

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**PLANEJAMENTO, ESTUDOS DE DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE *N*-METIL-*N*-ACILIDRAZONAS PLANEJADAS
COMO INIBIDORAS DA ENZIMA PDE4**

Luciana Luiz de Azevedo

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PLANEJAMENTO, ESTUDOS DE DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE N-METIL-N-ACILIDRAZONAS PLANEJADAS
COMO INIBIDORAS DA ENZIMA PDE4**

LUCIANA LUIZ DE AZEVEDO

Sob Orientação do Professor

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

**Seropédica, RJ
Dezembro de 2018**

Dedico este trabalho aos meus pais, Ana Lucia e Jefferson, e a meu marido Douglas, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por tudo o que Ele tem feito na minha vida, pela minha família, pela minha vida profissional, pela oportunidade de poder continuar estudando e me aperfeiçoando na área em que escolhi atuar.

Agradeço aos meus pais, Ana Lucia e Jefferson, por todo o incentivo e amor incondicional.

Agradeço ao meu marido, Douglas, por todo o seu esforço e dedicação em querer o melhor pra mim, por sua sincera amizade, pela honestidade, pela compreensão, pela atenção, pelo cuidado, pelo carinho, pelo incentivo e amor.

Agradeço aos meus familiares, pela compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço ao meu orientador Arthur, pela paciência, pela compreensão nos momentos de dificuldade, pela dedicação e orientação no decorrer deste trabalho.

Agradeço aos amigos que fiz durante a jornada de pós-graduação: Daiana, Felipe, Thiago, Pedro, Sabrina, Nathália, Lucas, Gabriela e Paula, pelos dias de trabalho divertidos e produtivos no laboratório.

Agradeço aos amigos que me acompanharam de perto na graduação, Diego, Elaine e Arthur, com os quais tive a oportunidade de aprender sobre diversos assuntos.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação, pela dedicação em ensinar.

Agradeço aos professores que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a professora Dra. Rosane Nora, pelos experimentos de HPLC realizados, ao professor Dr. Carlos Maurício Sant'Anna e a sua aluna de pós-doutorado Catarina de Nigris, pela disposição em auxiliar nos experimentos de modelagem molecular, e ao professor Dr. Guilherme Pereira Guedes e ao aluno de doutorado Henrique Arruda, pela realização do experimento de cristalografia de raio-X.

Agradeço os professores membros da banca, por aceitarem dedicar parte de seu tempo para contribuição com este trabalho.

A CAPES, CNPq, FAPERJ, a UFRRJ e ao PPGQ, pelo apoio financeiro e acadêmico a este trabalho.

RESUMO

As PDEs4 são enzimas do tipo fosfodiesterases descritas na literatura como reguladoras dos níveis de AMPc no meio e estão, diretamente, envolvidas na modulação de processos inflamatórios no organismo humano. Esta característica tornou a PDE4 um alvo bastante atraente para o desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória e diversos inibidores da enzima foram descritos, como as *N*-metil-*N*-acilidrazonas (*N*-metil-NAHs). Desta forma, este trabalho tem como objetivo geral a síntese, a caracterização e a avaliação farmacológica de compostos inéditos derivados da série *N*-metil-NAH planejados como inibidores da enzima PDE4, visando a determinação da influência de substituintes em diferentes posições desta classe de compostos para: 1- a obtenção de possíveis moléculas híbridas (séries A, B e C) para o tratamento da DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica) a partir da hibridação molecular do salmeterol, fármaco referência agonista dos receptores β_2 , e compostos *N*-metil-NAH, descritas por nosso grupo como potentes inibidores da PDE4; e 2- para a obtenção de novos derivados *N*-arilados (série D) visando modulações de propriedades físico-químicas. Todas as modificações foram planejadas a partir de estudos de modelagem molecular com o protótipo *N*-metil-NAH. A síntese das moléculas finais das séries A, B e C foi realizada de forma convergente após a obtenção dos dois principais blocos de construção reacional, do salmeterol e das *N*-metil-NAHs. A síntese do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B foi realizada após cinco etapas reacionais, com rendimentos que variaram entre 40-99%. Para a série C foi necessária a utilização de uma rota sintética alternativa, que contou com quatro etapas reacionais e apresentou rendimentos que variaram entre 54-99%. A síntese do bloco do salmeterol foi realizada após três etapas reacionais com rendimentos que variaram na faixa de 51-96%. Por fim, a reação para a união dos dois blocos de construção foi avaliada utilizando diferentes metodologias. Entretanto, não houve êxito na obtenção dos compostos híbridos das séries A, B e C. Ainda assim, testes de atividade inibitória da PDE4 foram realizados para os compostos sintetizados no bloco das *N*-metil-NAHs, similares em termos estéricos com os derivados finais propostos. Os resultados observados demonstraram que o composto avaliado da série C apresentou excelente atividade, com inibição de 97,4% da enzima PDE4 à concentração de 10 μ M, como previsto por experimentos de docking, onde este se comportava como o protótipo *N*-metil-NAH. Todavia, para os compostos das séries A e B os resultados observados de atividade inibitória (0% e 84,3% à 10 μ M, respectivamente) diferiram dos estudos teórico, que previu uma correta interação para a série A e não para B. A síntese da série D foi planejada em duas etapas principais: a primeira consistiu na obtenção de um derivado *N*-metil-*N*-acilidrazônico bromado, sintetizado em quatro etapas com rendimentos que variaram na faixa de 70-92%; e a segunda na reação de acoplamento cruzado propriamente dita entre o haleto obtido e diferentes aminas, onde após diversos testes o acoplamento de Buchwald-Hartwig utilizando Pd₂(dba)₃ como fonte de paládio, XPhos como ligante, K₃PO₄ como base e dioxano como solvente, à 100°C por 3 horas se mostrou a mais promissora. Foram sintetizadas e caracterizadas 14 diferentes *N*-metil-*N*-acilidrazonas com rendimentos variando entre 40-90%. Após a síntese dos compostos da série D, alguns foram selecionados de acordo com suas características físico-químicas para a avaliação biológica, onde os resultados observados foram excelentes, com inibição da PDE4 variando na faixa de 80,3-100,0% à 10 μ M. Cabe ressaltar que, este fato corroborou com os resultados obtidos pelos experimentos de *docking*, onde as interações essenciais com a enzima alvo foram mantidas.

PALAVRAS-CHAVE: PDE4, *N*-metil-*N*-acilidrazonas, DPOC, reação de Buchwald-Hartwig.

ABSTRACT

PDEs4 are described in the literature as phosphodiesterase enzymes which acts in the regulation of cAMP levels and are directly involved in inflammatory processes control in the human body. This characteristic has made this enzyme a very attractive target for development of anti-inflammatory drugs and numerous PDE4 inhibitors have been described, such as *N*-methyl-*N*-acylhydrazones (*N*-methyl-NAHs). Therefore, this work aims at the synthesis, characterization and pharmacological evaluation of novel compounds *N*-methyl-NAH derivatives as inhibitors of the PDE4 enzyme, to determine the influence of substituents in different positions for: 1- obtaining hybrid molecules (series A, B and C) for the chronic obstructive pulmonary disease's treatment (COPD), from the molecular hybridization of salmeterol, a β_2 agonist and *N*-methyl-NAH compounds, described by our group as potent inhibitors of PDE4; and 2- to obtain new *N*-aryl derivatives (series D) for modulations of physico-chemical properties. All modifications were planned from molecular modeling studies with the *N*-methyl-NAH prototype. Final molecules of A, B and C series were synthesized in convergent route after obtaining the two main building blocks, salmeterol and *N*-methyl-NAHs. The synthesis of the *N*-methyl-NAHs block of A and B series was performed after five steps, presenting yields ranging from 40-99%. For the C series synthesis it was necessary to use an alternative synthetic route, which was performed after four steps and presented yields ranging from 54-99%. The salmeterol block synthesis was performed after three steps in yields ranging from 51-96%. Finally, the reaction for the union of the two building blocks was evaluated testing several reaction conditions. However, there was no success in obtaining the hybrid compounds of A, B and C series. Despite, PDE4 inhibitory activity tests were performed for compounds synthesized in the *N*-methyl-NAHs block, similar in steric to the proposed final derivatives. It was observed an excellent activity for the C-labeled compound, with 97.4% inhibition of the PDE4 at the concentration of 10 μ M, as predicted by docking experiments, where it behaved like the *N*-methyl-NAH prototype. However, for the A and B series the observed results of inhibitory activity (0% and 84.3% at 10 μ M, respectively) diverged from the theoretical studies, which predicted a correct interaction for the A series, but ain't for B. The D series synthesis was designed in two main steps: the first one was the synthesis of brominated *N*-methyl-*N*-acylhydrazonic derivative after four steps, with yields ranged from 70-92%; and the second one was the cross-coupling reaction itself between the halide and different amines. After several tests with Buchwald-Hartwig coupling reaction, the methodology using Pd₂(dba)₃ as source of palladium, XPhos as binder, K₃PO₄ as base and dioxane as solvent, at 100 ° C for 3 hours proved to be the most promising. 14 different *N*-methyl-*N*-acylhydrazones were synthesized and characterized, in yields ranging from 40-90%. After the D series synthesis, some were selected according to their physico-chemical characteristics for the biological evaluation, and the results were excellent, with PDE4 inhibition varying in the range of 80.3-100.0% at 10 μ M. Furthermore, the biological activities of the D series validate the results observed by the docking experiments, which demonstrated that the essential interactions between ligand and the target enzyme are still there.

KEYWORDS: PDE4, *N*-methyl-*N*-acylhydrazones, COPD, Buchwald-Hartwig reaction.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Domínio catalítico da PDE4 com o AMPc. Subdomínios destacados em verde, para o bolsão S, em amarelo, para o bolsão M, e em vermelho para o bolsão Q.....	5
Figura 2. Modelo de interação entre o AMPc e a PDE4 que leva à hidrólise.....	5
Figura 3. Derivados da metilxantina inibidores de PDEs.....	7
Figura 4. Inibidores da PDE4 da 1 ^a e 2 ^a geração.....	8
Figura 5. A) Mapa fármacofórico com a disposição e tipos de grupos funcionais necessários a inibição da PDE4; B) Sobreposição do iPDE4 cilomilaste (13) ao mapa farmacofórico.....	10
Figura 6. Inibidores da PDE4 do grupo dialcoxifenila.....	11
Figura 7. Composto aza-heterociclo (21) planejado por anelação da metoxila do rufumilaste (12).....	12
Figura 8. A) Novas estruturas de inibidores de PDE4 com diferentes arcaibouços moleculares. B) Modo de interação dos derivados borólicos com a PDE4.....	12
Figura 9. <i>N</i> -metil-NAH posicionada no sítio catalítico da PDE. A) Visualização da cavidade de acesso ao solvente. B) Interações com o sítio catalítico.....	15
Figura 10. Agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos.....	18
Figura 11. Moduladores da atividade dos receptores M3 muscarínicos.....	18
Figura 12. Glicocorticoides utilizados no tratamento da DPOC.....	19
Figura 13. Mecanismo de inibição da PDE4 na DPOC.....	20
Figura 14. Inibidores seletivos da PDE4B.....	21
Figura 15. Inibidores da PDE4 seletivos frente ao tecido alvo.....	21
Figura 16. Triazóis inibidores da PDE4B avaliados para o tratamento do câncer.....	23
Figura 17. Inibidores da PDE4D avaliados para o tratamento do câncer.....	24
Figura 18. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da depressão.....	25
Figura 19. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da doença de Alzheimer, de Parkinson e esclerose múltipla.....	26
Figura 20. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento de dermatite atópica.....	27
Figura 21. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da dermatite atópica, psoríase e artrite reumatoide.....	28
Figura 22. Ligante NPD001 cocristalizado com o sítio catalítico da enzima PDE4B.....	69

- Figura 23.** Atividade broncodilatadora dos protótipos (100 μ M) usados no planejamento dos compostos híbridos. A atividade de 100% é dada pela força de contração exercida pelo carbacol à 2,5 μ M.....71
- Figura 24.** A) Forma de interação entre as *N*-metil-NAHs (**27**) e o sítio ativo da PDE4. B) Pontos de hibridação planejados para as séries híbridas A, B e C.....72
- Figura 25.** Espectros bidimensionais de HSQC do produto **65a** (Série A) em DMSO: Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,1ppm e 25,0-70,0ppm; B) 6,8-8,0ppm e 105,0-145,0ppm.....90
- Figura 26.** Espectros bidimensionais de HMBC do produto **65a** (Série A) em DMSO: Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,2ppm e 20,0-68,0ppm; B) 6,75-8,0ppm e 108,0-137,0ppm; C) 3,3-4,1ppm e 138,0-175,0ppm; D) 6,8-8,0ppm e 138,0-172,0ppm.....90
- Figura 27.** Espectros bidimensionais de HSQC do produto **66a** (Série B) em DMSO: Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,0ppm e 25,0-70,0ppm; B) 6,7-8,1ppm e 105,0-145,0ppm.....91
- Figura 28.** Espectros bidimensionais de HMBC do produto **66a** (Série B) em DMSO: Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,0ppm e 24,0-72,0ppm; B) 6,8-8,0ppm e 108,0-137,0ppm; C) 3,4-3,9ppm e 140,0-175,0ppm; D) 6,8-8,0ppm e 138,0-172,0ppm.....91
- Figura 29.** Espectro de RMN bidimensional NOESY da *N*-metil-NAH **65a** (Série A) em DMSO. Visualização da interação espacial entre: A) os átomos de hidrogênio 12 e 26, com ampliação entre 3,70-4,05ppm no eixo horizontal e 6,80-7,15ppm no eixo vertical; B) os átomos de hidrogênio 15 e 16, com ampliação entre 6,85-7,05ppm no eixo horizontal e 3,2-3,6ppm no eixo vertical.....96
- Figura 30.** Espectro de RMN bidimensional NOESY da *N*-metil-NAH **66a** (Série B) em DMSO. Visualização da interação espacial entre: A) os átomos de hidrogênio 12 e 16, com ampliação entre 6,80-7,10ppm no eixo horizontal e 3,2-3,6 no eixo vertical; B) os átomos de hidrogênio 15 e 26, com ampliação entre 6,80-7,10ppm no eixo horizontal e 3,65-3,95ppm no eixo vertical.....97
- Figura 31.** Espectro de RMN bidimensional NOESY das *N*-metil-NAHs em DMSO: A) **65a** (Série A), com ampliação entre 7,70-8,00ppm no eixo horizontal e 3,00-4,25ppm no eixo vertical; B) **66a** (Série B), com ampliação entre 7,80-7,95ppm no eixo horizontal e 3,20-3,70ppm no eixo vertical. Visualização da interação espacial entre os átomos de hidrogênio 9 e 27 para determinação da configuração relativa *E*.....98
- Figura 32.** Semelhanças estruturais entre o ligante NPD001 (**89**) cocristalizado com a enzima PDE4B, na estrutura cristalográfica de código 5LAQ, as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas sintetizadas **65a-d**, **66a-d** e **72a-d** (das séries A, B e C, respectivamente) e o protótipo inspirador dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (**27**).....122

- Figura 33.** Redocking, em destaque azul, do ligante NPD001 (**89**) cocrystalizado, em destaque vermelho, com o sítio catalítico da enzima PDE4B utilizando a função GoldScore.....123
- Figura 34.** A) Análise das principais interações moleculares entre o protótipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-*N*-acilidrazona (**27**) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do ligante cocrystalizado NPD001 (**89**), em destaque azul, e o protótipo **27** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o composto **27** ancorado.....125
- Figura 35.** A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada **65c** (da série A) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **65c** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o ligante **65c** ancorado.....125
- Figura 36.** A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada **72c** (da série C) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **72c** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o ligante **72c** ancorado.....126
- Figura 37.** A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada **66c** (da série B) e o sítio catalítico da enzima PDE4B, para as soluções de 1 a 5. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **66c** atracado à enzima, em destaque vermelho, para as soluções de 1 a 5.....127
- Figura 38.** A) Planejamento estrutural da série de *N*-metil-NAHs *N*-ariladas D. B) Ponto de *N*-arilação.....129
- Figura 39.** Curva de absorção no UV na faixa de 200-400nm para: A) a *N*-metil-NAH de partida **86**; B) o produto *N*-arilado **88a**.....138
- Figura 40.** Cromatogramas de HPLC para o acompanhamento da reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção do produto *N*-arilado **88a**, a partir da *N*-metil-NAH **86**, utilizando a metodologia descrita no teste 3 (Tabela 16), com detecção no UV a 310nm. A) Após 1 hora de reação. B) Após 3 horas de reação. C) Após 6 horas de reação..139
- Figura 41.** Cromatograma de HPLC para o acompanhamento da reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção do produto *N*-arilado **88a**, a partir da *N*-metil-NAH **86**, utilizando a metodologia descrita no teste 7 (Tabela 16), após 1 hora de reação, com detecção no UV a 310nm.....140
- Figura 42.** Representação ORTEP do resultado da cristalografia de raios-X para a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** e a confirmação da diastereoisomeria (*E*).....144
- Figura 43.** Semelhanças estruturais entre o ligante zardaverina (**15**) cocrystalizado com a enzima PDE4D, na estrutura cristalográfica de código 1XOR, e as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas sintetizadas **88a-n** e o protótipo inspirador da série D (**27**).....147

- Figura 44.** Redocking, em destaque azul, do ligante zardaverina (**15**) cocristalizado, em destaque vermelho, com o sítio catalítico da enzima PDE4D utilizando a função GoldScore.....148
- Figura 45.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH **27** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do ligante zardaverina (**15**), em destaque azul, e o protótipo **27** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **27** ancorado.....150
- Figura 46.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88a** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88a** ancorado.....151
- Figura 47.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88b** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88b** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88b** ancorado.....151
- Figura 48.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88c** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88c** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88c** ancorado.....152
- Figura 49.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88d** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88d** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88d** ancorado.....152
- Figura 50.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88e** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88e** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88e** ancorado.....153
- Figura 51.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88f** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88f** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88f** ancorado.....153
- Figura 52.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88g** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88g** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88g** ancorado.....154
- Figura 53.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88h** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88h** atracado à enzima, em destaque vermelho. **C)** Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88h** ancorado.....154
- Figura 54.** **A)** Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88i** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. **B)** Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul,

e o composto **88i** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88i** ancorado.....155

Figura 55. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88j** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88j** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88j** ancorado.....155

Figura 56. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88k** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88k** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88k** ancorado.....156

Figura 57. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88l** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88l** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88l** ancorado.....156

Figura 58. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88m** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88m** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88m** ancorado.....157

Figura 59. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88n** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88n** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88n** ancorado.....157

Figura 60. Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico de diferentes isoformas da PDE4, em destaque amarelo, e região de acesso ao volume adicional da série A, em destaque vermelho A) Cristal de código 5LAQ; B) Cristal de código 1RO6; C) Cristal de código 5OHJ; D) Cristal de código 1XOR.....160

LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1. Hidrólise da ligação 3'-fosfodiéster para AMPc (1) e GMPc (2) através da atividade catalítica das PDEs. Onde R = adenosina para AMPc (1) e 5'-AMP (3) e R = guanosina para GMPc (2) e 5'-GMP (4).....	1
Esquema 2. Roflumilaste (12) e seu produto de metabolização.....	8
Esquema 3. Planejamento da série das <i>N</i> -acilidrazonas iPDE4 26 e 27.....	14
Esquema 4. Planejamento estrutural dos compostos híbridos agonistas β_2 e inibidores de PDE4.....	72
Esquema 5. Análise retrossintética inicial para a obtenção dos derivados híbridos da série A (90a-d), B (91a-d) e C (92a-d).....	73
Esquema 6. Análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos 94a-d, 96a-d e 98a-d (das séries A, B e C, respectivamente) do ponto de vista da construção do bloco do salmeterol.....	74
Esquema 7. Análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos 94a-d e 96a-d (das séries A e B, respectivamente) do ponto de vista da construção do bloco das <i>N</i> -metil-NAHs.....	75
Esquema 8. Análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos 98a-d (da série C) do ponto de vista da construção do bloco das <i>N</i> -metil-NAHs.....	76
Esquema 9. Reação de <i>N</i> -alquilação para a obtenção das ftalimidias <i>N</i> -alquiladas 56a-d espaçadoras das séries A, B e C.....	77
Esquema 10. Mecanismo de formação das ftalimidias <i>N</i> -alquiladas 56a-d, via reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN ₂), e possível formação do produto bisalquilado (102a-d).....	78
Esquema 11. Reação de <i>O</i> -alquilação para a obtenção dos aldeídos <i>O</i> -alquilados 58a-d (série A) e 60a-d (série B).....	79
Esquema 12. Mecanismo geral para a obtenção dos aldeídos <i>O</i> -alquilados 58a-d da série A, aplicável também para a série B (60a-d), via reação de substituição nucleofílica bimolecular (SN ₂).....	81
Esquema 13. Reação de condensação para a obtenção das NAHs <i>O</i> -alquiladas 62a-d (série A) e 63a-d (série B).....	82
Esquema 14. Mecanismo geral para a obtenção das NAHs <i>O</i> -alquiladas 62a-d da série A com configuração relativa <i>E</i> , aplicável também para a série B (60a-d), via reação de condensação ácido-catalisada, e possível formação de seu isômero geométrico <i>Z</i> (112a-d).....	84
Esquema 15. Reação de <i>N</i> -alquilação para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas 65a-d (série A) e 66a-d (série B).....	86

Esquema 16. Mecanismo geral para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas 65a-d da série A, aplicável também para a série B (66a-d), via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S _N 2), e possível formação dos subprodutos <i>C</i> -metilado (116a-d) e <i>O</i> -metilado (117a-d).....	88
Esquema 17. Reações de substituição nucleofílica à carbonila para obtenção da <i>N</i> -metil-hidrazida hidroxilada 69 da série C.....	99
Esquema 18. Mecanismo de formação do cloreto de ácido (100) para obtenção do bloco das <i>N</i> -metil-NAHs da série C, via mecanismo de substituição nucleofílica à carbonila (S _N Ac)..	100
Esquema 19. Mecanismo de formação da <i>N</i> -metil-hidrazida hidroxilada 69 , com possível formação do produto 136, partindo do cloreto de ácido 100 e de metilhidrazina (68), via mecanismo de substituição nucleofílica à carbonila (S _N Ac).....	101
Esquema 20. Reação de condensação para a obtenção da <i>N</i> -metil-NAH hidroxilada (71) da série C.....	102
Esquema 21. Mecanismo para a obtenção da <i>N</i> -metil-NAH hidroxilada 71 da série C com configuração relativa <i>E</i> , via reação de condensação ácido-catalisada, e possível formação de seu isômero geométrico <i>Z</i> (144).....	103
Esquema 22. Reação de <i>O</i> -alquilação para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série C (72a-d).....	105
Esquema 23. Mecanismo para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas 72a-d da série C, via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S _N 2).....	106
Esquema 24. Reação de hidrasinólise para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas desprotegidas das séries A (74a-d) e B (75a-d).....	107
Esquema 25. Mecanismo para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas desprotegidas 74a-d da série A, aplicável para a série B (75a-d), via reação de substituição nucleofílica à carbonila.....	108
Esquema 26. Reação de acilação de Friedel Crafts para a obtenção do salicilaldeído acilado (78).....	109
Esquema 27. Mecanismo para a obtenção do salicilaldeído acilado (78) do bloco do salmeterol, com possível formação do produto acilado 156 , via reação de substituição eletrofílica aromática (S _E Ar).....	112
Esquema 28. Reação de redução do aldeído 78 para a obtenção do derivado 2-(hidroximetil)fenólico (79) do bloco do salmeterol.....	113
Esquema 29. Mecanismo de redução para a obtenção do o derivado 2-(hidroximetil)fenólico (79) do bloco do salmeterol, com possível formação do diol 161 , via reação de adição nucleofílica à carbonila.....	114
Esquema 30. Mecanismo de redução de carbonilas de aldeídos e cetonas em meio alcalino, ácido e neutro com borohidreto de sódio (158).....	115

Esquema 31. Reação de proteção do grupo catecol presente no álcool 79 para a obtenção do cetal 81 do bloco do salmeterol.....	115
Esquema 32. Mecanismo de proteção do grupo catecol no produto 79 , para a obtenção do cetal 81 , via reação de adição nucleofílica.....	116
Esquema 33. Reação de união dos blocos do salmeterol e <i>N</i> -metil-NAH, através da reação entre o cetal 81 e as <i>N</i> -metil-NAHs desprotegidas 74a-d e 75a-d , para a obtenção das cetonas híbridas 94a-d e 96a-d	117
Esquema 34. Reação teste de substituição nucleofílica para a união dos blocos do salmeterol e <i>N</i> -metil-NAH, através da reação entre α -bromo-acetofenona (175) e a fenetilamina (176), para a obtenção da cetona 177	118
Esquema 35. Reação teste de substituição nucleofílica para a união dos blocos do salmeterol e <i>N</i> -metil-NAH, através da reação entre a <i>N</i> -metil-NAH desprotegida (74a) e o cetal (81), para a obtenção do produto híbrido 94a	119
Esquema 36: Análise retrossintética para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas da série D (88a-n).....	130
Esquema 37. Reação de oxidação de Yamada para a obtenção do éster benzílico 83 da série D.....	130
Esquema 38. Mecanismo de formação do éster benzílico 83 da série D, via reação de oxidação de Yamada.....	131
Esquema 39. Reação de substituição nucleofílica à carbonila para a obtenção da 4-bromo-benzil-hidrazida (84) da série D.....	132
Esquema 40. Mecanismo de formação a 4-bromo-benzil-hidrazida (84) da série D, via reação de substituição nucleofílica à carbonila (S_NAc).....	132
Esquema 41. Reação de condensação para a obtenção da NAH 85 da série D.....	133
Esquema 42. Reação de <i>N</i> -alquilação para a obtenção da <i>N</i> -metil-NAH 86 da série D.....	134
Esquema 43. Reação geral de <i>N</i> -arilação para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas 88a-n da série D.....	135
Esquema 44. Reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas 88a-n da série D.....	140
Esquema 45. Ciclo catalítico do paládio para a reação de <i>N</i> -ariação da <i>N</i> -metil-NAH 86 com as aminas 87a-p e obtenção das <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas 88a-p , via mecanismo de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig.....	142

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Família das PDEs: Seus respectivos substratos e distribuição tecidual.....	2
Tabela 2. Isoformas da família PDE4: distribuição tecidual.....	4
Tabela 3. Valores de CI_{50} para as isoformas de PDE4.....	9
Tabela 4. Atividades e seletividades das NAHs (27a-j) frente à inibição da PDE4.....	15
Tabela 5. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as ftalimidas <i>N</i> -alquiladas 56a-d após processo de purificação em coluna cromatográfica.....	78
Tabela 6. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para os aldeídos <i>O</i> -alquilados 58a-d (série A) e 60a-d (série B).....	80
Tabela 7. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as NAHs <i>O</i> -alquiladas 62a-d (série A) e 63a-d (série B).....	82
Tabela 8. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas 65a-d (série A) e 66a-d (série B).....	86
Tabela 9. Dados de RMN de 1H (500MHz) e de ^{13}C (125MHz) do produto 65a em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.....	92
Tabela 10. Dados de RMN de 1H (500MHz) e de ^{13}C (125MHz) do produto 66a em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.....	93
Tabela 11. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série C (72a-d).....	105
Tabela 12. Tabela de rendimentos reacionais para as <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas desprotegidas das séries A (74a-d) e B (75a-d).....	107
Tabela 13. Testes de avaliação metodológica da reação de acilação de Friedel Crafts sobre o produto 78	110
Tabela 14. Testes de avaliação metodológica da reação de substituição nucleofílica entre a α -bromo-acetofenona (175) e a fenetilamina (176).....	118
Tabela 15. Testes de avaliação metodológica da reação de substituição nucleofílica entre a <i>N</i> -metil-NAH desprotegida (74a) e o cetal (81).....	120
Tabela 16. Função de pontuação e respectivos valores de RMSD em Å para o redocking com o ligante NPD001 (89) e a enzima PDE4B.....	123
Tabela 17. Melhores pontuações de docking dos ligantes 65c (série A), 72c (série C) e 27 (protótipo) com sítio catalítico da enzima PDE4B.....	124

Tabela 18. Metodologias avaliadas para a obtenção da <i>N</i> -metil-NAH <i>N</i> -arilada 88a da série D.....	135
Tabela 19. Rendimentos reacionais e pontos de fusão para as <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas 88a-n da série D.....	140
Tabela 20. Propriedades físico-químicas calculadas para as <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas da série D (88a-n).....	145
Tabela 21. Função de pontuação e respectivos valores de RMSD em Å para o redocking com o ligante zardaverina (15) e a enzima PDE4D.....	148
Tabela 22. Melhores pontuações de docking dos ligantes 88a-n (série D) e 27 (protótipo) com sítio catalítico da enzima PDE4D.....	149
Tabela 23. Percentual de inibição da enzima PDE4B1 pelas <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas 65c (série A), 66c (série B) e 72c (série C), em comparação com a <i>N</i> -metil-NAH protótipo 27 , à 10 µM.....	159
Tabela 24. Percentual de inibição da enzima PDE4B1 pelas <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas (série D) à 10 µM.....	162

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Levantamento da frequência de artigos publicados na literatura abordando a PDE4 (do ano 1990 até 2018).....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-AMP - 5'-monofosfato de adenosina

5'-GMP - 5'-monofosfato de guanosina

Å - angstrom

AMPc - 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina

Ar - anel aromático

Asp - aspartato

BINAP - 2,2'-bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftaleno

CCFA - cromatografia de camada fina analítica

CE₅₀ - concentração eficaz para atingir 50% da atividade máxima

CDCl₃ - clorofórmio deuterado

CI₅₀ - concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima

Clog P - coeficiente de partição calculado

CR3 - domínio regulatório enzimático denominado região de controle 3

CREB - fator de transcrição dependente de AMPc

CYP - citocromo P450

DBA - tris((1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona) di-paládio

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DMSO - dimetilsulfóxido

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crônica

ERK - quinase reguladora de sinais extracelulares

FDA - *Food and Drug Administration*

GAF - domínio enzimático presente em PDEs reguladoras de GMPC

GDNF - fator neurotrófico derivado de células gliais

Gln - glutamina

GMPC - 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina

HBA - aceptores de ligações de hidrogênio

HBD - doadores de ligações de hidrogênio

hcl - *human chromosome location*

His - histidina

HMBC - espectroscopia de correlação heteronuclear de múltiplas ligações

HPLC - cromatografia líquida de alta performance

HSCQ - espectroscopia de correlação heteronuclear quântica única

IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina
IGF - interconversão de grupos funcionais
IL - interleucina
Ile - isoleucina
INF - interferon
iPDE4 - inibidor de fosfodiesterase do tipo 4
J - constante de acoplamento
LASSBio - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
Leu - leucina
logP - coeficiente de partição
M.W. - microondas
Met - metionina
NAHs - *N*-acilidrazonas
NCT - registro de ensaios clínicos
ND - não formação do produto desejado
NFP - não formação de produto qualquer
NOE - efeito Overhauser nuclear
NOESY - espectroscopia com efeito Overhauser nuclear
PAS - domínio regulatório enzimático denominado pela presença das proteínas Per-Arnt-Sim
PDB - Protein data bank
PDE - fosfodiesterase
pH - potencial hidrogeniônico
Phe - fenilalanina
PM6- *Parameterization Method 6*
PKA - proteína quinase A
R.T. - temperatura ambiente
RMN - ressonância magnética nuclear
RMN-¹³C - ressonância magnética nuclear de carbono - ¹³C
RMN-¹H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio - ¹H
RMN 2D - ressonância magnética nuclear de correlação bidimensional
RMSD - raiz quadrada do desvio médio
RO5 - regra dos cinco de Lipinski
S_EAr - substituição eletrofílica aromática

Ser - serina

S_N2 - substituição nucleofílica bimolecular

S_NAc - substituição nucleofílica ao carbono acílio

SNC - sistema nervoso central

TEA - Trietilamina

THF - tetraidrofurano

TMS - tetrametilsilano

TNF - fator de necrose tumoral

Tyr - tirosina

UCR - upstream conserved region - domínio regulatório enzimático

UV - ultravioleta

Xantphos - 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

XPhos - 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triiisopropilbifenil

WHO - *World Health Organization*

W.M. - peso molecular

δ - deslocamento químico

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO.....	1
1.1) A classe das fosfodiesterases e sua caracterização.....	1
1.2) A Fosfodiesterase 4 (PDE4) e sua função.....	3
1.3) Os inibidores da PDE4.....	6
1.3.1) Compostos importantes e requisitos estruturais.....	6
1.3.2) A descoberta de um novo padrão <i>N</i> -metil-NAH inibidor da PDE4.....	13
1.3.3) Efeitos colaterais frequentes da classe dos inibidores da PDE4.....	16
1.4) A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).....	17
1.4.1) Tratamentos disponíveis para DPOC.....	17
1.4.2) O ressurgimento dos inibidores da PDE4 e suas vantagens na DPOC...	19
1.5) Novas aplicações da classe dos inibidores da PDE4.....	22
1.5.1) Novos inibidores da PDE4 e o câncer.....	23
1.5.2) Novos inibidores da PDE4 e as doenças do SNC.....	24
1.5.3) Novos inibidores da PDE4 e as do sistema imunológico.....	26
2) OBJETIVOS.....	29
2.1) Objetivo Geral.....	29
2.2) Objetivos Específicos.....	29
3) MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1) Metodologia Sintética.....	30
3.1.1) Síntese dos derivados das <i>N</i> -metil-NAHs planejados como inibidores da PDE4 visando à obtenção de compostos híbridos.....	31
3.1.1.1) Síntese dos espaçadores das séries A, B e C.....	31
3.1.1.2) Síntese do núcleo dialcoxifenila da série A.....	32
3.1.1.3) Síntese do núcleo dialcoxifenila da série B.....	35
3.1.1.4) Síntese das NAHs <i>O</i> -alquiladas da série A.....	37
3.1.1.5) Síntese das NAHs <i>O</i> -alquiladas da série B.....	39
3.1.1.6) Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série A.....	42
3.1.1.7) Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série B.....	44
3.1.1.8) Síntese da <i>N</i> -metil-hidrazida hidroxilada da série C.....	47
3.1.1.9) Síntese da <i>N</i> -metil-NAH hidroxilada da série C.....	47
3.1.1.10) Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série C.....	48

3.1.1.11) Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas desprotegidas das séries A e B.....	51
3.1.1.12) Síntese do salicilaldeído acilado para o bloco do salmeterol.....	52
3.1.1.13) Síntese do derivado 2-(hidroximetil)fenólico para o bloco do salmeterol.....	53
3.1.1.14) Síntese do produto protegido para o bloco do salmeterol.....	53
3.1.2) Síntese dos derivados das <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -arilados planejados como inibidores da PDE4.....	54
3.1.2.1) Síntese do 4-bromo-benzoato de metila.....	54
3.1.2.2) Síntese da 4-bromo-benzil-hidrazida.....	55
3.1.2.3) Síntese da 4-bromo- <i>N</i> -acilidrazona.....	56
3.1.2.4) Síntese da 4-bromo- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazona.....	56
3.1.2.5) Síntese das <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazonas <i>N</i> -ariladas.....	57
3.1.2.5.1) Metodologia 1.....	57
3.1.2.5.2) Metodologia 2.....	58
3.1.2.5.3) Metodologia 3.....	58
3.1.2.5.4) Metodologia 4.....	59
3.1.2.5.5) Metodologia 5.....	59
3.1.2.5.6) Metodologia 6.....	60
3.1.2.5.7) Metodologia 7.....	60
3.1.2.5.8) Metodologia 8.....	61
3.2) Metodologia de avaliação de atividade biológica.....	68
3.3) Metodologia para os estudos de ancoramento molecular.....	68

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO.....70

4.1) Estudos de derivatização das <i>N</i> -metil-NAHs planejadas como inibidoras da PDE4 visando à obtenção de compostos híbridos.....	70
4.1.1) Planejamento dos derivados híbridos.....	70
4.1.1.1) Planejamento estrutural.....	70
4.1.1.2) Planejamento sintético.....	73
4.1.2) Síntese dos derivados híbridos.....	77
4.1.2.1) Síntese do bloco das <i>N</i> -metil-NAHs.....	77
4.1.2.1.1) Síntese dos espaçadores para as séries A, B e C.....	77
4.1.2.1.2) Síntese do núcleo dialcoxifenila das séries A e B.....	79

4.1.2.1.3)	Síntese das NAHs <i>O</i> -alquiladas das séries A e B.....	82
4.1.2.1.4)	Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas das séries A e B.....	85
4.1.2.1.5)	Síntese da <i>N</i> -metil-hidrazida hidroxilada da série C.....	98
4.1.2.1.6)	Síntese da <i>N</i> -metil-NAH hidroxilada da série C.....	102
4.1.2.1.7)	Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas da série C.....	105
4.1.2.1.8)	Síntese das <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas desprotegidas das séries A e B.....	107
4.1.2.2)	Síntese do bloco do salmeterol.....	109
4.1.2.2.1)	Síntese do salicilaldeído acilado para o bloco do salmeterol.....	109
4.1.2.2.2)	Síntese do derivado 2-(hidroximetil)fenólico para o bloco do salmeterol.....	113
4.1.2.2.3)	Síntese do produto protegido para o bloco do salmeterol.....	115
4.1.2.3)	União dos blocos <i>N</i> -metil-NAH e salmeterol.....	117
4.1.3)	Estudos do perfil de interação entre as <i>N</i> -metil-NAHs <i>O</i> -alquiladas das séries A, B e C e o sítio catalítico da enzima PDE4 por modelagem molecular.....	121
4.2)	Estudos de derivatização das <i>N</i> -metil-NAHs planejadas como inibidoras da PDE4 através de reações de <i>N</i> -arilação.....	128
4.2.1)	Planejamento dos derivados <i>N</i> -arilados.....	128
4.2.1.1)	Planejamento estrutural.....	128
4.2.1.2)	Planejamento sintético.....	129
4.2.2)	Síntese dos derivados <i>N</i> -arilados.....	130
4.2.2.1)	Síntese do 4-bromo-benzoato de metila.....	130
4.2.2.2)	Síntese da 4-bromo-bezil-hidrazida.....	131
4.2.2.3)	Síntese da 4-bromo- <i>N</i> -acilidrazona.....	133
4.2.2.4)	Síntese da 4-bromo- <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazona.....	134
4.2.2.5)	Síntese das <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazonas <i>N</i> -ariladas.....	135
4.2.3)	Avaliação das propriedades físico-químicas das novas <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas da série D.....	144
4.2.4)	Estudos do perfil de interação entre as <i>N</i> -metil-NAHs <i>N</i> -ariladas da série D e o sítio catalítico da enzima PDE4 por modelagem molecular.....	147
4.3)	Avaliação da atividade biológica dos novos derivados <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazônicos das séries A-D sobre a enzima PDE4.....	158

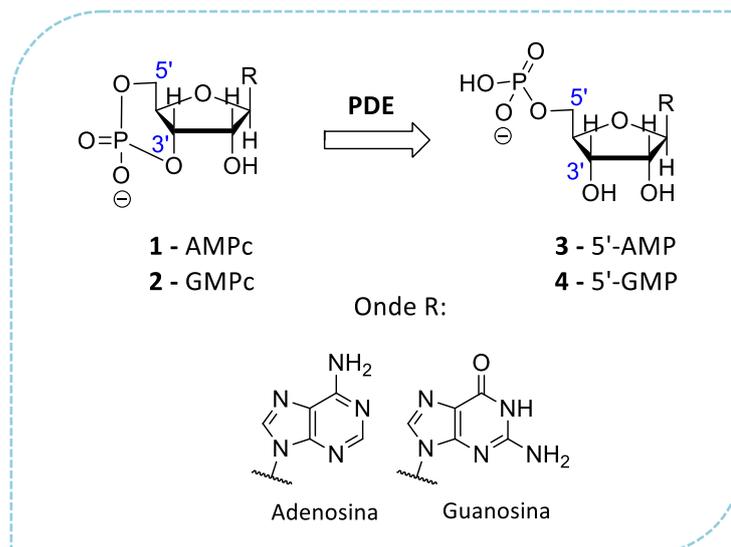
5) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	163
6) BIBLIOGRAFIA.....	165
7) ANEXOS.....	180

1) INTRODUÇÃO

1.1) A classe das fosfodiesterases e sua caracterização

As fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) foram descritas pela primeira vez em 1962 pelo Dr. Earl Sutherland e seus colaboradores logo após a descoberta do 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (1) em 1958 (BEAVO, 1995; BUTCHER; SUTHERLAND, 1962; SUTHERLAND; RALL, 1958).

Atualmente, entende-se que estas enzimas desempenham um papel crítico na regulação indireta da sinalização de diversas vias do metabolismo intracelular. Este controle se dá através da hidrólise seletiva de ligações fosfodiéster de substratos específicos como o AMPc (1) e o GMPc (3',5'-monofosfato cíclico de guanosina) (2) que atuam como segundos mensageiros nestas vias de sinalização. A hidrólise das ligações fosfodiéster destes nucleotídeos culmina na inativação dos mesmos, através da formação de 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) (3), para o substrato AMPc (1), e 5'-monofosfato de guanosina (5'-GMP) (4), para o substrato GMPc (2) (Esquema 1) (BEAVO, 1995; BENDER; BEAVO, 2006; KERAVIS; LUGNIER, 2012; LUGNIER, 2006).



Esquema 1. Hidrólise da ligação 3'-fosfodiéster para AMPc (1) e GMPc (2) através da atividade catalítica das PDEs. Onde R = adenosina para AMPc (1) e 5'-AMP (3) e R = guanosina para GMPc (2) e 5'-GMP (4) (Adaptado de LUGNIER, 2006).

Após a identificação inicial da classe das fosfodiesterases, percebeu-se que havia mais de uma isoforma destas enzimas com diferentes propriedades cromatográficas, cinéticas, diferentes substratos, especificidade e propriedades farmacológicas que foram identificadas em extratos de cérebro e em outros órgãos de roedores (THOMPSON, 1971). Atualmente,

relata-se na literatura que há 11 famílias de isoenzimas da classe das PDEs que são nomeadas com algarismos arábicos de 1 à 11, como por exemplo PDE1-PDE11, apresentando distribuições teciduais diferenciadas (Tabela 1). Adicionalmente, cada família possui de 1 a 4 genes distintos, originando mais de 20 genes em mamíferos que decodificam mais de 50 proteínas diferentes. Estes genes são então representados com letras maiúsculas após a numeração respectiva, i.e. PDE1A, PDE1B e PDE1C (KERAVIS; LUGNIER, 2012).

Tabela 1. Família das PDEs: Seus respectivos substratos e distribuição tecidual (Adaptado de BENDER; BEAVO, 2006; KERAVIS; LUGNIER, 2012; LUGNIER, 2006).

Família	Substrato	Distribuição em tecido
PDE1	AMPc e GMPc	Coração, cérebro, pulmão e músculo liso
PDE2	AMPc e GMPc	Glândula supra-renal, coração, pulmão, fígado, plaquetas e células endoteliais
PDE3	AMPc e GMPc	Coração, músculo liso, pulmão, fígado, plaquetas, adipócitos e células do sistema imunológico
PDE4	AMPc	Cérebro, rim, fígado, coração, músculo liso, pulmão, células endoteliais e células do sistema imunológico
PDE5	GMPc	Pulmão, plaquetas, músculo liso, coração, células endoteliais e cérebro
PDE6	GMPc	Fotorreceptores, glândula pineal e pulmão
PDE7	AMPc	Músculo esquelético, coração, rim, cérebro, pâncreas e linfócitos T
PDE8	AMPc	Testículos, olhos, fígado, músculo esquelético, coração, rim, ovário, cérebro, linfócitos T e tireoide
PDE9	GMPc	Rim, fígado, pulmão e cérebro
PDE10	AMPc e GMPc	Testículos, cérebro e tireoide
PDE11	AMPc e GMPc	Músculo esquelético, próstata, glândula pituitária, fígado e coração

Em geral, as PDEs são observadas em sua forma dimérica, ou seja, através da associação de duas subunidades enzimáticas (KERAVIS; LUGNIER, 2012). A estrutura monomérica de todas as isoformas é composta por 3 domínios distintos: um domínio catalítico, uma subunidade N-terminal e outra C-terminal (BOLGER, 1994; CONTI; BEAVO, 2007; THOMPSON, 1991).

O domínio C-terminal é similar em todas as famílias de PDEs e está envolvido na regulação da atividade enzimática através de mecanismo de fosforilação pela enzima ERK

(HALPIN, 2008; LENHARD *et al.*, 1996). O domínio N-terminal atua também como regulador da atividade enzimática através de diferentes subdomínios, como o GAF encontrado nas famílias de PDEs 2, 5, 6, 10 e 11, como as regiões UCR1 e UCR2 encontradas na família da PDE4, e como o subdomínio PAS na PDE8 (KERAVIS; LUGNIER, 2012). Além disso, este domínio difere de forma pronunciável entre as famílias das PDEs e contém regiões que determinam a localização intracelular de cada isoforma (LUGNIER, 2006). Por fim, o domínio catalítico é o responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster, presente nos substratos monofosfatos cíclicos, devido à presença de um centro metálico em sua estrutura, constituído do íon Zn^{+2} e por vezes também de Mg^{+2} . O domínio catalítico conserva certa semelhança, pois compartilha de 25 à 52% de homologia entre as famílias das fosfodiesterases encontradas em mamíferos, tornando a busca por inibidores seletivos de PDEs um grande desafio (KERAVIS; LUGNIER, 2012).

1.2) A Fosfodiesterase 4 (PDE4) e sua função

As fosfodiesterases do tipo 4 (PDEs4) são responsáveis pela hidrólise seletiva de AMPc, e possuem em seu sítio catalítico íons de Zn^{+2} e Mg^{+2} capazes de formar complexos com o substrato nucleotídico em questão, favorecendo a reação de hidrólise (XU *et al.*, 2000). Estas enzimas estão presentes em uma gama de diferentes tecidos como células do sistema imunológico, linfócitos T (GIEMBYCZ *et al.*, 1996; TENOR *et al.*, 1995), neutrófilos (NIELSON *et al.*, 1990), monócitos (SELDON *et al.*, 1995), eosinófilos (DENT *et al.*, 1994), e basófilos (PEACHELL *et al.*, 1992), endotélio e músculo liso de vias aéreas, e cérebro (HOUSLAY *et al.*, 2005).

A família PDE4 é codificada por 4 genes conhecidos como PDE4A (hcl :19p13.2), PDE4B (hcl:1p31), PDE4C (hcl:19p13.1) e PDE4D (hcl:5p12), que através de “splicing alternativo” originam mais de 25 isoformas humanas distintas de PDE4, tornando esta a família mais extensa dentre as fosfodiesterases (BOLGER, 2006; KERAVIS; LUGNIER, 2012). A expressão das isoformas varia de acordo com o tipo celular (Tabela 2) e a região intracelular em que estas estão compartimentalizadas (HOUSLAY; ADAMS, 2003; SHAKUR *et al.*, 1993). Cabe ressaltar que o domínio catalítico das diferentes isoenzimas pertencentes a esta família se conserva na ordem de, aproximadamente, 75% da sequência de aminoácidos (BENDER; BEAVO, 2006).

Tabela 2. Isoformas da família PDE4: distribuição tecidual (SRIVANI *et al.*, 2008).

Distribuição em tecido	PED4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D
Pulmão e traqueia	**	**	**	**
Linfócitos B	**	**	-	-
Linfócitos T	**	-	-	-
Eosinófilos	**	**	-	**
Neutrófilos	*	**	-	*
Macrófagos	**	-	-	-
Músculo esquelético	***	***	***	***
Fígado, rins e coração	**	**	**	**
Cérebro	-	*	-	**

*** forte expressão; ** expressão; * fraca expressão; - sem expressão.

Estudos de cristalografia de raios-X feitos com a isoforma PDE4B demonstram que a estrutura do sítio ativo é formada por uma reentrância profunda presente no domínio catalítico da enzima, ficando voltado diretamente para face externa e exposto ao solvente. Este sítio é dividido em três regiões com funções e características físico-químicas distintas (Figura 1) (XU *et al.*, 2000).

A primeira região é formada pelo centro metálico composto de íons divalentes, no qual está presente o Zn^{+2} (coordenado com resíduos de histidina e aspartato, além de duas moléculas de água) e o íon Mg^{+2} (coordenado com o mesmo resíduo de aspartato que coordena o Zn^{+2} , bem como mais cinco moléculas de água). Esta região é a responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster do substrato AMPc (CARD *et al.*, 2004; HOUSLAY *et al.*, 2005; KE, 2004; SPINA, 2008; XU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2007).

A segunda região possui uma bolsa hidrofóbica com resíduos de aminoácidos apolares, como isoleucina e fenilalanina, capazes de interagir por interações hidrofóbicas e do tipo π - π stacking, respectivamente, com o anel planar purínico presente no AMPc (Figura 1). Nesta mesma região, encontra-se ainda o resíduo de glutamina 369 que é responsável por uma importante interação com os nitrogênios da adenosina através de ligação hidrogênio (CARD *et al.*, 2004; HOUSLAY *et al.*, 2005; KE, 2004; SPINA, 2008; XU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2007).

A terceira região possui uma bolsa hidrofílica constituída essencialmente de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e preenchida com uma rede de moléculas de água (CARD *et al.*,

2004; HOUSLAY *et al.*, 2005; KE, 2004; SPINA, 2008; XU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2007).

Estas regiões são denominadas respectivamente, sítio M, sítio Q e sítio S (Figura 1) (CARD *et al.*, 2004; HOUSLAY *et al.*, 2005; KE, 2004; SPINA, 2008; XU *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2007).

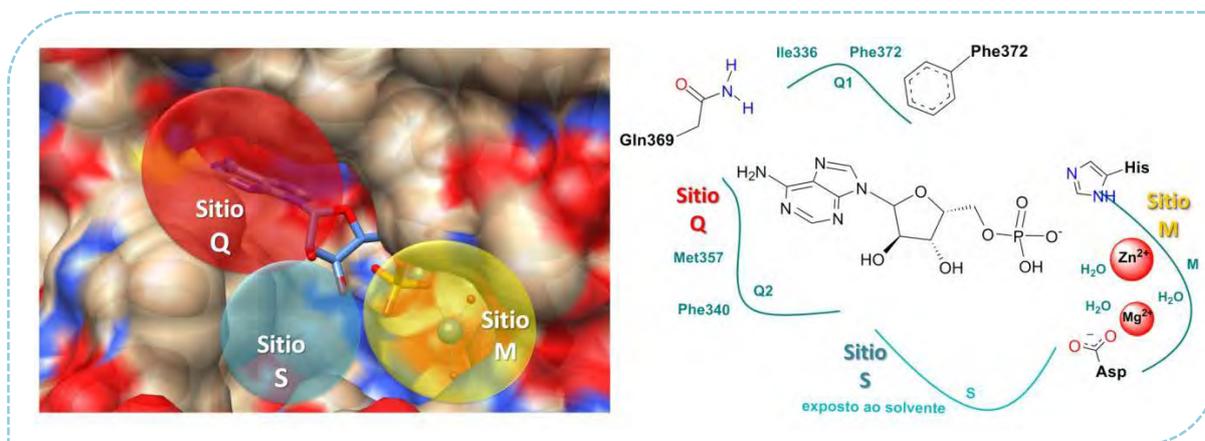


Figura 1. Domínio catalítico da PDE4 com o AMPc. Subdomínios destacados em verde, para o bolsão S, em amarelo, para o bolsão M, e em vermelho para o bolsão Q.

A hidrólise do AMPc ocorre através da interação desta molécula com os resíduos de aminoácidos presentes nos subdomínios Q e M. No sítio Q ocorre o reconhecimento do núcleo adenosina presente na estrutura do substrato, e no sítio M ocorre a reação de hidrólise propriamente dita. Neste, os átomos de oxigênio presentes na estrutura do substrato interagem com os íons Zn^{+2} e Mg^{+2} , que atuam como ácidos de Lewis (Figura 2), tornando o átomo de fósforo mais eletrofílico e suscetível ao ataque do grupo hidroxila, gerado pela desprotonação de uma molécula de água coordenada nesta região (Figura 2) (HOUSLAY; ADAMS, 2003; HUAI *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2000).

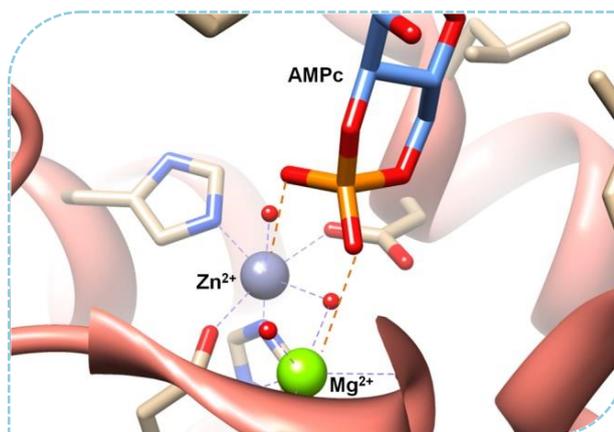


Figura 2. Modelo de interação entre o AMPc e a PDE4 que leva à hidrólise.

O processo enzimático de hidrólise em questão é regulado basicamente por reações de fosforilação, através de proteínas dependentes de AMPc. O aumento da concentração deste substrato promove a ativação de proteínas quinases como a PKA (proteína quinase A) e a ERK (quinase reguladora de sinais extracelulares), que por sua vez, atuam na fosforilação da PDE4, ativando a enzima (SETTE *et al.*, 1994). Além disso, o aumento dos níveis de AMPc no meio estimula uma maior expressão da fosfodiesterase, através de mecanismos de transcrição e tradução do material genético (SWINNEN *et al.*, 1989; SWINNEN *et al.*, 1991).

Existem três principais regiões que regulam a atividade enzimática da PDE4 através da fosforilação. As primeiras estão localizadas no domínio N-terminal, são únicas na família das fosfodiesterases e são denominadas UCR1 e UCR2, onde o sítio de fosforilação para a enzima PKA se encontra na UCR1. Já a terceira está localizada no domínio C-terminal com um sítio de ligação para a enzima ERK (KERAVIS; LUGNIER, 2012). Cabe ressaltar que as diferentes isoformas de PDEs4 podem ser divididas em três grandes grupos, segundo as duas primeiras regiões de regulação. As isoformas longas, que possuem tanto a região UCR1, quanto a UCR2, como a PDE4A11, a PDE4B1 e a PDE4D4; as isoformas curtas, que possuem somente a região UCR2, como a PDE4B2 e a PDE4D1; e as isoformas super-curtas, que possuem parte da região UCR2, como a PDE4D2 e a PDE4A1 (HALPIN, 2008; LUGNIER, 2006).

As isoformas longas são ativadas pela fosforilação da região UCR1, que contém um sítio de interação com a enzima PKA. Quando fosforilada, a UCR1 perde a habilidade de interagir com a região UCR2, levando a uma mudança conformacional da PDE4 e posterior ativação da enzima. Para as outras isoformas, a ativação ocorre pela fosforilação do sítio da ERK, pois todas possuem essa região (KERAVIS; LUGNIER, 2012; LUGNIER, 2006).

1.3) Os inibidores da PDE4

1.3.1) Compostos importantes e requisitos estruturais

Como mencionado anteriormente, a PDE4 está envolvida diretamente com o controle dos níveis de AMPc, que por sua vez atua na modulação dos processos inflamatórios no organismo de forma homeostásica (HALPIN, 2008). Uma vez que se encontra distribuída pelo corpo humano de forma variada segundo as suas isoformas (de A-D) (BOLGER, 2006; KERAVIS; LUGNIER, 2012), as fosfodiesterases apresentaram-se como um alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos, que visavam, em um primeiro momento, a busca por novos anti-inflamatórios.

A teofilina (**5**) (Figura 3) foi o primeiro inibidor de PDEs a ser utilizado na terapêutica. No entanto, este composto é um inibidor pouco potente e pouco seletivo entre as diferentes isoformas de PDEs (CI_{50} PDE1 = 134 μ M; PDE2 = 264 μ M; PDE3 = 110 μ M; PDE4 = 322 μ M; PDE6 = 582 μ M; PDE10 = 307 μ M) (HATZELMANN *et al.*, 2010). A teofilina pertence a uma família de derivados da metilxantina, como a 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (**6**), arofilina (**7**), doxofilina (**8**), cipamfilina (**9**) e a pentoxifilina (**10**) (Figura 3) (HOUSLAY *et al.*, 2005). Efeitos colaterais são observados com a utilização desta classe, pois a mesma apresenta uma janela terapêutica estreita, limitando seu uso na terapia medicamentosa (DIAMANT; SPINA, 2011; WEINBERGER; HENDELES, 1996). Embora não sejam mais comumente utilizados, os derivados da metilxantina são bastante conhecidos por suas atividades broncodilatadora e anti-inflamatória (BANNER; PAGE, 1995; BARNES, 2005).

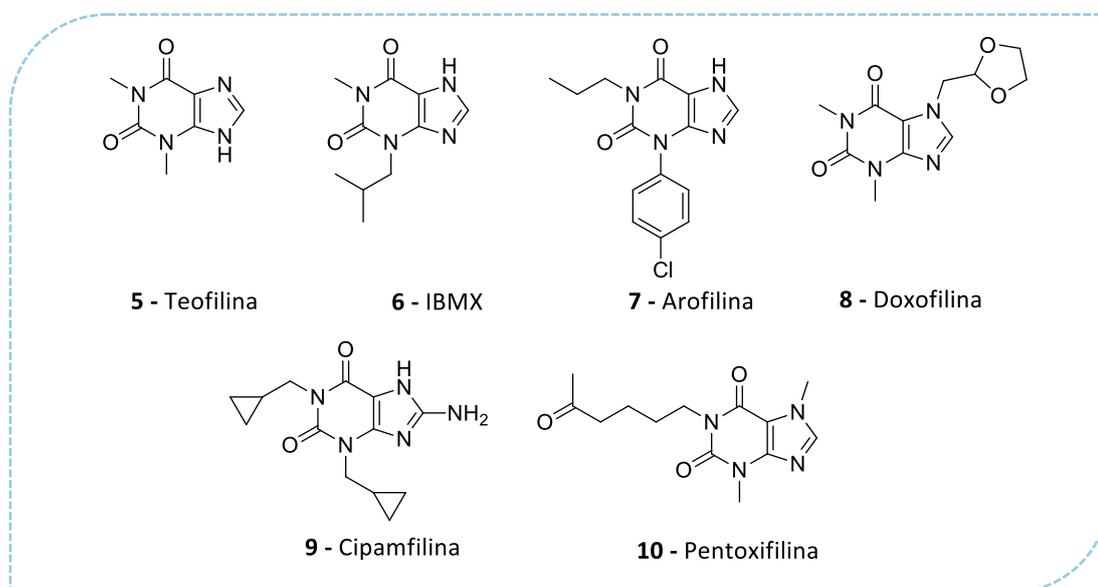


Figura 3. Derivados da metilxantina inibidores de PDEs.

Um dos representantes da primeira geração de inibidores de PDE4 é o rolipram (**11**) (Figura 4) (SCHWABE *et al.*, 1976). Este composto é um potente e seletivo inibidor da PDE4 (CI_{50} = 800nM) (KÜMMERLE *et al.*, 2012), apresentando 100 vezes mais seletividade por esta isoforma com relação às outras PDEs (BENDER; BERAVO, 2006; HATZELMANN *et al.*, 2010; MAURICE *et al.*, 2014). Curiosamente, o rolipram (**11**) foi planejado como um composto antidepressivo (SCHWABE *et al.*, 1976; WACHTEL, 1982), mas se mostrou ser um inibidor promissor da hidrólise do AMPc em tecidos cerebrais e um eficaz modulador da atividade anti-inflamatória (KOMAS *et al.*, 1989; LUGNIER *et al.*, 1983; SANZ *et al.*, 2005).

O rolipram (**11**), assim como outros inibidores de PDE4 de primeira geração, apresentou efeitos colaterais indesejados como náuseas, vômitos e diarreia (BENDER; BEAVO, 2006; HALPIN, 2008; HOUSLAY, 2005). Entretanto, o grande potencial anti-inflamatório destes compostos serviu de incentivo à comunidade científica, o que culminou no desenvolvimento de inibidores de PDE4 mais seletivos e avançados como o roflumilaste (**12**) e o cilomilaste (**13**) (Figura 4), ditos inibidores da PDE4 de segunda geração (MAURICE *et al.*, 2014; MOKRY; MOKRA, 2013).

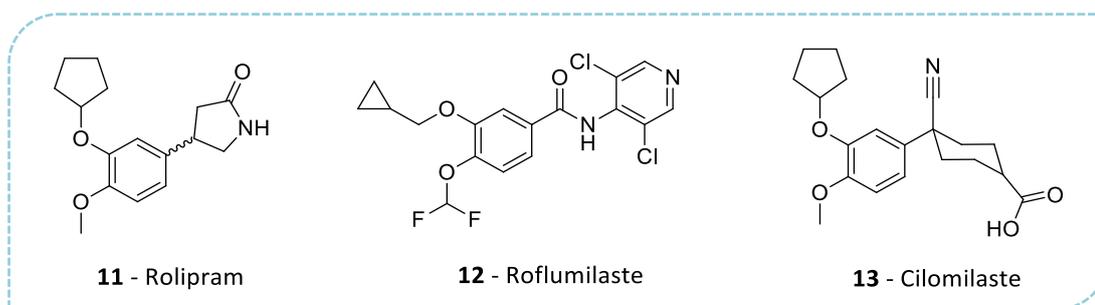
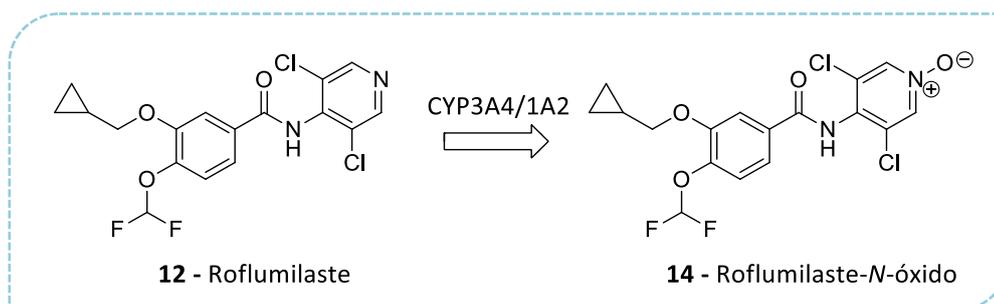


Figura 4. Inibidores da PDE4 da 1ª e 2ª geração.

O roflumilaste (**12**) foi identificado, inicialmente, em 1993 a partir de uma série de benzamidas em um programa de triagem em alta escala. Este composto apresentou potência elevada (Tabela 3) e alta seletividade para inibição da enzima PDE4 (HATZELMANN; SCHUDT, 2001; MAURICE *et al.*, 2014), sem, entretanto, mostrar seletividade entre as diferentes isoformas de PDEs4, com exceção da PDE4C, que é inibida com uma potência ligeiramente inferior às outras (Tabela 3) (CLAVEAU *et al.*, 2004). Curioso destacar que este composto pode ser rapidamente metabolizado à sua forma *N*-oxidada (Esquema 2) pelo complexo enzimático citocromo P450 (CYP3A4 e CYP1A2) (BETHKE *et al.*, 2007). O roflumilaste-*N*-óxido (**14**) é apenas de duas a três vezes menos potente do que o composto não metabolizado com relação à inibição da PDE4 (Tabela 3), mas mantém a alta seletividade para esta família enzimática (HATZELMANN *et al.*, 2010).



Esquema 2. Roflumilaste (**12**) e seu produto de metabolização (HATZELMANN *et al.*, 2010).

O cilomilaste (**13**) também é um potente inibidor seletivo da PDE4, assim como o roflumilaste, sendo aproximadamente 10 vezes mais seletivo para a isoforma PDE4D se comparado às outras isoformas (Tabela 3). A introdução do grupo carboxilato em sua estrutura faz com que, em pH fisiológico, este permaneça desprotonado (ionizado) diminuindo a lipofilicidade da molécula e dificultando uma possível passagem do fármaco para o sistema nervoso central, onde o mesmo poderia exercer efeitos colaterais indesejáveis (GIEMBYCZ, 2001; HATZELMANN *et al.*, 2010; TORPHY *et al.*, 1999).

Tabela 3. Valores de CI_{50} para as isoformas de PDE4 (Adaptado de HATZELMANN *et al.*, 2010).

Composto	CI_{50} (nM)									
	4A1	4B2	4C2	4D2	1A3	2A3	3A1	5A1	6	7A1
Roflumilaste	0,7	0,2	4,3	0,3	>10 ³					
Roflumilaste- N-óxido	1,4	1,1	7,8	0,4	>10 ³					
Cilomilaste (μ M)	0,11	0,09	0,63	0,018	48	84	>100	>100	24	>100

Uma característica em comum de um grupo extenso de inibidores da PDE4, assim como os anteriormente citados rolipram (**11**), roflumilaste (**12**) e cilomilaste (**13**), é a presença do grupo dialcoxi-fenila, como pode ser observado nas estruturas químicas destes compostos (HOUSLAY *et al.*, 2005). Adicionalmente, é possível perceber a presença de outras funções químicas com características e disposições espaciais semelhantes. De fato, isto ocorre devido a uma grande similaridade entre as estruturas proteicas das PDEs4.

Os subdomínios Q, M e S do sítio catalítico das PDE4s apresentam diferenças muito sutis em termos de conformação, visto que estas regiões compartilham mais de 80% de homologia na sequência de aminoácidos entre os subtipos de PDE4 (HOUSLAY, 2001; SRIVANI *et al.*, 2008). Assim, o planejamento de inibidores de PDE4 pode ser feito a partir do mapa farmacofórico descrito na Figura 5A.

As análises estruturais a partir de docking molecular e de co-cristais sugerem que o inibidor ideal de PDE4 deve ter: a) uma subunidade aromática que possa realizar interações π - π stacking com resíduos de fenilalanina e interações hidrofóbicas com resíduos de interleucina e metionina (Figura 5A, região azul); b) possibilidade de atuar como acceptor de ligações de hidrogênio para interagir com Gln369 (Figura 5A, região laranja); c) apresentar grupos hidrofóbicos ligados ao anel aromático que possam ser acomodados nos bolsões hidrofóbicos

Q1 e Q2 (Figura 5A, região vermelha); d) um grupo polar, ligado ao anel aromático anteriormente citado por meio de espaçadores, que possa realizar interações eletrostáticas com os átomos do metal ou de ligações de hidrogênio com as águas presentes neste subdomínio M (Figura 5A, região verde); e) apesar de não obrigatório, grupos polares também podem ser ligados ao anel aromático visando interações com o subdomínio de acesso ao solvente, que é rico em resíduos de aminoácidos polares, e desta forma poderem auxiliar no aumento da hidrossolubilidade dos compostos (Figura 5A, região verde) (SRIVANI *et al.*, 2008).

Na figura 5B, temos o cilomilaste (**13**) incluído no modelo farmacofórico e podemos perceber como ele se sobrepõe perfeitamente aos descritores de inibição enzimática da PDE4.

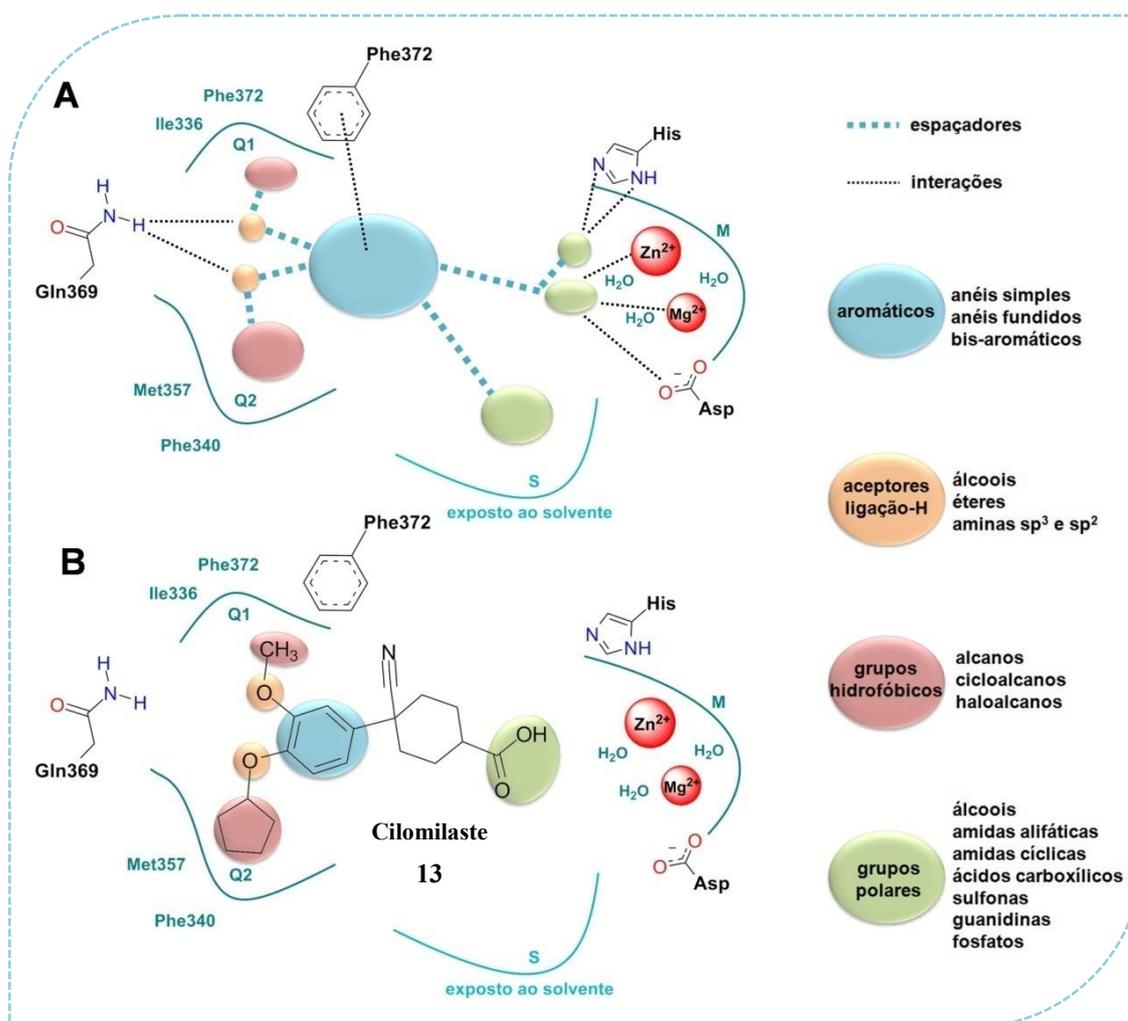


Figura 5. A. Mapa fármacofórico com a disposição e tipos de grupos funcionais necessários a inibição da PDE4; B. Sobreposição do iPDE4 cilomilaste (**13**) ao mapa farmacofórico.

Estas características estruturais se encontram presentes não só no cilomilaste (**13**), como também em diferentes exemplos de reconhecidos inibidores de PDEs4 (iPDEs4) como a

zardaverina (**15**), o filaminaste (**16**), o mesopram (**17**), o piclamilaste (**18**), o tetomilaste (**19**) e o apremilaste (**20**) (Figura 6). Dentre estes compostos, percebe-se que todos lançam mão do uso de grupos dialcoxi-fenila como grupos aceptores de ligação-H na interação com a glutamina 369.

Entretanto, diversos outros inibidores descritos mostram estruturas completamente diferentes dos representantes dos dialcoxi-fenilas. Nas Figuras 7 e 8A estão representados compostos, com grande potência sobre a inibição da PDE4, de algumas das séries descritas na literatura onde este grupamento não está presente (KOJIMA *et al.*, 2013; KUANG *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2012; WOODROW *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010).

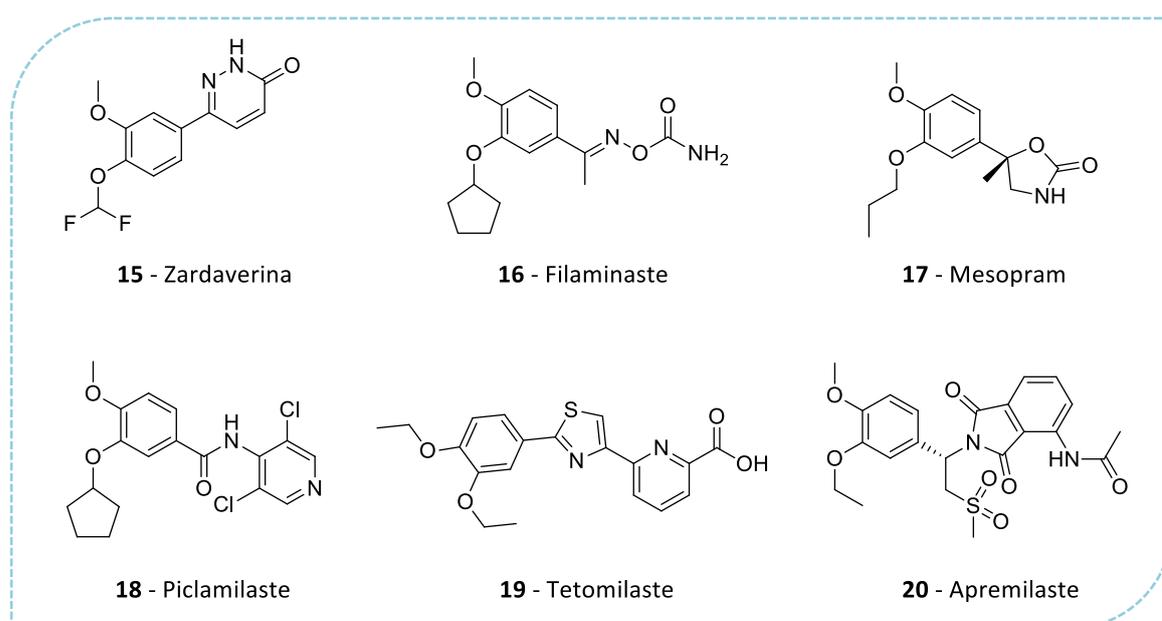


Figura 6. Inibidores da PDE4 do grupo dialcoxi-fenila.

Alguns destes compostos, como **21**, foram planejados utilizando a estratégia de bioisosterismo não clássico de restrição conformacional, onde uma das metoxilas sofre anelação, originando aza-heterociclos metoxilados que podem mimetizar as dialcoxi-fenilas, como representado na Figura 7 (KOJIMA *et al.*, 2013). Já outros compostos (**22-25**) possuem grupamentos bastante diferenciados e inibem a PDE4 de forma distinta (Figura 8A). Um exemplo são as fenoxibenzoxaborolas (**25**) (ZHANG *et al.*, 2010), pequenas moléculas contendo um átomo de boro ciclizado em um anel de cinco membros fundido a um anel benzeno, que demonstram um modo de ligação ao sítio da PDE4 diferenciado com relação aos derivados catecólicos. Esta classe de compostos se liga à PDE4 principalmente através da sua função borola por meio de interações diretas com o sítio bimetálico, como pode ser observado

em sua estrutura cristalográfica, sem interagir com a glutamina 369 (Figura 8B) (FREUND *et al.*, 2012).

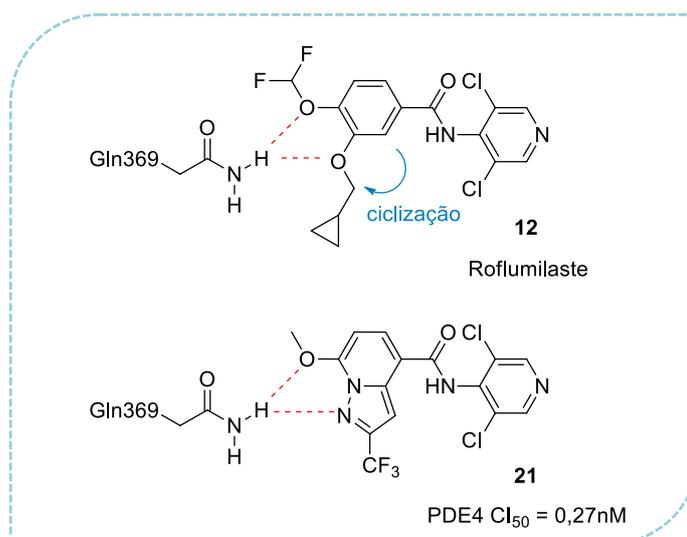


Figura 7. Composto aza-heterociclo (21) planejado por anelação da metoxila do roflumilaste (12).

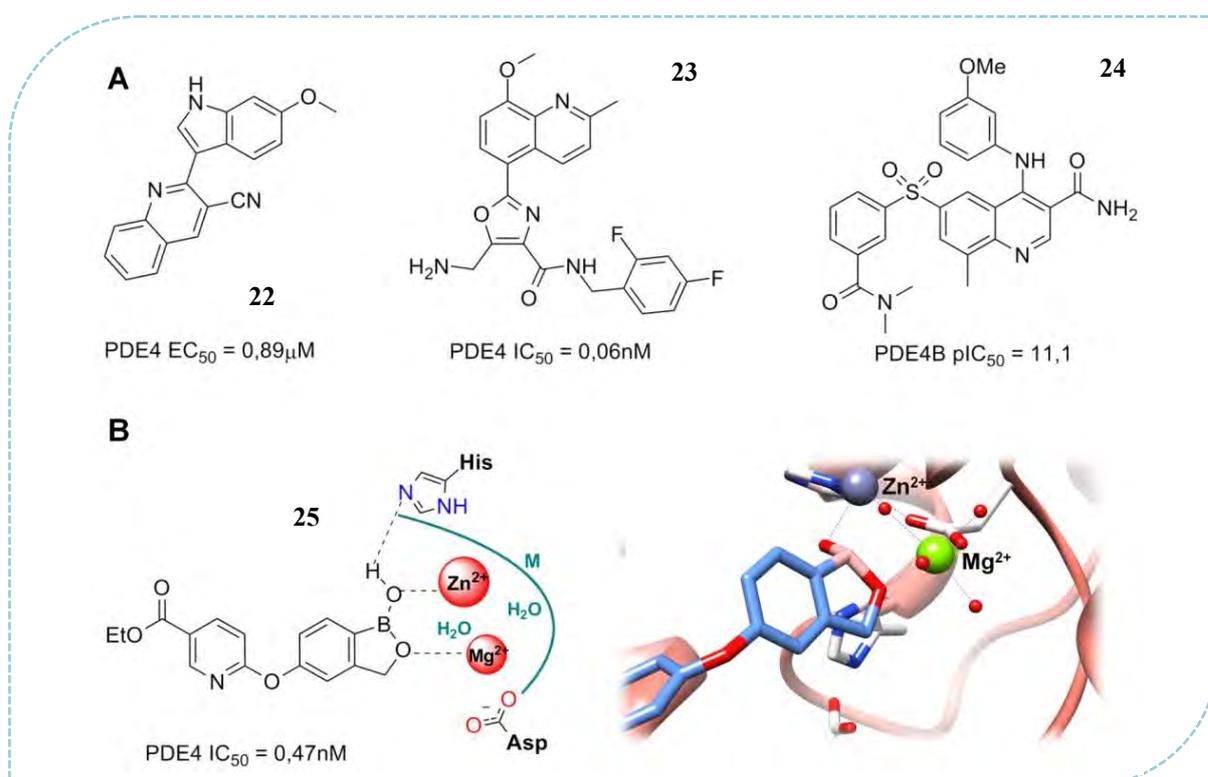


Figura 8. A. Novas estruturas de inibidores de PDE4 com diferentes arcabouços moleculares. **B.** Modo de interação dos derivados borólicos com a PDE4.

Além da potência frente a PDE4, a busca por seletividade frente às isoformas, já que estas estão distribuídas de maneira diferenciada pelos tecidos, é também um grande desafio. O desenho destes inibidores não deve passar por um planejamento baseado exclusivamente no

sítio catalítico, mas sim explorando as diferenças de sequências fora do sítio ativo. Uma maior seletividade entre as PDE4B e PDE4D, por exemplo, pode ser atingida pelo planejamento de moléculas que possam atingir hélice C-terminal reguladora, atualmente denominada CR3 (Região de Controle 3), a partir do sítio ativo, numa conformação que impeça o acesso do AMPc ao mesmo (FOX *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2000). A seletividade frente a PDE4B é dirigida por um único polimorfismo sobre o aminoácido na CR3 (Leu674 na PDE4B1 contra Gln594 na PDE4D). As mutações recíprocas sobre a PDE4B e PDE4D podem causar uma mudança de 70-80 vezes na seletividade. No entanto, diversas vezes os compostos seletivos frente aos diferentes subtipos enzimáticos podem apresentar mecanismos de inibição complexos, o que gera a necessidade de análises mais aprofundadas através da resolução da proteína completa, muitas vezes por análises como difração de raios-X (FOX *et al.*, 2014).

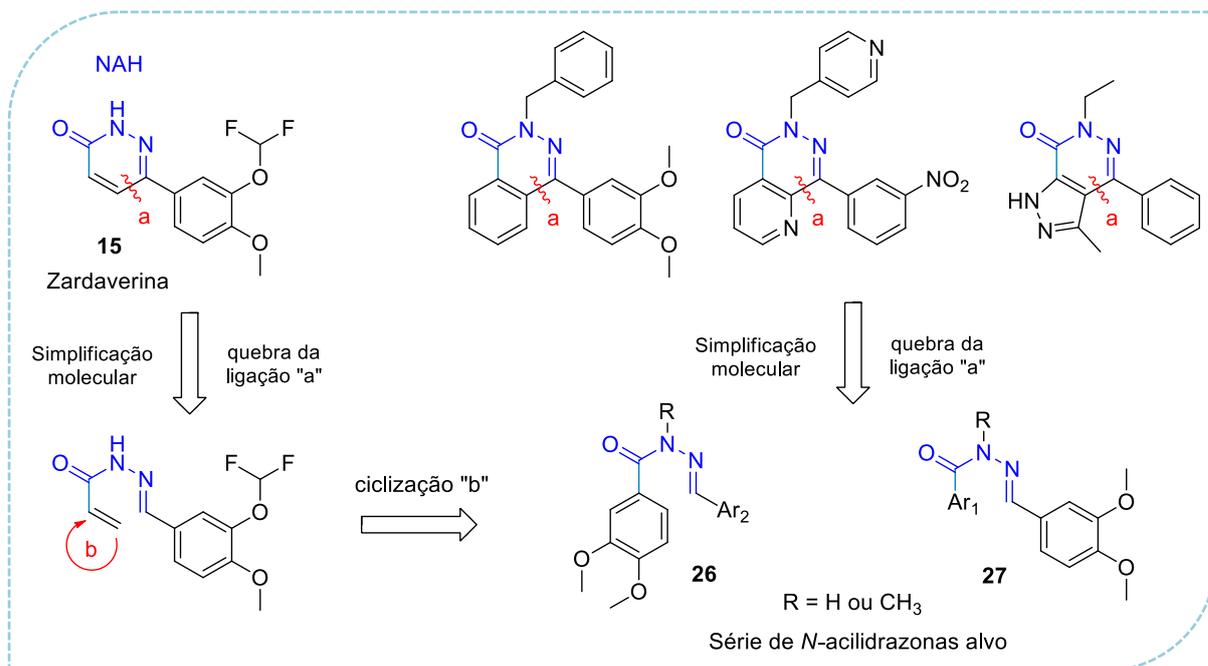
1.3.2) A descoberta de um novo padrão *N*-metil-NAH inibidor da PDE4

Recentemente, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) deu uma grande contribuição para o entendimento de como as *N*-acilidrazonas (NAHs) poderiam atuar como iPDE4, através da *N*-metilação da subunidade amídica destes compostos (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Apesar de uma grande variedade de estruturas químicas terem sido descritas como iPDE4, este foi o primeiro relato desta classe de compostos.

Estas NAHs (**26** e **27**) foram planejadas lançando-se mão de estratégia de simplificação molecular de inibidores conhecidos da PDE4 (BARREIRO, 2002), através de uma simples ruptura da ligação entre as posições 5 e 6 do anel piridazinona central, o que permitiu identificar as semelhanças estruturais entre estes compostos e as NAHs (Esquema 3). Vale destacar que esta estratégia já havia sido previamente utilizada pelo LASSBio na descoberta do protótipo cardioativo LASSBio-294, um agente inotrópico positivo e vasodilatador que atua através da modulação dos níveis de GMPc (SILVA *et al.*, 2002; SUDO *et al.*, 2001), demonstrando uma relação bioisotérica entre as NAHs e a zardaverina (**15**), um iPDE4 (LIMA; BARREIRO, 2005).

Os grupos farmacofóricos para a inibição da PDE4, como anéis dialcoxi-fenila, foram escolhidos para serem ligados ao grupo carbonila (Ar₁) e/ou ao grupo imina (Ar₂). Adicionalmente, foi selecionado um conjunto de anéis aromáticos com diferentes substituintes, visando à modulação de parâmetros físico-químicos em Ar₁ e Ar₂. Por fim, o grupo explorou o efeito da *N*-metilação das NAHs (R = H ou Me), uma estratégia

anteriormente utilizada na síntese de potentes NAHs vasodilatadoras que demonstrou a grande importância do grupo metila na modificação das conformações bioativas desta classe de compostos (BARREIRO *et al.*, 2011; KÜMMERLE *et al.*, 2009).



Esquema 3. Planejamento da série das *N*-acilidrazonas iPDE4 **26** e **27** (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

De fato, os resultados farmacológicos demonstraram o acerto no planejamento da série, nos quais foram obtidos compostos com potência inibitória da PDE4 de até 50 nM, além de seletividade frente a outras isoformas de até 182 vezes (Tabela 4). Interessantemente, os compostos que apresentaram atividade inibitória tinham alguns requisitos estruturais bastante marcantes como: 1- o grupo farmacofórico dialcoxi-fenila precisava estar ligado à subunidade imina das NAHs; 2- o anel fenila ligado a carbonila, apesar de não alterar sobremaneira a potência frente a PDE4, alterava drasticamente a seletividade frente a outras isoformas; e 3- *N*-metilação se mostrava crucial para a atividade iPDE. Sem a presença da metila, os compostos não apresentavam atividade (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

O uso de cálculos teóricos ajudou a explicar a importância destes requisitos farmacofóricos para a atividade (Figura 9). O grupo dialcoxi-fenila ligado à imina ficava posicionado diretamente a subunidade Q do sítio (bolsão hidrofóbico) realizando interações π - π *stacking* com as fenilalaninas 340 e 372, bem como duas ligações de hidrogênio com a glutamina 369. Estas interações direcionavam a carbonila amídica diretamente para o sítio de hidrólise do AMPc, onde esta então realiza ligações de hidrogênio com os resíduos de água próximos aos metais. Todo esse arranjo só era possível devido a *N*-metilação das NAHs que

fazia com que o oxigênio da sua função amida assumisse uma conformação *cis* com relação à metila (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

Tabela 4. Atividades e seletividades das NAHs (27a-j) frente à inibição da PDE4 (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

NAHs	R	R ₁	R ₂	PDE4 CI ₅₀	Selet.
27a	H	H	H	-	-
27b	H	OCH ₂ O	H	-	-
27c	H	Cl	H	-	-
27d	H	OCH ₃	H	-	-
27e	H	OH	H	-	-
27f	CH ₃	H	H	140nM	140
27g	CH ₃	OCH ₂ O	H	110nM	>90
27h	CH ₃	Cl	H	150nM	45
27i	CH ₃	OCH ₃	H	105nM	1,5
27j	CH ₃	OH	H	50nM	182

Os CI₅₀ foram calculados por regressão linear (r=0,95) e representa a média de três experimentos. Os CI₅₀ não foram calculados quando as % de inibição foram menor do que 50% à 10μM.

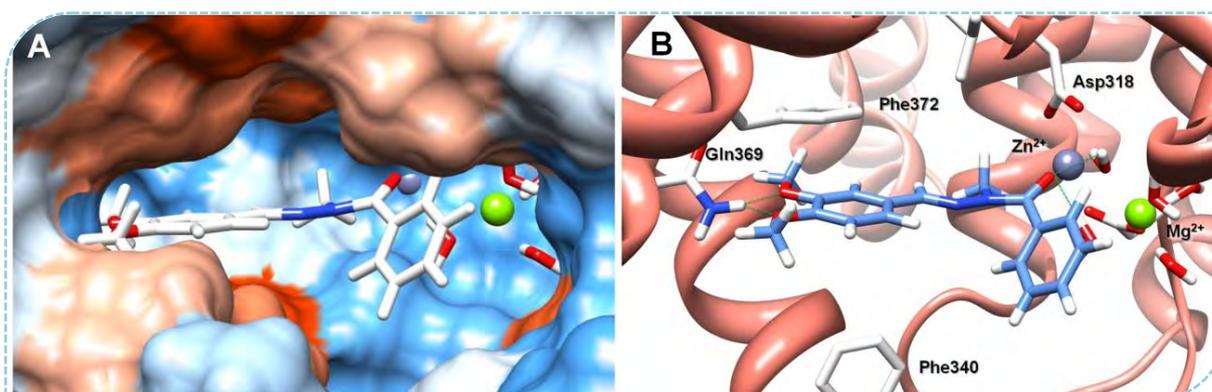


Figura 9. *N*-metil-NAH posicionada no sítio catalítico da PDE. **A.** Visualização da cavidade de acesso ao solvente. **B.** Interações com o sítio catalítico (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

A avaliação *in vivo* destes compostos em modelos de inflamação respiratória, administrados por via oral, demonstrou a importância desta classe de compostos, onde todas as *N*-metil-NAHs foram capazes de reverter os parâmetros inflamatórios como a produção das citocinas TNF- α e IL-6, e a migração celular de leucócitos e neutrófilos, bem como levar a

uma broncodilatação com eficácias semelhantes, e por muitas vezes melhores, quando comparadas ao composto referência rolipram (**11**). Adicionalmente, a avaliação dos efeitos colaterais clássicos desta série de compostos, não demonstrou qualquer alteração nos animais, mesmo em altas doses de 200 µmol/Kg administrados por via subcutânea (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

1.3.3) Efeitos colaterais frequentes da classe dos inibidores da PDE4

Como exposto, efeitos colaterais são comumente relatados e associados ao uso da teofilina (**5**) e dos derivados da xantina. Entretanto, diversos inibidores seletivos da PDE4 também produzem uma quantidade considerável de efeitos adversos como náuseas, vômito, diarreia, dores abdominais, dores de cabeça, dentre outros, que são desvantagens significantes para a utilização terapêutica destes fármacos (CALVERLEY *et al.*, 2007; RABE *et al.*, 2005; RENNARD *et al.*, 2006).

Os mecanismos responsáveis pelo aparecimento de efeitos colaterais têm sido investigados para auxiliar na descoberta de novos inibidores de PDE4 mais seletivos. Uma hipótese levantada é a da inibição de PDE4 em tecidos que não são os alvos, especialmente nos sistemas nervoso central e gastrointestinal (ROBICHAUD *et al.*, 2002). Uma segunda hipótese considera que estes efeitos secundários são causados pela interação com o sítio de alta afinidade, chamado de sítio de ligação de alta afinidade do rolipram (**11**), no sistema nervoso central e em células secretoras de ácido gástrico (DAL-PIAZ; GIOVANNONI, 2000). Outra proposta enfatiza a inibição de uma isoforma específica de PDE4, mais provavelmente a PDE4D, como a fonte dos efeitos eméticos ocorridos com a utilização de inibidores desta família enzimática (GIEMBYCZ, 2002; HOUSLAY; ADAMS, 2010; O'BYRNE; GAUVREAU, 2009; ROBICHAUD *et al.*, 2002). No entanto, ainda não se tem uma resposta definitiva de qual dos mecanismos descritos, ou até mesmo um novo, seria o real responsável pelos efeitos colaterais.

A problemática de diversos representantes da classe dos inibidores da PDE4 terem apresentado efeitos colaterais gerou um grande ceticismo da comunidade científica quanto à possibilidade de um dia estes inibidores se tornarem fármacos, o que num primeiro momento pareceu verdade. No entanto, apesar dos efeitos colaterais, a falta de alternativas efetivas para o tratamento de doenças inflamatórias de cunho respiratório estimulou esforços visando à descoberta de novos inibidores de PDE4 mais seguros.

Este esforço foi recompensado recentemente, com a aprovação do roflumilaste (12) para uso no tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), uma doença que afeta o sistema respiratório na qual aparentemente os inibidores de PDE4 tem se mostrado extremamente eficazes (GIEMBYCZ; FIELD, 2010).

1.4) A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

A DPOC é uma enfermidade respiratória que se caracteriza pela presença de obstrução crônica do fluxo aéreo, que não é totalmente reversível, onde o sintoma característico é a dificuldade para respirar de forma normal. Esta é geralmente progressiva e está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à inalação de partículas ou gases tóxicos (DOURADO *et al.*, 2006). É um grave problema de saúde pública, com uma prevalência global de 251 milhões de casos (RABE; WATZ, 2017), tendo causado mais de 3 milhões de mortes no mundo em 2016, o que representa 6% de todas as mortes registradas (WHO, 2018), e prevista para ser a quarta causa de morte em 2030 (MATHERS; LONCAR, 2006).

Embora a DPOC comprometa os pulmões, ela também produz consequências sistêmicas significativas como a depleção nutricional, disfunção do músculo esquelético periférico, perda de peso, inflamação sistêmica, dentre outras (DOURADO *et al.*, 2006; SINDEN; STOCKLEY, 2010). Há um consenso de longa data que o tabagismo é o fator etiológico mais comum em pacientes com DPOC, mas a patogênese exata ainda é desconhecida. Sabe-se que a disfunção do músculo liso e a inflamação crônica das vias aéreas desempenham papéis importantes no estabelecimento e progressão da doença. Conseqüentemente, os anti-inflamatórios e medicamentos broncodilatadores são utilizados extensivamente para o tratamento da DPOC (RABE; WATZ, 2017).

1.4.1) Tratamentos disponíveis para DPOC

A teofilina (5) tem sido utilizada no tratamento da asma e DPOC desde 1930, embora sua popularidade tenha diminuído devido à introdução dos broncodilatadores e glicocorticoides. A teofilina (5) é utilizada muitas vezes associada com corticosteroides como segunda e terceira linha de escolha terapêutica para o tratamento da asma e em combinação com broncodilatadores de longa ação na DPOC (LIM *et al.*, 2000; RENNARD, 2004; SPINA, 2008; SULLIVAN *et al.*, 1994; WEINBERGER; HENDELES, 1996).

Os agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos também são usados no tratamento de asma e DPOC, devido ao seu efeito broncodilatador (WALDECK, 2002). Estes receptores são

encontrados nos pulmões e estão presentes na superfície muscular, epitélio, glândulas cerosas e mucosas, pneumócitos, fibroblastos e músculo liso vascular deste órgão (GIEMBYCZ; NEWTON, 2006). Atualmente, existem duas classes de agonistas dos receptores β_2 : os de curta duração como o salbutamol (**28**) e fenoterol (**29**), por exemplo, e de longa duração como o salmeterol (**31**) e formoterol (**30**) (Figura 10) (HUGHES *et al.*, 2011).

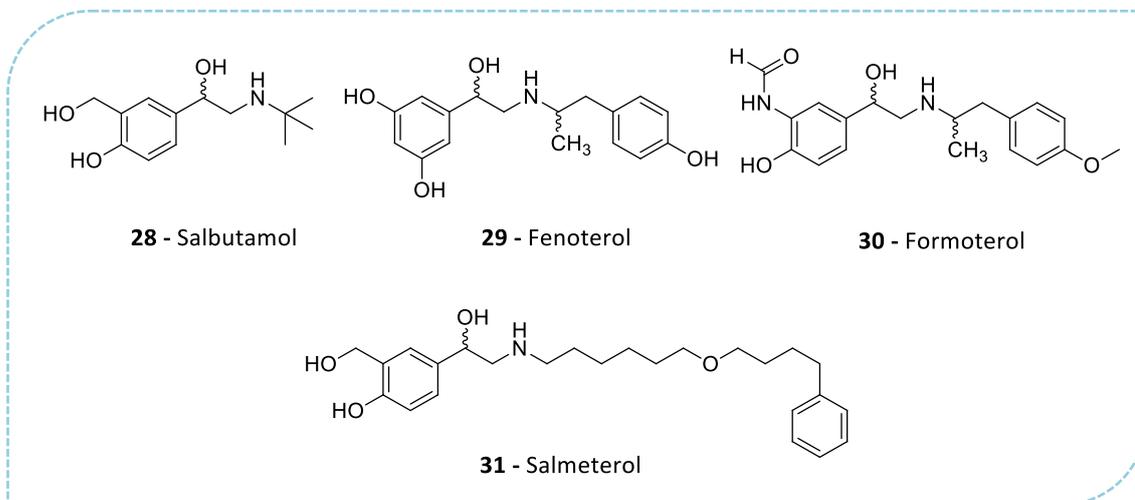


Figura 10. Agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos.

Outra classe de broncodilatadores utilizada no tratamento da DPOC é a dos anticolinérgicos ou antimuscarínicos. Os receptores muscarínicos dos tipos M1 e M3 estão localizados nas vias respiratórias e quando estimulados promovem a broncoconstrição e estimulam a secreção de muco (BARNES, 2004; MOULTON; FRYER, 2011). Desta maneira, os antagonistas dos receptores muscarínicos atuam basicamente na inibição deste processo de broncoconstrição das vias aéreas. Como exemplos de anticolinérgicos disponíveis para o tratamento da DPOC têm-se os brometos de ipatrópio (**33**) e de tiotrópio (**32**) (Figura 11) (NGKELO; ADCOCK, 2013).

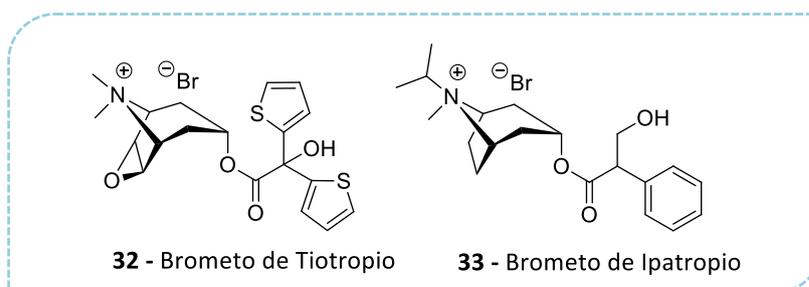


Figura 11. Moduladores da atividade dos receptores M3 muscarínicos.

Os glicocorticoides são fármacos anti-inflamatórios utilizados para o tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas, incluindo a asma e artrite reumatoide, mas são pouco

eficazes na DPOC (BARNES, 2010), e por este motivo são geralmente utilizados em associação a outros fármacos. Como exemplo desta classe têm-se o propionato de fluticasona (**35**) e a budesonida, (**34**) (Figura 12) (NGKELO; ADCOCK, 2013).

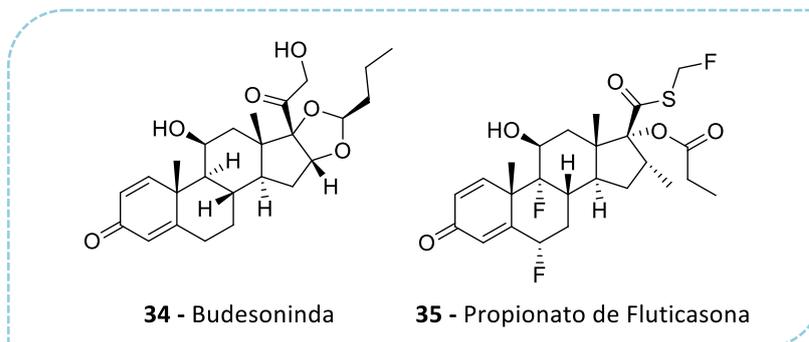


Figura 12. Glicocorticoides utilizados no tratamento da DPOC.

Os sintomas multifacetados característicos da DPOC levaram a utilização de fármacos associados, com atividade anti-inflamatória e broncodilatadora, como Advair® (salmeterol e propionato de fluticasona), quarto medicamento mais vendido do mundo em 2012, e Symbicort® (formoterol e budesonida) (BARNES, 2013; NGKELO; ADCOCK, 2013).

1.4.2) O ressurgimento dos inibidores da PDE4 e suas vantagens na DPOC

Até o ano de 2010 não haviam grandes opções farmacoterapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento da DPOC. Como dito anteriormente, o tratamento baseava-se na administração de broncodilatadores inalatórios e glicocorticoides que atuavam no alívio dos sintomas (CELLI *et al.*, 2011; SINGH; LOKE, 2010). Em geral, as terapias disponíveis não suprimiam adequadamente a inflamação e, até mesmo os corticosteroides que atuavam bem para o tratamento da asma, não reduziam a progressão da DPOC (HATZELMANN *et al.*, 2010; CAZZOLA; MOLIMARD, 2010).

Nos últimos anos, os inibidores de PDE4 foram avaliados como terapias promissoras para o tratamento de desordens inflamatórias pulmonares, incluindo asma e DPOC (KÜMMERLE *et al.*, 2012; VIGNOLA, 2004). Como descrito anteriormente, estes atuam, de forma geral, na inibição da hidrólise do AMPc no tecido pulmonar e em células do sistema imunológico, promovendo o bloqueio da proliferação e quimiotaxia de células inflamatórias, a inibição da atividade de células pró-inflamatórias, e a supressão da liberação de mediadores inflamatórios e citotóxicos no tecido, como o TNF- α , por exemplo. Somado a esses fatores, o aumento de AMPc nos pulmões também auxilia no relaxamento do músculo liso das vias aéreas (broncodilatação). (Figura 13) (SCHALKWYK *et al.*, 2005).

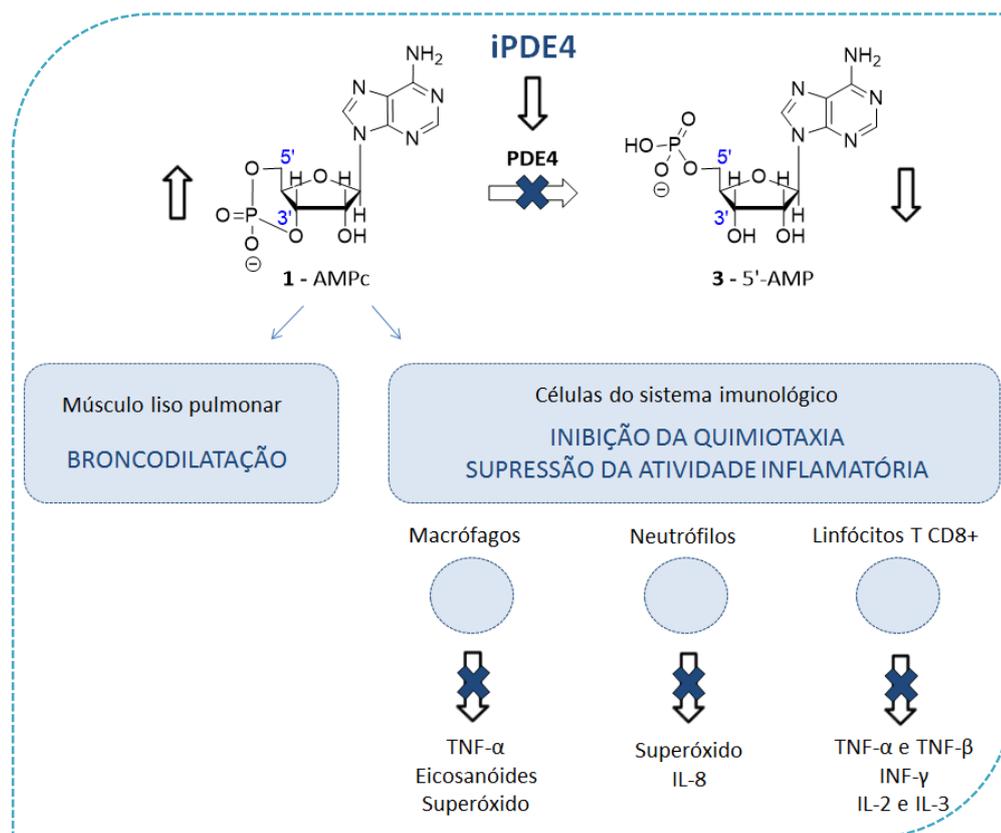


Figura 13. Mecanismo de inibição da PDE4 na DPOC (Adaptado de VIGNOLA, 2004).

De fato, a classe dos inibidores da PDE4 tem se mostrado tão promissora no tratamento da DPOC que em 2011 foi concedida pelo FDA a aprovação ao roflumilaste (**12**) como uma nova alternativa para o tratamento desta doença, se tornando este o primeiro inibidor seletivo de PDE4 a ser aprovado para utilização na terapêutica. O fármaco em questão apresentou eficácia clínica na diminuição do processo inflamatório estabelecido na patologia e significativa melhora da função pulmonar de pacientes em fases mais avançadas da DPOC (GIEMBYCZ; FIELD, 2010; HATZELMANN *et al.*, 2010; KERAVIS; LUGNIER, 2012).

Mesmo com a aprovação do roflumilaste, o cenário de pesquisa atual ainda busca por inibidores de PDE4 que ofereçam menos efeitos colaterais indesejados frente ao uso contínuo para o tratamento da DPOC. Uma possibilidade seria a obtenção de inibidores mais seletivos para as isoformas PDE4A e B e menos seletivos para a isoforma D (GIEMBYCZ, 2002; HOUSLAY; ADAMS, 2010; O'BYRNE; GAUVREAU, 2009; ROBICHAUD *et al.*, 2002).

Recentemente, Naganuma e colaboradores descreveram a síntese e a avaliação de derivados da 2-amilpirimidina, que apresentaram perfil de seletividade cerca de 100 vezes maior para a isoforma B, se comparada com a D (Figura 14, estrutura **36**) (NAGANUMA *et*

al., 2009). Outros derivados da 2-arilpirimidina também foram avaliados por Goto e colaboradores. Estes pesquisadores sintetizaram um composto capaz de inibir a isoforma B com seletividade, aproximadamente, 430 vezes maior do que para a isoforma D (Figura 14, estrutura **37**) (GOTO *et al.*, 2014).

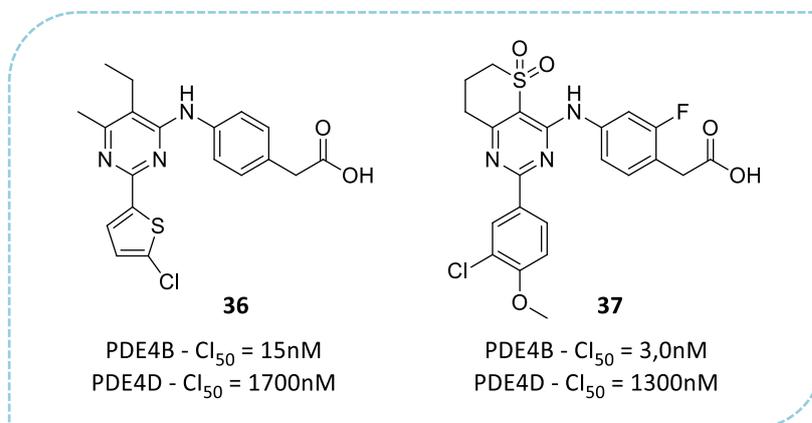


Figura 14. Inibidores seletivos da PDE4B.

Outra abordagem seria aumentar a seletividade dos inibidores para o tecido alvo da DPOC, como pulmões e células do sistema imunológico. Savi e colaboradores desenvolveram uma série de inibidores de PDE4 que podem ser administrados por via inalatória. A estrutura **38** (Figura 15) representa a molécula com o melhor perfil de atividade anti-inflamatória quando administrada por inalação em cobaias (SAVI *et al.*, 2014).

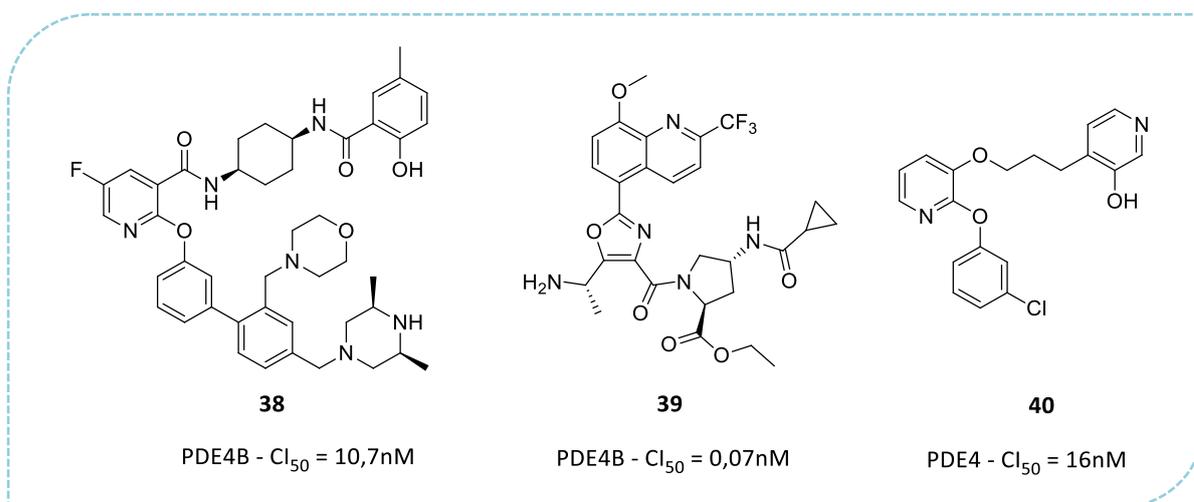


Figura 15. Inibidores da PDE4 seletivos frente ao tecido alvo.

Ting e colaboradores também desenvolveram inibidores de PDE4 inalatórios como exemplificado na figura 15, estrutura **39** (TING *et al.*, 2013). Kawasaki e colaboradores propuseram uma abordagem diferente das apresentadas anteriormente. Estes sintetizaram

moléculas para serem administradas por via oral, que não são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica e causar os efeitos colaterais indesejados no sistema nervoso central, por conta da sua hidrofobicidade. Esta estratégia aboliu o efeito emético nesta classe de inibidores (Figura 15, estrutura **40**) (KAWASAKI *et al.*, 2014).

A aprovação do roflumilaste para o tratamento da DPOC foi uma surpresa para muitos pesquisadores, pois os inibidores da PDE4 foram considerados compostos sem possibilidade de aplicação terapêutica devido a seus efeitos colaterais, o que poderia ter levado a um declínio nas pesquisas sobre este alvo. No entanto, um levantamento recente feito na base de dados Scopus utilizando as palavras chaves “PDE4”, ou “*phosphodiesterase 4*”, ou “*phosphodiesterase-4*”, mostrou como as pesquisas envolvendo a PDE4 vem crescendo ao longo do tempo, totalizando mais de 3100 trabalhos publicados, sendo 101 somente até o início do mês de julho do ano de 2018 (Gráfico 1) (SCOPUS, 2018).

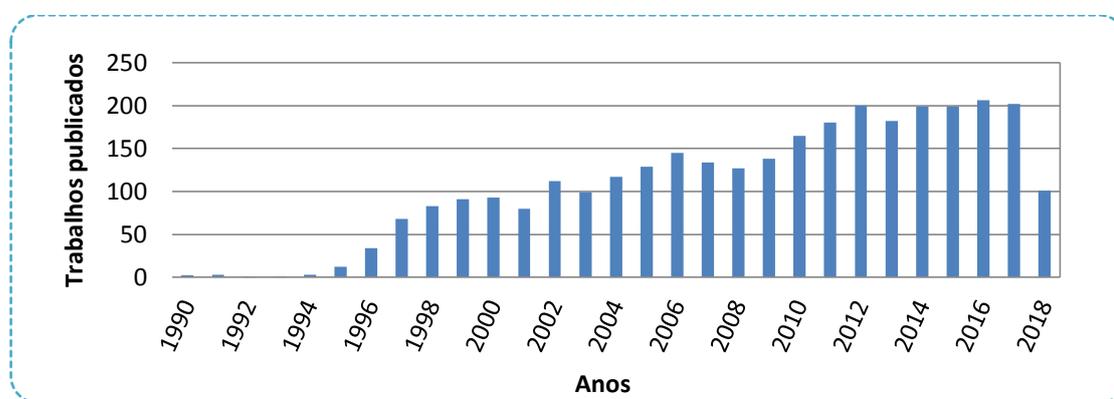


Gráfico 1. Levantamento da frequência de artigos publicados na literatura abordando a PDE4 (do ano 1990 até 2018) (SCOPUS, 2018).

Apesar do ressurgimento da classe ter ocorrido pela grande eficácia no tratamento da DPOC, este crescimento tem sido impulsionado, também, pelas diversas novas aplicações que vêm sendo estudadas para os iPDE4 com resultados bastante promissores, o que mostra um interesse renovado por esta classe de compostos.

1.5) Novas aplicações da classe dos inibidores da PDE4

Inibidores de PDE4 de 1ª e 2ª geração já estudados para o tratamento de doenças respiratórias como o rolipram (**11**), o roflumilaste (**12**) e o apremilaste estão em avaliação através de triagens clínicas para o tratamento de diversas outras doenças. O rolipram (**11**) está em estudos de fase II para o tratamento da Síndrome de McCune-Albright (NCT02743377). O roflumilaste (**12**) está em fase I para o tratamento de linfoma de células B (NCT03458546), e

em fase IV para o tratamento da sarcoidose (NCT01830959). O apremilaste (**20**) está em fase I para o tratamento de prurigo nodular (NCT03576287), e em fase II para o tratamento de dermatite (NCT03160248), colite ulcerativa (NCT02289417), vitiligo (NCT03123016) e dermatomiosite (NCT03529955). Está também em estudos de fase III para o tratamento da artrite psoriática (NCT03191539) e de fase IV para o tratamento da alopecia (NCT03422640) e psoríase (NCT03082729) (CLINICAL TRIALS, 2018).

Pesquisas recentes com novos inibidores de PDE4 vêm demonstrando que estes podem também ser explorados em diferentes abordagens terapêuticas como o câncer, doenças envolvendo o sistema nervoso central e correlacionadas com o sistema imunológico.

1.5.1) Novos inibidores da PDE4 e o câncer

A inibição da PDE4 em tecidos tumorais é uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do câncer, pois dados recentes revelam que estas enzimas estão amplamente expressas em células oncogênicas. Há relatos na literatura de inibidores de PDE4 com a capacidade de inibir o crescimento de tumores, de reduzir a proliferação e angiogênese de células tumorais e de levá-las a apoptose de forma seletiva, sem afetar as células normais (SAVAI *et al.*, 2010; SENGUPTA *et al.*, 2011).

Mareddy e colaboradores desenvolveram compostos triazólicos derivados da nimesulida com atividade inibitória sobre a PDE4B e células de câncer de pulmão da linhagem A549, de fígado (HepG2) e de próstata (DU145). Um exemplo desta classe é o triazol **41** (Figura 16) que apresentou inibição de 70% da PDE4B na concentração de 10 μ M e inibição da proliferação celular nas células citadas com CE₅₀ na faixa de 6-7 μ M (MAREDDY *et al.*, 2017).

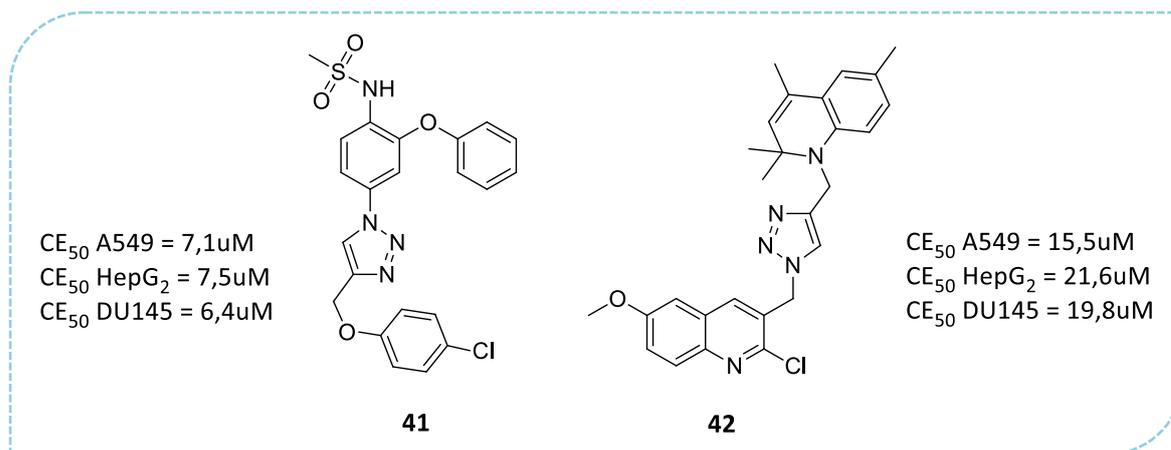


Figura 16. Triazóis inibidores da PDE4B avaliados para o tratamento do câncer.

Praveena e colaboradores sintetizaram derivados quinolínicos que apresentaram atividade sobre a PDE4B e células tumorais. Um exemplo desta classe é o triazol **42** (Figura 16) que apresentou 88% de inibição da PDE4B à 30 μM e CE_{50} sobre células tumorais variando de 15 à 22 μM (PRAVEENA *et al.*, 2015).

Trifilief e colaboradores sintetizaram uma série de compostos derivados da 1,7-naftiridina com atividade inibitória sobre a fosfodiesterases do tipo 4, inicialmente para o tratamento de distúrbios inflamatórios. O composto NVP-ABE171 (**43**, Figura 17) apresentou atividade pronunciada contra todas as isoformas da PDE4 (PDE4A = 602nM, PDE4B = 34nM, PDE4C = 1230nM, PDE4D = 1,5nM) (TRIFILIEF *et al.*, 2002). Posteriormente, este também foi avaliado como possível agente de inibição do crescimento de células tumorais de câncer de próstata, e apresentou inibição de 50% do crescimento de células da linhagem LNCaP-C4 à 50nM (POWERS *et al.*, 2015). Outro exemplo de inibidor da PDE4 com atividade antitumoral foi descrito por Merz e seus colaboradores (MERZ *et al.*, 1998). O derivado pteridínico **44** (Figura 17) apresentou atividade sobre a isoforma PDE4D na ordem de 16nM e foi capaz de inibir o crescimento de células HepG2 com um CE_{50} de 0,5 μM (MASSIMI *et al.*, 2017).

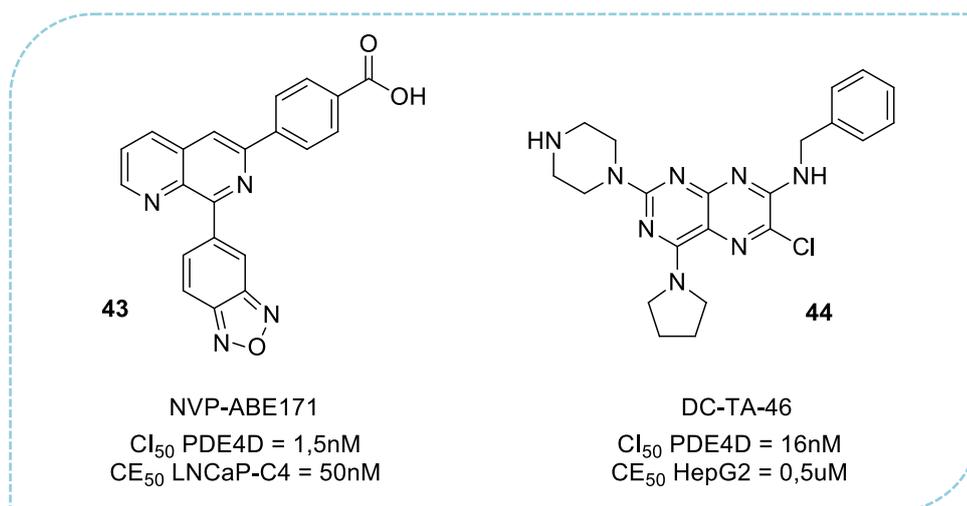


Figura 17. Inibidores da PDE4D avaliados para o tratamento do câncer.

1.5.2) Novos inibidores da PDE4 e as doenças do SNC

A PDE4 é amplamente expressa no sistema nervoso central, mas ainda não se sabe seu papel exato na maior parte das funções neurais. Estudos com o rolipram (**11**) demonstram que

a PDE4 está associada com o processo de depressão e também possui papel importante em processos cognitivos (SOARES *et al.*, 2016).

Desta forma, o desenvolvimento de inibidores da PDE4 passou a ser considerado importante para obtenção de novos agentes terapêuticos para doenças que causam danos cognitivos como a doença de Alzheimer e para outras doenças que afetam o sistema nervoso central, como a depressão, a esclerose múltipla e a doença de Parkinson, por exemplo.

Zhang e colaboradores desenvolveram um composto denominado ZX-107 (**45**) que apresentou atividade sobre as isoformas PDE4B e PDE4D, sendo mais potente para esta última (CI_{50} = 99,3 μ M PDE4B e CI_{50} = 7,45 μ M PDE4D) (Figura 18). Utilizando testes comportamentais, foi observado o efeito antidepressivo em cobaia, após administração de uma dose única de 0,15mg/kg desta piridazinona (ZHANG *et al.*, 2013). A catecolamina **46** também foi avaliada por Zhou e colaboradores. Eles observaram uma potente atividade de inibição da PDE4 (CI_{50} = 47nM PDE4D e CI_{50} = 31 μ M PDE4B), assim como atividade antidepressiva em roedores a 0,8mg/kg (ZHOU *et al.*, 2017).

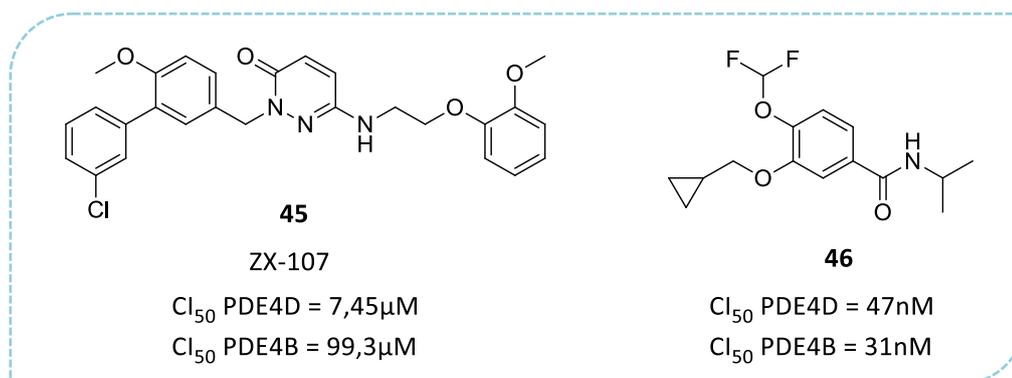


Figura 18. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da depressão.

Brullo e colaboradores descreveram uma série de novos compostos promissores para o tratamento da doença de Alzheimer. Dentre eles o composto **47** (Figura 19) apresentou resultados significativos de inibição da PDE4D (CI_{50} = 7,6 μ M) e capacidade de aumentar a memória e a cognição, em estudos comportamentais com cobaias, à concentração de 0,003mg/kg (BRULLO *et al.*, 2016). Zhang e colaboradores avaliaram a atividade de diferentes compostos do tipo feniluréia. Dentre estes, o produto D159687 (**48**, Figura 19) apresentou excelente atividade inibitória da PDE4D (CI_{50} = 28nM), assim como promoveu a melhora da memória em cobaia (após dose de 3mg/kg) e efeito antidepressivo (com 0,3mg/kg) (ZHANG *et al.*, 2017). Cabe destacar que os compostos descritos anteriormente foram capazes de aumentar os níveis de AMPc em células neuronais, extraídas do hipocampo

de camundongos, assim como os níveis da proteína CREB ativa (dependente de AMPc), que está diretamente associada ao desenvolvimento da memória (BRULLO *et al.*, 2016; VITOLO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2017).

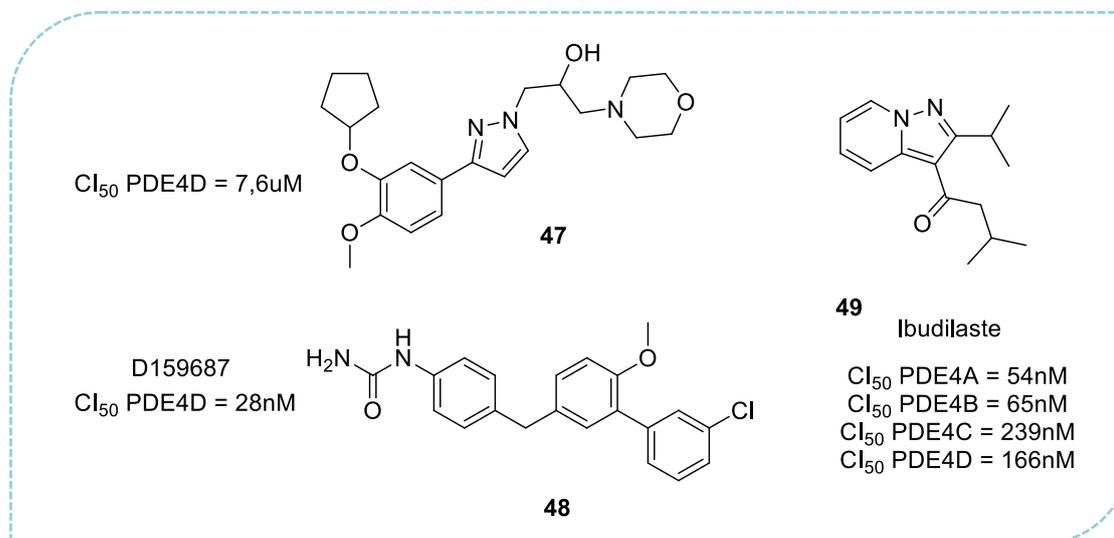


Figura 19. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da doença de Alzheimer, de Parkinson e esclerose múltipla.

Há relatos na literatura da utilização de inibidores de PDE4 para o tratamento da esclerose múltipla e da doença de Parkinson. Um exemplo é o ibudilaste (**49**, Figura 19), que é um potente inibidor das diferentes isoformas da enzima (CI_{50} = 54-239 nM) e da produção de TNF α com CI_{50} = 6,2 μ M (HUANG *et al.*, 2006). Goodman e colaboradores avaliaram a atividade do composto, em questão, em modelos de esclerose múltipla e observaram propriedades anti-inflamatórias e neuroprotetoras em cobaias (GOODMAN *et al.*, 2016). Atualmente, o ibudilaste está sendo avaliado em estudos de fase clínica I e II para o tratamento desta doença (NCT02714036) (CLINICAL TRIALS, 2018). Schwenkgrub e colaboradores descreveram sobre a atividade do composto **49** em modelos de doença de Parkinson. Eles observaram a diminuição do processo neuroinflamatório em camundongos, a redução da liberação de citocinas em células estriais, assim como o aumento na expressão de GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) *in vivo*, que atua na proteção e recuperação dos neurônios lesados gerados nesta doença, após a administração de 20 mg/kg do ibudilaste durante 9 dias (SCHWENKGRUB *et al.*, 2017).

1.5.3) Novos inibidores da PDE4 e as do sistema imunológico

Devido às propriedades anti-inflamatórias dos inibidores de PDE4, já discutidas anteriormente, estes podem ser úteis para o tratamento de doenças que envolvem respostas do

sistema imunológico como a dermatite atópica, a artrite reumatoide, a artrite psoriásica e a psoríase (MAURICE *et al.*, 2014). Um representante desta classe é o fármaco apremilaste (**20**) que, em 2014, foi aprovado pelo FDA para o tratamento das duas últimas (FALA, 2015).

Ishii e colaboradores relataram a avaliação do composto E6005 (Figura 20, estrutura **50**) para o tratamento da dermatite atópica. Este apresentou potente e seletiva inibição da atividade da PDE4 com $CI_{50} = 2,8$ nM e suprimiu a produção de citocinas em linfócitos e monócitos com $CI_{50} = 0,49$ à $3,1$ nM. Em modelo de dermatite atópica realizado em camundongos, a aplicação tópica de E6005 produziu um imediato efeito antipruriginoso, bem como um efeito anti-inflamatório (ISHII *et al.*, 2013). Ensaios clínicos de fase I e II demonstraram a diminuição das erupções cutâneas e do prurido em pacientes doentes sem efeitos colaterais graves (FURUE *et al.*, 2017).

Felding e colaboradores sintetizaram uma série de acetamidas com potente atividade inibitória da PDE4. Destacou-se o composto denominado LEO-29102 (**51**, Figura 20) com $CI_{50} = 5$ nM, para inibição da isoforma PDE4D, e com $CI_{50} = 16$ nM para inibição da liberação de TNF α em células mononucleares do sangue humano. O produto **51** foi avaliado, em fase clínica I, para o tratamento de pacientes com dermatite atópica e mostrou-se eficaz, seguro e bem tolerado após a administração de dose única de 2,5mg/g do creme sobre a derme após 48 horas (FELDING *et al.*, 2014). Estudos de fase II estão sendo realizados, mas os resultados ainda não foram publicados (NCT01037881) (CLINICAL TRIALS, 2018).

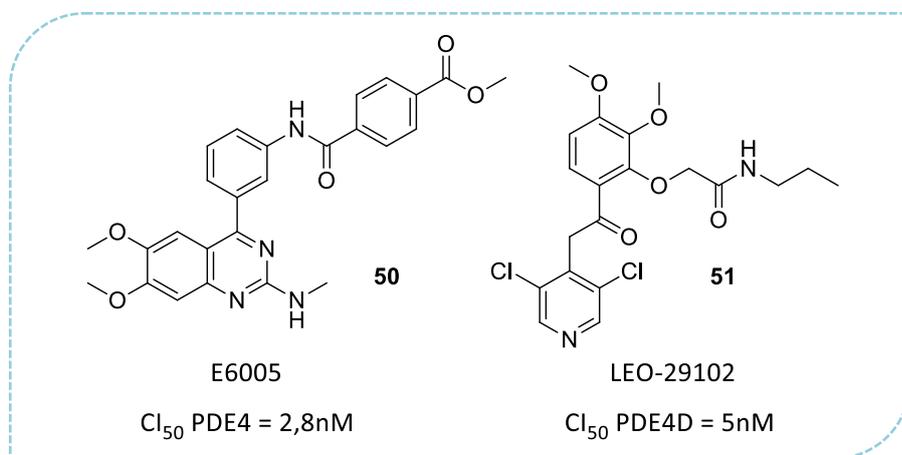


Figura 20. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento de dermatite atópica.

O composto crisaborola (**52**, Figura 21) foi descrito na literatura como promissor para o tratamento da dermatite atópica e da psoríase. Este é um inibidor seletivo da enzima PDE4 com $CI_{50} = 55-340$ nM, para as diferentes isoformas, assim como atua na supressão da liberação de TNF α ($CI_{50} = 0,17$ μ M) e de interleucinas ($CI_{50} = 0,48$ μ M) em cultura celular

(DONG *et al.*, 2016). Cabe ressaltar que, devido aos excelentes resultados em triagens clínicas, a utilização da benzoxaborona **52** foi aprovada pelo FDA, em 2016, para o tratamento de quadros leves e moderados de dermatite atópica (HOY, 2017).

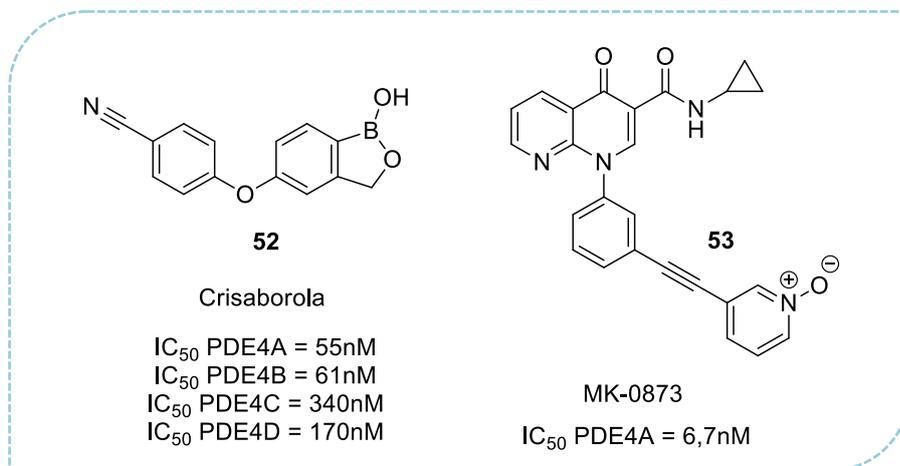


Figura 21. Inibidores da PDE4 avaliados para o tratamento da dermatite atópica, psoríase e artrite reumatóide.

Guay e colaboradores descreveram uma série de naftiridinonas com potente atividade inibitória da PDE4. Dentre essas, o composto MK-0873 se destacou com $CI_{50} = 6,7nM$. Estudos de fase clínica I foram realizados para o tratamento da psoríase, assim como de fase II para o tratamento da artrite reumatoide, mas os resultados ainda não foram publicados (NCT01235728 e NCT00132769) (CLINICAL TRIALS, 2018; GUAY *et al.*, 2008).

A despeito dos efeitos colaterais apresentados por muitos compostos da classe dos inibidores da PDE4 ainda não terem sido resolvidos, a aprovação de dois medicamentos para uso em humanos, como o roflumilaste (**12**) e apremilaste (**20**), mostra o quanto os efeitos benéficos desta classe de medicamentos são úteis no tratamento de desordens inflamatórias, de doenças auto-imunes e, até mesmo, do câncer. O tratamento de diversas outras patologias tem sido investigado com bons resultados, o que indica que esta classe terapêutica ainda se mostra um bom campo para pesquisas e desenvolvimento de novos fármacos.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese, a caracterização e a avaliação farmacológica de compostos inéditos derivados da série *N*-metil-*N*-acilidrazona (*N*-metil-NAH) planejados como inibidores da enzima fosfodiesterase 4 (PDE4).

2.2) Objetivos Específicos

- Planejamento estrutural dos novos derivados das *N*-metil-NAHs: séries A, B, C e D;
- Síntese, purificação e caracterização de novos derivados das *N*-metil-NAHs visando determinar a influência de substituintes, em diferentes posições desta classe de compostos, na obtenção de possíveis compostos híbridos: séries A, B e C;
- Desenvolvimento de protocolo de síntese, purificação e caracterização de novos derivados das *N*-metil-NAHs através de reação de *N*-arilação: série D;
- Investigação do perfil de atividade biológica de compostos sintetizados representativos das séries A-D, em modelo *in vitro* de inibição da PDE4;
- Investigação, por métodos teóricos de modelagem molecular, do perfil de interação das séries de compostos sintetizados com a PDE4, bem como da correlação estrutura atividade.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Metodologia Sintética

O acompanhamento das reações foi realizado com cromatografia de camada fina analítica (CCFA) em placas de alumínio Kieselgel 60 (Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCFA foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm).

A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografia líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage®, modelo ISO-4SV (ICE-UFRRJ). Para as colunas de fase normal, utilizou-se a coluna Biotage® SNAP Ultra, que contém sílica como fase estacionária e, como fase móvel, foram utilizados hexano e acetato de etila em diferentes proporções de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto. Para a coluna de fase reversa, utilizou-se a coluna Biotage® SNAP Ultra C18, que contém C18 como fase estacionária e, como fase móvel, foram utilizados metanol e água destilada em uma rampa de concentração que variou de 5-10%.

Os experimentos de HPLC foram realizados com coluna C18 Thermo Betasil (25 X 4.5mm X 5µM), em um método isocrático que utilizou acetonitrila e água com 1% de ácido acético como fase móvel, na concentração de 20%. O fluxo utilizado foi de 1,0mL/min, com pressão de 53kgf/cm e temperatura de 35°C. A detecção das amostras foi realizada através de espectrometria de absorvância no UV-visível na faixa de 200-500nm.

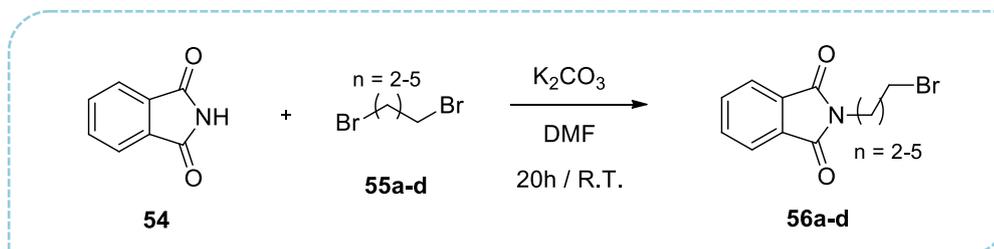
A fase orgânica das reações foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório IKA (modelo RV 10 digital) com banho IKA (modelo HB 10 digital).

A determinação dos pontos de fusão foi realizada em aparelho Aaker modelo PFM - II e os valores não foram corrigidos.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente para hidrogênio e 125 MHz e 100MHz, respectivamente para carbono. As amostras foram dissolvidas em CDCl_3 ou DMSO-d_6 , contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: *s*-simpleto / *d*-dupleto / *t*-tripleto / *q*-quadrupleto / *quin*-quinteto / *m*-multiplete / *dd*-duplo dupleto / *sl*-simpleto largo.

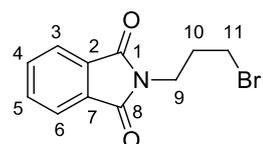
3.1.1) Síntese dos derivados das *N*-metil-NAHs planejados como inibidores da PDE4 visando à obtenção de compostos híbridos

3.1.1.1) Síntese dos espaçadores das séries A, B e C (CESARI *et al.*, 2006)



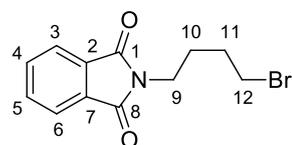
Em um balão de fundo redondo foram solubilizados 5,4mmol de carbonato de potássio e 4,1mmol de dibromoalcano (**55a-d**) em 4mL de DMF. Em outro balão, a parte, foram solubilizados 2,7mmol de ftalimida (**54**) em 1mL de DMF. Sob agitação constante adicionou-se a solução de ftalimida gota a gota à solução de carbonato e dibromoalcano. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 20 horas. Posteriormente, o produto foi isolado através de extração com diclorometano e água. Evaporou-se o solvente da fase orgânica em rotaevaporador e purificou-se o produto através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

2-(3-bromopropil)isoindolina-1,3-diona (**56a**)



O composto **56a** foi obtido como um sólido branco em 61% de rendimento e com ponto de fusão de 71°C. **RMN 1H (400 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** $H_{10} = 2,27$ (*quin*, $J=6,78$ Hz, 2H); $H_{11} = 3,42$ (*t*, $J=6,78$ Hz, 2H); $H_9 = 3,84$ (*t*, $J=6,90$ Hz, 2H); $H_{3\ e\ 6} = 7,66-7,79$ (*m*, 2H); $H_{4\ e\ 5} = 7,79-7,95$ (*m*, 2H). **RMN ^{13}C (100 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** $C_{10} = 29,79$; $C_{11} = 31,62$; $C_9 = 36,72$; $C_{3\ e\ 6} = 123,30$; $C_{2\ e\ 7} = 132,00$; $C_{4\ e\ 5} = 134,03$; $C_{1\ e\ 8} = 168,21$.

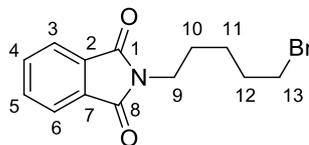
2-(4-bromobutil)isoindolina-1,3-diona (**56b**)



O composto **56b** foi obtido como um sólido branco em 58% de rendimento e com ponto de fusão de 78°C. **RMN 1H (400 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** $H_{10\ e\ 11} = 1,75-2,02$ (*m*, 4H); $H_{12} = 3,45$ (*t*, $J=6,40$ Hz, 2H); $H_9 = 3,73$ (*t*, $J=6,78$ Hz, 2H); $H_{3\ e\ 6} = 7,57-7,79$ (*m*, 2H); $H_{4\ e\ 5} =$

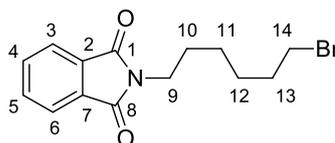
7,79-8,01 (*m*, 2H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 27,21; C₁₀ = 29,81; C₁₂ = 32,72; C₉ = 36,93; C_{3 e 6} = 123,23; C_{2 e 7} = 132,03; C_{4 e 5} = 133,95; C_{1 e 8} = 168,33.

2-(5-bromopentil)isoindolina-1,3-diona (56c)



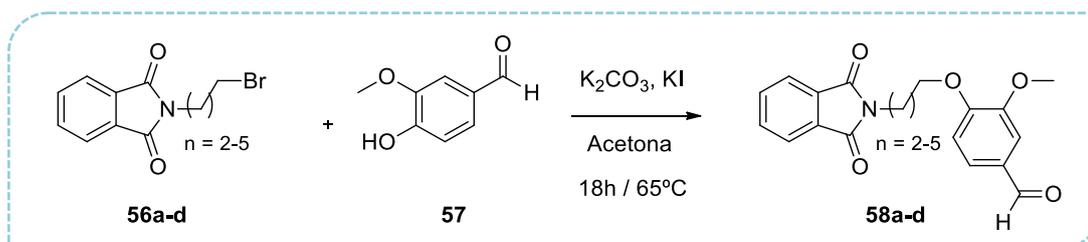
O composto 56c foi obtido como um sólido branco em 56% de rendimento e com ponto de fusão de 60°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₁ = 1,50 (*t*, 2H); H₁₀ = 1,72 (*t*, 2H); H₁₂ = 1,91 (*t*, 2H); H₁₃ = 3,40 (*t*, *J*=6,78Hz, 2H); H₉ = 3,70 (*t*, *J*=7,28Hz, 2H); H_{3, 4, 5 e 6} = 7,78-7,95 (*m*, 4H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 25,36; C₁₀ = 27,69; C₁₂ = 32,15; C₁₃ = 33,31; C₉ = 37,62; C_{3 e 6} = 123,17; C_{2 e 7} = 132,09; C_{4 e 5} = 133,88; C_{1 e 8} = 168,35.

2-(6-bromohexil)isoindolina-1,3-diona (56d)



O composto 56d foi obtido como um sólido branco em 60% de rendimento e com ponto de fusão de 58°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{11 e 12} = 1,30-1,56 (*m*, 4H); H₁₀ = 1,70 (*t*, 2H); H₁₃ = 1,86 (*t*, 2H); H₁₄ = 3,39 (*t*, *J*=6,78Hz, 2H); H₉ = 3,69 (*t*, *J*=7,28Hz, 2H); H_{3 e 6} = 7,63-7,78 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,78-7,94 (*m*, 2H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 25,99; C₁₂ = 27,68; C₁₀ = 28,38; C₁₃ = 32,58; C₁₄ = 33,64; C₉ = 37,81; C_{3 e 6} = 123,16; C_{2 e 7} = 132,12; C_{4 e 5} = 133,86; C_{1 e 8} = 168,41.

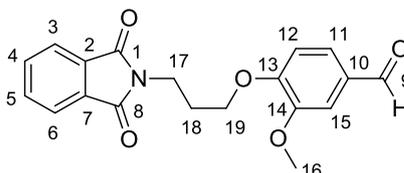
3.1.1.2) Síntese do núcleo dialcoxifenila da série A (LIU *et al.*, 2013)



Em um tubo de borossilicato reforçado o foram adicionados 0,43mmol de vanilina (**57**), 0,65mmol de carbonato de potássio, 0,04mmol de iodeto de potássio e 2mL de acetona. A reação foi aquecida à 65°C sob agitação. Adicionou-se 0,56mmol de ftalimida alquilada (**56a-**

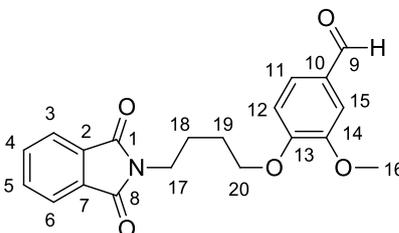
d), em pequenas porções, durante 1h. O tubo foi selado e a reação foi mantida à 65°C por 18h. Posteriormente, a reação foi finalizada com 1mL de solução aquosa de HCl 1M. Extraiu-se o produto com clorofórmio (6 x 30mL) e água (30mL). Evaporou-se o solvente da fase orgânica em rotaevaporador. O produto obtido foi purificado através de precipitação em gelo após ser solubilizado em 2mL de etanol. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água gelada.

4-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propoxi)-3-metoxibenzaldeído (58a)



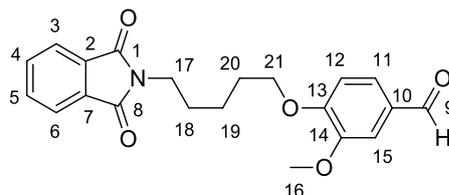
O composto 58a foi obtido como um sólido branco em 78% rendimento e com ponto de fusão de 157°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₈ = 2,29 (*quin*, 2H); H₁₆ = 3,68 (*s*, 3H); H₁₇ = 3,93 (*t*, 2H); H₁₉ = 4,19 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,93 (*d*, *J*=8,03Hz, 1H); H₁₅ = 7,32 (*d*, *J*=2,01, 1H); H₁₁ = 7,41 (*dd*, *J*=8,16Hz, *J*=1,88Hz, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,75 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,78-7,87 (*m*, 2H); H₉ = 9,82 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₈ = 28,16; C₁₇ = 35,54; C₁₆ = 55,68; C₁₉ = 67,07; C₁₅ = 109,11; C₁₂ = 111,48; C_{3 e 6} = 123,15; C₁₁ = 126,71; C₁₀ = 130,13; C_{2 e 7} = 132,20; C_{4 e 5} = 133,84; C₁₄ = 149,78; C₁₃ = 153,74; C_{1 e 8} = 168,31; C₉ = 190,90.

4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-3-metoxibenzaldeído (58b)



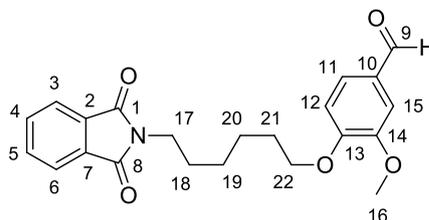
O composto 58b foi obtido como um sólido branco em 90% de rendimento e com ponto de fusão de 98°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{18 e 19} = 1,98-1,96 (*m*, 4H); H₁₇ = 3,78 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,90 (*s*, 3H); H₂₀ = 4,14 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,96 (*d*, *J*=8,03Hz, 1H); H₁₅ = 7,38 (*s*, *J*=1,76, 1H); H₁₁ = 7,42 (*dd*, *J*=8,16Hz, *J*=1,88Hz, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,74 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,81-7,86 (*m*, 2H); H₉ = 9,83 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₈ = 25,10; C₁₉ = 26,27; C₁₇ = 37,46; C₁₆ = 55,97; C₂₀ = 68,29; C₁₅ = 109,31; C₁₂ = 111,58; C_{3 e 6} = 123,19; C₁₁ = 126,68; C₁₀ = 130,05; C_{2 e 7} = 132,05; C_{4 e 5} = 133,94; C₁₄ = 149,88; C₁₃ = 153,91; C_{1 e 8} = 168,38; C₉ = 190,86.

4-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-3-metoxibenzaldeído (58c)



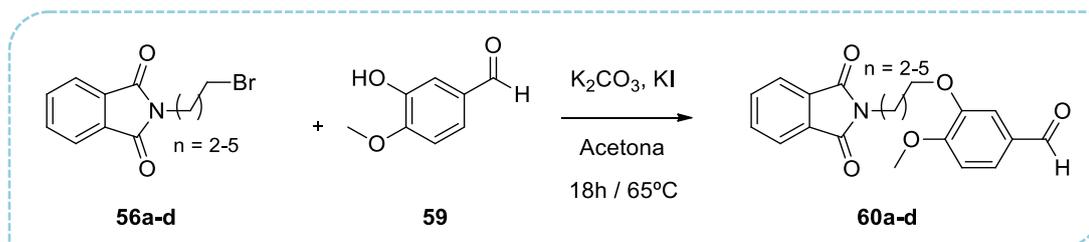
O composto 58c foi obtido como um sólido branco em 95% de rendimento e com ponto de fusão de 114°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 1,55 (*quin*, 2H); H₁₈ = 1,78 (*quin*, 2H); H₂₀ = 1,92 (*quin*, 2H); H₁₇ = 3,72 (*t*, *J*=7,15, 2H); H₁₆ = 3,90 (*s*, 3H); H₂₁ = 4,10 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,95 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H₁₅ = 7,39 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,43 (*dd*, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,75 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,80-7,88 (*m*, 2H); H₉ = 9,84 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₉ = 23,21; C₂₀ = 28,25; C₁₈ = 28,44; C₁₇ = 37,73; C₁₆ = 55,96; C₂₁ = 68,72; C₁₅ = 109,28; C₁₂ = 111,42; C_{3 e 6} = 123,16; C₁₁ = 126,73; C₁₀ = 129,94; C_{2 e 7} = 132,10; C_{4 e 5} = 133,88; C₁₄ = 149,84; C₁₃ = 154,04; C_{1 e 8} = 168,38; C₉ = 190,87.

4-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-3-metoxibenzaldeído (58d)



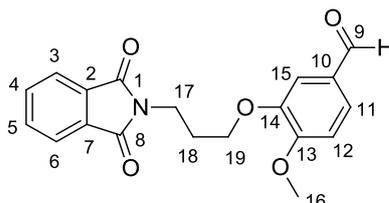
O composto 58d foi obtido como um sólido branco em 89% de rendimento e com ponto de fusão de 76°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 1,43 (*quin*, 2H); H₂₀ = 1,54 (*quin*, 2H); H₁₈ = 1,72 (*quin*, 2H); H₂₁ = 1,88 (*quin*, 2H); H₁₇ = 3,70 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H₂₂ = 4,09 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,95 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H₁₅ = 7,40 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,43 (*dd*, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,74 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,81-7,86 (*m*, 2H); H₉ = 9,84 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂₀ = 25,49; C₁₉ = 26,52; C₂₁ = 28,45; C₁₈ = 28,76; C₁₇ = 37,83; C₁₆ = 55,99; C₂₂ = 68,91; C₁₅ = 109,29; C₁₂ = 111,40; C_{3 e 6} = 123,14; C₁₁ = 126,74; C₁₀ = 129,84; C_{2 e 7} = 132,12; C_{4 e 5} = 133,86; C₁₄ = 149,85; C₁₃ = 154,11; C_{1 e 8} = 168,41; C₉ = 190,88.

3.1.1.3) Síntese do núcleo dialcoxifenila da série B (LIU *et al.*, 2013)



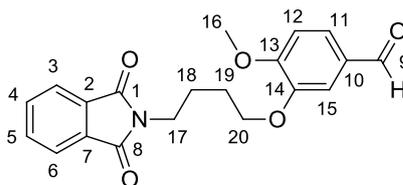
Em um tubo de borosilicato reforçado foram adicionados 0,43mmol de isovanilina (**59**), 0,65mmol de carbonato de potássio, 0,04mmol de iodeto de potássio e 2mL de acetona. A reação foi aquecida à 65°C sob agitação. Adicionou-se 0,56mmol de ftalimida alquilada (**56a-d**), em pequenas porções, durante 1h. O tubo foi selado e a reação foi mantida à 65°C por 18h. Posteriormente, a reação foi finalizada com 1mL de solução aquosa de HCl 1M. Extraíu-se o produto com clorofório (6 x 30mL) e água (30mL). Evaporou-se o solvente da fase orgânica em rotaevaporador. O produto obtido foi purificado através de precipitação em gelo após ser solubilizado em 2mL de etanol. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água gelada.

3-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propoxi)-4-metoxibenzaldeído (**60a**)



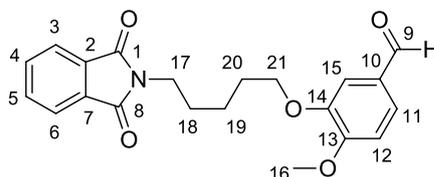
O composto **60a** foi obtido como um sólido branco em 88% de rendimento e com ponto de fusão de 142°C. **RMN 1H (400 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** $H_{18} = 2,26$ (*quin*, 2H); $H_{16} = 3,74$ (*s*, 3H); $H_{17} = 3,93$ (*t*, 2H); $H_{19} = 4,16$ (*t*, 2H); $H_{12} = 6,90$ (*d*, $J=8,28$ Hz, 1H); $H_{15} = 7,36$ (*d*, $J=1,76$, 1H); $H_{11} = 7,43$ (*dd*, $J=8,16$ Hz, $J=1,88$ Hz, 1H); $H_{3\ e\ 6} = 7,68-7,74$ (*m*, 2H); $H_{4\ e\ 5} = 7,80-7,86$ (*m*, 2H); $H_9 = 9,82$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (100 MHz) $CDCl_3$ / TMS (δ -ppm):** $C_{18} = 28,17$; $C_{17} = 35,58$; $C_{16} = 55,88$; $C_{19} = 66,85$; $C_{15} = 110,60$; $C_{12} = 110,81$; $C_{3\ e\ 6} = 123,15$; $C_{11} = 126,63$; $C_{10} = 129,98$; $C_{2\ e\ 7} = 132,24$; $C_{4\ e\ 5} = 133,78$; $C_{14} = 148,75$; $C_{13} = 154,83$; $C_{1\ e\ 8} = 168,28$; $C_9 = 190,80$.

3-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-4-metoxibenzaldeído (60b)



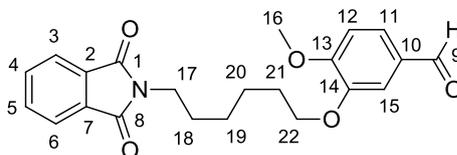
O composto 60b foi obtido como um sólido branco em 95% de rendimento e com ponto de fusão de 126°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{18 e 19} = 1,91 (*m*, 4H); H₁₇ = 3,79 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,93 (*s*, 3H); H₂₀ = 4,11 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,96 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H₁₅ = 7,39 (*d*, *J*=2,01, 1H); H₁₁ = 7,44 (*dd*, *J*=8,16Hz, *J*=1,88Hz, 1H); H_{3 e 6} = 7,69-7,74 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,81-7,87 (*m*, 2H); H₉ = 9,83 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₈ = 25,23; C₁₉ = 26,43; C₁₇ = 37,57; C₁₆ = 56,10; C₂₀ = 68,34; C₁₅ = 110,70,31; C₁₂ = 110,83; C_{3 e 6} = 123,17; C₁₁ = 126,54; C₁₀ = 130,04; C_{2 e 7} = 132,11; C_{4 e 5} = 133,88; C₁₄ = 148,93; C₁₃ = 154,90; C_{1 e 8} = 168,36; C₉ = 190,82.

3-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-4-metoxibenzaldeído (60c)



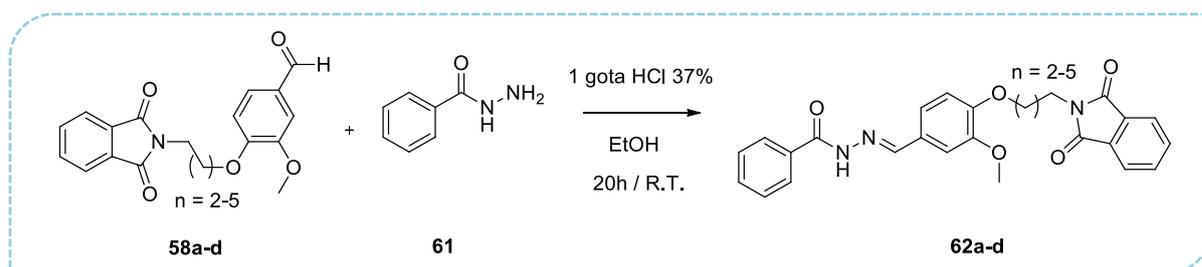
O composto 60c foi obtido como um sólido branco em 95% de rendimento e com ponto de fusão de 124°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 1,55 (*quin*, 2H); H₁₈ = 1,78 (*quin*, 2H); H₂₀ = 1,90 (*quin*, 2H); H₁₇ = 3,72 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,93 (*s*, 3H); H₂₁ = 4,04 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,92 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H₁₅ = 7,38 (*d*, *J*=1,76Hz, 1H); H₁₁ = 7,44 (*dd*, *J*=8,16Hz, *J*=1,88Hz, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,74 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,81-7,87 (*m*, 2H); H₉ = 9,84 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₉ = 23,31; C₂₀ = 28,32; C₁₈ = 28,57; C₁₇ = 37,79; C₁₆ = 56,10; C₂₁ = 68,68; C₁₅ = 110,57; C₁₂ = 110,66; C_{3 e 6} = 123,16; C₁₁ = 126,47; C₁₀ = 130,05; C_{2 e 7} = 132,14; C_{4 e 5} = 133,84; C₁₄ = 149,03; C₁₃ = 154,86; C_{1 e 8} = 168,38; C₉ = 190,86.

3-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-4-metoxibenzaldeído (60d)



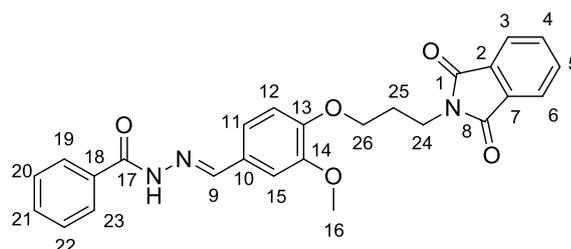
O composto 60d foi obtido como um sólido branco em 89% de rendimento e com ponto de fusão de 76°C. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 1,43 (*quin*, 2H); H₂₀ = 1,54 (*quin*, 2H); H₁₈ = 1,73 (*quin*, 2H); H₂₁ = 1,87 (*quin*, 2H); H₁₇ = 3,70 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,95 (*s*, 3H); H₂₂ = 4,07 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,97 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H₁₅ = 7,39 (*d*, *J*=1,76Hz, 1H); H₁₁ = 7,44 (*dd*, *J*=8,16Hz, *J*=1,88Hz, 1H); H_{3 e 6} = 7,68-7,74 (*m*, 2H); H_{4 e 5} = 7,81-7,87 (*m*, 2H); H₉ = 9,84 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂₀ = 25,56; C₁₉ = 26,59; C₂₁ = 28,51; C₁₈ = 28,87; C₁₇ = 37,89; C₁₆ = 56,13; C₂₂ = 68,55; C₁₅ = 110,51; C₁₂ = 110,64; C_{3 e 6} = 123,15; C₁₁ = 126,47; C₁₀ = 130,08; C_{2 e 7} = 132,17; C_{4 e 5} = 133,84; C₁₄ = 149,10; C₁₃ = 154,87; C_{1 e 8} = 168,42; C₉ = 190,90.

3.1.1.4 Síntese das NAHs *O*-alquiladas da série A (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998)



Em um tubo de borossilicato reforçado foram adicionados 2mL de etanol, 0,15mmol de fenilhidrazida (**61**) e 1 gota de HCl 37%. Agitou-se a solução por 5 minutos. Adicionou-se 0,18mmol dos aldeídos obtidos anteriormente (**58a-d**) e a reação foi mantida à temperatura ambiente e com agitação por 20h. Precipitou-se o produto formado em água com gelo. Neutralizou-se a reação com solução de bicarbonato de sódio 10%. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

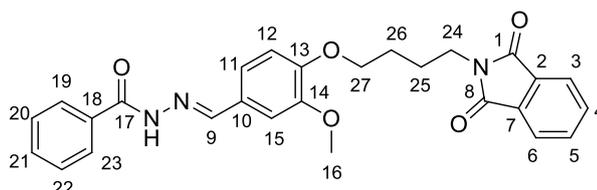
(*E*)-*N'*-(4-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)proxi)-3-metoxibenzilideno)benzoidrazida (**62a**)



O composto 62a foi obtido como um sólido branco em 91% de rendimento e com ponto de fusão de 190°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₅ = 2,08 (*sl*, 2H); H₁₆ = 3,55 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,78 (*t*, 2H); H₂₆ = 4,07 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,96 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₁ = 7,15

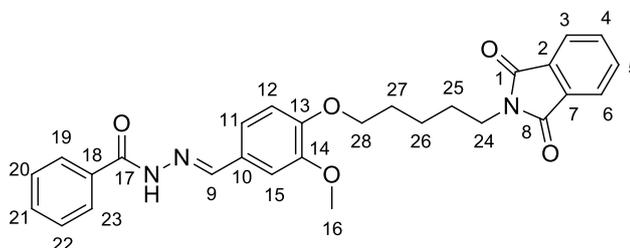
(*d*, $J=7,88$, 1H); $H_{15} = 7,25$ (*s*, 1H); $H_{20\text{ e }22} = 7,52$ (*t*, 2H); $H_{21} = 7,61$ (*t*, 1H); $H_{3,6,19\text{ e }23} = 7,82-7,86$ (*m*, 4H); $H_{4\text{ e }5} = 7,87-7,91$ (*m*, 2H); $H_9 = 8,35$ (*s*, 1H); $H_{N-H} = 11,73$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $C_{25} = 27,61$; $C_{24} = 35,49$; $C_{16} = 55,24$; $C_{26} = 66,63$; $C_{15} = 108,06$; $C_{12} = 112,25$; $C_{11} = 121,89$; $C_{3\text{ e }6} = 122,94$; $C_{10} = 127,02$; $C_{20\text{ e }22} = 127,60$; $C_{19\text{ e }23} = 128,51$; $C_{21} = 131,69$; $C_{2\text{ e }7} = 131,91$; $C_{18} = 133,60$; $C_{4\text{ e }5} = 134,24$; $C_9 = 148,05$; $C_{14} = 149,09$; $C_{13} = 149,96$; $C_{17} = 163,00$; $C_{1\text{ e }8} = 168,07$.

(*E*)-*N'*-(4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-3-metoxibenzilideno)benzoidrazida (62b)



O composto 62b foi obtido como um sólido branco em 88% de rendimento e com ponto de fusão de 194°C. **RMN ^1H (500 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $H_{25\text{ e }26} = 1,75$ (*sl*, 4H); $H_{24} = 3,65$ (*sl*, 2H); $H_{16} = 3,81$ (*s*, 3H); $H_{27} = 4,02$ (*sl*, 2H); $H_{12} = 7,01$ (*d*, $J=8,51\text{Hz}$, 1H); $H_{11} = 7,16$ (*d*, $J=7,88$, 1H); $H_{15} = 7,32$ (*s*, 1H); $H_{20\text{ e }22} = 7,52$ (*t*, 2H); $H_{21} = 7,59$ (*t*, 1H); $H_{3,6,19\text{ e }23} = 7,82-7,88$ (*m*, 4H); $H_{4\text{ e }5} = 7,90$ (*d*, 2H); $H_9 = 8,36$ (*s*, 1H); $H_{N-H} = 11,74$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $C_{25} = 24,77$; $C_{26} = 26,81$; $C_{24} = 37,19$; $C_{16} = 55,49$; $C_{27} = 67,71$; $C_{15} = 108,36$; $C_{12} = 112,52$; $C_{11} = 121,89$; $C_{3\text{ e }6} = 123,04$; $C_{10} = 127,04$; $C_{20\text{ e }22} = 127,60$; $C_{19\text{ e }23} = 128,50$; $C_{2\text{ e }7} = 131,65$; $C_{21} = 131,68$; $C_{18} = 133,61$; $C_{4\text{ e }5} = 134,40$; $C_9 = 148,01$; $C_{14} = 149,20$; $C_{13} = 150,02$; $C_{17} = 163,00$; $C_{1\text{ e }8} = 168,06$.

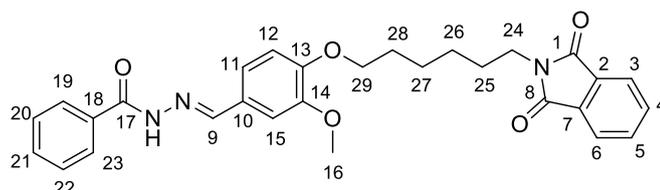
(*E*)-*N'*-(4-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-3-metoxibenzilidene)benzoidrazida (62c)



O composto 62c foi obtido como um sólido branco em 89% de rendimento e com ponto de fusão de 197°C. **RMN ^1H (500 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $H_{26} = 1,42$ (*quin*, 2H); $H_{26} = 1,66$ (*quin*, 2H); $H_{27} = 1,76$ (*quin*, 2H); $H_{24} = 3,60$ (*t*, 2H); $H_{16} = 3,78$ (*s*, 3H); $H_{28} = 3,98$ (*t*, $J=6,46\text{Hz}$, 2H); $H_{12} = 7,01$ (*d*, $J=8,20\text{Hz}$, 1H); $H_{11} = 7,16$ (*d*, $J=7,25$, 1H); $H_{15} = 7,32$ (*s*, 1H); $H_{20\text{ e }22} = 7,53$ (*t*, 2H); $H_{21} = 7,59$ (*t*, 1H); $H_{3,6,19\text{ e }23} = 7,82-7,89$ (*m*, 4H); $H_{4\text{ e }5} = 7,90$ (*d*,

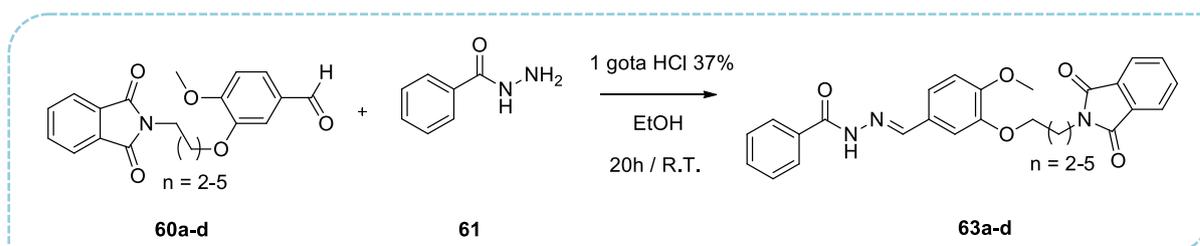
$J=7.25\text{Hz}$, 2H); $H_9 = 8,36$ (*s*, 1H); $H_{N-H} = 11,75$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $C_{26} = 22,83$; $C_{27} = 27,70$; $C_{25} = 28,24$; $C_{24} = 37,34$; $C_{16} = 55,46$; $C_{28} = 67,93$; $C_{15} = 108,38$; $C_{12} = 112,42$; $C_{11} = 121,94$; $C_{3 \text{ e } 6} = 123,05$; $C_{10} = 126,94$; $C_{20 \text{ e } 22} = 127,59$; $C_{19 \text{ e } 23} = 128,50$; $C_{2 \text{ e } 7} = 131,62$; $C_{21} = 131,68$; $C_{18} = 133,61$; $C_{4 \text{ e } 5} = 134,43$; $C_9 = 148,03$; $C_{14} = 149,17$; $C_{13} = 150,12$; $C_{17} = 163,00$; $C_{1 \text{ e } 8} = 168,02$.

(*E*)-*N'*-(4-(((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-3-metoxibenzilideno)benzoidrazida (62d)



O composto 62d foi obtido como um sólido branco em 88% de rendimento e com ponto de fusão de 174°C. **RMN ^1H (500 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $H_{26} = 1,32$ (*m*, 2H); $H_{27} = 1,44$ (*m*, 2H); $H_{25} = 1,61$ (*m*, 2H); $H_{28} = 1,71$ (*m*, 2H); $H_{24} = 3,57$ (*t*, 2H); $H_{16} = 3,81$ (*s*, 3H); $H_{29} = 3,98$ (*t*, 2H); $H_{12} = 7,00$ (*d*, $J=8,20\text{Hz}$, 1H); $H_{11} = 7,16$ (*d*, $J=8,20$, 1H); $H_{15} = 7,33$ (*s*, 1H); $H_{20 \text{ e } 22} = 7,52$ (*t*, 2H); $H_{21} = 7,59$ (*t*, 1H); $H_{3, 6, 19 \text{ e } 23} = 7,82-7,87$ (*m*, 4H); $H_{4 \text{ e } 5} = 7,90$ (*d*, 2H); $H_9 = 8,37$ (*s*, 1H); $H_{N-H} = 11,74$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $C_{27} = 25,16$; $C_{26} = 26,02$; $C_{28} = 27,94$; $C_{25} = 28,51$; $C_{24} = 37,38$; $C_{16} = 55,49$; $C_{29} = 68,12$; $C_{15} = 108,36$; $C_{12} = 112,40$; $C_{11} = 121,94$; $C_{3 \text{ e } 6} = 123,03$; $C_{10} = 126,93$; $C_{20 \text{ e } 22} = 127,59$; $C_{19 \text{ e } 23} = 128,50$; $C_{2 \text{ e } 7} = 131,63$; $C_{21} = 131,67$; $C_{18} = 133,61$; $C_{4 \text{ e } 5} = 134,39$; $C_9 = 148,05$; $C_{14} = 149,20$; $C_{13} = 150,16$; $C_{17} = 163,00$; $C_{1 \text{ e } 8} = 168,00$.

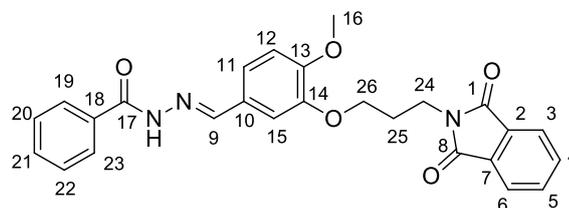
3.1.1.5) Síntese das NAHs *O*-alquiladas da série B (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998)



Em um tubo de borossilicato reforçado foram adicionados 2mL de etanol, 0,15mmol de fenilhidrazida (61) e 1 gota de HCl 37%. Agitou-se a solução por 5 minutos. Adicionou-se 0,18mmol dos aldeídos obtidos anteriormente (60a-d) e a reação foi mantida à temperatura ambiente e com agitação por 20h. Precipitou-se o produto formado em água com gelo.

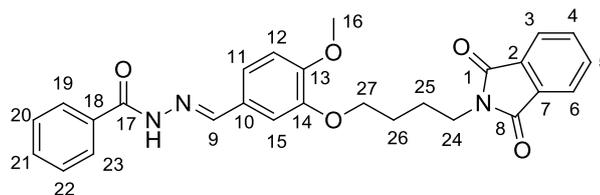
Neutralizou-se a reação com solução de bicarbonato de sódio 10%. O precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

(E)-N'-(3-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propoxi)-4-metoxibenzilideno)benzoidrazida (63a)



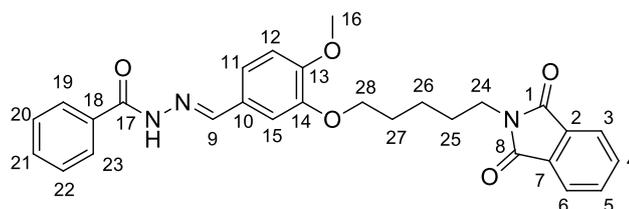
O composto 63a foi obtido como um sólido branco em 90% de rendimento e com ponto de fusão de 245°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₅ = 2,10 (*m*, 2H); H₁₆ = 3,54 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,79 (*t*, 2H); H₂₆ = 4,07 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,94 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₁ = 7,18 (*d*, *J*=7,88, 1H); H₁₅ = 7,28 (*s*, 1H); H_{20 e 22} = 7,52 (*t*, 2H); H₂₁ = 7,59 (*t*, 1H); H_{3, 6, 19 e 23} = 7,81-7,87 (*m*, 4H); H_{4 e 5} = 7,90 (*d*, *J*=7,25Hz, 2H); H₉ = 8,35 (*s*, 1H); H_{N-H} = 11,73 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₅ = 27,73; C₂₄ = 35,50; C₁₆ = 55,38; C₂₆ = 66,63; C₁₅ = 109,30; C₁₂ = 111,44; C₁₁ = 121,87; C_{3 e 6} = 122,93; C₁₀ = 126,92; C_{20 e 22} = 127,60; C_{19 e 23} = 128,50; C₂₁ = 131,68; C_{2 e 7} = 131,92; C₁₈ = 133,62; C_{4 e 5} = 134,21; C₉ = 148,04; C₁₄ = 148,27; C₁₃ = 150,83; C₁₇ = 162,99; C_{1 e 8} = 168,09.

(E)-N'-(3-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-4-metoxibenzilideno)benzoidrazida (63b)



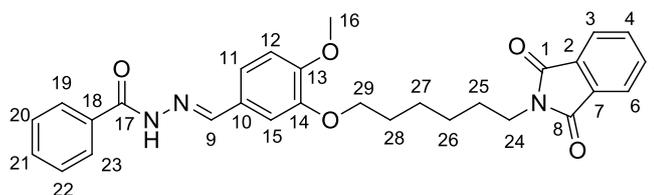
O composto 63b foi obtido como um sólido branco em 99% de rendimento e com ponto de fusão de 213°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{25 e 26} = 1,77 (*sl*, 4H); H₂₄ = 3,66 (*sl*, 2H); H₁₆ = 3,79 (*s*, 3H); H₂₇ = 4,02 (*sl*, 2H); H₁₂ = 7,01 (*d*, *J*=8,51Hz, 1H); H₁₁ = 7,19 (*d*, *J*=8,20, 1H); H₁₅ = 7,32 (*s*, 1H); H_{20 e 22} = 7,52 (*t*, 2H); H₂₁ = 7,59 (*t*, 1H); H_{3, 4, 5, 6, 19 e 23} = 7,80-7,92 (*m*, 6H); H₉ = 8,36 (*s*, 1H); H_{N-H} = 11,73 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₅ = 24,78; C₂₆ = 26,29; C₂₄ = 37,18; C₁₆ = 55,60; C₂₇ = 67,69; C₁₅ = 109,51; C₁₂ = 111,66; C₁₁ = 121,88; C_{3 e 6} = 123,04; C₁₀ = 127,00; C_{20 e 22} = 127,59; C_{19 e 23} = 128,49; C_{2 e 7} = 131,65; C₂₁ = 131,67; C₁₈ = 133,62; C_{4 e 5} = 134,39; C₉ = 148,01; C₁₄ = 148,34; C₁₃ = 150,92; C₁₇ = 162,98; C_{1 e 8} = 168,05.

(E)-N'-(3-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-4-metoxibenzilideno)benzoidrazida (63c)



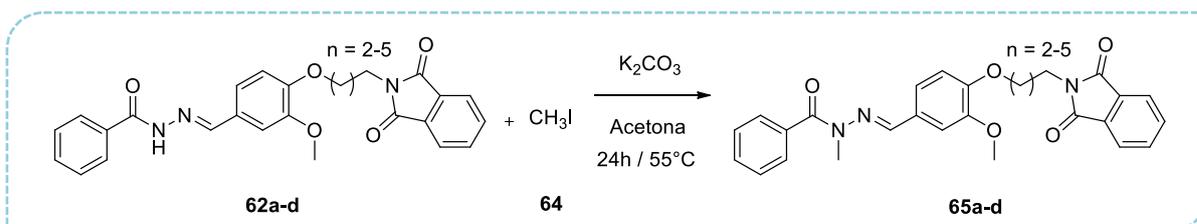
O composto 63c foi obtido como um sólido branco em 86% de rendimento e com ponto de fusão de 186°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ = 1,44 (*quin*, 4H); H₂₅ = 1,67 (*quin*, 2H); H₂₇ = 1,77 (*quin*, 2H); H₂₄ = 3,60 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,77 (*s*, 3H); H₂₈ = 3,98 (*t*, 2H); H₁₂ = 7,01 (*d*, *J*=8,51Hz, 1H); H₁₁ = 7,19 (*d*, *J*=8,20, 1H); H₁₅ = 7,32 (*s*, 1H); H_{20 e 22} = 7,52 (*t*, 2H); H₂₁ = 7,59 (*t*, 1H); H_{3,4, 5, 6,19 e 23} = 7,80-7,92 (*m*, 6H); H₉ = 8,36 (*s*, 1H); H_{N-H} = 11,73 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₆ = 22,85; C₂₇ = 27,72; C₂₅ = 28,32; C₂₄ = 37,34; C₁₆ = 55,58; C₂₈ = 67,94; C₁₅ = 109,43; C₁₂ = 111,67; C₁₁ = 121,77; C_{3 e 6} = 123,04; C₁₀ = 127,02; C_{20 e 22} = 127,59; C_{19 e 23} = 128,49; C_{2 e 7} = 131,64; C₂₁ = 131,66; C₁₈ = 133,62; C_{4 e 5} = 134,40; C₉ = 148,01; C₁₄ = 148,40; C₁₃ = 150,89; C₁₇ = 162,98; C_{1 e 8} = 168,01.

(E)-N'-(3-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-4-metoxibenzilideno)benzoidrazida (63d)



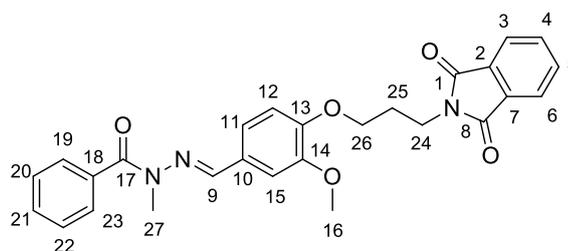
O composto 63d foi obtido como um sólido branco em 85% de rendimento e com ponto de fusão de 188°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ = 1,35 (*m*, 2H); H₂₇ = 1,46 (*m*, 2H); H₂₅ = 1,62 (*m*, 2H); H₂₈ = 1,73 (*m*, 2H); H₂₄ = 3,58 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,80 (*s*, 3H); H₂₉ = 3,98 (*t*, 2H); H₁₂ = 7,02 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₁ = 7,19 (*d*, *J*=8,20, 1H); H₁₅ = 7,32 (*s*, 1H); H_{20 e 22} = 7,52 (*t*, 2H); H₂₁ = 7,59 (*t*, 1H); H_{3, 6,19 e 23} = 7,81-7,87 (*m*, 4H); H_{4 e 5} = 7,90 (*d*, 2H); H₉ = 8,36 (*s*, 1H); H_{N-H} = 11,74 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₇ = 25,17; C₂₆ = 26,06; C₂₈ = 27,95; C₂₅ = 28,62; C₂₄ = 37,39; C₁₆ = 55,60; C₂₉ = 68,15; C₁₅ = 109,46; C₁₂ = 111,65; C₁₁ = 121,79; C_{3 e 6} = 123,02; C₁₀ = 127,01; C_{20 e 22} = 127,59; C_{19 e 23} = 128,49; C_{2 e 7} = 131,64; C₂₁ = 131,66; C₁₈ = 133,61; C_{4 e 5} = 134,38; C₉ = 148,03; C₁₄ = 148,44; C₁₃ = 150,94; C₁₇ = 162,98; C_{1 e 8} = 168,00.

3.1.1.6) Síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas da série A (BARCO *et al.*, 1973)



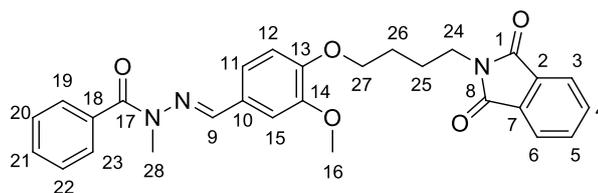
Em um tubo de borosilicato reforçado foram adicionados 0,15mmol das *N*-acilidrazonas preparadas anteriormente (**62a-d**), 0,4mmol de carbonato de potássio e 2mL de acetona. Agitou-se a solução por 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se 0,4mmol de iodeto de metila (**64**). O tubo foi selado e a reação foi mantida sob agitação constante por 24h à 55°C . Evaporou-se o solvente da reação em rotaevaporador. Em seguida, foram adicionados 2mL de etanol à reação e a mesma foi precipitada em uma solução bissulfito de sódio com gelo. O precipitado foi filtrado e lavado com água.

(*E*)-*N'*-(4-(3-(1,3-dioxisoindolin-2-il)propoxi)-3-metoxibenzilideno)-*N*-metilbenzoidrazida (**65a**)



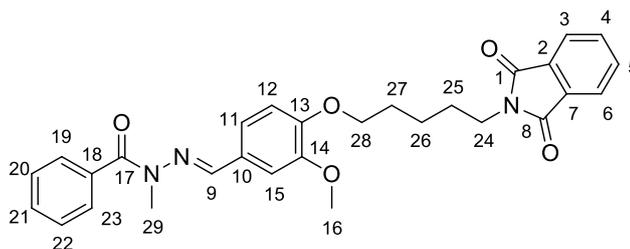
O composto **65a** foi obtido como um sólido branco em 75% de rendimento e com ponto de fusão de 200°C . **RMN ^1H (500 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $\text{H}_{25} = 2,05$ (*m*, 2H); $\text{H}_{16} = 3,37$ (*s*, 3H); $\text{H}_{27} = 3,46$ (*s*, 3H); $\text{H}_{24} = 3,74$ (*t*, 2H); $\text{H}_{26} = 4,01$ (*t*, 2H); $\text{H}_{12} = 6,89$ (*d*, $J=8,20\text{Hz}$, 1H); $\text{H}_{15} = 6,96$ (*s*, 1H); $\text{H}_{11} = 7,03$ (*d*, $J=8,20$, 1H); $\text{H}_{20, 21 \text{ e } 22} = 7,46$ (*m*, 3H); $\text{H}_{19 \text{ e } 23} = 7,62$ (*d*, 2H); $\text{H}_{3,4, 5 \text{ e } 6} = 7,83$ (*m*, 4H); $\text{H}_9 = 7,91$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $\text{C}_{25} = 27,58$; $\text{C}_{27} = 28,54$; $\text{C}_{24} = 35,44$; $\text{C}_{16} = 54,75$; $\text{C}_{26} = 66,53$; $\text{C}_{15} = 108,09$; $\text{C}_{12} = 112,24$; $\text{C}_{11} = 121,16$; $\text{C}_{3 \text{ e } 6} = 122,91$; $\text{C}_{20 \text{ e } 22} = 127,22$; $\text{C}_{10} = 127,74$; $\text{C}_{19 \text{ e } 23} = 129,39$; $\text{C}_{21} = 129,80$; $\text{C}_{2 \text{ e } 7} = 131,87$; $\text{C}_{4 \text{ e } 5} = 134,21$; $\text{C}_{18} = 135,73$; $\text{C}_9 = 139,93$; $\text{C}_{14} = 148,85$; $\text{C}_{13} = 149,25$; $\text{C}_{1 \text{ e } 8} = 168,02$; $\text{C}_{17} = 169,73$.

(E)-N'-(4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-3-metoxibenzilideno)-N-metilbenzoidrazida (65b)



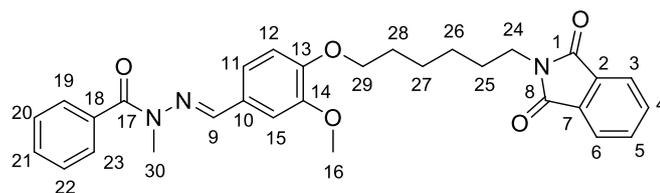
O composto 65b foi obtido como um sólido branco em 87% de rendimento e com ponto de fusão de 152°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{25 e 26} = 1,71 (*sl*, 4H); H₂₈ = 3,47 (*s*, 3H); H_{16 e 24} = 3,61 (*sl*, 5H); H₂₇ = 3,97 (*sl*, 2H); H₁₂ = 6,94 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H_{11 e 15} = 6,98-7,11 (*m*, 2H); H_{20, 21 e 22} = 7,42-7,51 (*m*, 3H); H_{19 e 23} = 7,63 (*d*, 2H); H_{3, 4, 5 e 6} = 7,79-7,88 (*m*, 4H); H₉ = 7,91 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₅ = 24,73; C₂₆ = 26,14; C₂₈ = 28,54; C₂₄ = 37,16; C₁₆ = 54,99; C₂₇ = 67,63; C₁₅ = 108,33; C₁₂ = 112,52; C₁₁ = 121,20; C_{3 e 6} = 123,01; C_{20 e 22} = 127,23; C₁₀ = 127,77; C_{19 e 23} = 129,40; C₂₁ = 129,84; C_{2 e 7} = 131,63; C_{4 e 5} = 134,38; C₁₈ = 135,73; C₉ = 139,91; C₁₄ = 148,96; C₁₃ = 149,30; C_{1 e 8} = 168,03; C₁₇ = 169,74.

(E)-N'-(4-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-3-metoxibenzilideno)-N-metilbenzoidrazida (65c)



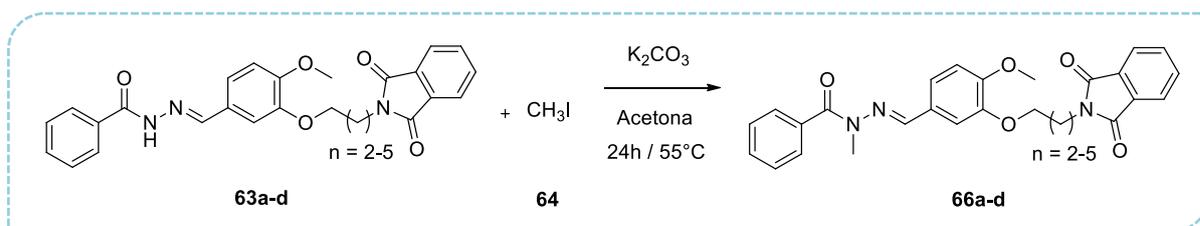
O composto 65c foi obtido como um sólido branco em 84% de rendimento e com ponto de fusão de 135°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ = 1,39 (*sl*, 2H); H₂₅ = 1,64 (*sl*, 2H); H₂₇ = 1,71 (*sl*, 2H); H₂₉ = 3,47 (*s*, 3H); H_{16 e 24} = 3,58 (*sl*, 5H); H₂₈ = 3,92 (*sl*, 2H); H₁₂ = 6,93 (*d*, 1H); H_{11 e 15} = 7,02 (*m*, 2H); H_{20, 21 e 22} = 7,47 (*sl*, 3H); H_{19 e 23} = 7,62 (*sl*, 2H); H_{3, 4, 5 e 6} = 7,79-7,89 (*m*, 4H); H₉ = 7,91 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₆ = 22,80; C₂₇ = 27,68; C₂₅ = 28,21; C₂₉ = 28,54; C₂₄ = 37,32; C₁₆ = 54,98; C₂₈ = 67,86; C₁₅ = 108,35; C₁₂ = 112,39; C₁₁ = 121,27; C_{3 e 6} = 123,03; C_{20 e 22} = 127,24; C₁₀ = 127,67; C_{19 e 23} = 129,41; C₂₁ = 129,85; C_{2 e 7} = 131,61; C_{4 e 5} = 134,41; C₁₈ = 135,75; C₉ = 139,95; C₁₄ = 148,94; C₁₃ = 149,43; C_{1 e 8} = 168,00; C₁₇ = 169,74.

(E)-N'-(4-(((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-3-metoxibenzilideno)-N-metil-benzoidrazida (65d)



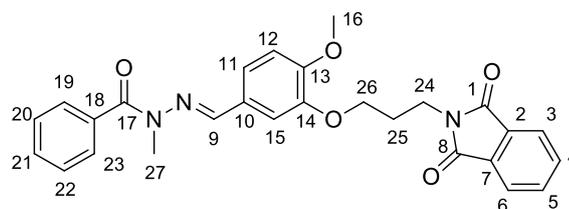
O composto 65d foi obtido como um sólido branco em 92% de rendimento e com ponto de fusão de 160°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ = 1,30-1,35 (*m*, 2H); H₂₇ = 1,38-1,43 (*m*, 2H); H₂₅ = 1,56-1,64 (*m*, 2H); H₂₈ = 1,65-1,70 (*m*, 2H); H₃₀ = 3,47 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,56 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,61 (*s*, 3H); H₂₉ = 3,92 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,93 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₁ e 15 = 6,98-7,11 (*m*, 2H); H_{20, 21 e 22} = 7,39-7,53 (*m*, 3H); H_{19 e 23} = 7,63 (*d*, 2H); H_{3, 4, 5 e 6} = 7,80-7,87 (*m*, 4H); H₉ = 7,92 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₇ = 25,13; C₂₆ = 25,98; C₂₈ = 27,91; C₂₅ = 28,47; C₃₀ = 28,54; C₂₄ = 37,36; C₁₆ = 55,00; C₂₉ = 68,06; C₁₅ = 108,35; C₁₂ = 112,40; C₁₁ = 121,25; C_{3 e 6} = 123,01; C_{20 e 22} = 127,23; C₁₀ = 127,65; C_{19 e 23} = 129,39; C₂₁ = 129,84; C_{2 e 7} = 131,62; C_{4 e 5} = 134,39; C₁₈ = 135,74; C₉ = 139,97; C₁₄ = 148,95; C₁₃ = 149,47; C_{1 e 8} = 167,99; C₁₇ = 169,74.

3.1.1.7) Síntese das N-metil-NAHs O-alkiladas da série B (BARCO *et al.*, 1973)



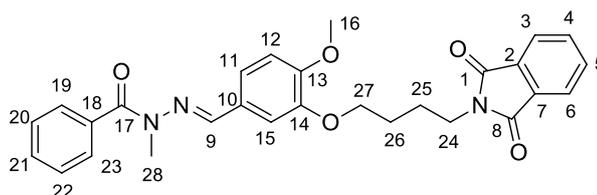
Em um tubo de borossilicato reforçado foram adicionados 0,15mmol das N-acilidrazonas preparadas anteriormente (**63a-d**), 0,4mmol de carbonato de potássio e 2mL de acetona. Agitou-se a solução por 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se 0,4mmol de iodeto de metila (**64**). O tubo foi selado e a reação foi mantida sob agitação constante por 24h à 55°C. Evaporou-se o solvente da reação em rotaevaporador. Em seguida, foram adicionados 2mL de etanol à reação e a mesma foi precipitada em uma solução bissulfito de sódio com gelo. O precipitado foi filtrado e lavado com água.

(E)-N'-(3-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propoxi)-4-metoxibenzilideno)-N-metil benzoidrazida (66a)



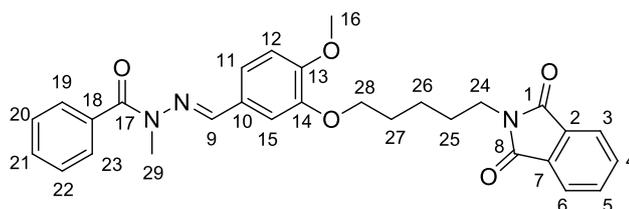
O composto 66a foi obtido como um sólido branco em 75% de rendimento e com ponto de fusão de 162°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₅ = 2,05 (*m*, 2H); H₂₇ = 3,46 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,49 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,74 (*t*, 2H); H₂₆ = 3,85 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,87 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₅ = 6,99 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,05 (*d*, *J*=8,20, 1H); H_{20, 21 e 22} = 7,40 (*m*, 3H); H_{19 e 23} = 7,60 (*d*, 2H); H_{3,4, 5 e 6} = 7,84 (*sl*, 4H); H₉ = 7,90 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₅ = 27,54; C₂₇ = 28,51; C₂₄ = 35,42; C₁₆ = 55,30; C₂₆ = 66,07; C₁₅ = 109,31; C₁₂ = 111,37; C₁₁ = 121,11; C_{3 e 6} = 122,93; C_{20 e 22} = 127,19; C₁₀ = 127,61; C_{19 e 23} = 129,28; C₂₁ = 129,67; C_{2 e 7} = 131,84; C_{4 e 5} = 134,24; C₁₈ = 135,78; C₉ = 139,86; C₁₄ = 147,92; C₁₃ = 150,13; C_{1 e 8} = 167,99; C₁₇ = 169,75.

(E)-N'-(3-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-4-metoxibenzilideno)-N-metilbenzoidrazida (66b)



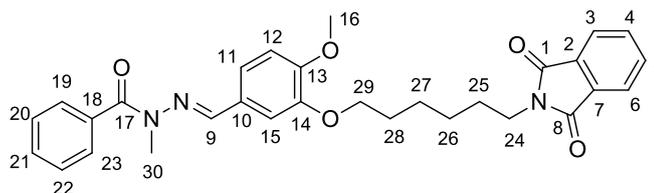
O composto 66b foi obtido como um sólido branco em 71% de rendimento e com ponto de fusão de 141°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{25 e 26} = 1,71 (*sl*, 4H); H₂₈ = 3,46 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,64 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,74 (*s*, 3H); H₂₇ = 3,79 (*t*, 2H); H₁₂ = 6,94 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₅ = 7,02 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,06 (*d*, 1H); H_{20, 21 e 22} = 7,40-7,51 (*m*, 3H); H_{19 e 23} = 7,61 (*d*, 2H); H_{3, 4, 5 e 6} = 7,80-7,89 (*m*, 4H); H₉ = 7,90 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₅ = 24,59; C₂₆ = 26,09; C₂₈ = 28,50; C₂₄ = 37,13; C₁₆ = 54,51; C₂₇ = 67,26; C₁₅ = 109,22; C₁₂ = 111,54; C₁₁ = 121,32; C_{3 e 6} = 123,04; C_{20 e 22} = 127,25; C₁₀ = 127,71; C_{19 e 23} = 129,31; C₂₁ = 129,78; C_{2 e 7} = 131,66; C_{4 e 5} = 134,40; C₁₈ = 135,79; C₉ = 139,81; C₁₄ = 148,00; C₁₃ = 150,23; C_{1 e 8} = 168,06; C₁₇ = 169,79.

(E)-N'-(3-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-4-metoxibenzilideno)-N-metil-benzoidrazida (66c)



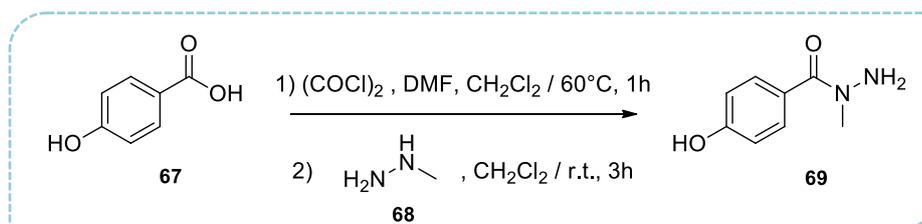
O composto 66c foi obtido como um sólido branco em 89% de rendimento e com ponto de fusão de 143°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ = 1,32-1,43 (*m*, 2H); H₂₅ e 27 = 1,60-1,75 (*m*, 4H); H₂₉ = 3,46 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,61 (*t*, 2H); H₁₆ e 28 = 3,72 (*sl*, 5H); H₁₂ = 6,93 (*d*, *J*=8,51Hz, 1H); H₁₅ = 7,00 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,06 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H_{20, 21} e 22 = 7,37-7,49 (*m*, 3H); H₁₉ e 23 = 7,59 (*d*, 2H); H_{3, 4, 5} e 6 = 7,83-7,8 (*m*, 4H); H₉ = 7,90 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₆ = 22,73; C₂₇ = 27,72; C₂₅ = 28,21; C₂₉ = 28,47; C₂₄ = 37,33; C₁₆ = 55,49; C₂₈ = 67,53; C₁₅ = 108,87; C₁₂ = 111,49; C₁₁ = 121,32; C₃ e 6 = 123,05; C₂₀ e 22 = 127,20; C₁₀ = 127,74; C₁₉ e 23 = 129,28; C₂₁ = 129,70; C₂ e 7 = 131,62; C₄ e 5 = 134,44; C₁₈ = 135,83; C₉ = 139,76; C₁₄ = 148,10; C₁₃ = 150,17; C₁ e 8 = 168,04; C₁₇ = 169,81.

(E)-N'-(3-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-4-metoxibenzilideno)-N-metil-benzoidrazida (66d)



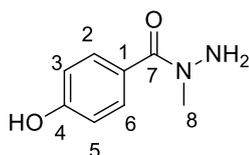
O composto 66d foi obtido como um sólido branco em 82% de rendimento e com ponto de fusão de 127°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₆ e 27 = 1,27-1,46 (*m*, 4H); H₂₅ e 28 = 1,57-1,72 (*m*, 4H); H₃₀ = 3,46 (*s*, 3H); H₂₄ = 3,59 (*t*, 2H); H₁₆ e 29 = 3,68-3,82 (*m*, 5H); H₁₂ = 6,94 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₅ = 7,01 (*s*, 1H); H₁₁ = 7,06 (*d*, 1H); H_{20, 21} e 22 = 7,38-7,52 (*m*, 3H); H₁₉ e 23 = 7,60 (*d*, 2H); H_{3, 4, 5} e 6 = 7,82-7,87 (*m*, 4H); H₉ = 7,90 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₇ = 25,03; C₂₆ = 25,99; C₂₈ = 27,95; C₂₅ = 28,41; C₃₀ = 28,48; C₂₄ = 37,37; C₁₆ = 55,51; C₂₉ = 67,70; C₁₅ = 108,95; C₁₂ = 111,48; C₁₁ = 121,33; C₃ e 6 = 123,02; C₂₀ e 22 = 127,20; C₁₀ = 127,72; C₁₉ e 23 = 129,30; C₂₁ = 129,70; C₂ e 7 = 131,64; C₄ e 5 = 134,39; C₁₈ = 135,83; C₉ = 139,79; C₁₂ = 148,13; C₁₃ = 150,21; C₁ e 8 = 168,00; C₁₇ = 169,79.

3.1.1.8) Síntese da *N*-metil-hidrazida hidroxilada da série C (BENSTEAD *et al.*, 2005)



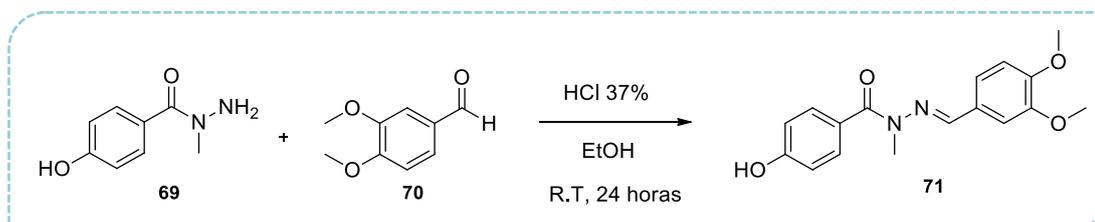
Em um tubo de borosilicato reforçado foram adicionados 3,6mmol de ácido 4-hidroxibenzóico (**67**), 11mmol de cloreto de oxalila, 16mL de diclorometano e 4 gotas de DMF. A reação foi selada e deixada em atmosfera inerte e agitação constante por 1 hora à 60°C. Após o término da reação, evaporou-se o solvente e traços de cloreto de oxalila em rotaevaporador. Posteriormente, preparou-se uma solução do resíduo bruto obtido anteriormente em 25mL de diclorometano, que foi mantida sob agitação à 0°C. À esta foi gotejada lentamente uma solução de 21,7mmol de metilidrazina (**68**) em 15mL de diclorometano. A reação foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente. Evaporou-se o solvente da reação e o produto obtido foi purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila (50-100%) como eluente.

4-hidroxi-*N*-metilbenzoidrazida (**69**)



O composto 69 foi obtido como um sólido bege em 54% de rendimento e com ponto de fusão de 155°C. RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm): H₈ = 3,12 (s, 3H); H_{NH2} = 4,83 (sl, 2H); H_{3 e 5} = 6,73 (d, 2H); H_{2 e 6} = 7,44 (d, 2H); H_{OH} = 9,51 (sl, 1H).

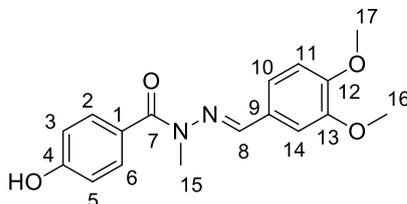
3.1.1.9) Síntese da *N*-metil-NAH hidroxilada da série C (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998)



Em um tubo de borosilicato reforçado foram adicionados 7mL de etanol, 0,93mmol de hidrazida metilada (**69**) e 2 gotas de HCl 37%. Agitou-se a solução por 5 minutos. Adicionou-

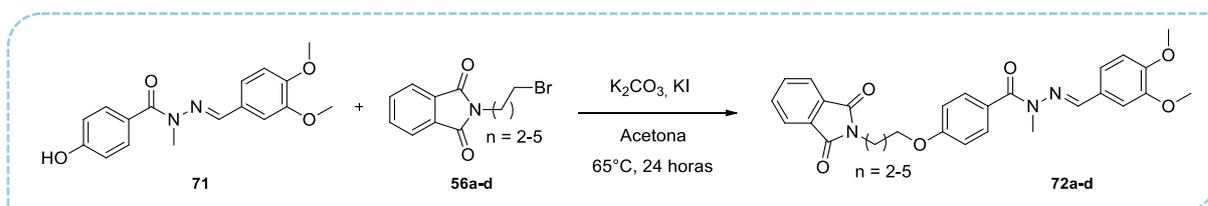
se 1,02mmol de 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**) e a reação foi mantida à temperatura ambiente com agitação por 24h. Evaporou-se parte do solvente em rotaevaporador e o produto formado foi precipitado em água com gelo. Este foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-hidroxi-N-metilbenzohidrazida (71)



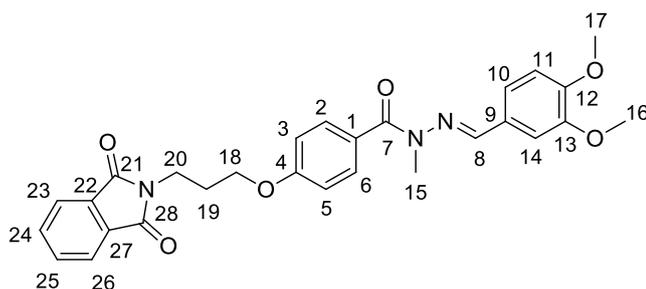
O composto **71** foi obtido como um sólido amarelo em 63% de rendimento e com ponto de fusão de 210°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₁₅ = 3,44 (s, 3H); H₁₆ = 3,70 (s, 3H); H₁₇ = 3,77 (s, 3H); H_{3 e 5} = 6,81 (d, J=8,78Hz, 2H); H₁₁ = 6,99 (d, J=8,28Hz, 1H); H₁₀ = 7,13 (d, 1H); H₁₄ = 7,17 (s, 1H); H_{2 e 6} = 7,61 (d, J=8,78Hz, 2H); H₈ = 7,90 (s, 1H); H_{OH} = 9,96 (s, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₁₅ = 28,73; C₁₆ = 55,05; C₁₇ = 55,53; C₁₁ = 108,32; C₁₄ = 111,47; C_{3 e 5} = 113,83; C₁₀ = 121,13; C₁ = 125,50; C₉ = 128,00; C_{2 e 6} = 132,26; C₈ = 139,29; C₁₃ = 148,86; C₁₂ = 149,99; C₄ = 159,39; C₇ = 169,05.

3.1.1.10 Síntese das N-metil-NAHs O-alkiladas da série C (LIU *et al.*, 2013)



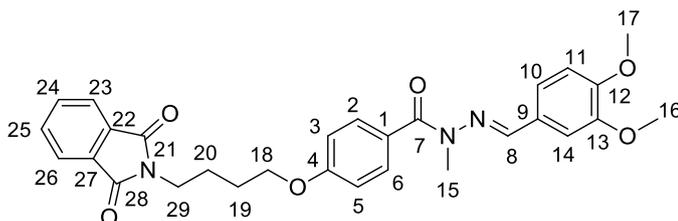
Em um tubo de borosilicado reforçado foram adicionados 0,48mmol de hidrazona (**71**), 0,71mmol de carbonato de potássio, 0,05mmol de iodeto de potássio e 5mL de acetona. A reação foi aquecida à 65°C sob agitação. Adicionou-se 0,62mmol de ftalimida alquilada (**56a-d**), em pequenas porções, durante 1h. O tubo foi selado e a reação foi mantida à 65°C por 24h. Posteriormente, evaporou-se o solvente da reação. O produto obtido foi solubilizado em diclorometano (50mL) e lavado através de extração com água alcalina (pH = 12). Evaporou-se o solvente da fase orgânica em rotaevaporador.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-(3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)propoxi)-N-metilbenzohidrazida (72a)



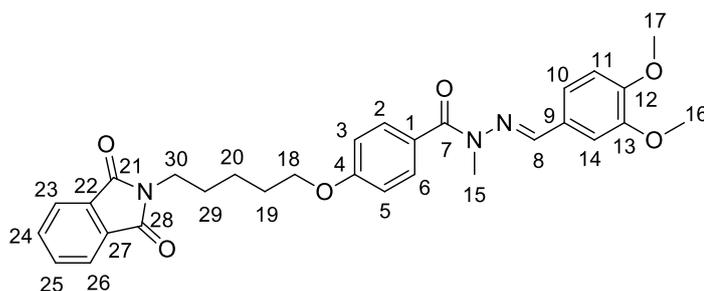
O composto 72a foi obtido como um sólido amarelo em 94% de rendimento e com ponto de fusão de 147°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 2,08 (*quin*, 2H); H₁₅ = 3,45 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,67 (*s*, 3H); H₁₇ = 3,77 (*s*, 3H); H₂₀ = 3,78 (*t*, 2H); H₁₈ = 4,07 (*t*, 2H); H_{3 e 5} = 6,87 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H₁₁ = 6,98 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H₁₀ = 7,11 (*d*, 1H); H₁₄ = 7,13 (*s*, 1H); H_{2 e 6} = 7,64 (*d*, *J*=9,14Hz, 2H); H_{23, 24, 25 e 26} = 7,81-7,88 (*m*, 4H); H₈ = 7,92 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{15, 16, 17, 18, 19 e 20} = não foram observados; C₁₁ = 108,72; C₁₄ = 111,92; C_{3 e 5} = 113,32; C₁₀ = 121,64; C_{23 e 26} = 123,47; C₁ = 127,68; C₉ = 128,35; C_{22 e 27} = 132,23; C_{2 e 6} = 132,38; C_{24 e 25} = 134,81; C₈ = 140,05; C₁₃ = 149,33; C₁₂ = 150,48; C₄ = 160,41; C_{21 e 28} = 168,49; C₇ = 169,34.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-(4-(1,3-dioxoisindolin-2-il)butoxi)-N-metilbenzohidrazida (72b)



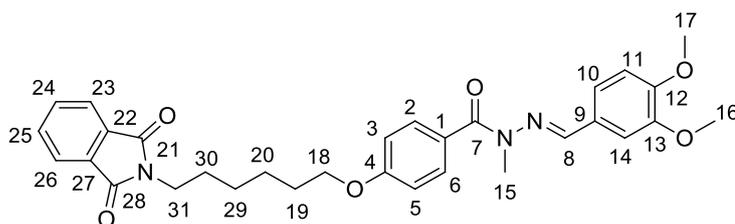
O composto 72b foi obtido como um sólido amarelo em 93% de rendimento e com ponto de fusão de 134°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{20 e 19} = 1,73-1,79 (*m*, 4H); H₁₅ = 3,45 (*s*, 3H); H₂₉ = 3,65 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,69 (*s*, 3H); H₁₇ = 3,76 (*s*, 3H); H₁₈ = 4,04 (*t*, 2H); H_{3, 5 e 11} = 6,95-7,00 (*m*, 3H); H_{10 e 14} = 7,10-7,15 (*m*, 2H); H_{2 e 6} = 7,67 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H_{23, 24, 25 e 26} = 7,81-7,88 (*m*, 4H); H₈ = 7,92 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{15, 18, 19, 20 e 29} = não foram observados; C₁₆ = 55,02; C₁₇ = 55,51; C₁₁ = 108,27; C₁₄ = 111,45; C_{3 e 5} = 112,97; C₁₀ = 121,15; C_{23 e 26} = 123,01; C₁ = 127,16; C₉ = 127,89; C_{22 e 27} = 131,64; C_{2 e 6} = 131,96; C_{24 e 25} = 134,37; C₈ = 139,55; C₁₃ = 148,86; C₁₂ = 150,01; C₄ = 160,05; C_{21 e 28} = 168,03; C₇ = 168,88.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenilideno)-4-((5-(1,3-dioxoisindolin-2-il)pentil)oxi)-N-metilbenzohidrazida (72c)



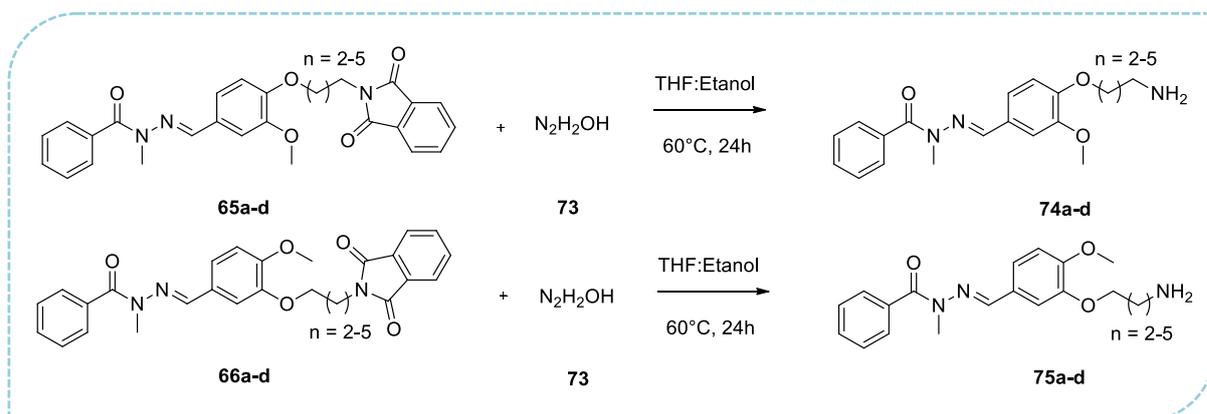
O composto 72c foi obtido como um sólido amarelo em 87% de rendimento e com ponto de fusão de 130°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{20, 19 e 29} = 1,58-1,85 (*m*, 6H); H₁₅ = 3,45 (*s*, 3H); H₃₀ = 3,61 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,68 (*s*, 3H); H₁₇ = 3,77 (*s*, 3H); H₁₈ = 4,00 (*t*, 2H); H_{3, 5 e 11} = 6,95-7,00 (*m*, 3H); H_{10 e 14} = 7,11-7,15 (*m*, 2H); H_{2 e 6} = 7,66 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H_{23, 24, 25 e 26} = 7,81-7,88 (*m*, 4H); H₈ = 7,92 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{15, 16, 17, 18, 19, 20, 29 e 30} = não foram observados; C₁₁ = 108,28; C₁₄ = 111,47; C_{3 e 5} = 112,94; C₁₀ = 121,14; C_{23 e 26} = 123,02; C₁ = 127,09; C₉ = 127,90; C_{22 e 27} = 131,60; C_{2 e 6} = 131,96; C_{24 e 25} = 134,39; C₈ = 139,54; C₁₃ = 148,86; C₁₂ = 150,01; C₄ = 160,11; C_{21 e 28} = 167,99; C₇ = 168,90.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenilideno)-4-((6-(1,3-dioxoisindolin-2-il)hexil)oxi)-N-metilbenzohidrazida (72d)



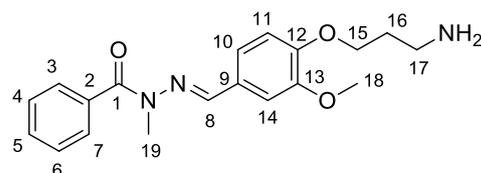
O composto 72d foi obtido como um sólido amarelo em 64% de rendimento e com ponto de fusão de 114°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{20, 19, 29 e 30} = 1,53-1,82 (*m*, 8H); H₁₅ = 3,45 (*s*, 3H); H₃₁ = 3,58 (*t*, 2H); H₁₆ = 3,68 (*s*, 3H); H₁₇ = 3,76 (*s*, 3H); H₁₈ = 3,99 (*t*, 2H); H_{3, 5 e 11} = 6,95-6,99 (*m*, 3H); H_{10 e 14} = 7,11-7,14 (*m*, 2H); H_{2 e 6} = 7,66 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H_{23, 24, 25 e 26} = 7,80-7,88 (*m*, 4H); H₈ = 7,92 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{15, 18, 19, 20, 29, 30, 31} = não foram observados; C₁₆ = 54,97; C₁₇ = 55,51; C₁₁ = 108,26; C₁₄ = 111,44; C_{3 e 5} = 112,92; C₁₀ = 121,14; C_{23 e 26} = 122,99; C₁ = 127,06; C₉ = 127,89; C_{22 e 27} = 131,60; C_{2 e 6} = 131,95; C_{24 e 25} = 134,35; C₈ = 139,52; C₁₃ = 148,84; C₁₂ = 150,00; C₄ = 160,14; C_{21 e 28} = 167,97; C₇ = 168,90.

3.1.1.11) Síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas das séries A e B (LIU *et al.*, 2013)



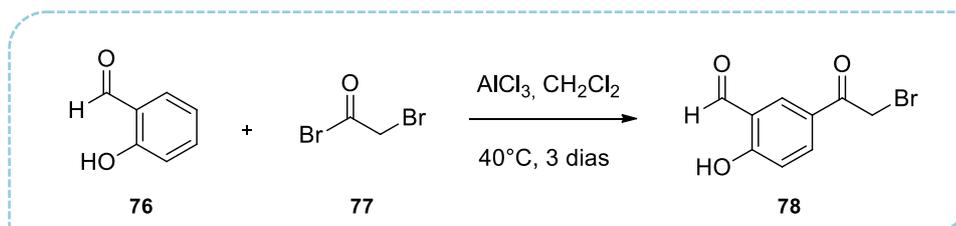
Em um tubo de borossilicato reforçado foram adicionados 0,6mmol das *N*-metil-NAHs sintetizadas anteriormente (**65a-d**, para obtenção da série A; e **66a-d**, para a obtenção da série B), 6mmol hidrato de hidrazina (**73**), 4,8mL de THF e 1,2mL de etanol. O tubo foi selado e a reação foi mantida em agitação por 24h à $60^\circ C$. Ao término da reação evaporou-se em rotaevaporador o solvente da reação. E o produto foi purificado através de coluna cromatográfica de fase reversa, utilizando metanol e água (5-10%) como eluente.

(*E*)-*N'*-(4-(3-aminopropoxi)-3-metoxibenzilideno)-*N*-metilbenzohidrazida (**74a**)



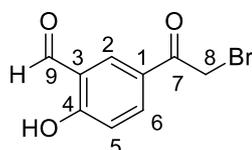
O composto **74a** foi obtido como um óleo marrom em 40% de rendimento. **RMN 1H (500 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $H_{16} = 1,78$ (*quin*, 2H); $H_{17} = 2,69$ (*t*, 2H); $H_{19} = 3,47$ (*s*, 3H); $H_{18} = 3,63$ (*t*, 3H); $H_{15} = 4,02$ (*t*, 2H); $H_{11} = 6,96$ (*d*, $J=8,20$ Hz, 1H); H_{10} e $H_{14} = 7,04-7,09$ (*m*, 2H); $H_{4, 5}$ e $H_6 = 7,43-7,49$ (*m*, 3H); H_{3} e $H_7 = 7,63$ (*dd*, $J=7,88, 1,58$ Hz, 2H); $H_8 = 7,93$ (*s*, 1H). **RMN ^{13}C (125 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $C_{19} = 28,52$; $C_{17} = 38,24$; $C_{18} = 55,02$; $C_{15} = 66,24$; $C_{14} = 108,32$; $C_{11} = 112,36$; $C_{10} = 121,24$; C_{3} e $C_7 = 127,22$; $C_9 = 127,65$; C_{4} e $C_6 = 129,37$; $C_5 = 129,81$; $C_2 = 135,73$; $C_8 = 139,94$; $C_{13} = 148,94$; $C_{12} = 149,50$; $C_1 = 169,72$.

3.1.1.12) Síntese do salicilaldeído acilado para o bloco do salmeterol (LIU *et al.*, 2008)



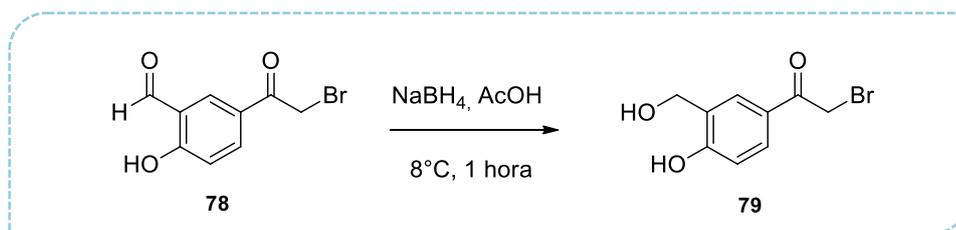
Em um balão de fundo redondo de 50mL foram adicionados 65,5mmol de cloreto de alumínio anidro e 20mL de diclorometano. A suspensão foi mantida sob agitação à aproximadamente 10°C sob agitação. Adicionou-se gota a gota uma solução previamente preparada de 19,6mmol de brometo de bromoacetila (77) em 2,5mL de diclorometano. Após 1 hora de reação à temperatura ambiente foi adicionada, gota a gota, uma solução de 16,4mmol de salicilaldeído (76) em 2,5mL de diclorometano. A adição foi realizada de forma extremamente lenta, de modo a esperar o desaparecimento da coloração amarela observada a cada gotejamento. A reação foi mantida sob refluxo e agitação por 3 dias à 40°C. Esta foi finalizada com a adição de 50mL de água com gelo picado. A solução ficou em agitação por 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente, foi extraída com diclorometano (2 x 50mL). A fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador e o produto obtido foi purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

5-(2-bromoacetil)-2-hidroxi-benzaldeído (78)



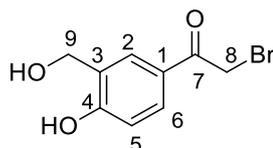
O composto 78 foi obtido como um sólido bege em 51% de rendimento. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₈ = 4,41 (*s*, 2H); H₅ = 7,10 (*d*, *J*=8,78Hz, 1H); H₆ = 8,18 (*dd*, *J*=8,78, 2,26Hz, 1H); H₂ = 8,31 (*d*, *J*=2,26Hz, 1H); H_{OH} = 10,00 (*s*, 1H); H₉ = 11,53 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₈ = 29,84; C₅ = 118,48; C₃ = 120,12; C₁ = 126,24; C₂ = 135,77; C₆ = 137,21; C₄ = 165,70; C₇ = 188,96; C₉ = 196,25.

3.1.1.13) Síntese do derivado 2-(hidroximetil)fenólico para o bloco do salmeterol (LIU *et al.*, 2008)



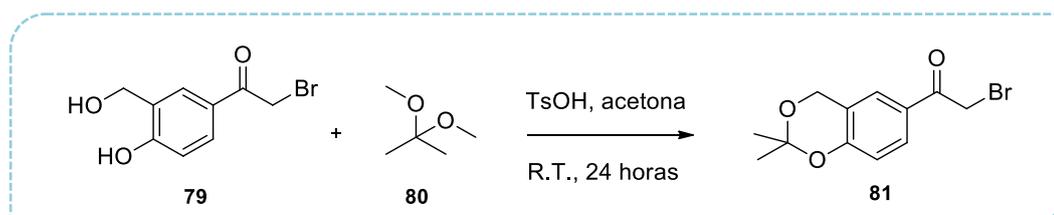
Em um balão de fundo redondo de 100mL foram adicionados 8,4mmol do salicilaldeído acilado (**78**) e 40mL de ácido acético glacial. A reação foi mantida à 8°C com agitação constante e adicionou-se 16,8mmol de boroidreto de sódio em quatro porções durante 1 hora. A reação foi finalizada, após 30 minutos de agitação à temperatura ambiente, com a adição de 40mL de água destilada. A mesma foi neutralizada com solução saturada de carbonato de potássio e extraída com acetato de etila (3 x 50mL). A fase orgânica foi lavada com solução salina de cloreto de sódio e evaporada em rotaevaporador. O produto obtido não necessitou de purificação posterior.

2-bromo-1-(4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil)etanona (**79**)



O composto **79** foi obtido como um óleo amarelo em 96% de rendimento. **RMN ^1H (400 MHz) DMSO / TMS (δ -ppm):** $\text{H}_8 = 4,49$ (s, 2H); $\text{H}_9 = 4,76$ (s, 2H); $\text{H}_5 = 6,87$ (d, $J=8,28\text{Hz}$, 1H); $\text{H}_6 = 7,79$ (dd, $J=8,53, 2,26\text{Hz}$, 1H); $\text{H}_2 = 7,98$ (d, 1H); $\text{H}_{\text{OH}} = 10,57$ (s, 1H).

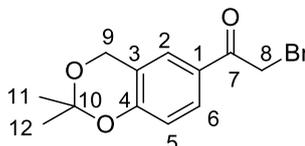
3.1.1.14) Síntese do produto protegido para o bloco do salmeterol (LIU *et al.*, 2008)



Em um balão de fundo redondo de 100mL foram adicionados 8,05mmol do álcool obtido anteriormente (**79**), 40,2mmol de 2,2-dimetoxipropano (**80**), 0,80mmol de ácido *p*-toluenosulfônico monoidratado e 40mL de acetona. A reação foi mantida em agitação

constante por 1 dia à temperatura ambiente. Ao término desta, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e o produto obtido foi extraído com acetato de etila (2 x 50mL) e água (50mL). A fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador e o produto obtido foi purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

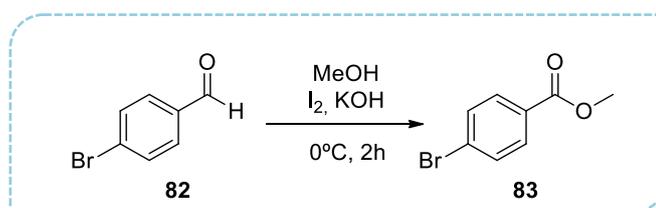
2-bromo-1-(2,2-dimetil-4H-benzo[d][1,3]dioxin-6-il)etanona (81)



O composto 81 foi obtido como um óleo amarelo em 68% de rendimento. **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{11 e 12} = 1,57 (*s*, 6H); H₈ = 4,39 (*s*, 2H); H₉ = 4,90 (*s*, 2H); H₅ = 6,88 (*d*, *J*=8,78Hz, 1H); H₂ = 7,70 (*d*, *J*=2,26Hz, 1H); H₆ = 7,82 (*dd*, *J*=8,78Hz, *J*=2,26Hz, 1H); **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{11 e 12} = 24,78; C₈ = 30,52; C₉ = 60,60; C₅ = 117,37; C₃ = 119,51; C₁ = 126,37; C₂ = 126,52; C₆ = 129,65; C₄ = 156,36; C₇ = 189,98.

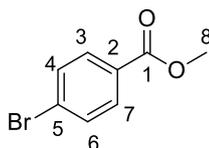
3.1.2) Síntese dos derivados das *N*-metil-NAHs *N*-arilados planejados como inibidores da PDE4

3.1.2.1) Síntese do 4-bromo-benzoato de metila (YAMADA *et al.*, 1992)



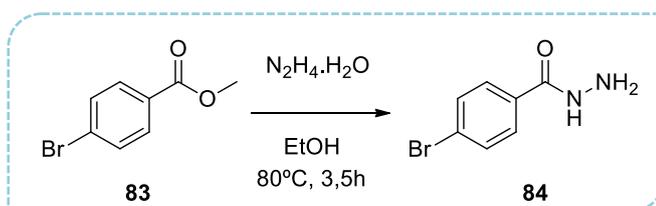
A uma solução de 13,0 mmol do aldeído (**82**) em 170 mL de MeOH, mantida à 0°C, adicionou-se seguidamente, uma solução de 39,0 mmol de KOH em 170 mL de MeOH e uma solução de I₂ (16,9 mmol) em 170 mL de MeOH. Após 2 horas de reação à 0°C adicionou-se ao meio reacional pequenas porções de solução aquosa saturada de NaHSO₃, até o total desaparecimento da coloração castanha. A purificação do produto foi realizada por redução do volume de solvente por evaporação à pressão reduzida e subsequente precipitação em gelo seguida de filtração em funil de Büchner.

4-bromobenzoato de metila (83)



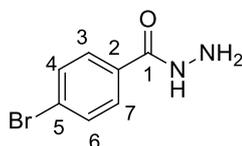
O composto 83 foi obtido como um sólido branco em 88% de rendimento. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₈ = 3,92 (*s*, 3H); H_{4 e 6} = 7,58 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H_{3 e 7} = 7,90 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₈ = 52,28; C₅ = 128,02; C₂ = 129,00; C_{4 e 6} = 131,09; C_{3 e 7} = 131,69; C₁ = 166,35.

3.1.2.2) Síntese da 4-bromo-benzil-hidrazida (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998)



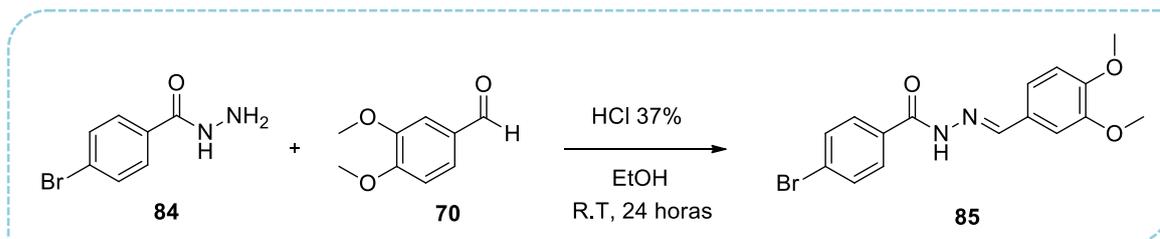
Em um balão de 50 mL foram colocados 15,0 mmol do éster metílico (83), 10 mL de EtOH e 7,5 mL (150 mmol) de hidrato de hidrazina à 98%. Em seguida foi acoplado um condensador de refluxo e a mistura reacional foi mantida sob refluxo à 80°C por 3,5h. Após redução do volume final sob pressão reduzida, a solução resultante foi vertida sobre uma mistura de gelo picado e água. O precipitado obtido foi isolado através de filtração em funil de Büchner e lavado com água gelada.

4-bromo-benzil-hidrazida (84)



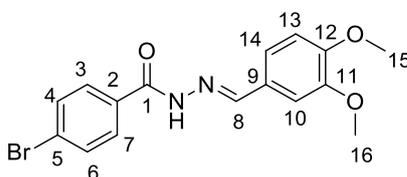
O composto 84 foi obtido como um sólido branco em 70% de rendimento e com ponto de ebulição de 162°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{NH₂-} = 5,00 (*sl*, 2H); H_{4 e 6} = 7,65 (*d*, *J*=7,88Hz, 2H); H_{3 e 7} = 7,76 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H); H_{NH-} = 9,95 (*sl*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{4 e 6} = 124,86; C₅ = 129,08; C₂ = 131,42; C_{3 e 7} = 132,23; C₁ = 164,87.

3.1.2.3) Síntese da 4-bromo-*N*-acilidrazona (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998)



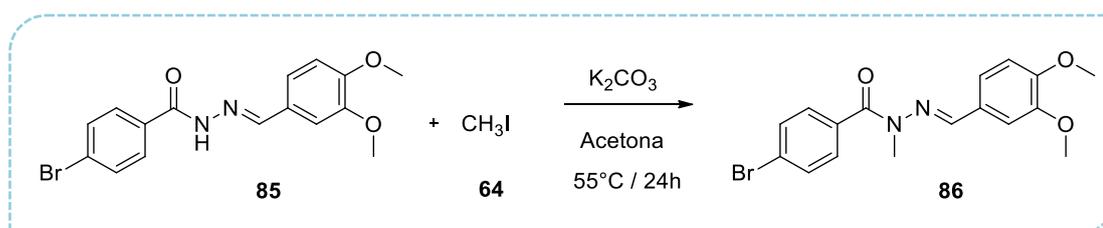
Em um tubo de borosilicato reforçado foram adicionados 7mL de etanol, 0,93mmol de hidrazida (**84**) e 2 gotas de HCl 37%. Agitou-se a solução por 5 minutos. Adicionou-se 1,02mmol de 3,4-dimetoxialdeído (**70**) e a reação foi mantida à temperatura ambiente e com agitação por 24h. Evaporou-se parte do solvente em rotaevaporador e o produto formado foi precipitado em água com gelo. Este foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

(*E*)-4-bromo-*N'*-(3,4-dimetoxibenzilideno)benzohidrazida (**85**)



O composto **85** foi obtido como um sólido branco em 86% de rendimento e com ponto de ebulição de 210°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{15 e 16} = 3,81 (*sl*, 6H); H₁₃ = 7,03 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H) H₁₄ = 7,21 (*dd*, *J*=8,35Hz, *J*=1,73Hz, 1H); H₁₀ = 7,34 (*d*, *J*=1,58Hz, 1H); H_{4 e 6} = 7,75 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H); H_{3 e 7} = 7,86 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H); H₈ = 8,38 (*s*, 1H); H_{NH} = 11,82 (*s*, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₁₅ = 55,46; C₁₆ = 55,58; C₁₃ = 108,21; C₁₀ = 111,47; C₁₄ = 121,99; C₅ = 125,40; C₉ = 126,91; C_{4 e 6} = 129,69; C_{3 e 7} = 131,50; C₂ = 132,64; C₈ = 148,36; C₁₁ = 149,07; C₁₂ = 150,84; C₁ = 162,00.

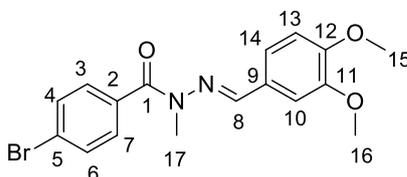
3.1.2.4) Síntese da 4-bromo-*N*-metil-*N*-acilidrazona (BARCO *et al.*, 1973)



Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,15mmol da *N*-acilidrazona preparada anteriormente (**85**), 0,4mmol de carbonato de potássio e 2mL de acetona. Agitou-se a solução por 5 minutos e, posteriormente, adicionou-se 0,4mmol de iodeto de metila (**64**). O

tubo foi selado e a reação foi mantida sob agitação constante por 24h à 55°C. Evaporou-se o solvente da reação em rotaevaporador. Em seguida, foram adicionados 2mL de etanol à reação e a mesma foi precipitada em uma solução bissulfito de sódio com gelo. O precipitado foi filtrado e lavado com água.

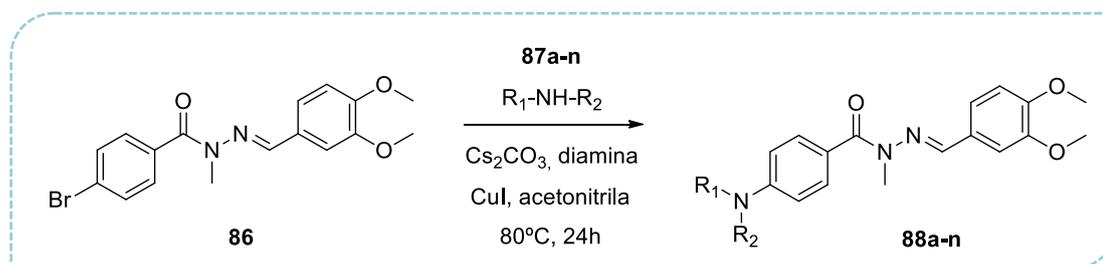
(E)-4-bromo-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metilbenzohidrazida (86)



O composto 86 foi obtido como um sólido branco em 91% de rendimento e com ponto de ebulição de 136°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,55 (s, 3H); H₁₅ = 3,79 (s, 3H); H₁₆ = 3,90 (s, 3H); H₁₃ = 6,85 (d, J=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,03 (d, 1H); H₁₀ = 7,05 (s, 1H); H_{4 e 6} = 7,55 (d, J=8,51Hz, 2H); H_{3 e 7} = 7,62 (d, J=8,51Hz, 2H); H₈ = 7,69 (s, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,54; C₁₅ = 55,50; C₁₆ = 55,91; C₁₃ = 107,80; C₁₀ = 110,63; C₁₄ = 121,66; C₅ = 124,39; C₉ = 127,65; C_{4 e 6} = 130,34; C_{3 e 7} = 131,48; C₂ = 134,41; C₈ = 138,89; C₁₁ = 149,30; C₁₂ = 150,61; C₁ = 169,97.

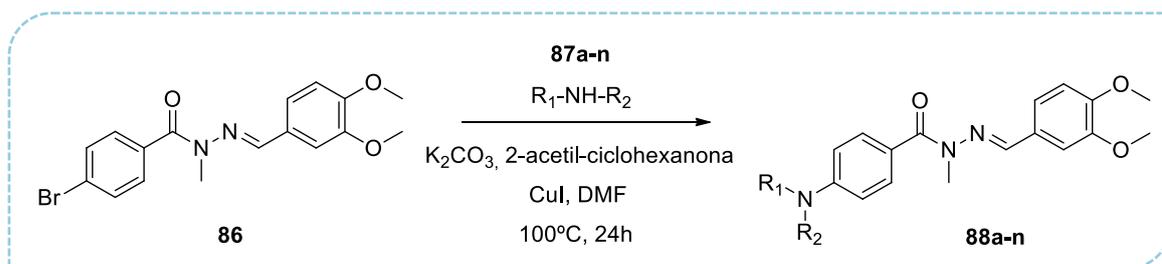
3.1.2.5) Síntese das N-metil-N-acilidrazonas N-ariladas

3.1.2.5.1) Metodologia 1 (SHE, *et al.*, 2016)



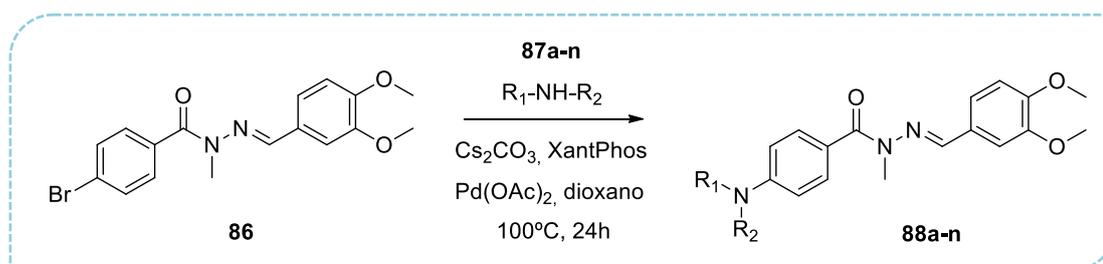
Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,100mmol das aminas (**87a-n**), 0,170mmol de carbonato de céσιο anidro e 0,008mmol de iodeto de cobre I. Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,016mmol de trans-1,2-ciclohexanodiamina (diamina) e 0,080mmol da N-metil-NAH preparada anteriormente (**86**) em 1mL de acetonitrila. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à 80°C por cerca de 24 horas.

3.1.2.5.2) Metodologia 2 (YANG *et al.*, 2010)



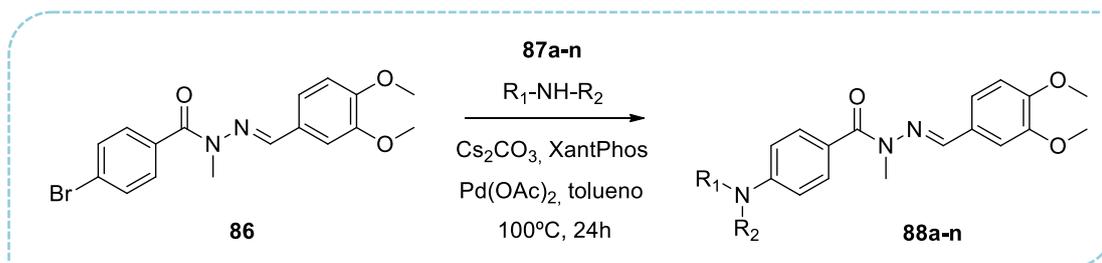
Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,120mmol das aminas (**87a-n**), 0,20mmol de carbonato de potássio anidro e 0,016mmol de iodeto de cobre I. Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,016mmol de 2-acetil-ciclohexanona e 0,080mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**) em 1mL de DMF. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à $100^\circ C$ por cerca de 24 horas.

3.1.2.5.3) Metodologia 3 (WITULSKI *et al.*, 2006)



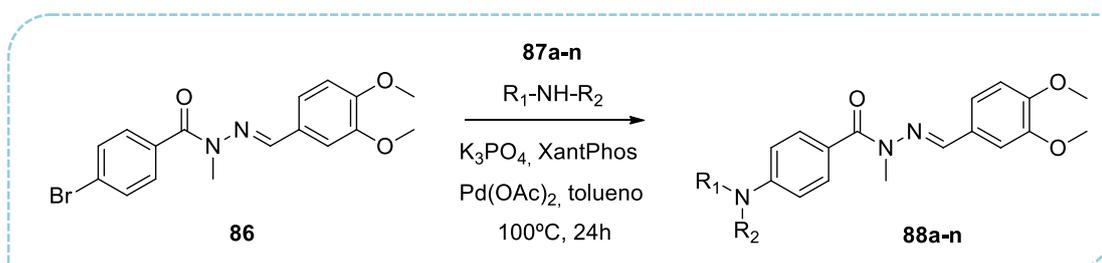
Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,080mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,120mmol de carbonato de céσιο anidro, 0,008mmol de 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (XantPhos) e 0,004mmol de acetato de paládio II ($Pd(OAc)_2$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,095mmol da amina (**87a-n**) em 1mL de 1,4-dioxano. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à $100^\circ C$ por cerca de 24 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

3.1.2.5.4) Metodologia 4 (WITULSKI *et al.*, 2006)



Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,080mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,120mmol de carbonato de céσιο anidro, 0,008mmol de 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (XantPhos) e 0,004mmol de acetato de paládio II ($Pd(OAc)_2$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,095mmol da amina (**87a-n**) em 1mL de tolueno. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à $100^\circ C$ por cerca de 24 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizadando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

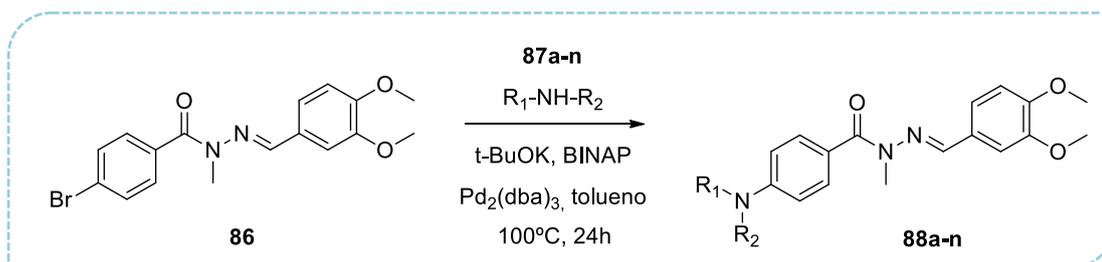
3.1.2.5.5) Metodologia 5 (WITULSKI *et al.*, 2006)



Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,080mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,120mmol de fosfato de potássio anidro, 0,008mmol de 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (XantPhos) e 0,004mmol de acetato de paládio II ($Pd(OAc)_2$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,095mmol da amina (**87a-n**) em 1mL de tolueno. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à $100^\circ C$ por cerca de 24 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil

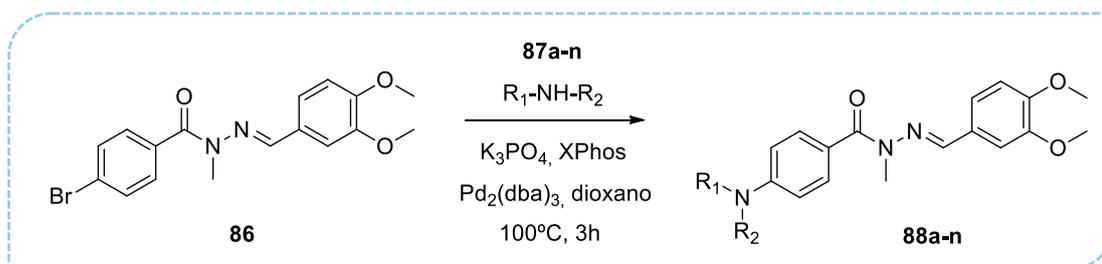
sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

3.1.2.5.6) Metodologia 6 (YANG *et al.*, 2005)



Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,080mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,120mmol de ter-butóxido de potássio anidro (t-BuOK), 0,008mmol de 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno (BINAP) e 0,004mmol de tris((1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona) di-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,095mmol da amina (**87a-n**) em 1mL de tolueno. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à 100°C por cerca de 24 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

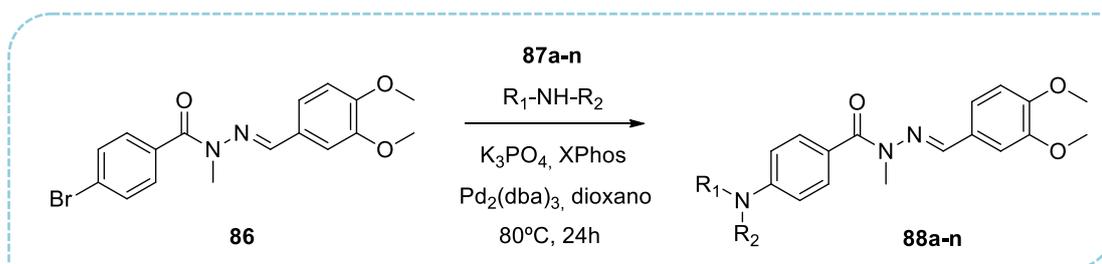
3.1.2.5.7) Metodologia 7 (JAMES *et al.*, 2013)



Em um tubo de borosilicato reforçado foi adicionado 0,27mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,53mmol de fosfato de potássio anidro, 0,027mmol de 2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenil (XPhos) e 0,013mmol de tris((1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona) di-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma

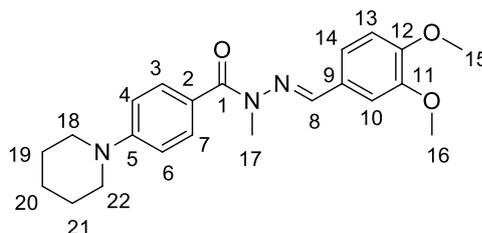
solução de 0,32mmol da amina (**87a-n**) em 3mL de 1,4-dioxano. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à 100°C por cerca de 3 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

3.1.2.5.8 Metodologia 8 (JAMES *et al.*, 2013)



Em um tubo de borossilicato reforçado foi adicionado 0,27mmol da *N*-metil-NAH preparada anteriormente (**86**), 0,53mmol de fosfato de potássio anidro, 0,027mmol de 2-diciclohexilfosfina-2',4',6'-triisopropilbifenil (XPhos) e 0,013mmol de tris((1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona) di-paládio ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$). Selou-se o tubo e trocou-se a atmosfera da reação por gás nitrogênio. Foi adicionado, com o auxílio de uma agulha e seringa, uma solução de 0,32mmol da amina (**87a-n**) em 3mL de 1,4-dioxano. Degasou-se, novamente com nitrogênio, a solução reacional, e a mesma permaneceu sob agitação constante à 80°C por cerca de 24 horas. A amina desejada (**88a-n**) foi isolada através de filtração do meio utilizando Celite como meio filtrante, funil sinterizado e kitassato. O filtrado foi evaporado sob pressão reduzida e purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, utilizando hexano e acetato de etila 30% como eluente.

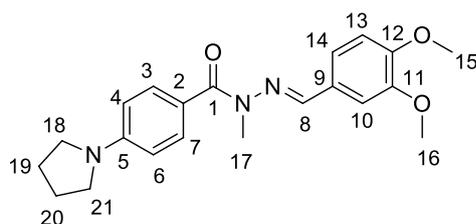
(*E*)-*N'*-(3,4-dimetoxibenzilideno)-*N*-metil-4-(piperidin-1-il)benzohidrazida (**88a**)



O composto 88a foi obtido como um sólido bege e com ponto de ebulição de 115°C. Os rendimentos obtidos para as diferentes metodologias avaliadas foram: 0% (metodologia 1), 0% (metodologia 2), 40% (metodologia 3), 53% (metodologia 4), 36% (metodologia 5), 38%

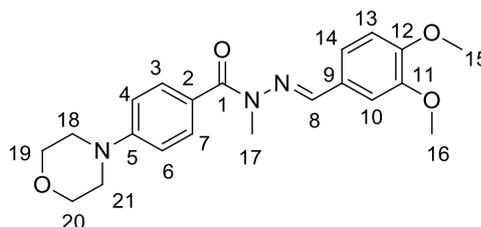
(metodologia 6), 90% (metodologia 7) e 60% (metodologia 8). **RMN ¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₂₀ = 1,65 (*m*, 2H); H_{19 e 21} = 1,70 (*m*, 4H); H_{18 e 22} = 3,28 (*s*, 4H); H₁₇ = 3,54 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,83 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,90 (*s*, 3H); H₁₃ = 6,85 (*d*, *J*=8,28Hz, 1H); H_{4 e 6} = 6,88 (*d*, *J*=9,03Hz, 2H); H₁₄ = 7,07 (*dd*, *J*=8,28Hz, *J*=2,01Hz, 1H); H₁₀ = 7,24 (*d*, *J*=2,01Hz, 1H); H₈ = 7,68 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,80 (*d*, *J*=9,03Hz, 2H). **RMN ¹³C (100 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂₁ = 24,32; C_{19 e 21} = 25,37; C₁₇ = 28,71; C_{18 e 22} = 49,26; C₁₅ = 55,54; C₁₆ = 55,87; C₁₃ = 107,93; C₁₀ = 110,57; C_{4 e 6} = 113,16; C₁₄ = 121,44; C₂ = 123,72; C₉ = 128,33; C_{3 e 7} = 132,36; C₈ = 137,62; C₁₁ = 149,17; C₁₂ = 150,15; C₅ = 153,04; C₁ = 170,24.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(pirrolidin-1-il)benzohidrazida (88b)



O composto 88b foi obtido como um sólido bege em 77% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 138°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{19 e 20} = 2,04 (*s*, 4H); H_{18 e 21} = 3,33 (*s*, 4H); H₁₇ = 3,54 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,86 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{4 e 6} = 6,52 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H); H₁₃ = 6,85 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H₁₄ = 7,08 (*d*, *J*=7,57Hz, 1H); H₁₀ = 7,30 (*s*, 1H); H₈ = 7,68 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,86 (*d*, *J*=8,20Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{19 e 20} = 25,41; C₁₇ = 28,91; C_{18 e 21} = 47,45; C₁₅ = 55,62; C₁₆ = 55,88; C₁₃ = 108,00; C_{4 e 6} = 109,61; C₁₀ = 110,58; C₂ = 120,59; C₁₄ = 121,42; C₉ = 128,53; C_{3 e 7} = 132,94; C₈ = 137,29; C₁₁ = 149,19; C₅ = 149,35; C₁₂ = 150,08; C₁ = 170,35.

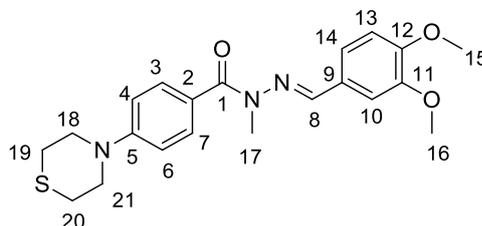
(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-morfolinobenzohidrazida (88c)



O composto 88c foi obtido como um sólido bege em 60% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 200°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{18 e 21} = 3,25 (*m*, 4H); H₁₇ = 3,55 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,83 (*s*, 3H); H_{19 e 20} = 3,89 (*m*, 4H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H₁₃ = 6,86 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H_{4 e 6} = 6,89 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H); H₁₄ = 7,08 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₀ = 7,21 (*s*, 1H); H₈ = 7,70 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,82 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125**

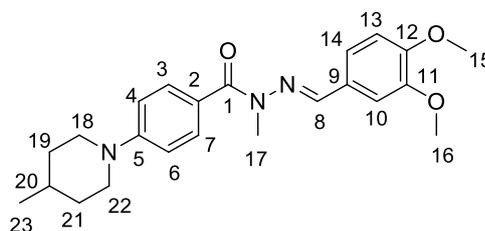
MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm): C₁₇ = 28,81; C_{18 e 21} = 48,26; C₁₅ = 55,59; C₁₆ = 55,93; C_{19 e 20} = 66,69; C₁₃ = 108,10; C₁₀ = 110,68; C_{4 e 6} = 112,96; C₁₄ = 121,47; C₂ = 125,45; C₉ = 128,24; C_{3 e 7} = 132,28; C₈ = 137,96; C₁₁ = 149,23; C₁₂ = 150,31; C₅ = 152,58; C₁ = 170,16.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-tiomorfolinobenzohidrazida (88d)



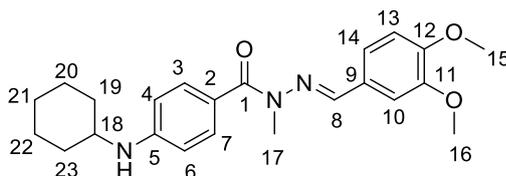
O composto 88d foi obtido como um sólido bege em 60% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 148°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{19 e 20} = 2,72 (*m*, 4H); H₁₇ = 3,54 (*s*, 3H); H_{18 e 21} = 3,71 (*m*, 4H); H₁₅ = 3,83 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{4, 6 e 13} = 6,85 (*m*, 3H); H₁₄ = 7,08 (*d*, *J*=6,90Hz, 1H); H₁₀ = 7,22 (*s*, 1H); H₈ = 7,69 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,81 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{19 e 20} = 25,89; C₁₇ = 28,81; C_{18 e 21} = 50,86; C₁₅ = 55,53; C₁₆ = 55,90; C₁₃ = 108,06; C₁₀ = 110,66; C_{4 e 6} = 113,60; C₁₄ = 121,44; C₂ = 124,52; C₉ = 128,21; C_{3 e 7} = 132,53; C₈ = 137,94; C₁₁ = 149,19; C₁₂ = 150,26; C₅ = 151,61; C₁ = 170,05.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(4-metilpiperidin-1-il)benzohidrazida (88e)



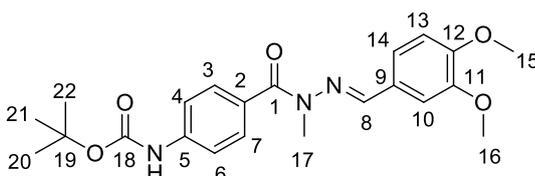
O composto 88e foi obtido como um sólido bege em 65% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 108°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₂₃ = 1,00 (*sl*, 3H); H_{19 e 21} = 1,33 (*sl*, 2H); H₂₀ = 1,61 (*sl*, 1H); H_{19 e 21} = 1,75 (*sl*, 2H); H_{18 e 22} = 2,82 (*sl*, 2H); H₁₇ = 3,56 (*sl*, 3H); H_{15, 18 e 22} = 3,86 (*sl*, 5H); H₁₆ = 3,93 (*s*, 3H); H_{4, 6 e 13} = 6,91 (*sl*, 3H); H₁₄ = 7,09 (*sl*, 1H); H₁₀ = 7,30 (*sl*, 1H); H₈ = 7,70 (*sl*, 1H); H_{3 e 7} = 7,82 (*sl*, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂₃ = 21,82; C₁₇ = 28,77; C₂₀ = 30,72; C_{19 e 21} = 33,59; C_{18 e 22} = 48,62; C₁₅ = 55,55; C₁₆ = 55,86; C₁₃ = 107,95; C₁₀ = 110,59; C_{4 e 6} = 113,15; C₁₄ = 121,45; C₂ = 123,71; C₉ = 128,35; C_{3 e 7} = 132,37; C₈ = 137,60; C₁₁ = 149,19; C₁₂ = 150,16; C₅ = 152,80; C₁ = 170,22.

(E)-4-(ciclohexilamino)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metilbenzohidrazida (88f)



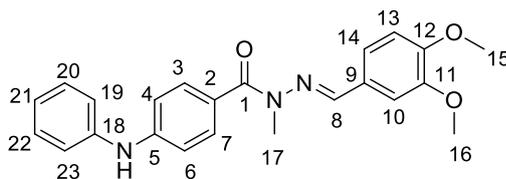
O composto 88f foi obtido como um sólido bege em 40% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 139°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{20 e 22} = 1,20 (*m*, 2H); H_{20 e 22} = 1,38 (*m*, 2H); H₂₁ = 1,68 (*m*, 2H); H_{19 e 23} = 1,78 (*m*, 2H); H_{19 e 23} = 2,06 (*m*, 2H); H₁₈ = 3,32 (*m*, 1H); H₁₇ = 3,54 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,85 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{4 e 6} = 6,55 (*d*, *J*=8,51Hz; 2H); H₁₃ = 6,86 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,08 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₀ = 7,28 (*s*, 1H); H₈ = 7,68 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,77 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{20 e 22} = 24,90; C₂₁ = 25,79; C₁₇ = 28,90; C_{19 e 23} = 32,22; C₁₈ = 51,36; C₁₅ = 55,59; C₁₆ = 55,92; C₁₃ = 107,99; C₁₀ = 110,61; C_{4 e 6} = 110,84; C₁₄ = 121,50; C₂ = 122,23; C₉ = 128,47; C_{3 e 7} = 132,99; C₈ = 137,45; C₁₁ = 149,25; C₁₂ = 149,37; C₅ = 150,18; C₁ = 170,24.

(E)-tert-butil(4-(2-(3,4-dimetoxibenzilideno)-1-metilhidrazinacarbonil)fenil)carbamato (88g)



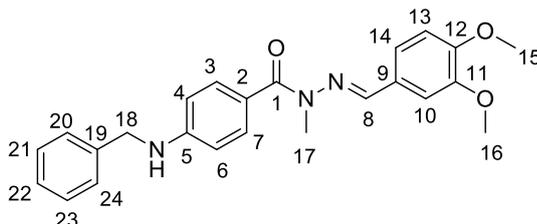
O composto 88g foi obtido como um sólido bege em 74% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 114°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H_{20, 21 e 22} = 1,54 (*s*, 9H); H₁₇ = 3,55 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,82 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,90 (*s*, 3H); H_{NH-} = 6,65 (*s*, 1H); H₁₃ = 6,85 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,05 (*dd*, *J*=8,20Hz, *J*=1,58Hz, 1H); H₁₀ = 7,16 (*d*, *J*=1,89Hz, 1H); H_{4 e 6} = 7,42 (*d*, *J*=8,51Hz; 2H); H₈ = 7,69 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,77 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C_{20, 21 e 22} = 28,26; C₁₇ = 28,67; C₁₅ = 55,81; C₁₆ = 55,90; C₁₃ = 108,02; C₁₀ = 110,63; C_{4 e 6} = 116,38; C₁₄ = 121,45; C₂ = 128,04; C₉ = 129,35; C_{3 e 7} = 131,52; C₈ = 138,31; C₅ = 140,29; C₁₁ = 149,30; C₁₂ = 150,39; C₁₈ = 152,29; C₁ = 170,18.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(fenilamino)benzohidrazida (88h)



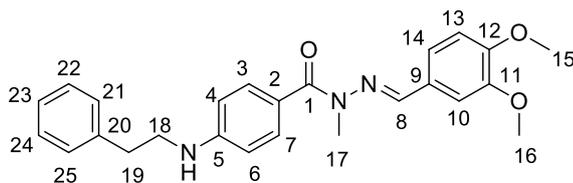
O composto 88h foi obtido como um sólido bege em 50% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 174°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,56 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,84 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{NH-} = 6,01 (*s*, 1H); H₁₃ = 6,86 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H_{20, 21 e 22} = 7,03 (*m*, 3H); H₁₄ = 7,08 (*d*, *J*=6,94Hz, 1H); H_{4 e 6} = 7,16 (*d*, *J*=7,57Hz; 2H); H₁₀ = 7,25 (*s*, 1H); H_{19 e 23} = 7,32 (*t*, *J*=7,72Hz, 2H); H₈ = 7,71 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,80 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,82; C₁₅ = 55,59; C₁₆ = 55,90; C₁₃ = 107,92; C₁₀ = 110,64; C_{4 e 6} = 114,31; C_{19 e 23} = 119,45; C₁₄ = 121,59; C₂₁ = 122,33; C₂ = 126,12; C₉ = 128,17; C_{20 e 22} = 129,39; C_{3 e 7} = 132,50; C₈ = 138,09; C₁₈ = 141,62; C₅ = 145,71; C₁₁ = 149,24; C₁₂ = 150,31; C₁ = 170,05.

(E)-4-(benzilamino)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metilbenzohidrazida (88i)



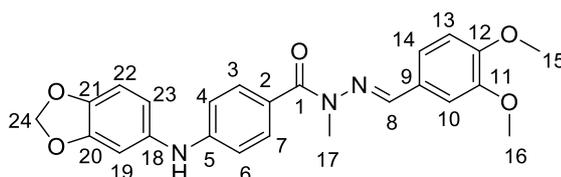
O composto 88i foi obtido como um sólido bege em 72% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 121°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,53 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,74 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,90 (*s*, 3H); H₁₈ = 4,39 (*s*, 2H); H_{4 e 6} = 6,60 (*d*, *J*=8,83Hz; 2H); H₁₃ = 6,85 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,06 (*dd*, *J*=8,20Hz, *J*=1,58Hz, 1H); H₁₀ = 7,24 (*d*, *J*=1,26Hz, 1H); H₂₂ = 7,29 (*m*, 1H); H_{20, 21, 23 e 24} = 7,37 (*m*, 4H); H₈ = 7,67 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,78 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,81; C₁₈ = 47,62; C₁₅ = 55,51; C₁₆ = 55,84; C₁₃ = 107,79; C₁₀ = 110,53; C_{4 e 6} = 110,66; C₁₄ = 121,50; C₂ = 123,05; C_{20 e 24} = 127,14; C₂₂ = 127,31; C₉ = 128,21; C_{21 e 23} = 128,65; C_{3 e 7} = 132,83; C₈ = 137,62; C₁₉ = 138,76; C₅ = 149,18; C₁₁ = 149,99; C₁₂ = 150,14; C₁ = 170,12.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(fenetilamino)benzohidrazida (88j)



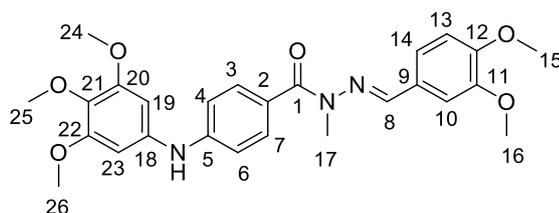
O composto 88j foi obtido como um sólido bege em 87% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 80°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₉ = 2,95 (*t*, *J*=6,94Hz, 2H); H₁₈ = 3,47 (*t*, *J*=6,94Hz, 2H); H₁₇ = 3,55 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,84 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,92 (*s*, 3H); H_{4 e 6} = 6,60 (*d*, *J*=8,83Hz; 2H); H₁₃ = 6,87 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,09 (*dd*, *J*=8,20Hz, *J*=1,89Hz, 1H); H_{21 e 25} = 7,24 (*d*, *J*=7,25Hz, 2H); H₁₀ = 7,26 (*sl*, 1H); H₂₃ = 7,28 (*sl*, 1H); H_{22 e 24} = 7,35 (*t*, *J*=7,57Hz, 2H); H₈ = 7,70 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,79 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,88; C₁₉ = 35,21; C₁₈ = 44,53; C₁₅ = 55,62; C₁₆ = 55,90; C₁₃ = 107,99; C₁₀ = 110,62; C_{4 e 6} = 110,72; C₁₄ = 121,46; C₂ = 122,98; C₂₃ = 126,55; C₉ = 128,37; C_{21 e 25} = 128,65; C_{22 e 24} = 128,70; C_{3 e 7} = 132,88; C₈ = 137,63; C₂₀ = 138,88; C₅ = 149,22; C₁₁ = 149,90; C₁₂ = 150,19; C₁ = 170,28.

(E)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilamino)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metilbenzohidrazida (88k)



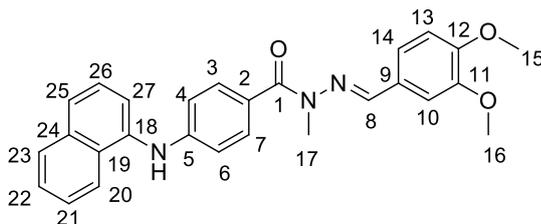
O composto 88k foi obtido como um sólido bege em 79% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 191°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,55 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,85 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{NH-} = 5,76 (*s*, 1H); H₂₄ = 5,98 (*s*, 2H); H₂₃ = 6,62 (*dd*, *J*=8,04Hz, *J*=2,05Hz, 1H); H₁₉ = 6,73 (*d*, *J*=1,89Hz, 1H); H₂₂ = 6,78 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H_{4, 6 e 13} = 6,87 (*m*, 3H); H₁₄ = 7,07 (*dd*, *J*=8,20Hz, *J*=1,58Hz, 1H); H₁₀ = 7,25 (*d*, *J*=1,26Hz, 1H); H₈ = 7,70 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,78 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,83; C₁₅ = 55,64; C₁₆ = 55,92; C₂₄ = 101,28; C₁₉ = 103,92; C₂₂ = 107,86; C₁₃ = 108,60; C₁₀ = 110,62; C_{4 e 6} = 113,12; C₂₃ = 114,89; C₁₄ = 121,62; C₂ = 125,25; C₉ = 128,26; C_{3 e 7} = 132,68; C₁₈ = 135,59; C₈ = 137,94; C₅ = 143,92; C₂₁ = 147,25; C₂₀ = 148,27; C₁₁ = 149,27; C₁₂ = 150,31; C₁ = 170,04.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-((3,4,5-trimetoxifenil)amino)benzohidrazida (88l)



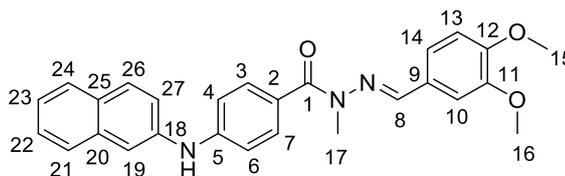
O composto 88l foi obtido como um sólido bege em 50% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 192°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,56 (*s*, 3H); H_{15, 16, 24, 25 e 26} = 3,75-4,00 (*m*, 15H); H_{NH-} = 5,86 (*sl*, 1H); H_{19 e 23} = 6,42 (*s*, 2H); H₁₃ = 6,86 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H_{4 e 6} = 6,99 (*d*, *J*=7,57Hz, 2H); H₁₄ = 7,09 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H₁₀ = 7,22 (*s*, 1H); H₈ = 7,71 (*s*, 1H); H_{3 e 7} = 7,81 (*d*, *J*=8,20Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,89; C₁₅ = 55,72; C₁₆ = 55,93; C_{24 e 26} = 56,14; C₂₅ = 61,05; C_{19 e 23} = 98,06; C₁₃ = 108,29; C₁₀ = 110,71; C_{4 e 6} = 114,10; C₁₄ = 121,43; C₂ = 125,99; C₉ = 128,16; C_{3 e 7} = 132,58; C₁₈ = 137,62; C₈ = 138,21; C₅ = 146,19; C₁₁ = 149,25; C₁₂ = 150,36; C_{20 e 22} = 153,85; C₁ = 170,05.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(naftalen-1-ilamino)benzohidrazida (88m)



O composto 88m foi obtido como um sólido bege em 88% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 163°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,54 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,69 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,89 (*s*, 3H); H_{NH-} = 6,17 (*s*, 1H); H_{4, 6 e 13} = 6,86 (*m*, 3H); H₁₄ = 7,05 (*d*, *J*=7,57Hz, 1H); H₁₀ = 7,22 (*s*, 1H); H_{21, 22, 26 e 27} = 7,48 (*m*, 4H); H_{8 e 25} = 7,68 (*s*, 2H); H_{3 e 7} = 7,79 (*d*, *J*=7,25Hz, 2H); H₂₃ = 7,90 (*d*, *J*=6,94Hz, 1H); H₂₀ = 8,02 (*d*, *J*=7,25Hz, 1H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,78; C₁₅ = 55,49; C₁₆ = 55,87; C₁₃ = 107,80; C₁₀ = 110,56; C_{4 e 6} = 113,69; C₂₇ = 119,45; C₁₄ = 121,58; C₂₅ = 122,15; C₂₀ = 124,85; C₂ = 125,39; C₂₁ = 125,84; C₂₂ = 126,06; C₂₆ = 126,29; C₉ = 128,21; C₂₃ = 128,52; C₁₉ = 128,95; C_{3 e 7} = 132,60; C₂₄ = 134,69; C₁₈ = 137,18; C₈ = 137,91; C₅ = 147,89; C₁₁ = 149,20; C₁₂ = 150,25; C₁ = 170,06.

(E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-N-metil-4-(naftalen-2-ilamino)benzohidrazida (88n)



O composto 88n foi obtido como um sólido bege em 73% de rendimento (metodologia 7) e com ponto de ebulição de 181°C. **RMN ¹H (500 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 3,57 (*s*, 3H); H₁₅ = 3,85 (*s*, 3H); H₁₆ = 3,91 (*s*, 3H); H_{NH} = 6,15 (*sl*, 1H); H₁₃ = 6,87 (*d*, *J*=8,20Hz, 1H); H₁₄ = 7,09 (*dd*, *J*=8,20Hz, *J*=1,89Hz, 1H); H_{4 e 6} = 7,12 (*d*, *J*=8,83Hz, 2H); H₁₀ = 7,26 (*d*, *J*=1,58Hz, 1H); H₂₁ = 7,30 (*dd*, *J*=8,51Hz, *J*=2,21Hz, 1H); H₂₃ = 7,37 (*t*, *J*=6,94Hz, 1H); H₂₂ = 7,45 (*t*, *J*=6,94Hz, 1H); H₁₉ = 7,56 (*d*, *J*=2,21Hz, 1H); H₂₇ = 7,70 (*d*, *J*=7,88Hz, 1H); H₈ = 7,72 (*s*, 1H); H_{24 e 26} = 7,79 (*m*, 2H); H_{3 e 7} = 7,84 (*d*, *J*=8,51Hz, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 28,83; C₁₅ = 55,65; C₁₆ = 55,91; C₁₃ = 108,00; C₁₀ = 110,67; C₁₉ = 114,16; C_{4 e 6} = 114,73; C₂₇ = 120,82; C₁₄ = 121,59; C₂₃ = 124,18; C₂ = 126,58; C₂₁ = 126,62; C₂₂ = 126,65; C₂₄ = 127,68; C₉ = 128,16; C₂₆ = 129,30; C₂₅ = 129,75; C_{3 e 7} = 132,54; C₂₀ = 134,37; C₈ = 138,20; C₁₈ = 139,29; C₅ = 145,54; C₁₁ = 149,27; C₁₂ = 150,36; C₁ = 170,05.

3.2) Metodologia de avaliação de atividade biológica

A avaliação da atividade biológica dos compostos planejados neste trabalho foi realizada em parceria com o CEREP, uma empresa do grupo Eurofins, com sede na França, segundo metodologia própria. Selecionou-se a isoforma PDE4B1 como modelo de inibição e a atividade enzimática foi determinada, de forma indireta, através da quantificação de AMPc (1) no meio (0,5 μM) após 20 minutos de incubação da enzima com os compostos em questão (10 μM), à temperatura ambiente. Cabe ressaltar que estes foram dissolvidos em DMSO, a uma concentração final de 1% e o controle negativo utilizado foi o Ro-20-1724 (4-(3-Butoxi-4-metoxibenzil)imidazolidin-2-ona) com CI₅₀ = 0,34 μM (CEREP, 2018).

3.3) Metodologia para os estudos de ancoramento molecular

Para a realização do estudo de ancoramento molecular (docking), foram utilizados dois modelos distintos: com o sítio catalítico da isoforma PDE4B de código 5LAQ e resolução de 2,4 Å, cocrystalizado com o composto NPD001 (89, Figura 22), para os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos das séries A, B e C (BLAAZER *et al.*, 2018).; e com o sítio catalítico da

PDE4D, de código 1XOR e resolução de 1,5 Å, cocrystalizado com a zardaverina (**15**), para os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos da série D (CARD *et al.*, 2004).

As estruturas dos compostos planejados foram construídas no programa Spartan Pro, versão 14.0, e otimizadas utilizando-se o método semi-empírico Parameterization Method 6 (PM6).

Os compostos planejados foram submetidos ao estudo de docking com a PDE4 utilizando-se o programa GOLD, versão 5.1 (CCDC) em dois modelos distintos: com corte de 10 Å a partir do resíduo de Phe618, com a função GoldScore, determinada após experimento de redocking entre a enzima e o composto cocrystalizado **89**, para os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos das séries A, B e C; e com corte de 10 Å a partir do resíduo de Asp318, com a função GoldScore, determinada também após experimento de redocking entre a enzima e o composto cocrystalizado **15**, para os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos da série D.

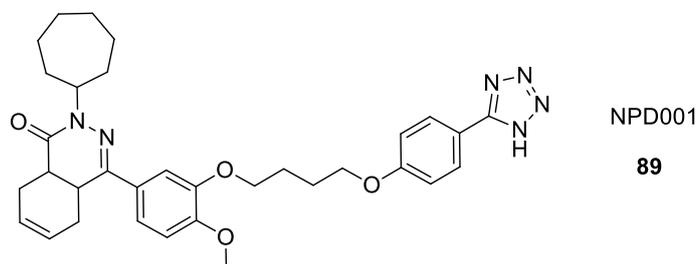


Figura 22. Ligante NPD001 cocrystalizado com o sítio catalítico da enzima PDE4B (BLAAZER *et al.*, 2018).

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1) Estudos de derivatização das *N*-metil-NAHs planejadas como inibidoras da PDE4 visando à obtenção de compostos híbridos

4.1.1) Planejamento dos derivados híbridos

4.1.1.1) Planejamento estrutural

Um dos objetivos deste trabalho é a síntese, a caracterização e a avaliação farmacológica de novos derivados das *N*-metil-NAHs visando atividades híbridas, com ênfase para a obtenção de compostos que possuam, tanto a atividade inibitória da enzima PDE4, quanto a atividade agonista dos receptores β_2 adrenérgicos, para o tratamento da DPOC (doença pulmonar obstrutiva crônica).

O uso de compostos inibidores da PDE4, ou agonistas dos receptores β_2 tem sido empregado no tratamento da DPOC pelo fato desta doença apresentar um perfil inflamatório do tecido pulmonar, bem como a broncoconstrição das vias aéreas. O tratamento com fármacos que atuam nestes dois quadros de maneira simultânea, como o Advair[®], que possui dois princípios ativos em um único comprimido, tem sido bastante utilizado (LIU *et al.*, 2013). No entanto, esta associação pode levar a problemas, pois os compostos apresentam farmacocinética diferenciada podendo ocasionar diferenças de concentração plasmática de um princípio ativo frente a outro (BRUNTON *et al.*, 2012). Com base nesta ideia de associação de atividades, esta tese tem como hipótese científica a obtenção de compostos que agreguem em sua estrutura subunidades que sejam capazes de atuar ao mesmo tempo sobre a PDE4 e receptores β_2 . Desta forma, uma única molécula atuaria nestes dois alvos levando a um único perfil de farmacocinética e, portanto, de maior segurança terapêutica.

Como não há qualquer descrição na literatura da associação de atividades das moléculas usadas como protótipos em nosso projeto, *ie.* Salmeterol (**31**) e as *N*-metil-NAH, era necessária uma prova de conceito de que a mesma seria benéfica. Desta forma, nosso grupo estudou o efeito dos compostos em separado e associados no modelo de contração de traquéia de cobaia, induzida por ovoalbumina (Figura 23) (COELHO *et al.*, 2008). Como é possível ver na Figura 23, ambos o salmeterol (**31**) e a *N*-metil-NAH (LASSBio-1407) (**27k**) foram capazes de realizar um relaxamento do músculo da traqueia quando comparados ao controle. Quando os compostos foram utilizados ao mesmo tempo, houve um efeito sinérgico

que comprova a eficácia desta associação e corrobora o planejamento destas moléculas híbridas.

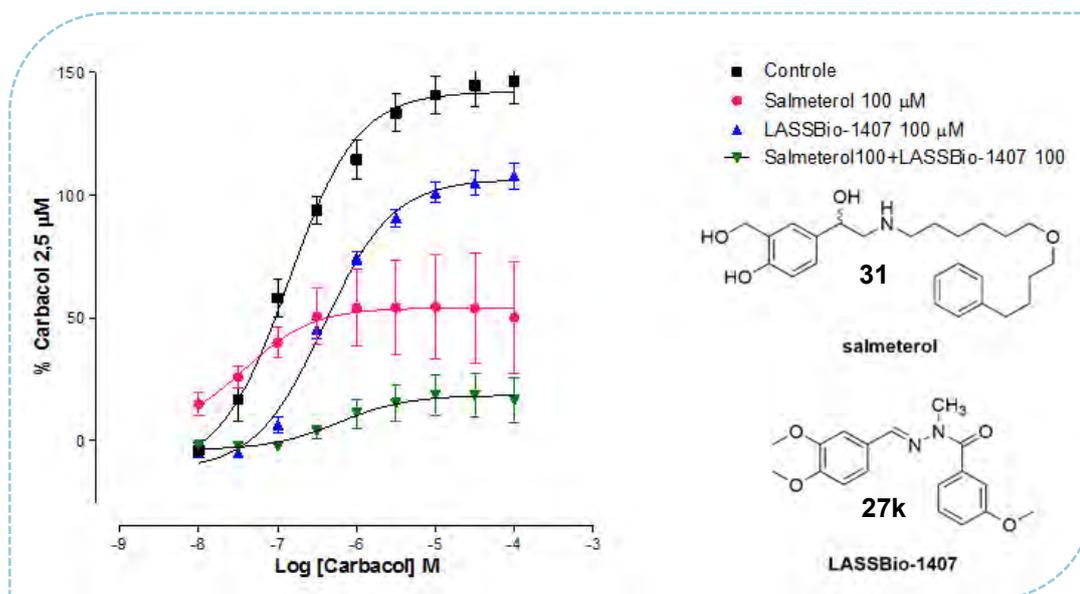
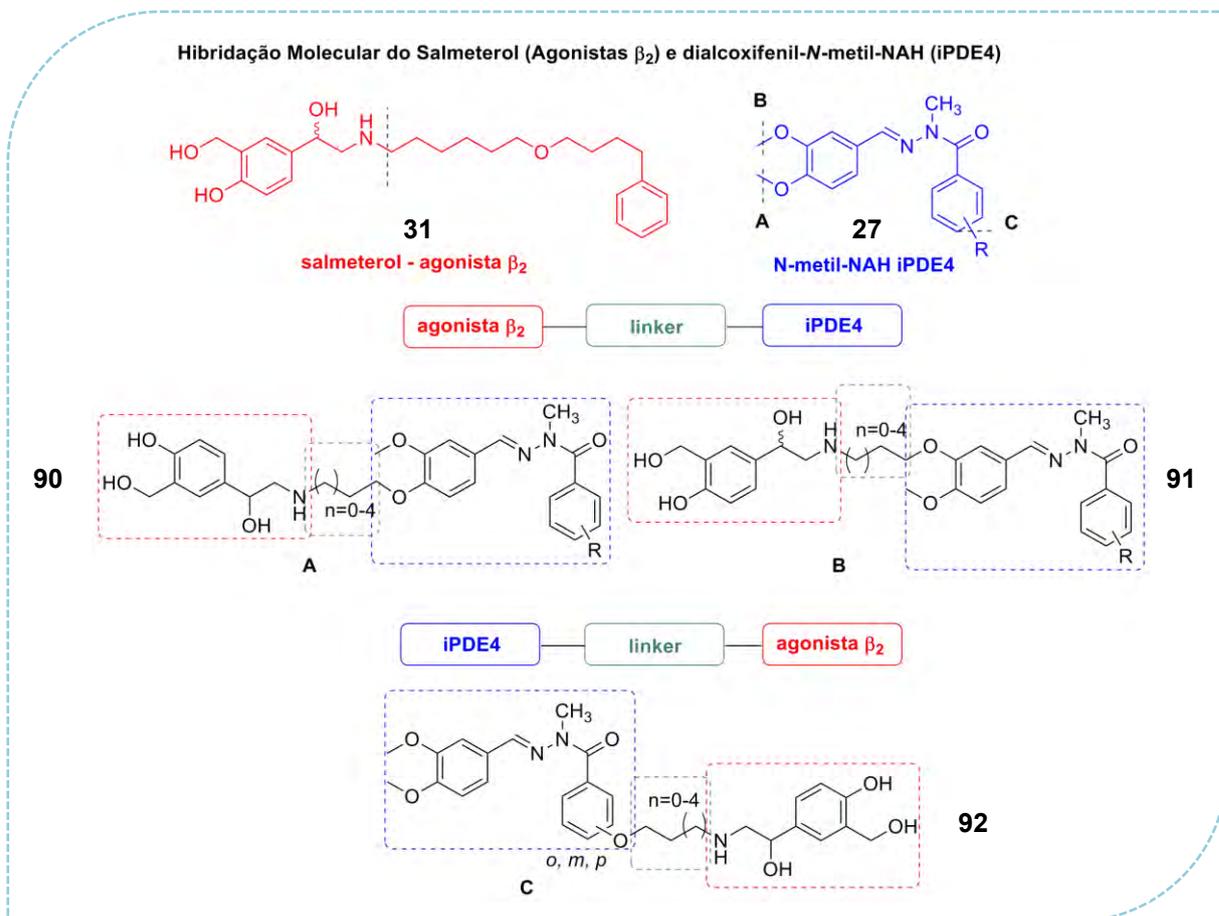


Figura 23. Atividade broncodilatadora dos protótipos (100 μM) usados no planejamento dos compostos híbridos. A atividade de 100% é dada pela força de contração exercida pelo carbacol à 2,5 μM (COELHO *et al.*, 2008).

A classe de compostos proposta neste trabalho foi planejada a partir da hibridação molecular do salmeterol (**31**), um fármaco referência que atua como agonista dos receptores β_2 (HUGHES *et al.*, 2011), e compostos do tipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-*N*-acilidrazonas (*N*-metil-NAH) (**27**), que recentemente foram descritas por nosso grupo como potentes inibidoras da PDE4 com reconhecida atividade por via oral em modelos de inflamação respiratória (Esquema 4) (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Esta hibridação teve como princípio manter grupos farmacofóricos para suas respectivas atividades como a cadeia de etanolamina do salmeterol, responsável por uma interação iônica com um aspartato do receptor β_2 , e dialcoxifenila e carbonila com o espaçador metil-hidrazona entre eles, responsáveis por interações com a glutamina 369 e sítio metálico respectivamente na PDE4 (KÜMMERLE *et al.*, 2012). De acordo com a conexão entre a subunidade derivada do salmeterol (**31**) e a *N*-metil-NAH (**27**) foram propostas 3 séries de compostos (séries A, B e C) (Esquema 4).

O modo de ligação entre os compostos nas séries A (**90**), B (**91**) e C (**92**) foi baseado em estudos de modelagem molecular que demonstraram a possível forma de interação entre as *N*-metil-NAHs (**27**) e a PDE4 (Figura 24). A partir deste modelo foi possível pensar a hibridação a partir da metoxila em *para* à imina da hidrazona (série A), pois esta posição fica voltada para a face externa do sítio e comportaria maiores volumes estéricos. A hibridação proposta em B tem como objetivo validar o modelo teórico de interação, uma vez que esta

região é impedida estericamente e deveria gerar compostos com reduzida atividade sobre a PDE4. Por fim a substituição em diferentes posições do anel aromático ligado à carbonila em C, por se apresentar voltada para uma região sem resíduos de aminoácidos próximos e que comportaria maiores volumes estéricos, conforme já descrito por Kümmerle e colaboradores (2012).



Esquema 4. Planejamento estrutural dos compostos híbridos agonistas β_2 e inibidores de PDE4.

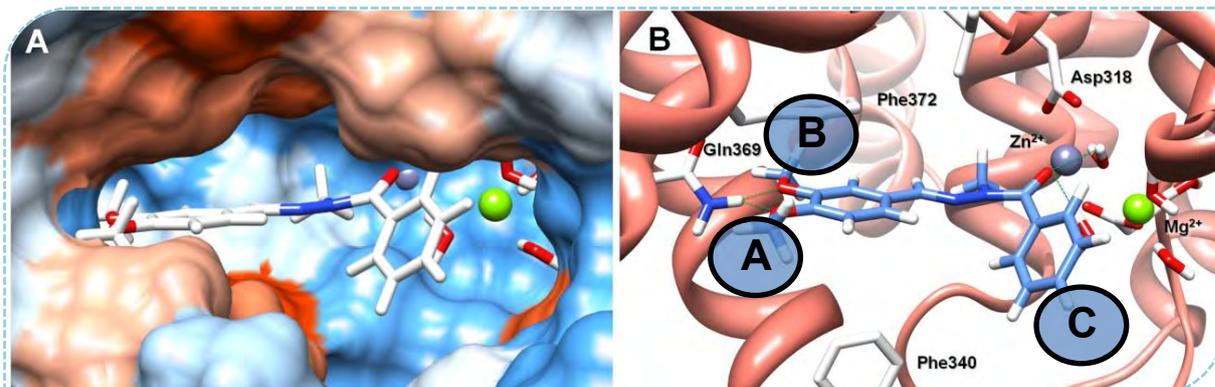
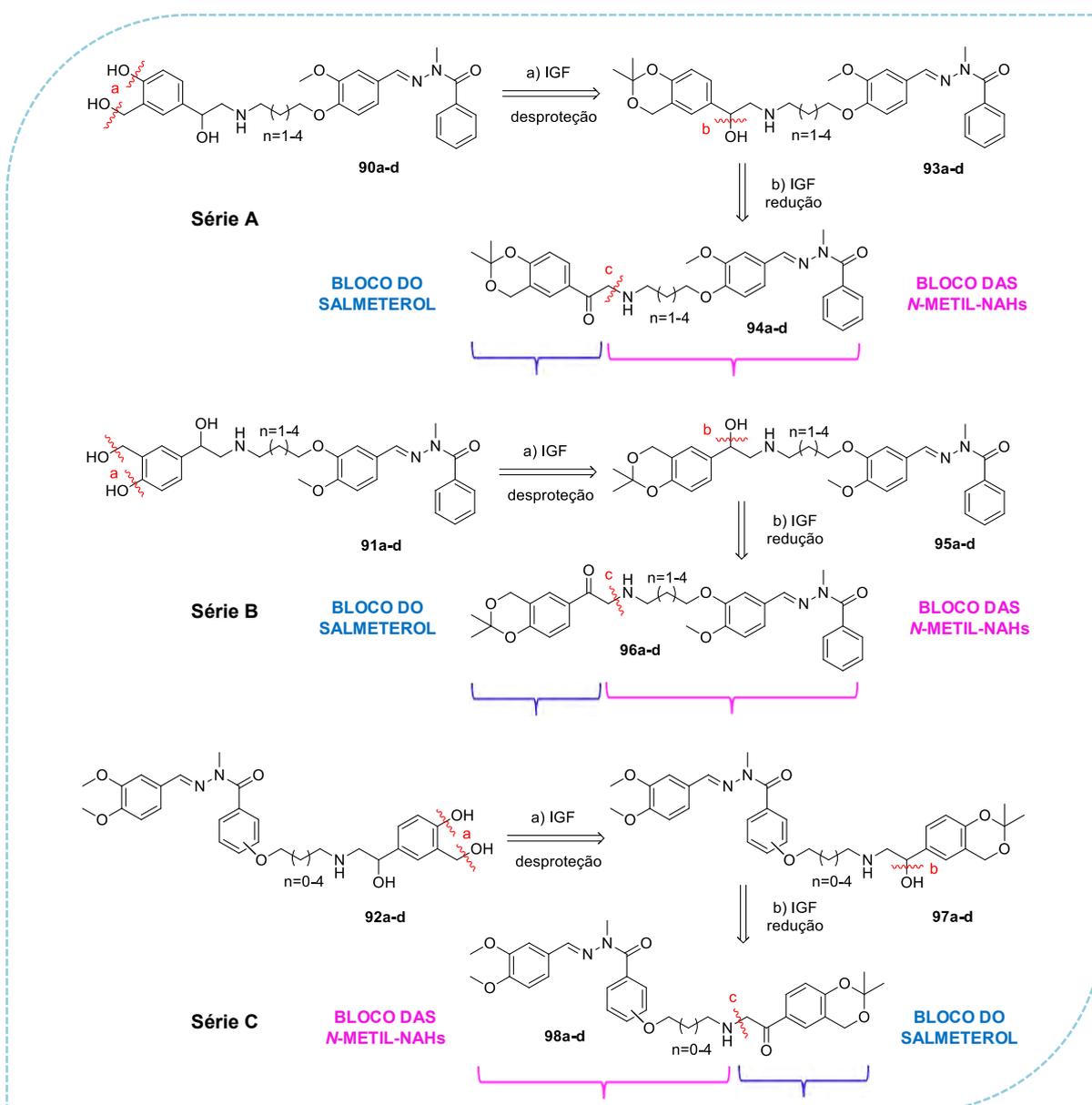


Figura 24. A) Forma de interação entre as *N*-metil-NAHs (27) e o sítio ativo da PDE4. B) Pontos de hibridação planejados para as séries híbridas A, B e C (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

4.1.1.2) Planejamento sintético

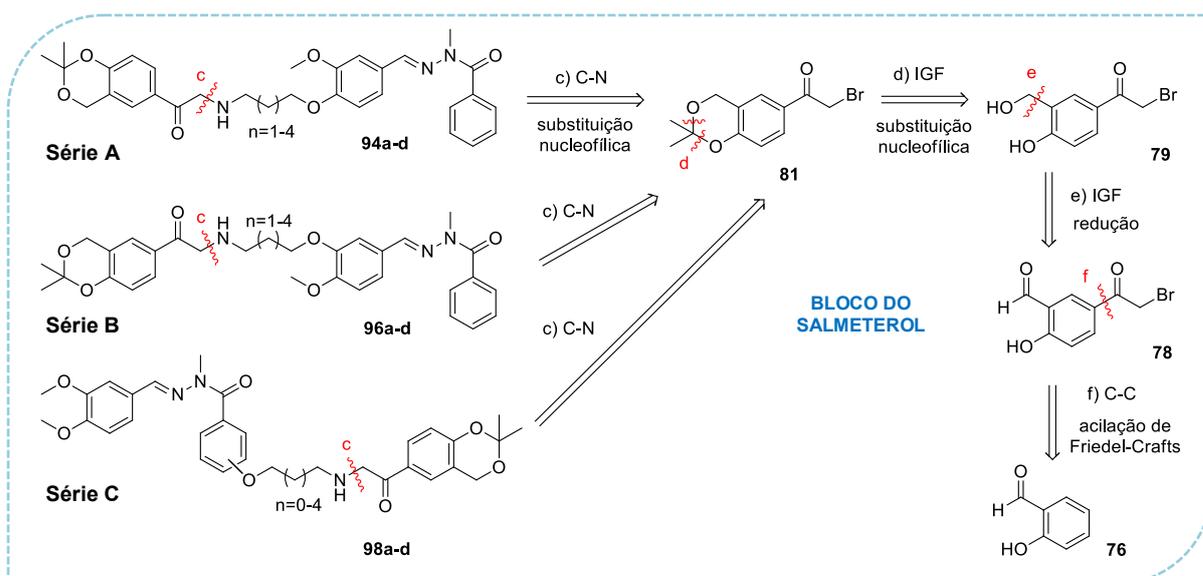
A síntese dos derivados híbridos das séries A, B e C foi baseada segundo as análises retrossintéticas ilustradas nos esquemas 5, 6, 7 e 8. O primeiro esquema retrata a análise inicial para a obtenção dos produtos finais **90a-d**, **91a-d** e **92a-d** (para as séries A, B e C, respectivamente). Através de interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa a), foi possível identificar os precursores protegidos **93a-d**, **95a-d** e **97a-d** (séries A, B e C), explorando reações de desproteção por hidrólise em meio ácido. Em seguida, através de outra IGF (etapa b), os precursores destes últimos foram caracterizados como os compostos cetônicos **94a-d**, **96a-d** e **98a-d** (séries A, B e C), utilizando reações de redução de carbonilas (Esquema 5).



Esquema 5: Análise retrossintética inicial para a obtenção dos derivados híbridos da série A (**90a-d**), B (**91a-d**) e C (**92a-d**).

Através da desconexão C-N (etapa c) foi possível planejar a obtenção dos precursores cetônicos **94a-d**, **96a-d** e **98a-d** (séries A, B e C, respectivamente) (Esquemas 5, 6, 7 e 8) utilizando a estratégia de síntese convergente, onde dois “blocos” moleculares foram sintetizados de forma linear e, posteriormente, unidos em um meio reacional. (SMITH, 2016). São eles: o bloco do salmeterol e o bloco das *N*-metil-NAHs (Esquema 5).

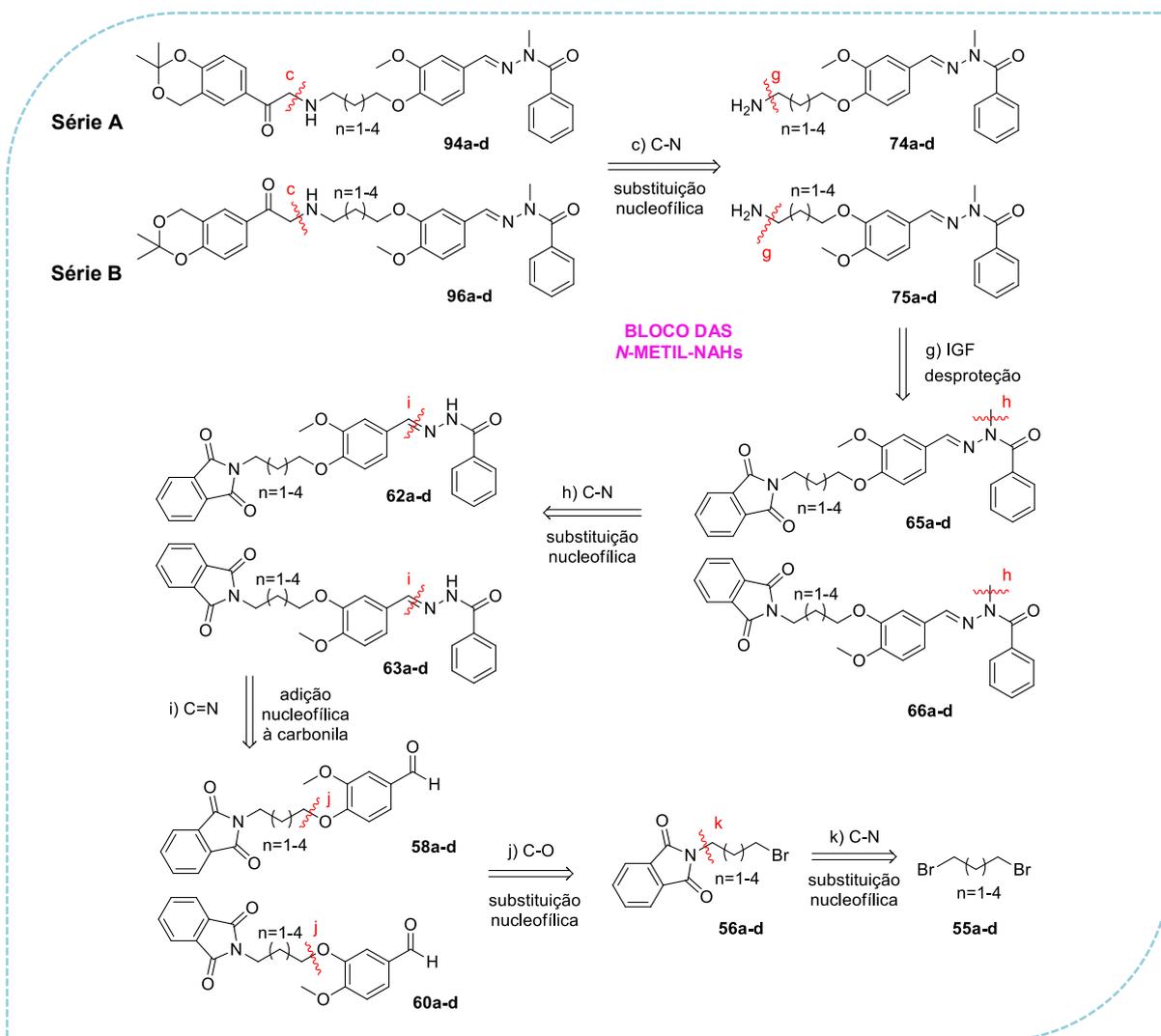
No esquema 6, é possível observar a análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos do ponto de vista da construção do bloco do salmeterol. Foi identificado o cetil **81** como o composto-chave, após uma desconexão C-N (etapa c), explorando reações de substituição nucleofílica clássica com as amins advindas da construção do bloco molecular das *N*-metil-NAHs (**74a-d** da série A e **75a-d** da série B, esquema 7; e **99a-d** da série C, esquema 8). O álcool **79** foi caracterizado como precursor do cetil **81**, através de uma IGF (etapa d), utilizando, novamente, reações de substituição nucleofílica com 2,2-dimetoxipropano. Por sua vez, o produto **79** tem como precursor o salicilaldeído acilado **78**, identificado através de IGF (etapa e), explorando reações de redução de carbonilas. Por fim, caracterizou-se o salicilaldeído **76** como o produto de partida para a obtenção dos precursores cetônicos das séries A, B e C (**94a-d**, **96a-d**, **98a-d**, respectivamente), através de uma desconexão C-C, utilizando reações de acilação de Friedel-Crafts com brometo de bromoacetila (Esquema 6).



Esquema 6: Análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos **94a-d**, **96a-d** e **98a-d** (das séries A, B e C, respectivamente) do ponto de vista da construção do bloco do salmeterol.

A análise retrossintética para a obtenção dos intermediários **94a-d** e **96a-d** (séries A e B, respectivamente), do ponto de vista da construção do bloco das *N*-metil-NAHs, está

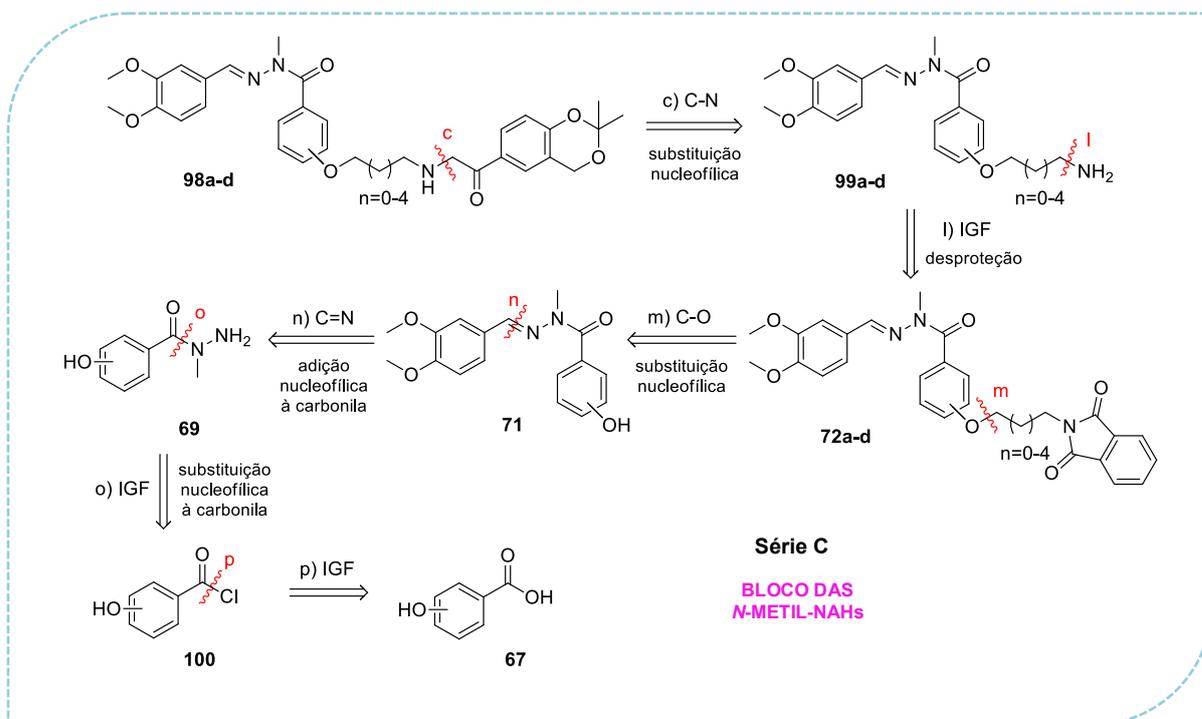
disposta no esquema 7. Através de uma desconexão C-N (etapa c) foi possível identificar as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas **74a-d** (para a série A) e **75a-d** (série B) como suas precursoras diretas, explorando reações de substituição nucleofílica clássica com a α -bromo cetona **81** (Esquema 6). Na etapa seguinte, caracterizou-se as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas **65a-d** (série A) e **66a-d** (série B) como precursoras de **74a-d** e **75a-d**, após IGF (etapa g), através da utilização de reações de desproteção com hidrato de hidrazina (Esquema 7). Posteriormente, as NAHs *O*-alquiladas **62a-d** (série A) e **63a-d** (série B) foram identificadas como precursoras dos produtos protegidos (**65a-d** e **66a-d**) através de uma desconexão C-N (etapa h), explorando reações de substituição nucleofílica com iodeto de metila. Por sua vez, os seus precursores foram caracterizados, após uma desconexão C=N (etapa i), como sendo os aldeídos *O*-alquilados **58a-d** (série A) e **60a-d** (série B), através da utilização de reações de condensação ácido-catalisadas com benzil-hidrazidas funcionalizadas (Esquema 7).



Esquema 7: Análise retró sintética para a obtenção dos precursores cetônicos **94a-d** e **96a-d** (das séries A e B, respectivamente) do ponto de vista da construção do bloco das *N*-metil-NAHs.

As bromo-*N*-alquil-ftalimididas **56a-d** foram identificadas como as precursoras dos aldeídos *O*-alquilados de ambas as séries A e B (**58a-d** e **60a-d**, respectivamente), através de uma desconexão C-O (etapa j), explorando reações de substituição nucleofílica entre estas e vanilina, para a série A, e isovanilina para a B (Esquema 7). Por fim, os dibromoalcanos **55a-d** foram caracterizados como os produtos de partida para a obtenção dos precursores cetônicos das séries A e B (**94a-d** e **96a-d**, respectivamente), após uma desconexão C-N (etapa k), através, novamente, da utilização de reações de substituição nucleofílica clássica com ftalimida (Esquema 7).

O esquema 8 retrata a análise retrossintética para a obtenção dos precursores-chave da série C, **98a-d**, do ponto de vista da construção do bloco das *N*-metil-NAHs. O mesmo se deu de maneira distinta do descrito para os derivados cetônicos das séries A e B (**94a-d** e **96a-d**), pois o precursor *N*-metil-*N*-acilidrazônico hidroxilado **71** (Esquema 8) não teria como ser obtido através de reação de *N*-alquilação sem haver uma competição com reações de *O*-alquilação da hidroxila presente em sua estrutura.



Esquema 8: Análise retrossintética para a obtenção dos precursores cetônicos **98a-d** (da série C) do ponto de vista da construção do bloco das *N*-metil-NAHs.

Deste modo, os precursores da cetona **98a-d** foram identificados como as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas **99a-d**, através de uma desconexão C-N (etapa c), explorando reações de substituição nucleofílica clássica com a α -bromo cetona **81** (Esquema 6). Caracterizou-se também as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas **72a-d** como precursoras destas

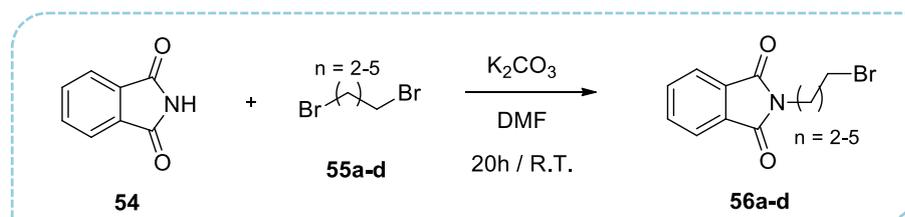
últimas, após IGF (etapa l), através da utilização de reações de desproteção com hidrato de hidrazina. Em seguida, foi identificada a *N*-metil-NAH hidroxilada **71**, como precursora dos produtos alquilados, citados anteriormente, após desconexão C-O (etapa m) (Esquema 8), explorando reações de substituição nucleofílica entre esta e as bromo-*N*-alquil-ftalimidias **56a-d**, planejadas no esquema 7. Posteriormente, caracterizou-se a *N*-metil-hidrazida **69** como precursora da hidrazona **71**, através de uma desconexão C=N (etapa n), explorando reações de condensação ácido-catalisadas com 3,4-dimetoxibenzaldeído. Por sua vez, após uma IGF (etapa o), foi possível identificar o precursor da hidrazida, descrita anteriormente, como sendo o cloreto de ácido **100**, após a utilização de reações de substituição nucleofílica à carbonila com metil-hidrazina. Finalmente, o ácido **67**, através de IGF (etapa p), foi identificado como o produto de partida para a síntese dos precursores cetônicos da série C (**98a-d**).

4.1.2) Síntese dos derivados híbridos

4.1.2.1) Síntese do bloco das *N*-metil-NAHs

4.1.2.1.1) Síntese dos espaçadores para as séries A, B e C

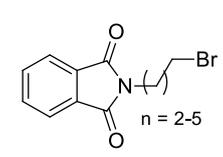
A primeira etapa reacional da síntese dos derivados híbridos das séries A, B e C consistiu em uma reação de *N*-alquilação em meio básico, entre a ftalimida (**54**) e 4 dibroalcanos distintos (**55a-d**), com a cadeia alquílica variando entre 3 a 6 metilenos, para a obtenção das ftalimidias espaçadoras *N*-alquiladas **56a-d** (Esquema 9) (CESARI *et al.*, 2006). Esta foi realizada à temperatura ambiente e após 20 horas verificou-se que houve o consumo total do produto de partida (**54**), através de cromatografia em camada fina analítica (CCFA). Os produtos brutos obtidos foram purificados através de cromatografia em coluna e, posteriormente caracterizados por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de determinação do ponto de fusão (Tabela 5). Os rendimentos reacionais foram considerados de razoáveis a bons, variando entre 56-61% para as ftalimidias alquiladas desejadas (**56a-d**) (Tabela 5).



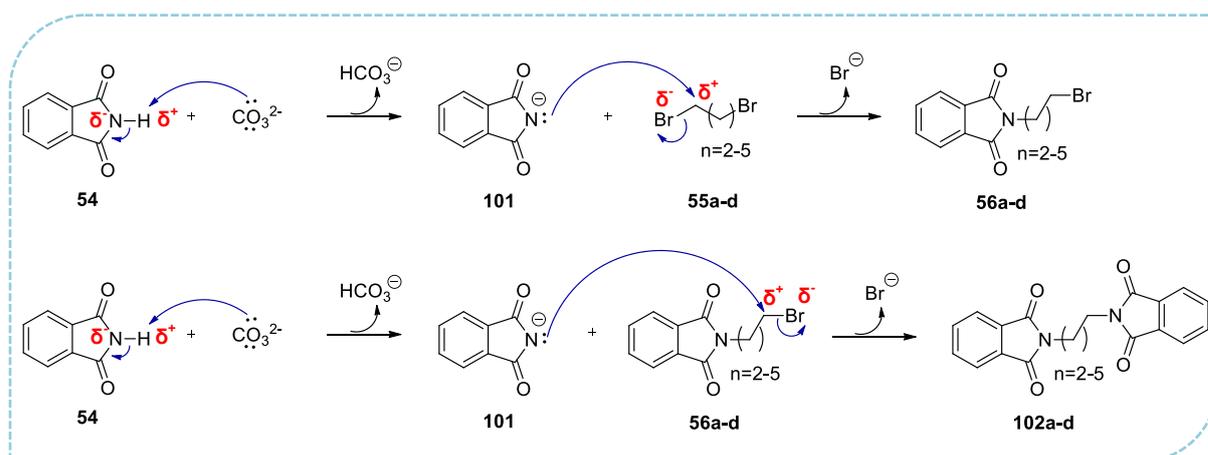
Esquema 9. Reação de *N*-alquilação para a obtenção das ftalimidias *N*-alquiladas **56a-d** espaçadoras das séries A, B e C.

Tabela 5. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as ftalimidas *N*-alquiladas **56a-d** após processo de purificação em coluna cromatográfica.

Produtos	n	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
56a	2	61	71
56b	3	58	78
56c	4	56	60
56d	5	60	58



Os espaçadores ftalimídicos foram obtidos através de uma *N*-alquilação, regida pelo mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), descrito no esquema 10. Inicialmente, ocorre a desprotonação da ftalimida (**54**) pela base presente no meio, *i.e.* carbonato de potássio, formando o intermediário desprotonado **101**. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio da ftalimida desprotonada (**101**) ao carbono eletrofílico do dibrometo de alquila (**50a-d**) com concomitante eliminação do íon brometo, que é um bom grupo de saída, e posterior formação das ftalimidas *N*-alquiladas desejadas (**56a-d**, esquema 10) (MCMURRY, 2016).



Esquema 10. Mecanismo de formação das ftalimidas *N*-alquiladas **56a-d**, via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), e possível formação do produto bisalquilado (**102a-d**) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

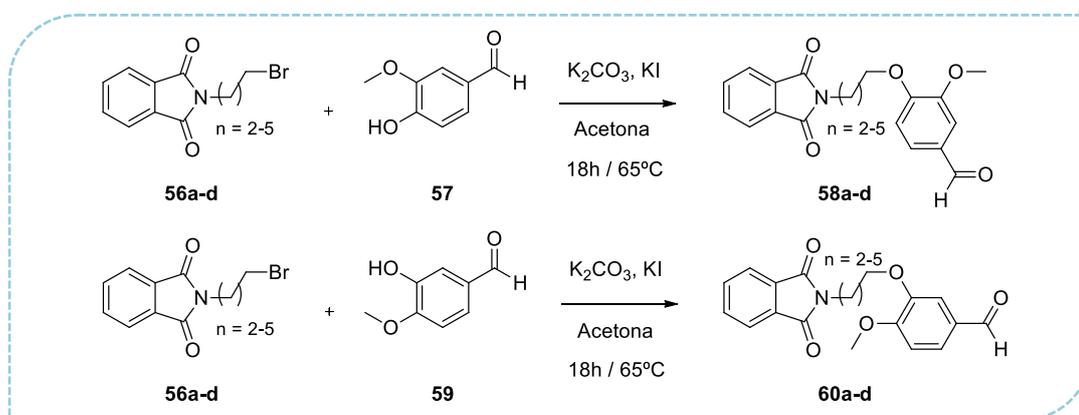
Cabe destacar que, reações de bisalquilação podem competir com a reação de monoalquilação, em questão, e promover a formação do subproduto bis-isoindolina-diona (**102a-d**) indesejado (Esquema 10). Este fato ocorre, pois as *N*-alquil-ftalimidas formadas (**56a-d**) são tão reativas quanto os seus precursores dibromoalcanos (**55a-d**), frente às reações de S_N2 , podendo o íon ftalimídico (**101**) reagir com um, ou com o outro produto (Esquema 10) (MCMURRY, 2016). Na tentativa de evitar essa competição, foi realizado o controle estequiométrico da reação, onde se utilizou um excesso de 0,5 equivalentes de

dibromoalcanos (**55a-d**) frente à ftalimida (**54**), além da adição gota a gota, desta última, no meio reacional. Entretanto, os rendimentos obtidos para as ftalimidias *N*-alquiladas desejadas (**56a-d**) foram considerados razoáveis (Tabela 5). Adicionalmente, foi observada a formação de um subproduto mais polar, que não foi isolado e caracterizado por técnicas espectroscópicas, que poderia ser o produto bisalquilado **102a-d**.

As ftalimidias *N*-alquiladas **56a-d** foram caracterizadas através de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C . No espectro de ressonância de hidrogênio a presença de sinais em campo alto (1,30-3,84ppm) confirmaram a introdução de grupamentos alquílicos no núcleo ftalimídico, como o proposto. Característica semelhante também pôde ser observada nos espectros de carbono, onde os sinais observados em campo alto (25,3-39,9ppm) comprovaram a presença de cadeias alquílicas nos produtos desejados (**56a-d**). Os sinais que se apresentaram entre 7,57-8,01ppm, no espectro de RMN ^1H , confirmaram a presença de 4 hidrogênios ligados à sistemas aromáticos presentes no núcleo ftalimídico, enquanto, no espectro de RMN ^{13}C , sinais variando entre 168,2 e 168,4ppm confirmaram a presença dos carbonos carbonílicos presentes no grupo imida.

4.1.2.1.2) Síntese do núcleo dialcoxifenila das séries A e B

A segunda etapa da síntese do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B consistiu em uma reação de *O*-alquilação entre as ftalimidias *N*-alquiladas (**56a-d**), obtidas anteriormente, e vanilina (**57**, para a série A) e isovanilina (**59**, para a série B), em meio básico, para a obtenção dos aldeídos *O*-alquilados **58a-d** (série A) e **60a-d** (série B), que serão descritos como “espaçadores dialcoxifenila” (Esquema 11) (LIU *et al.*, 2013).

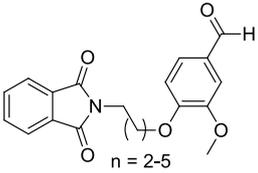


Esquema 11. Reação de *O*-alquilação para a obtenção dos aldeídos *O*-alquilados **58a-d** (série A) e **60a-d** (série B).

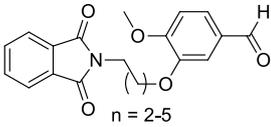
Os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e determinação de ponto de fusão (Tabela 6). Os rendimentos reacionais foram considerados ótimos para os aldeídos *O*-alquilados sintetizados **58a-d** e **60a-d** (das séries A e B, respectivamente) variando entre 78-95% após isolamento (Tabela 6).

Tabela 6. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para os aldeídos *O*-alquiladas **58a-d** (série A) e **60a-d** (série B).

Produtos	n	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
58a	2	78	157
58b	3	90	98
58c	4	95	114
58d	5	89	76
60a	2	88	142
60b	3	95	126
60c	4	95	124
60d	5	89	76

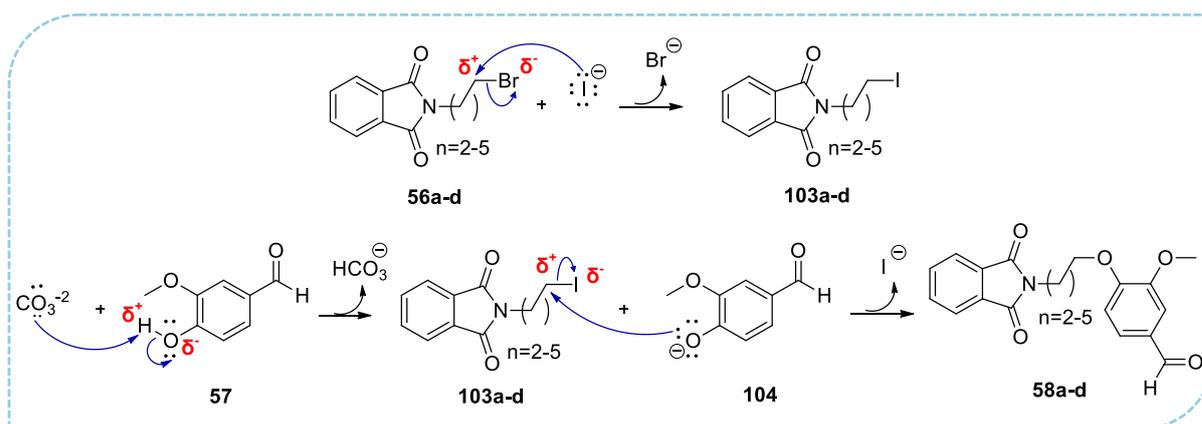


58a-d



60a-d

O mecanismo desta reação é muito similar para as duas séries e, desta maneira, o esquema abaixo (Esquema 12) ilustra o mecanismo geral de síntese dos produtos desejados tanto para A (**58a-d**) quanto para B (**60a-d**). Novamente, a reação é regida pelo mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) que resulta na obtenção de produtos *O*-alquilados (**58a-d** e **60a-d**) (MCMURRY, 2016). Inicialmente, ocorre a troca entre os íons brometo e iodeto no produto **56a-d**, promovida pela presença do iodeto de potássio, que é o catalisador desta reação. Esta troca iônica favorece a reação de substituição nucleofílica seguinte, pois o produto formado (**103a-d**) possui um grupo abandonador mais eficiente se comparado ao produto bromado (**56a-d**). Na etapa seguinte ocorre a desprotonação da molécula de vanilina (**57**) pelo carbonato presente no meio. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da vanilina desprotonada (**104**) ao carbono eletrofílico do iodeto de alquila **103a-d**. Paralelamente, ocorre a eliminação do íon iodeto presente na estrutura deste último (**103a-d**), pois é um excelente grupo de saída. (Esquema 12) (MCMURRY, 2016).

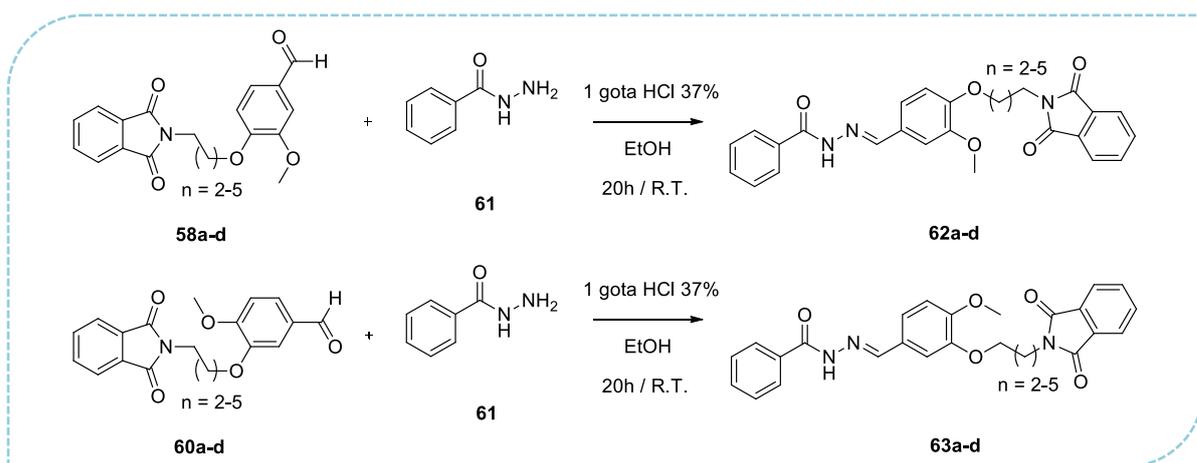


Esquema 12. Mecanismo geral para a obtenção dos aldeídos *O*-alquilados **58a-d** da série A, aplicável também para a série B (**60a-d**), via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

Os “espaçadores dialcoxifenila” das séries A (**58a-d**) e B (**60a-d**) foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C e apresentaram perfil semelhante quanto à quantidade e multiplicidade de sinais e deslocamento químico, sendo necessária uma posterior análise de espectros bidimensionais dos compostos finais do bloco das *N*-metil-NAHs para diferenciar, espectroscopicamente, a série A da série B. No espectro de ressonância de hidrogênio de ambas as séries, observou-se um simpleto com 3 hidrogênios de integração na faixa de 3,68-3,95ppm que confirmou a presença de um grupo metoxila na estrutura dos aldeídos *O*-alquilados desejados (**58a-d** e **60a-d**). De forma semelhante, no espectro de carbono foi observado um sinal na faixa de 55,7-56,1ppm que confirmou a presença do grupo metoxila. Outro sinal interessante, do ponto de vista da caracterização estrutural, é o simpleto com 1 hidrogênio de integração na faixa de 9,82-9,84ppm no espectro de RMN ¹H, que confirma a presença de um grupo aldeído na estrutura produto desejado (**58a-d** e **60a-d**). Esta informação é respaldada pela análise do espectro de carbono, que apresenta um sinal na faixa de 190,8-190,9ppm. Os sinais descritos anteriormente foram os principais para a confirmação do sucesso da reação de *O*-alquilação, mas outros sinais também são essenciais para a caracterização estrutural da série como o sinal em 168,3-168,4ppm no espectro de carbono, que se referente aos carbonos carbonílicos presentes no núcleo ftalimídico, demonstrando que ele continua intacto.

4.1.2.1.3) Síntese das NAHs *O*-alquiladas das séries A e B

A terceira etapa na síntese do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B consistiu em uma reação de condensação clássica entre fenilidrazida (**61**) e os aldeídos aromáticos obtidos em etapas anteriores (**58a-d** para série A; **60a-d** para série B), catalisada por ácido clorídrico e realizada à temperatura ambiente (Esquema 13) (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998). Os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , e determinação de ponto de fusão (Tabela 7). Os rendimentos reacionais foram considerados excelentes para as NAHs *O*-alquiladas sintetizadas (**62a-d** e **63a-d**) variando entre 85-99% após processo de isolamento (Tabela 7).



Esquema 13. Reação de condensação para a obtenção das NAHs *O*-alquiladas **62a-d** (série A) e **63a-d** (série B).

Tabela 7. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as NAHs *O*-alquiladas **62a-d** (série A) e **63a-d** (série B).

Produtos	n	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
62a	2	91	190
62b	3	88	194
62c	4	89	197
62d	5	88	174
63a	2	90	245
63b	3	99	213
63c	4	86	186
63d	5	85	188

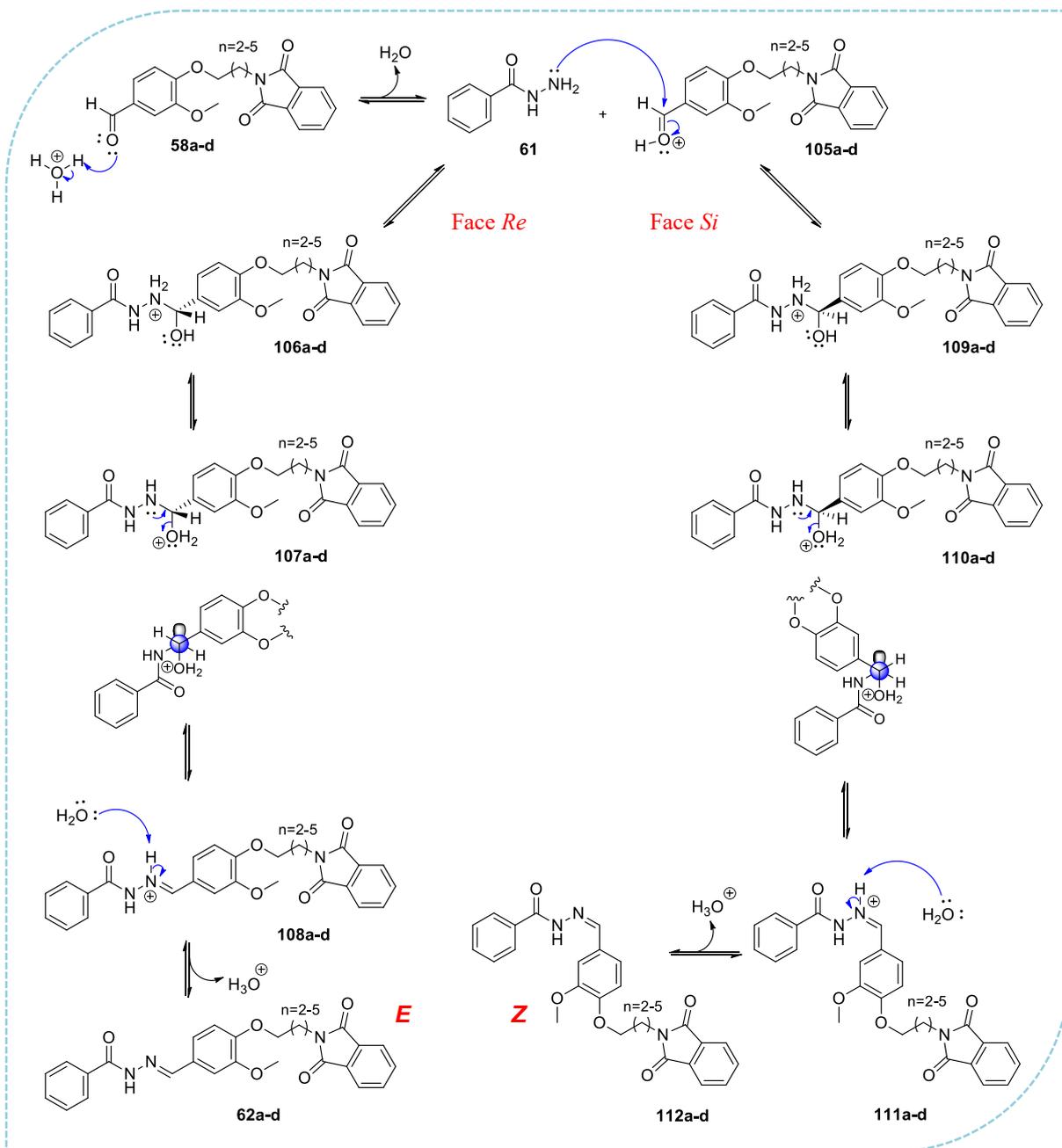
As estruturas químicas das NAHs *O*-alquiladas **62a-d** e **63a-d** são mostradas à direita da tabela. A estrutura **62a-d** mostra a indolizina com o grupo alquila *O*-alquilado na posição 2, e a estrutura **63a-d** mostra a indolizina com o grupo alquila *O*-alquilado na posição 3. Em ambas as estruturas, o grupo alquila *O*-alquilado é representado por um parêntese com um traço e o número n = 2-5.

Como mencionado anteriormente, a reação em questão é regida por um mecanismo de condensação clássica, catalisado por ácido, entre a fenilidrazida (**61**) e os respectivos

aldeídos (**58a-d**, para série A; **60a-d**, para a série B) (COSTA *et al.*, 2003). O mecanismo geral de síntese dos produtos desejados, tanto para A (**62a-d**) quanto para B (**63a-d**), está disposto do esquema 14 e é muito similar para as duas séries. A primeira etapa consiste na protonação do aldeído correspondente (**62a-d**), levando à formação do íon oxônio (**105a-d**). Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons da amina primária da hidrazida (**61**) à carbonila ativada do aldeído (**105a-d**), gerando os intermediários hemiaminais *N*-protonados **106a-d** (quando o ataque ocorre pela face *Re*) e **109a-d** (quando o ataque ocorre pela face *Si*) correspondentes. Fato que pode ser explicado pela planaridade da carbonila do aldeído em questão, onde o carbono carbonílico está hibridizado em sp², permitindo uma aproximação do nucleófilo pela face da “frente”, ou de “trás” da molécula (MCMURRY, 2016). Posteriormente, ocorre uma transferência de prótons do átomo de nitrogênio para o oxigênio nos intermediários hemiaminais *N*-protonados (**106a-d** e **109a-d**), via solvente, com formação de um bom grupo de saída, *i.e.* água, e obtenção dos intermediários hemiaminais *O*-protonados (**107a-d** e **110a-d**). Em seguida, ocorre uma reação de eliminação do grupo de saída com, concomitante, formação de ligação π nos intermediários hemiaminais (**107a-d** e **110a-d**) e a formação dos íons imínicos (**108a-d** e **111a-d**). Por fim, estes são desprotonados, via solvente, podendo levar à formação de iminas diastereoisoméricas de configuração relativa *E* (**62a-d**) e/ou *Z* (**112a-d**) (Esquema 14) (COSTA *et al.*, 2003).

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C das *N*-acilidrazonas sintetizadas (**62a-d** e **63a-d**) permitiu evidenciar, para todos os compostos, a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal simpleto, em todos os espectros de RMN ¹H, referente ao hidrogênio imínico (N=CH) do grupo NAH, variando entre 8,35-8,37ppm (DMSO). Da mesma forma, a observação dos espectros de RMN ¹³C evidenciou a presença de somente um sinal referente ao carbono imínico variando de 148,05-148,1ppm (DMSO).

Uma vez atribuída a presença de único diastereoisômero, fez-se necessário a determinação da configuração relativa da ligação dupla imínica. De acordo com dados descritos na literatura por Palla e colaboradores, baseados em estudos de RMN de ¹H e ¹³C de *N*-acilidrazonas (PALLA *et al.*, 1982; PALLA *et al.*, 1986), a condensação ácido catalisada de hidrazidas com aldeídos leva a formação preferencial de NAHs com configuração diastereoisomérica (*E*). Estendendo a análise de Palla e colaboradores para este trabalho, a configuração relativa das NAHs sintetizadas (**62a-d** e **63a-d**) é do tipo *E*.



Esquema 14. Mecanismo geral para a obtenção das NAHs *O*-alquiladas **62a-d** da série A com configuração relativa *E*, aplicável também para a série B (**60a-d**), via reação de condensação ácido-catalisada, e possível formação de seu isômero geométrico *Z* (**112a-d**) (Adaptado de COSTA *et al.*, 2003).

De forma semelhante, Kümmerle e colaboradores descreveram a síntese de uma quimioteca extensa de NAHs com configuração relativa *E* através desta mesma reação. Onde, o sinal atribuído ao hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de RMN ^1H , para os produtos *N*-acilidrazônicos variou entre 8,3-8,8ppm (DMSO) e o sinal atribuído ao carbono imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de ^{13}C , variou entre 137,5-148,5ppm (DMSO) (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Se compararmos estes sinais aos das NAHs sintetizadas neste trabalho (8,35-8,37ppm

– RMN ^1H ; e 148,05-148,1ppm – RMN ^{13}C), podemos novamente concluir que a configuração diastereoisomérica dos produtos **62a-d** e **63a-d** é do tipo *E*.

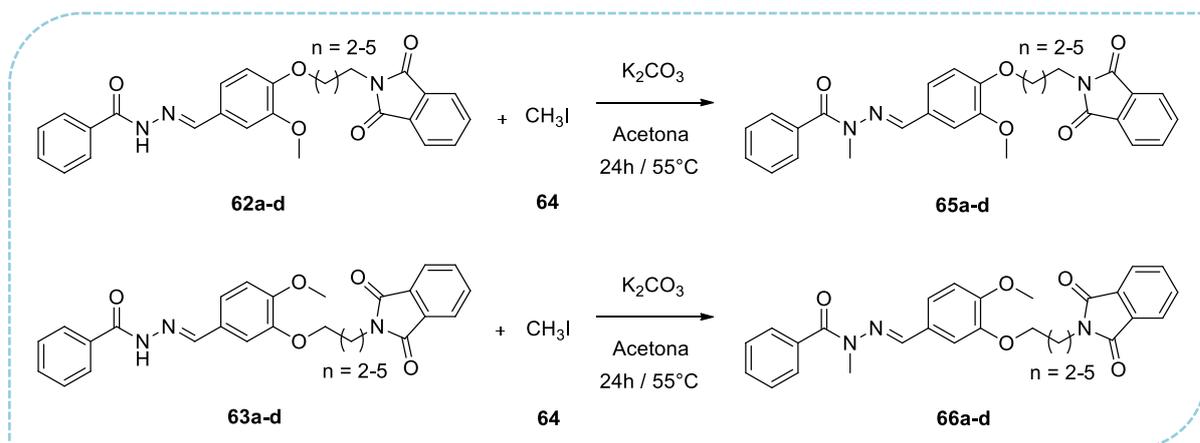
Os produtos sintetizados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e os espectros das NAHs obtidas da série A (**62a-d**) foram, novamente, muito semelhantes aos das NAHs da série B (**63a-d**), em termos de quantidade e multiplicidade dos sinais e do deslocamento químico destes. Desta maneira, reforça-se a necessidade uma análise de espectros bidimensionais dos produtos finais do bloco das *N*-metil-NAHs para caracterizar, não só as diferenças entre as séries A e B, mas também para confirmar a configuração relativa dos produtos sintetizados.

Alguns sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram essenciais para determinar o sucesso da reação de condensação proposta, assim como para caracterizar a formação das NAHs desejadas (**62a-d** e **63a-d**). Um sinal simpleto com 1 hidrogênio de integração na faixa de 11,73-11,75ppm no espectro de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio amídico (N-H) do grupo hidrazona, confirmando a obtenção dos produtos desejados, já que este sinal não se encontrava presente nos espectros dos produtos de partida (**58a-d** e **60a-d**). O sinal na faixa de 8,35-8,37ppm referente à um simpleto com 1 hidrogênio de integração também confirmou a presença de um hidrogênio imínico (N=CH). Esta informação é complementada pela análise do espectro de carbono, onde um sinal na faixa de 148,05-148,1ppm se torna evidente. Cabe ressaltar, que o sinal referente ao carbono aldeídico presente nos produtos de partida (**58a-d** e **60a-d**) na faixa de 190,8-190,9ppm não foi observado nos espectros dos produtos desejados (**62a-d** e **63a-d**), assim como o sinal correspondente no espectro de hidrogênio na faixa de 9,82-9,84ppm. Outro sinal no espectro de carbono que demonstrou a eficácia da síntese foi o sinal em 162,9-163,0ppm, referente ao carbono carbonílico do grupo hidrazona, visto que este também não foi observado nos espectros dos produtos de partida (**58a-d** e **60a-d**).

4.1.2.1.4 Síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas das séries A e B

A quarta etapa na síntese do bloco das *N*-metil-NAH das séries A e B consistiu em uma reação de *N*-alquilação entre as NAHs produzidas em etapas anteriores (**62a-d**, para a série A; **63a-d**, para a série B) e iodeto de metila (**64**), em meio básico, para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas **65a-d** e **66a-d** (para as séries A e B, respectivamente) (Esquema 15) (BARCO *et al.*, 1973). Os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , e determinação de ponto de fusão (Tabela 8). Os

rendimentos reacionais foram considerados ótimos para os produtos sintetizados (**65a-d** e **66a-d**) variando entre 71-92% após processo de isolamento (Tabela 8).



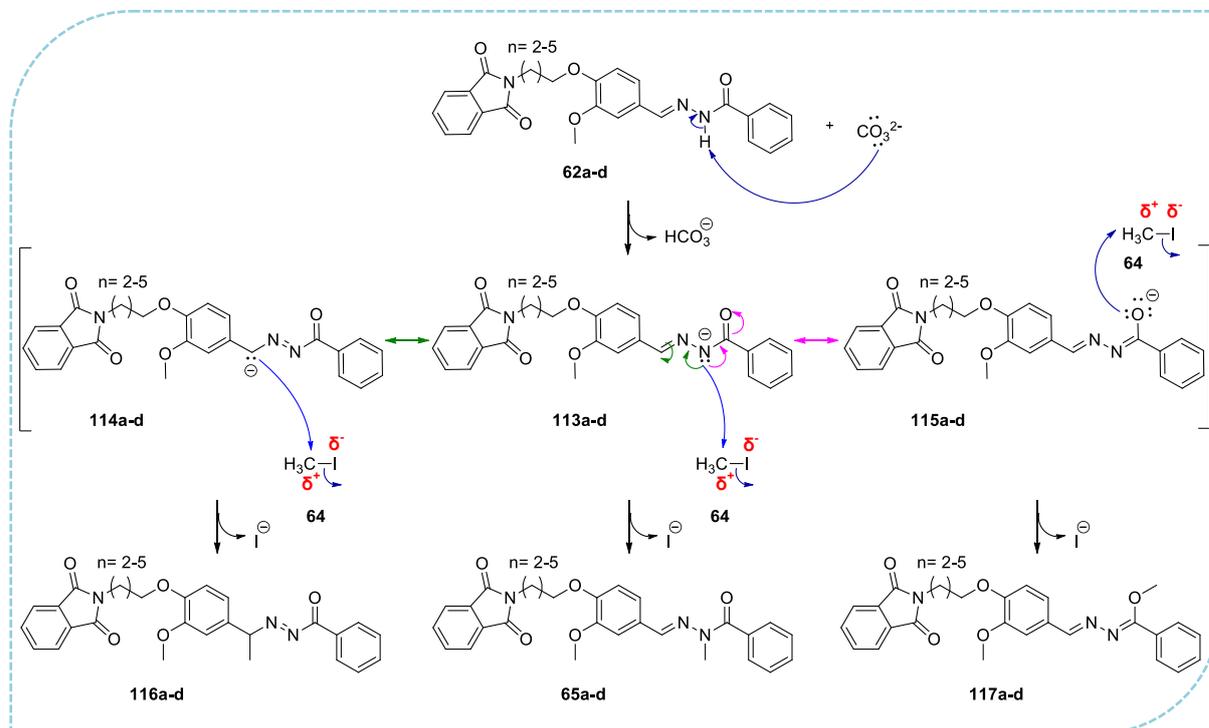
Esquema 15. Reação de *N*-alkilação para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alkiladas **65a-d** (série A) e **66a-d** (série B).

Tabela 8. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as *N*-metil-NAHs *O*-alkiladas **65a-d** (série A) e **66a-d** (série B).

Produtos	n	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
65a	2	75	200
65b	3	87	152
65c	4	84	135
65d	5	92	160
66a	2	75	162
66b	3	71	141
66c	4	89	143
66d	5	82	127

A reação de *N*-metilação, em questão, é regida por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) entre o iodeto de metila (**64**) e as respectivas NAHs (**62a-d**, para série A; **63a-d**, para a série B) (MCMURRY, 2016). Este mecanismo está descrito no esquema 16 e é representativo tanto para a série A quanto para a série B, devido as suas semelhanças estruturais. A primeira etapa consiste na desprotonação da NAH (**62a-d**), pelo carbonato presente no meio, formando o intermediário aza-aniônico **113a-d** e outros compostos contribuintes para o híbrido de ressonância, como o carbânion (**114a-d**) e o oxa-ânion (**115a-d**). Na segunda etapa ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio amídico presente na estrutura do produto aza-aniônico (**113a-d**) ao centro

eletrofílico da molécula de iodeto de metila (**64**). Concomitantemente, ocorre a eliminação do grupo iodeto, que é um bom grupo abandonador, formando as *N*-metil-NAHs desejadas **65a-d**, com a possibilidade de formação das respectivas espécies *C*-metiladas (**116a-d**) e *O*-metiladas (**117a-d**) (Esquema 16) (MCMURRY, 2016).



Esquema 16. Mecanismo geral para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alkiladas **65a-d** da série A, aplicável também para a série B (**66a-d**), via reação de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), e possível formação dos subprodutos *C*-metilado (**116a-d**) e *O*-metilado (**117a-d**) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C das *N*-metil-NAHs sintetizadas (**65a-d** e **66a-d**) permitiu evidenciar, para todos os compostos, a formação de um único produto metilado, devido à presença de um sinal simples, com integração de 3 hidrogênios em todos os espectros de RMN de ^1H , referente aos hidrogênios metílicos introduzidos ao produto final através da reação de alquilação, variando entre 3,46-3,47ppm (DMSO). Da mesma forma, a observação dos espectros de ressonância de ^{13}C evidenciou a presença de somente um sinal, referente ao carbono metílico em questão, variando de 28,4-28,5ppm (DMSO).

Uma vez atribuída a presença de único produto metilado, fez-se necessária a sua caracterização. Segundo Barco e colaboradores, o uso de carbonato de potássio, como base desta reação, favorece a formação única dos produtos *N*-metilados (**65a-d** e **66a-d**), em face dos demais (BARCO *et al.*, 2003). Este fato pode ser, inicialmente, explicado através do conceito de moleza e dureza de Pearson, onde uso do carbonato de potássio favorece uma

forte associação entre o cátion potássio, uma espécie dura, e a espécie oxa-ânion (**115a-d**), deixando o oxigênio pouco disponível para atuar como um centro nucleofílico, favorecendo as reações de *N*- e *C*-metilação (PEARSON, 1936). Adicionalmente, as espécies aza-ânion (**113a-d**) e carbânion (**114a-d**) possuem um caráter mais mole com relação à espécie oxa-ânion (**115a-d**), segundo Pearson, e reagem preferencialmente com haletos de alquila contendo bromo e iodo, devido à melhor natureza destes grupos de saída (COSTA *et al.*, 2003; PEARSON, 1936). Já a seletividade pela *N*-alquilação poderia ser explicada também pelo menor impedimento estérico da espécie aza-ânion (**113a-d**), com relação ao carbânion (**114a-d**), além da dispersão de carga gerada pelo anel aromático neste último (**114a-d**). Somado a todos estes fatores, a análise da extensa quimioteca de *N*-metil-NAHs publicadas na literatura e sintetizadas com a metodologia descrita por Barco e colaboradores, utilizada neste trabalho, corrobora com a hipótese de formação do produto *N*-metilado desejado (**65a-d** e **66a-d**) (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

As *N*-metil-NAHs obtidas (**65a-d** e **66a-d**) foram caracterizadas através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C . Os sinais essenciais para determinar o sucesso da reação foram os respectivos à introdução do grupo metila na estrutura após reação de *N*-alquilação. O sinal simpleto no RMN ^1H com 3 hidrogênios de integração na faixa de 3,46-3,47ppm valida este fato, sendo característico de grupos alquila ligados a átomos de nitrogênio. Além disso, no espectro de carbono observou-se um sinal em 28.4-28,5ppm, novamente condizente à uma metila ligada à um átomo de nitrogênio. Cabe ressaltar, que o sinal na faixa de 11.73-11.75ppm no espectro de hidrogênio das NAHs de partida (**62a-d** e **63a-d**) não foi observado nos espectros das *N*-metil-NAHs sintetizadas (**65a-d** e **66a-d**), o que confirma a desprotonação do produto de partida para a introdução do grupo metila advindo do iodeto de metila (**64**), segundo o mecanismo proposto para a reação (Esquema 16). Outros sinais permaneceram similares aos dos produtos de partida, pois nenhuma grande modificação foi realizada na estrutura dos produtos desejados, o que corrobora com a justificativa de obtenção dos produtos *N*-metilados (**65a-d** e **66a-d**), em contrapartida dos produtos *C*-metilados (**116a-d**) e *O*-metilados (**117a-d**).

Foram realizados estudos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de correlação bidimensional (RMN 2D) para caracterizar integralmente as estruturas nas *N*-metil-NAHs sintetizadas das séries A e B, assim como para diferenciá-las entre si (Figuras 25-31 e tabelas 9 e 10). Foram escolhidos para a realização dos experimentos de 2D os produtos

65a (série A) e **66a** (série B) como modelo para os demais, por razão destes apresentarem as estruturas mais simples de cada série.

Os espectros de correlação, obtidos através dos experimentos de RMN 2D do tipo HSCQ (espectroscopia de correlação heteronuclear quântica única), para as *N*-metil-NAHs analisadas encontram-se dispostos nas figuras 25 e 27 (para os produtos **65a** e **66a**, respectivamente), com as suas respectivas atribuições. Cabe ressaltar que, estes experimentos revelam a correlação heteronuclear entre os átomos de carbono e hidrogênio, presentes nas estruturas dos produtos, através de uma ligação covalente, J^1 , tornando possível a atribuição inequívoca da maioria dos sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C (eixo vertical) e ^1H (eixo horizontal) unidimensionais (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Experimentos de RMN 2D do tipo HMBC (espectroscopia de correlação heteronuclear de múltiplas ligações) também foram realizados e os espectros de correlação obtidos encontram-se nas figuras 26 e 28 (para os produtos **65a** e **66a**, respectivamente), com as suas respectivas atribuições. Visto que, estes experimentos revelam a correlação heteronuclear entre carbono e hidrogênio, presentes na estrutura dos produtos, através de duas, três e, até, quatro ligações covalentes, J^2 , J^3 e J^4 , torna-se possível a atribuição inequívoca dos sinais observados nos espectros de RMN ^{13}C (eixo vertical) e ^1H (eixo horizontal) unidimensionais, que não puderam ser atribuídos com o auxílio dos espectros de HSQC (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Entretanto, para melhor visualização dos resultados observados nos espectros de HSQC e HMBC para os produtos **65a** e **66a**, as tabelas 8 e 9 foram elaboradas. Nestas, é possível observar os deslocamentos químicos (δ), em ppm, dos sinais presentes nos espectros de RMN ^1H (δ_{H}) e ^{13}C (δ_{C}) dos produtos e a correlação entre eles.

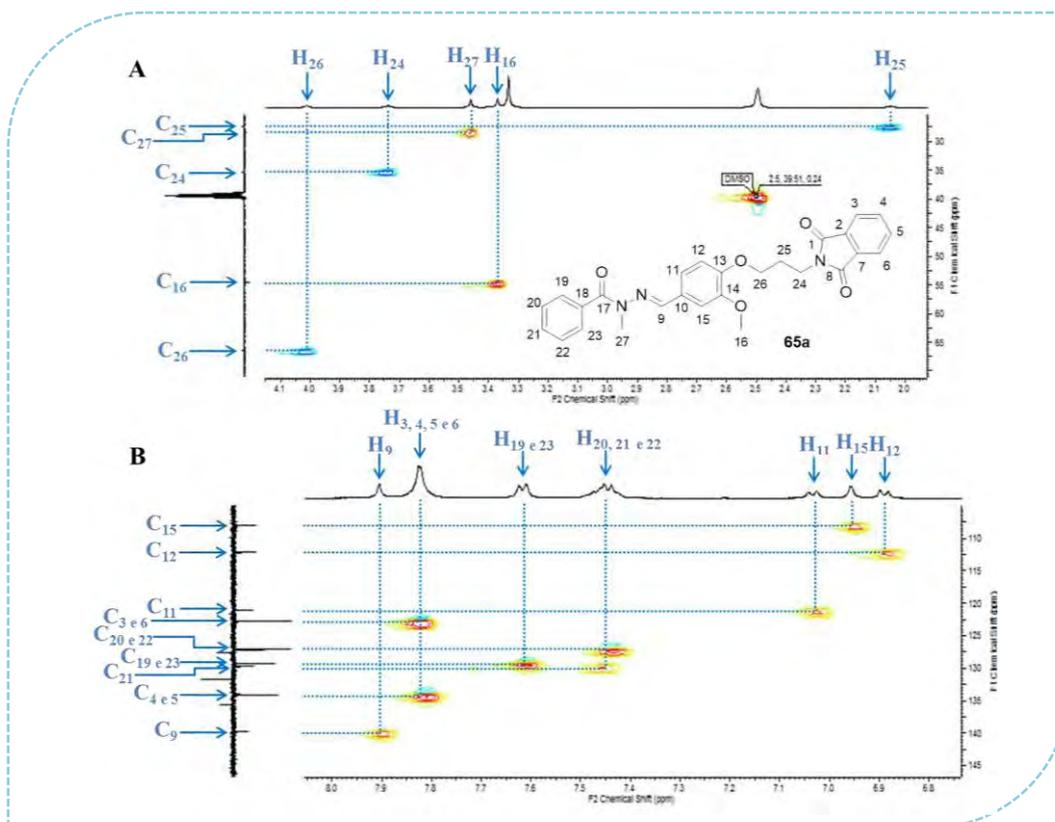


Figura 25. Espectros bidimensionais de HSQC do produto **65a** (Série A) em DMSO: Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,1ppm e 25,0-70,0ppm; B) 6,8-8,0ppm e 105,0-145,0ppm.

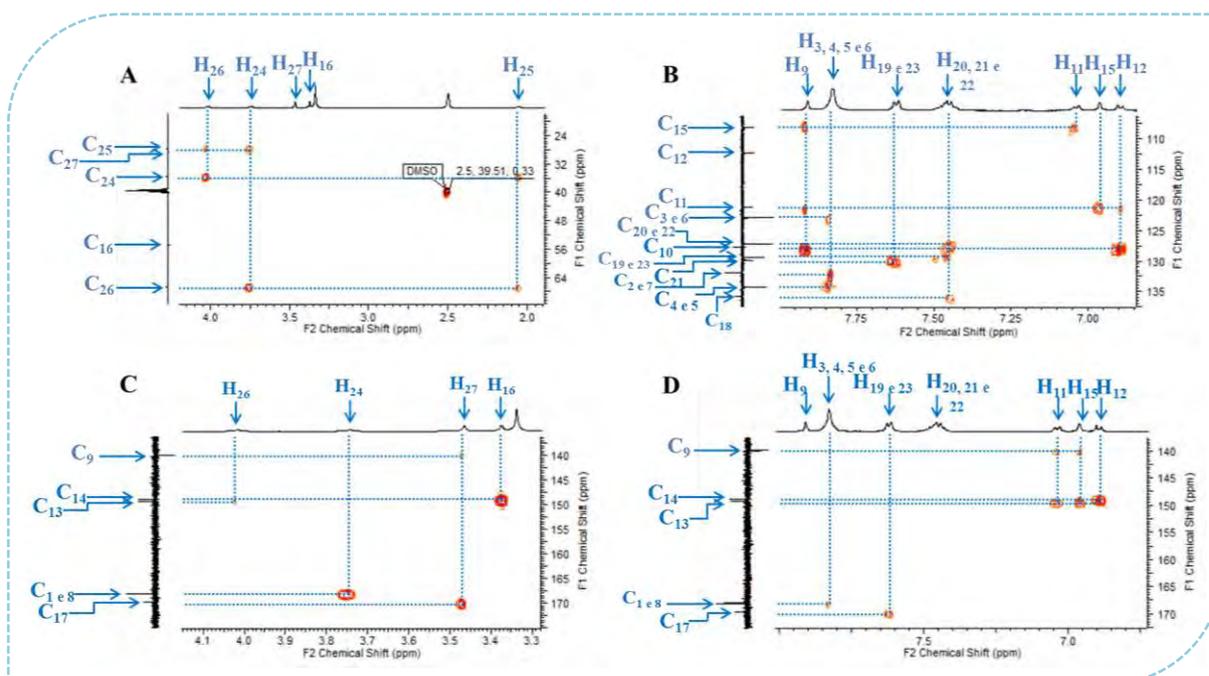


Figura 26. Espectros bidimensionais de HMBC do produto **65a** (Série A) em DMSO: Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,2ppm e 20,0-68,0ppm; B) 6,75-8,0ppm e 108,0-137,0ppm; C) 3,3-4,1ppm e 138,0-175,0ppm; D) 6,8-8,0ppm e 138,0-172,0ppm.

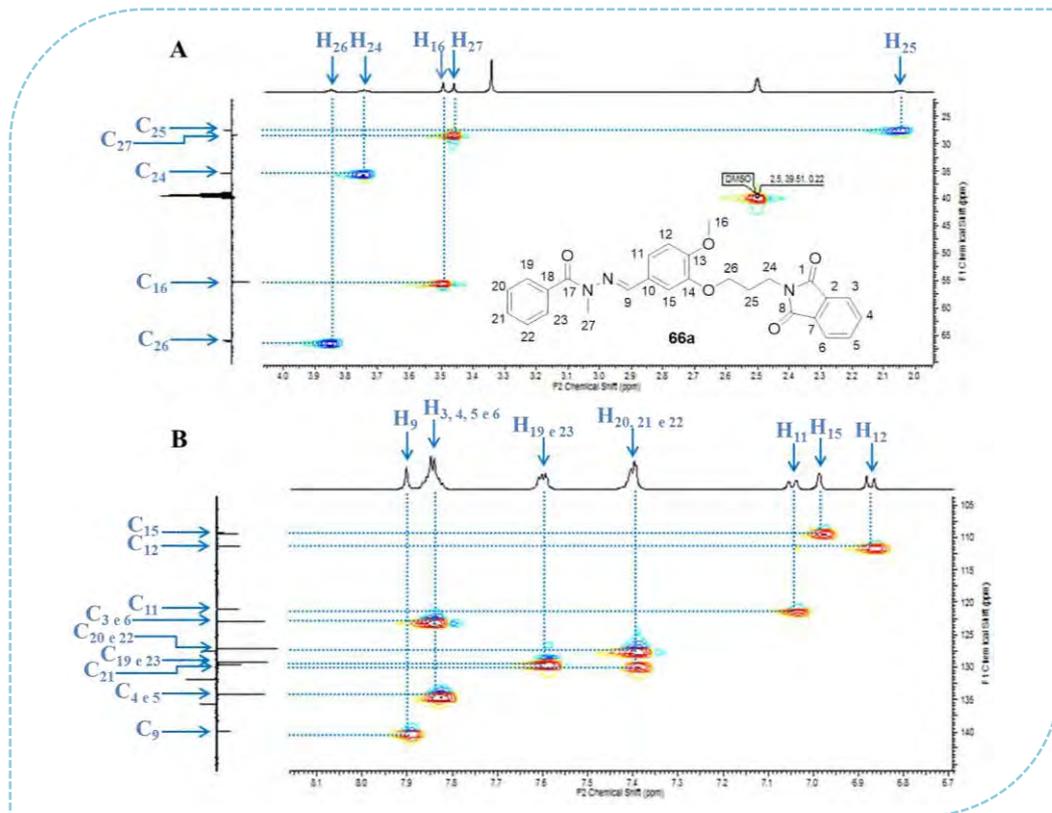


Figura 27. Espectros bidimensionais de HSQC do produto **66a** (Série B) em DMSO: Visualização das correlações J^1 entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,0ppm e 25,0-70,0ppm; B) 6,7-8,1ppm e 105,0-145,0ppm.

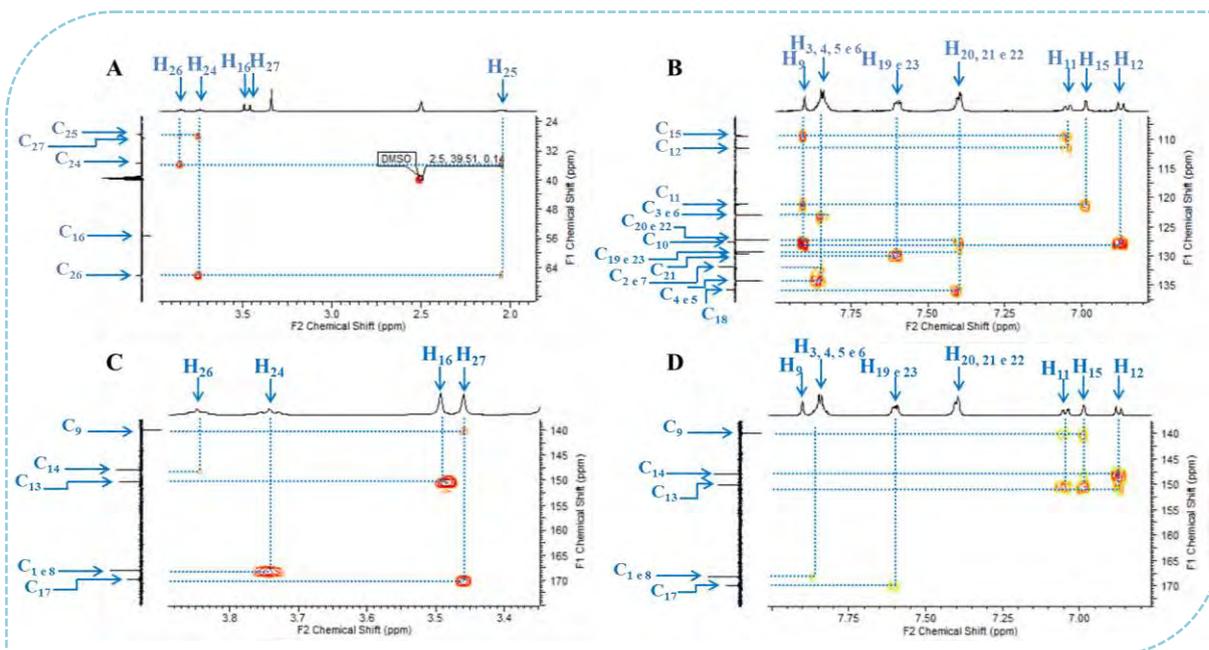


Figura 28. Espectros bidimensionais de HMBC do produto **66a** (Série B) em DMSO: Visualização das correlações J^2 , J^3 e J^2 , entre carbono e hidrogênio. Ampliações nos espectros de ^1H (eixo horizontal) e ^{13}C (eixo vertical), respectivamente, entre: A) 2,0-4,0ppm e 24,0-72,0ppm; B) 6,8-8,0ppm e 108,0-137,0ppm; C) 3,4-3,9ppm e 140,0-175,0ppm; D) 6,8-8,0ppm e 138,0-172,0ppm.

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (500MHz) e de ^{13}C (125MHz) do produto **65a** em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.

	HSQC (J^1)		HMBC		
	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade)	J^2_{CH}	J^3_{CH}	J^4_{CH}
C					
C ₁	168,0	-	-	H ₂₄ ; H ₃	-
C ₂	131,9	-	H ₃	H ₆ ; H ₄	-
C ₇	131,9	-	H ₆	H ₅ ; H ₃	-
C ₈	168,0	-	-	H ₂₄ ; H ₆	-
C ₁₀	127,7	-	H ₉	H ₁₂	-
C ₁₃	149,3	-	H ₁₂	H ₂₆ ; H ₁₅ ; H ₁₁	-
C ₁₄	148,9	-	H ₁₅	H ₁₆ ; H ₁₂	-
C ₁₇	169,7	-	-	H ₂₇ ; H ₂₃ ; H ₁₉	-
C ₁₈	135,7	-	-	H ₂₂ ; H ₂₀	-
CH					
C ₃	122,9	H ₃ : 7,83 (<i>m</i>)	H ₄	H ₅	-
C ₄	134,2	H ₄ : 7,83 (<i>m</i>)	H ₅ ; H ₃	H ₆	-
C ₅	134,2	H ₅ : 7,83 (<i>m</i>)	H ₆ ; H ₄	H ₃	-
C ₆	122,9	H ₆ : 7,83 (<i>m</i>)	H ₅	H ₄	-
C ₉	139,9	H ₉ : 7,91 (<i>s</i>)	-	H ₁₅ ; H ₁₁	H ₂₇
C ₁₁	121,2	H ₁₁ : 7,03 (<i>d</i> , $J=8,20\text{Hz}$)	H ₁₂	H ₁₅ ; H ₉	-
C ₁₂	112,2	H ₁₂ : 6,89 (<i>d</i> , $J=8,20\text{Hz}$)	-	-	-
C ₁₅	108,1	H ₁₅ : 6,96 (<i>s</i>)	-	H ₁₁ ; H ₉	-
C ₁₉	129,4	H ₁₉ : 7,62 (<i>d</i>)	H ₂₀	H ₂₃ ; H ₂₁	-
C ₂₀	127,2	H ₂₀ : 7,46 (<i>m</i>)	H ₂₁	H ₂₂	-
C ₂₁	129,8	H ₂₁ : 7,46 (<i>m</i>)	-	H ₂₃ ; H ₁₉	-
C ₂₂	127,2	H ₂₂ : 7,46 (<i>m</i>)	H ₂₁	H ₂₀	-
C ₂₃	129,4	H ₂₃ : 7,62 (<i>d</i>)	H ₂₂	H ₂₁ ; H ₁₉	-
CH₂					
C ₂₄	35,4	H ₂₄ : 3,74 (<i>t</i>)	H ₂₅	H ₂₆	-
C ₂₅	27,6	H ₂₅ : 2,05 (<i>m</i>)	H ₂₆ ; H ₂₄	-	-
C ₂₆	66,5	H ₂₆ : 4,01 (<i>t</i>)	H ₂₅	H ₂₄	-
CH₃					
C ₁₆	54,8	H ₁₆ : 3,37 (<i>s</i>)	-	-	-
C ₂₇	28,5	H ₂₇ : 3,46 (<i>s</i>)	-	-	-

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (500MHz) e de ^{13}C (125MHz) do produto **66a** em DMSO, incluindo os resultados obtidos dos espectros de correlação heteronuclear de HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4). Deslocamentos em δ (ppm) e multiplicidade entre parênteses.

66a

HSQC (J^1)		HMBC			
	δ_{C}	δ_{H} (multiplicidade)	J^2_{CH}	J^3_{CH}	J^4_{CH}
C					
C ₁	168,0	-	-	H ₂₄ ; H ₃	-
C ₂	131,8	-	H ₃	H ₆ ; H ₄	-
C ₇	131,8	-	H ₆	H ₅ ; H ₃	-
C ₈	168,0	-	-	H ₂₄ ; H ₆	-
C ₁₀	127,6	-	H ₉	H ₁₂	-
C ₁₃	150,1	-	H ₁₂	H ₁₆ ; H ₁₅ ; H ₁₁	-
C ₁₄	147,9	-	H ₁₅	H ₂₆ ; H ₁₂	-
C ₁₇	169,8	-	-	H ₂₇ ; H ₂₃ ; H ₁₉	-
C ₁₈	135,8	-	-	H ₂₂ ; H ₂₀	-
CH					
C ₃	122,9	H ₃ : 7,84 (<i>m</i>)	H ₄	H ₅	-
C ₄	134,2	H ₄ : 7,84 (<i>m</i>)	H ₅ ; H ₃	H ₆	-
C ₅	134,2	H ₅ : 7,84 (<i>m</i>)	H ₆ ; H ₄	H ₃	-
C ₆	122,9	H ₆ : 7,84 (<i>m</i>)	H ₅	H ₄	-
C ₉	139,9	H ₉ : 7,90 (<i>s</i>)	-	H ₁₅ ; H ₁₁	H ₂₇
C ₁₁	121,1	H ₁₁ : 7,05 (<i>d</i> , $J=8,20\text{Hz}$)	-	H ₁₅ ; H ₉	-
C ₁₂	111,4	H ₁₂ : 6,87 (<i>d</i> , $J=8,20\text{Hz}$)	H ₁₁	-	-
C ₁₅	109,3	H ₁₅ : 6,99 (<i>s</i>)	-	H ₁₁ ; H ₉	-
C ₁₉	129,3	H ₁₉ : 7,60 (<i>d</i>)	H ₂₀	H ₂₃ ; H ₂₁	-
C ₂₀	127,2	H ₂₀ : 7,40 (<i>m</i>)	H ₂₁	H ₂₂	-
C ₂₁	129,7	H ₂₁ : 7,40 (<i>m</i>)	-	H ₂₃ ; H ₁₉	-
C ₂₂	127,2	H ₂₂ : 7,40 (<i>m</i>)	H ₂₁	H ₂₀	-
C ₂₃	129,3	H ₂₃ : 7,60 (<i>d</i>)	H ₂₂	H ₂₁ ; H ₁₉	-
CH₂					
C ₂₄	35,4	H ₂₄ : 3,74 (<i>t</i>)	H ₂₅	H ₂₆	-
C ₂₅	27,5	H ₂₅ : 2,05 (<i>m</i>)	H ₂₆ ; H ₂₄	-	-
C ₂₆	66,1	H ₂₆ : 3,85 (<i>t</i>)	H ₂₅	H ₂₄	-
CH₃					
C ₁₆	55,3	H ₁₆ : 3,49 (<i>s</i>)	-	-	-
C ₂₇	28,5	H ₂₇ : 3,46 (<i>s</i>)	-	-	-

A diferenciação estrutural entre as séries A e B pôde ser determinada através da análise dos espectros de RMN bidimensionais do tipo HSQC e HMBC ilustrados nas figuras anteriores (Figuras 25-28) e sintetizados nas tabelas 8 e 9. A análise inicial do espectro de correlação do tipo HSQC da *N*-metil-NAH **65a** (série A) revelou uma singularidade deste produto, com relação aos sinais atribuídos às metilas (N-CH₃ e O-CH₃) presentes em sua estrutura (Figura 25A): o acoplamento observado entre o sinal em 28,5ppm no espectro de ¹³C (eixo vertical), atribuído ao carbono *N*-metílico (N-CH₃, ou C₂₇), ocorreu com o sinal em 3,46ppm no espectro de ¹H (eixo horizontal), enquanto o acoplamento entre o sinal em 54,8ppm no espectro de ¹³C (eixo vertical), atribuído ao carbono metoxílico (O-CH₃, ou C₁₆), ocorreu com o sinal em 3,37ppm no espectro de ¹H (eixo horizontal). Uma vez que o experimento de HSQC mostra o acoplamento entre núcleos de carbono e hidrogênio através de uma ligação (J^1) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), o sinal em 3,46ppm foi atribuído aos hidrogênios *N*-metílicos (N-CH₃, ou H₂₇) e o sinal em 3,37ppm aos hidrogênios da metoxila (O-CH₃, ou H₁₆) (Figura 25A e tabela 9). O que parecia improvável, uma vez que os hidrogênios metoxílicos (H₁₆) deveriam estar mais desprotegidos no espectro de ¹H do que os hidrogênios *N*-metílicos (H₂₇), pela diferença de eletronegatividade entre os átomos de nitrogênio e oxigênio, onde este último é mais eletronegativo (MCMURRY, 2016).

Para a *N*-metil-NAH da série B (**66a**) a atribuição dos sinais das metilas (N-CH₃ e O-CH₃), nos espectros de ¹H e ¹³C, foi realizada também através da observação do espectro de HSQC (Figura 27A e tabela 10). Desta vez, o resultado observado encontrou-se de acordo com o esperado, uma vez que foi identificado o acoplamento entre o sinal em 28,5ppm no espectro de ¹³C (eixo horizontal), atribuído ao carbono *N*-metílico (N-CH₃, ou C₂₇), e o sinal em 3,46ppm no espectro de ¹H (eixo horizontal), assim como o acoplamento entre o sinal em 55,3ppm no espectro de ¹³C (eixo vertical), atribuído ao carbono metoxílico (O-CH₃, ou C₁₆), e o sinal em 3,49ppm no espectro de ¹H (eixo horizontal). Ou seja, os sinais em 3,46ppm e 3,49ppm nos espectros de ¹H puderam ser atribuídos aos hidrogênios *N*-metílicos (N-CH₃, ou H₂₇) e metoxílicos (O-CH₃, ou H₁₆), respectivamente.

Nos espectros de RMN bidimensionais do tipo HMBC, onde pode-se observar a correlação entre os núcleos de carbono e hidrogênio à múltiplas ligações de distância (J^2 , J^3 e J^4) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007), foi possível visualizar outros acoplamentos que auxiliaram na diferenciação entre as séries A e B (Figuras 26 e 28), como o acoplamento entre os sinais dos carbonos quaternários, presentes no núcleo dialcoxifenila nas posições *para* e *meta* em

relação à imina (C_{13} e C_{14} , respectivamente), e os hidrogênios metoxílicos ($O-CH_3$, ou H_{16}) e O -metilênicos ($O-CH_2$, ou H_{26}).

Inicialmente, foi necessário atribuir de forma inequívoca, no espectro de ^{13}C , os sinais respectivos aos carbonos quaternários C_{13} e C_{14} , que se encontravam muito próximos na faixa de 147,9-150,1ppm. Para solucionar esse primeiro desafio, foram analisados os espectros de HMBC de ambos os produtos das séries A (**65a**) e B (**66a**). Observou-se a correlação entre o sinal na faixa de 149,3-150,1ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e os sinais atribuídos aos hidrogênios ligados ao sistema aromático do núcleo dialcoxifenila nas posições 11, 12 e 15, encontrados na faixa de 6,87-7,05ppm no espectro de 1H (eixo horizontal) (Figuras 26D e 28D; Tabelas 8 e 9). Isto permitiu a atribuição do sinal na faixa de 149,3-150,1ppm no espectro de ^{13}C ao carbono quaternário *para* à imina (C_{13}) na estrutura dos produtos **65a** e **66a**. Ademais, foi observado o acoplamento entre o sinal na faixa de 147,9-148,9ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e os sinais atribuídos aos hidrogênios ligados ao sistema aromático do núcleo dialcoxifenila nas posições 12 e 15, encontrados na faixa de 6,87-6,99ppm no espectro de 1H (eixo horizontal) (Figuras 26D e 28D; Tabelas 9 e 10), permitindo a atribuição do sinal na faixa de 147,9-148,9ppm no espectro de ^{13}C ao carbono quaternário *meta* à imina (C_{14}) na estrutura dos produtos **65a** e **66a**.

Posteriormente, foi realizada a análise dos espectros de HMBC das *N*-metil-NAHs, em questão, para observar a correlação entre os carbonos quaternários C_{13} e C_{14} e os hidrogênios metoxílicos ($O-CH_3$, ou H_{16}) e O -metilênicos ($O-CH_2$, ou H_{26}), de modo à distinguir as séries A e B (Figuras 26 e 28). Para o produto **65a** (série A) foi identificada uma correlação do tipo J^3 entre o sinal atribuído ao C_{14} em 148,9ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e o sinal atribuído aos hidrogênios metoxílicos ($O-CH_3$, ou H_{16}) em 3,37ppm no espectro de 1H (eixo horizontal). Foi observado também o acoplamento do tipo J^3 entre o sinal atribuído ao C_{13} em 149,3ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e o sinal atribuído aos hidrogênios O -metilênicos ($O-CH_2$, ou H_{26}) em 4,01ppm no espectro de 1H (eixo horizontal) (Figura 26C e Tabela 9). Entretanto, para o produto **66a** (série B) foi observado o inverso, onde identificou-se uma correlação do tipo J^3 entre o sinal atribuído ao C_{14} em 147,2ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e o sinal atribuído aos hidrogênios O -metilênicos ($O-CH_2$, ou H_{26}) em 3,85ppm no espectro de 1H (eixo horizontal). Foi observado também o acoplamento do tipo J^3 entre o sinal atribuído ao C_{13} em 150,1ppm, no espectro de ^{13}C (eixo vertical), e o sinal atribuído aos hidrogênios metoxílicos ($O-CH_3$, ou H_{16}) em 3,49ppm no espectro de 1H (eixo horizontal) (Figura 28C e Tabela 10).

De maneira a sanar qualquer dúvida com relação às diferenças estruturais entre as séries A e B, foram realizados experimentos de RMN 2D do tipo NOESY, onde foi possível observar as interações espaciais homonucleares entre os núcleos de hidrogênio presentes na estrutura das *N*-metil-NAHs analisadas (**65a** e **66a**) (Figuras 29 e 30) (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Duas principais interações foram observadas para este fim: as interações entre os sinais atribuídos aos hidrogênios metoxílicos (O-CH₃, H₁₆), ou aos hidrogênios *O*-metilênicos (O-CH₂, H₂₆), e os hidrogênios ligados ao sistema aromático do núcleo dialcoxifenila (H₁₂ e H₁₅).

Para o produto **65a** (série A) foi observada a interação espacial (NOE – Efeito Overhauser Nuclear) entre o sinal em 6,89ppm (eixo vertical), atribuído ao hidrogênio H₁₂ do núcleo dialcoxifenila, e o sinal em 4,01ppm (eixo horizontal), atribuído aos hidrogênios *O*-metilênicos (H₂₆) (Figura 29A). Observou-se também a interação espacial (NOE) entre o sinal em 3,37ppm, atribuído aos hidrogênios metoxílicos (H₁₆), e o sinal em 6,96ppm, atribuído ao hidrogênio H₁₅ do núcleo dialcoxifenila (Figura 29B).

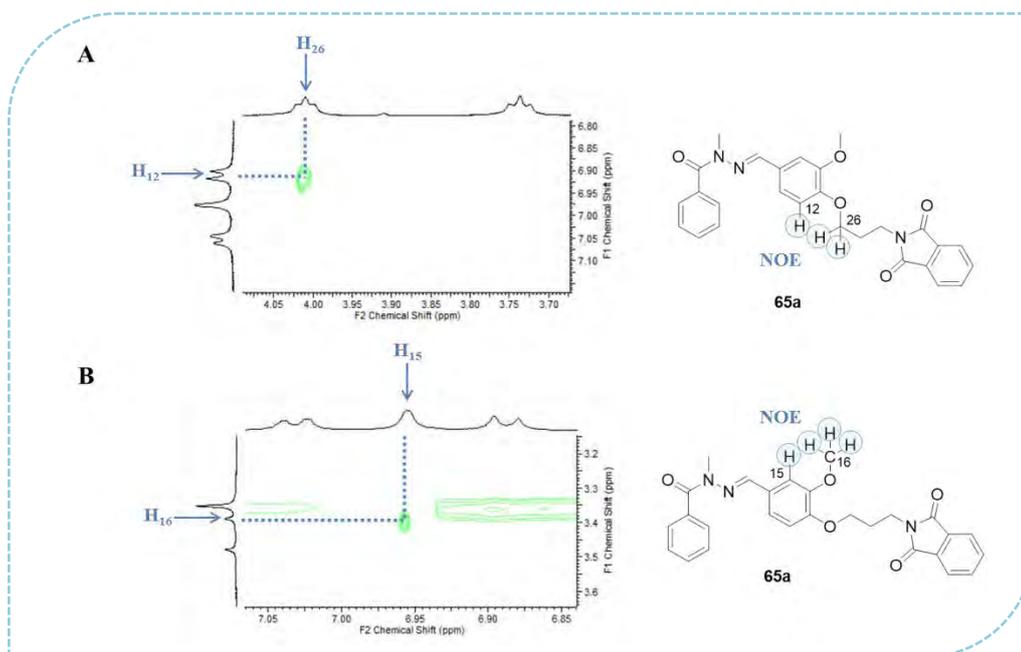


Figura 29. Espectro de RMN bidimensional NOESY da *N*-metil-NAH **65a** (Série A) em DMSO. Visualização da interação espacial entre: A) os átomos de hidrogênio 12 e 26, com ampliação entre 3,70-4,05ppm no eixo horizontal e 6,80-7,15ppm no eixo vertical; B) os átomos de hidrogênio 15 e 16, com ampliação entre 6,85-7,05ppm no eixo horizontal e 3,2-3,6ppm no eixo vertical.

Inversamente, para o produto **66a** (série B) foi observado a interação espacial (NOE) entre o sinal em 6,87ppm, atribuído ao hidrogênio H₁₂ presente no núcleo dialcoxifenila, e o sinal em 3,49ppm, atribuído aos hidrogênios metoxílicos (H₁₆) (Figura 30A). Observou-se também a interação espacial (NOE) entre o sinal em 3,85ppm, atribuído aos hidrogênios *O*-

metilênicos (H_{26}), e o sinal em 6,99ppm, atribuído ao hidrogênio H_{15} do núcleo dialcoxifenila (Figura 29B).

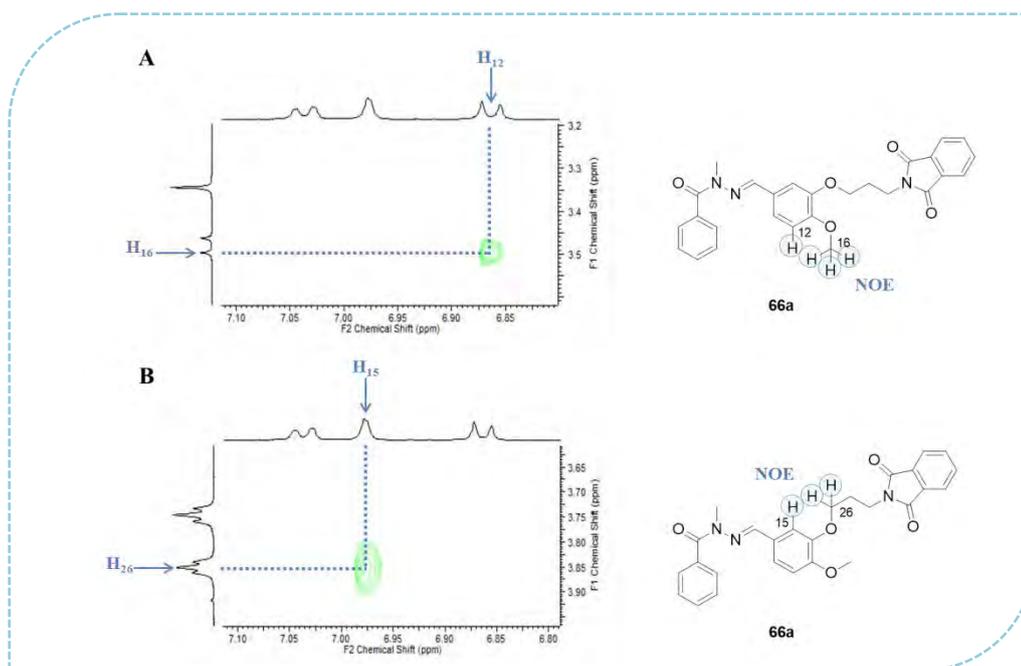


Figura 30. Espectro de RMN bidimensional NOESY da *N*-metil-NAH **66a** (Série B) em DMSO. Visualização da interação espacial entre: A) os átomos de hidrogênio 12 e 16, com ampliação entre 6,80-7,10ppm no eixo horizontal e 3,2-3,6 no eixo vertical; B) os átomos de hidrogênio 15 e 26, com ampliação entre 6,80-7,10ppm no eixo horizontal e 3,65-3,95ppm no eixo vertical .

De maneira a caracterizar a configuração relativa *E* dos produtos *N*-metil-NAHs das séries A e B, foi observado o espectro de RMN bidimensional de interação espacial NOESY com ampliação na região entre 3,2-4,0ppm (eixo vertical) e 7,7-8,0ppm (eixo horizontal) nos espectros de 1H (Figura 31). Tanto para o produto **65a** (série A), quanto para o **66a** (série B) foi observada a interação entre o sinal em 3,46ppm (eixo vertical) e o sinal na faixa de 7,90-7,91ppm (eixo horizontal), onde estes foram atribuídos aos hidrogênios *N*-metílicos ($N-CH_3$, ou H_{27}) e ao hidrogênio imínico ($N=CH$, ou H_9), respectivamente (Figura 31). Cabe destacar que, este resultado só poderia ser observado quando da configuração diastereoisomérica *E*, uma vez que para a configuração *Z* os núcleos de hidrogênio imínico ($N=CH$, ou H_9) e *N*-metoxílicos ($N-CH_3$, ou H_{27}) não estariam próximos para uma interação espacial.

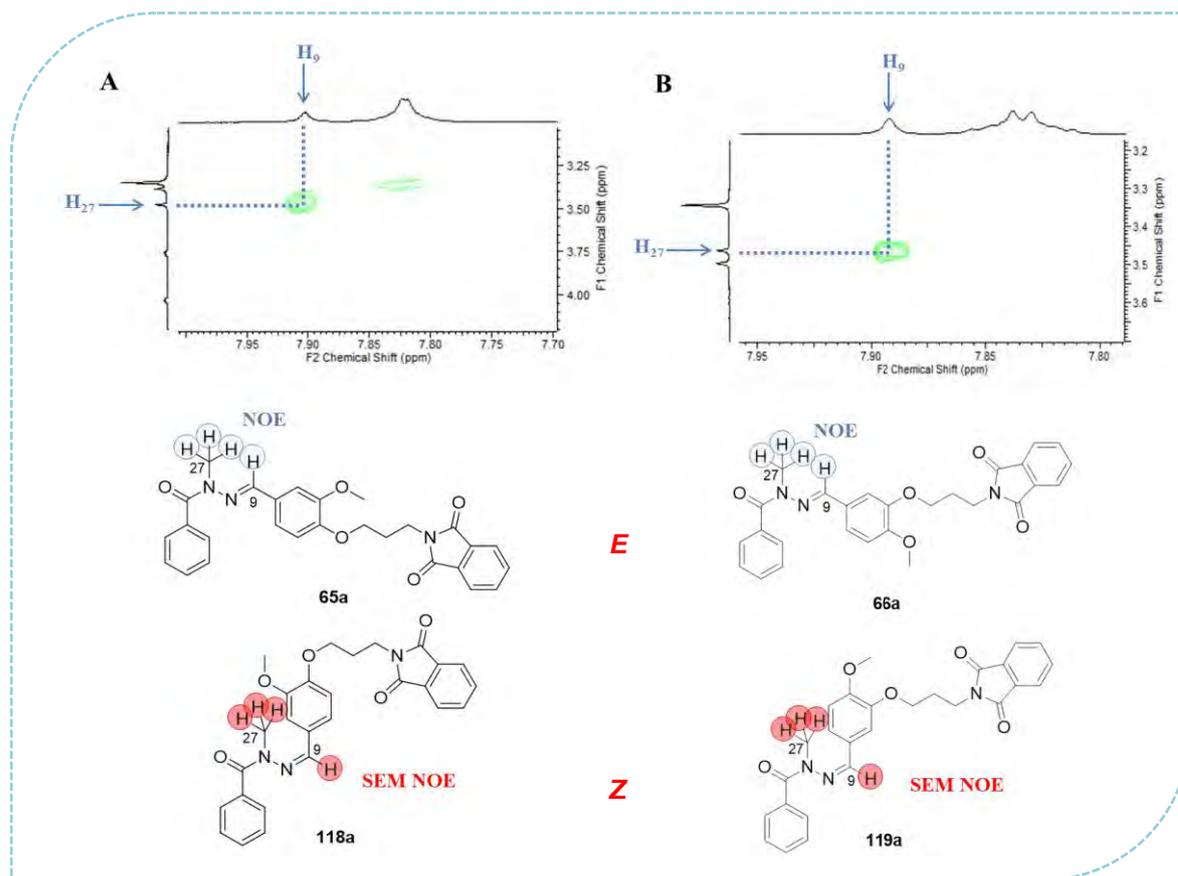
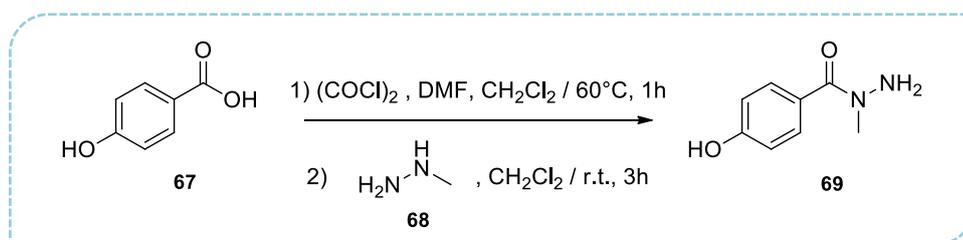


Figura 31. Espectro de RMN bidimensional NOESY das *N*-metil-NAHs em DMSO: A) **65a** (Série A), com ampliação entre 7,70-8,00ppm no eixo horizontal e 3,00-4,25ppm no eixo vertical; B) **66a** (Série B), com ampliação entre 7,80-7,95ppm no eixo horizontal e 3,20-3,70ppm no eixo vertical. Visualização da interação espacial entre os átomos de hidrogênio 9 e 27 para determinação da configuração relativa *E*.

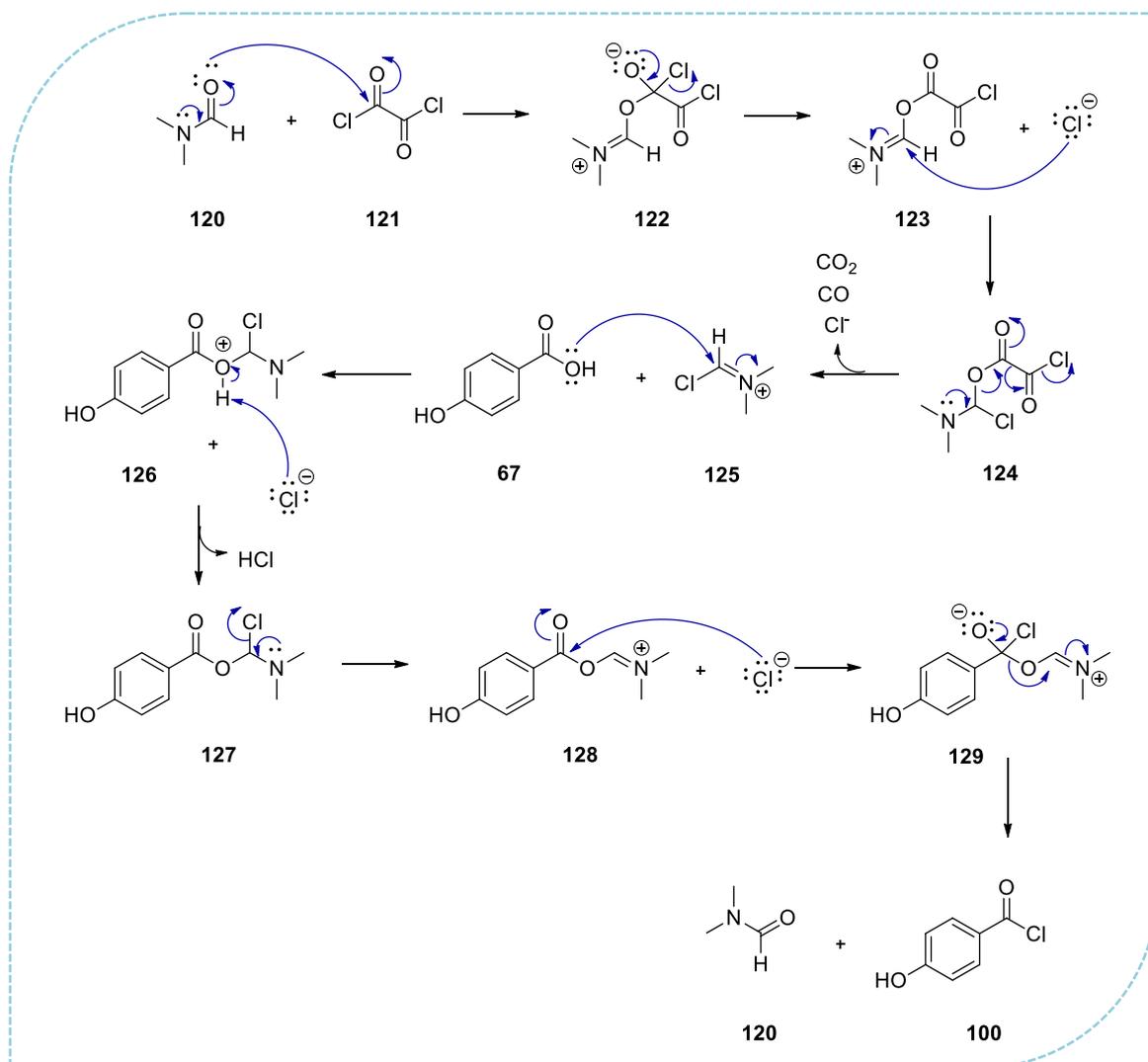
4.1.2.1.5) Síntese da *N*-metil-hidrazida hidroxilada da série C

A síntese do bloco das *N*-metil-NAHs da série C iniciou-se com a obtenção da *N*-metil-hidrazida hidroxilada (**69**) após duas etapas reacionais. A primeira consistiu na reação entre o ácido 4-hidroxibenzoico (**67**) e cloreto de oxalila, na presença de DMF como catalizador, para a obtenção do intermediário mais reativo, *i.e.* o seu respectivo cloreto de ácido (**100**) (Esquema 17) (BENSTEAD *et al.*, 2005). A segunda etapa consistiu na reação de substituição nucleofílica à carbonila entre o cloreto de ácido (**100**), obtido anteriormente, e a metil-hidrazina (**68**) à 0°C (Esquema 17) (BENSTEAD *et al.*, 2005). O produto obtido (**69**) foi isolado, purificado através de coluna cromatográfica de fase normal, e caracterizado por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H . O rendimento reacional foi considerado razoável de 54% e o ponto de fusão determinado foi de 155°C.



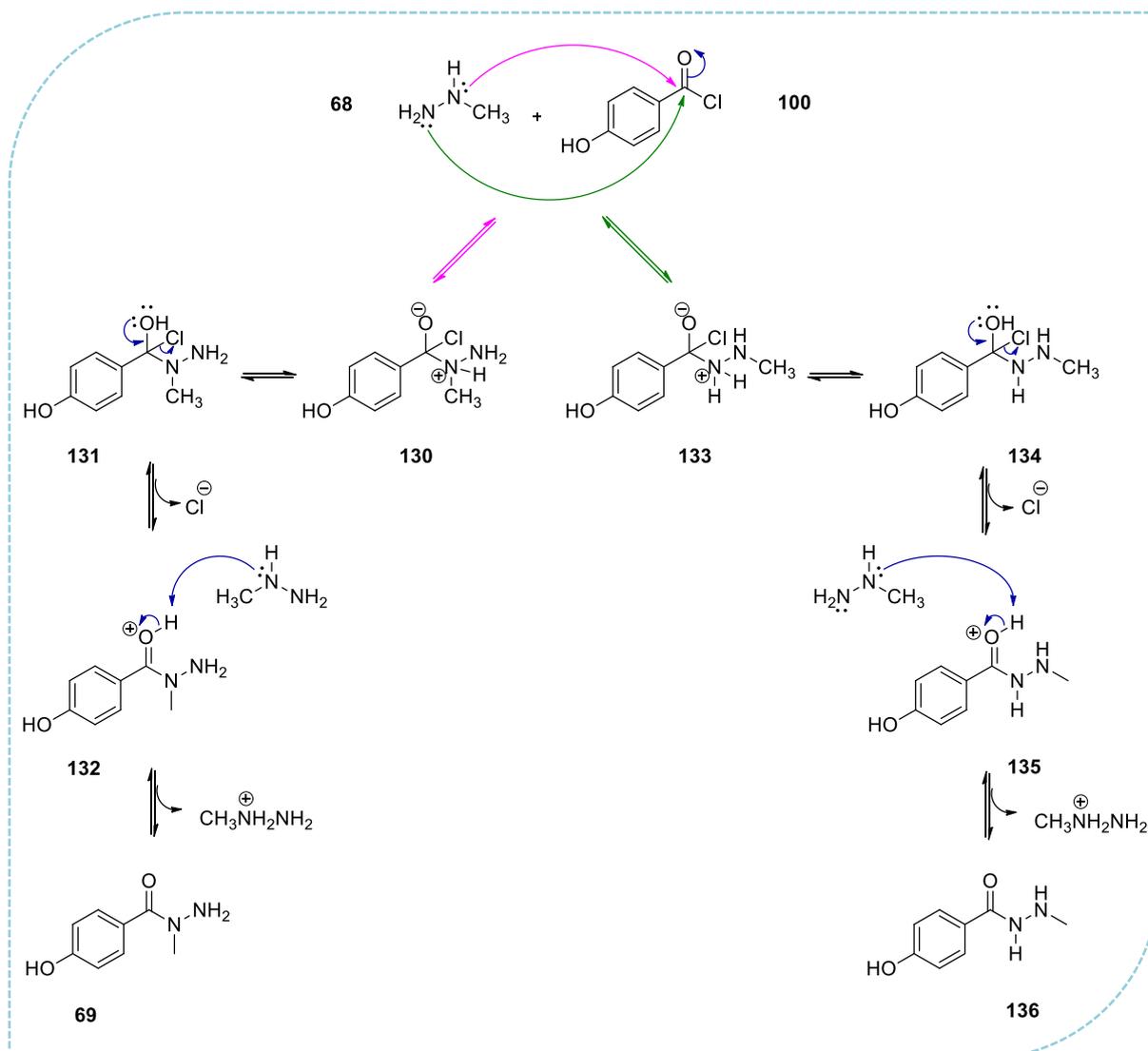
Esquema 17. Reações de substituição nucleofílica à carbonila para obtenção da *N*-metil-hidrazida hidroxilada **69** da série C.

A primeira etapa para a obtenção da *N*-metil-hidrazida hidroxilada (**69**) consiste na síntese do cloreto de acila (**100**), onde o mecanismo é regido basicamente por uma reação de substituição nucleofílica à carbonila ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$; Esquema 18) (CLAYDEN *et al.*, 2012). Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligantes do oxigênio carbonílico, presente na estrutura do DMF (**120**), ao carbono carbonílico eletrofílico do cloreto de oxalila (**121**), e formação do intermediário íon imidoíla **122**. Este, ao restituir a dupla ligação da carbonila promove a eliminação do íon cloreto, um bom grupo abandonador, para a obtenção do respectivo éster imidoílico (**123**). Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico do íon cloreto sobre o carbono imínico presente na estrutura do intermediário **123**, para a formação da cloro-amina **124**. Esta, por sua vez, sofre rearranjo intramolecular para gerar o cloreto de imidoíla **125**, com liberação de monóxido e dióxido de carbono. Após a formação do intermediário-chave (**125**), enfim ocorre a reação deste com o ácido carboxílico de partida (**67**), através do ataque nucleofílico do par de elétrons do átomo de oxigênio carboxílico (**67**) ao centro eletrofílico do cloreto de imidoíla (**125**). O éster formado (**126**) é desprotonado e gera a cloro-amina intermediária **127**, que por sua vez, através da eliminação do grupo cloreto, gera o éster imidoílico **128**. Este último sofre um ataque nucleofílico do íon cloreto sobre o carbono carbonílico de sua estrutura para formar o intermediário **129**, que, ao restituir a dupla ligação carbonílica, promove a eliminação do grupo formamida e gera o cloreto de ácido desejado **100** (Esquema 18) (CLAYDEN *et al.*, 2012).



Esquema 18. Mecanismo de formação do cloreto de ácido (**100**) para obtenção do bloco das *N*-metil-NAHs da série C, via mecanismo de substituição nucleofílica à carbonila ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$) (Adaptado de CLAYDEN *et al.*, 2012).

A segunda etapa para a obtenção da hidroxí-hidrazida (**69**) consistiu na reação entre o cloreto de acila preparado anteriormente (**100**), que não foi isolado e caracterizado, e metilidrazina (**68**) (Esquema 17) (COSTA *et al.*, 2003). O mecanismo desta ocorre via substituição nucleofílica à carbonila e está descrito no esquema 19. Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligantes presentes no átomo de nitrogênio da metilidrazina (**68**) ao centro eletrofílico do cloreto de ácido (**100**), gerando as amônias intermediárias **130** (quando o ataque se dá pelo nitrogênio da amina alquilada) e **133** (quando o ataque se dá pelo nitrogênio da amina não alquilada). Posteriormente, ocorre uma transferência de prótons do átomo do nitrogênio para o oxigênio nos intermediários **130** e **133**, via metilidrazina (**68**). Por fim, ocorre a restituição da dupla ligação carbonílica na estrutura destes últimos, seguida de desprotonação dos íons oxônio (**132** e **135**), para a obtenção das *N*-metil-hidrazidas **69** e **136** (Esquema 19) (COSTA *et al.*, 2003).



Esquema 19. Mecanismo de formação da *N*-metil-hidrazida hidroxilada **69**, com possível formação do produto **136**, partindo do cloreto de ácido **100** e de metilidrazina (**68**), via mecanismo de substituição nucleofílica à carbonila (S_NAc) (Adaptado de COSTA *et al.*, 2003).

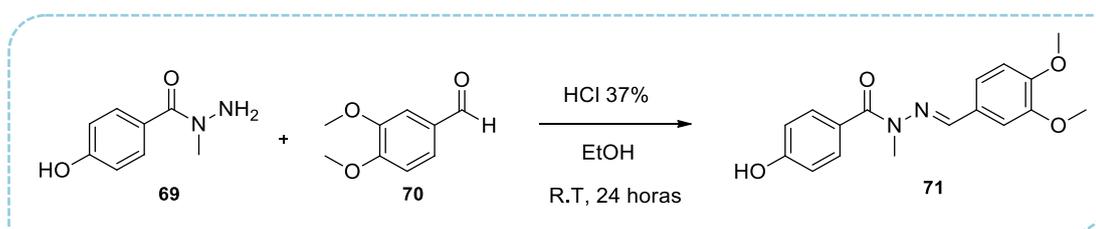
Devido a existência de dois centros nucleofílicos na metilidrazina (Esquema 19), esta foi adicionada lentamente sobre as soluções, à 0°C, dos cloretos de ácidos correspondentes, visando uma regiosseletividade do ataque nucleofílico realizado pela amina alquilada que é mais nucleofílica devido ao efeito indutivo da metila, para a obtenção do produto cinético desejado (**69**), em contrapartida do produto termodinâmico (**136**) (BENSTEAD *et al.*, 2005).

A análise do espectro de RMN de ¹H da *N*-metil-hidrazida hidroxilada da série C (**69**), permitiu evidenciar o sucesso da reação, uma vez que foi observado o sinal simpleto com três hidrogênios de integração, referente à *N*-metila presente na estrutura do produto desejado (**69**) e ausente no produto de partida (**67**). Foi comprovado também o ataque seletivo do nitrogênio secundário (-NHCH₃) devido à ausência do sinal referente ao hidrogênio da função amida em

torno de 9,0-10,0ppm, característico de hidrazidas não metiladas, já descritas na literatura (KÜMMERLE *et al.*, 2012), além da presença do sinal referente ao hidrogênio amínico da hidrazida (-NCH₃NH₂) com integral de sinais igual a dois hidrogênios, em 4,83ppm.

4.1.2.1.6 Síntese da *N*-metil-NAH hidroxilada da série C

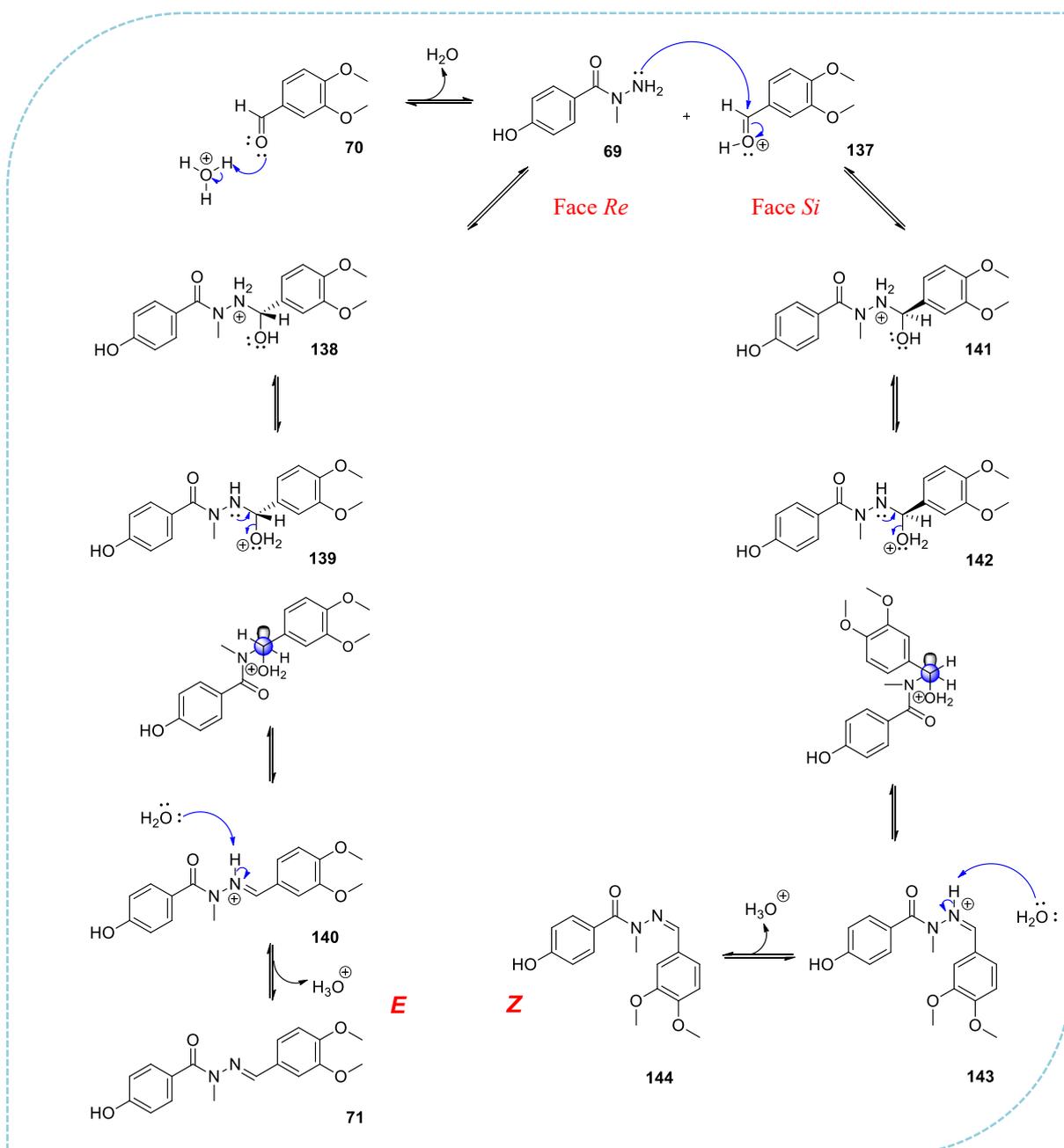
A segunda etapa para a construção do bloco das *N*-metil-NAHS da série C consistiu em uma reação de condensação clássica entre a hidroxí-hidrazida (**69**) e 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**), catalisada por ácido clorídrico e realizada à temperatura ambiente (Esquema 25) (LIMA *et al.*, 2000; RIBEIRO *et al.*, 1998). O produto obtido (**71**) foi isolado e caracterizado por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C. O rendimento reacional foi considerado bom de 63% e o ponto de fusão determinado foi de 210°C.



Esquema 20. Reação de condensação para a obtenção da *N*-metil-NAH hidroxilada (**71**) da série C.

Como mencionado anteriormente, a reação em questão é regida por um mecanismo de condensação clássica, catalisado por ácido, entre a hidroxí-hidrazida (**69**) e 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**) (COSTA *et al.*, 2003). A primeira etapa consiste na protonação do aldeído (**70**), levando à formação do íon oxônio (**137**). Em seguida, ocorre um ataque nucleofílico do par de elétrons da amina primária da hidrazida (**69**) à carbonila ativada do aldeído (**137**), gerando os intermediários hemiaminais *N*-protonados **138** (quando o ataque ocorre pela face *Re*) e **141** (quando o ataque ocorre pela face *Si*) correspondentes. Fato que pode ser explicado pela planaridade da carbonila do aldeído em questão, onde o carbono carbonílico está hibridizado em sp², permitindo uma aproximação do nucleófilo pela face da “frente”, ou de “trás” da molécula (MCMURRY, 2016). Posteriormente, ocorre uma transferência de prótons do átomo de nitrogênio para o oxigênio nos intermediários hemiaminais *N*-protonados (**138** e **141**), via solvente, com formação de um bom grupo de saída, *i.e.* água, e obtenção dos intermediários hemiaminais *O*-protonados (**139** e **142**). Em seguida, ocorre uma reação de eliminação do grupo de saída com, concomitante, formação de ligação π nos intermediários hemiaminais (**139** e **142**) e a formação dos íons imínicos (**140** e **143**). Por fim, estes são desprotonados, via solvente, podendo levar à formação de iminas

diastereoisoméricas de configuração relativa *E* (**71**) e/ou *Z* (**144**) (Esquema 21) (COSTA *et al.*, 2003).



Esquema 21. Mecanismo para a obtenção da *N*-metil-NAH hidroxilada **71** da série C com configuração relativa *E*, via reação de condensação ácido-catalisada, e possível formação de seu isômero geométrico *Z* (**144**) (Adaptado de COSTA *et al.*, 2003).

A análise dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C da *N*-metil-NAH sintetizada (**71**) permitiu evidenciar, novamente, a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal simples, no espectro de RMN 1H , referente ao hidrogênio imínico ($N=CH$) do grupo NAH, em 7,90ppm (DMSO). Da mesma forma, a observação do espectro

de RMN ^{13}C evidenciou a presença de somente um sinal referente ao carbono imínico em 139,3ppm (DMSO).

Uma vez atribuída a presença de único diastereoisômero, fez-se necessário a determinação da configuração relativa da ligação dupla imínica da *N*-metil-NAH sintetizada. (**71**). Para isto, foram comparados os dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C desta com os dados das *N*-metil-NAHs das séries A e B (**65a-d** e **66a-d**, respectivamente), caracterizadas com configuração relativa *E*. Para as séries A e B, o sinal atribuído ao hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de RMN ^1H , variou entre 7,90-7,92ppm (DMSO) e o sinal atribuído ao carbono imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de ^{13}C , variou entre 139,7-140,0 (DMSO). E para a NAH **71**, os respectivos sinais foram observados em 7,90ppm (RMN ^1H - DMSO) e 139,3ppm (RMN ^{13}C - DMSO). Estendendo a análise realizada dos espectros de RMN para as *N*-metil-NAHs das séries A e B (**65a-d** e **66a-d**) para a *N*-metil-NAH da série C (**71**), concluiu-se que a configuração relativa desta é do tipo *E*.

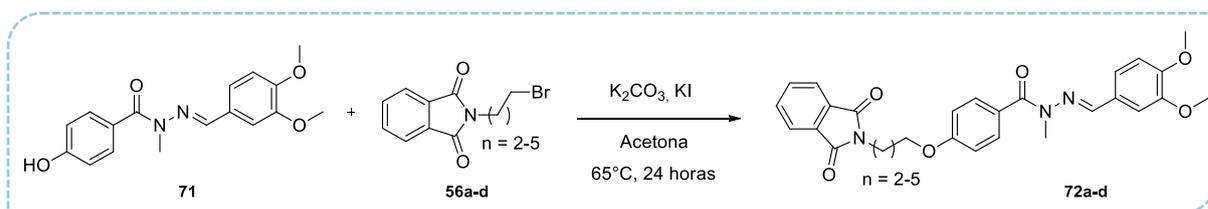
Kümmerle e colaboradores também sintetizaram uma quimioteca de *N*-metil-NAHs hidroxiladas com configuração relativa do tipo *E*. Onde, o sinal atribuído ao hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de RMN ^1H , variou entre 7,7-8,2ppm (DMSO) e o sinal atribuído ao carbono imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$), no espectro de ^{13}C , variou entre 130,8-141,3ppm (DMSO) (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Uma vez que, a metodologia empregada neste trabalho foi a mesma utilizada pelos autores acima citados, e que os resultados observados nos espectros de RMN apresentam similaridades, com relação ao sinal do hidrogênio e carbono imínicos, com a *N*-metil-NAH **71** (7,90ppm e 139,3ppm nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C - DMSO), concluiu-se que, de fato, a configuração relativa do produto sintetizado (**71**) é do tipo *E*.

A *N*-metil-NAH hidroxilada da série C (**71**) foi caracterizada por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e alguns sinais foram essenciais para determinar o sucesso da reação de condensação proposta. No espectro de RMN ^1H foi observado a presença do simpleto em 7,90ppm que foi atribuído ao hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$) presente no produto desejado (**71**). Atribuição semelhante foi realizada para o sinal em 139,29ppm no espectro de carbono. Cabe ressaltar, que estes sinais não estavam presentes no produto de partida (**69**). A presença dos sinais em 3,77ppm e 3,70ppm, no espectro de hidrogênio, e 55,53ppm e 55,05ppm, no espectro de carbono, também contribuem para a caracterização da hidrazona **71**, pois estes podem ser atribuídos às metilas advindas do aldeído de partida (**70**). A ausência do sinal em 4,83ppm no RMN ^1H , atribuído anteriormente aos hidrogênios ligados à amina

primária da hidroxí-hidrazida de partida (**69**), também corrobora para confirmar a ocorrência da reação de condensação entre os reagentes de partida (**69** e **70**) para a formação da hidrazona desejada (**71**).

4.1.2.1.7) Síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas da série C

A terceira etapa na síntese do bloco das *N*-metil-NAHs da série C consistiu em uma reação de *O*-alquilação entre as ftalimidas alquiladas (**56a-d**), preparadas anteriormente, e a *N*-metil-NAH hidroxilada **71**, em meio básico, para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas **72a-d** (Esquema 22) (LUI *et al.*, 2013). Os produtos obtidos foram isolados e caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e determinação de ponto de fusão (Tabela 11). Os rendimentos reacionais foram considerados de bons à excelentes para os produtos sintetizados variando entre 64-94% após processo de isolamento (Tabela 11).



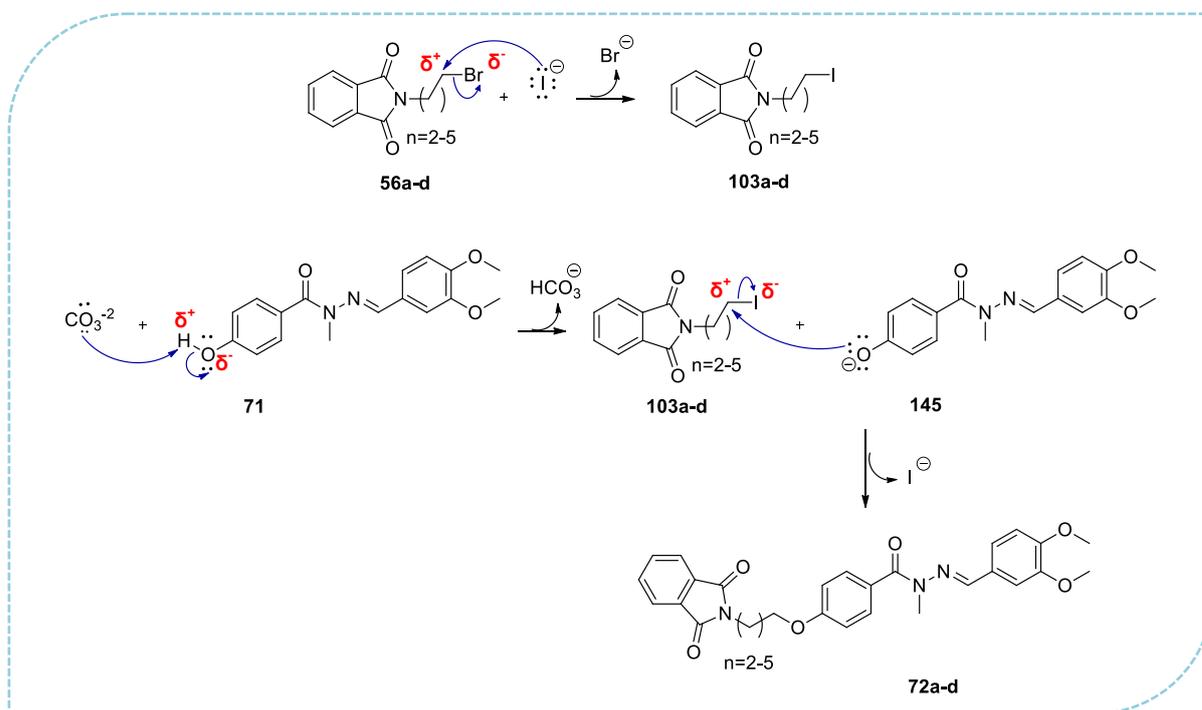
Esquema 22. Reação de *O*-alquilação para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas da série C (**72a-d**).

Tabela 11. Tabela de rendimentos reacionais e pontos de fusão para as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas da série C (**72a-d**).

Produtos	n	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
72a	2	94	147
72b	3	93	134
72c	4	87	130
72d	5	64	114

A reação em questão é regida pelo mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) que resulta na obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas (**72a-d**) (Esquema 23) (MCMURRY, 2016). Inicialmente ocorre a troca entre os íons brometo e iodeto no produto **56a-d**, promovida pela presença do iodeto de potássio, que é o catalisador desta reação. Esta troca iônica favorece a reação de substituição nucleofílica seguinte, pois o produto formado (**103a-d**) possui um grupo abandonador mais eficiente se comparado ao produto bromado (**56a-d**). Na etapa seguinte ocorre a desprotonação da hidrazona **71** pelo carbonato presente no meio. Posteriormente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons do oxigênio da

hidrazona desprotonada (**145**) ao carbono eletrofílico do iodeto de alquila **103a-d**. Paralelamente, ocorre a eliminação do grupo íon iodeto presente na estrutura deste último, pois este é um excelente grupo de saída, formando os produtos desejados (**72a-d**). (Esquema 23) (MCMURRY, 2016).

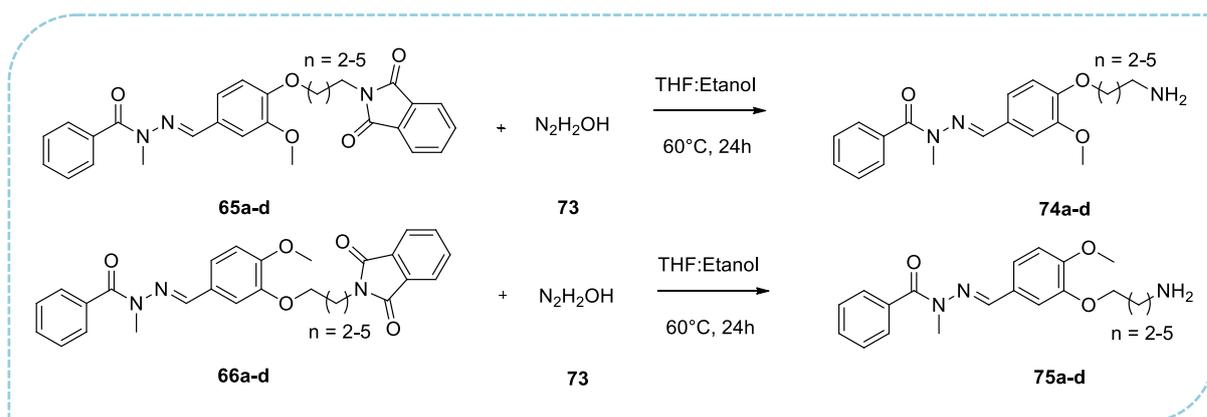


Esquema 23. Mecanismo para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alkiladas **72a-d** da série C, via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

As *N*-metil-NAHs *O*-alkiladas (**72a-d**) foram caracterizadas através de RMN 1H e ^{13}C . Inicialmente observou-se a ausência do sinal 9,96ppm no espectro de 1H referente ao hidrogênio da hidroxila (OH) presente no produto de partida (**71**) o que indicou uma possível formação dos produtos *O*-alkilados desejados (**72a-d**). Multipletos na região de 7,80-7,88ppm no RMN 1H foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos presentes no anel ftalimídico inserido no produto final (**72a-d**), assim como a presença de três sinais entre 132,2-131,6ppm, 122,9-123,4 e 134,3-134,8ppm no espectro de ^{13}C que foram também atribuídos aos carbonos desta subunidade. Outros sinais característicos da formação do produto desejado (**72a-d**) foram observados no RMN 1H , como os dois tripletos com integração de 2 hidrogênios cada, entre 4,07-3,99ppm e 3,78-3,58ppm caracterizados como os metilenos *O*-alkilados e *N*-alkilados, respectivamente. Por fim, observou-se a aparição um sinal na faixa de 168,4-167,9ppm nos espectros dos produtos **72a-d** referente às carbonilas presentes no anel ftalimídico. Deste modo, as hidrazonas desejadas foram caracterizadas de forma inequívoca.

4.1.2.1.8) Síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas das séries A e B

A última etapa na síntese do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B consistiu em uma reação de desproteção por hidrazinólise das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas sintetizadas em etapas anteriores (**65a-d**, para a série A; e **66a-d**, para a série B) em meio de hidrato de hidrazina (**73**) à 60°C (Esquema 24) (LIU *et al.*, 2013) (Tabela 12). Dos produtos obtidos, somente um (**74a**) foi purificado através de cromatografia em coluna de fase reversa, com 40% de rendimento, e caracterizado por técnicas espectroscópicas de RMN ¹H e ¹³C. Os rendimentos reacionais para os outros produtos brutos variaram entre 108-153% (Tabela 12).



Esquema 24. Reação de hidrazinólise para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas das séries A (**74a-d**) e B (**75a-d**).

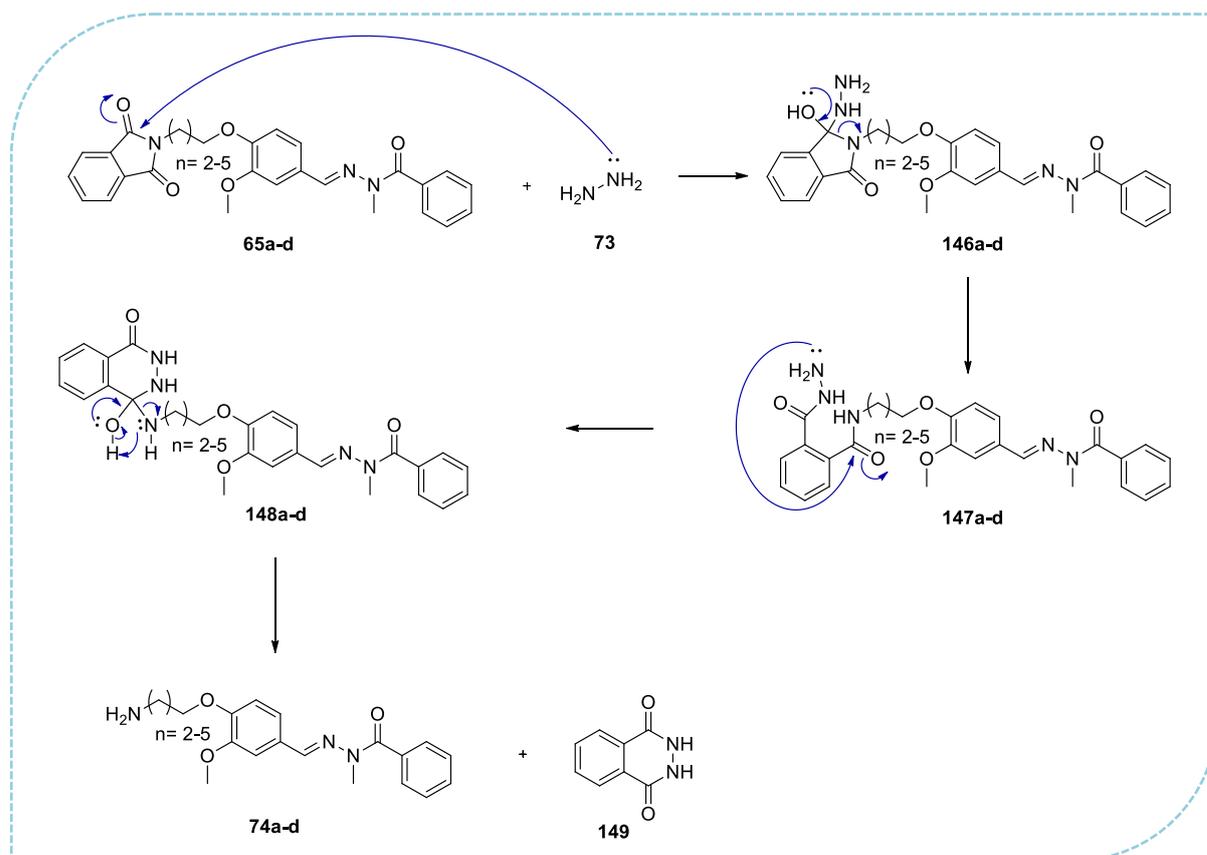
Tabela 12. Tabela de rendimentos reacionais para as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas das séries A (**74a-d**) e B (**75a-d**).

Produtos	n	Rendimentos (%)	
74a	2	40 ^a	<p>74a-d</p> <p>75a-d</p>
74b	3	111 ^b	
74c	4	108 ^b	
74d	5	113 ^b	
75a	2	133 ^b	
75b	3	153 ^b	
75c	4	130 ^b	
75d	5	117 ^b	

^a Produto isolado através de coluna cromatográfica; ^b Produto bruto

A obtenção das aminas **74a-d** e **75a-d** desejadas para a construção do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B, respectivamente, foi planejada a partir da síntese de Gabriel,

onde aminas primárias podem ser obtidas através de reação de hidrazinólise de núcleos ftalimídicos (MCMURRY, 2016). O mecanismo da reação em questão resulta de sucessivas substituições nucleofílicas à carbonila entre o hidrato de hidrazina (**73**) e as respectivas *N*-metil-NAHs protegidas (**65a-d**, para série A; e **66a-d**, para a série B). Este mecanismo está descrito no esquema a seguir (Esquema 25) e é representativo tanto para a série A, quanto para a série B, devido as suas semelhanças estruturais. A primeira etapa consiste no ataque nucleofílico do par de elétrons não-ligantes do nitrogênio na molécula de hidrazina (**73**) à carbonila ftalimídica da *N*-metil-NAH (**65a-d**). O intermediário tetraédrico formado (**146a-d**), ao restituir a dupla ligação da carbonila, promove a quebra da ligação entre carbono e nitrogênio ftalimídicos gerando o intermediário **147a-d**. Este, por sua vez, sofre um ataque nucleofílico intramolecular do par de elétrons da amina primária, advinda da molécula de hidrazina, sobre o carbono amídico presente em sua estrutura (**147a-d**). Forma-se então outro intermediário tetraédrico (**148a-d**) que, ao restituir novamente a dupla ligação carbonílica, promove a eliminação da amina desejada (**74a-d**) e a formação de diidroftalazina (**149**). (Esquema 25) (MCMURRY, 2016).



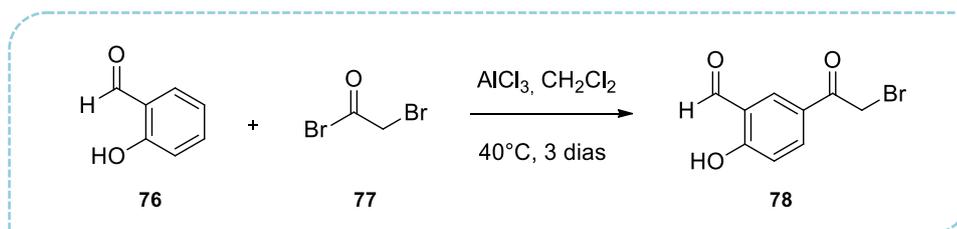
Esquema 25. Mecanismo para a obtenção das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas desprotegidas **74a-d** da série A, aplicável para a série B (**75a-d**), via reação de substituição nucleofílica à carbonila (Adaptado de MCMURRY, 2016).

Como mencionado anteriormente, somente o produto **74a** foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de ressonância de hidrogênio pôde-se observar a ausência de sinais na região entre 7,80-7,90ppm referentes aos hidrogênios aromáticos presentes no anel ftalimídico do produto de partida (**65a**). Característica semelhante foi observada no espectro de carbono onde os sinais próximos à 134ppm, 132ppm e 123ppm também não foram visualizados. O sinal próximo à 168ppm, referente às carbonilas presentes no anel ftalimídico do produto **65a**, de forma análoga, não foi observado. Ademais, o sinal referente ao hidrogênio imínico ($\text{CH}=\text{N}$) foi observado em 7,93ppm, no espectro de RMN ^1H , assim como em 139,9ppm, no espectro de RMN ^{13}C , para o seu respectivo carbono ($\text{CH}=\text{N}$). Observou-se também o sinal do carbono carbonílico, presente na função NAH, na faixa de 169,7ppm. Deste modo, os dados experimentais apresentados corroboram para determinar que o grupo protetor em questão foi removido do produto de partida (**65a**), para formação do produto desprotegido desejado (**74a**).

4.1.2.2) Síntese do bloco do salmeterol

4.1.2.2.1) Síntese do salicilaldeído acilado para o bloco do salmeterol

A primeira etapa na síntese do bloco do salmeterol consistiu em uma reação clássica de acilação de Friedel Crafts do salicilaldeído (**76**), na presença de brometo de bromoacetila (**77**) e catalisada por cloreto de alumínio (Esquema 26) (LUI *et al.*, 2008). O produto obtido (**78**) foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C e apresentou rendimento razoável de 51%, após processos de isolamento e purificação em coluna cromatográfica de fase normal. Cabe destacar, que esta reação representou um desafio durante o desenvolvimento deste trabalho, pois a metodologia teve que ser aprimorada devido a não reprodutibilidade da mesma com o relatado na literatura (LIU *et al.*, 2008). Foram avaliados alguns parâmetros como o solvente, a temperatura da reação, a forma da adição dos reagentes e o tempo (Tabela 13).



Esquema 26. Reação de acilação de Friedel Carfts para a obtenção do salicilaldeído acilado (**78**).

Tabela 13. Testes de avaliação metodológica da reação de acilação de Friedel Crafts sobre o produto **78**.

Teste	Solvente	Temperatura	Tempo	Resultado
1	Diclorometano	10-40°C	15h	NFP
2	Diclorometano	10-50°C	15h	NFP
3	Diclorometano	10-70°C	15h	NFP
4	Diclorometano	10-70°C	48h	Traços
5	Diclorometano	10-100°C (M.W.)	1h	NFP
6	Diclorometano seco ^a	10-40°C	15h	NFP
7	Dicloroetano	10-120°C	15h	NFP
8	Dicloroetano	10-120°C (M.W.)	1h	NFP
9	Dicloroetano seco ^a	10-40°C	15h	NFP
10	Diclorometano	10-70°C	96h	NFP
11	Diclorometano ^b	10-40°C	72h	51% ^c

^a Reação realizada em atmosfera inerte; ^b Adição extremamente lenta do reagente **76**; ^c Rendimento isolado.

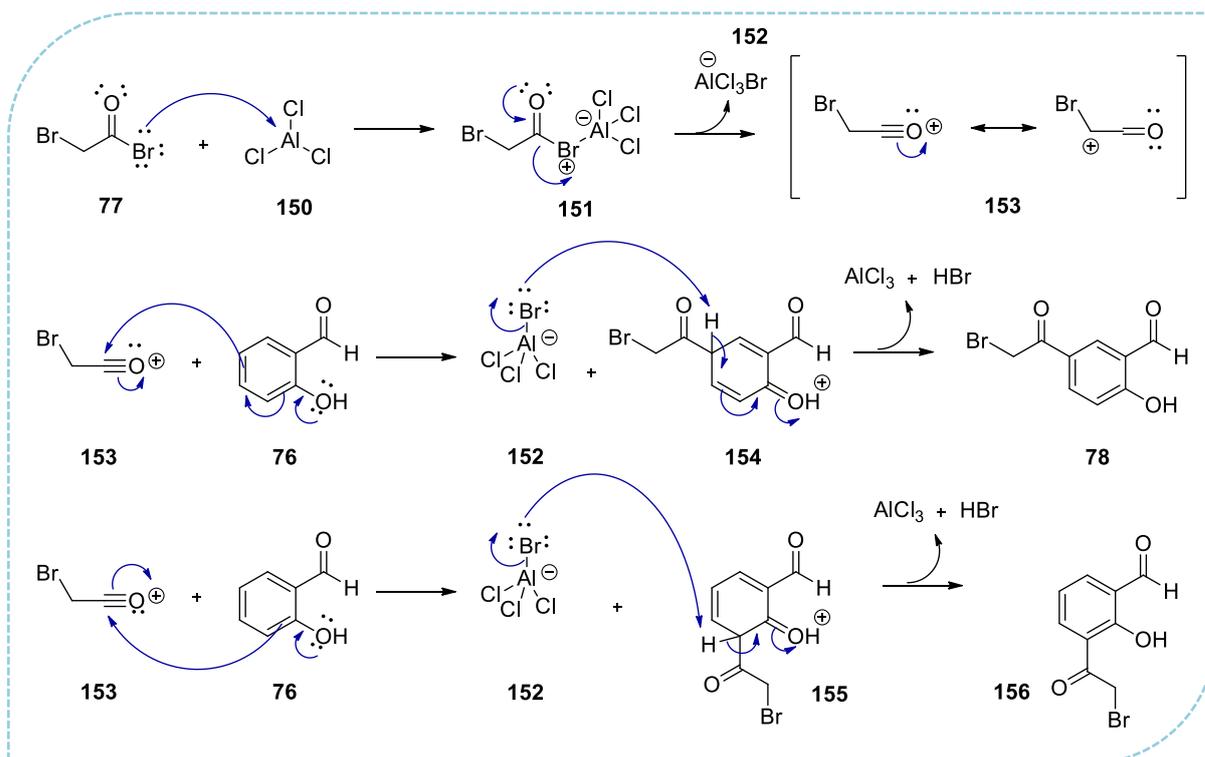
Metodologia geral: Em um tubo de ensaio 4eq de cloreto de alumínio (218mg) foram dissolvidos em 10mL de solvente (diclorometano/dicloroetano) e 1,2eq de brometo de bromoacetila (**77**) foram adicionados gota a gota à essa solução à 10°C. Elevou-se a temperatura para 40°C e a reação permaneceu nesta por 1h. Adicionou-se gota a gota uma solução preparada previamente de 1eq de *orto*-hidroxibenzaldeído (**76**) em 10mL do solvente (diclorometano/dicloroetano) (LIU *et al.*, 2008). A reação permaneceu na temperatura e tempo determinado para cada teste.

O primeiro teste seguiu o protocolo descrito por Liu e colaboradores, sendo este o mais descrito também por outros autores (Tabela 13, entrada 1) (LIU *et al.*, 2008). Este teste serviu de modelo para a realização dos demais também descritos na tabela 9 (entradas 2-10). O teste padrão foi realizado em diclorometano à 40°C por 15h e o resultado obtido, através de monitoramento por placa de TLC, foi a não formação de produto qualquer (NFP, tabela 13). Na tentativa de fornecer energia suficiente para o início da reação, foram realizados testes em temperaturas mais elevadas (50°C, entrada 2; e 70°C, entrada 3), não alterando o tempo e o solvente. Entretanto, também não foi observada a formação de produto (Tabela 13). Outros testes foram realizados aumentando o tempo reacional para 2 e 4 dias (entradas 4 e 10, respectivamente). Após 2 dias houve formação de traços de um produto mais polar se comparado ao aldeído de partida (**76**) em placa de TLC (Tabela 13). Este foi isolado e caracterizado por RMN ¹H e apresentou sinais compatíveis ao produto de acilação desejado

(78). Entretanto, esta metodologia não foi reprodutível, e nem após 4 dias de reação observou-se a formação do produto **78** (Tabela 13). A reação foi testada também com dicloroetano, que permitiu que temperaturas mais altas fossem avaliadas (entradas 7 e 8, tabela 13). Mas também não foi observada a formação de produto. A reação de acilação também foi testada em microondas (M.W.) para os dois solventes disponíveis (diclorometano e dicloroetano) (entradas 5 e 8, respectivamente), mas novamente se mostrou ineficiente para a obtenção do produto acilado **78**. Também foram realizados testes em atmosfera inerte e com solventes previamente secos (entradas 6 e 9, tabela 13), mas o resultado se repetiu aos demais, com a não formação de produtos. Por fim, ao testarmos novamente a metodologia descrita por Liu e colaboradores (LIU *et al.*, 2008), observamos que a adição extremamente lenta de salicilaldeído (**76**) (necessidade de a cada gota aguardar o retorno da coloração original para a adição subsequente) se mostrou essencial para a formação do produto desejado (**78**). Então, optamos pela utilização desta à uma temperatura de 40°C por mais tempo do que o descrito (Esquema 26), na tentativa de aumentar o rendimento reacional, o que foi observado através de placas de cromatografia em camada fina (TLC). Verificou-se que em três dias o rendimento era satisfatório (51%), visto que após este tempo o produto se degradava no meio.

O mecanismo da reação de acilação de Friedel Crafts, em questão, ocorre via substituição eletrofílica aromática (S_{EAr}) e está descrito no esquema abaixo (Esquema 27) (MCMURRY, 2016). É importante destacar que, a utilização de cloreto de alumínio (**150**) como catalizador é essencial para a obtenção do produto de acilação (**78**) desejado em tempo hábil, uma vez que o cloreto de acila de partida (**77**) não é suficientemente reativo frente à reações de S_{EAr} (MCMURRY, 2016). Inicialmente, ocorre a formação do íon acílio (**153**) através do ataque nucleofílico do par de elétrons livres do bromo, no brometo de bromoacetila (**77**), ao orbital vazio do átomo de alumínio no catalisador (**150**), seguida de eliminação do bromo-tricloro-aluminato (**152**) do intermediário **151** formado. Onde, o intermediário **153** é um substrato mais reativo do que seu produto de partida (**77**) para a reação de substituição eletrofílica aromática. De forma subsequente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons π do anel aromático do salicilaldeído (**76**), ativado por uma hidroxila em sua estrutura, ao centro eletrofílico do íon acílio (**153**). O resultado obtido é a formação de dois possíveis produtos não-aromáticos acilados na posição *para* (**154**) e *meta* (**155**) à hidroxila no anel, resultante da ativação destas posições pelo grupo hidroxila presente na estrutura do aldeído de partida (**76**). Por fim, os produtos acilados **154** e **155** sofrem uma desprotonação, com concomitante restituição da aromaticidade destes e com a formação de HBr, de cloreto de

alumínio catalítico (**150**) e dos produtos acilados finais **78** e **156** (Esquema 27) (MCMURRY, 2016).



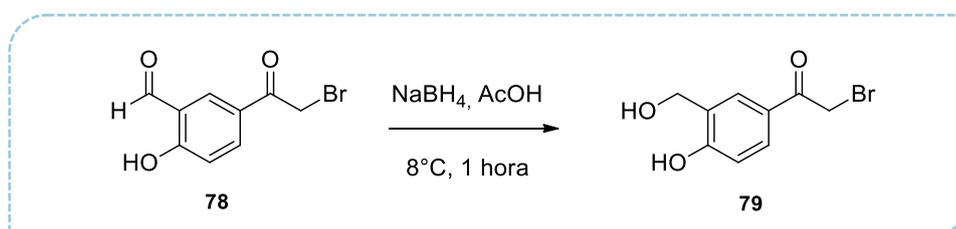
Esquema 27. Mecanismo para a obtenção do salicilaldeído acilado (**78**) do bloco do salmeterol, com possível formação do produto acilado **156**, via reação de substituição eletrofílica aromática ($\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

A acilação do salicilaldeído (**76**) foi acompanhada com o auxílio de cromatografia em camada fina analítica (CCFA), onde observou-se a formação de um único produto e consumo parcial do produto de partida (**76**), mesmo após 3 dias de reação. Desta maneira, o produto obtido necessitou de isolamento e purificação através de coluna cromatográfica de fase normal. Este foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , onde testificou-se o sucesso da reação na observação dos sinais em 4,41ppm, no espectro de hidrogênio, com integração para 2 hidrogênios, e em 29,8ppm no espectro de carbono, atribuído aos núcleos de hidrogênio e carbono, respectivamente, presentes no grupo metileno introduzido no produto de partida (**76**) após acilação. De modo a corroborar com os dados descritos anteriormente, foi observado também no espectro de carbono um sinal em 189,0ppm que foi atribuído ao carbono acílico introduzido ao produto de partida (**76**). A análise dos sinais em campo baixo, no espectro de hidrogênio, como o simpleto largo em 8,31ppm, o duplo-duplete em 8,18ppm e o duplete em 7,10ppm, todos com integração de 1 hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios ligados ao sistema aromático, foi essencial para a

determinação do padrão de substituição do anel e para a identificação do produto final obtido (**78** ou **156**). Estas informações corroboram para a caracterização inequívoca do produto acilado desejado (**78**) na posição *para* à hidroxila, uma vez que, para o produto *meta* acilado **156** seria observado um padrão de sinais no RMN de ^1H do tipo dois dupletos e um tripleto, na faixa de 6,5-8,5ppm (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

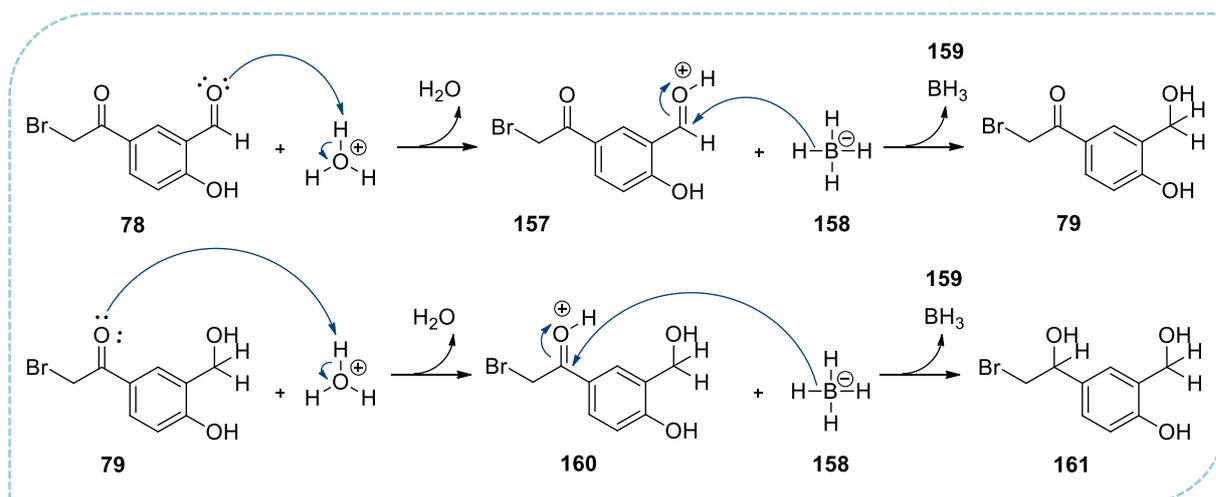
4.1.2.2.2) Síntese do derivado 2-(hidroximetil)fenólico para o bloco do salmeterol

A segunda etapa na síntese do bloco do salmeterol consistiu em uma reação clássica de redução seletiva do aldeído obtido anteriormente (**78**) para a obtenção do álcool desejado **79**, através da utilização de borohidreto de sódio, como agente redutor, e ácido acético glacial como solvente e catalisador da reação (Esquema 28) (LIU *et al.*, 2008). O produto obtido foi caracterizado através de RMN ^1H e apresentou um rendimento excelente de 96% após processo de isolamento.



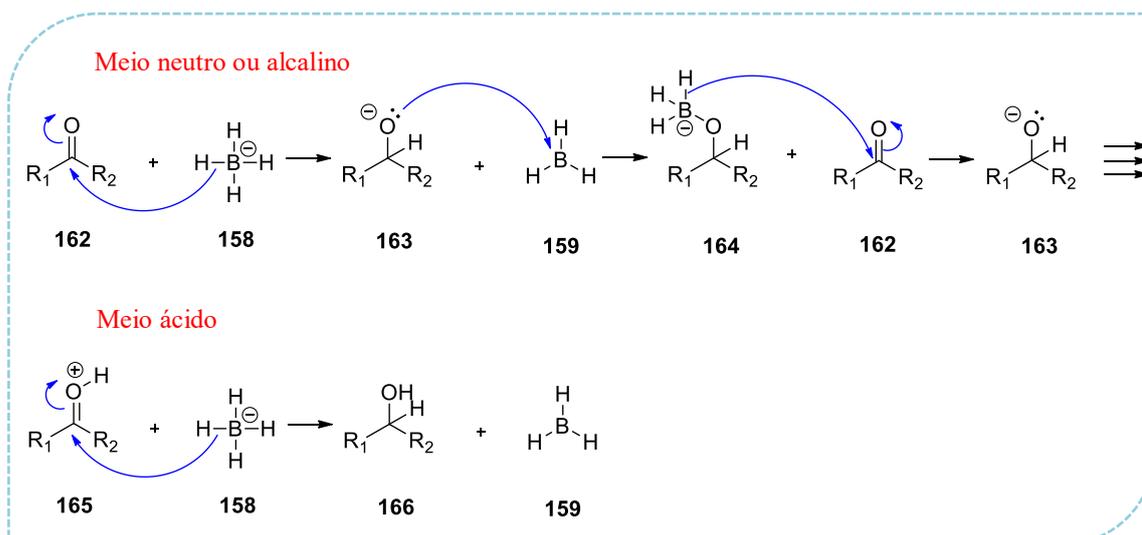
Esquema 28. Reação de redução do aldeído **78** para a obtenção do derivado 2-(hidroximetil)fenólico (**79**) do bloco do salmeterol.

O mecanismo da reação de redução seletiva do produto **78** para a obtenção do álcool **79** ocorre via adição nucleofílica à carbonila e está descrito no esquema abaixo (Esquema 29) (MCMURRY, 2016). Inicialmente, devido ao caráter ácido do meio, ocorre a ativação da carbonila aldeídica do produto **78** através da protonação do átomo de oxigênio no grupo aldeído. Então, o intermediário ativado **157** sofre um ataque nucleofílico do íon hidreto, gerado a partir do borohidreto de sódio (**158**) gerando o álcool desejado **79** e borano (**159**). No entanto, este último (**79**) ainda poderia ser novamente protonado e reduzido para a obtenção do diol **161**, uma vez que o agente redutor utilizado, *i.e.* o borohidreto de sódio (**158**), é capaz de reduzir aldeídos e cetonas (MCMURRY, 2016) (Esquema 29).



Esquema 29. Mecanismo de redução para a obtenção do o derivado 2-(hidroximetil)fenólico (**79**) do bloco do salmeterol, com possível formação do diol **161**, via reação de adição nucleofílica à carbonila (Adaptado de MCMURRY, 2016).

De maneira a evitar a redução da função cetona do produto **79** desejado e a formação do diol **163**, foi realizado o controle estequiométrico da reação, mantendo em excesso a concentração do aldeído de partida (**78**) em relação ao agente redutor (**158**). Uma vez que a função aldeído é mais reativa, frente à reação de adição nucleofílica à carbonila, do que a função cetona, é provável que a primeira seja reduzida preferencialmente (MCMURRY, 2016). Para isto, partiu-se de 1 equivalente do produto **78** e 1 equivalente de borohidreto de sódio (**158**), e este último foi adicionado ao meio reacional em pequenas quantidades durante 1 hora. Utilizou-se também o meio ácido, com ácido acético glacial como solvente, para o controle estequiométrico, uma vez que este impede a geração de mais de um equivalente de íon hidreto no meio por molécula de borohidreto de sódio (**158**) (Esquema 30). Em meio alcalino, ou neutro ocorre a estabilização do íon alcóxido (**163**), formado após a redução da carbonila do produto **162**, através da reação com o borano (**159**), seguida da formação de uma nova espécie tetravalente de boro (**164**), capaz de gerar mais um íon hidreto no meio, e assim sucessivamente, até os quatro íons serem transferidos. (MCMURRY, 2016) (Esquema 30).

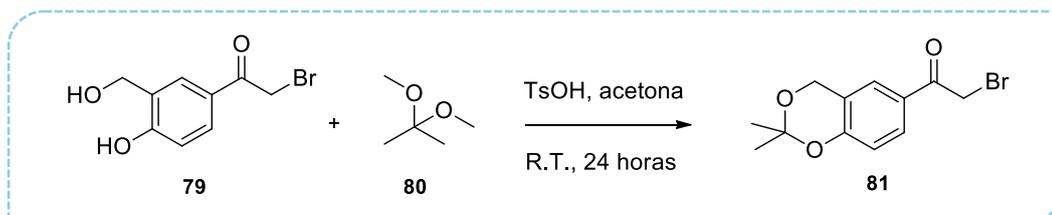


Esquema 30. Mecanismo de redução de carbonilas de aldeídos e cetonas em meio alcalino, ácido e neutro com borohidreto de sódio (**158**) (Adaptado de MCMURRY, 2016).

O álcool **79** foi caracterizado somente por espectroscopia de RMN de ^1H , onde a observação do espectro de hidrogênio foi suficiente para determinar a formação do produto desejado (**79**). O sinal em 11,57ppm referente ao hidrogênio ligado à carbonila aldeídica do produto de partida (**78**) não foi observado no espectro, o que se esperaria após este ser reduzido. E adicionalmente, foi observado um simpleto em 4,76ppm com integração para 2 hidrogênios característico do grupo metileno presente no produto desejado (**79**).

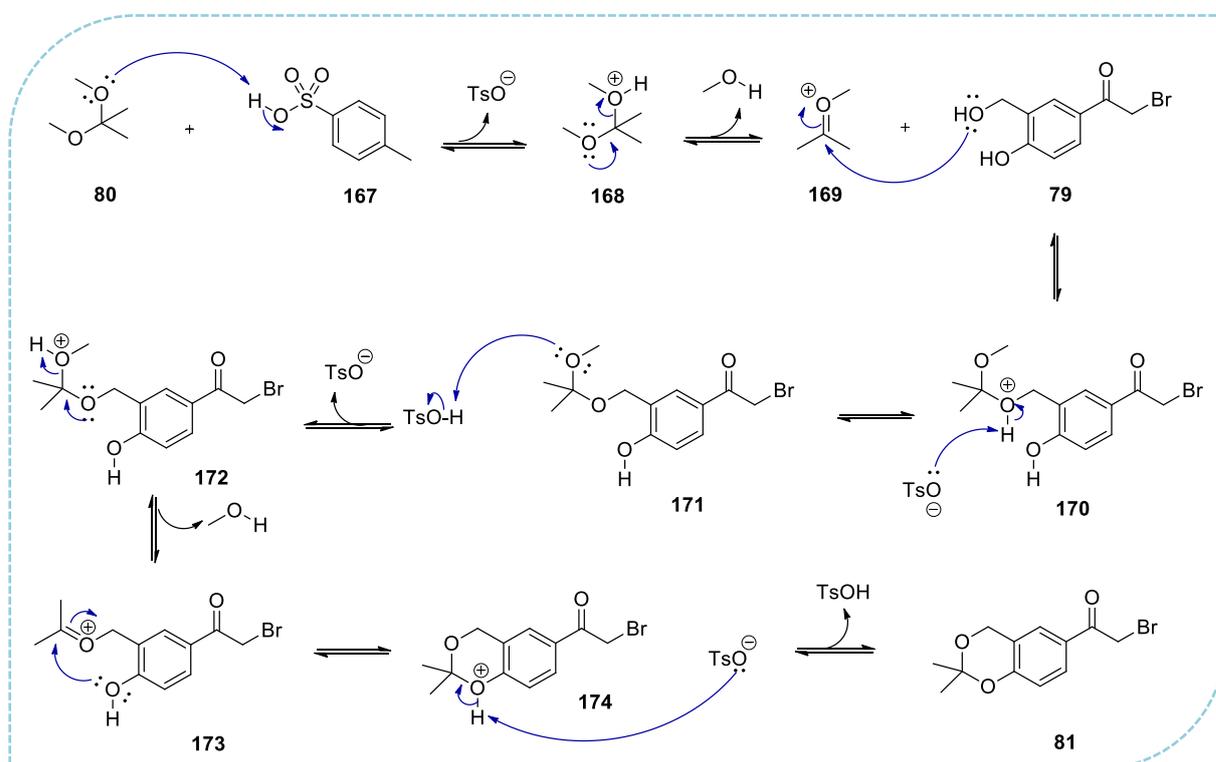
4.1.2.2.3) Síntese do produto protegido para o bloco do salmeterol

A terceira etapa na síntese do bloco do salmeterol consistiu em uma reação de proteção do grupo catecol presente no álcool **79**, através da utilização do grupo de proteção 2,2-dimetoxipropano (**80**), em meio ácido, para a obtenção do cetal **81** (Esquema 31) (LIU *et al.*, 2008). O produto obtido (**81**) foi caracterizado através de RMN ^1H e ^{13}C , e apresentou um bom rendimento de 68% após processo de isolamento e purificação através de cromatografia em coluna de fase normal.



Esquema 31. Reação de proteção do grupo catecol presente no álcool **79** para a obtenção do cetal **81** do bloco do salmeterol.

O mecanismo da reação de proteção ocorre através subsequentes adições nucleofílicas como descrito no esquema 32 (MCMURRY, 2016). Inicialmente ocorre a protonação do cetal **80** através do ácido orgânico presente no meio (**167**). O cetal protonado **168**, através de formação de ligação π , elimina metanol e forma o íon oxônio **169**, que por sua vez, sofre um ataque nucleofílico do par de elétrons do átomo de oxigênio do álcool **79**. O produto *O*-alquilado **170** sofre nova desprotonação, enquanto o intermediário **171** é reprotonado para a formação de um bom grupo abandonador. No cetal protonado **172** ocorre uma nova formação de ligação π com subsequente eliminação de metanol, para a obtenção do íon oxônio no composto **173**. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico intramolecular do par de elétrons do átomo de oxigênio fenólico do produto **173** ao íon acílio. Por fim, o cetal cíclico resultante **174** é desprotonado gerando o produto protegido desejado (**81**) (Esquema 32) (MCMURRY, 2016).



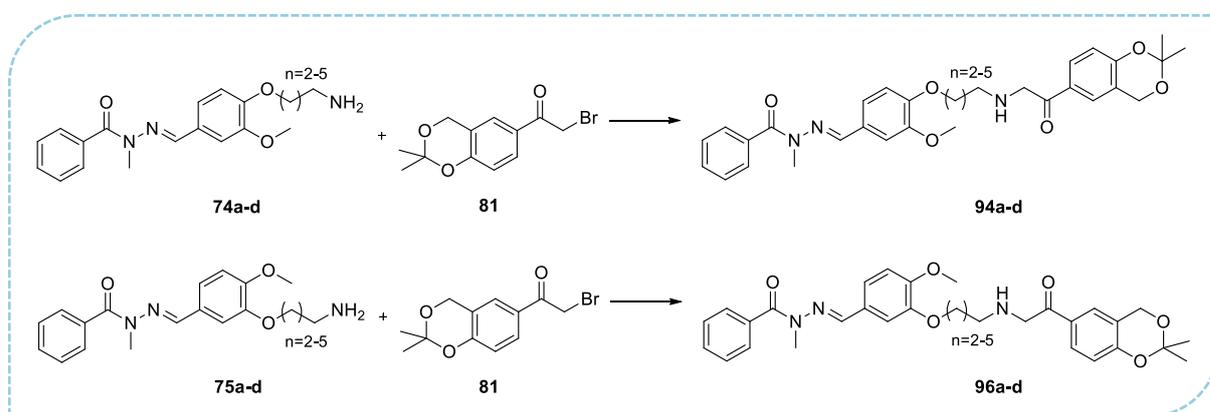
Esquema 32. Mecanismo de proteção do grupo catecol no produto **79**, para a obtenção do cetal **81**, via reação de adição nucleofílica (Adaptado de MCMURRY, 2016).

O produto protegido **81** foi caracterizado através de técnicas espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C, onde alguns sinais foram essenciais para determinar o sucesso da reação de proteção. No espectro de ressonância de hidrogênio não foi observado o sinal em 10,57ppm, atribuído ao hidrogênio presente na hidroxila fenólica do produto de partida **79**, como o esperado após proteção deste grupo para a formação do respectivo cetal. Foi observado um

sinal simpleto com integração para 6 hidrogênios em 1,57ppm, característico de dois grupos metílicos introduzidos, através da reação de proteção com o 2,2-dimetoxipropano (**80**), no produto final (**81**). O que pôde ser confirmado, no espectro de carbono, através da observação do sinal em 24,8ppm.

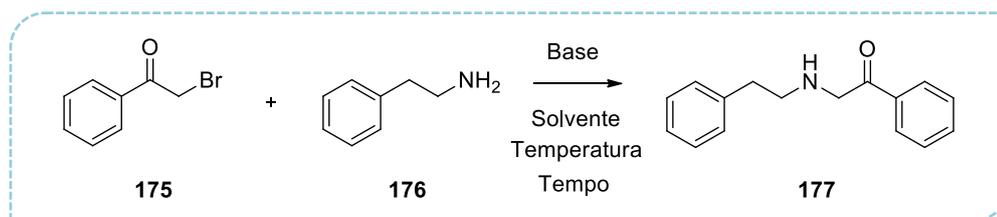
4.1.2.3) União dos blocos *N*-metil-NAH e salmeterol

Após a obtenção do cetal **81**, do bloco do salmeterol, e das *N*-metil-NAHs desprotegidas **74a-d** e **75a-d**, do bloco das *N*-metil-NAHs das séries A e B respectivamente, foram realizados testes reacionais para união dos dois blocos, através de reação de substituição nucleofílica, para a síntese dos produtos cetônicos híbridos **94a-d** e **96a-d** desejados (Esquema 33).



Esquema 33. Reação de união dos blocos do salmeterol e *N*-metil-NAH, através da reação entre o cetal **81** e as *N*-metil-NAHs desprotegidas **74a-d** e **75a-d**, para a obtenção das cetonas híbridas **94a-d** e **96a-d**.

Devido à exaustiva síntese dos produtos de partida **74a-d**, **75a-d** e **81**, obtidos após muitas etapas reacionais, optou-se pelo início dos testes de união dos blocos do salmeterol e das *N*-metil-NAHs a partir de reagentes comerciais, com estrutura química muito similar aos produtos citados. Utilizou-se, como protótipo, a α -bromo-acetofenona (**175**) para simular o cetal **81**, pois esta apresenta o grupo bromo ligado ao carbono alfa à carbonila essencial para a reação de substituição com o bloco das *N*-metil-NAHs. De maneira a simular as *N*-metil-NAHs desprotegidas **74a-d** e **75a-d**, utilizou-se a fenetilamina (**176**), uma vez que esta possui, ligada à uma cadeia alquílica, uma amina primária, importante para a reação de substituição com o bloco do salmeterol (Esquema 34). Deste modo, foram avaliados diferentes parâmetros para a realização da reação de substituição nucleofílica entre a α -bromo-acetofenona (**175**) e a fenetilamina (**176**), como o tipo de solvente, a temperatura, a base e o tempo reacional observado (Esquema 34; Tabela 14).



Esquema 34. Reação teste de substituição nucleofílica para a união dos blocos do salmeterol e *N*-metil-NAH, através da reação entre α -bromo-acetofenona (**175**) e a fenetilamina (**176**), para a obtenção da cetona **177**.

Tabela 14. Testes de avaliação metodológica da reação de substituição nucleofílica entre a α -bromo-acetofenona (**175**) e a fenetilamina (**176**), onde ND significa a não formação do produto desejado **177**.

Teste	Base	Solvente	Temperatura	Tempo	Resultado
1	TEA	DMF	65°C	1h	ND + degradação de 175
2	TEA	DMF	R.T.	1h	ND + degradação de 175
3	K ₂ CO ₃	DMF	R.T.	1h	ND + degradação de 175
4 ^a	NaH	DMF anidro	R.T.	1h	ND + degradação de 175
5	-	DMF	R.T.	1h	ND + degradação de 175
6	K ₂ CO ₃	THF	R.T.	1h	ND + degradação de 175
7	K ₂ CO ₃	Acetonitrila	R.T.	1h	ND + degradação de 175
8	K ₂ CO ₃	Acetona	R.T.	1h	ND + degradação de 175
9	-	THF	0°C	1h	Formação de produto

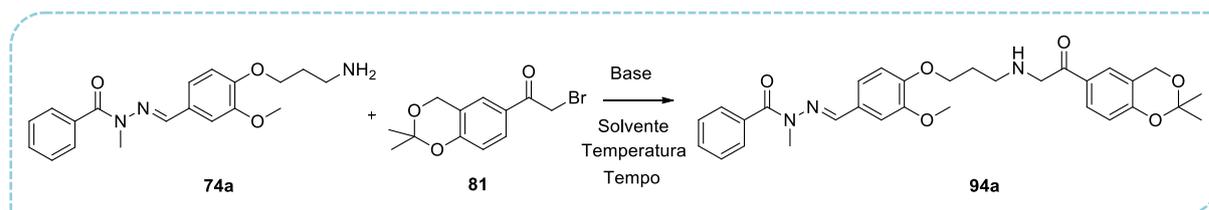
^a Reação realizada em atmosfera inerte.

Metodologia geral: Em um tubo de ensaio 2eq de fenetilamina (0,2mmol, **176**) e 3eq de base foram dissolvidos em 1mL de solvente. Posteriormente, foi adicionada à reação uma solução de 1eq de α -bromo-acetofenona (**175**) em 1mL de solvente, gota a gota. A reação permaneceu na temperatura estipulada por aproximadamente 1 hora sob agitação constante (LIU *et al.*, 2008).

O primeiro teste seguiu o protocolo descrito por Liu e colaboradores, sendo este o mais descrito também por outros autores (Tabela 14, entrada 1) (LIU *et al.*, 2008). Este teste serviu de modelo para a realização dos demais também descritos na tabela 14 (entradas 2-9). O teste padrão foi realizado em *N,N*-dimetilformamida (DMF), utilizando trietilamina (TEA) como a base da reação, à 65°C durante 1 hora e o resultado obtido, através de monitoramento por placa de TLC, foi a não formação do produto desejado (**177**) (ND) e a degradação

completa do brometo de alquila de partida (**175**) (Tabela 14). Na tentativa de impedir a degradação do brometo de partida (**175**), foram realizados testes em temperaturas mais brandas, como a temperatura ambiente (R.T.) (Tabela 14, entradas 2-8). No teste 2 foram utilizados os mesmos parâmetros do teste padrão, com exceção da temperatura (R.T.), entretanto, também foi observada a degradação completa do brometo **175** e a não formação do produto **177**, através de TLC (Tabela 14). Outros testes foram realizados para avaliar o papel da base na reação de substituição e na não degradação dos produtos de partida (Tabela 14, entradas 3-5). Foi avaliada, à temperatura ambiente (R.T.) por 1 hora em DMF, a não utilização de base na reação (Entrada 5), assim como a utilização de carbonato de potássio (K_2CO_3 , entrada 3) e hidreto de sódio sob atmosfera inerte (NaH, entrada 4). Porém, em nenhum dos testes foi observado, através de TLC, a formação do produto **177**, acompanhado da degradação do brometo de partida **175** (Tabela 14). A fim de solucionar o problema da degradação, foram avaliados diferentes solventes à temperatura ambiente por 1 hora, utilizando K_2CO_3 como base, entretanto, os mesmos resultados em TLC foram observados (Tabela 14, entradas 6-8). Por fim, foi avaliada uma metodologia realizada à $0^\circ C$, sem a utilização de base no meio (Tabela 14, entrada 9), que resultou na não degradação do brometo de alquila de partida (**175**), assim como no seu consumo após 1 hora de reação e a formação de um produto final, que não foi isolado e caracterizado por RMN devido a sua alta polaridade.

De maneira a verificar a aplicabilidade das metodologias testadas com os protótipos **175** e **176**, citadas anteriormente, foram realizados alguns testes com os produtos de partida de interesse: a *N*-metil-NAHs desprotegida **74a** (do bloco das *N*-metil-NAHs) e o cetal **81** (do bloco do salmeterol) (Esquema 35, Tabela 15).



Esquema 35. Reação teste de substituição nucleofílica para a união dos blocos do salmeterol e *N*-metil-NAH, através da reação entre a *N*-metil-NAH desprotegida (**74a**) e o cetal (**81**), para a obtenção do produto híbrido **94a**.

Tabela 15. Testes de avaliação metodológica da reação de substituição nucleofílica entre a *N*-metil-NAH desprotegida (**74a**) e o cetal (**81**), onde ND significa a não formação do produto desejado **94a**.

Teste	Base	Solvente	Temperatura	Tempo	Resultado
1	TEA	DMF	65°C	1h	ND + degradação de 81
2	TEA	DMF	R.T.	1h	ND + degradação de 81
3	-	THF	0°C	1h	ND

Metodologia geral: Em um tubo de ensaio 2eq da *N*-metil-NAH desprotegida (0,2mmol, **74a**) e 3eq de trietilamina (TEA) foram dissolvidos em 1mL de solvente. Posteriormente, foi adicionada à reação uma solução de 1eq do cetal (**81**) em 1mL de solvente, gota a gota. A reação permaneceu na temperatura estipulada por aproximadamente 1 hora sob agitação constante (LIU *et al.*, 2008).

O primeiro teste seguiu o protocolo descrito por Liu e colaboradores, e serviu de modelo para a realização dos demais (LIU *et al.*, 2008). O teste padrão foi realizado em *N,N*-dimetilformamida (DMF), utilizando trietilamina (TEA) como a base da reação, à 65°C durante 1 hora e o resultado obtido, através de monitoramento por placa de TLC, foi a não formação do produto desejado (**94a**) (ND) e a degradação completa do brometo de alquila de partida (**81**) (Tabela 15, entrada 1), assim como o observado para os protótipos **175** e **176** (Tabela 14, entrada 1). Na tentativa de impedir a degradação do brometo de partida (**81**), foi realizado um teste em temperatura ambiente (R.T.), onde foram utilizados os mesmos parâmetros do teste padrão, com exceção da temperatura (R.T.), entretanto, também foi observada a degradação completa do brometo **81** e a não formação de produto **94a**, através de TLC (Tabela 15, entrada 2), assim como o observado para os protótipos **175** e **176** (Tabela 14, entrada 2). Por fim, foi avaliada a melhor metodologia descrita anteriormente na entrada 9 (Tabela 14). Para a reação entre a *N*-metil-NAH desprotegida (**74a**) e o cetal (**81**), em THF à 0°C, não foi observada a degradação do produto **81**, como o esperado, mas também não foi identificada a formação de produto no meio, através de TLC (Tabela, 15, entrada 3).

Deste modo, as cetonas híbridas **94a-d** e **95a-d**, advindas da união dos blocos do salmeterol e das *N*-metil-NAHs, não puderam ter sua síntese concluída neste trabalho, assim como os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos híbridos finais das séries A, B e C (**90a-d**, **91a-d** e **92a-d**, respectivamente).

4.1.3) Estudos do perfil de interação entre as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas das séries A, B e C e o sítio catalítico da enzima PDE4 por modelagem molecular

Uma vez que os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos finais das séries A, B e C (**90a-d**, **91a-d** e **92a-d**, respectivamente), planejados como agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos e inibidores da enzima PDE4, não foram obtidos sinteticamente, tornou-se importante demonstrar o potencial desta classe para futuros estudos de derivatização e obtenção de compostos híbridos. Portanto, foi investigado o perfil de interação entre as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas sintetizadas (**65a-d**, da série A; **66a-d**, da série B; e **72a-d**, da série C) e o sítio catalítico da PDE4. Cabe ressaltar que, estas foram escolhidas a fim de determinar a influência da adição de grupos volumosos no arcabouço da estrutura da classe protótipo inspiradora deste trabalho, dialcoxi-fenil-*N*-metil-*N*-acilidrazona (**27**, Figura 32), já descrita na literatura como potente inibidora da enzima em questão (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

Para a realização dos estudos de ancoramento molecular (docking), foi selecionada, no banco de dados do PDB (Protein Data Bank), a estrutura cristalográfica do domínio catalítico da PDE4B, de código 5LAQ e resolução de 2,4 Å, com um corte de 10 Å a partir do resíduo de Phe618 (BLAAZER *et al.*, 2018). Esta escolha foi baseada na similaridade estrutural entre o ligante NPD001 (**89**, Figura 32), cocristalizado com a enzima, e as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas avaliadas. Ambas apresentam em suas estruturas a função *N*-acilidrazônica (em destaque vermelho), assim como o núcleo dialcoxi-fenila (em azul) (Figura 32). Além disso, a piridazinona **89** possui um grupo adicional volumoso fenil-tetrazólico, ligado à estrutura principal através de uma cadeia alquílica, de forma similar ao núcleo ftalimídico presente nos produtos avaliados (**65a-d**, **66a-d** e **72a-d**, Figura 32).

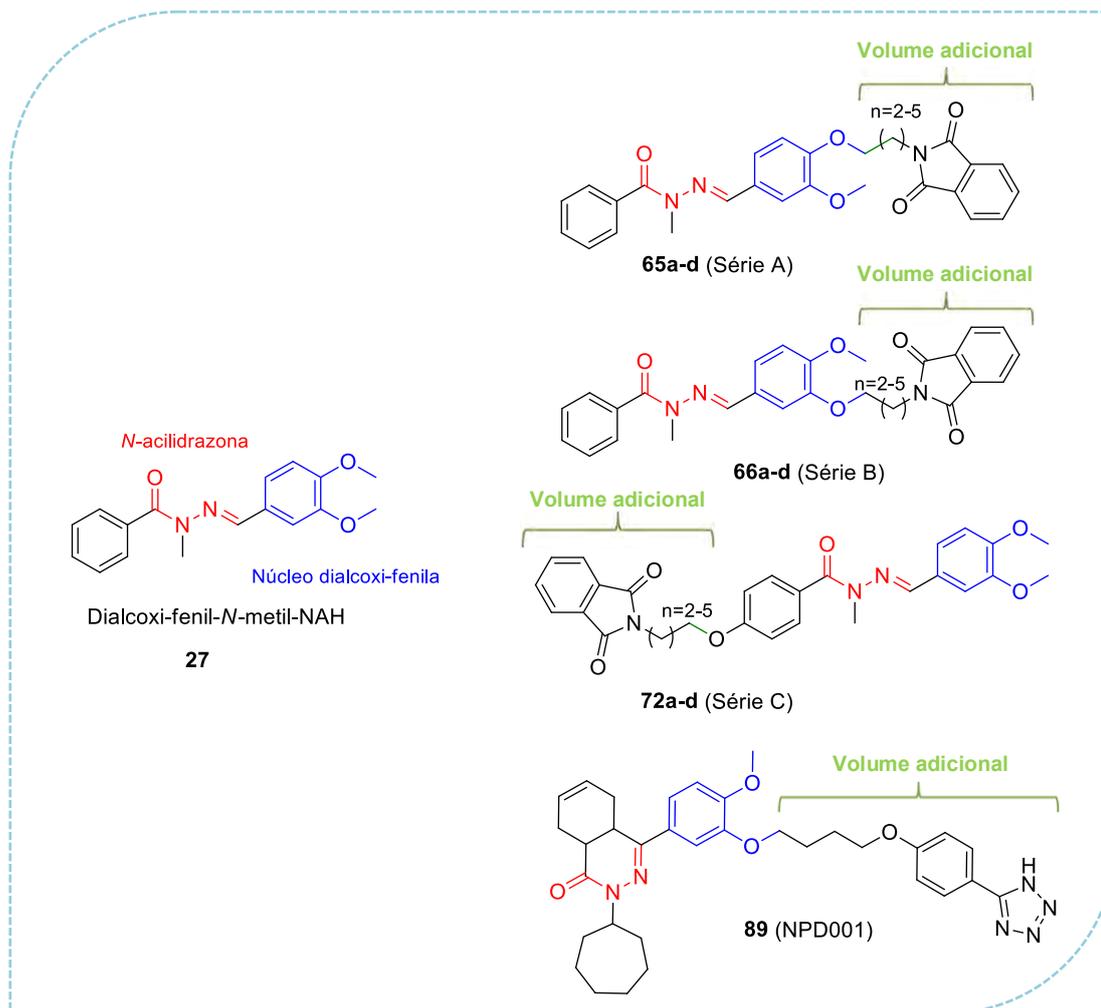


Figura 32. Semelhanças estruturais entre o ligante NPD001 (**89**) cocrystalizado com a enzima PDE4B, na estrutura cristalográfica de código 5LAQ, as *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas sintetizadas **65a-d**, **66a-d** e **72a-d** (das séries A, B e C, respectivamente) e o protótipo inspirador dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (**27**).

Inicialmente, foram realizados os experimentos de redocking, no programa GOLD (versão 5.1), do ligante cocrystalizado (**89**) com o sítio catalítico da PDE4B, para determinar qual a melhor função a ser utilizada para os estudos de docagem molecular. Através da visualização dos valores de RMSD, para cada função de pontuação (Tabela 16), foi possível perceber que os valores obtidos foram razoáveis, sendo o menor valor, igual à 0,71 Å, oriundo da função GoldScore (Figura 33). Deste modo, tal função foi escolhida para ser utilizada no experimento de docking dos compostos *N*-metil-*N*-acilidrazônicos.

Tabela 16. Função de pontuação e respectivos valores de RMSD em Å para o redocking com o ligante NPD001 (89) e a enzima PDE4B.

Função de pontuação	RMSD (Å)
Asp	0,96
ChemPLP	3,48
ChemScore	6,31
GoldScore	0,71

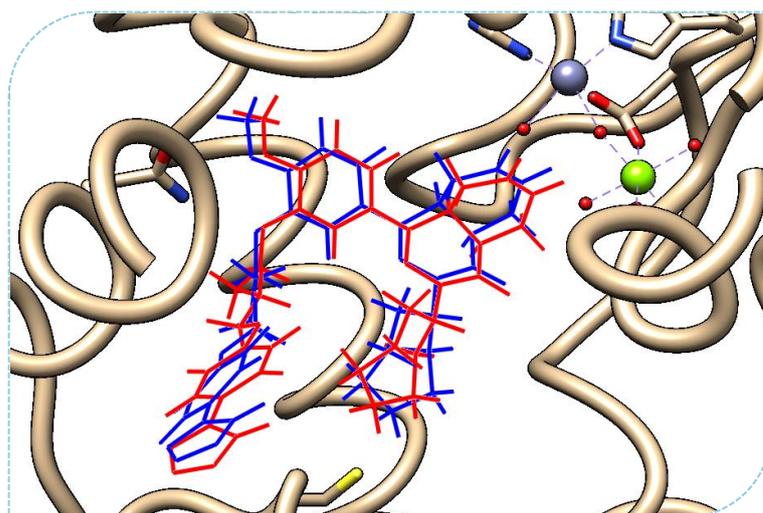


Figura 33. Redocking, em destaque azul, do ligante NPD001 (89) cocrystalizado, em destaque vermelho, com o sítio catalítico da enzima PDE4B utilizando a função GoldScore.

Finalmente, os compostos *N*-metil-*N*-acilidrazônicos selecionados das séries A (65c), B (66c), C (72c) e o protótipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (27) previamente tratados, através da minimização de energia via método semi-empírico PM6 (Spartan Pro - versão 14.0) (STEWART, 2007), foram ancorados no sítio catalítico da enzima PDE4B e os resultados podem ser observados nas figuras 34-37 e na tabela 17.

Os melhores valores de pontuação obtidos para os ligantes 27 (protótipo), 65c (série A) e 72c (Série C) estão descritos na tabela 17, onde foi possível observar que os compostos derivados das *N*-metil-NAHs (65c e 72c) apresentaram melhor atracamento ao sítio catalítico da PDE4, com pontuação de 66,85 e 65,31, respectivamente, em comparação com protótipo (27), com pontuação de 50,82 (Tabela 17). Deste modo, foi possível presumir teoricamente que o volume adicional nas séries A e C não compromete a interação da classe *N*-acilidrazônica avaliada com a enzima alvo, assim como pode promover um ganho de novas

interações. Salientando que estes fatos corroboram com a proposta de planejamento estrutural de novos derivados híbridos *N*-metil-*N*-acilidrazônicos descrita anteriormente.

Tabela 17. Melhores pontuações de docking dos ligantes **65c** (série A), **72c** (série C) e **27** (protótipo) com sítio catalítico da enzima PDE4B.

Compostos	Pontuação
27 (protótipo)	50,82
65c (série A)	66,85
72c (série C)	65,31

As Figuras 34-36 mostram os resultados de docking das melhores soluções, respectivas aos valores de pontuação demonstrados na tabela acima (Tabela 17) para os compostos **27**, **65c** e **72c**. Nas figuras 35A e 36A é possível identificar que os derivados *N*-metil-NAHs em questão (**65c** e **72c**) são capazes de realizar interações essenciais para a inibição da PDE4, assim como o protótipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (**27**) (Figura 34A). São estas: a interação do tipo ligação hidrogênio entre o grupo dialcoxi-fenila, presente nos ligantes, e o resíduo de glutamina (Gln), no sítio catalítico da PDE4; a interação do tipo π -stacking entre o mesmo grupo e o resíduo de fenilalanina (Phe); e a interação do tipo íon-dipolo entre o oxigênio carbonílico das NAHs com os íons zinco e magnésio (Figuras 34A-36A). Adicionalmente, foram identificadas novas interações realizadas pelo núcleo ftalimídico, presente na estrutura dos ligantes **65c** e **72c**, como a interação do tipo π -stacking com o resíduo de tirosina (Tyr), para o ligante **65c**, e a interação do tipo ligação hidrogênio com o resíduo de serina (Ser), para o ligante **72c**, o que explica, em parte, o aumento da pontuação observada nos experimentos em comparação com o protótipo **27** (Tabela 17).

A figura 34B ilustra a sobreposição do ligante cocristalizado NPD001 (**89**), em destaque azul, e o protótipo **27**, em destaque vermelho, onde é possível observar que estes se atracam de modo muito semelhante, com relação às interações realizadas pelo núcleo dialcoxi-fenila, ao sítio catalítico da PDE4. De forma similar, a análise foi estendida aos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos (**65c** e **72c**), em destaque vermelho, sobrepondo-os ao protótipo (**27**), em destaque azul (Figuras 35B e 36B). Através da observação dos resultados, foi possível identificar que as moléculas em questão ancoram de forma quase que idêntica ao sítio da PDE4. Este fato corrobora, mais uma vez, com a proposta de planejamento estrutural da série de derivados das *N*-metil-NAHs das séries A e C, onde a adição de grupos volumosos

ao arcabouço da estrutura da classe protótipo (27), nas regiões voltadas para o exterior da cavidade enzimática, sem interferir nas interações essenciais para a atividade dos compostos, é teoricamente viável.

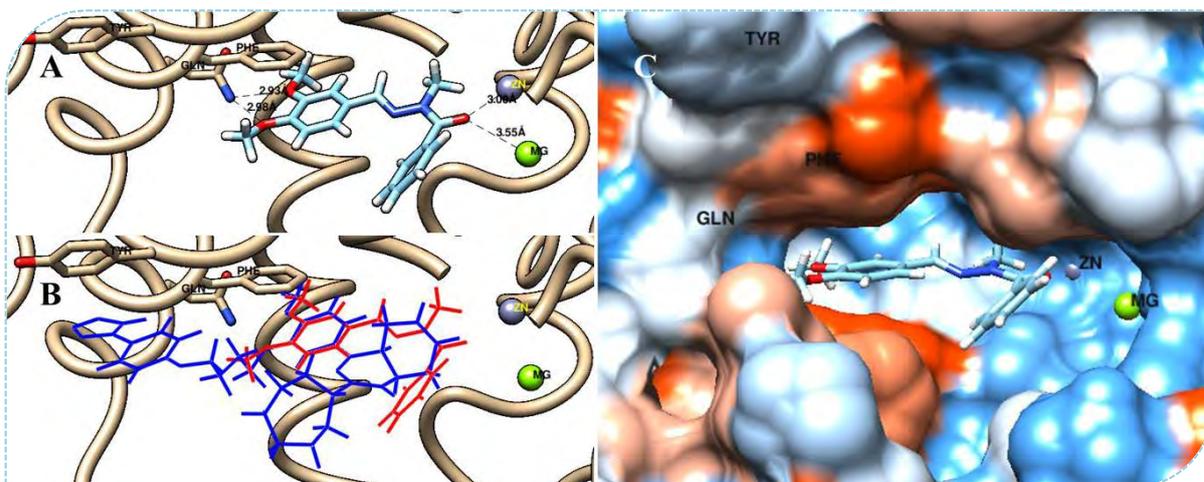


Figura 34. A) Análise das principais interações moleculares entre o protótipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-*N*-acilidrazona (27) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do ligante cocristalizado NPD001 (89), em destaque azul, e o protótipo 27 atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o composto 27 ancorado.

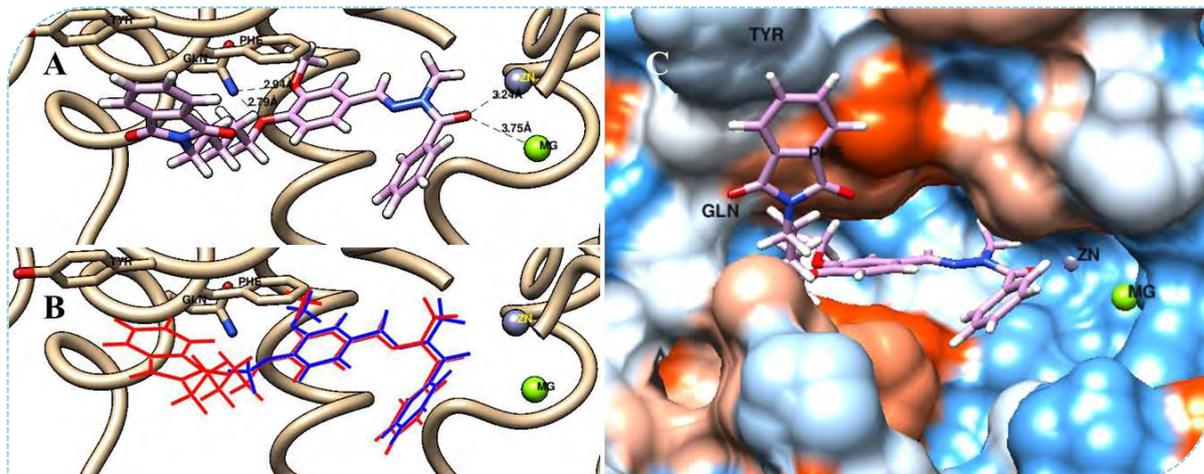


Figura 35. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada 65c (da série A) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do protótipo 27, em destaque azul, e o composto 65c atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o ligante 65c ancorado.

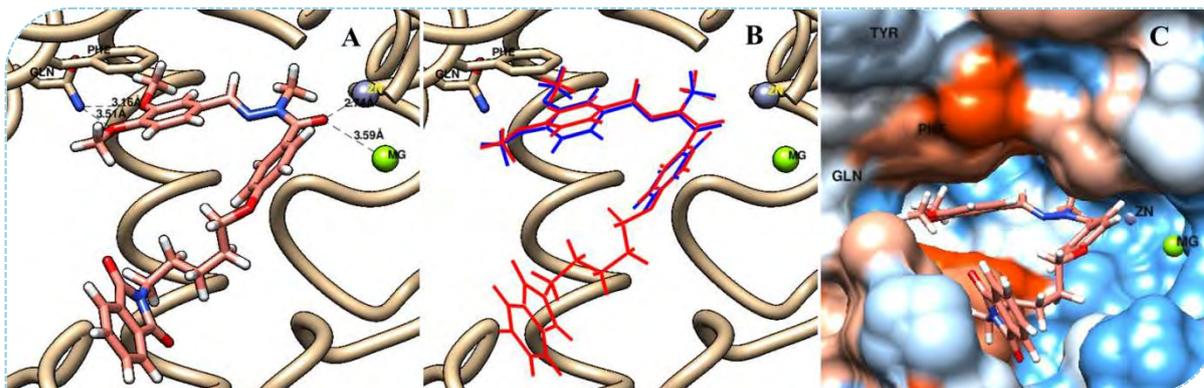


Figura 36. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada **72c** (da série C) e o sítio catalítico da enzima PDE4B. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **72c** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4B com o ligante **72c** ancorado.

Entretanto, para a série B (**66c**) não foi observado o mesmo padrão de interação das demais *N*-metil-NAHs (**65c**, **72c** e **27**) e o sítio catalítico da enzima PDE4, para todas as soluções encontradas (Sol 1-5, Figura 37). Dentre as interações essenciais para a atividade da série, somente as do tipo ligação hidrogênio entre o núcleo dialcoxi-fenila e o resíduo de glutamina (Gln) foram identificadas neste modelo (Figura 37A). Através da sobreposição do produto **66c**, em destaque vermelho, e do protótipo **27**, em destaque azul, pôde-se constatar de fato que o atracamento é muito distinto entre os ligantes analisados, principalmente na região da função *N*-acilidrazônica, que sofre uma retorção no produto **66c**, para que a molécula caiba no interior do sítio catalítico da enzima (Figura 37B). Cabe destacar novamente que, os resultados observados se apresentam de acordo com o descrito no planejamento estrutural da dos derivados *N*-acilidrazônicos, uma vez que o volume adicional da série B impede, através de efeitos estéricos, que esta interaja com a PDE4 da mesma maneira que o protótipo inspirador **27**.

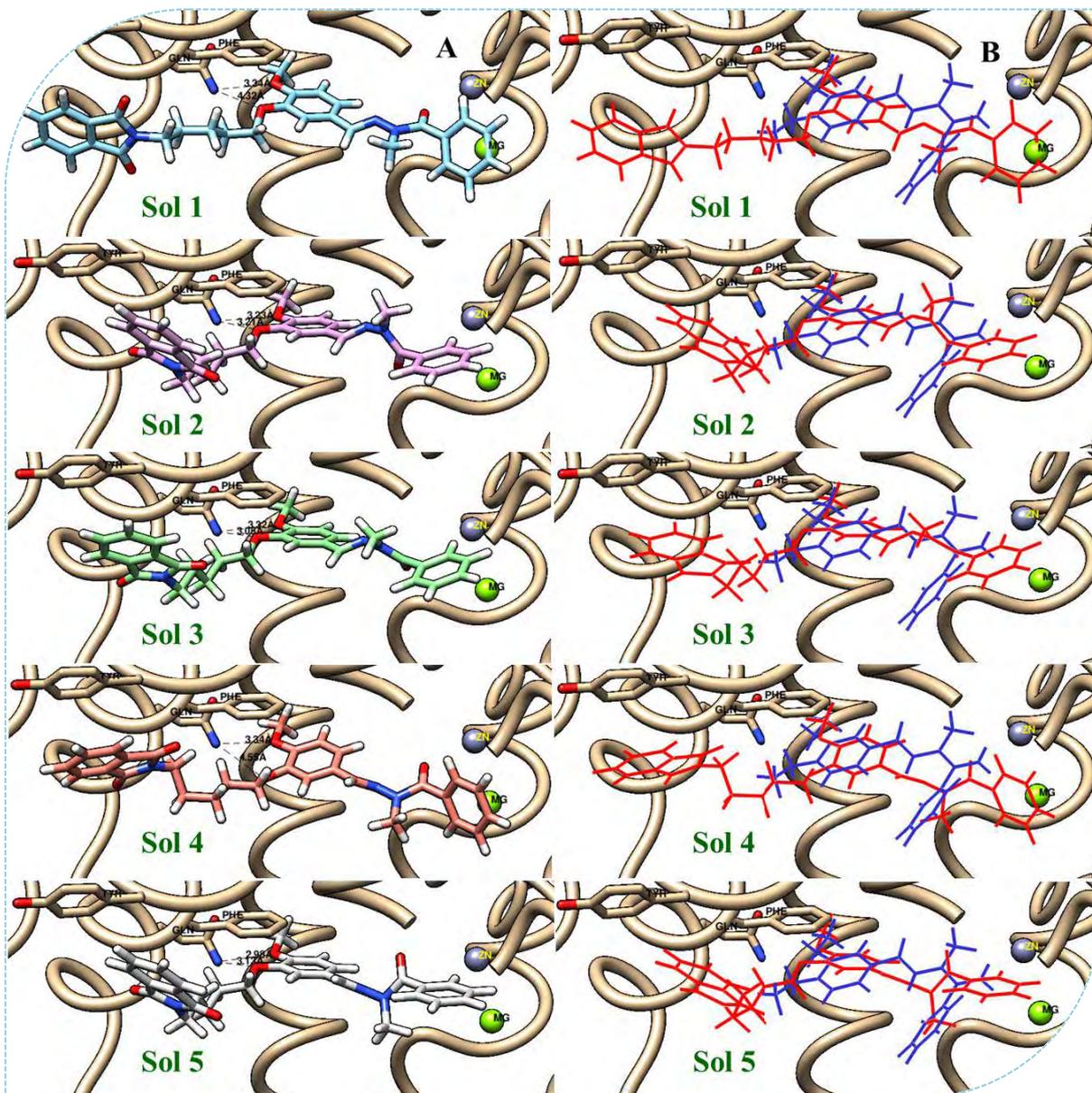


Figura 37. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *O*-alquilada **66c** (da série B) e o sítio catalítico da enzima PDE4B, para as soluções de 1 a 5. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **66c** atracado à enzima, em destaque vermelho, para as soluções de 1 a 5.

A avaliação farmacológica desta série de compostos foi realizada e os resultados serão discutidos na página 158, juntamente com a série de compostos *N*-metil-NAHs *N*-arilados descritos a seguir.

4.2) Estudos de derivatização das *N*-metil-NAHs planejadas como inibidoras da PDE4 através de reações de *N*-arilação

4.2.1) Planejamento dos derivados *N*-arilados

4.2.1.1) Planejamento estrutural

Um segundo objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento sintético, a caracterização e a avaliação farmacológica de novos derivados das *N*-metil-NAHs *N*-arilados obtidos através de reações de acoplamento com metais, planejados como inibidores de enzima PDE4.

Como, já descrito na literatura, existem diferentes isoformas da enzima PDE4, *ie.* PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D, e estas estão distribuídas de forma distinta nos tecidos do sistema respiratório, no cérebro e em células do sistema imunológico (SRIVANI *et al.*, 2008). Desta maneira, a série de compostos *N*-arilados foi planejada para a obtenção de novas *N*-metil-NAHs com propriedades físico-químicas variadas, capazes de serem distribuídas no organismo de forma distinta, e atuarem em um tecido alvo específico. Como por exemplo, quanto maior a lipofilicidade do composto da série, maior a probabilidade deste de atravessar a barreira hematoencefálica, onde poderia atuar na inibição da PDE4D para o tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC), enquanto compostos com maior hidrofiliicidade poderiam ser utilizados em preparações aerossólicas para agirem somente nos pulmões (WERMUTH, 2003).

Os compostos foram planejados a partir de estudos de modelagem molecular de interação da classe das *N*-metil-NAHs (**27**) com o sítio catalítico da enzima PDE4 (Figura 38B) (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Cabe ressaltar, que os principais grupos de interação entre as moléculas e a enzima alvo foram mantidos, como a dialcoxifenila e a carbonila com o espaçador metil-hidrazona entre eles, responsáveis por interações com a glutamina 369 e sítio metálico, respectivamente. A *N*-arilação do anel aromático, ligado a carbonila, em D foi planejada por esta se apresentar voltada para uma região sem resíduos de aminoácidos próximos e que comportaria volumes estéricos maiores (Figura 38B). Para a modificação das propriedades físico-químicas da série, foi proposta a inserção de diferentes grupos em D como o grupo piperidina, morfolina, bezilamina, naftilamina, dentre outros, visando obter uma maior faixa de logP entre esses compostos (**88a-n**, Figura 38A).

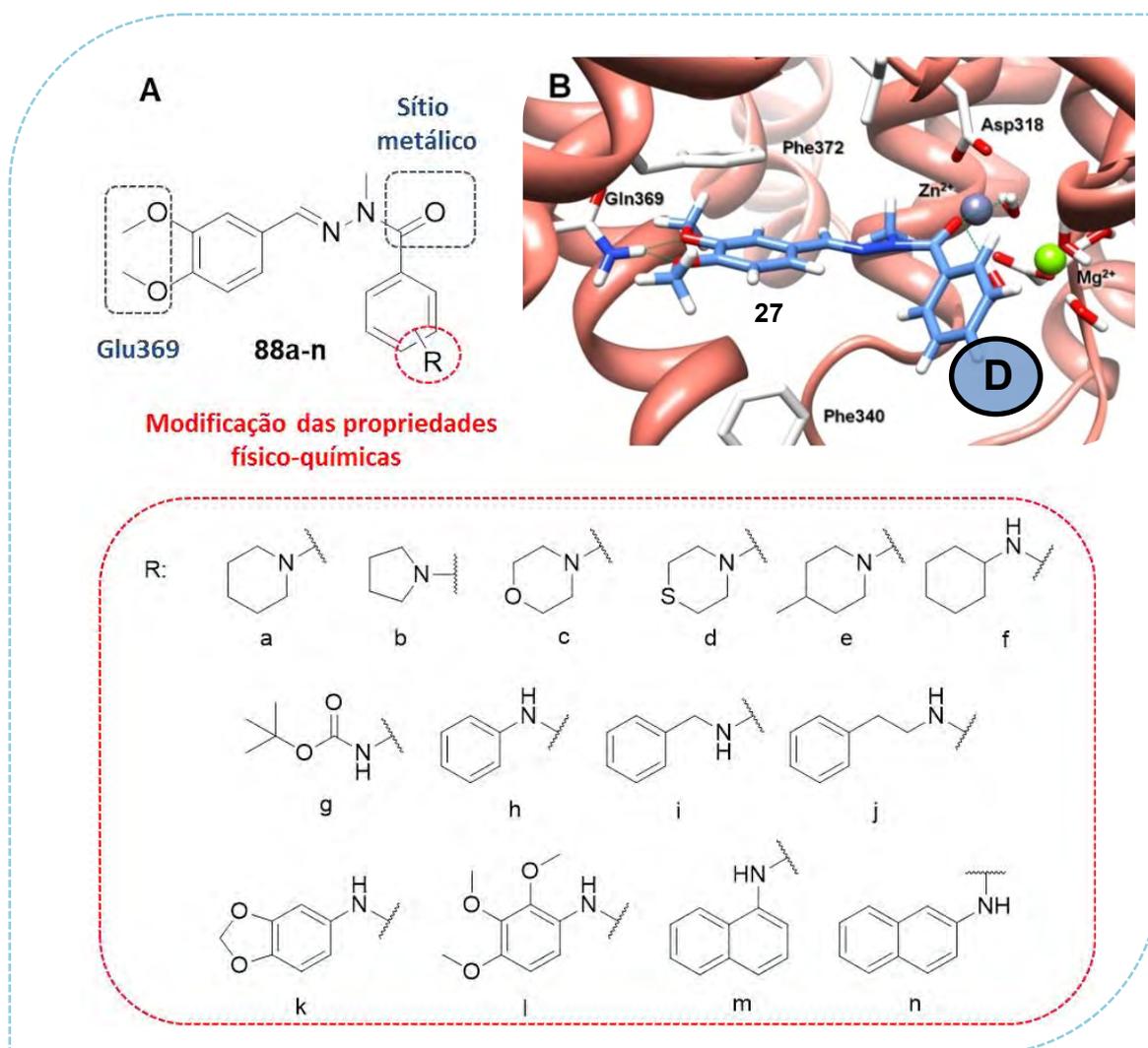


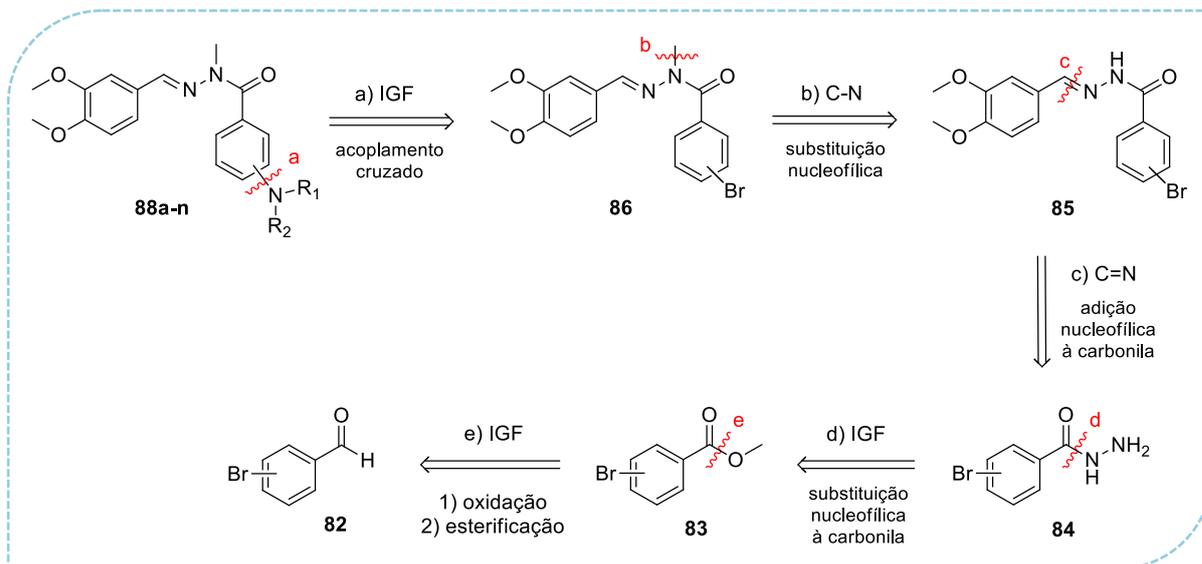
Figura 38. A) Planejamento estrutural da série de *N*-metil-NAHs *N*-ariladas D. B) Ponto de *N*-arilação.

Além da modificação das propriedades físico-químicas, a inserção de diferentes grupos em D também poderia auxiliar na formação de novas interações entre a série planejada e a face externa da cavidade onde se encontra o sítio catalítico da enzima PDE4.

4.2.1.2) Planejamento sintético

A síntese dos derivados *N*-arilados da série D foi baseada segundo a análise retrossintética ilustrada no esquema 36, onde inicialmente, através de uma interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa a), foi possível identificar os precursores das *N*-metil-*N*-acilidrazonas *N*-ariladas finais (**88a-n**), explorando a reação de acoplamento cruzado entre as aminas **87a-n** e a *N*-metil-NAH **86**. Em seguida, a *N*-acilidrazona **85** foi caracterizada como precursora do produto metilado **86**, através de uma desconexão C-N (etapa b), utilizando a reação de substituição nucleofílica com iodeto de metila. Por sua vez, o seu precursor foi caracterizado, após uma desconexão C=N (etapa c), como sendo a benzil-hidrazida **84**, explorando a reação de condensação ácido-catalisada com 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**).

Após uma interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa d), foi identificado o precursor do produto **84**, como o éster benzílico **83**, através da utilização da reação de substituição nucleofílica à carbonila com hidrazina hidratado (**73**). Por fim, o benzaldeído **82** foi caracterizado como o reagente de partida para a obtenção dos produtos finais *N*-arilados desejados, através de outra interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa e), explorando reações de oxidação e esterificação (Esquema 36).

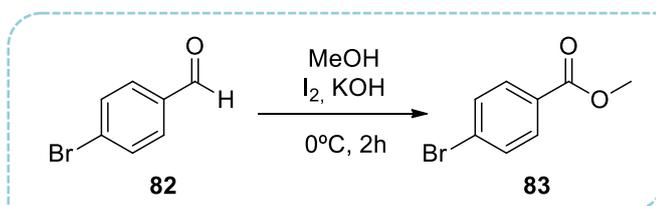


Esquema 36: Análise retrossintética para a obtenção das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D (**88a-n**).

4.2.2) Síntese dos derivados *N*-arilados

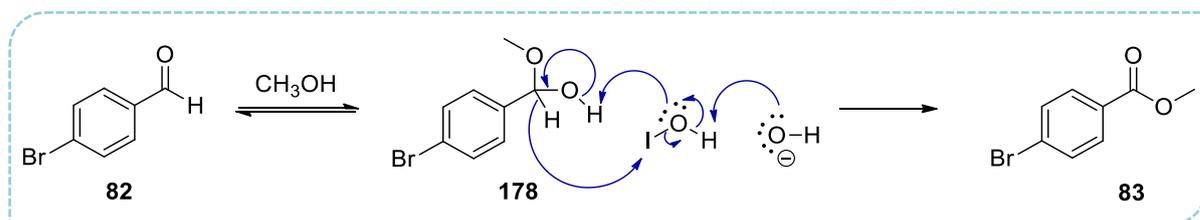
4.2.2.1) Síntese do 4-bromo-benzoato de metila

A primeira etapa na síntese dos derivados *N*-metil-*N*-acilhidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) consistiu em uma reação de oxidação e esterificação, empregando a metodologia “one-pot”, descrita por Yamada e colaboradores, para a obtenção do 4-bromo-benzoato de metila **83**, a partir do 4-bromo-benzaldeído **82** (YAMADA *et al.*, 1992), em meio de KOH e iodo (I_2) (Esquema 37). O produto foi obtido com um bom rendimento, após isolamento, de 88%, e caracterizado por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C .



Esquema 37. Reação de oxidação de Yamada para a obtenção do éster benzílico **83** da série D.

Apesar desta metodologia, que explora o emprego seqüencial de soluções metanólicas de iodo (I_2) e hidróxido de potássio (KOH) à 0°C , não ter seu mecanismo completamente esclarecido, a literatura indica que o mesmo envolve a oxidação do intermediário hemiacetal (**178**) pelo ácido hipoiódico (HIO) formado “*in situ*” (YAMADA *et al.*, 1992) (Esquema 38).

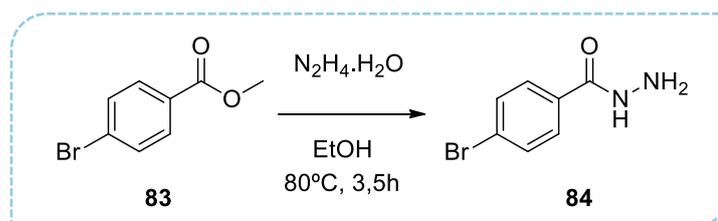


Esquema 38. Mecanismo de formação do éster benzílico **83** da série D, via reação de oxidação de Yamada.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do éster benzílico **83**, permitiu evidenciar o sucesso da reação, assim como caracterizar estruturalmente o produto obtido. Foi observado no espectro de ^1H o sinal simpleto na faixa de 3,92ppm, com três hidrogênios de integração, referente à metoxila ($\text{O}-\text{CH}_3$) presente na estrutura do produto desejado (**83**) e ausente no produto de partida (**82**). De forma semelhante, no espectro de carbono foi observado um sinal na faixa de 52,3ppm que confirmou a presença do grupo metoxila ($\text{O}-\text{CH}_3$). Outro sinal interessante, do ponto de vista da confirmação da ocorrência da reação, é o sinal em 166,4ppm, no espectro de carbono, atribuído ao carbono carbonílico do éster **83**, uma vez que o sinal do carbono carbonílico do aldeído de partida **82** se encontra na faixa de 200ppm. Por fim, os dois sinais identificados na faixa entre 7,58-7,90ppm no espectro de ^1H com 2 hidrogênios de integração cada, referentes aos hidrogênios ligados ao sistema aromático, em substituição do tipo *para*, auxiliaram na caracterização inequívoca do 4-bromo-benzoato de metila (**83**).

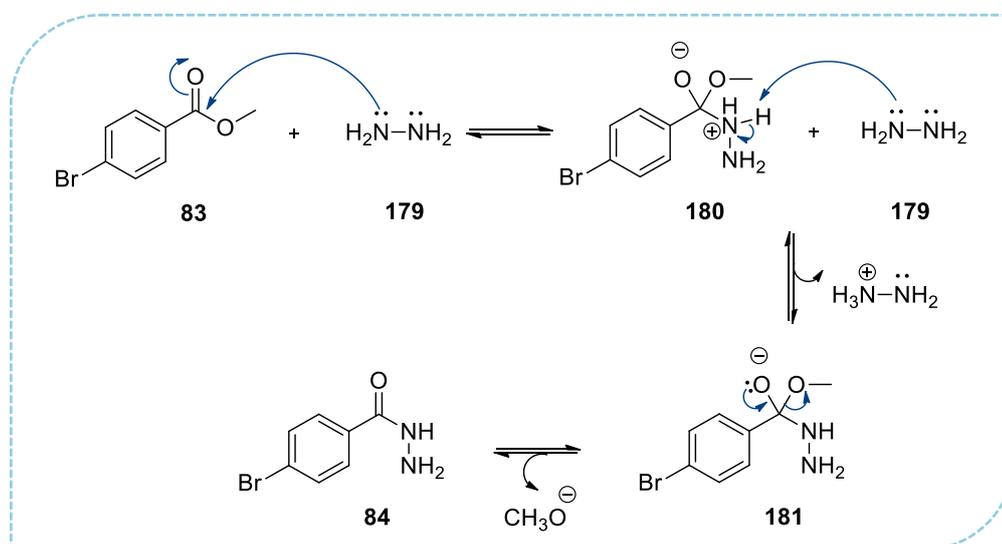
4.2.2.2) Síntese da 4-bromo-bezil-hidrazida

A segunda etapa na síntese dos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) consistiu em uma reação de substituição nucleofílica à carbonila do éster metílico sintetizado anteriormente (**83**) pelo hidrato de hidrazina, em meio etanólico (Esquema 39) (RIBEIRO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000). O produto foi obtido com um bom rendimento, após processo de isolamento, de 70%, e caracterizado por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de determinação do ponto de fusão de 162°C .



Esquema 39. Reação de substituição nucleofílica à carbonila para a obtenção da 4-bromo-benzil-hidrazida (**84**) da série D.

O mecanismo para a obtenção da 4-bromo-benzil-hidrazida (**84**) da série D ocorre via reação de substituição nucleofílica à carbonila ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$) e está ilustrado no esquema 40 (MCMURRY, 2016). Inicialmente, ocorre o ataque nucleofílico do par de elétrons desemparelhados do nitrogênio presente na hidrazina (**179**) ao centro eletrofílico do éster benzílico **83**, gerando-se a amônia intermediária **180**. Em seguida, ocorre a desprotonação da amina pelo meio para a formação do intermediário **181**, que ao restituir sua dupla ligação, elimina o íon metóxido e forma a benzil-hidrazida desejada (**84**) (Esquema 40) (MCMURRY, 2016).



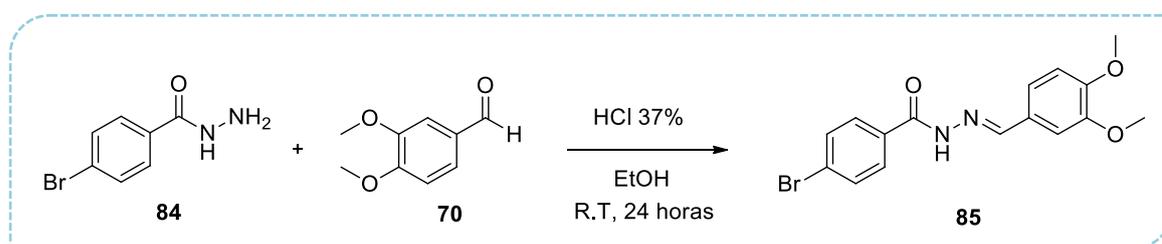
Esquema 40. Mecanismo de formação a 4-bromo-benzil-hidrazida (**84**) da série D, via reação de substituição nucleofílica à carbonila ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$).

Alguns sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram essenciais para determinar o sucesso da síntese da benzil-hidrazida desejada (**84**), assim como para sua caracterização. Inicialmente, foi observada a ausência dos sinais atribuídos à metoxila, característicos do produto de partida **83**, na faixa de 3,92ppm, no espectro de hidrogênio, e 52,3ppm no espectro de carbono. De forma a corroborar para a confirmação da obtenção do produto desejado **84**, foram identificados, no espectro de ^1H , dois sinais do tipo simpleto largo em 5,00ppm, com 2 hidrogênios de integração, e 9,95ppm, com 1 hidrogênio de integração, referentes aos

hidrogênios presentes nas aminas primária e secundária (NH-NH_2), respectivamente, da hidrazida **84**.

4.2.2.3) Síntese da 4-bromo-*N*-acilidrazona

A terceira etapa na síntese dos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) consistiu em uma reação de condensação clássica ácido-catalisada entre a 4-bromo-benzil-hidrazida (**84**), produzida anteriormente, e 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**), para a obtenção da *N*-acilidrazona **85** (Esquema 41) (RIBEIRO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 2000). O produto foi obtido com um rendimento ótimo, após processo de isolamento, de 86%, e caracterizado por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de determinação do ponto de fusão de 210°C .



Esquema 41. Reação de condensação para a obtenção da NAH **85** da série D.

A reação em questão é regida por um mecanismo de condensação clássica, catalisado por ácido, entre a 4-bromo-benzil-hidrazida (**84**) e 3,4-dimetoxibenzaldeído (**70**), de forma análoga ao descrito anteriormente na página 84 (COSTA *et al.*, 2003).

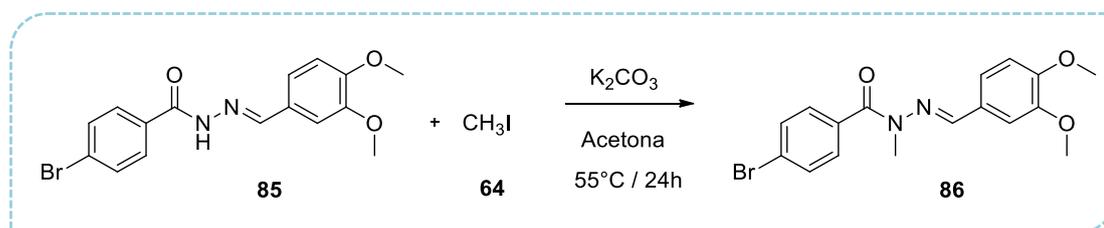
A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da NAH sintetizada (**85**) permitiu evidenciar, novamente, a formação de um único diastereoisômero devido à presença de apenas um único sinal simpleto, no espectro de RMN ^1H , referente ao hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$) do grupo NAH, em 8,38ppm (DMSO). Da mesma forma, a observação do espectro de RMN ^{13}C evidenciou a presença de somente um sinal referente ao carbono imínico em 148,4ppm (DMSO). Após a comparação destes com os sinais observados para a quimioteca de NAHs descritas por Kümmerle e colaboradores (8,3-8,8ppm – RMN ^1H ; e 137,5-148,5ppm – RMN ^{13}C , em DMSO) (KÜMMERLE *et al.*, 2012), a configuração relativa para o composto sintetizado **85** foi determinada como *E*.

Alguns sinais nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram essenciais para determinar o sucesso da reação de condensação proposta, assim como para caracterizar a formação da NAH desejada (**85**). O sinal na faixa de 8,38ppm referente à um simpleto com 1 hidrogênio de integração confirmou a presença de um hidrogênio imínico ($\text{N}=\underline{\text{C}}\text{H}$). Esta informação é

complementada pela análise do espectro de carbono, onde um sinal na faixa de 148,4ppm se torna evidente. Cabe ressaltar, que estes sinais não estavam presentes no produto de partida (**84**). Um sinal simpleto com 1 hidrogênio de integração na faixa de 11,82ppm no espectro de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio amídico (N-H) do grupo hidrazona, confirmando a obtenção do produto desejado (**85**). A presença dos sinais em 3,81ppm com 6 hidrogênios de integração, no espectro de hidrogênio, e 55,5ppm e 55,9ppm, no espectro de carbono, também contribuem para a caracterização da hidrazona **85**, pois estes podem ser atribuídos às metilas advindas do aldeído de partida (**70**). A ausência do sinal em 5,00ppm no RMN ^1H , atribuído anteriormente aos hidrogênios ligados à amina primária da hidrazida de partida (**84**), também corrobora para confirmar a ocorrência da reação de condensação entre os reagentes de partida (**84** e **70**) para a formação da hidrazona desejada (**85**).

4.2.2.4) Síntese da 4-bromo-*N*-metil-*N*-acilidrazona

A quarta etapa na síntese dos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) consistiu em uma reação de *N*-alquilação entre a NAH produzida na etapa anterior (**85**) e iodeto de metila (**64**), em meio básico, para a obtenção da *N*-metil-NAH **86** (Esquema 42) (BARCO *et al.*, 1973). O produto foi obtido com um rendimento excelente, após processo de isolamento, de 91%, e caracterizado por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de determinação do ponto de fusão de 136°C.



Esquema 42. Reação de *N*-alquilação para a obtenção da *N*-metil-NAH **86** da série D.

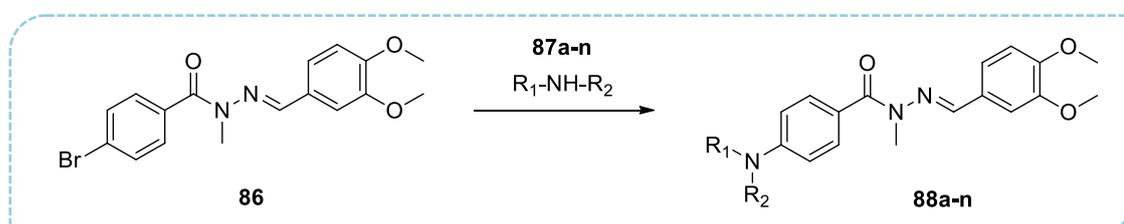
A reação de *N*-metilação, em questão, é regida por um mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) entre o iodeto de metila (**64**) e a NAH **85**, de forma análoga ao descrito anteriormente na página 88 (MCMURRY, 2016).

A *N*-metil-NAH obtida (**86**) foi caracterizada através de técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C . Os sinais essenciais para determinar o sucesso da reação foram os respectivos à introdução do grupo metila na estrutura após reação de *N*-alquilação. O sinal simpleto no RMN ^1H com 3 hidrogênios de integração em 3,55ppm valida este fato, sendo característico

de grupos alquila ligados a átomos de nitrogênio. Além disso, no espectro de carbono observou-se um sinal em 28,5ppm, novamente condizente à uma metila ligada à um átomo de nitrogênio. Cabe ressaltar, que o sinal em 11,82ppm no espectro de hidrogênio da NAH de partida (**85**) não foi observado no espectro da *N*-metil-NAH sintetizadas (**86**), o que confirma a desprotonação do produto de partida para a introdução do grupo metila advindo do iodeto de metila (**64**), segundo o mecanismo proposto para a reação (Esquema 16, página 88).

4.2.2.5) Síntese das *N*-metil-*N*-acilidrazonas *N*-ariladas

A última etapa na síntese dos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) consistiu na reação de *N*-arilação da *N*-metil-NAH **86**, obtida anteriormente, com aminas primárias ou secundárias (**87a-n**) (Esquema 43). Foram avaliadas diversas metodologias para a realização da reação em questão (Tabela 18), uma vez que não existe na literatura descrição para *N*-arilação de *N*-metil-NAHs.



Esquema 43. Reação geral de *N*-arilação para a obtenção das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas **88a-n** da série D.

Tabela 18. Metodologias avaliadas para a obtenção da *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** da série D.

Teste	Cat.	Ligante	Base	Solvente	Temp.	Tempo	Resultado
1	CuI	Diamina	Cs ₂ CO ₃	Acetonitrila	80°C	24h	ND
2	CuI	2-acetil-ciclohexanona	K ₂ CO ₃	DMF	100°C	24h	ND
3	Pd(OAc) ₂	Xantphos	Cs ₂ CO ₃	Dioxano	100°C	24h	40% ^a
4	Pd(OAc) ₂	Xantphos	Cs ₂ CO ₃	Tolueno	100°C	24h	53% ^a
5	Pd(OAc) ₂	Xantphos	K ₃ PO ₄	Tolueno	100°C	24h	36% ^a
6	Pd ₂ (dba) ₃	BINAP	<i>t</i> -BuOK	Tolueno	100°C	24h	38% ^a
7	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	K ₃ PO ₄	Dioxano	100°C	3h	90% ^a
8	Pd ₂ (dba) ₃	XPhos	K ₃ PO ₄	Dioxano	80°C	24h	60% ^a

^a Rendimento encontrado após isolamento por coluna cromatográfica

Os testes de *N*-arilação foram realizados utilizando-se como padrão a *N*-metil-NAH **86** e a amina **87a** (R_1 e $R_2 = -(CH_2)_5-$, piperidina). Inicialmente, nos testes de número 1 e 2 avaliou-se a possibilidade de obtenção dos produtos desejados através da reação de acoplamento cruzado de Ullmann, que utiliza iodeto de cobre I (CuI) como catalisador (Tabela 18) (LIN; SUN, 2013). O primeiro teste seguiu o protocolo descrito por Shen e colaboradores, que retrata a *N*-arilação de haletos de arila, utilizando o catalisador CuI, trans-1,2-ciclohexanodiamina (diamina) como ligante, carbonato de céσιο (CS_2CO_3) como base e acetonitrila como solvente, à 80°C (SHE *et al.*, 2016). A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) por até 24h e o resultado obtido foi a não formação do produto desejado (**88a**) (ND, Tabela 16). Foi avaliado em seguida (Teste 2, Tabela 18) o protocolo descrito por Yang e colaboradores, que retrata a *N*-arilação de haletos de arila, onde se utilizou, novamente, CuI como catalisador, 2-acetil-ciclohexanona como ligante, carbonato de potássio (K_2CO_3) como base e *N,N*-dimetilformamida (DMF) como solvente à 100°C (YANG *et al.*, 2010). Do mesmo modo, após de 24 horas de acompanhamento da reação, o resultado obtido foi a não formação do produto desejado (**88a**) (ND, Tabela 18). Devido à ineficácia observada da reação de Ullmann para a *N*-arilação da *N*-metil-NAH **86**, foi investigada para tal fim a reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig, que utiliza paládio como catalisador e ligantes do tipo fosfina (HERAVI *et al.*, 2018) (Testes 3-8, Tabela 18). O primeiro deles (Teste 3, Tabela 18), foi realizado segundo o protocolo descrito por Witulski e colaboradores, e foi adotado como padrão para a realização dos demais testes. Este retrata a *N*-arilação de brometos de arila, com acetato de paládio ($Pd(OAc)_2$) como catalisador, Xantphos (4,5-bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno) como ligante, carbonato de céσιο como base e dioxano como solvente, à 100°C (WITULSKI *et al.*, 2006). Após 24 horas de reação foi observada a formação do produto desejado (**88a**), que foi purificado através de cromatografia em coluna, com rendimento de 40% (Tabela 18). Contudo, foi identificada também no meio reacional a presença notória de um subproduto mais polar que não foi isolado e caracterizado. A fim de aperfeiçoar os parâmetros reacionais, a mesma metodologia descrita anteriormente foi avaliada utilizando-se tolueno como solvente da reação (Teste 4, Tabela 18), em substituição ao dioxano, uma vez que este primeiro é muito empregado em reações de acoplamento cruzado (HERAVI *et al.*, 2018). O resultado observado foi a obtenção do produto *N*-arilado **88a**, em 24 horas de reação, com 53% de rendimento após processo de purificação (Teste 4, Tabela 18), além da formação do mesmo subproduto observado no teste anterior. Com o propósito de diminuir a formação de produtos

indesejados, a reação de *N*-arilação foi avaliada utilizando-se uma base mais fraca, *i.e.* fosfato de potássio (K₃PO₄) (Teste 5, Tabela 18). Mas novamente, foi identificada a formação de subproduto, acompanhada da formação do produto desejado **88a** após 24 horas de reação à 100°C, com rendimento inferior ao encontrado anteriormente de 36% (Teste 5, Tabela 18). Foram analisadas também outras metodologias para a obtenção das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas através da reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig, como a descrita por Yang e colaboradores, que utiliza Pd₂(dba)₃ (tris((1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona) di-paládio) como catalisador, BINAP (2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftaleno) como ligante, tert-butóxido de potássio (t-BuOK) como base e tolueno como solvente, à 100°C (Teste 6, Tabela 18) (YANG *et al.*, 2005). Assim como o descrito para os testes 3-5, foi observada a formação do subproduto mais polar, e o rendimento encontrado após purificação do produto **88a** foi de 38% (Teste 6, Tabela 18). Em seguida, analisou-se a metodologia descrita por James e colaboradores, que retrata a *N*-arilação de 4-bromo-benzamidas, e utiliza Pd₂(dba)₃ como catalisador, XPhos (diciclohexilfosfino-2',4',6'-triisopropilbifenil) como ligante, fosfato de potássio (K₃PO₄) como base e dioxano como solvente, à 100°C (Teste 7, Tabela 18) (JAMES *et al.*, 2013). Através do acompanhamento por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), observou-se que após 3 horas de reação o produto de partida **86** foi totalmente consumido, acompanhado pela não formação de subprodutos, e da formação do produto desejado (**88a**) em excelente rendimento de 90%, após processo de purificação por cromatografia em coluna de fase normal (Teste 7, Tabela 18). Por fim, com o objetivo de avaliar a influência da temperatura na reação em questão, analisou-se a metodologia descrita anteriormente em uma temperatura inferior de 80°C (Teste 8, Tabela 18). Verificou-se que não houve a formação de subprodutos, entretanto não houve o consumo total de produto de partida (**86**), o que resultou na diminuição do rendimento reacional para 60% após purificação (Teste 8, Tabela 18).

Na tentativa de quantificar, de forma relativa, a formação do produto desejado (**88a**) em correlação ao consumo do produto de partida (**86**) ao longo da reação de *N*-arilação em questão, foram realizados experimentos cromatográficos por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance, CLAE) (Figuras 40 e 41). Inicialmente, os produtos **86** e **88a** foram cromatografados de forma isolada para determinar o perfil de eluição dos mesmos na metodologia cromatográfica empregada, onde se utilizou de forma isocrática uma mistura de acetonitrila e água (80:20), além de 1% de ácido acético, como fase móvel e coluna C18 como fase estacionária, assim como para obter as suas respectivas curvas de absorção no UV

(Figura 39). Para o produto de partida **86** observou-se o máximo de absorção a 315nm, enquanto que para o produto final **88a**, este valor foi observado foi a 311nm (Figura 39). Cabe ressaltar que, estas informações foram essenciais para identificar os picos dos produtos **86** e **88a** nos cromatogramas dos testes de *N*-arilação avaliados.

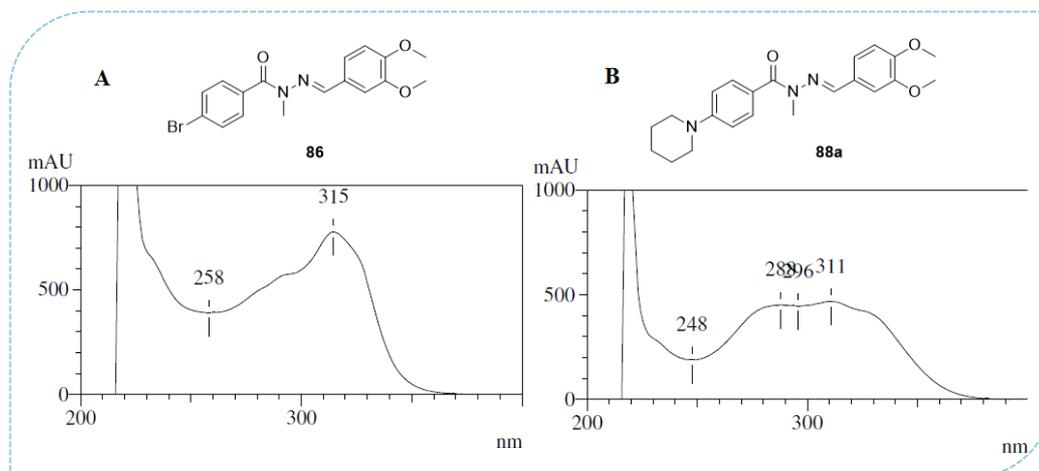


Figura 39. Curva de absorção no UV na faixa de 200-400nm para: **A)** a *N*-metil-NAH de partida **86**; **B)** o produto *N*-arilado **88a**.

Com base nas curvas de UV dos produtos **86** e **88a**, os experimentos cromatográficos seguintes foram realizados na faixa de detecção de 310nm, uma vez que os máximos de absorção, para cada composto analisado isoladamente, se encontram próximos a esta medida (311-315nm) (Figura 39).

Como não foi possível realizar o experimento de HPLC para todas as metodologias sintéticas avaliadas, selecionou-se a metodologia mais eficaz para a obtenção da *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** (Teste 7, Tabela 16) e a utilizada como padrão para os demais testes (Teste 3, Tabela 16). Aliquotas foram retiradas ao longo das reações de *N*-arilação (1-6 horas) nas metodologias avaliadas (Testes 3 e 7) e o resultado obtido está ilustrado nas figuras 40 e 41.

A análise dos cromatogramas do teste 3, ao longo de 6 horas, permitiu a observação de dois picos predominantes no meio, identificados através das suas respectivas curvas de UV, como o produto de partida (**86**), com eluição na faixa de 4,180-4,184 minutos, e o produto *N*-arilado final (**88a**) com eluição na faixa de 4,492-4,506 minutos (Figura 40). Após 1 hora de reação é possível observar que há a formação de cerca de 10% do produto desejado **88a** em comparação ao produto de partida **86** (Figura 40A). Após 3 horas o percentual de formação do produto final (**88a**) aumenta para cerca de 40% (Figura 40B) e finalmente, após 6 horas de

reação há aproximadamente 85% de produto formado (**88a**), enquanto que há apenas 15% de produto de partida (**86**) (Figura 40B). Cabe destacar que, não foram considerados aqui os percentuais quantitativos dos subprodutos formados durante a reação, uma vez que estes não foram isolados e caracterizados quanto à sua absorção no UV, dificultando a sua observação e identificação nos cromatogramas. Desta forma, os valores percentuais demonstrados de formação do produto final **88a**, ao longo da reação (Figura 40), não correspondem e nem devem ser comparados aos valores encontrados para os rendimentos reacionais após o processo de isolamento e purificação (Tabela 18).

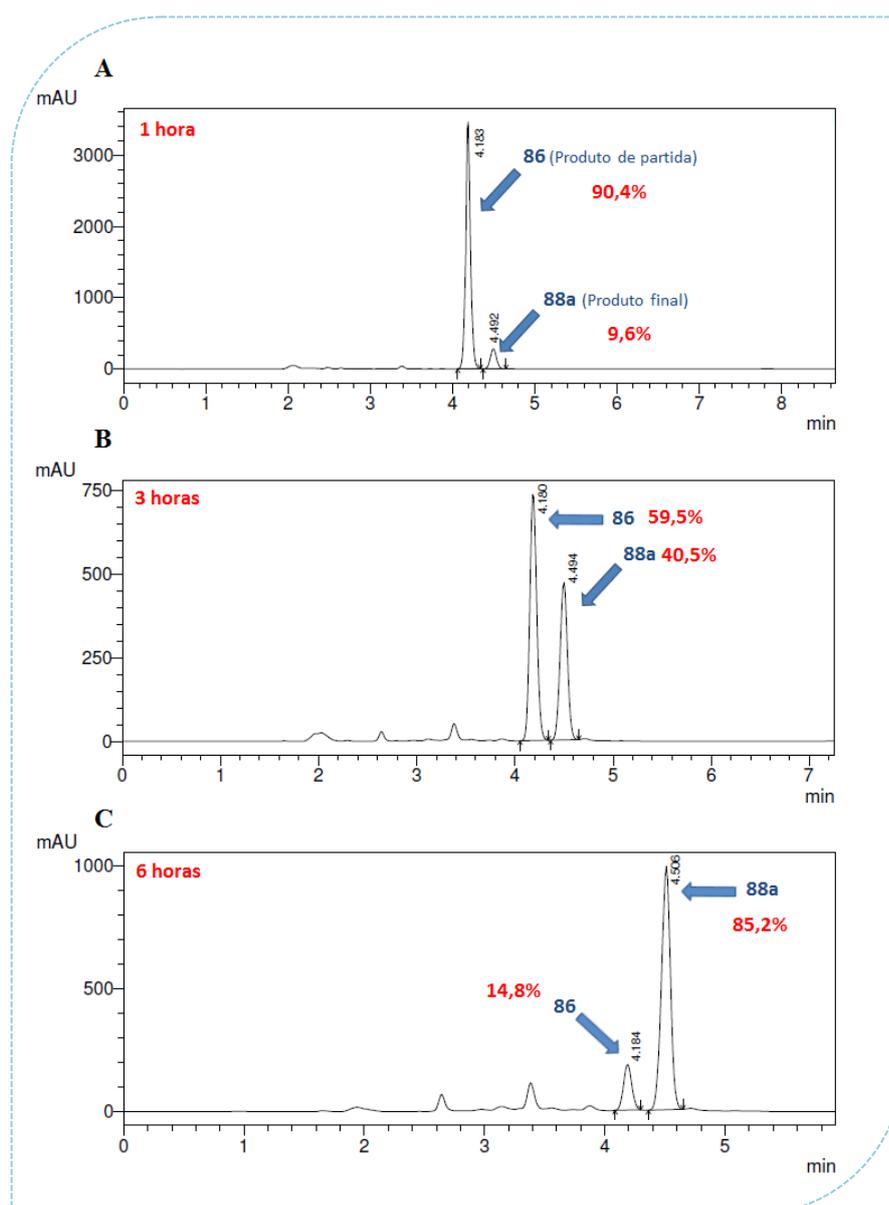


Figura 40. Cromatogramas de HPLC para o acompanhamento da reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção do produto *N*-arilado **88a**, a partir da *N*-metil-NAH **86**, utilizando a metodologia descrita no teste 3 (Tabela 16), com detecção no UV a 310nm. **A)** Após 1 hora de reação. **B)** Após 3 horas de reação. **C)** Após 6 horas de reação.

Contudo, a análise cromatográfica do teste 7 demonstrou que houve o consumo total do reagente de partida (**86**), cujo pico não foi identificado no cromatograma, acompanhado da formação majoritária do produto *N*-arilado desejado (**88a**), após 1 hora de reação (Figura 41). Deste modo, comprovou-se a maior eficiência da metodologia descrita no teste 7 para a síntese dos produtos finais **88a-n**, em comparação com as demais.

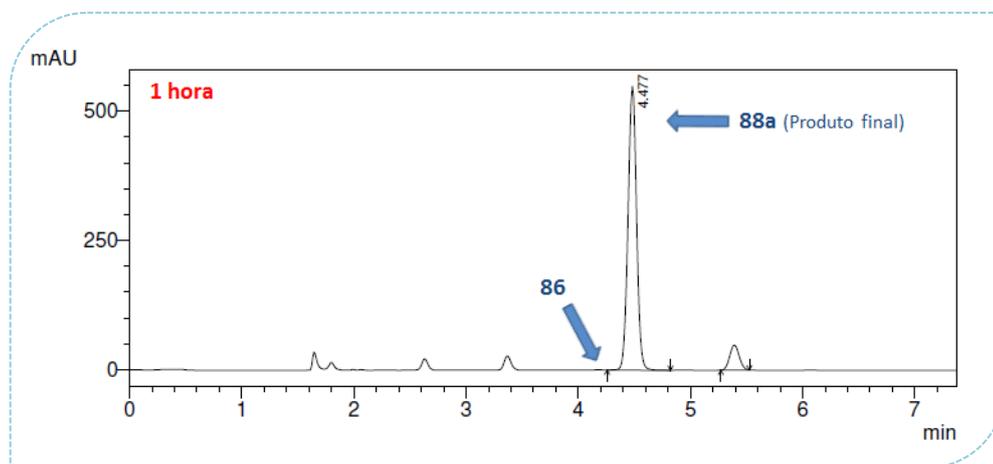
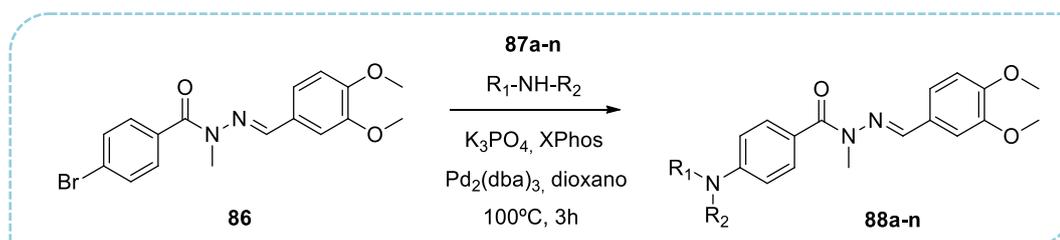


Figura 41. Cromatograma de HPLC para o acompanhamento da reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção do produto *N*-arilado **88a**, a partir da *N*-metil-NAH **86**, utilizando a metodologia descrita no teste 7 (Tabela 16), após 1 hora de reação, com detecção no UV a 310nm.

Devido ao sucesso na síntese do produto **88a** em 90% de rendimento, através do emprego da metodologia descrita no teste 7 (Tabela 18), com a utilização de $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ como catalisador, XPhos como ligante, fosfato de potássio (K_3PO_4) como base e dioxano como solvente, à 100°C por 3 horas, optou-se pela utilização da mesma como padrão para a obtenção das novas *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D (**88a-n**) (Esquema 44) (JAMES *et al.*, 2013). Os produtos brutos obtidos foram purificados através de cromatografia em coluna e, posteriormente caracterizados por técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , além de determinação do ponto de fusão (Tabela 19). Os rendimentos reacionais foram considerados de razoáveis a excelentes, variando entre 40-90% para as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas **88a-n** (Tabela 19).

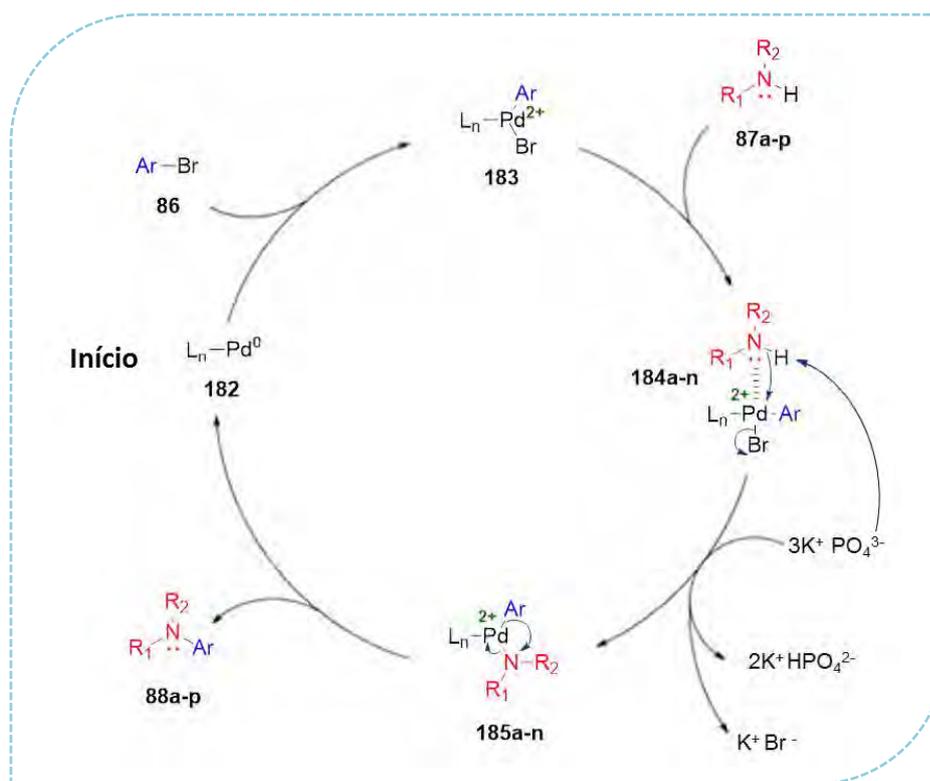


Esquema 44. Reação de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig para a obtenção das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas **88a-n** da série D.

Tabela 19. Rendimentos reacionais e pontos de fusão para as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas **88a-n** da série D.

Produtos	R ₁	R ₂	Rendimentos (%)	Ponto de fusão (°C)
88a	-(CH ₂) ₅ -		90	115
88b	-(CH ₂) ₄ -		77	138
88c	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -		60	200
88d	-(CH ₂) ₂ -S-(CH ₂) ₂ -		60	148
88e	-(CH ₂) ₂ -CHCH ₃ -(CH ₂) ₂ -		65	108
88f	Ciclohexil-	H-	40	139
88g	-COOC(CH ₃) ₃	H-	74	114
88h	Ph-	H-	50	174
88i	PhCH ₂ -	H-	72	121
88j	Ph-(CH ₂) ₂ -	H-	87	80
88k	3,4-(metilenodioxi)fenil	H-	79	191
88l	3,4,5-(trimetoxi)fenil	H-	50	192
88m	1-Naftil	H-	88	162
88n	2-Naftil	H-	73	181

A reação de *N*-arilação em questão, para a obtenção das *N*-metil NAHs desejadas (**88a-n**), é conhecida como reação de Buchwald-Hartwig e é essencialmente uma reação de acoplamento cruzado entre um haleto de arila (**86**) e uma amina (**87a-n**), empregando paládio como catalisador (HERAVI *et al.*, 2018). O mecanismo está descrito no esquema abaixo, onde inicialmente ocorre a etapa de adição oxidativa do produto de partida (*N*-metil-NAH, **86**) ao paládio, que passa do estado de oxidação zero (0) para 2+ (Esquema 45). O intermediário **183** formado passa para a segunda etapa de coordenação com uma molécula de amina (**87a-p**), para a obtenção do complexo **184a-n**. Em seguida, a base presente no meio, *i.e.* K₃PO₄, promove a abstração do hidrogênio da função amina (**184a-n**) formando um amideto que, por sua vez, ataca de forma concertada o átomo de paládio (2+) e promove a eliminação do íon brometo da molécula. O intermediário **185a-n** formado passa pela etapa de eliminação redutiva, onde ocorre a formação do produto desejado (**88a-n**) e a redução do número de oxidação do átomo de paládio de +2 para zero (0), novamente (Esquema 45) (GURAM; BUCHWALD, 1994; PAUL *et al.*, 1994).



Esquema 45. Ciclo catalítico do paládio para a reação de *N*-ariação da *N*-metil-NAH **86** com as aminas **87a-p** e obtenção das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas **88a-p**, via mecanismo de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig (Adaptado de GURAM; BUCHWALD, 1994; PAUL et al., 1994).

As *N*-metil-NAHs *N*-ariladas (**88a-n**) foram caracterizadas através de técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C e o sucesso da reação foi determinado pela identificação de alguns sinais-chave, como os observados em campo alto, atribuído aos hidrogênios e carbonos alquílicos dos produtos **88a-g**, introduzidos pelas aminas de partida (**87a-g**). Estes foram identificados nos espectros de hidrogênio na faixa de 1,00-3,89ppm (CDCl_3) e no espectro de carbono na faixa de 21,8-51,4ppm (CDCl_3). Para os produtos com introdução de sistemas aromáticos pela reação de *N*-arilação (**88h-n**), foram observados novos sinais em campo baixo na faixa de 6,42-8,02ppm (CDCl_3) no espectro de hidrogênio e 98,1-153,9ppm (CDCl_3) no espectro de carbono, que não eram observados na *N*-metil-NAH de partida (**86**). Outro sinal que auxilia na determinação do sucesso da reação de *N*-arilação é o sinal atribuído ao carbono ípso presente na estrutura da *N*-metil-NAH de partida (**86**) ($\text{C}-\text{Br}$) em 124,4ppm (CDCl_3), no espectro de carbono, que sofre deslocamento nos espectros dos produtos *N*-arilados desejados ($\text{C}-\text{NR}_1\text{R}_2$) (**88a-n**) para a faixa de 140,3-153,0ppm (CDCl_3). De maneira análoga, os sinais dos hidrogênios ligados ao sistema aromático vizinho à carbonila foram deslocados em comparação entre o produto de partida **86** e os produtos finais **88a-n**. Os sinais

em posição *meta* à carbonila na *N*-metil-NAH **86** foram identificados em 7,55ppm, (CDCl₃) no espectro de hidrogênio, enquanto que os mesmos sinais nos produtos *N*-arilados **88a-n** foram observados deslocados para campo mais alto, na faixa de 6,52-7,42ppm (CDCl₃). Este fato pode ser explicado uma vez que, a posição em questão permanece mais protegida pelo grupo amina, introduzida nas moléculas finais **88a-n**, em comparação com o grupo bromo presente na estrutura do produto de partida **86**, pelo efeito de ressonância. Entretanto, para a posição *orto* à carbonila o resultado observado foi inverso, uma vez que esta é desprotegida pelo efeito pronunciável de indução exercido pelo nitrogênio presente no grupo amina introduzida nos produtos *N*-arilados (**88a-n**). Onde os sinais atribuídos aos hidrogênios em questão deslocaram de 7,62ppm (CDCl₃) no espectro de hidrogênio na *N*-metil-NAH **86**, para a faixa de 7,77-7,86ppm (CDCl₃) nos produtos finais **88a-n**.

Devido à possibilidade de inversão da configuração relativa *E* da função *N*-acilidrazona nos produtos **88a-n** após a reação de *N*-arilação (resultado observado pelo grupo com outros metais), os sinais respectivos aos hidrogênios imínicos (CH=N) nas moléculas finais foram analisados. Observou-se, para todos os produtos (**88a-n**), a presença de somente um sinal no espectro de hidrogênio que variou na faixa de 7,67-7,72ppm (CDCl₃) com integração para 1 hidrogênio, e um sinal no espectro de carbono que variou na faixa de 137,3-138,3ppm (CDCl₃). Ou seja, não foi observada a mistura de diastereoisômeros nos produtos finais. Comparando-se estes valores encontrados nos espectros de RMN, com os valores observados para o hidrogênio imínico por Kümmerle e colaboradores na quimioteca de *N*-metil-NAHs de configuração relativa *E* (7,7-8,2ppm no RMN de ¹H; 130,8-141,3ppm no RMN ¹³C) (KÜMMERLE *et al.*, 2012), pôde-se inferir que as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas obtidas neste trabalho (**88a-n**) possuem, igualmente, configuração *E*.

De maneira a corroborar com a caracterização estrutural das moléculas finais da série D (**88a-n**) foi realizado o experimento cristalografia de raios-X de um monocristal obtido do produto **88a** (Figura 42), onde foi possível confirmar a configuração relativa *E*.

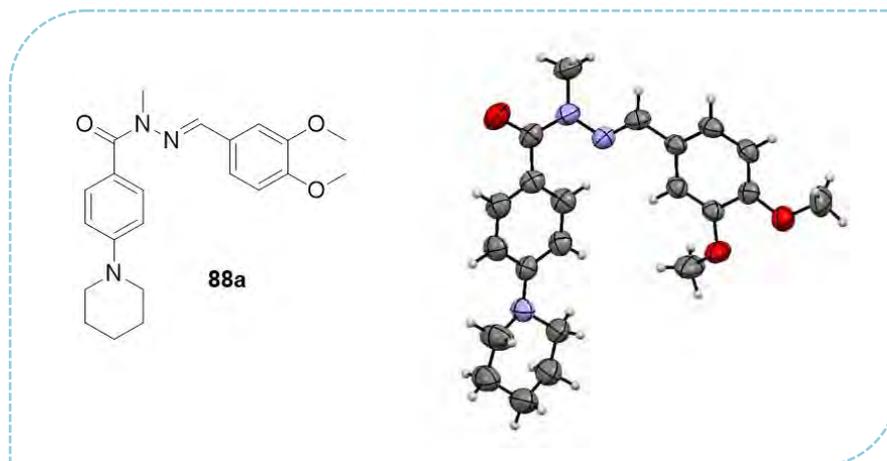


Figura 42. Representação ORTEP do resultado da cristalografia de raios-X para a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** e a confirmação da diastereoisomeria (*E*).

4.2.3) Avaliação das propriedades físico-químicas das novas *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D

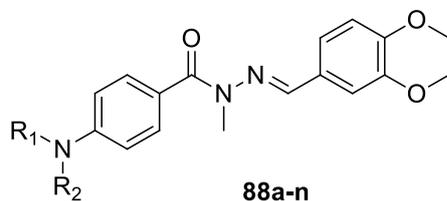
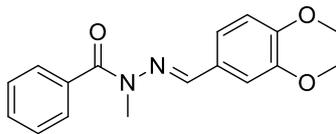
Após a síntese das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D (**88a-n**), foram realizados estudos teóricos para determinar as propriedades físico-químicas de cada composto final. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 20 e foram analisados segundo as regras de Lipinski, para a obtenção de moléculas promissoras finais como futuras candidatas a fármacos.

Em 1997, Lipinski e colaboradores realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, no qual observaram que algumas propriedades físico-químicas eram essenciais para que os compostos apresentassem boa absorção e distribuição no organismo. Os resultados alcançados por eles geraram a chamada regra dos cinco de Lipinski, mais comumente conhecida como “*rule of five*” (RO5) (LIPINSKI, 2004). De acordo com a RO5, algumas propriedades moleculares são relevantes: o coeficiente de partição, cujo valor calculado (Clog P) deve permanecer abaixo de 5; o número de doadores de ligações de hidrogênio (HBD), que deve ser no máximo 5; o número de aceptores de ligações de hidrogênio (HBA), inferior à 10; e o peso molecular (W.M.), que necessita estar abaixo dos 500 Daltons (LIPINSKI, 2004).

Inicialmente, foi calculado o peso molecular (W.M.) das *N*-metil-NAH *N*-ariladas **88a-n**. Cabe destacar que, esta propriedade está diretamente correlacionada com a solubilidade em água dos compostos em questão, assim como com a difusão passiva dos mesmos pela bicamada lipídica presente nas membranas celulares (WERMUTH, 2003). Segundo as regras de Lipinski, os compostos devem apresentar peso molecular menor ou igual a 500 Daltons, uma vez que o aumento deste valor acarreta em uma menor absorção

destes pelo organismo. Os valores obtidos para os produtos *N*-arilados avaliados variaram na faixa de 367,44-479,53g/mol, abaixo do limite máximo permitido (Tabela 20), demonstrando que as *N*-metil-NAHs da série D preenchem este pré-requisito.

Tabela 20. Propriedades físico-químicas calculadas para as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D (**88a-n**).

						
Produtos	R ₁	R ₂	W.M. (Daltons)	ClogP	HBA	HBD
88a	-(CH ₂) ₅ -		381,47	3,567	6	0
88b	-(CH ₂) ₄ -		367,44	3,008	6	0
88c	-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -		383,44	2,185	7	0
88d	-(CH ₂) ₂ -S-(CH ₂) ₂ -		399,51	3,018	6	0
88e	-(CH ₂) ₂ -CHCH ₃ -(CH ₂) ₂ -		395,49	4,086	6	0
88f	Ciclohexil-	H-	395,49	4,259	6	1
88g	-COOC(CH ₃) ₃	H-	413,47	3,435	8	1
88h	Ph-	H-	389,45	4,207	6	1
88i	PhCH ₂ -	H-	403,47	3,676	6	1
88j	Ph-(CH ₂) ₂ -	H-	417,50	4,325	6	1
88k	3,4-(metilenodioxifenil	H-	433,46	4,301	8	1
88l	3,4,5-(trimetoxifenil	H-	479,52	3,607	9	1
88m	1-Naftil	H-	439,51	5,381	6	1
88n	2-Naftil	H-	439,51	5,381	6	1
27			298,34	2,729	5	0

O coeficiente de partição também é uma propriedade importante a ser avaliada para a obtenção de bons candidatos à fármacos, uma vez que está correlacionado com a absorção dos compostos pelo organismo, através de difusão passiva, com a ligação dos mesmos a proteínas plasmáticas e com a distribuição destes em diferentes tecidos (ERTL *et al.*, 2000;

WERMUTH, 2003). O coeficiente de partição indica a tendência preferencial de um composto se dissolver em uma fase orgânica ou aquosa. O logaritmo desse coeficiente é chamado de logP. Se o $\log P = 0$, pode-se deduzir que $P = 1$, mostrando que o composto possui afinidade igual às duas fases (orgânica e aquosa); se $\log P < 0$, significa que $P < 1$, assim a solubilidade é maior na fase aquosa; se o $\log P > 0$, o $P > 1$, mostrando que o composto tem afinidade maior pela fase orgânica. Quanto maior o valor de logP mais hidrofóbico e lipossolúvel será o composto. Esse valor de logP pode variar de -3 a 7, no entanto, o valor ideal para fármacos fica entre 2 a 5, isso porque valores abaixo desse limite dificultam a permeação pela membrana plasmática, enquanto que fármaco com logP maior que 5 podem ficar retidos na membrana, devido a sua alta lipossolubilidade (LIPINSKI, 2004). Deste modo, os valores calculados de coeficiente de partição (ClogP) para as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas demonstraram que os produtos **88a-l** permaneceram dentro dos parâmetros ideais da RO5, na faixa de 2,185-4,325, enquanto que os produtos **88n** e **88m** não obedecem as regras, com valores de ClogP iguais a 5,381 (Tabela 20). Ademais, é essencial destacar que através do cálculo dos valores de coeficiente de partição foi possível comprovar a diversidade de compostos sintetizados com relação à lipofilicidade, conforme o planejado para a série D. Onde o produto **88c** foi o menos lipofílico da série (ClogP = 2,185), podendo ser avaliado futuramente, por exemplo, em preparações aerossólicas para a inibição da PDE4 somente nos pulmões. Enquanto que os produtos **88j** e **88k** foram os mais lipofílicos que se enquadraram na RO5 (ClogP = 4,325 e 4,301, respectivamente), podendo ser avaliados como inibidores da enzima PDE4 para o tratamento de doenças do sistema nervoso central (SNC), devido a maior probabilidade de ultrapassar barreiras apolares com maior facilidade, como a barreira hematoencefálica (Tabela 20).

Outra propriedade analisada pela regra de Lipinski é a capacidade de um composto de promover interações do tipo ligação de hidrogênio com o meio, como doador ou aceptor. Essas interações são extremamente importantes, não só para a farmacodinâmica, mas também para a farmacocinética de um determinado composto, pois podem afetar a sua absorção e a sua distribuição (WERMUTH, 2003). Ligações de hidrogênio aumentam a solubilidade de um composto em água, o que dificulta a passagem deste para o interior da célula por difusão passiva. Além disso, estas interações podem aumentar a afinidade das moléculas, em questão, com as proteínas plasmáticas presentes na corrente sanguínea e dificultar a distribuição do composto pelos tecidos (WERMUTH, 2003). Deste modo, Lipinski e colaboradores determinaram que até 5 átomos doadores de ligação hidrogênio (HBD), e até 10 átomos

aceptores de ligação hidrogênio (HBA), são necessários na estrutura de um composto para que este possa apresentar biodisponibilidade satisfatória e um número ótimo de interações com o alvo farmacológico (LIPINSKI, 2004). Para as *N*-metil-NAHs avaliadas (**88a-n**), a quantidade de átomos que são capazes de realizar interações do tipo ligação hidrogênio por doação (HBD), ou por recepção (HBA), se encontra dentro da faixa estipulada pela RO5, onde o composto **88i** permanece no limite da faixa com 9 átomos aceptores (Tabela 20).

Por fim, após a análise realizada dos compostos *N*-arilados finais da série D (**88a-n**), pôde-se concluir que a maioria dos compostos (**88a-l**) possui os atributos necessários, segundo as regras de Lipinski, para se tornarem bons candidatos a fármacos com diferentes perfis de lipofilicidade, como o planejado.

4.2.4) Estudos do perfil de interação entre as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D e o sítio catalítico da enzima PDE4 por modelagem molecular

Para a realização dos estudos de ancoramento molecular (docking), foi selecionada, no banco de dados do PDB (Protein Data Bank), a estrutura cristalográfica do domínio catalítico da PDE4D, de código 1XOR e resolução de 1,5 Å, com um corte de 10 Å a partir do resíduo Asp318 (CARD *et al.*, 2004). Esta escolha foi baseada na similaridade estrutural entre o ligante zardaverina (**15**), cocrystalizado com a enzima, e as *N*-metil-NAHs avaliadas (**88a-n** e **27**). Ambas apresentam em suas estruturas a função *N*-acilidrazona (em destaque vermelho), assim como o núcleo dialcoxi-fenila (em azul) (Figura 43).

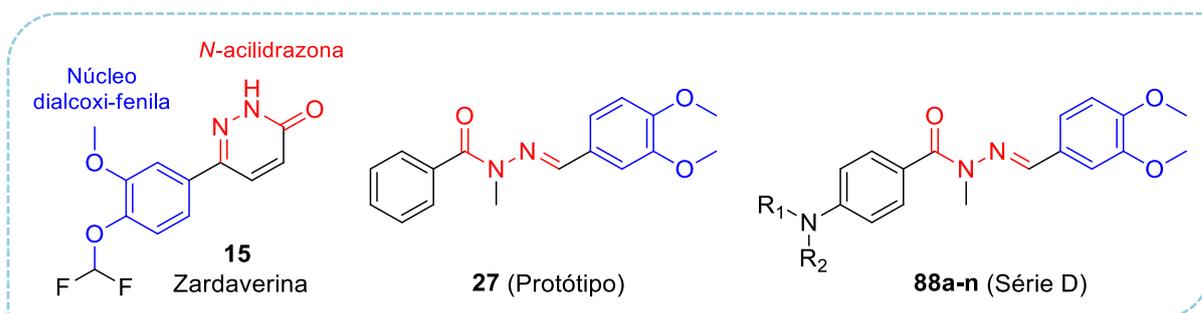


Figura 43. Semelhanças estruturais entre o ligante zardaverina (**15**) cocrystalizado com a enzima PDE4D, na estrutura cristalográfica de código 1XOR, e as *N*-metil-NAHs *N*-ariladas sintetizadas **88a-n** e o protótipo inspirador da série D (**27**).

Inicialmente, foram realizados os experimentos de redocking, no programa GOLD (versão 5.1), do ligante cocrystalizado (**15**) com o sítio catalítico da PDE4D, para determinar qual a melhor função a ser utilizada para os estudos de docagem molecular. Através da visualização dos valores de RMSD para cada função de pontuação (Tabela 21), foi possível

perceber que estes foram razoáveis, sendo o menor valor, igual à 0,36 Å, oriundo da função GoldScore (Figura 44). Deste modo, tal função foi escolhida para ser utilizada no experimento de docking dos compostos *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados.

Tabela 21. Função de pontuação e respectivos valores de RMSD em Å para o redocking com o ligante zardaverina (15) e a enzima PDE4D.

Função de pontuação	RMSD (Å)
Asp	4,37
ChemPLP	4,97
ChemScore	4,93
GoldScore	0,36

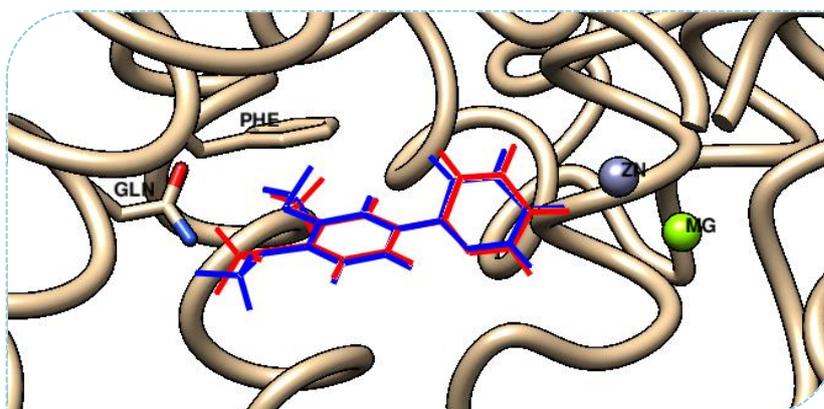


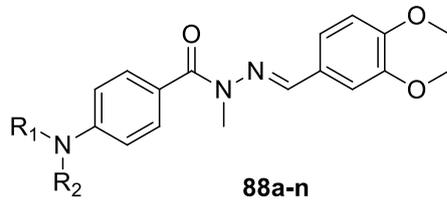
Figura 44. Redocking, em destaque azul, do ligante zardaverina (15) cocrystalizado, em destaque vermelho, com o sítio catalítico da enzima PDE4D utilizando a função GoldScore.

Finalmente, os compostos *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados (**88a-n**) e o protótipo inspirador desta série, a dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (**27**), foram previamente tratados, através da minimização de energia via método semi-empírico PM6 (Spartan Pro - versão 14.0) (STEWART, 2007), ancorados no sítio catalítico da enzima PDE4D e os resultados podem ser observados nas figuras 45-59 e na tabela 20.

Os melhores valores de pontuação obtidos para os ligantes **27** (protótipo) e **88a-n** (série D) estão descritos na tabela 22, onde foi possível observar que todos os compostos derivados *N*-arilados (**88a-n**) apresentaram melhor atracamento ao sítio catalítico da PDE4, com pontuação na faixa de 51,11-65,09, em comparação com protótipo inspirador (**27**), com pontuação de 49,41. Deste modo, é possível presumir teoricamente que o volume adicional nos novos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados (**88a-n**) não compromete a

interação da classe *N*-acilidrazônica avaliada com a enzima alvo, assim como pode promover um ganho de novas interações, corroborando com o planejamento descrito anteriormente para a série D.

Tabela 22. Melhores pontuações de docking dos ligantes **88a-n** (série D) e **27** (protótipo) com sítio catalítico da enzima PDE4D.

			
Produtos	R ₁	R ₂	Pontuação
88a		-(CH ₂) ₅ -	55,80
88b		-(CH ₂) ₄ -	54,65
88c		-(CH ₂) ₂ -O-(CH ₂) ₂ -	51,11
88d		-(CH ₂) ₂ -S-(CH ₂) ₂ -	52,82
88e		-(CH ₂) ₂ -CHCH ₃ -(CH ₂) ₂ -	54,86
88f	Ciclohexil-	H-	58,26
88g	-COOC(CH ₃) ₃	H-	58,22
88h	Ph-	H-	51,27
88i	PhCH ₂ -	H-	57,46
88j	Ph-(CH ₂) ₂ -	H-	56,76
88k	3,4-(metilendioxi)fenil	H-	56,35
88l	3,4,5-(trimetoxi)fenil	H-	65,09
88m	1-Naftil	H-	58,96
88n	2-Naftil	H-	59,21
27			49,41

As Figuras 45-59 mostram os resultados de docking das melhores soluções, respectivas aos valores de pontuação demonstrados na tabela acima (Tabela 22) para os compostos **88a-n** e **27**. Nas figuras 46A-59A é possível identificar que os derivados *N*-metil-

NAHs em questão (**88a-n**) são capazes de realizar interações essenciais para a inibição da PDE4, assim como o protótipo dialcoxi-fenil-*N*-metil-NAH (**27**) (Figura 45A). São estas: a interação do tipo ligação hidrogênio entre o grupo dialcoxi-fenila, presente nos ligantes, e o resíduo de glutamina (Gln), no sítio catalítico da PDE4; a interação do tipo π -stacking entre o mesmo grupo e o resíduo de fenilalanina (Phe); e a interação do tipo íon-dipolo entre o oxigênio carbonílico das NAHs com o íon magnésio (Figuras 46A-59A).

A figura 45B ilustra a sobreposição do ligante cocristalizado zardaverina (**15**), em destaque azul, e o protótipo **27**, em destaque vermelho, onde é possível observar que estes se atracam de modo muito semelhante, com relação às interações realizadas pelo núcleo dialcoxi-fenila, ao sítio catalítico da PDE4. De forma similar, a análise foi estendida aos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados (**88a-n**), em destaque vermelho, sobrepondo-os ao protótipo inspirador deste trabalho (**27**), em destaque azul (Figuras 46B-59B). Através da observação dos resultados, foi possível identificar que as moléculas em questão ancoram de forma quase que idêntica ao sítio da PDE4. Este fato corrobora, mais uma vez, com a proposta de planejamento estrutural da série de derivados das *N*-metil-NAHs da série D, onde a adição de grupos volumosos ao arcabouço da estrutura da classe protótipo (**27**), na região voltada para o exterior da cavidade enzimática, sem interferir nas interações essenciais para a atividade dos compostos, é teoricamente viável. Fato, este, que é confirmado através da visualização das figuras 46C-59C, onde é possível observar que as *N*-Metil-NAHs avaliadas são facilmente comportadas no interior do sítio catalítico da enzima PDE4D.

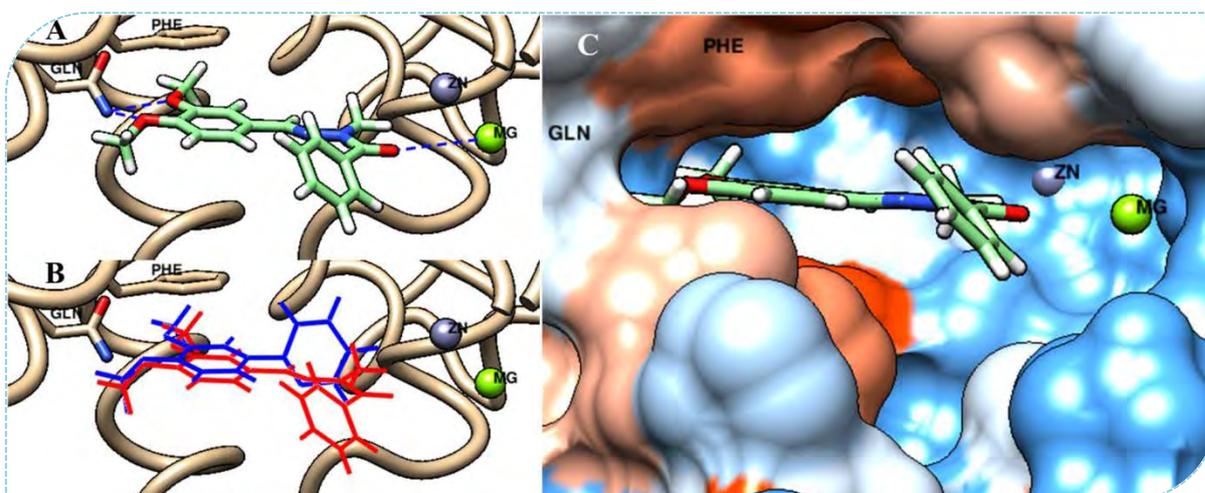


Figura 45. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH **27** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do ligante zardaverina (**15**), em destaque azul, e o protótipo **27** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **27** ancorado.

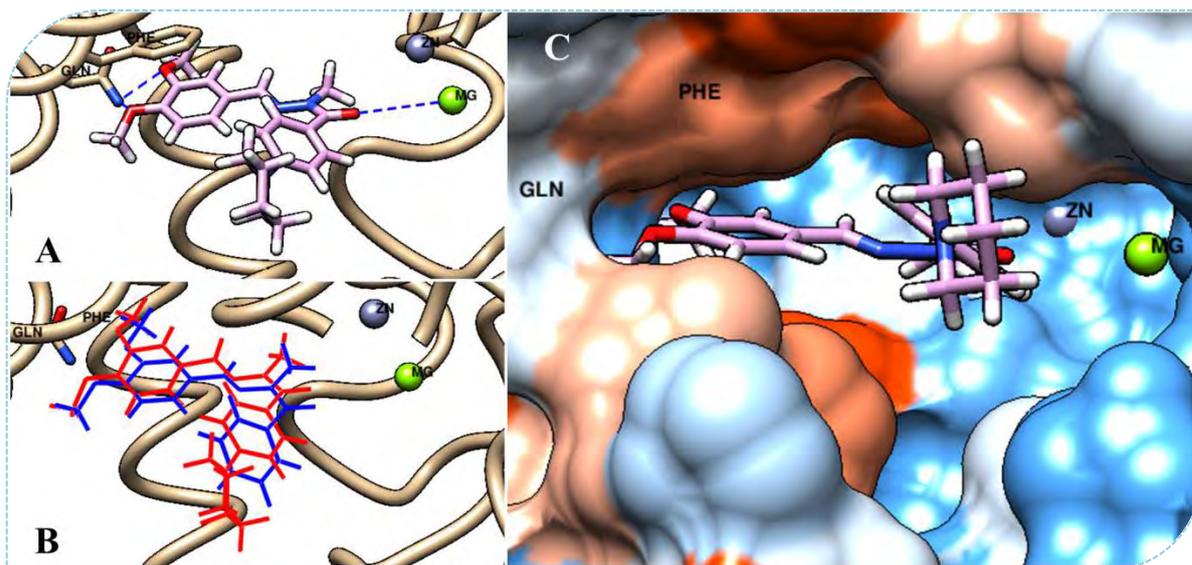


Figura 46. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88a** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88a** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88a** ancorado.

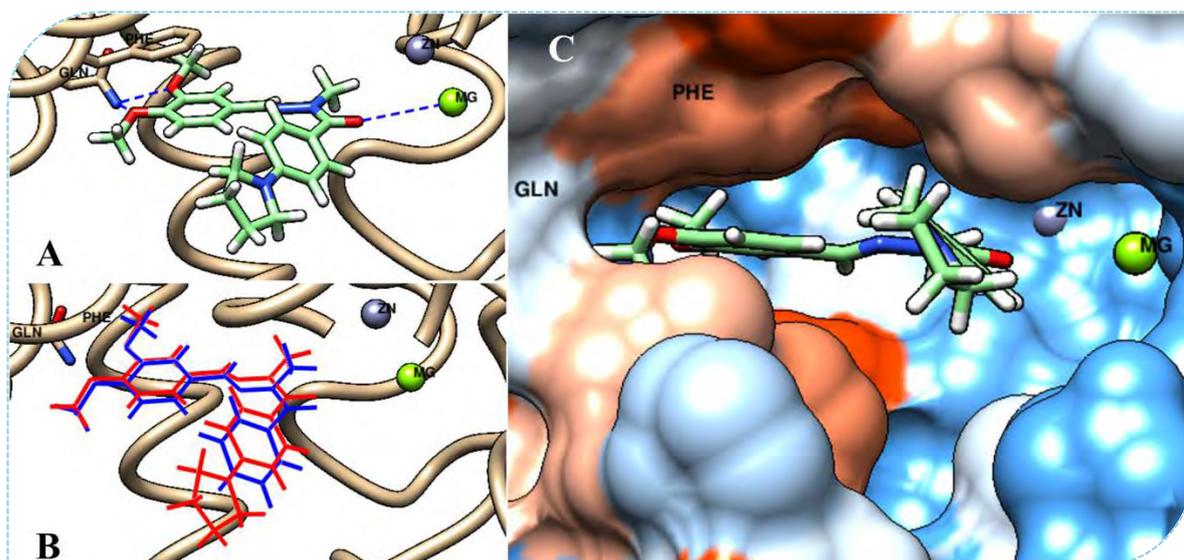


Figura 47. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88b** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88b** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88b** ancorado.

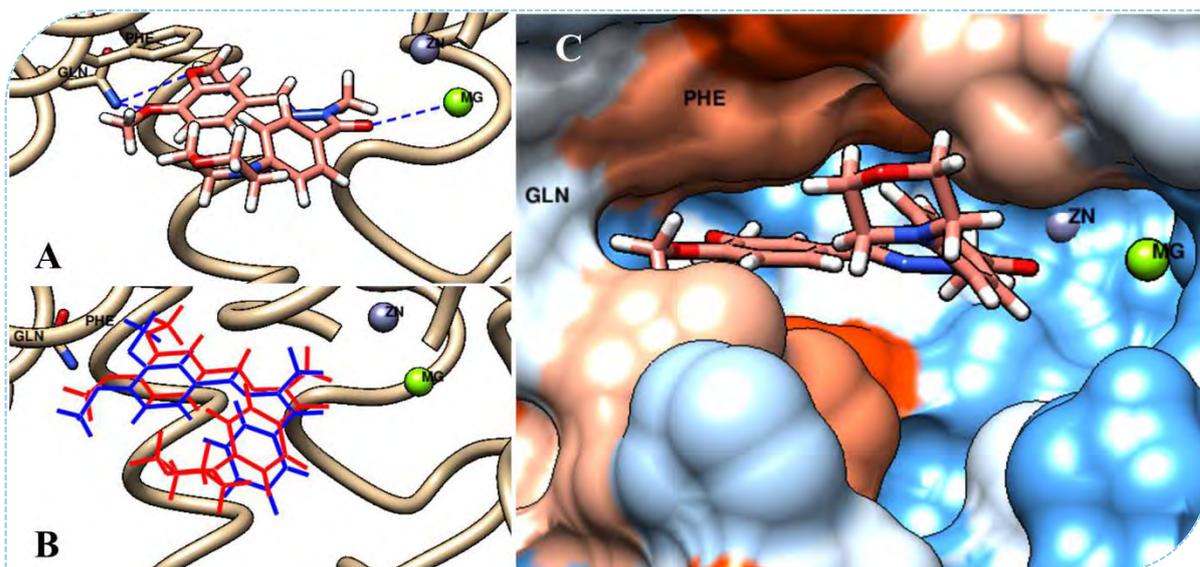


Figura 48. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88c** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88c** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88c** ancorado.

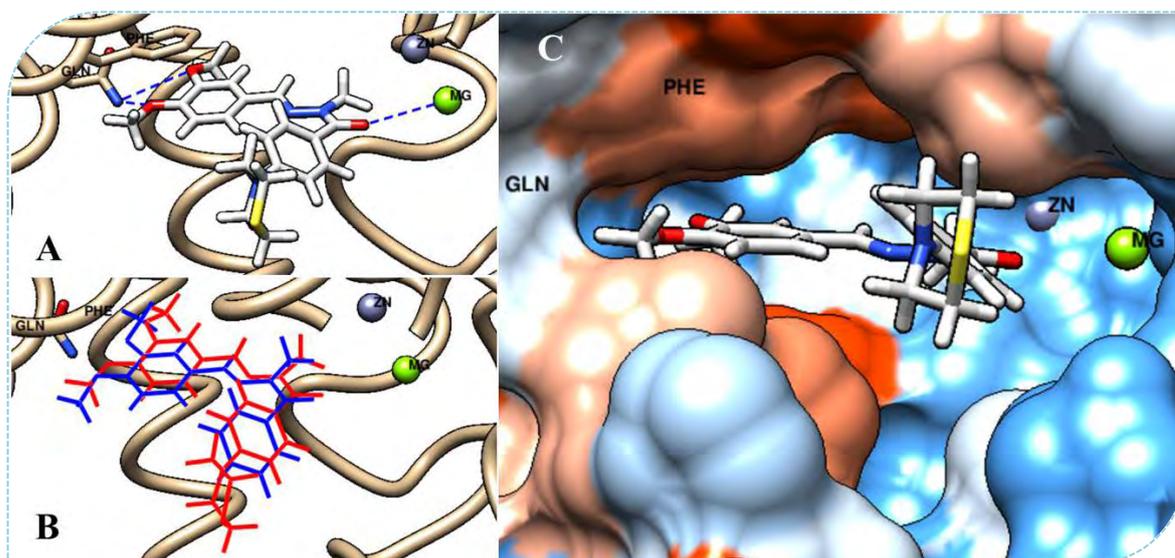


Figura 49. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88d** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88d** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88d** ancorado.

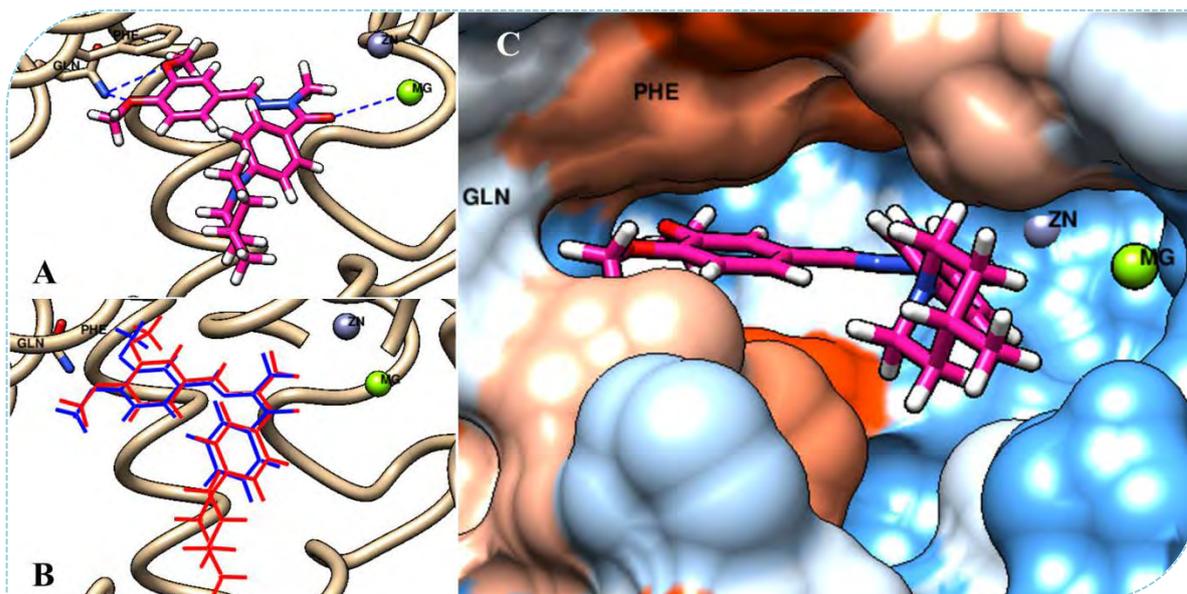


Figura 50. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88e** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88e** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88e** ancorado.

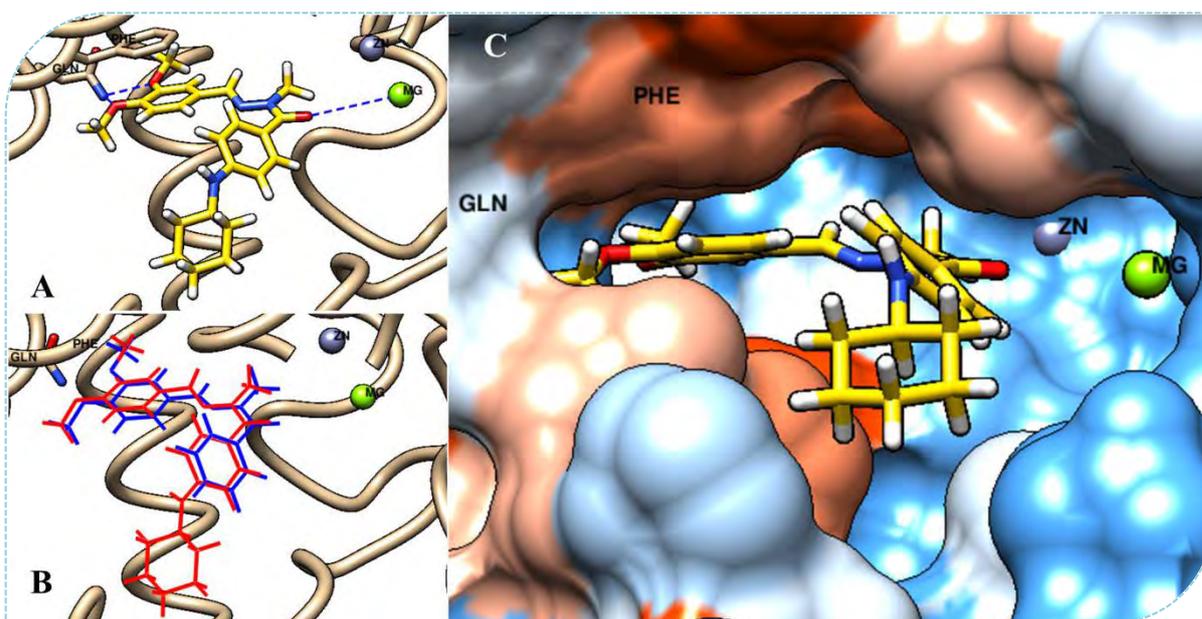


Figura 51. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88f** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88f** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88f** ancorado.

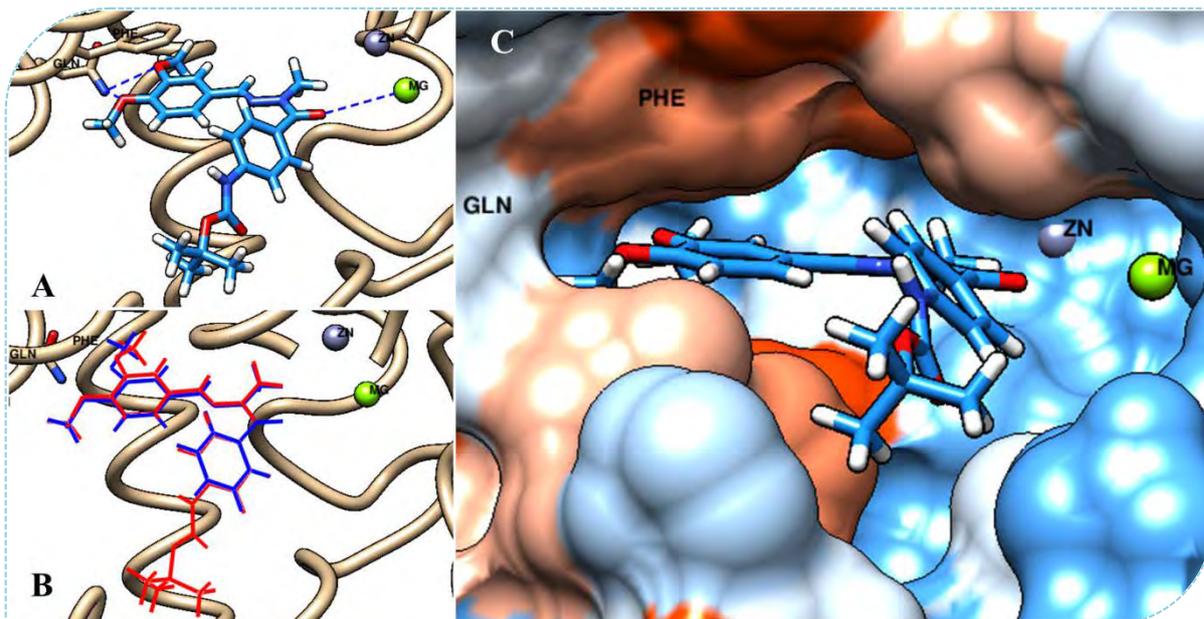


Figura 52. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88g** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88g** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88g** ancorado.

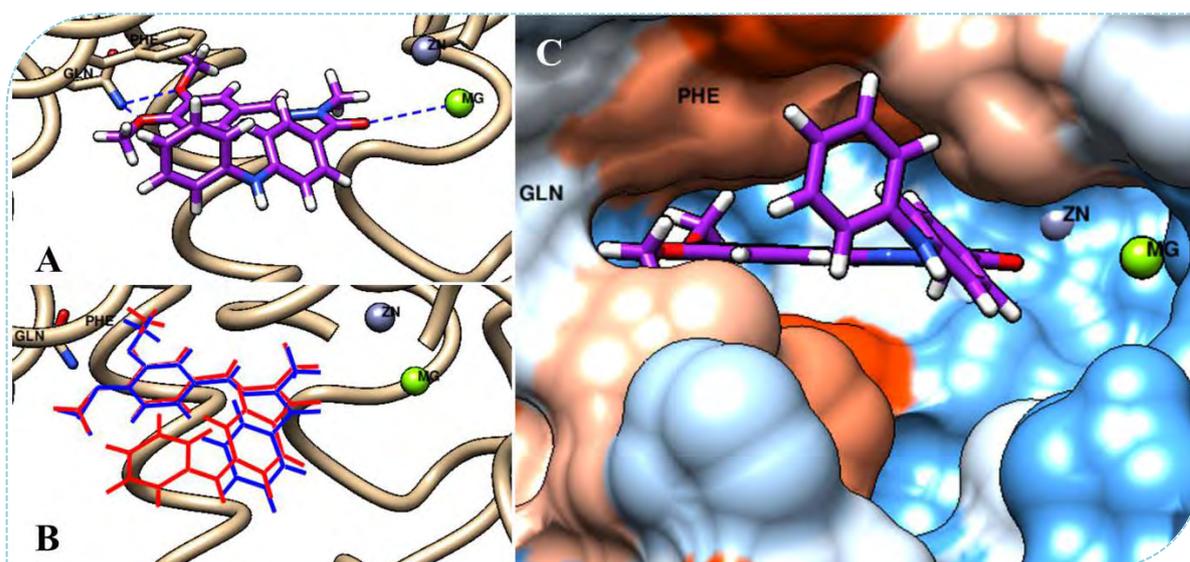


Figura 53. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88h** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88h** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88h** ancorado.

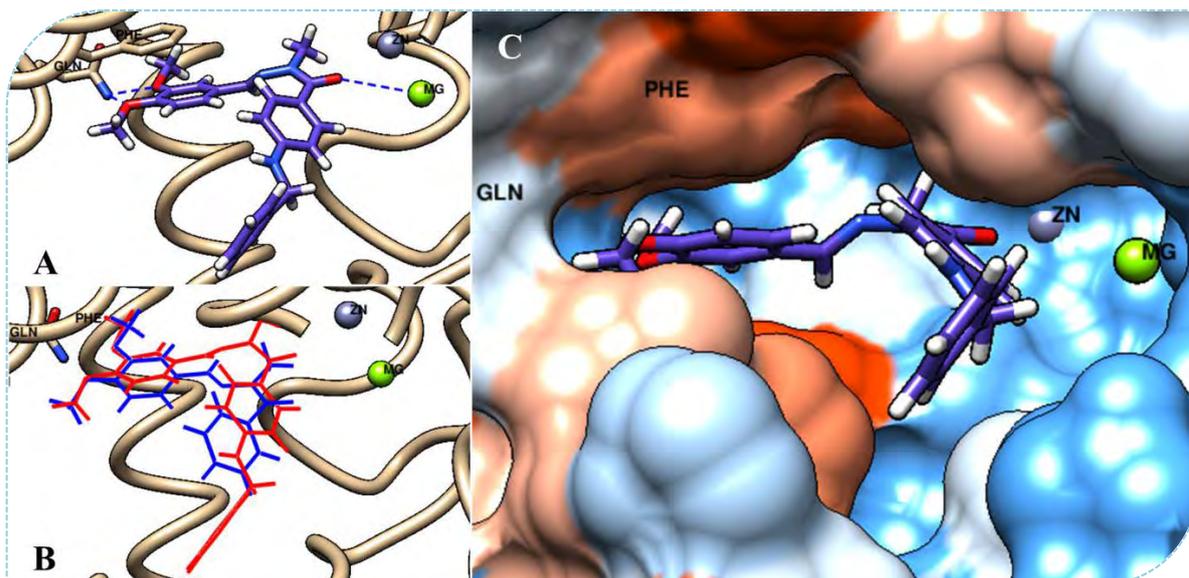


Figura 54. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88i** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88i** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88i** ancorado.

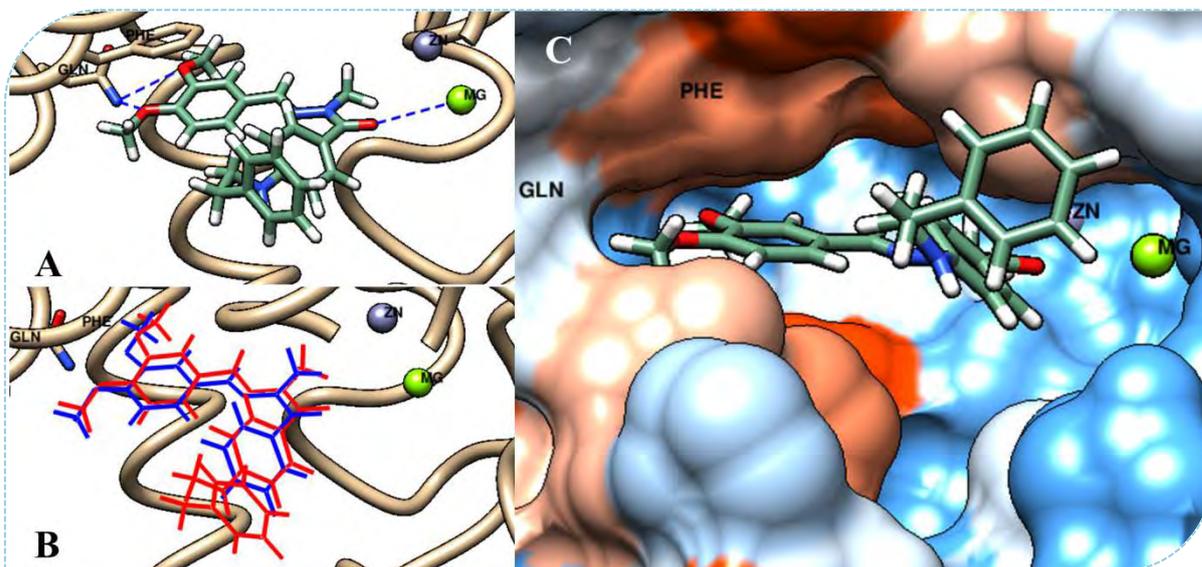


Figura 55. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88j** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88j** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88j** ancorado.

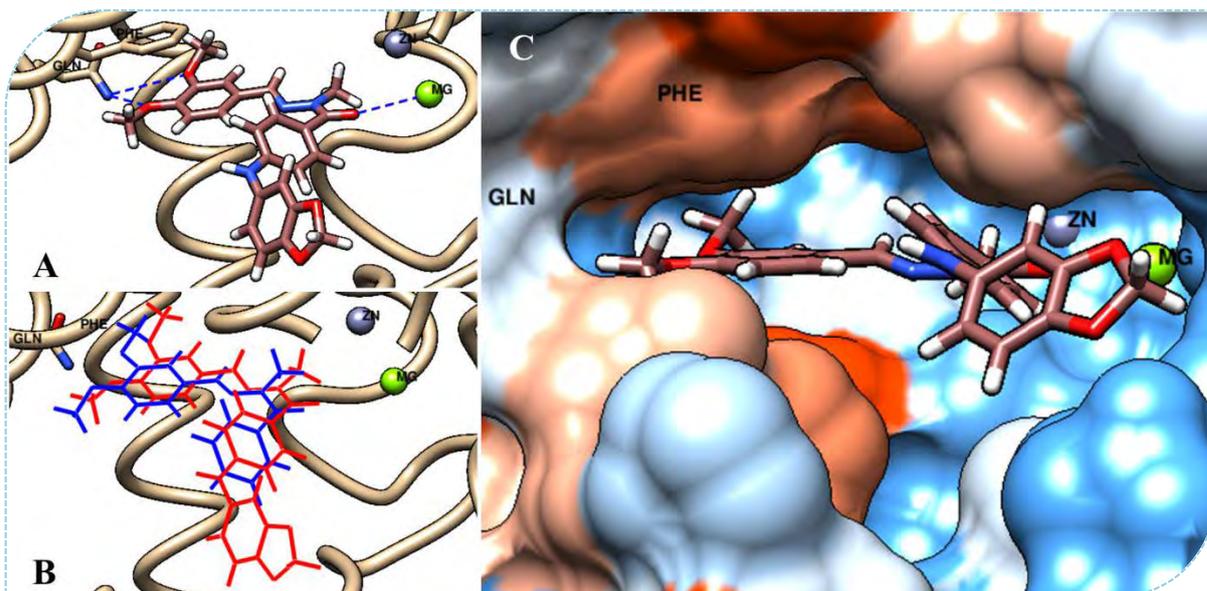


Figura 56. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88k** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88k** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88k** ancorado.

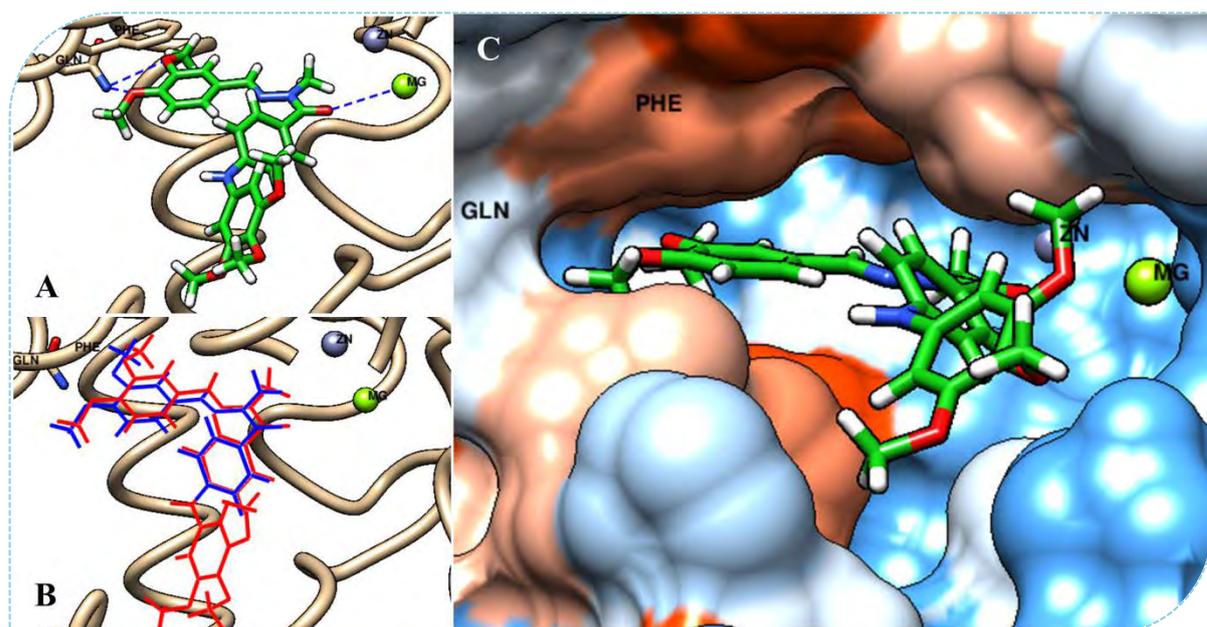


Figura 57. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **881** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **881** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **881** ancorado.

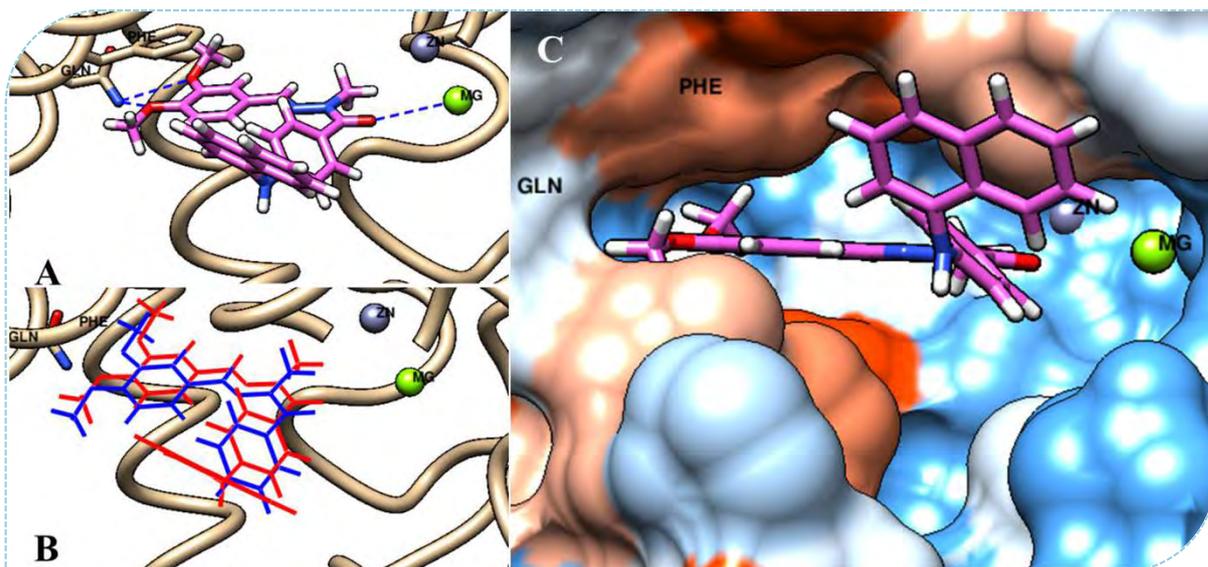


Figura 58. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88m** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88m** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88m** ancorado.

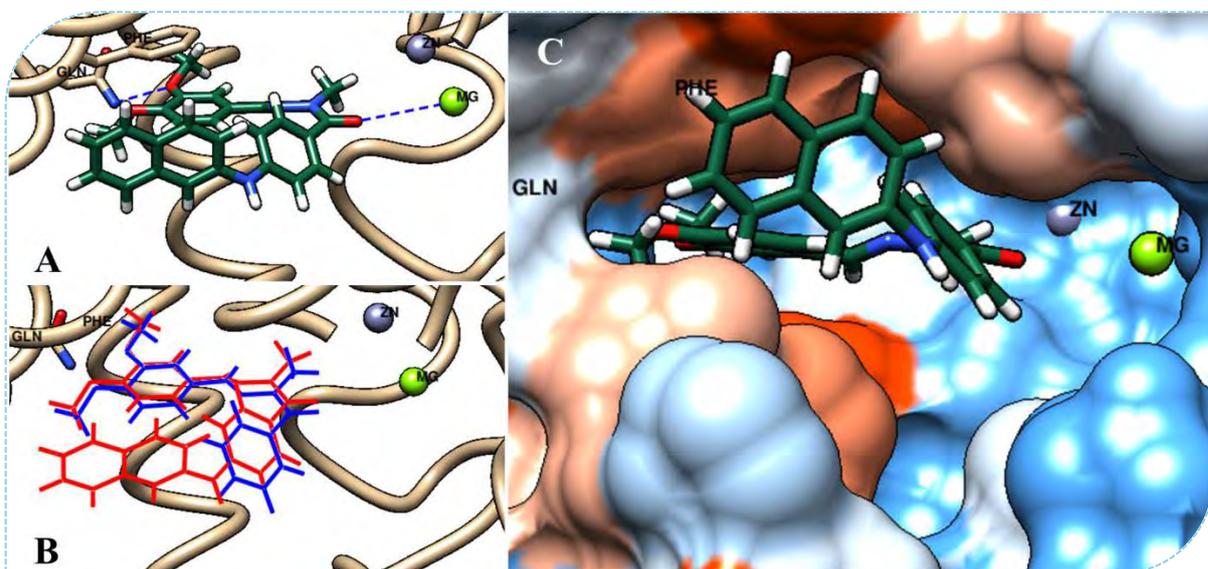


Figura 59. A) Análise das principais interações moleculares entre a *N*-metil-NAH *N*-arilada **88n** e o sítio catalítico da enzima PDE4D. B) Sobreposição do protótipo **27**, em destaque azul, e o composto **88n** atracado à enzima, em destaque vermelho. C) Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4D com o ligante **88n** ancorado.

4.3) Avaliação da atividade biológica dos novos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos das séries A-D sobre a enzima PDE4

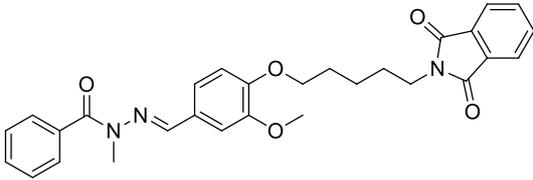
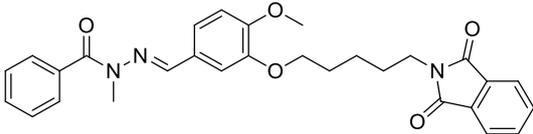
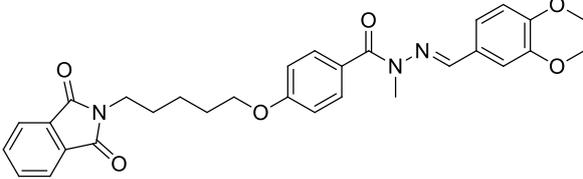
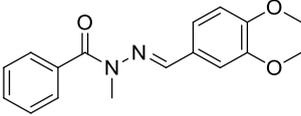
A avaliação da atividade biológica dos novos derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos sintetizados neste trabalho sobre a enzima PDE4 foi realizada pelo CEREP, uma empresa do grupo Eurofins, com sede na França, segundo metodologia própria. Selecionou-se a isoforma PDE4B1 como modelo de inibição e a atividade enzimática foi determinada, de forma indireta, através da quantificação do seu substrato natural presente no meio, *i. e.* o AMPc (**1**).

Uma vez que os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos finais das séries A, B e C (**90a-d**, **91a-d** e **92a-d**, respectivamente), planejados como agonistas dos receptores β_2 adrenérgicos e inibidores da enzima PDE4, não foram obtidos sinteticamente, tornou-se importante demonstrar o potencial desta classe para futuros estudos de derivatização e obtenção de compostos híbridos. Portanto, foi investigado o perfil de inibição da PDE4 pelas *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas sintetizadas (**65a-d**, da série A; **66a-d**, da série B; e **72a-d**, da série C). Cabe ressaltar que, estas foram escolhidas a fim de determinar a influência da adição de grupos volumosos no arcabouço da estrutura da classe protótipo inspiradora deste trabalho, dialcoxi-fenil-*N*-metil-*N*-acilidrazona (**27**), já descrita na literatura como potente inibidora da enzima em questão (KÜMMERLE *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos de atividade inibitória da PDE4 estão descritos nas tabelas 23 e 24, onde os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos foram avaliados a uma concentração final de 10 μ M. Dentre os compostos das séries A, B e C foram escolhidos os produtos **65c** (série A), **66c** (série B) e **72c** (série C), todos com cadeia alquílica com cinco carbonos espaçadores, e avaliados anteriormente através de estudos teóricos de ancoramento molecular com a enzima em questão.

Para a *N*-metil-NAH da série C (**72c**) observou-se uma expressiva inibição da enzima em questão na faixa de 97,4%, próximo ao valor descrito na literatura para o protótipo **27** sobre a isoforma PDE4D de 97,1% (Tabela 23) (KÜMMERLE *et al.*, 2012). Este fato corrobora com o estudo de modelagem molecular do derivado **72c**, que demonstra que a presença de grupos volumosos no anel aromático vizinho à carbonila da *N*-metil-NAH da série C, na região voltada para o exterior da cavidade enzimática, não interfere nas interações essenciais para a atividade desta série.

Tabela 23. Percentual de inibição da enzima PDE4B1 pelas *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas **65c** (série A), **66c** (série B) e **72c** (série C), em comparação com a *N*-metil-NAH protótipo **27**, à 10 μM.

Produtos	Inibição (%)
 <p>65c (série A)</p>	0
 <p>66c (série B)</p>	84,3
 <p>72c (série C)</p>	97,4
 <p>27</p>	97,1 ^a

^a Percentual de inibição frente à PDE4D à 10 μM (KÜMMERLE *et al.*, 2012)

Análise semelhante foi estendida ao derivado da série A (**65c**), onde se esperava observar atividade inibitória da PDE4 similar à do protótipo (**27**). Entretanto, não foi observada atividade inibitória para o composto **65c** (Tabela 23), divergindo dos resultados teóricos de modelagem molecular obtidos. Este fenômeno poderia ser justificado através da visualização da cavidade catalítica (em destaque amarelo) de diferentes cristais da enzima PDE4 (5LAQ, 1RO6, 5OHJ e 1XOR), onde pode-se observar que há uma grande variação conformacional da região onde, em teoria, deveria ser acomodada a cadeia alcóxica de **65c**. Estas significantes modificações no volume de abertura da cavidade do sítio enzimático (em destaque vermelho, Figura 60) é induzida pelo encaixe dos inibidores no interior da mesma (PDB, 2018). Provavelmente, a isoforma utilizada nos experimentos de atividade biológica, *i. e.* a PDE4B1, não foi capaz de comportar o volume adicional do composto **65c** (série A), devido à uma provável restrição na área de acesso da cavidade catalítica em questão, o que

provavelmente levou à interferência nas interações essenciais entre o núcleo *N*-metil-*N*-acilidrazônico e a enzima alvo.

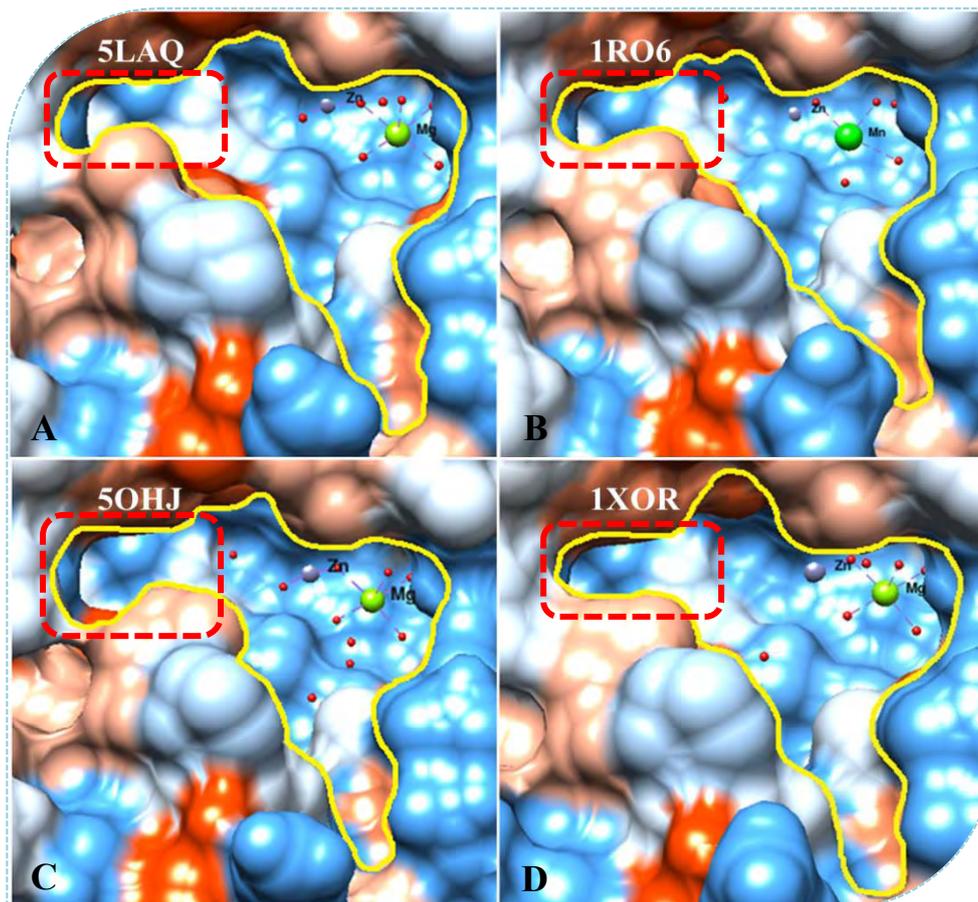


Figura 60. Análise da cavidade de acesso ao sítio catalítico de diferentes isoformas da PDE4, em destaque amarelo, e região de acesso ao volume adicional da série A, em destaque vermelho. A) Cristal de código 5LAQ; B) Cristal de código 1RO6; C) Cristal de código 5OHJ; D) Cristal de código 1XOR (PDB, 2018).

Por outro lado, como descrito anteriormente, para o derivado da série B (**66c**) não se esperava observar atividade biológica, devido ao volume adicional da série que impediria, através de efeitos estéricos, a interação do composto com o sítio catalítico da enzima, da mesma maneira que o protótipo inspirador **27**. Contudo, verificou-se que o composto **66c** foi capaz de inibir a PDE4 de maneira significativa na faixa de 84,3% (Tabela 23). Este fato nos leva a presumir que a *N*-metil-NAH **66c** deve interagir com a enzima em questão de maneira distinta das demais *N*-metil-NAHs já descritas na literatura, assim como das descritas neste trabalho. Cabe ressaltar que o modelo adotado para a realização dos estudos teóricos de modelagem molecular não foi capaz de prever o modo de interação do derivado da série B com a PDE4, de maneira que isso só seria possível através da obtenção de um cristal da enzima com o composto em questão.

Para a realização do ensaio de atividade inibitória da enzima PDE4 com os derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos *N*-arilados da série D (**88a-n**) foram selecionadas algumas moléculas representativas da classe, uma vez que não foi possível realizar experimento para todas. De maneira a avaliar a influência do anel saturado na atividade das *N*-metil-*N*-acilidrazonas, foram escolhidos os compostos *N*-arilados com o anel piperidínico (**88a**) e com seu respectivo homólogo superior, o anel ciclohexilamina (**88f**). Para avaliar a influência de anéis aromáticos, foram selecionados os compostos *N*-arilados com o grupo benzilamina (**88i**), com os seus respectivos homólogos superior, o grupo fenetilamina (**88j**), e inferior substituído, o grupo trimetoxi-anilina (**88j**). Foram escolhidos também os derivados *N*-arilados com uma função amida (**88g**) e com um anel aromático de maior volume, a naftilamina (**88n**).

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 24, onde pode-se observar uma expressiva inibição da enzima em questão na faixa de 100,0-80,3%, próximo ao valor descrito na literatura para o protótipo **27** sobre a isoforma PDE4D de 97,1% (Tabela 24) (KÜMMERLE *et al.*, 2012), onde o composto com a maior inibição foi a amida substituída (**88g**), com 100%, e o que apresentou o menor valor inibitório foi a amina aromática trissubstituída (**88i**), com 80,3%. Este fato corrobora com os estudos de modelagem molecular dos derivados *N*-arilados **88a-n**, que demonstra que a presença de grupos volumosos no anel aromático vizinho à carbonila da *N*-metil-NAH da série D, na região voltada para o exterior da cavidade enzimática, não interfere negativamente nas interações essenciais para a atividade desta série, assim como o observado para a série C (**72c**).

Desta forma, podemos considerar que modificações no anel aromático ligado à carbonila são as mais favoráveis do ponto de vista de futuras otimizações dos compostos do ponto de vista farmacodinâmico e farmacocinético.

Tabela 24. Percentual de inibição da enzima PDE4B1 pelas *N*-metil-NAHs *N*-ariladas (série D) à 10 μM.

88a-n

Produtos	R ₁	R ₂	Inibição (%)
88a	-(CH ₂) ₅ -		96,8
88f	Ciclohexil-	H-	98,9
88g	-COOC(CH ₃) ₃	H-	100,0
88i	PhCH ₂ -	H-	98,8
88j	Ph-(CH ₂) ₂ -	H-	98,4
88l	3,4,5-(trimetoxi)fenil	H-	80,3
88n	2-Naftil	H-	98,8

5) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados 27 derivados *N*-metil-*N*-acilidrazônicos inéditos. Entretanto, as *N*-metil-NAHs híbridas finais das séries A, B e C (**90a-d**, **91a-d** e **92a-d**, respectivamente), planejadas como inibidoras da enzima PDE4 e agonistas dos receptores β_2 , não puderam ser obtidas, devido à ineficácia das metodologias sintéticas avaliadas.

As *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas das séries A (**65a-d**) e B (**66a-d**), sintetizadas para a obtenção do bloco das *N*-metil-NAHs, foram obtidas após quatro etapas reacionais em rendimentos que variaram entre bons a excelentes, na faixa de 56-99%. Para a síntese das *N*-metil-NAHs *O*-alquiladas da série C (**72a-d**) foi utilizada uma rota sintética alternativa que contou com quatro etapas reacionais e com rendimentos variando entre bons a excelentes, na faixa de 54-94%. Devido à similaridade estrutural entre as séries em questão, todas foram inequivocamente caracterizadas quanto as suas derivatizações, através da técnica de espectroscopia de RMN bidimensional, onde adicionalmente pôde-se atribuir a diastereoisomeria da imina como sendo *E* para todos os compostos.

O bloco do salmeterol foi sintetizado como planejado inicialmente, através da otimização dos parâmetros reacionais descritos na literatura para a reação de acilação de Friedel Crafts, realizada na primeira etapa entre o salicilaldeído (**76**) e o brometo de bromoacetila (**77**), para a obtenção do salicilaldeído acilado **78** com 51% de rendimento.

A série D (**88a-n**) representou um novo desafio sintético para este trabalho, uma vez que não havia relato na literatura reações de acoplamento cruzado de Buchwald-Hartwig com NAH. As *N*-metil-NAHs *N*-ariladas (**88a-n**) foram obtidas após o desenvolvimento de um novo protocolo reacional utilizando $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ como catalisador, XPhos como ligante, K_3PO_4 como base e dioxano como solvente, à 100°C por 3 horas. Foram sintetizadas e caracterizadas 14 novas *N*-metil-*N*-acilidrazonas inéditas (**88a-n**) com rendimentos variando entre 40-90%.

A maioria das *N*-metil-NAHs *N*-ariladas da série D (**88a-n**) apresentaram propriedades físico-químicas calculadas dentro dos parâmetros determinados pela regra de Lipinski para compostos com bom perfil farmacocinético. Ademais, pôde-se constatar que as *N*-metil-NAHs sintetizadas (**88a-n**) apresentaram em seu escopo moléculas com diferentes perfis de lipofilicidade, planejadas para serem capazes de se distribuírem no organismo de forma distinta e atuarem em tecidos alvos específicos.

A maioria dos derivados selecionados das séries A, B e C (**65c**, **66c** e **72c**) e D (**88a**, **88f**, **88g**, **88i**, **88j**, **88l** e **88n**) apresentaram excelentes porcentagens de inibição da PDE4 à 10µM (80-100%), conforme planejamento estrutural, e indicaram que a melhor região para derivatizações nestes compostos é o anel A.

Dentre os compostos das séries A, B e C, apenas o composto **72c**, da série A, se comportou como previsto por modelagem molecular com inibição de 97,4% da enzima PDE4. Entretanto houve uma inversão com relação ao previsto para as séries A e B, onde o composto **65c** (série A) não foi ativo e **66c** (série B) apresentou inibição de 84,3%. Essa diferença poderia ser explicada por diferentes conformações adotadas pela enzima quando da interação com os compostos ou formas de interação diferentes das obtidas teoricamente. Já para os compostos da série D, conforme o previsto teoricamente, todos foram capazes de inibir a PDE4 na faixa de 80,3-100,0% à 10µM, próximos ao valor descrito na literatura para o protótipo **27** (97,1%).

Por fim, temos como perspectivas futuras a obtenção dos derivados híbridos desejados através da avaliação de novas metodologias sintéticas, a obtenção da potência de inibição dos compostos frente à PDE4 e avaliações *in vivo* em modelos de inflamação pulmonar para os compostos híbridos das séries A, C e D, assim como de doenças neurodegenerativas para os compostos mais lipofílicos da série D.

6) BIBLIOGRAFIA

BANNER, K. H.; PAGE, C. P. Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma. *The European Respiratory Journal* **1995**, *8*, 996.

BARCO, A.; BENETTI, S.; POLLINI, G. P. A Facile Alkylation of Ethyl 2-Oxocyclopentanecarboxylate. *Synthesis-Stuttgart* **1973**, *5*, 316.

BARNES, P. J. The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease. *The American Journal of Medicine* **2004**, *20*, 24.

BARNES, P. J. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease: new horizons. *Proceedings of the American Thoracic Society* **2005**, *2*, 334.

BARNES, P. J. Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *120*, 76.

BARNES, P. J. Development of new drugs for DPOC. *Current Medicinal Chemistry* **2013**, *20*, 1531.

BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a Descoberta de novo agente cardioativo. *Química Nova* **2002**, *25*, 1172.

BARREIRO, E. J.; K MMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M. The methylation effect in medicinal chemistry. *Chemical Reviews* **2011**, *111*, 5215.

BEAVO, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional implications of multiple isoforms. *Physiological Reviews* **1995**, *75*, 725.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 488.

BENSTEAD, D. J.; HULME, A. N.; MCNAB, H.; WIGHT, P. An efficient synthesis of substituted hydrazides. *Synlett* **2005**, *10*, 1571

BETHKE, T. D.; BOHMER, G. M.; HERMANN, R.; HAUNS, B.; FUX, R.; MORIKE, K. Doseproportional intraindividual single- and repeated-dose pharmacokinetics of roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor. *The Journal of Clinical Pharmacology* **2007**, *47*, 26.

BLAAZER, A. R.; SINGH, A. K.; DE HEUVEL, E.; EDINK, E.; ORRLING, K. M.; VEERMAN, J. J. N.; VAN DEN BERGH, T.; JANSEN, C.; BALASUBRAMANIAM, E.; MOOIJ, W. J.; CUSTERS, H.; SIJM, M.; TAGOE, D. N. A.; KALEJAIYE, T. D.; MUNDAY, J. C.; TENOR, H.; MATHEEUSSEN, A.; WIJTMANS, M.; SIDERIUS, M.; DE GRAAF, C.; MAES, L.; DE KONING, H. P.; BAILEY, D. S.; STERK, G. J.; DE ESCH, I. J.

P.; BROWN, D. G.; LEURS, R. Targeting a Subpocket in *Trypanosoma brucei* Phosphodiesterase B1 (TbrPDEB1) Enables the Structure-Based Discovery of Selective Inhibitors with Trypanocidal Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 3870.

BOLGER, G. B. Molecular biology of the cyclic AMP-specific cyclicnucleotide phosphodiesterases: a diverse family of regulatory enzymes. *Cell Signal* **1994**, *6*, 851.

BOLGER, G. B. Em *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*; Beavo, J. A.; Francis, S. H.; Houslay, M. D. CRC Press: Boca Raton 2006, cap. 2.

BRULLO, C.; RICCIARELLI, R.; PRICKAERTS, J.; ARANCIO, O.; MASSA, M.; ROTOLO, C.; ROMUSSI, A.; REBOSIO, C.; MARENGO, B.; PRONZATO, M. A.; VAN HAGEN, B. T. J.; VAN GOETHEM, N. P.; D'URSI, P.; ORRO, A.; MILANESI, L.; GUARIENTO, S.; CICHERO, E.; FOSSA, P.; FEDELE, E.; BRUNO, O. New insights into selective PDE4D inhibitors: 3-(Cyclopentyloxy)-4-methoxybenzaldehyde O-(2-(2,6-dimethylmorpholino)-2-oxoethyl)oxime (GEBR-7b) structural development and promising activities to restore memory impairment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 82.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, E.; A.; KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman. 12^a Edição. Nova Iorque: Editora McGraw Hill, **2012**, 2112p.

BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenosine 3',5'-phosphate in biologicals materials. *The Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237*, 1244.

CALVERLEY, P. M.; SANCHEZ-TORIL, F.; MCIVOR, A.; TEICHMANN, P.; BREDENBROEKER, D.; FABBRI, L. M. Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2007**, *176*, 154.

CARD, G. L.; ENGLAND, B. P.; SUZUKI, Y.; FONG, D.; POWELL, B.; LEE, B.; LUU, C.; TABRIZAD, M.; GILLETTE, S.; IBRAHIM, P. N.; ARTIS, D. R.; BOLLAG, G.; MILBURN, M. V.; KIM, S. H.; SCHLESSINGER, J.; ZHANG, K. Y. Structural Basis for the Activity of Drugs that Inhibit Phosphodiesterases. *Structure* **2004**, *12*, 2233.

CAZZOLA, M.; MOLIMARD, M. The scientific rationale for combining long-acting beta2-agonists and muscarinic antagonists in DPOC. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *23*, 257.

CELLI, B.; VESTBO, J.; JENKINS, C. R.; JONES, P. W.; FERGUSON, G. T.; CALVERLEY, P. M.; YATES, J. C.; ANDERSON, J. A.; WILLITS, L. R.; WISE, R. A. Sex differences in mortality and clinical expressions of patients with chronic obstructive pulmonary disease. The TORCH experience. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **2011**, *183*, 317.

CEREP. Eurofins CEREP SA. Disponível em: <<https://www.eurofinsdiscoveryservices.com/catalogmanagement/viewitem/PDE4B1-Human-Phosphodiesterase-Enzymatic-Assay-Cerep/4076#additionalInfo>>. Acesso em: 02 agosto 2018.

CESARI, N.; BIANCALANI, C.; VERGELLI, C.; PIAZ, V.; GRAZIANO, V.; BIAGINI, P.; GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; GIOVANNONI, M. P. Arylpiperazinylalkylpyridazinones and analogues as potent and orally active antinociceptive agents: synthesis and studies on mechanism of action. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 7826.

CLAVEAU, D.; CHEN, S. L.; O'KEEFE, S.; ZALLER, D. M.; STYHLER, A.; LIU, S.; HUANG, Z.; NICHOLSON, D. W.; MANCINI, J. A. Preferential inhibition of T helper 1, but not T helper 2, cytokines in vitro by L-826,141 [4-[2-(3,4-Bisdifluoromethoxyphenyl)-2-[4-(1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-hydroxy-propan-2-yl) phenyl]-ethyl]3-methylpyridine-1-oxide], a potent and selective phosphodiesterase 4 inhibitor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, *310*, 752.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. Organic Chemistry. 2ª Edição. Oxford: Oxford University Press, **2012**. 1264p.

CLINICALTRIALS.GOV. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/home>>. Acesso em: 09 julho 2018.

COELHO, L. P.; SERRA, M. F.; PIRES, A. L. A.; CORDEIRO, R. S. B.; SILVA, P. M. R.; SANTOS, M. H.; MARTINS, M. A. 7-Epiclusianone, a Tetraprenylated Benzophenone, Relaxes Airway Smooth Muscle through Activation of the Nitric Oxide-cGMP Pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2008**, *327*, 206.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2007**, *76*, 481.

COSTA, P.; PINHEIRO, S.; PILLI, R.; VASCONCELLOS, M. Substâncias carboniladas e derivados. 1ª Edição. Porto Alegre: Artmed, **2003**. 412p.

DAL-PIAZ, V.; GIOVANNONI, M. P. Phosphodiesterase 4 inhibitors, structurally unrelated to rolipram, as promising agents for the treatment of asthma and other pathologies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 463.

DENT, G.; GIEMBYCZ, M. A.; EVANS, P. M.; RABE, K. F.; BARNES, P. J. Suppression of human eosinophil respiratory burst and cyclic AMP hydrolysis by inhibitors of type IV phosphodiesterase: interaction with the beta adrenoceptor agonist albuterol. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, *271*, 1167.

DIAMANT, Z.; SPINA, D. PDE4-inhibitors: A novel, targeted therapy for obstructive airways disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2011**, *24*, 353.

DONG, C.; VIRTUCIO, C.; ZEMSKA, O.; BALTAZAR, G.; ZHOU, Y.; BAIA, D.; JONES-IATAURO, S.; SEXTON, H.; MARTIN, S.; DEE, J.; MAK, Y.; MEEWAN, M.; ROCK, F.; AKAMA, T.; JARNAGIN, K. Treatment of Skin Inflammation with Benzoxaborole Phosphodiesterase Inhibitors: Selectivity, Cellular Activity, and Effect on Cytokines Associated with Skin Inflammation and Skin Architecture Changes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2016**, 358, 413.

DOURADO, V. Z.; TANNI S. E.; VALE, S. A.; FAGANELLO, M. M.; SANCHEZ, F. F.; GODOY, I. J. Manifestações sistêmicas na doença pulmonar obstrutiva crônica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* **2006**, 32, 161.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, 3714.

FALA, L. Otezla (Apremilast), an Oral PDE-4 Inhibitor, Receives FDA Approval for the Treatment of Patients with Active Psoriatic Arthritis and Plaque Psoriasis. *American Health & Drug Benefits* **2015**, 8, 105.

FELDING, J.; SØRENSEN, M. D.; POULSEN, T. D.; LARSEN, J.; ANDERSSON, C.; REFER, P.; ENGELL, K.; LADEFOGED, L. G.; THORMANN, T.; VINGGAARD, A. M.; HEGARDT, P.; SØHOEL, A.; NIELSEN, S. F. Discovery and early clinical development of 2-{6-[2-(3,5-dichloro-4-pyridyl)acetyl]-2,3-dimethoxyphenoxy}-N-propylacetamide (LEO 29102), a soft-drug inhibitor of phosphodiesterase 4 for topical treatment of atopic dermatitis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 5893.

FOX 3RD, D.; BURGIN, A. B.; GURNEY, M. E. Structural basis for the design of selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *Cellular Signalling* **2014**, 26, 657.

FREUND, Y. R.; AKAMA, T.; ALLEY, M. R.; ANTUNES, J.; DONG, C.; JARNAGIN, K.; KIMURA, R.; NIEMAN, J. A.; MAPLES, K. R.; PLATTNER, J. J.; ROCK, F.; SHARMA, R.; SINGH, R.; SANDERS, V.; ZHOU, Y. Boron-based phosphodiesterase inhibitors show novel binding of boron to PDE4 bimetal center. *FEBS Letters* **2012**, 586, 3410.

FURUE, M.; KADONO, T.; TSUJI, G.; NAKAHARA, T. Topical E6005/RVT-501, a novel phosphodiesterase 4 inhibitor, for the treatment of atopic dermatitis. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2017**, 26, 1403.

GIEMBYCZ, M. A. Cilomilast: a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2001**, 10, 1361.

GIEMBYCZ, M. A. 4D or not 4D: the emetogenic basis of PDE4 inhibitors uncovered? *Trends in Pharmacological Sciences* **2002**, 23, 548.

GIEMBYCZ, M. A.; CORRIGAN, C. J.; SEYBOLD, J.; NEWTON, R.; BARNES, P. J. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-

lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *British Journal of Pharmacology* **1996**, *118*, 1945.

GIEMBYCZ, M. A.; FIELD, S. K. Roflumilast: The first in class phosphodiesterase 4 inhibitor approved for the treatment of DPOC. *Journal of Drug Design, Development and Therapy* **2010**, *4*, 147.

GIEMBYCZ, M. A.; NEWTON, R. Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways. *European Respiratory Journal* **2006**, *27*, 1286.

GOODMAN, A. D.; GYANG, T.; SMITH III, A. D.; Ibudilast for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2016**, *25*, 1231.

GOTO, T.; SHIINA, A.; MURATA, T.; TOMII, M.; YAMAZAKI, T.; YOSHIDA, K.; YOSHINO, T.; SUZUKI, O.; SOGAWA, Y.; MIZUKAMI, K.; TAKAGI, N.; YOSHITOMI, T.; ETORI, M.; TSUCHIDA, H.; MIKKAICHI, T.; NAKAO, N.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, H.; SASAKI, S. Identification of the 5,5-dioxo-7,8-dihydro-6H-thiopyrano[3,2-d] pyrimidine derivatives as highly selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 893.

GUAY, D.; BOULET, L.; FRIESEN, R. W.; GIRARD, M.; HAMEL, P.; HUANG, Z.; LALIBERTÉ, F.; LALIBERTÉ, S.; MANCINI, J. A.; MUISE, E.; PON D.; STYHLER, A. Optimization and structure–activity relationship of a series of 1-phenyl-1,8-naphthyridin-4-one-3-carboxamides: Identification of MK-0873, a potent and effective PDE4 inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 5554.

GURAM, A. S.; BUCHWALD, S. L. Palladium-Catalyzed Aromatic Aminations with in situ Generated Aminostannanes. *Journal of American Chemical Society* **1994**, *116*, 7901.

HALPIN, D. M. G. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in DPOC. *International Journal of DPOC* **2008**, *3*, 543.

HATZELMANN, A.; SCHUDT, C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *297*, 267.

HATZELMANN, A.; MORCILLO, E. J.; LUNGARELLA, G.; ADNOT, S.; SANJAR, S.; BEUME, R.; SCHUDT, C.; TENOR, H. The preclinical pharmacology of roflumilast e A selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *23*, 235.

HERAVI, M. M.; KHEILKORDI, Z.; ZADSIRJAN, V.; HEYDARI, M.; MALMIR, M. Buchwald-Hartwig reaction: An overview. *Journal of Organometallic Chemistry* **2018**, *861*, 17.

HOUSLAY, M. D. PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **2001**, *69*, 249.

HOUSLAY, M. D.; ADAMS, D. R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *The Biochemical Journal* **2003**, *370*, 1.

HOUSLAY, M. D.; ADAMS, D. R. Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nature Biotechnology* **2010**, *28*, 38.

HOUSLAY, M. D.; SCHAFFER, P.; ZHANG, K. Y. J. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1503.

HOY, S. M. Crisaborole Ointment 2%: A Review in Mild to Moderate Atopic Dermatitis. *American Journal of Clinical Dermatology* **2017**, *18*, 837.

HUAI, Q.; WANG, H.; SUN, Y.; KIM, H. Y.; LIU, Y.; KE, H. Three-dimensional structures of PDE4D in complex with roliprams and implication on inhibitor selectivity. *Structure* **2003**, *11*, 865.

HUANG, Z.; LIU, S.; ZHANG, L.; SALEM, M.; GREIG, G. M.; CHAN, C. C.; NATSUMEDA, Y.; NOGUCHI, K. Preferential inhibition of human phosphodiesterase 4 by ibudilast. *Life Sciences* **2006**, *78*, 2663.

HUGHES, A. D.; CHIN, K. H.; DUNHAM, S. L.; JASPER, J. R.; KING, K. E.; LEE, T. W.; MAMMEN, M.; MARTIN, J.; STEINFELD, T. Discovery of muscarinic acetylcholine receptor antagonist and beta 2 adrenoceptor agonist (MABA) dual pharmacology molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 1354.

ISHII, N.; SHIRATO, M.; WAKITA, H.; MIYAZAKI, K.; TAKASE, Y.; ASANO, O.; KUSANO, K.; YAMAMOTO, E.; INOUE, C.; HISHINUMA, I. Antipruritic Effect of the Topical Phosphodiesterase 4 Inhibitor E6005 Ameliorates Skin Lesions in a Mouse Atopic Dermatitis Models. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2013**, *346*, 105.

JAMES, L.I.; KORBOUKH, V. K.; KRICHEVSKY, L.; BAUGHMAN, B. M.; HEROLD, J. M.; NORRIS, J. L.; JIN, J.; KIREEV, D. B.; JANZEN, W. P.; ARROWSMITH, C. H.; FRYE, S. V. Small-Molecule Ligands of Methyl-Lysine Binding Proteins: Optimization of Selectivity for L3MBTL3. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 7358.

KAWASAKI, M.; FUSANO, A.; NIGO, T.; NAKAMURA, S.; ITO, M. N.; TERANISHI, Y.; MATSUMOTO, S.; TODA, H.; NOMURA, N.; SUMIYOSHI, T. Identification of 2,3-disubstituted pyridines as potent, non-emetic PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 2689.

KE, H. Implications of PDE4 structure on inhibitor selectivity across PDE families. *International Journal of Impotence Research* **2004**, *16*, S24.

KERAVIS, T.; LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *British Journal of Pharmacology* **2012**, *165*, 1288.

KOJIMA, A.; TAKITA, S.; SUMIYA, T.; OCHIAI, K.; IWASE, K.; KISHI, T.; OHINATA, A.; YAGETA, Y.; YASUE, T.; KOHNO, Y. Phosphodiesterase inhibitors. Part 6: Design, synthesis, and structure–activity relationships of PDE4-inhibitory pyrazolo[1,5-a]pyridines with anti-inflammatory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 5311.

KOMAS, N., LUGNIER, C., LE BEC, A., SERRADEIL-LE GAL, C., BARTHELEMY, G., STOCLET, J. C. Differential sensitivity to cardiotoxic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1989**, *14*, 213.

KUANG, R.; SHUE, H.; XIAO, L.; BLYTHIN, D. J.; SHIH, N.; CHEN, X.; GU, D.; LIN, J. S. L.; TING, P. C.; CAO, J.; ASLANIAN, R.; PIWINSKI, J. J.; PRELUSKY, D.; WU, P.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; CELLY, C. S.; BILLAH, M.; WANG, P. Discovery of oxazole-based PDE4 inhibitors with picomolar potency. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *22*, 2594.

KUMAR, K. S.; KUMAR, S. K.; SREENIVAS, B. Y.; GORJA, D. R.; KAPAVARAPU, R.; RAMBABU, D.; KRISHNA, G. R.; REDDY, C. M.; RAO, M. V. B.; PARSA, K. V. L.; PAL, M. C–C bond formation at C-2 of a quinoline ring: Synthesis of 2-(1H-indol-3-yl)quinoline-3-carbonitrile derivatives as a new class of PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 2199.

K MMERLE, A. E.; RAIMUNDO, J. M.; LEAL, C. M.; DA SILVA, G. S.; BALLIANO, T. L.; PEREIRA, M. A.; DE SIMONE, C. A.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. Studies towards the identification of putative bioactive conformation of potent vasodilator arylidene N -acylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 4004.

K MMERLE, A. E.; SCHMITT, M.; CARDOZO, S. V. S.; LUGNIER, C.; VILLA, P.; LOPES, A. B.; ROMEIRO, N. C.; JUSTINIANO, H.; MARTINS, M. A.; FRAGA, C. A. M.; BOURGUIGNON, J.; BARREIRO, E. J. Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 7525.

LENHARD, J. M.; KASSEL, D. B.; ROCQUE, W. J.; HAMACHER, L.; HOLMES, W. D.; PATEL, I.; HOFFMAN, C.; LUTHER, M. Phosphorylation of a cAMP-specific phosphodiesterase (HSPDE4B2B) by mitogen-activated protein kinase. *The Biochemical Journal* **1996**, *316*, 751.

LIM, H.; SUN, D. Recent Synthetic Developments and Applications of the Ullmann Reaction. A Review. *Organic Preparations and Procedures International* **2013**, *45*, 341.

LIM, S.; JATAKANON, A.; GORDON, D.; MACDONALD, C.; CHUNG, K. F.; BARNES, P. J. Comparison of high dose inhaled steroids, low dose inhaled steroids plus low dose theophylline, and low dose inhaled steroids alone in chronic asthma in general practice. *Thorax* **2000**, *55*, 837.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism, an useful strategy for molecular modification and drug design. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 23.

LIMA, P. C.; LIMA, L. M.; SILVA, K. C. M.; LÉDA, P. H. O.; MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and analgesic activity of novel N-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *35*, 187.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery. Today: Technologies* **2004**, *1*, 337.

LIU, A.; HUANG, L.; WANG, Z.; LUO, Z.; MAO, F.; SHAN, W.; XIE, J.; LAI, K.; LI, X. Hybrids consisting of the pharmacophores of salmeterol and roflumilast or phthalazinone: Dual b2-adrenoceptor agonists-PDE4 inhibitors for the treatment of COPD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 1548

LIU, J.; ZHOU, D.; JIA, X.; HUANG, L.; LI, X.; CHAN, A. S. C. A convenient synthesis of (R)-salmeterol via Rh-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1824.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *109*, 366.

LUGNIER, C.; STIERLE, A.; BERETZ, A.; SCHOEFFTER, P.; LE BEC, A.; WERMUTH, C. G.; CAZENAVE, J. P.; STOCLET, J. C. Tissue and substrate specificity of inhibition by alkoxy-aryl-lactams of platelet and arterial smooth muscle cyclic nucleotide phosphodiesterases relationship to pharmacological activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1983**, *113*, 954.

MAREDDY, J.; SURESH, N.; KUMAR, C. G.; KAPAVARAPU, R.; JAYASREE, A.; PAL, S. 1,2,3-Triazole-nimesulide hybrid: Their design, synthesis and evaluation as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 518.

MASSIMI, M.; CARDARELLI, S.; GALLI, F.; GIARDI, M. F.; RAGUSA, F.; PENERA, N.; CINQUE, B.; CIFONE, M. G.; BIAGIONE, S.; GIORGI, M. Increase of Intracellular Cyclic AMP by PDE4 Inhibitors Affects HepG2 Cell Cycle Progression and Survival. *Journal of Cellular Biochemistry* **2017**, *118*, 1401.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine* **2006**, *3*, 2011.

MAURICE, D. H.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y.; CHUNG, J.; MANGANIELLO, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide fosfodiesterases. *Nature Reviews* **2014**, *13*, 290.

MCMURRY, J. Química Orgânica. Tradução Noveritis do Brasil. 3ª Edição. São Paulo: Cengage Learning, **2016**. 1472p.

MERZ, K. H.; MARKO, D.; REGIERT, T.; REISS, G.; FRANK, W.; EISENBRAND, G. Synthesis of 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridine and Novel Derivatives Free of Positional Isomers. Potent Inhibitors of cAMP-Specific Phosphodiesterase and of Malignant Tumor Cell Growth. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 4733.

MOKRY, J.; MOKRA, D. Immunological aspects of phosphodiesterase inhibition in the respiratory system. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **2013**, *187*, 11.

MOULTON, B. C.; FRYER, A. D. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and DPOC. *British Journal of Pharmacology* **2011**, *163*, 44.

NAGANUMA K.; OMURA, A.; MAEKAWARA, N.; SAITOH, M.; OHKAWA, N.; KUBOTA, T.; NAGUMO, H.; KODAMA, T.; TAKEMURA, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, J.; TSUJITA, R.; KAWASAKI, K.; YOKOI, H.; KAWANISHI, M. Discovery of selective PDE4B inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 3174.

NGKELO, A.; ADCOCK, I. M. New treatments for DPOC. *Current Opinion in Pharmacology* **2013**, *13*, 362.

NIELSON, C. P.; VESTAL, R. E.; STURM, R. J. Effects of selective phosphodiesterase inhibitors on the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **1990**, *86*, 801.

O'BYRNE, P. M.; GAUVREAU, G. Phosphodiesterase-4 inhibition in DPOC. *Lancet* **2009**, *374*, 665.

PALLA, G.; PELIZZI, C.; PREDIERI, G.; VIGNALI, C. Conformational study on *N*-acylhydrazones of aromatic-aldehydes by NMR-spectroscopy. *Gazzetta Chimica Italiana* **1982**, *112*, 339.

PALLA, G.; PREDIERI, G.; DOMIANO, P.; VIGNALI, C.; TURNER, W. Conformational behaviour and *E/Z* isomerization of acyl and *N*-aroylhydrazones. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3649.

PAUL, F.; PATT, J; HARTWIG, J. F. Palladium-catalyzed formation of carbon-nitrogen bonds. Reaction intermediates and catalyst improvements in the hetero cross-coupling of aryl halides and tin amides. *Journal of American Chemical Society* **1994**, *116*, 5969.

PEACHELL, P. T.; UNDEM, B. J.; SCHLEIMER, R. P.; MACGLASHAN, D. W.; LICHTENSTEIN, L. M.; CIESLINSKI, L. B.; TORPHY, T. J. Preliminary identification and role of phosphodiesterase isozymes in human basophils. *The Journal of Immunology* **1992**, *148*, 2503.

PEARSON, R. G. Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 3533.

PDB. RCSB Protein Data Bank. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/>>. Acesso em : 02 agosto 2018.

POWERS, G. L.; HAMMER, K. D. P.; DOMENECH, M.; FRANTSKEVICH, K.; MALINOWSKI, R. L.; BUSHMAN, W.; BEEBE, D. J.; MARKER, P. C. Phosphodiesterase 4D Inhibitors Limit Prostate Cancer Growth Potential. *Molecular Cancer Research* **2015**, *13*, 149.

PRAVEENA, K. S. S.; RAMARAO, E. V. V. S.; MURTHY, N. Y. S.; AKKENAPALLY, S.; KUMAR, C. G.; KAPAVARAPU, R.; PAL, S. Design of new hybrid template by linking quinoline, triazole and dihydroquinoline pharmacophoric groups: A greener approach to novel polyazaheterocycles as cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *25*, 1057.

RABE, K. F.; BATEMAN, E. D.; O'DONNELL, D.; WITTE, S.; BREDENBROKER, D.; BETHKE, T. D. Roflumilast—an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* **2005**, *366*, 563.

RABE, K. F.; WATZ, H. Chronic obstructive pulmonary disease. *The Lancet* **2017**, *389*, 1931.

RENNARD, S. I. Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* **2004**, *364*, 791.

RENNARD, S. I.; SCHACHTER, N.; STREK, M.; RICKARD, K.; AMIT, O. Cilomilast for DPOC: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *Chest* **2006**, *129*, 56.

RIBEIRO, I. G.; SILVA, K. C. M.; PARRINI, S. C.; MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Synthesis and antinociceptive properties of new structurally planned imidazo[1,2-a]pyridine 3-acylarylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *33*, 225.

ROBICHAUD, A.; STAMATIOU, P. B.; JIN, C.; LACHANCE, N.; MACDONALD, D.; LALIBERT, F.; LIU, S.; HUANG, Z.; CONTI, M.; CHAN, C. C. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha2-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioural correlate of emesis. *The Journal of Clinical Investigation* **2002**, *110*, 1045.

SANZ, M. J.; CORTIJO, J.; MORCILLO, E. J. PDE4 inhibitors as new antiinflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacology & Therapeutics* **2005**, *106*, 269.

SAVAI, R.; PULLAMSETTI, S. S.; BANAT, G. A.; WEISSMANN, N.; GHOFRANI, H. A.; GRIMMINGER, F.; SCHERMULY, R. T. Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opinion Investigational Drugs* **2010**, *19*, 117.

SAVI, C.; COX, R. J.; WARNER, D. J.; COOK, A. R.; DICKINSON, M. R.; MCDONOUGH, A.; MORRILL, L. C.; PARKER, B.; ANDREWS, G.; YOUNG, S. S.; GILMOUR, P. S.; RILEY, R.; DEARMAN, M. S. Efficacious Inhaled PDE4 Inhibitors with Low Emetic Potential and Long Duration of Action for the Treatment of DPOC. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 4661.

SCHALKWYK, E. V.; STRYDOM, K.; WILLIAMS, Z.; VENTER, L.; LEICHTL, S.; WIRLITSCH, C. S.; BREDENBRÖKER, D.; BARDIN, P. G. Roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates allergen-induced asthmatic reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, *116*, 292.

SCHWABE, U.; MIYAKE, M.; OHGAM, Y.; DALY, J. W. 4-(3-Cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-2-pyrrolidone (ZK 62711): a potent inhibitor of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterases in homogenates and tissue slices from rat brain. *Molecular Pharmacology* **1976**, *12*, 900.

SCHWENKGRUB, J.; ZAREMBA, M.; JONIEC-MACIEJAK, I.; CUDNA, A.; MIROWSKA-GUZEL, D.; KURKOWSKA-JASTRZĘBSKA, I. The phosphodiesterase inhibitor, ibudilast, attenuates neuroinflammation in the MPTP model of Parkinson's disease. *Plos One* **2017**, *12*, e0182019.

SCOPUS. Disponível em: <<http://www.scopus.com>>. Acesso em: 05 julho 2018.

SELDON, P. M.; BARNES, P. J.; MEJA, K.; GIEMBYCZ, M. A. Suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α generation from human peripheral blood monocytes by inhibitors of phosphodiesterase 4: interaction with stimulants of adenylyl cyclase. *Molecular Pharmacology* **1995**, *48*, 747.

SENGUPTA, R.; SUN, T.; WARRINGTON, N. M.; RUBIN, J. B. Treating brain tumors with PDE4 inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2011**, *32*, 337.

SETTE, C.; VICINI, E.; CONTI, M. The rat PDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 18271.

SHAFIR, A.; LICHTOR, P. A.; BUCHWALD, S. L. N- versus O-Arylation of Aminoalcohols: Orthogonal Selectivity in Copper-Based Catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3490.

SHAKUR, Y.; PRYDE, J. G.; HOUSLAY, M. D. Engineered deletion of the unique N-terminal domain of the cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 prevents plasma membrane association and the attainment of enhanced thermostability without altering its sensitivity to inhibition by rolipram. *The Biochemical Journal* **1993**, 292, 677.

SHE, G; ZHAO L.; BAO W. 1,1'-Binaphthyl-2,2'-diamine Dihydrochloride: an Efficient Ligand for the N-Arylation of Imidazole with Aryl/heteroaryl Halides Catalyzed by CuI. *Chemical Research in Chinese Universities* **2016**, 32, 947.

SILVA, C. L. M.; NOEL, F.; BARREIRO, E. J. Vasodilatory properties of LASSBio 294 and its dependence on cGMP increase. *British Journal of Pharmacology* **2002**, 135, 293.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Tradução: Ricardo Bicca de Alancastro. 7ª Edição. Rio de Janeiro: LTC Editora, **2007**. 490p.

SINDEN, N. J.; STOCKLEY, R. A. Systemic inflammation and comorbidity in DPOC: a result of 'overspill' of inflammatory mediators from the lungs? Review of the evidence. *Thorax* **2010**, 65, 930.

SINGH, S.; LOKE, Y. K. An overview of the benefits and drawbacks of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* **2010**, 5, 189.

SMITH, M. Organic Synthesis. 4ª Edição. Massachusetts: Academic Press, **2016**. 1106p.

SOARES, L. M.; VRY, D.; STEINBUSCH, H. W. M.; MILANI, H.; PRICKAERTS, J.; OLIVEIRA, R. M. W. Rolipram improves cognition, reduces anxiety- and despair-like behaviors and impacts hippocampal neuroplasticity after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience* **2016**, 326, 69.

SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. *British Journal of Pharmacology* **2008**, 155, 308.

SRIVANI, P.; USHARANI, D.; JEMMIS, E. D.; SASTRY, G. N. Subtype Selectivity in Phosphodiesterase 4 (PDE4): A Bottleneck in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, 14, 3854.

STEWART, J. J. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling* **2007** 13, 1173.

SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G.; BARREIRO, E. J. LASSBio 294, a novel cardionotropic agent, increases the calcium content in the sarcoplasmic reticulum of saponin-skinned cardiac fibres. *British Journal of Pharmacology* **2001**, 134, 603.

SULLIVAN, P.; BEKIR, S.; JAFFAR, Z.; PAGE, C.; JEFFERY, P.; COSTELLO, J. Antiinflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet* **1994**, *343*, 1006.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *The Journal of Biological Chemistry* **1958**, *232*, 1077.

SWINNEN, J. V.; JOSEPH, D. R.; CONTI, M. The mRMN encoding a high-affinity cAMP phosphodiesterase is regulated by hormones and cAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86*, 8197.

SWINNEN, J. V.; TSIKALAS, K. E.; CONTI, M. Properties and hormonal regulation of two structurally related cAMP fosfodiesterases from the rat Sertoli cell. *The Journal of Biological Chemistry* **1991**, *266*, 18370.

TENOR, H.; STANICIU, L.; SCHUDT, C.; HATZELMANN, A.; WENDEL, A.; DJUKANOVIC, R.; CHURCH, M. K.; SHUTE, J. K. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from purified human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Clinical & Experimental Allergy* **1995**, *25*, 616.

THOMPSON, W. J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: pharmacology, biochemistry and function. *Pharmacology & Therapeutics* **1991**, *51*, 13.

THOMPSON, W. J.; APPLEMAN, M. M. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **1971**, *246*, 3145.

TING, P. C.; LEE, J. F.; KUANG, R.; CAO, J.; GU, D.; HUANG, Y.; LIU, Z.; ASLANIAN, R. G.; FENG, K.; PRELUSKY, D.; LAMCA, J.; HOUSE, A.; PHILLIPS, J. E.; WANG, P.; WUD, P.; LUNDELL, D.; CHAPMAN, R. W.; CELLY, C. S. Discovery of oral and inhaled PDE4 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 5528.

TORPHY, T. J.; BARNETTE, M. S.; UNDERWOOD, D. C.; GRISWOLD, D. E.; CHRISTENSEN, S. B.; MURDOCH, R. D.; NIEMAN, R. B.; COMPTON, C. H. Ariflo® (SB 207499), a Second Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitor for the Treatment of Asthma and DPOC: from Concept to Clinic. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *12*, 131.

TRIFILIEF, A.; WYSS, D.; WALKER, C.; MAZZONI, L.; HERSPERGER, R. Pharmacological Profile of a Novel Phosphodiesterase 4 Inhibitor, 4-(8-Benzo[1,2,5]oxadiazol-5-yl-[1,7]naphthyridin-6-yl)-benzoic Acid (NVP-ABE171), a 1,7-Naphthyridine Derivative, with Anti-Inflammatory Activities. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, *301*, 241.

VIGNOLA, A. M. PDE4 inhibitors in DPOC: a more selective approach to treatment. *Respiratory Medicine* **2004**, *98*, 495.

VITOLO, O.V.; SANT'ANGELO, A.; COSTANZO, V.; BATTAGLIA, F.; ARANCIO, O.; SHELANSKI, M. Amyloid beta-peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 13217.

XU, R. X.; HASSELL, A. M.; VANDERWALL, D.; LAMBERT, M. H.; HOLMES, W. D.; LUTHER, M. A.; ROCQUE, W. J.; MILBURN, M. V.; ZHAO, Y.; KE, H.; NOLTE, R. T. Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism a specificity. *Science* **2000**, 288, 1822.

WACHTEL, H. Characteristic behavioural alterations in rats induced by rolipram and other selective adenosine cyclic 3,5-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Psychopharmacology* **1982**, 77, 309.

WALDECK, B. Beta-adrenoceptor agonists and asthma: 100 years of development. *European Journal of Pharmacology* **2002**, 445, 1.

WANG, H.; PENG, M. S.; CHEN, Y.; GENG, J.; ROBINSON, H.; HOUSLAY, M. D.; CAI, J.; KE, H. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. *The Biochemical Journal* **2007**, 408, 193.

WEINBERGER, M.; HENDELES, L. Theophylline in asthma. *The New England Journal of Medicine* **1996**, 334, 1380.

WERMUTH, C. G. The Practical of Medicinal Chemistry. 2ª Edição. Londres: Academic Press, **2003**, 736.

WHO. Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 03 julho 2018.

WITULSKI, A.; SENFT, S.; BONET, J.; JOST, O. Palladium-Catalyzed N-Arylation Reactions with Aziridine and Azetidine. *Synthesis* **2007**, 2, 243.

WOODROW, M. D.; BALLANTINE, S. P.; BARKER, M. D.; CLARKE, B. J.; DAWSON, J.; DEAN, T. W.; DELVES, C. J.; EVANS, B.; GOUGH, S. L.; GUNTRIP, S. B; HOLMAN, S.; HOLMES, D. S.; KRANZ, M.; LINDVAAL, M. K.; LUCAS, F. S.; NEU, M.; RANSHAW, L. E.; SOLANKE, Y. E.; SOMERS, D. O.; WARD, P.; WISEMAN, J. O. Quinolines as a novel structural class of potent and selective PDE4 inhibitors. Optimisation for inhaled administration. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 5261.

YAMADA, S.; MORIZONO, D.; YAMAMOTO, K. Mild oxidation of aldehydes to the corresponding carboxylic acids and esters: alkaline iodine oxidation revisited. *Tetrahedron Letters* **1992**, 33, 4329.

YANG, Q.; NEY, J. E.; WOLFE, J. P. Palladium-Catalyzed Tandem N-Arylation/Carboamination Reactions for the Stereoselective Synthesis of N-Aryl-2-benzyl Pyrrolidines. *Organic Letters* **2005**, *7*, 2575.

YANG, X.; LUI H.; FU, H.; QIAO, R.; JIANG, Y.; ZHAO, Y. Efficient Copper-Catalyzed Synthesis of 4-Aminoquinazoline and 2,4-Diaminoquinazoline Derivatives. *Synlett* **2010**, *1*, 101.

ZHANG, C.; XU, Y.; ZHANG, H.; GURNEY, M. E.; O'DONNELL, J. M. Comparison of the Pharmacological Profiles of Selective PDE4B and PDE4D Inhibitors in the Central Nervous System. *Nature Scientific Reports* **2017**, *7*, 40115.

ZHANG, M.; ZHOU, Z.; YUAN, X.; CHENG, Y.; BI, B.; GONG, M.; CHEN, Y.; XU, J. Chlorbipram: A novel PDE4 inhibitor with improved safety as a potential antidepressant and cognitive enhancer. *European Journal of Pharmacology* **2013**, *721*, 56.

ZHANG, Y.; PLATTNER, J. J.; AKAMA, T.; BAKER, S. J.; HERNANDEZ, V. S.; SANDERS, V.; FREUND, Y.; KIMURA, R.; BU, W.; HOLD, K. M.; LU, X. Design and synthesis of boron-containing PDE4 inhibitors using soft-drug strategy for potential dermatologic anti-inflammatory application. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 2270.

ZHOU, Z.; CHENG, Y.; ZOU, Z.; GE, B.; YU, H.; HUANG, C.; WANG, H.; YANG, X.; XU, J. Discovery of N-Alkyl Catecholamides as Selective Phosphodiesterase-4 Inhibitors with Anti-neuroinflammation Potential Exhibiting Antidepressant-like Effects at Non-emetic Doses. *ACS Chemical Neuroscience* **2017**, *8*, 135.