

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO

**Síntese de Novos derivados Ácido (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos
Planejados como Inibidores da Fosfodiesterase 4
Para o tratamento da asma e COPD**

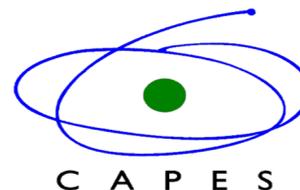
Elaborado por

PEDRO LESSA PENETRA

Orientador

ARTHUR EUGEN KÜMMERLE

SEROPÉDICA – 2016



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

MESTRADO

PEDRO LESSA PENETRA

Bolsista

Síntese de Novos Derivados Ácido (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos
Planejados como Inibidores da Fosfodiesterase 4
para o tratamento da asma e COPD

ARTHUR EUGEM KUMMERLE

Orientador

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós
Graduação em Química da
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P397s Penetra, Pedro Lessa, 1992-
Síntese de Novos derivados Ácido (Z)-2-benzamido-3
fenilacrílicos Planejados como Inibidores da
Fosfodiesterase 4 para o tratamento da Asma e COPD /
Pedro Lessa Penetra. - 2016.
175 f.

Orientador: Arthur Eugen Kummerle.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Química,
2016.

1. Química Medicinal. 2. Síntese Orgânica. 3.
Tratamento da Asma e DPOC. I. Kummerle, Arthur Eugen,
1979-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química III.
Título.

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

PEDRO LESSA PENETRA

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 21 DE JULHO DE 2016

Dr. Arthur Eugen Kummerle (ICE-UFRRJ) – Orientador

Dr. Ricardo Olimpio de Moura (PPGCF-UEPB)

Dra. Amanda Porto Neves (ICE-UFRRJ)

“E movidos pela fé viemos pra relizar grandes coisas no Senhor em todo o tempo.
Somos filhos, somos livres e pra sempre vou viver Teu extraordinário.
Construímos pela fé o impossível”

(Aline Barros)

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao amado Mestre Jesus, governador da Terra pois toda honra e glória seja dada a Ti.

Aos meus pais que sempre dedicaram suas vidas aos filhos, em especial a minha mãe Marcia Cristina que jamais me deixou só mesmo nos momentos mais difíceis, nem nunca se opôs às minhas escolhas me apoiando na medida das suas capacidades, oferecendo-me sempre seu máximo e além.

Às minhas tias Lea e Lisete que depositaram em mim suas fichas, patrocinando meus sonhos, proporcionando-me chegar ao lugar que aos 5 anos de idade havia apontado. Não digo que não os atingiria, mas certamente sem vossa ajuda e carinho os obstáculos seriam maiores, as adversidades mais recorrentes e o cansaço iminente.

À minha madrinha Lucinda que praticamente me colocou dentro da faculdade e me apoiou no que precisei desde os tempos do Ensino Médio.

Aos meus amigos (essa é a parte do agradecimento que fica “brókáda”). De fato a pós-graduação na RURAL me trouxe além de uma nova e mais ampla consciência intelectual, também me proporcionou muitos amigos e a oportunidade de estreitar os laços de amizade que já havia adquirido desde a graduação, por isso dedico quase que integralmente este trabalho a eles. Aos meus amigos do laboratório, Luciana, Sabrina, Daiana (Fatty), Gabriélla, Thiago, e é claro as Alessandras (que eu nunca decoro os nomes), que tornam os dias de trabalho muito mais harmoniosos e engraçados, mesmo nos dias em que estive “difícil de lidar”, afinal o importante é o DVD ficar bonito. Aos colegas que sofreram junto comigo o crivo e o estresse das disciplinas avançadas (Org. Det. FQO) Larissa, Douglas, Pitasse e Otávio. Sobretudo a amizade de Esther, inBella, Edlene, Raquel, as meninas da psicologia, que apesar de escolherem áreas e caminhos diferentes dos meus ainda vivem em meu coração e dessa lembrança eu não abro mão, e jamais abrirei.

Aos professores do DEQUIM, em especial a Cayoco que foi uma mãe pra mim durante a graduação, sempre preocupada com a formação não só acadêmica de seus estudantes, como também na formação de indivíduos socialmente operantes e

independentes intelectualmente, além de realçar a maioria dos valores morais e éticos que recebi dos meus pais, isso eu levarei e aplicarei para sempre, nesta e noutras vidas.

Ao meu orientador, Arthur, que possui uma incomparável capacidade em maximizar as capacidades mentais e práticas de seus alunos, sem falar da atenção que disponibiliza não só aos seus como a todos que lhe procuram, independente da trivialidade das dúvidas.

A Deus mais uma vez por ter colocado em meu caminho pessoas com individualidades tão diferente das minhas, só assim aprendemos com o outro aquilo que valorizamos tanto, mas que recorrentemente nos falta. Contudo, quando nem sempre o que há de mais precioso encontra-se no ambiente externo, mas sim dentro de nós mesmo, Ele nos faz conhecer pessoas semelhantes a nós e que funcionam como estímulos, espelhos e ideal a ser seguido. Por isso agradeço ter conhecido a professora Rosane, que dentre inúmeras qualidades possui a força em viver, presença e empatia sem igual.

Aos outros professores como Amanda Neves e Ricardo de Moura, que aceitaram o convite em fazer parte da banca da dissertação; Carlos Maurício, Catarina, Marco Edilson e Áurea, que de alguma forma me motivaram a seguir em frente.

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

Agradeço mais uma vez a Deus e que os caminhos que se abrirem daqui pra frente eu os percorra a passos firmes. Que o Altíssimo me permita desvendar, através da ciência, a delicadeza de como foram feitas suas obras e que eu jamais me envaideça pelas descobertas que fizer, pois tenho consciência de que esta vaidade enfraquece meu espírito e me põe numa frequência abaixo da necessária e exigida por Ti para que use-me como instrumento divino e nunca de interesse unicamente pessoal.

Por fim dedico este trabalho a todos os enfermos e acamados da nossa esfera, em especial àqueles que com dificuldades realizam com muito sofrimento um ato involuntário, mas fundamental de um ser vivo: a respiração; que o Senhor tenha misericórdia e recrute vosso socorro na velocidade de suas necessidades.

RESUMO

Asma e Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) são doenças inflamatórias crônicas com diferentes níveis de obstrução do fluxo aéreo. O reconhecimento do papel crítico da inflamação no processo tem sido dirigido ao eixo de tratamento para a prevenção ou bloqueio de alterações inflamatórias. Com esse propósito novos fármacos foram estudados e entre eles os inibidores específicos da fosfodiesterase 4 (PDE4) apresentaram resultados promissores devido ao controle dos níveis de AMPc, que estão implicados em células musculares lisas, inflamatórias e imunes. Este trabalho tem como objetivo sintetizar novos ácidos (Z) -2-benzamida-3-fenilacrílicos concebidos como inibidores de PDE4 (iPDE4), com base nos farmacóforos presentes no cilomilast e roflumilast, e avaliar a actividade inibitória dos compostos sintetizados num modelo enzimático teórico de *docking* molecular para a PDE4. A síntese para a obtenção dos novos ácidos passa por quatro etapas. Primeiro, uma série de derivados de succinimida, que são obtidos a partir da reação de um ácido benzóico substituído com a N-hidroxisuccinimida, DCC em THF à temperatura ambiente durante 20 h (93-79%). Em segundo lugar, os derivados de ácido hipúrico que foram produzidos a partir da reacção de intermediários succinimídicos da etapa anterior com glicina no ambiente básico (76-66%). Em terceiro lugar, a preparação de azalactonas seguindo uma metodologia de Erlemmeyer-Ploch onde os derivados de ácido hipúrico, benzaldeídos substituídos, acetato de sódio reagem a 120°C em anidrido acético (59-49%). Finalmente, a hidrólise de azalactonas com hidróxido de sódio em acetonitrila à temperatura ambiente levou aos ácidos desejados (96-92%). Os estudos de acoplamento molecular foram realizados no programa GOLD com o sítio catalítico de PDE4D (PDB 1XOR) definido em torno de 10,0 Å da tirosina 159. O *redocking* foi feito para escolher a melhor base para validar o modelo. Os melhores resultados foram obtidos com a base PLP. As estruturas dos compostos ácidos (1-7) foram minimizadas usando o software Spartan Pro 14.0 (PM6) e os estudos de acoplamento foram realizados fornecendo as pontuações de score de energia (72,45 - 78,06). Apesar dos valores de pontuação elevada indicar uma bom ancoramento, foi feita ainda uma análise visual da interação entre os ligantes e o bioreceptor. As principais conformações revelam as principais interações esperadas de inibidores de PDE4: ligações hidrogênio dos grupos dimetoxifenila com Gln369, empacotamento π com Phe372 e interações hidrofílicas com o sítio metálico. A rota de síntese para obtenção do ácido (Z) -2-benzamido-3-fenilacrílico foi viável e apresenta bons rendimentos, passando por intermediários de reacção estáveis e de fácil armazenamento. Estudos de acoplamento molecular com os produtos finais apresentaram um perfil de inibição teórica "in silico" para PDE4 muito semelhante aos inibidores já descritos na literatura. Os compostos estão agora sob avaliação dos seus perfis inibitórios de PDE4, para verificação de atividade "in vitro".

Palavras Chave: DPOC, Asma, PDE4, inflamação, ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico.

ABSTRACT

Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) are chronic inflammatory diseases with varying levels of airflow obstruction. Recognition of the critical role of inflammation in the process has been directed the treatment axis for the prevention or blockage of inflammatory changes. For this purpose new drugs have been studied and among them the specific inhibitors of phosphodiesterase 4 (PDE4) have presented promising results due to the control of cAMP levels, which are implicated in smooth, inflammatory and immune muscle cells. This work aimed to synthesize new (*Z*)-2-benzamide-3-phenylacrylic acids designed as PDE4 inhibitors (iPDE4), based on pharmacophores present in cilomilast and roflumilast, and to evaluate the inhibitory activity of the synthesized compounds in a theoretical enzymatic model of PDE4 molecular docking. The synthesis for obtaining the new acids goes through four steps. First, a series of succinimide derivatives, which are obtained from the reaction of a substituted benzoic acid with an *N*-hydroxysuccinimide, DCC in THF at room temperature for 20 h (93-79%). Second, hippuric acid derivatives were produced from the reaction of succinimide intermediates of the previous step with glycine in basic environment (76-66%). Third, preparation of azalactones following an Erlemmeyer-Ploch methodology where the derivatives of hippuric acid, substituted benzaldehydes, sodium acetate are reacted at 120 °C in acetic anhydride (59-49%). Finally, the hydrolysis of azalactones with sodium hydroxide in acetonitrile at room temperature led to the desired acids (96-92%). Molecular docking studies were performed in the GOLD program with the catalytic site of PDE4D (PDB 1XOR) defined around 10.0 Å from tyrosine 159. Redocking was done in order to choose the best base and to validate the model. The best results were obtained with the PLP basis. The acid compounds (**1-7**) were minimized using Spartan Pro 14.0 software (PM6) and the docking studies were done providing the scores (72,45 - 78,06). Despite the high score values it was made a visual analysis of the interaction poses between ligand and bioreceptor. The main conformers showed the main expected interactions of PDE4 inhibitors: hydrogen bonds of the dimethoxyphenyl groups with Gln369, π -stacking with Phe372 and hydrophilic interactions with the metal site. The synthetic route for obtaining (*Z*)-2-benzamido-3-phenylacrylic acid was viable and presented good yields, through stable reaction intermediates. Molecular docking studies with the final products presented a theoretical inhibition profile for PDE4 very similar to the inhibitors already described in the literature. The compounds are now under evaluation of their PDE4 inhibitory profiles.

Keywords: COPD, asthma, PDE4, inflammation, acid-(*Z*)-2-benzamido-3-phenylacrylic.

ÍNDICE GERAL DE TABELAS, FIGURAS E ESQUEMAS

TABELAS

Tabela 1. As 10 cidades com maior poluição atmosférica do planeta.....	6
Tabela 2. Expressão das PDEs4 em diferentes células do nosso organismo.....	21-22
Tabela 3. Rendimentos e pontos de fusão dos intermediários succinimídicos.....	34-35
Tabela 4. Rendimentos e pontos de fusão dos derivados do ácido hipúrico.....	40
Tabela 5. Rendimentos e pontos de fusão das azalactonas.....	45
Tabela 6. Rendimentos e pontos de fusão do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos..	53
Tabela 7. Valores de RMSD para os ligantes de zardaverina no sítio da PDE4.....	61
Tabela 8. Valores de escores de energia usando a função PLP.....	63

FIGURAS

Figura 1. Comparação de um pulmão saudável com um pulmão de um paciente com Asma.....	1
Figura 2. Prevalência de episódios de asma noturna em pacientes ambulatoriais.....	4
Figura 3. Doenças que acometem o trato respiratório.....	4
Figura 4. Tabagismo e o fenômeno <i>Haze</i> na China.....	7
Figura 5. Diferenciação entre os quadros de ASMA e DPOC.....	8
Figura 6. Asma e DPOC a nível brônquico.....	9
Figura 7. Asma e DPOC a nível alveolar.....	9
Figura 8. Células inflamatórias e imunitárias envolvidas na Asma.....	11
Figura 9. Células inflamatórias e imunitárias envolvidas na DPOC.....	12
Figura 10. Financiamento para investigação de doenças em 2013.....	13
Figura 11. Possíveis mecanismos responsáveis pela broncodilatação.....	14

Figura 12. Agonistas β_2 adrenérgicos.....	15
Figura 13. Mecanismo de ação dos agonistas β_2 na relaxação da musculatura lisa.....	16
Figura 14. Derivados da xantina.....	17
Figura 15. Controle colinérgico das vias aéreas pelo sistema nervoso parassimpático.....	18
Figura 16. Antagonistas muscarínicos.....	19
Figura 17. Função bioquímica da PDE4 na conversão do AMPc ao AMP.....	20
Figura 18. Eventos celulares promovidos pela inibição da PDE4.....	22
Figura 19. Rolipram – Inibidor de primeira geração de PDE4.....	23
Figura 20. Inibidores de PDE4 de segunda geração.....	24
Figura 21. Domínio catalítico da PDE4 com o AMP.....	27
Figura 22. Modelo de interação que leva à hidrólise.....	28
Figura 23. Planejamento e similaridade estrutural dos ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.....	30
Figura 24. Inserção de uma das séries planejadas de ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.....	31
Figura 25. Exemplo de elucidação espectral do intermediário succinimídico 27d	37
Figura 26. Espectro de RMN ^1H do intermediário succinimídico 27d	38
Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C do intermediário succinimídico 27d	38
Figura 28. Comparação entre a reatividade das carboxilas e das carbonilas succinimídicas.....	41
Figura 29. Elucidação espectral do derivado de ácido hipúrico 29d	42
Figura 30. Espectro de RMN ^1H do derivado de ácido hipúrico 29d	43

Figura 31. Espectro de RMN ¹³ C do derivado de ácido hipúrico 29d	43
Figura 32. Elucidação do espectro da azalactona 31h	48
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H da azalactona 31h	49
Figura 34. Espectro de RMN ¹³ C da azalactona 31h	49
Figura 35. Projeção de Newman para a reação de eliminação via mecanismo E ₂ do núcleo azalactônico.....	50
Figura 36. Diferença energética teórica entre isômeros de <i>E</i> e <i>Z</i> de um núcleo azalactônico.....	51
Figura 37. Espectro de RMN ¹³ C para determinação da configuração relativa da azalactona.....	51
Figura 38. Comparação estrutural entre carbonilas de ésteres.....	53
Figura 39. Principais sinais do RMN ¹ H e RMN ¹³ C para o ácido (<i>Z</i>)-2-benzamido-3-fenilacrílico 34h	57
Figura 40. Espectro de RMN ¹ H do ácido-(<i>Z</i>)-2- benzamido-3-fenilacrílico 34h	57
Figura 41. Espectro de RMN ¹³ C do ácido-(<i>Z</i>)-2- benzamido-3-fenilacrílico 34h	58
Figura 42. Comparação estrutural através do espectro de IV.....	59
Figura 43. Estrutura 2D da zardaverina.....	60
Figura 44. Estrutura 2D da <i>N</i> -metil <i>N</i> -acilidrazona (NAH).....	61
Figura 45. Comparação dos modelos teóricos de inibição da PDE4 pela NAH.....	62
Figura 46. Confôrmers do ácido-(<i>Z</i>)-2-benzamido-3-fenilacrílico (34g) dentro do sítio catalítico da PDE4.....	64
Figura 47. Confôrmers do ácido-(<i>Z</i>)-2-benzamido-3-fenilacrílico (34h) dentro do sítio catalítico da PDE4.....	65

Figura 48. Análise das interações dos confôrmeros do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34g**) dentro do sítio catalítico da PDE4.....66

Figura 49. Análise das interações dos confôrmeros do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34h**) dentro do sítio catalítico da PDE4.....66

ESQUEMAS

Esquema 1. Mapa da rota sintética dos novos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.....4

Esquema 2. Reação de obtenção dos intermediários succinimídicos (**27a-d**).....34

Esquema 3. Reação ácido-base.....35

Esquema 4. Mecanismo de formação do intermediário succinimídico.....36

Esquema 5. Reação de obtenção dos derivados do ácido hipúrico (**29a-h**).....39

Esquema 6. Mecanismo de formação dos derivados do ácido hipúrico.....40

Esquema 7. Estruturas de ressonância do grupo abandonador succinimídico.....41

Esquema 8. Reação de obtenção das azalactonas (**31a-h**).....44

Esquema 9. Mecanismo de formação do anidrido misto e do núcleo azalactônico.....46

Esquema 10. Formação da azalactona através da reação de Erlenmeyer-Plöchl.....47

Esquema 11. Reação de obtenção dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.....52

Esquema 12. Mecanismo de hidrólise da azalactona.....56

Esquema 13. Estruturas 2D dos novos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (**34a-h**).....63

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - adenilciclase;

ACh - acetilcolina;

AIE - Asma Induzida por Exercício;

AMP - adenosina monofosfato;

AMPc - adenosina monofosfato cíclico;

ATP - adenosina trifosfato;

CCDA - Cromatografia planar em Camada Delgada Analítica;

CCL - quimiocinas ligantes;

CCR - quimiocinas receptoras;

CXCL - quimiocina ligante motivo;

DCC - *N, N'* – dicioexilcarbodiimida;

DMSO - Dimetilsulfóxido;

DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica;

G - proteína G;

GMPC - guanosina monofosfato cíclico;

HPDE - fosfodiesterase de glândulas gástricas;

IBGE - Instituto de Geografia e Estatística;

Ig - Imunoglobulina;

IGF - interconversão de grupos funcionais;

IL - interleucinas;

IV – infravermelho;

LABA - β 2-agonistas de longa duração;

LAMA - broncodilatadores anti-muscarínicos de longa duração;

LPDE - fosfodiesterases de células imunológicas;

M - receptores muscarínicos;

MMP - metaloproteinase de matriz;

N - receptor nicotínico;

NANC - sistema nervoso não adrenérgico não colinérgico;

NHS - *N* - hidróxissuccinimida;

NIH - Instituto Nacional Norte Americano;

Nu – nucleófilo;

OMS - Organização Mundial de Saúde;

PDE - fosfodiesterases;

PNS - Pesquisa Nacional de Saúde;

PK – proteína quinase inativa

PKA - proteína quinase ativa;

RMN – ressonância magnética nuclear;

SABA - β 2-agonistas de ação curta;

SUS - Sistema Único de Saúde;

TC - células citotóxicas;

TGF - fator transformador de crescimento;

Th - células T helper;

THF - tetraidrofurano;

TNF - fator de necrose tumoral;

TMS – tetrametilsilano;

Treg - células T reguladoras;

TSLP - linfopoetina estromal tímica;

β_2 AR - receptor β_2 -adrenérgico;

δ – deslocamento químico;

RMSD- Raiz do desvio médio quadrático;

NAH- N-acilidrazona;

ν – número de onda.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1-25
1.1. Asma.....	1-2
1.1.1. Tipos de Asma.....	2-4
1.2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).....	4-7
1.3. Asma Vs. DPOC.....	7-12
1.4. Tratamento.....	12-13
1.4.1. Broncodilatadores.....	13-14
1.4.1.1. Agonistas β_2 – adrenérgicos.....	14-15
1.4.1.1.1. Mecanismo de ação dos agonistas β_2	15-16
1.4.2. Derivados da Xantina.....	17-18
1.4.3. Antagonistas Muscarínicos.....	18-20
1.5. A Fosfodiesterase como alvo na inflamação.....	20-23
1.5.1. Inibidores de primeira geração da PDE4.....	23-24
1.5.2. Inibidores de segunda geração da PDE4.....	24-25
2. OBJETIVOS	26-31
2.1. Objetivos Gerais.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
2.3. Planejamento Estrutural.....	26-31
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32-66
3.1. Análise Retrossintética.....	32-33

3.2. Síntese e determinação estrutural dos Intermediários succinimídicos.....	34-38
3.3. Síntese e determinação estrutural dos Derivados do ácido hipúrico.....	39-43
3.4. Síntese e Determinação estrutural das azalactonas.....	44-51
3.5. Síntese e caracterização dos Novos Ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos..	52-59
3.6. Estudos de ancoramento molecular (<i>docking</i>) dos novos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos sobre a PDE4.....	59-66
4. METODOLOGIAS.....	67-85
3.1. Materiais.....	67
3.2. Reagentes.....	68
3.3. Metodologia.....	68-85
3.3.1. Síntese dos intermediários succinimídicos.....	68-70
3.3.2. Síntese dos derivados do ácido hipúrico.....	70-73
3.3.3. Síntese das azalactonas.....	73-79
3.3.4. Obtenção dos ácidos (Z)- 2- benzamido – 3 – fenilacrílicos.....	79-85
5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	86
6. REFERÊNCIAS.....	87-99
ANEXO.....	I - LIX

1. INTRODUÇÃO

1.1. Asma

A asma é uma doença inflamatória das vias aéreas inferiores e está entre as doenças crônicas mais comuns, afetando crianças e adultos. Caracteriza-se pela inflamação crônica, hiperresponsividade brônquica e limitação do fluxo aéreo (Figura 1). A doença se manifesta clinicamente com tosse recorrente, sibilância e/ou dispneia. Os mecanismos responsáveis pela manutenção da resposta inflamatória, que se caracterizam pelo aumento do número de linfócitos ativados, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos de forma variável, são apenas parcialmente reconhecidos (FILHO, 2015).

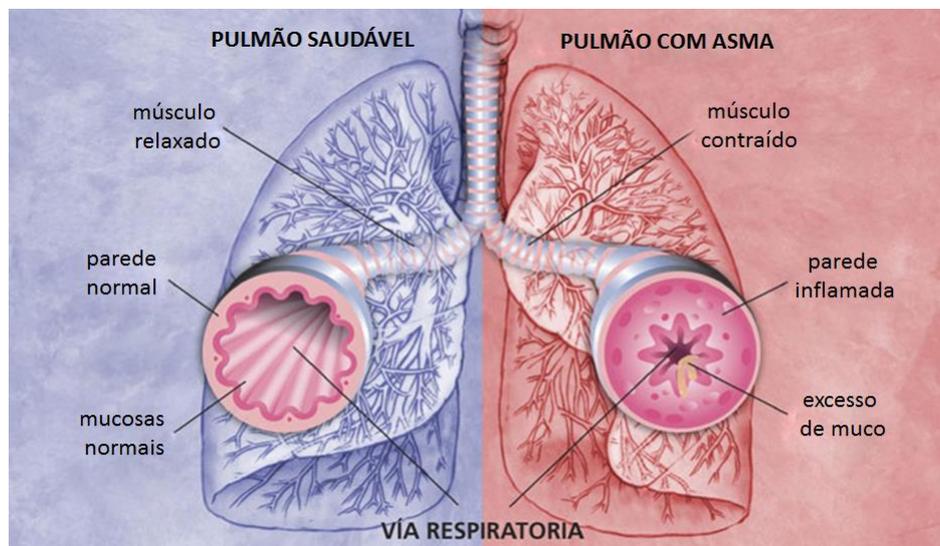


Figura 1: Comparação de um pulmão saudável com um pulmão de um paciente com Asma (Adaptado de LÓPEZ, 2008).

A asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos, de acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) do Ministério da Saúde e Instituto de Geografia e Estatística (IBGE). Asma é uma das condições crônicas mais comuns, acometendo cerca de 235 milhões de pessoas no mundo todo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estima-se que, no Brasil, cerca de 10% da população sofra com o problema. (OMS, 2013) A asma é a quarta causa de hospitalização pelo Sistema Único de Saúde (SUS), somente no ano de 2014 foram registradas quase 174,5 mil internações em todo o Brasil, além disso aproximadamente 2,5 mil pessoas morrem por ano em decorrência de complicações causadas pela doença (Ministério da Saúde, 2015).

As causas da asma não são completamente compreendidas. No entanto, fatores de risco para desenvolver a doença incluem a inalação de substâncias que funcionam como "gatilhos", tais como alérgenos, fumo de tabaco e irritantes químicos. Até então, não há uma cura para a doença, mas um tratamento adequado pode controlar a desordem e habilitar os portadores a desfrutar de uma boa qualidade de vida (SOUZA, 2015). Nesse sentido, além dos agentes β 2-adrenérgicos, da teofilina e dos corticosteróides, novos fármacos vêm sendo estudados, dentre eles os inibidores específicos de fosfodiesterases vêm apresentando resultados promissores (CAMPOS, 2003).

A asma pode ser classificada em vários tipos diferentes dependendo dos fatores que a desencadeiam. Conhecer o tipo de asma é útil para que se procure formas de alívio mais eficazes. Dessa forma, pode-se dividir a doença em asma alérgica, asma induzida por exercício, asma ocupacional e asma noturna (BORGES, 2011).

1.1.1. Tipos de Asma

A asma alérgica é geralmente sazonal e é frequentemente conhecida como rinite alérgica. Caracteriza-se pela hipersensibilidade de substâncias presentes no ambiente, frequentemente ao pólen ou a outros compostos libertados por plantas (alérgenos) (SOUZA, 2015). Esta hipersensibilidade leva à produção de histamina pelas células do sistema imunitário. Como são pré-formadas e armazenadas nos mastócitos, as histaminas são liberadas quando o antígeno anticorpo entra em contato com essas células, iniciando o processo alérgico. Uma vez controlada a reação alérgica, os sintomas de asma tendem a diminuir (OPPENHEIMER, 2006).

A maioria das pessoas que têm asma mal controlada, terá sintomas durante o exercício. Algumas pessoas podem ter sintomas de asma somente durante a atividade física, esta forma de asma é chamada de Asma Induzida por Exercício (AIE). A AIE pode ser explicada por duas hipóteses. A hipótese osmótica considera que a desidratação das vias aéreas gerada pela perda insensível de água pelo trato respiratório estimulada pela inalação de ar seco durante o exercício aumenta a osmolaridade dos líquidos periciliares, liberando mediadores químicos (histamina, prostaglandinas e leucotrienos) que acentuam a contração da musculatura lisa brônquica, causando a obstrução. A hipótese térmica

considera que a AIE é iniciada pelo efeito térmico nas vias aéreas causado pelo exercício, isto é, o resfriamento das vias aéreas seguido de um reaquecimento pós-exercício que causa uma hiperemia reativa da vasculatura brônquica e edema na parede das vias aéreas. Isso sugere que o resfriamento das vias aéreas seria um importante estímulo para a AIE (ZEITOUN, 2004). Quanto ao tratamento, ressalta-se a importância de manobras como a realização de aquecimentos pré - exercício em função do período refratário e também a utilização de beta-adrenérgicos para prevenir a AIE (SERAFIN, 1996).

Há duas categorias de asma que ocorrem no local de trabalho: asma ocupacional e asma agravada no local de trabalho. A asma ocupacional é caracterizada pelo quadro obstrutivo e hiperreatividade das vias aéreas devido a condições próprias do ambiente de trabalho. A asma preexistente é agravada por fatores irritantes do ambiente de trabalho (MENDONÇA, 2000). A asma ocupacional, ocorre após a exposição a altas concentrações de gases, fumos ou substâncias químicas. O melhor tratamento é o afastamento do paciente do agente provocador (VANDENPLAS, 1997). O trabalhador pode ser mudado de lugar dentro da mesma empresa ou ser transferido para outro tipo de ocupação. O uso de máscaras ou outro método para reduzir a exposição não é efetivo para os pacientes com asma ocupacional com período de latência, pois estes indivíduos tendem a reagir frente a diminutas quantidades do agente (VANDENPLAS, 2003).

Muitos asmáticos apresentam exacerbação intermitente da doença durante a noite. Acordam de madrugada com sibilância, dispnéia e tosse. Os sintomas noturnos contribuem para a privação do sono, sonolência diurna, fadiga e irritabilidade. A probabilidade de ter sintomas durante o sono é mais elevada (Figura 2), e são particularmente perigosos devido ao arrefecimento das vias aéreas, à posição reclinada e à secreção hormonal que segue o ciclo circadiano, e por isso que a maioria das mortes relacionadas com a asma ocorre durante o período noturno (DETHLEFSEN, 1985).



Figura 2: Prevalência de episódios de asma noturna num universo amostral de 7700 pacientes ambulatoriais (TURNER - WARWICK, 1988)

1.2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

A asma e a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), juntas, são doenças que hoje atingem 27 milhões de brasileiros, de acordo com a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT). A DPOC é uma doença caracterizada por desenvolvimento progressivo da limitação ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível. Os termos mais familiares como "bronquite crônica" e "enfisema" não são mais usados, e agora estão incluídos dentro do diagnóstico de DPOC (Figura 3) (Ministério da Saúde - Conselho Federal de Medicina, 2015).

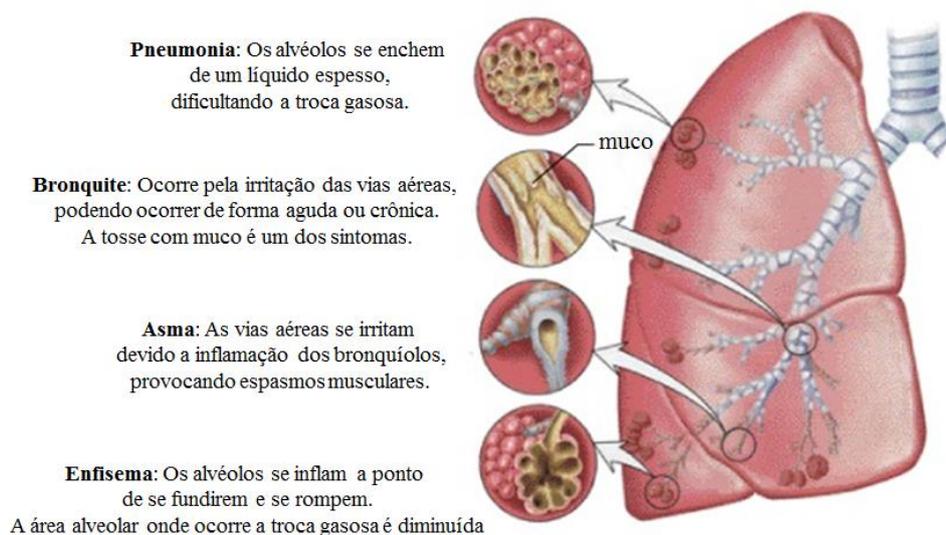


Figura 3: Doenças que acometem o trato respiratório.

Os sintomas mais comuns da DPOC são falta de ar, expectoração excessiva e uma tosse crônica. No entanto, a DPOC não é simplesmente uma "tosse de fumante", mas uma doença pulmonar potencialmente fatal sub-diagnosticada que pode progressivamente levar à morte (OMS, 2016).

Em 2012, a Organização Mundial da Saúde (OMS) registrou cerca de 64 milhões de casos, tendo mais de 3 milhões de mortes, ou seja, 6% de todas as mortes no mundo foram atribuídas a DPOC. No Brasil, esta doença atinge aproximadamente 7,3 milhões de pessoas, de ambos os sexos, principalmente a partir dos 40 anos de idade (Ministério da Saúde - DATASUS, 2014).

Para quem possui a DPOC, a exposição a agentes irritantes pode significar a diferença entre o reaparecimento do quadro de inflamação e a manutenção da doença controlada. O maior “gatilho” da DPOC é o tabagismo. Mas além disso, há uma série de outros irritantes pulmonares que podem iniciar ou agravar os sintomas. Alérgenos como poeira, pólen, pelos de animais, ácaros, mofo, podem desencadear crises alérgicas; o estado psicológico como estresse, cansaço e fadiga podem debilitar o sistema imunológico; alguns patógenos como vírus e bactérias que causam gripes e até mesmo mudanças bruscas na temperatura causando resfriados, também são disparadores facilitando o quadro de inflamação crônica do pulmão (ATHANAZIO, 2012). Um dos fatores que começou a ser investigado ultimamente é a poluição das grandes cidades. Sabe-se que nas grandes metrópoles a demanda de combustíveis fósseis para obtenção de energia é mais intensa, o que conseqüentemente leva a uma maior poluição atmosférica. Em 2015 a OMS declarou que a poluição presente no ar é responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano e ressalta, em relatório à ONU, uma lista divulgada no ano anterior das 10 cidades cujo o nível de poluição atmosférica excede o permitido (Tabela 1) (OMS, 2015).

As 10 Cidades mais poluídas do mundo

1° Nova Délhi, Índia
2° Patna, Índia
3° Gwalior, Índia
4° Raipur, Índia
5° Karachi, Paquistão
6° Peshwar, Paquistão
7° Rawalpindi, Paquistão
8° Khoramabad, Irã
9° Ahmedabad, Índia
10° Lucknow, Índia

Tabela 1: As 10 cidades com a maior poluição atmosférica do planeta (OMS, 2014)

A poluição atmosférica causada pela elevada concentração de partículas finas e gases poluentes oriundos da queima de biomassa nas capitais chinesas também preocupam a OMS. Menos de 1% das maiores cidades deste país cumprem as diretrizes de qualidade do ar recomendadas. Até então, os estudos sobre os efeitos da neblina de poluição na saúde têm-se centrado nos danos que a inalação de pequenas partículas podem causar, uma vez que penetram profundamente no pulmão, irritam e corroem a parede alveolar e, conseqüentemente, prejudica a função pulmonar, levando a sibilos, tosses e desordens respiratórias, aumentando os riscos de desenvolver a DPOC, e outras complicações do trato respiratório inferior (LU, 2013).

De acordo com uma estimativa, a taxa de prevalência global da DPOC na China é de 8,2% e a taxa de mortalidade por causa da doença é de aproximadamente 1,6% e está em quarto lugar no grupo das principais causas de morte em áreas urbanas desse país (PATEL, 2014). A fumaça do cigarro e a utilização de biomassa como combustíveis são os contribuintes para a elevada incidência da DPOC na China (Figura 4) (FANG, 2011).



Figura 4: Tabagismo, uma das principais causas de internação na China (à esquerda); Fenômeno denominado *Haze* cobrindo as capitais chinesas com uma névoa de poluição (à direita)

Os sintomas mais angustiantes para os pacientes que têm a DPOC são dispnéia, intolerância ao exercício e incapacidade progressiva de realizar atividades cotidianas. Recentemente o tratamento tem avançado com novos medicamentos, entretanto há questionamentos sobre a inserção dos corticosteroides inaláveis e sobre as associações de broncodilatadores. Os pacientes com poucos sintomas podem receber medicações de curta duração e apenas quando necessário. Se uma resposta imediata aos β_2 -agonistas não ocorre, é recomendada a adição de um anticolinérgico e nas agudizações deve-se utilizar broncodilatadores de longa duração e/ou corticóides inalatórios para os pacientes em estado grave (MARCHIORI, 2010). Aos pacientes com alto risco de exacerbação administra-se o roflumilast, inibidor de fosfodiesterase 4, com o intuito de melhorar a resposta aos broncodilatadores de longa duração (COSTA, 2013).

1.3. Asma Vs. DPOC

Em adultos, diferenciar asma de DPOC pode ser difícil (Figura 5), mas é importante pelas marcadas diferenças no tratamento, progressão da doença e prognóstico entre estas duas condições. Os sintomas presentes em ambas as condições são inespecíficos e se superpõem, portanto, definir os vários fenótipos é uma prioridade da pesquisa com grande relevância clínica (BÁRTHOLO, 2013).

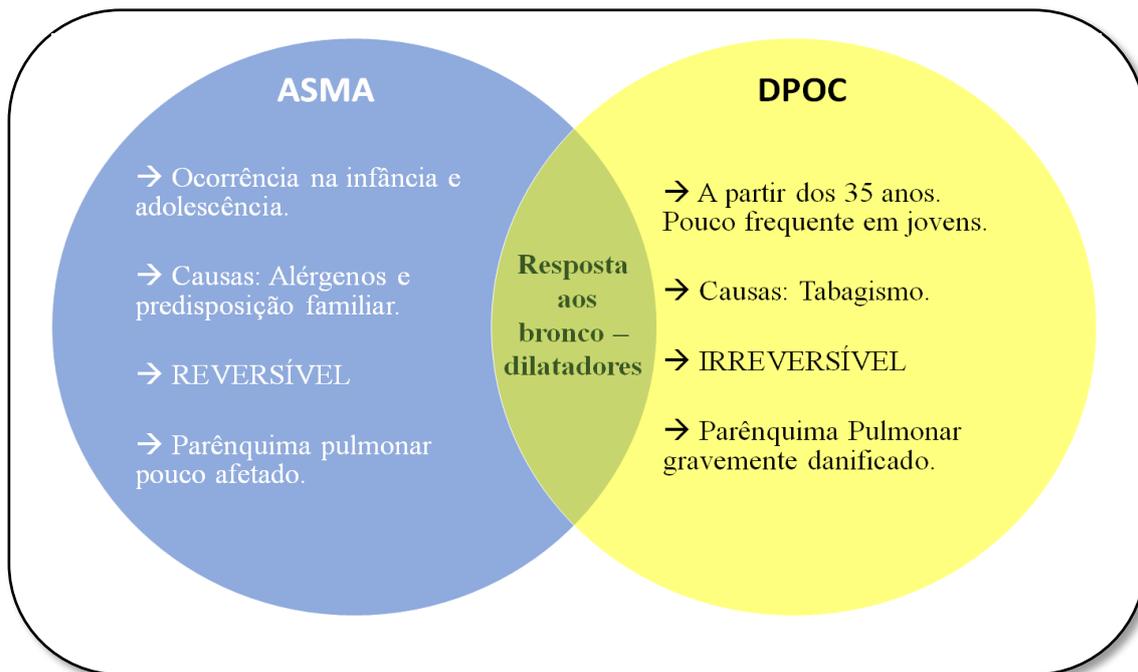


Figura 5. Diferenciação entre os quadros de ASMA e DPOC

A asma provoca a hiperatividade brônquica, ação do sistema nervoso autônomo (parassimpático), secreção vagal e defeitos intrínsecos no músculo liso brônquico. Mastócitos liberam mediadores químicos que atuam diretamente sobre a musculatura lisa, glândulas, capilares sanguíneos e a inflamação brônquica ocorre em resposta a fatores extrínsecos e intrínsecos. Na DPOC a inalação da fumaça do cigarro lesa o epitélio das vias aéreas aumentando-se a frequência de infecções, inibindo a atividade ciliar e macrofágica. O ar poluído atua de forma semelhante, embora menos intensa, uma vez que é inalado em menores concentrações, como pode ser visualizada na figura 6 (Figura 6).

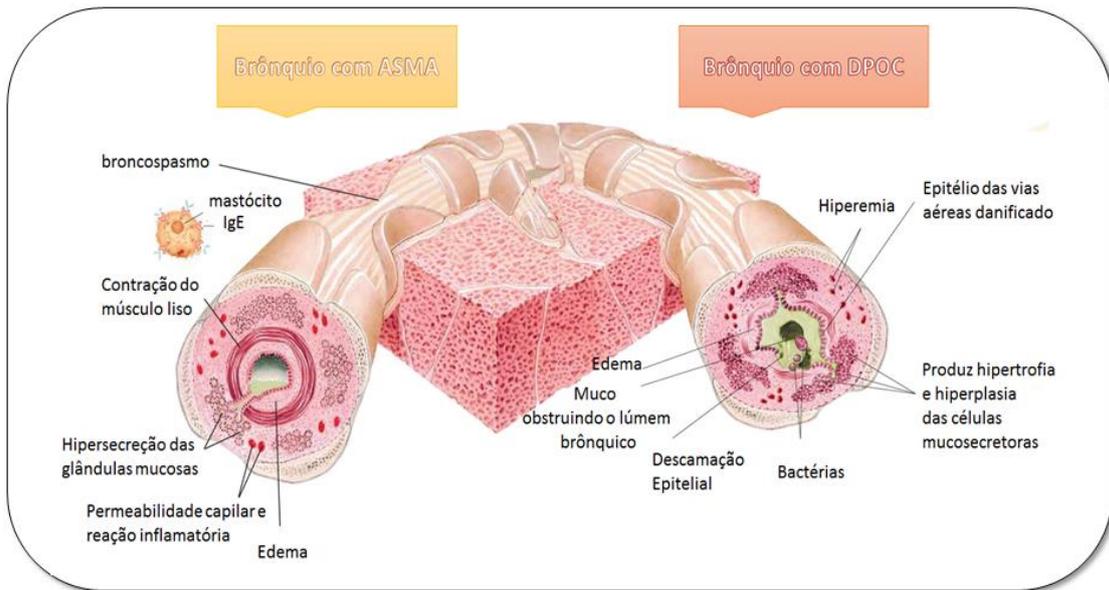


Figura 6. Asma (à esquerda) e DPOC (à direita) ao nível brônquico

Durante a inspiração numa crise asmática, as vias aéreas deixam o ar atingir os alvéolos. No entanto durante a expiração, as vias inchadas evitam que o ar saia, causando retenção de CO₂. O enfisema resulta da destruição da matriz do tecido conjuntivo pulmonar, principalmente das fibras de colágeno e elastina. O dano é causado pela ação da collagenase e elastase dos neutrófilos ativos e pelas espécies reativas de oxigênio. O fumo do tabaco libera oxidantes e radicais livres que ativam os macrófagos, atraindo neutrófilos que inativam a α - antitripsina e outros inibidores de protease, como mostra a figura 7 (Figura 7).

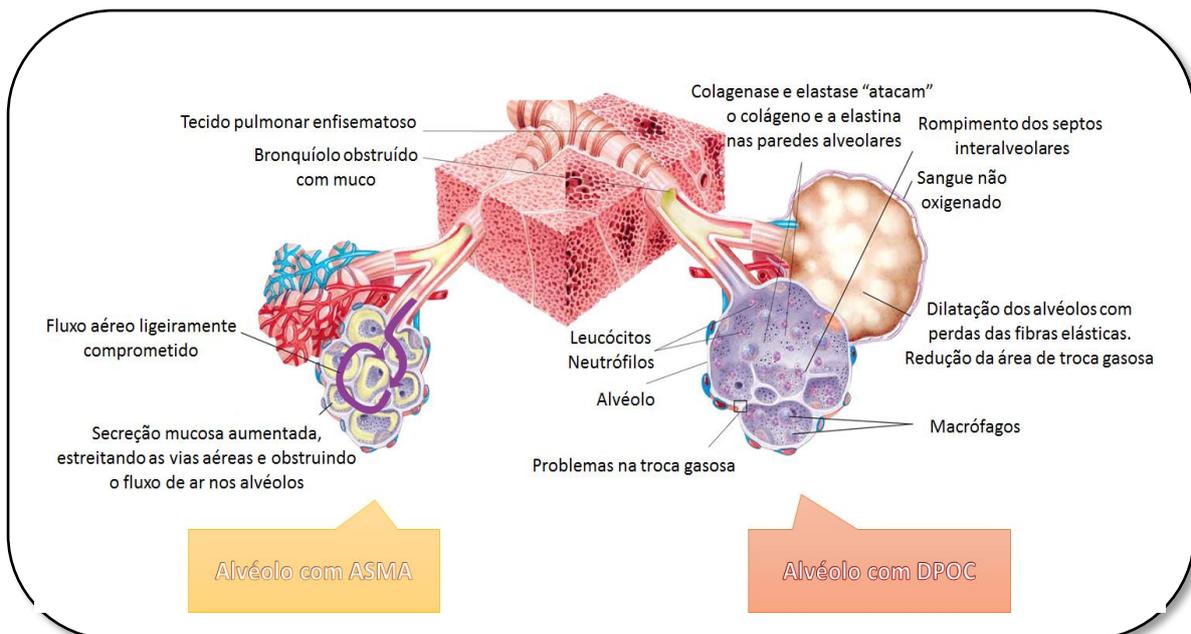


Figura 7. Asma (à esquerda) e DPOC (à direita) ao nível alveolar

Embora tenha-se alcançado considerável progresso na elucidação dos mecanismos celulares da asma, à DPOC não se tem dado a mesma atenção. A evolução inflamatória na DPOC é bem distinta da asma, com diferentes células, mediadores inflamatórios e resposta à terapia. A asma é um processo inflamatório eosinofílico de hiperresponsividade brônquica que afeta o trato respiratório inferior, mas sem danificar consideravelmente o parênquima pulmonar. Na DPOC o processo inflamatório é neutrofílico, e ocorre danificação irreversível do parênquima pulmonar. A inflamação eosinofílica na asma é marcadamente suprimida por corticosteróides, mas que não têm efeito significativo sobre os pacientes com DPOC (BARNES, 2000), porém ambos os quadros clínicos respondem aos broncodilatadores, que revertem o quadro de inflamação na asma, e proporcionam benefícios modestos fundamentais, sendo a melhor opção frente a irreversibilidade da DPOC (RANG & DALE, 2007).

Alérgenos ativam os mastócitos ao entrar em contato com as IgE's da superfície dessas células, liberando vários mediadores broncoconstritores, incluindo cisteinil - leucotrienos e prostaglandina D₂ (Figura 8). As células epiteliais liberam o fator de células estaminais, que serão responsáveis pela manutenção de mastócitos das mucosas na superfície das vias respiratórias. Os alérgenos são processados pelas células dendríticas, que são condicionadas pelas linfopoetina estromal tímica (TSLP) secretadas por células epiteliais e mastócitos para liberar quimiocinas - quimiocinas ligantes (CCL17 e CCL22), as quais irão atuar nas quimiocinas receptoras (CCR4), com o intuito de atrair células T helper 2 (Th2). As células Th2 desempenham um papel central da resposta inflamatória por meio da liberação das interleucinas 4 (IL-4) e IL-13 (estimulam células B sintetizar IgE), IL-5 (necessária na inflamação eosinofílica) e IL-9 (estimula a proliferação dos mastócitos). As células epiteliais liberam CCL11, que recrutam eosinófilos através do CCR3. Ocasionalmente os portadores da asma tem uma disfunção nas células T reguladoras (Treg), o que pode favorecer ainda mais a proliferação de células Th2 (BARNES, 2008 - Adaptado).

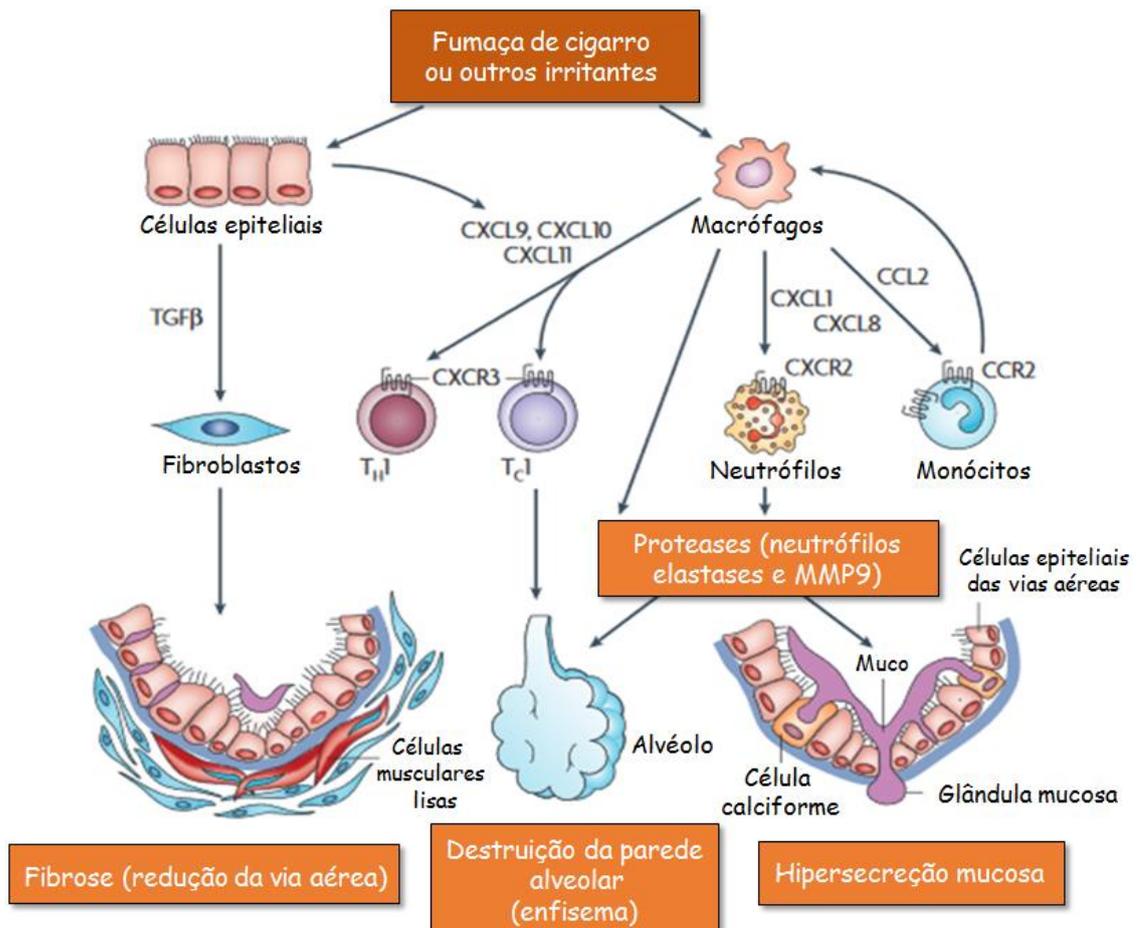


Figura 9. Células inflamatórias e imunes envolvidas na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

1.4. Tratamento

Embora existam tratamentos refratários para a asma moderada e asma grave, há uma necessidade urgente de desenvolver terapias eficazes para a DPOC, uma vez que, apesar da cronicidade de ambas as doenças, elas possuem mecanismos de ativação diferenciados e nem todas as alternativas que funcionam para um quadro, se estabelece eficientemente para o outro (BARNES, 2008).

Além disso, os investimentos financeiros na descoberta de terapias anti – HIV, por exemplo, lançam-se consideravelmente a frente quando comparados aos investimentos aplicados na descoberta de tratamentos mais eficazes e seguros para a DPOC, sendo a morbidade e mortalidade desta última muito superior nos últimos anos

(Figura 10). Contudo, as terapias atuais com broncodilatadores têm se mostrado promissoras no tratamento de ambas as doenças – asma e DPOC. Dentre estes pode-se citar os agonistas β_2 - adrenérgicos, anticolinérgicos, derivados das xantinas, inibidores de fosfodiesterases (PDEs) e corticosteroides - este último particularmente eficaz no tratamento da inflamação na asma (ZUO et al, 2015).

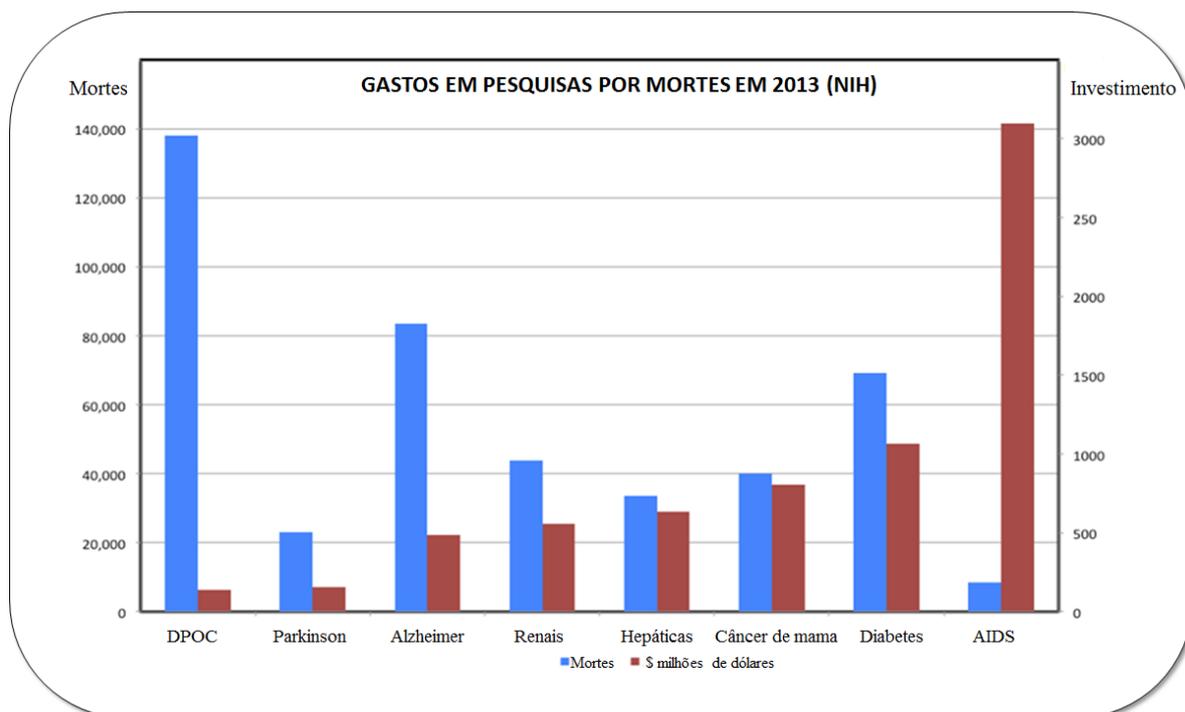


Figura 10. Gastos em pesquisa x mortes no ano de 2013 - Instituto Nacional de Saúde norte-americano (NIH)

1.4.1. Broncodilatadores

Broncodilatadores agem através de efeito relaxante sobre a célula muscular lisa. Eles pertencem a três classes farmacológicas: agonistas dos receptores β_2 -adrenérgicos, metilxantinas e antagonistas muscarínicos (ou anticolinérgicos inalatórios). Quando usados pela via inalatória, os agonistas - β_2 e os antagonistas muscarínicos têm ação mais rápida com menos efeitos sistêmicos. Os broncodilatadores de ação rápida são mais usados no tratamento de alívio dos sintomas agudos enquanto os de ação prolongada usados no tratamento da doença crônica. Os anticolinérgicos têm início de ação mais lento

e menos efetivo sobre a função pulmonar, quando comparados aos β_2 - agonistas, sendo mais usados no tratamento de portadores da DPOC. O emprego das metilxantinas no tratamento regular é limitado por seus efeitos tóxicos potencialmente perigosos. Os agonistas - β_2 de curta e de longa duração, junto com os corticosteroides inalatórios, constituem o pilar terapêutico dos pacientes com a asma mal controlada (CHUNG, 2011).

Os mecanismos de broncodilatação que envolvem a estimulação dos receptores β_2 - adrenérgicos, inibição do sistema nervoso não adrenérgico não colinérgico (NANC), inibição da fosfodiesterase e modulação dos canais de potássio estão intrinsecamente relacionados (Figura 11).

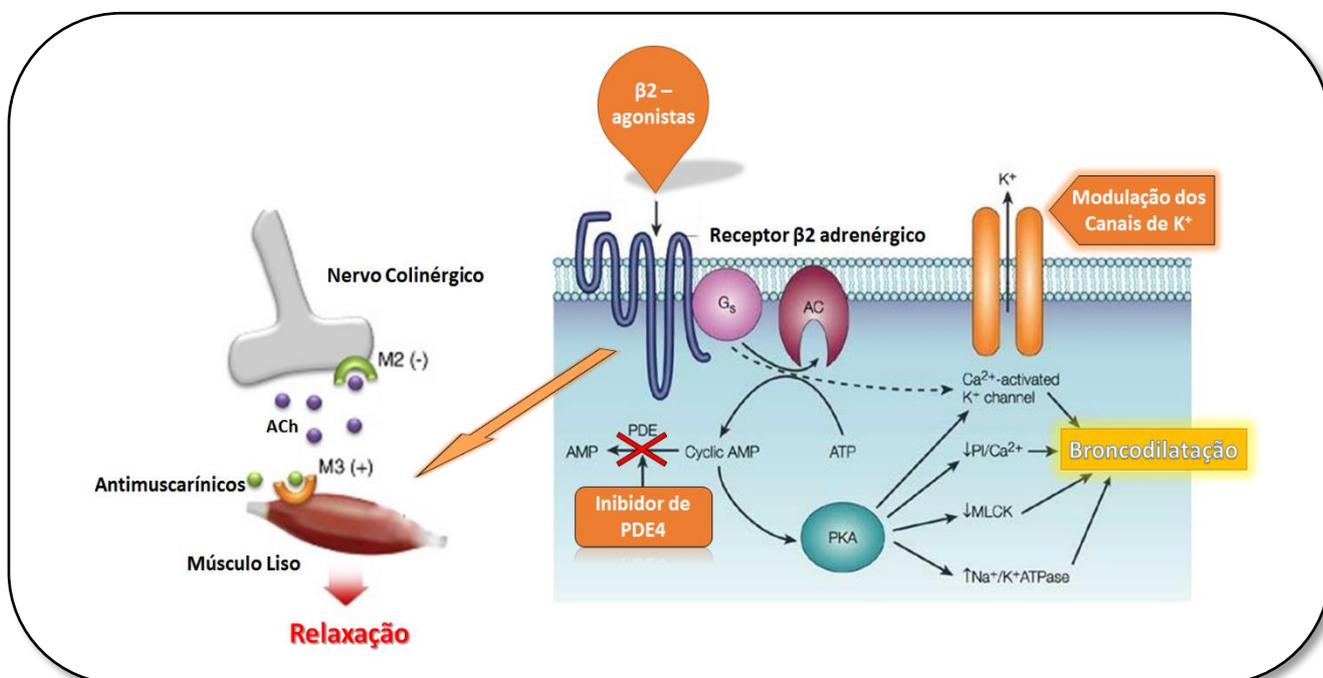


Figura 11. Possíveis mecanismos responsáveis pela broncodilatação.

1.4.1.1. Agonistas β_2 -adrenérgicos

Além do seu efeito broncodilatador essa classe também protege contra estímulos broncoconstritores. Os agonistas β_2 são divididos em dois grupos: de ação curta e de ação prolongada. O grupo dos broncodilatadores de ação curta (SABAs), também chamados de broncodilatadores de resgate, inclui os medicamentos salbutamol (1), fenoterol (2) e terbutalina (3), que devido a curta meia-vida limita a eficácia como medicamentos de manutenção da DPOC. Visto isso, um volume de evidência publicadas apoiam o papel de β_2 -agonistas de longa duração (LABAs) no tratamento da DPOC. Atualmente LABAs,

como formoterol (4) e salmeterol (5), têm se mostrado eficazes na dilatação das vias aéreas, diminuindo a dispneia e a frequência de exacerbações da doença (CAZZOLA, 2014).

No tratamento do asmático, os LABAs estão indicados quando não há resposta adequada ao tratamento com corticosteroides inalatórios, e a associação LABA-corticosteroide sistêmico se faz necessária para aqueles pacientes cronicamente sintomáticos (GROSS, 2004).

Há ainda uma classe de β_2 -agonista denominada de ultralonga duração (ultra-LABA) – indacaterol (6), olodaterol (7) - cujo efeito broncodilatador tem início em poucos minutos e permanece por 24h (FDA, 2015).

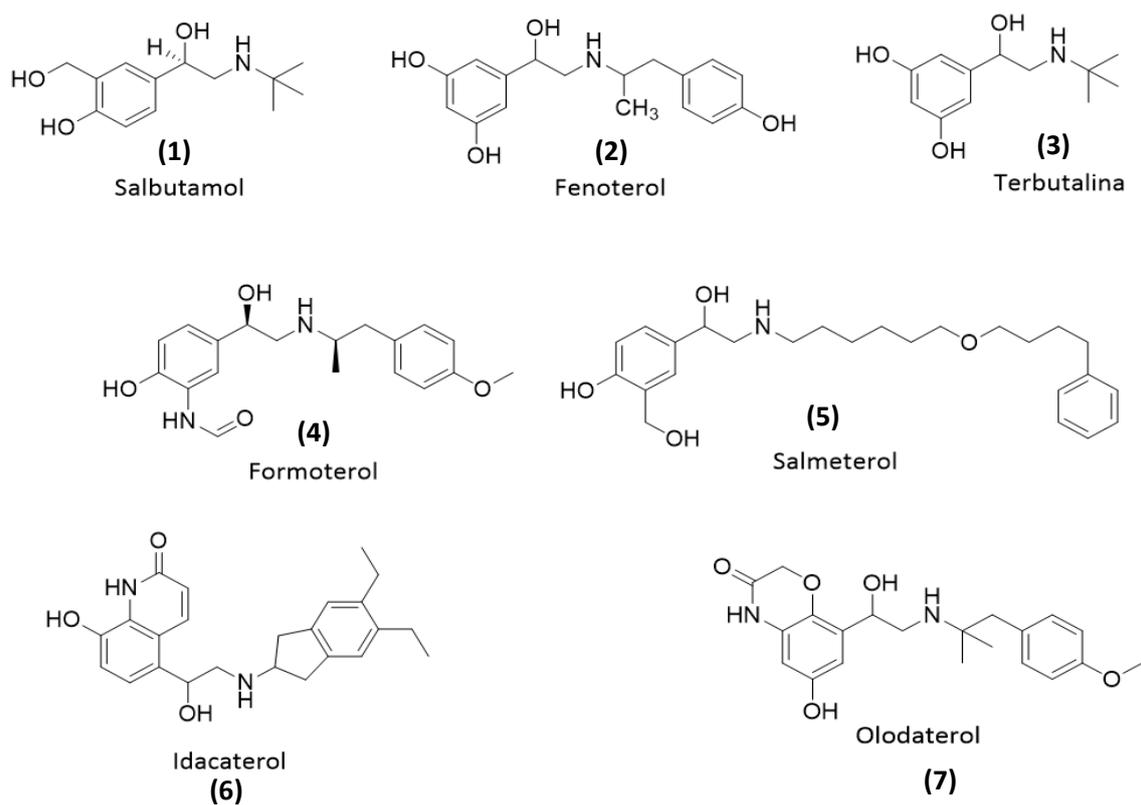


Figura 12. Agonistas β_2 – adrenérgicos

1.4.1.1.1. Mecanismo de Ação dos agonistas β_2

A ação broncodilatadora dos β_2 - agonistas se dá através da ativação do receptor β_2 -adrenérgico (β_2 AR) acoplado à proteína G na superfície celular. A ativação desse receptor leva ao aumento da atividade da adenilato ciclase, enzima que catalisa a conversão do ATP em AMPc. Esse último se liga a unidade regulatória da proteína quinase A, promovendo a liberação de sua unidade catalítica que causa fosforilação de um grande número de proteínas alvo, relaxando o músculo liso peribrônquico (Figura 12). O AMPc inibe a liberação de cálcio dos depósitos intracelulares e reduz o influxo de cálcio através da membrana, auxiliando o relaxamento da musculatura lisa e a broncodilatação. A ativação do β_2 AR também potencializa a atividade anti-inflamatória dos glicocorticosteroides, aumentando a translocação do receptor de glicocorticoesteroide do citoplasma para o núcleo da célula (CAMPOS, 2012).

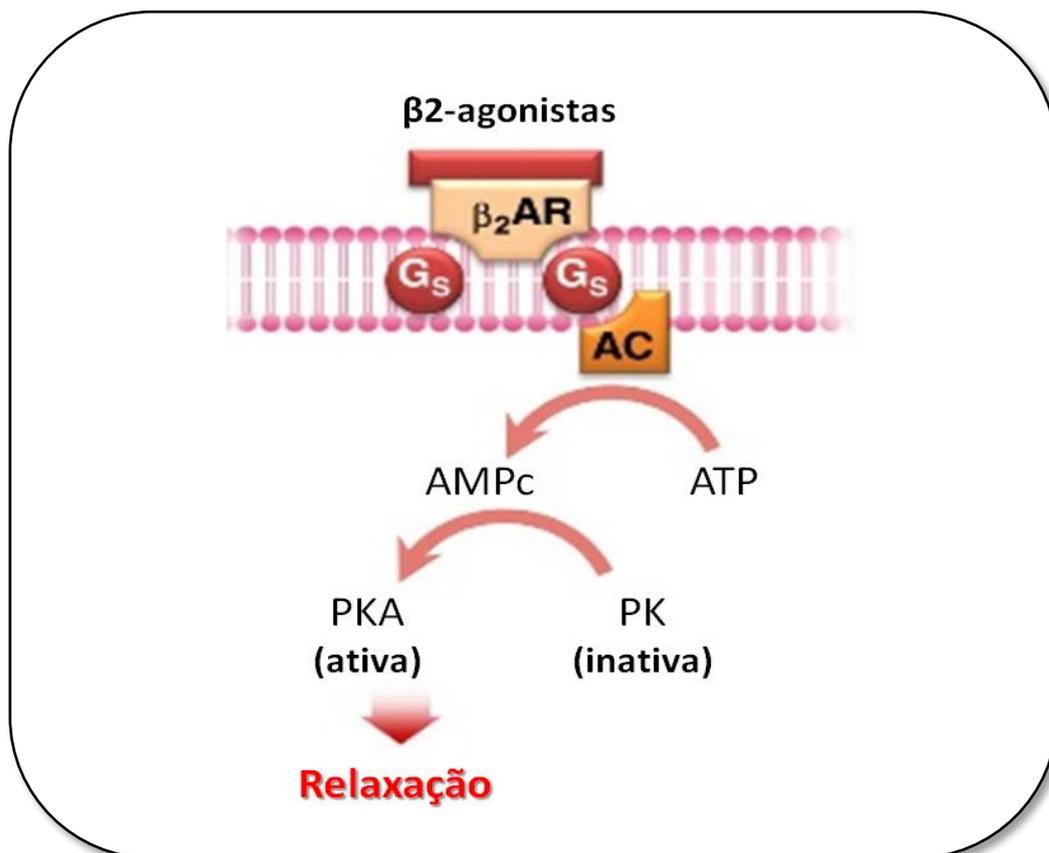


Figura 13. Mecanismo de ação dos agonistas β_2 -adrenérgicos na relaxação da musculatura lisa.

1.4.2. Derivados da Xantina

As metilxantinas são broncodilatadores efetivos, dotadas de propriedades anti-inflamatórias, administradas pela via oral, com velocidade de início de ação e tempo de duração de seus efeitos razoáveis. No século XVIII o uso clínico das metilxantinas – aminofilina (8) e teofilina (9) - no tratamento da asma passou a ser estudado, já que eram os medicamentos mais prescritos para asmáticos em todo o mundo (MITRA et al, 2005).

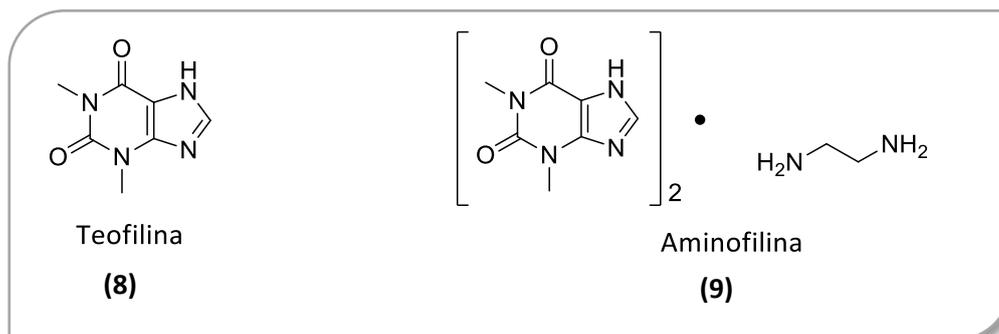


Figura 14. Derivados da Xantina

Entretanto, com o desenvolvimento de novos fármacos broncodilatadores mais potentes e seguros, particularmente os β 2-agonistas, a utilização das metilxantinas foi reduzida. Seu emprego associado aos β 2-agonistas ou aos anticolinérgicos em doses plenas promove um efeito broncodilatador adicional e pode estar ligado a eventos adversos como náuseas, vômitos, dor abdominal, cefaleia, tremores e arritmias (WALLACK, et al, 2001).

Atualmente, as metilxantinas são recomendadas para aqueles asmáticos que não atingem o controle com o emprego regular de corticosteroides e β 2-agonistas inalatórios de ação prolongada (MASTBERGEN *et al*, 2012).

Diversos mecanismos moleculares foram propostos para explicar a ação broncodilatadora das xantinas. Os mecanismos ligados à relaxação incluiriam inibição de fosfodiesterases, antagonismo do receptor de adenosina, estímulo da liberação de catecolamina e elevação do nível intracelular de cálcio. Porém os mecanismos relacionados aos efeitos anti-inflamatórios ainda não estão claros; é provável que envolvam, entre outros, a ativação da histona deacetilase no epitélio da via aérea, suprimindo a produção de mediadores inflamatórios tanto pelas células estruturais como pelas células inflamatórias infiltrantes (BANNER, 2009).

O ponto negativo das xantinas reside na proximidade entre as doses terapêuticas e as tóxicas, além da faixa terapêutica ser estreita oferecendo riscos potenciais. O papel imunomodulador e o sinergismo com os corticosteroides fazem com que esta classe seja mantida no arsenal medicamentoso da asma e DPOC, em adultos, tendo valor em situações particulares (WEINBERGER, 1996).

1.4.3. Antagonistas Muscarínicos

Agentes antimuscarínicos ou anticolinérgicos são usados no tratamento da asma e da DPOC, pois inibem a broncoconstrição induzida pelo nervo colinérgico mediada pelo sistema motor parassimpático regulador do tônus broncomotor (LAPPERRE, 2010).

No sistema motor parassimpático regulador da musculatura lisa dos brônquios, a estimulação dos receptores M1 e M3 media o efeito broncoconstritor, enquanto a estimulação do receptor M2 antagoniza esse efeito, inibindo a liberação de acetilcolina (Figura 13). Assim, um medicamento antimuscarínico ideal para o tratamento da asma seria o antagonismo dos receptores M1 e M3, sem agir sobre o M2 (MAK, 2012).

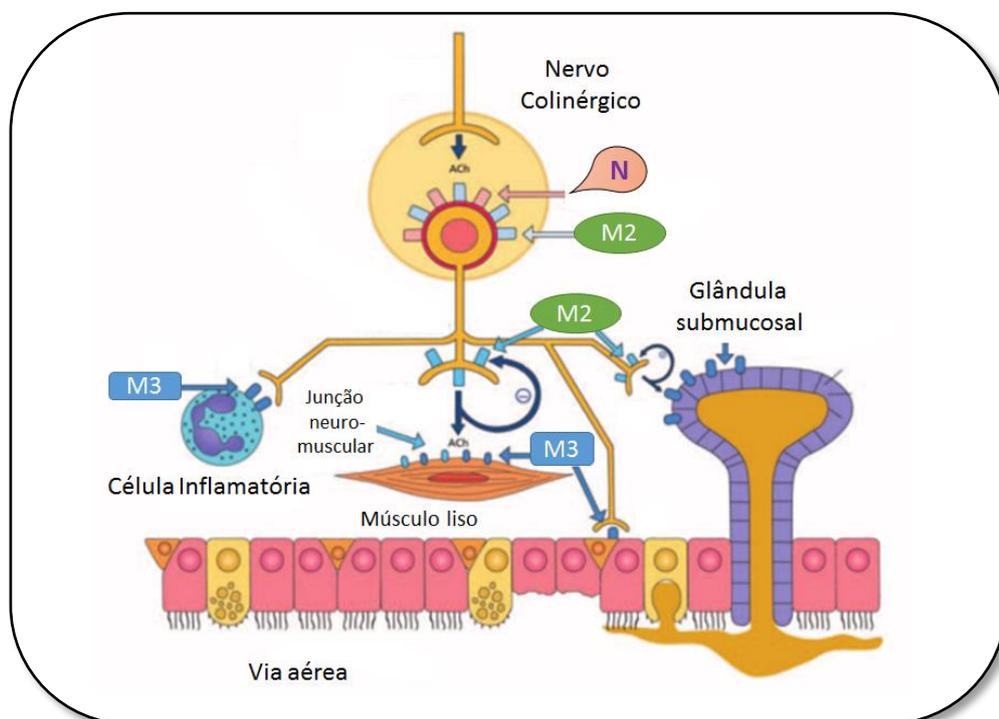


Figura 15. Controle colinérgico das vias aéreas pelo sistema nervoso parassimpático. ACh: acetilcolina; Mx: receptores muscarínicos; N: receptor nicotínico.

Os antagonistas muscarínicos, ou anticolinérgicos inalatórios, usados no tratamento do asmático são os brometos de ipratrópio (11) e de tiotrópio (13) e têm poucos efeitos colaterais, que incluem boca seca, retenção urinária e cefaleia. A crescente evidência da importância de broncodilatadores anti-muscarínicos de longa duração (LAMAs), como o brometo de tiotrópio na terapia de manutenção da DPOC tem estimulado novas pesquisas para identificação de novos LAMAs, com um potencial melhoramento do perfil risco benefício em comparação com LAMAs atuais. Ultra-LAMAs são atualmente o melhor tratamento disponível para a DPOC, tais como brometo de glicopirronio (11) e aclidínio (12) que possuem rápido início de ação, longa duração e são mais seletivos aos receptores M3 em comparação com os receptores M2 (KODGULE, 2012).

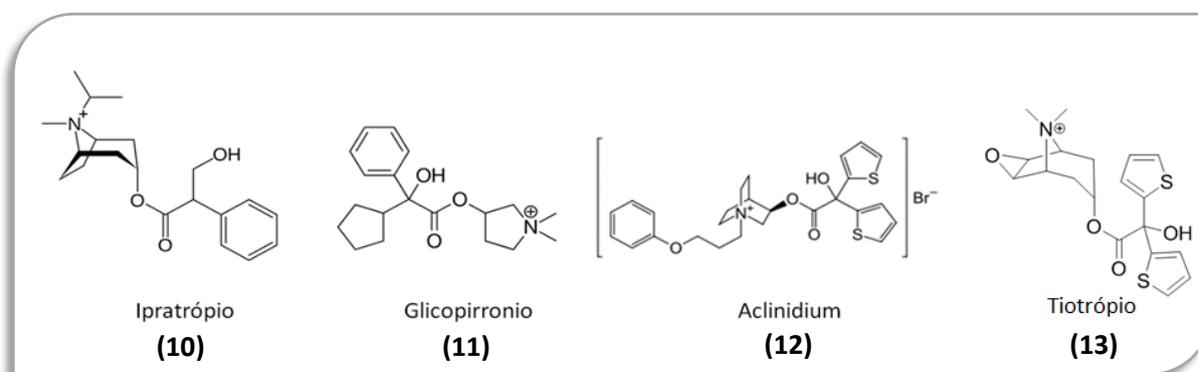


Figura 16. Antagonistas muscarínicos

Recentemente tem sido mostrado que estes agentes anti-muscarínicos não só têm um melhor e sustentado efeito broncodilatador como também possuem propriedades anti-inflamatórias. Aparentemente, os LAMAs reduzem a taxa de exacerbação em doentes com DPOC e, desta forma, apresentam o potencial para conter parcialmente o progresso da doença e reduzir a taxa de mortalidade (BARJAKTAREVIC *et al*, 2015).

Os antagonistas colinérgicos não são particularmente eficientes contra estímulos por alérgenos, mas inibem o aumento da secreção de muco que ocorre na asma, aumentam a depuração mucociliar das secreções brônquicas e podem ser usados juntamente com agonistas β_2 - adrenérgicos (RANG & DALE, 2007).

1.5. A Fosfodiesterase IV como alvo na inflamação

As fosfodiesterases (PDEs) de nucleotídeos cíclicos foram descritas pela primeira vez em 1962 pelo Dr. Earl Sutherland e seus colaboradores logo após a descoberta do 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) em 1958. Atualmente, entende-se que estas enzimas desempenham um papel crítico na regulação indireta da sinalização de diversas vias do metabolismo intracelular.

As PDEs são descritas na literatura como uma classe enzimática capaz de promover a hidrólise seletiva de ligações fosfodiéster de substratos específicos como o AMPc e o 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Estes atuam como segundos mensageiros em diversas vias de sinalização celular (SUTHERLAND & RALL, 1958). Embora todas as PDEs catalisem a hidrólise de AMPc e/ou GMPc, estas enzimas diferem nas suas propriedades bioquímicas e farmacológicas e apresentam diferentes afinidades para vários inibidores.

A enzima fosfodiesterase tipo IV (PDE4) é uma isoforma dentre o grupo de onze fosfodiesterases conhecidas atualmente, sendo responsável pela manutenção dos níveis citoplasmáticos de AMPc nas células musculares lisas, inflamatórias e imunitárias - macrófagos, eosinófilos e neutrófilos (GURNEY *et al*, 2015).

A PDE4 mantém o controle sobre a inflamação através da hidrólise do AMPc (14) transformando-o em 3',5'-monofosfato de adenosina (AMP) (15), estabelecendo-se regulação da resposta inflamatória (Figura 14). É sabido que um nível elevado de AMPc pode inibir alguns processos inflamatórios, assim como altos níveis de AMP levam a eventos inflamatórios.

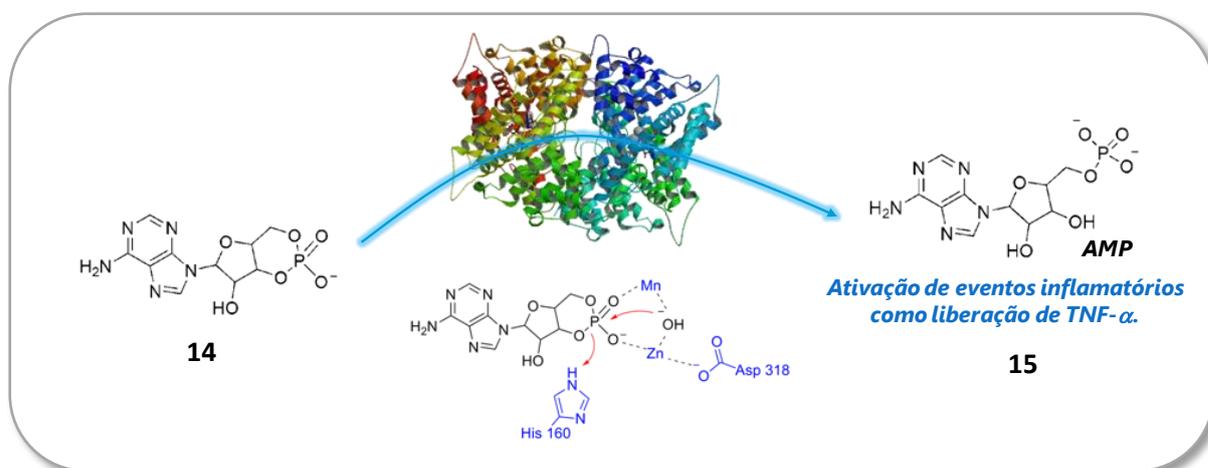


Figura 17: Função bioquímica da PDE4 na conversão do AMPc ao AMP.

A PDE4 é encontrada altamente expressa no tecido muscular das vias aéreas. Supõe-se que existam pelo menos quatro tipos de PDE4: A, B, C e D, derivados de quatro genes. Estes quatro genes codificam mais de 16 isoformas de PDE4, as quais podem ser divididas em curtas (~65–75 kDa) e longas formas (~80–130 kDa). A diferença entre as formas curta e longa reside na região *N*-terminal. Cada PDE4 possui distribuição e função própria dependendo do tecido onde se encontra (Tabela 2) (GIEMBYCZ et al, 2014).

Tabela 2. Expressão das PDEs4 em diferentes células do nosso organismo

Tipo de Célula	PDE Predominante
Células Inflamatórias	
Mastócito	4-D
Macrófago	4-D
Monócito	4-B
Eosinófilo	4-D
Neutrófilo	4-B
Linfócito T	4-D
Célula endotelial	4-A
Nervo sensorial	4-C
Célula epitelial das vias aéreas	4-C
Músculo Liso	
Músculo Liso das Vias Aéreas	4-D

Estudos comprovam que a enzima PDE4 é um alvo na terapêutica de uma gama de condições patológicas como a DPOC, asma, diabetes, doença de Huntington, e várias outras desordens inflamatórias (Figura 15). O maior enfoque para a inibição da PDE4 está voltado para o tratamento da DPOC devido à grande necessidade de se descobrir novos fármacos broncodilatadores mais eficazes que os existentes na terapia atual. Roflumilast (18) é um fármaco pertencente a esta classe - inibidores de fosfodiesterase do tipo 4 - no tratamento de DPOC, e também mostrou resultados significativos no tratamento de pacientes asmáticos. Porém, comumente são associados a esta classe

efeitos colaterais, direcionando pesquisas para o desenvolvimento de inibidores que minimizem os efeitos secundários (PARIKH, 2016).

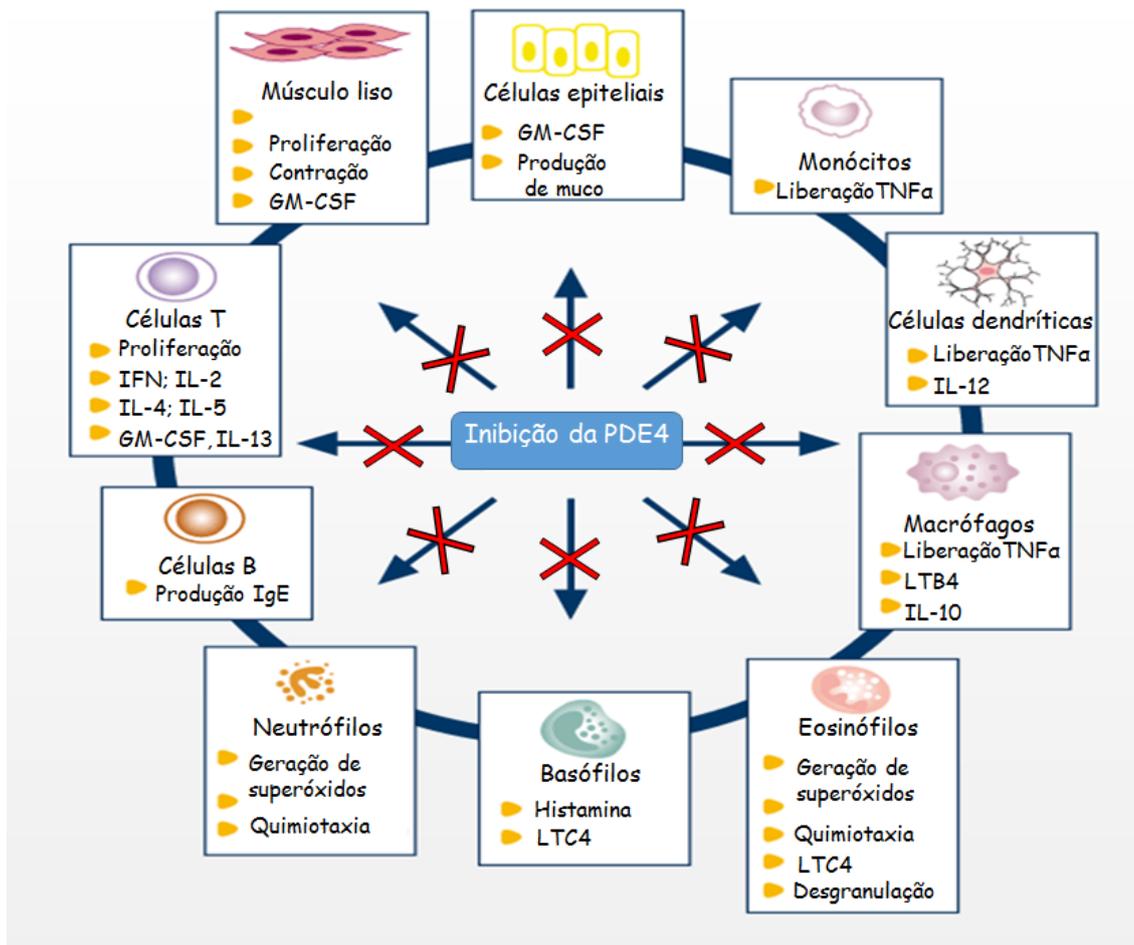


Figura 18. Cascata de eventos suprimidos pela inibição da PDE4.

1.5.1. Inibidores de primeira geração da PDE4

A teofilina (8) foi o primeiro inibidor de PDEs a ser utilizado na terapêutica. No entanto, este composto é pouco potente e pouco seletivo entre as diferentes isoformas de PDEs, além de apresentar estreita janela terapêutica e efeitos colaterais, limitando seu uso na terapia (de AZEVEDO, 2014).

O rolipram (16) foi preconcebido nos anos 1990 como candidato a fármaco anti-depressivo, porém descontinuado após a descoberta da sua estreita janela terapêutica (ZHU et al, 2001).

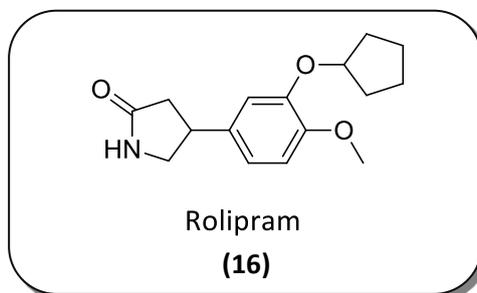
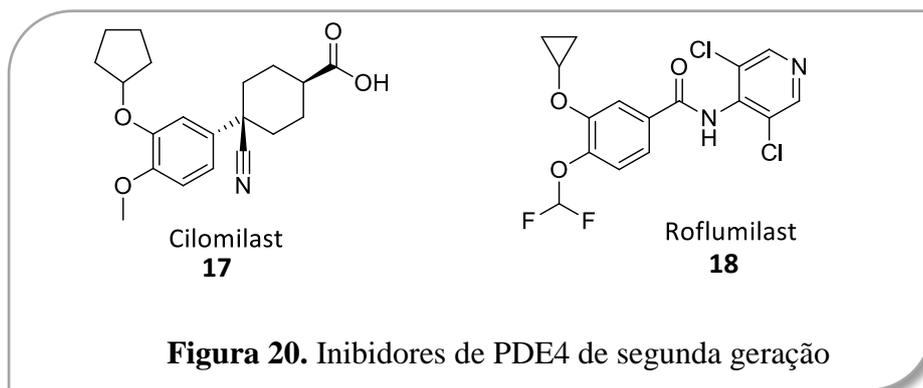


Figura 19. Rolipram – Inibidor de primeira geração de PDE4.

Nos estudos pré-clínicos frente a PDE4 demonstrou incrível atividade em células inflamatórias, tornando-se o primeiro agente seletivo para a PDE4. No entanto, os efeitos secundários associados ao rolipram eram significativos tais como êmese, náuseas e aumento da secreção gastrointestinal causado pela inibição de isoformas de PDE4 presentes no sistema nervoso central e nas glândulas parietais. Esses resultados exigiram o desenvolvimento de inibidores com uma razão terapêutica melhorada (VIGNOLA, 2003).

1.5.2. Inibidores de segunda geração da PDE4

Os inibidores seletivos de PDE4 clinicamente mais avançados, cilomilast (17) e roflumilast (18), tem menos efeitos colaterais que a teofilina e os outros compostos de primeira geração. Esses compostos foram pensados sabendo-se que existem, pelo menos, duas isoformas bem distintas de PDEs4: as encontradas predominantemente no sistema nervoso central e nas glândulas gástricas (HPDE4), e as encontradas predominantemente em células imunológicas (LPDE4). Ao contrário do rolipram que possui maior afinidade com as HPDE4, os inibidores de segunda geração foram elaborados para agir sobre as LPDE4 (TORPHY, 1999).



De fato, os inibidores de PDE4 de segunda geração apresentaram pronunciados efeitos anti-inflamatórios. Cilomilast e Roflumilast inibem a atividade de células responsáveis pela agudização da DPOC como os neutrófilos, macrófagos, monócitos, células T CD4, células epiteliais e fibroblastos. Outros efeitos incluem a diminuição da quimiotaxia e modulação de mediadores inflamatórios como TNF- α e interleucinas. Além disso o roflumilast se mostra ainda mais eficaz que o cilomilast, pois estimula menos a secreção gastrointestinal (PROFITA *et al*, 2003).

Apesar de sua ação seletiva sobre as LPDE4 os inibidores de segunda geração como o roflumilast não mostram seletividade entre as outras PDEs4 desta classe, com exceção da PDE4C. O cilomilast é mais seletivo para a isoforma PDE4D, porém possui efeitos colaterais ligeiramente mais pronunciados que o roflumilast. Estes fármacos ainda causam êmese, porém foram liberados para uso clínico em 2011 devido à falta de tratamentos efetivos para a DPOC.

Acredita-se que as desejáveis propriedades anti-inflamatórias e as indesejáveis reações secundárias (náuseas e vômitos), embora apareçam num mesmo quadro simultaneamente, estão associadas a atividades bioquímicas distintas. Testes em camundongos deficientes em PDE4B ou PDE4D demonstraram que a inibição seletiva da PDE4D leva ao quadro de náuseas e êmese. Este fato é considerado ruim, pois os inibidores de PDE4 clinicamente avançados possuem grande afinidade pelas diferentes PDEs4D (GIEMBYCZ *et al*, 2014).

Além do tratamento da DPOC, tem sido proposto que os inibidores da PDE4 podem ser úteis no tratamento de doenças intestinais, fibrose cística, hipertensão arterial pulmonar, mielóides e linfóides, doença de Alzheimer, artrite reumatóide e esclerose

múltipla, infecção induzida pelo trabalho de parto prematuro, psoríase, depressão e doenças alérgicas (RICCIARELLI, 2015; de AZEVEDO, 2014).

Desta forma, a pesquisa por novos inibidores da PDE4 de maior eficácia clínica é um campo bastante vasto e alvo de pesquisa de vários grupos pelo mundo, inclusive objetivo desta dissertação, devido à grande aplicabilidade desta classe de compostos no tratamento de quadros inflamatórios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

No contexto de um programa de desenvolvimento de compostos anti-inflamatórios que visam um tratamento mais eficaz para a DPOC, este trabalho tem como objetivo geral a síntese e caracterização estrutural de novos ácidos (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos substituídos, planejados como inibidores da fosfodiesterase 4, e avaliar suas atividades frente a esta enzima em modelos teóricos de *docking* molecular.

2.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar novos ácidos (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos substituídos;
- Caracterizar por métodos físicos (ponto de fusão) e espectroscópicos, como infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ^1H e ^{13}C) os produtos sintetizados;
- Avaliar a atividade biológica dos novos compostos frente a PDE4 em modelos teóricos de *docking* molecular e *in vitro* de inibição enzimática;

2.3. Planejamento Estrutural

O planejamento da série de ácidos (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos como possíveis inibidores de PDE4 foi baseado no conhecimento estrutural desta enzima e das interações que o substrato (AMPc) realiza com seu sítio catalítico, e na estrutura de fármacos da segunda geração de inibidores desta enzima como cilomilast e roflumilast.

Estudos de cristalografia de raios-X feitos com a isoforma PDE4B demonstraram que a estrutura do sítio ativo desta enzima é formada por uma reentrância profunda presente no domínio catalítico da enzima, ficando voltado diretamente para face externa

e exposto ao solvente. Este sítio é dividido em três regiões (M, Q e S, Figura 21) com funções e características físico-químicas distintas:

A primeira (M) é formada pelo centro metálico composto de íons divalentes, no qual está presente o Zn^{+2} (coordenado com resíduos de histidina e aspartato, além de duas moléculas de água) e o íon Mg^{+2} (coordenado com o mesmo resíduo de aspartato que interage o Zn^{+2} e mais cinco moléculas de água). Esta região é a responsável pela hidrólise da ligação fosfodiéster do substrato AMPc (Figura 21 e 22).

A segunda região (Q) possui uma cavidade hidrofóbica com resíduos de aminoácidos apolares, como isoleucina (Ile336) e fenilalanina (Phe372), capazes de interagir por interações hidrofóbicas e do tipo $\pi-\pi$ *stacking*, respectivamente, com o anel planar purínico presente no AMPc (Figura 21). Nesta mesma região, encontra-se ainda o resíduo de glutamina (Gln369) que é responsável por uma importante interação com os nitrogênios da adenosina através de ligações de hidrogênio.

A terceira região (S) possui uma cavidade hidrofílica constituída essencialmente de resíduos de aminoácidos hidrofílicos e preenchida com uma rede de moléculas de água (Figura 21) (de AZEVEDO, 2014).

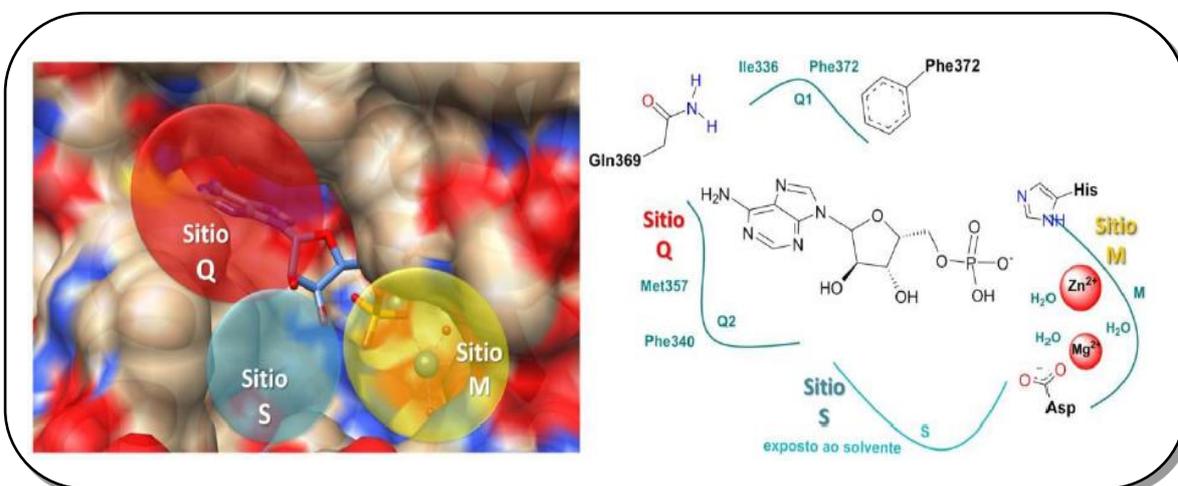


Figura 21. Domínio catalítico da PDE4 com o AMP. Subdomínios destacados em verde, para o subdomínio S, em amarelo, para o subdomínio M, e em vermelho para o subdomínio Q.

A hidrólise do AMPc ocorre, principalmente, por conta das interações desta molécula com os resíduos de aminoácidos presentes nos subdomínios Q e M. No sítio Q ocorre o reconhecimento do núcleo adenosina presente na estrutura do substrato, e no sítio M ocorre a reação de hidrólise propriamente dita. Neste, os átomos de oxigênio presentes na estrutura do substrato interagem com os íons Zn^{+2} e Mg^{+2} , que atuam como ácidos de Lewis (Figura 17), tornando o átomo de fósforo mais eletrofílico e suscetível ao ataque do grupo hidroxila, gerado pela desprotonação de uma molécula de água coordenada nesta região (Figura 22). (de AZEVEDO, 2014)

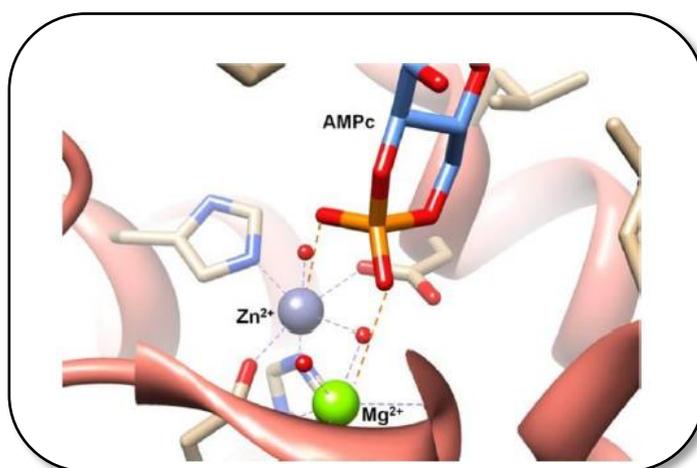


Figura 22. Modelo de interação que leva à hidrólise (de AZEVEDO, 2014).

Devido a esta importância dos sítios Q e M, um bom inibidor da PDE4 deve interagir com estes dois sítios ao mesmo tempo. Como característica estrutural importante para esta atividade farmacológica e que está presente nos inibidores de segunda geração, têm-se os grupos ácido carboxílico, no cilomilast, e 4-piridinila, no roflumilast, que são capazes de interagir por lig-H com moléculas de água e indiretamente com o sítio metálico. Adicionalmente, grupos 3,4-dialcoxifenila são encontrados nestes inibidores, por mimetizar as interações que a adenina faz com a Gln369 e Phe372, sendo os principais farmacóforos destes inibidores de PDE4.

Desta forma, dada a experiência do grupo no uso de azalactonas, vislumbrou-se que seus produtos de hidrólise, os ácidos (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos, poderiam apresentar requisitos estruturais farmacofóricos semelhantes aos iPDE4 (Figura 23). Neste planejamento, imaginou-se a síntese de duas séries análogas, onde em uma o

farmacóforo 3,4-dimetoxifenila estaria ligado em Ar₁ e na outra em Ar₂. Como pode-se perceber pela Figura 18, as distâncias entre o farmacóforo 3,4-dimetoxifenila e o grupo capaz de interagir com as águas do sítio metálico, das duas séries, se assemelham bastante às mesmas dos fármacos de referência cilomilast e roflumilast. Adicionalmente, os grupos hidrofóbicos e doadores/aceptores de lig-H também se encontram em regiões semelhantes. Os substituintes em X foram escolhidos de modo a variar as propriedades físico – químicas dos compostos (X = 4-OCH₃; 4-Cl; 4-Br; 3,4-OCH₃; 4-H), explorando outras possíveis interações com a cavidade enzimática ou até mesmo reforçar as interações intermoleculares que a molécula faz com a parte enzimática que fica exposta ao solvente (Figura 23).

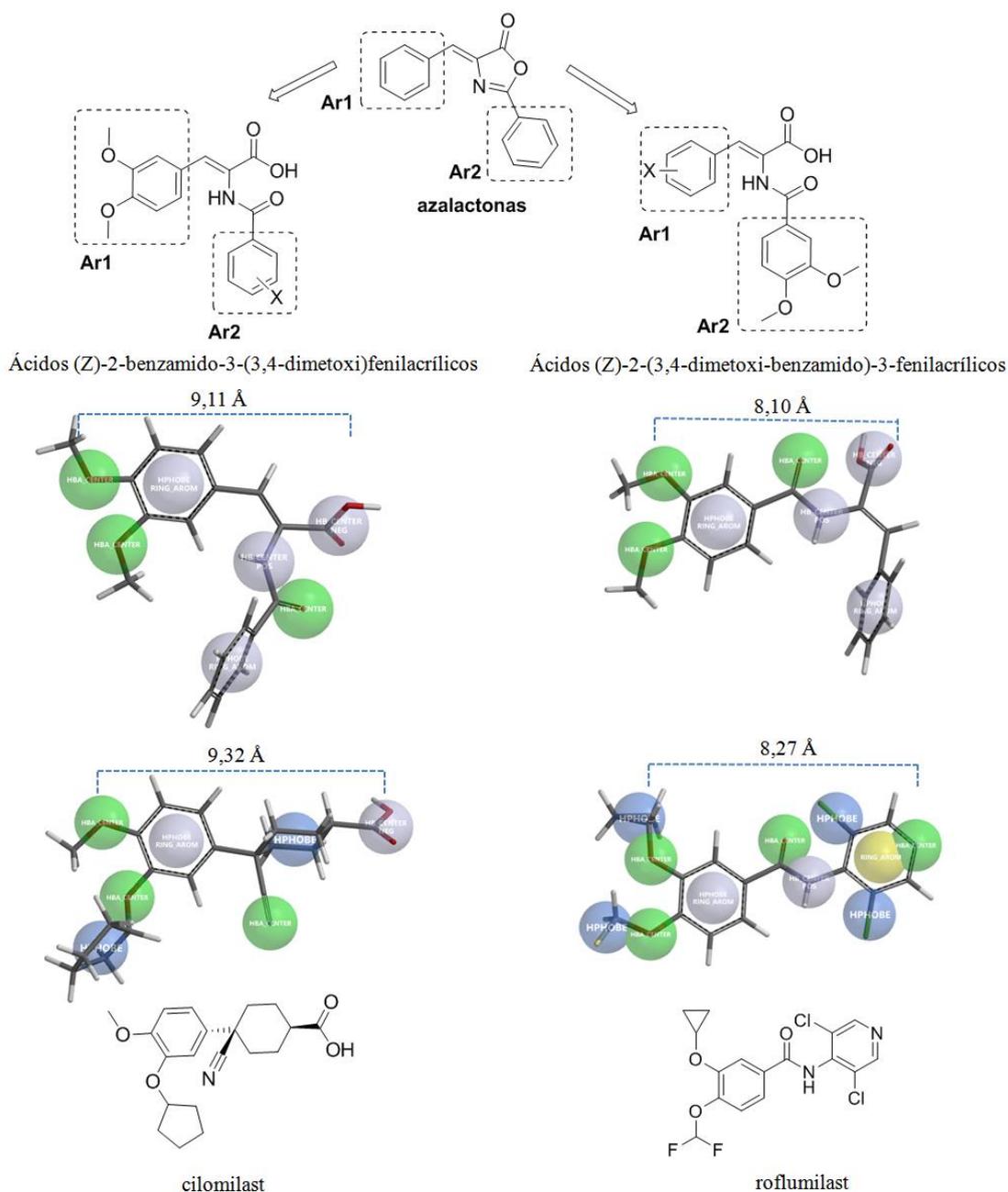


Figura 23. Planejamento e similaridade estrutural dos ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos comparados aos inibidores de segunda geração cilomilast e roflumilast.

A inserção de uma das séries dos compostos planejados sobre um modelo topográfico da PDE-4 mostra que esses compostos podem interagir de maneira semelhante ao cilomilast com os sítios Q e M (Figura 24).

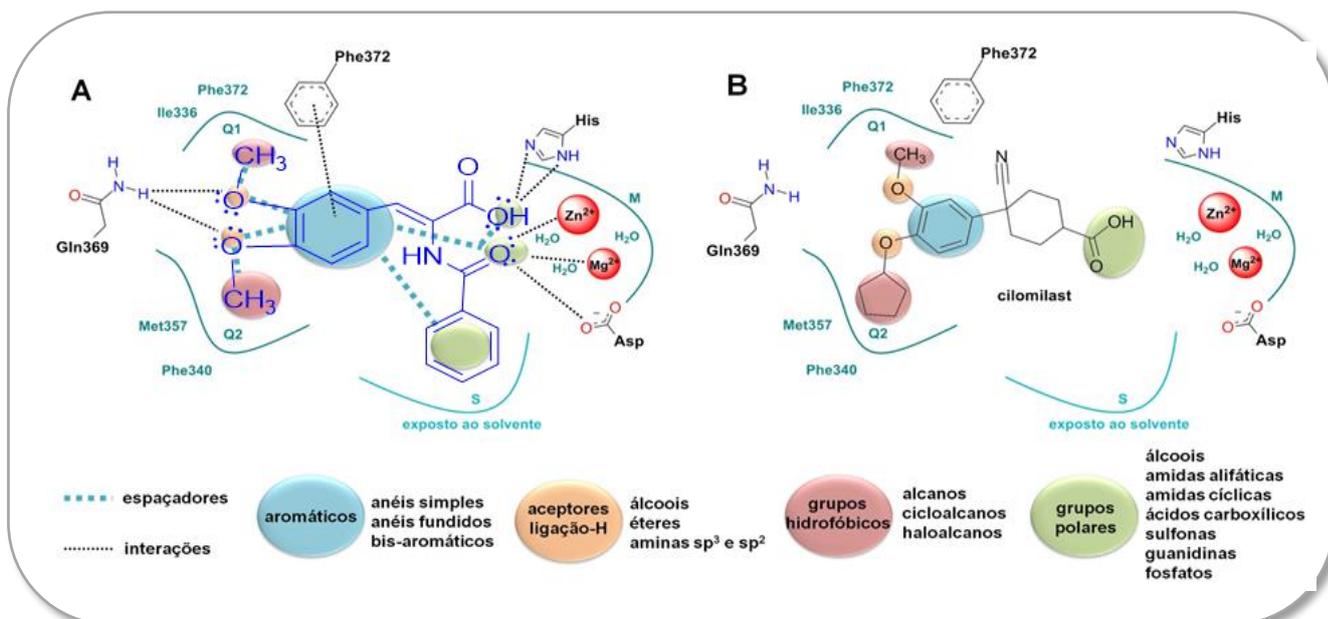
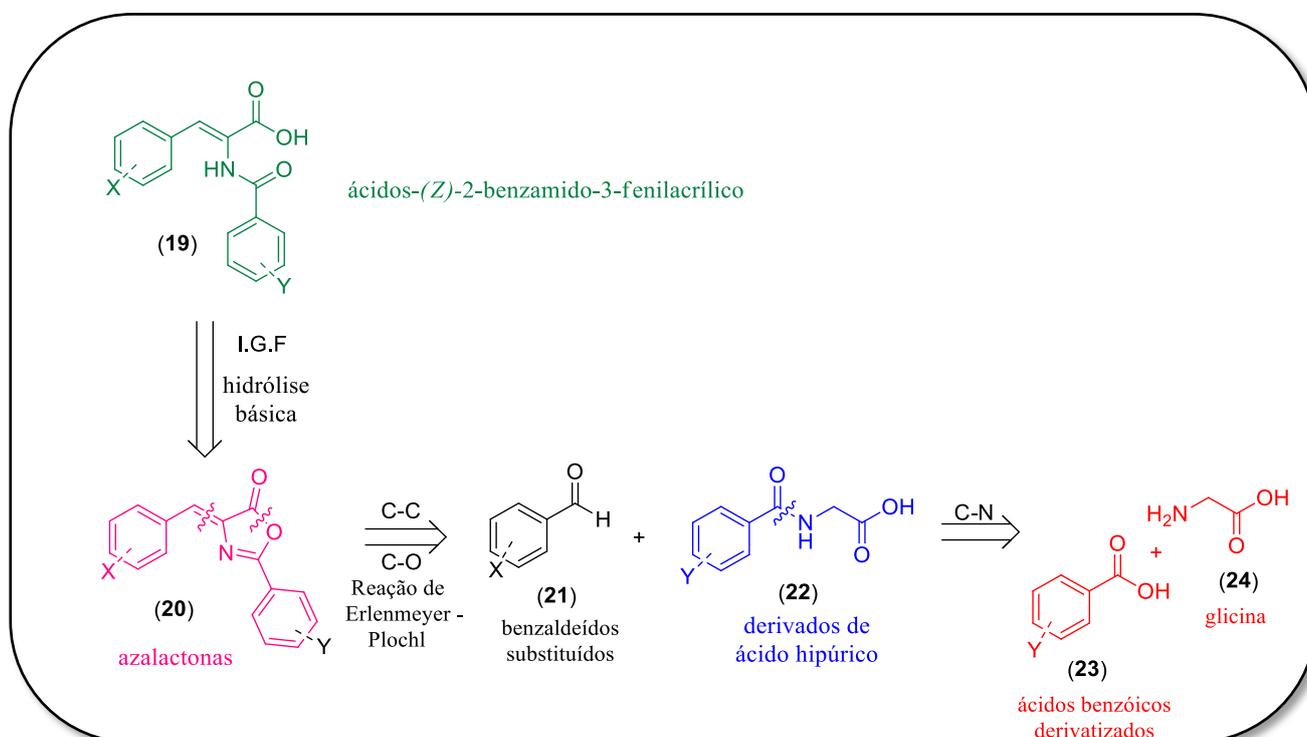


Figura 24. Inserção de uma das séries planejadas de ácidos (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (esquerda) e do cilomilast (direita) em modelo topográfico de PDE4.

3. RESULTADOS e DISCUSSÕES

3.1. Análise retrossintética

A retróssíntese é o raciocínio que se utiliza para visualizar, em sentido contrário a partir da molécula alvo, intermediários progressivamente mais simples, por meios de desconexões e/ou interconversões de grupos funcionais, que correspondam a reações conhecidas e que mostrem o material de partida adequado para a síntese. A análise retróssintética que permite visualizar a formação dos compostos planejados neste trabalho se encontra no Esquema 1.



onde X podem ser: 3,4-dimetóxi, 4-metóxi, 4-cloro, 4-bromo, 4-hidrogênio.

Y podem ser: 4-hidrogênio, 4-cloro, 3,4-dimetóxi.

Esquema 1. Análise retróssintética dos novos ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.

Para criar uma rota sintética capaz de produzir de maneira eficiente novos derivados de ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos, teve-se como ponto de partida derivados de ácido benzóico e o aminoácido glicina.

Porém o derivado de ácido benzóico que originará os produtos derivado do ácido hipúrico deverá ser transformado num bom eletrófilo capaz de sofrer o ataque nucleofílico da glicina, e por isso, seguindo a metodologia descrita em ANDRADE *et al* (2013), chegou-se aos intermediários succinimídicos, que por sua vez possuem um sítio extremamente eletrofílico capaz de sofrer o ataque da glicina liberando um bom grupo abandonador.

Após a formação dos derivados do ácido hipúrico, este reage com um benzaldeído substituído gerando a azalactona correspondente via reação de Erlenmayer – Plöchl. Os benzaldeídos substituídos podem ser obtidos comercialmente, porém os derivados do ácido hipúricos tiveram que ser sintetizados.

O terceiro passo da síntese envolve uma simples reação de hidrólise em meio básico, uma vez que o carbono carbonílico da azalactona está extremamente deficiente em elétrons e susceptível a um ataque nucleofílico.

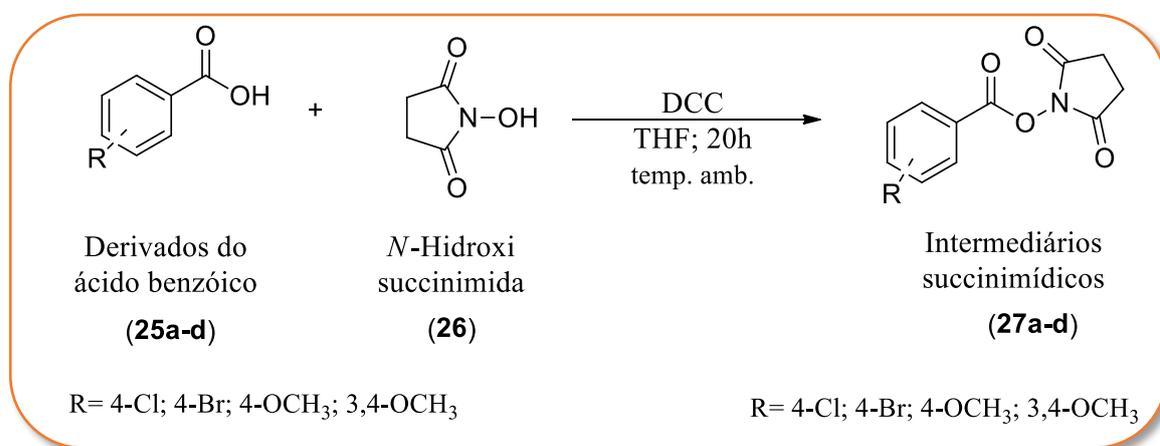
A partir da interconversão de grupos funcionais do ácido (*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (19), pôde-se determinar as azalactonas funcionalizadas (20) como precursoras diretas através de simples reações de hidrólise. Por sua vez, através de duas desconexões, uma C-C e outra C-N, foi possível identificar que as azalactonas (20) podem ser originadas via reação de Erlenmeyer – Plöchl a partir de benzaldeídos (21) e ácidos hipúricos derivatizados (22). Aldeídos são produtos comerciais de fácil acesso, especialmente com os substituintes aqui propostos neste trabalho, *i.e.* 3,4-dimetoxila; 4-metoxila, 4-cloro, 4-bromo e sem qualquer substituinte. Entretanto, os ácidos hipúricos não são de fácil acesso, além do alto valor comercial, e por isso precisam ser sintetizados. Por uma simples desconexão C-N percebe-se que os ácidos hipúricos podem ser sintetizados a partir de ácidos carboxílicos derivatizados (23) e glicina (24), através de uma reação de Substituição Nucleofílica Acíclica (S_NAc). Há de se destacar, porém, que os derivados ácidos benzoicos (23) de partida necessitam ser transformados em bons eletrófilos, e para tal, seguindo a metodologia descrita em ANDRADE e colaboradores (2013), optou-se pela ativação da carbonila através da síntese de intermediários succinimídicos.

3.2. Síntese e determinação estrutural dos Intermediários succinimídicos (27)

Como descrito acima, a síntese dos ácidos hipúricos necessitava passar por intermediários carbonílicos reativos frente a reações de S_NAc . Inicialmente foi pensada a transformação dos ácidos carboxílicos em cloretos de ácido. Entretanto, a dificuldade de se obter reagentes de cloração e a baixa estabilidade destes cloretos nos levaram a procurar uma alternativa. A opção mais viável passava pela transformação desses ácidos em derivados succinimídicos, através da clássica reação de acoplamento de peptídeos promovidas por DCC (*N,N'*-dicicloexilcarbodiimida) e *N*-hidróxi-succinimida (NHS), que são estáveis, de fácil manuseio e estocagem (TANG *et al.*, 1994). A partir deste protocolo (Esquema 2), foram sintetizadas 4 intermediários succinimídicos (27a-d) que, posteriormente, foram utilizadas para a síntese dos derivados de ácidos hipúricos (27a-d), em rendimentos que variaram de 79% a 93% após processo de purificação (Tabela 3).

Esta é uma reação de acoplamento de amidas, clássica e largamente utilizada na síntese de peptídeos e proteínas, em que o carbono N-terminal é frequentemente usado como ponto de ligação ao qual é adicionado os monômeros de aminoácidos. (PRI-BARA, 1997)

O uso do DCC tem como princípio aumentar a eletrofilicidade de um grupo do ácido carboxílico, transformando sua hidroxila em um bom grupo de saída. O DCC se liga temporariamente ao grupo carboxilato e imediatamente é substituído pela hidroxisuccinimida para formar um grupo altamente eletrofílico e mais susceptível a ataques de nucleófilos, como o grupo amino de aminoácidos, tal qual a glicina.

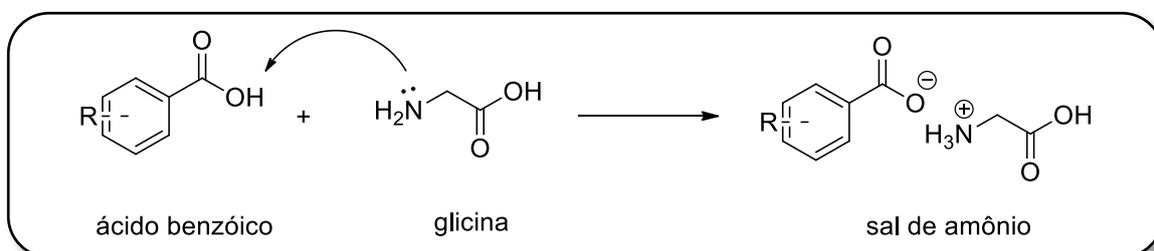


Esquema 2. Reação de obtenção dos intermediários succinimídicos (**27a-d**)

Tabela 3. Rendimentos e ponto de fusão dos intermediários succinimídicos (**27a-d**)

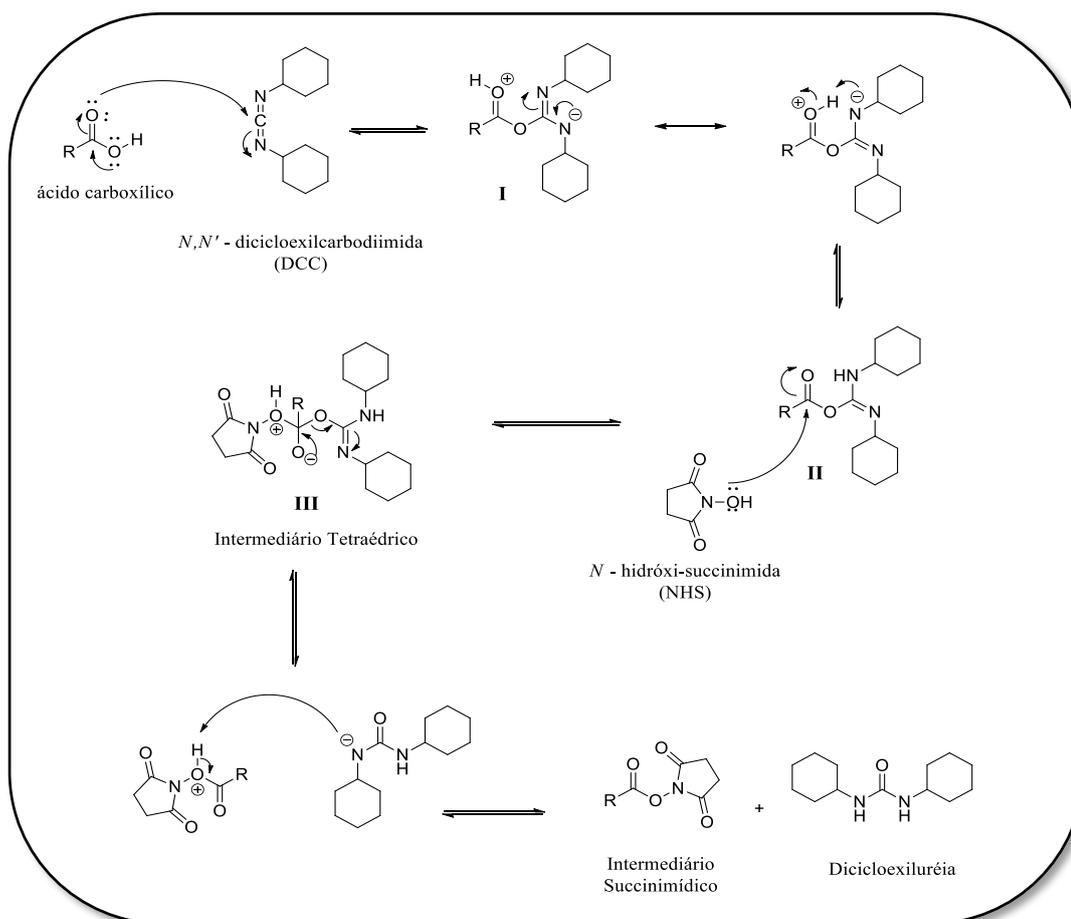
	R	Rendimento	p.f
27^a	4-Cl	93%	202 °C
27^b	4-Br	87%	212 °C
27^c	4-OCH ₃	79%	168 °C
27^d	3,4-(OCH ₃) ₂	80%	185 °C

Se não houvesse a pré-ativação do centro carboxílico, a formação da ligação amídica ficaria comprometida, visto que ao colocar em contato um ácido carboxílico com uma molécula que possui um nitrogênio altamente básico e livre para atacar, a reação preferencial seria a ácido-base, entre o ácido benzóico em questão e a glicina (Esquema 3), uma vez que o nitrogênio de um aminoácido é tão básico quanto nucleofílico, resultando na abstração de um próton do grupo carboxila ao invés de atacar o carbono carbonílico. Portanto, a passagem por um intermediário mais reativo, tal como os intermediários succinimídicos, torna-se necessária antes da reação principal que originará o derivado do ácido hipúrico (pseudopeptídeo).



Esquema 3: Representação da reação ácido-base entre derivados do ácido benzoico e grupos básicos como aminas.

O mecanismo desta reação é bem conhecido e descrito na literatura (LIMA, 2013) (Esquema 4). Inicialmente ocorre o ataque do par de elétrons livres da carboxila do derivado do ácido benzóico ao centro eletrofílico do DCC, formando o intermediário **I**, bipolar e carregado. Este refaz sua neutralidade eletrônica através da captura de um próton do grupo carboxila pelo nitrogênio carregado negativamente, reformando o par de elétrons livres do oxigênio carbonílico. Este intermediário **II**, sofre o ataque nucleofílico do oxigênio da NHS (*N*-hidróxisuccinimida), formando um intermediário tetraédrico **III**, bipolar e carregado. Finalmente o oxigênio que conecta o resíduo do DCC ao resíduo do intermediário succinimídico, puxa o par de elétrons para formar uma dupla ligação com o carbono diimídico, dando origem a um derivado de uréia negativamente carregado. Este derivado de uréia captura um próton do oxônio do intermediário succinimídico, formando a dicioexiluréia, que sai da reação como um precipitado branco insolúvel no solvente em questão, THF. Com isso, o intermediário succinimídico é liberado na reação ficando em solução, o qual pode ser retirado após a filtração do resíduo da dicioexiluréia e obtido após evaporação do solvente em rotaevaporador.



Esquema 4: Formação do intermediário succinimídico através do mecanismo de acoplamento de peptídeos via DCC.

Visando determinar a formação dos compostos (27a-d) foram realizadas análises de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . Como é possível observar na Figura 25, algumas características espectroscópicas comprovam a obtenção dos derivados desejados.

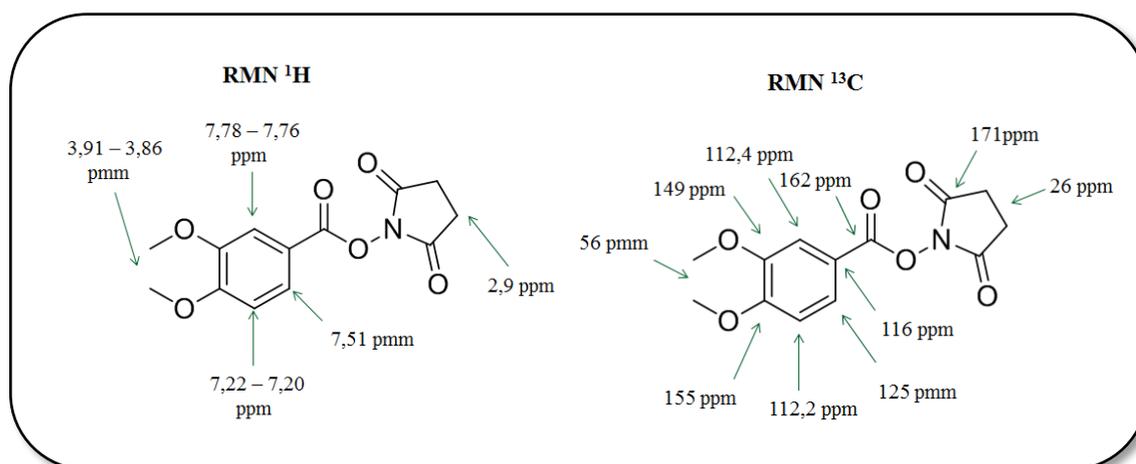


Figura 25. Exemplo de elucidação espectral do intermediário succinimídico 2,5-di-(oxo)-pirrolidil-1 3,4-dimetoxibenzóico (**27d**)

Nos espectros de RMN ^1H para o composto **27d** é possível observar um pico em torno de 2,90 ppm com integral igual a 4 e multiplicidade condizente com os hidrogênios metilênicos do anel succinimídico (Figura 26). Como estes picos não poderiam estar presentes nos ácidos carboxílicos de partida, os mesmos indicam a correta formação e servem como marcadores dos derivados desejados. Adicionalmente, os espectros de RMN ^{13}C revelam picos de carbono quaternário variando de 170,24 a 170,94 ppm, característicos e dentro da faixa do deslocamento químico de carbonilas amídicas, e outros típicos de carbonos secundários na faixa de 25,98 a 25,56 ppm oriundos dos carbonos metilênicos (Figura 27).

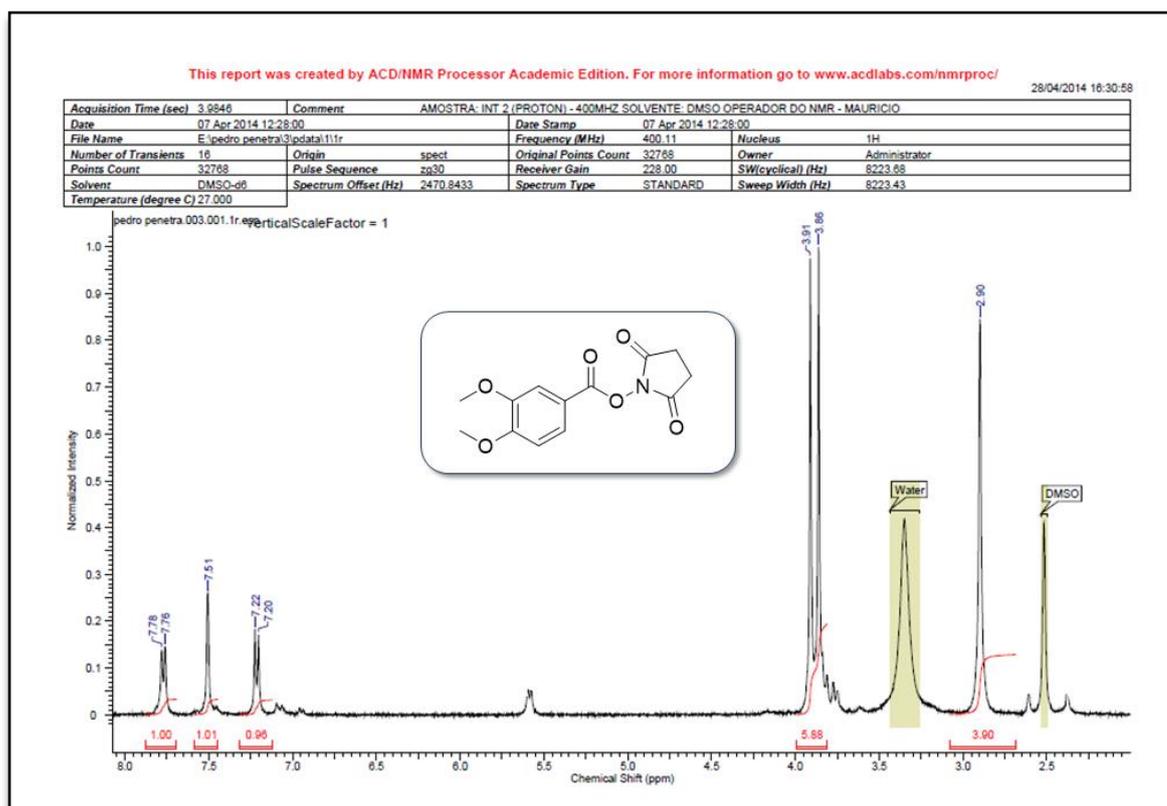


Figura 26. Espectro de RMN ¹H do intermediário succinimídico **27d**

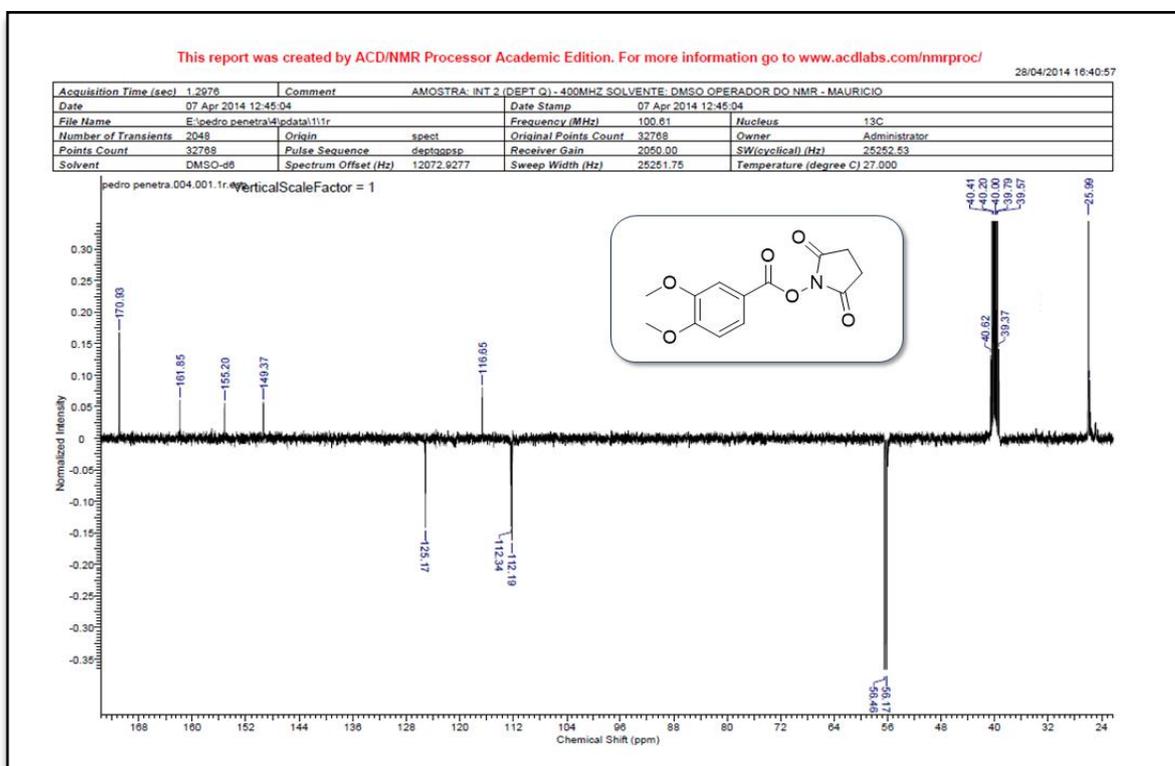
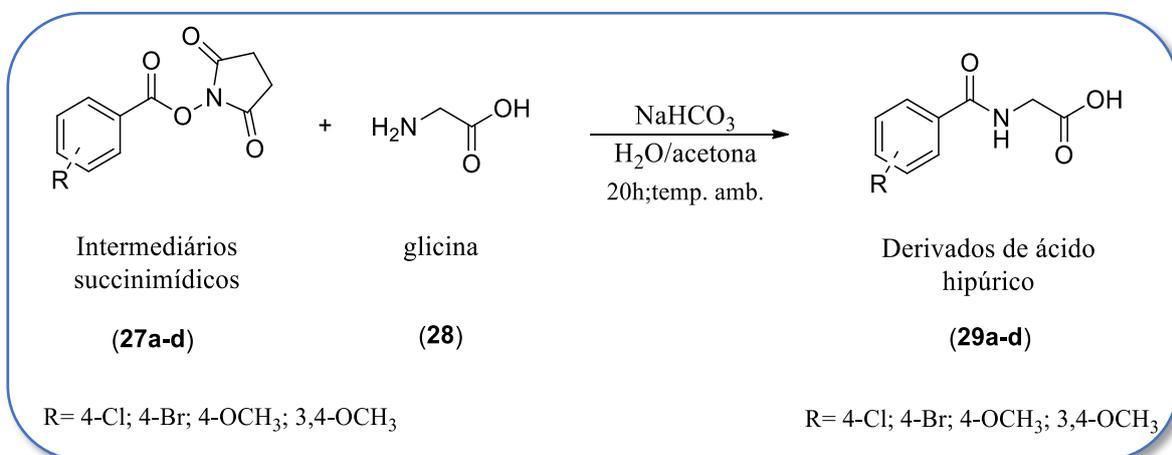


Figura 27. Espectro de RMN ¹³C do intermediário succinimídico **27d**

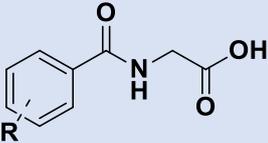
3.3. Síntese e determinação estrutural dos Derivados do ácido hipúrico (29)

Os derivados de ácido hipúrico (29a-d) foram obtidos através de uma reação de substituição nucleofílica acílica entre os intermediários succinimídicos (27a-d) e o aminoácido glicina (28) em meio básico de acetona/água (Esquema 5). Nessa etapa necessitou-se utilizar uma quantidade superior a estequiométrica para que o equilíbrio da reação se deslocasse no sentido da formação de produtos. Este procedimento, oriundo de uma metodologia descrita por MARIAPANN e colaboradores, teve que ser adaptado para otimizar os rendimentos. Modificações no isolamento como utilizar somente acetato de etila na extração, visto que este solubiliza melhor o produto do que diclorometano, porém atentando-se para o fato de que o pH deve ser exatamente três (pH=3,0), uma vez que o pH mais baixo fornece prótons suficientes para hidrolisar o acetato de etila, contribuíram para formação de produtos puros com um maior rendimento. Através de tais ajustes desse processo sintético, foram obtidos 4 diferentes derivados do ácido hipúrico que, posteriormente, foram utilizadas para a síntese das azalactonas, em rendimentos que variaram de 66 – 76 % após processo de purificação (Tabela 4).



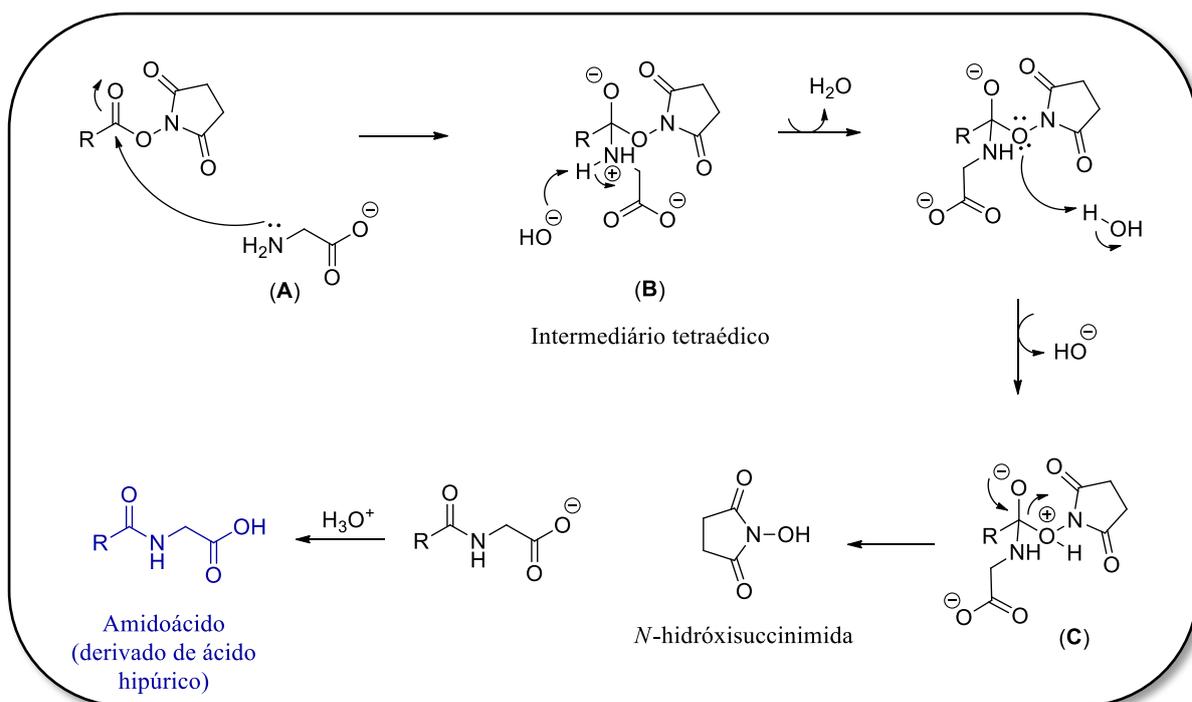
Esquema 5. Reação de obtenção dos derivados do ácido hipúrico (29a-d)

Tabela 4. Rendimentos e pontos de fusão dos derivados de ácido hipúrico (**29a-d**)

			
	R	Rendimentos	p. f.
29a	4-Cl	74%	134°C
29b	4-Br	76%	145°C
29c	4-OCH ₃	66%	127°C
29d	3,4-(OCH ₃) ₂	73%	137°C

O mecanismo desta reação é bem conhecido e descrito na literatura (CAREY, 2007) (Esquema 6). A utilização do bicarbonato de sódio proporciona o meio básico necessário para que a glicina passe da forma zwitteriônica para sua forma básica, isto é, com os elétrons do nitrogênio livres para fazer o ataque nucleofílico.

Inicialmente ocorre o ataque do par de elétrons livres do nitrogênio da glicina (A) na sua forma de base livre, à carbonila succinimídica, gerando um intermediário tetraédrico (B). Posteriormente, a hidroxila do meio abstrai um próton do intermediário B, liberando uma molécula de água, da qual o oxigênio succinimídico reabstrai o próton na etapa subsequente, gerando o intermediário C. Em seguida o oxigênio succinimídico, na forma de oxônio, puxa o par de elétrons da ligação C-O, sendo eliminado como NHS e liberando o derivado do ácido hipúrico desprotonado. O equilíbrio iônico permite a transferência de próton entre as duas moléculas, que cessa após a adição de um ácido inorgânico gerando, finalmente, o derivado do ácido hipúrico na sua forma neutra.



Esquema 6: Reação de formação dos derivados do ácido hipúrico via mecanismo de substituição nucleofílica acílica (S_NAc), frente a nucleófilos de nitrogênio.

Trata-se de uma reação clássica de uma vasta gama de reações que envolve adição de grupos nucleofílicos à carbonilas. As carbonilas são naturalmente polarizadas, devido a diferença de eletronegatividade entre o carbono e o oxigênio, fato este que gera um momento dipolar significativo, discriminando sítios na molécula em que há uma carga parcial negativa sobre o oxigênio e carga parcial positiva sobre o carbono carbonílico. Tal diferenciação facilita o ataque de grupos com cargas negativas ou ricos em elétrons à carbonila.

No caso, a carga parcial do carbono carbonílico dos intermediários succinimídicos (27a-d) se torna ainda mais pronunciada em comparação com as carbonilas de ácidos carboxílicos (Figura 28), uma vez que o oxigênio succinimídico atrai a carga para si e a saída deste grupo volumoso é estabilizada por ressonância com o nitrogênio e as carbonilas do ciclopentadiamídico. Este fato favorece a substituição nucleofílica acílica, em que o nucleófilo nitrogenado, glicina (28), será inserido na molécula e o grupo succinimídico será eliminado.

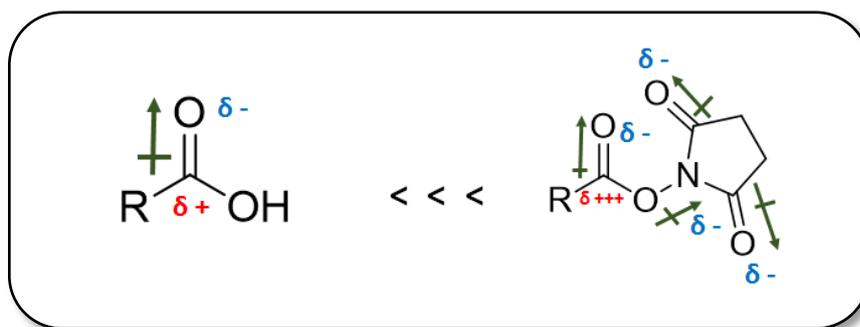
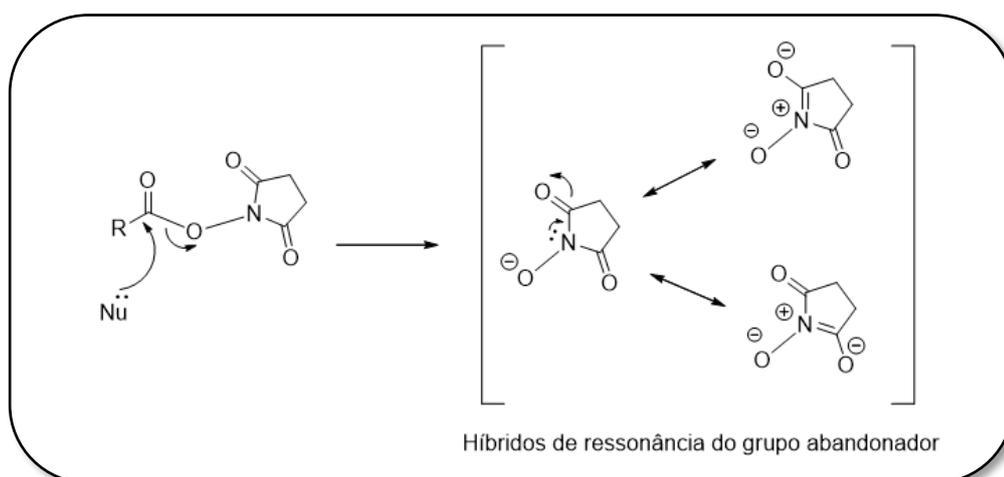


Figura 28: Comparação entre a reatividade das carboxilas e das carbonilas succinimídicas.

Portanto a reação de formação dos derivados do ácido hipúrico, é favorecida por fatores cinéticos e termodinâmicos, uma vez que a eliminação do grupo de saída é estabilizada por ressonância (Esquema 7).



Esquema 7. Estruturas de ressonância do grupo abandonador succinimídico

Os sinais do espectro de RMN ^1H para o composto 29d que confirmam a formação dos derivados de ácido hipúrico (Figuras 29 e 30) são os em torno de 3,90 ppm, com integral igual a dois hidrogênios e multiplicidade condizente com os hidrogênios metilênicos (hidrogênios α) oriundos da glicina, além dos sinais em torno de 8,70 ppm com integral igual a um e multiplicidade concordante com o hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico. Adicionalmente, os espectros de RMN ^{13}C revelam como principais picos os do metileno, que variam entre 41,62 – 41,70 ppm, e os picos de carbono quaternário de ácido carboxílico, para os quais o deslocamento varia entre 171,64 – 171,96 ppm (Figuras 29 e 31).

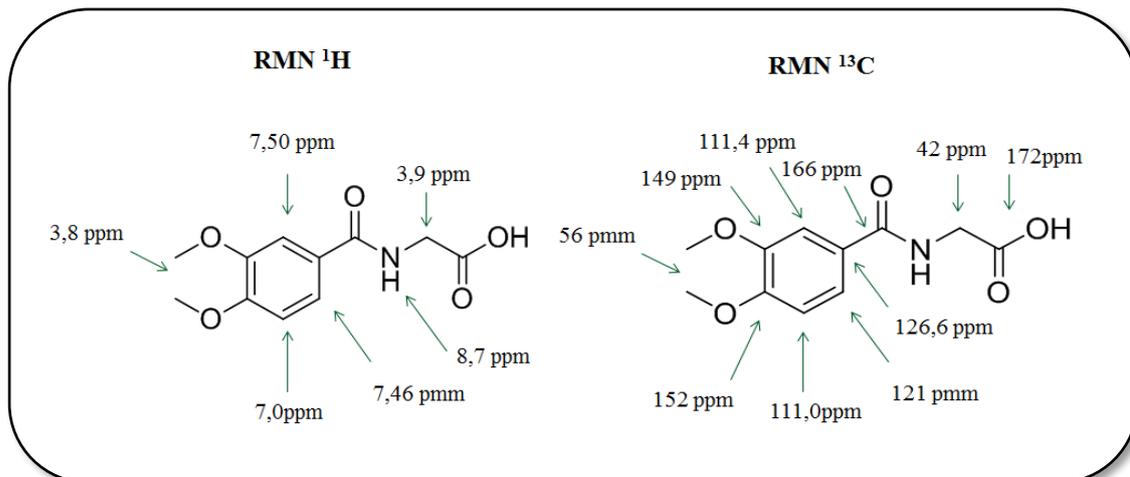


Figura 29. Elucidação espectral do derivado do ácido 2-(3,4-dimetóxi)benzamido acético (**29d**)

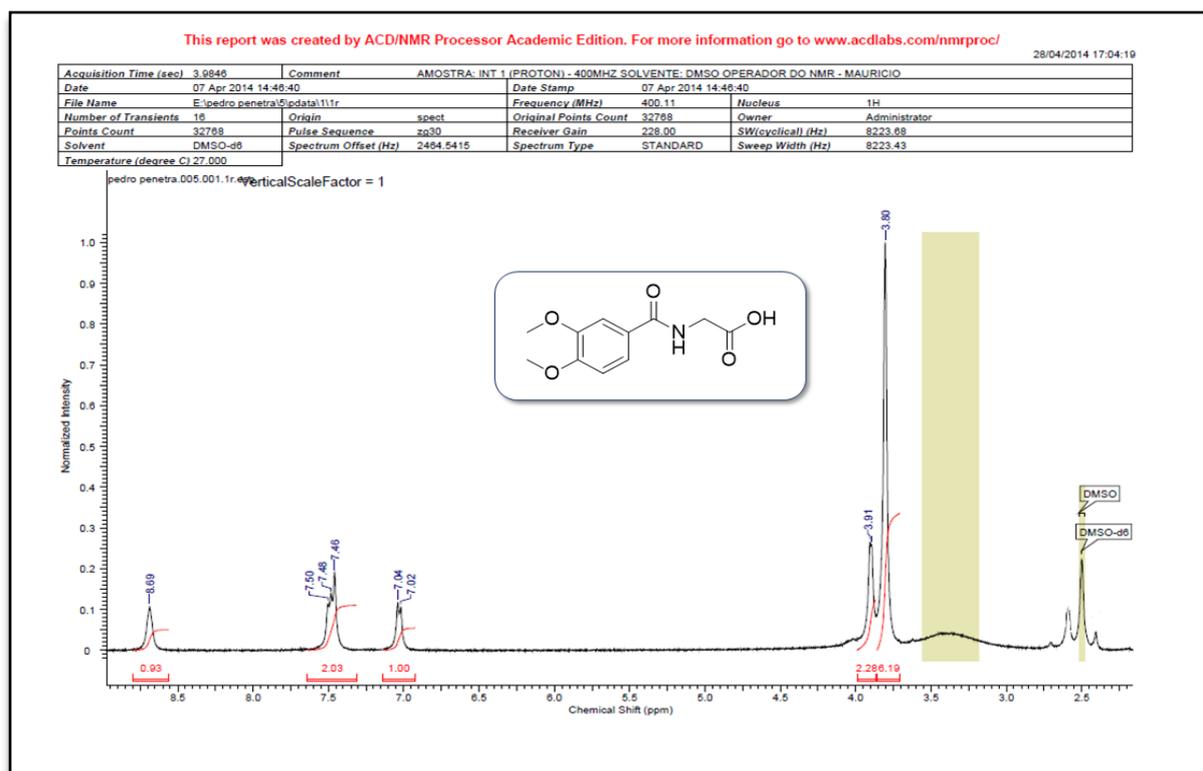


Figura 30. Espectro de RMN ¹H do derivado de ácido hipúrico **29d**

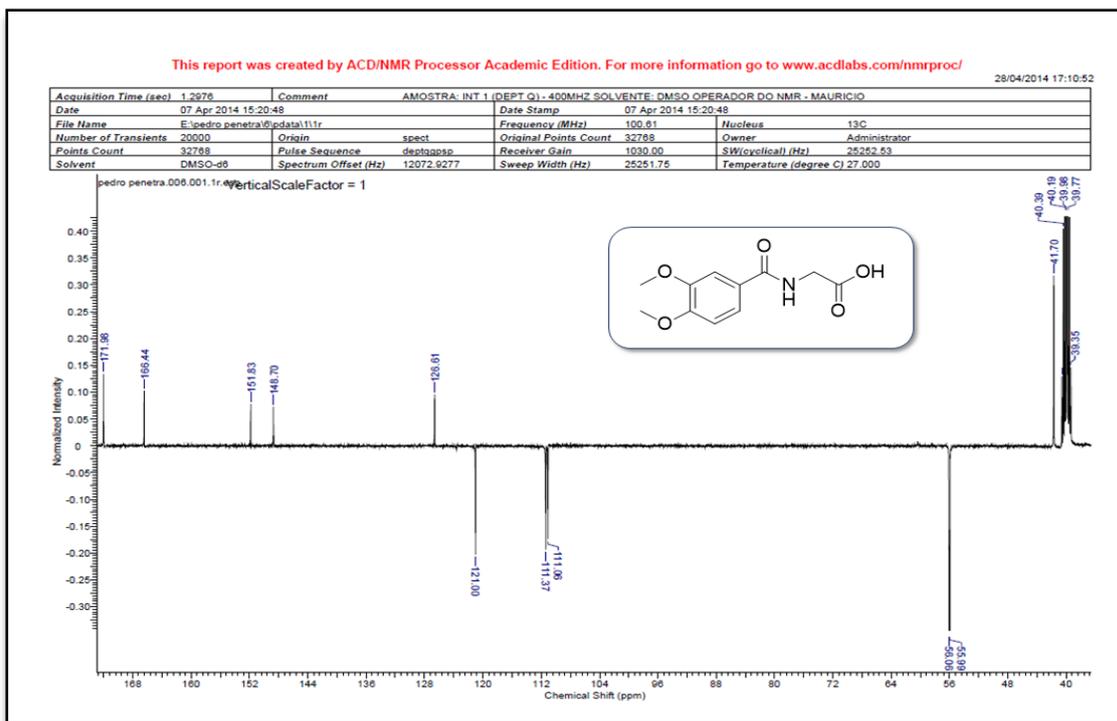
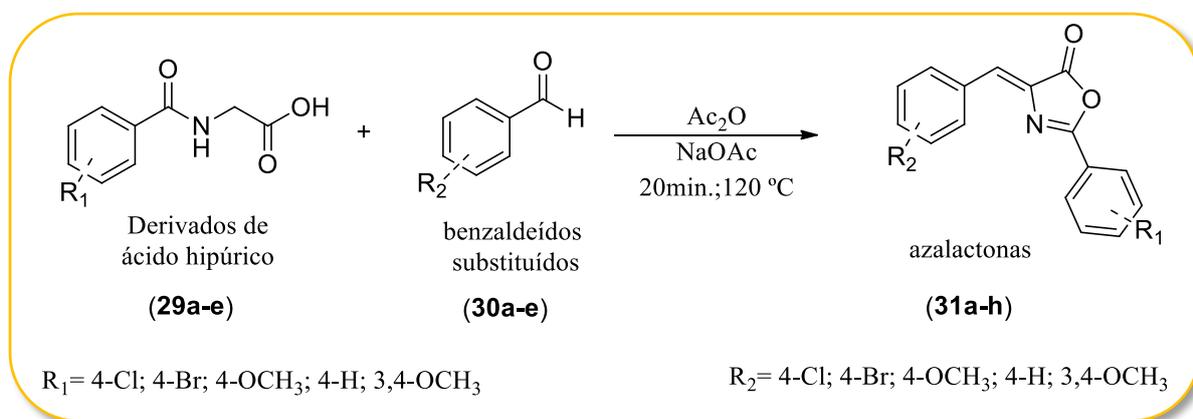


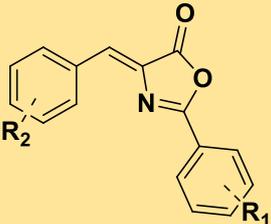
Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C do derivado de ácido hipúrico **29d**

3.4. Síntese e determinação estrutural das Azalactonas (31)

A síntese de obtenção dos intermediários azalactonas (31a-h) passou pela clássica reação de Erlenmeyer-Plöchl, que permite a formação destes compostos propostos através de sucessivas reações de condensações à carbonila (ERLENMEYER, 1893; PLÖCHL, 1893). 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). Desta forma, foram sintetizadas 8 azalactonas a partir dos ácidos hipúricos (29a-d) e aldeídos substituídos (R= -H, 4-OMe, 3,4-MeO, 4-Cl e 4-Br) em meio de anidrido acético em rendimentos que variaram de 49 - 59%, após processo de purificação (Esquema 8, Tabela 5).



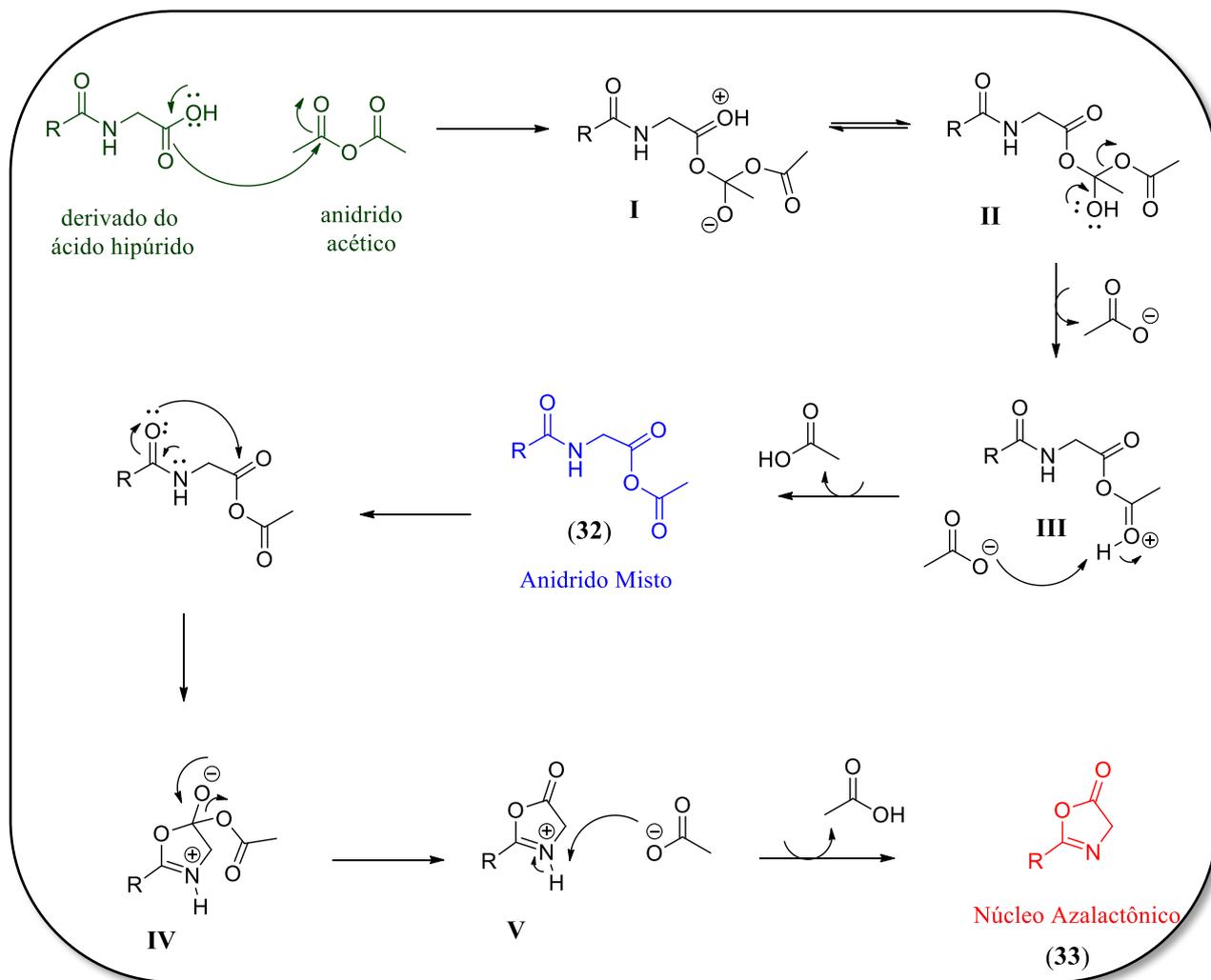
Esquema 8. Reação de obtenção das azalactonas (31a-h)

Tabela 5. Rendimentos e pontos de fusão das azalactonas (**31a-h**)

The chemical structure shows a 2-phenyl-2-oxo-1,3-dioxolane ring system. The nitrogen atom is substituted with a 4-R₂phenyl group. The 2-position of the dioxolane ring is substituted with a 4-R₁phenyl group.

	R ₁	R ₂	Rendimentos	p.f.
31a	3,4-O(CH ₃) ₂	4-Cl	58%	232°C
31b	3,4-O(CH ₃) ₂	4-Br	57%	254°C
31c	3,4-O(CH ₃) ₂	4-OCH ₃	55%	218°C
31d	4-Cl	3,4-O(CH ₃) ₂	54%	207°C
31e	4-Br	3,4-O(CH ₃) ₂	51%	219°C
31f	4-OCH ₃	3,4-O(CH ₃) ₂	49%	195°C
31g	3,4-O(CH ₃) ₂	4-H	50%	176°C
31h	4-H	3,4-O(CH ₃) ₂	52%	169°C

O mecanismo desta reação é bem conhecido e descrito na literatura (ERLENMEYER, 1893; PLÖCHL, 1893). Inicialmente ocorre o ataque do par de elétrons livres da carboxila do derivado do ácido hipúrico ao centro eletrofílico do anidrido acético, formando o intermediário tetraédrico I bipolar. 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 (32), um intermediário mais reativo que o produto de partida (Esquema 9) (de AZEVEDO, 2013).

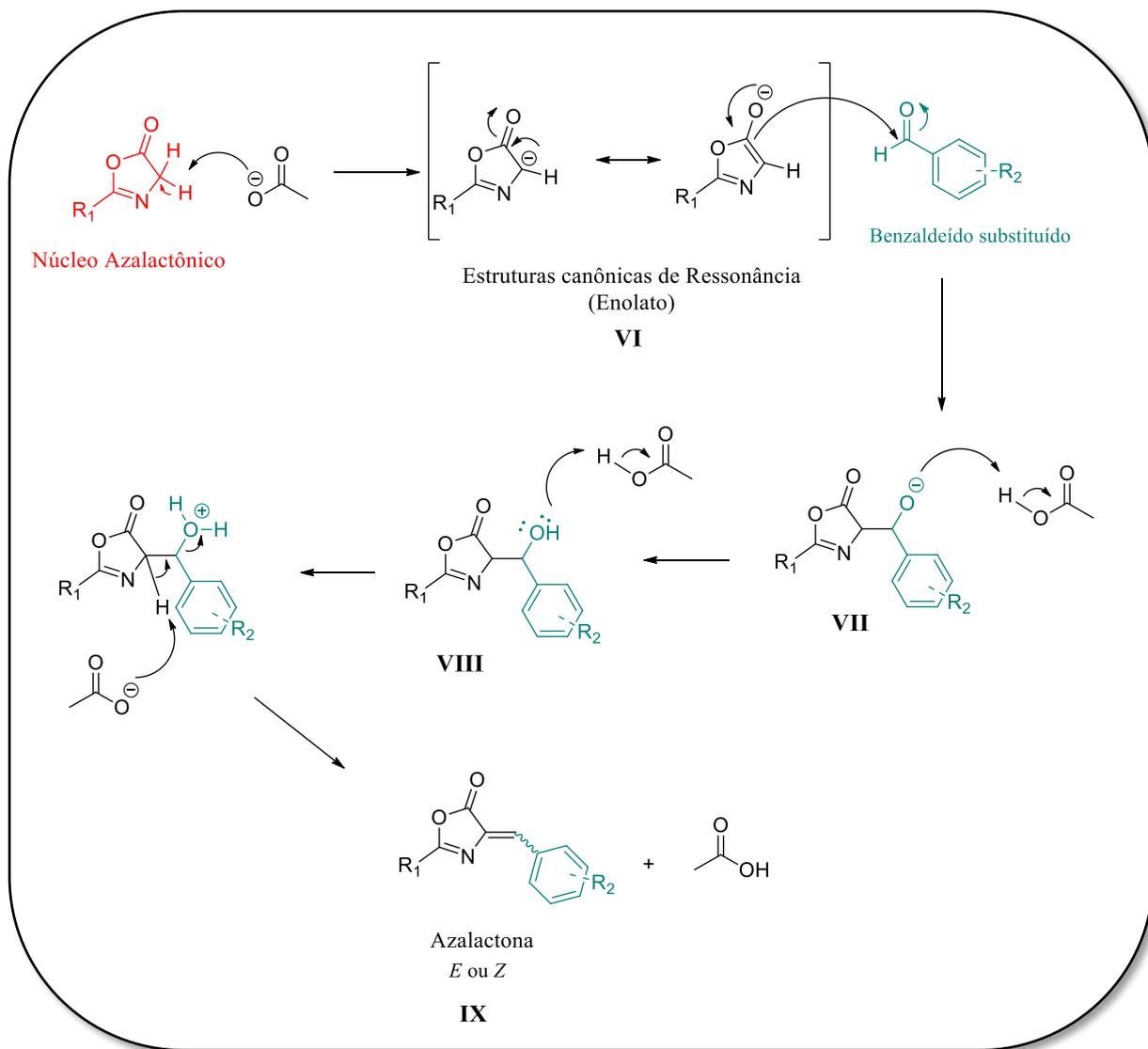


Esquema 9: Mecanismo de formação do anidrido misto (32) e do núcleo azalactônico (33).

A próxima etapa consiste em uma reação de ciclização intramolecular do anidrido misto (32) formado na etapa anterior. 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 (33) para a próxima etapa reacional (LI, 2006).

Após a formação do núcleo oxazolônico (33) ocorre a reação de condensação deste com o benzaldeído presente no meio. Esta etapa tem início na formação do enolato VI, que é consideravelmente estável no meio reacional pela formação de um sistema aromático estabilizado com 6 elétrons π (CHANDRASEKHAR e KARRI, 2006). Todo este processo ocorre devido a grande acidez do hidrogênio α à carbonila presente no núcleo oxazolônico, que é abstraído mesmo na presença de uma base fraca como o acetato

de sódio ($pK_{aH} \cong 5$) (MARCH, 1992). O enolato gerado atua como nucleófilo e ataca o centro eletrofílico do benzaldeído, como numa condensação aldólica, 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 azalactonas (**31a-h**) (Esquema 10) (LI, 2006).



Esquema 10: Formação das azalactonas (**31a-h**) através da reação de Erlenmeyer-Plöchl.

Visando determinar a formação dos compostos (**31a-h**) foram realizadas análises de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C . Como é possível observar nas Figuras 32 e 33, algumas características espectroscópicas comprovam a obtenção das desejadas.

Ao analisar os espectros de RMN ^1H da azalactona 31h observa-se os sinais característicos como os em torno 7,20 ppm, com integral igual a 1 e multiplicidade condizente com o hidrogênio ligado ao carbono benzilidênico, que só poderia ser detectado se ocorresse a reação de condensação entre o derivado do ácido hipúrico com o aldeído substituído. Além disso, os sinais de RMN ^{13}C que confirmam a presença do heterocíclico são os relativos ao carbono carbonílico da lactona, que para as lactonas sintetizadas variam de 167,56 – 168,26 ppm (Figurs 33 e 34).

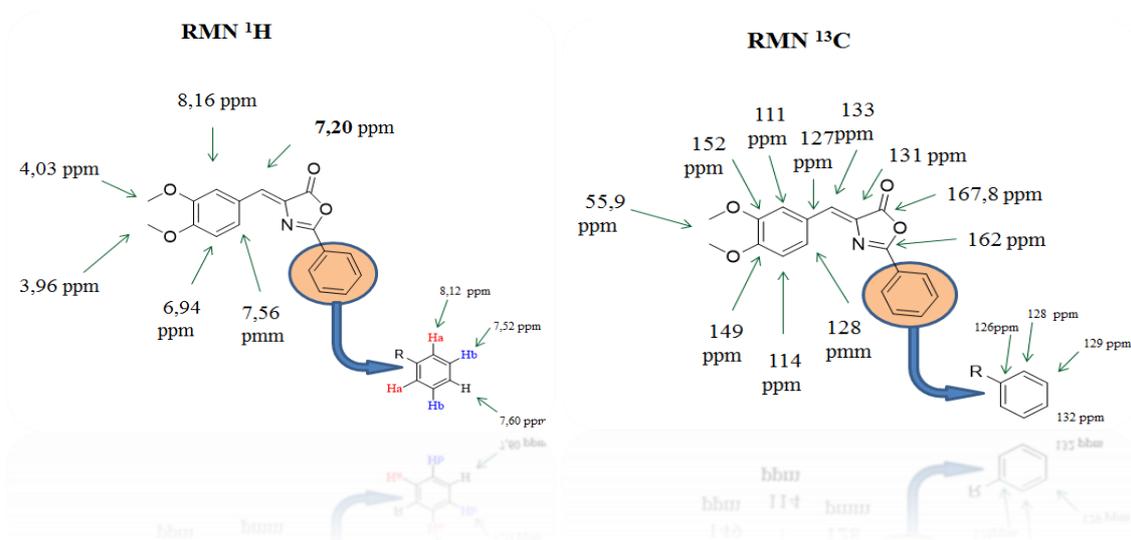


Figura 32. Elucidação do espectro da (Z)-2-(4-metoxifenil)-4-(3,4 - dimetoxibenzelideno)ox-5(4H)-azolona (**31h**)

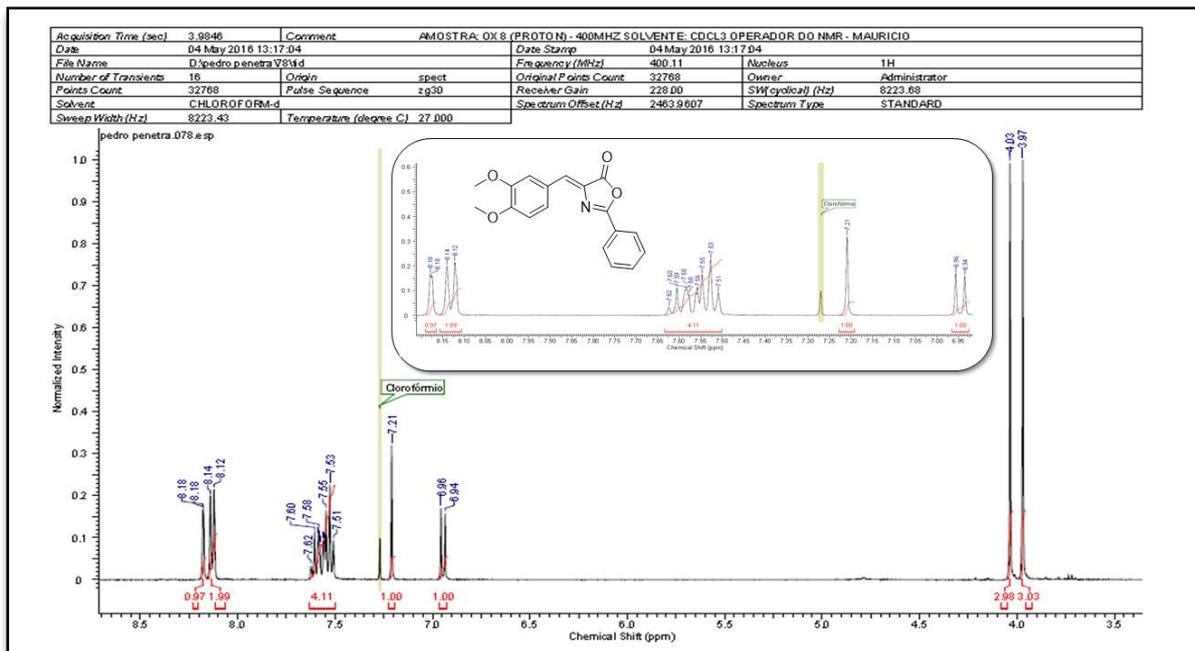


Figura 33. Espectro de RMN ^1H da azalactona **31h**

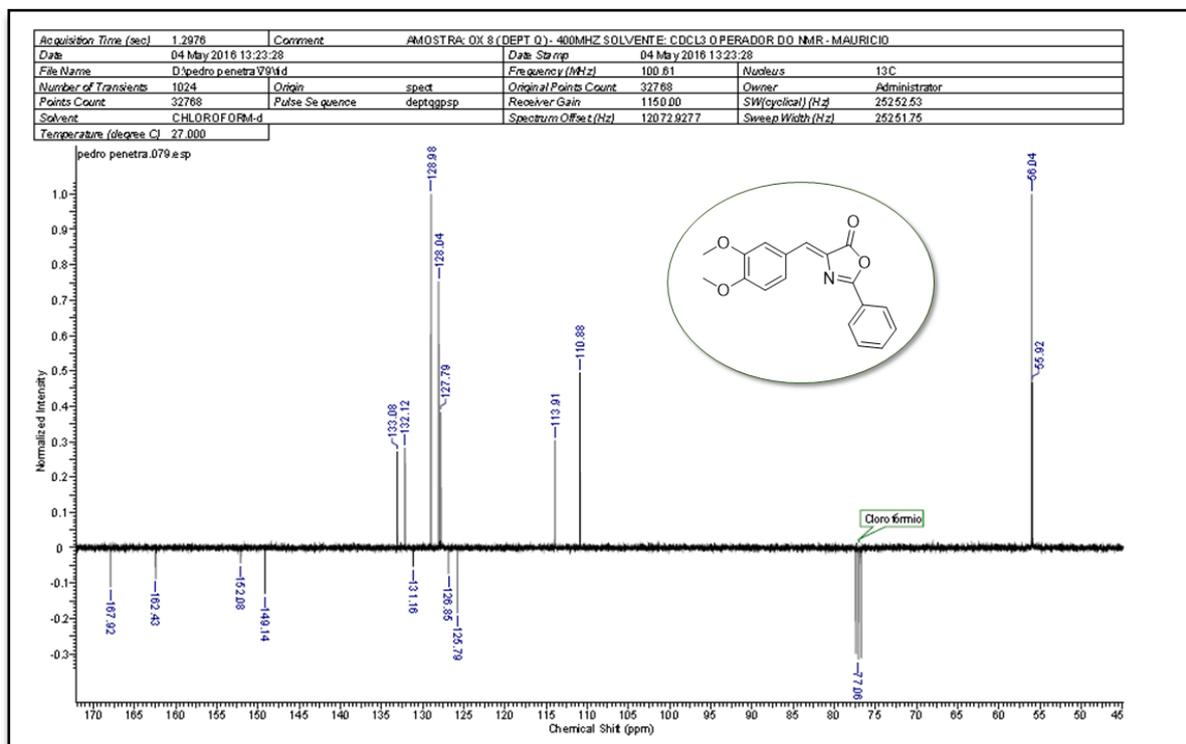


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C da azalactona **31h**

Em uma reação de eliminação que segue a via de mecanismo bimolecular (E_2), a posição relativa entre os grupos envolvidos deve ser do tipo *anti*, isto é, o grupo de saída deve estar numa posição anti-periplanar ao hidrogênio que será abstraído por uma base do meio, para dar origem a dupla ligação (FERREIRA, 2011). A configuração relativa preferencial, *E* ou *Z* em relação a dupla ligação pode variar de acordo com as interações estereo-eletrônicas entre os grupos substituintes.

No caso das azalactonas espera-se uma repulsão estereo-eletrônica entre a carbonila, e seu par de elétrons do oxigênio, e o substituinte aromático, uma vez que a fenila está paralela a sub-unidade benzilidênica, devido a conjugação entre os elétrons π das duplas ligações (Figura 35).

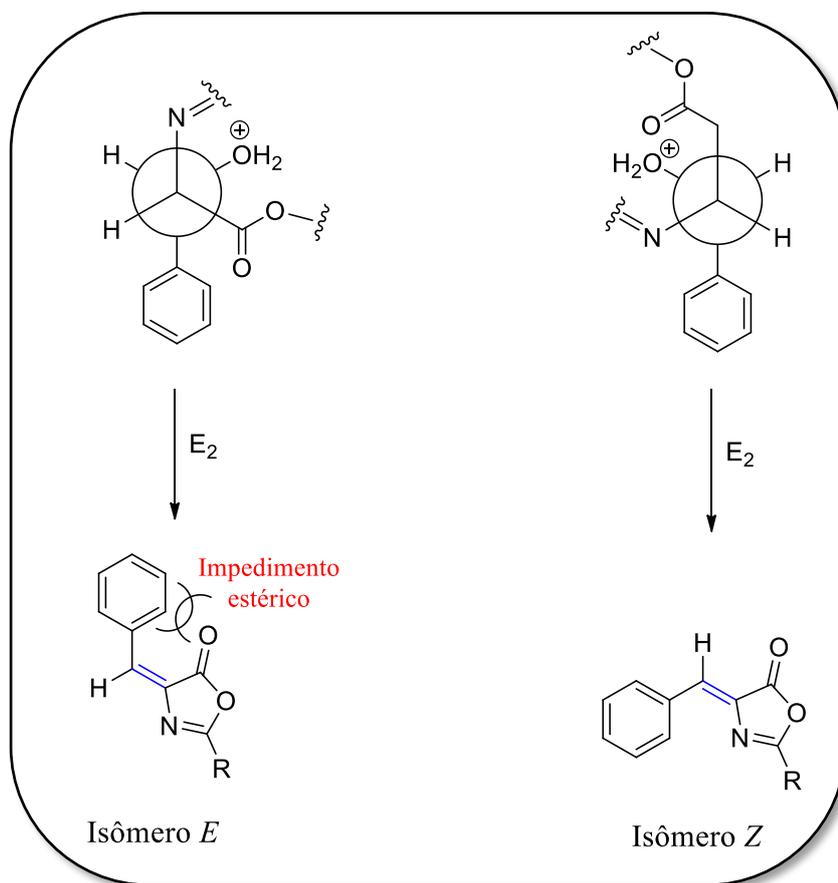


Figura 35. Projeção de Newman para a reação de eliminação via mecanismo E_2 do núcleo azalactônico. Representação do impedimento estérico que ocorre no isômero de configuração relativa *E*.

Um estudo realizado por Azevedo (2013), avaliou a estabilidade dos isômeros de compostos com núcleos azalactônicos através de cálculos de modelagem molecular no programa Spartan 04. Os resultados estão expressos na figura 36, em que se percebe o isômero *Z* como o produto termodinâmico, ou seja, o de menor energia, sendo aproximadamente 4 kcal/mol mais estável que o isômero *E*.

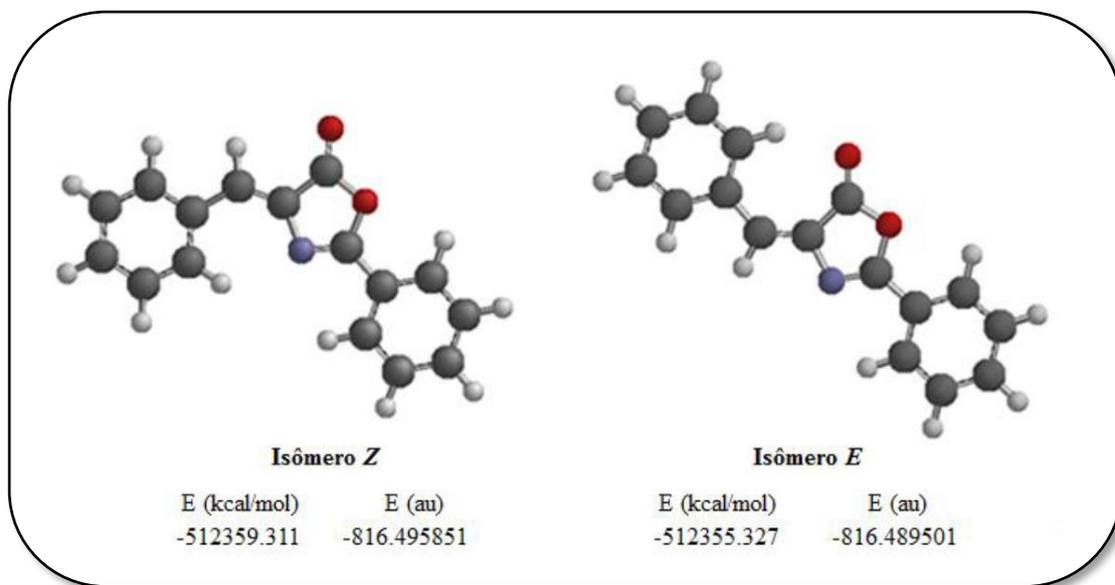


Figura 36. Diferença energética teórica entre isômeros de *E* e *Z* de um núcleo azalactônico.

Além do estudo teórico, um experimento de RMN ^{13}C (zggd30, espectro de carbono acoplado a longa distância, $J^3\text{CH}$) revela uma constante de acoplamento (J) de 5,45Hz característico de uma interação entre os átomos quando há a configuração *Z* (Figura 37) (de AZEVEDO, 2013). Para um produto de configuração relativa *E* seria esperado um valor de J próximo a 12Hz (PROKOF'EV e KARPEISKAYA, 1979).

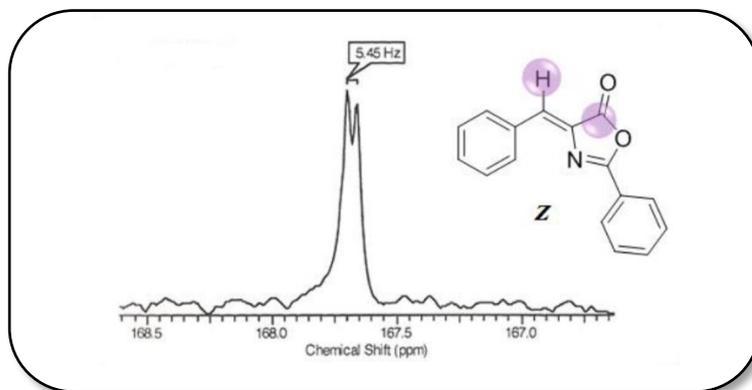
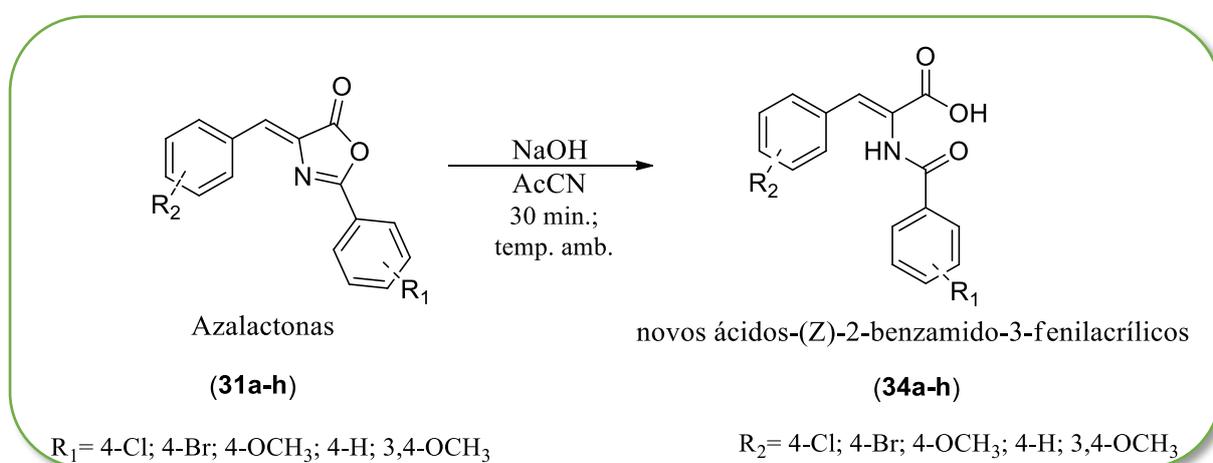


Figura 37. Espectro de RMN ^{13}C para determinação da configuração relativa da azalactona.

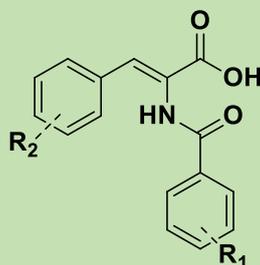
3.5 Síntese e caracterização dos Novos Ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (34)

Por fim, os ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (34a-h) foram obtidos através da reação de hidrólise das azalactonas em meio básico de acetonitrila à temperatura ambiente (Esquema 11), seguindo o mesmo mecanismo de reações de substituição nucleofílica acílica na qual a carbonila sofre uma adição de um nucleófilo de oxigênio, formando moléculas estáveis, de fácil manuseio e estocagem. Ao total foram sintetizadas 8 moléculas finais de ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos que em rendimentos que variaram de 92 – 96 % após processo de purificação por precipitação (Tabela 6).



Esquema 11: Reação de obtenção dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (34a-h)

Tabela 6. Rendimentos e pontos de fusão dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (34a-h)



	R ₁	R ₂	Rendimento	p.f.
34a	4-Cl	3,4-O(CH ₃) ₂	96%	228°C
34b	4-Br	3,4-O(CH ₃) ₂	95%	263°C
34c	4-OCH ₃	3,4-O(CH ₃) ₂	92%	226°C
34d	3,4-O(CH ₃) ₂	4-Cl	93%	245°C
34e	3,4-O(CH ₃) ₂	4-Br	93%	271°C
34f	3,4-O(CH ₃) ₂	4-OCH ₃	92%	237°C
34g	4-H	3,4-O(CH ₃) ₂	94%	204°C
34h	3,4-O(CH ₃) ₂	4-H	92%	198°C

Esta hidrólise trata-se de uma reação clássica incluída numa vasta gama de reações que envolvem adição de grupos nucleofílicos à carbonilas. Neste caso, por se tratar de uma hidrólise básica, o nucleófilo é a hidroxila. A reação ocorre semelhantemente a hidrólise de ésteres, na qual um grupo acila de éster se converte num ácido carboxílico. Porém, as lactonas são mais reativas do que os ésteres alifáticos devido ao ângulo de ligação entre o oxigênio e o carbono na carbonila serem menores (< 120°) que o ângulo menos tensionado de uma carbonila de cadeia aberta (120°). Além disso, as azalactonas são mais reativas que as lactonas, devido a presença de um átomo de nitrogênio, que retira elétrons por indução, deixando o sítio carbonílico ainda mais eletrofílico (Figura 38).

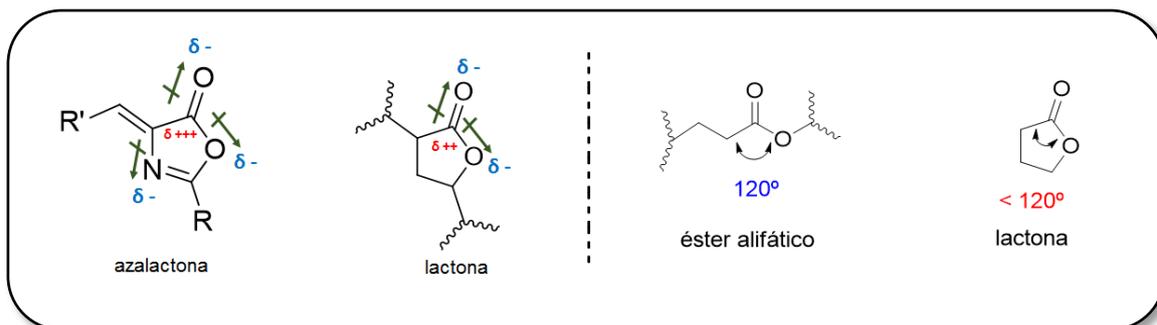


Figura 38. Comparação estrutural entre carbonilas de ésteres. À esquerda diferença na polaridade das carbonilas das azalactonas e lactonas; à direita: diferença na tensão angular entre os ésteres.

Tais fatos, proporcionam uma reação que acontece à temperatura ambiente, sem necessidade de utilização de uma metodologia mais drástica como aquecimento e/ou refluxo, tais como as utilizadas na hidrólise de ésteres que estão em equilíbrio dinâmico com a reação inversa, a esterificação.

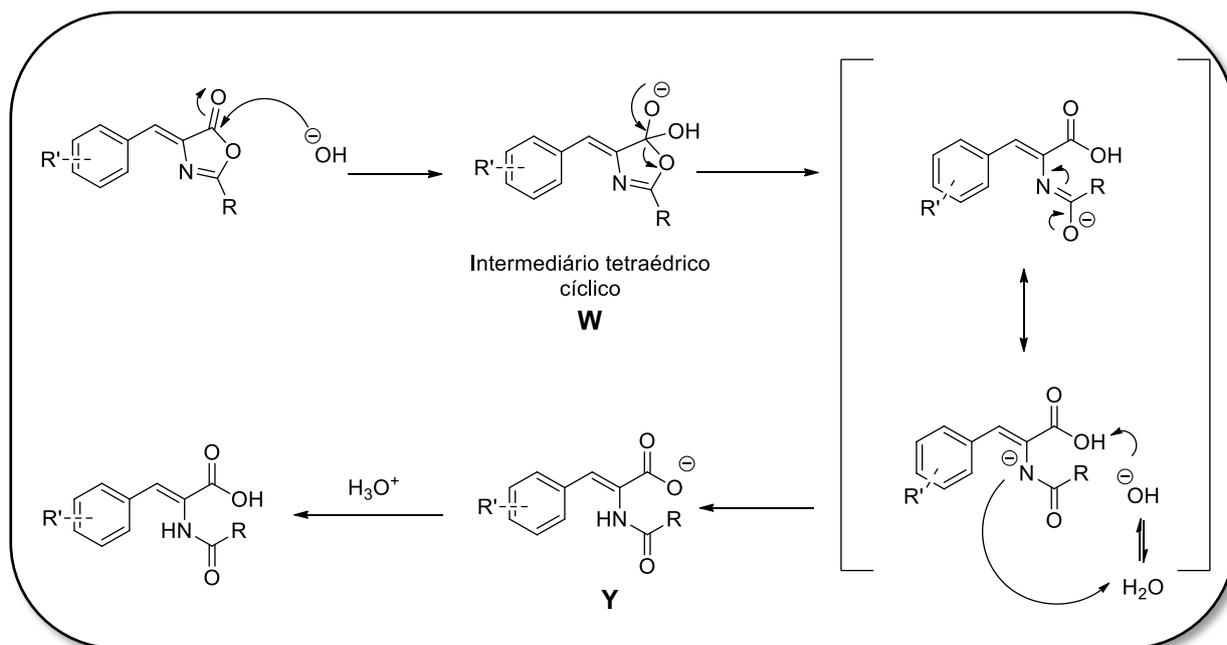
Apesar de aparentemente eficaz, a hidrólise descrita por Hisashi Shinkai, *et al.* (1987) precisou de algumas adaptações em termos práticos. O solvente clássico utilizado neste tipo de síntese é a mistura metanol/água, devido a alta capacidade do metanol em solubilizar moléculas orgânicas que possuem grupos de média e alta polaridade, como é o caso das azalactonas. Porém, devido à alta reatividade presente no núcleo azalactônico, causada pelos heteroátomos presentes no anel, a carbonila lactônica se torna muito vulnerável a ataques nucleofílicos de qualquer espécie polar que tenham pares de elétrons livres. Com isso, a utilização de metanol como solvente para essa reação, fornecia um baixo rendimento. Ao investigar a causa desses rendimentos tão baixos (30-35%), imaginou-se que o solvente pudesse estar participando da reação, competindo com o nucleófilo da hidrólise, no caso a hidroxila. Ou seja, o metanol, solvente da reação estava competindo pelo sítio positivo da azalactona com a hidroxila, formando uma razoável quantidade de subproduto e conseqüentemente baixando o rendimento da reação. Ao acompanhar a reação com placa cromatográfica analítica percebia-se duas manchas proeminentes, uma mais retida na origem (o produto desejado – o ácido carboxílico) e outra um pouco mais acima, levando-nos a concluir que poderia ser um éster, proveniente da reação do ácido carboxílico (produto desejado) com o metanol (solvente), reação esta que ocorreria facilitada pelo meio básico.

Diante deste problema, pensou-se em utilizar somente água como solvente da reação, porém a mesma não era capaz de solubilizar a azalactona. Por fim, escolheu-se a mistura acetonitrila/água como solvente para a reação, uma vez que a acetonitrila não possui par de elétrons disponíveis capaz de atacar e/ou competir com a hidroxila pelo sítio positivo da azalactona, nem posteriormente reagir com o produto final, originando uma etapa indesejada.

Outra etapa importante na obtenção dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos foi o processo de purificação, que consistiu em uma extração líquido-líquido com diclorometano para retirar impurezas orgânicas (2 x CH₂Cl₂). Logo em seguida adicionou-se à fase aquosa ácido clorídrico concentrado em banho de gelo, de modo a precipitar o produto que devido ao meio básico encontra-se na forma de carboxilato. Uma parte do produto formado foi filtrado e lavado com água gelada. Na fase aquosa outra parte do produto, que tenha solubilizado em água durante a precipitação, sofre uma reextração com acetato de etila (3x acetato). Após a reextração, evaporou o solvente.

O mecanismo desta reação (Esquema 12) ocorre, inicialmente, com a adição nucleofílica do par de elétrons livres da hidroxila à carbonila do anel azalactônico, gerando um intermediário tetraédrico cíclico (W). Na etapa seguinte ocorre a eliminação de uma amida intermediária, que possui uma carga negativa que entra em ressonância, ficando localizada sobre dois átomos eletronegativos, nitrogênio e oxigênio. Por fim, quando esta carga negativa se encontra sobre o nitrogênio (mais básico), ocorre a abstração de um próton de uma molécula de água, solvente da reação e que também é gerada no meio pela desprotonação do ácido carboxílico formado em (Y). Com isso, a molécula entraria na sua forma de carboxilato, sendo necessário o ajuste do pH do meio, para a precipitação sob forma do novo ácido.

Apesar de seguir o mesmo mecanismo das reações de substituição nucleofílica acílica, a eliminação leva a desconexão de um grupo que, apesar de abandonador da carbonila azalactônica, continua fazendo parte da molécula por estar presente num núcleo cíclico. O único efeito desta hidrólise é sobre o anel azalactônico que é aberto dando origem a duas funções distintas da original, ácido carboxílico e amida, transformando a oxazolona numa molécula que após a reação torna-se bifuncionalizada, assemelhando-se a estruturas peptídicas.



Esquema 12: Hidrólise da azalactona. Formação do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico através do mecanismo de $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$, frente a nucleófilos de oxigênio.

Nos espectros de RMN ^1H para o composto 34h é possível observar os sinais característicos que confirmam a formação do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico, que são os em torno de 12,60 ppm inerente ao deslocamento químico do hidrogênio ligado a hidroxila do ácido e os sinais na faixa de 9,90 ppm pertinentes ao hidrogênio amídico (Figuras 39 e 40). Adicionalmente, os espectros de RMN ^{13}C revelam sinais bem semelhantes ao da azalactona, apesar de podermos notar uma ligeira diminuição no deslocamento químico das carbonilas dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos em comparação com as carbonilas das azalactonas (carbonilas de éster cíclico) (Figuras 39 e 41). Além disso, outro sinal característico é o do carbono quaternário que faz ligação dupla com o nitrogênio nas azalactonas, variando em 161,51 ppm – 163,66 ppm, que quando hidrolisadas transformam-se em carbonos carbonílicos quaternários de amida, tendo seus deslocamentos químicos ligeiramente aumentados após a hidrólise.

Vale destacar que não houve duplicação de nenhum dos sinais dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , o que indica a presença de um único estereoisômero formado, sendo atribuído a este a configuração Z, baseado na configuração descrita para seus intermediários anteriores, as azalactonas.

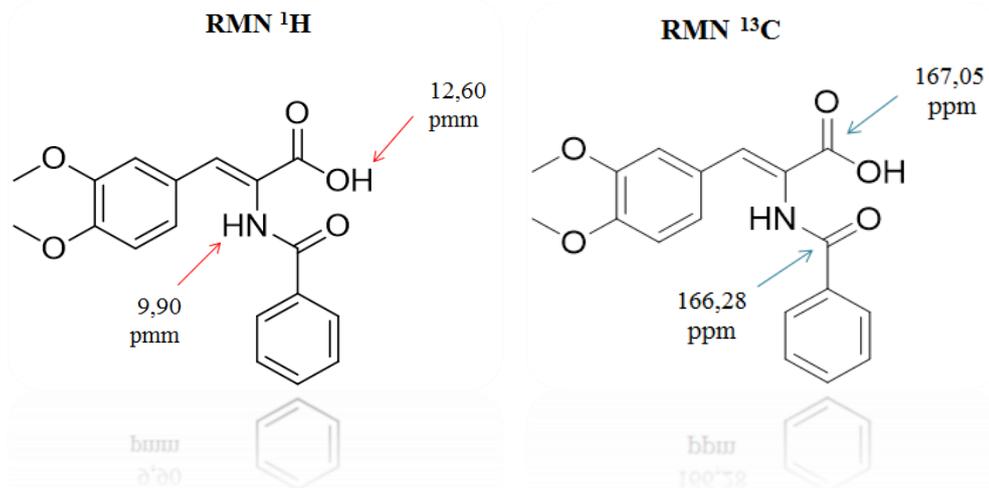


Figura 39. Principais sinais do RMN ¹H e RMN ¹³C para o ácido (Z)-2-benzamido-3-(3,4-dimetóxifenil) acrílico (**34h**)

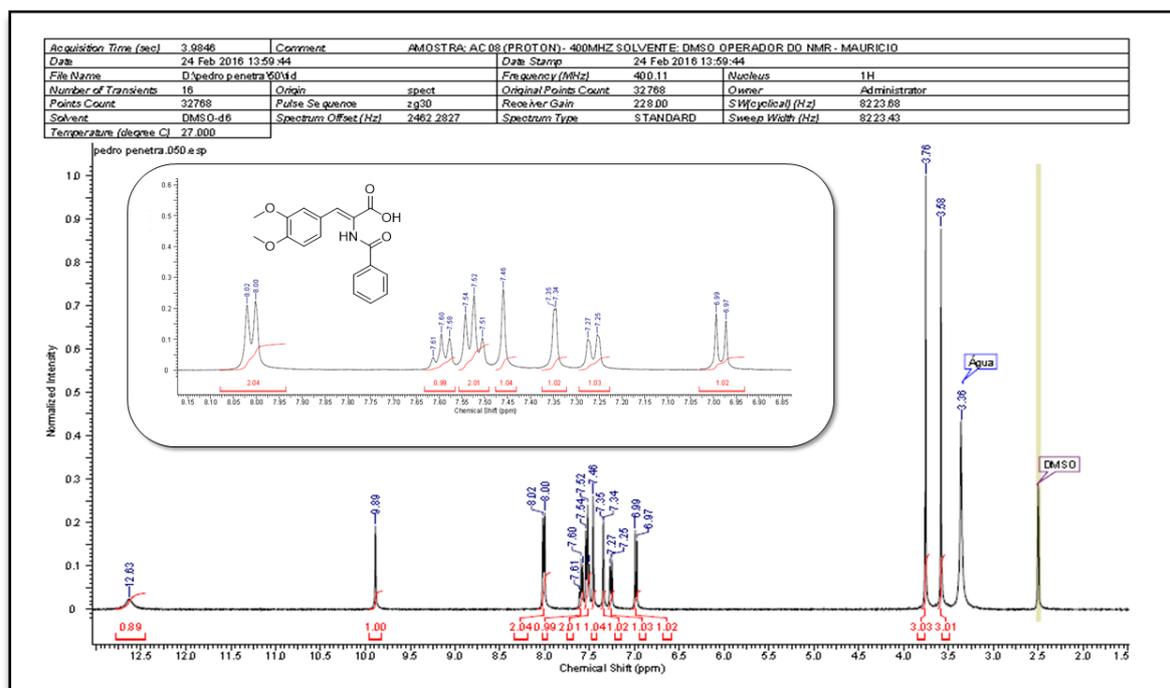


Figura 40. Espectro de RMN ¹H do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico **34h**

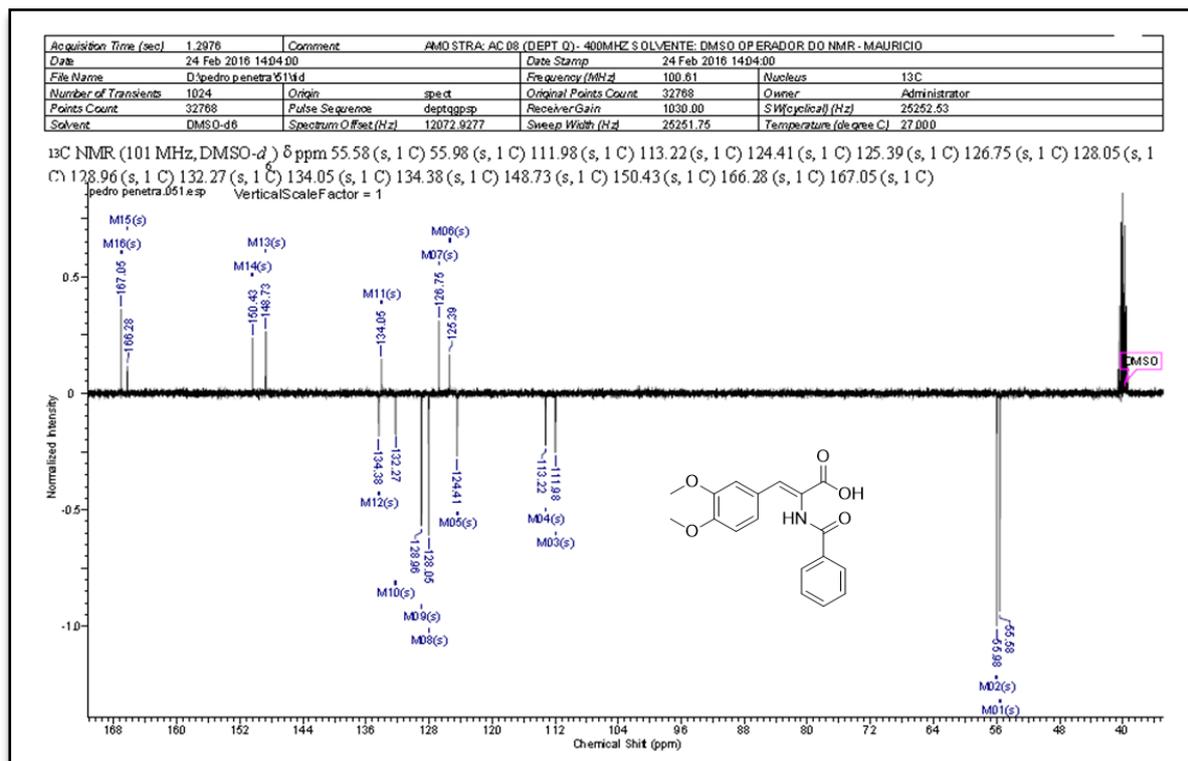


Figura 41. Espectro de RMN ¹³C do ácido-(Z)-2- benzamido-3-fenilacrílico **34h**

Sobretudo, ao comparar dois espectros de infravermelho, um do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico e outro da azalactona correspondente, percebe-se uma banda larga na região de 3200 – 3600cm⁻¹ referente ao estiramento axial da ligação hidrogênio – nitrogênio (ν_{N-H}) do ácido, enquanto que no produto de partida o mesmo não é observado. Além disso, nos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos aparecem duas bandas distintas para carbonilas, as do ácido carboxílico, que para os produtos finais (**34a-h**) variou entre 1684-1693cm⁻¹, e as da amida que ficaram entre 1629-1647cm⁻¹; enquanto que para as azalactonas só é possível ver a banda de estiramento de ligação C=O do éster cíclico, que geralmente ficam na faixa de 1780-1796 cm⁻¹ (de AZEVEDO, 2013).

A título de comparação dos espectros de infra-vermelho foi feita a síntese da azalactona não substituída e do ácido carboxílico correspondente, para comprovar tais bandas e diferenças marcantes de ambos os núcleos (Figura 42).

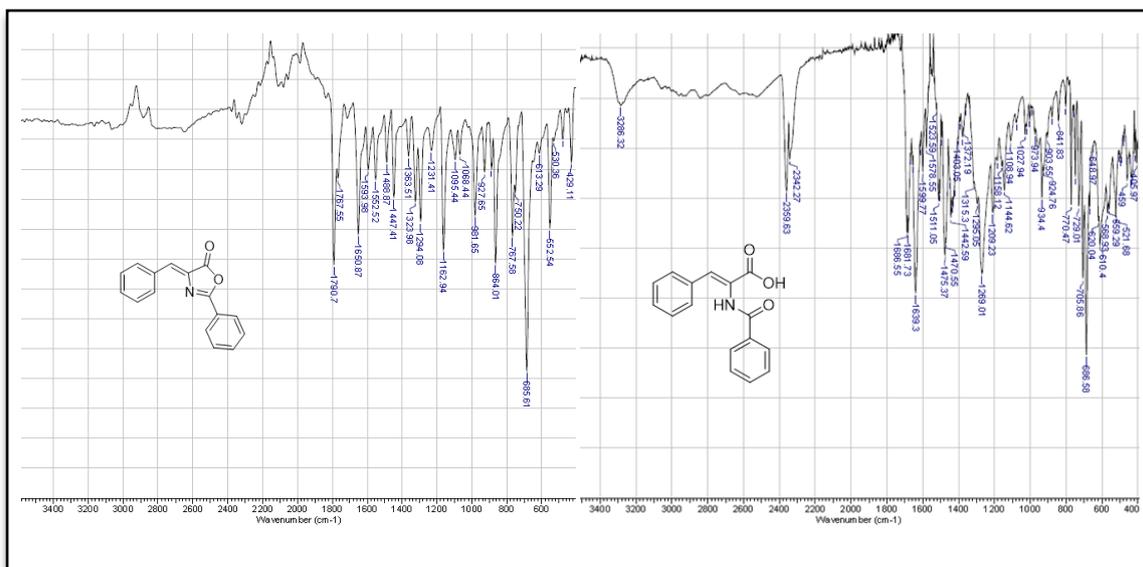


Figura 42. Comparação estrutural através do espectro de IV (à esquerda da azalactona não substituída e à direita do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico correspondente)

3.6. Estudos de ancoramento molecular (*docking*) dos novos ácidos (Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos sobre a PDE4

Em química computacional, genericamente citada como modelagem molecular, destaca-se o “docking” molecular como um dos métodos mais empregados no planejamento racional de fármacos, com inúmeros casos envolvendo o emprego de simulações computacionais (MARSHAL, 2004), tendo como exemplo importantes fármacos como: losartana, atorvastatina e celecoxib. Com esse método, são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor, ou simplesmente entre duas macromoléculas (INSIGHT II USER GUIDE, 2005).

Os métodos de “docking” em geral envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletroestáticos, eletrodinâmicos e estéricos, assim como a interação com o solvente e os graus de flexibilidade da molécula (McCONKEY, 2002), os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia.

As mais recentes versões de programas de “docking”, FlexX e GOLD, consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor utilizando a informação farmacofórica do sítio para guiar as simulações. A partir dessa estratégia é possível selecionar, por "screening" virtual, compostos de bases de dados contendo milhares de estruturas, eliminando compostos não promissores antes que sejam sintetizados (ALONSO; BLIZNYUK; GREADY et al., 2006).

Uma das características mais valiosas do "docking" é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como forma de validação dos mesmos. Para realizar um teste desse nível, um ligante é extraído de seu complexo cristalográfico e submetido a simulações com o sítio ligante da proteína. Dessa forma, os modos de ligação obtidos nas simulações são comparados com os respectivos modos de ligação obtidos experimentalmente. Tal processo de validação é conhecido como “redocking” e tem por objetivo testar as funções matemáticas presentes numa base, comparando os cálculos teóricos com os resultados experimentais. Outra possibilidade inerente ao método é a capacidade de sua função de escore de ordenar ligantes de acordo com valores experimentais de atividade. As funções de escore podem ser estabelecidas de acordo com campos de força de mecânica molecular, parâmetros

empíricos de cálculos de energia livre ou até de acordo com parâmetros denominados "knowledge-based" (SCHENEIDER; BOHM, 2002; da SILVA, 2007).

Para este trabalho utilizou-se o programa GOLD, sendo escolhido a cadeia A da PDE4D, de código 1XOR (PDB) e resolução de 1,54 Å, com um corte de 10,0 Å a partir do resíduo de tirosina 159 (Tyr159), pois este cristal apresentava cocrystalizado uma molécula de zardaverina (35) (Figura 43), uma piridazinona que possui uma função *N*-acilidrazônica inclusa em sua estrutura, que posteriormente funcionou como referência para a comparação do escore de energia.

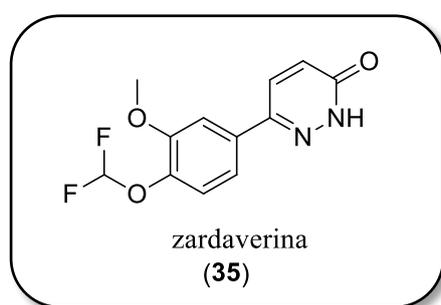


Figura 43. Estrutura 2D da zardaverina

Com o intuito de validar as bases contidas no GOLD, foi feito o “redocking” da zardaverina, obtendo-se valores de RMSD para as 4 funções presentes neste programa. Como no arquivo PDB existiam três ligantes cocrystalizados com disposições diferentes, foi necessário fazer o “redocking” de todos eles, tendo como melhores resultados de RMSD as funções Gold e PLP (Tabela 7). Optou-se seguir com o método PLP, pois o mesmo previu melhor o L3, forma cocrystalizada da zardaverina que apresenta interações com a cavidade mais externa da PDE4, onde imaginamos que os compostos desta dissertação poderão também interagir.

Tabela 7. Valores de RMSD das funções que melhor descrevem a posição dos ligantes na cavidade da PDE4.

	L ₁	L ₂	L ₃
Gold	0,3641	1,2831	4,2042
PLP	4,9662	4,4418	1,1153

Ainda assim, para ratificar o método fez-se uma validação externa utilizando como referência o modelo de inibição da PDE4 descrito por KUMMERLE *et. al.*, (2009 & 2012), em que a *N*-metil *N*-acilidrazona (NAH) (**36**) (Figura 44), da classe das *N*-acilidrazonas, tiveram resultados bem sucedidos, descrevendo muito bem a posição e a forma de interação com o sítio da PDE4. Estes compostos foram selecionados, pois neste mesmo artigo outro programa (FlexX) foi utilizado, sendo necessário fazer este ensaio de “docking” com validação externa para o modelo desenvolvido no GOLD, utilizando a função PLP.

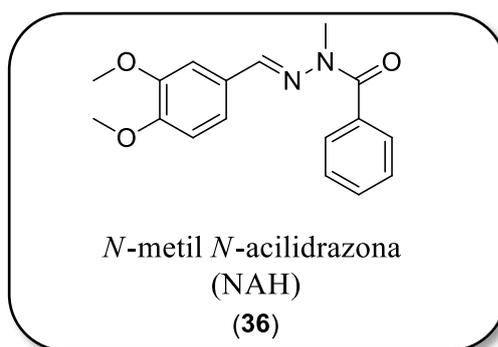


Figura 44. Estrutura 2D da *N*-metil *N*-acilidrazona (NAH).

Dessa forma, através de uma análise visual da Figura 45, percebe-se que tanto o FlexX (esquerda) quanto o GOLD (direita) mostraram formas conformacionais e disposição para a NAH (**36**) semelhantes, realizando os mesmos tipos de interações dentro da cavidade da PDE4, legitimando a função PLP do programa GOLD como base para se fazer o “docking” dos ácidos-(*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.

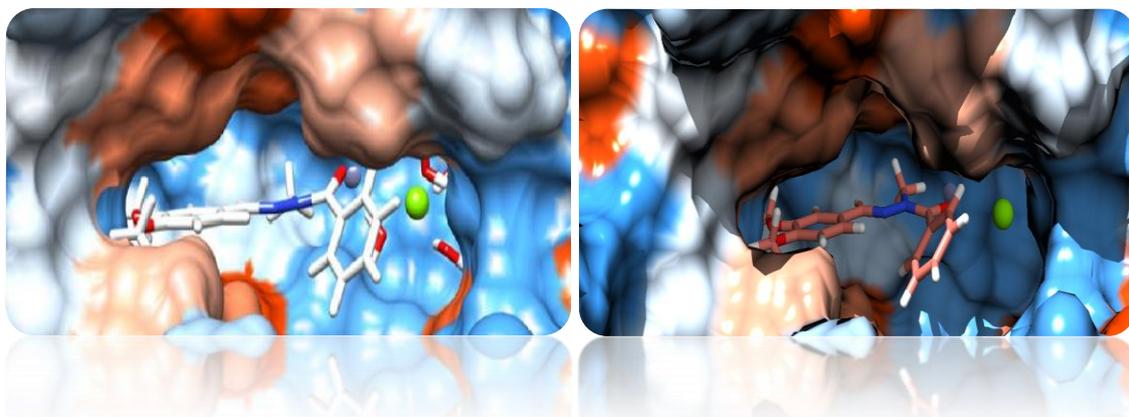
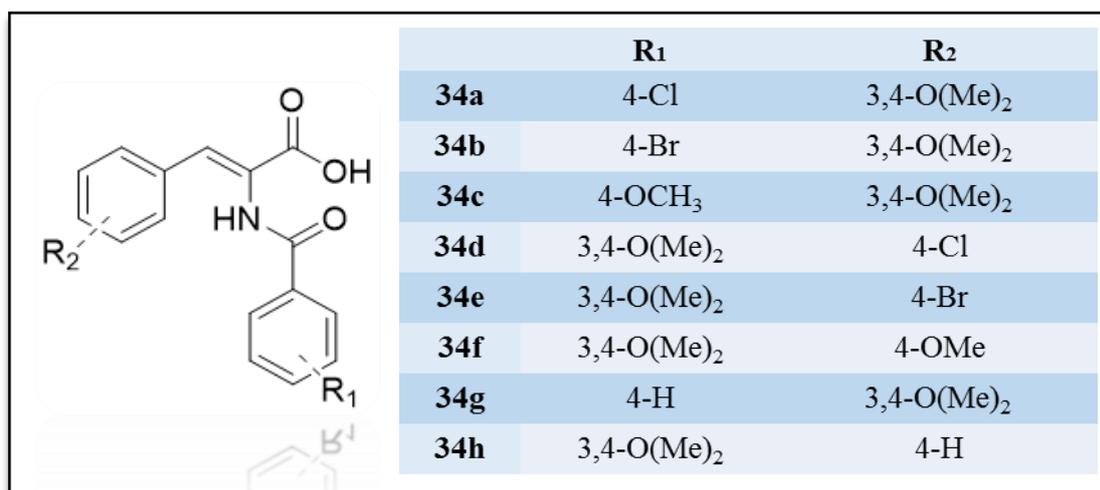


Figura 45. Comparação dos modelos teóricos de inibição da PDE4 pela NAH, à esquerda FlexX – descrito por KUMMERLE *et. al.*, 2009; e à direita GOLD.

Uma vez que o método foi validado, decidiu-se avaliar se os compostos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos planejados e sintetizados poderiam funcionar, teoricamente, como possíveis inibidores da PDE4, principalmente quanto às interações, que baseados nas estruturas de inibidores como Roflumilast e Cilomilast, acredita-se ocorrer através das funções farmacofóricas do grupo 3,4-dimetoxifenila em Ar₁ e Ar₂, e dos ácidos carboxílicos.

Para tanto, foi realizado estudo de ancoramento molecular (docking) dos ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (Esquema 13). Estes compostos (**34a-h**) tiveram suas estruturas minimizadas empregando método semi-empírico PM6 (EUQUERES, 2009) no programa PC Spartan Pro 14.0. Utilizou-se o programa GOLD para o ancoramento molecular desses compostos com o sítio catalítico PDE4, obtendo-se os valores de escore de energia pela função PLP de todos os compostos (Tabela 8).



Esquema 13. Estruturas 2D dos novos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (**34a-h**)

Tabela 8. Valores comparativos de escores usando a função PLP.

Valor de Escore PLP	
zardaverina	61,40
NAH	65,43
34^a	76,82
34b	76,90
34c	77,80
34d	72,96
34e	72,45
34f	76,70
34g	78,06
34h	77,36

Invariavelmente ao comparar tais valores de escores dos novos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos com os padrões (zardaverina e NAH), percebe-se que, teoricamente, os novos ácidos (34a-h) interagem mais fortemente com a enzima, exibindo chances nítidas de inibição da PDE4, tornando-as promissoras a uma possível atividade biológica.

Um bom valor de escore é interessante, entretanto, por se tratar de um modelo teórico, além desses valores é preciso realizar uma análise visual das formas de interação, pois algumas podem ser tidas como não reais por apresentarem conformações ou geometria dos átomos incompatíveis com o que se esperaria. Desta forma, escolheu-se os ácidos **34g** e **34h** para um estudo mais detalhado da forma de ancoramento, permitindo a obtenção de complexos dos ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos (**34g-h**) e o biorreceptor. Estes compostos foram escolhidos por não apresentarem substituintes, ou seja, serem os mais simples de cada série.

No total foram obtidos 13 complexos pelo programa, sendo 10 para o ácido **34g** e 3 para o ácido **34h**, os quais foram analisados qualitativamente, com o intuito de selecionar grupos de confôrmeros similares dentre os resultados. Foi possível separar os 13 complexos em 4 grandes grupos comuns de confôrmeros, 2 para **34g** e 2 para **34h**. Para **34g**, o primeiro grupo apresentava a carbonila amídica para frente (visualizado a

partir do exterior da cavidade enzimática) e ligeiramente paralela ao plano do grupo fenila; no segundo a carbonila amídica aponta-se para o interior da cavidade uma vez que o volume estérico da fenila impede a projeção do grupo nitrogenado para a face exposta ao solvente da enzima (Figura 46).

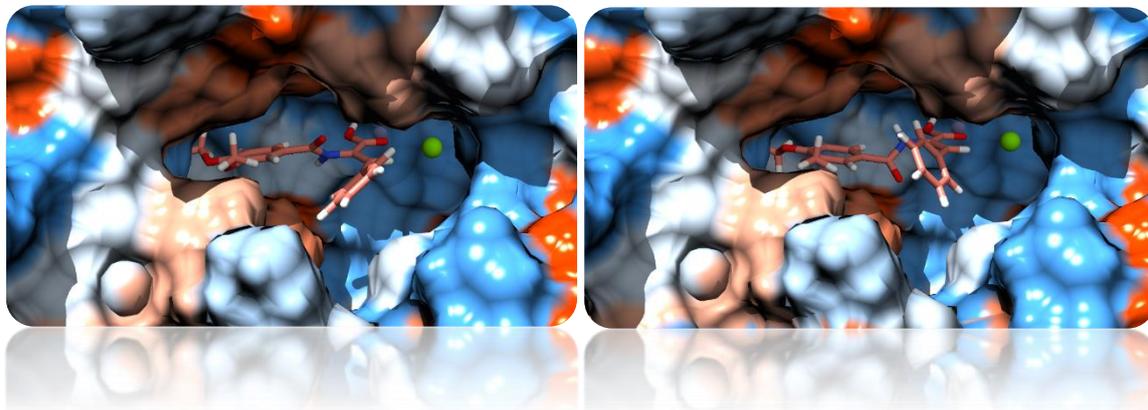


Figura 46. Confôrmeros do ácido-(*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34g**) dentro do sítio catalítico da PDE4 (à esquerda o primeiro confôrmero e à direita o segundo).

Para **34h**, em seu primeiro grupo a carbonila amídica encontra-se voltada para cima, com a fenila exposta a cavidade de acesso ao solvente e encaixando-se verticalmente numa bolsa hidrofóbica; e por fim, em seu segundo grupo, a carbonila fica mais voltada para o sítio de interação dos metais, numa conformação mais diagonal, a mesma adotada pela fenila voltada para a cavidade de acesso ao solvente (Figura 47).

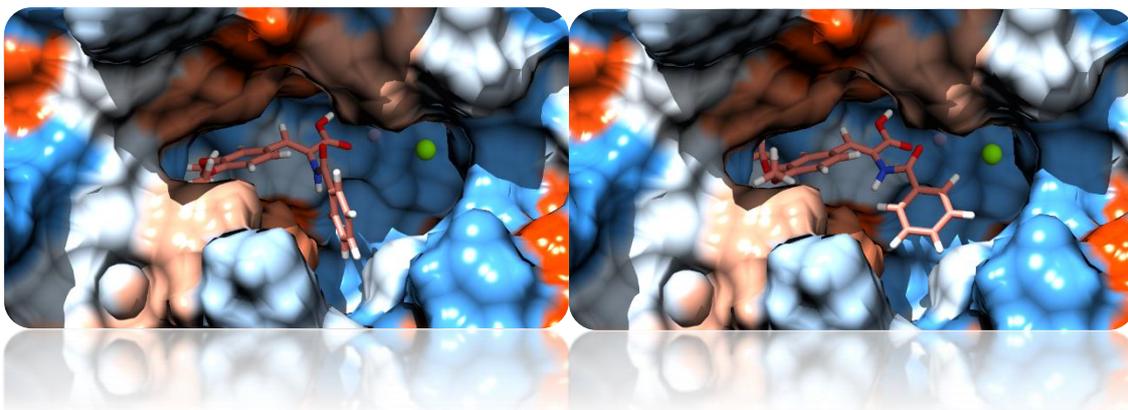


Figura 47. Confôrmeros do ácido-(*Z*)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34h**) dentro do sítio catalítico da PDE4 (à esquerda o terceiro confôrmero e à direita o quarto).

A partir destes 4 grupos de confôrmeros, foi possível fazer uma análise da ocupação da cavidade de acesso ao sítio catalítico da PDE4 com o ligante ancorado. Esta análise nos permitiu observar os modos como o ligante está ancorado à enzima e se estas interações seriam plausíveis como forma de inibição enzimática. Os 4 grupos de confôrmeros ligaram-se à enzima bloqueando bem toda a entrada do sítio do AMPc, incluindo a região onde estão presentes os íons metálicos (Zn^{2+} e Mg^{2+}), região esta muito importante para a atividade catalítica (KUMMERLE, 2009).

Ainda de acordo com este resultado, pode-se perceber que a fenila em Ar₂, para **34g**, e em Ar₁, para **34h**, fica voltada para a face externa exposta ao solvente e a inserção de substituintes neste anel aromático não representaria fator limitador em relação à interação dos ácidos-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos com o sítio receptor. Este poderia, inclusive, ser um fator favorável na investigação de grupos capazes de interagir com a parte externa do sítio, de modo a aumentar uma possível atividade e/ou seletividade.

Do ponto de vista das interações com os resíduos de aminoácido do sítio da PDE4, foi possível observar que os 4 confôrmeros apresentaram um perfil de ancoramento como o planejado.

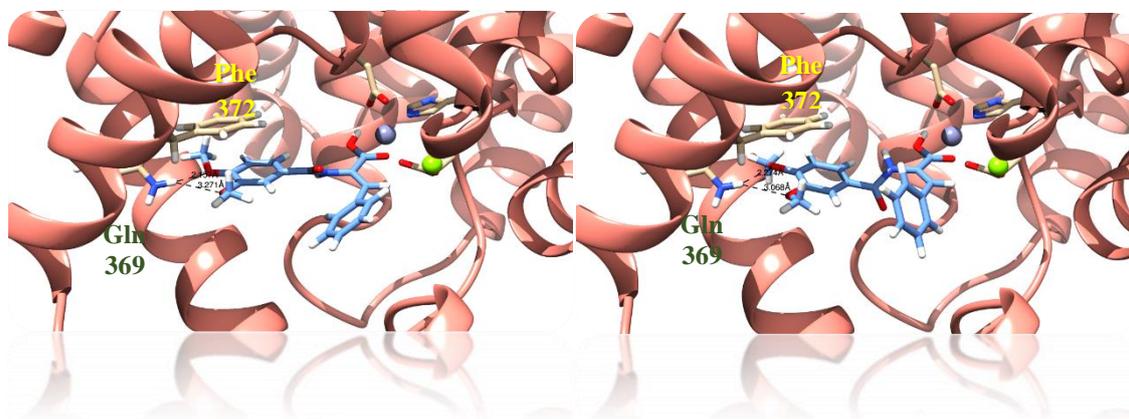


Figura 48. Análise das interações dos confôrmeros do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34g**) dentro do sítio catalítico da PDE4 (à esquerda o primeiro confôrmero e à direita o segundo).

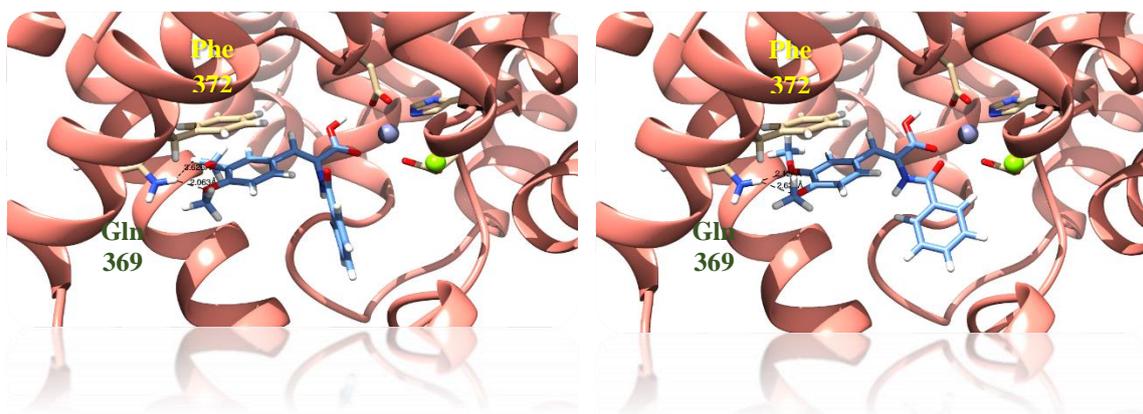


Figura 49. Análise das interações dos conformêros do ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílico (**34h**) dentro do sítio catalítico da PDE4 (à esquerda o terceiro conformêro e à direita o quarto).

As principais interações dos inibidores da PDE4 com o sítio catalítico foram mantidas nos compostos **34g** e **34h**, ou seja, as interações por ligações-H dos grupos dimetoxifenila com a glutamina 369 (Gln369), interações do tipo π -stacking com a fenilalanina 372 (Phe372) e interação com o sítio metálico, direta ou indiretamente (Figura 48 e 49) (KUMMERLE, 2009).

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

Utilizou-se para acompanhar o andamento de todas as reações a técnica de Cromatografia Planar em camada Delgada Analítica (CCDA) em placas de alumínio Kieselgel 60 (Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCDA foi realizada em lâmpada ultravioleta (254-365nm).

Óleo de silicone (Silaex) como fluido térmico no aquecimento de algumas reações.

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).

Bomba para filtrações a vácuo.

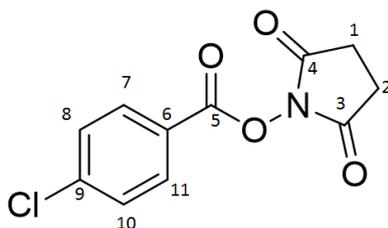
Placas de aquecimento IKA com controle de temperatura e agitação magnética.

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 400MHz e 500MHz. As amostras foram dissolvidas em DMSO contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN ^{13}C foram obtidos à 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400, respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em e DMSO contendo TMS como referência interna.

Além de toda a vidraria e papelaria básica de laboratório como balões, erlenmeyers, béchers, papéis de filtro, fita de pH, kitassato, funil de buckner, entre outros.

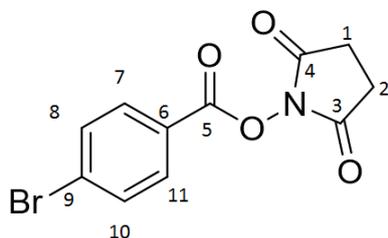
A mistura reacional é mantida em agitação à temperatura ambiente por 20 horas. A reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e eluída em hexano:acetato de etila 50%. Após a reação ter sido completada filtra-se em funil de buchner e o filtrado é evaporado em evaporador rotatório. O sólido obtido é usado na forma bruta com pureza adequada

2,5 – di-(oxo)-pirrolidil - 1 4-clorobenzóico (27a)



O produto **27a** foi obtido como um sólido branco amorfo em 93% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H_{1 e 2}: 2,91 (t, 4H); H_{8 e 10}: 7,75 (d, 2H); H_{7 e 11}: 8,12 (d, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{1 e 2}: 25,56; C₆: 123,29; C_{8 e 10}: 129,84; C_{7 e 11}: 131,86; C₉: 140,67; C₅: 161,32; C_{3 e 4}: 170,24.

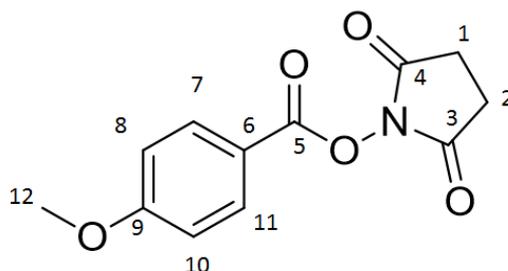
2,5 – di-(oxo)-pirrolidil - 1 4-bromobenzóico (27b)



O produto **27b** foi obtido como um sólido branco amorfo em 87% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H_{1 e 2}: 2,89 (t, 4H); H_{8 e 10}:

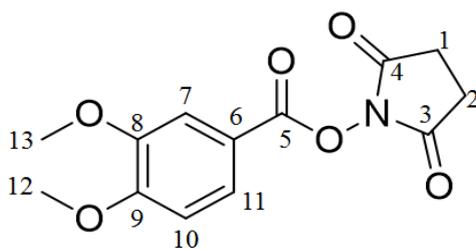
7,88 (d, 2H); H_{7 e 11}: 8,02 (d, 2H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{1 e 2}: 25,57; C₆: 123,65; C₉: 129,98; C_{8 e 10}: 131,86; C_{7 e 11}: 132,81; C₅: 161,32; C_{3 e 4}: 170,24.

2,5 – di-(oxo)-pirrolidil – 1 4-metóxibenzóico (27c)



O produto **27c** foi obtido como um sólido branco amorfo em 79% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H_{1 e 2}: 2,89 (t, 4H); H_{7 e 11}: 8,06 (d, 2H); H_{8 e 10}: 7,18 (d, 2H); H₁₂: 3,90 (s, 3H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{1 e 2}: 25,98; C₁₂: 56,30; C_{7 e 11}: 132,85; C₆: 116,77; C_{8 e 10}: 115,38; C₉: 161,77; C₅: 165,28; C_{3 e 4}: 170,94.

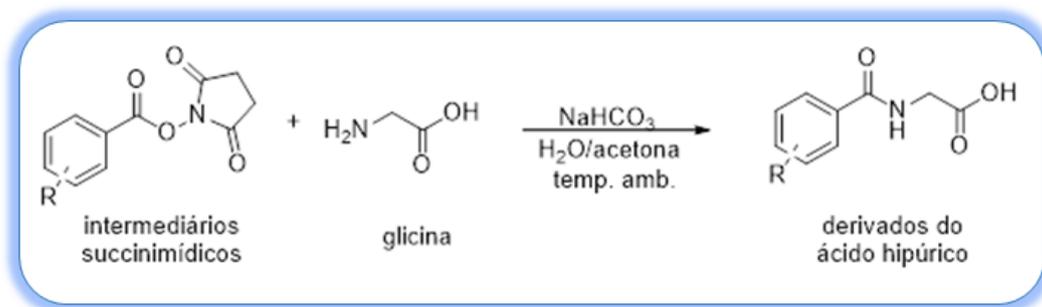
2,5 – di-(oxo)-pirrolidil-1 3,4-dimetóxibenzóico (27d)



O produto **27d** foi obtido como um sólido branco amorfo em 80% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H_{1 e 2}: 2,90 (t, 4H); H₇: 7,51 (sl, 1H); H₁₁: 7,77 (d, 1H); H₁₀: 7,21 (d, 1H); H₁₂: 3,91 (s, 3H); H₁₃: 3,86 (s, 3H). **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{1 e 2}: 25,98; C₁₃: 56,17; C₁₂: 56,46; C₁₀: 112,19; C₇: 112,34; C₆: 116,65; C₁₁: 125,17; C₈: 149,37; C₉: 155,20; C₅: 161,85; C_{3 e 4}: 170,93.

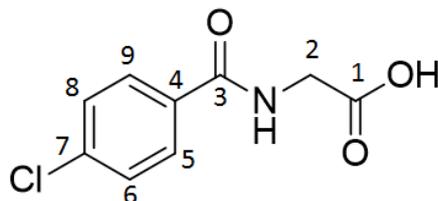
4.3.2. Síntese dos derivados do ácido hipúrico (29)

(MARIAPPAN *et al.*, 2011)



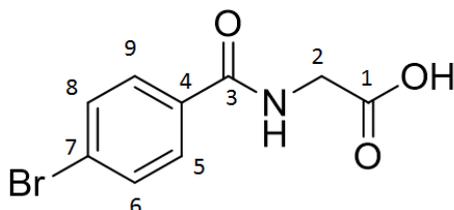
Descrição do método: Num frasco **A** o intermediário succinimídico é solubilizado em acetona. Noutro frasco **B**, reúne-se 1 mmol de glicina e 2 mmol de bicarbonato de sódio em água destilada. Submete-se a agitação magnética até completa solubilização. Verte-se o conteúdo do frasco **A** em **B**. Após 20h verifica-se por CCDA que a reação se completou. Filtra-se em funil de buchner para a retirada de impurezas sólidas oriundas do grupo de saída. Após a filtração é feita a acidificação do meio com ácido clorídrico diluído levando até pH=3. Filtra-se consecutivas vezes em funil de buckner para se obter o produto sólido branco. Para se retirar o produto ainda solúvel na água-mãe o filtrado é extraído com 5x20mL de diclorometano e 2x20mL de acetato de etila. (MARIAPPAN *et al.*, 2011).

Ácido 2 - (4 -clorobenzamido) acético (29a)



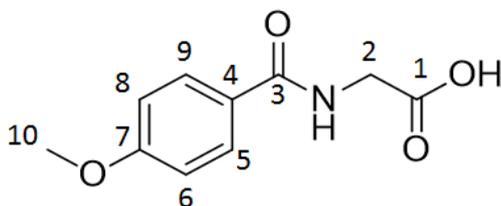
O produto **29a** foi obtido como um sólido branco amorfo em 74% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₂: 3,93 (s, 2H); H_{6 e 8}: 7,57 (d, 2H); H_{5 e 9}: 7,93 (d, 2H); H_{N-H}: 8,94 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₂: 41,70; C_{6 e 8}: 128,94; C_{5 e 9}: 129,63; C₄: 133,03; C₇: 136,75; C₃: 166,00; C₁: 171,65.

Ácido 2 - (4 -bromobenzamido) acético (29b)



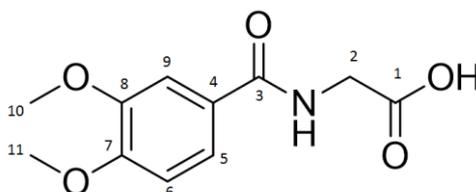
O produto **29b** foi obtido como um sólido branco amorfo em 76% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₂: 3,94 (s, 2H); H_{5 e 9}: 7,88 (d, 2H); H_{6 e 8}: 7,72 (d, 2H); H_{N-H}: 8,95 (s, 1H); H_{O-H}: 12,66 (sl, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₂: 41,70; C_{6 e 8}: 129,84; C_{5 e 9}: 131,89; C₄: 125,66; C₇: 133,42; C₃: 166,06; C₁: 171,64.

Ácido 2 - (4 -metóxi benzamido) acético (29c)



O produto **29c** foi obtido como um sólido branco amorfo em 66% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₀: 3,83 (s, 3H); H₂: 3,92 (s, 2H); H_{6 e 8}: 7,03 (d, 2H); H_{5 e 9}: 7,87 (d, 2H); H_{N-H}: 8,69 (s, 1H); H_{O-H}: 12,55 (sl, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₂: 41,62; C₁₀: 55,81; C_{6 e 8}: 114,01; C₄: 126,55; C_{5 e 9}: 129,56; C₇: 162,16; C₃: 166,45; C₁: 171,95.

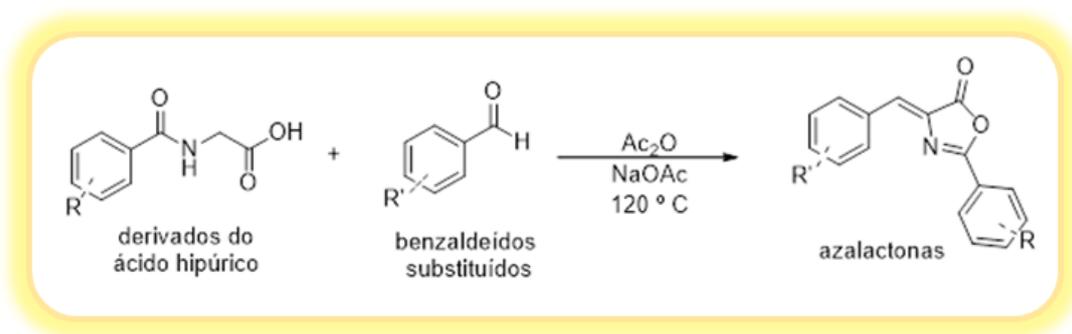
Ácido 2 - (3,4 -dimetóxi)benzamido) acético (29d)



O produto **29d** foi obtido como um sólido branco amorfo em 73% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₀ e H₁₁: 3,80 (s, 6H); H₂: 3,91 (s, 2H); H₆: 7,03 (d, 1H); H₅: 7,49 (d, 1H); H₉: 7,46 (s, 1H); H_{N-H}: 8,69 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₂: 41,70; C₁₀: 55,99; C₁₁: 56,06; C₆: 111,06; C₉: 111,37; C₅: 121,00; C₄: 126,61; C₈: 148,70; C₇: 151,83; C₃: 166,44; C₁: 171,98.

4.3.3. Síntese das azalactonas (31)

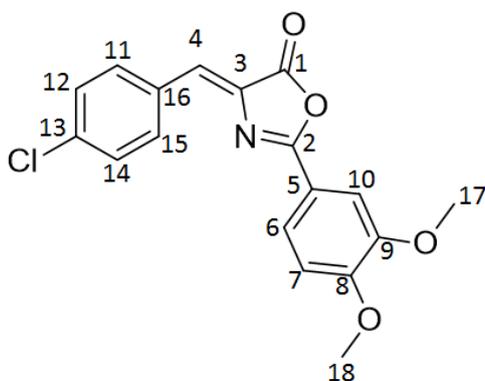
(ERLENMEYER, 1983; PLOCHL, 1983; CLEARY et al., 2010)



A obtenção dos compostos azalactônicos se dá através da reação de Erlenmeyer-Plöchl que 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 (CARTER, 1946).

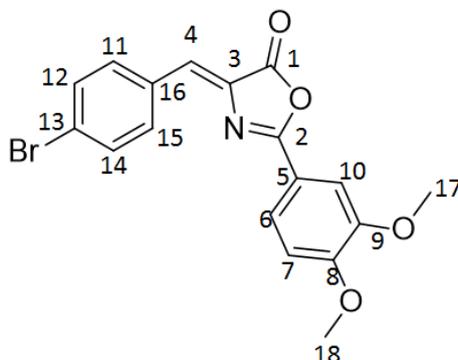
Descrição do método: Em um tubo selado são adicionados 1 mmol de ácido hipúrico, 1 mmol de benzaldeído, 0,2 mmol de acetato de sódio anidro em anidrido acético. Aqueceu-se a reação com tubo selado em placa de aquecimento e agitação por 20 minutos à 120°C. Após aquecimento, resfria-se a reação em banho de gelo. O produto formado é filtrado à vácuo com auxílio de funil de buchner, kitassato, bomba e, posteriormente, lavado com uma solução de água e etanol 2:1.

(Z) - 4 - (4 - clorobenzalideno) - 2 - (3,4 - dimetóxilifenil)ox- 5(4H) – azolona (31a)



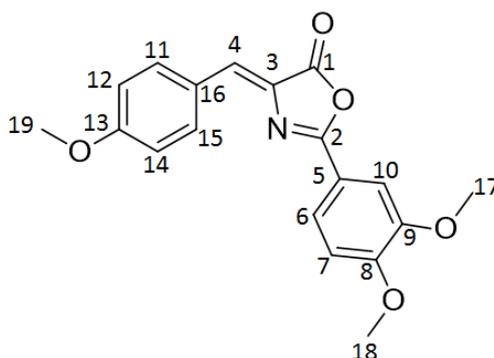
O produto **31a** foi obtido como um sólido amarelo amorfo em 58% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,99 (s, 3H); H₁₈: 4,00 (s, 3H); H₇: 6,99 (d, 1H); H₄: 7,11 (s, 1H); H_{12 e 14}: 7,45 (d, 2H); H₁₀: 7,61 (sl, 1H); H₆: 7,82 (dd, 1H); H_{11 e 15}: 8,12 (d, 2H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{17 e 18}: 56,13; C₇: 110,18; C₄: 110,98; C₁₆: 117,65; C₁₀: 123,01; C₆: 128,56; C_{12 e 14}: 129,15; C_{3 e 5}: 132,13; C_{11 e 15}: 133,25; C₁₃: 136,86; C₉: 149,22; C₈: 153,77; C₂: 163,61; C₁: 167,57.

(Z) - 4 - (4 - bromobenzalideno) - 2 - (3,4 - dimetóxfenil)ox- 5(4H) – azolona (31b)



O produto **31b** foi obtido como um sólido amarelo em 57% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,99 (s, 3H); H₁₈: 4,00 (s, 3H); H₇: 6,99 (d, 1H); H₄: 7,09 (s, 1H); H_{12 e 14}: 7,61 (d, 2H); H₁₀: 7,61 (sl, 1H); H₆: 7,82 (dd, 1H); H_{11 e 15}: 8,05 (d, 2H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{17 e 18}: 56,13; C₇: 110,19; C₄: 110,99; C₁₆: 117,64; C₁₀: 125,47; C₆: 128,61; C_{12 e 14}: 132,12; C_{3 e 5}: 132,52; C_{11 e 15}: 133,39; C₁₃: 133,95; C₉: 149,23; C₈: 153,79; C₂: 163,66; C₁: 167,56.

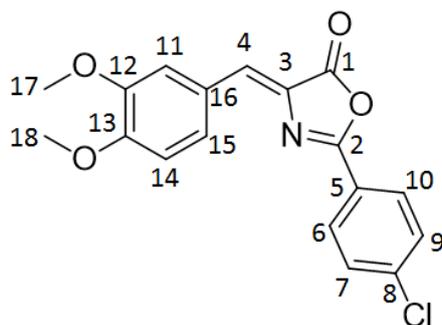
(Z) - 4 - (4 - metóxi benzalideno) - 2 - (3,4 - dimetóxfenil)ox- 5(4H) – azolona (31c)



O produto **31c** foi obtido como um sólido amarelo em 55% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₉: 3,90 (s, 3H); H₁₇: 3,99 (s, 3H); H₁₈: 4,01 (s, 3H); H₇: 7,00 (d, 1H); H₄: 7,17 (s, 1H); H_{12 e 14}: 7,00 (d, 2H); H₁₀:

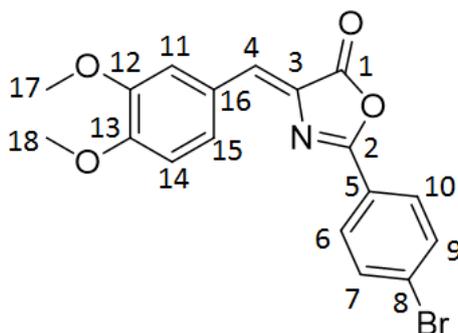
7,63 (sl, 1H); H₆: 7,82 (dd, 1H); H_{11 e 15}: 8,18 (d, 2H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₉: 55,49; C_{17 e 18}: 56,19; C₇: 110,11; C₄: 111,00; C_{12 e 14}: 114,51; C₁₆: 118,22; C₁₀: 122,60; C₆: 130,67; C_{3 e 5}: 131,36; C_{11 e 15}: 134,35; C₁₃: 149,22; C₉: 153,35; C₈: 161,98; C₂: 162,36; C₁: 168,26.

(Z) - 2 - (4-clorofenil) - 4 - (3,4 - dimetóxi benzelideno)ox- 5(4H) - azolona (31d)



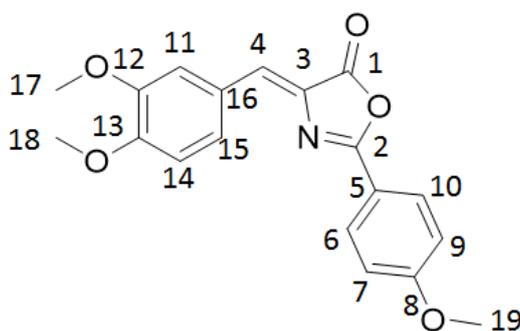
O produto **31d** foi obtido como um sólido amarelo em 54% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,96 (s, 3H); H₁₈: 4,01 (s, 3H); H₁₄: 6,94 (d, 1H); H₄: 7,20 (s, 1H); H_{7 e 9}: 7,49 (d, 2H); H₁₅: 7,57 (dd, 1H); H_{6 e 10}: 8,04 (d, 2H); H₁₁: 8,09 (sl, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,91; C₁₈: 56,05; C₁₄: 110,93; C₄: 113,95; C₃: 124,27; C₁₆: 126,71; C₁₁: 127,92; C_{7 e 9}: 129,21; C_{6 e 10}: 129,41; C₅: 130,87; C₁₅: 132,62; C₈: 139,42; C₁₂: 149,15; C₁₃: 152,25; C₂: 161,51; C₁: 167,61.

(Z) - 2 - (4-bromofenil) - 4 - (3,4 - dimetóxi benzelideno)ox- 5(4H) - azolona (31e)



O produto **31e** foi obtido como um sólido amarelo em 51% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 4,02 (s, 3H); H₁₈: 4,07 (s, 3H); H₁₄: 6,99 (d, 1H); H₄: 7,31 (s, 1H); H₁₅: 7,63 (dd, 1H); H_{7 e 9}: 7,71 (d, 2H); H_{6 e 10}: 8,02 (d, 2H); H₁₁: 8,14 (sl, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,93; C₁₈: 56,07; C₁₄: 110,95; C₄: 113,97; C₃: 124,73; C₁₆: 126,74; C₁₁: 127,94; C₅:128,06; C_{7 e 9}: 129,31; C₈:130,88; C_{6 e 10}: 132,39; C₁₅: 132,70; C₁₂:149,17; C₁₃: 152,28; C₂: 161,65; C₁: 167,58.

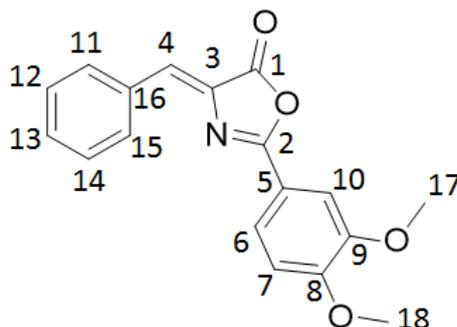
(Z) - 2 - (4-metóxi fenil) - 4 - (3,4 - dimetóxi benzelideno)ox- 5(4H) - azolona (31f)



O produto **31f** foi obtido como um sólido amarelo em 49 % de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₉: 3,90 (s, 3H); H₁₇: 3,96 (s, 3H); H₁₈: 4,03 (s, 3H); H₁₄: 6,94 (d, 1H); H_{7 e 9}: 7,02 (d, 2H); H₄: 7,14 (s, 1H); H₁₅: 7,55 (dd, 1H); H_{6 e 10}: 8,08 (d, 2H); H₁₁: 8,16 (sl, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO /**

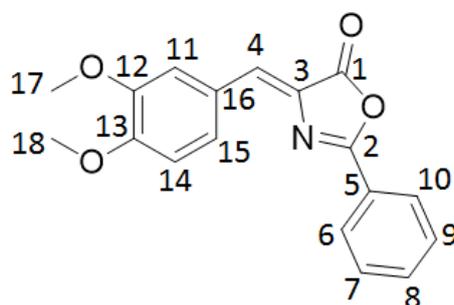
TMS (δ - ppm): C₁₉: 55,58; C₁₇: 55,90; C₁₈: 56,02; C₁₄: 110,86; C₄: 113,80; C₇e₉: 114,51; C₃: 118,08; C₁₆: 127,06; C₁₁: 127,39; C₆e₁₀: 130,07; C₁₅: 130,57; C₅:131,48; C₈:149,09; C₁₂:151,75; C₁₃: 162,33; C₂: 163,63; C₁: 168,15.

(Z) - 4 - benzelideno - 2 - (3,4 - dimetóxfenil)ox- 5(4H) – azolona (31g)



O produto **31g** foi obtido como um sólido amarelo em 50% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,99 (s, 3H); H₁₈: 4,01 (s, 3H); H₇: 7,00 (d, 1H); H₄: 7,20 (s, 1H); H_{12, 13 e 14}: 7,45 – 7,51 (m, 3H); H₁₀: 7,64 (sl, 1H); H₆: 7,84 (dd, 1H); H_{11 e 15}: 8,20 (d, 2H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C_{17 e 18}: 56,20; C₇: 110,25; C₄: 111,02; C₁₆: 117,92; C₁₀: 122,96; C_{12 e 14}: 128,91; C₆: 130,47; C₁₃: 130,96; C_{11 e 15}: 132,27; C₅: 133,52; C₃:133,69; C₉: 149,26; C₈: 153,67; C₂: 163,39; C₁: 167,94.

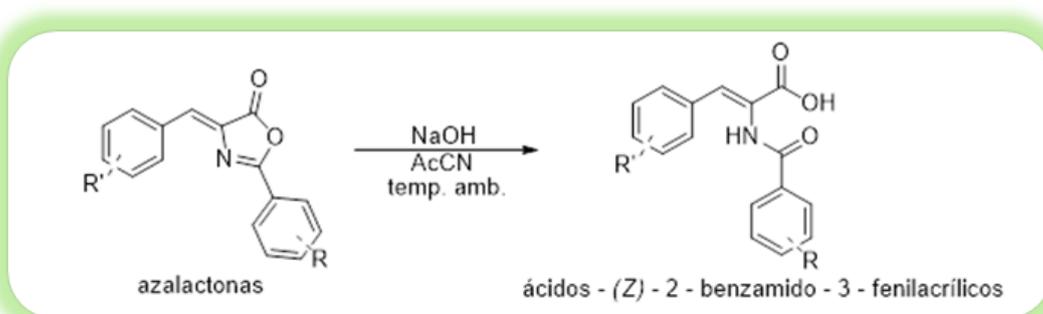
(Z) – 4 – (3,4-dimetoxibenzelideno) – 2 – fenil – ox– 5(4H) – azolona (31h)



O produto **31h** foi obtido como um sólido amarelo em 52% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,97 (s, 3H); H₁₈: 4,03 (s, 3H); H₁₄: 6,95 (d, 1H); H₄: 7,21 (s, 1H); H_{7, 8, 9 e 15}: 7,51 – 7,62 (m, 4H); H₁₁: 8,18 (sl, 1H); H_{6 e 10}: 8,13 (d, 2H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,93; C₁₈: 56,04; C₁₄: 110,88; C₄: 113,91; C₁₆: 125,79; C₅: 126,85; C₈: 127,79; C_{7 e 9}: 128,04; C_{6 e 10}: 128,98; C₃: 131,16; C₁₁: 132,12; C₁₅: 133,08; C₁₂: 149,14; C₁₃: 152,08; C₂: 162,43; C₁: 167,92.

4.3.4. Obtenção dos novos ácidos - (Z) – 2 – benzamido – 3 – fenilacrílicos (34)

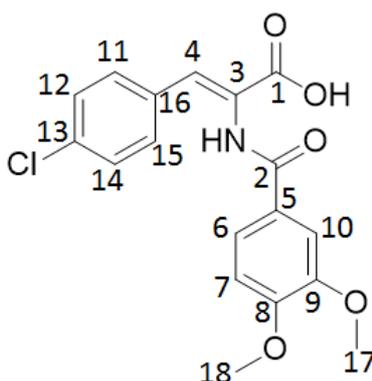
(HISASHI SHINKAI, *et al.*, 1987)



A terceira e última passagem consiste na hidrólise da azalactona formada na etapa anterior. O objetivo nesta fase é abrir o anel azalactônico pela reação em meio básico descrita por HISASHI SHINKAI, *et al.* e formar o ácido - (Z) – 2 – benzamido – 3 – fenilacrílico.

Descrição do método: Num balão de fundo redondo foi adicionado a azalactona à determinado volume de acetonitrila e hidróxido de sódio aquoso 1M. A mistura reacional foi mantida sob agitação até a completa solubilização, levando em média 30 minutos. O solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Após a retirada do solvente iniciou-se o processo de purificação, uma extração líquido-líquido com diclorometano (2x CH₂Cl₂). Em seguida adiciona-se à fase aquosa ácido clorídrico concentrado em banho de gelo. Uma parte do produto formado foi filtrado e lavado com água gelada. Na fase aquosa outra parte do produto, que tenha solubilizado em água durante a precipitação, sofre uma reextração com acetato de etila (3x acetato). Após a reextração, evaporou o solvente.

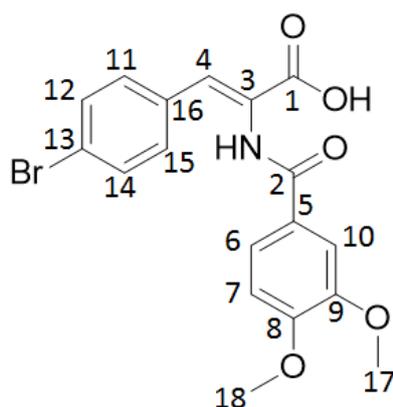
Ácido (Z) - 3 - (4 - clorofenil) - 2 - (3,4 - dimetóxi benzamido) acrílico (34a)



O produto **34a** foi obtido como um sólido branco em 96% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,81 (s, 3H); H₁₈: 3,83 (s, 3H); H₇: 7,08 (d, 1H); H₄: 7,38 (s, 1H); H₁₄ e ₁₂: 7,46 (d, 2H); H₁₀: 7,54 (sl, 1H); H₆: 7,62 (dd, 1H); H₁₁ e ₁₅: 7,66 (d, 2H); H_{N-H}: 9,82 (s, 1H); H_{O-H}: 12,86 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 56,04; C₁₈: 56,16; C₇: 111,39; C₁₀: 111,46;

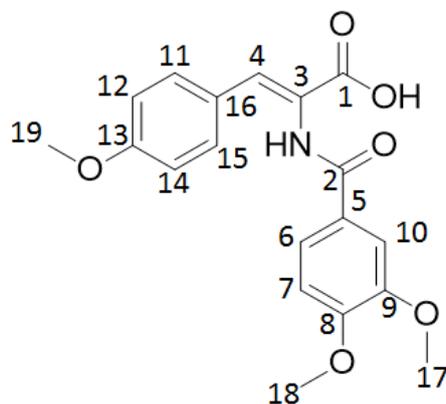
C₄: 121,69; C₁₆: 126,03; C₅: 128,81; C₁₂ e ₁₄: 129,12; C₆: 131,27; C₁₁ e ₁₅: 131,85; C₃: 133,31; C₁₃:134,11; C₉:148,81; C₈:152,29; C₂: 165,95; C₁: 166,84. **I.V. Max. (KBr) ν -cm⁻¹**: 3221 (O-H); 1693 (C=O); 1635 (C=O); 1598(C=C); 1586 (C=C); 1263 (C-N); 1089 (C-O-C); 768 (C-Cl).

Ácido (Z) - 3 - (4 - bromofenil) - 2 - (3,4 - dimetóxi benzamido) acrílico (34b)



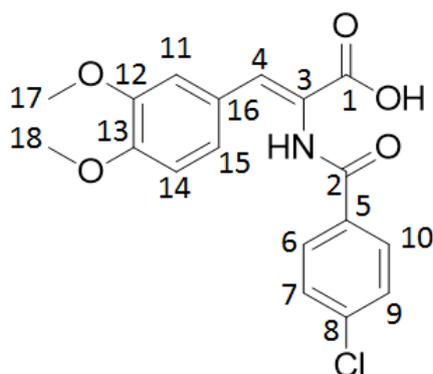
O produto **34b** foi obtido como um sólido branco em 95% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm)**: H₁₇: 3,81 (s, 3H); H₁₈: 3,83 (s, 3H); H₇: 7,07 (d, 1H); H₄: 7,35 (s, 1H); H₁₀: 7,54 (sl, 1H); H_{11, 12, 14 e 15}: 7,58 (m, 4H); H₆: 7,62 (dd, 1H); H_{N-H}: 9,80 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm)**: C₁₇: 56,03; C₁₈: 56,13; C_{7 e 10}: 111,39; C₄: 121,70; C₁₆: 122,90; C₅: 126,03; C₆: 128,90; C_{11, 12, 14 e 15}: 132,05; C₃:131,29, C₁₃: 133,66; C₉:148,81; C₈:152,29; C₂: 165,93; C₁: 166,84. **I.V. Max. (KBr) ν -cm⁻¹**: 3200 (O-H); 1687 (C=O); 1630 (C=O); 1583 (C=C); 1501 (C=C); 1267 (C-N); 1019 (C-O-C); 531 (C-Br).

Ácido (Z) - 3 - (4 - metóxfenil) - 2 - (3,4 - dimetóxibenzamido) acrílico (34c)



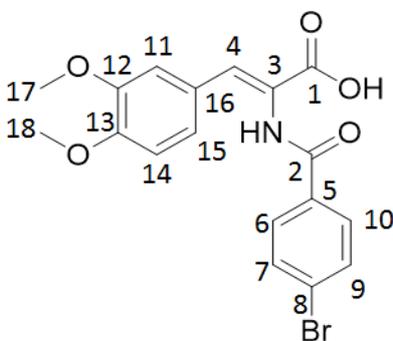
O produto **34c** foi obtido como um sólido branco em 92% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₉: 3,75 (s, 3H); H₁₇: 3,82 (s, 3H); H₁₈: 3,83 (s, 3H); H_{12 e 14}: 6,95 (d, 2H); H₇: 7,09 (d, 1H); H₄: 7,40 (s, 1H); H₁₀: 7,56 (sl, 1H); H_{6, 11 e 15}: 7,62 – 7,65 (m, 3H); H_{N-H}: 9,71 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₉: 55,72; C₁₇: 56,03; C₁₈: 56,14; C₇: 111,36; C₁₀: 111,45; C_{12 e 14}: 114,57; C₄: 121,59; C₁₆: 125,68; C₅: 126,30; C₃: 126,74; C_{11 e 15}: 132,12; C₆: 133,46; C₉: 148,79; C₈: 152,16; C₁₃: 160,58; C₂: 165,91; C₁: 167,17. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3197 (O-H); 1684 (C=O); 1629 (C=O); 1600 (C=C); 1503 (C=C); 1257 (C-N); 1025 (C-O-C).

Ácido (Z) - 2 - (4 - clorobenzamido) - 3 - (3,4 - dimetóxilfenil) acrílico (34d)



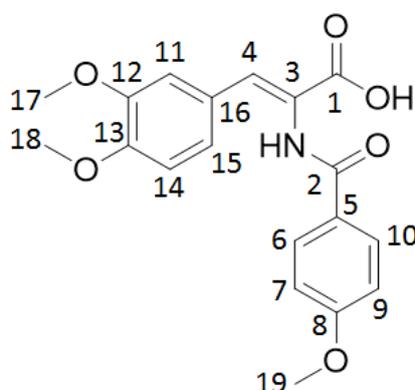
O produto **34d** foi obtido como um sólido branco em 93% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,59 (s, 3H); H₁₈: 3,76 (s, 3H); H₁₄: 6,98 (d, 1H); H₁₅: 7,25 (dd, 1H); H₁₁: 7,32 (sl, 1H); H₄: 7,46 (s, 1H); H_{7 e 9}: 7,61 (d, 2H); H_{6 e 10}: 8,02 (d, 2H); H_{N-H}: 9,98 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,61; C₁₈: 55,98; C₁₄: 111,99; C₁₁: 113,20; C₄: 124,40; C₁₆: 125,14; C₅: 126,64; C_{7 e 9}: 129,10; C_{6 e 10}: 129,99; C₃: 132,80; C₁₅: 134,51; C₈: 137,15; C₁₂: 148,74; C₁₃: 150,47; C₂: 165,30; C₁: 166,93. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3227 (O-H); 1687 (C=O); 1647 (C=O); 1597 (C=C); 1503 (C=C); 1264 (C-N); 1022 (C-O-C); 761 (C-Cl).

Ácido (Z) - 2 - (4 - bromobenzamido) - 3 - (3,4 - dimetóxilfenil) acrílico (34e)



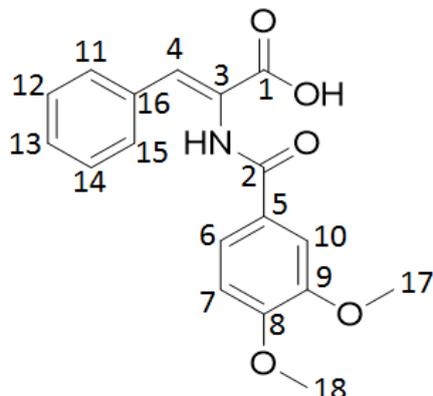
O produto **34e** foi obtido como um sólido branco em 93% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,60 (s, 3H); H₁₈: 3,76 (s, 3H); H₁₄: 6,98 (d, 1H); H₁₅: 7,25 (dd, 1H); H₁₁: 7,32 (sl, 1H); H₄: 7,46 (s, 1H); H_{7 e 9}: 7,75 (d, 2H); H_{6 e 10}: 7,94 (d, 2H); H_{N-H}: 9,98 (s, 1H); H_{O-H}: 12,76 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,17; C₁₈: 55,52; C₁₄: 111,53; C₁₁: 112,77; C₄: 123,92; C₁₆: 124,67; C₅: 126,17; C_{7 e 9}: 129,69; C_{6 e 10}: 131,57; C₃: 132,71; C₁₅: 134,04; C₈:130,00; C₁₂:148,29; C₁₃: 150,02; C₂: 164,96; C₁: 166,44. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3224 (O-H); 1696 (C=O); 1647 (C=O); 1630 (C=C); 1502 (C=C); 1263 (C-N); 1020 (C-O-C); 592 (C-Br).

Ácido (Z) - 2 - (4 - metóxi benzamido) - 3 - (3,4 - dimetóxi fenil) acrílico (34f)



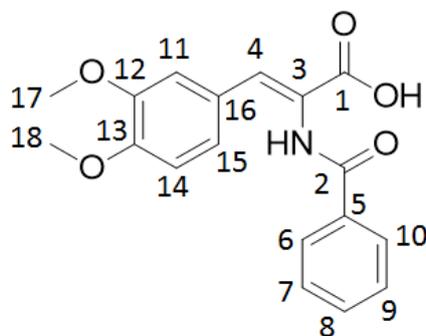
O produto **34f** foi obtido como um sólido branco em 92% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₉: 3,58 (s, 3H); H₁₇: 3,76 (s, 3H); H₁₈: 3,83 (s, 3H); H₁₄: 6,97 (d, 1H); H_{7 e 9}: 7,05 (d, 2H); H₁₅: 7,24 (dd, 1H); H₁₁: 7,34 (sl, 1H); H₄: 7,42 (s, 1H); H_{6 e 10}: 8,00 (d, 2H); H_{N-H}: 9,72 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₉: 55,57; C₁₇: 55,89; C₁₈: 55,97; C₁₄: 111,94; C₁₁: 113,16; C_{7 e 9}: 114,13; C₄: 124,40; C₁₆: 125,63; C₅: 126,28; C₃:126,87; C_{6 e 10}: 130,01; C₁₅: 133,99; C₈: 148,71; C₁₂: 150,35; C₁₃: 162,45; C₂: 165,75; C₁: 167,19. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3227 (O-H); 1686 (C=O); 1642 (C=O); 1604 (C=C); 1512 (C=C); 1254 (C-N); 1024 (C-O-C).

Ácido (Z) - 2 - (3,4 - dimetóxi benzamido) - 3 - fenilacrílico (34g)



O produto **34g** foi obtido como um sólido branco em 94% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,81 (s, 3H); H₁₈: 3,83 (s, 3H); H₇: 7,08 (d, 1H); H₁₀: 7,56 (sl, 1H); H_{6, 12, 13 e 14}: 7,34 – 7,40 (m, 4H); H_{10, 11 e 15}: 7,63 – 7,66 (m, 3H); H_{N-H}: 9,82 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,59; C₁₈: 55,70; C_{7 e 10}: 110,95; C₄: 121,14; C₁₆: 125,71; C₅: 127,74; C_{12 e 14}: 128,63; C₁₃: 129,31; C_{11 e 15}: 129,81; C₆: 132,49; C₃: 133,85; C₉: 148,35; C₈: 151,77; C₂: 165,54; C₁: 166,53. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3214 (O-H); 1687 (C=O); 1630 (C=O); 1582 (C=C); 1497 (C=C); 1265 (C-N); 1018 (C-O-C).

Ácido (Z) - 2 - benzamido - 3 - (3,4 - dimetóxi fenil) acrílico (34h)



O produto **34h** foi obtido como um sólido branco em 92% de rendimento, após purificação. **RMN ¹H (500 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** H₁₇: 3,58 (s, 3H); H₁₈: 3,76 (s, 3H); H₁₄: 6,98 (d, 1H); H₁₅: 7,26 (dd, 1H); H₁₁: 7,34 (sl, 1H); H₄: 7,46 (s, 1H); H_{7 e 9}: 7,52 (t, 2H); H₈: 7,60 (t, 1H); H_{6 e 10}: 8,01 (d, 2H); H_{N-H}: 9,89 (s, 1H); H_{O-H}: 12,62 (s, 1H); **RMN ¹³C (125 MHz) DMSO / TMS (δ - ppm):** C₁₇: 55,58; C₁₈: 55,98; C₁₄: 111,98; C₁₁: 113,22; C₄: 124,41; C₁₆: 125,39; C₅: 126,75; C_{7 e 9}: 128,05; C_{6 e 10}: 128,96; C₈: 132,27; C₁₅: 134,05; C₃: 134,38; C₁₂: 148,73; C₁₃: 150,43; C₂: 166,28; C₁: 167,05. **I.V. Max. (KBr) ν-cm⁻¹:** 3513-3445 (N-H); 3197 (O-H); 1693 (C=O); 1643 (C=O); 1598 (C=C); 1508 (C=C); 1252 (C-N); 1019 (C-O-C).

5. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

A rota de síntese para a obtenção dos ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos mostrou-se promissora, visto que passa por intermediários reacionais estáveis e de fácil armazenamento, além de apresentar rendimentos reacionais de razoáveis a bons e reprodutíveis.

A análise espectroscópica de RMN de ^1H dos ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos sintetizados indicou a obtenção de produto com estereoquímica única da dupla ligação. A esta foi atribuída a configuração Z, baseado em análise de RMN ^{13}C acoplado com hidrogênio à longa distância indicou a presença deste isômero Z na oxazolona intermediária n-1, e também pela sua maior estabilidade termodinâmica calculada através de modelagem molecular.

Os estudos de “docking” dos produtos finais mostraram-se promissores, uma vez que apresentam perfil teóricos de inibição para a PDE4 muito semelhantes a inibidores já descritos na literatura, e corroboram o planejamento molecular dos ácido-(Z)-2-benzamido-3-fenilacrílicos.

Como perspectivas, os compostos serão testados *in vitro* e *in vivo* para medir sua atividade biológica de inibição frente a fosfodiesterase 4 e também como anti-inflamatório para doenças pulmonares.

Caso apresentem atividade biológica, será possível explorar grupos capazes de interagir com a parte da cavidade enzimática exposta ao solvente, aumentando ainda mais a afinidade e/ou seletividade dos compostos com a enzima.

6. BIBLIOGRAFIA

AHMAD, R. KHOSROPOUR. *C₆(Mim)₂]₂W₁₀O₃₂.2H₂O: A novel and powerful catalyst for the synthesis of 4-arylidene-2-phenyl-5(4)-oxazolones under ultrasonic condition. University of Isfahan, 2010.*

ALONSO, H.; BLIZBYUK, A. A.; GREASY. *Combining docking simulation in drug design. Medical Research Reviews*, v. 9, p. 531-568, 2006.

ANDRADE G. A. , PISTNER A. J., YAP G. P. A. , LUTTERMAN D., ROSENTHAL J. *Photocatalytic Conversion of CO₂ to CO Using Rhenium Bipyridine Platforms Containing Ancillary Phenyl or BODIPY Moieties. ACS Catalysis*, v. 3, n. 8, p. 1685 – 1692, 2013.

Asian-Development-Bank. *Toward an Environmentally Sustainable Future: Country Environmental Analysis of the People's Republic of China*, 2013.

Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. *Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica*, 2001.

ATHANAZIO, R., *Airway disease: similarities and differences between asthma, COPD and bronchiectasis. Clinics*, v. 67, n. 11, p. 1335 – 1343, 2012.

BANNER K. H., TREVETHICK M. A. *PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. Trends Pharmacol. Sci.*, v. 25, n. 8, p. 430 – 436, 2004.

BANNER, K. H., PRESS, N. J. *Dual PDE3/4 inhibitors as therapeutic agents for chronic obstructive pulmonary disease. British journal of pharmacology*, v. 157, n. 6, p. 892 - 906, 2009.

BARJAKTAREVIC, I. Z., ARREDONDO, A. F., COOPER, C. B. *Positioning new pharmacotherapies for COPD. International Journal of COPD*, v. 10, p. 1427 – 1442, 2015.

BARNES, P. J. *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 3, p. 183 – 192, 2008.

BARNES, P. J. *Mechanisms in COPD: differences from asthma*. **Chest**, v. 117, p. 10 – 14, 2000.

BARNETTE M. S. *Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)*. **Prog. Drug Res.**, v. 53, p. 193 – 229, 1999.

BARNETTE M. S., CHRISTENSEN S. B., UNDERWOOD D.C. *Phosphodiesterase 4: Biological underpinnings for the design improved inhibitors*. **Pharmacol. Rev. Commun.**, v. 8,n. 1, p. 65 – 73, 1995.

BARNETTE M.S., BARTUS J.O., BURMAN M. *Association of the anti-inflammatory activity of phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibitors with either inhibition of PDE4 catalytic activity or competition forrolipram binding*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 51, n. 7, p. 949 – 956, 1996.

BÁRTHOLO, R. M. *Diferenças clínicas entre asma e DPOC*. **Revista HUPE, UERJ**, v. 12, n. 2, p. 62 – 70, 2013.

BOLGER G.B., ERDOGAN S., JONES R.E. *Characterization of five different proteins produced by alternatively spliced mRNAs from the human cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D gene*. **Biochem. J.**, v.328, pt. 2, p. 539 – 548, 1997.

BORGES, W., BURNS, D., VIEIRA, S. E. *Asthma in childhood: drug therapy*. **Ver. Assoc. Med.**, v.57, n. 4, p. 369 – 376, 2011.

BUTCHER R. W.; SUTHERLAND E. W. *Adenosine 3',5'-Phosphate in Biological*. **The jornal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 4, 1962.

CAMPOS H., XISTO D., ZIN W.A., ROCCO P.R.M. *Inibidores de fosfodiesterases: novas perspectivas de uma antiga terapia na asma?* **J. Pneumol**, v.29, n. 3, 2003.

CAMPOS, H. S., CAMARGOS, P. A. M. *Broncodilatadores*. **Pulmao RJ**, v. 21, n. 2, p. 60 – 64, 2012.

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

CARTER, H. E. *Azalactones*. **Org react.**, v. 3, p. 198 – 239, 1946.

CAVALLA D., FRITH R. *Phosphodiesterase IV inhibitors: structural diversity and therapeutic potential in asthma*. **Curr. Med. Chem.**, v. 2, p. 561 – 572, 1995.

CAZZOLA, M., SEGRETI, A., MATERA, M. G. *Novel bronchodilators in asthma*. **Curr. Opin. Pulm. Med.**, v. 16, n. 1, p. 6 – 12, 2010.

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.

CHOUDHARY, M. I. *Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure–activity relationships*. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, n. 17, p. 6027-6033, 2006.

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.

COMPTON C. H., GUBB J., NIEMAN R. *Cilomilast, a selective phosphodiesterase-4 inhibitor for treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomised, dose-ranging study*. **The Lancet.**, v. 358, p. 265 – 70, 2001.

COSTA C. H., RUFINO R.; *Tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica*. **Revista HUPE RJ**, v. 12, n. 2, p. 71 – 77, 2013.

CROCKER I. C., TOWNLEY R. G. *Therapeutic potential of phosphodiesterase 4 inhibitors in allergic diseases*. **Drugs Today.**, v. 35, n. 7, p. 519 – 535, 1999.

Da SILVA, V. B. *Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes*. 2007. Dissertação – USP.

DE AZEVEDO, L. L. *Síntese e avaliação farmacológica de novas imidazolonas planejadas como inibidoras de cisteína proteases para o tratamento da Leucemia*. 2013. Dissertação (Mestrado) – UFRRJ.

DE AZEVEDO, L. L.; KUMMERLE, A. E. *Inibidores da PDE4: da Descoberta e Fracasso Anunciado ao seu Ressurgimento*. **Rev. Virtual Quím.**, v. 7, n. 2, p. 465 – 494, 2014.

DETHLEFSEN, U., REPGAS, R. *Ein neues therapieprinzip bei nechtlichen asthma*. **Klin Med.**, v. 80, p. 44 – 47, 1985.

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

ERTEKIN, K.; ALP, S.; KARAPIRE, C.; YENIGÜL, B.; HENDEN, E.; IÇLI, S. *Fluorescence emission studies of an azlactone derivative embedded in polymer films: an optical sensor for pH measurements*. **J. Photochem, Photobiol. A**, v. 137, p. 155-161, 2000.

ERTEKIN, K.; ALP, S.; YALCIN, I. *Photophysical and photochemical characteristics of an azlactone dye in sol-gel matrix; a new fluorescent pH indicator*. **Dyes & Pigm.**, v. 56, n. 2, p. 125-133, 2003.

ERTEKIN, K.; CINAR, S.; AYDEMIR, T.; ALP, S. *Glucose sensing employing fluorescent pH indicator: 4-[(p-N,N-dimethylamino)benzylidene]-2-phenyloxazole-5-one*. **Dyes & Pigm.**, v. 67, n. 2, p. 133-138, 2005.

EUQUERES, J. S. *Estimativa do pKa da Rutina empregando modelos semi-empíricos de cálculo mecânico-quântico*. 2009. Dissertação – Universidade Federal de Uberlândia.

FANG, X., WANG, C. X. *COPD in China: the burden and importance of proper management*. **Chest**, v. 139, n. 4, p. 920 – 929, 2011.

FERREIRA, C.; ARROIO, A.; RESENDE, D. B. *Uso de modelagem molecular no estudos de conceito de nucleofilicidade e basicidade*. **Quim. Nov.**, v. 34, n. 9, p. 1661-1664, 2011.

G. MARIAPPAN, B. P. SAHA, SRIPARNA DATTA, DEEPAK KUMAR; P. K. HALDAR. *Design, synthesis and antidiabetic evaluation of oxazolone derivatives*. **J. Chem. Sci.**, v. 123, n. 3, p. 335 – 341, 2011.

GIEMBYCZ, M. A., NEWTON, R. *How Phosphodiesterase 4 Inhibitors Work in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease of the Severe, Bronchitic, Frequent Exacerbator Phenotype*. **Clin. Chest. Med.**, v. 35, p. 203 – 217, 2014.

GURNEY, M. E., D'AMATO, E. C., BURGIN, A. B. *Phosphodiesterase-4 (PDE4) Molecular Pharmacology and Alzheimer's Disease*. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 49 – 56, 2015.

HEILMANN, S. M.; DRTINA, G. J.; HADDAD, L. C.; RASMUSSEN, J. K., GADDAM, B. N.; LIU, J. J.; FITZSIMONS, R. T.; FANSLER, D. D.; VYVYAN, J. R.; YANG, Y. N.; BEAUCHAMP T. J. *Az lactone-reactive polymer supports for immobilizing synthetically useful enzymes (Part I - Pig liver esterase on dispersion polymer supports)*. **J. Mol. Cat. B**, v. 30, n. 1, p. 33-42, 2004.

HISASHI SHINKAI, KOJI TOI, KUMASHIRO IZUMI, YOSHIKO SETO, MARIKO SETO. *N-Acylphenylalanines and Related Compounds. A New Class of Oral*

Hypoglycemic Agents. **J. Med. Chem.**, n. 31, p. 2092 - 2097, 1988.

HORTON Y.M., SULLIVAN M., HOUSLAY M. D. *Molecular cloning of a novel splice variant of human type IVa (PDE-IVa) cyclic AMP phosphodiesterase and localization of the gene to the p13.1-q12 region of human chromosome 19*. **Biochem. J.**, v. 308, pt. 3, p. 683 – 691, 1995.

HUSTON E., HOUSLAY T.M., BAILLIE G. S. *cAMP phosphodiesterase-4A1 (PDE4A1) has provided the paradigm for the intracellular targeting of phosphodiesterases, a process that underpins compartmentalized cAMP signalling*. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, pt. 4, p. 504 – 509, 2006.

Insight II User Guide, version 2005, Accelrys: CA, USA, 2005.

JACOBITZ S., McLAUGHLIN M. M., LIVI G.P. *Mapping the functional domains of human recombinant phosphodiesterase 4A: structural requirements for catalytic activity and rolipram binding*. **Mol. Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 891 – 899, 1996.

KARLSSON J. A., ALDOUS D. *Phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of asthma*. **Expert Opinion on Therapeutic Patents.**, v. 7, n. 9, p. 989 – 1003, 1997.

KHAN, K. M.; MUGHAL, U. R., KHAN, M. T. H., ULAAH, Z., PERVEEN, S.; KODGULE, R., VAIDYA, A., SALVI, S. *Newer Therapies for Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 60, p. 8 – 13, 2012.

KÜMMERLE, A. E. *Uma quimioteca de N-acilidrazonas (NAH): a influência da metila na modulação das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de novos candidatos a fármacos*. 2009. Tese – UFRJ.

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

KÜMMERLE, A. E.; SCHMITT, M.; LOPES, A. B. et. al. *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of N-Acylhydrazones and Novel Conformationally Constrained Compounds as Selective and Potent Orally Active Phosphodiesterase-4 Inhibitors*. **J. Med. Chem.**, n. 55, p. 7525–7545, 2012.

LAPERRE, T. S. *Airway pathology in COPD: smoking cessation and pharmacological treatment intervention*. **Results from the GLUCOLD study, Universiteit Leiden**. p. 169, 2010.

LEHNINGER, *Princípios de Bioquímica*. 4ª EDIÇÃO; CAPÍTULO 6 - ENZIMAS, p. 190 - 200.

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

LIMA, M. M. *Síntese de peptídeo modificado contendo grupo 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído*. 2013. Dissertação – USP.

LIPWORTH B. J. *Pharmacological interventions and outcome measurements in the unified airway*. **Clinical & Experimental Allergy Reviews**, v. 5, n. 1, p. 26 – 31, 2005.

LOBBAN M., SHAKUR Y., BEATTIE J. *Identification of two splice variant forms of type IVB cyclic AMP phosphodiesterase, DPD (rPDE-IVB1) and PDE-4 (rPDE-IVB2) in brains; selective localization in membrane and cytosolic compartments and differential expression in various brain regions*. **Biochem. J.**, v. 304, p. 399–406, 1994.

LÓPEZ, O. B. G. *Presence of bronchial asthma and the use of peak flow meter in children and adolescents living at more than 3 000 meters of altitude*. **Rev. Peru. pediatr.**, v. 61, n. 4, p. 207 – 214, 2008.

Lu, K., QIN, Y., HE, G. X. *The impact of haze weather on health: a view to future*. **Biomed. Environ. Sci.**, v. 26, p. 945 – 946, 2013.

MAK, G., HANANIA, N. A., *New bronchodilators*. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 12, n. 3, p. 238 – 245, 2012.

MANGANIELLO V. C., MURATA T., TAIRA M. *Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families.* **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 322, n. 1, p. 1 – 13, 1995.

MANNING C. D., BURMAN M., CHRISTENSEN S. B. *Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B.* **Br J. Pharmacol.**, v.128, n. 7, p. 1393 – 1398, 1999.

MARCHIORI, R. C., SUSIN, C. F., LAGO, L. D. *Diagnosis and treatment of exacerbated COPD in emergency care.* **Revista da AMRIGS, RS**, v. 54, n. 2, p. 214 - 223, 2010

MARSHALL, G. R. *Introduction to chemoinformatics in drug discovery - A personal view.* In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery.** Weinheim: WILEY - VHC, 2004. p. 1-22.

MARTIN - CHOULY C. A., ASTIER A., JACOB C. *Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors.* **Life Sci.**, v. 75, n. 7, p. 823 – 840, 2004.

MASTBERGEN, V. J. *The mechanism of action of doxofylline is unrelated to HDAC inhibition, PDE inhibition or adenosine receptor antagonism.* **Pulm Pharmacol Ther**, v. **25**, n. 1, p. 55 – 61, 2012.

McCONKEY, B. J., SOBOLEV, V., EDELMAN, M. *The performance of current methods in ligand-protein docking.* **Current Science**, v. 83, n. 7, p. 845-856, 2002.

MEHATS C., JIN S. L., WAHLSTROM J. *PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction.* **FASEB J.**, v. 17, n. 13, p. 1831 – 1841, 2003.

MENDONÇA, E. M., ALGRANTI, E., de FREITAS J. B., ROSA, E. A., SANTOS, F. J. A., SANTOS, P. U. D. *Occupational asthma in the city of Sao Paulo.* **Am. J. Ind. Med.**, v. 43, n. 6, p. 611 – 617, 2003.

MITRA, A., BASSLER, D., GOODMAN, K., LASSERSON, T. J., DUCHARME, F. M. *Intravenous aminophylline for acute asthma in children over two years receiving inhaled bronchodilators*. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 2, p. 1276, 2005.

MULLER T., ENGELS P., FOZARD J.R. *Subtypes of the type 4 cAMP phosphodiesterases: structure, regulation and selective inhibition*. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, n. 8, p. 294 – 298, 1996.

NICHOLSON C. D., SHAHID M. *Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes their potential utility in the therapy of asthma*. **Pulm. Pharmacol**, v. 7, n. 1, p. 1 – 17, 1994.

OBERNOLTE R., RATZLIFF J., BAECKER P. A. *Multiple splice variants of phosphodiesterase PDE4C cloned from human lung and testis*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1353, n. 3, p. 287 – 97, 1997.

OLIVEIRA J. C. A. *Doença Obstrutiva Crônica Pulmonar*. **J. Bras. Pneumol.**, v.24, n. 6, 1998.

OPPENHEIMER, J., NELSON, H. S. *Skin testing*. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, v. 96, n. 2, p. 6 – 12, 2006.

OZTURK, G.; ALP, S.; ERTEKIN, K. *Fluorescence emission studies of 4-(2-furylmethylene)-2-phenyl-5-oxazolone embedded in polymer thin film and detection of Fe³⁺ ion*. **Dyes & Pigm.**, v. 72, n.2, p. 150-156, 2007.

PALFREYMAN M. N. SOUNESS J. E. *Phosphodiesterase type IV inhibitors*. **Prog. Med. Chem.**, v. 33, n. 1, p. 1 – 52, 1996.

PARIKH, N., CHAKRABORTI, A. K. *Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitors in the treatment of COPD: Promising drug candidates and future directions*. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 129 – 141, 2016.

PATEL, J. G., NAGAR, S. P. *Indirect costs in chronic obstructive pulmonary disease: a review of the economic burden on employers and individuals in the United States.* **Int. J. chronic Obstr. Pulm. Dis.**, v. 9, p. 289 – 300, 2014.

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

PRI-BARA, I., SCHWARTZ, J. *N,N-Dialkylcarbodiimide synthesis by palladium-catalysed coupling of amines with isonitriles.* **Chem. Commun.**, v. 4, p. 347, 1997.

PROFITA, M., CHIAPPARA, G., MIRABELLA, F. *Effect of cilomilast (Ariflo) on TNF-alpha, IL-8, and GM-CSF release by airway cells of patients with COPD.* **Thorax**, v. 58, p. 573 – 579, 2003.

RABE K. F., MAGNUSSEN H., DENT G. *Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants.* **European Respiratory Journal**, v.8, n. 4, p. 637 – 642, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia. 6º Ed.** Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2007.

RIBEIRO L. V. F. S. F., PINTO, L. A., STEIN, T. R. *Uso de macrolídeos em doenças pulmonares: controvérsias da literatura recente.* **J. Pediatr. RJ**, v.91, n.6, 2015.

Roberta Ricciarelli, Ernesto Fedele. Phosphodiesterase 4D: na enzyme to remember. *British Journal of Pharmacology* (2015) 172 p. 4785 – 4789.

ROBICHAUD A., SAVOIE C., STAMATIOU P.B., TATTERSALL F.D., CHAN C.C. *PDE4 inhibitors induce emesis in ferrets via a noradrenergic pathway.* **Neuropharmacology.**, v. 40, n. 2, p. 262 – 269, 2001.

SCHNEIDER, G.; BOHM, H. *Virtual screening and fast automated docking methods.* **Drug Discovery Today**, v. 7, p. 64-70, 2002.

Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. *Estatísticas de Mortalidade.* Ministério da Saúde; 2014.

SERAFIN, W. E. *Drugs used in the treatment of asthma. The pharmacological basis of therapeutics.*, 9^a Ed., p. 659 – 682, 1996.

SILVER P. J., HAMEL L. T., PERRONE M. H. *Differential pharmacologic sensitivity of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes isolated from cardiac muscle, arterial and airway smooth muscle.* **Eur. J. Pharmacol.**, v. 150, n. 1 – 2, p. 85 – 94, 1988.

SOUNESS J.E., HOUGHTON C., SARDAR N. *Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress interleukin-2 release from murine splenocytes by interacting with a 'low-affinity' phosphodiesterase 4 conformer.* **Br J. Pharmacol.**, v. 121, n. 4, p. 743 – 750, 1997.

SOUZA, D. S., NOBLAT, L. A. C. B., SANTOS, P. M. *Factors associated with quality of life in patients with severe asthma: the impact of pharmacotherapy* **J. bras. Pneumol.** v.41, n.6, 2015.

SOUZA, R.O.M.A; MIRANDA, LSM. *Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: Uma história de sucesso no Brasil.* **Quím. Nova**, v. 34, n. 3, p. 497 – 506, 2011.

SUTHERLAND E. W.; RALL T. W. *Earl W. Sutherland's Discovery of Cyclic Adenine Monophosphate and the Second Messenger System.* **The journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, 1958.

TANG, J., MOHAN, T., VERKADE, J. G. *Selective and Efficient Syntheses of Perhydro-1,3,5-triazine-2,4,6-triones and Carbodiimides from Isocyanates Using ZP(MeNCH₂CH₂)_sN Catalysts.* **J. Org. Chem.**, v. 59, p. 4931 – 4938, 1994.

TORPHY T. J. *Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents.* **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 157, n. 2, p. 351 – 370, 1998.

TORPHY T.J. *Beta-Adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle: challenges to the dogma.* **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 15, n.10, p. 370–374, 1994.

TORPHY T.J., STADEL J. M., BURMAN M. *Coexpression of human cAMP-specific phosphodiesterase activity and high affinity rolipram binding in yeast.* **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 3, p. 1798 – 804, 1992.

TORPHY, T. J., BARNETTE, M. S., UNDERWOOD, D. C. *A second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic.* **Pulm. Pharmacol. Ther.**, v. 12, p. 131 – 135, 1999.

TURNER-WARWICK, M. *Epidemiology of nocturnal asthma.* **Am J. Med.**, v. 85, p. 6 – 8, 1988.

VANDENPLAS, O., MALO, J. L. *Inhalation challenges with agents causing occupational asthma.* **Eur Respir. J.**, v. 10, n. 11, p. 2612 – 2629, 1999.

VANDEPLAS, O., MALO, J. L. *Definitions and types of work-related asthma: a nosological approach.* **Eur Respir. J.**, v. 21, n. 4, p. 706 – 712, 2003.

VIGNOLA, A. M. *PDE4 inhibitors in COPD, a more selective approach to treatment.* **Respiratory Medicine**, v. 98, p. 495 – 503, 2004.

WALLACK, Z. R.L. *Salmeterol plus theophylline combination therapy in the treatment of COPD.* **Chest**, v. 119, n. 6, p. 1661-70, 2001.

WANG P., WU P., OHLETH K. M. *Phosphodiesterase 4B2 is the predominant phosphodiesterase species and undergoes differential regulation of gene expression in human monocytes and neutrophils.* **Mol. Pharmacol.**, v. 56, n. 1, p. 170 – 174, 1995.

WEINBERGER M., HENDELES L. *Theophylline in asthma.* **N. Eng. I. J. Med.**, v. 334, n. 21, p. 1380 – 1388, 1996.

www.fda.gov (acessado em maio de 2016).

ZEITOUN M., WILK B., MATSUZAKA, A., KNOPFLI, B.H., WILSON B., *Facial cooling enhances exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. Med Sci Sports Exerc.*, v. 36, n. 5, p. 767 – 771, 2004.

ZHANG, X.Y., WANG, Y. Q., NIU, T. *Atmospheric aerosol compositions in China: spatial/temporal variability, chemical signature, regional haze distribution and comparisons with global aerosols. Atmos. Chem. Phys.*, v. 12, p. 779 – 799, 2012.

ZHU, J., MIX, E., WINBLAD, B. *The antidepressant and antiinflammatory effects of rolipram in the central nervous system. CNS Drug Reviews*, v. 7, n. 4, p. 387 – 398, 2001.

ZUO, L., KURT, L., FORTUNA, C. A., CHUANG, C. C., THOMAS, M. B. *Molecular Regulation of Toll-like receptors in Asthma and COPD. Frontiers in Physiology*, v. 6, p. 312, 2015.

CHUNG, L. P., WATETER, G., THOMPSON, P. J. *Pharmacogenetics of β 2 adrenergic receptor gene polymorphisms, long-acting β -agonists and asthma. Clin. Exp Allergy*, v. 41, n.3, p.312-326, 2011.

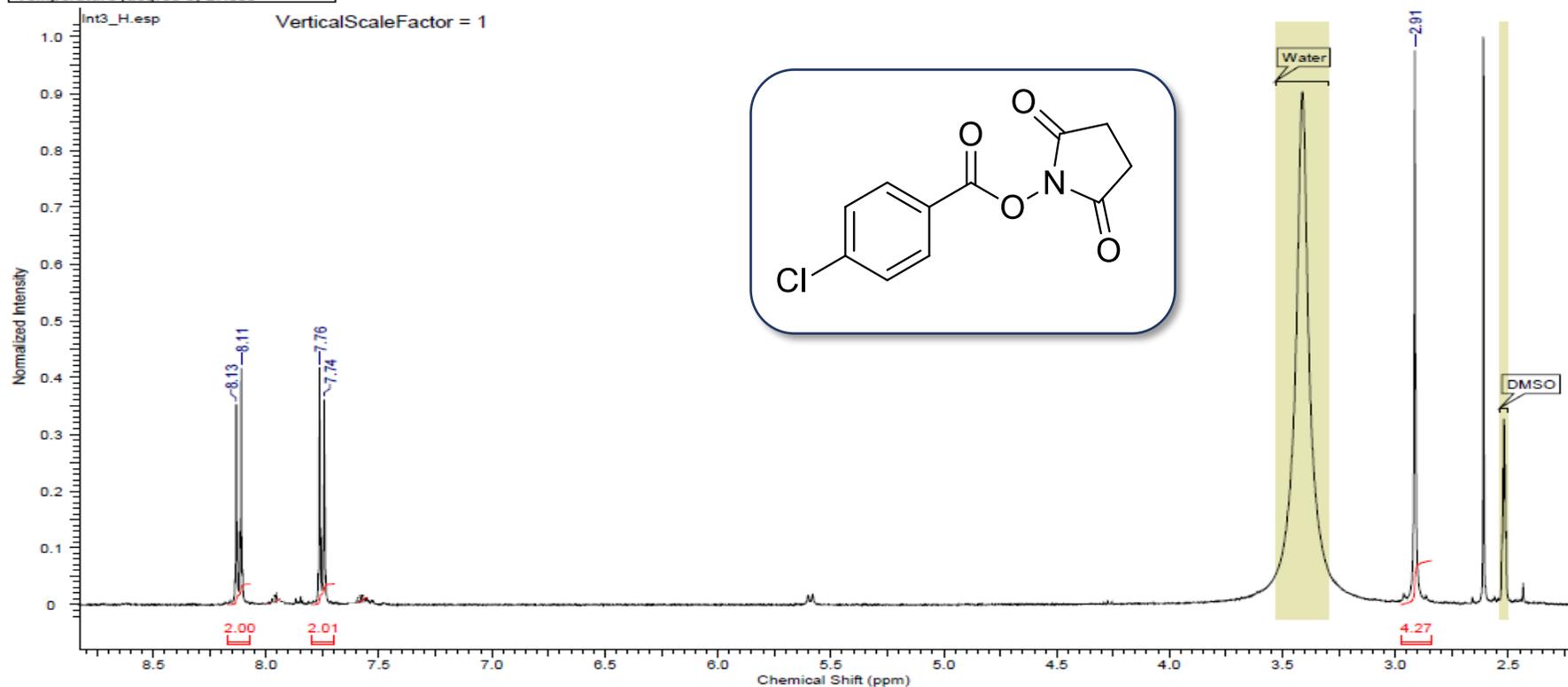
7. ANEXOS

Espectro de RMN ^1H do produto **27a** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

27/06/2014 11:49:15

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: INT 3 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	15 May 2014 10:54:08	Date Stamp	15 May 2014 10:54:08		
File Name	E:\pedro penetra\1\fid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32788
Points Count	32788	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	161.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

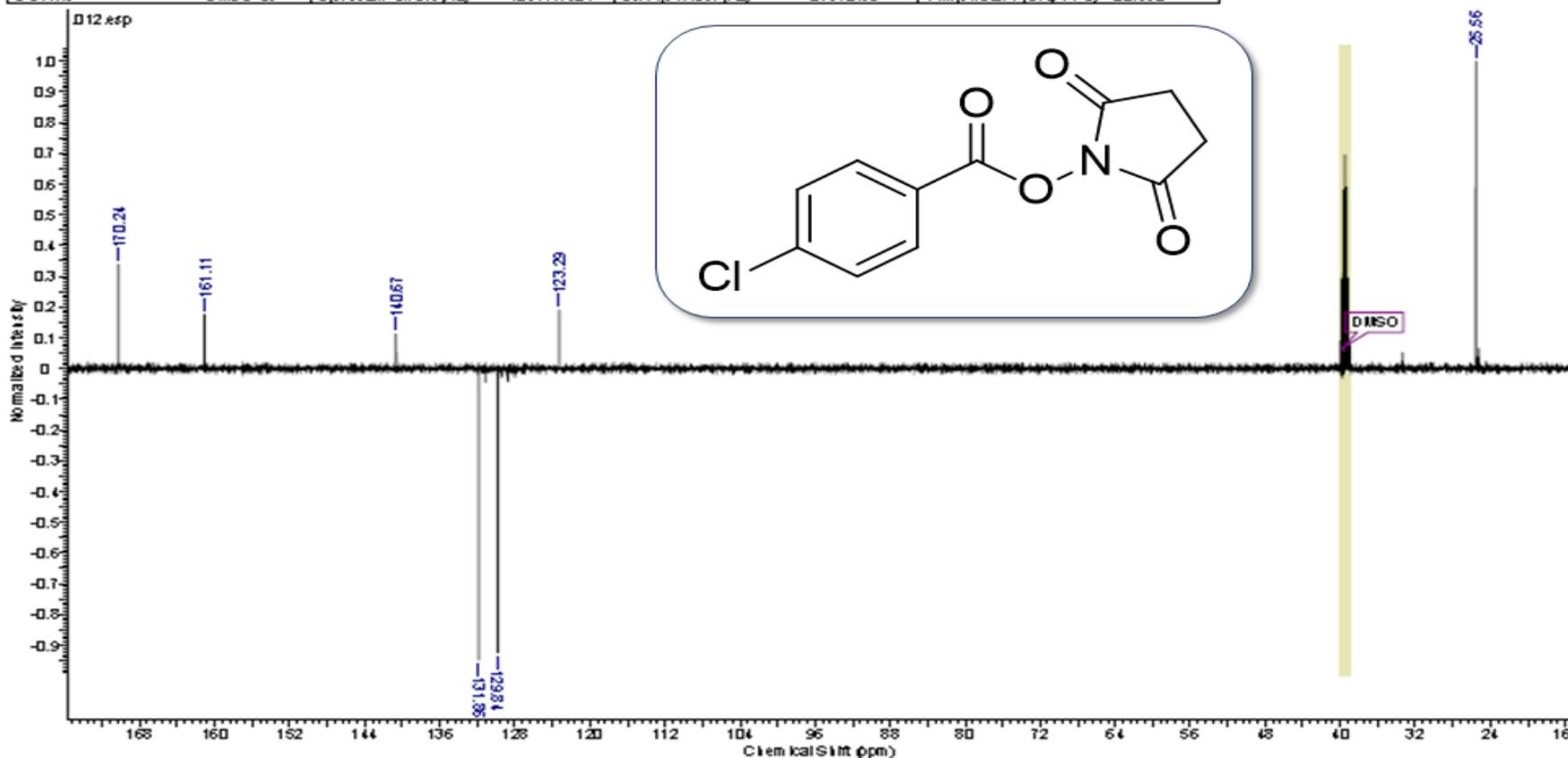


Espectro de RMN ¹³C do produto **27a** em DMSO à 125 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

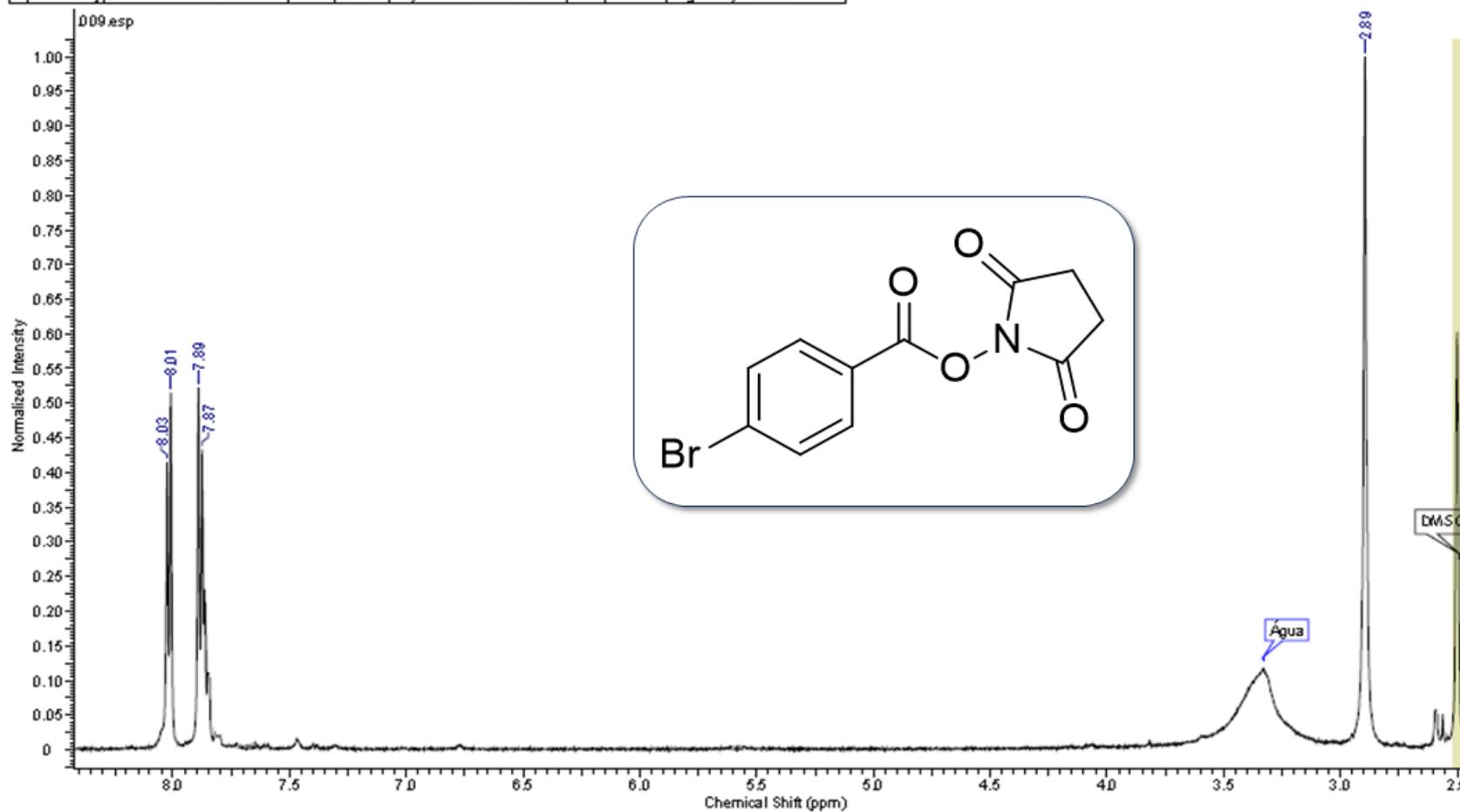
30.05.2016 15:09:40

Acquisition Time (sec)	1.1884	Comment AMOSTRA: In 13C Soluente: DMSO OPERADOR: VITOR					
Date	28 Apr 2016 13:34:08	Date Smp	28 Apr 2016 13:34:08	File Name	D:\12\td		
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	13C	Number of Transients	1024	Original Points Count	32768
Owner	ke	Points Count	32768	Pulse Sequence	dep13gqsp	Receiver Gain	2050.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12517.1621	Sweep Width (Hz)	27572.69	Temperature (degree C)	22.660



Espectro de RMN ^1H do produto **27b** em DMSO à 500 MHz

Acquisition Time (sec)	3.2768	Comment	AMOSTRA: Int-Br Solvente: DMSO OPERADOR: VITOR				Date	28 Apr 2016 11:32:32
Date Stamp	28 Apr 2016 11:32:32	File Name	D:\9\td	Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	^1H	
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner	ice	
Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	456.00	SW(cyclical) (Hz)	10000.00	Solvent	DMSO-d6	
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9999.70	Temperature (degree C)	21.560	Spectrum Offset (Hz)	30848894	

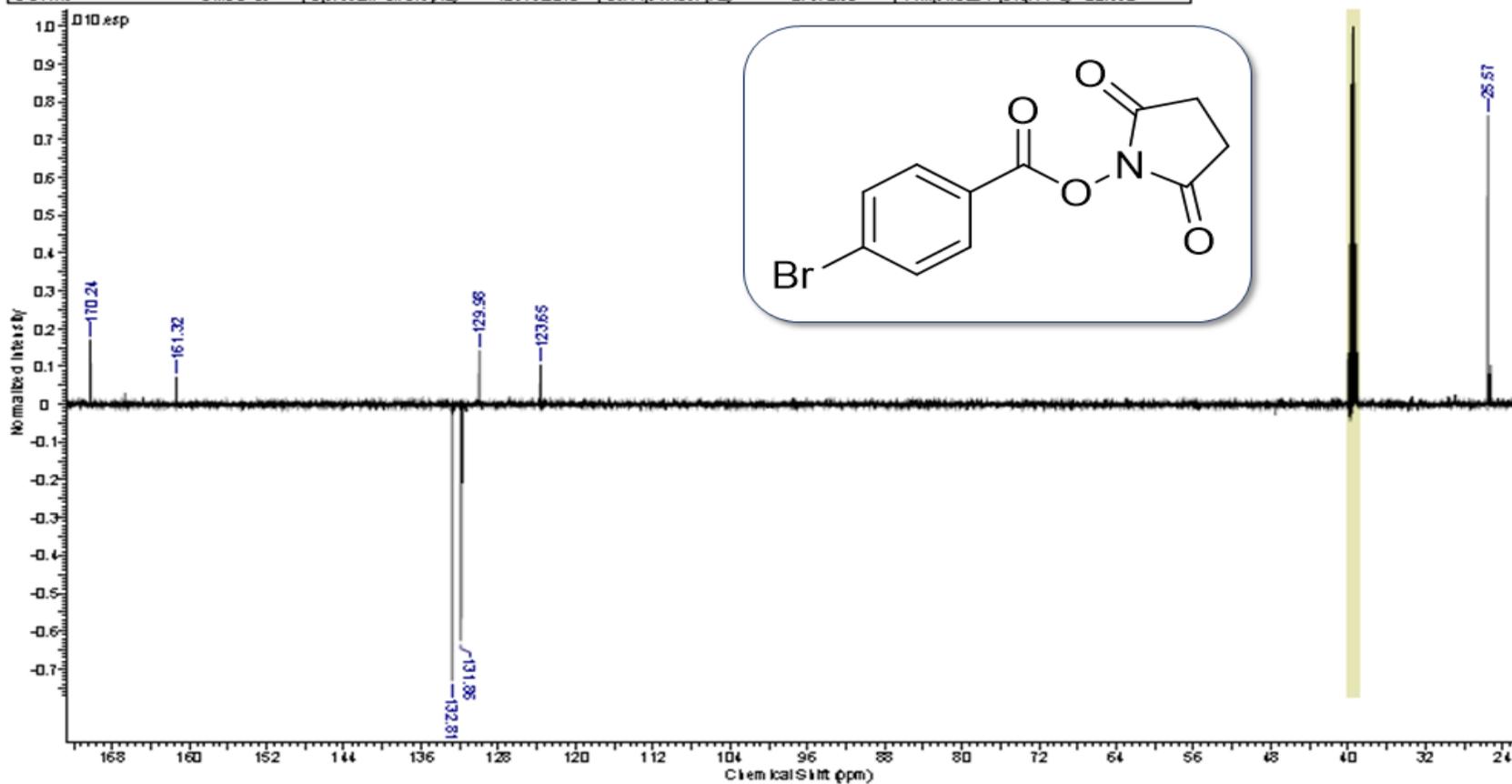


Espectro de RMN ¹³C do produto **27b** em DMSO à 125 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

03/05/2016 15:19:43

Acquisition Time (sec)	1.1884	Comment				AMOSTRA: In-Br Solvente: DMSO OPERADOR: VITOR
Date	28 Apr 2016 12:47:12	Date Sample	28 Apr 2016 12:47:12	File Name	D:\10\td	
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	¹³ C	Number of Transients	1780	
Owner	ice	Pulses Count	32768	Pulse Sequence	de p1qgsp	
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12518.0049	Receiver Gain	2050.00	
		Sweep Width (Hz)	21512.69	Temperature (degrees C)	22.660	
				Original Points Count	32768	
				SW (cycles) (Hz)	21513.53	

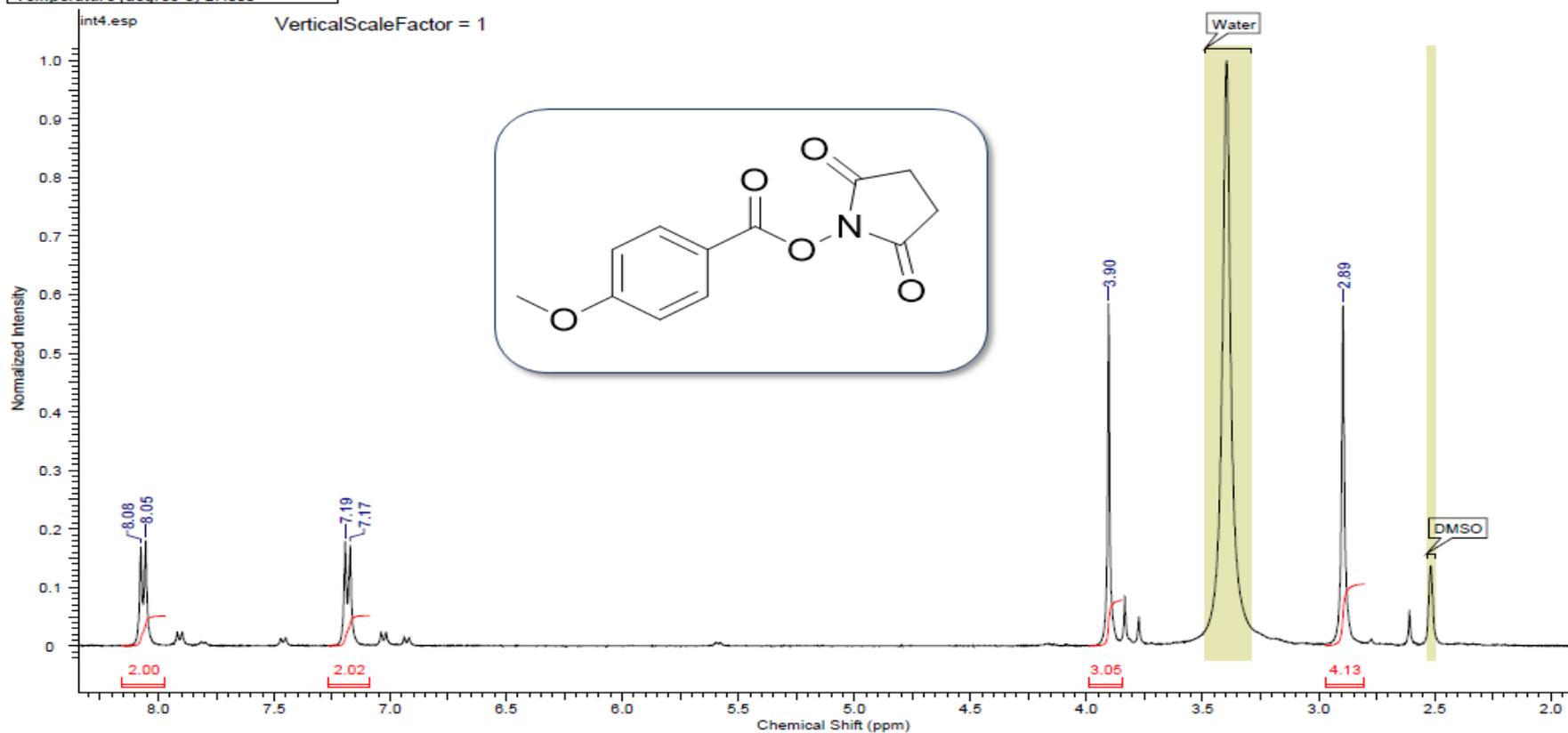


Espectro de RMN ¹H do produto **27c** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

27/06/2014 11:31:23

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: INT 4 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	15 May 2014 09:48:00	Date Stamp	15 May 2014 09:48:00		
File Name	E:\pedro penetra\9\pdata\111r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	144.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	Spectrum Type	STANDARD
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	8223.43		

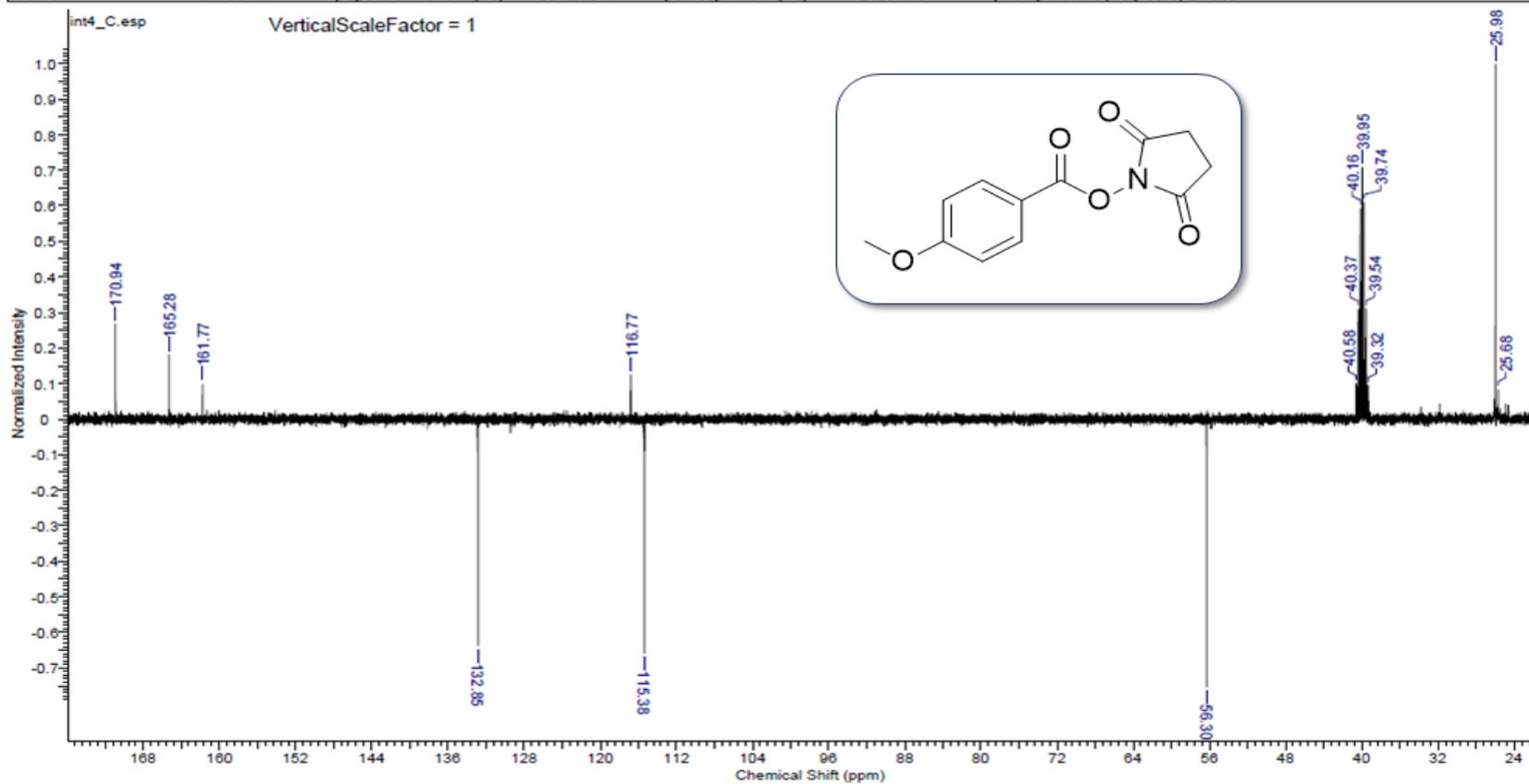


Espectro de RMN ¹³C do produto **27c** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

27/06/2014 11:41:38

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: INT 4 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO			
Date	15 May 2014 10:47:44	Date Stamp	15 May 2014 10:47:44			
File Name	E:\pedro penetra\10\pdata\111r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768	
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	2050.00	
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53	
			Sweep Width (Hz)	25251.75	Temperature (degree C)	27.000

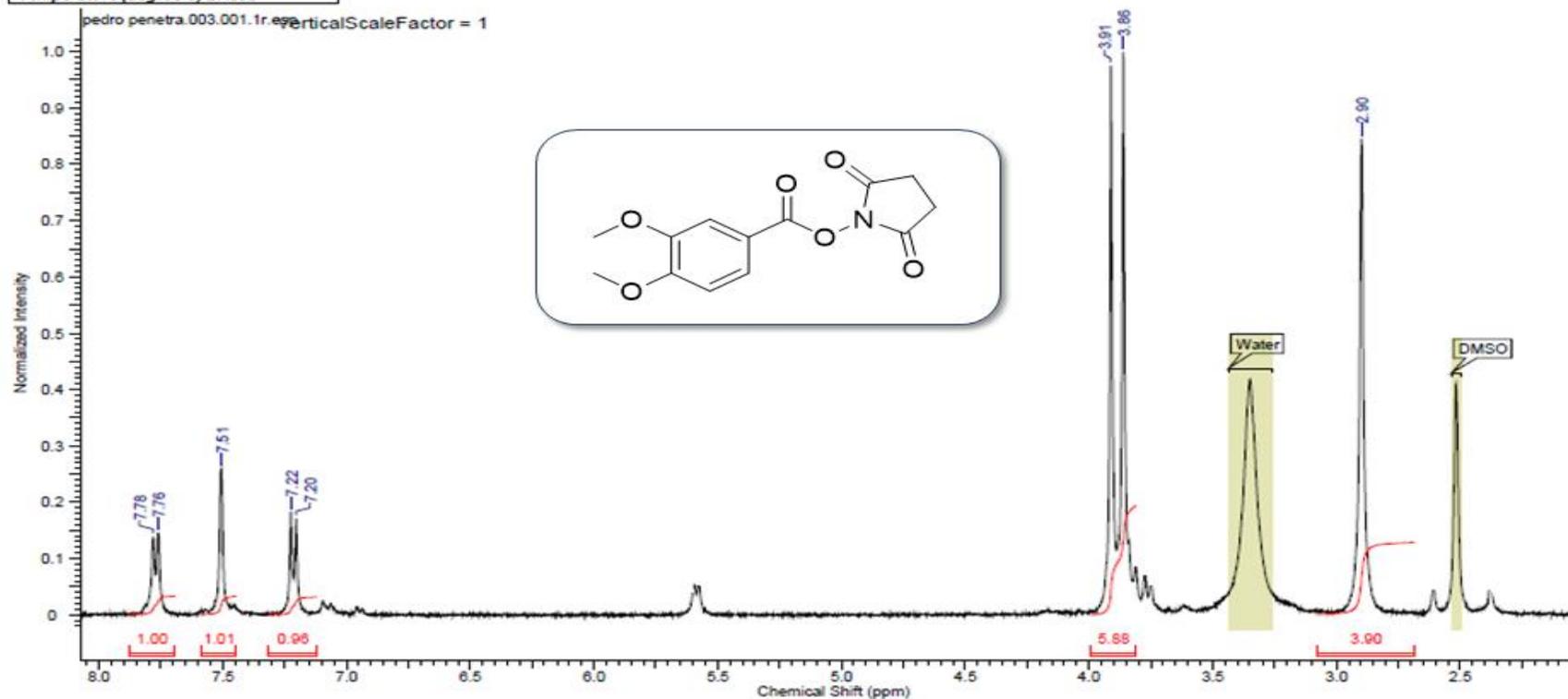


Espectro de RMN ^1H do produto **27d** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

28/04/2014 16:30:58

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: INT 2 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	07 Apr 2014 12:28:00	Date Stamp	07 Apr 2014 12:28:00		
File Name	E:\pedro penetra\3\pdata\111r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	228.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

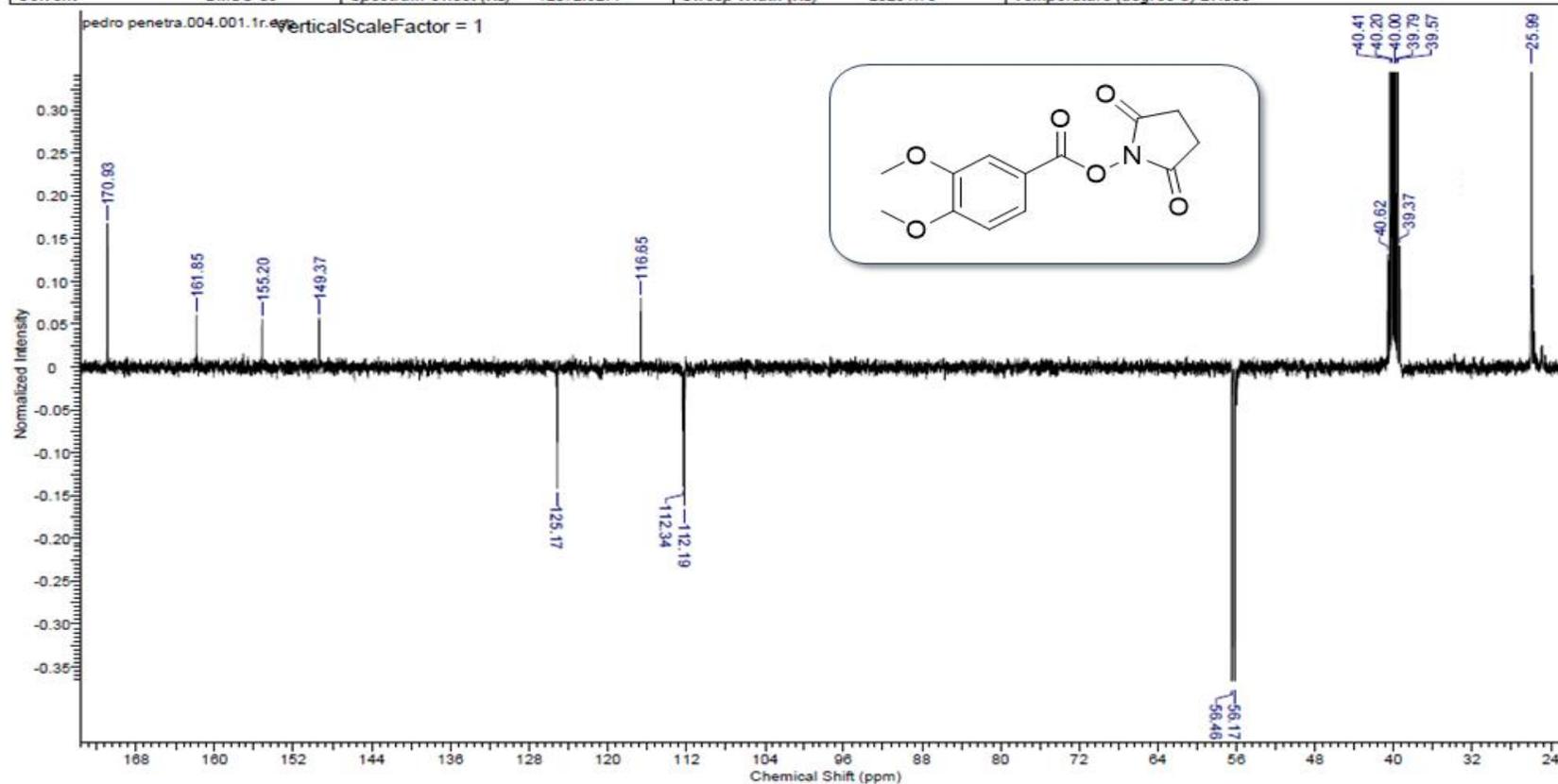


Espectro de RMN ¹³C do produto **27d** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

28/04/2014 16:40:57

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: INT 2 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	07 Apr 2014 12:45:04	Date Stamp	07 Apr 2014 12:45:04		
File Name	E:\pedro penetra\4\pdata\1\1r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	2048	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	2050.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degree C)	27.000

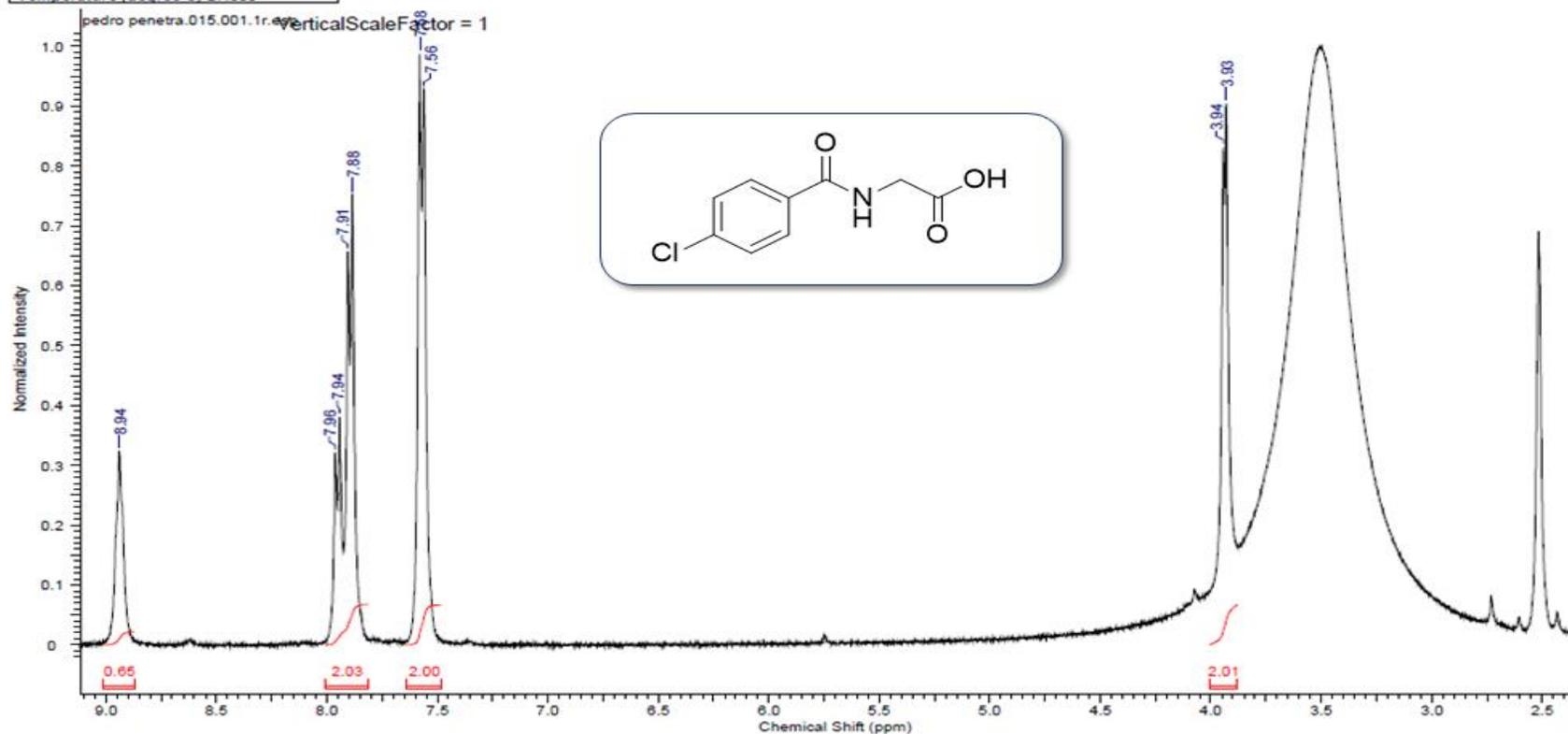


Espectro de RMN ^1H do produto **29a** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22/07/2014 15:37:17

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: P.P3 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	24 Jun 2014 12:38:40	Date Stamp	24 Jun 2014 12:38:40		
File Name	E:\pedro penetra\15\data\1\1r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	144.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

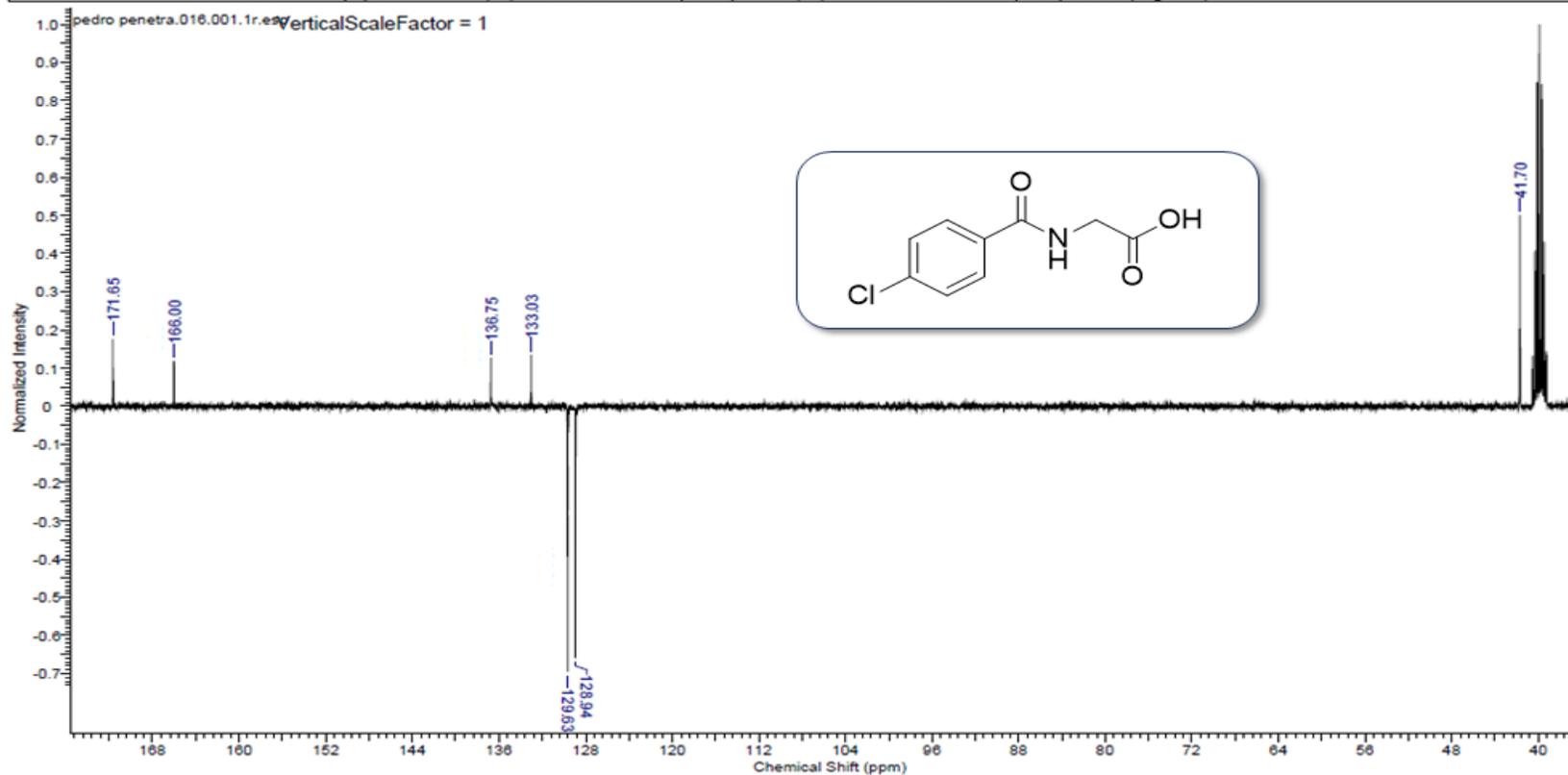


Espectro de RMN ^{13}C do produto **29a** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22/07/2014 15:43:03

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: P.P3 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	24 Jun 2014 13:08:32	Date Stamp	24 Jun 2014 13:08:32		
File Name	E:\pedro penetra\16\data\1\1r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqppsp	Receiver Gain	1030.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
		Sweep Width (Hz)	25251.75	Temperature (degree C)	27.000

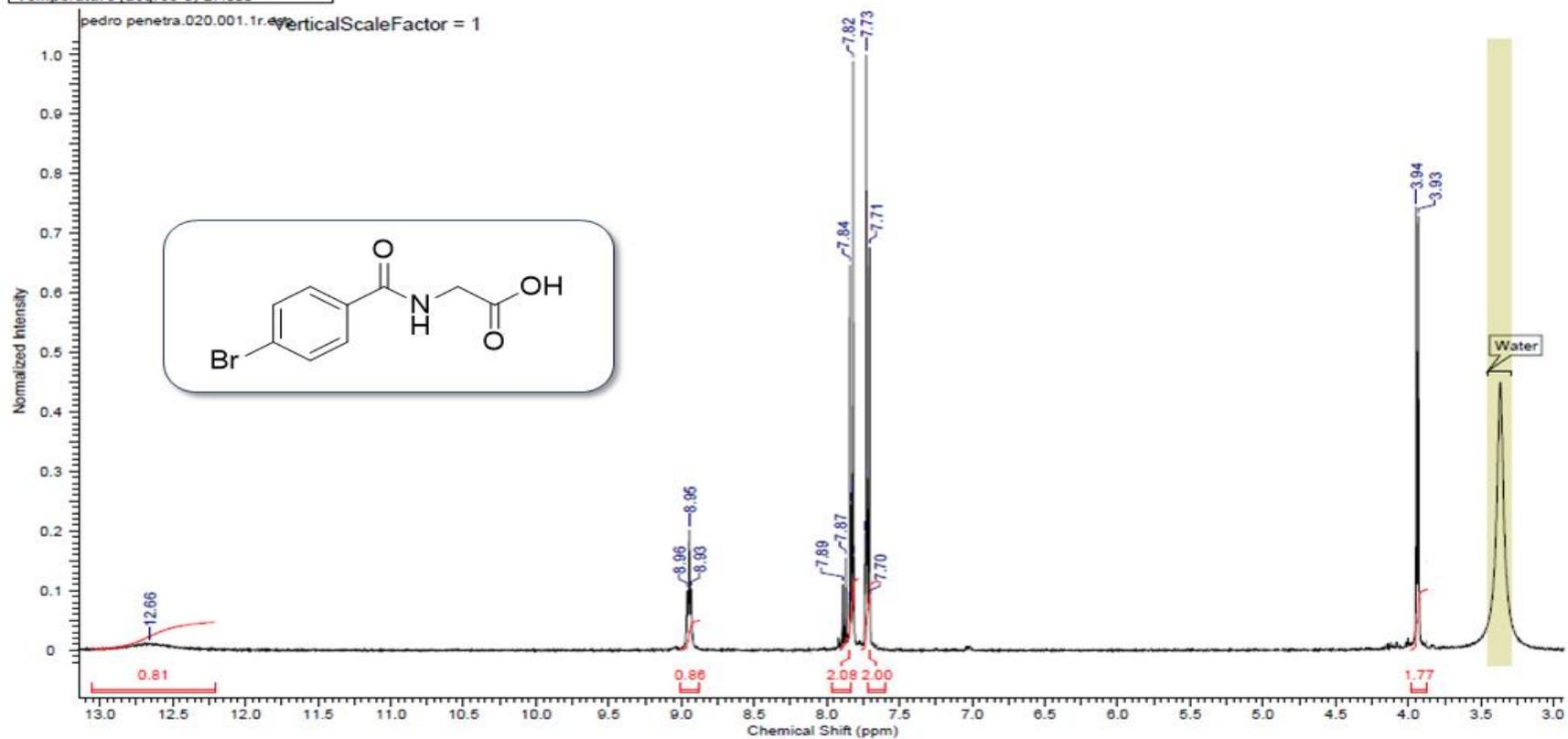


Espectro de RMN ^1H do produto **29b** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22/07/2014 16:00:49

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: P.P5 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR		
Date	27 Jun 2014 15:14:24	Date Stamp	27 Jun 2014 15:14:24		
File Name	E:\pedro penetra\20\pdata\111r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	228.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

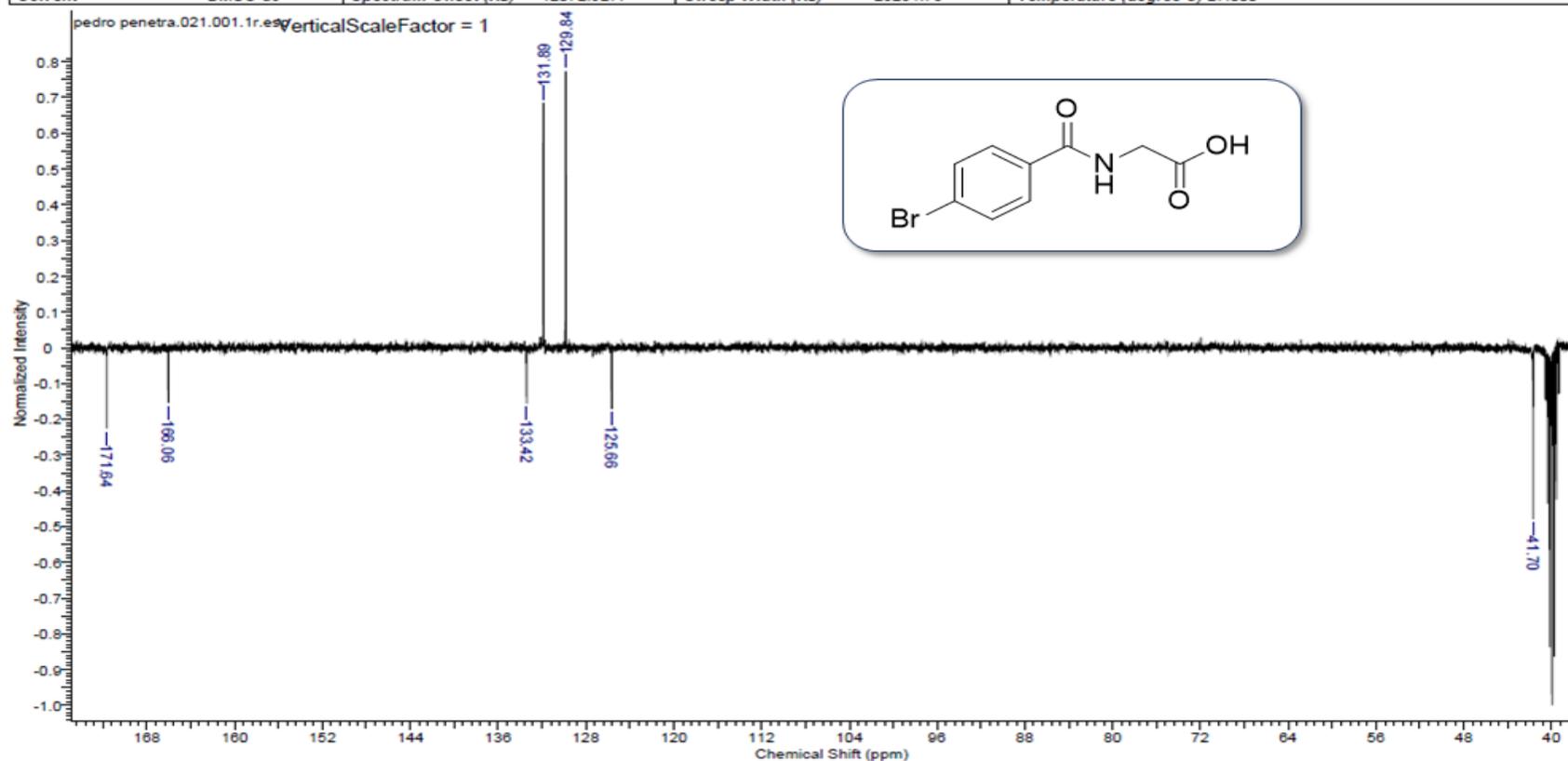


Espectro de RMN ¹³C do produto **29b** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22/07/2014 16:02:35

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: P.P5 (DEPTQ) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR				
Date	27 Jun 2014 15:33:36		Date Stamp	27 Jun 2014 15:33:36			
File Name	E:\pedro penetra\21\data\1\1r		Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C	
Number of Transients	512	Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptgqpsp	Receiver Gain	812.00	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75	Temperature (degree C)	27.000

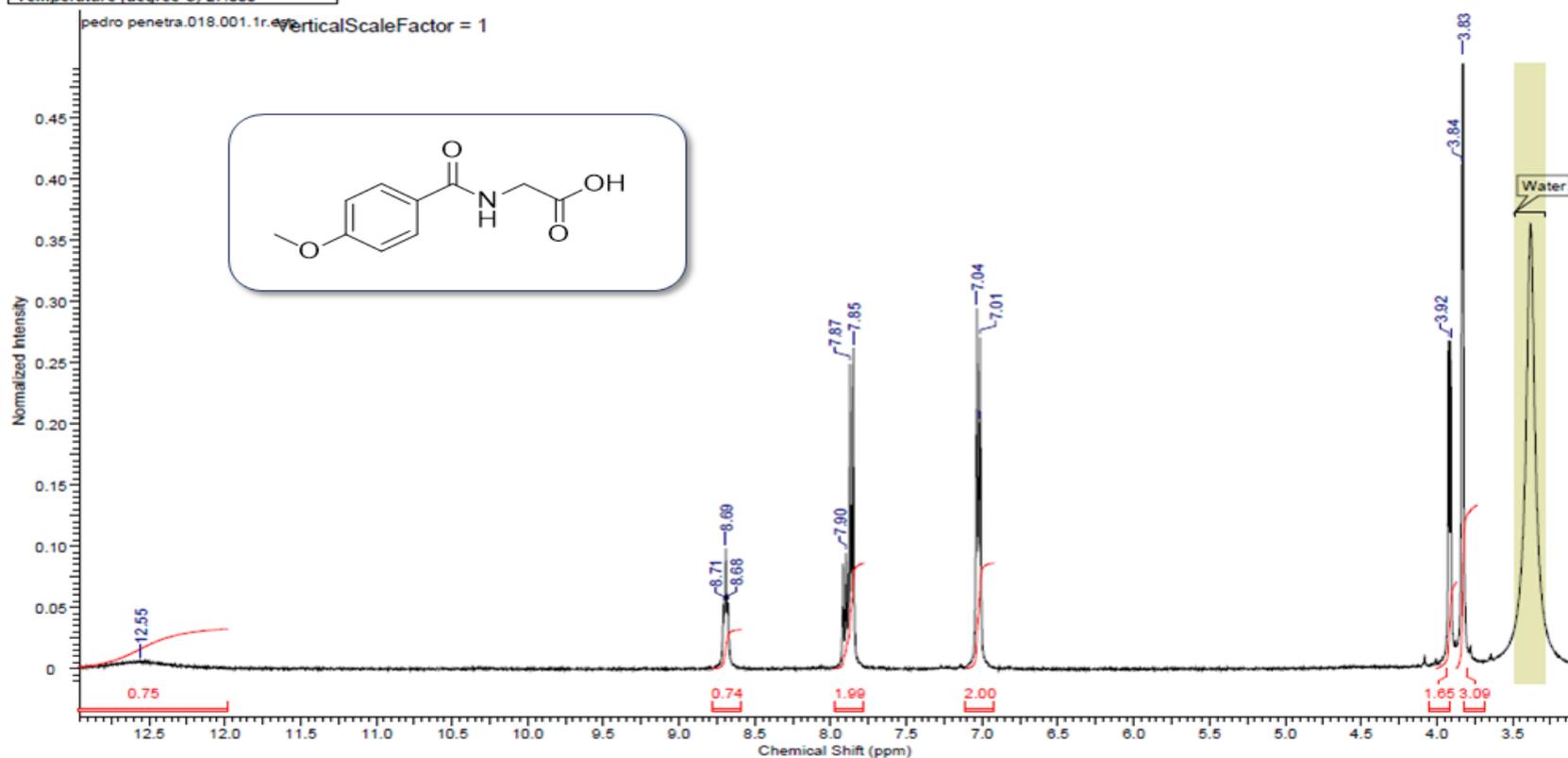


Espectro de RMN ¹H do produto **29c** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22/07/2014 15:54:05

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: P.P4 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR		
Date	27 Jun 2014 14:27:28	Date Stamp	27 Jun 2014 14:27:28		
File Name	E:\pedro penetra\18\pdata\1\1r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	181.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2470.8433	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

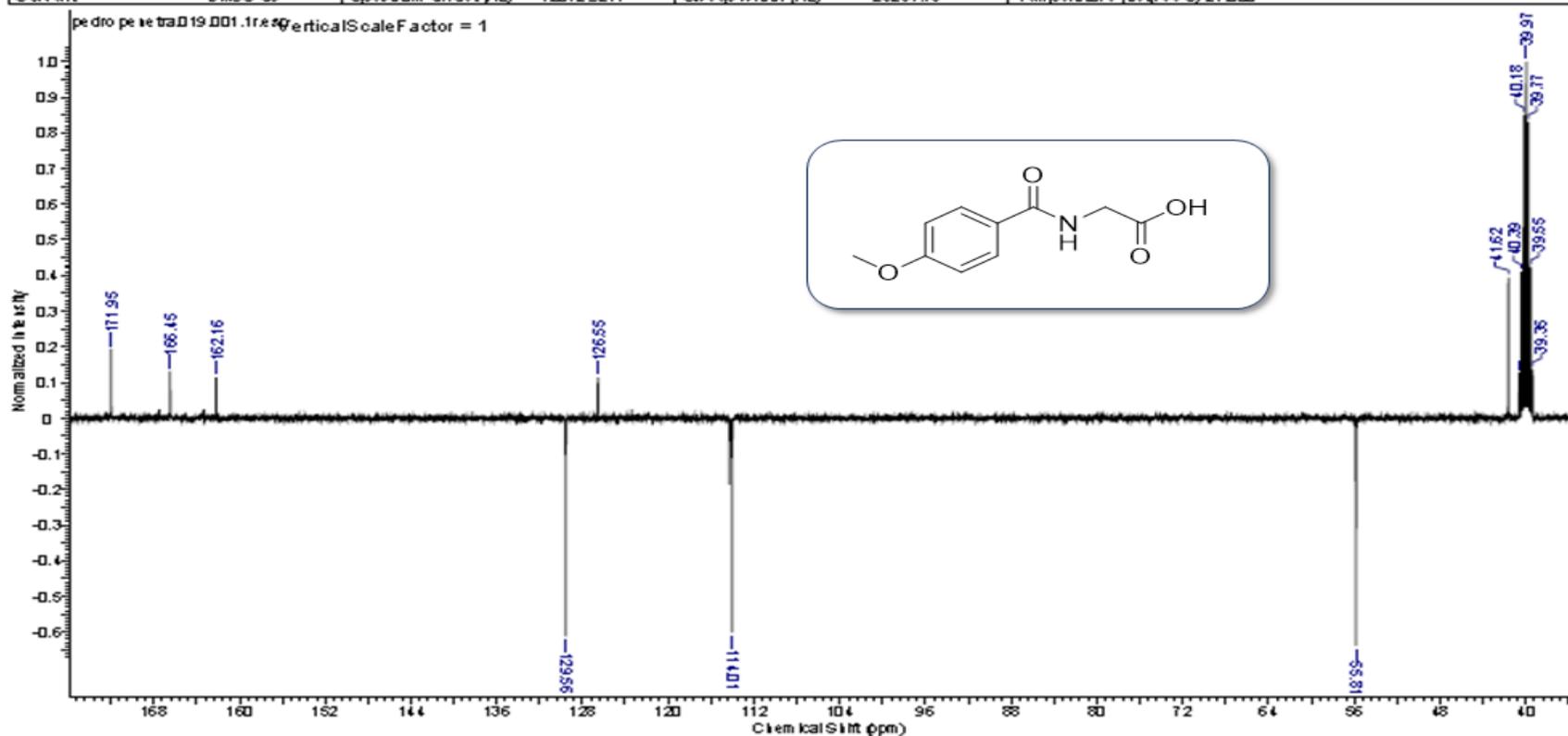


Espectro de RMN ¹³C do produto **29c** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

22.07.2014 15:56:16

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: P.P.4 (DEPTQ) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - VITOR		
Date	27 Jul 2014 14:53:04	Date Samp	27 Jul 2014 14:53:04		
File Name	E:\pedro pe se tra\19\data\11r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	703	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deppqep	Receiver Gain	812.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degrees C)	27.000

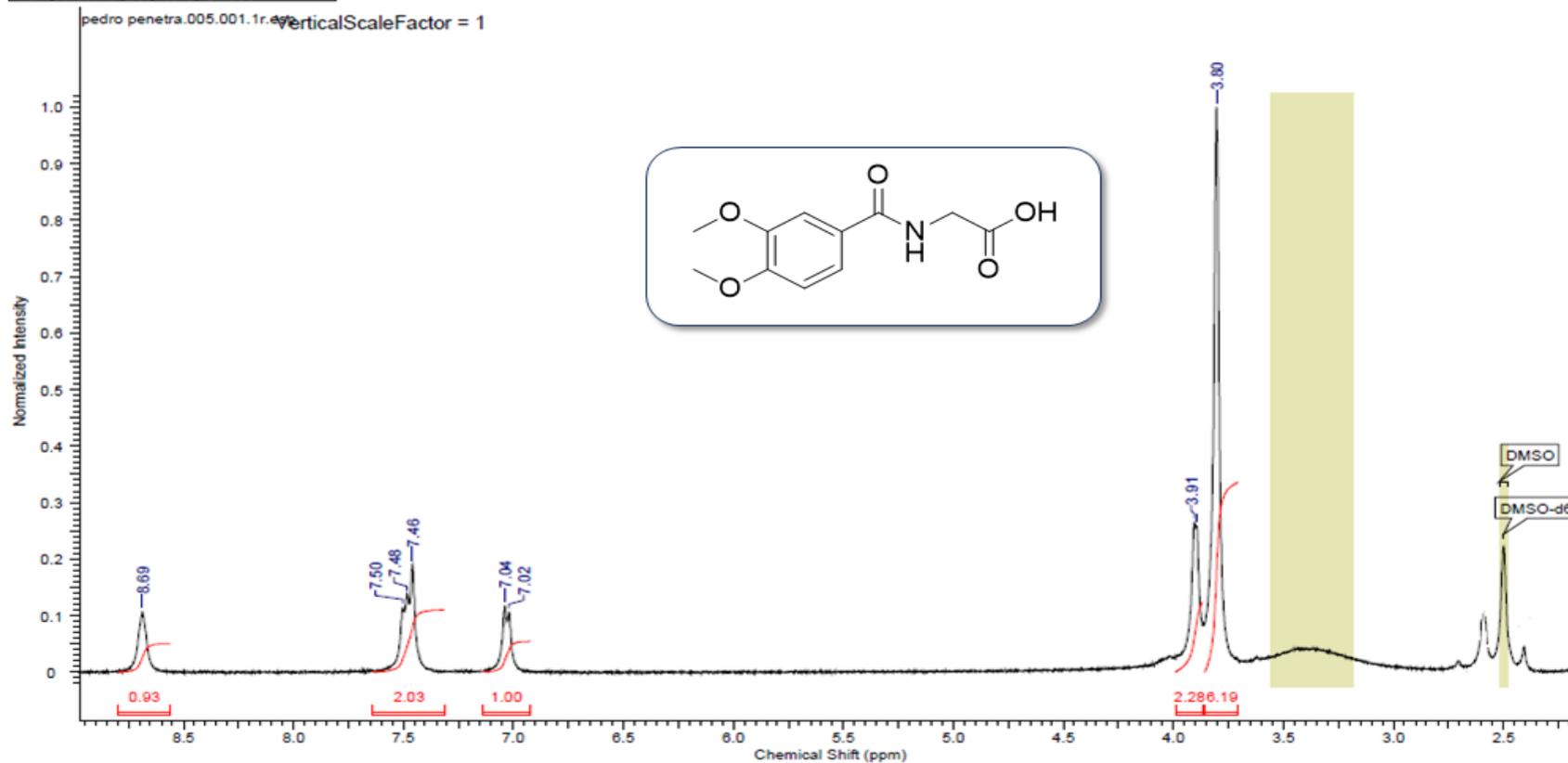


Espectro de RMN ^1H do produto **29d** em DMSO à 400 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

28/04/2014 17:04:19

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: INT 1 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	07 Apr 2014 14:46:40	Date Stamp	07 Apr 2014 14:46:40		
File Name	E:\pedro penetra\5\pdata\11\1r	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	228.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2464.5415	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43

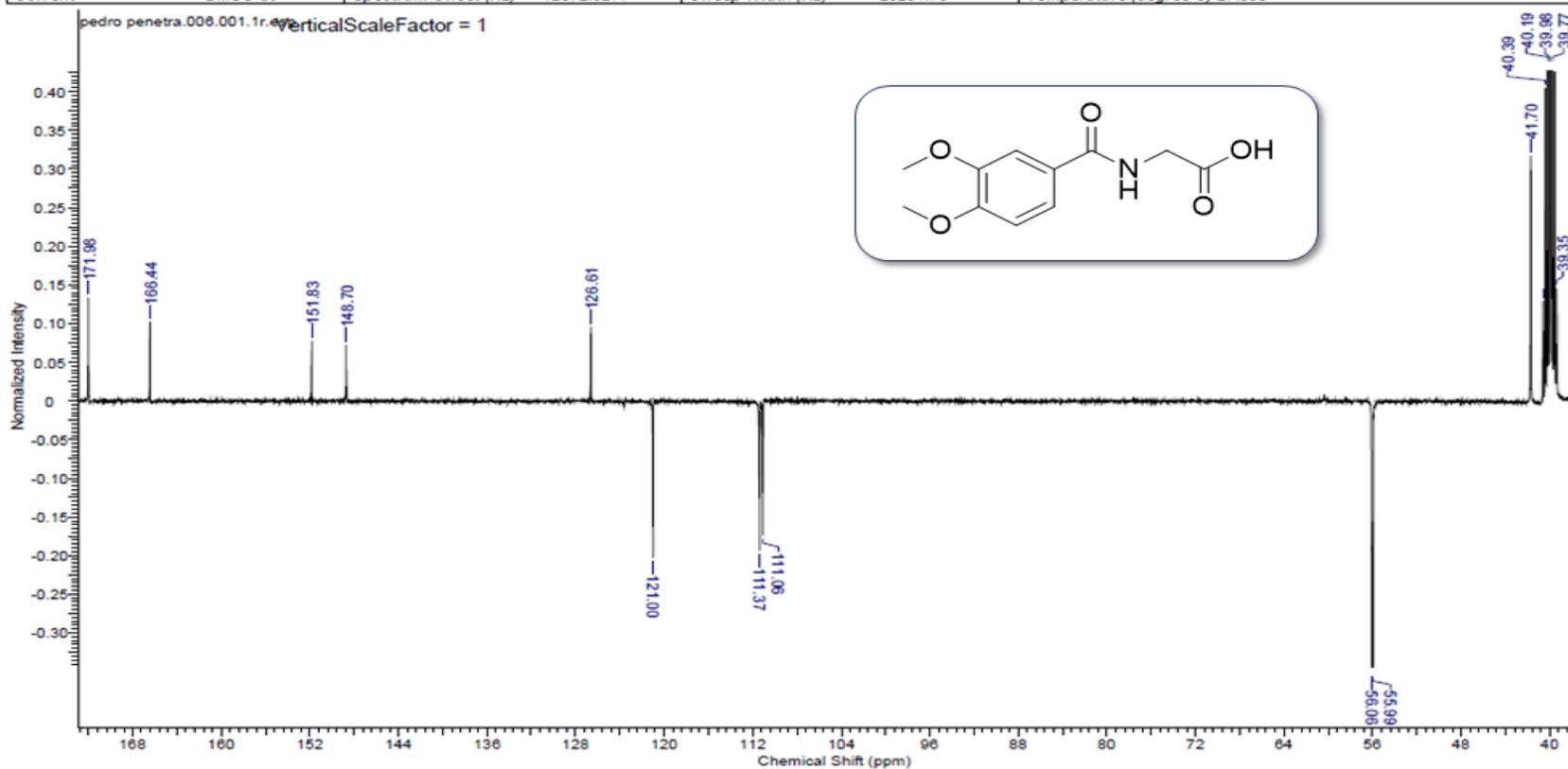


Espectro de RMN ¹³C do produto **29d** em DMSO à 100 MHz

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

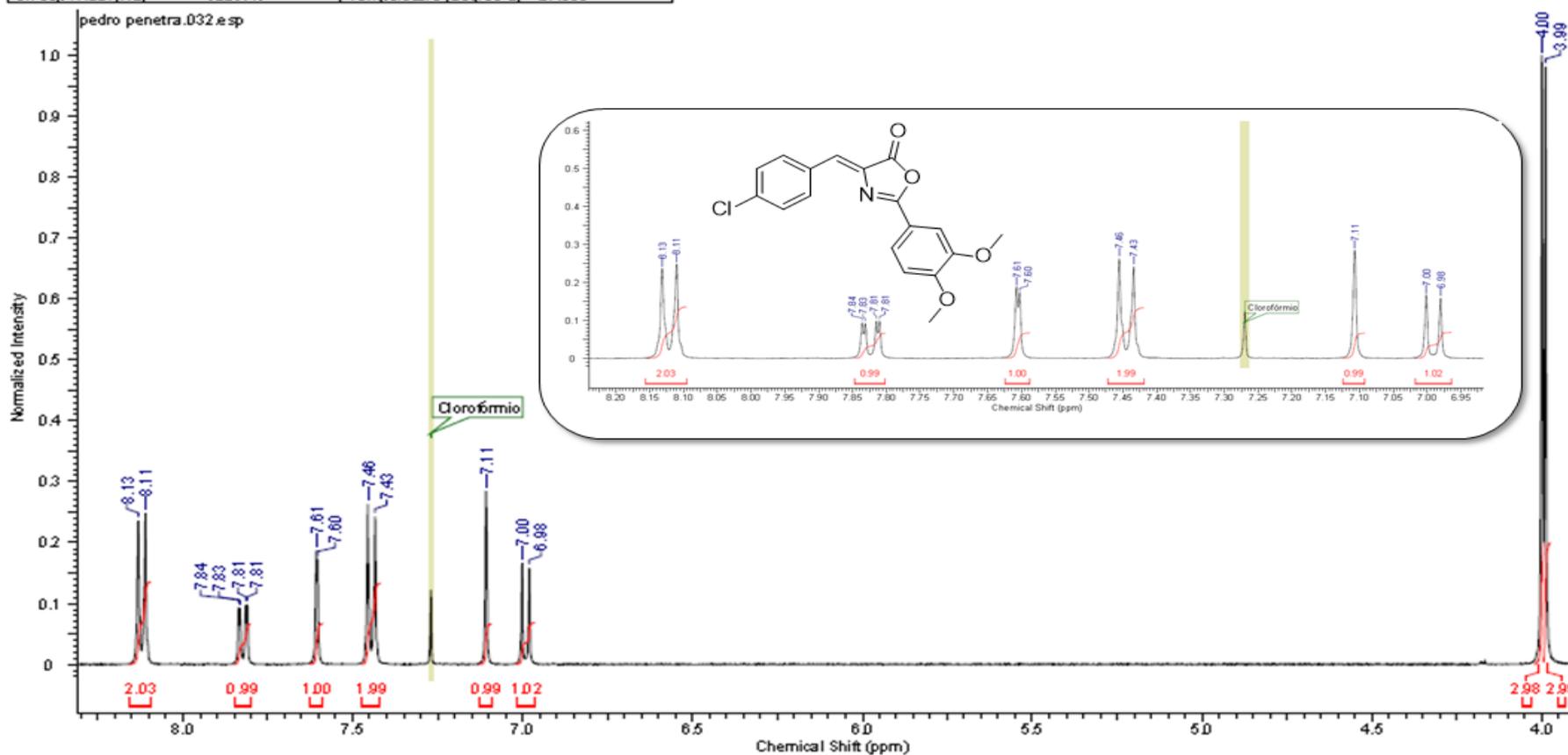
28/04/2014 17:10:52

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: INT 1 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	07 Apr 2014 15:20:48	Date Stamp	07 Apr 2014 15:20:48		
File Name	E:\pedro penetra\0\pdata\1\1r	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	20000	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1030.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
		Sweep Width (Hz)	25251.75	Temperature (degree C)	27.000



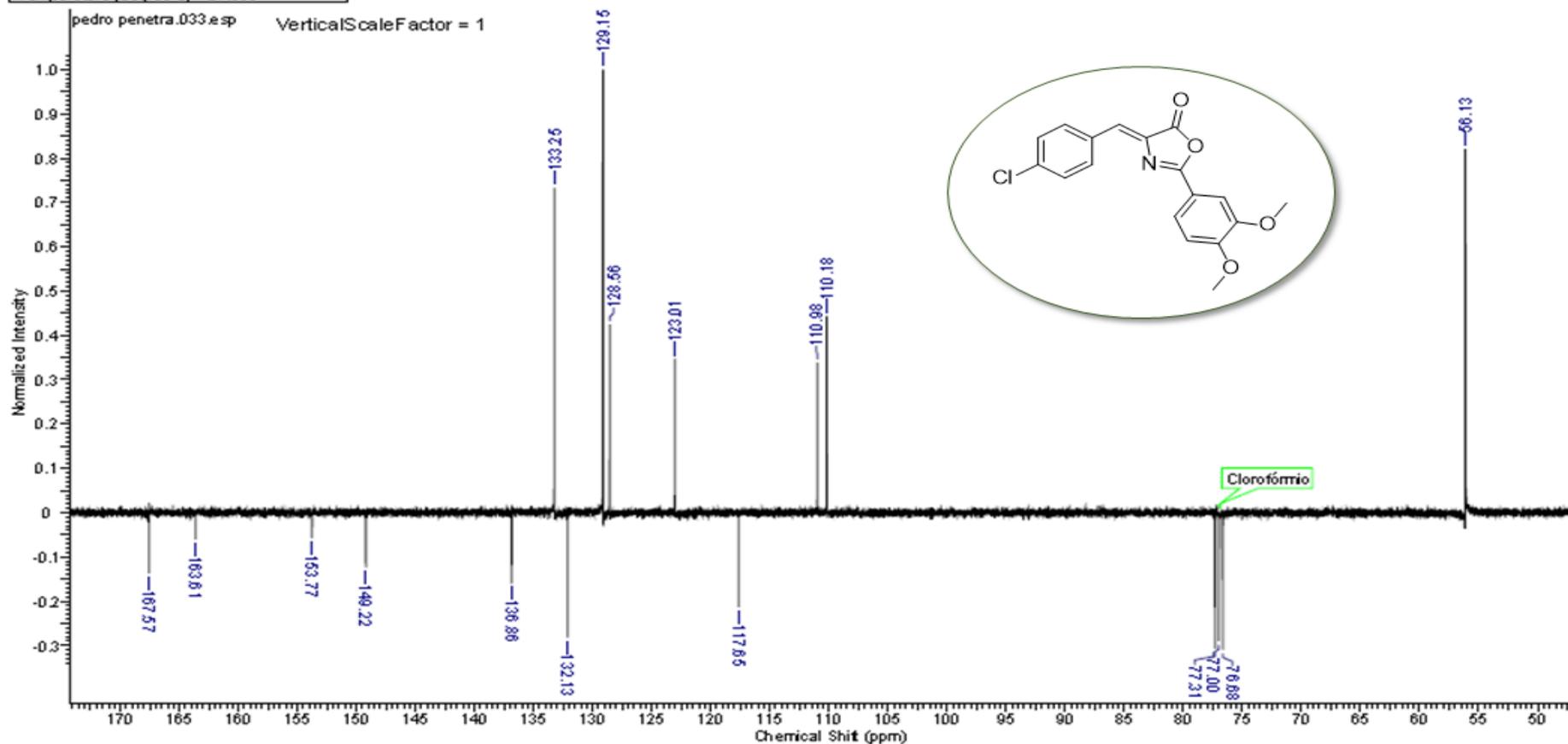
Espectro de RMN ^1H do produto **31a** com ampliação em 8,20 – 6,95 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OX 1 (PROTON) - 400MHZ S OLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	08 Dec 2015 15:18:40	Date Stamp	08 Dec 2015 15:18:40	Frequency (MHz)	400.11
File Name	D:\pedro penetra\3214d	Origin	spect	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Original Points Count	32768	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	287.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.7097	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



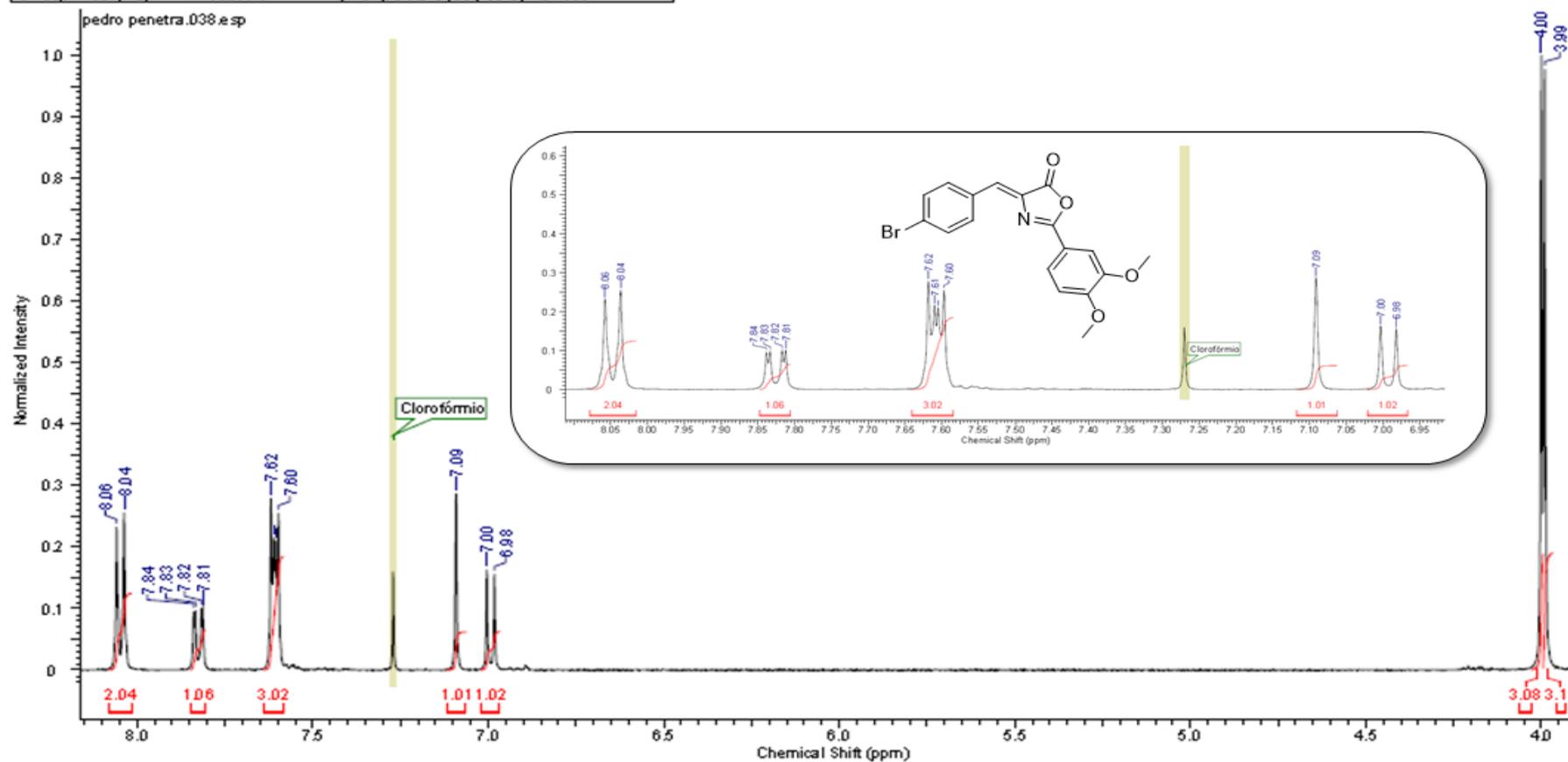
Espectro de RMN ¹³C do produto **31a** em CDCl₃ à 100 MHz

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AM0 STRA: OX 1 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	08 Dec 2015 15:18:40	Date Stamp	08 Dec 2015 15:18:40		
File Name	D:\pedro penetra\33\1d	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12066.6514	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		



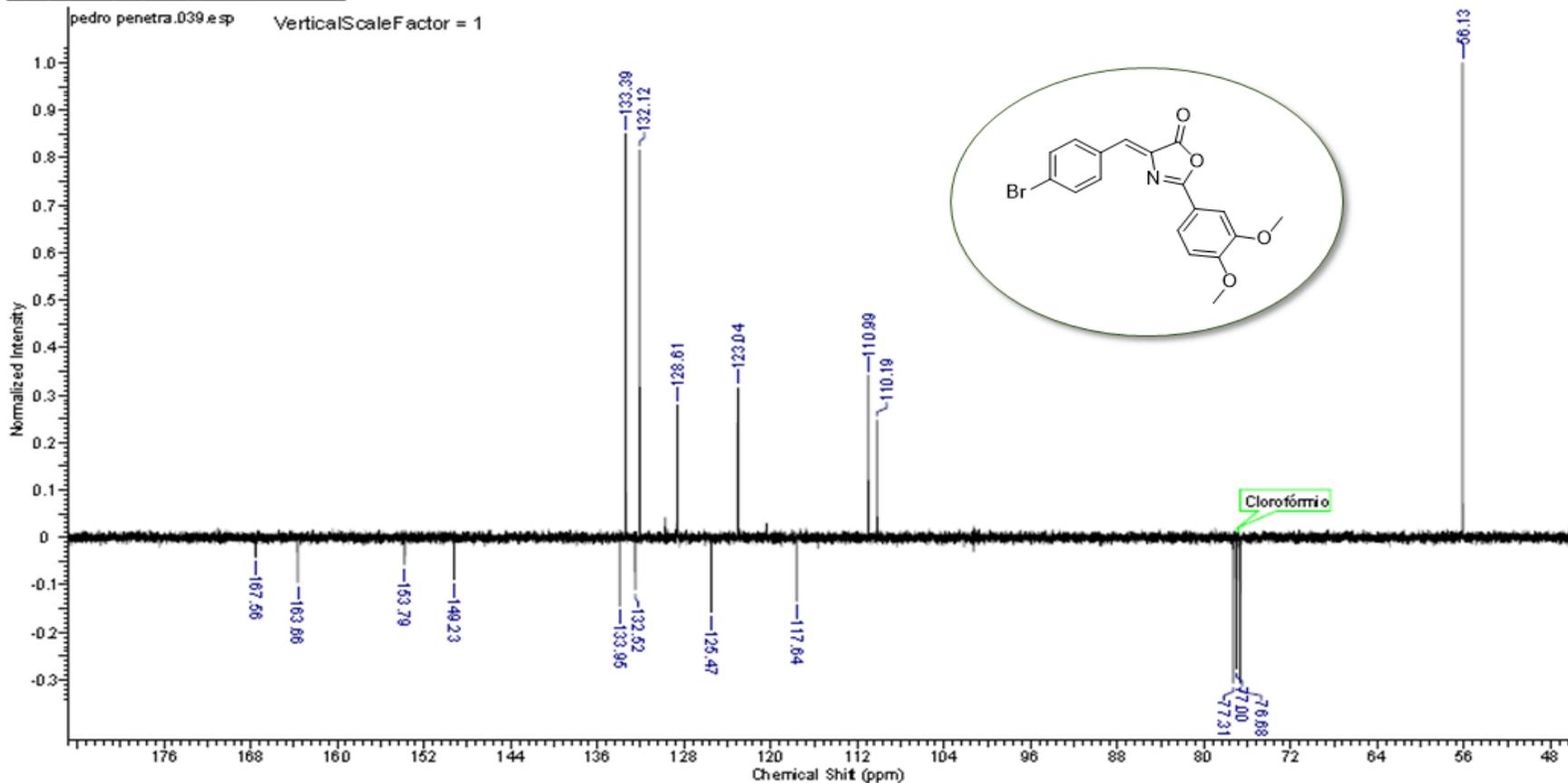
Espectro de RMN ^1H do produto **31b** com ampliação em 8,10 – 6,95 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: 0X 2 (PROTON)- 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 09:54:24	Date Stamp	09 Dec 2015 09:54:24		
File Name	D:\pedro penetra\38\1.d	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	287.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.7097	SW (cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



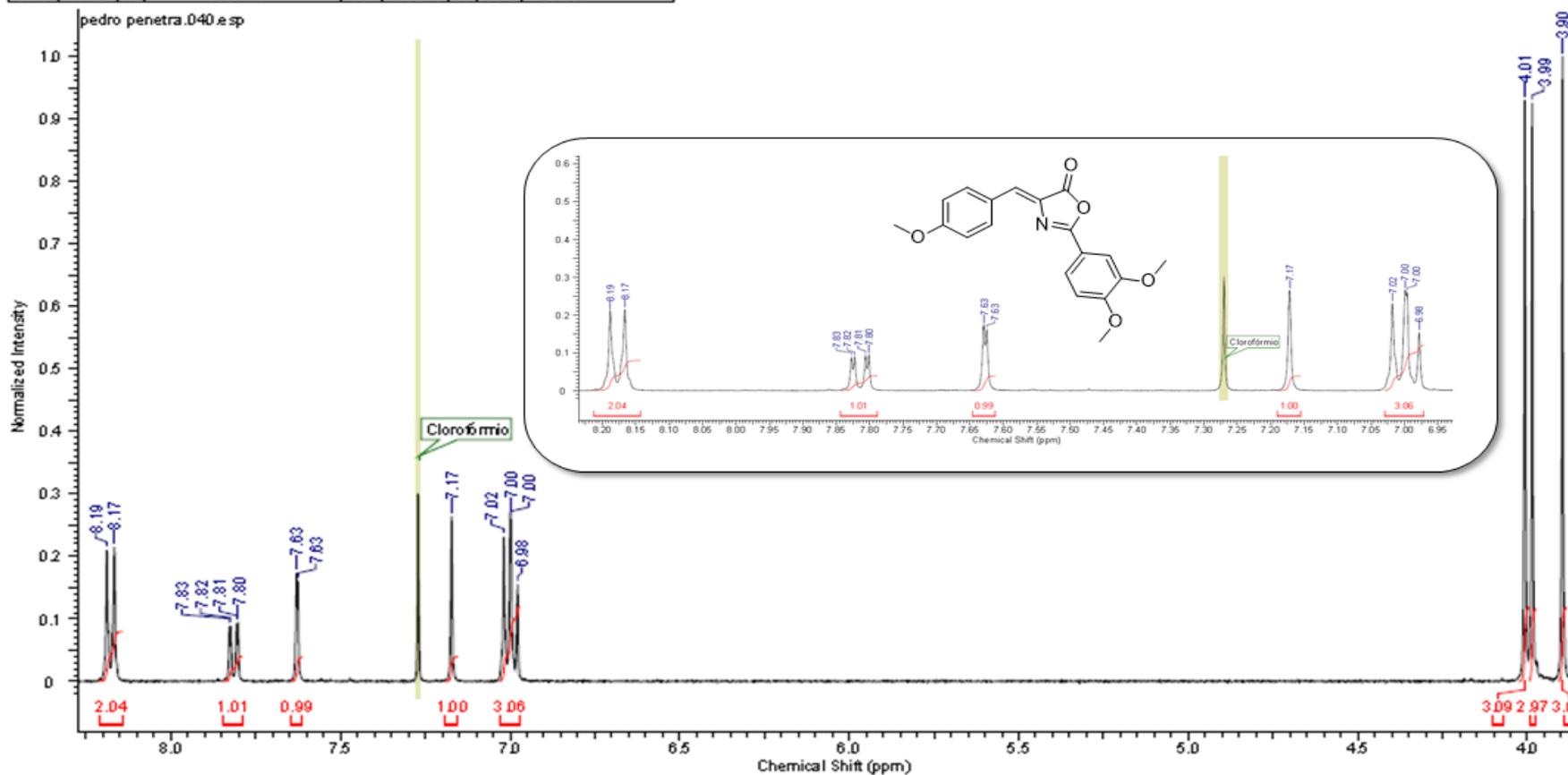
Espectro de RMN ¹³C do produto **31b** em CDCl₃ à 100 MHz

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMO STRA: OX 2 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 10:00:48	Date Stamp	09 Dec 2015 10:00:48		
File Name	D:\pedro penetra\09\vid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	588	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgpsp	Receiver Gain	2050.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12066.6514	SW (cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		



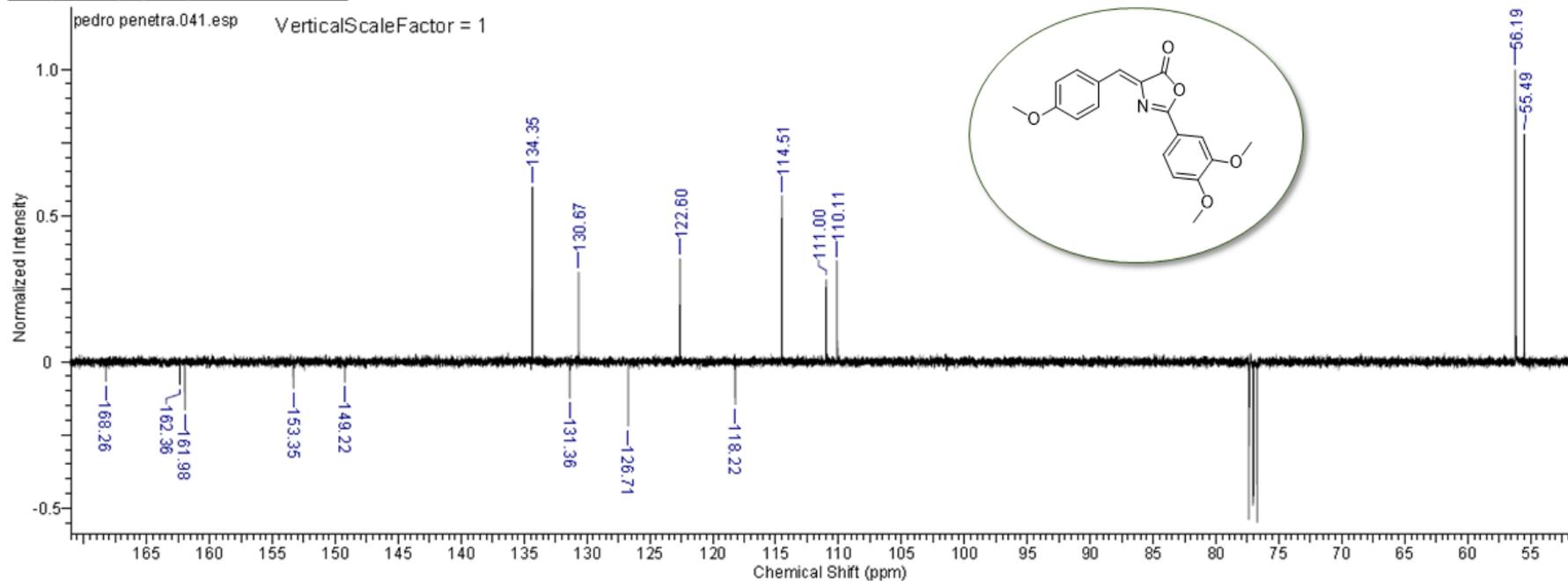
Espectro de RMN ^1H do produto **31c** com ampliação em 8,20 – 6,95 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: 0X 3 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 10:41:20	Date Stamp	09 Dec 2015 10:41:20		
File Name	D:\pedro penetra\40\fid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1 H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	322.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.7097	SW (cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



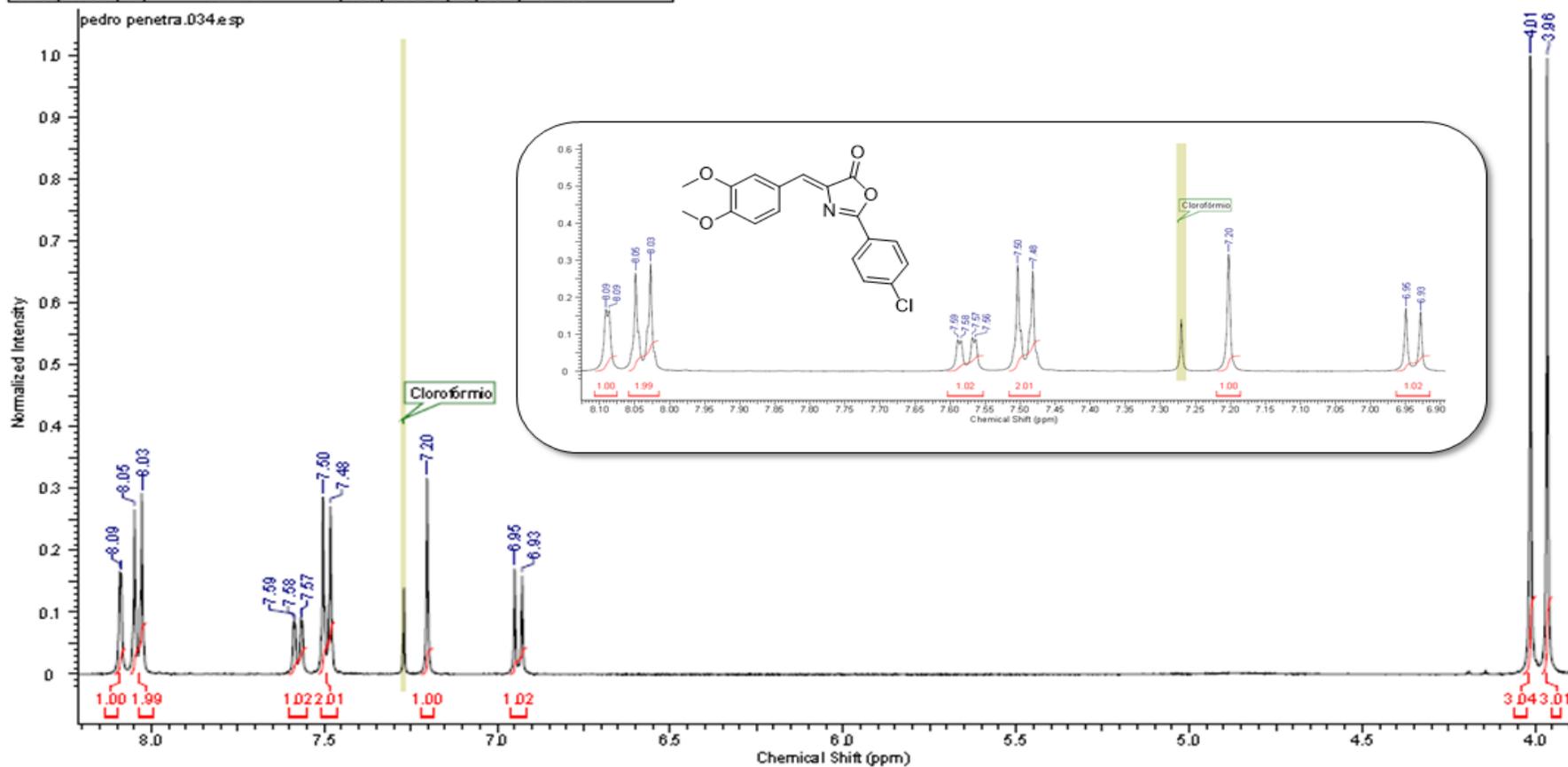
Espectro de RMN ¹³C do produto **31c** em CDCl₃ à 100 MHz

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: OX 3 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 10:41:20	Date Stamp	09 Dec 2015 10:41:20		
File Name	D:\pedro penetra\41\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	956	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		



Espectro de RMN ^1H do produto **31d** com ampliação em 8,15 – 6,90 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

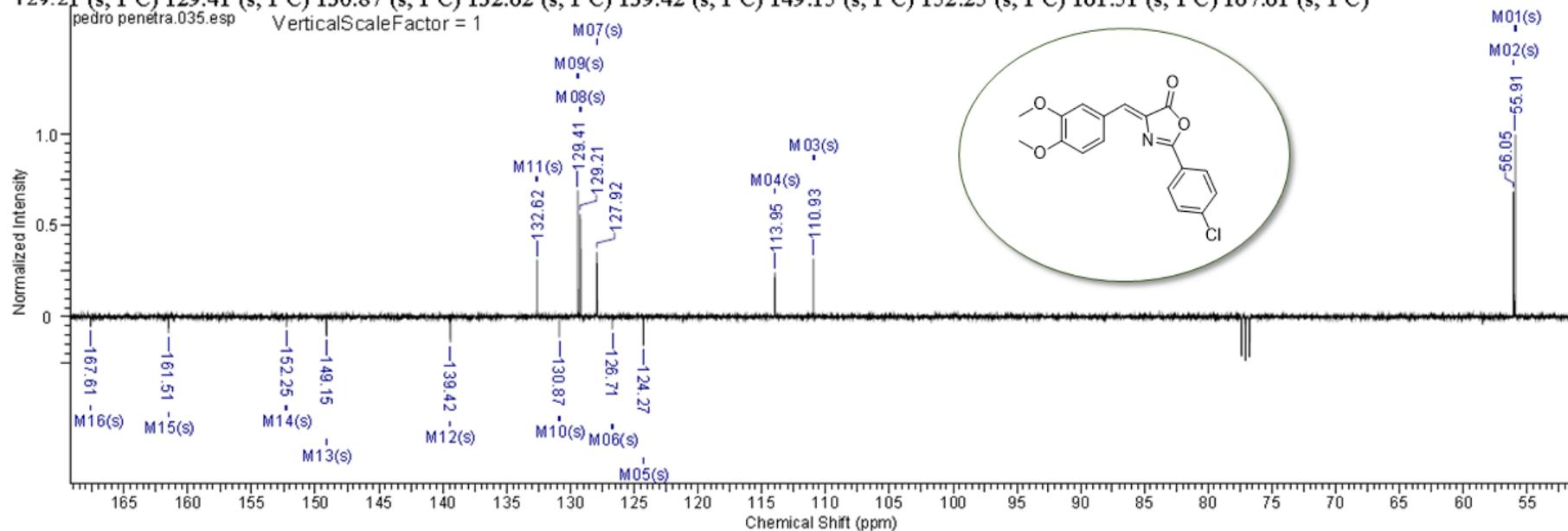
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OX 4 (PROTON)- 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	08 Dec 2015 17:56:32	Date Stamp	08 Dec 2015 17:56:32		
File Name	D:\pedro penetra\34\1d	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	203.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.7097	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



Espectro de RMN ¹³C do produto **31d** em CDCl₃ à 100 MHz

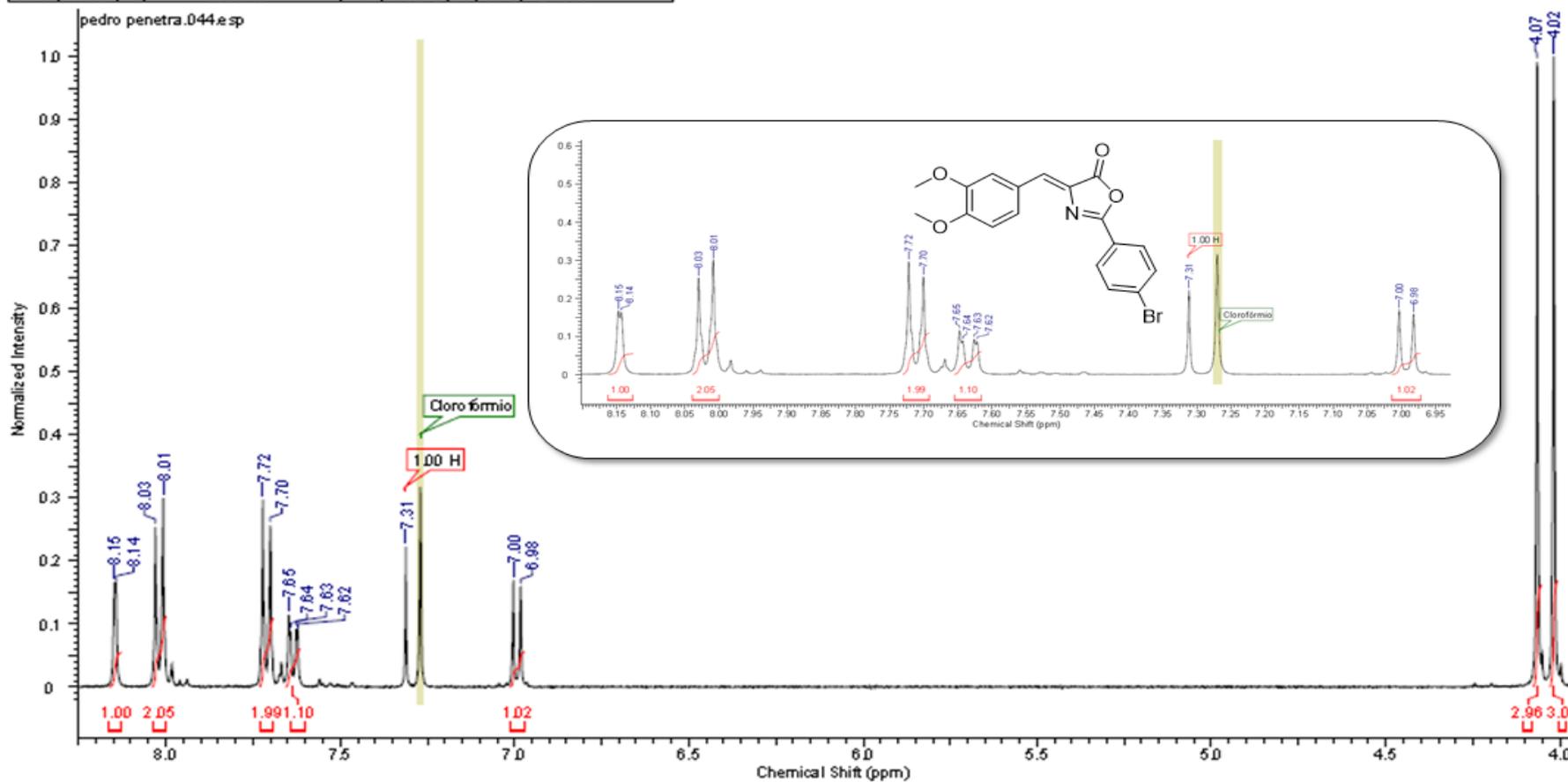
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppp	Receiver Gain	812.00	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75		
Temperature (degree C)	27.000						

¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 55.91 (s, 1 C) 56.05 (s, 1 C) 110.93 (s, 1 C) 113.95 (s, 1 C) 124.27 (s, 1 C) 126.71 (s, 1 C) 127.92 (s, 1 C) 129.21 (s, 1 C) 129.41 (s, 1 C) 130.87 (s, 1 C) 132.62 (s, 1 C) 139.42 (s, 1 C) 149.15 (s, 1 C) 152.25 (s, 1 C) 161.51 (s, 1 C) 167.61 (s, 1 C)



Espectro de RMN ^1H do produto **31e** com ampliação em 8,15 – 6,95 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

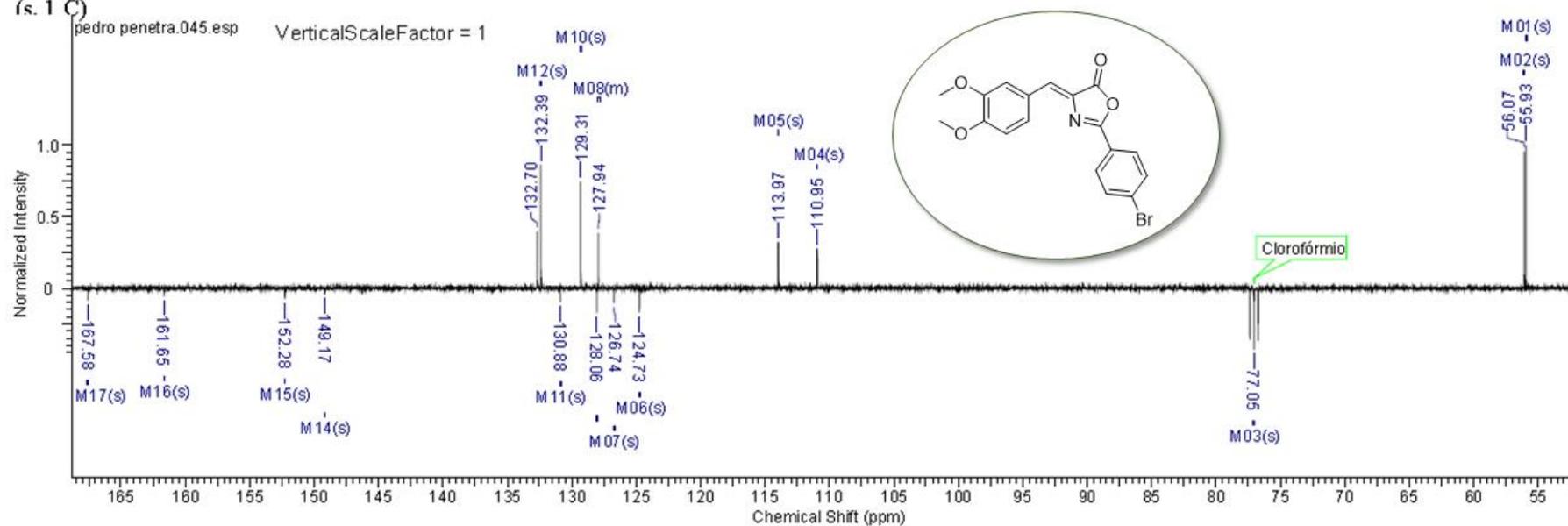
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: 0X 5 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 12:21:36	Date Stamp	09 Dec 2015 12:21:36		
File Name	D:\pedro penetra\44\4	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	322.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2480.2734	Sweep Width (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



Espectro de RMN ^{13}C do produto **31e** em CDCl_3 à 100 MHz.

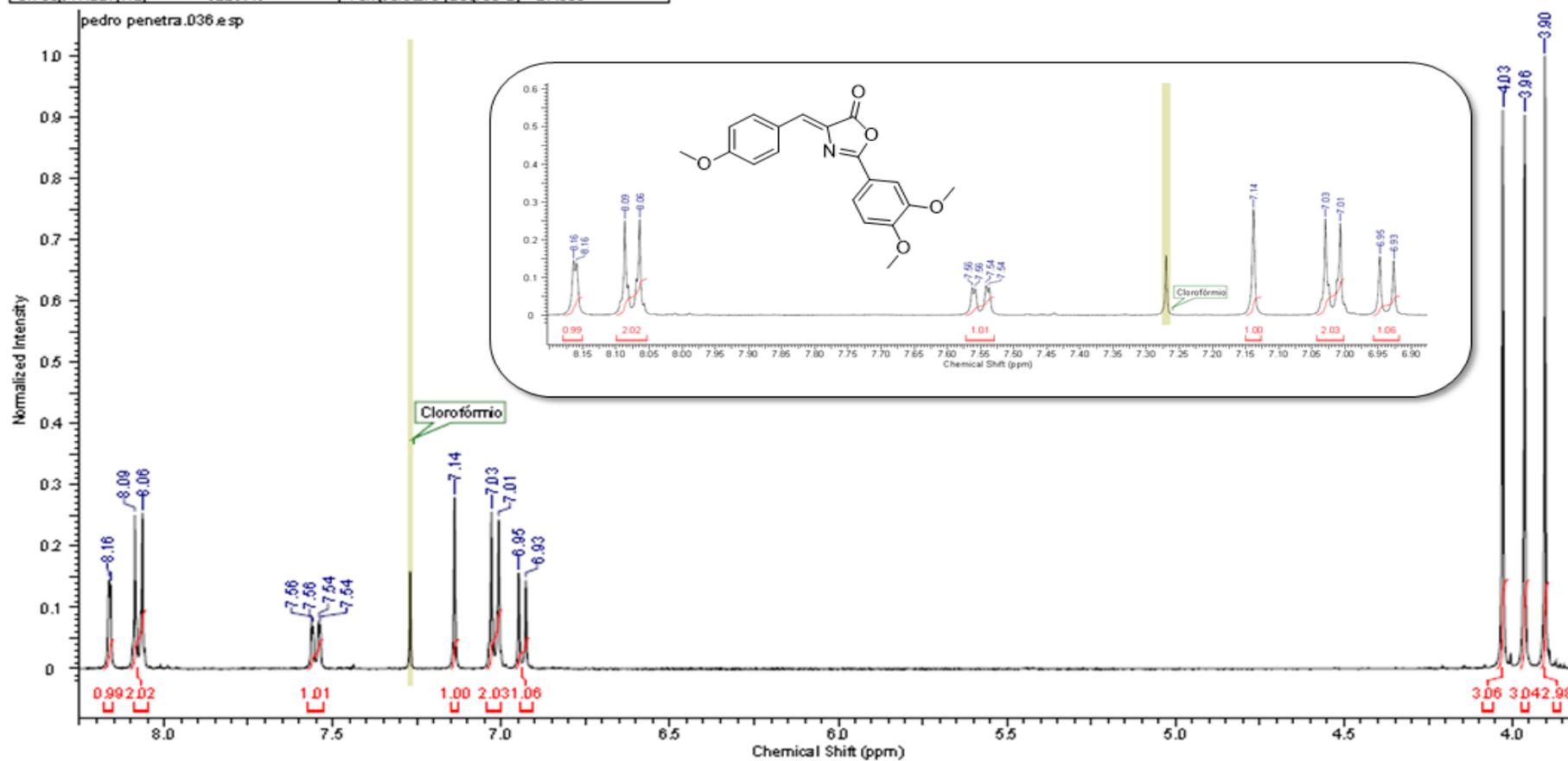
Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: OX 5 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 12:28:00	Date Stamp	09 Dec 2015 12:28:00		
File Name	D:\pedro penetra\45.fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	795	Origin	spect	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 55.93 (s, 1 C) 56.07 (s, 1 C) 77.05 (s, 1 C) 110.95 (s, 1 C) 113.97 (s, 1 C) 124.73 (s, 1 C) 126.74 (s, 1 C) 127.84 - 127.93 (m, 1 C) 128.06 (s, 1 C) 129.31 (s, 1 C) 130.88 (s, 1 C) 132.39 (s, 1 C) 132.70 (s, 1 C) 149.17 (s, 1 C) 152.28 (s, 1 C) 161.65 (s, 1 C) 167.58 (s, 1 C)



Espectro de RMN ^1H do produto **31f** com ampliação em 8,15 – 6,90 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

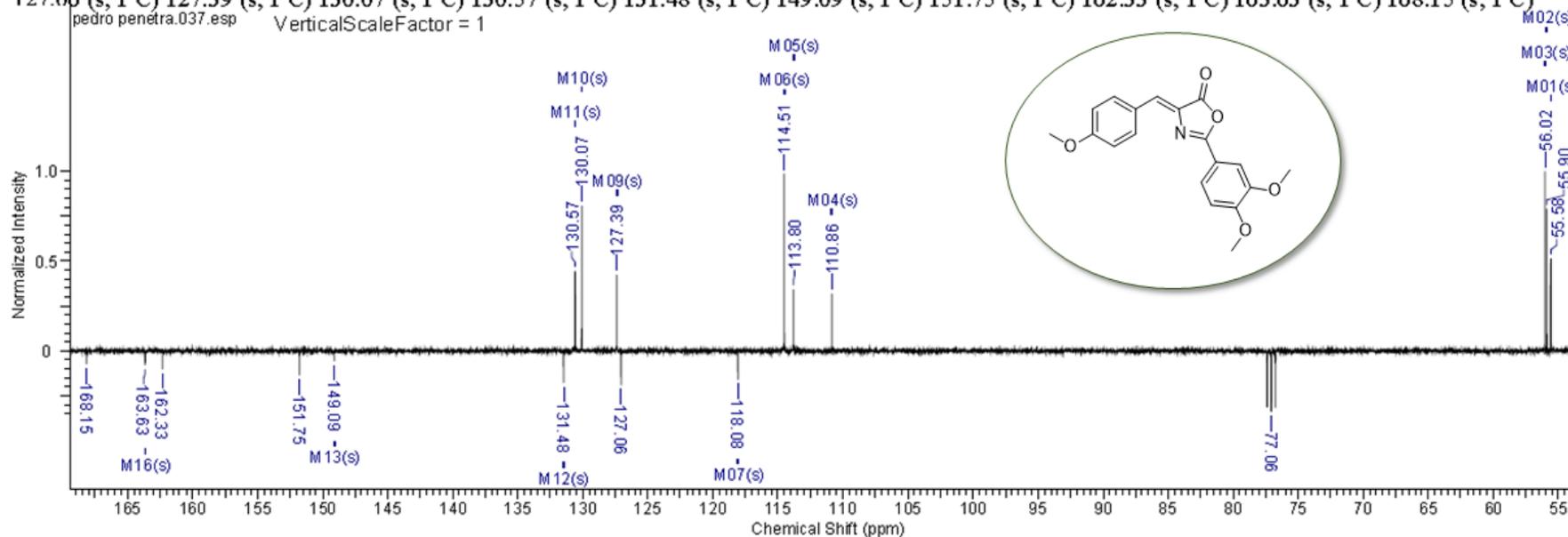
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OX 6 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 08:58:56	Date Stamp	09 Dec 2015 08:58:56		
File Name	D:\pedro penetra\06\1d	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	256.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.7097	SW (cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



Espectro de RMN ¹³C do produto **31f** em CDCl₃ à 100 MHz.

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: OX 6 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	09 Dec 2015 09:07:28	Date Stamp	09 Dec 2015 09:07:28		
File Name	D:\pedro penetra\37fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	895	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		

¹³C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 55.58 (s, 1 C) 55.90 (s, 1 C) 56.02 (s, 1 C) 110.86 (s, 1 C) 113.80 (s, 1 C) 114.51 (s, 1 C) 118.08 (s, 1 C) 127.06 (s, 1 C) 127.39 (s, 1 C) 130.07 (s, 1 C) 130.57 (s, 1 C) 131.48 (s, 1 C) 149.09 (s, 1 C) 151.75 (s, 1 C) 162.33 (s, 1 C) 163.63 (s, 1 C) 168.15 (s, 1 C)

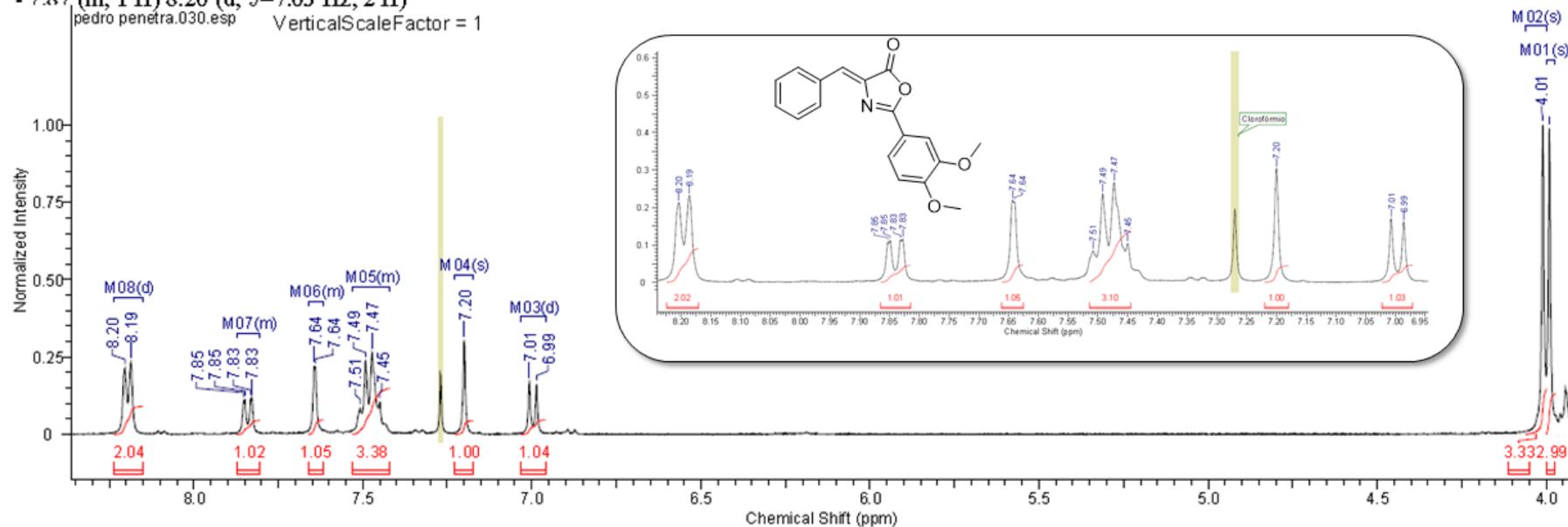


Espectro de RMN ¹H do produto **31g** com ampliação em 8,20 – 6,95 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

08/12/2015 07:33:00

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OX 7 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	08 Dec 2015 13:38:24	Date Stamp	08 Dec 2015 13:38:24		
File Name	D:\pedro penetra\30\fid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	287.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.4587	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD

¹H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 3.99 (s, 3 H) 4.01 (s, 3 H) 7.00 (d, J=8.28 Hz, 1 H) 7.20 (s, 1 H) 7.42 - 7.53 (m, 3 H) 7.62 - 7.66 (m, 1 H) 7.81 - 7.87 (m, 1 H) 8.20 (d, J=7.03 Hz, 2 H)

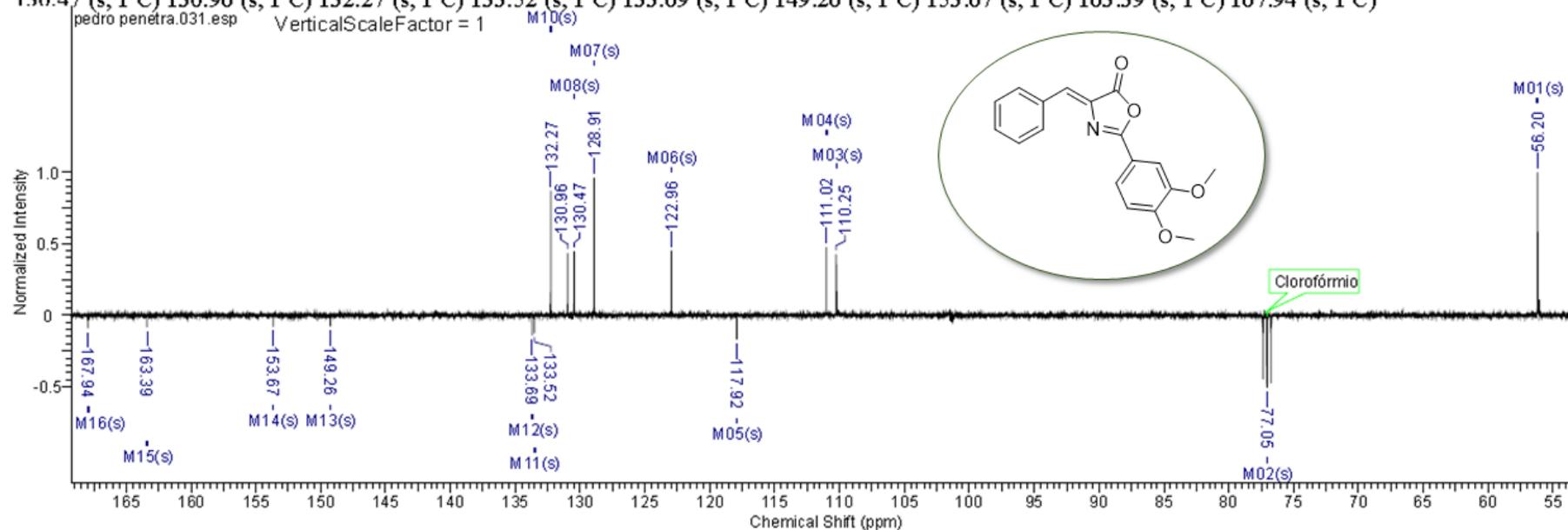


Espectro de RMN ^{13}C do produto **31g** em CDCl_3 à 100 MHz.

0002/2010 02.00.92

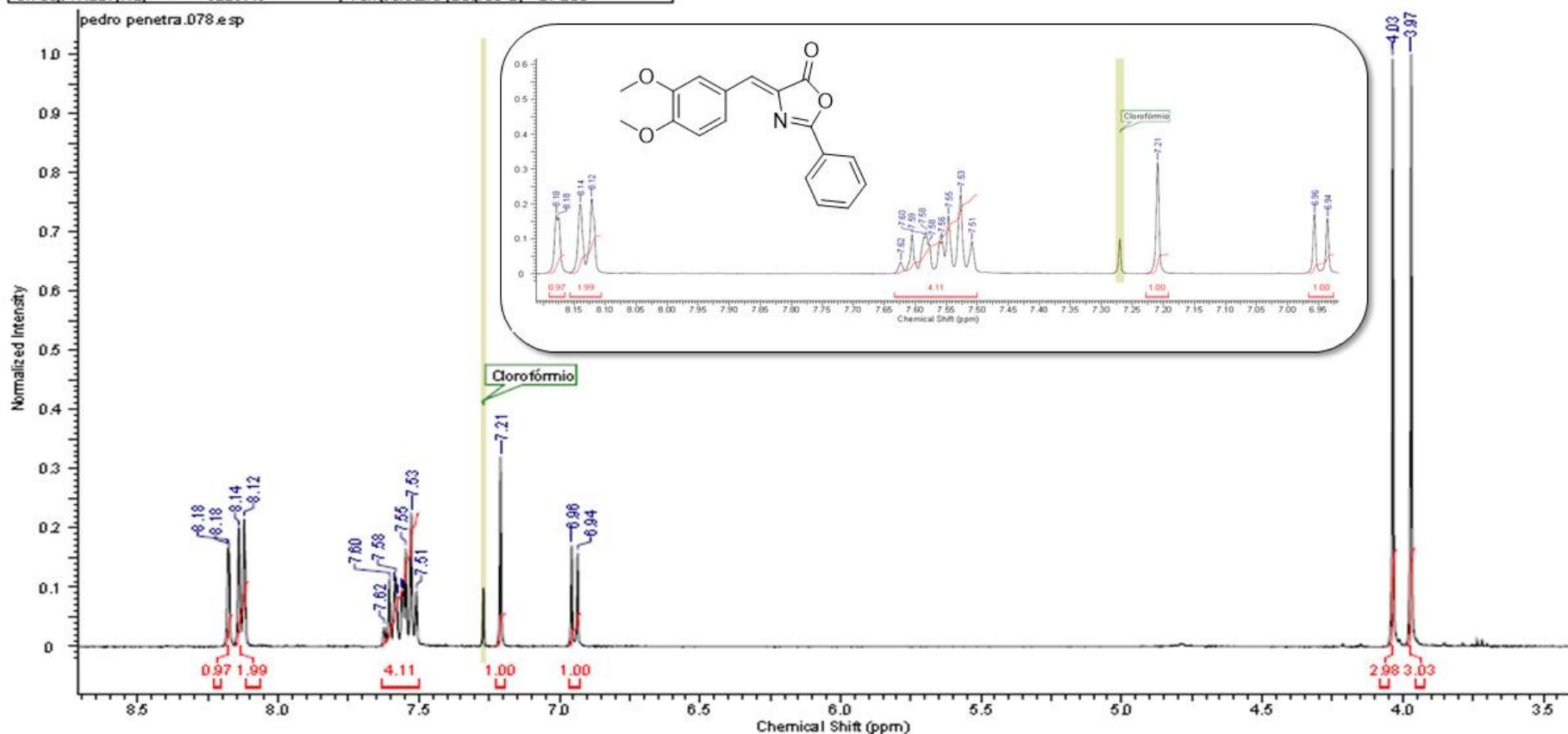
Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: OX 7 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	08 Dec 2015 13:51:12	Date Stamp	08 Dec 2015 13:51:12		
File Name	D:\pedro penetra\31\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW (cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		

^{13}C NMR (101 MHz, CHLOROFORM-d) δ ppm 56.20 (s, 1 C) 77.05 (s, 1 C) 110.25 (s, 1 C) 111.02 (s, 1 C) 117.92 (s, 1 C) 122.96 (s, 1 C) 128.91 (s, 1 C) 130.47 (s, 1 C) 130.96 (s, 1 C) 132.27 (s, 1 C) 133.52 (s, 1 C) 133.69 (s, 1 C) 149.26 (s, 1 C) 153.67 (s, 1 C) 163.39 (s, 1 C) 167.94 (s, 1 C)



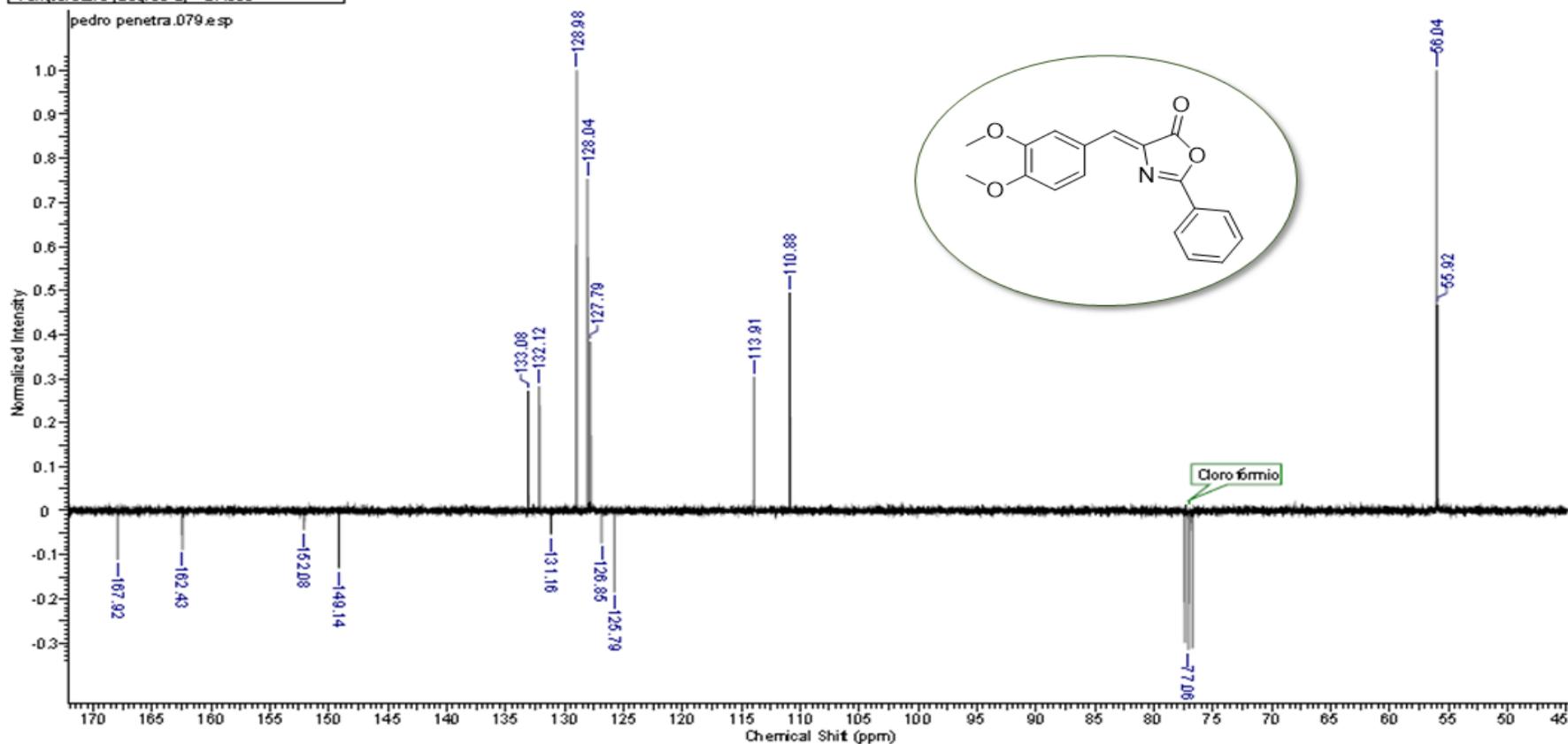
Espectro de RMN ¹H do produto **31h** com ampliação em 8,20 – 6,95 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: OX 8 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	04 May 2016 13:17:04	Date Stamp	04 May 2016 13:17:04		
File Name	D:\pedro penetra\781\d	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	228.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	2463.9607	SW (cyclical) (Hz)	8223.68
Sweep Width (Hz)	8223.43	Temperature (degree C)	27.000	Spectrum Type	STANDARD



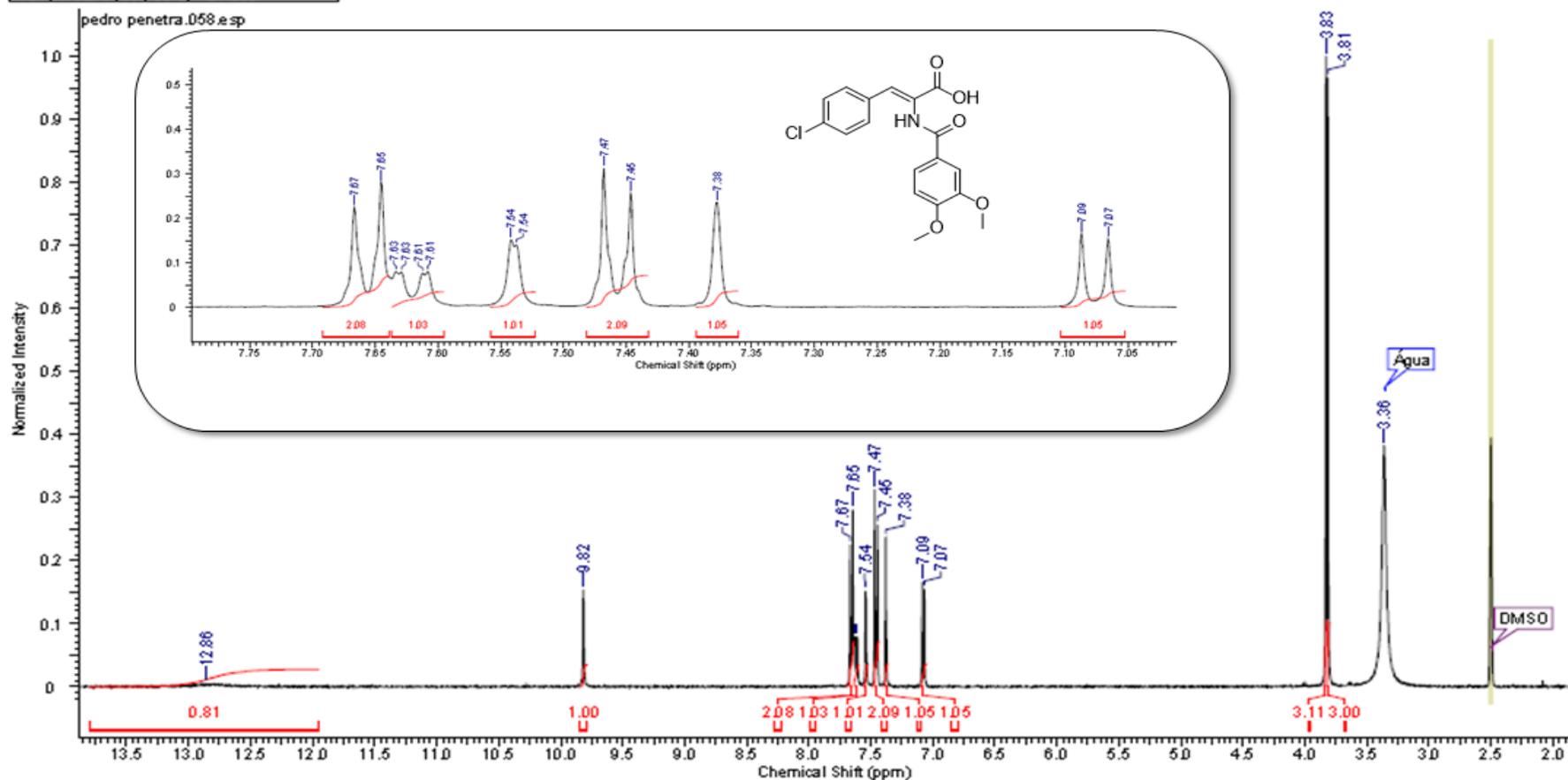
Espectro de RMN ¹³C do produto **31h** em CDCl₃ à 100 MHz.

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: OX 8 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: CDCL3 OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	04 May 2016 13:23:28	Date Stamp	04 May 2016 13:23:28		
File Name	D:\pedro penetra\79\vid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1150.00
Solvent	CHLOROFORM-d	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	SW(cyclical) (Hz)	25252.53
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	25251.75		



Espectro de RMN ^1H do produto **34a** com ampliação em 7,75 – 7,05 ppm em CDCl_3 à 400 MHz.

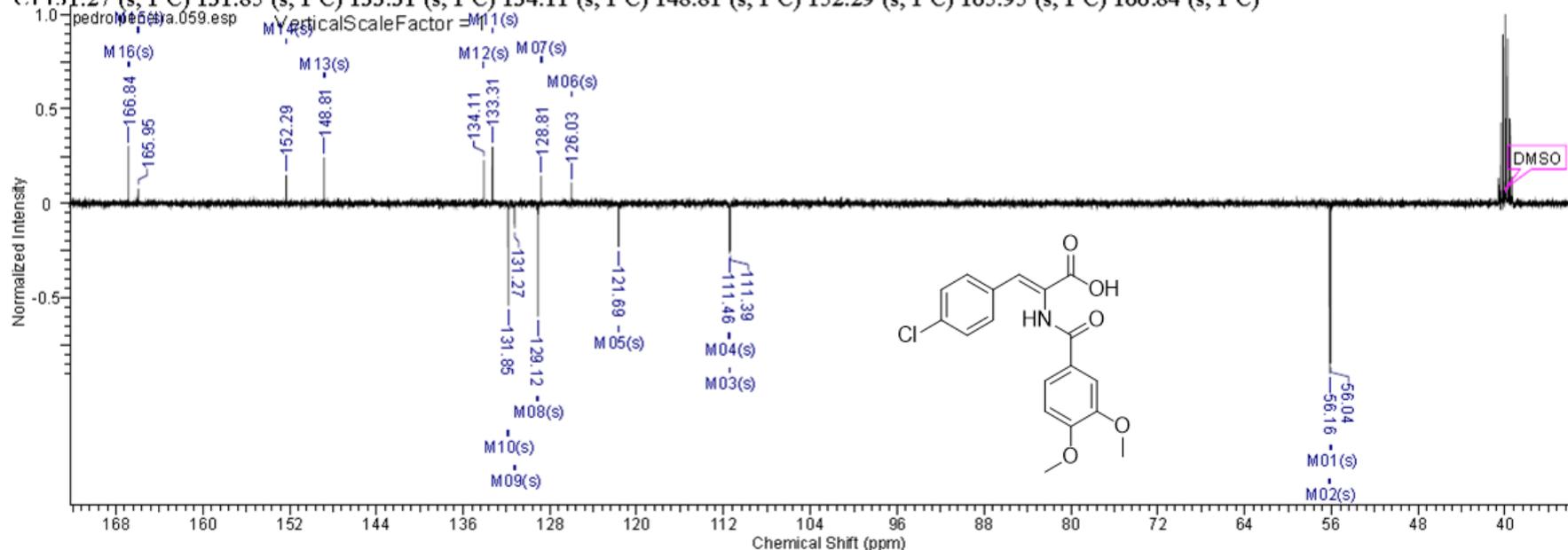
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: AC 01 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	25 Feb 2016 12:21:36	Date Stamp	25 Feb 2016 12:21:36		
File Name	D:\pedro penetra\58\vid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	^1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	256.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2462.2827	Spectrum Type	STANDARD
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	8223.43		



Espectro de RMN ^{13}C do produto **34a** em CDCl_3 à 100 MHz.

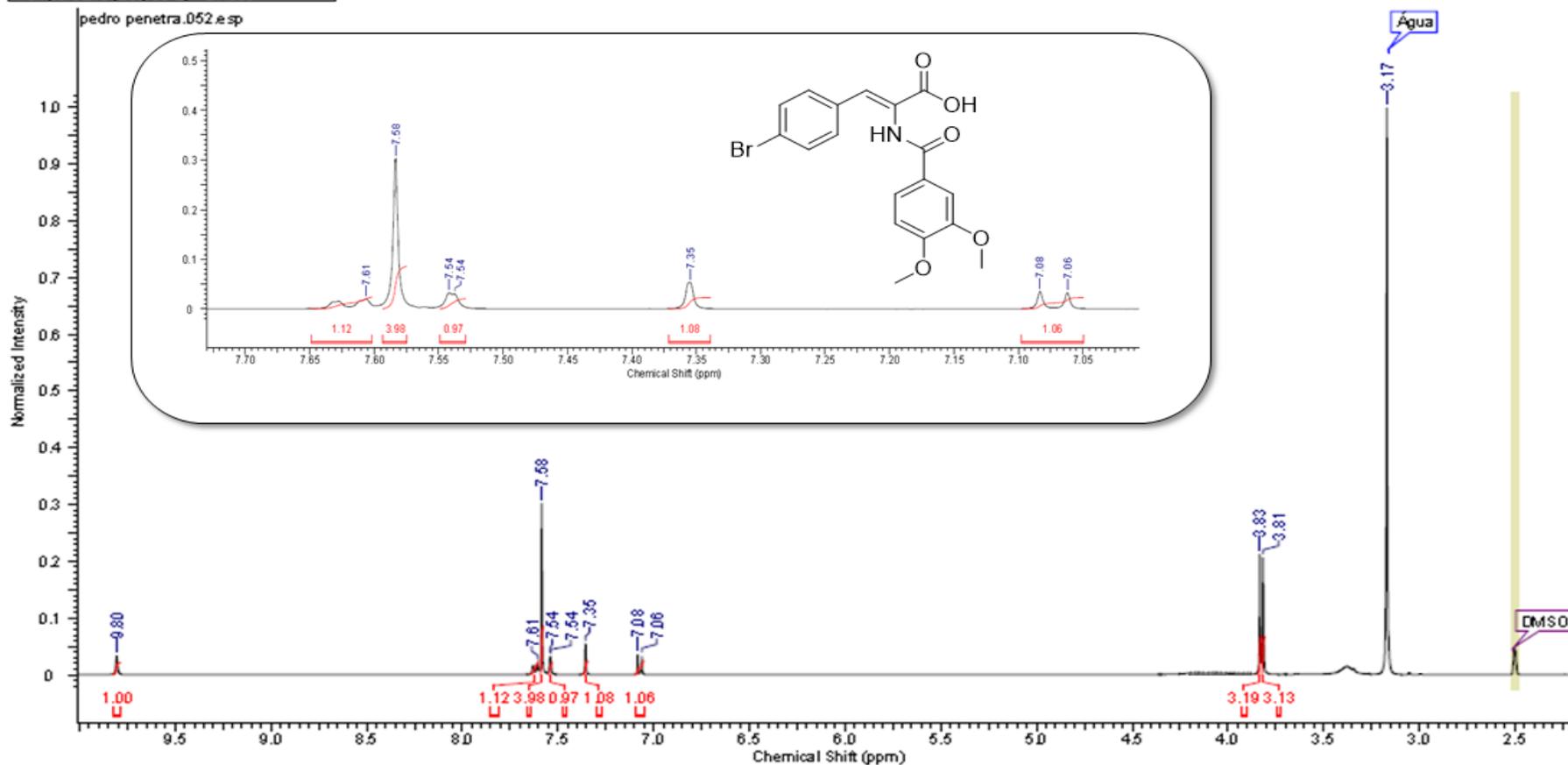
Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMOSTRA: AC 01 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	25 Feb 2016 12:25:52	Date Stamp	25 Feb 2016 12:25:52		
File Name	D:\pedro penetra\59\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	^{13}C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	1030.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degree C)	27.000

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.04 (s, 1 C) 56.16 (s, 1 C) 111.39 (s, 1 C) 111.46 (s, 1 C) 121.69 (s, 1 C) 126.03 (s, 1 C) 128.81 (s, 1 C) 129.12 (s, 1 C) 131.27 (s, 1 C) 131.85 (s, 1 C) 133.31 (s, 1 C) 134.11 (s, 1 C) 148.81 (s, 1 C) 152.29 (s, 1 C) 165.95 (s, 1 C) 166.84 (s, 1 C)



Espectro de RMN ¹H do produto **34b** com ampliação em 7,70 – 7,05 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

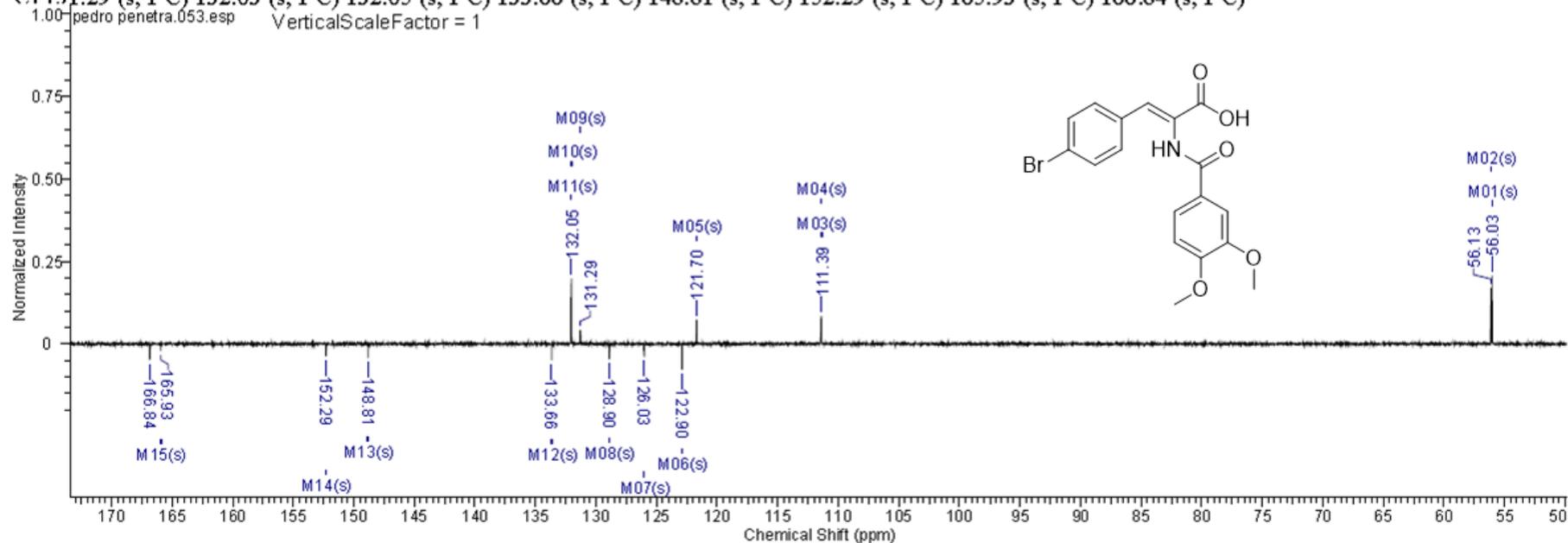
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: AC 02 (PROTON) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	25 Feb 2016 07:57:04	Date Stamp	25 Feb 2016 07:57:04		
File Name	D:\pedro penetra\52\fid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	¹ H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	144.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2462.0317	Spectrum Type	STANDARD
Temperature (degree C)	27.000			Sweep Width (Hz)	8223.43



Espectro de RMN ¹³C do produto **34b** em CDCl₃ à 100 MHz.

No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height	No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	56.03	5636.9	0.2070	5	121.70	12243.6	0.0737	9	131.29	13209.2	0.0417	13	148.81	14971.7	-0.0427
2	56.13	5646.9	0.1695	6	122.90	12364.6	-0.0775	10	132.03	13283.2	0.1806	14	152.29	15321.6	-0.0381
3	111.39	11207.1	0.0855	7	126.03	12679.8	-0.0393	11	132.05	13284.8	0.1979	15	165.93	16694.1	-0.0224
4	111.44	11211.7	0.0780	8	128.90	12968.0	-0.0473	12	133.66	13447.4	-0.0502	16	166.84	16785.0	-0.0496
Points Count		32768		Pulse Sequence		deptqgppp		Receiver Gain		2050.00		SW(cyclical) (Hz)		25252.53	
Solvent		DMSO-d6		Spectrum Offset (Hz)		12072.9277		Sweep Width (Hz)		25251.75		Temperature (degree C)		27.000	

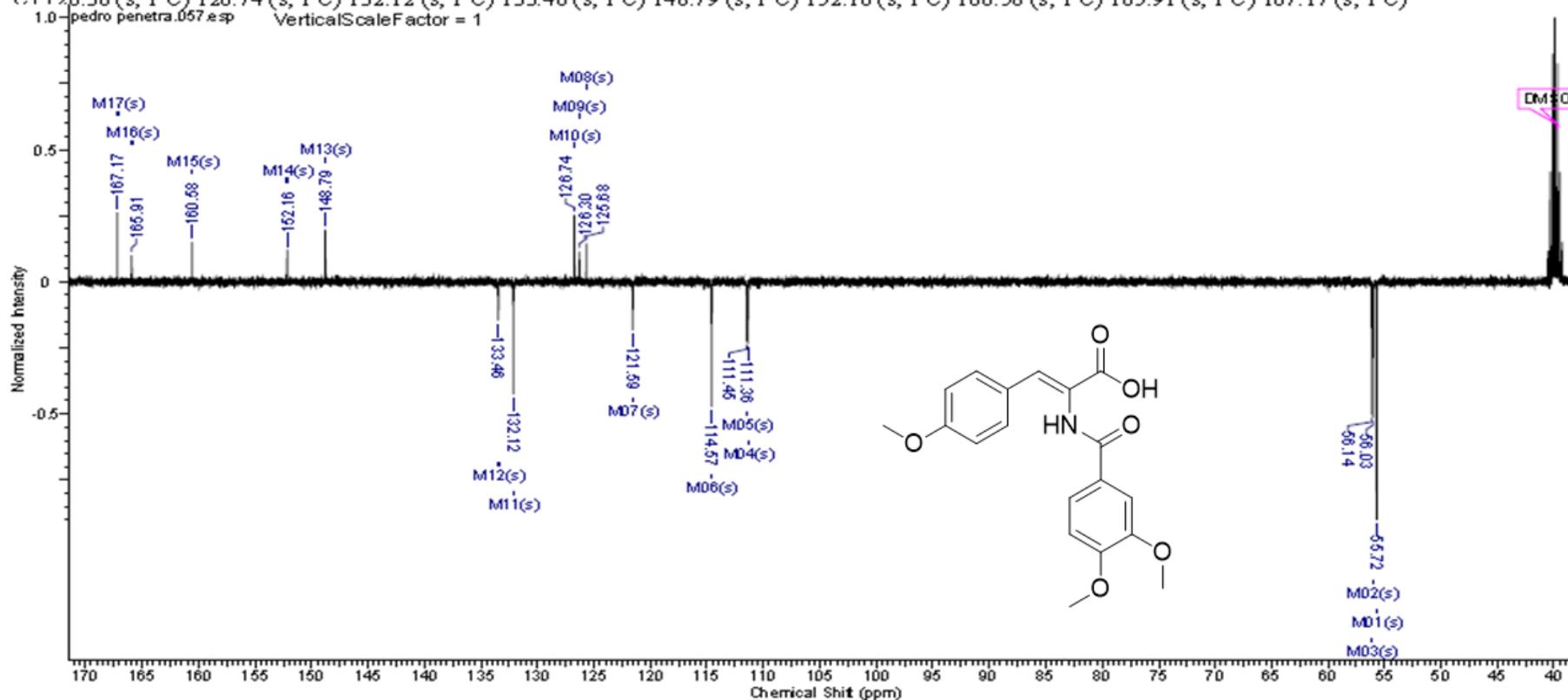
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 56.03 (s, 1 C) 56.13 (s, 1 C) 111.39 (s, 1 C) 111.44 (s, 1 C) 121.70 (s, 1 C) 122.90 (s, 1 C) 126.03 (s, 1 C) 128.90 (s, 1 C) 131.29 (s, 1 C) 132.03 (s, 1 C) 132.05 (s, 1 C) 133.66 (s, 1 C) 148.81 (s, 1 C) 152.29 (s, 1 C) 165.93 (s, 1 C) 166.84 (s, 1 C)



Espectro de RMN ¹³C do produto **34c** em CDCl₃ à 100 MHz.

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMO STRA: AC 03 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	25 Feb 2016 11:51:44	Date Stamp	25 Feb 2016 11:51:44		
File Name	D:\pedro penetra\57\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppp	Receiver Gain	1030.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degree C)	27.000

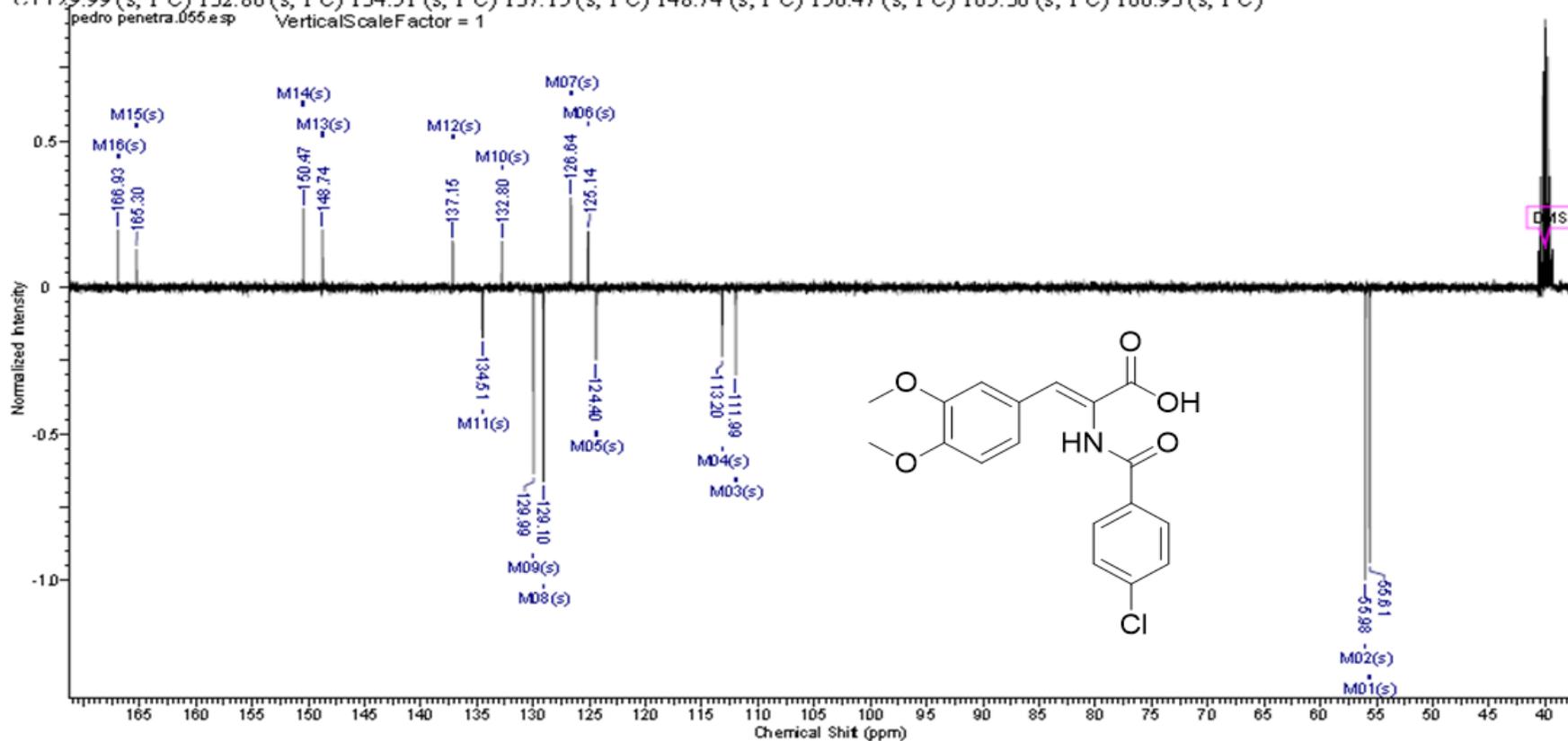
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 55.72 (s, 1 C) 56.03 (s, 1 C) 56.14 (s, 1 C) 111.36 (s, 1 C) 111.45 (s, 1 C) 114.57 (s, 1 C) 121.59 (s, 1 C) 125.68 (s, 1 C) 126.30 (s, 1 C) 126.74 (s, 1 C) 132.12 (s, 1 C) 133.46 (s, 1 C) 148.79 (s, 1 C) 152.16 (s, 1 C) 160.58 (s, 1 C) 165.91 (s, 1 C) 167.17 (s, 1 C)



Espectro de RMN ¹³C do produto **34d** em CDCl₃ à 100 MHz.

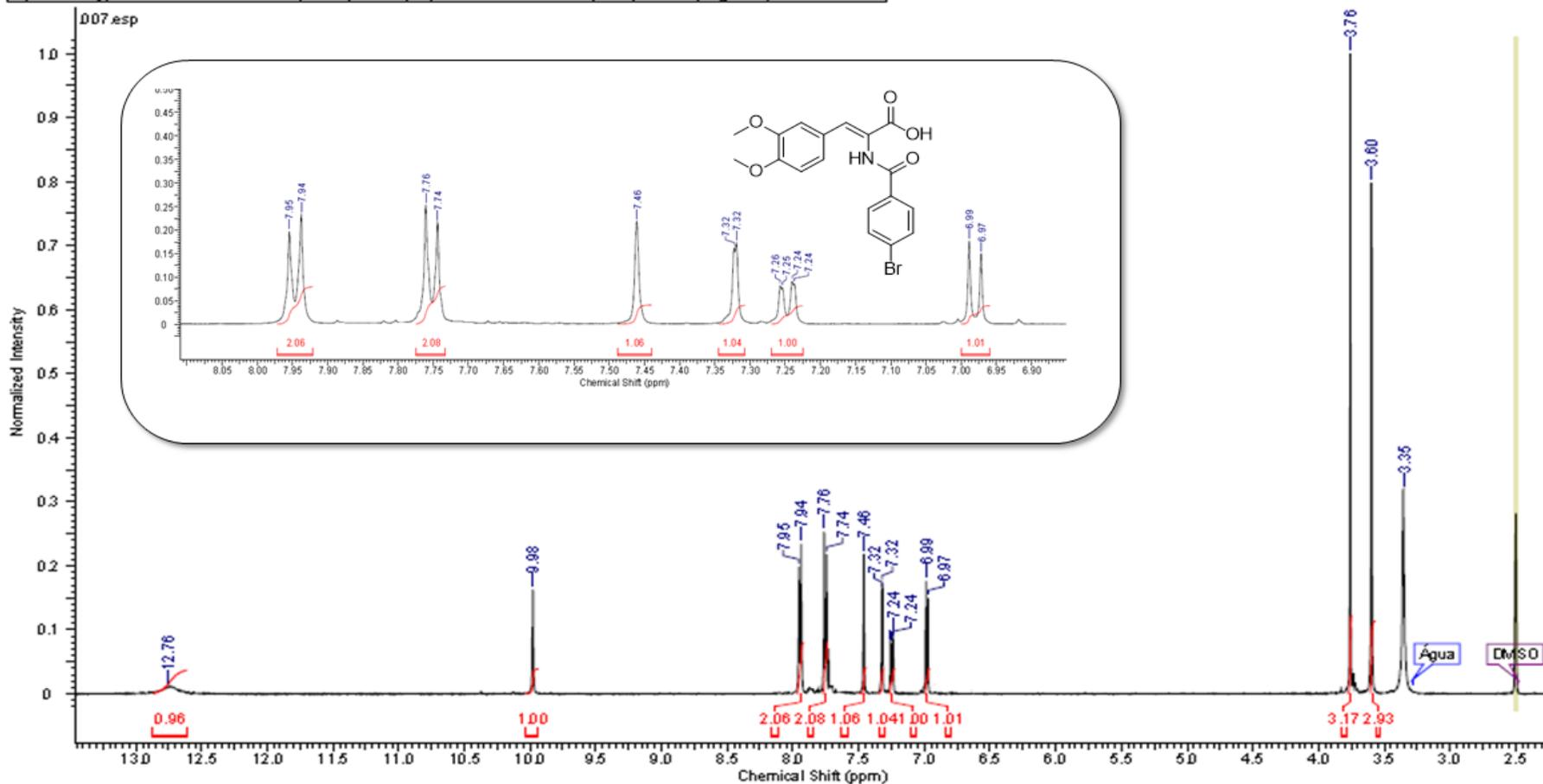
Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AM0 STRA: AC 04 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	25 Feb 2016 10:41:20	Date Stamp	25 Feb 2016 10:41:20		
File Name	D:\pedro penetra\55\1d	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	2050.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (de gree C)	27.000

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 55.61 (s, 1 C) 55.98 (s, 1 C) 111.99 (s, 1 C) 113.20 (s, 1 C) 124.40 (s, 1 C) 125.14 (s, 1 C) 126.64 (s, 1 C) 129.10 (s, 1 C) 129.99 (s, 1 C) 132.80 (s, 1 C) 134.51 (s, 1 C) 137.15 (s, 1 C) 148.74 (s, 1 C) 150.47 (s, 1 C) 165.30 (s, 1 C) 166.93 (s, 1 C)



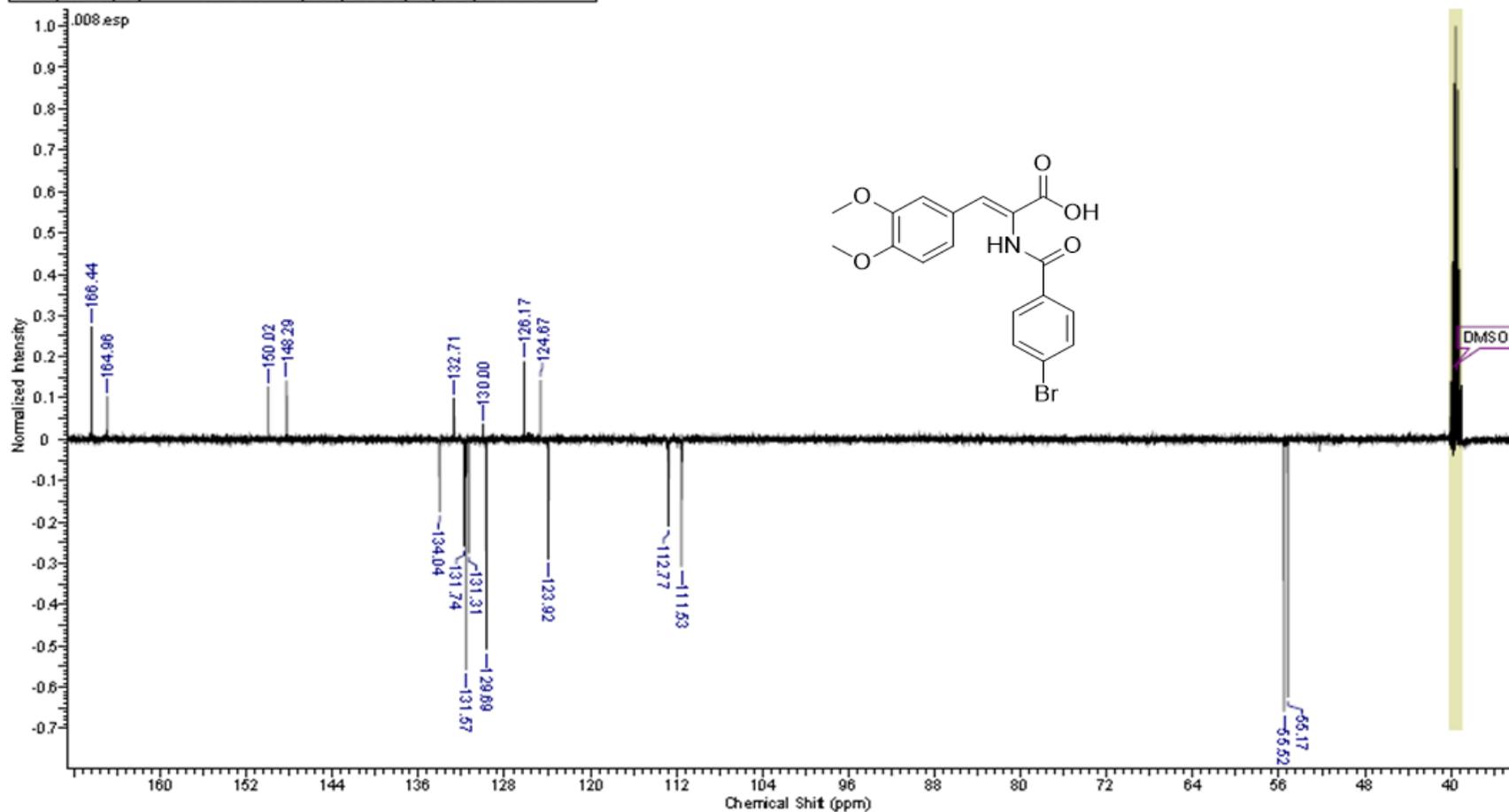
Espectro de RMN ¹H do produto **34e** com ampliação em 8,05 – 6,90 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.2768	Comment	AMOSTRA: Ac05 Solvente: DMSO OPERADOR: VITOR			Date	28 Apr 2016 09:28:48
Date Stamp	28 Apr 2016 09:28:48	File Name	D17fid	Frequency (MHz)	500.13	Nucleus	1H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner	ice
Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	456.00	SW (cycles) (Hz)	10000.00	Solvent	DMSO-d6
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	9999.70	Temperature (degree C)	21.460	Spectrum Offset (Hz)	3084.5842



Espectro de RMN ¹³C do produto **34e** em CDCl₃ à 100 MHz.

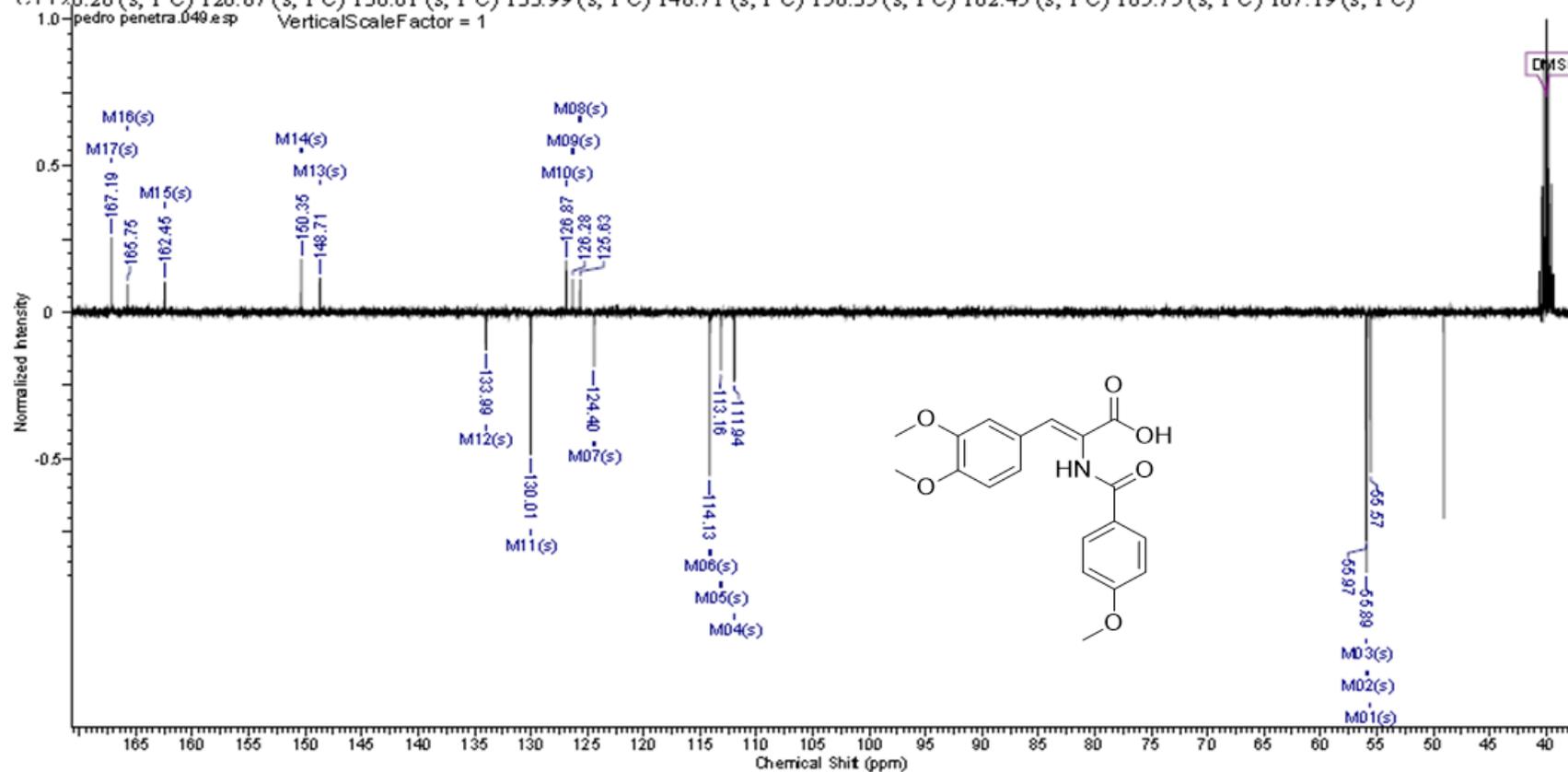
Acquisition Time (sec)	1.1884	Comment	AMOSTRA: Ac05 Solvente: DMSO OPERADOR: VITOR			Date	28 Apr 2016 10:11:28
Date Stamp	28 Apr 2016 10:11:28	File Name	D'8'fid	Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner	ice
Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	2050.00	S W (cyclical) (Hz)	27573.53	Solvent	DMSO-d6
Sweep Width (Hz)	27572.69	Temperature (degree C)	22.560			Spectrum Offset (Hz)	12518.0049



Espectro de RMN ¹³C do produto **34f** em CDCl₃ à 100 MHz

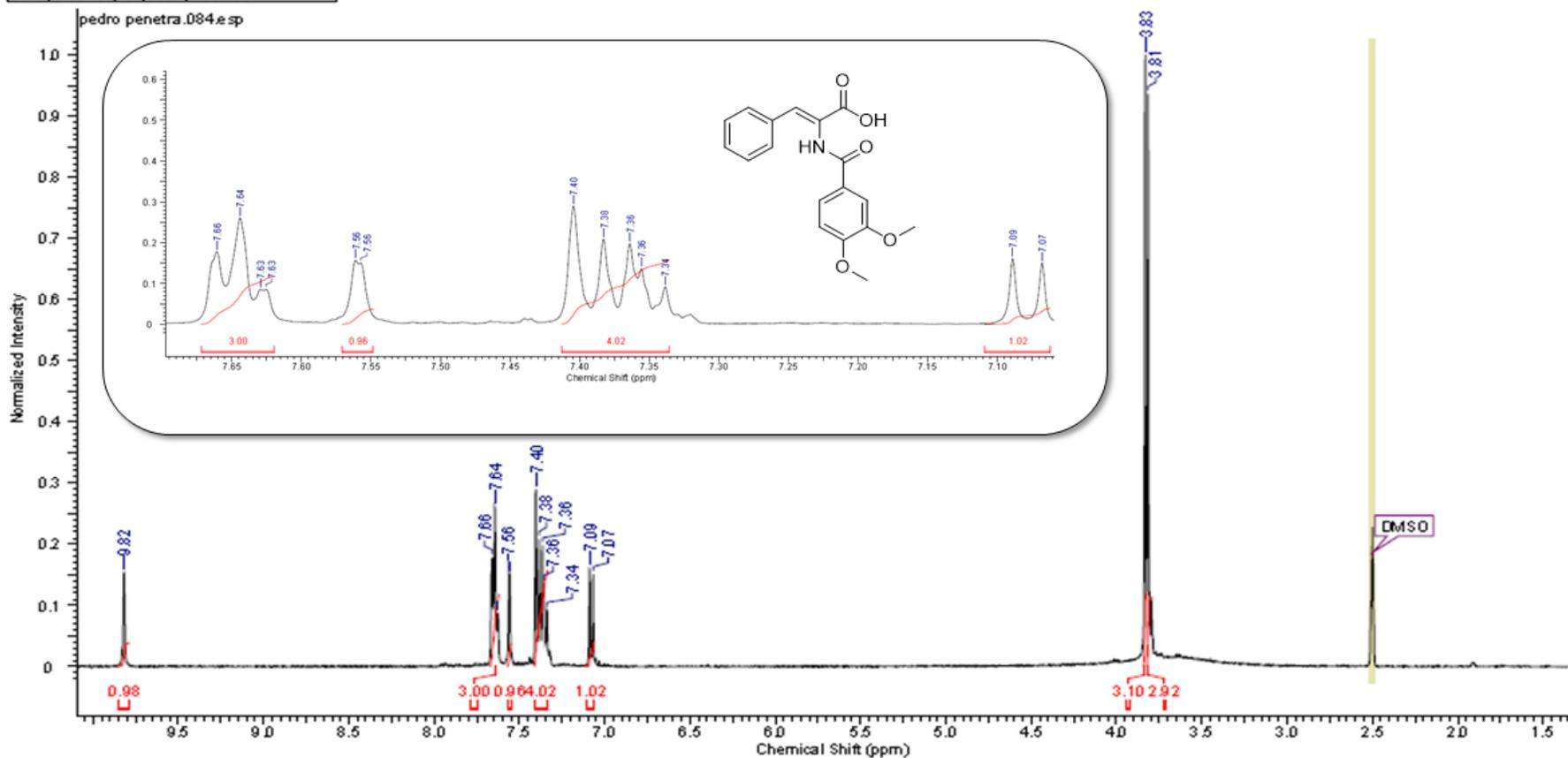
Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMD STRA: AC 06 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	24 Feb 2016 13:00:00	Date Stamp	24 Feb 2016 13:00:00		
File Name	D:\pedro penetra\49\vid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppp	Receiver Gain	2050.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degree C)	27.000

¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 55.57 (s, 1 C) 55.89 (s, 1 C) 55.97 (s, 1 C) 111.94 (s, 1 C) 113.16 (s, 1 C) 114.13 (s, 1 C) 124.40 (s, 1 C) 125.63 (s, 1 C) 126.28 (s, 1 C) 126.87 (s, 1 C) 130.01 (s, 1 C) 133.99 (s, 1 C) 148.71 (s, 1 C) 150.35 (s, 1 C) 162.45 (s, 1 C) 165.75 (s, 1 C) 167.19 (s, 1 C)



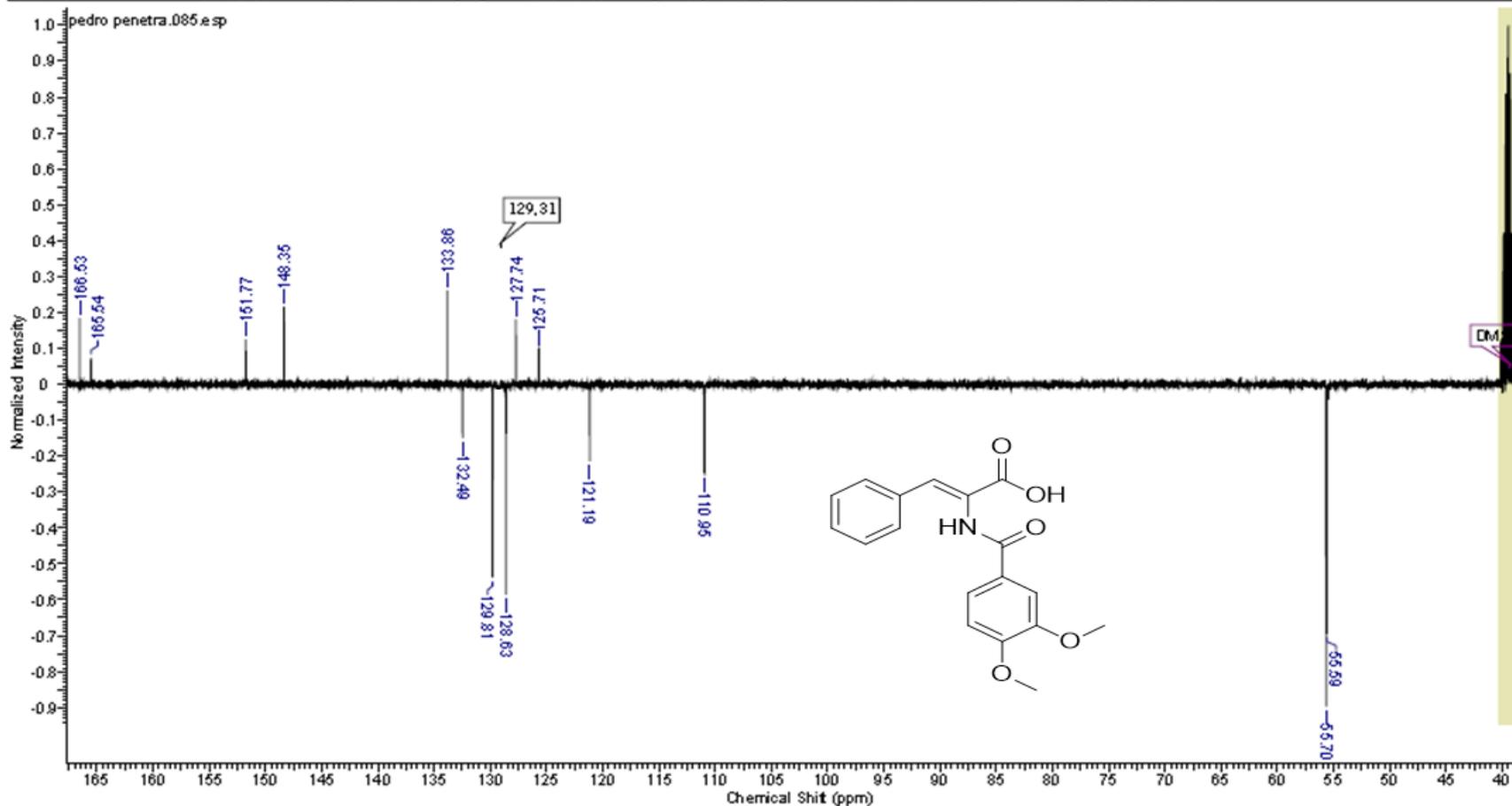
Espectro de RMN ¹H do produto **34g** com ampliação em 7,70 – 7,05 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: AC 07 (PROTON)- 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO				
Date	11 May 2016 13:49:04	Date Stamp	11 May 2016 13:49:04				
File Name	D:\pedro penetra\84\1d	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	1H		
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner	Administrator
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	203.00	SW(cyclical) (Hz)	8223.68
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2462.2827	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8223.43
Temperature (degree C)	27.000						



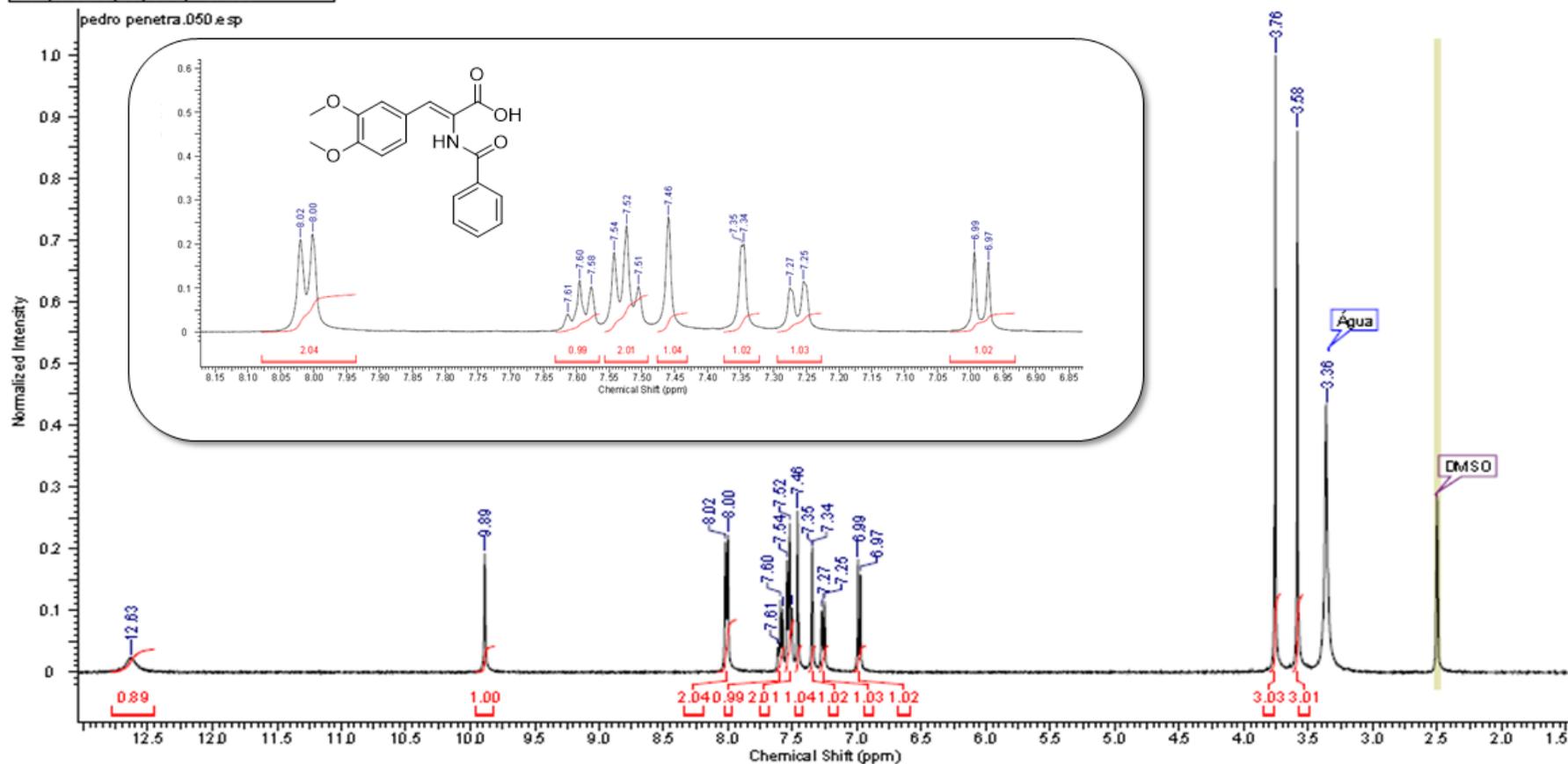
Espectro de RMN ¹³C do produto **34g** em CDCl₃ à 100 MHz

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMO STRA: AC 07 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	11 May 2016 13:57:36	Date Stamp	11 May 2016 13:57:36		
File Name	D:\pedro penetra\85\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	¹³ C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppsp	Receiver Gain	812.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12027.8760	SW (cyclical) (Hz)	25252.53
		Sweep Width (Hz)	25251.75	Temperature (degree C)	27.000



Espectro de RMN ¹H do produto **34h** com ampliação em 8,05 – 6,95 ppm em CDCl₃ à 400 MHz.

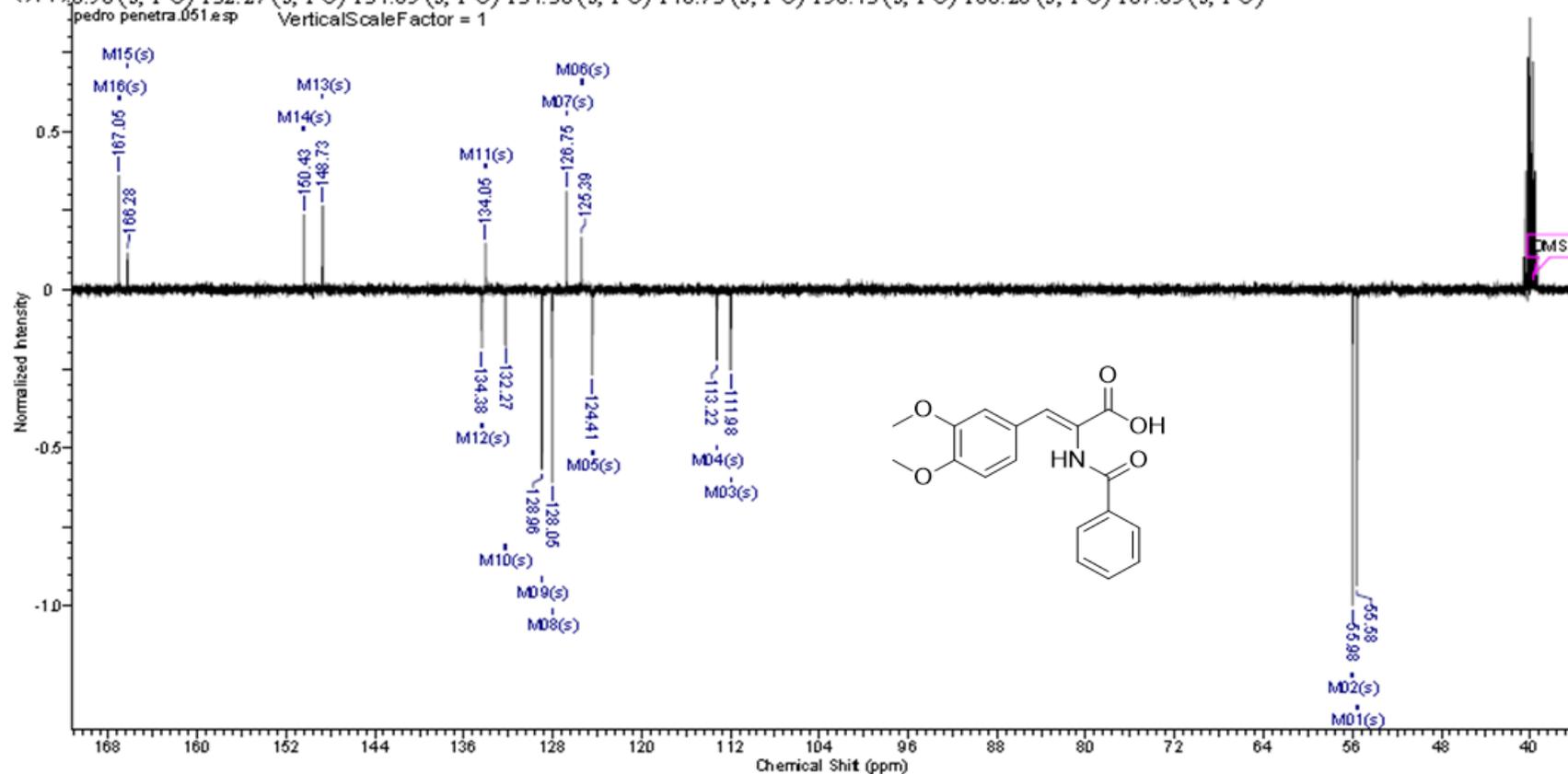
Acquisition Time (sec)	3.9846	Comment	AMOSTRA: AC 08 (PROTON)- 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	24 Feb 2016 13:59:44	Date Stamp	24 Feb 2016 13:59:44		
File Name	D:\pedro penetra\50\vid	Frequency (MHz)	400.11	Nucleus	¹ H
Number of Transients	16	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Receiver Gain	228.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	2462.2827	Spectrum Type	STANDARD
Temperature (degree C)	27.000	Sweep Width (Hz)	8223.43		



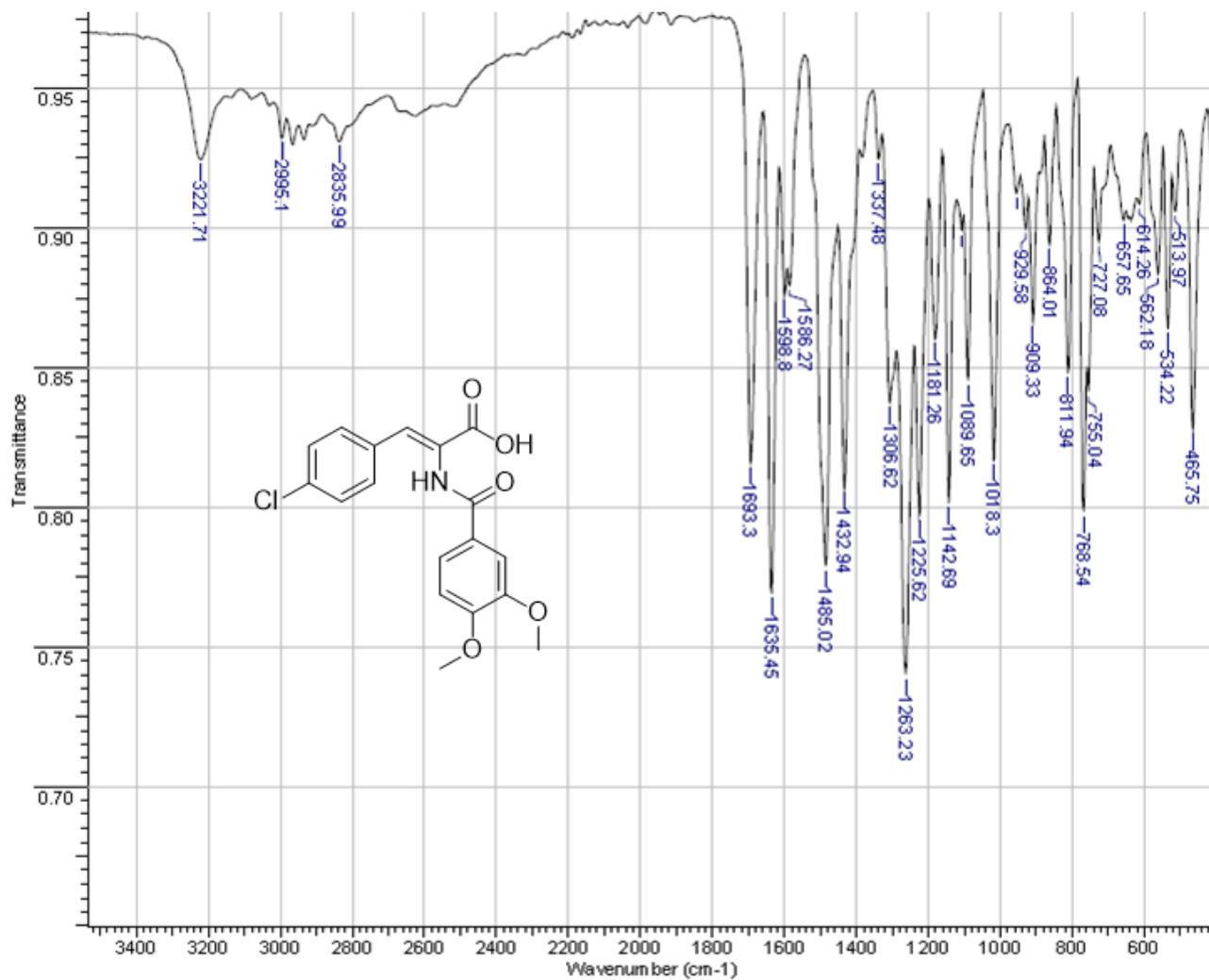
Espectro de RMN ¹³C do produto **34h** em CDCl₃ à 100 MHz

Acquisition Time (sec)	1.2976	Comment	AMO STRA: AC 08 (DEPT Q) - 400MHZ SOLVENTE: DMSO OPERADOR DO NMR - MAURICIO		
Date	24 Feb 2016 14:04:00	Date Stamp	24 Feb 2016 14:04:00		
File Name	D:\pedro penetra\61\fid	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	1024	Origin	spect	Original Points Count	32768
Points Count	32768	Pulse Sequence	deptqgppp	Receiver Gain	1030.00
Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)	12072.9277	Sweep Width (Hz)	25251.75
				Temperature (degree C)	27.000

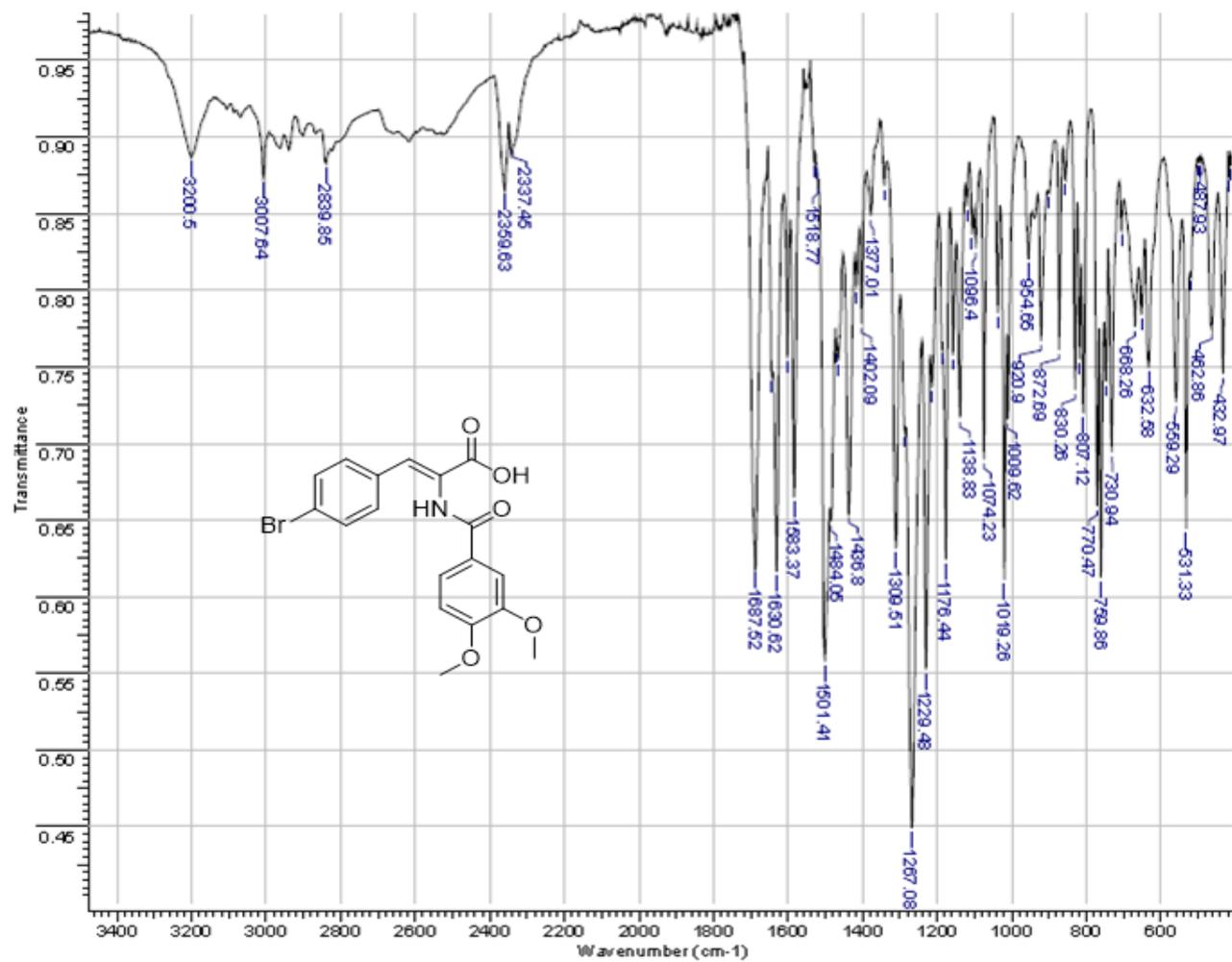
¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 55.58 (s, 1 C) 55.98 (s, 1 C) 111.98 (s, 1 C) 113.22 (s, 1 C) 124.41 (s, 1 C) 125.39 (s, 1 C) 126.75 (s, 1 C) 128.05 (s, 1 C) 128.96 (s, 1 C) 132.27 (s, 1 C) 134.05 (s, 1 C) 134.38 (s, 1 C) 148.73 (s, 1 C) 150.43 (s, 1 C) 166.28 (s, 1 C) 167.05 (s, 1 C)



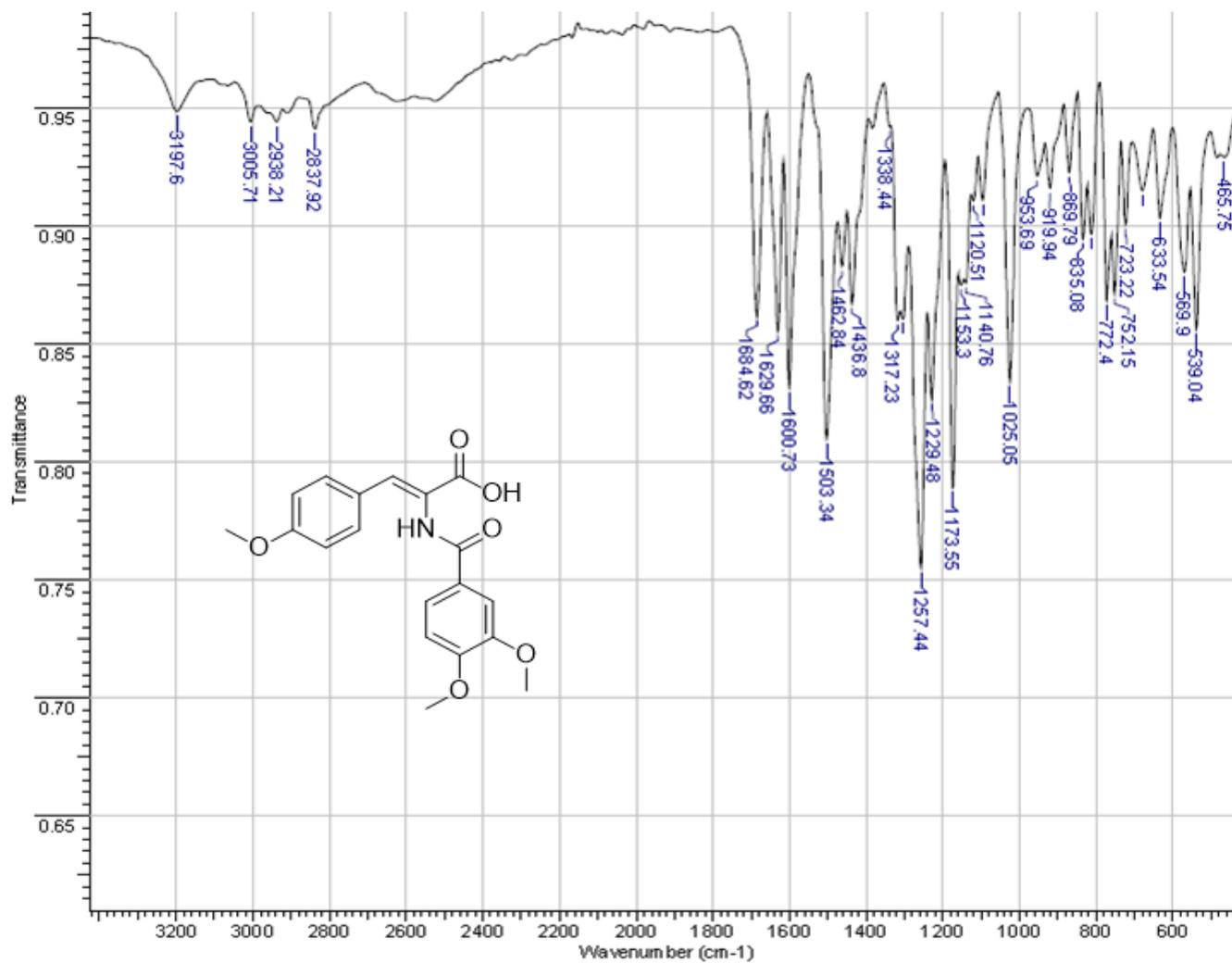
Espectro de IV do produto **34a**



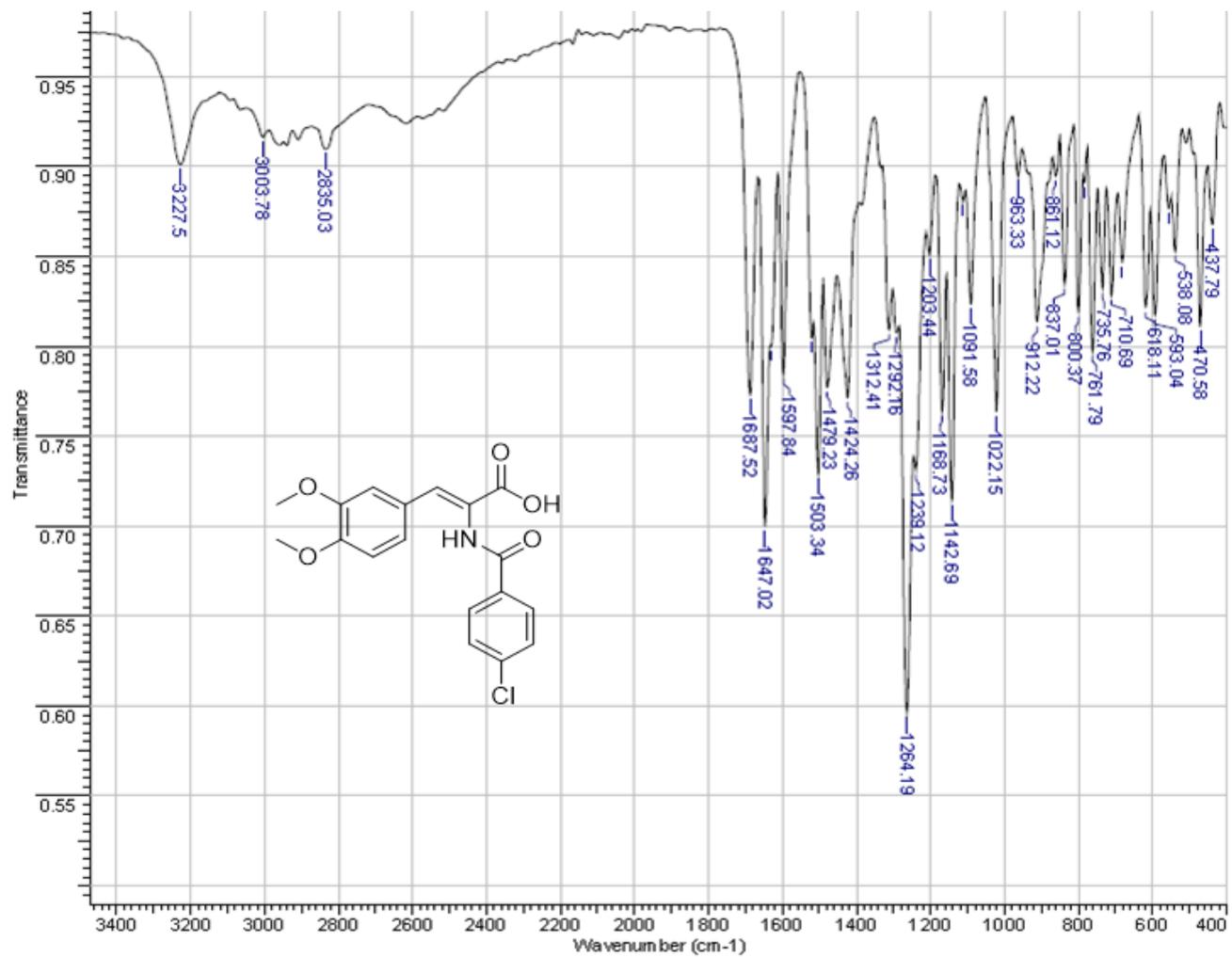
Espectro de IV do produto **34b**



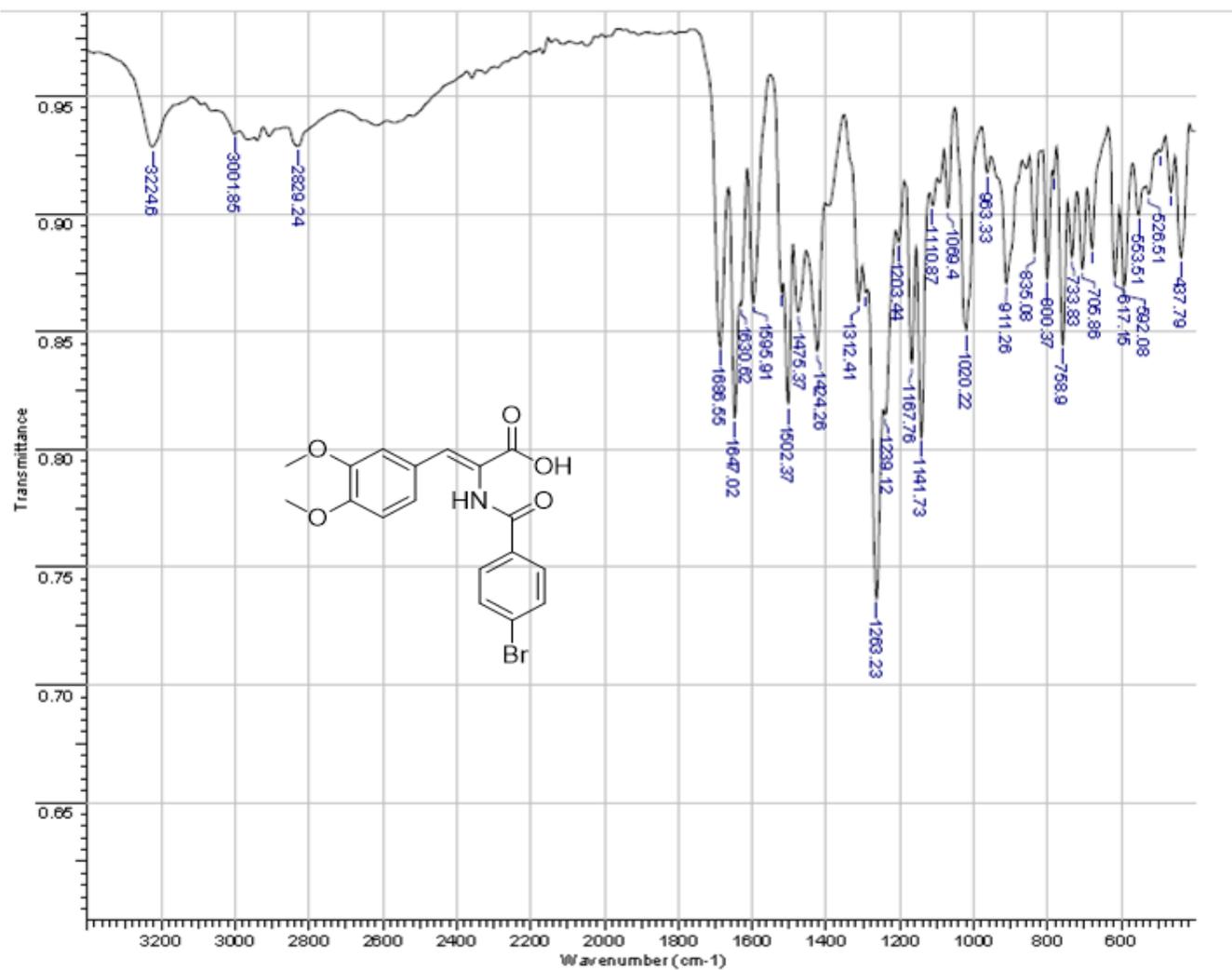
Espectro de IV do produto **34c**



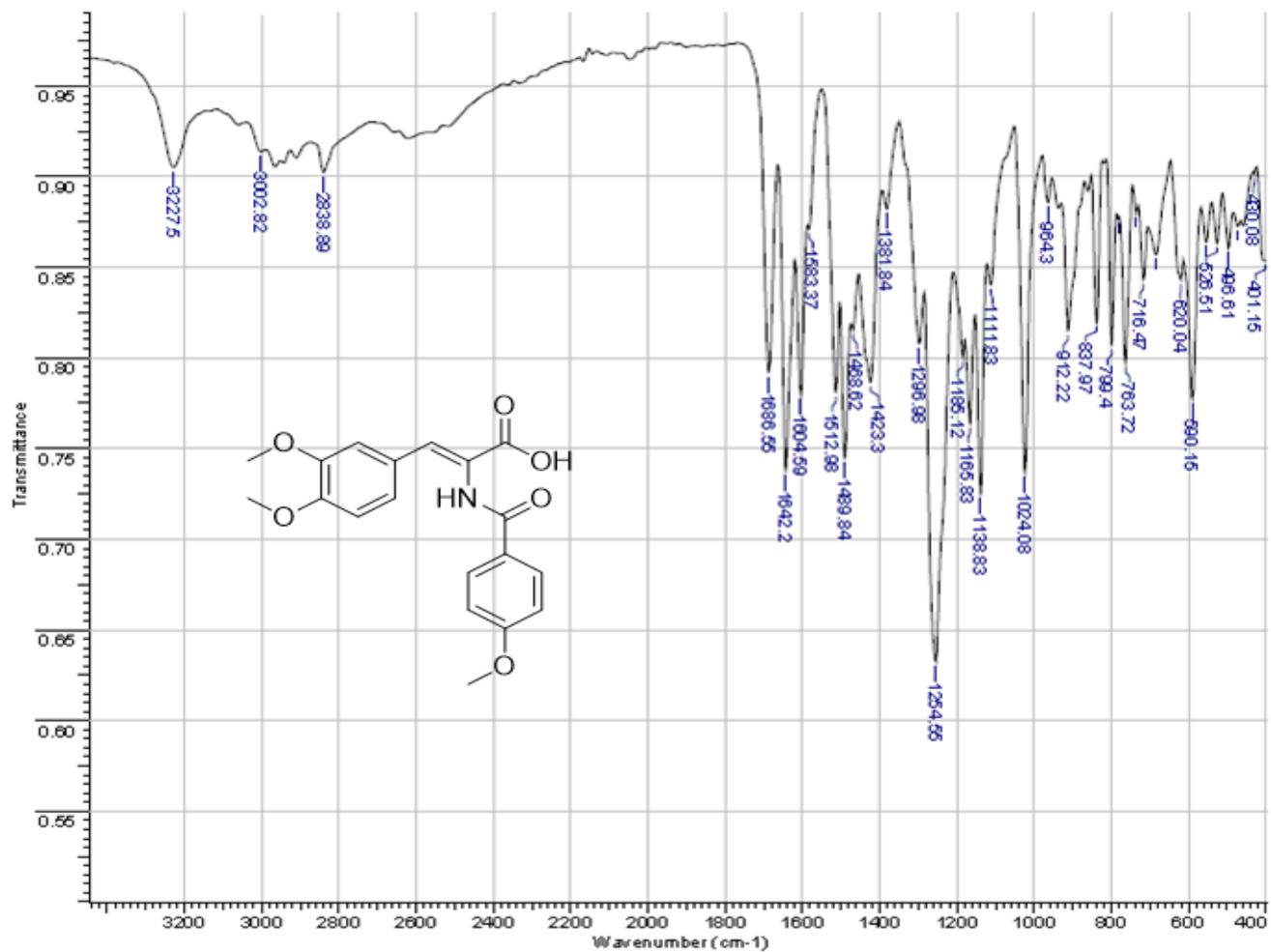
Espectro de IV do produto **34d**



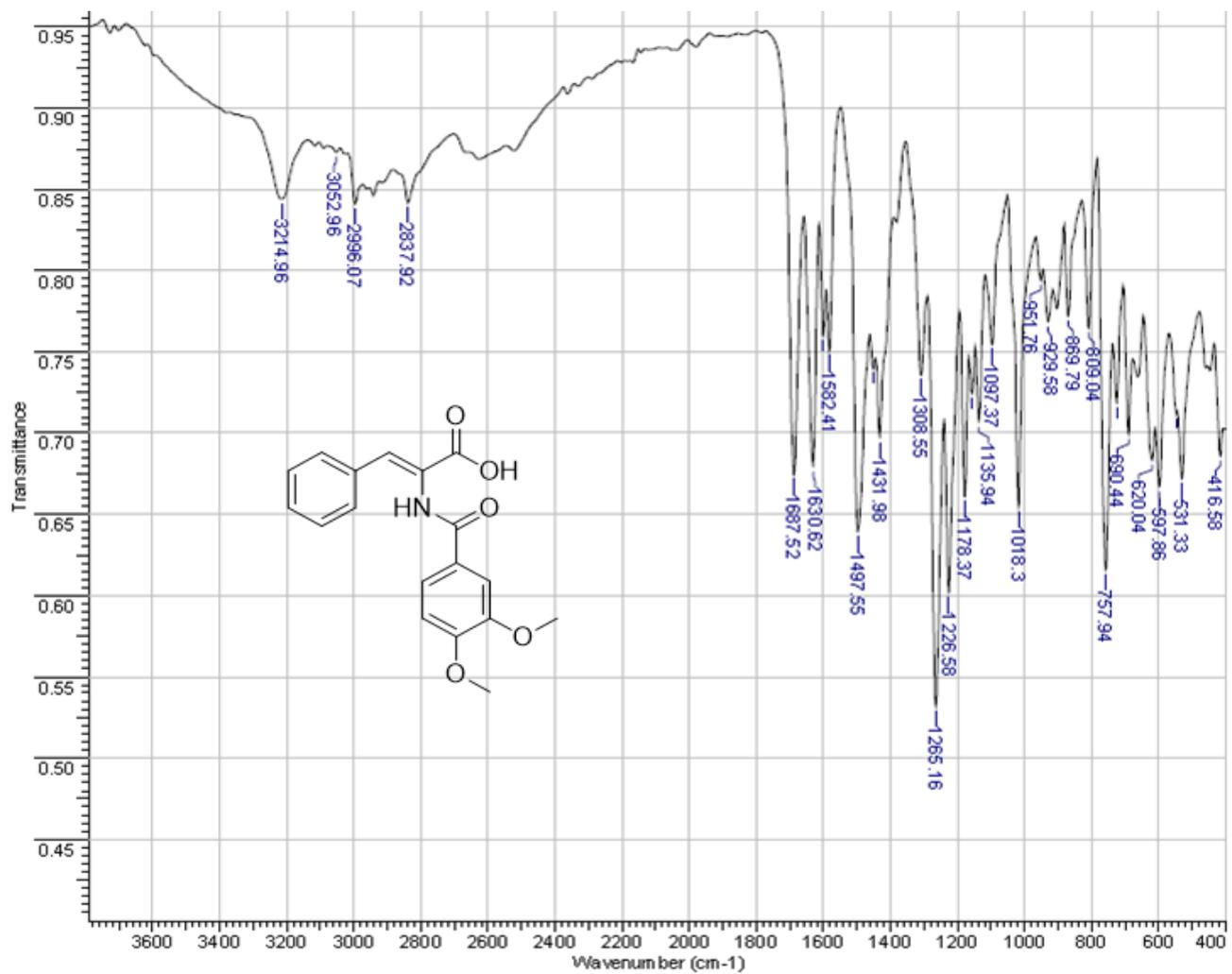
Espectro de IV do produto **34e**



Espectro de IV do produto **34f**



Espectro de IV do produto **34g**



Espectro de IV do produto **34h**

