

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

RAQUEL MELLO DA ROSA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIOXIDANTE DE
CALCOGENO-AMINO TIMIDINAS (CAT)**

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Raquel Mello da Rosa

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIOXIDANTE DE CALCOGENO-AMINO TIMIDINAS (CAT)

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado do programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Mello da Rosa, Raquel
Síntese e Atividade Antitumoral e Antioxidante de
Calcogeno-amino Timidinas (CAT) / Raquel Mello da
Rosa.- 2016.
121 f.; 30 cm

Orientador: Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues
Coorientadores: Luciano Dornelles, Gilson Rogério Zeni
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2016

1. Calcogeno-amino Timidinas (CAT) 2. Atividade
antitumoral 3. Atividade antioxidante I. Dorneles
Rodrigues, Oscar Endrigo II. Dornelles, Luciano III.
Zeni, Gilson Rogério IV. Título.

Raquel Mello da Rosa

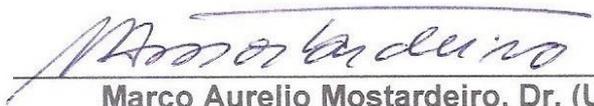
**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIOXIDANTE DE
CALCOGENO-AMINO TIMIDINAS (CAT)**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado do programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Naturais e Exatas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Química**.

Aprovado em 29 de julho de 2016:



Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Marco Aurelio Mostardeiro, Dr. (UFSM)



Leonardo Fantinel, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Serei infinitamente grata a todos os colegas e amigos que passaram pelo LabSelen!

A todos os antigos e atuais colegas de trabalho e que são também amigos. Obrigado pela amizade, incentivo e compreensão de vocês, MUITO OBRIGADO!

A todos os amigos da FAMÍLIA LabSelen que sempre me incentivaram e estiveram dividindo comigo em todos os momentos. A amizade de vocês certamente será para a vida toda. Obrigado pela compreensão nos momentos em que eu estava mal humorada pela manhã

Aos professores Drs. Oscar e Luciano pela orientação e amizade de anos e anos e muitos anos. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, por estarem sempre dispostos a nos ouvirem atenderem e compreenderem todos os alunos. Obrigada mesmo professor Oscar pela confiança e por acreditar que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos amigos e colegas do laboratório do prof. Gilson, Cláudio, Hélio e Nilo pela amizade e por toda ajuda prestada durante este trabalho.

Ao serviço de RMN pelas análises, competência e agilidade no desenvolvimento de seu trabalho, principalmente quando eu precisava fazer minhas amostras com telúrio e pediu urgência. Desculpem-me por estas não serem solúveis em quase nenhum solventes e vocês sempre faziam minhas amostras super diluídas.

Aos professores e funcionários do Departamento de Química da UFSM em especial a tia Tereza que sempre deixou o nosso ambiente de laboratório limpo e organizado e ao Ademir e a Valeria pelo competente trabalho frente à Coordenação do PPGQ, e também por me ajudarem a adquirir bolsa de estudos depois de um semestre sem auxílio financeiro.

Aos professores João B. (JB), Gilson e a prof.^a Cristina pela amizade e incentivo durante este período.

Aos professores Marco Aurelio, Leonardo e Luciano me concederem o tempo de vocês para ler e contribuir com este trabalho!

Obrigada professores pelas sabias palavras de ajuda, sugestões, opiniões e pontos de vista que farão muita diferença nessa dissertação

“A coragem não é a ausência do medo mas decisão de que algo é mais importante que o medo, o corajoso pode não viver p sempre, mas o cauteloso não vive plenamente”

À agência financiadora CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

SÍNTESE E ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIOXIDANTE DE CALCOGENO-AMINO TIMIDINAS (CAT)

AUTOR: Raquel Mello da Rosa
ORIENTADOR: Prof. Dr. Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

O presente trabalho tem como finalidade apresentar a síntese de uma nova classe de 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**) contendo derivados de organocalcogênios do nucleosídeo timidina (3-azidotimidina **1**) via processo *one-pot* envolvendo avaliação antioxidante e antitumoral. Planejou-se a elaboração de uma rota sintética que envolveu duas transformações em uma única etapa reacional. Os compostos apresentaram variações em posições específicas, derivadas da adição de organocalcogênios na posição 5 da 3-azidotimidina **1**.

A reação consiste na clivagem dos respectivos dicalcogenetos arílicos (**4a-j**) em THF seguido pela adição da agente redutor de NaBH₄ e EtOH, levando a formação das espécies nucleofílicas de calcogênio que levou a introdução da porção organocalcogênio. Adicionalmente nesta mesma etapa, foi realizada a redução da azida do grupamento da 3-azidotimidina mesilada **3** para as respectivas aminas desejadas, formando as 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**) em rendimentos na faixa de 20-82%.

Os estudos do tempo reacional e a quantidade do agente redutor foram realizados visando a otimização para as duas etapas reacionais desejadas, o que propiciou o acesso rápido a uma gama de compostos inéditos. Com os compostos devidamente caracterizados, estes foram submetidos a avaliações quanto sua potencialidade antioxidante e antitumoral.

Palavras-chaves: Nucleosídeos. Calcogeno-amino Timidina (CAT). Atividade Antioxidante e Antitumoral.

UNIVERSIDADE FEREDAL DE SANTA MARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Dissertação de Mestrado

ABSTRACT

SYNTHESIS, ANTIOXIDANT AND ANTITUMORAL ACTIVITIES OF CHALCOGENO-AMINO THYMIDINE DERIVATIVES

AUTHOR: Raquel Mello da Rosa.
Academic Advisor: Prof.Dr.Oscar Endrigo Dorneles Rodrigues

This work aims the synthesis of new 5'-arylchalcogenil-3-amino-thymidine (**5a-m**) derivative containing chalcogenium or thymidines nucleosides derivatives (3-azidothymidine **1**) with potential antioxidant and antitumor evaluation. The development of a synthetic route involving two transformations in a single reaction step was planned. The compounds exhibit changes at specific positions consisting in adding organochalcogenium at position 5 of 3-azidothymidine **1**.

The cleavage reaction of the corresponding aryl dichalcogenetes (**4a-j**) in THF followed by the addition of the reducing agent NaBH₄ and EtOH, leading to the formation of nucleophilic species to react chalcogen through a bimolecular nucleophilic substitution reaction, these nucleophiles reacted with 3-azidothymidine mesilada **3** and along this same protocol, the reduction of the azide grouping of 3-azidothymidine mesilada **3** to their desired amines was performed forming the 5'-arylchalcogenil-3-amino-thymidine (**5a-m**) in yields in the range 20 -82%.

The studies of reaction time and the amount of reducing agent were performed in order to optimize for the two desired reaction steps, which allowed quick access to a range of novel compounds. With properly characterized compounds, they have undergone as its antioxidant and anti-tumor potential

Keywords: Nucleosides. Chalcogeno-aminothymidine. Antioxidant and Antitumoral Activity.

FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA MARIA
CHEMISTRY POST-GRADUATE PROGRAM
Master Dissertation

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------|--|
| ALBN | Azobisisobutironitrila |
| ATTAn | 14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanóico |
| AZT | 3-azidotimidina |
| BEAS-2B | Células tumorais de brônquios |
| Boc | Dicarbonato de <i>tert</i> butila |
| CAT | Calcogeno-amino timidinas |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CCRF-CEM | Células tumorais leucêmicas |
| COSY | <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i> (do inglês) |
| DCM | Diclorometano |
| d | Dupleto |
| dd | Duplo dupleto |
| DBA | 3,3' -diamonobenzidina |
| DNA | Desoxirribonucleico |
| DPPH | 2,2-difenilpicrilhidrazil, 1,1-di(feil)-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazila |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EMAR | Espectroscopia de Massas de Alta Resolução |
| ESI | <i>Electro Spray Ionization</i> (do inglês) |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GPx | Glutaciona peroxidase |
| h | Horas |
| HBV | Vírus da Hepatite B |
| HCV | Vírus da Hepatite C |
| HEP-G2 | Hepatocarcinoma |
| Hz | Hertz |
| HIV | Vírus da imunodeficiência humana |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (do inglês) |

| | |
|--------------|--|
| HSV | Vírus da herpes tipo 1 |
| HT-29 | Carcinoma de cólon de útero |
| HT-1098 | Fibrosarrose humana |
| HTB54 | Carcinoma de pulmão |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| K-562 | Leucemia |
| MCF-07 | Adenocarcinoma |
| MCF-10a | Células tumorais da mama |
| MG-22a | Células Hepáticas |
| MHz | Megahertz |
| MTT | (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio) |
| Ni Raney | Sal alumina de níquel |
| m | Multiplete |
| PC-3 | Câncer de Próstata |
| ppm | Parte por milhão |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| RNM | Ribonucleico |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| s | Simpleto |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| sl | Simpleto largo |
| <i>TBARS</i> | Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |
| Trx-R | tioredoxina redutase |
| t | Triplete |
| t.a. | Temperatura ambiente |
| THF | Tetraidrofurano |
| TMS | Trimetilsilano |
| UV | Ultravioleta |
| λ | Comprimento de onda |
| δ | Deslocamento químico |
| °C | Graus Celcius |
| 184B5 | Células Tumorais Benignas da mama |

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| AGRADECIMENTOS | vii |
| RESUMO | ix |
| ABSTRACT | xi |
| LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | xiii |
| INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... | 19 |
| REVISÃO DA LITERATURA..... | 25 |
| 1.1 Nucleosídeos | 25 |
| 1.2 Organocalcogênios | 33 |
| 1.3 Reduções de azidas orgânicas | 46 |
| 2. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... | 57 |
| 2.1 Análise Retrossintética..... | 57 |
| 2.2 Obtenção da 5'-O-(metanosulfonyl)-3-azidotimidina (3)..... | 58 |
| 2.3 Obtenção dos 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (5a-m) | 59 |
| 2.4 Análise da atividade antitumoral..... | 73 |
| 2.5 Análise de Atividade Antioxidante e Toxicidade Celular..... | 77 |
| 2.5.1 Análise de Atividade Antioxidante..... | 77 |
| 2.5.2 Toxicidade Celular | 82 |
| 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 87 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL..... | 91 |
| 4.1 Materiais e Métodos..... | 91 |
| 4.1.1 Ponto de Fusão | 91 |
| 4.1.2 Rota Evaporadores..... | 91 |
| 4.1.3 Reagentes e Solventes..... | 92 |
| 4.1.4 Cromatografia em coluna (CC)..... | 92 |
| 4.1.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 92 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.6 Espectroscopia de Massas de Alta Resolução | 92 |
| 4.1.7 Análise dos dados para Avaliação Biológica (Antitumoral). | 93 |
| 4.1.8 Análise de dados das Atividades Antioxidantes e Toxicológico. . | 93 |
| 4.2 Procedimentos Experimentais | 93 |
| 4.2.1 Procedimento geral para síntese do mesilato derivado da 3-azidotimidina..... | 93 |
| 4.2.2 Procedimento geral para a síntese 5'-arilcalcogenil-3-amino-timidina 5a-m derivados da 3-azidotimidina | 94 |
| 4.3 Preparo das soluções para avaliação biológica (antitumoral)..... | 101 |
| 4.3.1 Cultivo Celular e Ensaio de Proliferação..... | 101 |
| 4.4 Metodologia de Análise Antioxidante..... | 102 |
| 4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>TBARS</i>)..... | 102 |
| 4.4.2 Ensaio de trapeamento do radical (<i>DPPH</i>). | 102 |
| 4.4.3 Atividade Mimética da Tiol Peroxidase (<i>GPx</i>) | 103 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 107 |
| 6. ESPECTROS DE RMN SELECIONADOS..... | 115 |
| 7. ESPECTROS DE EMAR SELECIONADOS..... | 131 |

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Atualmente, a versatilidade entre os diversos ramos da síntese orgânica tem instigado os químicos a desenvolverem compostos que apresentam blocos com diferentes propriedades e que possam levar a um aumento no potencial de tais propriedades ou no surgimento de novas aplicações para estes compostos.

Um excelente exemplo dessa versatilidade é a química que envolve compostos com calcogênios, os quais estão envolvidos em inúmeros processos biológicos. Sabe-se que, os organocalcogênios são importantes no ponto de vista sintético e medicinal,¹ estando presente em diversas classes de compostos.²

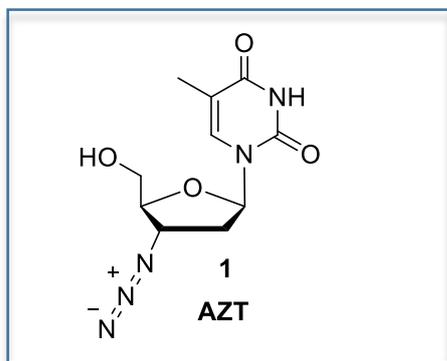
Os compostos organocalcogênios tem ganhado destaque na química medicinal como uma alternativa para o tratamento contra o câncer, visto que, a capacidade desses compostos de inibir o crescimento celular além da apoptose das células tumorais tem sido uma proposta para a prevenção do câncer.³

Por outro lado os nucleosídeos consistem de uma classe de compostos com uma variedade de aplicações biológicas.

Neste contexto, o cientista americano, Dr. Horwitz, sintetizou pela primeira vez em 1964 a 3-azidotimidina **1** (3'-azido-2',3'-dideoxitimidina) inicialmente sendo apresentada como uma droga anticancerígena.⁴ Porém, estes estudos iniciais foram abandonados por não apresentarem significativo poder antitumoral. Posteriormente, estes estudos foram retomados na década de 70, quando sua atividade antiviral foi relatada pela primeira vez, sendo o primeiro composto a apresentar atividade anti-HIV passando a fazer parte do coquetel de medicamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).⁵

A 3-azidotimidina **1** (Figura 1), também conhecida como zidovudina ou retrovir, é um nucleosídeo que tem ganhado destaque no mercado farmacêutico pela sua potencialidade biológica.⁶

Figura 1. Estrutura da 3-azidotimidina **1**.



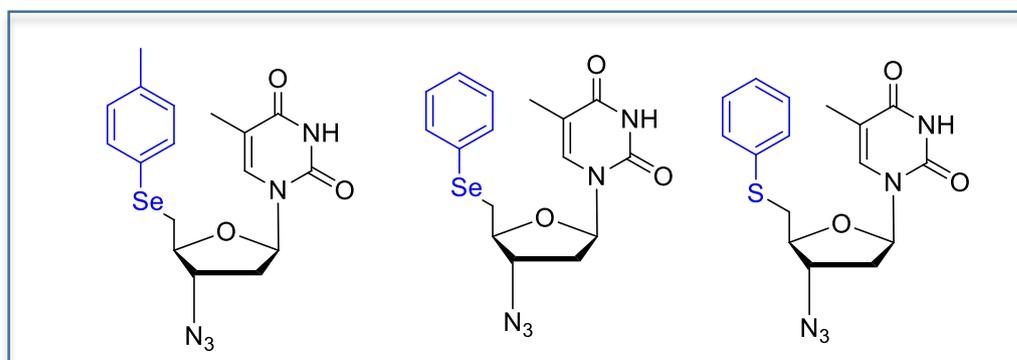
Fonte: Autora

Dessa forma, devido a estrutura da 3-azidotimidina **1** apresentar diferentes posições capazes de sofrer modificações estruturais, novos estudos têm sido feitos para explorar alguns fatores chave para o aumento do potencial biológico destes novos nucleosídeos.⁷

Através da introdução de diferentes funcionalizações a estes compostos em 2015, nosso grupo de pesquisa relatou a substituição do grupo hidroxila presente na estrutura 3-azidotimidina **1** por derivados de calcogenetos, a fim de observar as propriedades antioxidante e antitumoral destes novos compostos (Figura 2). Este estudo demonstrou um aumento expressivo destas propriedades com relação ao padrão 3-azidotimidina **1**.⁸

Figura 2. Estruturas de novos calcogeno-timidinas derivados da 3-azidotimidina

1.

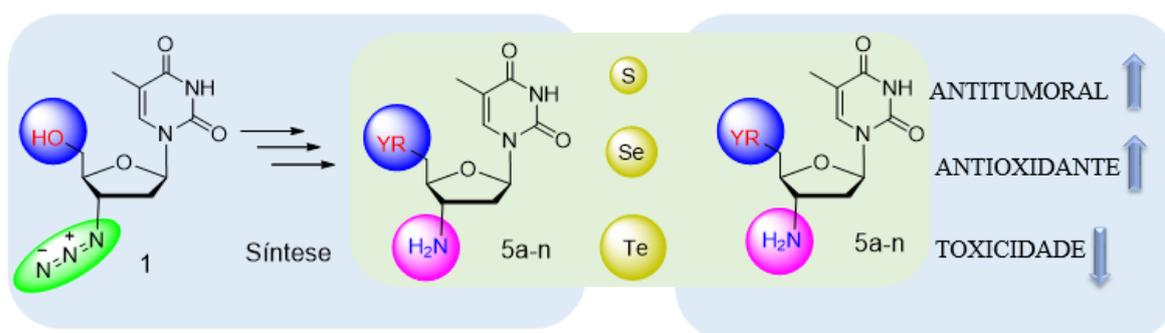


Fonte: Autora

A incorporação de átomos de calcogênio, em especial, S, Se e Te às moléculas biologicamente ativas, bem como, o desenvolvimento de novas rotas sintéticas para introdução de tais átomos é um dos principais focos de interesse do nosso grupo de pesquisa.

Tendo em vista nosso interesse no desenvolvimento de novos nucleosídeos contendo átomos de calcogênios que possuem suas atividades relatadas na literatura, planejou-se a preparação de uma série de moléculas inéditas que possuam em sua estrutura a molécula de 3-azidotimidina **1** e as várias espécies de calcogênios e posteriormente realizar as avaliações envolvendo as atividades antitumoral antioxidante destes novos compostos (Esquema 1). Planejou-se otimizar o protocolo de reação para duas transformações em uma única etapa de reação, realizar a síntese de moléculas inéditas de calcogenoaminotimidinas (CATs) bem como a identificação e caracterização dos novos compostos sintetizados.

Esquema 1. Síntese de calcogeno-amino timidinas (CATs).



Fonte: Autora

Para uma melhor compreensão, essa dissertação está dividida em 6 capítulos. No primeiro será realizada uma revisão da literatura relacionando os compostos estudados nesse trabalho, seguido do segundo capítulo onde serão descritos os resultados obtidos pela síntese também as avaliações biológicas realizadas por grupos colaboradores desse projeto e pela discussão dos mesmos. No terceiro serão realizadas algumas considerações finais importantes para o trabalho. No capítulo quatro será apresentada a parte experimental da síntese e das análises biológicas com os procedimentos adotados e equipamentos. No quinto capítulo serão listadas as referências bibliográficas utilizadas nesta dissertação, no sexto capítulo encontra-se

os espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) selecionados e por último os espectros de EMAR (Espectroscopia de Massas de Alta Resolução) selecionados.

Capítulo 1
Revisão da Literatura

1. REVISÃO DA LITERATURA

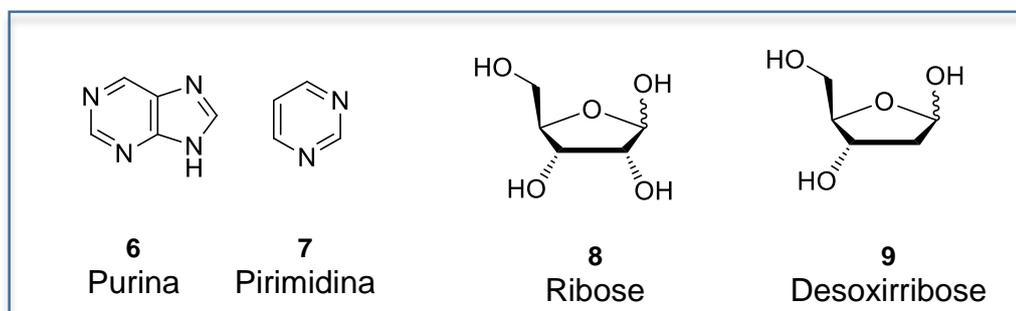
Nesta seção será apresentada uma revisão da literatura abordando os temas referentes a este trabalho. Primeiramente, será realizada uma revisão sobre nucleosídeos, em seguida, serão abordados alguns aspectos referentes à síntese e aplicação de compostos organocalcogênicos e algumas reduções de azidas orgânicas.

1.1 Nucleosídeos

Os nucleosídeos são heterociclos essenciais para a construção das macromoléculas do DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico).

Estruturalmente os nucleosídeos são glicosilaminas constituídas de uma base nitrogenada, como a purina **6** ou a pirimidina **7**, (Figura 3) ligadas a um açúcar (ribose **8** ou desoxirribose **9**).⁹

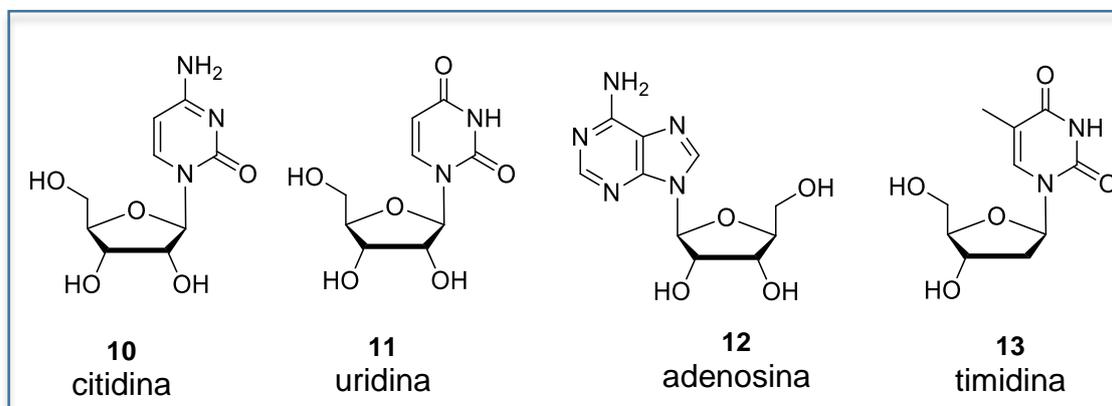
Figura 3. Moléculas que compõe os nucleosídeos.⁹



Fonte: Autora

Estes açucares ligam-se através da amina da base nitrogenada formando uma série de nucleosídeos, (Figura 4), como por exemplo a citidina **10**, uridina **11**, adenosina **12**, timidina **13**.

Figura 4. Nucleosídeos de ocorrência natural.⁹

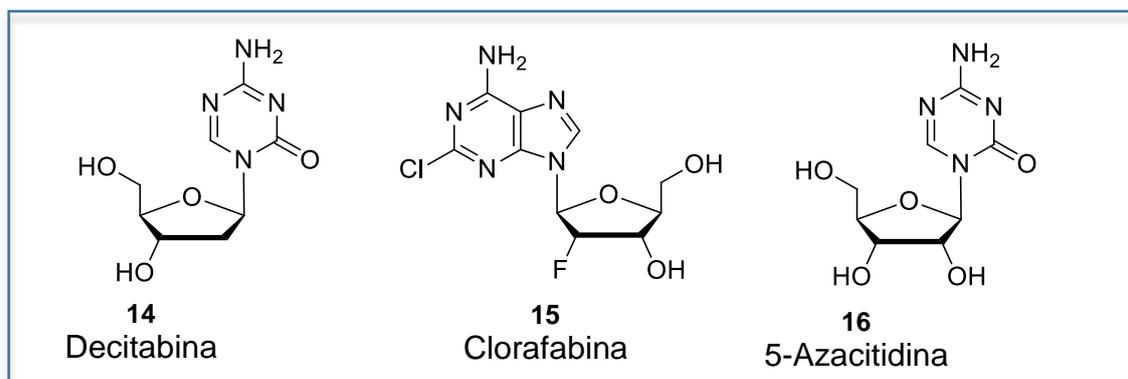


Fonte: Autora

No organismo, os nucleosídeos podem ser fosforilados no interior das células, produzindo nucleotídeos e desta forma serem incorporados ao DNA e RNA, desempenhando funções essenciais nos organismos vivos.⁹

Nos últimos anos, o uso de análogos de nucleosídeos tem ganhado papel de destaque no tratamento de diversas enfermidades, principalmente devido a importância dos nucleosídeos endógenos no organismo.⁷ Além disso, tem sido alvo de estudos para tratamento contra diversas doenças como agentes antivirais e anticancerígenos.¹⁰ Entre estes, pode-se citar a decitabina **14**,¹¹ clofarabina **15**,¹² e a 5-azacitidina **16**,¹³ nucleosídeos aprovados para o tratamento de síndromes mielodisplásicas e leucemias, (Figura 5).

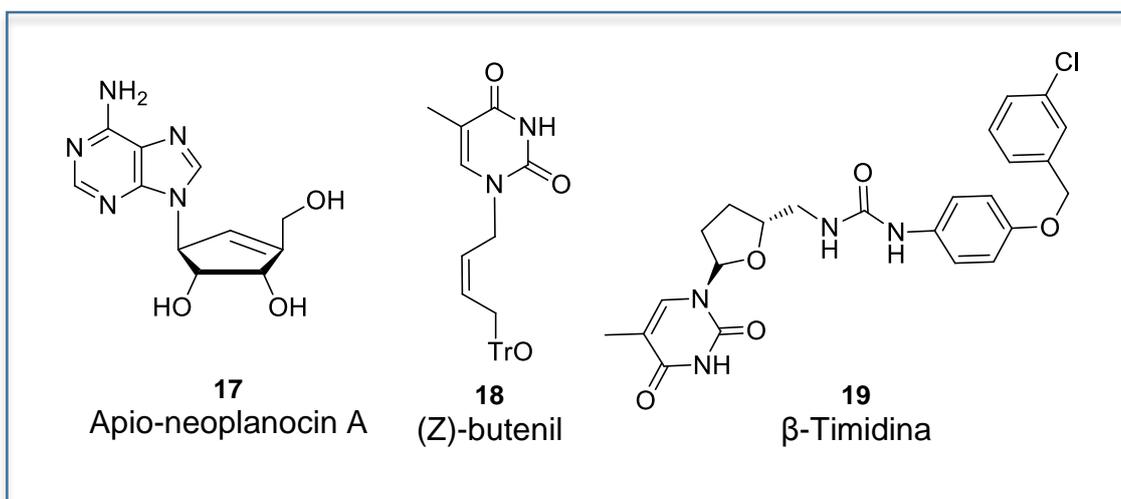
Figura 5. Nucleosídeos com atividade antitumoral.¹¹⁻¹³



Fonte: Autora

Os análogos dos nucleosídeos constituem uma importante classe de compostos biologicamente ativos e estão sendo amplamente utilizados como novos fármacos. A Apio-neoplanocin A **17**, (Z)-butenil **18**, β -Timidina **19** (Figura 6), são exemplos de nucleosídeos que sofreram alterações na sua estrutura básica, proporcionando efetivos resultados quanto a atividade biológica.¹⁴

Figura 6. Análogos de nucleosídeos com propriedades biológicas.¹⁴

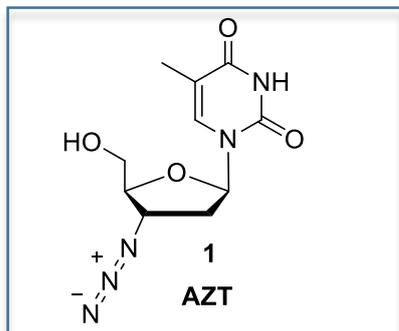


Fonte: Autora

O nucleosídeo mais conhecido atualmente, o AZT (3' -azido-2', 3' -dideoximidina) foi sintetizado pela primeira vez por Horwitz em 1964 e inicialmente apresentado como um composto com propriedades antitumorais.⁴ No entanto, por não apresentar o resultado esperado, estes estudos foram abandonados, sendo retomados no início da década de 70 quando foi identificada sua potencialidade como agente antiviral, sendo que, no ano de 1985 foi o primeiro composto a apresentar ação anti-HIV.⁵

Um ano depois, 3-azidotimidina **1** (Figura 7), foi aprovada pelo “Food and Drug Administration” FDA – órgão de controle sobre produtos farmacêuticos e alimentícios tendo sua venda permitida em 1987. Após a descoberta dessa potencialidade, o AZT, também conhecido por Azidotimidina, Zidovudina ou Retrovir passou a ser o fármaco utilizado para o combate ao vírus HIV.¹⁵

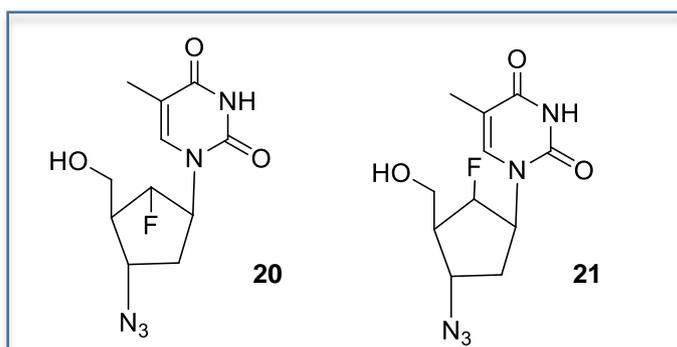
Figura 7. Estrutura da 3-azidotimidina **1**.



Fonte: Autora

No ano de 1989 a 3-azidotimidina **1** já estava disponível para comercialização quando Fletcher e colaboradores¹⁶ sintetizaram uma classe de compostos com o objetivo de que estes fossem mais estáveis do que a 3-azidotimidina **1**. Para isso, seria necessário substituir o anel da pentose por uma unidade fluorometilênica, (Figura 8). Depois de várias etapas o produto 6'-fluorocarbocíclico-3-azidotimidina foi obtido e para a surpresa dos pesquisadores, o isômero **20** mostrou-se mais capaz de combater as células infectadas com HIV que o composto **21**.¹⁶

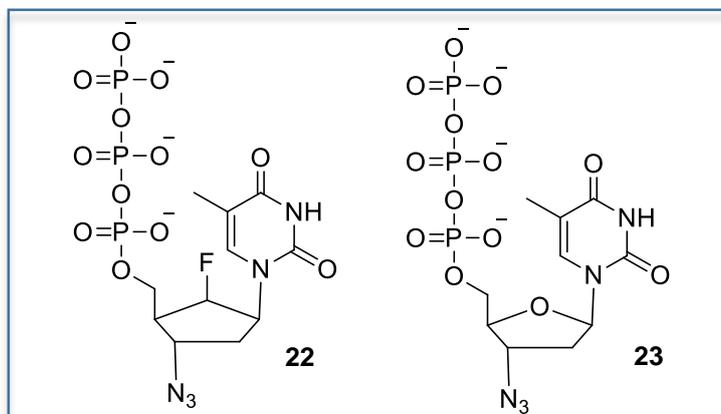
Figura 8. Estrutura da 6'-fluorocarbocíclico-3-azidotimidina.¹⁶



Fonte: Autora

Com base nestes resultados, foram preparados os compostos 3-azidotimidina-trifosfato **22** e também o trifostado 6'-fluorocarbocíclico-3-azidotimidina **23** (Figura 9), com o objetivo de testar a inibição da transcriptase reversa do HIV. Após as avaliações, foi observado que o composto **23** mostrou-se mais eficiente com relação ao análogo **22**.

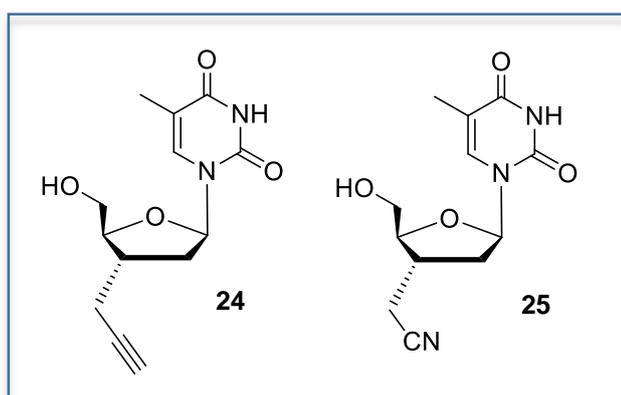
Figura 9. Estrutura dos trifosfatos sintetizados.¹⁶



Fonte: Autora

A fim de explorar novas funcionalizações em análogos de nucleosídeos, no ano de 1990, Flandort e colaboradores sintetizaram a 3'-deoxi-3'-(2-propinil)-timidina **24** e a 3'-cianometil-3'-deoxitimidina **25**, (Figura 10). Estes novos análogos da timidina foram preparados a fim de adicionar uma ligação carbono-carbono na posição 3 da porção correspondente ao açúcar.¹⁷

Figura 10. Estruturas de nucleosídeos análogos da timidina.¹⁷



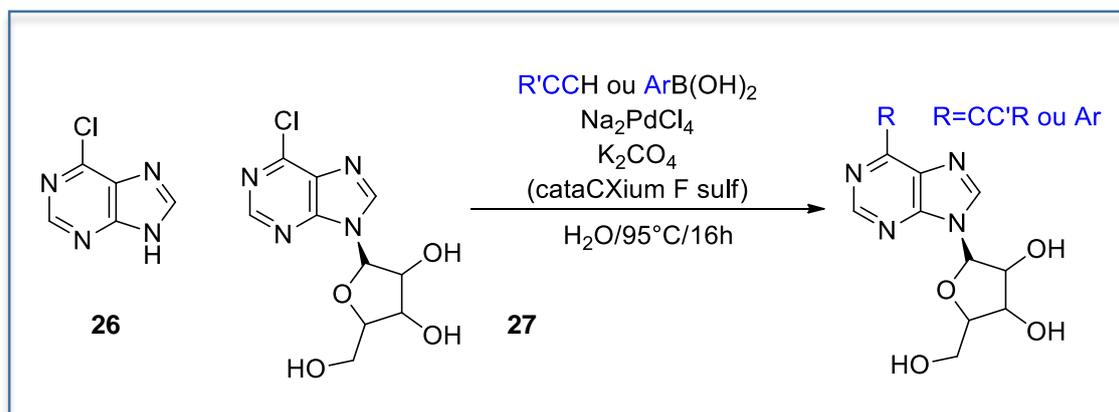
Fonte: Autora

Mais recentemente, a pesquisa com análogos de nucleosídeos estendeu-se para inúmeros ramos da síntese orgânica, incluindo a síntese com catalisadores metálicos em reações de acoplamento.

Em 2009, Pschierer e Plenio reportaram a síntese de 6-cloropurinas **26** e β -D-ribofuranosil-6-cloropurina **27** utilizando reações de acoplamento de Suzuki-Miyaura

e Sonogashira utilizando água como solvente, (Esquema 4). Os autores utilizaram derivados da purina e o ligante de fluorenilfosfina como ligante.¹⁸

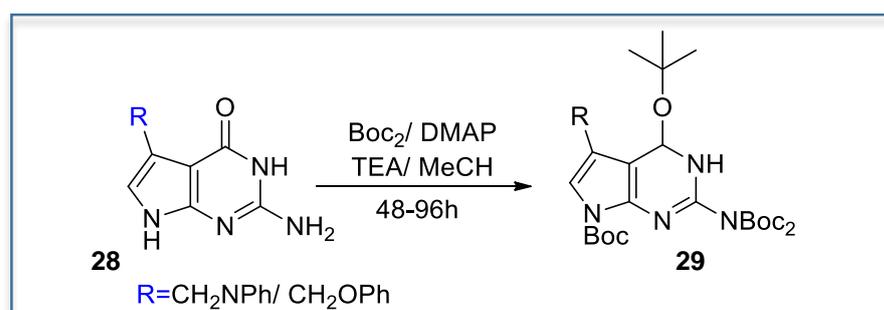
Esquema 4. Síntese de derivados da 6-cloropurinas **26** e β -D-ribofuranosil-6-cloropurina **27**.¹⁸



Fonte: Autora

Também em 2009, Wang e Gold reportaram a síntese de análogos da guanina **28** passando pelo intermediário protegido **29**. Nesta proposta (Esquema 5) os autores relataram que em determinadas posições das pirimidinas, adeninas e guaninas não havia dificuldade para incorporar grupos que proporcionaram um aumento nas propriedades antivirais e antitumoral¹⁹, porém não era possível até então, inserir grupamento açúcar nesses derivados. Os autores puderam realizar a síntese desejada e os produtos foram obtidos em bons rendimentos, porém empregando várias etapas e longos tempos reacionais, (Esquema 5).

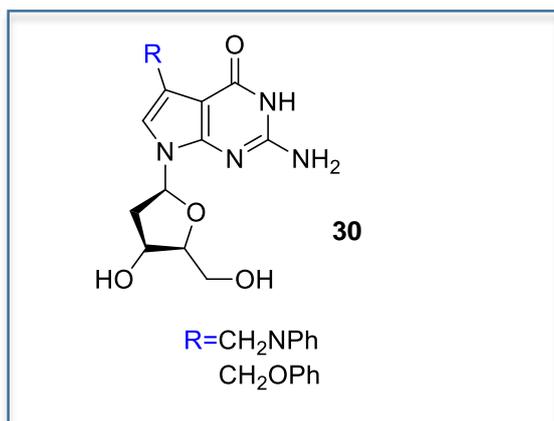
Esquema 5. Síntese do intermediário protegido com Boc **29**.¹⁹



Fonte: Autora

Após 14 etapas reacionais e rendimento de 6,4%, os autores obtiveram as aminas desejadas, (Figura 11), porém, por passarem por vários passos de reações, os autores consideram válida a formação do produto esperado.

Figura 11. Estrutura da amina **30** derivada da guanina **28** desenvolvida nesse trabalho.¹⁹

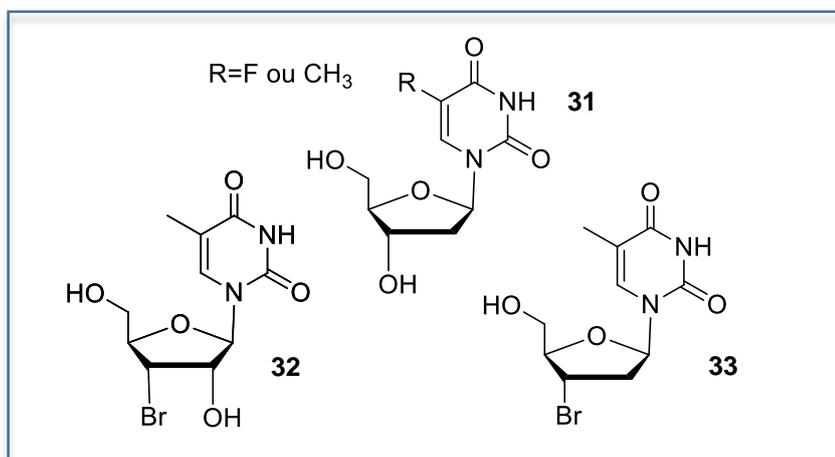


Fonte: Autora

Em 2010, Shakya e colaboradores prepararam uma nova classe de pirimidinas nucleosídicas **31** que apresentou-se com promissor potencial antimicrobiano, inibidor da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* e com baixa toxicidade.

Após 7 etapas reacionais, os autores relataram que de todas as 37 variações realizadas o composto **32** e **33** foram os que apresentaram os melhores resultados de inibição da bactéria *Mycobacterium tuberculosis*, (Figura 12).²⁰

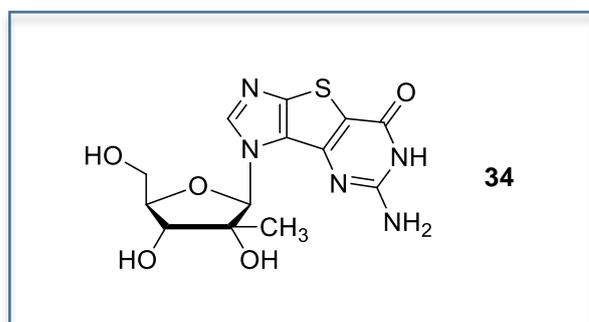
Figura 12. Análogos da timidina **31** com potencial antimicrobiano.²⁰



Fonte: Autora

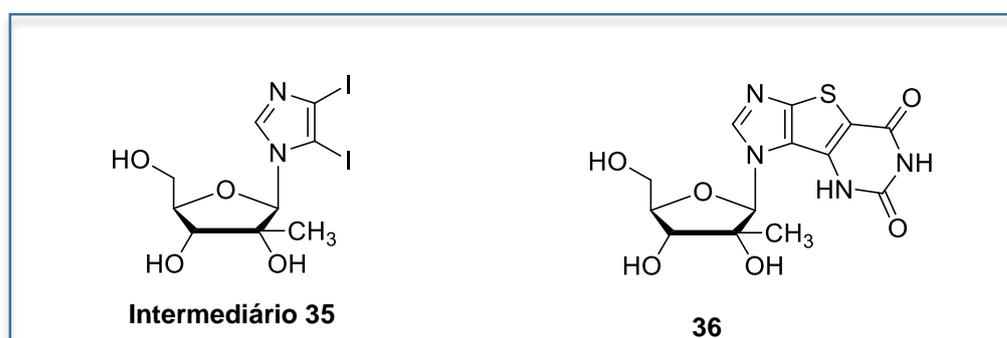
Também em 2010, Waushope e colaboradores, sintetizaram um análogo de nucleosídeo 2'-C tricíclico **36** (Figura 14) a partir de derivados nucleosídicos **34** (Figura 13), pois já haviam demonstraram em seus estudos atividade de inibição do vírus da hepatite C HCV. Em um primeiro momento, os autores não obtiveram sucesso na preparação do produto desejado, porém foi observado que era necessário passar por um intermediário chave **35** para dar sequência a rota sintética. O produto **36** (Figura 14), foi obtido com sucesso porém os autores relataram uma baixa solubilidade do composto em solventes orgânicos, o que pode causar o abandono dos estudos biológicos deste produto.²¹

Figura 13. Estrutura dos composto **34** com atividade contra o vírus HCV.²¹



Fonte: Autora

Figura 14. Estrutura do intermediário **35** e do produto 2'-C' tricíclicos **36**.²¹

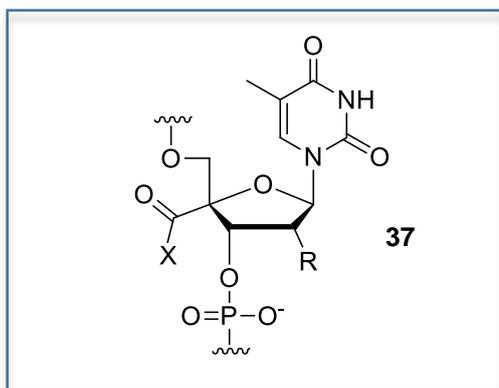


Fonte: Autora

Em 2012, Hari e colaboradores, sintetizaram análogos da 4'-carboximidina **37** (Figura 15), utilizando vários substituintes no anel do açúcar, nos grupamentos

representados por R e X a fim de observar sua capacidade de inserção na cadeia do DNA e RNA.²²

Figura 15. Estrutura análoga da 4'-carboxitimidina.²²



Fonte: Autora

Estes estudos conduziram a um aumento da estabilidade da dupla hélice do RNA em comparação com a timidina natural levando a produção de novos fármacos.

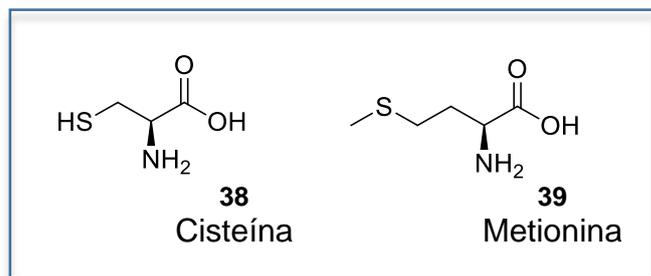
1.2 Organocalcogênios

Nos últimos anos, os compostos organocalcogênios têm sido alvo de interesse na síntese orgânica em virtude de sua ampla aplicação como reagentes e intermediários de reações, aplicações industriais e de suas propriedades farmacológicas.²

Conhecido desde a antiguidade, o átomo de enxofre já era relatado pelo filósofo grego Homero que recomendava evitar o contato com enxofre, pois ele acreditava que este composto pudesse provocar a proliferação de doenças infecciosas, capaz de atingir proporções epidêmicas e até mesmo a morte.²³

Somente no ano de 1770, o químico francês Antoine Lavoisier pode mostrar à comunidade científica da época, que o enxofre era um elemento químico e não um composto. Hoje, facilmente pode-se notar que este elemento é de suma importância, estando presente em alguns aminoácidos naturais, (Figura 16) como a cisteína **38** e a metionina **39**.²³

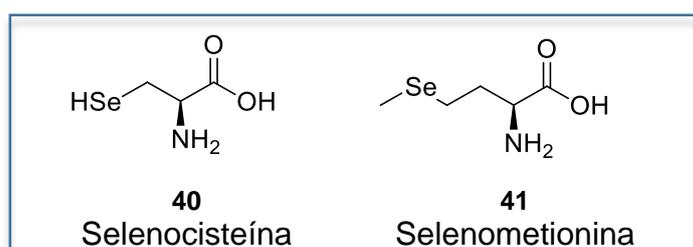
Figura 16. Aminoácidos que contém o átomo de enxofre em sua estrutura.²³



Fonte: Autora

Em 1817, o químico sueco Jacob Berzelius, descobriu um elemento químico que era caracterizado pela sua dificuldade de manipulação, mau cheiro e por ser altamente prejudicial à saúde humana, este elemento era o átomo de selênio. Porém em 1957, Schwartz e Foltz encontraram evidências que contrapôs os estudos de Berzelius, relatando que o átomo de selênio era como um elemento essencial para a dieta dos animais e seres humanos e que sua ausência causaria danos graves a saúde humana.²⁴ Importantes moléculas possuem átomos de selênio em sua estrutura (Figura 17), a selenocisteína **40** e a selenometionina **41** são alguma delas, pois são precursores importantes para a formação de seleno-proteínas.²⁵

Figura 17. Aminoácidos que contém o átomo de selênio em sua estrutura.²⁵



Fonte: Autora

O átomo de telúrio foi descoberto pelo mineralogista Von Reichenstein em 1782, a partir do minério de ouro denominado calaverita (AuTe_2) provenientes de uma mina da Transilvania. A preparação dos primeiros compostos orgânicos de telúrio foi descrito por Wöhler em 1840, mas sua aplicação sintética foi deixada de lado por muitos anos. Por exemplo, entre 1910 e 1950, somente 50 trabalhos foram publicados envolvendo a química do telúrio. Entretanto, em 1970 este cenário mudou, tendo

ganhado destaque em 1971 com uma série de conferências dedicadas à química de selênio e telúrio.²⁴

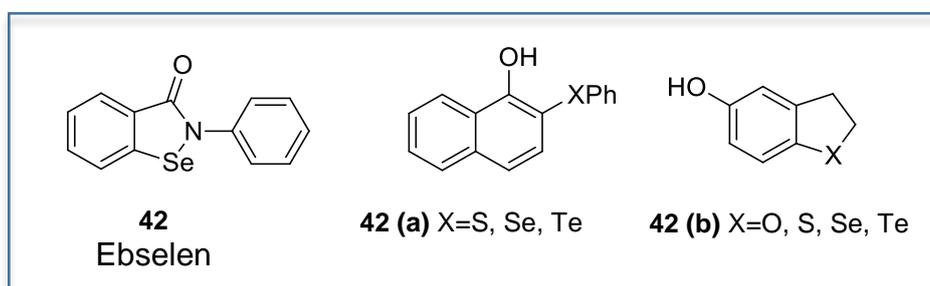
Com isso, a busca por novas estratégias para a preparação de substâncias de interesse para indústria química, farmacêutica e de alimentos tem atraído à atenção da comunidade científica. Estudos contendo átomos de enxofre, selênio ou telúrio tem sido alvo de intensos estudos do ponto de vista sintético²⁶ e medicinal⁹ por apresentarem propriedades biológicas, como por exemplo, atividade antioxidante,²⁷ antitumoral²⁸ e antimicrobiana.²⁹

Descobriu-se que o átomo de selênio está presente no centro ativo de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase (GPx), tioredoxina redutase (Trx-R), 5'-deiodinases (hormônio da tireoide), ressaltando a importância do selênio como elemento chave para a redução das espécies reativas de oxigênio (EROs).³⁰

No ano de 1984 foi apresentado composto pioneiro a mimetizar a atividade da GPx, o Ebselen **42**.³¹ Este composto heterocíclico exibe também propriedades anti-inflamatórias, anti-arterioscleróticas e com uma toxicidade relativamente baixa.³¹

Devido a estas propriedades, o Ebselen (Figura 18) tem sido usado como padrão para compostos contendo selênio em sua estrutura e que apresentam as propriedades da GPx, pois esta é uma importante enzima do sistema de defesa do organismo no combate a substâncias formadas durante o metabolismo do oxigênio, como o caso do peróxido de hidrogênio H₂O₂.

Figura 18. Ebselen **42** e outras derivatizações com atividade antioxidante.³²



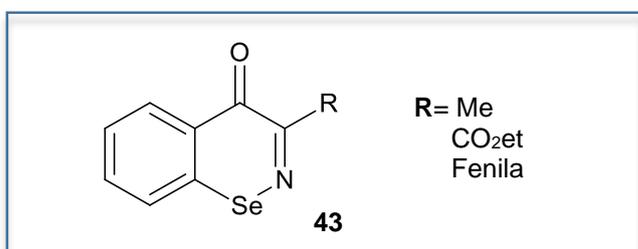
Fonte: Autora

Nos últimos anos, diversas estratégias tem sido investigadas para desenvolver ou potencializar a atividade mimética da GPx em compostos contendo os átomos de

enxofre, selênio e telúrio. Além do destaque para atividades antioxidante contendo selênio em sua estrutura, alguns compostos contendo o átomo de telúrio tem ganhado merecido destaque, visto que também apresenta-se com capacidade relevante de mimetizar a enzima glutathiona peroxidase (GPx).

Messali e colaboradores, relataram em 2007 a preparação de derivados do Ebselen (Figura 19). Os autores puderam mostrar a capacidade antioxidante do composto **43** pois este veio a aumentar a taxa de redução de H₂O₂ em comparação com Ebselen **42**, utilizado como fármaco de controle.³³

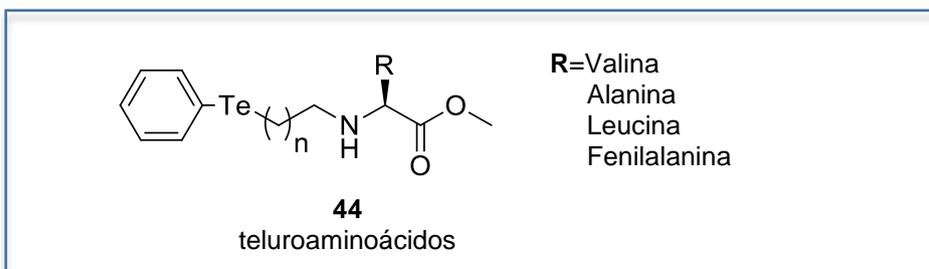
Figura 19. Estrutura do composto derivado do Ebselen **43**.



Fonte: Autora

Já em 2009, Alberto e colaboradores relataram a preparação de teluroaminoácidos **44** como miméticos da glutathiona peroxidase (GPx). Os autores prepararam derivados de teluroaminoácidos (Figura 20) onde puderam utilizar vários aminoácidos como representados pelo grupamento R, bem como modificar o número de carbonos (dois e três carbonos) no grupamento representado por n.³⁴

Figura 20. Estrutura do teluroaminoácidos sintetizados neste trabalho.³⁴

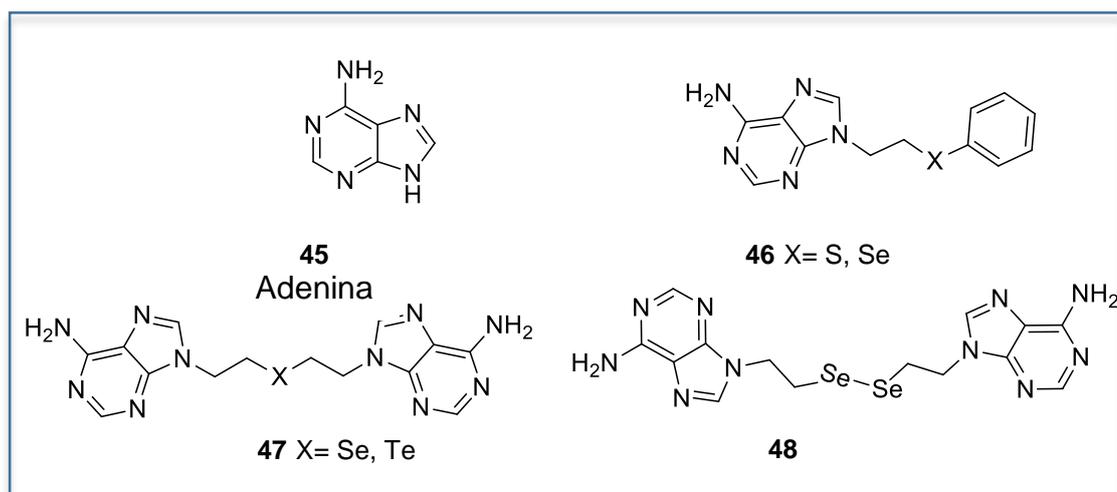


Fonte: Autora

Mais recentemente, no ano de 2015, a síntese de análogos da adenina **45** foi realizada por Hua e colaboradores que adicionaram organocalcogênios em derivado

de nucleosídeos (Figura 21). Os derivados contendo calcogênio substituídos na posição 9 não foram relatados em estudos anteriores. Neste trabalho, uma série de novos derivados **46** a **48** contendo S, Se ou Te na posição 9 da adenina foram obtidos em rendimentos satisfatórios, na faixa de 65% a 93%.³⁵

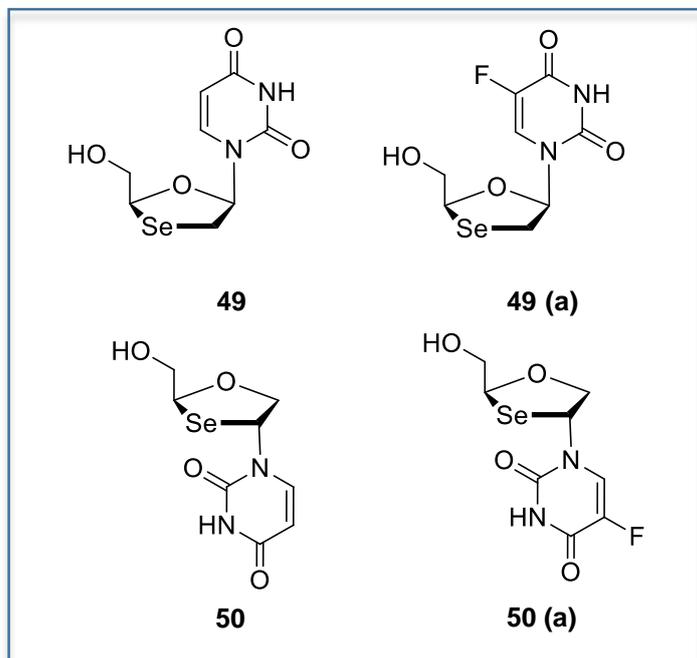
Figura 21. Síntese de análogos da adenina **45** contendo S, Se, Te.³⁵



Fonte: Autora

Em 2000, Chu e colaboradores sintetizaram derivados de dioxolanas oxatiolanas para a obtenção de uma nova classe de nucleosídeos de oxasselenolanas (Figura 22). Este estudo mostrou-se interessante pois os compostos **49** e **50** apresentaram atividade antiviral para o vírus da HIV-1 e também para a o vírus da hepatite B (HBV). Estes compostos são racêmicos da β -seleno citosina, β -seleno fluorocitosina, e também da β -seleno guanina que apresentam potencial inibitório para ambos os vírus (HIV-1 e HBV).³⁶

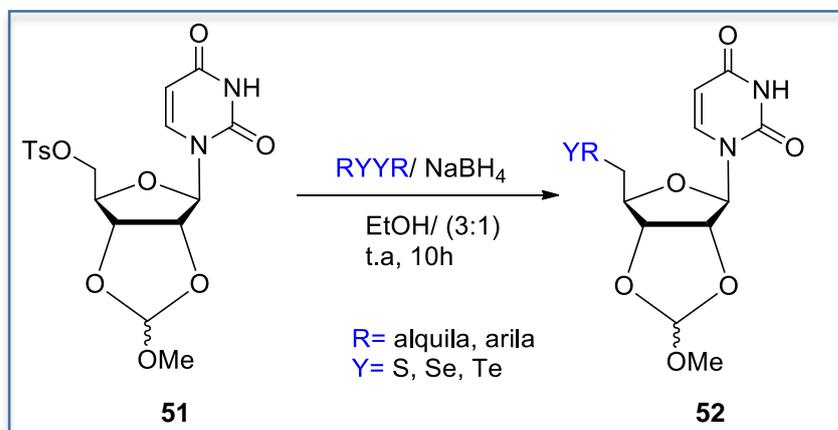
Figura 22. Derivados da β -seleno citosina.³⁶



Fonte: Autora

Em 2009, nosso grupo de pesquisa realizou a preparação de calcogenucleosídeos a partir da uridina **51**. Primeiramente, realizou-se uma reação de tosilção onde havia o grupamento hidroxila (OH) para que depois este intermediário fosse substituído por calcogenolatos para a obtenção dos calcogenosídeos **52** com rendimentos na faixa de 60 à 78%, desejados conforme esquema 6.³⁷

Esquema 6. Síntese de calcogenonucleosídeos derivados da uridina.³⁷



Fonte: Autora

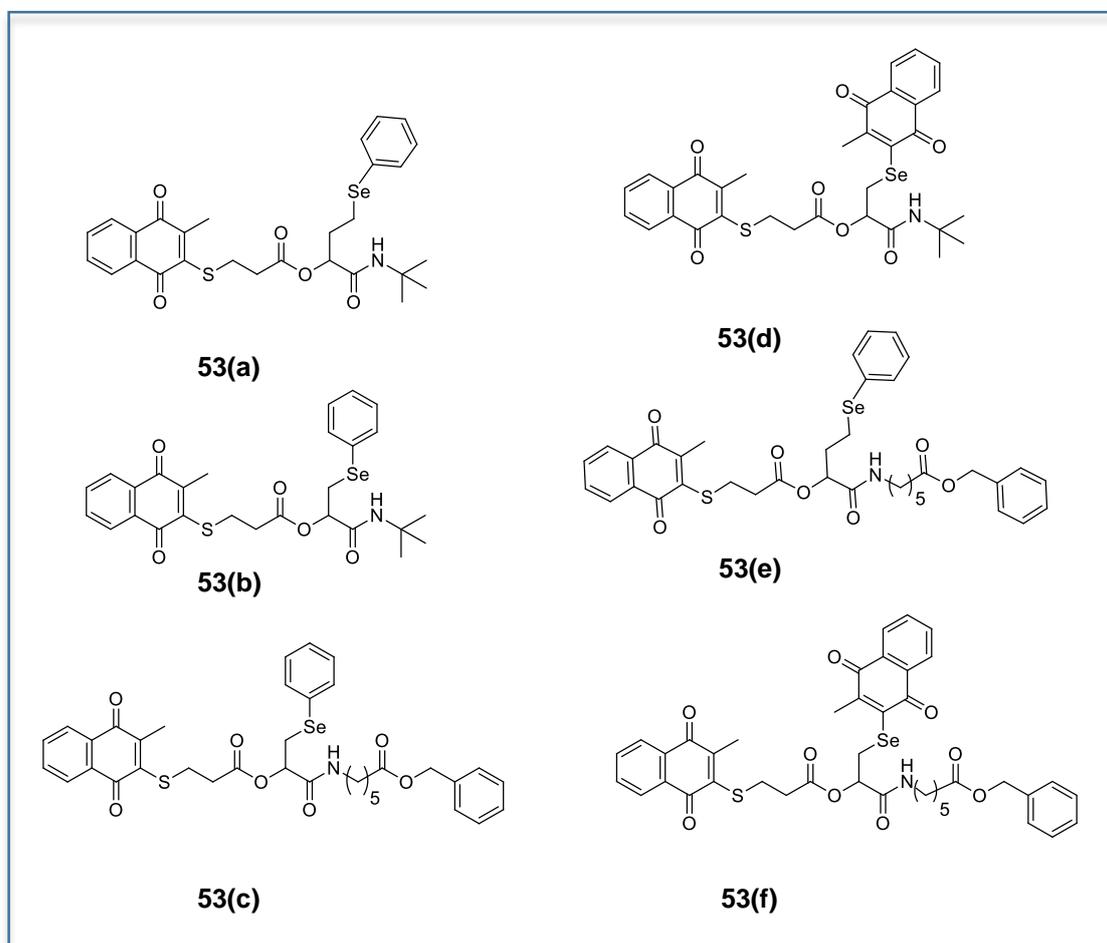
Em 2013, Pesarico e colaboradores, relataram uma série de derivados de organoselênio que apresentaram-se como potentes agentes farmacológicos. Diversas avaliações foram realizadas visando determinar suas ações como antioxidantes, inibidores de enzimas, neuroprotetores, antitumorais, anti-infecciosos, imunomoduladores e antifúngicos.³⁸

Além de estudos contendo nucleosídeos, outros trabalhos relatam as propriedades que os organocalcogênios podem apresentar quando ligados a outras classes de compostos, como é o caso dos heterociclos contendo oxigênio em sua estrutura.

Shaaban e colaboradores, relataram que muitos tipos de células cancerígenas estão associados a um equilíbrio redox e *stress* oxidativo (SO). Entre os agentes utilizados para modular o estado redox intracelular, catalisadores redox contendo quinona e calcogênio mostraram-se promissores quando incubados em diferentes células cancerígenas, inibindo o crescimento celular e induzindo a morte das células por apoptose.³⁹

Foram sintetizados os compostos de **53 (a-d)**, (Figura 23) obtidos por reações multicomponentes tipo Passerine³⁵ não qual apresentaram-se como catalisadores redox contendo quinona e calcogênio.

Figura 23 – Estrutura de alguns compostos contendo múltiplos locais redox de quinona e calcogênio.³⁹



Fonte: Autora

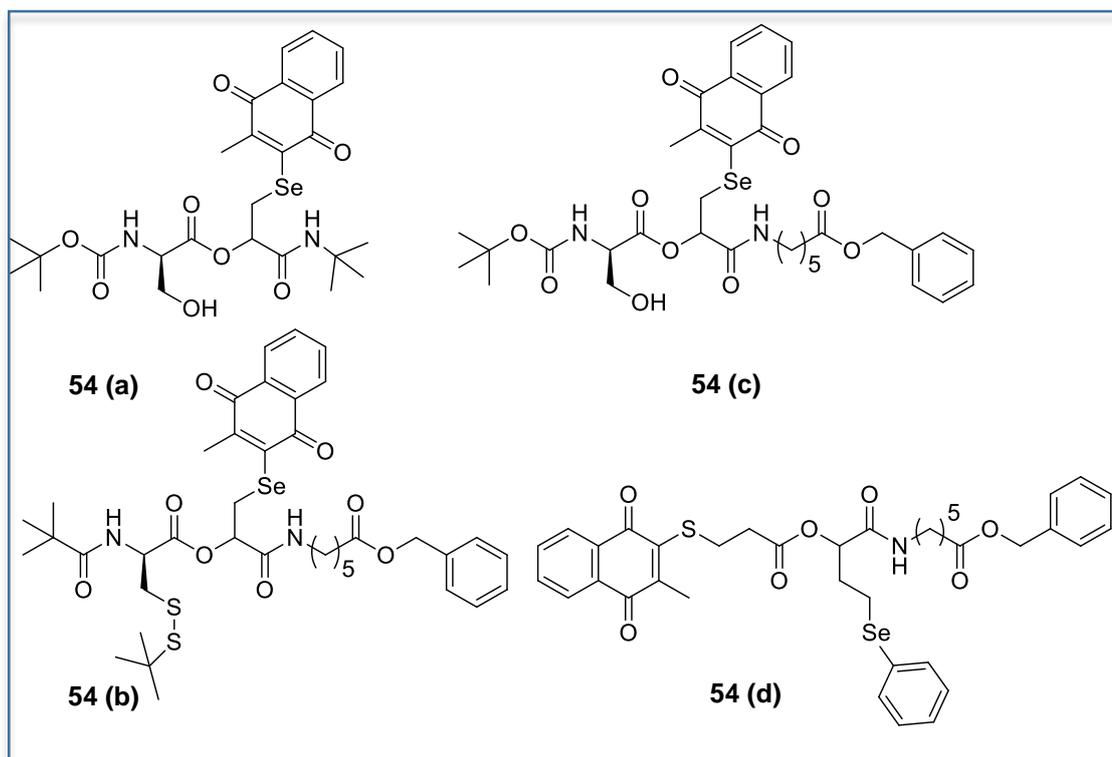
Foram realizados testes biológicos com os compostos contendo quinona e calcogênio **53 (f)** e **54 (a-c)** (Figura 23 e Figura 24, respectivamente), onde estes foram adicionados a 58 linhas de células de câncer de mama, renal, próstata, cólon, ovário, sistema nervoso central (SNC), pulmão, leucemia e linhas de células de melanoma.

Posteriormente, foi realizada a avaliação toxicológica destes compostos. Os resultados demonstraram que todos os compostos testados exibiram uma citotoxicidade significativa contra as linhagens testadas.³⁹

Foi encontrada uma correlação entre as estruturas químicas e as atividades tóxicas para os compostos **53 (c)** e **53 (d)** (Figura 23), com quatro centros redox, sendo estes dois mais citotóxico do que os seus homólogos com dois e três centros redox.

Adicionalmente, os compostos que possuem uma conexão direta do selênio com a molécula de quinona apresentaram-se mais tóxicos, como é o caso dos compostos **53 (d)** e **53 (f)** (Figura 23) que os compostos **53 (a)**, **53 (b)**, **53 (c)** e **53 (e)** (Figura 23), onde o átomo de selênio está localizado mais longe do grupamento quinona.

Figura 24. Compostos que apresentaram atividade antitumoral.³⁹



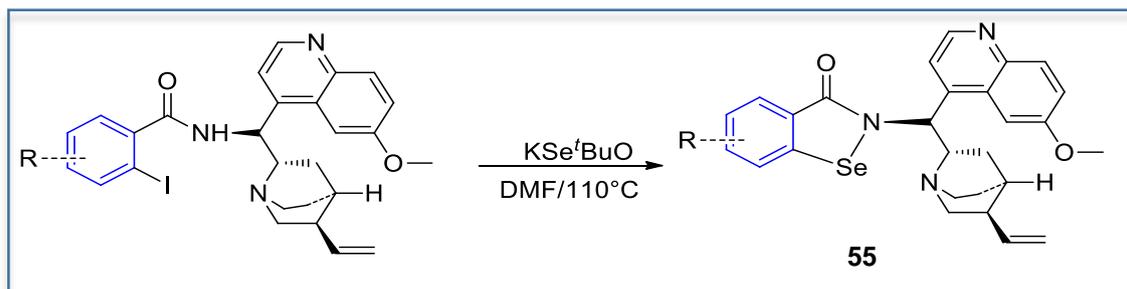
Fonte: Autora

Mais recentemente em 2015, Balkrishna e colaboradores reportaram a preparação de novas isoselenazolonas **55** derivados do Ebselen **56** passando pelo intermediário chave, selenol **57**, a fim de mimetizar a glutathiona peroxidase GPx. Os autores citam que as isoselenazolonas juntamente com a benzoamida funcionalizada não haviam sido alvo de estudos como miméticos da GPx, devido a dificuldades na sua síntese.⁴⁰

A reação do KSeO^tBu com a 2-iodo-arilbenzamidás forneceram as isoselenazolonas desejadas, conforme esquema 7. Os compostos isoselenazolonas **55** sintetizados nesse trabalho exibiram elevada atividade mimética dos da GPx e

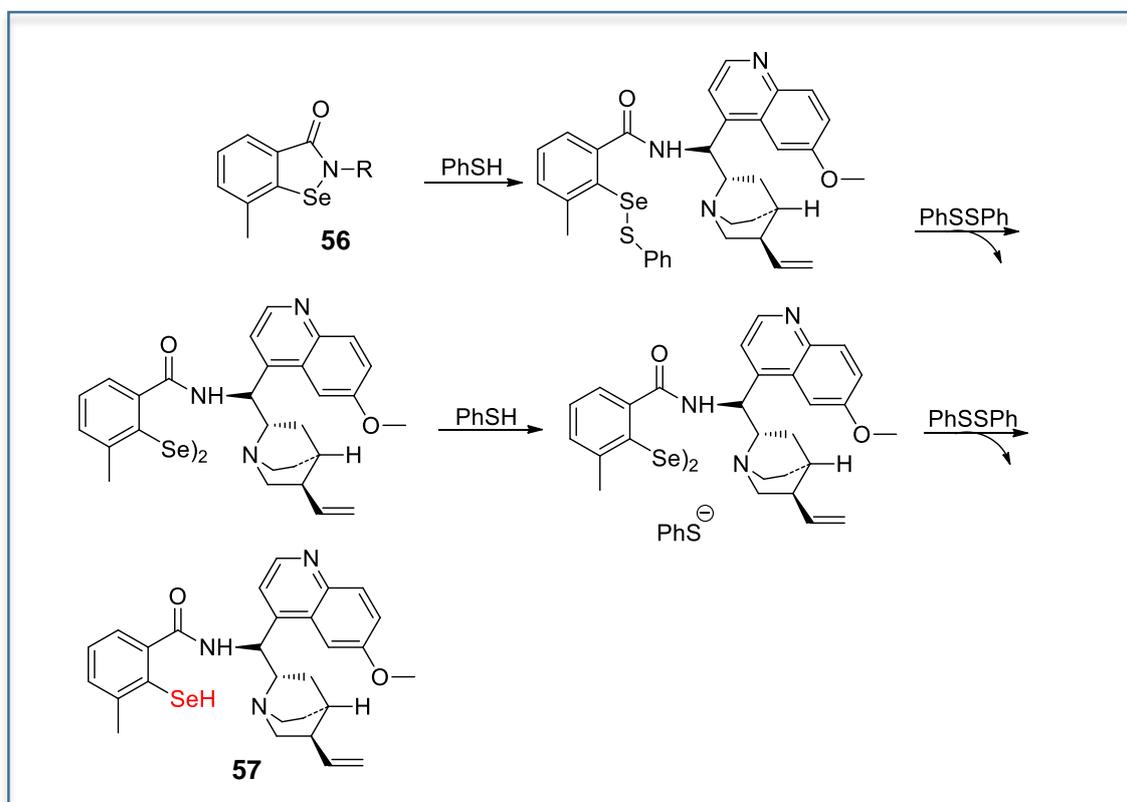
passam pelo intermediário selenol, assim, os autores sugerem que a presença de um grupamento impedido da amina N-quinina substituída e da orto-metil-benzamina substituída, deu a estabilidade necessária para o intermediário selenol, demonstrado no esquema 8.⁴⁰

Esquema 7. Síntese das isoselenazolonas **55**.⁴⁰



Fonte: Autora

Esquema 8. Proposta para a geração do selenol **57**.⁴⁰

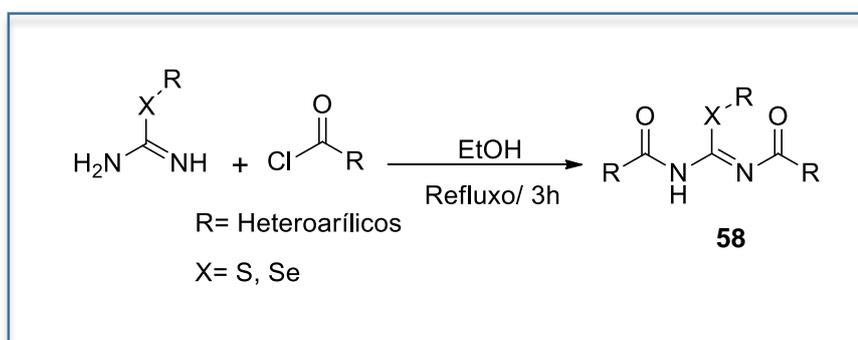


Fonte: Autora

Em 2010 Ibñez e colaboradores, reportaram a preparação de uma série de derivados de imidaselenocarbamatos e imidaticarbamatos e realizaram a avaliação destes 5 tipos de células antitumorais: adenocarcinoma (MCF-O7), carcinoma de cólon (HT-29), leucemia (K-562), hepatocarcinoma (Hep-G2) câncer de próstata (PC-3) e células tumorais de mama (MCF-10A).

Os autores reportaram a preparação das S-imidacarbamatos, Se-metil-imidaselenocarbamatos ou Se-benzil-imidaselenocarbamatos para a obtenção dos alquil-calcofenil-imidacarbamatos **58**, conforme esquema 9.⁴¹

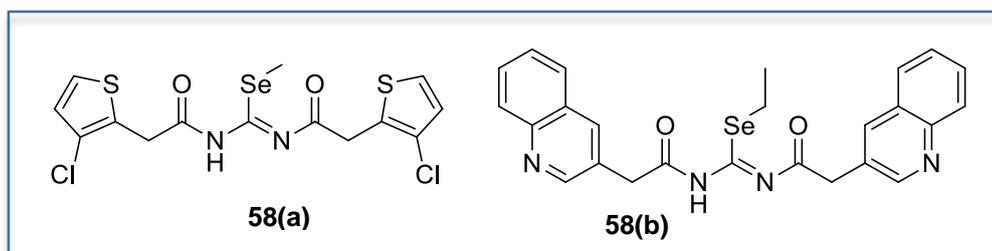
Esquema 9. Síntese de alquil-calcofenil-imidacarbamatos **58**.⁴¹



Fonte: Autora

Na Figura 25 estão apresentados os compostos **58 (a)** e **58 (b)** que apresentaram-se promissores para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes antitumorais para adenocarcinoma (MCF-O7) e células tumorais de mama (MCF-10A).

Figura 25. Compostos que apresentaram inibição do crescimento de células tumorais.

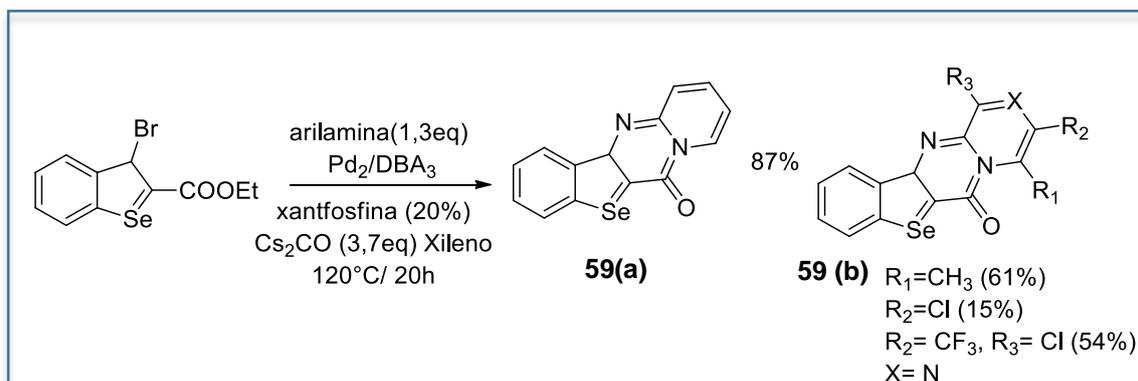


Fonte: Autora

Arsenyan e colaboradores, no ano de 2011 prepararam uma série de derivados de selenofenos com atrativo potencial biológico em células cancerígenas.

Após a síntese destes policiclos, os compostos passaram por testes *in vitro* e exibiram atividade antitumoral para fibrosarrose humana (HT-1080) e células hepáticas (MG-22a).⁴¹ Os autores acreditam que este resultado seja possivelmente pelos selenofenos **59** assemelharem-se com um agente antitumoral conhecido, Batracilin. O Esquema 10 mostra os composto que apresentaram bons resultados citotóxicos nas linhagens de células tumorais, embora a inserção do átomo de nitrogênio não exibiu nenhum efeito sob as células.⁴²

Esquema 10. Protocolo reacional para a preparação dos selenofenos **59**.⁴²

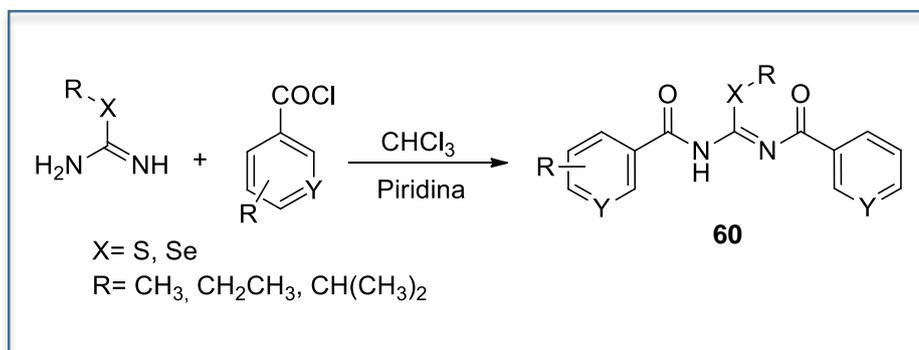


Fonte: Autora

Plano e colaboradores, prepararam uma série de imidatiocarbamatos e imidaselnocarbamatos **60** (Esquema 11) com potencial antitumoral e relataram as avaliações citotóxicas destes produtos utilizando células tumorais de próstata (PC-3). Os autores destacam o resultado para atividade antitumoral do composto **60** e que este pode ser um candidato a novos fármacos para o tratamento contra o câncer.

Quando os autores compararam as atividades dos composto com relação ao átomo de selênio e enxofre, foi observado que apesar de serem quimicamente muito semelhante, o selênio apresenta maior atividade contra células tumorais.⁴³

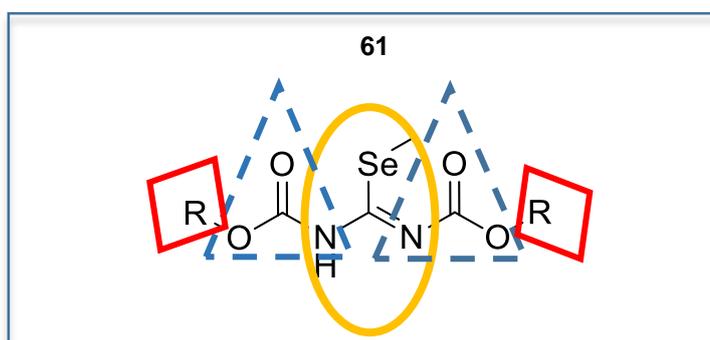
Esquema 11. Síntese de imidatiocarbamatos e imidaselnocarbamatos **60** com propriedades antitumorais.⁴³



Fonte: Autora

Romano e colaboradores, relataram uma série de derivados de carbamatos **61** contendo metilselênio como organocalogênio (Figura 26). Os testes contaram com avaliação de inúmeras células humanas para a avaliação tumoral que incluíram células tumorais leucêmicas (CCRF-CEM e K-562), carcinoma de cólon (HT-29), carcinoma de pulmão (HTB-54), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de mama (MCF-7), células tumorais benignas de mama (184B5) e células tumorais de brônquios (BEAS-2B).⁴⁴

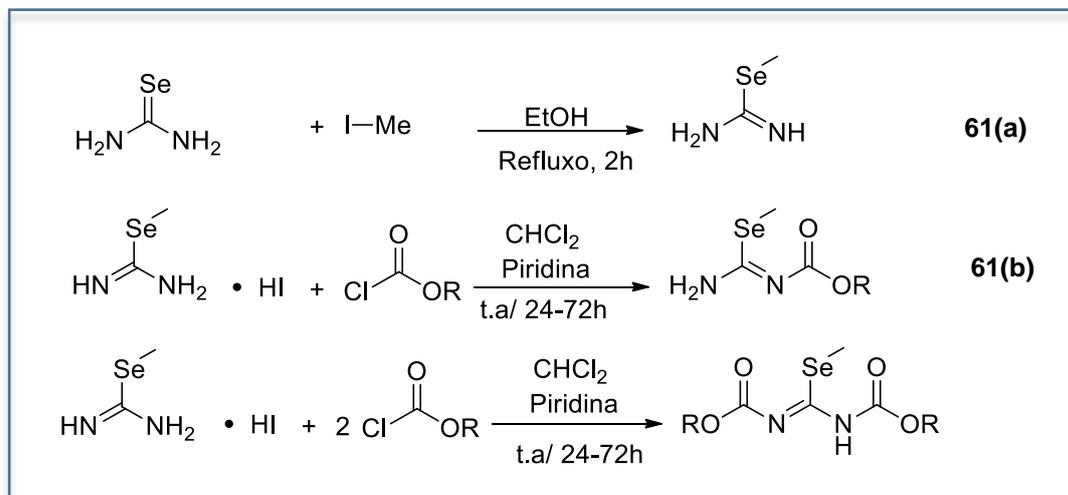
Figura 26. Estrutura geral para os selenocarbamatos **61**.⁴⁴



Fonte: Autora

As reações foram preparadas conforme esquema 12, e avaliaram as condições de temperatura, catalisadores e solventes obtendo bons rendimentos e puderam variar o grupamento representado por R como alifático, aromático e heteroaromático.

Esquema 12. Síntese dos derivados de metilselenocarbamatos **61**.⁴⁴



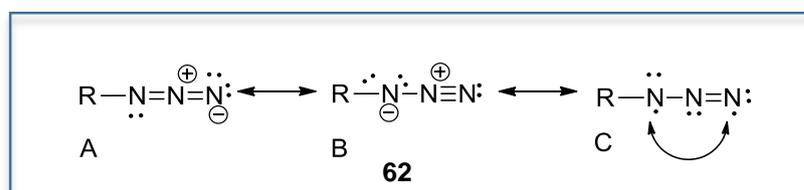
Fonte: Autora

1.3 Reduções de azidas orgânicas

As azidas **62** participam de diversas reações para a formação de novas ligações carbono-nitrogênio ou nitrogênio–heteroátomo.⁴⁵ Sua reatividade tem despertado um interesse significativo desde a descoberta da fenilazida por Roesky no ano de 1864.⁴⁶

Evers e colaboradores relataram em 2011, que a estrutura de ressonância da azida representado por B é a mais importante delas, (Figura 27). A distância da ligação N α -N β é de 1,233 Å, que sugere uma maior ordem de ligação na estrutura B.⁴⁷

Figura 27. Estrutura de uma azida orgânica **62**.⁴⁷



Fonte: Autora

Nos últimos anos, as azidas (Figura 27) tem sido foco de estudos desde que foi reconhecido seu potencial em “reações *click*”, - reação que une o grupamento azida à

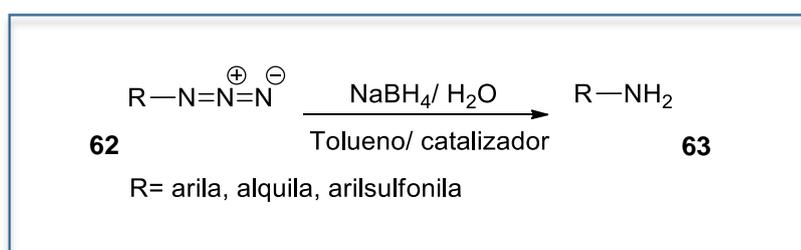
um alcino, formando um anel triazólico. Outro exemplo a ser destacado foi a preparação da 3-azidotimidina **1** reconhecida no tratamento da SIDA.⁶

Entretanto, deve-se lembrar que as azidas devem ser manuseadas com cuidado, pois alguns membros desta classe de compostos são explosivos, por conseguinte, a prática prudente deve ser respeitada no laboratório.⁴⁷

Scriven e Turnbull, em 1988, propuseram uma discussão para a preparação e aplicação de diversos tipos de azidas orgânicas, pois acreditavam que estas seriam intermediários-chave para novos compostos com promissoras aplicações, pois já havia sido relatado as propriedades biológicas do AZT, 3-azidotimidina **1**.⁶ Os autores demonstram uma série de preparações das reduções de Staudinger e Schmidt, que utilizam fosfinas como redutores de azidas.⁴⁸

Em 1989, Rola e colaboradores relataram a redução de azidas **62** com borohidreto de sódio (NaBH₄) para a obtenção de aminas orgânicas **63**, Esquema 13, porém essas reações não poderiam ser realizadas na ausência de um catalisador. Nesse estudo foi utilizado hexadeciltributilfosfona de bromo (C₂₈H₆₀PBr) como catalisador de transferência de fase (CTF) para que fosse possível obter os produtos desejados.⁴⁹

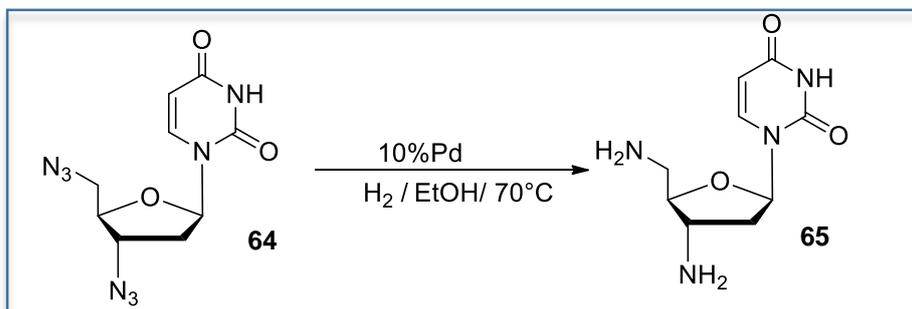
Esquema 13. Redução da azida orgânica na presença CTF.⁴⁹



Fonte: Autora

Lin e colaboradores, em 1985 relataram a redução de ambas azidas provenientes de derivadas da timidina **64** utilizando catálise de paládio para a obtenção das aminas representadas no esquema 14. Os produtos foram obtidos com 97% de rendimento e apresentaram promissores resultados para inibição contra células tumorais leucêmicas.⁵⁰

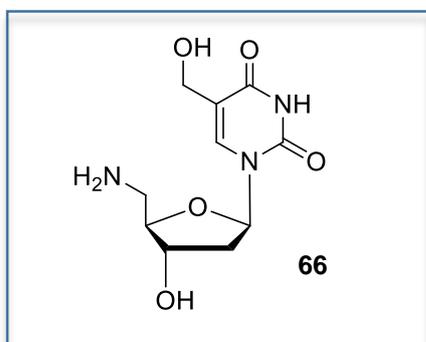
Esquema 14. Síntese de análogos da timidina **64**.⁵⁰



Fonte: Autora

Shiuau e colaboradores, em 1980 relataram a redução de azidas derivada da timidina **13** para as respectivas amins **66** (Figura 28) no qual foi submetido a hidrogenação com alumina de ródio. Essas amins apresentaram atividade antitumoral e antiviral, para o vírus da herpes tipo 1 (HSV-1).⁵¹

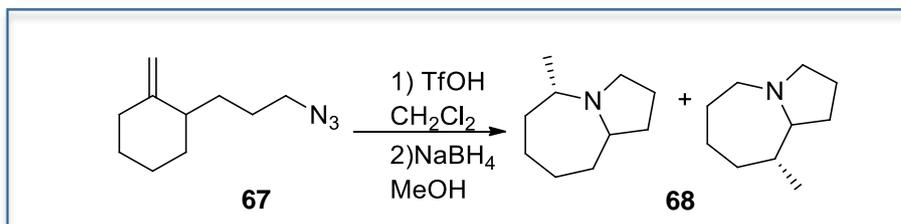
Figura 28. Estrutura da amins **66** derivadas da timidina com potencial biológico.⁵¹



Fonte: Autora

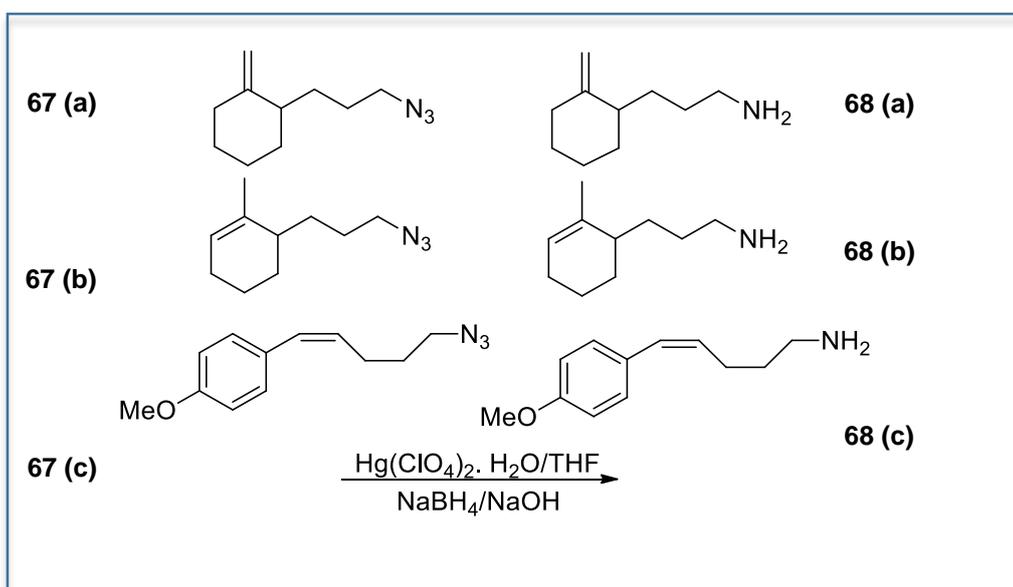
No ano de 2000, Pearson e colaboradores, relataram a síntese de diversas amins **68 (a-c)** utilizando azidas orgânicas alifáticas **67** e sais de mercúrios II (azidomercuração de alcenos), por reações de Redução de Schmidt (Esquema 16).⁵³ Os autores demonstram que não era possível obter o produto desejado utilizando apenas o reagente de boro como redutor, isso acarretaria na obtenção de isômeros **68**, (Esquema 15).⁵²

Esquema 15. Redução de azidas utilizando apenas reagentes de boro.⁵²



Fonte: Autora

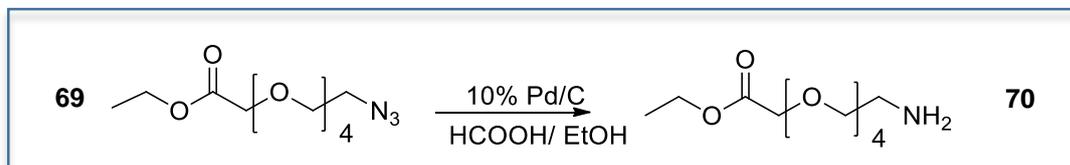
Esquema 16. Reduções de Schmidt para a obtenção das aminas desejadas.⁵²



Fonte: Autora

Dhawan e colaboradores, no ano de 2000, reportaram a síntese do polímero ácido 14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanóico (ATTAn) a partir de polímeros que continham o grupamento azida, (Esquema 17). Além das reações serem basicamente exotérmica, não era possível utilizar com polímeros menores (4 carbonos), pois estes levavam a formação de impurezas na reação que não foram identificadas, acarretando na perda do catalizador. A redução das azidas **69** para as aminas desejadas **70** ocorreu através de reações com catalisadores de paládio e ácido fórmico como fonte de hidrogênio.⁵³

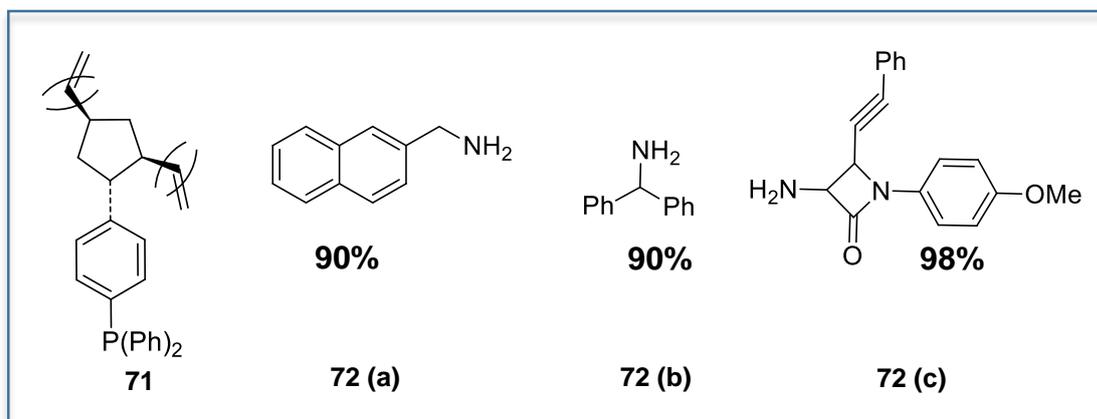
Esquema 17. Síntese das 14-amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecanóico **70** utilizando catálise de paládio.⁵³



Fonte: Autora

Em 2002, Årstad reportaram a síntese de aminas **72** (Figura 29), a partir de azidas orgânicas com excelentes rendimentos (%) utilizando reagentes com fósforo **71** através das reduções de Staudinger.⁵⁴

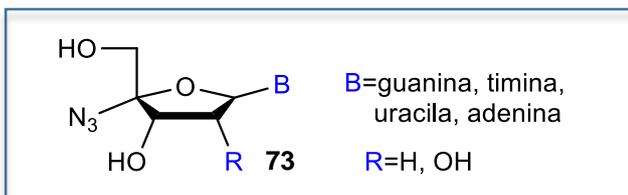
Figura 29. Reagente de fosfina **71** e algumas aminas preparadas nesse trabalho **71 (a-c)**.⁵⁴



Fonte: Autora

Também em 2002, Tanmaya Pathank apresentou várias preparações de azidas utilizando análogos de nucleosídeos, (Figura 30). Neste trabalho sobre azidonucleosídeos, o autor relata a redução das azidas para a obtenção de aminas a fim de demonstrar umas das transformações possíveis de ocorrer. Excepcionalmente, umas das azidas preparadas **73**, destacou-se entre as demais pois apresentou potencial inibitório para o vírus da imunodeficiência do tipo 1 (HIV-1). Cabe salientar que o autor utilizou para as reações a guanina, timidina, uracila e também a adenina como bases nitrogenadas.⁵⁵

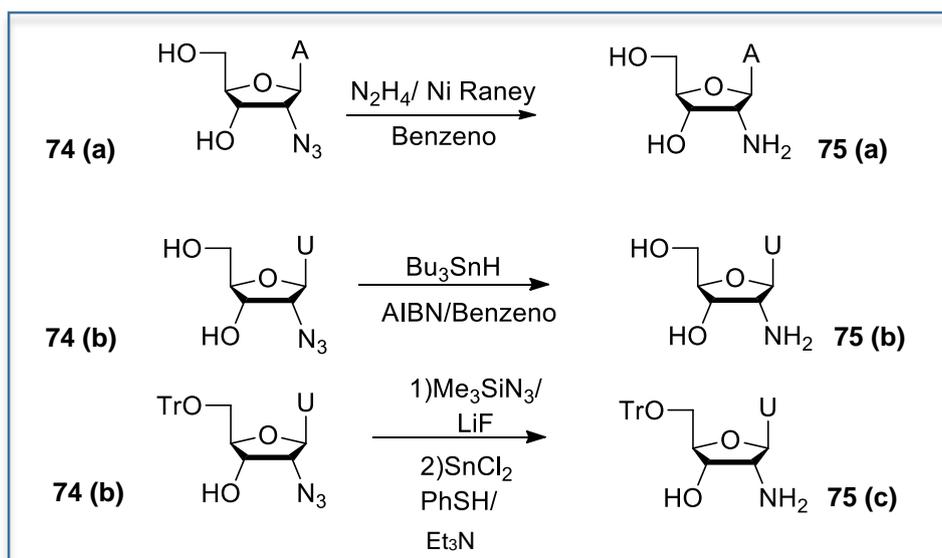
Figura 30. Estrutura da azida **73** com atividade antiviral.⁵⁵



Fonte: Autora

Após a obtenção da azida **74 (a-c)**, os autores realizaram a síntese das reduções das azidas para as respectivas aminas, como demonstrado no esquema 18. O autor utiliza uma liga metálica de níquel e alumínio (Ni Raney) e também uma mistura de Azobisisobutironitrila (ALBN) com hidreto de tributilestanho Bu_3SnH (tributilestanho-IUPAC). A obtenção das aminas desejadas **75 (a-c)** através de reagentes estanho, porém neste trabalho o autor relatou que apesar de obter as respectivas aminas com sucesso (Esquema 18), os reagentes que utilizam silício, como Ph_3SiH ainda eram a melhor alternativa.⁵⁵

Esquema 18. Redução de azidas **74 (a-c)** utilizando Níquel e Azobisisobutironitrila (ALBN) e estanho (Sn).⁵⁵

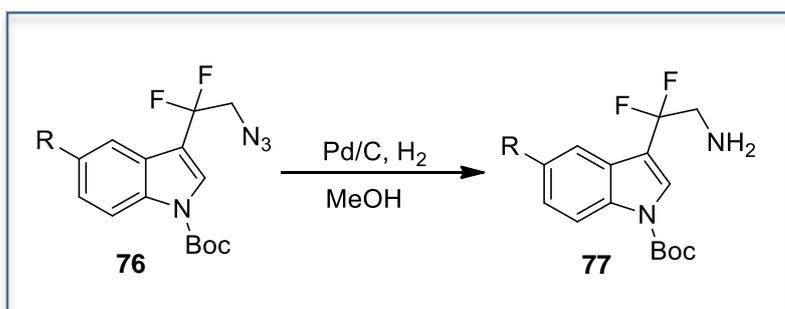


Fonte: Autora

Deng e colaboradores, em 2002 relataram a síntese de β - β -difluorotriptaminas a fim de estudar os efeitos de substituição de flúor sobre as atividades biológicas neuroativas de aminas.⁵⁶

Primeiramente, os autores protegeram o grupo amina contido na estrutura com a posterior redução dessas azida **76** para as aminas **77** desejadas, (Esquema 19). Porém este produto mostrou-se instável não sendo possível de ser caracterizado por RMN ou EM. Os autores encontraram como alternativa para seguir a síntese que compreendia na formação de novos ciclos, 2-metil-5-[3-(5-metoxindoil)]oxazol, (Esquema 19). Neste trabalho também foi utilizado catalise de paládio e as aminas obtidas apresentaram atividade biológica.⁵⁶

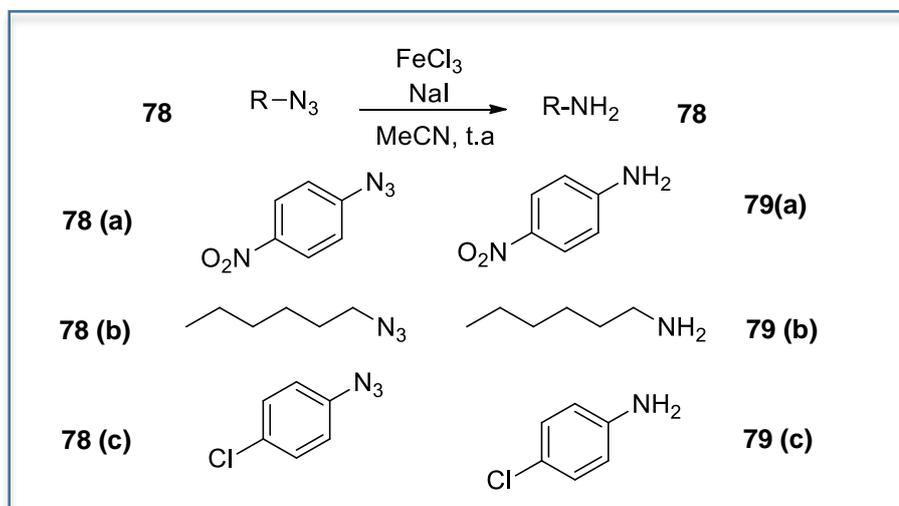
Esquema 19. Preparação das β - β -difluorotriptaminas **77** sob catálise de paládio.⁵⁶



Fonte: Autora

Kamal e colaboradores, sintetizaram a partir de azidas orgânicas **78** aminas aromáticas e alifáticas **79**, (Figura 25). Este protocolo utilizou-se de cloreto de ferro e iodeto de sódio como para obter as respectivas aminas em bons rendimentos, conforme representado no esquema 16. Este mesmo protocolo de reação, estendeu-se para aminas cíclicas, (Esquema 20).⁵⁷

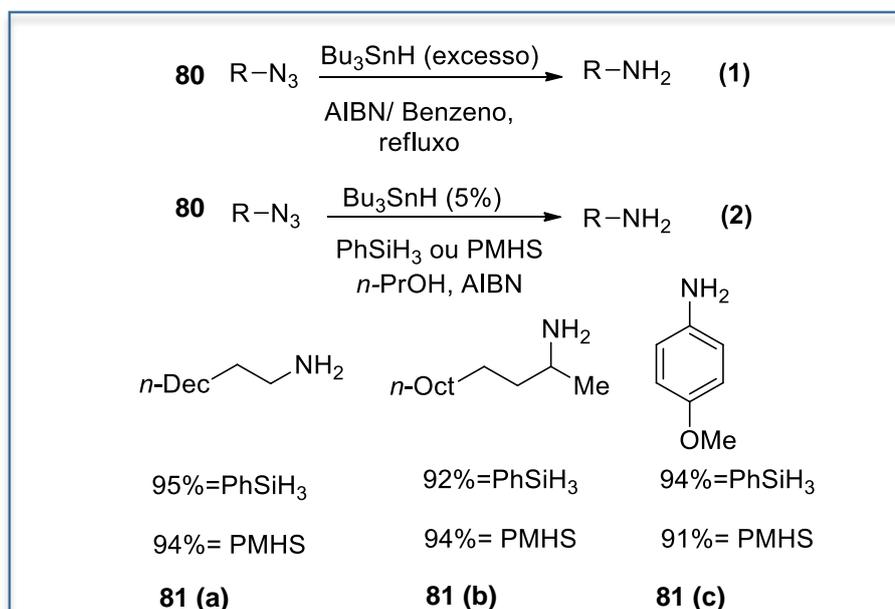
Esquema 20. Síntese de aminas **79** envolvendo FeCl₃.⁵⁷



Fonte: Autora

Hays e colaboradores, prepararam aminas a partir de azidas **80** orgânicas empregando catalizadores de estanho com bons rendimentos, conforme observado no esquema 21. Embora, os autores relatam que não puderam definir o mecanismo que ocorre nessas transformações, eles relatam que este é um caminho viável para reduções de azida.⁵⁸

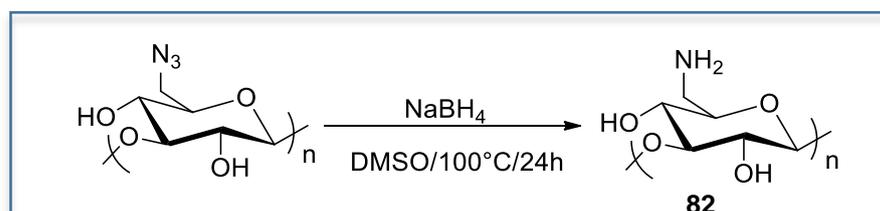
Esquema 21. Preparação de aminas **81** utilizando reagentes de estanho.⁵⁸



Fonte: Autora

Em 2014, Zang e Edgar, relataram a preparação de 6-amino-6-deoxicurdlans **82**, aminopolissacarídeos solúveis em água à partir de azidas reduzidas por borohidreto de sódio, (Esquema 22). Conhecido também como *curdlan*, os aminopolissacarídeos naturais são hidrofílicos, pois contém grupos como hidroxilas, amidas, amins. A habilidade desses compostos apresentaram solubilidade em água mostrou-se um caminho interessantes para os autores para aplicações biológicas.⁵⁹

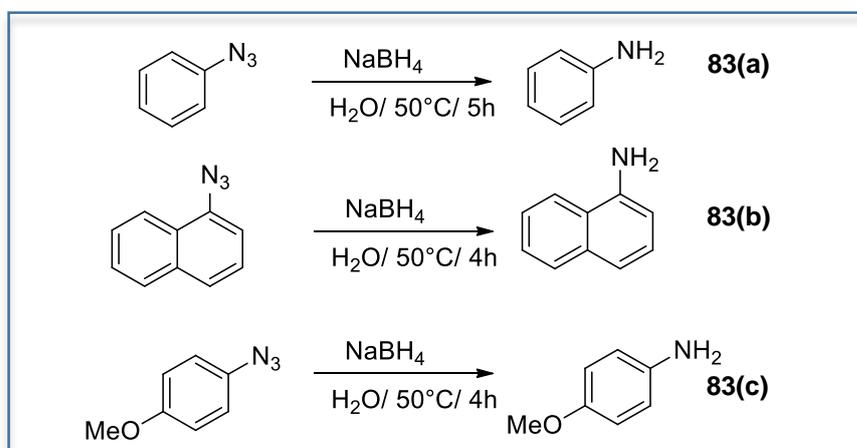
Esquema 22. Síntese de 6-amino-6-deoxicurdlans **82**.⁵⁹



Fonte: Autora

Neste ano de 2016, Du e colaboradores, prepararam amins **83 (a-c)** através da redução de azidas orgânicas, utilizando borohidreto de sódio e sal quaternário de amônio (*A-Hp-Br*) como catalisador de transferência de fase, (Esquema 23). Os autores estenderam este protocolo para reduções de carbonilas, bem como cetonas e aldeídos benzílicos com bons rendimentos e utilizaram para estas reações água como solvente.⁶⁰

Esquema 23. Síntese de amins em meio aquoso.⁶⁰



Fonte: Autora

Capítulo 2

Apresentação e Discussão dos Resultados

2. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Atualmente, a incorporação de átomos de calcogênio à moléculas biologicamente ativas, bem como, o desenvolvimento de novas rotas sintéticas para a introdução de tais átomos é um dos principais focos de interesse do nosso grupo de pesquisa.

Outra linha de pesquisa que vem despertando o interesse de nosso grupo diz respeito aos nucleosídeos, que além de terem grande aplicabilidade na indústria farmacêutica possuem centros reativos capazes de sofrerem diversas modificações.

Levando em consideração a essa reconhecida importância biológica dos organocalcogênios e as versáteis transformações nas estruturas dos nucleosídeos, planejou-se a síntese de uma série de compostos derivados da 3-azidotimidina, a incorporação de calcogênios a esses compostos e os testes das atividades biológicas pretendidas.

Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a realização do presente trabalho. Será apresentado a síntese dos 5' -arilcalcogenil-3-amino-timidina **5a-m** e para finalizar, serão discutidos os dados de caracterização dos compostos obtidos.

2.1 Análise Retrossintética

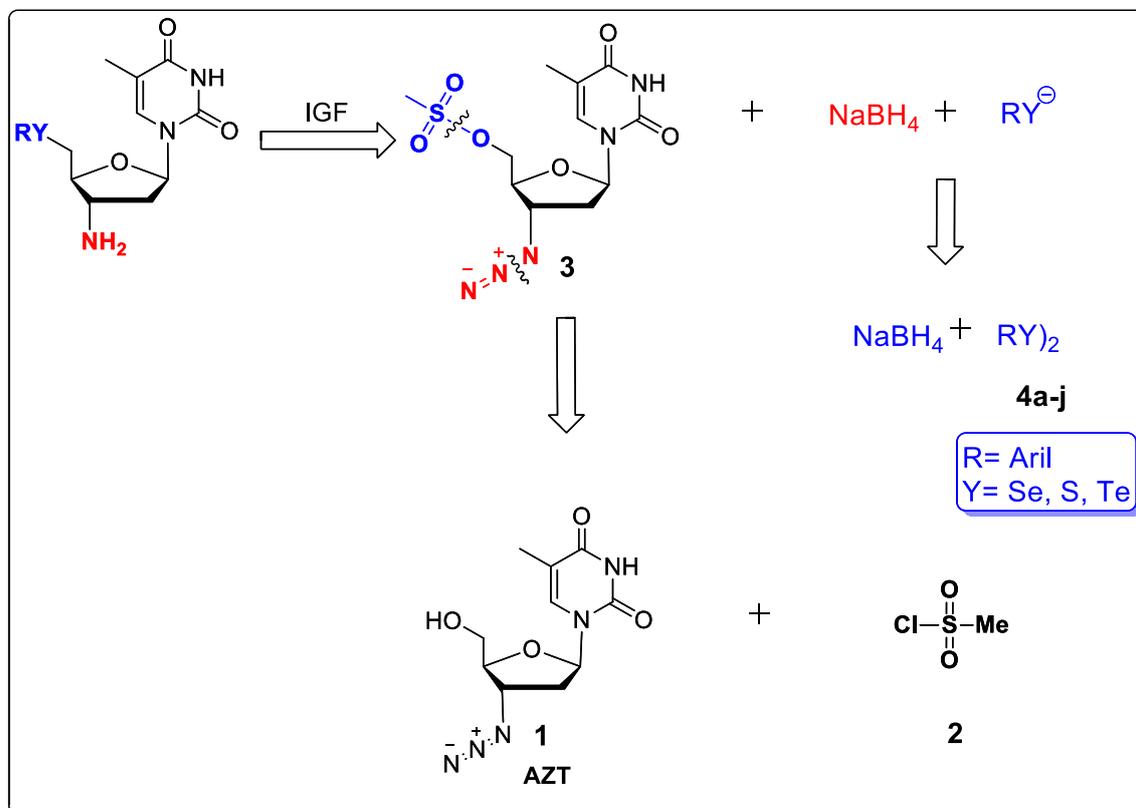
Para a síntese das moléculas alvos deste trabalho, foi proposta uma análise retrossintética, onde pode-se observar os equivalentes sintéticos precursores do produto final desejado (Esquema 24).

A 5'- arilcalcogenil-3-animo-timidina **5a-m** pode ser obtida como o produto da reação entre os dicalcogeneto **4a-j** com a 3-azidotimidina mesilada **3**, onde a conexão destas unidades pode ser realizada a partir da substituição de 3-azidotimidina mesilada **3** pela espécie nucleofílica de calcogênio.

O fragmento da amina dos compostos **5a-m** teria como equivalentes sintéticos a azida orgânica do derivado da 3-azidotimidina mesilada a qual é obtida através de uma reação de redução pelo borohidreto de sódio, disponível comercialmente.

Para a síntese da azidotimidina mesilada **3**, é necessária uma reação de substituição entre a 3-azidotimidina **1** (AZT) com o cloreto de mesila **2**.

Esquema 24- Equivalentes sintéticos precursores da 5'-arilcalcogenil-3-animotimidina derivados da 3-azidotimidina.



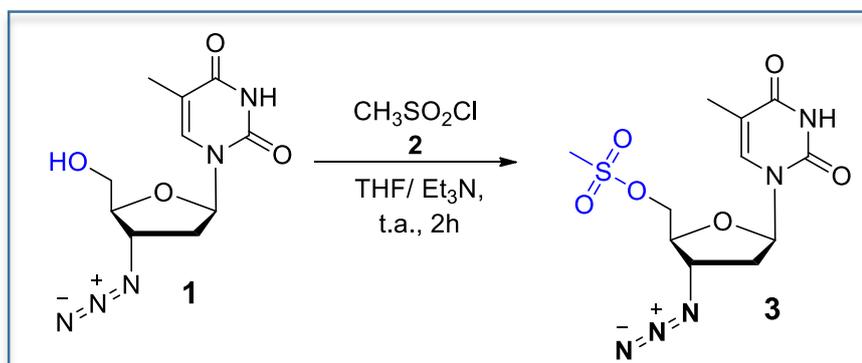
Fonte: Autora

2.2 Obtenção da 5'-O-(metanosulfonyl)-3-azidotimidina (3)

Para a obtenção do produto desejado, a primeira etapa realizada foi a preparação do composto **3** a partir da 3-azidotimidina.

As reações de mesilação são amplamente utilizadas para substituir grupamentos que não são considerados bons grupos de saída, como por exemplo da hidroxila OH. No caso da 3-azidotimidina **1**, a hidroxila está localizada em uma posição passível das transformações desejadas, porém, para que tais modificações possam ocorrer, realizou-se a modificação desta hidroxila para um grupamento mesilato, que consiste de um grupo abandonador eficiente para a transformação desejada.

Esquema 25. Síntese de 5'-O-(metanosulfonil)-3-azidotimidina **3**.



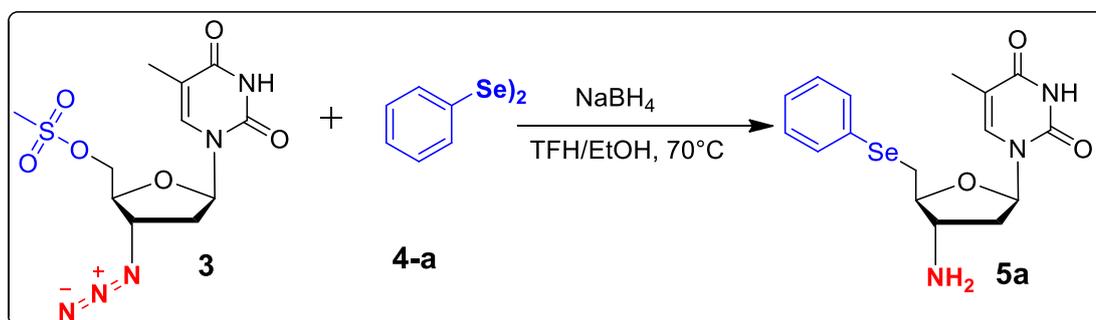
Fonte: Autora

2.3 Obtenção dos 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**)

Dando sequência ao planejamento anteriormente apresentado, seguiu-se então para o próximo objetivo proposto, que consiste nas reações de substituição nucleofílica bimolecular, empregando diferentes calcogenolatos arílicos juntamente com a redução da azida do composto **3**.

Para isso empregou-se o disseleneto de difenila como dicalcogeneto padrão, borohidreto de sódio (NaBH₄) como agente redutor em uma mistura de etanol e THF como solventes (Esquema 26).

Esquema 26. Síntese dos 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**)



Fonte: Autora

Após, adicionou-se uma solução do respectivo mesilato **3** em THF e o sistema permaneceu sob agitação a temperatura de 70°C em tempos que variaram de 5 a 24 horas, conforme esquema 26.

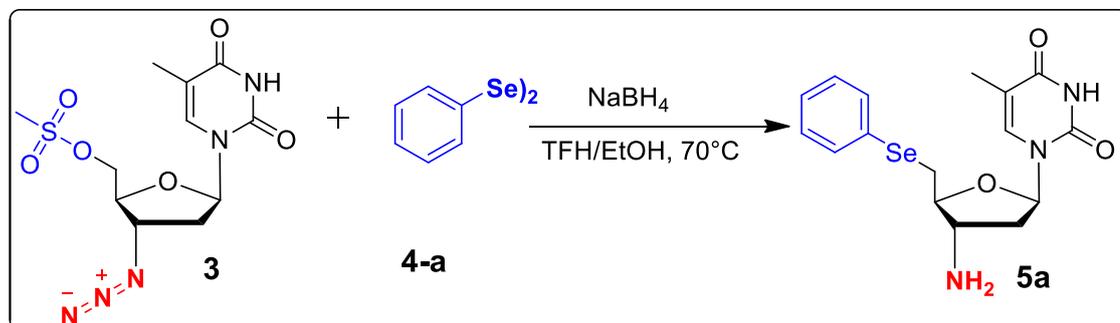
Este dicalcogeneto foi utilizado como padrão para a otimização das condições reacionais e a variação dos solventes não foi realizada, pois o emprego desta mistura THF/EtOH consiste de um sistema de solvente já bem estabelecido para estas reações.¹

Inicialmente, foi empregado 2,5 equivalentes do agente redutor NaBH₄ no período de 5 horas de reação (Tabela 1, entrada **1**). A reação foi acompanhando por placa cromatográfica em camada delgada (CCD) onde observou-se que, após este período, o material de partida não foi convertido no produto desejado, levando a formação apenas do produto de substituição, já descrito pelo nosso grupo de pesquisa.⁸

Visto esse resultado, elevou-se a quantidade do agente redutor para 5 equivalentes (Tabela 1, entrada **2**), para que seja observado além do produto de substituição, também a formação da amina desejada, nesta nova condição reacional foi possível observar a formação do composto **5a** com 38% de rendimento. Buscando uma maior eficiência deste produto, o tempo reacional desta reação foi estendido para 12 horas (Tabela 1, entrada **3**) levando a formação do produto **5a** com um rendimento de 66%. Este resultado pode ser atribuído a eficiência na redução da azida, levando a formação mais efetiva do produto em questão.

Como houve um aumento expressivo do rendimento do produto isolado com o aumento do tempo reacional de 5 para 12 horas, uma nova reação empregando 24 horas foi realizada, levando a obtenção do produto com um rendimento de 78% (Tabela 1, entrada **4**). Com esta condição reacional obtida, foi realizado o aumento da quantidade de NaBH₄ para 10 equivalentes que também levou a formação do produto desejado, com valor de rendimento de 74% (Tabela 1, entrada **5**).

Tabela 1. Otimização do tempo de reação e do agente redutor para a obtenção do produto **5a**.



(Esquema 26) Síntese dos 5'-arilcalcogenil-3-amino-timidina (**5a-m**).

| | Tempo | Agente Redutor | Solvente | Rendimento ^a (%) |
|---|-------|--------------------------------|----------|-----------------------------|
| 1 | 5h | NaBH ₄ (2,5 eq.) | THF:EtOH | - ^b |
| 2 | 5h | NaBH ₄ (5 eq.) | THF:EtOH | 38% |
| 3 | 12h | NaBH ₄ (5 eq.) | THF:EtOH | 66% |
| 4 | 24h | NaBH ₄ (5 eq.) | THF:EtOH | 78% |
| 5 | 24h | NaBH ₄ (10 eq.) | THF:EtOH | 74% |

^a Rendimentos dos produtos purificados por coluna cromatográfica.

^b Não observou-se a formação do produto desejado.

A fim de verificar a influência da temperatura na formação do produto desejado, realizou-se um teste a temperatura ambiente utilizando 5 equivalentes de NaBH₄, sendo o consumo dos matérias de partida bem como a formação do produto foram monitorados por CCD. Cabe ressaltar que foi observado a formação do produto porém com diversos subprodutos com valores de retenção (rf) muito próximos ao do composto **5a**, não sendo possível isolá-lo para análise.

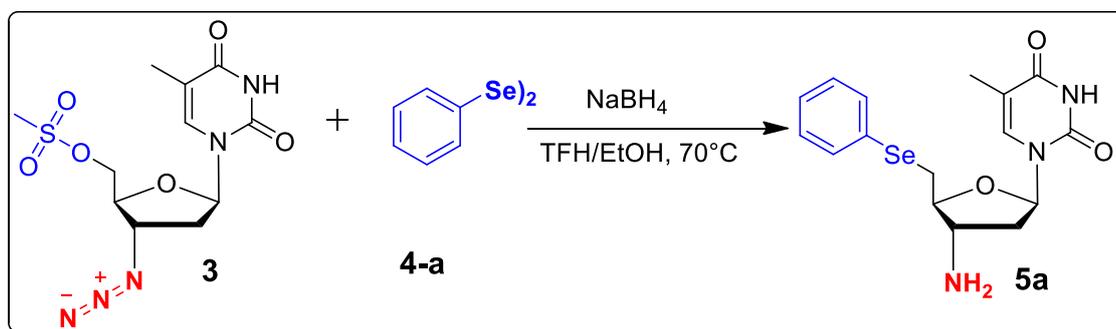
Com este estudo, observou-se que houve a necessidade de fornecer uma maior energia ao sistema de reação para a obtenção do produto desejado **5a**.

Adicionalmente foi possível verificar que não houve a necessidade de uma quantidade expressiva do reagente redutor, pois na Tabela 1, entradas **4** e **5**, não ocorreu um acréscimo no rendimento quando dobrou-se a quantidade do NaBH₄.

Desta forma, pode-se comprovar a eficiência da condição reacional estabelecida para sintetizar os produtos **5a-m**, utilizando NaBH₄ na preparação dos produtos **5a-m**.

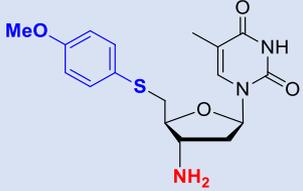
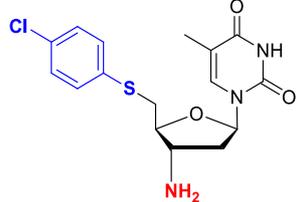
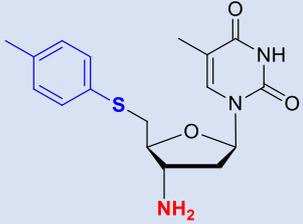
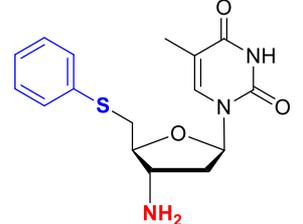
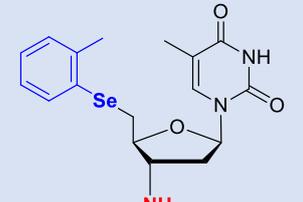
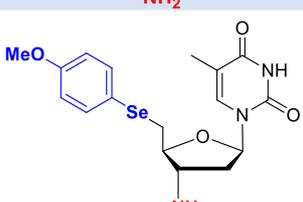
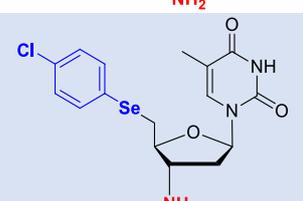
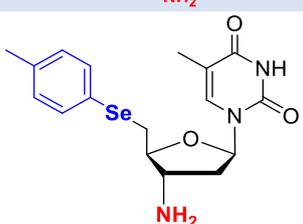
De posse destes estudos, estabeleceu-se a condição para a reação de substituição nucleofílica e redução utilizando-se NaBH₄ como agente redutor, (5 equivalentes), THF e etanol como solvente (7mL:3mL), 0,5 mmol do dicalcogeneto e 1mmol da 3-azidotimidina mesilada **3**, à temperatura de refluxo. A partir disso, seguiu-se a síntese da 3-azidotimidina mesilada **3** e variando-se a fonte de calcogênio **4a-j**, todas acompanhadas por CCD (Tabela 2).

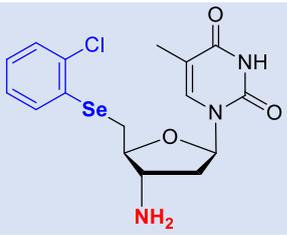
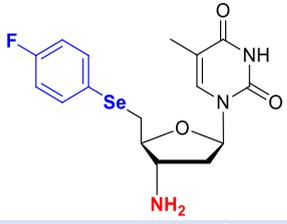
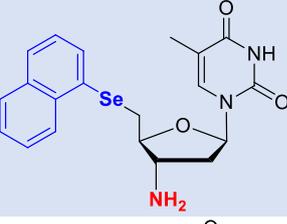
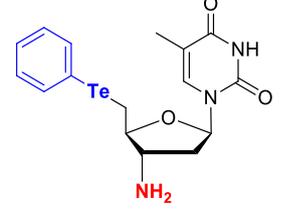
Tabela 2. Estruturas e rendimentos obtidos dos compostos calcogeno amina **5a-m** derivados da 3-azidotimidina **1**.



(Esquema 26) Síntese dos 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**).

| Entrada | Composto | Produto | R | Rendimento (%) ^a |
|---------|----------|-----------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | | 5a | C ₆ H ₅ | 78 |

| | | | | |
|---|---|----|-------------------------------------|----|
| 2 |  | 5b | 4-MeO-C ₆ H ₄ | 60 |
| 3 |  | 5c | 4-Cl-C ₆ H ₄ | 20 |
| 4 |  | 5d | 4-Me-C ₆ H ₄ | 47 |
| 5 |  | 5e | C ₆ H ₅ | 82 |
| 6 |  | 5f | 2-Me-C ₆ H ₄ | 70 |
| 7 |  | 5g | 4-MeO-C ₆ H ₄ | 72 |
| 8 |  | 5h | 4-Cl-C ₆ H ₄ | 68 |
| 9 |  | 5i | 4-Me-C ₆ H ₄ | 40 |

| | | | | |
|-----------|--|-----------|------------------------------------|----|
| 10 |  | 5j | 2-Cl-C ₆ H ₄ | 62 |
| 11 |  | 5k | 4-F-C ₆ H ₄ | 62 |
| 12 |  | 5l | C ₁₀ H ₇ | 42 |
| 13 |  | 5m | C ₆ H ₅ | 48 |

Fonte: Autora

^a Rendimentos dos produtos purificados por coluna cromatográfica.

Analisando os valores descritos na Tabela 2, pode-se fazer algumas considerações. Por exemplo, com relação ao átomo de calcogênio, é possível observar que a maioria dos compostos foram obtidos em bons rendimentos sendo que os selenetos foram obtidos com um rendimento levemente superior aos sulfetos (Tabela 2 Entradas **1**, **3-5** e Entrada **9**, **10-12** respectivamente). Isso pode ser explicado, devido ao átomo de selênio ser mais nucleofílico quando comparado com o átomo de enxofre. Com relação ao átomo de telúrio, o respectivo produto **5m**, (Tabela 2, Entrada **13**) foi obtido com um decréscimo no rendimento quando comparado com os átomos de selênio e enxofre, isso pode ser explicado devido à instabilidade do ânion teluroato no meio reacional.

Em termo de efeito eletrônico do substituinte ligado ao anel aromático, grupos doadores de elétrons levaram a formação dos produtos com rendimento levemente superiores aos grupos retiradores de elétrons. Essa diferença pode ser atribuída ao

efeito de nucleofilicidade dos calcogenolatos com grupamentos ativantes de elétrons ligados ao anel aromático (Tabela 2, Entrada **2, 6 e 7**).

Os rendimentos obtidos para os produtos **5a** e **5e** sem substituintes no anel aromático podem ser atribuídos devido a não existência dos efeitos dos grupos desativantes e ativantes. Por exemplo, a presença de grupamentos ativantes podem aumentar a nucleofilicidade do calcogenolato formado, mas por outro lado podem dificultar a clivagem do disseleneto para gerar o ânion, enquanto que por sua vez, os grupamentos desativantes podem auxiliar na clivagem do dicalcogeneto mas de contra partida diminuem a nucleofilicidade do calcogenolatos. Pode-se observar que na presença de grupamentos eletronicamente neutros, neste caso um átomo de H, (Entradas **1, 5 e 13**) o somatório destes efeitos parece ser favorável quanto a reatividade dos calcogenolatos formados, levando a formação dos produtos com uma alta eficiência.

A fim de exemplificar os efeitos dos substituintes, além dos efeitos eletrônicos citados anteriormente, foi realizado um teste com o grupamento naftila e este apresentou um menor rendimento quando comparado com o grupamento fenila como substituinte (Tabela 1, Entradas **1 e 12**). Este fato pode ser atribuído ao maior impedimento estérico do substituinte naftila que interfere na aproximação do centro eletrofílico acarretando uma diminuição no rendimento.

Cabe destacar que foram realizados testes com ditelureto de arila com substituintes ativantes e desativantes, (4-CH₃-C₆H₄, 4-Cl-C₆H₄) respectivamente e para estes não foi observado a formação do produto desejado, não sendo realizado o procedimento de extração do produto bruto tão pouco o de purificação, já que ao desligar o sistema de reação observou-se um pó de cor cinza escuro suspenso na solução que pode tratar-se de telúrio elementar. É importante ressaltar o apelo verde para esta metodologia, uma vez que são realizadas duas transformações em uma única etapa reacional: uma substituição nucleofílica do mesilato pelos respectivos calcogenolatos e a redução da azida para a amina desejada. Este processo *one-pot*, para duas transformações faz com que somente uma etapa de extração e purificação para ambas as modificações químicas seja realizada, diminuindo assim o uso de solvente e sílica para as etapas descritas.

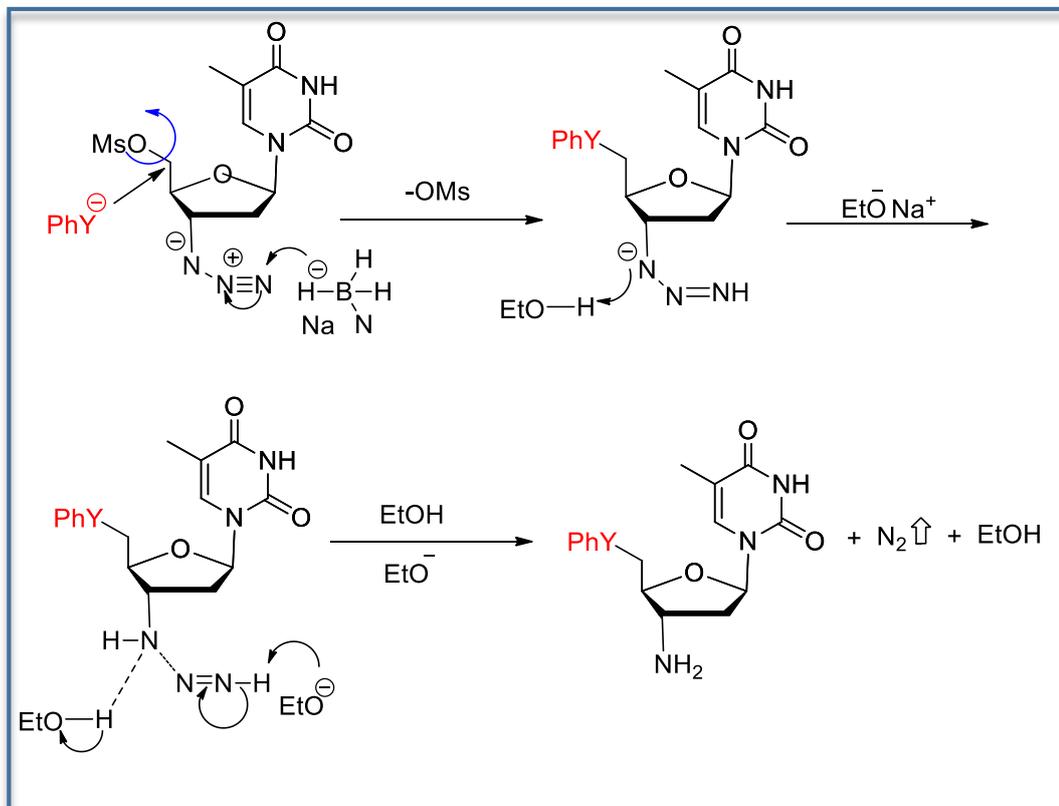
É importante salientar que todos os compostos **5a-m** sintetizados são inéditos e foram identificados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, carbono 13 e através de análise de massas de alta resolução.

Uma proposta mecanística para a obtenção das aminas sintetizado neste trabalho, pode ser observado no Esquema 27.

Primeiramente, o nucleófilo hidreto, proveniente do agente redutor borohidreto de sódio ataca o centro eletrofílico da azida deslocando a carga para o nitrogênio seguinte. O nitrogênio nucleofílico ligado diretamente ao AZT, captura um próton proveniente do etanol previamente adicionado no meio reacional. Concertadamente, uma espécie de etóxido captura o próton do nitrogênio que desloca a ligação para a eliminação de nitrogênio na forma de gás, enquanto que outro próton é capturado pelo nitrogênio ligado diretamente ao AZT para a formação da amida final.

Juntamente com a redução da azida, ocorre a clivagem do dicalcogeneto diarílico também com o mesmo agente redutor de boro. Por conseguinte, desta clivagem é gerado duas espécies: o selenolato e o selenol. Através de uma reação de substituição nucleofílica bimolecular, o selenolato atuará como nucleófilo e irá atacar o carbono eletrofílico a fim de substituir o grupamento mesilato pela espécie de organocalcogênio (Esquema 27).

Esquema 27. Mecanismo proposto para a formação das aminas desejadas.

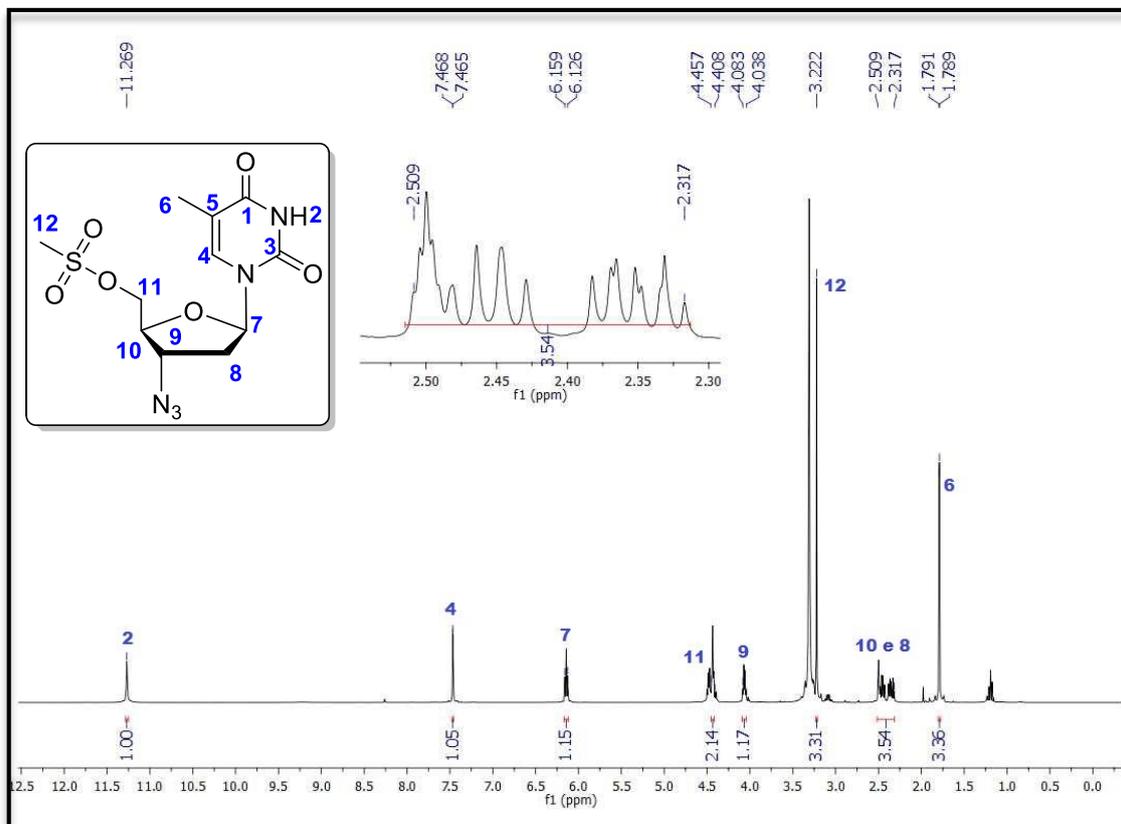


Fonte: Autora

A título de exemplo, será discutida a atribuição dos sinais do espectro de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN ¹H) e carbono 13 (RMN ¹³C) do composto derivado da azidotimidina mesilato **3**, Figura 27

A Figura 31 mostra o espectro de RMN ¹H do mesilato **3** derivado a azidotimidina **1**, em DMSO-d₆ a 400 MHz, onde pode-se observar o simpleto em 11,27 ppm, referente ao hidrogênio **2** do grupamento NH-**2** e em 7,47 ppm o duplete referente ao H-**4** da base nitrogenada do composto **3**. Em 6,14 ppm observa-se o tripleto referente ao hidrogênio H-**7** do anel nucleosídeo e em 4,46–4,41 ppm pode-se observar os multipletos referentes aos hidrogênios H**11**- H**11**' do CH₂ ligados ao mesilato, já em 4,09 – 4,04 ppm observa-se o multipletos que referem-se ao hidrogênio H-**9** do anel nucleosídeo. Logo em seguida observa-se o simpleto referente à metila do mesilato CH₃-**12**. O multipletos na região de 2,47-2,31 ppm é referente ao hidrogênio H-**10** ligado a azida e o CH₂ -**8** do anel nucleosídeo. E por fim, na região de 1,79 ppm observa-se o duplete referente a metila CH₃-**6** da base do composto **3**.

Figura 31. Espectro de RMN ^1H do composto **3** em DMSO- d_6 a 400 MHz.

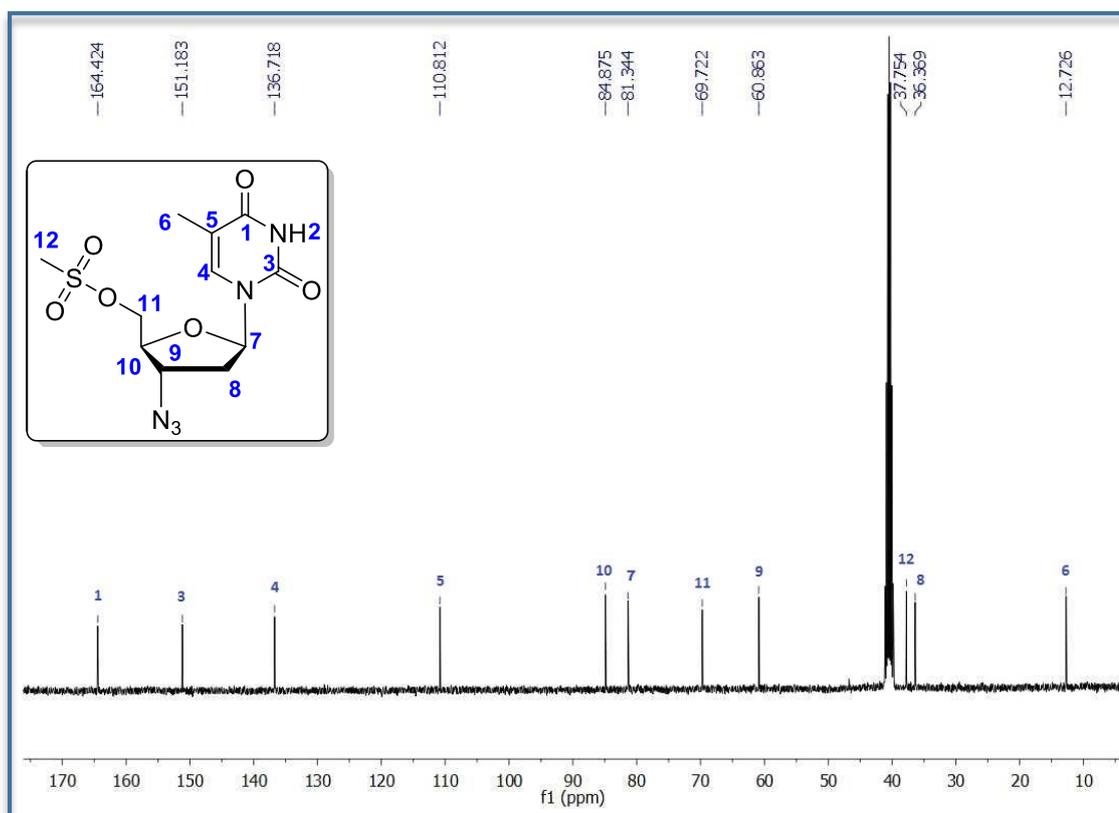


Fonte: Autora

A seguir, será discutida a atribuição dos sinais de carbono no espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN ^{13}C), utilizando o composto 3-azidotimidina mesilada **3**.

A Figura 32 apresenta o espectro de ^{13}C do mesilato **3**, onde pode-se observar em 164,42 ppm e 151,18 ppm os carbonos carbonílicos C-1 e C-3, respectivamente nos deslocamentos químico de 136,71 e 110,81 ppm, visualiza-se os sinais de carbonos C-4 e C-5. Na região compreendida entre 84-60 ppm, mais precisamente nos deslocamentos de 84,87; 81,34; 69,72 e 60,86 ppm pode se observar os carbonos C-10, C-7, C11 e C-9, respectivamente, estes referem-se ao anel nucleosídeo e ao CH_2 ligado ao mesilato e em 37,75 e 12,73 ppm observa-se as metilas C-12 e C-6, respectivamente. E por fim, no deslocamento químico de 36,37 ppm encontra-se o sinal referente ao carbono C-8, do anel nucleosídeo.

Figura 32. Espectro de RMN ^{13}C do composto **3** em DMSO- d_6 a 100 MHz.



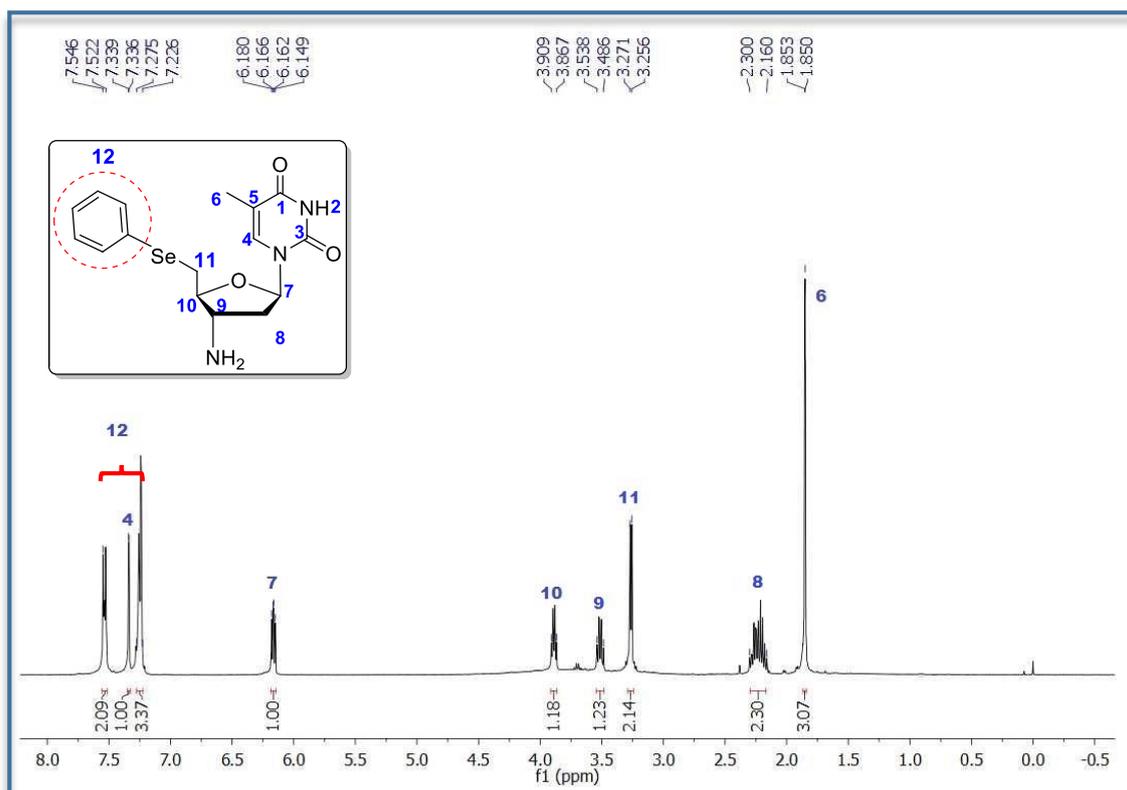
Fonte: Autora

Na sequência, será discutida a atribuição dos sinais do espectro de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN ^1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C) utilizando composto calcogeno amina **5a** como exemplo.

A Figura 33 visualiza-se o espectro de RMN ^1H do composto **5a**, em CDCl_3 a 400 MHz, o qual foi obtido através de reação de redução e substituição do composto **3a** com o dicalcogeneto **4a**. Neste espectro é possível observar os sinais característicos do duplete em 7,43 ppm referente ao hidrogênio H-4, seguidos dos cinco hidrogênios H-12 do anel aromático desdobrados em um multiplete entre 7,57 ppm e 7,18 ppm, mostrando que houve a substituição do mesilato pelo grupamento SePh. Após, o duplo duplete em 6,16 ppm referente ao hidrogênio H-7; em 3,93 ppm e 3,84 ppm pode-se observar o multiplete referentes ao hidrogênio H-10 e em 3,55 ppm e 3,48 ppm o multiplete referente ao hidrogênio H-9. Identifica-se outro multiplete referente aos hidrogênios H-11 localizado no deslocamento químico na faixa de 3,29 ppm e 3,24 ppm.

Já em 2,31 ppm e 2,13 ppm observa-se um multiplete com integral relativa para dois hidrogênios que correspondem ao H-8 do CH₂ ligado aos substituinte SePh, por fim, verifica-se a presença de um duplete com integral relativa a três hidrogênios do H-6 no deslocamento químico de 1,82 ppm, o qual foi atribuído aos hidrogênios pertencentes a metila da base nitrogenada.

Figura 33. Espectro de RMN ¹H do composto **5a** em CDCl₃ a 400 MHz.



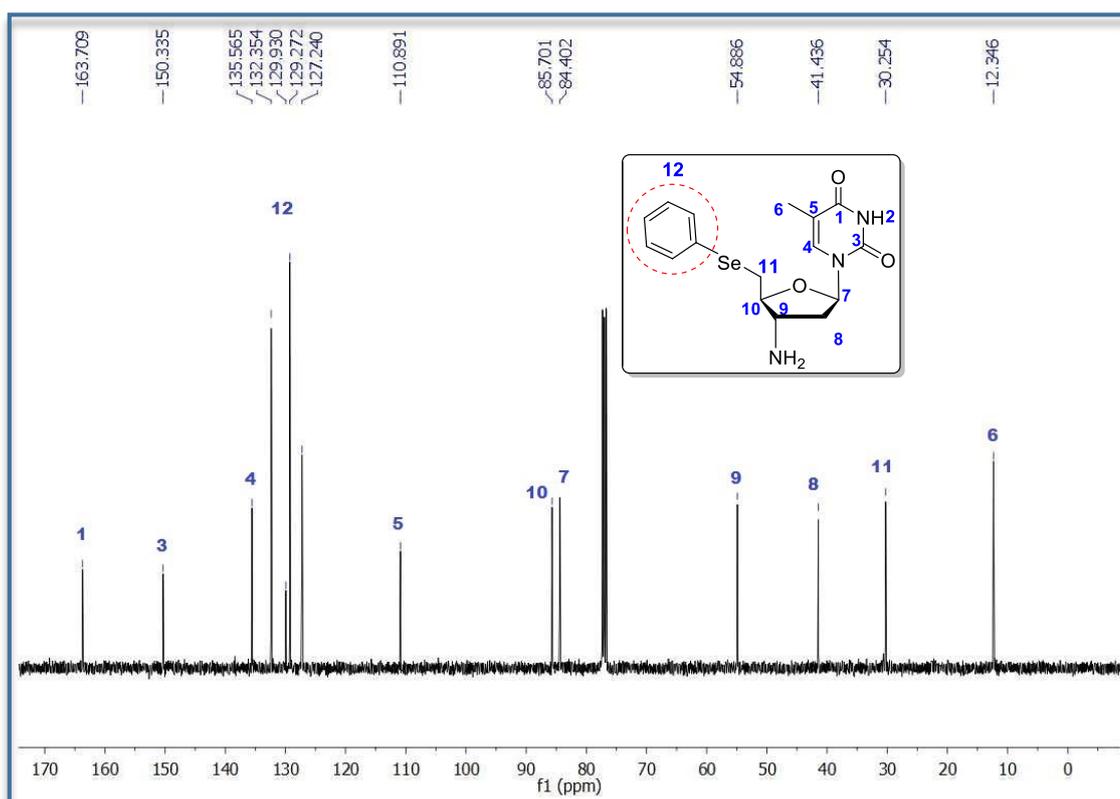
Fonte: Autora

Após essas atribuições, fica claro que há uma diferença no espectro de RMN ¹H do composto **5a** e do composto 3-azidotimidina mesilada **3** principalmente em relação ao aparecimento dos sinais na região dos hidrogênios ligados ao anel aromático. Também não foi observado nos espectros de RMN ¹H o hidrogênio da amina, proveniente do grupamento azida da 3-azidotimidina **1** cuja transformação foi um dos principais alvos desta síntese, com exceção do composto **5c** que exibiu o simpleto largo da amina no deslocamento químico na faixa de 4.28 ppm. Isso pode ser explicado pela diferença de solvente utilizado no preparo da amostra da 3-

azidotimidina mesilada **3** (DMSO- d_6) e pela concentração da amostra do composto **5c** preparada com $CDCl_3$.

Na Figura 34, podemos observar os sinais de RMN ^{13}C para o composto **5a**, em $CDCl_3$ a 100 MHz, onde pode-se observar que em relação ao espectro de RMN ^{13}C do composto **3**, o espectro de RMN ^{13}C para o composto **5a** apresenta os sinais referentes ao anel aromático na região entre 132 ppm a 127 ppm e no deslocamento químico de 30 ppm observa-se o sinal do CH_2 referente aos C-11. Na região característica para átomos de carbonos pertencentes a grupamentos alquílicos e ligados a heteroátomos, observa-se a presença do sinal do carbono C-9 localizado no deslocamento químico de 54 ppm.

Figura 34. Espectro de ^{13}C do composto **5a** em $CDCl_3$ a 100 MHz.



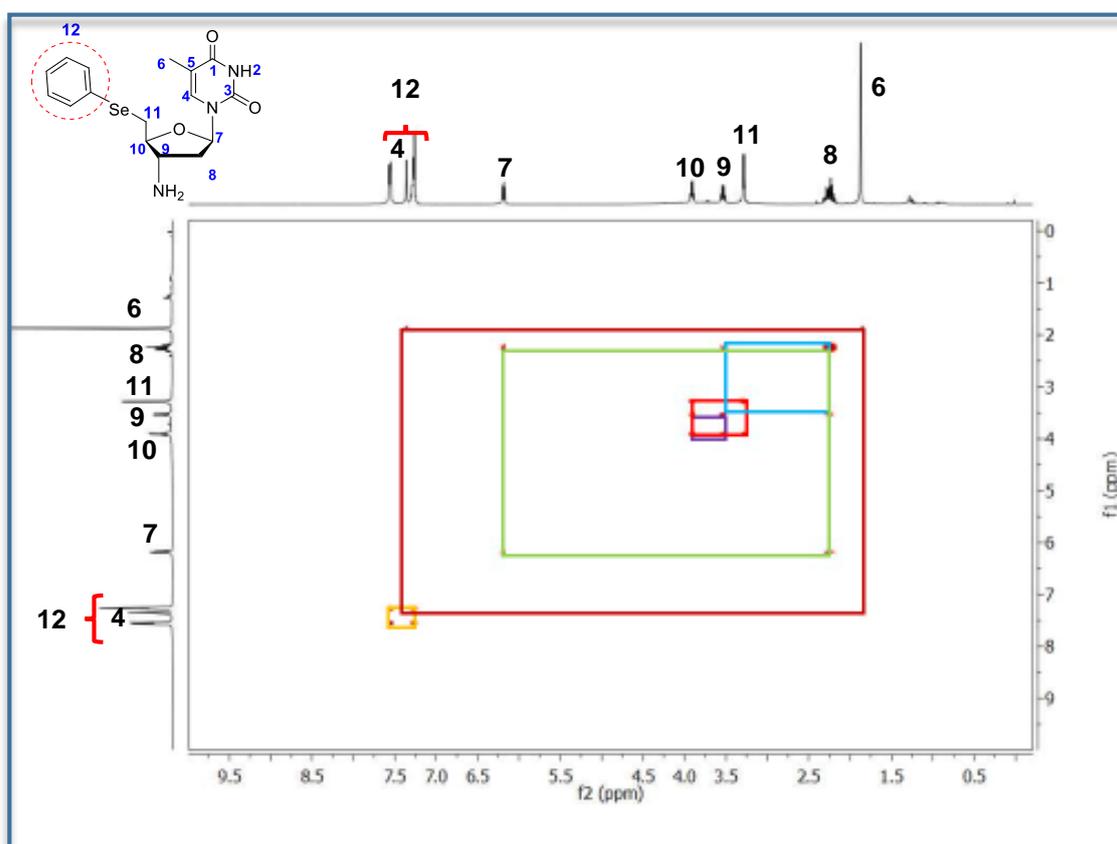
Fonte: Autora

Adicionalmente, foram realizados experimentos de RMN em duas dimensões, com a finalidade de confirmar as atribuições realizadas nos espectro de ressonância magnética nuclear do hidrogênio (RMN 1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C). Para isso, experimentos de RMN-2D HSQC e COSY do composto **5a** foram realizados.

No experimento de RMN-2D COSY homonuclear ^1H - ^1H do composto **5a**, são observadas as correlações entre hidrogênios pertencentes a um mesmo sistema de spins. No espectro resultante, observa-se a formação de uma diagonal que representa o espectro em uma dimensão, e sinais fora da diagonal sob forma de pares simétricos, representam os sistemas de acoplamento dos hidrogênios.

No espectro COSY homonuclear ^1H - ^1H , em DMSO- d_6 (Figura 35), pode-se observar sistemas de spins distintos. Em um primeiro momento, observa-se um sistema de spins no qual apresenta relação entre hidrogênios ligados os anel aromático presentes no deslocamento entre 7,5 ppm e 7,1 ppm. Observa-se um segundo sistemas de spins que correlaciona os hidrogênios H-7 com o H-8. Por fim, identifica-se os acoplamentos dos hidrogênios do anel nucleosídico da região na faixa de 4,0-3,0 ppm e outro sistemas de spins que corresponde aos hidrogênios H-10, H-9 e o H-11.

Figura 35. Espectro de COSY-2D do composto **5a** em DMSO- d_6 .



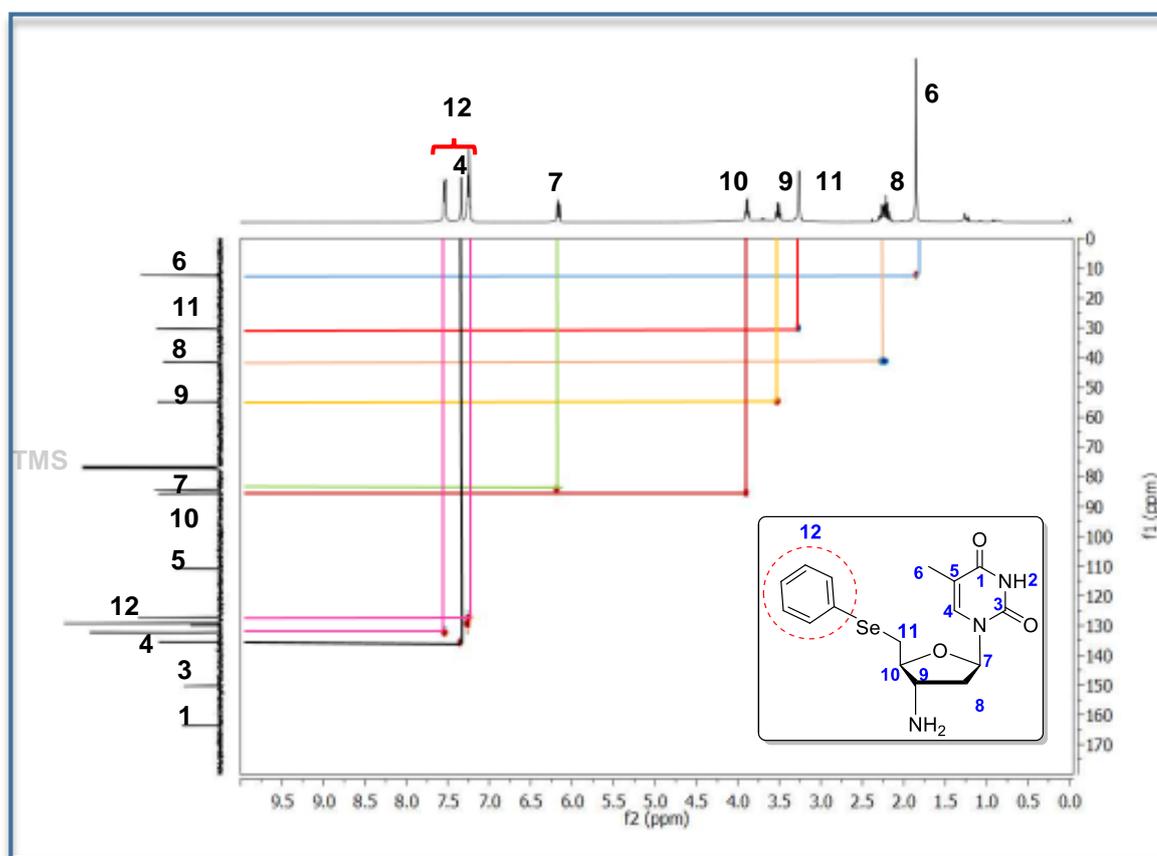
Fonte: Autora

No espectro de RMN-2D heteronuclear HMQC (Figura 35), foram analisados os acoplamentos carbono-hidrogênio, a distância de uma ligação.

A fim de confirmar a atribuição realizada nos espectros de hidrogênios e carbono-13 do composto **5a**, um espectro de em duas dimensões

Analizando as correlações presentes no espectro, pode-se observar as correlações dos carbonos com seus respectivos hidrogênios, demonstrando as atribuições anteriormente realizadas. Cabe destacar os hidrogênios H-11 presentes no deslocamento de 3,26 ppm e os hidrogênios H-8 em 2,23 ppm que estão relacionados com os carbonos C-11 e C-8.

Figura 35. Espectro de HMQC-2D do composto **5a** em CDCl_3 .



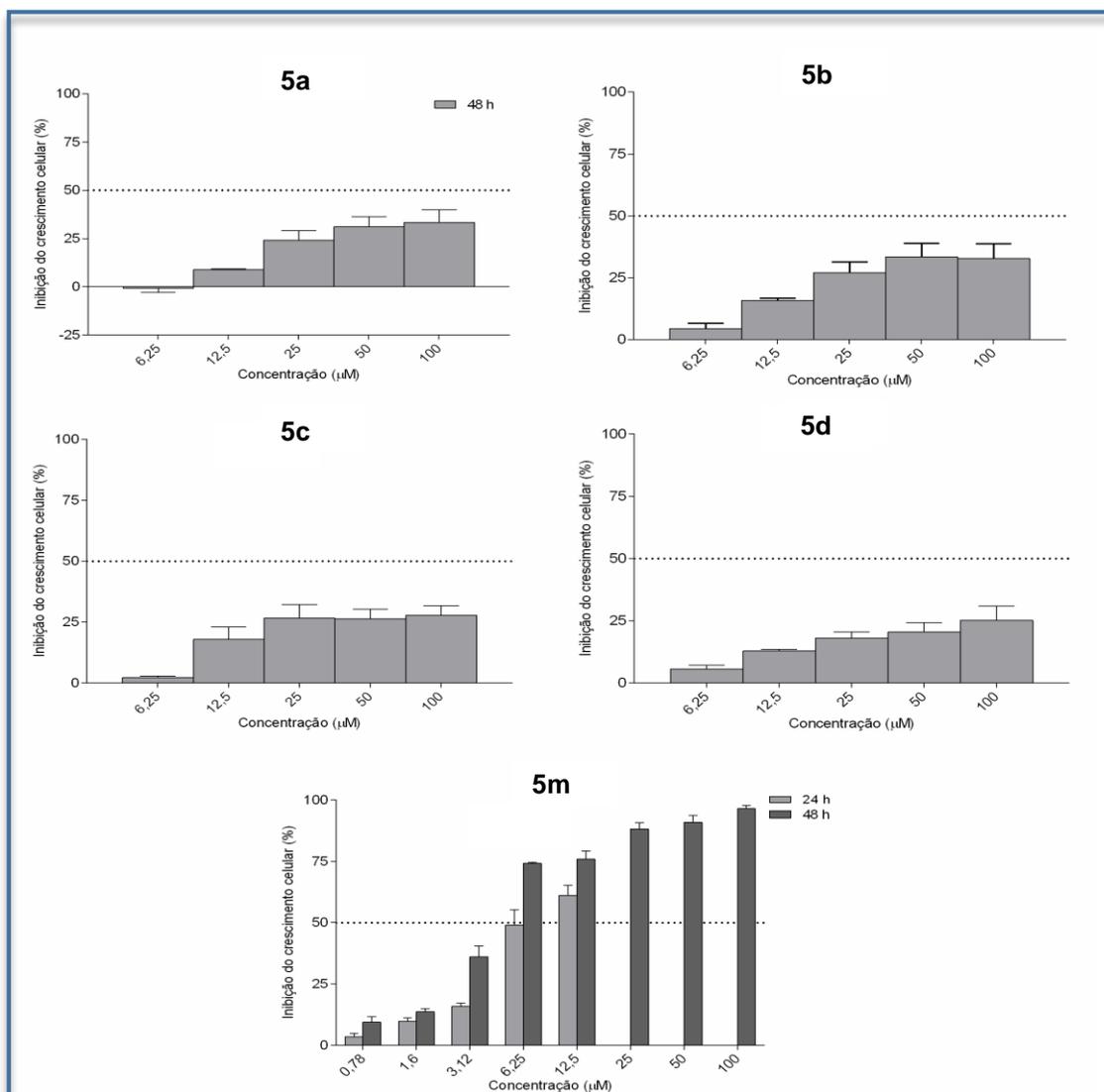
Fonte: Autora

2.4 Análise da atividade antitumoral

Os ensaios de atividades biológicas foram realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no grupo de pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – GPO,

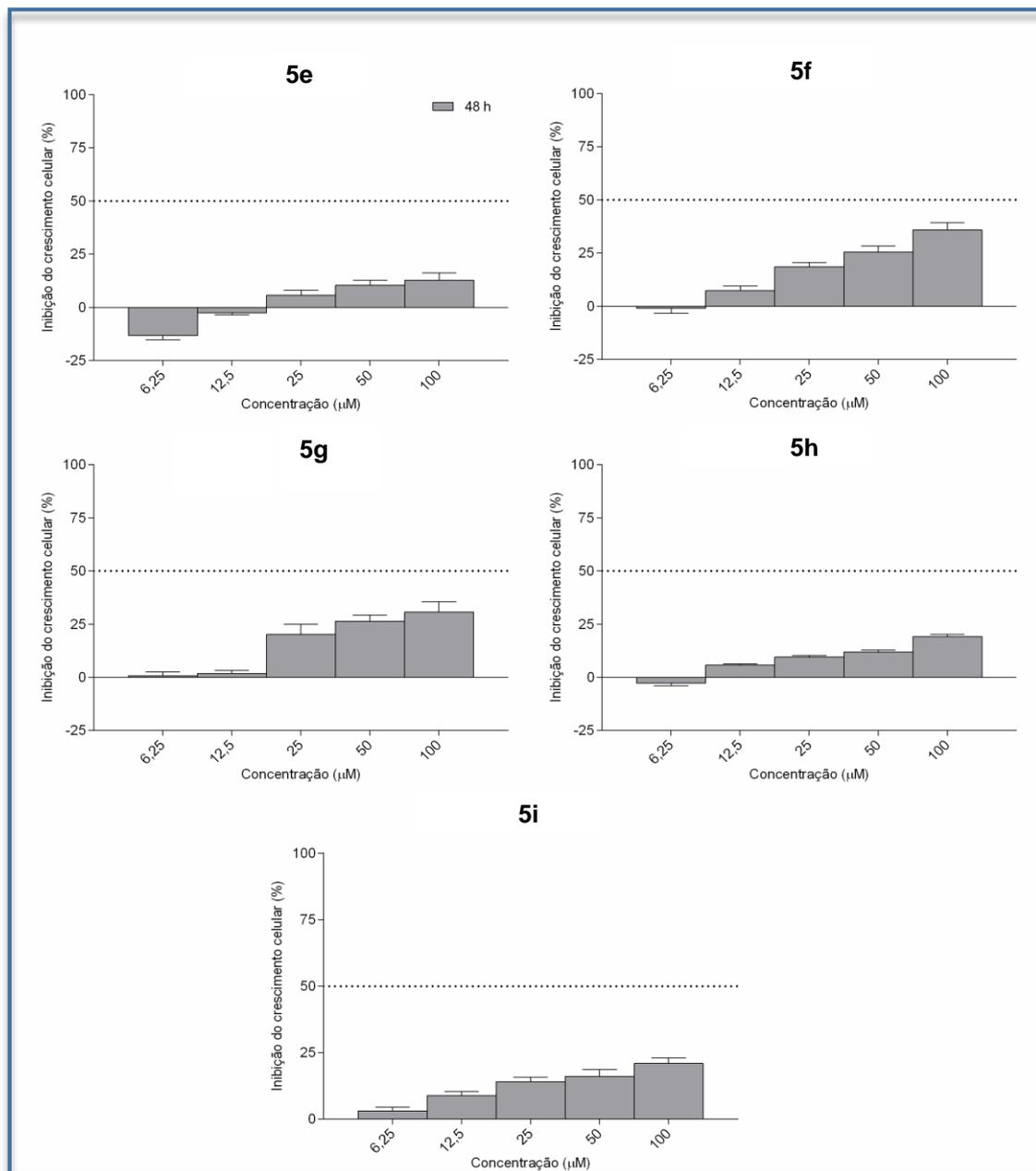
sob coordenação do Prof. Dr. Tiago Collares e Prof. Dr. Fabiana Seixas. Todos os compostos inéditos sintetizados neste trabalho foram testados para avaliar sua atividade biológica. O composto que apresentou atividade antitumoral para -5637- (células de carcinoma de bexiga humano) foi composto 5'-Teluro-(fenil)-3-(amino)-timidina **5m**. Observa-se que os derivados **5a**, **5b**, **5c**, **5d** (Figura 36), **5e**, **5f**, **5g**, **5h** e **5i** (Figura 36), os quais contém em sua estrutura moléculas de enxofre (S) e selênio (Se), não demonstraram toxicidade em comparação com o derivado **5m** (Figura 37). O composto **5m** foi exposto a concentrações de 0,78 a 100 μM , também nos tempos 24 h e 48 h.

Figura 36. Porcentagem de inibição do crescimento celular de 5637 após o tratamento com doses de 6,25 a 100 μM dos derivados **5a**, **5b**, **5c** e **5d** por 48 h.



Fonte: Autora

Figura 37. Porcentagem de inibição do crescimento celular de 5637 após o tratamento com doses de 6,25 a 100 μM dos derivados **5e**, **5f**, **5g**, **5h** e **5i** em 48h.



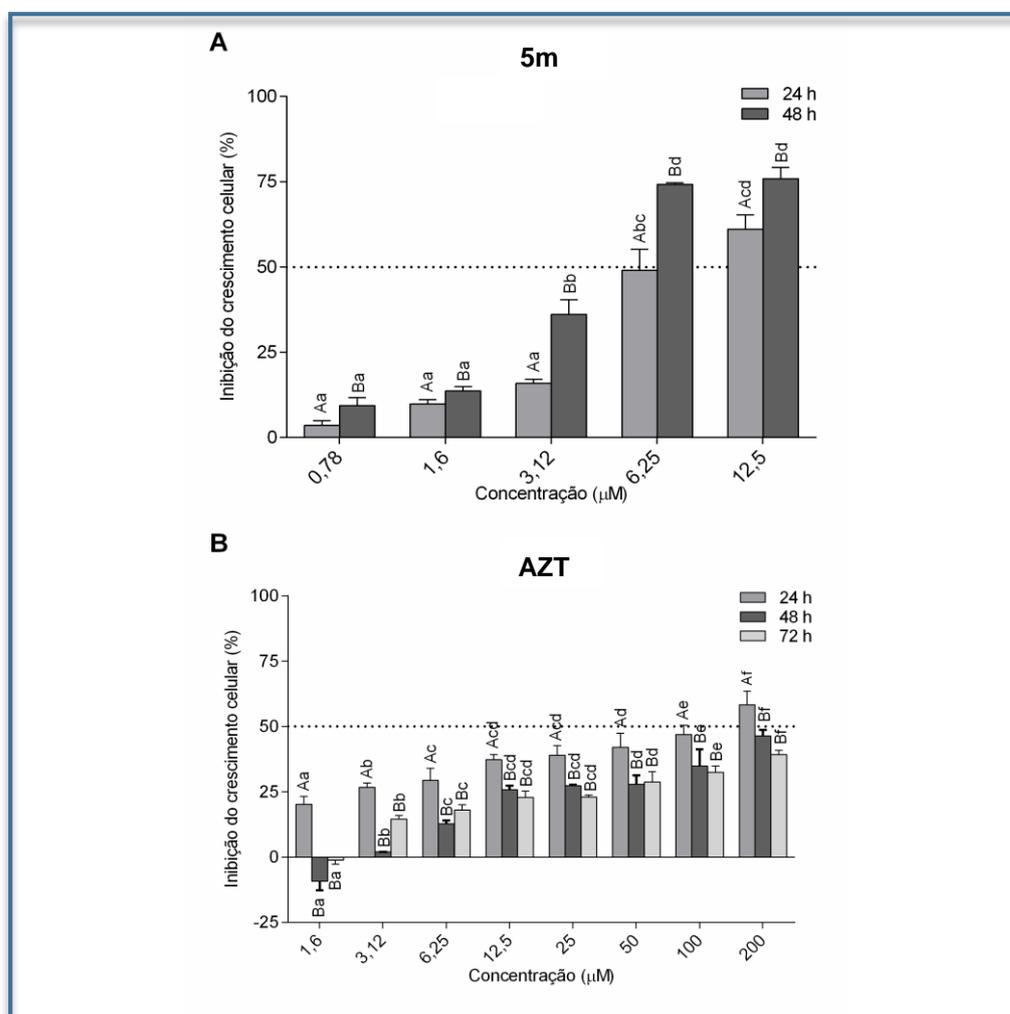
Fonte: Autora

Como o composto **5m** demonstrou ser interessante, este foi investigado mais detalhadamente tendo seu potencial de citotoxicidade avaliado em doses mais baixas de 0,78 μM e no tempo de 24 h de exposição.

Na figura 38, a porcentagem de inibição do crescimento de células da linhagem 5637 avaliada pelo ensaio de redução da microcultura de tetrazólio-MTT- (3-(4,5-

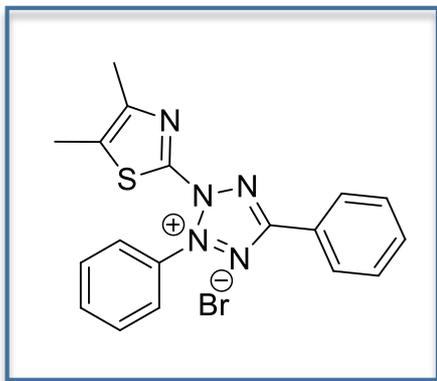
dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) representado na figura 39. Na figura correspondente **A**, as células 5637 tratadas com o derivado de AZT **5m** nas concentrações de 0,78; 1,6; 3,12; 6,25 e 12,5 μM nos tempos de 24 e 48 h, já em **B** células 5637 tratadas com o AZT convencional nas concentrações de 1,6; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 μM durante 24, 48 e 72 h. Letras maiúsculas representam as diferenças entre os tempos analisados e as letras minúsculas representam as diferenças entre as concentrações. Dados apresentados como média \pm SEM.

Figura 38. Porcentagem de inibição do crescimento de células da linhagem 5637 avaliada pelo ensaio de redução do MTT.



Fonte: Autora

Figura 39. Estrutura do MTT utilizado para testes de toxicidade.



Fonte: Autora

Doses mais baixas de **5m** foram necessárias para inibir a proliferação de células de carcinoma de bexiga, com um valor de inibição do crescimento (IC_{50}) de 6,61 μ M em 24 h de tratamento (Tabela 3). Este resultado demonstra que somente o derivado de AZT contendo uma molécula de telúrio (Te) em sua estrutura demonstrou toxicidade na linhagem celular avaliada.

Tabela 3. Valores de IC_{50} para AZT e seu derivado 148 em células tumorais de bexiga^a.

| IC_{50} (μ M) | 24 h | 48 h |
|----------------------|-------------------|-----------------|
| AZT | 128,82 \pm 1,43 | - |
| 5m | 6,61 \pm 2,02 | 7,94 \pm 1,92 |

Fonte: Autora

^a Os valores que inibem 50% do crescimento (IC_{50}) foram determinados a partir dos dados obtidos do ensaio de viabilidade celular (MTT) em triplicata independente. Dados apresentados como $IC_{50} \pm$ SEM.

2.5 Análise de Atividade Antioxidante e Toxicidade Celular

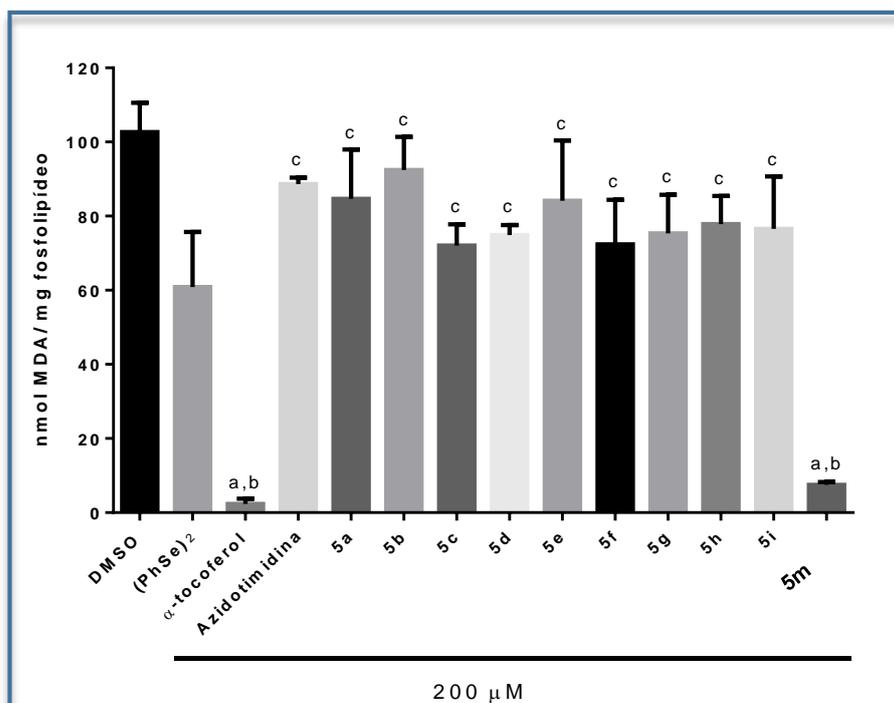
2.5.1 Análise de Atividade Antioxidante

Os ensaios de atividades biológicas foram realizados na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no grupo de pesquisa em Bioquímica Toxicológica, sob coordenação do Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha.

O potencial antioxidante dos compostos derivados da 3-azidotimidina **1** foram investigados em três sistemas: inibição da oxidação da fosfatidilcolina induzida por ferro (produção de TBARS),⁵⁷ o trapeamento do radical livre 2,2-difenilpicrilhidrazil (DPPH)⁵⁸ e atividade mimética da tiol peroxidase⁶⁰. Dos dez compostos testados, somente o **5m** exibiu um efeito inibitório contra a oxidação da fosfatidilcolina induzida por Fe(II) (Figura 40). O composto **5m** foi mais eficiente do que o disseleneto de difenila e apresentou efeito similar ao α -tocoferol (controles positivos).

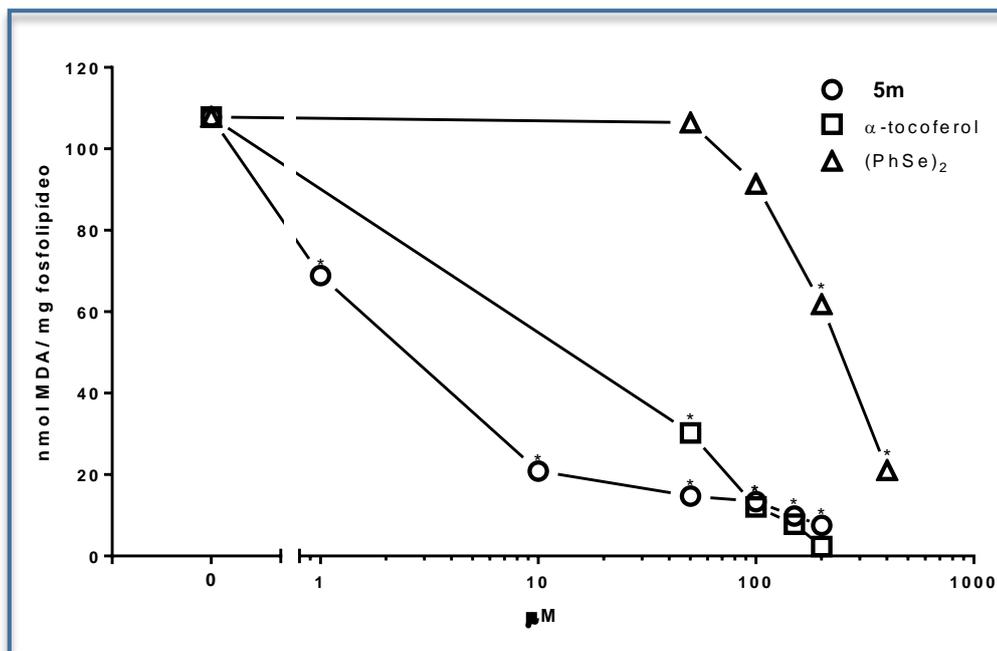
Em seguida realizamos uma curva de concentração inibitória para o composto **5m** (Figura 41). O cálculo do IC₅₀ para a inibição da peroxidação lipídica foi $4,67 \pm 0,33 \mu\text{M}$ (**5m**), $35,3 \pm 3,48 \mu\text{M}$ (α -tocoferol) e $232,7 \pm 15,38 \mu\text{M}$ (disseleneto de difenila). Os valores de IC₅₀ do composto **5m** foram significativamente menores do que os encontrados para o disseleneto de difenila e similar ao obtido para o α -tocoferol ($p < 0,05$ para ambas as comparações).

Figura 40. Efeito dos compostos derivados da azidotimidina (200 μM) na inibição da peroxidação lipídica induzida pelo ferro. O disseleneto de difenila (PhSe)₂ e o α -tocoferol (200 μM) foram utilizados como controles positivo; a \neq DMSO; b \neq (PhSe)₂; c \neq α -tocopherol.



Fonte: Autora

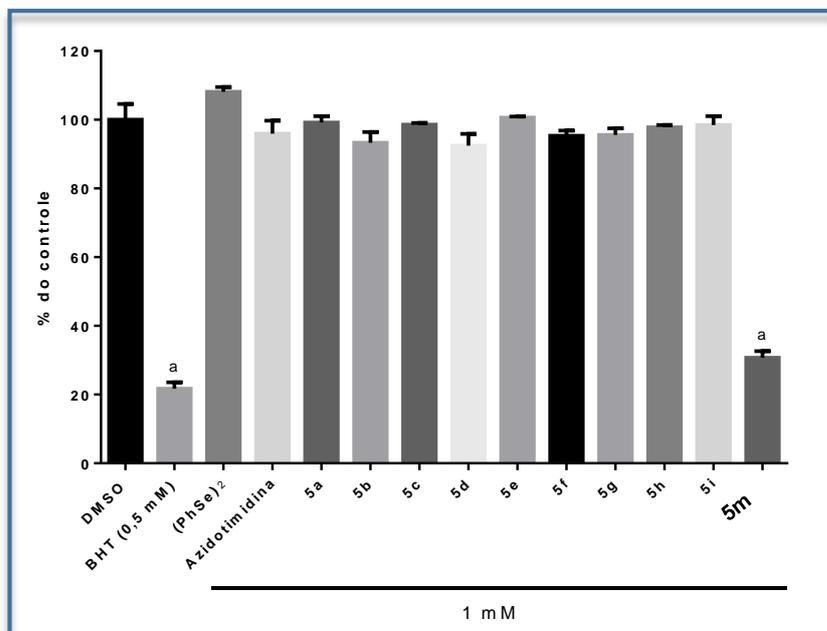
Figura 41. Curva de concentração inibitória da peroxidação lipídica pelo composto **5m**, (PhSe)₂ e α-tocoferol. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de três determinações. * ≠ 0 μM. Os dados foram analisados utilizando o método ANOVA (análise estatística) de uma (A) e duas (B) vias seguido do teste post-hoc de Newman–Keuls (p < 0,05).



Fonte: Autora

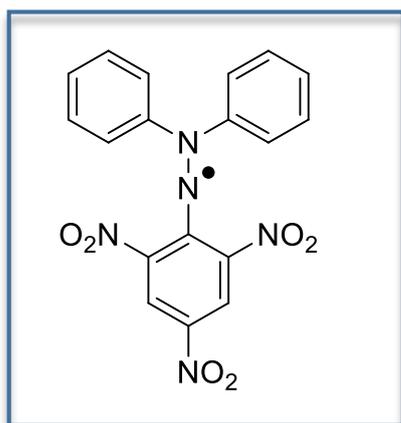
Quanto ao trapeamento do radical colorimétrico (DPPH) 2,2-difenilpicrilhidrazil, 1,1-di(feil) - (2,4,6-trinitrofenil) hidrazila – IUPAC- pelos compostos derivados da 3-azidotimidina **1**, somente o composto **5m** foi eficaz na concentração de 1 mM (Figura 42). Desta maneira foram realizadas curvas de concentração inibitória dependente do tempo para este composto (Figura 44). O composto **5m** liga-se a 50% do radical DPPH (Figura 43), depois de, aproximadamente, 38,7 ± 8,9 min (1 mM), 77,3 ± 10,3 min (0,5 mM), 104,7 ± 10,0 min (0,25 mM) e >180 min (0,1 mM). A atividade de todos os compostos derivados da 3- azidotimidina **1** foi menor que o controle positivo BHT, o qual liga-se a 50% do radical DPPH em aproximadamente 22 min na concentração de 0,5 mM.

Figura 42. Atividade de trapeamento do radical DPPH pelos compostos derivados da 3-azidotimidina **1** (1 mM) após 90 minutos de incubação; a ≠ DMSO. O butil hidroxitolueno, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol-IUPAC (BHT, 0,5 mM) foi utilizado como controle positivo.



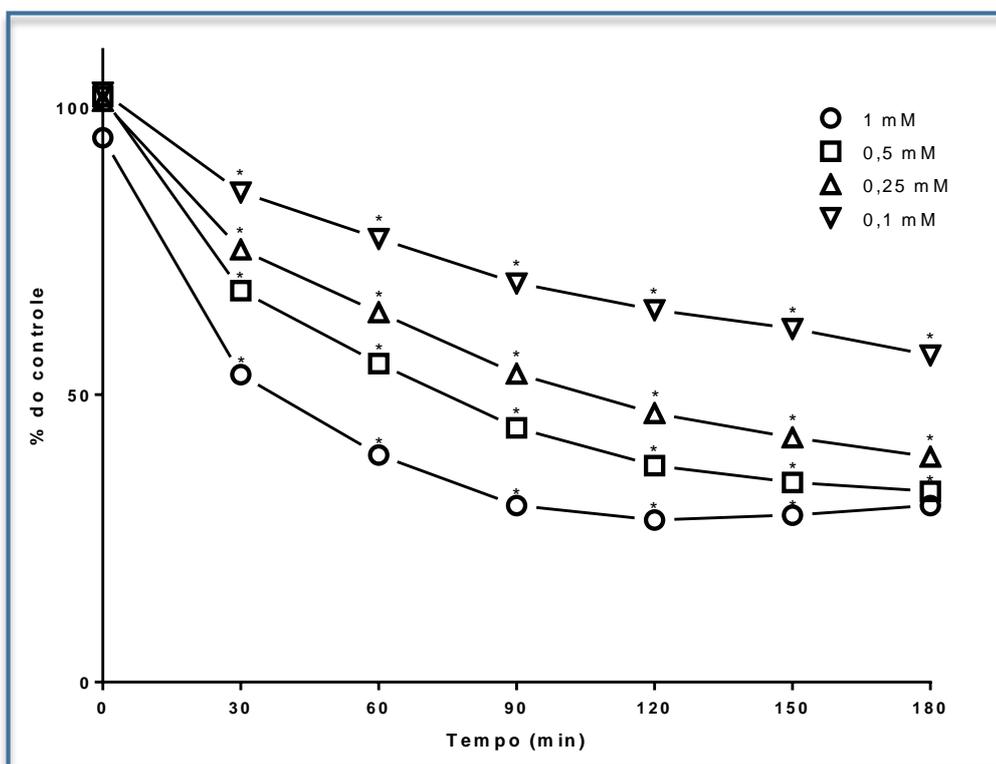
Fonte: Autora

Figura 43. Estrutura do DPPH, 2,2-difenilpicrilhidrazil.



Fonte: Autora

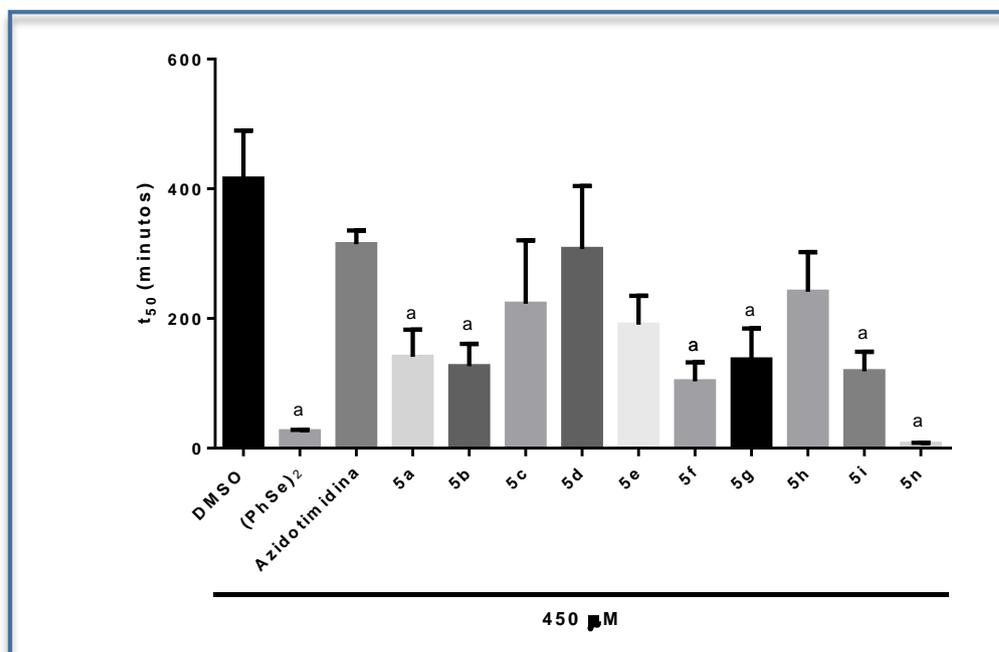
Figura 44. Curvas de concentração inibitória dependente do tempo do composto **5m** no teste de atividade de trapeamento do radical DPPH. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de três determinações; \neq 0 minuto. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ($p < 0,05$).



Fonte: Autora

Adicionalmente foi realizado o teste da atividade mimética da tiol peroxidase dos compostos (Figura 45). Esta metodologia pode indicar a eficácia dos compostos derivados da azidotimidina em mimetizar a enzima antioxidante glutathiona peroxidase (GPx). A Figura 42 mostra que os compostos **5a**, **5b**, **5f**, **5g**, **5i** e **5m** decompõem o peróxido de hidrogênio mais eficientemente que o controle (DMSO).

Figura 45. Atividade mimética da tiol peroxidase dos compostos derivados da azidotimidina (450 μ M). O disseleneto de difenila ((PhSe)₂) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de três determinações; a \neq DMSO. Os dados foram analisados utilizando o teste t de *Student* ($p < 0,05$).

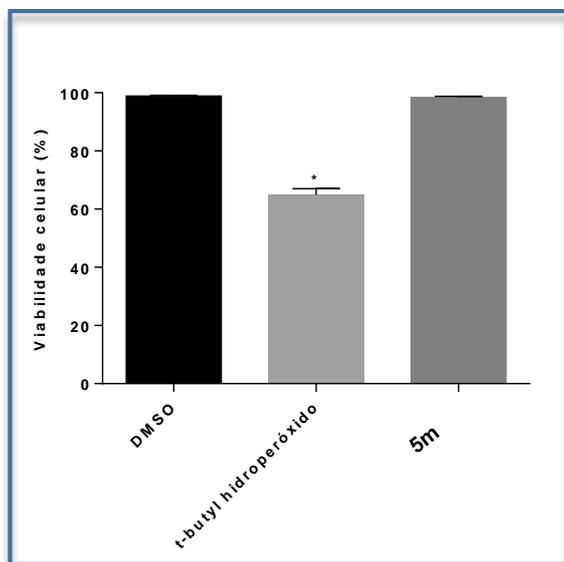


Fonte: Autora

2.5.2 Toxicidade Celular

A viabilidade celular⁶⁰ do composto **5m** foi analisada conforme mostrado na Figura 46. Os leucócitos humanos incubados com t-butil hidroperóxido (controle positivo) causaram uma diminuição na viabilidade celular (aproximadamente 40%) quando comparada ao controle (DMSO). Entretanto, quando os leucócitos foram incubados com o composto **5m** (100 μ M), nenhuma alteração foi observada demonstrando que o composto não apresentou toxicidades nas células tratadas. O T-butil hidroperóxido (1 mM) foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de três determinações. * \neq DMSO. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ($p < 0,0001$).

Figura 46: Viabilidade celular de leucócitos humanos após tratamento com o composto **5m**.



Fonte: Autora

Capítulo 3

Considerações Finais, Conclusões e Perspectivas

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando os objetivos que foram pretendidos neste trabalho e analisando os resultados obtidos, pode-se fazer algumas considerações importantes.

Concluiu-se que uma classe inédita de 5'-arilcalcogenil-3-animo-timidina (**5a-m**) foi sintetizada utilizando-se de uma metodologia simples e que mostrou-se eficiente para duas transformações em uma única etapa de reação, com rendimentos que variaram na faixa de 20 a 82%.

Do ponto de vista sintético, estes produtos foram obtidos através de uma reação de redução de azida para as aminas propostas, juntamente com a inserção de organocalcogênios na 3-azidovudina mesilada **3**, empregando o mesmo reagente para ambas transformações.

Como pretendido inicialmente, estes compostos foram submetidos a análises quanto atividade antioxidante, antitumoral e viabilidade celular. Os compostos analisados não demonstraram toxicidade, o que mostrou-se interessante para as aplicações medicinais e farmacológicas. Adicionalmente o composto **5m** destacou-se por apresentaram atividade antioxidante e antitumoral para carcinoma de bexiga humano.

Outros testes de atividade biológica estão sendo realizados com estes e demais compostos deste trabalho.

Por fim, os resultados obtidos nesta dissertação resultaram na síntese de uma série de moléculas inéditas que uniram em uma única estrutura duas classes de compostos com diferentes propriedades biológicas interessantes e conhecidas na literatura. Todos os estudo que deram origem a este documento já foram finalizados e submetido a um importante periódico de nível internacional.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Métodos

Este capítulo trata dos procedimentos experimentais para a síntese dos compostos apresentados neste trabalho.

Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance III 400, que operam na frequência de 200 MHz e 400 MHz para hidrogênio, e 50 MHz e 100 MHz para carbono, Bruker Avance III 600, que operam na frequência de 600 MHz para hidrogênio, e 150 MHz para carbono (Departamento de Química - UFSM). Os deslocamentos químicos (δ) estão relacionados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS – Me_4Si , $\delta = 0$ ppm) utilizado como padrão interno para os espectros de RMN ^1H e CDCl_3 para espectros de RMN ^{13}C . As amostras foram preparadas e, tubos de 5 mm de diâmetro e os dados adquiridos a temperatura ambiente na faixa de 294 K. Entre parâmetros consta a multiplicidade (s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, dd = duplo duplete, t = tripleto, m = multiplete), os hidrogênios calculados a partir da integral relativa e a constante de acoplamento (J) expressa em Hertz.

4.1.1 Ponto de Fusão

Os valores de ponto de fusão dos compostos sólidos foram determinados em aparelho digital do ponto de fusão Micro Química MQAPF-302 no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

4.1.2 Rota Evaporadores

Para remoção dos solventes das soluções orgânicas, foram utilizados:

- Rota-evaporador Heidolph VV 2000;
- Rota-evaporador Ika RV 10 digital;
- Linha de vácuo equipada com bomba de alto-vácuo Vaccumbrand modelo RD

4, 4,3 m^3/h .

4.1.3 Reagentes e Solventes

Os solventes foram purificados e secos antes de serem utilizados, conforme técnicas usuais⁶⁶. Os demais reagentes empregados foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem prévia purificação com exceção d 3-azidotimidina, que foi adquirido junto ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), na forma de capsulas que após abertas foram submetidas a extração com acetato de etila.

4.1.4 Cromatografia em coluna (CC)

A maioria das substâncias sintetizadas foram purificadas por cromatografia em coluna, o material usado foi coluna de vidro, sílica gel (230-400 mesh – Merck) e, como eluentes, um solvente ou mistura de solventes adequados.

4.1.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada do tipo ascendente foi realizada em placas comerciais da Merck Sílica Gel GF₂₅₄ e utilizadas para acompanhar as reações e avaliar o grau de pureza dos produtos.

A identificação dos compostos sucedeu-se através do método de revelação por irradiação luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) e solução de vanilina ácida.

4.1.6 Espectroscopia de Massas de Alta Resolução

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos a partir do aparelho XEVO-G-2QT, operando em modo ESI+ (Ionização por Eletrospray positivo). A introdução da amostra foi realizada por infusão em solução de acetonitrila:água contendo 0,1% de ácido fórmico. Os experimentos foram realizados pelo Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) na Universidade Federal de Santa Maria.

4.1.7 Análise dos dados para Avaliação Biológica (Antitumoral)

A análise dos dados e os gráficos foram realizados no software *GraphPad Prism* 6.0. Os conjuntos de dados a partir de MTT foram analisados utilizando *two-way* ANOVA seguido por teste *Tukey* para múltiplas comparações. Os fatores considerados foram as diferentes concentrações e tempos utilizados durante os tratamentos. Significância de $p < 0,05$ foi considerada em todas as análises.

4.1.8 Análise de dados das Atividades Antioxidantes e Toxicológico

Os experimentos foram repetidos três vezes. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma ou duas vias seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ou pelo teste t de *Student* quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$. Os resultados foram analisados pelo software *GraphPad* v. 6 para Windows.

Os experimentos foram repetidos três vezes. Os dados foram analisados usando ANOVA de uma seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. A diferença foi considerada significativa quando o $p < 0,0001$. Os resultados foram analisados pelo software *GraphPad* v. 6 para Windows.

4.2 Procedimentos Experimentais

4.2.1 Procedimento geral para síntese do mesilato derivado da 3-azidotimidina

Em um balão reacional de 100 mL de duas bocas, sob argônio, previamente flambado e sob agitação magnética, adicionou-se 1 mmol da 3-azidotimidina solubilizado em 7 mL de tetrahidrofurano (THF). Em seguida resfriou-se o sistema reacional a 0°C e adicionou-se 1,5 mmols de trietilamina. Após 10 minutos, ainda à 0°C, gotejou-se a esta mistura 1,1 mmols de cloreto de mesila diluído em 3 mL de THF. Então, o banho de gelo foi removido e o sistema permaneceu sob agitação por um tempo reacional de 2 horas à temperatura ambiente. Após este período evaporou-se o solvente e o produto bruto resultante foi neutralizado com bicarbonato de sódio

(NaHCO₃) e extraído com diclorometano (3 x 10 mL). As frações orgânicas foram reunidas e lavadas uma vez com cloreto de sódio (NaCl) e em seguida foram secas com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtradas e o solvente foi removido por evaporador rotatório. O sólido branco resultante foi seco por 2 horas em uma bomba de alto vácuo fornecendo o produto com rendimento de 92%.

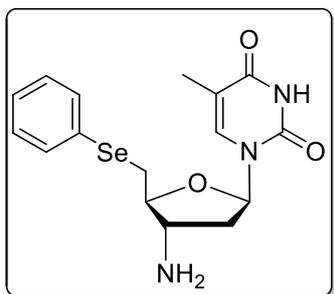
Com o derivado mesilato previamente preparado, partiu-se para as reações de obtenção dos 5'-arilcalcogenil-3-amino-timidina.

4.2.2 Procedimento geral para a síntese 5'-arilcalcogenil-3-amino-timidina 5a-m derivados da 3-azidotimidina

Em um balão reacional de duas bocas de 50 mL, munido de condensador de refluxo, previamente flambado e sob argônio, adicionou-se 0,5 mmol do dicalcogeneto de diarila correspondente, 4 mL de THF e borohidreto de sódio (5 equivalentes, 0,185g). Subsequentemente, foi adicionado 3 mL de etanol à reação e observado o desaparecimento da cor. Após 30 minutos, foi adicionado lentamente a esta mistura reacional uma solução de 1 mmol (0,345g) do mesilato **3** dissolvido em 3 mL de THF e deixou-se o sistema reagir por 24 horas sob refluxo.

Decorrido deste período, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o produto bruto em acetato de etila e, a esta solução, adicionou-se uma solução saturada de cloreto de amônio (NH₄Cl). Extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (3 x 30 mL) e as frações orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de magnésio (MgSO₄), filtradas e evaporadas, fornecendo os produtos brutos.⁶⁷ Os respectivos compostos foram purificados em coluna cromatográfica utilizando sílica gel 230-400 mesh e eluída com uma mistura adequada de diclorometano-álcool etílico (95:5, 90:10, 70:30) respectivamente, obtendo como produto os compostos **5a-m**. Os produtos foram secos em bomba de alto vácuo por 3 horas sob banho de água à 60°C. Todas as reações foram acompanhadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Os produtos foram obtidos com rendimentos que variaram de 20% a 82%.

(5a) 5'-Seleno-(fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 78%

Características físicas: Sólido amarelo.

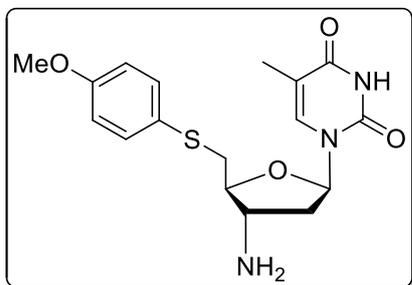
Ponto de fusão: 132-134°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,54 – 7,52 (m, 2H); 7,34 (s, 1H); 7,27 – 7,22 (m, 3H); 6,16 (dd, $J^1 = 7,2$, $J^2 = 5,6$ Hz, 1H); 3,93 – 3,84 (m, 1H); 3,55 – 3,48 (m, 1H); 3,27 – 3,25 (m, 2H); 2,31 – 2,16 (m, 2H); 1,85 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,71; 150,34; 135,56; 132,35; 129,93; 129,27; 127,24; 110,89; 85,70; 84,40; 54,89; 41,44; 30,25; 12,35.

EMAR (TOF MS ESI+): m/z calculado para C₁₆H₁₉N₃O₃Se [M+H]⁺: 382,0670. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 382,0688.

(5b) 5'-Sulfeto-(4-metoxi-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 60%

Características físicas: Sólido rosa claro.

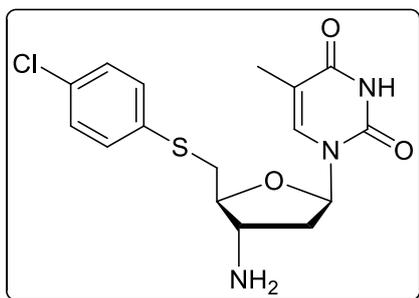
Ponto de fusão: 133-136°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,42 – 7,38 (m, 2H); 7,37 (s, 1H); 6,87 – 6,83 (m, 2H); 6,16 (dd, $J^1 = 6,4$, $J^2 = 5,2$ Hz, 1H); 3,84 – 3,79 (m, 4H); 3,57 – 3,52 (m, 1H); 3,20 – 3,18 (m, 2H); 2,26 – 2,16 (m, 2H); 1,88 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 164,07; 158,86; 150,43; 135,40; 132,50; 125,70; 114,59; 110,54; 85,07; 84,23; 55,08; 53,88; 40,74; 38,23; 12,17.

EMAR (TOF MS ESI+): m/z calculado para C₁₇H₂₁N₃O₄S [M+H]⁺: 364,1331. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 364,1349.

(5c) 5'-Sulfeto-(4-cloro-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 20%

Características físicas: Sólido amarelo.

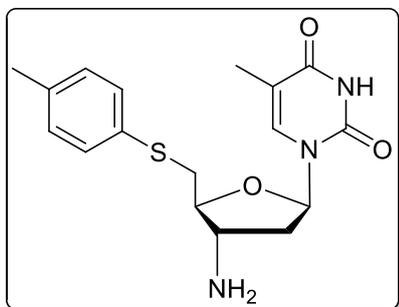
Ponto de fusão: 133-136°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,35 – 7,30 (m, 2H); 7,27 (m, 1H); 7,26 – 7,22 (m, 2H); 6,17 (dd, *J*¹ = 6,8, *J*² = 5,2 Hz, 1H); 4,28 (sl, 2H); 3,90 – 3,86 (m, 1H); 3,60 – 3,55 (m, 1H); 3,34 – 3,24 (m, 2H); 2,32 – 2,18 (m, 2H); 1,83 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,93; 150,46; 135,49; 134,34; 132,42; 130,42; 129,13; 110,94; 84,84; 84,48; 54,04; 41,05; 36,55; 12,35.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₆H₁₈ClN₃O₃S [M+H]⁺: 368,0835. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 368,0828.

(5d) 5'-Sulfeto-(4-metil-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 47%

Características físicas: Sólido laranja escuro.

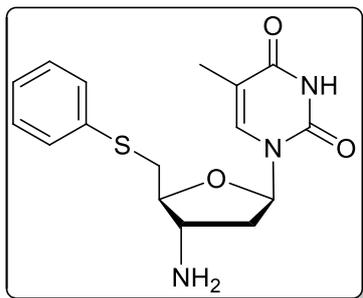
Ponto de fusão: 150-152°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,36 (s, 1H); 7,32 – 7,29 (m, 2H); 7,11 – 7,09 (m, 2H); 6,17 (t, *J* = 6,0 Hz, 1H); 3,88 – 3,87 (m, 1H); 3,60 – 3,55 (m, 1H); 3,31 – 3,22 (m, 2H); 2,31 (s, 3H); 2,28 – 2,21 (m, 2H); 1,85 (s, 3H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 100 MHz), δ (ppm): 163,54; 150,24; 135,97; 135,23; 132,44; 129,48; 128,66; 109,42; 84,76; 83,35; 54,23; 35,79; 20,30; 11,88.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₇H₂₁N₃O₃S [M+H]⁺: 348,1382. Encontrado (experimental) [M + H]⁺: 348,1376.

(5e) 5'-Sulfeto-(fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 82%

Características físicas: Sólido laranja claro.

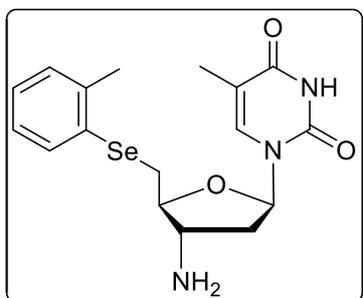
Ponto de fusão: 140-143°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,41 – 7,38 (m, 2H); 7,34 (s, 1H); 7,31 – 7,29 (m, 2H); 7,21 – 7,17 (m, 1H); 6,20 (dd, *J*¹ = 6,8, *J*² = 5,2 Hz, 1H); 3,92 – 3,87 (m, 1H); 3,61 – 3,56 (m, 1H); 3,33 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H); 2,30 – 2,19 (m, 2H); 1,82 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,94; 150,38; 135,59; 135,53; 129,09; 128,92; 126,41; 110,88; 84,95; 84,26; 53,92; 41,18; 36,13; 12,47.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₆H₁₉N₃O₃S [M+H]⁺: 334,1225. Encontrado (experimental) [M + H]⁺: 334,1240.

(5f) 5'-Seleno-(2-metil-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 70%

Características físicas: Sólido laranja escuro.

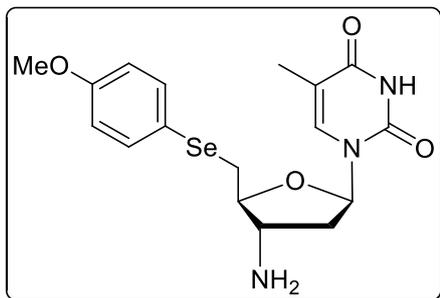
Ponto de fusão: 82-85°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,35 (s, 1H); 7,20 – 7,15 (m, 2H); 7,14 – 7,08 (m, 2H); 6,18 (dd, *J*¹ = 6,4, *J*² = 5,6 Hz, 1H); 3,95 – 3,90 (m, 1H); 3,57 – 3,52 (m, 1H); 3,26 – 3,24 (m, 2H); 2,43 (s, 3H); 2,28 – 2,23 (m, 2H), 1,84 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,97; 150,46; 135,72; 135,52; 135,11; 129,03; 129,01; 126,36; 115,00; 110,84; 84,96; 84,39; 53,96; 41,00; 36,28; 31,29; 12,34.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₇H₂₁N₃O₃Se [M+H]⁺: 396,0826. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 396,0826.

(5g) 5'-Seleno-(4-metoxi-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 72%

Características físicas: Sólido amarelo claro.

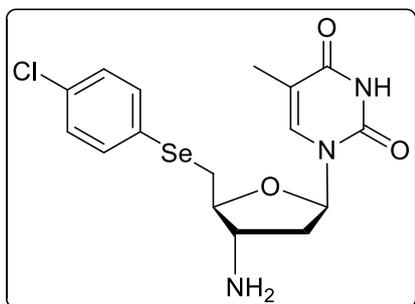
Ponto de fusão: 124-127°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,51 – 7,47 (m, 2H); 7,37 (s, 1H); 6,83 – 6,79 (m, 2H); 6,17 (dd, *J*¹ = 6,8, *J*² = 5,6 Hz, 1H); 3,87 – 3,82 (m, 1H); 3,78 (s, 3H); 3,51 – 3,46 (m, 1H); 3,17 (d, *J* = 5,6 Hz, 2H); 2,29 – 2,17 (m, 2H); 1,87 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 164,08; 159,36; 150,45; 135,49; 135,06; 119,43; 114,91; 110,74; 85,58; 84,13; 55,16; 54,66; 41,08, 31,21; 12,38.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₇H₂₁N₃O₄Se [M+H]⁺: 412,0775. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 412,0765.

(5h) 5'-Seleno-(4-cloro-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 68%

Características físicas: Sólido amarelo claro.

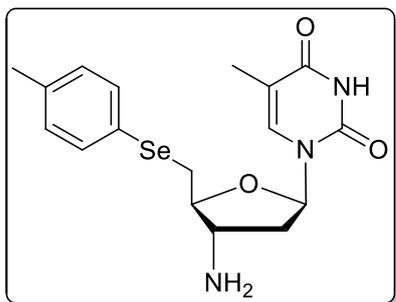
Ponto de fusão: 144-146°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,48 – 7,45 (m, 2H); 7,30 (s, 1H); 7,26 – 7,22 (m, 2H); 6,17 (dd, *J*¹ = 6,8, *J*² = 5,2 Hz, 1H); 3,87 – 3,83 (m, 1H); 3,52 – 3,47 (m, 1H); 3,31 – 3,21 (m, 2H); 2,32 – 2,16 (m, 2H); 1,87 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,56; 150,18; 135,53; 133,71; 133,61; 129,45; 128,01; 110,99; 85,47; 84,33; 54,89; 41,56; 30,54; 12,47.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₆H₁₈ClN₃O₃Se [M+H]⁺: 416,0280. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 416,0273.

(5i) 5'-Seleno-(4-metil-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 40%

Características físicas: Sólido amarelo claro.

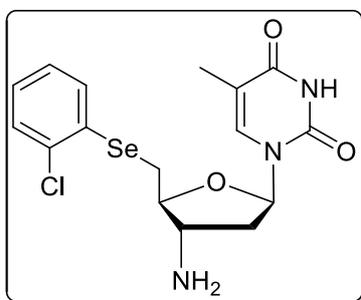
Ponto de fusão: 146-149°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,45 – 7,42 (m, 2H); 7,37 (s, 1H); 7,10 – 7,06 (m, 2H); 6,17 (dd, $J^1 = 6,8$, $J^2 = 5,2$ Hz, 1H); 3,88 – 3,84 (m, 1H); 3,52 – 3,47 (m, 1H); 3,24 – 3,20 (m, 2H); 2,31 (s, 3H); 2,28 – 2,16 (m, 2H); 1,87 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,83; 150,34; 137,45; 135,60; 132,81; 130,13; 125,92; 110,89; 85,74; 84,28; 54,79; 41,45; 30,52; 21,02; 12,45.

EMAR (TOF MS ESI+): m/z calculado para C₁₇H₂₁N₃O₃Se [M+H]⁺: 396,0826. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 396,0826.

(5j) 5'-Seleno-(2-cloro-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 62%

Características físicas: Sólido laranja escuro.

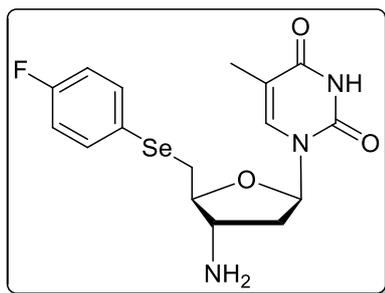
Ponto de fusão: 92-95°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,51 – 7,48 (m, 1H); 7,36 (s, 1H); 7,34 (s, 1H); 7,32 – 7,31 (m, 2H); 6,20 (dd, $J^1 = 7,2$, $J^2 = 5,6$ Hz, 1H); 3,97 – 3,93 (m, 1H); 3,59 – 3,54 (m, 1H); 3,38 – 3,28 (m, 2H); 2,33 – 2,19 (m, 2H); 1,82 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,97; 150,47; 135,57; 134,91; 131,22; 130,56; 129,53; 127,69; 127,35; 110,96; 85,00; 84,12; 54,69; 41,13; 28,72; 12,29.

EMAR (TOF MS ESI+): m/z calculado para C₁₆H₁₈ClN₃O₃Se [M+H]⁺: 416,0280. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 416,0273.

(5k) 5'-Seleno-(4-flúor-fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 62%

Características físicas: Sólido laranja escuro.

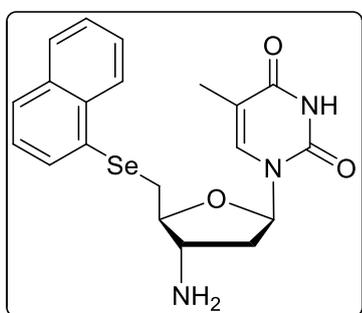
Ponto de fusão: 94-97°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 7,56 – 7,50 (m, 2H); 7,32 (s, 1H); 7,00 – 6,94 (m, 2H); 6,18 (dd, *J*¹ = 6,8, *J*² = 5,2 Hz, 1H); 3,90 – 3,85 (m, 1H); 3,54 – 3,49 (m, 1H); 3,27 – 3,18 (m, 2H); 2,3 – 2,19 (m, 2H); 1,87 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 163,84; 150,38; 135,57; 135,04; 134,96; 116,59; 116,38; 111,00; 85,45; 84,37; 54,88; 41,29; 31,12; 12,47.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₆H₁₉FN₃O₃Se [M+H]⁺: 400,0576.
Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 400,0573.

(5l) 5'-Seleno-(naftil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 42%

Características físicas: Sólido bege.

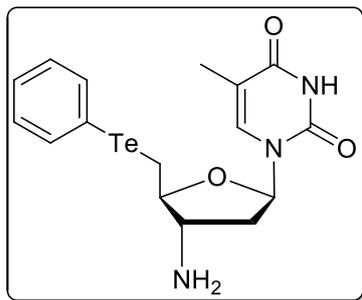
Ponto de fusão: 27-30°C

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ (ppm): 8,37 – 8,34 (m, 1H); 7,85 – 7,78 (m, 3H); 7,58 – 7,48 (m, 2H); 7,37 – 7,34 (m, 1H); 7,30 (s, 1H); 6,15 (dd, *J*¹ = 6,4, *J*² = 5,6 Hz, 1H); 3,90 – 3,86 (m, 1H); 3,54 – 3,49 (m, 1H); 3,32 – 3,23 (m, 2H); 2,27 – 2,15 (m, 2H); 1,80 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ (ppm): 164,05; 150,43; 135,37; 133,80; 133,67; 131,81; 128,83; 128,58; 128,34; 126,88; 126,63; 126,14; 125,65; 110,68; 85,37; 84,13; 54,68; 40,72; 30,19; 12,25.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₂₀H₂₁N₃O₃Se [M+H]⁺: 432,0826.
Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 432,0826.

(5m) 5'-Teluro-(fenil)-3-(amino)-timidina



Rendimento: 48%

Características físicas: Sólido bege.

Ponto de fusão: 199°C (decompõe)

RMN ¹H (CDCl₃ e CD₃OD, 400 MHz), δ (ppm): 7,78 – 7,75 (m, 2H); 7,45 (s, 1H); 7,31 – 7,18 (m, 3H); 6,20 – 6,14 (m, 1H); 3,92 – 3,87 (m, 1H); 3,46 – 3,24 (m, 3H); 2,38 – 2,20 (m, 2H); 1,87 (s, 3H).

RMN ¹³C (CDCl₃ e CD₃OD, 100 MHz), δ (ppm): 164,35; 150,30; 137,42; 135,9; 128,77; 127,27; 111,18; 110,29; 85,50; 83,49; 55,43; 40,01; 11,40; 10,86.

EMAR (TOF MS ESI+): *m/z* calculado para C₁₆H₁₉N₃O₃Te [M+H]⁺: 432,0567. Encontrado (experimental) [M+H]⁺: 432,0572.

4.3 Preparo das soluções para avaliação biológica (antitumoral)

Os compostos foram previamente diluídos em DMSO e adicionados ao meio suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), (concentração de DMSO não é superior a 0,5%). Nos poços controles, 200 µL poço⁻¹ de DMEM/SFB foram adicionados, e nos poços para controle do veículo, DMSO foram adicionados em 200µL poço⁻¹ de *DMEM/SFB* com uma concentração de DMSO correspondente a utilizada na diluição da concentração estoque (mãe) das substâncias testadas.

4.3.1 Cultivo Celular e Ensaio de Proliferação

Células da linhagem 5637 (carcinoma superficial de bexiga) foram adquiridas a partir do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) e foram cultivadas em meio *DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium)*, suplementado com 10% de soro feral bovino, bicarbonato de sódio, antibiótico e antimicótico e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂. Ensaio de viabilidade celular foram realizados por semeadura de 2x10⁴ células por poço em um volume de 100 µL em placas de 96 poços. As células foram tratadas com os fármacos durante 24 h e 48 h, em seguida, foi adicionado 180 µL

poço⁻¹ de *DMEM/SFB* e 20 µL de *MTT* (5mg de *MTT*/mL da solução) foi adicionado em cada poço e mantidas em incubadora por 3 horas a 37°C. Então o meio contendo *MTT* foi aspirado e 100 µL poço⁻¹ de *DMSO* foi adicionado. Subsequentemente, a absorbância a 492 nm foi medida usando um espectrofotômetro (*Thermo Plate TP-Reader*). O percentual de proliferação (%) foi calculado através da fórmula: $[1 - (\text{Absorbância média das células tratadas} / \text{Absorbância média do controle})] \times 100$. Células em fase logarítmica de crescimento foram utilizadas em todos os experimentos.

4.4 Metodologia de Análise Antioxidante

4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Nesta análise, foi utilizado o método proposto por Ohkawa, Ohishi and Yagi (1979). A fosfatidilcolina (0,4 mg) foi incubada durante 30 min em 37 °C com sulfato de ferro (55 µM) e tampão Tris-HCl pH 7,4 (1,85 mM) a fim de induzir a peroxidação lipídica. Os compostos derivados da azidotimidina foram testados com o objetivo de inibir a peroxidação lipídica na concentração final de 0-200 µM. O *DMSO* foi utilizado como veículo. A incubação com fosfatidilcolina, tampão e água destilada foi utilizada como branco. Em seguida, foi adicionado tampão ácido acético pH 3,4 e ácido tiobarbitúrico (0,22%). As amostras foram, então, incubadas durante uma hora a 100 °C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas, adicionou-se 400 µL de *N*-butanol, os tubos foram agitados por 30 segundos e centrifugados durante 10 minutos a 6000 rpm. O sobrenadante foi lido a 532 nm. O MDA (malonaldeído) foi utilizado como padrão. O disseleneto de difenila (0-400 µM) e o α-tocoferol (0-200 µM) foram utilizados como controle positivo.

4.4.2 Ensaio de trapeamento do radical (DPPH)

Foi utilizado o método proposto por Pereira *et al* (2014). Um milimolar dos compostos derivados da azidotimidina foram misturados com 0,3 mM de *DPPH* em etanol. Para a curva de concentração, foi utilizado 0-1 mM (concentração final) do

composto. A absorbância foi lida em 518 nm durante 180 minutos com intervalo de 30 min. O *BHT* foi utilizado como controle positivo.

4.4.3 Atividade Mimética da Tiol Peroxidase (GPx)

Foi utilizado o método proposto por Iwaoka e Tomoda (1994) com algumas modificações. O benzenotiol foi utilizado como uma alternativa a enzima glutathione peroxidase. O sistema de incubação consistiu em: etanol, benzenotiol (2,5 mM), DMSO (branco) ou compostos (concentração final de 450 μ M) e peróxido de hidrogênio (2,3 mM). A reação foi monitorada a 305 nm durante 20 minutos.

4.2 Metodologia de Análise Toxicológica

4.2.1 Viabilidade celular

A preparação das amostras e a viabilidade celular foram realizadas utilizando-se a metodologia previamente descrita na literatura (Bueno et al., 2013; Waczuk et al., 2015). O sangue venoso heparinizado foi obtido de doadores voluntários saudáveis do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), Santa Maria, Brasil (idade entre 25-52 anos). O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado no Comitê de Ética da UFSM (n. 089.0.243.000-07).

Os leucócitos isolados (2×10^6 /mL⁻¹) foram incubados durante três horas com DMSO (0,5%), 1 mM de t-butyl hidroperóxido (controle positivo) ou o composto indicado em uma solução de tampão de Hank's contendo 10% de plasma humano.

Capítulo 5
Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. (a) Paulmier, C.; *Organic Synthesis*. Oxford: Pergamon. **1986**. (b) Braga, A. L.; Silveira, C. C.; Zeni, G.; Severo, W. A. *J. Chem. Res.* **1996**, 5, 206. (c) Braga, A. L.; Zeni, G.; Andrade, L. H. *Synlett.* **1997**, 5, 595.
2. (a) Petragnani, N.; Rodrigues, R.; Comasseto, J. V. *Organomet Chem.* **1974**, 15, 144. (b) Comasseto, J. V. *Org. Chem.* **1983**, 253, 131. (c) Rotruck, J.; T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E. *Science.* **1973**, 179, 588. (d) Holmgren, A. *Free Rad. Bio. Med.* **2006**, 41, 862.
3. (a) Steinbrenner, H.; Sies, H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **2009**, 1790, 1478. (b) Naithani, R. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini Rev Med Chem.* **2008**, 8, 657.
4. Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M.; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076.
5. Mitsuya, H.; Weinholdt, K. J.; Furman, P. A.; Clair, M H, St.; Lehrman, S N.; Gallo, R C.; Bolognesi, D.; Barry, W. D.; Broder, S Proc. *Natt Acad. Sci. USA.* **1985**, 82, 7097.
6. Mackey, J. R.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Drug Resist Update.* **1998**, 1, 310.
7. Sirivolu, V. R.; Vernekar S. K. V.; Ilina, T.; Myshakina, N. S.; Parniak, M. A.; Wang, Z. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 8765.
8. Souza, D.; Mariano, D. O. C.; Nedel, F.; Schultze, E. Campos, V. F.; Seixas, F.; Silva, R. S.; Munchen, T. S.; Ilha, V.; Dornelles, L.; Braga, A. L.; Rocha, J. B. T.; Collares, T.; Rodrigues, O. E. D. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 3329.
9. Chu, C. K. *Recente advences in nucleosider. Chemistry and Chemotherapy. Elsevier Science B. V. Amnsterdam.* **2002**.
10. Vorbruggen, H.; Ruh-pohlenz, C. *Handbook of Nucleoside Synthesis Wiley-Interscience.* New York, **2001**.
11. Gore, S. D.; Jones, C.; Kirkpatrick, P. Decitabine. *Nat. Rev. Drug Discovery.* **2006**, 5, 891.
12. Bonate, P.L.; Arthaud, L.; Cantrell, W. R.; Stephenson, K. Jr.; Secrist III, J. A.; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 855.

13. Clercq, E. D. Antiviral drugs in current clinical use. *J. Clin. Virol.* **2004**, 30, 115.
14. (a) Wu, D.; Ji, S.; Zhao, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 17, 2983. (b) Lee, J. A.; Moon, H. R.; Kim, H. O.; Kim, K. R.; Lee, K.; Kim, B. T.; Hwang, K. J.; Chun, M. W.; Jacobson, K. A.; Jeong, L. S. *J. Org. Chem.* **2009**, 70, 5006.
15. Trakur, R. K.; Mishra, A.; Ramakrishna, K. K. G.; Mahra, R.; Shukla, S. K.; Sanjeev, K.; Srivastava, A. K.; Tripathi, R. P. *Tetrahedron.* **2002**, 70, 8462.
16. Flether, C. A.; Hilpert, H.; Myers, P. L.; Roberts, S. M.; Storer, R. *J. Chem. Soc.* **1989**, 1707.
17. Flandort, J.; Tam, S. Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 597.
18. Pschierer, J.; Plenio, H. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2551.
19. Wang, R. W.; Gold, B. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2465.
20. Shakya, N.; Srivastava, N. C.; Desroches, N.; Agrawal, B.; Kunimoto, D. Y. Kuma, R. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4130.
21. Wauchope, O. R.; Tomney, M. J.; Pepper, J. L.; Korba, B.; Seley-Radtke, K. L. *Org. Lett.* **2010**, 12, 4466.
22. Hari, Y.; Osawa, T.; Obika, S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 963.
23. Peixoto, E. M. A. *Quím. Nova.* **2002**, 16, 51.
24. Comasseto, J. V.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, 11, 2027.
25. Zeng, H.; Combs, G. F.; Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, 19, 1.
26. Hua, G.; Du, J.; Cordes, D. B.; Slawin, A. M. Z.; Woollins, D. *Tetrahedron.* **2015**, 71, 1792.
27. Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B. T. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 6255.
28. Shaaban, S.; Diestel, R.; Hinkelmann, B.; Muthukumar, Y.; Verma, R. P.; Sasse, F.; Jacob, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 192.
29. Vargas, J.; Narayanaperumal, S.; Gul, K.; Ravanello, B. B.; Dornelles, L.; Soares, L. C.; Alves, C. F. S.; Schneider, T.; Vaucher, R. A.; Santos, R. C. V.; Rodrigues, O. E. D. *Tetrahedron.* **2012**, 68, 10444.
30. Ghose, A.; Fleming, J.; Harrison, P. R. *Biofactors.* **2001**, 14, 127.
31. Müller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 3235;

32. (a) Malmstrom, J.; Jonsson, M.; Cotgreave, I. A.; Hammarstrom, L.; Sjodin, M.; Engman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3434. (b) Vessman, K.; Ekstrom, K.; Berglund, M.; Andersson, C. M.; Engman, L. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 4461. (c) Engman, L.; Stern, D.; Frisell, H.; Vessman, K.; Berglund, M.; Ek, K.; Andersson, C. M. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 1255.
33. Messali, M.; Christiaens, L. E.; Alshahateet, S. F.; Kooli, F.; *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7448.
34. Alberto, E. E.; Soares, L. C.; Sudati, J. H.; Borges, A. C. A.; Rocha, J. B. T.; Braga, A. L. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4211.
35. Hua, G.; Du, J.; Cordes, D. B.; Slawin, A. M. D.; Woollins, J. D. *Tetrahedron.* **2015**, 71, 1792.
36. Chu, C. K.; Ma, L.; Olgen, S.; Pierra, C.; Du, J.; Gumina, G.; Gullen, E.; Chenh, Y.; Schinazi, R. F. *J. Med. Chem.* **2009**, 43, 3906.
37. Braga, A. L.; Severo, W. A. F.; Schwab, R. R.; Rodrigues, O. E. D.; Dornelles, L.; Braga, H. C.; Ludtke, D. S.; *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 3005.
38. Pesarico, A. P.; Sartori, G.; Santos, C. F. A.; Neto, J. S. S.; Bortolotto, V.; Santos, R. C. V.; Nogueira, C. W.; Prigol, M. *Microbiol. Res.* **2013**, 168, 563.
39. Shaaban, S.; Diestel, R.; Hinkelmann, B.; Muthukumar, Y.; Verma, R. P.; Sasse, F.; Jacob, C. *Euro. J. Med. Chem.* **2012**, 58, 192.
40. Balkrishna, S. J.; Kumar, S.; Azad, G. K.; Bhakuni, B. S.; Panini, P.; Ahalawat, N.; Tomar, R. S.; Detty, M. R.; Kumar, S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 1215.
41. Ebânez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Plop, J. A.; Sanmartib, C. *Euro. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 256.
42. Arsenyan, P.; Paegle, E.; Belyakov, S.; Shestakova, I.; Jasckenko, E.; Domrakeva, I.; Popelis, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3434.
43. Plano, D.; Sanmartin, C.; Moreno, E.; Prior, E.; Calvo, A.; Plop, J. A. *Biorg. Med. Lett.* **2007**, 17, 6853.
44. Romano, B.; Font, M.; Encío, I.; Palop, J. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 82, 674.
45. Brase, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 5188.
46. Roesky, H.; Glemser, D. *Chem. Ber.* **1964**, 97, 1710.

47. Evers, J.; Gobel, M.; Krumn, B.; Martin, F.; Medvedyev, S.; Oehlinger, G.; SteemaNn, F. X.; Troyan, I.; KlapoT. M.; Erements, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 12100.
48. Scriven, E. F. V.; Turnbull, K. *Chemical. Reviwes.* **1988**, 88, 297.
49. Rola, F. *Org. Chem.* **1982**, 47, 4327.
50. Lin, T.; Zhou, R. X.; Scalon, K. J.; Brubaker, W. F.; Lee, J. J. S.; Woods, k.; Humphreys, C.; Prusoff, W. H. *J. Med. Chem.* **1986**. 29, 681.
51. Shiau, G. T.; Schinazl, R. F.; Chen, M. S.; Prusoff, W. H. R. *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 127.
52. Pearson, W. H.; Hutta, D.; Fang, W. K. *J. Org. Chem.* **2000**, 20, 8326.
53. Dhawan, R.; Kadijk, M. G. A.; Joikinen, T. J.; Feng, M.; Ansell, S. M. *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 14.
54. Arstad, E.; Barrett, A. G. M.; Hopkins, B. T.; Kobberling, J. *Org. Lett.* **2002**, 11, 1975.
55. Pathak, T. *J. Med, Chem.* **2002**, 102, 1623.
56. Deng, W. P.; Nam, G.; Fan, J.; Kirk, K. *J. Org, Chem.* **2003**, 68, 2798.
57. Kamal, A.; Ramana, K. V.; Ankati, H. B.; Ramana, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6861.
58. Hays, D. S.; Fu, G. C. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 2796.
59. Zang, R.; Edgar, K. J. *Carbohydrate Polymers.* **2015**, 122, 84.
60. Du, J.; Xu, G.; Lin, H.; Wang, G.; Toa, M.; Zhang. *Green. Chem.* **2016**, 18, 2726.
61. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. *Anal. Biochem.* **1979**, 95, 351.
62. Pereira, R. P.; Boligon, A. A.; Appel, A. S.; Fachinetto, R.; Ceron, C. S.; Tanus-Santos, J. E.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T. *Industrial Crops and Products.* **2014**, 53, 34.
63. Iwaoka, M.; Tomoda, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2557.
64. Bueno, D. C.; Meinerz, D. F.; Allebrandt, J.; Waczuk, E. P.; Santos, D. B.; Mariano, D. O. C.; Rocha, J. B. T. *Bio. Med. Res. Int.* **2013**, 1.
65. Waczuk, E. P.; Kamdem, J. P.; Abolaji, A. O.; Meinerz, D. F.; Bueno, D. C.; Gonzaga, T. K. S. N.; Dorow, T. S. C.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Rocha, J. B. T.; Avila, D. S. *Toxicol. Res.* **2015**, 4, 739.

66. Perrin, D. D.; Armarego W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals.:* Pergamon Press. New York, 3ª edição. **1988**.

67. Miyashita, M.; Hoshino, M.; Yoshikoshi, A. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 347.

Capítulo 6

Espectros de RMN Seleccionados

6. ESPECTROS DE RMN SELECCIONADOS

Figura 47. Espectro de RMN ^1H do composto **5a** em CDCl_3 a 400 MHz

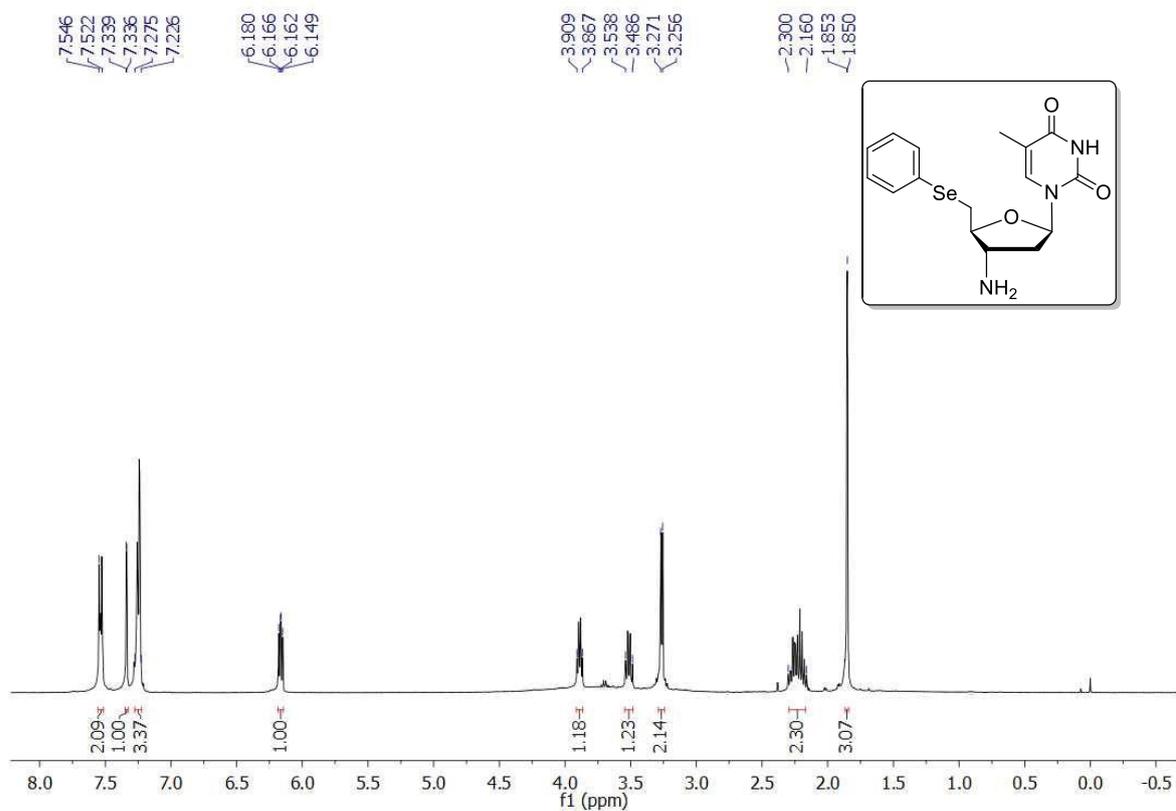


Figura 48. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5a** em CDCl_3 a 100 MHz.

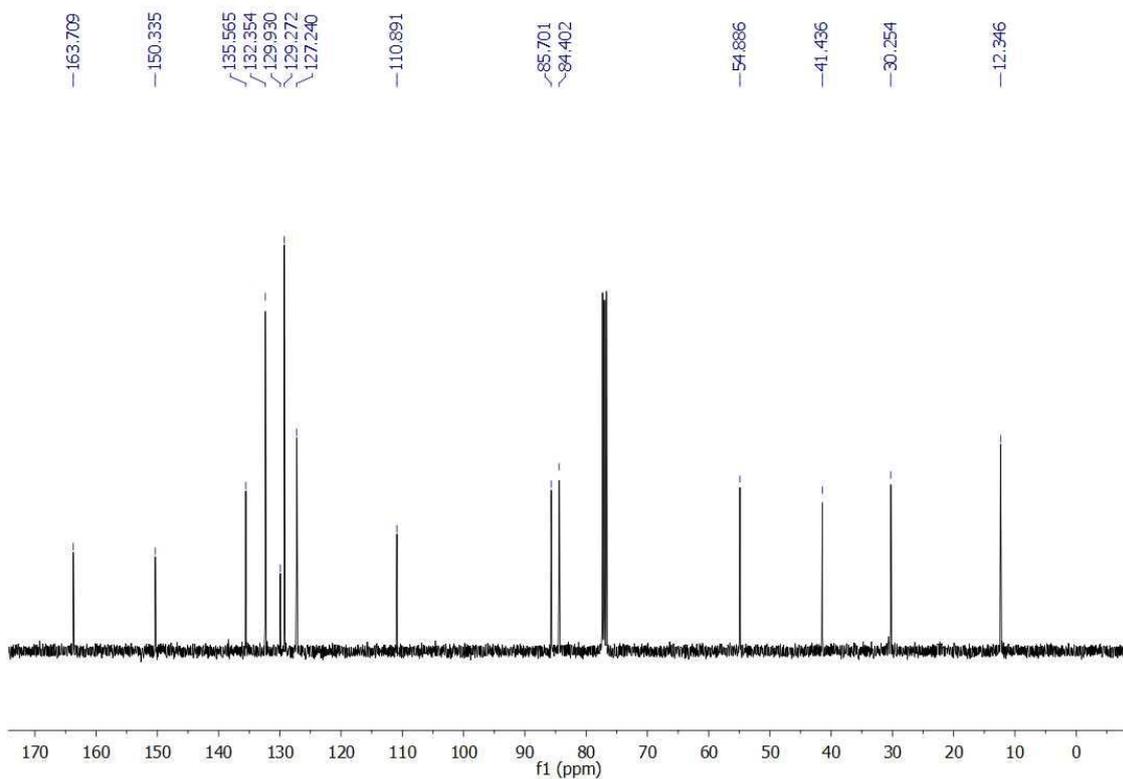


Figura 49. Espectro de RMN ^1H do composto **5b** em CDCl_3 a 400 MHz.

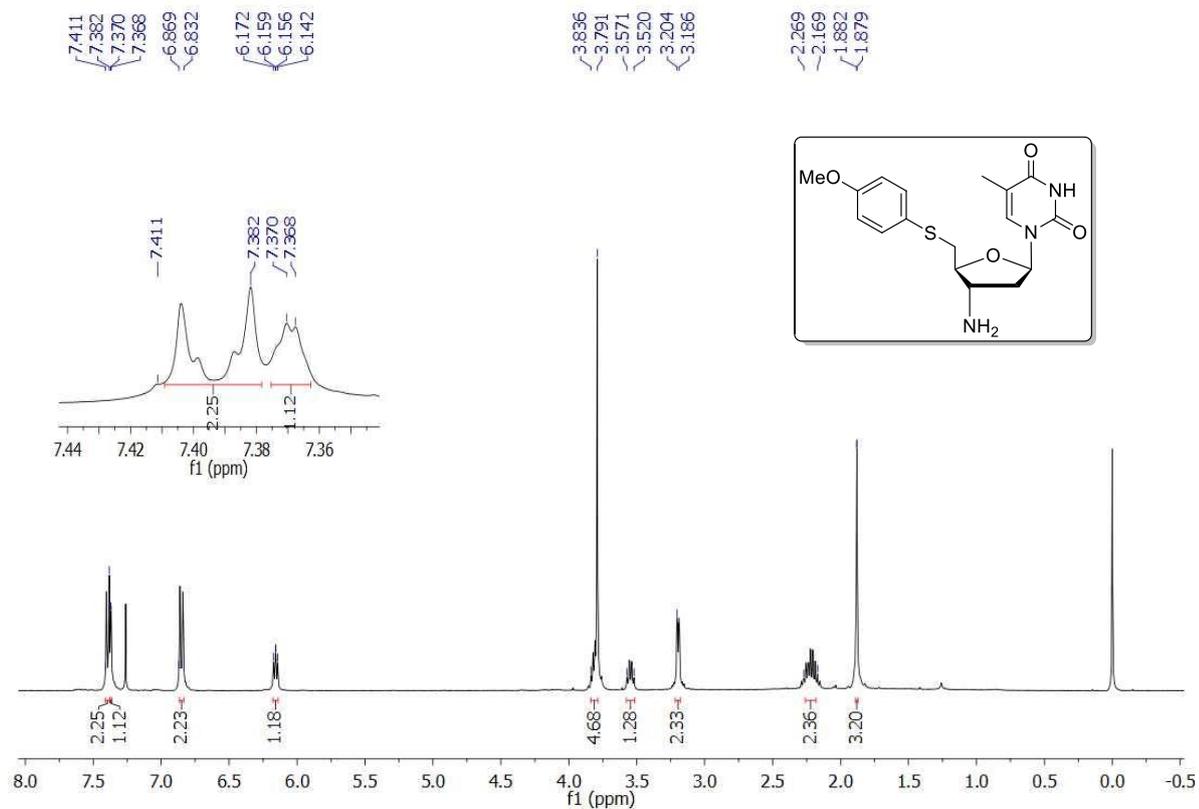


Figura 50. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5b** em CDCl_3 a 100 MHz.

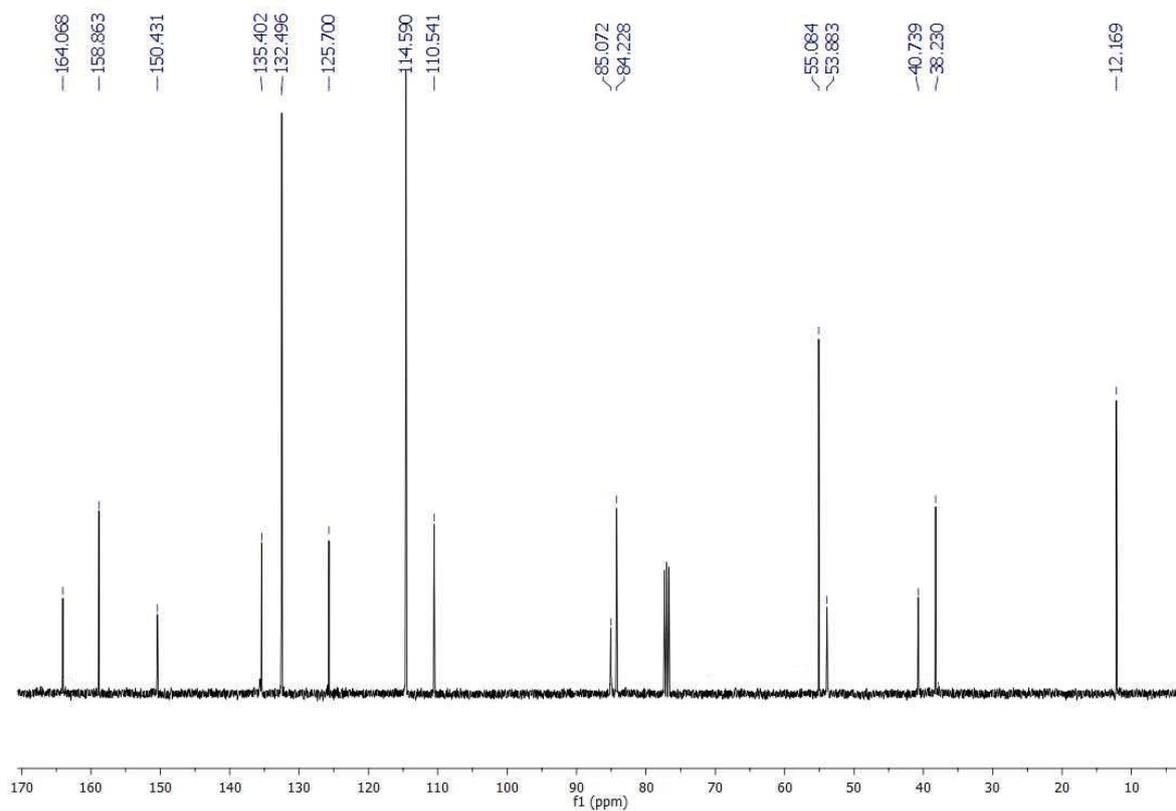


Figura 51. Espectro de RMN ^1H do composto **5c** em CDCl_3 a 400 MHz.

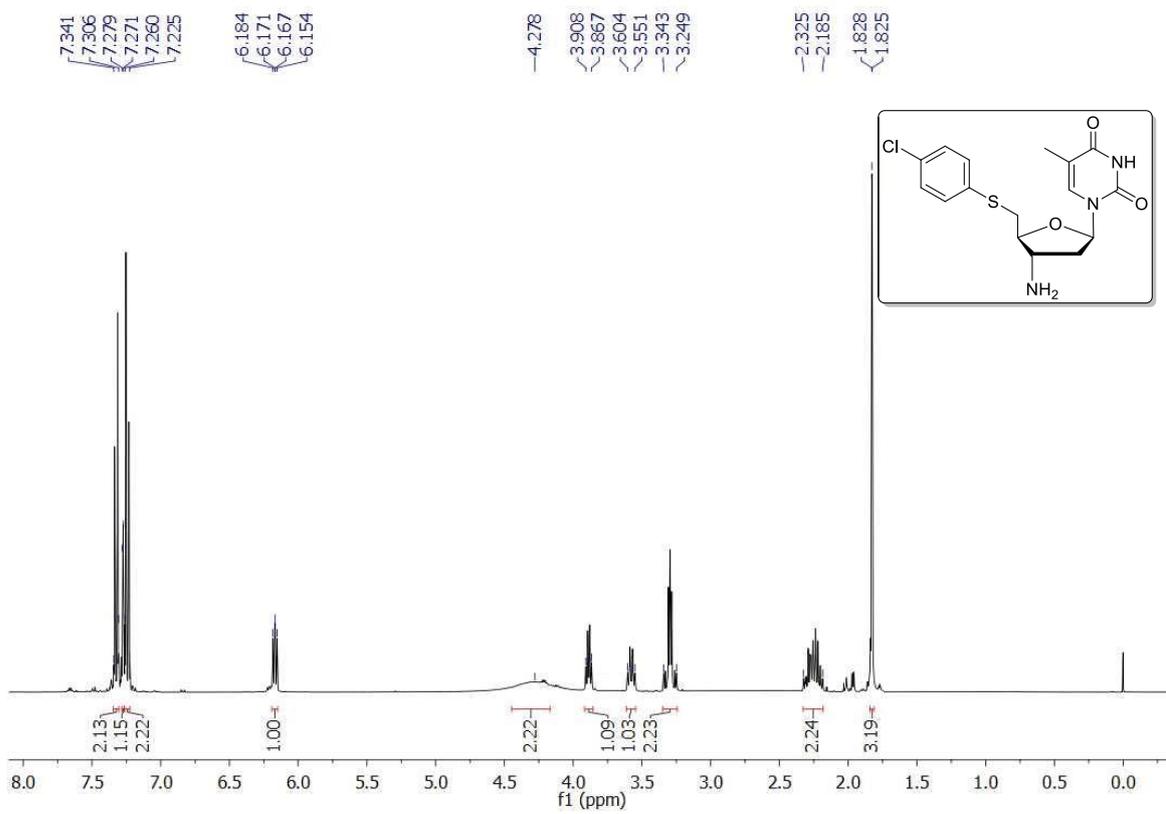


Figura 52. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5c** em CDCl_3 a 100 MHz.

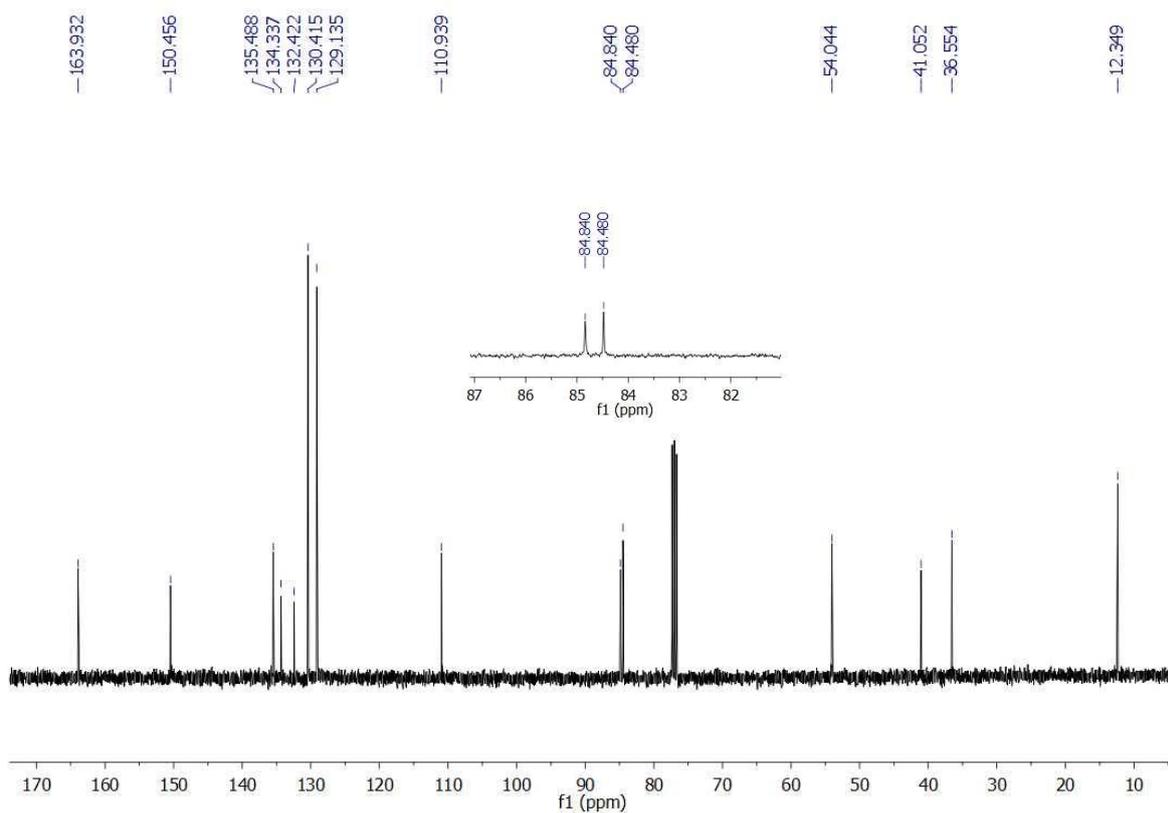


Figura 53. Espectro de RMN ^1H do composto **5d** em CDCl_3 a 400 MHz.

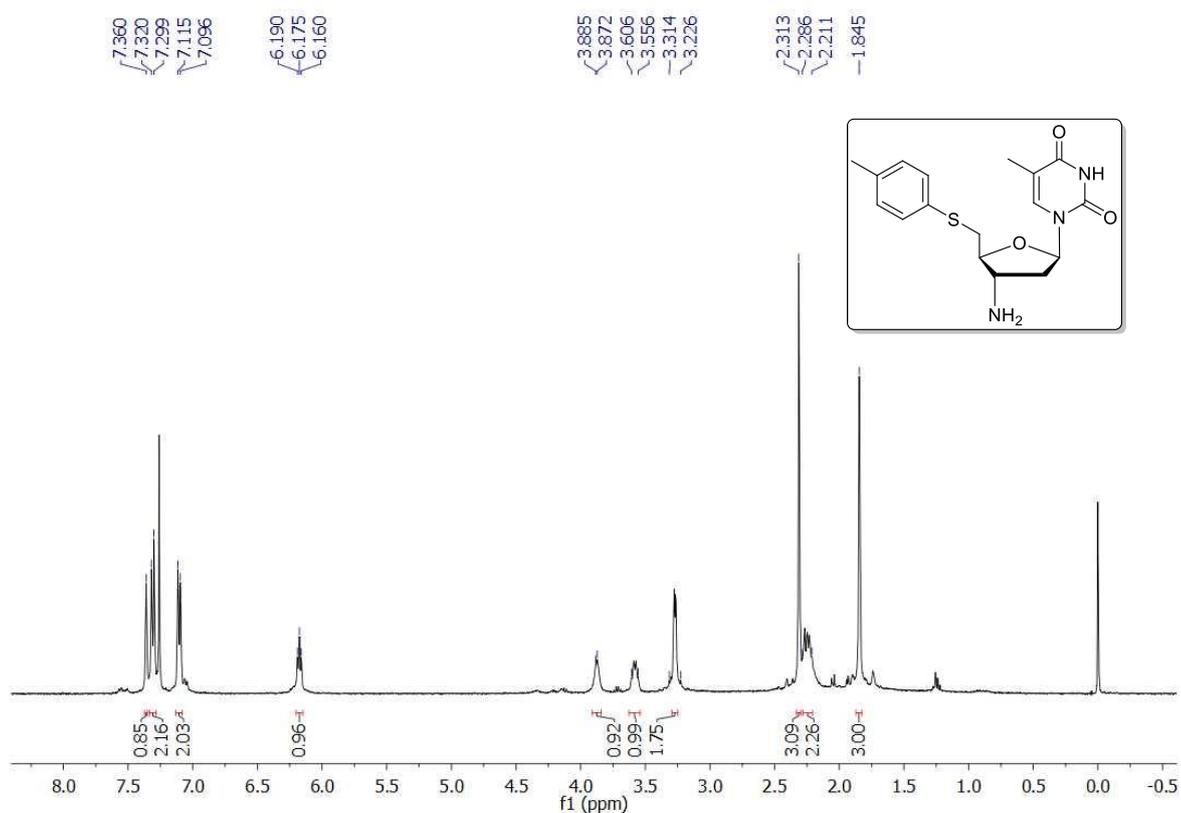


Figura 54. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5d** em DMSO-d_6 a 100 MHz.

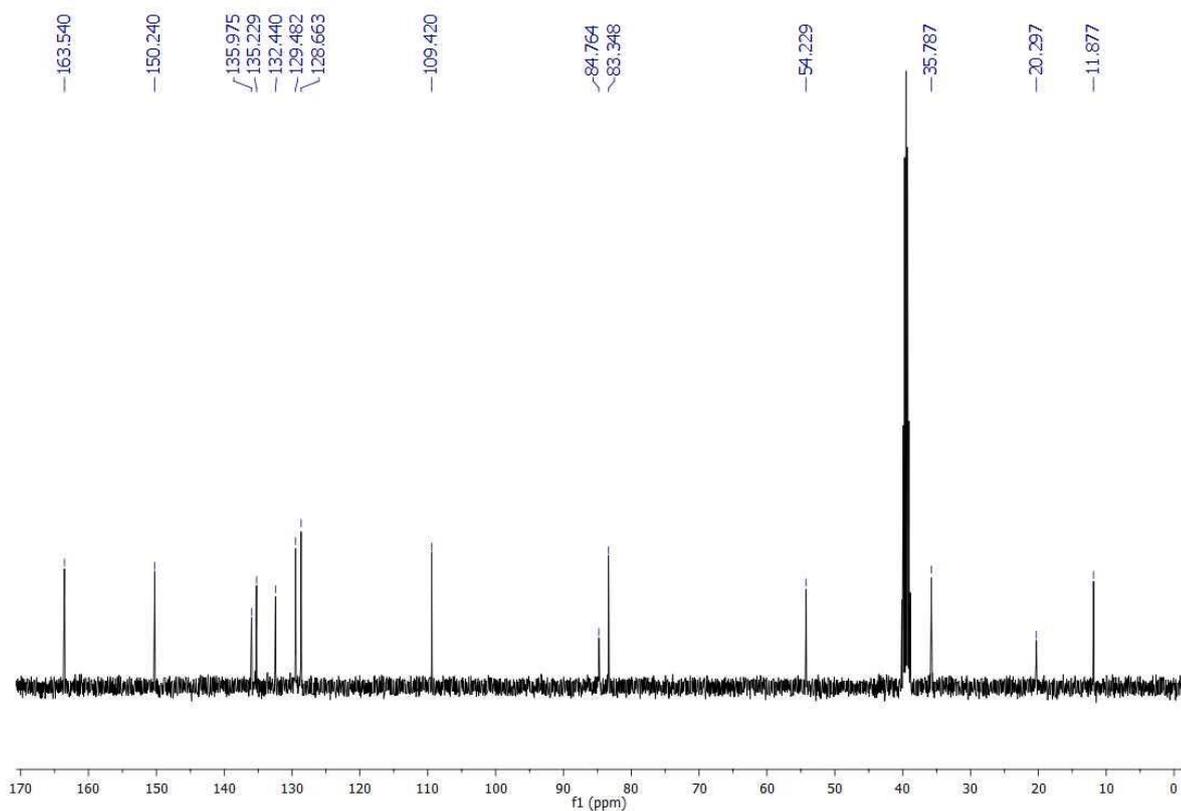


Figura 55. Espectro de RMN ¹H do composto **5e** em CDCl₃ a 400 MHz.

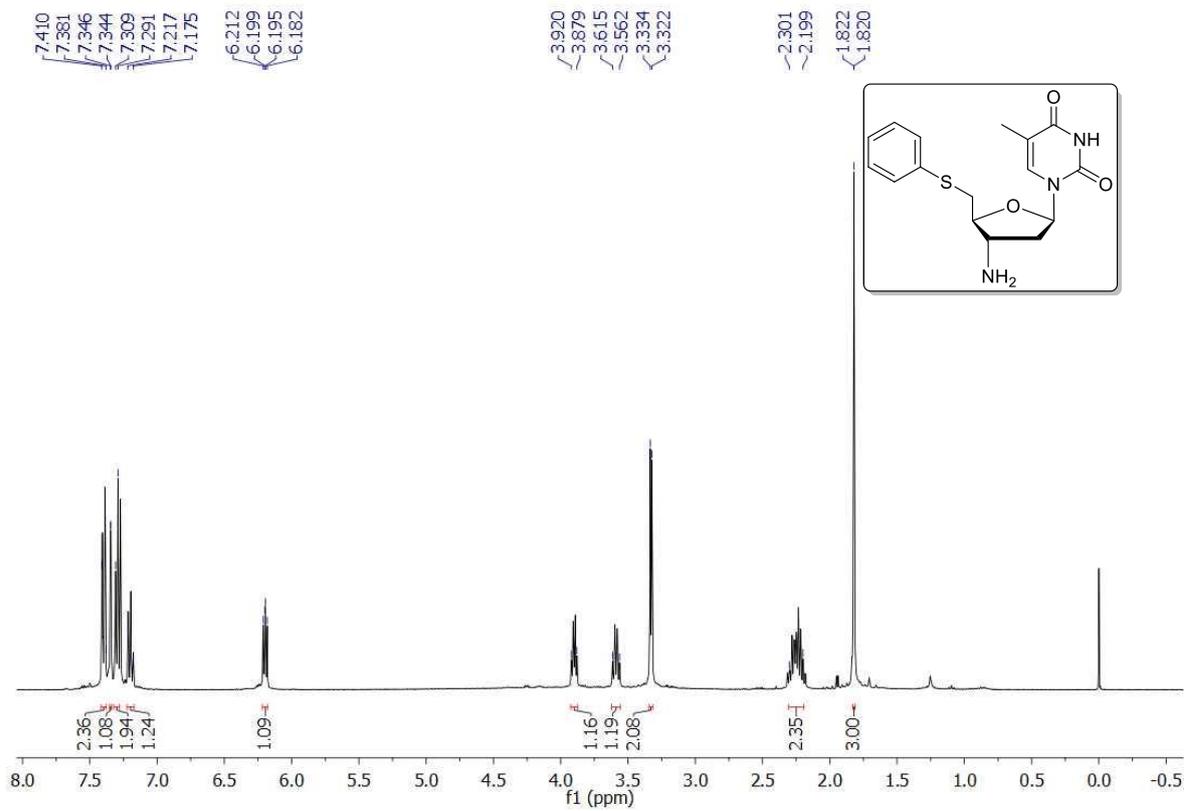


Figura 56. Espectro de RMN ¹³C do composto **5e** em CDCl₃ a 100 MHz.

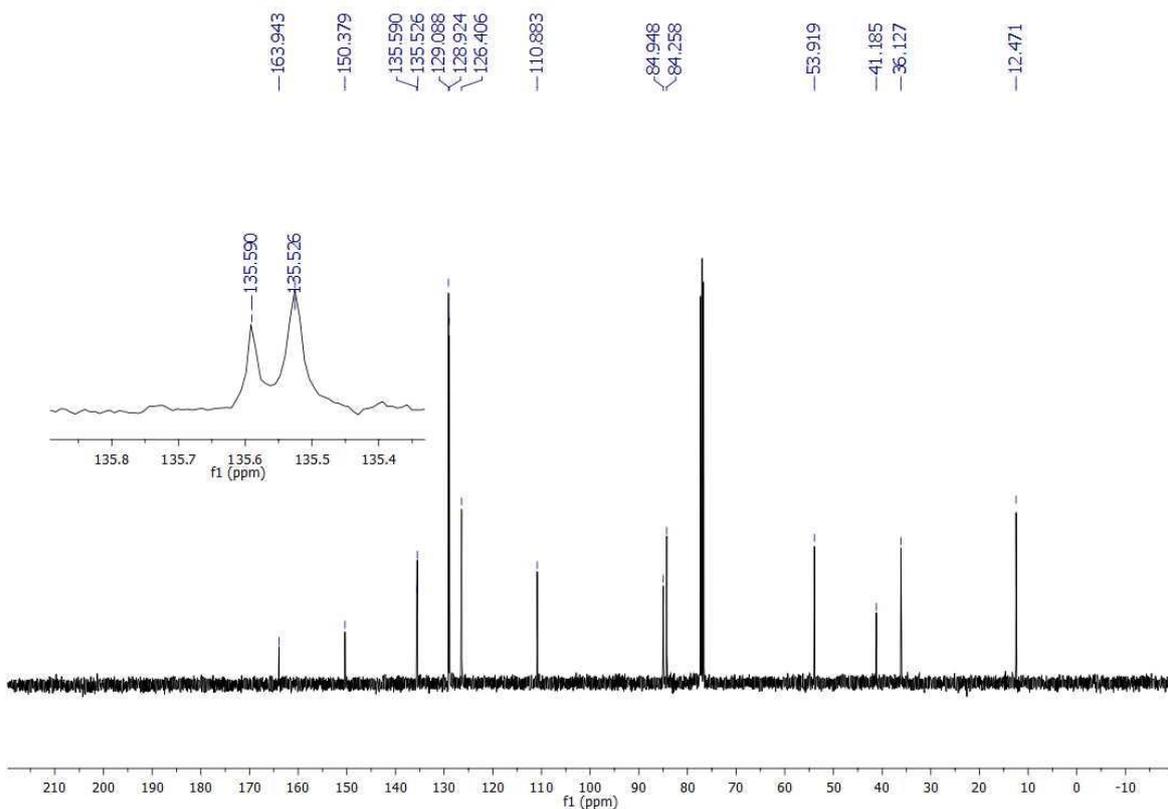


Figura 57. Espectro de RMN ¹H do composto **5f** em CDCl₃ a 400 MHz.

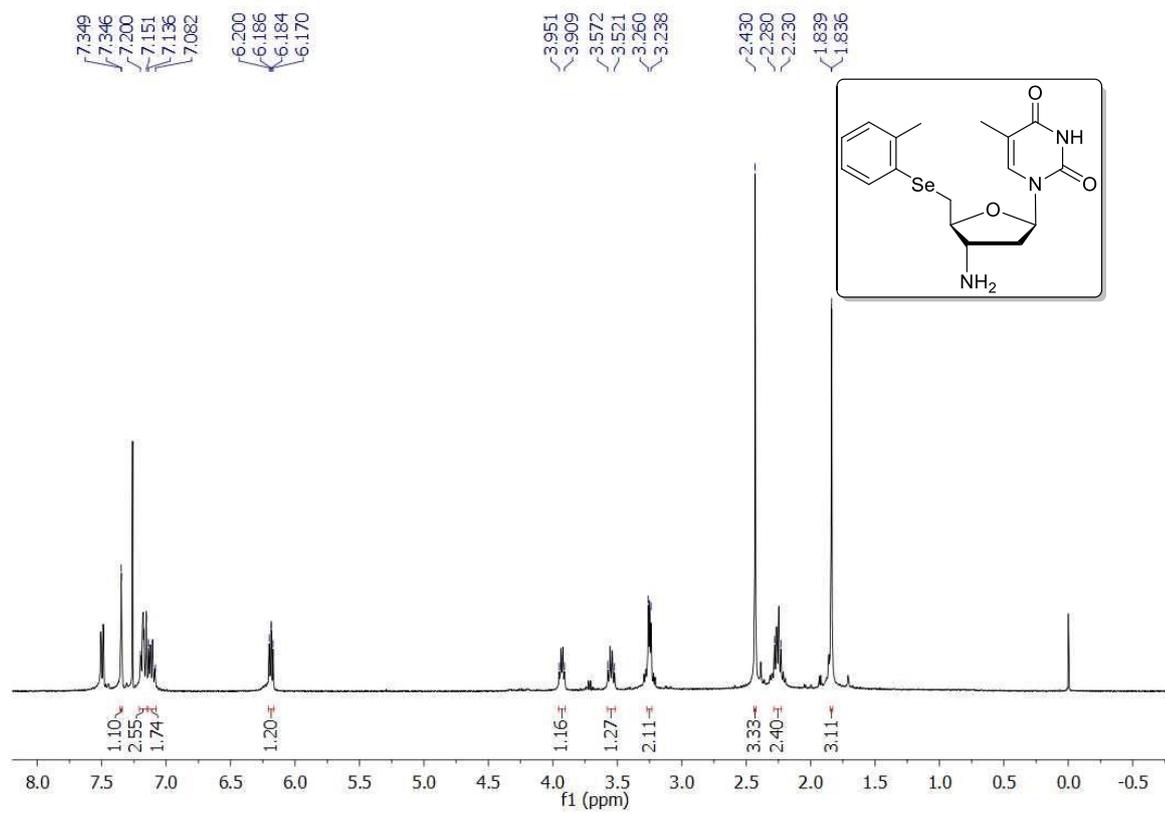


Figura 58. Espectro de RMN ¹³C do composto **5f** em CDCl₃ a 100 MHz.

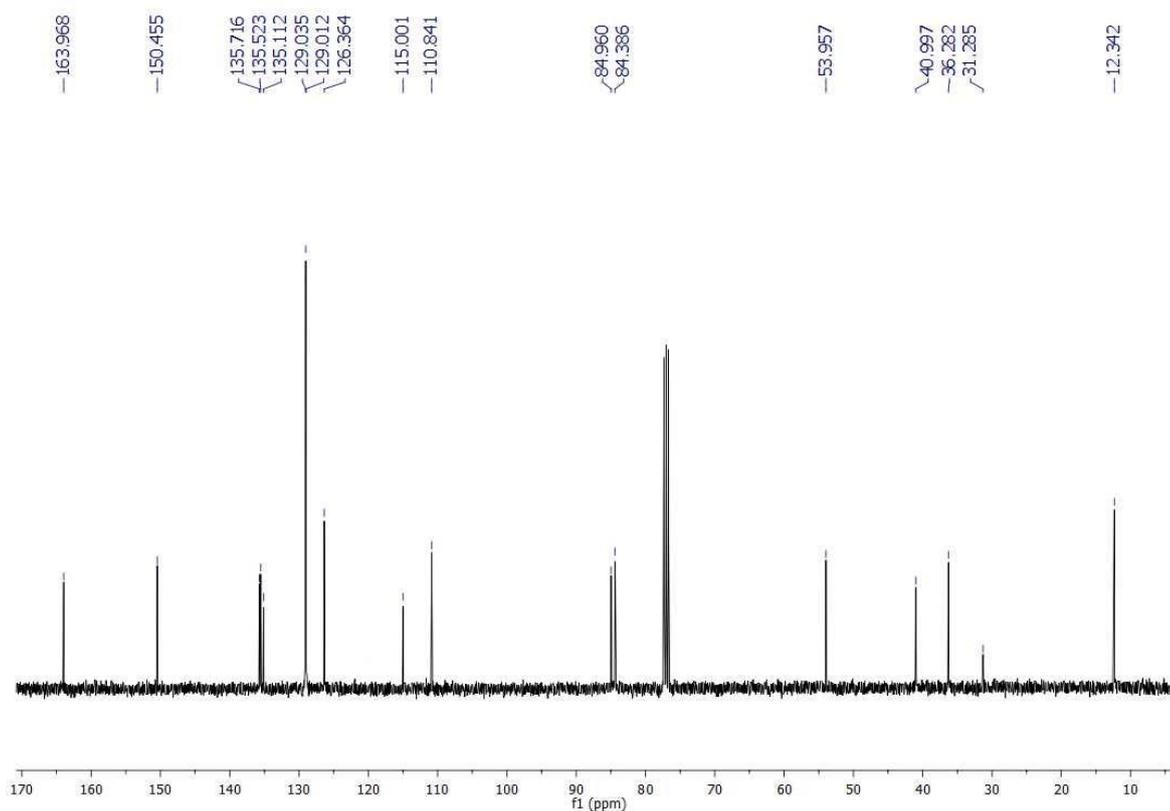


Figura 59. Espectro de RMN ¹H do composto **5g** em CDCl₃ a 400 MHz.

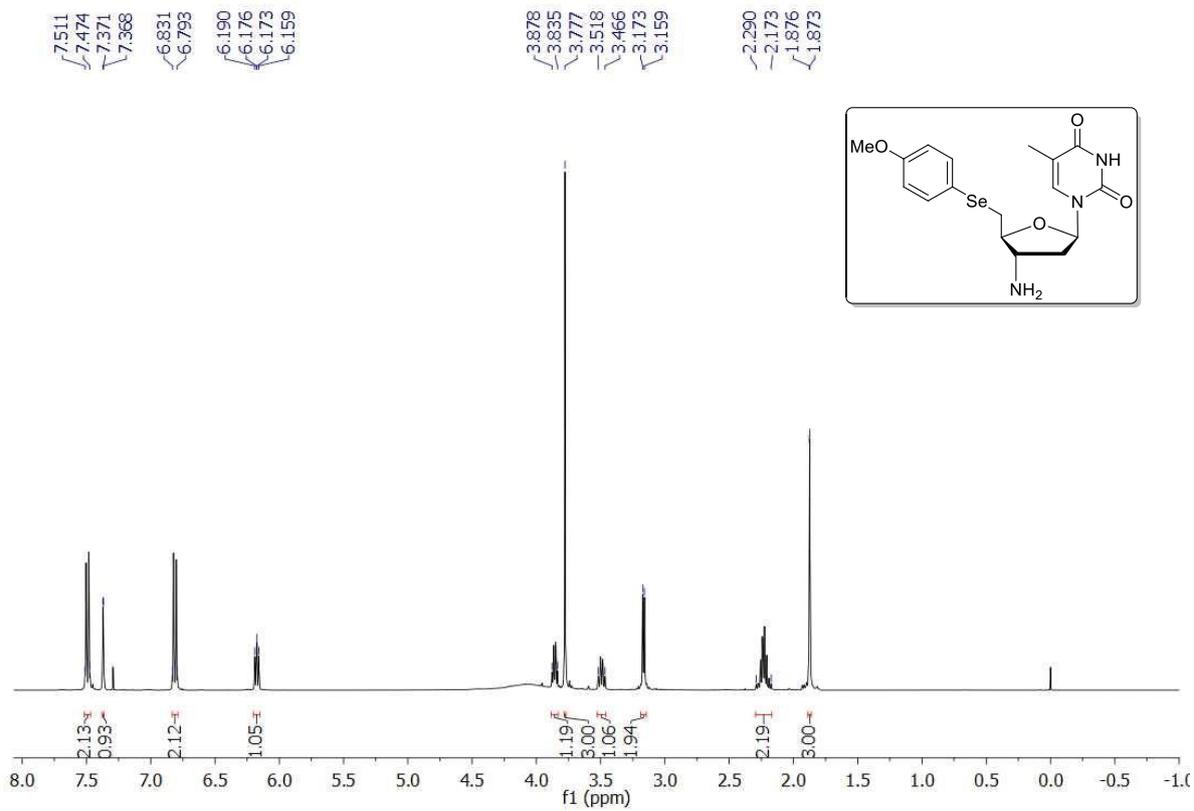


Figura 60. Espectro de RMN ¹³C do composto **5g** em CDCl₃ a 100 MHz.

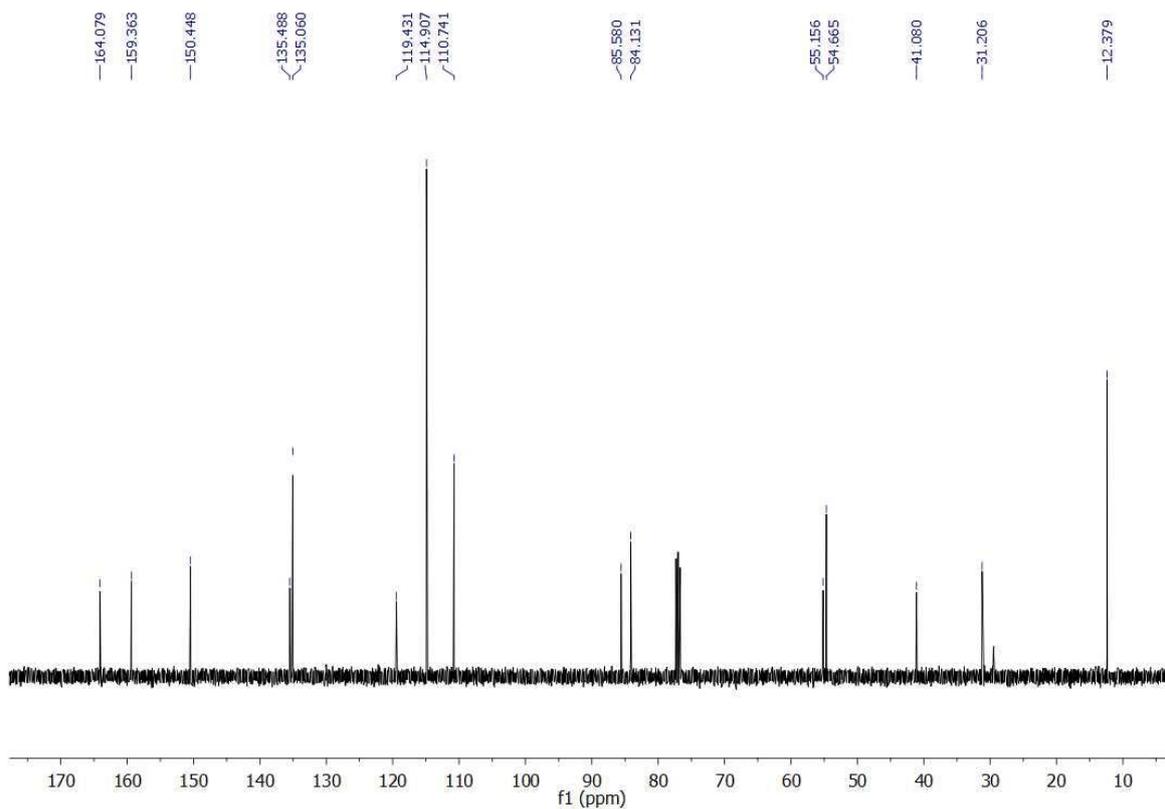


Figura 61. Espectro de RMN ^1H do composto **5h** em CDCl_3 a 400 MHz.

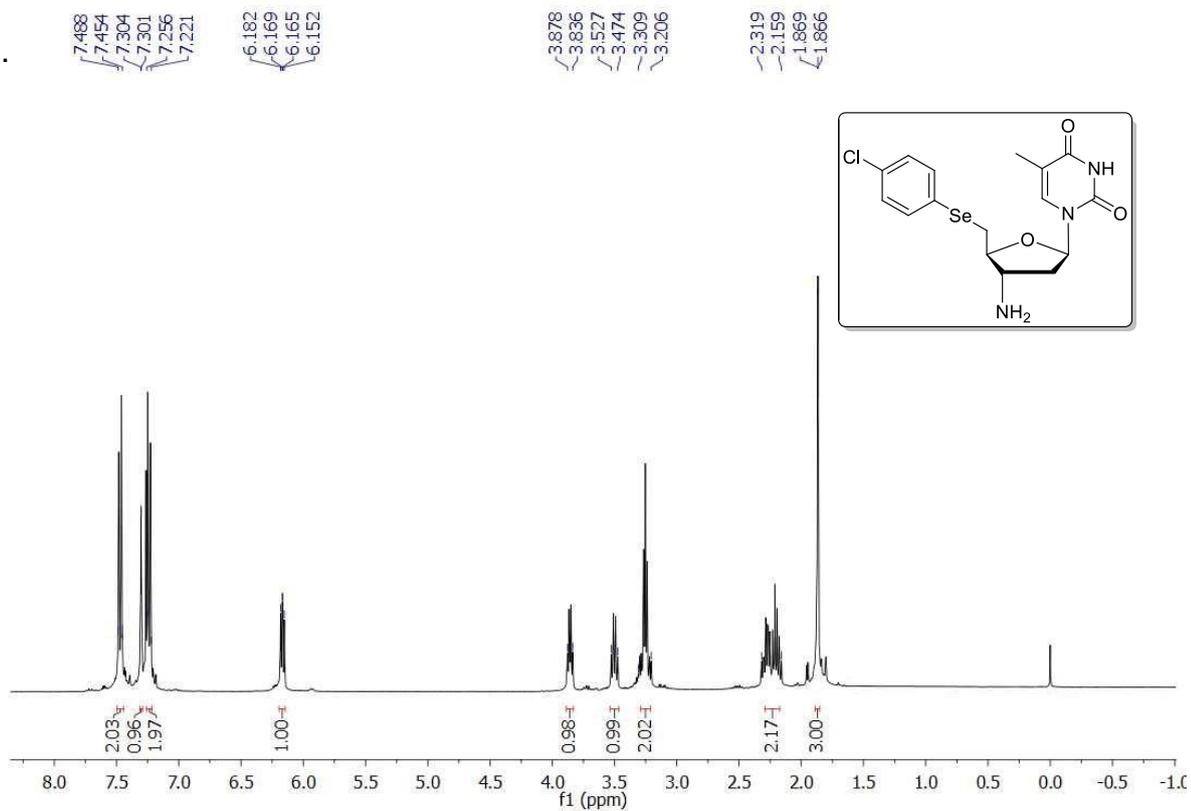


Figura 62. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5h** em CDCl_3 a 100 MHz

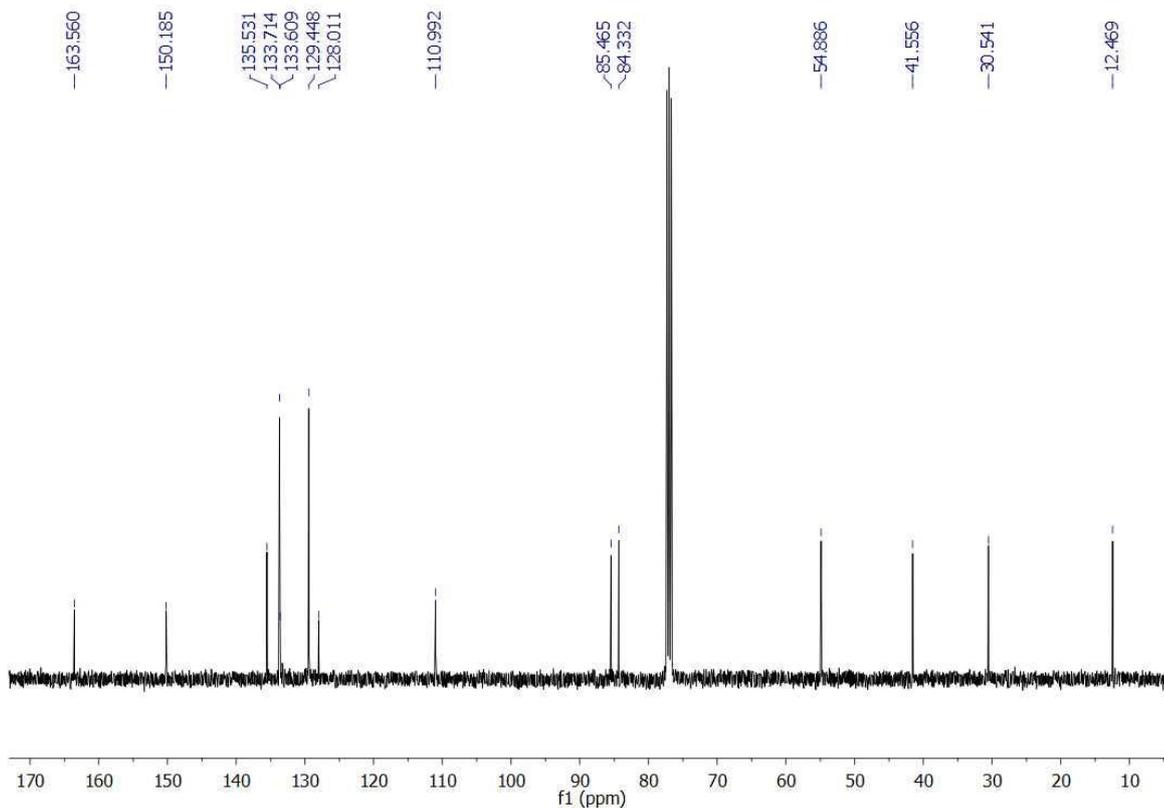


Figura 63. Espectro de RMN ^1H do composto **5i** em CDCl_3 a 400 MHz.

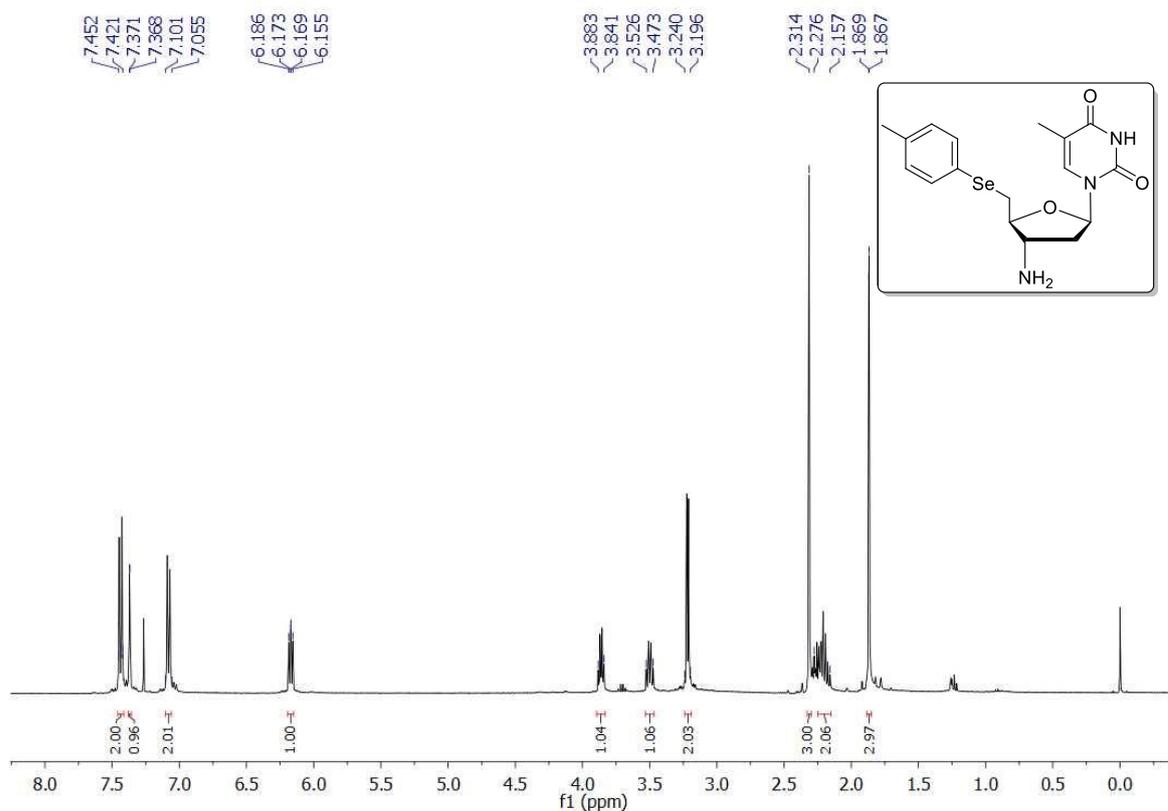


Figura 64. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5i** em CDCl_3 a 100 MHz.

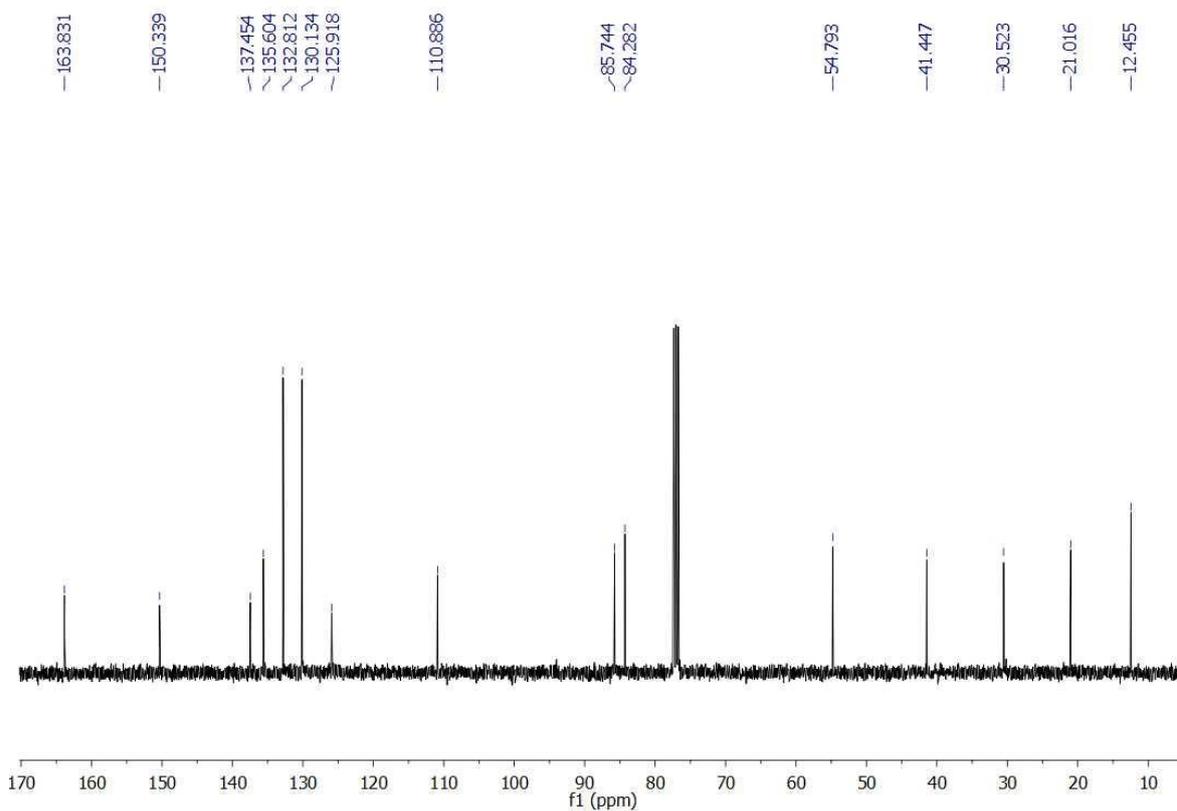


Figura 65. Espectro de RMN ^1H do composto **5j** em CDCl_3 a 400 MHz.

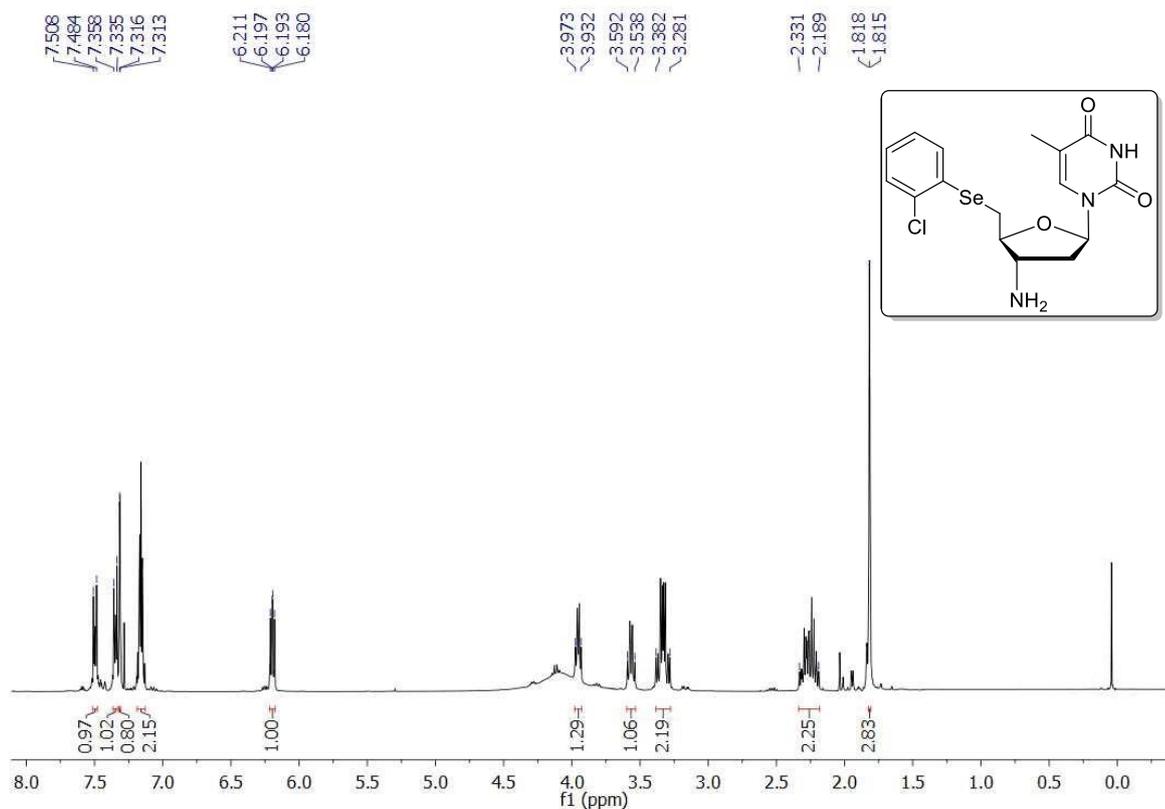


Figura 66. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5j** em CDCl_3 a 100 MHz.

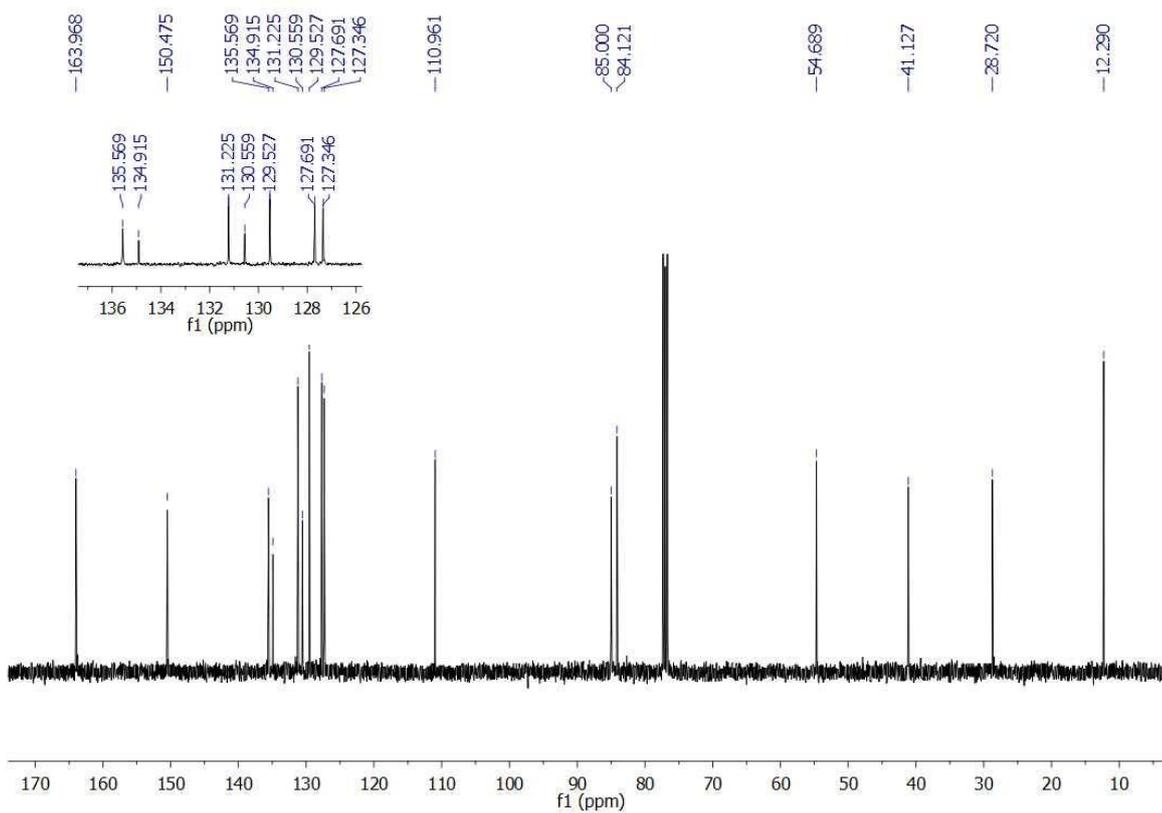


Figura 67. Espectro de RMN ¹H do composto **5k** em CDCl₃ a 400 MHz.

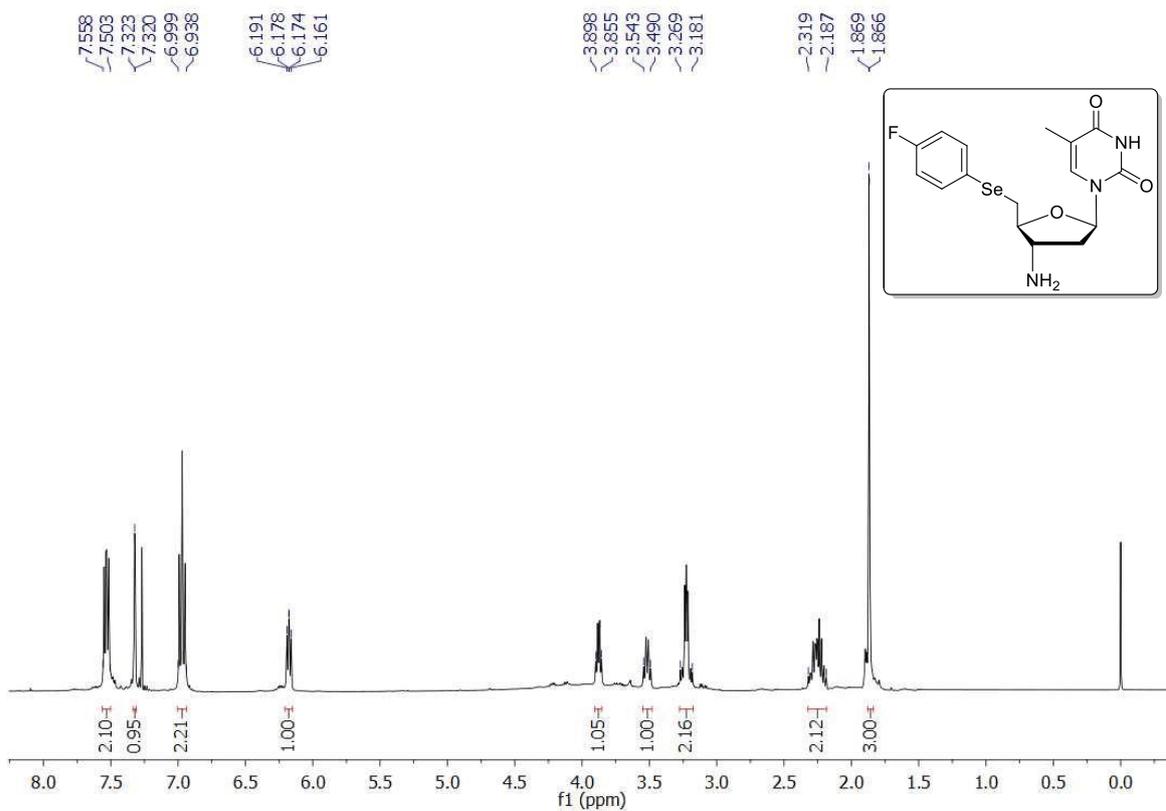


Figura 68. Espectro de RMN ¹³C do composto **5k** em CDCl₃ a 100 MHz.

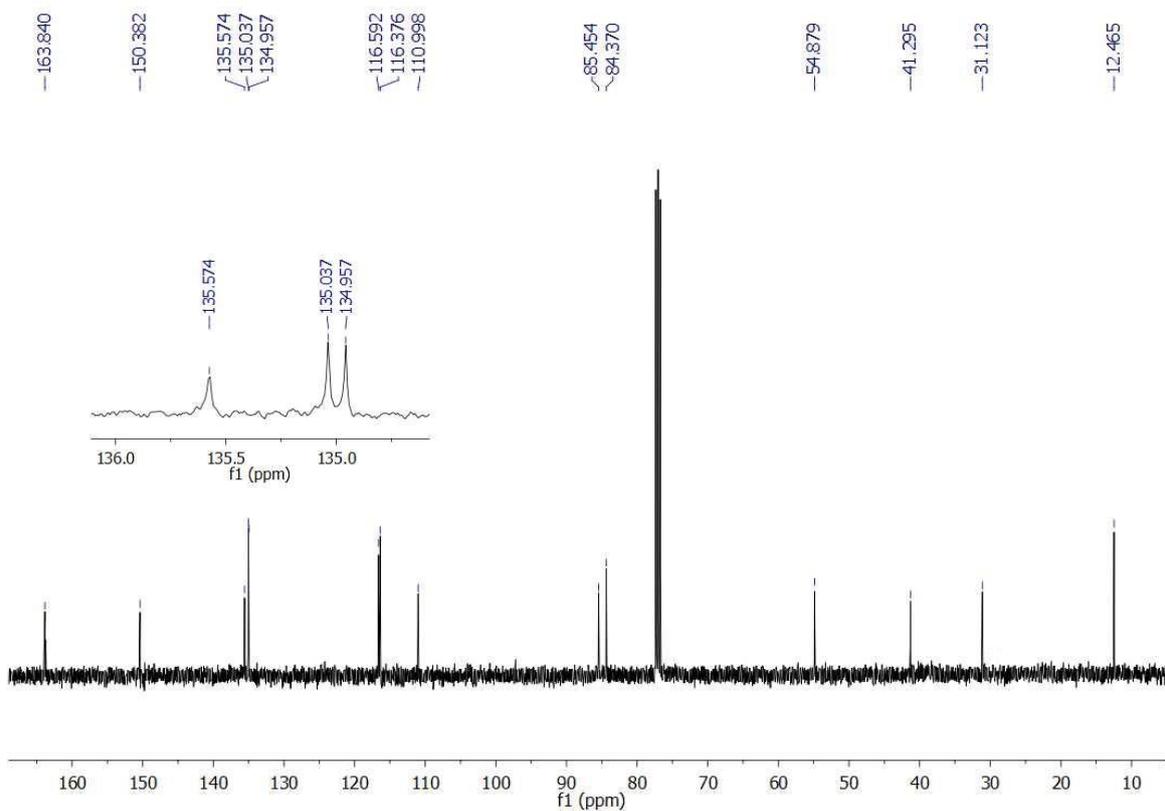


Figura 69. Espectro de RMN ^1H do composto **5I** em CDCl_3 a 400 MHz.

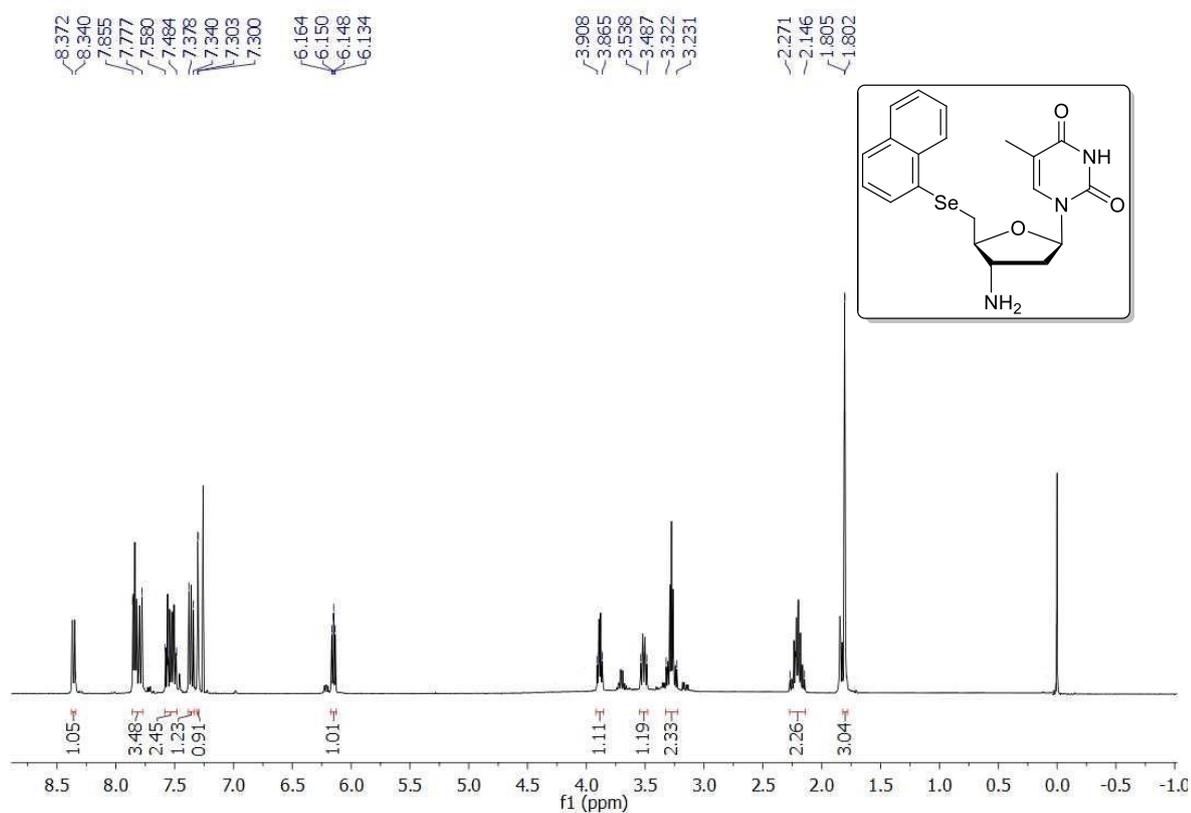


Figura 70. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5I** em CDCl_3 a 100 MHz.

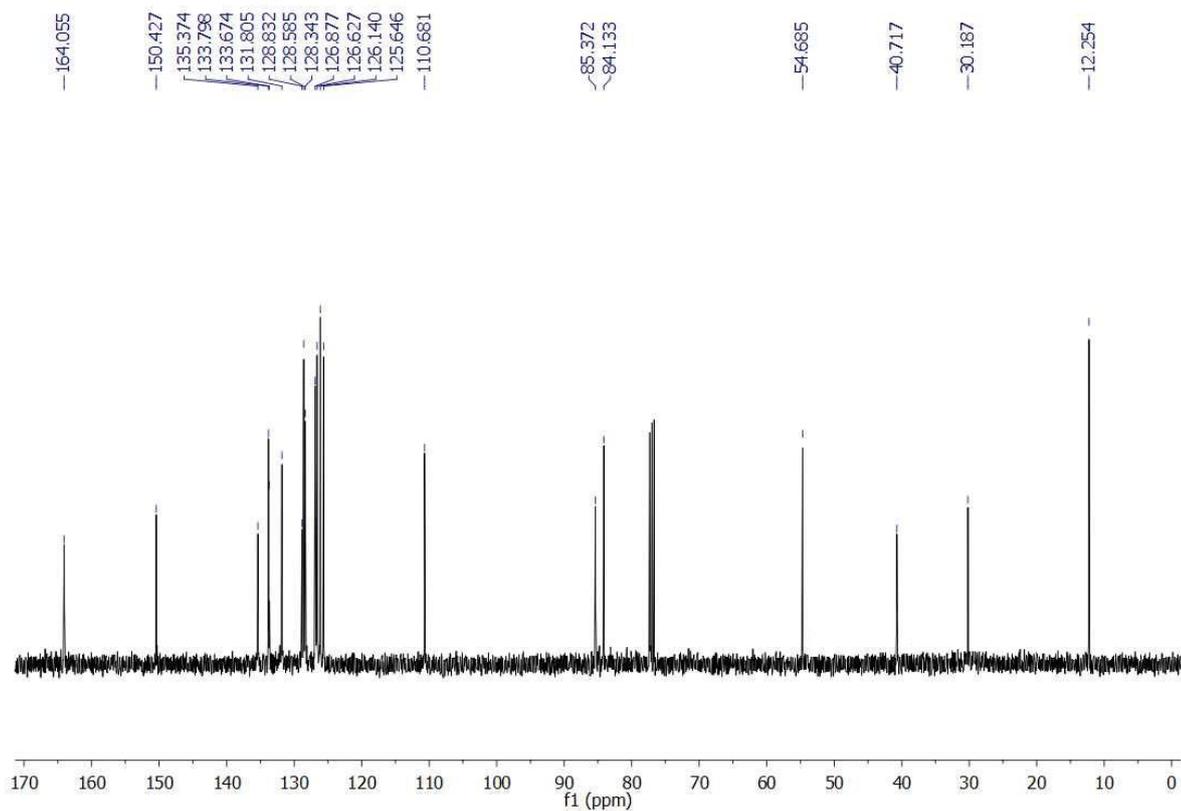


Figura 71. Espectro de RMN ^1H do composto **5m** em CDCl_3 e CD_3OD a 400 MHz.

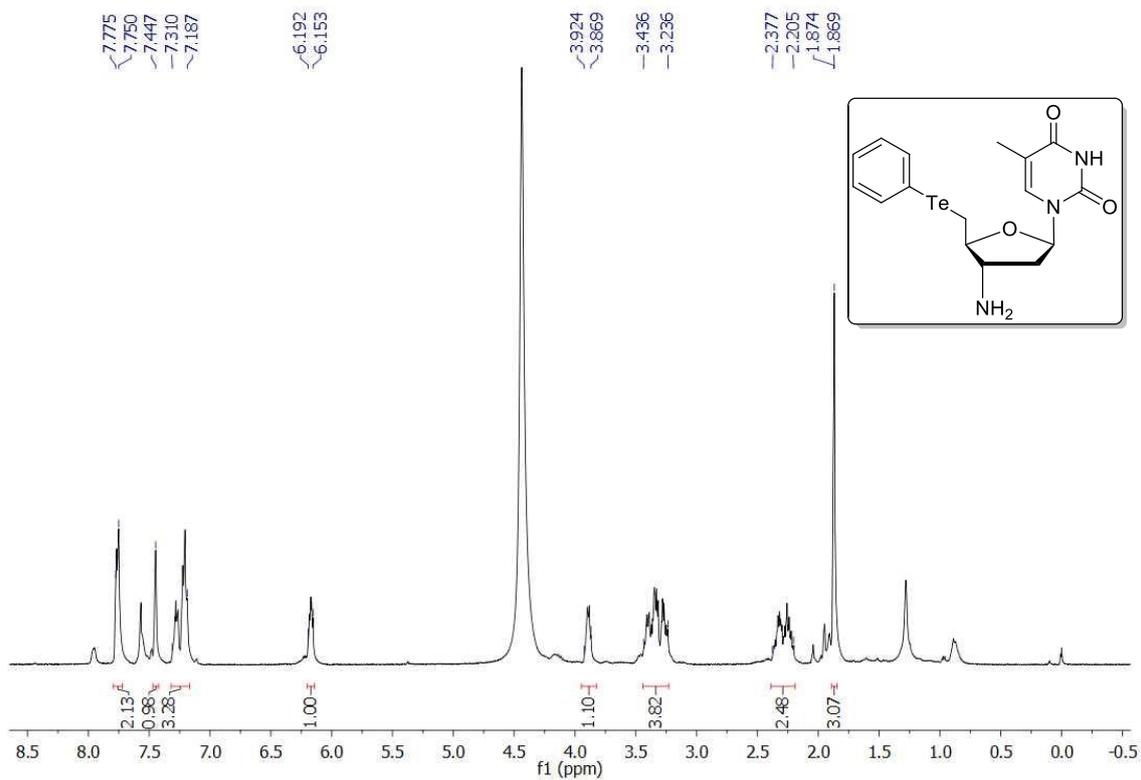
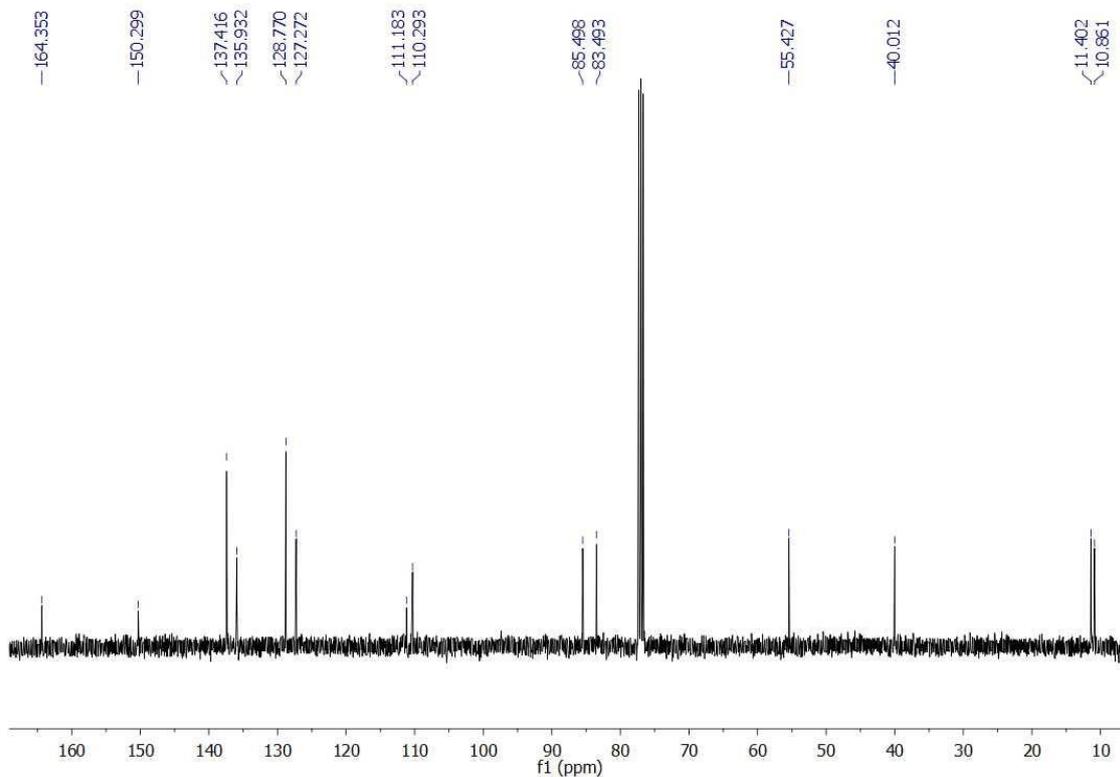


Figura 72. Espectro de RMN ^{13}C do composto **5m** em CDCl_3 e CD_3OD a 100 MHz.



Capítulo 7

Espectros de EMAR Seleccionados

7. ESPECTROS DE EMAR SELECIONADOS

Figura 73. Espectro de EMAR do composto **5a** (Massa calculada $+H$: 382,0670).

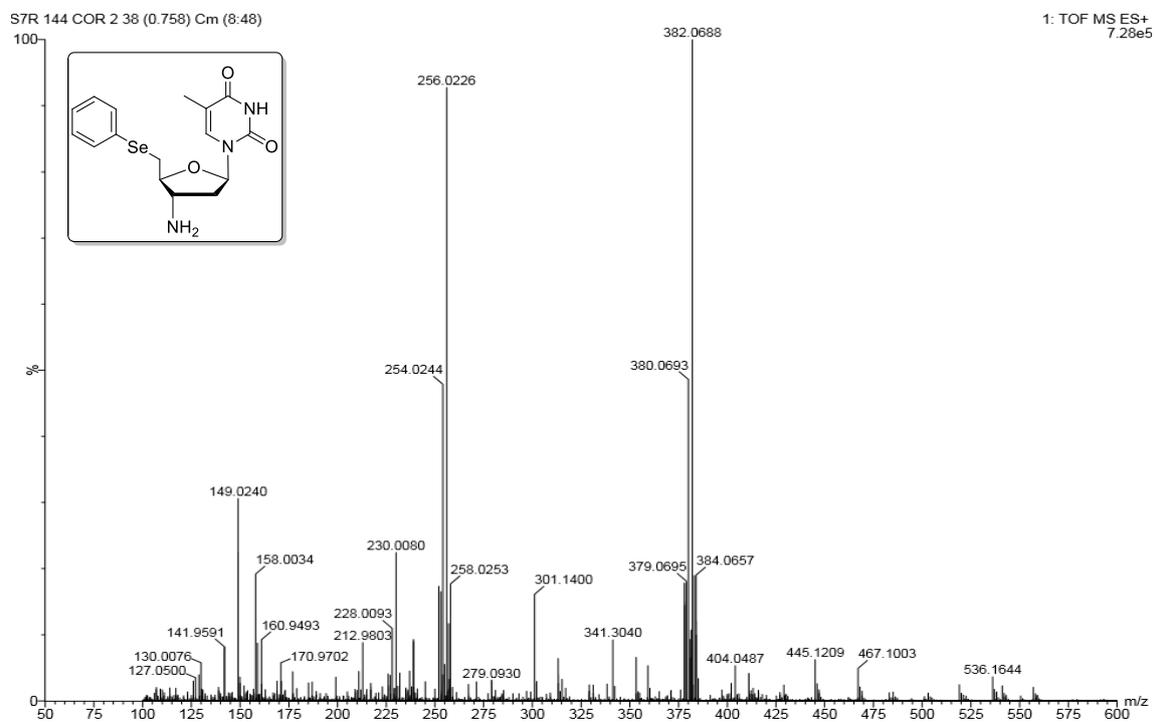


Figura 74. Espectro de EMAR do composto **5b** (Massa calculada $+H$: 364,1331).

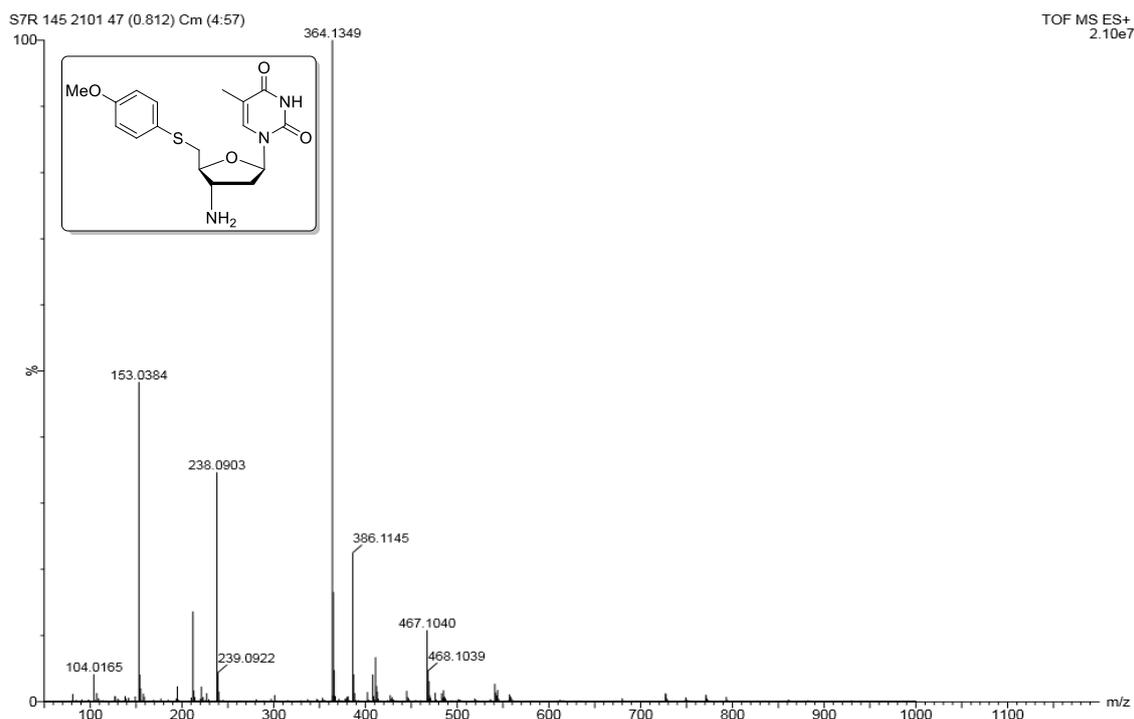


Figura 75. Espectro de EMAR do composto **5c** (Massa calculada ^+H : 368,0835).

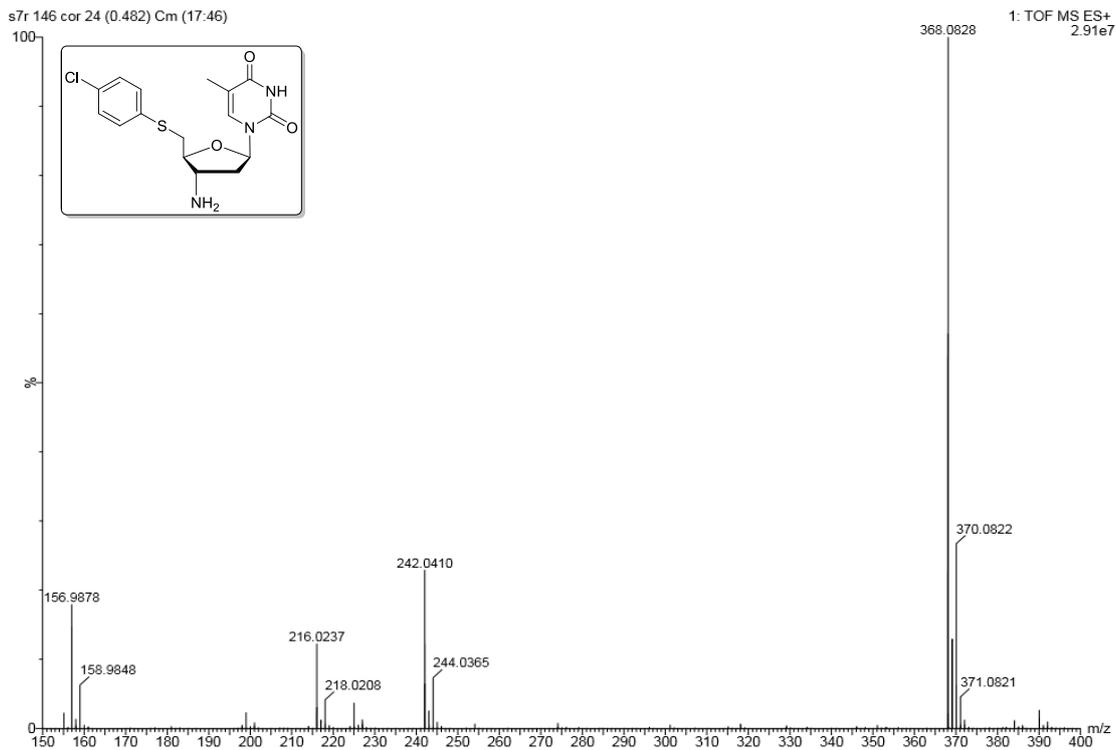


Figura 76. Espectro de EMAR do composto **5d** (Massa calculada ^+H : 348,1382).

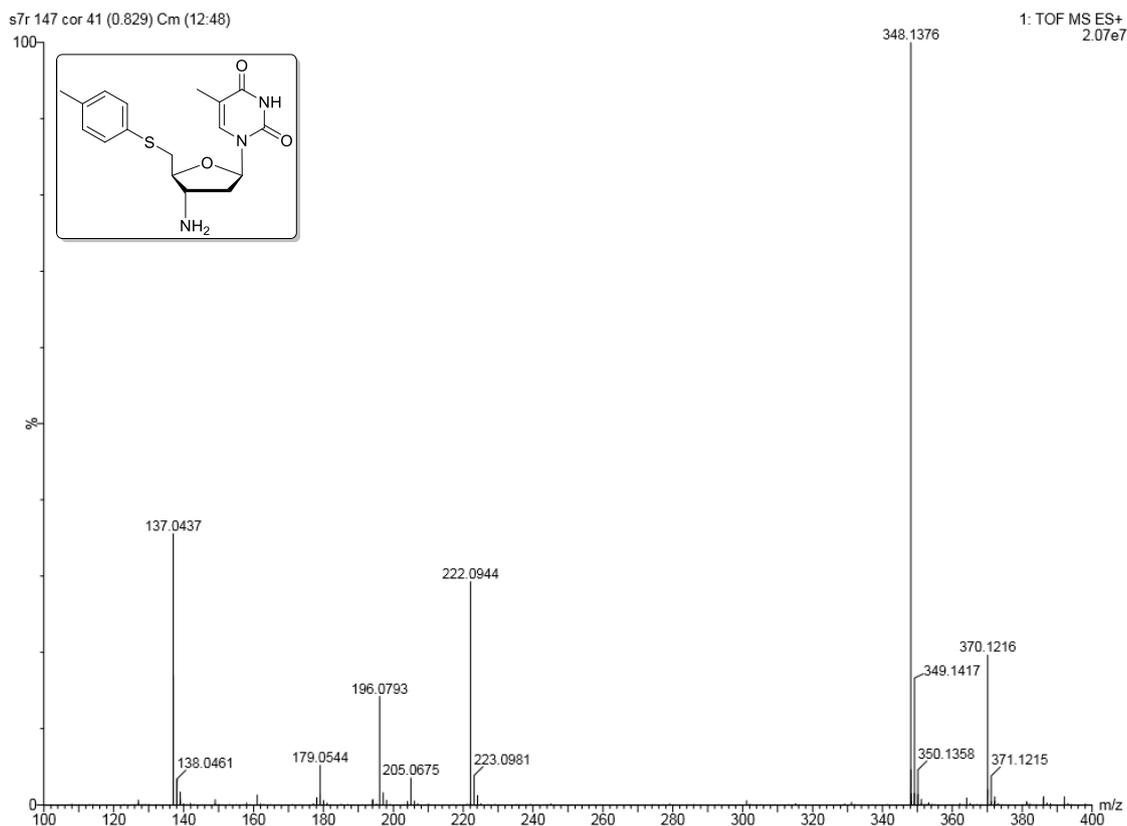


Figura 77. Espectro de EMAR do composto **5e** (Massa calculada ^+H : 334,1225).

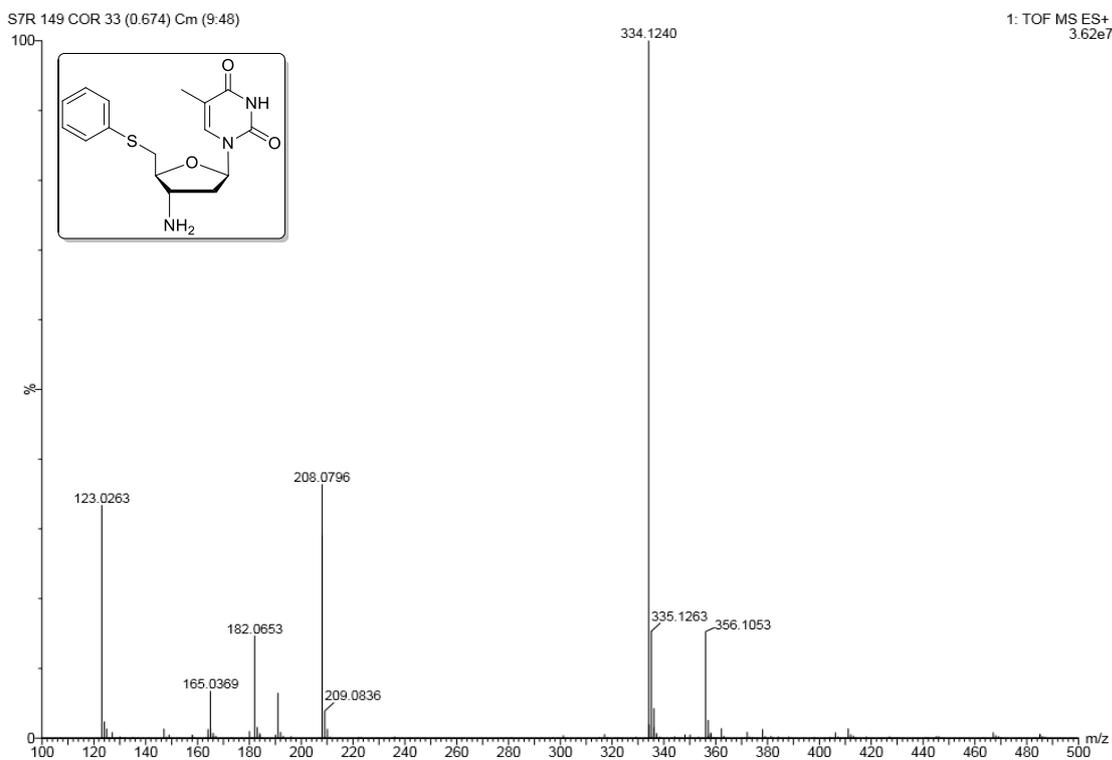


Figura 78. Espectro de EMAR do composto **5f** (Massa calculada ^+H : 396,0826.).

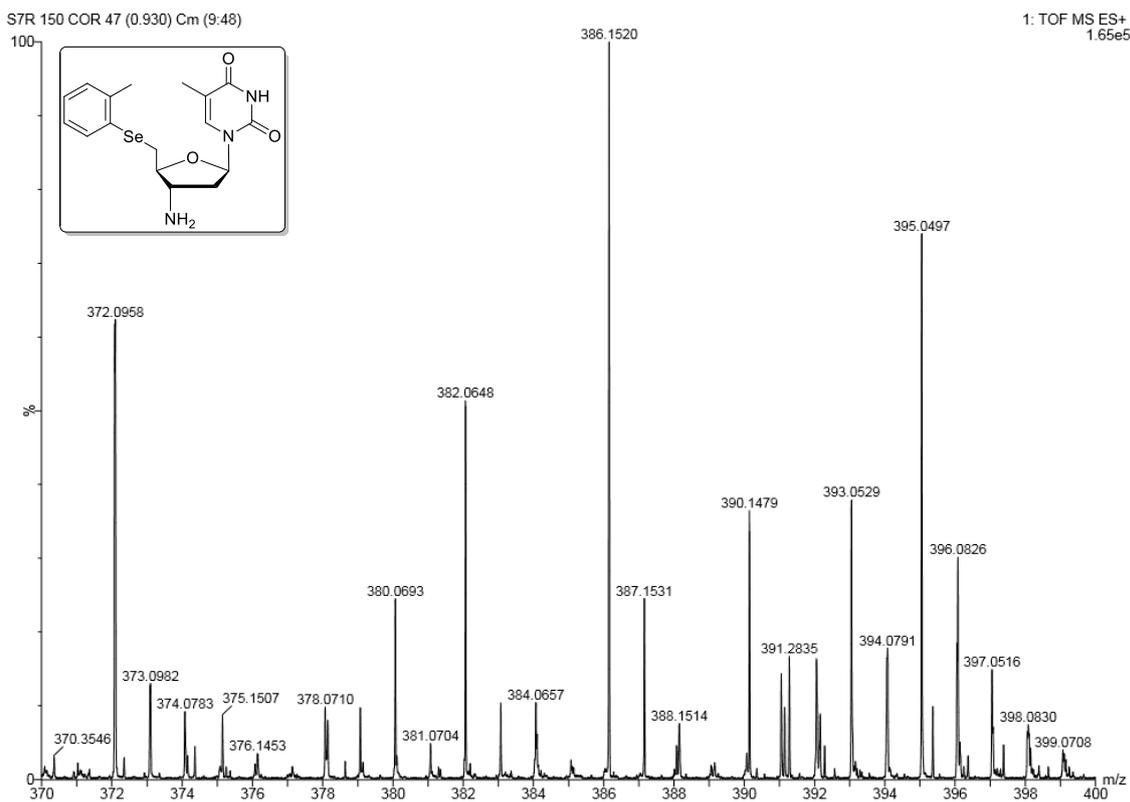


Figura 79. Espectro de EMAR do composto **5g** (Massa calculada ^+H : 412,0775.)

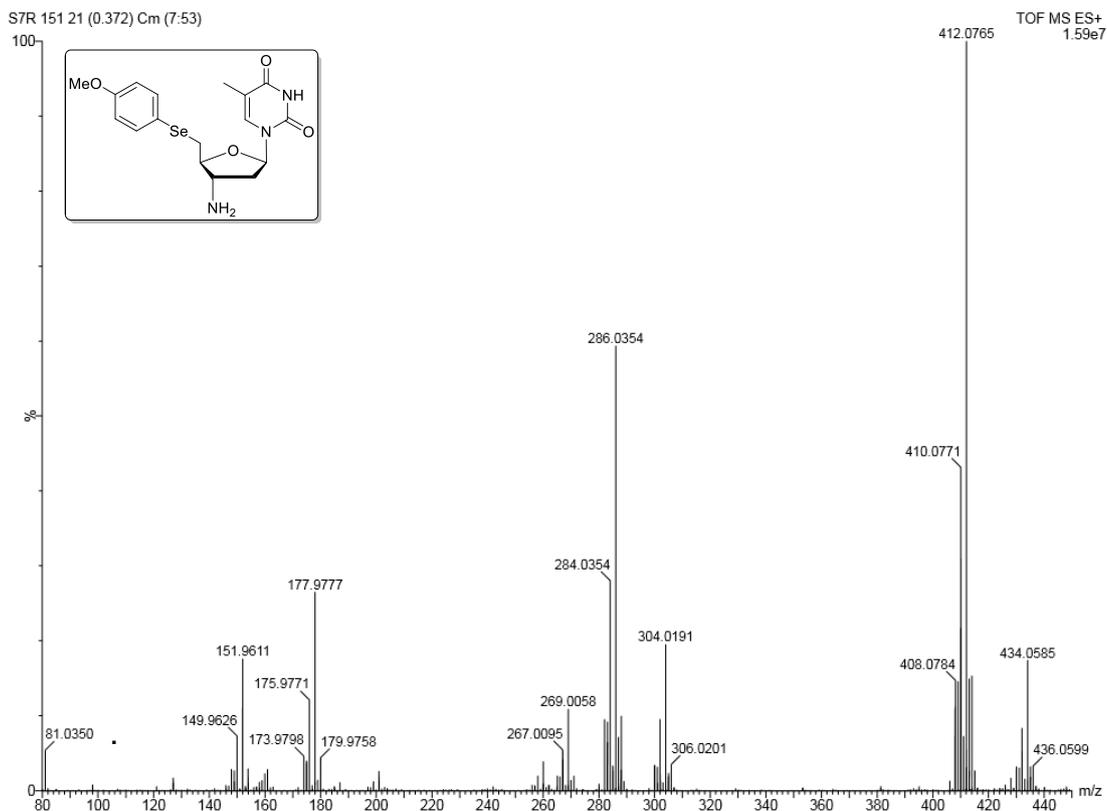


Figura 80. Espectro de EMAR do composto **5h** (Massa calculada ^+H : 416,0280.)

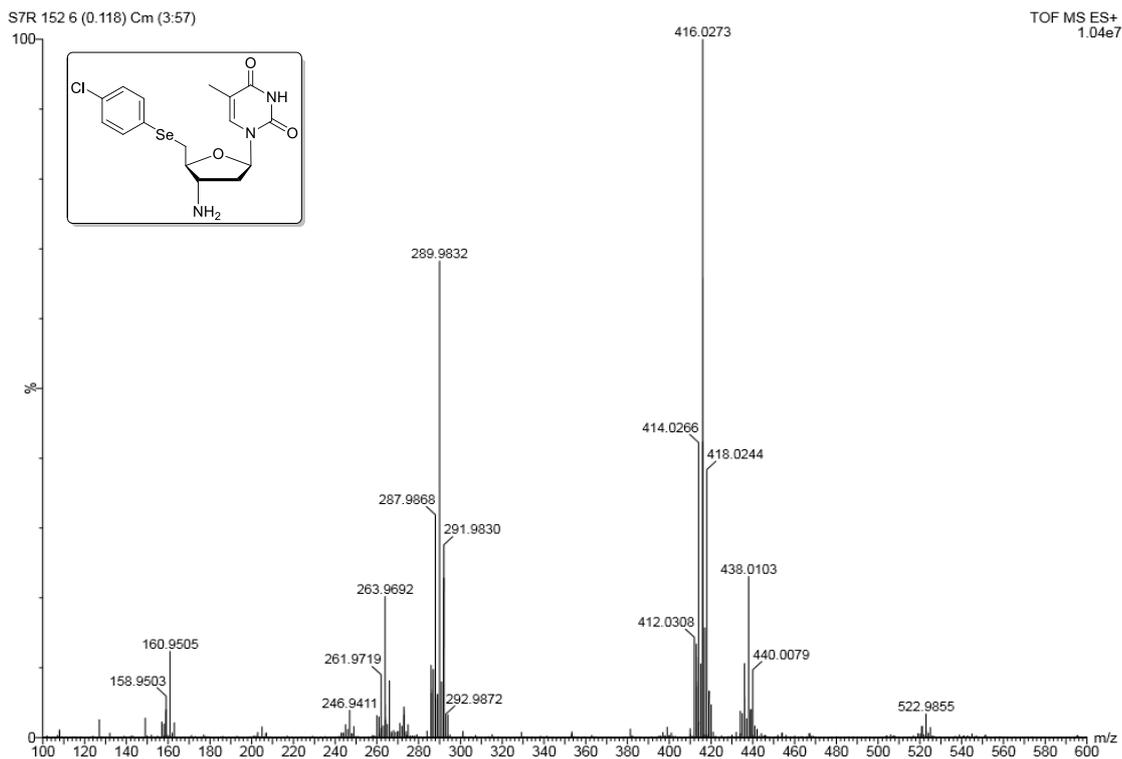


Figura 81. Espectro de EMAR do composto **5i** (Massa calculada ^+H : 396,0826).

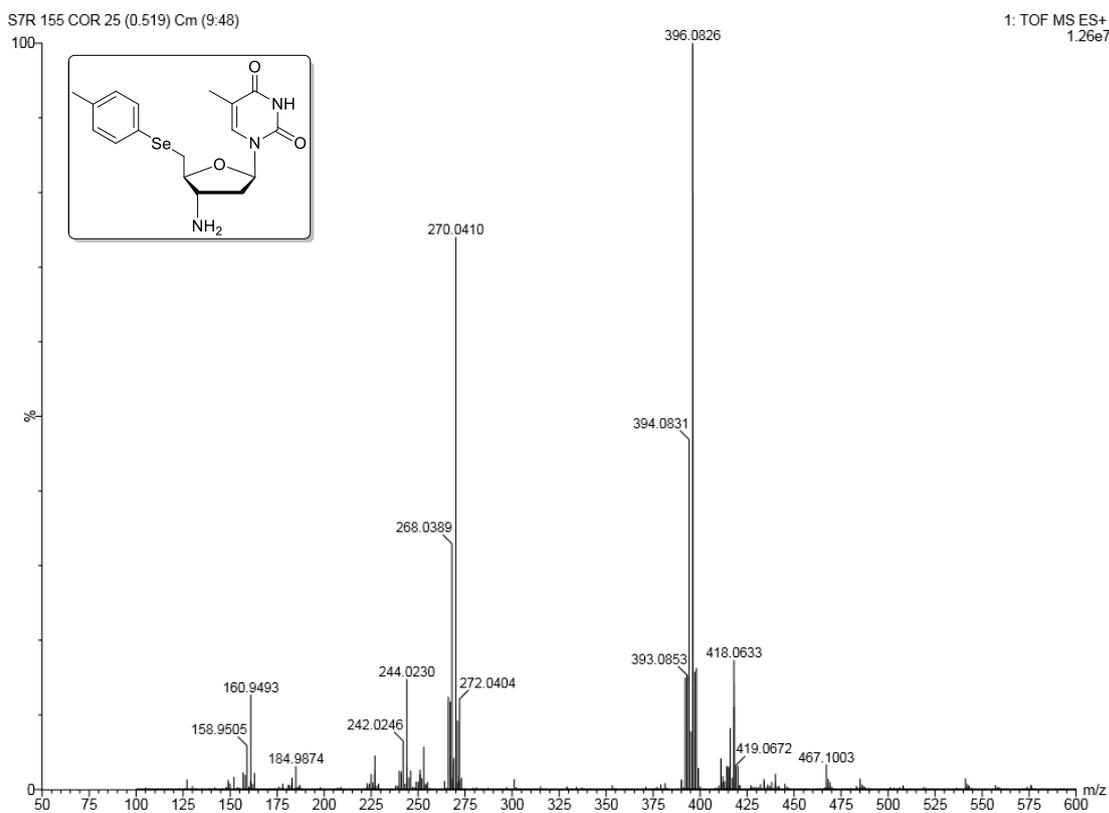


Figura 82. Espectro de EMAR do composto **5j** (Massa calculada ^+H : 416,0280).

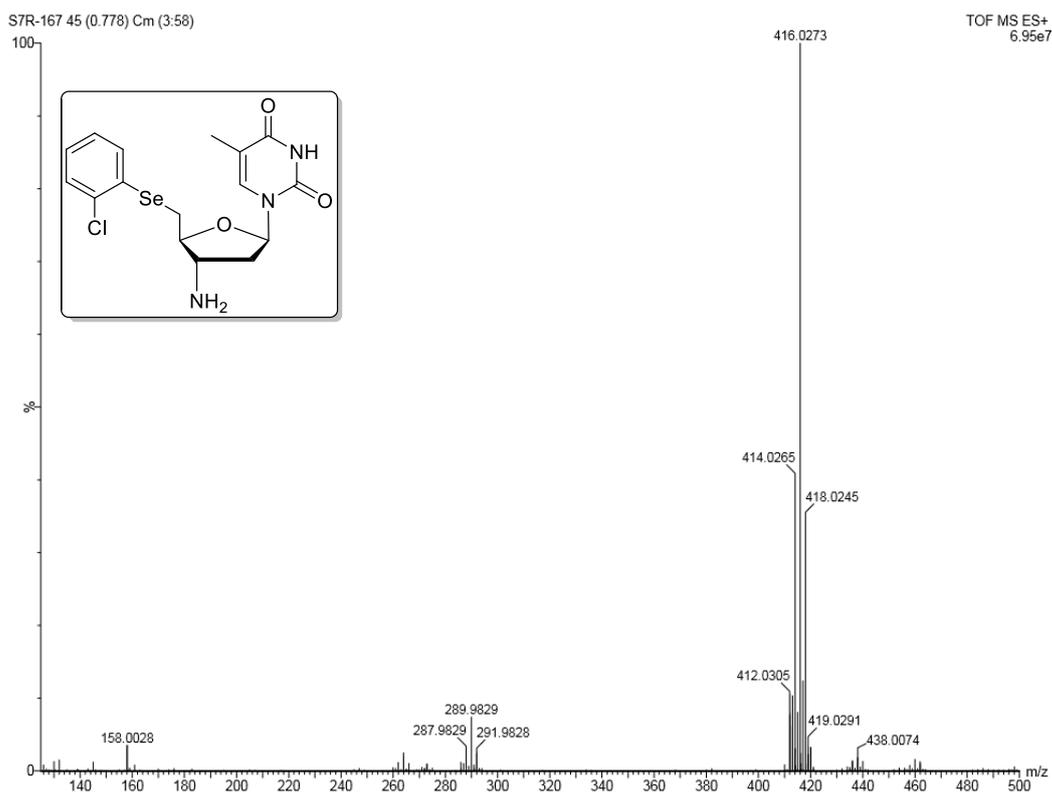


Figura 83. Espectro de EMAR do composto **5k** (Massa calculada ^+H : 400,0576).

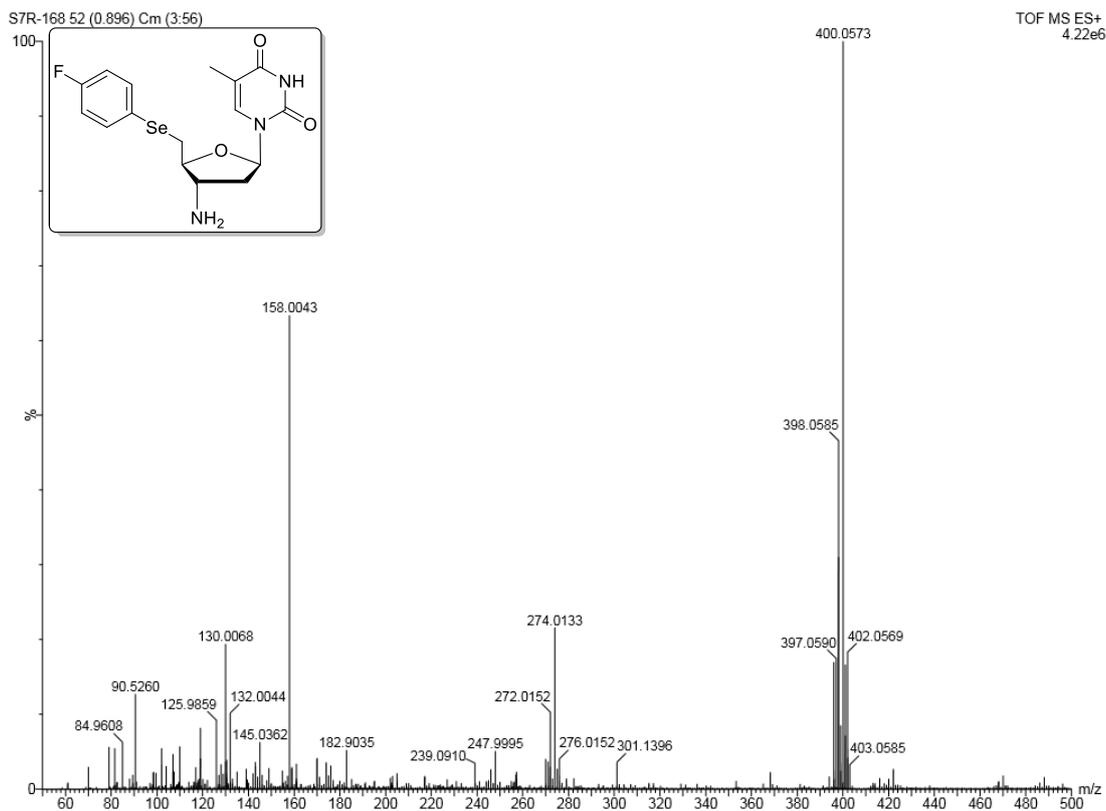


Figura 84. Espectro de EMAR do composto **5l** (Massa calculada ^+H : 432,0826)

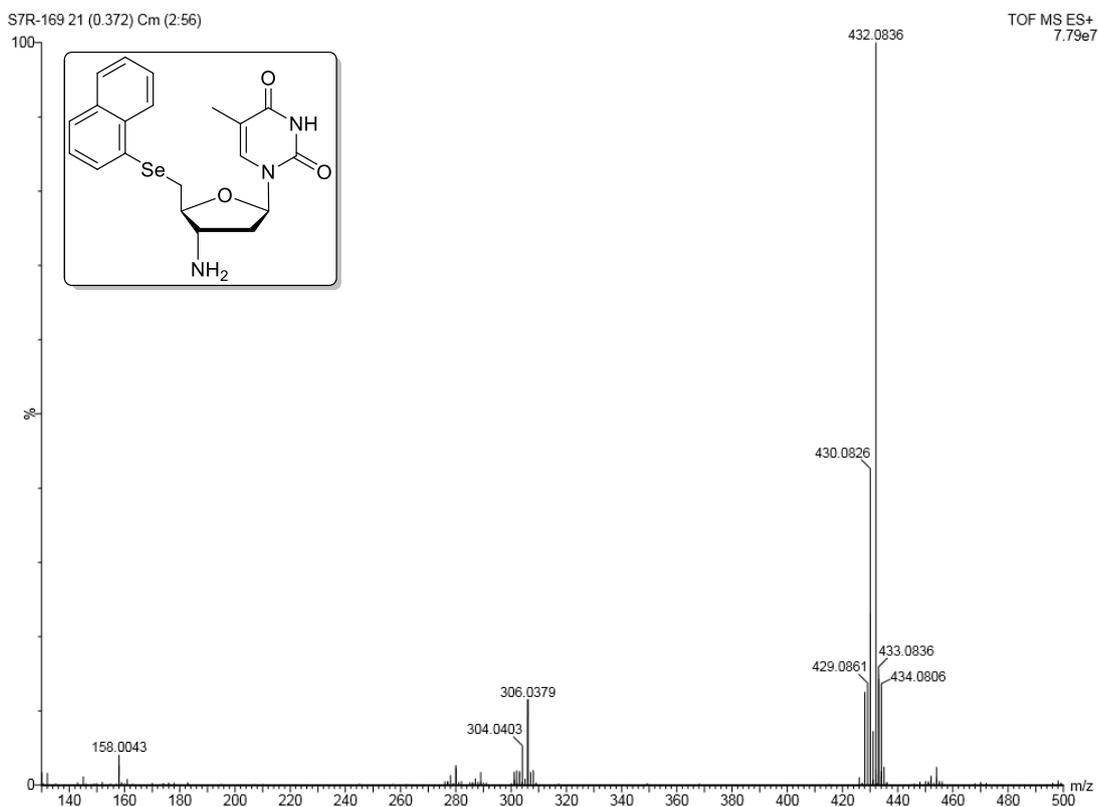


Figura 95. Espectro de EMAR do composto **5m** (Massa calculada $+H$: 432,0567).

