

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

DISSERTAÇÃO

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVAS
IMIDAZOLONAS PLANEJADAS COMO INIBIDORAS DE CISTEÍNO
PROTEASES PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA**

Luciana Luiz de Azevedo

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVAS
IMIDAZOLONAS PLANEJADAS COMO INIBIDORAS DE CISTEÍNO
PROTEASES PARA O TRATAMENTO DA LEUCEMIA**

LUCIANA LUIZ DE AZEVEDO

Sob Orientação do Professor

Dr. Arthur Eugen Kümmerle

Co-Orientação do Professor

Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves Souza

Dissertação submetida como requisito Parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Química Área de concentração Química Orgânica.

Seropédica, RJ

Outubro de 2013

615.19

A994s

T

Azevedo, Luciana Luiz de, 1989-

Síntese e avaliação farmacológica de novas imidazolonas planejadas como inibidoras de cisteíno proteases para o tratamento da leucemia / Luciana Luiz de Azevedo. - 2013.

177 f.: il.

Orientador: Arthur Eugen Kümmerle.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2013.

Bibliografia: f. 85-93.

1. Química farmacêutica - Teses. 2. Leucemia - Tratamento - Teses. 3. Agentes antineoplásicos - Teses. 4. Moléculas - Síntese - Teses. I. Kümmerle, Arthur Eugen, 1979- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

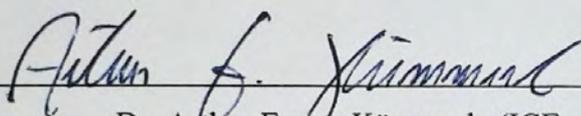
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUCIANA LUIZ DE AZEVEDO

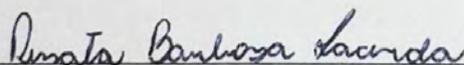
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Medicinal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07/10/ 2013

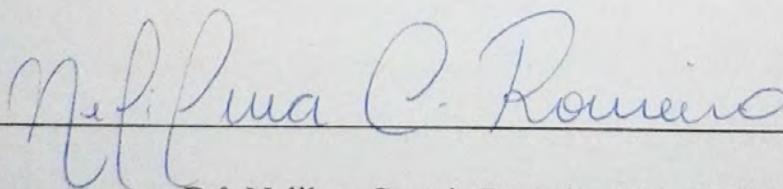


Dr. Arthur Eugen Kümmerle (ICE - UFRRJ) - Orientador

Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves Souza (IQ - UFRJ) - Co-Orientador



Dr^a. Renata Barbosa Lacerda (ICE - UFRRJ)



Dr^a. Nelilma Correia Romeiro (IQ - UFRJ)

Aos meus pais, Ana Lucia e Jefferson,
e a meu marido Douglas com carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao me deparar com a escrita desta parte tão importante de qualquer trabalho, percebi que tenho muito a agradecer. Em primeiro lugar, a Deus pela dádiva da vida e da salvação, pois está escrito em João 10:10 “(...) Eu vim para que tenham vida, e a tenham com abundância.” e em João 3:16 “Porque Deus amou o mundo de tal maneira que deu o seu Filho unigênito, para que todo aquele que nele crê não pereça, mas tenha a vida eterna.” Agradeço a Deus pela grande oportunidade de fazer aquilo que amo e de poder contribuir para a sociedade, de alguma maneira, com os frutos do meu trabalho, pois “não há nada melhor para o homem do que comer e beber, e fazer com que sua alma goze do bem do seu trabalho. Também vi que isto vem da mão de Deus.” Eclesiastes 2:24.

Agradeço a Deus pela vida dos meus pais, Ana Lucia e Jefferson, pelo amor incondicional, pela imensa dedicação e carinho e por todos os ensinamentos dispensados a mim. Tudo o que tenho e o que sou devo a eles, e sei que nunca serei capaz de recompensá-los um dia. Eles são os meus amores, o meu orgulho e a minha motivação de fazer sempre o melhor, pois “a coroa dos velhos são os filhos dos filhos; e a glória dos filhos são seus pais.” Provérbios 17:6

Sou grata a Deus pela vida do meu marido Douglas, pelo apoio e estímulo durante todo o tempo em que estivemos juntos, quase 8 anos. Agradeço por ele acreditar nas minhas escolhas, por mais loucas que parecessem aos olhos de outras pessoas. Agradeço pelo imenso sacrifício de trabalhar em uma jornada de quase 15 horas por dia para prover o sustento da nossa casa, para que eu possa me concentrar nos estudos. “O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece. Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal; Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.” 1 Coríntios 13:4-7.

Agradeço também a Deus pela escolha do meu orientador Arthur. Tenho plena certeza que ele foi escolhido por Ti Senhor através das minhas orações. Aprendi muito com ele, pois sempre está disposto a ensinar e a ajudar sempre que necessário. Agradeço por ele acreditar que sou capaz de desenvolver as minhas potencialidades, como por exemplo a escrita deste trabalho, que nem eu imaginava que seria capaz de tal ato. Acredito que existem poucas pessoas com o dom de ensinar, e o Arthur definitivamente é uma dessas. “De modo que, tendo

diferentes dons, segundo a graça que nos é dada; se é ensinar, que haja dedicação ao ensino.” Romanos 12:6 e 7.

Agradeço a Deus pela compreensão dos meus familiares, primos, primas, tios, tias e avós. Por não passar tanto tempo, quanto gostaria, perto deles por sempre estar estudando para alguma prova, ou para a apresentação de algum trabalho, ou simplesmente lendo alguns artigos para o enriquecimento científico.

Agradeço a Deus pelos amigos que fiz durante a jornada de graduação e pós-graduação. Agradeço aos amigos do laboratório Daiana, Felipe, aos Thiagos, pois são vários, Dayane, Carla, Pedro, Sabrina, pelos dias de trabalho divertidíssimos na presença de vocês. Com certeza vocês alegraram muito os meus dias de trabalho no laboratório. Aos amigos que me acompanharam de perto na graduação, Diego, Elaine e Arthur, com os quais aprendi muito, na área da química, física, matemática, e a lidar com pessoas com o pensamento diferente do meu. Vocês são especiais em minha vida e carregam vocês no meu coração. “Em todo o tempo ama o amigo e para a hora da angústia nasce o irmão.” Provérbios 17:17.

Sou muito grata a Deus pela colaboração da professora Dra. Vivian M. B. D. Rumjanek e do Dr. Eduardo Salustiano J. dos Santos. Agradeço pelas “portas abertas” do Laboratório de Imunologia Tumoral na UFRJ para que eu pudesse desenvolver parte deste trabalho. Agradeço a atenção, a dedicação ao trabalho, aos ensinamentos e a disposição em ajudar, especialmente do Eduardo.

Agradeço a Deus pelos professores que tive ao longo da minha vida, pois guardo o que aprendi até os dias de hoje. Agradeço aos professores da pós-graduação pela dedicação em ensinar, especialmente à professora Rosane, ao Cédric, ao Carlos Maurício, ao Marco Edílson, ao Arthur e ao Mário Geraldo.

Agradeço a Deus por todos os professores e orientadores que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente o meu co-orientador Dr. Rodrigo Octavio Mendonça Alves Souza e o professor Dr. Leandro Soter de Mariz e Miranda. Aos professores membros da banca, por aceitarem dedicar parte de seu tempo para contribuição com este trabalho.

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

RESUMO

A palavra câncer é utilizada para designar um conjunto de mais de 100 doenças diferentes que têm, em comum, o crescimento desordenado de células anormais que invadem tecidos e órgãos, e é considerada pela Organização Mundial da Saúde um dos maiores problemas de saúde enfrentados pela humanidade neste século. As deubiquitinases (cisteíno proteases) encontram-se hoje como possíveis alvos terapêuticos no tratamento contra o câncer. Estas enzimas são responsáveis pela regulação de diversos processos celulares, dentre estes, o processo de multiplicação celular. Deste modo, o presente trabalho propõe o planejamento e a síntese de moléculas capazes de modular a ação destas enzimas, com a finalidade de impedir a proliferação de células tumorais. As moléculas aqui descritas são da classe das imidazolonas e foram planejadas a partir da classe das tirfostinas, que são comprovadamente ativas sobre linhagens celulares de leucemia mielóide crônica. Portanto, este trabalho tem por objetivo sintetizar as imidazolonas planejadas como inibidoras de deubiquitinases e avaliar farmacologicamente a atividade biológica desta classe frente a diferentes linhagens de células leucêmicas. Foram sintetizadas 3 séries de imidazolonas, estruturalmente relacionadas, para estudos de SAR através da reação de Erlenmeyer, seguida de reação com anilina e benzilamina em meio de piridina, e ácido acético, que se demonstrou essencial para esta síntese. Foi observada a formação de mistura diastereoisomérica para alguns produtos sintetizados, sendo que suas proporções isoméricas foram determinadas através da análise de espectros de RMN ^1H , variando entre 85-100% para o isômero Z, que foi caracterizado por experimento de RMN de ^{13}C acoplado a hidrogênio a longa distância. Algumas imidazolonas foram selecionadas para avaliação de atividade antitumoral através de ensaio colorimétrico de MTT. A eficácia dos produtos avaliados foi determinada através da observação dos valores de viabilidade celular na maior concentração testada, de 50 μM , em culturas de células leucêmicas de duas linhagens diferentes, a K562 e Lucena-1. A viabilidade destas células variou entre 61,4-6,1%. As potências foram determinadas e os resultados variaram entre 57,8-20,4 μM . Os produtos com os melhores resultados de atividade antitumoral foram **39h** e **41a** que apresentaram viabilidade celular de 16,7% e 19,7% para a K562, respectivamente, e 6,1% e 13,7% para a Lucena-1. Estes apresentaram CE_{50} de 20,4 μM para o produto **39h** e 24,1 μM para o produto **41a**, frente à K562, e 22,7 μM para o produto **39h** e 25 μM pra o produto **41a**, frente à Lucena-1. Observou-se que os resultados de atividade antitumoral para as duas linhagens celulares foi similar tanto em potência quanto em eficácia máxima, fato que não era esperado, já que a linhagem Lucena-1 apresenta fator de resistência a múltiplas drogas. Deste modo, os resultados obtidos tornam as séries das imidazolonas propostas neste trabalho interessantes como novos compostos protótipos para o tratamento da leucemia. Os resultados obtidos corroboram o planejamento deste trabalho, pois até o momento, as imidazolonas avaliadas possuem maior atividade antitumoral se comparada a protótipos que inspiraram o planejamento das mesmas.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia, imidazolonas, atividade antitumoral.

ABSTRACT

Cancer is described as a set of more than 100 different diseases that have in common the uncontrolled growth of abnormal cells that invade tissues and organs, been considered by the World Health Organization as one of the biggest health problems facing humanity at this century. Deubiquitinases (cysteine proteases) are potential therapeutic targets in cancer treatment. These enzymes are responsible for the regulation of many cellular processes, among them, the cell multiplication one. Thus, this work proposes the design and synthesis of molecules that could modulate the action of these enzymes, aiming at preventing tumor cell proliferation. The molecules described herein belong to the class of imidazolones and were planned from the class of tyrphostins, which are remarkably active inhibiting cell lines from chronic myelogenous leukemia. For this purpose we synthesized 3 series of correlated imidazolone compounds planned as inhibitors of deubiquitinases and evaluated their biological activities against different leukemic cell lines. The imidazolones were synthesized by means of an Erlenmeyer reaction, followed by reaction with aniline or benzylamine in a pyridine and acetic acid medium, which was essential to our synthesis. It was observed the formation of diastereoisomeric mixture for some products synthesized, and their isomeric ratios were determined by analysis of ^1H NMR spectra, ranging from 85-100% for the Z isomer, which was experimentally characterized by ^{13}C NMR coupled to hydrogen over long distances. Some imidazolones were selected for antitumor activity evaluation by MTT colorimetric assay. The effectiveness of the compounds was determined by observation of cell viability at the highest concentration (50 μM) in culture of two different leukemic cell lines, K562 and Lucena-1. The viability of these cells ranged from 61.4 to 6.1%. Their potencies were determined and the results ranged from 57.8 to 20.4 μM . The products with the best antitumor activity were **39h** and **41a**, which showed cell viability of 16.7% and 19.7% for K562, respectively, and 6.1% and 13.7% for the Lucena-1. Compounds also presented CE_{50} of 20.4 μM to **39h** and 24.1 μM for **41a** in K562, and 22.7 μM for **39h** and 25 μM for **41a** in Lucena-1. The results of antitumor activity for both cell lines were similar both in potency and in maximum effectiveness. This fact was not expected, since the Lucena-1 cell presents multidrug resistance. Thus, the results obtained for our series of proposed imidazolones make them interesting as new lead compounds for the treatment of leukemia. The results supported the design of this work, once until now, the tested imidazolones presented greater antitumor activity compared to prototypes that inspired the design.

KEYWORDS: Leukemia, imidazolones, antitumor activity.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento do câncer.....	1
Figura 2. As marcas do câncer.....	2
Figura 3. Análise de células que compõem o sangue de indivíduos sadios (esquerda) e com leucemia (direita).....	4
Figura 4. Células precursoras da célula-tronco hematopoética.....	5
Figura 5. Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22.....	6
Figura 6. Cromossomo Ph e seus domínios principais.....	7
Figura 7. Enzima BCR-ABL e atividade tirosina quinase.....	7
Figura 8. Principais vias metabólicas alteradas pela BCR-ABL.....	8
Figura 9. Evolução da terapêutica no combate à LMC.....	9
Figura 10. Gás mostarda e mostardas nitrogenadas.....	11
Figura 11. Agentes alquilantes mais comuns.....	11
Figura 12. Mecanismo de ação dos agentes alquilantes.....	12
Figura 13. Sítio catalítico da RNR.....	13
Figura 14. Mecanismo de ação da hidroxiuréia.....	14
Figura 15. Nucleosídeos pirimidínicos e fármacos antimetabólitos.....	14
Figura 16. Mecanismo de ação da citarabina.....	15
Figura 17. Mecanismo de ação da vincristina.....	15
Figura 18. Mecanismo de ação do imatinibe.....	17
Figura 19. Interações do IM com BCR-ABL.....	17
Figura 20. Desenvolvimento e otimização do inibidor de tirosina quinase IM.....	18
Figura 21. Nilotinibe e Imatinibe.....	20
Figura 22. Principais interações entre nilotinibe e BCR-ABL.....	20
Figura 23. Interações entre imatinibe e nilotinibe com sítio BCR-ABL.....	21
Figura 24. Função das deubiquitinasas.....	22

Figura 25. Tríade catalítica e deubiquitinação.....	23
Figura 26. Mecanismo de ação do composto WP1130.....	24
Figura 27. Esquema simplificado da via JAK/STAT.....	25
Figura 28. Placa de 96 poços.....	44
Figura 29. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das oxazolonas.....	48
Figura 30. Isômeros geométricos das oxazolonas sintetizadas.....	49
Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C para a determinação da configuração relativa da oxazolona 35a.....	50
Figura 32. Benzaldeídos com grupos doadores de elétrons.....	51
Figura 33. Benzaldeído com grupo retiradores de elétrons.....	51
Figura 34. Benzaldeídos com grupos halogênicos.....	52
Figura 35. Isômeros geométricos das imidazolonas sintetizadas.....	57
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C para a determinação da configuração relativa da imidazolona 39c.....	57
Figura 37. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das imidazolonas das séries A e C.....	59
Figura 38. Espectro de RMN bidimensional NOESY para o produto 39a.....	60
Figura 39. Espectro de RMN bidimensional HSQC ampliado na região de 8,50-8,20ppm para ^1H e 134,0-130,0ppm para ^{13}C para o produto 39a.....	61
Figura 40. Espectro de RMN bidimensional HSQC ampliado na região de 7,55-7,25ppm para ^1H e 132,0-127,0ppm para ^{13}C para o produto 39a.....	62
Figura 41. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 7,65-7,20ppm para ^1H e 175,0-155,0ppm para ^{13}C para o produto 39a.....	63
Figura 42. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 8,40-8,30ppm para ^1H e 133,0-126,0ppm para ^{13}C para o produto 39a.....	64
Figura 43. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 7,30-7,25ppm para ^1H e 133,0-127,0ppm para ^{13}C para o produto 39a.....	65

Figura 44. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das imidazolonas da série B.....	68
Figura 45. Imidazolonas selecionadas para avaliação de atividade antitumoral.....	71
Figura 46. Gráfico de viabilidade celular para as imidazolonas avaliadas.....	73
Figura 47. Gráficos de viabilidade celular versus concentração das imidazolonas da série A.....	75
Figura 48. Gráficos de viabilidade celular versus concentração da imidazolona da série B.....	76
Figura 49. Gráficos de viabilidade celular versus concentração da imidazolona da série C.....	76
Figura 50. Relação estrutura atividade das imidazolonas da série A.....	77
Figura 51. Densidade e cálculo de coeficiente de LUMO para as imidazolonas da série A.....	78
Figura 52. Relação estrutura atividade da imidazolona da série B.....	80
Figura 53. Relação estrutura atividade da imidazolona da série C.....	80

LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1. Planejamento estrutural da série de imidazolonas A, B e C.....	27
Esquema 2. Síntese das oxazolonas 35a-j e 37a.....	45
Esquema 3. Formação de anidrido misto na Reação de Erlenmeyer.....	46
Esquema 4. Formação do núcleo oxazolônico na Reação de Erlenmeyer.....	47
Esquema 5. Formação das oxazolonas através da reação de Erlenmeyer.....	47
Esquema 6. Reações paralelas na reação de Erlenmeyer.....	52
Esquema 7. Síntese das imidazolonas das séries A e C.....	52
Esquema 8. Primeira etapa da reação de formação das imidazolonas das séries A e C.....	55
Esquema 9. Segunda etapa da reação de formação das imidazolonas das séries A e C.....	56
Esquema 10. Síntese da imidazolona da série B.....	66
Esquema 11. Primeira etapa da reação de formação das imidazolonas da série B.....	66
Esquema 12. Segunda etapa da reação de formação das imidazolonas das séries B.....	67
Esquema 13. Reação de redução do MTT.....	70

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Oxazolonas sintetizadas.....	45
Tabela 2. Imidazolonas sintetizadas.....	53
Tabela 3. Proporção isomérica das imidazolonas das séries A e C.....	58
Tabela 4. Viabilidade celular para as imidazolonas avaliadas.....	73
Tabela 5. Valores de CE ₅₀ para as imidazolonas testadas sobre a K562 e Lucena-1.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABL - Abelson oncogene (gene ABL)
- ADP - adenosina difosfato
- Asp - aminoácido aspartato
- ATP - adenosina trifosfato
- BCR - *breakpoint cluster region* (gene BCR)
- CB - crise blástica
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CCFA - camada fina analítica
- CCR - Resposta citogenética completa (*complete cytogenetic response*)
- CE₅₀ - concentração eficaz média
- CG - cromatógrafo à gás
- CHR - Resposta hematológica completa (*complete hematologic response*)
- CMR - Resposta molecular completa (*complete molecular response*)
- Cys - aminoácido cisteína
- DMSO - dimetilsulfóxido
- DNA - ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- DUBs - deubiquitinasas
- EDG - grupos doadores de elétrons (*electron donating groups*)
- EM - espectrômetro de massas
- EWG - grupos retiradores de elétrons (*electron withdrawing groups*)
- FA - fase acelerada
- FC - fase crônica
- FDA - *Food and Drug Administration*
- GIST - tumores gastrointestinais
- His - aminoácido histidina
- HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
- HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
- IC₅₀ - concentração inibitória média
- IM - imatinibe
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- IV - infravermelho
- J - constante de acoplamento
- JAK/STAT - *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*
- LLA - leucemia linfóide aguda

LLC - leucemia linfóide crônica
LMA - leucemia mielóide aguda
LMC - leucemia mielóide crônica
MAPK - *Mitogenic activated protein kinase*
MDR - resistência a múltiplas drogas (*multiple drug resistance*)
MJDs - proteases com domínio proteico da doença de Machado-Joseph
MTT - brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol
MW - micro-ondas (microwave)
NOESY - *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
Nu - nucleófilo
OTUs - proteases relacionadas com o tumor ovariano
P - fosfato
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PDB - banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)
P.f. - ponto de fusão
Ph - cromossomo Philadelphia
PI3K - *Phosphatidylinositol 3-kinase*
PKC - proteína quinase C
RAS - *Rat Sarcoma*
RCC - carcinoma de células renais
RMN - ressonância magnética nuclear
RNA - ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
RNR - ribonucleotídeo redutase
SAR - Relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship*)
SFB - soro fetal bovino
T315I - troca de um aminoácido treonina na posição 315 por uma isoleucina
Thr - aminoácido treonina
TK - tirosina quinase (*tyrosine-kinase*)
TMS - tetrametilsilano
Tyr - aminoácido tirosina
Ub - ubiquitina
UCHs - ubiquitina carbóxi-terminal hidrolases
USPs - ubiquitina proteases-específicas
UV- ultravioleta
VCR - vincristina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Câncer.....	1
1.2 Leucemias.....	3
1.2.1 Leucemia Mielóide Crônica.....	5
1.2.2 Terapêutica.....	9
1.2.2.1 Agentes alquilantes.....	10
1.2.2.2 Antimetabólitos.....	12
1.2.2.3 Produtos naturais.....	15
1.2.2.4 Imunoterapia.....	15
1.2.2.5 Inibidores de tirosina quinase de 1ª geração.....	16
1.2.2.6 Inibidores de tirosina quinase de 2ª geração.....	19
1.3 Deubiquitinasas.....	21
1.4 JAK/STAT.....	24
2 OBJETIVO.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
2.3 Planejamento estrutural.....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Metodologia sintética.....	28
3.1.1 Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção das séries A e B (35a-j).....	29
3.1.2 Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção da série C (37a).....	33
3.1.3 Síntese das imidazolonas da série A (39a-j).....	34
3.1.4 Síntese das imidazolonas da série B (41a).....	40
3.1.5 Síntese das imidazolonas da série C (42a).....	41
3.2 Metodologia de avaliação de atividade biológica.....	42
3.2.1 Linhagens celulares e cultura de células.....	43
3.2.2 Preparação das amostras de imidazolonas.....	43
3.2.3 Ensaio colorimétrico de MTT.....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção das séries A, B e C.....	45

4.2. Síntese das imidazolonas da série A e C.....	52
4.3. Síntese das imidazolonas da série B.....	65
4.4. Avaliação de atividade biológica.....	68
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	82
6 BIBLIOGRAFIA.....	85
7 ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

A palavra câncer é utilizada para designar um conjunto de mais de 200 doenças diferentes que têm, em comum, o crescimento desordenado de células anormais que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2011) (Figura 1). Tais células são consideradas tumorais quando apresentam dano no seu genoma, espontâneos ou não, em genes que regulam o crescimento, diferenciação e mecanismos de morte celular, os quais conferem vantagens para sua sobrevivência (HARBER, 2000; ROBSON *et al.*, 2001).

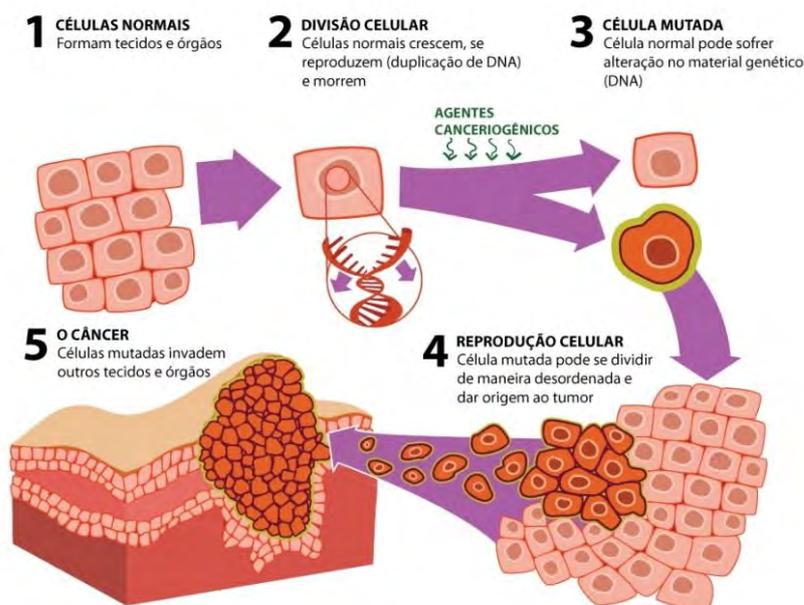


Figura 1. Desenvolvimento do câncer. Células normais que após alterações genéticas perdem o controle proliferativo e invadem tecidos e órgãos (Adaptado de HARBER, 2000).

É considerado pela Organização Mundial da Saúde um dos maiores problemas de saúde enfrentados pela humanidade neste século. Em todo o mundo, a cada ano, mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer e cerca de 8 milhões de óbitos são registrados (SHURIN, 2012). No Brasil, a estimativa para o biênio 2012/2013 é de mais de 500 mil novos casos de incidência desta doença (INCA, 2011).

Pesquisadores da área já compararam a progressão do câncer com o processo evolutivo proposto por Darwin, onde a sucessão de alterações genéticas, que confira à célula normal uma vantagem de crescimento ou sobrevivência, pode conduzi-la ao processo de conversão em uma célula tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

As alterações genéticas ocorrem, a princípio, em genes específicos como os proto-oncogenes. São genes dominantes, mas inativos em células normais e quando ativos transformam-se em oncogenes, que podem garantir vantagens de sobrevivência às células e estabelecer a malignização das mesmas (WEINBERG *et al.*, 1982). Outra classe de genes relacionados são os genes supressores de tumor que, ao contrário dos oncogenes, são recessivos e devem ser inativados para permitirem a progressão tumoral, uma vez que a sua função está ligada ao controle da proliferação celular (BISHOP, 1996).

A inativação de genes supressores, como o gene *p53*, não é o único mecanismo que garante vantagem proliferativa às células tumorais. Outros mecanismos são marcantes como secreção aumentada de fatores de crescimento, alta taxa de síntese de ácidos nucleicos e alta capacidade de geração de ATP pela via glicolítica (PRATT *et al.*, 1994; DE VITA *et al.*, 1997). Além do descontrole das etapas de proliferação celular, outras alterações na fisiologia da célula normal estão associadas à tumorigênese, como resistência à apoptose, instabilidade genômica e alterações metabólicas. A célula tumoral também é capaz de modificar o microambiente no qual está inserida, aumentando o processo inflamatório, induzindo a angiogênese, inibindo os mecanismos de defesa do sistema imunológico e possibilitando a invasão de outros tecidos, que podem levar às metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2011) (Figura 2).



Figura 2. As marcas do câncer. Características celulares adquiridas e compartilhadas pelas formas de câncer humano que governam a transformação das células normais em tumores malignos (Adaptado de HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O efeito de instabilidade genômica, causando novas mutações no DNA, combinado com a expressão alterada de genes pode acelerar o crescimento maligno e, dadas as vantagens de sobrevivência destas células em relação às demais, ocorre a formação de massa de células tumorais, que pode ser classificada em maligna ou benigna (DAIRKEE e SMITH, 1996). Os tumores benignos se apresentam como uma massa de células bem localizada, similar ao tecido de origem e envolvida por uma capsula que impede a invasão em outros tecidos. Tumores malignos são caracterizados pelo crescimento desordenado mais acelerado, pela capacidade de disseminação pelo organismo, invasão e colonização de tecidos distantes da origem do tumor (DAIRKEE e SMITH, 1996).

O câncer também pode ser classificado de acordo com o tecido e o tipo celular de origem e pode ser dividido em sólido e não sólido. Dentre os tumores sólidos, há os tumores originados em células epiteliais, denominados carcinomas, os originados do tecido conjuntivo ou de células musculares, os sarcomas, e os tumores derivados do sistema nervoso, como os gliomas. Já entre os não sólidos encontram-se os linfomas, originados no tecido linfático, e as leucemias originadas no tecido hematopoético (ALBERTS *et al.*, 2009).

1.2 Leucemias

Os casos de incidência de leucemia no Brasil aumentam a cada ano. A estimativa de novos casos desta doença no país é de mais de 8 mil para o biênio 2012/2013 e o número de óbitos no ano de 2010 foi estimado em 6 mil em todo o país (INCA, 2011). A leucemia é o tipo de câncer infantil mais comum em crianças de até 15 anos de idade no Brasil, correspondendo entre 25-35% de todos os casos, sendo a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) a de maior incidência (INCA, 2008).

As leucemias são um grupo de neoplasias complexas e heterogêneas que afetam a expansão e a diferenciação de células hematopoéticas na medula óssea. Frequentemente ocorre uma série de alterações genéticas ao invés de um único evento, tendo como característica principal o acúmulo de leucócitos (basófilos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e B, por exemplo) na medula óssea e circulação sanguínea (BROWN *et al.*, 2012) (Figura 3).

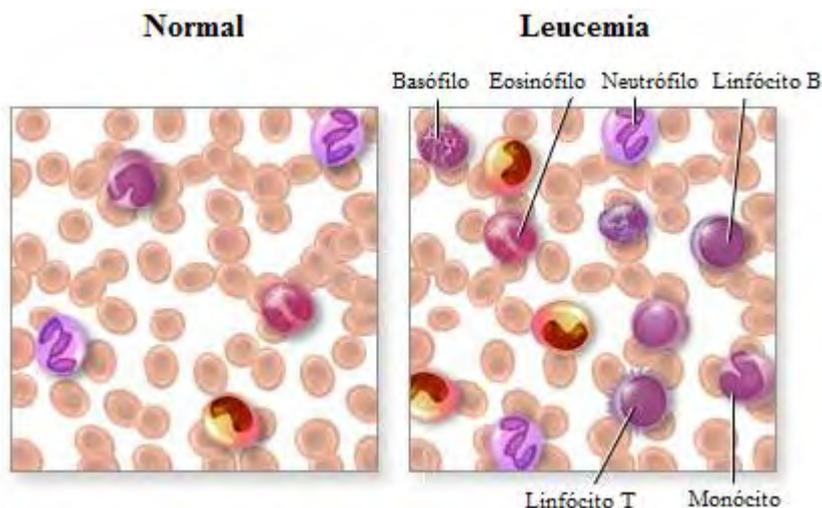


Figura 3. Análise de células que compõem o sangue de indivíduos saudios (esquerda) e com leucemia (direita).

A proliferação anormal e desordenada no número de leucócitos leva, também, à alterações na contagem de células de outras linhagens sanguíneas, como a eritoblástica e a megacarioblástica, que têm seu número drasticamente reduzido. O indivíduo leucêmico apresenta, então, quadros de anemia e trombocitopenia como consequência desta anormalidade (BROWN *et al.*, 2012).

Os sintomas mais comuns em indivíduos acometidos por esta doença são febre e perda de peso, pelo aumento do metabolismo das células leucêmicas; cansaço, falta de ar e fraqueza muscular, devido ao quadro característico de anemia; hemorragias e aparecimento de manchas roxas na pele, característico de trombocitopenia; e aumento do volume do baço, fígado e linfonodos, devido à invasão de células leucêmicas nestes órgãos após ganharem a circulação sanguínea (CAVALCATI, 2009).

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido e o grau de maturação das células. A célula na qual ocorre a transformação leucêmica pode ser de origem linfóide, mielóide, ou até mesmo uma célula tronco multipotencial, com a capacidade de se diferenciar tanto em células mielóides quanto linfóides (Figura 4). Deste modo, existem dois tipos mais comuns de leucemia: a linfóide e a mielóide, dependendo do tipo celular envolvido (GOASGUEN *et al.*, 1996) (Figura 4).

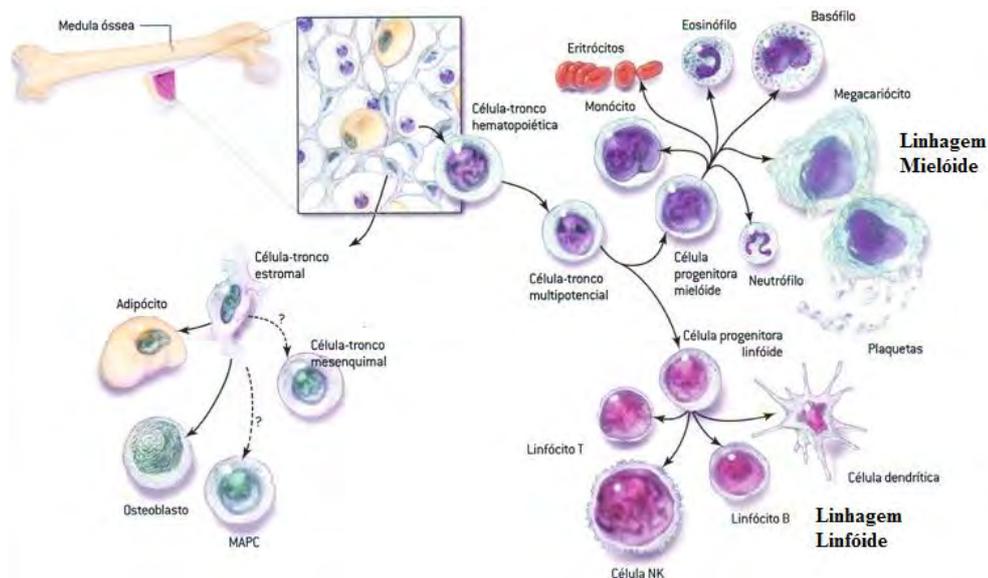


Figura 4. Células precursoras da célula-tronco hematopoiética. Células da linhagem mielóide e linfóide que podem sofrer alterações e se transformarem em células leucêmicas (Adaptado de CAVALCATI, 2009).

As leucemias também podem se apresentar na forma aguda ou crônica de acordo com o estado de maturação das células leucêmicas. As agudas se caracterizam por um desequilíbrio entre a proliferação e a maturação das células, levando a uma expansão contínua do clone leucêmico e acúmulo de células imaturas (blastos), devido à rápida progressão da doença. As leucemias crônicas progridem mais lentamente e se caracterizam por um elevado número de células em proliferação, com predomínio de células diferenciadas, porém não funcionais (COTRAN *et al.*, 1994; GOASGUEN *et al.*, 1996). Deste modo, pela união das classificações acima, as principais formas de leucemia podem ser divididas em: Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Linfóide Crônica (LLC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA) e Leucemia Mielóide Crônica (LMC).

1.2.1 Leucemia Mielóide Crônica

Considerada uma doença rara, a leucemia mielóide crônica (LMC) tem uma incidência mundial de 1-2 novos casos por 100 mil habitantes por ano, verificando uma ligeira preponderância no sexo masculino. Esta forma de leucemia representa cerca de 20% das leucemias diagnosticadas em adultos (FRAZER *et al.*, 2007). Embora esta doença atinja todas as faixas etárias, a idade média de diagnóstico varia entre 45 e 60 anos de idade (ROHRBACHER e HASFORD, 2009).

A LMC é uma doença mieloproliferativa que se caracteriza pelo acúmulo excessivo de células mielóides morfologicamente normais, porém com função alterada (PERROTTI *et al.*,

2010). Esta doença foi descrita pela primeira vez pelos patologistas Bennet, Craigie e Virchow em 1845 (WONG e WITTE, 2004).

As células com LMC apresentam uma anormalidade cromossômica característica, a formação do cromossomo Philadelphia (Ph), que foi o primeiro rearranjo cromossomal a ser relacionado com um tipo de câncer específico (NOWELL e HUNGEFORD, 1962). Este marco tornou a LMC um modelo de estudo para o câncer e impulsionou a identificação e a associação de inúmeras outras alterações cromossômicas à neoplasias.

O cromossomo Ph está presente em cerca de 90% dos indivíduos com LMC, sendo assim considerado o marcador citogenético desta doença (WONG e WITTE, 2004). Este cromossomo é formado pela translocação recíproca entre os segmentos distais do braço longo dos cromossomos 9 e 22 (ROWLEY, 1973). O resultado desta translocação é o gene BCR-ABL, pela justaposição do oncogene ABL, no cromossomo 9 com o gene BCR, no cromossomo 22 (BEN-NERIAH *et al.*, 1986) (Figura 5). No entanto, o mecanismo que promove esta translocação recíproca entre cromossomos ainda permanece desconhecido (ROWLEY, 1973).

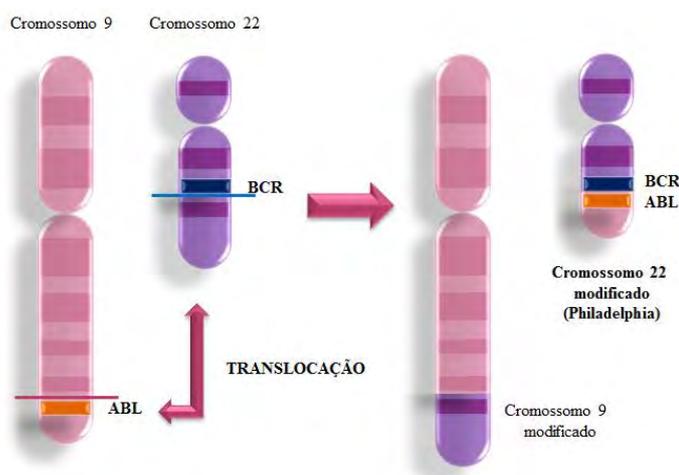


Figura 5. Translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Representação esquemática da formação do cromossomo Philadelphia (Ph), originando o gene BCR-ABL.

O gene ABL codifica uma enzima constitutiva com atividade tirosina quinase (TK) que se encontra envolvida em vários mecanismos de regulação da homeostase celular como diferenciação celular, regulação do ciclo celular, adesão, dentre outras funções. O gene BCR codifica uma enzima com atividade serina/treonina quinase, mas ainda pouco se sabe sobre as funções desempenhadas por esta enzima (LI *et al.*, 2009).

O gene de fusão BCR-ABL resultante da translocação recíproca transcreve uma proteína quimérica citoplasmática, a proteína BCR-ABL. Esta proteína é composta por vários

domínios estruturais, tendo destaque os domínios SH1 e SH3 da subunidade ABL da enzima (Figura 6) (FADERL *et al.*, 1999).

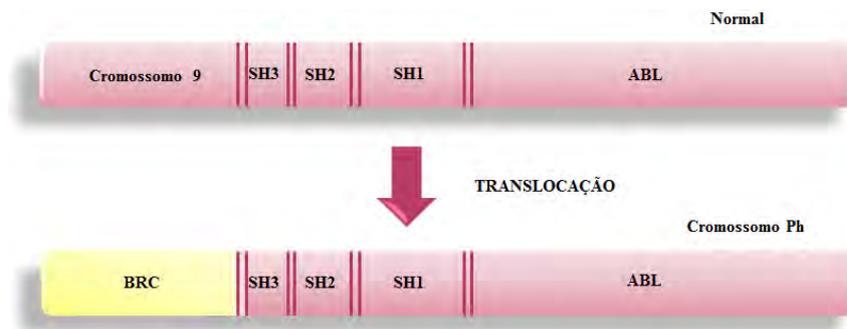


Figura 6. Cromossomo Ph e seus domínios principais. Representação esquemática dos principais domínios presentes na enzima BCR-ABL após a formação do cromosso Ph.

O domínio tirosina quinase, responsável pelo desenvolvimento da LMC, pois controla diversos mecanismos de regulação celular, corresponde ao domínio SH1. Em condições fisiológicas esta quinase é rigorosamente regulada pelo domínio SH3 que a mantém constitutivamente inativa (WONG e WITTE, 2004). No entanto, quando ocorre a fusão dos genes BCR e ABL, o domínio SH3 tem a sua estrutura modificada, resultando na perda da regulação da atividade quinase da enzima BCR-ABL, sendo esta encontrada na sua forma ativa. Este fato culmina em uma atividade tirosina quinase aumentada em relação à proteína transcrita pelo gene ABL isoladamente, que resulta no desenvolvimento e estabelecimento da LMC (FADERL *et al.*, 1999).

A enzima BCR-ABL, como mencionado anteriormente, possui atividade tirosina quinase, ou seja, ela ativa diferentes vias de regulação celular através de transferência de grupamento fosfato advindo de uma molécula de ATP (fosforilação) para diversos substratos que possuem resíduos livres de tirosina. A enzima possui um sítio específico para a ligação do ATP e um sítio para a ligação com o substrato (domínio catalítico) (Figura 7) (DRUKER, 2008).

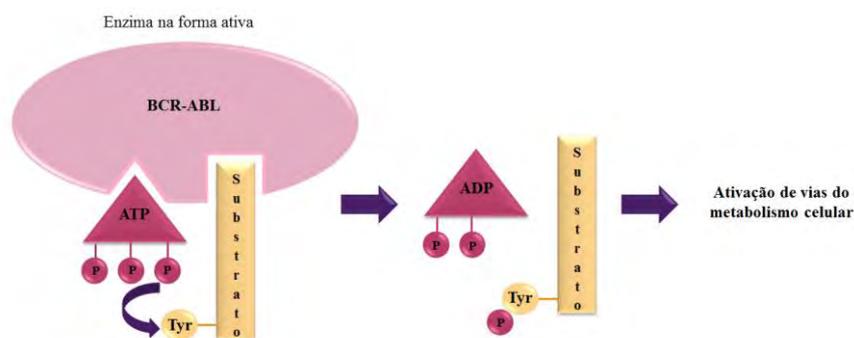


Figura 7. Enzima BCR-ABL e atividade tirosina quinase. Representação da enzima BCR-ABL e transferência de grupo fosfato para resíduo de tirosina (Tyr) livre do substrato.

Uma ampla gama de proteínas envolvidas nos mecanismos de sinalização celular é regulada direta ou indiretamente pela atividade da enzima BCR-ABL através de mecanismo de fosforilação (SATTLER *et al.*, 2002). Entre as vias de sinalização mais afetadas pela atividade desta enzima destacam-se a via RAS (*Rat Sarcoma*), JAK/STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*), MAPK (*Mitogenic activated protein kinase*) e PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) (Figura 8) (KANTARJIAN *et al.*, 2006). Em células hematopoéticas normais estas vias de sinalização são ativadas por sinais extracelulares, incluindo citocinas e fatores de crescimento que regulam a sobrevivência, crescimento e diferenciação destas células. No entanto em células leucêmicas a desregulação destas vias de sinalização traduz-se no aumento da proliferação de formas indiferenciadas das células da linhagem mielóide, na perda da capacidade de adesão destas ao estroma da medula óssea e no aumento da capacidade de sobrevivência celular (STEELMAN *et al.*, 2004; KANTARJIAN *et al.*, 2007).

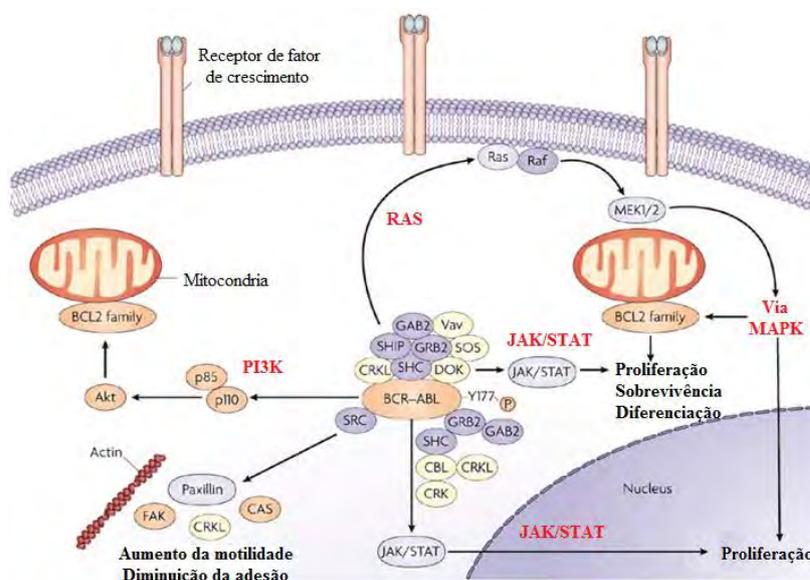


Figura 8. Principais vias metabólicas alteradas pela BCR-ABL. Esquema simplificado das principais vias de transdução de sinal e moléculas sinalizadoras desreguladas pela atividade constitutiva da tirosina quinase BCR-ABL (Adaptado de WEISBERG *et al.*, 2007).

Com base nas características clínicas a LMC pode ser dividida em três fases distintas. A primeira fase, a Fase Crônica (FC), é caracterizada por uma expansão massiva de células diferenciadas da linhagem mielóide e pelo aparecimento de blastos indiferenciados na medula óssea (menos de 10% das células) (KANTARJIAN *et al.*, 2006). A maioria dos casos de LMC (90%) é diagnosticada nesta fase da doença de maneira ocasional, pela verificação do aumento na contagem de leucócitos no sangue, através de hemograma, uma vez que a FC é assintomática ou possui sintomas muito inespecíficos (QUINTAS-CARDAMA e CORTES,

2006). A FC tem duração média de 3 a 5 anos em indivíduos sem tratamento, à qual progride para a Fase Acelerada (FA). Nesta fase ocorre o aumento do número de células indiferenciadas na medula óssea, de 10-30% das células leucêmicas, ocorre o aparecimento de sintomas mais característicos e agressivos, como esplenomegalia e trombocitopenia, e tem duração de 6-9 meses em indivíduos não tratados (FRAZER *et al.*, 2007). Por fim a doença culmina na Crise Blástica (CB), onde o tempo médio de sobrevida é de 2-4 meses e o fenótipo patológico é muito similar ao da LMA. Mais de 30% das células do sangue e da medula óssea são blastos indiferenciados, o que resulta em uma sintomatologia muito agressiva, como aumento da esplenomegalia, trombocitopenia, dificuldades respiratórias e elevada suscetibilidade a infecções (FRAZER *et al.*, 2007).

Cabe ressaltar que as causas da evolução da doença da FC até a CB ainda não são totalmente claras, mas sabe-se que existe uma relação direta entre a atividade da BCR-ABL e o aumento de instabilidade genômica nas células leucêmicas, devido ao *stress* oxidativo e alterações nos mecanismos de reparação do DNA (FERNANDES *et al.*, 2009). Este último pode levar ao acúmulo de mutações em genes críticos envolvidos na proliferação, sobrevivência, e principalmente, diferenciação celular (PERROTI *et al.*, 2010).

1.2.2 Terapêutica

Desde a descoberta da LMC em 1845 pelos patologistas Bennet, Craigie e Virchow (WONG e WITTE, 2004), várias terapias vêm sendo desenvolvidas para o tratamento desta doença (Figura 9).

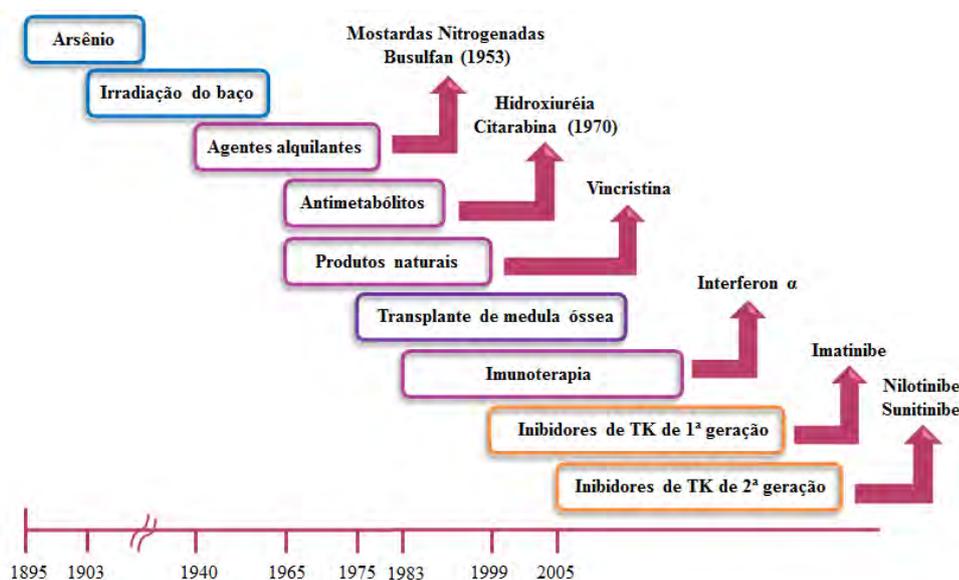


Figura 9. Evolução da terapêutica no combate à LMC. Surgimento dos medicamentos mais utilizados para o tratamento da LMC ao longo dos anos (Adaptado de HEHLMANN *et al.*, 2007).

Algumas substâncias como sais de arsênio e mercúrio já foram utilizadas como um paliativo para o tratamento da LMC quando não se tinha conhecimento sobre a sua toxicidade. Algumas técnicas como irradiação do baço também foram utilizadas de maneira a tentar promover a liberação de citocinas e estimular o sistema imunológico para o combate contra as células leucêmicas. No entanto, as técnicas utilizadas não apresentavam grandes resultados em termos terapêuticos. Pode-se dizer que hoje, a cura da LMC só é alcançada através do transplante de medula óssea (HEHLMANN *et al.*, 2007).

A cura é atingida quando se consegue simultaneamente resposta molecular completa (CMR – *Complete Molecular Response*), ou seja, a ausência de transcritos BCR-ABL, resposta hematológica completa (CHR - *Complete Hematologic Response*), isto é uma normalização da contagem de células no sangue, e resposta citogenética completa (CCR - *Complete Cytogenetic Response*), ou seja, a erradicação das células da medula com o cromossomo Ph. O monitoramento de doentes com LMC permitiu estabelecer uma relação direta entre a resposta citogenética e o aumento da sobrevivência dos mesmos. Deste modo, atingir a resposta citogenética tornou-se o principal alvo nas terapias contra a LMC (KANTARJIAN *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Agentes alquilantes

O primeiro tratamento não só da LMC, mas de vários outros tipos de câncer como linfomas e outros tipos de leucemia, foi o uso de um agente alquilante inspirado no “gás mostarda”. Sua descoberta como agente antineoplásico foi ao acaso. Durante um treinamento militar um grupo de pessoas foi exposto acidentalmente ao gás mostarda (1) e posteriormente descobriu-se que tiveram uma diminuição na contagem de leucócitos do sangue. Durante a década de 1940, muitos pacientes com linfoma avançado receberam este tratamento por via intravenosa, ao invés de inalar o gás. A melhora destes pacientes foi notável, embora temporária por conta dos mecanismos de resistência criados pela doença. Esta experiência levou a pesquisas com outras substâncias que tinham efeito similar contra o câncer. Como resultado foram desenvolvidos diversos outros agentes alquilantes como as mostardas nitrogenadas (2, 3, 4 e 5) (Figura 10) (GILMAN, 1963).

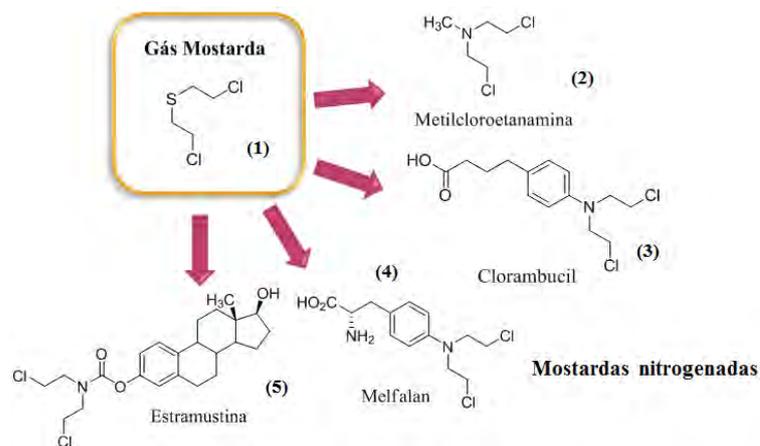


Figura 10. Gás mostarda e mostardas nitrogenadas. Mostardas nitrogenadas criadas a partir da descoberta do gás mostarda para o tratamento de LMC.

Outro agente alquilante que ainda é bastante utilizado como citostático, reduzindo o número de células leucêmicas circulantes, para o tratamento da LMC é o bussulfan (6). Este fármaco é um sulfonato alquílico normalmente utilizado em associação com outra classe de medicamento, os antimetabólitos como a hidroxiuréia (15). A associação dos fármacos busulfan e hidroxiuréia resulta em resposta hematológica completa (CHR) em 50-80% dos doentes, mas não se observa qualquer resposta citogenética, e por este motivo o tratamento com esses dois medicamentos apenas proporcionava alguns benefícios clínicos aos doentes, mas não alterava o percurso natural da doença (PAVLOVSKY *et al.*, 2009).

Existem outros agentes alquilantes que também são utilizados para o tratamento do câncer como os complexos de platina (10 e 11), as etil enaminas (12 e 13), as nitrosuréias (8 e 9), e outros sulfonatos alquílicos (6 e 7) como observado na Figura 11 (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

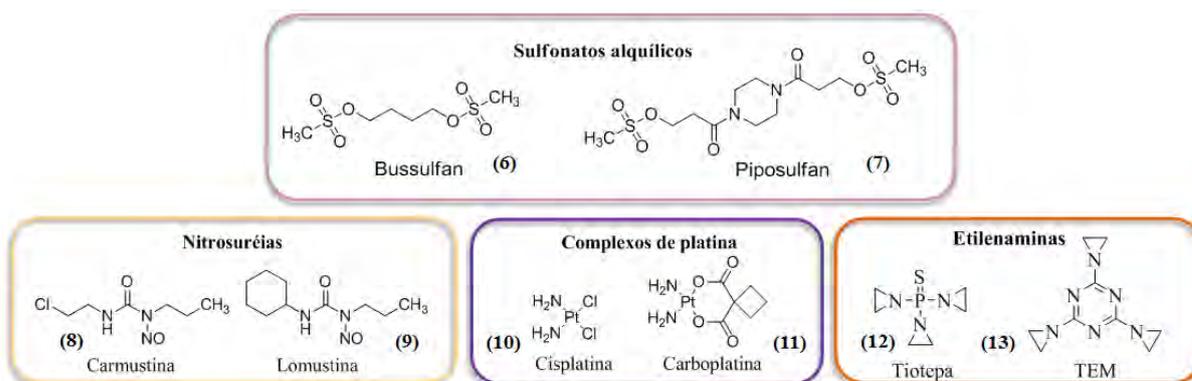


Figura 11. Agentes alquilantes mais comuns. Sulfonatos alquílicos, nitrosuréias, complexos de platina e etilenaminas como os agentes alquilantes mais comuns.

Todos os agentes alquilantes citados anteriormente têm em comum uma característica essencial, a presença de um centro eletrofílico em sua estrutura molecular, fato este que

proporciona a alquilação das bases nitrogenadas presentes na fita de DNA, por isto são chamados de agentes alquilantes. As bases nitrogenadas possuem centros nucleofílicos, como átomos de nitrogênio e oxigênio que são capazes de formar ligação covalente com os centros eletrofílicos dos agentes alquilantes através de reação de substituição nucleofílica (Figura 12B) (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

A fita de DNA pode ser monoalquilada e bisalquilada, pelo fato da maioria dos agentes alquilantes possuírem dois centros eletrofílicos. A bisalquilação pode ser dar entre as duas fitas do DNA (bisalquilação interfita), em dois pontos distintos da mesma fita (bisalquilação intrafita) e alquilação entre uma fita de DNA e uma proteína (Figura 12A). A fita alquilada impede a transcrição de RNA, promove a fragmentação da própria fita por enzimas reparadoras, promove o pareamento incorreto de nucleotídeos, e a bisalquilação impede a separação da fita de DNA para replicação. Deste modo o processo de proliferação celular exacerbada em células neoplásicas é inibido (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

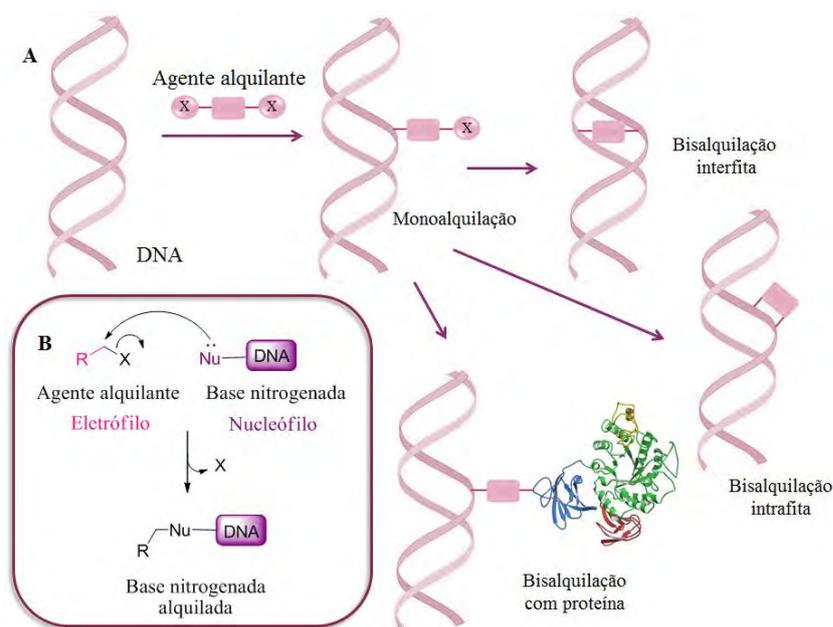


Figura 12. Mecanismo de ação dos agentes alquilantes. Parte A: tipos de alquilação, sendo X o grupo de saída. Parte B: mecanismo de substituição nucleofílica envolvido na alquilação do DNA.

1.2.2.2 Antimetabólitos

Os antimetabólitos podem ser definidos como análogos de moléculas naturais encontradas no organismo que, por esta similaridade estrutural podem interferir nas vias metabólicas reguladas por estas. A maioria interfere com a síntese de ácidos nucleicos e por esta razão atuam dificultando a síntese de DNA e RNA, o que culmina na inibição da proliferação celular. Esta classe atua através de diferentes mecanismos como: competição por

sítios de ligação de enzimas que participam de rotas biossintéticas essenciais e incorporação dos mesmos em ácidos nucleicos, o que os tornaria não funcionais e desencadearia o processo de apoptose celular (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

Um exemplo de fármaco da classe dos antimetabólitos utilizado para o tratamento da LMC é a hidroxiuréia (15) que foi introduzida no mercado em 1964. Assim como o bussulfan (6), a hidroxiuréia é um agente citostático paliativo, utilizado para reduzir o número de células leucêmicas circulantes. Este fármaco atua na inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (RNR), responsável pela síntese de DNA através da conversão de ribonucleotídeo difosfato em desoxiribonucleotídeo difosfato (Figura13) (JIANG *et al.*, 1997).

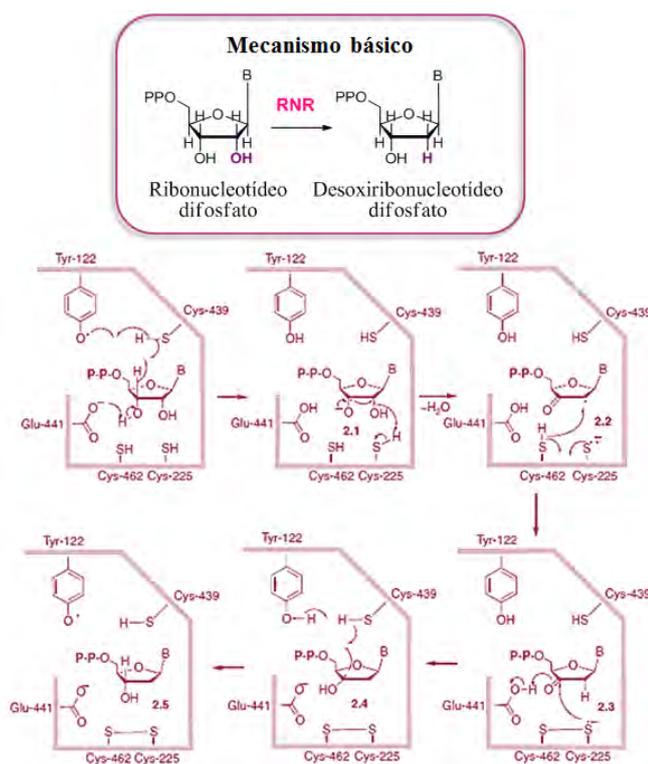


Figura 13. Sítio catalítico da RNR. Conversão de ribonucleotídeo difosfato em desoxiribonucleotídeo difosfato para a síntese de DNA (Adaptado de AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

A presença de um radical estável formado na tirosina 122 é essencial para atividade da enzima RNR como pode ser observado na Figura 13. A hidroxiuréia, assim como seus análogos didox (13) e trimidox (14), atua saciando esse radical através da doação de hidrogênio para o resíduo de tirosina, enquanto se transforma em um radical mais estável (Figura 14). Deste modo, a síntese de DNA é comprometida, assim como os mecanismos de proliferação celular das células leucêmicas (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

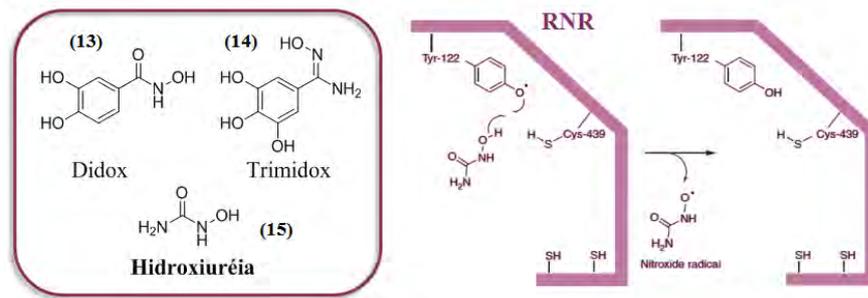


Figura 14. Mecanismo de ação da hidroxiuréia. Inibição da enzima RNR e antimetabólitos análogos à hidroxiuréia (Adaptado de AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

A hidroxiuréia não interfere com o curso natural da doença, não impedindo a evolução para as fases acelerada e crise blástica. Seus principais efeitos colaterais são leves como náuseas, erupções na pele, escurecimento das unhas e diminuição na contagem de células no sangue (CAVALCANTI, 2009).

Outro fármaco da classe dos antimetabólitos muito utilizado para o tratamento da LMC é a citarabina (18), comumente em associação com interferon α , um imunorregulador. Este fármaco e seus análogos (18, 19, 20 e 21) apresentam similaridade estrutural com os nucleosídeos pirimidínicos, citosina (16) e timina (17), presentes na fita de DNA (Figura 15) (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

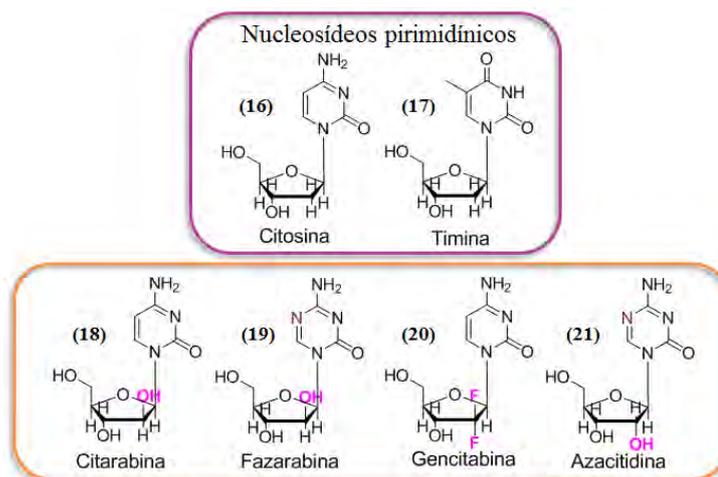


Figura 15. Nucleosídeos pirimidínicos e fármacos antimetabólitos. Citarabina e análogos estruturais semelhantes aos nucleosídeos pirimidínicos.

A citarabina e seus análogos por apresentarem semelhança estrutural aos nucleosídeos pirimidínicos são incorporados na fita de DNA, durante a sua síntese, após serem ativados aos correspondentes trifosfatos. O mecanismo descrito leva à inibição do alongamento da fita de DNA, desta maneira o ciclo celular é interrompido durante a fase S, onde o DNA deve ser replicado (Figura16) (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

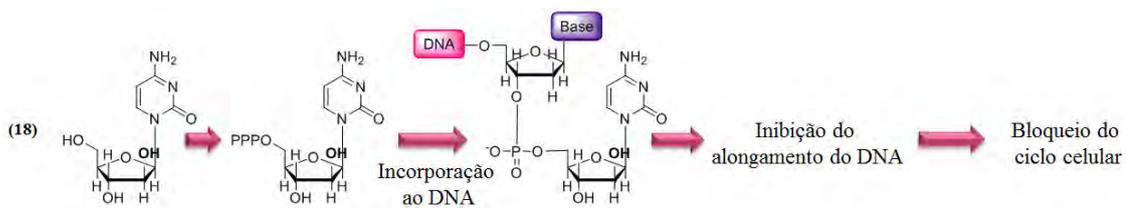


Figura 16. Mecanismo de ação da citarabina. Incorporação na fita de DNA e inibição do ciclo celular em células leucêmicas (Adaptado de AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

1.2.2.3 Produtos naturais

Os alcalóides da vinca foram descobertos no final da década de 50 com reconhecida propriedade antineoplásica. Estes são produtos naturais extraídos da *Catharanthus roseus* (L.), popularmente conhecida como vinca (JOHNSON *et al.*, 1963). A vimblastina e a vincristina foram os primeiros alcalóides descobertos e aprovados pelo FDA para a utilização no tratamento do câncer, em 1963 e 1965, respectivamente (ISHIKAWA *et al.*, 2009).

Dentre os produtos naturais antineoplásicos, a vincristina (22) é um dos poucos fármacos utilizados para o tratamento de leucemias. Este alcalóide atua na inibição da polimerização dos microtúbulos, através da ligação com a β -tubulina. Como os microtúbulos são essenciais para o processo de mitose, a inibição da formação dos mesmos pode impedir a divisão celular (Figura 17). Desta maneira as células leucêmicas não conseguem se proliferar e sofrem processo de apoptose celular (JORDAN e WILSON, 2004).

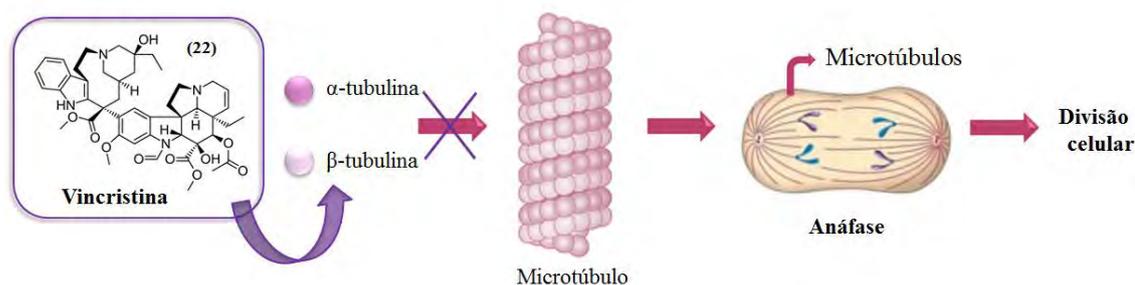


Figura 17. Mecanismo de ação da vincristina. Inibição da polimerização dos microtúbulos e consequente inibição da divisão celular.

1.2.2.4 Imunoterapia

A imunoterapia é uma técnica terapêutica utilizada para o tratamento de diversas doenças. Esta técnica visa estimular o sistema imunológico por meio de substâncias modificadoras da resposta biológica para o combate aos agentes causadores de doenças (FUNKE *et al.*, 2008). Esta terapia pode ser realizada de forma passiva, com a utilização de anticorpos ou células exógenas, que proporcionam resposta imunológica no combate à

doença, ou de forma ativa com a utilização de moléculas estimulantes e restauradoras da função imunológica (BERGANTINI *et al.*, 2005).

O interferon α é uma glicoproteína largamente utilizada como imunorreguladora em indivíduos com LMC. Foi o primeiro agente terapêutico a induzir resposta citogenética em grande parte dos doentes e a promover o aumento da sobrevida dos mesmos submetidos a este tratamento. No entanto, um elevado percentual de doentes é intolerante ao tratamento com este fármaco devido aos seus elevados níveis de toxicidade (KANTARJIAN *et al.*, 2003). Alguns efeitos adversos são comuns como diarreia, alopecia branda, erupções cutâneas, elevação de enzimas hepáticas, vômito e náuseas (LEE, 1998).

1.2.2.5 Inibidores de tirosina quinase de 1ª geração

Com o aprimoramento das técnicas e melhor compreensão molecular e genética dos sinais reguladores das atividades celulares houve, então, uma nova perspectiva de tratamento, baseada no reparo de defeitos moleculares em células tumorais, dando início à “terapia direcionada”, com os chamados “fármacos inteligentes” que visam diminuir os efeitos tóxicos do tratamento convencional (CALABRESI *et al.*, 1995).

Um marco na terapia direcionada foi o desenvolvimento do fármaco mesilato de imatinibe (IM), um inibidor específico da enzima tirosina quinase BCR-ABL, o agente responsável pelo desenvolvimento da LMC, como visto anteriormente. Esta abordagem terapêutica permitiu a eliminação seletiva das células neoplásicas, uma vez que esta enzima está presente em células leucêmicas e ausente em células normais (DRUKER *et al.*, 1996).

A base do mecanismo de ação do IM (23) se dá por conta da afinidade deste com o sítio de ligação do ATP na enzima BCR-ABL. Ao ligar-se a este sítio, o IM inibe a ativação da enzima e impede a interação desta com a molécula de ATP para o processo de fosforilação de diversos substratos. Desta maneira as vias metabólicas que antes eram ativadas pela BCR-ABL não são mais ativadas por este mecanismo, somente sendo reguladas de forma natural (Figura 18) (SCHINDLER *et al.*, 2000; DRUKER, 2008).

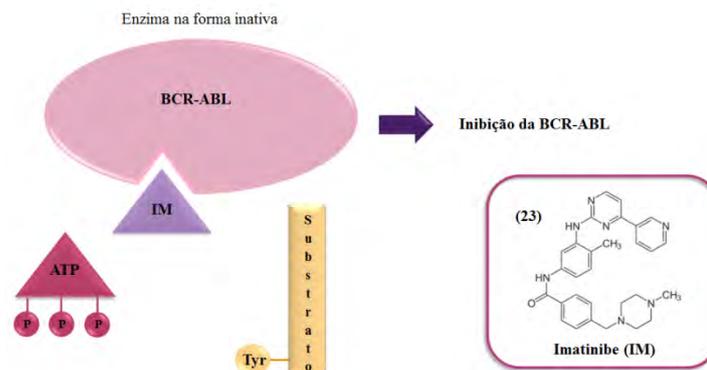


Figura 18. Mecanismo de ação do imatinibe. Inibição da enzima BCR-ABL pela interação com imatinibe no sítio de ligação com o ATP.

A interação do IM com o sítio de ligação de ATP da enzima BCR-ABL ocorre pois tanto o fármaco em questão quanto a própria molécula de ATP (24) possuem um grupamento essencial para esta interação, a sub-unidade amino-pirimidina (Figura 19A). A formação de ligação hidrogênio desta com um resíduo de treonina (Thr) 315 é essencial para a interação entre estes ligantes e a enzima alvo (Figura 19B) (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

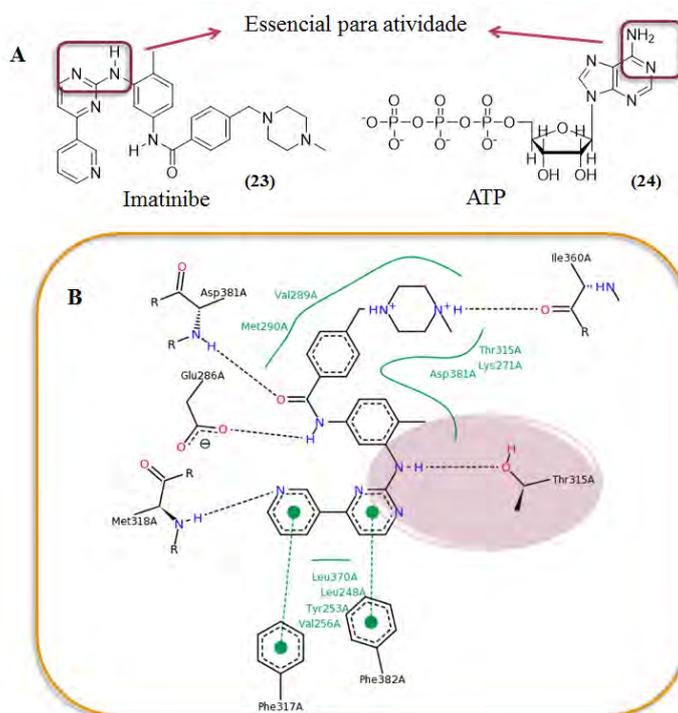


Figura 19. Interações do IM com BCR-ABL. Parte A: Grupamento essencial para atividade sobre a enzima BCR-ABL para o IM e ATP. Parte B: Principais interações entre IM e aminoácidos presentes no sítio de ligação com ATP, destacando a interação do tipo ligação hidrogênio entre o ligante e resíduo de treonina na posição 315 (Adaptado de PDB 3K5V).

Este fármaco foi desenvolvido a partir de um “screening” em um banco de dados de moléculas com atividade inibitória de proteína quinase C (PKC). Uma fenilaminopirimidina (25) apresentou características interessantes de inibição desta enzima e foi escolhida para ser

otimizada (Figura 20) (TEAGUE *et al.*, 1999). Após a introdução de um grupamento 3'-piridil na posição 3' no anel pirimidínico, para a obtenção da fenilaminopirimidina substituída (26), observou-se o aumento da potência para a inibição da PKC (Figura 20). Adicionalmente, a introdução de uma função amida no anel fenílico aumentava a atividade sobre a PKC e fornecia atividade sobre a enzima alvo para a molécula 27 (Figura 20). Através de análises de relação estrutura-atividade (SAR) observou-se que a introdução de um grupo na posição 6 do anel diaminofenil abolia a atividade sobre a PKC. Deste modo propôs-se a introdução de uma metila na posição 6 deste anel para a obtenção da molécula 28, que através da restrição conformacional da estrutura, promoveu o aumento da seletividade sobre a enzima BCR-ABL e a abolição da atividade sobre a PKC (Figura 20) (KÜMMERLE *et al.*, 2011). No entanto, a primeira série de inibidores seletivos apresentou baixa biodisponibilidade oral e baixa solubilidade em água. A introdução de uma *N*-metilpiperazina foi a solução encontrada para resolver estes problemas de solubilidade. O melhor derivado a partir desta série foi um derivado metilpiperazina que foi originalmente chamado de STI571, hoje conhecido como imatinibe (23) (Figura 20) (ZIMMERMANN *et al.*, 1996; ZIMMERMANN *et al.*, 1997).

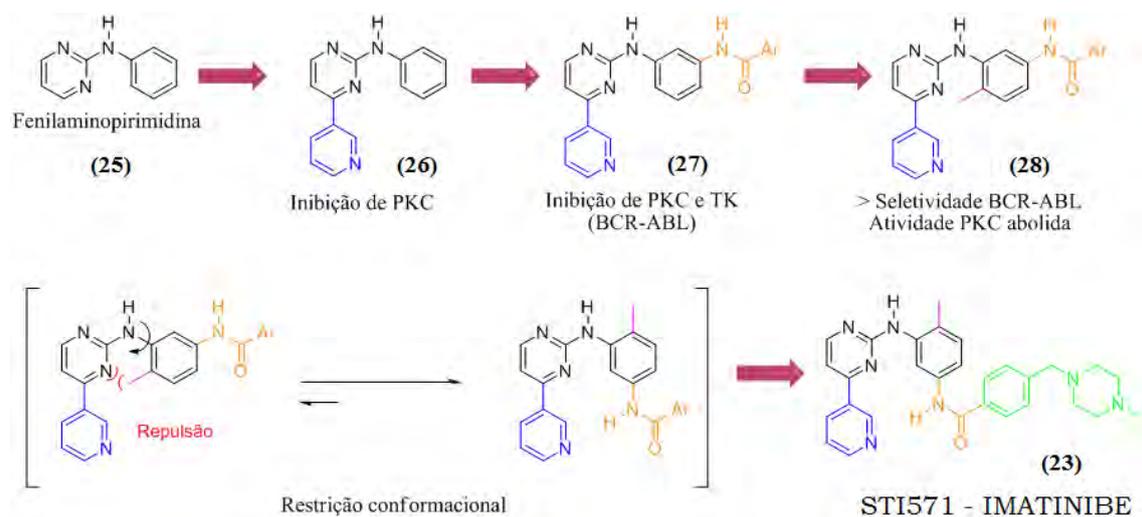


Figura 20. Desenvolvimento e otimização do inibidor de tirosina quinase IM. Otimização da fenilaminopirimidina A até obtenção da estrutura STI571, mais conhecida como imatinibe (Adaptado de CAPDEVILE *et al.*, 2002).

A atividade antiproliferativa do IM foi inicialmente testada em linhagens celulares com a expressão da proteína BCR-ABL e em modelos animais transplantados com células hematopoéticas leucêmicas. Os resultados obtidos com ambos os modelos indicaram uma elevada eficácia do fármaco (DEININGER *et al.*, 2005). Observou-se também que o tratamento com IM não só inibia a proliferação celular como em alguns casos levava também à morte celular por apoptose (OETZEL *et al.*, 2000).

O acompanhamento farmacoterapêutico de pacientes após o tratamento com este fármaco durante 6 anos mostrou que cerca de 80% dos doentes apresentou resposta citogenética completa (CCR) e a taxa de doentes livres da progressão da doença para a fase aguda ou crise blástica foi de cerca de 90% (HOCHHAUS *et al.*, 2009). Com base na eficácia terapêutica do IM demonstrada nos resultados obtidos durante as fases clínicas de estudos o fármaco não só foi introduzido na prática clínica como também foi estabelecido como a primeira linha de tratamento da LMC (HOCHHAUS *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados promissores obtidos com a utilização do IM como terapia de escolha para o tratamento da LMC, casos de resistência ao fármaco ocorrem em uma pequena parcela dos pacientes tratados. Fato este originado de mutações pontuais na enzima BCR-ABL que culminam na diminuição da afinidade entre o fármaco e o sítio de ligação com a enzima. Casos de intolerância ao fármaco também são relatados assim como casos em que indivíduos não respondem ao tratamento. Estes fatos levaram à pesquisa por novas moléculas capazes de inibir as enzimas BCR-ABL resistentes ao IM, assim como a pesquisa de novos alvos terapêuticos para o tratamento da LMC (DRUKER *et al.*, 2006).

1.2.2.6 Inibidores de tirosina quinase de 2ª geração

Na tentativa de desenvolver fármacos que fossem ativos sobre as formas mutantes da enzima BCR-ABL resistentes ao tratamento com imatinibe (23), surgiram os inibidores de tirosina quinase de 2ª geração. Como exemplo desta classe há o nilotinibe e o sunitinibe, dentre vários outros “tinibes” existentes no mercado inspirados na atividade tirosina quinase do imatinibe (WEISBERG *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do nilotinibe (29) como derivado de uma fenilaminopirimidina, assim como o IM, seguiu a concepção de terapia direcionada com base nas estruturas cristalográficas de complexos de inibidores de tirosina quinase com a enzima BCR-ABL. Este fármaco é muito mais potente que o protótipo, IM ($IC_{50} = 250nM$), com IC_{50} de 30nM sobre a enzima alvo (MANLEY *et al.*, 2005) (Figura 21). O aumento da potência deve-se, dentre vários outros fatores, à maior permeabilidade deste nas células, atingindo concentrações intracelulares mais elevadas que o imatinibe (VERSTOVSEK *et al.*, 2006).

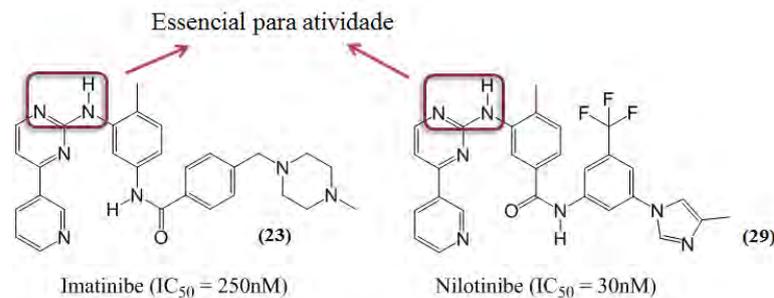


Figura 21. Nilotinibe e Imatinibe. Diferenças e semelhanças estruturais e atividade inibitória sobre a enzima BCR-ABL.

Com relação ao tratamento das leucemias resistentes ao imatinibe, o nilotinibe foi capaz de inibir 32 das 33 formas mutantes testadas de BCR-ABL resistentes em concentrações fisiológicas relevantes. Somente a mutação denominada T315I, ou seja, vinda da troca de um aminoácido treonina na posição 315 por uma isoleucina, não foi inibida pelo nilotinibe, da mesma maneira como ocorre com inibidores de tirosina quinase de 1ª geração, pois este resíduo é de extrema importância para a interação entre o fármaco e a enzima (Figura 22) (O'HARE *et al.*, 2005; WEISBREG *et al.*, 2006).

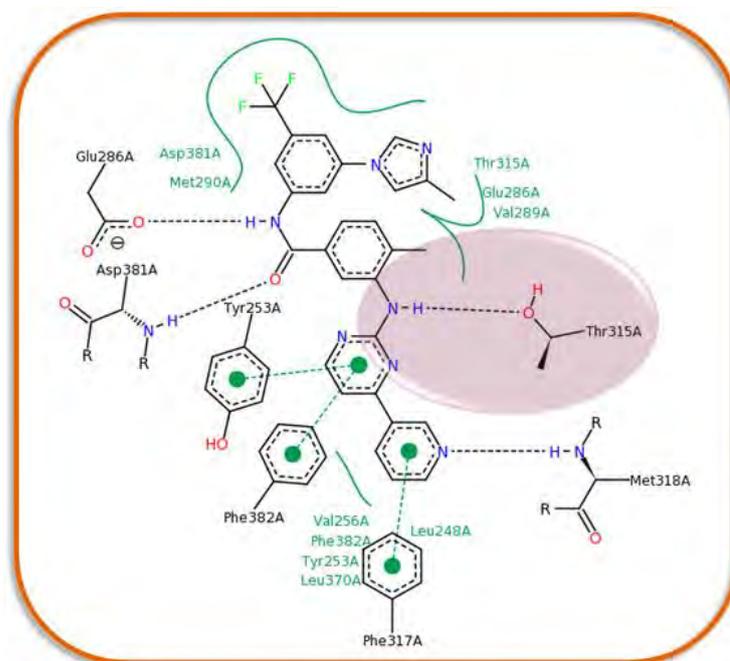


Figura 22. Principais interações entre nilotinibe e BCR-ABL. Principais interações entre nilotinibe e o sítio de ligação com ATP da enzima BCR-ABL, destacando a interação do tipo ligação hidrogênio entre o ligante e resíduo de treonina na posição 315 (Adaptado de PDB 3CS9).

As Figuras 19 e 22 mostram que as interações mais importantes entre resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação com o ATP da enzima alvo e os fármacos ligantes, imatinibe e nilotinibe, são muito similares. No entanto, pela Figura 23 pode-se concluir que o nilotinibe, por possuir uma subunidade mais apolar ligada à amida aromática, preenche uma

cavidade lipofílica presente no sítio de ligação resultando em maior flexibilidade à superfície da cavidade enzimática. Por conta desta flexibilidade o fármaco em questão fica menos suscetível à mutações pontuais geradas no sítio de ligação com ATP (SWORDS *et al.*, 2009).

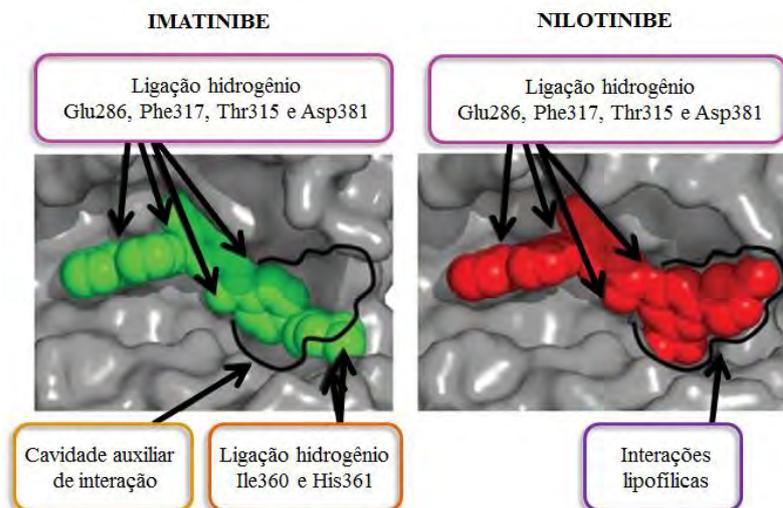


Figura 23. Interações entre imatinibe e nilotinibe com sítio BCR-ABL. Interações lipofílicas entre nilotinibe e a cavidade de ligação da BCR-ABL garantindo maior flexibilidade à enzima (Adaptado de SWORDS *et al.*, 2009).

Existem outros fármacos em desenvolvimento para a inibição das BCR-ABLs resistentes ao tratamento com o imatinibe, como por exemplo o sunitinibe que apresenta atividade sobre a forma mutante T315I. Este fármaco foi aprovado em 2006 pelo FDA para o tratamento de carcinoma de células renais (RCC) e de tumores gastrointestinais (GIST), mas vem sendo estudado para a utilização em casos de LMC pela sua atividade inibitória sobre a tirosina quinase (FAIVRE *et al.*, 2007).

Devido à pressão seletiva das terapias tóxicas, da diversidade genética existente na maioria dos tumores humanos, há uma grande probabilidade dos tumores apresentarem mecanismos de resistência às quimioterapias convencionais. Desta maneira, é de extrema importância a pesquisa de novos fármacos, assim como a descoberta de novos alvos terapêuticos. Para o tratamento da LMC a descoberta de novos alvos como as deubiquitinas e via JAK/STAT vem oferecendo bons resultados para a terapêutica (PENG *et al.*, 2011).

1.3 Deubiquitinas

Durante os últimos 10 anos, o processo de conjugação da ubiquitina às proteínas intracelulares surgiu como um importante mecanismo para a regulação de numerosos processos celulares. Estes incluem a progressão do ciclo celular e transdução de sinal, o transporte de substâncias através da membrana plasmática, o controle de qualidade de

proteínas através da degradação daquelas que não são mais úteis, a regulação da transcrição e controle de crescimento celular (PICKART, 2001; WEISSMAN, 2001). A desregulação dos componentes desta elaborada rede leva ao desenvolvimento de doenças no organismo humano, como o câncer. (HOELLER e DIKIC, 2009).

As deubiquitinases (DUBs) são enzimas que possuem papel importante na regulação do sistema ubiquitina-proteínas intracelulares. Estas enzimas são cisteíno proteases, ou seja, atuam na clivagem de ligações peptídicas através de um resíduo de cisteína presente no sítio catalítico desta enzima. Atuam mais especificamente na clivagem da ligação entre a ubiquitina e seu substrato após os processos de regulação celular, deixando a ubiquitina livre para desempenhar outros papéis de importância na célula. Este processo é chamado de deubiquitinação (Figura 24) (NICHOLSON *et al.*, 2007).

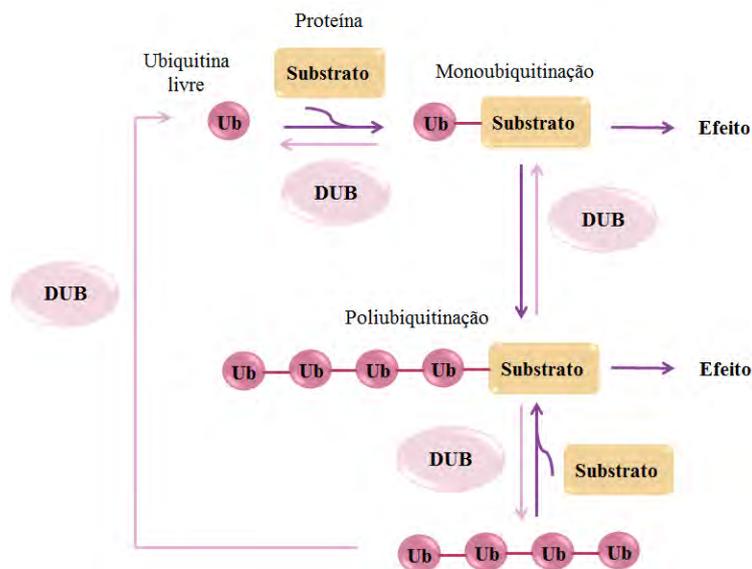


Figura 24. Função das deubiquitinases. A ubiquitina se liga ao seu substrato para exercer controle sobre diversas vias metabólicas através de mono ou poliubiquitinação. As DBUs atuam na recuperação da ubiquitina livre no meio celular (Adaptado de AMERIK e HOCHSTRASSER, 2004).

O genoma humano codifica aproximadamente cerca de 100 DUBs, embora muitas delas ainda permaneçam com suas funções desconhecidas. Baseado na estrutura de seus domínios, as enzimas deubiquitinases foram divididas em cinco famílias: as ubiquitina carbóxi-terminal hidrolases (UCHs), ubiquitina proteases-específicas (USPs), proteases relacionadas com o tumor ovariano (OTUs), proteases com domínio proteico da doença de Machado-Joseph (MJDs), todas estas sendo cisteíno proteases, e as metaloenzimas contendo o domínio JAB1/PAB1/MPN (JAMMs) (NIJMAN *et al.*, 2005).

As famílias de DUBs pertencentes às cisteíno proteases possuem três resíduos de aminoácidos cruciais no seu sítio catalítico: cisteína (Cys), histidina (His) e aspartato (Asp),

constituindo uma tríade catalítica. Nestas enzimas a proximidade com as cadeias laterais da histidina diminui o pKa da cisteína catalítica, permitindo o ataque nucleofílico na ligação peptídica que une ubiquitina e substrato. O terceiro resíduo, o aspartato, alinha-se e polariza a histidina catalítica de forma a auxiliar no processo de transferência de próton e eliminação do substrato. Após este processo ocorre a hidrólise da ligação entre cisteína e ubiquitina, liberando a ubiquitina livre no meio e restituindo a tríade catalítica (Figura 25) (KOMANDER; BARFORD, 2008).

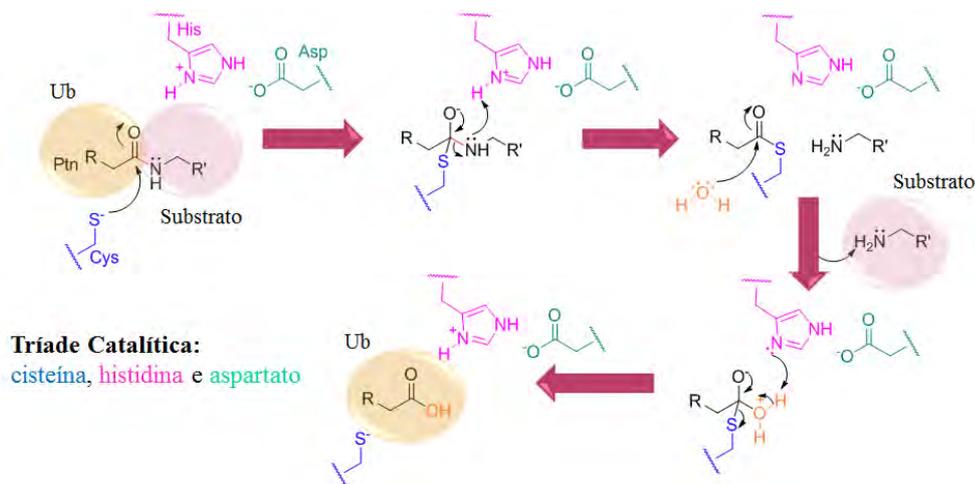


Figura 25. Tríade catalítica e deubiquitinação. Quebra da ligação peptídica entre ubiquitina e substrato.

As DUBs encontram-se hoje como possíveis alvos para o tratamento do câncer, pois controlam de maneira indireta diversos processos como transcrição do DNA e controle do ciclo celular, processos importantes e exacerbados em células tumorais. Desta maneira, através da inibição destas enzimas todos os processos envolvidos com a proliferação celular são comprometidos (KOMANDER *et al.*, 2009).

Inibidores de DUBs têm sido desenvolvidos para o tratamento do câncer como o WP1130 (30), derivado da série de tirfostinas descrito na literatura como inibidor da enzima USP9X, uma cisteína protease. Esta inibição ocorre através da formação de ligação covalente entre o resíduo de cisteína presente no sítio catalítico da cisteína protease e o carbono insaturado β à carbonila, caracterizando uma adição de Michael (PENG *et al.*, 2011; KAPURIA *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2011).

Segundo Sun e colaboradores este composto foi testado em células leucêmicas de LMC não resistentes e resistentes ao tratamento com imatinibe e foi comprovado que a utilização do inibidor de DUB promoveu a inativação da enzima BCR-ABL, pois a mesma se liga à ubiquitina e não consegue quebrar a ligação peptídica gerada através desta conjugação,

permanecendo conjugada à esta proteína. Desta maneira, todas as vias metabólicas que antes eram controladas pela enzima BCR-ABL em células leucêmicas, são normalizadas e a formação de agregados desta enzima com a ubiquitina promove a ativação de mecanismos celulares de apoptose (Figura 26) (SUN *et al.*, 2011).

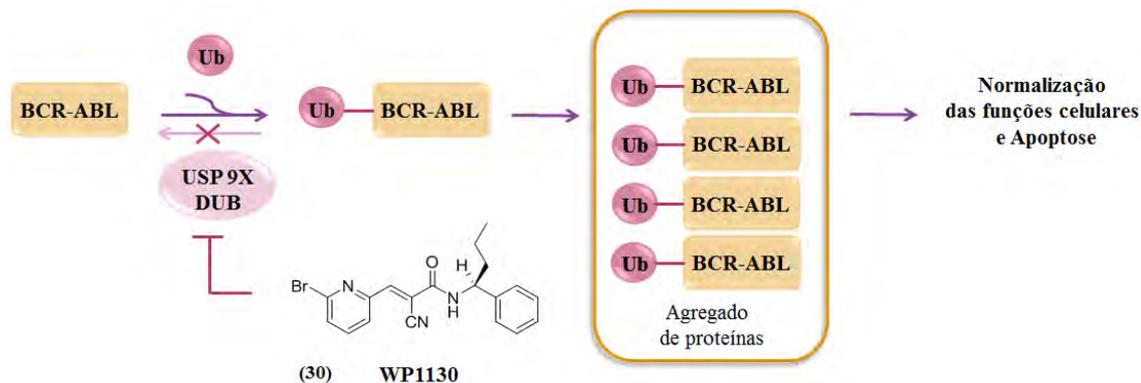


Figura 26. Mecanismo de ação do composto WP1130. Inibição da USP9X promove o acúmulo de BCR-ABL inativa e consequente ativação de mecanismos de apoptose celular (Adaptado de SUN *et al.*, 2011).

1.4 JAK/STAT

As respostas celulares para dezenas de citocinas e fatores de crescimento são mediadas pela via de sinalização JAK/STAT. Estas respostas incluem a proliferação, diferenciação, migração, apoptose e sobrevivência celular, de acordo com o sinal e o tecido em questão. Esta via é essencial para inúmeros processos de desenvolvimento e manutenção da homeostase celular, incluindo a hematopoese e desenvolvimento de células do sistema imune (GHORESCHI *et al.*, 2009).

As Janus quinases (JAKs) pertencem a classe de enzimas com função tirosina quinase que contêm tanto um domínio catalítico quanto um segundo domínio quinase, que tem função auto reguladora, portanto a comparação com o deus romano de duas faces *Jano* (em latim *Janus*) (DARNELL *et al.*, 1994). Existem cerca de quatro isoformas da enzima JAK e sete da STAT conhecidas atualmente em mamíferos. Estas isoformas estão presentes em diferentes tecidos e são ativadas por diferentes receptores de membrana (SCHINDLER e PLUMLEE, 2008).

A ativação desta via ocorre através da interação de ligantes extracelulares, como citocinas e fatores de crescimento, com seus respectivos receptores de membrana. Estes sofrem modificações estruturais que, no meio intracelular, permitem a fosforilação das JAKs associadas a estes receptores de membrana. Após a auto fosforilação, a JAK atua promovendo a fosforilação e ativação da STAT que forma dímeros, ou oligômeros mais complexos, e entra

no núcleo para regular a transcrição de diversos fatores celulares (Figura 27) (HARRISON, 2012).

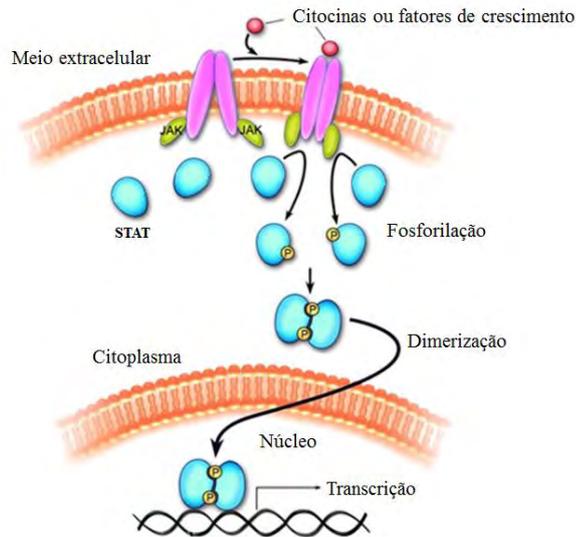


Figura 27. Esquema simplificado da via JAK/STAT. Ativação da via por ligantes externos e transcrição de diversos fatores para o controle da homeostase celular (Adaptado de HARRISON, 2012).

Cabe ressaltar que a via JAK/STAT é uma das vias metabólicas ativadas pela BCR-ABL em quadros de LMC. Sabe-se que as proteínas da família STAT estão envolvidas na suspensão da maturação celular e, principalmente, na inibição da apoptose (COFFER *et al*, 2000). A STAT5 é substrato direto da BCR-ABL e a ativação do mesmo resulta na super expressão do gene anti-apoptótico BCL-XL, contribuindo para o desenvolvimento do quadro de LMC (HORITA *et al.*, 2000).

Visto que a via JAK/STAT possui papel importante na regulação das vias metabólicas celulares como proliferação, regulação do ciclo celular e transcrição de fatores anti-apoptóticos, pode-se dizer que esta é um alvo interessante para o tratamento do câncer através de sua inibição (HARRISON, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é sintetizar e caracterizar, através de técnicas espectroscópicas, três séries de imidazolonas, planejadas como inibidores de enzimas deubiquitinases (DUBs), e avaliar a atividade antitumoral destes compostos frente a linhagens de células de leucemia mielóide crônica.

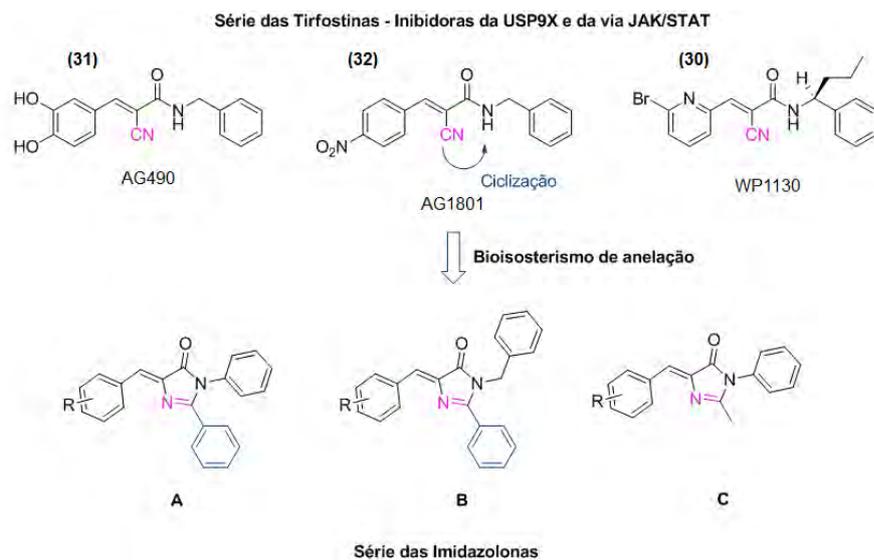
2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e purificar as três séries das imidazolonas planejadas: série A, B e C;
- Caracterizar por métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C) e espectrometria de massas os produtos sintetizados;
- Avaliar a atividade antitumoral dos compostos sintetizados sobre duas diferentes linhagens de células de leucemia mielóide crônica: a K562 e a Lucena-1;
- Realizar estudos de SAR para determinar atributos essenciais para a atividade antitumoral das séries das imidazolonas planejadas.

2.3 Planejamento Estrutural

Este trabalho tem como objetivo geral a síntese de compostos do tipo imidazolonas planejados como inibidores de enzimas deubiquitinases (DUBs). Compostos inibidores destas enzimas têm como característica suas ações antitumorais e têm como representantes descritos na literatura a série das tirfostinas (Esquema 1). Diversos grupos têm pesquisado novos inibidores desta enzima buscando cada vez mais seletividade e, conseqüentemente, menores efeitos colaterais.

Desta forma, a partir das tirfostinas descritas na literatura capazes de inibir a ação das deubiquitinases e conseqüentemente promover o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas e apoptose da célula tumoral (PENG *et al.*, 2011), planejamos os compostos alvo deste trabalho através da técnica de bioisosterismo não-clássico de anelação (Esquema 1). Através desta ciclização, pode-se visualizar as imidazolonas como análogas dos compostos protótipos, antecipando uma possível atividade antitumoral, descrevendo-se então como um possível novo agente contra o câncer.



Onde **R** = H- (a); 4-Cl-(b); 4-CH₃O- (c); 3,4-(CH₃O)₂ (d); 3,4-($\text{-OCH}_2\text{O-}$) (e); 3,4,5-(CH₃O)₃ (f); 4-OH- (g); 4-NO₂ (h); 3-Br- (i); 4-Br- (j)

Esquema 1. Planejamento estrutural da série de imidazolonas A, B e C.

Como característica estrutural das tirfostinas inibidoras das deubiquitinasas, pode-se destacar a presença do grupo α,β insaturado, que é essencial para a atividade desta série funcionando como um aceptor de Michael para a formação de ligação covalente entre o ligante e a enzima alvo. Esta característica foi mantida nas séries de imidazolonas **A**, **B** e **C**. Os substituintes em R₁, no anel aromático ligado ao benzilideno, foram escolhidos de modo a se variar as propriedades físico-químicas dos compostos e também a modular a reatividade sobre a dupla ligação. Foram escolhidos grupos doadores e aceptores de ligação hidrogênio, polares, apolares, hidrofílicos, lipofílicos e doadores e retiradores de elétrons. Ligado diretamente ao nitrogênio amídico, foi planejado o uso de um anel fenila e de seu homólogo superior, uma benzila, visando estudar o efeito de uma maior e menor liberdade conformacional relacionada a esta posição da molécula frente às interações hidrofóbicas. Finalmente, ligada à sub-unidade amidínica da imidazolona foram planejadas a presença de um grupo mais volumoso (fenila) e um menos volumoso (metila) com o intuito de se verificar a influência destes grupos para a atividade, uma vez que esta parte da molécula não está presente nos protótipos originais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Metodologia Sintética

Para a cromatografia em camada fina analítica (CCFA) foram utilizadas 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).

Nas cromatografias de adsorção em coluna, utilizou-se gel de sílica 70-230 *mesh* (Merck) como fase estacionária e *n*-hexano e acetato de etila como fase móvel.

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 foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN ¹³C foram obtidos à 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl₃ e DMSO contendo TMS como referência interna.

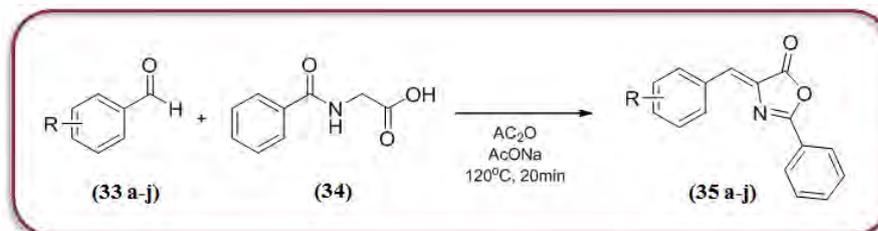
As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: *s*-simpleto / *d*-dupleto / *t*-tripleto / *q*-quadrupeto / *m*-multipeto / *dd*-duplo dupeto/ *sl* – simpleto largo.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrofotômetro Bruker 1600 FT (ICE-UFRRJ), utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Os espectros de massas (EM) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu (modelo CGMS-QP2010 Plus) acoplado a um cromatógrafo à gás (CG) (ICE-UFRRJ), utilizando acetona como solvente das amostras.

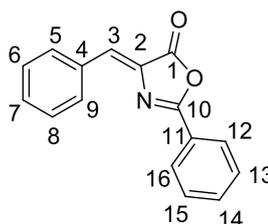
3.1.1 Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção das séries A e B (35a-j)

(ERLENMEYER, 1893; PLÖCHL, 1893; CLEARY *et al.*, 2010)



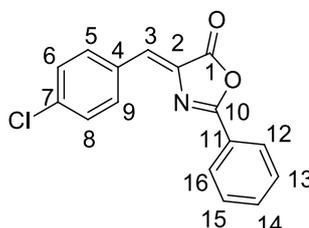
Em um tubo de ensaio foi adicionado 1mmol de ácido hipúrico (34), 1mmol de benzaldeído (33 a-j), 0,2mmol de acetato de sódio anidro e 2mL de anidrido acético. Aqueceu-se a reação em tubo selado em placa de aquecimento e agitação por 20 minutos à 120°C . Após aquecimento, resfriou-se a reação em banho de gelo. O produto formado (35 a-j) foi filtrado a vácuo com auxílio de funil de buchner e kitassato e, posteriormente, lavado com solução de água e etanol 2:1. Deixou-se o mesmo secar à temperatura ambiente.

(Z)-4-benzilideno-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35a)



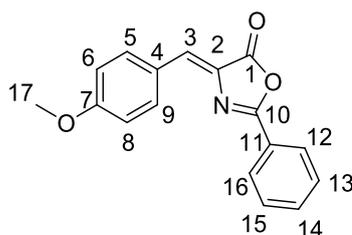
O composto **35a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 65% de rendimento. Ponto de fusão de 168°C . **RMN ^1H (500MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm):** $\text{H}_3=7,26$ (s, 1H); $\text{H}_6, 7$ e $8 = 7,45-7,52$ (m, 3H); H_{13} e $15 = 7,54$ (t, 2H); $\text{H}_{14} = 7,63$ (t, 1H); H_{12} e $16 = 8,20$ (d, 2H); H_5 e $9 = 8,22$ (d, 2H). **RMN ^{13}C (125MHz) CDCl_3 / TMS (δ -ppm):** $\text{C}_{11} = 125,53$; C_{12} e $16 = 128,34$; C_{13} e $15 = 128,88$; C_6 e $8 = 128,91$; $\text{C}_7 = 131,18$; $\text{C}_{14} = 131,77$; C_5 e $9 = 132,44$; $\text{C}_2 = 133,22$; $\text{C}_3 = 133,33$; $\text{C}_4 = 133,47$; $\text{C}_{10} = 163,51$; $\text{C}_1=167,63$. **I.V. Max. (KBr) $\gamma - \text{cm}^{-1}$:** 3062 (C-H); 1793 (C=O); 1651 (C=C); 1593 (C=C); 1448 (C=C); 1161 (C-N); 769 (C-H); 690 (C-H).

(Z)-4-(4-clorobenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35b)



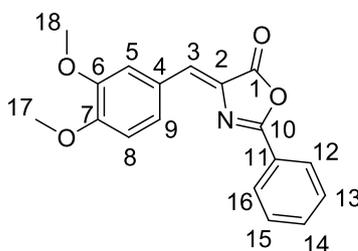
O composto **35b** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 69% de rendimento. Ponto de fusão de 198°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₃= 7,18 (s, 1H); H₆ e H₈ = 7,39-7,50 (m, 2H); H₁₃ e H₁₅ = 7,55 (m, 2H); H₁₄ = 7,63 (m, 1H); H₅, H₉, H₁₂ e H₁₆ = 8,08 – 8,25 (m, 4H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 125,37; C₁₂ e C₁₆ = 128,42; C₁₃ e C₁₅ = 128,97; C₆ e C₈ = 129,20; C₁₄ = 130,00; C₂ = 131,96; C₅ e C₉ = 133,49; C₃ = 133,53; C₄ = 133,57; C₇ = 137,24; C₁₀ = 163,84; C₁ = 167,35. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1795 (C=O); 1652 (C=C); 1589 (C=C); 1450 (C=C); 1161 (C-N); 694 (C-Cl).

(Z)-4-(4-metoxibenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35c)



O composto **35c** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 52% de rendimento. Ponto de fusão de 188°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇=3,89 (s, 3H); H₆ e H₈ = 7,00 (d, 2H); H₃ = 7,22 (s, 1H); H₁₃ e H₁₅ = 7,53 (t, 2H); H₁₄=7,60 (t, 1H); H₁₂ e H₁₆ = 8,17 (d, 2H); H₅ e H₉ = 8,20 (d, 2H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 55,42; C₆ e C₈ = 114,48; C₁₁ = 125,79; C₄ = 126,52; C₁₂ e C₁₆ = 128,10; C₁₃ e C₁₅ = 128,85; C₂ = 131,05; C₁₄ = 131,87; C₃ = 132,94; C₅ e C₉ = 134,55; C₇= 162,14; C₁₀ = 162,40; C₁ = 167,96. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1787 (C=O); 1651 (C=C); 1600 (C=C); 1450 (C=C); 1265 (C-O-C); 1161 (C-N).

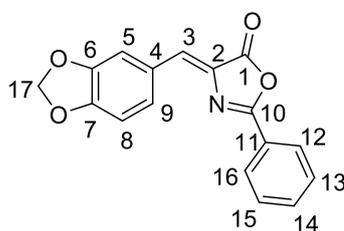
(Z)-4-(3,4-dimetoxibenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35d)



O composto **35d** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 55% de rendimento. Ponto de fusão de 175°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₇= 3,96 (s, 3H); H₁₈ = 4,03 (s, 3H); H₈ = 6,94 (d, 1H); H₃ = 7,19 (s, 1H); H₁₃ e H₁₅ = 7,52 (t, 2H); H₉ = 7,56 (dd, 1H); H₁₄ = 7,60 (t, 1H); H₁₂ e H₁₆ = 8,12 (d, 2H); H₅ = 8,16 (sl, 1H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 55,83; C₁₈ = 55,95; C₅ = 110,80; C₈ = 113,85; C₁₁ = 125,73; C₄

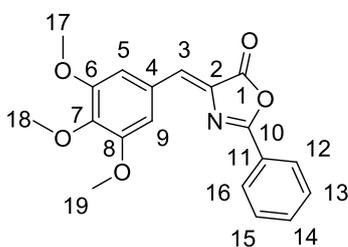
= 126,76; C₉ = 127,70; C_{12 e 16} = 127,95; C_{13 e 15} = 128,89; C₂ = 131,08; C₁₄ = 132,01; C₃ = 132,99; C₇ = 149,06; C₆ = 152,00; C₁₀ = 162,34; C₁ = 167,80. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3005 (C-H); 1786 (C=O); 1647 (C=C); 1597 (C=C); 1460 (C=C); 1271 (C-O-C); 1245 (C-O-C); 1153 (C-N).

(Z)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35e)



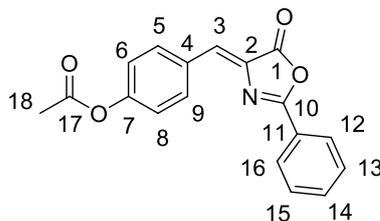
O composto **35e** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 43% de rendimento. Ponto de fusão de 220°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₁₇= 6,07 (s, 2H); H₈ = 6,89 (d, 1H); H₃ = 7,16 (s, 1H); H₉ = 7,45 (d, 1H); H_{13 e 15} = 7,53 (t, 2H); H₁₄ = 7,60 (t, 1H); H₅ = 8,11 (s, 1H); H_{12 e 16} = 8,16 (d, 2H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** C₁₇ = 101,77; C₈ = 108,65; C₅ = 111,05; C_{11 e 4} = 125,66; C_{12 e 16} = 128,17; C_{13 e 15} = 128,88; C₉ = 129,41; C₂ = 131,37; C₁₄ = 131,70; C₃ = 133,07; C₇ = 148,31; C₆ = 150,45; C₁₀ = 162,59; C₁ = 167,81. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1780 (C=O); 1647 (C=C); 1618 (C=C); 1448 (C=C); 1267 (C-O-C); 1163 (C-N).

(Z)-2-fenil-4-(3,4,5-trimetoxibenzilideno)oxazol-5(4H)-ona (35f)



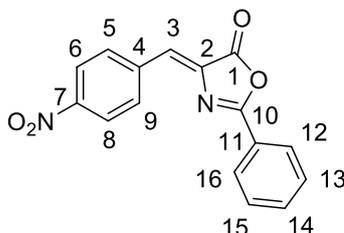
O composto **35f** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 56% de rendimento. Ponto de fusão de 163°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** H₁₈= 3,95 (s, 3H); H_{17 e 19} = 3,97 (s, 6H); H₃ = 7,15 (s, 1H); H_{5, 9, 13 e 15} = 7,51-7,55 (m, 4H); H₁₄ = 7,61 (t, 1H); H_{12 e 16} = 8,11 (d, 2H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ -ppm):** C_{17 e 19} = 56,10; C₁₈ = 61,03; C_{5 e 9} = 109,69; C₁₁ = 125,53; C_{12 e 16} = 128,06; C_{4 e 7} = 128,82; C_{13 e 15} = 128,95; C₁₄ = 131,69; C₂ = 132,27; C₃ = 133,25; C_{6 e 8} = 153,13; C₁₀ = 163,03; C₁ = 167,55. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3001 (C-H); 1784 (C=O); 1651 (C=C); 1579 (C=C); 1454 (C=C); 1251 (C-O-C); 1163 (C-N).

(Z)-4-((5-oxo-2-feniloxazol-4(5H)-ilideno) metil) fenil acetato (35g)



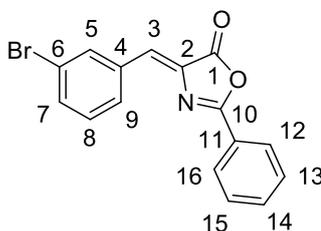
O composto **35g** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 68% de rendimento. Ponto de fusão de 185°C. **RMN ¹H (500MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₈= 2,35; H_{6, 8 e 3} = 7,22-7,25 (m, 3H); H_{13 e 15} = 7,54 (t, 2H); H₁₄ = 7,63 (t, 1H); H_{12 e 16} = 8,18 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,25 (d, 2H). **RMN ¹³C (125MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₈= 21,18; C_{6 e 8} = 122,12; C₁₁ = 125,46; C_{12 e 16} = 128,35; C_{13 e 15} = 128,94; C₁₄ = 130,48; C₂= 131,17; C₄ = 133,16; C₃ = 133,39; C_{5 e 9} = 133,71; C₇ = 152,62; C₁₀ = 163,62; C₁ = 168,98. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1795 (C=O); 1651 (C=C); 1604 (C=C); 1450 (C=C); 1218 (C-O-C); 1164 (C-N).

(Z)-4-(4-nitrobenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35h)



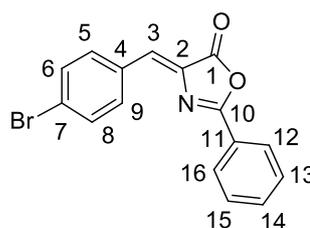
O composto **35h** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 85% de rendimento. Ponto de fusão de 240°C. **RMN ¹H (400MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₃=7,48 (s, 1H); H_{13 e 15} = 7,67 (t, 2H); H₁₄ = 7,78 (t, 1H); H_{12 e 16} = 8,19 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,36 (d, 2H); H_{6 e 8} = 8,55 (d, 2H). **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{6 e 8} = 123,92; C₁₁ = 124,83; C_{12 e 16} = 126,94; C_{13 e 15} = 128,41; C_{5 e 9} = 129,44; C₁₄ = 132,29; C₃ = 134,30; C₂ = 136,29; C₄ = 139,62; C₇ = 147,81; C₁ = 166,44. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3105 (C-H); 3070 (C-H); 1797 (C=O); 1654 (C=C); 1598 (C=C); 1556 (N=O)₂; 1342 (N=O)₂; 1163 (C-N).

(Z)-4-(3-bromobenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (35i)



O composto **35i** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 71% de rendimento. Ponto de fusão de 159°C. **RMN ¹H (400MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₃= 7,14 (s, 1H); H₈= 7,35 (t, 1H); H_{9, 13 e 15}= 7,52-7,60 (m, 3H); H₁₄= 7,65 (t, 1H); H₇= 8,08 (d, 1H); H_{12 e 16}= 8,19 (d, 2H); H₅= 8,43 (sl, 1H). **RMN ¹³C (100MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₂= 122,92; C₁₁= 125,23; C_{12 e 16}= 128,54; C_{13 e 15}= 129,00; C₇= 129,49; C₅= 130,28; C₉= 130,84; C₃= 133,68; C₅= 133,79; C₈= 134,73; C₄= 135,38; C₆= 155,05; C₁₀= 164,25; C₁= 167,17. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3070 (C-H); 1795 (C=O); 1652 (C=C); 1593 (C=C); 1446 (C=C); 1161 (C-N); 677 (C-Br).

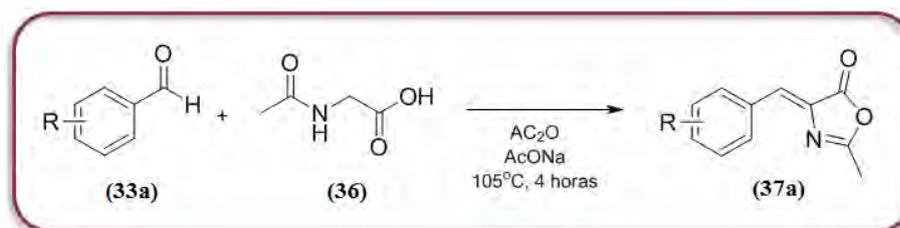
(Z)-4-(4-bromobenzilideno)-2-feniloxazol-5(4H)-ona (**35j**)



O composto **35j** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 71% de rendimento. Ponto de fusão de 238°C. **RMN ¹H (400MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₃= 7,17 (s, 1H); H_{13 e 15}= 7,55 (t, 2H); H_{6, 8 e 14}= 7,58-7,72 (m, 3H); H_{5 e 9}= 8,08 (d, 2H); H_{12 e 16}= 8,18 (d, 2H). **RMN ¹³C (100MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₇= 125,37; C₁₁= 125,89; C_{12 e 16}= 128,44; C_{13 e 15}= 128,99; C₁₄= 130,06; C_{5 e 9}= 132,20; C₂= 132,36; C₃= 133,56; C_{6 e 8}= 133,62; C₄= 133,73; C₁₀= 163,89; C₁= 167,35. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 1793 (C=O); 1651 (C=C); 1583 (C=C); 1448 (C=C); 1159 (C-N); 694 (C-Br).

3.1.2 Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção da série C (**37a**)

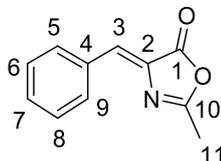
(ERLENMEYER, 1893; PLÖCHL, 1893; BLANCO-LOMAS *et al.*, 2012)



Em um tubo de ensaio adicionou-se 1mmol de *N*-acetil-glicina (36), 1mmol de benzaldeído (33a), 1mmol de acetato de sódio anidro e 2mL de anidrido acético. Aqueceu-se a reação em placa de aquecimento e agitação por 4 horas à 105°C. Após aquecimento, a

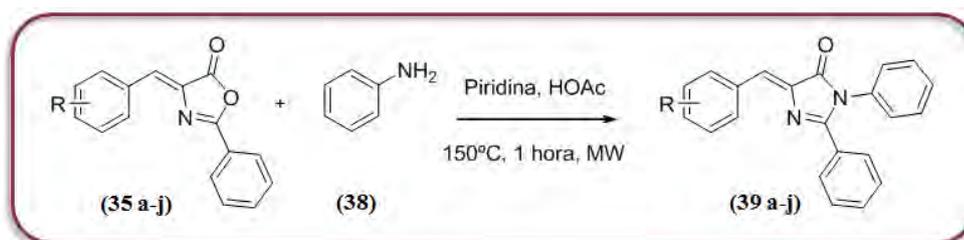
reação foi resfriada em banho de gelo. O produto obtido (37a) foi filtrado à vácuo com auxílio de funil de buchner e kitassato. Em seguida, o mesmo foi lavado com solução de água e etanol 2:1 e deixado secar à temperatura ambiente.

(Z)-4-benzilideno-2-metiloxazol-5(4H)-ona (37a)



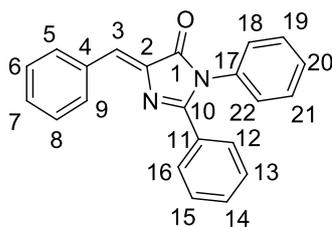
O composto **37a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 46% de rendimento. Ponto de fusão de 181°C. **RMN ¹H (400MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₁₁ = 2,42 (s, 3H); H₃ = 7,15 (s, 1H); H_{6, 7 e 8} = 7,36-7,54 (m, 3H); H_{5 e 9} = 7,99-8,18 (m, 2H). **RMN ¹³C (100MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 15,66; C_{6 e 8} = 128,85; C₇ = 131,10; C₃ = 131,45; C_{5 e 9} = 132,14; C₂ = 132,56; C₄ = 133,09; C₁₀ = 166,08; C₁ = 167,79. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3064 (C-H); 3053 (C-H); 1774 (C=O); 1654 (C=C); 1598 (C=C); 1450 (C=C); 1166 (C-N); 769 (C-H); 690 (C-H).

3.1.3 Síntese das imidazolonas da série A (39a-j)



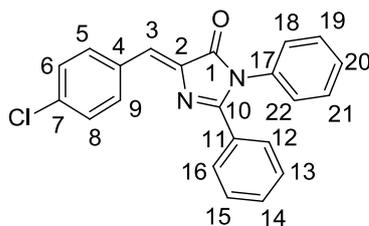
Em um tubo de ensaio adicionou-se 1mmol de oxazolona (35 a-j), 2mmol de anilina (38), 4mmol de ácido acético glacial e 5mL de piridina. Aqueceu-se a mistura reacional em tubo selado por 1 hora à 150°C em microondas. A piridina foi retirada da reação através de evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador. Foi adicionado cerca de 10mL de tolueno à mistura reacional e a mesma foi novamente evaporada, até total evaporação da piridina. O produto obtido (39 a-j) foi purificado em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato em diferentes proporções.

(Z)-4-benzilideno-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39a)



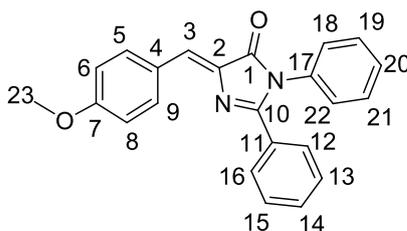
O composto **39a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 61% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 174°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{3, 18 e 22} = 7,25-7,33 (m, 3H); H_{6, 7, 8, 12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,37-7,55 (m, 11H); H_{5 e 9} = 8,37 (d, 2H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₃ = 127,67; C_{18 e 22} = 127,90; C_{6 e 8} = 128,44; C₂₀ = 128,56; C_{12 e 16} = 128,91; C_{13 e 15} = 128,97; C_{19 e 21} = 129,36; C₇ = 130,58; C₁₄ = 131,55; C_{5 e 9} = 132,37; C₄ = 134,14; C₁₁ = 134,55; C₁₇ = 138,46; C₁₀ = 160,85; C₁ = 169,75. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3089 (C-H); 3051 (C-H); 3022 (C-H); 1710 (C=O); 1635 (C=C); 1593 (C=C); 1440 (C=C); 1168 (C-N); 759(C-H); 688 (C-H). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 324 (M⁺).

(Z)-4-(4-clorobenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39b)



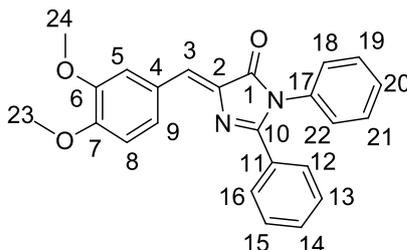
O composto **39b** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 41% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 200°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{3, 18 e 22} = 7,27-7,33 (m, 3H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,36-7,55 (m, 8H); H_{6 e 8} = 7,59 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,39 (d, 2H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₃ = 126,03; C_{18 e 22} = 127,91; C_{6 e 8} = 128,43; C₂ = 128,50; C_{12 e 16} = 128,61; C_{13, 15 e 20} = 129,01; C_{19 e 21} = 129,36; C₁₄ = 131,64; C₇ = 133,09; C_{5 e 9} = 133,87; C₄ = 134,46; C₁₁ = 135,14; C₁₇ = 138,85; C₁₀ = 161,28; C₁ = 169,64. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3059 (C-H); 1718 (C=O); 1637 (C=C); 1589 (C=C); 1444 (C=C); 1168 (C-N); 690 (C-Cl). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 358 (M⁺).

(Z)-4-(4-metoxibenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39c)



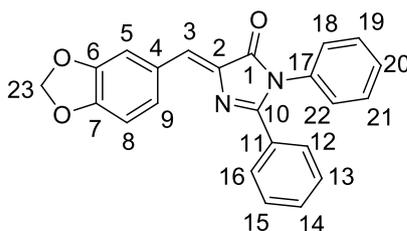
O composto **39c** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 71% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 188°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₃ = 3,85 (s, 3H); H_{6 e 8} = 7,10 (d, 2H); H_{3, 18 e 22} = 7,26-7,30 (m, 3H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,35-7,56 (m, 8H); H_{5 e 9} = 8,36 (d, 2H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{6 e 8} = 114,58; C₄ = 126,93; C_{18 e 22} = 127,87; C₃ = 128,02; C_{12 e 16} = 128,40; C₂ = 128,79; C_{13, 15 e 20} = 128,83; C_{19 e 21} = 129,32; C₁₄ = 131,28; C_{5 e 9} = 134,46; C₁₁ = 134,71; C₁₇ = 136,43; C₇ = 159,37; C₁₀ = 161,33; C₁ = 169,65. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3066 (C-H); 3053 (C-H); 3039 (C-H); 3026 (C-H); 1714 (C=O); 1645 (C=C); 1589 (C=C); 1444 (C=C); 1257 (C-O-C); 1168 (C-N). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 354 (M⁺).

(Z)-4-(3,4-dimetoxibenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39d)



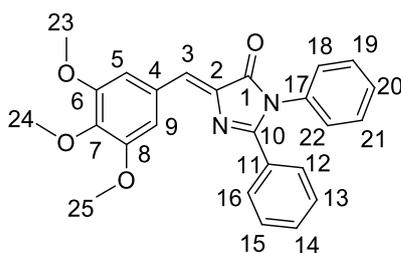
O composto **39d** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 65% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 218°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₃ = 3,85 (sl, 6H); H₈ = 7,11 (d, 1H); H₃ = 7,25 (s, 1H); H_{18 e 22} = 7,28 (d, 2H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,36-7,56 (m, 8H); H₉ = 7,88 (d, 1H); H₅ = 8,24 (s, 1H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₃ = 55,38; C₂₄ = 55,64; C₅ = 111,70; C₈ = 114,70; C₂ = 127,07; C₃ = 127,21; C_{18 e 22} = 127,87; C₉ = 128,34; C₂₀ = 128,42; C_{12 e 16} = 128,45; C_{13 e 15} = 128,74; C₄ = 128,78; C_{19 e 21} = 129,33; C₁₄ = 131,29; C₁₁ = 134,74; C₁₇ = 136,42; C₇ = 148,64; C₆ = 151,30; C₁₀ = 159,13; C₁ = 169,62. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3057 (C-H); 3043 (C-H); 3003 (C-H); 1712 (C=O); 1641 (C=C); 1593 (C=C); 1442 (C=C); 1267 (C-O-C); 1176 (C-N). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 384 (M⁺).

(Z)-4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ilmetileno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39e)



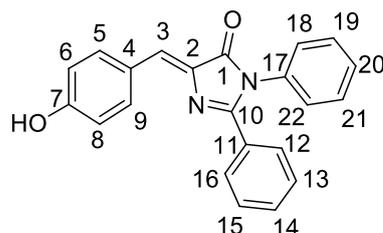
O composto **39e** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 82% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 214°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₃ = 6,14 (s, 2H); H₈ = 7,08 (d, 1H); H₃ = 7,24 (s, 1H); H_{18 e 22} = 7,27 (d, 2H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,35-7,54 (m, 8H); H₉ = 7,77 (dd, 1H); H₅ = 8,18 (sl, 1H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂₃ = 101,80; C₅ = 108,80; C₈ = 110,72; C_{18 e 22} = 127,84; C₃ = 127,87; C_{12 e 16} = 128,40; C₂₀ = 128,44; C₂ = 128,56; C₄ = 128,69; C_{13 e 15} = 128,82; C₉ = 129,07; C_{19 e 21} = 129,30; C₁₄ = 131,31; C₁₁ = 134,62; C₁₇ = 136,68; C₇ = 147,81; C₆ = 149,58; C₁₀ = 159,59; C₁ = 169,56. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3070 (C-H); 1708 (C=O); 1639 (C=C); 1597 (C=C); 1444 (C=C); 1261 (C-O-C); 1168 (C-N). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 368 (M⁺).

(Z)-1,2-difenil-4-(3,4,5-trimetoxibenzyldiene)-1H-imidazol-5(4H)-one (39f)



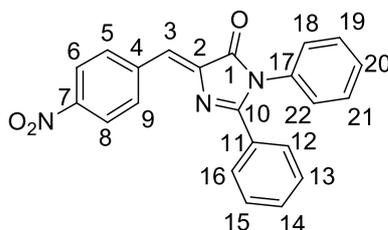
O composto **39f** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 43% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 219°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₂₄ = 3,76 (s, 3H); H_{23 e 25} = 3,86 (s, 3H); H₃ = 7,25 (s, 1H); H_{18 e 22} = 7,30 (d, 2H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,36-7,54 (m, 8H); H_{5 e 9} = 7,85 (s, 2H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{23 e 25} = 55,90; C₂₄ = 60,25; C_{5 e 9} = 110,02; C_{18, 22 e 3} = 127,87; C_{12 e 16} = 128,50; C₂₀ = 128,55; C₄ = 128,63; C_{13 e 15} = 128,79; C_{19 e 21} = 129,36; C₂ = 129,61; C₁₄ = 131,51; C₁₁ = 134,66; C₁₇ = 137,56; C₇ = 139,89; C_{6 e 8} = 152,82; C₁₀ = 159,99; C₁ = 169,68. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3099 (C-H); 3055 (C-H); 3043 (C-H); 3005 (C-H); 1712 (C=O); 1639 (C=C); 1573 (C=C); 1463 (C=C); 1247 (C-O-C); 1159 (C-N). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 399, 414 (M⁺).

(Z)-4-(4-hidroxibenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39g)



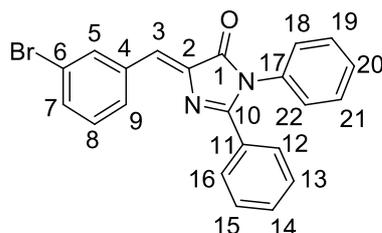
O composto **39g** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 53% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 248°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{OH} = 5,76 (s, 1H); H_{6 e 8} = 6,91 (d, 2H); H₃ = 7,21 (s, 1H); H_{18 e 22} = 7,27 (d, 2H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,35-7,52 (m, 8H); H_{5 e 9} = 8,25 (d, 2H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{6 e 8} = 116,04; C₄ = 125,45; C_{18 e 22} = 127,85; C_{3, 12 e 16} = 128,37; C₂₀ = 128,76; C_{13 e 15} = 128,79; C₂ = 128,87; C_{19 e 21} = 129,29; C₁₄ = 131,13; C₁₁ = 134,77; C_{5 e 9} = 134,82; C₁₇ = 135,64; C₇ = 158,75; C₁₀ = 160,31; C₁ = 169,64. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3059 (C-H); 1710 (C=O); 1643 (C=C); 1597 (C=C); 1440 (C=C); 1161 (C-N). **CG-MS:** não cromatografa.

(Z)-4-(4-nitrobenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39h)



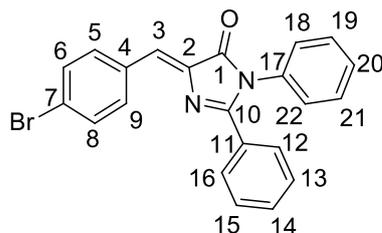
O composto **39h** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 40% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 187°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{18 e 22} = 7,33 (d, 2H); H_{3, 12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,39-7,58 (m, 9H); H_{6 e 8} = 8,34 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,61 (d, 2H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C_{6 e 8} = 123,85; C₃ = 124,04; C_{18 e 22} = 127,94; C₂ = 128,23; C_{12 e 16} = 128,47; C₂₀ = 128,75; C_{13 e 15} = 129,19; C_{19 e 21} = 129,41; C₁₄ = 132,02; C_{5 e 9} = 132,97; C₁₁ = 134,29; C₁₇ = 140,56; C₄ = 141,06; C₇ = 147,44; C₁₀ = 163,09; C₁ = 169,64. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3101 (C-H); 3041 (C-H); 1728 (C=O); 1637 (C=C); 1595 (C=C); 1442 (C=C); 1338 (N=O)₂; 1174 (C-N). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 369 (M⁺).

(Z)-4-(3-bromobenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39i)



O composto **39i** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 43% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 182°C. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₃ = 7,28 (s, 1H); H_{18 e 22} = 7,31 (d, 2H); H_{8,12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,39-7,58 (m, 9H); H₇ = 7,66 (m, 2H); H₉ = 8,37 (d, 2H); H₅ = 8,60 (sl, 1H); **RMN ¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₆ = 122,02; C₃ = 125,48; C_{18 e 22} = 127,87; C₂ = 128,41; C_{12 e 16} = 128,45; C₂₀ = 128,59; C_{13 e 15} = 128,97; C_{19 e 21} = 129,34; C₁₄ = 130,91; C₉ = 131,10; C₈ = 131,70; C₅ = 132,84; C₇ = 134,26; C₄ = 134,38; C₁₁ = 136,48; C₁₇ = 139,40; C₁₀ = 161,72; C₁ = 169,55. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3062 (C-H); 1720 (C=O); 1641 (C=C); 1597 (C=C); 1444 (C=C); 1170 (C-N); 690 (C-Br). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 404 (M⁺).

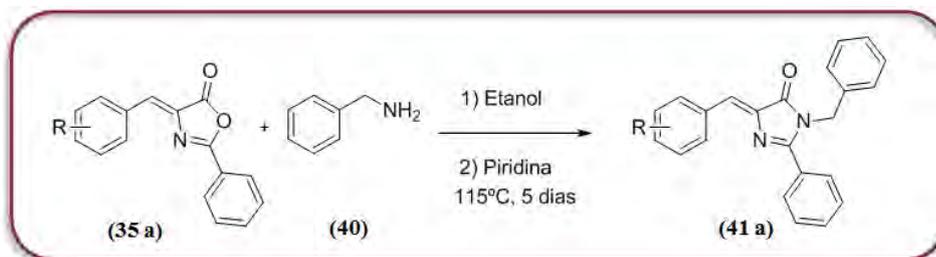
(Z)-4-(4-bromobenzilideno)-1,2-difenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (39j)



O composto **39j** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 51% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 205°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H_{3, 18 e 22} = 7,27-7,23 (m, 3H); H_{12, 16, 13, 15, 14, 19, 20 e 21} = 7,37-7,55 (m, 8H); H_{6 e 8} = 7,72 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,17 (d, 2H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₇ = 124,21; C₃ = 126,11; C_{18 e 22} = 127,90; C_{12 e 16} = 128,43; C₂ = 128,50; C₂₀ = 128,60; C_{13 e 15} = 129,00; C_{19 e 21} = 129,36; C₁₄ = 131,64; C_{6 e 8} = 131,96; C₄ = 133,38; C_{5 e 9} = 134,04; C₁₁ = 134,45; C₁₇ = 138,94; C₁₀ = 161,29; C₁ = 169,64. **I.V. Max. (KBr) γ-cm⁻¹:** 3055 (C-H); 1720 (C=O); 1637 (C=C); 1581 (C=C); 1444 (C=C); 1172 (C-N); 692 (C-Br). **CG-MS:** m/z 51, 77, 105, 180, 402 (M⁺).

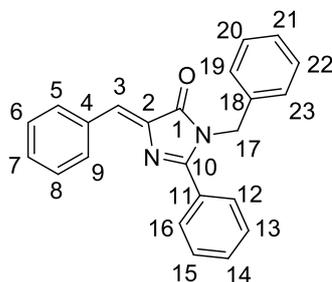
3.1.4 Síntese das imidazolonas da série B (41a)

(LEE *et al.*, 2012)



Em um balão de fundo redondo adicionou-se 1mmol de oxazolona (35a), 1,6mmol de benzilamina (40) e 3mL de etanol. A reação permaneceu sobre agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. O etanol foi removido da reação sobre pressão reduzida em rotaevaporador. Adicionou-se ao produto obtido anteriormente 3mL de piridina e a mistura reacional foi aquecida e agitada por 5 dias à 115°C. A piridina foi retirada da reação através de evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador. Foi adicionado cerca de 10mL de tolueno à mistura reacional e a mesma foi novamente evaporada, até total evaporação da piridina. O produto obtido (41a) foi purificado em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato em diferentes proporções.

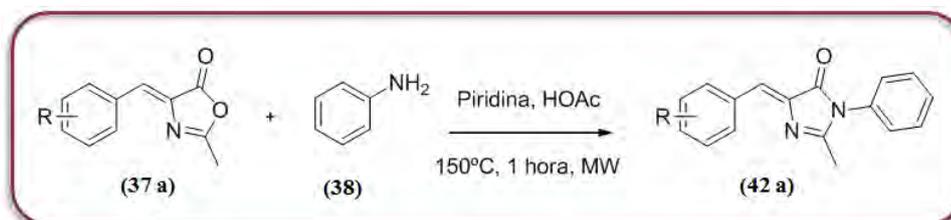
(Z)-1-benzil-4-benzilideno-2-fenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (41a)



O composto **41a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 53% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 138°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₁₇ = 4,98 (s, 2H); H_{19 e 23} = 7,08 (d, 2H); H₂₁ = 7,23 (t, 1H); H_{3, 13 e 15} = 7,26-7,32 (m, 3H); H_{6, 7, 8, 20 e 22} = 7,43-7,54 (m, 5H); H₁₄ = 7,59 (t, 1H); H_{12 e 16} = 7,75 (d, 2H); H_{5 e 9} = 8,32 (d, 2H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₁₇ = 44,52; C_{19 e 23} = 126,31; C₃ = 127,38; C_{20 e 22} = 127,77; C₂₁ = 128,11; C_{6 e 8} = 128,37; C_{12 e 16} = 128,73; C_{13 e 15} = 128,84; C₂ = 128,95; C₇ = 130,56; C₁₄ = 131,68; C_{5 e 9} = 132,39; C₁₁ = 134,04; C₁₇ = 136,67; C₄ = 138,48; C₁₀ = 162,75; C₁ = 170,76. **I.V. Max. (KBr) γ-cm⁻¹:** 3086 (C-H); 3064 (C-H); 3030 (C-H); 1712

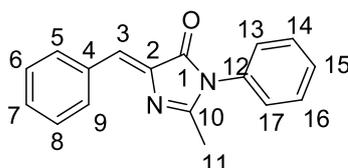
(C=O); 1639 (C=C); 1595 (C=C); 1444 (C=C); 1153 (C-N); 769 (C-H); 692 (C-H). **CG-MS:** m/z 91, 338 (M⁺).

3.1.5 Síntese das imidazolonas da série C (42a)



Em um tubo de ensaio adicionou-se 1mmol de oxazolona (37a), 2mmol de anilina (38), 4mmol de ácido acético glacial e 5mL de piridina. A mistura reacional foi aquecida em tubo selado por 1 hora à 150°C em microondas. A piridina foi retirada da reação através de evaporação sob pressão reduzida em rotaevaporador. Foi adicionado cerca de 10mL de tolueno à mistura reacional e a mesma foi novamente evaporada, até total evaporação da piridina. O produto obtido (42a) foi purificado em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica e fase móvel mistura de hexano:acetato em diferentes proporções.

(Z)-4-benzilideno-2-metil-1-fenil-1H-imidazol-5(4H)-ona (42a)



O composto **42a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 99% de rendimento após purificação. Ponto de fusão de 161°C. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₁₁ = 2,22 (s, 3H); H₃ = 7,10 (s, 1H); H_{13, 15 e 17} = 7,41-7,46 (m, 3H); H_{6, 7 e 8} = 7,46-7,51 (m, 3H); H_{14 e 16} = 7,52-7,58 (m, 2H); H_{5 e 9} = 8,28 (d, 2H); **RMN ¹³C (125MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₁₁ = 16,28; C₃ = 125,64; C_{13 e 17} = 127,69; C₁₅ = 128,68; C_{6e8} = 128,79; C₇ = 130,21; C_{5 e 9} = 132,00; C₂ = 133,46; C₄ = 134,04; C₁₂ = 138,33; C₁₀ = 162,90; C₁ = 169,14. **I.V. Max. (KBr) γ-cm⁻¹:** 3059 (C-H); 3033 (C-H); 1706 (C=O); 1651 (C=C); 1593 (C=C); 1450 (C=C); 1388 (C-H); 1168 (C-N). **CG-MS:** m/z 40, 51, 77, 104, 118, 262 (M⁺).

3.2 Metodologia de avaliação de atividade biológica

Os experimentos de avaliação de atividade biológica foram realizados em ambiente estéril em capela de fluxo laminar previamente esterilizado por luz UV por 20 minutos.

As culturas de células leucêmicas foram mantidas incubadas em estufa por 72 horas em atmosfera a 5% de CO₂, à 37°C.

As células foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico para o ajuste de concentração de 2×10^4 células/mL de solução.

As placas de 96 poços utilizadas no experimento de MTT foram centrifugadas por 7 minutos a 1500rpm após adição do sal de MTT.

O espectrofotômetro utilizado para realizar a leitura de absorvância no experimento de MTT foi o leitor de ELISA Tecan Sunrise ELISA Reader, Tecan Group, Switzerland, em um comprimento de onda de 490 nm.

Os reagentes utilizados foram:

Brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazol (MTT) – Sigma. Utilizado a 5mg/mL diluído em salina e mantido a 4°C.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma. Mantido a temperatura ambiente.

Meio de cultura RPMI 1640 – Sigma. Meio RPMI-1640 10,4g/L, preparado com Bicarbonato de sódio 2g/L (Reagen), HEPES 25mM (Sigma), Soro Fetal Bovino 100ml/L, Estreptomicina 10mg/L (Sigma), Penicilina 60mg/L (Sigma) e b-mercaptoetanol 5mM (Sigma). Todos os reagentes foram adicionados em 1L de água deionizada e filtrados por uma membrana de nitrocelulose 0.22mm (MILLIPORE). O pH foi ajustado para 7,2 - 7,4.

Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) - 8,0g NaCl (Merck), 0,2g KCl (Reagen), 1,15g NaH₂PO₄.H₂O (Reagen), 0,2g Na₂HPO₄.7H₂O (Reagen). Reagentes solubilizados em 1L de água deionizada, pH 7,4, utilizando NaOH ou HCl.

Soro Fetal Bovino (SFB) - Gibco, Grand Island, NY, USA. Mantido a -20°C até o uso. Utilizado em meio de cultura a 10% (v/v).

Sulfato de Vincristina (VCR) – Eli Lilly do Brasil LDTA. Concentração estoque 1mg/mL diluída em meio RPMI na concentração de 6µM e mantida em a -20°C até o momento do uso.

3.2.1 Linhagens celulares e cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares leucêmicas K562 e Lucena-1. De maneira geral, estas cresceram em garrafas de 25cm³, em 5mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram contadas por microscopia ótica em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2x10⁴ células/mL antes dos repiques, realizados duas vezes por semana. A linhagem Lucena-1 foi mantida na presença de 60nM de vincristina (VCR). As culturas foram mantidas em atmosfera a 5% de CO₂, à 37°C.

3.2.2 Preparação das amostras de imidazolonas

As imidazolonas sintetizadas foram selecionadas e estocadas em solução de DMSO estéril a uma concentração de 25mM. Para a realização do experimento foi preparada uma solução intermediária a partir da dissolução da solução estoque em DMSO estéril com concentração final de 5mM. Esta, através de suscetivas diluições sequenciais, permitiu o preparo das soluções utilizadas no experimento de avaliação de atividade biológica (500µM, 250µM e 125µM). As diluições foram realizadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

3.2.3 Ensaio colorimétrico de MTT

(MOSSMANN, 1983; DENIZOT E LANG, 1986; BARILE *et al.*, 1994)

Em placas de cultura de 96 poços foram adicionados 180µL de células leucêmicas na concentração de 2x10⁴ células/mL de meio de cultura, previamente contadas em câmara de Neubauer por microscopia ótica e ajustadas nesta concentração em meio de RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Ao branco adicionou-se 20µL de PBS, assim como no controle negativo. No controle positivo adicionou-se 20µL de vincristina 60nM. Os produtos imidazolônicos foram adicionados à placa com as células leucêmicas nas concentrações de análise preparadas previamente no volume de 20µL. Cada ponto do experimento foi realizado em triplicata (Figura 28). As placas com as células e os produtos foram incubadas por 72 horas em estufa e mantidas em atmosfera a 5% de CO₂, à 37°C.

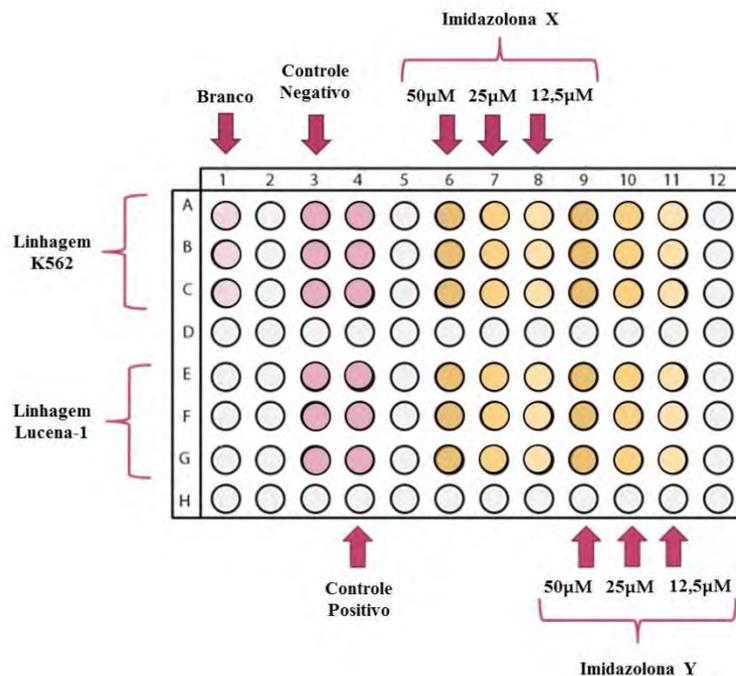


Figura 28. Placa de 96 poços. Esquema de adição das culturas de células leucêmicas. K562 na parte superior (linhas A, B e C) e Lucena-1 na parte inferior (linhas E, F e G). Branco na coluna 1, controle negativo na coluna 3 e controle positivo na coluna 4. Imidazolonas testadas nas colunas 6, 7 e 8 para um produto X e 9, 10 e 11 para um produto Y.

Após as 72 horas de incubação foram adicionados as placas de 96 poços 20µL solução de MTT (brometo de 3,4,5-dimetiazol-2-il-2,5-difeniltetrazol) previamente preparada na concentração de 5mg/mL de PBS. Cobriram-se as placas com papel alumínio e as mesmas foram novamente incubadas por 3 horas. Em seguida, a placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado após este processo. Adicionou-se então 200µL de DMSO e as mesmas foram lidas em leitor de Elisa para determinação da absorvância no comprimento de onda de 490nm.

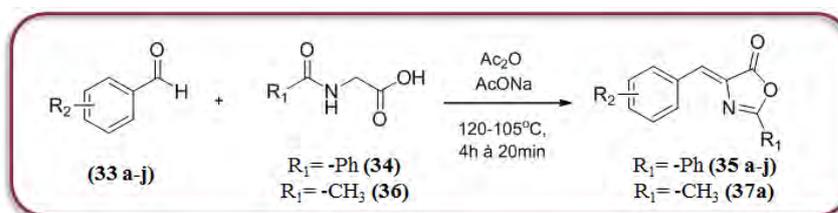
Os resultados obtidos foram normalizados considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade e um modelo de gráfico de viabilidade celular pôde ser gerado para a avaliação da atividade das imidazolonas testadas. O experimento de MTT foi realizado em triplicata para cada produto testado.

O cálculo da concentração eficaz média CE_{50} foi feito utilizando-se os dados de porcentagem de viabilidade dos experimentos realizados com os produtos em cada uma das linhagens. O valor do CE_{50} foi calculado a partir da análise de regressão não linear, no programa Microsoft Excel 2010.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

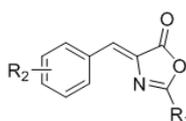
4.1 Síntese das oxazolonas intermediárias para a obtenção das séries A, B e C

Foram sintetizadas 10 oxazolonas que, posteriormente, foram utilizadas para a síntese das imidazolonas finais das séries **A** e **B**, e 1 oxazolona para a síntese final da série **C** (Esquema 2) em rendimentos que variaram de 43-85% após processo de purificação (Tabela 1). Estes produtos intermediários foram obtidos através da clássica reação de Erlenmeyer-Plöchl que permite a formação das oxazolonas propostas através de sucessivas reações de acoplamento (ERLENMEYER, 1893; PLÖCHL, 1893) (Esquema 2). Apesar de ser uma reação bastante antiga, até hoje se mostra uma reação muito versátil e tem sido aprimorada para diversos usos (AHMADI *et al.*, 2012; CLEARY *et al.*, 2010; CHANDRASEKHAR e KARRI, 2007).



Esquema 2. Síntese das oxazolonas 35a-j e 37a. Esquema reacional para a síntese das oxazolonas **35a-j** e **37a** utilizadas como intermediárias para a obtenção das imidazolonas das séries **A** e **B**, e **C** respectivamente.

Adicionalmente, de acordo com o substituinte em R_1 , as oxazolonas foram obtidas à 120°C (R_1 =Ph; **35a-j**) por 20 minutos (CLEARY *et al.*, 2010), ou à 105°C (R_1 =CH₃; **37a**) por 4 horas (BLANCO-LOMAS *et al.*, 2012) (Esquema 2).

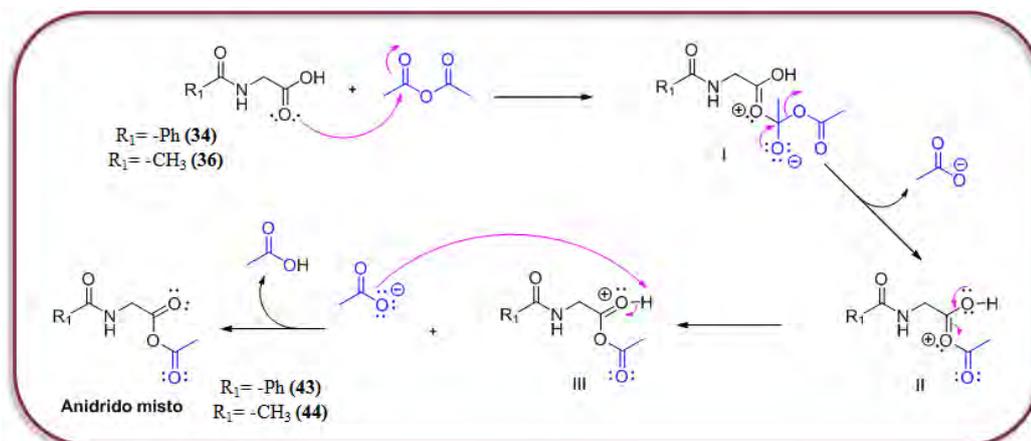


Oxazolonas	R ₁	R ₂	Rendimentos (%)	P.f. (°C)
35a	-Ph	H-	65	168
35b	-Ph	4-Cl-	69	198
35c	-Ph	4-CH ₃ O-	52	188
35d	-Ph	3,4-(CH ₃ O) ₂	55	175
35e	-Ph	3,4-(-OCH ₂ O-)	43	220
35f	-Ph	3,4,5-(CH ₃ O) ₃	56	163
35g	-Ph	4-CH ₃ OCO-	68	185
35h	-Ph	4-NO ₂ -	85	240
35i	-Ph	3-Br-	71	159
35j	-Ph	4-Br-	71	238
37a	-CH ₃	H-	46	181

Tabela 1. Oxazolonas sintetizadas. Oxazolonas sintetizadas para obtenção das séries **A**, **B** e **C**, seus rendimentos e pontos de fusão.

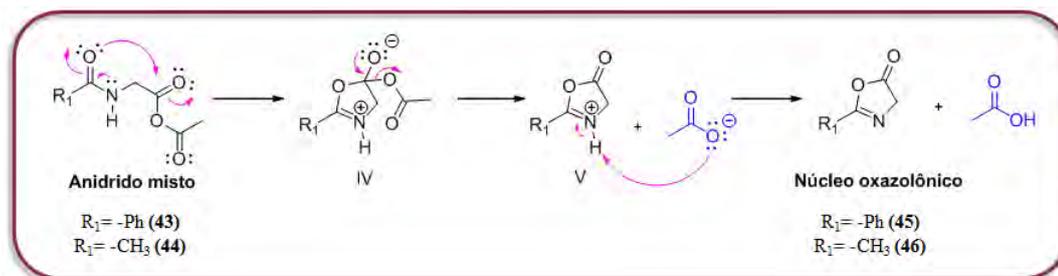
A reação de Erlenmeyer-Plöchl consiste na condensação entre derivados da glicina, como o ácido hipúrico e a *N*-acetilglicina, e diferentes benzaldeídos substituídos para obtenção de anéis oxazolônicos na presença de anidrido acético e acetato de sódio. Estes últimos possuem papéis importantes nesta reação: o acetato de sódio atua como uma base no meio, enquanto que o anidrido acético auxilia na formação de intermediário mais reativo, atua como agente desidratante e solvente da reação (Esquema 3) (CARTER, 1946).

O mecanismo desta reação é bem conhecido e descrito na literatura. Inicialmente ocorre o ataque do par de elétrons livres da carboxila do derivado da glicina (34 ou 36) ao centro eletrofílico do anidrido acético, formando o intermediário tetraédrico I. Este ao refazer a dupla ligação da carbonila, promove a eliminação do grupo de saída mais estável, o acetato, formando o intermediário II. Este se converte no intermediário III, que em seguida é desprotonado para a formação do anidrido misto (43 ou 44), um intermediário mais reativo que o produto de partida (Esquema 3) (LI, 2006).



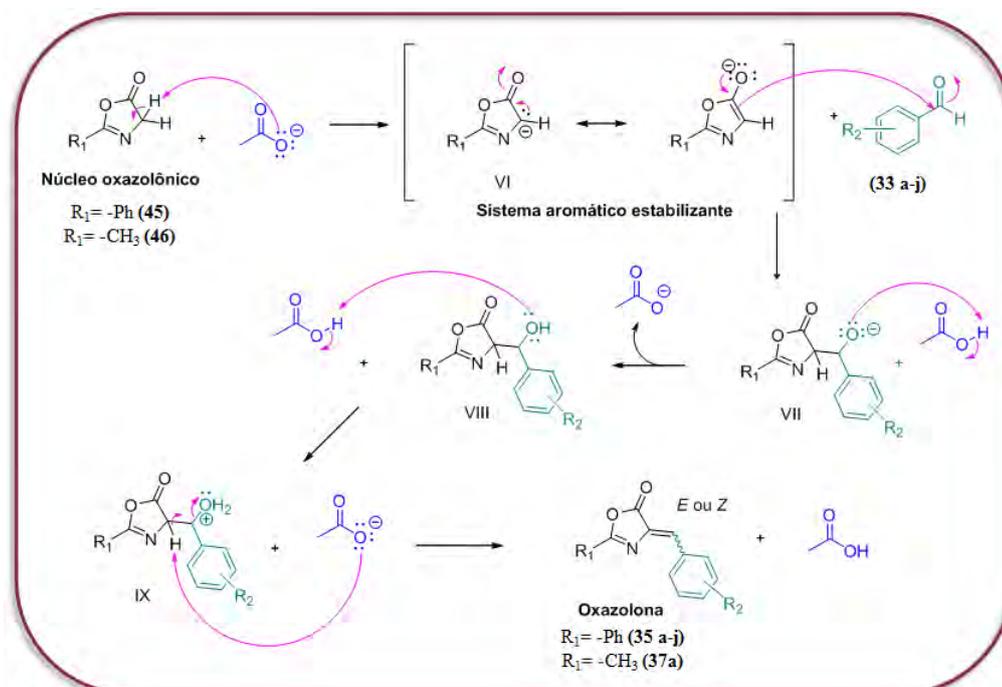
Esquema 3. Formação de anidrido misto na Reação de Erlenmeyer. Formação de anidrido misto através da reação de condensação do ácido hipúrico com anidrido acético, seguido de eliminação de acetato no meio (Adaptado de LI, 2006).

A próxima etapa consiste em uma reação de ciclização intramolecular do anidrido misto formado na etapa anterior (43 ou 44). Isto ocorre através do ataque do par de elétrons livres do átomo de oxigênio amídico à carbonila eletrofílica presente no anidrido misto formando o intermediário tetraédrico IV. Este ao restituir a dupla ligação e eliminar o grupo de saída mais estável leva à formação do intermediário V, que após desprotonação promove a formação do núcleo oxazolônico (45 ou 46) para a próxima etapa reacional (Esquema 4) (LI, 2006).



Esquema 4. Formação do núcleo oxazolônico na Reação de Erlenmeyer. Reação intramolecular do anidrido misto levando a eliminação de acetato e formação do núcleo oxazolônico (Adaptado de LI, 2006).

Após a formação do núcleo oxazolônico ocorre a reação de condensação deste com o benzaldeído (33a-j) presente no meio, com posterior eliminação de água. Esta etapa tem início na formação do enolato VI, que é consideravelmente estável no meio reacional pela formação de um sistema aromático estabilizante com 6 elétrons π (CHANDRASEKHAR e KARRI, 2006). Fato este que ocorre através da retirada do hidrogênio ácido α à carbonila presente no núcleo oxazolônico pelo acetato, uma base fraca ($\text{pK}_a \approx 5$) (MARCH, 1992). O enolato gerado atua como nucleófilo e ataca o centro eletrofílico do benzaldeído (33a-j), promovendo a formação do intermediário tetraédrico VII. Através da subsequente protonação dos intermediários VII e VIII ocorre a eliminação de água e formação de dupla ligação (*E* ou *Z*) no intermediário IX, gerando as oxazolonas propostas para a síntese das séries **A**, **B** e **C**. (Esquema 5) (LI, 2006).



Esquema 5. Formação das oxazolonas através da reação de Erlenmeyer. Formação do enolato e posterior reação de condensação entre este e o benzaldeído promovendo formação das oxazolonas propostas (Adaptado de LI, 2006; CHANDRASEKHAR e KARRI, 2006).

Visando-se determinar a formação dos compostos propostos foram realizados diversos experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , ponto de fusão (Tabela 1) e espectrofotometria no IV. Alguns sinais característicos puderam comprovar a formação desta classe de compostos como o sinal entre 7,26-7,14ppm no espectro de RMN ^1H e 133,7-132,9ppm para as oxazolonas **35a-j** ($\text{R}_1=\text{Ph}$) e 131,5ppm para a oxazolona **37a** ($\text{R}_1=\text{CH}_3$) no RMN ^{13}C , referentes ao hidrogênio e ao carbono benzilidênicos (Figura 29), que só poderiam ser formados através da reação de acoplamento dos aldeídos com os núcleos oxazolônicos. A presença de sinais na região entre 7,0-8,5ppm no espectro de hidrogênio caracterizaram a presença de hidrogênios ligados aos sistemas aromáticos, presentes nos produtos sintetizados. O sinal no espectro de carbono entre 169,0-167,2ppm caracterizou a presença da carbonila lactônica presente no núcleo oxazolônico, assim como o sinal entre 164,3-162,3ppm para as oxazolonas **35a-j** ($\text{R}_1=\text{Ph}$), e 166,1ppm para a oxazolona **37a** ($\text{R}_1=\text{CH}_3$), caracterizaram a presença do carbono amidínico presente no núcleo oxazolônico (Figura 29). Deste modo, pôde-se comprovar a formação do núcleo oxazolônico através da reação proposta. Sinais em 2,42ppm e 15,66ppm nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, caracterizaram a presença da metila nas oxazolonas da série **C** (Figura 29). Bandas no espectro de infravermelho (IV) também auxiliaram no processo de caracterização como as que aparecem na região de $1797\text{-}1780\text{cm}^{-1}$ para as oxazolonas **35a-j** ($\text{R}_1=\text{Ph}$) e 1774cm^{-1} para a oxazolona **37a** ($\text{R}_1=\text{CH}_3$), referentes ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ da carbonila lactônica conjugada com a dupla ligação. A presença da banda em $1654\text{-}1647\text{cm}^{-1}$ caracterizou o estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$ da dupla ligação das oxazolonas sintetizadas e as bandas em $1618\text{-}1583$ e $1460\text{-}1446\text{cm}^{-1}$ caracterizaram a presença de anéis aromáticos pelo estiramento das ligações $\text{C}=\text{C}$ do anel (Figura 29).

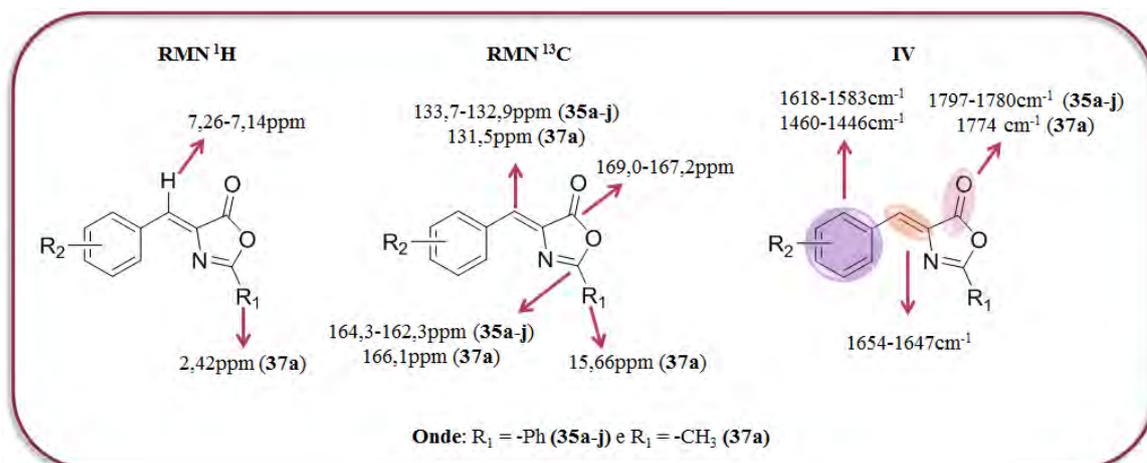


Figura 29. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das oxazolonas. Principais sinais e bandas para a caracterização estrutural das oxazolonas das séries **A**, **B** e **C**.

Como dito anteriormente, as oxazolonas podem ser obtidas como dois isômeros, *i.e.* *E* e *Z*. Desta forma, foi avaliada a estabilidade dos isômeros do composto **35a** ($R_1=Ph$; $R_2=H$) por cálculos de modelagem molecular no programa Spartan 04. Inicialmente os compostos foram construídos utilizando-se a ferramenta de desenho do programa. Em seguida, os compostos sofreram minimização energética por método AM1, seguida de equilíbrio geométrico utilizando base Hartree-Fock 6,31G*. Os resultados estão expressos na Figura 30, onde podemos ver que o isômero *Z* se mostrou o produto termodinâmico, *i.e.*, o de menor energia, sendo aproximadamente 4kcal/mol mais estável comparado ao isômero *E* (Figura 30A). Esta diferença de energia se origina provavelmente pela repulsão estéreo-eletrônica existente entre os pares de elétrons do oxigênio da carbonila e o C-H do anel aromático, uma vez que a fenila está paralela a sub-unidade benzilidênica, devido à conjugação entre os elétrons π das duplas ligações. A Figura 30B demonstra os ângulos de ligação entre a dupla do benzilideno com o carbono C1 do anel aromático e o carbono da carbonila da oxazolona, onde suas somas para o isômero *Z* levam a um valor de 255,55°, enquanto para o isômero *E* de 267,37°, confirmando que esta repulsão entre os átomos gera um aumento de 11,82° na soma dos ângulos de ligação, justificando a menor estabilidade do *E*.

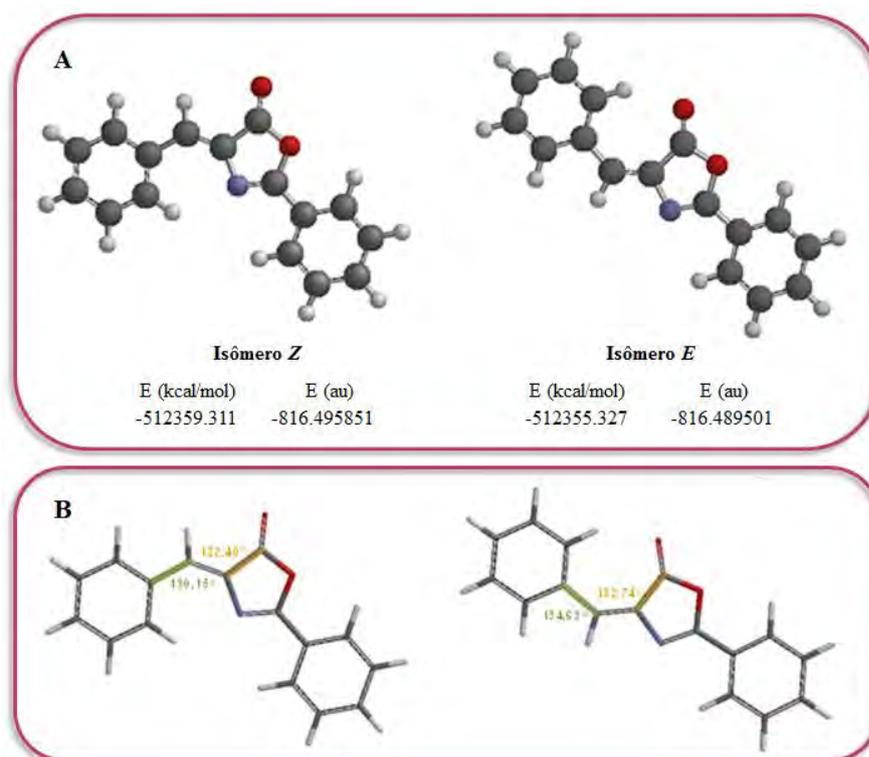


Figura 30. Isômeros geométricos das oxazolonas sintetizadas. Parte A: Diferença energética teórica entre os isômeros *Z* e *E* das oxazolonas sintetizadas. Parte B: Ângulos de ligação formados entre os carbonos em destaque verde e amarelo para os dois isômeros *Z* e *E*.

Com o intuito de se determinar inequivocamente a configuração relativa da dupla ligação presente nos produtos oxazolônicos, foi realizado um experimento de RMN ^{13}C (zgpg30, espectro de carbono acoplado a hidrogênio a longa distância, $J^3\text{CH}$) para observar a constante de acoplamento entre o carbono da carbonila lactônica e o hidrogênio ligado ao carbono benzilidênico do produto **35a** (Figura 31). Foi observada uma constante de acoplamento (J) de 5,45Hz o que caracteriza a presença de uma interação entre estes dois átomos quando da configuração *Z* (Figura 31). Para um produto com configuração relativa *E* seria esperado um valor de J próximo à 12Hz (PROKOF'EV e KARPEISKAYA, 1979). Este resultado era esperado, visto que as condições reacionais favorecem a formação do produto termodinamicamente mais estável que, conforme os cálculos realizados, seria o produto com configuração relativa *Z* (RAO, 1976).

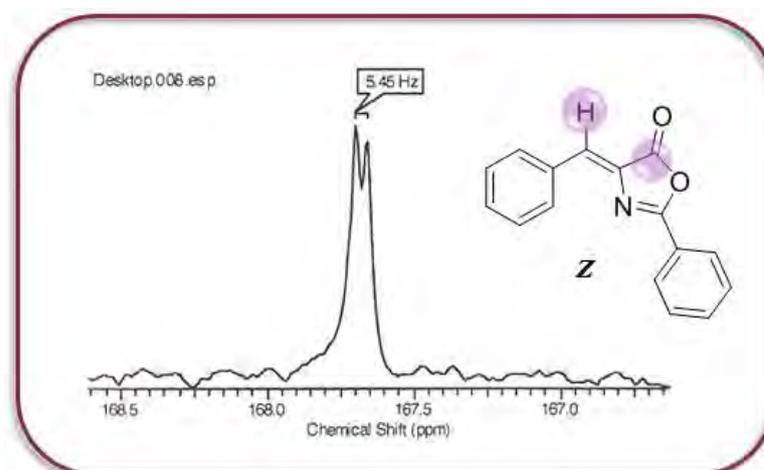


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C para a determinação da configuração relativa da oxazolona 35a. Determinação da configuração relativa *Z* da série das oxazolonas através da constante de acoplamento entre o hidrogênio benzilidênico e a carbonila lactônica em destaque roxo.

Observando os rendimentos reacionais para a síntese das oxazolonas propostas para as séries **A** e **B (35a-j)** foi verificado uma grande variação nestes valores à medida que ocorre a mudança dos grupos substituintes do anel aromático nas mesmas (Tabela 1). Para o melhor entendimento deste fato, foi realizada uma comparação do valor de rendimento da oxazolona sem substituição **35a** com as demais oxazolonas.

As oxazolonas que possuem, inseridos em suas estruturas, grupos (R_2) doadores de elétrons para o anel aromático (EDG), **35c**, **35d**, **35e** e **35f**, apresentaram valores de rendimento reacional mais baixos que a oxazolona não substituída **35a** (Tabela 1). Este fato pode ser explicado através da observação da reatividade dos benzaldeídos substituídos de partida, **33c**, **33d**, **33e** e **33f**, frente à reação de condensação com o núcleo oxazolônico (45) (Esquema 5). Grupos doadores de elétrons promovem a diminuição da carga parcial positiva

sobre o carbono carbonílico do benzaldeído (Figura 32), diminuindo sua reatividade (MARCH, 1992). Quanto menos reativo o benzaldeído, menor é a taxa de condensação com o núcleo oxazolônico e, conseqüentemente, menor seria o rendimento da reação (CLEARY *et al.*, 2010; CHAVEZ *et al.*, 2010).

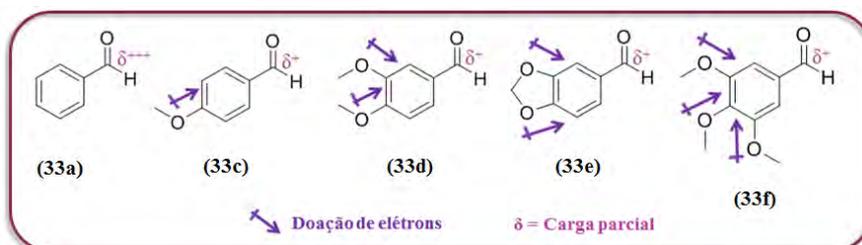


Figura 32. Benzaldeídos com grupos doadores de elétrons. Efeito dos grupos doadores de elétrons por indução e ressonância sobre o centro eletrofílico dos diferentes benzaldeídos utilizados na síntese das oxazolonas.

No entanto, para as oxazolonas que possuem grupos retiradores de elétrons do anel aromático (EWG) como o produto **35h**, o que se observou foi um aumento considerável no rendimento da reação (Tabela 1). Este fato, da mesma maneira que no caso anterior, também pode ser explicado pela avaliação da reatividade do benzaldeído substituído de partida **33h**, frente à condensação com o núcleo oxazolônico. Grupos retiradores de elétrons promovem o aumento da carga parcial positiva sobre o carbono carbonílico do benzaldeído (Figura 33), aumentando sua reatividade (MARCH, 1992) e o rendimento da reação (CLEARY *et al.*, 2010; CHAVEZ *et al.*, 2010).

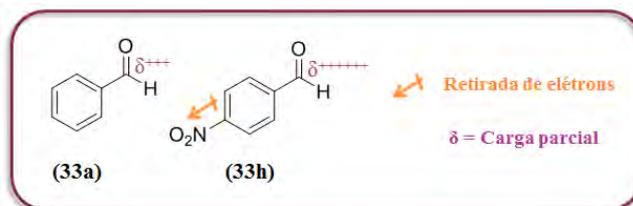


Figura 33. Benzaldeído com grupos retiradores de elétrons. Efeito dos grupos retiradores de elétrons por indução e ressonância sobre o centro eletrofílico dos benzaldeídos utilizados na síntese das oxazolonas.

Para as oxazolonas que possuem halogênios como substituintes **35b**, **35i** e **35j**, foi observado um ligeiro aumento do rendimento reacional, que não se compara com os produtos que possuem grupos retiradores de elétrons (Tabela 1). Este fato ocorre, pois os seus respectivos benzaldeídos substituídos de partida, **33b**, **33i** e **33j**, possuem reatividade intermediária aos que mesmos possuem EDG e EWG. Os halogênios são fracos doadores de elétrons por ressonância e bons retiradores por indução (MARCH, 1992), deste modo, aumentam ligeiramente a carga parcial positiva sobre o carbono carbonílico do benzaldeído e sua reatividade (Figura 34) (CLEARY *et al.*, 2010; CHAVEZ *et al.*, 2010).

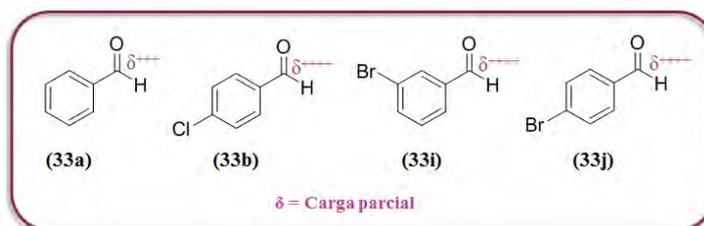
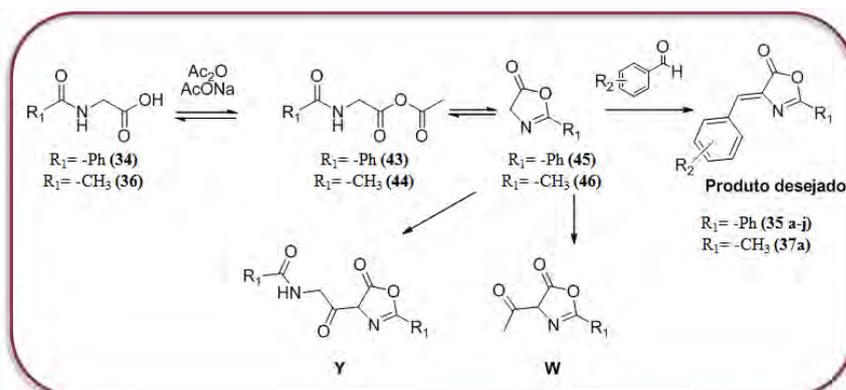


Figura 34. Benzaldeídos com grupos halogênios. Efeito dos grupos retiradores de elétrons por indução e doadores de elétrons ressonância sobre o centro eletrofílico dos benzaldeídos utilizados na síntese das oxazolonas.

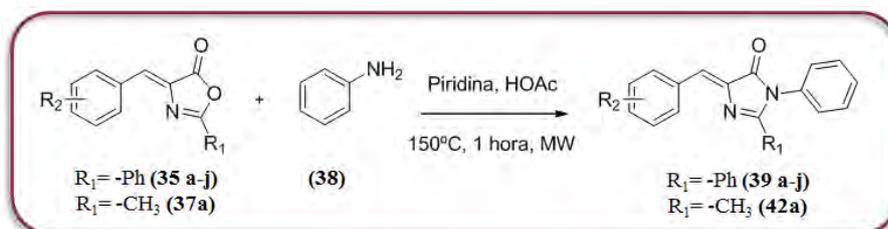
Adicionalmente, quanto mais reativos forem os centros eletrofílicos dos benzaldeídos utilizados na síntese de Erlenmeyer-Plöchl, menores são as chances de ocorrerem reações paralelas que podem levar à formação de produtos indesejáveis e diminuir o rendimento reacional. Estas reações paralelas incluem a condensação do anel oxazolônico com o anidrido acético presente no meio gerando o produto W e com o anidrido misto formado gerando o produto Y (Esquema 6) (CLEARY *et al.*, 2010; CHAVEZ *et al.*, 2010).



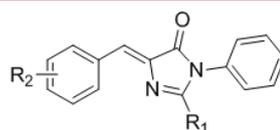
Esquema 6. Reações paralelas na reação de Erlenmeyer. Reações paralelas que podem formar produtos indesejáveis e diminuir o rendimento da reação (Adaptado de CLEARY *et al.*, 2010).

4.2 Síntese das imidazolonas da série A e C

Foram sintetizadas 10 imidazolonas da série A e 1 oxazolona da série C segundo o esquema abaixo (Esquema 7). Estas apresentaram alto grau de pureza segundo análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas, e bons rendimentos reacionais após processo de purificação em cromatografia em coluna de 40-99% (Tabela 2).



Esquema 7. Síntese das imidazolonas das séries A e C. Esquema reacional para a síntese das imidazolonas 39a-j e 42a e obtenção das séries A e C, respectivamente.



Imidazolonas	R ₁	R ₂	Rendimentos (%)	P.f. (°C)
39a	-Ph	H-	61	174
39b	-Ph	4-Cl-	41	200
39c	-Ph	4-CH ₃ O-	71	188
39d	-Ph	3,4-(CH ₃ O-)₂	65	218
39e	-Ph	3,4-(-OCH ₂ O-)	82	214
39f	-Ph	3,4,5-(CH ₃ O)₃	43	219
39g	-Ph	4-OH-	53	248
39h	-Ph	4-NO ₂ -	40	187
39i	-Ph	3-Br-	43	182
39j	-Ph	4-Br-	51	205
42a	-CH ₃	H-	99	161

Tabela 2. Imidazolonas sintetizadas. Imidazolonas sintetizadas das séries **A** e **C**, seus rendimentos e pontos de fusão.

A síntese das imidazolonas tanto para a série **A**, quanto para a **B** e **C**, demandou muita dedicação e tempo empregado, pois as metodologias descritas na literatura para a síntese das mesmas não se mostravam adequadas para a obtenção de todos os produtos da série. A maioria das metodologias descritas fornecia produtos com rendimentos muito baixos e baixo grau de pureza.

Foram realizados testes em diferentes meios reacionais como, por exemplo, em meio aquoso de ácido acético e acetato de sódio (MADHAVI *et al.*, 2010), em piridina (KHAN *et al.*, 2010), em dioxano, foram realizadas reações em fase sólida, (BIPLAB *et al.*, 2005) com carbonato de potássio em etanol (LEE *et al.*, 2012), sob aquecimento convencional (LINGI *et al.*, 1969), aquecimento em micro-ondas (KHAN *et al.*, 2010), foram utilizadas diferentes metodologias de purificação como recristalização em etanol (KHAN *et al.*, 2009) e purificação em coluna cromatográfica (KHAN *et al.*, 2010), dentre outras. Todas estas metodologias foram testadas em diferentes concentrações de reagentes e em diferentes tempos reacionais com acompanhamento em cromatografia em camada delgada (CCD).

Depois de muitas tentativas para encontrar uma metodologia adequada para a preparação das imidazolonas propostas neste trabalho, uma se mostrou inicialmente adequada para obtenção de **39a** (R₁=Ph; R₂=H) e **39c** (R₁=Ph; R₂=OCH₃): a reação entre a oxazolona preparada anteriormente e anilina em meio de ácido acético catalisada por acetato de sódio em aquecimento em tubo selado à 120°C por 1 dia (MADHAVI *et al.*, 2010), na proporção de 1 equivalente (eq) de oxazolona para 2eq de anilina e 0,2eq de acetato de sódio. O produto **39a**

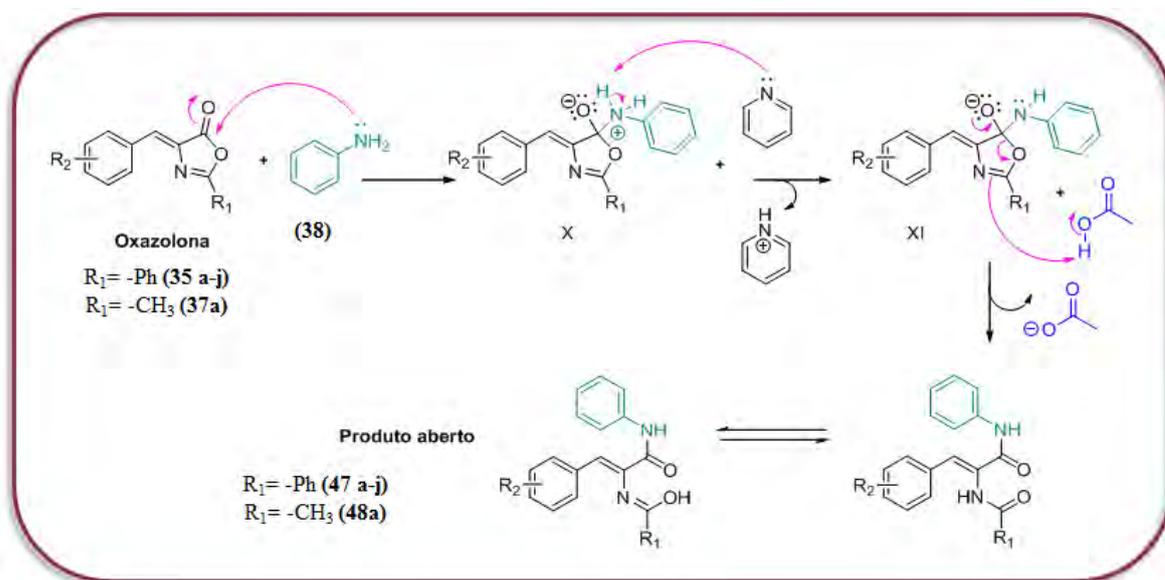
apresentou 50% de rendimento após purificação em coluna cromatográfica, e 32% de rendimento após recristalização em etanol, enquanto que o produto **39c** apresentou rendimento de 61% após cromatografia em coluna. Para as outras imidazolonas sintetizadas, os rendimentos obtidos foram inferiores a 30% e algumas não foram purificadas, pois através da análise da reação por CCD, verificou-se que a quantidade de produto formado era mínima em comparação com a quantidade de impurezas.

Na tentativa de desenvolver uma metodologia para a obtenção de todas as imidazolonas planejadas, e não somente privilegiar a formação de algumas, foi testada uma nova metodologia para a condensação da oxazolona **35a** com a anilina na presença de piridina sob aquecimento em chapa à 150°C por 1 dia (LINGI *et al.*, 1969). Observou-se então a formação do produto desejado, através do acompanhamento da reação por CCD, assim como a intensa formação de um subproduto de maior polaridade, que após ser purificado apresentou coloração branca, que não foi caracterizado. Acredita-se que este subproduto seja o produto de condensação de cadeia aberta (47 ou 48) já descrito na literatura como intermediário desta reação (LEE *et al.*, 2012) (Esquema 8). A mesma metodologia também testada sob aquecimento em micro-ondas à 150°C (KHAN *et al.*, 2010) também não resultou em bons rendimentos reacionais.

Curiosamente, observou-se em um trabalho paralelo, a formação da imidazolona desejada através da reação de condensação entre a 2-carbóxi-anilina e a oxazolona **35a** em meio de piridina com as mesmas condições aplicadas anteriormente (KHAN *et al.*, 2010). A respectiva imidazolona apresentou bom rendimento reacional após processo de purificação por cromatografia em coluna (acima de 60%). Desta maneira, postulou-se que deveria existir uma importância do grupo ácido carboxílico presente na anilina utilizada para o bom funcionamento do processo de ciclização. Desta forma, foi sugerida a adição de um catalisador ácido (1eq) à metodologia citada anteriormente, como uma fonte de prótons, para auxiliar no processo de reciclagem do intermediário aberto obtido (47 ou 48) em maiores proporções (Esquema 9). Otimizações destas condições reacionais mostraram que os produtos poderiam ser obtidos em bons rendimentos por aquecimento em micro-ondas à 150°C por 1 hora.

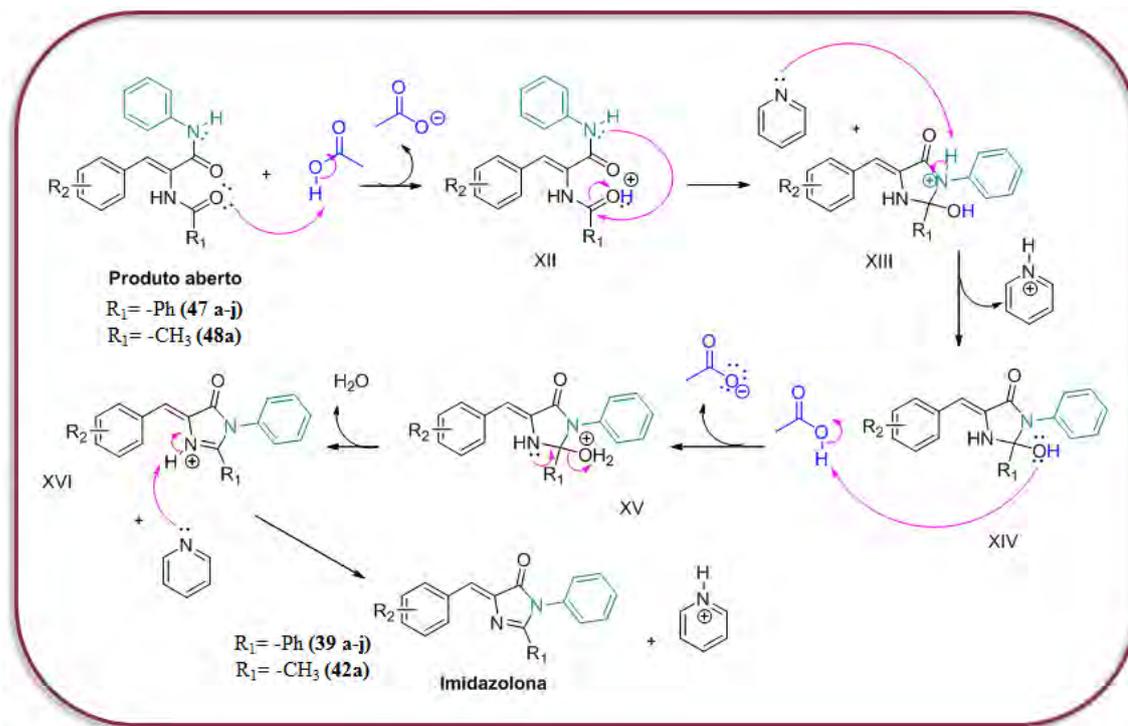
Sabe-se que a reação passa pela formação de um intermediário de cadeia aberta que se forma rapidamente, e posteriormente sofre um longo processo de reciclagem (LEE *et al.*, 2012). Na primeira etapa ocorre a condensação da amina com a oxazolona presente no meio reacional através de reação de substituição ao carbono acílico (S_NAc), que se inicia através do

ataque nucleofílico do nitrogênio da amina ao centro eletrofílico da oxazolona, formando o intermediário tetraédrico X (Esquema 8). Este é desprotonado pela piridina presente no meio gerando o intermediário XI, que por sua vez, ao restituir a dupla ligação, forma o produto aberto (47 ou 48) para a próxima etapa reacional (Esquema 8).



Esquema 8. Primeira etapa da reação de formação das imidazolonas das séries A e C. Ataque nucleofílico da amina sobre o centro eletrofílico da oxazolona para a formação do intermediário aberto.

A etapa seguinte consiste na reciclagem intramolecular do produto aberto (47 ou 48) após a condensação com a amina aromática com subsequente eliminação de água (Esquema 9). Esta etapa inicia-se com a ativação da carbonila do produto aberto formando o intermediário XII. Este sofre ataque nucleofílico intramolecular do nitrogênio amídico gerando o intermediário XIII, que posteriormente é desprotonado pela piridina formando o intermediário XIV. Após abstração de um próton este último intermediário forma um bom grupo abandonador na sua estrutura, XV, que após eliminação (XVI) e desprotonação forma as imidazolonas desejadas (Esquema 9).



Esquema 9. Segunda etapa da reação de formação das imidazolonas das séries A e C. Reciclagem do intermediário aberto com consequente eliminação de água e formação das imidazolonas **39a-j** e **42a**, para a obtenção das séries A e C, respectivamente.

Para determinar a formação dos compostos propostos foram realizados diversos experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C , ponto de fusão (Tabela 2), espectrofotometria no IV e espectrofotometria de massas (anexos). Alguns sinais característicos puderam comprovar a formação desta classe de compostos como o sinal entre 7,30-7,21ppm no espectro de RMN ^1H e 128,4-124,0ppm no RMN ^{13}C , referentes ao hidrogênio e ao carbono benzilidênicos (Figura 37). Curiosamente, alguns compostos, mesmo após purificação cromatográfica, apresentaram duplicação de sinais, indicando uma isomerização parcial da dupla ligação do carbono benzilidênico, conforme descrito na Tabela 3.

Como realizado anteriormente, avaliamos a estabilidade dos isômeros do composto **39a** por cálculos de modelagem molecular no programa Spartan 04. Os resultados estão expressos na Figura 35, onde podemos ver que, novamente, o isômero Z se mostrou o produto termodinâmico, isto é, o de menor energia, sendo aproximadamente 6kcal/mol mais estável comparado ao isômero E (Figura 35). Como para as oxazolonas, essa diferença de energia se dá provavelmente devido a repulsão estereo-eletrônica entre os pares de elétrons do oxigênio da carbonila e o C-H do anel aromático. Mais uma vez, o experimento de RMN ^{13}C acoplado a hidrogênio ($J^3\text{CH}$) foi realizado com a carbonila em maior proporção do produto **39c**

($R_1=Ph$; $R_2=OCH_3$), indicando um acoplamento de 4,54Hz, característico do isômero *Z* (PROKOF'EV e KARPEISKAYA, 1979), o que confirma os resultados teóricos (Figura 36).

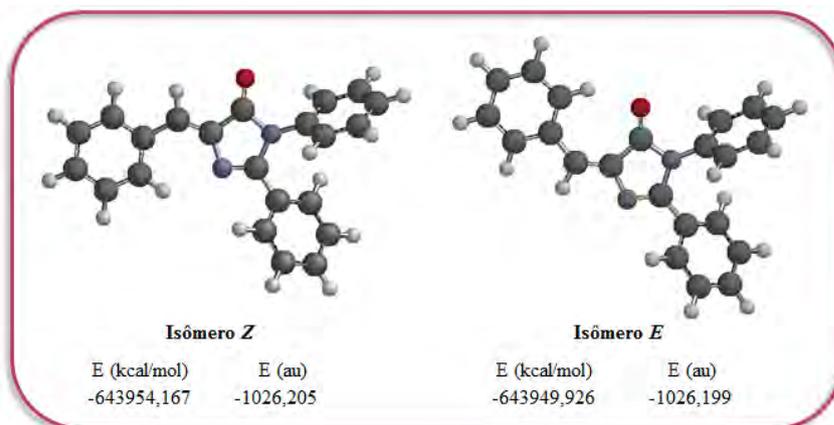


Figura 35. Isômeros geométricos das imidazolonas sintetizadas. Diferença energética teórica entre os isômeros *Z* e *E* das imidazolonas sintetizadas.

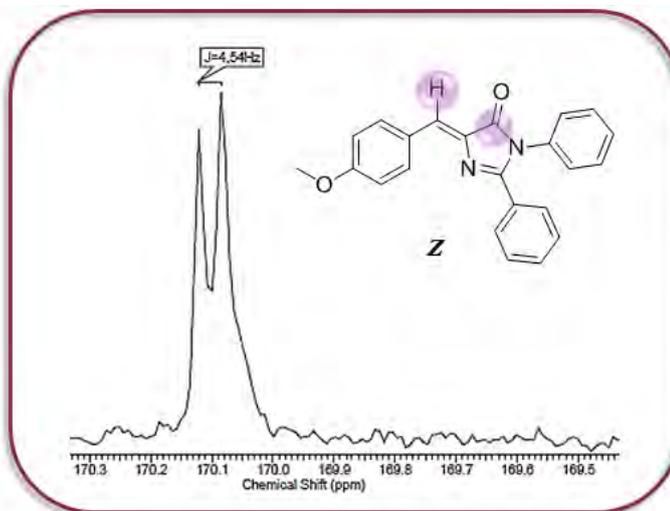
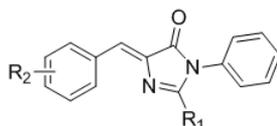


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C para a determinação da configuração relativa da imidazolona 39c. Determinação da configuração relativa *Z* da série das imidazolonas através da constante de acoplamento entre o hidrogênio benzilidênico e a carbonila lactônica em destaque roxo.

Assim, a proporção dos isômeros foi calculada por correlação direta dos sinais referentes aos hidrogênios 5 e 9, onde atribuiu-se ao de maior proporção e mais blindado a configuração *Z* (Tabela 3).



Imidazolonas	R ₁	R ₂	E:Z(%)
39a	-Ph	H-	0:100
39b	-Ph	4-Cl-	0:100
39c	-Ph	4-CH ₃ O-	10:90
39d	-Ph	3,4-(CH ₃ O-)₂	0:100
39e	-Ph	3,4-(OCH ₂ O-)	10:90
39f	-Ph	3,4,5-(CH ₃ O-)₃	0:100
39g	-Ph	4-OH-	0:100
39h	-Ph	4-NO ₂ -	0:100
39i	-Ph	3-Br-	0:100
39j	-Ph	4-Br-	5:95
42a	-CH ₃	H-	0:100

Tabela 3. Proporção isomérica das imidazolonas das séries A e C. Proporção entre os isômeros *E* e *Z* para as imidazolonas **39a-j** da série A e **42a** da série C.

Cabe destacar, a diminuição dos valores de deslocamento químico no espectro de carbono para o carbono benzilidênico (Figura 37) das imidazolonas formadas, em comparação com as oxazolonas de origem **35a-j** (Figura 29), comprovando a transformação do anel oxazolônico em imidazolônico através da síntese proposta. A presença de sinais na região entre 7,0-8,5ppm no espectro de hidrogênio caracterizou a presença de hidrogênios ligados aos sistemas aromáticos, presentes nos produtos sintetizados. O sinal no espectro de carbono entre 169,8-169,1ppm caracterizou a presença da carbonila lactâmica presente no núcleo imidazolônico, assim como o sinal entre 163,1-159,1ppm caracterizaram a presença do carbono ligado ao nitrogênio através de dupla ligação presente no núcleo imidazolônico (Figura 37). Também pôde-se observar a diminuição dos valores de deslocamento químico para os sinais no espectro de carbono referentes ao carbono amidínico e o aumento dos valores de deslocamento químico para o carbono carbonílico, se comparados com os sinais das oxazolonas de origem **35a-j** (Figura 29). Fato que corrobora para determinar a formação do produto imidazolônico desejado. Sinais em 2,22ppm e 16,28ppm nos espectros de RMN ¹H e ¹³C, respectivamente, caracterizaram a presença da metila na imidazolona **42a** da série C (Figura 37). Bandas no espectro de infravermelho (IV) também auxiliaram no processo de caracterização como as que aparecem na região de 1728-1706cm⁻¹, referentes ao estiramento da ligação e C=O da carbonila lactâmica conjugada com a dupla ligação. Esta banda também difere da banda encontrada no espectro das oxazolonas de origem **35a-j** (Figura 29), onde a mesma se encontra em 1797-1780cm⁻¹. A presença da banda em 1651-1635cm⁻¹ caracterizou o estiramento da ligação C=C da dupla ligação das imidazolonas sintetizadas e as bandas em

1597-1553 e 1464-1440 cm^{-1} caracterizaram a presença de anéis aromáticos pelo estiramento das ligações C=C do anel (Figura 37).

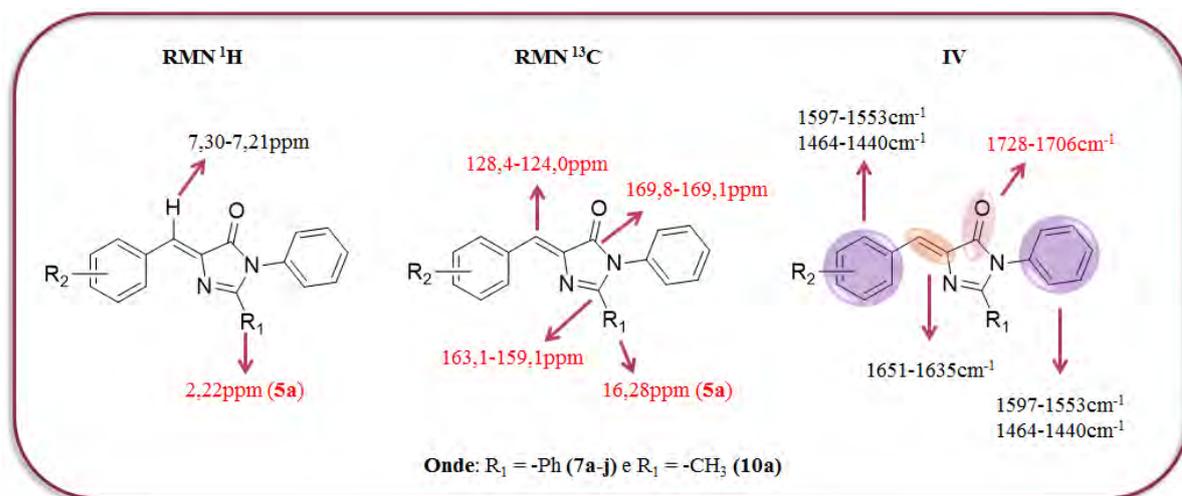


Figura 37. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das imidazolonas das séries A e C. Principais sinais e bandas para a caracterização estrutural das imidazolonas **39a-j** e **42a** das séries A e C, respectivamente. Em letras vermelhas, estão destacadas as diferenças de sinais e bandas nos espectros de RMN e IV presentes nas imidazolonas em comparação com as oxazolonas de origem.

Visto que as imidazolonas sintetizadas apresentam mais de um núcleo aromático em sua estrutura, a determinação estrutural destes compostos apresentou-se como um desafio com relação à atribuição dos sinais observados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C . De maneira a solucionar este problema, foram realizados espectros de RMN de correlação ou bidimensionais para a correta atribuição dos sinais observados nos espectros unidimensionais. Os espectros foram obtidos a partir da estrutura **39a** da série A, devido à sua maior disponibilidade quantitativa, mas pela semelhança dos núcleos das séries sintetizadas neste trabalho, a atribuição dos sinais pôde ser estendida para as séries B e C.

Com o propósito de se determinar a proximidade espacial entre os núcleos de hidrogênio presentes nas séries sintetizadas foi realizado um espectro de RMN NOESY (SILVERSTEIN *et al.*, 2007) do produto **39a** (Figura 38). Através deste, pôde-se verificar a interação entre dois sinais no espectro de hidrogênio, o sinal em 8,37ppm e em 7,29ppm (Figura 38), caracterizando a interação espacial entre um átomo de hidrogênio blindado e dois átomos de hidrogênios desblindados. O sinal localizado em campo alto é correspondente ao hidrogênio benzilidênico (hidrogênio 3) (Figura 38), pois este é protegido através do efeito de cone de proteção gerado pela carbonila vizinha, este fenômeno é conhecido como anisotropia magnética (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Deste modo, o sinal observado em campo baixo com integração para 2 hidrogênios é referente aos hidrogênios *orto* ao benzilideno (hidrogênios 5 e 9) (Figura 38).

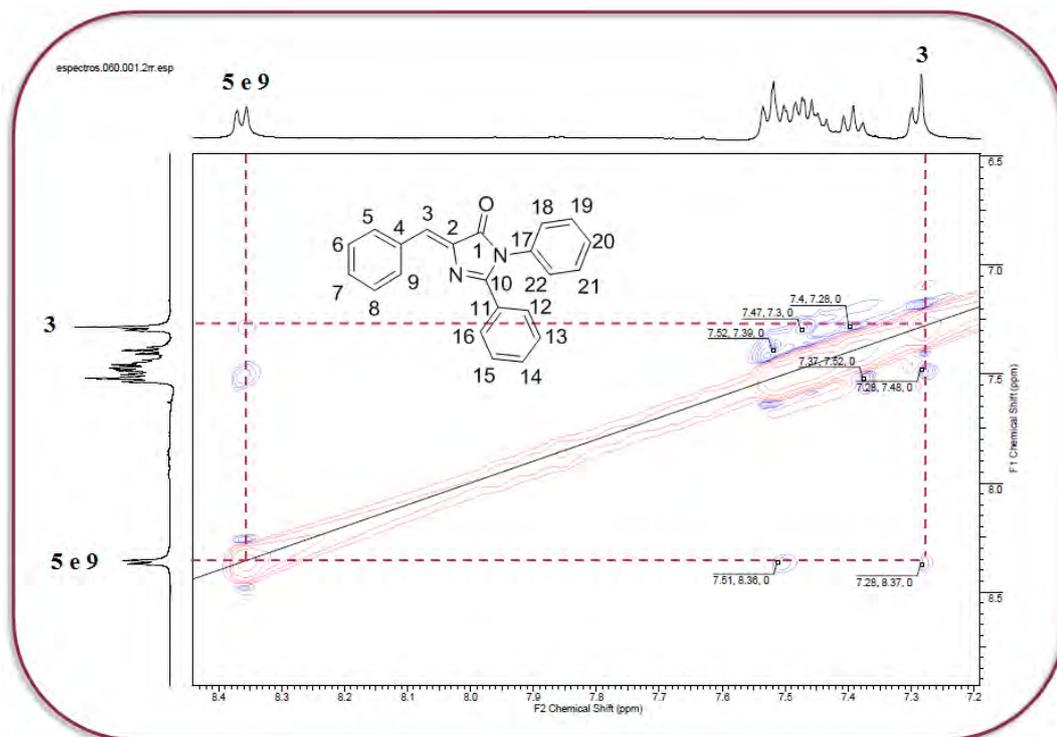


Figura 38. Espectro de RMN bidimensional NOESY para o produto 39a. Interação espacial entre os átomos de hidrogênio presentes nas posições 3, 5 e 9 para o produto 39a.

Através da atribuição dos dois sinais no espectro de hidrogênio descritos anteriormente, foi possível determinar no espectro de carbono os sinais correspondentes aos carbonos ligados a estes hidrogênios através de um experimento de HSQC. Este visualiza o acoplamento entre os núcleos de carbono e de hidrogênio presentes na estrutura do produto através de uma ligação covalente, J^1 (SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

A Figura 39 demonstra uma ampliação no espectro de HSQC na faixa de 8,50-8,20ppm para o espectro de hidrogênio, eixo horizontal, e 134,0-130,0ppm no espectro de carbono, eixo vertical. Observou-se o acoplamento do tipo J^1 entre os hidrogênios *orto* ao benzilideno (hidrogênios 5 e 9) em 8,37ppm no espectro de hidrogênio com um sinal em 132,37ppm no espectro de carbono (Figura 39). Como o experimento de HSQC demonstra o acoplamento entre carbono e hidrogênio através de uma ligação, acreditou-se que o sinal em 132,37ppm pode ser atribuído aos carbonos *orto* ao benzilideno (carbonos 5 e 9) (Figura 39).

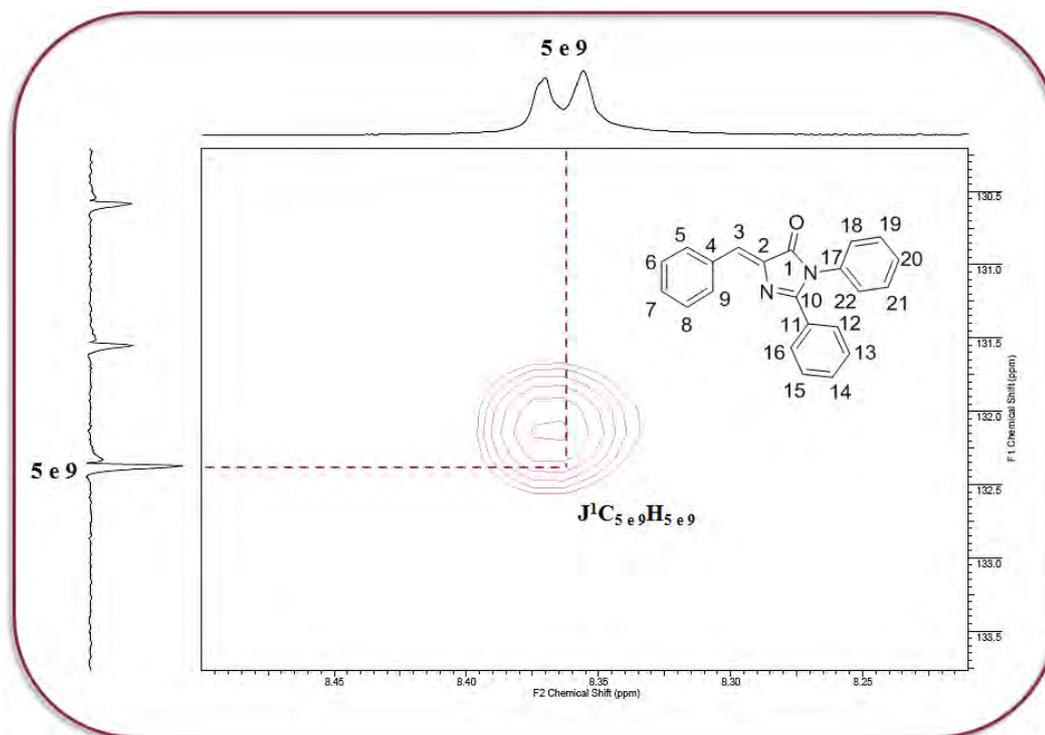


Figura 39. Espectro de RMN bidimensional HSQC ampliado na região de 8,50-8,20ppm para ^1H e 134,0-130,0ppm para ^{13}C para o produto **39a**. Acoplamento entre o átomo de carbono e de hidrogênio através de uma ligação covalente para o produto **39a**. Visualização do acoplamento entre os hidrogênios 5 e 9 e os carbonos 5 e 9.

A Figura 40 é referente a uma ampliação do espectro de HSQC na região de 7,55-7,25ppm para o espectro de hidrogênio, eixo horizontal, e 132,0-127,0ppm no espectro de carbono, eixo vertical. Foi observado acoplamento do tipo J^1 entre o sinal respectivo ao hidrogênio benzilidênico (hidrogênio 3) em 7,29ppm no espectro de ^1H e um sinal em 127,67ppm no espectro de ^{13}C (Figura 40). Desta maneira, atribuiu-se este último sinal ao carbono benzilidênico (carbono 3) (Figura 40).

O sinal observado entre 7,33-7,25ppm no espectro de RMN ^1H (Figura 40) corresponde a uma fusão de sinais referentes ao hidrogênio benzilidênico (hidrogênio 3), já discutido anteriormente, e aos hidrogênios *orto* à amida presente na estrutura do produto (hidrogênios 18 e 22). Acreditou-se que estes últimos, por serem blindados através do efeito de ressonância realizado pela doação de elétrons para o anel pelo nitrogênio amídico, estão deslocados para campo alto diferente dos outros sinais de hidrogênio ligados a sistemas aromáticos presentes nos produtos sintetizados. Através da visualização do espectro de RMN HSQC (Figura 40) também pôde ser observado o acoplamento do tipo J^1 entre os hidrogênios *orto* à amida (hidrogênios 18 e 22), em 7,33-7,25ppm no espectro de RMN ^1H , com o sinal em 127,90ppm no espectro de ^{13}C . Desta maneira, atribuiu-se este último sinal aos carbonos em posição *orto* à amida (carbonos 18 e 22) presentes nos produtos sintetizados (Figura 40).

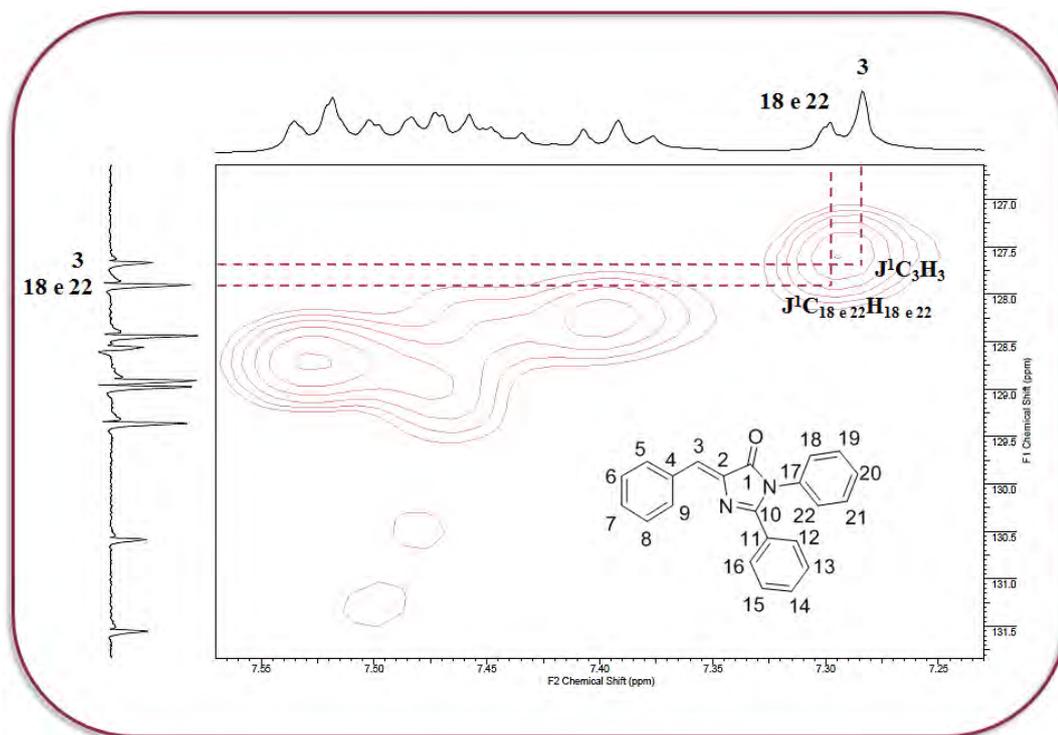


Figura 40. Espectro de RMN bidimensional HSQC ampliado na região de 7,55-7,25ppm para ^1H e 132,0-127,0ppm para ^{13}C para o produto **39a**. Acoplamento entre o átomo de carbono e de hidrogênio através de uma ligação covalente para o produto **39a**. Visualização do acoplamento entre o hidrogênio 3 e o carbono 3, assim como entre os hidrogênios 18 e 22 e os carbonos 18 e 22.

A fim de se determinar os sinais remanescentes, foi realizado um experimento para observar o acoplamento entre os átomos de carbono e hidrogênio a três ligações covalentes de distância entre eles, o espectro de RMN HMBC (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A Figura 41 é referente a uma ampliação deste espectro na região de 7,65-7,20ppm para o espectro de hidrogênio, eixo horizontal, e 175,0-155,0ppm no espectro de carbono, eixo vertical. Foi observado acoplamento do tipo J^3 entre o sinal respectivo ao hidrogênio benzilidênico (hidrogênio 3) em 7,29ppm no espectro de RMN ^1H e um sinal em 169,75ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figura 41). Desta maneira, atribuiu-se este último sinal ao carbono carbonílico (carbono 1) (Figura 41).

O sinal em 160,85ppm no espectro de carbono foi atribuído ao carbono amídínico (carbono 10) pela desblindagem promovida pelos dois átomos de nitrogênio ligados diretamente à este. Tendo posse desta informação, a correlação observada entre um conjunto de sinais em aproximadamente 7,52ppm no espectro de hidrogênio e o referente sinal no espectro de carbono sugere o acoplamento entre estes núcleos através de três ligações de distância (Figura 41). Desta maneira, atribuiu-se ao conjunto de sinais em 7,52ppm no espectro de RMN ^1H aos hidrogênios *orto* à amidina (hidrogênios 12 e 16) (Figura 41).

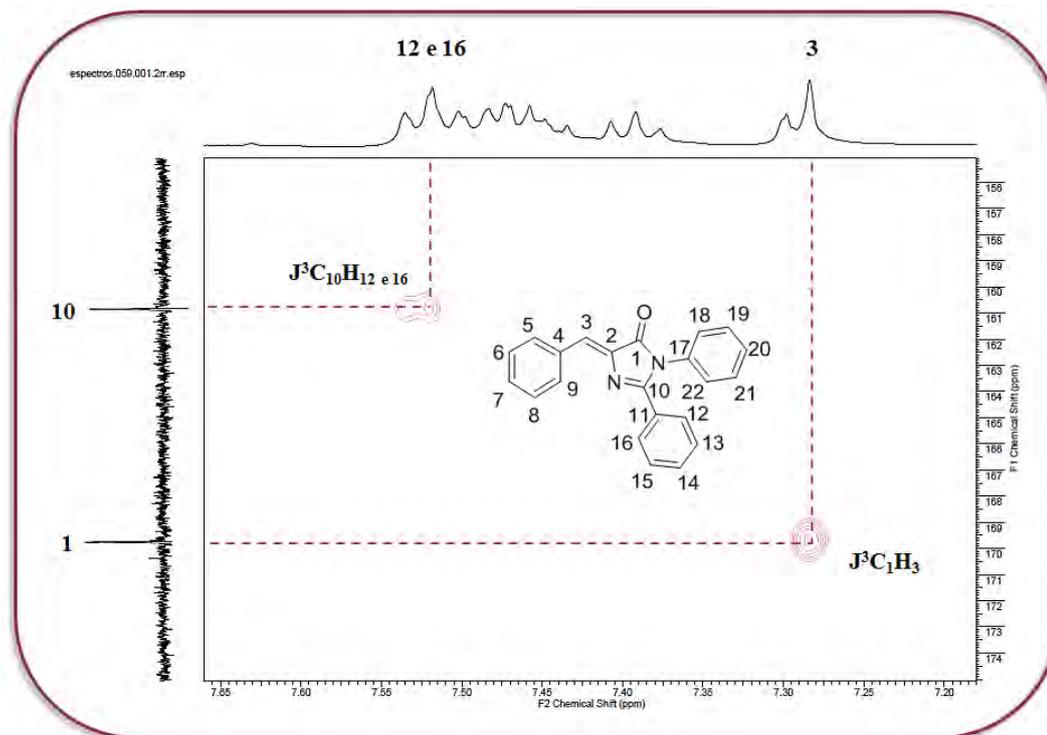


Figura 41. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 7,65-7,20ppm para ^1H e 175,0-155,0ppm para ^{13}C para o produto **39a**. Acoplamento entre o átomo de carbono e de hidrogênio através de três ligações covalentes para o produto **39a**. Visualização do acoplamento J^3 entre o hidrogênio 3 e o carbono 1, assim como entre os hidrogênios 12 e 16 e o carbono 10.

A Figura 42 demonstra a correlação de sinais para os hidrogênios *orto* ao benzilideno. Esta figura é referente a um espectro de HMBC com ampliação na região de 8,40-8,30ppm para o espectro de hidrogênio, eixo horizontal, e 133,0-126,0ppm no espectro de carbono, eixo vertical. Foi observado acoplamento do tipo J^3 entre o sinal respectivo aos hidrogênios *orto* ao benzilideno (hidrogênios 5 e 9) em 8,37ppm no espectro de RMN ^1H e um sinal em 127,67ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figura 42). Desta maneira, pôde ser comprovada a atribuição feita anteriormente, onde o sinal em 127,67ppm foi atribuído ao carbono benzilidênico (carbono 3) (Figura 42). Também foi observada outra correlação entre os hidrogênios *orto* ao benzilideno (hidrogênios 5 e 9) com um sinal presente no espectro de carbono em 130,58ppm (Figura 42). Desta maneira, pôde-se atribuir este sinal ao carbono *para* ao benzilideno (carbono 7) pelo acoplamento do tipo J^3 , observado entre este e os hidrogênios em questão (hidrogênios 5 e 9) (Figura 42).

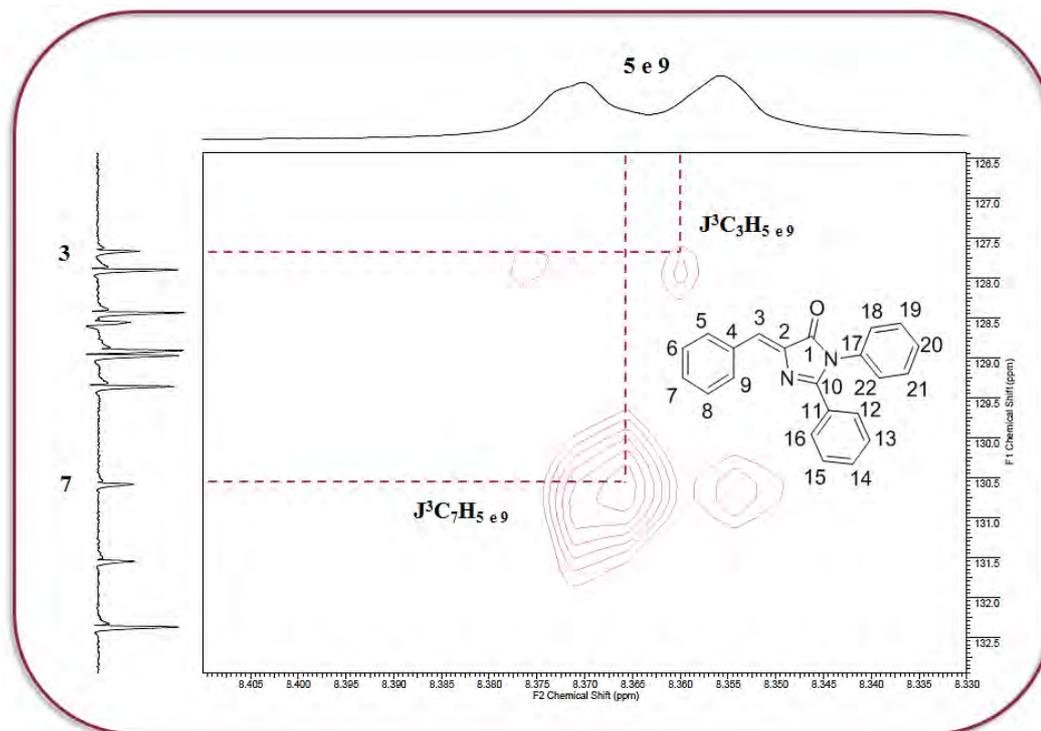


Figura 42. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 8,40-8,30ppm para ^1H e 133,0-126,0ppm para ^{13}C para o produto **39a**. Acoplamento entre o átomo de carbono e de hidrogênio através de três ligações covalentes para o produto **39a**. Visualização do acoplamento J^3 entre os hidrogênios 5 e 9 e o carbono 3, assim como entre os hidrogênios 5 e 9 e o carbono 7.

A Figura 43 é referente a um espectro de HMBC com ampliação na região de 7,30-7,25ppm para o espectro de hidrogênio, eixo horizontal, e 133,0-127,0ppm no espectro de carbono, eixo vertical. Foi observado acoplamento do tipo J^3 entre o sinal respectivo ao hidrogênio benzilidênico (hidrogênio 3) em 7,29ppm no espectro de RMN ^1H e um sinal em 132,37ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figura 43). Desta maneira, pôde ser comprovada a atribuição feita anteriormente, onde o sinal em 132,37ppm foi atribuído aos carbonos na posição *orto* ao benzilidênico (carbonos 5 e 9) (Figura 43). Também foi observada outra correlação entre os hidrogênios *orto* à amida (hidrogênios 18 e 22) com um sinal presente no espectro de carbono em 128,56ppm (Figura 43). Desta maneira, pôde-se atribuir este sinal ao carbono *para* à amida (carbono 20) pelo acoplamento do tipo J^3 , observado entre este e os hidrogênios em questão (hidrogênios 18 e 22) (Figura 43).

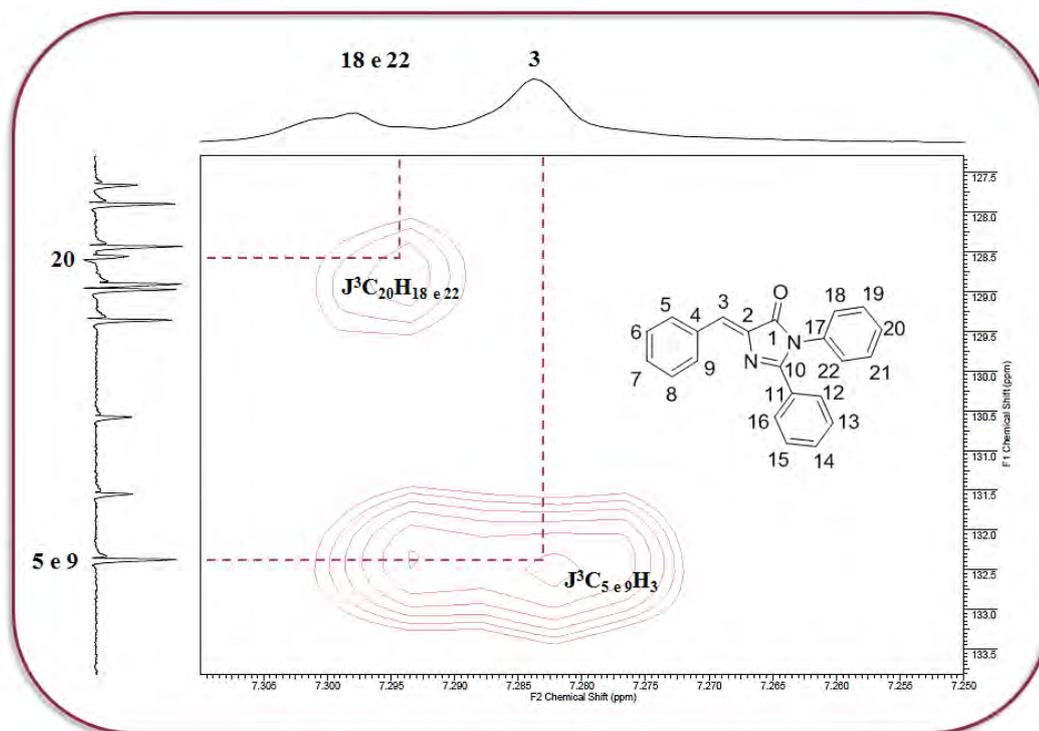
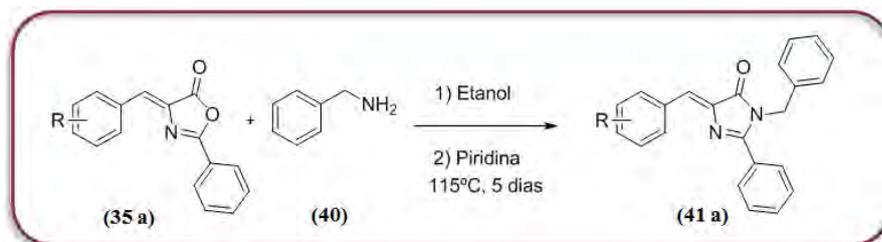


Figura 43. Espectro de RMN bidimensional HMBC ampliado na região de 7,30-7,25ppm para ^1H e 133,0-127,0ppm para ^{13}C para o produto **39a**. Acoplamento entre o átomo de carbono e de hidrogênio através de três ligações covalentes para o produto **39a**. Visualização do acoplamento J^3 entre os hidrogênios 18 e 22 e o carbono 20, assim como entre o hidrogênio 3 e os carbonos 5 e 9.

Os sinais restantes foram atribuídos por exclusão como, por exemplo, o sinal em 131,55ppm no espectro de carbono foi atribuído ao carbono *para* à amidina (carbono 14) no produto **39a**. Os outros sinais foram atribuídos conforme modelos teóricos gerados pelo programa ACDLABS 12.0.

4.3 Síntese das imidazolonas da série B

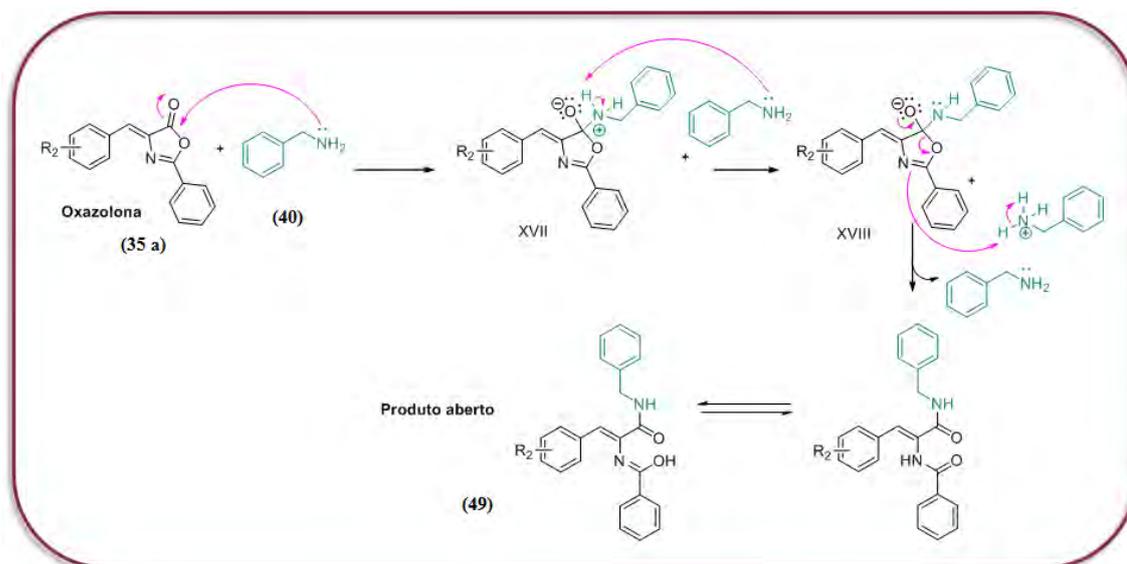
Foi sintetizada somente 1 imidazolona para a obtenção da série **B** segundo o esquema abaixo (Esquema 10). Esta apresentou alto grau de pureza segundo análise de espectros de RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas, e bom rendimento reacional após processo de purificação em cromatografia em coluna de 53%. Seu ponto de fusão foi de 138°C. Apresentou também formação de isômeros geométricos na proporção de 85% para o isômero *Z* e 15% para o isômero *E*. A proporção dos isômeros foi calculada por correlação direta dos sinais referentes aos hidrogênios 5 e 9, onde atribuiu-se ao de maior proporção e mais blindado a configuração *Z*.



Esquema 10. Síntese da imidazolona da série B. Esquema reacional para a síntese da imidazolona **41a** para a obtenção da série **B**.

A reação utilizada para a síntese da série **B** foi feita em duas etapas (Esquema 10). A primeira consiste na reação entre a oxazolona **35a**, sintetizada anteriormente, e a benzilamina (40) em meio de etanol, formando um produto intermediário de cadeia aberta. Este, em uma segunda etapa, é ciclizado em piridina para a obtenção do produto **41a** (Esquema 10) (LEE *et al.*, 2012).

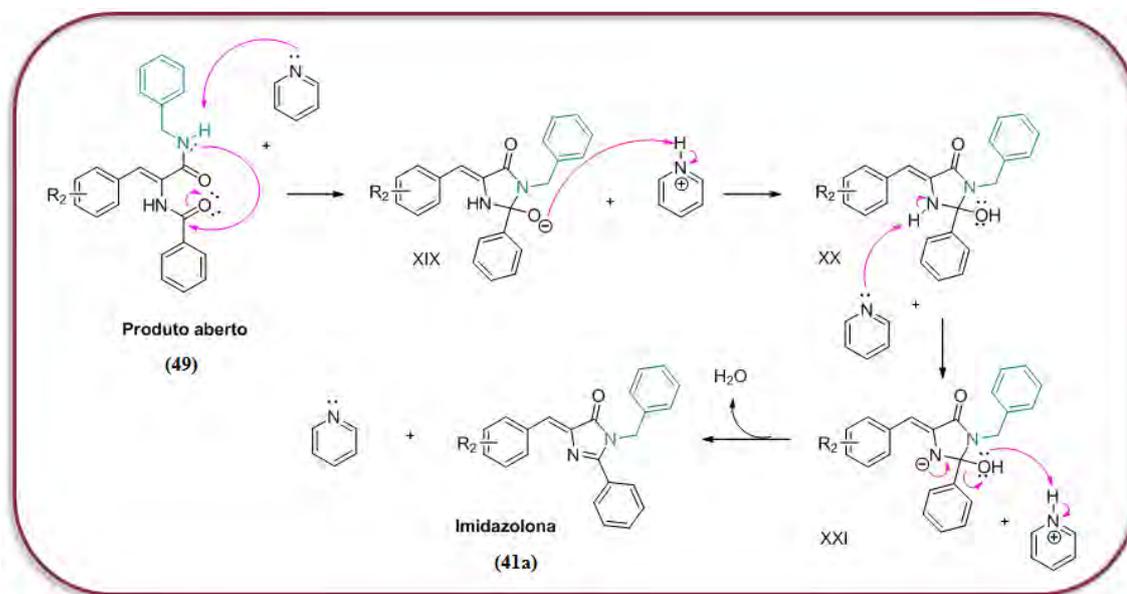
O mecanismo desta reação inicia-se na primeira etapa com a formação do intermediário tetraédrico de reação XVII após ataque nucleofílico da benzilamina sobre o centro eletrofílico da oxazolona **35a** que, por sua vez, sofre desprotonação para a obtenção do intermediário XVIII. Este, ao restituir a dupla ligação, promove a formação do produto aberto (49) (Esquema 11).



Esquema 11. Primeira etapa da reação de formação das imidazolonas da série B. Ataque nucleofílico da amina sobre o centro eletrofílico da oxazolona para a formação do intermediário aberto.

A etapa seguinte consiste na reciclagem intramolecular do produto aberto (49) após a condensação com a amina, com subsequente eliminação de água (Esquema 12). Esta etapa inicia-se com ataque nucleofílico intramolecular do nitrogênio amídico à carbonila do produto aberto (49) gerando o intermediário XIX. Através da doação de próton realizada pela piridina

protonada gerada na etapa anterior ocorre a formação do intermediário XX. Este último sofre desprotonação e forma o intermediário XXI que, por sua vez, promove a formação de dupla ligação com subsequente eliminação de água, gerando as imidazolonas desejadas (Esquema 12).



Esquema 12. Segunda etapa da reação de formação das imidazolonas das séries **B**. Reciclagem do intermediário aberto com consequente eliminação de água e formação da imidazolona **41a**.

Para se determinar a formação dos compostos propostos foram realizados diversos experimentos de determinação estrutural como RMN 1H e ^{13}C , ponto de fusão, espectrofotometria no IV e espectrofotometria de massas (anexos). Alguns sinais característicos puderam comprovar a formação desta classe de compostos como o sinal em 7,29ppm no espectro de RMN 1H e 127,38ppm no RMN ^{13}C , referentes ao hidrogênio e ao carbono benzilidênicos (Figura 44), atribuídos aos isômeros *Z*. A imidazolona **41a** também apresentou, mesmo após purificação cromatográfica, duplicação de sinais, indicando uma isomerização parcial da dupla ligação do carbono benzilidênico, onde atribuiu-se ao sinal de maior proporção e mais blindado a configuração *Z*, assim como para as imidazolonas da série **A**.

De maneira semelhante às imidazolonas das séries **A** e **C**, também foi observado para a série **B** uma diminuição do valor de deslocamento químico no espectro de carbono para o carbono benzilidênico (Figura 44) em comparação com a oxazolona de origem **35a**, em 133,33ppm no RMN ^{13}C (Figura 29), comprovando a transformação do anel oxazolônico em imidazolônico através da síntese proposta. A presença de sinais na região entre 7,0-8,5ppm no espectro de hidrogênio caracterizaram a presença de hidrogênios ligados aos sistemas

aromáticos, presentes nos produtos sintetizados. O sinal no espectro de carbono em 170,76ppm caracterizou a presença da carbonila lactâmica presente no núcleo imidazolônico, assim como o sinal em 162,75ppm caracterizou a presença do carbono amidínico presente no núcleo imidazolônico (Figura 44). Também pôde-se observar um aumento do valor de deslocamento químico para o sinal no espectro de carbono descrito para o carbono carbonílico (Figura 44), se comparado com o sinal da oxazolona de origem **35a**, em 167,63ppm no espectro de RMN ^{13}C (Figura 29). Fato que corrobora para determinar a formação do produto imidazolônico desejado. Sinais em 4,98ppm e 44,52ppm nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , respectivamente, caracterizaram a presença do grupo metileno que só pode ser observado após a reação de condensação da oxazolona com a benzilamina, comprovando novamente a obtenção da imidazolona desejada (Figura 44). Bandas no espectro de infravermelho (IV) também auxiliaram no processo de caracterização como as que aparecem na região de 1712cm^{-1} (Figura 44), referentes ao estiramento da ligação e C=O da carbonila lactâmica conjugada com a dupla ligação. Esta banda também difere da banda encontrada no espectro da oxazolona de origem **35a**, em 1793cm^{-1} no IV (Figura 29). A presença da banda em 1639cm^{-1} caracterizou o estiramento da ligação C=C da dupla ligação das imidazolonas sintetizadas e as bandas em 1595cm^{-1} e 1444cm^{-1} caracterizaram a presença de anéis aromáticos pelo estiramento das ligações C=C do anel (Figura 44).

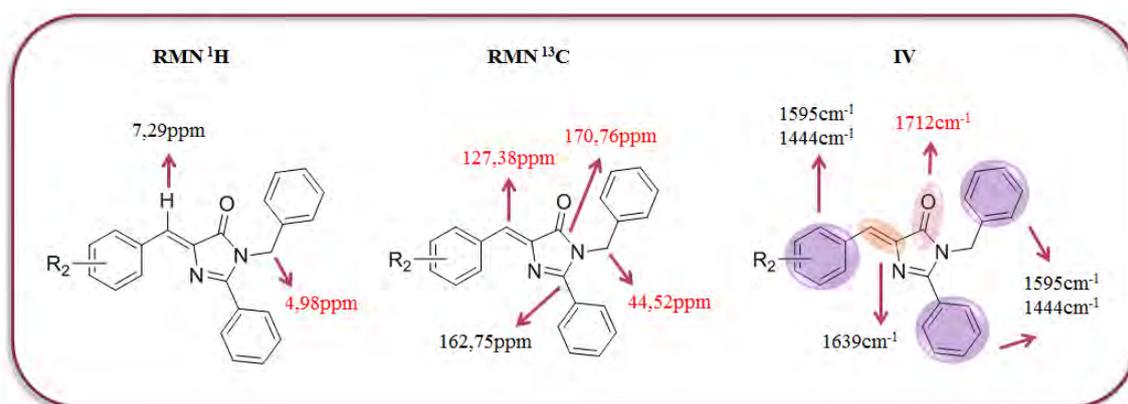


Figura 44. Principais sinais de RMN ^1H e ^{13}C e bandas de IV características das imidazolonas da série B. Principais sinais e bandas para a caracterização estrutural das imidazolonas da série B. Em letras vermelhas, estão destacadas as diferenças de sinais e bandas nos espectros de RMN e IV presentes nas imidazolonas em comparação com as oxazolonas de origem.

4.4 Avaliação de atividade biológica

Com o objetivo de se avaliar uma possível atividade antitumoral das séries das imidazolonas sintetizadas em linhagens de células leucêmicas humanas, foram realizados, em

parceria com o Laboratório de Imunologia Tumoral da UFRJ, experimentos de viabilidade celular frente à utilização destes candidatos a quimioterápicos.

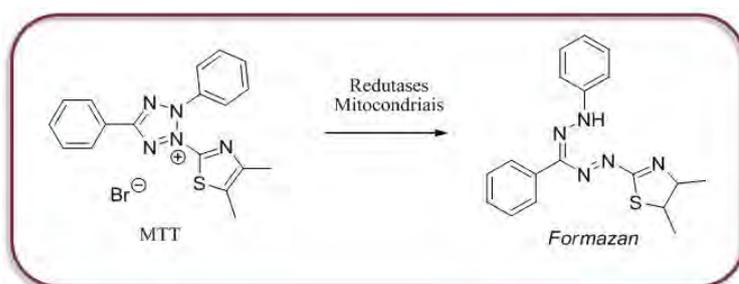
Para a realização dos experimentos de determinação de viabilidade celular, foram utilizadas duas linhagens de células leucêmicas, a linhagem K562 e Lucena-1. A primeira foi estabelecida a partir da efusão pleural de um indivíduo de 53 anos com LMC em CB (LOZZIO e LOZZIO, 1975). Estas células possuem a translocação cromossômica que origina o cromossomo Ph, e por isso, expressam naturalmente o transcrito de fusão *BCR-ABL*. Morfologicamente as células K562 possuem uma forma arredondada e podem ter um tamanho variável. Em cultura, encontram-se individualmente em suspensão e o tempo de duplicação varia entre 30 a 40 horas. A maioria destas células são blastos indiferenciados mononucleados que podem adquirir características semelhantes às de células nas fases iniciais da diferenciação mielóide (SILVA, 2011).

A Lucena-1 é uma linhagem obtida a partir da K562, a qual foi submetida a concentrações crescentes de um quimioterápico derivado de alcalóides da vinca, a vincristina. Diferente da linhagem de origem, a Lucena-1 é totalmente resistente a este fármaco (RUMJANEK *et al.*, 2001) e apresenta fenótipo característico de resistência a múltiplas drogas (MDR). Este fenômeno caracteriza-se pela resistência cruzada a fármacos sem estrutura molecular relacionada, nem mecanismo de ação comum, deste modo, até mesmo tratamentos que utilizam vários agentes quimioterápicos não são eficazes na cura do câncer (PRITCHARD *et al.*, 2012). Deste modo, a Lucena-1 não apresenta somente resistência à vincristina, mas também a fármacos estruturalmente não relacionados (MAIA *et al.*, 1996), como a Daunorrubicina. Esta também apresenta expressão do gene *BCR-ABL* maior que a sua linhagem de origem (YUNES, 2013).

Os experimentos de viabilidade celular, descritos como ensaios colorimétricos de MTT, foram realizados em 72 horas de incubação dos candidatos a quimioterápicos com as linhagens descritas anteriormente em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, de modo a simular as condições fisiológicas humanas. Como controle positivo do experimento utilizou-se a vincristina e como controle negativo não foi adicionado nenhuma substância capaz de inibir a proliferação celular.

Após o período de incubação das células leucêmicas com os produtos em avaliação, foi adicionado solução de MTT a essas culturas para avaliação da viabilidade celular. O MTT é um sal de tetrazol que, em células viáveis, é capaz de ser reduzido por desidrogenases

mitocondriais, promovendo a formação de cristais de *formazan* insolúveis de cor azul-púrpura que se acumulam no citoplasma celular (Esquema 13). Estes cristais ao serem dissolvidos em DMSO podem servir como parâmetro de avaliação de viabilidade celular através de ensaio colorimétrico, pois estes absorvem em comprimento de onda de 490nm (MOSSMANN, 1983; DENIZOT e LANG, 1986; BARILE, 1994). Quanto maior a densidade ótica obtida através de ensaio colorimétrico, maior a foi a formação dos cristais, maior a quantidade de células viáveis comparativamente ao controle negativo que representa 100% de viabilidade celular.



Esquema 13. Reação de redução do MTT. Redução do MTT à cristais de *formazan* azul-púrpura por desidrogenases mitocondriais.

As imidazolonas sintetizadas das séries **A**, **B** e **C** foram selecionadas para a realização do teste de avaliação de atividade antitumoral, descrito anteriormente. Como já mencionado, estes testes foram realizados em parceria com o Laboratório de Imunologia Tumoral sobre responsabilidade da professora Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek. Devido a alguns problemas operacionais com o ensaio, como perda das células de todo o laboratório devido a uma contaminação, os testes de avaliação biológica só puderam ser executados em um universo representativo de 6 moléculas, mas que continham a maior diversidade de informações estruturais possível.

As imidazolonas selecionadas para avaliação da atividade antitumoral da série **A** eram compostas de 4 moléculas com características estereo-eletrônicas distintas. Vale destacar que esta série difere, apenas, nos grupos substituintes do anel aromático vizinho ao carbono benzilidênico. Inicialmente escolheu-se a imidazolona sem nenhum substituinte ligado ao anel **39a** (Figura 45), de maneira a comparar sua atividade biológica com relação à adição de grupos funcionais sobre o anel aromático em questão. A segunda imidazolona selecionada foi a que possui como substituinte um grupo doador de elétrons para o anel **39g** (R=OH) de maior polaridade e capaz de formar ligações hidrogênio. Escolheu-se também uma imidazolona que possui grupo retirador de elétrons para o anel **39h** (R=NO₂), e de maior polaridade se comparada com o produto sem substituição, **39a**. A última imidazolona escolhida possui

substituinte halogênio presente no anel aromático **39b** (R=Cl), que possui solubilidade intermediária e é um retirador mais fraco de elétrons do anel, se comparado com o produto **39h** (Figura 45).

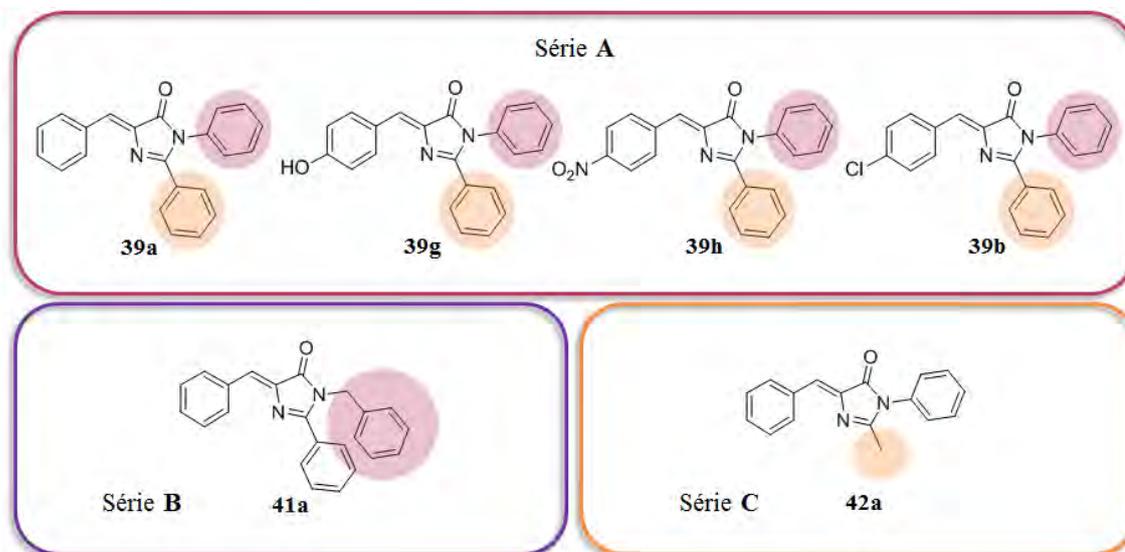


Figura 45. Imidazolonas selecionadas para avaliação de atividade antitumoral. Imidazolonas selecionadas e destaque para as diferenças estruturais entre as séries sintetizadas **A**, **B** e **C**. Entre a série **A** e **B**, em rosa, destaca-se a diferença pela adição de grupo espaçador na série **B**. Entre a série **A** e **C** destaca-se, em laranja, a diferença de volume das duas séries.

A série **B** se diferencia da série **A** com relação à adição de um grupo espaçador no resíduo proveniente do grupamento amina, visando-se avaliar o efeito de uma homologação e consequente maior liberdade conformacional sobre a atividade das imidazolonas testadas (Figura 45). Desta maneira, **41a** foi selecionada para avaliação da atividade antitumoral em comparação com os compostos da série **A** (Figura 45). A única imidazolona sintetizada da série **C**, a imidazolona **42a**, também foi selecionada para avaliação biológica, devido à importância de se avaliar a influência do volume estérico (fenila) presente na série **A**, que está ausente na série **C** (metila) (Figura 45).

Através de ensaios preliminares de solubilidade e eficácia dos produtos selecionados, determinou-se que a faixa de concentração a ser avaliada a eficácia e a potência dos mesmos seria entre 50-10 μ M. Acima desta faixa as imidazolonas sintetizadas tornavam-se insolúveis no meio de cultura celular, e abaixo desta foi verificado que a eficácia se manteve similar para os pontos analisados. Desta maneira, optou-se pela realização da avaliação dos produtos sintetizados nas concentrações de 50 μ M, 25 μ M e 12,5 μ M. Os pontos de concentração para cada produto avaliado foram preparados inicialmente 10 vezes mais concentrados, ou seja, nas concentrações de 500 μ M, 250 μ M e 125 μ M, pois quando adicionados na placa de cultura

com as células tumorais sofrem diluição de 10 vezes. Foram escolhidos apenas três pontos de concentração para avaliação e construção da curva de atividade antitumoral pela possibilidade de se realizar, por experimento, a avaliação de dois produtos distintos simultaneamente (Figura 28).

Desta maneira, foi possível desenvolver as curvas de viabilidade versus concentração das imidazolonas testadas (Figura 46). Estas curvas demonstram a eficácia dos produtos testados sobre as duas linhagens celulares avaliadas neste trabalho, a K562 e a Lucena-1, tendo como controle positivo do experimento a vincristina à 60nM. Existe uma clara diferença dos valores de viabilidade celular entre as duas linhagens leucêmicas frente à utilização de vincristina: enquanto a linhagem Lucena-1 apresenta resistência a este fármaco, com 100-90% de viabilidade celular (Tabela 4), a K562 tem sua viabilidade reduzida entre 30-20% (Tabela 4) (SALUSTIANO, 2008).

Para melhor visualização dos resultados presentes nos gráficos (Figura 46), foi construída uma tabela com os valores de viabilidade celular para cada concentração das imidazolonas em teste (Tabela 4). Através da observação destes valores pôde-se determinar a eficácia dos produtos em avaliação. Para a análise da atividade antitumoral de qualquer protótipo, quanto menor for a viabilidade das células leucêmicas, ou quanto maior for a citotoxicidade sobre estas células, maior é a eficácia do produto testado (WERMUTH, 2008).

A eficácia máxima observada para os compostos à 50µM, para a linhagem K562, variou entre 61,4-16,7% de viabilidade celular, com destaque para o produto **39h** com 16,7% e o produto **41a** com 19,7% de viabilidade celular (Tabela 4), sendo estes os de maior eficácia máxima contra a linhagem avaliada. Já o produto **39g** apresentou 61,4% de viabilidade das células leucêmicas (Tabela 4), sendo o produto de menor eficácia máxima dentre as imidazolonas testadas. Comportamento similar foi observado para as células leucêmicas da linhagem Lucena-1, onde os valores de viabilidade celular variaram entre 44,6-6,1% (Tabela 4). Os produtos **41a** e **39h**, novamente, apresentaram maior eficácia máxima com, respectivamente, 6,1% e 13,7% de viabilidade celular, enquanto o produto **39g** apresentou mais uma vez a menor eficácia máxima com 44,6% (Tabela 4).

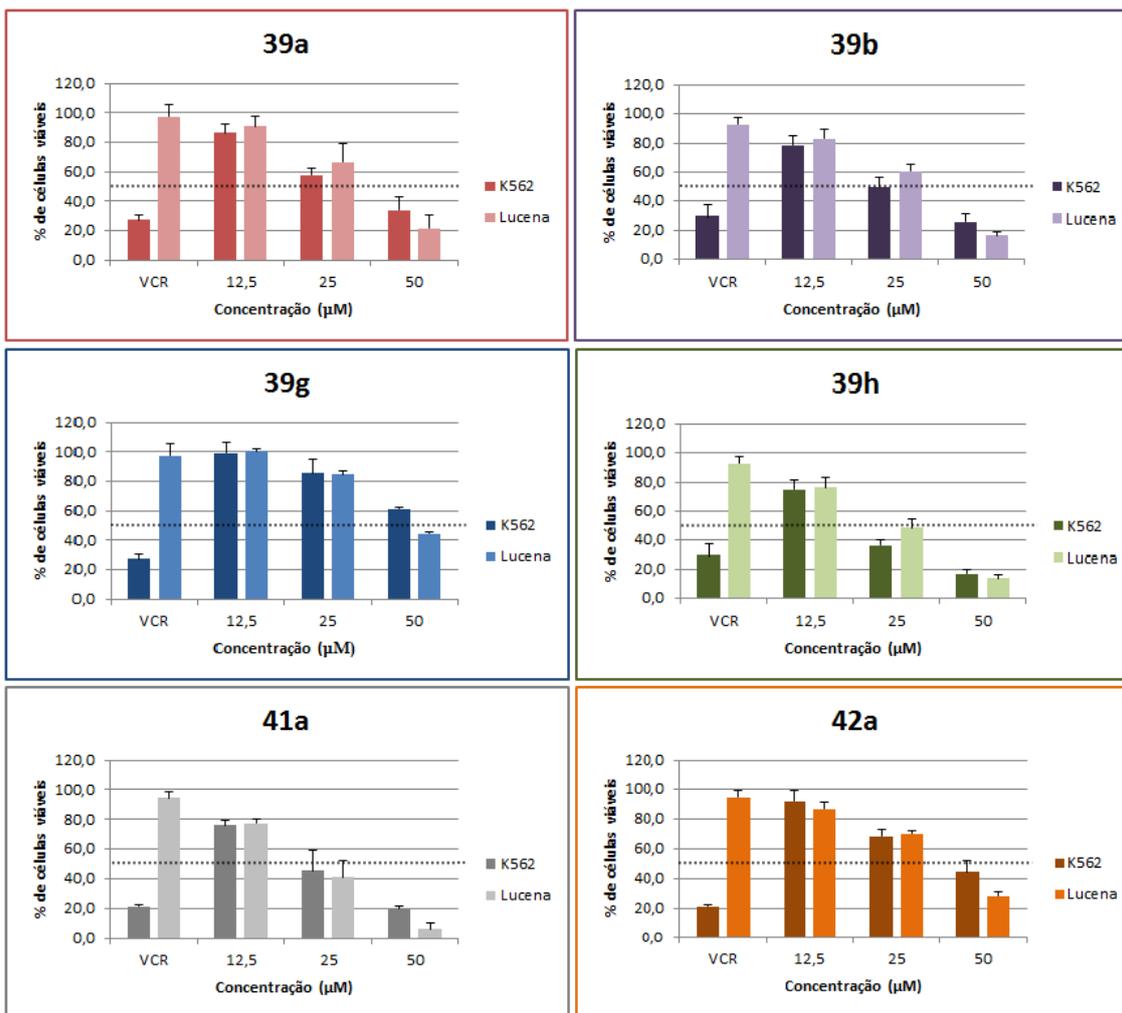


Figura 46. Gráfico de viabilidade celular para as imidazolonas avaliadas. Viabilidade celular para as imidazolonas testadas em diferentes concentrações.

Imidazolonas	Viabilidade K562 (%)			Viabilidade Lucena (%)		
	12,5μM	25μM	50μM	12,5μM	25μM	50μM
39a	80,3±6,5	57,9±4,9	34,2±8,6	90,7±7,0	66,8±12,6	21,8±9,1
39b	78,6±6,7	49,7±6,5	25,8±5,2	83,2±5,6	60,6±4,2	16,4±2,9
39g	99,1±7,0	85,7±9,2	61,4±1,2	100,5±1,9	84,9±2,0	44,6±1,4
39h	75,0±6,9	35,8±3,7	16,7±3,2	76,1±7,0	48,1±6,3	13,7±2,3
41a	76,0±3,7	45,4±13,8	19,7±2,2	77,3±2,9	41,3±11,4	6,1±4,7
42a	91,8±7,3	68,3±4,8	44,4±7,3	86,5±4,5	69,8±2,3	28,5±2,4
VCR	29-22			97-92		

Tabela 4. Viabilidade celular para as imidazolonas avaliadas. Viabilidade celular para as duas linhagens de células leucêmicas frente à utilização das imidazolonas testadas em diferentes concentrações e variação de viabilidade celular para as duas linhagens frente à vincristina.

Para a avaliação da potência dos produtos foi calculada a concentração eficaz média CE_{50} para cada imidazolona testada a partir das curvas de correlação entre concentração e

efeito para as duas linhagens celulares avaliadas (Tabela 5). A partir destas curvas foram geradas linhas de tendência de função polinomial de 2º grau com coeficiente de determinação (R^2) próximo à 1 (Figuras 47, 48 e 49). As linhas de tendências adicionadas forneceram equações polinomiais de 2º grau que auxiliaram no cálculo das CE_{50} (Figuras 47, 48 e 49).

Os valores de CE_{50} das imidazolonas testadas variaram entre 20,4-57,8 μ M para a linhagem K562, com destaque para os produtos **39h** e **41a**, com CE_{50} de 20,4 μ M e 24,1 μ M, respectivamente (Tabela 5). Sabe-se que quanto menor o valor da CE_{50} maior a potência do produto avaliado (WERMUTH, 2008). Desta maneira, estes produtos (**39h** e **41a**) foram os mais potentes, enquanto que o produto **39g** apresentou a menor potência dentre as imidazolonas testadas com CE_{50} de 57,8 μ M (Tabela 5). De forma similar para a linhagem Lucena-1, obtivemos variação de CE_{50} entre 22,7-51,9 μ M. Os produtos com maior potência foram o **41a** e **39h**, com CE_{50} de 22,7 μ M e 25 μ M respectivamente (Tabela 5). O produto que apresentou maior valor de CE_{50} , o produto **39g**, foi novamente aquele que apresentou a menor potência dentre as imidazolonas testadas frente à linhagem Lucena-1 (Tabela 5).

Curiosamente, os resultados das avaliações de eficácia máxima e potência das imidazolonas testadas contra as duas linhagens leucêmicas neste trabalho foram similares, onde os produtos **39h** e **41a** foram os mais eficazes e potentes e o produto **39g** foi o que apresentou menor eficácia e menor potência dentre os produtos avaliados.

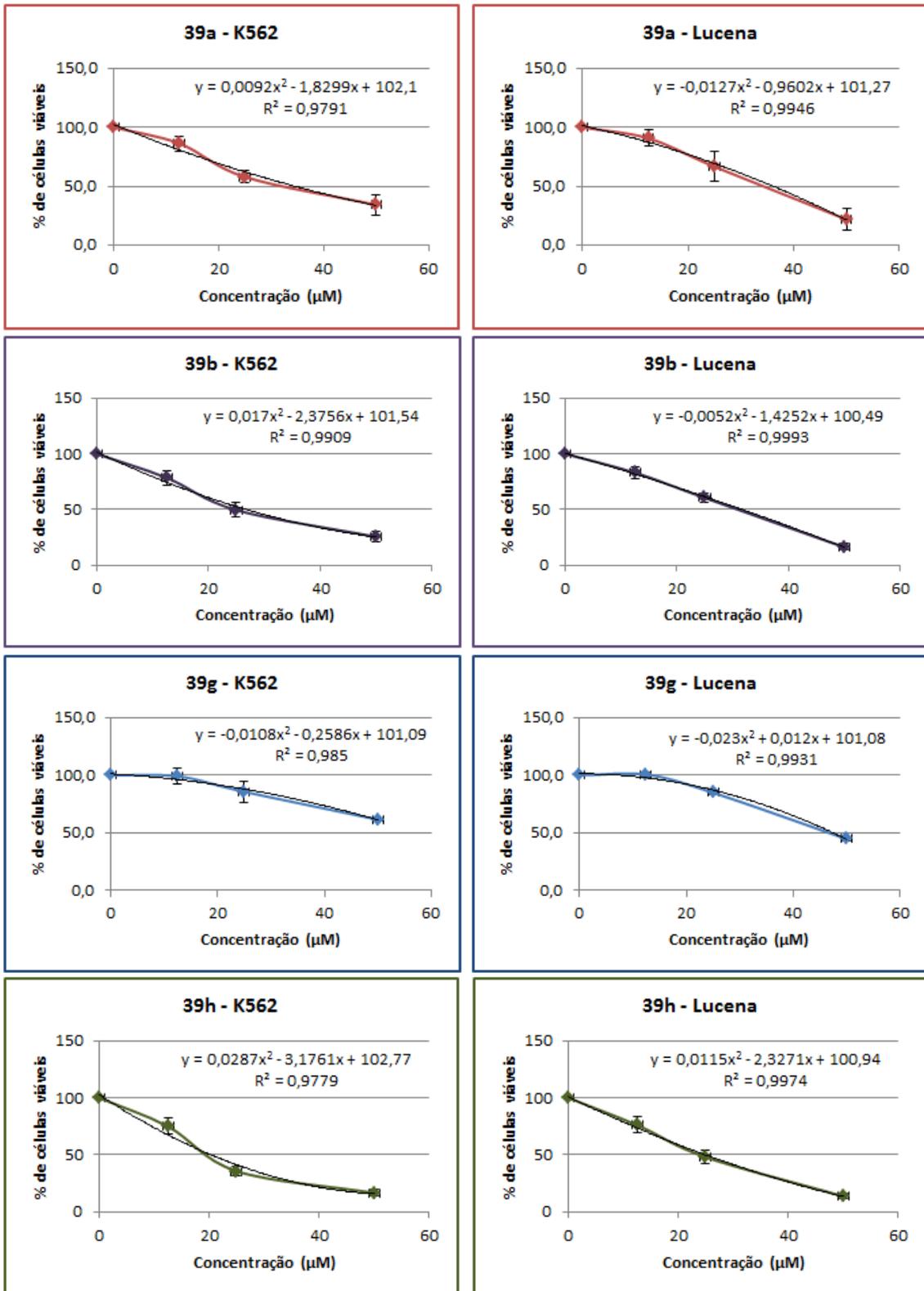


Figura 47. Gráficos de viabilidade celular versus concentração das imidazolonas da série A. Determinação da equação de função polinomial de 2º grau para o experimento de viabilidade celular nas concentrações de 0µM, 12,5µM, 25µM e 50µM para as imidazolonas da série A frente à linhagem K562 e Lucena-1.

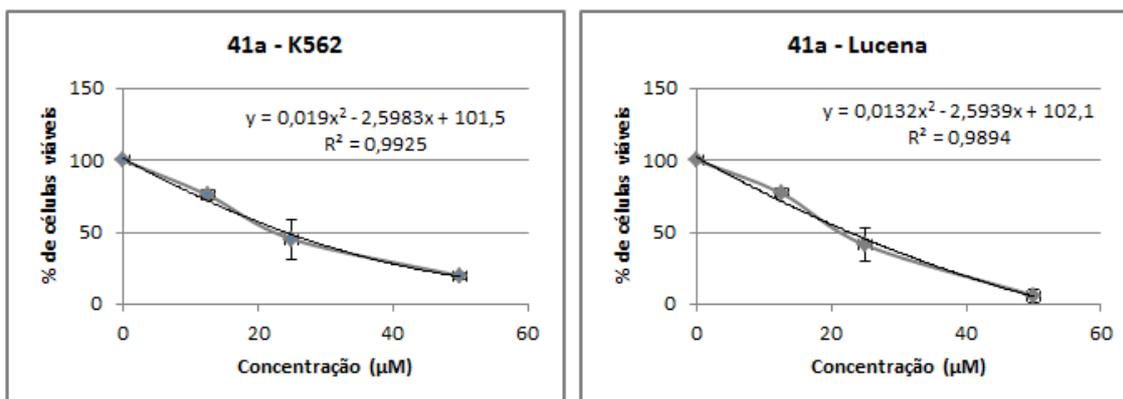


Figura 48. Gráficos de viabilidade celular versus concentração da imidazolona da série B. Determinação da equação de função polinomial de 2º grau para o experimento de viabilidade celular nas concentrações de 0µM, 12,5µM, 25µM e 50µM para a imidazolona da série B frente à linhagem K562 e Lucena-1.

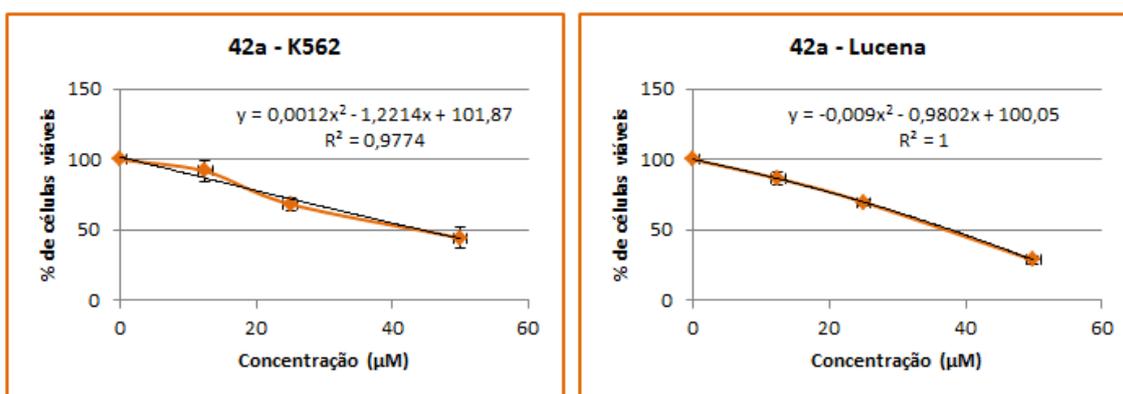


Figura 49. Gráficos de viabilidade celular versus concentração da imidazolona da série C. Determinação da equação de função polinomial de 2º grau para o experimento de viabilidade celular nas concentrações de 0µM, 12,5µM, 25µM e 50µM para a imidazolona da série C frente à linhagem K562 e Lucena-1.

Produtos	CE ₅₀ (µM)	
	K562	Lucena
7a	34,4	36,1
7b	26,9	31,8
7g	57,8	51,9
7h	20,4	25,0
9a	24,1	22,7
10a	44,4	37,9

Tabela 5. Valores de CE₅₀ para as imidazolonas testadas sobre a K562 e Lucena-1. Valores de CE₅₀ determinados a partir das equações geradas dos gráficos de concentração versus viabilidade celular para as imidazolonas testadas.

De maneira a explicar os resultados experimentais de atividade biológica obtidos neste trabalho, foi realizado um estudo de correlação estrutura-atividade, ou seja, um estudo de SAR. Inicialmente comparamos os aspectos estruturais das imidazolonas da série A com a sua eficácia e potência frente às duas linhagens de células leucêmicas. Observou-se que os grupos adicionados ao anel aromático vizinho ao benzilideno têm um papel importante na atividade das imidazolonas testadas da série A. Tomando como comparativo a imidazolona sem

nenhum substituinte presente no anel aromático em questão **39a** (R=H) (Figura 21), que possui CE_{50} de $34,4\mu\text{M}$ para K562 e $36,1\mu\text{M}$ para Lucena-1 (Tabela 5) e valores de viabilidade celular máxima de 34,2% e 21,8% (Tabela 4), observou-se que a adição de grupos doadores de elétrons para o anel aromático, EDG, promoveram a diminuição da atividade da série em avaliação (Figura 50). Este fato ocorre com o produto **39g** (R=OH), que apresentou a menor eficácia máxima e a menor potência dentre os produtos testados, como já mencionado anteriormente. Quando se avaliou a adição de grupos retiradores de elétrons do anel aromático, EWG, observou-se o aumento da atividade da série A sobre as duas linhagens testadas (Figura 50). Para o produto **39h** (R=NO₂) este aumento foi considerável, com relação à potência, $CE_{50} = 20,4\mu\text{M}$ para K562 e $25,0\mu\text{M}$ para Lucena-1 (Tabela 5), e com relação à eficácia, com 16,7% e 13,7% de viabilidade celular (Tabela 4). Talvez este resultado possa ser explicado pela presença do grupo nitro, um forte retirador de elétrons por ressonância e por indução (MARCH, 1992). O produto **39b** possui em sua estrutura um fraco grupo retirador de elétrons do anel aromático, o grupo cloro (MARCH, 1992). Acredita-se que por este motivo, houve um ligeiro aumento na atividade deste produto, que apresentou CE_{50} de $26,9\mu\text{M}$ e $31,8\mu\text{M}$ (Tabela 5) e viabilidade celular máxima de 25,8% e 16,4% (Tabela 4).

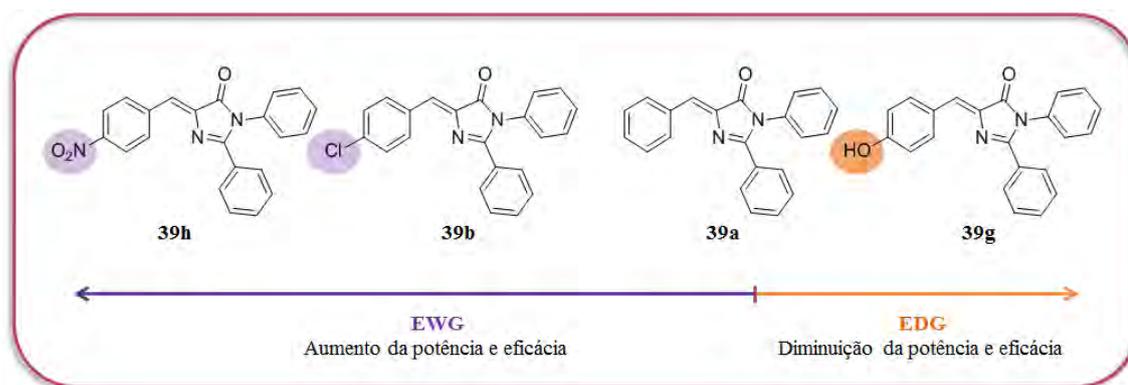


Figura 50. Relação estrutura atividade das imidazolonas da série A. Adição de grupos doadores de elétrons, em laranja, diminui a atividade antitumoral das imidazolonas da série A e adição de grupos retiradores de elétrons, em roxo, aumentam esta atividade.

O mecanismo de ação, proposto inicialmente para o planejamento da série das imidazolonas discutidas neste trabalho, se baseia na reatividade do carbono benzilidênico frente a um possível ataque nucleofílico realizado pela enzima alvo. As deubiquitinas possuem em seu sítio catalítico um resíduo de cisteína 223 capaz de atuar como um nucleófilo (KOMANDER; BARFORD, 2008) e, possivelmente, como um doador de Michael para a formação de ligação entre este resíduo e o centro eletrofílico das imidazolonas propostas. Esta interação poderia implicar na inativação da cisteíno-protease em questão e promover o efeito

antitumoral desejado. Sendo assim, como mencionado anteriormente, a reatividade do carbono benzilidênico das imidazolonas em questão pode ser essencial para a atividade antitumoral destes compostos. Quanto maior o caráter LUMO do carbono benzilidênico, maior é a possibilidade de formação de ligação covalente entre ligante e receptor (CAREY e SUNDBERG, 2007).

Assim, de posse das informações descritas anteriormente, foi realizado um cálculo de coeficiente de LUMO para o carbono benzilidênico das imidazolonas da série **A** testadas biologicamente, **39a**, **39b**, **39h** e **39g**, e sua densidade foi determinada através de modelagem molecular realizada no programa Spartan04, após minimização inicial em AM1 e otimização estrutural em método quântico Hartree-Fock com base 6-31G* (Figura 22). Através da análise da Figura 51, observou-se a alta densidade de LUMO sobre o carbono benzilidênico das quatro imidazolonas, o que indica a possibilidade deste ser um bom acceptor de Michael frente a um ataque nucleofílico como planejado.

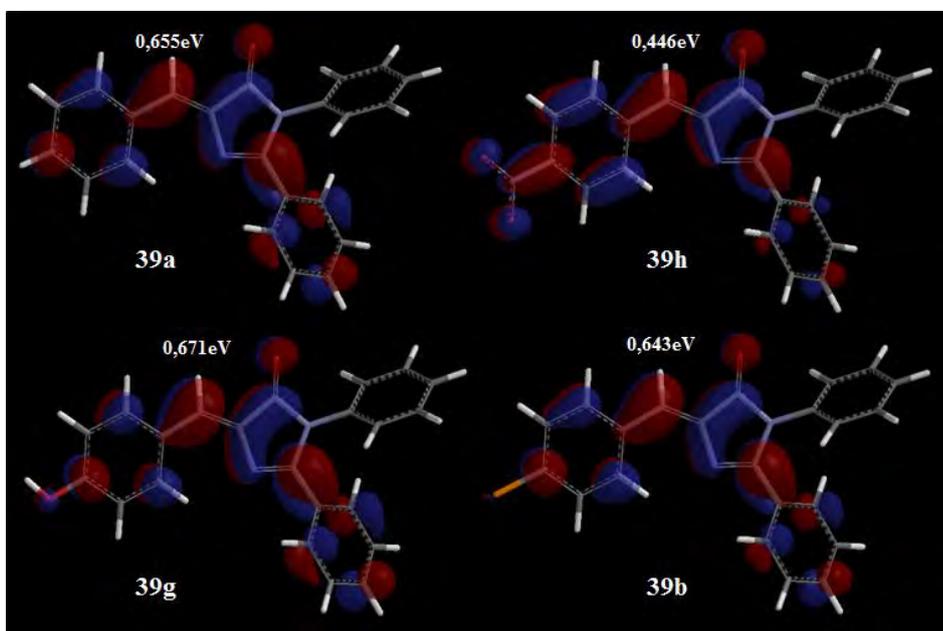


Figura 51. Densidade e cálculo de coeficiente de LUMO para as imidazolonas da série A. Cálculo de coeficiente LUMO realizado pelo programa Spartan 04 após minimização inicial em AM1 e otimização estrutural em método quântico Hartree-Fock com base 6-31G*.

O cálculo do coeficiente de LUMO foi realizado de modo a comparar a reatividade do carbono benzilidênico para as diferentes imidazolonas da série **A**, pois estas possuem grupos ligados ao anel aromático vizinho com características físico-químicas e eletrônicas distintas que podem interferir na reatividade deste núcleo. A imidazolona **39a**, sem nenhum substituinte no anel, foi utilizada como referência para as outras e apresentou valor de coeficiente de LUMO de 0,655eV (Figura 51). Em comparação com esta, a imidazolona **39h**

apresentou coeficiente de 0,446eV, o que indica um aumento de reatividade deste núcleo frente a ataques nucleofílicos (CAREY e SUNDBERG, 2007) (Figura 51). Para a imidazolona **39b**, com 0,643eV, também foi observado uma diminuição no valor de coeficiente de LUMO em comparação com a imidazolona sem substituição, mas esta diminuição foi menos intensa se comparada com a observada para o produto **39h** (Figura 51). Para o produto **39g** observou-se o aumento do valor de coeficiente de LUMO para 0,671eV (Figura 51), o que implica em menor reatividade do carbono benzilidênico frente a ataques nucleofílicos (CAREY e SUNDBERG, 2007). Este fenômeno pode ser explicado pelo caráter eletrônico dos grupos adicionados ao anel aromático vizinho ao benzilideno. O grupo nitro, no produto **39h**, possui forte caráter retirador de elétrons do sistema por indução e ressonância, contribuindo para uma maior deficiência de elétrons no carbono benzilidênico, o que aumenta a sua reatividade frente a um ataque nucleofílico (MARCH, 1992). O grupo cloro, no produto **39b**, é um fraco retirador de elétrons do sistema por indução, aumentando de forma pouco significativa a reatividade do centro eletrofílico em questão (MARCH, 1992). Já o produto **39g**, que possui um grupo hidroxila, tem a reatividade do carbono benzilidênico diminuída, pois este grupo é um forte doador de elétrons para o sistema por ressonância (MARCH, 1992), aumentando a densidade eletrônica sobre o centro em questão.

Curiosamente, os resultados obtidos com a utilização do modelo teórico, descrito anteriormente, são similares aos resultados obtidos em modelo experimental de determinação de atividade antitumoral das imidazolonas da série **A**. Observou-se que o produto com maior reatividade do carbono benzilidênico **39h**, também apresentou a maior atividade antitumoral em termos de eficácia e potência sobre as duas linhagens leucêmicas avaliadas. E o produto com menor reatividade sobre este centro, **39g**, apresentou menor atividade antitumoral, também em termos de eficácia e potência sobre as duas linhagens leucêmicas avaliadas. O produto **39b** que apresentou reatividade maior que o produto **39a**, porém menor que o produto **39h**, também apresentou atividade antitumoral intermediária aos dois produtos citados anteriormente. Apesar desta correlação, como ainda não foi avaliada a atividade de todas as imidazolonas da série **A** sobre as linhagens leucêmicas K562 e Lucena-1, não se pode afirmar inequivocamente que os resultados de atividade biológica encontrados estão diretamente correlacionados com a reatividade do carbono benzilidênico frente ao ataque nucleofílico, realizado pelo resíduo de cisteína 223 presente no sítio catalítico das deubiquitinasas.

A avaliação das séries **B** e **C**, comparadas com o composto **39a** da série **A**, nos forneceu indícios importantes sobre a influência das fenilas ligadas ao nitrogênio e a amidina

da imidazolona. Inicialmente, comparando-se a série **B** (**41a**) com a série **A** (Figura 52), observou-se o aumento na atividade citotóxica em termos de potência, com CE_{50} de 24,1 μ M e 22,7 μ M, e de eficácia máxima, com 19,7% e 6,1% de viabilidade celular frente à K562 e Lucena-1, respectivamente (Tabelas 4 e 5). Acredita-se que este fato se deve à maior proximidade estrutural de **41a** com a série protótipo escolhida para o desenvolvimento deste trabalho, a série das tirfostinas, onde um espaçador entre o anel imidazolônico e o anel aromático advindo da adição de uma amina tem extrema importância para a liberdade conformacional deste anel e para a atividade de série **B** (Figura 52).

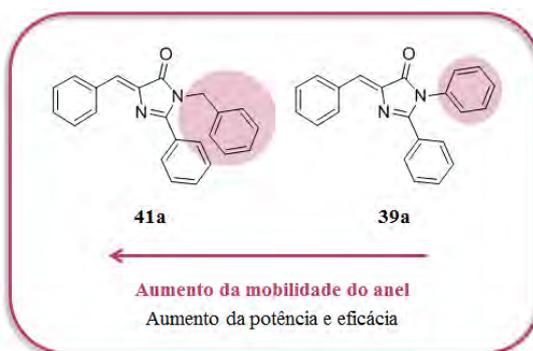


Figura 52. Relação estrutura atividade da imidazolona da série B. Comparação da atividade e estrutura química da imidazolona da série A, **39a**, com a imidazolona da série B, **41a**. Em destaque rosa a diferença estrutural entre as duas séries.

Para a avaliação da série C, o produto **42a** foi comparado com o produto **39a** da série A (Figura 53). Foi observada uma diminuição na atividade biológica para o produto da série C com relação à potência, CE_{50} de 44,4 μ M e 37,9 μ M, e com relação à eficácia máxima, com 44,4% e 28,5% de viabilidade celular frente à K562 e Lucena-1, respectivamente (Tabelas 4 e 5). Acredita-se que este fato se deve à possível perda de interações realizadas pelo anel aromático vizinho ao carbono amidínico, após este ser substituído por uma metila na série C (Figura 53).

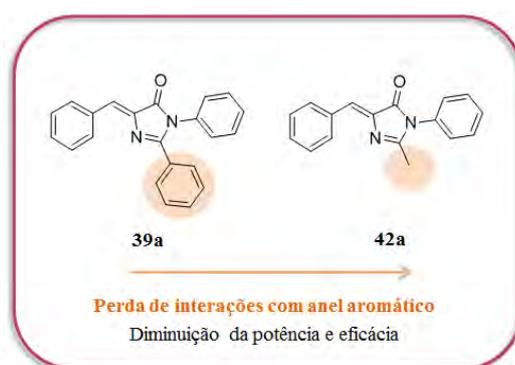


Figura 53. Relação estrutura atividade da imidazolona da série C. Comparação da atividade e estrutura química da imidazolona da série A, **39a**, com a imidazolona da série C, **42a**. Em destaque laranja a diferença estrutural entre as duas séries.

Curiosamente, para todas as imidazolonas testadas, os valores de viabilidade celular e de CE_{50} foram similares entre as duas linhagens celulares avaliadas (Tabelas 4 e 5). Assim como para a vincristina, as imidazolonas poderiam se mostrar inativas frente à Lucena-1, devido a esta apresentar um fator de resistência a múltiplas drogas (MDR) (PRITCHARD *et al.*, 2012). Mas de forma surpreendente, esta linhagem se comportou de forma similar à K562 quando da utilização dos produtos testados. Este fato torna as séries das imidazolonas propostas neste trabalho interessantes como novos compostos protótipos para o tratamento da leucemia, pois estes produtos conseguem atuar em ambas as linhagens celulares, com ou sem resistência a múltiplas drogas.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A síntese das imidazolonas finais das séries **A**, **B** e **C** mostrou-se de fácil execução após desenvolvimento de novo processo sintético, apesar das dificuldades de isolamento. As metodologias descritas na literatura forneciam produtos impuros e com baixos rendimentos reacionais. A metodologia aqui descrita se mostrou viável para a obtenção das imidazolonas desejadas com rendimentos variando de médio a excelente (40-99%) após purificação em coluna cromatográfica.

A análise espectroscópica de RMN de ^1H das imidazolonas sintetizadas indicou a obtenção de mistura diastereoisomérica *Z* / *E* em proporções que variaram entre 85-100% do isômero *Z*. Para a maioria esta mistura não foi observada nos espectros, indicando a formação de um único diastereoisômero ou sua total separação através de purificação por coluna cromatográfica. A análise de RMN ^{13}C acoplado com hidrogênio à longa distância indicou a predominância proporcional do isômero *Z*, que foi comprovado como a configuração relativa de maior estabilidade termodinâmica através de modelagem molecular.

Devido à presença de 2 à 3 núcleos aromáticos nos compostos finais, a elucidação estrutural por técnicas 1D de RMN de ^1H e de ^{13}C foram muito complicadas. Tendo em vista solucionar este problema, foram realizados espectros de RMN bidimensionais que auxiliaram em grande parte da elucidação estrutural das imidazolonas sintetizadas.

Os ensaios de atividade biológica demonstraram que o planejamento estrutural se mostrou adequado, pois foram obtidos valores de CE_{50} de 20,4 μM a 57,8 μM para as imidazolonas obtidas. Ademais, de uma maneira geral a série se mostrou mais potente em comparação com algumas tirfostinas protótipos como a AG490 (31), que apresenta CE_{50} de 62 μM sobre a mesma linhagem celular (K562).

As imidazolonas da série **A** apresentaram resultados interessantes em aspectos de estrutura-atividade. O produto **39h**, que possui um grupo retirador de elétrons ($\text{R}=\text{NO}_2$) do anel aromático ligado ao benzilideno apresentou maior atividade antitumoral em termos de eficácia máxima e de potência para as duas linhagens celulares avaliadas, a K562 e a Lucena-1. Já o produto **39g**, que possui um grupo doador de elétrons ($\text{R}=\text{OH}$) para o anel aromático onde está inserido, por sua vez, apresentou menor atividade antitumoral em termos de eficácia máxima e de potência para as duas linhagens celulares. Estas atividades podem estar correlacionadas aos diferentes valores de LUMO do carbono benzilidênico, planejado para

atuar como acceptor de Michael frente ao resíduo de cisteína 223, presente no sítio ativo das deubiquitinases (as enzimas alvo deste trabalho).

Cálculos de modelagem molecular demonstraram que os grupos inseridos ao anel aromático vizinho ao benzilideno influenciam diretamente o caráter LUMO do próprio carbono benzilidênico. Tendo sido demonstrado que grupos retiradores de elétrons do anel atuam na diminuição do coeficiente de LUMO, ou seja, no aumento da reatividade do carbono benzilidênico frente a ataques nucleofílicos, e grupos doadores de elétrons atuam no aumento do coeficiente de LUMO, ou seja, na diminuição da reatividade do carbono benzilidênico frente a estes ataques. Este fato pode estar correlacionado com os resultados de atividade antitumoral observados experimentalmente.

As imidazolonas da série **B** e **C** também apresentaram resultados interessantes do ponto de vista estrutura-atividade. A imidazolona **41a** (homologação na amida) da série **B** apresentou maior atividade antitumoral contra as duas linhagens leucêmicas avaliadas, em comparação com a imidazolona **39a** da série **A**, em termos de potência e eficácia máxima. Entretanto, a imidazolona **42a** (troca da fenila pela metila na amidina) da série **C** apresentou menor atividade biológica frente às duas linhagens avaliadas, com relação à potência e eficácia máxima. Este fato indica que o anel aromático vizinho ao carbono amidínico, bem como a presença de uma homologação no nitrogênio amidico são importantes para a atividade das séries das imidazolonas.

Os valores observados de CE_{50} e viabilidade celular são muito similares para as duas linhagens leucêmicas avaliadas, a K562 e a Lucena-1, isto indica que ambas se comportam da mesma maneira frente à utilização das imidazolonas. Desta maneira, pode-se comprovar, através deste trabalho, que a linhagem Lucena-1 não apresenta resistência aos produtos à que foi submetida. Esta conclusão torna as séries das imidazolonas desenvolvidas neste trabalho interessantes do ponto de vista biológico, pois estas são capazes de inibir o crescimento de células leucêmicas que apresentam fator de resistência à múltiplas drogas (MDR), da mesma maneira que atuam em células leucêmicas que não apresentam esta resistência.

Visando a completa compreensão das relações estrutura-atividade das séries das imidazolonas, temos como perspectivas a caracterização do perfil de atividade antitumoral de outros derivados imidazolônicos, estruturalmente relacionados aos compostos descritos neste trabalho, com o intuito de respaldar as eventuais modificações moleculares que possam resultar em novos protótipos mais potentes. Pretendemos realizar também, em parceria com o

Laboratório de Imunologia Tumoral da UFRRJ, experimentos de análise de ciclo celular, para determinar em que fase do ciclo as imidazolonas atuam, análise de apoptose e necrose celular, para determinar o tipo de morte que as células leucêmicas sofrem frente à utilização das imidazolonas, dentre outros experimentos que serão determinadas pelo grupo de pesquisa do referente laboratório.

6 BIBLIOGRAFIA

AHMADI, S. J.; SADJADI, S.; HOSSEINPOUR, M. A green protocol for Erlenmeyer Plöchl reaction by using iron oxide nanoparticles under ultra sonic irradiation. **Ultrason Sonochem.** v. 20, n. 1, p. 408-412, 2013.

ALBERTS, B; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Cancer: in molecular biology of the cell.** 5 ed. London: Garland Science, 2009.

AMERIK, A. Y.; HOCHSTRASSER, M. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1695, p. 189-207, 2004.

AVENDANO, C; MENENDEZ J. C. **Medicinal chemistry of anticancer drugs.** 1 ed. Amsterdam: The Netherlands Linacre House, 2008.

BARILE, F. A.; DIERICKX, P. J.; KRISTEN, U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biol Toxicol.** v. 10, p. 155-162, 1994.

BEN-NERIAH, Y; DALEY, G. Q.; MES-MASSON, A. M.; WITTE, O. N.; BALTIMORE, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. **Science.** v. 23, p. 212-214, 1986.

BERGANTINI, A. B. F.; CASTRO, F. A.; SOUZA, A. M. Leucemia Mielóide Crônica. **Bras Hematol Hemoter.** v. 27, n. 2, 2005.

BIPLAB, D.; KUMAR, G.; SAMPATH, S. Synthesis of some oxazolinones and imidazolinones and their antimicrobial screening. **Acta Pharmaceutica.** v. 55, n.3, p. 287-296, 2005.

BISHOP, J. M. The discovery of proto-oncogenes. **FASEB Journal.** v. 10, p. 362-364, 1996.

BLANCO-LOMAS, M.; CAMPOS, P. J.; SAMPEDRO, D. Benzylidene-Oxazolones as Molecular Photoswitches. **Organic Letters.** v. 14, n. 17, p. 4334-4337, 2012.

BROWN, G; HUGHES, P. J.; CEREDIG, R; MICHELL, R. H. Versatility and nuances of the architecture of haematopoiesis – Implications for the nature of leukaemia. **Leuk Res.** v. 36, n. 1, p. 14-22, 2012.

CALABRESI, P. CHABNER, B. A. **Quimioterapia de doenças neoplásicas** in: as bases farmacológicas da terapêutica. 8 ed. Rio de Janeiro: 1995.

CAPDEVILLE, R.; BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; MATTER, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. **Nature Reviews.** v. 1, p. 493-502, 2002.

CAREY, F.; SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry.** 5 ed. Spring Verlag, 2007.

CARTER, H. E. **Organic Reactions.** 1 ed. New York: Ed. Wiley, v. 3, p. 198-239, 1946.

CAVALCANTI, A. S. **Leucemia Mielóide Crônica: Orientações básicas aos pacientes e familiares.** Rio de Janeiro: Hemorroio, 2009.

CHANDRASEKHAR, S.; KARRI, P. Aromaticity in azlactone anions and its significance for the Erlenmeyer synthesis. **Tetrahedron Letters.** v. 47, p. 5763-5766, 2006.

CHANDRASEKHAR, S.; KARRI, P. Erlenmeyer azlactone synthesis with aliphatic aldehydes under solvent-free microwave conditions. **Tetrahedron Letters.** v. 48, p. 785-786, 2007.

CHAVEZ, F.; KENNEDY, N.; RAWALPALLY, R.; WILLIAMSON, T.; CLEARY, T. Substituents effect on the Erlenmeyer-Plöchl reaction: understanding an observed process reaction time. **Organic Process Research and Development.** v. 14, p. 579-584, 2010.

CLEARY, T.; BRICE, J.; KENNEDY, N.; CHAVEZ, F. One-pot process to Z- α -benzoylamino-acrylic acid methyl esters via potassium phosphate-catalyzed Erlenmeyer reaction. **Tetrahedron Letters.** v. 51, p. 625-628, 2010.

CLEARY, T.; RAWALPALLY, T.; KENNEDY, N.; CHAVEZ, F. Catalyzing the Erlenmeyer Plöchl reaction: organic bases versus sodium acetate. **Tetrahedron Letters.** v. 51, p. 1533-1536, 2010

COFFER, P. J.; KOENDERMAN, L.; DE GROOT, R. P. The Role of Stats in Myeloid Differentiation and Leukemia. **Oncogene.** v. 19, p. 2511-2522, 2000.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins-Pathologic Basis of Disease.** 5 ed. Rio de Janeiro: WB Saunders Company Edição, 1994.

DAIRKEE, S. H.; SMITH, H. S. Genetic analysis of breast cancer progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** v. 1, p. 139-151, 1996.

DARNELL, J. E. JR.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science.** v. 264, p.1415-1421, 1994.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The Development of Imatinib as a Therapeutic Agent for Chronic Myeloid Leukemia. **Blood.** v. 105, p. 2640-2653, 2005.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J Immunol Methods.** v. 89, p. 271-277, 1986.

DE VITA, V. T.; HELLMANS, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer, Principles & Practice of Oncology.** 5 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v.1, 1997.

DRUKER, B. J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G. M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N. B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells. **Nature Medicine.** v. 2, p. 561-566, 1996.

DRUKER, B. J.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S. G.; GATHMANN, I.; KANTARJIAN, H.; GATTERMANN, N.; DEININGER, M. W. N.; SILVER, R. T.; GOLDMAN, J. M.; STONE, R. M.; CERVANTES, F.; HOCHHAUS, A.; POWELL, B. L.; GABRILOVE, J. L.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; CORNELISSEN, J. J.; HUGHES, T.; AGIS, H.; FISCHER, T.; VERHOEF, G.; SHEPHERD, J.; SAGLIO, G.; GRATWOHL, A.; NIELSEN, J. L.; RADICH, J. P.; SIMONSSON, B.; TAYLOR, K.; BACCARANI, M.; SO, C.; LETVAK, L.; LARSON, R. A. Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**. v. 355, p. 2408-2417, 2006.

DRUKER, B. J. Translation of the Philadelphia Chromosome into Therapy for Cml. **Blood**. v. 112, p. 4808-4817, 2008.

ERLENMEYER, F. G. C. E. Ueber die Condensation der Hippursäure mit Phtalsäureanhydrid und mit Benzaldehyd. **Ann**. v. 275, p. 3, 1893.

FADERL, S.; TALPAZ, M.; ESTROV, Z.; O'BRIEN, S.; KURZROCK, R.; KANTARJIAN, H. M. Mechanisms of Disease - the Biology of Chronic Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**. v. 341, p. 164-172, 1999.

FAIVRE, S.; DEMETRI, G.; SARGENT, W.; RAYMOND, E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 6, p. 734-745, 2007.

FERNANDES, M. S.; REDDY, M. M.; GONNEVILLE, J. R.; DEROO, S. C.; PODAR, K.; GRIFFIN, J. D.; WEINSTOCK, D. M.; SATTLER, M. Bcr-Abl Promotes the Frequency of Mutagenic Single-Strand Annealing DNA Repair. **Blood**. v. 114, p. 1813-1819, 2009.

FRAZER, R.; IRVINE, A. E.; MCMULLIN, M. F. Chronic Myeloid Leukaemia in the 21st Century. **The Ulster Medical Journal**. v. 76, p. 8-17, 2007.

FUNKE, V. M.; SETUBAL, D. C.; RUIZ, J.; AZAMBUJA, A. P.; LIMA, D. H.; KOJO, T. K.; PASQUIM, R. O tratamento da leucemia mielóide crônica com mesilato de imatinibe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 30, p. 27-31, 2008.

GHOESCHI, K.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Janus kinases in immune cell signaling. **Immunol Rev**. v. 228, p. 273-287, 2009.

GILMAN, A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. **Am J Surg**. v. 105, p. 574-578, 1963.

GOASGUEN, J. E.; BENNETT, J. M.; HENDERSON, E. S. Biologic Diagnosis of Leukemias, in: HENDERSON, E. S.; LISTER, T. A.; GREAVES, M. F. **Leukemia**. 6 ed. London: Editora WB Saunders, 1996.

HABER D. Roads leading to breast cancer. **N Engl J Med**. v. 343, p. 1566-1568, 2000.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v. 144, p. 646-674, 2011.

HARRISON, D. A. The JAK/STAT Pathway. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 4, p. 1-3, 2012.

HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **The Lancet.** v. 370, n. 9584, p. 342-350, 2007.

HOCHHAUS, A.; O'BRIEN, S. G.; GUILHOT, F.; DRUKER, B. J.; BRANFORD, S.; FORONI, L.; GOLDMAN, J. M.; MULLER, M. C.; RADICH, J. P.; RUDOLTZ, M.; MONE, M.; GATHMANN, I.; HUGHES, T. P.; LARSON, R. A. Six-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for the First-Line Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. **Leukemia.** v. 23, p. 1054-1061, 2009.

HOELLER, D; DIKIC, I. Targeting the ubiquitin system in cancer therapy. **Nature.** v.458, p. 438-444, 2009.

HORITA, M.; ANDREU, E. J.; BENITO, A.; ARBONA, C.; SANZ, C.; BENET, I.; PROSPER, F.; FERNANDEZ-LUNA, J. L. Blockade of the Bcr-Abl Kinase Activity Induces Apoptosis of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 5-Dependent Expression of Bcl-(Xl). **Journal of Experimental Medicine.** v. 191, p. 977-984, 2000.

ISHIKAWA, H.; COLBY, D. A.; SETO, S.; VA, P.; TAM, A.; KAKEI, H.; RAYL, T. J.; HWANG, I.; BOGER, D. L. Total Synthesis of Vinblastine, Vincristine, Related Natural Products, and Key Structural Analogues. **J. Am. Chem. Soc.** v. 131, p. 4904-4916, 2009.

JIANG, J.; JORDAN, S. J.; BARR, D. P.; GUNTHER, M. R.; MAEDA, H.; MASON, R. P. *In Vivo* Production of Nitric Oxide in Rats after Administration of Hydroxyurea. **Mol Pharmacol.** v. 52, p. 1081, 1997.

JOHNSON, I. S. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. **Cancer Res.** v. 23, p. 1390-1427, 1963.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs **Nat. Rev. Cancer.** v. 4, p. 253-265, 2004.

KANTARJIAN, H. M.; O'BRIEN, S.; CORTES, J. E.; SHAN, J. Q.; GILES, F. J.; RIOS, M. B.; FADERL, S. H.; WIERDA, W. G.; FERRAJOLI, A.; VERSTOVSEK, S.; KEATING, M. J.; FREIREIEH, E. J.; TALPAZ, M. Complete Cytogenetic and Molecular Responses to Interferon-Alpha-Based Therapy for Chronic Myelogenous Leukemia Are Associated with Excellent Long-Term Prognosis. **Cancer.** v. 97, p. 1033-1041, 2003.

KANTARJIAN, H. M.; TALPAZ, M.; GILES, F.; O'BRIEN, S.; CORTES, J. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. **Annals of Internal Medicine.** v. 145, p. 913-923, 2006.

KANTARJIAN, H. M.; GILES, F.; QUINTAS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Important Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia. **Clinical Cancer Research.** v. 13, p. 1089-1097, 2007.

KANTARJIAN, H.; SCHIFFER, C.; JONES, D.; CORTES, J. Monitoring the Response and Course of Chronic Myeloid Leukemia in the Modern Era of Bcr-Abl Tyrosine Kinase Inhibitors: Practical Advice on the Use and Interpretation of Monitoring Methods. **Blood**. v. 111, p. 1774-1780, 2008.

KAPURIA, V.; PETERSON, L. F.; FANG, D.; BORNMANN, W. G.; TALPAZ, M.; DONATO, N. J. Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Research*. V. 70, n. 22, p. 9256-9276, 2010.

KHAN, K. M.; MUGHAL, U. R.; AMBREEN, N.; PERVEEN, S.; CHOUDHARY, M. I. Synthesis and leishmanicidal activity of 2,3,4-substituted-5-imidazolones. **J Enzyme Inhib Med Chem**. v. 25, N. 1, P. 29-37, 2010.

KOMANDER, D.; BARFORD, D. Structure of the A20 OUT domain and mechanistic insights into deubiquitination. **Society**. v. 85, n. 2, p. 77-85, 2008.

KOMANDER, D.; CLAGUE, M. J.; URBÉ, S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. **Nature Reviews**. v. 10, p. 550-563, 2009.

KÜMMERLE, A. E.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**. v. 111, p. 5215–5246, 2011.

LEE, C. Y.; CHEN, Y. C.; LIN, H. C.; JHONG, Y.; CHANG, C. W.; TSAI, C. H.; KAO, C. L.; CHIEN, T. C. Facile synthesis of 4-arylidene-5-imidazolinones as synthetic analogs of fluorescent protein chromophore. **Tetrahedron**. v. 68, p. 5898-5907, 2012.

LEE, G. R. **Hematologia Clínica**. 1 ed. São Paulo: Manole, v. 1, p. 766-769, 1998.

LI, J. J. **Name Reactions**. 3 ed. Berlin: Springer, p. 212-213, 2006.

LI, X. R.; LIU, X.; WANG, G. F.; ZHU, X. H.; QU, X. H.; LI, X. M.; YANG, Y.; PENG, L.; LI, C. F.; LI, P.; HUANG, W.; MA, Q. J.; CAO, C. Non-Receptor Tyrosine Kinases C-Abl and Arg Regulate the Activity of C/Ebp Beta. **Journal of Molecular Biology**. v. 391, p. 729-743, 2009.

LINGI, A.; ALFONSO, M.; PIERLUIGI, R.; AFRO, G.; ENZO, Z.; NICOLA, D. T.; WALTER, M. DERIVATIVES OF IMIDAZOLE. Synthesis and pharmacological activities of nitriles, amides, and carboxylic acid derivatives of imidazo[1,2-a]pyridine. **J. Med. Chem**. v.12, p. 12, 1969.

LOZZIO, C. B.; LOZZIO, B. B. Human chronic myelogenous leucemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. **Blood**. v. 45, p. 321-334, 1975.

MADHAVI, K.; PRASAD, K.V.S.R.G.; BHARATHI, K. Synthesis and Medicinal Properties of 4-Benzylidene-1-phenyl-2-(substituted styryl)imidazolin-5-ones. **Asian Journal of Chemistry**. v. 22, n. 7, p. 5588-5594, 2010.

MAIA, R. C.; WAGNER, K.; CABRAL, R.H.; RUMJANEK, V. M. Heparin reverses rhodamine 123 extrusion by multidrug resistance cells. **Cancer Lett**. v. 106, p. 101-108, 1996.

MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; MESTAN, J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl Kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. **Biochim. Biophys Acta.** v. 1754, p. 3–13, 2005.

MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry.** New York: John Wiley, 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA. Câncer na criança e no adolescente no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/tumores_infantis/pdf/livro_tumores_infantis_0904.pdf> Acesso em: 23 de agosto de 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/INCA. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf> Acesso em: 15 de agosto de 2013.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v. 65, p. 55-63, 1983.

NICHOLSON, B.; MARBLESTONE, J. G.; BUTT, T. R.; MATTERN, M. R. Deubiquitinating enzymes as novel anticancer targets. **Future Oncol.** v. 3, n. 2, p. 191–199, 2007.

NIJMAN, S. M. B.; LUNA-VARGAS, M. P. A.; VELDS, A. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell.** v. 123, n.5, p. 773-786, 2005.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome studies in human leukemia. IV. Myeloproliferative syndrome and other atypical myeloid disorders. **J Natl Cancer Inst.** v. 29, p. 911-931, 1962.

OETZEL, C.; JONULEIT, T.; GOTZ, A.; VAN DER KUIP, H.; MICHELS, H.; DUYSSTER, J.; HALLEK, M.; AULITZKY, W. E. The Tyrosine Kinase Inhibitor Cgp 57148 (STI 571) Induces Apoptosis in Bcr-Abl-Positive Cells by Down-Regulating Bcl-X. **Clinical Cancer Research.** v. 6, p. 1958-1968, 2000.

O'HARE, T.; WALTERS, D. K.; STOFFREGEN, E. P.; JIA, T.; MANLEY, P. W.; MESTAN, J.; COWAN-JACOB, S. W.; LEE, F. Y.; HEINRICH, M. C.; DEININGER, M. W. N.; DRUKER, B. J. *In vitro* activity of BCR-ABL inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant ABL kinase domain mutants. **Cancer Res.** v. 65, p. 4500–4505, 2005.

PAVLOVSKY, C., KANTARJIAN, H. E. CORTES, J. E. First-Line Therapy for Chronic Myeloid Leukemia: Past, Present, and Future. **American Journal of Hematology.** 84. 287-293, 2009.

PENG, Z.; PAL, A.; HAN, D.; WANG, S.; MAXWELL, D.; LEVITZKI, A.; TALPAZ, M.; DONATO, N. J.; BORNMANN, W. Tyrphostin-like compounds with ubiquitin modulatory activity as possible therapeutic agents for multiple myeloma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** v. 19, p. 7194-7204, 2011.

PERROTTI, D.; JAMIESON, C.; GOLDMAN, J.; SKORSKI, T. Chronic Myeloid Leukemia: Mechanisms of Blastic Transformation. **Journal of Clinical Investigation.** v. 120, p. 2254-2264, 2010.

PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annu. Rev. Biochem.** v. 70, p. 503–533, 2001.

PLÖCHL J. Über einige Derivate der Benzoylimdozimtsäure. **Ber.** v. 17, p. 1623, 1893.

PRATT, W. B.; RUDDON, R. W.; ENSMINGER, W. D.; MAYBAUM, J. **The Anticancer Drugs.** 2 ed. USA: Oxford University Press, 1994.

PRITCHARD, J. R.; LAUFFENBURGER, D. A.; HEMANN, M. T. Understanding resistance to combination chemotherapy. **Drug Resist Updat.** v. 15, p. 249-257, 2012.

PROKOF'EV, E. P.; KARPEISKAYA, E. I. The proton coupled ¹³C NMR determination of *Z*-, *E*-configuration of 4-benzyliden-2-phenyl(methyl)- Δ^2 -oxazolin-5-onas and products of their solvolysis. **Tetrahedron Letters.** n. 8, p. 737-740, 1979.

QUINTAS-CARDAMA, A.; CORTES, J. E. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings.** 81. 973-988, 2006.

RAO, Y. S. A new stereospecific synthesis of the *E* isomers of 2-phenyl-4-arylmethylene-2-oxazolin-5-ones. **J Org Chem.** v. 41, n. 4, p. 722-724, 1976.

ROBSON, M. E.; BOYD, J.; BORGAN, P. I.; CODY, H. S. Hereditary breast cancer. **Curr Probl Surg,** v. 38, n. 3, p. 387-480, 2001.

ROHRBACHER, M.; HASFORD, J. Epidemiology of Chronic Myeloid Leukaemia (Cml). **Best Practice & Research Clinical Haematology.** v. 22, p. 295-302, 2009.

ROWLEY, J. D. Chromosomal patterns in myelocytic leukemia. **N Engl J Med.** v. 289, p. 220-221, 1973.

RUMJANEK, V. M.; TRINDADE, G. S.; SOUZA, K. W.; OLIVEIRA, M. C. M.; SANTOS, L. F. M.; MAIA, R. C.; CAPELLA, M. A. M. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistance cell line K562-Lucena 1. **An Acad Bras Cienc.** v. 73, p. 57-69, 2001.

SALUSTIANO, E. J. S. **Caracterização do Efeito Antitumoral de Novas Moléculas Sintéticas em Linhagens Tumorais Resistentes a Múltiplas Drogas.** Dissertação (Mestre em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro- Rio de Janeiro , 2008.

SATTLER, M.; MOHI, M. G.; PRIDE, Y. B.; QUINNAN, L. R.; MALOUF, N. A.; PODAR, K.; GESBERT, F.; IWASAKI, H.; LI, S. G.; VAN ETEN, R. A.; GU, H. H.; GRIFFIN, J. D.; NEEL, B. G. Critical Role for Gab2 in Transformation by Bcr/Abl. **Cancer Cell.** v. 1, p. 479-492, 2002.

SCHINDLER, C.; PLUMLEE, C. Inteférons pen the JAK-STAT pathway. **Semin Cell Dev Biol.** v. 19, p. 311-318, 2008.

SCHINDLER, T.; BORNMANN, W.; PELLICENA, P.; MILLER, W. T.; CLARKSON, B.; KURIYAN, J. Structural Mechanism for Sti-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. **Science.** v. 289, p. 1938-1942, 2000.

SHURIN, M. R.; NAIDITCH, H.; GUTKIN, D. W.; UMANSKY, V.; SHURIN, G. V. ChemoImmunoModulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. **Curr Med Chem**. v. 19, n. 12, p. 1792-1803, 2012.

SILVA, V. P. N. **Contributo para os estudos dos mecanismos de resistência ao Imatinib em Leucemia Mielóide Crónica**. Dissertação (Mestre em Genética Molecular e Biomedicina) - Universidade de Lisboa – Lisboa, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Tradução: Ricardo Bicca de Alancastro. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

STEELMAN, L. S.; POHNERT, S. C.; SHELTON, J. G.; FRANKLIN, R. A.; BERTRAND, F. E.; MCCUBREY, J. A. Jak/Stat, Raf/Mek/Erk, Pi3k/Akt and Bcr-Abl in Cell Cycle Progression and Leukemogenesis. **Leukemia**. v. 18, p. 189-218, 2004.

SUN, H.; KAPURIA, V.; PATERSON, L. F.; FANG, D.; BOMMANN, W. G.; BARTHOLOMEUSZ, G.; TALPAZ, M.; DONATO, N. J. BCR-ABL ubiquitination and Usp9X inhibition block kinase signaling and promote CML cell apoptosis. **Blood**. v. 117, p. 3151-3162, 2011.

SWORDS, R.; MAHALINGAM, D.; PADMANABHAN, S.; CAREW, J.; GILES, F. Nilotinib: optimal therapy for patients with chronic myeloid leukemia and resistance or intolerance to imatinib. **Drug Des Devel Ther**. v. 3, p. 89-101, 2009.

TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D. The design of leadlike combinatorial libraries. **Angew. Chem. Int. Edn Eng**. v. 38, p. 3743–3748, 1999.

VERSTOVSEK, S.; AKIN, C.; MANSHOURI, T.; QUINTÁS-CARDAMA, A.; HUYNH, L.; MANLEY, P.; TEFFERI, A.; CORTES, J.; GILES, F. J.; KANTARJIAN, H. Effects of AMN107, a novel aminopyrimidine tyrosine kinase inhibitor, on human mast cells bearing wild-type or mutated codon 816 c-kit. **Leukemia Res**. 30, 1365–1370, 2006.

WEINBERG, R. A.; BARGMANN, C. I.; HUNG, M. C. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. **Nature**. v. 319, p. 226-230, 1986.

WEISBERG, E.; MANLEY, P.; MESTAN, J.; COWAN-JACOB, S.; RAY, A.; GRIFFIN, J. D. AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. **Br. J. Cancer**. v. 94, p. 1765–1769, 2006.

WEISBERG, E.; MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; HOCHHAUS, A.; GRIFFIN, J. D. Second Generation Inhibitors of Bcr-Abl for the Treatment of Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukaemia. **Nature Reviews Cancer**. 7. 345-U345, 2007.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation, **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**. v. 2, p. 169-178, 2001.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier, 2008.

WONG, S; WITTE, O. N. The Bcr-Abl Story: Bench to Bedside and Back. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 247-306, 2004.

YUNES, N. D. **Resistência, agressividade e diferenciação celular: uma tríade dissonante em células de leucemia mielóide crônica.** Dissertação (Doutor em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, 2013.

ZIMMERMANN, J.; BUCHDUNGER, E.; METT, H.; MEYER, T.; LYDON. (Phenylamino)pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and highly selective PDGF-receptor autophosphorylation inhibitors. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 6, p. 1221–1226, 1996.

ZIMMERMANN, J.; BUCHDUNGER, E.; METT, H.; MEYER, T.; LYDON. Potent and selective inhibitors of the ABL-kinase: phenylaminopyrimidine (PAP) derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 7, p. 187–192, 1997.

7 ANEXOS

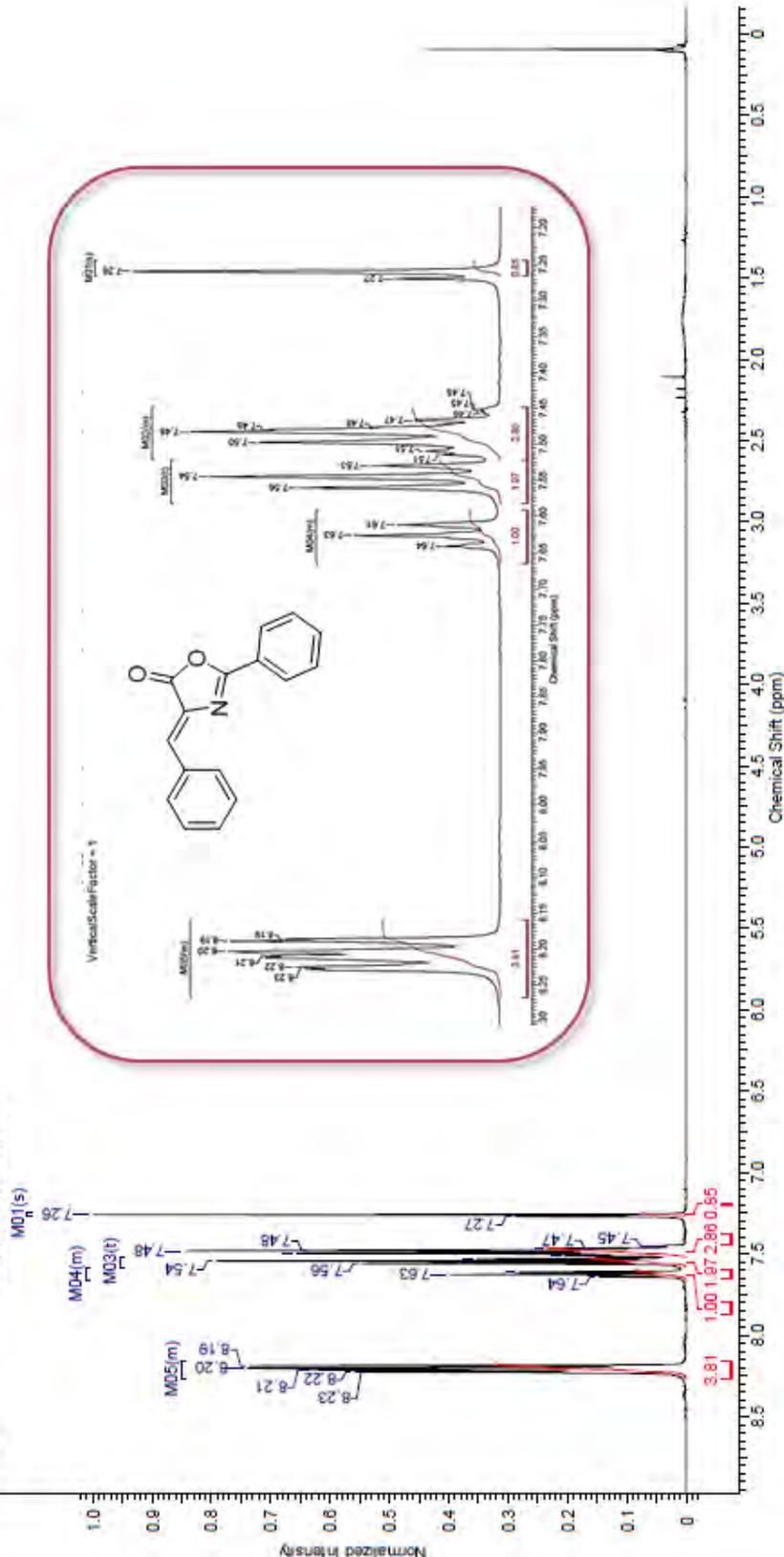
Anexo 1. Espectro de RMN ¹H do produto **35a** com ampliação em 8,30-7,70ppm em CDCl₃ à 500MHz.

22/08/2013 18:17:08

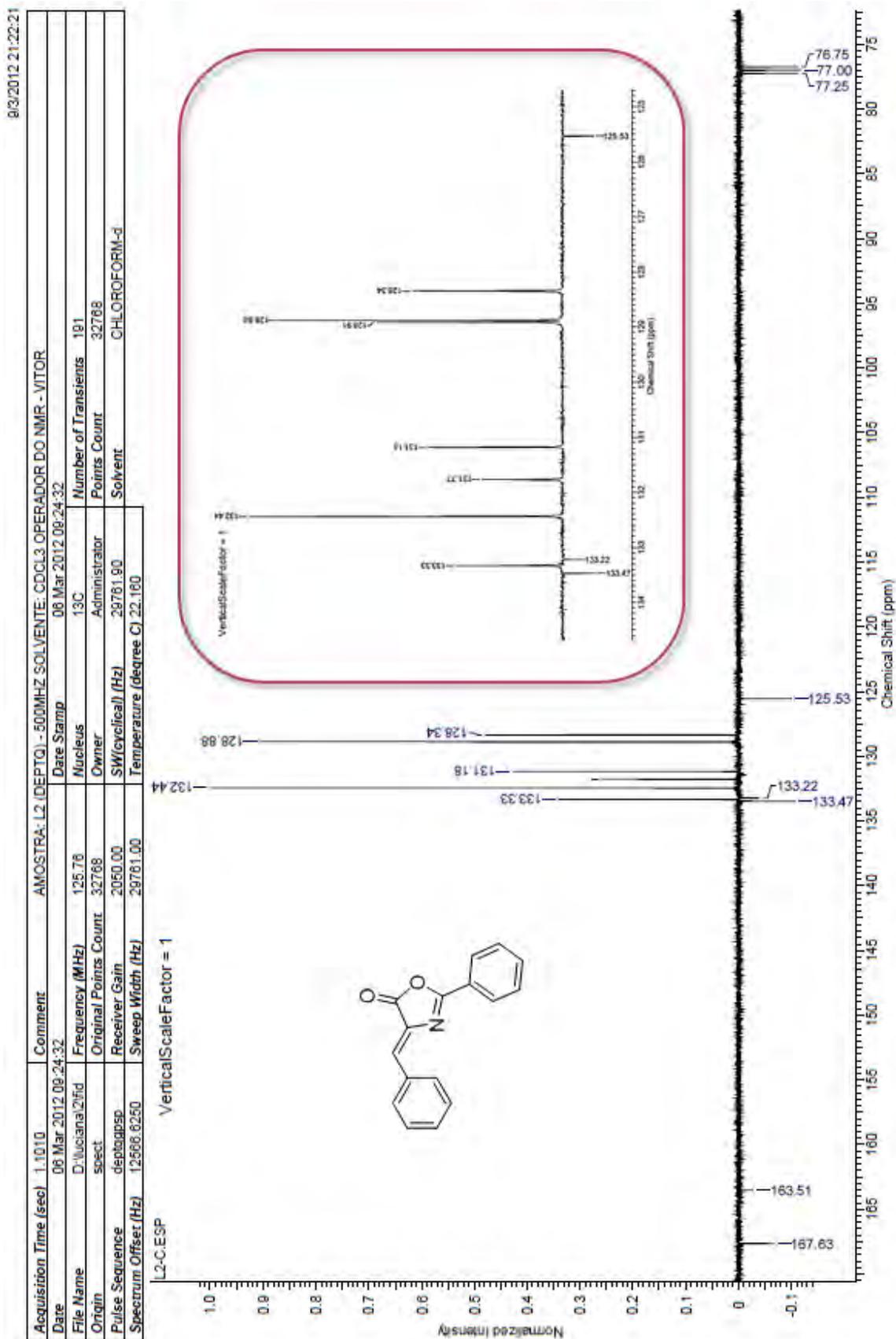
Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: L2 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
Date	06 Mar 2012 12:18:08	Date Stamp	06 Mar 2012 12:18:08
File Name	D:\Luciana\luciana_001000f0d	Frequency (MHz)	500.13
Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Receiver Gain	90.50
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	3079.8838
Temperature (degree C)	22.160	Sweep Width (Hz)	10330.26

¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.26 (s, 1 H) 7.45 - 7.52 (m, 3 H) 7.54 (t, J=7.57 Hz, 2 H) 7.59 - 7.66 (m, 1 H) 8.16 - 8.27 (m, 4 H)

L2-H.esp
VerticalScaleFactor = 1



Anexo 2. Espectro de RMN ¹³C do produto **35a** com ampliação em 134-125ppm em CDCl₃ à 125MHz.

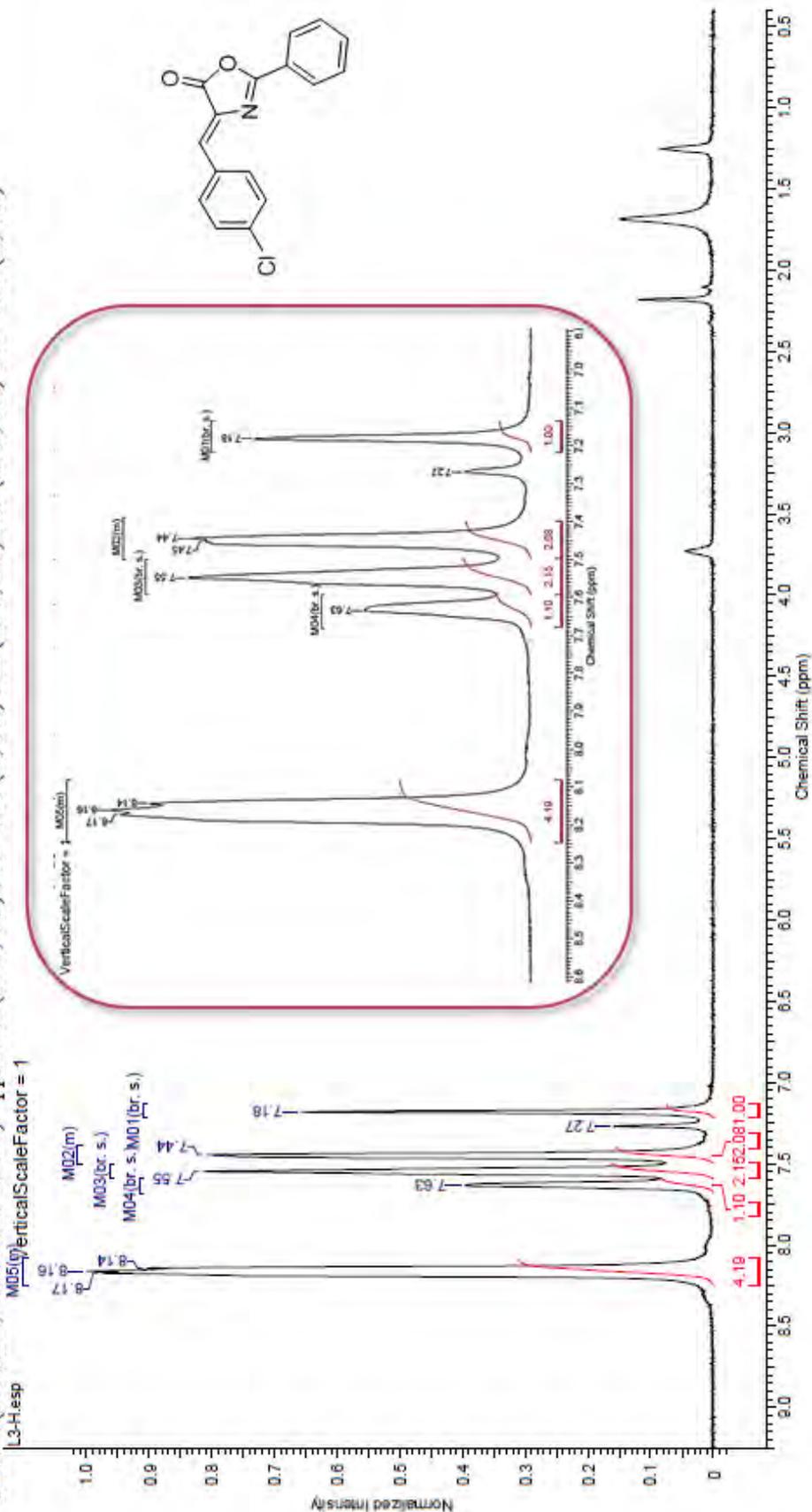


Anexo 3. Espectro de RMN ¹H do produto **35b** com ampliação em 8,04-7,00ppm em CDCl₃ à 500MHz.

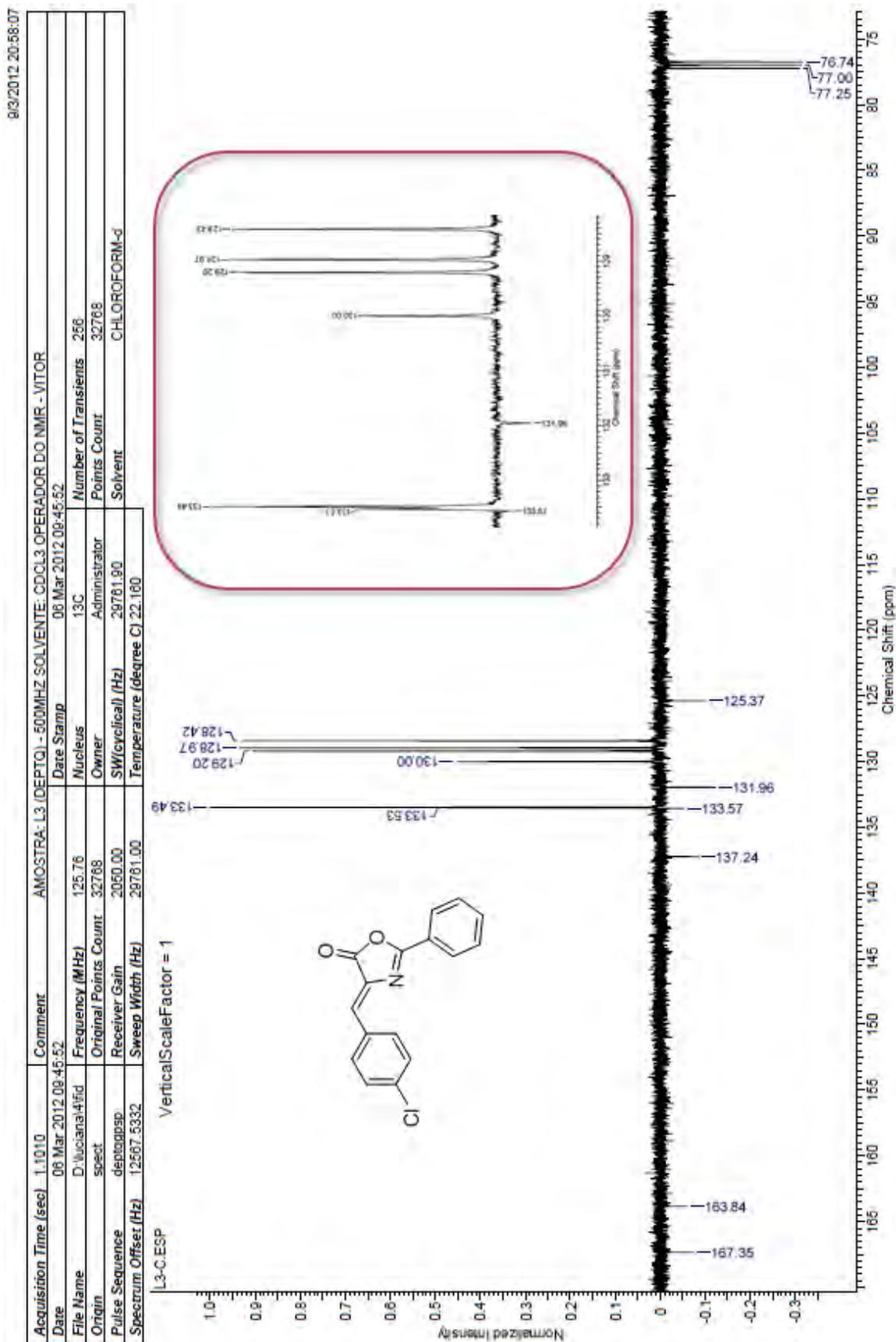
22/08/2013 18:12:29

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA_L3 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
Date	06 Mar 2012 08:37:20	Date Stamp	06 Mar 2012 08:37:20
File Name	D:\Luciana\3rd	Nucleus	¹ H
Origin	soest	Original Points Count	500.13
Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	32768
Spectrum Offset (Hz)	3077.4546	Spectrum Type	STANDARD
		Owner	Administrator
		SW(cyclical) (Hz)	10330.88
		Sweep Width (Hz)	10330.26
		Solvent	CHLOROFORM-d
		Temperature (degree C)	22.160

¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 7.18 (br. s., 1 H) 7.39 - 7.50 (m, 2 H) 7.55 (br. s., 2 H) 7.63 (br. s., 1 H) 8.08 - 8.25 (m, 4 H)



Anexo 4. Espectro de RMN ¹³C do produto **35b** com ampliação em 134-128ppm em CDCl₃ à 125MHz.

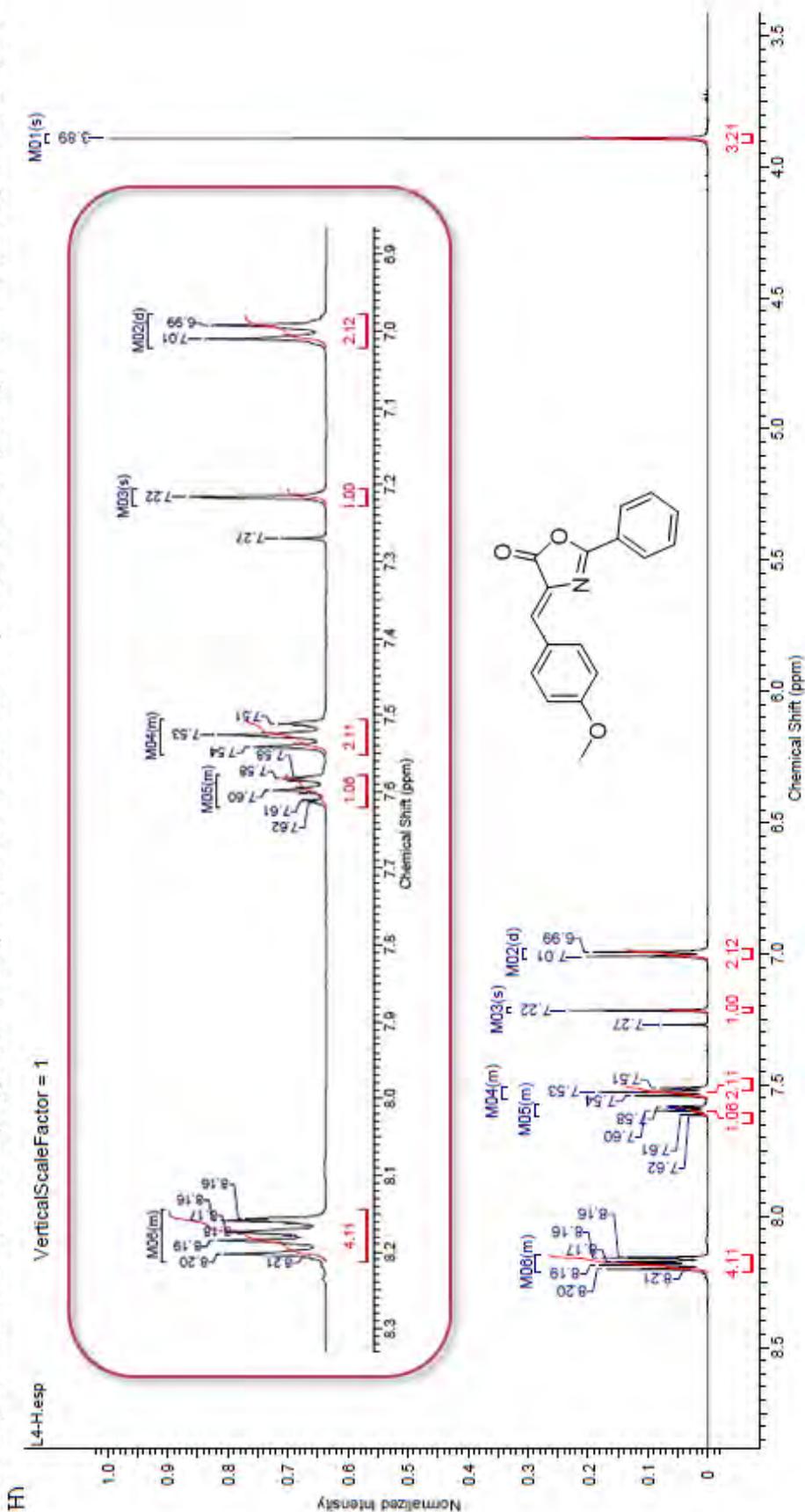


Anexo 5. Espectro de RMN ¹H do produto **35c** com ampliação em 8,3-6,9ppm em CDCl₃ à 500MHz.

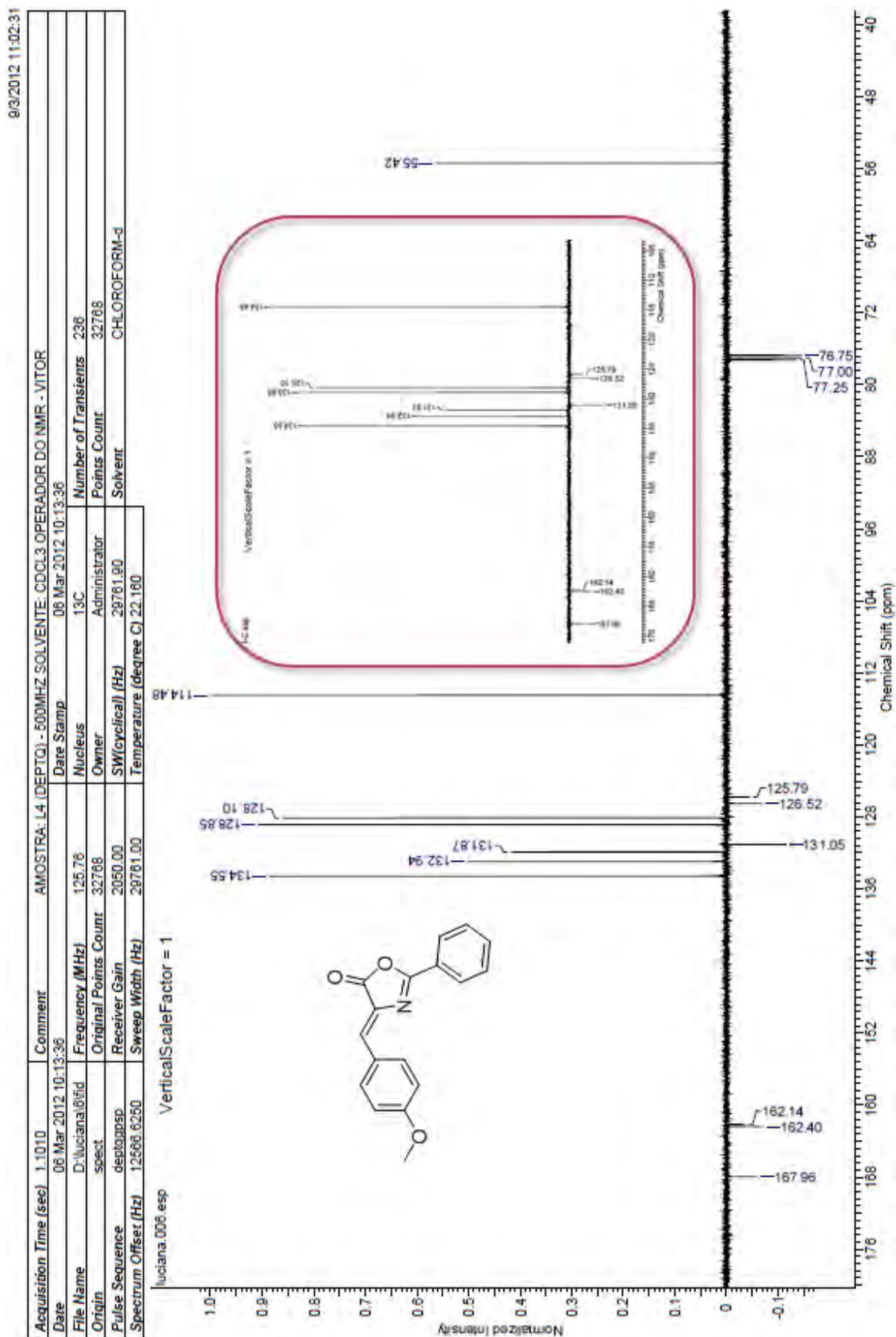
24/08/2013 17:53:11

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: L4 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
Date	06 Mar 2012 06:58:40	Date Stamp	06 Mar 2012 06:58:40
File Name	D:\Luciana\51\id	Nucleus	¹ H
Origin	spect	Frequency (MHz)	500.13
Pulse Sequence	z030	Original Points Count	32768
Spectrum Offset (Hz)	3079.6614	Receiver Gain	80.60
		SW (cyclical) (Hz)	10330.58
		Spectrum Type	STANDARD
		Solvent	CHLOROFORM-d
		Temperature (degree C)	22.160
		Sweep Width (Hz)	10330.26

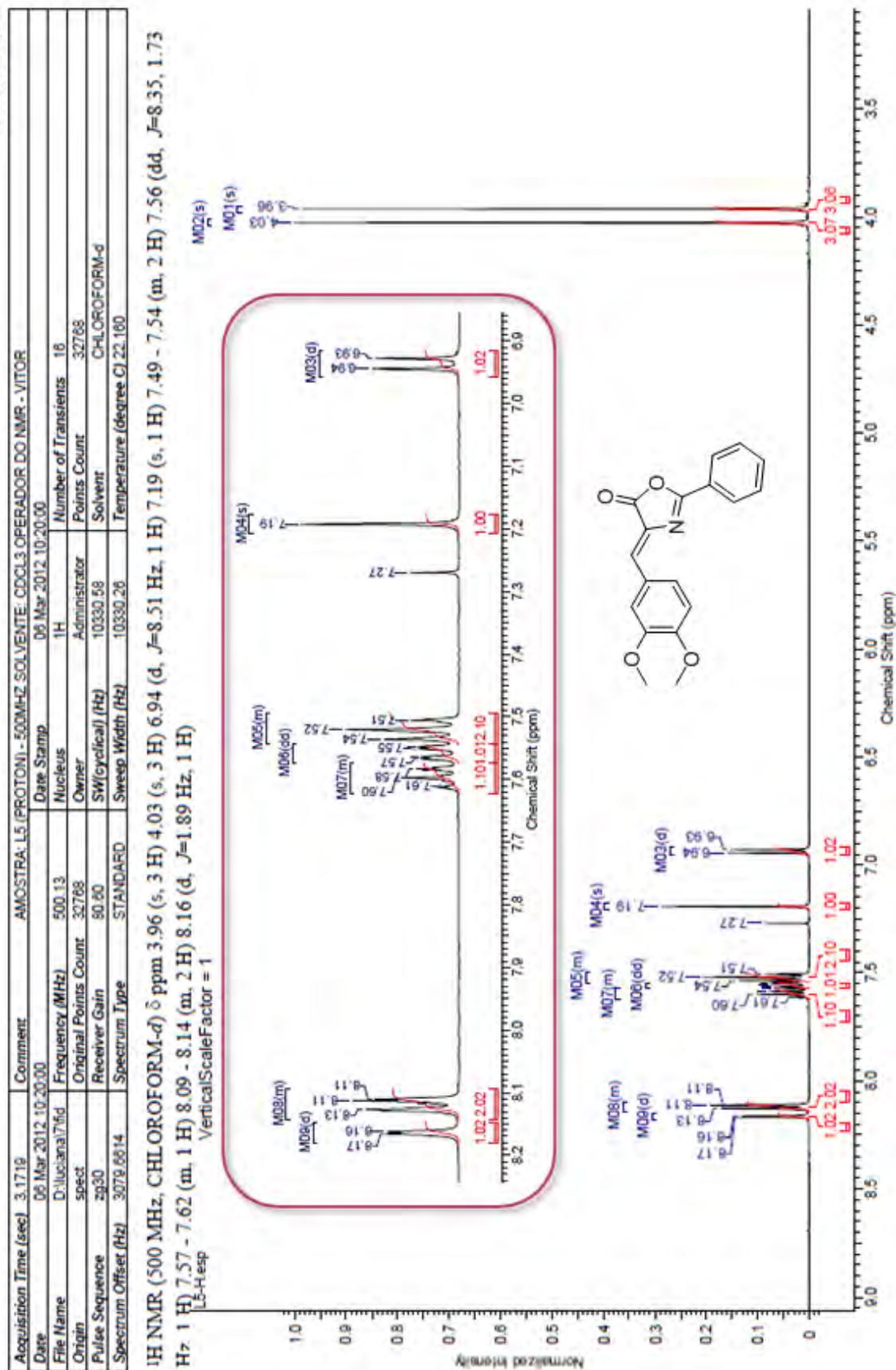
¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.89 (s, 3 H) 7.00 (d, J=8.83 Hz, 2 H) 7.22 (s, 1 H) 7.51 - 7.55 (m, 2 H) 7.58 - 7.62 (m, 1 H) 8.15 - 8.21 (m, 4



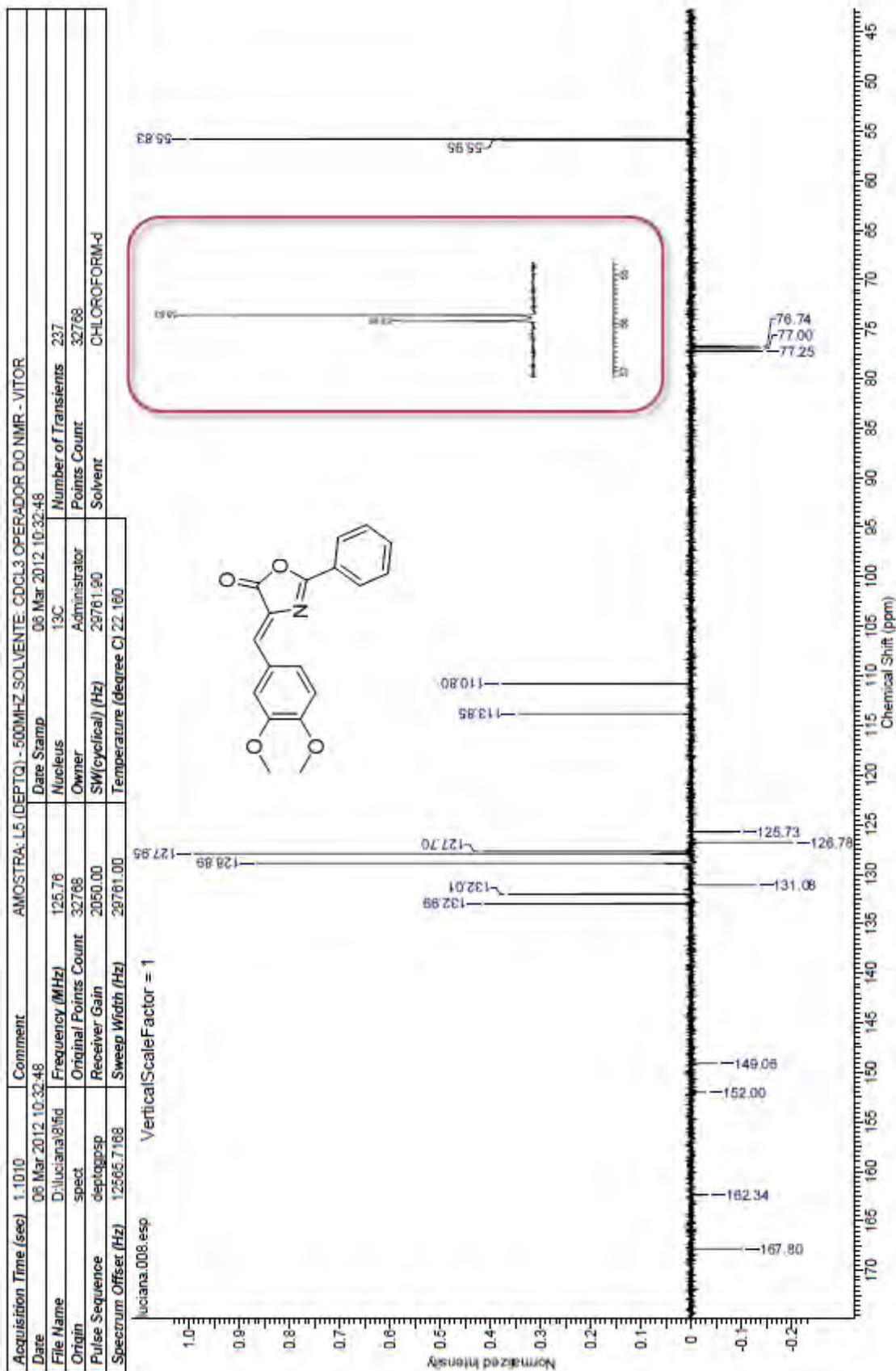
Anexo 6. Espectro de RMN ¹³C do produto **35c** com ampliação em 170-105ppm em CDCl₃ à 125MHz.



Anexo 7. Espectro de RMN ¹H do produto **35d** com ampliação em 8,2-6,9ppm em CDCl₃ à 500MHz.



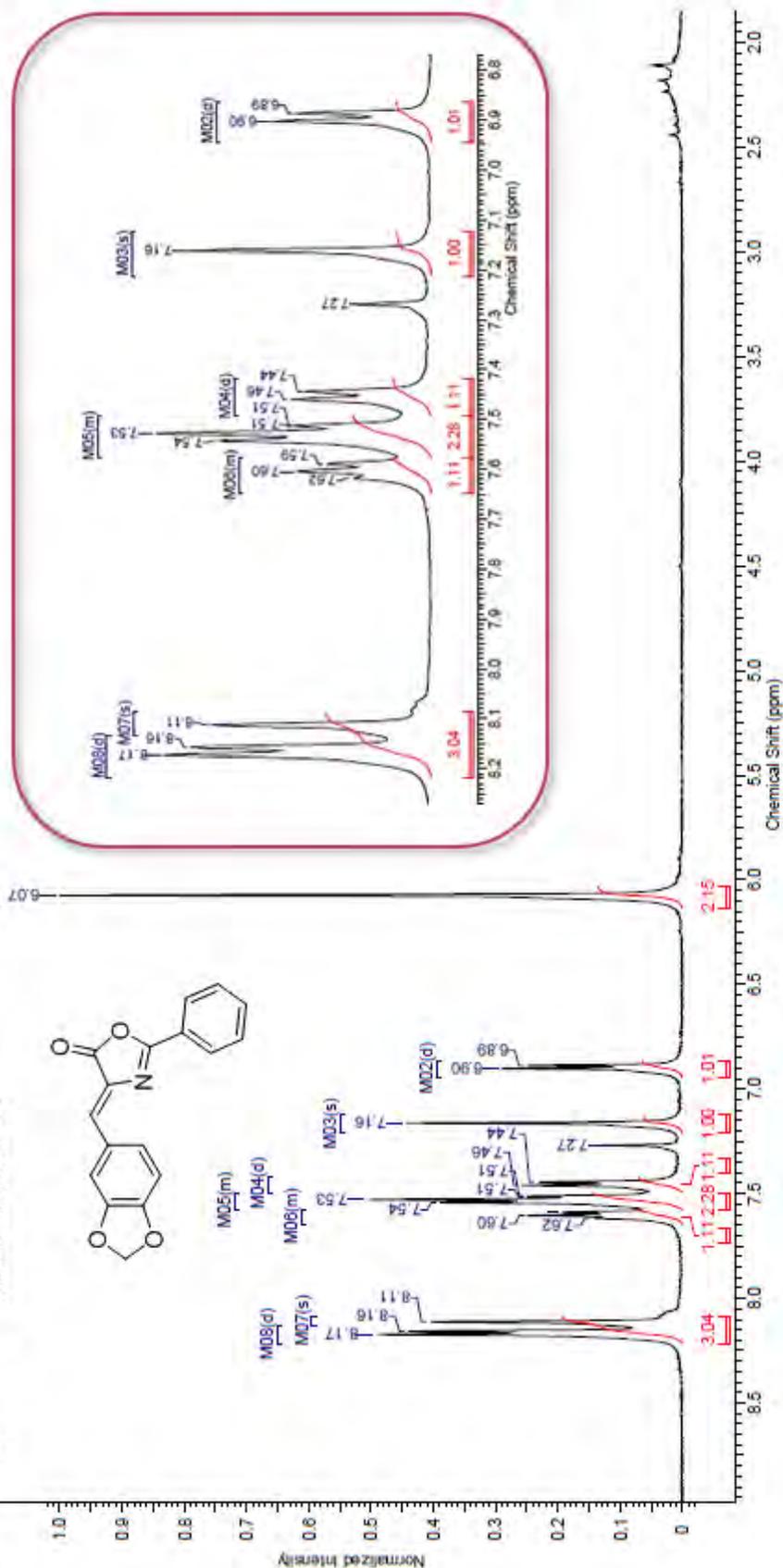
Anexo 8. Espectro de RMN ¹³C do produto **35d** com ampliação em 57-55ppm em CDCl₃ à 125MHz.



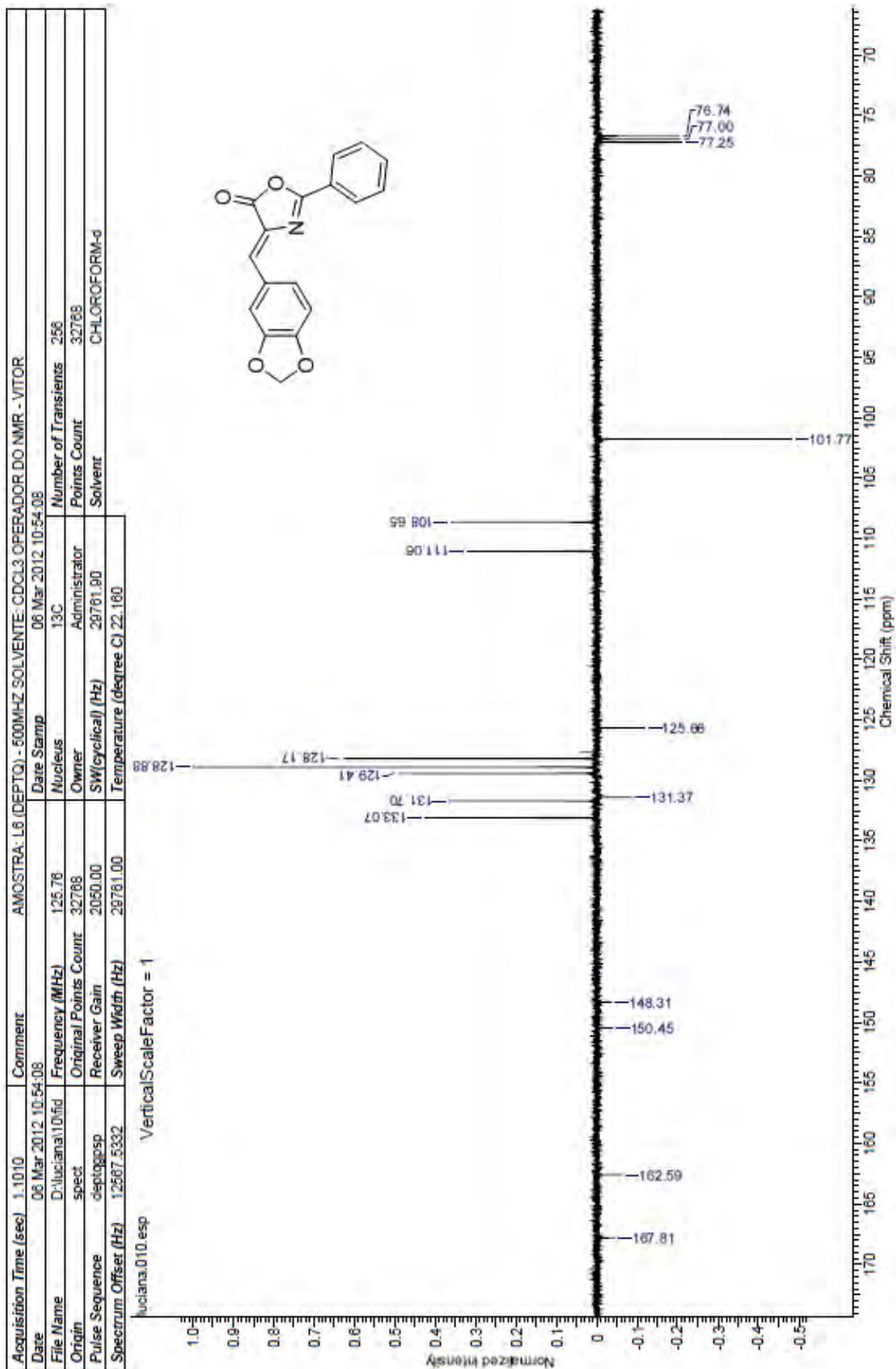
Anexo 9. Espectro de RMN ¹H do produto **35e** com ampliação em 8,3-6,8ppm em CDCl₃ à 500MHz.

Acquisition Time (sec)	3.1719	Comment	AMOSTRA: L8 (PROTON) - 500MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - VITOR
Date	06 Mar 2012 10:38:12	Date Stamp	06 Mar 2012 10:38:12
File Name	D:\luciana\l8\fid	Nucleus	¹ H
Origin	spect	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	90.50
Spectrum Offset (Hz)	3079.3462	Spectrum Type	STANDARD
		Number of Transients	16
		Points Count	32768
		Administrator	CHLOROFORM-d
		Solvent	10330.58
		Temperature (degree C)	22.160

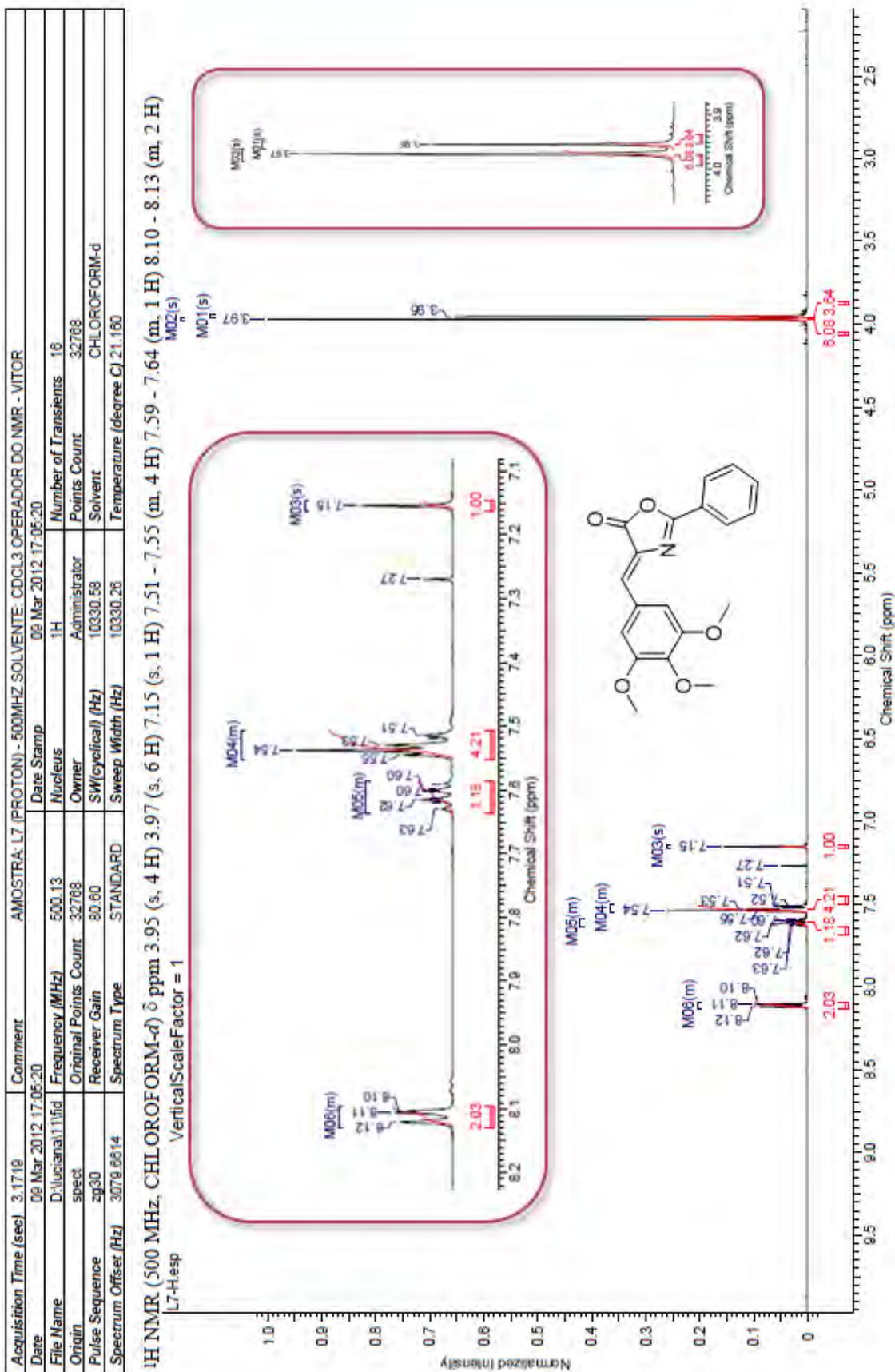
¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 6.07 (s, 2 H) 6.89 (d, J=8.20 Hz, 1 H) 7.16 (s, 1 H) 7.45 (d, J=7.88 Hz, 1 H) 7.49 - 7.58 (m, 2 H) 7.58 - 7.65 (m, 1 H) 8.11 (s, 1 H) 8.16 (d, J=8.20 Hz, 2 H)



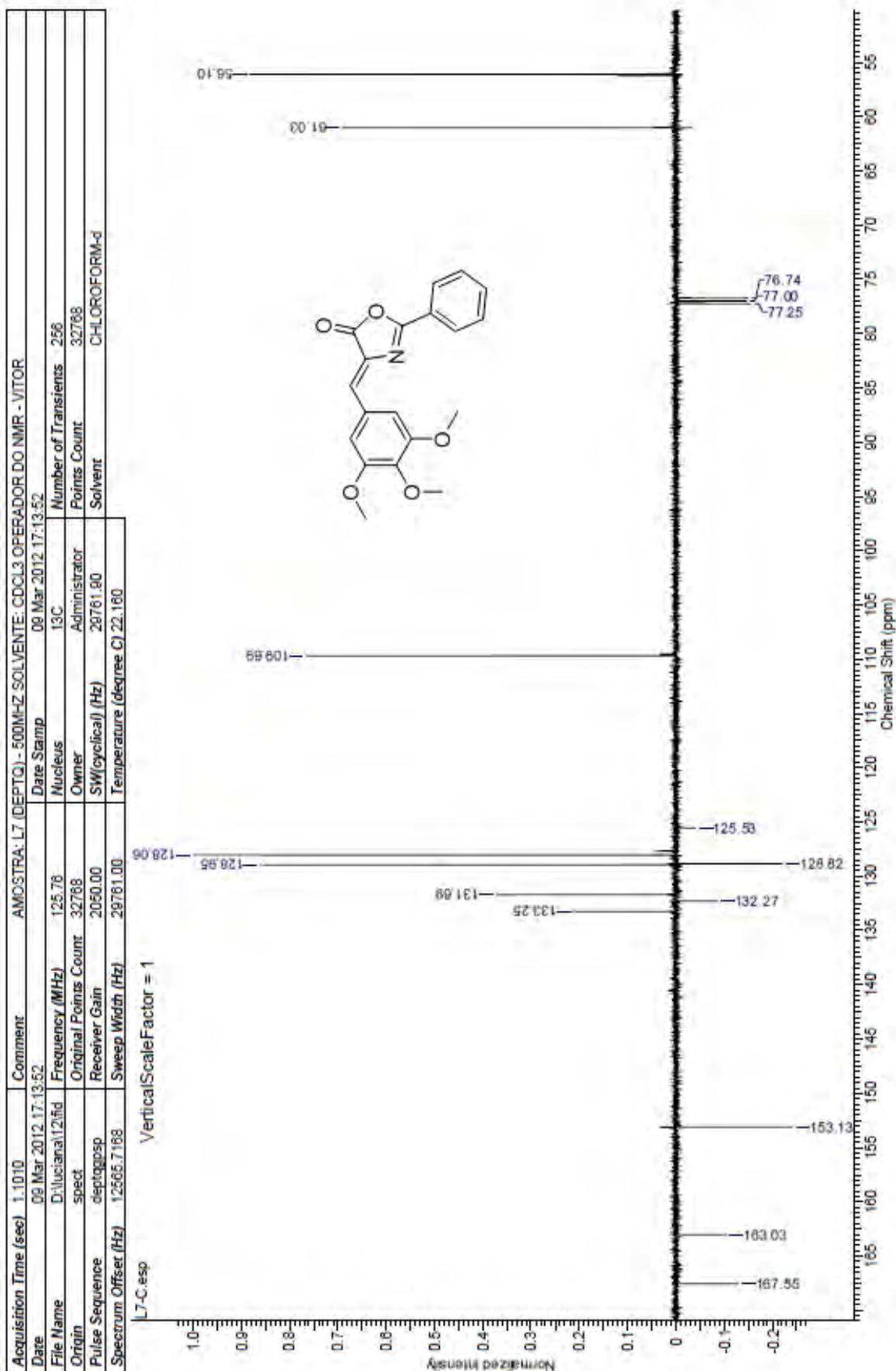
Anexo 10. Espectro de RMN ¹³C do produto **35e** em CDCl₃ à 125MHz.



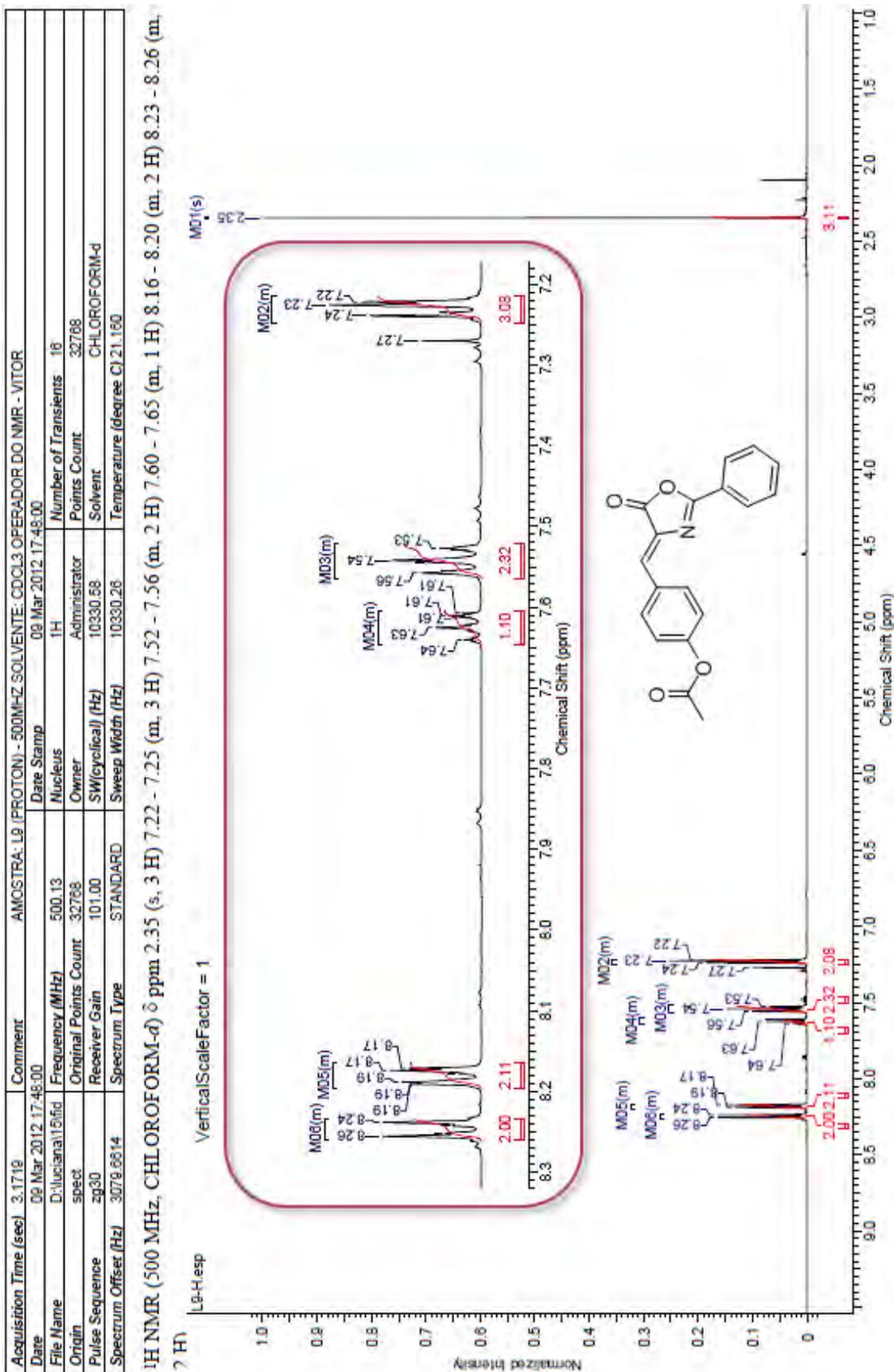
Anexo 11. Espectro de RMN ¹H do produto **35f** com ampliação em 8,2-7,1ppm e 4,1-3,9ppm em CDCl₃ à 500MHz.



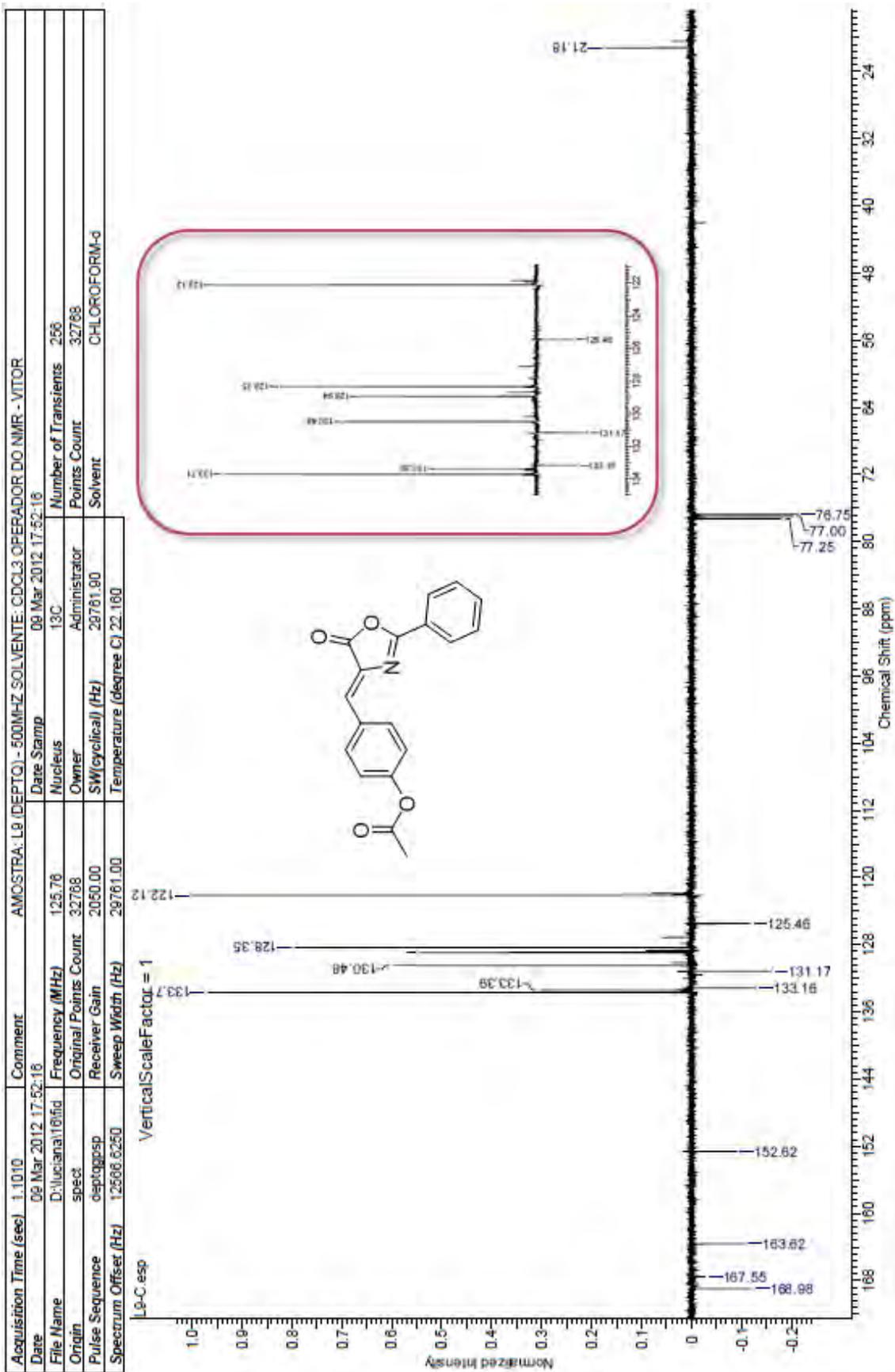
Anexo 12. Espectro de RMN ¹³C do produto **35f** em CDCl₃ à 125MHz.



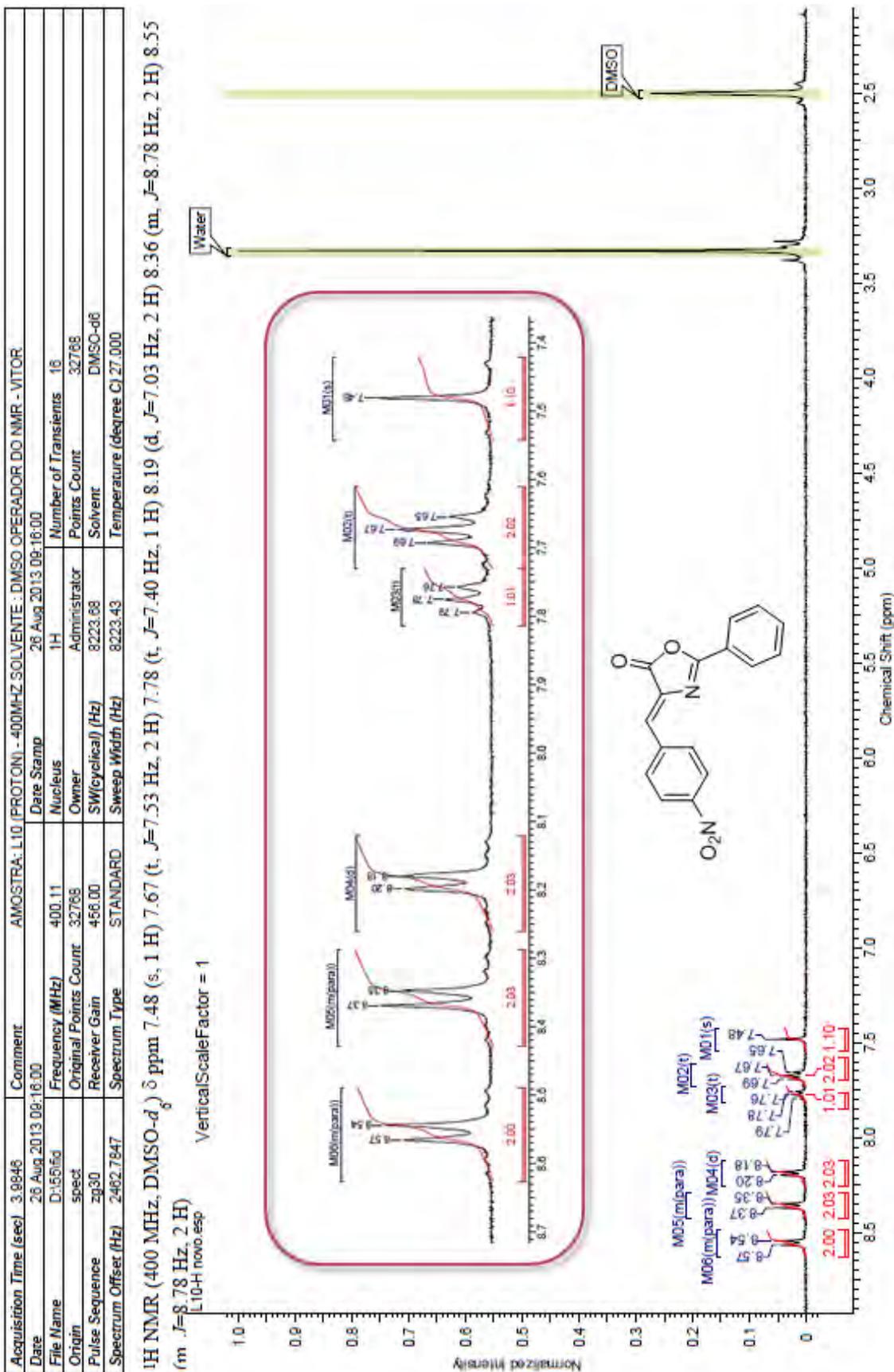
Anexo 13. Espectro de RMN ^1H do produto **35g** com ampliação em 8,3-7,2ppm em CDCl_3 à 500MHz.



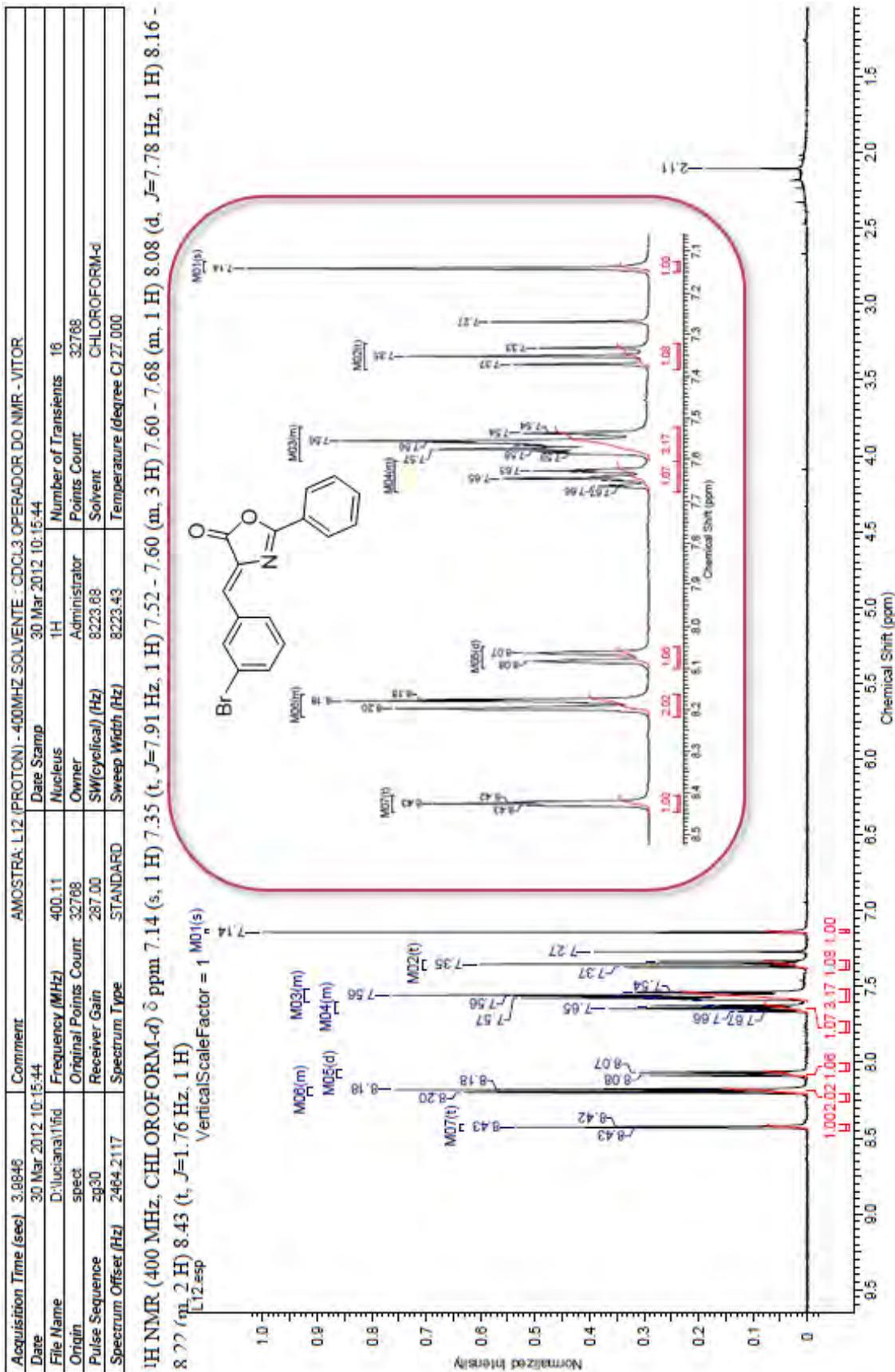
Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C do produto **35g** com ampliação em 134-122ppm em CDCl_3 à 125MHz.



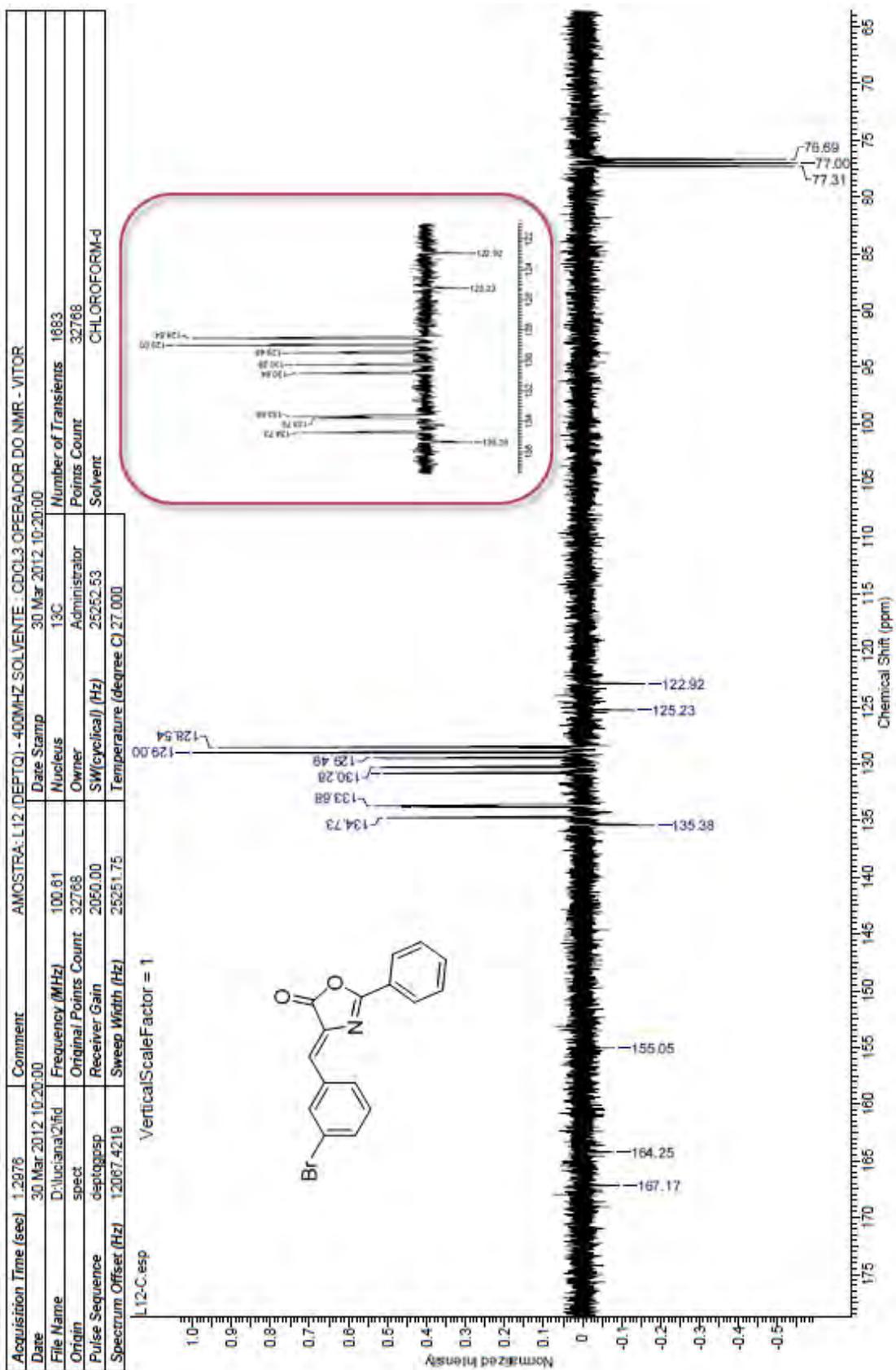
Anexo 15. Espectro de RMN ¹H do produto **35h** com ampliação em 8,7-7,4ppm em DMSO à 400MHz.



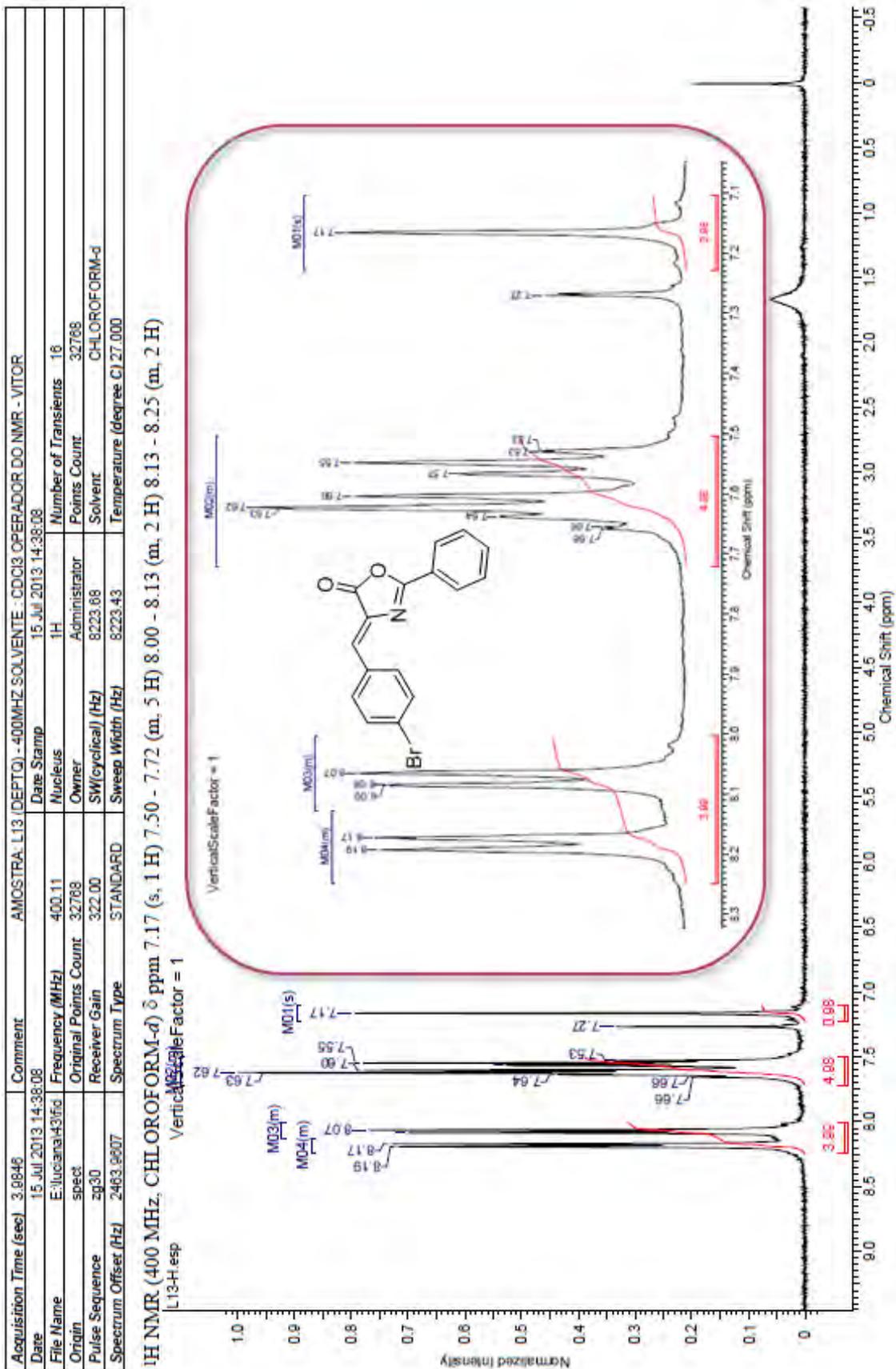
Anexo 17. Espectro de RMN ¹H do produto **35i** com ampliação em 8,5-7,1ppm em CDCl₃ à 400MHz.



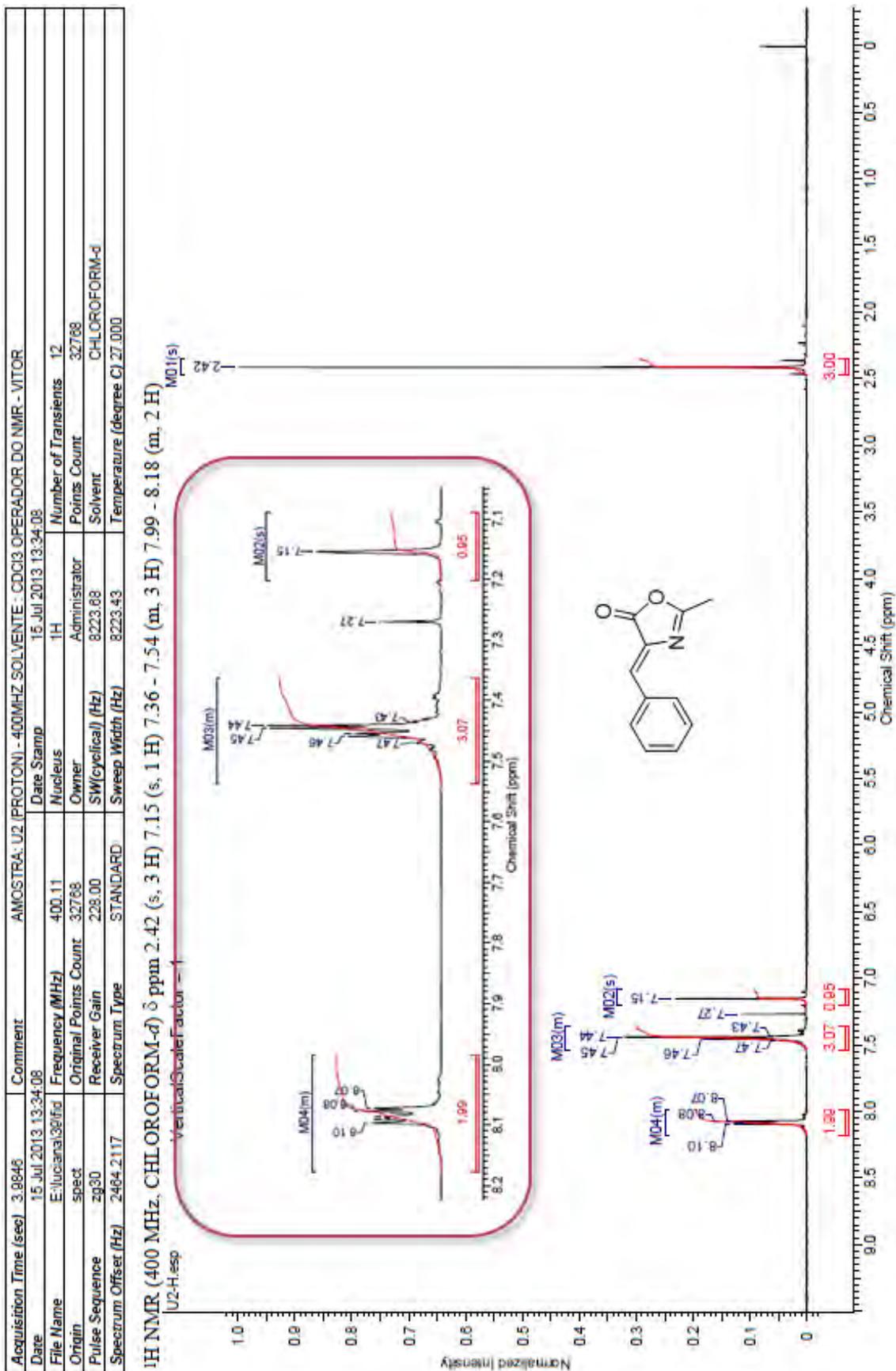
Anexo 18. Espectro de RMN ^{13}C do produto **35i** com ampliação em 136-122ppm em CDCl_3 à 100MHz.



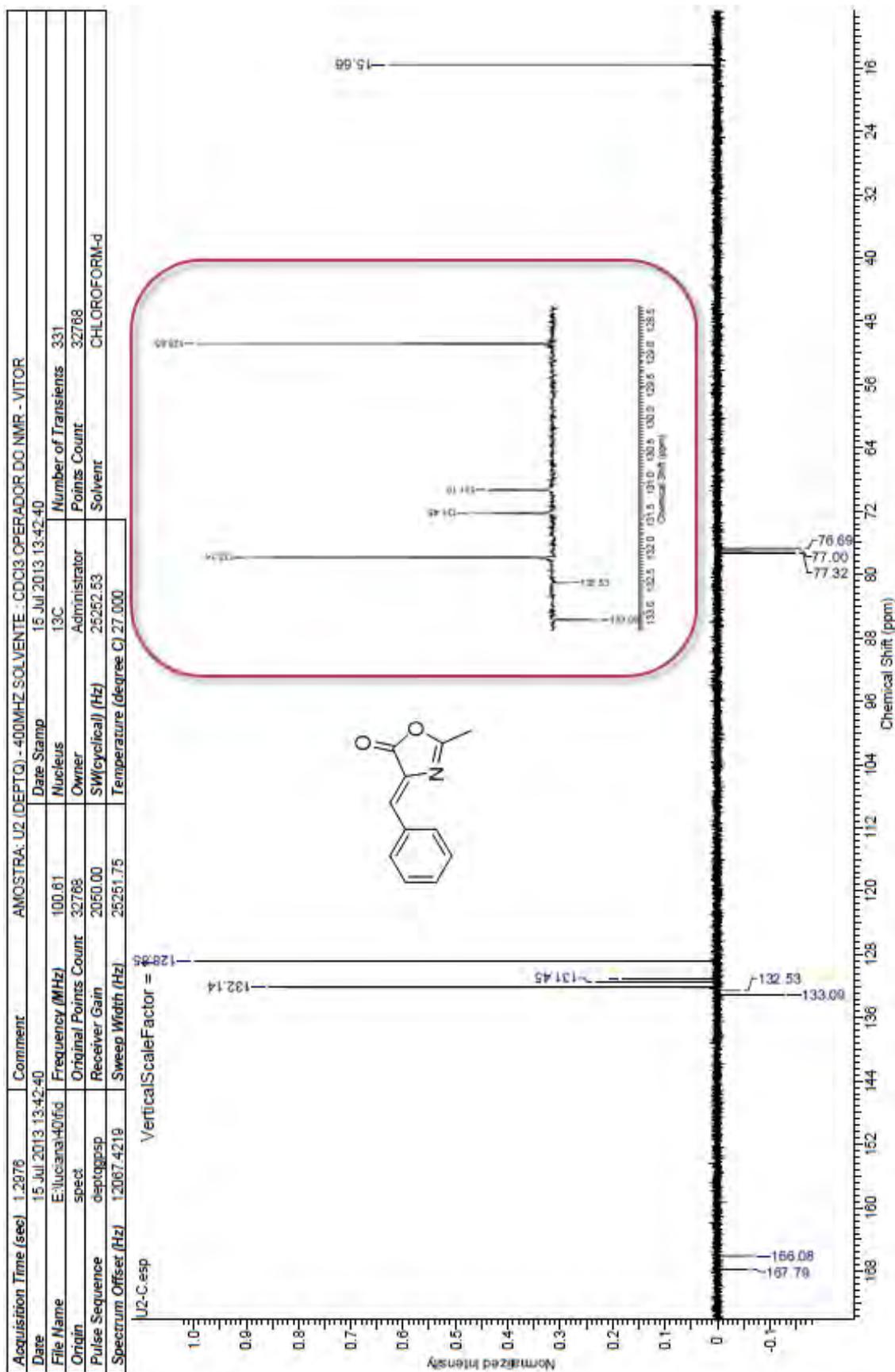
Anexo 19. Espectro de RMN ¹H do produto **35j** com ampliação em 8,3-7,1ppm em CDCl₃ à 400MHz.



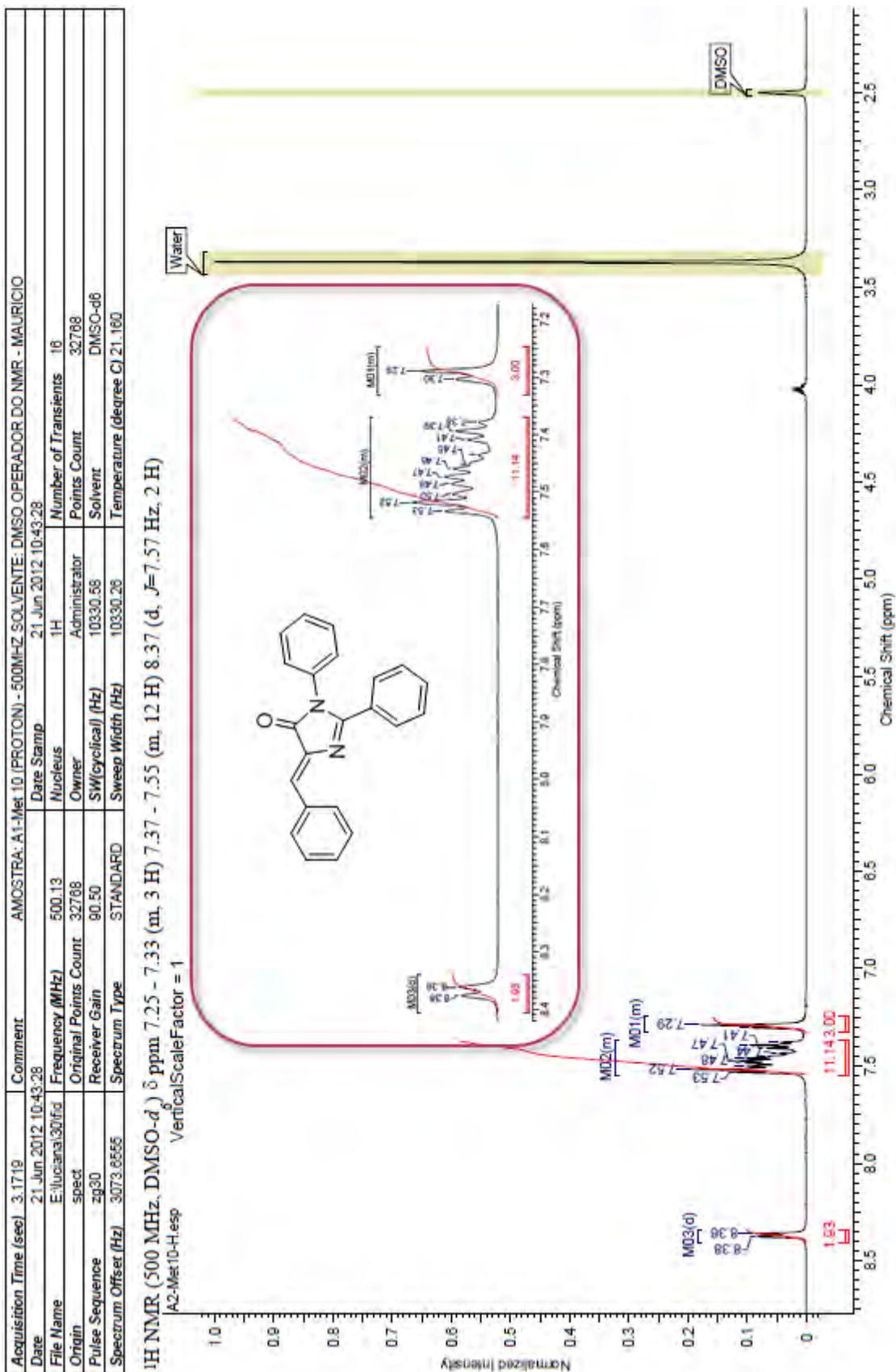
Anexo 21. Espectro de RMN ¹H do produto **37a** com ampliação em 8,2-7,1ppm em CDCl₃ à 400MHz.



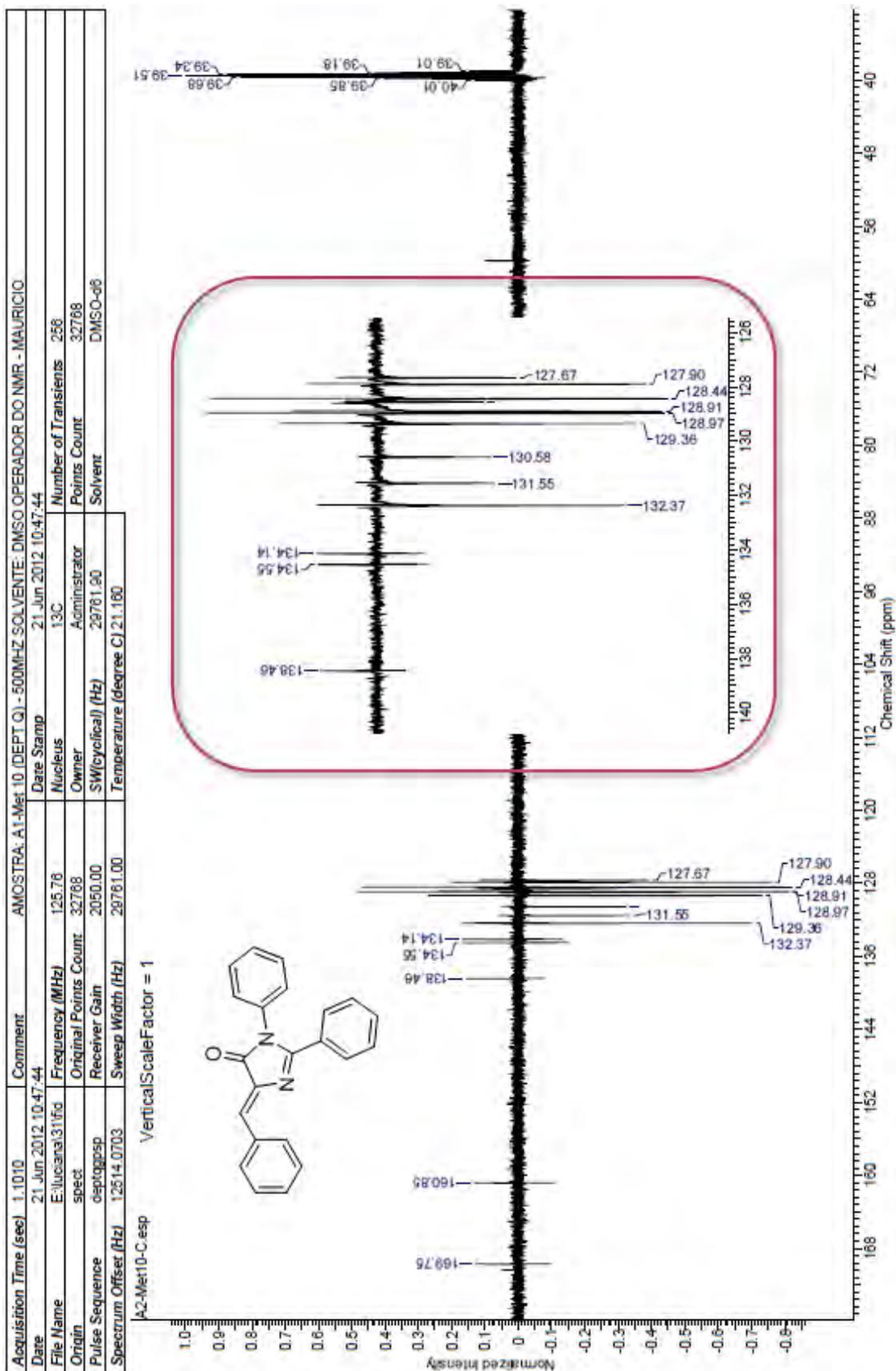
Anexo 22. Espectro de RMN ^{13}C do produto **37a** com ampliação em 133-128ppm em CDCl_3 à 100MHz.



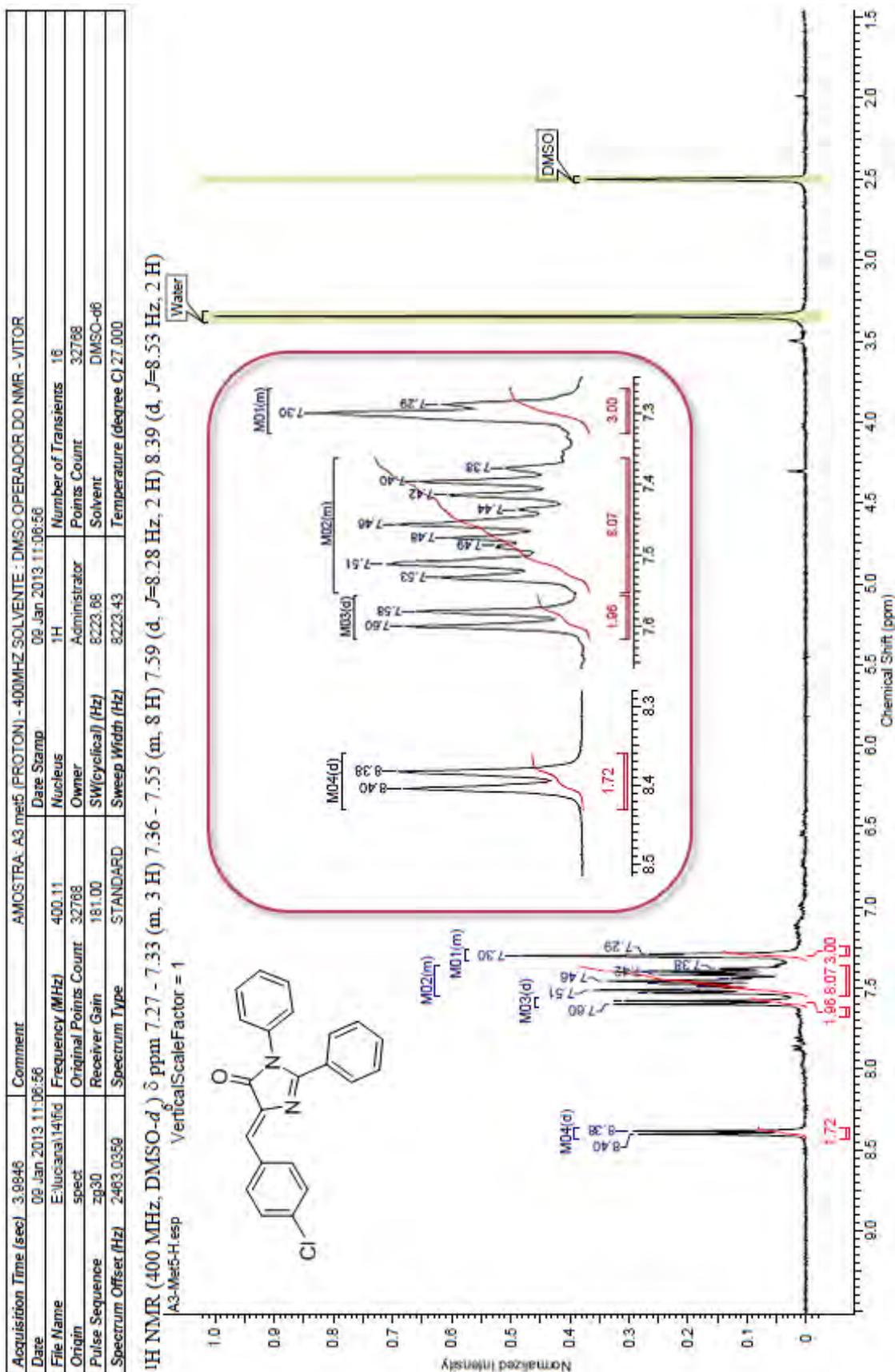
Anexo 23. Espectro de RMN ¹H do produto **39a** com ampliação em 8,4-7,2ppm em DMSO à 500MHz.



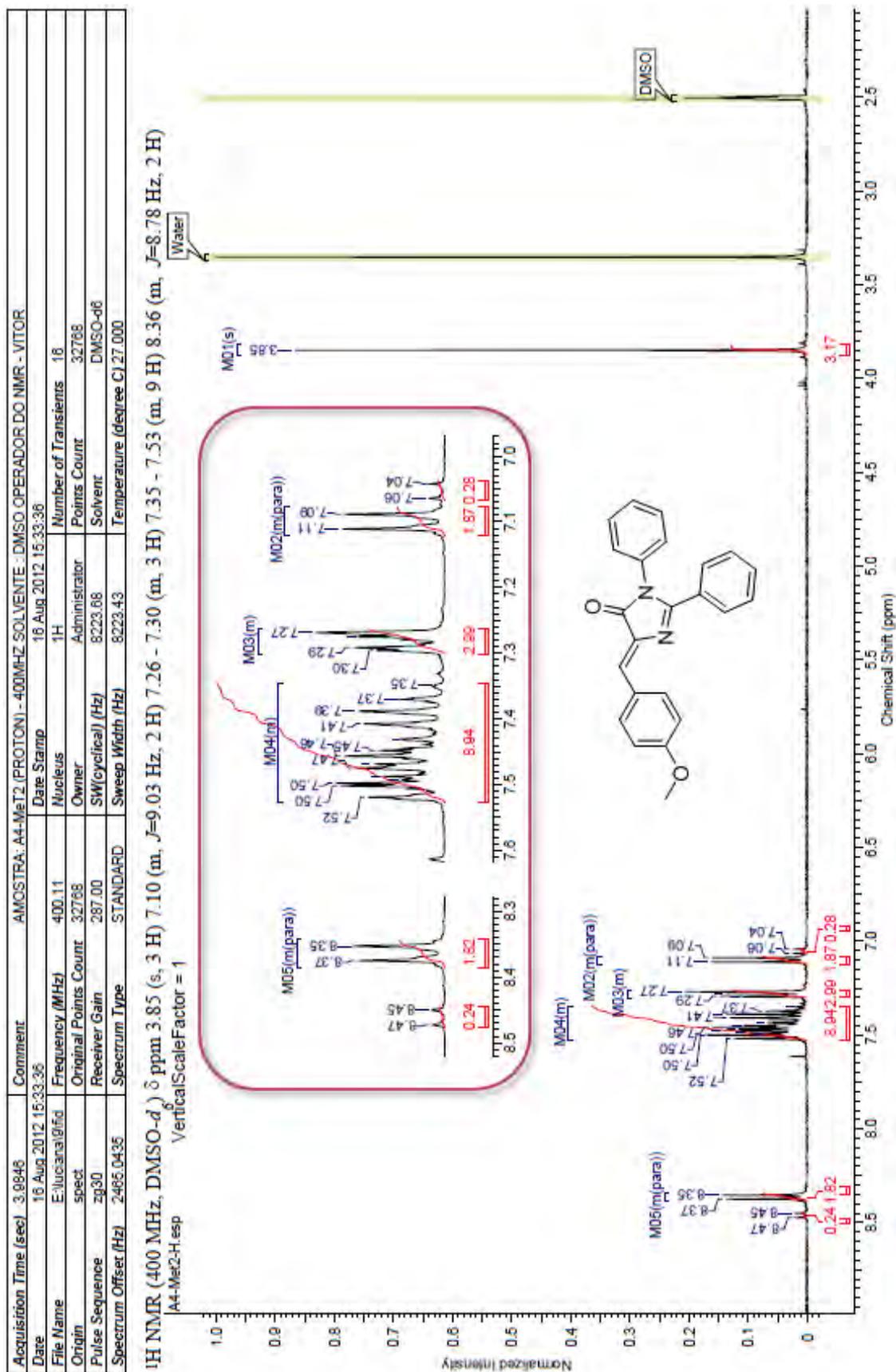
Anexo 24. Espectro de RMN ¹³C do produto 39a com ampliação em 140-126ppm em DMSO à 125MHz.



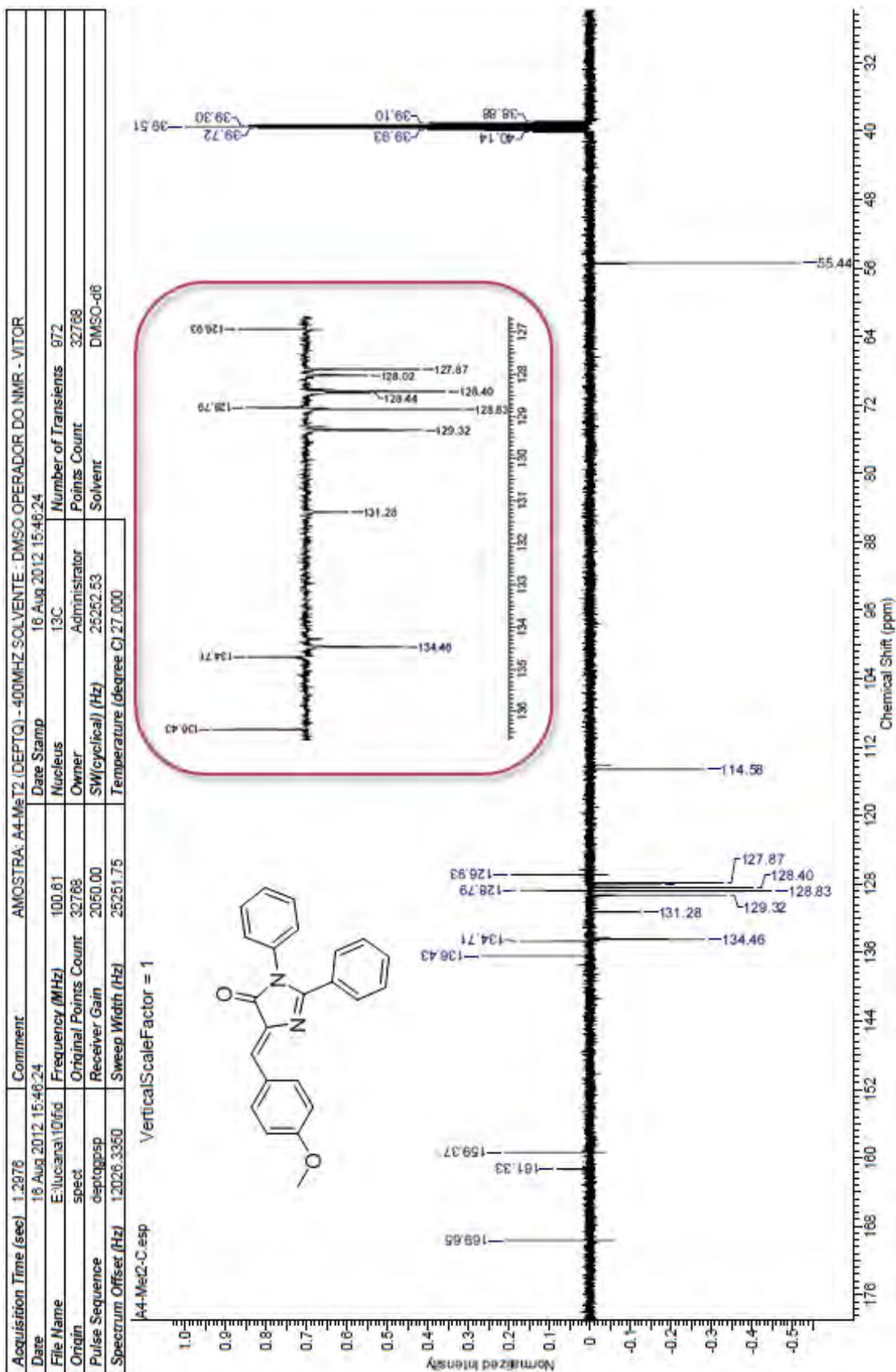
Anexo 25. Espectro de RMN ¹H do produto **39b** com ampliação em 8,5-8,3ppm e 7,6-7,3ppm em DMSO à 400MHz.



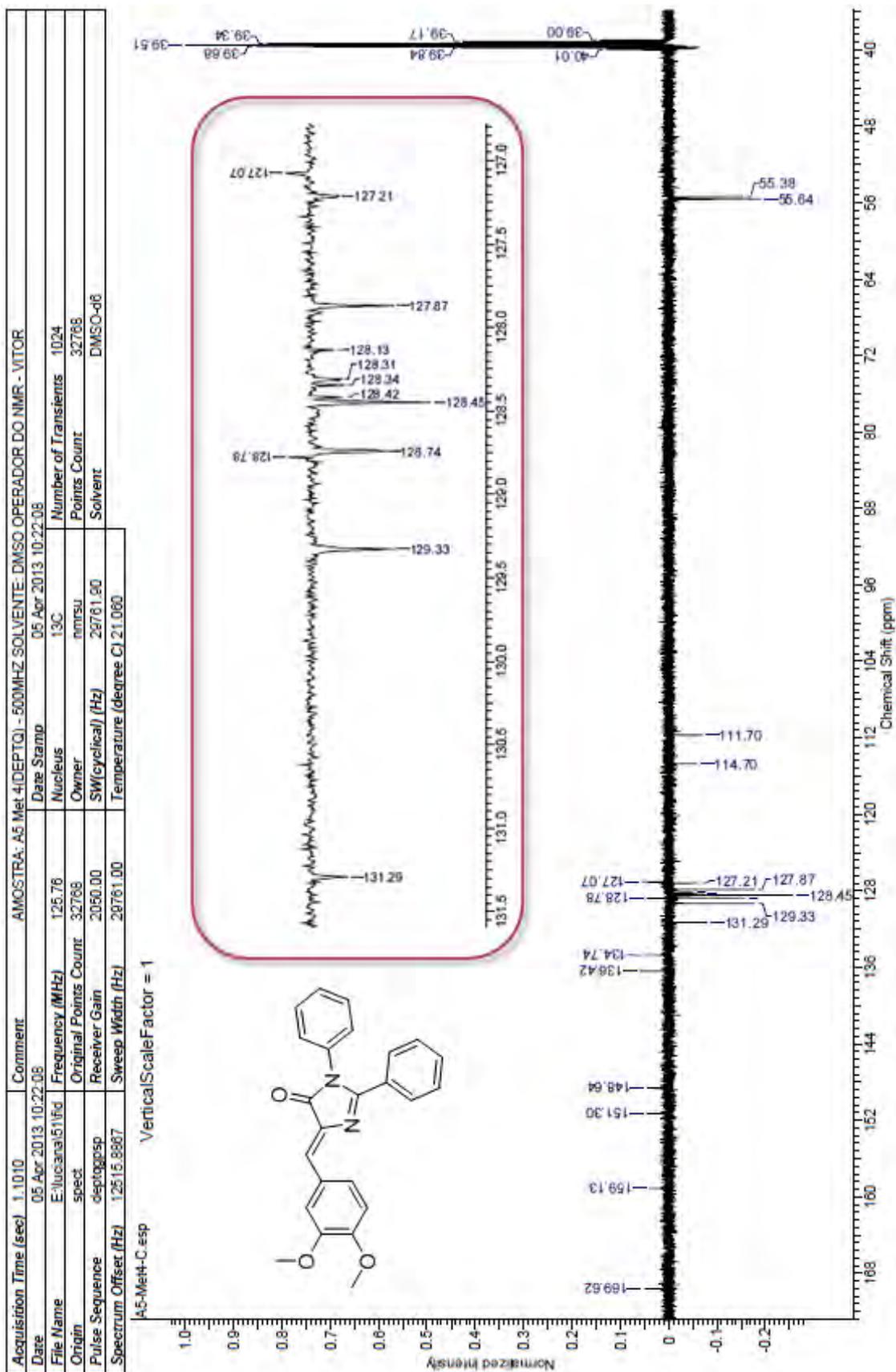
Anexo 27. Espectro de RMN ¹H do produto **39c** com ampliação em 8,5-8,3ppm e 7,6-7,0ppm em DMSO à 400MHz.



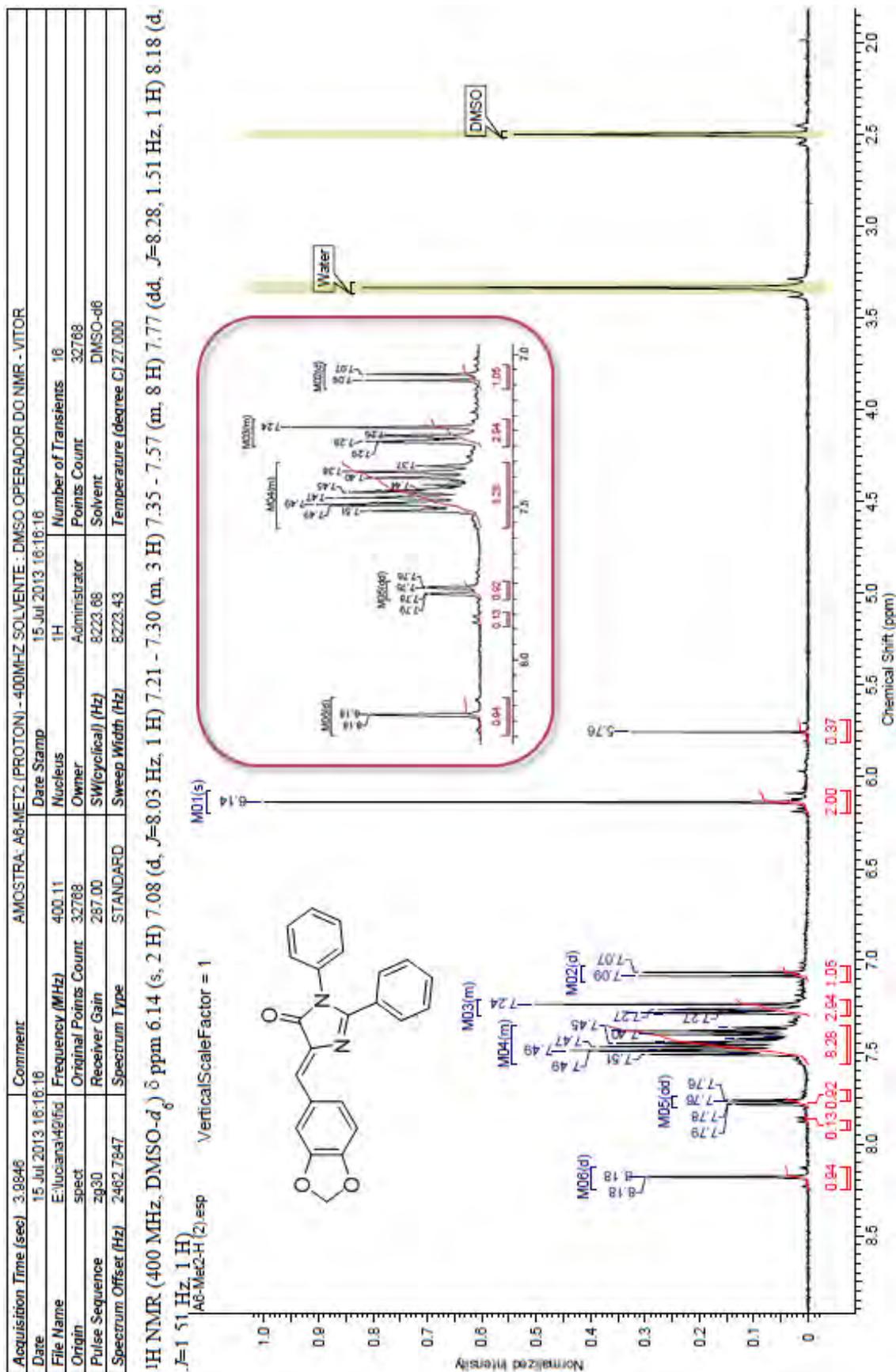
Anexo 28. Espectro de RMN ^{13}C do produto **39c** com ampliação em 140-126ppm em DMSO à 100MHz.



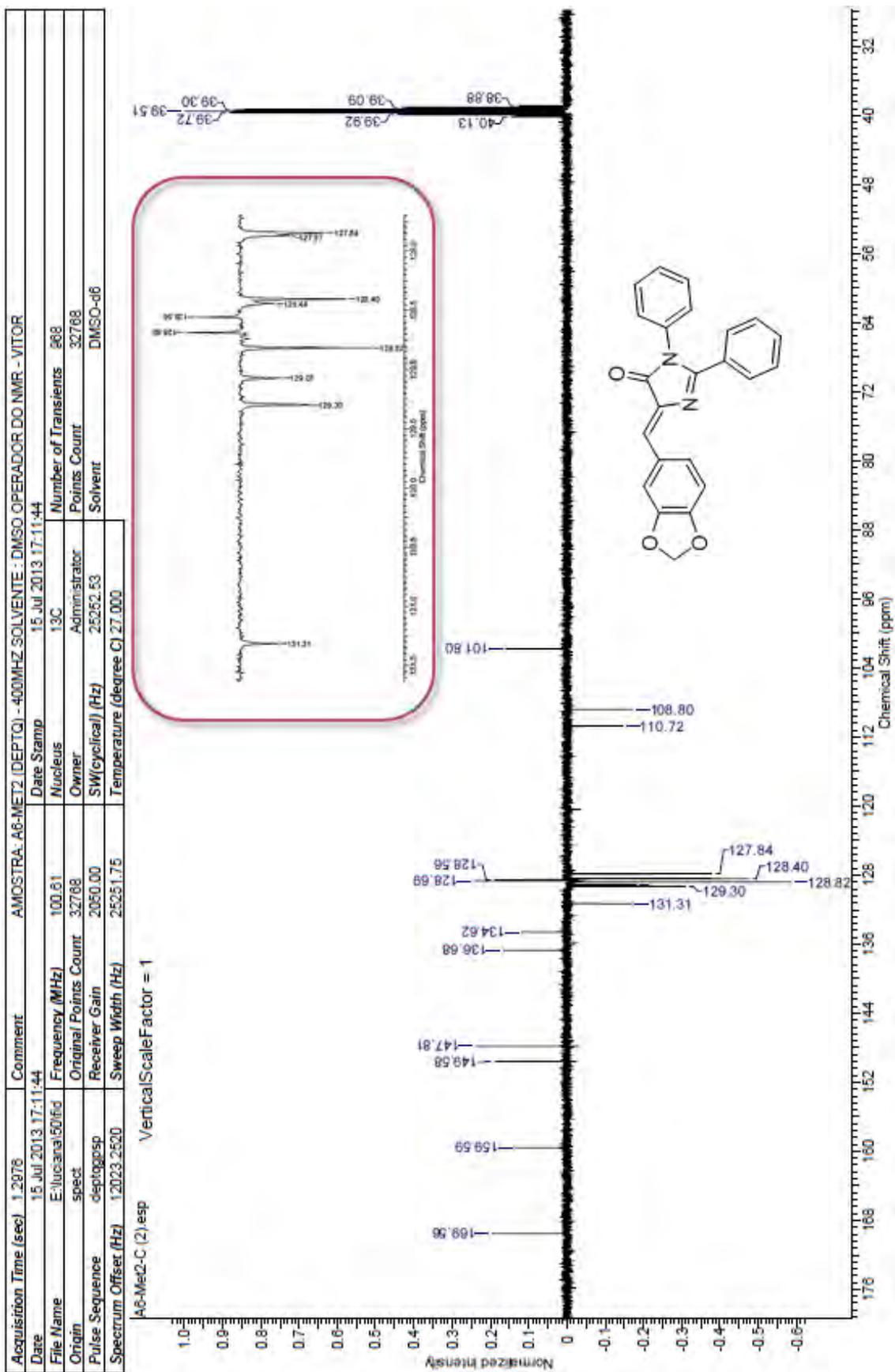
Anexo 30. Espectro de RMN ^{13}C do produto **39d** com ampliação em 132-127ppm em DMSO à 125MHz.



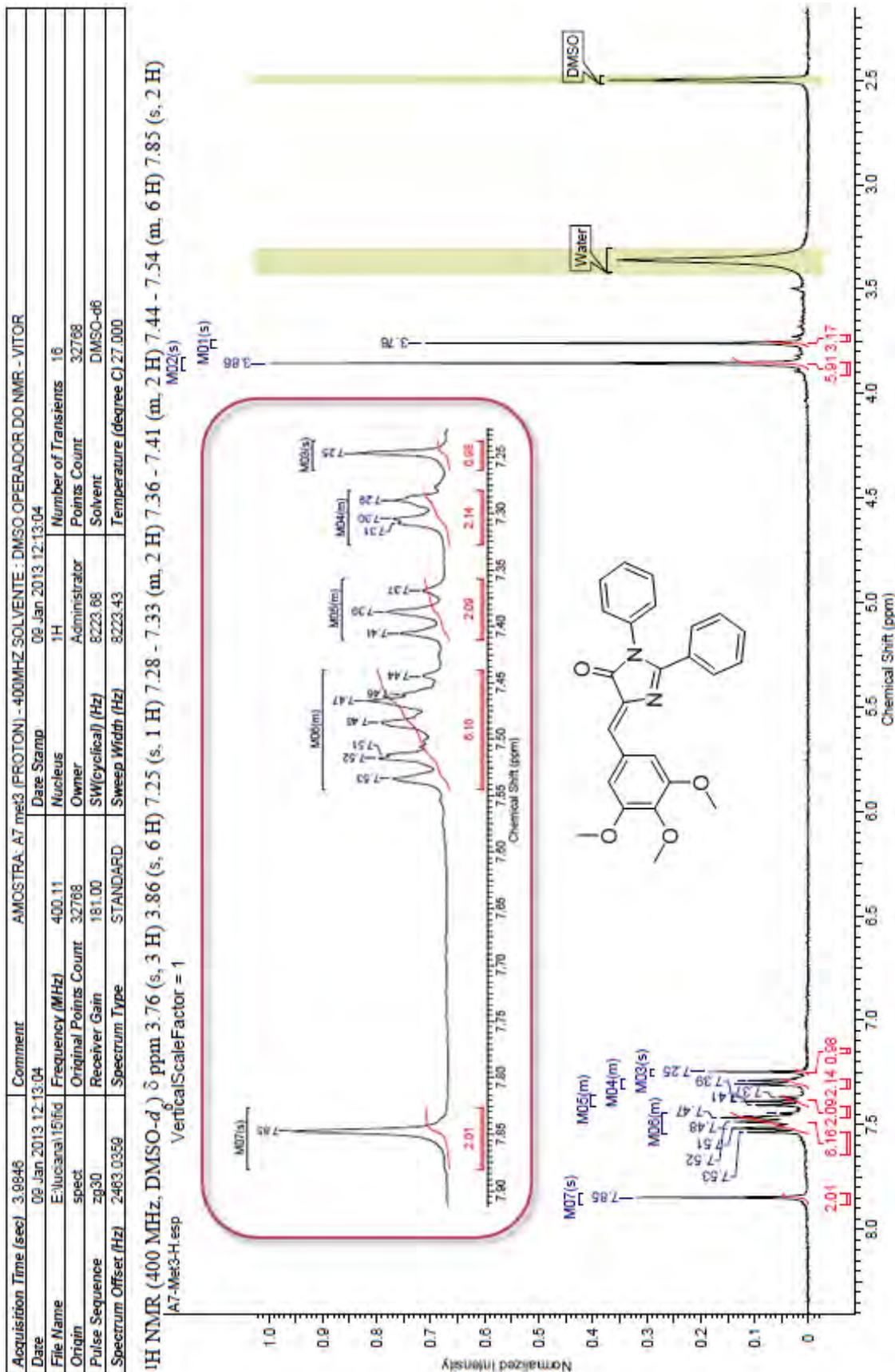
Anexo 31. Espectro de RMN ¹H do produto **39e** com ampliação em 8,5-7,0ppm em DMSO à 400MHz.



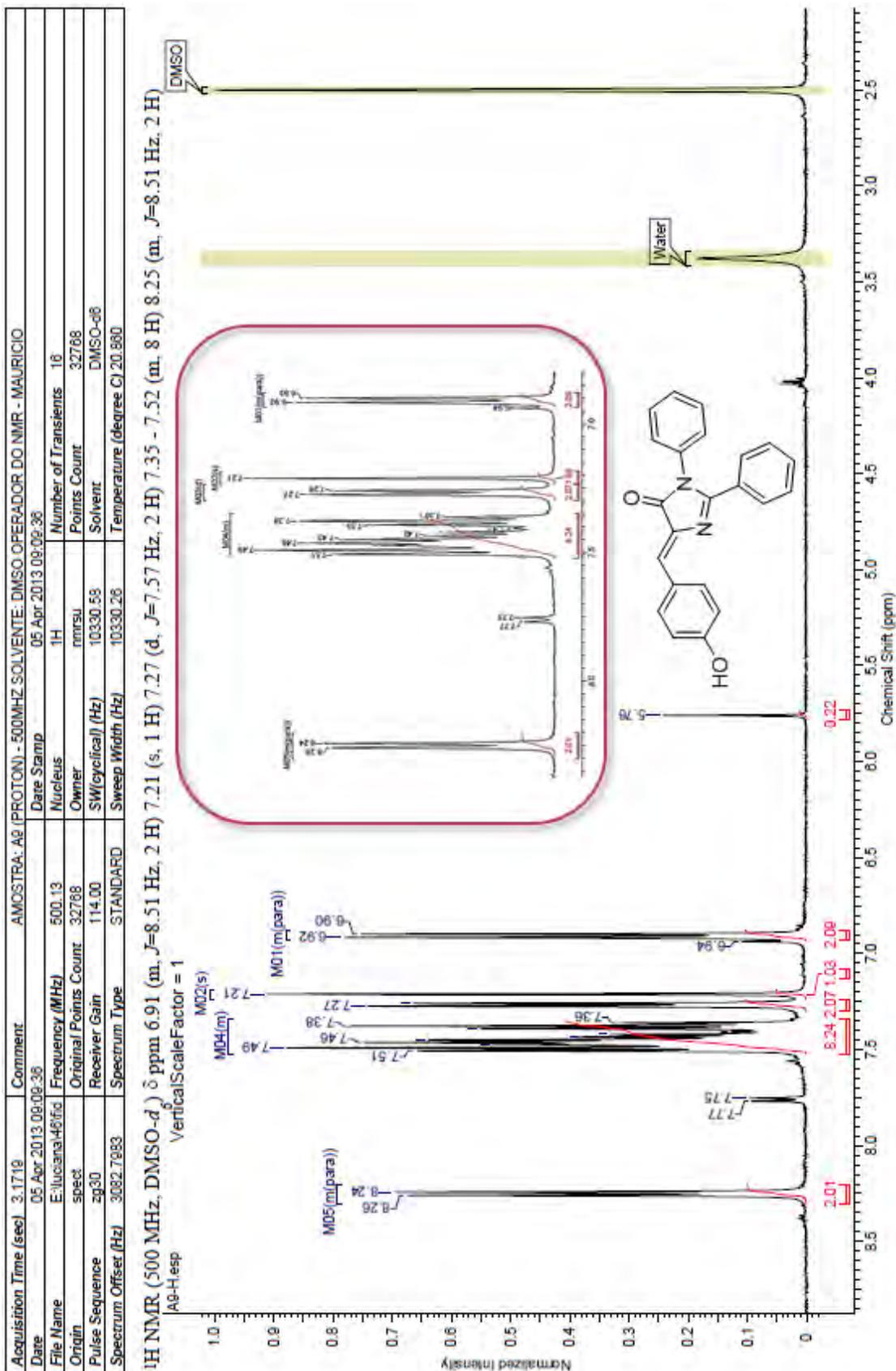
Anexo 32. Espectro de RMN ^{13}C do produto **39e** com ampliação em 132-128ppm em DMSO à 100MHz.



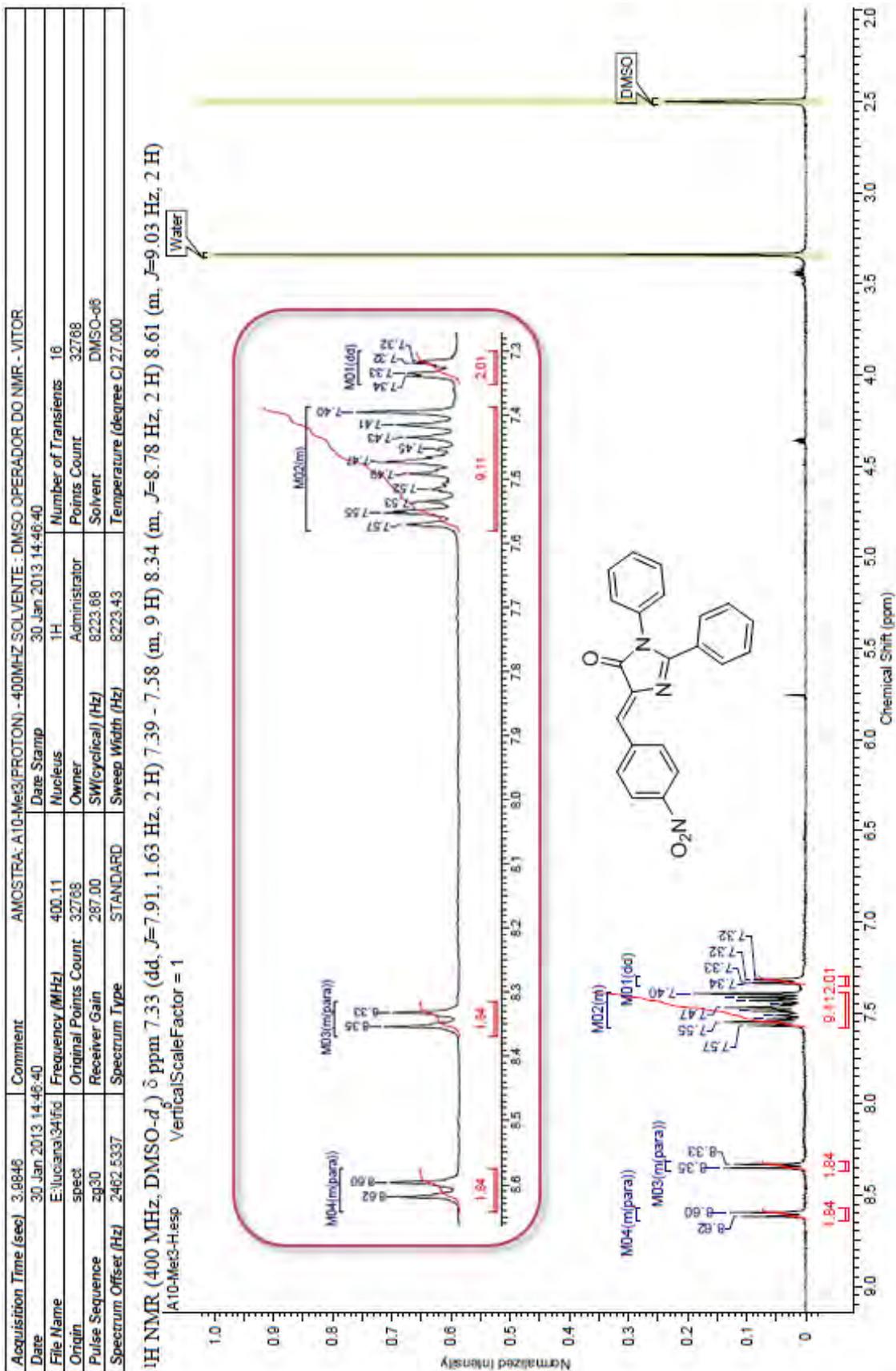
Anexo 33. Espectro de RMN ¹H do produto **39f** com ampliação em 7,9-7,2ppm em DMSO à 400MHz.



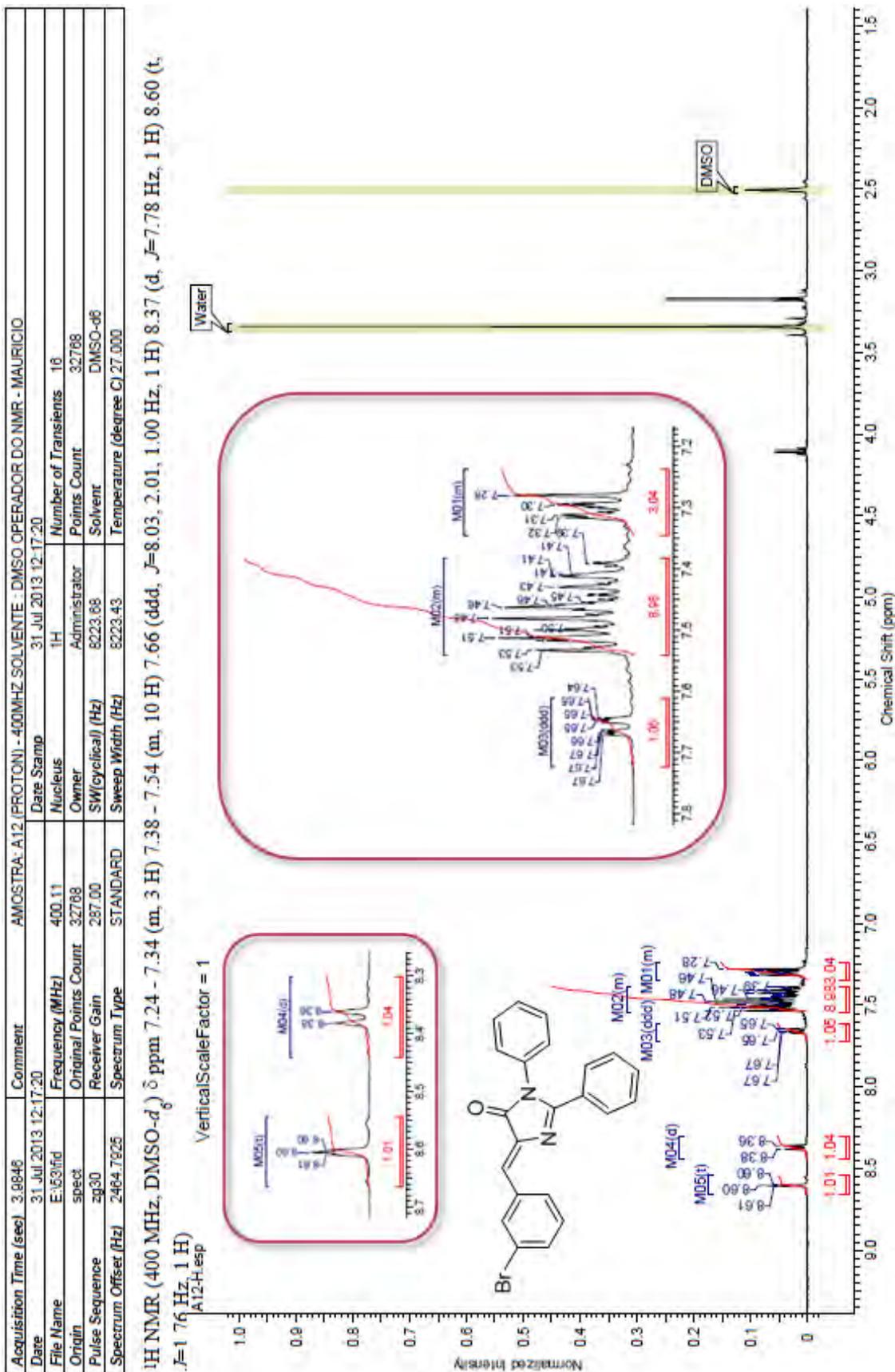
Anexo 35. Espectro de RMN ¹H do produto **39g** com ampliação em 8,5-6,5ppm em DMSO à 500MHz.



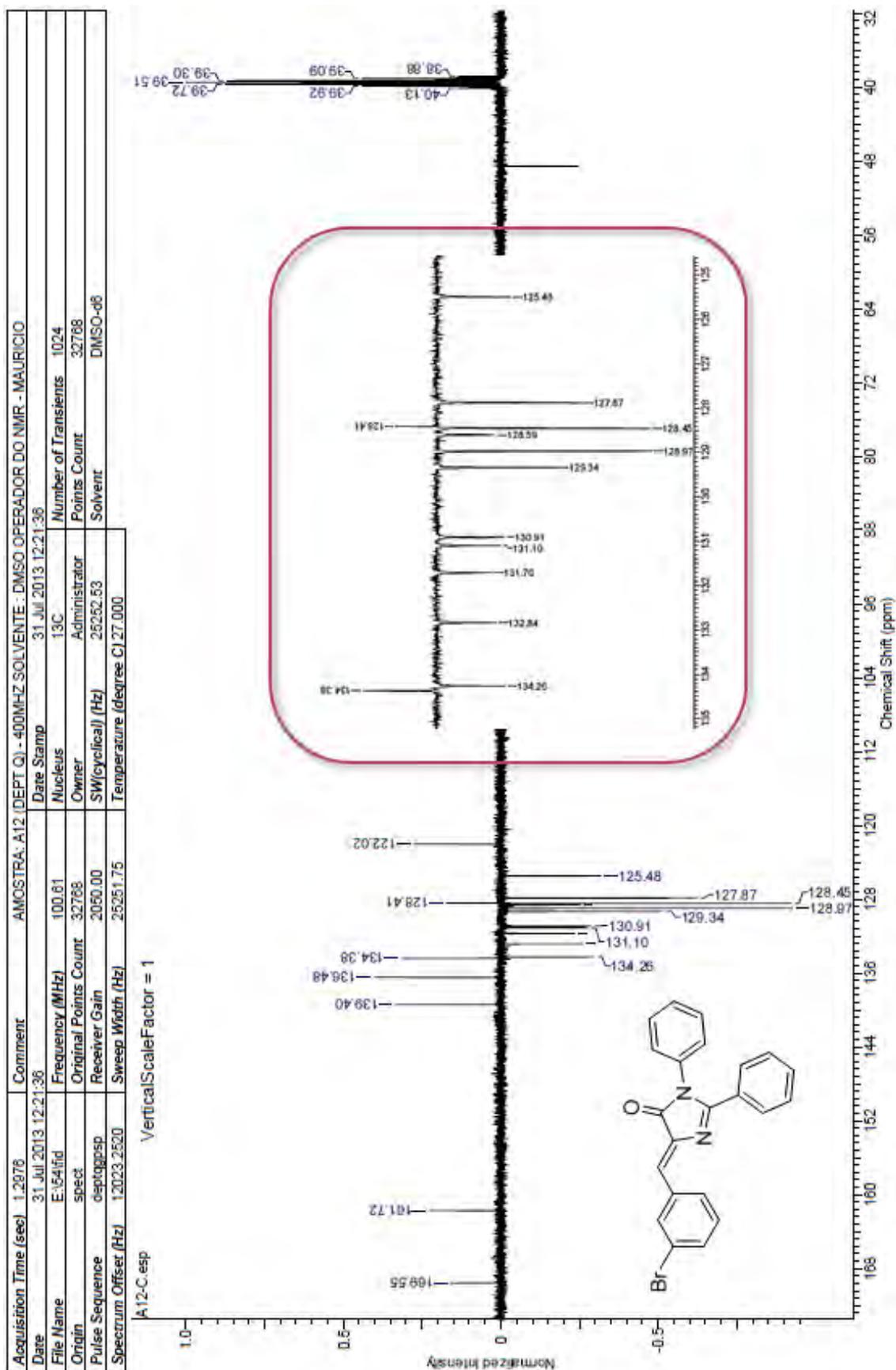
Anexo 37. Espectro de RMN ¹H do produto **39h** com ampliação em 8,6-7,3ppm em DMSO à 400MHz.



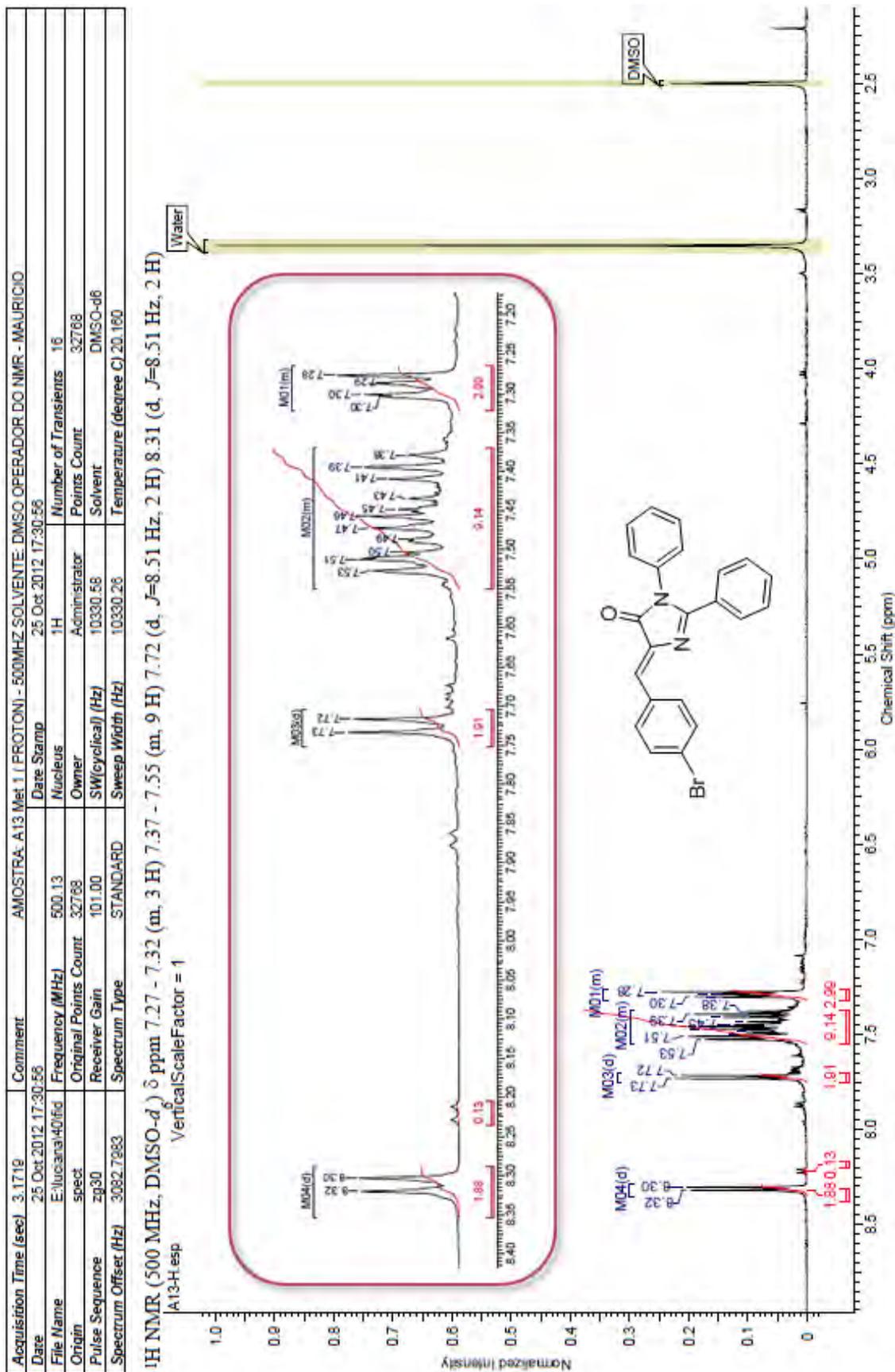
Anexo 39. Espectro de RMN ¹H do produto **39i** com ampliação em 8,7-8,3ppm e 7,8-7,2ppm em DMSO à 400MHz.



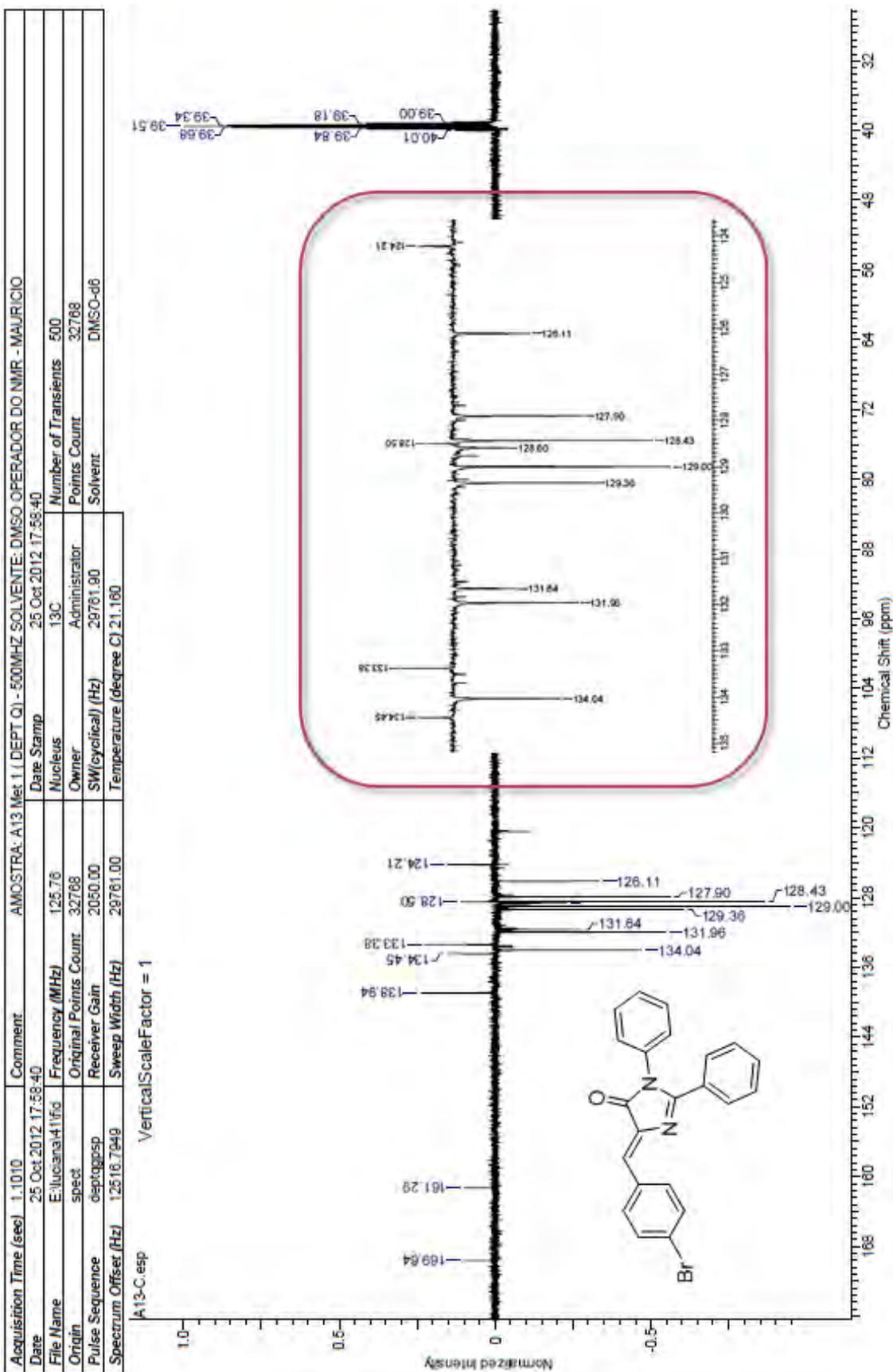
Anexo 40. Espectro de RMN ¹³C do produto **39i** com ampliação em 135-125ppm em DMSO à 100MHz.



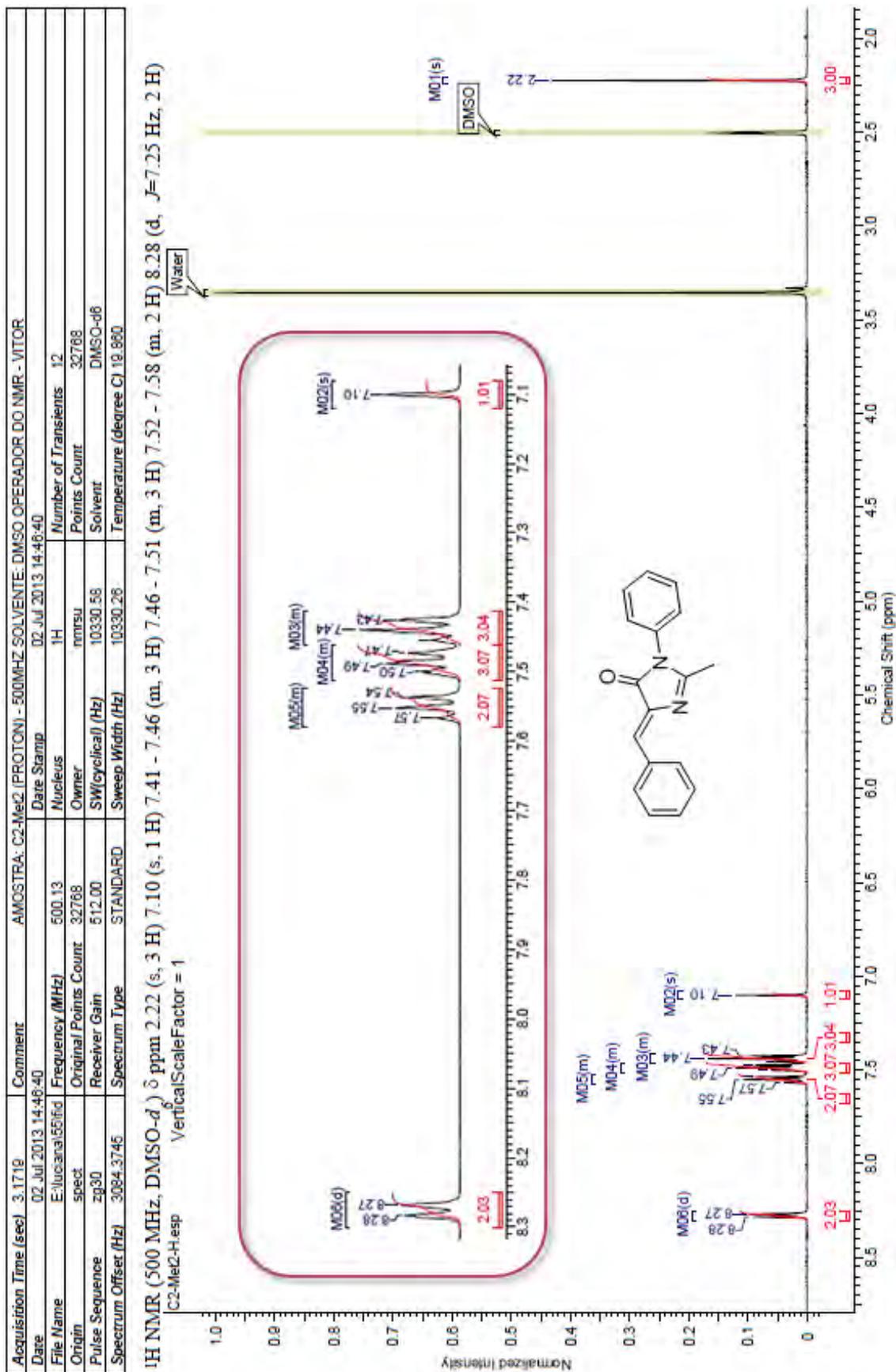
Anexo 41. Espectro de RMN ¹H do produto **39j** com ampliação em 8,4-7,20ppm em DMSO à 500MHz.



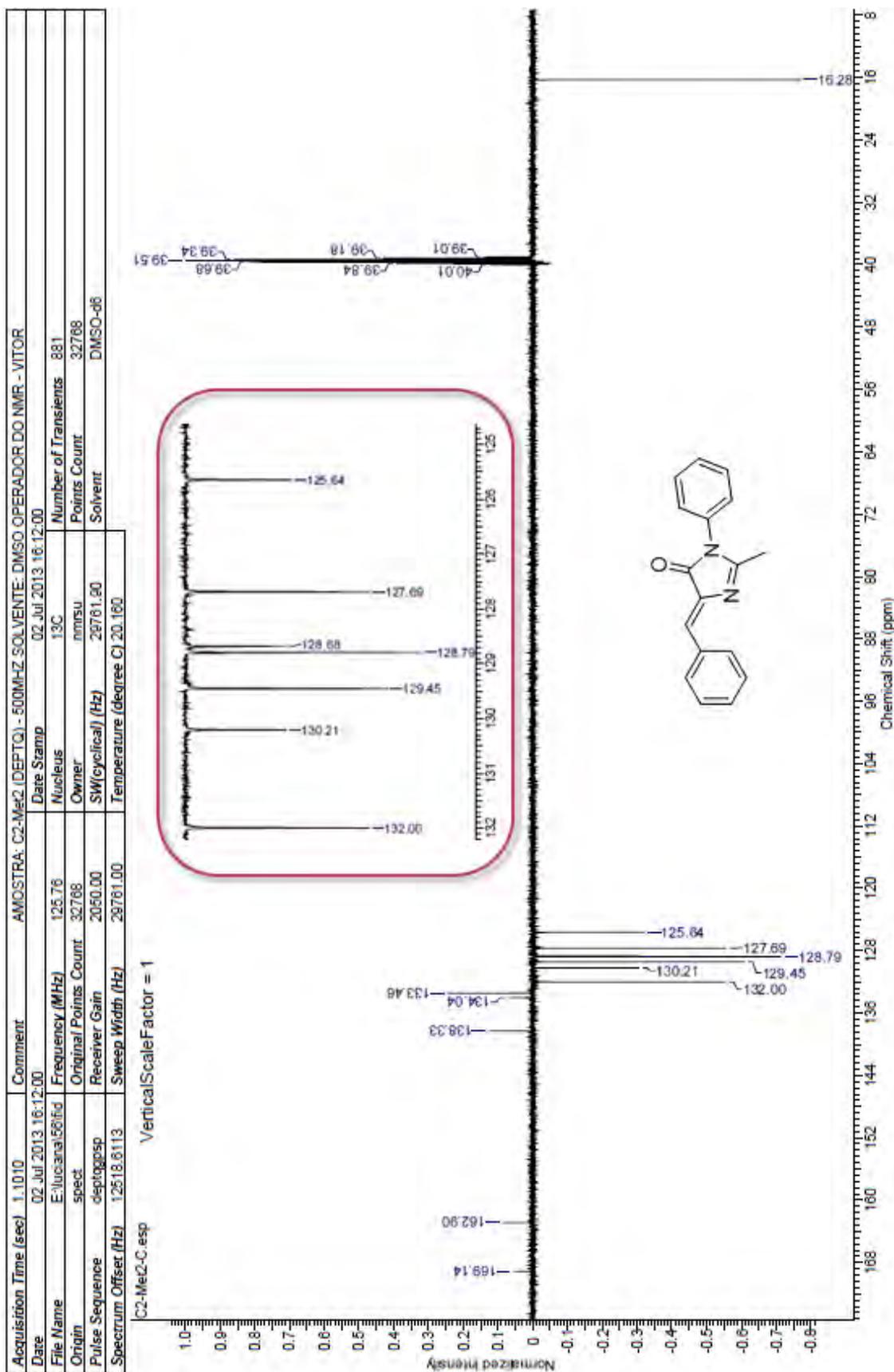
Anexo 42. Espectro de RMN ^{13}C do produto **39j** com ampliação em 135-124ppm em DMSO à 125MHz.



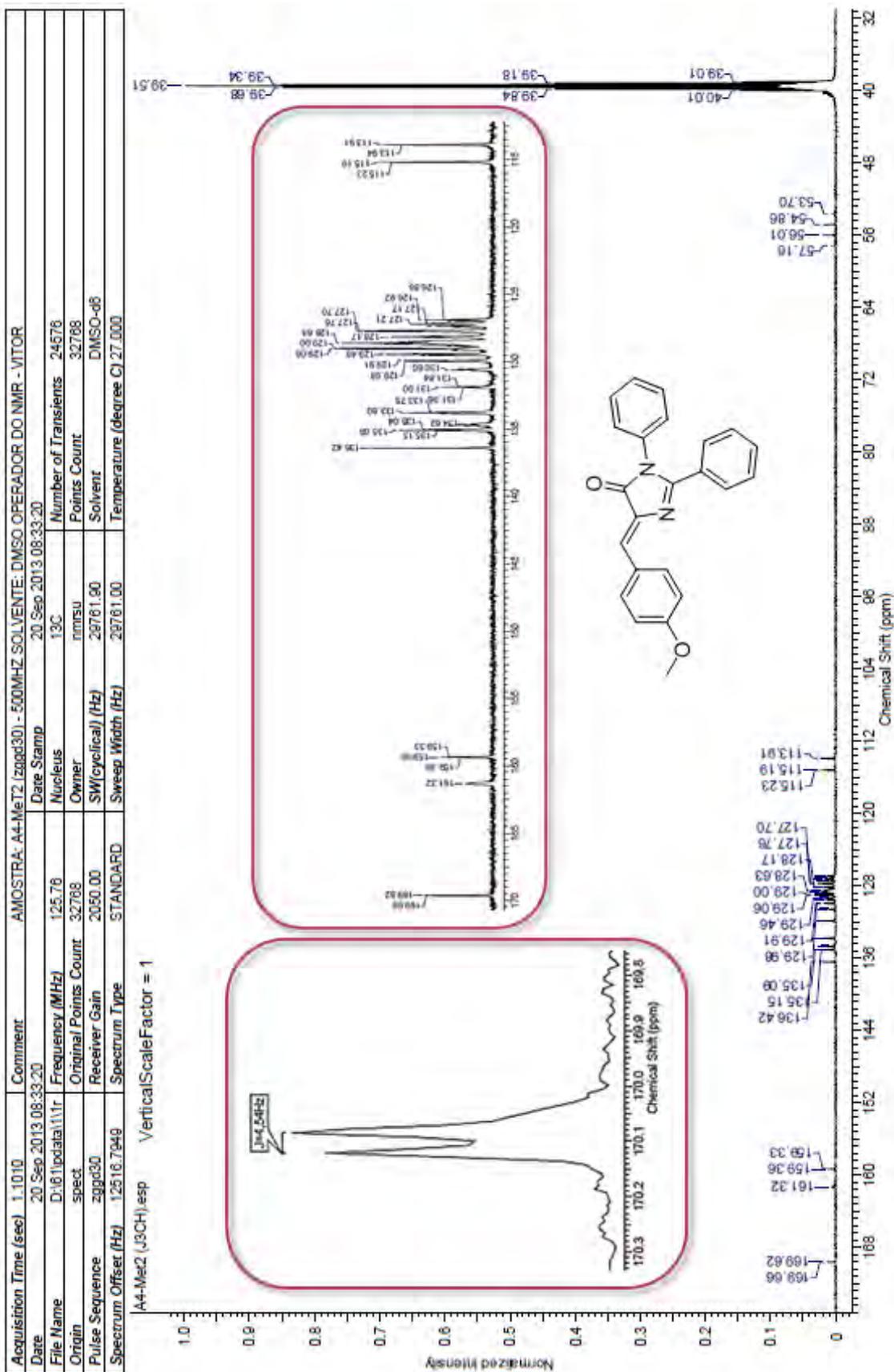
Anexo 45. Espectro de RMN ¹H do produto **42a** com ampliação em 8,3-7,1ppm em DMSO à 500MHz.



Anexo 46. Espectro de RMN ^{13}C do produto 42a com ampliação em 132-125ppm em DMSO à 125MHz.

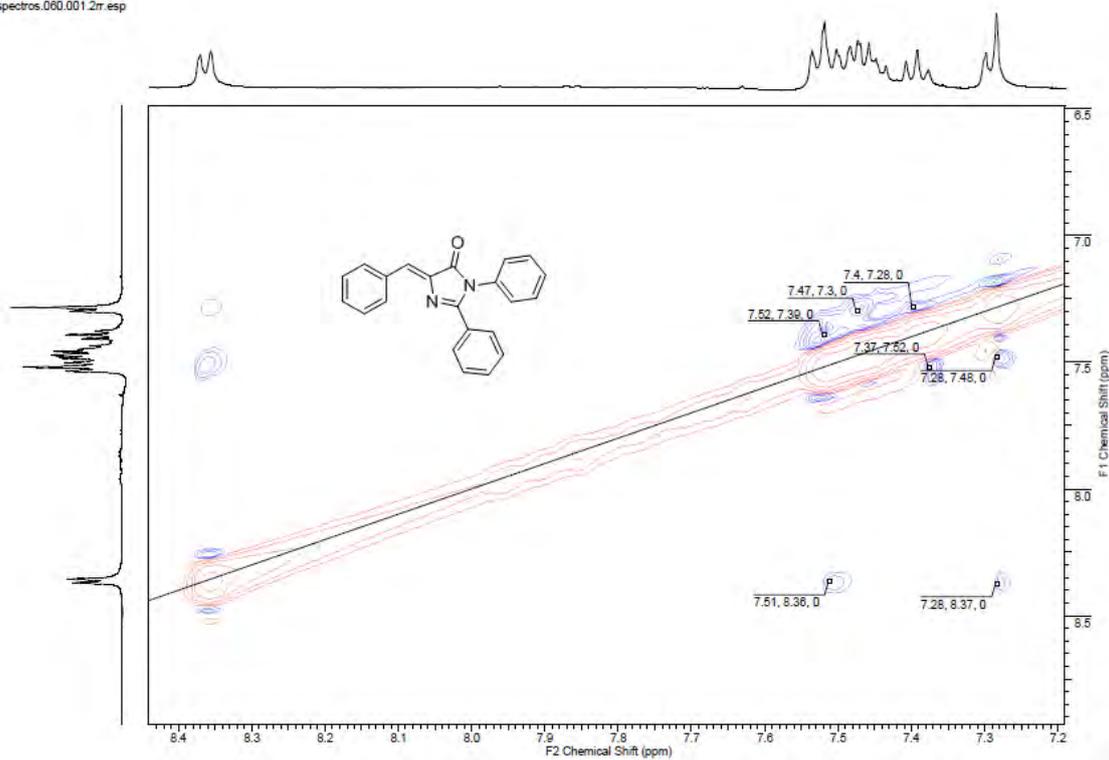


Anexo 48. Espectro de RMN ^{13}C zggd30 acoplado a hidrogênio a longa distância do produto **39c** com ampliação em 170-115ppm e 170,3-169,8ppm em DMSO à 125MHz.



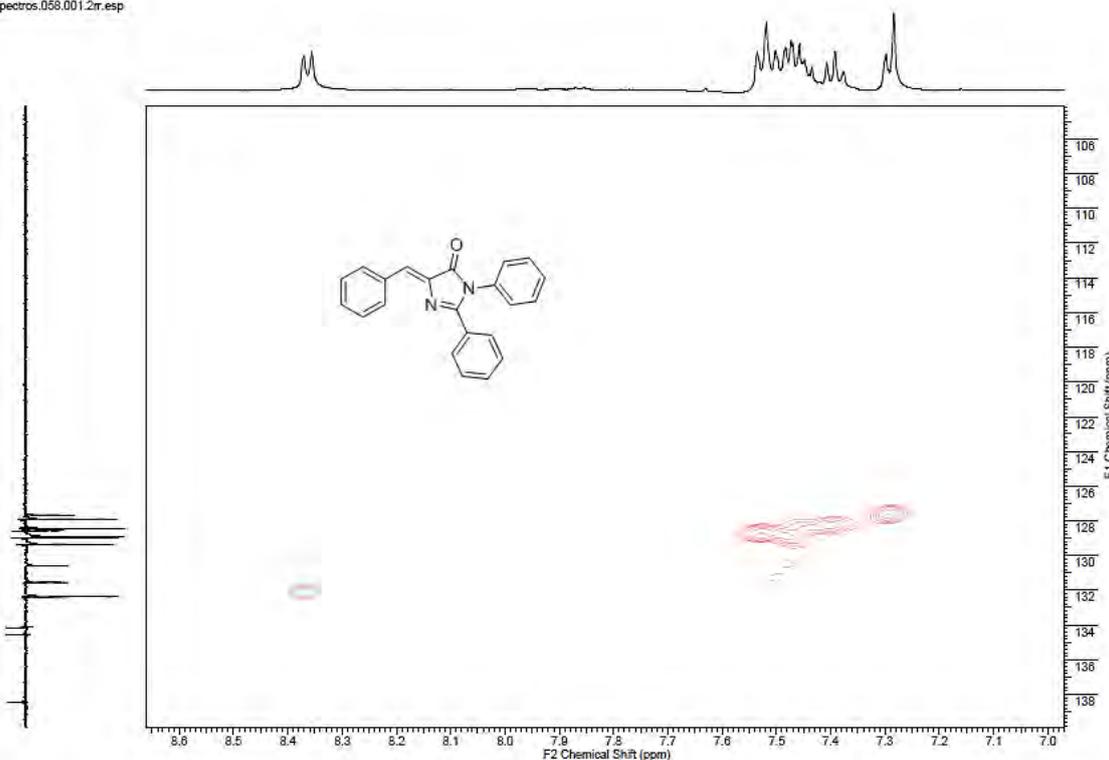
Anexo 49. Espectro de RMN NOESY do produto **39a** em DMSO.

espectros.060.001.2r.esp

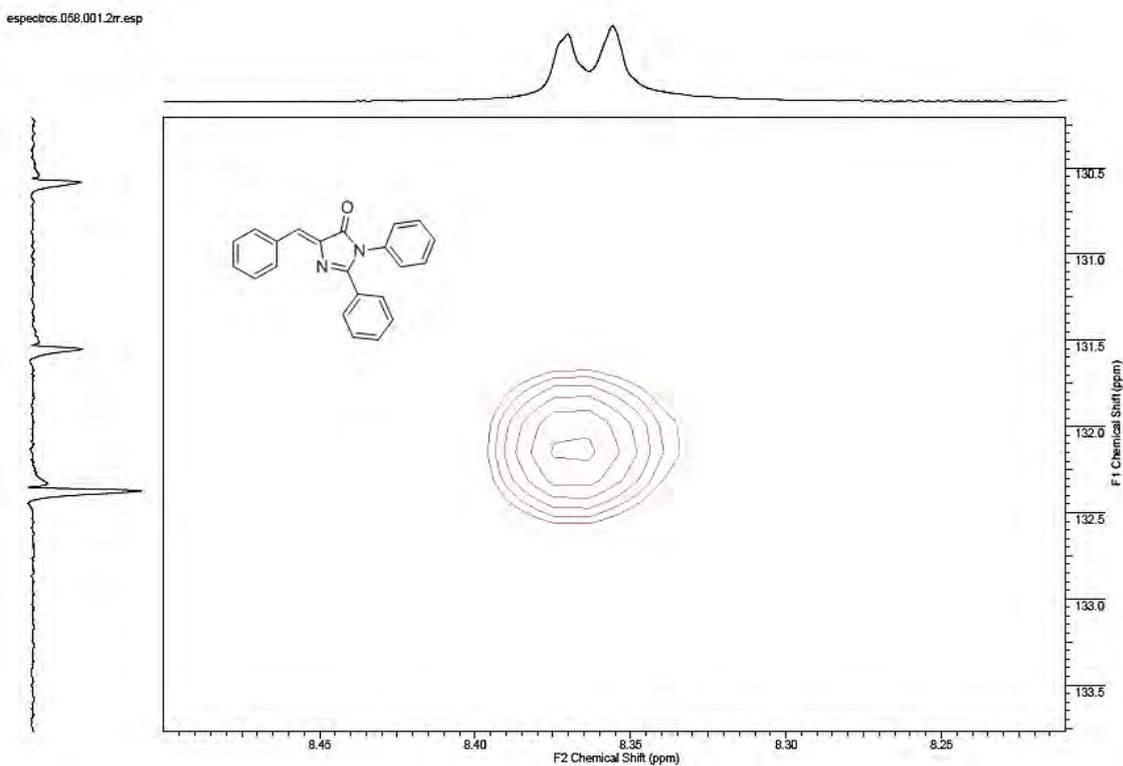


Anexo 50. Espectro de RMN HSQC do produto **39a** em DMSO.

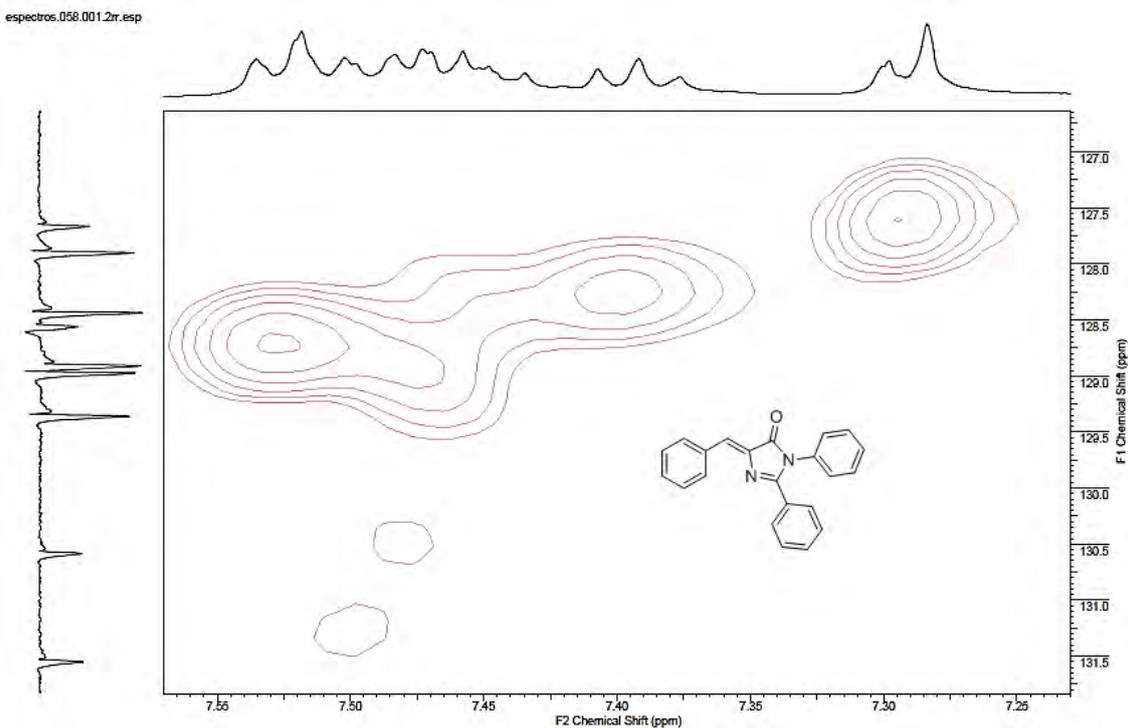
espectros.058.001.2r.esp



Anexo 51. Espectro de RMN HSQC do produto **39a** com ampliação em 8,45-8,25ppm e 133,5-130,5ppm em DMSO.

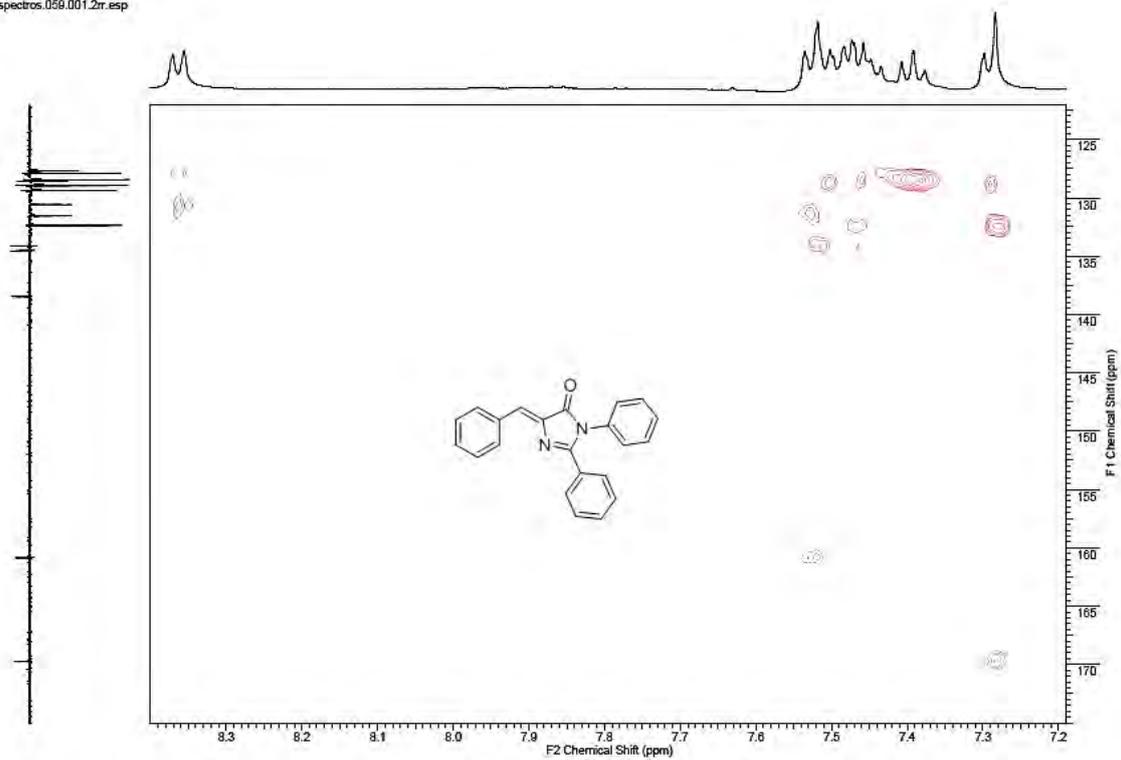


Anexo 52. Espectro de RMN HSQC do produto **39a** com ampliação em 7,55-7,25ppm e 131,5-127,0ppm em DMSO.



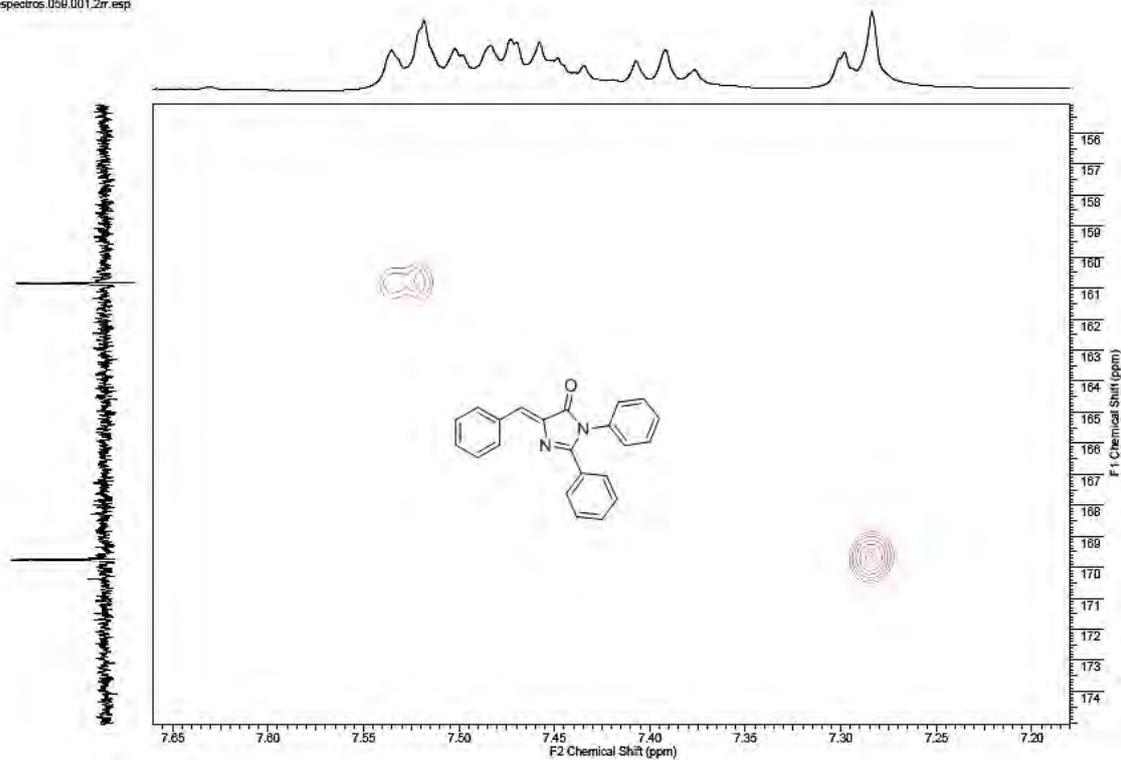
Anexo 53. Espectro de RMN HMBC do produto **39a** em DMSO.

espectros.059.001.2r.esp



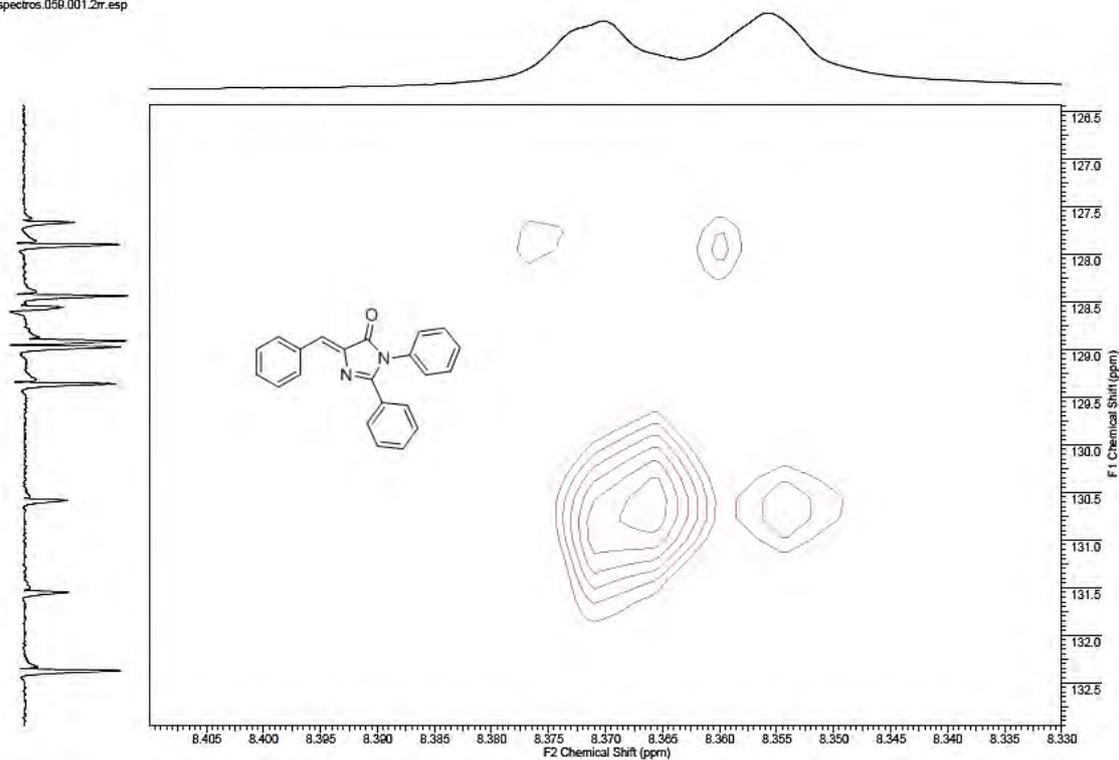
Anexo 54. Espectro de RMN HMBC do produto **39a** com ampliação em 7,65-7,20ppm e 1740,-156,0ppm em DMSO.

espectros.059.001.2r.esp



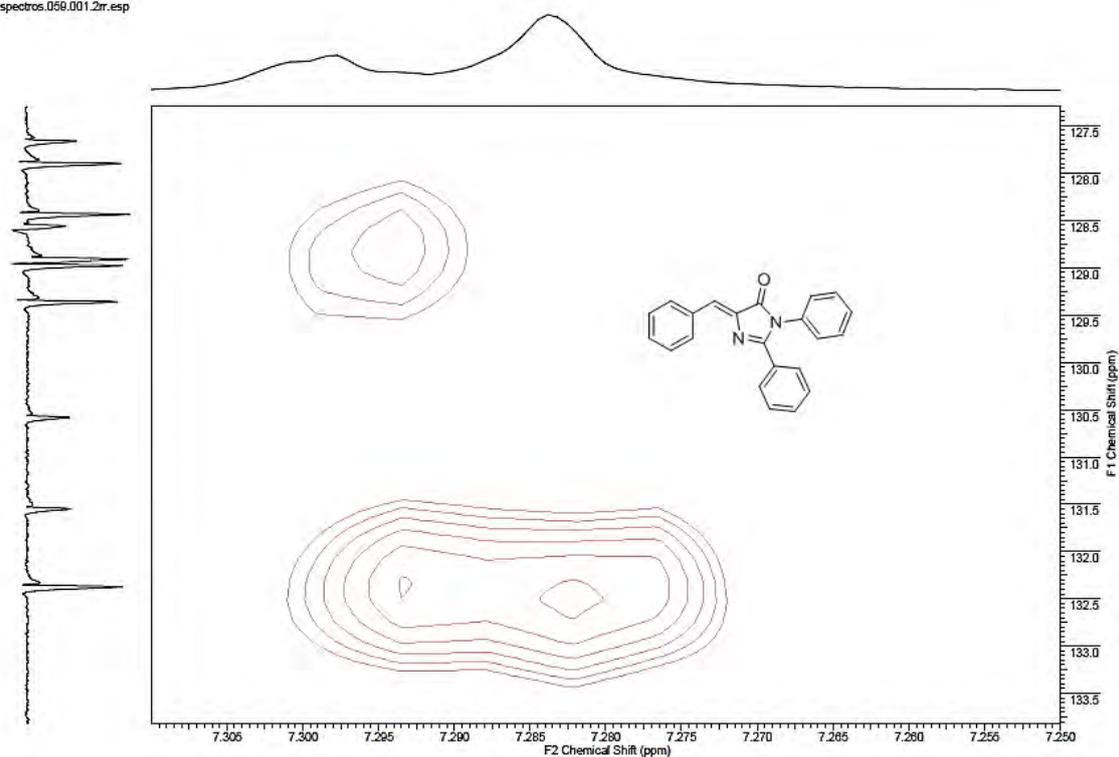
Anexo 55. Espectro de RMN HMBC do produto **39a** com ampliação em 8,40-8,30ppm e 132,5-126,5ppm em DMSO.

espectros.058.001.2r.esp



Anexo 56. Espectro de RMN HMBC do produto **39a** com ampliação em 7,30-7,25ppm e 133,5-127,5ppm em DMSO.

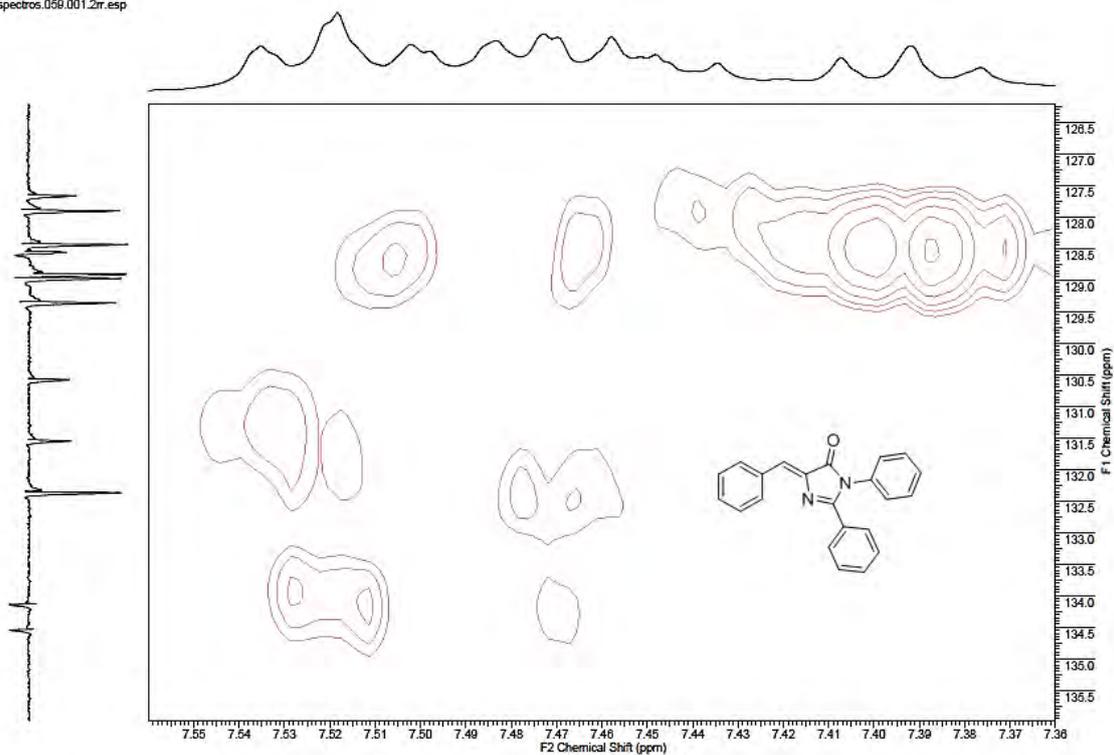
espectros.058.001.2r.esp



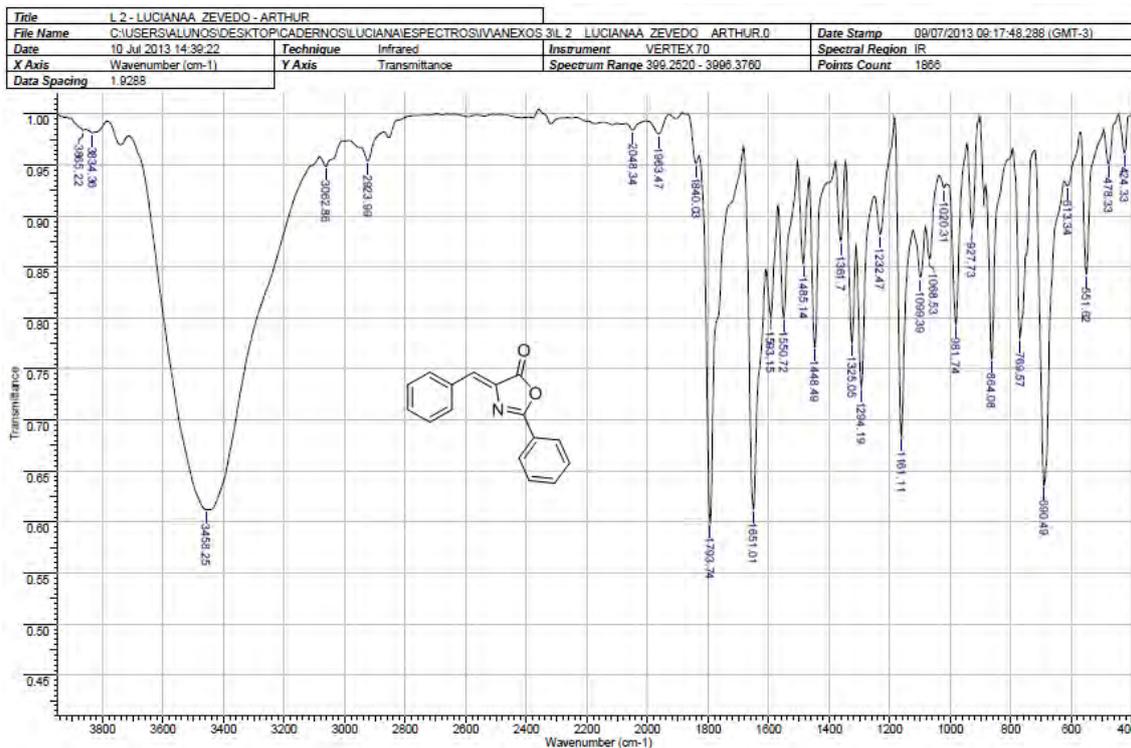
Anexo 57. Espectro de RMN

HMBC do produto **39a** com ampliação em 7,55-7,36ppm e 135,5-126,5ppm em DMSO.

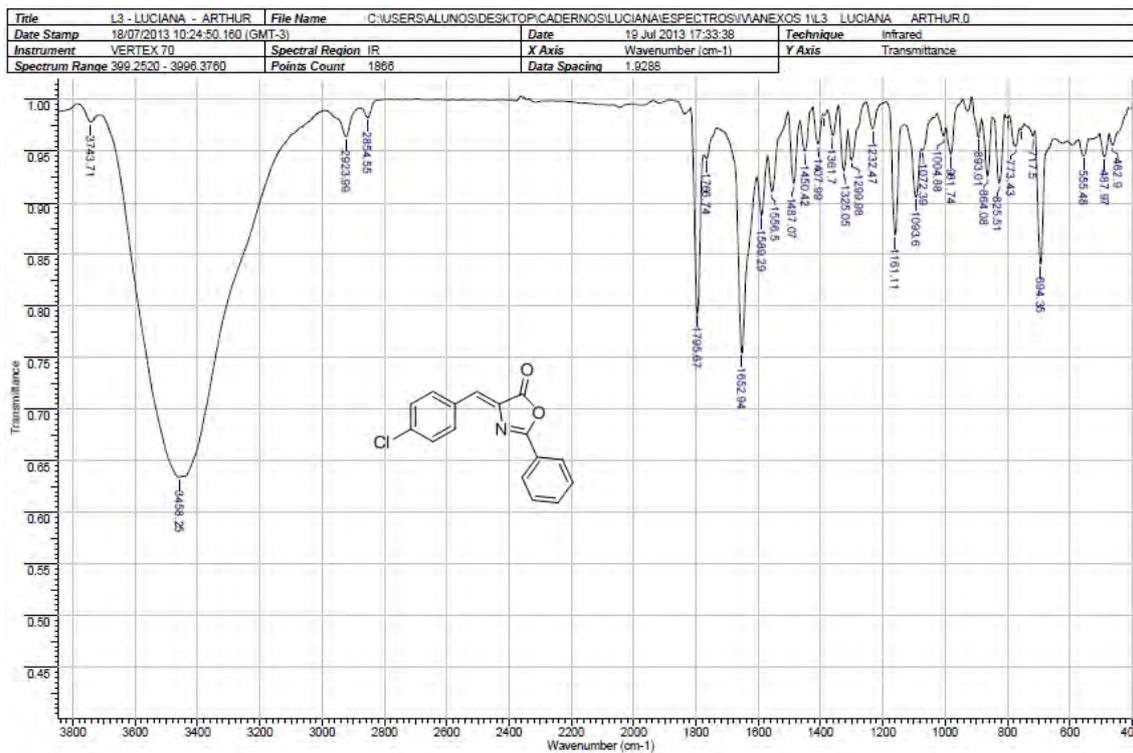
espectros.058.001.2r.esp



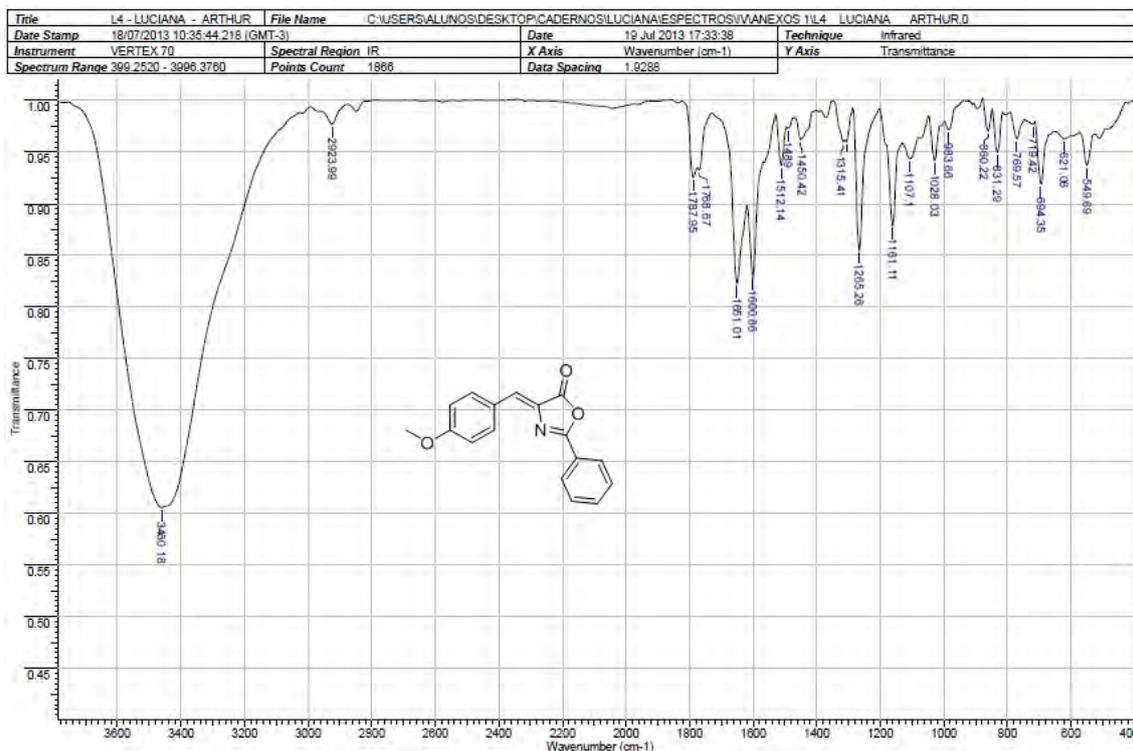
Anexo 58. Espectro de IV do produto **35a**.



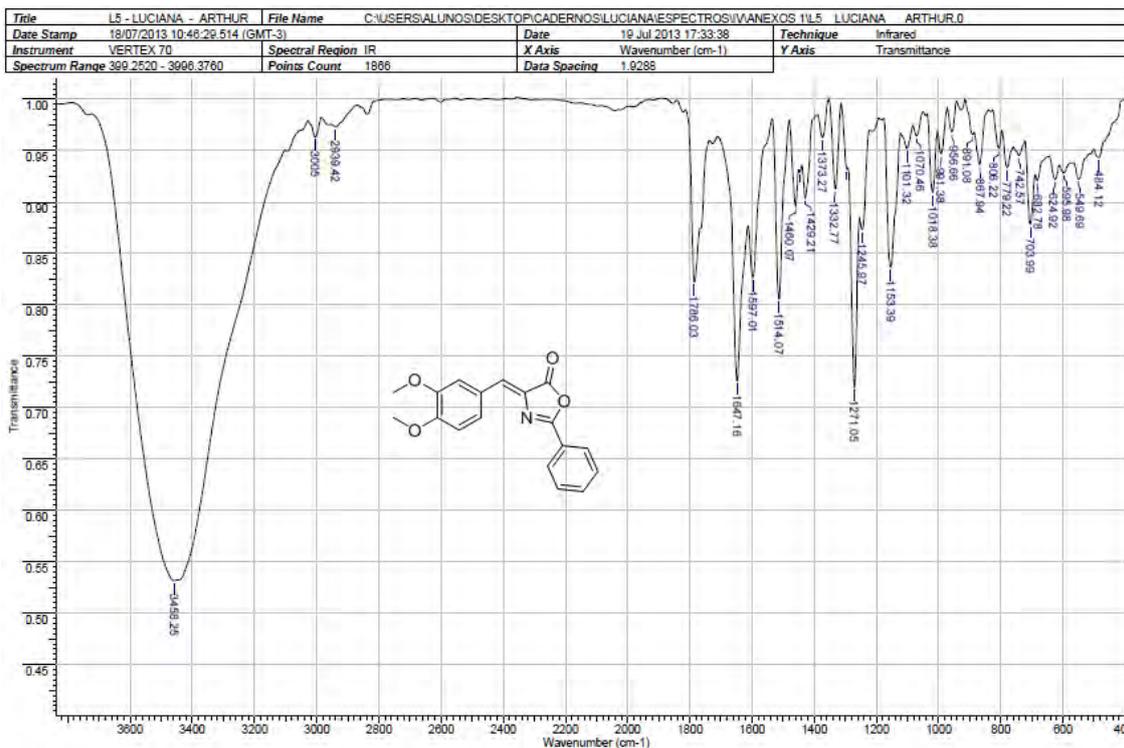
Anexo 59. Espectro de IV do produto 35b.



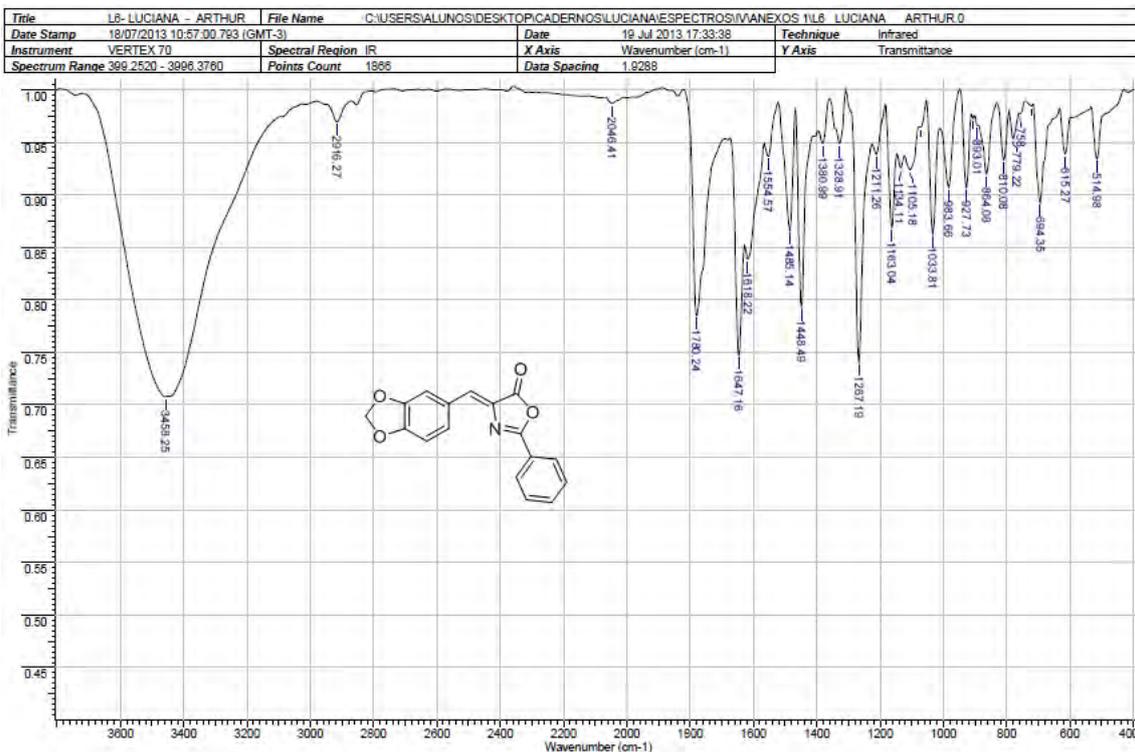
Anexo 60. Espectro de IV do produto 35c.



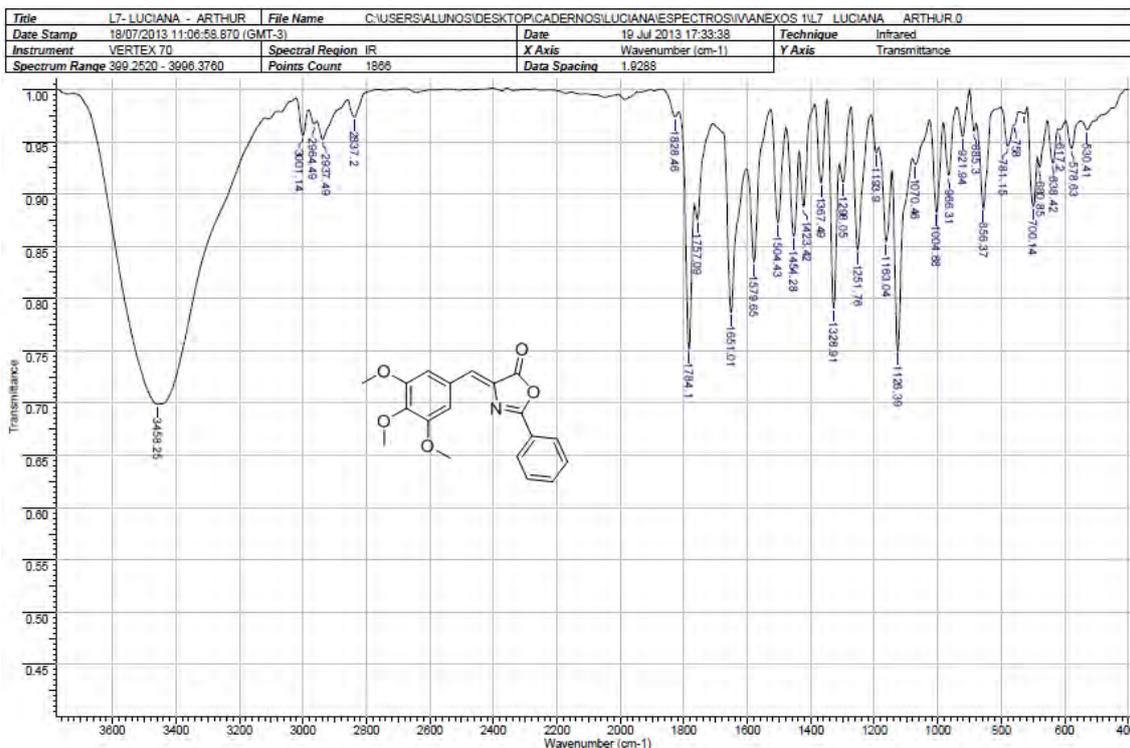
Anexo 61. Espectro de IV do produto 35d.



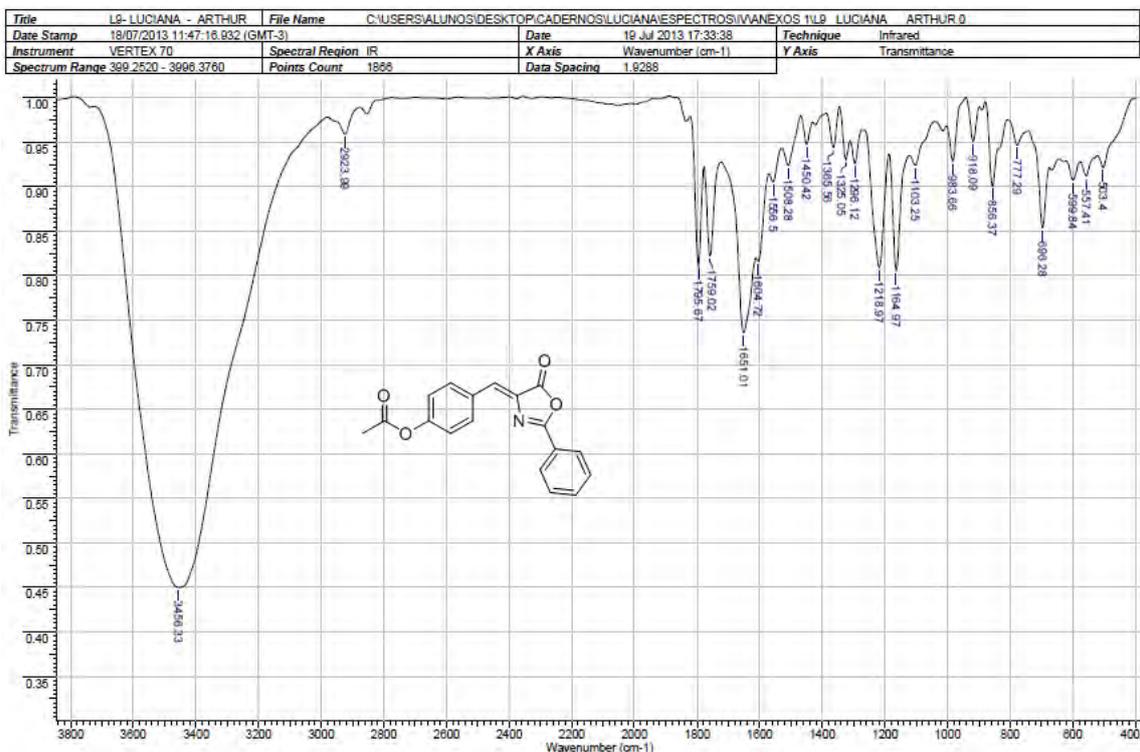
Anexo 62. Espectro de IV do produto 35e.



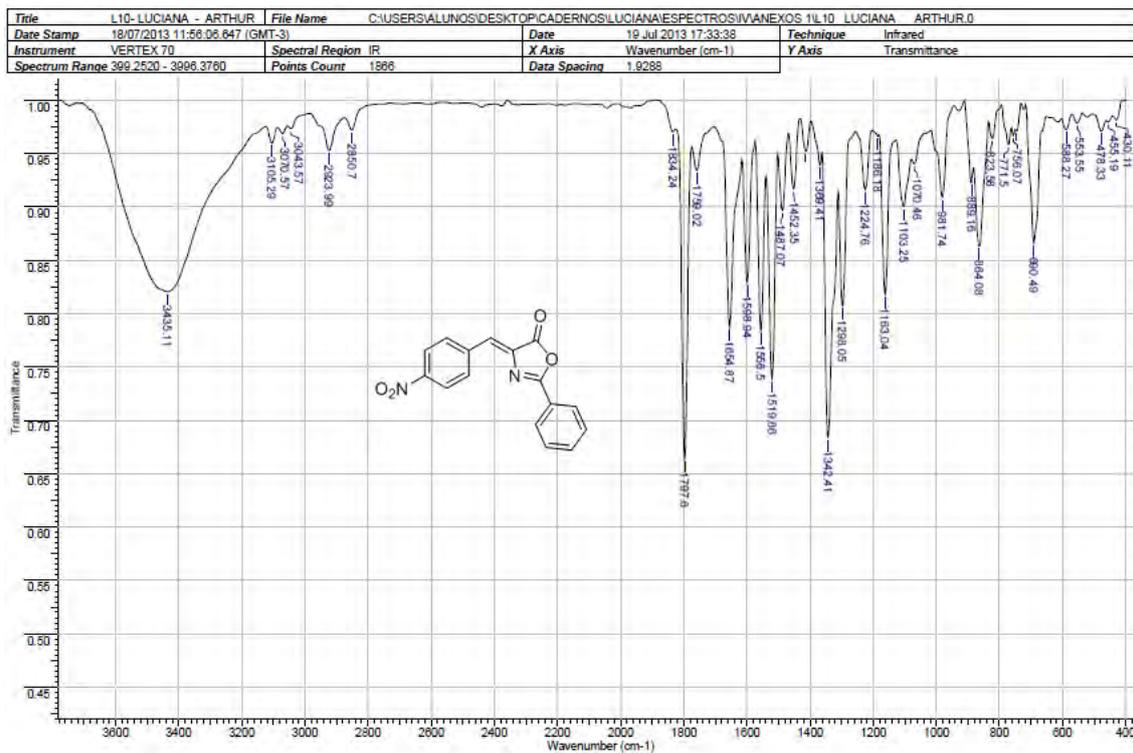
Anexo 63. Espectro de IV do produto 35f.



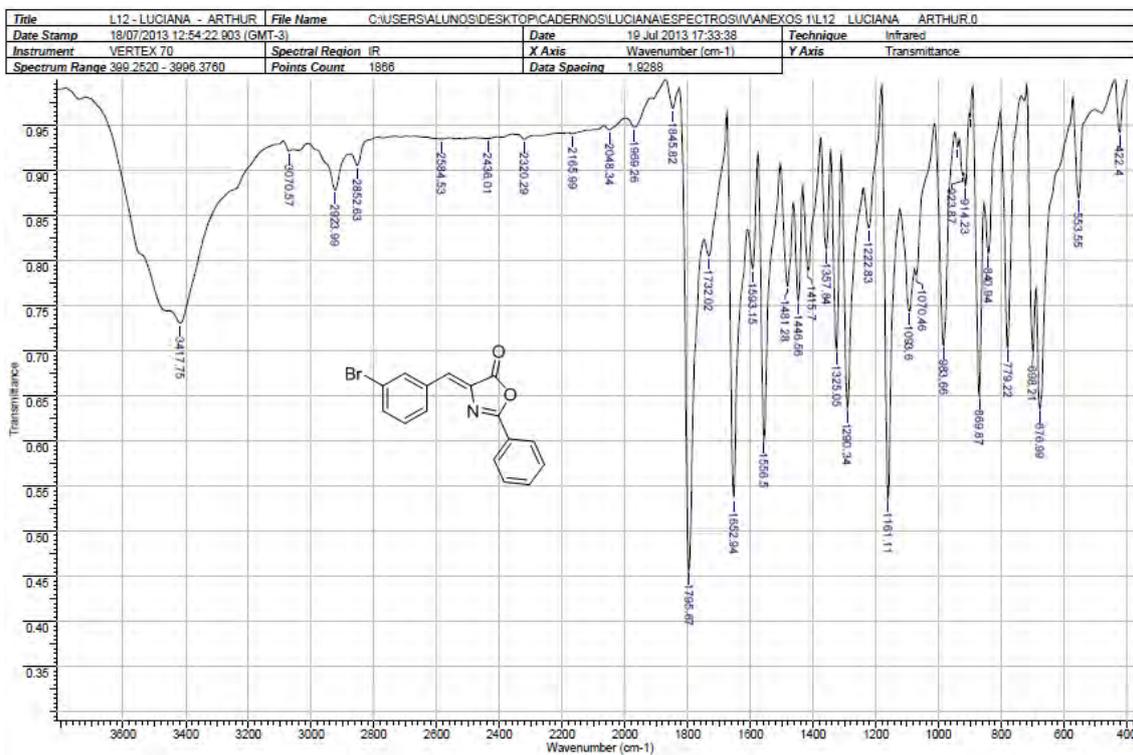
Anexo 64. Espectro de IV do produto 35g.



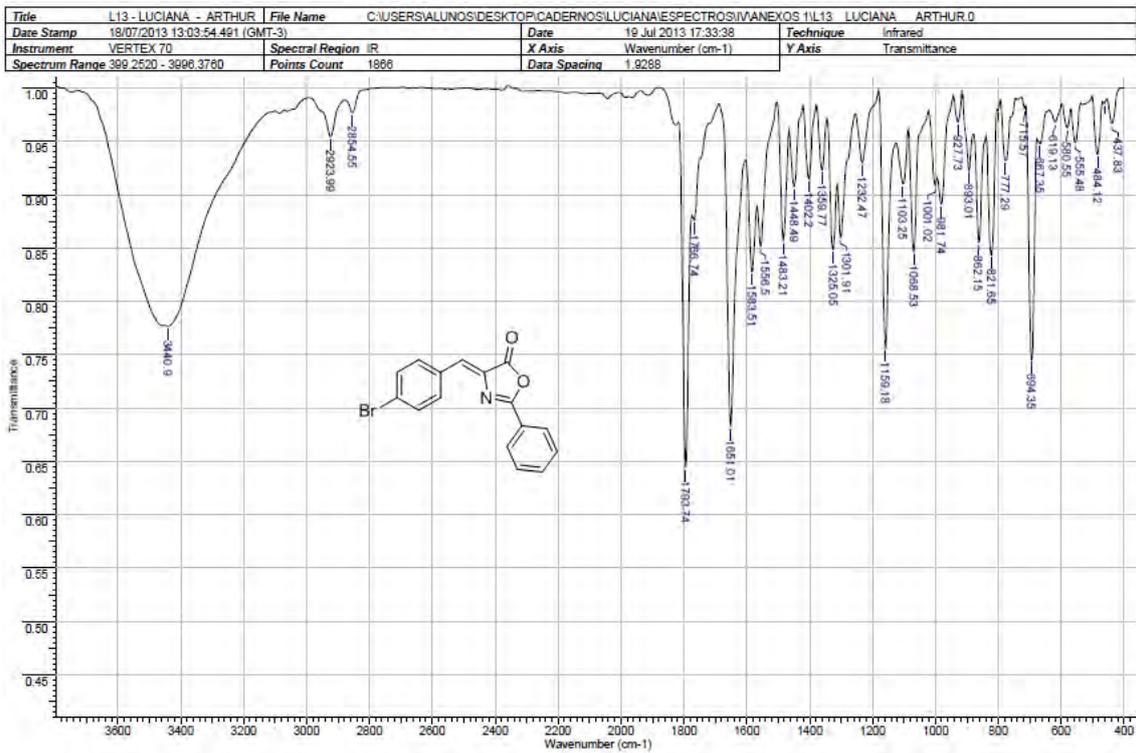
Anexo 65. Espectro de IV do produto 35h.



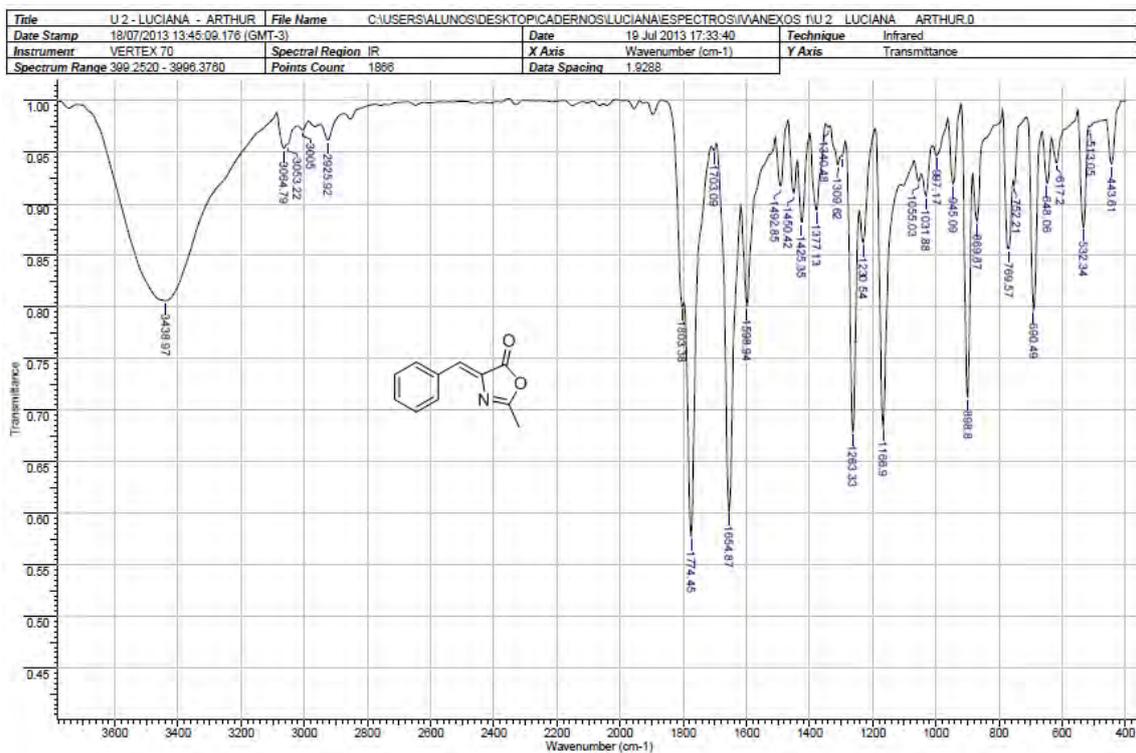
Anexo 66. Espectro de IV do produto 35i.



Anexo 67. Espectro de IV do produto 35j.

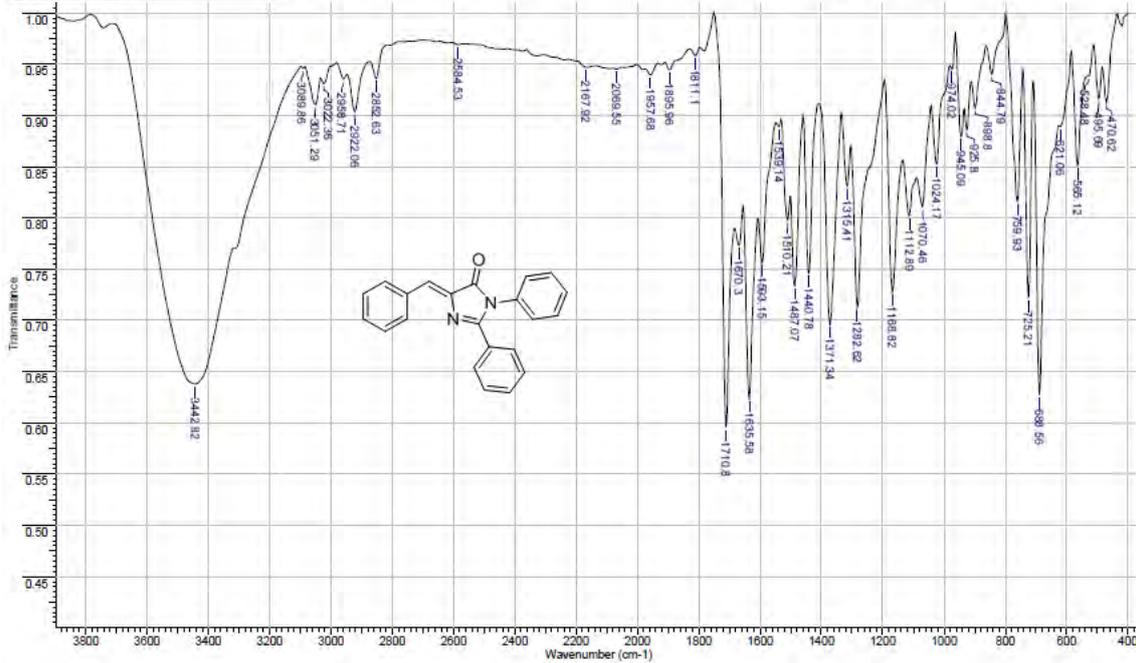


Anexo 68. Espectro de IV do produto 37a.



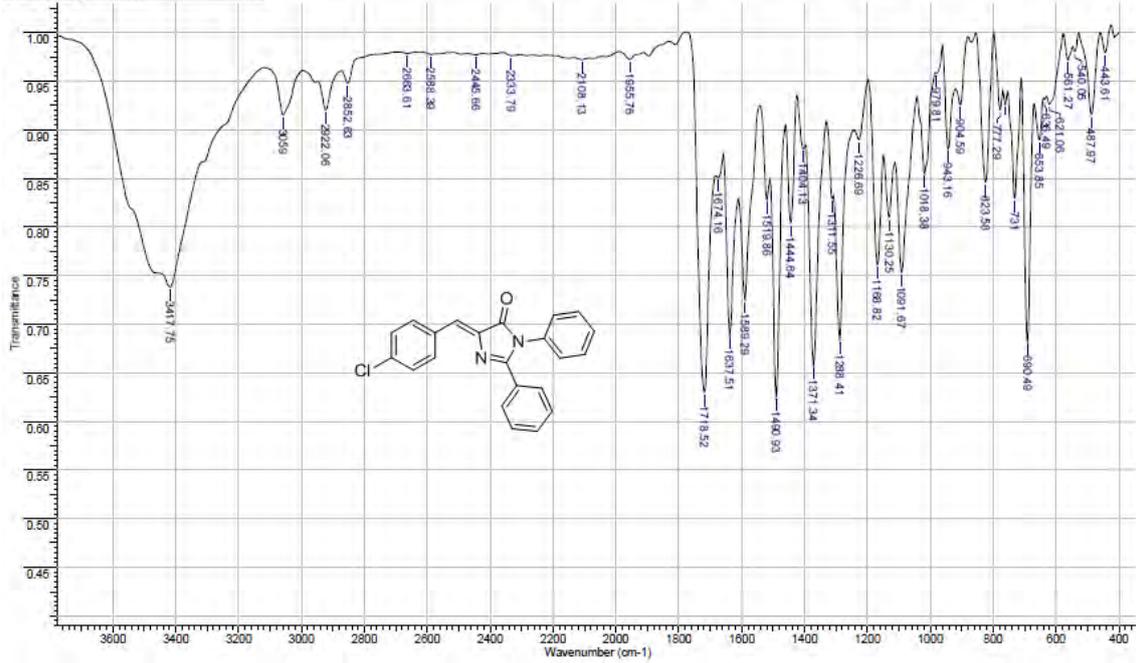
Anexo 69. Espectro de IV do produto 39a.

Title	A 2 - LUCIANA ZEVEDO - ARTHUR		Date Stamp	09/07/2013 09:29:13.228 (GMT-3)	
File Name	C:\USERS\ALUNOS\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\IVANEXOS 3A 2 - LUCIANA ZEVEDO - ARTHUR.D		Spectral Region	IR	
Date	10 Jul 2013 14:39:22	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2520 - 3999.3760
Data Spacing	1.9288			Points Count	1866



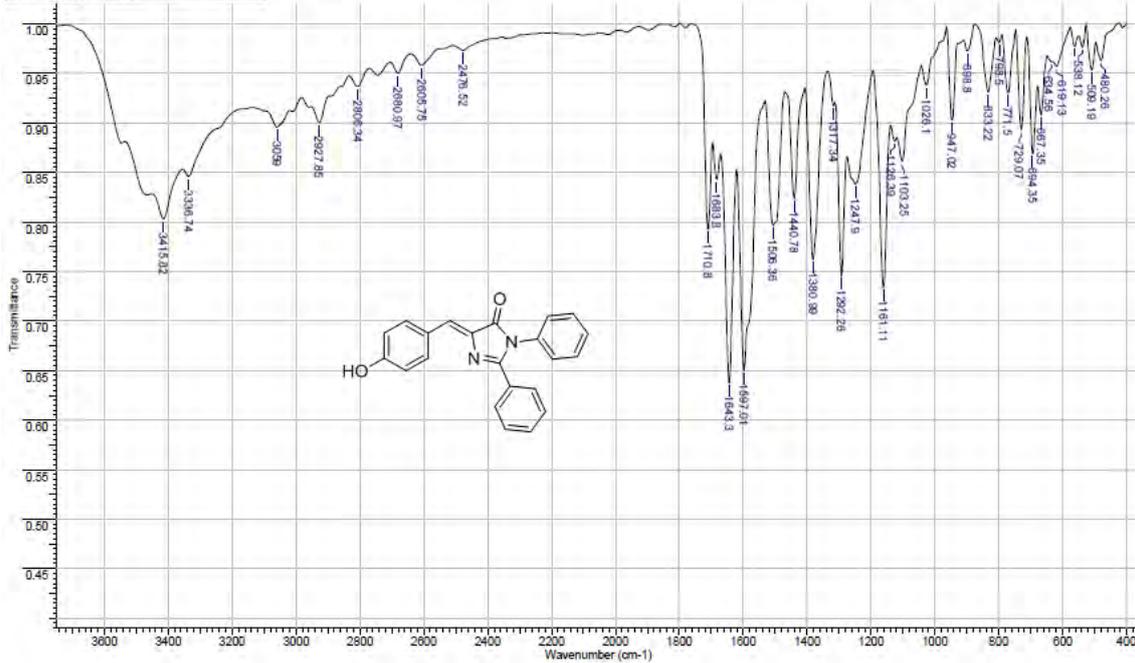
Anexo 70. Espectro de IV do produto 39b.

Title	A 3 - LUCIANA - ARTHUR		Date Stamp	18/07/2013 14:57:10.022 (GMT-3)	
File Name	C:\USERS\ALUNOS\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\IVANEXOS 2A 3 - LUCIANA - ARTHUR.D		Spectral Region	IR	
Date	19 Jul 2013 17:36:08	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2520 - 3999.3760
Data Spacing	1.9288			Points Count	1866



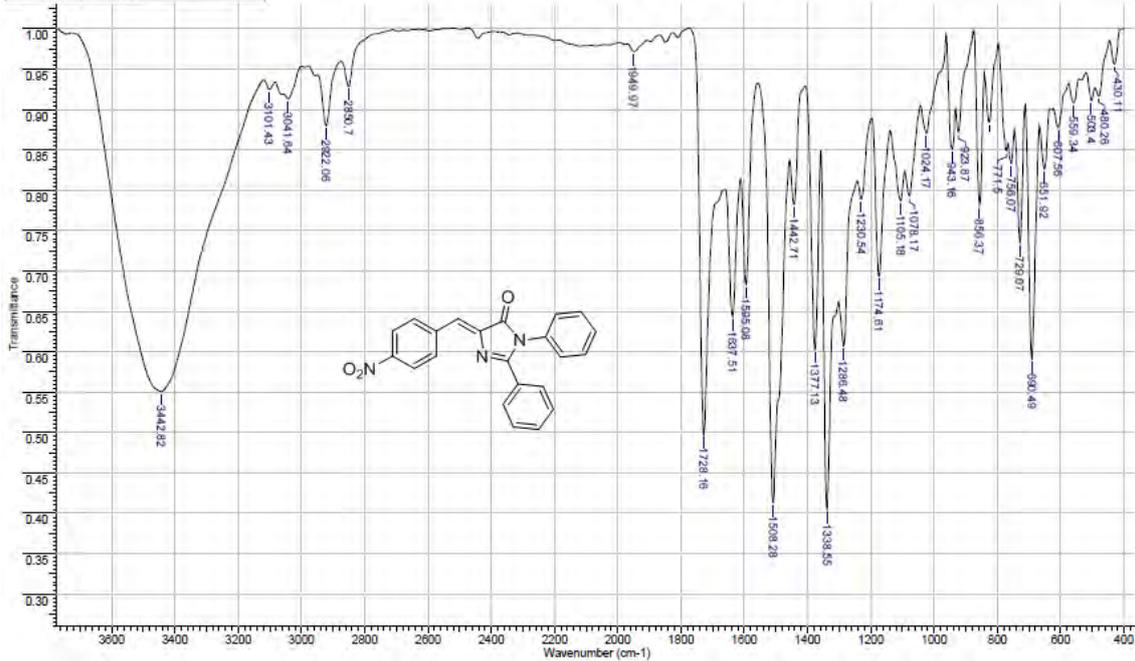
Anexo 75. Espectro de IV do produto 39g.

Title	A 9 - LUCIANA - ARTHUR			Date Stamp	18/07/2013 16:02:43.550 (GMT-3)
File Name	C:\USERS\LUCIANO\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\IVANEXOS 2\A 9 LUCIANA ARTHUR.D			Instrument	VERTEX 70
Date	19 Jul 2013 17:36:08	Technique	Infrared	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2520 - 3996.3760
Data Spacing	1.9288			Points Count	1866

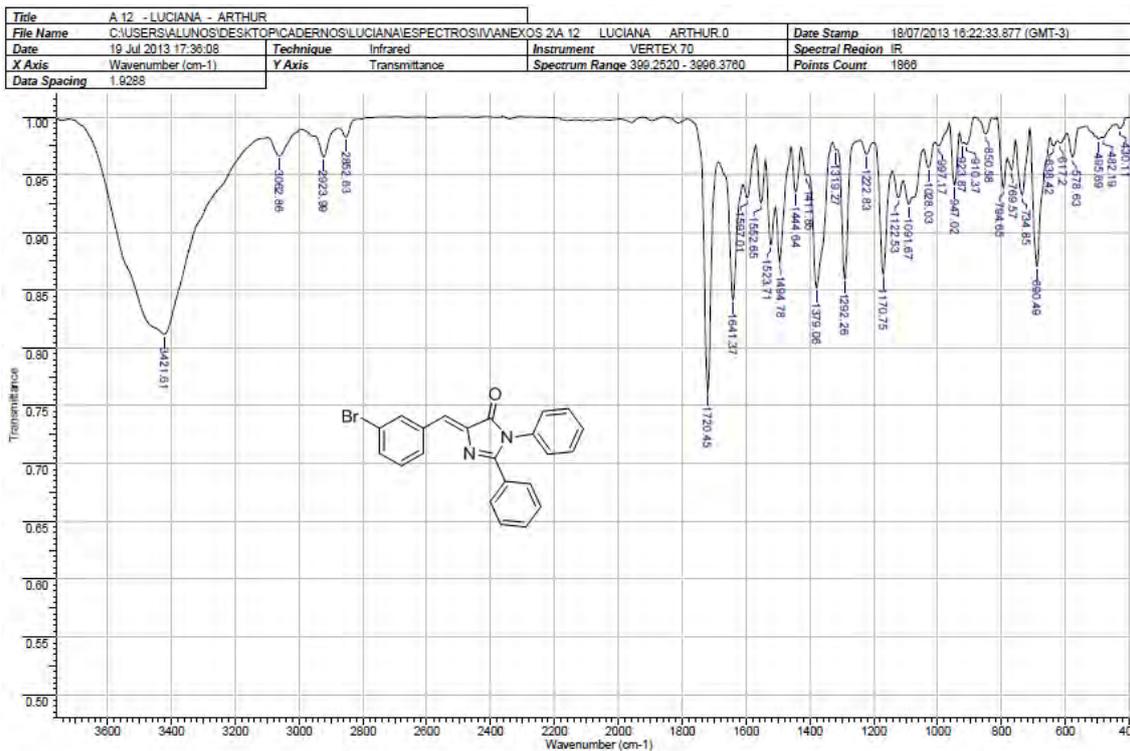


Anexo 76. Espectro de IV do produto 39h.

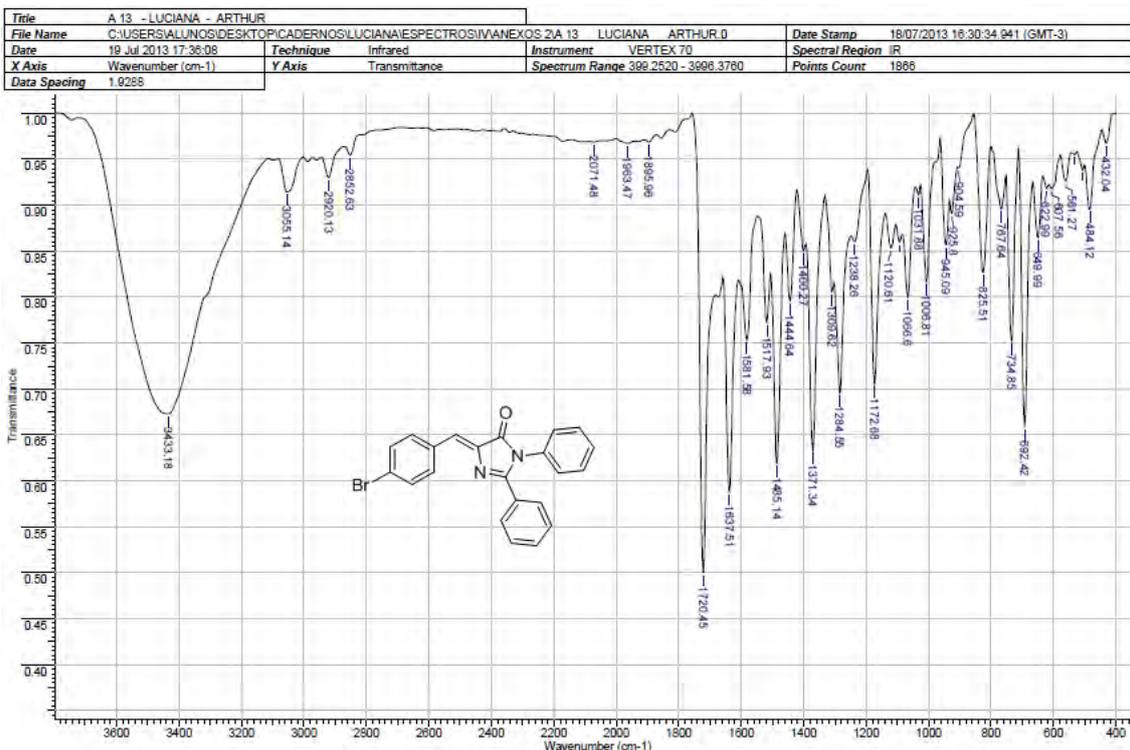
Title	A 10 - LUCIANA - ARTHUR			Date Stamp	18/07/2013 16:11:54.284 (GMT-3)
File Name	C:\USERS\LUCIANO\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\IVANEXOS 2\A 10 LUCIANA ARTHUR.D			Instrument	VERTEX 70
Date	19 Jul 2013 17:36:08	Technique	Infrared	Spectral Region	IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2520 - 3996.3760
Data Spacing	1.9288			Points Count	1866



Anexo 77. Espectro de IV do produto 39i.

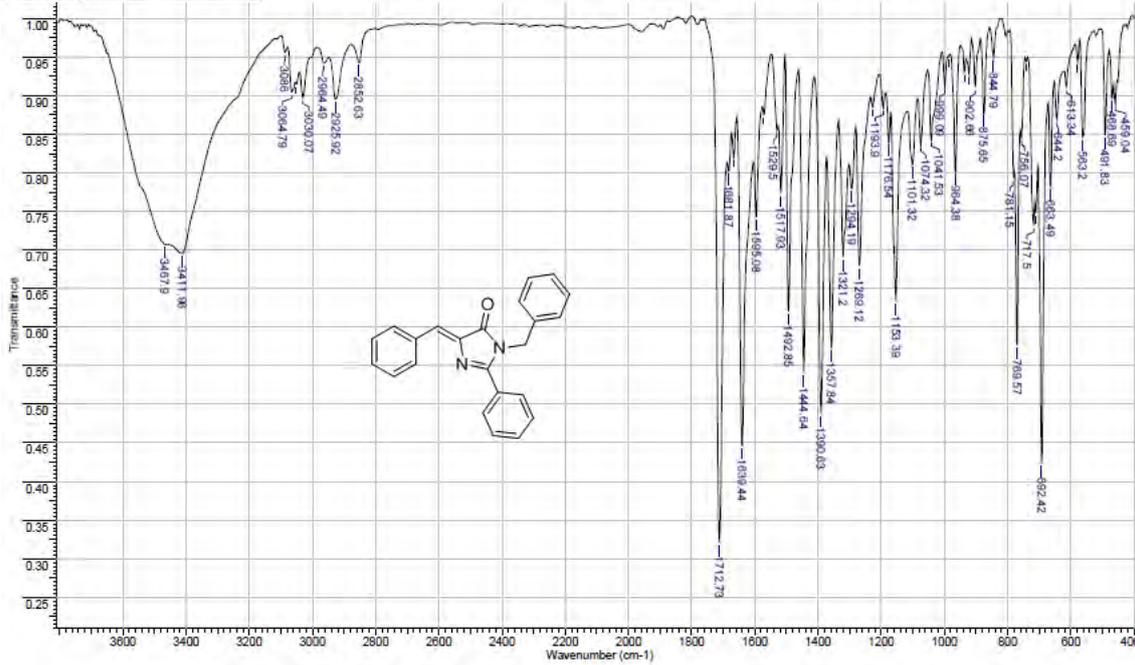


Anexo 78. Espectro de IV do produto 39j.



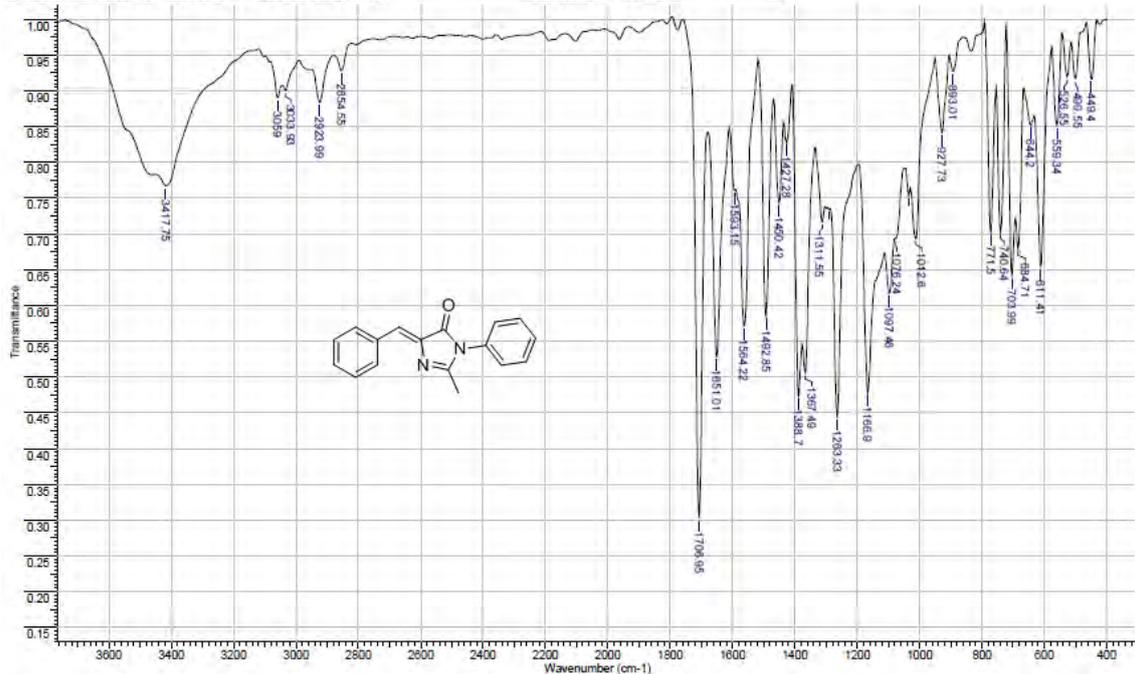
Anexo 79. Espectro de IV do produto 41a.

Title	B 2 - LUCIANA - ARTHUR			
File Name	C:\USERS\LUCIANA\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\ANEXOS\B 2 LUCIANA ARTHUR.0	Date Stamp	18/07/2013 14:39:49 256 (GMT-3)	
Date	19 Jul 2013 17:33:40	Technique	Infrared	Spectral Region IR
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Points Count 1866
Data Spacing	1.9288	Spectrum Range	399.2520 - 3999.3760	

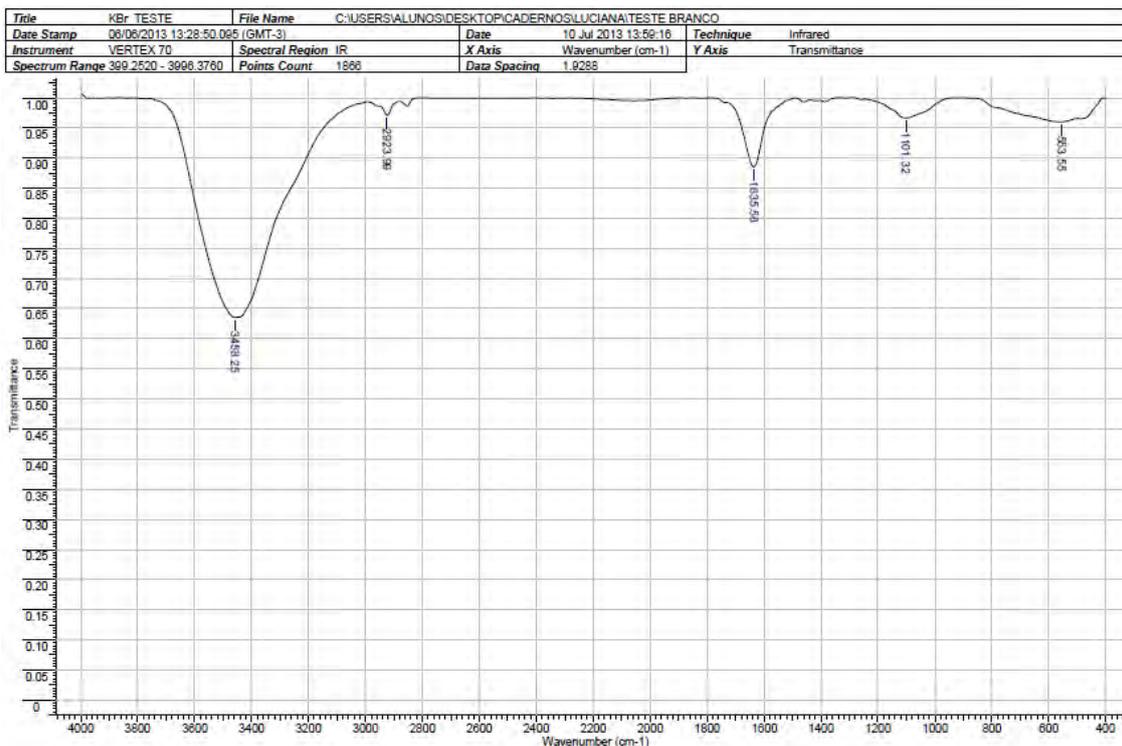


Anexo 80. Espectro de IV do produto 42a.

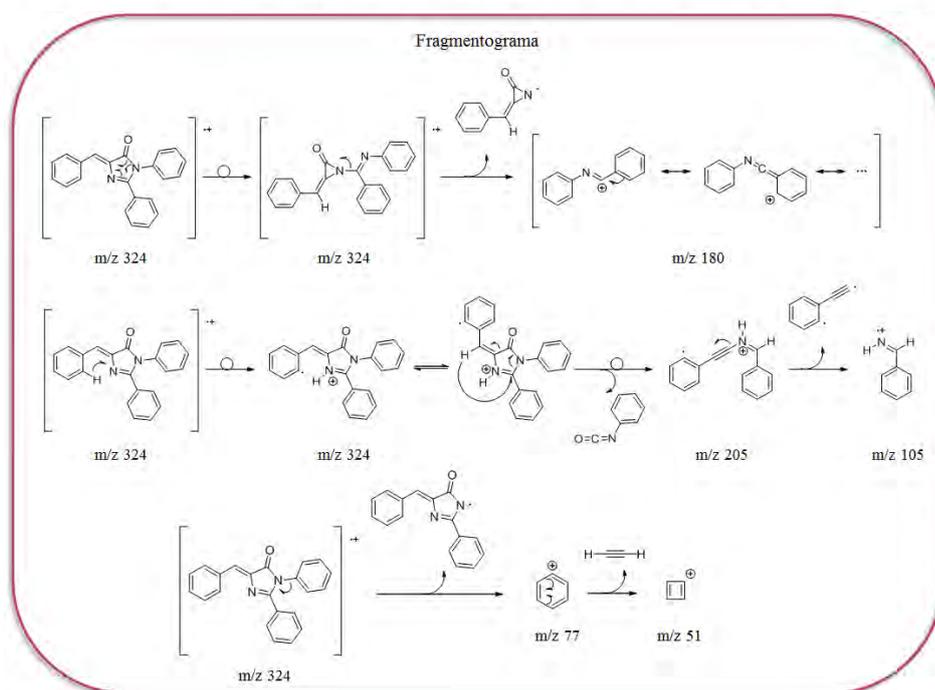
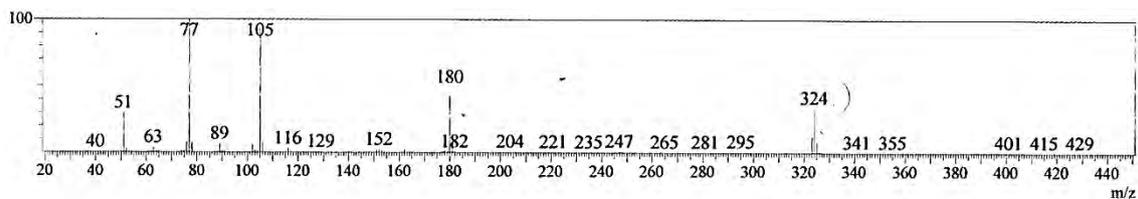
Title	C 2 - LUCIANA - ARTHUR	File Name	C:\USERS\LUCIANA\DESKTOP\CADERNOS\LUCIANA\ESPECTROS\IV\ANEXOS 2\C 2 LUCIANA ARTHUR.0		
Date Stamp	18/07/2013 14:29:30.091 (GMT-3)	Date	19 Jul 2013 17:38:08	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance
Spectrum Range	399.2520 - 3999.3760	Points Count	1866	Data Spacing	1.9288



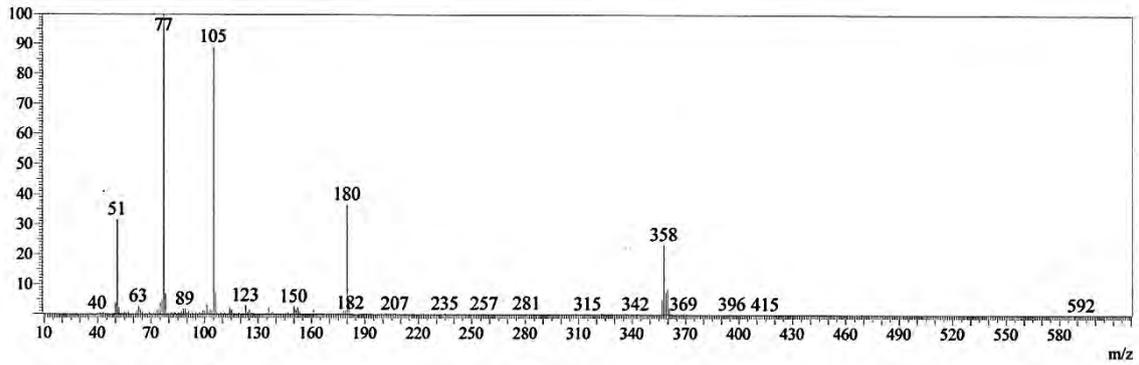
Anexo 81. Espectro de IV do Branco.



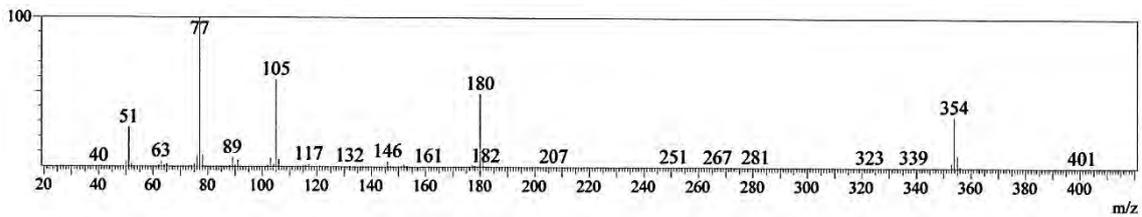
Anexo 82. Espectro de Massas do produto 39a e fragmentograma dos principais picos.



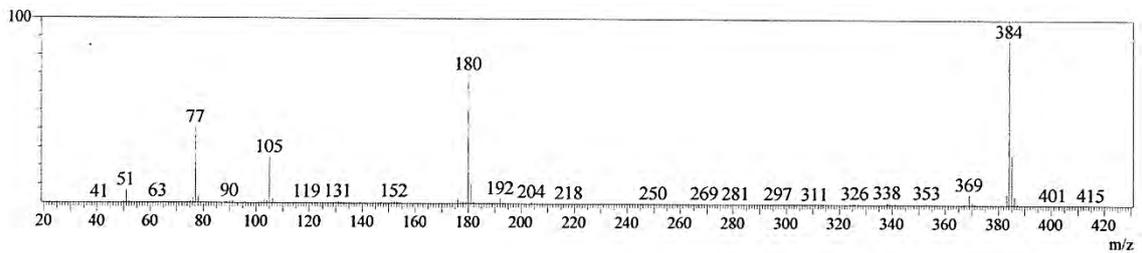
Anexo 83. Espectro de Massas do produto 39b.



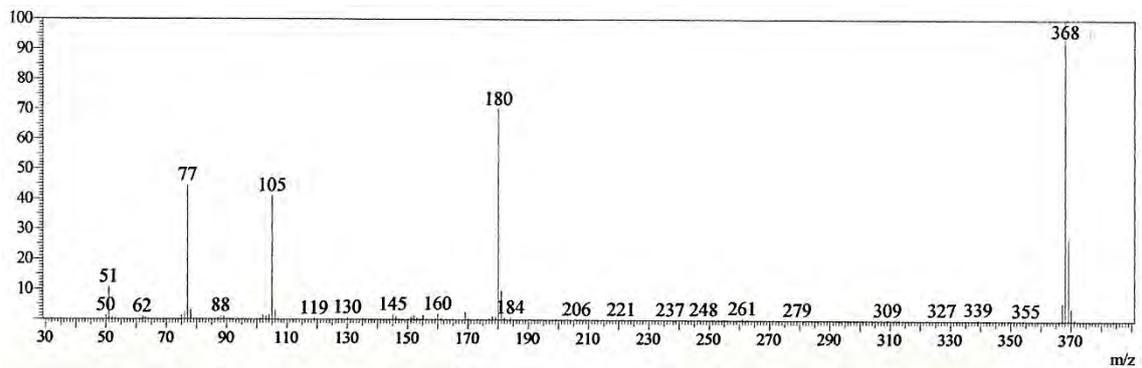
Anexo 84. Espectro de Massas do produto 39c.



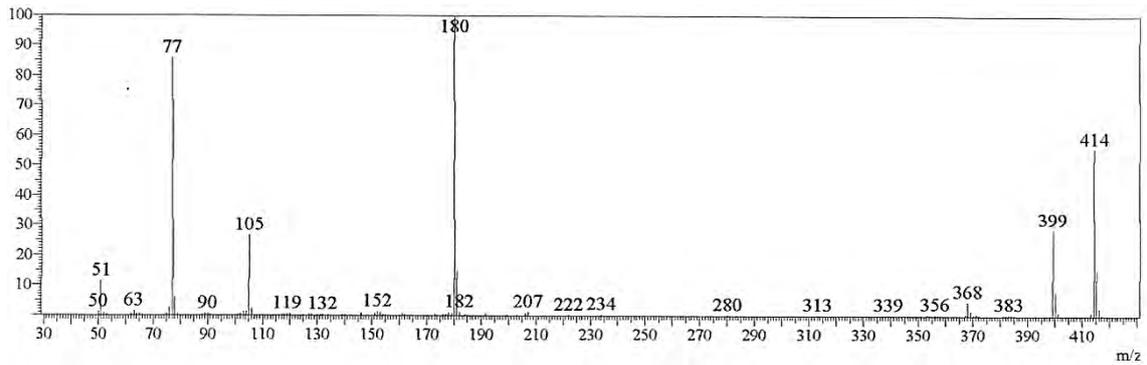
Anexo 85. Espectro de Massas do produto 39d.



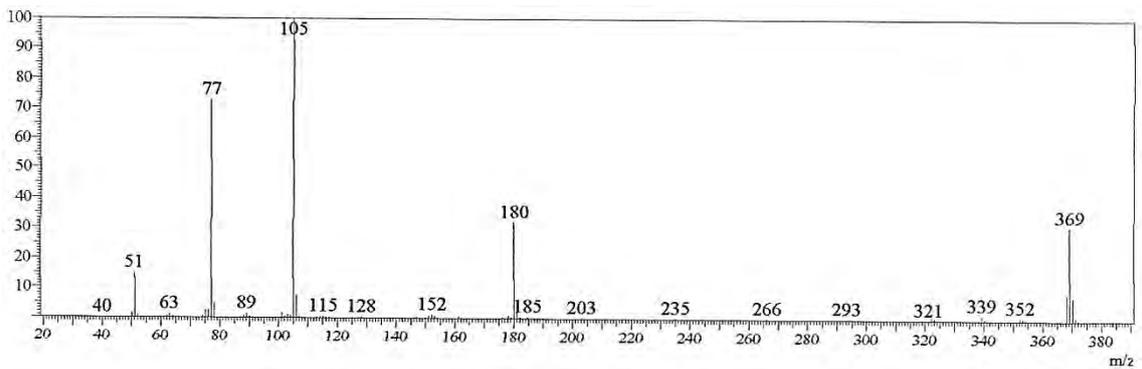
Anexo 86. Espectro de Massas do produto 39e.



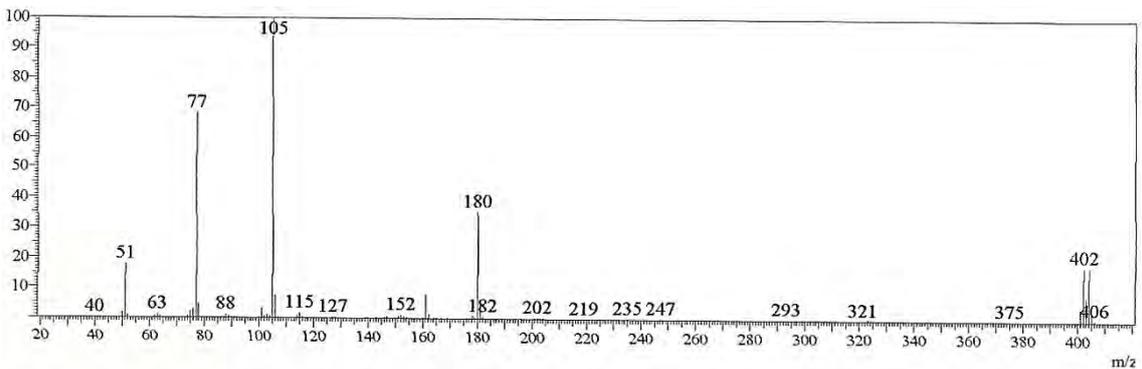
Anexo 87. Espectro de Massas do produto **39f**.



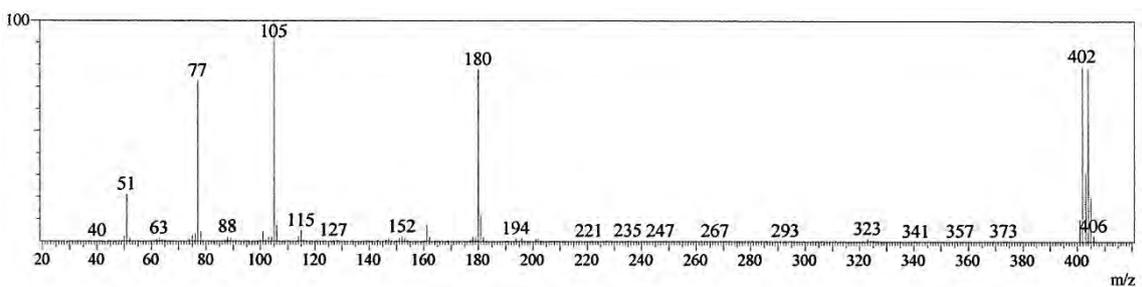
Anexo 88. Espectro de Massas do produto **39h**.



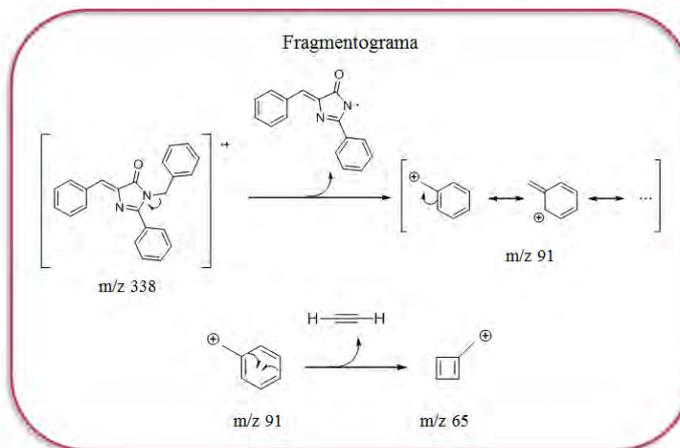
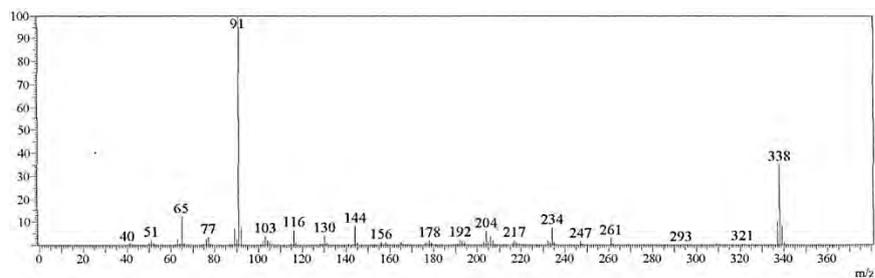
Anexo 89. Espectro de Massas do produto **39i**.



Anexo 90. Espectro de Massas do produto **39j**.



Anexo 91. Espectro de Massas do produto 41a e fragmentograma dos principais picos.



Anexo 92. Espectro de Massas do produto 42a e fragmentograma dos principais picos.

