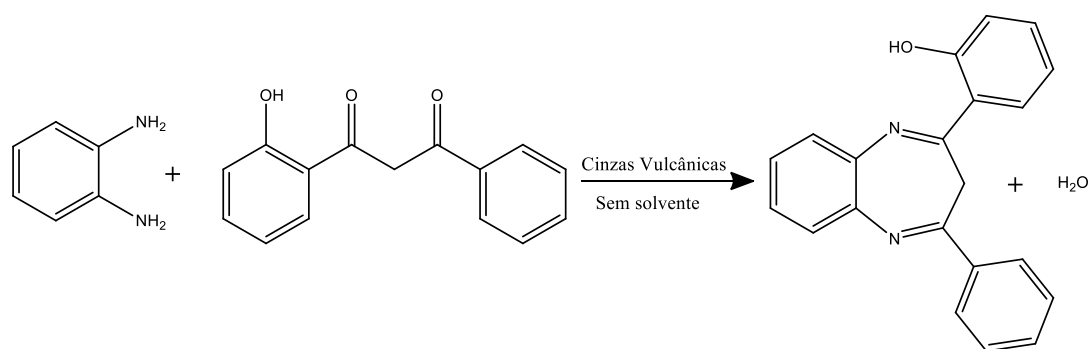
1.8. Sínteses

A síntese de 1,5-BDZ's geralmente ocorre pela reação entre a *o*-fenilenodiamina como fonte dos dois átomos de nitrogênio e diferentes fontes de carbonilas.



Esquema 2. Reações de obtenção do núcleo 1,5- benzodiazepínico. a) *o*-fenilenodiamina com composto dicarbonílico, b) *o*-fenilenodiamina com composto carbonílico α,β -insaturado e c) *o*-fenilenodiamina com duas moléculas de cetonas e com uma dicetona e um aldeído⁷⁶.

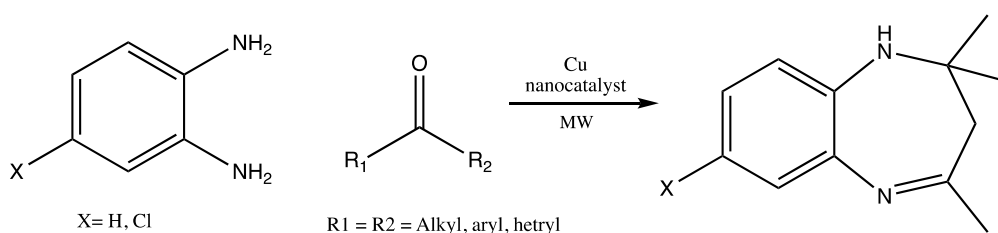
O uso de compostos dicarbonílicos gera benzodiazepinas com insaturações nos dois nitrogênios e substituições nos carbonos 2 e 4 como as BDZ's análogas mostradas no Esquema 2a. Muños et al. (2019) obtiveram este tipo de estruturas ao utilizar cinzas vulcânicas (aluminosilicatos) para catalisar a reação entre *o*-fenilenodiamina (e derivados) e compostos dicarbonílicos derivados da 1,3-difenilpropanodiona (Esquema 3).



Esquema 3. Esquema reacional desenvolvido por Muños et al. (2019) para a síntese de 1,5-benzodiazepínico

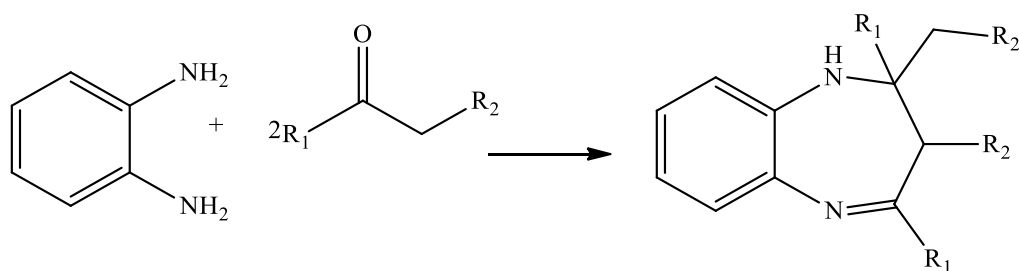
Os autores obtiveram os derivados benzodiazepínicos em rendimentos satisfatórios variando de 61 a 91% ⁷⁷. Esses compostos exibem sistemas altamente conjugados diferentes das benzodiazepinas descritas utilizando outros tipos de compostos carbonílicos (Esquema 2b, 2c).

Derivados benzodiazepínicos com estrutura análoga aos descritos no Esquema 2b foram obtidos por Shaikh et al (2019) usando um nanocatalisador de Cobre, na ausência de solvente e aquecimento em micro-ondas. Os autores obtiveram 20 derivados com rendimentos superiores a 90% e tempo de reação variando de 8 a 12 min⁷⁸ (Esquema 4). O uso do nanocatalisador de Cobre promoveu a síntese desses derivados de forma mais eficiente e em menor tempo em comparação com outras rotas já utilizadas para a obtenção desses mesmos derivados^{79,80,81}. Entretanto, a obtenção do nanocatalisador de Cobre requer várias e longas etapas e não há descrição de seu reuso o que pode encarecer a metodologia.



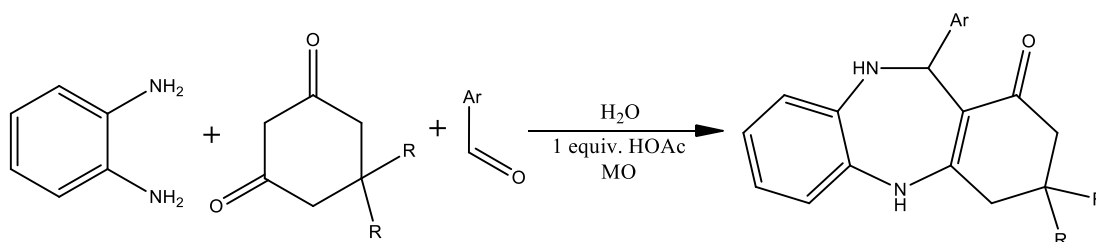
Esquema 4. Esquema reacional desenvolvido por Shaikh et al (2019), para obtenção de derivados benzodiazepínicos.

Benzodiazepinas análogas às descritas no Esquema 2b com *o*-fenilenodiaminas e cetonas, na proporção de 1:2, foram obtidas por Isavera et al. (2019) (Esquema 5) utilizando vários catalizadores. Foram obtidos seis derivados de 1,5-benzodiazepinas com rendimentos variando de 68 a 95% em tempos de até 480 min, entretanto, os nanocatalisadores utilizados são baseados em Calix[n]arenes de difícil acesso e os exemplos citados envolvem apenas cetonas simples ⁸².



Esquema 5. Síntese desenvolvida por Isaeva et al., (2019) para obter 1,5-benzodiazepinas.

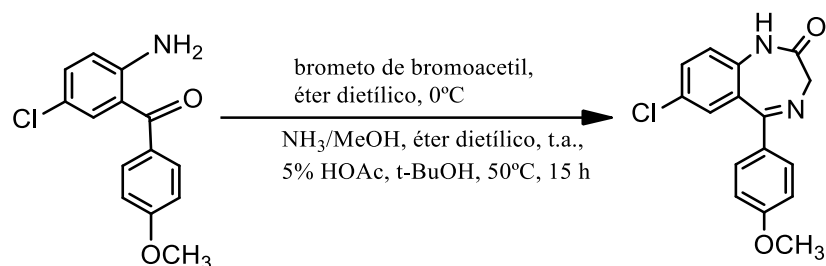
Os 1,5-benzodiazepínicos análogos ao esquema 2c foram obtidos através da reação entre dimedonas (dicetonas cíclicas), *o*-fenilenodiamina e aldeídos aromáticos. Xiao-Tong Zhu et al. (2014), obtiveram 17 derivados 1,5-benzodiazepínicos através da reação dominó entre a *o*-fenilenodiamina e a dimedona em água à temperatura ambiente, com adição sequencial do aldeído aromático usando ácido acético como catalisador sob aquecimento em MO. Os compostos foram obtidos em rendimentos de 74 a 92%, com tempos reacionais de 10 a 24 min⁸³ (Esquema 6).



Esquema 6. Síntese de 1,5-benzodiazepinas por Zhu et al. (2014)

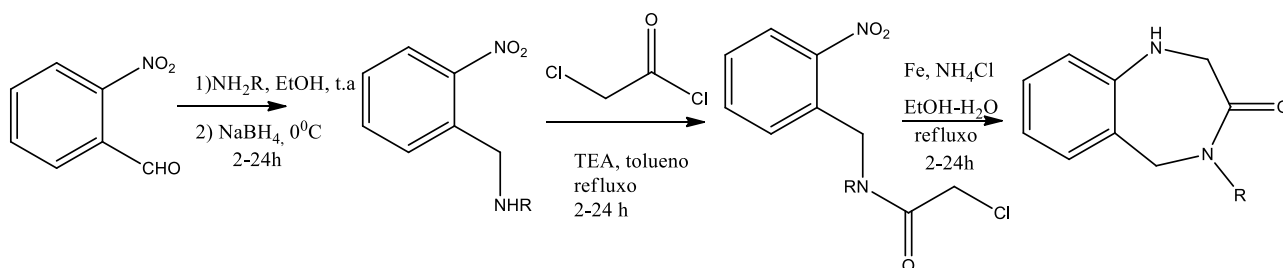
Para a síntese de 1,4-benzodiazepinonas uma das reações mais clássicas utilizadas é a síntese de Kyungjin Kim (1998) que se baseia⁸⁴ na reação entre *o*-aminobenzofenona e o brometo de bromoacetil (Esquema 7). Este composto foi obtido em 73% de rendimento e foi utilizado como

material de partida para a síntese de outros derivados substituídos no carbono α à carbonila através da reação de alquilação com haletos de alquila⁸⁵.



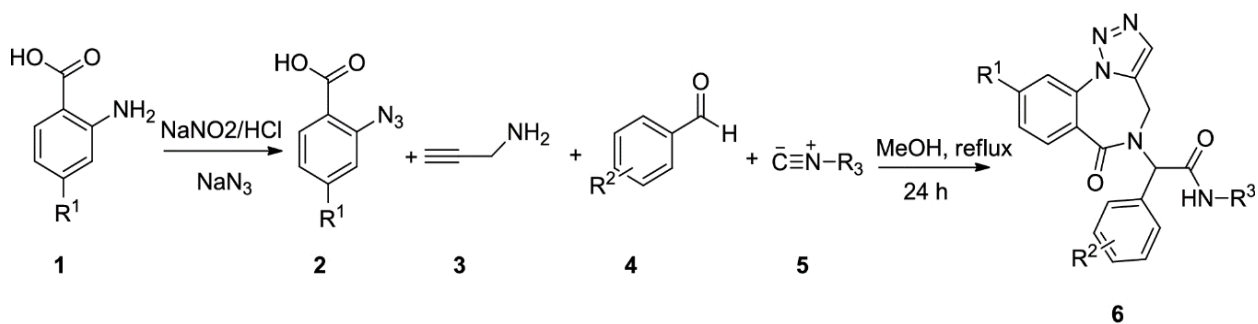
Esquema 7. Síntese de 1,4-benzodiazepin-2-ona

Além dos métodos convencionais^{86,87,88}, sínteses mais recentes como a de Sasiambarrena et al., (2019) utiliza como precursor o *o*-nitrobenzaldeído, que em reação de aminação fornece o intermediário com dois átomos de nitrogênio que, após várias etapas, fornece os compostos 1,4-benzodiazepínicos (Esquema 8) em rendimentos de 65 a 89% com tempos reacionais variando de 2 a 24 h.



Esquema 8. Reação de Sasiambarrena et al., (2019)⁸⁹.

A síntese desenvolvida por Shafie et al., (2019) se baseia na reação entre ácidos azidobenzóicos, propargilaminas, benzaldeídos e isocianetos para a obtenção de triazolo-benzodiazepinas com substituições em três locais diferentes da molécula, gerando a possibilidade de inúmeros derivados (Esquema 9). Os autores obtiveram quinze derivados de 1,2,3-triazolo-benzodiazepinas com a configuração 1,4 no anel benzodiazepínico em rendimentos variando de 65 a 79 % após 24h de reação⁹⁰.



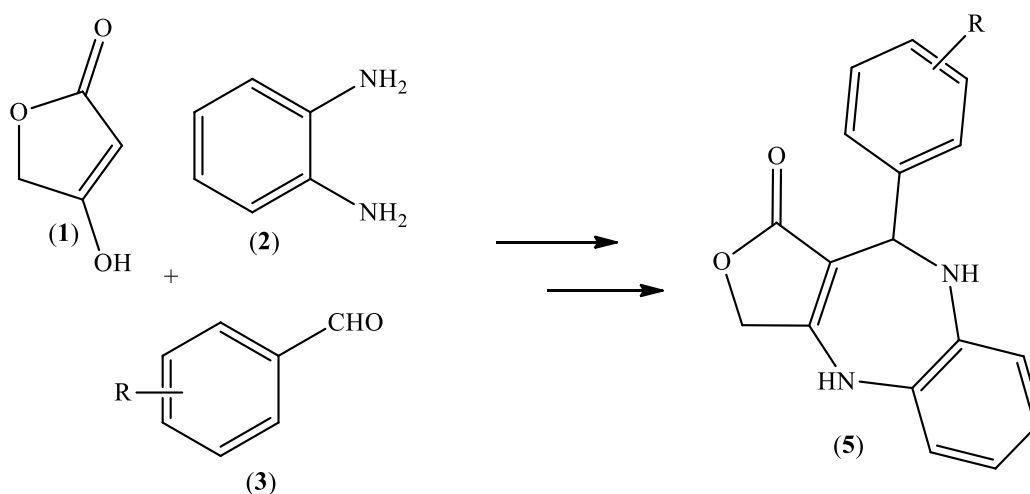
Esquema 9. Síntese de triazolo-benzodiazepinas por Shafie et al., (2019).

Desta forma, devido ao interesse biológico das benzodiazepinas as pesquisas sobre a síntese dessa classe de compostos são de extrema importância, pois visa a otimização de rotas sintética para a obtenção de moléculas já conhecidas e o desenvolvimento de metodologia para a obtenção de novos derivados buscando compostos que possam apresentar maior seletividade biológica.

2. Objetivos

2.1. Gerais

Sintetizar derivados 1,5-Benzodiazepínicos onde o anel benzodiazepínico está condensado a um anel butirolactônico nas posições 2 e 3. A proposta se baseia na reação entre ácido tetrônico (**1**), *o*-fenilenodiamina (**2**) e um aldeído aromático (**3**). Para tal serão avaliadas metodologias envolvendo reações multicomponentes ou reações dominó.



Esquema 10. Esquema geral para obtenção dos derivados benzodiazepínicos 5

2.2. Objetivos específicos

- Otimizar as condições reacionais através da variação de solventes, catalizadores e temperatura;
- Avaliar as propriedades luminescentes dos compostos sintetizados;
- Avaliar por docking molecular o modo de interação dos compostos sintetizados na proteína GABA_A- α 1 β 3 γ 2.

3. Metodologia

3.1. Reagentes e Equipamentos

3.1.1. Reagentes

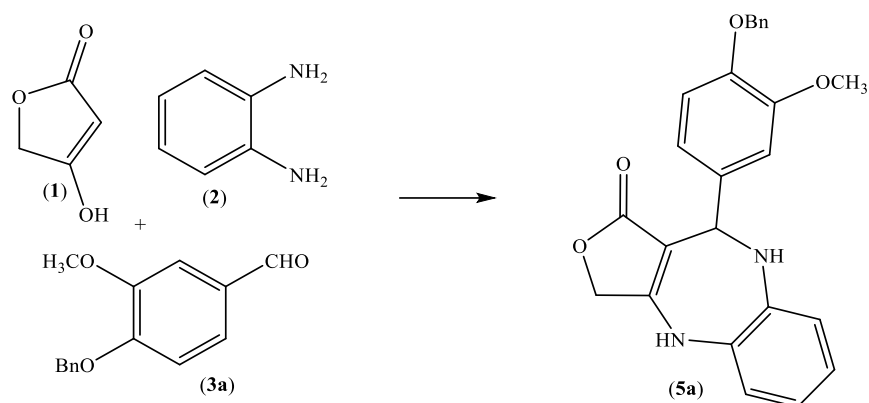
Todos os reagentes e solventes foram utilizados sem purificação adicional. As análises por CCD foram realizadas em placas Merck de sílica gel 60F₂₅₄, que foram visualizadas em irradiação UV-365 nm ou por revelação em solução de vanilina sulfúrica.

3.1.2. Equipamentos

Todas as reações assistidas por micro-ondas foram realizadas no reator Discover Reflux (CEM corporation, 200 W) com energia de irradiação contínua de 0 a 200 W em vaso aberto. Os espectros de ¹H e ¹³C RMN foram determinados em um espectrômetro Bruker ARX 400 em DMSO-d₆. As análises de Espectrometria de Massas de alta resolução (HRMS) foram realizadas usando um espectrômetro Bruker Daltonics (micrOTOF-Q) equipado com um ionizador por eletropulverização que opera no modo de íons positivos.

3.2. Sínteses

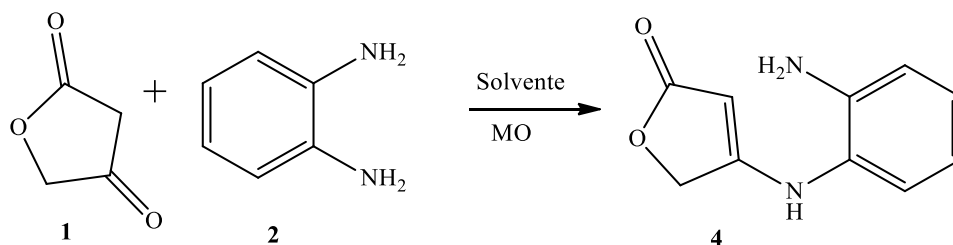
3.2.1. Reação Multicomponente para obtenção de 5a



Esquema 11. Reação multicomponente para obtenção do composto 5a

A mistura equimolar (0,5 mmol) de ácido tetrônico (1), o-fenilenodiamina (2), e 4-benzilóxi-3-metoxibenzaldeído (3) em 3 mL de acetonitrila foi colocada em um balão de 10 mL equipado com uma barra magnética e um condensador de refluxo. A mistura foi então irradiada em um reator de micro-ondas por 10 minutos sob modo refluxo. A reação foi monitorada por CCD (20% de acetato de etila em hexano) e após o consumo dos materiais de partida a reação foi resfriada à temperatura ambiente. O solvente foi então removido à pressão reduzida e o resíduo obtido purificado em coluna de sílica gel usando como eluente a mistura de hexano: acetato de etila na proporção 7:3. Os produtos obtidos foram submetidos à análises de RMN de ^1H e ^{13}C para a determinação de suas estruturas.

3.2.2. Procedimento para a obtenção de 4



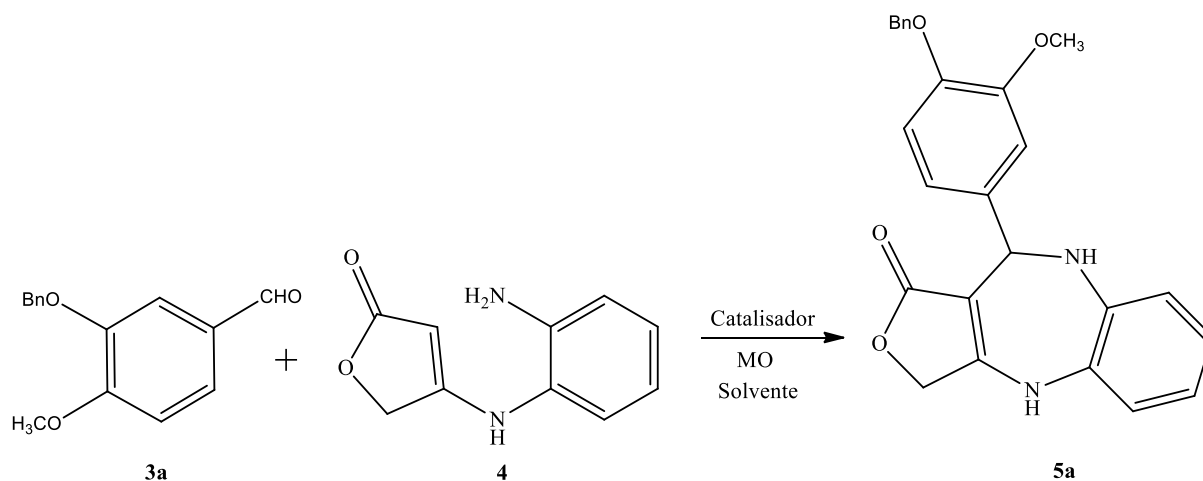
Esquema 12. Reação para obtenção do intermediário 4

Uma mistura equimolar (1 mmol) de ácido tetrônico (**1**) e *o*-fenilenodiamina (**2**) em 2 mL de solvente foi aquecida a refluxo, sob agitação magnética, em um reator de micro-ondas. A reação foi monitorada por CCD (20% de acetato de etila em hexano) e após o consumo do ácido tetrônico (**1**) foi resfriada à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo obtido purificado por lavagem com hexano:acetato de etila (8:2). O sólido resultante foi submetido a análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação da estrutura.

3.2.3. Procedimentos para a otimização da reação de obtenção de **4**

A reação foi otimizada pela variação do solvente (etanol e acetonitrila) e pelo uso de catalizadores em proporções variando de 0 a 30% em massa (HOAc, amberlite IR-120[®] e TiO₂) através do mesmo procedimento descrito no item 3.2.2.

3.2.4. Otimização do procedimento para a obtenção dos compostos **5a** através do intermediário **4** isolado

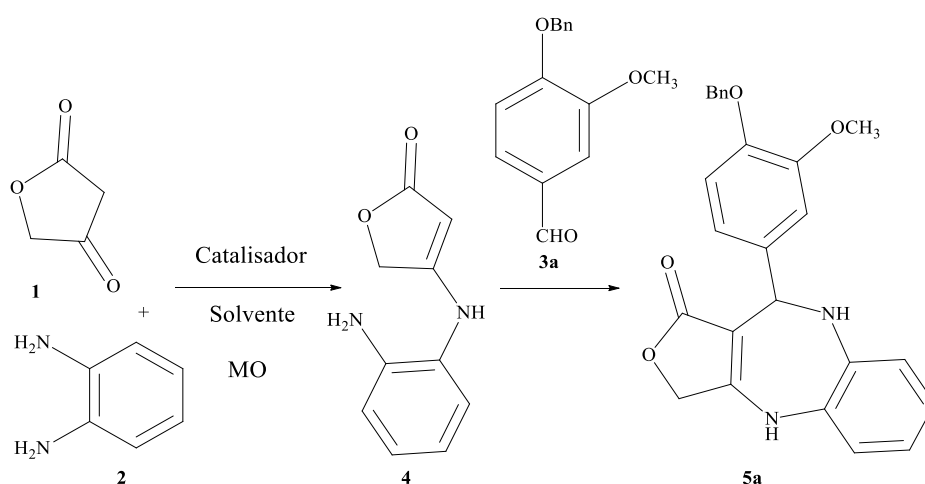


Esquema 13. Reação de obtenção do derivado **5a** através do intermediário **4** isolado.

A mistura equimolar (0,26 mmol) do intermediário **4** e do aldeído aromático **3a**, em 2 mL de solvente, foi aquecida a refluxo em micro-ondas. A reação foi monitorada por CCD (20% de acetato

de etila em hexano) e após o consumo dos materiais de partida a mistura foi resfriada à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo obtido purificado por sucessivas lavagens com acetonitrila, etanol e hexano:acetato de etila (8:2). O composto obtido foi submetido a análises de RMN de ^1H e ^{13}C para determinação da estrutura. Nesta etapa, a reação foi avaliada com e sem solvente (etanol e acetonitrila) e com catalizador variando na proporção de 0 a 30% em massa (TiO_2 , HOAc e amberlite IR-120[®]).

3.2.5. Reação dominó para obtenção do produto 5a



Esquema 14. Reação dominó para a síntese do produto 5a

A mistura de ácido tetrônico (**1**) (0,5 mmol), *o*-fenilenodiamina (**2**) (0,5 mmol), amberlite IR-120[®] (20% em massa) e 2 mL etanol foi aquecida a refluxo em MO. A reação foi monitorada por CCD (20% de acetato de etila em hexano) e após o consumo dos materiais de partida a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e o aldeído aromático **3a** (0,5 mmol) foi adicionado ao mesmo balão reacional. Essa mistura foi novamente aquecida a refluxo por MO e o curso da reação foi acompanhado por CCD. Após o término da reação o solvente foi removido à pressão reduzida e o sólido resultante foi purificado por sucessivas lavagens com acetonitrila e etanol. Esse mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção dos derivados **5b-m** variando-se o aldeído aromático **3b-**

m. Todos os compostos obtidos foram submetidos a análise de EM e RMN de ^1H e ^{13}C para determinação das estruturas (APÊNDICE).

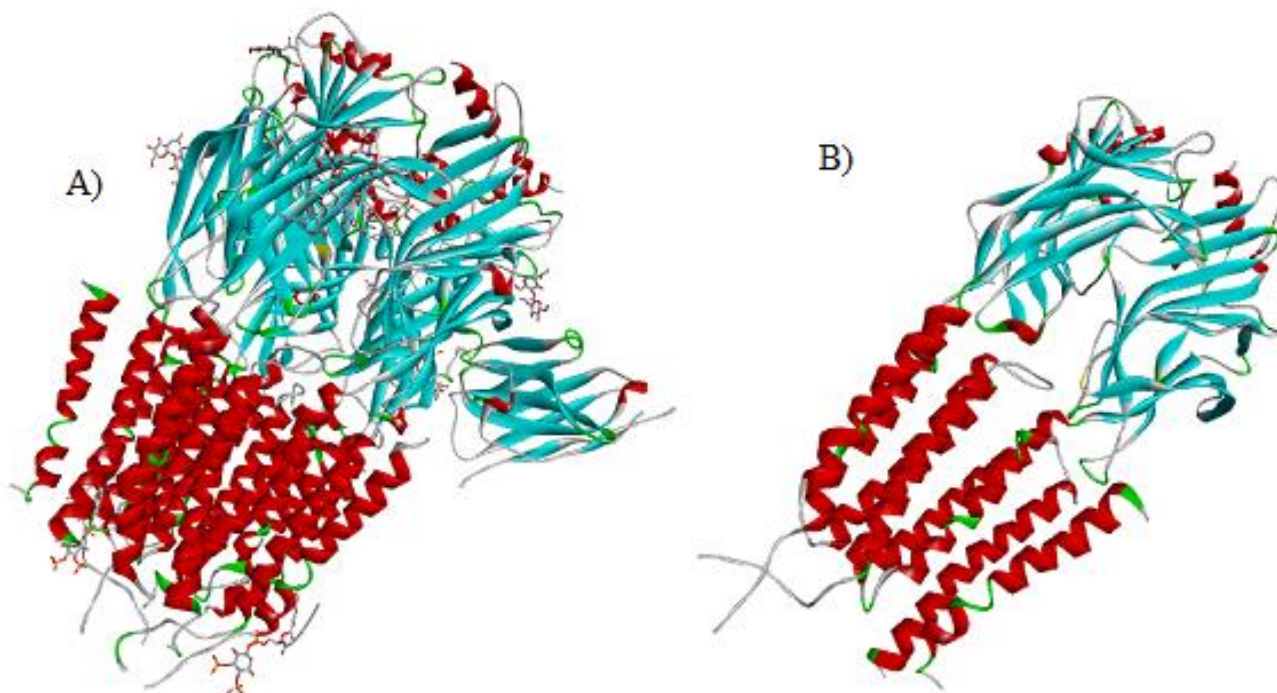
3.3. Estudo de reciclabilidade do catalisador

A amberlite IR-120[®] usada na reação de obtenção do derivado **5a** a partir do procedimento em reação dominó foi recuperada por filtragem. Sucessivas lavagens da resina com acetonitrila e etanol foram realizadas para garantir que nenhum contaminante da reação anterior atrapalhasse o resultado da reação seguinte. Esse processo foi repetido por mais 3 vezes e rendimento do produto e os tempos reacionais foram avaliados a fim de medir a eficiência do catalisador no reuso.

3.4. Estudo de Docking Molecular

Inicialmente, foi selecionada a proteína $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABA_A, devido à sua relação com as propriedades sedativas e de ataxia conhecidas e demonstradas na literatura⁴³. Foi feito o download da proteína humana cristalizada em complexo com o benzodiazepínico Alprazolam do PDB ID: 6HUO. A seguir, essa proteína foi preparada através da otimização dos meros da interface da proteína em que o Alprazolam interage (Figura 14A), pelo programa Discovery Studio Visualizer (DSV) e, posteriormente, pela extração do ligante pelo programa GOLD validado pelo cálculo de RMSD no pré-*docking*. O resultado foi uma proteína pura e otimizada, somente com os meros C e D (Figura 14B).

Figura 14. Estrutura da proteína GABA_A- α 1 β 3 γ 2 complexada com Alprazolam (A) e após preparação (B)



Fonte: Próprio autor

Os ligantes foram desenhados no programa ChemDraw Professional 16.0.1.4, e a partir dos cálculos conformacionais de menor energia baseadas no mecanismo molecular MM2 do ChemDraw3D, posteriormente tratados com cálculos de aromaticidade no DSV para rodar no GOLD.

O estudo de *docking* molecular foi regido por uma simulação computacional onde é possível avaliar e analisar a formação de complexos proteína-ligante detalhadamente, e então, usar os resultados para *virtual screening*⁹¹, tendo como vantagem o fato de utilizar menor tempo computacional por manter a proteína rígida, isso permite que a estrutura da proteína e suas interações sejam representadas por um conjunto, isso evita o cálculo explícito de todas as interações entre todos os átomos do ligante e os átomos da proteína em cada etapa da pesquisa conformacional. O programa

inclui princípios físico-químicos modelos otimizados, a função de pontuação, e algoritmos de busca conformacional, o algoritmo *docking*⁸³.

A simulação computacional deste trabalho foi feita pelo programa **GOLD 5.1**^{92,93,94}, que utiliza o algoritmo genético⁹⁵ para buscar soluções *docking*, que reproduz múltiplas cópias do modelo flexível do ligante no sítio ativo do receptor (proteína) e recombina segmentos destas cópias aleatoriamente até que um conjunto convergente de estruturas seja gerado (pose). A seleção da pose é acompanhada pelo uso de função de pontuação, o *scoring function*, que incorpora os componentes: energia de ligação de hidrogênio do complexo, energia interna do ligante e energia torsional^{93,94,95}.

Os cálculos de *docking* no **GOLD 5.1** foram realizados utilizando a função de pontuação *Gold Score* e os sítios receptores escolhidos utilizando a estrutura GABA_A- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ em complexo com Alprazolam (PDB ID: 6HUO). A estrutura do complexo foi analisada e os sítios de ligação do ligante, foram calculados usando o programa Discovery Studio Visualizer.

3.5. Análises de UV/Vis e Fluorescência

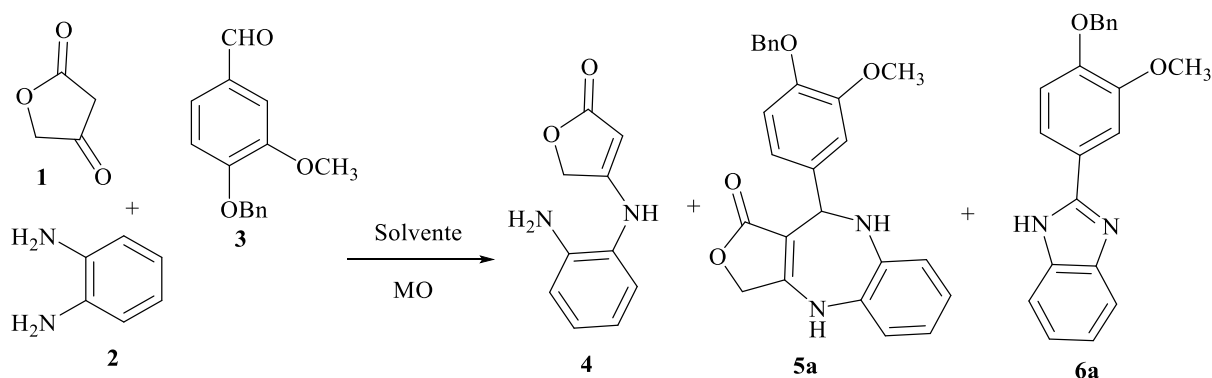
Os espectros de absorção na região UV-Vis foram obtidos em um intervalo de 260 a 500 nm usando o espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 tendo como fonte de luz a lâmpada de Xenônio, 150W. As curvas de emissão de fluorescência foram obtidas a partir do espectrofluorímetro Shimadzu RF-6000 utilizando o comprimento de onda de excitação determinado pelos máximos de absorção no UV-Vis. O rendimento quântico (Φ) foi medido comparando-se as intensidades de fotoluminescência integrada e os valores de absorbância com o composto de referência 9,10-difenilantraceno ($\Phi = 0,9$ em ciclo-hexano) de acordo com a Eq. (1), em que onde Φ é o rendimento quântico de fluorescência, A é a absorção do comprimento de onda de excitação, F é a área sob a curva de emissão n é o índice de refração dos solventes utilizados. Std subscrito, denota o padrão. Os compostos foram avaliados na concentração de 10^{-6} M utilizando DMSO como solvente.

Equação 1: Cálculo do rendimento quântico usando 9,10-difenilantraceno

$$\Phi_f = \Phi_{std} \times \frac{A_{std} F}{A F_{std}} \times \frac{n^2}{n_{std}^2}$$

4. Resultados e Discussão

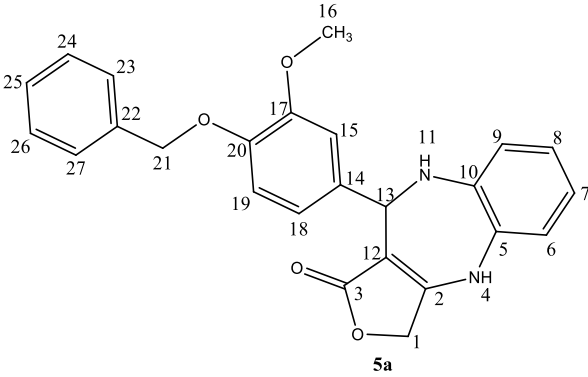
Para a obtenção dos derivados de interesse, inicialmente foi realizada a reação multicomponente entre ácido tetrônico (**1**), *o*-fenilenodiamina (**2**) e o aldeído aromático **3a** em reação assistida por MO. O monitoramento da reação foi realizado a cada 5 min por CCD e após 10 min de reação observou-se o consumo dos materiais de partida e a formação de três compostos com diferentes Rfs. Após purificação as análises de RMN confirmaram a formação do derivado benzodiazepínico **5a**, da azo-butenolida **4** e do benzimidazol **6a** (Esquema 15).



Esquema 15. Síntese de **5a** via reação multicomponente

Os dados de RMN de **5a** estão descritos na Tabela 4 e os espectros de RMN nas Figuras 15-17. Os valores dos desvios químicos (δ) nos espectros de RMN estão em ppm, as constantes de acoplamento (J) estão em Hz e os padrões de divisão dos prótons são descritos como s (singlete), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete). A numeração dos átomos de carbono e hidrogênio das estruturas analisadas e descritas neste trabalho não obedecem às regras da IUPAC, sendo utilizadas apenas para facilitar a atribuição de sinais nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

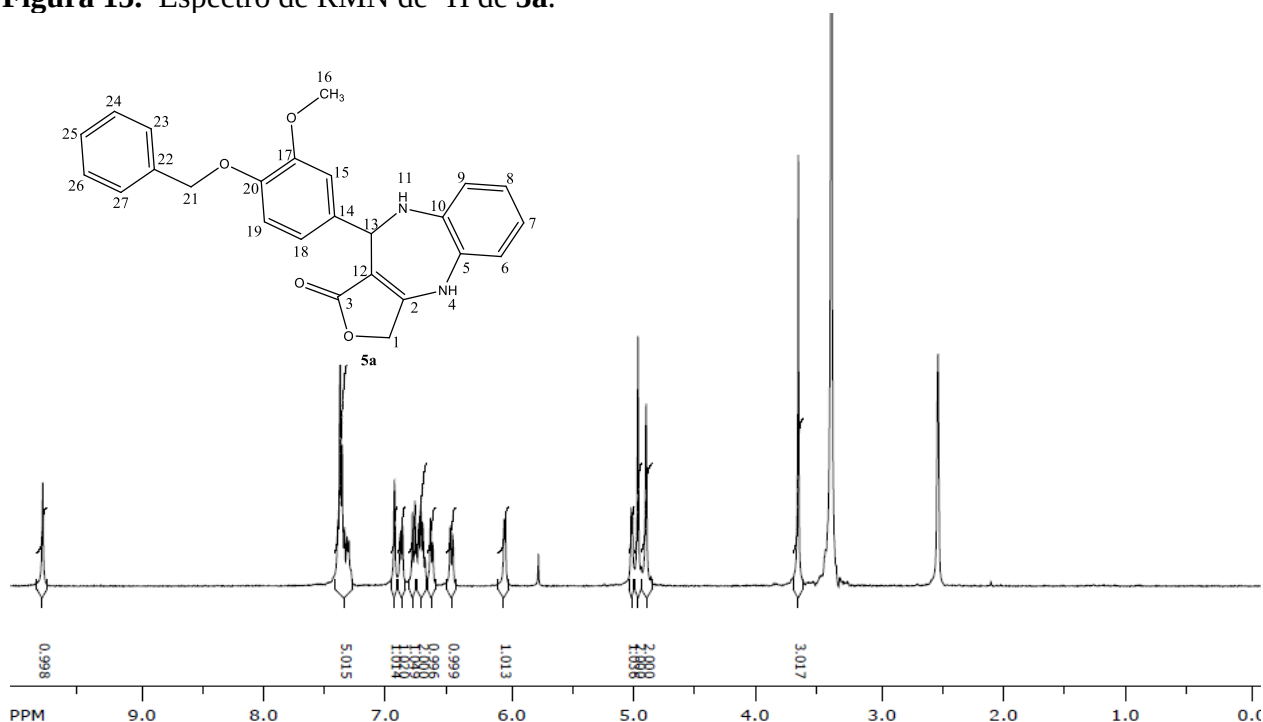
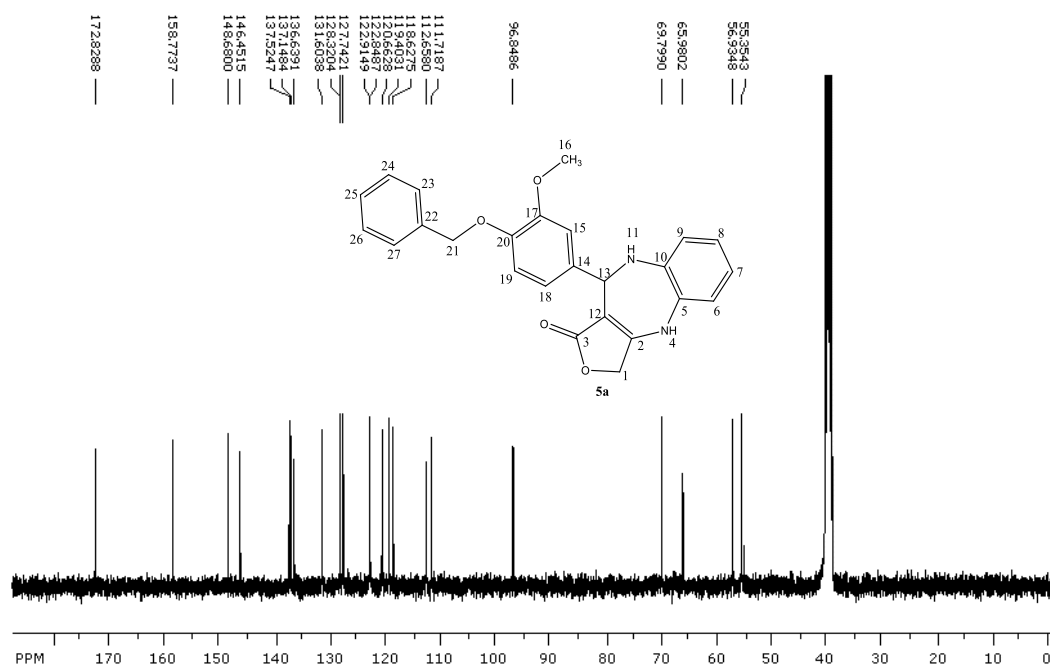
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **5a** (400 MHz, DMSO- d_6).

					
C	C (ppm)	H	H (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)
1	65,9	1a 1b	4,89	s	-
2	158,7	-	-	-	-
3	172,8	-	-	-	-
4	-	4	9,80	s	-
5	131,6	-	-	-	-
6	122,9	6	6,88	dl	7,3
7	120,6	7	6,64	dl	7,3
8	122,8	8	6,68 – 6,76	m	-
9	118,6	9	6,47	dl	8,2
10	136,6	-	-	-	-
11	-	11	6,04	d	4,4
12	96,8	-	-	-	-
13	56,9	13	5,01	d	4,4
14	137,1	-	-	-	-
15	111,7	15	6,94	sl	-
16	55,3	16	3,65	s	-
17	146,4	-	-	-	-
18	119,4	18	6,68 - 6,76	m	-
19	112,6	19	6,78	d	8,2
20	148,6	-	-	-	-
21	69,7	21	4,96	s	-
22	137,5	-	-	-	-
23	127,7	23	7,28 - 7,45	m	-
24	128,3	24	7,28 - 7,45	m	-
25	122,8	25	7,28 - 7,45	m	-
26	128,3	26	7,28 - 7,45	m	-
27	127,7	27	7,28 - 7,45	m	-

Os sinais dos H4 e H11, ambos ligados aos nitrogênios do anel benzodiazepínico, aparecem em locais bastante distintos do espectro onde H11 aparece como um duplete em 6,05 ppm acoplando com H13 com $J = 4,4$ Hz, enquanto H4 aparece como um singlete em 9,8 ppm. Os sinais em 4,89 ppm e 4,96 ppm integrando para dois hidrogênios cada são atribuídos aos dois H1 e aos dois H21 benzílicos, respectivamente. Em 5,1 ppm o duplete com $J = 4,4$ Hz é relativo ao H13 em acoplamento com H11.

Os sinais que aparecem no intervalo de 6,47 ppm a 6,88 ppm são dos hidrogênios ligados ao anel aromático no núcleo benzodiazepínico H6, H7, H8 e H9 (Tabela 4). O multiplete em 6,68 - 6,76 ppm é relativo ao H18 acoplando com H15 e H19. H19 aparece como um duplete em 6,78 ppm acoplando com H18 com $J = 8,2$ Hz. O singlete largo em 6,94 ppm é relativo a H15 que acopla com H18, este acoplamento resultaria em um duplete, mas como o J *meta* é pequeno o que se vê é um singlete largo. Os demais sinais no intervalo de 7,45 - 7,28 ppm são relativos aos hidrogênios aromáticos do anel benzílico H23-H27. O sinal em 3,65 ppm é relativo aos três H16 do grupo metoxila.

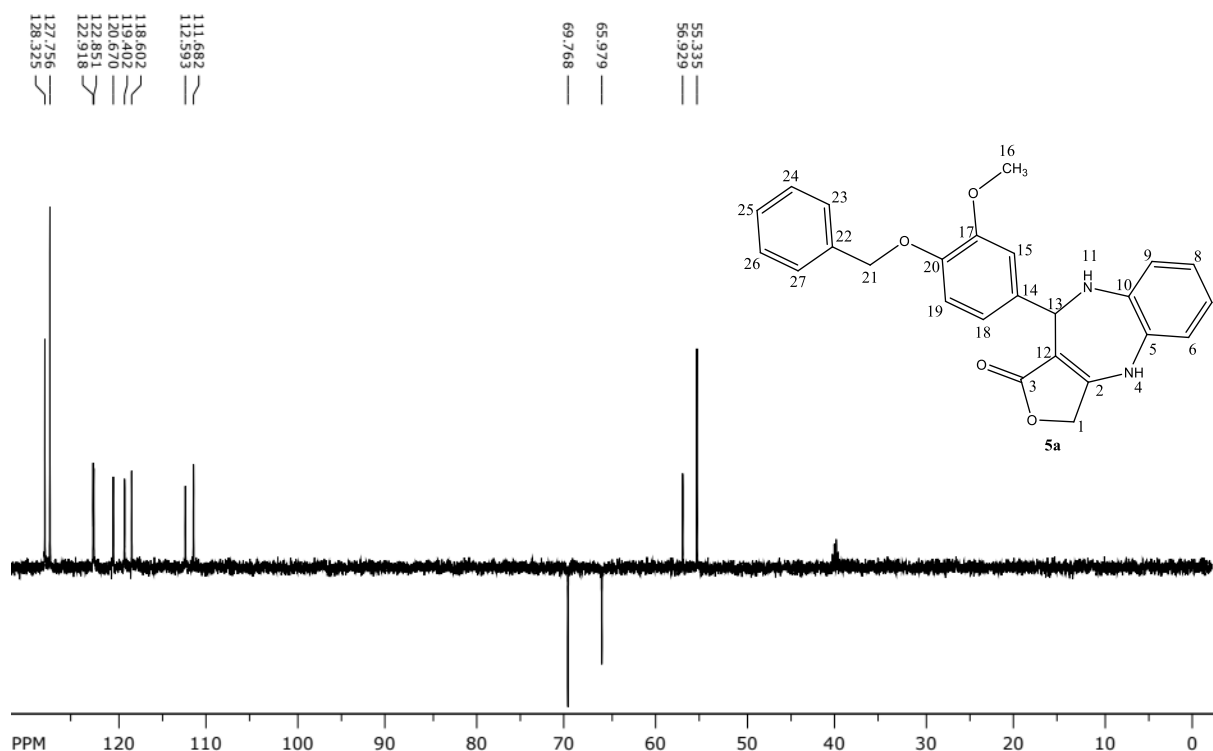
A associação entre os espectros de ^{13}C (Figura 16) e o DEPT-135 (Figura 17) possibilitou a atribuição dos sinais aos respectivos carbonos da estrutura, identificando, no DEPT-135, os carbonos terciários (CH), primários (CH_3) para cima e secundários (CH_2) com o sinal para baixo, entretanto alguns dos sinais referentes a carbonos aromáticos podem estar trocados. A partir da combinação das duas técnicas foi possível atribuir os sinais em 172,8 ppm, 158,7 ppm, 148,6 ppm e 146,4 ppm aos carbonos C3, C2, C20 e C17 que são carbonos terciários onde a desblindagem é maior e estão ligados a átomos eletronegativos como oxigênio e nitrogênio, por isso aparecem em campo mais baixo.

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H de 5a.**Figura 16.** Espectro de RMN de ^{13}C de 5a.

Os sinais em 137,5 ppm, 137,1 ppm, 136,6 ppm e 131,6 ppm são carbonos quaternários aromáticos (Figura 17) e correspondem respectivamente ao C22, C14, C10 e C5. Os dois sinais bem intensos em 128,3 ppm e 127,7 ppm são correspondentes aos C-H aromáticos C23 a C27. Aos sinais respectivos a C6, C7, C8, C9 e C18 aparecem em 122,9 ppm, 120,6 ppm, 122,8 ppm, 118,6 ppm e

119,4 ppm. Em 112,6 ppm e 111,7 ppm estão os sinais, respectivamente atribuídos a C19 e C15. O sinal correspondente a C12, que não faz parte do núcleo aromático, mas é um carbono sp^2 , aparece em 96,8 ppm. Os sinais em 69,7 ppm e 65,9 ppm foram atribuídos ao C21 e C1, respectivamente. Esses carbonos contêm dois hidrogênios cada (Figura 17), sendo C21 um CH_2 benzílico ligado a um oxigênio e C1 o carbono vizinho ao átomo de oxigênio no anel lactônico e, por isso ocorrem em campo mais baixo do que os sinais atribuídos a C13 e C16 que aparecem em 56,9 ppm e 55,3 ppm, respectivamente (Figuras 16 e 17).

Figura 17. Espectro de RMN DEPT-135 de **5a**.



O segundo composto obtido foi identificado através do espectro de ^1H RMN (Figura 18) como a butenolida **4**. Os dados de RMN para esse composto são apresentados na Tabela 5.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H de **4** (400 MHz, DMSO- d_6).

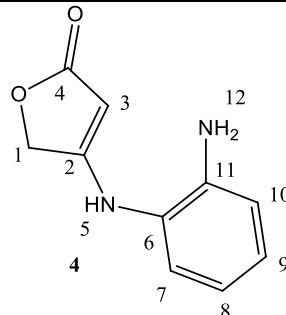
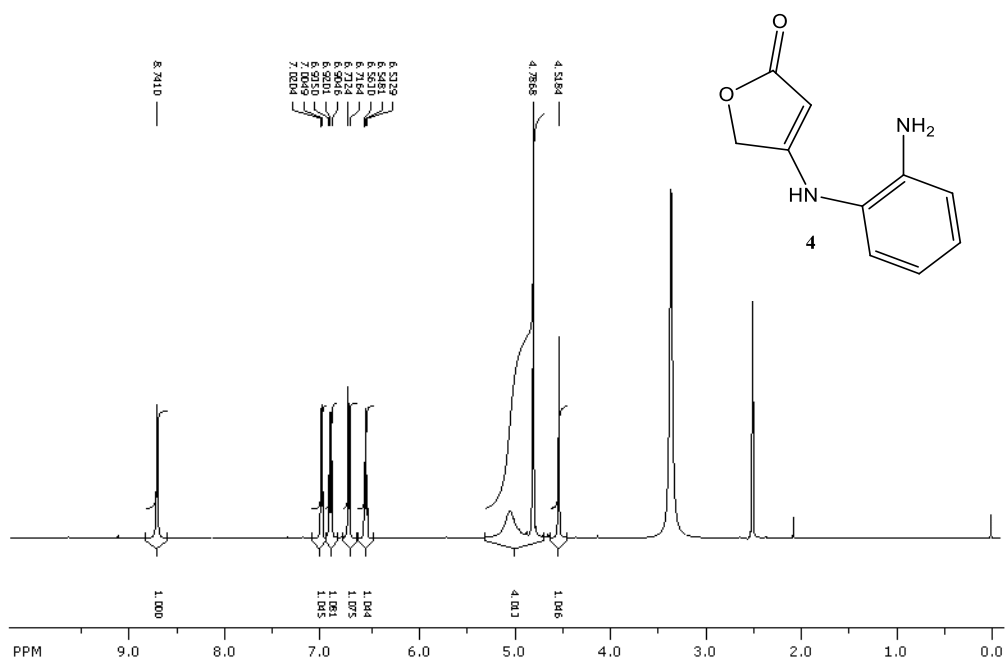
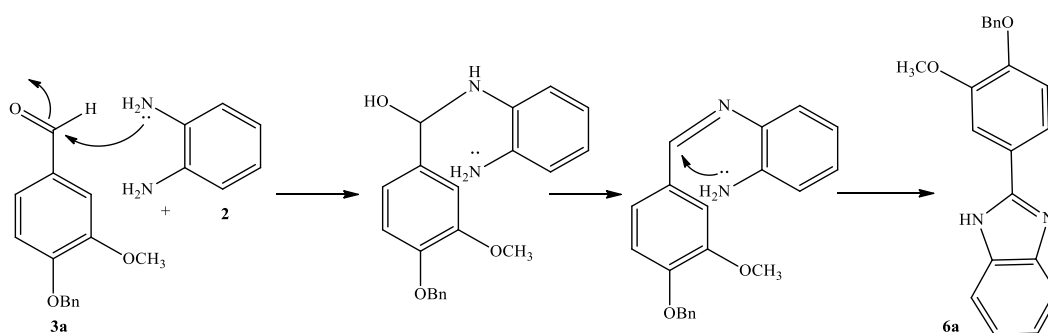
							
H	H (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)	H	H (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)
1a	4,78	s	-	7	7,01	dl	7,8
1b	4,51	s	-	8	6,54	t	7,5
2	-	-	-	9	6,91	t	7,5
3	4,78	s	-	10	6,72	dl	8,0
4	-	-	-	11	-	-	-
5	8,74	s	-	12a	5,0	sl	-
6	-	-	-	12b	-	-	-

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de **4**

Esse composto apresenta um singlete em 8,74 ppm integrando para um hidrogênio e um singlete largo integrando para dois hidrogênios em 5,01 ppm que foram atribuídos, respectivamente

aos H5 e H12. O duplete largo em 7,01 ppm foi atribuído ao H7 que acopla com H8 com um J *orto* e com H9 com um J *meta* relativamente pequeno que acaba resultando em um duplete largo com um $J = 7,8$ Hz. O tripleto largo em 6,91 ppm foi atribuído a H9 e é resultante do acoplamento *orto* com H8, *orto* com H10 e *meta* com H7. A H10 foi atribuído o duplete largo em 6,72 ppm com $J = 78,0$ Hz é resultante do acoplamento em *orto* com H9 e em *meta* com H8. O tripleto largo em 6,54 ppm foi atribuído a H8 que acopla com H7 e H9 com J *orto* e com H10 com J *meta*, entretanto, somente é possível calcular um J com valor de 7,5 Hz. Em 5,01 ppm aparece um singlete largo integrando para dois hidrogênios que foi atribuído aos H12. Em 4,78 ppm aparece um singlete integrando para dois hidrogênios o qual foi atribuído a H1a em sobreposição ao H3 e o outro singlete em 4,51 ppm foi atribuído a H1b.

O último composto foi identificado como o benzimidazol **6a** formado através da reação entre o aldeído **3a** e a *o*-fenilenodiamina (**2**) como descrito no esquema 16. Essa reação acontece mais rapidamente do que a reação com o ácido tetrônico devido à maior reatividade da carbonila do aldeído.



Esquema 16. Mecanismo de formação do derivado benzimidazol **6a**.

Os dados de caracterização de **6a** são apresentados na Tabela 6 e os espectros de RMN nas Figuras 19 e 20.

A identificação do núcleo benzimidazol de **6a** se baseou na presença dos sinais em 151,82 ppm atribuído C7 e 137,32 ppm atribuído a C1 e C6, com mesmo deslocamento. Ainda em relação ao núcleo benzimidazol aos sinais em 113,95 ppm e 119,65 ppm foram atribuídos aos C2/C5 e

C3/C4, respectivamente. Os outros sinais fazem parte do anel benzílico proveniente do aldeído de partida, com maior destaque para C11 e C12 em 149,80 ppm e 149,73 ppm, C14 em 70,41 ppm, C15 em 56,15 ppm e o conjunto de sinais dos C18 a C22 em 128,26 ppm a 128,96 ppm.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **6a** (400 MHz, DMSO- d_6).

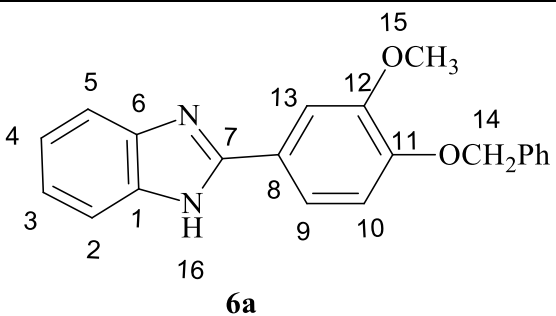
					
C	C (ppm)	H	H (ppm)	Multiplicidade	<i>J</i> (Hz)
1	137,32	-			
2	113,95	2	7,17-7,20	m	
3	119,67	3	7,62-7,53	m	
4	119,67	4	7,62-7,53	m	
5	113,95	5	7,17-7,20	m	
6	137,32	-			
7	151,82	-			
8	123,4	-			
9	122,35	9	7,72	dd	1,9 e 8,4
10	110,52	10	7,22	d	8,4
11	149,73	-	-	-	-
12	149,80	-			
13	113,95	13	7,79	d	1,9
14a	70,41	14	5,17	s	
14b					
15	56,15	15	3,90	s	
-		16	12,78	sl	
17	137,32	-		m	
18	128,36	18	7,32-7,52	m	
19	128,92	19	7,32-7,52	m	
20	128,42	20	7,32-7,52	m	
21	128,92	21	7,32-7,52	m	
22	128,36	22	7,32-7,52	m	

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H de **6a**

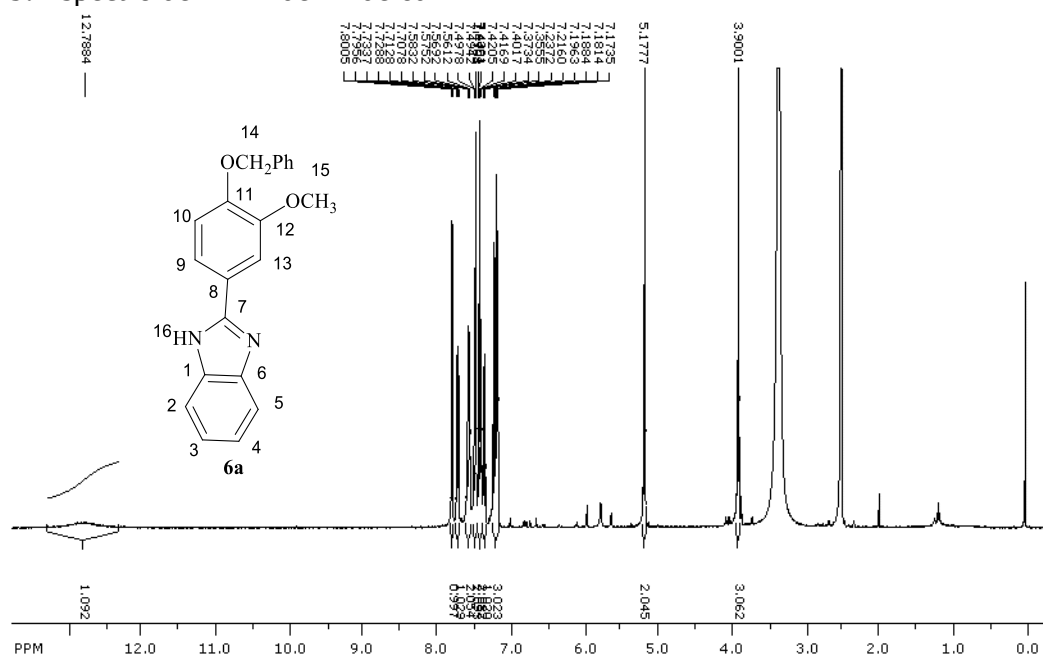
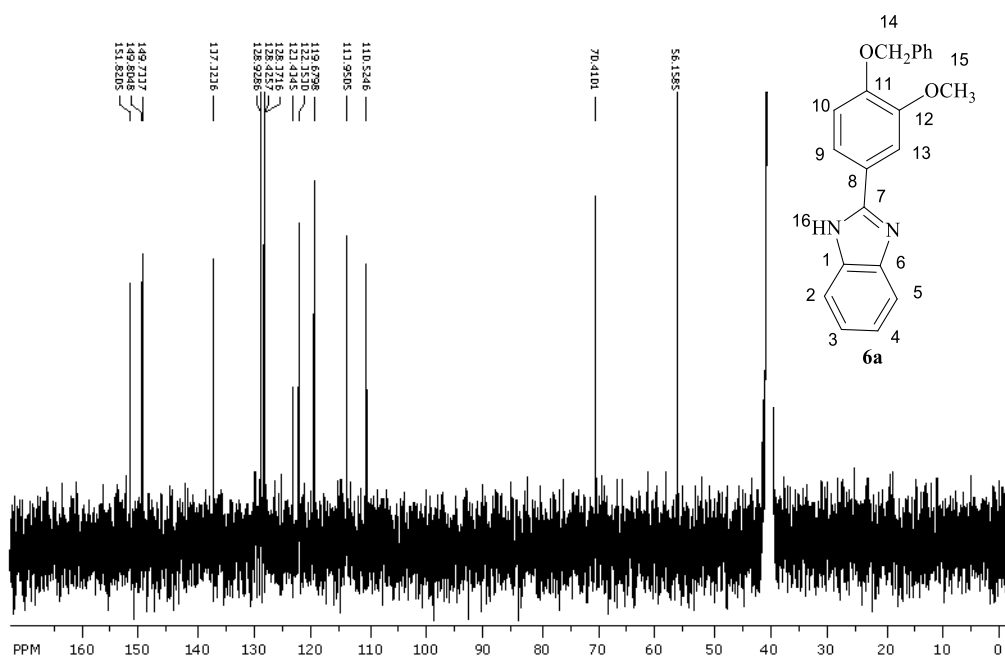


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de **6a**



Com a formação do benzimidazol **6a** como produto majoritário em 50% e o derivado benzodiazepínico em apenas 20% a reação multicomponente foi abandonada e outra rota foi estudada com a formação de **5a** ocorrendo em duas etapas através de uma reação dominó. Na primeira etapa a reação entre a *o*-fenilenodiamina (**2**) e o ácido tetrônico ocorre a formação do

composto **4** como produto principal e a adição sequencial do aldeído **3a** produz **5a** de forma majoritária.

Entretanto, para avaliar a reação dominó em duas etapas foi necessário avaliar cada etapa separadamente para a escolha das melhores condições racionais.

Portanto, para a otimização da etapa de obtenção do intermediário **4** foi realizada a reação entre o ácido tetrônico e a *o*-fenilenodiamina (**2**) em diferentes solventes e catalizadores sob refluxo em MO (180W) (Tabela 6).

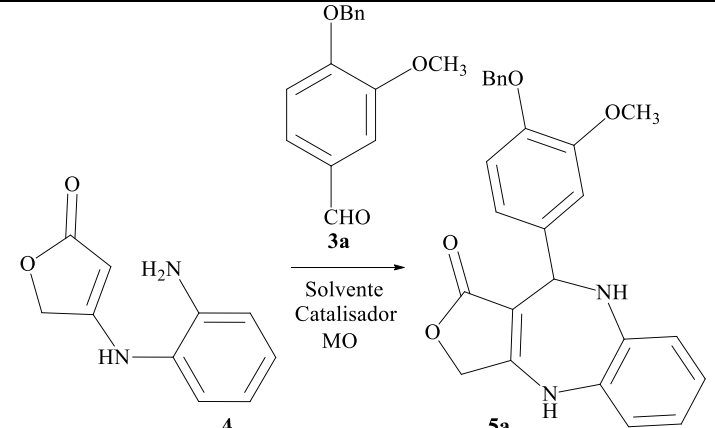
O composto **4** foi formado em todas as condições utilizadas, porém a melhor condição de síntese foi obtida utilizando etanol como solvente, sob refluxo em MO e Amberlite IR-120® como catalizador na proporção de 20% em massa em relação à massa do ácido tetrônico. Apesar dessa condição ser a melhor outras condições em que **4** foi formado em bons rendimentos também foram avaliadas para a obtenção de **5a**.

Tabela 6. Resultado da otimização das reações para a obtenção de **4** em função do solvente e catalisador

Reação	Solvente	catalisador	Tempo (min)	Rendimento 4 (%)
1	CH ₃ CN	-----	60	92
2	EtOH	-----	60	87
3	EtOH	Amberlite (20%)	45	90

A otimização da segunda etapa da reação dominó foi feita através da avaliação da reação entre o intermediário **4** isolado e o aldeído **3a** variando-se o solvente e o catalizador como descrito na Tabela 7.

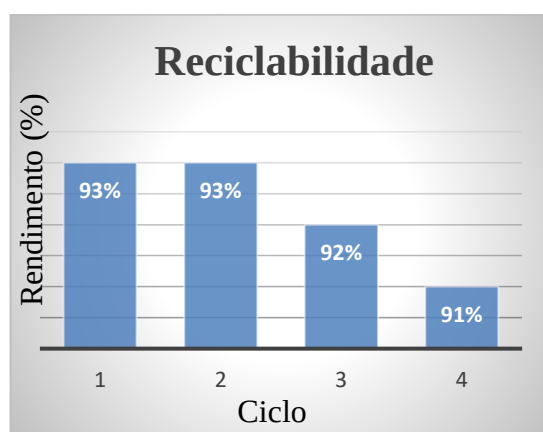
Tabela 7. Reações de otimização para obtenção de **5a** a partir da reação entre **4** e **3a**.

				
Reação	Solvente	Catalisador ^b	Tempo (min)	Rendimento 5a (%)
1	CH ₃ CN	—	60	50
2	CH ₃ CN	TiO ₂	25	75
3	EtOH	HOAc (10%)	20	80
4	EtOH	HOAc (20%)	15	90
5	Sem Solvente	Amberlite (30%)	60	72
6	Sem Solvente	Amberlite (30%)	60	82
7	EtOH	Amberlite (20%)	10	93
8	EtOH	Amberlite (30%)	10	94

O produto obtido dessas reações foi comparado por CCD com aquele obtido da reação multicomponente caracterizado por RMN como **5a**. A condição reacional para a obtenção de **5a** descrita na reação 8 da Tabela 7 foi a que forneceu maior rendimento do produto, porém com maior uso de catalizador, portanto a reação 7 foi tida como a mais eficiente.

A amberlite usada como catalisador na reação 7 (Tabela 7) foi recuperada a fim de se determinar se mesmo após o uso a resina mantém suas propriedades catalíticas. Após os testes foi constatado que, a resina mantém sua eficiência catalítica em 91% mesmo após três usos sob as mesmas condições de obtenção de **5a** (Figura 21). Este resultado demonstra que o método utilizado para síntese de **5a** usando a amberlite como catalisador além de fornecer o produto desejado em excelente rendimento, traz vantagens pela possibilidade da reutilização do catalizador, somente pela lavagem deste com etanol.

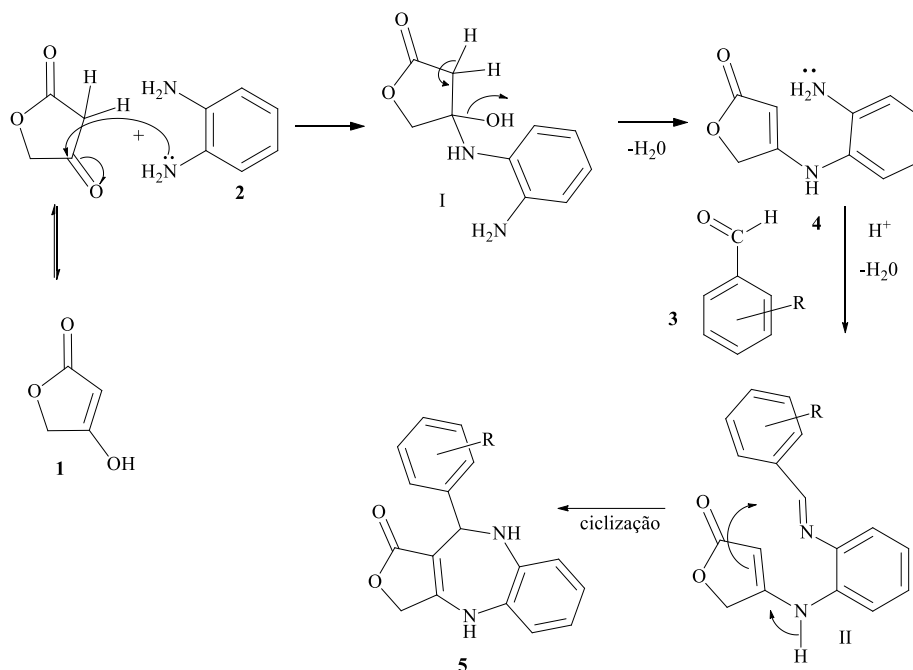
Figura 21. Rendimentos obtidos na reciclagem da amberlite



Desta forma, a condição reacional descrita na reação 7 foi utilizada para a síntese dos demais derivados benzodiazepínicos (**5a-m**).

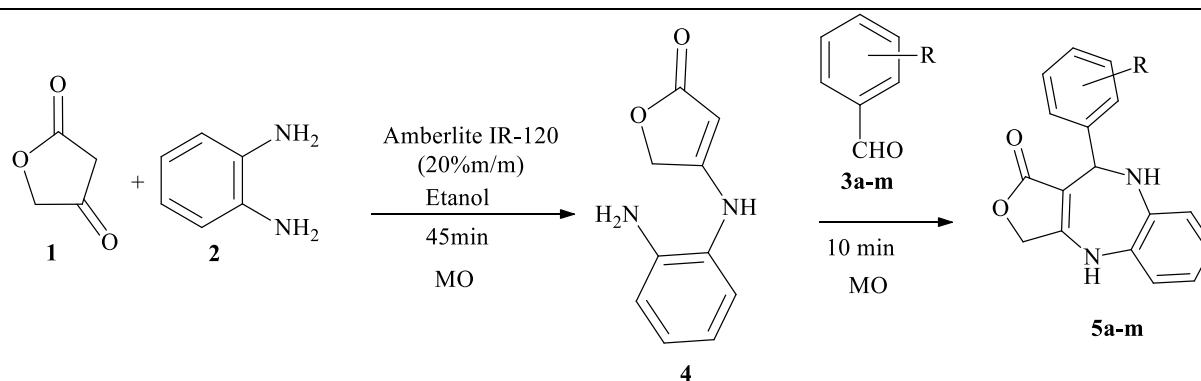
De acordo com o mecanismo proposto no esquema 17, a reação entre o ácido tetrônico (**1**) e a *o*-fenilenodiamina (**2**) ocorre pelo ataque do par de elétrons do nitrogênio da *o*-fenilenodiamina à carbonila da função cetona do ácido tetrônico, com a formação do intermediário I que após eliminação de uma molécula de água dá origem ao composto **4**. A reação entre **4** e o aldeído aromático **3** ocorre pelo ataque nucleofílico do nitrogênio do grupo NH₂ de **4** à carbonila de **3** com a perda de uma molécula de água e a formação do intermediário não isolado II. Este intermediário

após sofrer reação de ciclização promove a formação do composto **5**^{96,97}, essas etapas podem ocorrer simultaneamente.



Esquema 17. Mecanismo proposto para a formação do produto **5**

Tabela 8. Rendimentos das reações para formação dos produtos **5a-m**



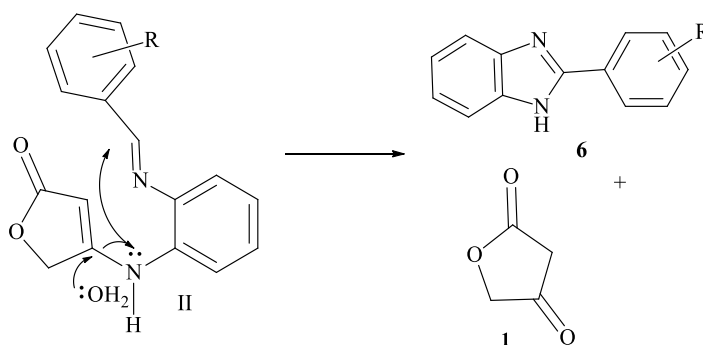
Reação	Aldeído	Grupo (R)	Produto	Tempo (min) ^a	Rendimento (%) ^b
1	4a	4-OBn-3-OCH ₃	5a	10	93
2	4b	4-OH-3,5-OCH ₃	5b	20	87
3	4c	4-OH-3-OCH ₃	5c	10	86
4	4d	3,4,5-OCH ₃	5d	15	85

5	4e	3,4-CH ₂ OCH ₂	5e	15	81
6	4f	4-SCH ₃	5f	15	89
7	4g	3-OH	5g	20	76
8	4h	3-OCH ₃	5h	15	94
9	4i	6-NO ₂ -3,4-CH ₃	5i	5	73
10	4j	4-Cl	5j	15	71
11	4k	4-N-(CH ₃) ₂	5k	25	89
12	4l	3,4-OH	5l	30	81
13	4m	6-NO ₂ -3,4- CH ₂ OCH ₂	5m	15	85

^a Tempos referentes à reação do intermediário **4** com **3a-m**; ^b Rendimento do produto isolado obtido através da recristalização

Compostos análogos a **5** foram obtidos em rendimentos de 80 a 92% por Savina et al (2007)⁹⁸ a partir da reação entre **3** e **4**, usando como solvente butanol ou etanol em meio ácido (HOAc) após 3 horas de reação sob refluxo. Os autores utilizaram a síntese em duas etapas, mas somente foi contabilizado o rendimento da segunda reação. Em outro estudo Wang et al (2011)⁹⁹, também partindo de reação dominó e utilizando água em meio ácido (HOAc) como solvente obteve compostos de estrutura análoga a **5**, porém em rendimentos menores (70 a 89%) do que os obtidos em nosso trabalho (Tabela 9). Durante a otimização para a obtenção do derivado **5a** foi avaliada a condição descrita pelo autor acima citado, porem foi constatada a formação do respectivo benzimidazol **6a** em 20% de rendimento sob essas condições. Em outro estudo Amari et al (2002)¹⁰⁰ também sintetizaram derivados com estruturas análogas aos derivados **5** utilizando o composto **4** isolado. Os autores usaram etanol como solvente e refluxo por 6 horas obtendo os análogos a **5** em rendimentos de 80 a 85%, mas este rendimento é relativo apenas a etapa em questão.

A formação de **6a** dificulta o processo de purificação. Em nossos estudos, via reação dominó, os respectivos benzimidazois **6** foram obtidos em maior proporção nas reações com maior tempo reacional, pois nestas reações a ciclização do intermediário II (influência dos substituintes do anel aromático) demora mais e com isso a reação de formação de **6** acontece pelo ataque de uma molécula de água (utilizada durante a otimização)⁹¹ ou do álcool no carbono beta do anel lactônico com a quebra da ligação C-N e regeneração da carbonila, na sequência esse nitrogênio ataca o carbono benzílico gerando o anel imidazol (Esquema 18)



Esquema 18. Mecanismo proposto para a formação o produto **6** a partir do intermediário II

O uso de catalizador ácido diminuiu o tempo reacional, porem dentre os catalisadores avaliados a Amberlite IR-120[®] foi a melhor escolha devido ao maior rendimento do produto, baixo custo, facilidade de recuperação e possibilidade de reuso. Os rendimentos obtidos nesta rota sintética foram bastante expressivos e mostram a viabilidade da rota. Em relação à natureza do aldeído não se notou um padrão de comportamento em relação aos grupos sacadores e doadores de elétrons ligados ao anel aromático. Os menores rendimentos foram obtidos com 4-clorobenzaldeído (71%), 6-nitro-3,4-dimetoxibenzaldeído (73%) e 3-hidroxibenzaldeído (76%). Como se pode observar esses aldeídos possuem grupos doadores (OH, OCH₃) e sacadores de elétrons (Cl e NO₂), portanto os menores rendimentos obtidos com esses aldeídos, possivelmente devem ter relação com problemas na etapa de purificação.

Todos os compostos sintetizados tiveram as respectivas estruturas confirmadas através de análises de EM e RMN de ¹H e ¹³C (APÊNDICE).

Durante as análises por CCD os compostos obtidos apresentam forte emissão de luz quando submetidos a luz UV de comprimento de onda 354 nm e, por isso foram submetidos a análises de UV-vis e de Fluorescência.

Em todos os derivados observa-se bandas de absorção semelhantes, independentemente da natureza do grupo substituinte; o fato de não ter influência nos espectros de absorção pode indicar que a absorção da molécula se deve principalmente ao grupo benzodiazepínico, porém não exclusivamente. Os espectros de UV-vis dos derivados 5 foram separados em dois grupos para melhor compreensão e são apresentados nas Figuras 22 e 23.

Figura 22. Espectros de UV-vis dos derivados 5a, 5c, 5d, 5f, 5h, 5j e 5l.

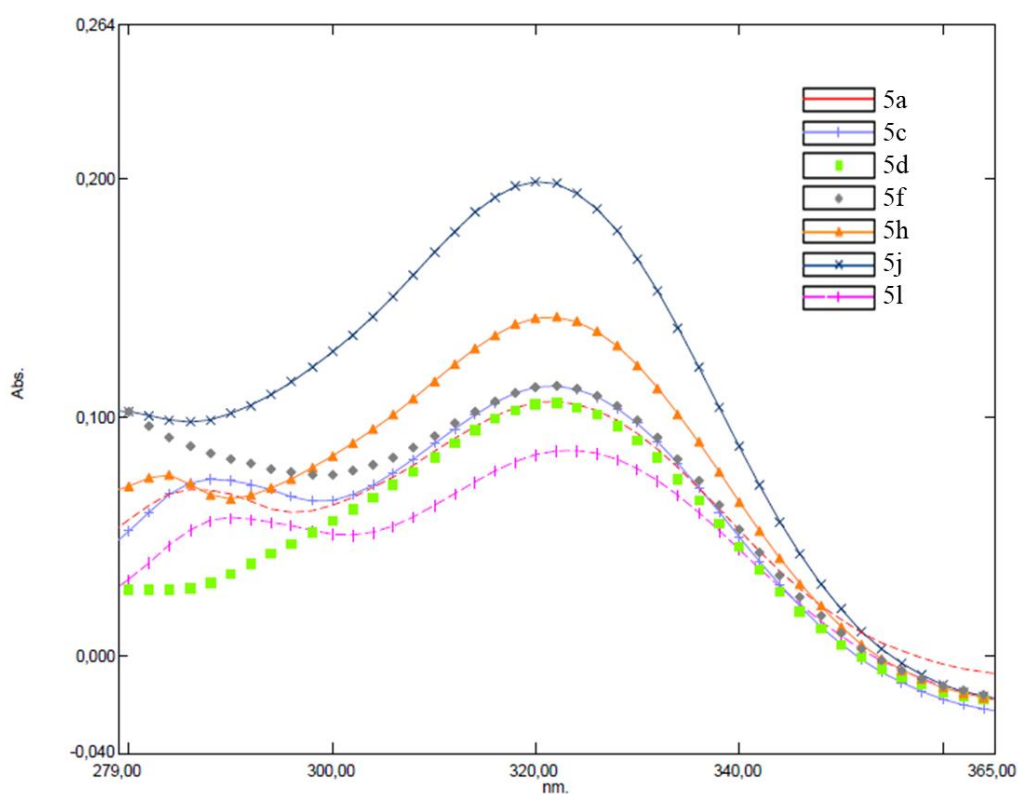
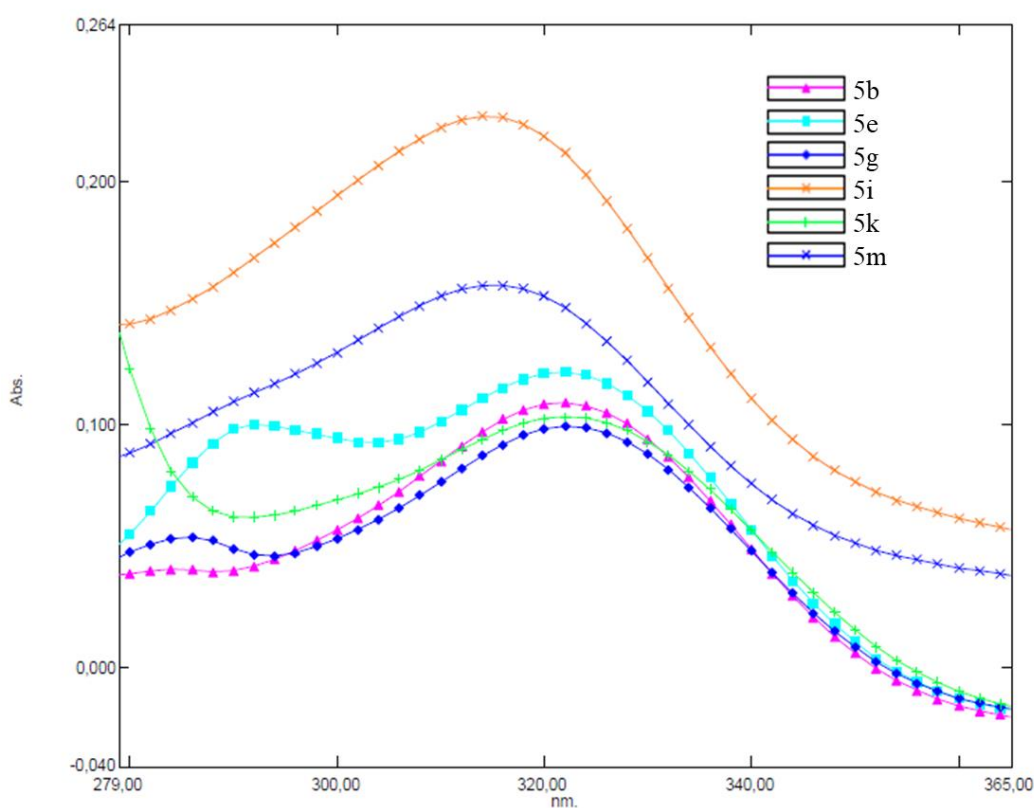


Figura 23. Espectros de UV-vis dos derivados **5b**, **5e**, **5g**, **5i**, **5k** e **5m**

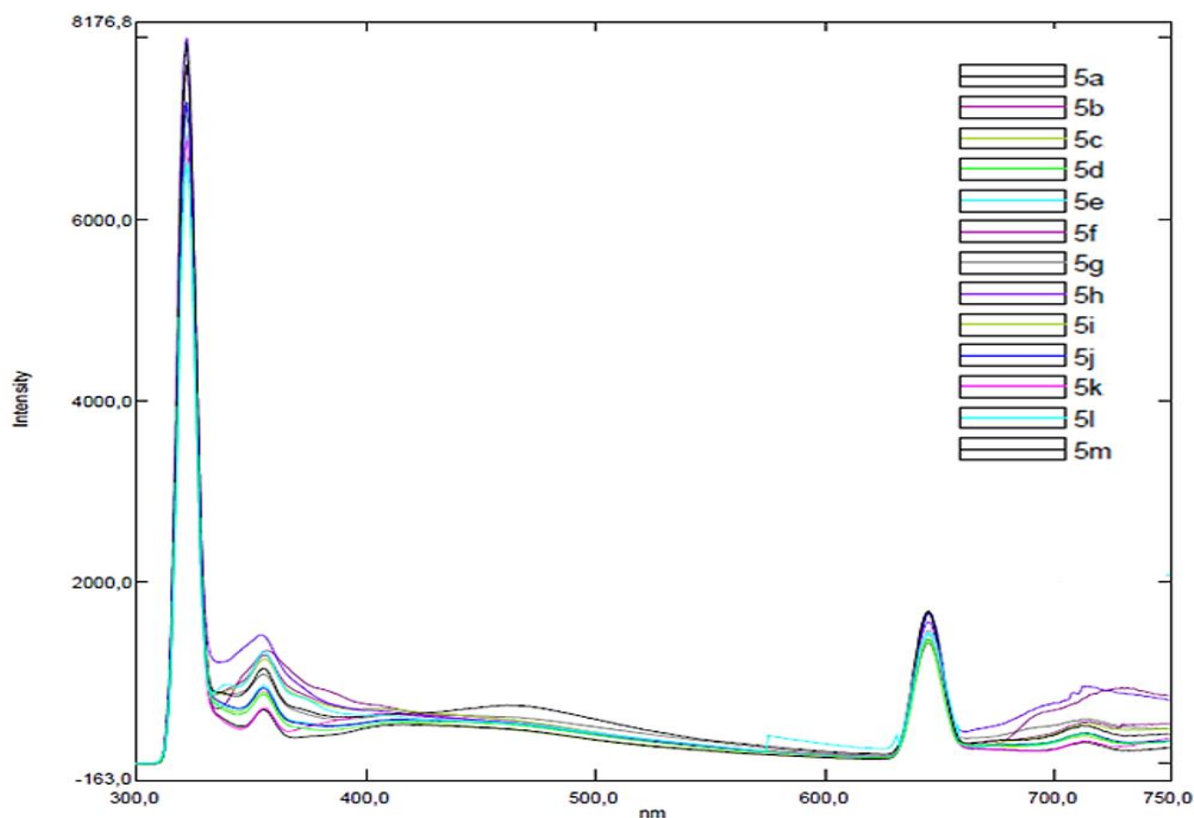


Os comprimentos de onda máximos de absorção dos derivados **5** foram utilizados como comprimentos de onda de excitação nos estudos de fluorescência, apresentados na Figura 24.

Analisando as regiões dos picos de emissões, foi observado o mesmo padrão para todos os derivados **5**. A primeira banda de emissão, a mais intensa, ocorre no mesmo comprimento de onda da excitação ($\lambda_{\text{ex}} = 322 \text{ nm}$), indicando uma reemissão de grande parte dos fótons incididos. A segunda banda na região de $\lambda = 355 \text{ a } 357 \text{ nm}$, menos intensa, tem $\Delta\nu$ menor que 45 nm, a terceira banda entre 409 e 461 nm e uma a quarta banda em 644 nm que é o dobro da banda de emissão.

A reemissão, segundo a literatura, pode ser explicada pela dispersão dos fótons incidentes. Existem algumas formas de dispersão que podem ser caracterizadas devido ao comportamento, dentre elas, a dispersão de Rayleigh e o efeito Raman, caracterizados por processos de espalhamento de luz¹⁰¹.

Figura 24. Espectro de emissão das amostras **5a-m** excitadas a $\lambda = 322$ nm



A diferença entre os métodos em que a molécula absorve e emite luz dos processos que dispersam os fótons (Rayleigh e Raman) é que na dispersão, não há estado eletrônico excitado pelo átomo ou molécula dispersora, sendo considerado apenas um processo de colisões elásticas no caso da dispersão de Rayleigh. Esse tipo de dispersão consiste no espalhamento da luz incidida pelo dispersor, onde o fóton não tem ganho ou perda de energia após a colisão, mantendo constante seu comprimento de onda (λ “incidente” = λ “espalhado”). No caso da dispersão Raman as colisões são inelásticas onde, quando o comprimento de onda do fóton espalhado é menor do que o incidido (λ “incidente” > λ “espalhado”) este processo é chamado de Raman *Anti-Stokes*. No processo chamado de Raman *Stokes*, o fóton perde energia, resultando no aumento do seu comprimento de onda (λ “incidente” < λ “espalhado”) esses dois processos alteram a direção dos fótons incididos¹⁰².

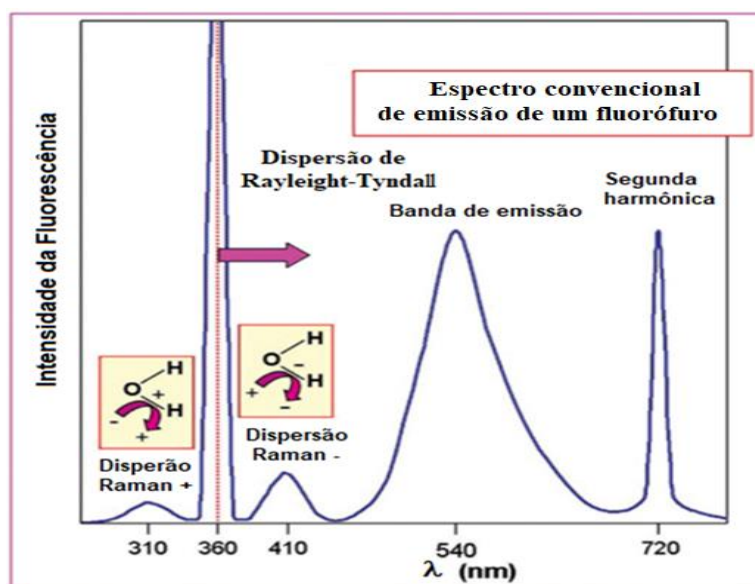
Nos espectros de fluorescência dos derivados 5 (Figura 24), as colisões elásticas de Rayleigh, podem ser observadas nos picos mais intensos de reemissão em $\lambda = 322$ nm, enquanto as colisões inelásticas de Raman Stokes podem ser observadas na região de $\lambda = 355$ a 357 nm. O espalhamento

Raman é considerado um efeito muito fraco, na escala de aproximadamente 1 em cada 10 milhões de fótons produzem a transição, ou seja, estatisticamente, quanto mais intensa for a fonte de luz (laser do fluorímetro) mais se vê do fenômeno¹⁰³, por isso as baixas intensidades visualizadas nos espectros dos derivados 5.

Os mecanismos descritos para o efeito Raman e a dispersão de Rayleigh resumidamente, são embasados em cálculos teóricos de um campo elétrico oscilante interagindo com átomos ou moléculas, no qual somente os elétrons de luz seguem rapidamente a frequência externa de oscilação⁹⁴.

Existem correlações entre as propriedades luminescentes dos derivados benzodiazepínicos 5 e de moléculas fluoróforas, pois as mesmas bandas descritas para moléculas fluoróforas são também observadas nos espectros dos derivados 5: a banda de reemissão (Rayleigh-Tyndall scattering), as bandas do fenômeno Raman (Stokes ou Anti-Stokes), a banda de emissão verdadeira (fluorescência) e a banda da segunda dispersão harmônica da excitação. Apesar dessas bandas serem descritas como bandas de emissão, somente a banda de emissão verdadeira corresponde à fluorescência da molécula¹⁰⁴, (Figura 25).

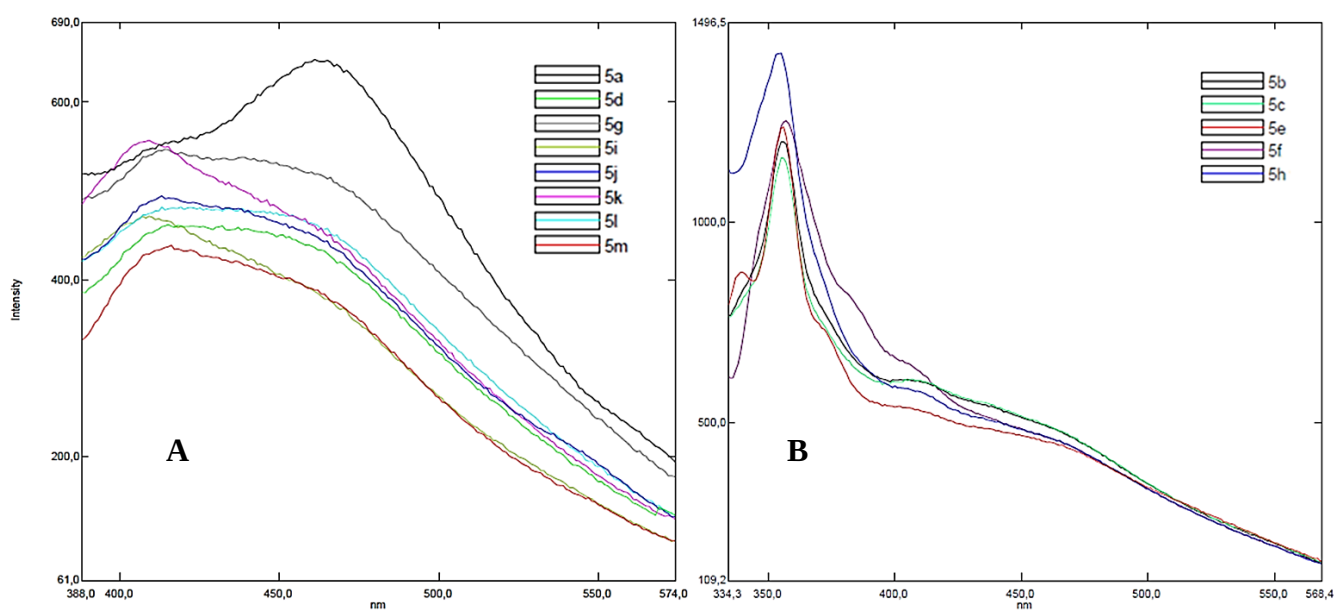
Figura 25. Espectro de emissão convencional de moléculas denominadas fluoróforas (ou fluoróchromas), contendo a dispersão de Rayleigh-Tyndall ($\lambda = 360$ nm), espalhamentos Raman ($\lambda = 310$ e 410 nm), banda de emissão ($\lambda = 540$ nm) e a segunda dispersão harmônica ($\lambda = 720$ nm)



Fonte: Juan Carlos Stockert et al. (2017).

Os derivados **5** foram divididos em dois grupos de acordo com seus espectros de emissão em Grupo A: compostos com bandas de emissão verdadeira e Grupo B: compostos sem bandas de emissão (Figura 26).

Figura 26. Espectros de emissão das amostras **5a-m** excitadas com $\lambda_{\text{exc}} = 322$ nm. A) amostras com emissão detectada B) amostras sem emissão detectada, apenas a banda da dispersão Raman.



Os parâmetros de fluorescência dos derivados **5** que apresentam bandas de emissão verdadeira são apresentados na Tabela 9.

Os derivados tem bandas de emissão possuem deslocamentos de Stokes ($\Delta\nu$) variando entre 87 a 139 nm. Esses compostos possuem em suas estruturas diferentes substituintes no anel benzílico que influenciam suas propriedades luminescentes. O derivado **5a** contém os grupos OBn e OCH₃, que são fortemente doadores de elétrons, e dentre os derivados é o que apresenta maior intensidade de fluorescência e o maior λ de emissão (Tabela 9). Entretanto, esse fator não deve ser avaliado isoladamente, pois outros derivados contendo também grupos fortemente doadores de elétrons não apresentaram fluorescência como **5b** e **5c** (Figura 26 B).

Tabela 9. Dados de UV-vis e Fluorescência dos compostos benzodiazepínicos **5**

Amostra ^a	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm) ^b	Intensidade emissão	$\Delta\nu$ (nm)	ϕ^c
5a	322	461	648	139	0,0018
5d	322	415	462	93	0,0020
5g	322	414	547	92	0,0019
5i	314	409	471	95	0,0016
5j	320	413	497	93	0,0019
5k	322	409	557	87	0,0018
5l	324	419	481	95	0,0022
5m	316	416	438	100	0,0016

^a Concentração = 10⁻⁵ M, ^b λ de excitação 322 nm, ^c 9,10-difenilantraceno usado como padrão para cálculo de ϕ do (0,9 em ciclohexano)

No caso de **5a**, o fator mais importante é a presença do anel aromático do grupo OBn que também tem sua parcela de contribuição na intensidade da fluorescência e no λ de emissão. No caso de **5g** e **5k**, que são os outros derivados com maior intensidade de fluorescência, existem grupos em posições que favorecem estruturas de ressonância que diminuem a energia do estado excitado

aumentando a intensidade da fluorescência. O número de substituintes também pode aumentar a dispersão dos fótons como no caso dos derivados **5d**, **5i** e **5m**.¹⁰⁵

Os grupos doadores e sacadores de elétrons participam de inúmeros mecanismos intermoleculares e intramoleculares como transferência fotoinduzida de próton, transferência fotoinduzida de elétron e formação de excímeros⁶³ que alteram as propriedades fluorescentes de núcleos fluoróforos. Esses grupos também influenciam o gap de energia ($\Delta E_{\text{LUMO-HOMO}}$) após a excitação da molécula⁷².

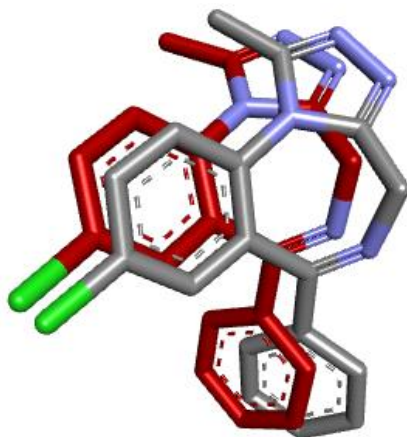
Baixos rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos para os derivados **5** (0,0016 a 0,0022) indicando que (Tabela 9) grande parte dos fótons incididos sofrem os processos de dispersão discutidos acima resultando na baixa fluorescência observada.

Para que estes derivados possam vir a ser utilizados como sondas seria necessária a introdução de grupos ligados aos átomos de nitrogênio que possam aumentar a fluorescência desses derivados, entretanto sem alterar a ligação com os receptores GABA⁸⁴.

Para entender como os derivados **5** se comportam na proteína alvo GABA_A- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, as estruturas foram submetidas a simulações de *docking* molecular, visando as propriedades sedativas características de fármacos da classe das benzodiazepínicos. Antes do *docking* molecular foi realizada a validação do processo, usando como composto de referência o Alprazolam da estrutura cristalográfica, que segundo a literatura⁴³ é responsável pela sedação e ataxia, GABA_A- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (PDB ID: 6HUO).

O resultado emitido de RMSD foi de 1,03Å, que segundo a literatura¹⁰⁶, está dentro dos valores que validam o processo, ou seja, abaixo de 2Å. O resultado do processo de validação do *docking* pode ser visualizado a partir da Figura 27.

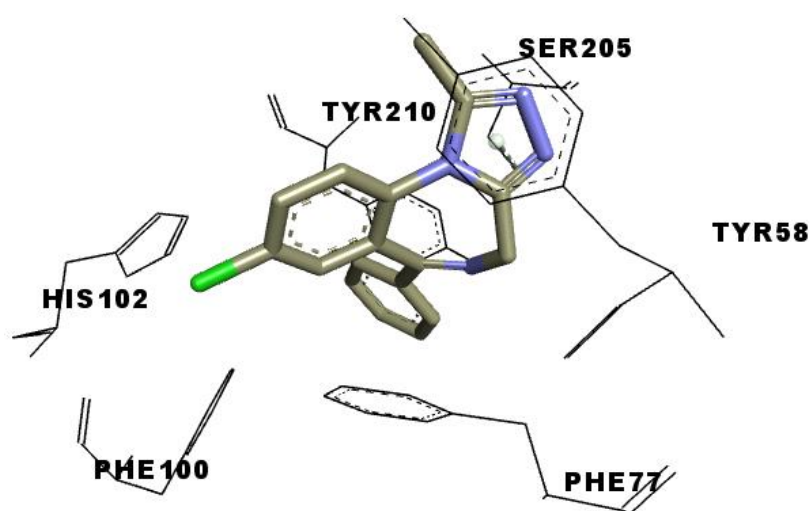
Figura 27. Resultado para a validação da simulação. Sobreposição do Alprazolam originário da estrutura cristalográfica (referência), em vermelho, e o Alprazolam resultante do processo de *docking*, em cinza.



Fonte: Próprio Autor.

Após a validação do processo foi realizado *docking* molecular do Alprazolam na proteína para estudar seu modelo de interação (Figura 28) que será utilizado comparativamente aos resultados do *docking* molecular da proteína com as BDZ's sintetizadas **5a-m**.

Figura 28. Resultado do processo de *docking* molecular do Alprazolam no receptor GABA_A- $\alpha 1\beta 3\gamma 2$

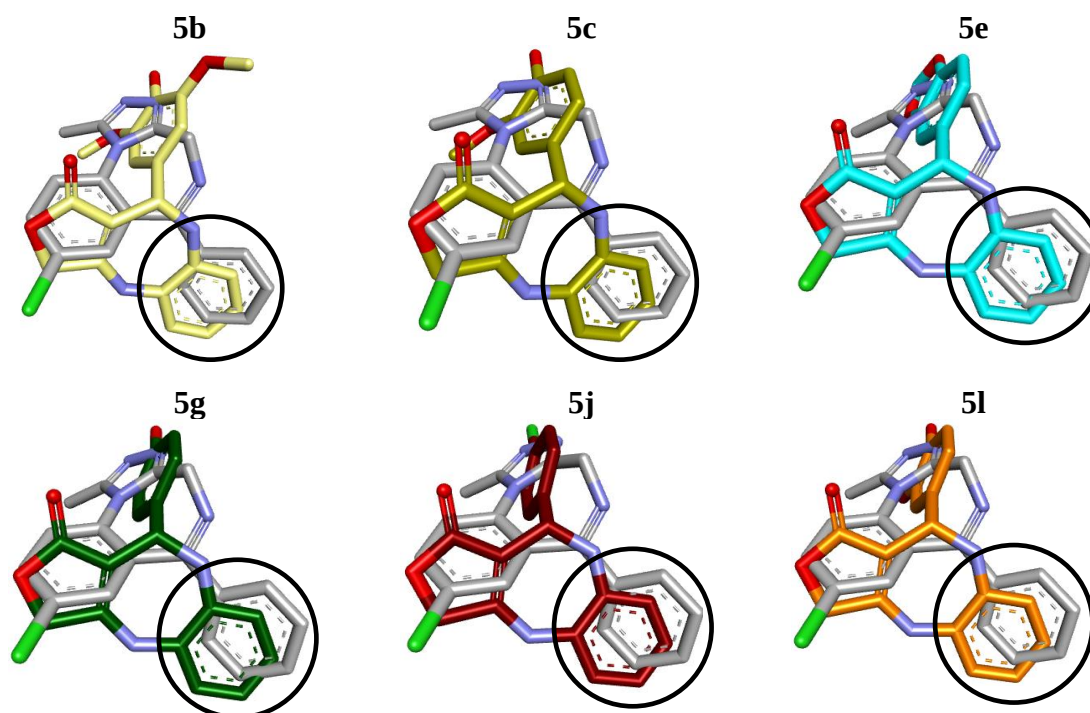


Fonte: Próprio Autor

De acordo com a literatura as principais interações com a proteína e que definem a função do Alprazolam são principalmente interações com a *His102* e a *Asn60* além de interações com os resíduos de *Tyr58*, *Phe77*, *Phe100*, *Tyr160*, *Val203*, *Ser205* e *Tyr210*¹⁰⁷. A partir dos resultados do *docking* molecular foi possível identificar interações hidrofóbicas com os resíduos *Tyr58*, *Phe77*, *Phe100*, *His102* e *Tyr210* e a interação por ligação de hidrogênio (L.H.) não clássica com a *Ser205* (Figura 28) assim como relatado na literatura¹⁰⁷.

As estruturas das BDz's foram então submetidas a análises de comparação das poses com o Alprazolam. Sendo que, para a seleção dos melhores ligantes, foi utilizado como parâmetro, além dos cálculos de porcentagem da função de pontuação, a semelhança no modelo de interação do Alprazolam com a proteína, e principalmente com os resíduos de *His102* e/ou *Asn60*. Os resultados são apresentados nas Figuras 29 e 30 e nas Tabelas 10 e 11.

Figura 29. Sobreposições entre o Alprazolam da simulação (cinza) e os melhores resultados entre os compostos ligantes.



Fonte: Próprio Autor

A análise de sobreposição, exibida na Figura 29, das estruturas ligantes com o Alprazolam indica que estes ocupam a mesma região do sítio ativo que o Alprazolam. Além disso, os compostos **5b**, **5c**, **5e**, **5g**, **5j** e **5l** apresentam em comum a sobreposição (marcado com um círculo) do seu anel aromático do grupo benzodiazepínico com o anel aromático substituído no grupo benzodiazepínico do Alprazolam, o que parece, segundo análise dos resultados que serão mostrados a seguir, interferir de forma positiva no modelo de interação destes compostos com a proteína. Em relação aos modelos de interação, sugere-se que, as estruturas testadas no *docking*, mostradas na Figura 29, partilham dos mesmos resíduos que são importantes na interação do Alprazolam com a proteína alvo (GABA_A- α 1 β 3 γ 2). Inicialmente, observa-se um padrão de interações hidrofóbicas, que se assemelham às descritas na literatura por parte da interação da Tyr58 com o anel fenil pendente dos ligantes **5b**, **5c**, **5e**, **5g**, **5j** e **5l** que tomam o lugar do mesmo tipo de interação deste resíduo no anel triazol do Alprazolam (Figura 30 e Tabela 10).

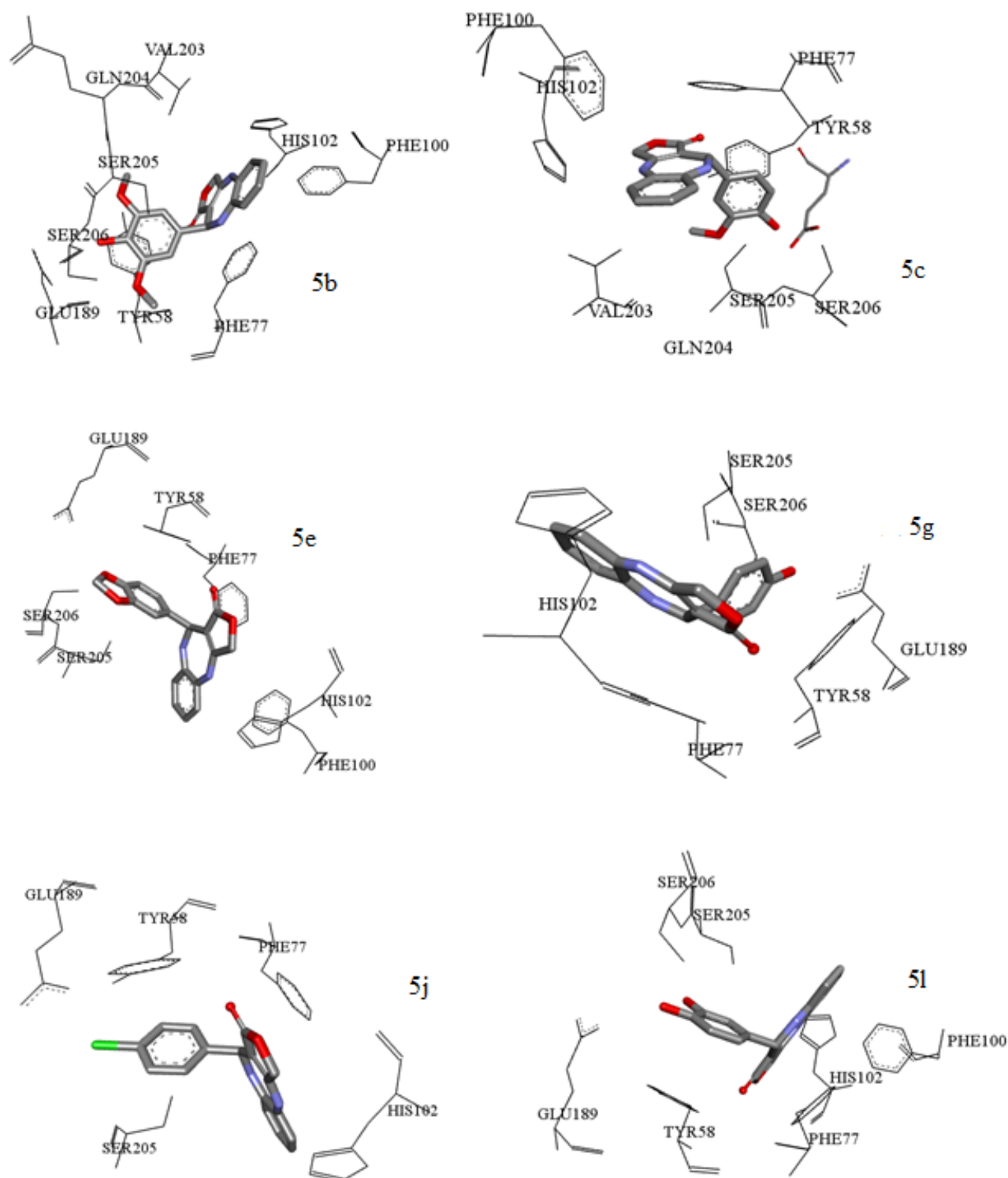
Todos estes os ligantes citados acima interagem com a Phe77, através de 3 interações hidrofóbicas, enquanto na simulação do Alprazolam, configura-se apenas uma interação.

A interação hidrofóbica feita entre o Phe100 com os ligantes **5b**, **5c**, **5e** e **5l** é muito semelhante à do Alprazolam obtido na pose do *docking*, entretanto, o ligante de referência interage com o anel fenil pendente, enquanto as BDZ's do *docking* utilizam o benzeno do grupo benzodiazepínico para fazer a interação.

Além das interações descritas acima, entre os ligantes, as estruturas **5b** e **5c** interagem com uma sequência de 4 resíduos, Val203; Gln204; Ser205 e Ser206, destacando a ligação de hidrogênio clássica com a Ser206 (Figura 30).

Para as estruturas **5b**, **5g** e **5l** é sugerida a interação por ligação de hidrogênio com os resíduos Glu189 e Ser206. Já para a estrutura **5c**, a presença de um grupo metóxi na posição 3 do anel fenil pendente exclui a interação com a Glu189 (Figura 30).

Figura 30. Conformação dos ligantes **5b**, **5c**, **5e**, **5g**, **5j** e **5l** com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABA_A- α 1 β 3 γ 2



A presença do grupo metilenodioxo na estrutura do ligante **5e** configura a troca da interação por ligação de hidrogênio clássica para a ligação não clássica com o resíduo *Glu189*. Na estrutura **5j**, o átomo de cloro presente na posição 4 do anel fenil pendente resulta na única interação por ligação de halogênio com o *Glu189* e uma ligação hidrofóbica com a *Tyr58* (Figura 30).

As poses das estruturas **5b**, **5c**, **5e**, **5g**, **5j**, **5l**, sugerem a presença de interação hidrofóbica e por ligação de hidrogênio não clássica com a *His102*, segundo a literatura, este resíduo é importante função na interação do Alprazolam no sítio ativo da proteína alvo (Figura 30). A Tabela 10 mostra as interações detalhadas entre os resíduos de aminoácidos com os compostos ligantes.

Tabela 10. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das estruturas virtuais, **Alprazolam**, **5b**, **5c**, **5e**, **5g**, **5j** e **5l**.

Ligante /Receptor	Alprazolam	5b	5c	5e
<i>Tyr58</i>	AA – A triazol H , π - π /e	AA-OCH ₃ f.p., H , π -A; AA-f.p., H , π - π /e	AA-OCH ₃ fp, H , π -A; AA-f.p., H , π - π /e	AA-OCH ₃ f.p., H , π -A; AA-f.p., H , π - π /e
<i>Phe77</i>	AA –Cl-bzn H , π -A AA – f.p., H , π - π /e	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A
<i>Glu189</i>	N/A	CO-OH fp, LH /c.	N/A	CO-OCH ₂ O f.p., LH /C-H
<i>Phe100</i>	AA–f.p., H , π - π /T AA–Cl-bzn H , π -A	AA-bzn., H , π - π /T	AA-bzn., H , π - π /T	AA-bzn., H , π - π /T
<i>His102</i>	AA–Cl-bzn H , π -A AA–bzn, H , π - π /e	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A
<i>Val203</i>	CH ₂ OH–A Triazol LH / π d-H	Alquil-f.p., H , π -A	Alquil-OCH ₃ f.p., H , π -A	N/A
<i>Gln204</i>	N/A	CO-OCH ₃ f.p., H /C-H	CO-OCH ₃ f.p, H /C-H	N/A
<i>Ser205</i>	OH–A Triazol LH / π d-H	CH-OCH ₃ f.p., LH /C-H	CH-OCH ₃ f.p., LH /C-H	OH- f.p., LH / π d-H
<i>Ser206</i>	N/A	NH-OH f.p., LH /c.	NH-OH fp, LH /c.	N/A
<i>Tyr210</i>	AA – f.p., H , π - π /e	N/A	N/A	N/A
Ligante /Receptor	Alprazolam	5g	5j	5l

<i>Tyr58</i>	AA – A triazol H , π - π /e	A-OCH ₃ f.p., H , π -A AA-f.p., H , π - π /e	AA-OCH ₃ f.p., H , π -A; AA-f.p., H , π - π /e	AA-f.p., H , π - π /e
<i>Phe77</i>	AA – Cl-bzn H , π -A AA – f.p., H , π - π /e	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-lig. σ H , π -A
<i>Glu189</i>	N/A	CO-OH f.p., LH /c.	CO-Cl f.p., L.Hal , Cl	CO – 4-OH f.p., LH /c.
<i>Phe100</i>	AA-f.p., H , π - π /T AA-Cl-bzn H , π -A	N/A	N/A	AA-bzn., H , π - π /T
<i>His102</i>	AA-Cl-bzn H , π -A AA-bzn, H , π - π /e	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A
<i>Val203</i>	CH ₂ OH–A Triazol LH / π d-H	N/A	N/A	N/A
<i>Gln204</i>	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Ser205</i>	OH–A Triazol LH / π d-H	OH-f.p., LH / π d-H	OH- f.p., LH / π d-H	CH – 3-OH, LH /C-H OH-f.p., LH / π d-H
<i>Ser206</i>	N/A	NH-OH f.p., LH /c.	N/A	NH – 3-OH f.p., LH /c.
<i>Tyr210</i>	AA – f.p., H , π - π /e	N/A	N/A	N/A

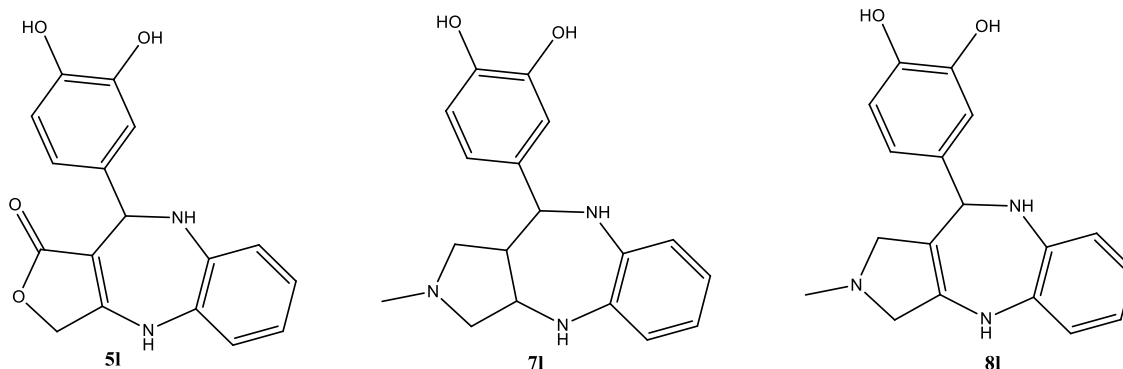
Legenda: AA (anel aromático); bzn (benzeno); **H** (hidrofóbica); e (empilhado); T (T-shaped); A (Alquil); **L.Hal** (ligação de Halogênio); f.p. (fenil pendente); **LH** (ligação de hidrogênio); π d-H (π doador – H); c (clássica), N/A (não se aplica)

Após os resultados do *docking* molecular obtido com as estruturas sintetizadas **5a-m**, foram modeladas estruturas teóricas viáveis, com base na estrutura do composto **5l**, onde foi estudado os efeitos nas interações a partir da substituição do anel lactônico. Várias substituições foram idealizadas, porém, somente são apresentados aqui os resultados de *docking* molecular com os compostos **7l** e **8l** onde a substituição do anel lactônico foi feita por um anel N-metilpirrolidina em **7l** e um anel N-metilpirrol em **8l** (Figura 31).

Em relação ao composto **7l**, embora a sobreposição seja diferente das demais estruturas das BDZ's, sua conformação permitiu uma interação com a *His102*, de modo muito semelhante ao Alprazolam (Figura 32 e Tabela 11), além de uma interação hidrofóbica a mais com o mesmo resíduo. A *Phe77* compartilha da mesma interação com o anel fenil pendente do ligante **5l**, porém,

houve a adição de outra interação hidrofóbica com o anel pirrolidina. Ainda há a interação do anel pirrolidina com o resíduo de *Val203*, presente na simulação do Alprazolam.

Figura 31. Estruturas idealizadas **7I** e **8I**, obtidas a partir de **5I**



Fonte: Próprio Autor.

A sequência *Ser205* e *Ser206* interagem da mesma forma que a **5I**, porém, os dois resíduos compartilham o mesmo oxigênio. Na Figura 33 pode-se observar a conformação das estruturas e os resíduos de interação nas simulações.

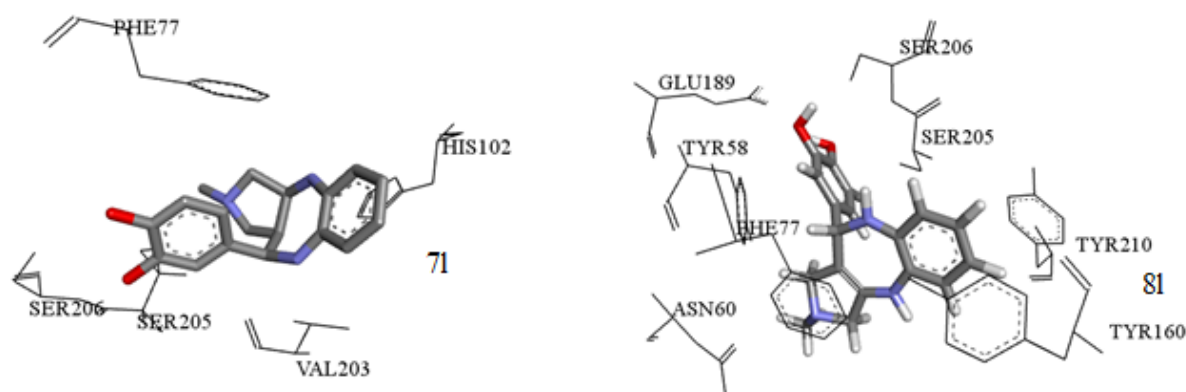
Tabela 11. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das simulações, Alprazolam e estruturas teóricas **7I** e **8I**.

Ligante /Receptor	Alprazolam	7I	8I
<i>Tyr58</i>	AA – A triazol H , π - π/e	N/A	AA-f.p., H , π - π/e
<i>Asn60</i>	AA –Cl-bzn H , π -A AA – f.p., H , π - π/e	N/A	C=O – CH ₃ anel pirrolidina, LH/C-H
<i>Phe77</i>	N/A	AA-anel pirrol H , π - Alquil AA-f.p., H , π - π/T	AA-bzn., H , π - π/e AA-anel diazepínico, H , π - π/T
<i>Glu189</i>	AA–f.p., H , π - π/T AA–Cl-bzn H , π -A	N/A	CO – 4-OH fp, LH/c .
<i>His102</i>	AA–Cl-bzn H , π -A AA–bzn, H , π - π/e	AA-NH, LH / π d-H AA-lig. σ H , π -A	N/A
<i>Tyr160</i>	CH ₂ OH–A Triazol LH / π d-H	N/A	AA-bzn., H , π - π/e

Val203	N/A	Alquil-anel pirrolidina, H , Alquil	N/A
Ser205	OH-A Triazol LH / π d-H	CH – 3-OH fp, LH /C-H	OH- f.p., LH /C-H
Ser206	N/A	NH – 3-OH fp, LH /c.	N/A
Tyr210	AA – f.p., H , π - π /e	N/A	AA-bzn., H , π - π /e

Legenda: AA (anel aromático); bzn (benzeno); **H** (hidrofóbica); e (empilhado); T (T-shaped); A (Alquil); **L.Hal** (ligação de Halogênio); f.p. (fenil pendente); **LH** (ligação de hidrogênio); π d-H (π doador – H); c (clássica); N/A (não se aplica)

Figura 32. Conformação dos ligantes **7l** e **8l** com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABA_A- α 1 β 3 γ 2.



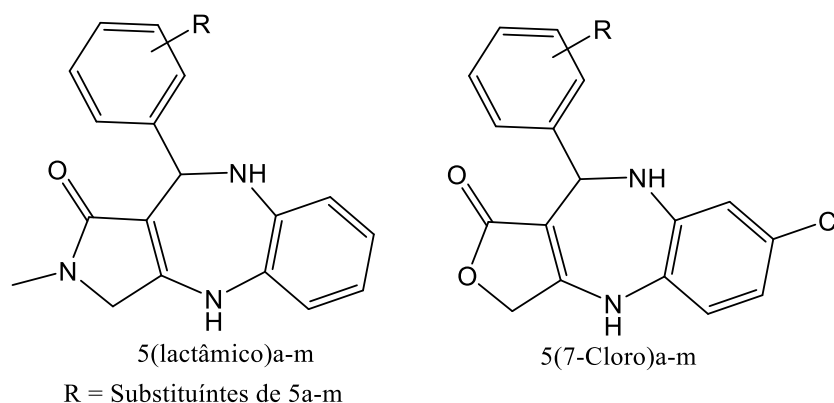
Fonte: Próprio autor.

O estudo com a estrutura ligante **8l** sugere mudança no modelo de interação, principalmente com diferentes aminoácidos. A conformação mais planar da estrutura **8l** em relação a **7l**, permite que a molécula realize interações com resíduos que as estruturas das outras BDZ's 5 não interagiram. O ligante **8l** realiza interação como com o resíduo *Asn60*, resíduo este que segundo a literatura¹⁰⁷ é importante para a interação do ligante com o sítio ativo da proteína, onde há interação por ligação de hidrogênio não clássica entre a carbonila do aminoácido e o hidrogênio do grupo metil, proveniente do anel pirrol. Em comparação com o composto **5l**, todas as interações se mantiveram na estrutura de **8l**, entretanto, houve a troca da *His102* pela *Asn60*. Uma interação

hidrofóbica com a *Phe77* também se destaca, pois utiliza o anel diazepínico, (Tabela 11) o que torna este composto o único deste estudo que interage com a proteína através desta parte da estrutura.

A avaliação dos resultados anteriores direcionou para a idealização de outras estruturas baseadas nas estruturas dos derivados **5a-m**, onde o anel lactônico foi trocado por um anel N-metillactâmico **5a-m(lactâmico)** e outra classe de moléculas onde foi introduzido um átomo de cloro na posição 7 da estrutura dos derivados **5a-m** gerando as estruturas **5a-m(7-Cloro)** que, de acordo com a literatura, parece aumentar a atividade das BDZ's⁵⁴. A estruturas dessas moléculas são apresentadas na Figura 33.

Figura 33. Esqueletos idealizados: **5a-m(lactâmico)** e **5a-m(7-Cloro)**



Fonte: Próprio Autor

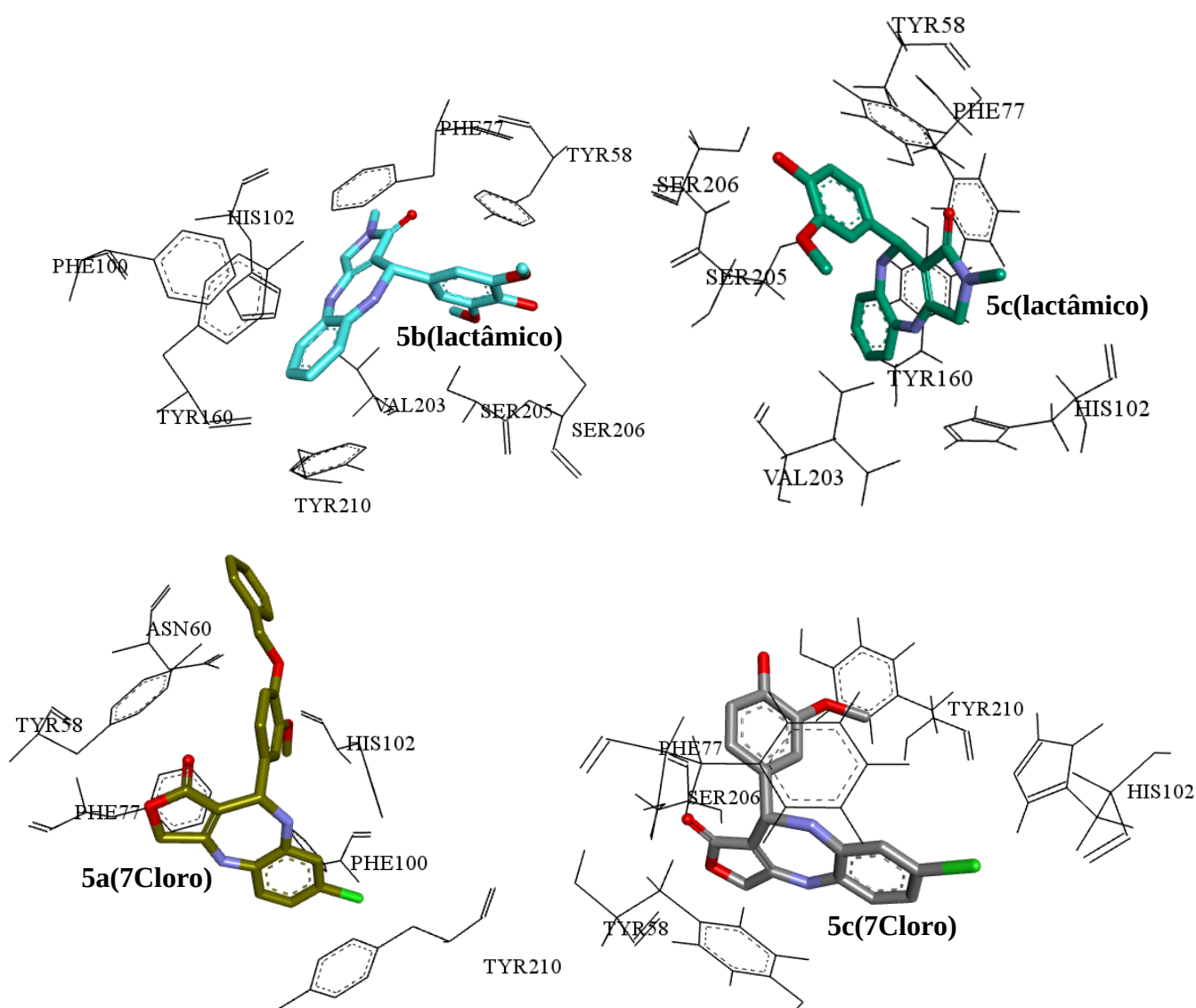
Os estudos foram realizados com os mesmos procedimentos e parâmetros descritos, o *docking* sugeriu que algumas das estruturas além de compartilharem o mesmo sítio ativo do ligante cristalográfico da referência, também compartilharam interações com importantes resíduos (*His102* e *Asn60*), porém, com um modelo de interação diferente do Alprazolam, mostrados na Figura 32 e Tabela 12.

A nova conformação proveniente do anel lactâmico nos compostos **5b(lactâmico)** e **5c(lactâmico)** possibilitaram principalmente a interação por uma ligação de hidrogênio clássica e uma não clássica com a *His102*, além de interações hidrofóbicas com os resíduos *Try58*, *Phe77*,

Tyr160 e *Val203* e por ligação de hidrogênio com a *Ser205* (Figura 34 e Tabela 12), aminoácidos descritos no modelo de interação da referência.

O ligante **5b(lactâmico)** também interage por interações hidrofóbicas π - π T Shaped com a *Phe100* e π - π empilhado com a *Tyr210*, e assemelha-se ao modelo do Alprazolam, porém, com o benzeno. Também se destaca as duas ligações de hidrogênio clássicas com a *Ser206* (Figura 34 e Tabela 12).

Figura 34. Conformação dos ligantes **5b(lactâmico)**, **5c(lactâmico)**, **5a(7Cloro)** e **5c(7Cloro)** com a posição dos resíduos do sítio ativo da proteína GABA_A- α 1 β 3 γ 2.



Fonte: Próprio Autor.

A adição do Cl na posição 7 das estruturas **5a(7Cloro)** e **5c(7Cloro)** sugere que a interação π -Alquil do átomo de cloro com a *His102* seja exatamente a mesma do Alprazolam, além de interagir de outra forma com os mesmos resíduos *Tyr58*, *Phe77*, *Ser206* e *Tyr210* no composto ligante **5c(7Cloro)**, sendo que a *Ser206* interage especificamente como anel butirolactona. Já o ligante idealizado **5a(7Cloro)** interage com a *His102* e também por uma interação por π -par de elétrons com a *Asn60*, devido a conformação do seu anel aromático benzílico. A molécula ainda interage exatamente igual na interação do Cl do Alprazolam com o resíduo de *Phe100*, além de interagir também com a *Tyr58*, *Phe77* e *Tyr210* (Figura 34 e Tabela 12).

Tabela 12. Resultado detalhado das interações receptor-ligante das simulações com o Alprazolam e estruturas teóricas **5b(lactâmico)**, **5c(lactâmico)**, **5a(7Cloro)** e **5c(7Cloro)**.

Ligante /Receptor	Alprazolam	5b(lactâmico)	5c(lactâmico)
<i>Tyr58</i>	AA – A triazol H , π - π /e	AA-3,5-OCH ₃ f.p., H , π -A; AA-f.p., H , π - π /e	AA-OCH ₃ fp, H , π -A AA-f.p., H , π - π /e
<i>Phe77</i>	AA –Cl-bzn H , π -A AA – f.p., H , π - π /e	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T AA-NCH ₃ H , π -A
<i>Phe100</i>	AA-f.p., H , π - π /T AA-Cl-bzn H , π -A	AA-bzn., H , π - π /T	N/A
<i>His102</i>	AA-Cl-bzn H , π -A AA-bzn, H , π - π /e	AA-NH, LH /c N(imidazol)-NH, LH / π d-H	AA-NH, LH /c N(imidazol)-NH, LH / π d-H
<i>Tyr160</i>	N/A	AA-bzn., H , π - π /e	AA-bzn., H , π - π /e
<i>Val203</i>	CH ₂ OH-A Triazol LH / π d-H	Alquil- OCH ₃ f.p., H , A	Alquil-OCH ₃ f.p., H , A
<i>Ser205</i>	OH-A Triazol LH / π d-H	OH- f.p., LH / π d-H	OH- f.p., LH / π d-H
<i>Ser206</i>	N/A	NH-OH f.p., LH /c.	NH-OH f.p., LH /c.
<i>Tyr210</i>	AA – f.p., H , π - π /e	AA-bzn., H , π - π /e	N/A
Ligante /Receptor	Alprazolam	5a(7Cloro)	5c(7Cloro)
<i>Tyr58</i>	AA – A triazol H , π - π /e	AA-lig. σ H , π -A AA-C=O π -par de elétrons	AA-lig. σ H , π -A AA-bzn, H , π - π /e
<i>Asn60</i>	N/A	C=O-AA (OBn) π -par de elétrons	N/A
<i>Phe77</i>	AA –Cl-bzn H , π -A	AA-OCH ₃ f.p., H , π -A	AA-NH, LH / π d-H

	AA – f.p., H , π - π /e	AA-lig. σ H , π -A	AA-bzn., H , π - π /e AA-f.p., H , π - π /T
<i>Phe100</i>	AA–f.p., H , π - π /T AA–Cl-bzn H , π -A	AA–OCH ₃ f.p., H , π -A AA–Cl-bzn H , π -A	N/A
<i>His102</i>	AA–Cl-bzn H , π -A AA–bzn, H , π - π /e	AA–Cl-bzn H , π -A AA–OCH ₃ f.p., H , π -A C=O–OCH ₃ f.p., LH /C-H	AA–Cl-bzn H , π -A CH (imidazol)–Cl-bzn LH , C-H
<i>Val203</i>	CH ₂ OH–A Triazol LH / π d-H	N/A	N/A
<i>Ser205</i>	OH–A Triazol LH / π d-H	N/A	N/A
<i>Ser206</i>	N/A	N/A	NH–CO(lactona), LH /c. CH–C=O(lactona), LH /c.
<i>Tyr210</i>	AA – f.p., H , π - π /e	AA – bzn H , π - π /e AA–Cl-bzn H , π -A	AA–OCH ₃ f.p., H , π -A

Legenda: AA (anel aromático); bzn (benzeno); **H** (hidrofóbica); e (empilhado); T (T-shaped); A (Alquil); **L.Hal** (ligação de Halogênio); f.p. (fenil pendente); **LH** (ligação de hidrogênio); π d-H (π doador – H); c (clássica); N/A (não se aplica)

As estruturas geradas a partir dos derivados 5 pela alteração do anel lactônico ou pela adição de um átomo de cloro ao anel aromático do núcleo benzodiazepínico, fornece estruturas onde as interações com os aminoácidos do sítio ativo da proteína foram em maior número e mais fortes, porém com um modelo de interação diferente do Alprazolam. Entretanto, esses resultados não indicam que essas interações com a proteína não possam conduzir aos efeitos biológicos esperados, apenas indicam que o modelo de interação é diferente do observado pelo Alprazolam. Na literatura é possível encontrar uma série de trabalhos com estudos de relação estrutura atividade para benzodiazepinas por docking molecular seguido de ensaios *in vitro*, entretanto a maioria deles utiliza derivados de 1,4-benzodiazepínicos^{108, 109, 110}, portanto a comparação com os derivados 1,5-benzodiazepínicos utilizado neste trabalho é mais difícil de ser realizada, pois são grandes as diferenças estruturais¹¹¹. Consequentemente, a pesquisa utilizando derivados 1,5-benzodiazepínicos com avaliação *in silico* e *in vitro* ainda é uma área pouco estudada e que carece de estudos mais aprofundados devido à importância biológica dessa classe de compostos.

5. Conclusão

Os derivados benzodiazepínicos foram obtidos por reação dominó em menores tempos reacionais, maiores rendimentos e com menor gastos de solventes se comparados com outras metodologias descritas na literatura;

O catalisador utilizado é facilmente recuperado e purificado para o reuso sem perder a capacidade catalítica em pelo menos 4 vezes;

Os novos compostos sintetizados têm como diferencial, em relação aos benzodiazepínicos convencionais, o anel lactônico fundido ao anel benzodiazepínico que podem alterar as interações com os receptores GABA;

Esses derivados tem fluorescência na região do azul, porém de baixa intensidade com alta reemissão dos fótons incididos o que culmina em baixo rendimento quântico de fluorescência, porém, as propriedades luminescentes podem ser uteis para aplicações biológicas;

De acordo com o que foi observado, as estruturas de **5b**, **5c** e **5l** interagem com a *His102* igualmente, e variam nas interações com outros resíduos devido aos diferentes substituintes, onde estes compostos tem maior interação com o sitio ativo da proteína e com os resíduos essenciais quando comparado ao Alprazolam;

Portanto, dentre os compostos sintetizados os derivados **5b**, **5c** e **5l**, devido ao modelo de interação com a proteína, são candidatos a avaliação biológica quanto às propriedades sedativas;

As estruturas idealizadas **7l** e **8l**, demonstraram modelos de interações diferentes do modelo do Alprazolam, devido à presença do anel pirrolidina e pirrol, respectivamente, destacando a interação de **8l** com a *Asn60* do sítio ativo da proteína;

A substituição do anel lactônico nos derivados **5b** e **5c** por um anel N-metil-lactâmico gerou as estruturas **5b(lactâmico)** e **5c(lactâmico)** que apresentaram interações por ligação de hidrogênio clássica com a *His102*;

Em relação às estruturas com cloro as **5a(7Cloro)** e **5c (7Cloro)** foi possível observar que a adição do cloro possibilitou a interação dessas estruturas com a *His102*, com destaque para a **5a(7Cloro)** que também interagiu com a *Asn60*, ou seja, a estrutura idealizada é a única no estudo que interage com os dois principais aminoácidos que são citados na literatura para a atividade do Alprazolam;

Os modelos de interação apresentados por **8l** e **5a(7Cloro)** fazem destas estruturas teóricas fortes candidatas ao desenvolvimento de rotas sintéticas, para a obtenção e posterior avaliação biológica.

6. Referências

- ¹ Netzel, C. L., & Abd-Elseyed, A. (2019). Benzodiazepines. In *Pain* (pp. 289-292). Springer, Cham.
- ² Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (1993). Use of benzodiazepines in anxiety disorders. *New England Journal of Medicine*, 328(19), 1398-1405.
- ³ Chweh, A. Y., Lin, Y. B., & Swinyard, E. A. (1984). Hypnotic action of benzodiazepines: A possible mechanism. *Life Sciences*, 34(18), 1763-1768.
- ⁴ Olkkola, K. T., & Ahonen, J. (2008). Midazolam and other benzodiazepines. In *Modern Anesthetics* (pp. 335-360). Springer, Berlin, Heidelberg.
- ⁵ Johnson, D. A. (1985). The use of benzodiazepines in depression. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19(S1), 31S-35S.
- ⁶ Gastaut, H., & Low, M. D. (1979). Antiepileptic properties of clobazam, a 1–5 benzodiazepine, in man. *Epilepsy*, 20(4), 437-446.
- ⁷ Bernstein, E., Carey, T. S., & Garrett, J. M. (2004). The use of muscle relaxant medications in acute low back pain. *Spine*, 29(12), 1346-1351.
- ⁸ Kuch, H. (1979). Clobazam: chemical aspects of the 1,4 and 1,5-benzodiazepines. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 7(S1), 17S-21S.
- ⁹ López-Muñoz, F., Álamo, C., & García-García, P. (2011). The discovery of chlordiazepoxide and the clinical introduction of benzodiazepines: half a century of anxiolytic drugs. *Journal of Anxiety Disorders*, 25(4), 554-562.
- ¹⁰ Bostwick, J. R., Casher, M. I., & Yasugi, S. (2012). Benzodiazepines: a versatile clinical tool; evidence supports their use for alcohol withdrawal, insomnia, anxiety disorders, and other conditions. *Current Psychiatry*, 11(4), 54-62.
- ¹¹ Weaver, M. F. (2015). Focus: Addiction: Prescription Sedative Misuse and Abuse. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 88(3), 247.
- ¹² Moosmann, B., & Auwärter, V. (2018). Designer benzodiazepines: another class of new psychoactive substances. In *New Psychoactive Substances* (pp. 383-410). Springer, Cham.
- ¹³ Archer, S., Lewis, T. R., Unser, M. J., Hoppe, J. O., & Lape, H. (1957). 1-Ethyl-4-(3-tropanyl)-tetrahydro-1H-1, 4-benzodiazepine. *Journal of the American Chemical Society*, 79(21), 5783-5785.
- ¹⁴ An, Y. S., Hao, Z. F., Zhang, X. J., & Wang, L. Z. (2016). Efficient Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of 1, 5-Benzodiazepine Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Chemical Biology & Drug Design*, 88(1), 110-121.

-
- ¹⁵ López-Muñoz, F., & González, C. Á. (Eds.). (2007). *Historia de la Psicofarmacología* (Vol. 3). Ed. Médica Panamericana.
- ¹⁶ Sternbach, L. H. (1978). The benzodiazepine story. In *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des Recherches Pharmaceutiques* (pp. 229-266). Birkhäuser Basel.
- ¹⁷ Wick, J. (2013). The history of benzodiazepines. *The Consultant Pharmacist*®, 28(9), 538-548.
- ¹⁸ Hamid, H. A., Ramli, A. N., & Yusoff, M. M. (2017). Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs: A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 96.
- ¹⁹ Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H, Pergamon Press, Oxford, 1979. Copyright 1979 IUPAC
- ²⁰ Stefani, H. A. (2000). *Introdução à química de compostos heterocíclicos*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.
- ²¹ International Programme on Chemical Safety, 'Benzodiazepines', *Poisons Information Monographs*, World Health Organization, Geneva (<http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pimg008.htm>).
- ²² Eberts Jr, F. S., Philopoulos, Y., Reineke, L. M., & Vlieg, R. W. (1981). Triazolam disposition. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 29(1), 81-93.
- ²³ Gustavson, L. E., & Carrigan, P. J. (1990). The clinical pharmacokinetics of single doses of estazolam. *The American Journal of Medicine*, 88(3), S2-S5.
- ²⁴ Dawson, G. W., Jue, S. G., & Brogden, R. N. (1984). Alprazolam. *Drugs*, 27(2), 132-147.
- ²⁵ Manchester, K. R., Maskell, P. D., & Waters, L. (2018). Experimental versus theoretical log D7. 4, pKa and plasma protein binding values for benzodiazepines appearing as new psychoactive substances. *Drug Testing and Analysis*, 10(8), 1258-1269.
- ²⁶ Ashton, C. Heather (March 2007). "Benzodiazepine Equivalence Table". benzo.org.uk. Retrieved 2020-02-05.
- ²⁷ Apotheker-Verein, S. (2000). *Index Nominum 2000: International Drug Directory* (Vol. 17). Taylor & Francis.
- ²⁸ Niwa, T., Shiraga, T., Ishii, I., Kagayama, A., & Takagi, A. (2005). Contribution of human hepatic cytochrome p450 isoforms to the metabolism of psychotropic drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(9), 1711-1716.
- ²⁹ "CHAPTER 1 Alcohol and Other Drugs". The Public Health Bush Book: Facts & approaches to three key public health issues. ISBN 0-7245-3361-3. Archived from the original on 2020-05-04.

-
- ³⁰ Max Planck Institute. (2016, September 24). How Neurons Talk to Each Other. NeuroscienceNews. Retrieved September 24, 2016 from <http://neurosciencenews.com/neurons-synapses-neuroscience-5119/>
- ³¹ Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*, 60(3), 469-476.
- ³² Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. J. (2014). *Princípios de Neurociências-5*. AMGH Editora, p.1531
- ³³ TONEL, Deisi. Neurotransmissão. 2013. Disponível em: <<http://auladefisiologiahumana.blogspot.com.br/p/neurotransmissor.html>>. Acesso em: 30/10/2019.
- ³⁴ Whiting, P. J. (2003). GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discovery Today*, 8(10), 445-450.
- ³⁵ PJ Whiting, et al. GABA TE Creighton (ed.) , Encyclopedia of Molecular Biology , Wiley Interscience (1999) , pp. 1957 – 1959
- ³⁶ Brandão, M. L. (2008). As bases biológicas do comportamento. Introdução à neurociência. São Paulo: E.P.U. p.244
- ³⁷ Aires, M. M. (2008). Fisiologia 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.1252
- ³⁸ Schwartz, T. W., & Holst, B. (2007). Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends in Pharmacological Sciences*, 28(8), 366-373.
- ³⁹ Hoffman, E. J., & Warren, E. W. (1993). Flumazenil: a benzodiazepine antagonist. *Clinical Pharmacy*, 12(9), 641-56.
- ⁴⁰ Richter, L., De Graaf, C., Sieghart, W., Varagic, Z., Mörzinger, M., De Esch, I. J., et al. (2012). Diazepam-bound GABA A receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 455.
- ⁴¹ Williams, J. T. Vollum Institute of Oregon Health Sciences University, Interviewed by Saira Ahmed, November 11, 2008.
- ⁴² Blaus, B. (2014). Medical gallery of Blausen medical 2014. WikiJournal of Medicine, 1(2), 10.
- ⁴³ Wieland, H. A., Lüddens, H., & Seeburg, P. H. (1992). A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *Journal of Biological Chemistry*, 267(3), 1426-1429.
- ⁴⁴ Liu, G., Li, H., Shi, J.; Wang, W., Furuta, K., Liu, D., Zhao, C., Ozoe, F., Ju, X., & Ozoe, Y. (2019). 4-Aryl-5-carbamoyl-3-isoxazolols as competitive antagonists of insect GABA receptors:

Synthesis, biological activity, and molecular docking studies. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 27, 416–424.

⁴⁵ Sankar, R. (2012). GABA A receptor physiology and its relationship to the mechanism of action of the 1,5-benzodiazepine clobazam. *CNS Drugs*, 26(3), 229-244.

⁴⁶ Walters, W. P., Stahl, M. T., & Murcko, M. A. (1998). Virtual screening—an overview. *Drug Discovery Today*, 3(4), 160-178.

⁴⁷ Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. In *Molecular Modeling of Proteins* (pp. 365-382). Humana Press.

⁴⁸ Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., & Kuntz, I. D. (2001). DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15(5), 411-428.

⁴⁹ Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., & Olson, A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, 19(14), 1639-1662.

⁵⁰ Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267(3), 727-748.

⁵¹ Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., & Klebe, G. (1996). A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*, 261(3), 470-489.

⁵² What is the difference between the GoldScore, ChemScore, ASP and ChemPLP scoring functions provided with GOLD?. *Cambridge Crystallographic Data Centre* – Disponível em 3 de julho de 2020 <<https://bit.ly/3feI9Rr>>

⁵³ Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 52(4), 609-623.

⁵⁴ Lu, S. H., Wu, J. W., Liu, H. L., Zhao, J. H., Liu, K. T., Chuang, C. K., Lin, H. Y., Tsai, W. B., & Ho, Y. (2011). The discovery of potential acetylcholinesterase inhibitors: a combination of pharmacophore modeling, virtual screening, and molecular docking studies. *Journal of Biomedical Science*, 18(1), 8.

⁵⁵ Chorna, T. (2016). Psychotherapy anxiety and phobic disorders. *European Psychiatry*, 33, S394.

⁵⁶ Guina, J., & Merrill, B. (2018). Benzodiazepines I: Upping the care on downers: The evidence of risks, benefits and alternatives. *Journal of Clinical Medicine*, 7(2), 17.

⁵⁷ Griffin, C. E., Kaye, A. M., Bueno, F. R., & Kaye, A. D. (2013). Benzodiazepine pharmacology and central nervous system–mediated effects. *Ochsner Journal*, 13(2), 214-223.

-
- ⁵⁸ Benasi, G., Guidi, J., Offidani, E., Balon, R., Rickels, K., & Fava, G. A. (2018). Benzodiazepines as a monotherapy in depressive disorders: a systematic review. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 87(2), 65-74.
- ⁵⁹ Roehrs, T., & Roth, T. (2010). Drug-related sleep stage changes: functional significance and clinical relevance. *Sleep Medicine Clinics*, 5(4), 559-570.
- ⁶⁰ Batlle, E., Lizano, E., Viñas, M., & Pujol, M. D. (2018). 1,4-Benzodiazepines and new derivatives: description, analysis, and organic synthesis. In *Medicinal Chemistry*. pp 63-90.
- ⁶¹ Isojarvi, J., Gidal, B. E., Chung, S., & Wechsler, R. T. (2018). Optimizing clobazam treatment in patients with Lennox–Gastaut syndrome. *Epilepsy & Behavior*, 78, 149-154.
- ⁶² Chaidos, A., Caputo, V., & Karadimitris, A. (2015). Inhibition of bromodomain and extra-terminal proteins (BET) as a potential therapeutic approach in haematological malignancies: emerging preclinical and clinical evidence. *Therapeutic Advances in Hematology*, 6(3), 128-141.
- ⁶³ Sharp, P. P., Garnier, J. M., Hatfaludi, T., Xu, Z., Segal, D., Jarman, K. E., & Hall, P. (2017). Design, synthesis, and biological activity of 1,2,3-triazolobenzodiazepine BET bromodomain inhibitors. *A CS Medicinal Chemistry Letters*, 8(12), 1298-1303.
- ⁶⁴ Lakowicz, J. R. (Ed.). (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media. pp 1-7.
- ⁶⁵ Menéndez, G. O., Leskow, F. C., & Spagnuolo, C. C. (2015). Basic Concepts of Fluorescence and Fluorescent Probes. In *Fluorescence Imaging for Surgeons* (pp. 3-18). Springer, Cham.
- ⁶⁶ Stokes, G. G. (1852). XXX. On the change of refrangibility of light. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, (142), 463-562.
- ⁶⁷ Valeur, B. (2003). Molecular fluorescence. *Digital Encyclopedia of Applied Physics*, 477-531.
- ⁶⁸ Fernández-Suárez, M., & Ting, A. Y. (2008). Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 929-943.
- ⁶⁹ Tsien, R. Y. (1989). Fluorescent probes of cell signaling. *Annual Review of Neuroscience*, 12(1), 227-253.
- ⁷⁰ Cooke, R. (1982). Fluorescence as a probe of contractile systems. In *Methods in enzymology* (Vol. 85, pp. 574-593). Academic Press.
- ⁷¹ Yguerabide, J. (1972). Nanosecond fluorescence spectroscopy of macromolecules. In *Methods in enzymology* (Vol. 26, pp. 498-578). Academic Press.
- ⁷² Hong, G., Antaris, A. L., & Dai, H. (2017). Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nature Biomedical Engineering*, 1(1), 1-22.

-
- ⁷³ Liu, J., Liu, C., & He, W. (2013). Fluorophores and their applications as molecular probes in living cells. *Current Organic Chemistry*, 17(6), 564-579.
- ⁷⁴ Terai, T., & Nagano, T. (2013). Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 465(3), 347-359.
- ⁷⁵ Qomi, H. R., Habibi, A., & Shahcheragh, S. M. (2017). Synthesis and fluorescence studies of nine 1,5-benzodiazepine-2,4-dione derivatives: dual emission and excimer fluorescence. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 174, 164-170.
- ⁷⁶ Singh, R. K., Sharma, S., Sandhar, A., Saini, M., & Kumar, S. (2016). Current development in multicomponent catalytic synthesis of 1,5-benzodiazepines: A systematic review. *Iranian Journal of Catalysis*, 6(1), 1-21.
- ⁷⁷ Muñoz, M., Pasquale, G., Sathicq, A. G., Romanelli, G. P., Cabello, C. I., & Gazzoli, D. (2019). Volcanic ash as reusable catalyst in the green synthesis of 3H-1,5-benzodiazepines. *Green Processing and Synthesis*, 8(1), 600-610.
- ⁷⁸ Shaikh, I. N., Baseer, M. A., Ahmed, D. B., Adil, S. F., Khan, M., & Alwarthan, A. (2020). Microwave-assisted green synthesis of 1,5-benzodiazepines using Cu (II)-clay nanocatalyst. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 979-985.
- ⁷⁹ Balakrishna, M. S., & Kaboudin, B. (2001). A simple and new method for the synthesis of 1,5-benzodiazepine derivatives on a solid surface. *Tetrahedron Letters*, 42(6), 1127-1129.
- ⁸⁰ Maiti, G., Kayal, U., Karmakar, R., & Bhattacharya, R. N. (2012). Terminal alkynes as keto-methyl equivalent toward one pot synthesis of 1,5-benzodiazepine derivatives under catalysis of Hg (OTf)₂. *Tetrahedron Letters*, 53(12), 1460-1463.
- ⁸¹ Thakuria, H., Pramanik, A., Borah, B. M., & Das, G. (2006). A one-pot synthesis and self-assembled superstructure of organic salts of a 1,5-benzodiazepine derivative. *Tetrahedron Letters*, 47(18), 3135-3138.
- ⁸² Isaeva, V. I., Timofeeva, M. N., Panchenko, V. N., Lukoyanov, I. A., Chernyshev, V. V., Kapustin, G. I., et al. (2019). Design of novel catalysts for synthesis of 1,5-benzodiazepines from 1,2-phenylenediamine and ketones: NH₂-MIL-101 (Al) as integrated structural scaffold for catalytic materials based on calix [4] arenes. *Journal of Catalysis*, 369, 60-71.
- ⁸³ Zhu, X. T., Liu, J. Y., Jiang, B., & Tu, S. J. (2015). Microwave-Assisted Aqueous Reactions: An Efficient Route to Benzodiazepines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 52(1), 92-96.
- ⁸⁴ Kaur, N., & Kishore, D. (2014). Synthetic strategies applicable in the synthesis of privileged scaffold: 1,4-benzodiazepine. *Synthetic Communications*, 44(10), 1375-1413.

-
- ⁸⁵ Kyungjin, K., Volkman, S. K., & Ellman, J. A. (1998). Synthesis of 3-substituted 1,4-benzodiazepin-2-ones. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(4), 375-379.
- ⁸⁶ Gilman, N. W., Blount, J. F., & Fryer, R. I. (1976). Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. LXXII. Synthesis of benzoxazinones from anthranilic acids. Revision of structures originally described as 1,4-benzodiazepines. *Journal of Organic Chemistry*, 41(4), 737-739.
- ⁸⁷ Bergman, J., & Brynolf, A. (1983). The synthesis, separation and structure determination of two conformers of 2,2-dimethyl-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin-3-one. *Heterocycles (Sendai)*, 20(11), 2145-2148.
- ⁸⁸ Keating, T. A., & Armstrong, R. W. (1996). Postcondensation modifications of Ugi four-component condensation products: 1-Isocyanocyclohexene as a convertible isocyanide. Mechanism of conversion, synthesis of diverse structures, and demonstration of resin capture. *Journal of the American Chemical Society*, 118(11), 2574-2583.
- ⁸⁹ Sasiambarrena, L. D., Barri, I. A., Fraga, G. G., Bravo, R. D., & Ponzinibbio, A. (2019). Facile synthesis of 4-substituted 1,2,4,5-tetrahydro-1,4-benzodiazepin-3-ones by reductive cyclization of 2-chloro-N-(2-nitrobenzyl) acetamides. *Tetrahedron Letters*, 60(3), 264-267.
- ⁹⁰ Shafie, A., Mohammadi-Khanaposhtani, M., Asadi, M., Rahimi, N., Ranjbar, P. R., Ghasemi, J. B., et al. (2020). Novel fused 1,2,3-triazolo-benzodiazepine derivatives as potent anticonvulsant agents: design, synthesis, *in vivo*, and *in silico* evaluations. *Molecular Diversity*, 24(1), 179-189.
- ⁹¹ Schwede, T., Peitsch, M. (2008). Computational Structural Biology - Methods Applications. Cap. 17. World Scientific Publishing Co. Pte. 779 p. Singapore.
- ⁹² Jones, G., Willet, P., Glen, R. C., Leach, A. R., & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, 267, 727-48.
- ⁹³ Jones, G., Willet, P., & Glen, R. (1995). Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *Journal of Molecular Biology*, 245, 43-53.
- ⁹⁴ Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., & Taylor, R. D. (2003). Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins*, 52, 609-623.
- ⁹⁵ Morgon, N. H., & Coutinho, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. Livraria da Física. 540 pgs. São Paulo. 2007.
- ⁹⁶ Bennamane, N., Kaoua, R., Hammal, L., & Nedjar-Kolli, B. (2008). Synthesis of new amino-1,5-benzodiazepine and benzotriazole derivatives from dimedone. *Organic Communications*, 1(3), 62-68.

-
- ⁹⁷ Kolos, N. N., Yurchenko, E. N., Orlov, V. D., Shishkina, S. V., & Shishkin, O. V. (2004). Investigation of the products of interaction of cyclic diketones with nitrogen-containing 1,4-binucleophiles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 40(12), 1550-1559.
- ⁹⁸ Savina, S. A., Lyubchanskaya, V. M., Alekseeva, L. M., Shashkov, A. S., & Granik, V. G. (2007). Synthesis of novel furoquinolines and furobenzodiazepines from tetronic acid. *Russian Chemical Bulletin*, 56(11), 2298.
- ⁹⁹ Wang, S. L., Cheng, C., Wu, F. Y., Jiang, B., Shi, F., Tu, S. J., et al. (2011). Microwave-assisted multi-component reaction in water leading to highly regioselective formation of benzo [f] azulene-1-ones. *Tetrahedron*, 67(25), 4485-4493.
- ¹⁰⁰ Amari, M., Fodili, M., Nedjar-Kolli, B., Hoffmann, A. P., & Perie, J. (2002). Reactivity studies on 4-aminopyrones: Access to benzimidazole and benzimidazolone derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 39(4), 811-816.
- ¹⁰¹ Berg, R. W. (2007). Raman spectroscopy and ab-initio model calculations on ionic liquids. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 138(11), 1045-1075.
- ¹⁰² Braeuer, A. *In situ spectroscopic techniques at high pressure*. Amsterdam: Elsevier, 2015. Chapter 2 - Interaction of Matter and Electromagnetic Radiation (p.41-192)
- ¹⁰³ Andrews, D. L. (2016). Rayleigh scattering and Raman effect, theory. Elsevier, pp. 924-930. Norwich, UK
- ¹⁰⁴ Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A. (2017). "Chapter 3 Dyes and Fluorochromes". *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. Bentham Science Publishers, p. 61–95.
- ¹⁰⁵ Nijegorodov, N., Mabbs, R., & Winkoun, D. P. (2003). Influence of weak and strong donor groups on the fluorescence parameters and the intersystem crossing rate constant. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(3), 595-606.
- ¹⁰⁶ Torsten, S. (Ed.). (2008). *Computational structural biology: Methods and applications*. World scientific.
- ¹⁰⁷ Masiulis, S., Desai, R., Uchański, T., Martin, I. S., Lavery, D., Karia, D., & Steyaert, J. (2019). GABA A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*, 565(7740), 454-459.
- ¹⁰⁸ Belhassan, A., Zaki, H., Benlyas, M., Lakhliifi, T., & Bouachrine, M. (2019). Study of novel triazolo-benzodiazepine analogues as antidepressants targeting by molecular docking and ADMET properties prediction. *Heliyon*, 5(9), e02446.

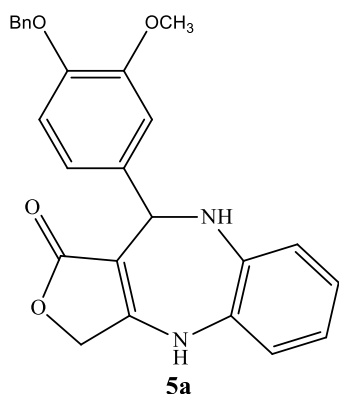
-
- ¹⁰⁹ Menghani, S. S., Chikhale, R., Pant, A., Mathew, B., & Khedekar, P. (2017). Molecular Docking, Synthesis and CNS Activity of Some Novel 1, 4-Benzodiazepine Derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, 14, 690.
- ¹¹⁰ Anzini, M., Braile, C., Valenti, S., Cappelli, A., Vomero, S., Marinelli, L., Limongelli, V., Novellino, E., Betti, L., Giannaccini, G., Lucacchini, A., Ghelardini, C., Galeotti, N., Makovec, F., Giorgi, G., & Fryer, R. I. (2008). Ethyl 8-fluoro-6-(3-nitrophenyl)-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3- carboxylate as novel, highly potent and safe antianxiety agent. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 4730-4743.
- ¹¹¹ Mohsin, N. A., & Qadir, M. I. (2015). Recent structure activity relationship studies of 1,4-benzodiazepines. *Peertechz Journal of Medicinal Chemistry and Research* ,1 (1) 008, 12(008).

APÊNDICE

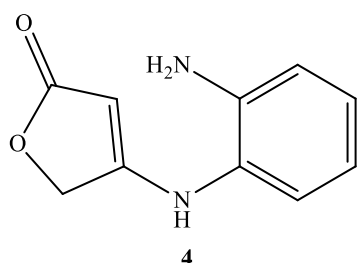
Dados de Caracterização e espectros de HRMS e RMN dos derivados **5a-m**

Dados de caracterização dos derivados 5a-m	97
Espectros de HRMS e RMN dos derivados 5a-m	102

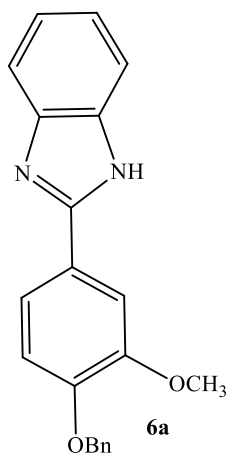
Dados de caracterização dos derivados 5a-m



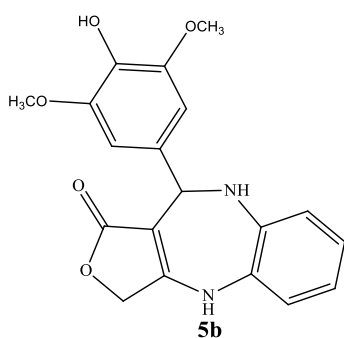
10-(4-(benziloxy)-3-metoxifenil)-3,4,9,10-tetrahydro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5a): 0,0963 g (0,23 mmol), 93%, pf.: 235-238°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,80 (s, 1H, NH); 7,48-7,27 (m, 5H arom); 6,94 (s, 1H arom); 6,88 (d, 1H arom, $J = 7,3\text{Hz}$); 6,78 (d, 1H arom, $J = 8,2\text{ Hz}$); 6,76-6,68 (m, 2H arom); 6,64 (d, 1H arom, $J = 7,3\text{ Hz}$); 6,47 (d, 1H arom, $J = 8,2\text{ Hz}$); 6,04 (d, 1H, NH, $J = 4,4\text{ Hz}$); 5,01 (d, 1H, $J = 4,4\text{ Hz}$); 4,96 (s, 2H, CH_2); 4,89 (s, 2H, CH_2); 3,65 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,83; 158,77; 158,67; 146,45; 137,14; 136,64; 131,60; 128,32; 122,85; 120,66; 119,40; 118,63; 112,65; 111,71; 96,84; 69,79; 65,98; 56,93; 55,35. HRMS (ESI $^+$): m/z $[\text{M}+2\text{H}]^+$ calculado for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$: 415,1658, encontrado: 415,1652.



4-((2-aminofenil)amino)furan-2(5H)-ona (4): 0,0912 g (0,48 mmol), 92 %. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 8,74 (s, 1H); 7,01 (dl, 1H, $J = 7,8\text{ Hz}$); 6,91 (t, 1H, $J = 7,5\text{ Hz}$); 6,54 (t, 1H, $J = 7,5\text{ Hz}$); 6,72 (dl, 1H, $J = 8,0\text{ Hz}$); 5,0 (sl, 2H); 4,78 (s, 1H); 4,51 (s, 1H); 4,78 (s, 1H).

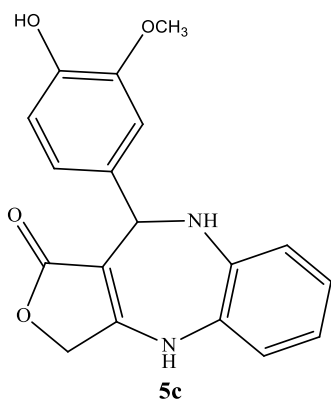


2-(4-(benziloxy)-3-metoxifenil)-1H-benzo[d]imidazol (6a): 0,0331 g (0,10 mmol), 50 %. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 12,78 (s, 1H); 7,79 (d, 1H, $J = 1,9\text{ Hz}$); 7,72 (dd, 1H, $J = 1,9\text{ Hz}$, $J = 8,4\text{ Hz}$); 7,62-7,53 (m, 2H); 7,52 - 7,32 (m, 5H arom); 7,22 (d, 1H, $J = 8,4\text{ Hz}$); 7,20 - 7,17 (m, 2H); 5,17 (s, 1H); 3,9 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 151,82; 149,80; 149,73; 137,32; 128,92; 128,42; 128,36; 123,4; 122,35; 119,67; 113,95; 110,52; 70,41, 56,15.

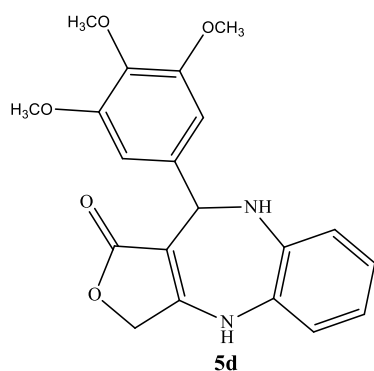


10-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4,9,10-tetrahydro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5b): 0,0775 g (0,22 mmol), 87%, pf.: 245°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,80 (s, 1H, NH); 8,15 (s, 1H, OH); 6,90 (d, 1H arom, $J = 7,2\text{ Hz}$); 6,80-6,67 (m, 2H arom); 6,62 (d, 1H arom, $J = 7,2\text{ Hz}$); 6,38 (s, 2H arom); 5,93 (d, 1H, NH, $J = 3,4\text{ Hz}$); 4,97 (d, 1H, $J = 3,4\text{ Hz}$); 4,92 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,7\text{ Hz}$); 4,87 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,7\text{ Hz}$); 3,58 (s, 6H, 2 CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,88; 158,75; 147,43; 137,68; 134,21; 134,03; 131,63; 123,00; 122,84;

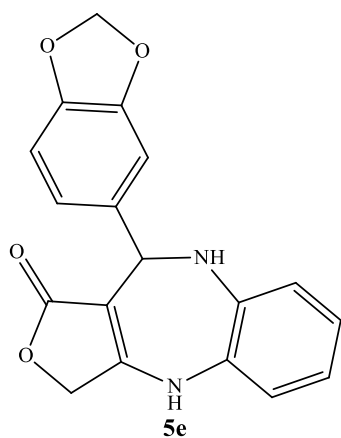
120,65; 119,31; 104,98; 96,98; 65,94; 57,35; 55,84. HRMS (ESI⁺): m/z [M+2H]⁺ calculado para C₁₉H₁₇N₂O₅: 355,1294, encontrado: 355,1286.



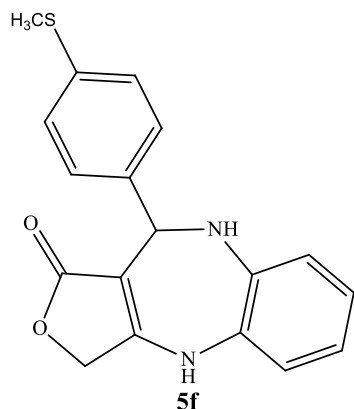
10-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5c): 0,0696 g (0,21 mmol), 86%, pf.: 265°C. ¹H RMN (400 MHz DMSO-d₆) δ (ppm) 9,77 (s, 1H, NH); 8,75 (s, 1H, OH); 6,87 (d, 1H arom, *J* = 7,6 Hz); 6,85 (s, 1H arom); 6,77-6,66 (m, 2H arom); 6,61 (d, 1H arom, *J* = 7,3 Hz); 6,52 (d, 1H arom, *J* = 8,0 Hz); 6,38 (d, 1H arom, *J* = 8,0 Hz); 5,96 (d, 1H, NH, *J* = 4,0 Hz); 4,97 (d, 1H, *J* = 4,0 Hz); 4,88 (s, 2H, CH₂); 3,64 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172,84; 158,70; 147,18; 145,09; 137,62; 134,75; 131,64; 122,93; 122,77; 120,59; 119,33; 119,02; 114,55; 111,78; 97,05; 65,94; 57,00; 55,41. m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₇O₄N₂: 325,1189, encontrado: 325,1184.



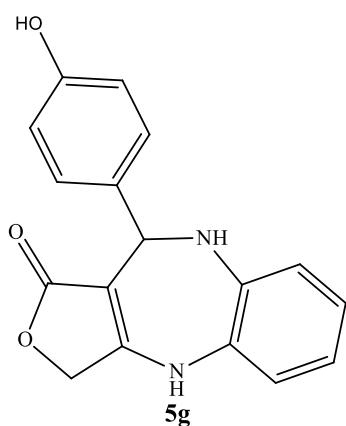
10-(3,4,5-trimetoxifenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5d): 0,0823 g (0,22 mmol), 85%, pf.: 270-275°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9,81, (s, 1H, NH); 6,88 (d, 1H arom, *J* = 7,3 Hz); 6,76-6,67 (m, 2H arom); 6,63 (d, 1H arom, *J* = 7,3 Hz); 6,39 (s, 2H arom); 5,98 (d, 1H, NH, *J* = 4,4 Hz); 4,95 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz); 4,88 (d, 1H, CH₂, *J* = 15,2 Hz); 4,84 (d, 1H, CH₂, *J* = 15,2 Hz); 3,55 (s, 6H, 2CH₃); 3,53 (s, 3H, CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172,85; 158,71; 152,28; 139,55; 137,50; 136,00; 131,43; 122,92; 120,71; 119,42; 104,59; 96,67; 65,98; 59,86; 57,38; 55,61. m/z [M+H]⁺ calculado para C₂₀H₂₁O₅N₂: 369,14513, encontrado: 369,1444.



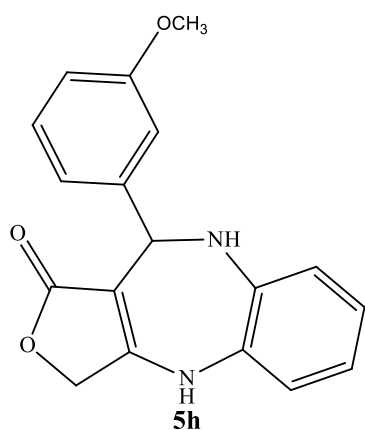
10-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5e): 0,0764 g (0,24mmol), 91%, pf.: 295-297°C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 9,82 (s, 1H, NH); 6,88 (dd, 1H arom, *J* = 1,8 Hz, *J* = 7,5 Hz); 6,77-6,68 (m, 4H arom); 6,61 (dd, 1H arom, *J* = 1,7 Hz, *J* = 7,4 Hz); 6,56 (dd, 1H arom, *J* = 1,5 Hz, *J* = 8,0 Hz); 6,00 (d, 1H, NH, *J* = 4,5 Hz); 5,92 (s, 2H, CH₂); 4,97 (d, 1H, *J* = 4,4 Hz); 4,91 (d, 1H, CH₂, *J* = 15,1 Hz); 4,86 (d, 1H, CH₂, *J* = 15,1 Hz). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) 172,73; 158,87; 146,96; 145,74; 137,72; 137,23; 131,54; 122,92; 122,81; 120,74; 120,14; 119,45; 107,55; 107,50; 100,72; 96,71; 66,00; 56,99. m/z [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₁₅O₄N₂: 323,10415, encontrado: 323,1027.



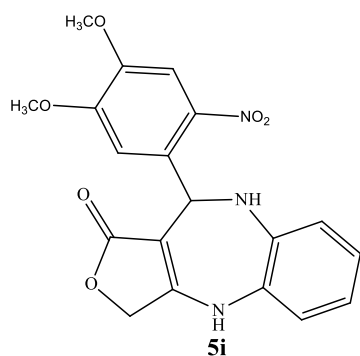
10-(4-(metiltio)fenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5f): 0,0760 g (0,23 mmol), 90%, pf.: 282-287°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 9,85 (s, 1H, NH); 7,07 (s, 4H arom); 6,89 (dd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz); 6,74 (ddd, 1H, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,4$ Hz); 6,70 (ddd, 1H, $J = 1,8$ Hz, $J = 7,7$ Hz); 6,60 (dd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz); 6,07 (d, 1H, NH, $J = 4,5$ Hz); 5,01 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz); 4,89 (s, 2H, CH_2); 2,39 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,74; 158,78; 140,41; 137,19; 136,04; 131,46; 127,65; 125,52; 122,91; 122,81; 120,72; 119,49; 96,54; 66,02; 56,81; 14,57. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$: 325,1009, encontrado: 325,1005.



10-(4-hidróxifenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5g): 0,0587 g (0,19 mmol), 76%, pf.: 295-297°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,83 (s, 1H, NH); 9,22 (s, 1H, OH); 7,00-6,94 (m, 1H arom); 6,89 (dd, 1H arom, (dd, 1H arom, $J = 1,8$ Hz, $J = 7,5$ Hz); 6,77-6,67 (m, 2H arom); 6,63-6,56 (m, 2H arom); 6,53-6,48 (m, 2H arom); 6,03 (d, 1H, NH, $J = 4,5$ Hz); 4,94 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz); 4,90 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,5$ Hz); 4,86 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,5$ Hz). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,79; 158,55; 156,91; 145,19; 137,30; 131,24; 128,81; 122,80; 122,72; 120,50; 119,43; 117,89; 114,16; 113,39; 96,76; 65,97; 57,16. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_2$: 295,10835, encontrado: 295,1078.



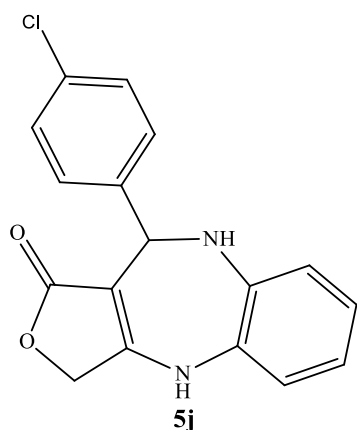
10-(3-metoxifenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5h): 0,0761 g (0,24 mmol), 93%, pf.: 241°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,84 (s, 1H, NH); 7,09 (t, 1H arom, $J = 7,9$ Hz); 6,89 (dd, 1H arom, $J = 1,6$ Hz, $J = 7,6$ Hz); 6,77-6,65 (m, 5H, arom); 6,61 (dd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 1,5$ Hz); 6,08 (d, 1H, NH, $J = 4,5$ Hz); 5,02 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz); 4,92 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz); 4,87 (d, 1H, $J = 15,4$ Hz); 3,64 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,79; 158,97; 158,75; 145,29; 137,29; 131,37; 128,90; 122,87; 122,77; 120,64; 119,46; 119,25; 113,18; 111,61; 96,57; 66,00; 57,13; 54,76. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}_2$: 309,12401 encontrado: 309,1233.



10-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-

b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5i): 0,0736 g (0,19 mmol), 73%, pf.: 229°C.

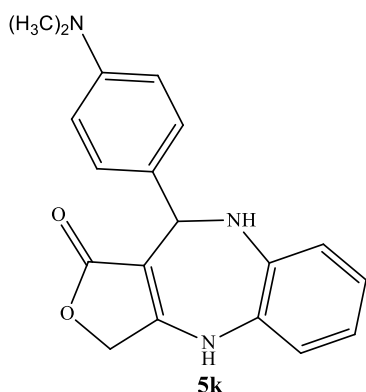
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10,09 (s, 1H, NH); 7,57 (s, 1H arom); 7,03 (d, 1H arom, $J = 7,4$ Hz); 6,86 (t, 1H arom, $J = 7,0$ Hz); 6,74 (t, 1H arom, $J = 7,0$ Hz); 6,61 (d, 1H arom, $J = 7,6$ Hz); 6,26 (s, 1H arom); 5,81 (d, 1H, NH, $J = 4,0$ Hz); 5,59 (d, 1H, $J = 4,1$ Hz); 4,97 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,2$ Hz); 4,93 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,2$ Hz); 3,81 (s, 3H, CH_3); 3,40 (s, 3H, CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 172,39; 159,70; 151,88; 146,93; 140,83; 136,28; 132,44; 131,93; 123,68; 123,44; 121,68; 119,53; 109,77; 107,90; 95,99; 66,17; 55,42; 52,81. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}_3$: 384,11964, encontrado: 384,1196.



10-(4-clorofenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-

b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5j): 0,0578 g (0,18 mmol), 71%, pf.: >300°C.

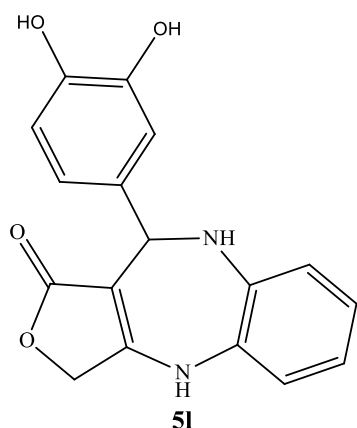
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,89 (s, 1H, NH); 7,298-7,23 (m, 2H arom); 7,17-7,13 (m, 2H arom); 6,90 (d, 1H, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,8$ Hz); 6,75 (ddd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,2$ Hz, $J = 7,5$ Hz); 6,70 (ddd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,4$ Hz, $J = 7,6$ Hz); 6,59 (dd, 1H arom, $J = 1,5$ Hz, $J = 7,7$ Hz); 6,10 (d, 1H, NH, $J = 4,5$ Hz); 5,06 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz); 4,90 (s, 2H, CH_2). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,69; 159,03; 142,62; 136,95; 131,58; 131,15; 128,86; 127,90; 123,01; 122,83; 120,93; 119,57; 96,15; 66,09; 56,68.



10-(4-(dimetilamino)fenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-

b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5k): 0,0745 g (0,23 mmol), 89%, pf.: 264-268°C.

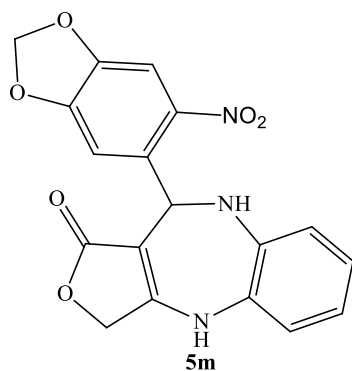
^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,76 (s, 1H, NH); 6,94 (dl, 2H arom, $J = 8,7$ Hz); 6,87 (dd, 1H arom, $J = 1,7$ Hz, $J = 7,5$ Hz); 6,75-6,65 (m, 2H arom); 6,59 (dd, 1H arom, $J = 1,6$ Hz, $J = 7,5$ Hz); 6,53 (dl, 2H arom, $J = 8,8$ Hz); 5,95 (d, 1H, NH, $J = 4,5$ Hz); 4,95 (d, 1H, $J = 4,3$ Hz); 4,87 (s, 2H, CH_2); 2,79 (s, 6H, 2CH_3). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,79; 158,42; 149,44; 137,63; 131,48; 131,44; 127,67; 122,83; 122,70; 120,41; 119,33; 111,89; 97,35; 65,90; 56,66. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_3$: 322,1557, encontrado: 322,1550.



10-(3,4-dihidróxifenil)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-

b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5l): 0,0660 g (0,21 mmol), 81%, pf.: 245°C.

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 9,76 (s, 1H, NH); 8,70 (s, 1H, OH); 8,63 (s, 1H, OH); 6,87 (dd, 1H arom, $J = 1,6$ Hz, $J = 7,6$ Hz); 6,76-6,65 (m, 2H arom); 6,59 (dd, 1H arom, $J = 1,2$ Hz, $J = 7,4$ Hz); 6,54-6,49 (m, 2H arom); 6,39 (dd, 1H arom, $J = 1,8$ Hz, $J = 8,0$ Hz); 5,90 (d, 1H, NH, $J = 4,2$ Hz); 4,88 (d, 1H, CH_2 , $J = 4,2$ Hz); 4,88 (d, 1H, CH_2 , $J = 14,8$ Hz); 4,84 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,0$ Hz). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,79; 158,42; 144,52; 143,77; 137,52; 134,82; 131,42; 122,81; 122,71; 120,43; 119,33; 118,02; 114,95; 114,82; 97,27; 65,90; 56,84; 56,01; 18,51. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_2$: 311,10325, encontrado: 311,1028.

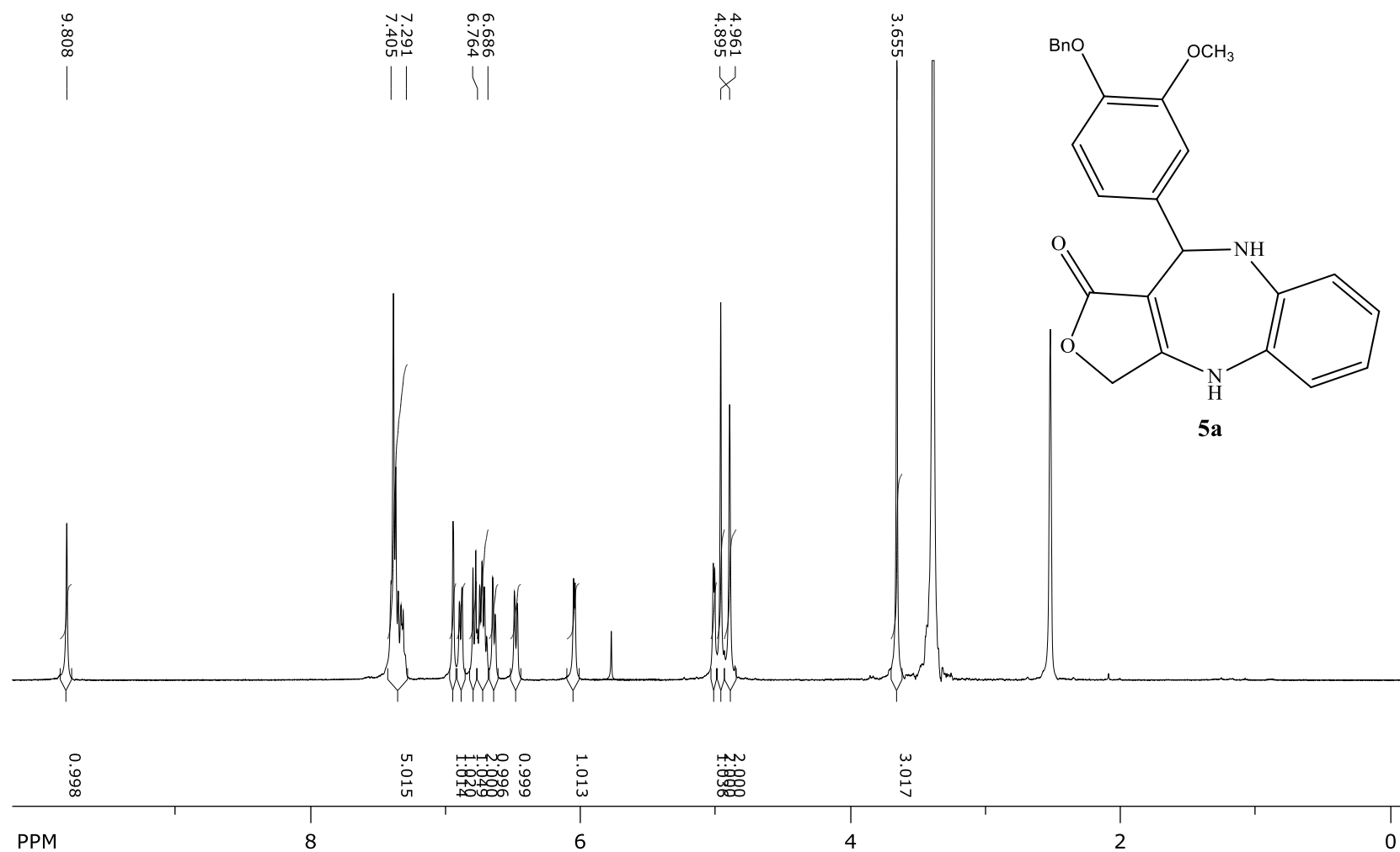


10-(6-nitrobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3,4,9,10-tetrahidro-1H-furo[3,4-

b][1,5]benzodiazepin-1-ona (5m): 0,0814 g (0,22 mmol), 84%, pf.: 275-

279°C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 10,03 (s, 1H, NH); 7,59 (s, 1H arom); 6,97 (d, 1H arom, $J = 7,8$ Hz); 6,82 (t, 1H arom, $J = 7,5$ Hz); 6,72 (t, 1H arom, $J = 7,5$ Hz); 6,63 (d, 1H arom, $J = 7,8$ Hz); 6,37 (s, 1H arom); 6,08 (d, 2H, CH_2 , $J = 15,0$ Hz); 5,60 (d, 1H, NH, $J = 3,9$ Hz); 5,50 (d, 1H, $J = 3,9$ Hz); 4,93 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,0$ Hz); 4,87 (d, 1H, CH_2 , $J = 15,0$ Hz). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) 172,37; 159,80; 151,01; 146,54; 142,8; 135,79; 135,08; 131,78; 123,47; 123,38; 121,75; 119,67; 106,60; 105,29; 103,30; 95,62; 66,30; 53,37. m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_6\text{N}_3$: 368,08832, encontrado: 368,0876.

Espectros de HRMS e RMN dos derivados 5a-m

**Figura 1.** Espectro de RMN de ^1H de **5a** em DMSO-d_6

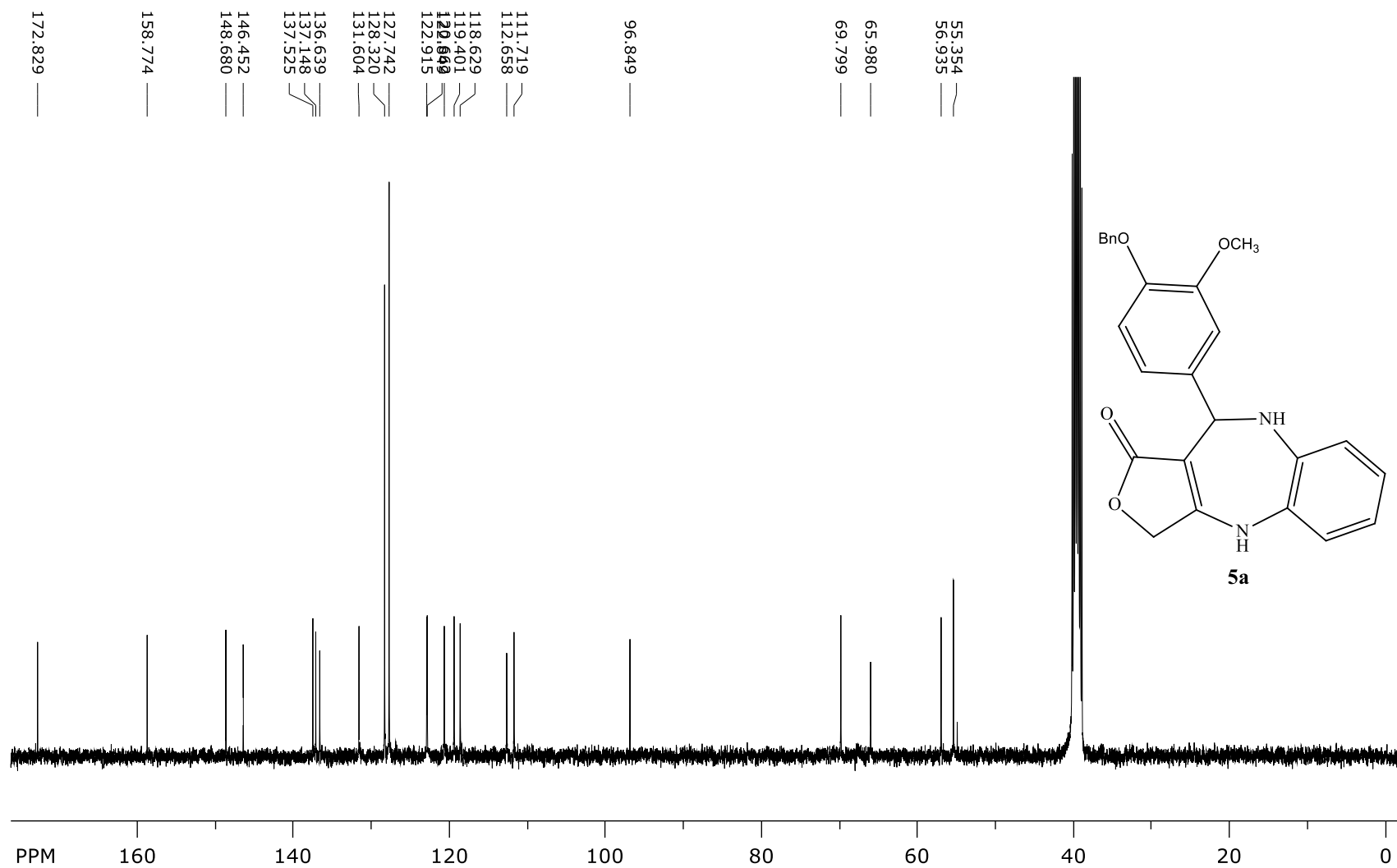


Figura 2. Espectro de RMN de ^{13}C de **5a** em DMSO-d_6

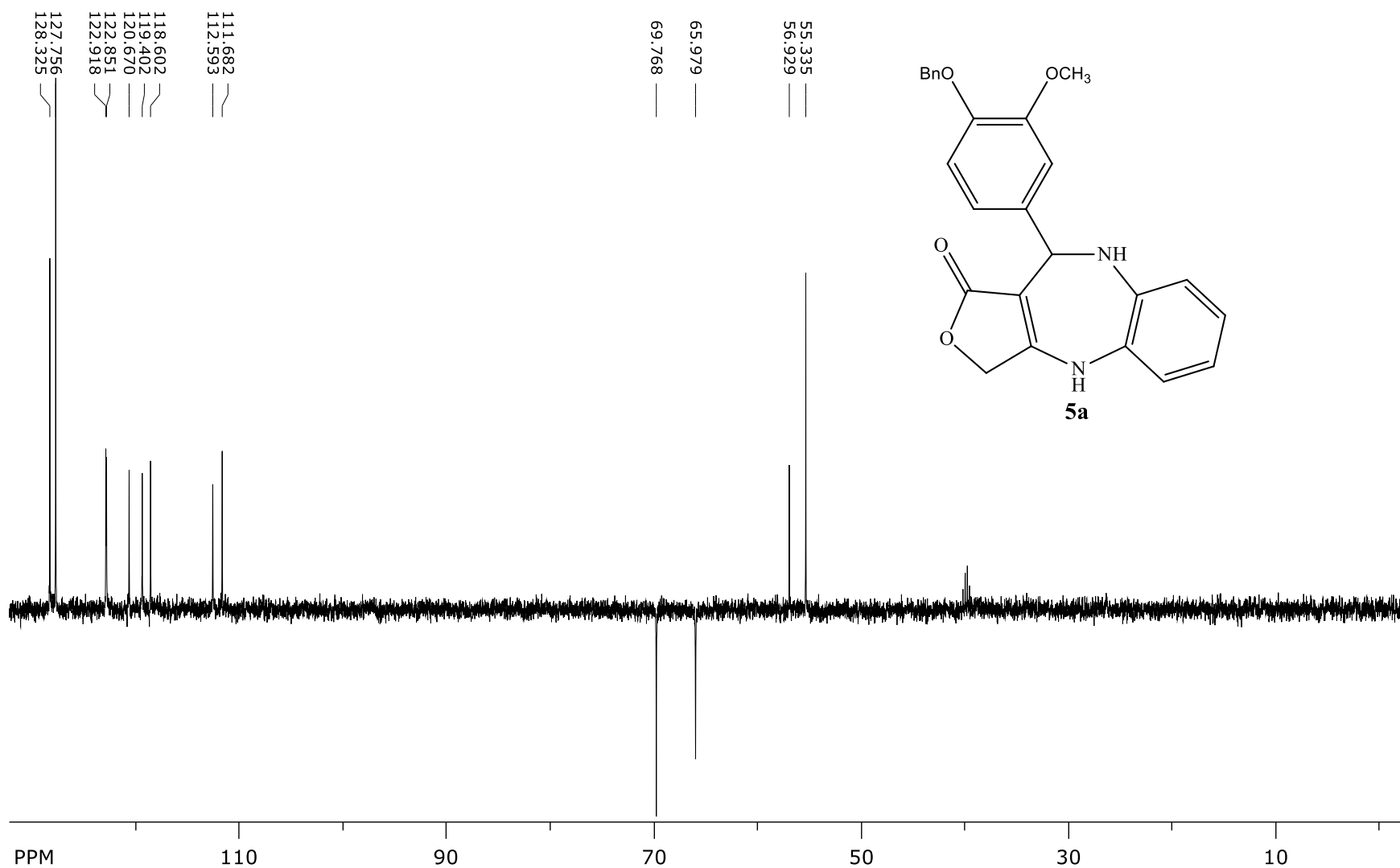


Figura 3. Espectro de RMN DEPT-135 de **5a** em DMSO-d₆

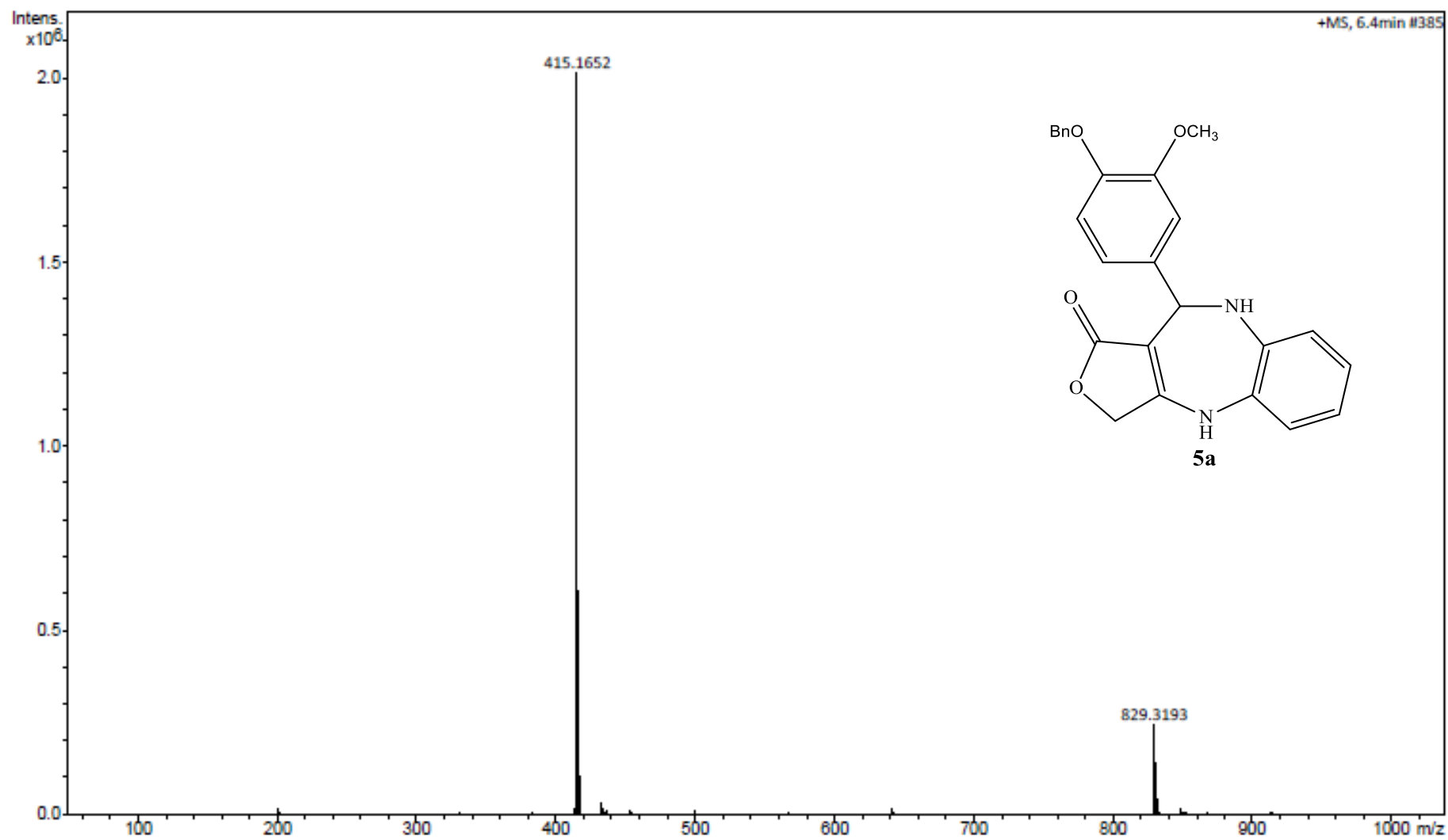


Figura 4. Espectro de HRMS de **5a**

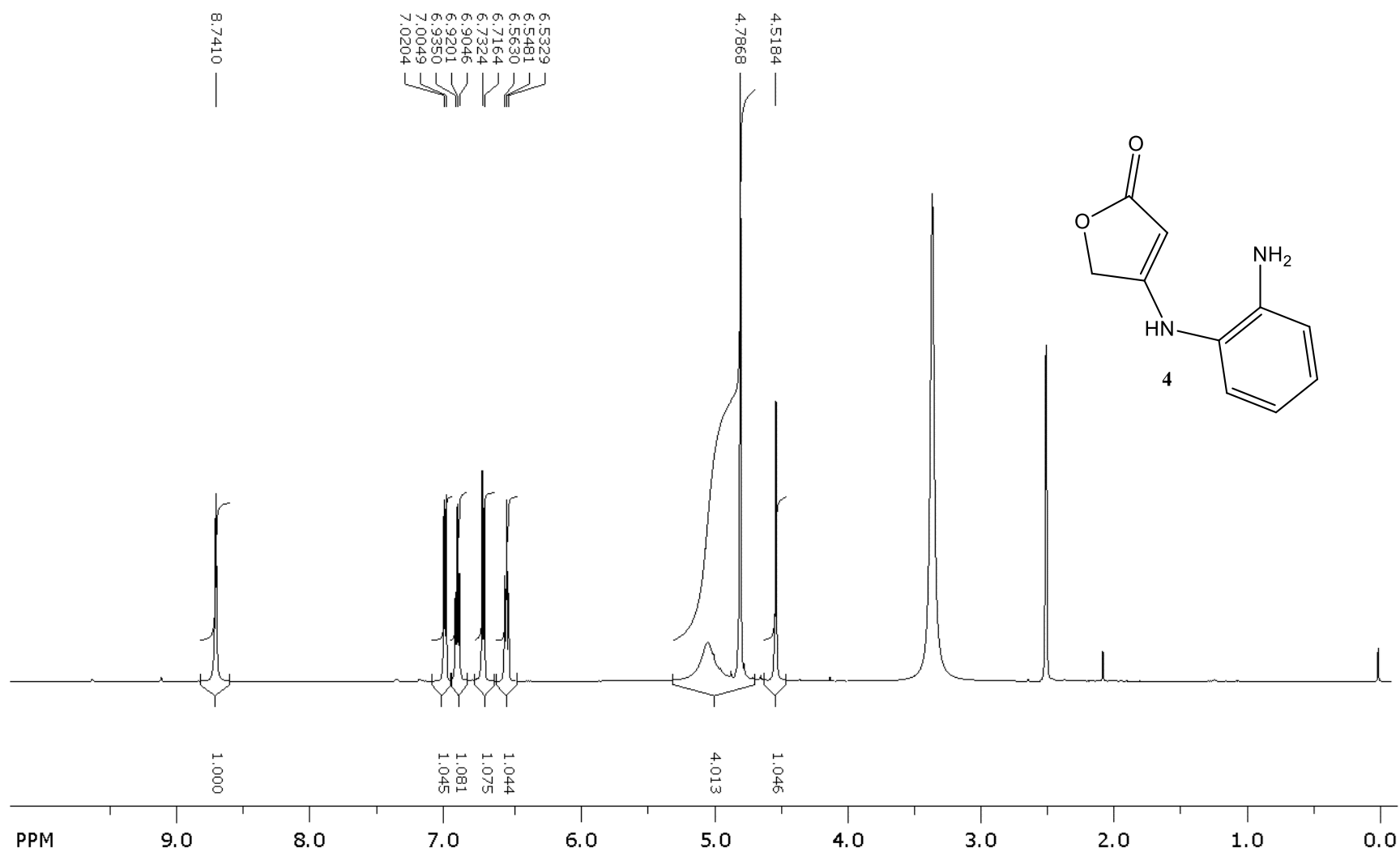


Figura 5. Espectro de RMN de ¹H de 4 em DMSO-d₆

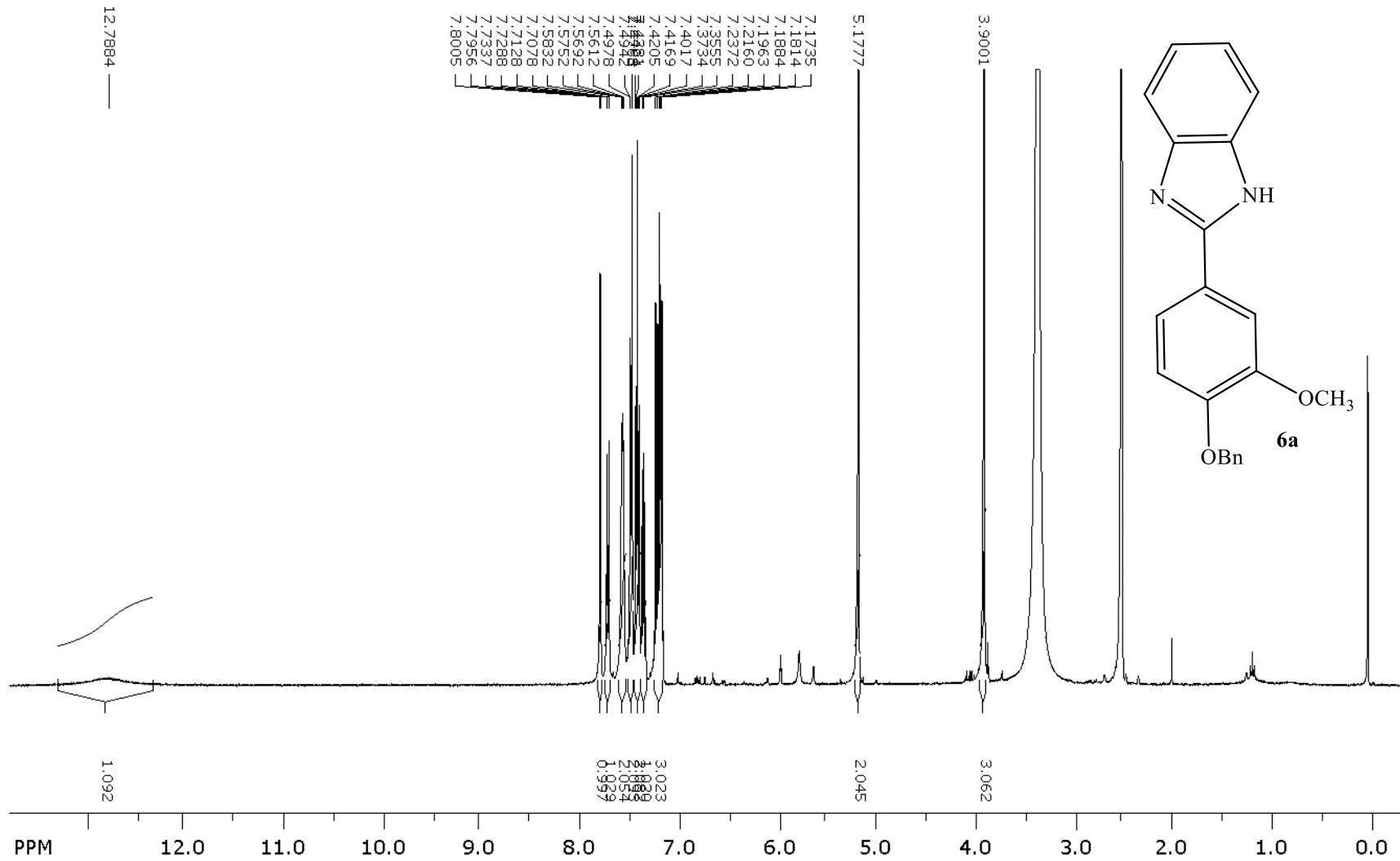


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de **6a** em DMSO- d_6

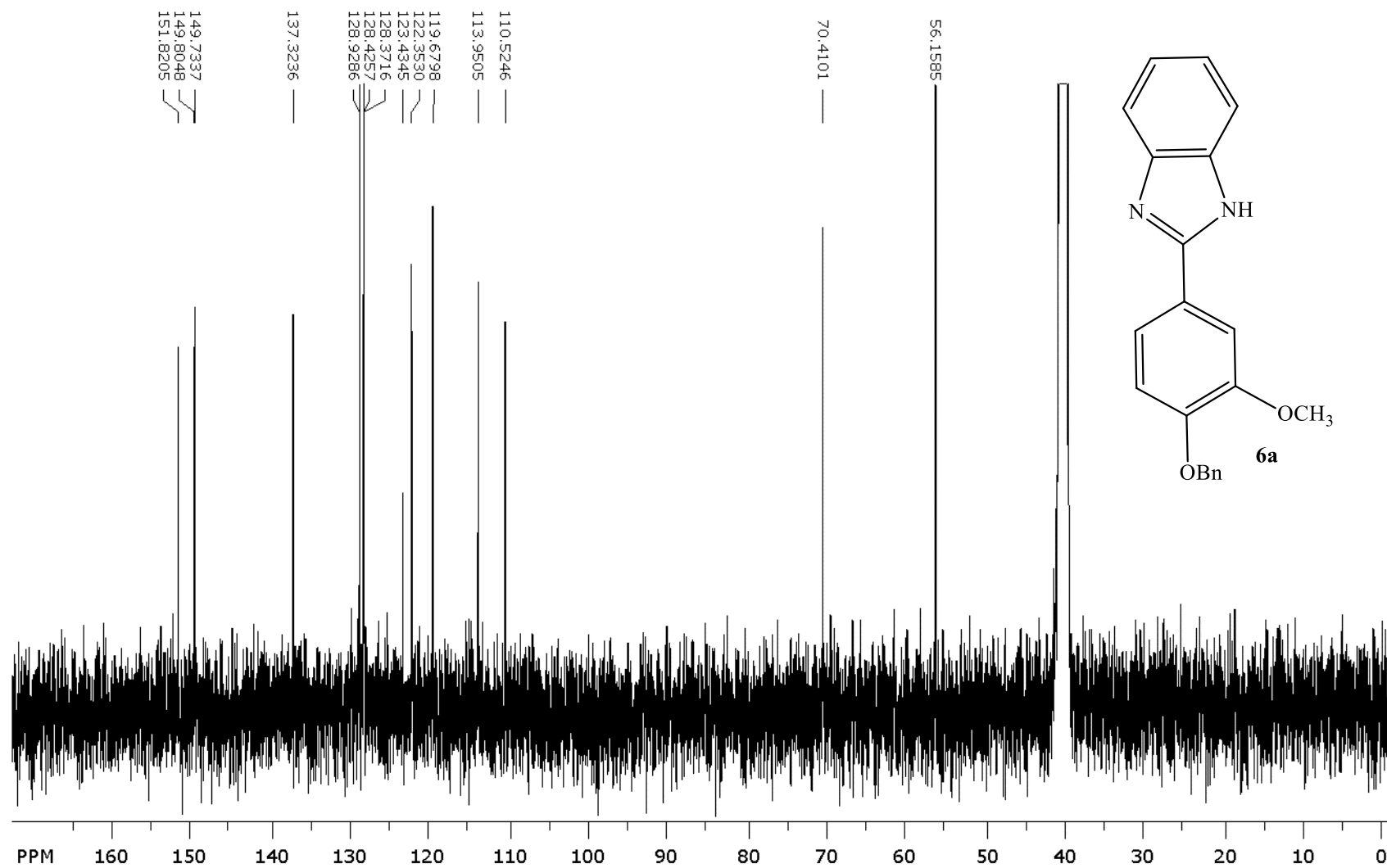


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C de **6a** em DMSO-d_6

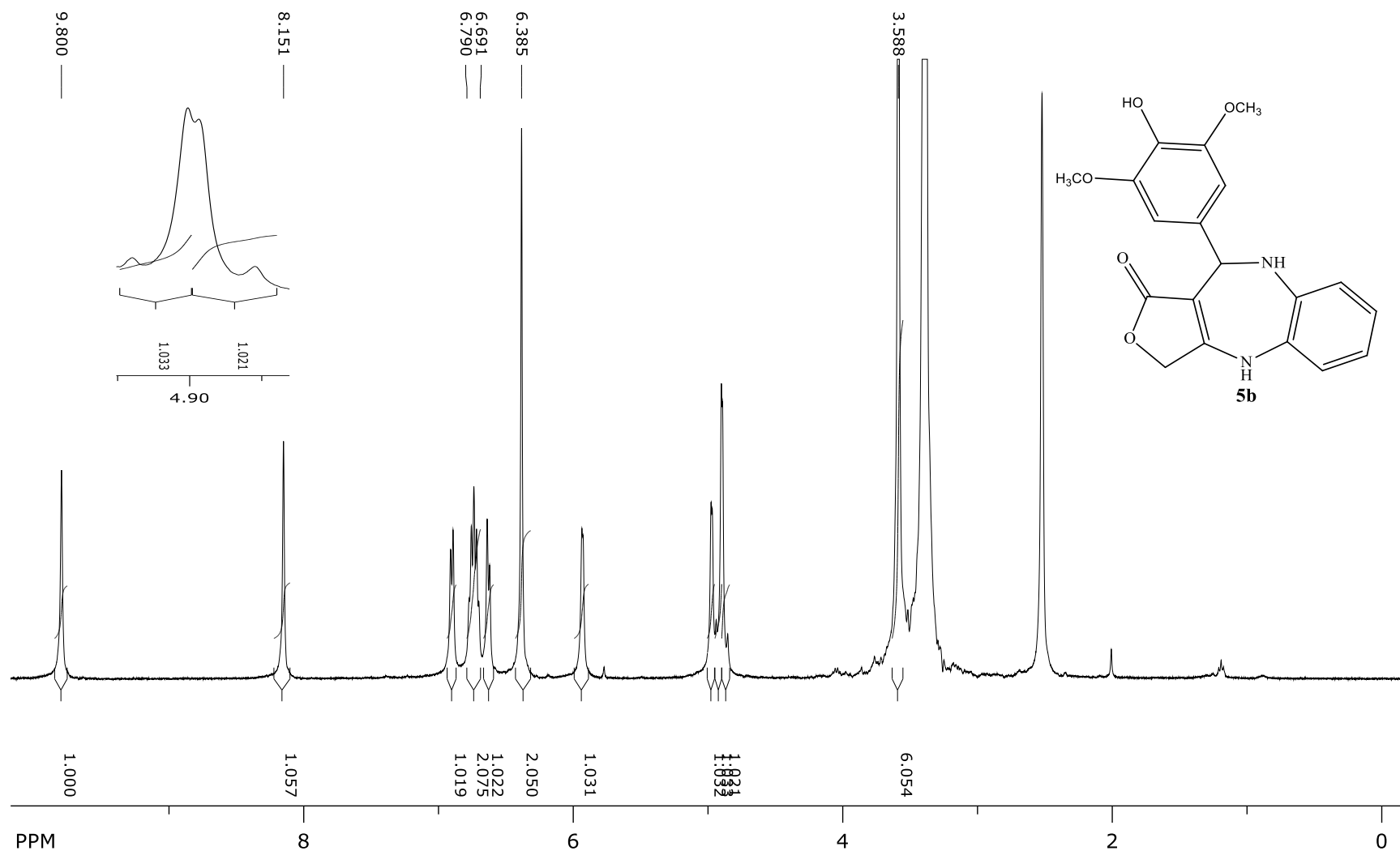


Figura 8. Espectro de RMN de ^1H de **5b** em DMSO-d_6

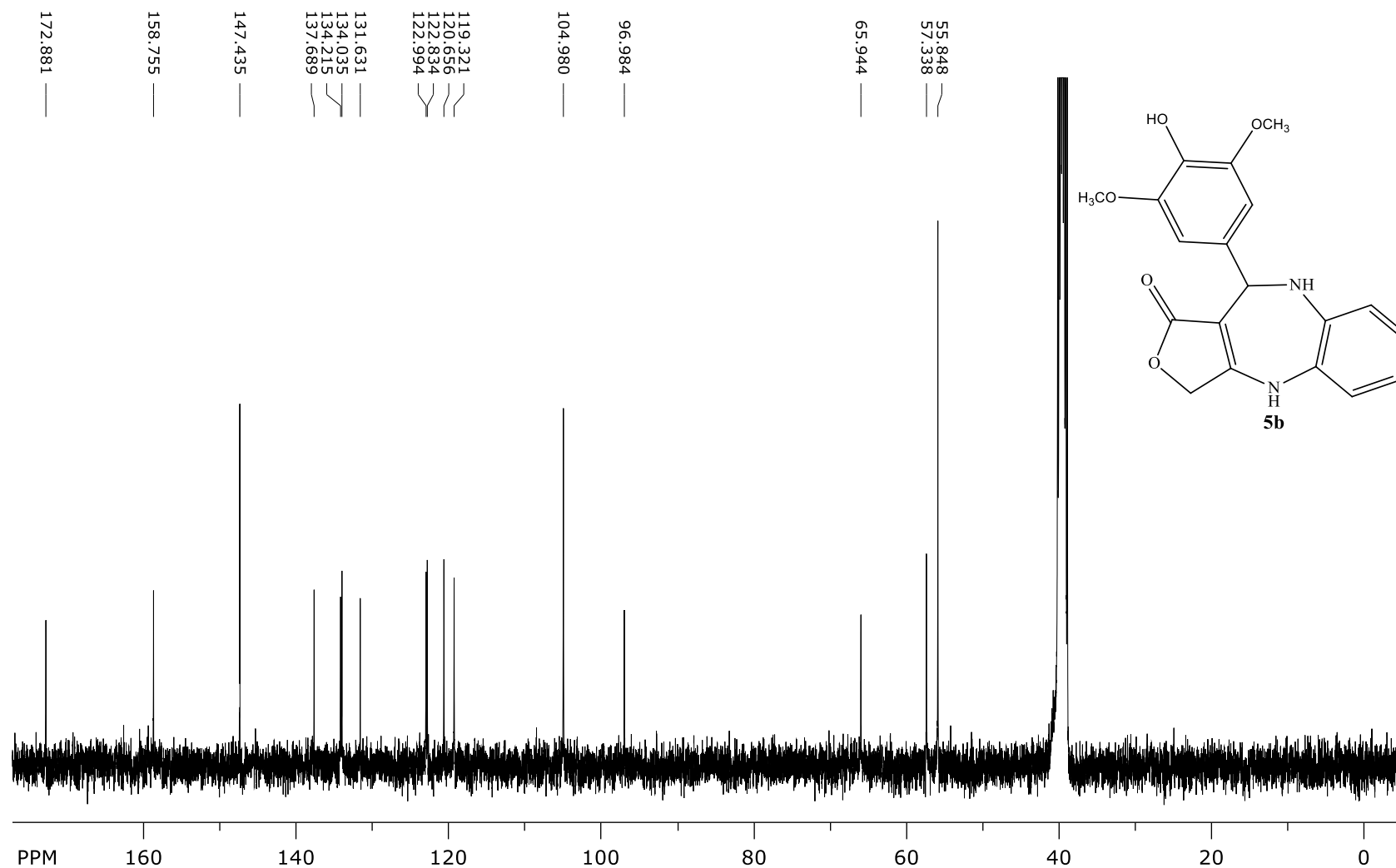


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C de **5b** em DMSO-d_6

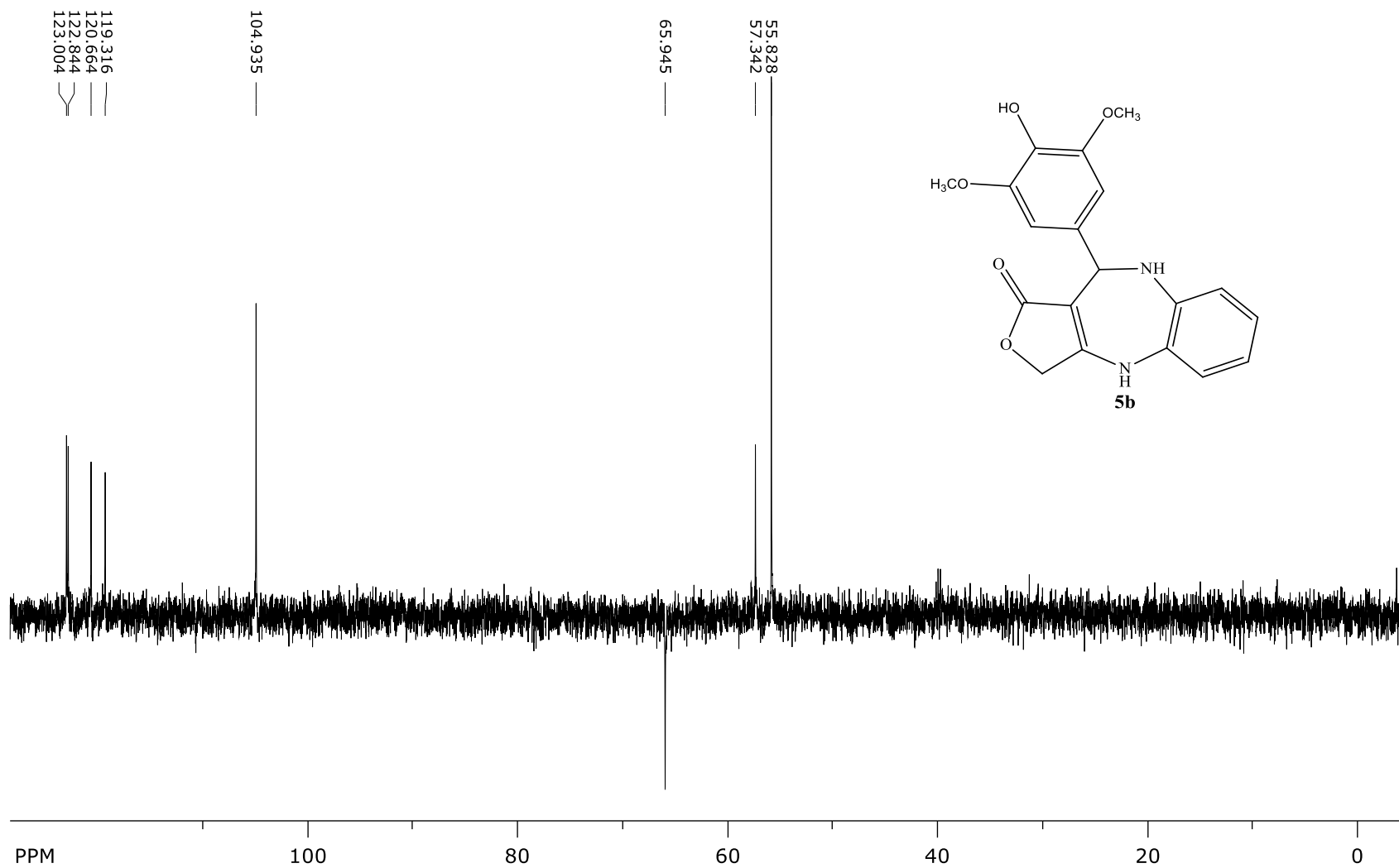


Figura 10. Espectro de RMN DEPT-135 de **5b** em DMSO-d₆

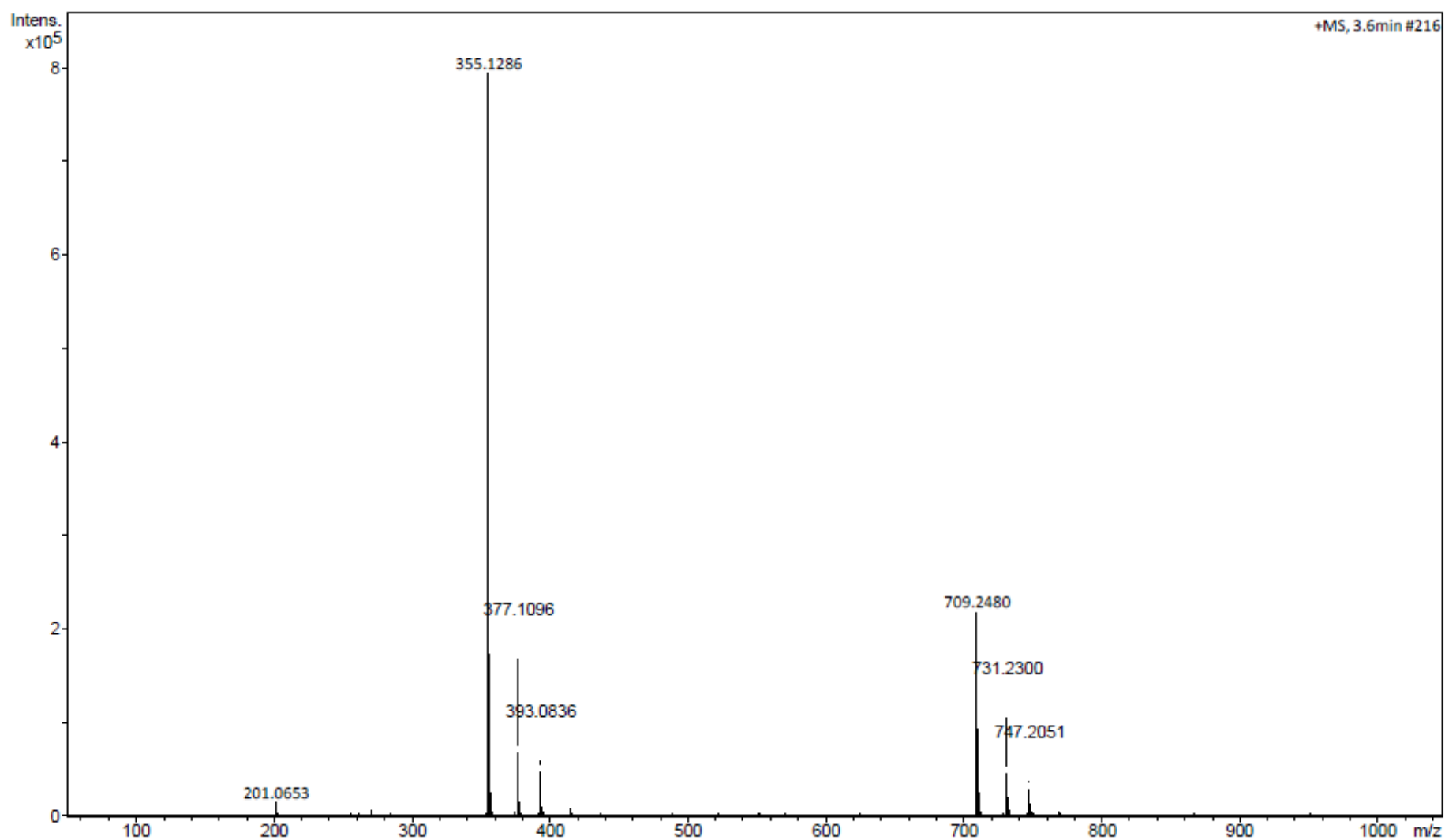


Figura 11. Espectro de HRMS de 5b

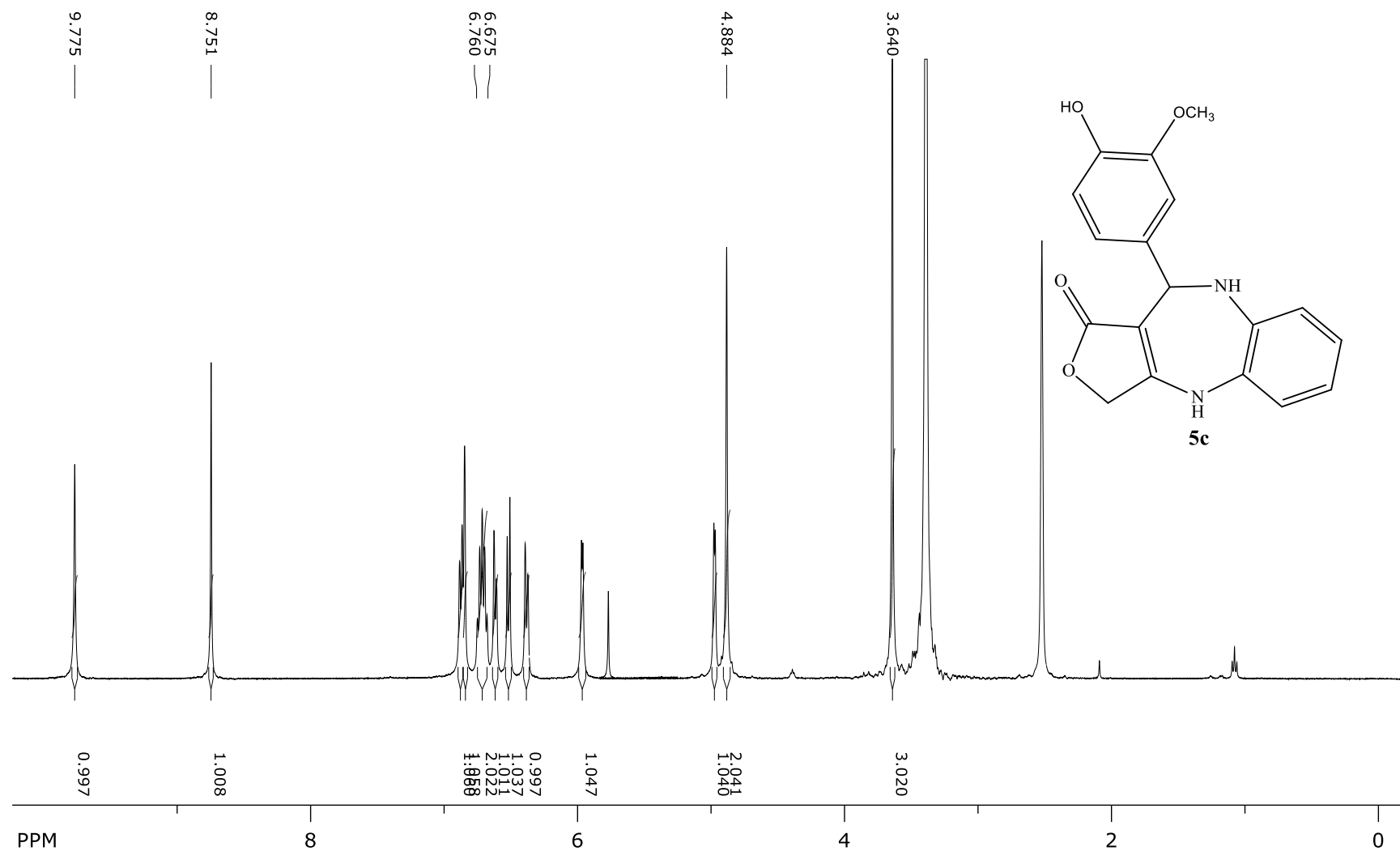


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H de **5c** em DMSO-d_6

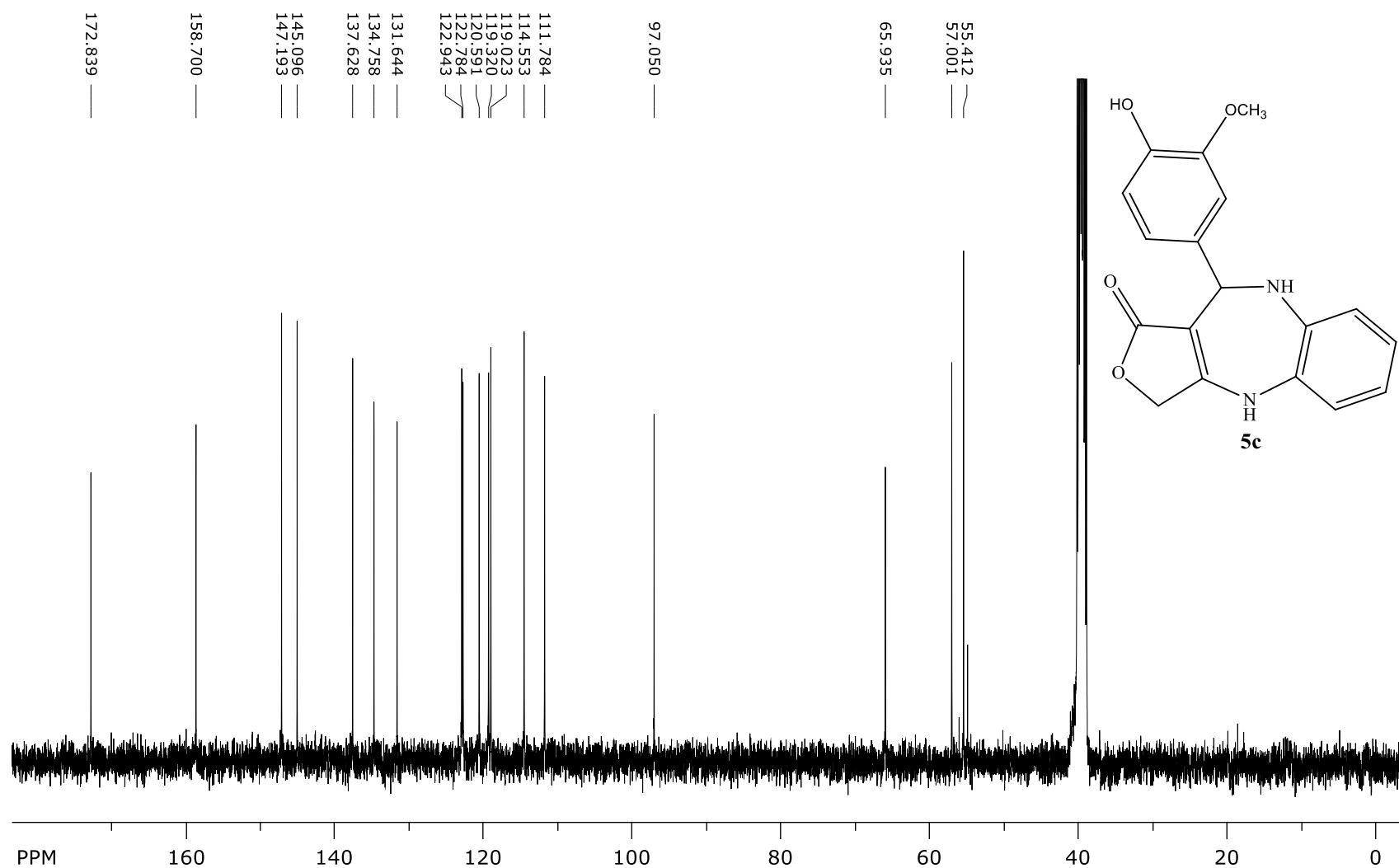


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de **5c** em DMSO-d_6

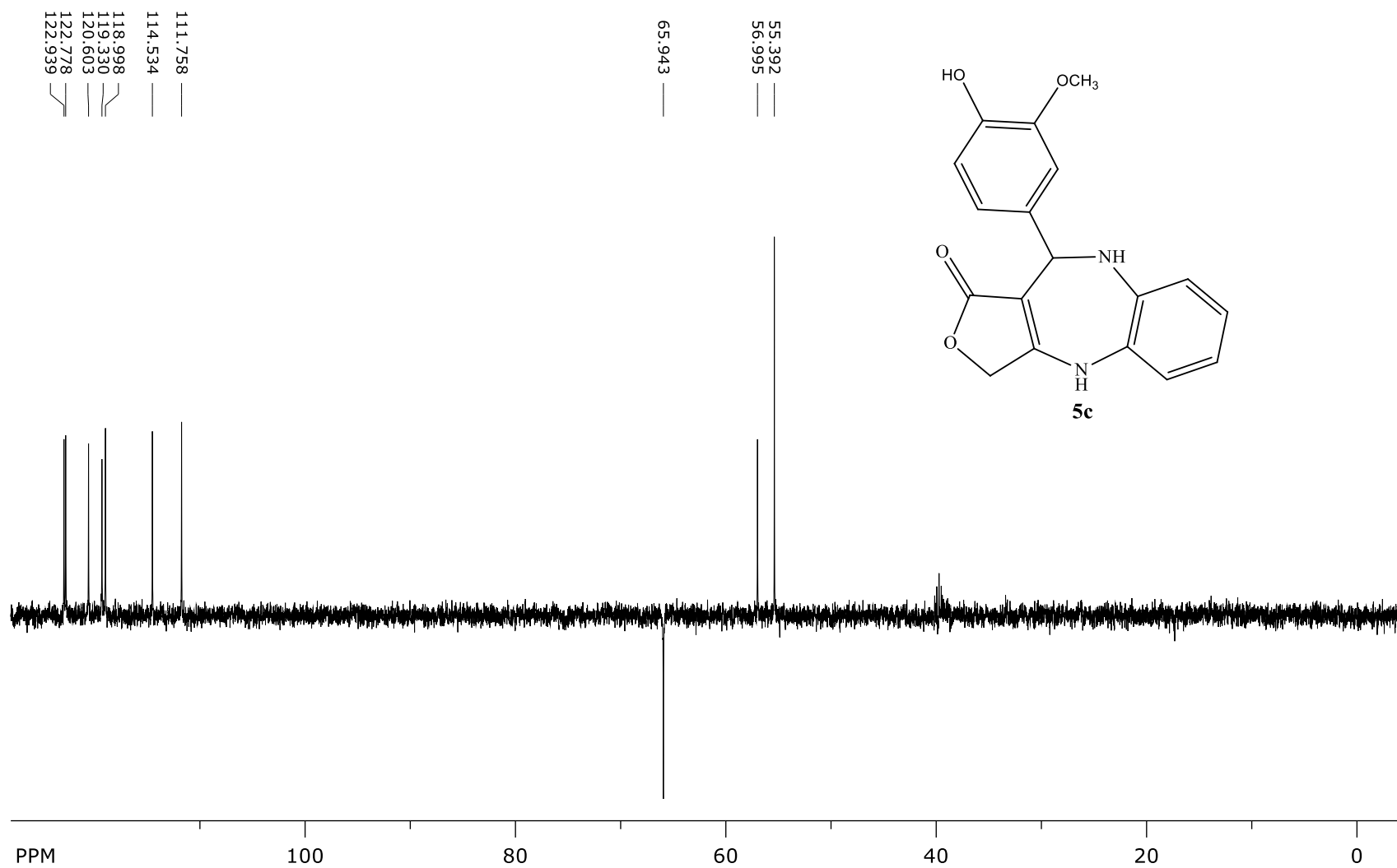


Figura 14. Espectro de RMN DEPT-135 de **5c** em DMSO-d₆

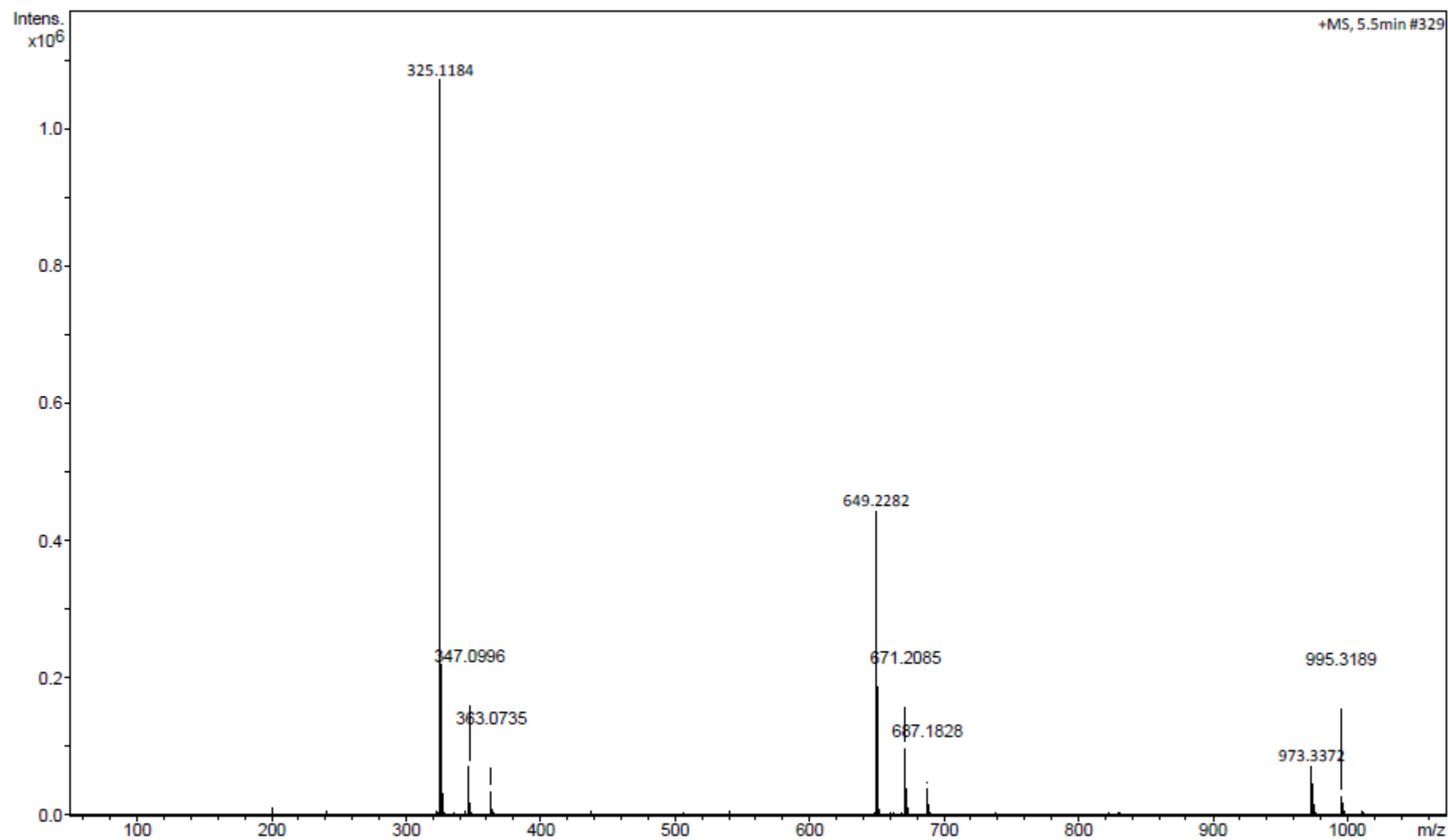


Figura 15. Espectro de HRMS de 5c

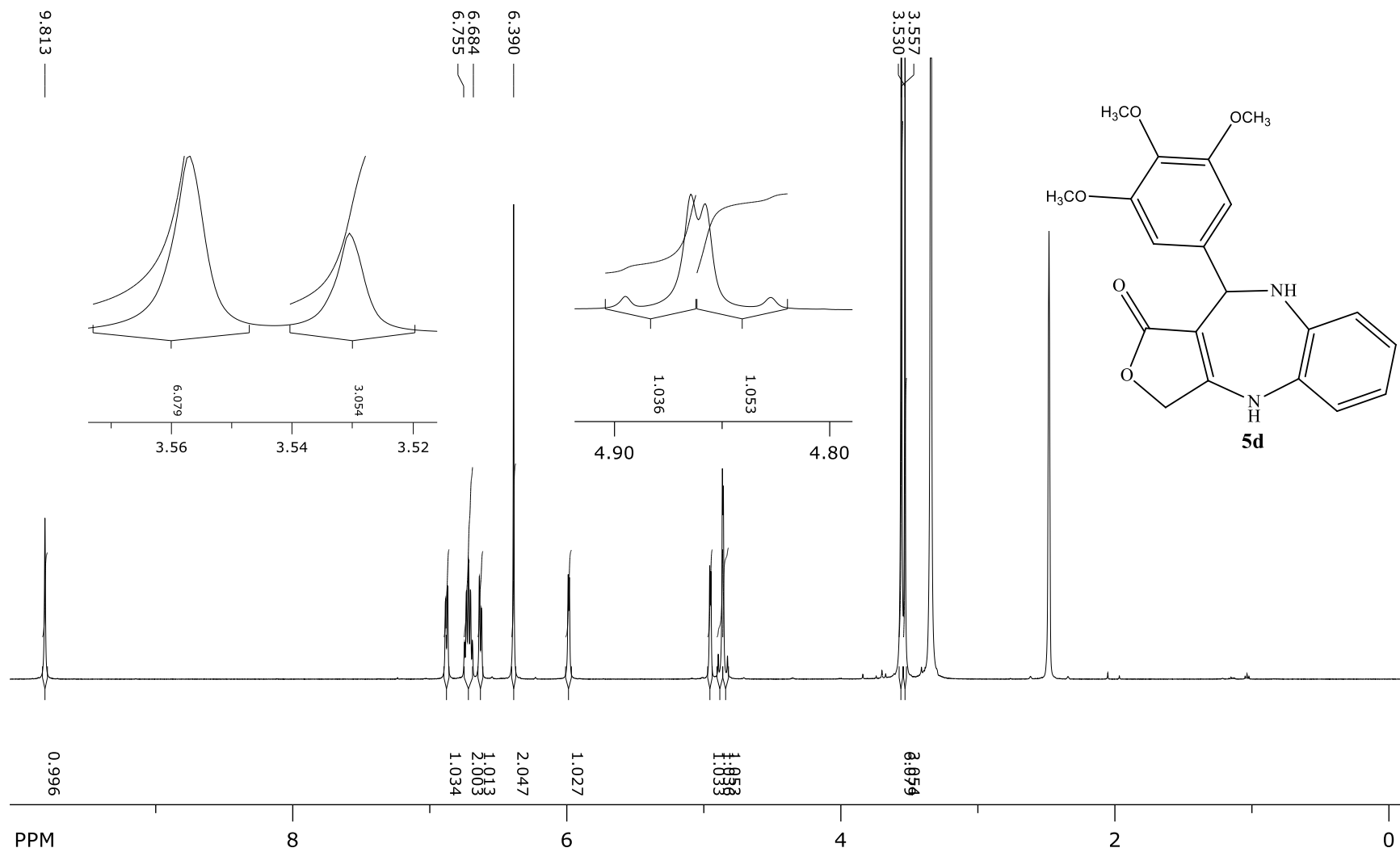


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H de **5d** em DMSO- d_6

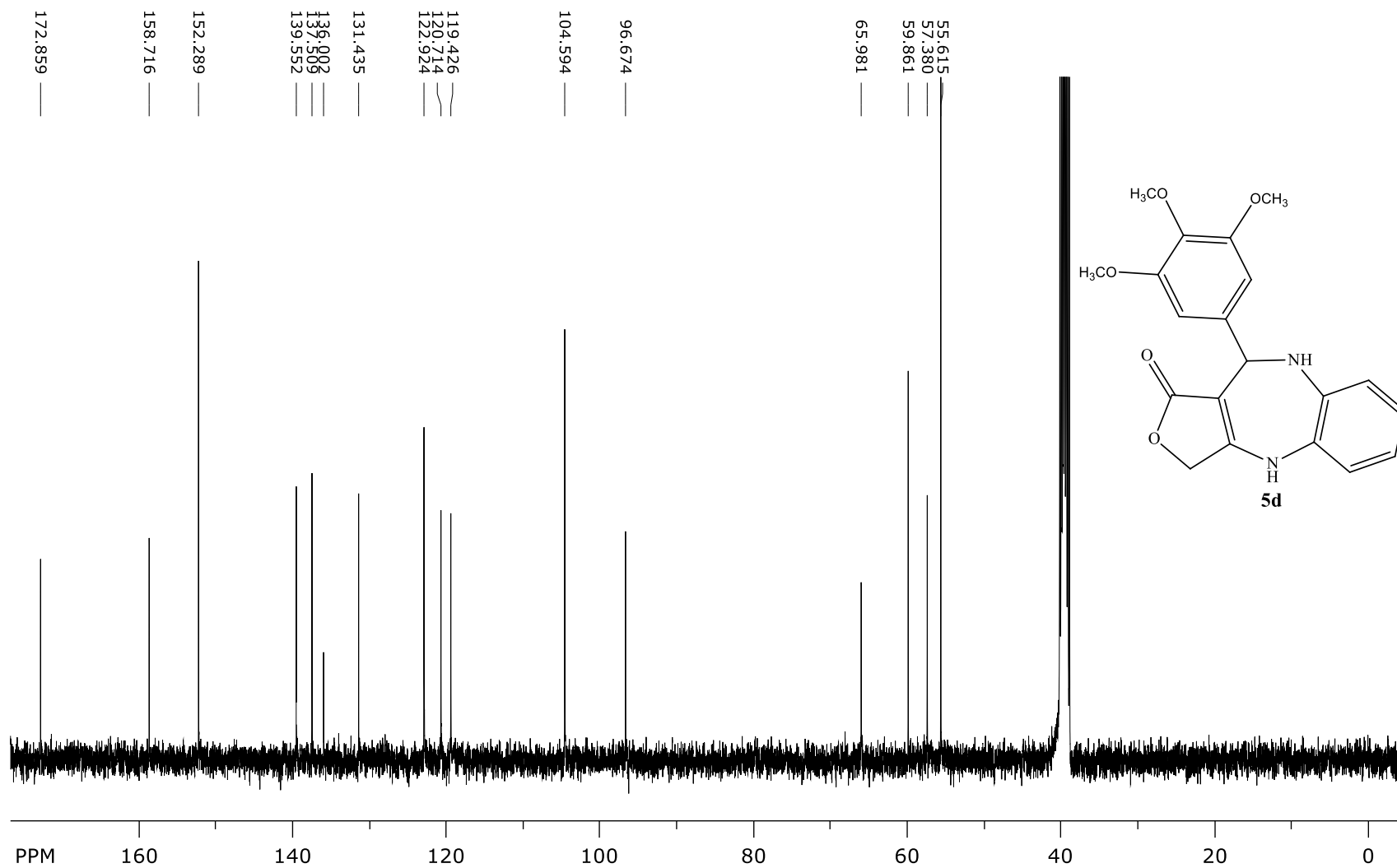


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C de **5d** em DMSO-d_6

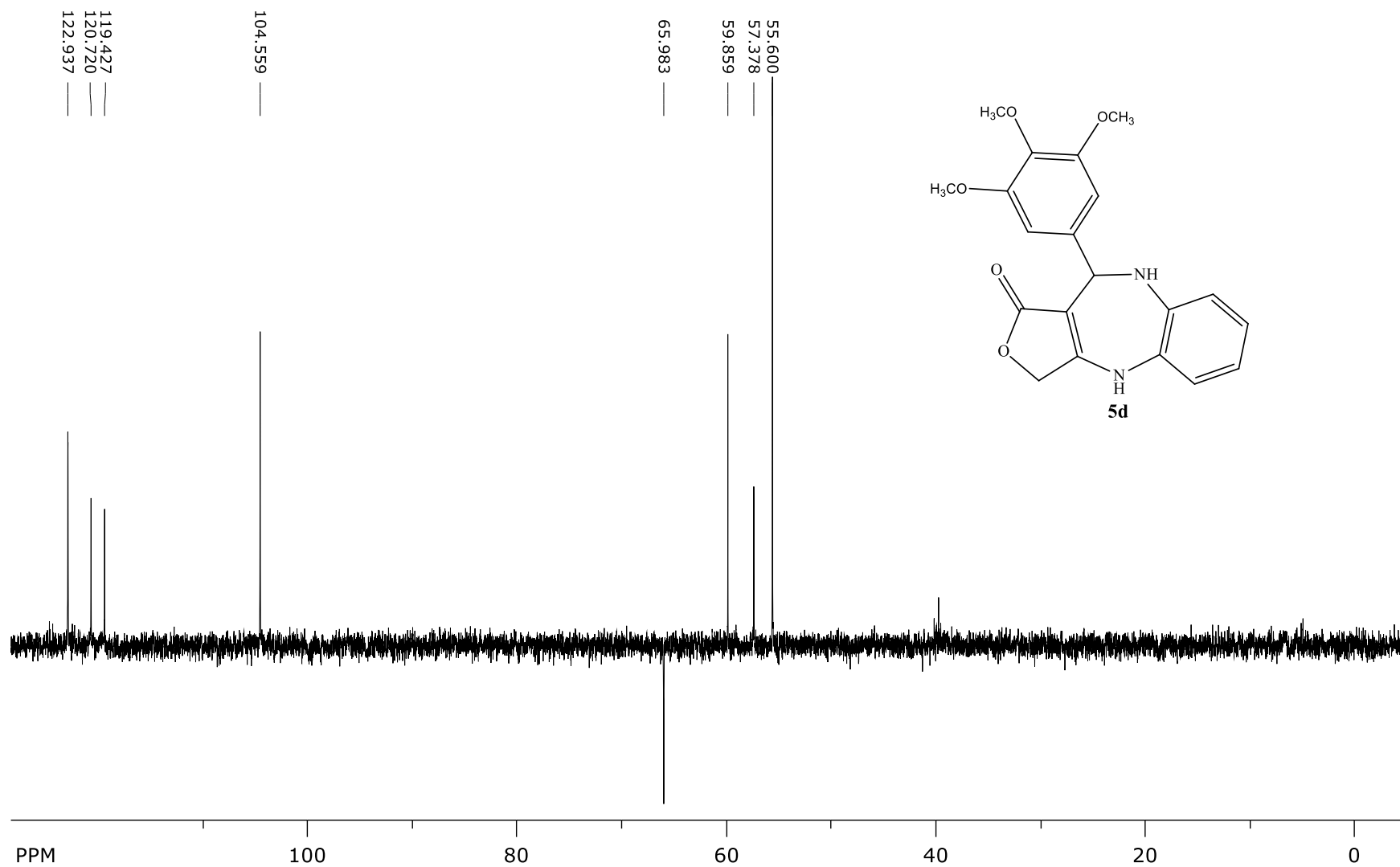


Figura 18. Espectro de RMN DEPT-135 de **5d** em DMSO-d₆

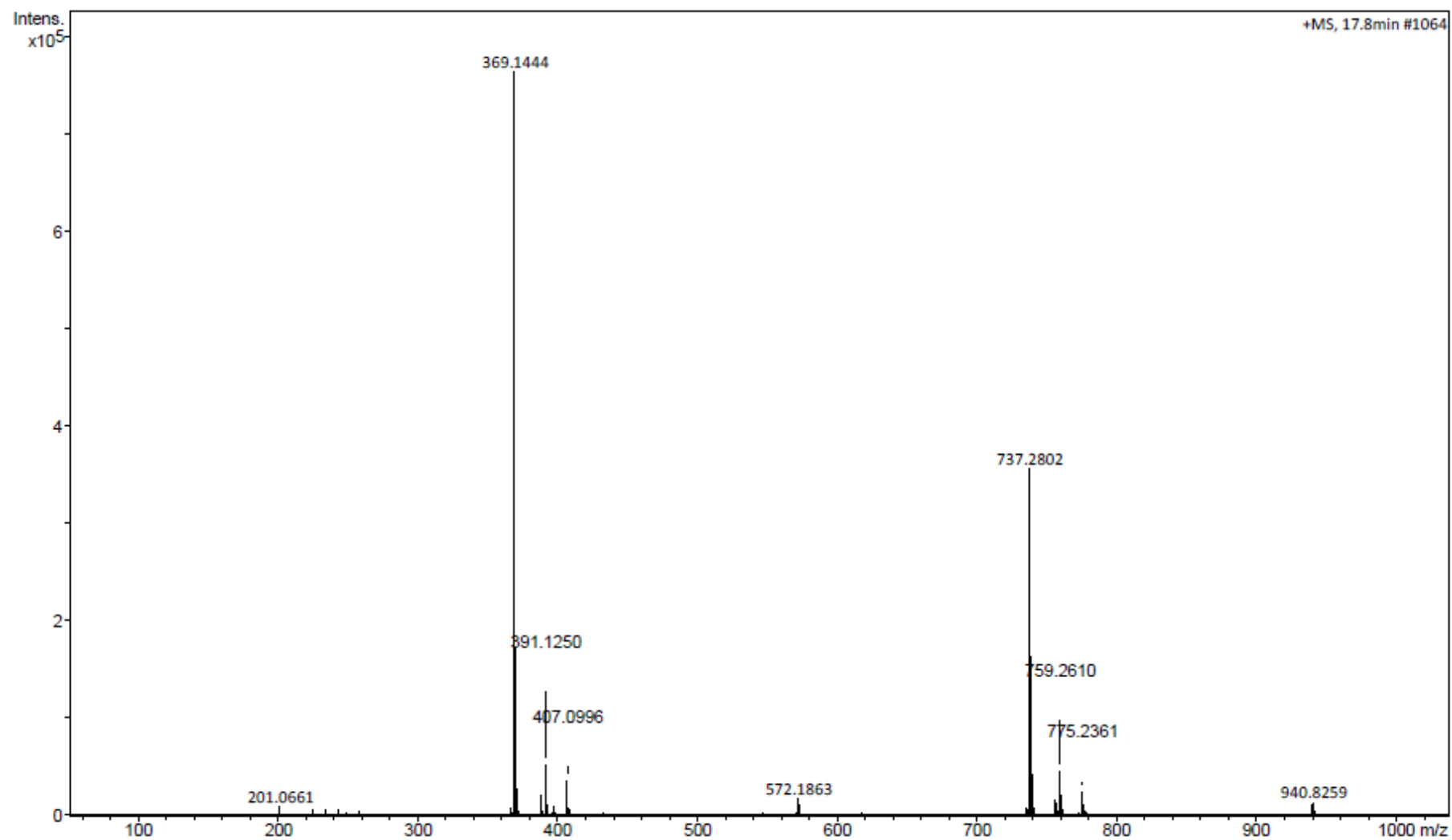


Figura 19. Espectro de HRMS de 5d

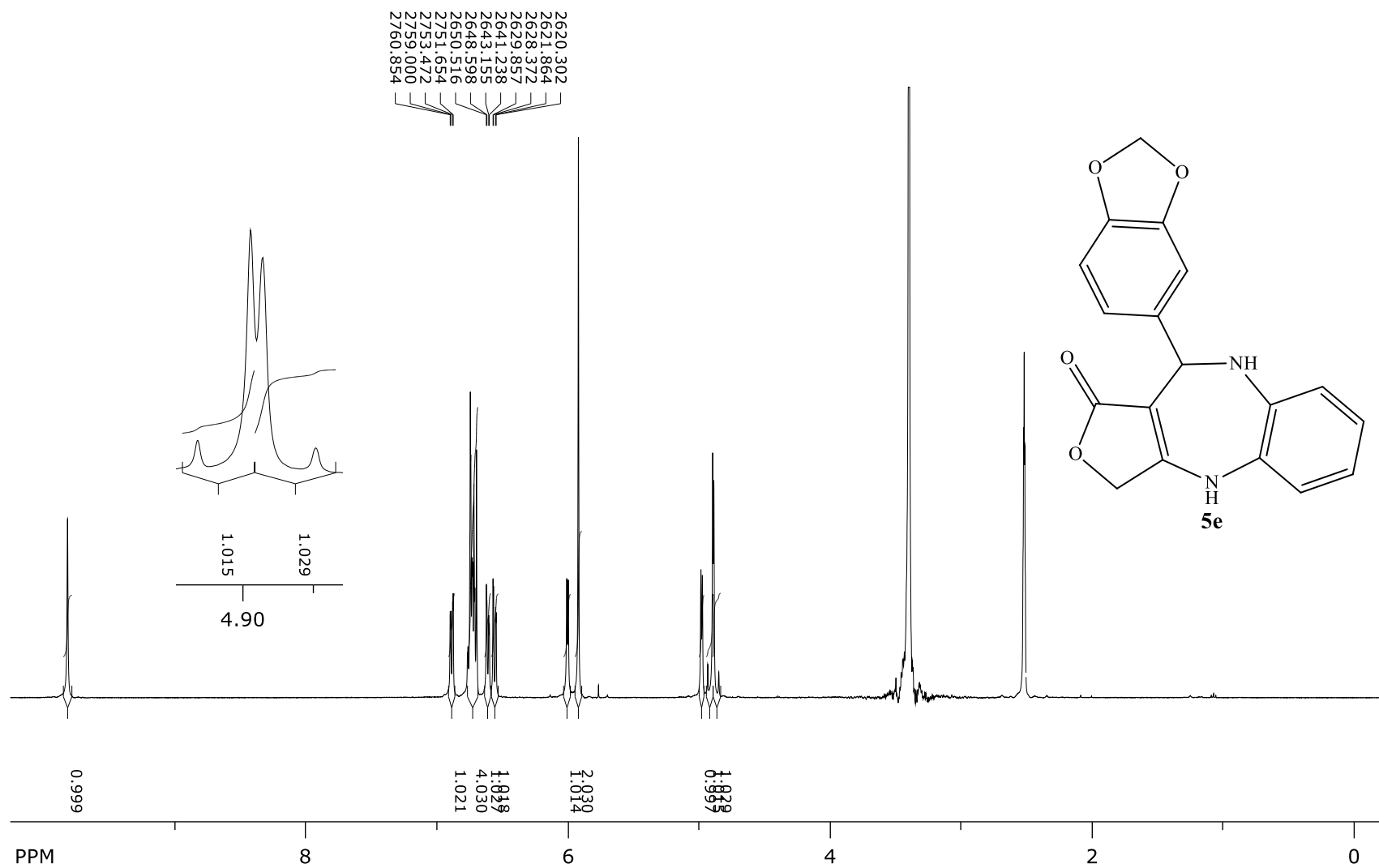


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H de **5e** em DMSO-d₆

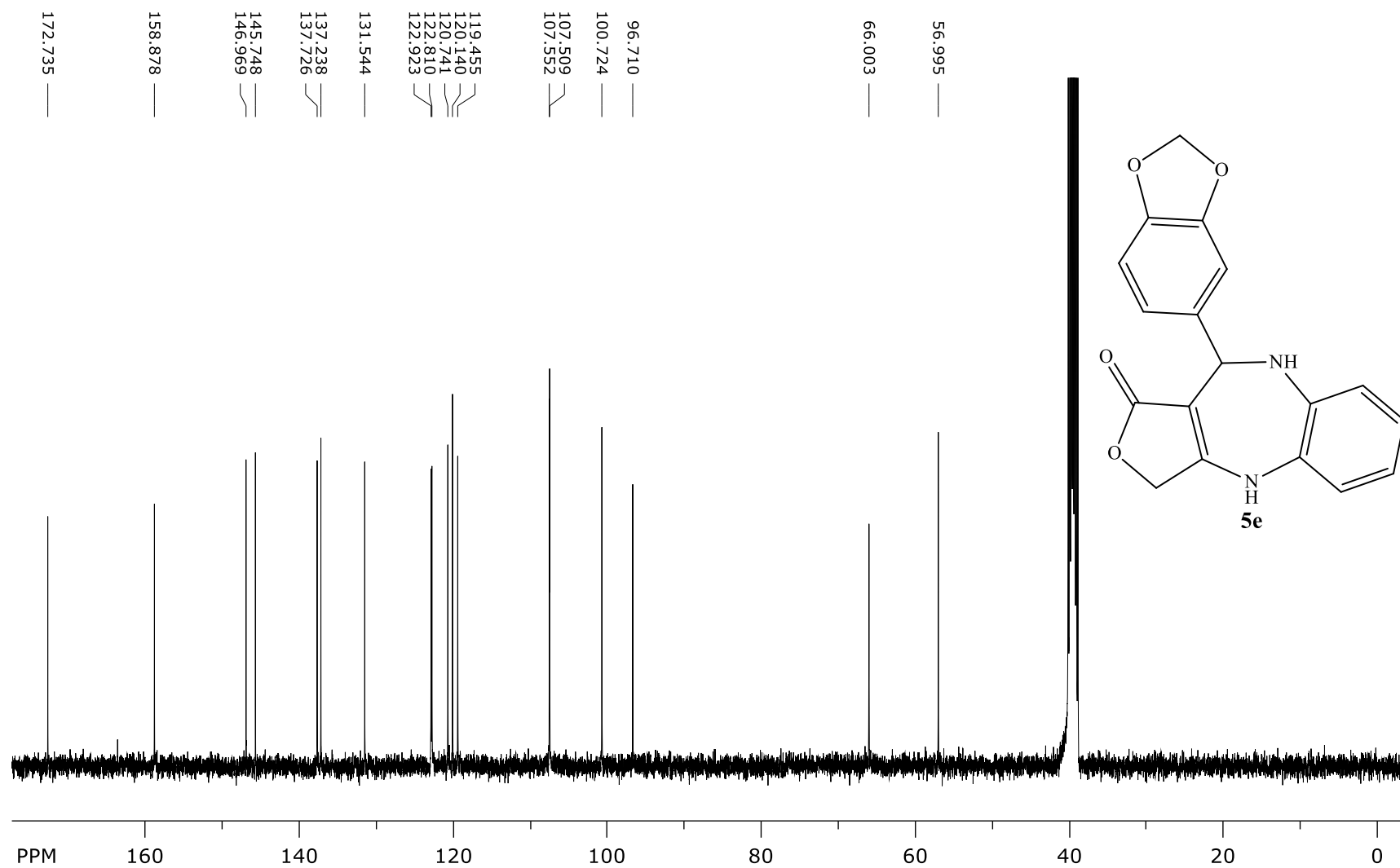


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de **5e** em DMSO-d_6

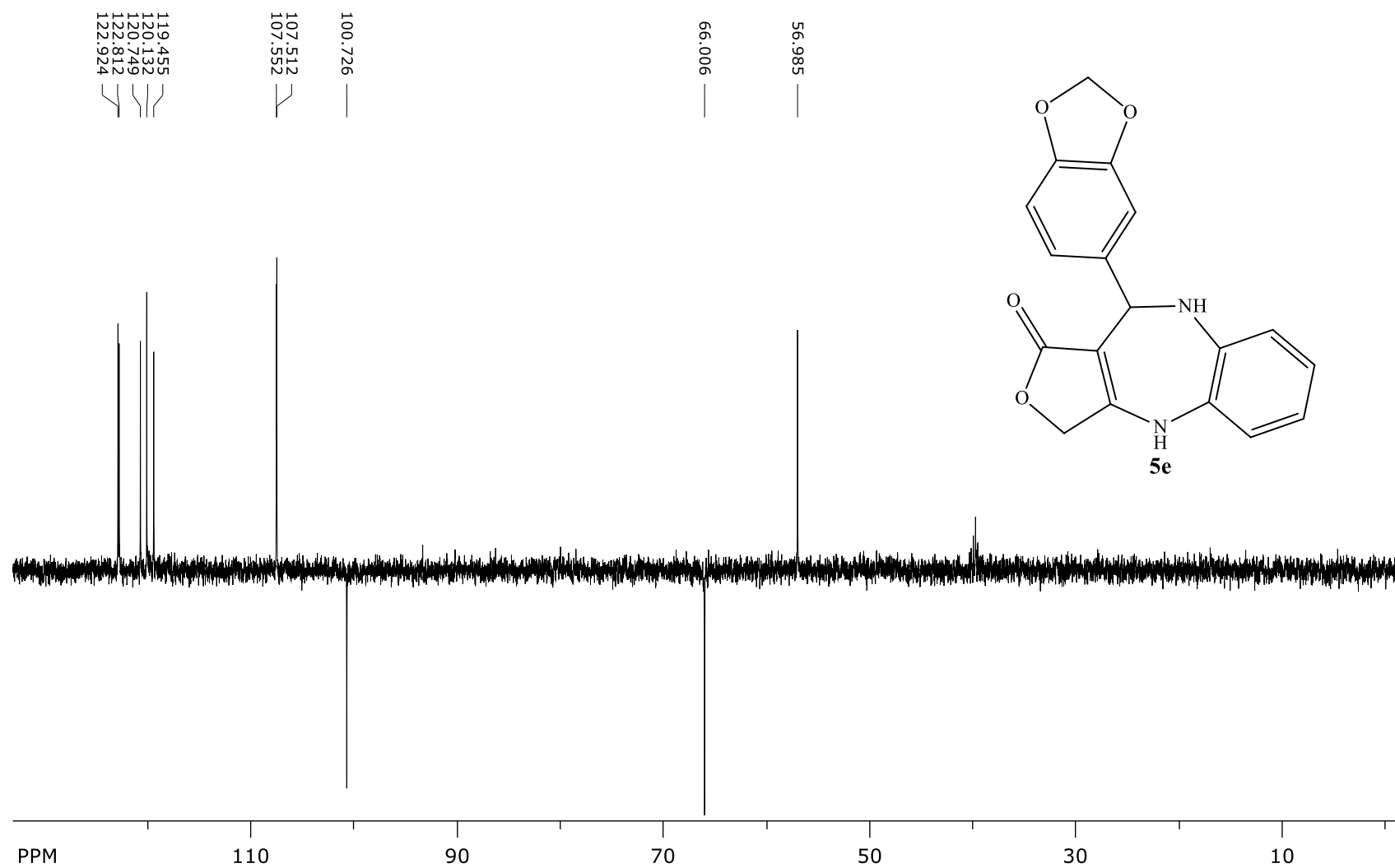


Figura 22. Espectro de RMN DEPT-135 de **5e** em DMSO-d₆

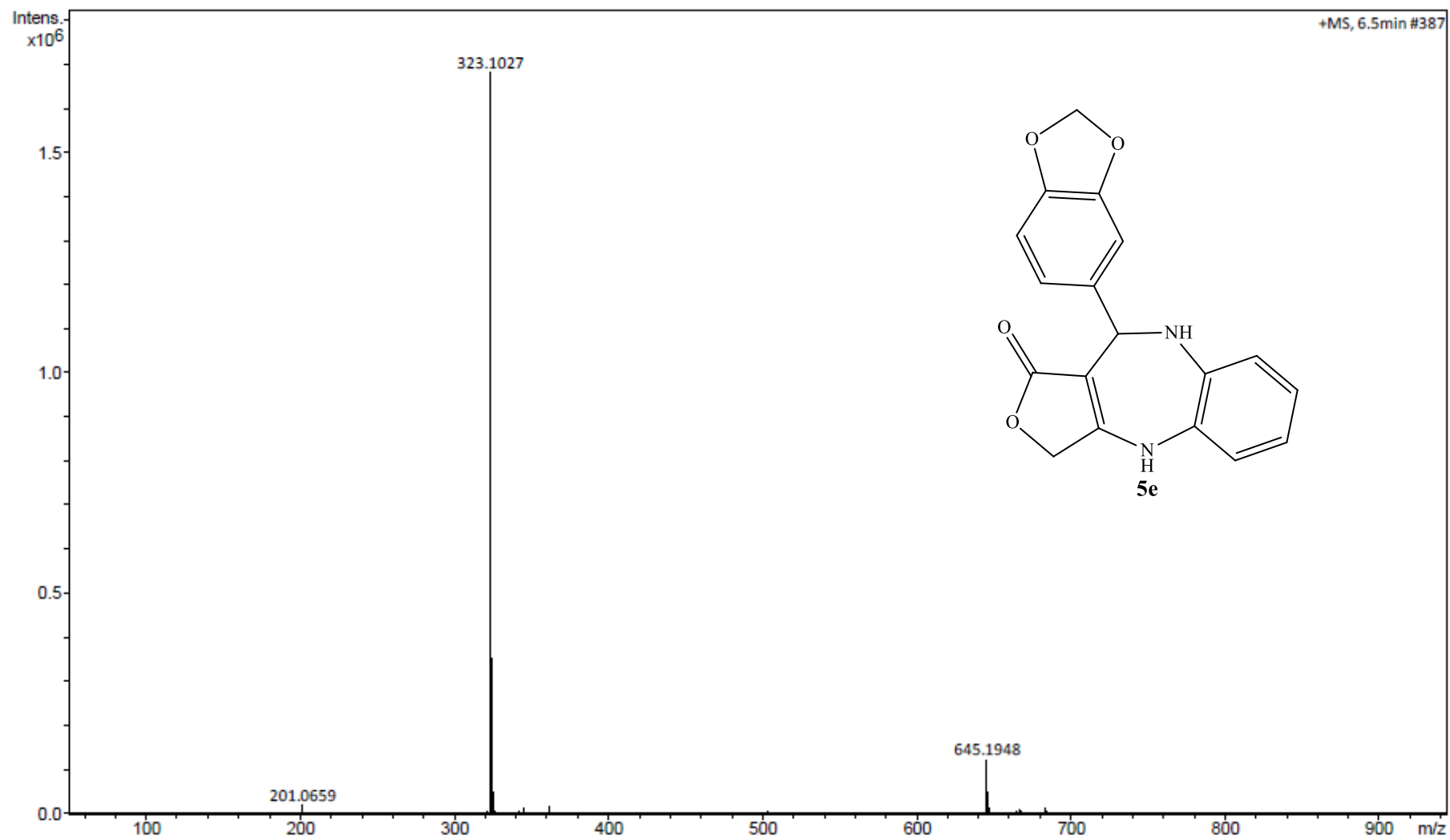


Figura 23. Espectro de HRMS de **5e**

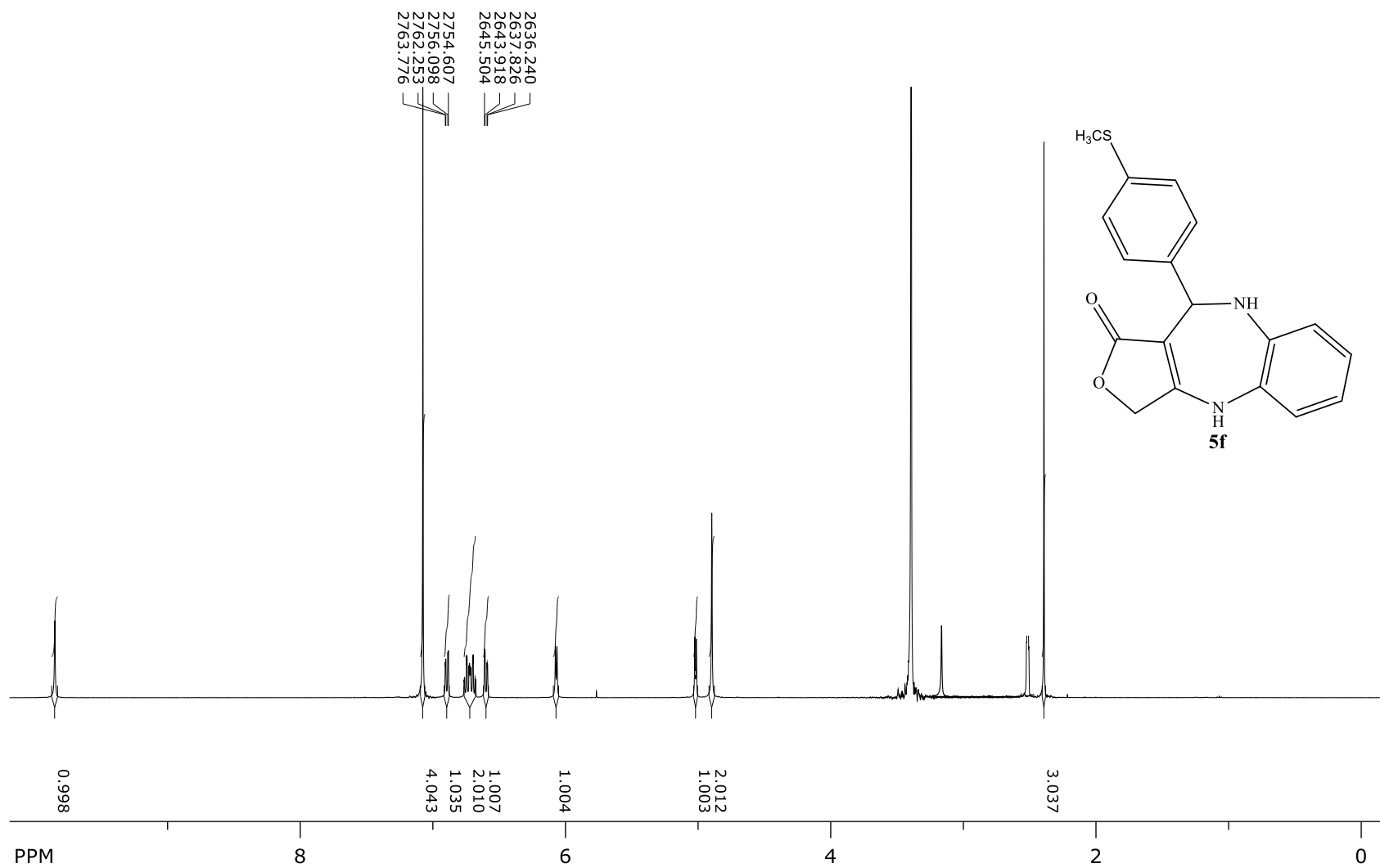


Figura 24, Espectro de RMN de ^1H de **5f** em DMSO-d_6

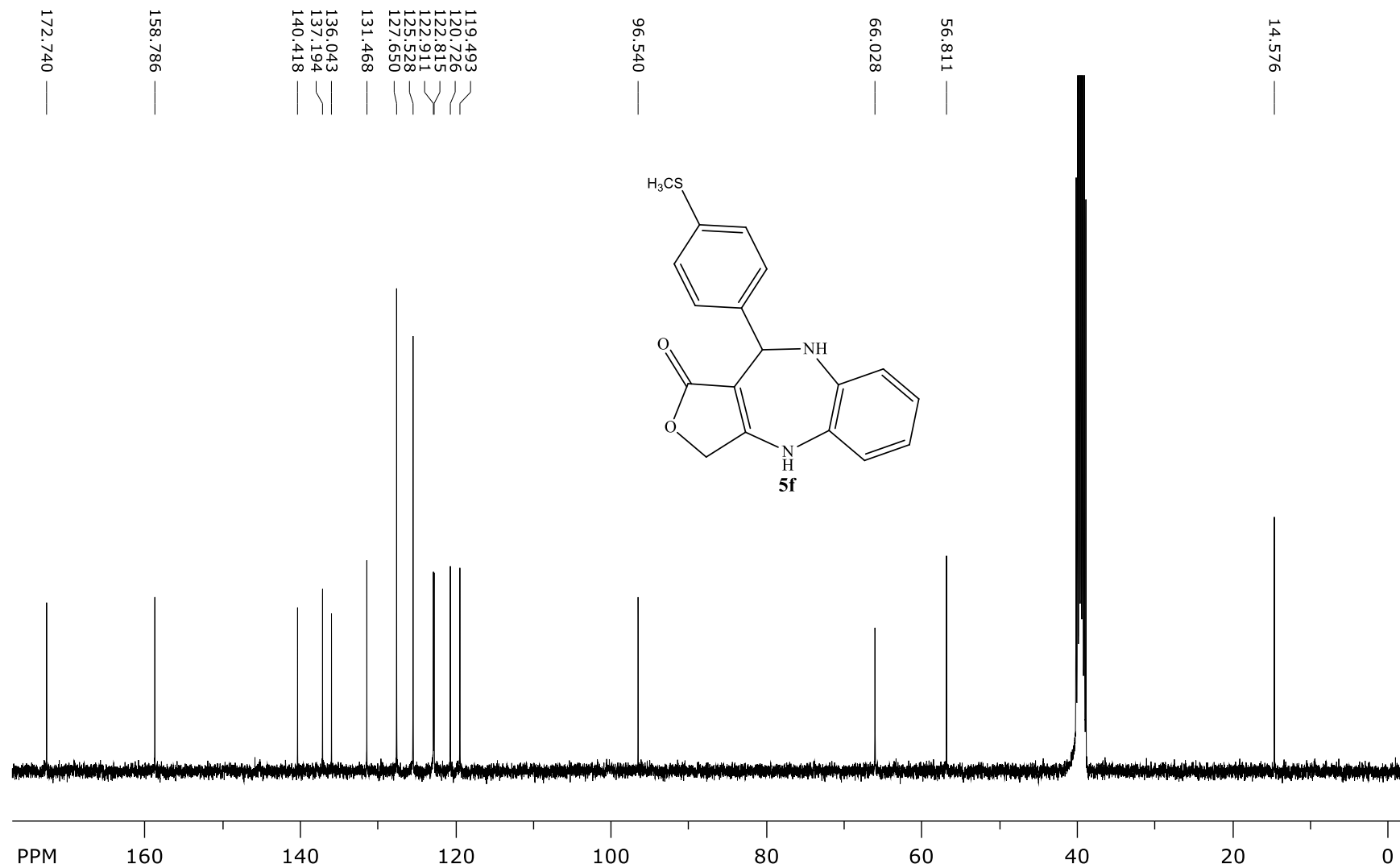


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C de **5f** em DMSO-d_6

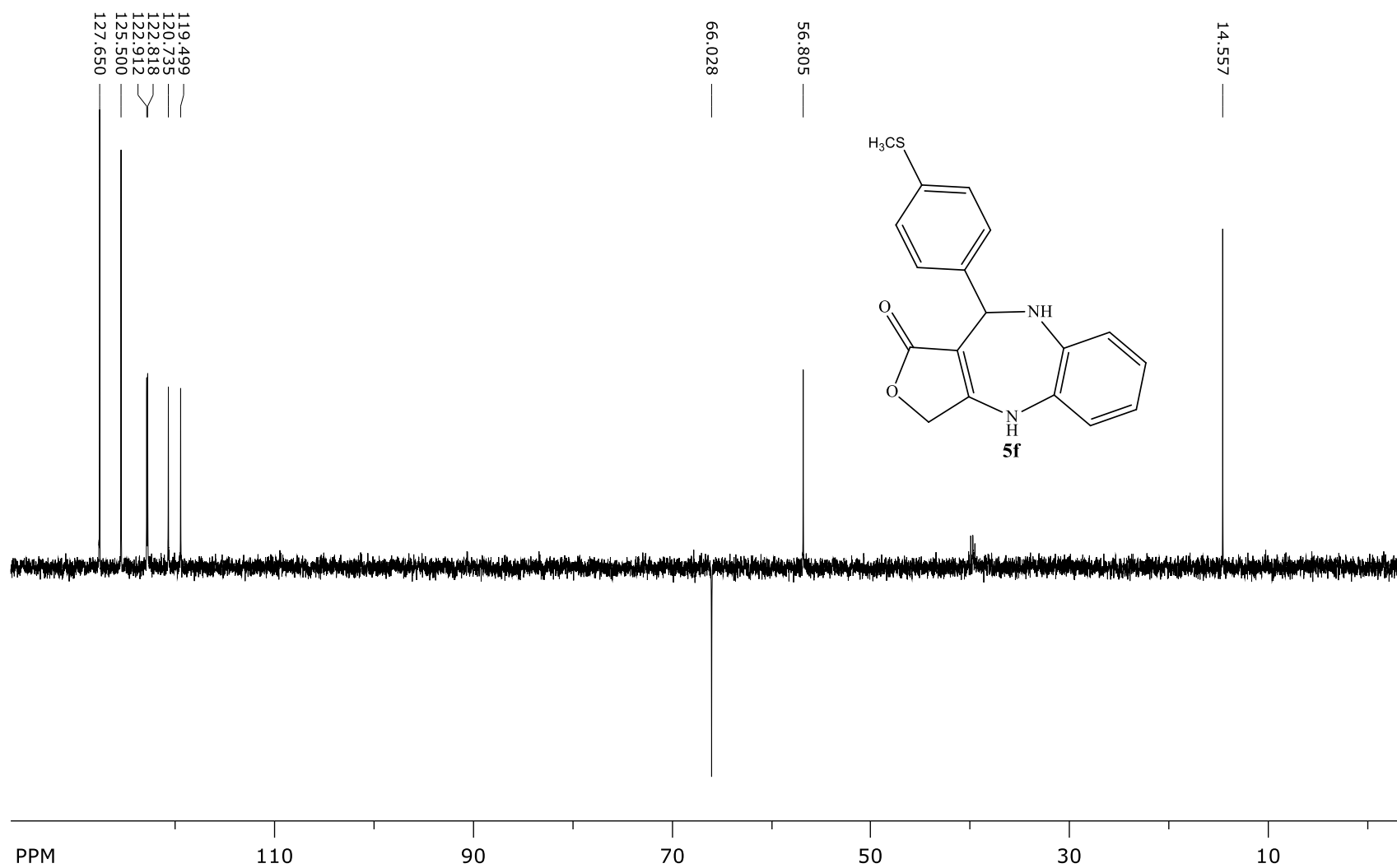


Figura 26. Espectro de RMN DEPT-135 de **5f** em DMSO-d₆

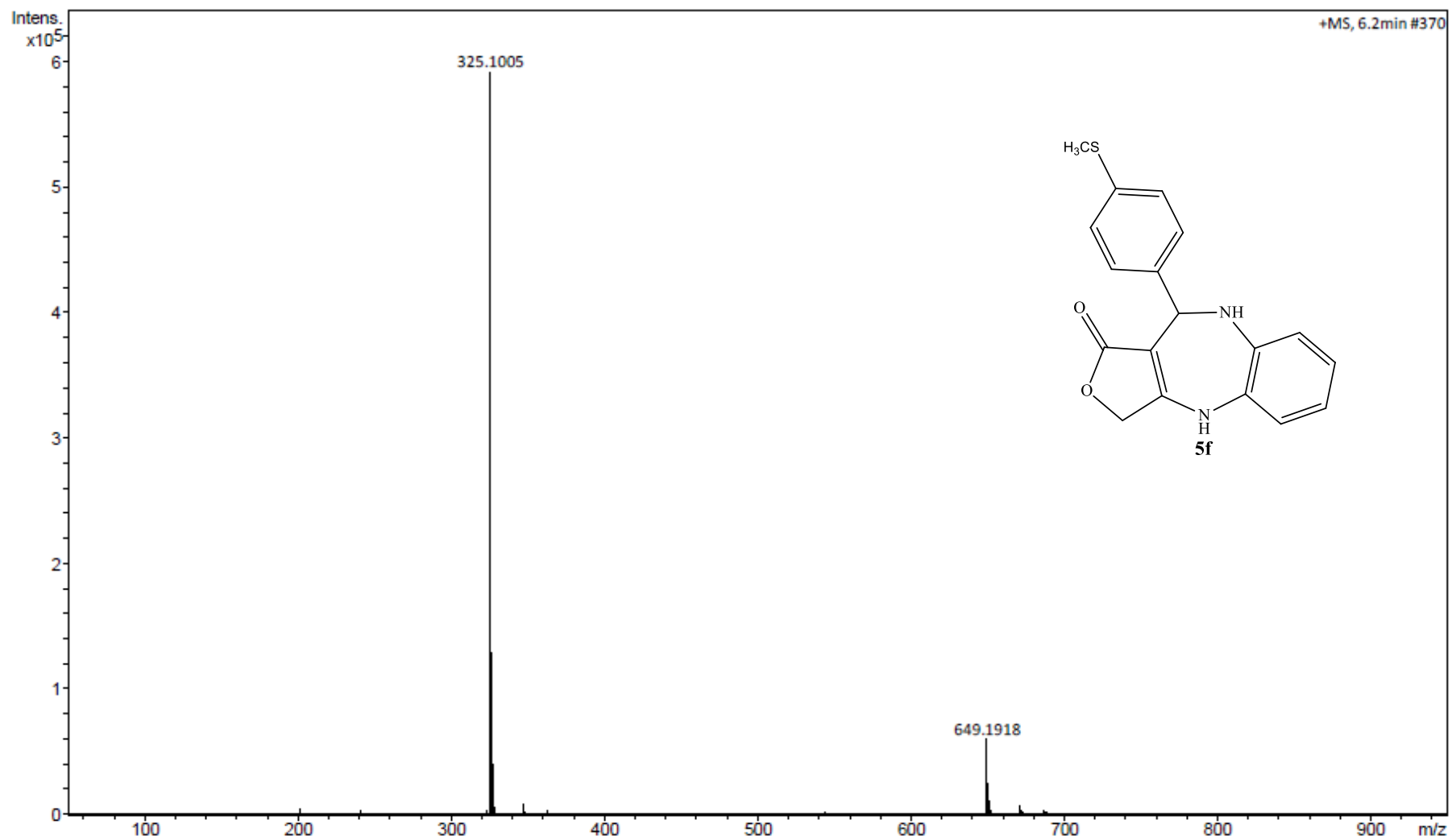


Figura 27. Espectro de HRMS de **5f**

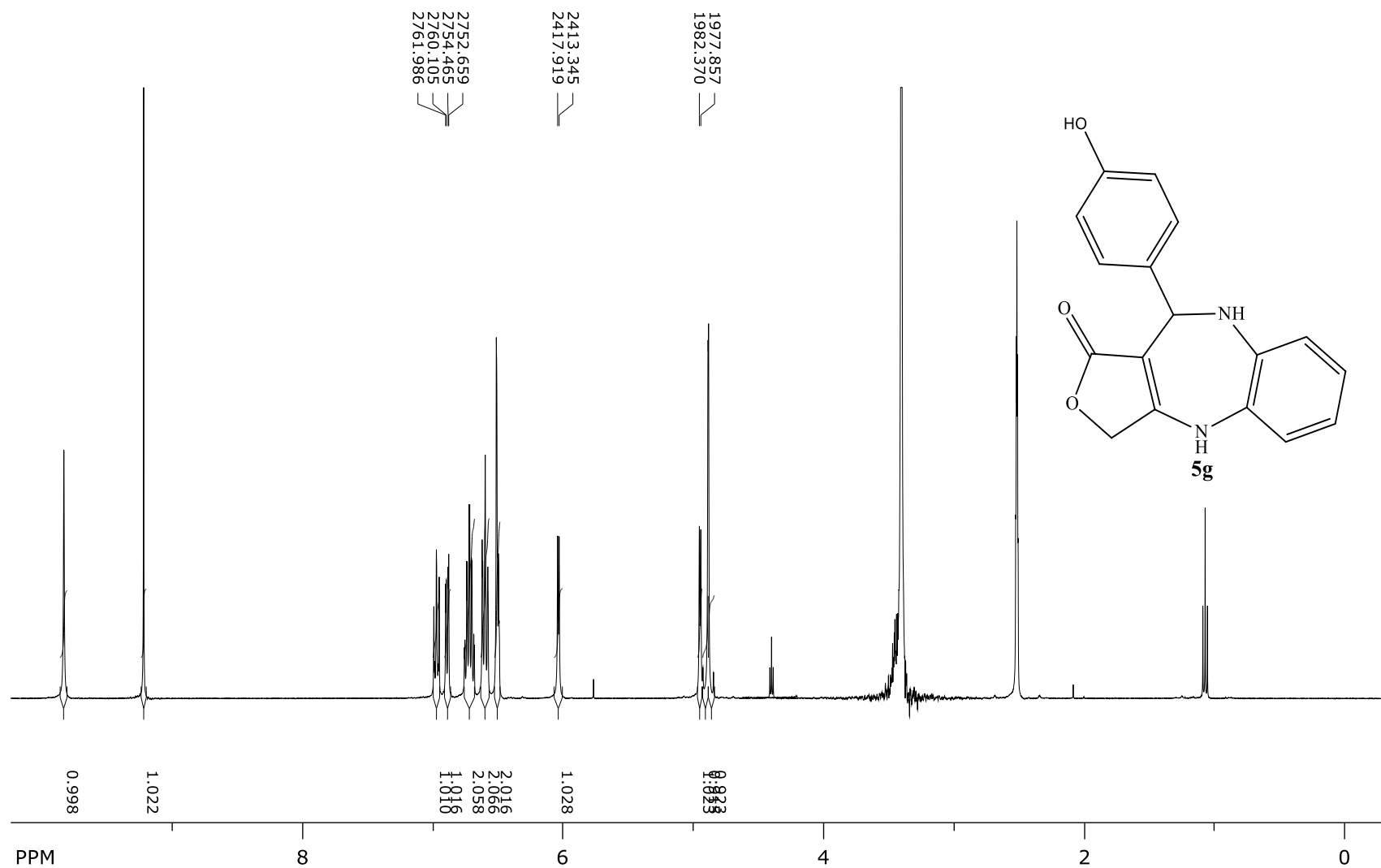


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H de **5g** em DMSO-d_6

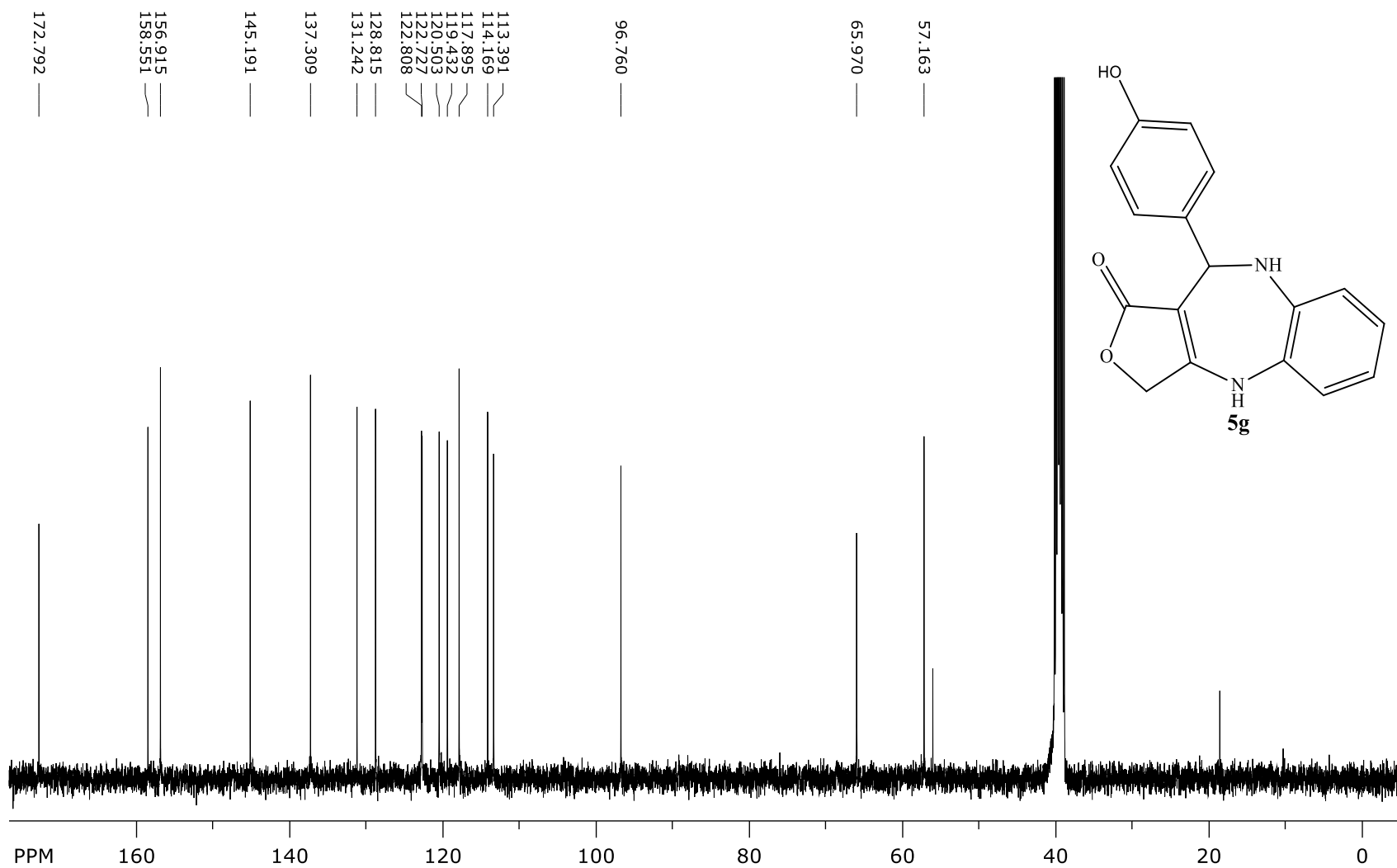


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C de **5g** em DMSO-d_6

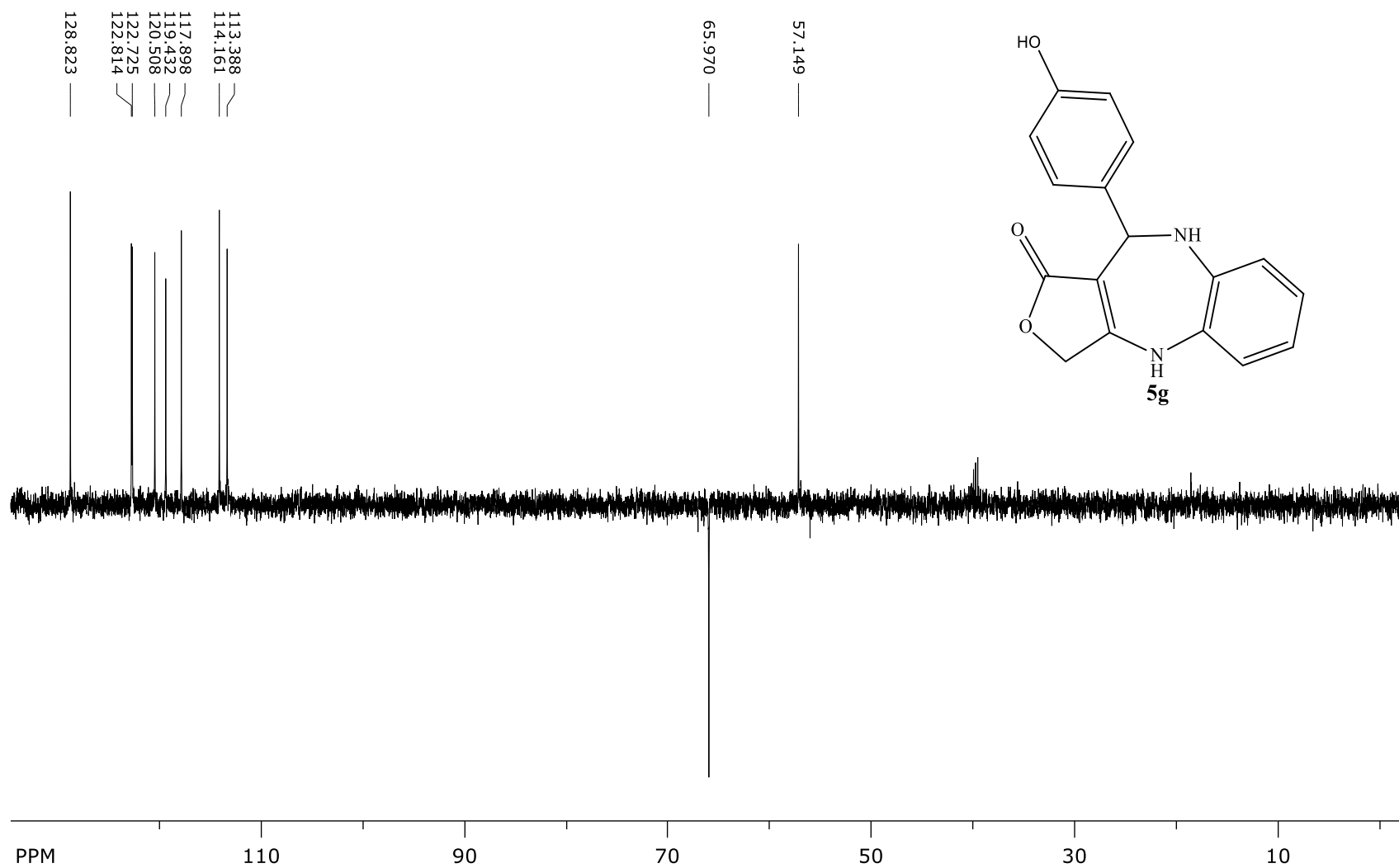


Figura 30. Espectro de RMN DEPT-135 de **5g** em DMSO-d₆

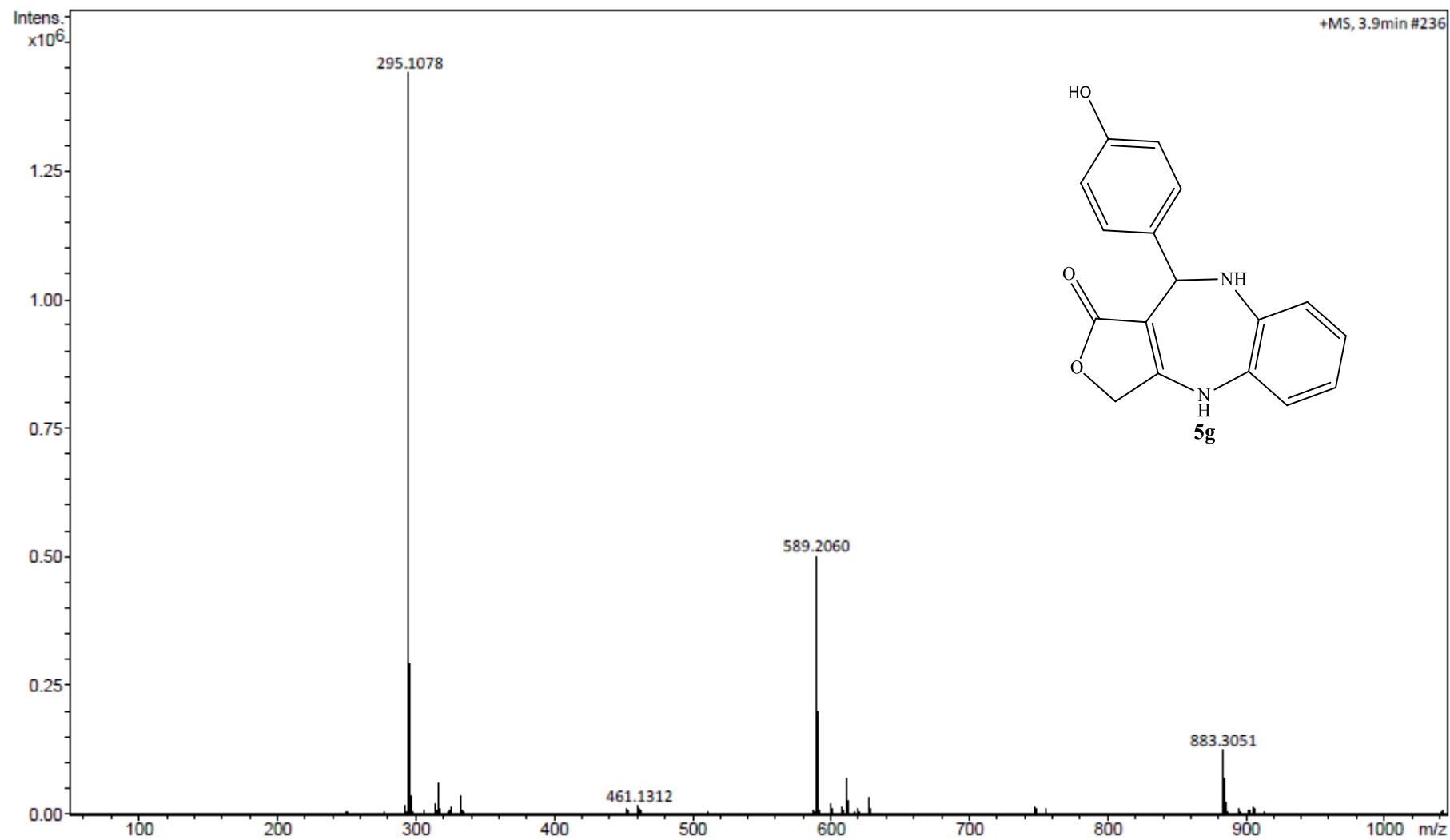


Figura 31. Espectro de HRMS de **5g**

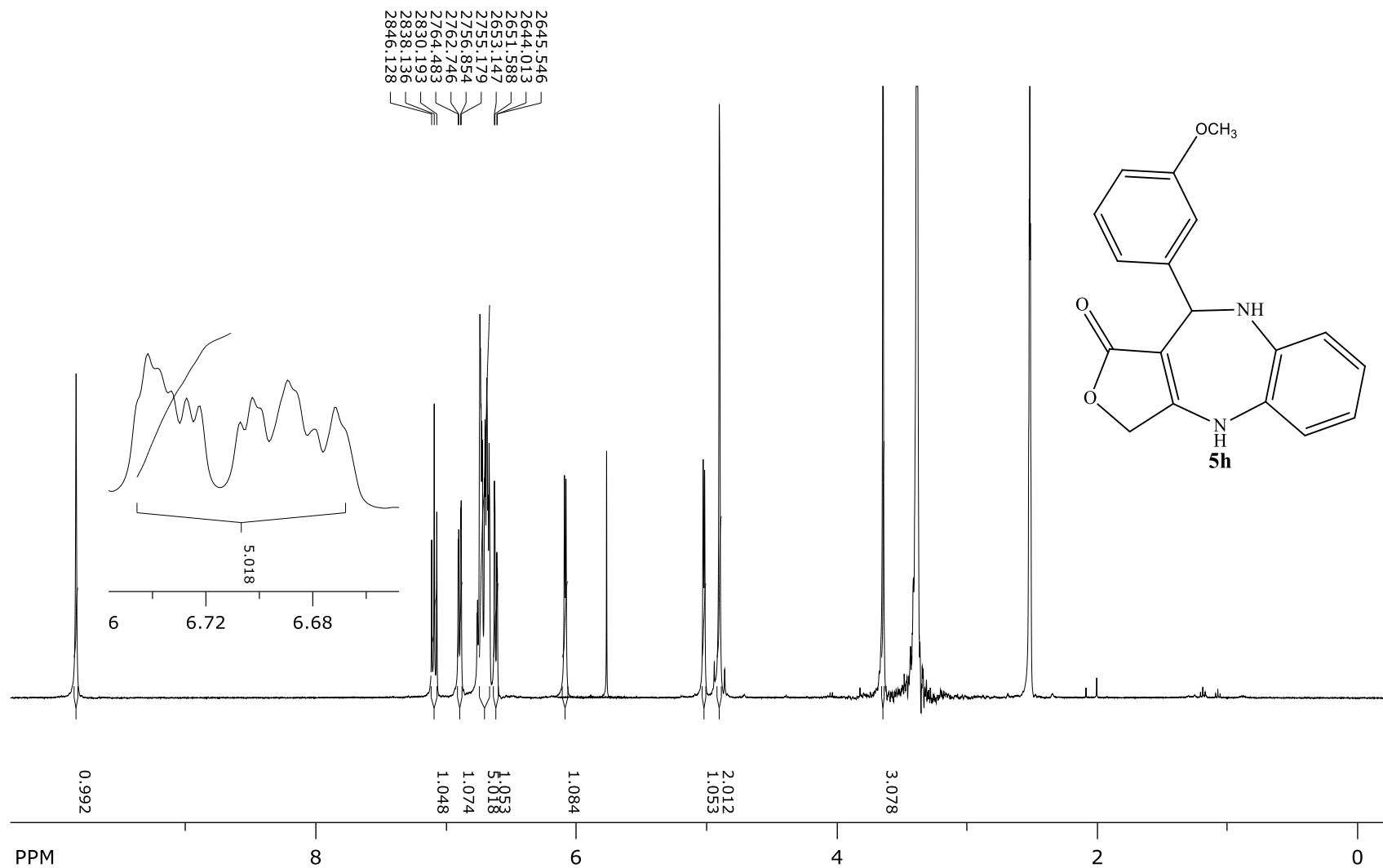


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H de **5h** em DMSO- d_6

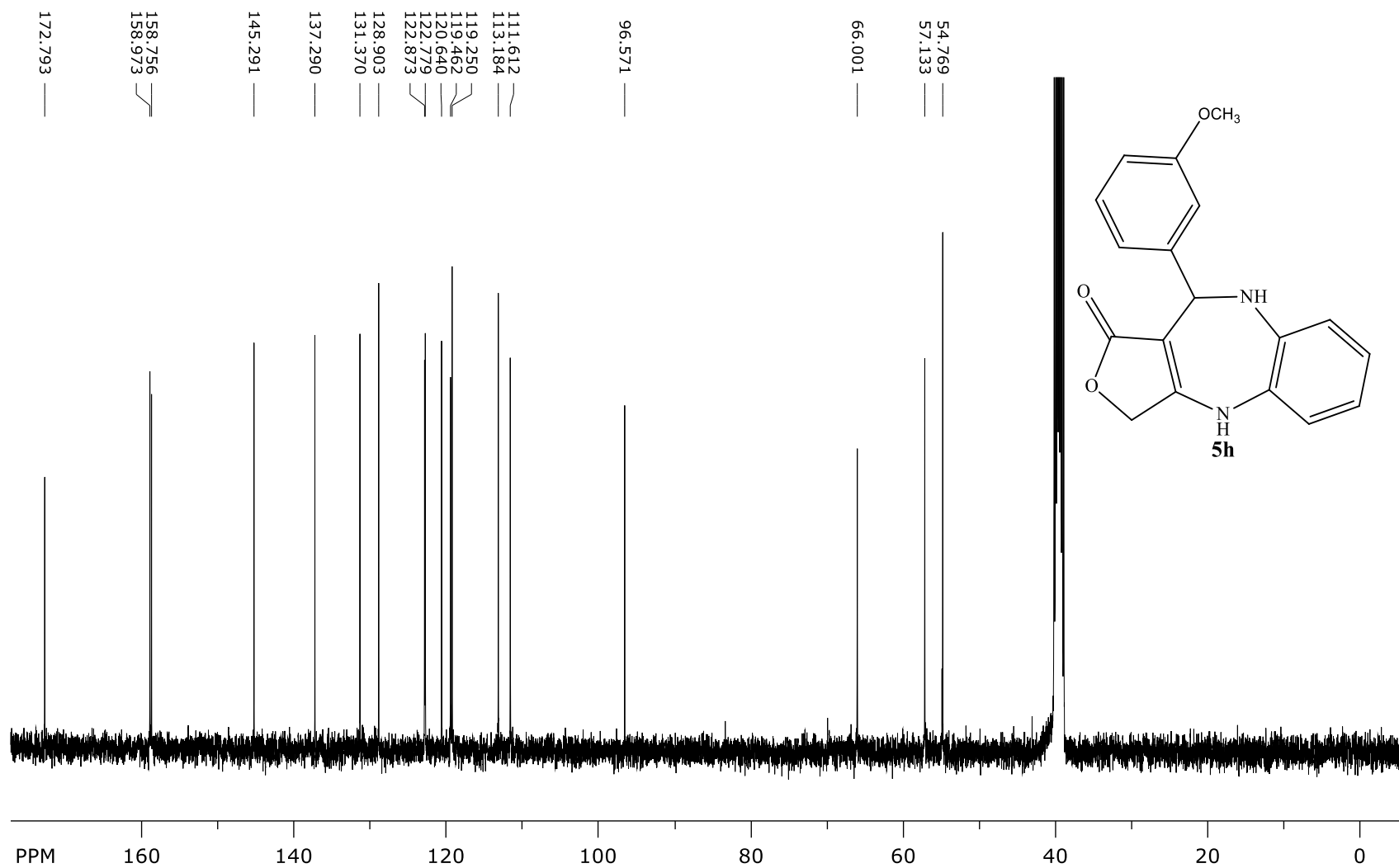


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C de **5h** em DMSO-d_6

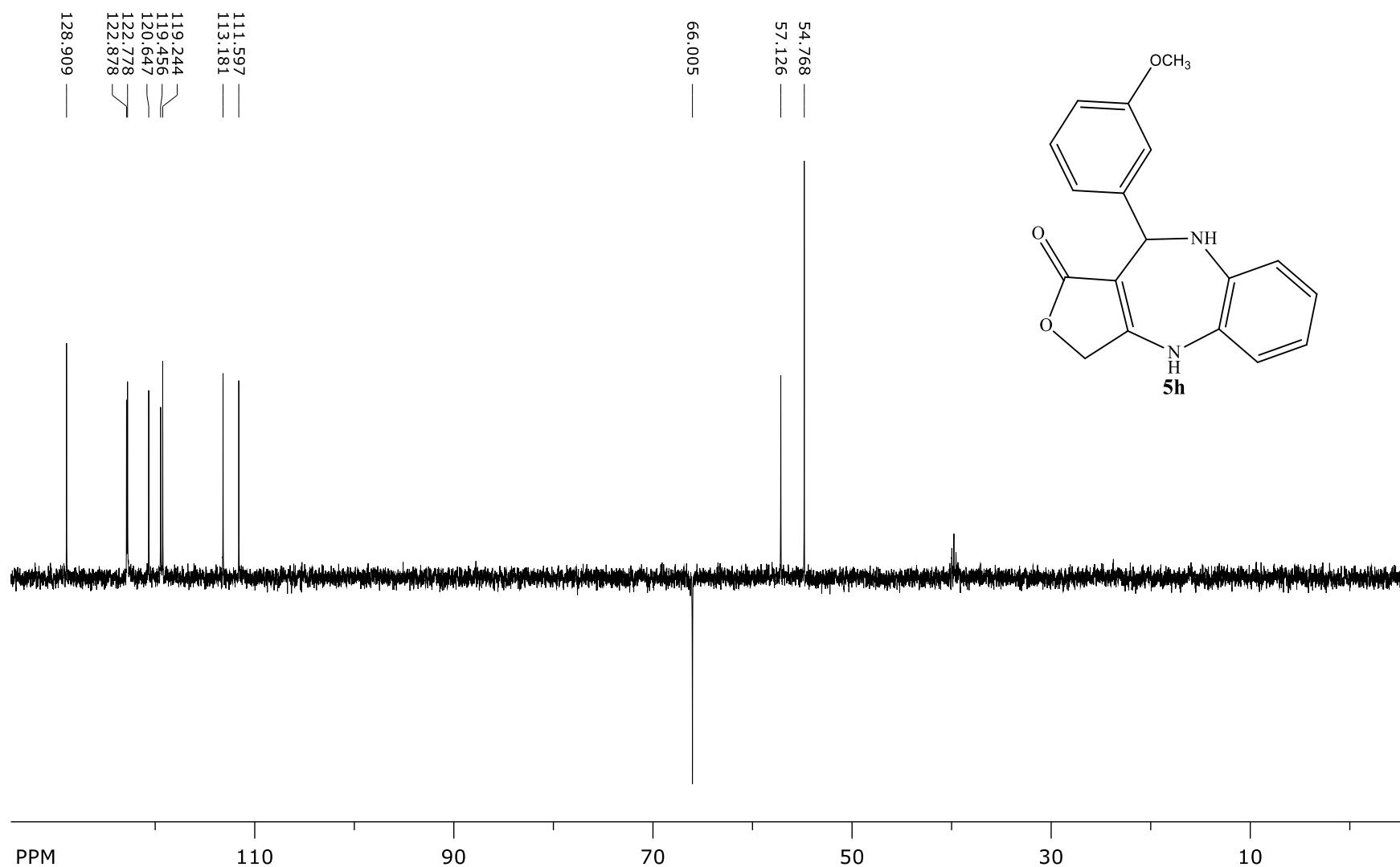


Figura 34. Espectro de RMN DEPT-135 de **5h** em DMSO-d₆

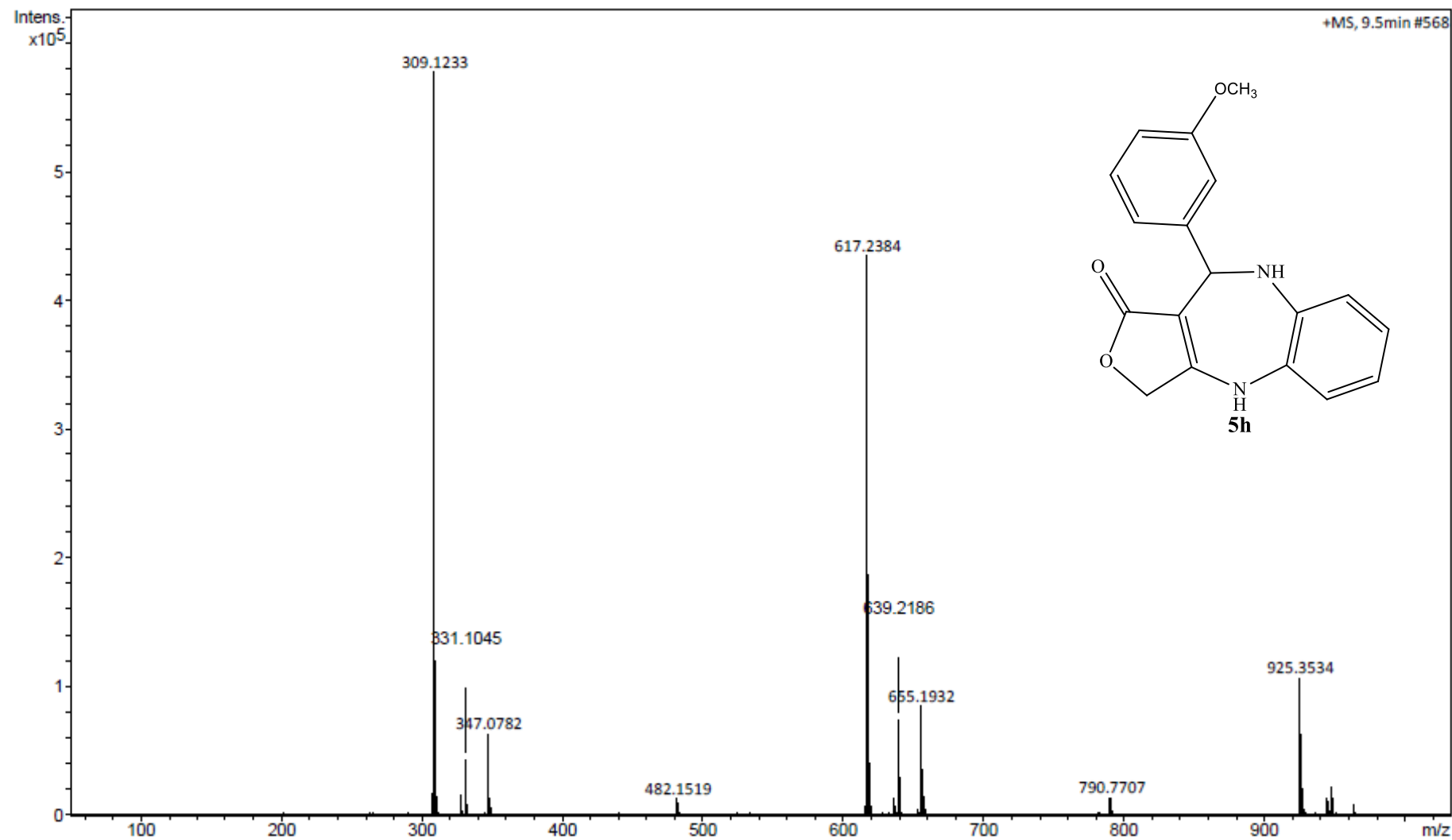


Figura 35. Espectro de HRMS de **5h**

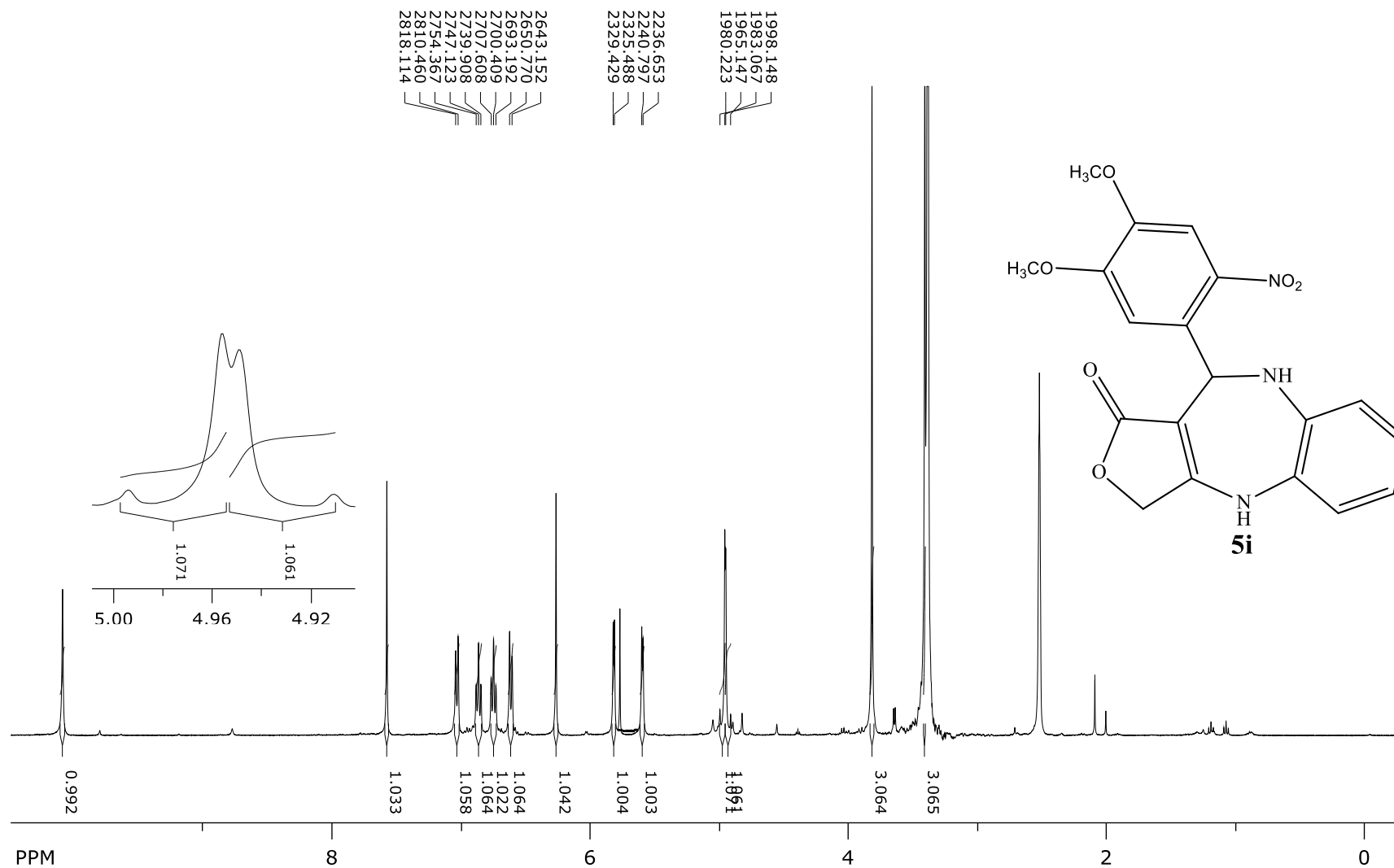


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H de **5i** em DMSO- d_6

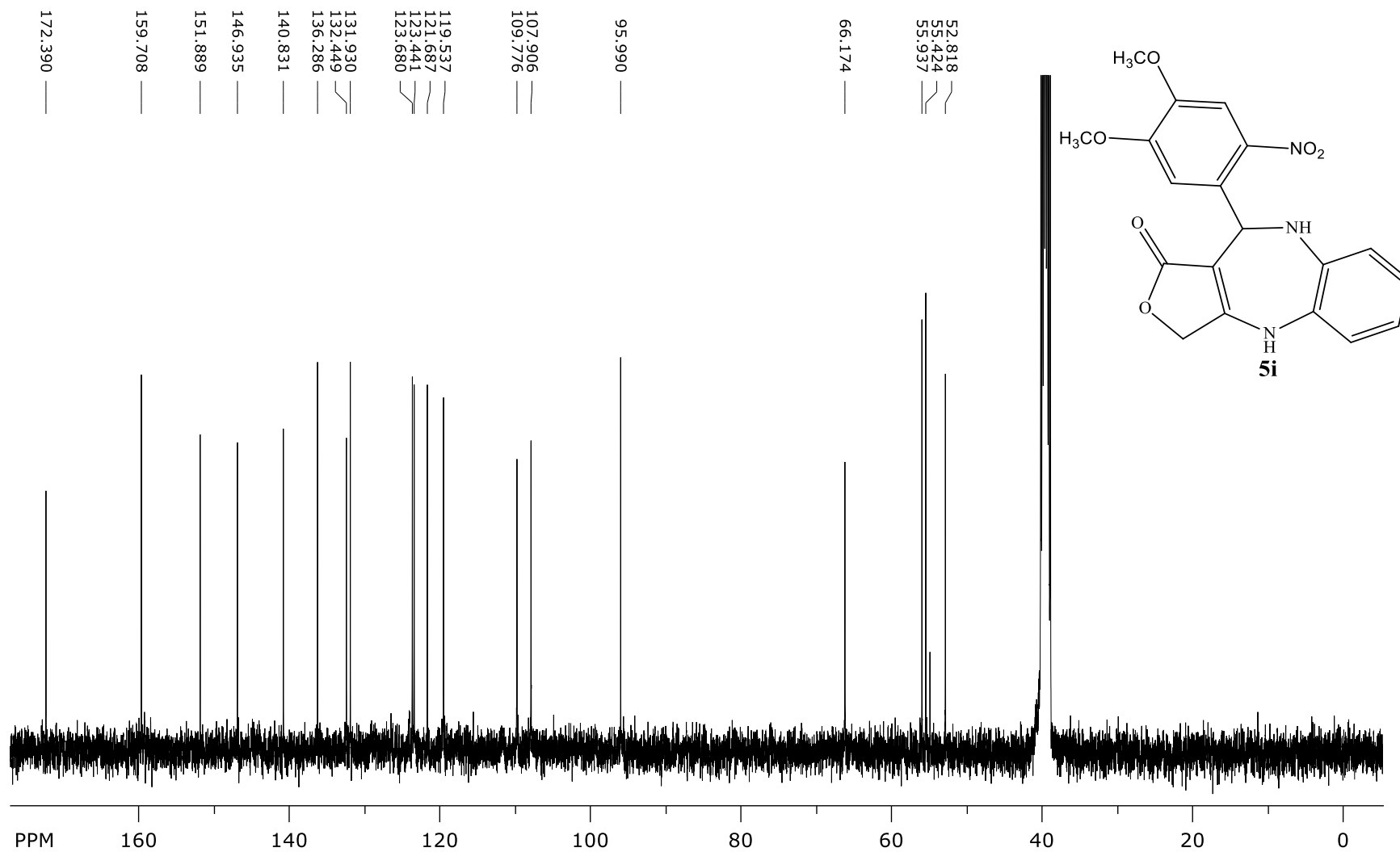


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C de **5i** em DMSO-d_6

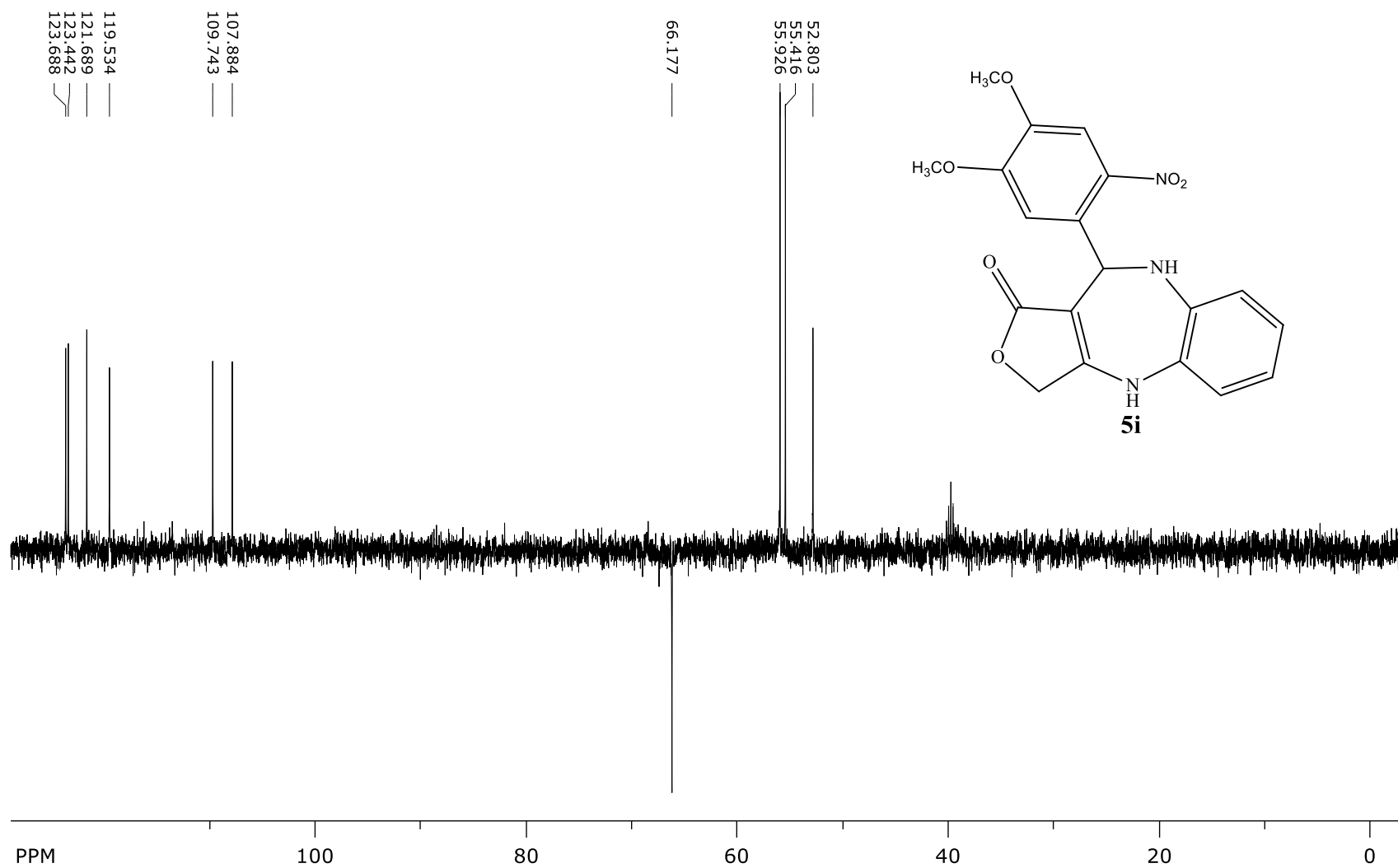


Figura 38. Espectro de RMN DEPT-135 de **5i** em DMSO-d₆

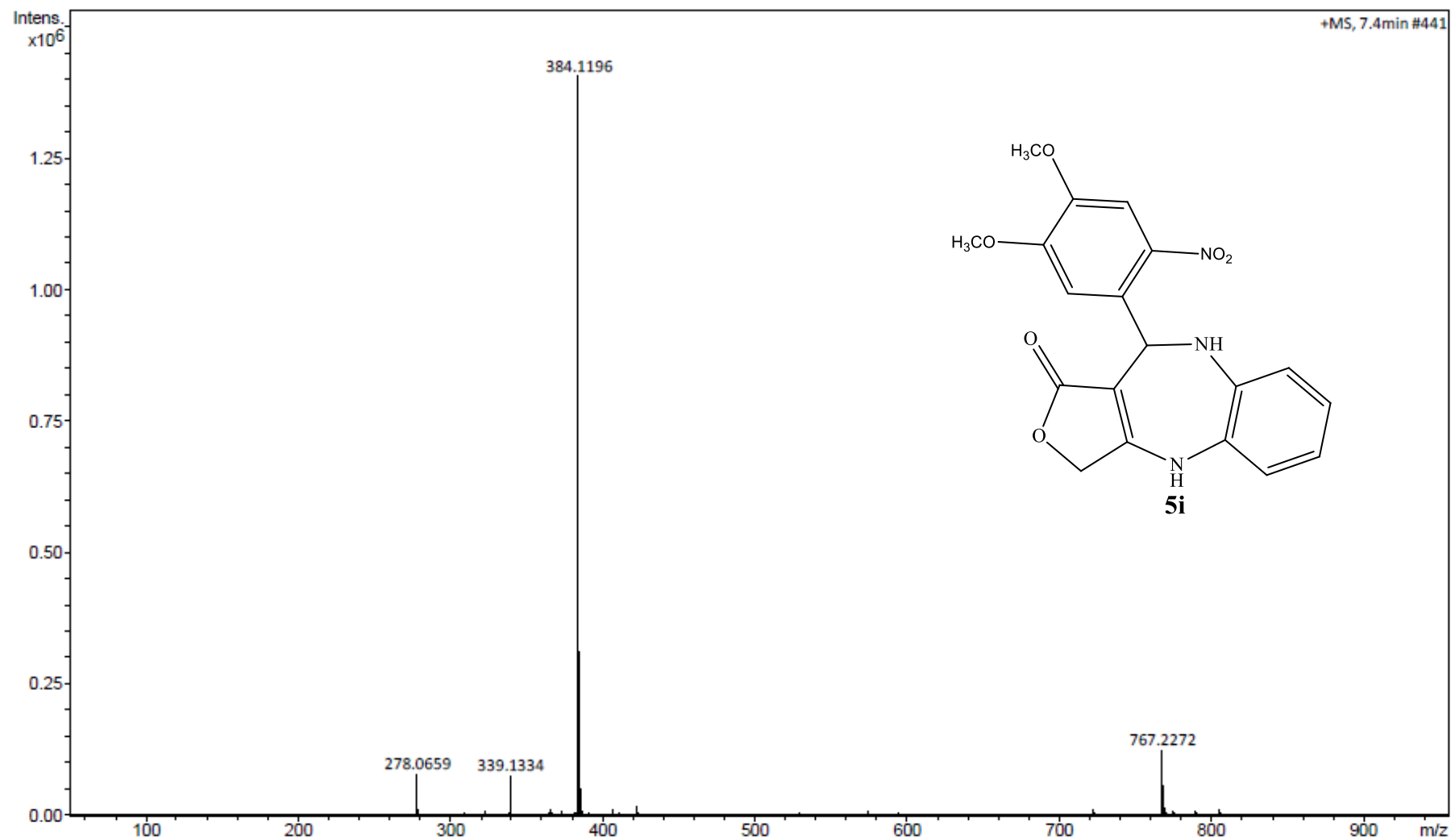


Figura 39. Espectro de HRMS de **5i**

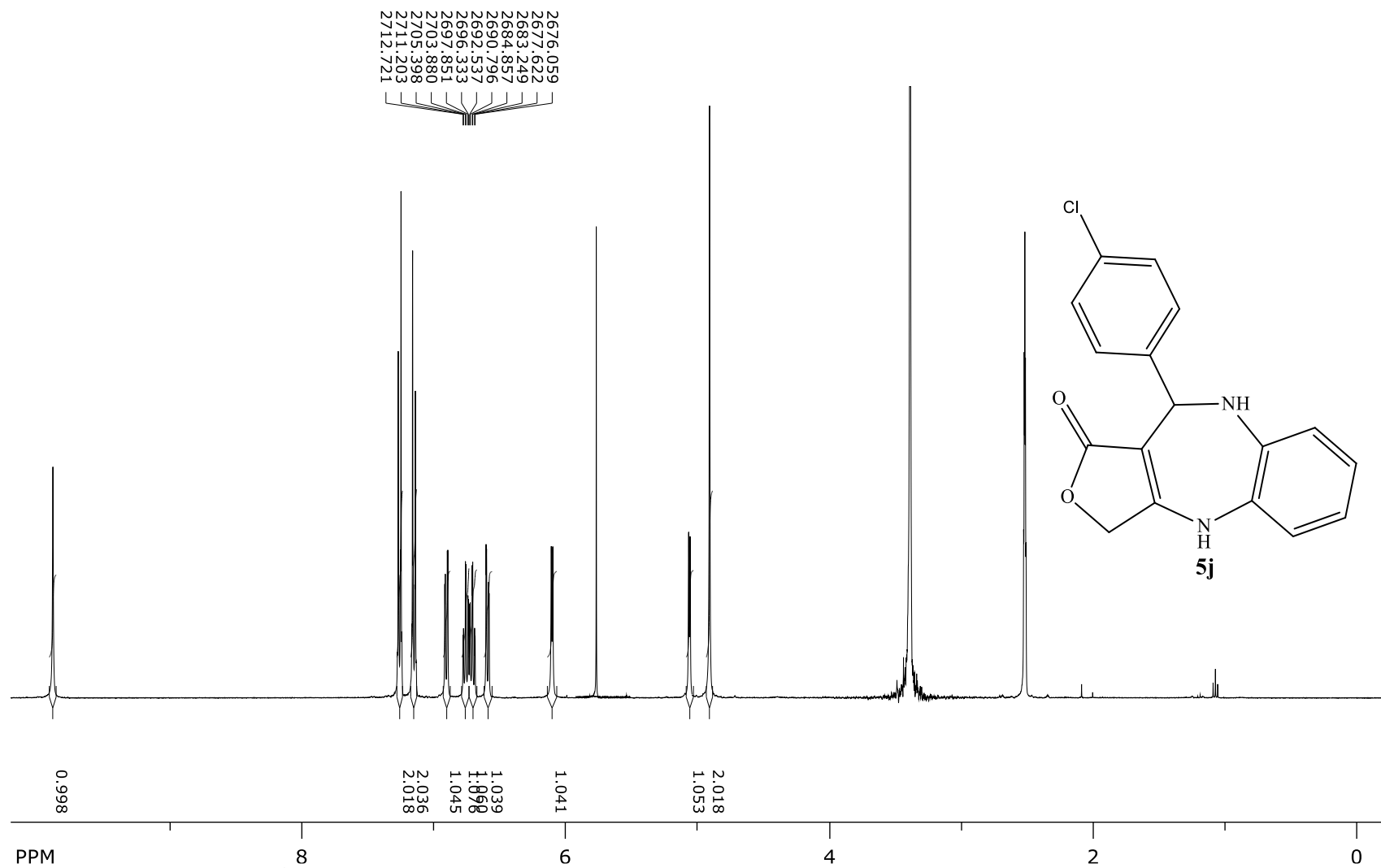


Figura 40. Espectro de RMN de ^1H de **5j** em DMSO-d₆

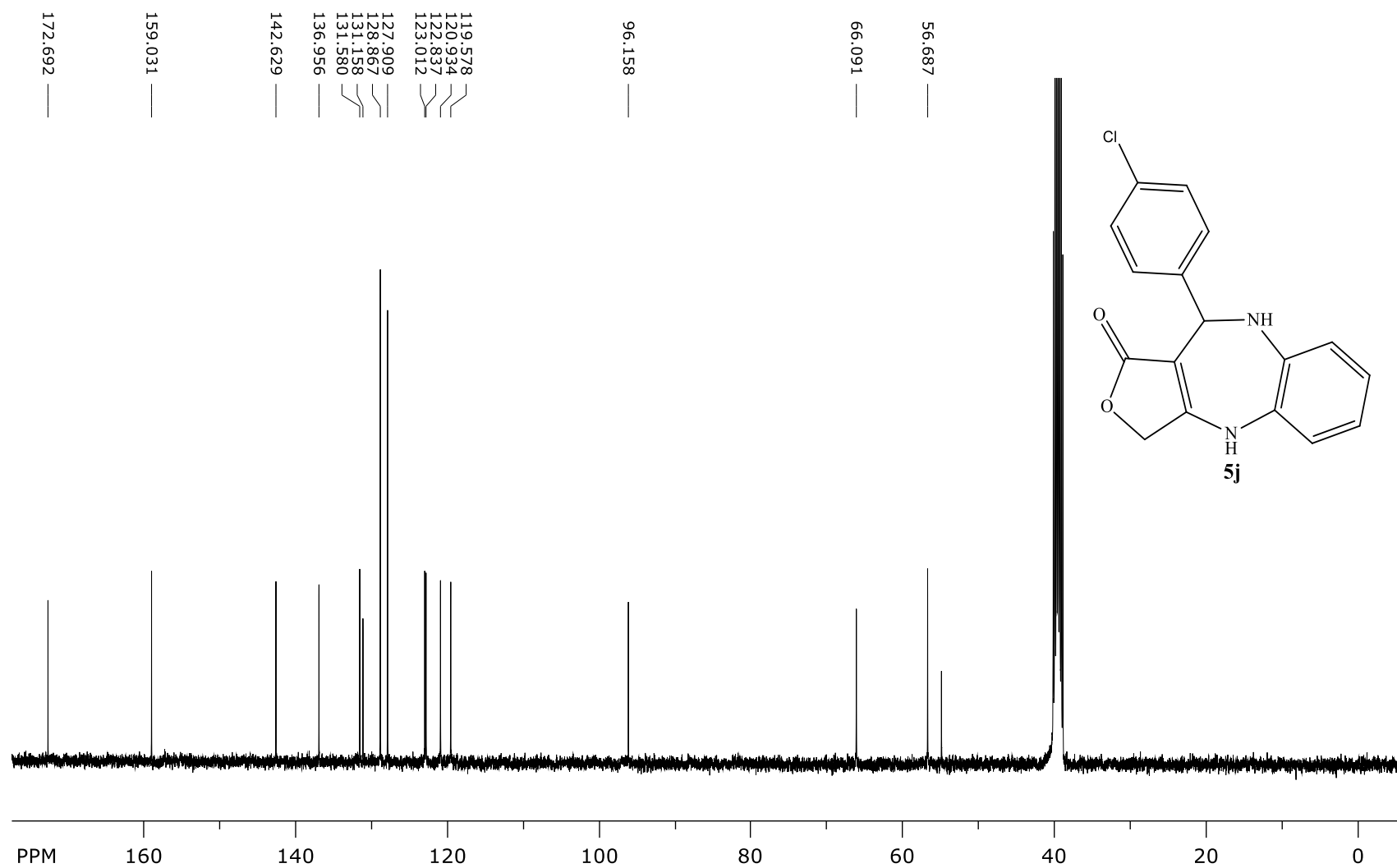


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C de **5j** em DMSO-d_6

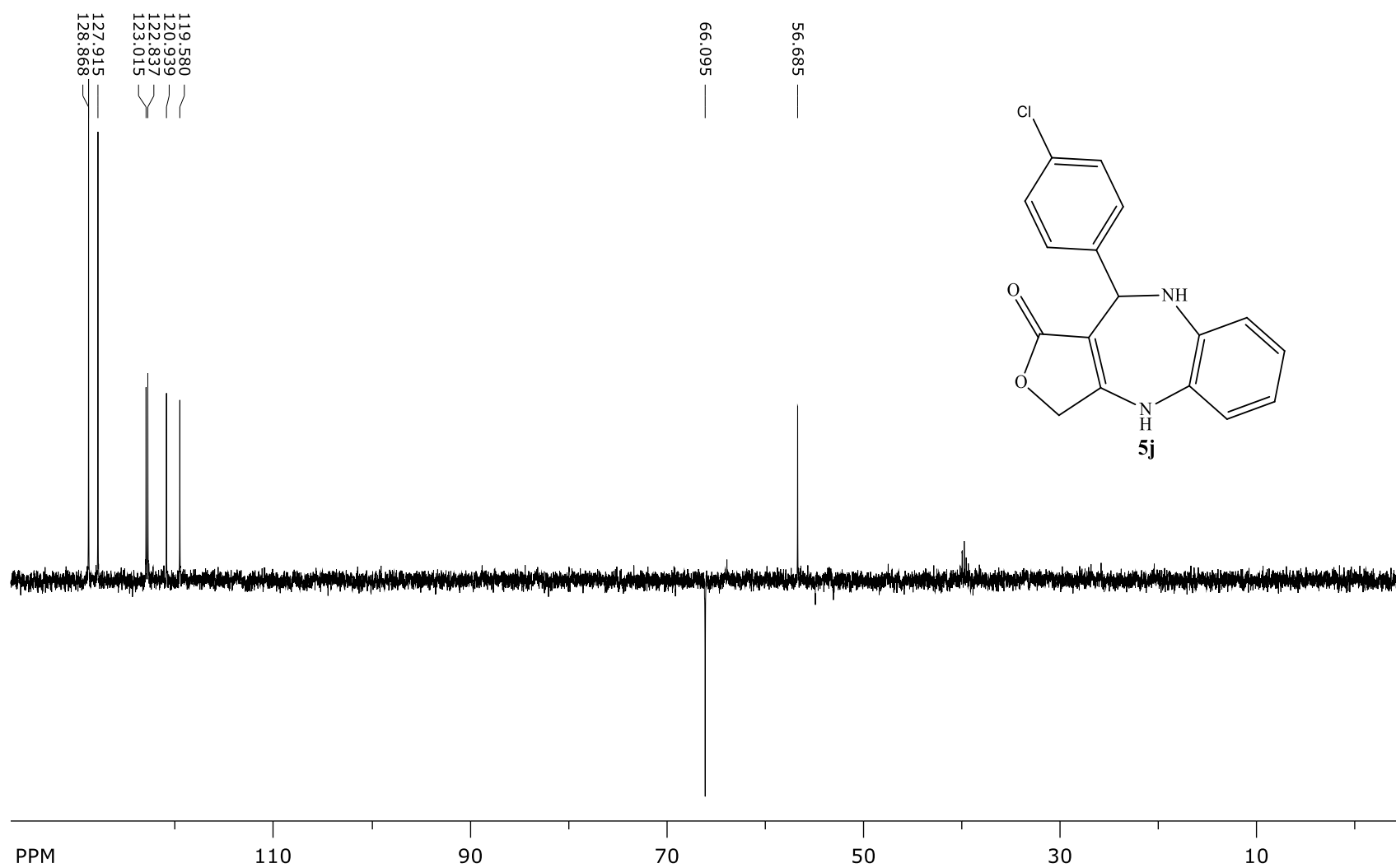


Figura 42. Espectro de RMN DEPT-135 de **5j** em DMSO-d₆

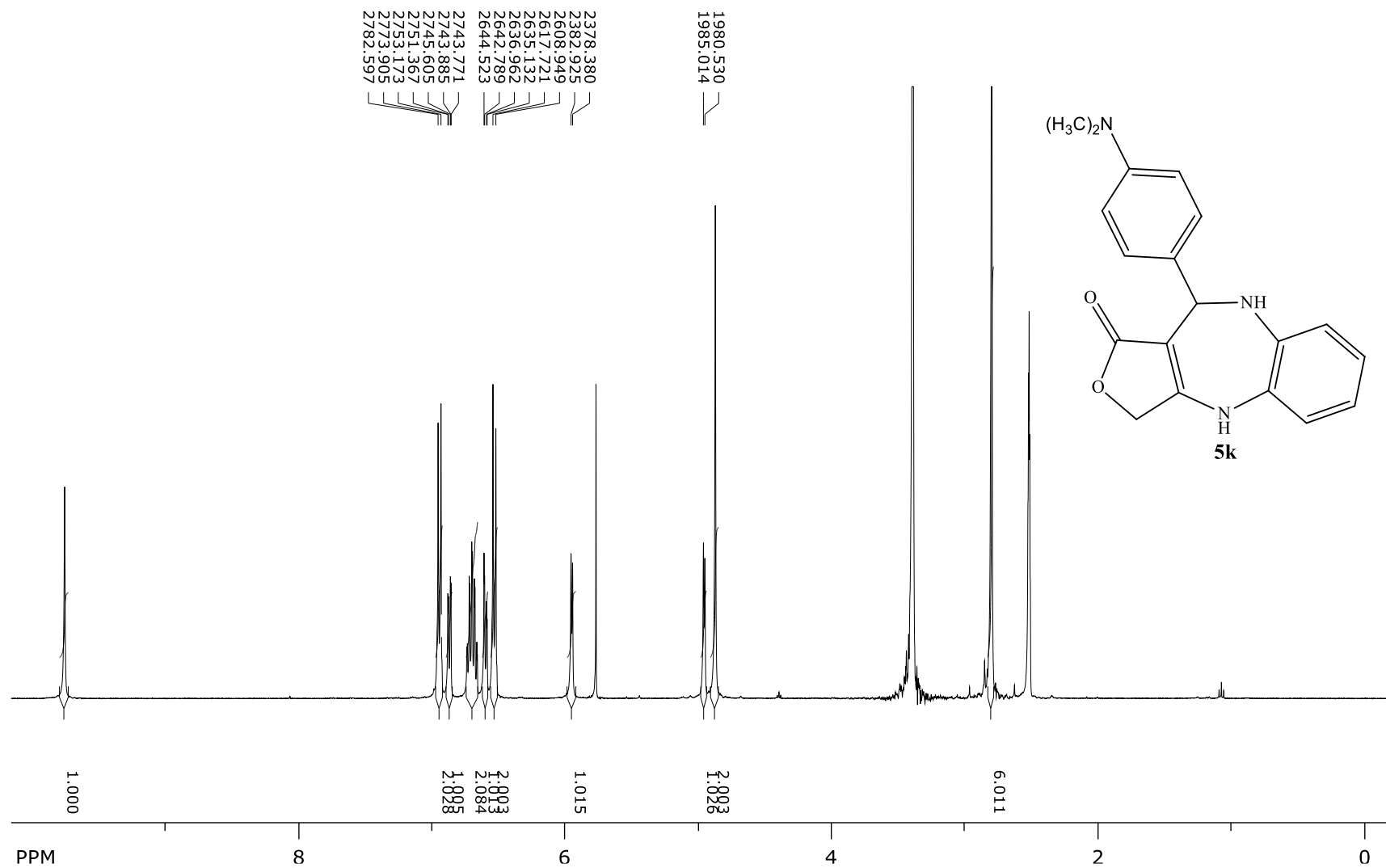


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H de **5k** em DMSO-d_6

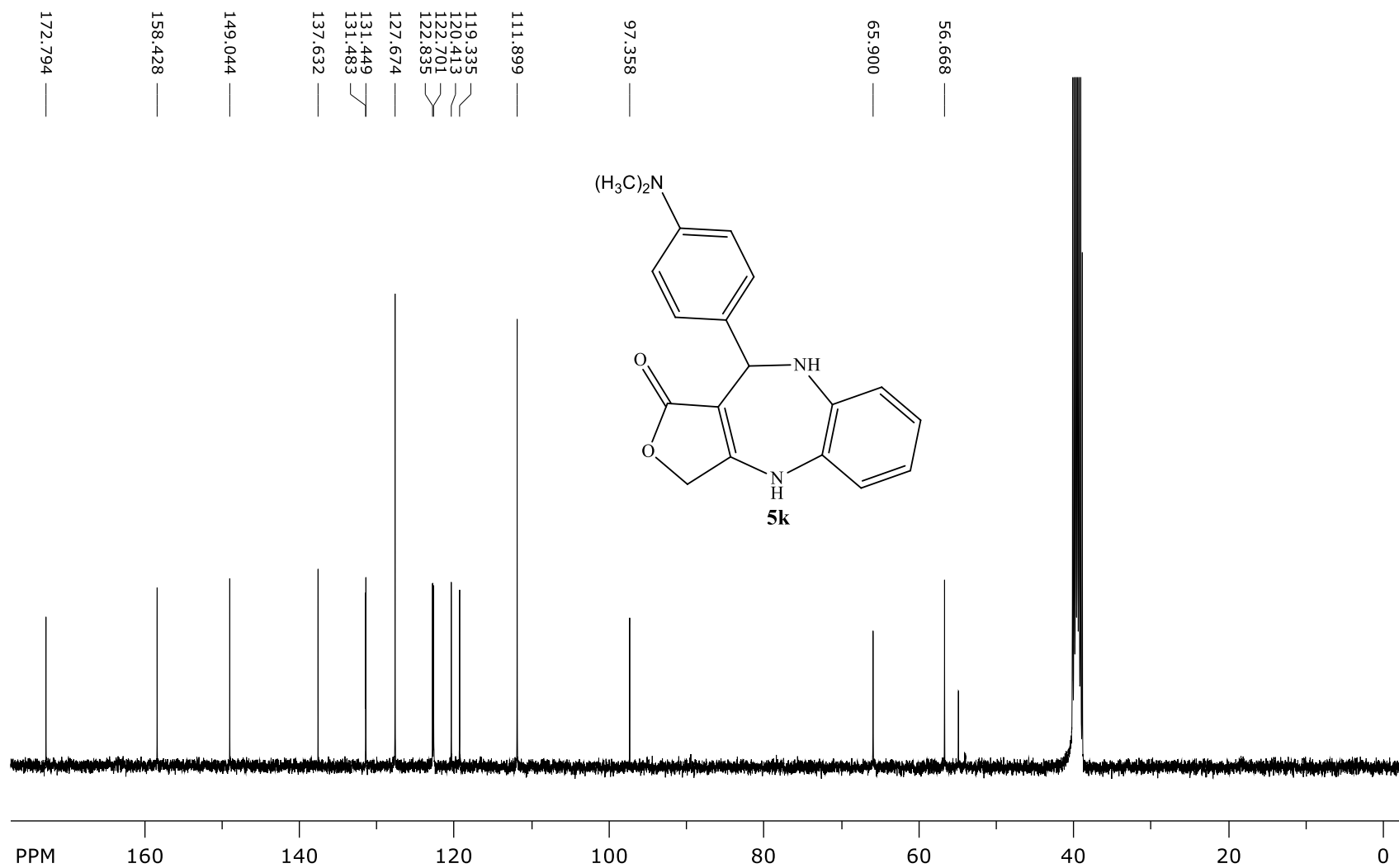


Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C de **5k** em DMSO-d_6

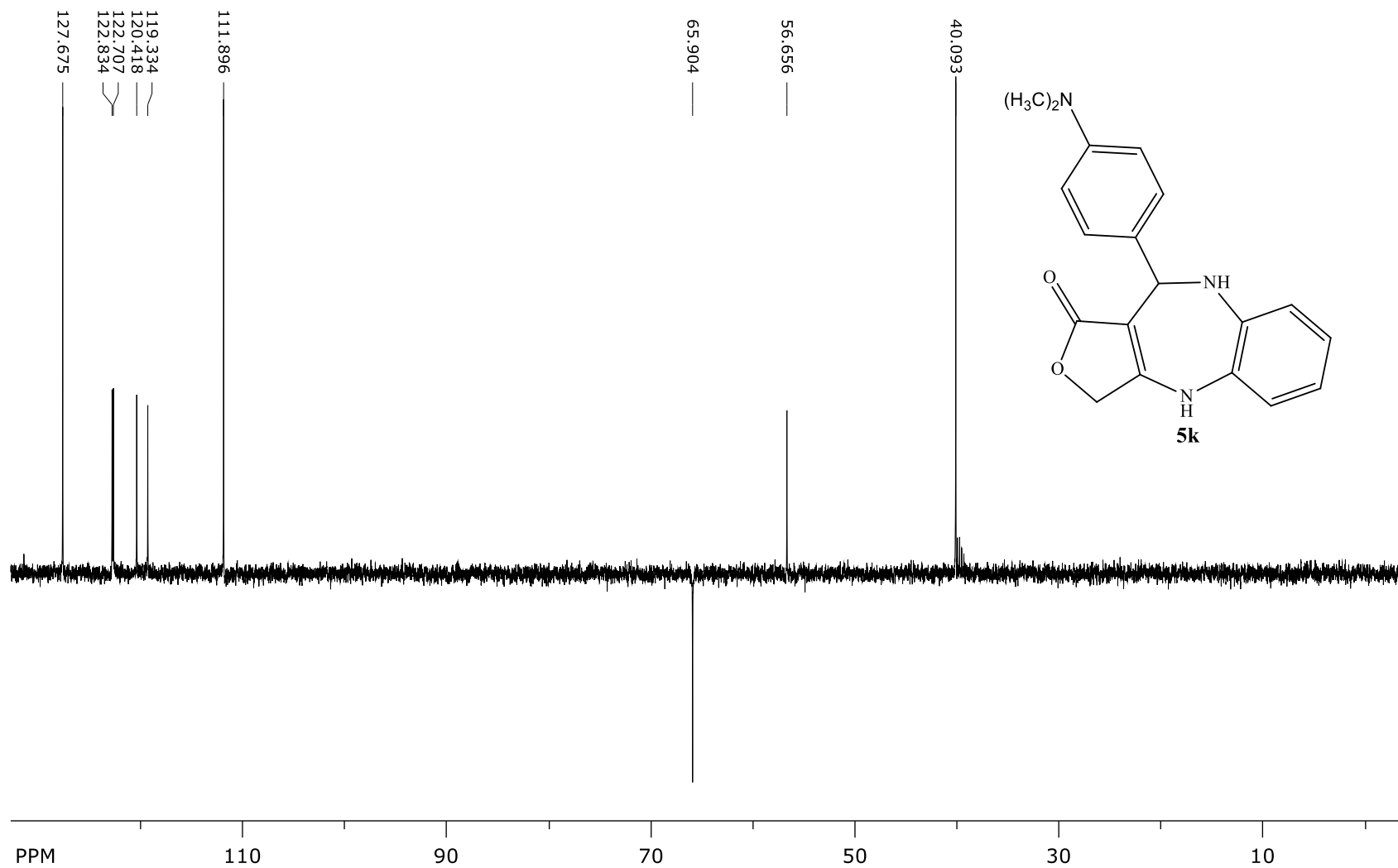


Figura 45. Espectro de RMN DEPT-135 de **5k** em DMSO-d₆

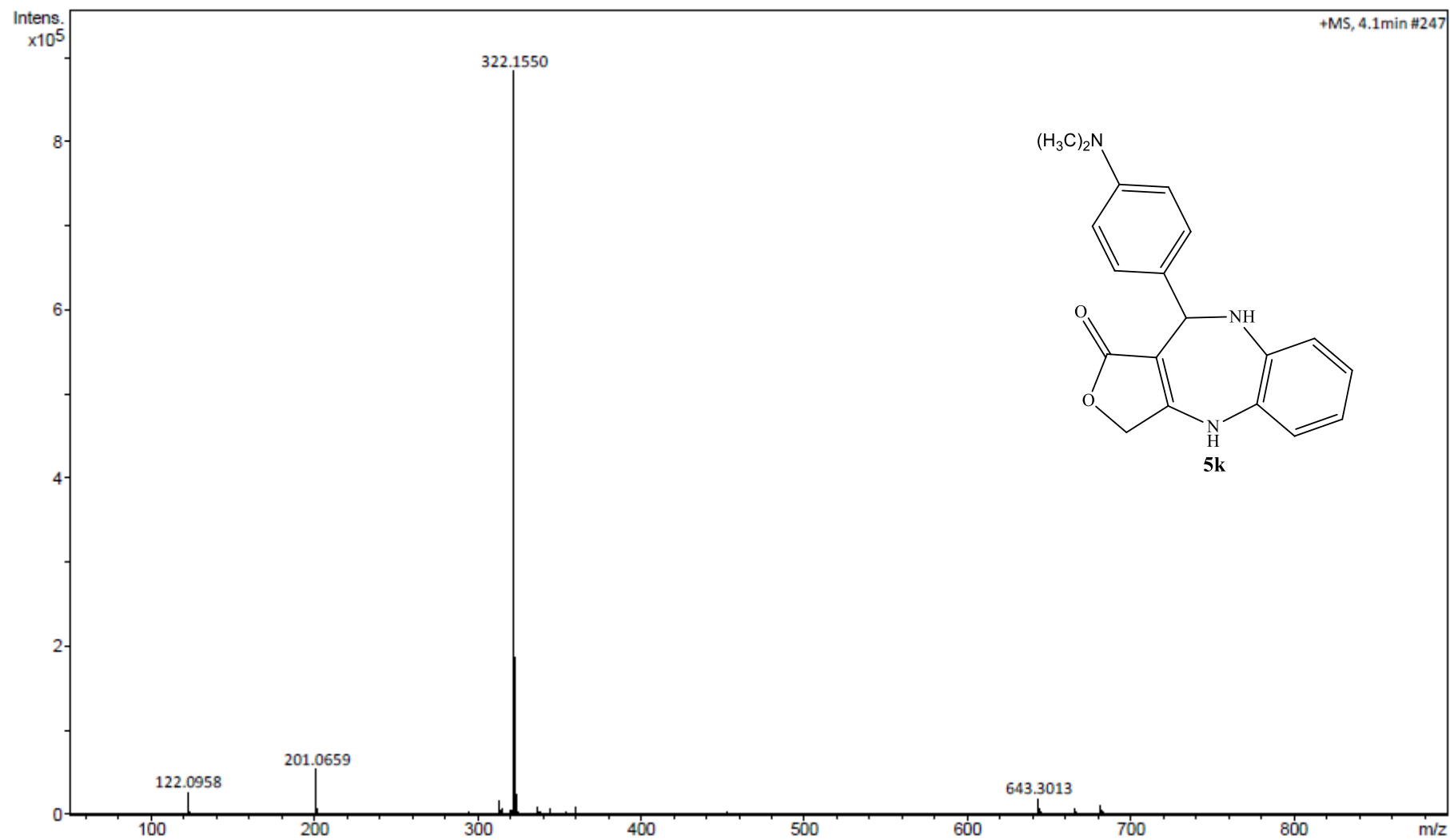


Figura 46. Espectro de HRMS de **5k**

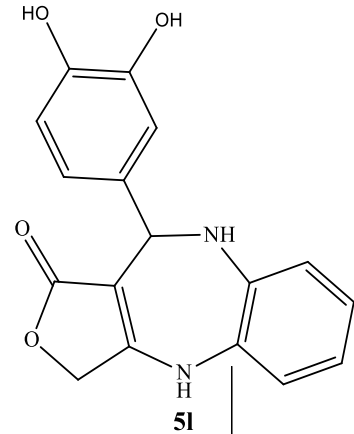


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H de **5l** em DMSO- d_6

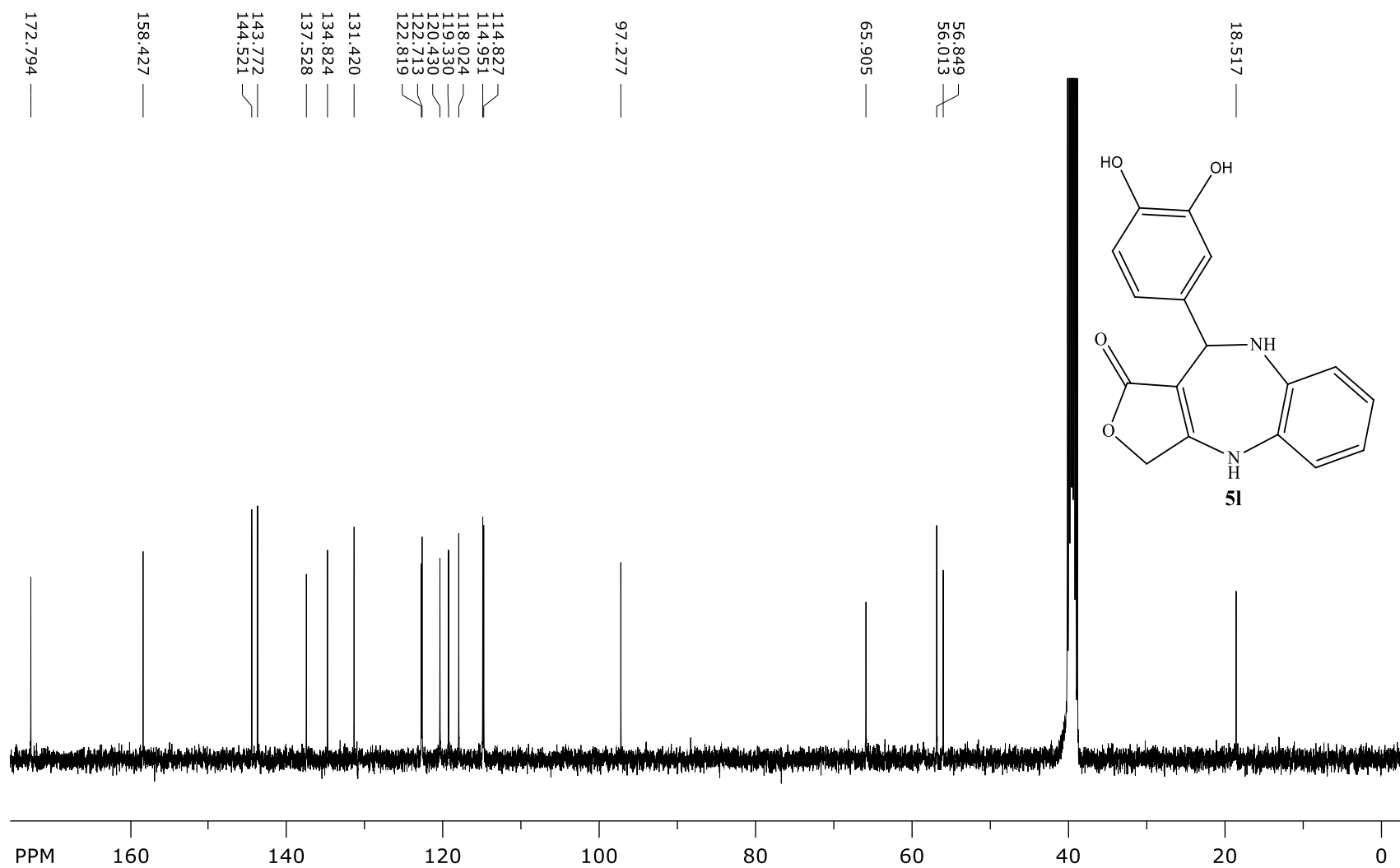


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C de **5l** em DMSO-d_6

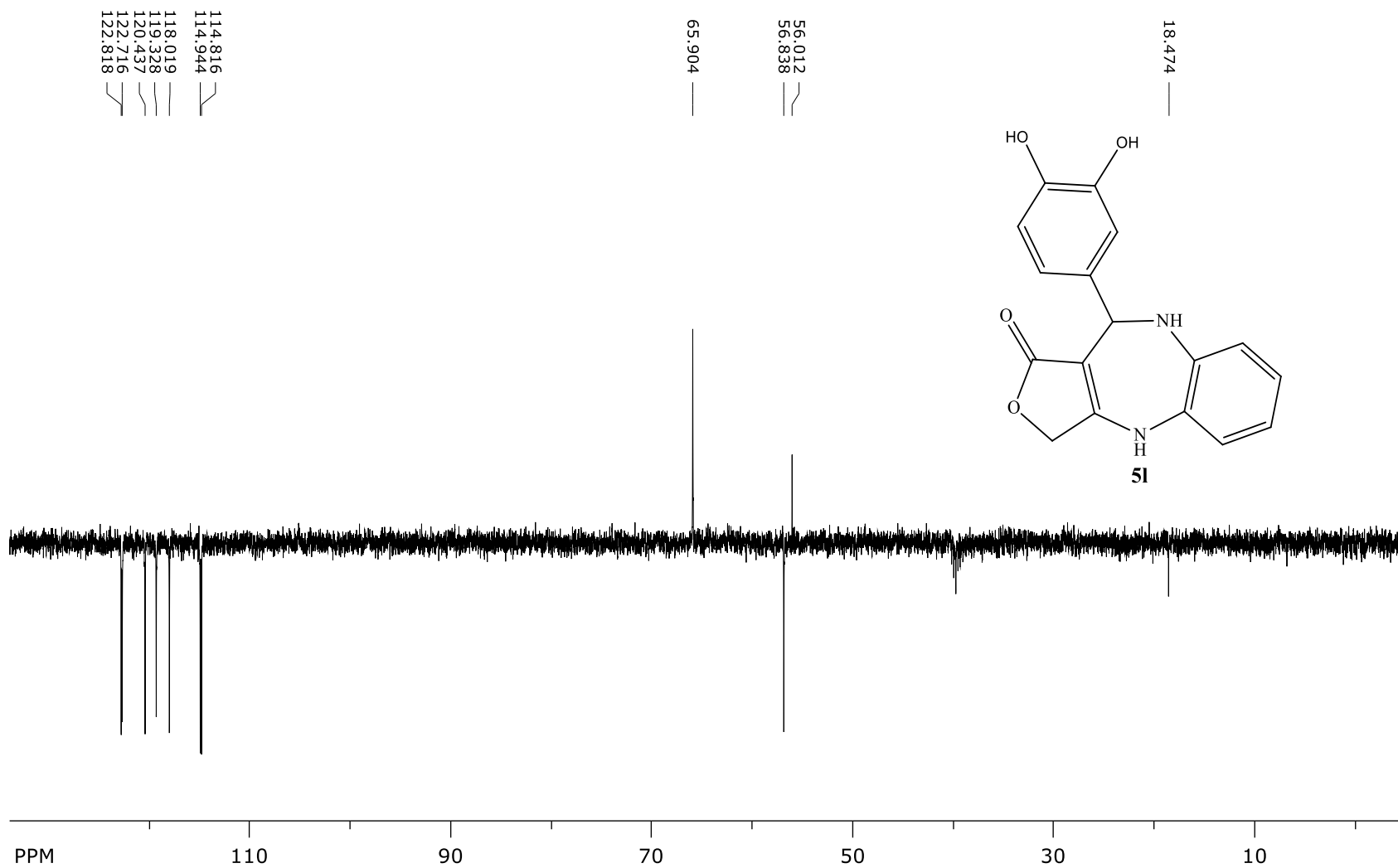


Figura 49. Espectro de RMN DEPT-135 de **5l** em DMSO-d₆

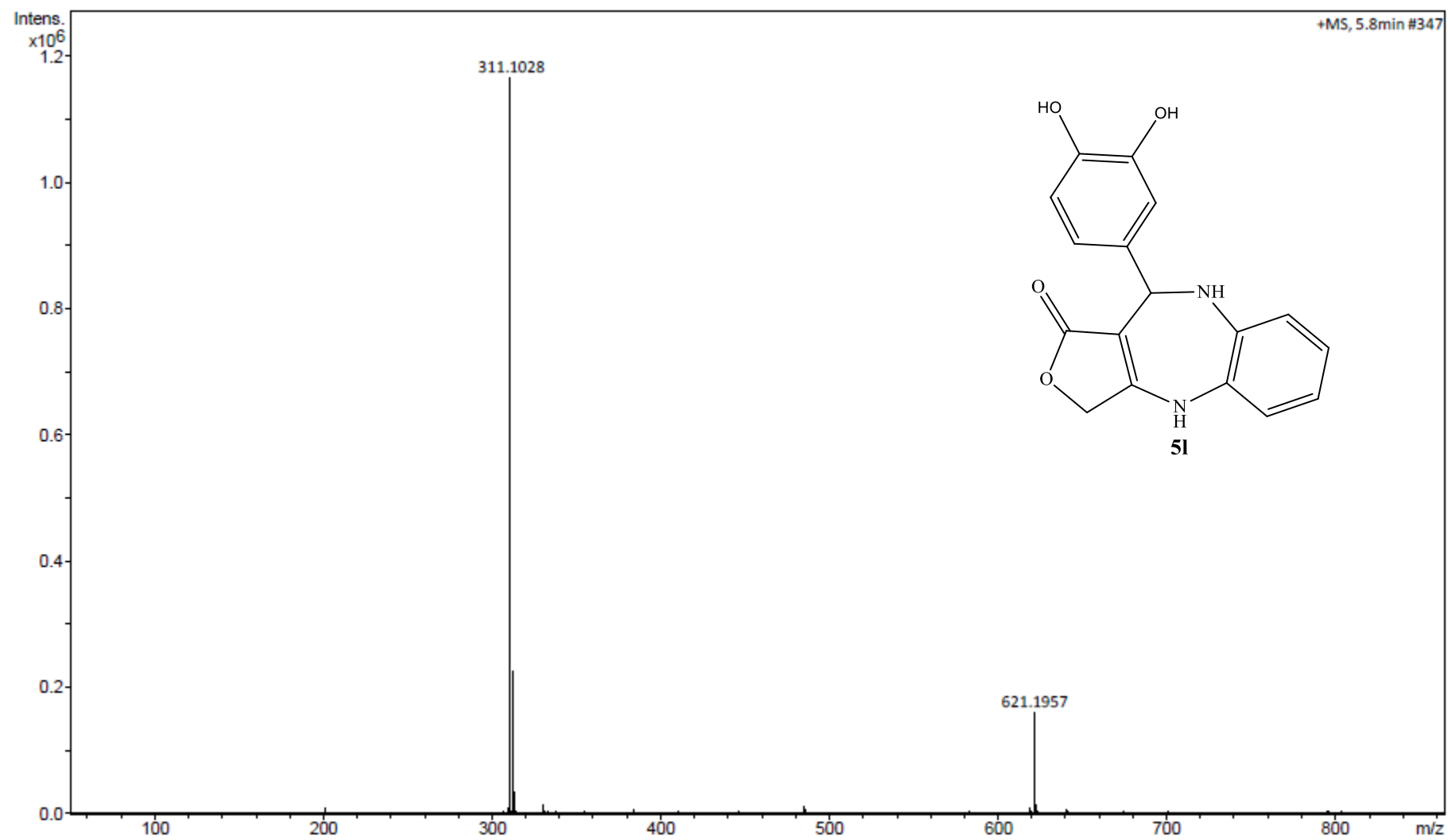


Figura 50. Espectro de HRMS de **51**

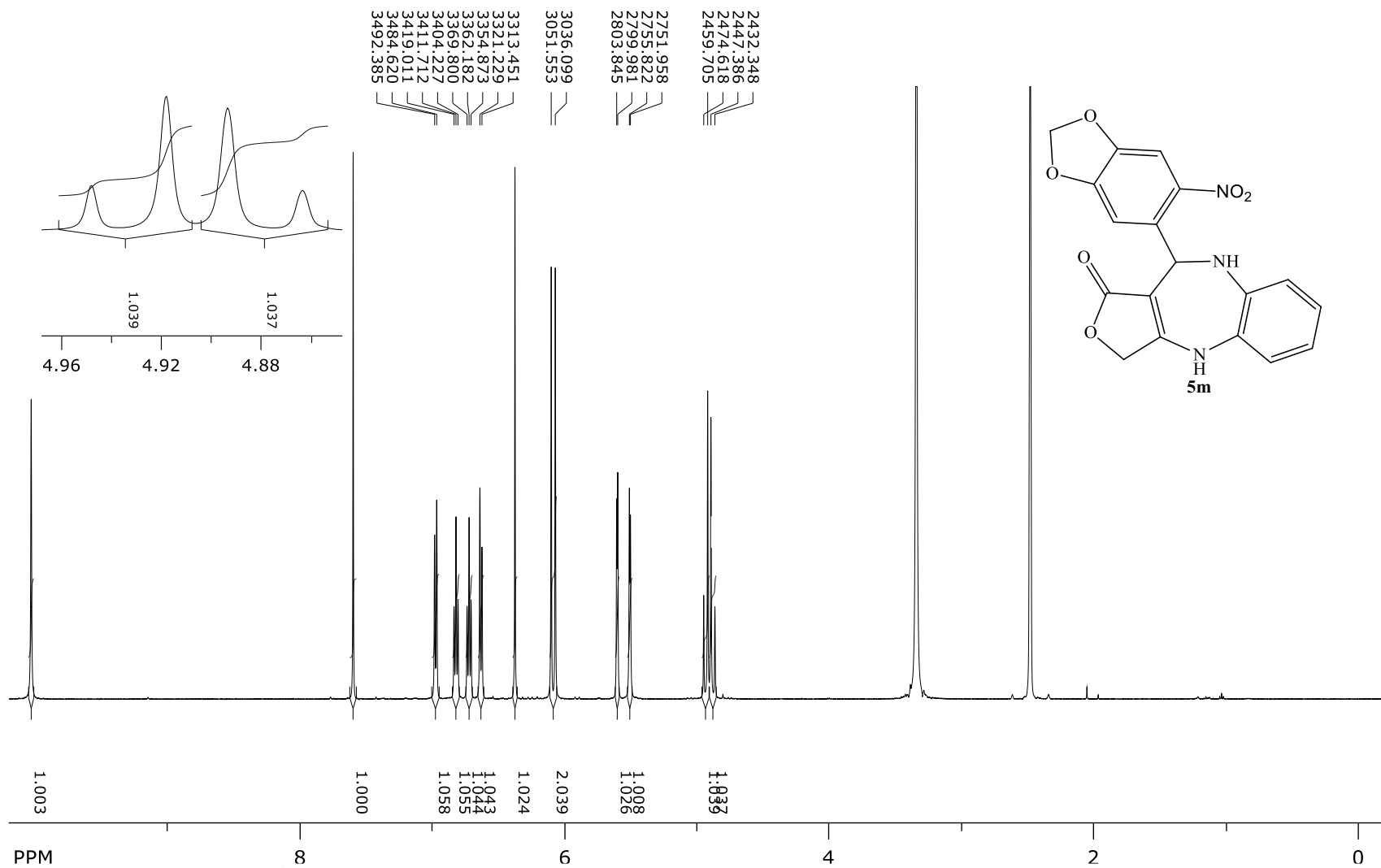


Figura 51. Espectro de RMN de ^1H de **5m** em DMSO-d₆

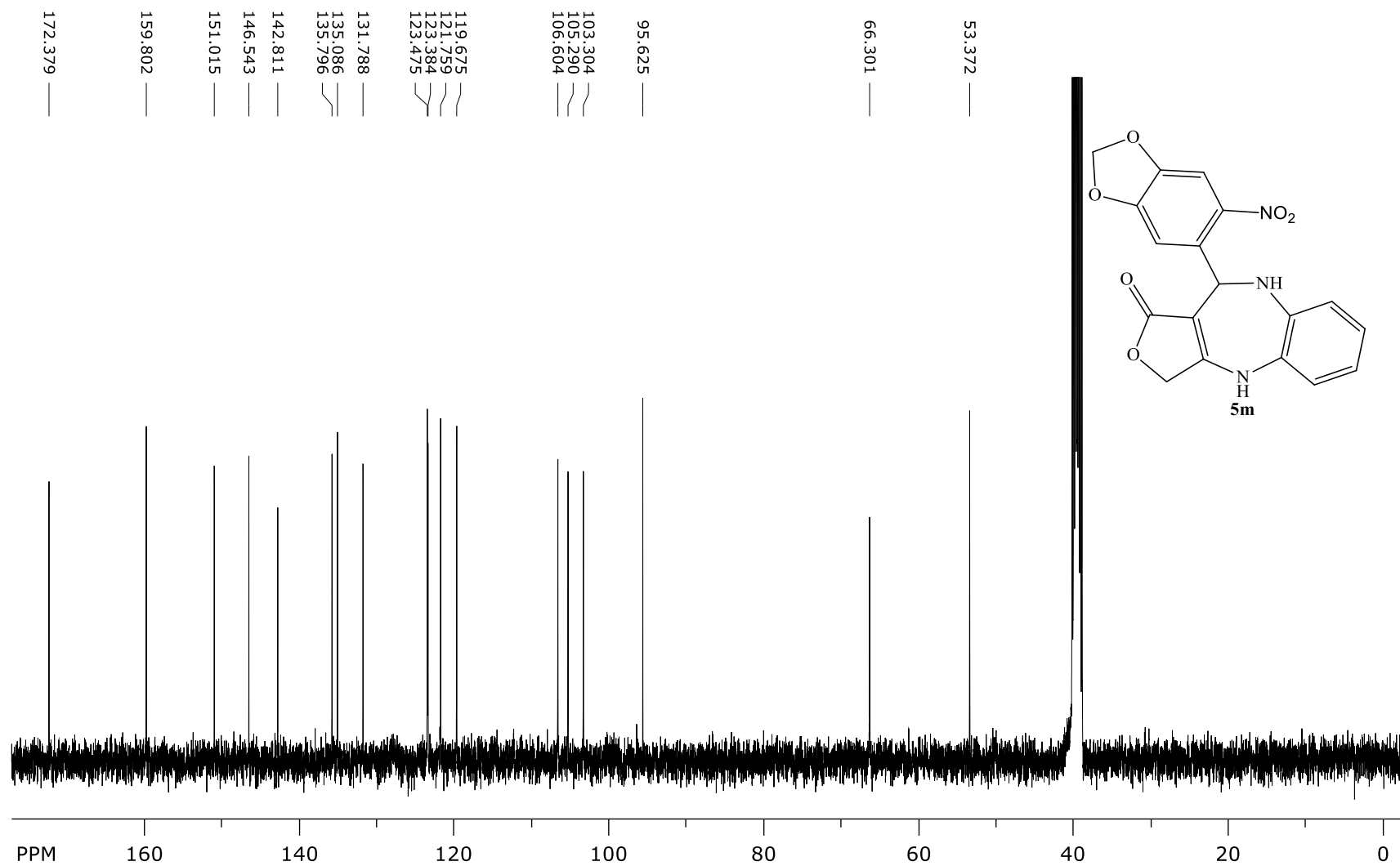


Figura 52. Espectro de RMN de ^{13}C de **5m** em DMSO-d_6

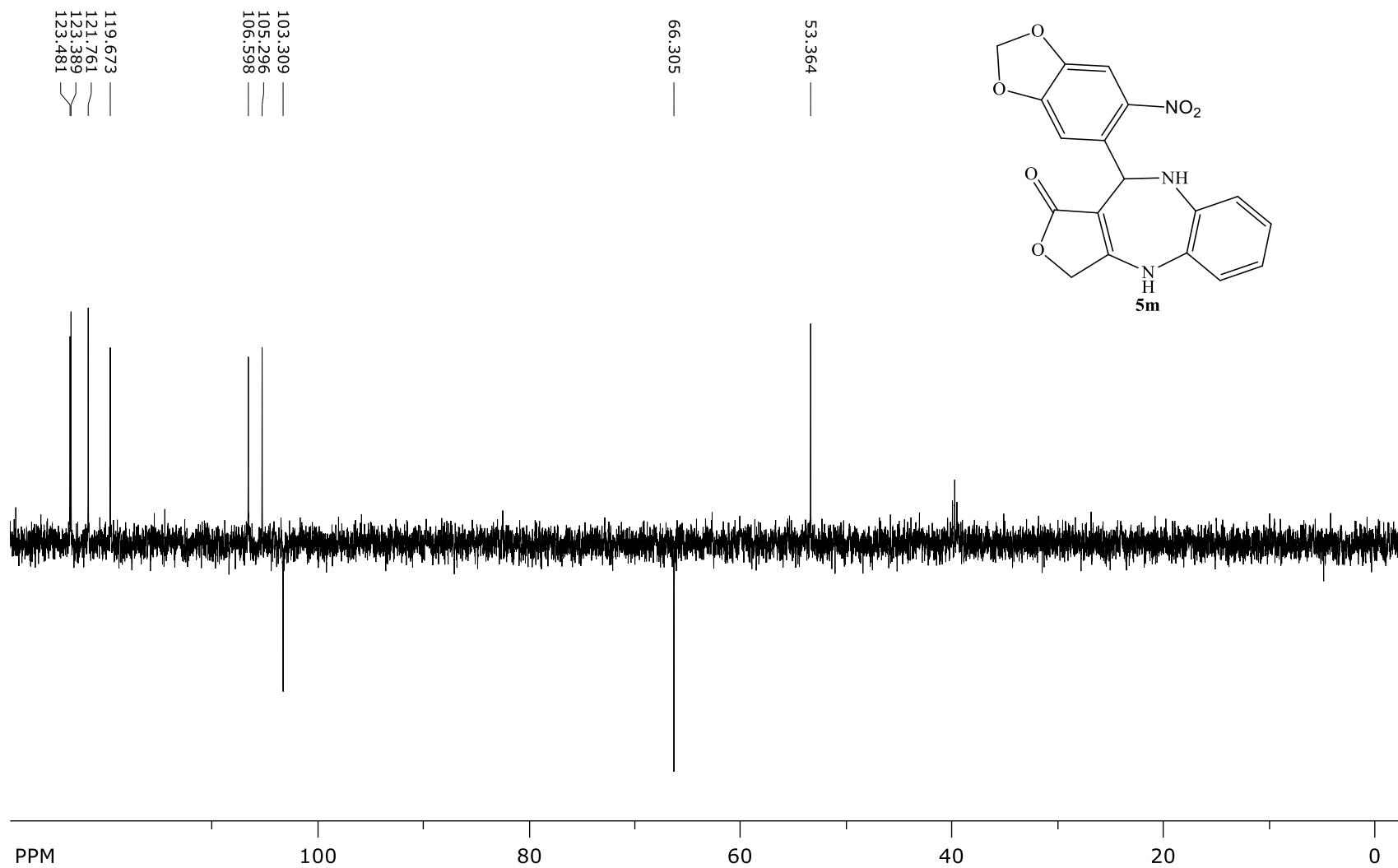


Figura 53. Espectro de RMN DEPT-135 de **5m** em DMSO-d₆

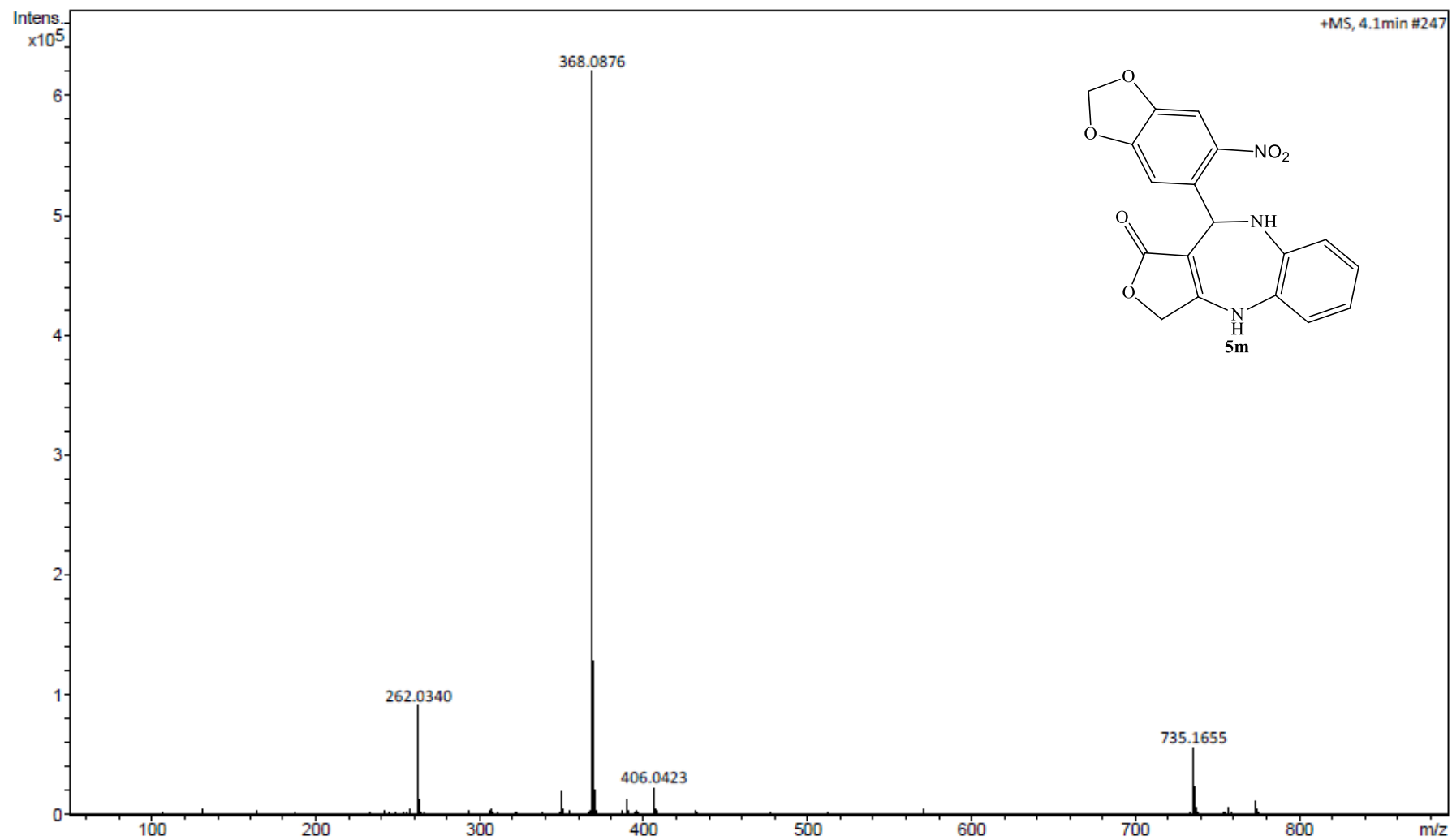


Figura 54. Espectro de HRMS de **5m**

