

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
COMPOSTOS HÍBRIDOS DERIVADOS DE RESVERATROL E BEZAFIBRATO
ÚTEIS AO TRATAMENTO DA DISLIPIDEMIA

LUIZ ANTONIO DUTRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

COORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido

ARARAQUARA-SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS
COMPOSTOS HÍBRIDOS DERIVADOS DE RESVERATROL E BEZAFIBRATO
ÚTEIS AO TRATAMENTO DA DISLIPIDEMIA

LUIZ ANTONIO DUTRA

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos

COORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael V. C. Guido

ARARAQUARA - SP

2017

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PLANEJAMENTO, SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE RESVERATROL ÚTEIS AO TRATAMENTO DA DISLIPIDEMIA

AUTOR: LUIZ ANTONIO DUTRA

ORIENTADOR: JEAN LEANDRO DOS SANTOS

COORIENTADOR: RAFAEL VICTORIO CARVALHO GUIDO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS

Depto de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara-UNESP



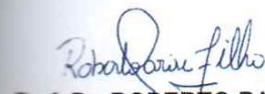
Profa Dra. ANGELICA AMORIM AMATO

Farmácia / Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília



Profa. Dra. IVONE CARVALHO

Depto de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP



Prof. Dr. ROBERTO PARISE FILHO

Depto de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo



Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN

Depto de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara-UNESP

Araraquara, 20 de Dezembro de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Pai, Valdecir Dutra, que nos deixou este ano (26/09/2017). Ele sempre me apoiou durante toda a jornada da Pós-Graduação e tinha muito orgulho da minha carreira científica.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade do Doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos pela confiança depositada em tomada de decisões, e pela amizade gerada por todos esses anos.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Rafael V. C. Guido pelo apoio nos estudos de docking molecular.

Ao Prof. Dr. Stefan Knapp pela oportunidade em realizar o Doutorado Sanduíche no *Structural Genomics Consortium* (SGC) na Goethe University, Frankfurt am Main, Alemanha.

À Fapesp pela concessão da Bolsa de Doutorado no País (Processo 2014/03945-9) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE (Processo 2015/21271-8).

A todos os colaboradores deste trabalho: Dr. Marisa Passarelli (USP), Fabiane Dias Ferreira (USP), Profa. Dra. Angélica Amorim Amato (UNB) e Dra. Mariella Lacerda (UNB).

A todos os colegas de laboratório que sempre estiveram presentes nos momentos de felicidade e tristeza com as reações orgânicas: Gabriel, Thaís, Aline, Guilherme, Diego, Rafael, Cauê, Karina, Juliana, Johnny, Gabriela, Beatriz, Mateus, Marcella e Daniela.

À minha esposa Isabel Duarte Coutinho por estar sempre ao meu lado nos melhores e difíceis momentos durante este período.

Às minhas filhas gêmeas Carina e Clarice que nos enchem de alegria todos os dias.

Aos meus pais, Valdecir e Cleuza, e meu irmão Maurício pelo apoio e carinho.

RESUMO

A dislipidemia causada por hipertrigliceridemia e baixo HDL-C é um marcador de risco para a progressão da aterosclerose e doenças cardiovasculares. Os receptores PPARs são fatores de transcrição que controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e glicose. A ativação de PPAR- α aumenta a expressão gênica de apoA1 e LPL contribuindo para o aumento de HDL-C e redução de TG, respectivamente. Através da hibridação molecular entre fibratos e resveratrol, nós planejamos e sintetizamos novos agonistas de PPAR- α . O novos compostos híbridos ativaram os receptores PPAR- α/γ na faixa de nM, com destaque para o composto (*E*)-2-metil-2-(4-fenoxiestireno)propanoamida (**5b**). O composto **5b** foi mais eficiente que o bezafibrato ($EC_{50}= 18000nM$) na ativação de PPARs, com valor de $EC_{50}= 28nM$ para PPAR- α e $EC_{50}= 69nM$ para PPAR- γ . Ainda, **5b** ocupou o sítio ativo de PPAR- α mostrando interação polar com His 440 além de ser estabilizado por interações hidrofóbicas. Além disso, **5b** aumentou o efluxo de colesterol em macrófagos em 20% e 20,8% mediado por HDL e apoA1 respectivamente. **5b** não mostrou valores significativos no na diferenciação de adipócitos, concluindo que não há acúmulo de TG no tecido adiposo, o qual é o principal efeito adverso das tiazolidinedionas.

Palavras-chave: Resveratrol. Fibratos. PPARs. Dislipidemia.

ABSTRACT

Dyslipidemia caused by hypertriglyceridemia and low HDL-C is a marker of risk for the progression of atherosclerosis and cardiovascular diseases. Receptors PPARs are transcription factors that control the expression genes involved in lipid and glucose metabolism. The PPAR- α activation increases gene expression of apoA1 and LPL contributing to elevation of HDL-C and reduction of TG. Considering, molecular hybridization between fibrates and resveratrol, we designed and synthesized new PPAR- α agonists. The novel compounds were able to activate both PPAR- α/γ in the nM range, highlighting **5b** with EC₅₀ value of 28nM for PPAR- α and 69nM for PPAR- γ . Furthermore, **5b** occupied the active site of PPAR- α showing polar interaction with His 440 and it was stabilized by hydrophobic interactions. In addition, **5b** was able to remove cholesterol from cells around 20% cholesterol efflux led by HDL and 20.8% by apoA1 in macrophages bone marrow line. Compound **5b** did not show significant values in the differentiation of adipocytes. Then, there is no accumulation of TG in adipose tissue, which is the main adverse effect of thiazolidinediones.

Keywords: Resveratrol. Fibrates. PPARs. Dyslipidemia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.2.1 METABOLISMO DE LIPÍDIOS	16
1.2.1.1 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)	16
1.2.1.2 Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)	17
1.2.1.3 Triglicerídeos (TG).....	19
1.2.3 ATEROSCLEROSE E DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES	19
1.2.4 RECEPTORES PPARS COMO ALVO NO TRATAMENTO DA DISLIPIDEMIA	20
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODO	26
3.1 MATERIAL	26
3.2 MÉTODOS ANALÍTICOS	27
3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	27
3.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN)	27
3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica.....	27
3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa	27
3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	27
3.2.6 Espectrofotometria na região do Infravermelho	28
3.3 PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	28
3.4 METODOLOGIA SINTÉTICA	30
3.4.1 Síntese do intermediário 1b	31
3.4.2 Síntese do intermediário 2b	32
3.4.3 Síntese dos compostos híbridos finais.....	33
3.5 ENSAIO DE TRANSFEÇÃO E GENE REPÓRTER	35
3.6 AVALIAÇÃO DO EFLUXO DE COLESTEROL.....	36
3.7 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS	37
3.8 DOCAGEM MOLECULAR	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 1B	39
4.2 SÍNTESE DO INTERMEDIÁRIO 2B	40
4.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL.....	46
4.4.1 Intermediário 1a	46
4.4.2 Intermediário 1b.....	46
4.4.3 2-bromo-2-dimetil-buatanoamida	47
4.4.4 Intermediário 2b.....	47
4.4.5 Compostos híbridos finais	48
4.5 ATIVIDADE AGONISTA EM PPAR- α/γ	55
4.6 MODO DE LIGAÇÃO DE 5B EM PPAR- α/γ	57
4.7 EFLUXO DE COLESTEROL EM MACRÓFAGOS.....	59
5. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE.....	68

Lista de Figuras

Figura 1. Transporte reverso de colesterol em tecidos e macrófagos.....	18
Figura 2. Efeitos biológicos e estruturais após ativação dos receptores PPARs (autoria própria).....	22
Figura 3. Estrutura química de fibratos, resveratrol e CTM como agonistas de PPARs	25
Figura 4. Modo de ligação do resveratrol no sítio ativo de PPAR- γ em comparação com o agonista CTM ...	29
Figura 5. Mecanismo de reação do intermediário 1a	40
Figura 6. Estrutura química dos compostos híbridos 4a-f e 5a-f.....	45
Figura 7. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5f	48
Figura 8. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 4a.....	49
Figura 9. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 4b	50
Figura 10. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 4c.....	50
Figura 11. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 4d	51
Figura 12. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 4e.....	51
Figura 13. Estrutura química do composto 4f.....	52
Figura 14. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5a.....	52
Figura 15. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5b	53
Figura 16. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5c.....	53
Figura 17. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5d	54
Figura 18. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto 5e.....	54
Figura 19. Curva de dose-resposta para os agonistas 5b e 5f em PPAR- α e PPAR- γ	56
Figura 20. Modo de ligação de 5b em PPAR- α/γ	58
Figura 21. Percentagem do efluxo de colesterol determinado pelos para os compostos 4a-f e 5a-f	60
Figura 22. Indução da diferenciação de adipócitos por 5b.....	62

Lista de Tabelas

Tabela 1. Funções biológicas proveniente da ativação de PPARs.....	21
Tabela 2. Otimização sintética para os compostos híbridos finais	43
Tabela 3. Valores de EC ₅₀ para os novos agonistas de PPAR- α/γ	56

Lista de Esquemas

Esquema 1. Planejamento estrutural das moléculas híbridas de fibratos.....	30
Esquema 2. Esquema geral de síntese para os compostos híbridos 4a-f e 5a-f.	31
Esquema 3. Esquema geral para a síntese do intermediário 2a.	31
Esquema 4. Esquema geral para a síntese do intermediário 2b.	32
Esquema 5. Esquema geral para síntese dos compostos híbridos finais.....	34
Esquema 6. Etapas de formação de um carbocátion.....	39
Esquema 7. Mecanismo de hidrólise de éster para formação do intermediário 2a.....	40
Esquema 8. Mecanismo de reação do cloreto de acila, propionamida e 2b.....	41
Esquema 9. Mecanismo de reação de Heck na obtenção de compostos (<i>E</i>).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABCA1 - Transportador cassete de ligação a ATP-1
- ACAT – Acil-CoA-colesterol-aciltransferase
- apoA1 – Apolipoproteína A1
- apoB100 - Apolipoproteína B100
- CETP – Proteína de transferência de éster de colesterol
- CDCl_3 – Clorofórmio deuterado
- CPK - Creatinofosfoquinase
- DCV – Doenças cardiovasculares
- eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
- HDL – Lipoproteína de alta densidade
- HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA
- HMG-CoA - 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase
- LCAT - Lecitina-colesterol-aciltransferase
- IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
- LDL – Lipoproteína de baixa densidade
- LDL-R – Receptores de LDL
- LPL – Lipoproteína de lipase
- LRT – Lipoproteínas ricas em triglicerídeos
- PPAR- α – Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos- α
- PPAR- γ – Receptores ativadores da proliferação de peroxissomos- γ
- RXR – Receptores retinóide X
- SR-BI – receptores de varredura BI
- TG – Triglicerídeos
- TRC – Transporte reverso de colesterol
- TNF- α – Fator de necrose tumoral- α
- VCAM-1 – Moléculas de adesão endotelial
- VLDL – Lipoproteína de muita baixa densidade

1. INTRODUÇÃO

A dislipidemia é definida como uma desregulação dos níveis lipídicos no plasma, sendo considerada como principal fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares causadas (DCV) por aterosclerose. DCV recorrente por aterosclerose como doenças isquêmicas e acidente vascular cerebral são líderes em causas de morte em todo o mundo (NAGHAVI et al., 2015).

Aumento dos níveis plasmáticos de colesterol bem como elevadas concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) dão início ao processo de depósito desses lipídios na camada das artérias, conhecido como aterosclerose. Esta doença é um processo inflamatório que envolve as células espumosas que se depositam na camada íntima das artérias. Além de LDL-C, lipoproteínas ricas em triglicerídeos como VLDL, IDL e quilomicrons também contribuem no desenvolvimento de aterosclerose (LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, 2011).

Diminuição nas concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) aceleram o desenvolvimento de DCV. A HDL apresenta propriedade antiaterogênica porque realiza o transporte reverso de colesterol (TRC) de tecidos e placas ateroscleróticas para depuração no fígado. Concentrações normais de HDL-C (>40mg/dL para homens e >50mg/dL para mulheres) leva a redução de placa aterosclerótica promovendo proteção a eventos cardíacos (KINGWELL et al., 2014).

Embora as estatinas sejam consideradas fármacos de primeira escolha para o tratamento da dislipidemia, estas apresentam pouca eficácia no aumento de HDL-C e redução de TG. Interessantemente, a ativação de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) está diretamente relacionado com o metabolismo de lipídios, principalmente na regulação de TG e HDL-C (ASCUNCE et al., 2012; TENENBAUM; FISMAN, 2012).

Os PPARs estão envolvidos no controle do metabolismo de lipídios, da glicose e inflamação. PPAR- α expressa genes de apoA1 (principal apolipoproteína que constitui a estrutura de HDL) no fígado, o qual é um receptor de colesterol durante o TRC. ApoA1 capta colesterol através dos transportadores ABCA1 no fígado e intestino para formar HDL-C. Esta lipoproteína juntamente com apoA1 também promovem efluxo de colesterol de células espumosas pelos transportes ABCA1 e ABCG1 na membrana celular de macrófagos, levando a regressão de placa aterosclerótica (KINGWELL et al., 2014; TENENBAUM; FISMAN, 2012).

A ativação de PPAR- α expressa genes de lipoproteína lipase (LPL). A LPL degrada TG de VLDL, IDL e quilomicrons em ácidos graxos livres que serão utilizados como fonte de energia pelo tecido muscular ou depositados no tecido adiposo na forma de TG. A aumentada atividade LPL por

PPAR- α reduz concentrações de TG plasmática, diminuindo a progressão de placa aterosclerótica e riscos cardiovasculares. Os fibratos são fármacos agonistas PPAR- α disponíveis na terapêutica para o tratamento da dislipidemia. Os fibratos reduzem concentrações de TG e elevam HDL-C através da expressão gênica de LPL e apoA1, respectivamente (TALAYERO; SACKS, 2011; TOTH, 2016). A busca por novas terapias capazes de aumentar a concentração de HDL-C plasmático ainda é um desafio no cenário da Química Farmacêutica e Medicinal, uma vez que os fibratos são únicos fármacos disponíveis para redução de TG e aumento de HDL-C utilizados no tratamento da dislipidemia.

Alguns compostos agonistas de PPAR têm sido descritos na literatura, dentre os quais se destaca o resveratrol. Este é um produto natural encontrado em plantas, a exemplo da *Vitis vinefera* (videira). Diversos benefícios cardioprotetores têm sido descritos com o uso de resveratrol, como por exemplo, efeito antioxidante, vasodilatador, antiagregante plaquetário e modulador lipídico (NAKATA; TAKAHASHI; INOUE, 2012). Estudos mostram que resveratrol é um agonista de PPAR- α capaz de aumentar a expressão de genes de ABCA1 e promover efluxo de colesterol em macrófagos (BERROUGUI et al., 2009; NAKATA; TAKAHASHI; INOUE, 2012). O resveratrol aumenta concentrações de HDL-C e reduz concentrações de LDL e TG (MIURA; MIURA; YAGASAKI, 2003). Diante destes benefícios, resveratrol é um interessante protótipo para o desenvolvimento de novos compostos moduladores lipídicos através da atividade agonista de PPAR- α .

Neste trabalho foram planejados novos agonistas de PPAR- α utilizando a abordagem de hibridização molecular. Esta abordagem visa à união de estruturas biologicamente ativas para a obtenção de uma nova entidade química com potência superior aos compostos de origem. Diante dos benefícios observados pelo resveratrol na modulação lipídica, foram sintetizados híbridos baseados na estrutura química deste protótipo e dos fibratos. Esta abordagem pode permitir a obtenção de fármacos mais seguros e efetivos para o aumento de HDL-C e redução de TG.

1.2 Revisão da literatura

As doenças cardiovasculares (DCV) como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial ainda são as principais causas de morte no mundo. Por ano, aproximadamente um terço das mortes em adultos em todo o mundo é devido DCV(ASCUNCE et al., 2012). Dados estatísticos mostram que as DCV ainda representam a terceira maior causa de morte em todo mundo, seguido por HIV/AIDS e câncer. No período de 1990-2013 as mortes por DCV recuaram -21,9%, enquanto HIV/AIDS -23,0%, e câncer -14,0%(NAGHAVI et al., 2015).

No ano de 2007, por exemplo, ocorreram no Brasil cerca de 308.866 óbitos por doenças circulatórias. Em 2009, foi registrado 91.970 internações no SUS por DCV, resultando em um custo de R\$165.461.644,33(SBC; SBH; SBN, 2010). Em países como os Estados Unidos as DCV constituem também sério problema de Saúde Pública. Naquele país, 19 milhões de pessoas apresentam DCV, sendo que 6,5 milhões desenvolvem acidente vascular encefálico (ASCUNCE et al., 2012).

Dentre todas as DCV, aquelas causadas por aterosclerose, a exemplo de doenças isquêmicas (infarto do miocárdio e doenças cérebro vasculares) representam 46% de mortes em homens e 38% em mulheres(WORLD ORGANIZATION. WORLD HEART FEDERATION. WORLD STROKE ORGANIZATION, 2011). Altas taxas de mortalidade observadas por doenças isquêmicas refletem em alto investimento por indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos. Dados de 2011 mostram que os fármacos reguladores de lipídios estão em segundo lugar no âmbito de valores investidos para pesquisa, chegando a \$36 bilhões de dólares. Somente a atorvastatina (Lipitor[®]) em 2009 rendeu a Pfizer \$12,5 bilhões de dólares (LEDFORD, 2011).

A dislipidemia é definida como alterações multifatoriais ou genéticas no metabolismo de lipoproteínas, a exemplo de LDL-C, VLDL/IDL e HDL-C. A dislipidemia é o principal fator de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e conseqüentemente o surgimento de eventos isquêmicos (BIBBINS-DOMINGO et al., 2016).

De acordo com tipo de alteração dos níveis séricos de lipídios plasmáticos, a dislipidemia pode ser classificada em quatro tipos: *Hipercolesterolemia isolada*- elevação isolada do LDL (≥ 160 mg/dL); *Hipertrigliceridemia* - elevação isolada dos triglicerídeos (TG) (≥ 150 mg/dL), o qual aumenta o volume de partículas ricas em TG como VLDL, IDL e quilomícrons; *Hiperlipidemia mista* - valores aumentados de LDL-C (≥ 160 mg/dL) e TG (≥ 150 mg/dL); *HDL-C baixo* - redução do HDL-C (homens <40 mg/dL e mulheres <50 mg/dL) isolada ou em associação com aumento de LDL ou de TG (ANVISA, 2011).

A seguir, descrevemos o metabolismo de lipídios detalhando a importância de cada lipoproteína para o desenvolvimento de aterosclerose.

1.2.1 Metabolismo de lipídios

1.2.1.1 Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL)

O colesterol é uma molécula orgânica pertencente à classe dos esteróis contendo uma hidroxila livre em sua estrutura química. O colesterol é o principal componente das membranas celulares além de ser precursor na biossíntese da vitamina D, hormônios e sais biliares. O colesterol pode ser adquirido pela dieta, mas todas as células do corpo produzem colesterol, sendo grande parte biossintetizado no fígado. A etapa crucial para a formação do colesterol é a conversão de HMG-CoA em mevalonato, o qual é catalisado por HMG-CoA redutase para a formação de colesterol intracelular (Figura 1). Após o colesterol segue diferentes caminhos: **1)** o colesterol formado em tecido extra-hepático é utilizado para compor membranas, formação de hormônios e armazenamento (após esterificação pela acil-CoA-colesterol-aciltransferase-ACAT); **2)** o colesterol hepático é esterificado pela ACAT e transportado no plasma até os tecidos por lipoproteínas de baixa densidade (LDL-C) (NELSON; COX, 2011).

A LDL circulante é reconhecida por receptores de LDL (LDL-R) encontrados na superfície celular e transferidos para o interior da célula, evento conhecido como endocitose. Os ésteres de colesterol no interior celular são hidrolisados em colesterol livre, e os LDL-R retornam à superfície para atuar novamente na captação de LDL. Níveis ideais de colesterol intracelular regulam a sua biossíntese inibindo a atividade da HMG-CoA redutase. Altos níveis de colesterol intracelulares ativam ACAT, que aumentam a formação de ésteres de colesterol para armazenamento. Níveis de colesterol aumentados na célula inibem a transcrição do gene que codifica o LDL-R, o qual reduz a produção do receptor e a captação de LDL plasmática, levando ao estado de hipercolesterolemia (NELSON; COX, 2011).

Na hipercolesterolemia familiar os níveis de colesterol plasmático são extremamente elevados e há o desenvolvimento de aterosclerose na infância. A doença é caracterizada por mutações no gene que codifica o receptor de LDL (LDL-R); mutações também são observadas no gene *APOB* que codifica apolipoproteína B-100 (Apo B-100), diminuindo a afinidade pelo LDL-R. Nesses indivíduos, a captação de colesterol plasmático mediado por LDL-R celular não ocorre, podendo ocorrer um acúmulo de colesterol no plasma, contribuindo para o desenvolvimento de aterosclerose acelerada (BRASILEIRA, 2012).

Alguns fármacos são disponíveis como terapia na redução das concentrações de LDL-C, a exemplo das estatinas e inibidores de PCSK9. As estatinas são inibidores de HMG-CoA redutase levando a inibição da biossíntese de colesterol hepática e aumento da expressão de receptores de LDL (LDL-R), e conseqüentemente diminuição de LDL-C circulante (MANSI et al., 2013). A proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) é uma proteína expressa em diversos

tecidos que degrada receptores de LDL (LDL-R) na superfície celular, inibindo desta forma a absorção de colesterol pelas células. No entanto, o bloqueio de PCSK9 por inibidores (evolocumab, bococizumab, and alirocumab) promovem a reciclagem de LDL-R celular reduzindo LDL-C plasmático (LAMBERT et al., 2012).

1.2.1.2 Lipoproteína de Alta Densidade (HDL)

A lipoproteína de alta densidade (HDL) contém em sua estrutura diversas apolipoproteínas, como apoA-1, apoC-I, apoC-II, apoC-III e outras, além da enzima lecitina-colesterol-aciltransferase (LCAT) que catalisa a formação de ésteres de colesterol. A HDL participa do processo conhecido como transporte reverso de colesterol (TRC). O processo de TRC remove lipídios (colesterol livre e éster de colesterol) principalmente do fígado, intestino e tecido adiposo através dos *transportadores cassete de ligação a ATP-1* (ABCA-1) para formação de HDL-C (BREWER, 2004; HEINECKE, 2012). A apoA-1 é biossintetizada no fígado sendo a principal apolipoproteína que compõe a estrutura de HDL. O efluxo de colesterol por ABCA-1 é captado por apoA-1 e leva à formação da chamado pré-HDL (ou HDL nascente). Após a esterificação de colesterol livre por LCAT se tem a formação da α -HDL, que transporta os ésteres de colesterol para excreção no fígado (Figura 1). Em macrófagos aterogênicos (células espumosas que compõem placa aterosclerótica) o TRC é mediado por HDL através do transportador ABCG1 e receptores SR-BI (receptores de varredura-BI), além de apoA1 (ABCA1) (CHOI et al., 2017; JOY; HEGELE, 2008).

A HDL é considerada antiaterogênica por diminuir riscos de evento cardiovascular devido o TRC, o qual leva a regressão de placa aterosclerótica. Pacientes com concentrações de HDL < 35 mg/dL estão mais propensos a eventos isquêmicos do que aqueles que apresentam concentrações séricas > 60 mg/dL (BALLANTYNE et al., 1999). Pacientes com Síndrome Coronária Aguda apresentam menor formação de α -HDL e estão mais predispostos a eventos cardiovasculares (TIAN et al., 2014). Estudos realizados *in vivo* mostraram que a infusão direta de apoA-1 em ratos aumenta o TRC e níveis plasmáticos de α -HDL, além de reduzir placas ateroscleróticas (HUANG et al., 2014). Alguns fármacos são disponíveis para o tratamento da dislipidemia devido baixo HDL-C, a exemplo dos fibratos e niacina. Esses compostos aumentam a expressão gênica de apoA1 no fígado e elevando HDL-C plasmático após ativação dos receptores ativadores da proliferação por peroxissomos-alfa (PPAR- α) (HENNUYER et al., 2005).

Outros fármacos têm recebido atenção para o tratamento de dislipidemia ocasionado por baixo HDL-C, como a exemplo da niacina. O possível mecanismo da niacina envolve a inibição de lipoproteínas lipase (LPL), reduzindo a hidrólise de triglicerídeos no tecido adiposo. O resultado final é uma menor concentração de ácidos graxos livre na corrente sanguínea, diminuindo a

biossíntese de VLDL e IDL com aumento de HDL-C. Estes aumentos de HDL-C provem da ação da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) (DE MARIA; MOREIRA, 2011). Esta proteína tem como função a transferência de colesterol de lipoproteínas ricas em TG (VLDL e IDL) para HDL. Um estudo realizado recentemente em pacientes com baixo HDL-C e altas concentrações de TG, mostrou que niacina não apresentou benefícios quanto à prevenção de eventos cardíacos (CHOI et al., 2017). A CETP por muitos anos têm sido investigada como alvo terapêutico no aumento de HDL-C. No entanto, diversos compostos foram planejados como candidatos a fármacos, entre eles torcetrapibe, anacetrapibe, dalcetrapibe, e evacetrapibe. Grande parcela desses compostos tiveram seus estudos clínicos interrompidos devido causas de morte e complicações cardíacas. Atualmente apenas o anacetrapibe encontra-se em fase clínica III (MULLARD, 2015).

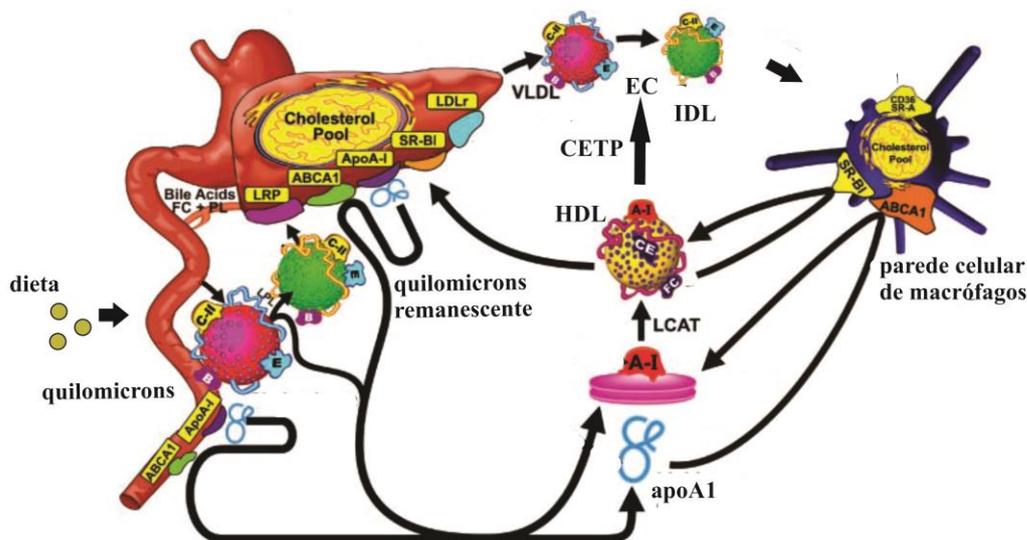


Figura 1. Transporte reverso de colesterol em tecidos e macrófagos (adaptado de BREWER, 2004 e HEINECKE, 2012). apoA1 (biossíntese no fígado) age comoceptor de colesterol proveniente de fígado e intestino através dos transportador ABCA1 levando à formação de HDL-C, a qual transporta colesterol para degradação no fígado. HDL-C e apoA1 também agem como aceptores de colesterol em células espumosas (componente de placa aterosclerótica) através de ABCA1, ABCG1 e SR-BI respectivamente. A CETP transfere éster de colesterol de HDL para VLDL e IDL, tornando estas lipoproteínas aterogênicas, diminuindo a eficiência de HDL no processo de TRC.

1.2.1.3 Triglicerídeos (TG)

Os triglicerídeos (TG) podem ser obtidos por duas vias, a exógena através da dieta, e endógena por biossíntese no fígado. Durante uma dieta lipídica os TGs são absorvidos por enterócitos e transportados por quilomicrons até o fígado para degradação. Durante este percurso os TGs são hidrolisados por lipoproteínas lipases (LPL) originando ácidos graxos livres e quilomicrons remanescente. Os ácidos graxos são utilizados pelo músculo esquelético como fonte de energia, ou também armazenado no tecido adiposo. Os TG em quilomicrons remanescentes são degradados pelo fígado em ácidos graxos (TALAYERO; SACKS, 2011; TOTH, 2016).

Seguindo a via endógena, na presença de glicerol-3-fosfato, os ácidos graxos são convertidos em TGs os quais são transportados na corrente sanguínea por lipoproteínas de muita alta densidade (VLDL). As VLDLs são degradadas em lipoproteína de densidade intermediária (IDL), LDL e ácidos graxos por ação das LPLs. Estudos mostram que lipoproteínas remanescentes ricas em TGs contribuem para a formação de placa aterosclerótica (TALAYERO; SACKS, 2011; TOTH, 2016).

No tratamento de hipertrigliceridemia, os fibratos são potentes redutores de TG plasmático. Os fibratos expressam genes de LPL, aumentando a atividade dessa lipoproteína. Esse efeito contribui com a hidrólise do TG em ácido graxo nas partículas de VLDL/IDL (HENNUYER et al., 2005). Alvos terapêuticos como diacilglicerol acil-transferase-2 (DGAT2) têm sido investigados para redução de TG. A DGAT2 catalisa a etapa de biossíntese de TG através da esterificação de diacilglicerol na presença de acil-CoA. Promissores inibidores de DAGT2 têm sido planejados e alguns compostos como o pradigastat se encontra em fase clínica III (FUTATSUGI et al., 2015).

1.2.3 Aterosclerose e desenvolvimento de doenças cardiovasculares

O aumento dos níveis séricos de LDL plasmático está diretamente relacionado com o desenvolvimento de aterosclerose, uma doença inflamatória crônica caracterizada pelo acúmulo de lipídios na camada íntima das artérias (CHARO; TAUB, 2011). O processo inflamatório se inicia com a migração de monócitos circulantes para camada íntima através de moléculas de adesão endotelial (VCAM-1). Os monócitos se diferenciam em macrófagos, que fagocitam LDL oxidadas (LDLox), transformando-se em células espumosas (*foam cells*) que são depositadas na parede de artérias iniciando o processo de formação de placa aterosclerótica. As células espumosas secretam TNF- α e interleucina 1- β que promovem aumento da expressão de molécula de adesão vascular celular -1 (VCAM-1), dando início ao processo inflamatório crônico (LIBBY, 2002; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011).

Assim como a LDL-C, as lipoproteínas remanescentes ricas em TG (VLDL, IDL e quilomicrons) são fagocitadas por macrófagos levando a formação de células espumosas, as quais contribuem para formação e progressão de placa aterosclerótica. A hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (LRT) resulta em altas concentrações de ácidos graxos oxidados, os quais aumentam a expressão de citocinas pró-inflamatórias levando a inflamação endotelial. Por outro lado, as LRT aumentam a expressão de VCAM-1 endotelial recrutando monócitos para o endotélio e a resposta inflamatória na formação de células espumosas (TOTH, 2016).

Diante de um estado de hipertrigliceridemia que contribui para a formação de placa aterosclerótica, concentrações de HDL-C são reduzidas por ação da CETP. Efeitos antiaterogênicos de HDL como inibição da oxidação de LDL-C e redução da expressão de VCAM-1 endotelial são diminuídos. Além disso, a redução do processo de TRC de células espumosas também reduz, acelerando a formação e progressão de placa aterosclerótica (TOTH, 2016).

O crescente acúmulo de células espumosas na íntima das artérias se estende para outras camadas diminuindo seu calibre ou podendo acarretar na ruptura da placa aterosclerótica. Após o rompimento do endotélio há o extravasamento do conteúdo da placa para a circulação que pode levar a formação de trombo através do processo de agregação plaquetária. A formação de trombo no local da lesão endotelial interrompe o fluxo sanguíneo em artérias, levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares como infarto do miocárdio e doenças cerebrovasculares (LIBBY, 2011).

1.2.4 Receptores PPARs como alvo no tratamento da dislipidemia

Os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) são fatores de transcrição e membros da família dos receptores nucleares. A ativação dos receptores PPARs dispara a expressão/silenciamento de genes envolvidos em diversas respostas biológicas como inflamação, regulação do metabolismo lipídico e da glicose. Três isoformas de PPARs são possíveis, como PPAR- α , PPAR- β e PPAR- γ , e as diversas respostas a partir da ativação deles estão apresentadas na tabela 1 (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

Tabela 1. Funções biológicas proveniente da ativação de PPARs

PPAR- α	PPAR- β	PPAR- γ
↑ oxidação de ácidos graxos	↑ oxidação de ácidos graxos	↓ citocinas pró-inflamatórias
↑ apoA-1	↑ oxidação de ácidos graxos	↑ ABCA-1
↑ LPL	↑ HDL	↓ NF- κ B
↑ ABCA-1		↑ captação de glicose
↓ citocinas pró-inflamatórias		↑ glicogênio
↑ HDL		↓ resistência a insulina
↓ LDL		
↓ triglicerídeos		

O controle da expressão gênica pelos receptores PPARs no núcleo celular é dependente de um ligante, ou seja, um agonista endógeno (oxisteróis) ou exógeno (molécula de origem natural ou sintética) o qual reconhece a estrutura do receptor para desencadear uma resposta. NO núcleo celular, os PPARs formam um heterodímero com os receptores A ativação do receptor por um agonista leva ao recrutamento de coativadores com por exemplo o receptor X retinóide (RXR). O complexo formado entre PPAR+ligante+RXR reconhece sequências de DNA conhecidas como elementos responsivos proliferadores de peroxissomos (PPREs) para então conduzir a regulação da expressão gênica (Figura 2A) (BERGER; MOLLER, 2002; BERNARDES et al., 2013; CHANDRA et al., 2009).

Estruturalmente os receptores PPARs são compostos por duas principais regiões, como o domínio de ligação ao DNA (*DNA binding domain* – DBD): esta região é responsável por reconhecer as sequências de DNA para iniciar a transcrição gênica; e o domínio de ligação do ligante ou sítio ativo (*ligand binding domain* – LBD). Análise tridimensional das estruturas químicas de fibratos ligados ao receptor tem oferecido uma melhor compreensão do modo de ativação de PPAR- α e as alterações provocadas na região C-terminal (AF2) (Samarasinghe, et al., 2009). O complexo cristalográfico do PPAR- α o fibrato **CTM** indica interações importantes que estabilizam o modo de ligação, entre elas, destaca-se as ligações de hidrogênio entre o substituinte ácido carboxílico e os resíduos Tyr464 e His440 (Figura 2c). O fibrato **CTM** também é estabilizado por interações hidrofóbicas através de resíduos de metionina e cisteína no sítio ativo de PPAR- α (Figura 2c). A ligação de hidrogênio com a Tyr464 é importante para a manutenção da proteína na sua conformação ativa, pois a conformação fechada dessa hélice é essencial para o

recrutamento de coativadores e início da transcrição (BÉNDARDEAU et al., 2009)(CHANDRA et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2015).

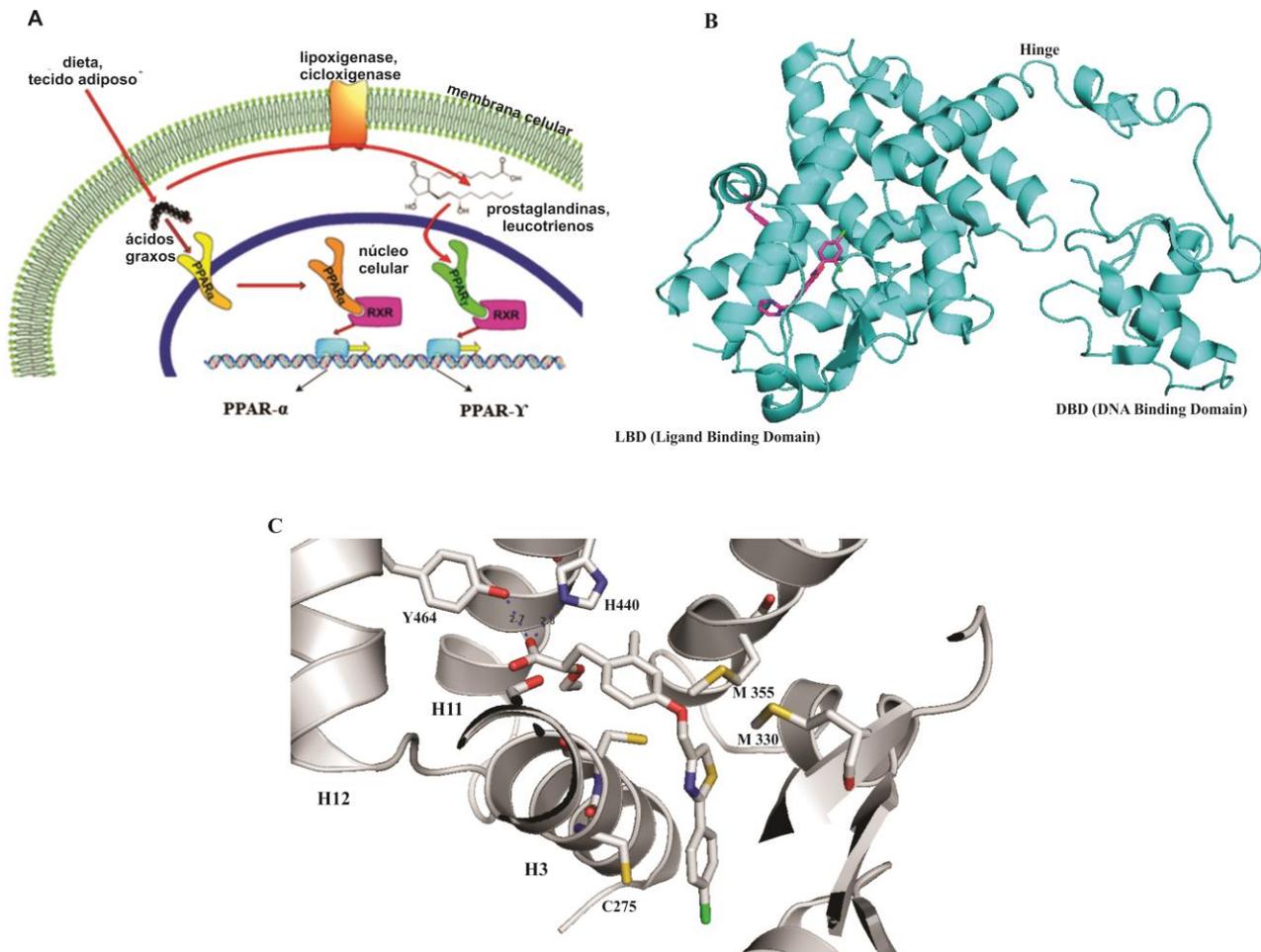


Figura 2. Efeitos biológicos e estruturais após ativação dos receptores PPARs (autoria própria). **A**, ativação de PPARs e início da transcrição gênica no núcleo celular (adaptado de BERGER; MOLLER, 2002; **B**, conformação ativa da estrutura de PPARs na forma fechada; **C**, modo de interação do fibrato CTM com o receptor PPAR- α . Código PDB 3FEI. H3, Hélice 3. H5, Hélice 5. H12, Hélice 12. Y464, tirosina 464. H440, histidina 440.

O PPAR- α é expressado em diversos tecidos como fígado, coração, rins, células endoteliais e macrófagos, e sua ativação está diretamente relacionada com a modulação lipídica, principalmente com a regulação de HDL-C, TG e oxidação de ácidos graxos. No núcleo de células hepáticas, a ativação de PPAR- α eleva a expressão de genes para biossíntese de apoA-1. Ainda em células hepáticas e do intestino, a ativação de PPAR- α conduz a transcrição gênica dos receptores- α X do fígado (LXR- α), que aumentam a expressão dos transportadores ABCA-1 da membrana celular elevando o efluxo de colesterol daquelas células (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005). Por esses mecanismos, o efeito agonista de PPAR- α contribui para biossíntese de HDL ativando o transporte reverso de colesterol a promovendo a regressão de placa aterosclerótica e prevenções ao

sistema cardiovascular (TENENBAUM; FISMAN, 2012). Estudos *in vitro* mostram que agonistas de PPARs inibem a expressão de TNF- α , uma citocina pró-aterogênica que aumenta a expressão de VCAM-1 endotelial levando ao recrutamento de monócitos durante o processo de formação de placa (JIANG; TING; SEED, 1998).

Os fibratos são os únicos fármacos agonistas de PPAR- α disponíveis na terapêutica atualmente desde a descoberta destes receptores na década de 60. Esses compostos aumentam a expressão gênica de apoA1 e dos transportadores ABCA1, conduzindo ao efluxo de colesterol de células espumosas e promovendo a elevação dos níveis de HDL. Entre os fibratos disponíveis atualmente encontram-se o ciprofibrato, bezafibrato, fenofibrato e genfibrozila (TENENBAUM; FISMAN, 2012).

Estudos clínicos mostraram que bezafibrato é o mais efetivo no tratamento de níveis reduzidos de HDL e hipertrigliceridemia. A administração deste composto em camundongos elevou os níveis de HDL em 56% e diminuiu TG em 69%, além da redução de placa aterosclerótica (Inaba et al., 2008). Estudos clínicos em humanos relataram aumento de HDL em 28-29%, redução de TG em 40-55% e também regressão de placa aterosclerótica (AYAORI et al., 2008; DUEZT et al., 2002).

A ativação de PPAR- α por fibratos estimula a atividade da LPL que aumenta a hidrólise de triglicerídeos em lipoproteínas circulantes. A terapia com fibratos pode ser realizada em monoterapia para o tratamento de baixo HDL e hipertrigliceridemia, ou em combinação com estatinas para o tratamento de hiperlipidemia mista ou baixo HDL associado com elevações de LDL. Estudos mostraram que combinações de fibratos/estatinas são mais eficientes na redução de TG e aumento de HDL quando comparada em monoterapia com estatinas. Porém, a terapia com fibratos é limitada devido aos efeitos colaterais como miopatia e rabdomiólise, que são mais significantes quando combinados com estatinas (TENENBAUM; FISMAN, 2012). Tais efeitos colaterais podem ser diagnosticados através da dosagem dos níveis plasmáticos de creatinafosfoquinase (CPK), uma enzima que catalisa a formação de fosfocreatina, utilizada no tecido muscular como fonte de energia (GOLDENBERG; BENDERLY; GOLDBOURT, 2008).

O resveratrol é um composto natural pertencente à classe dos polifenóis classificado quimicamente como 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, podendo ser encontrado principalmente nas sementes dos frutos de *Vitis vinifera* (videira). Este composto é encontrado naturalmente sob duas formas isoméricas, *E* e *Z*, sendo que diversos estudos têm demonstrado os benefícios de (*E*)-resveratrol à saúde, como antioxidante, quimiopreventivo, anti-inflamatório, antifúngico, antiagregante plaquetário e vasodilatador (ASENSI et al., 2002).

O (*E*)-resveratrol têm sido relatado como um composto com propriedades preventivas de complicações relacionadas às DCV e aterosclerose devido sua capacidade de modular o metabolismo lipídico. Este composto ativa PPAR- α , promove aumento da expressão do transportador ABCA-1 em macrófagos e contribuiu para o efluxo de colesterol em células espumosas na formação de HDL. Resultados de Miura e colaboradores (2003) mostraram que ratos tratados por via oral com resveratrol tiveram aumento de HDL e redução de LDL/triglicérides. Estudos mostraram que coelhos tratados com (*E*)-resveratrol (2mg/kg) apresentaram redução de placa aterosclerótica com inibição na expressão de citocinas pro-inflamatórias e VCAM-1 endotelial, além de reduzir em até 34% os eventos cardiovasculares como infarto do miocárdio (MATOS et al., 2012)(MIURA; MIURA; YAGASAKI, 2003).

Outro estudo envolvendo a redução de placa aterosclerótica em camundongos mostrou a diminuição da área de lesão em 52% por (*E*)-resveratrol, 40% por atorvastatina e 47% na combinação de ambos. Neste mesmo estudo um segundo mecanismo foi proposto no aumento de HDL envolvendo (*E*)-resveratrol, devido à inibição da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), responsável por transferir ésteres de colesterol para LDL. Camundongos com aumento na expressão de CETP e tratados com resveratrol tiveram elevações nas concentrações de HDL-C plasmático e redução na transferência de éster de colesterol para LDL em 24% (BERBÉE et al., 2013).

Indivíduos obesos receberam tratamento com resveratrol diariamente por duas semanas, e este composto reduziu LDL plasmático em 27% além de diminuir a resistência a insulina. Um possível mecanismo para a redução de LDL por (*E*)-resveratrol é sua regulação na excreção de lipídios (DASH et al., 2013).

O (*E*)-resveratrol reduz lesão aterosclerótica ao inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) e por ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). A ativação de eNOS eleva a produção de óxido nítrico (NO), uma molécula simples envolvida em diversos efeitos vasculares, como diminuição da expressão de citocinas, adesão dos monócitos ao endotélio, oxidação de LDL pelo sequestro de radicais livres lipídicos e vasodilatação (Wang et al., 2012). Estudos relataram que pacientes hipertensos tiveram redução da pressão sanguínea quando tratados com resveratrol, devido a ativação de eNOS e modulação do metabolismo de NO (CARRIZZO et al., 2013).

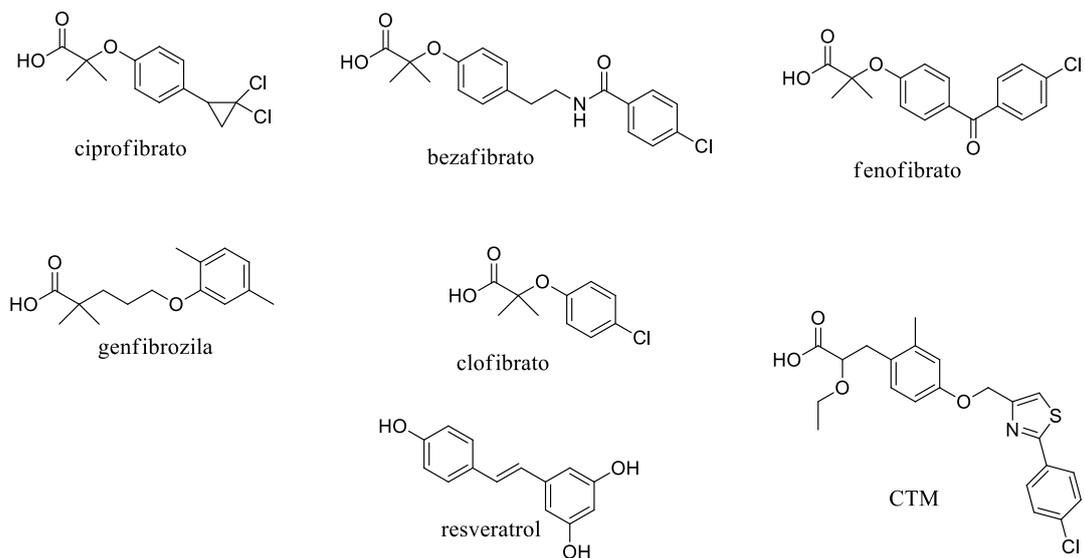


Figura 3. Estrutura química de fibratos, resveratrol e CTM como agonistas de PPARs

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho visa à pesquisa de novos protótipos híbridos derivados do resveratrol e bezafibrato com propriedades agonistas do receptor PPAR- α .

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Sintetizar, purificar e caracterização estrutural dos compostos híbridos finais (**4a-f** e **5a-f**);

2.2.2 Avaliar o efeito agonista dos receptores PPARs pelos compostos híbridos finais;

2.2.3 Avaliar o modo de ligação dos compostos mais potentes com a estrutura de PPARs através de docking molecular;

2.2.4 Avaliação do efluxo de colesterol em macrófagos pelos compostos híbridos;

2.2.5 Avaliar a diferenciação de adipócitos pelos compostos mais potentes;

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Material

Acetonitrila grau HPLC (JB Baker), acetato de etila, acetato de paládio II (Sigma Aldrich), carbonato de potássio, cloreto de tionila (Labsynth), hidreto de sódio (Sigma Aldrich), hexano, hidróxido de amônio (Labsynth), hidróxido de sódio (Labsynth), diclorometano, dimetilformamida, sílica gel (sílica “flash”), sulfato de sódio anidro (Labsynth), trietanolamina (Sigma Aldrich), tetrahydrofurano (Labsynth), 2-bromo-2-dimetil-butanoato de metil, (JB Baker), 2-bromo-2-dimetil ácido butanóico (Sigma Aldrich), 2-bromo-2-dimetil-butanoamida, 4-bromo-fluorbenzeno (Sigma Aldrich), 4-bromo-hidroxibenzeno (Sigma Aldrich), 4-bromo-trifluorbenzeno (Sigma Aldrich), 4-bromo-metoxibenzeno (Sigma Aldrich), 4-bromo-metilbenzeno (Sigma Aldrich), 4-bromo-benzeno (Sigma Aldrich), 4-hidroxiestireno.

3.2 Métodos analíticos

3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para realização da cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de gel de sílica em folhas de alumínio de 250 μm (Whatman[®]), e a fase móvel foi estabelecida para cada composto analisado. Após eluição das cromatoplasmas, estas foram visualizadas em câmara de luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm.

3.2.2 Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CC-FN)

Na purificação por cromatografia em coluna de fase normal, empregou-se como suporte cromatográfico gel de sílica com tamanho de partícula de 40-60 μm ("Flash"), (Across Organics[®]). A sílica foi transferida para uma coluna de vidro e condicionada com a fase móvel adequada para cada composto de interesse.

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Analítica

Os compostos híbridos **4a-f** e **5a-f** foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjos de Diodos Analítica (CLAE-DAD analítica) utilizando-se cromatógrafo Shimadzu LC-6AD com coluna de 250 x 4,6 mm e fluxo de 1mL/minuto. O volume de injeção foi 20 μL na concentração de 1mg/mL e faixa de comprimento de onda de 190-800 nm. A fase móvel foi estabelecida de acordo com a polaridade de cada composto analisado e para todos os casos houve adição de 0,1% de ácido fórmico.

3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa

Os compostos híbridos **4a-f** e **5a-f** foram purificados por CLAE-DAD preparativa utilizando-se cromatógrafo Shimadzu LC-6AD com coluna de 250 x 20 mm e fluxo de 15mL/minuto. O volume de injeção foi 2 mL na concentração de 25mg/mL e faixa de comprimento de onda de 190-800 nm. A fase móvel foi estabelecida de acordo com a polaridade de cada composto analisado por CLAE-DAD analítico com adição de 0,1% de ácido fórmico.

3.2.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Todos os compostos tiveram suas estruturas moleculares determinadas por meio das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear unidimensional de ¹H, e ¹³C, e bidimensional (HSQC e HMBC). Os espectros foram obtidos em espectrômetro Bruker Fourier 300, operando a

300 MHz para os núcleos de ^1H e 75 MHz para ^{13}C . Os solventes utilizados na solubilização das amostras para a obtenção dos espectros foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e acetona deuterada.

3.2.6 Espectrofotometria na região do Infravermelho

Todas as moléculas tiveram seus grupos funcionais identificados por análises realizadas por espectrofotometria na região do infravermelho. Os espectros foram adquiridos em Espectrofotômetro Shimadzu[®] Prestige-R, os quais foram gerados em % Transmitância x frequências de absorção na região de 400-4000 cm^{-1} . Pastilhas de KBr foram utilizadas no preparo de amostras para a obtenção dos espectros.

3.3 Planejamento estrutural

A busca por novos fármacos destinados ao tratamento de hipertrigliceridemia que promova aumento dos níveis de HDL torna-se emergente, uma vez que a terapia atual com bezafibrato apresenta limitações devido aos efeitos adversos como miopatia e hepatotoxicidade. A importância dos produtos naturais na busca por novos protótipos é amplamente conhecido e diferentes classes química de fármacos tiveram como inspiração moléculas derivadas de produto natural. O resveratrol é um produto natural que tem sido relatado como um agonista de PPARs capaz de aumentar concentrações de HDL-C e reduzir LDL-C e placas ateroscleróticas.

O modo de ligação do resveratrol no sítio ativo de PPARs tem sido investigado por estudos cristalográficos utilizando a estrutura de PPAR- γ . O Resveratrol ocupa o sítio ativo de PPAR- γ de modo que a hidroxila na posição *para* está voltada para a cavidade hidrofóbica dos receptores PPARs. O anel aromático que contém as hidroxilas nas posições 3,5 está voltado para a cavidade polar do sítio ativo, para a qual está posicionada a hélice 12 (H12) que contém o resíduo de tirosina 473. A interação com este resíduo mantém a conformação ativa dos receptores PPARs para início da transcrição gênica (Figura 4).

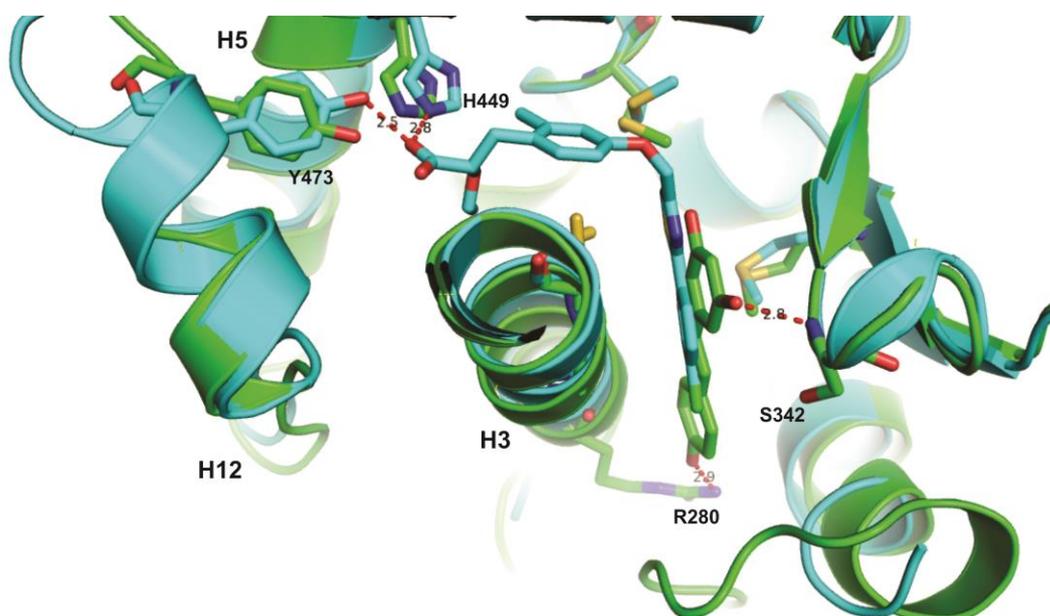


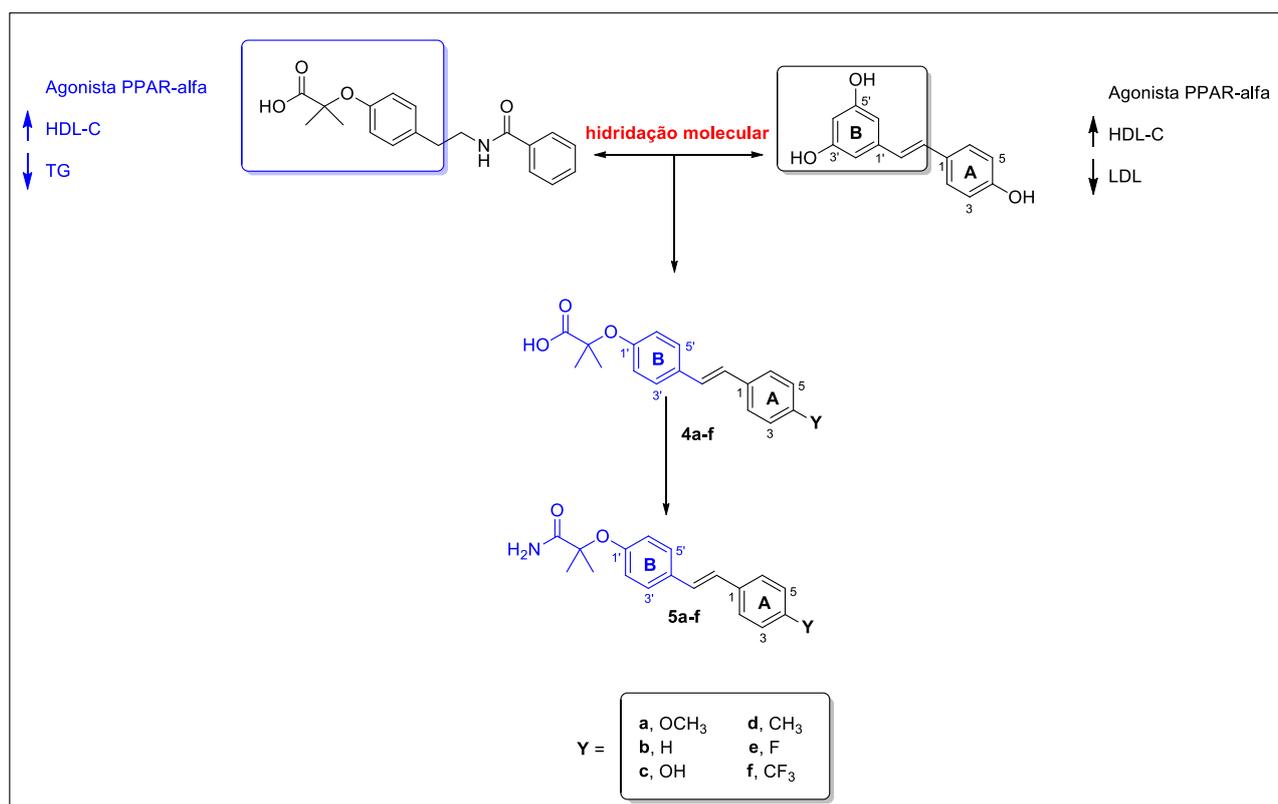
Figura 4. Modo de ligação do resveratrol no sítio ativo de PPAR- γ em comparação com o agonista CTM. Na cor verde, o resveratrol ocupa o sítio de PPAR- γ com interações polares com arginina 280 (R280) e serina 342 (S342). Em azul, o agonista CTM faz interações polares com tirosina 473 (Y473) e histidina 449 (H449) na cavidade polar de PPAR- γ

A modificação molecular é uma abordagem de descoberta de novos fármacos, que a partir de compostos ativos conhecidos, tem como objetivo a obtenção de novas entidades químicas mais potentes e seguras. A hibridação molecular é um exemplo de modificação molecular, caracterizada pela conjugação de duas ou mais estruturas distintas biologicamente ativas para obtenção de uma nova estrutura química com atividade sinérgica (WERMUTH, 2008).

Neste trabalho, uma nova série de compostos foi planejada por hibridação molecular entre resveratrol e bezafibrato para obtenção de novos agonistas de PPARs destinados ao tratamento da dislipidemia (Esquema 1). O objetivo do planejamento estrutural é obter novos compostos com atividade sinérgica na ativação de PPAR- α/γ levando à modulação do perfil lipídico, como aumento de HDL-C, redução de triglicérides, e redução de LDL-C.

Os novos compostos foram planejados através da hibridação de subunidades do resveratrol (anel B) e do bezafibrato. Nos compostos híbridos, as hidroxilas das posições 3',5' do anel B proveniente do resveratrol foram removidas para inserção do grupo ácido de bezafibrato na posição 4'. A inserção do grupo ácido no anel B teve o objetivo em buscar interações polares com resíduos de tirosina e histidina em H12 e H5 respectivamente (Figura 4; Esquema 1). A hidroxila na posição 4 do anel A do resveratrol foi substituída por grupos doadores de elétrons (CH_3 , OCH_3) e retiradores de elétrons (F, CF_3) com a finalidade de avaliar a influência da densidade eletrônica neste anel sobre a atividade agonista em PPARs (Esquema 1). O grupo ácido carboxílico do bezafibrato foi substituído pelo isómero amida, a fim de avaliar a influência das diferentes

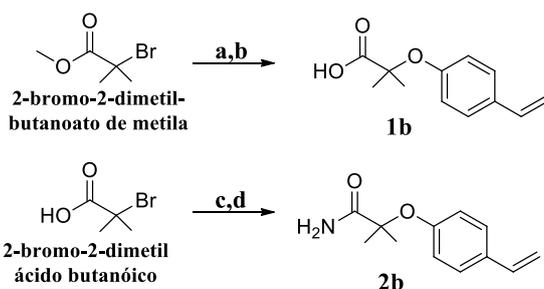
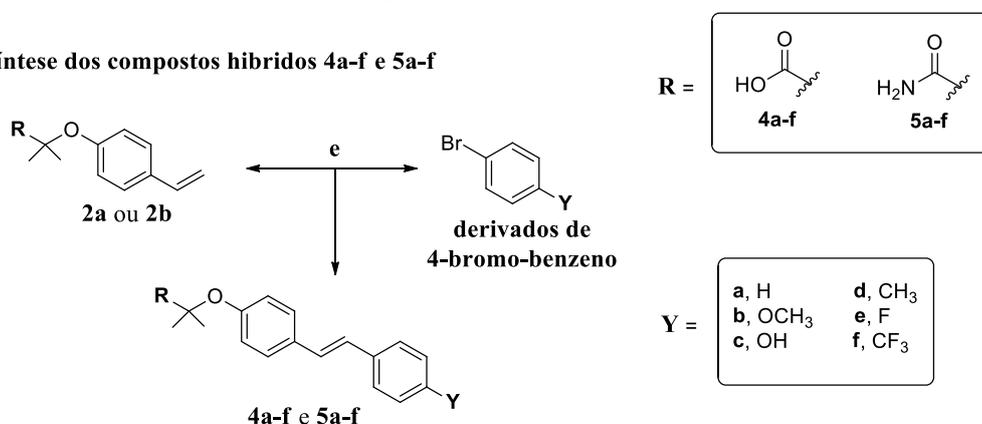
interações com resíduos de aminoácidos do sítio ativo de PPARs. No esquema 1 a seguir está representado o planejamento estrutural por hibridação molecular de novos agonistas de PPARs.



Esquema 1. Planejamento estrutural das moléculas híbridas de fibratos

3.4 Metodologia sintética

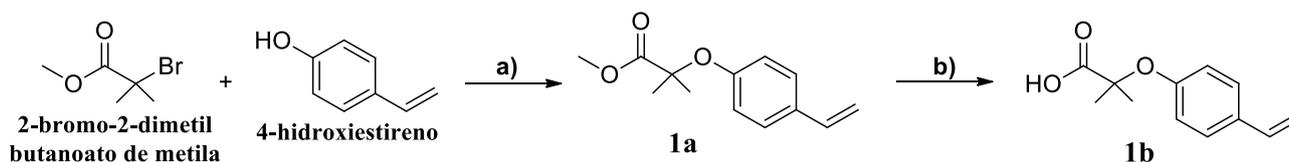
Os compostos foram obtidos de acordo com o Esquema 2. O processo sintético convergente foi dividido em duas rotas gerais: **1)** síntese dos intermediários **1b** e **2b**; **2)** síntese dos compostos híbridos finais **4a-f** e **5a-f**. A seguir é detalhada cada uma destas etapas:

Síntese dos intermediários **1b** e **2b**Síntese dos compostos híbridos **4a-f** e **5a-f**

Esquema 2. Esquema geral de síntese para os compostos híbridos **4a-f** e **5a-f**. **a** = 4-hidroxiestireno, DMF, K_2CO_3 , 2-bromo-2-dimetil-butanoato de metila, 4h, refluxo; **b** = 1a, NaOH 50%, THF, t.a., 3h; **c** = SO_2Cl , 3h, refluxo; NH_4OH 30%, hexano, 0°C , 1h; **d** = 4-hidroxiestireno, NaH, THF, 2-bromo-2-dimetil-butanoamida, 12h, refluxo; **e** = TEA, $\text{Pd}(\text{AcO})_2$, 100°C , 30h

3.4.1 Síntese do intermediário **1b**

A obtenção do intermediário **1b** ocorreu através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular entre 2-bromo-2-dimetil-butanoato de metila e 4-hidroxiestireno, seguido de uma hidrólise do grupo éster do intermediário **1a** (Esquema 3) (MORO; CARDOSO; CORREIA, 2008; SIERRA et al., 2007).



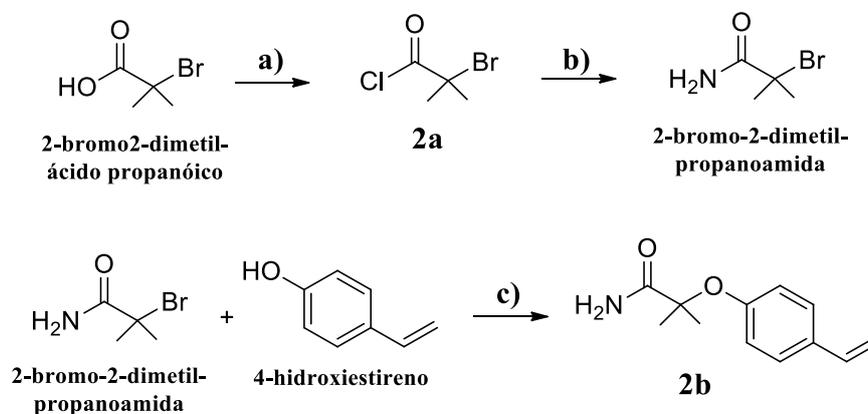
Esquema 3. Esquema geral para a síntese do intermediário **1b**. a) DMF, K_2CO_3 , refl., 4h; b) NaOH, THF, t.a., 3h

Procedimento experimental para síntese do intermediário **1b**

- a) Uma solução 5,726 g (33,1 mmol, 1,2 eq.) de 4-hidroxiestireno em dimetilformamida (DMF) na presença de carbonato de potássio (5,520 g, 40mmol, 1,2 eq.) foi agitada em refluxo por 15 minutos. Em seguida, 3,6 mL de 2-bromo-2-dimetil-butanoato de metila foi adicionado, e a reação foi mantida sob refluxo 4h. Ao meio reacional obtido foi adicionado 70 mL de água destilada e extrações com diclorometano foram realizadas (4 x 30mL). O solvente foi seco em evaporador rotatório para obtenção de um óleo marrom, o qual foi purificado por CC-FN utilizando-se como fase móvel proporções de hexano:acetato de etila (9:1). A molécula **1a** foi obtida como um óleo laranja.
- b) Para uma solução de 890mg de **1a** (4,0mmol) em THF (2mL) foi adicionado 512mg de solução de NaOH 50% m/m. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 3h. Após, o meio reacional foi acidificado com solução de HCL 2N, 50mL de água destilada foram adicionados ao meio reacional e extrações com acetato de etila foram realizadas (4 x 30mL). O acetato de etila foi seco em evaporador rotatório para obtenção de um sólido branco, identificado como o intermediário **1b**.

3.4.2 Síntese do intermediário **2b**

O processo sintético para obtenção do intermediário **2b** ocorreu em duas etapas (Esquema 4): **1**) cloração do grupo do 2-bromo-2-dimetil ácido butanóico utilizando-se cloreto de tionila (SO_2Cl), e obtenção da 2-bromo-2-dimetil-butanoamida através da adição de hidróxido de amônio; **2**) o intermediário **2b** foi sintetizado através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular entre a 2-bromo-2-dimetil-butanoamida e 4-hidroxiestireno (WEIDNER et al., 1997).



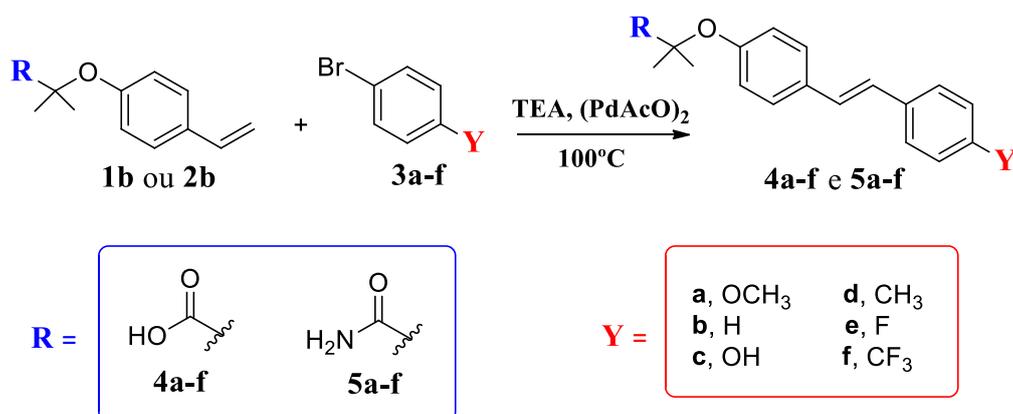
Esquema 4. Esquema geral para a síntese do intermediário **2b**. a) SO_2Cl , 2h, refluxo; b) hexano, NH_4OH , 0°C , 40 minutos; c) 4-hidroxiestireno, NaH, THF, 12h, refluxo

Procedimento experimental para síntese do intermediário **2b**

- a) Uma mistura de 2-bromo-2-dimetil ácido butanóico (2g, 0,012mol) e SO₂Cl (2,5 eq., 2,2mL, 0,03mol) foram mantidos sob agitação e refluxo por 2h. Ao final do procedimento o meio reacional foi resfriado e sobre ele adicionado 60mL de DCM. Em seguida a solução foi lavada com NaHCO₃ (3 x 30mL) com auxílio de funil de separação. O excesso de DCM foi reduzido em evaporador rotatório para obtenção do composto **2a** como um óleo laranja (sem purificação).
- b) O composto **2a** (1,5 g, 8,15mmol) foi dissolvido em hexano e resfriado a 0° C. Em seguida, uma solução de NH₄OH 30% (12 eq., 98 mmol, 13mL) foi adicionado gota a gota com auxílio de um funil de adição, e a reação foi mantida 0° C por 40 min. O precipitado formado foi filtrado e lavado com hexano para obter a 2-bromo-2-dimetil-butanoamida como um sólido branco.
- c) Para uma solução de 4-hidroxiestireno (1,836g, 15,3mmol, 1,26 eq.) em THF anidro (20mL) foi adicionado NaH (552 mg, 23 mmol), e a mistura foi agitada sob refluxo por 2h. Após esse tempo, a 2-bromo-2-dimetil-butanoamida foi acrescentada (2g, 12,1 mmol) e a reação foi mantida sob refluxo por 12h. Ao final foi adicionado 60 mL de água destilada e extrações com acetato de etila foram realizadas (4 x 30 mL). Sulfato de sódio (Na₂SO₄) foi acrescentado na fase orgânica e o solvente foi seco em evaporador rotatório. O meio reacional foi submetido à purificação por CC-FN (sílica flash) utilizando proporções de hexano:acetato de etila (5:5) como fase móvel. O intermediário **2b** foi obtido como um sólido branco.

3.4.3 Síntese dos compostos híbridos finais

Os compostos híbridos **4a-f** e **5a-f** foram sintetizados através da Reação de Heck, levando à formação da ligação C–C a partir de um aril-haleto e uma olefina, catalisada por paládio (Esquema 5) (HONG; WANG, 2006). O procedimento sintético foi otimizado variando-se a quantidade de paládio, aril-haleto e tempo reacional, com o objetivo de buscar a melhor condição para fornecer o melhor rendimento (Tabela 2).



Esquema 5. Esquema geral para síntese dos compostos híbridos finais

Compostos 4a-f: Para uma solução de aril-haletos (**3a-f**) em trietanolamina (TEA) foi adicionado Pd(AcO)₂ (acetato de paládio II) e reação foi mantida sob agitação a 100° por 10 minutos. Em seguida, 0,97mmol do intermediário **2a** foi acrescentado e a reação foi mantida a 100° C por 15 ou 30h (vide tabela 2). Após, o meio reacional foi acidificado com solução de HCL 2N, diluído com 50 mL de água e extrações foram realizadas com acetato de etila (4 x 30mL). Na₂SO₄ foi adicionado na fase orgânica e o solvente foi seco em evaporador rotatório. O meio reacional foi filtrado em sílica gel utilizando-se como fase móvel proporções de hexano:acetato de etila:ácido acético (5:5:2%). O sólido obtido foi purificado por CLAE-DAD preparativo utilizando-se proporções de acetonitrila:água como fase móvel. Os compostos **4a-f** foram obtidos como sólido branco e rendimentos variados (vide tabela 2).

Compostos 5a-f: Para uma solução de aril-haletos (**3a-f**) em trietanolamina (TEA) foi adicionado Pd(AcO)₂ e reação foi mantida sob agitação a 100° por 10 minutos. Em seguida, 0,97mmol do intermediário **2b** foi acrescentado e a reação foi mantida a 100° C por 30h. Após, o meio reacional foi neutralizado com solução de HCL 2N, diluído com 50 mL de água e extrações foram realizadas com acetato de etila (4 x 30mL). Na₂SO₄ foi adicionado na fase orgânica e o solvente foi seco em evaporador rotatório. O meio reacional foi filtrado em sílica gel utilizando-se como fase móvel proporções de hexano:acetato de etila:ácido acético (5:5:2%). O sólido obtido foi purificado por CLAE-DAD preparativo utilizando-se proporções de acetonitrila:água como fase móvel. Os compostos **5a-f** foram obtidos como sólido branco e rendimentos variados (vide tabela 2).

3.5 Ensaio de transfecção e gene repórter

O ensaio de transfecção dos receptores PPAR- α e PPAR- γ foram realizados em parceria com o Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, os quais foram conduzidos pela Dra. Mariella Lacerda e sob supervisão da Professora Dra. Angélica Amorim Amato.

Todos os plasmídeos utilizados neste ensaio foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Webb do *Methodist Research Institute* (Houston, EUA).

Para este ensaio foram utilizados os seguintes plasmídeos:

Plasmídeos contendo sequências que codificam os receptores nucleares constituídos pelo LBD de PPAR α /PPAR γ fusionados ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4, denominados de DBD-GAL4 /LBD-PPAR α e DBD-GAL4/LBD- PPAR γ , respectivamente; e o plasmídeo GAL4-LUC, que possui o elemento responsivo destes receptores (GAL4) fusionado ao gene repórter da luciferase.

Para a transfecção, células HeLa foram semeadas em placas de 48 poços (30 x 10³ células por poço) com meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino, seguida pela incubação das mesmas a 37°C com 5% de CO₂.

No dia seguinte ao plaqueamento, a transfecção foi realizada utilizando o reagente *Lipofectamine*[®] 2000 *Transfection Reagent* (Thermo Fisher Scientific) e seguindo as instruções do fabricante. Foram co-transfectados, por poço, 300 ng de DNA plasmidial.

Seis horas após a transfecção, as células foram tratadas por 24 horas com veículo (DMSO), bezafibrato 10⁻⁴ M, rosiglitazona 10⁻⁵ M e com os compostos **4a-f** e **5a-f** nas concentrações de 10⁻¹¹ M até a concentração máxima não tóxica observada no ensaio de citotoxicidade. O bezafibrato (agonista do PPAR α), rosiglitazona (agonista do PPAR γ) e resveratrol foram utilizados como controles positivos.

A atividade da luciferase foi mensurada utilizando o *Reporter Luciferase Assay Kit* (Promega[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Nesta etapa, as células foram lisadas e foi adicionado o substrato da luciferase, a luciferina. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina em um processo no qual energia química é convertida em luz. Esta luminosidade foi então quantificada em um aparelho luminômetro (*GloMax*[®] 20/20 *Luminometer* - Promega[®]) em unidades relativas de luz.

O cálculo do EC50 para cada composto foi feito por meio de uma curva dose resposta. O objetivo foi determinar em qual concentração cada um dos compostos em estudo induziu 50% do seu efeito máximo. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da ativação dos ligantes comparada com o bezafibrato e rosiglitazona. A análise de variância (ANOVA) seguida pelo *post-hoc* de Bonferroni foram os testes estatísticos utilizados. O nível de significância adotado foi de $p <$

0,05. Todas as análises foram feitas utilizando o programa *GraphPad Prism*[®] *version 6.0c*. Cada experimento foi realizado em triplicada e repetido no mínimo três vezes.

3.6 Avaliação do efluxo de colesterol

O ensaio de efluxo de colesterol utilizando macrófagos foi realizado em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, os quais foram conduzidos pela Dra. Fabiana Dias Ferreira, e sob supervisão da Dra. Marisa Passarelli.

3.6.1 Obtenção e cultivo dos macrófagos derivados de células da medula óssea

Com auxílio de agulha (26G ½ - 0,45mm:13mm) e seringa, foram injetados na medula de fêmur e tibia, 5 mL de meio de condicionamento (400 mL de DMEM com baixa glicose + 4 mL de penicilina/estreptomicina + 50 ml de soro fetal bovino inativado + 50 mL de meio condicionado de células L929 - 25 mL de meio da primeira semana com 25 mL de meio da segunda semana) para coletar as células da medula óssea.

O meio de condicionamento contendo as células isoladas da medula óssea foram suavemente aspirado e expelido por 5 vezes utilizando-se seringa de 20 mL e agulha tamanho 18 e ½ (diâmetro de 1.2mm e comprimento de 40mm). Em seguida, as células foram centrifugadas durante 6 min a 1000 rpm em temperatura ambiente. O *pellet* celular foi ressuspensionado em meio de condicionamento, distribuídos em placa de cultura e incubadas durante 5 dias a 37°C sob 5% (v/v) de CO₂ para promover a diferenciação dos monócitos em macrófagos. No dia 5, o meio condicionado foi trocado para um novo meio de condicionamento por 24h. Após esse período, os macrófagos foram tratados de acordo com metodologia descrita no item 4.5.2

3.6.2 Efluxo de ¹⁴C-colesterol mediado por apoA-I e HDL

Os macrófagos foram incubados em placas de cultura com 96 cavidades (0,2 x 10⁶ células por cavidade). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de CO₂ 5%. Os macrófagos foram incubados com DMEM/FAFA, acrescido com LDL acetilada (50 µg de proteína de LDL/mL de meio) e ¹⁴C-colesterol (0,3 µCi/mL de meio), por 48h. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS/FAFA e incubadas por 24 h com meio DMEM contendo 0,5 mM de 8-Bromoadenosine 3', 5'- monofosfato cíclico (8-Br AMPc) na presença de bezafibrato (controle positivo), resveratrol e o compostos **4a-f** e **5a-f**.

Após esse período, os macrófagos foram incubados por mais 8h na presença ou ausência de apoA-I (30 µg / mL) ou HDL (50 µg / mL) como aceptores concomitantemente com os compostos

novamente. O meio de cultura foi recolhido para tubos de vidro, centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C para a remoção de debris celulares e transferido para frascos de cintilação, seguindo-se de adição de solução contadora (Perkin Elmer, Turko, Finlândia). As cavidades das placas foram lavadas com solução fisiológica gelada (4°C). A quantidade de radioatividade presente no meio ao final do período de incubação indicou o efluxo basal de colesterol e o fluxo mediado pela apoA-I ou HDL.

Os lipídios celulares foram extraídos com solução de hexano:isopropanol (3:2) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a radioatividade determinada após evaporação do solvente. As células foram incubadas com 250 µL de NaOH 0,2N durante 3h a temperatura ambiente para lise celular e determinação da concentração de proteína através do método de Lowry.

Os valores obtidos em incubações na presença de apoA-I ou HDL foram subtraídos daqueles obtidos apenas com meio, de maneira a refletir o efluxo mediado somente por apoA-I ou HDL.

A porcentagem de efluxo foi calculada como:

$$\frac{{}^{14}\text{C-colesterol no meio}}{\text{{}^{14}\text{C-colesterol no meio} + {}^{14}\text{C-colesterol na célula}}} \times 100$$

3.7 Ensaio de diferenciação de adipócitos

O ensaio de diferenciação de adipócitos foi realizado em parceria com o Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, os quais foram conduzidos pela Dra. Mariella Lacerda e sob supervisão da Professora Dra. Angélica Amorim Amato.

Células 3T3-L1 foram semeadas em placas de 6 poços (48 x 10³ células por poço) e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂ com meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro neonatal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas nessas condições até atingirem 100% de confluência (considerado o dia -2).

Atingida a confluência de 100%, as células permaneceram por mais dois dias, do dia -2 ao dia 0, sendo cultivadas em iguais condições. Esse período foi necessário para a parada do crescimento, pré-requisito para a diferenciação celular. Em seguida, foi realizada a troca do meio de cultura por um meio indutor de diferenciação constituído por DMEM, 10% de soro fetal bovino, 10 µg/mL de insulina humana, dexametasona 1 µM, isobutimetilxantina (IBMX) 0,5 mM, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, que foi mantido por dois dias (dia 0 ao dia 2). O coquetel indutor de adipogênese composto por insulina, dexametasona e IBMX, constitui um forte estímulo para a diferenciação. No dia 2, o meio de cultura foi novamente substituído por um meio de manutenção de adipócitos constituído por DMEM, 10% de soro fetal bovino, 10 µg/mL de

insulina humana, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, que foi mantido, com troca de meio a cada 48 horas, até a fixação (para coloração) ou coleta das células (para RT-qPCR).

Durante todo o período de diferenciação, as células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 10^{-7} M ou com o ligante 2 nas concentrações de 10^{-7} até 10^{-5} M. O tratamento foi realizado a cada 48 horas, iniciando-se sempre no dia 0.

O efeito adipogênico do ligante 2 foi avaliado por meio de dois métodos: (i) coloração das células com o reagente óleo vermelho O e RT-qPCR (Transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa).

A coloração das células com óleo vermelho O foi feita no 15º dia de diferenciação. No protocolo adotado, esse foi o tempo necessário para que pudessem ser observadas células com fenótipo de adipócitos diferenciados, sendo então possível avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a adipogênese.

A avaliação dos efeitos do ligante 2 sobre a expressão do gene adipogênico Fabp4 foi feita no terceiro dia de diferenciação (baseado nos resultados de Milton e colaboradores (2015), que mostraram uma maior expressão de genes adipogênicos nas 72 hs iniciais da diferenciação).

3.8 Docagem molecular

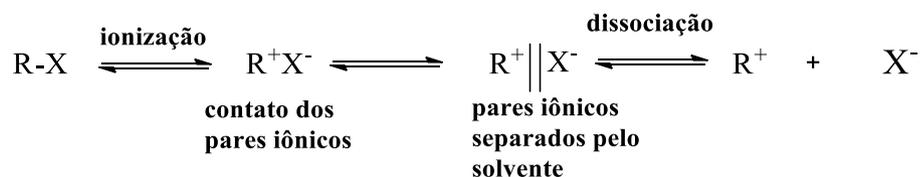
Estudos de docagem molecular foram realizados utilizando o software Maestro disponível pela Schrödinger Inc. (Nova Iorque, NY, EUA). A estrutura da proteína de PPAR- α (PDB 3FEI) e PPAR- γ (PDB 3FEJ) complexado com o ligante foram importados do Protein Data Bank (PDB) para o Schrödinger Maestro 2017. Moléculas de água conservadas sem interações com ligante foram excluídas. A proteína foi preparada adicionando átomos de hidrogênios e cargas formais além da minimização da estrutura. Os compostos **5a-f** foram preparados utilizando LigPrep. Para este procedimento foi aplicado campo de força OPLS3 com o objetivo de otimizar a geometria dos compostos, gerando baixa energia da estrutura 3D e eliminar erros estruturais dos ligantes. O estado de ionização dos compostos foi gerado na faixa de pH 7.0 a pH 2.0 utilizando Epik através Schrödinger Maestro 2017. Nós especificamos pontos de interações no sítio ativo da proteína (ie., Grid). O grid foi gerado como caixa cúbica de $10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA} \times 10 \text{ \AA}$, o qual foi centralizado nos resíduos do sítio ativo de PPAR- α/γ . Para a docagem molecular foi utilizado o método Extra Precision (XP) com geração de pelo menos 10 poses para cada composto testado. O protocolo de docagem foi validado por re-docagem do ligante co-cristalizado originalmente com a proteína com o objetivo de verificar a capacidade do software em reproduzir a mesma pose do ligante observado na estrutura do cristal. Distâncias até 3.2 \AA foram consideradas confiáveis para este método de docagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese do intermediário **1b**

A primeira etapa sintética foi a obtenção de **1a** que ocorreu através da Reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular (S_N2) entre metil- α -bromo-isobutirato e 4-hidroxiestireno em meio básico para obtenção de **1a** com rendimento de 16%. Interessantemente, a estrutura química do metil- α -bromo-isobutirato é um exemplo clássico de reagentes que poderiam sofrer uma Reação de Primeira Ordem ou Reação de Substituição Nucleofílica Monomolecular (S_N1). A etapa de ionização e consequentemente uma evolução para formação do carbocátion depende principalmente da estabilidade adquirida pela estrutura do reagente (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Winstein e colaboradores (1956) concluíram que a formação do carbocátion pode passar por três fases até sua obtenção dependendo da estrutura do reagente: **1)** contato dos pares iônicos, onde há um pequeno estiramento da ligação C-X, mas ambos ainda continuam ligados; **2)** pares iônicos separados pelo solvente: formação de um pseudo-carbocátion, o qual é separado pelo grupo de saída e por moléculas do solvente; **3)** dissociação, formação do carbocátion e solvatação dos íons pelo solvente (Esquema 6) (WINSTEIN et al., 1956).



Esquema 6. Etapas de formação de um carbocátion

Estudos realizados por El-Nahas e Clark (1995) mostraram que há três principais efeitos que podem influenciar na estabilização de carbocátion: doadores- π , grupos que estabilizam a carga positiva por compartilham os pares de elétrons não ligantes (OH, OCH₃ e NH₂); hiperconjugação, estabilização da carga por delocalização de uma ligação σ , geralmente por um CH₃; efeito polar, o qual promove desestabilização do carbocátion por grupos eletronegativos. Neste estudo, os autores mostram que desestabilização de carbocátions por grupo carbonila deve-se a interação de orbitais π daqueles grupos e orbitais p do centro do cátion (EL-NAHAS; CLARK, 1995).

Outro estudo mostrou o comportamento de Reações de Substituição utilizando-se o p-metilbenzil tosilato, quando este apresentava substituintes doadores (GDE) ou retiradores (GRE) de elétrons. Na presença de GDE foi possível observar a formação do carbocátion e a reação foi conduzida por S_N1 ; na presença de GRD a reação foi conduzida por substituição direta do nucleófilo ao carbono que suporta o haleto (S_N2) (TSUJI et al., 1995).

Logo, o processo de obtenção do intermediário **1a** é semelhante ao da literatura, uma vez que na estrutura do 2-bromo-2-dimetil-butanoamida o carbono que suporta o -Br é terciário, mas também é um carbono vizinho ao grupo carbonila. Tal feito permite que a reação seja conduzida por S_N2 (Figura 5).

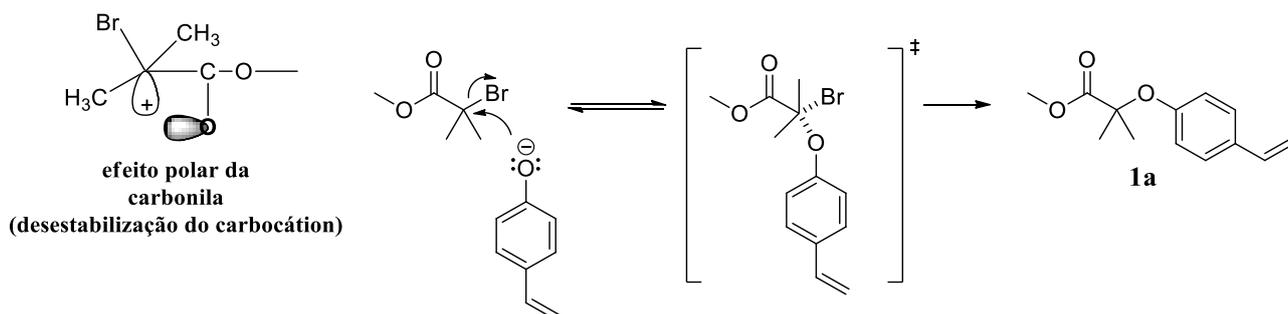
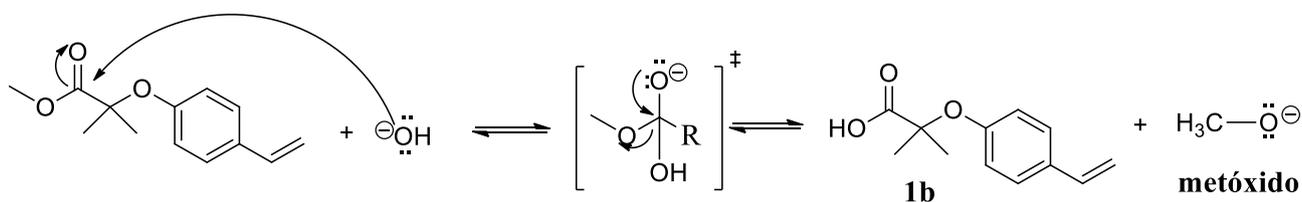


Figura 5. Mecanismo de reação do intermediário **1a**

Como citado anteriormente, o rendimento desta reação foi de 16%, o qual é possível compararmos com a reação de **2b**. Para obtenção de **1a** a base utilizada foi K₂CO₃ enquanto que para **2b** foi NaH. O uso de NaH em **2b** dobrou o rendimento reacional (32%), mas o baixo rendimento considerado em ambas reações poderia ser explicado pelo impedimento estérico das duas metilas presentes no carbono que suporta o halogênio.

A segunda etapa foi descrita através da hidrólise em meio básico do grupo éster de **1a** para formação de grupo ácido presente em **1b**, com rendimento de 80%. O mecanismo é uma reação de adição/eliminação, onde o hidróxido (OH⁻) ataca a carbonila do grupo éster com delocalização dos pares de elétrons para o oxigênio. Nesta etapa têm-se um estado de transição com formação de uma estrutura tetraédrica, e após o reestabelecimento da ligação C=O o grupo éster deixa a estrutura carregando os pares de elétrons para formação do grupo ácido (Esquema 7) (MCMURRY, 2005).



Esquema 7. Mecanismo de hidrólise de éster para formação do intermediário **2a**

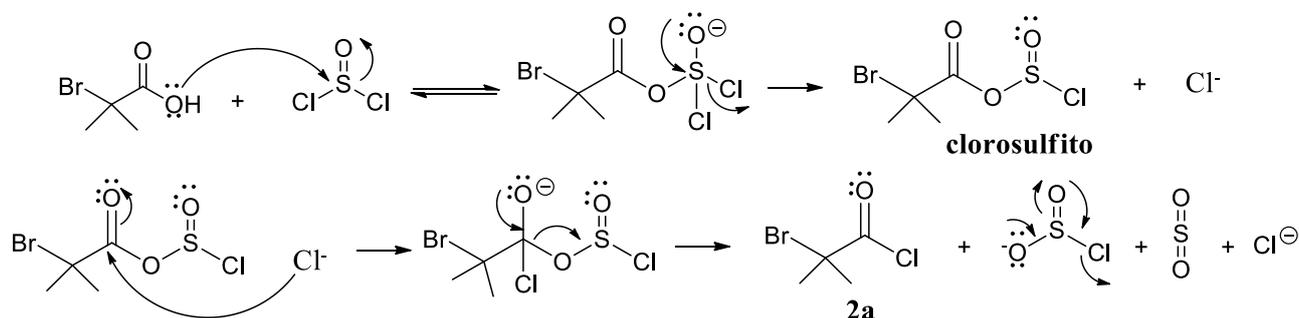
4.2 Síntese do intermediário **2b**

A síntese do intermediário **2b** ocorreu em três etapas: Reação de Substituição Nucleofílica à carbonila do metil- α ácido propiônico para formação de cloreto de acila (**2a**) e propionamida; e Reação de Substituição Nucleofílica Bimolecular para obtenção de **2b**. Na primeira etapa reacional, o metil- α

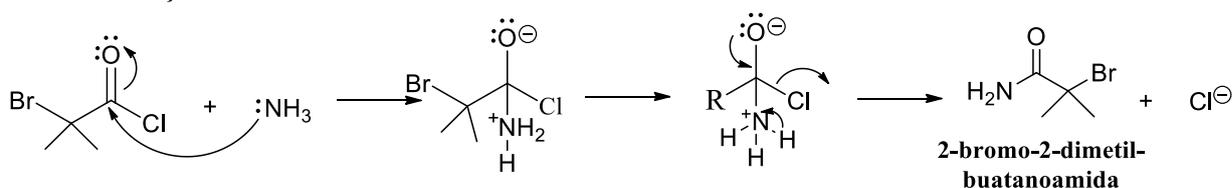
ácido propiônico foi clorado utilizando-se cloreto de tionila para obtenção do cloreto de ácido **2a** com rendimento de 90%. O mecanismo se inicia com a substituição do –OH do grupo ácido por um melhor grupo de saída, o clorosulfito. Em seguida, o cloreto nucleofílico ataca a carbonila substituindo o clorosulfito, que deixa a estrutura levando o par de elétrons da ligação C–O (Esquema 8) (MCMURY, 2005).

Na segunda etapa, o cloreto de acila **2a** é substituído por amônia para gerar o intermediário propionamida com rendimento de 83%. O ataque nucleofílico da amônia à carbonila promove a delocalização do par de elétrons para oxigênio. Após o reestabelecimento da ligação C=O o cloro deixa a estrutura levando o par de elétrons da ligação C–Cl (Esquema 8) (McMurry, 2005). O mecanismo de reação de S_N2 para obtenção de **2b** é semelhante ao do Esquema 7, o qual permitiu obter este intermediário com rendimento de 32%.

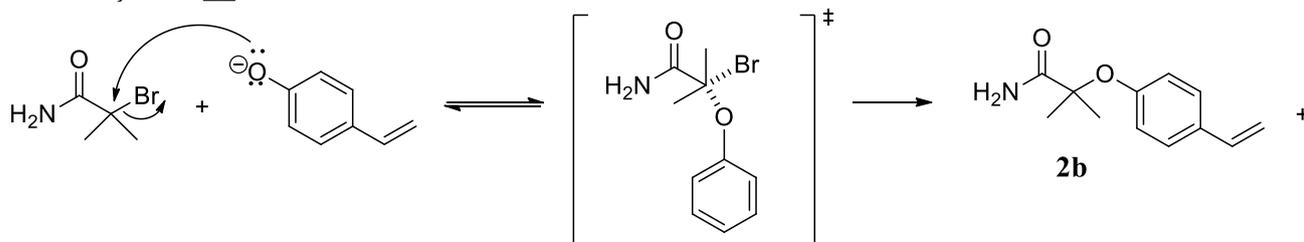
Obtenção do cloreto de acila



Obtenção do 2-bromo-2-dimetil-butanoamida



Obtenção de **2b**



Esquema 8. Mecanismo de reação do cloreto de acila, propionamida e **2b**.

4.3 Síntese dos compostos híbridos finais

Os compostos híbridos finais **4a-f** e **5a-f** foram sintetizados empregando-se a Reação de Mizoroki-Heck capaz de levar à formação de ligações C–C entre um aril-haleto e olefina catalisado por paládio (ZIELGER; HECK, 1978). Usando esta metodologia foi possível obter os compostos **4a-f** e **5a-f** com rendimentos entre 8-60% (Figura 6).

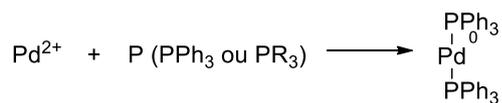
De acordo com Zielger e Heck (1978) e Hong e Wang (2006), a Reação de Heck é regioseletiva na obtenção de compostos (*E*) utilizando-se 1% em mol de Pd(AcO)₂ (ZIELGER; HECK, 1978) (HONG; WANG, 2006). Seguindo esta metodologia, o composto **4b** foi obtido com rendimento de 2%. Posteriormente, aumentado a porcentagem de paládio para 4,5%, o rendimento foi de 8%. Para os compostos **4e-f** foram utilizados 10% em mol de paládio e 30h de reação, indicando que estes parâmetros foram essenciais para dobrar o rendimento, obtido em 16% (Tabela 2). Para as condições de formação dos compostos **4a-f** foi utilizado 1 mol equivalente do aril-haleto e podemos observar nos cromatogramas presentes nos apêndices **5-9** a presença do intermediário **1b** no meio reacional, fato que pode explicar o baixo rendimento para estas reações. Diante desses parâmetros otimizados, os compostos **5a-f** foram sintetizados com 10% em mol de paládio, 30h de reação e dois equivalentes (mol) do aril-haleto. No entanto, o uso de dois equimolares de aril-haleto no meio reacional (**5a-f**) aumentou os rendimentos reacionais em até 60% (**5f**), uma vez que de acordo com o mecanismo proposto por Zielger e Reck (1978), a formação da ligação C-C depende anteriormente da etapa de quartenização para consumo do aril-haleto pelo Pd e formação do complexo (Esquema 9).

Em 1978, Richard Heck descreveu a reação de acoplamento entre aril-haletos e olefinas na presença de fosfinas como ligantes, trietilamina como base e paládio como catalisador para obtenção de compostos (*E*). O mecanismo de reação pode ser dividido em três principais etapas: **1**) redução do paládio por fosfinas para formação do complexo Pd(0)–(P)₂; **2**) etapa de quartenização, processo oxidativo do complexo Pd(0)–P por adição do aril-haleto; **3**) mecanismo de inserção do complexo de paládio à olefina para formação da ligação C–C (ZIELGER; HECK, 1978). No Esquema 9 abaixo está detalhado cada uma destas etapas:

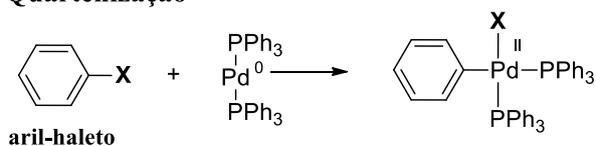
Tabela 2. Planejamento sintético para os compostos híbridos finais

Compostos	Pd(AcO)₂ Mol %	3a-f (mol %)	Tempo (h)	Rendimento (%)
4a	-	-	-	-
4b	1	1	15	2
4b	4,5	1	15	8
4c	4,5	1	15	8
4d	10	1	30	10
4e	10	1	30	16
4f	10	1	30	16
5a	10	2	30	-
5b	10	2	30	20
5c	10	2	30	-
5d	10	2	30	9
5e	10	2	30	25
5f	10	2	30	60

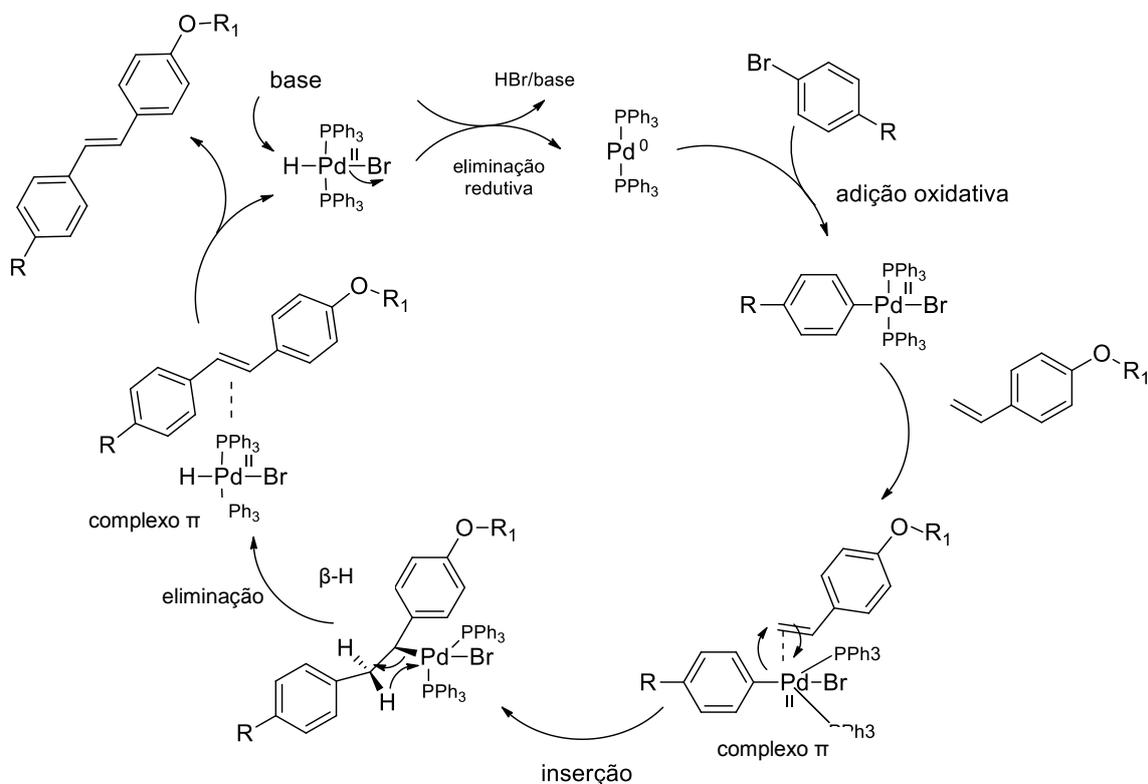
1) Redução do paládio



2) Quaternização



3) Inserção do aril-haleto à olefina



Esquema 9. Mecanismo de reação de Heck na obtenção de compostos (*E*). R= -H, -OCH₃, -OH, -CH₃, -F, -CF₃. R₁= 2-dimetil-butanoaminda ou 2-dimetil-ácido butanóico

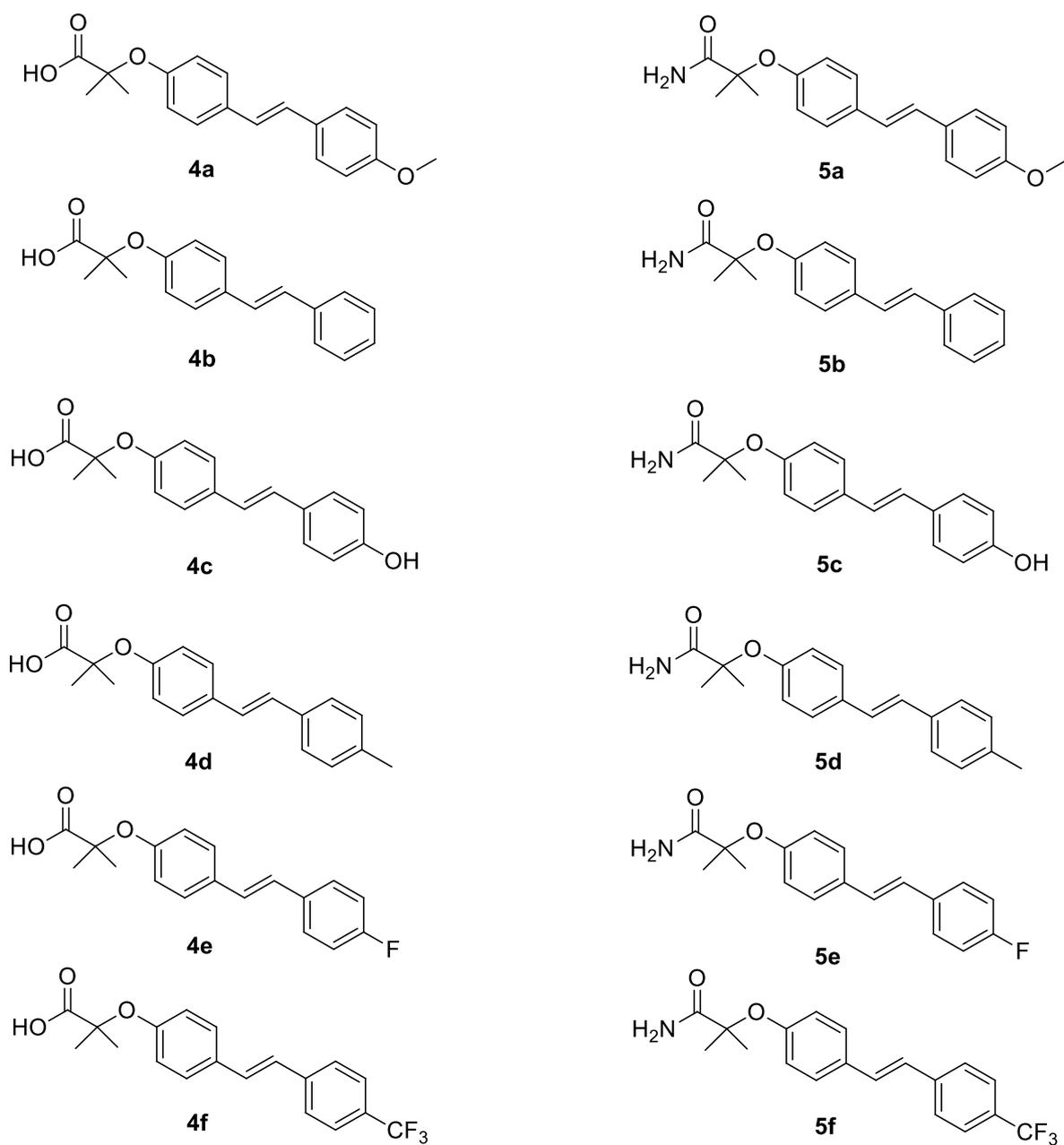
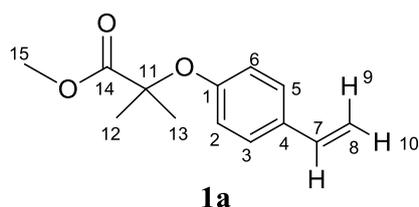


Figura 6. Estrutura química dos compostos híbridos 4a-f e 5a-f.

4.4 Identificação Estrutural

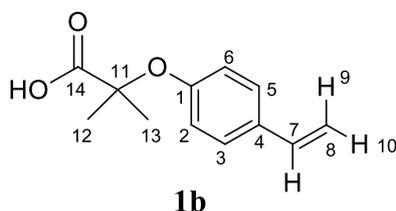
Todas as moléculas tiveram suas estruturas identificadas por Espectroscopia na região do infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para os compostos híbridos finais **4a-f** e **5a-f** foram utilizadas técnicas unidimensionais como RMN de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais como HSQC e HMBC. Os sinais foram atribuídos como, s: simpleto, d: dupletto, t: tripleto, q: quarteto, e J = constante de acoplamento em Hz.

4.4.1 Intermediário **1a**



1a. Óleo laranja, rendimento de 16%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,29 (d; J = 9,0 Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 6,77 (d; J = 9,0 Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 6,61 (dd; J = 12 e 18 Hz; H-7), δ_{H} 5,62 (d; J = 18 Hz; H-9), δ_{H} 5,14 (d; J = 12 Hz; H-10), 3,78 (s; H-15), δ_{H} 1,59 (s; H-12/H-13). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 174,0 (C-14), δ_{C} 155,6 (C-1), δ_{C} 136,3 (C-7), δ_{C} 131,6 (C-4), 127,4 (C-3 e C-5), δ_{C} 118,9 (C-2 e C-6), δ_{C} δ_{C} 111,7 (C-8), δ_{C} 79,0 (C-11), δ_{C} 52,3 (s; H-15), δ_{C} 25,2 (C-12/C-13). (Apêndice 1).

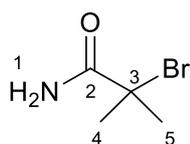
4.4.2 Intermediário **1b**



1b. Sólido branco, rendimento de 80%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,36 (d; J = 9,0 Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 6,86 (d; J = 9,0 Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 6,65 (dd; J = 12 e 18 Hz; H-7), 5,66 (d; J = 18 Hz; H-9), δ_{H} 5,11 (d; J = 12 Hz; H-10), δ_{H} 1,59 (s; H-12/H-13). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 174,5 (C-14), δ_{C} 155,6 (C-1), δ_{C} 136,3 (C-7), δ_{C} 131,6 (C-4), δ_{C} 126,9 (C-3 e C-5), δ_{C} 119,0 (C-2 e C-6), δ_{C} 111,5 (C-8), δ_{C} 78,8 (C-11), δ_{C} 24,7 (C-12/C-13). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 2750-3250 (COOH), 1705 (C=O), 1600 (C=C alceno), 1506 e 1465 (C=C aromático).

O espectro de absorção na região do infravermelho do composto **1b** mostrou um estiramento alargado na faixa de 2.750-3.250 cm^{-1} pertencente ao estiramento O-H presente ao ácido carboxílico desta molécula. Esse dado foi confirmado devido à presença da banda no infravermelho em 1.705 cm^{-1} e o sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 174,5 referente à presença da carbonila do ácido carboxílico. O espectro na região do infravermelho ainda exibe um estiramento em 1.600 cm^{-1} o pertencente à ligação C=C da olefina, dado consistente pela presença dos sinais no RMN de ^1H em δ_{H} 6,65, 5,66 e 5,11 referentes aos H-7, H-9 e H-10 respectivamente (Apêndice 2).

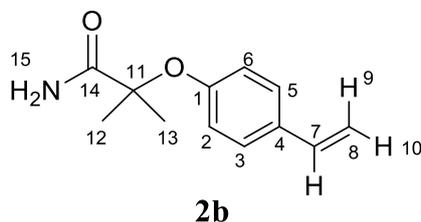
4.4.3 2-bromo-2-dimetil-butanoamida



2-bromo-2-dimetil-butanoamida

Sólido branco, rendimento de 83%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,16 e 6,78 (s; NH_2), δ_{H} 1,90 (s; H-4/H-5). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 174,0 (C-2), δ_{C} 60,5 (C-3), δ_{C} 31,65 (C-4/C-5). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3200 e 3450 (N-H da amida), 2924 (C-H alifático), 1697 (C=O), 1624 (N-H da amida) (Apêndice 3).

4.4.4 Intermediário **2b**



2b. Sólido branco, rendimento de 32%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,39 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,15 e 6,59 (s; NH_2), δ_{H} 6,92 (d; $J = 9$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 6,67 (dd; $J = 12$ Hz; H-7), δ_{H} 6,13 (dd; $J = 12$ Hz; H-9), δ_{H} 5,68 (dd; $J = 18$ Hz; H-10), δ_{H} 1,47 (s; H-12/H-13). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 176,8 (C-14), δ_{C} 155,8 (C-1), δ_{C} 136,6 (C-7), δ_{C} 132,0 (C-4), δ_{C} 127,5 (C-3 e C-5), δ_{C} 121,0 (C-2 e C-6), δ_{C} 112,6 (C-8), δ_{C} 81,24 (C-11), 25,1 δ_{C} (C-12/C-13). IV (V_{max} ; cm^{-1} ;

pastilha de KBr), 3200 e 3400 (N-H da amida), 2985 (C-H alifático), 1693 (C=O), 1624 (N-H da amida), 1508 e 1460 (C=C de aromático).

O espectro de absorção na região do infravermelho da molécula **2b** mostrou dois estiramentos em 3200 e 3400 cm^{-1} , as quais puderam ser identificadas como pertencente a ligação N-H da amida. Esse dado foi confirmado devido a presença de dois simpletos no espectro de RMN de ^1H com δ_{H} 7,15 e 6,59 ppm. Pôde ser observado no espectro de absorção na região do infravermelho o estiramento em 1693 cm^{-1} e o sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ_{C} 176,8 referente à presença da carbonila. A banda de absorção no infravermelho 1600 cm^{-1} foi identificada como pertencente à ligação C=C da olefina, dado consistente pela presença dos sinais no RMN de ^1H em δ_{H} 6,67, 6,13 e 5,68 referentes aos H-7, H-9 e H-10 respectivamente (Apêndice 4).

4.4.5 Compostos híbridos finais

Devido à semelhança espectral entre essas moléculas apenas uma estrutura química recebeu discussão detalhada sobre a identificação estrutural, o qual mostra os principais sinais que confirmam sua obtenção (**5f**). Para os demais, os dados foram citados e mais detalhes podem ser observados na seção apêndice para cada estrutura química.

4.4.5.1 Composto **5f**

5f. Sólido branco, rendimento de 60%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,70 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,68 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,58 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,39 (d; $J = 15,0$ Hz; H-8), δ_{H} 7,22 (d; $J = 15,0$ Hz; H-7), δ_{H} 6,98 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,59 (s; $-\text{NH}_2$), δ_{H} 1,51 (s; H-10 e H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 176,9 (C-12), δ_{C} 156,3 (C-1'), δ_{C} 142,6 (C-1), δ_{C} 132,0 (C-4'), δ_{C} 131,7 (C-8), δ_{C} 128,6 (C-3' e C-5'), δ_{C} 127,5 (C-3 e C-5), δ_{C} 126,3 (C-2 e C-6), δ_{C} 126,3 (C-7), δ_{C} 121,2 (C-2' e C-6'), δ_{C} 81,7 (C-9), δ_{C} 25,4 (C-10 e C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3192-3442 (N-H amida), 2949 (C-H alifático), 1602 (C=C alceno), 1688 (C=O), 1510 e 1452 (C=C aromático) (Apêndice 16).

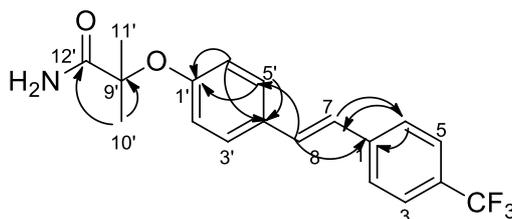


Figura 7. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5f**

O composto **5f** foi obtido como um sólido branco. As bandas de absorção na região do IV em 1602 (C=C) juntamente com os dupletos em δ_H 7,22 e 7,39 ($J = 18,0$ Hz) evidenciam a presença do composto **5f** com configuração (*E*). A ligação C=C ainda pôde ser confirmada devido à correlação no mapa de contorno de HMBC entre o H-6 e C-7. O δ_C 176,9 juntamente com a banda larga presente no espectro de IV na faixa de 3192-3442 cm^{-1} (estiramento N-H) é referente à presença do grupo amida na estrutura, o qual ainda foi confirmado através das correlações no mapa de contorno de HMBC (Figura 7) entre H-10/H-11 e C-12 (Apêndice 16).

4.4.5.2 Composto **4a**

4a. Sólido branco, rendimento de 7,8%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_H 7,50 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2/H-6 e H-3'/H-5'), δ_H 7,05 (s; H-7 e H-8), δ_H 6,91 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3/H-5 e H-2'/H-6'), δ_H 3,80 (s; 4-OCH₃), δ_H 1,58 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_C 175,4 (C-12), δ_C 160,0 (C-4), δ_C 156,0 (C-1'), δ_C 132,6 (C-1), δ_C 131,2 (C-4'), δ_C 128,3 (C-7/C-8), δ_C 127,5 (C-2 e C-6), δ_C 126,6 (C-3' e C-5'), δ_C 120,0 (C-3 e C-5), δ_C 114,9 (C-2' e C-6'), δ_C 79,6 (C-9), δ_C 55,8 (4-OCH₃), δ_C 25,5 (C-10/C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 2,989 (C-H alifático), 2,250-3500 (COOH), 1,720 (C=O), 1,602 (C=C alceno), 1,512 e 1,465 (C=C aromático) (Apêndice 5). A figura 8 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC.

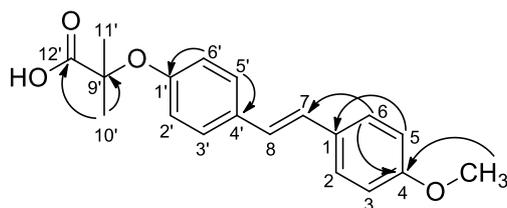


Figura 8. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **4a**

4.4.5.3 Composto **4b**

4b. Sólido branco, rendimento de 15%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_H 7,25 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2/H-6 e H-3'/H-5'), δ_H 6,97 (d; $J = 18$ Hz; H-7/H-8 e H-4), δ_H 6,89 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3/H-5 e H-4), δ_H 6,89 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_H 1,56 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_C 175,5 (C-12), δ_C 156,0 (C-1'), δ_C 132,9 (C-4'), δ_C 129,9 (C-2 e C-6), δ_C 129,9 (C-7/C-8), δ_C 122,7 (C-3' e C-5'), δ_C 119,9 (C-3 e C-5), δ_C 122,7 (C-4), δ_C 119,9 (C-2' e C-6'), δ_C 25,6 (C-10/C-11), (Apêndice 6). A figura 9 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC.

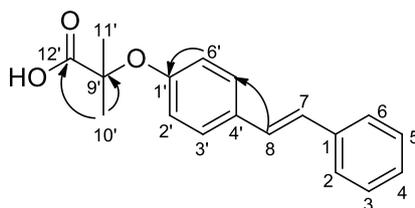


Figura 9. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **4b**

4.4.5.4 Composto **4c**

4c. Sólido branco, rendimento de 8%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,43 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2/H-6, e H-3'/H-5'), δ_{H} 7,0 (d; $J = 18$ Hz; H-7 e H-8), δ_{H} 6,85 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,82 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 1,57 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 175,5 (C-12), δ_{C} 157,9 (C-4), δ_{C} 155,8 (C-1'), δ_{C} 132,7 (C-4'), δ_{C} 130,1 (C-1), δ_{C} 128,4 (C-7/C-8), δ_{C} 127,8 (C-3' e C-5'), δ_{C} 125,8 (C-2 e C-6), δ_{C} 120,0 (C-2' e C-6'), δ_{C} 116,3 (C-3 e C-5), δ_{C} 79,3 (C-9), δ_{C} 1,57 (C-10/C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3456 (O-H aromático), 3016 (C-H alifático), 2250-3600 (COOH), 1712 (C=O), 1606 (C=C alceno), 1514 e 1436 (C=C aromático) (Apêndice 7). A figura 10 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC.

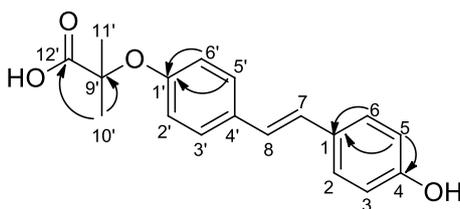


Figura 10. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **4c**

4.4.5.5 Composto **4d**

4d. Sólido branco, rendimento de 10%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,48 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2/H-6 e H-3'/H-5'), δ_{H} 7,16 (d; $J = 18$ Hz; H-7 e H-8), δ_{H} 7,10 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 6,90 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 2,31 (s; 4- CH_3), δ_{H} 1,59 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 175,9 (C-12), δ_{C} 156,3 (C-1'), δ_{C} 137,8 (C-4), δ_{C} 135,9 (C-1), δ_{C} 132,5 (C-4'), δ_{C} 130,2 (C-3 e C-5), δ_{C} 128,1 (C-3' e C-5'), δ_{C} 127,9 (C-2 e C-6), δ_{C} 127,1 (C-7/C-8), δ_{C} 120,1 (C-2' e C-6'), δ_{C} 79,8 (C-9), δ_{C} 21,3 (4- CH_3), δ_{C} 1,59 (C-10/C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 2200-3500 (COOH), 2989 (C-H alifático), 1712 (C=O), 1600 (C=C alceno), 1512 (C=C aromático) (Apêndice 8). A figura 11 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4d**.

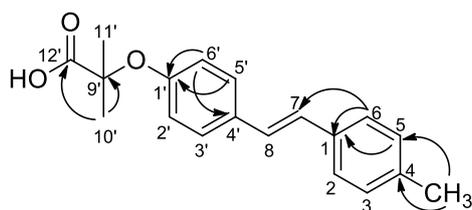


Figura 11. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **4d**

4.4.5.6 Composto **4e**

4e. Sólido branco, rendimento de 16%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,60 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,49 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,15 (dd; $J = 18$ Hz; H-7/H-8), δ_{H} 7,12 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 6,90 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 1,59 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 175,1 (C-12), δ_{C} 164,6 (C-4), δ_{C} 156,5 (C-1'), δ_{C} 135,1 (C-1), δ_{C} 132,2 (C-4), δ_{C} 128,8 (C-3 e C-5), δ_{C} 128,0 (C-3' e C-5'), δ_{C} 126,6 (C-2 e C-6), δ_{C} 120,0 (C-2' e C-6'), 116,4 (C-7/C-8), δ_{C} 79,0 (C-9), δ_{C} 25,9. (C-10/C-11), IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 2200-3650 (COOH), 2991 (C-H alifático), 1720 (C=O), 1597 (C=C alceno), 1510 e 1469 (C=C aromático) (Apêndice 9). A figura 12 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4e**.

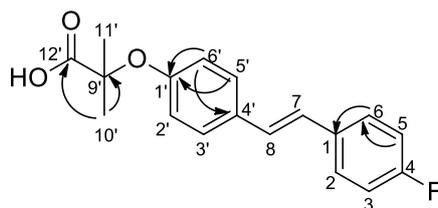


Figura 12. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **4e**

4.4.5.7 Composto **4f**

4f. Sólido branco, rendimento de 16%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,75 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,64 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,50 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,34 (d; $J = 18$ Hz; H-7), δ_{H} 7,15 (d; $J = 18$ Hz; H-8), δ_{H} 6,92 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 1,56 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 157,8 (C-4), δ_{C} 142,9 (C-1'), δ_{C} 132,1 (C-1), δ_{C} 130,6 (C-4'), δ_{C} 128,8 (C-3 e C-5), δ_{C} 127,5 (C-7/C-8), δ_{C} 126,3 (C-2 e C-6), δ_{C} 125,5 (C-3' e C-5'), δ_{C} 119,6 (C-2' e C-6'), δ_{C} 26,1 (C-10/C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 2250-3650 (CCOH), 3022 (C-H alifático), 1720 (C=O), 1604 (C=C alceno), 1508 (C=C aromático) (Apêndice 10). A figura 13 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4f**.

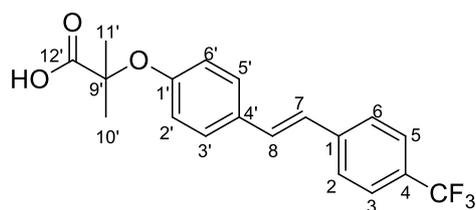


Figura 13. Estrutura química do composto **4f**

4.4.5.8 Composto **5a**

5a. Sólido branco, rendimento de 20%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,49 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,49 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,07 (dd; $J = 18$ Hz; H-7/H-8), δ_{H} 6,93 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 6,93 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,56 (s; -NH₂), δ_{H} 1,56 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 176,2 (C-12), δ_{C} 159,4 (C-4), δ_{C} 154,4 (C-1'), δ_{C} 132,3 (C-4'), δ_{C} 127,5 (C-2 e C-6), δ_{C} 127,5 (C-3' e C-5'), δ_{C} 126,9 (C-7/C-8), δ_{C} 120,6 (C-2' e C-6'), δ_{C} 114,0 (C-3 e C-5), δ_{C} 80,4 (C-9), δ_{C} 24,5 (C-10/C-11), (Apêndice 11). A figura 14 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **5a**.

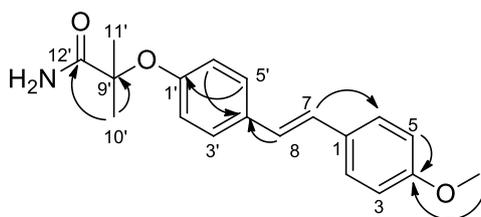


Figura 14. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5a**

4.4.5.9 Composto **5b**

5b. Sólido branco, rendimento de 20%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,57 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,53 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,35 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,17 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-4), δ_{H} 7,17 (dd; $J = 15$ Hz; H-7/H-8), δ_{H} 6,96 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,58 (-NH₂), δ_{H} 1,49 (s; H-10/H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 177,0 (C-12), δ_{C} 155,7 (C-1'), δ_{C} 138,5 (C-1), δ_{C} 132,7 (C-4'), δ_{C} 129,5 (C-3 e C-5), δ_{C} 128,8 (C-4), δ_{C} 128,8 (C-7/C-8), δ_{C} 128,1 (C-3' e C-5'), δ_{C} 127,1 (C-2 e C-6), δ_{C} 121,4 (C-2' e C-6'), δ_{C} 81,6 (C-9), δ_{C} 25,4 (C-10/C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3452-3190 (N-H amida), 2991 (C-H alifático), 1688 (C=O), 1609 (C=C alceno), 1508 e 1450 (C=C aromático) (Apêndice 12). A figura 15 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **5b**.

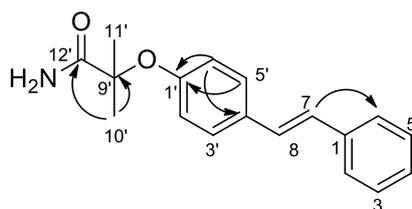


Figura 15. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5b**

4.4.5.10 Composto **5c**

5c. Sólido branco, rendimento de 20%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,47 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,40 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,04 (dd; $J = 18,0$ Hz; H-7 e H-8), δ_{H} 6,94 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,83 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 6,57 (s; $-\text{NH}_2$), δ_{H} 1,48 (s; H-10 e H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 177,0 (C-12), δ_{C} 158,0 (C-4), δ_{C} 155,2 (C-1'), δ_{C} 133,4 (C-4'), δ_{C} 128,6 (C-2 e C-6), δ_{C} 127,7 (C-3' e C-5'), δ_{C} 125,8 (C-7 e C-8), δ_{C} 121,4 (C-2' e C-6'), δ_{C} 116,3 (C-3 e C-5), δ_{C} 81,4 (C-9), δ_{C} 25,4 (C-10 e C-11). IV (V_{max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3294-3485 (N-H amida), 1685 (C=O), 1602 (C=C alceno), 1512 e 1462 (C=C aromático) (Apêndice 13). A figura 16 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **5c**.

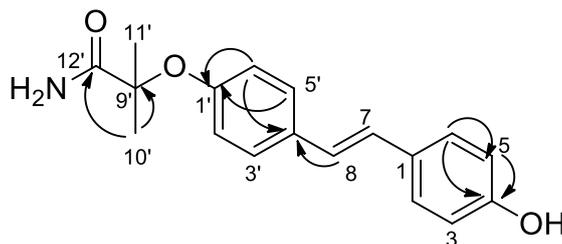


Figura 16. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5c**

4.4.5.11 Composto **5d**

5d. Sólido branco, rendimento de 9%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_{H} 7,51 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_{H} 7,45 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_{H} 7,14 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_{H} 7,14 (dd; $J = 18,0$ Hz; H-7 e H-8), δ_{H} 6,94 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_{H} 6,58 (s; $-\text{NH}_2$), δ_{H} 1,49 (s; H-10 e H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_{C} 177,0 (C-12), δ_{C} 155,5 (C-1'), δ_{C} 137,8 (C-4), δ_{C} 135,7 (C-1), δ_{C} 132,9 (C-4'), δ_{C} 128,0 (C-7 e C-8), δ_{C} 130,1 (C-3 e C-5), δ_{C} 127,8 (C-3' e C-5'), δ_{C}

127,0 (C-2 e C-6), δ_C 121,4 (C-2' e C-6'), δ_C 81,7 (C-9), δ_C 25,4 (C-10 e C-11). IV (V_{\max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3194-3435 (N-H amida), 2,927 (C-H alifático), 1688 (C=O), 1631 (N-H amida), 1510 e 1458 (C=C aromático) (Apêndice 14). A figura 17 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **5d**.

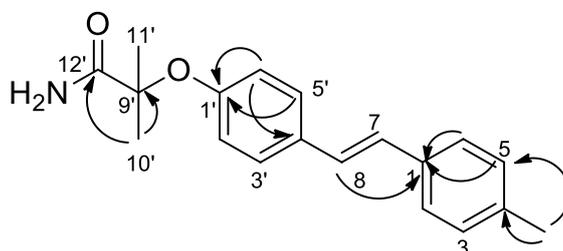


Figura 17. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5d**

4.4.5.12 Composto **5e**

5e. Sólido branco, rendimento de 25%. RMN de ^1H (300 MHz, acetona deuterada), δ_H 7,61 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-3 e H-5), δ_H 7,52 (d; $J = 9,0$ Hz; H-3' e H-5'), δ_H 7,11 (dd; $J = 9,0$ Hz; H-2 e H-6), δ_H 7,11 (dd; $J = 15,0$ Hz; H-7 e H-8), δ_H 6,96 (d; $J = 9,0$ Hz; H-2' e H-6'), δ_H 6,58 (s; $-\text{NH}_2$), δ_H 1,49 (s; H-10 e H-11). RMN de ^{13}C (75 MHz, acetona deuterada), δ_C 177,0 (C-12), δ_C 164,6 (C-4), δ_C 161,3 (C-1), δ_C 155,7 (C-1'), δ_C 132,0 (C-4'), δ_C 128,8 (C-3 e C-5), δ_C 128,1 (C-3' e C-5'), δ_C 126,8 (C-2 e C-6), δ_C 121,4 (C-2' e C-6'), δ_C 116,1 (C-7 e C-8), δ_C 81,6 (C-9), δ_C 25,4 (C-10 e C-11). IV (V_{\max} ; cm^{-1} ; pastilha de KBr), 3192-3450 (N-H amida), 2945 (C-H alifático), 1668 (C=O), 1510 e 1365 (C=C aromático) (Apêndice 15). A figura 18 mostra as principais correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **5e**.

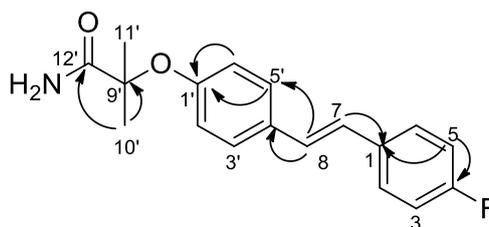


Figura 18. Principais correlações no mapa de contorno de HMBC para o composto **5e**

4.5 Atividade agonista em PPAR- α/γ

O objetivo deste ensaio foi avaliar a capacidade transcricional dos receptores PPARs na presença dos compostos **4a-f** e **5a-f**. Para este ensaio foi utilizado plasmídeos contendo resíduos que codificam o LDB de PPARs acoplados do DBD de Gal4; e plasmídeos contendo genes de luciferase. Após a interação dos compostos com os receptores espera-se que haja o aumento da transcrição dos genes de luciferase levando ao aumento da expressão dessa proteína. A luciferease catalisa a reação oxidativa da liciferina gerando luminescência, o qual é quantificada em unidades relativas de luz. A luminescência é uma marcador da atividade transcricional pelos receptores PPARs. Para a atividade agonista em PPAR- α/γ foi utilizada concentrações de 10^{-12} – 10^{-4} M para determinação de curva dose-resposta para obtenção de valores da concentração efetiva (EC_{50}) para os compostos **4a-f** e **5a-f**. Os dados estão descritos na Tabela 3.

Anteriormente ao ensaio de gene reporter, todos os compostos tiveram a citotoxicidade avaliada em células HeLa com concentrações crescentes (10^{-12} a 10^{-4} M) utilizando MTT como revelador. O DMSO foi usando como veículo em todas as análises. Todos os composto apresentaram viabilidade celular superior 90% na maior concentração de 10^{-6} M.

Os compostos **4a-f** e **5a-f** apresentaram atividade agonista em PPAR- α/γ com valores de EC_{50} que variaram entre 20.000nM–28nM (Figura 19). A presença do grupo amida na estrutura química do estilbeno promoveu agonismo dual α/γ quando comparado os valores de EC_{50} para **5a-f**. O composto **5b** sem substituição no anel aromático apresentou valor de EC_{50} = 28nM e 69nM para PPAR- α e PPAR- γ respectivamente (Tabela 3). Ainda, o composto **5b** promoveu substancial seletividade para PPAR- α em relação à PPAR- γ (~2.5x). Grupos $-CH_3$ e $-F$ favorecem uma atividade agonista significativa com valores de EC_{50} = 40 e 32nM respectivamente. Por outro lado, a inserção de $-CF_3$ no anel de **5b** reduziu drasticamente a potência de ativação em 64 e 68x para PPAR- α (EC_{50} = 1800nM) e PPAR- γ (EC_{50} = 4700nM) respectivamente (Tabela 3).

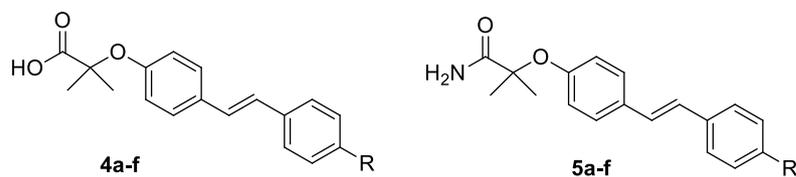


Tabela 3. Valores de EC₅₀ para os novos agonistas de PPAR- α/γ

Compostos	PPAR- α		PPAR- γ	Seletividade α/γ
	R	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	
Bezafibrato	-	18300	-	-
rosiglitazona	-	-	18,6	-
resveratrol	-	-	-	-
4a	OCH ₃	>20000	>20000	-
4b	H	>20000	>20000	-
4c	OH	-	>20000	-
4d	CH ₃	-	14400	-
4e	F	-	>20000	-
4f	CF ₃	>20000	>20000	-
5a	OCH ₃	153± 0,06	247± 0,11	1,6
5b	H	28± 0,07	69± 0,12	2,5
5c	OH	433± 0,06	488± 0,07	1,1
5d	CH ₃	40±0,06	71± 0,14	1,7
5e	F	32± 0,09	35± 0,05	1,0
5f	CF ₃	1800± 0,06	4700± 0,16	2,6

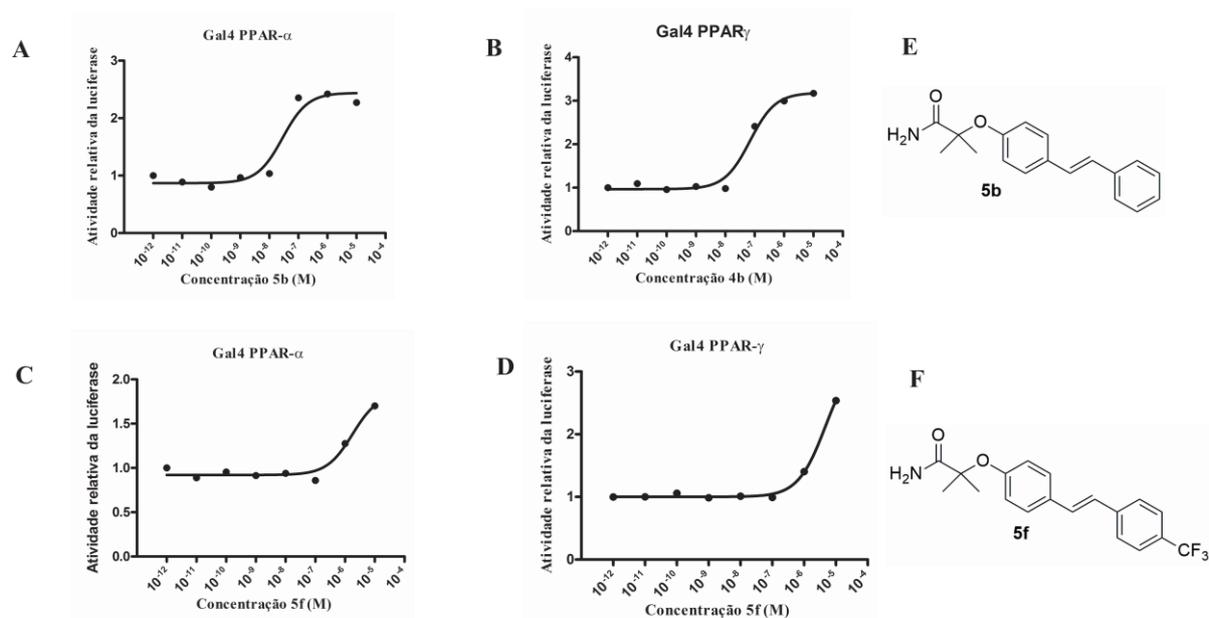


Figura 19. Curva de dose-resposta para os agonistas **5b** e **5f** em PPAR- α e PPAR- γ . **A**, atividade agonista de **5b** em PPAR- α ; **B**, atividade agonista de **5b** em PPAR- γ ; **C**, influência do grupo -CF₃ na atividade agonista de **5f** em PPAR- α ; **D**, influência do grupo -CF₃ na atividade agonista de **5f** em PPAR- γ ; **E**, estrutura química de **5b**; **F**, estrutura química de **5f**.

4.6 Modo de ligação de **5b** em PPAR- α/γ

O possível modo de ligação de **5b** em PPAR- α/γ e suas interações no sítio ativo foram caracterizados por estudos de docagem molecular. De modo geral, o sítio ativo de PPAR- α/γ é representado pelo formato da letra ‘Y’ com a presença de três cavidades: cavidade I, com característica polar devido à presença de resíduos como Tyr 314, Tyr 464 e His 440 ligados a hélice 5 (H5), hélice 12 (H12) e hélice 11(H11) respectivamente; cavidade II e III com características hidrofóbicas devido à presença de resíduos de Met 330 e Cys 275 (Figura 20A e 20B). A extremidade polar da cavidade I juntamente com a cavidade II representa a chamada cavidade “U”, o qual representa o sítio de interação da maioria de agonistas totais. A cavidade II de PPAR- α é composta por resíduos de Met 330 e Cys 275 que fornecem maior hidrofobicidade e um estreitamento da cavidade quando comparado com PPAR- γ (Figura 20C e 20E) (DOS SANTOS et al., 2015).

O modelo estrutural de docking mostra que composto **5b** ocupa a cavidade “U” do sítio ativo de PPAR- α . O composto **5b** apresenta uma ligação polar na cavidade I com His 440 da hélice 11 (H11), além de ser estabilizado por interações hidrofóbicas na cavidade II por resíduos de metionina 335, metionina 330, alanina 332 e cisteína 275 de PPAR- α (Figura 20C).

Apesar de fazer uma interação polar com His 449 da H11 na cavidade I de PPAR- γ , o composto **5b** não ocupa a cavidade “U” como observado em PPAR- α (Figura 20F). A interação de **5b** no sítio de PPAR- γ se estende por toda cavidade II e em parte da cavidade III (Figura 20H). Além disso, em ambos receptores **5b** não apresenta interações com resíduo de Tyr da H12 em PPAR α/γ como observados na maioria dos agonistas totais (Figura 20C e 20E) (BÉNARDEAU et al., 2009; GRETHER et al., 2009; LI et al., 2008). Esse perfil de interação tem sido observado como uma característica de agonistas parciais. A interação com H12 mantém o receptor em sua forma ativa (fechada) para o reconhecimento de sequências do DNA e início da transcrição gênica. A ausência de interação com H12 em ambos receptores pode explicar a menor potencia de **5b**.

As diferentes conformações de **5b** no reconhecimento do sítio ativo de PPAR- α/γ podem ser explicadas com base na diferença estrutural entre ambos receptores. A cavidade I preenchida por **5b** em PPAR- γ é maior do que em PPAR- α . Esta diferença estrutural na cavidade I é devida um resíduo de arginina em PPAR- γ enquanto que na mesma posição em PPAR- α há um resíduo de valina que promove um estreitamento da cavidade I, forçando **5b** a ocupar esta posição (Figura 20G e 20H). Ainda, a conformação planar de **5b** devido à presença da ligação C=C pode ser um segundo fator para a ocupação de cavidade I em PPAR- γ . Esta diferença conformacional no modo de ligação de **5b** pode explicar o valor de seletividade α/γ observado no ensaio de transativação (Tabela 3).

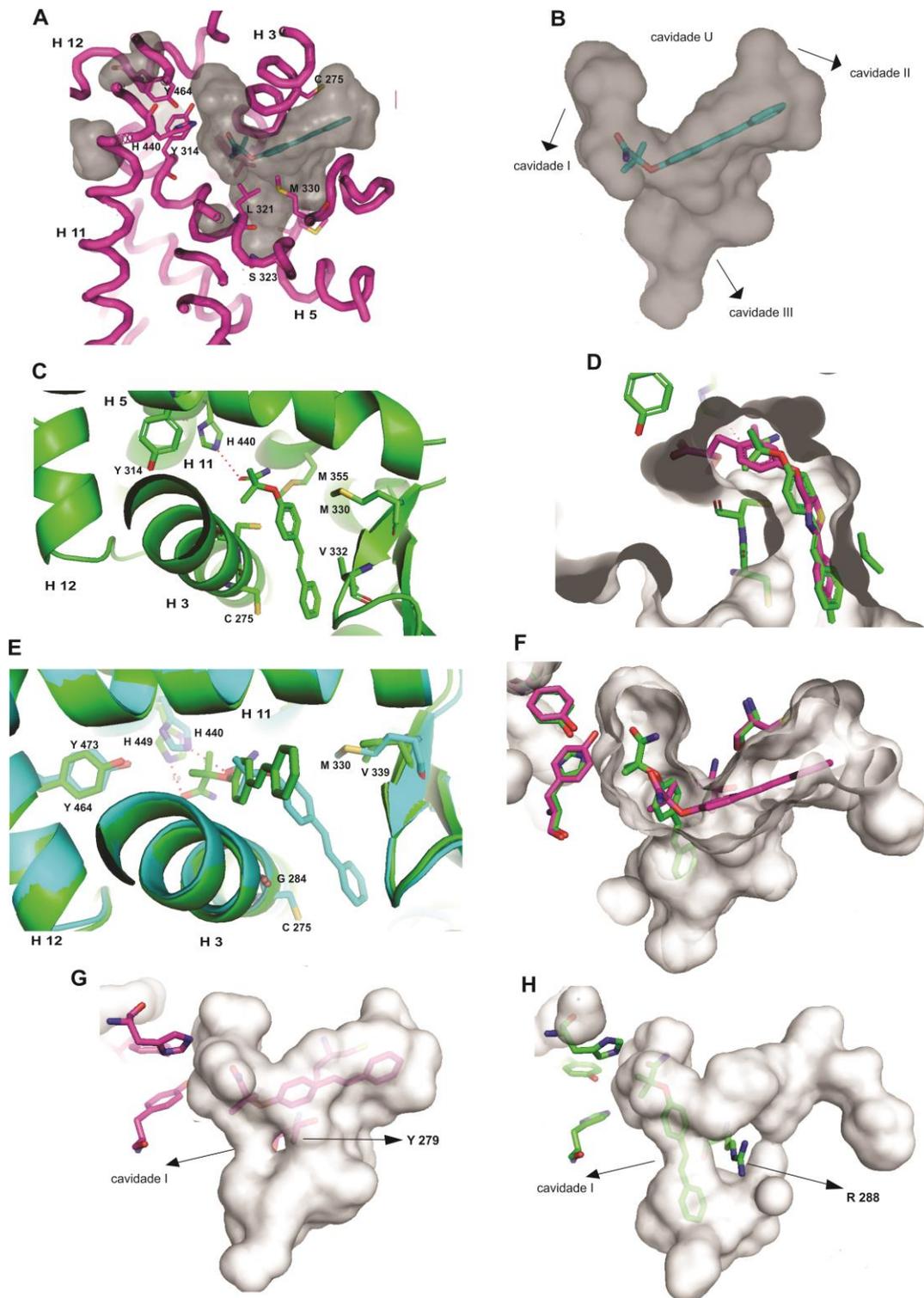


Figura 20. Modo de ligação de **5b** em PPAR- α/γ . **A**, estrutura do receptor PPAR- α representado em ribbons e seu sítio ativo representado em superfície contendo seus principais resíduos de aminoácidos. **B**, sítio ativo dos receptores PPARs na forma de “Y” classificado por suas cavidades de interação. **C**, interação de **5b** no sítio de PPAR- α com ligação polar com His 440 e interações hidrofóbicas com resíduos de cisteína, valina e metionina. **D**, ocupação de **5b** (verde) na cavidade “U” de PPAR- α em sobreposição com o ligante aleglitzar (magenta) (PDB 3FEI). **E**, interação de **5b** no sítio ativo de PPAR- γ (verde) em sobreposição com PPAR- α (azul). **F**, sobreposição do sítio ativo de PPAR- α/γ mostra o diferente modo de interação de **5b** em PPAR- γ (verde). **G**, presença da tirosina 279 permite que a cavidade I de PPAR- α seja menor em relação à de PPAR- γ . **H**, a cavidade I de PPAR- γ é maior devido a presença do resíduo de arginina 288, o qual permite a ocupação de **5b** nesta região.

4.7 Efluxo de colesterol em macrófagos

O ensaio de efluxo de colesterol tem como objetivo avaliar a capacidade dos compostos (**4a-f** e **5a-f**) em aumentar o efluxo de colesterol de macrófagos (células espumosas) na presença de apoA1 e HDL. O TRC é o processo de remoção de colesterol celular que contribui para o aumento das concentrações de HDL-C, para o qual o efluxo de colesterol é o ponto-chave desta etapa. A apoA1 (biossintetizada no fígado) promove efluxo de colesterol celular através dos transportadores ABCA1, enquanto a HDL promove efluxo através de ABCG1.

Neste ensaio, macrófagos (J777 e de medula óssea) foram encubados na presença de éster de colesterol para adquirirem o aspecto de células espumosas. Em seguida, as células foram incubadas com os compostos na presença de apoA1 ou HDL para determinar a % de efluxo de colesterol. Frente a macrófagos J777, o composto agonista **5b** elevou a percentagem de efluxo de colesterol mediado por HDL em 6,5%, enquanto o bezafibrato (controle positivo) elevou o efluxo em 8%. Os demais compostos **4a, c-f** e **5a, c-f** não tiveram efeitos significativos no efluxo mediado por apoA1 (Figura 21).

Em macrófagos de medula óssea o agonista **5b** elevou em 20 e 20,8% o efluxo de colesterol mediado por HDL e apoA1, respectivamente. Estes valores são superiores aos de HDL e ApoA1 (controles positivos), com 16 e 14%, respectivamente. Bezafibrato promoveu efluxo de 18% para HDL e 17,7% para apoA1, enquanto resveratrol não apresentou efeitos significativos de efluxo para ambas as vias.

A ativação da transcrição gênica dos transportadores de membrana ABCA1 parece ser uma estratégia para aumentar a eficiência do efluxo de colesterol. É descrito na literatura que a ativação de PPAR- α conduz à expressão dos transportadores de membrana ABCA-1 levando ao aumento do efluxo de éster de colesterol (KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005; TENENBAUM; FISMAN, 2012). Através do mecanismo de efluxo de colesterol juntamente com transcrição gênica de apoA1 no fígado, os fibratos aumentam as concentrações plasmáticas de HDL-C (KAWASHIRI et al., 2011). Por esses ensaios pudemos confirmar que o agonista dual de PPAR- α/γ é capaz de remover colesterol intracelular através dos transportadores de membrana ABCA1 e ABCG1 de forma dependente de apoA1 e HDL, respectivamente. Estes resultados podem estar relacionados com a capacidade de **5b** em transcrever genes de ABCA1, ABCG1 bem como de apoA1.

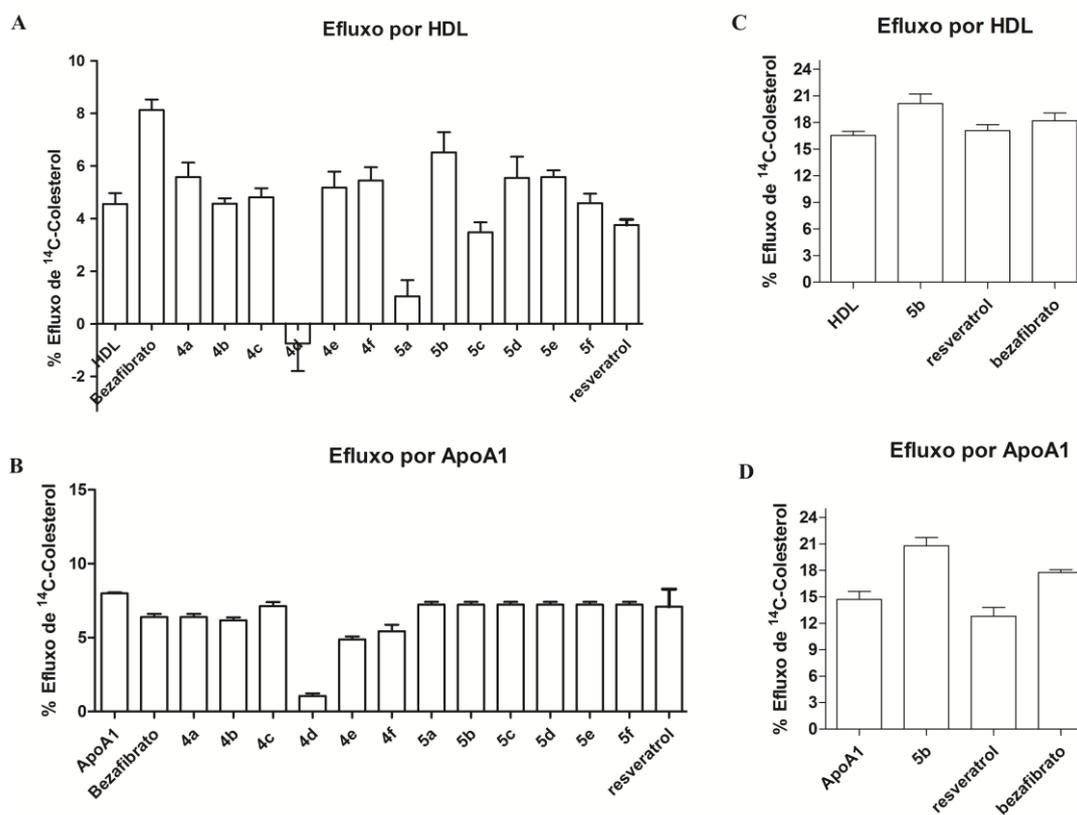


Figura 21. Percentagem do efluxo de colesterol determinado pelos para os compostos **4a-f** e **5a-f**. A, % de efluxo colesterol para 4a-f e 5a-f mediado por HDL em macrófagos J777; B, % de efluxo colesterol para **4a-f** e **5a-f** mediado por apoA1 em macrófagos J777; C, % de efluxo colesterol determinada para **5b** mediado por HDL em macrófagos bone marrow; D, % de efluxo colesterol determinada para **5b** mediado por ApoA1 em macrófagos de medula óssea.

4.8 Diferenciação de adipócitos

O ganho de peso é um dos principais efeitos colaterais das tiazolidinedionas (TZD) usadas contra resistência à insulina, uma vez que a ativação de PPAR- γ no tecido adiposo regula o processo de adipogênese. PPAR- γ é altamente expresso no tecido adiposo e recruta coativadores como C/EBP para promover a expressão gênica de adipócitos, como o Fabp4. Em um indivíduo em que o ganho energético é superior à despesa, os adipócitos se atrofiam gerando processo inflamatório com recrutamento de macrófagos. Estas células secretam citocinas pró-inflamatórias o qual que exacerba a resistência à insulina em adipócitos, aumentando o depósito de ácidos graxos em células como fígado, musculo e pâncreas. A ativação de PPAR- γ por TZD no tecido adiposo aumenta a transcrição de genes de PEPKC levando a conversão de piruvato em glicerol-3-fosfato. Ácidos graxos circulantes na presença de glicerol-3-fosfato são convertidos em TG em adipócitos. Além disso, as TZD no tecido adiposo aumentam a transcrição de genes Fabp4 capazes de diferenciar células pré-adipócitos em adipócitos maduros. O acúmulo de TG em adipócitos juntamente com a multiplicação destas células

têm-se um aumento da massa do tecido adiposo e conseqüentemente o ganho de peso (ROSEN; MACDOUGALD, 2006; SIERSBÆK; NIELSEN; MANDRUP, 2010).

Devido o composto **5b** ser agonista dual PPAR- α/γ , nós realizamos o ensaio de diferenciação de adipócitos utilizando células pré-adipócitos 3T3-L1 e determinamos a expressão relativa do mRNA do gene Fabp4 (Figura 22).

Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos na presença de insulina (167 nM), dexametasona (1 μ M) e isobutilmetilxantina (0,5 mM). As células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 10^{-7} M (controle positivo) e **5b** (10^{-7} até 10^{-5} M) por 48h. O composto **5b** não apresentou expressão significativa do mRNA de Fabp4 na concentração de 1000nM quando comparado a rosiglitazona na mesma concentração (Figura 22). Além disso, rosiglitazona apresentou maior capacidade de diferenciação de adipócitos quando comparado com **5b**, bem como o acúmulo de TG. Na figura 22, o acúmulo de TG pode ser observado através da pigmentação celular vermelho.

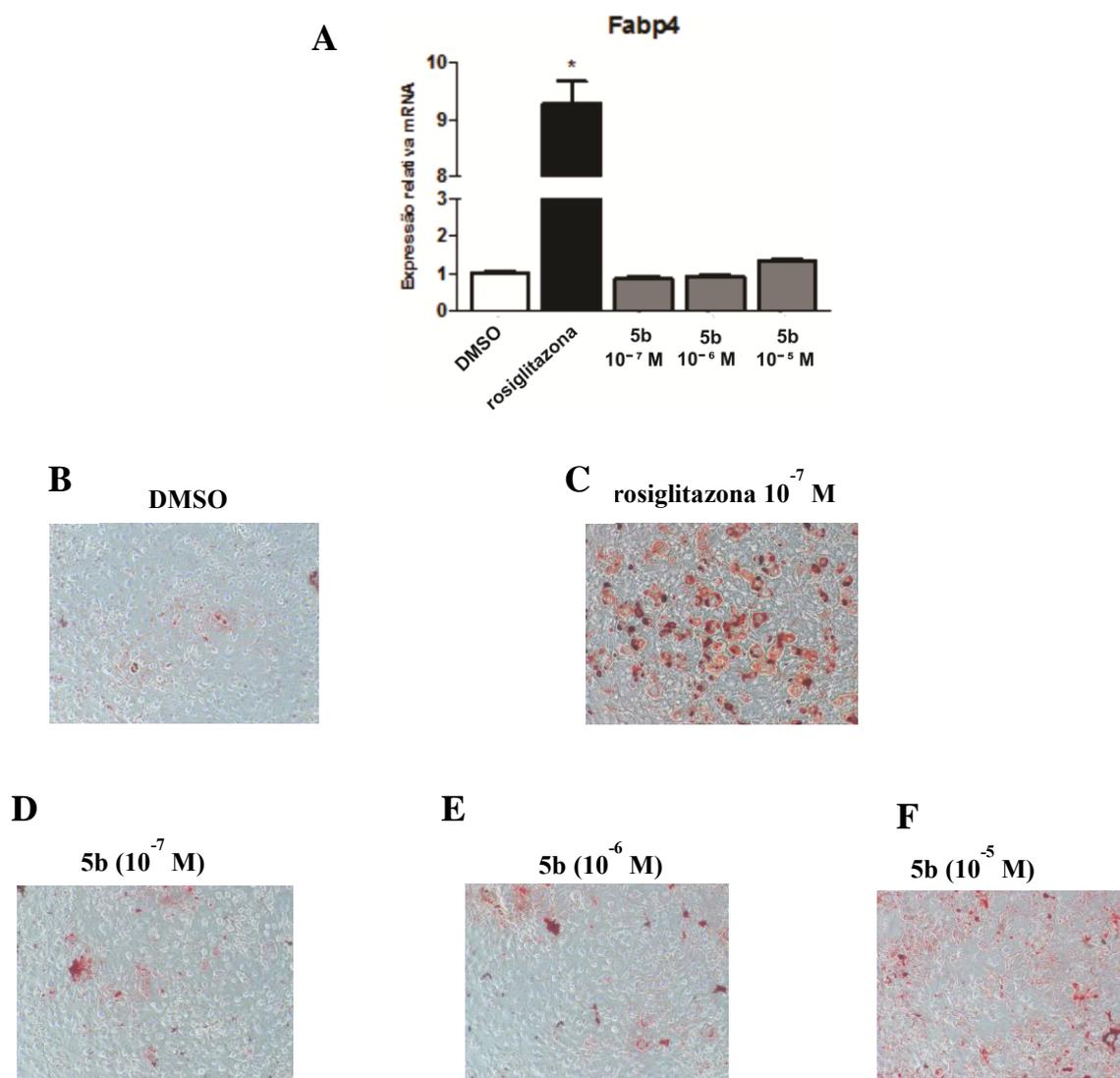


Figura 22. Indução da diferenciação de adipócitos por **5b**. **A**, expressão relativa do mRNA de Fabp4 na presença de DMSO, rosiglitazona e **5b** em três concentrações. **B**, diferenciação de adipócitos por DMSO. **C**, diferenciação de adipócitos por rosiglitazona. **D**, **E** e **F**: diferenciação de adipócitos por **5b** nas concentrações de 10^{-7} , 10^{-6} e 10^{-5} respectivamente.

5. CONCLUSÃO

Foi possível realizar a síntese, purificação e caracterização estrutural por RMN de ^1H , ^{13}C e espectroscopia de absorção na região do infravermelho dos intermediários **1a**, **1b**. Ambos foram obtidos com rendimentos de 16 e 80%, respectivamente. Estes intermediários foram planejados para obtenção da série dos compostos híbridos contendo grupo ácido na estrutura. A partir dos intermediários **1a** e **1b** seis compostos híbridos finais (**4a-f**) foram sintetizados, purificados por CLAE-DAD preparativo, e caracterizados por RMN unidimensional de ^1H e ^{13}C , e bidimensional de HSQC e HMBC, com rendimentos que variaram entre 8-16%.

Os intermediários propionamida e **2b** foram sintetizados, purificados e caracterizados por RMN de ^1H , ^{13}C e espectroscopia de absorção na região do Infravermelho, com rendimentos de 83 e 32%. Estes intermediários foram planejados para obtenção dos compostos híbridos finais contendo grupo amida na estrutura. A partir dos intermediários propionamida e **2b** seis compostos híbridos (**5a-f**) foram obtidos. Além disso, foi possível realizar uma breve otimização do procedimento sintético para os compostos híbridos finais, para os quais se observou aumento gradativo do rendimento reacional em relação ao aumento do uso de $\text{Pd}(\text{AcO})_2$.

Os compostos híbridos **5a-f** apresentaram atividade agonista dual em $\text{PPAR-}\alpha/\gamma$ com valores de EC_{50} que variaram entre 28nM a 4700nM. O agonista **5b** foi 660x mais potente que o fármaco bezafibrato na ativação de $\text{PPAR-}\alpha$. Este agonista (**5b**) mostrou substancial seletividade para $\text{PPAR-}\alpha$ em relação à $\text{PPAR-}\gamma$ (2,5x). Estudos de docagem molecular mostram que **5b** se liga no sítio ativo de $\text{PPAR}\alpha/\gamma$, o qual é estabilizado por interações polares e hidrofóbicas.

O novo agonista dual **5b** foi eficaz em promover efluxo de colesterol em macrófagos J777 mediado por HDL (6,5%) e em macrófagos bone marrow mediado por HDL (20%) e ApoA1(20,8%). Esses resultados sugerem que **5b** aumenta o efluxo de colesterol através dos transportadores ABCA1 e ABCG1 na presença de HDL e apoA1.

Apesar de ser um agonista de $\text{PPAR-}\gamma$, interessantemente o composto **5b** não apresentou valores significativos na expressão gênica de Fabp4. Além disso, não promoveu diferenciação de adipócitos de forma significativa comparado à rosiglitazona.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Dislipidemia. Saúde e Economia. **Saúde e economia**, v. 3, n. 6, p. 1–4, 2011.
- ASCUNCE, R. R. et al. The role of statin therapy for primary prevention: What is the evidence? **Current Atherosclerosis Reports**, v. 14, n. 2, p. 167–174, 2012.
- ASENSI, M. et al. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 3, p. 387–398, 2002.
- AYAORI, M. et al. Effect of bezafibrate therapy on atherosclerotic aortic plaques detected by MRI in dyslipidemic patients with hypertriglyceridemia. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 425–433, 2008.
- BALLANTYNE, C. M. et al. Influence of low HDL on progression of coronary artery disease and response to fluvastatin therapy. **Circulation**, v. 99, n. 6, p. 736–43, 1999.
- BÉNARDEAU, A. et al. Aleglitazar, a new, potent, and balanced dual PPAR α/γ agonist for the treatment of type II diabetes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2468–2473, 2009.
- BERBÉE, J. F. P. et al. Resveratrol protects against atherosclerosis, but does not add to the antiatherogenic effect of atorvastatin, in APOE * 3-Leiden.CETP mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1423–1430, 2013.
- BERGER, J.; MOLLER, D. E. The Mechanisms of Action of PPARs. **Annual Review of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 409–435, 2002.
- BERNARDES, A. et al. Molecular mechanism of peroxisome proliferator-activated receptor α activation by WY14643: A new mode of ligand recognition and receptor stabilization. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 16, p. 2878–2893, 2013.
- BIBBINS-DOMINGO, K. et al. Screening for Lipid Disorders in Children and Adolescents. **JAMA**, v. 316, n. 6, p. 625, 2016.
- BRASILEIRA, S. I D iretriz B rasileira de H ipercolesterolemia F amiliar (HF). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 99, p. 1-28, 2012.
- BREWER, H. B. High-Density Lipoproteins: A New Potential Therapeutic Target for the Prevention of Cardiovascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, n. 3, p. 387–391, 2004.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms**: 5 ed. Nova Iorque: Springer, 2007.

CARRIZZO, A. et al. Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism. **Hypertension**, v. 62, n. 2, p. 359–366, 2013.

CHANDRA, V. et al. Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex DNA. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 350–356, 2009.

CHARO, I. F.; TAUB, R. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 5, 365–376, 2011.

CHOI, H. Y. et al. High-Density Lipoproteins: Biology, Epidemiology, and Clinical Management. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 33, n. 3, p. 325–333, 2017.

DASH, S. et al. High-dose resveratrol treatment for 2 weeks inhibits intestinal and hepatic lipoprotein production in overweight/obese men. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 12, p. 2895–2901, 2013.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. A intrigante bioquímica da niacina - Uma revisão crítica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1739–1752, 2011.

DOS SANTOS, J. C. et al. Different binding and recognition modes of GL479, a dual agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. **Journal of Structural Biology**, v. 191, n. 3, p. 332–340, 2015.

DUEZT, H. et al. Reduction of atherosclerosis by the peroxisome proliferator-activated receptor α agonist fenofibrate in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48051–48057, 2002.

EL-NAHAS, A. M.; CLARK, T. AM1 and PM3 Calculations on the Effect of Substituents on the Stabilities of Carbocations in the Gas Phase and in Solution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 60, n. 24, p. 8023–8027, 1995.

FUTATSUGI, K. et al. Discovery and Optimization of Imidazopyridine-Based Inhibitors of Diacylglycerol Acyltransferase 2 (DGAT2). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 7173–7185, 2015.

GOLDENBERG, I.; BENDERLY, M.; GOLDBOURT, U. Update on the use of fibrates: Focus on bezafibrate. **Vascular Health and Risk Management**, v. 4, n. 1, p. 131–141, 2008.

GRETHER, U. et al. Design and biological evaluation of novel, balanced dual PPAR α/γ agonists.

ChemMedChem, v. 4, n. 6, p. 951–956, 2009.

HEINECKE, J. W. The not-so-simple HDL story: A new era for quantifying HDL and cardiovascular risk? **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1346–1347, 2012.

HENNUYER, N. et al. PPAR α , but not PPAR γ , activators decrease macrophage-laden atherosclerotic lesions in a nondiabetic mouse model of mixed dyslipidemia. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 9, p. 1897–1902, 2005.

HONG, J. L.; WANG, L. Triethanolamine as an efficient and reusable base, ligand and reaction medium for phosphane-free palladium-catalyzed heck reactions. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 22, p. 5099–5102, 2006.

HUANG, Y. et al. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. **Nature Medicine**, v. 20, n. 2, p. 193–203, 2014.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR- α agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82–86, 1998.

JOY, T.; HEGELE, R. A. Is raising HDL a futile strategy for atheroprotection? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 143–155, 2008.

KAWASHIRI, M. AKI et al. Impact of bezafibrate and atorvastatin on lipoprotein subclass in patients with type III hyperlipoproteinemia: Result from a crossover study. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 11–12, p. 1068–1075, 2011.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H. W.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85–94, 2005.

LAMBERT, G. et al. The PCSK9 decade. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 12, p. 2515–2524, 2012.

LEDFORD, H. Blockbuster drugs bows out. **Nature**, v. 480, p. 16–17, 2011.

LI, Y. et al. T2384, a novel antidiabetic agent with unique peroxisome proliferator-activated receptor γ binding properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9168–9176, 2008.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868–874, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 317–325, 2011.

MANZI, I. et al. Statins and Musculoskeletal Conditions, Arthropathies, and Injuries. **JAMA Internal Medicine**, v. 173, n. 14, p. 1318, 2013.

MATOS, R. S. et al. Resveratrol provoca efeitos antiaterogênicos em um modelo animal de aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 98, n. 2, p. 136–142, 2012.

MIURA, D.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 11, p. 1393–1400, 2003.

MORO, A. V.; CARDOSO, F. S. P.; CORREIA, C. R. D. Heck arylation of styrenes with arenediazonium salts: short, efficient, and stereoselective synthesis of resveratrol, DMU-212, and analogues. **Tetrahedron Letters**, v. 49, n. 39, p. 5668–5671, 2008.

MULLARD, A. CETP set-back, again. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 739–739, 2015.

NAGHAVI, M. et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 385, n. 9963, p. 117–171, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger Princípios de bioquímica de Lehninger: 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 12, p. 885–896, 2006.

SBC, S. B. DE C.; SBH, S. B. DE H.; SBN, S. B. DE N. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1–51, 2010.

SIERRA, M. L. et al. Substituted 2- [(4-Aminomethyl) phenoxy] -2-methylpropionic Acid PPAR α Agonists. 1. Discovery of a Novel Series of Potent HDLc Raising Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 685–695, 2007.

SIERSBÆK, R.; NIELSEN, R.; MANDRUP, S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism - Novel insights from genome-wide studies. **FEBS Letters**, v. 584, n. 15, p. 3242–3249, 2010.

TALAYERO, B. G.; SACKS, F. M. The role of triglycerides in atherosclerosis. **Current Cardiology Reports**, v. 13, n. 6, p. 544–552, 2011.

TENENBAUM, A.; FISMAN, E. Z. Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction. **Cardiovascular Diabetology**, v. 11, n. 1, p. 125, 2012.

TIAN, L. et al. The value and distribution of high-density lipoprotein subclass in patients with acute coronary syndrome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

TOTH, P. P. Triglyceride-rich lipoproteins as a causal factor for cardiovascular disease. **Vascular Health and Risk Management**, v. 12, p. 171–183, 2016.

WEIDNER, J. J. et al. Preparation of N-Aryl-2-hydroxypropionamides from hydroxy aromatic compounds using a one-pot smiles rearrangement procedure. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6303–6312, 1997.

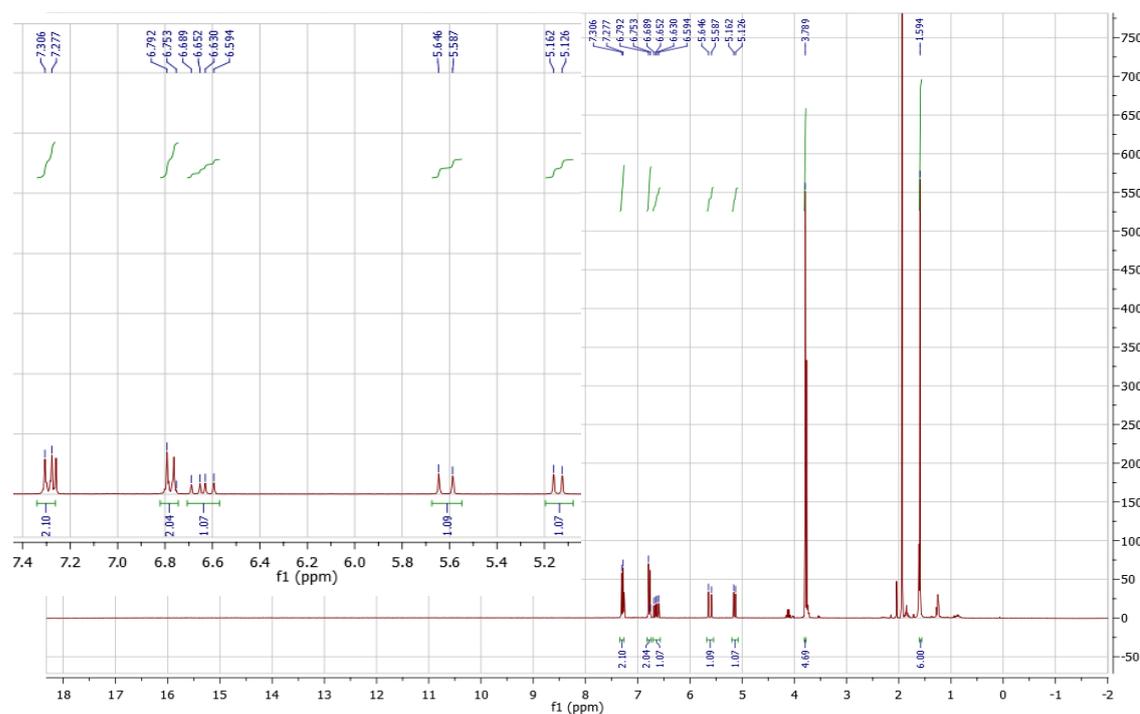
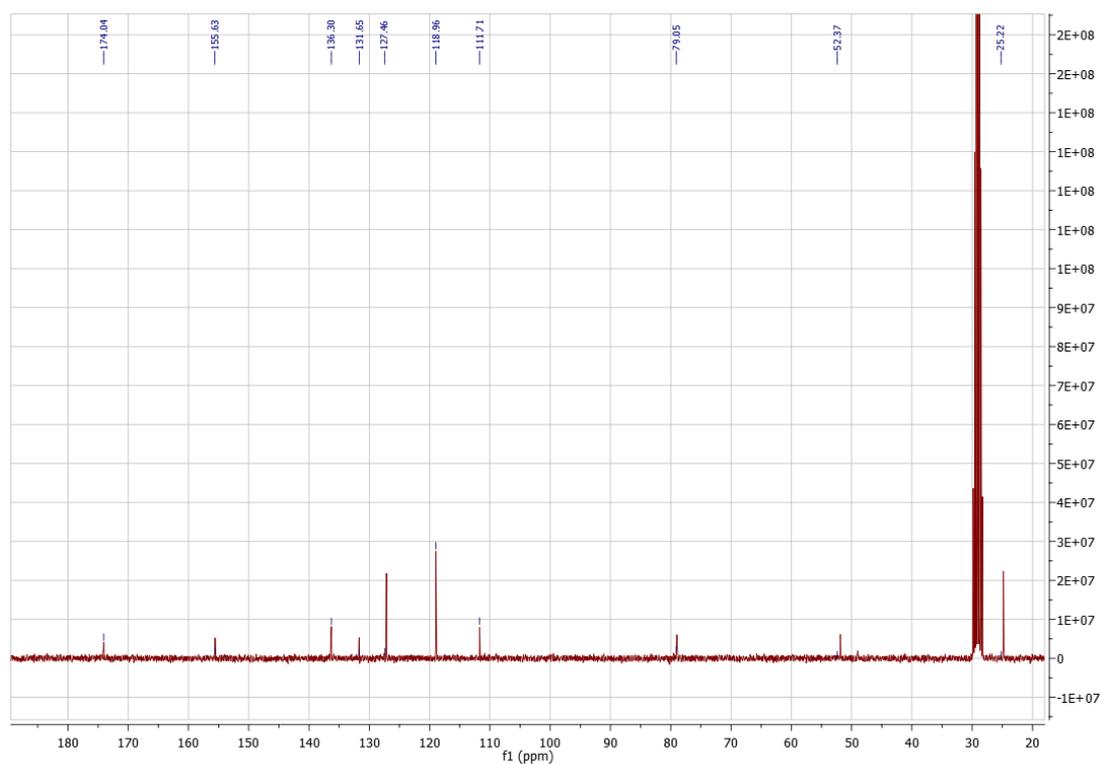
WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**: 3 ed. Londres: Elsevier, 2008.

WINSTEIN, S. et al. Salt effects and ion pairs in solvolysis and related reactions. III. Common ion rate depression and exchange of anions during acetolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 2, p. 328–335, 1956.

WORLD ORGANIZATION. WORLD HEART FEDERATION. WORLD STROKE ORGANIZATION. Global Atlas on Cardiovascular disease prevention and control. **Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.**, p. 1–66, 2011.

APÊNDICE

Apêndice 1

intermediário **1a**Figura: Espectro de ^1H do intermediário **1a**Figura: Espectro de ^{13}C do intermediário **1a**

Apêndice 2

Intermediário 1b

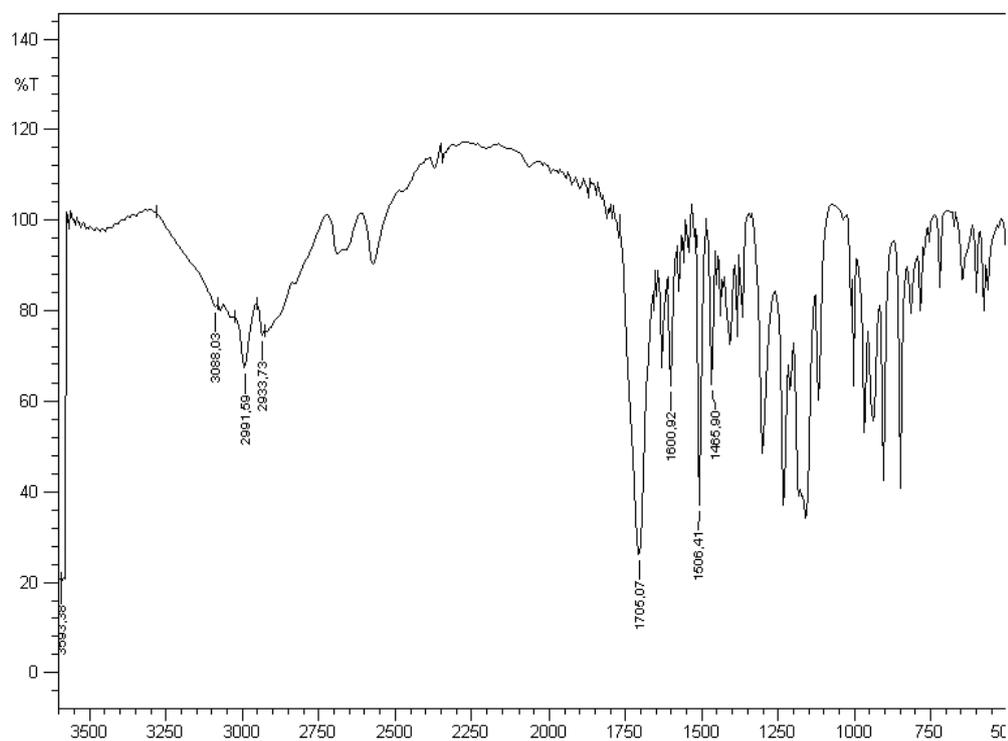
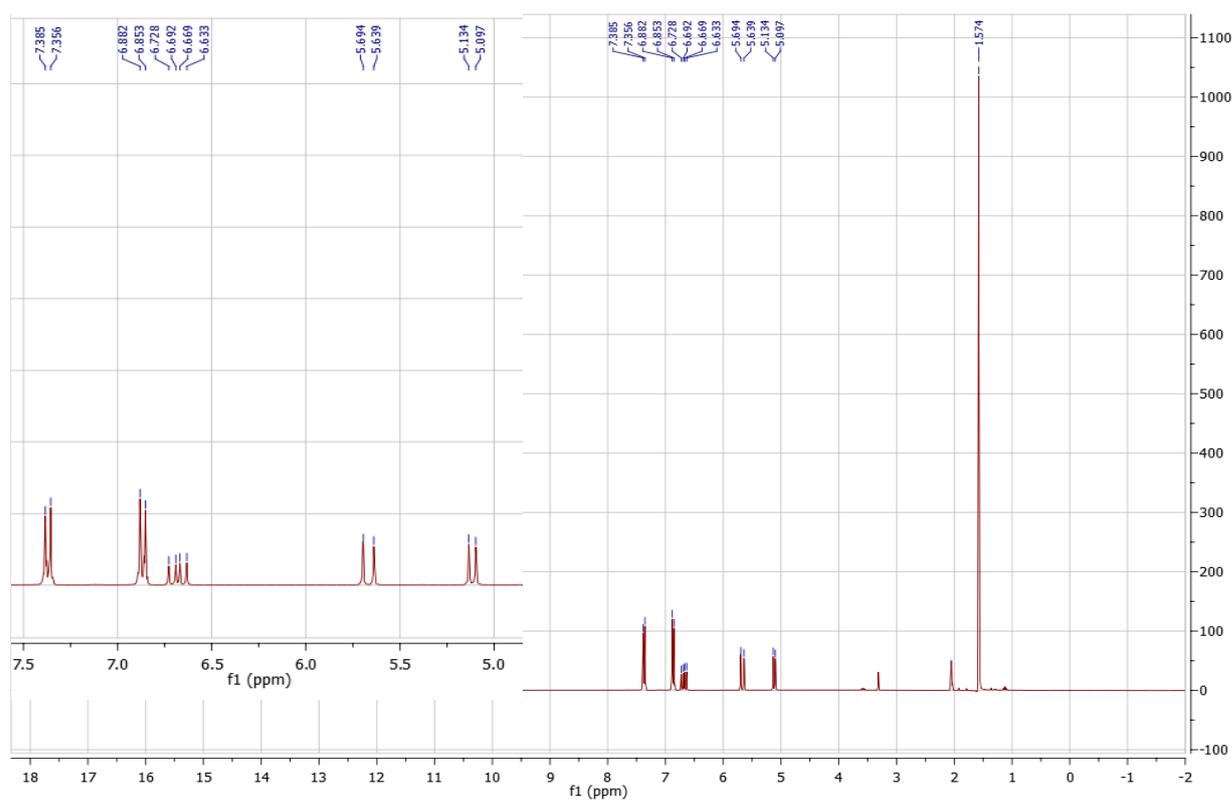


Figura: Espectro de absorção no Infravermelho do intermediário 1b

Figura: Espectro de ¹H do intermediário 1b

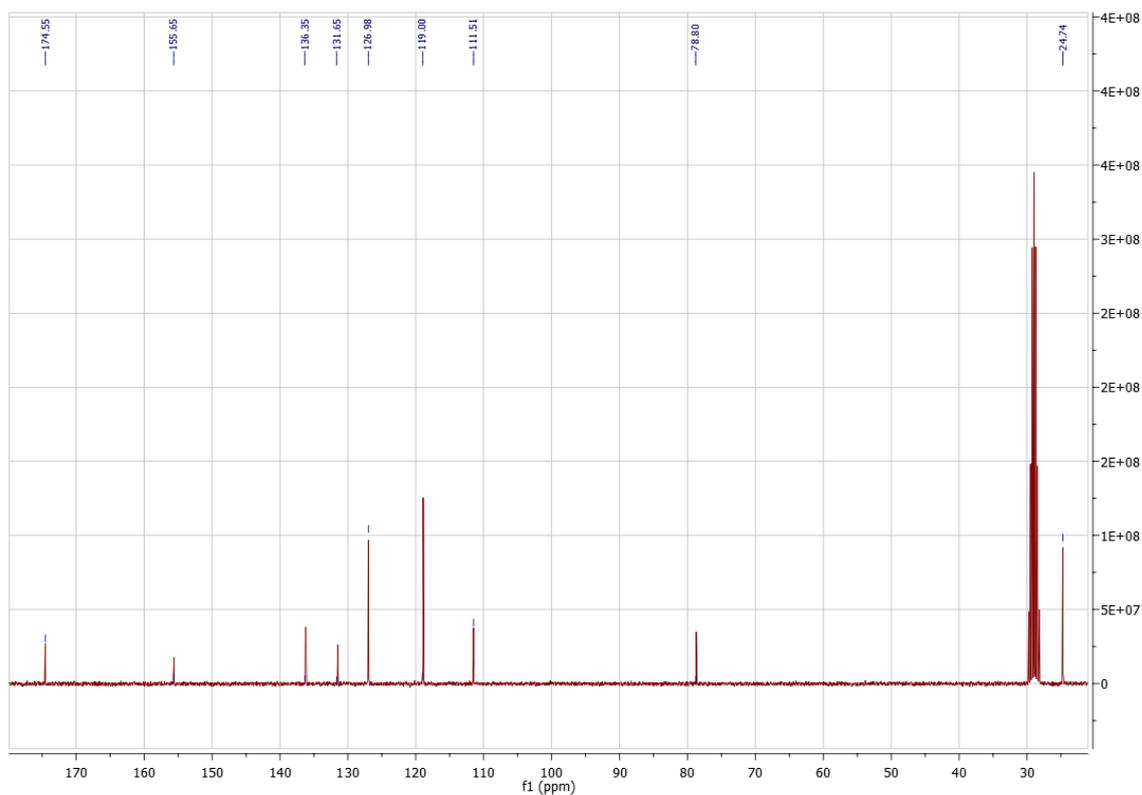


Figura: Espectro de ^{13}C do intermediário **1b**

Apêndice 3

2-bromo-2-dimetil-butanoamida

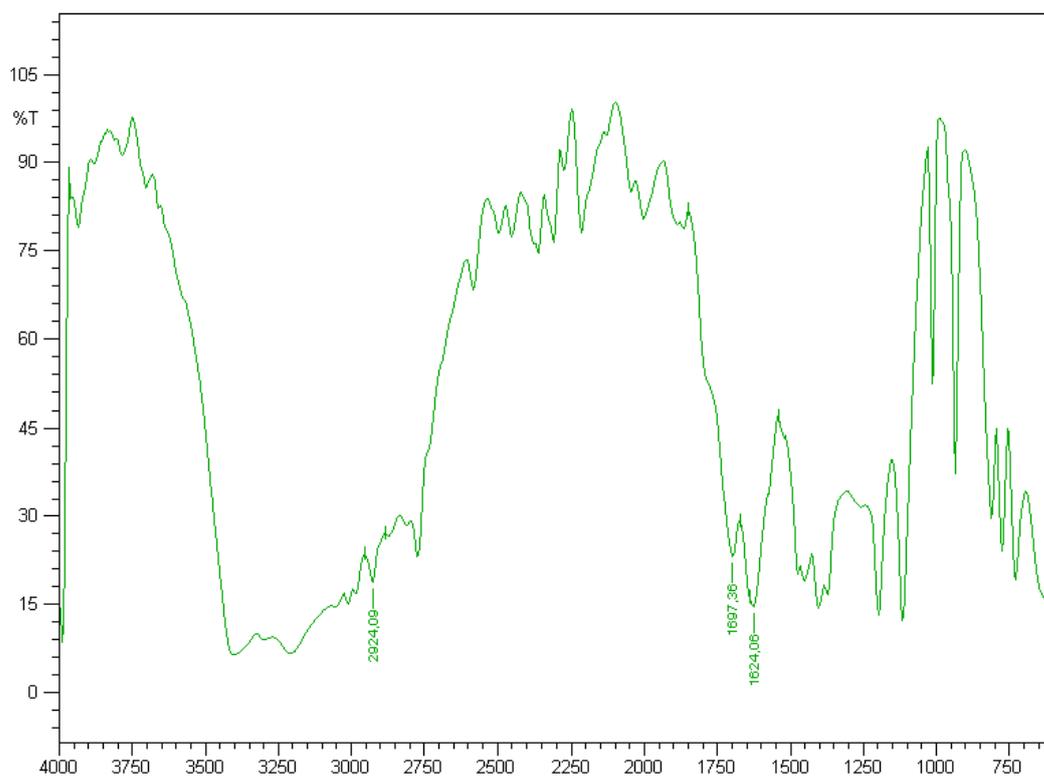


Figura: Espectro de absorção no Infravermelho da propionamida

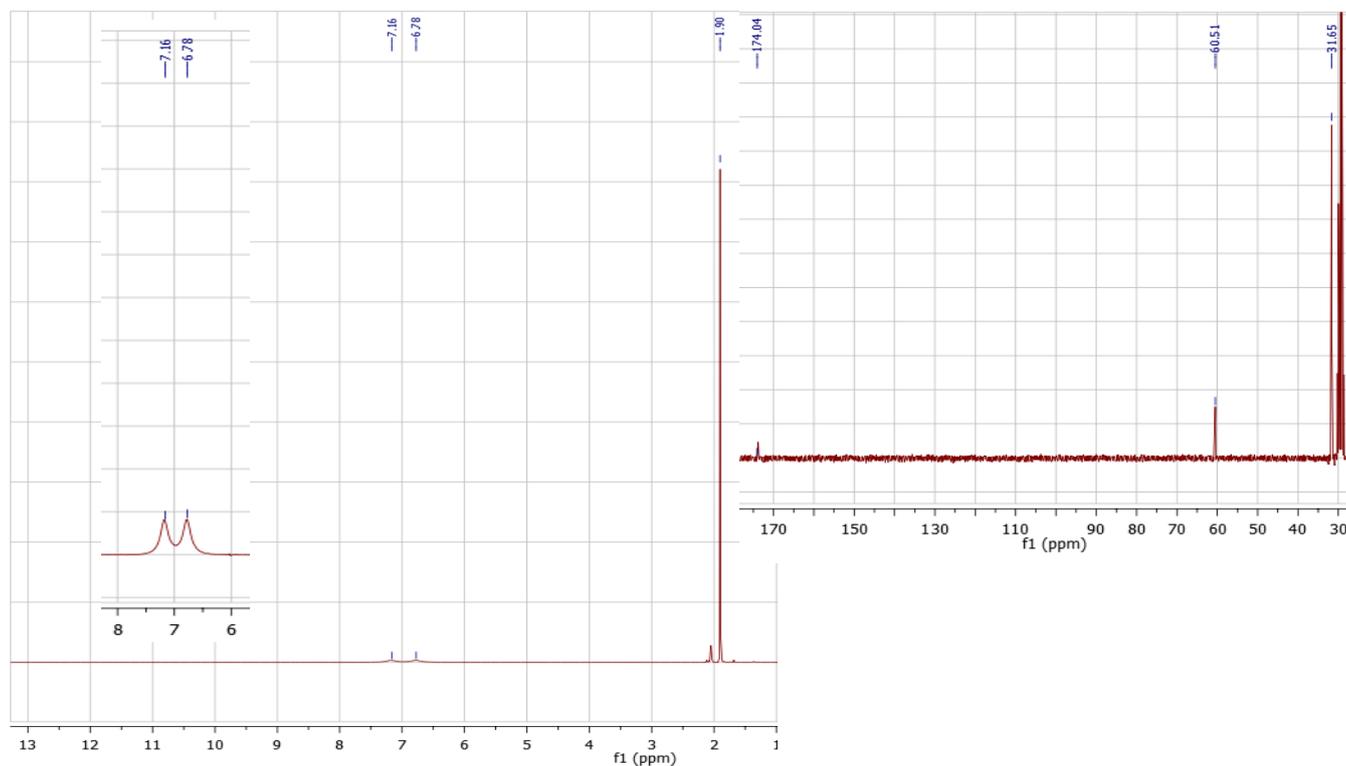


Figura: Espectro de ^1H e ^{13}C da propionamida

Apêndice 4

Intermediário **2b**

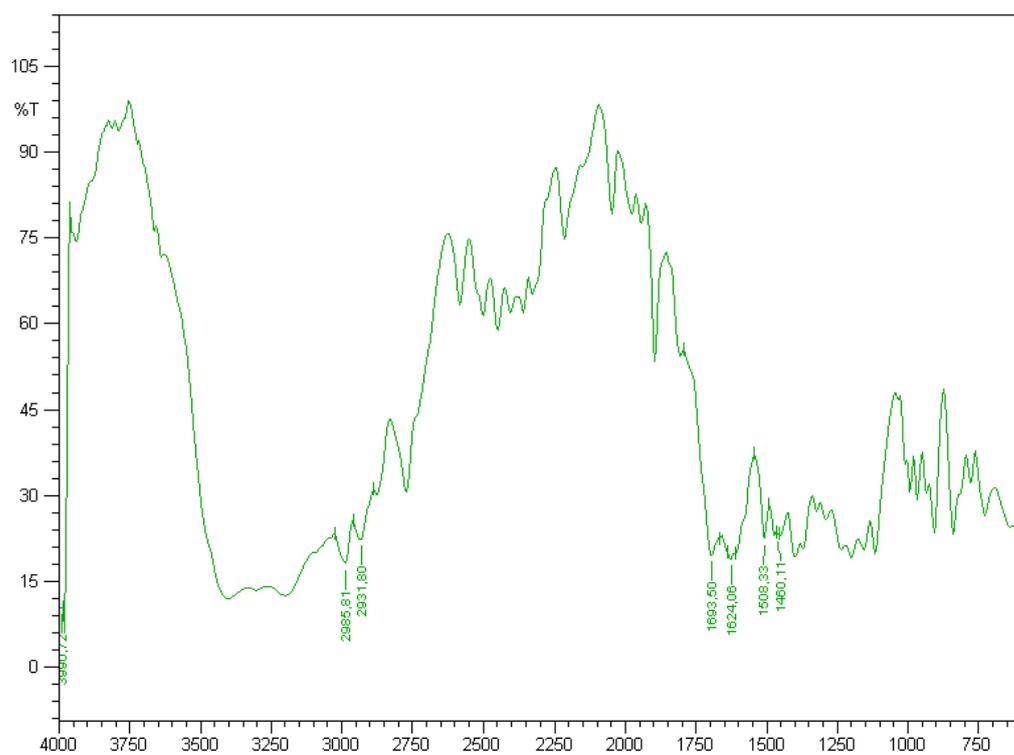


Figura: Espectro de absorção no Infravermelho do intermediário **2b**

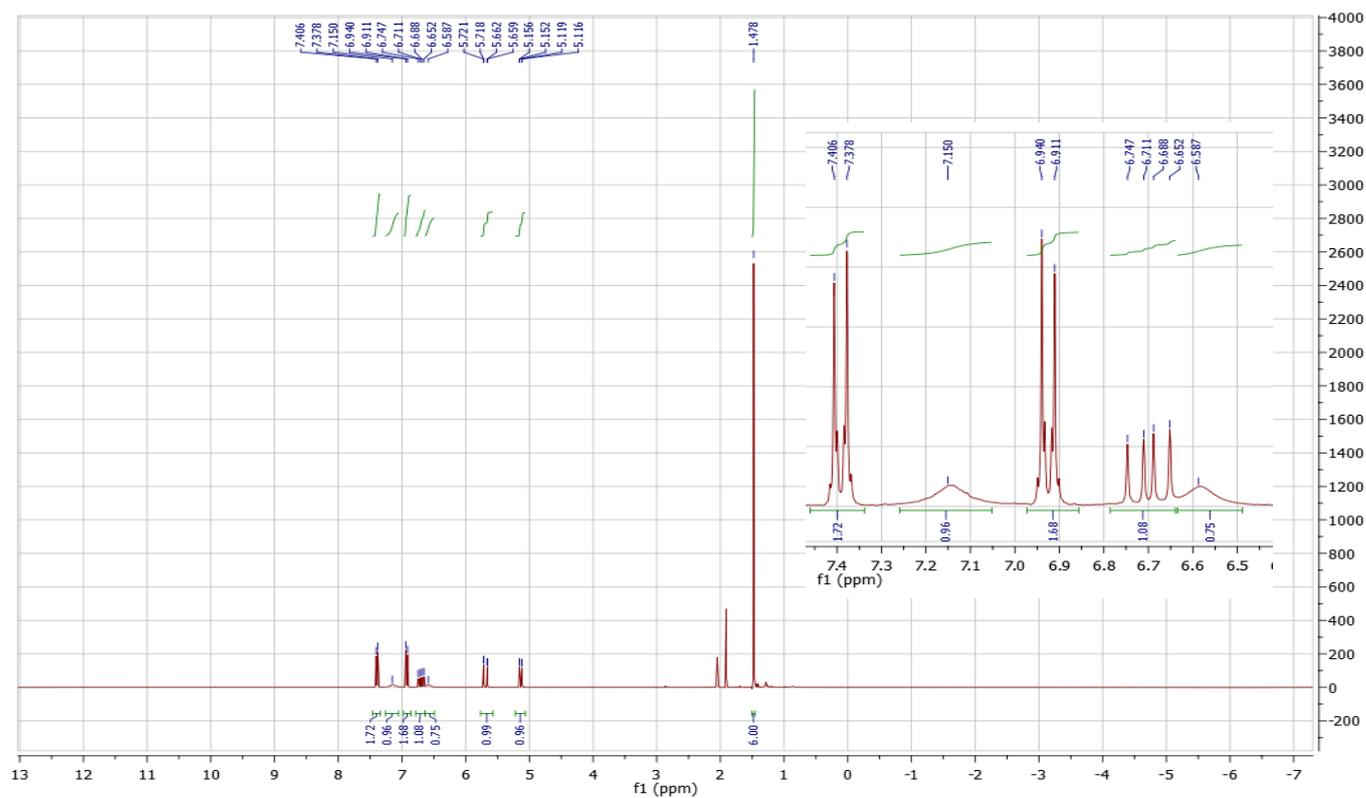


Figura: Espectro de ^1H do intermediário **2b**

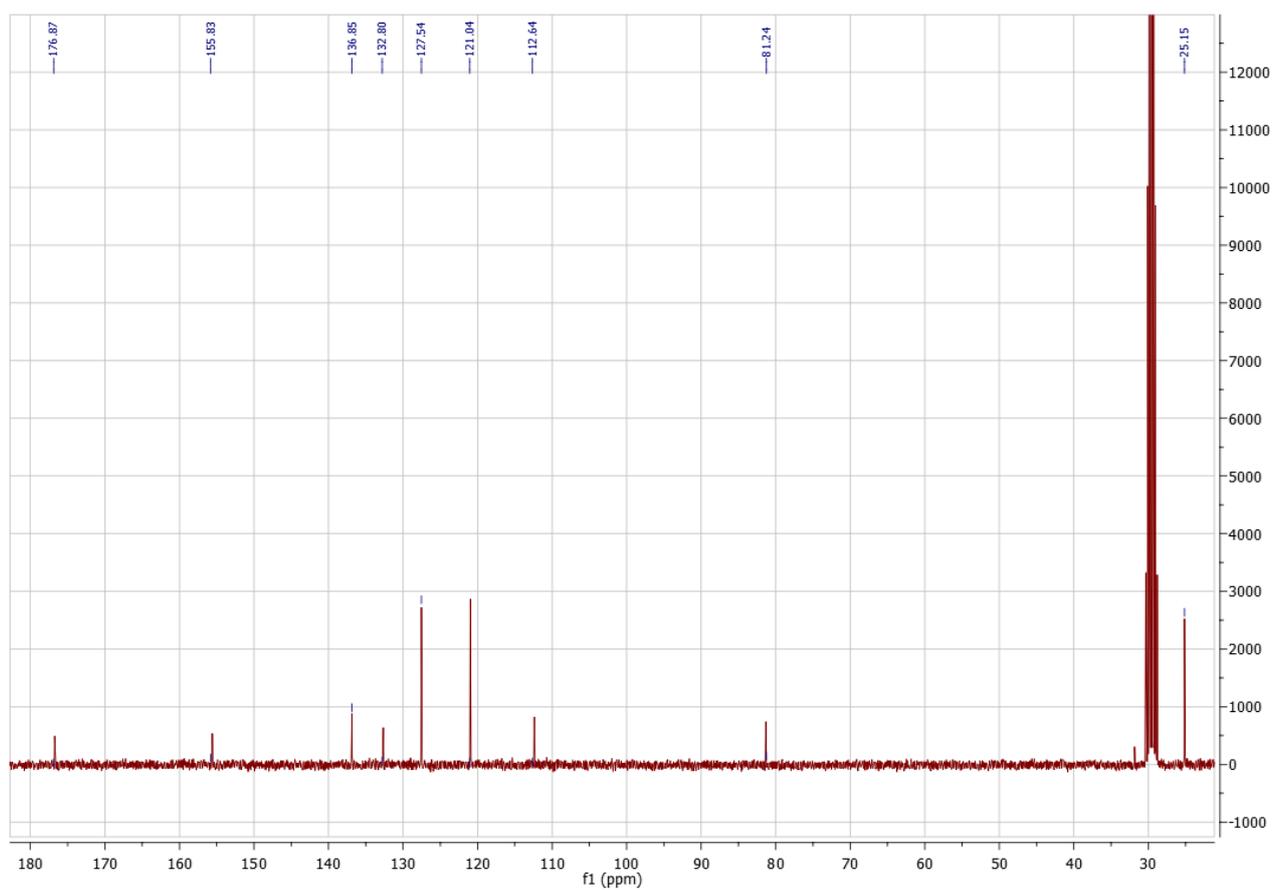
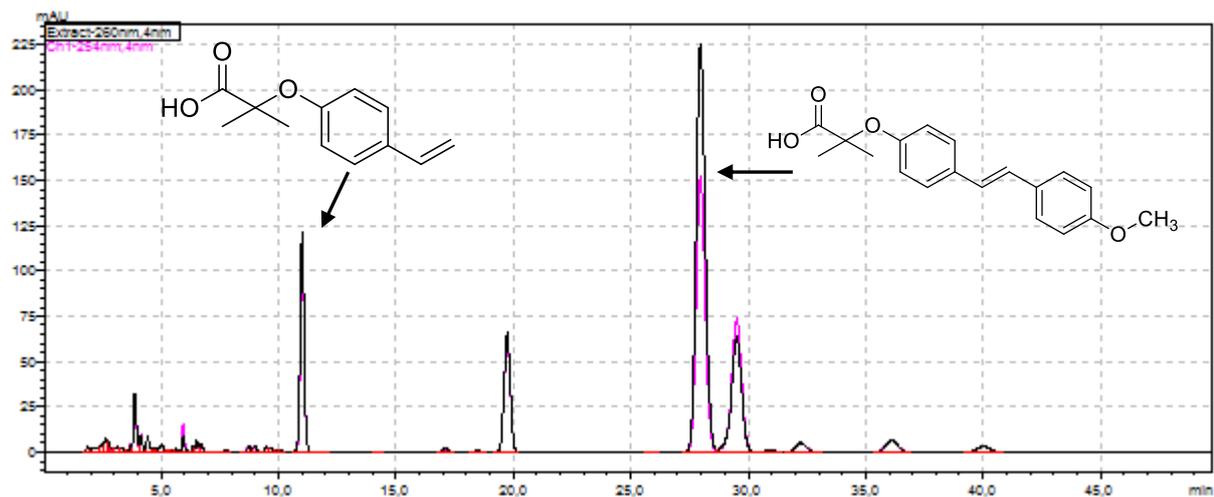
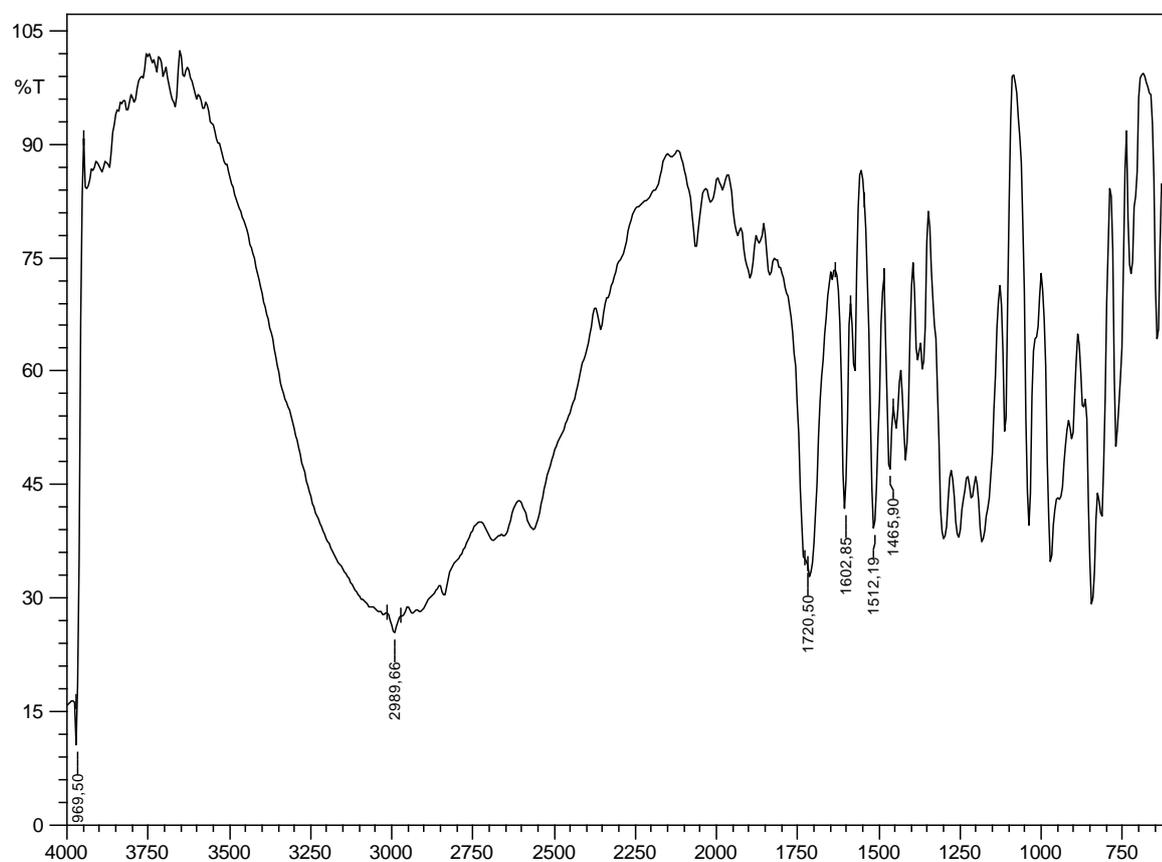


Figura: Espectro de ^{13}C do intermediário **2b**

Apêndice 5

Composto **4a****Figura:** Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto **4a****Figura:** Espectro de absorção no infravermelho do composto **4a**

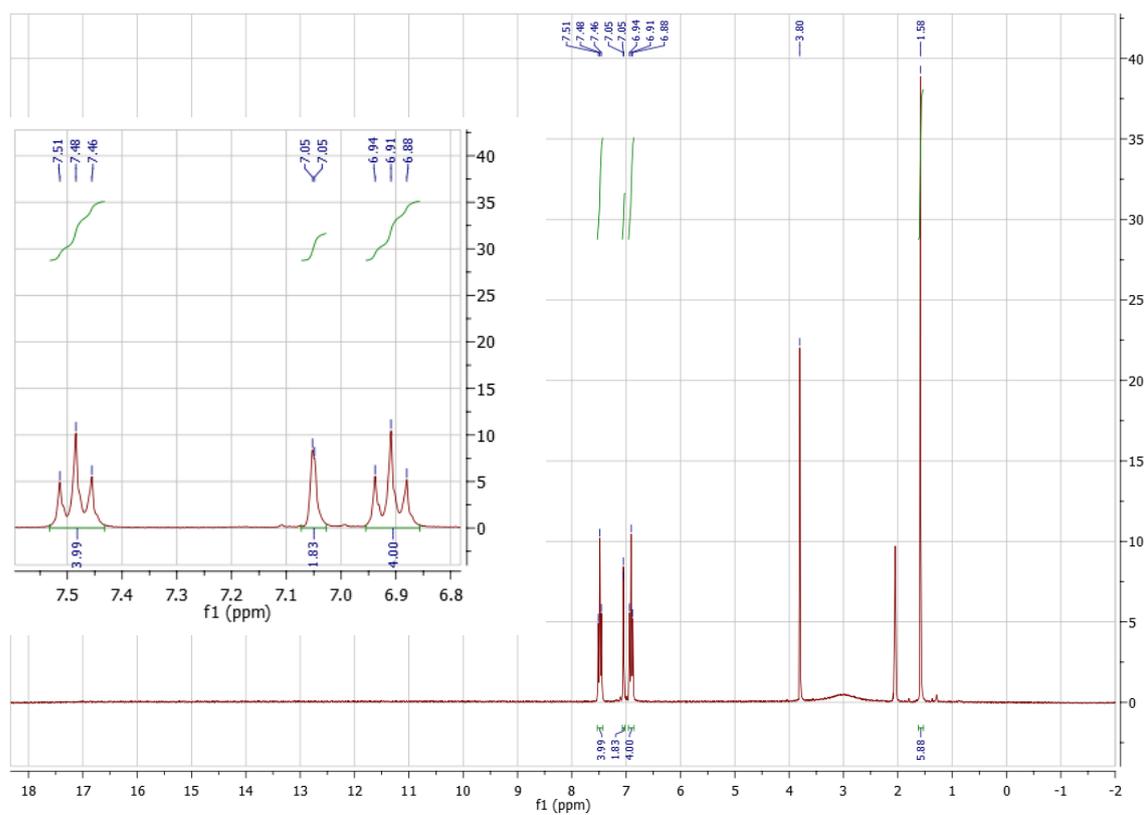


Figura: Espectro de RMN de ^1H do composto 4a

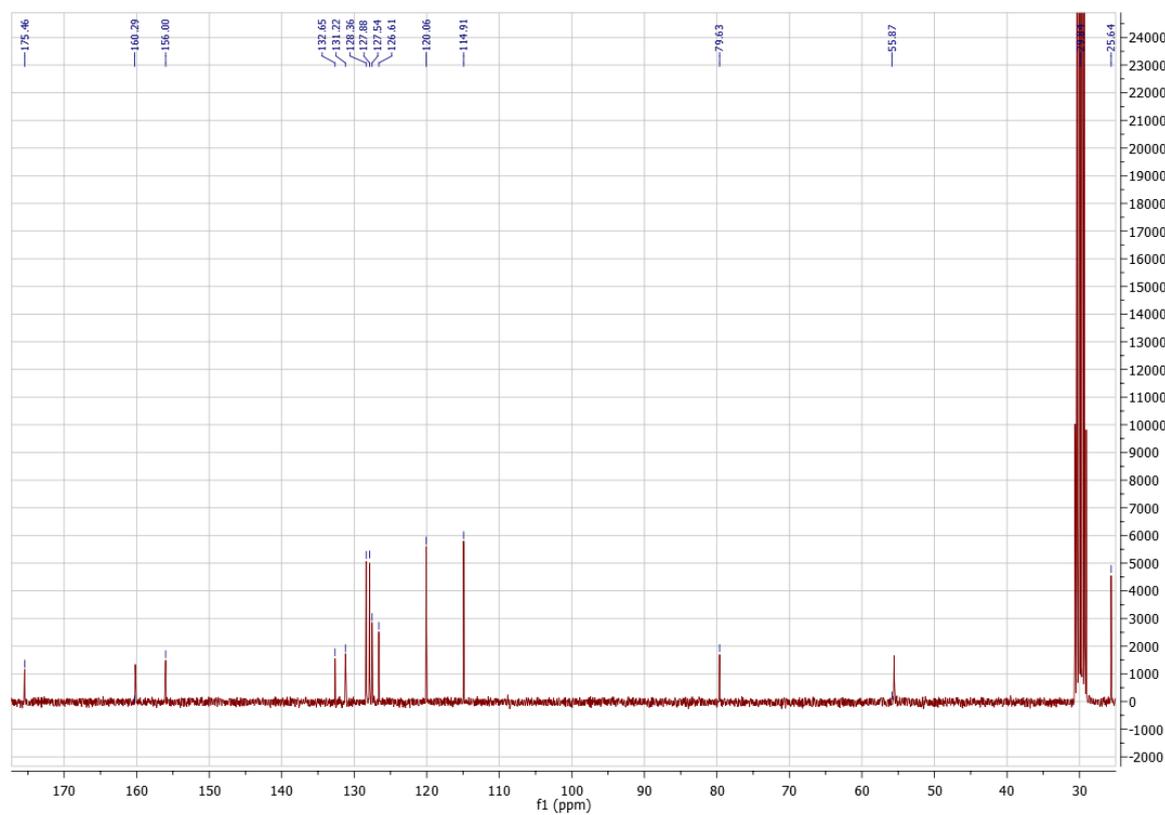


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4a

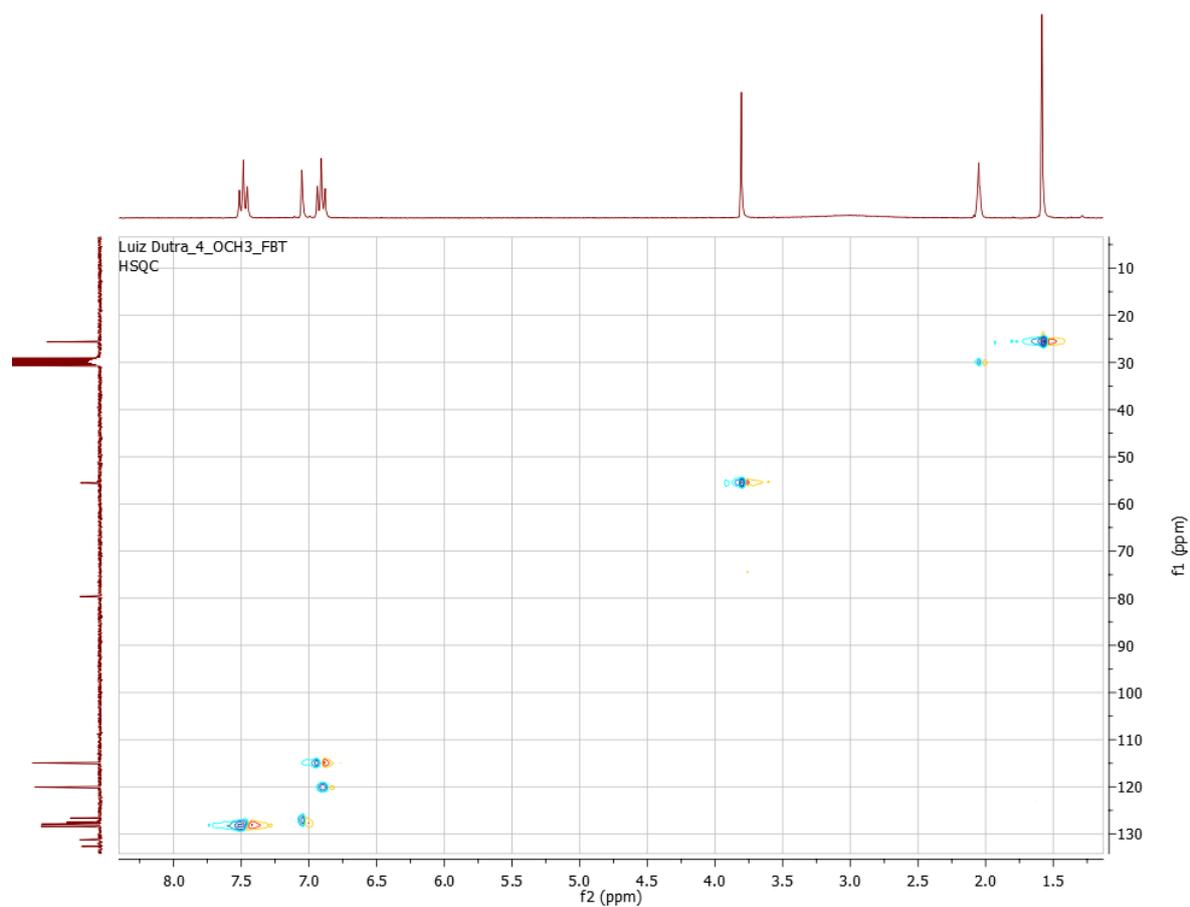


Figura: Correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4a**

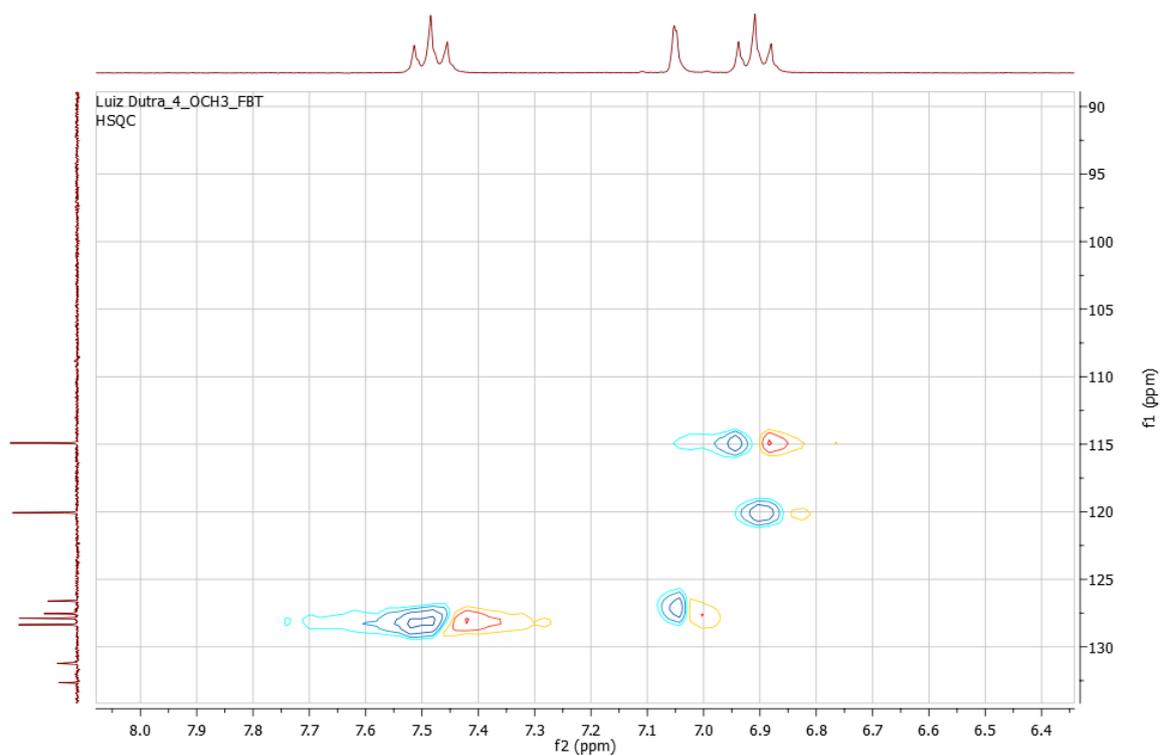


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4a**

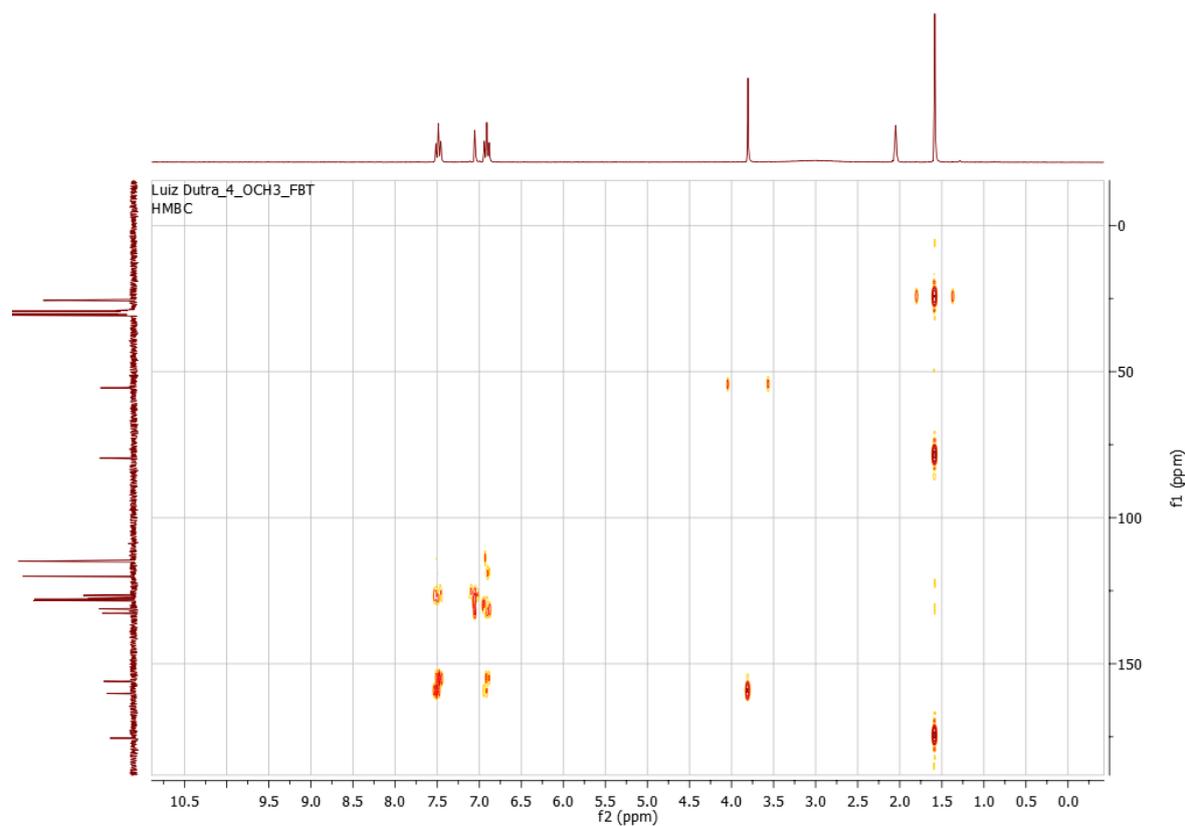


Figura: Correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4a**

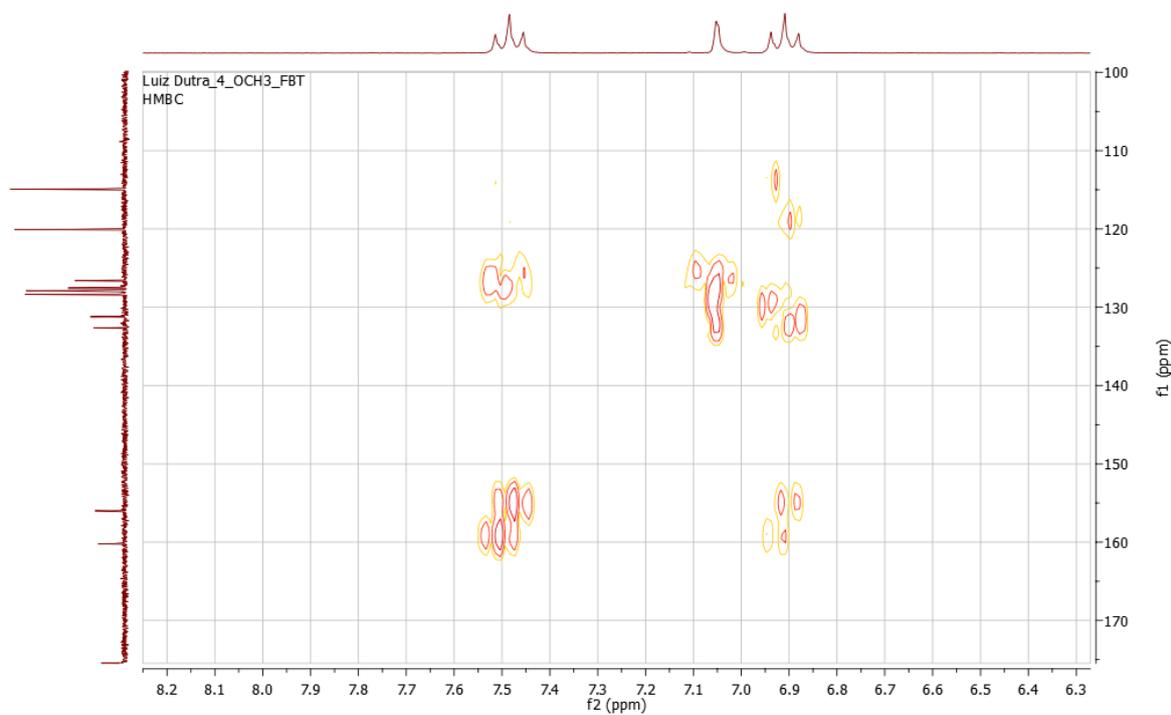
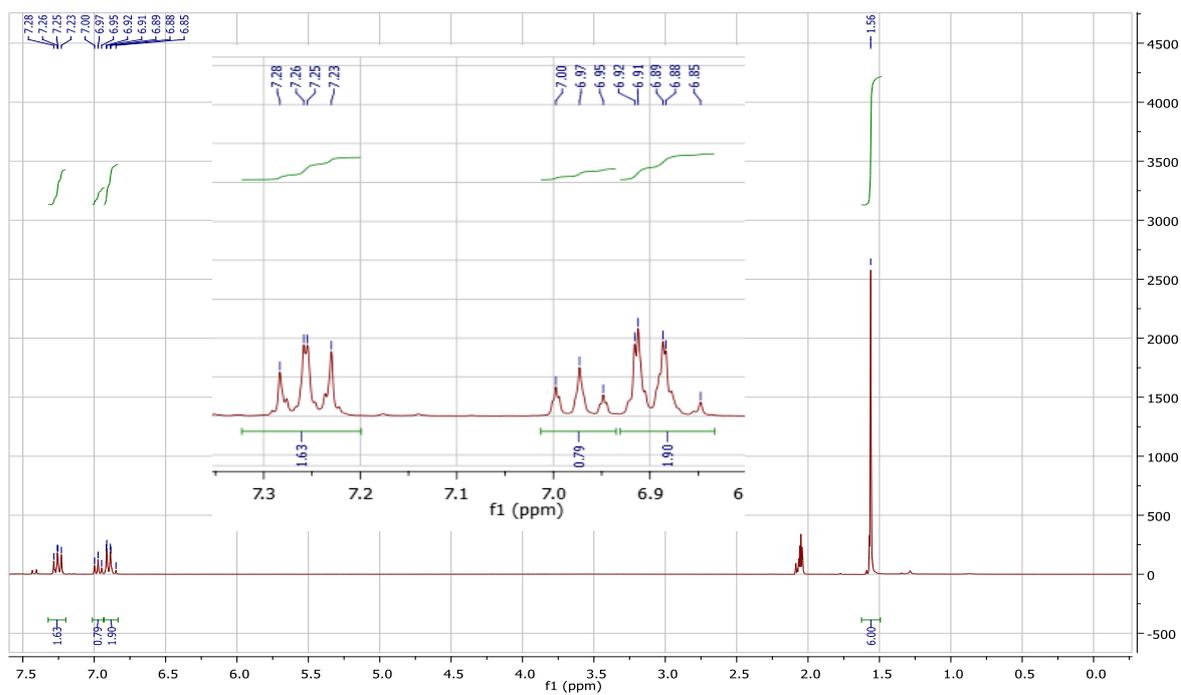
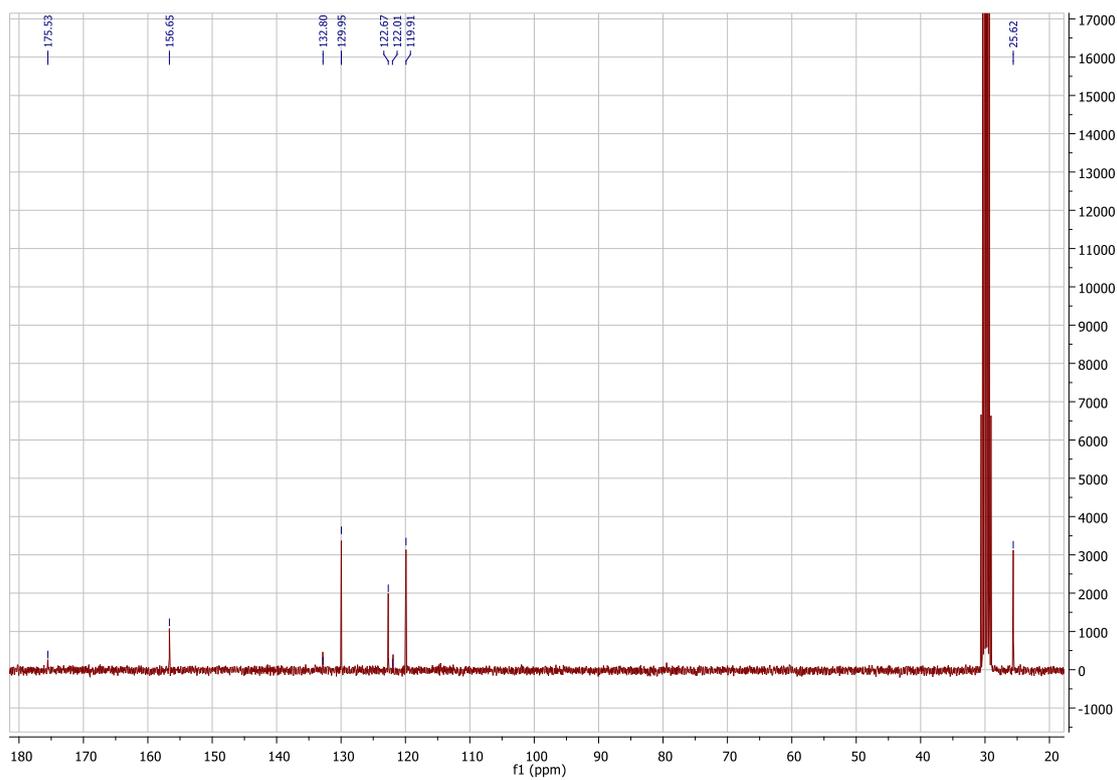


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4a**

Apêndice 6

Figura: Espectro de ^1H para o composto 4bFigura: Espectro de ^{13}C para o composto 4b

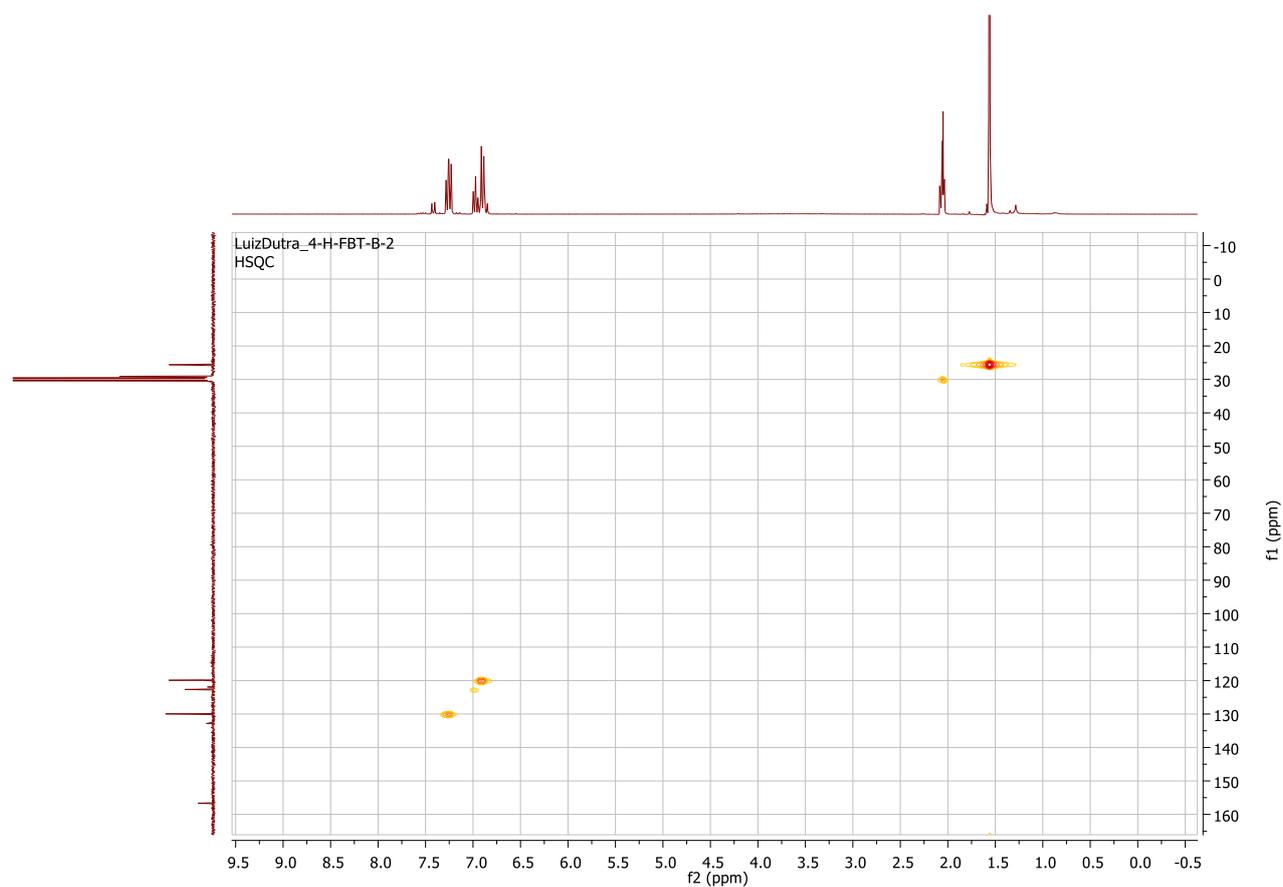


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4b**

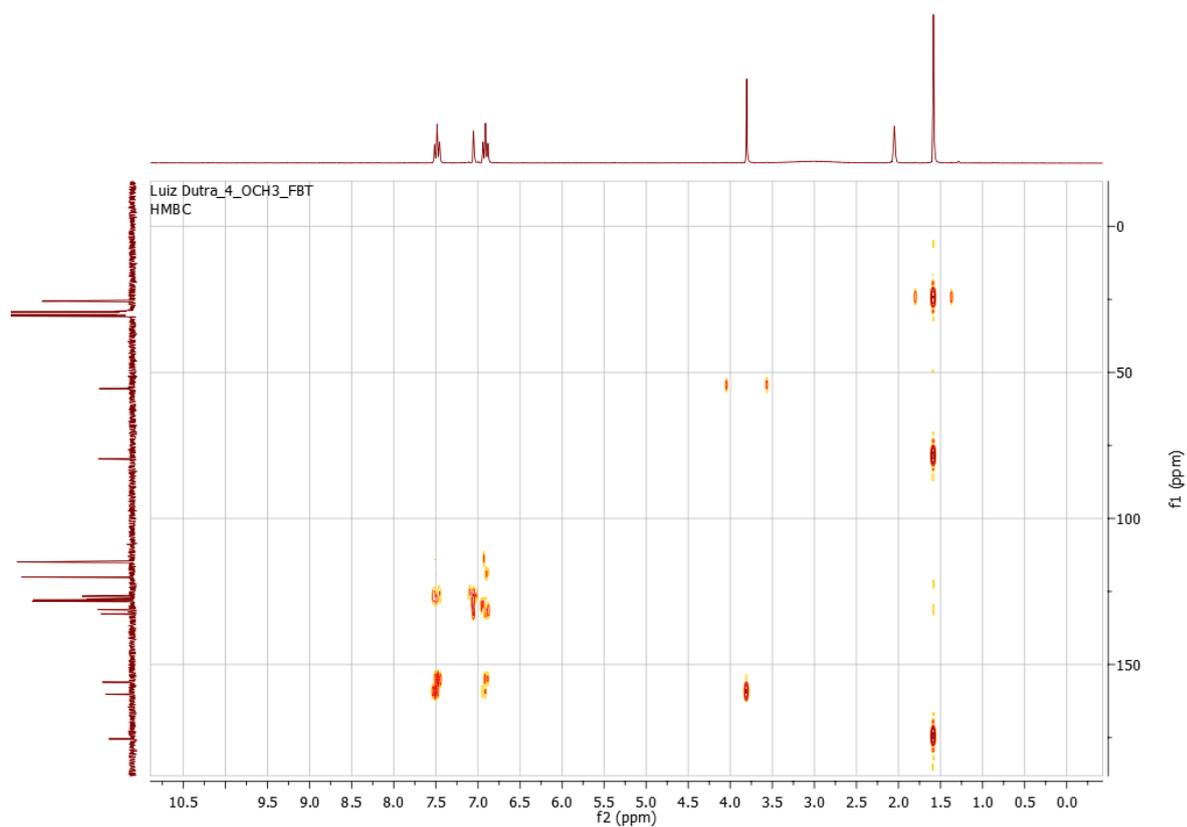


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4b**

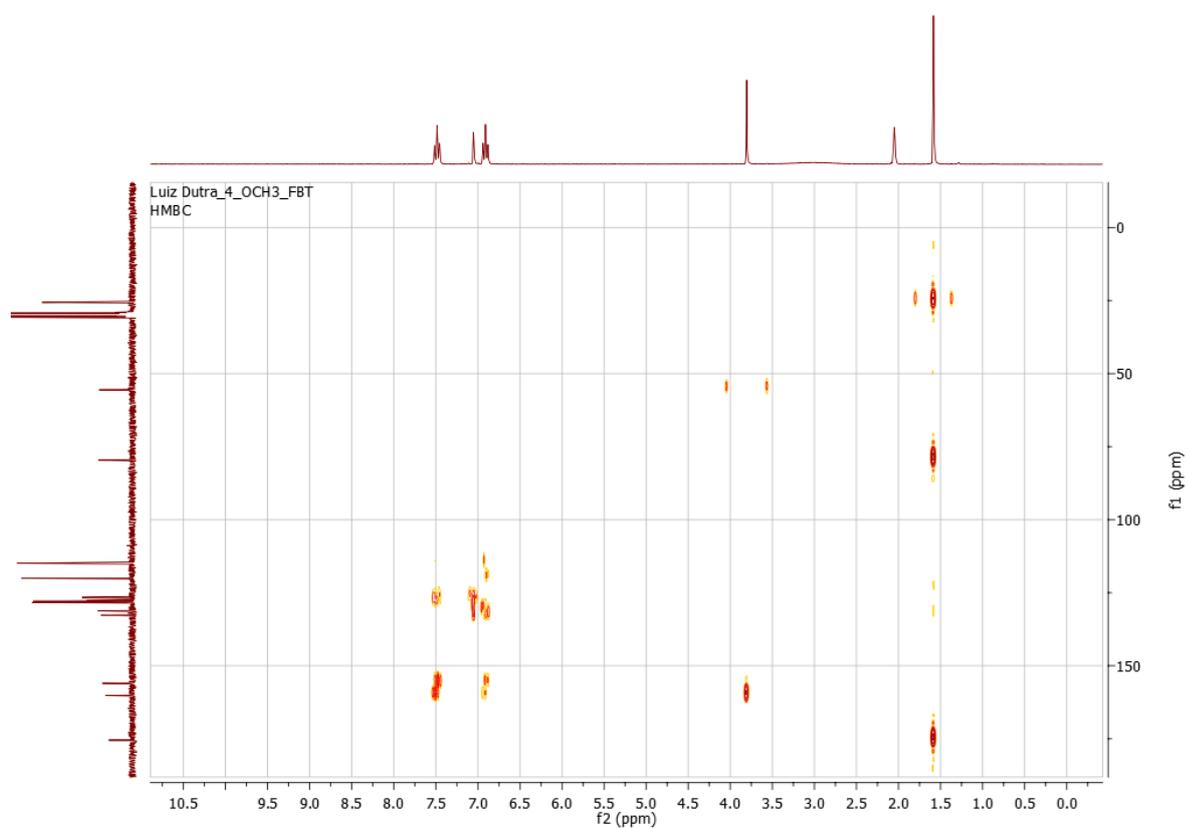


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **4b**

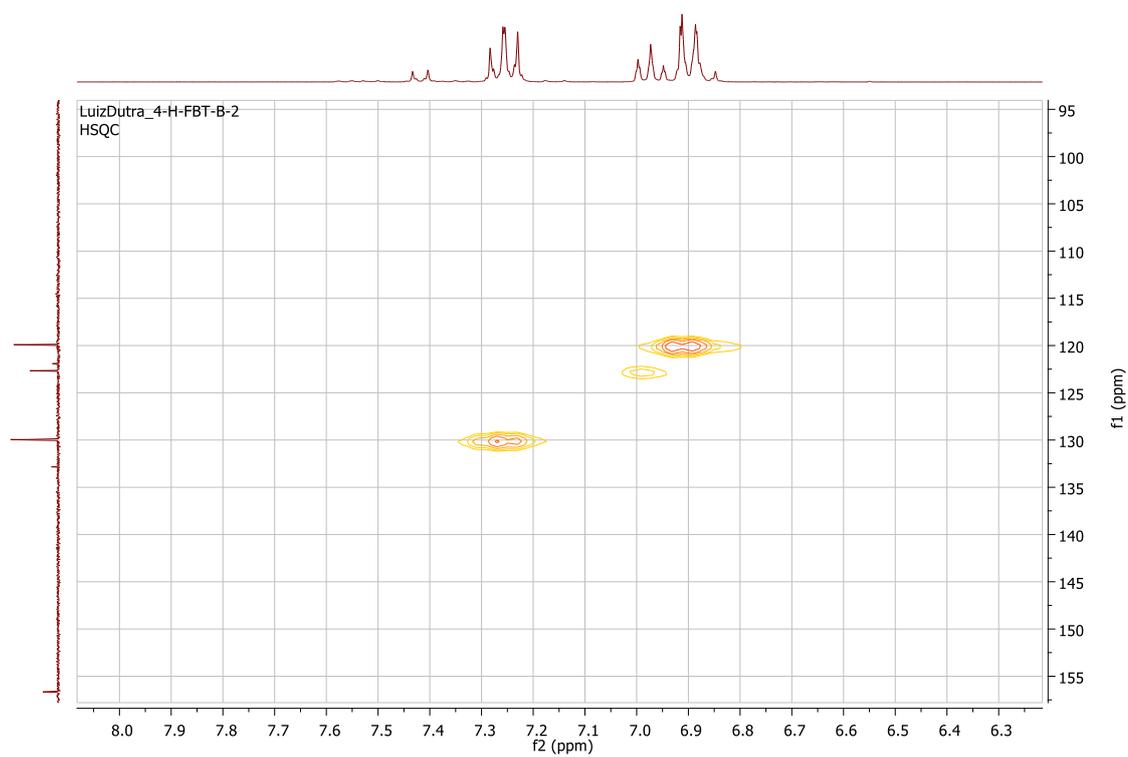


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4b**

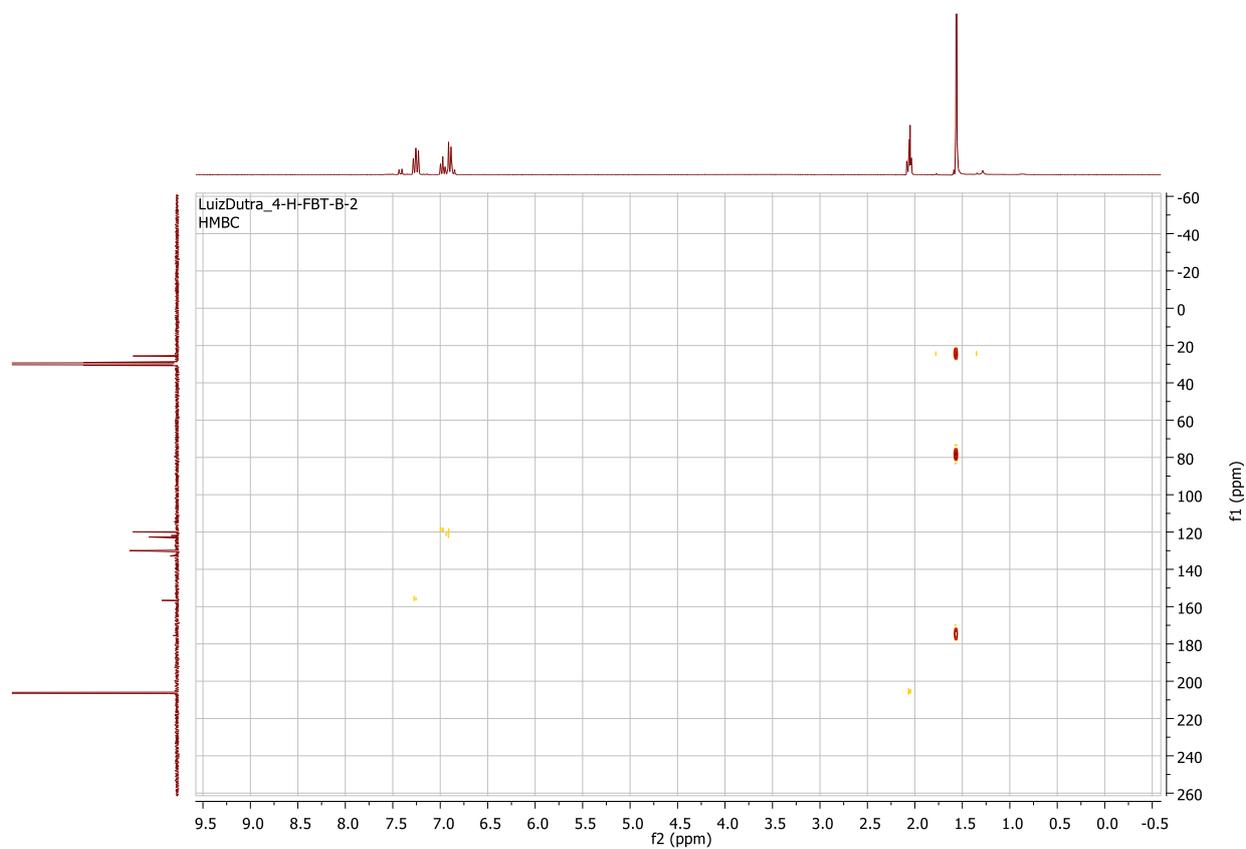


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **4b**

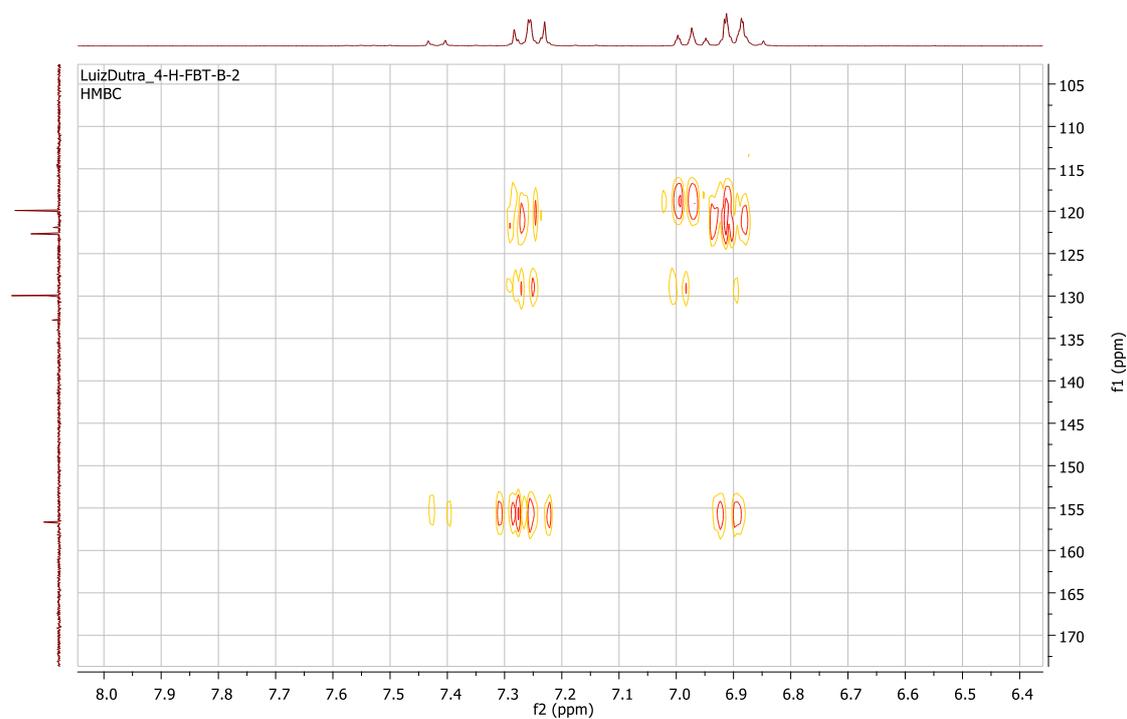
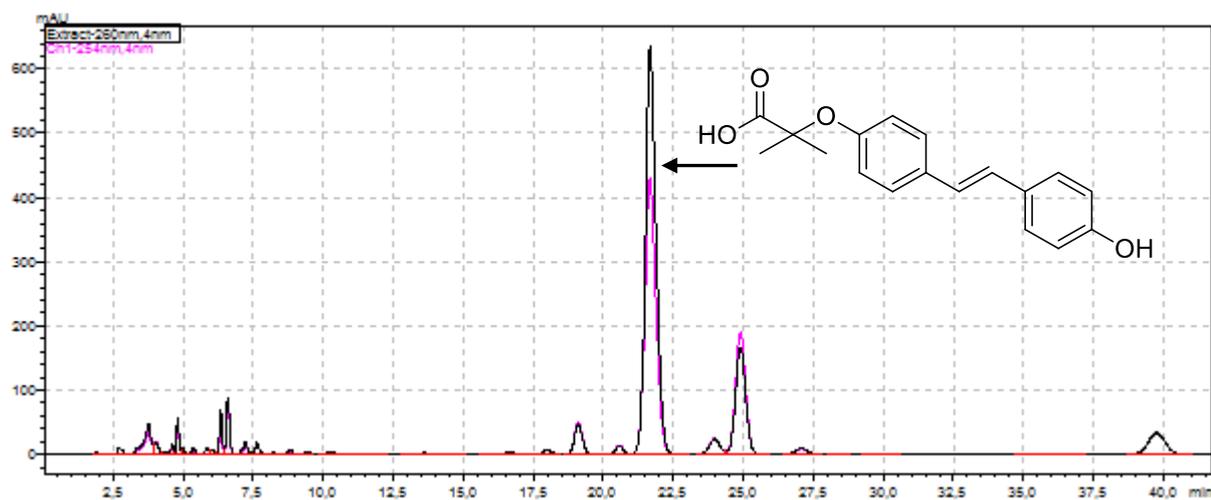
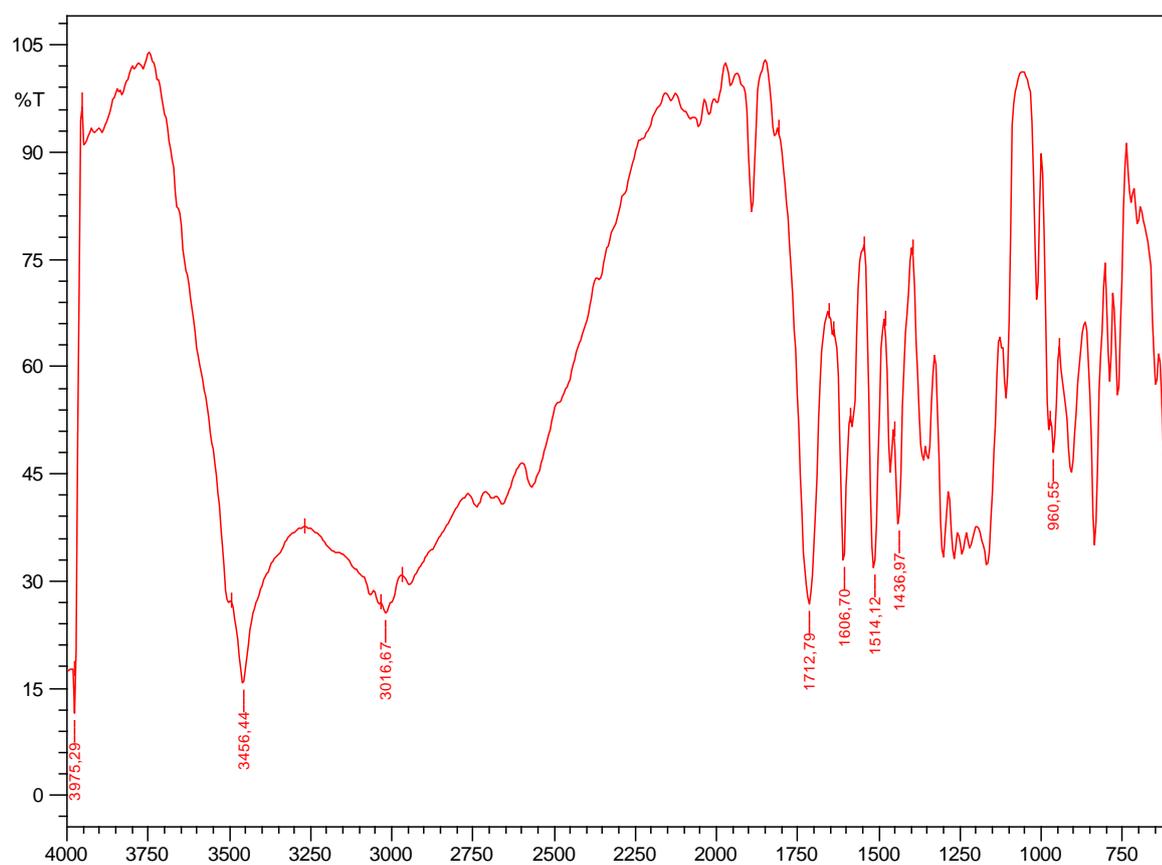


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4b**

Apêndice 7

Composto **4c**Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto **4c**Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto **4c**

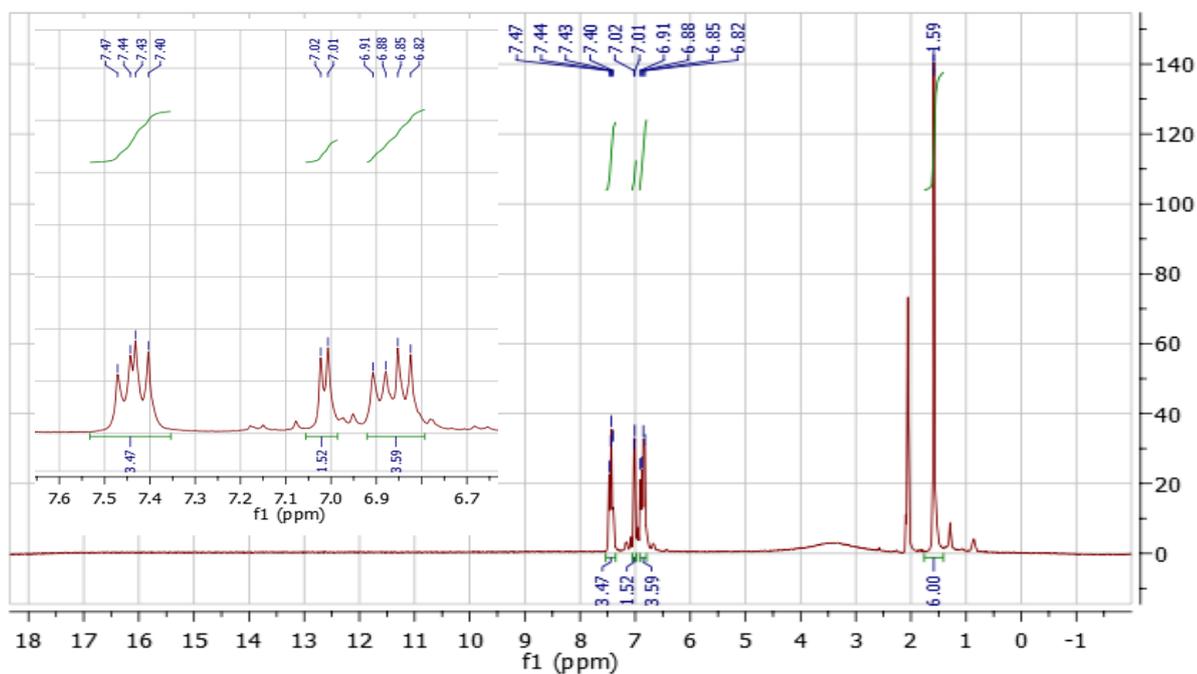


Figura: Espectro de RMN de ^1H do composto 4c

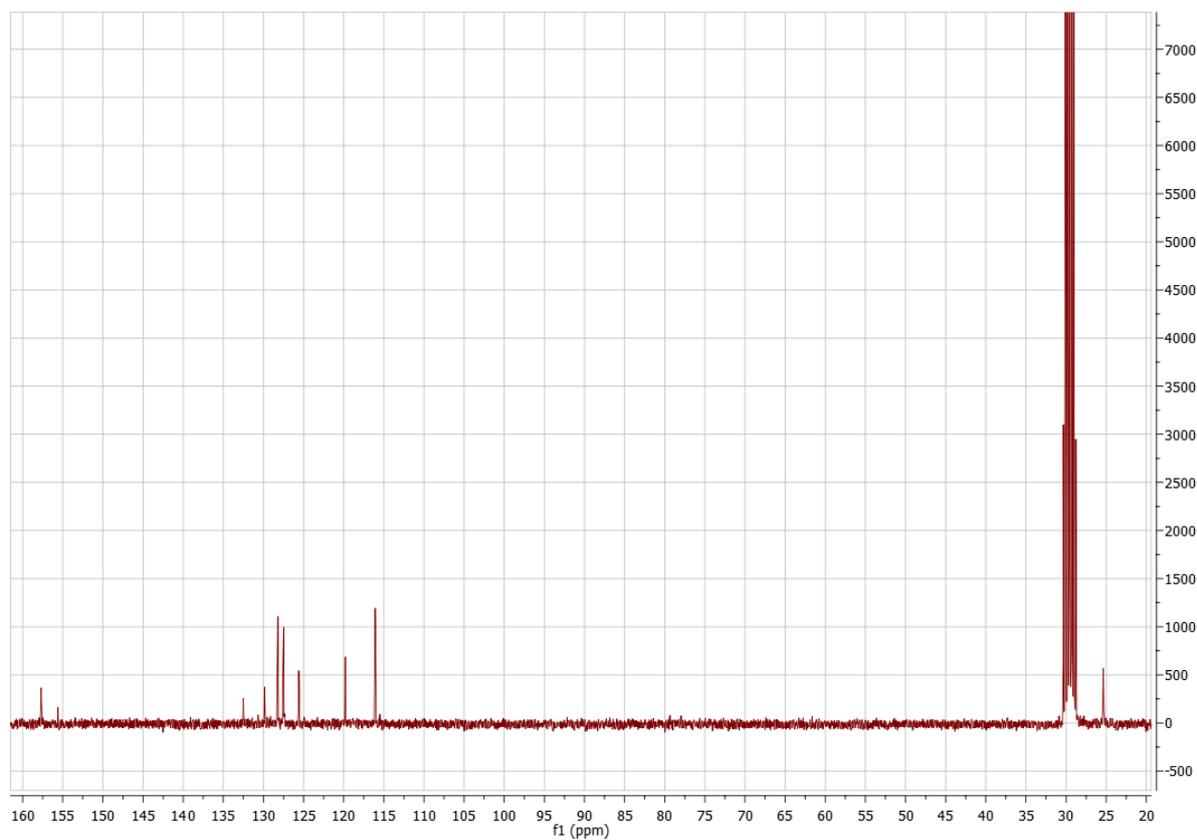


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4c

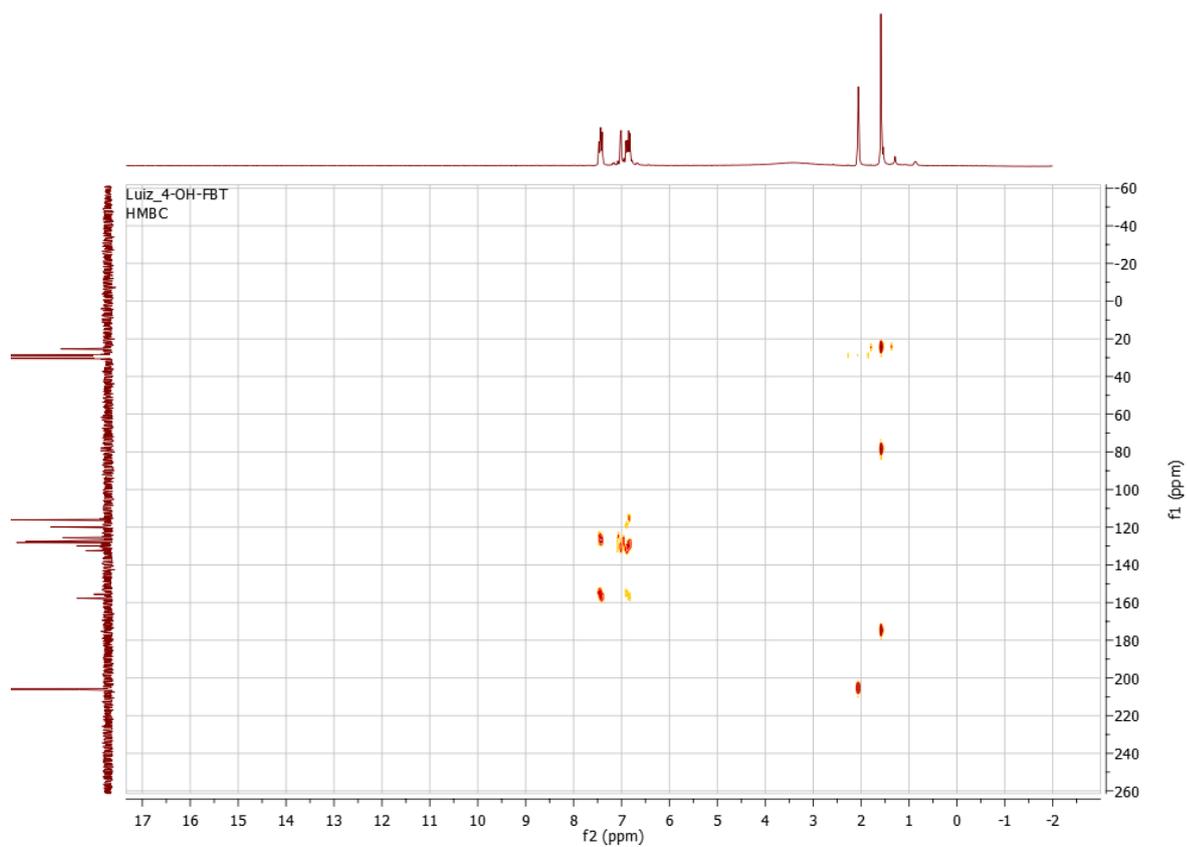


Figura: Correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4c**

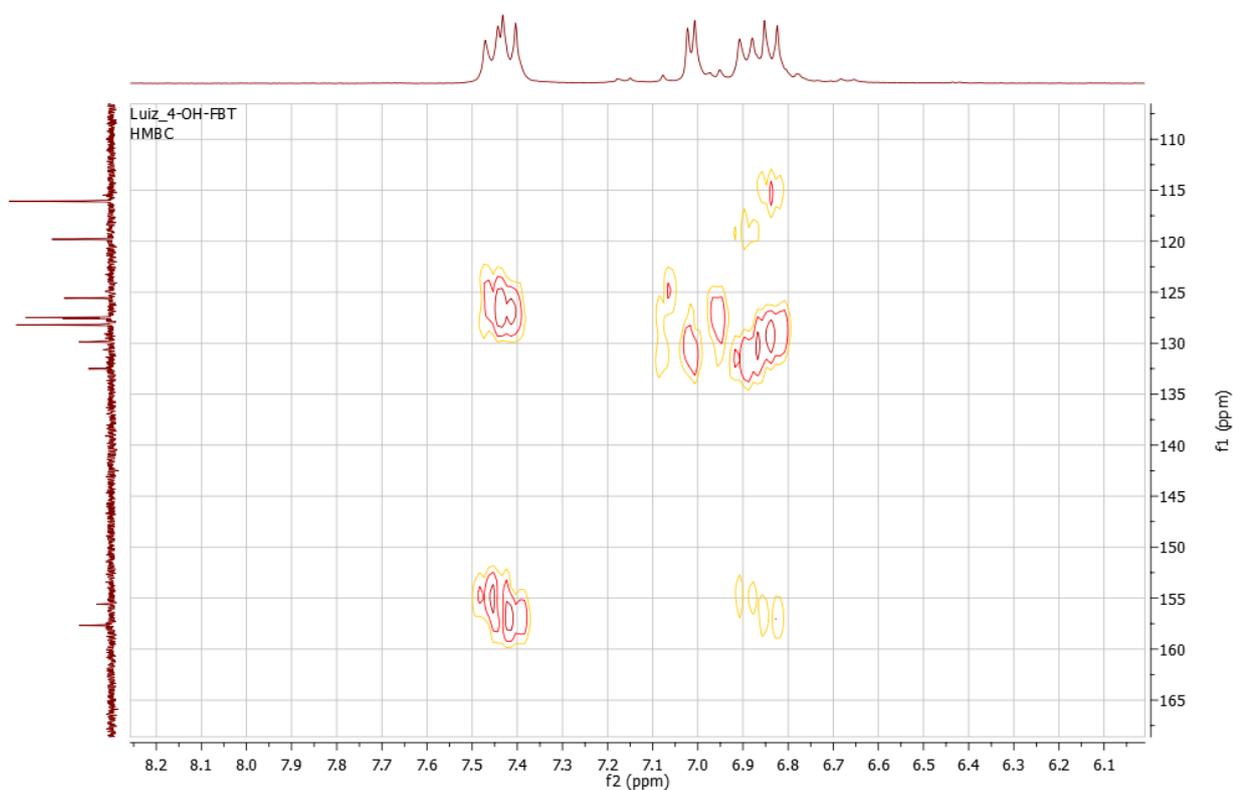


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4c**

Apêndice 8

Composto 4d

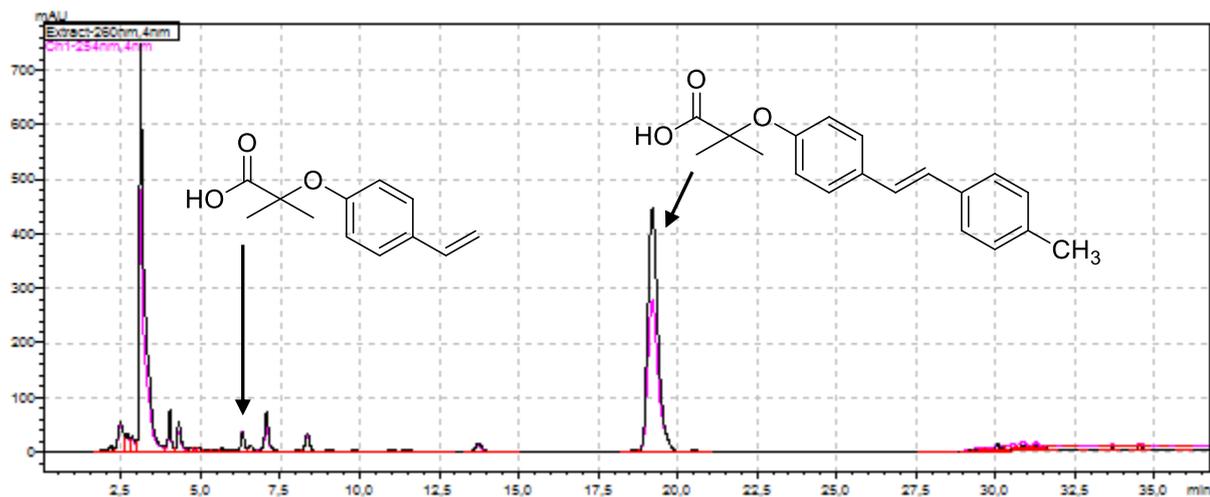


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto 4d

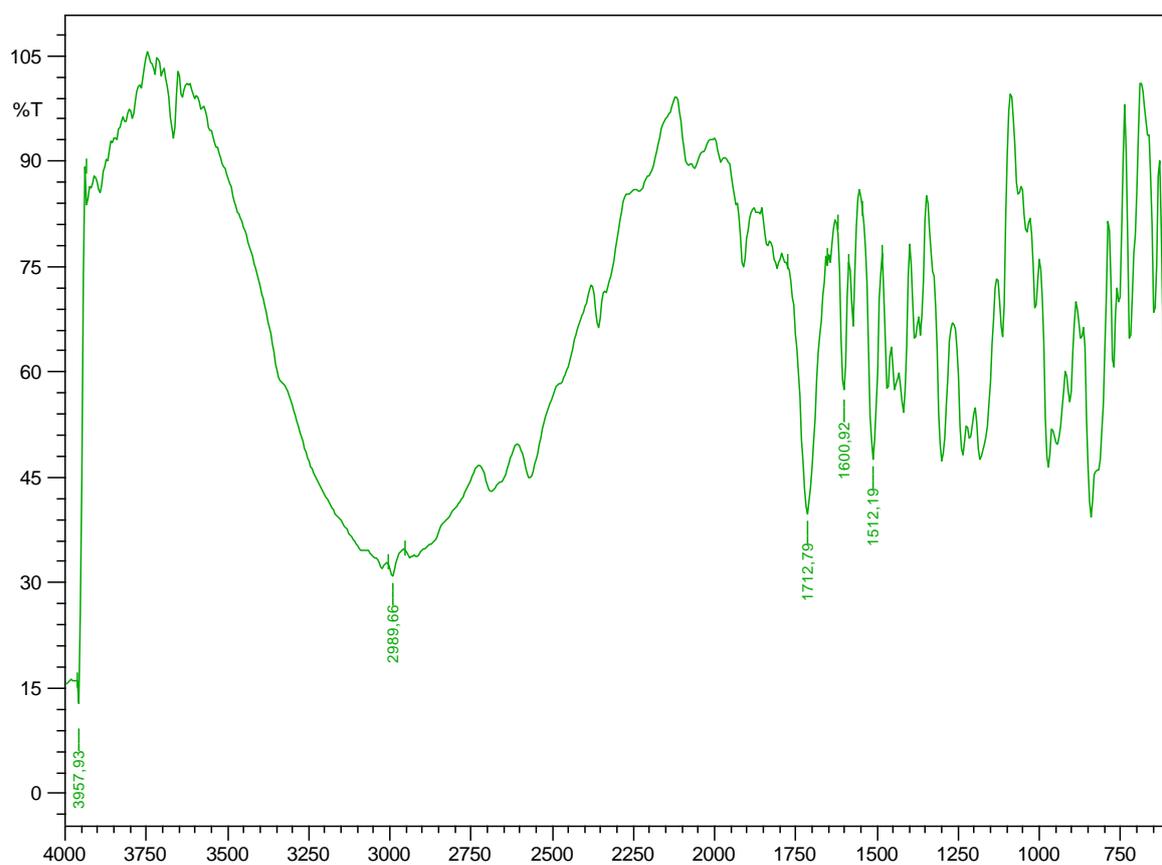


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto **4d**

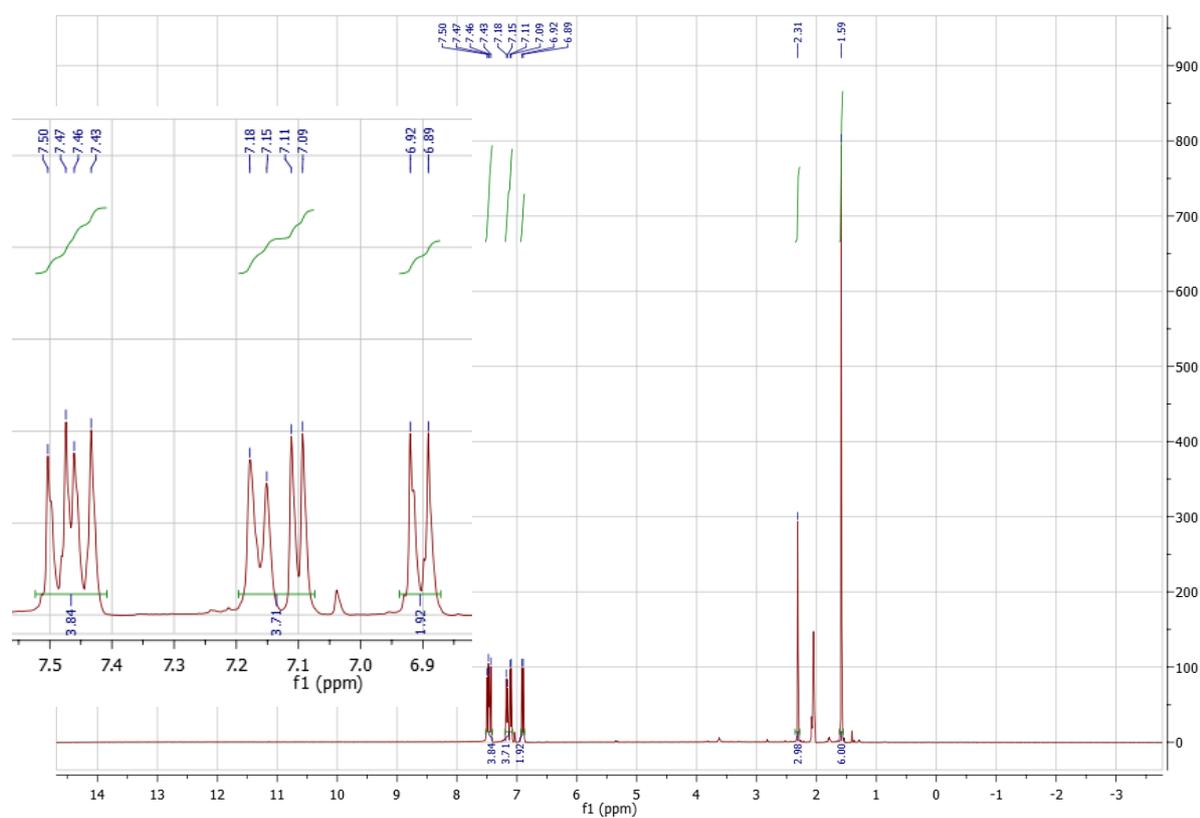


Figura: Espectro de RMN de ¹H do composto **4d**

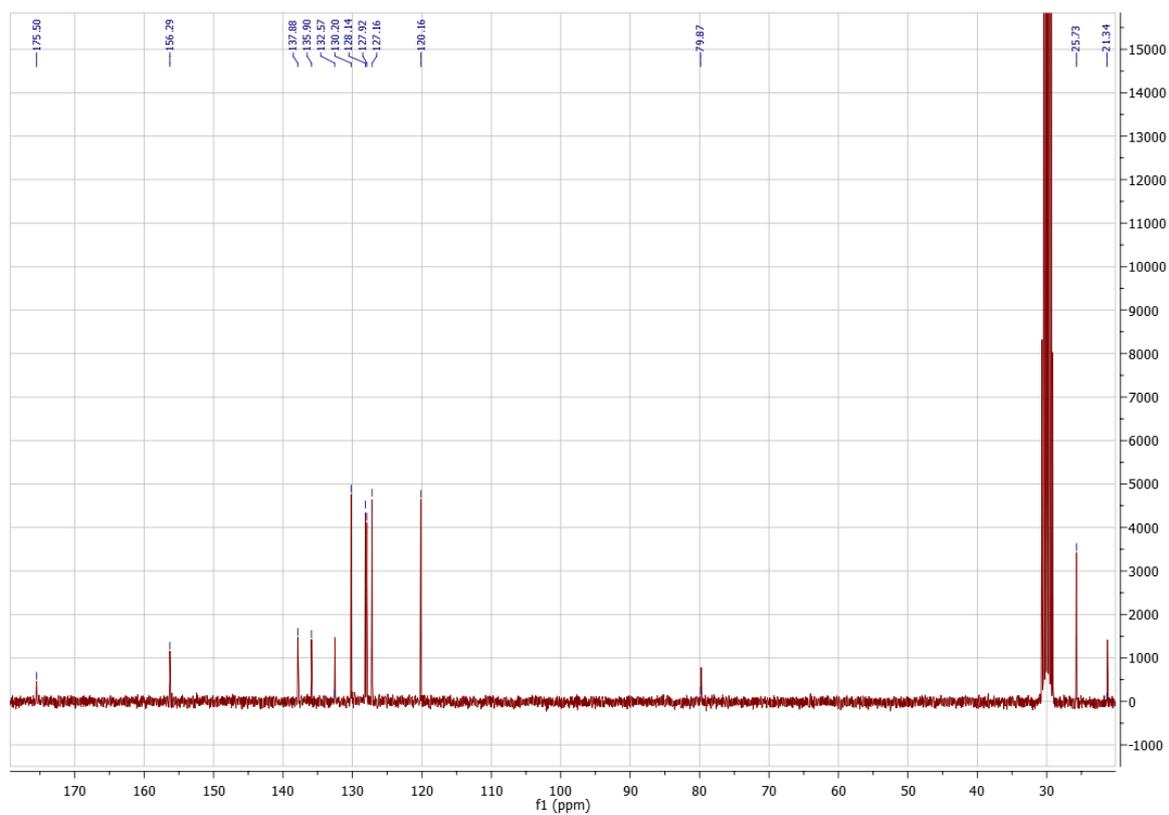


Figura: Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4d**

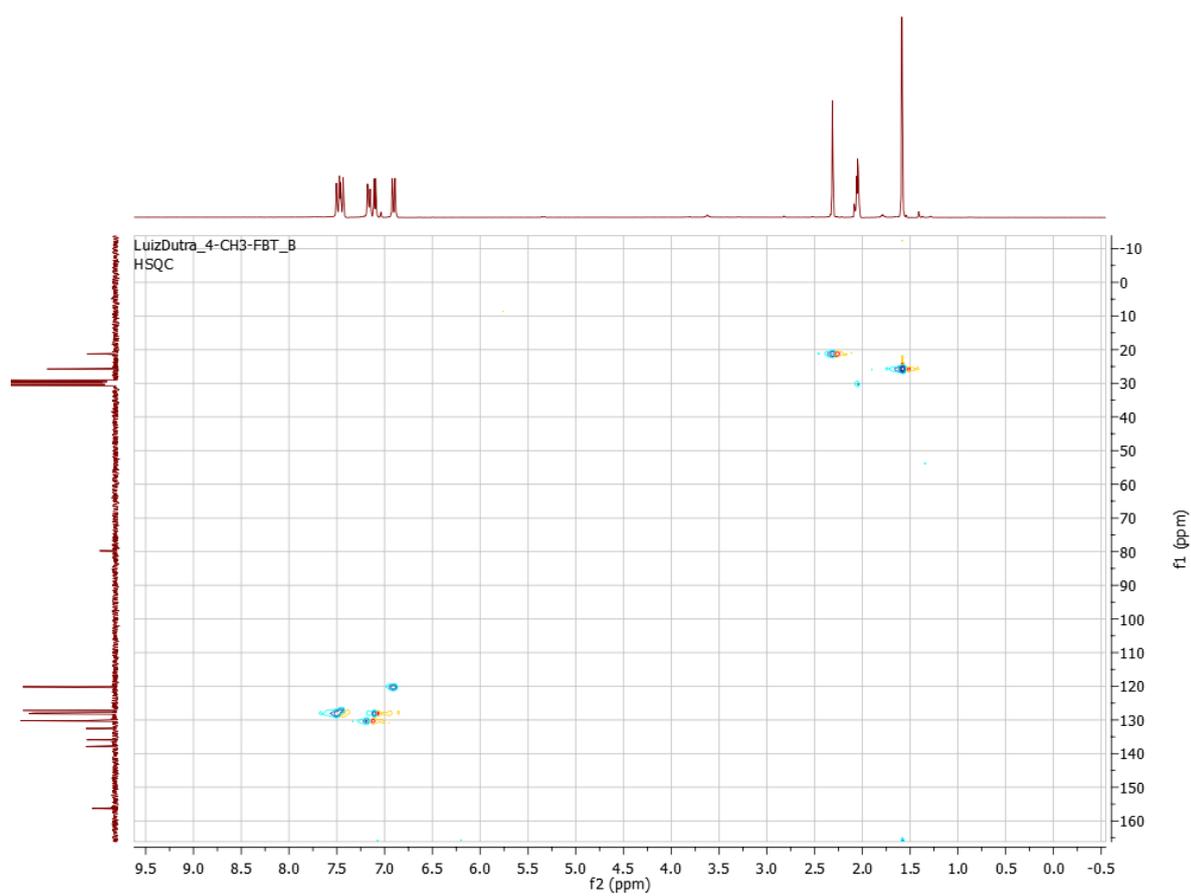


Figura: Correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4d**

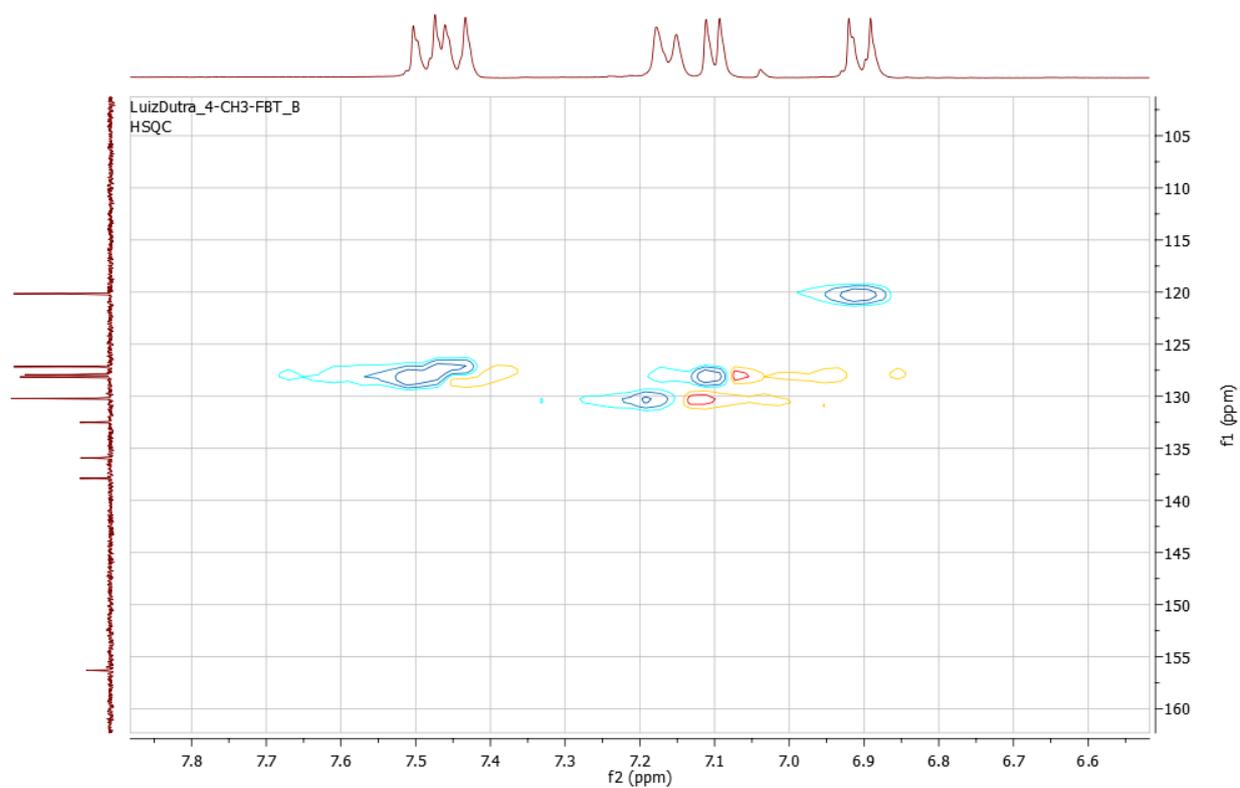


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4d**

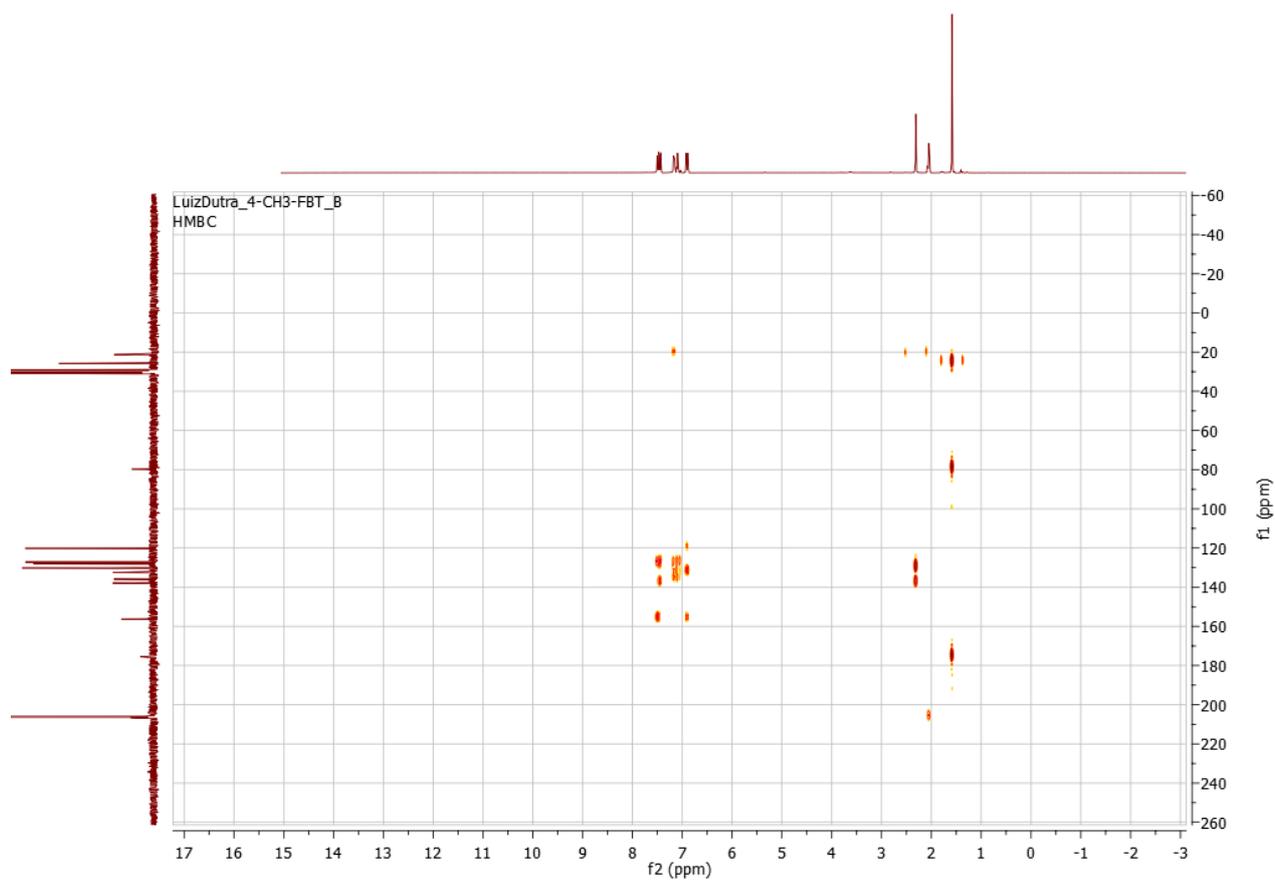


Figura: Correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4d**

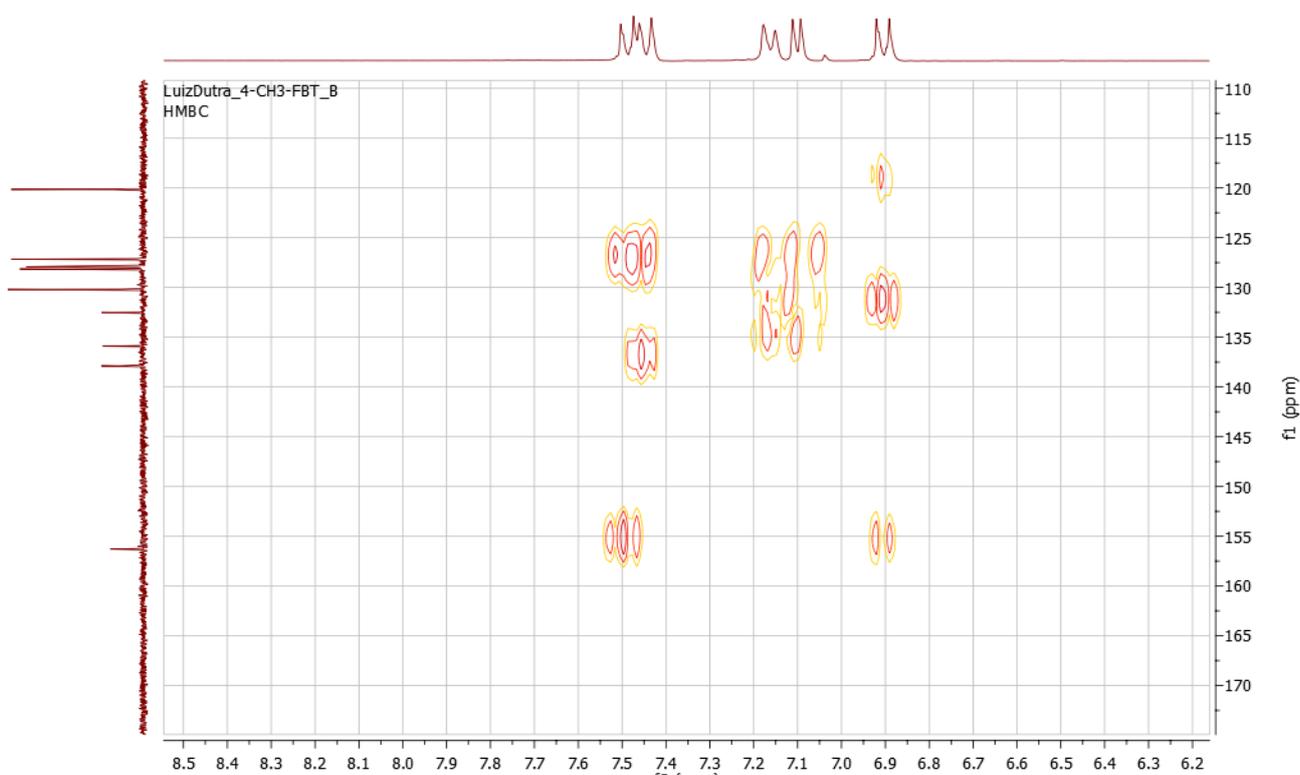


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4d**

Apêndice 9

Composto **4e**

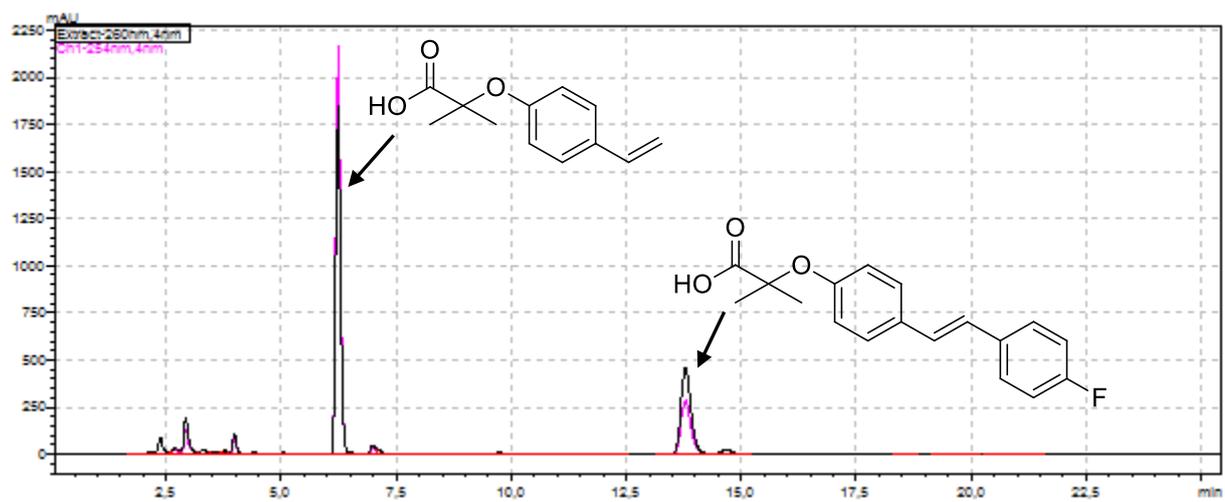


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto **4e**

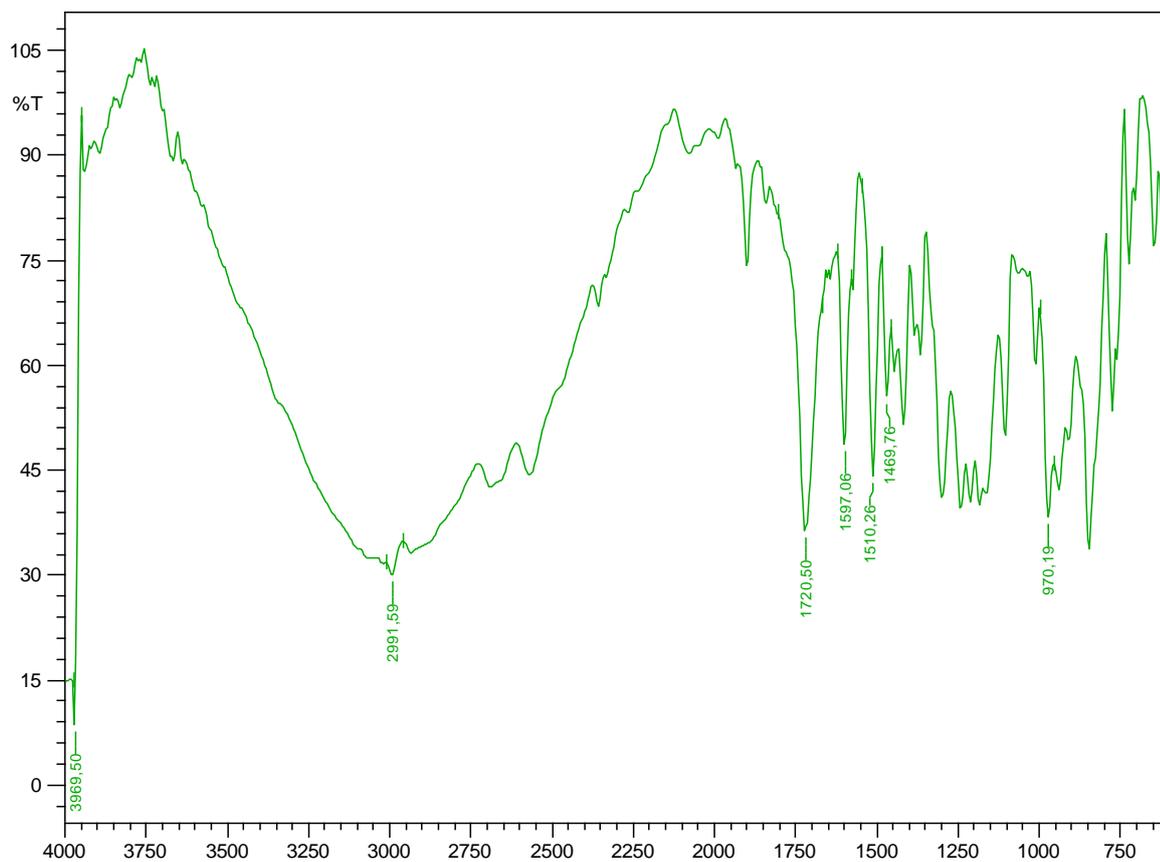


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 4e

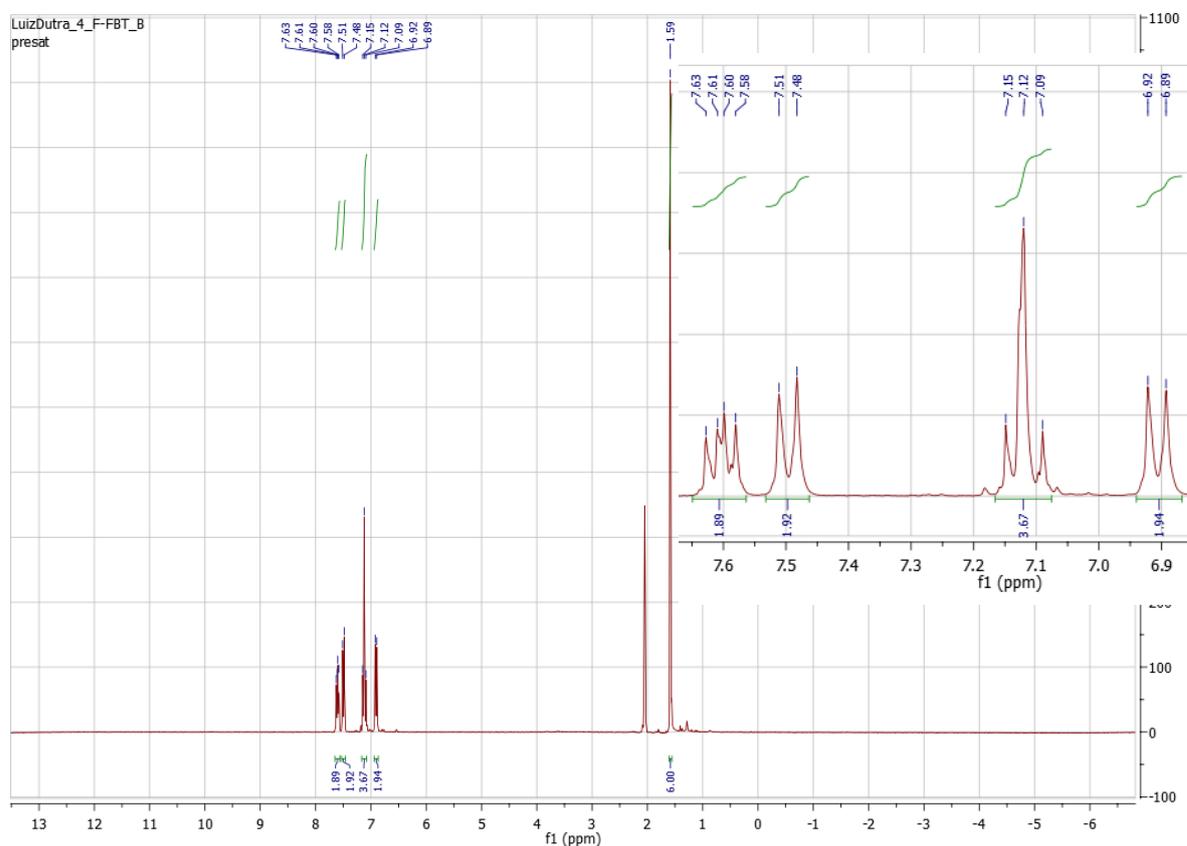
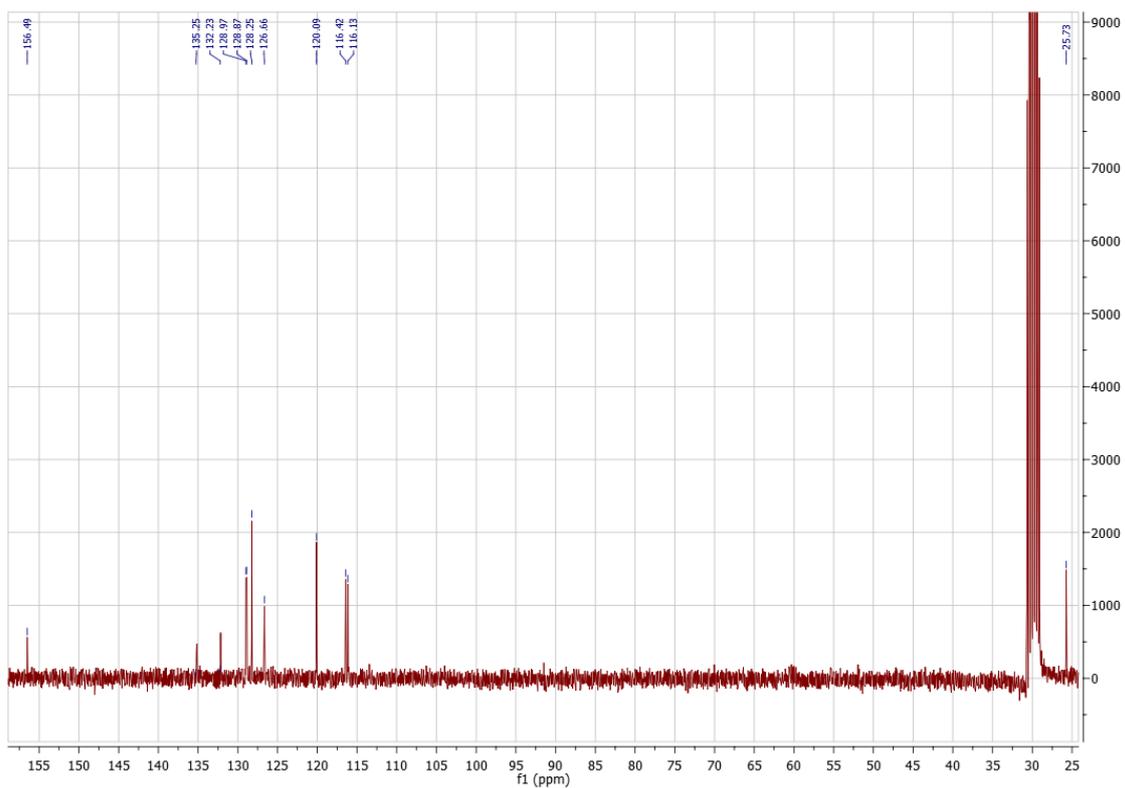
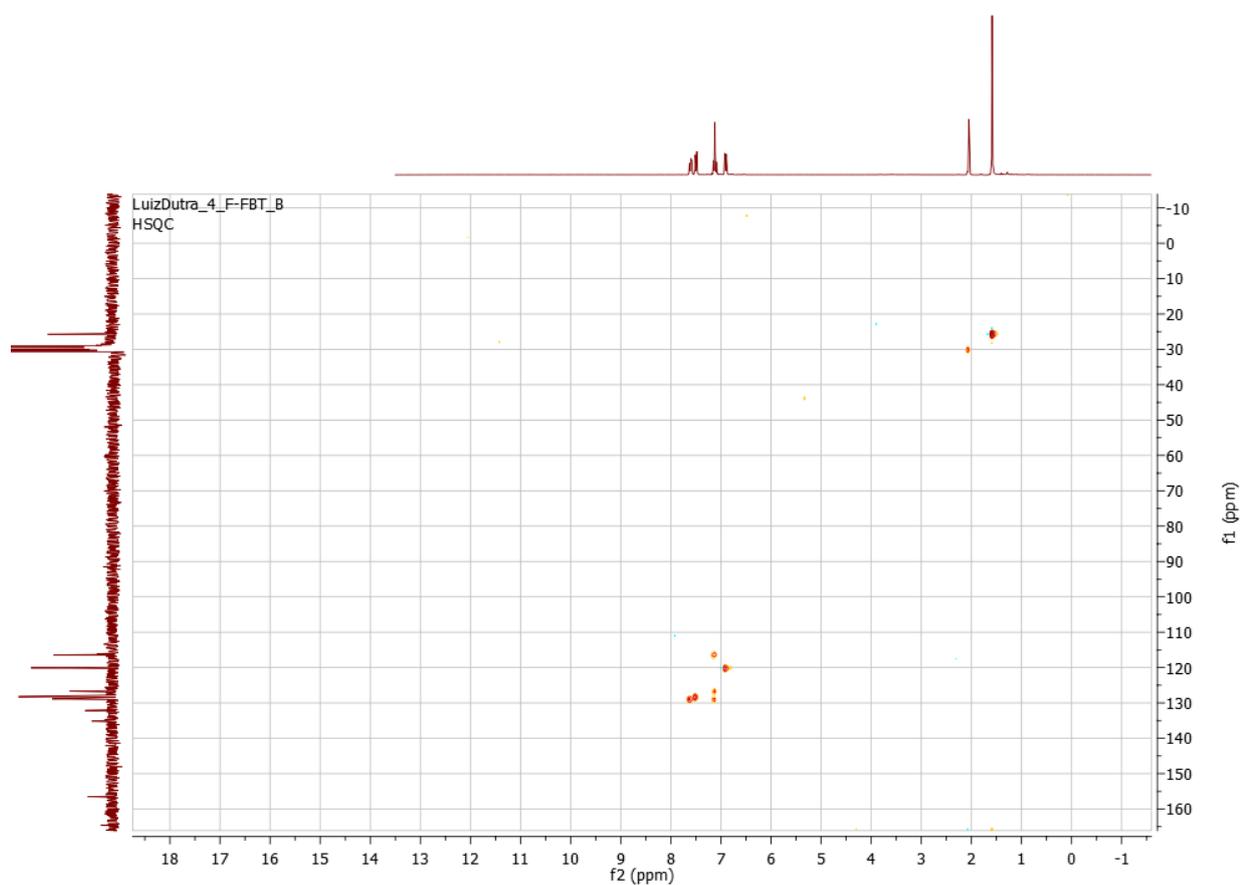


Figura: Espectro de RMN de ^1H do composto **4e****Figura:** Espectro de RMN de ^{13}C do composto **4e**



Fig

ura: Correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4e**

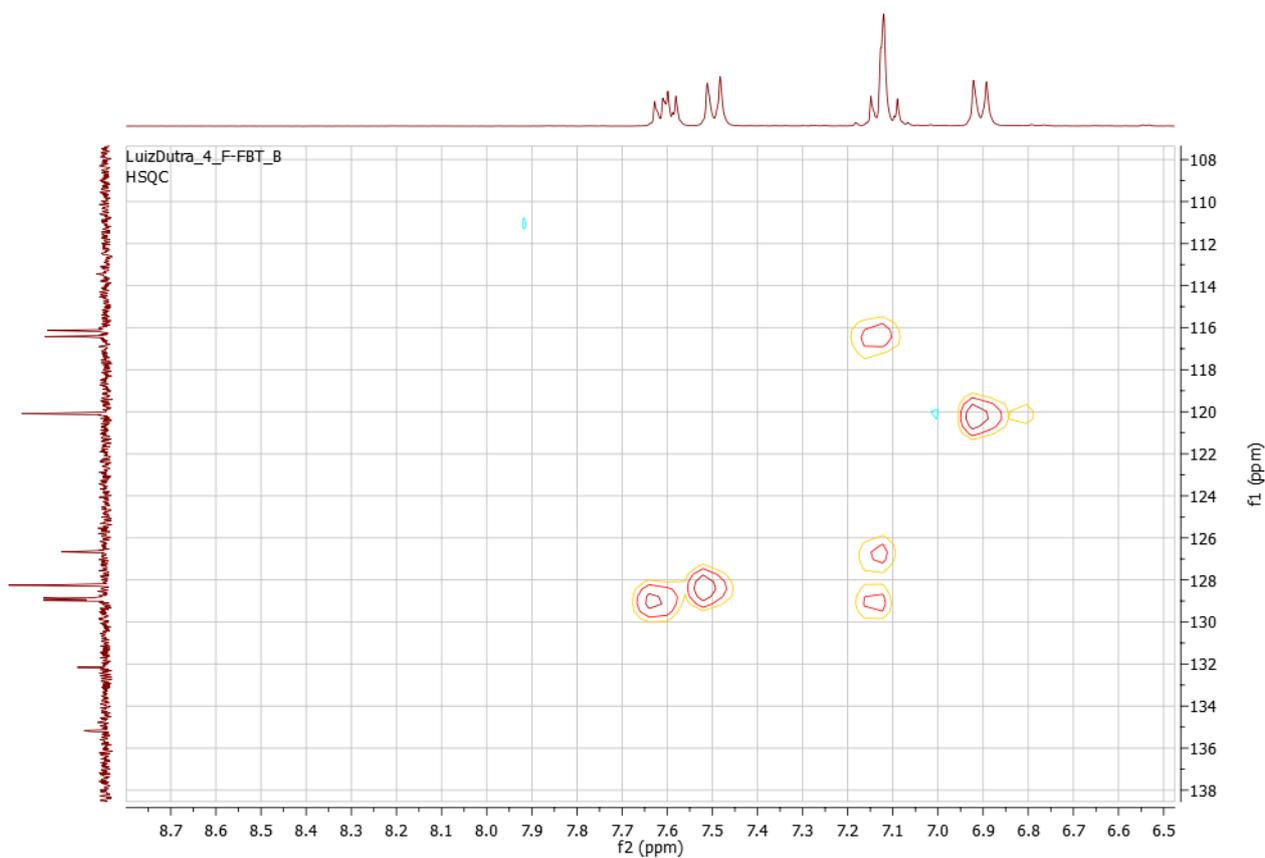


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4e**

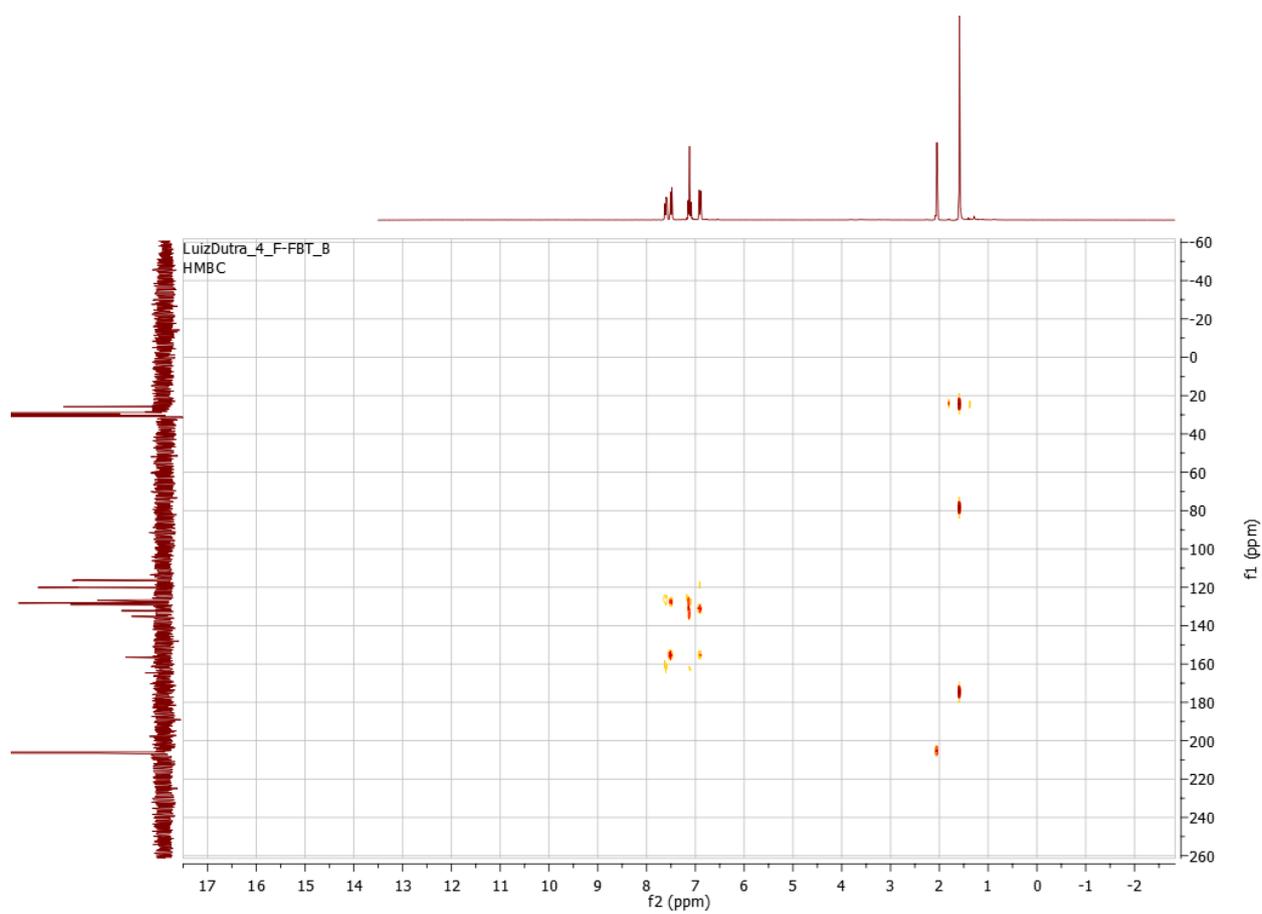


Figura: Correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4e**

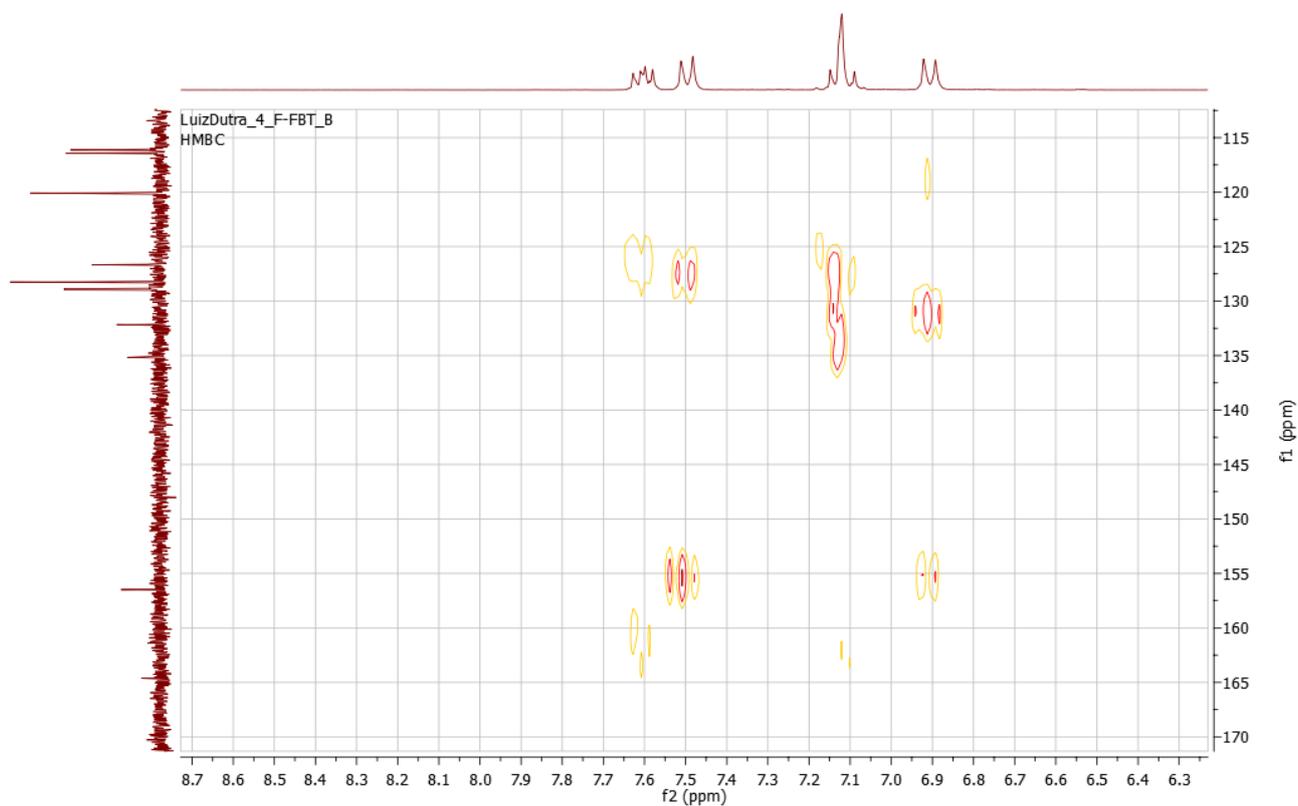


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HMBC do composto **4e**

Apêndice 10

Composto **4f**

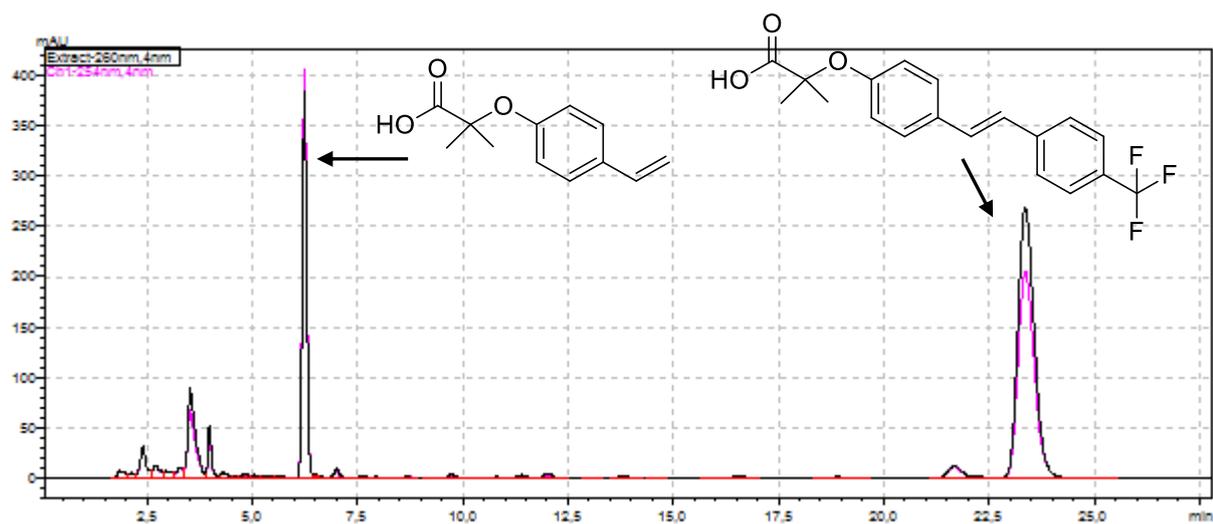


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto **4f**

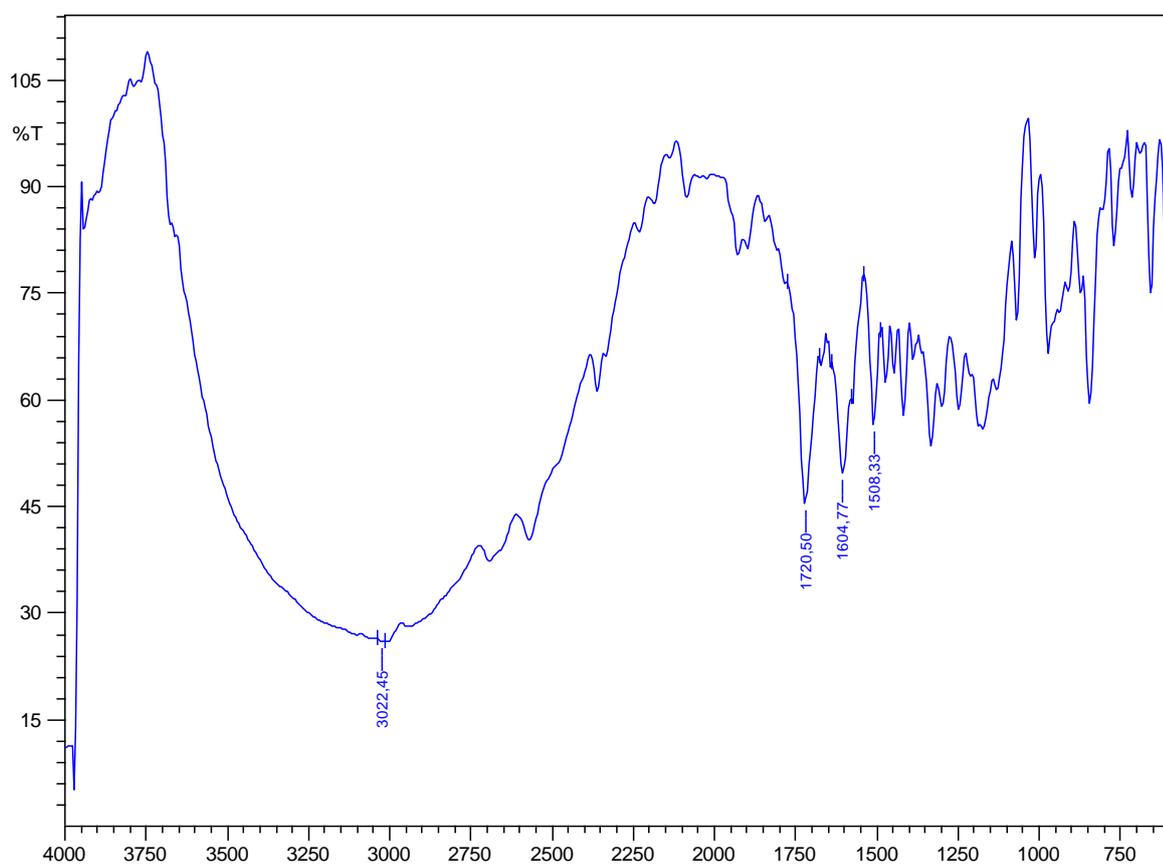


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 4f

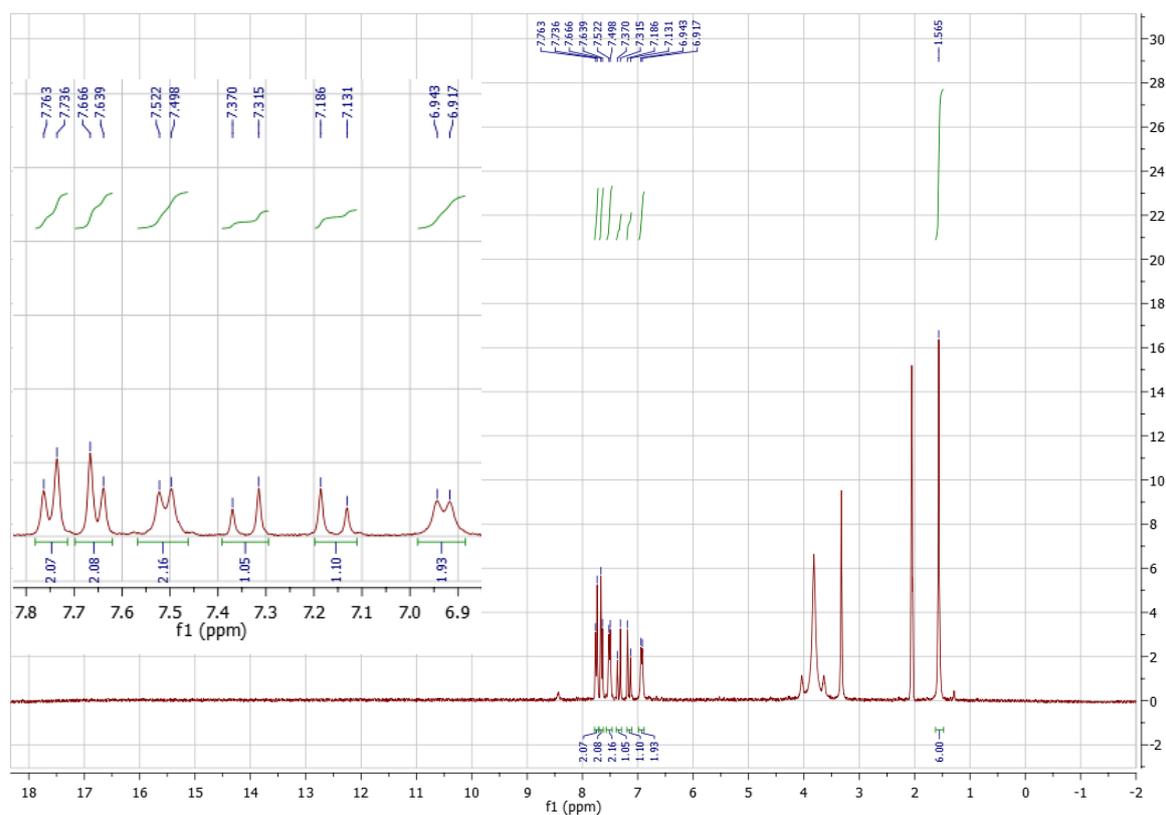


Figura: RMN de ¹H do composto 4f

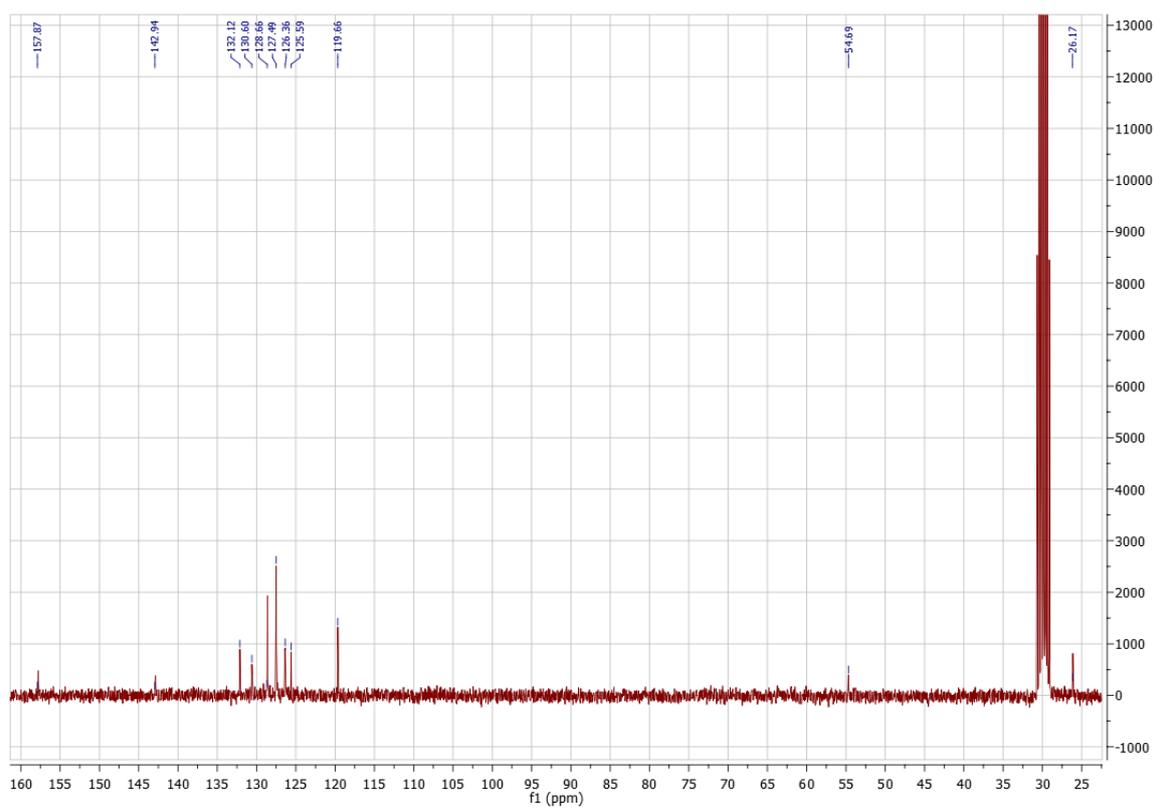


Figura: Espectro de ^{13}C do composto 4f

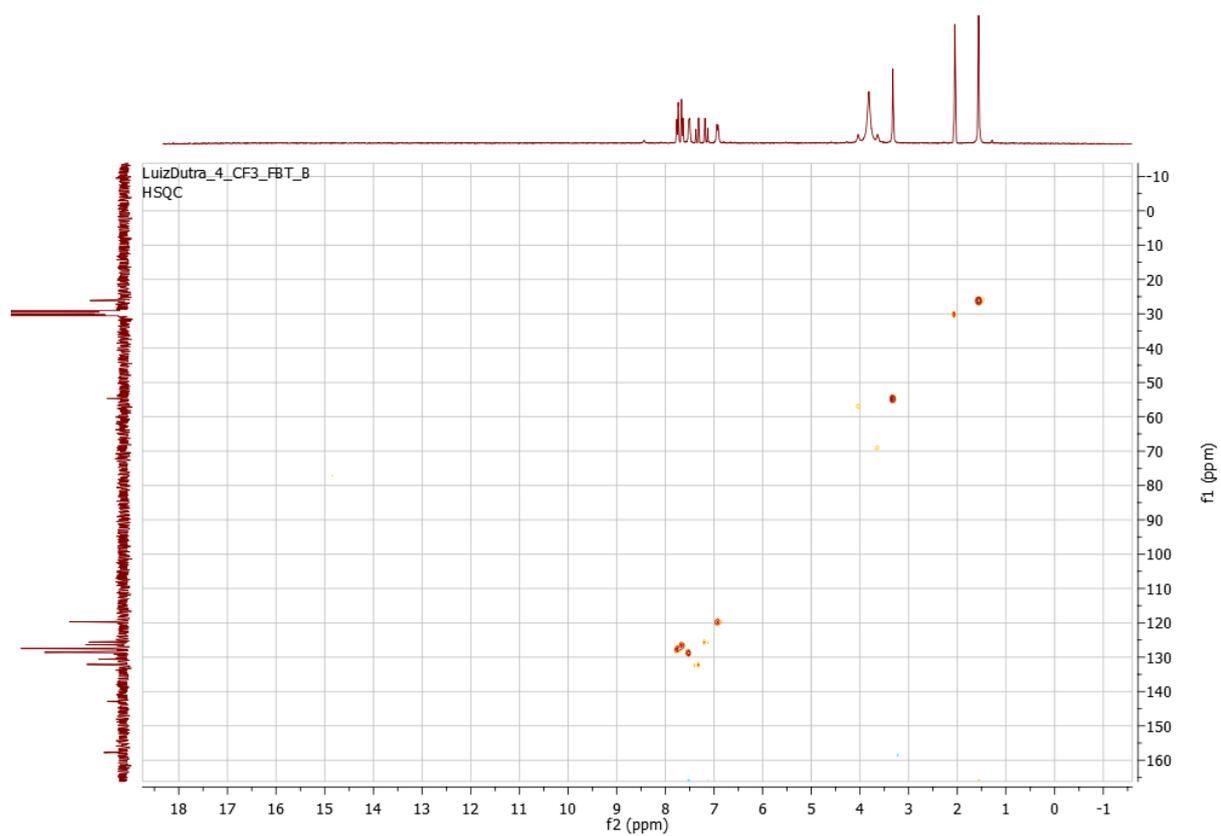


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto 4f

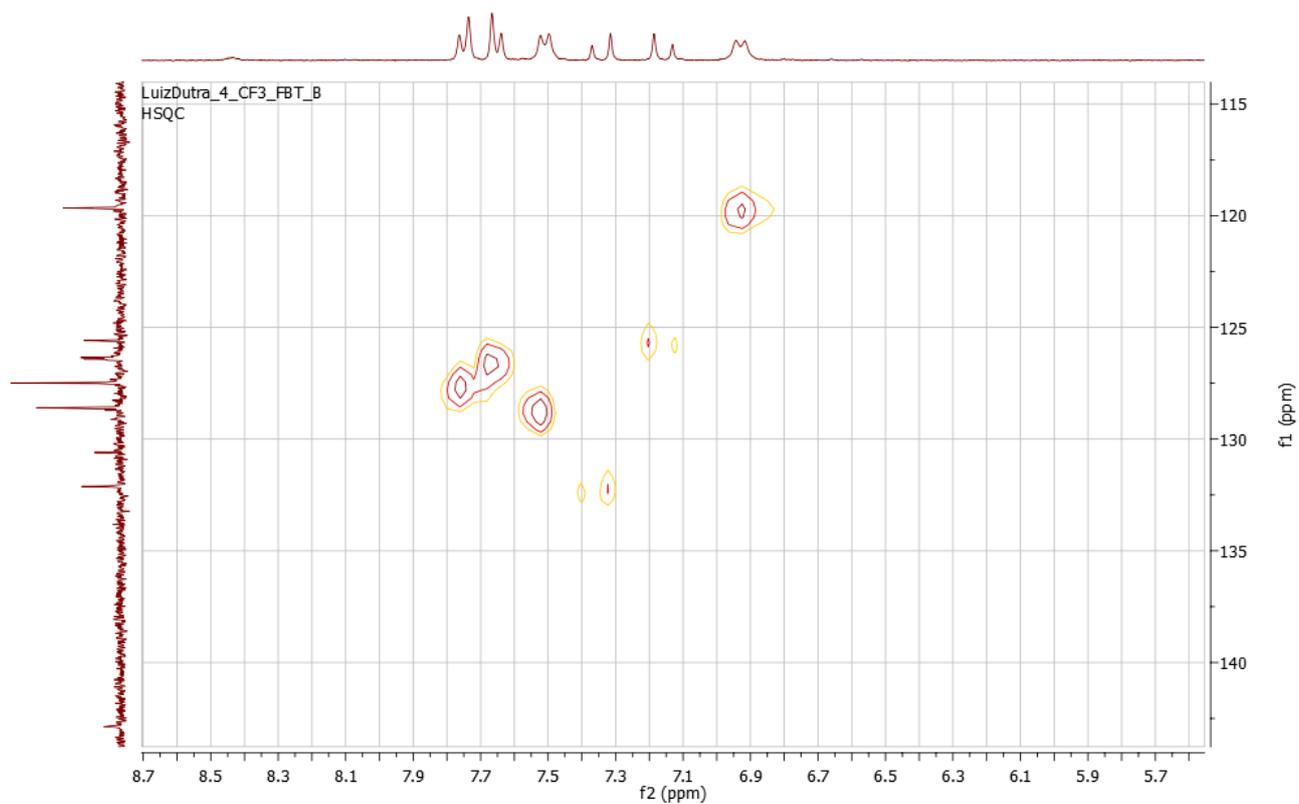


Figura: Ampliação das correlações no mapa de contorno de HSQC do composto **4f**

Apêndice 11

Composto 5a

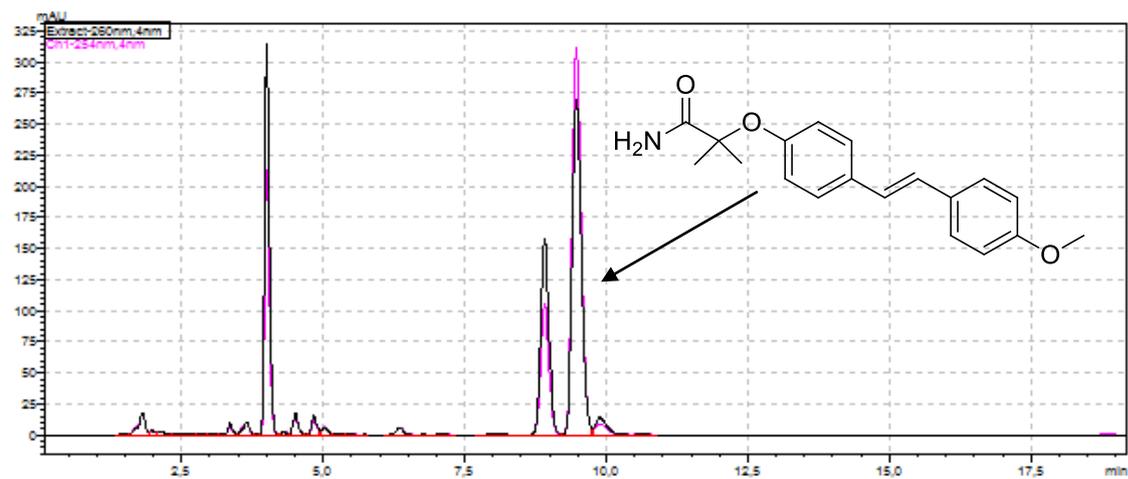


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto **5a**

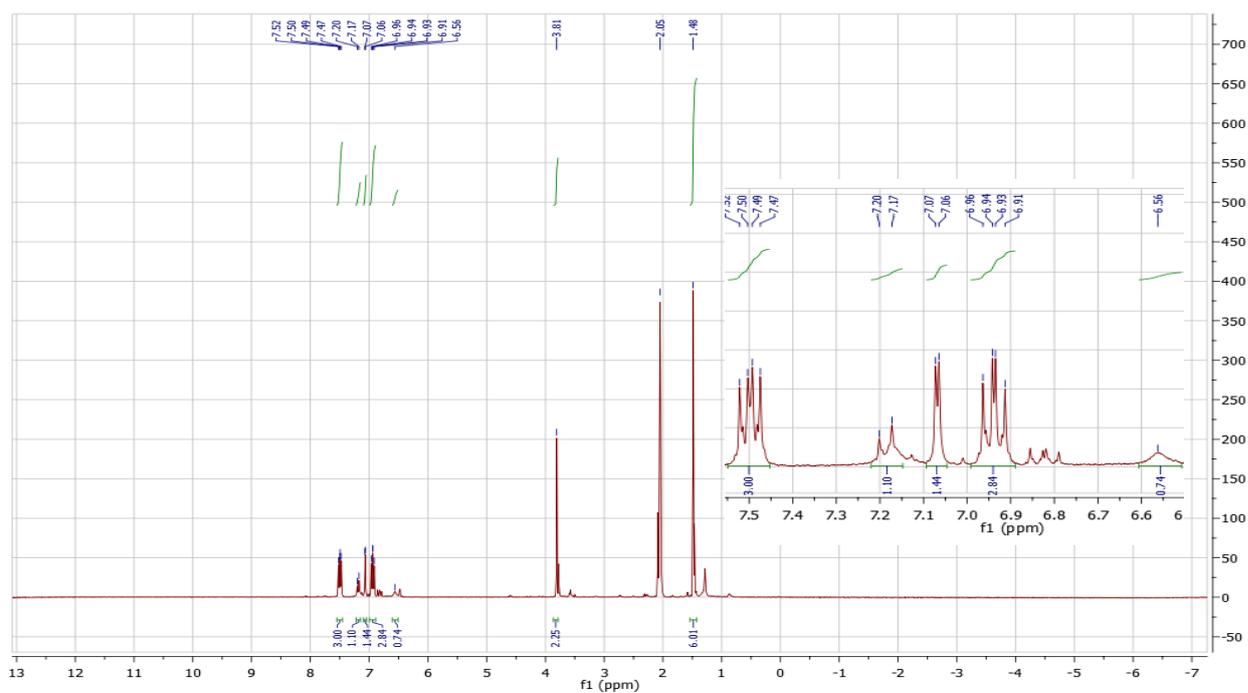


Figura: RMN de ^1H do composto 5a

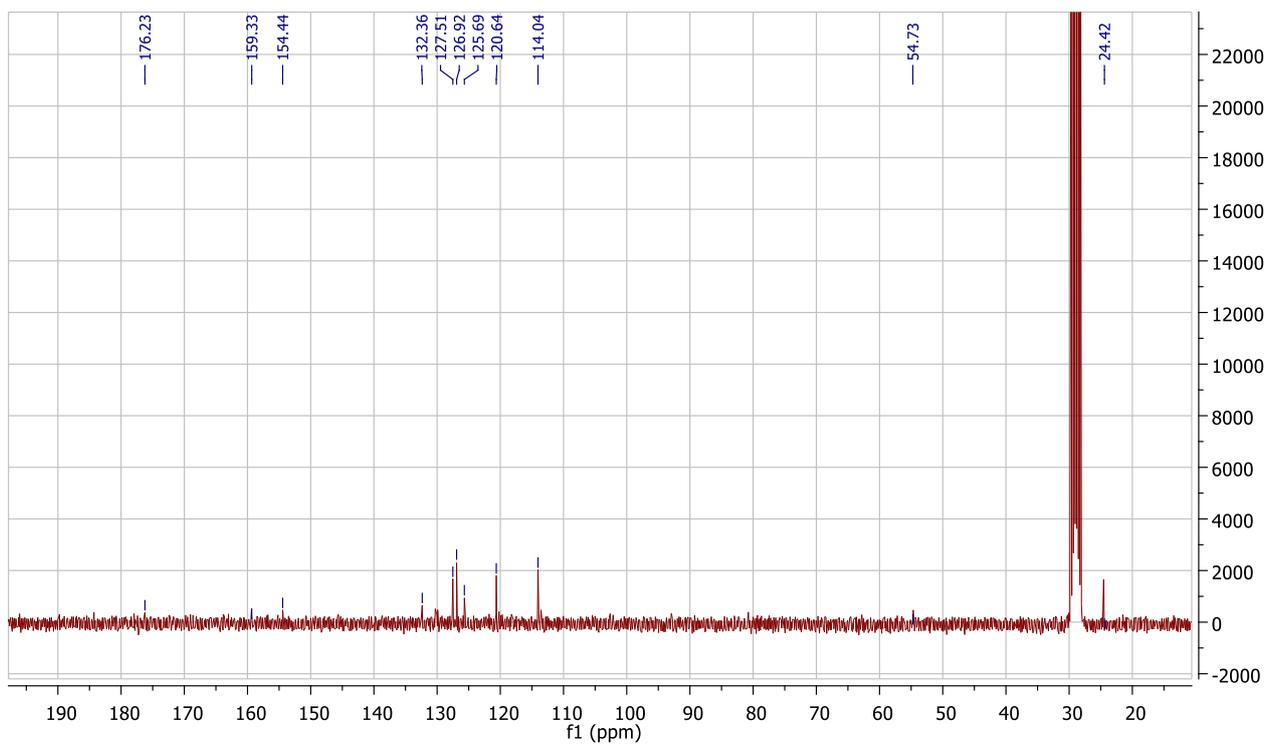


Figura: RMN de ^{13}C do composto 5a

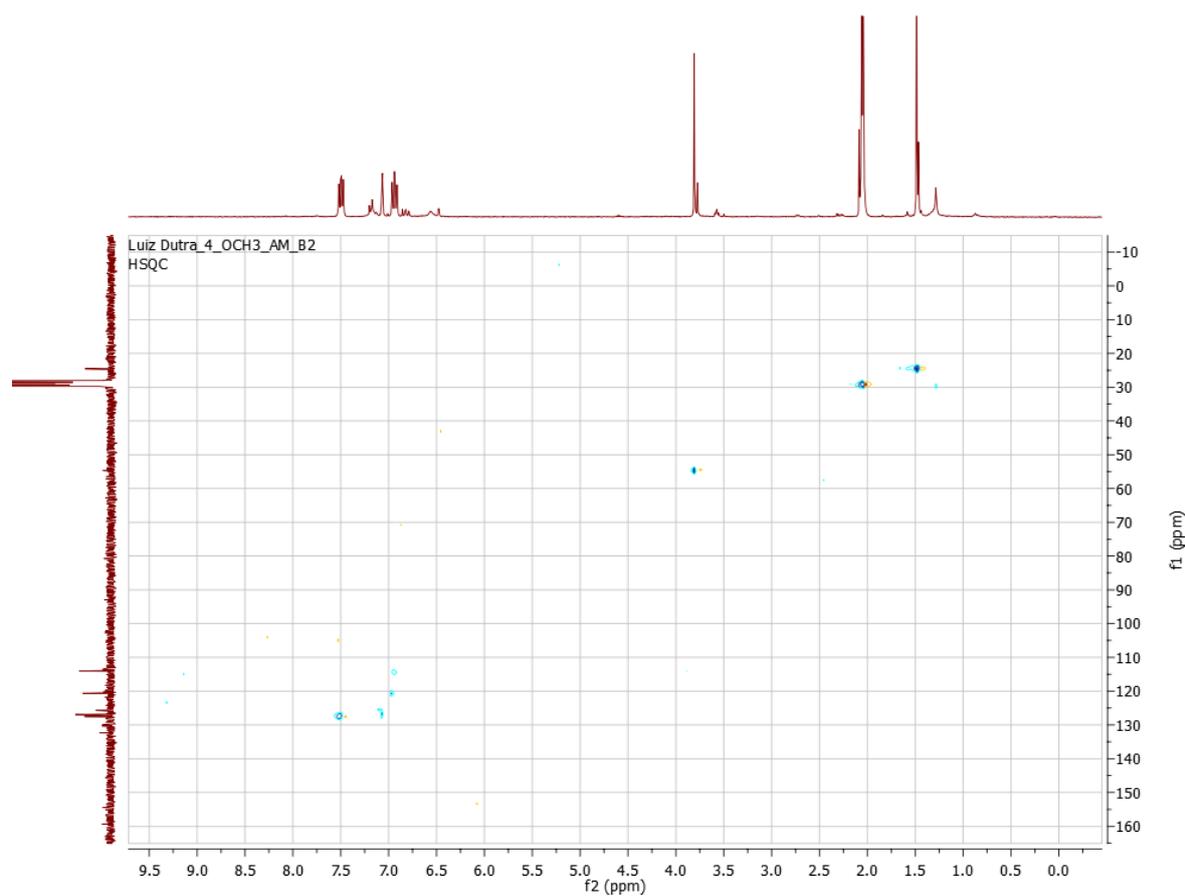


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5a**

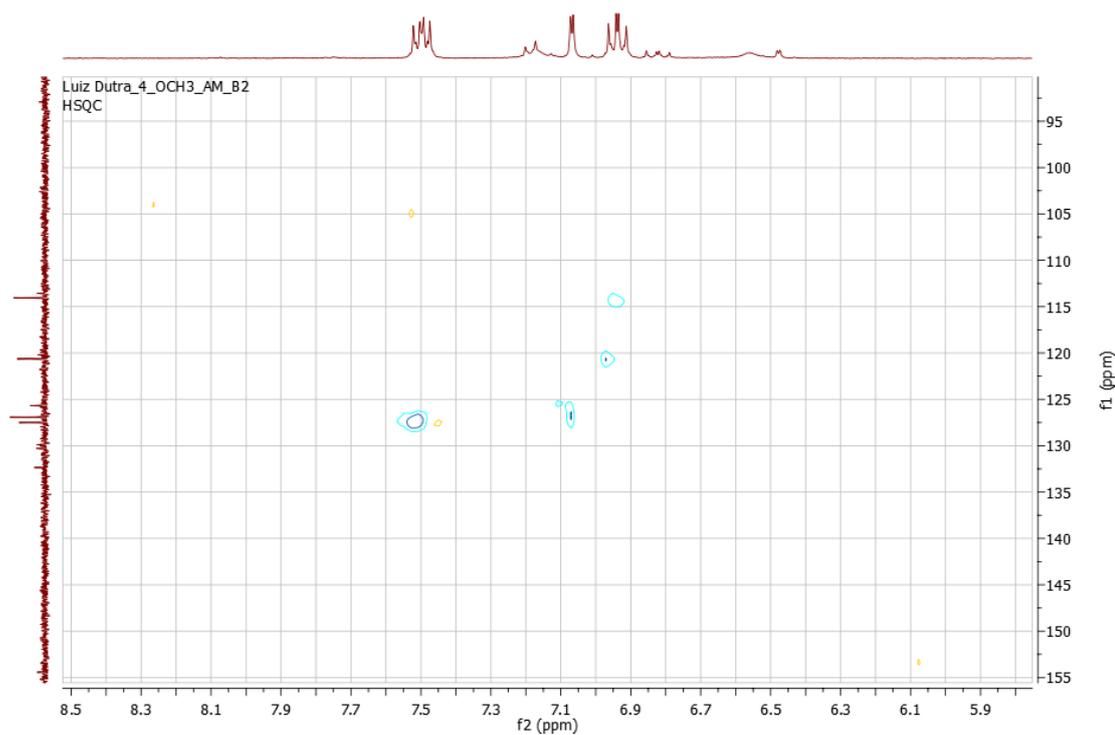


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5a**

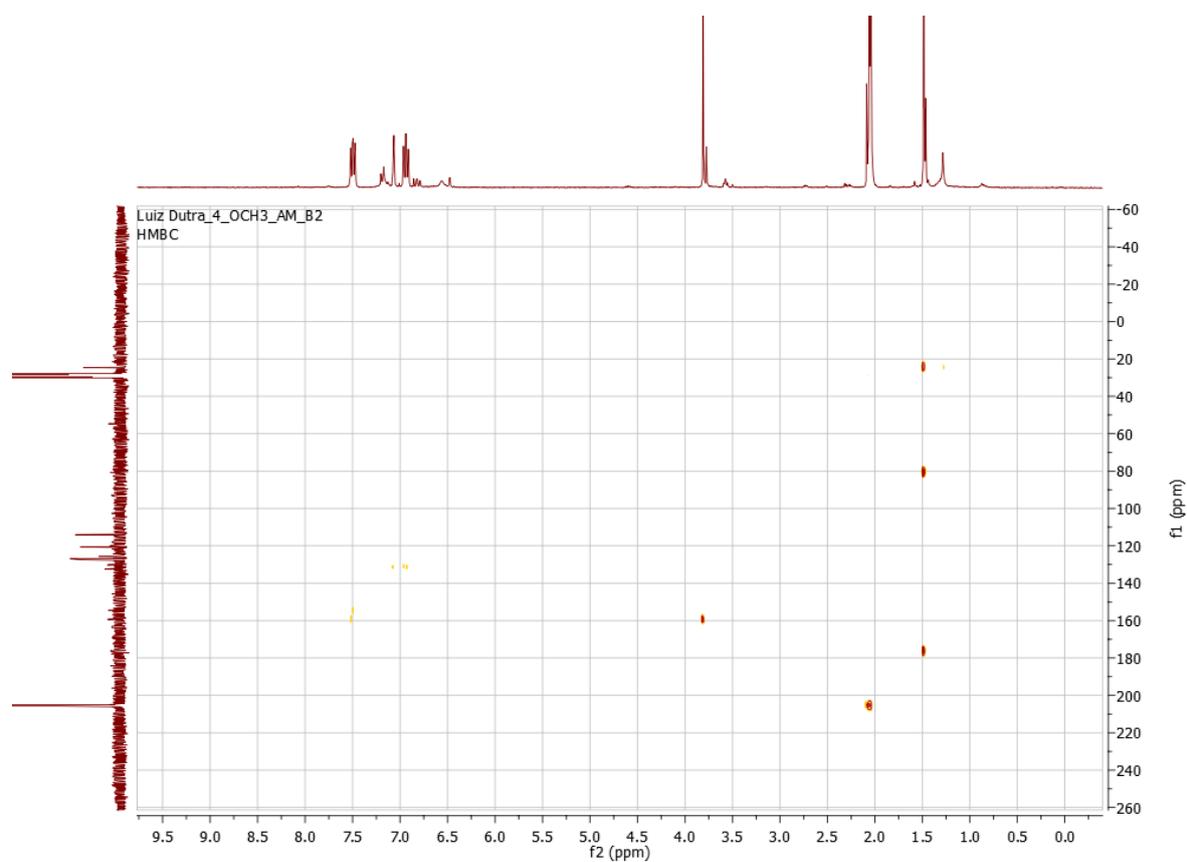


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5a**

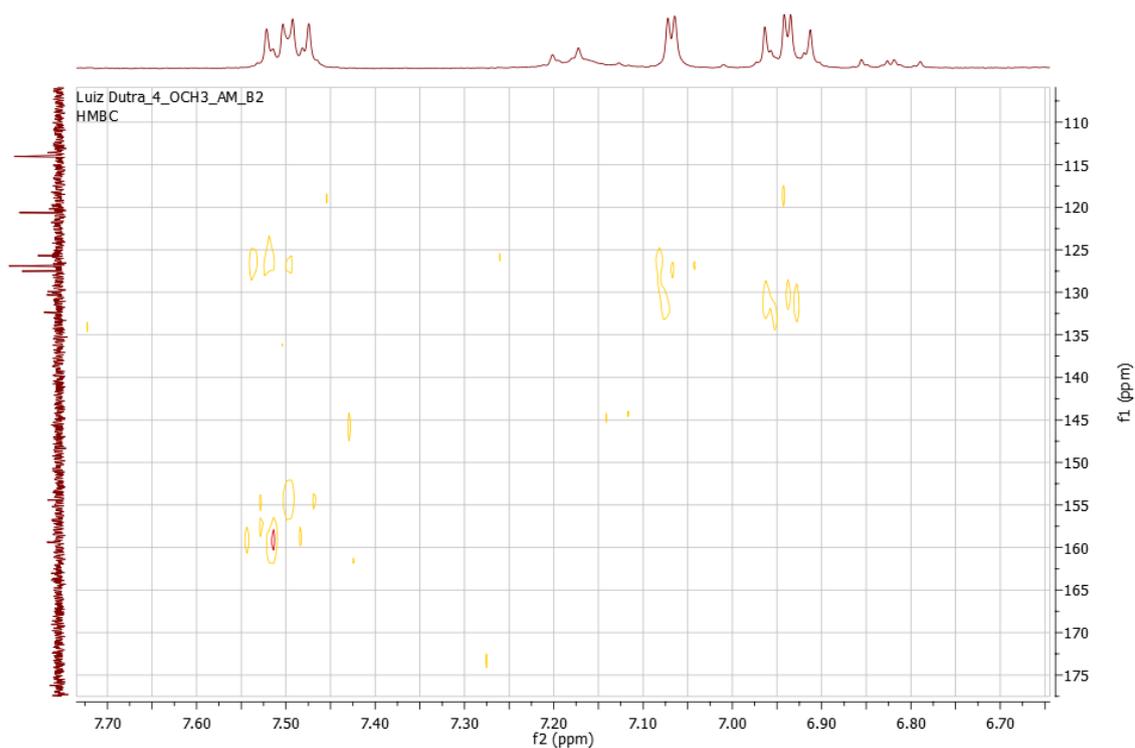


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5^a**

Apêndice 12

Composto 5b

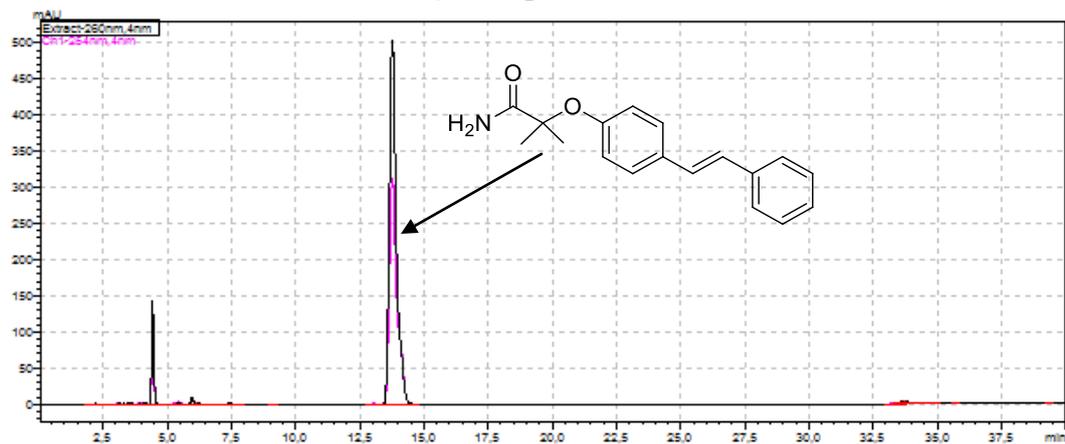


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto 5b

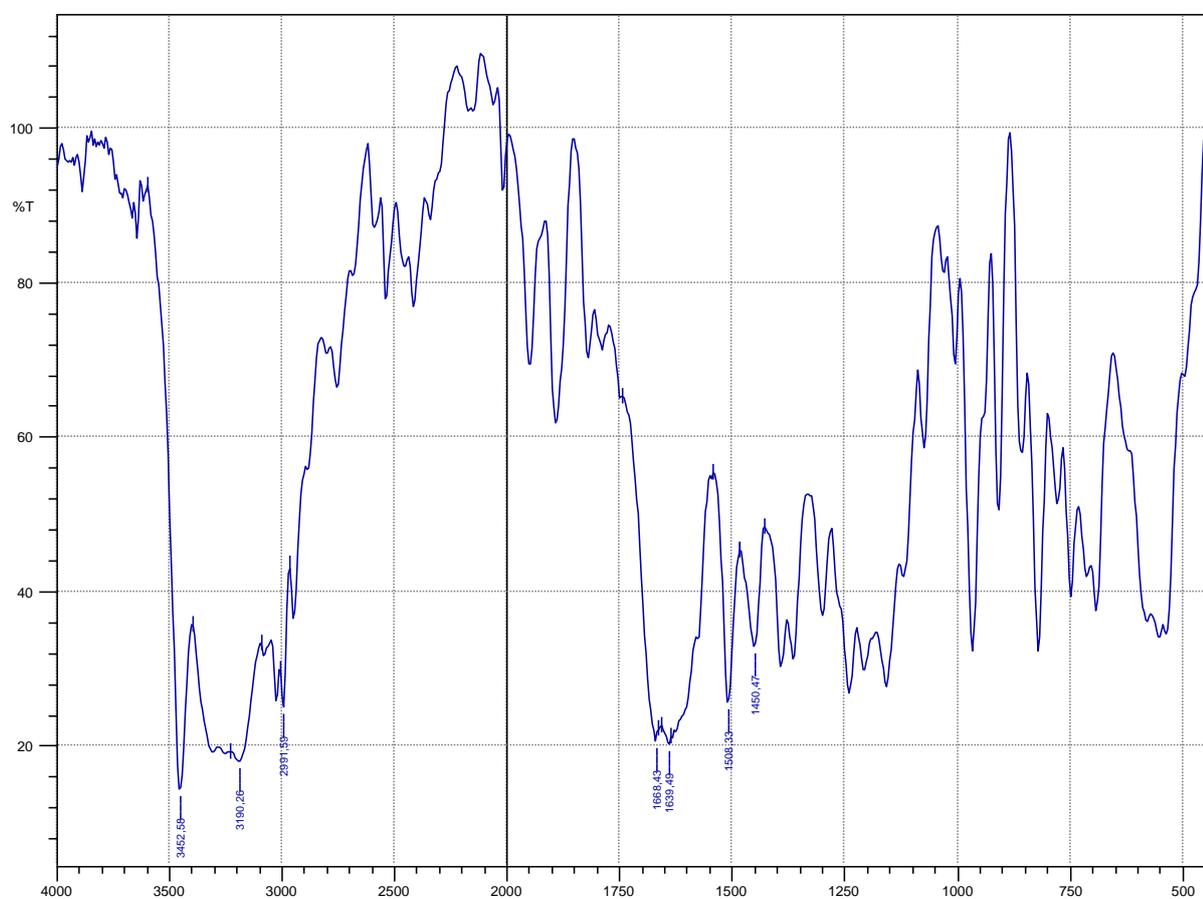


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 5b

Apêndice 13

Composto 5c

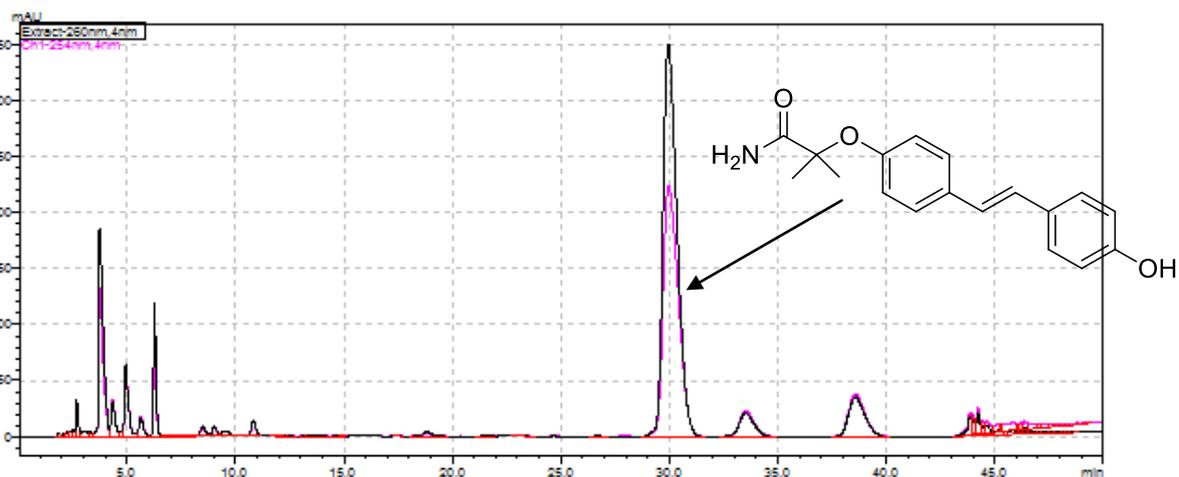


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto 5c

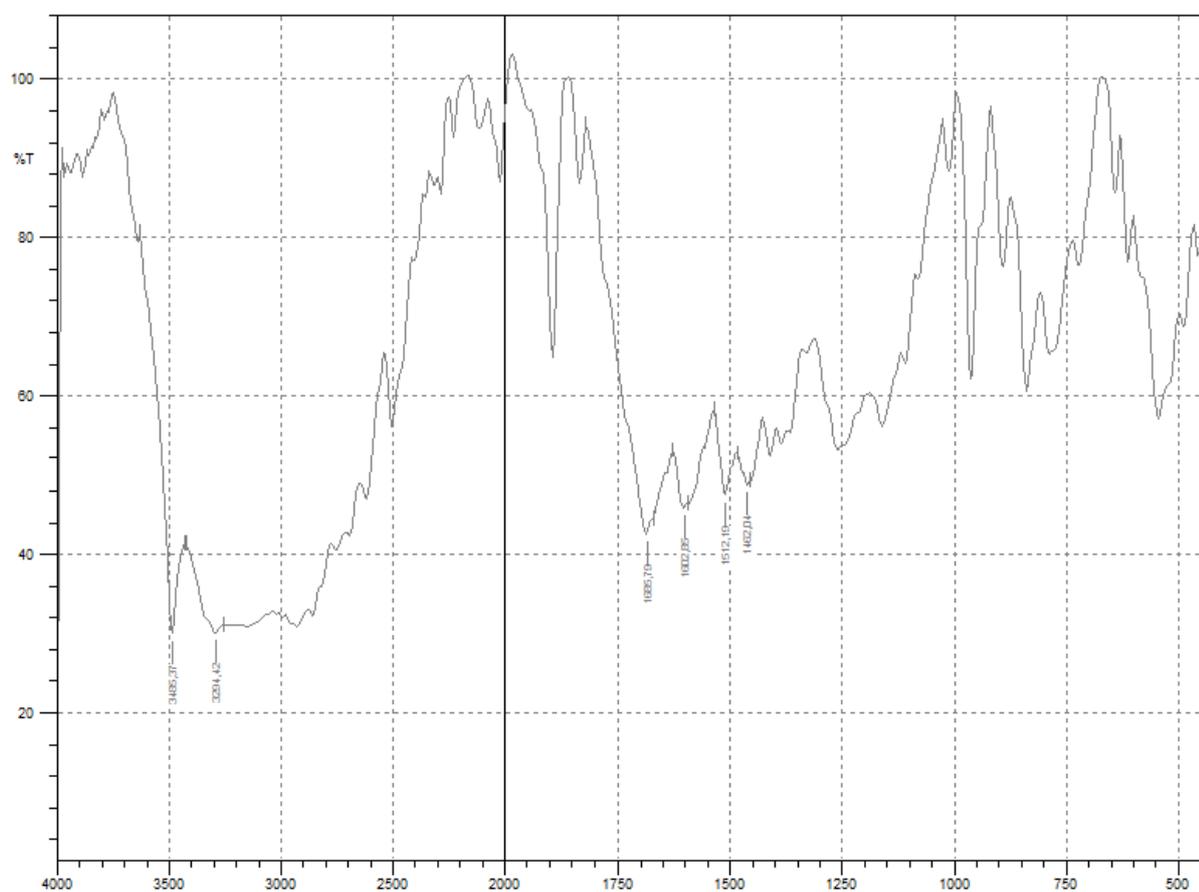


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 5c

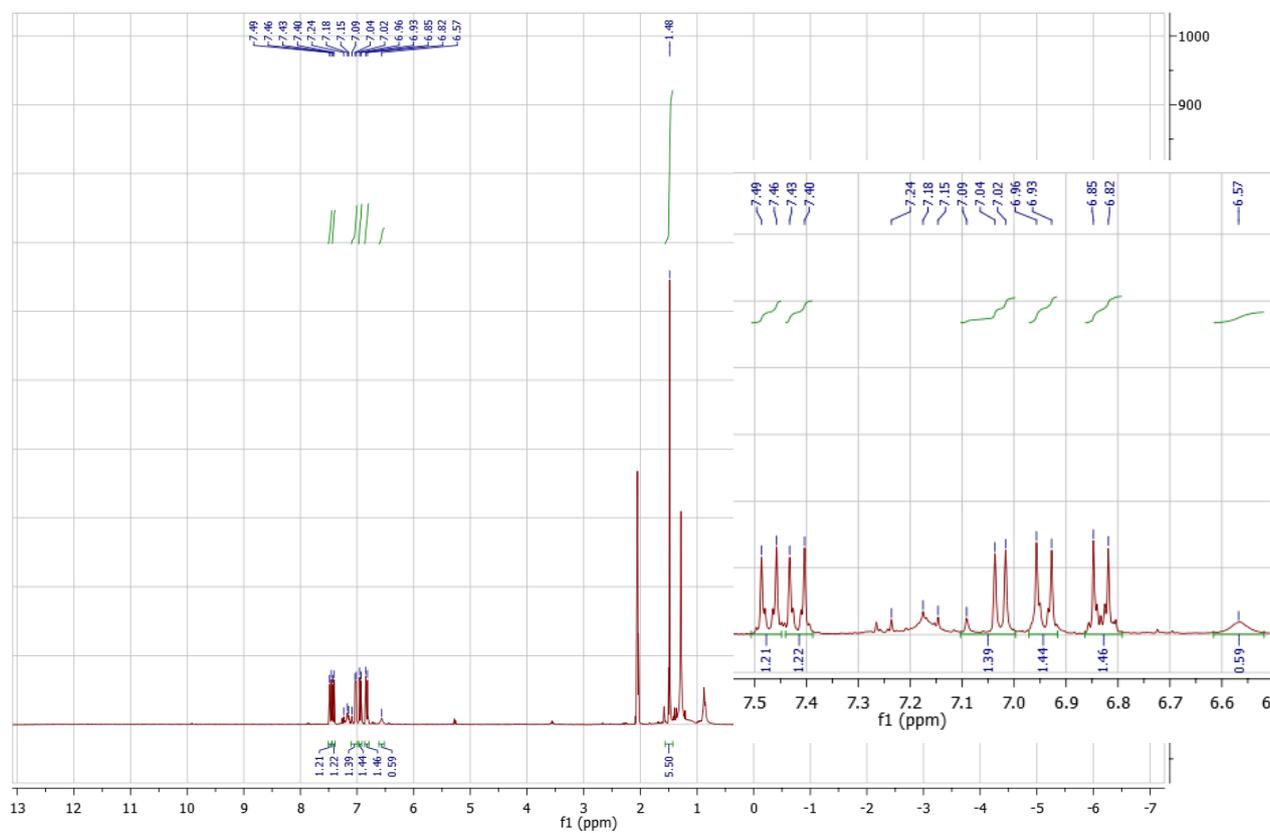


Figura: RMN de ^1H do composto **5c**

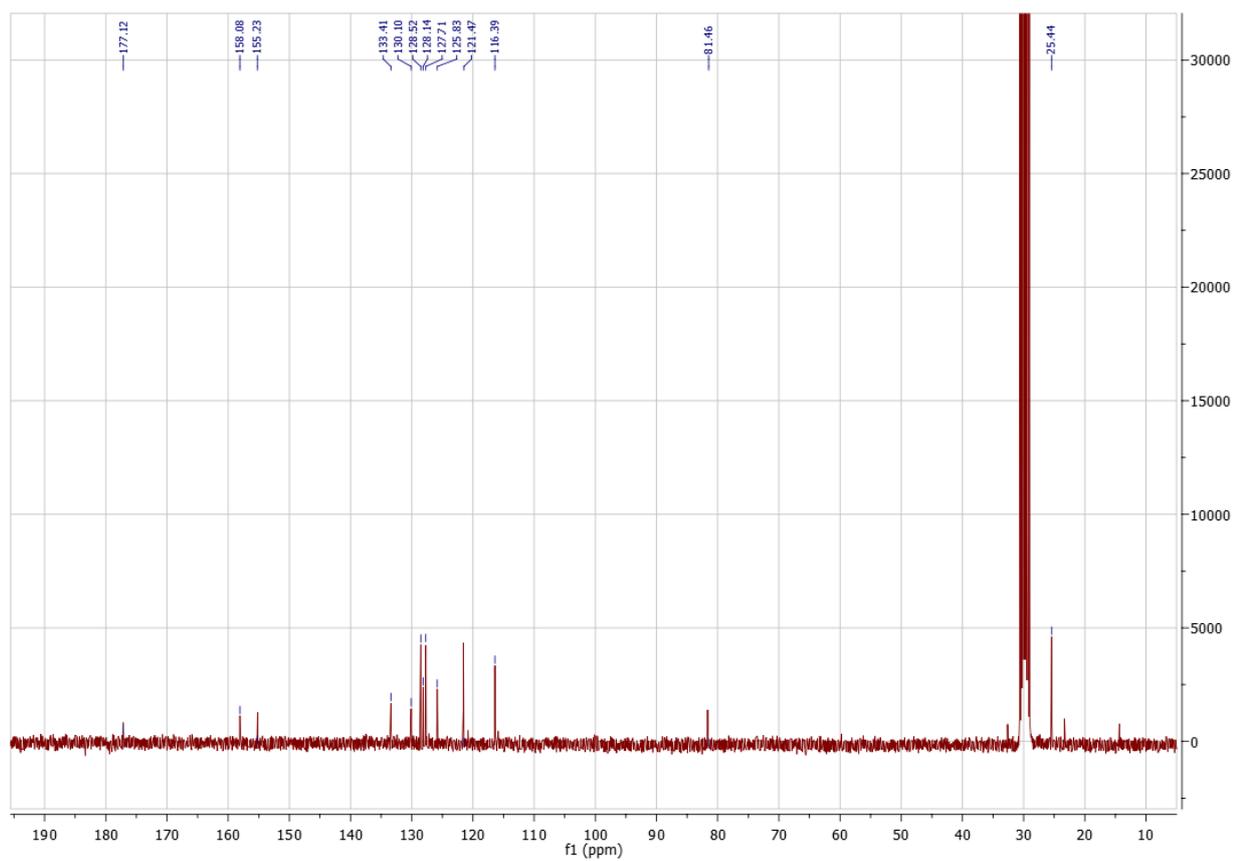


Figura: RMN de ^{13}C do composto **5c**

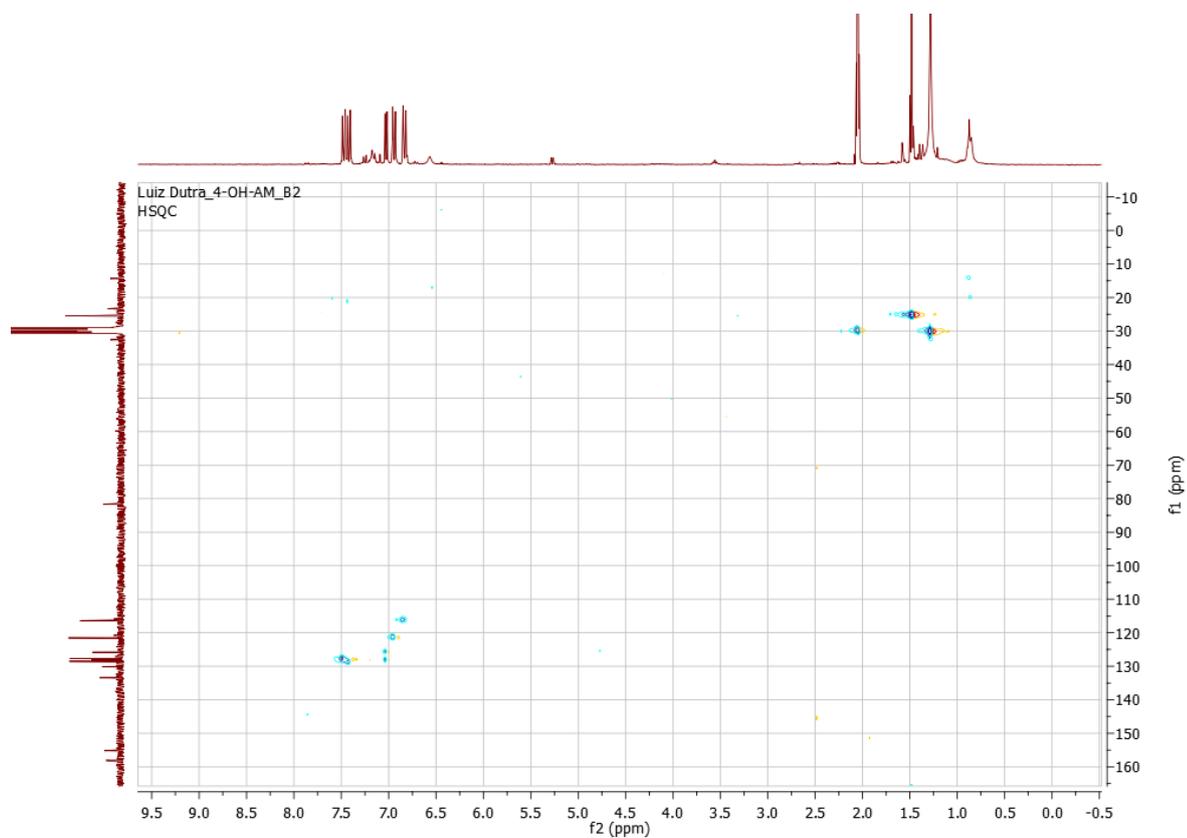


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5c**

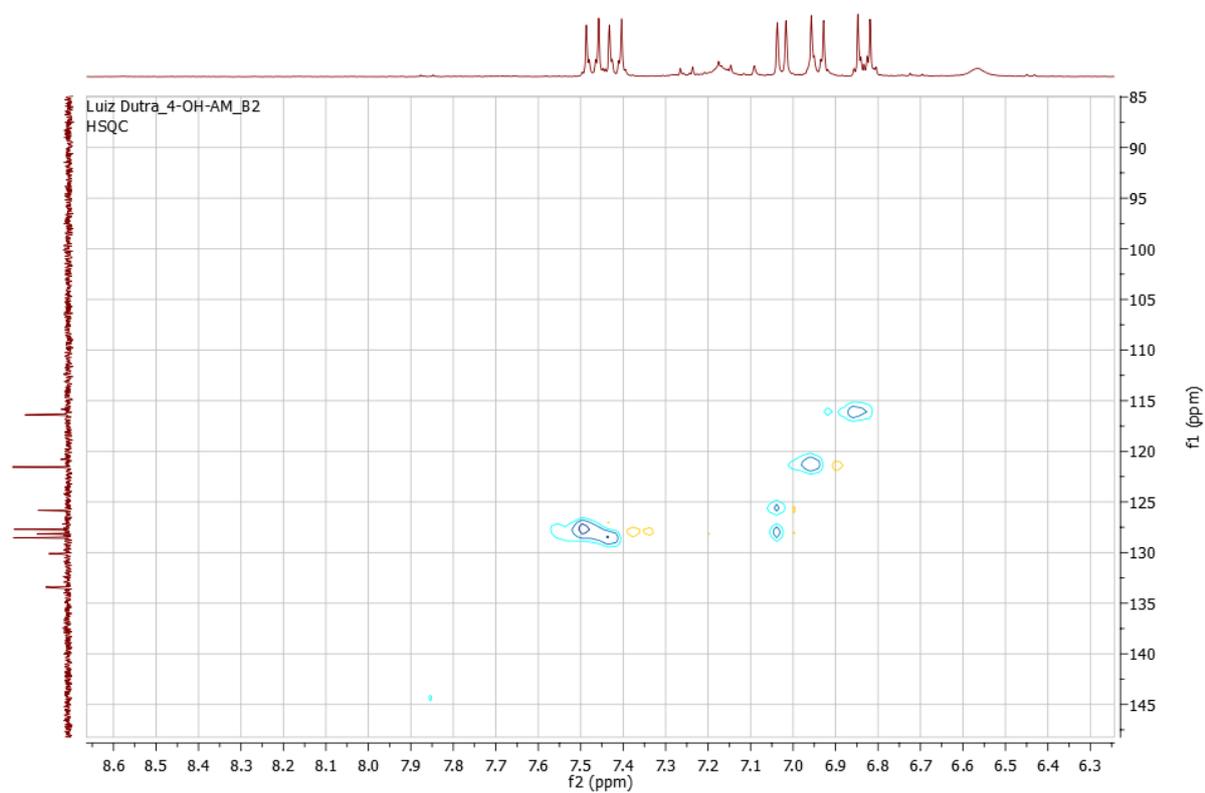


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5c**

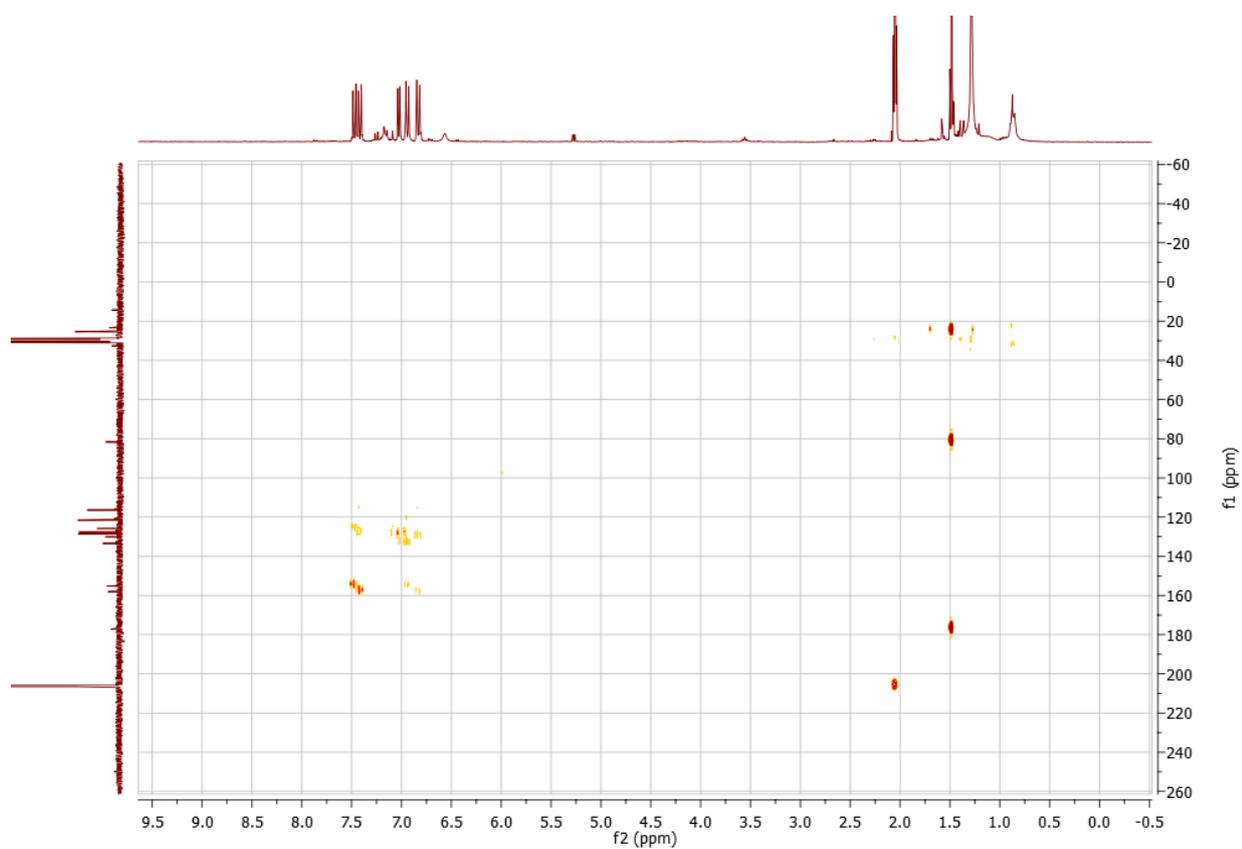


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5c**

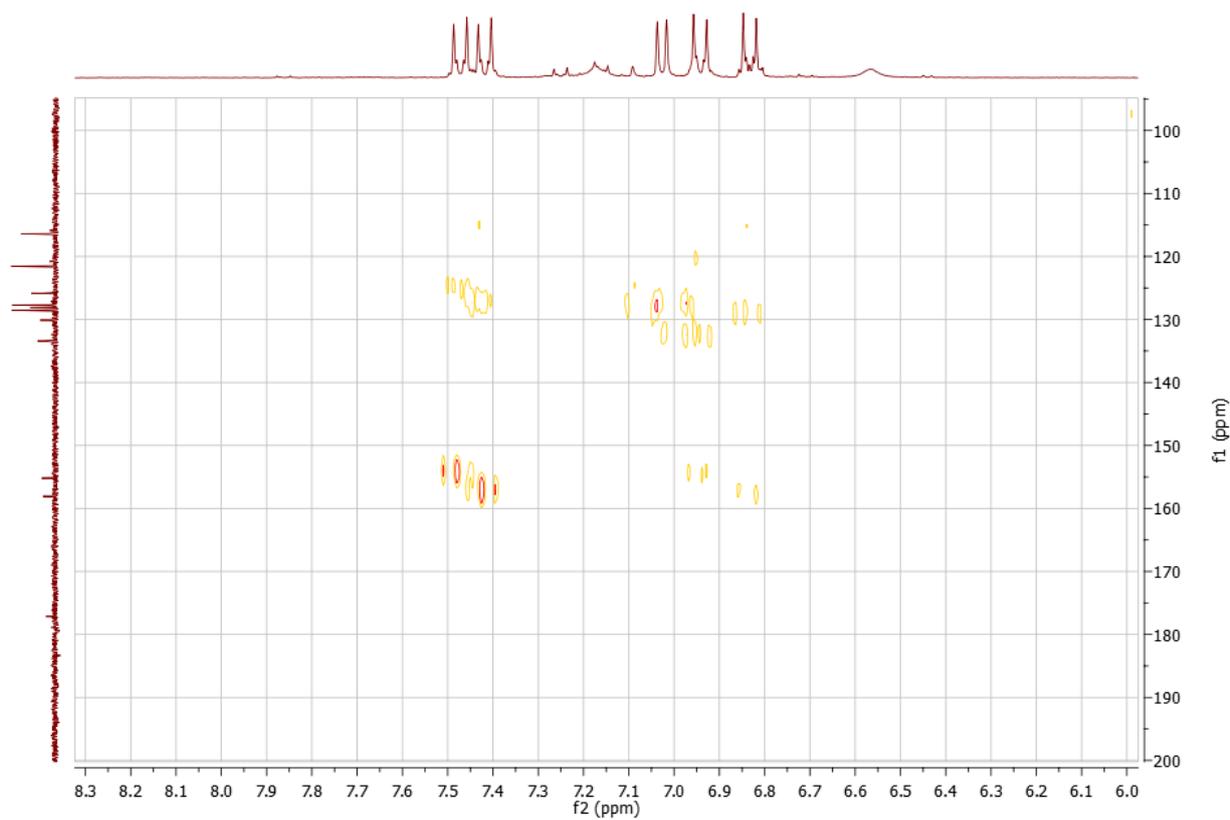


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5c**

Apêndice 14

Composto 5d

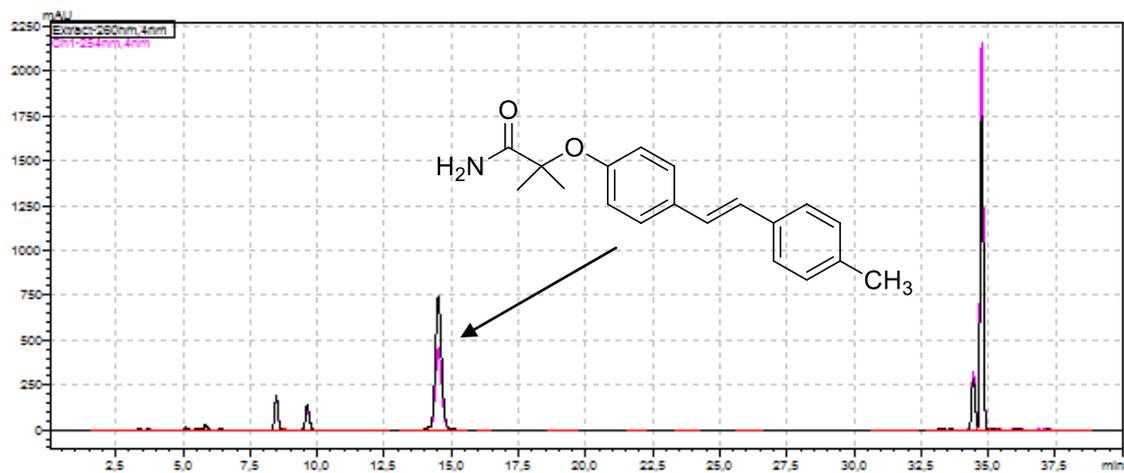


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto 5d

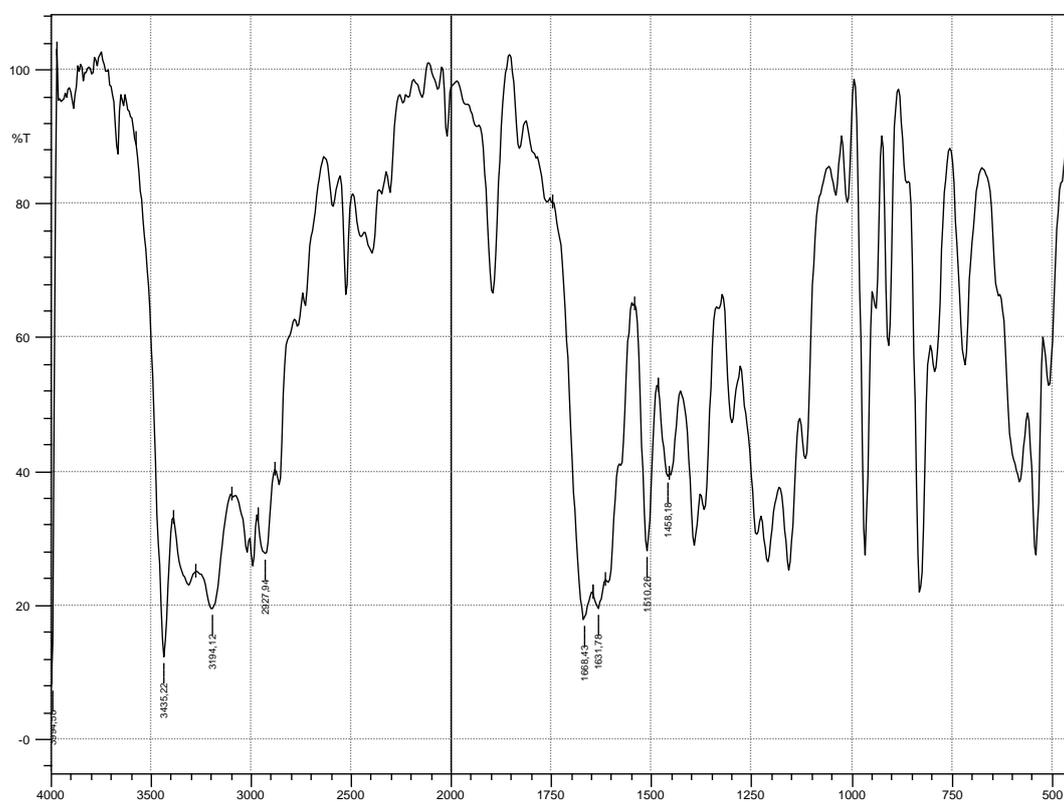


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 5d

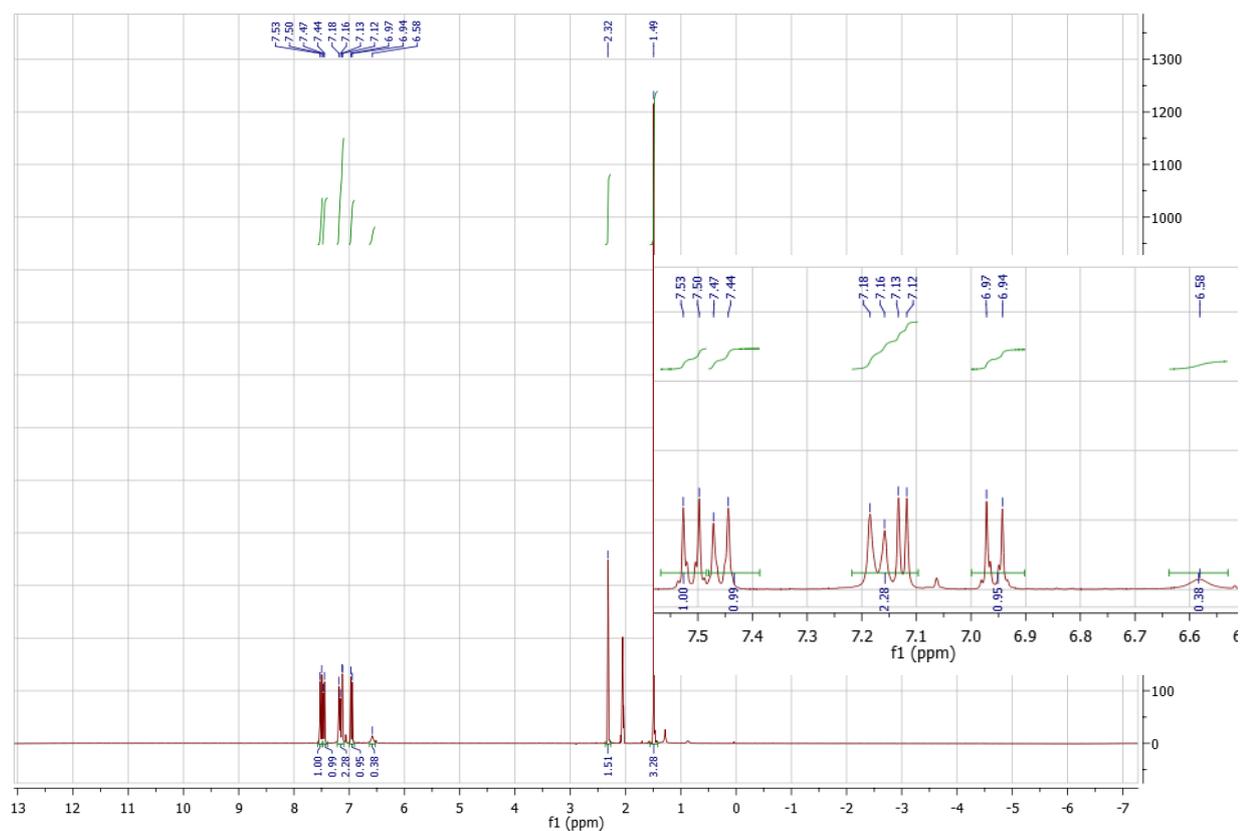


Figura: RMN de ^1H do composto **5d**

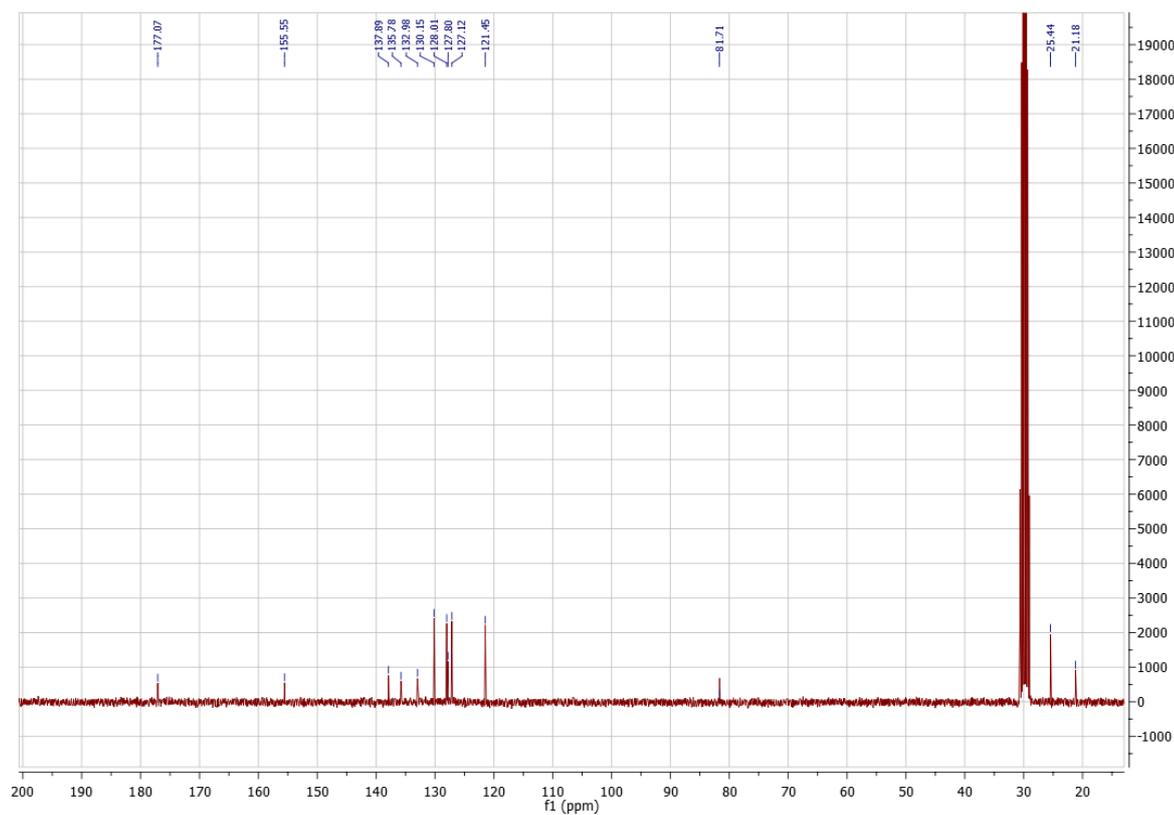


Figura: RMN de ^{13}C do composto **5d**

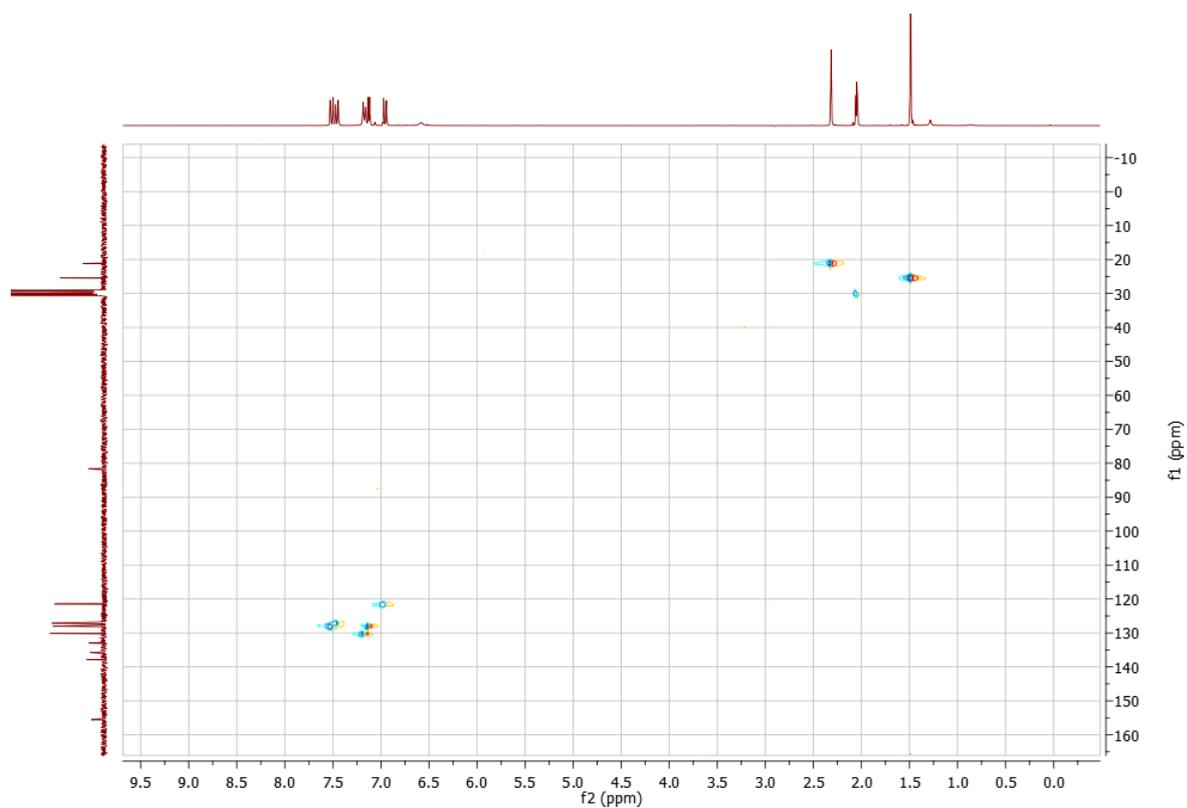


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5d**

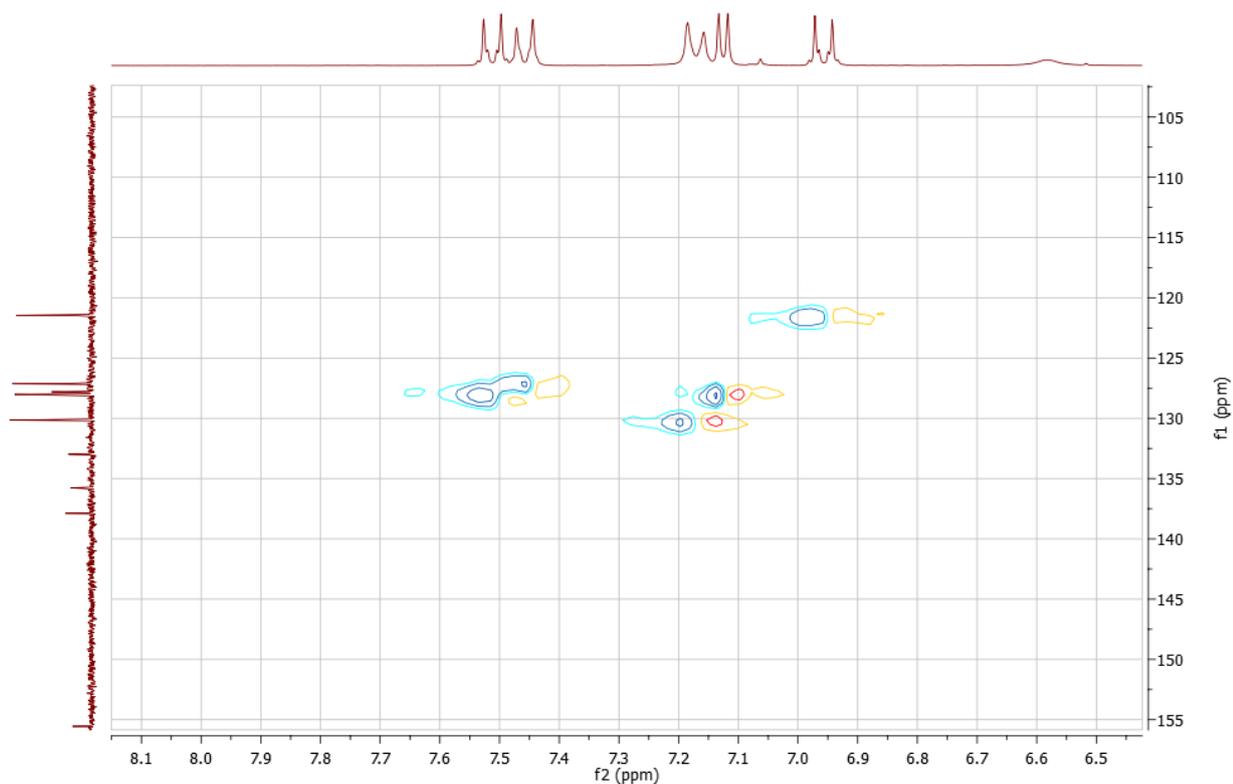


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5d**

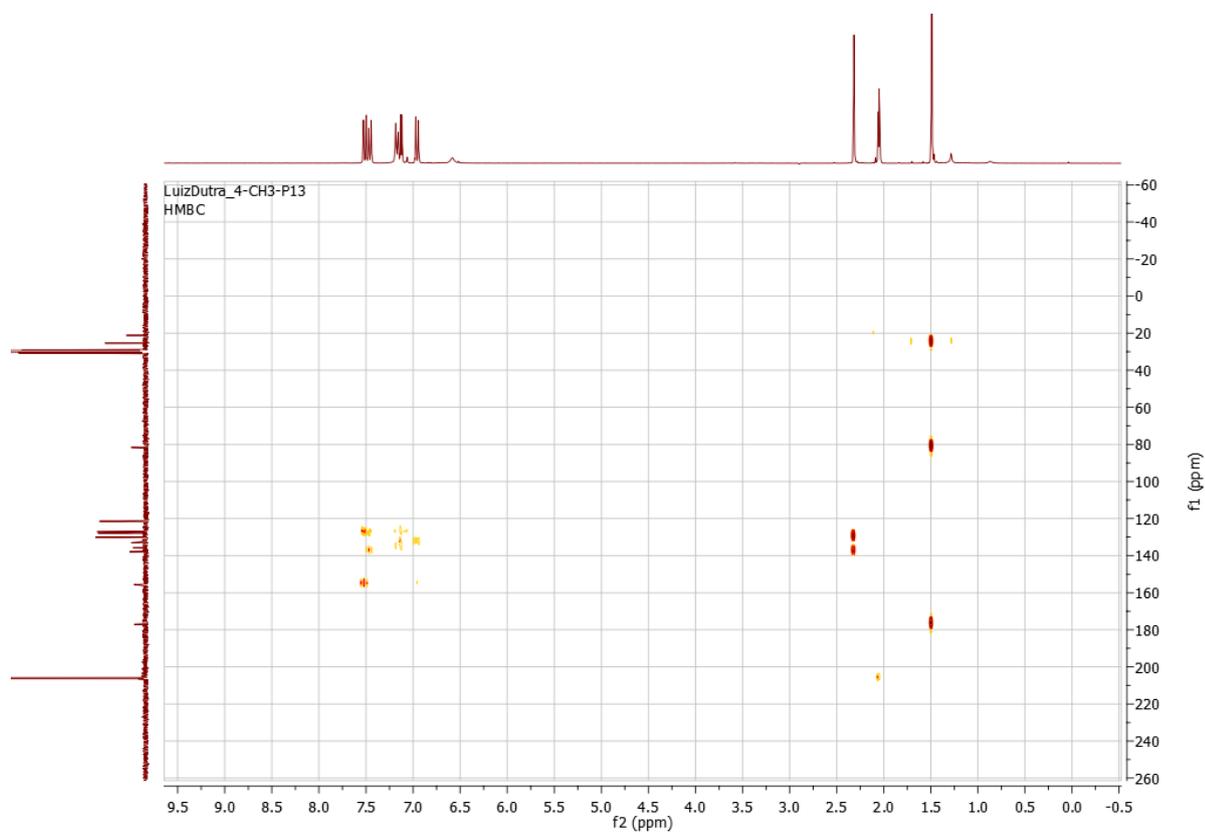


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5d**

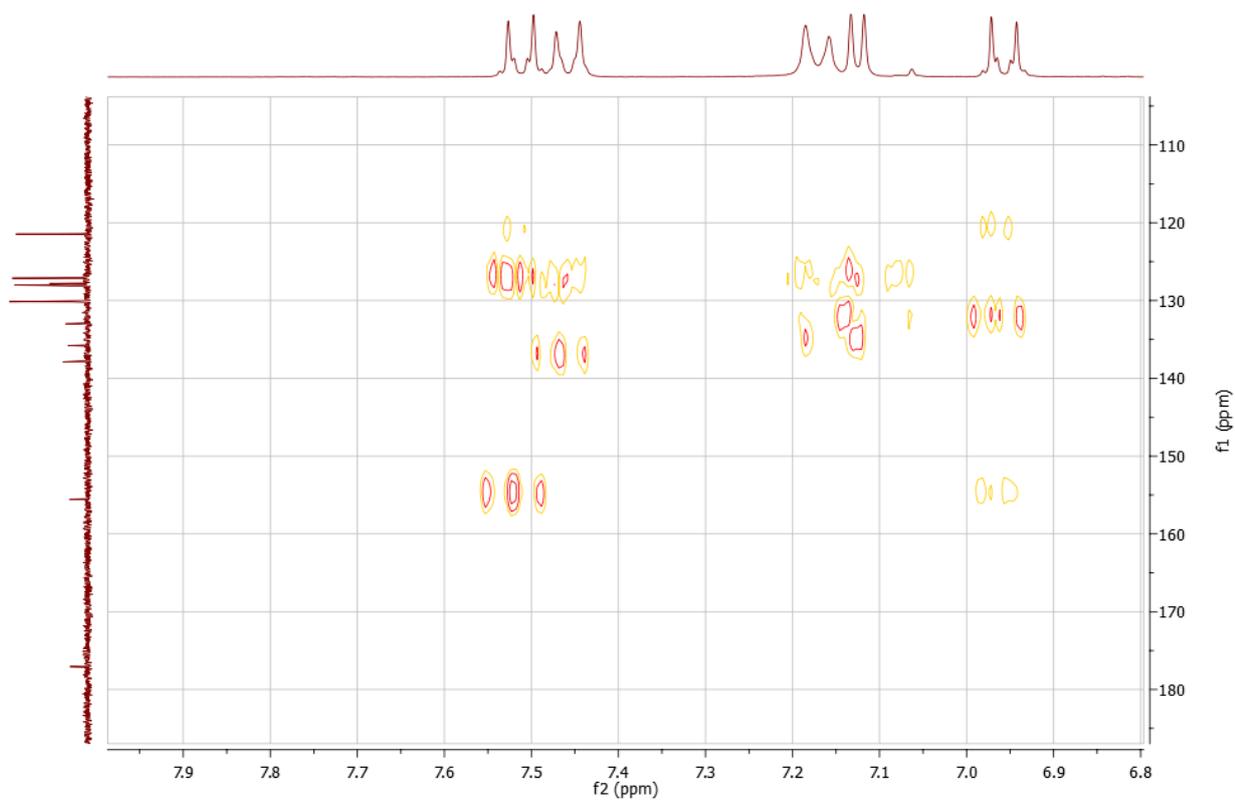


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5d**

Apêndice 15

Composto 5e

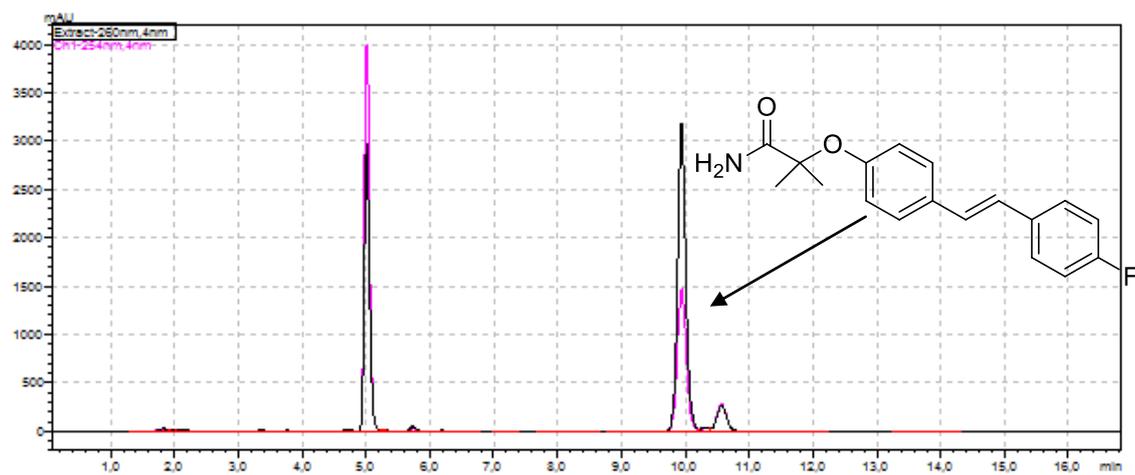


Figura: Cromatograma em CLAE-DAD analítico do composto 5e

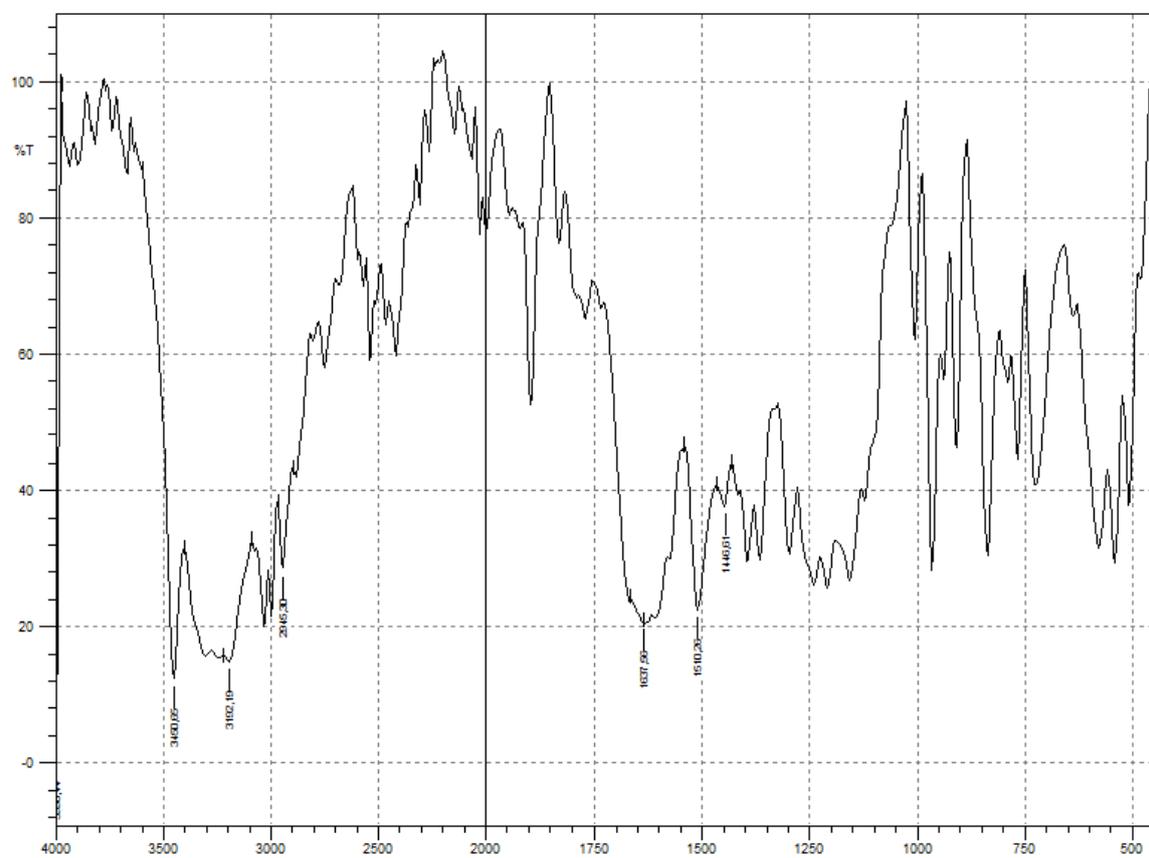


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 5e

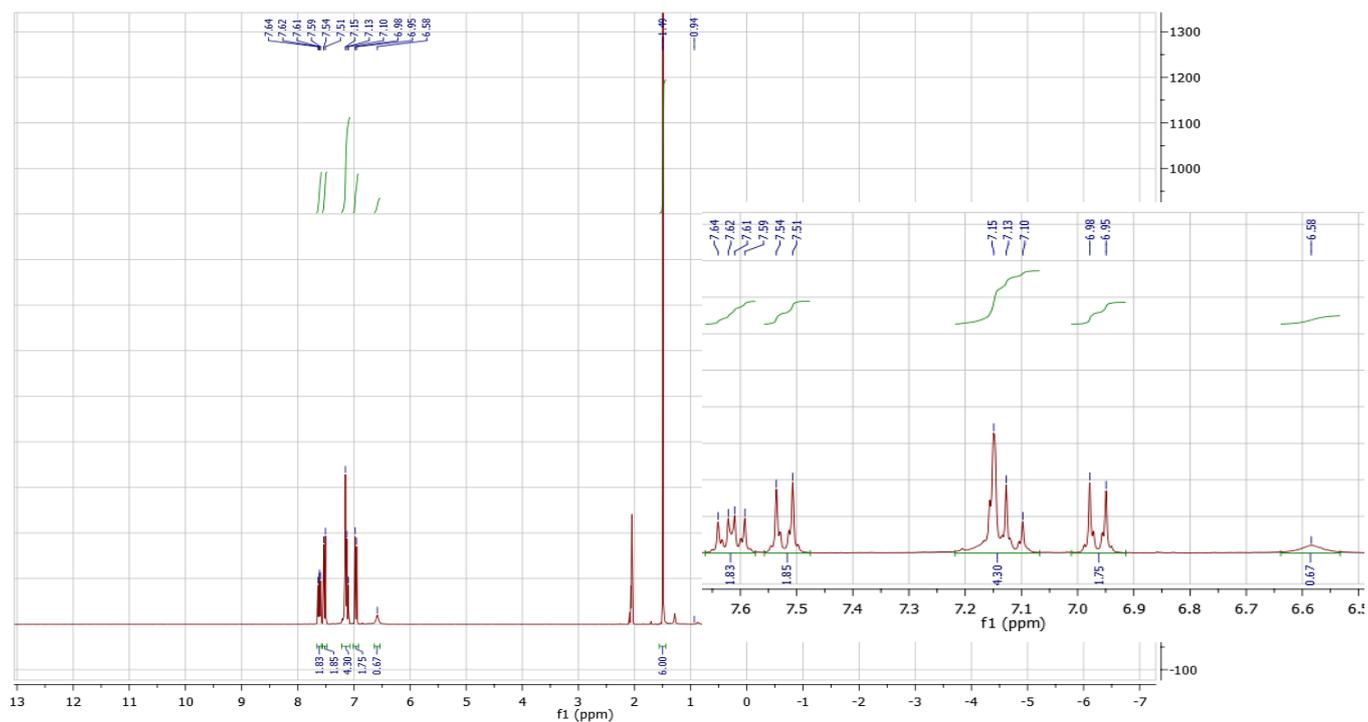


Figura: RMN de ^1H do composto 5e

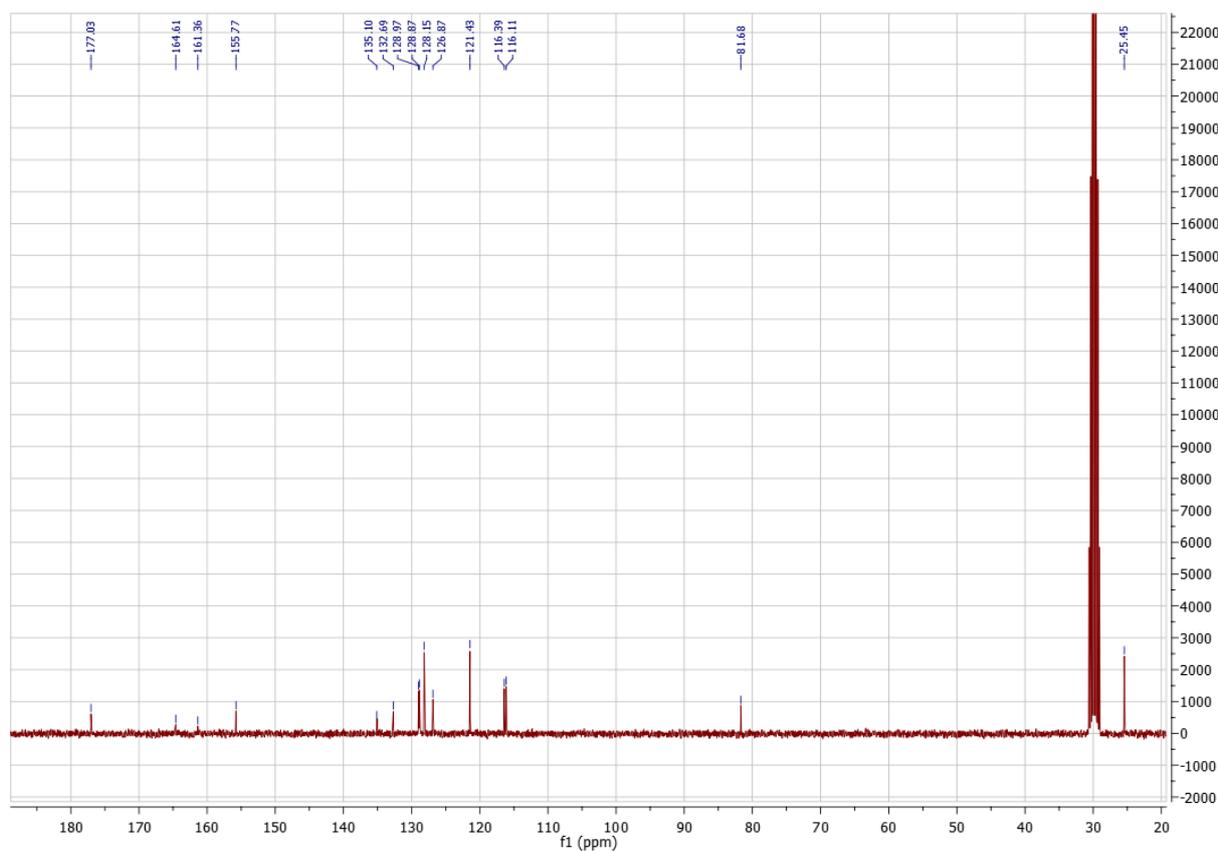


Figura: RMN de ^{13}C do composto 5e

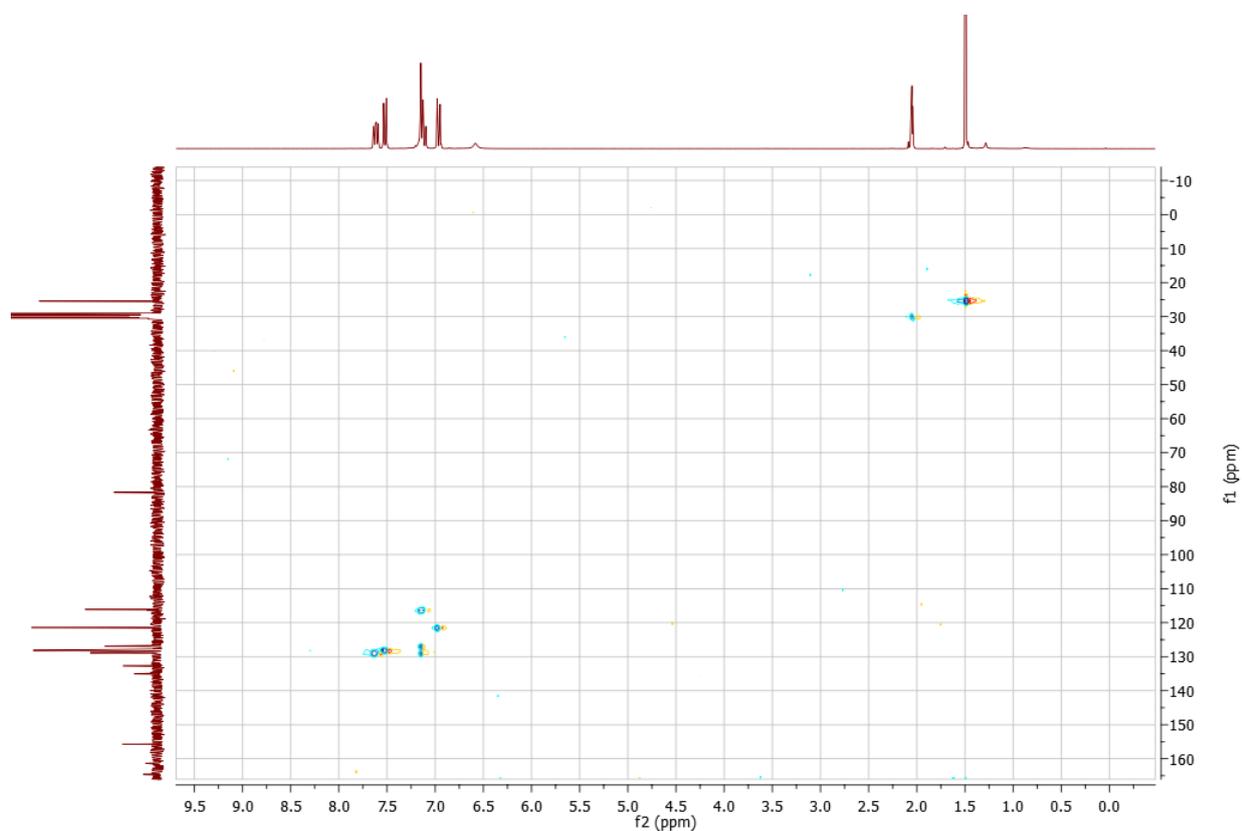


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5e**

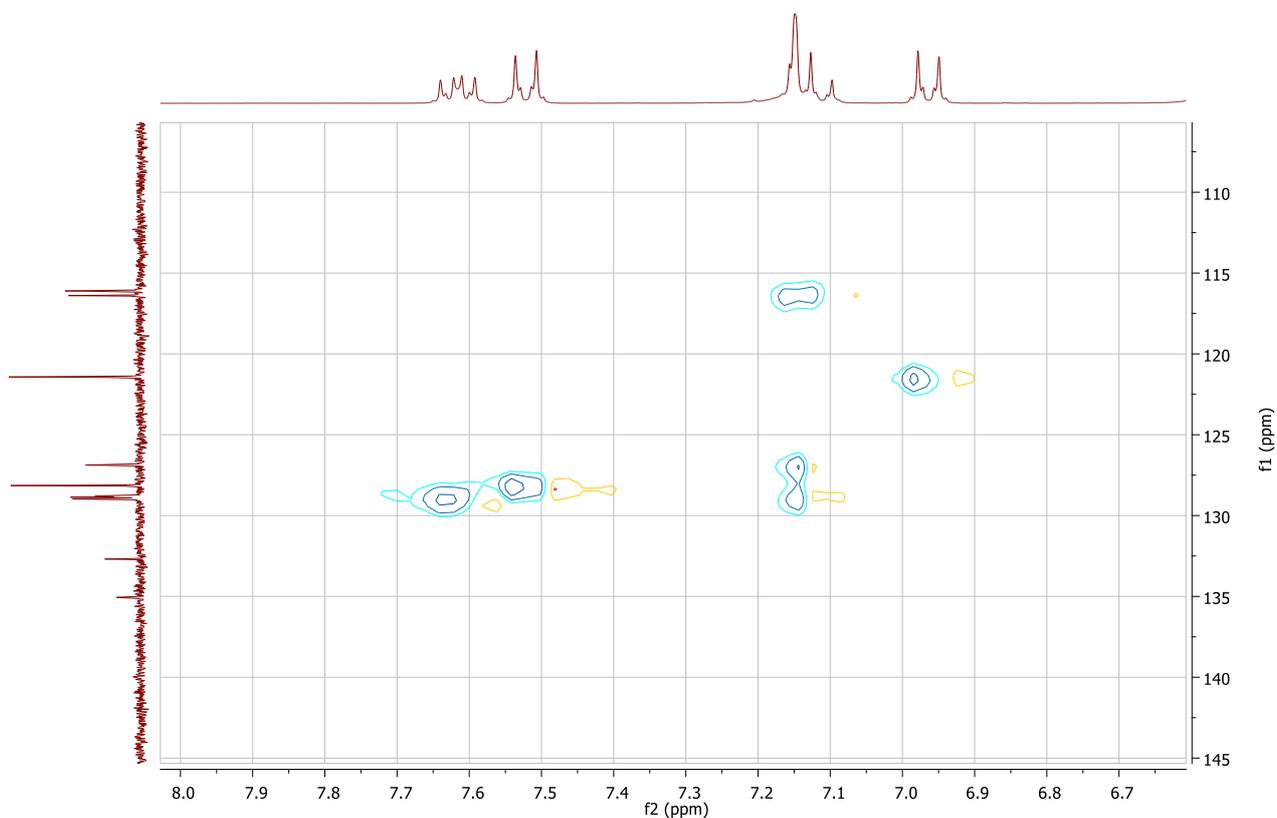


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5e**

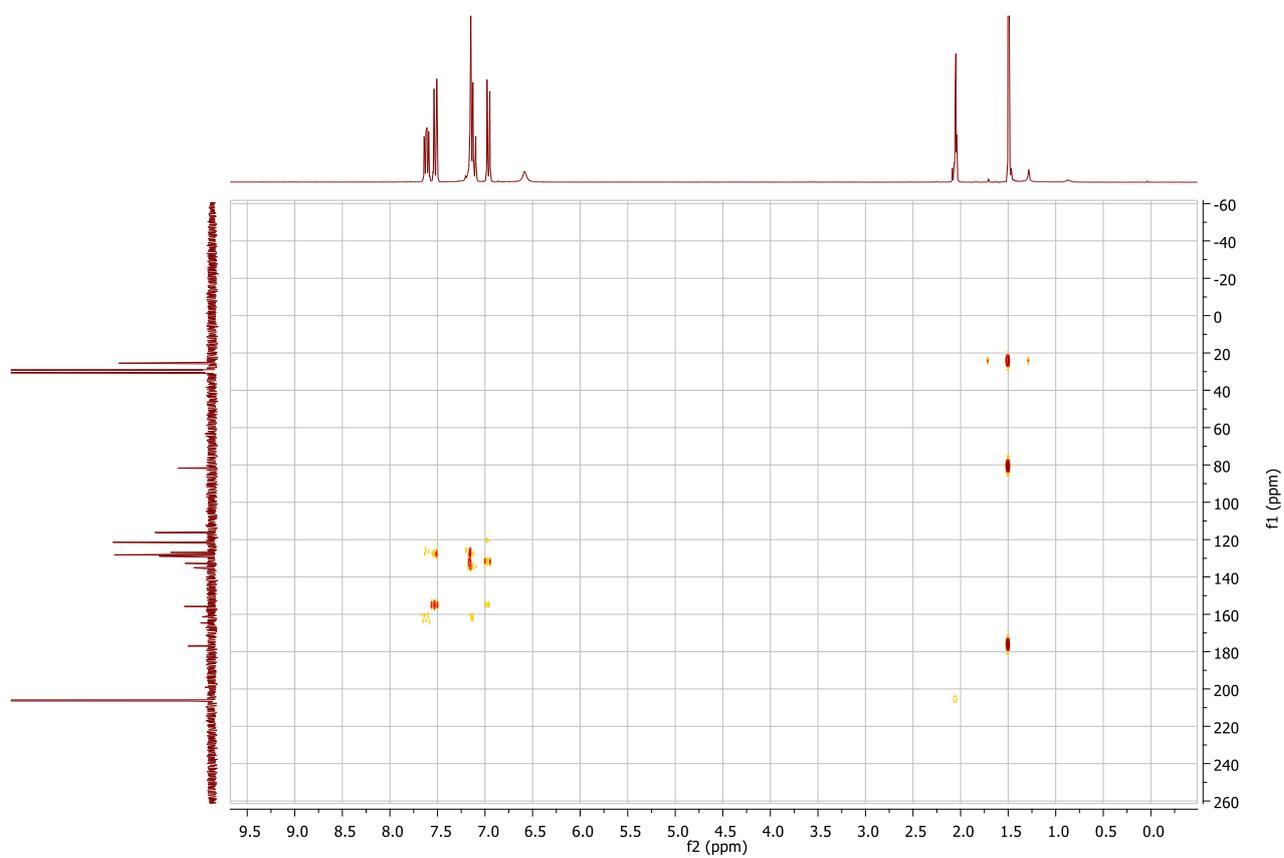


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto 5e

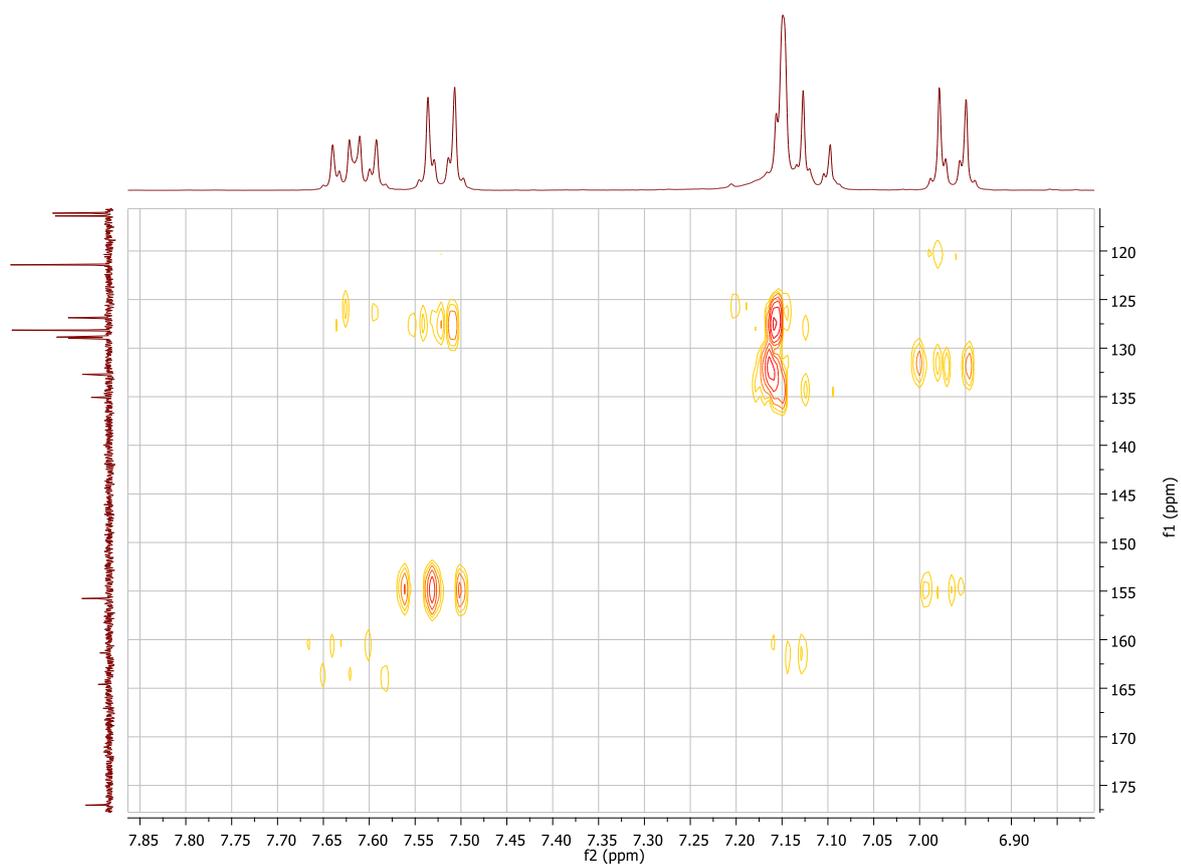


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HMBC do composto 5e

Apêndice 16

Composto 5f

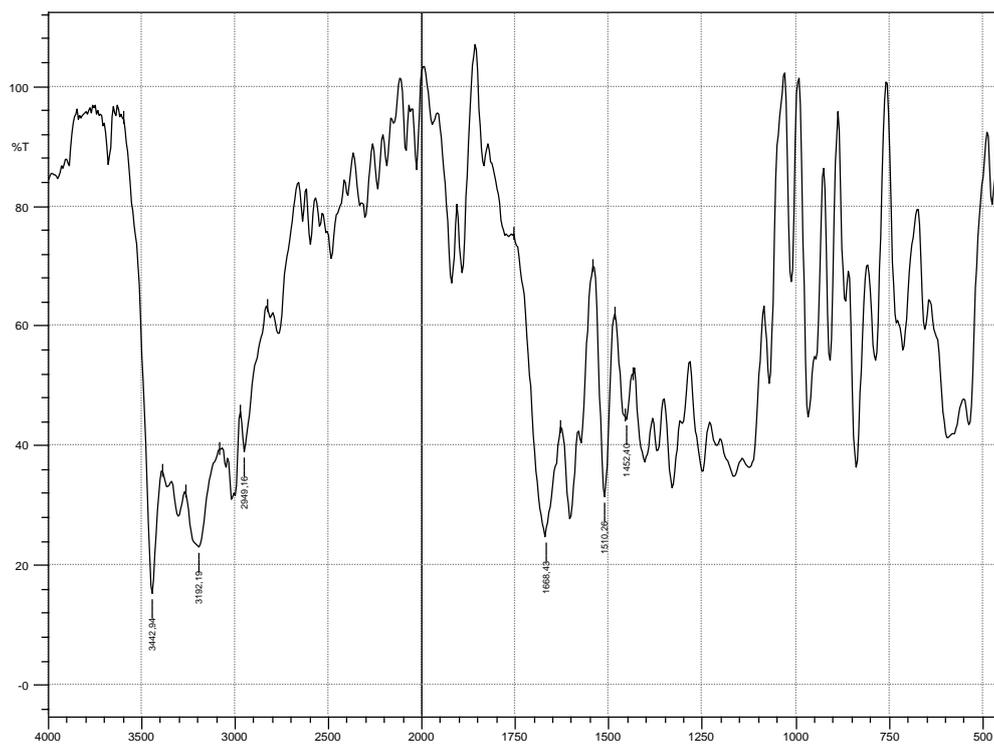


Figura: Espectro de absorção no infravermelho do composto 5f

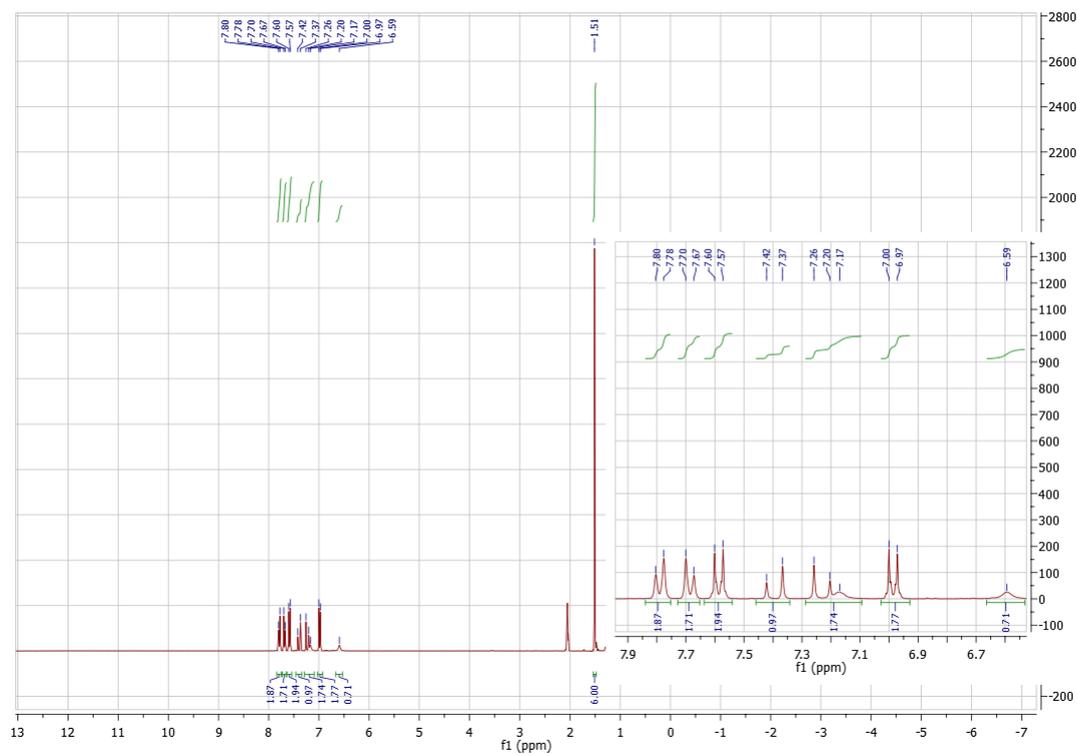


Figura: RMN de ¹H do composto 5f

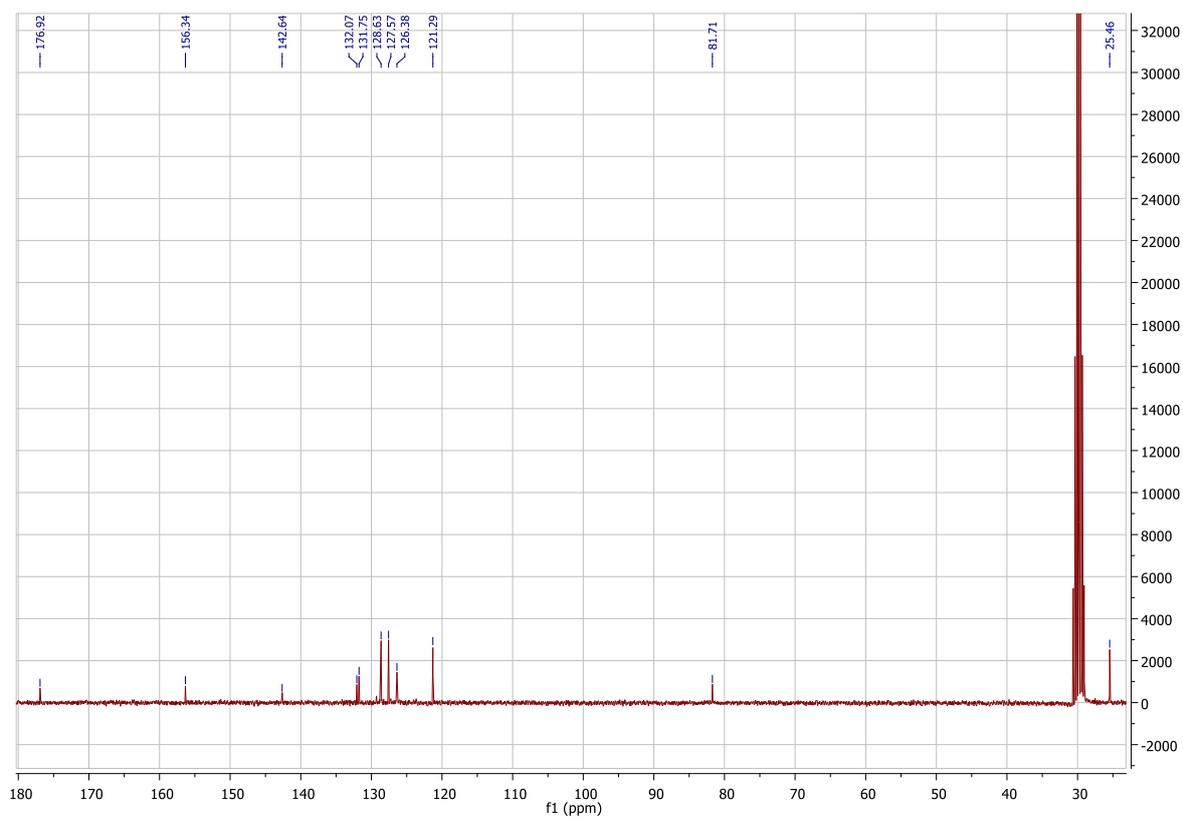


Figura: RMN de ^{13}C do composto 5f

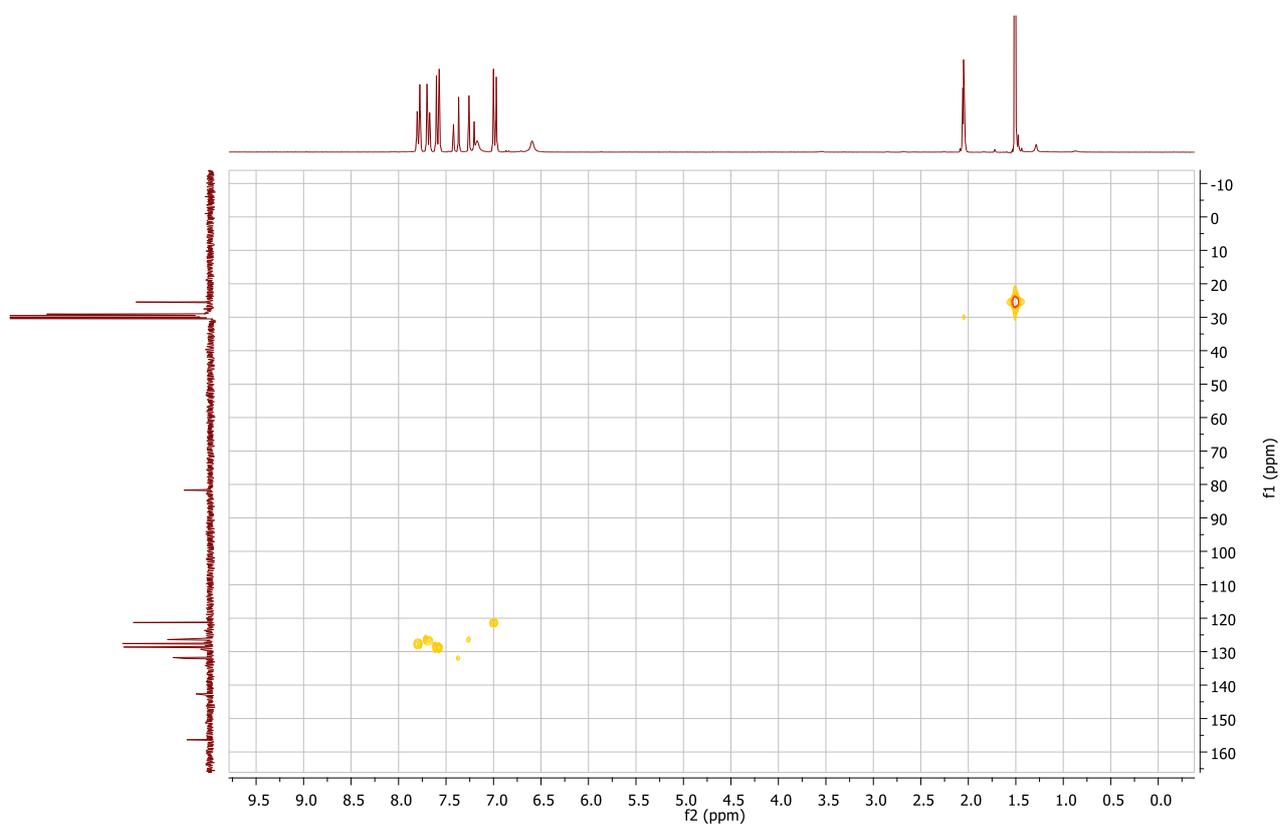


Figura: Correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5f**

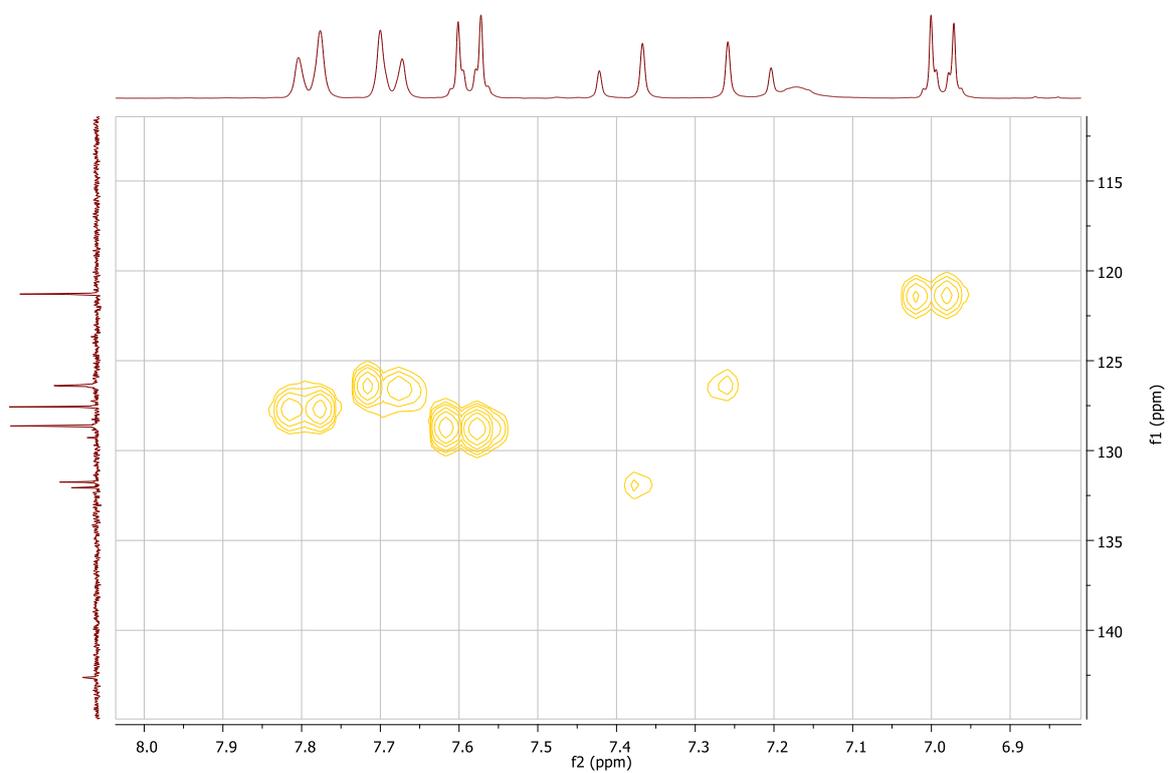


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HSQC do composto **5f**

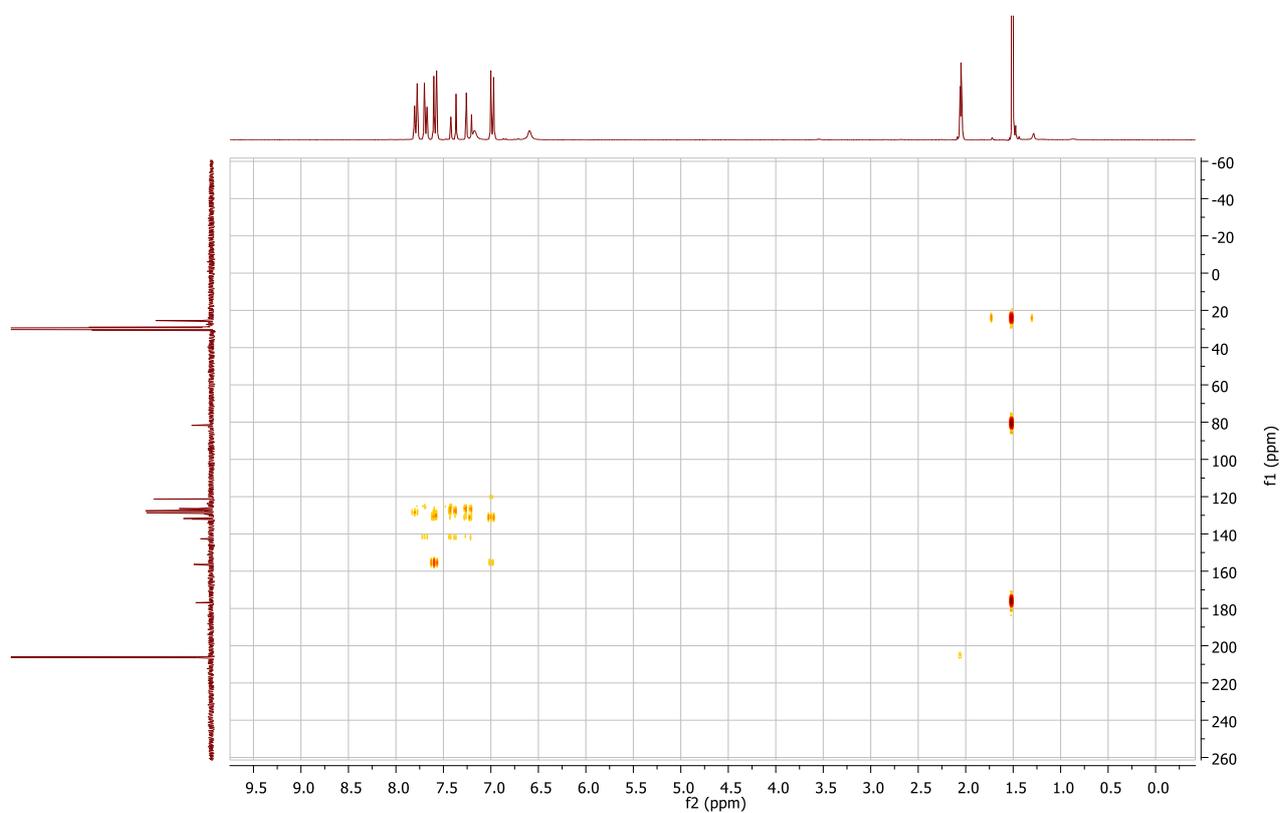


Figura: Correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5f**

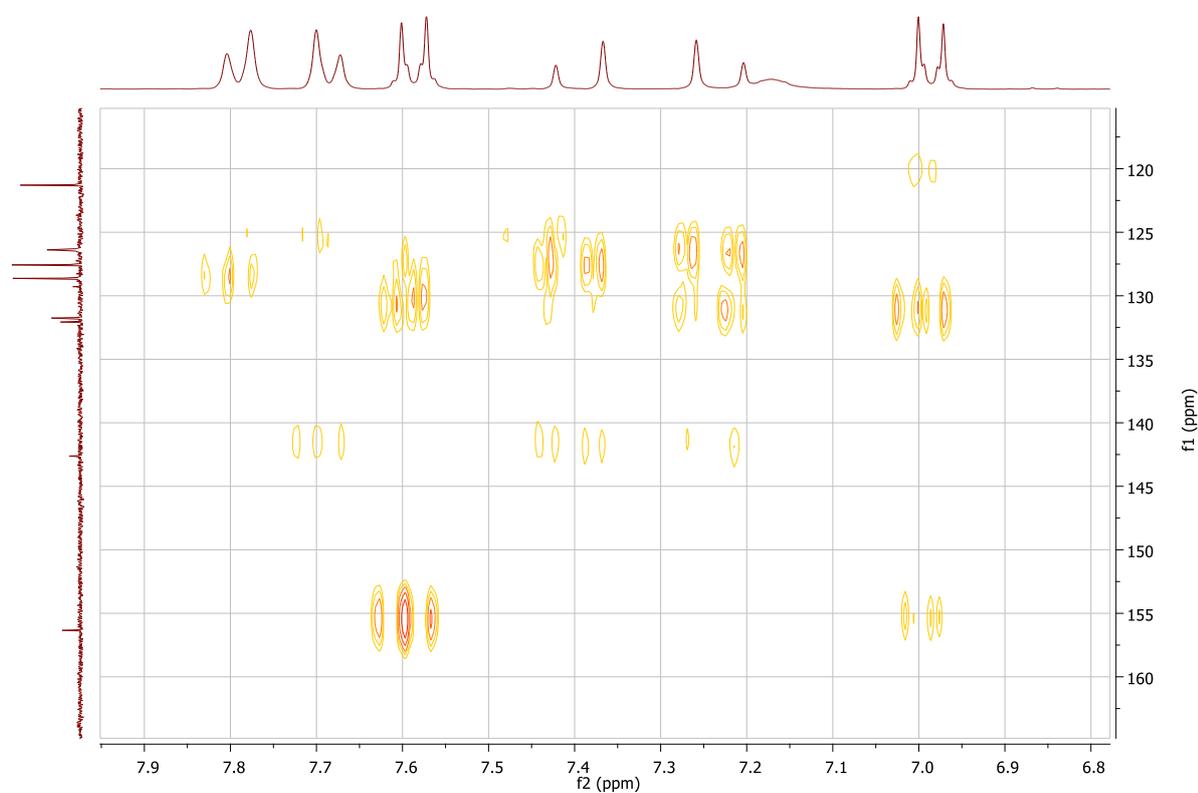


Figura: Ampliação da correlação no mapa de contorno de HMBC do composto **5f**