

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

DISSERTAÇÃO

**SÍNTESE DE COMPOSTOS CUMARÍNICOS-1,2,3-TRIAZÓIS
ANÁLOGOS AO NOVOBIOCIN PLANEJADOS COMO INIBIDORES
DA HSP90**

Daiana de Fatima Portella Franco

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

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

**SÍNTESE DE COMPOSTOS CUMARÍNICOS-1,2,3-TRIAZÓIS
ANÁLOGOS AO NOVOBIOCIN PLANEJADOS COMO INIBIDORES
DA HSP90**

DAIANA DE FATIMA PORTELLA FRANCO

Sob Orientação do Professor

Dr. Arthur EugenKümmerle

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

Seropédica, RJ

Agosto de 2015

547

F825s

T

Franco, Daiana de Fatima Portella, 1988-
Síntese de compostos cumarínicos-1,2,3-
triazóis análogos ao Novobiocin planejados
como inibidores da HSP90 / Daiana de Fatima
Portella Franco. - 2015.
159 f.: il.

Orientador: Arthur EugenKümmerle.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Química, 2015.

Bibliografia: f. 81-96.

1. Química orgânica - Teses. 2.
Compostos orgânicos - Teses. 3. Síntese
orgânica - Teses. 4. Inibidores químicos -
Teses. 5. Câncer - Tratamento - Teses. 6.
Proteínas de choque térmico - Teses. I.
EugenKümmerle, Arthur, 1979- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

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

DAIANA DE FATIMA PORTELLA FRANCO

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

APROVADA EM 27/08/2015

Dr. Arthur Eugen Kümmerle (Orientador) – DEQUIM-UFRRJ

Dr.^a. Renata Barbosa Lacerda – DEQUIM-UFRRJ

Dr. Sérgio Pinheiro – IQ-UFF

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela oportunidade de viver, de experimentar o mundo, a ciência e, principalmente, por colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais, certamente, nada disso seria possível.

Aos meus pais, Aparecida de Fatima e Julio Cesar, por me ensinarem a importância do estudo, e por sempre investirem na minha formação. Também por me concederem um lar e suporte para que eu pudesse me concentrar nos meus estudos.

Ao meu irmão, Julio Cesar, pelo incentivo e torcida. E, principalmente, por ser exemplo de determinação, pois assim foi possível alcançar mais uma conquista.

Ao meu noivo, André Alves, pela paciência e por entender os momentos de minha ausência. Obrigada pela amizade, incansável apoio e por todo amor!

Ao meu orientador, Dr Arthur Eugen Kummerle, por ser um exemplo a ser seguido. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e presença durante todo este curso. Agradeço por ouvir minhas inquietações e me tranquilizar, com certeza, não teria conseguido ordenar minhas idéias e tarefas sem sua dedicação.

Aos professores do programa de pós-graduação do Departamento de Química, agradeço pelos cursos ministrados e por dividirem comigo suas experiências e conhecimentos. Em especial, a professora Rosane Nora Castro, pela ajuda sempre disponível.

A meus amigos do LadMOL-QM que acompanharam de perto o desenvolvimento deste trabalho e sempre que necessário me auxiliaram. Em especial, a Luciana, Sabrina, Rafaela, Pedro, Felipe e Thiago, pelos momentos compartilhados, permeados por alegrias, ansiedade e companherismo. Sempre com palavras de motivação, tornaram meu trabalho mais leve. Foi bom dividir esta conquista com vocês!

A CAPES, CNPq, FAPERJ e a UFRRJ, pelo apoio financeiro e acadêmico para realização desta pesquisa.

RESUMO

O câncer é um termo genérico que se refere a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças, as quais se assemelham pelo crescimento celular desordenado. As HSP90 são chaperonas ATP-dependente responsáveis pela ativação e estabilização de mais de 200 proteínas. Muitas destas proteínas são relacionadas ao câncer e necessitam da HSP90 para exercerem suas atividades. Assim, inibidores da HSP90 são promissores, pois possibilitam inibir de maneira indireta várias proteínas oncogênicas simultaneamente. São descritos inibidores dos domínios *N*-terminal e *C*-terminal, sendo estes mais vantajoso que aqueles. O Novobiocin foi o primeiro composto identificado como inibidor do domínio *C*-terminal da HSP90. Atualmente, diversos análogos ao Novobiocin tem sido sintetizados, afim de se estabelecer a relação estrutura-atividade, objetivando desenvolver análogos mais potentes. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter duas séries análogas ao Novobiocin. O planejamento das séries foi baseado na manutenção do núcleo cumarínico presente no Novobiocin; troca isostérica do grupo amida, que liga a cumarina ao anel 4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-il)-benzamida, pelo anel [1,2,3]-triazol; e exploração de grupos metoxila (AN1) e hidroxila (AN2) em substituição à subunidade noviose. As séries AN1 (**76a-g**) e AN2 (**77a-g**) foram sintetizadas a partir das reações de: *O*-metilação da 7-hidroxi-cumarina (**83**); bromação da posição 3 da 7-metóxi-cumarina (**82**); reação de acoplamento cruzado de Sonogashira, a partir da 3-bromo-7-*R*-cumarina (**81a-b**); desproteção do grupamento trimetilsilila da 7-*R*-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**); e por fim, síntese do anel triazólico, através da reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (CuAAc), utilizando 3-etenil-7-*R*-cumarina (**80a-b**) e azidas aromáticas. Vale ressaltar que, a 3-bromo-7-hidróxi-cumarina (**81b**) foi obtida a partir do composto chave, 3-bromo-7-metóxi-cumarina (**81a**) via reação de *O*-demetilação. Obteve-se 12 compostos (**76a-g e 77a-g**) sendo que 8 (**76a-b, 77d**) foram, satisfatoriamente, purificados e, então, caracterizados por técnicas espectroscópicas (IV, RMN ¹H e ¹³C). Também foi constatado que a síntese “*one-pot*” de 7-metoxi-3-(1*H*-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina **76b** partir do composto **88a** (R=86%) foi mais eficiente que a realizada em duas etapas, desilinação/CuAAc (R_{global}= 47,2%). Os resultados são satisfatórios e promissores, além disso não há na literatura descrição das atividades biológica dos compostos sintetizados. Em continuação a este trabalho, os compostos puros (**76a-b, 77d**) serão devidamente ensaiados frente a células das linhagens de câncer de mama SkBr3 e MCF-7.

PALAVRAS-CHAVE: câncer, HSP90, Novobiocin e [1,2,3]-triazóis.

ABSTRACT

Cancer is a generic term related to more than 100 types of diseases which resemble each other by their disorganized cellular growth. HSP90 are ATP-dependent chaperones responsible for the activation and stabilization of more than 200 proteins. Most of these proteins are connected to cancer and need HSP90 to execute their activities. Thus, HSP90 inhibitors may indirectly inhibit plenty oncogenic proteins. According to the literature, there are N-terminal and C-terminal domains, nevertheless, C-terminal inhibitors present more advantages. Then, the advancement of C-terminal inhibitors represents an applicable alternative and an intense field of study. Novobiocin is the first compound identified as C-terminal domain inhibitor. Nowadays, Novobiocin analogues have been synthesized, besides its structure-activity relationship elucidated in order to develop more potent analogues. For that reason, the goal of this project is to obtain 2 analogue series of Novobiocin. The scheme of these series was based on maintaining the coumarinic part presented on Novobiocin: isosteric replacement of the amide group that binds coumarin to the 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-yl)-benzamide, by the [1,2,3]-triazole; and exploration of methyl groups (AN1) and hydroxyl (AN2) in substitution of subunit noviose. AN1 series (**76a-g**) and AN2 (**77a-g**) were synthesized from the following reactions: 7-hydroxy-coumarin o-methylation (**83**); 7-methoxy-coumarin 3-bromination (**82**); Sonogashira cross-coupling from 3-bromo-7-R-coumarin (**81a-b**); 7-R-3-((trimethylsilyl)ethynyl)-coumarin trimethylsilyl deprotection (**88a-b**); and lastly, synthesis of the triazole ring, through cycloaddition reaction, 1,3-dipolar catalysed by copper (CuAAC), using 3-ethynyl-7-R-coumarin (**80a-b**) and aromatic azides. It is worth taking into consideration that 3-bromo-7-R-coumarin (**81b**) was obtained from the key compound, 3-bromo-7-R-methoxy-coumarin (**81a**) by o-demethylation reaction. 12 compounds were obtained (**76a-g**) and 8 of them (**76a-b, 77d**) were nicely purified and then, characterized by spectroscopic techniques (IR, ¹H and ¹³C NMR). The “one-pot” synthesis of 7-methoxy-3-(1H-1,2,3-triazole-4-phenyl)-coumarin **76b** from **88a** compound (Yield=86%) was more efficient than the one realized in two steps (global yield=47,2%). Results are potential and satisfactory, moreover there is no citation in any literature about biological activities of the synthesized compounds. Continuing this work, the pure compounds (**76a-b, 77d**) will be tested on breast cancer cell lines SkBr3 and MCF-7.

KEYWORDS: cancer, HSP90, Novobiocin, [1,2,3]-triazoles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proliferação descontrolada de células tumorais	1
Figura 2. Diagrama simplificado da gênese do Câncer.....	3
Figura 3. Gráfico da estimativa de incidência e mortalidade de Câncer em 2012 no mundo.....	4
Figura 4. Gráfico da estimativa de incidência de Câncer em 2014/2015 no Brasil.....	5
Figura 5. (A) Mecanismo de ação de agentes alquilantes e compostos de platina. (B) Estrutura de agentes alquilantes e compostos de platina.....	6
Figura 6. Estrutura de antimetabólitos e respectivos análogos naturais.....	7
Figura 7. Estrutura de antibióticos antitumorais.....	8
Figura 8. Estrutura de produtos naturais citotóxicos.....	8
Figura 9. Estruturas de agentes hormonais.....	9
Figura 10. Estrutura de inibidores de proteínas cinases.....	9
Figura 11. Mecanismo de ação de inibidores de proteínas cinases (Imatinibe) e dos anticorpos monoclonais (Trastuzunabe e Cetuxinabe).....	10
Figura 12. Exemplos de proteínas cliente da HSP90.....	11
Figura 13.(A) Estrutura cristalina de HSP90 (código PDB: 2CG9) (B) Divisão dos domínios da HSP90. DN domínio <i>N</i> -terminal; DM domínio central; DC domínio <i>C</i> -terminal.....	12
Figura 14. Alteração conformacional ATP – dependente da HSP90.....	13
Figura 15. Marcadores do câncer e respectivas proteínas clientes da HSP90.....	14
Figura 16. Comparação entre inibidores de cinases (A) e inibidores da HSP90 (B).....	15
Figura 17. Geldanamicina, Radicicol e inibidores <i>N</i> -terminais da HSP90 em desenvolvimento clínico.....	17
Figura 18. Interações entre o domínio <i>N</i> -terminal e seus substratos. (A) ATP (B) ADP (C) Geldanamicina (D) Radicicol.....	18
Figura 19. Inibidores <i>C</i> -terminais da HSP90.....	19
Figura 20. Novobiocin e subunidades destacadas. CI_{50} igual a 700 μ M do Novobiocin frente a células SkBr3.....	20

Figura 21.(A) Análogos potentes do Nobobiocin. (B) Padrão observado de SAR de análogos do Novobiocin.....	21
Figura 22. Bioisosterismo Clássico e Não-Clássico.....	25
Figura 23. Propriedades semelhantes entre amida e [1,2,3]- triazol.....	26
Figura 24. [1,2,3]-triazóis bioisósteros de amidas.....	26
Figura 25. Número de publicações de [1,2,4]-triazol (verde) e [1,2,3] triazol (azul) durante os últimos 25 anos.....	27
Figura 26. Compostos contendo o núcleo [1,2,3]-triazólico comerciais ou em fase de ensaios clínicos.....	28
Figura 27. Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar térmica.....	28
Figura 28. Multiplicidade dos sinais de H ₆ (duplo dubleto) e H ₈ (dubleto).....	38
Figura 29. Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel.....	38
Figura 30. Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-metoxi-cumarina (83) e 7-metoxi-cumarina (82) nos espectros de RMN ¹ H e ¹³ C.....	40
Figura 31. Comparação entre os principais sinais da 7-metoxi-cumarina (82) e 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a) no espectro de RMN ¹ H e ¹³ C.....	43
Figura 32. Separação de spin dos hidrogênios H ₅ , H ₈ e H ₆ do composto e 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a) no espectro de RMN ¹ H.....	43
Figura 33. Comparação entre os principais sinais da 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a) e 3-bromo-7- hidroxí -cumarina (81b) no espectro de RMN ¹ H e ¹³ C.....	46
Figura 34. Cromatogramas da reação de CuAAC para obtenção do produto 76b (λ=340 nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H ₂ O 35%); A –3-etenil-7-metoxi -cumarina (80a); B – amostra da reação de de CuAAC após 24 horas.....	58
Figura 35. Sinais referentes ao anel triazólico e cumarínico no espectro de RMN ¹ H.....	63

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Planejamento Estrutural das séries AN ₁ e AN ₂ baseadas no Novobiocin.....	33
Esquema 2: Análise retróssintética para obtenção das séries AN ₁ e AN ₂	35
Esquema 3: Síntese de 7-hidroxycumarina (83).....	36
Esquema 4: Formação “ <i>in situ</i> ” do ácido formilacético a partir do ácido málico.....	36
Esquema 5: Mecanismo proposto para formação da 7-hidroxi-cumarina (83) através da condensação de Pechmann.....	37
Esquema 6: Síntese de 7-metoxi-cumarina (82).....	39
Esquema 7: Mecanismo proposto para formação de 7-metoxi-cumarina (82).....	40
Esquema 8: Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a).....	41
Esquema 9: Mecanismo proposto para formação de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a).....	42
Esquema 10: Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (81b).....	44
Esquema 11: Mecanismo proposto para reação de <i>O</i> -demetilação para obtenção de 3-Br-7-hidroxi-cumarina (81b).....	45
Esquema 12: Síntese de 7-R ₁ -3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b).....	47
Esquema 13: Mecanismo proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b).....	49
Esquema 14: Síntese de 3-etenil-7-R-cumarina (80a-b).....	51
Esquema 15: Mecanismo proposto para a obtenção da 3-etenil-7-R-cumarina (80a-b)	52
Esquema 16: Síntese de azidas aromáticas (78 b-g).....	53
Esquema 17: Mecanismo proposto para a formação do HONO (93) <i>in situ</i>	54
Esquema 18: Mecanismo proposto para a formação de sais diazônicos (95b-g)	54
Esquema 19: Mecanismo proposto para a formação da azidas (78b-g) a partir dos respectivos sais diazônicos.....	55

Esquema 20: Síntese de azidas (78a).....	55
Esquema 21: Mecanismo proposto para a obtenção da azidas (78a).....	55
Esquema 22: Síntese de 7-R ₁ -3-(1H-1,2,3-triazol-4-R ₂)-cumarina (76a-g) e 77(a-g)	56
Esquema 23: A- Mecanismo da CuAAC baseado no envolvimento de complexos de Cu(I) mononuclear. B- Mecanismo da CuAAC baseado nos complexos dinucleares.....	61
Esquema 24: Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetilato de Cu(I) XXV e XXX respectivamente	62
Esquema 25: Síntese “one-pot” da 7-metóxi-3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (76b).....	67
Esquema 26: Mecanismo proposto para a obtenção da 3-etenil-7-metoxi-cumarina a partir de fluoreto (80a).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuições dos principais sinais da e 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b) no espectro de como RMN ^1H e ^{13}C	50
Tabela 2: Atribuição dos principais sinais da 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b) e 3-etenil-7-R-cumarina (80a-b) no espectro de RMN ^1H e ^{13}C	53
Tabela 3: Ponto de fusão, rendimentos da síntese e pureza das 7-R ₁ -3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-R ₂)-cumarina (76a-g) e 77(d)	57
Tabela 4: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H dos compostos 76ad . Valores de δ expressos em ppm.....	64
Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN de ^1H dos compostos 76e-g e 77d . Valores de δ expressos em ppm.	65
Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C dos compostos 76a-g . Valores de δ expressos em ppm.....	66

LISTA DE ABREVIATURA

(HIF)-1 α – fator de indução de hipóxia alfa (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

17-AAG – 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina,

17-DMAG – 17-dimetilaminoetilamino-17- demetoxi-geldanamicina

ACS – reação de acoplamento cruzado de Sonogashira

ADP – adenosina difosfato

AKT – também conhecida com PKB, proteína cinase B (*Protein kinase B*)

Apaf-1 – fator de ativação de apoptose 1 (*apoptotic protease activating factor 1*)

ATP – adenosina trifosfato

BCR-ABL – oncoproteína codificada pelo gene fundido BCR e ABL (*breakpoint cluster region – Ableson gene*)

Bu₄NF – fluoreto de tetra-n-butilamônio

CAI - anticancerígeno carboxiamidotriazol

CCDA – cromatografia em camada delgada analítica

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

Cdc 37 – co-chaperona codificada pelo gene Cdc37 (*cell division cycle 37*)

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

CDK – cinase dependente de ciclina (*Cyclin-dependent kinases*)

CI₅₀ – concentração inibitória média

c-Kit – proteína tirosina cinase (*tyrosine-protein kinase*)

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

c-MET – receptor de tirosina cinase codificado pelo proto-oncogene c-MET

CuAAC – reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) a partir de azidas orgânicas e alcinos terminais

DC – domínio C-terminal

DCM – diclorometano

DHN1 – 4-desidronovobiocin

DHN2 – 3'-descarbamato-4-dehidroxinovobiocin

DM – domínio intermediário

DMF – dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

DN – domínio *N*-terminal

DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

EGCG – Epigallocatequina-3-galato

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico

FLT-3 – tirosina cinase 3 semelhante a *fms* (*fms-like tirosina quinase-3*)

HBV – vírus da hepatite B (*hepatitis B vírus*)

HER2 – receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (*human epidermal growth factor receptor 2*)

HOAc – ácido acético

HOMO – orbital molecular ocupado de mais alta energia (*highest occupied molecular orbital*)

HONO – ácido nitroso

HPV – vírus do papiloma humano (*human Papiloma virus*)

HSF-1 – fator de choque térmico 1 (*heat shock factor 1*)

HSP – protein de choque térmico (*heat shock protein*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IGF – interconversão de grupo funcional

IGFR-1 – receptores do fator de crescimento similar à insulina-1 (*Insulin-like growth factor 1 receptor*)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPI-504 – 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride

IV – infravermelho

J – constante de acoplamento

kDa – kilodalton

K_{eq} – constante de equilíbrio

LUMO – orbital molecular não ocupado de mais baixa energia (*lowest unoccupied molecular orbital*)

MCF-7 – células da linhagem de câncer de mama isolada pela Fundação do Câncer de Michigan-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*)

MeI – iodeto de metila

MeOH – metanol

MMP – metaloproteinase da matriz (*matrix metalloproteinases*)

MW – microondas (*microwave*)

Myc – oncogene do vírus da mielocitomatose (*myelocytomatosis viral oncogene*)

NBS – *N*-bromo-succinimida

P.E. – ponto de ebulição

P.F. – ponto de fusão

p23 – proteína de 53 kilodaltons, co-chaperona da Hsp90,

p53 – gene supressor tumoral que codifica proteína nuclear de 53 kilodaltons, proteína 53

PDB – banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*)

PDGFR- α – receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaqueta - alfa (*platelet-derived growth factor recepto – alpha*)

pKa – logaritmo negativo da constante de dissociação ácida (Ka)

PMDETA – N,N,N',N'',N''-pentametildietilenetriamina

ppm – partes por milhão

Raf-1 – serina/treonina cinase codificada pelo proto-oncogene Raf

RAS – oncogene viral do sarcoma de rato (*rat sarcoma viral oncogene*)

Rb1 – gene supressor de tumor de retinoblastoma (*retinoblastoma gene*)

RMN – ressonância magnética nuclear

RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

SAR – Relação estrutura-atividade (*structure-activity relationship*)

SKBr3 – células da linhagem de câncer de mama isolada pelo Centro de Câncer Sloan-Kettering (*Sloan-Kettering Cancer Center*)

S_N2 – substituição nucleofílica bimolecular

THF – tetraidrofurano

TMS – tetrametilsilano

TMS-A – trimetilsililacetileno

TSAO – 2,5-Bis-O-(tert-butildimetilsilil)-β-D-ribofuranosil]-3-espiro-5'-(4'-amino-1',2'-oxatíol 2',2'-dioxida

UCSF – Universidade da Califórnia, São Francisco (*University of California, San Francisco*)

VEGFR – receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (*vascular endothelial growth factor receptors*)

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

δ – deslocamento químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.2. Estimativas do Câncer.....	3
1.3. Quimioterapia do Câncer.....	5
1.4. Proteína de Choque Térmico – HSP90.....	10
1.5. Papel da HSP90 frente ao Câncer.....	13
1.6. Inibidor da HSP90 na terapêutica do Câncer.....	14
1.7. Novobiocin e Análogos.....	19
1.8. Bioisosterismo.....	23
1.8.1. Anel 1,2,3 triazólico como biosótero não-clássico de amida.....	25
1.9. Anéis [1,2,3]-Triazólicos.....	26
1.10. Reação de Cicloadição 1,3- dipolar - <i>Click Chemistry</i>	28
2 OBJETIVO.....	31
2.1. Objetivo geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
2.3. Planejamento estrutural.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1. Planejamento sintético das séries AN ₁ e AN ₂	34
3.2. Síntese de 7-hidroxi-cumarina (83).....	35
3.3. Síntese de 7-metoxi-cumarina (82)	39
3.4. Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a)	41
3.5. Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (81b)	44
3.6. Síntese de 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b)	46
3.7. Síntese de 3-etenil-7-R-cumarina (80a-b).....	50
3.8. Síntese de Azidas aromáticas (78b-g)	53
3.9. Síntese de 7-R ₁ -3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-R ₂)-cumarina (76a-g) e (77a-g)	56
3.10. Síntese “ <i>one-pot</i> ” de 7-metóxi-3-(1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (76b).....	67
4 CONCLUSÕES E PESPECTIVAS.....	69

5. PARTE EXPERIMENTAL.....	70
5.1. Metodologia sintética.....	70
5.2 Síntese de 7-hidroxi-cumarina (83)	71
5.3. Síntese de 7-metoxi-cumarina (82)	72
5.4. Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a)	72
5.5. Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (81b).....	73
5.6. Síntese de 7-R ₁ -3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (88a-b)	74
5.7. Síntese de 3-etenil-7-R ₁ -cumarina (80a-b).....	75
5.8. Síntese de Azidas 78(a-b)	76
5.9. Síntese de 7-R ₁ -3-(1H-1,2,3-triazol-4-R ₂)-cumarina (76-77a-g)	77
5.10. Síntese de 7-metóxi-3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-)-cumarina (76b)	82
6. BIBLIOGRAFIA.....	83
7. ANEXOS.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Células normais respondem a um conjunto de complexos sinais internos e externos que regulam seus processos fundamentais, como: crescimento, divisão, maturação e morte. Em condições normais, as células recebem tanto sinais de estímulo quanto de supressão, sendo estes finamente equilibrados. Contudo, quando um ou mais sinais é alterado, as células se dividem e se proliferam de forma descontrolada, e deixam de responder aos sinais normais, perdendo suas características regulares e, eventualmente, causando o câncer (PIERCE, 2010).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), câncer é um termo genérico que se refere a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças, as quais se assemelham pelo crescimento celular desordenado. Tais células malignas podem invadir tecidos e órgãos vizinhos, ou até mesmo se espalhar para outras regiões do corpo, isto é, sofrer metástase (Figura 1) (INCA, 2015).

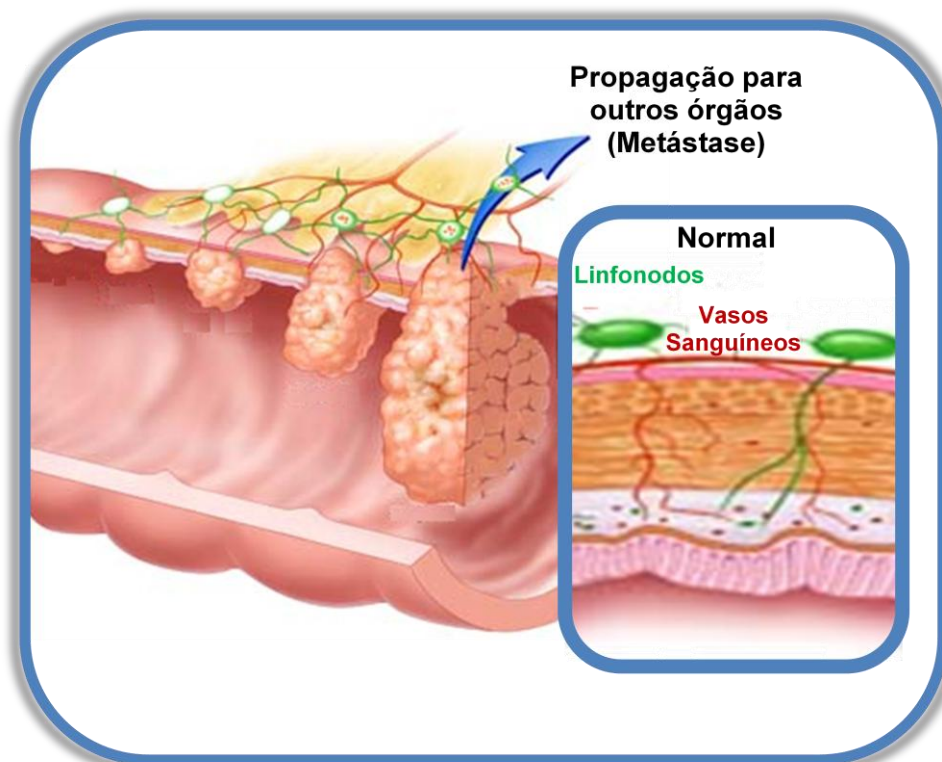


Figura 1: Proliferação descontrolada de células tumorais (Adaptado de UCSF, 2015).

Fundamentalmente, o câncer é uma doença genética, consequência de múltiplas mutações, acumuladas durante a vida do indivíduo, sejam elas herdadas, espontâneas ou em resposta ao ambiente (Figura 2) (PIERCE, 2010). Trata-se de um processo complexo de vários estágios que, também envolve outros fatores epigenéticos (hormonais, cocarcinogênicos e efeitos de promoção tumoral) que, por si só, não originam o câncer, porém elevam as chances de mutações genéticas resultarem nesta doença (RANG & DALE, 2012).

Fatores ambientais possuem papel importante no desenvolvimento de muitos tipos de câncer, por causar o aumento da taxa de mutações no organismo (PIERCE, 2008). Entre esses fatores, incluem-se a exposição à irradiação ionizante, carcinógenos químicos (ex.: benzenos, corante azos, aflotoxinas, asbestos, radônio), tabagismo e certos vírus (HPV e HBV) (KATZUNG & SALMONM, 2014).

Determinados genes, quando alterados, contribuem com a neoplasia. Assim sendo, defeitos nos genes que codificam componentes do sistema de reparo do DNA impossibilitam que erros provenientes do processo de replicação do DNA sejam corrigidos, aumentando a taxa de mutações em outros genes. Além disso, mutações em genes que codificam os sinais que controlam a divisão celular, através do equilíbrio fino entre estímulo e supressão desses sinais (proto-oncogenes e genes de supressão tumoral respectivamente), também colaboram como o câncer. Assim, proto-oncogenes ao serem mutados, convertem-se em oncogenes, que estimulam a divisão celular em momentos inapropriados. De outro modo, a divisão celular também pode ser estimulada através da inativação de genes de supressão tumoral responsáveis por suprimir tal processo (Figura 2) (PIERCE, 2010). Logo, transformação de proto-oncogenes em oncogenes ou a inativação de genes de supressão tumoral pode propiciar autonomia de crescimento a uma célula (RANG & DALE, 2012).



Figura 2: Diagrama simplificado da gênese do Câncer (Adaptado de RANG & DALE, 2012).

Células tumorais podem sofrer alterações fisiológicas que coletivamente ditam e mantém a proliferação do câncer. Tais modificações são também denominadas como marcadores do câncer. Dentre as capacidades adquiridas pela maioria, se não, todos os tipos de tumores estão: auto-suficiência de sinais de crescimento, insensibilidade à sinalização anti-crescimento, inibição da apoptose, sustentação da angiogênese, invasão e metástase de tecidos, resistência à senescência celular (HANAHAN & WEINBERG, 1996).

1.2 Estimativas do Câncer

O câncer encontra-se entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2015). Segundo estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, houve cerca de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas ao câncer em 2012 em todo o mundo. Na população masculina, os tipos de câncer com maior incidência em 2012 foram de pulmão, próstata, colorretal, estômago e câncer de fígado. Entre as mulheres, os tipos mais comuns foram de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e câncer de estômago (Figura 3). Tais pesquisas apontam que, nas próximas duas décadas, os números de novos casos aumentarão para 21,4 milhões, e os casos de morte pelo câncer para 13,2 milhões (IARC, 2015).

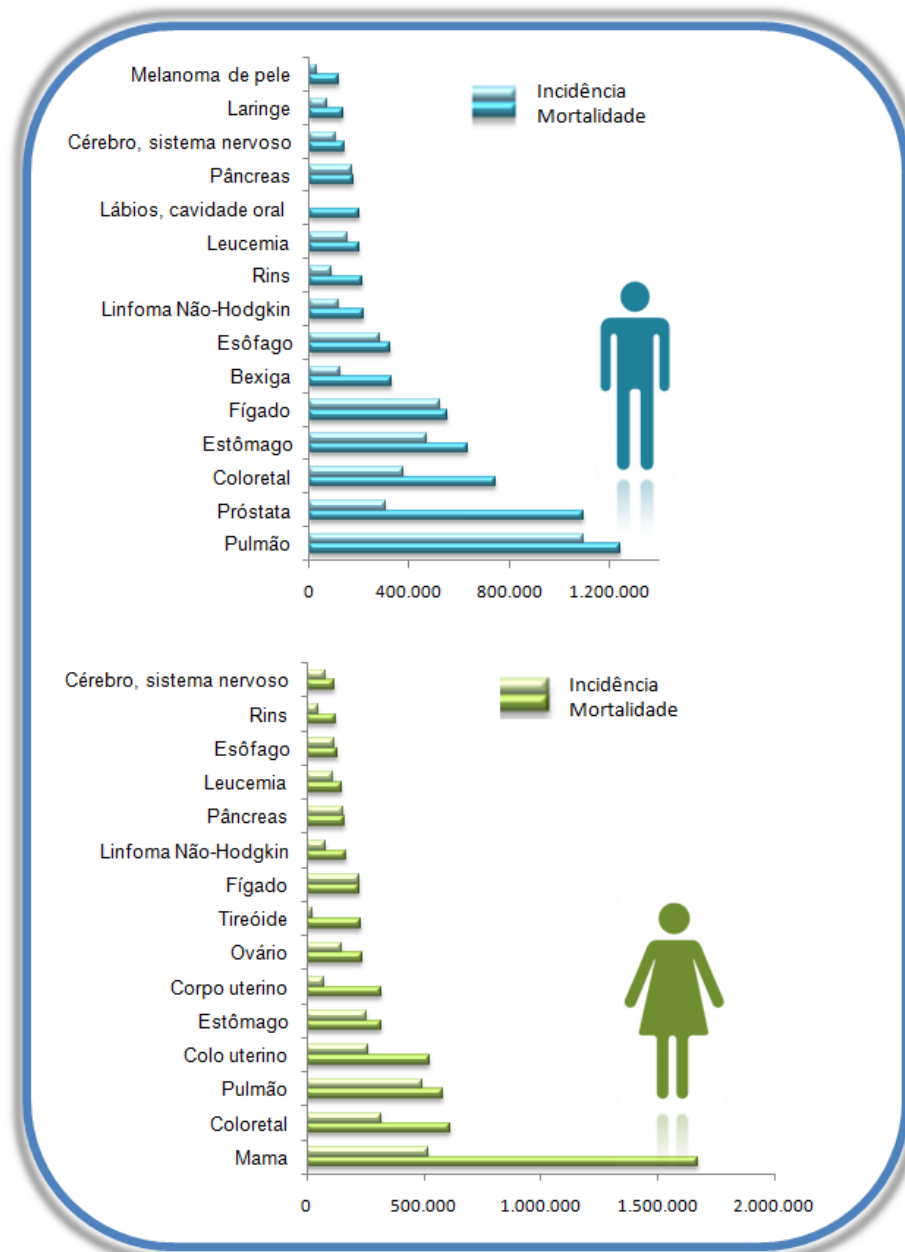


Figura 3: Estimativa de incidência e mortalidade de câncer em 2012 em todo o mundo. Valores correspondentes à população masculina em azul e feminina em verde (IARC, 2015).

No Brasil, o perfil demográfico tem mudado devido ao “envelhecimento” da população. Este fato, associado com novos hábitos e a maior exposição a fatores de risco característicos da realidade contemporânea, levou a transformação do perfil epidemiológico brasileiro, o qual apresenta uma diminuição nos casos de doenças infectocontagiosas, e aumento dos casos de doenças crônico-degenerativa (INCA, 2014).

Estimativas realizadas pelo INCA revelam a ocorrência de 395 mil novos casos de câncer, sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, para ano de 2014, que

também vale para 2015. Dentre esses casos, 204 mil atingem a população masculina e 190 mil a população feminina, sendo os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral os mais incidentes em homens; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (Figura 4). Estes números reforçam a magnitude do problema do câncer no país, e justifica a implementação de políticas de prevenção, controle e tratamento desta doença (INCA, 2014).

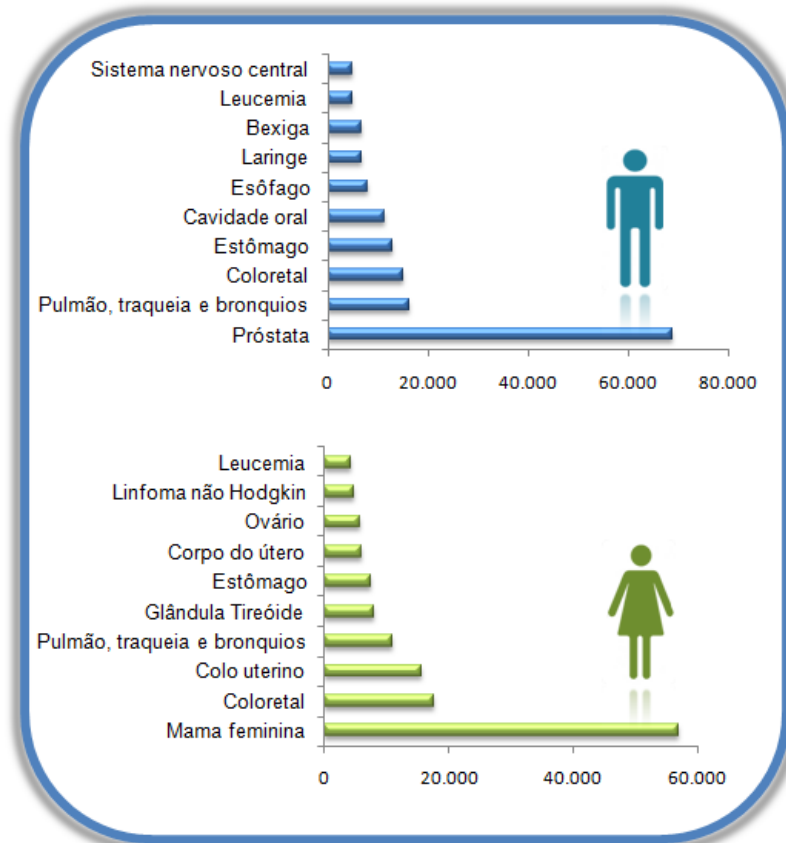


Figura 4: Estimativa de incidência de câncer em 2014/2015 no Brasil. Valores correspondentes à população masculina em azul e feminina em verde (INCA, 2014).

1.3 Quimioterapia do Câncer

O tratamento do câncer pode ser realizado, principalmente, por três maneiras: cirurgia, radioterapia e terapia com fármaco, denominada quimioterapia. A aplicação de cada um desses tratamentos depende do tipo do tumor e do seu estágio de desenvolvimento. A quimioterapia pode ser utilizada como terapia única ou associada a mais de um tipo de tratamento (RANG & DALE, 2012).

Os principais fármacos antitumorais podem ser classificados como: fármacos citotóxicos, que abrangem os agentes alquilantes, compostos de platina, antibióticos

antitumorais e derivados de plantas; agentes hormonais; anticorpos monoclonais; inibidores de proteínas quinases; entre outros que não se enquadram nessa classificação (RANG & DALE, 2012).

Agentes alquilantes exercem seus efeitos citotóxicos através da transferência de seus grupos alquila para biomoléculas nucleofílicas. Sendo assim, um dos seus principais alvos é o nitrogênio na posição 7 (N-7) da guanidina, por ser muito nucleofílico, além do N-1 e N-3 da adenina e N-3 da citosina (RANG & DALE, 2012). Agentes alquilantes bifuncionais são capazes de fazer ligações entre o DNA e proteínas; entre dois pontos da mesma fita do DNA; ou entre fitas adjacentes do DNA (Figura 5), que impedem sua separação durante a replicação e transcrição. Ademais, podem conduzir a fragmentação do DNA através de reações hidrolíticas e também pela ação de enzimas de reparo ao tentar remover as bases alquiladas. A alquilação também causa desemparelamento dos nucleotídeos por alteração da ligação de hidrogênio entre bases (AVENDANO & MENENDEZ, 2008). Dentre os agentes alquilantes estão: as mostardas nitrogenadas, ex. ciclofosfamida (**1**) e melfalana (**2**); as nitrossouréias, ex. carmustina (**3**) e lomustina (**4**) (RANG & DALE, 2012).

Compostos de platina agem por mecanismo análogo ao dos agentes alquilantes. O alvo principal de ligação é o N-7 da guanina, além de ocorrer também no N-3 da adenina e no oxigênio na posição 6 (O-6) da citosina. Nesta classe incluem-se cisplatina (**5**), carboplatina (**6**), e oxoliplatina (**7**) (KATZUNG & SALMONM, 2014).

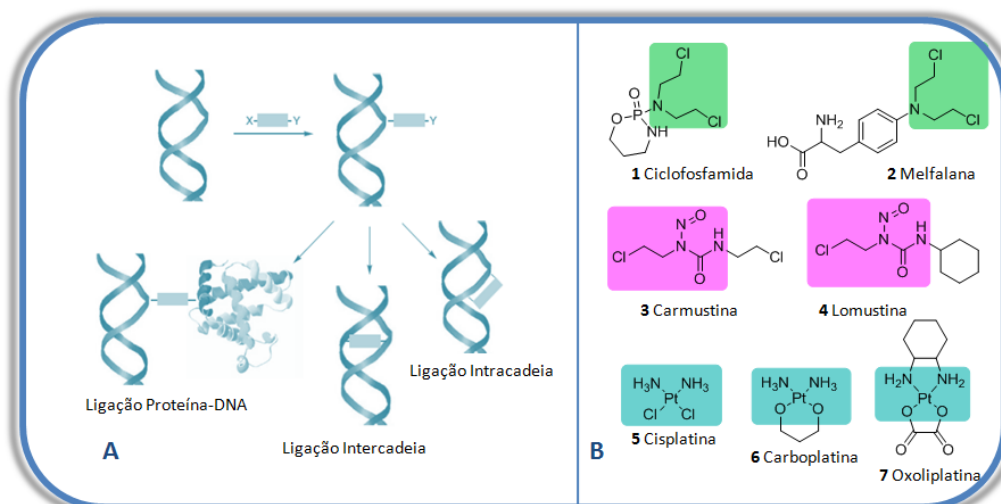


Figura 5: (A) Mecanismo de ação de agentes alquilantes e compostos de platina. (B) Estrutura de agentes alquilantes e compostos de platina.

Os antimetabólitos podem ser definidos como análogos de compostos naturais (**8,9,10**) que são capazes de interferir em rotas metabólicas essenciais, associadas à síntese de ácido nucleico que, conseqüentemente, afetam a formação da cadeia de DNA ou RNA. Os mecanismos envolvidos nesse processo incluem: competição por sítios de enzimas que participam da biossíntese de ácidos nucleicos; e incorporação nucleotídeos falsos, que provocam inibição do processo normal de biossíntese de DNA e RNA, causando o processo de apoptose. Composto esta classe estão: antifolatos, ex. metotrexato (**11**); análogos de pirimidina, ex. fluoruracila (**12**); análogos da purina, ex. mercaptopurina (**13**) (AVENDANO & MENENDEZ, 2008).

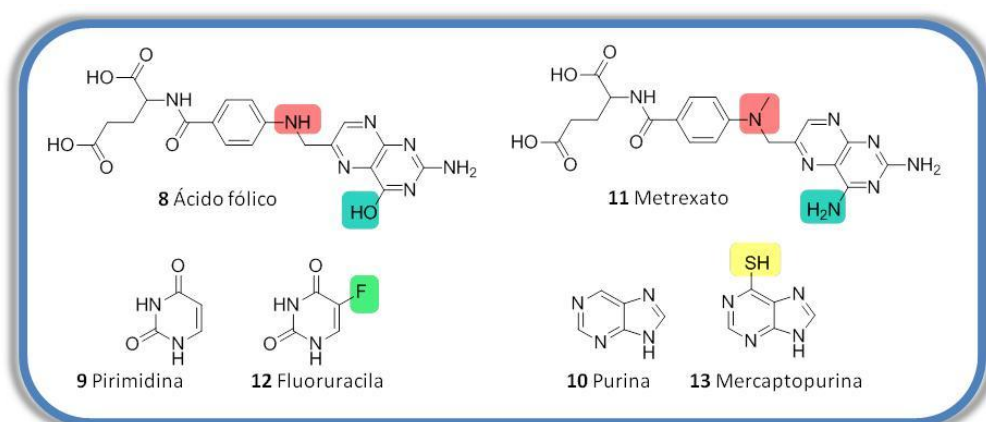


Figura 6: Estrutura de antimetabólitos e respectivos análogos naturais.

Os antibióticos antitumorais exercem seus efeitos através da ação direta no DNA, pertencendo a esta classe estão: antraciclinas (**14**), bleomicina (**15**), mitomicina (**16**) e dactinomicina (**17**). Doxorubicina (**14**) é o antibiótico mais importante da subclasse das antraciclinas, cujos principais mecanismos de ação são: à formação de ligações entre as fita adjacentes do DNA, inibição de topoisomerase II, produção de radicais livres de semiquinonas e de oxigênio; e ligação a membranas celulares, alterando sua fluidez e transporte de íons. Bleomicinas (**15**) degradam as cadeias do DNA devido à geração de radicais superóxido e/ou hidroxila. Mitomicina (**16**) faz ligações cruzadas no DNA e pode, também, degradar o DNA por meio da geração de radicais livres. Já a Dactinomicina (**17**) age ao se intercalar no sulco menor do DNA, interferindo na atividade da RNA polimerase, e conseqüentemente na transcrição (RANG & DALE, 2012).

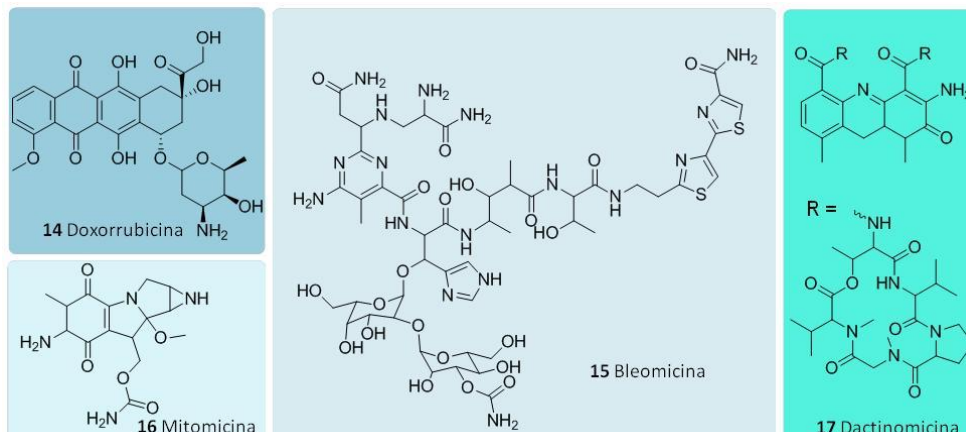


Figura 7: Estrutura de antibióticos antitumorais.

Diversos produtos naturais são utilizados clinicamente no tratamento do câncer, nesta classe se encontram: os alcalóides da vinca, os taxanos, as camptocinas e os semi sintéticos etoposídeos. Vincristina (**18**) e Vinblastina (**19**) são exemplos de alcalóides da vinca, cuja ação ocorre através da inibição da polimerização da tubulina impedindo a formação de fusos mitóticos e resultando no bloqueio da mitose na metáfase. Entre os taxanos, pode-se citar o paclitaxel (**20**) e docetaxel (**21**), que também provocam a inibição do fuso mitótico, a partir da dimerização da tubulina, seguida de sua estabilização no estado polimerizado, resultando no bloqueio da divisão celular. Já as camptotecinas são capazes de inibir a topoisomerase I, como exemplo o Irinotecano (**22**). Por fim, o epiposídeo (**23**), cujo mecanismo farmacológico consiste na inibição da enzima topoisomerase II (KATZUNG & SALMONM, 2014; RANG & DALE, 2012).

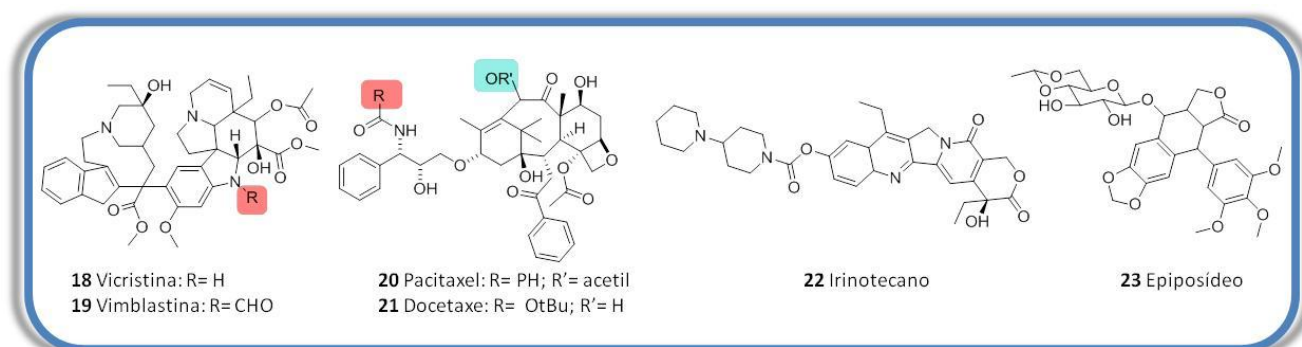


Figura 8: Estrutura de produtos naturais citotóxicos.

O tratamento do câncer através de agentes hormonais baseia-se no seguinte fato: tumores mantêm características fisiológicas de células normais que os deu origem. Sendo assim, tecidos como mama, útero, ovário e próstata podem ser dependentes de hormônios para

sofrer estímulos proliferativos ou antiproliferativos (SILVA, 2006). Desse modo, o tratamento da neoplasia pode lançar mão de hormônios antagonista ou agentes que inibem a síntese de hormônios endógenos. Presentes nessa classe estão: os glicocorticóides, ex. Dexametasona (24) e prednisolona (25); os antiestrógenos, ex. Tamoxifeno (26); os progestágenos, ex. Megestrol (27); os antagonistas de andrógênio, ex. Ciproterona (28) e flutamida (29); os inibidores da síntese de hormônio suprarrenal, ex. Trilostano (30); entre outros (RANG & DALE, 2012).

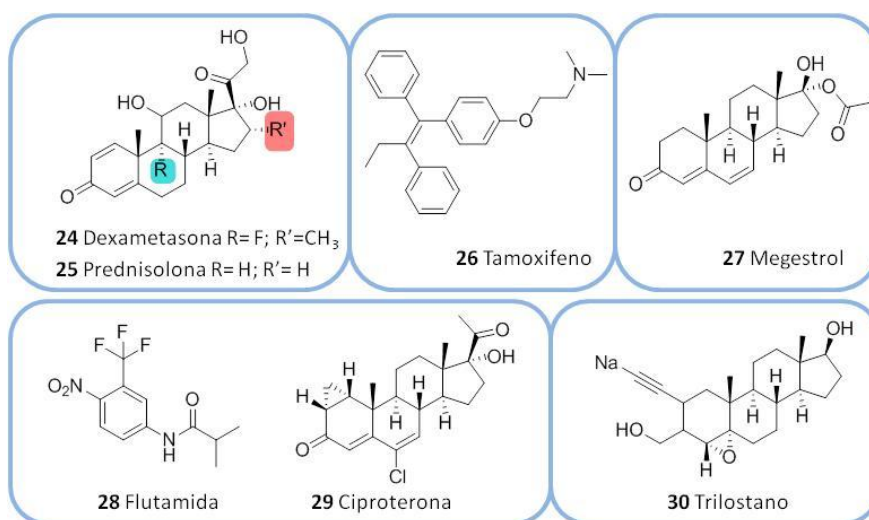


Figura 9: Estruturas de agentes hormonais.

Imatinibe (31), Dasatinibe (32) e Nilotibe (33) são inibidores de proteínas cinases. Estas são enzimas que fosforilam especificamente outras proteínas, levando à ativação de vias de transdução de sinal intracelular, fundamentais em múltiplos processos biológico incluindo, crescimento, diferenciação e morte celular. Em células tumorais, estas enzimas encontram-se desregulas ou superexpressas (SILVA, 2006). O imatinibe é inibidor da oncoproteína Bcr-abl, capaz de se ligar ao sítio do ATP, impedindo que esta exerça sua função como fosfoproteína (Figura 11). O Dasatinibe inibe várias tirosinas cinases, como, Bcr-Abl, Src, c-kit e PDGFR- α . O Nilotibe também é capaz de inibir Bcr-Abl, c-kit e PDGFR- α (KATZUNG & SALMONM, 1998; RANG & DALE, 2012).

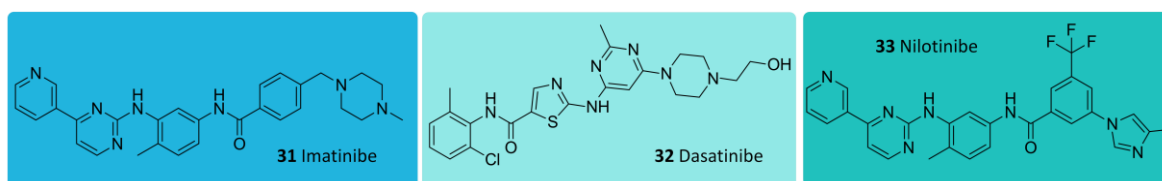


Figura 10: Estrutura de inibidores de proteínas cinases.

Anticorpos monoclonais são imunoglobulinas capazes de ligar-se a proteínas relacionadas ao câncer. Alguns deles destroem as células malignas devido à ativação do mecanismo imune do hospedeiro ao se ligar ao alvo. Outros anticorpos interagem com receptores do fator de crescimento, provocando a inativação destes, e, por conseguinte, a via de sobrevivência é bloqueada, causando apoptose celular. (RANG & DALE, 2012). Trastuzumabe se liga ao receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (HER2) superexpresso em células de câncer de mama, induzindo a resposta imune. Outro anticorpo monoclonal é o Cetuximabe, que bloqueia receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), também superexpresso em muitos tumores, impedindo a proliferação celular (Figura 11). Como último exemplo, o anticorpo monoclonal quimérico Rituximabe, responsável por ligar-se ao antígeno CD20, formador do canal de cálcio, presente nos linfócitos B, causando a ativação da resposta imune. (RANG & DALE, 2012; SILVA, 2006).

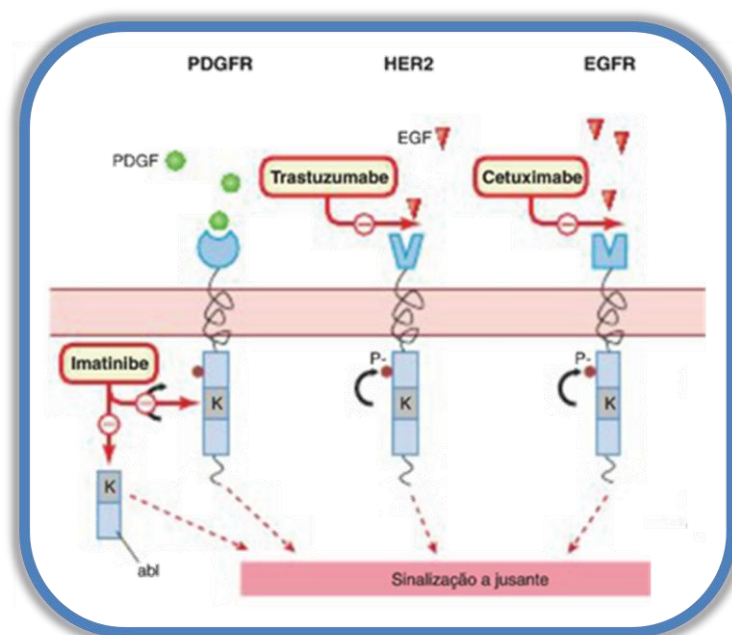


Figura 11: Mecanismo de ação de inibidores de proteínas quinases (Imatinibe) e dos anticorpos monoclonais (Trastuzumabe e Cetuximabe) (Adaptado de Rang & Dale, 2012).

1.4 Proteínas de choque térmico – HSP90

Em 1962, estudos realizados em células de glândulas salivares de uma espécie de mosca, *Drosophila busckii*, mostrou um conjunto de proteínas que era rapidamente induzido com a exposição ao calor e dinitrofenol ou salicilatos, sendo estas proteínas, então, definidas como proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins-HSP) (RITOSSA, 1962).

Agentes de estresse são capazes de afetar negativamente a conformação correta e, portanto, a função das proteínas (MINOWADA & WELCH, 1995). Ademais, a desnaturação de proteína expõe as subunidades hidrofóbicas de seus aminoácidos, que causam agregações protéicas indevidas (WYNN *et. al.*, 1994). Desse modo, as HSPs representam uma família de proteínas chaperonas, ou seja, proteínas assistentes, que previnem os danos causados pelo estresse celular, sendo responsáveis por auxiliar o enovelamento correto, maturação e evitar a agregação imprópria de proteínas, ditas clientes (HARTL, 1996). As HSPs também ajudam a transportar proteínas de um compartimento para outro no interior da célula e degradar proteínas danificadas (NEUPERT, 1997).

As HSPs em mamíferos são classificadas em cinco famílias em função do seu peso molecular em kDa: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e HSPs pequenas (HARTL, 2002). Estas enzimas também estão presentes em condições normais, HSPs constitutivas, compondo cerca de 1-2% de proteínas totais das células eucariotas, responsáveis pela manutenção da homeostase celular (WELCH, 1991).

As HSP90 desempenham papel específico na estabilização, regulação e ativação de uma lista numerosa de proteínas clientes (WANDINGER *et. al.*, 2008; ZHAO *et. al.*, 2005) Até o momento mais de 200 proteínas clientes já foram identificadas e este número está constantemente sendo atualizado (PICARD, 2015). Entre estas, dois grupos destacam-se, as proteínas cinases e fatores de transcrição associados com a extensa rede de sinalização celular (Figura 12).

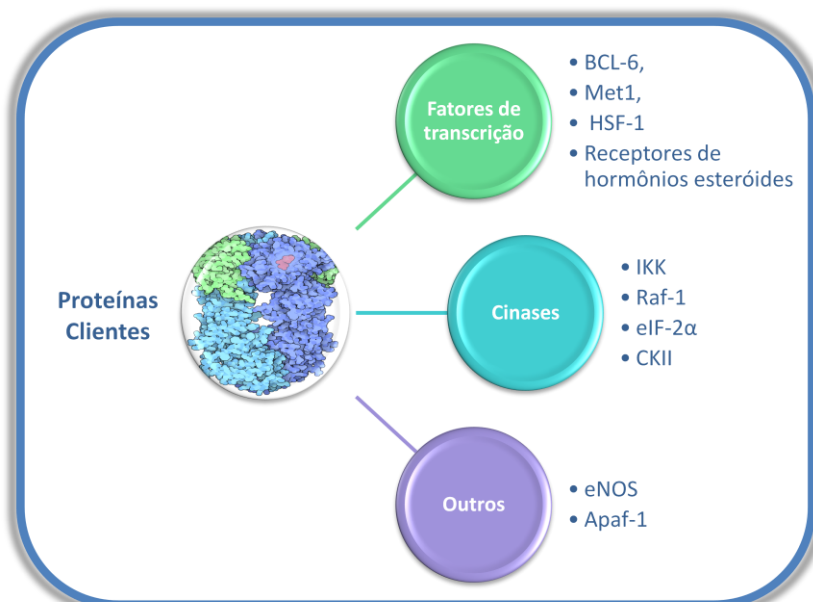


Figura 12: Exemplos de proteínas cliente da HSP90.

As HSP90 existem como um homodímero (Figura 13A), no qual cada monômero é formado por três domínios: domínio *N*-terminal 25 kDa (DN), domínio do central 55 kDa (DM) e domínio *C*-terminal 10 kDa (DC) (Figura 13B) (PRODROMOU & PEARL, 2003). O domínio *N*-terminal possui um sítio de ligação de ATP, semelhante ao sítio da proteína DNA girase B, DNA topoisomerasas e histidina-cinases, necessário para a produção de energia importante para a execução das funções da HSP90 (PRODROMOU *et al.*, 2002). O domínio do meio está envolvido na ligação e maturação de proteínas clientes, além disso, este domínio possui um *loop* catalítico que age como um acceptor de ligação do γ -fosfato do ATP, desempenhando um papel importante na hidrólise de ATP (BHAT *et al.*, 2014). No domínio *C*-terminal ocorre a dimerização entre os dois monômeros (PRODROMOU & PEARL, 2003). Recentemente, foi reportada a existência de um sítio de ATP no domínio *C*-terminal, relacionado ao controle alostérico sobre a ligação de proteínas clientes e também sobre o sítio de ligação de ATP no domínio *N*-terminal (BHAT *et al.*, 2014). E em todos os três domínios, são relatadas interações entre diferentes tipos de co-chaperonas (PRODROMOU & PEARL, 2003).

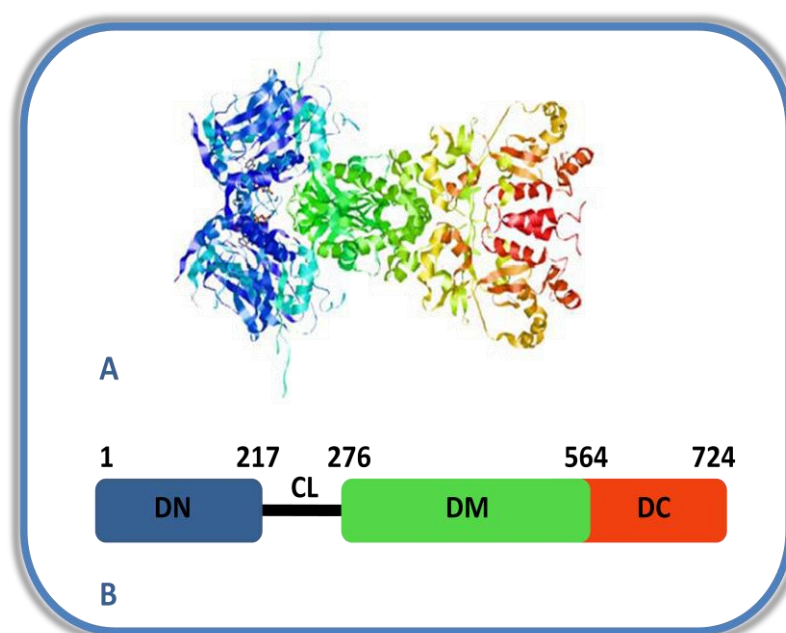


Figura 13: (A) Estrutura cristalina de HSP90 (código PDB: 2CG9) (B) Divisão dos domínios da HSP90. DN domínio *N*-terminal; DM domínio central; DC domínio *C*-terminal.

A atividade de chaperona desempenhada pela HSP90 ocorre através de alterações conformacionais, durante seu ciclo ATP-dependente, entre sua forma aberta e fechada. Na forma aberta, os dois domínios *N*-terminal estão separados, e não há ligação entre o

nucleotídeo. Após a ligação de ATP, a conformação se altera, promovendo a associação entre os domínios *N*-terminais, resultando em uma forma fechada (Figura 14) (MARUYA *et al.*, 1999) Este ciclo depende de chaperonas (ex. HSP40, HSP70) e um grande número de cochaperonas específicas (ex. p23, Cdc37), que entram e saem do maquinário da HSP90, regulando assim a maturação das proteínas clientes (PRATT & TOFT, 2003).

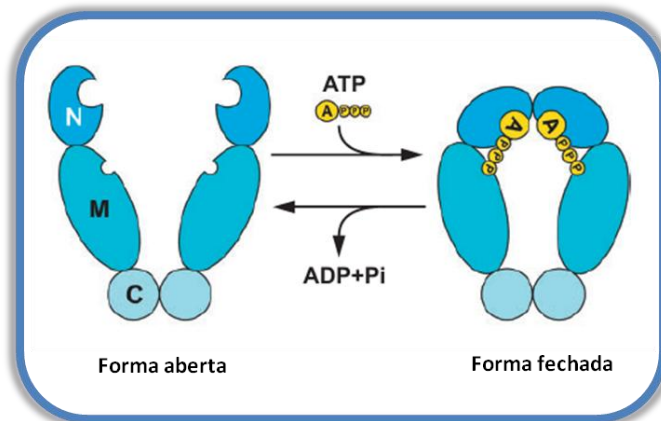


Figura 14: Alteração conformacional ATP – dependente da HSP90 (Adaptado de TERASAWA *et al.*, 2004)

Sob condições fisiológicas normais, a HSP90 está ligada ao fator de choque térmico 1 (HSF-1), responsável por mediar a resposta em condições de estresse, garantindo a sobrevivência celular. Ao ser acionada, a HSP90 libera HSF-1, permitindo que este seja direcionado ao núcleo, onde se liga ao gene promotor de resposta ao choque térmico, provocando a indução de mais HSP90. Se a HSP90 for superexpressa na ausência de estresse, esta se liga ao HSF-1, causando a supressão da chaperona (WU, 1995).

1.5 Papel da HSP90 frente ao Câncer

Muitas chaperonas, incluindo a HSP90, são exacerbadamente expressas em vários tumores como gástrico, mama, ovário, cólon, pulmão e próstata. À vista disso, as células cancerosas parecem depender mais da atividade das HSPs do que as células normais (CIOCCA & CALDERWOOD, 2005).

As células tumorais encontram-se em ambiente de estresse extremo, isto é, diante de acidose, hipoxia e danos induzidos pela quimioterapia e radioterapia, que podem gerar radicais livres e assim causar alterações físicas consideráveis em proteínas (ORTIZ & SALCEDO, 2010). Logo, as chaperonas, especificamente a HSP90, são importantes para a manutenção da homeostase celular frente ao estresse gerado pelo câncer. Ademais, a HSP90 é

essencial para a ativação e estabilidade de muitas proteínas clientes relacionadas ao câncer. Estas incluem HER2, BCR-ABL, IGFR-1, AKT, EGFR, CDK4, c-MET, VEGFR, FLT-3, p53 mutante, fator de indução de hipóxia (HIF)-1 α receptores de androgênio e estrogênio e telomerase (PICARD, 2015; NECKERS, 2007).

Proteínas oncogênicas associadas à HSP90 estão envolvidas em todos os seis marcadores do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 1996). Na figura seguinte (Figura 15), são citados os marcadores do câncer e exemplos das proteínas clientes dependentes da HSP90 em cada marcador.

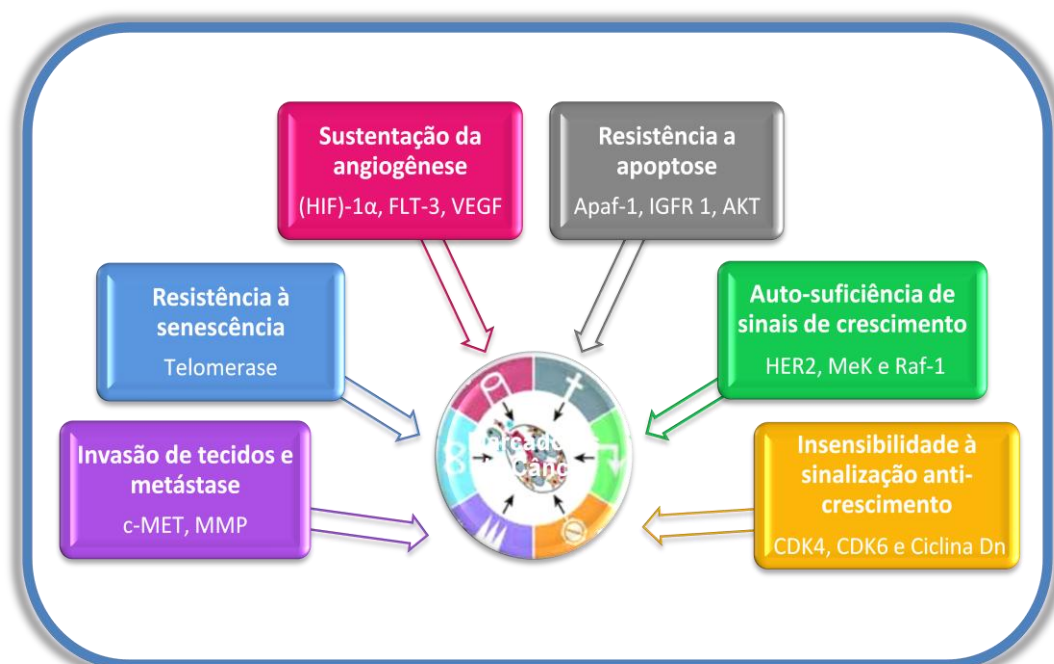


Figura 15: Marcadores do câncer e respectivas proteínas clientes da HSP90.

1.6 Inibidores da HSP90 na terapêutica do câncer

Até o momento do diagnóstico, células tumorais podem acumular mais de 10.000 mutações, de modo a tornar seu genoma altamente diversificado. Tais células dispõem de uma rede complexa e interativa de sinalização, que regula sua proliferação e sobrevivência. Desse modo, a interrupção de apenas um destes sinais pode não ser capaz de eliminar o fenótipo cancerígeno na maior parte dos tumores sólidos, já que a diversidade e plasticidade das células cancerosas as permitem escapar da ação antitumoral direcionada a apenas um alvo, tornando assim estas células resistentes ou indiferentes à intervenção sobre tal alvo terapêutico (WORKMAN, 2003).

Diante desse fato, o interesse no desenvolvimento de inibidores da HSP90 torna-se promissor, dado que possibilita a inibição de vários alvos celulares do câncer simultaneamente, pois, como visto anteriormente, inúmeras proteínas oncogênicas são dependentes desta chaperona (WORKMAN, 2003).

Um exemplo dessa base racional é a comparação entre o uso de inibidores da HSP90 e inibidores de proteína cinase. Inibidores da proteína cinase são direcionados para agir sobre uma dada cinase ou sobre um conjunto restrito destas. Em contraste, os inibidores da HSP90 têm uma ação mais ampla, pois, em vez de agirem sobre um número limitado de cinase específica, agem sobre uma chaperona, impedindo sua interação com diversas cinases, causando assim a degradação destas (Figura 16) (PRATT & TOFT, 2003). Para exemplificar a vantagem do uso de inibidores da HSP90, após o tratamento de cepas com a primeira geração de inibidores de cinases Imatinibe e Erlotinibe, as quinases Bcr-abl ou EGFR respectivamente, propiciavam o aparecimento de mutantes resistentes, entretanto, tais cepas se mostravam sensíveis aos inibidores da HSP90 (WHITESELL & LUNDQUIST, 2005).

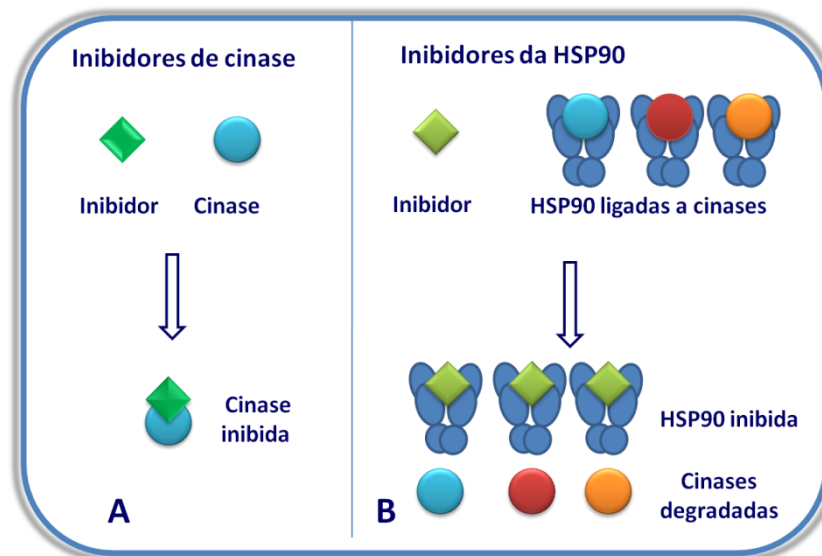


Figura 16: Comparação entre inibidores de quinases (A) e inibidores da HSP90 (B)

Outra vantagem do uso de inibidores da HSP90 está na sua ação seletiva em células tumorais frente às normais. Estudos mostraram que HSP90 isolada a partir de células cancerígenas tem afinidade com seus inibidores entre 20 e 200 vezes mais elevadas que as HSP90 isolada de células normais (KAMAL *et al.*, 2003).

Os primeiros inibidores da HSP90 identificados foram Radicol **34** e Geldamicina **35**. Contudo, esses inibidores apresentaram desvantagens, como: toxicidade e baixa solubilidade característica da Geldamicina; e ineficiência *in vivo* do Radicol (HADDEN *et al.*, 2006; SUPKO *et al.*, 1995). A fim de contornar tais problemas, foram sintetizados derivados da Geldamicina, como: 17-AAG (tanespimicina) **36**, 17-DMAG (alvespimicina) **37** e IPI-504 (retaspimicina) **38**, que se mostraram menos tóxicos e mais eficazes que seu protótipo (BANERJI *et al.*, 2005). A identificação do sítio de ligação do ATP no domínio *N*-terminal proporcionou o desenvolvimento de uma série inibidores da HSP90 baseados na estrutura do nucleotídeo purínico, altamente potentes como BIIB021 (**39**), Debio-0932 (**40**), PU-H71 (**41**) e MPC301 (**42**) (CHIOSIS, 2006; HE *et al.*, 2006; HONG *et al.*, 2013; STENDERUP *et al.*, 2014). Na literatura, também são descritos vários inibidores da HSP90 de baixo peso molecular com estrutura não relacionada ao ATP, incluindo, SNX-5422 (**43**), AUY 922 (**44**), KW-2478 (**45**) e STA 9090 (**46**) (WANG *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*, 2008; KAKASHIMA *et al.*, 2010; HAYSTEAD & HUGHES, 2014). Atualmente, esses inibidores encontram-se em fase de ensaios clínicos para vários tipos de tumores, compondo ao total 17 compostos (Figura 17).

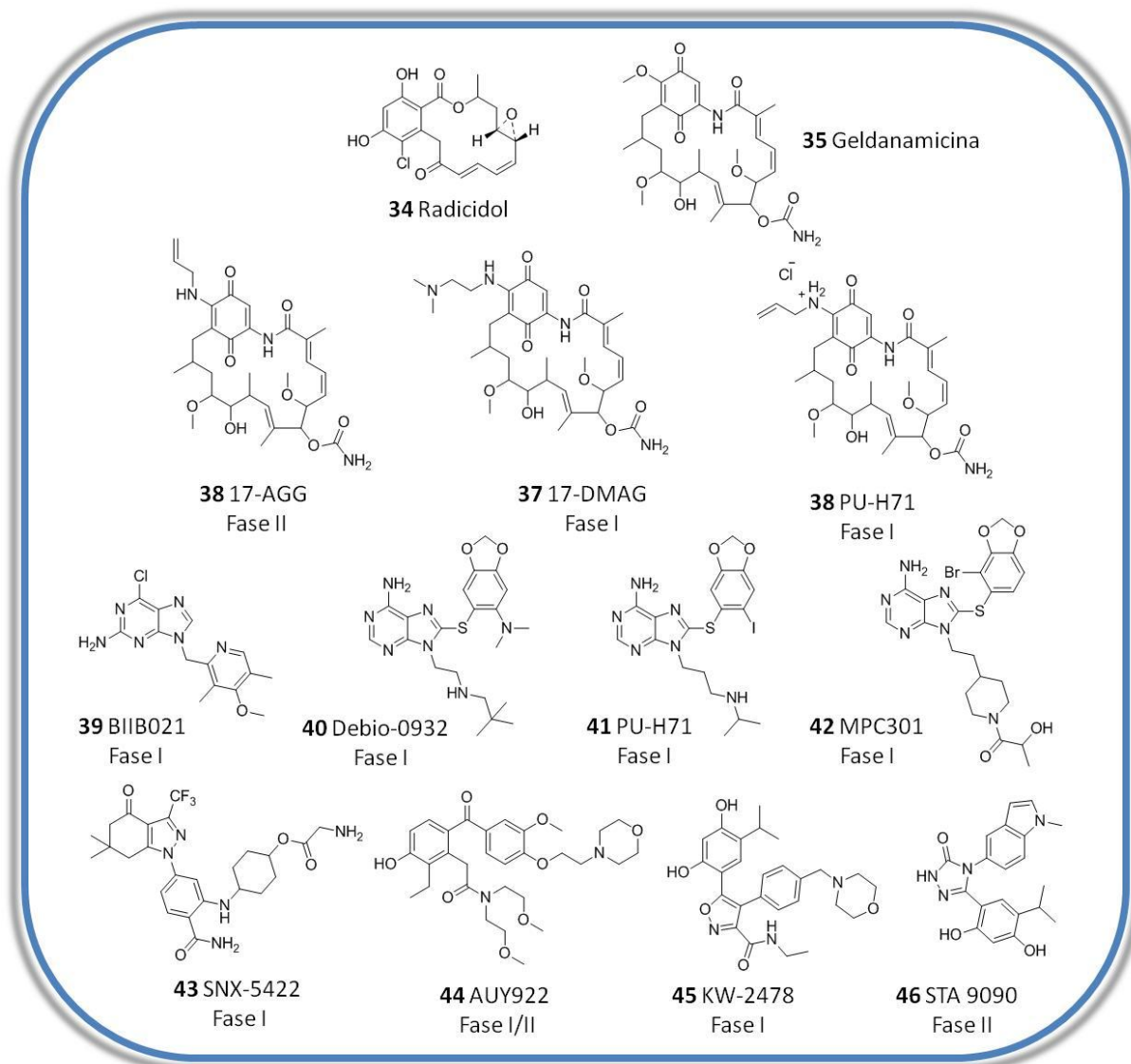


Figura 17: Geldanamicina, Radicicol e inibidores *N*-terminais da HSP90 em desenvolvimento clínico.

Esses inibidores mencionados ligam-se ao sítio do ATP no domínio *N*-terminal, com uma afinidade muito maior que o próprio nucleotídeo (Figura 18). Por conseguinte, a ligação do ATP é bloqueada, impedindo que o ciclo da HSP90 ocorra corretamente, levando à degradação da proteína (WHITESELL & LINDQUIST, 2005).

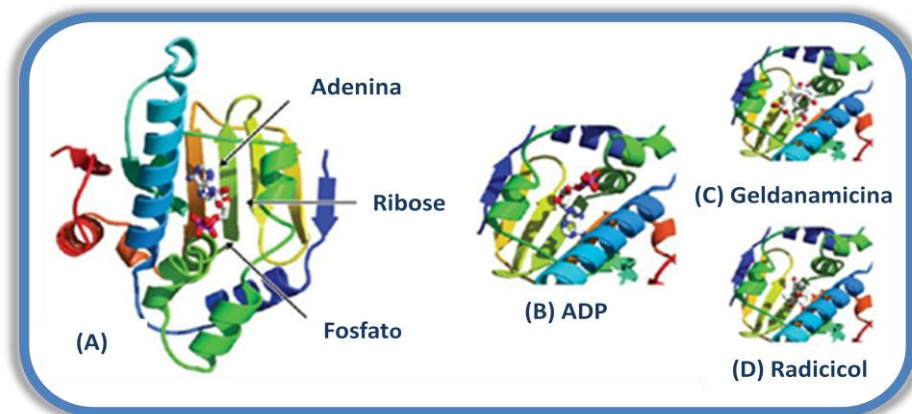


Figura 18: Interações entre o domínio *N*-terminal e seus substratos. (A) ATP (B) ADP (C) Geldanamicina (D) Radicicol.

Apesar da eficácia terapêutica, estudos têm relacionado inibidores *N*-terminal da HSP90 com casos de hepatotoxicidade e com a capacidade de originar resposta ao choque térmico de pró-sobrevivência, ou seja, ao inibir a HSP90, provocam a liberação de HSF-1, ligados a HSP90. Sendo assim, este fator induz a produção, de mais HSP90, contornando o efeito da inibição e, portanto, possibilitando à sobrevivência da célula maligna cliente (BAGATELL *et al.*, 2000).

Surge, como uma alternativa, os inibidores *C*-terminais, que dependendo de sua estrutura, são capazes de gerar, seletivamente, efeitos anti-proliferativas, sem apresentar resposta de choque térmico. Sendo assim, inibidores *C*-terminais apresentam vantagens frente aos inibidores *N*-terminal, de modo à representar um extenso campo de pesquisa (ZHAO *et al.*, 2014).

Vários compostos têm sido relatados como inibidores da Hsp90 a partir da interação com o domínio *C*-terminal, sendo esses: Coumermicin A1 (47), Clorobiocin (48), Novobiocin (49), o primeiro descrito, (MARCUS *et al.*, 2000^a; MARCUS *et al.*, 2000^b), Epigallocatequina-3-galato (EGCG) (50) (PALERMO *et al.*, 2005), Cis-platina (5) (ITOH *et al.*, 1999; SOTI *et al.*, 2002), e Taxol (51) (SOLIT *et al.*, 2003).

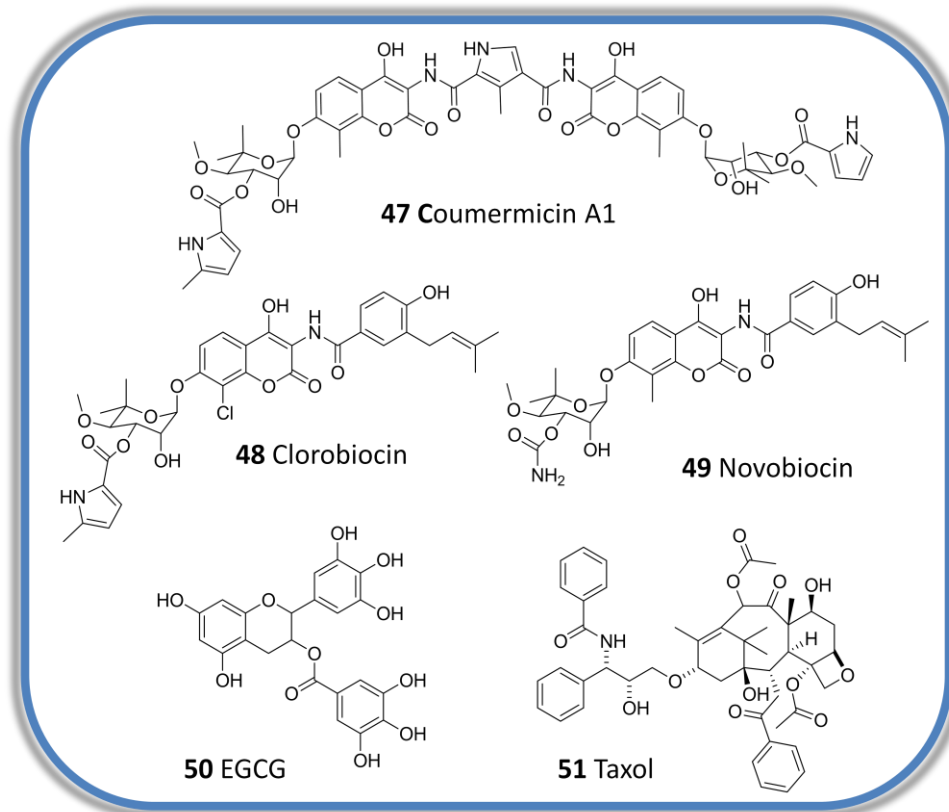


Figura 19: Inibidores C-terminais da HSP90.

1.7 Novobiocin e análogos

O Novobiocin (**49**) é um membro da família de antibióticos cumarínicos que possui atividade antimicrobiana a partir da inibição do sítio ATP-dependente da DNA-girase B (DUTTA & INOUE, 2000). Devido às semelhanças entre os sítios de ligação de ATP da DNA-girase B (HOLDGATE *et al.*, 1997; TSAI *et al.*, 1997) e HSP90 (ROE *et al.*, 1999), Neckers propôs que inibidores da DNA-girase B também poderiam inibir a HSP90. Após realizarem suas pesquisas, Neckers e colaboradores confirmaram que o Novobiocin induzia a degradação de proteínas clientes da HSP90 (MARCUS *et al.*, 2000^b). Entretanto, foi observado que este composto não se ligava ao domínio *N*-terminal, como era imaginado, e sim, ao domínio *C*-terminal, revelando a existência de outro sítio ATP-dependente, até então, não conhecido (MARCUS *et al.*, 2000^a; YUN *et al.*, 2004; SOTI *et al.*, 2003). A partir de então, surge um mecanismo alternativo de inibição da HSP90, que possibilita o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos eficazes no tratamento do câncer.

Entretanto, o Novobiocin (**49**), exibiu um valor de CI_{50} igual a 700 μ M frente a citotoxicidade em células SkBr3, que é significativamente menos potente do que os inibidores

N-terminais, que possuem valores na faixa de nM (MARCUS *et al.*, 2000^b). Desse modo, esforços têm sido empregados no desenvolvimento de análogos com atividades inibitórias maiores que a do Novobiocin. Como não há co-cristais da estrutura do inibidor ligado ao domínio *C*-terminal, avanços neste tema têm sido alcançados a partir de estudos de relação estrutura-atividades (SAR) de análogos do Novobiocin. Este produto natural é composto por três subunidades distintas onde modificações podem ser realizadas: o açúcar noviose, o núcleo cumarínico e a cadeia lateral benzamida (Figura 20).

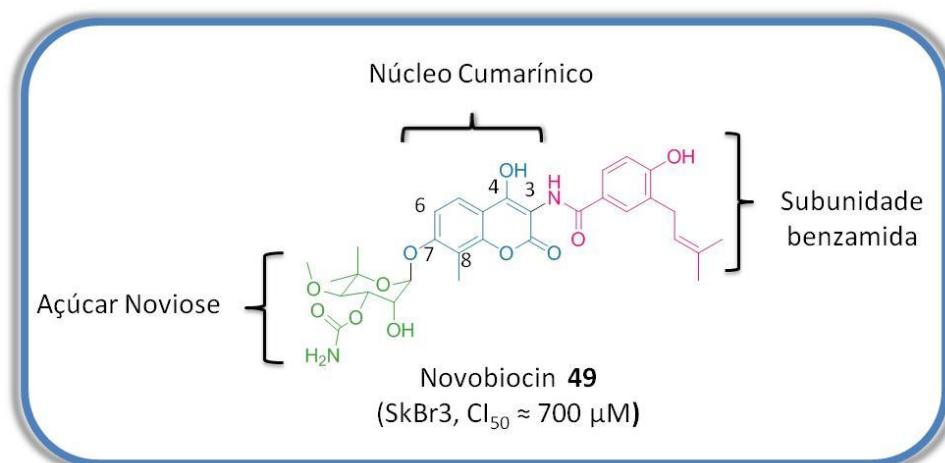


Figura 20: Novobiocin e subunidades destacadas. CI_{50} igual a $700 \mu M$ do Novobiocin frente a células SkBr3.

A primeira tentativa de otimizar a atividade inibitória do Novobiocin contra a HSP90 foi realizada por Yu e colaboradores, em 2005, a qual transformou o inibidor da DNA girase B em um potente inibidor de HSP90. Por meio desse estudo, foi demonstrado que grupamento metila na posição 8 aumenta sutilmente a atividade inibitória e que a subunidade noviose na posição *C*-7 e o grupamento amida na posição *C*-3 do anel de cumarínico são essenciais para a inibição da HSP90 (Figura 21B). Da quimioteca sintetizada por esses pesquisadores, o composto A4 (**52**), que apresentava modificações estruturais como o encurtamento da cadeia lateral da benzamida, remoção do grupamento 4-hidroxila e troca do grupamento carboxiamida do açúcar pela hidroxila, foi o análogo mais potente e capaz de induzir a degradação de proteínas clientes da HSP90 com concentração 70 vezes mais baixa que o Novobiocin. No entanto, foi demonstrado que A4 induz, simultaneamente, resposta ao choque térmico pró-sobrevivência (YU *et al.*, 2005).

Para confirmar o padrão observado de SAR demonstrado no estudo de Yu, foram preparados o 4-desidronovobiocin (DHN1) (**53**) e 3'-descarbamato-4-dehidroxinovobiocin

(DHN2) (**54**) e avaliados em células mutantes SkBr3. Os resultados mostraram que a 4-hidroxi e o 3'-carbamato são prejudiciais para a atividade inibitória sobre a HSP90 (Figura 21B), corroborando com a tendência observada anteriormente. DHN1 exibiu potencia aproximadamente 70 vezes maior que o Novobiocin, ao passo que DHN2 manifestou potencia cerca de 700 vezes maior que este precursor (BURLISON *et al.*, 2006^a).

Em novos estudos de Burlison e colaboradores, foi observado que a dimerização da estrutura de A4 (**52**) resultou no composto (**55**), 5 vezes mais potente e que não induzia a resposta de choque térmico. Estes resultados sugeriram que a obtenção de um composto com característica anti-proliferativas, sem apresentar resposta de choque térmico, poderia ser alcançada através da modificação da cadeia lateral amida (Figura 21B) (BURLISON *et al.*, 2006^b).

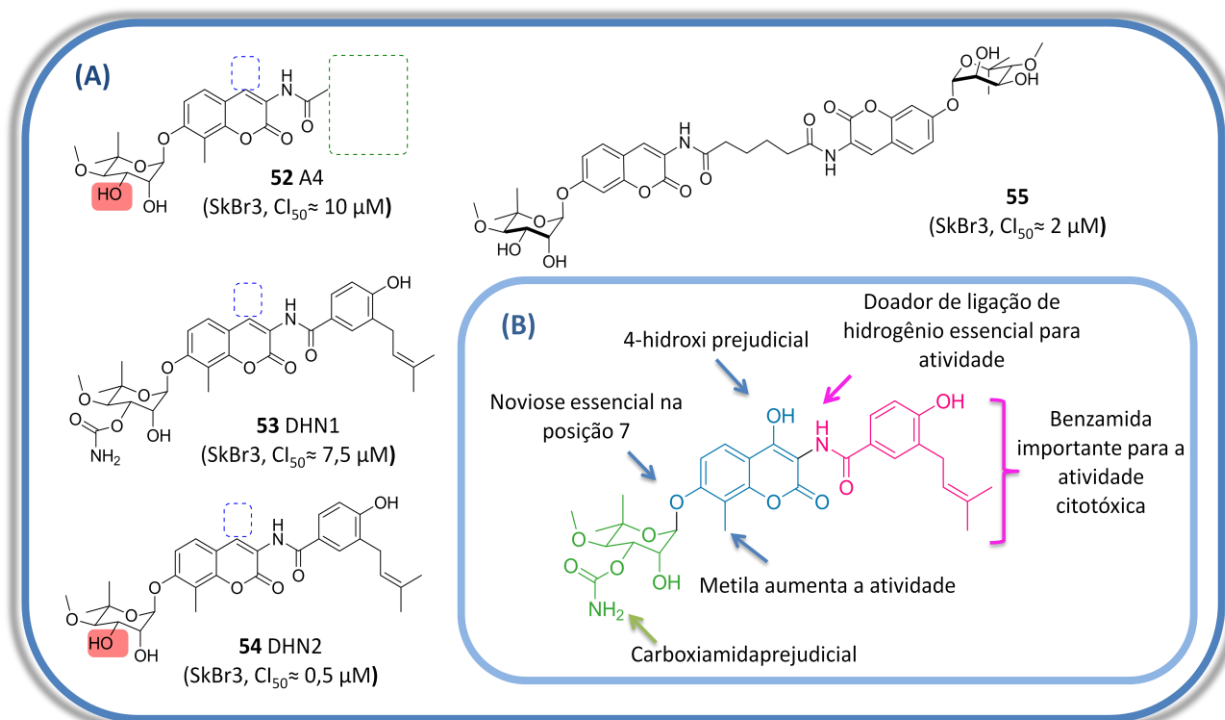
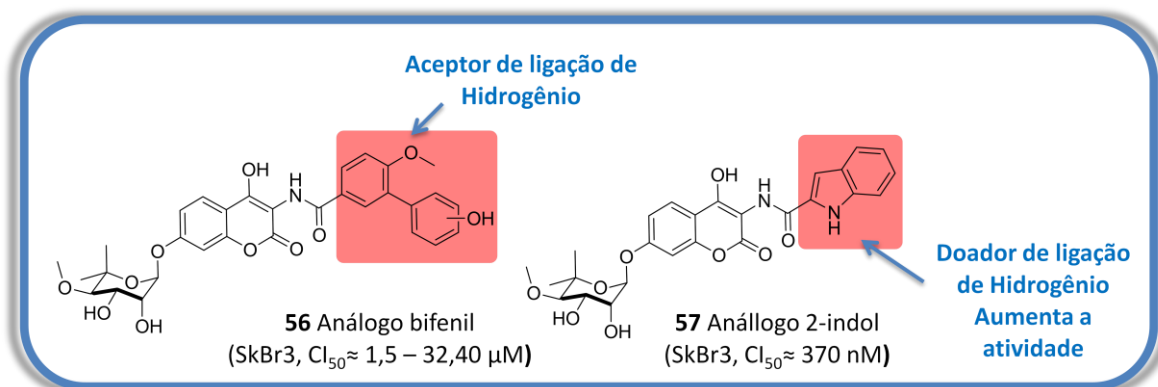


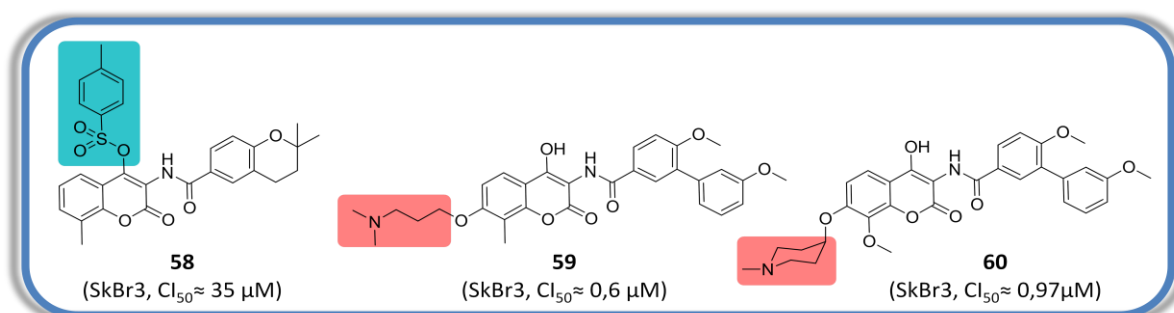
Figura 21:(A) Análogos potentes do Nobobiocin. (B) Padrão observado de SARde análogos do Novobiocin.

Logo, séries com alterações na subunidade amídica foram sintetizadas. Estes estudos conduziram à identificação dos compostos de cadeia lateral do tipo bifenilicas e indólicas com aumento significativo nas atividades anti-proliferativa em células SkBr3, o que também sugere que a capacidade de realizar ligação de hidrogênio adicional na cadeia lateral amídica otimiza a atividade inibitória frente a HSP90 (BURLISON *et al.*, 2008).



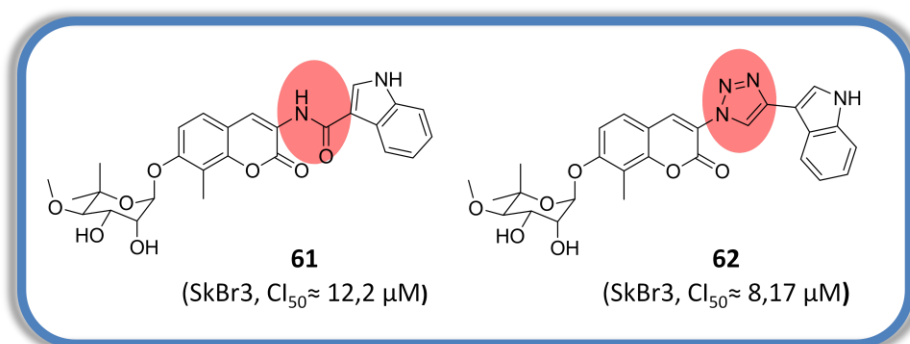
Renoir e colaboradores sintetizaram análogos ao novobiocin sem o açúcar noviose. Os estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que tais análogos também manifestaram atividade inibitória frente à HSP90, no entanto, com aumento da potência. Eles também demonstraram que, enquanto o grupamento 4-hidroxila é prejudicial, o 4-tosilfenol mantém a atividade anti-proliferativa (**58**) (LE BRAS *et al.*, 2007).

Zhao e colaboradores também desenvolveram pesquisas a fim de simplificar a obtenção de análogos do novobiocin a partir da troca da subunidade noviose. Este estudo demonstrou que compostos com alquilaminas lineares e cíclicas na posição C-7 da cumarina, **59** e **60** respectivamente, resultaram no aumento da atividade citotóxica, indicando que algumas interações com o sítio enzimático realizadas na região ocupada pela subunidade de noviose desempenham um papel crítico nas interações com o sítio C-terminal da HSP90, porém nem todos os grupos funcionais, como a própria noviose, são necessários. Ademais, o SAR obtido a partir desse estudo sugeriu que, a distância de 3 carbonos entre a amina e o oxigênio na posição 7 da cumarina seria a ideal para a atividade inibitória (ZHAO *et al.*, 2011).



Peterson e Blagg sintetizaram uma série análoga ao novobiocin através da troca do grupamento amida pelo anel triazólico. Este estudo foi o primeiro a realizar alteração

especificamente nesta subunidade. Já sabido sobre a importância do grupamento amida para a atividade inibitória da HSP90, tais pesquisadores sugeriram que inclusão de [1,2,3]-triazóis como um bioisótero de amida (PETERSON & BLAGG, 2010; BARREIRO & FRAGA, 2001). A série análoga obtida apresentou efeitos anti-proliferativos satisfatórios frente à linhagem de células mutantes SkBr3. O sucesso desta troca bioisostérica foi confirmada, visto que o composto amídico (**61**) e o análogo (**62**) obtiveram potências de inibição similares, sendo o bioisótero triazólico levemente mais potente (PETERSON & BLAGG, 2010).



Muitos outros estudos elucidaram SAR adicionais, que resultaram na identificação de vários análogos promissores ao novobiocin (SHELTON *et al.*, 2009; DONNELLY *et al.*, 2008, ZHAO *et al.*, 2012; ZHAO & BLAGG, 2013; KUSUMA *et al.*, 20014; GARG *et al.*, 2015). Inclusive, estudos recentes demonstraram que análogos contendo naftaleno ou bifenil no lugar do anel cumarínico apresentam atividade anti-proliferativa comparável, indicando que a cumarina pode servir como um fixador de orientação espacial para ligação ao sítio da HSP90 (ZHAO *et al.*, 2013).

1.8 Bioisosterismo

Como relatado acima, a troca de uma amida pelo triazol pode ser caracterizada como um bioisosterismo. Esta estratégia é muito empregada em Química Medicinal para o planejamento, desenho e modificação molecular para a obtenção de novo candidatos a fármacos, tendo como base um composto protótipo de conhecimento químico e estrutural estabelecido, bem como seu mecanismo de ação (LIMA & BARREIRO, 2005).

As bases do bioisosterismo foram inspiradas no conceito de isosterismo, o qual foi inicialmente introduzido por Langmuir em 1919, fundamentado nas semelhanças eletrônicas (número eletrônico de valência) entre átomos e moléculas. O mesmo foi ampliado, em 1932 por Erlenmeyer, o qual definiu isosterismo como átomos, íons e moléculas no qual camadas

eletrônicas periféricas podem ser consideradas idênticas, e complementou propondo que elementos da mesma coluna da Tabela Periódica são isósteros um dos outros (exemplo $C \approx Si$ e $O \approx S$). Grupos que aparentemente são diferentes, mas que na prática possuem propriedades bem próximas (exemplo Cl, CN e SCN) também foram incluídos. Além de criar o conceito de anéis eletronicamente equivalentes (exemplo benzeno e triptofano) (WERMUTH, 1996; LIMA & BARREIRO, 2005).

Em 1951, Friedman em seu trabalho pioneiro realizou trocas isostéricas em certas subunidades moleculares que resultaram em compostos de atividade similar ao original, introduzindo assim o conceito de bioisosterismo (FRIEDMAN, 1951). Este foi posteriormente expandido e definido como fenômeno pelo qual trocas isostéricas originam propriedades biológicas iguais ou antagônicas em um mesmo sítio receptor. (WERMUTH, 1996; BARREIRO & FRAGA, 2001).

Em 1970, Alfred Burger dividiu o bioisosterismo em duas classes, o clássico e não-clássico. O bioisoterismo clássico abrange a troca de átomos, grupos moleculares ou radicais de mesma valência, além de anéis equivalentes, restando aos demais casos, a classificação de bioisosterismo não clássico. Adiante, a esta última classe, foram incluídos os grupos funcionais com propriedades equivalentes, o retroisosterismo, subunidades estruturais que possuem mesma interação com o biorreceptor, bióforos e anelação ou retroanelação (Figura 22) (BARREIRO & FRAGA, 2001).

A versatilidade da utilização dessa estratégia advém da possibilidade de melhorar a atividade farmacológica, aumentar seletividade frente a um receptor, ou aperfeiçoar a farmacocinética de um novo composto protótipo comparado ao composto original (BARREIRO & FRAGA, 2001; LIMA & BARREIRO, 2005). Outra vantagem associada ao bioisosterismo é o seu uso por laboratórios de pesquisas de empresas farmacêuticas para transcender barreiras patentárias, a fim de obter novos fármacos com as mesmas propriedades terapêuticas que o fármaco inovador, os *me-too's* (BARREIRO & FRAGA, 2001).

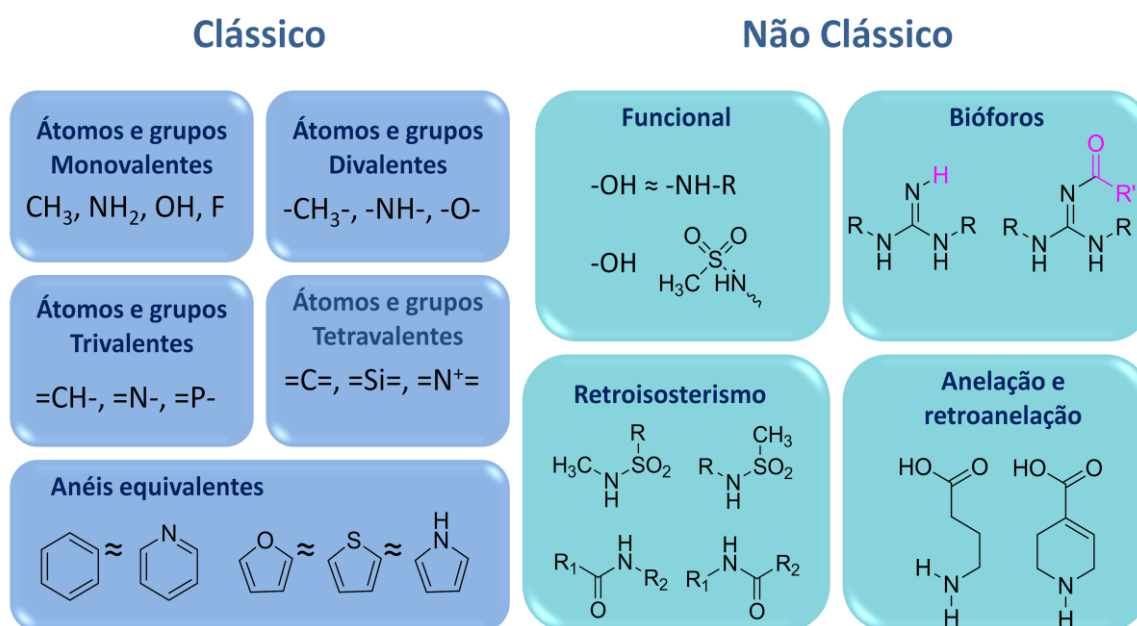


Figura 22: Bioisosterismo Clássico e Não-Clássico.

1.8.1 Anel [1,2,3]-traiazólico como biosóestero não-clássico de amida

O [1,2,3]-traiazol é considerado um biosóestero não-clássico da subunidade amida, pois apresentam semelhança estrutural, como a distância entre os substituintes que em amidas é igual a 3,8-3,9 Å e em [1,2,3]-triazóis é igual a 5,0-5,1 Å; e eletrônica, como o momento dipolar que em amida é igual a 4 Debye e em [1,2,3]-triazol é 5 Debye) (Figura 23) (PALMER *et al.*, 1974; TRON *et al.*, 2008).

Outra similaridade é encontrada nos tipos de interações que estas subunidades podem fazer. O [1,2,3]-triazol possui forte momento dipolar, que provoca polarização sobre o próton do carbono (5) que pode atuar como doador de ligação de hidrogênio, como o NH das amidas. Também age como acceptor fraco de ligação de hidrogênio, através dos pares de elétrons dos nitrogênios (2) e (3) hibridizados sp_2 , assim como ocorre em amidas a partir dos pares de elétrons do oxigênio (Figura 23) (PALMER *et al.*, 1974).

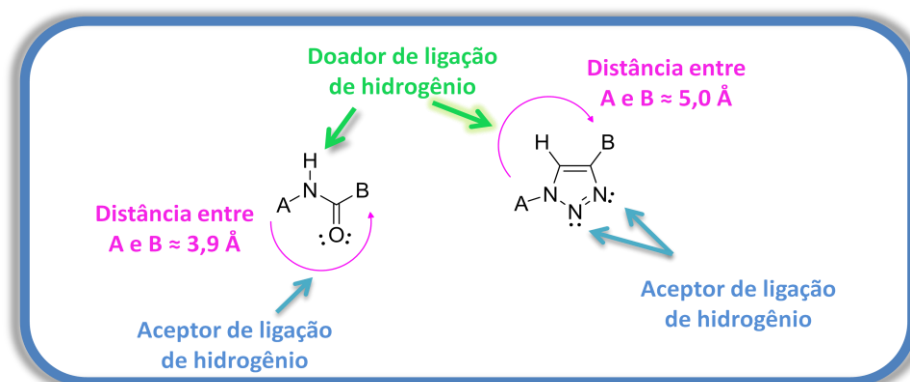


Figura 23: Propriedades semelhantes entre amida e [1,2,3]- triazol.

diferentemente das amidas, além de dificilmente sofrer oxidação ou redução, tornam-se muito estável em condições fisiológicas (KOLB & SHARPLESS, 2008). Esta característica confere a subunidade [1,2,3]-triazol propriedades farmacocinéticas mais favoráveis que amidas.

Na literatura são descritos alguns exemplos bem sucedidos de anéis [1,2,3]-triazólicos atuando como bioisósteros de amidas, como análogos de ceramidas (**64**) (KIM *et al.*, 2007) que atuam como agentes citotóxicos; análogos de linezolida (**66**) com atividade antimicrobiana (PHILLIPS *et al.*, 2003); e análogos [1,2,3]-triazólicos do Novobiocin (**62**), citado anteriormente (PETERSON & BLAGG, 2010).

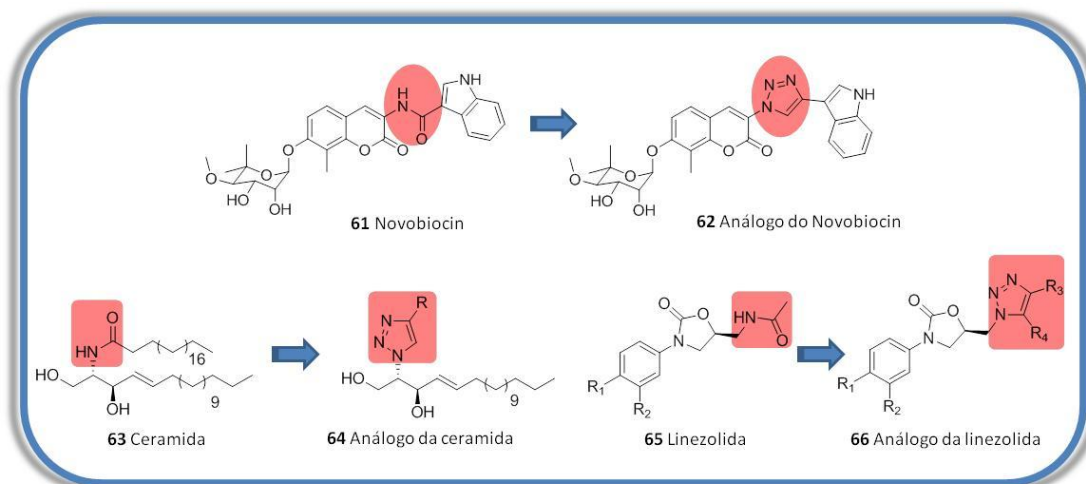


Figura 24: [1,2,3]-triazóis bioisósteros de amidas.

1.9 Anéis [1,2,3]-Triazólicos

Os triazóis são compostos heteroaromáticos de cinco membros e fórmula química $C_2H_2N_3$, que apresentam seis elétrons π (JOULE & MILLS, 2010). Não ocorrem na natureza, sendo exclusivamente de origem sintética (BUILLA *et al.*, 2011).

Os anéis triazólicos podem existir como [1,2,3]-triazóis ou [1,2,4]-triazóis, dependendo da disposição dos nitrogênios (JOULE & MILLS, 2010; BUILLA *et al.*, 2011). Uma busca na literatura revela que os sistemas [1,2,4]-triazóis são mais estudados, possuindo 9.624 publicações, contra 4.195 relacionadas ao outro sistema (Figura 25). Todavia, nos últimos quinze anos, pesquisas relacionadas aos [1,2,3]-triazóis têm aumentando expressivamente (SCOPUS, 2015), provavelmente por causa do advento de métodos de síntese mais eficazes.

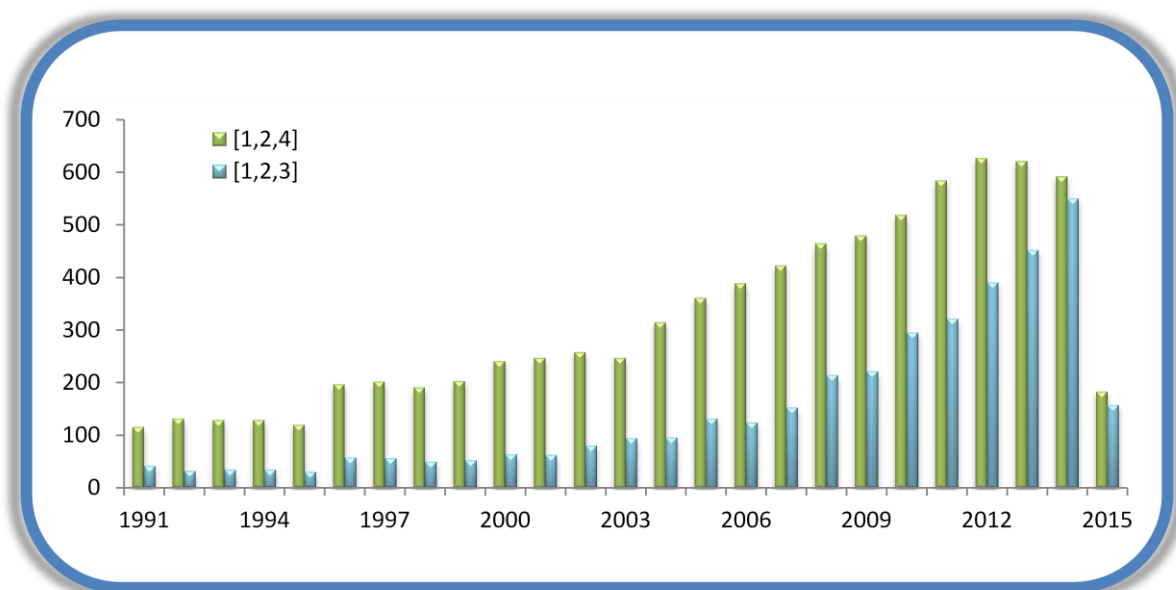


Figura 25: Número de publicações de [1,2,4] triazol (verde) e [1,2,3] triazol (azul) durante os últimos 25 anos.

Os [1,2,3]-triazóis são considerados ácidos fracos ($pK_a=9,40$) e bases ($pK_aH=1,17$) fracas, ou seja, possuem comportamento anfótero. Podem ser sintetizados a partir de diferentes modos, entretanto, a reação de ciclo adição 1,3-dipolar é o método mais importante para a síntese de [1,2,3]-triazóis a partir de azidas e alcinos (BUILLA *et al.*, 2011).

Compostos [1,2,3]-triazólicos desempenham uma vasta atividade biológica, dentre estas, atividades anti HIV (BRIK *et al.*, 2003; WHITING *et al.*, 2006), anticâncer (TRABOCCHI *et al.*, 2010; PAGLIAI *et al.*, 2006), antimicrobial (EBNER *et al.*, 2008) antiprotozoário (BAKUNOV *et al.*, 2010), antifúngico (CHAUDHARY *et al.*, 2009; SANGSHETTI *et al.*, 2009), citotóxico (LEE *et al.*, 2007), agentes neuroativos (MENEGATTI *et al.*, 2003), entre outras. Entretanto, há poucas moléculas contendo o núcleo [1,2,3]-triazólico no mercado ou na última fase de ensaios clínicos. Entre os medicamentos já comercializados com tal núcleo, estão o antibiótico β -lactâmico, Tazobactam (**72**) e a

cefalosporina cefatrizina (**73**); e entre os candidatos a fármacos incluem-se o composto anticancerígeno carboxiamidotriazol (CAI) (**74**) (SOLTIS et al, 1996) e o inibidor da transcriptase reversa, TSAO (**75**).

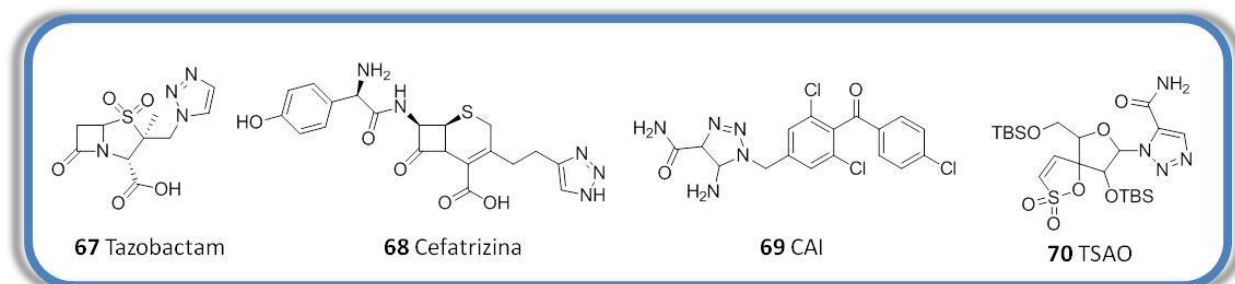


Figura 26: Compostos contendo o núcleo [1,2,3]-triazólico comerciais ou em fase de ensaios clínicos.

1.10 Reação de Cicloadição 1,3- dipolar - Click Chemistry

Em 1893, a reação de cicloadição 1,3-dipolar foi realizada pela primeira vez a partir dos trabalhos realizados por Arthur Michael (MICHAEL, 1893). Entretanto, somente na década de 60, através dos estudos Rolf Huisgen, o mecanismo da cicloadição 1,3-dipolar foi elucidado (HUISGEN *et al.*, 1967).

Na reação de cicloadição clássica, dois reagentes contribuem com seis elétrons, quatro oriundos do 1,3 dipolo e os outros dois do dipolarófilo, para formar um anel de cinco membros. O mecanismo da reação é concertado, envolvendo um estado de transição, que proporciona uma aproximação facial dos orbitais de fronteira dos reagentes, favorável à formação das duas novas ligações σ a partir de ligações π , exemplificado na figura 27 pela reação entre azidas e alcinos (MERLO, 2012).

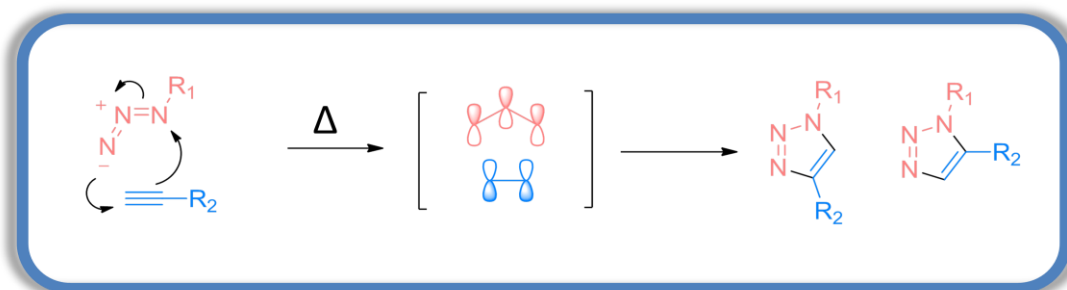


Figura 27: Mecanismo de reação de cicloadição 1,3-dipolar térmica.

A síntese de triazóis através da reação térmica de cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alcinos possui desvantagem, por ser altamente exotérmica, necessitando de cuidados na sua

execução, pois existem vários casos de explosão relatados na literatura; possui energia de ativação alta e, conseqüentemente, a velocidade de reação é muito baixa para reagentes não ativados, resultando em baixos rendimentos. Ademais, as diferenças de energia entre os orbitais de fronteira HOMO e LUMO de azidas e alcinos são de tamanhos similares, de modo que interações ocorrem, concomitantemente, entre HOMOazida – LUMOalcino e LUMOazida– HOMOalcino, produzindo misturas regioisoméricas de triazóis quando utilizado alcinos assimétricos (HOWELL *et al.*, 2001).

Todavia, pesquisas realizadas simultaneamente pelos grupos de Meldal e de Sharpless, em 2002, relataram que a utilização de Cu(I) aumentava a velocidade da reação de cicloadição 1,3-dipolar entre azidas e alcinos terminais na ordem de 7 vezes (MELDAL *et al.*, 2002; SHARPLESS *et al.*, 2002). Dentre os benefícios encontrados nessa nova metodologia também estão: formação exclusiva do regioisômero 1,4-dissubstituído; utilização de condições muito mais brandas; obtenção de rendimentos muito altos; utilização de uma grande variedade de solventes, incluindo a água, visto como algo positivo, já que se trata de um solvente benigno, universal e que possui capacidade de absorver a grande quantidade de calor gerada neste tipo de reação, além de ser importante no caso de aplicações destas reações em sistemas biológicos (ROSTOVTSEV *et al.*, 2002; RODIONOV *et al.*, 2005; BOCK *et al.*, 2006). Em virtude dessas vantagens, a reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por Cu a partir de azidas orgânicas e alcinos terminais (CuAAC) é considerada uma reação “Click Chemistry”.

A filosofia *Click* foi concebida em 2001, pelos cientistas Kolb, Finn, Sharpless, com o propósito de contornar os problemas encontrados na síntese de moléculas complexas. Sendo assim, os autores propuseram um processo sintético modular, fácil, rápido, e mais eficiente, de modo a atender a demanda da química moderna por novas moléculas ativas. Essa estratégia foi baseada na maneira que a natureza constrói seus metabólitos primários, através de blocos simples, que combinados entre si, proporcionam enorme diversidade de biomoléculas (KOLB, 2001).

De modo geral, a abordagem “*Click Chemistry*” pode ser resumida por uma frase de Sharpless “... *all search must be restrict to molecules that are easy to make*”, e como o nome mesmo sugere, química em um clique (KOLB, 2001).

A reação de CuAAC respeita todos os critérios click, sendo estes: reação modular, ou seja, ser realizada através de blocos simples; fácil execução (insensível à água e oxigênio); partir de reagentes acessíveis; originar apenas subprodutos inofensivos ou de fácil remoção, que não seja cromatográfica; sintetizar produtos regioseletivos; resultar em altos rendimentos; e utilizar solventes benignos ou facilmente removíveis (KOLB *et al.*, 2001).

Assim, a CuAAC é considerada o exemplo perfeito do conceito “Click”. Logo, essa reação foi revigorada, e a partir de então, extensamente aplicada em diversas áreas da ciência, como química medicinal (BRIK *et al.*, 2003; PAGLIAI *et al.*, 2006), bioconjugação (CRAVATT & SORENSEN, 2000; DEITERS *et al.*, 2003), química de materiais (SUDHIR *et al.*, 2009) catálise (CAMPONOVO *et al.*, 2009), entre outras.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi o estudo de síntese e caracterização estrutural, através de técnicas espectroscópicas, de duas séries de compostos cumarínicos-1,2,3-triazóis análogos ao Novobiocin, planejados como possíveis inibidores da chaperona HSP90.

2.2. Objetivos Específicos

- Padronização da síntese e purificação das duas séries análogas do Novobiocin: série AN₁ e AN₂;
- Caracterização das séries AN₁ e AN₂ por métodos espectroscópicos de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ¹H e de ¹³C).

2.3. Planejamento Estrutural

Fundamentando-se nos relatos da literatura referentes aos resultados de inibição enzimática da HSP90 ao nível do domínio C-terminal exercido pelo Novobiocin, planejamos sintetizar análogos deste protótipo, através da síntese de duas séries isósteras de [1,2,3]-triazóis.

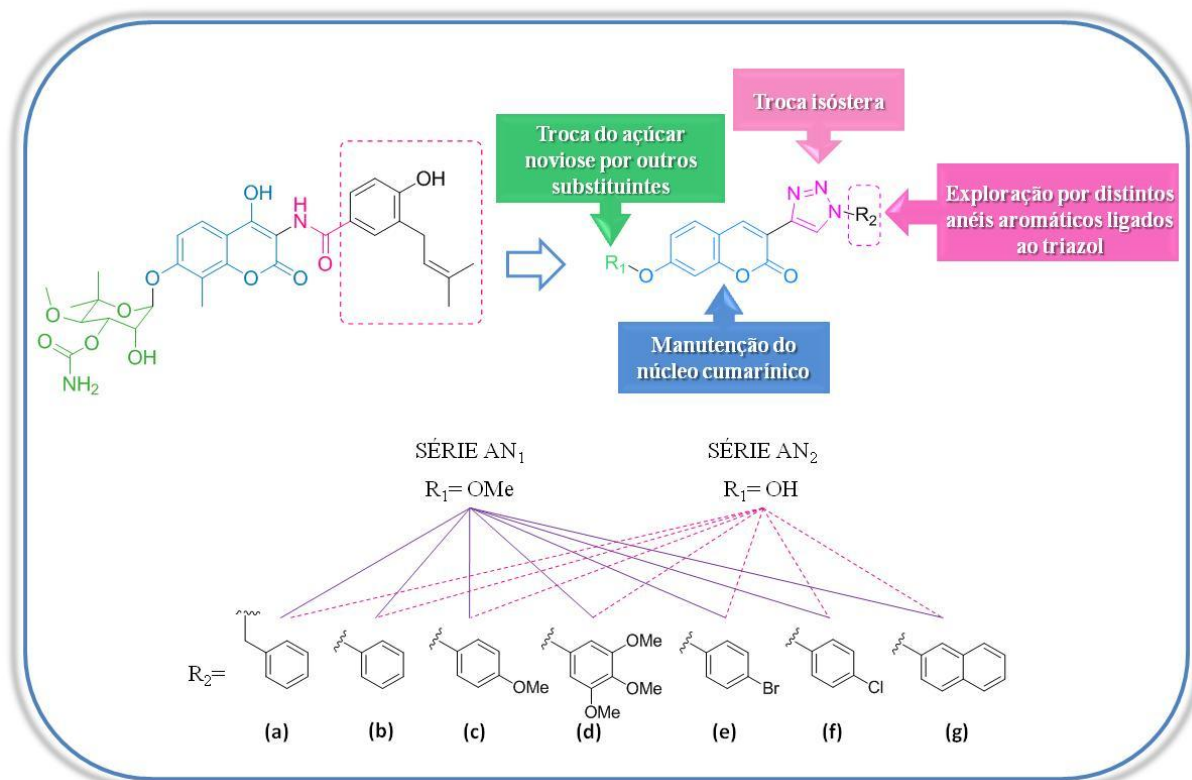
O planejamento racional das séries foi baseado na manutenção do núcleo cumarínico presente no Novobiocin, visto que esse núcleo foi descrito como um possível fixador de orientação espacial de grupos farmacofóricos para a interação destes com o sítio C-terminal da HSP90 (ZHAO *et al.*, 2013).

Além disso, foi proposto a troca do grupo amida, que liga a cumarina ao anel 4-hidroxi-3-(3-metilbut-2-il), pelo anel [1,2,3]-triazol. Essa troca baseia-se na estratégia de bioisosterismo não-clássico (BARREIRO & FRAGA, 2001) onde o triazol pode mimetizar a amida por possuir um nitrogênio com hibridização sp₂ (como o oxigênio da amida) e por possuir um hidrogênio com maior polaridade capaz de fazer ligações de hidrogênio, semelhante aos hidrogênios da amida (Figura 23). Também nos baseamos em resultados de Peterson e Blagg, que se utilizaram desta estratégia para a obtenção de análogos do Novobiocin com atividades antiproliferativas satisfatórias (PETERSON & BLAGG, 2010). O intuito dessa modificação foi melhorar as propriedades farmacocinéticas dos análogos, pois, a

subunidade [1,2,3]-triazol é mais estável em condições fisiológica que amidas, suscetíveis às amidases plasmáticas (BARREIRO & FRAGA, 2001).

Devido à complexidade da síntese do açúcar noviose, planejamos análogos sem essa subunidade, assim como já descrito na literatura por Renoir e Zhao (LE BRAS *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2001). Sendo assim, foi sugerida, em substituição à subunidade noviose, a exploração de distintos substituintes em R₁, como alquila (AN₁) e hidroxila (AN₂), que possibilitará a avaliação dos efeitos do átomo de hidrogênio na posição 7 do núcleo cumarínico.

Ao variar a natureza dos anéis aromáticos, R₂, ligados aos triazóis nas séries AN₁ e AN₂, tem-se como objetivo investigar a relevância da diversidade de interações moleculares e propriedades físico-químicas introduzidas pelas modificações propostas. A fenila foi escolhida como aromático de referência, já que não possui qualquer funcionalização. Também foi selecionado seu homólogo superior, benzila, a fim de se avaliar o efeito da maior liberdade conformacional desse substituinte frente às interações hidrofóbicas no sítio ativo. Com o propósito de se avaliar os efeitos eletrônicos envolvidos na interação ao sítio de ligação, foram eleitos substituintes doadores de elétrons (4-metóxi-fenila e 3,4,5-trimetóxi-fenila) e retiradores de elétrons por indução (4-Br-fenila e 4-Cl-fenila). Por fim, o grupamento naftila foi escolhido para se avaliar, futuramente, interações hidrofóbicas adicionais existentes no sítio de ligação do domínio C-terminal.



Esquema 1: Planejamento Estrutural das séries AN₁ e AN₂ baseadas no Novobiocin.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento sintético das séries AN₁ e AN₂

A síntese dos compostos das duas séries (**76-77a-g**) foi baseada na análise retrosintética detalhada no esquema 2.

Inicialmente, por meio de duas desconexões C-N (etapa a), foi possível identificar as azidas (**78a-g**) e o 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) como precursores dos [1,2,3]-triazóis (**76-77-a-g**), sendo essa etapa proporcionada pela reação de cicloadição de alcino-azida catalisada por cobre(I), da sigla do inglês CuAAC.

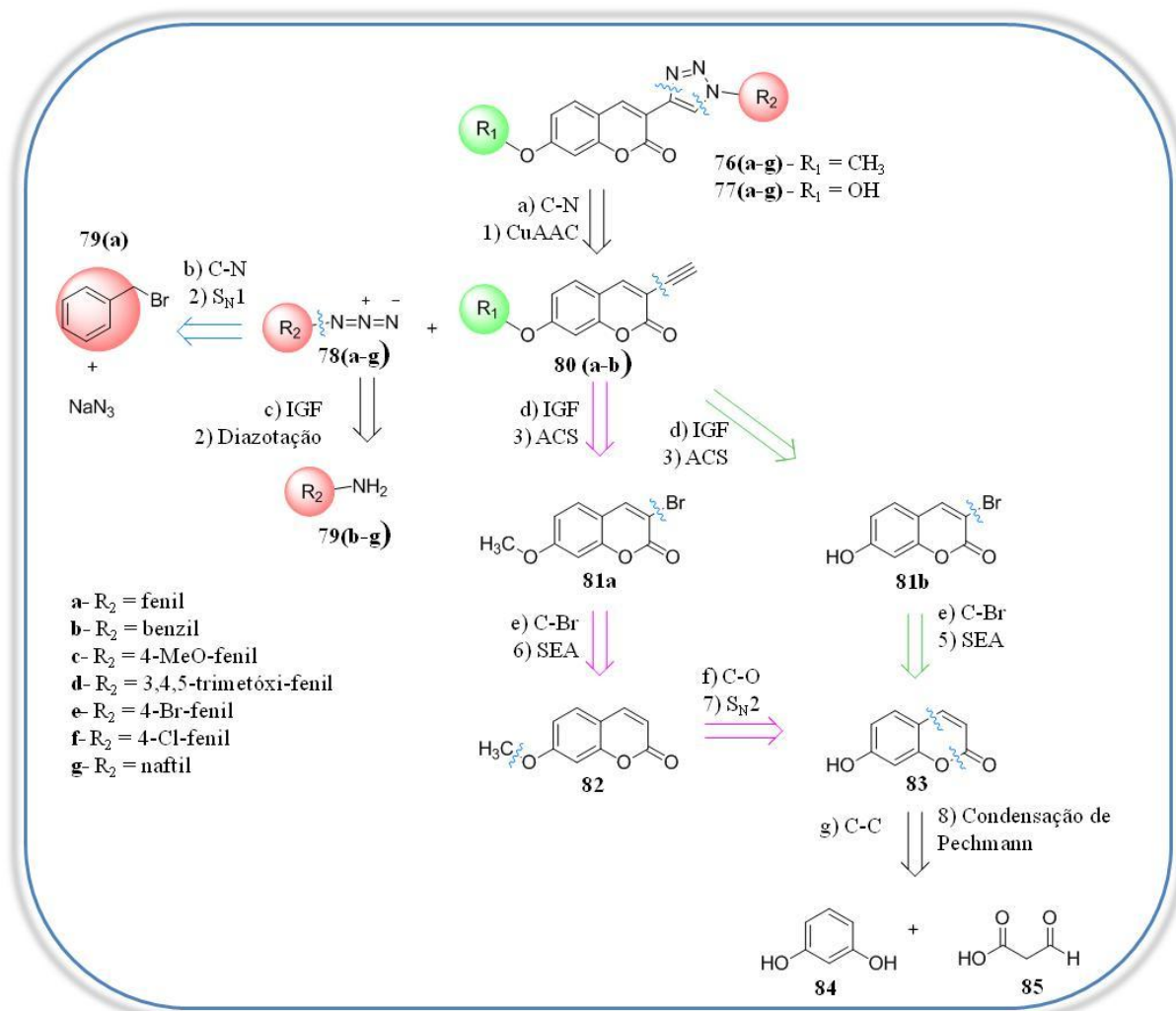
Através de uma desconexão C-N (etapa b), foi possível identificar o brometo de benzila como precursor da benzil-azida (**79a**), mediante uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) e a partir de uma interconversão de grupos funcionais (IGF) (etapa c), identificam-se as aminas aromáticas (**79b-g**) como precursores das respectivas azidas (**78b-g**), sendo tais azidas (**79b-g**) obtidas via reação de diazotação.

Após interconversões de grupos funcionais (IGF) (etapa d), observa-se que os compostos 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) têm como precursores as 3-Br-7-R₁-cumarina (**81a-c**), ao explorar a reação de acoplamento cruzado de Sonogashira (ACS). Entretanto, não é possível realizar tal reação utilizando acetileno, visto que, trata-se de um gás inflamável e muito perigoso. Assim, essa reação pode ser feita a partir de acetileno protegido com trimetilsilano, sendo necessário acrescentar a reação de desproteção do alcino.

Por meio de uma desconexão C-Br (etapa e) sobre a 3-bromo-7-R₁-cumarina (**81a-b**), identifica-se a 7-metoxi-cumarina (**82**) e 7-hidróxi-cumarina (**83**) como seus precursores respectivamente, explorando a substituição eletrofílica aromática para executar esta síntese. Prontamente, uma desconexão C-O (etapa f) sobre a 7-metoxi-cumarina (**82**), expõe o composto 7-hidroxi-cumarina (**83**) como seu precursor, a qual é obtida via reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Desse modo, a 7-hidroxi-cumarina é identificada como um intermediário comum dos compostos **81b e 82**.

Por fim, uma desconexão C-C e C-O sobre a 7-hidroxi-cumarina (**83**) (etapa g), aponta o resorcinol (**84**) e o ácido formilacético (**85**) como reagentes de partida para as duas séries, explorando a condensação de Pechmann. Entretanto, como o ácido formilacético é instável,

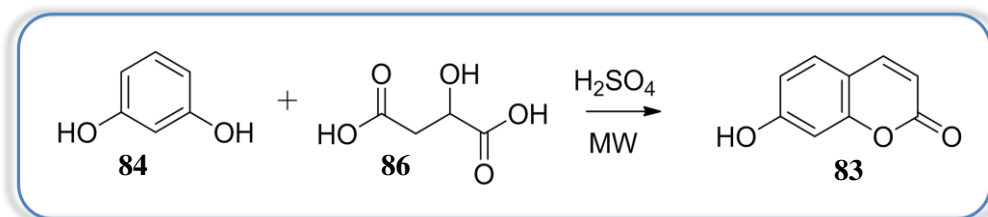
indica-se a utilização do ácido málico (**86**), o qual é capaz de gerar o ácido formilacético “*in situ*”.



Esquema 2: Análise retrosintética para obtenção das séries AN₁ e AN₂.

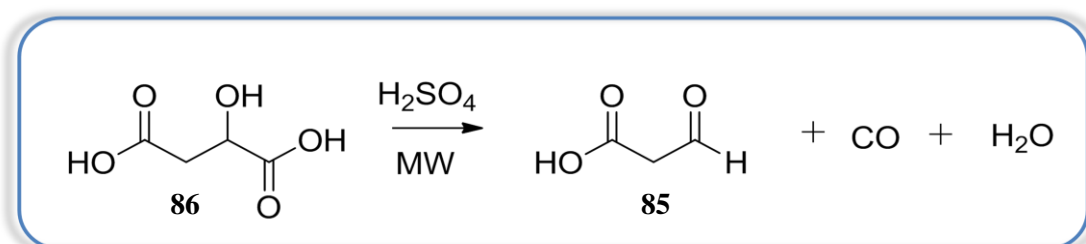
3.2 Síntese de 7-hidroxi-cumarina (**83**)

A síntese da 7-hidroxicumarina (**83**) foi realizada através da condensação de Pechmann (PECHMANN, 1884). Entretanto, não foi empregada a metodologia convencional por meio de aquecimento, visto que esta necessita de temperatura elevada, longo tempo reacional e resulta em baixos rendimentos. Desse modo, foi empregada a metodologia de síntese via irradiação de micro-ondas caseiro, desenvolvida pelo nosso grupo de trabalho (AMARAL & KUMMERLE, 2011), como exposto a seguir (Esquema 3). Através desta, foi obtido um sólido laranja com rendimento bruto igual a 80% e ponto de fusão igual a 235 °C (literatura igual a 230 °C).



Esquema 3: Síntese de 7-hidroxicumarina (**83**).

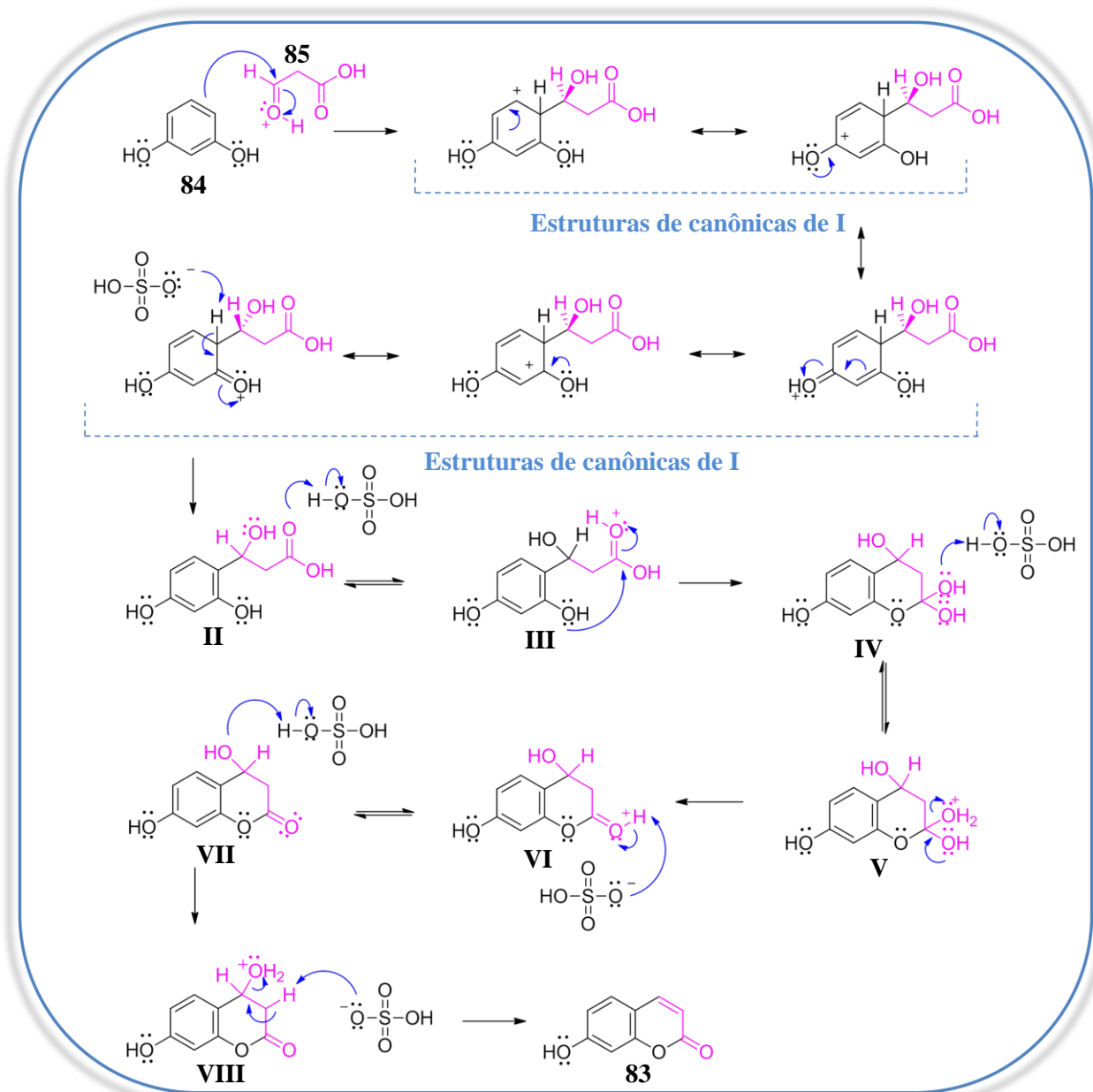
Para realizar esta condensação, foram utilizados resorcinol (**84**) e ácido málico (**85**) em meio de ácido sulfúrico, os quais foram irradiados na potência de 265 W e 30 segundos de reação, com 3 pulsos de 10 segundos no centro do prato (Esquema 3). Nesta reação, o ácido sulfúrico atua como catalisador e o ácido málico como um gerador *in situ* de ácido formilacético (**85**) (Esquema 4).



Esquema 4: Formação “*in situ*” do ácido formilacético a partir do ácido málico.

O mecanismo proposto (Esquema 5), inicialmente, ocorre com a formação *in situ* do ácido formilacético (**85**). Em seguida, ocorre uma substituição eletrofílica aromática, através do ataque dos elétrons π do resorcinol (**84**) ao carbono carbonílico do ácido formilacético (**86**) – ativado pelo catalisador ácido (Joule & Mills, 2010). Neste momento há a quebra de aromaticidade, no entanto, o intermediário catiônico **I** é estabilizado pelo efeito de ressonância. Seguidamente, uma base presente no meio abstrai o hidrogênio deste intermediário e, assim, os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para anel, restabelecendo a aromaticidade (**II**). Posteriormente, o ácido protona o oxigênio carboxílico do intermediário **II**, tornando o carbono carboxílico mais suscetível ao ataque nucleofílico (**III**). Subsequentemente, o oxigênio do resorcinol ataca o carbono carboxílico parcialmente positivo, resultando no intermediário **IV** que se encontra em equilíbrio com sua forma protonada **V**. Então, **V** elimina água, pois esta é considerada um bom grupo de saída – base fraca – seguida da formação do éster e abstração do hidrogênio da carbonila lactônica (**VI**). Por fim, a hidroxila do intermediário **VII** é protonada, levando ao intermediário

positivamente carregado **VIII**. Este, então, sofre a abstração do hidrogênio α à carbonila, seguida da eliminação de água e conseqüente formação da ligação dupla, levando à formação da 7-hidroxi-cumarina (**83**).



Esquema 5: Mecanismo proposto para formação da 7-hidroxi-cumarina (**83**) através da condensação de Pechmann (Adaptado de JOULE & MILLS, 2010).

Para confirmar a formação da 7-hidroxi-cumarina (**83**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C e espectrofotometria no IV (em anexo). Alguns sinais característicos possibilitaram a comprovação da formação deste composto, como o sinal simpleto em 10,61 ppm, referente ao hidrogênio fenólico (H_{OH}), e hidrogênios absorvendo na região característica de aromáticos 7,54 (d), 6,76 (d) e 6,72 (s) ppm, atribuídos

respectivamente aos hidrogênios H_5 , H_6 e H_8 . Estas atribuições foram feitas a partir da consideração que hidrogênios na posição *orto* em relação ao substituinte hidroxila possuem deslocamentos químicos em menores frequências, já que este substituinte é capaz de aumentar a densidade eletrônica por ressonância, blindando-os. Sendo assim, H_6 e H_8 absorvem em frequências menores. A diferenciação entre eles foi possível através da multiplicidade dos sinais, isto é, o duplo dubleto foi atribuído ao H_6 , pois este acopla com H_5 (J^3) e H_8 (J^5) e o dubleto ao H_8 , pois acopla apenas com H_8 (J^5) (anexo 1).

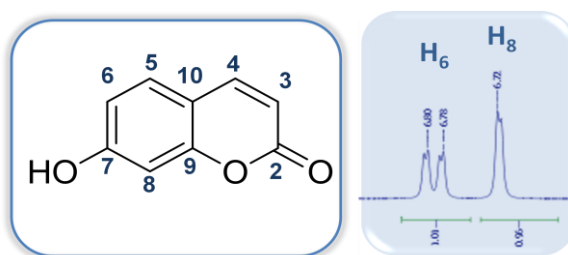


Figura 28: Multiplicidade dos sinais de H_6 (duplo dubleto) e H_8 (dubleto).

Também foram observados sinais em 6,21 e 7,94 ppm referentes aos deslocamentos químicos dos hidrogênios do anel lactônico. Tais hidrogênios encontram-se ligados à ligação dupla, logo, são desblindados devido ao campo anisotrópico dos elétrons π . Ademais, a diferença entre os deslocamento químico destes hidrogênios pode ser explicada pelo efeito de ressonância entre ligação dupla conjugada à carboxila do anel (Figura 29) (anexo 1).

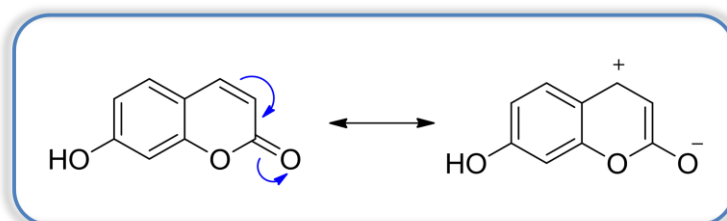


Figura 29: Efeito de ressonância entre a ligação dupla conjugada à carboxila do anel lactônico.

Nos espectros de RMN^{13}C da 7-hidroxi-cumarina (**83**) (anexo 2) observou-se o sinal de deslocamento químico em 161,75 ppm característico de carbono carboxílico. Além disso, foi indicada a presença de sinais característicos de anel aromáticos em 160,92, 156,00, 111,75 (carbonos quaternários), 130,20, 111,88 e 102,89 ppm (carbonos metínicos). Sugere-se que os sinais em 160,92 e 156,00 ppm correspondem aos carbonos quaternários C_7 e C_9 , pois estão diretamente ligados ao átomo de oxigênio, capaz de retirar elétrons por efeito indutivo, fazendo com que tais carbonos absorvam em frequências mais altas. Já os sinais em 111,88,

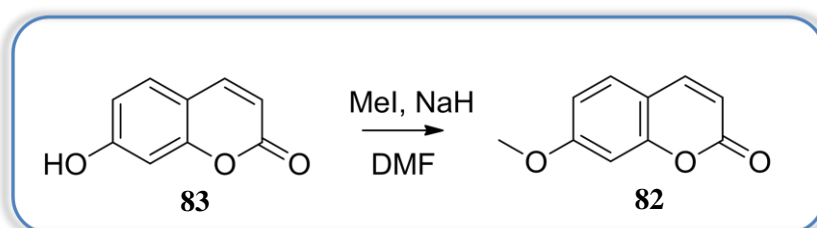
102,89 e 111,75 ppm são atribuídos aos carbonos C₆, C₈ e C₁₀ respectivamente, por estarem em posição *orto* ao substituinte hidroxila e/ou ao oxigênio lactônico e, conseqüentemente, serem blindados pelo efeito doador por ressonância característico deste grupamento (anexo 2).

Os sinais 113,5 e 145,02 ppm foram atribuídos aos C₃ e C₄ respectivamente. Estes valores de deslocamento químico são característicos de ligação dupla, porém a diferença entre estes valores pode ser considerada como consequência do efeito de ressonância entre ligação dupla conjugada à carboxila do anel, como observado para os hidrogênios equivalentes (Figura 29) (anexo 2).

3.3. Síntese de 7-metoxi-cumarina (82)

O composto 7-metoxi-cumarina (**82**) foi sintetizado via reação de *O*-metilação segundo o esquema abaixo (Esquema 6), o qual foi obtido como um sólido rosa de rendimento bruto igual a 70% e ponto de fusão igual a 114-116 °C (literatura igual à 117-118 °C).

A reação de *O*-metilação foi realizada a partir de 7-hidroxi-cumarina (**83**), hidreto de sódio (NaH) e iodeto de metila (MeI) em dimetilformamida (DMF), sob temperatura ambiente, na qual o NaH age como base e o MeI como fonte de metila eletrofílica (Esquema 6) (ZHAO *et al.*, 2012). É importante destacar, que a reação foi realizada em atmosfera inerte para que não ocorressem reações paralelas indesejadas, como reação ácido-base entre hidreto de sódio e água da atmosfera.

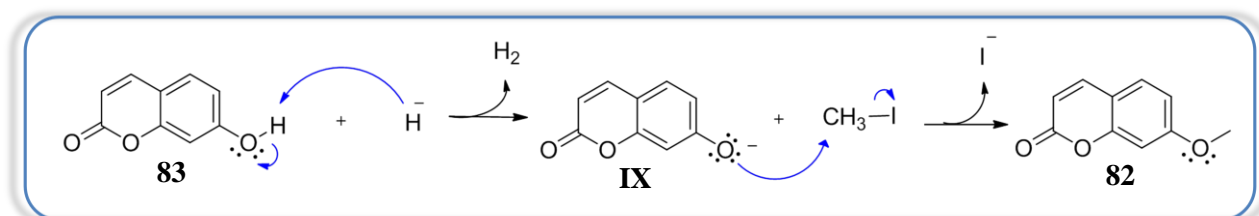


Esquema 6: Síntese de 7-metoxi-cumarina (**82**)

Inicialmente, seguindo o protocolo descrito por ZHAO e colaboradores, o rendimento máximo obtido nesta reação era de 63%. A fim de otimizar o rendimento, começou-se a evaporar 2/3 do solvente, já que supostamente o DMF poderia contribuir para a solubilização do composto de interesse em água. Além disso, era formado um precipitado fino, que se aglomerava lentamente. Desta forma, a etapa de filtração passou a ser realizada após 1 hora,

para que o sólido pudesse se aglomerar ao ponto de não passar pelo papel de filtro. Através destes procedimentos o rendimento aumentou 7%.

Como detalhado no mecanismo proposto (Esquema 7), inicialmente o hidreto abstrai o próton da hidroxila da 7-hidroxi-cumarina (**83**), formando gás hidrogênio e a 7-oxi-umbeliferona (**IX**). Em seguida, ocorre uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), na qual a 7-oxi-cumarina formada atua como nucleófilo e ataca o carbono ligado ao iodo. De maneira concertada, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-I vai se rompendo, até o iodeto ser liberado e assim formar a 7-metoxi-umbeliferona (**82**) (Esquema 7) (CAREY & SUNDBERG, 2008).



Esquema 7: Mecanismo proposto para formação de 7-metoxi-cumarina (**82**) (Adaptado de CAREY & SUNDBERG, 2007).

A fim de se determinar a formação da 7-metoxi-cumarina (**82**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C e espectrofotometria no IV (em anexo). O principal indicativo da formação deste composto foi a presença do sinal simpleto em 3,95 ppm com integração igual a três hidrogênios no espectro de RMN ^1H e o sinal de metila em 55,42 ppm no espectro de RMN ^{13}C , característicos do grupamento metoxila (Figura 30). Ademais, no espectro de RMN ^1H não foi observado o sinal referente ao hidrogênio da hidroxila fenólica presente no produto de partida (**83**), fato este que também corrobora para a confirmação da obtenção da 7-metoxi-cumarina (**82**) (anexo 3 e 4).

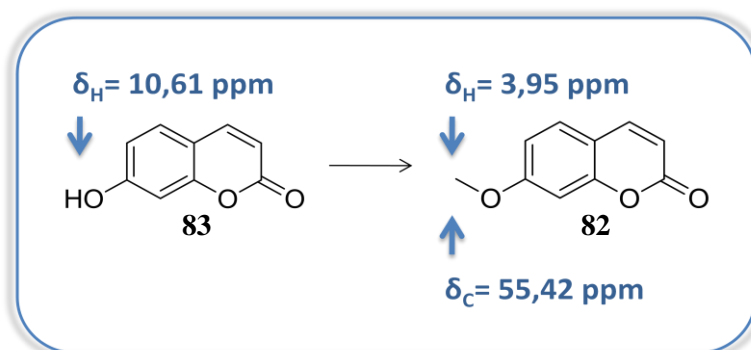
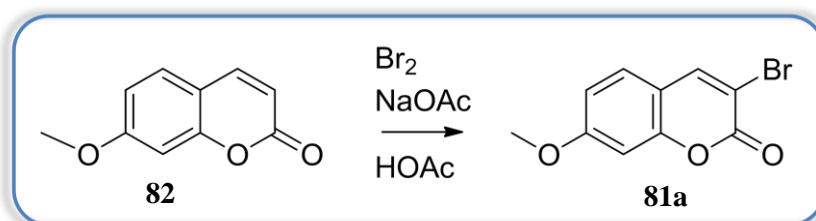


Figura 30: Atribuição comparativa dos principais sinais dos compostos 7-metoxi-cumarina (**83**) e 7-metoxi-cumarina (**82**) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C

3.4. Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**)

O composto 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) foi sintetizado através da reação de bromação segundo o esquema abaixo (Esquema 8), o qual foi obtido como um sólido laranja claro com rendimento bruto igual a 73% e ponto de fusão entre 158-161°C (literatura igual a 158-160 °C). A reação de bromação foi realizada a partir do tratamento da 7-metoxi-cumarina (**82**), com bromo (Br₂) em ácido acético (HOAc) sob temperatura ambiente (Esquema 8) (PETER *et al.*, 2007).



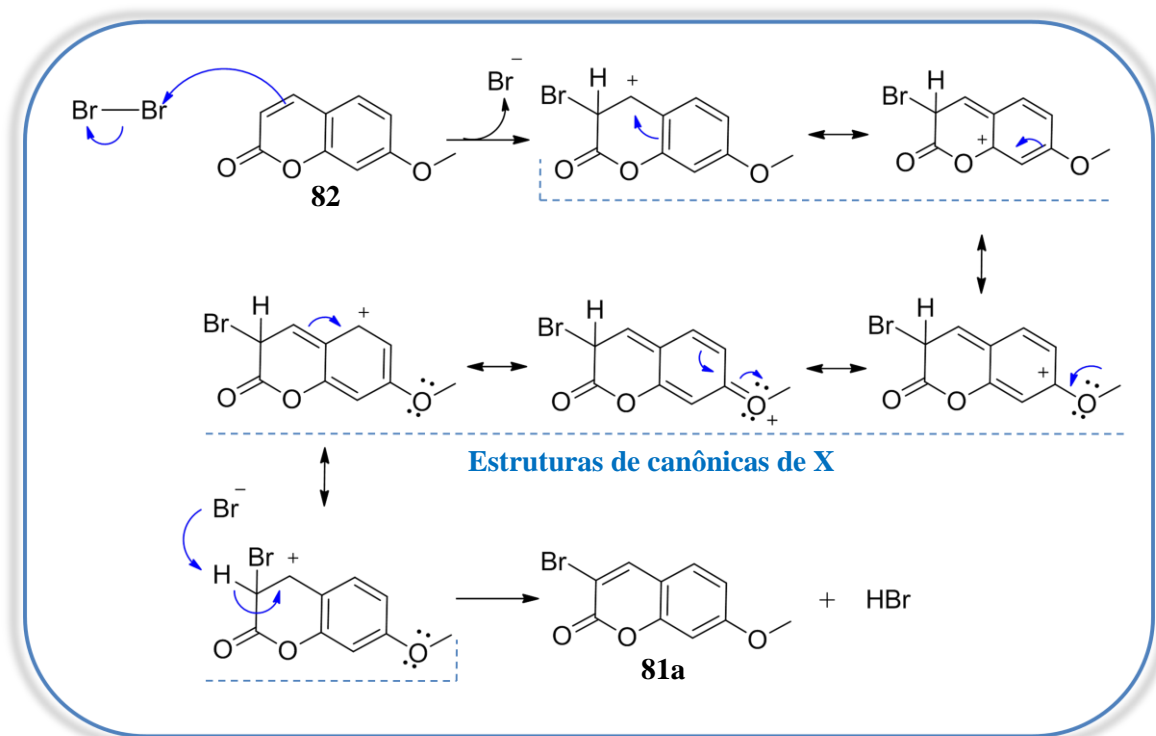
Esquema 8: Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**).

Nesta reação, o átomo de halogênio é inserido primeiramente na posição-3 do anel da piranona, porém, bromações subsequentes podem ocorrer no anel benzênico (SETHNA & SHAH, 1944). Inicialmente, a fim de evitar dibromações, foi utilizado *N*-bromossuccinimida (NBS) como fonte de bromo (ZHAO *et al.*, 2012), já que este reagente tem como característica a liberação lenta de bromo (CLAYDEN *et al.*, 2001). Contudo, ao monitorar a reação por cromatografia de camada fina analítica (CCFA), era observado que a reação não se completava e, principalmente, o reagente estava sempre em maior proporção que produto. Então, a metodologia foi alterada, utilizando para este fim bromo molecular, como já citado (PETER *et al.*, 2007). A adição do bromo foi feita lentamente e com cuidado para não usar excesso, evitando, assim, a dibromação.

Neste momento da discussão, vale ressaltar que o composto 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**) não pôde ser obtido como previamente planejado através da análise retrossintética. Foi realizada uma tentativa de síntese empregando a metodologia de bromação sugerida anteriormente (Esquema 8), entretanto, os espectros de RMN ¹H e ¹³C obtidos não confirmaram o composto (**81b**). Ao consultar a literatura, foi constatado que a bromação em 7-hidroxi-cumarina (**82**) não é restrita apenas à posição 3 no anel de piranona, ocorrendo também em grande extensão no anel benzênico devido a grande ativação frente à SEA gerada pela hidroxila. Desse modo, sugeriu-se superar esta dificuldade através da proteção do

grupamento hidroxila por grupamentos metila, obtendo um composto menos reativo (SETHNA & SHAH, 1944). A obtenção da (**81b**) ocorreu, então, através da desproteção da 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**), tornando, assim, este composto o intermediário chave da síntese das duas séries.

O mecanismo proposto para a bromação decorre de uma substituição eletrofílica aromática (SETHNA & SHAH, 1944), como é detalhada abaixo (Esquema 9). Como o átomo de bromo é volumoso, pode sofrer polarização e por isso a região de densidade eletrônica parcialmente positiva pode sofrer ataque dos elétrons π do anel piranona da 7-metoxi-umbeliferona (**82**), causando a ruptura da aromaticidade ao formar o intermediário catiônico (**X**). Então, este intermediário é estabilizado pela deslocalização da carga positiva pelos anéis da cumarina, representados pelas formas ressonantes (canônicas). Na etapa seguinte, uma base presente no meio abstrai o hidrogênio do intermediário catiônico e os elétrons que faziam parte da ligação com o próton migram para o anel, restabelecendo a aromaticidade e consequentemente formando o composto 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 9: Mecanismo proposto para formação de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

Com o propósito de determinar a formação da 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C e espectrofotometria no IV (em anexo). Ao observar o espectro de RMN ^1H (anexo 5), ficou evidente a ausência do sinal duplete, equivalente ao H_3 presente no espectro produto de partida (**82**). Além disso, o H_4 aparece como um singlete já que não há hidrogênio adjacente para que este se acople e seja observado um sinal duplete. Outro indicativo de formação do produto provém do espectro de RMN ^{13}C (anexo 6), no qual é identificada a presença de um sinal referente a um carbono quaternário, antes não observado no produto de partida e a ausência do sinal carbono metínico C_3 (Figura 31).

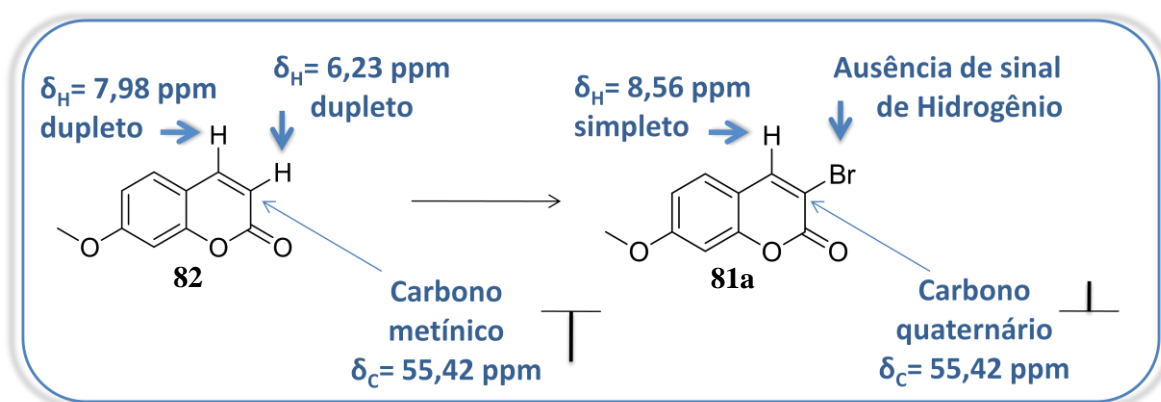


Figura 31: Comparação entre os principais sinais da 7-metoxi-cumarina (**82**) e 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) no espectro de RMN ^1H e ^{13}C .

Anteriormente fora descrito que a adição do bromo poderia ocorrer no anel benzênico. Entretanto, o resultado do RMN ^1H indica a bromação seletiva no C_3 do anel de piranona, uma vez que se observa um duplo duplete referente ao H_6 , cujas constantes de acoplamento são: 8,7 Hz referente ao acoplamento com o H_5 por três ligações (J^3) e 2,4 Hz relacionada ao acoplamento em W (J^5), confirmando que não ocorreu bromação no C_5 (Figura 32).

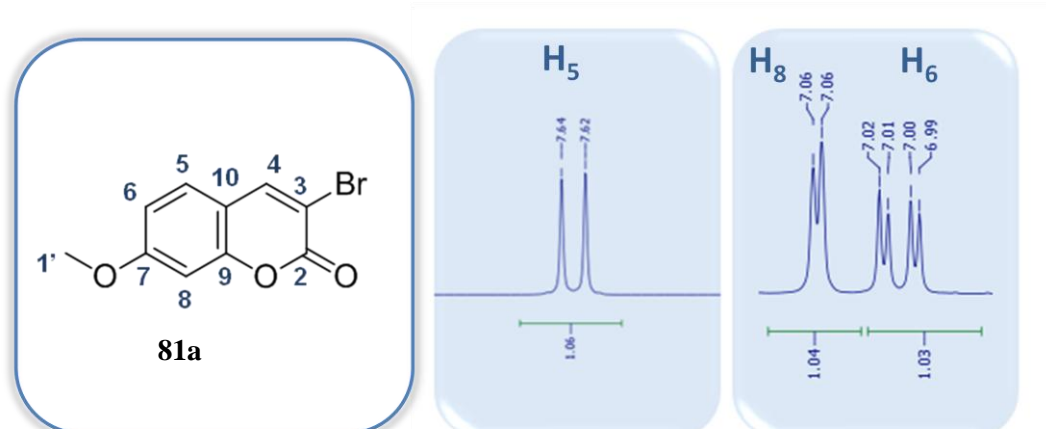
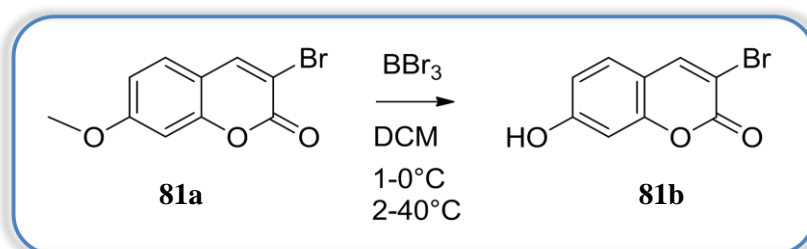


Figura 32: Separação de spin dos hidrogênios H₅, H₈ e H₆ do composto e 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) no espectro de RMN ¹H.

3.5. Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**)

A síntese do composto 3-bromo-7-hidroxi-cumarina foi satisfatoriamente realizada a partir da reação de *O*-demetilação. Foi obtido um sólido de coloração rosa claro, com rendimento de 74% e ponto de fusão igual a 285 °C.

A reação de *O*-demetilação foi realizada a partir do intermediário chave 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) na presença de tribrometo de boro (BBr₃) em diclorometano (DCM), com extrema atenção, já que o BBr₃ é um líquido volátil e fumegante, a fim de evitar acidentes no laboratório (Esquema 10) (ZHAO *et al.*, 2012).



Esquema 10: Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**).

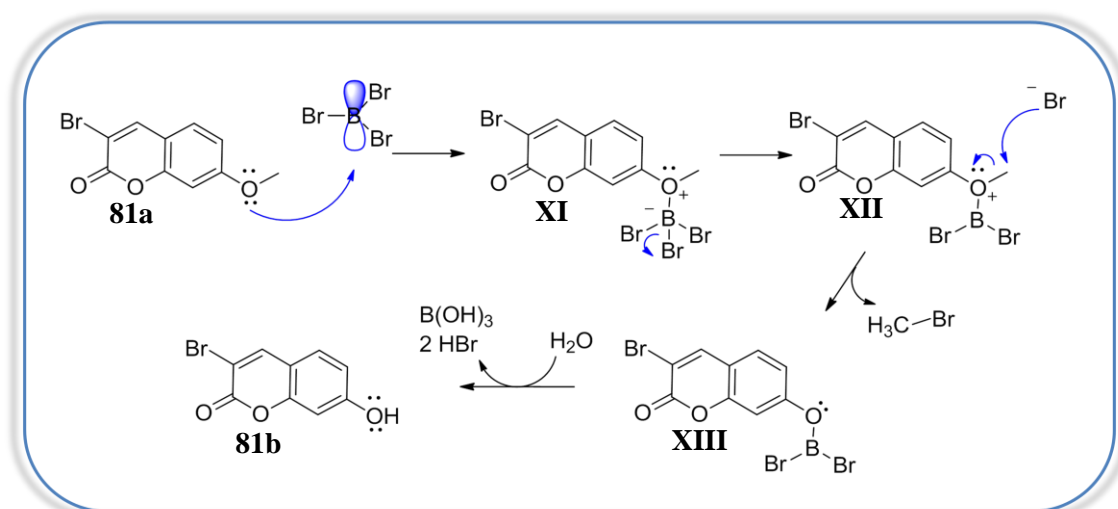
Foi observado através de monitoramento da reação por CCFA, que quando se utilizava 150 mg de 3-bromo-7-metoxi-cumarina, a reação findava em 12 horas, com consumo total do produto de partida. Entretanto, ao aumentar a escala para 600 mg, o mesmo não ocorria, a reação não se completava nem mesmo dentro de um período de 24 horas. Este fato dificultou a obtenção do composto 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**), visto que era necessário

reproduzir repetidas vezes esta síntese, cuidadosamente, a fim de acumular este intermediário para a obtenção das séries AN₂.

Durante os experimentos, também foi testada a desproteção dos compostos 80a e 76a, utilizando BBr₃ e temperatura igual à -78 °C (MYUNG *et al*, 2014). Entretanto, não foi obtido sucesso, já que ambos os produtos de partida foram degradados, sendo observadas manchas retidas na origem nas respectivas placas de CCFA, mesmo após utilizar eluente com elevada força de eluição (dicloro/metanol 10%).

Os éteres são compostos estáveis frente a nucleófilos, mas é possível fazer com que eles reajam ao lançar mão de ácidos próticos ou de Lewis. O BBr₃ é considerado um ácido de Lewis, pois possui um orbital p vazio, sendo ele muito eletrofílico e tendo preferência por atacar o átomo de oxigênio (CLAYDEN *et al*, 2001).

O mecanismo de *O*-demetilação é apresentado pelo esquema 11, no qual os elétrons proveniente do oxigênio do éter atacam o orbital vazio do ácido Lewis, BBr₃, formando o intermediário **XI**. Em seguida, ocorre a eliminação de um equivalente de brometo, originando o intermediário **XII**. Nesse momento, ocorre uma reação S_N2, no qual o brometo ataca o átomo de carbono mais suscetível. Como trata-se de um anel aromático, não é possível o ataque nucleofílico ao carbono pertencente a esse anel. Sendo assim, o ataque ocorre ao carbono metílico onde, simultaneamente, a ligação nucleófilo-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-O vai se rompendo, até a liberação do brometo de metila e formação do intermediário dibromo(organo)borano **XIII**. O dibromo(organo)borano sofre hidrólise para gerar o composto 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**), tri-hidróxido de boro (B(OH)₃) e ácido bromídrico (HBr) (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 11: Mecanismo proposto para reação de *O*-demetilação para obtenção de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

Para confirmar a formação da 3-Br-7-hidroxi-cumarina foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ^1H e ^{13}C e espectrofotometria no IV (em anexo). O sinal simpleto em 10,75 ppm referente ao hidrogênio fenólico (H_{OH}) contribui para provar a formação deste compostos no espectro de RMN ^1H . Além disso, não é observado sinais referentes à presença da metoxila no espectro de RMN ^1H (entre 3,2- 4,0 ppm) e nem no espectro de RMN ^{13}C (entre 50- 65 ppm) (Figura 33) (anexo 7).

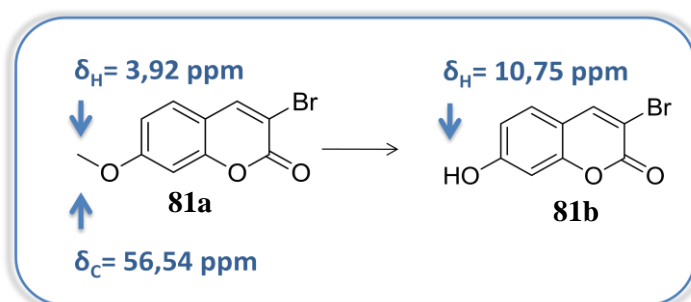
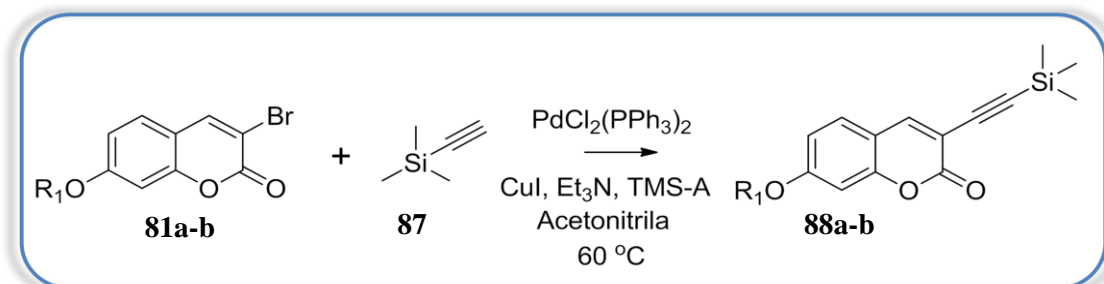


Figura 33: Comparação entre os principais sinais da 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) e 3-bromo-7- hidroxi -cumarina (**81b**) no espectro de RMN ^1H e ^{13}C .

3.6. Síntese de 7- R_1 -3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**)

Os compostos 7- R_1 -3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) foram satisfatoriamente obtidos como mostrado no esquema 12, lançando mão da reação de acoplamento cruzamento de Sonogashira a partir da 7- R_1 -3-Br-cumarina (**81a-b**), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio(II), iodeto de cobre, trietilamina e trimetilsililacetileno (TMS-A) (**87**) em acetonitrila à 60 °C (YEE *et al.*, 2006). O composto **80a** apresentou-se como um sólido de coloração amarela após purificação em coluna flash e utilizando hexano/acetato de etila 9:1 como eluente. O rendimento obtido para este composto foi razoável (59%) e o ponto de fusão determinado como 135 °C. Já o composto **80b** foi obtido como um óleo marrom após purificação em coluna flash utilizando hexano/acetato de etila 7:3 como eluente com rendimento também razoável de 53%.



Esquema 12: Síntese de 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**).

Para a síntese de 7-R₁-3-(etenil)-cumarina (**80a-b**), seria necessária a utilização de acetileno como bloco de construção de dois carbonos, no entanto, sua manipulação não é conveniente, pois é um gás explosivo. Desse modo, foi utilizado TMS-A, um líquido destilável de fácil manipulação como substituto do acetileno. Assim sendo, se obtêm os compostos **88a-b**, que necessitam ser desprotegidos, para se obter o composto **80a-b** inicialmente desejado.

Ao monitorar a reação de síntese da 7-metoxi-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a**) por CCFA ficou evidente que a reação não se completava totalmente, sendo observado um resquício da 7-metoxi-3-bromo-cumarina (**81a**). A fim de contornar essa questão, foi aumentado o tempo de reação de 30 minutos para 2 horas e a quantidade dos reagentes. Entretanto, o resíduo do composto de partida ainda permanecia. Além disso, observou-se que quanto mais tempo a reação durava, mais impurezas eram formadas, tornando notável a necessidade de realizar a purificação deste produto. Este comportamento também foi observado na síntese da 7-hidroxi-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88b**). Também é importante destacar que o solvente originalmente utilizado na literatura, DMF, foi alterado por outro solvente aprótico, acetonitrila, para facilitar a etapa de extração, visto que a acetonitrila (PE= 82 °C) é evaporada mais facilmente que o DMF (PE= 153 °C).

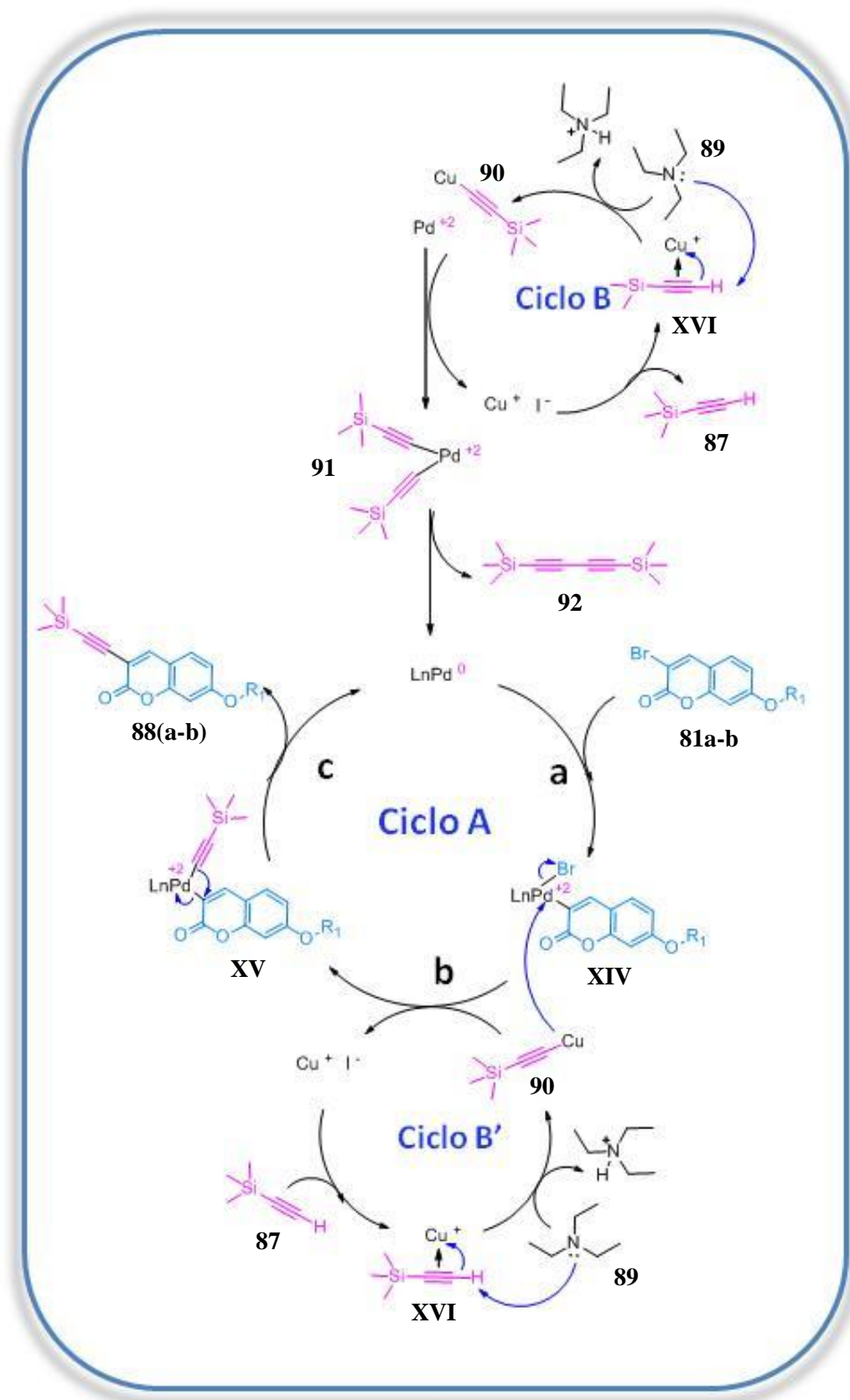
A reação de acoplamento cruzado de Sonogashira é uma eficiente ferramenta sintética para a construção de ligações C_{sp2}-C_{sp}, que resulta em compostos acetilênicos dissubstituídos. Trata-se de um acoplamento cruzado entre haletos de vinila ou arila com acetilenos terminais catalisado por complexos de paládio (0) e co-catalisado por sais de cobre (I) na presença de uma base (SONOGASHIRA *et al*, 1975).

O mecanismo da reação de acoplamento de Sonogashira ainda não é exatamente conhecido (SONOGASHIRA *et al*, 1975), nem mesmo a estrutura da espécie catalítica ativa e

o preciso envolvimento do CuI como catalisador (SONOGASHIRA *et al*, 1975). No entanto, o mecanismo mais aceito combina três ciclos catalíticos (A, B e B'), envolvendo os processos de adição oxidativa e eliminação redutiva (Esquema 13) (SONOGASHIRA *et al*, 2002).

Primeiramente, o complexo PdCl₂(PPh₃)₂ reage com dois equivalentes do acetileto de cobre (**90**), oriundo do ciclo B, para formar o bis(trifenilfosfina)dialquinil de paládio(II) (**91**), que por sua vez sofre eliminação redutiva resultando na formação do 1,3-butadiino (**92**) e da espécie catalítica ativa, bis-trifenilfosfina) de paládio(0) (Pd(PPh₃)₂). O ciclo catalítico do paládio (A) inicia-se com a adição oxidativa da 3-bromo-7-R-cumarina (**81a-b**), (etapa a), levando a formação do intermediário de paládio (II) (**XIV**). Em seguida, este intermediário sofre transmetalção (etapa b) com o acetileto de cobre, oriundo do ciclo B', resultando no intermediário (**XV**). Por fim, a partir da eliminação redutiva (etapa c), o produto final acoplado é formado, 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**), e o catalisador de paládio, Pd(PPh₃)₂, é regenerado (SONOGASHIRA *et al*, 2002).

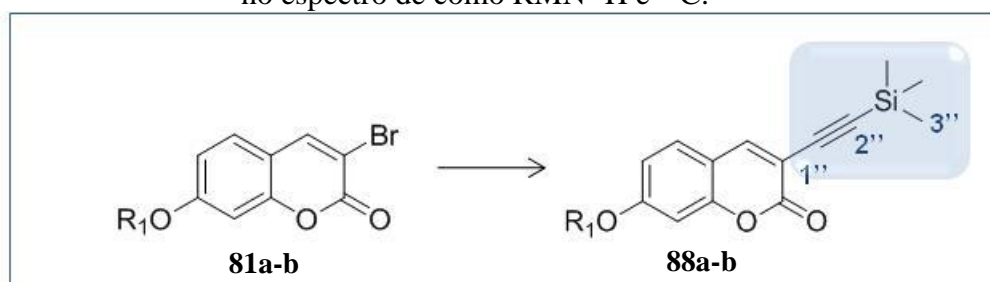
A formação do acetileto de cobre (**90**), utilizado na alquinição do complexo PdCl₂(PPh₃)₂ e na transmetalção do intermediário (**XIV**), ocorre através da catálise de cobre na presença da base, Et₃N (ciclo B e B'). Estes ciclos iniciam-se a partir da interação entre o Cu(I) e a ligação tripla do TMS-acetileno (**87**), que resulta na formação do complexo (**XVI**). Tal complexo torna o hidrogênio ligado ao carbono *sp* mais ácido, devido a capacidade do cobre de estabilizar carga negativa, já que possui propriedade eletropositiva. Este fato possibilita a desprotonação deste complexo pela Et₃N (**89**), resultando na formação do acetileto de cobre (**90**) (KURT, 2005).



Esquema 13: Mecanismo proposto para reação acoplamento de Sonogashira para obtenção de 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) (Adaptado de SONOGASHIRA *et al.*, 2002).

Para confirmar a formação 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C e espectrofotometria no IV (em anexo). Foram identificados sinais no espectro de RMN ¹H e ¹³C que não existiam nos espectros dos respectivos produtos de partida (**81a-b**) (Tabela 1). No espectro RMN ¹³C foram observados sinais referentes a carbonos quaternários C_{1''} e C_{2''}, entre 98 a 102 ppm, correspondendo aos carbonos da ligação tripla. Também foram identificados sinais referentes à presença da metila ligada ao silício no espectro de RMN ¹³C (entre -0,21- 0,25 ppm) e no espectro de RMN ¹H integrando 9 hidrogênios (entre 0,25- 0,30 ppm), estes valores encontram-se em campo mais baixos porque o Si possui características eletropositivas blindando, assim, as metilas. Estas evidências somadas confirmam a obtenção da 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) (anexos 9 e 10).

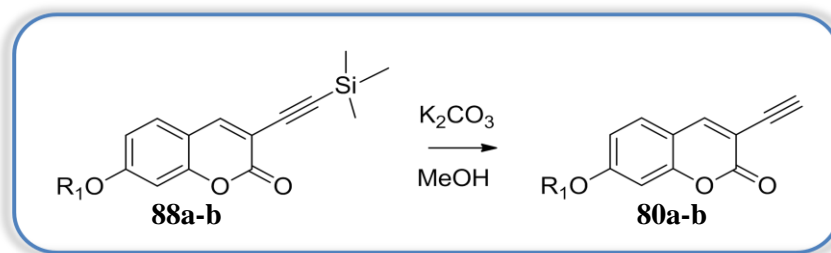
Tabela 1: Atribuições dos principais sinais da e 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) no espectro de como RMN ¹H e ¹³C.



Composto	R ₁	H _{3''}	C _{1''}	C _{2''}	C _{3''}
88a	Meo	0,25	99,49	100,08	0,23
88b	OH	0,28	98,33	101,16	-0,21

3.7. Síntese de 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**)

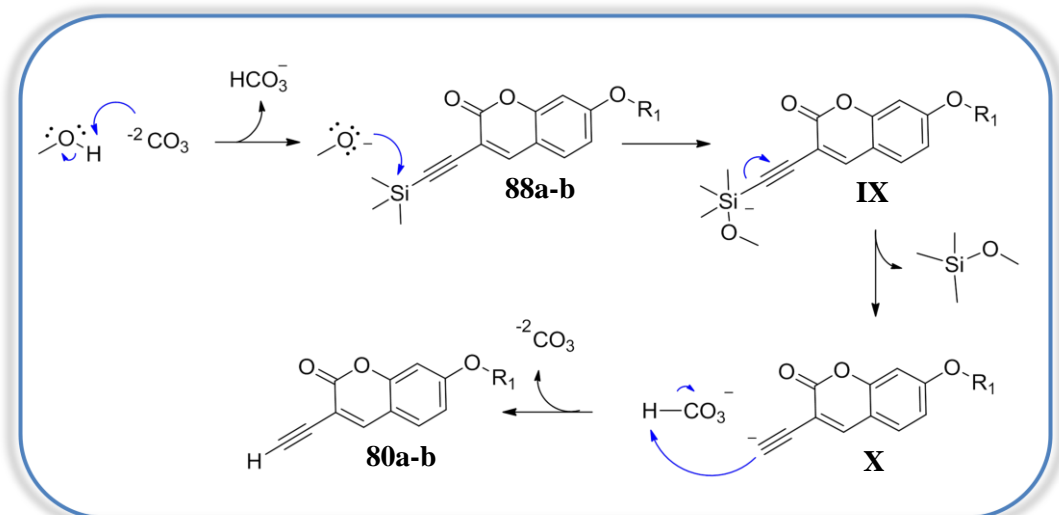
Os compostos 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) foram sintetizados como exibido no esquema a seguir (Esquema 14), a partir de reação dos compostos contendo os acetilenos protegidos com o grupamento trimetilsilila e carbonato de potássio em metanol (GAO *et al.*, 2013). Os compostos foram obtidos como sólidos marrons e rendimento bruto igual a 73% e 90% respectivamente. O valor de ponto de fusão de cada composto foi determinado, sendo 162-165 °C para os compostos **80a** e igual a 293 °C com degradação para o **80b**.



Esquema 14: Síntese de 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**).

A reação foi satisfatoriamente realizada para os dois compostos, visto que ao monitorar a reação por CCFA observou-se que os compostos de partida foram totalmente consumidos. Entretanto, ao proceder com a extração do composto (**80b**), foi observado que este permanecia dissolvido na água. Este detalhe indicou que provavelmente o composto (**80b**) estivesse ionizado, já que o meio reacional estava altamente alcalino. Logo, antes de realizar a extração, o pH foi ajustado para o valor igual a 7, eliminando assim o problema.

O mecanismo proposto para esta reação é apresentado abaixo (Esquema 15). Inicialmente, a partir de uma reação ácido-base, na qual ocorre a abstração do próton do metanol pelo carbonato (CO_3^{2-}), forma-se o ânion metoxila e um bicarbonato (HCO_3^-), sendo estabelecido um equilíbrio entre os reagentes e os produtos formados ($K_{\text{eq}} = 3,7 \times 10^{-35}$ a 298 K). Tendo em vista que, os grupamentos trimetilsilila são eletrófilos duros, estes irão reagir rapidamente com nucleófilos duros, como oxigênio. Sendo assim, o metoxilato ataca o silício formando um intermediário de geometria bipirâmide trigonal (**XVII**), no qual o silício está pentacoordenado e carregado negativamente. Este ataque é facilitado devido às longas ligações entre Si-C, que diminuem o efeito estérico. Em seguida, ocorre a liberação do ânion acetilênico, já que este é um bom grupo abandonador. Por fim, o ânion acetilênico abstrai um próton do bicarbonato, formando o composto 3-etenil-7-R₁-cumarina **80a-b** (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 15: Mecanismo proposto para a obtenção da 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

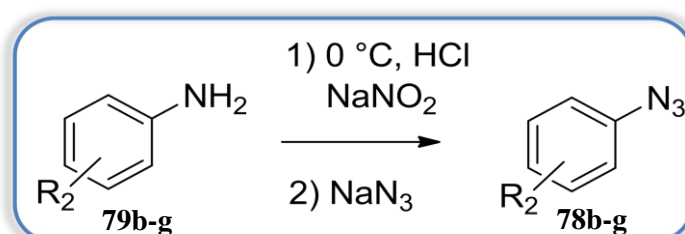
Para confirmar a formação da 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como RMN ¹H e ¹³C e espectrofotometria no IV (em anexo). Primeiramente, constatou-se que os sinais referentes à metila da trimetilsilila estavam ausentes nos espectros de RMN ¹H e ¹³C dos compostos **80a-b** (Tabela 2). Além disso, no espectro de RMN ¹H, foi identificado o sinal simpleto integrando um hidrogênio próximo da região caracterísitica de hidrogênios acetilênicos (Tabela 2). Por fim, outro indicativo da formação do produto provém do espectro de RMN ¹³C foi a identificação de um sinal de carbono metínico correspondendo ao C₂' (85,87 ppm), sendo que antes no produto de partida, este carbono apresentava-se como sinal equivalente a um carbono quaternário, não mais observado neste espectro de RMN ¹³C (Tabela 2). Estas observações possibilitam afirmar que os compostos 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) foram obtidos.

Tabela 2: Atribuição dos principais sinais da 7-R₁-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) e 3-etenil-7-R₁-cumarina (**80a-b**) no espectro de RMN ¹H e ¹³C.

Composto	R ₁	H ₂ ''	C ₁ ''	C ₂ ''
80a	Meo	4,44	78,65	85,87
80b	OH	4,01	-	-

3.8. Síntese de Azidas aromáticas (**78b-g**)

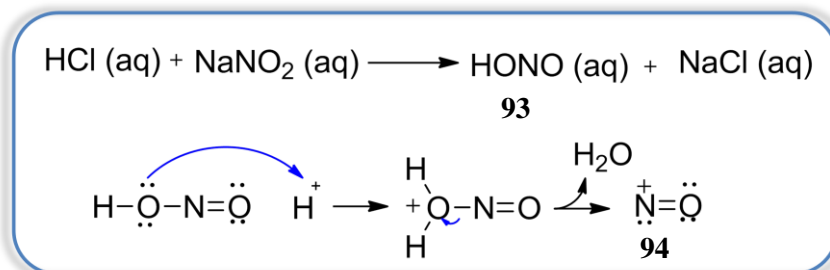
As azidas (**78b-g**) foram obtidas através da reação entre os íons diazônicos correspondentes e azida de sódio. Estes íons foram sintetizados via reação de diazotação a partir de aminas aromáticas, nitrito de sódio e ácido clorídrico em temperatura igual a 0 °C (Esquema 16) (CHENG *et al.*, 2012). Tais azidas foram obtidas como óleos de coloração entre amarelo-marrons e rendimento entre 75-81%.



Esquema 16: Síntese de azidas aromáticas (**78b-g**)

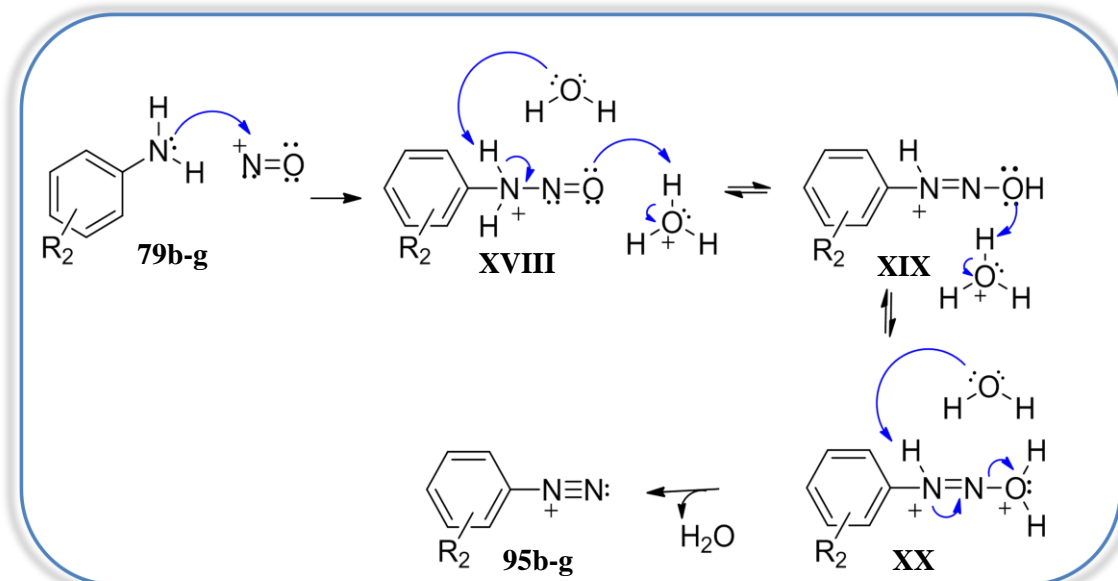
A reação de diazotação envolve o tratamento de aminas primárias com ácido nitroso (HONO) resultando na formação do respectivo sal diazônico. O íon diazônio é instável e a temperatura pode decompor-se, e liberar N₂. No entanto, este íon tem estabilidade suficiente em solução aquosa entre 0 e 5 °C (CLAYDEN *et al.*, 2001). Logo, a temperatura foi rigorosamente controlada, para que permanecesse nesta faixa. Além disso, mesmo respeitando a temperaturas dos banhos de gelo, após sua preparação, estes os íons diazônicos foram, imediatamente, utilizados na síntese das azidas sem serem isolados.

O mecanismo da diazotação inicia-se com a formação *in situ* do HONO (**93**), a partir da reação entre NaNO_2 e HCl . O HONO, por sua vez, dissocia-se para produzir o íon nitrosônio (**94**) (Esquema 17) (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 17: Mecanismo proposto para a formação do HONO (**93**) *in situ* (CLAYDEN *et al*, 2001).

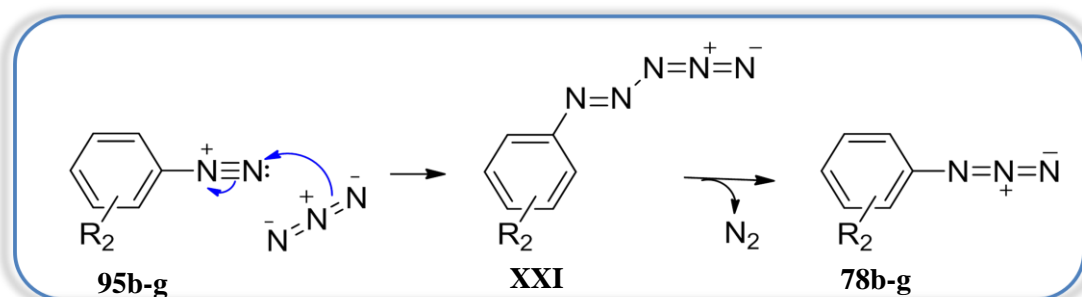
Em seguida, íon NO^+ (**94**) sofre ataque do par de elétrons do nitrogênio da amina (**79b-g**), levando a formação do íon *N*-nitrosamônio instável (**XVIII**). Por sua vez, este intermediário perde um próton, seguida da eliminação de água, resultando no diazoidróxido (**XIX**). Este na presença de ácido é protonado (**XX**) e, posteriormente, perde água para formar o íon diazônio (**95b-g**) (CLAYDEN *et al*, 2001).



Esquema 18: Mecanismo proposto para a formação de sais diazônicos (**95b-g**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

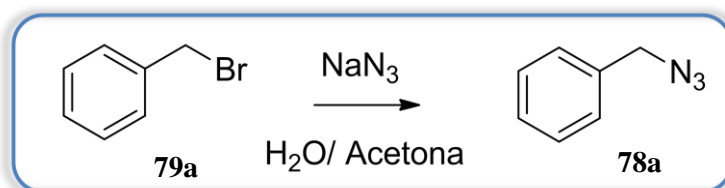
A natureza dos intermediários, da etapa que se segue, tem sido objeto de discussão desde a sua descoberta. Há um consenso que a azida, agindo como nucleófilo, ataca o íon de arenodiazônio, eletrófilo fraco, resultando na formação do intermediário penta nitrogenado (**XXI**), seguida da eliminação de uma molécula de nitrogênio, o que resulta na formação da

azida (**78b-g**). Estudos espectroscópicos de RMN ^1H estabeleceram a existência das três formas isoméricas do intermediário (**XXI**), ou seja, a (Z, E), (E, E) e (E, Z), sendo o isômero (Z, E) o mais favorável (BUTLER *et al*, 1998).



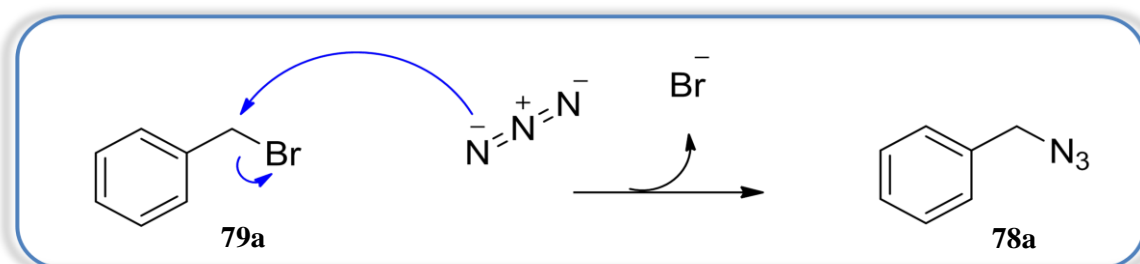
Esquema 19: Mecanismo proposto para a formação da azidas (**78b-g**) a partir dos respectivos sais diazônicos (Adaptado de BUTLER *et al*, 1998).

Já a benzilazida (**78a**) foi sintetizada via reação de substituição nucleofílica entre azida de sódio e o brometo de benzila em um mistura de água/acetona (Esquema 20) (HONG *et al.*, 2013). Esta azida foi obtida como óleo de coloração amarela e rendimento igual a 78%.



Esquema 20: Síntese de azidas (**78a**).

O mecanismo proposto para a síntese da benzil azida (**78a**) passa por uma substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$) (Esquema 21) (SMITH & MARCH, 2007). Na primeira etapa, a azida, considerada um bom nucleófilo, ataca o carbono ligado ao brometo (**79a**). Concertadamente, a ligação N-carbono vai se formando, enquanto a ligação C-Br vai se rompendo, até o brometo, bom grupo de saída, ser eliminado e assim formar a benzil azida (**78a**).

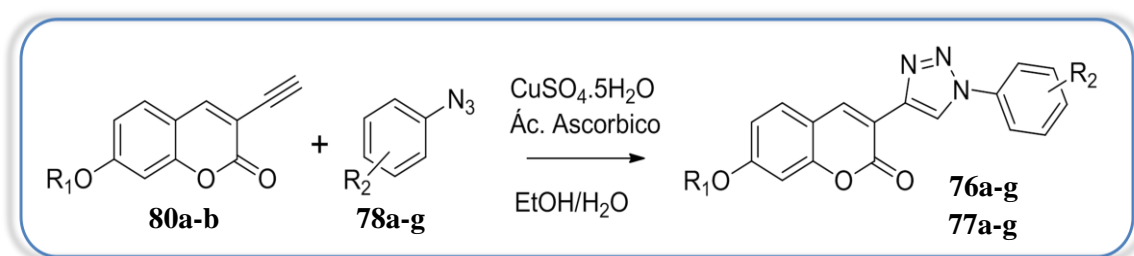


Esquema 21: Mecanismo proposto para a obtenção da azidas (**78a**) (Adaptado de SMITH & MARCH, 2007).

Optou-se por não caracterizar as azidas sintetizadas, pois estas são descritas como substâncias instáveis, logo, degradariam até o momento em que fossem analisadas.

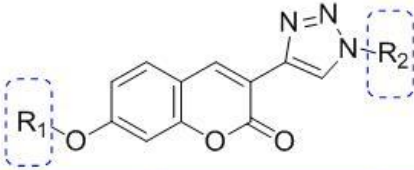
3.9. Síntese de 7-R₁-3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₂)-cumarina (76a-g) e (77a-g)

Os compostos triazólicos (76a-g) e (77a-g) foram sintetizados através da reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre (I) lançando mão das 3-etenil-7-R-cumarinas e das azidas aromáticas, previamente, sintetizadas (Esquema 22) (SIVAKUMAR *et al.*, 2004). Como fonte de cobre foi utilizado sulfato de cobre (II) (CuSO₄) e o ácido ascórbico, que desempenha a função de agente redutor responsável por gerar a espécie ativa Cu (I). Foram obtidos 12 compostos sólidos com rendimento bruto entre bom e ótimo, compreendendo a faixa entre 80-94% (Tabela 3). Entretanto, a reação de cicloadição levava a produtos de degradação e apenas os compostos 76a-g (AN1) e 77d (AN2) foram satisfatoriamente purificados em coluna flash, sendo utilizado como eluente tolueno/éter 5% e dicloro/metanol 5% respectivamente. O valor de ponto de fusão e pureza para cada composto sintetizado encontram-se na tabela a seguir (Tabela 3) (anexo 46-53).



Esquema 22: Síntese de 7-R₁-3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₂)-cumarina (76a-g) e 77(a-g).

Tabela 3: Ponto de fusão, rendimentos da síntese e pureza das 7-R₁-3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₂)-cumarina (**76a-g**) e **77(d)**.



Composto	R ₁	R ₂	PF°C	Rendimento (%)	Pureza (%)
76a	MeO	Benzil	200 (D)	85	100
76b	Meo	Fenil	221	67	100
76c	Meo	4-Meo-fenil	217-223	80	98,36
76d	Meo	3,4,5-trimetóxi-fenil	244 (D)	91	100
76e	Meo	4-Br-fenil	281 (D)	79	97
76f	Meo	4-Cl-fenil	281-283	90	90
76g	Meo	Naftil	245	84	100
77d	OH	3,4,5-trimetóxi-fenil	256(D)	65	-

Ao acompanhar a reação de CAACu através da CCFA, uma dúvida era permanente, o R_f da mancha referente ao alcino de partida (**80a**) e da amostra da reação eram muito próximos, isto dificultava avaliar se existia produto formado e o quanto restava do alcino de partida (**80a**). Um detalhe chamou a atenção, o tom azul fluorescente, à 365nm, das manchas era distinto, o que sugeria que algo deveria ter sido formado, mas ainda assim, permanecia a necessidade de saber se a reação havia findado. Para sanar esta dúvida, uma amostra desta reação foi analisada por CLAE (Figura 33), utilizando coluna Chomolight Merck C18 (10mmx4,6mm,x5mm) e acetonitrila/H₂O 30% como eluente. O resultado mostrou que a proporção do alcino de partida (**80a**) presente na amostra da reação era desprezível, significando que a reação havia terminado.

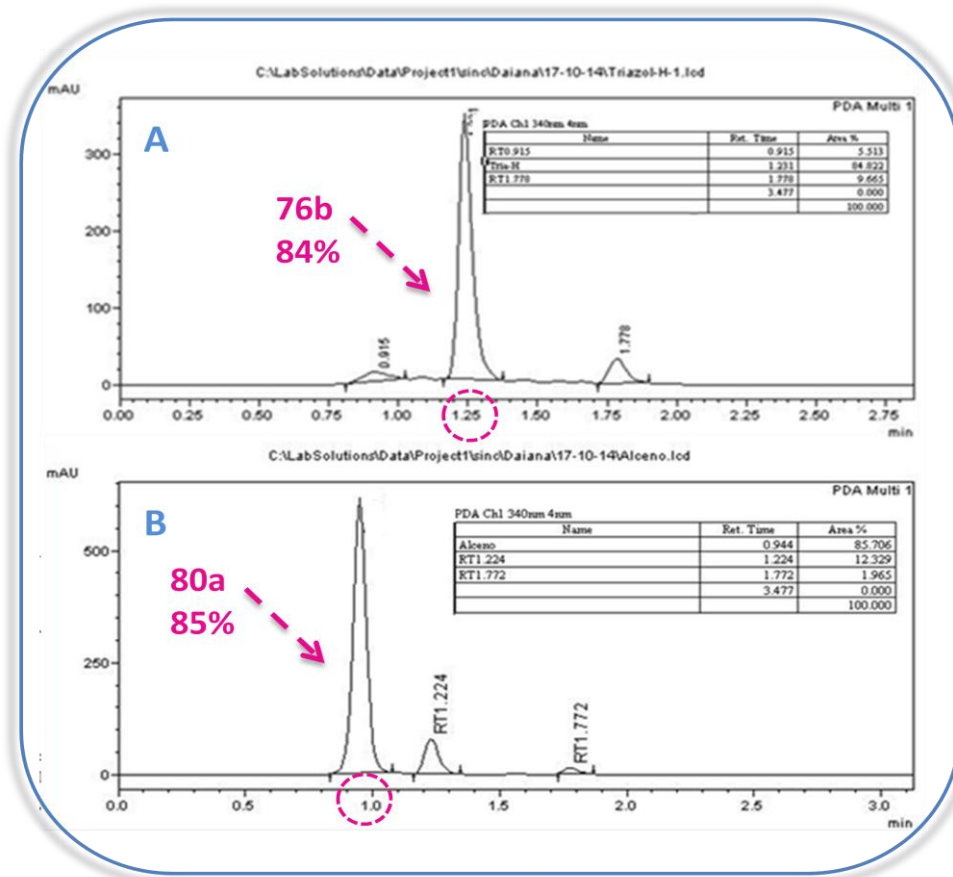


Figura 34: Cromatogramas da reação de CuAAC para obtenção do produto **76b**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%); A – 3-etenil-7-metoxi -cumarina (**80a**); B – amostra da reação de de CuAAC após 24 horas.

Vale a pena ressaltar que a estrutura planar característica destes compostos cumarino-triazólicos supostamente promove alta interação intermolecular π - π entre tais estruturas o que, consequentemente, contribuiu com a baixa solubilidade observada nestes compostos. Devido a esta característica, foram encontradas grandes dificuldades na etapa de purificação destas substâncias. Primeiramente, foram pesquisados solventes, ou mistura de solventes, que pudessem ser empregados na recristalização dos compostos da primeira série sintetizada **AN1**. Entretanto, estes compostos ou eram insolúveis independente da temperatura aplicada, ou se solubilizavam a quente, mas não precipitava a frio (ex.: etanol, acetona, mistura etanol/acetona). Desse modo, foi testada a purificação via cromatografia de coluna flash, utilizando como eluente hexano/acetato:ácido acético e tolueno éter em diversas proporções. A melhor condição, a qual foi possível realizar a purificação dos 7 compostos, foi empregando tolueno:éter 5%, o que sugere a necessidade de um solvente capaz de realizar interações intermoleculares π - π entre os compostos cumarínicos-triazólicos. Esta condição

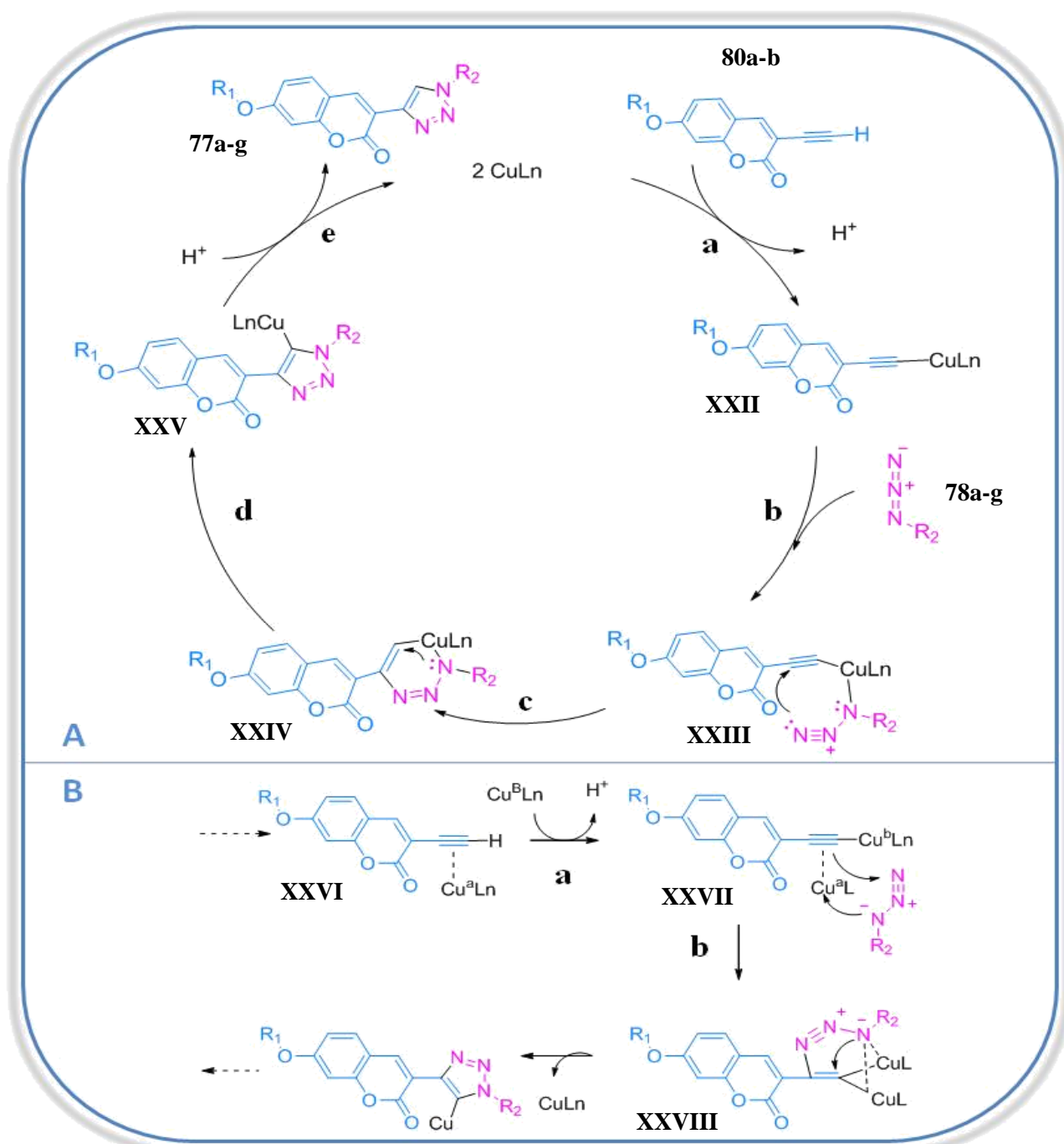
foi empregada na separação dos compostos (**76a-g**), mas não foi possível ser utilizada para a série (**77a-g**), visto que, o eluente tolueno/éter 5% não apresentava força suficiente para eluir e, conseqüentemente, separar tais compostos. Assim, foram testados eluentes com proporções maiores de éter e a mistura tolueno:acetato de etila, pois este possui força de eluição maior que o éter. O teste realizado através de CCFA mostrou que o eluente tolueno/acetato de etila 20% era mais adequado, entretanto, ao testá-lo via cromatografia de coluna flash apenas o composto **76a** pôde ser isolado com grau de pureza adequado. Além disso, visando evitar perda de material, foi testada a purificação utilizando cromatografia de camada delgada preparativa (CCFP), a partir do eluente que apresentou melhor resultado na CCFA, *ie.* tolueno:acetato de etila 20%. Porém, não era observada uma separação eficiente já que o produto de interesse se arrastava pela placa, co-eluindo com impurezas. Somente frações com pequena quantidade do material eram isoladas, insuficientes para serem detectadas com eficiência pelos métodos espectroscópicos. Acredita-se que esse comportamento da série **AN2** aconteça por causa da hidroxila, capaz de interagir muito com os silanóis existentes na fase estacionária, através de ligações de hidrogênio. Assim sendo, os demais compostos da série **AN2**, exceto **77d**, não foram eficientemente purificados, e conseqüentemente, não puderam ser caracterizados. Estudos mais minuciosos serão realizados a fim de resolver tais problemas.

A reação CuAAC foi empregada como alternativa à cicloadição térmica 1,3-dipolar, visto que esta metodologia clássica apresenta desvantagens como longos tempos reacionais, utilização de altas temperaturas, baixos rendimentos e formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos quando alcinos assimétricos estão envolvidos (HEIN & FOKIN, 2010). Contudo, a presença de cobre altera estas características ao transformar o mecanismo concertado em uma sequência de etapas rápidas, as quais envolvem intermediários polares responsáveis por definirem a regioespecificidade da reação. Pode-se dizer que a reação CuAAC possibilita a utilização de condições muito mais brandas, o que resulta em rendimentos muito altos (MELDAL *et al.*, 2002; SHARPLESS *et al.*, 2002)

O conjunto destas vantagens tornam a reação CuAAC o sinônimo perfeito do conceito “*Click Chemistry*” (KOLB *et al.*, 2001). Entretanto, como descrito anteriormente, a purificação dos compostos 1,2,3-triazólicos deste trabalho precisou ser realizada a partir de métodos cromatográficos, contrário ao que é determinado pelos critérios “click”. Acredita-se que as impurezas observadas na reação sejam oriundas da decomposição dos alcinos de partida, entretanto, este fato carece ser investigado mais detalhadamente.

O mecanismo inicialmente postulado para a CuAAC (Esquema 23-A), baseado em cálculos teóricos de densidade funcional, sugeriu o envolvimento de complexos de Cu(I) mononuclear. No qual a primeira etapa envolve a complexação entre os elétrons π do alcino (**80a-b**) com o cobre (I), seguida da abstração do hidrogênio terminal do alcino (**80a-b**), resultando no acetileto de cobre, **XXII** (etapa a). Isto é possível porque a complexação com o cobre diminui o pKa do alcino terminal, permitindo que a desprotonação ocorra em meio aquoso. Então, a azida (**78a-g**) é ativada por se coordenar ao cobre, ao formar intermediário **XXIII** (etapa b). Além de aumentar a proximidade em os reagentes, o cobre torna N₁ mais eletrofílico e C₄ mais nucleofílico, favorecendo o ataque de C₄ à N₁ para formação do metalociclo **XXIV** (etapa c). Esta etapa define a regioespecificidade da reação. Em seguida, ocorre a contração do anel, levando à formação da triazolila de cobre **XXV** (etapa d). Por fim, ocorre a protonação do intermediário triazolila de cobre com a formação do 1,2,3-triazol (**76-77a-g**) e regeneração do catalisador (etapa e) (HEIN & FOKIN, 2010).

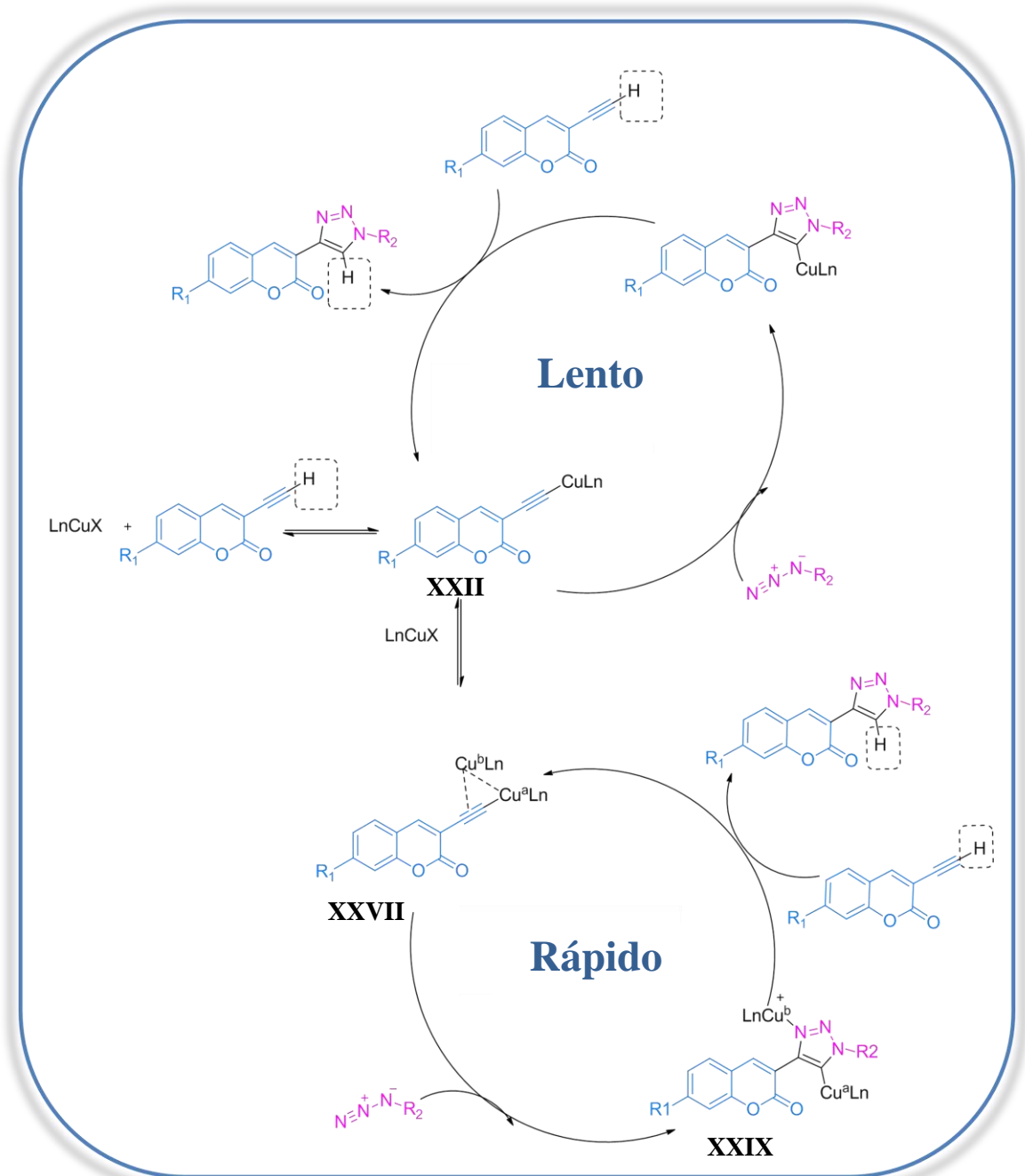
Contudo, estudos subsequentes, constataram que o mecanismo desta reação era mais complexo e sugeriram a participação de complexos de Cu (I) dinucleares ao se basear em experimentos cinéticos (RODIONOV *et al.*, 2005) e computacionais (HIMO *et al.*, 2005; AHLQUIST & FOKIN 2007; STRAUB, 2007). Fokins e colaboradores publicaram estudos, nos quais afirmaram que o complexo de acetileto de Cu dinuclear (**XXVII**) corresponde a espécie catalítica ativa e descrevem o mecanismo baseado nos complexos dinucleares (WORRELL *et al.*, 2013) (Esquema 23-B). No mecanismo do esquema a seguir, o intermediário **XXVI** se complexa com outro íon de Cu^b seguida da desprotonação deste intermediário (etapa a), levando ao acetileto de Cu dinuclear **XXVII**. Na etapa seguinte (etapa b), o N₃ nucleofílico se complexa com o Cu^a e o carbono da tripla ataque de N₁ eletrofílico, levando ao intermediário dinuclear **XXVI**. Logo, ocorre a contração do anel, levando à formação do triazolila de cobre **XXVIII** (etapa b), culminando na protonação do intermediário triazolila de cobre com a formação do 1,2,3-triazol (Esquema 23-B).



Esquema 23: A – Mecanismo da CuAAC baseado no envolvimento de complexos de Cu(I) mononuclear (Adaptado de HEIN & FOKIN, 2010). B- Mecanismo da CuAAC baseado nos complexos dinucleares (Adaptado de WORRELL *et al.*, 2013).

Recentemente, Bertrand e colaboradores, conseguiram isolar complexos de mono e bis acetileno de Cu(I) (XXII e XXVII respectivamente) e demonstrar que ambas as espécies são ativas no ciclo catalítico da CuAAC, contudo, o complexo dinuclear está envolvido na via cineticamente mais favorecida (Esquema 24). Além disso, foi possível isolar um complexo de

triazóla de Cu dinuclear nunca descrito (**XXIX**). Assim, os autores propuseram que a desmetalização de **XXIX** ocorre a partir do próton proveniente do alcino, capaz de regenerar o acetileno de Cu(I) dinuclear **XXII** e tornando os complexos de LCu(I)X desnecessários para recomeçar o ciclo catalítico (BERTRAND *et al.*, 2015).



Esquema 24: Mecanismo da CuAAC envolvendo ambos os complexos mono e bis acetileno de Cu(I) **XXII** e **XXVII** respectivamente (Adaptado de BERTRAND *et al.*, 2015).

A fim de confirmar a formação dos compostos de 7- R_1 -3-(1*H*-1,2,3-triazol-4- R_2)-cumarina (**76a-g**) e (**77d**) foram realizados experimentos de determinação estrutural como

RMN ^1H e ^{13}C e espectrofotometria no IV (em anexo). A partir dos espectros de RMN ^1H , não foram observados sinais referentes ao hidrogênio ligados à tripla, por outro lado, foram observados os sinais simples característicos do anel triazólico e cumarínico com deslocamentos químicos entre de 8,83-9,56 ppm e 8,62-9,33 ppm respectivamente, que comprovaram a formação do produto desejado (Figura 34) (Tabela 4 e 5). Ademais, foram atribuídos sinais característicos a cada anel aromáticos ligado ao triazol nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 4, 5 e 6).

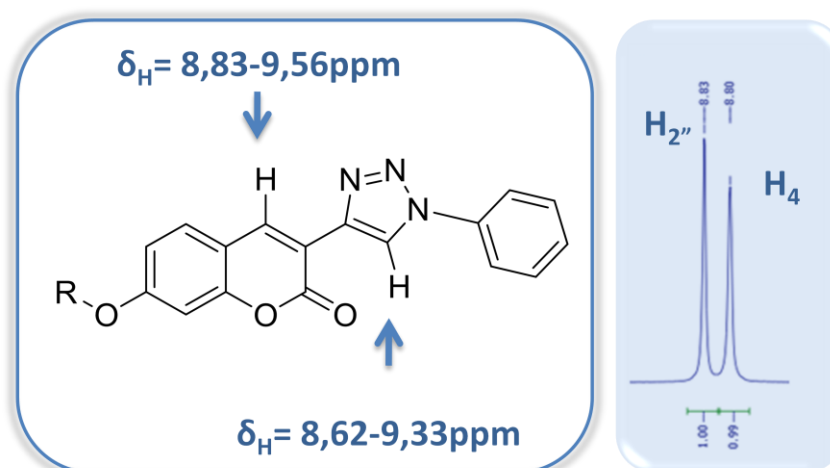
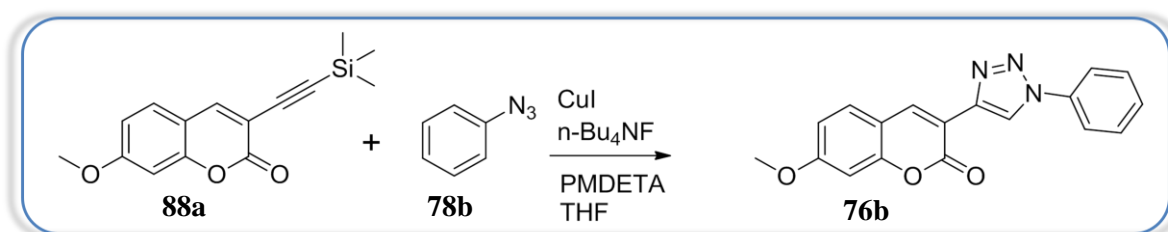


Figura 35: Sinais referentes ao anel triazólico e cumarínico no espectro de RMN ^1H

Os compostos triazólicos (**76a-g**) apresentaram pureza maior que 95%, de modo que estes serão enviados para serem ensaiados frente a células de linhagens de câncer de mama SkBr3 e MCF-7.

3.10. Síntese “one-pot” de 7-metóxi-3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (76b)

Dada a dificuldade de se acompanhar e isolar os produtos triazólicos finais devido a presença de impurezas oriundas da reação CuAAC a partir dos alcinos desprotegidos, decidiu-se fazer um ensaio de síntese “one-pot” da 7-metóxi-3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (**76b**) a partir do composto (**81a**), fenil azida (**78b**), fluoreto de tetrabutilamônio (n-Bu₄NF), iodeto de cobre (CuI), N,N,N',N'',N'''-pentametildietenetriamina (PMDETA) em tetraidrofurano (THF) (Esquema 25) (STEFANI *et al.*, 2012). Desta forma, **76b** foi obtido como um sólido marrom com rendimento bruto de 87% e com um aspecto reacional muito mais limpo.



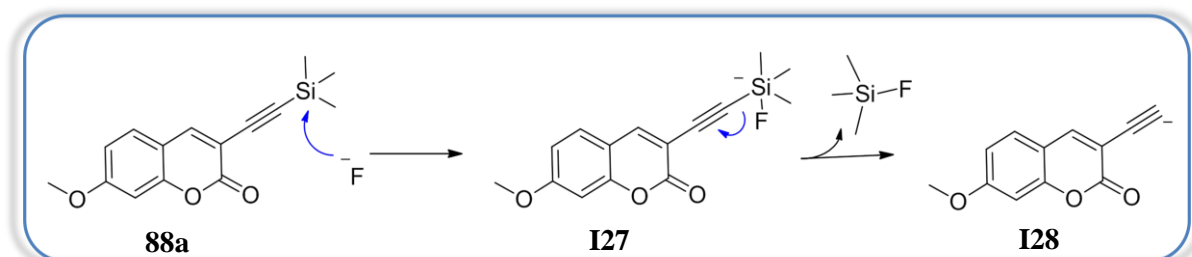
Esquema 25: Síntese “one-pot” da 7-metóxi-3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (**76b**) (STEFANI, *et al.*, 2012)

Nesta metodologia, a síntese da 7-metóxi-3-(1H-1,2,3-triazol-4-fenil)-cumarina (**76b**) foi realizada em um mesmo passo, “one pot”: reação de desproteção do grupamento trimetilsilila, seguida da reação de CuAAC.

O monitoramento da reação foi feito por CCDA, utilizando como padrões de referência: o produto de partida (**88a**), o alcino desprotegido (**80a**) e o produto de interesse (**76b**). Como resultado foi observado que o produto de partida foi totalmente consumido originando diretamente o composto triazólico (**76b**), o que demonstrou que esta reação foi satisfatoriamente executada. O alcino desprotegido (**80a**) não foi observado, o que indica que este ao ser formado, era imediatamente, consumido via CuAAC, evitando sua degradação no meio reacional.

A desproteção do grupamento trimetilsilila ocorre através da reação entre o composto (**88a**) com o fluoreto. Neste caso, o n-Bu₄NF, por ser solúvel em solventes orgânicos, foi empregado como fonte de fluoreto. Tal íon, altamente eletronegativo, é um nucleófilo bastante duro e eficaz para a interação com o silício, capaz de formar fortes ligações) (CLAYDEN *et al.*, 2001).

O mecanismo da etapa de desproteção a partir do fluoreto (Esquema 26) acontece de modo similar ao descrito anteriormente no esquema 16. O fluoreto inicialmente ataca o orbital d do silício, formando um intermediário pentacoordenado (**I27**), no qual o silício encontra-se negativamente carregado. Então, ocorre a liberação do ânion acetilênico, já que este é um bom grupo abandonador (CLAYDEN *et al*, 2001). Este intermediário pode prontamente interagir com o íon cobre para formar o acetileto de cobre (**90**) para a reação de CuAAC.



Esquema 26: Mecanismo proposto para a obtenção da 3-etenil-7-metoxi-cumarina a partir de fluoreto (**80a**) (Adaptado de CLAYDEN *et al*, 2001).

Neste caso específico de CuAAC, foi utilizado como fonte de Cu(I) o sistema catalítico Cu/PMDETA. O uso de íon cuproso como fonte direta em reações CuAAC tem desvantagem, pois apesar destes estarem no estado oxidativo correto para o processo catalítico e serem solúveis nos solventes empregados, normalmente se apresentam como aglomerados estáveis (MELDAL & TORNØE, 2008; HEIN & FOKIN, 2010) Desta forma, é necessária a utilização de base nitrogenada ou de aquecimento para promover a formação inicial do acetileto de cobre. Outra desvantagem do uso de sais de Cu(I) é que estes podem ser oxidados para Cu(II) e/ou sofrer desproporcionamento para cobre metálico e Cu(II). O PMDETA age como centro doador na coordenação com o cobre e diante dos contrastes citados, o emprego deste ligante torna-se importante, pois funciona como base, também sendo capaz de proteger o Cu(I) de oxidação na presença de oxigênio (HEIN & FOKIN, 2010).

O ligante PMDETA não é necessário para o efeito catalítico do Cu(I), logo, pode-se dizer que o mecanismo desta etapa ocorre como descrito anteriormente no esquema 24.

Como vantagem da metodologia “*one-pot*” pode-se citar: menor gasto de solventes, menor tempo reacional e praticidade. Além disso, comparativamente, o rendimento da síntese “*one-pot*”, 86%, foi melhor que o rendimento global da reação de desproteção do grupamento trimetilsilila e CuAAC, 47,2%. Desta forma, este protocolo será expandido para os outros compostos da série facilitando suas obtenções e, provavelmente, permitindo a obtenção da série de **AN2**.

4. CONCLUSÕES

Utilizando uma metodologia sintética elaborada, já que foram empregadas reações não convencionais com acoplamento Cruzado de Sonogashira e CuAAC, foi possível obter compostos cumarínicos-1,2,3-triazóis inéditos, análogos ao Novobiocin, como protótipos de compostos anti-tumorais atuando pela inibição HSP90.

Esta metodologia sintética se mostrou adequada para os objetivos deste trabalho, já que garantiu a obtenção dos compostos análogos com rendimentos variando de razoáveis a ótimo (65-91%) na etapa chave de cicloadição. Entretanto, o processo de purificação trouxe grandes dificuldades devido à propriedade estrutural destes compostos, *ie* capacidade de promover alta interação intermolecular π - π entre si que, conseqüentemente, contribuiu com a baixa solubilidade observada. Assim, 6 compostos da série AN2 (**77a-c**, **77 e-g**) não foram satisfatoriamente purificados e caracterizados como planejado.

Os compostos obtidos puros (**76a-g** **77d**) foram caracterizados através de métodos espectroscópicos de infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C), sendo que, os mesmos estão sendo ensaiados frente a células de linhagens de câncer de mama SkBr3 e MCF-7.

Ademais, foi realizado um ensaio de síntese “*one-pot*” para obtenção de 1,2,3-triazóis, devido a dificuldade de se acompanhar e isolar os produtos triazólicos finais dada a presença de impurezas oriundas da reação CuAAC a partir dos alcinos desprotegidos. Assim, foi observado como vantagem da metodologia “*one-pot*”: menor gasto de solventes, menor tempo reacional e praticidade. Além disso, comparativamente, o rendimento da síntese “*one-pot*”, 86%, foi melhor que o rendimento global da reação de desproteção do grupamento trimetilsilila e CuAAC, 47,2%. Assim sendo, este protocolo será expandido para os outros compostos da série facilitando suas obtenções e, provavelmente, permitindo a obtenção da completa da série AN2.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Metodologia sintética

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

O acompanhamento das reações foi feito através da técnica de cromatografia em camada fina analítica (CCFA), na qual foram utilizadas placas de alumínio Kieselgel 60 (HF-254, Merck) com 0,2 mm de espessura. A visualização das substâncias em CCFA foi realizada em lâmpada ultra violeta (254 e 365 nm).

A purificação dos compostos foi realizada a partir da técnica de cromatografias líquida de adsorção em coluna flash, Isolera Biotage, modelo ISO-4SV (ICE-UFRRJ). Para a confecção da pastilha, utilizou-se sílica gel 70-230 mesh (Merck). E como fase móvel, foram utilizadas as misturas solventes de acordo com as propriedades físico-químicas de cada composto.

Os espectros de RMN¹H foram obtidos em aparelhos Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), operando a 500MHz e 400MHz, respectivamente. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃, DMSO-d₆ ou acetona-d₆, contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna e colocadas em tubos de 5 mm de diâmetro.

Os espectros de RMN¹³C foram obtidos operando a 125 MHz e à 100MHz, em aparelho Bruker Avance-500 e Bruker Avance-400 (ICE-UFRRJ), respectivamente, e as amostras foram dissolvidas em CDCl₃, DMSO-d₆ ou acetona-d₆, contendo TMS como referência interna.

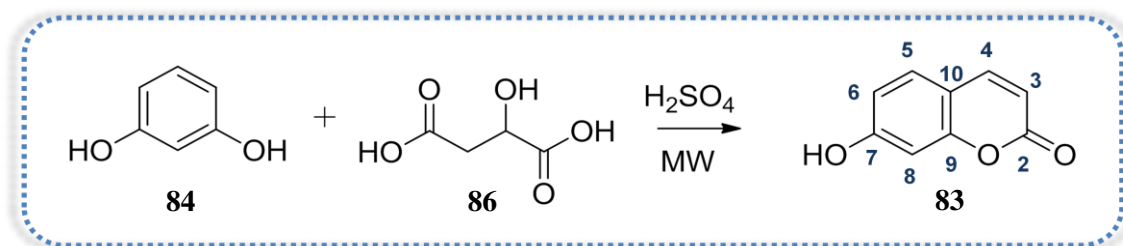
As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica e sua multiplicidade descrita com: s-singlete / d-dubleto / t-triplete / q-quarteto / m-multiplete / dd-duplo dubleto.

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

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho AAKER modelo PFM-II e os valores não foram corrigidos.

5.2 Síntese de 7-hidroxi-cumarina (**83**)

(AMARAL & KUMMERLE, 2011)

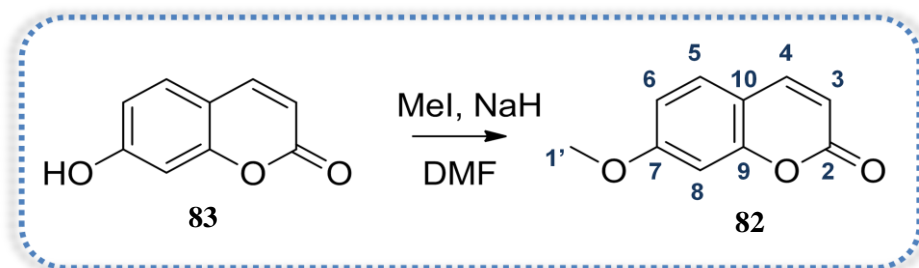


Em um erlemmeyer de 50 mL foram adicionados resorcinol (**84**) (20 mmol) pulverizado, ácido málico (**86**) (20 mmol) e ácido H_2SO_4 (10 mL). Na saída do erlenmeyer foi colocado um funil de vidro, a fim de canalizar a saída do gás liberado na reação e evitar projeções. Em um microondas caseiro, a mistura foi irradiada no centro do prato, em potência 6 durante 10 segundo por 3 pulsos. Logo após a irradiação, foi adicionado 5 mL de água quente, e agitada. Em seguida, foi colocado gelo picado dentro do erlenmeyer. Após o derretimento do gelo, o precipitado formado foi filtrado a vácuo.

O composto **83** foi obtido como um sólido coral em 80% de rendimento bruto. Ponto de fusão igual a 235 °C (literatura igual a 230 °C). **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆/ TMS (δ-ppm):** H₃=6.21 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H); H₄=7.94 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H); H₅=7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), H₆=6.79 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H); H₈=6.72 (s, 1H); H_{OH}=10.60 (s, 1H). **RMN¹³C (125MHz) DMSO-d₆/ TMS (δ-ppm):** C₂=161,75; C₃=113,5; C₄=145,02; C₅=130,20; C₆= 111,88; C₇=160,92; H₈=102,89; C₉=156,00; C₁₀= 111,75. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3083,03(C_{sp2}-H); 2924,89(C_{sp3}-H); 1681,83 (C=O); 3169,82 (C-OH).

5.3. Síntese de 7-metoxi-cumarina (82)

(ZHAO *et al.*, 2012)

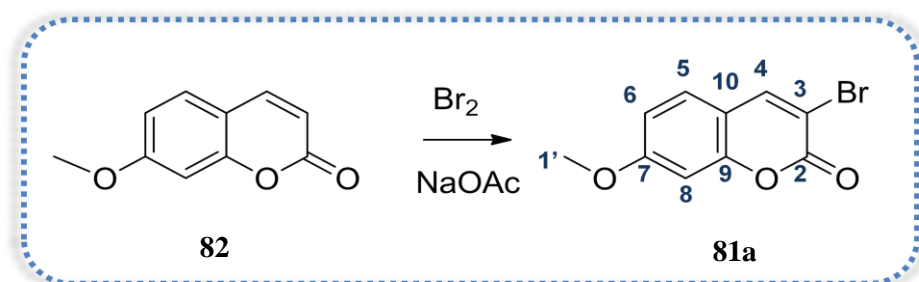


Em um balão de 50 mL, foi adicionado 10 mL de DMF seco, 7-hidroxi-cumarina (**83**) (3,1 mmol), NaH 60% em dispersão de óleo (4,6 mmol) e por último, o iodometano (6,2 mmol). A reação foi realizada em atmosfera inerte de nitrogênio, sob agitação e em temperatura ambiente por 3 horas. Ao fim, 2/3 do solvente foi evaporado e a solução foi vertida em água/gelo. O sólido foi filtrado e seco à vácuo para fornecer o produto (**82**).

O composto **82** foi obtido como um sólido rosado em 70% de rendimento bruto e ponto de fusão igual a 114-116 °C (na literatura igual a 117-118 °C). **RMN¹H (500 MHz) acetona-d₆/ TMS (δ-ppm):** H₃= 6,23 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₄= 7,92 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H); H₅= 7,60 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); H₆= 6,93 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); H₈= 6,90 (s, 1H); H_{1'} = 3,95 (s, 3H). **RMN¹³C (125MHz) acetona-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 163,32; C₃= 112,25; C₄= 143,40; C₅= 129,27; C₆= 112,75; C₇= 160,07; C₈= 100,53; C₉= 156,05; C₁₀= 112,58; C_{1'} = 55,45. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3083,99 (C_{sp2}-H); 2937,41 (C_{sp3}-H); 1705,94 (C=O); 1613,36 (C=C); 1504,39 (C=C); 1462,92 (C=C); 1123,47 (C-O).

5.4. Síntese de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (81a)

(PETER *et al.*, 2007)

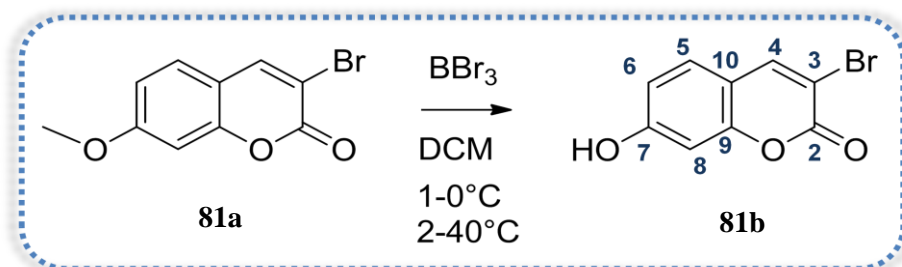


Em um balão de 100 mL, foi adicionado 7-metoxi-cumarina (**82**) (5,7 mmol) e acetado de sódio (17,0 mmol) em 40 mL de ácido acético. Em seguida, adicionou-se bromo (7,3 mmol) lentamente. A reação foi mantida sob agitação e temperatura ambiente durante 2 horas. Por fim, foi adicionado água/gelo e então o precipitado foi filtrado e lavado com água e metanol gelados, para fornecer o produto **81a**.

O composto **81a** foi obtido como um sólido amarelado em 73% de rendimento bruto e ponto de fusão igual a 158-161 °C (na literatura igual a 158-160 °C). **RMN¹H (400 MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,56 (s, 1H); H₅= 7,63 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); H₆= 7,00 (dd, *J* = 8,7, 2,4 Hz, 1H); H₈= 7,06 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H); H₁' = 3,92 (s, 3H). **RMN¹³C (100MHz) DMSO / TMS (δ-ppm):** C₂= 155,15; C₃= 106,99; C₄= 145,19; C₅= 129,44; C₆= 113,46; C₇= 163,24; C₈=101,08; C₉= 157,29; C₁₀= 113,43; C₁' = 56,54. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3052,17(C_{sp2}-H); 2975,02(C_{sp3}-H); 2929,7(C_{sp3}-H); 1723,29 (C=O); 1599,86 (C=C); 1503,42 (C=C); 1454,24 (C=C); 1220,87(C-O).

5.5. Síntese de 3-bromo-7-hidroxi-cumarina (**81b**)

(ZHAO *et al.*, 2012)



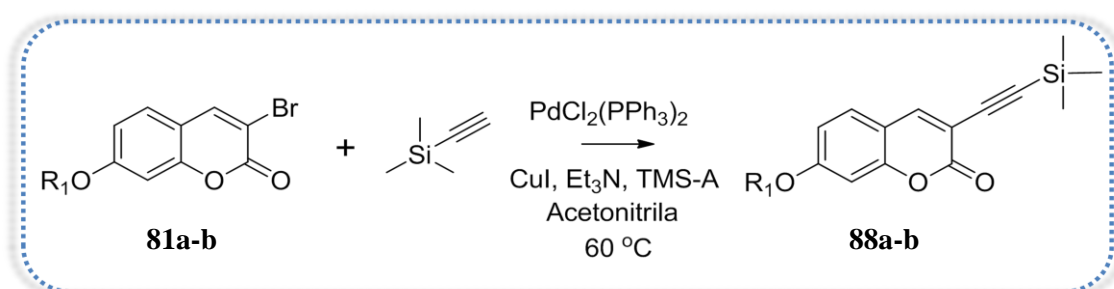
Em uma solução de 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a**) em DCM, foi adicionado BBr₃ à 0 °C. Então, a mistura reacional resultante ficou sob agitação a 40 °C em tubo selado por 4 horas. Após este período, o solvente foi evaporado e adicionado solução saturada de bissulfito gelada à mistura reacional. O sólido foi filtrado à vácuo e lavado com água gelada, para fornecer o composto **81b**.

O composto **81b** foi obtido como um sólido rosado em 74% de rendimento bruto e ponto de fusão igual a 285 °C como degradação. **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,50; H₅= 7,53; H₆= 6,85; H₈= 6,75; H_{OH}= 10,75. **RMN¹³C (125MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 152,22; C₃= 105,74; C₄=146,04; C₅= 129,76; C₆= 114,17; C₇= 162,11; C₈= 102,54; C₉= 157,38; C₁₀= 112,37. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3046,38 (C_{sp2}-H);

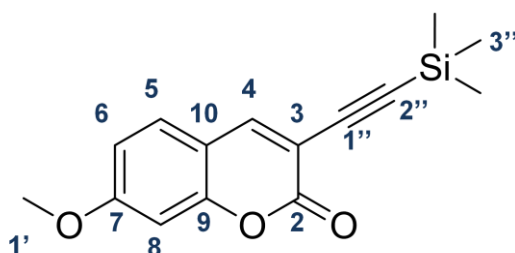
2923,9 (C_{sp3}-H); 1693,4 (C=O); 1619,14 (C=C); 1439,78 (C=C); 3255,65 (C-OH); 1231,48 (C-O).

5.6. Síntese de 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**)

(YEE *et al.*, 2006)

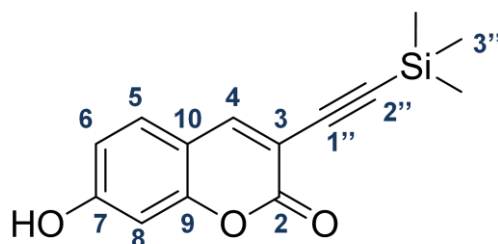


Em um balão, foram adicionados 3-bromo-7-metoxi-cumarina (**81a-b**) (3,90 mmol), CuI (0,16 mmol), PdCl₂(PPh₃) (0,18 mmol), trietilamina (7,84 mmol) e solubilizados em acetonitrila (40 mL). Em seguida, quando a temperatura alcançou os 60 °C, adicionou-se TMS-A (6,47 mmol) e o tubo foi selado. A reação teve sua atmosfera trocada por gás inerte (N₂) e ficou sob agitação por 2 horas. Ao fim da reação, a acetonitrila foi evaporada. O resíduo foi diluído em acetato de etila e então a solução foi filtrada. Por fim, o solvente foi evaporado. Os produtos obtidos **88a-b** foram purificado em coluna cromatográfica flash, utilizando como fase estacionária normal (gel de sílica) e fase móvel mistura de hexano:acetato de etila 9:1.



O composto **88a** foi obtido como um sólido amarelo em 59% de rendimento e ponto de fusão igual a 135 °C. **RMN¹H (400 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,31 (s, 1H); H₅= 7,63 (d, 1H); H₆= 6,99 (dd, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H); H₈=7,03 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); H_{1'}= 3,88 (s, 3H); H_{3''}= 0,25 (s, 9H). **RMN¹³C (100 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 155,22; C₃= 107,73; C₄= 147,91; C₅= 1130,25; C₆= 113,43; C₇= 163,78; C₈=100,87; C₉= 159,39; C₁₀= 112,63; C_{1'} = 56,10; C_{1''} = 100,08; C_{3''}= 0,23. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3039,63 (C_{sp2}-H);

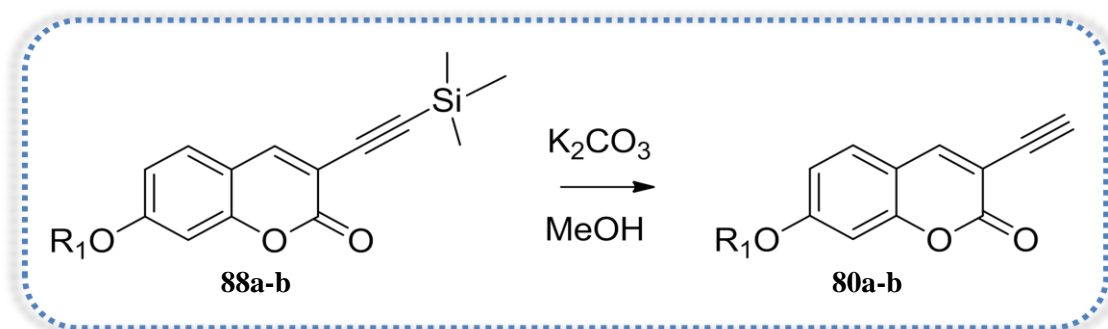
2960,56 (C_{sp3}-H); 2899,8 (C_{sp3}-H); 1722,33 (C=O); 1603,72 (C=C); 1504,39 (C=C); 1464,85 (C=C); 1250,72 (C-O); 2163,04 (C≡C).



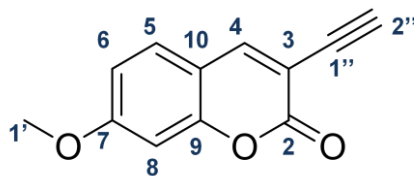
O composto **88b** foi obtido como um óleo marrom em 53% de rendimento. **RMN¹H (400 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** H₄= 7,92 (s, 1H); H₅= 7,37 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); H₆= 6,89 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); H₈= 6,96 (s, 1H); H_{OH}= 1,28 (s, 1H); H_{3''}= 0,28 (s, 9H). **RMN¹³C (100 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₂= 155,51; C₃= 107,49; C₄= 147,96; C₅= 130,19; C₆= 113,57; C₇= 163,72; C₈= 101,12; C₉= 159,17; C₁₀= 112,33; C_{1'}= 56,37; C_{1''}= 78,65; C_{2''}= 85,87. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3042,74 (C_{sp2}-H); 2950,35 (C_{sp3}-H); 1717,41 (C=O); 1605,55 (C=C).

5.7. Síntese de 3-etenil-7-R-cumarina (80a-b)

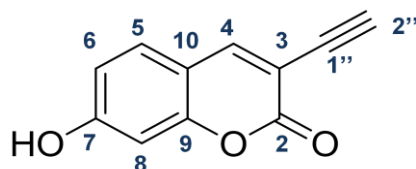
(GAO *et al.*, 2013)



Uma solução de 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a-b**) (3,67 mmol) em metanol (15 mL) foi tratada com K₂CO₃ (5,62 mmol). A reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, o solvente foi evaporado, em seguida, foram adicionados acetato de etila e água ao resíduo. Separou-se a fase orgânica, e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etila (3 × 15 mL). Por fim, fase orgânica combinada foi seca com Na₂SO₄ e concentrada à vácuo, para fornecer o composto **80a-b**.



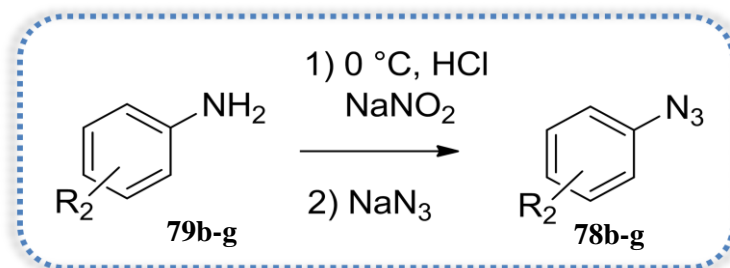
O composto **80a** foi obtido como um sólido marrom em 73% de rendimento e ponto de fusão igual a 165 °C. **RMN-¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,32 (s, 1H); H₅= 7,64 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H); H₆= 7,00 (dd, *J* = 8,7, 2,4 Hz, 1H); H₈=7,04 (d, *J*= 2,3Hz, 1H); H_{1'}= 3,88 (s,3H); H_{2''}=4,44 (s, 1H). **RMN-¹³C (125 MHz) DMSO-d₆/ TMS (δ-ppm):** C₂= 154,17; C₃= 108,62; C₄= 147,07; C₅= 129,31; C₆= 114,30; C₇= 160,75; C₈=103,25; C₉= 157,92; C₁₀= 111,71; C_{1'} = 98,33; C_{1''} = 101,16; C_{3''}= 0,21. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3035,78 (C_{sp2}-H); 2927,17 (C_{sp3}-H); 1711,72 (C=O); 1601,79 (C=C); 1502,46 (C=C); 1460,99 (C=C); 1249,8 (C-O)



O composto **80b** foi obtido como um sólido marrom em 90% de rendimento e ponto de fusão igual a 293 °C com degradação. **RMN¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,14 (s, 1H); H₅= 7,58 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H); H₆= 6,91 (dd, *J* = 8,6, 2,4 Hz, 1H); H₈= 6,79 (d, *J*= 2,4Hz, 1H); H_{2''}= 3,77 (s, 1H). **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 2952,67 (C_{sp3}-H); 1718,38 (C=O); 1607,48 (C=C); 1506,23 (C=C); 1462,84 (C=C); 1134,01(C-O)

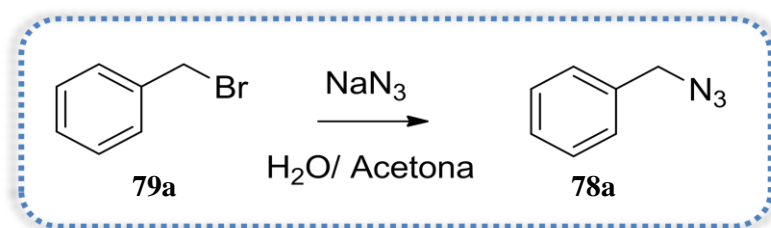
5.8. Síntese de Azidas (78(a-g))

(CHENG *et al.*, 2012)



Em uma solução à 0° C de arilamina (**79b-g**) (5,4 mmol) em acetato de etila (10 mL) e água (1,25mL), adicionou-se ácido clorídrico concentrado (3 mL). A reação foi agitada durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se NaNO₂ (9,2 mmol) dissolvido em água (2,0 mL) por 3 minutos. Após a completa adição, a reação foi mantida sob agitação e temperatura igual a 0°C durante 30 minutos. Então, foi adicionada uma solução de NaN₃ (9,2 mmol) em água (2,0 mL) por 5 minutos. A reação foi mantida sob agitação durante 1 hora, deixando a temperatura aumentar gradativamente, até a temperatura ambiente. A reação foi diluída com água (12,5 mL) e extraída com acetato de etila (2x 12,5 mL). Finalmente, a fase orgânica combinada foi lavada com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (12,5 mL) e, posteriormente, com água. A fase orgânica foi seca com NaSO₄ anidro e concentrada sob vácuo, para fornecer as azidas **78b-g**.

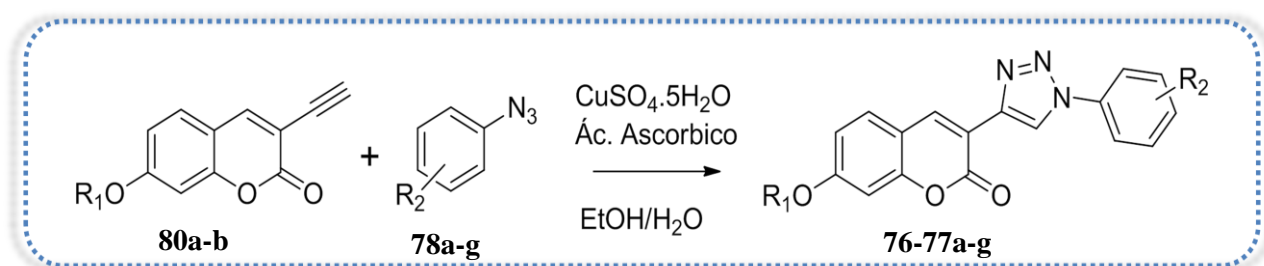
(HONG *et al.*, 2013)



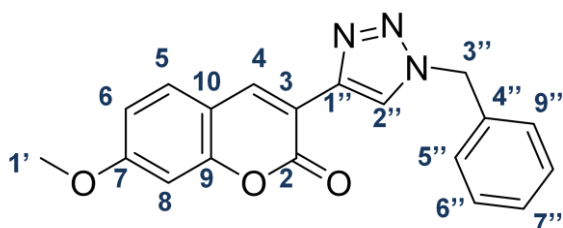
A síntese da benzil azida (**78a**) foi realizada diferentemente, a partir de uma solução de brometo de benzila (**79a**) (1,75 mmol) em água/acetona (1:3), na qual foi adicionado azida de sódio (NaN₃) (3,50 mmol). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Então, a mistura reacional foi extraída com diclorometano e lavada com água. A fase orgânica combinada foi seca com NaSO₄ anidro e concentrada sob vácuo, para fornecer as azidas **78a**

5.9. Síntese de 7-R₁-3-(1H-1,2,3-triazol-4-R₂)-cumarina (76-77a-g)

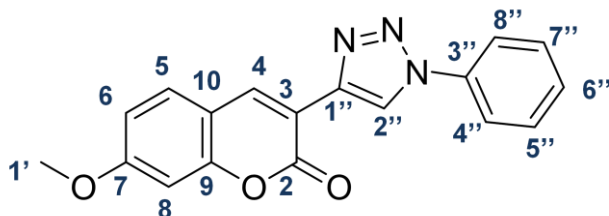
(SIVAKUMAR *et al.*, 2004)



Em uma mistura de 3-etenil-7-metoxi-cumarina (**80a-b**) (0,3mmol) e arilazida (**78a-g**) (0,3mmol) em água e etanol (v/v= 1:1, mL), foi adicionado ascorbato de sódio (0,06 mmol) dissolvido água (2,0 mL), seguido da adição de CuSO₄ pentahidratado 7.5 % CuSO₄ (0,015 mmol) em água (2,0 mL). A reação foi agitada vigorosamente durante 24 horas, no escuro e em temperatura ambiente. Ao término da reação, o etanol foi removido à vácuo e o resíduo foi vertido em gelo. O sólido foi filtrado e lavado com água gelada. Os produtos obtidos (**76-77a-g**) foram purificados em coluna cromatográfica flash utilizando como eluente tolueno/éter 5% para os compostos **76 a-g** e tolueno/acetato de etila 20% para o composto **77d**.

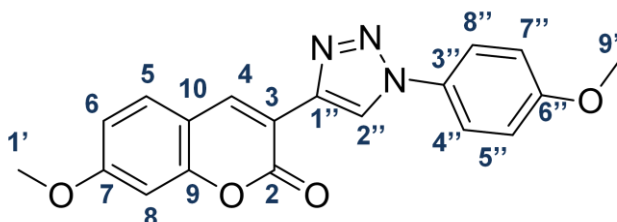


O composto **76a** foi obtido como um sólido marrom claro em 85% de rendimento e ponto de fusão igual a 200°C com degradação. **RMN¹H (400 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,62 (s, 1H); H₅= 7,85 (d, J = 8,7 Hz, 1H); H₆= 7,02 (d, J = 10,00 Hz, 1H); H₈= 7,08 (s, 1H); H₁'= 3,88 (s, 3H); H₂''= 8,76 (s, 1H); H₃''= 5,70 (s, 2H); H₅'', 6'', 7'', 8'' e 9''= 7,39 (s, 6H); **RMN¹³C (100 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 163,02; C₃= 113,16; C₄= 137,91; C₅= 130,64; C₆= 113,45; C₇= 159,41; C₈=100,88; C₉= 154,90; C₁₀= 114,55; C₁' = 56,48; C₁'' = 136,48; C₃''= 53,31; C₄''= 140,71; C₅'' e 9'' = 128,55; C₇''= 128,68; C₆'' e 8'' = 129,29. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3165(C_{sp2}-H); 2927,77 (C_{sp3}-H); 1712,69 (C=O); 1692,44 (C=N); 1610,47 (C=C); 1501,49 (C=C); 1229,55 (C-O).

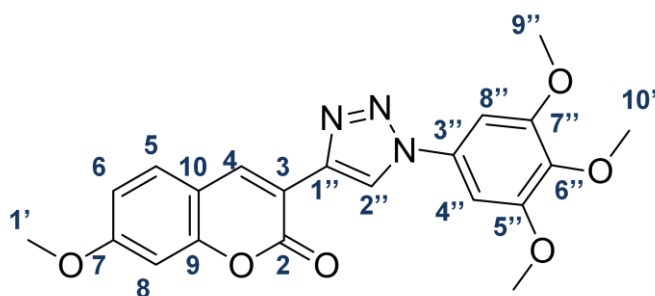


O composto **76b** foi obtido como um sólido branco em 67% de rendimento e ponto de fusão igual a 221°C. **RMN¹H (400 MHz) CDCl₃ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,80 (s, 1H); H₅= 7,48 (d, J= 7,4 Hz, 1H); H₆= 6,96 (dd, J = 7,4; 2,3 Hz, 1H); H₈= 6,92 (d, J= 2,3 Hz, 1H); H₁'= 3,93 (s, 3H); H₂''= 8,83 (s, 1H); H₄'', 6'', 8''= 7,59 (t, J=7,6 Hz, 3H); H₅'' e 7''= 7,86 (t, J= 7,6 Hz, 3H). **RMN¹³C (100 MHz) CDCl₃/ TMS (δ-ppm):** C₂= 163,02; C₃= 113,16; C₄= 137,91; C₅=

130,64; C₆= 113,45; C₇= 159,41; C₈= 100,88; C₉= 154,90; C₁₀= 114,55; C_{1'}= 56,48; C_{1''}= 136,48; C_{3''}= 53,31; C_{4''}= 140,71; C_{5''e 9''} = 128,55, C_{7''}= 128,68; C_{6''e 8''} = 129,29. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3158,25(C_{sp2}-H); 2926,8 (C_{sp3}-H); 1701,11(C=N); 1727,15(C=O); 1605,64 (C=C); 1503,42 (C=C); 1441,02 (C=C); 1231,48 (C-O); 1127,33 (C-O).

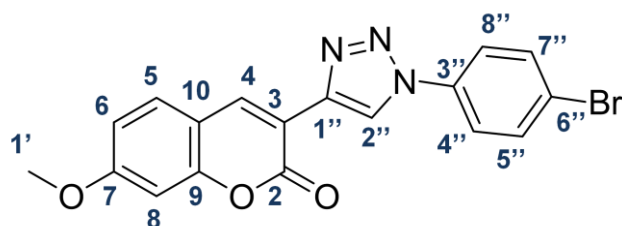


O composto **76c** foi obtido como um sólido amarelo claro em 80% de rendimento e ponto de fusão igual a 217-220°C. **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ -ppm):** H₄= 8,85 (s, 1H); H₅= 7,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); H₆= 7,05 (dd, *J* = 8,7; 2,3 Hz, 1H); H₈= 7,13 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H_{1'}= 3,90 (s, 3H); H_{3''}= 8,98 (s, 1H); H_{4''e 8''} = 7,92 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H); H_{5''e 7''} = 7,15 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H). **RMN¹³C (125 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ -ppm):** C₂= 163,2; C₃= 113,04; C₄= 138,57; C₅= 130,64; C₆= 113,54; C₇= 159,34; C₈= 100,94; C₉= 155,14; C₁₀= 114,27; C_{1'}= 56,05; C_{1''}= 141,46; C_{2''}= 123,45; C_{3''}= 130,35; C_{4''e 8''}= 122,46; C_{5''e 7''} = 115,34; C_{6''}= 159,84; C_{9''}= 56,53. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3185,25 (C_{sp2}-H); 3090,74 (C_{sp2}-H); 2922,95(C_{sp3}-H); 1729,08 (C=O); 1705,94(C=N); 1610,47(C=C); 1515,96 (C=C); 1253,66(C-O); 1234,37 (C-O); 1028 (C-O).

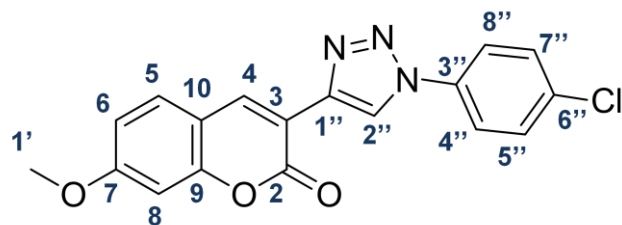


O composto **76d** foi obtido como um sólido amarelo claro em 91% de rendimento e ponto de fusão igual a 244°C com degradação. **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ -ppm):** H₄= 8,83 (s, 1H); H₅= 7,90 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); H₆= 7,04 (dd, *J* = 8,7; 2,3 Hz, 1H); H₈= 7,12 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H); H_{1'}= 3,91 (s, 3H); H_{2''}= 9,16 (s, 1H); H_{4''e 8''} = 7,30 (s, 2H); H_{9''e 11''} = 3,89 (s, 6H); H_{10''}= 3,72 (s, 6H). **RMN¹³C (125 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ -ppm)** C₂=

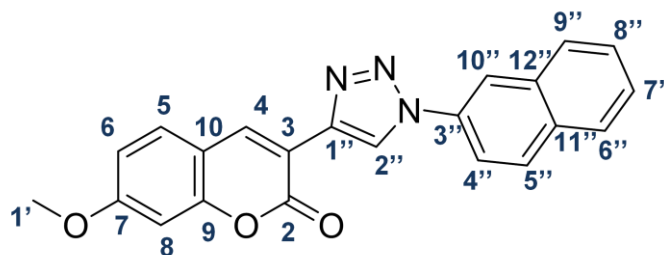
163,23; C₃= 112,71; C₄= 138,72; C₅= 130,58; C₆= 114,34; C₇= 159,40; C₈= 100,92; C₉= 155,06; C₁₀= 114,23; C_{1'}= 56,37; C_{1''}= 138,72; C_{2''}= 122,24; C_{3''}= 132,80; C_{4'' e 8''}= 98,60; C_{5''}= 153,78; C_{6''}= 141,54; C_{7''}= 153,78; C_{9'' e 11''}= 57,00; C_{10''}= 60,58. **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3007,81 (C_{sp2}-H); 2957,66 (C_{sp3}-H); 1705,94 (C=N); 1729,08 (C=O); 1607,57 (C=C); 1513,07 (C=C); 1475,46 (C=C); 1225,69 (C-O); 1132,15 (C-O).



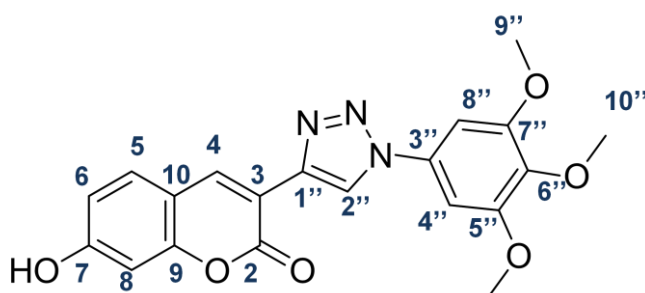
O composto **76e** foi obtido como um sólido bege em 79% de rendimento e ponto de fusão igual a 281°C com degradação. **RMN¹H (400 MHz) Acetona-d₆ / TMS (δ -ppm):** H₄= 8,82 (s, 1H); H₅= 8,04 (d, J= 8,8 Hz, 1H); H₆= 7,05 (m, 2H); H₈= 7,05 (m, 2H); H_{1'}= 3,99 (s, 3H); H_{2''}= 8,97 (s, 1H) H_{4'',5'',7'' e 8''}= 7,85 (m, 4H). **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 2923,91 (C_{sp3}-H); 1729,08(C=O); 1705,9 (C=N); 1617,22 (C=C); 1502,46 (C=C); 1461,96 (C=C).



O composto **76f** foi obtido como um sólido branco em 90% de rendimento e ponto de fusão igual a 281-283°C. **RMN¹H (500 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ -ppm):** H₄= 9,33 (s, 1H); H₅= 8,36 (d, J= 8,4 Hz, 1H); H₆= 7,52 (d, J = 8,4 Hz, 1H); H₈= 7,55 (s, 1H); H_{1'}= 4,41 (s, H); H_{2''}= 9,56 (s, 1H); H_{4'' e 8''}= 8,16 (s, J=8,2, 2H); H_{5'' e 7''}= 8,58 (s, J=8,2, 2H). **I.V. Max. (KBr) γ - cm⁻¹:** 3161,14 (C_{sp2}-H); 2923,91(C_{sp3}-H); 1709,79 (C=O); 1618,18 (C=C); 1505,35 (C=C); 1460,99 (C=C); 1137,93 (C-O).



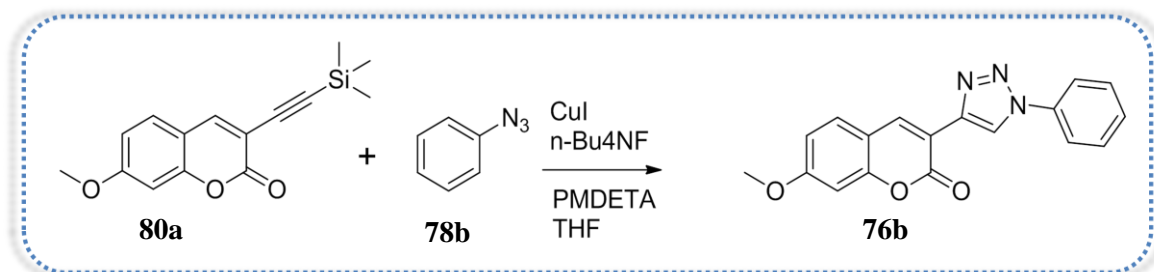
O composto **76g** foi obtido como um sólido branco em 84% de rendimento e ponto de fusão igual a 245°C. **RMN¹H (400 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,92 (s, 1H); H₅= 7,94 (d, J= 8,7 Hz, 1H); H₆= 7,07 (dd, J = 8,7, 2,3 Hz, 1H); H₈= 7,16 (d, J = 2,2 Hz, 1H); H₁= 3,92 (s, 3H); H_{2''}= 9,26 (s, 1H); H_{4''}= 8,08 (d, J = 7,0 Hz, 1H); H_{5''}= 8,13 (d, J = 7,5 Hz, 1H); H_{6''} e 9''= 8,21 (m, 2H); H_{7''} e 8''= 7,64 (m, 2H); H_{10''}= 8,67 (s, 1H). **RMN¹³C (100 MHz) DMSO-d₆ / TMS (δ-ppm):** C₂= 163,29; C₃= 113,08; C₄= 138,84; C₅= 128,86; C₆= 113,58; C₇= 159,38; C₈= 100,98; C₉= 155,2; C₁₀= 114,2; C₁'= 56,55; C₁''= 134,37; C₂'= 121,94; C₃'= 141,75; C₄'= 127,51; C₅'= 128,33; C₆'= 130,41; C₇'= 118,46; C₈'= 119,12; C₉'= 130,72; C₁₀'= 127,92; C₁₁'= 133,39; C₁₂'= 132,88. **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3145,71(C_{sp2}-H); 3012,63 (C_{sp2}-H); 2921,98 (C_{sp3}-H); 1704,01(C=O); 1610,47 (C=C); 1504,39 (C=C); 1448,48 (C=C); 1224,62 (C-O); 1223,76 (C-O).



O composto **77d** foi obtido como um sólido amarelo em 65% de rendimento e ponto de fusão igual a 256°C com degradação. **RMN¹H (400 MHz) Acetona-d₆ / TMS (δ-ppm):** H₄= 8,78 (s, 1H); H₅= 7,79 (d, J= 8,5,1H); H₆= 6,97 (d, J = 8,5 Hz, 1H); H₈= 6,88 (s,1H); H_{4'} e 8''= 7,34 (s, 2H); H_{9''} e 11''= 4,00 (s, 6H); H_{10''}= 3,82 (s, 3H). **I.V. Max. (KBr) γ- cm⁻¹:** 3043,32 (C_{sp2}-H); 2922,78 (C_{sp3}-H); 1707,77(C=O); 1606,52 (C=C); 1506,23 (C=C); 1446,38 (C=C); 1232,37 (C-O); 1133,05 (C-O).

5.10. Síntese de 7-metóxi-3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-)-cumarina (**76a**)

(STEFANI *et al.*, 2012)



Em um balão, contendo CuI (0,50 mmol), foram adicionados uma solução de 7-R-3-((trimetilsilil)etenil)-cumarina (**88a**) (0,50 mmol) em THF, fenilazida (**78b**) (0,60 mmol) e PMDETA (0,60 mmol). Em seguida, TBAF (0,60 mmol) dissolvido em THF (1 mL) foi acrescentado, lentamente à mistura reacional. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 14 horas. O produto foi precipitado em água gelada saturada com NH₄Cl, em seguida lavado com água gelada. Por fim, o produto obtido **76b** foi purificado em coluna cromatográfica flash utilizando tolueno/ éter 5% como eluente. O composto **76b** foi obtido como um sólido marrom em 86% de rendimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLQUIST, M.; FOKIN, V. V. Enhanced reactivity of dinuclear copper(I) acetylides in dipolar cycloadditions. **Organometallics**, v. 26, p. 4389-4391, 2007.

ALVAREZ-BUILLA, J.; VAQUERO, J. J.; BARLUENGA, J. **Modern Heterocyclic Chemistry**. v. 1, Wiley-Blackwell, 2011.

AMARAL, R. C. Síntese, caracterização da 7-hidroxi-cumarina e seu uso na detecção de tumores sólidos em condições de hipóxia celular. 2011. Monografia - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

AVENDANO, C; MENENDEZ J. C. **Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs**. 1ª Ed., Elsevier, Amsterdam, 2008.

BAGATELL, R.; PAINE-MURRIETA, G. D.; TAYLOR, C. W.; PULCINI, E. J.; AKINAGA, S.; BENJAMIN, I. J.; WHITESELL, L. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of Hsp90 binding agents. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 3312–3318, 2000.

BAKUNOV, S. A.; BAKUNOVA, S. M.; WENZLER, T.; GHEBRU, M.; WERBOVETZ, K. A.; BRUN, R.; TIDWELL, R. R. Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 1,4-diphenyl-1H-1,2,3-triazoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 254-72, 2010.

BANERJI, U.; O'DONNELL, A.; SCURR, M.; PACEY, S.; STAPLETON, S.; ASAD, Y. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, p. 4152-4161, 2005.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**, 1º Ed., ARTMED, Porto Alegre, 2001.

BHAT, R.; TUMMALAPALLI, S. R.; ROTELLA, D. P. Progress in the Discovery and Development of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 8718-8728, 2014.

BERTRAND, G.; JIN, I.; TOLENTINO, D. R.; MELAIMI, M.; Isolation of bis(copper) key intermediates in Cu-catalyzed azide-alkyne “click reaction. **Science Advances**, v.1 , 2015.

BOCK, V. D.; HIEMSTRA, H.; MAARSEVEEN, J. H. V. CuI Catalyzed alkyne-azide “click” cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2006, p. 51–68, 2006.

BRIK, A.; MULDOON, J.; LIN, Y. C.; ELDER, J. H.; GOODSSELL, D.; OLSON, A. J.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B.; WONG, C. H. Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening of HIV Protease Inhibitors. **Chem BioChem**, v. 4, p. 1246-1248, 2003.

BURLISON, J. A.; AVILA, C.; VIELHAUER, G.; LUBBERS, D. J.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. J. Development of novobiocin analogues that manifest anti-proliferative activity against several cancer cell lines. **Organic letters**, v. 73, p. 2130-2137, 2008.

BURLISON, J. A.; BLAGG, B. S. J. Synthesis and evaluation of coumermycin A1 analogues that inhibit the Hsp90 protein folding machinery. **Journal of American Chemical Society**, v. 8, p. 4855-4858, 2006.

BURLISON, J. A.; NECKERS, L.; SMITH, A. B.; MAXWELL, A.; BLAGG, B. S. J. Novobiocin: Redesigning a DNA gyrase inhibitor for selective inhibition of Hsp90. **Journal of American Chemical Society**, v. 128, p. 15529-15536, 2006.

BUTLER, R. N.; FOX, A.; COLLIER, S.; BURKE, L. A. Pentazole chemistry: the mechanism of the reaction of aryldiazonium chlorides with azide ion at 280 8C: concerted versus stepwise formation of arylpentazoles, detection of a pentazene intermediate, a combined 1 H and 15N NMR experimental and ab initio theoretical study. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, p. 2243–2247, 1998.

CAMPONOVO, J.; RUIZ, J.; CLOUTET, E.; ASTRUC, D. New Polyalkynyl Dendrons and Dendrimers: “Click” Chemistry with Azidomethylferrocene and Specific Anion and Cation Electrochemical Sensing Properties of the 1,2,3-Triazole-Containing Dendrimers. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, p. 2990-3002, 2009.

CAREY, F. A. SUNDBERG, R. J. **Advanced Organic Chemistry, Part A: Structure and Mechanisms**, 5^a Ed., Springer, New York, 2008

CHAUDHARY, P. M.; CHAVAN, S. R.; SHIRAZI, F.; RAZDAN, M.; NIMKAR, P.; MAYBHATE, S. P.; LIKHITE, A. P.; GONNADE, R.; HAZARA, B. G.; DESHPANDE, M. V.; DESHPANDE, S. R. Exploration of click reaction for the synthesis of modified nucleosides as chitin synthase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 2433-2440, 2009.

CHENG, H.; WAN, J.; LIN, M.; LIU, Y.; LU, X.; LIU, J.; XU, Y.; CHEN, J.; TU, Z.; CHENG, Y. E.; DING, K. Design, Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation of 1H-1,2,3-

Triazole-4-carboxamide Derivatives as New Anti-influenza A Agents Targeting Virus Nucleoprotein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 2144-2153, 2012.

CHIOSIS, G. Discovery and development of purine-scaffold Hsp90 inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1183-1191, 2006.

CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancers: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell Stress**, 2005.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**, 2^a Ed., Oxford University Press, New York, 2001.

CRAVATT, B. F.; SORENSEN, E. J. Chemical strategies for the global analysis of protein function. **Current Opinion in Chemistry Biology**, v. 4, p. 663-668, 2000.

DEITERS, A.; CROPP, T. A.; MUKHERJI, M.; CHIN, J. W.; ANDERSON, J. C.; SCHULTZ, P. G. Adding Amino Acids with Novel Reactivity to the Genetic Code of *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 11782, 2003.

DONNELLY, A. C.; MAYS, J. R.; BURLISON, J. A.; NELSON, J. T.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. J. The design, synthesis, and evaluation of coumarin ring derivatives of the novobiocin scaffold that exhibit antiproliferative activity. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 8901-8920, 2008.

DUTTA, R.; INOUE, M. GHKL, An emergent ATPase/kinase superfamily. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 24-28, 2000.

EBNER, D. C.; CULHANE, J. C.; WINKELMAN, T. N.; HAUSTEIN, M. D.; DITTY, J. L.; IPPOLITIA, J. T. Synthesis of novel oxazolidinone antimicrobial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 2651-2656, 2008.

FRIEDMAN, H. L. Influence of Isosteric Replacements upon Biological Activity, Em: National Research Council. Primeiro Simpósio Correlação Química-Biologia, Washington, EUA, **National Academy of Science**, n. 206, p. 295, 1951.

GAO, M.; DUAN, L.; LUO, J.; ZHANG, L.; LU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; TU, Z.; XU, Y.; REN, X.; DING, K. Discovery and Optimization of 3-(2 (Pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-6-yl)-ethynyl)benzamides as Novel Selective and Orally Bioavailable Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, p. 3281-3295, 2013.

GARG, G.; ZHAO, H.; BLAGG, B. S. J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Ring-Constrained Novobiocin Analogues as Hsp90 C-Terminal Inhibitors. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p. 204–209, 2015.

HADDEN, M. K.; LUBBERS, D. J.; BLAGG, B. S. Geldanamycin, radicicol, and chimeric inhibitors of the Hsp90 N-terminal ATP binding site. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 1173-1182, 2006.

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

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571-579, 1996.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, v. 295, p. 1852-1858, 2002.

HE, H.; ZATORSKA, D.; KIM, J.; AGUIRRE, J.; LLAUGER, L.; SHE, Y.; et al. Identification of potent water soluble purine-scaffold inhibitors of the heat shock protein 90. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 381-390, 2006.

HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p.1302-1315, 2010.

HIMO, F.; LOVELL, T.; HILGRAF R.; ROSTOVTSEV, V. V.; NOODLEMAN, L.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V.V. Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 210–216, 2005.

HOLDGATE, G. A.; TUNNICLIFFE, A.; WARD, W. H. J.; WESTON, S. A.; ROSENBROCK, G.; BARTH, P. T, TAYLOR, I. W. F.; PAUPIT, R. A.;TIMMS, D. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the **antibiotic novobiocin to**

a resistant mutant of DNA gyrase: A thermodynamic and crystallographic study. **Biochemistry**, v. 36, p. 9663-9673, 1997.

HONG, D. S.; SAID, R.; FALCHOOK, G. S.; NAING, A.; MOULDER, S. L.; TSIMBERIDOU, A. M.; GALLUPPI, G.; DAKAPPAGARI, N.; STORGARD, C.; KURZROCK, R.; ROSEN, L. S. Phase I study of BIIB028, a selective heat shock protein inhibitor in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 4824-4831, 2013.

HONG, L.; LIN, W.; ZHANG, F.; LIU, R.; ZHOU, X. Ln[N(SiMe₃)₂]₃-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of terminal alkynes to azides leading to 1,5-disubstituted 1,2,3-triazole derivatives: new mechanistic features. **Chemical Communications**, v. 49, p. 5589-5591, 2013.

HOWELL, S. J.; SPENCER, N.; PHILP, D. Recognition-Mediated Regiocontrol of a Dipolar Cycloaddition Reaction. **Tetrahedron**, v. 57, p. 4945-4954, 2001.

HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MOEBIUS, L.; 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen. **Chemische Berichte**, v. 100, p. 2494, 1967.

IARC. Globocan:Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Disponível em < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx> Acesso em: 04 de abril de 2015.

INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>> Acesso em: 04 de abril de 2015.

INCA. O que é câncer? Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>> Acesso em: 04 de abril de 2015.

ITOH, H.; OGURA, M.; KOMATSUDA, A.; WAKUI, H.; MIURA, A. B.; TASHIMA, Y. A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone Hsp90. **Biochemical Journal**, v. 343, p. 697-703, 1999.

JENSEN, M. R.; SCHOEPFER, J.; RADIMERSKI, T.; MASSEY, A.; GUY, C. T.; BRUEGGEN, J.; QUADT, C.; BUCKER, A.; COZENS, R.; DRYSDALE, M. J.; GARCIA-ECHEVERRIA, C.; CHÈNE, P. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. **Breast Cancer Research**, v. 2, p. 10, 2008.

JOULE, J. A.; MILLS, K. **Heterocyclic Chemistry**, 5^o Ed., Wiley-Blackwell, 2010.

KAKASHIMA, T.; ISHII, T.; TAGAYA, H.; SEIKE, T.; NAKAGAWA, H.; KANDA, Y.; AKINAGA, S.; SOGA, S.; SHIOTSU, Y. New molecular and biological mechanism of antitumor activities of KW-2478, a novel nonasnamycin heat shock protein 90 inhibitor in multiple myeloma cells. **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 2792-2802, 2010.

KAMAL, A.; THAO, L.; SENSINTAFFAR, J.; ZHANG, L.; BOEHM, M. F.; FRITZ, L. C.; BURROWS, F. J. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. **Nature**, v. 425, p.407-410, 2003.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e Clínica**. 12^a Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2014.

KIM, S.; CHO, M.; LEE, T.; LEE, S.; MIN, H.; LEE, S. K. Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of a novel triazole analogue of ceramide. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 4584-4587, 2007.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 40, p. 2004–2021, 2001.

KOLB, H. C.; SHARPLESS, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 1128-1137, 2008.

KUSUMA, B. R.; KHANDELWAL, A.; GU, W.; BROWN, D.; LIU, W.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; BLAGG, B. S. J. Synthesis and biological evaluation of coumarin replacements of novobiocin as Hsp90 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 1441–1449, 2014.

LE BRAS, G.; RADANYI, C.; PEYRAT, J. F.; BRIO, J.-D.; ALAMI, M.; MARSAUD, V.; STELLA, B.; RENOIR, J. M. New novobiocin analogues as antiproliferative agents in breast

cancer cells and potential inhibitors of heat shock protein 90. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 6189-6200, 2007.

LEE, T.; CHO M.; KO S. Y.; YOUN, H. J.; BAEK, D. J.; CHO, W. J.; KANG, C. Y.; KIM, S. Synthesis and evaluation of 1,2,3-triazole containing analogues of the immunostimulant alpha-GalCer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 585-589, 2007.

LIMA, M. L.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: A Useful Strategy for molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

MACHAJEWSKI, T. D., GAO, Z. Inhibitors of Molecular Chaperones as Therapeutic Agents, Série n° 37, **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 2014

MARCU, M. G.; CHADLI, A.; BOUHOUCHE, I.; CATELLI, M.; NECKERS, L. M. The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl terminus of the chaperone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.37181-37186, 2000^b.

MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent tresignaling proteins. **Journal of National Cancer Institute**, v. 92, p.242-248, 2000^a.

MARCU, M. G.; SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. Novobiocin and Related Coumarins and Depletion of Heat Shock Protein 90-Dependent Signaling Proteins. **Journal of National Cancer Institute**, v. 92, p. 242-248, 2000.

MARUYA, M.; SAMESHIMA, M.; NEMOTO, T.; YAHARA, I. Monomer arrangement in HSP90 dimer as determined by decoration with N and C-terminal region specific antibodies. **Journal of Molecular Biology**, v. 205, p. 903-907, 1999.

MELDAL, M.; TORNØE, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2952-3015, 2008.

MENEGATTI, R.; CUNHA, A. C.; FERREIRA, V. F.; FERREIRA, E. F. R.; EL-NABAWI, A.; ELDE-FRAWI, A. T.; ALBUQUERQUE, E. X.; NEVES, G.; RATES, S. M. K.; MERLO, A. A. **Reações pericíclicas: uma sinfonia de moléculas e elétrons**, 1ª Ed., UFRGS Editora, 2012

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Design, synthesis and pharmacological profile of novel dopamine D2 receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, 4807, 2003.

MICHAEL, A. Ueber die einwirkung von diazobenzolimid auf acetylendicarbonsäuremethylester. **Journal für Praktische Chemie**, v. 46, p. 94, 1893.

MINOWADA, G.; WELCH, W. I. Clinical implications of the stress response. **Journal Clinical Investigation**, v. 95, p. 3-12, 1995.

MYUNG, N.; CONNELLY, S.; KIM, B.; PARK, S. J.; WILSON, I. A.; KELLY, J. W.; CHOI, S. Bifunctional coumarin derivatives that inhibit transthyretin amyloidogenesis and serve as fluorescent transthyretin folding sensors. **Chemical Communications**, v. 49, p. 9188-9190, 2014

NECKERS L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. **Journal of Biosciences**, v. 32, p. 517-530, 2007.

NEUPERT, W. Protein import into mitochondria, **Annual Review Biochemistry**, v. 66, p. 863-917, 1997.

ORTIZ A. G.; SALCEDO J. M. Heat shock proteins as targets in oncology. **Clinical and Translational Oncology**, v. 12, p.166-173, 2010.

PAGLIAI, F.; PIRALI, T.; GROSSO, E. D.; BRISCO, R. D.; TRON, G. C.; SORBA, G.; GENAZZANI, A. A. Rapid Synthesis of Triazole-Modified Resveratrol Analogues via Click Chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 467-470, 2006.

PALERMO, C. M.; WESTLAKE, C. A.; GASIEWICZ, T. A. Epigallocatechin gallate inhibits aryl hydrocarbon receptor gene transcription through an indirect mechanism involving binding to a 90 KDa heat shock protein. **Biochemistry**, v. 44, p. 5041-5052, 2005.

PALMER, M. H.; FINDLAY, R. H.; GASKELL, A. J. Electronic charge distribution and moments of five- and six-membered heterocycles. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions, v. 4, p. 420-428, 1974.

PECHMANN, H. V. Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins. **Berichte der deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 17, p. 929-936, 1884.

PETER, D.; REDROBE, J. P.; NIELSEN, E. O. Novel chromen-2-one derivatives and their use as monoamine neurotransmitter re-uptake inhibitors. **WO 2007093604 A1**, 2007.

PETERSON, L.B.; BLAGG B. S. J. Click chemistry to probe Hsp90: synthesis and evaluation of a series of triazole-containing novobiocin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 3957-60, 2010.

PHILLIPS, O. A.; UDO, E.E.; ALI, A. A. M.; AL-HASSAWIA, N. Synthesis and antibacterial activity of 5-substituted oxazolidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 35-41, 2003.

PICARD. HSP90 Interactors Disponível em <<http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf>> Acesso em: 20 de abril de 2015.

PIERCE, B. A. **Genetics: A Conceptual Approach DNA**, 3ª Ed., W.H. Freeman and Company, New York 2010.

PRATT, W. B.; TOFT, D. O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70- based chaperone machinery. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, p.111-133, 2003.

PRODROMOU, C.; PANARETOU, B.; CHOCHAN, S.; SILIGARDI, G.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; ROE, S. M.; PIPER, P.W.; PEARL, L. H. The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. **EMBO Journal**, v. 19, p.4383-4392, 2002.

PRODROMOU, C.; PEARL, L. H. Structure and functional relationships of Hsp90. **Current Cancer Drug Targets**, v. 3, p.301-323, 2003.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**, 7ª Ed., Elsevier, 2012.

RITOSSA, F. A. New puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. **Cellular and Molecular Life Sciences Journal**, v. 18, p.571- 573, 1962.

RODIONOV, V. O.; FOKIN, V. V.; FINN, M. G. Mechanism of the ligand-free CuI-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 44, p. 2210-2215, 2005.

ROE, S. M.; PRODROMOU, C.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; PIPER, P.W.; PEARL, L.H. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 260-266, 1999.

SHARPLESS, K. B.; ROSTOVTSEV, V. V.; GREEN, L. G.; FOKIN, V. V. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 41, p. 2596–2599, 2002.

SANGSHETTI, J. N.; NAGAWADE, R. R.; SHINDE, D. B. Synthesis of novel 3-(1-(1-substituted piperidin-4-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazol-5(4H)-one as antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 3564-3567, 2009.

SCOPUS. Disponível em <<http://www.scopus.com/>> Acesso em: 12 de abril de 2015.

SETHNA, S. M.; SHAH, N. M. The Chemistry of coumarins. **Chemical Reviews**, v. 36, p. 1-62, 1945.

SHELTON, S. N.; SHAWGO, M. E.; MATTHEWS, S. B.; LU, Y.; DONNELLY, A. C.; SZABLA, K.; TANOL, M.; VIELHAUER, G. A.; RAJEWSKI, R. A.; MATTS, R. L.; BLAGG, B. S. J.; ROBERTSON, J. D. KU135, a novel novobiocin-derived C-terminal inhibitor of the 90-kDa heat shock protein, exerts potent antiproliferative effects in human leukemic cells. **Molecular Pharmacology**, v. 76, p. 1314–1322, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia**, 6^a Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

SIVAKUMAR, K.; XIE, F.; CASH, B. M.; LONG, S.; BARNHILL, H. N.; WANG, Q. A Fluorogenic 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of 3-Azidocoumarins and Acetylenes. **Organic Letters**, v. 6, p. 4603-4606, 2004.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry reactions, mechanism, and structure**, 6^o Ed., Wiley, New York, 2007.

SOLIT, D. B.; BASSO, A. D.; OLSHEN, A. B.; SCHER, H. I.; ROSEN, N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to taxol. **Cancer Research**, v. 63, p. 2139- 2144, 2003.

SOLTIS, M. J.; YEH, H. J.; COLE, K. A.; WHITTAKER, N.; WERSTO, R. P.; KOHN, E. C. Identification and characterization of human metabolites of CAI [5-amino-1-(4'-chlorobenzoyl-3,5-dichlorobenzyl)-1,2,3-triazole-4-carboxamide]. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 24, p. 799-806, 1996.

SONOGASHIRA, K. Development of Pd–Cu catalyzed cross coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 653, p. 46–49, 2002.

SONOGASHIRA, K.; TOHDA, Y.; HAGIHARA, N. A.; A Convenient Synthesis of Acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromolkenes, iodoarenes, and bromopyridines. **Tetrahedron Lett**, v. 50, p. 4467-4471, 1975.

SOTI, C.; RAEZ, A.; CSERMELY, P. A nucleotide-dependent molecular switch controls ATP binding at the C-terminal domain of Hsp90. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 7066-7075, 2002.

SOTI, C.; VERMES, A.; HAYSTEAD, T. A. J.; Csermely, P. Comparative analysis of the ATP-binding sites of Hsp90 by nucleotide affinity cleavage: a distinct nucleotide specificity of the C-terminal ATP-binding site. **European Journal Biochemistry**, v. 270, p. 2421-2428, 2003.

STEFANI, H.A.; GULOGIAN, K.; MANARIN, F.; FARSKY, S.H.P.; ZUKERMAN-SCHECTOR, J.; CARACELLI, I.; RODRIGUES, S. R. P.; MUSCARÁ, M.N.; TEIXEIRA, S.A.; SANTIN, J. R.; MACHADO, J. D.; BOLONHEIS, S.M.; CURI, R.; VENOLO, M. A. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 117-127, 2012.

STENDERUP, K.; ROSADA, C.; GAVILLET, B.; VUAGNIAUX, G.; DAM, T. N. Debio 0932, a new oral Hsp90 inhibitor alleviates psoriasis in a xenograft transplantation model. **Acta Dermato-Venereologica**, v.94, p. 672-676, 2014.

STRAUB B. F. m-Acetylide and m-alkenylidene ligands in “click” triazole syntheses. **Chemical Commun**, v. 2007, p. 3868–3870, 2007.

SUDHIR, V. S.; VENKATESWARLU, C.; MUSTHAF, O. T. M.; SAMPATH, S.; CHANDRASEKARAN, S. Click Chemistry Inspired Synthesis of Novel Ferrocenyl-

Substituted Amino Acids or Peptides. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 13, p. 2120-2129, 2009.

SUPKO, J. G.; HICKMAN, R. L.; GREVER, M. R.; MALSPEIS, L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. **Cancer Chemother Pharmacology**, v. 36, p. 305-315, 1995

TERASAWA, K.; MINAMI, M.; MINAMI, Y.; Constantly Update Knowledge of HSP90. . **Journal Biochemistry Minireview**, v. 137, p. 443-447, 2004.

TORNFE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3057, 2002.

TRABOCCHI, A.; MENCHI, G.; CINI, N.; BIANCHINI, F.; RASPANTI, S.; BOTTONCETTI, A.; PUPI, A.; CALORINI, L.; GUARNA, A. Click-Chemistry-Derived Triazole Ligands of Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) Integrins with a Broad Capacity To Inhibit Adhesion of Melanoma Cells and Both in Vitro and in Vivo Angiogenesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, 7119, 2010.

TRON G. C.; PIRALI, T.; BILLINGTON, R. A.; CANONICO, P. L.; SORBA, G.; GENAZZANI, A. A. Click chemistry reactions in medicinal chemistry: applications of 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, p.278-308, 2008.

TSAI, F. T. F.; SINGH, O. M. P.; SKARZYNSKI, T.; WONACOTT, A. J.; WESTON, S.; TUCKER, A.; PAUPTIT, R. A.; BREEZE, A. L.; POYSER, J. P.; O'BRIEN, R.; LADBURY, J. E.; WIGLEY, D. B. The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. **Proteins Structure Function Genetics Journal**, v. 28, p. 41-52, 1997.

UCSF. Disponível em <<http://colorectal.surgery.ucsf.edu/conditions--procedures/rectal-cancer.aspx>> Acesso em: 03 de maio de 2015.

WANDINGER, S. K.; RICHTER, K.; BUCHNER, J. The Hsp90 chaperone machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 18473–18477, 2008.

WANG, Y.; TREPEL, J. B.; NECKERS, L. M.; GIACCONE, G. STA-9090, a small-molecule Hsp90 inhibitor for the potential treatment of cancer. **Current Opinion Investigational Drugs**, v. 11, p. 1466-1476, 2010.

WELCH, W. J. The role of heat-shock proteins as molecular chaperones. **Current Opinion Investigational Drugs**, v. 3, p.1033-1038, 1991.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**, 1° Ed., Academic Press, Londres, 1996.

WHITESELL L.; LINDQUIST, S. L. HSP90 and the chaperoning of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 761-772, 2005

WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, I. C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. B.; FOKIN, V. V. Rapid Discovery and Structure–Activity Profiling of Novel Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Enabled by the Copper(I)-Catalyzed Synthesis of 1,2,3-Triazoles and Their Further Functionalization. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 7697-7710, 2006.

WHO. Cancer: Factsheets. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Acesso em: 04 de abril de 2015.

WORKMAN, P. (2003) Strategies for treating cancers caused by multiple genome abnormalities: from concepts to cures? **Current Opinion Investigational Drugs**, v. 4, p.1410-1415, 2003.

WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annual Review Cell Developmental Biology**, v. 11, p.441-469, 1995.

WYNN, R. M.; DAVIE, J. R.; COX, R. P.; CHUANG, D. T. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v. 124, p. 31-36, 1994.

YEE, D. J.; BALSANEK, V.; SAMES, D. Ligands for aldoketoreductases. **WO2006023821 A2**, 2006.

YU, X.; SHEN, G.; NECKERS, L.; BLAKE, H.; HOLZBEIERLEIN, J.; CRONK, B.; BLAGG, B. S. J. Hsp90 Inhibitors Identified from a Library of Novobiocin Analogues. **Journal of American Chemical Society**, v. 127, p. 12778-12779, 2005

YUN, B.; HUANG, W.; LEACH, N.; HARTSON, S. D.; MATTS, R. L. Novobiocin Induces a Distinct Conformation of Hsp90 and Alters Hsp90- Cochaperone-Client Interactions. **Biochemistry**, v. 43, p. 8217-8229, 2004.

ZHAO R.; DAVEY, M.; HSU, Y. C.; KAPLANEK P.; TONG, A.; PARSONS, A. B.; KROGAN, N.; CAGNEY, G.; MAI, D.; GREENBLATT J.; BOONE, C.; EMILI, A.; HOURY, W. A. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. **Cell**, v. 120, p. 715–727, 2005.

ZHAO, H.; ANYIKA, M.; GIRGIS, A.; BLAGG, B. S. J. Novologues containing a benzamide side chain manifest anti-proliferative activity against two breast cancer cell lines. . **Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3633–3637, 2014.

ZHAO, H.; BLAGG, B. S. J. Novobiocin analogues with secondgeneration noviose surrogates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 552– 557, 2013.

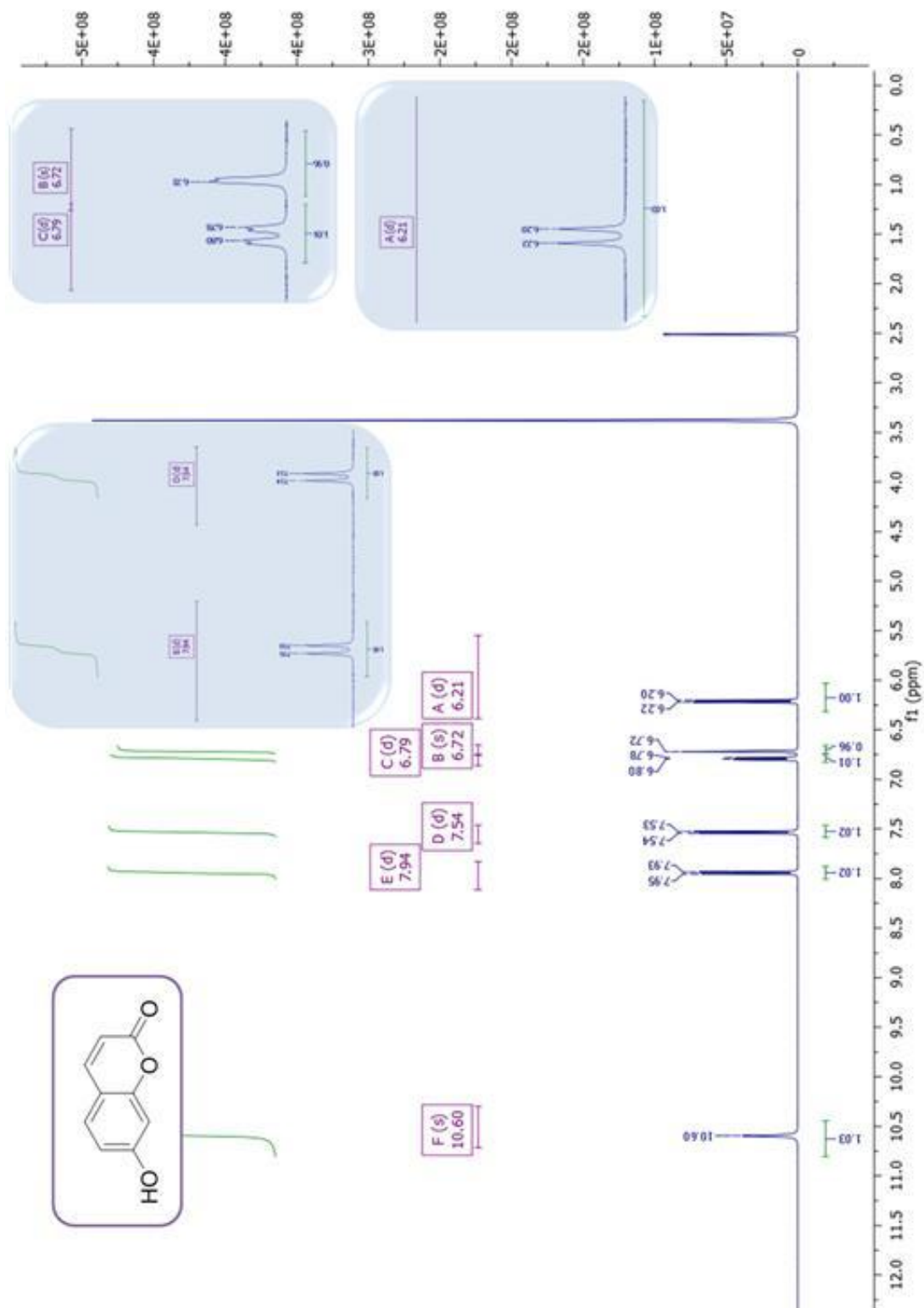
ZHAO, H.; DONNELLY, A. C.; KUSUMA, B. R.; BRANDT, G. E. L.; BROWN, D.; RAJEWSKI, R. A.; VIELHAUER, G.; HOLZBEIERLEIN, J.; COHEN, M. S.; BLAGG, B. S. J. Engineering an Antibiotic to Fight Cancer: Optimization of the Novobiocin Scaffold to Produce Anti-proliferative Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 3839, 2011.

ZHAO, H.; GARG, G.; ZHAO, J.; MORONI, E.; GIRGIS, A.; FRANCO, L. S.; SINGH, S.; COLOMBO, G.; BLAGG, B. S. J. Design, synthesis and biological evaluation of biphenylamide derivatives as Hsp90 C-terminal inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, p. 442-466, 2015.

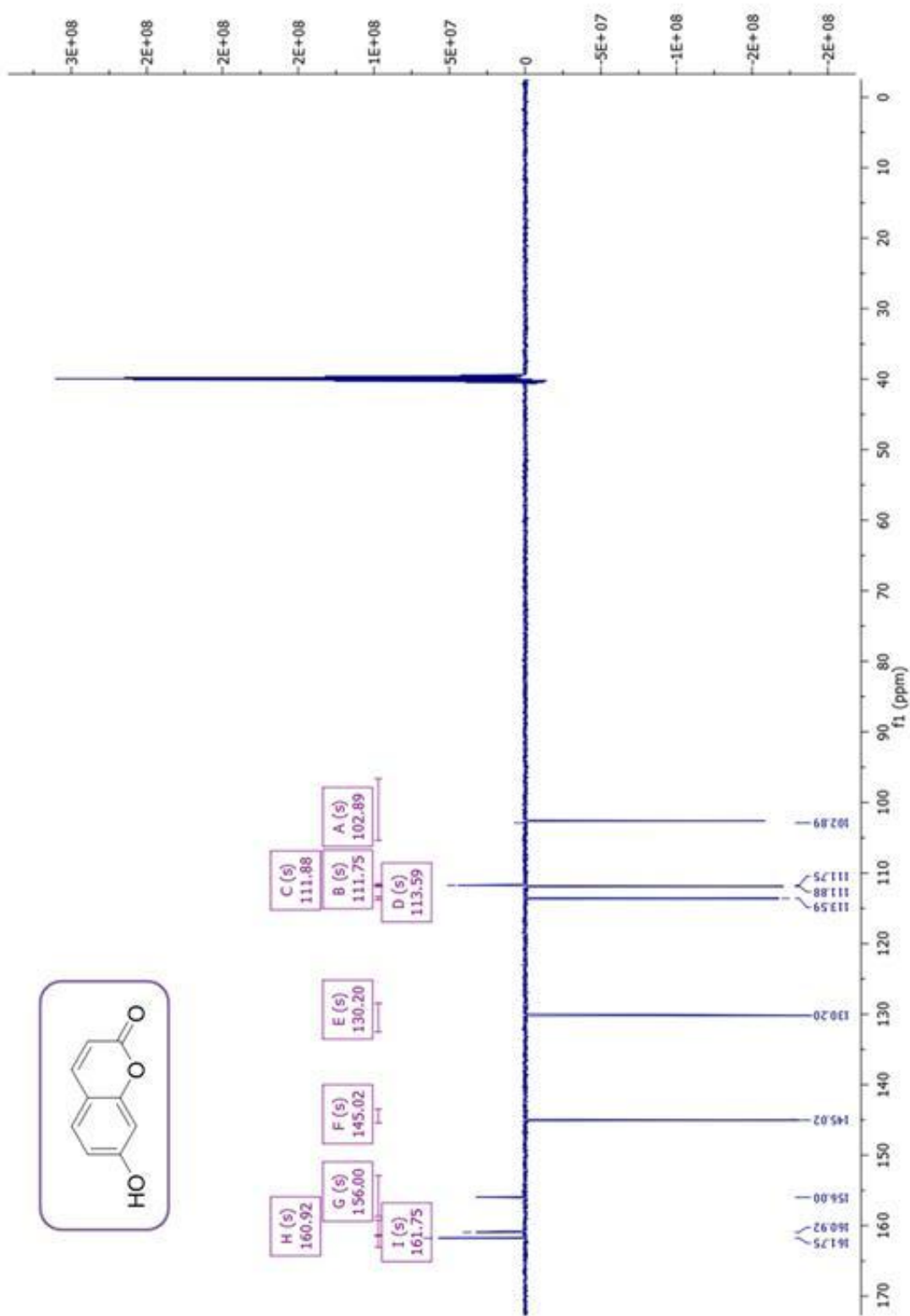
ZHAO, H.; YAN, B.; PETERSON, L. B.; BLAGG, B. S. J. 3-Arylcoumarin derivatives manifest anti-proliferative activity through Hsp90 inhibition. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 3, p. 327–331, 2012.

5. ANEXOS

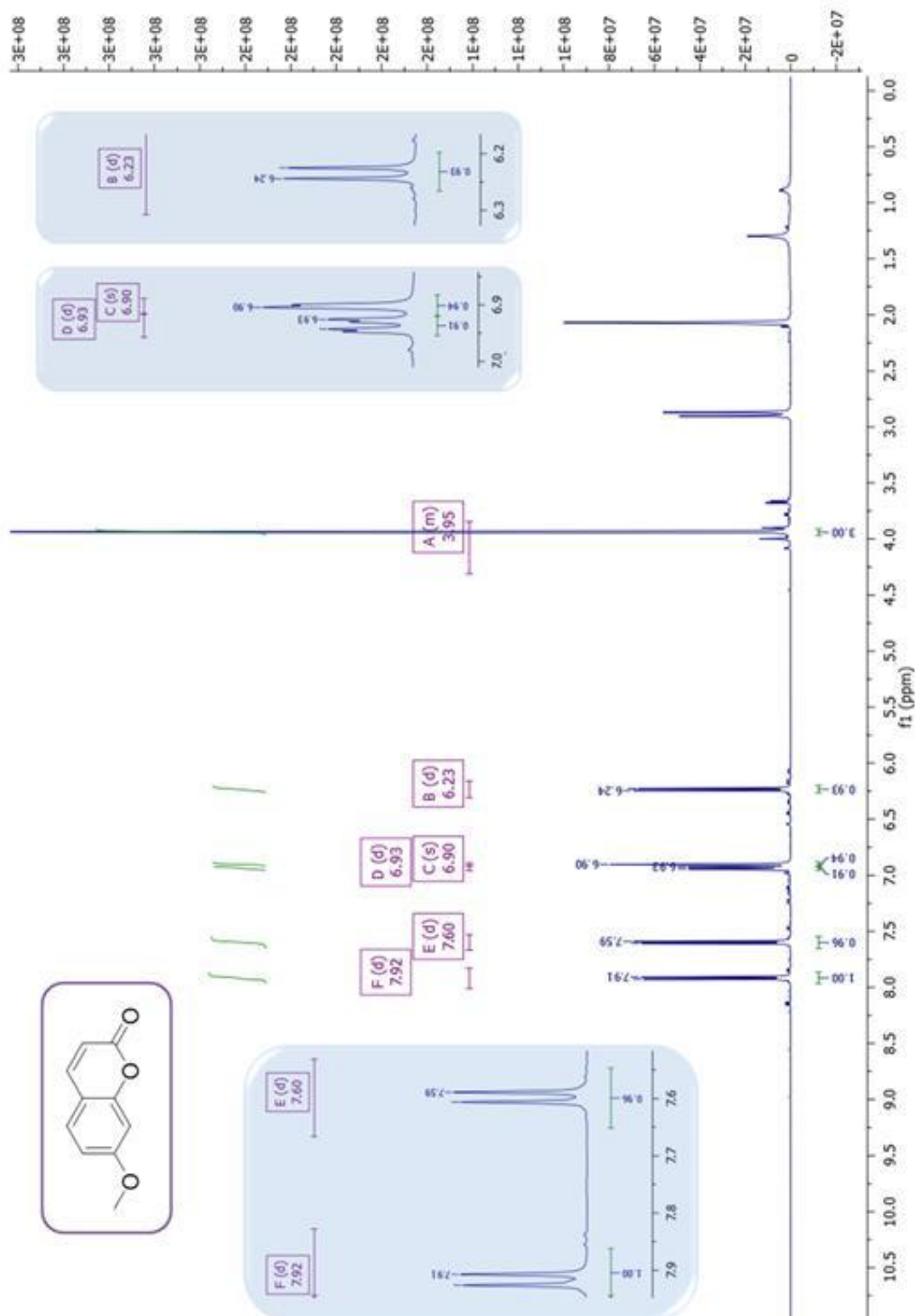
Anexo 1. Espectro de RMN ^1H do composto (**83**) com ampliação em 6,15-6,29 ppm, 6,6-6,85 ppm e 7,51-7,99 ppm em DMSO- d_6 à 500MHz.



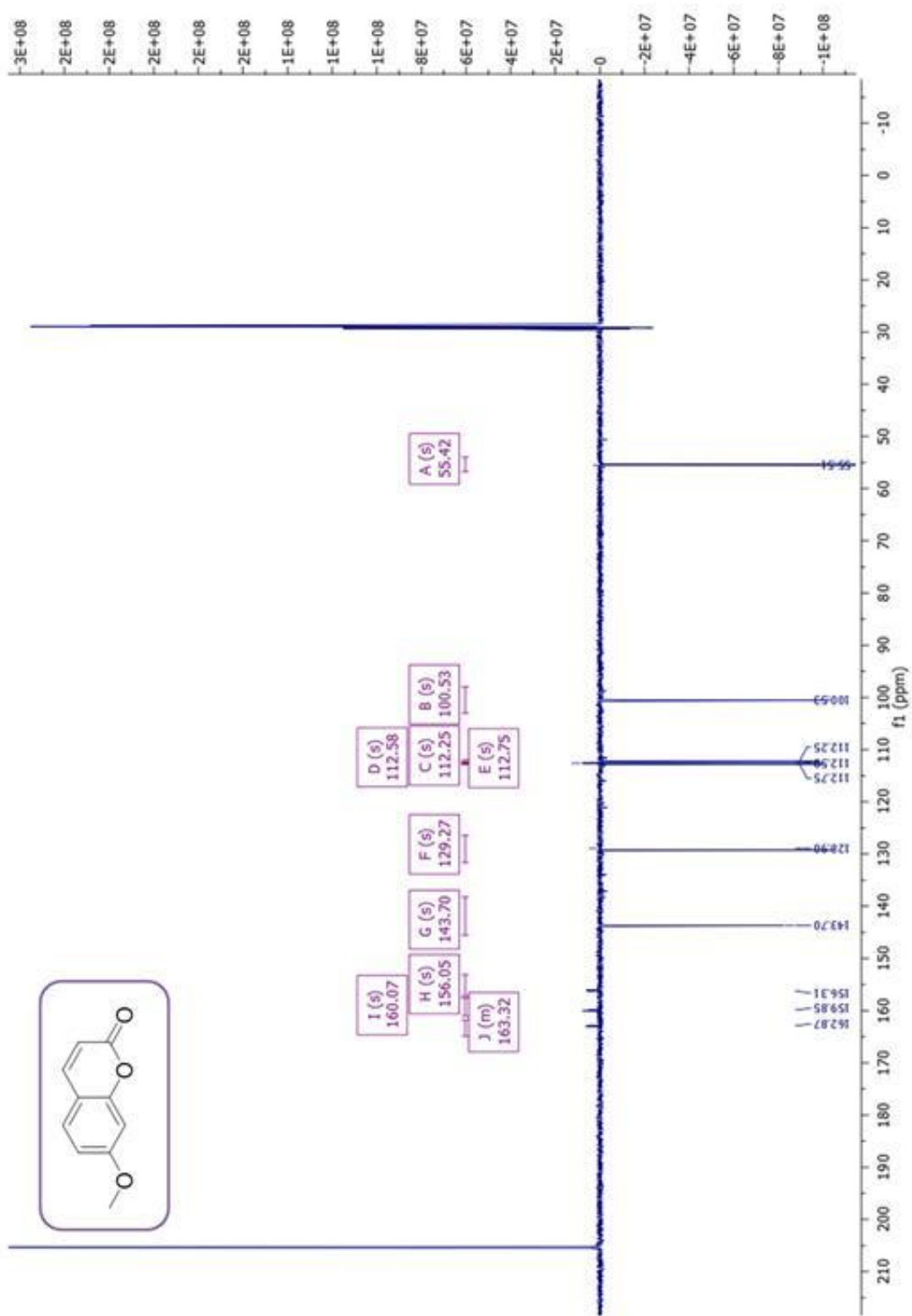
Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**83**) em DMSO- d_6 à 125MHz.



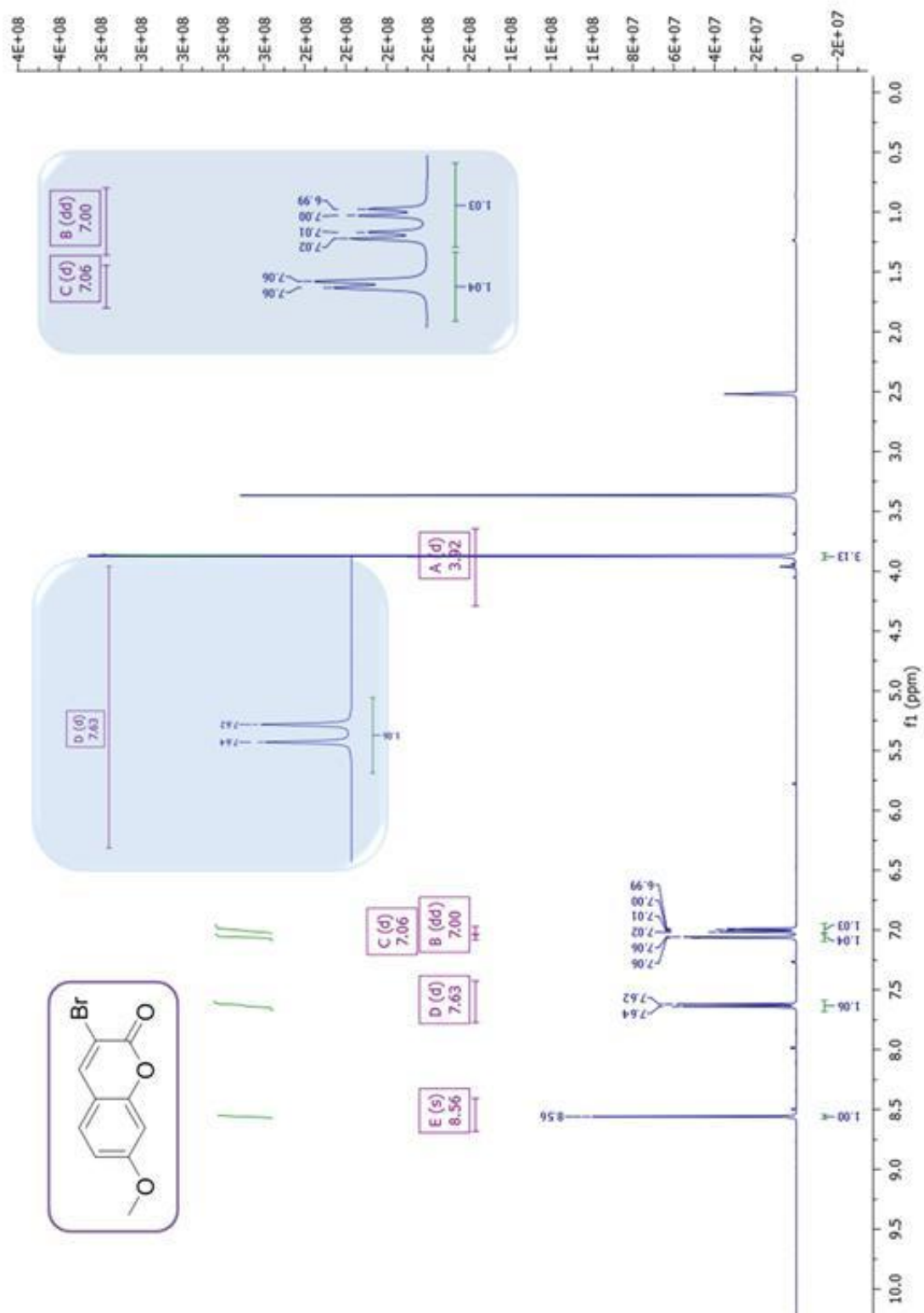
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H do produto (**82**) com ampliação 6,2-6,3 ppm, 6,89-7,0 ppm e 7,55-7,95 ppm em acetona- d_6 à 500MHz.



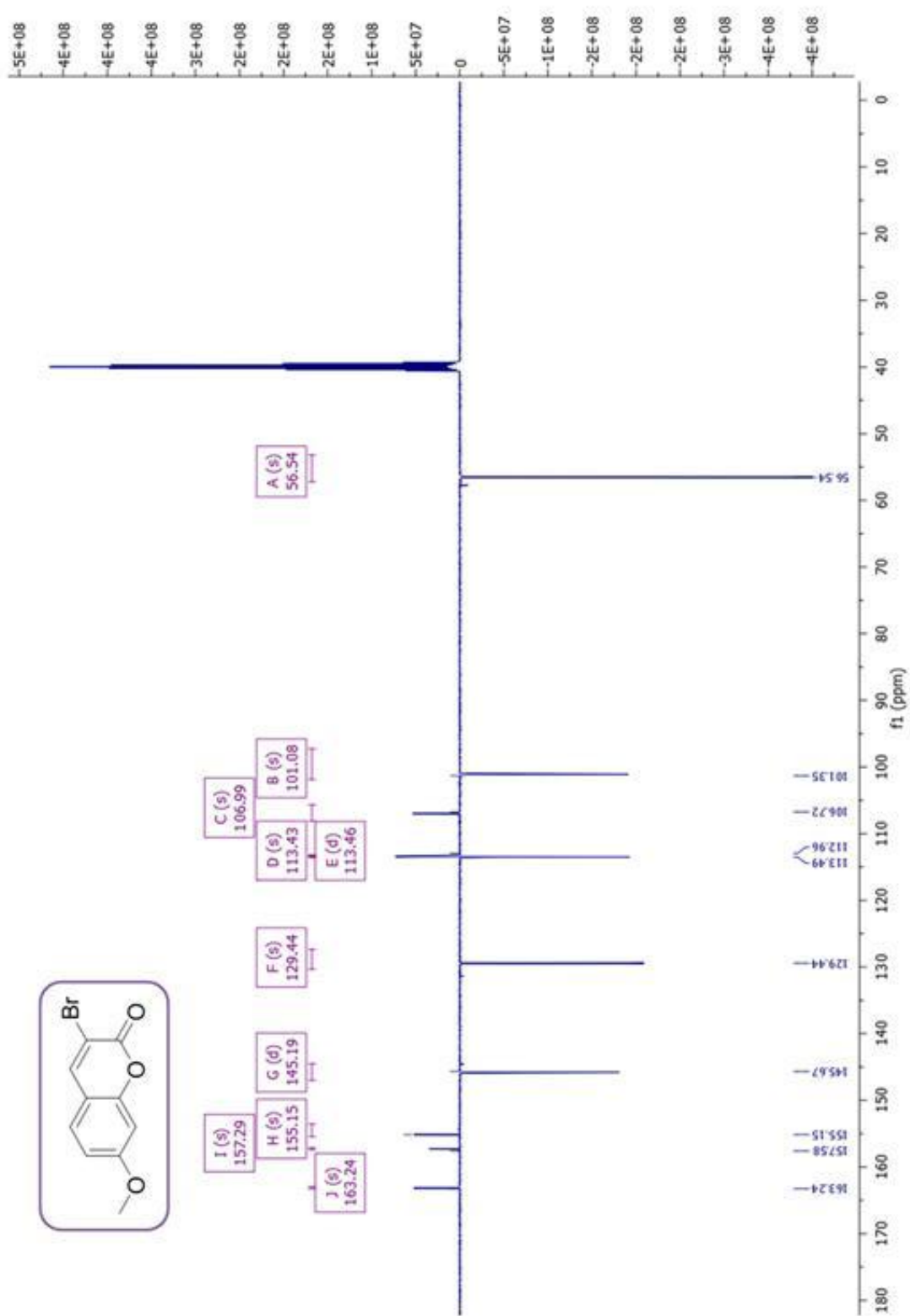
Anexo 4. Espectro de RMN ^{13}C do produto (82) em acetona- d_6 à 125MHz.



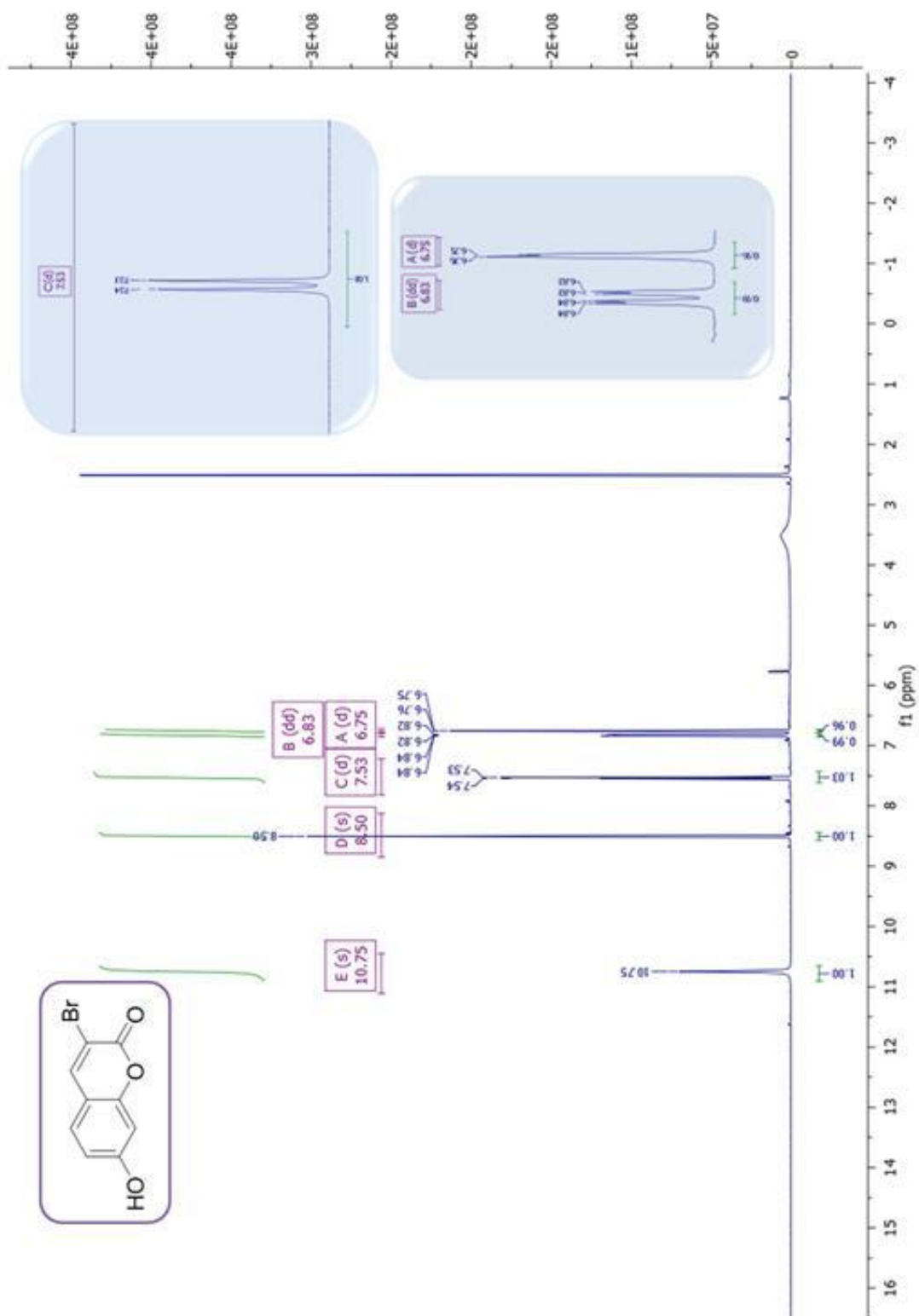
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H do produto (**81a**) com ampliação em 6,97-7,09 ppm, 7,50-7,74 em DMSO- d_6 à 400MHz.



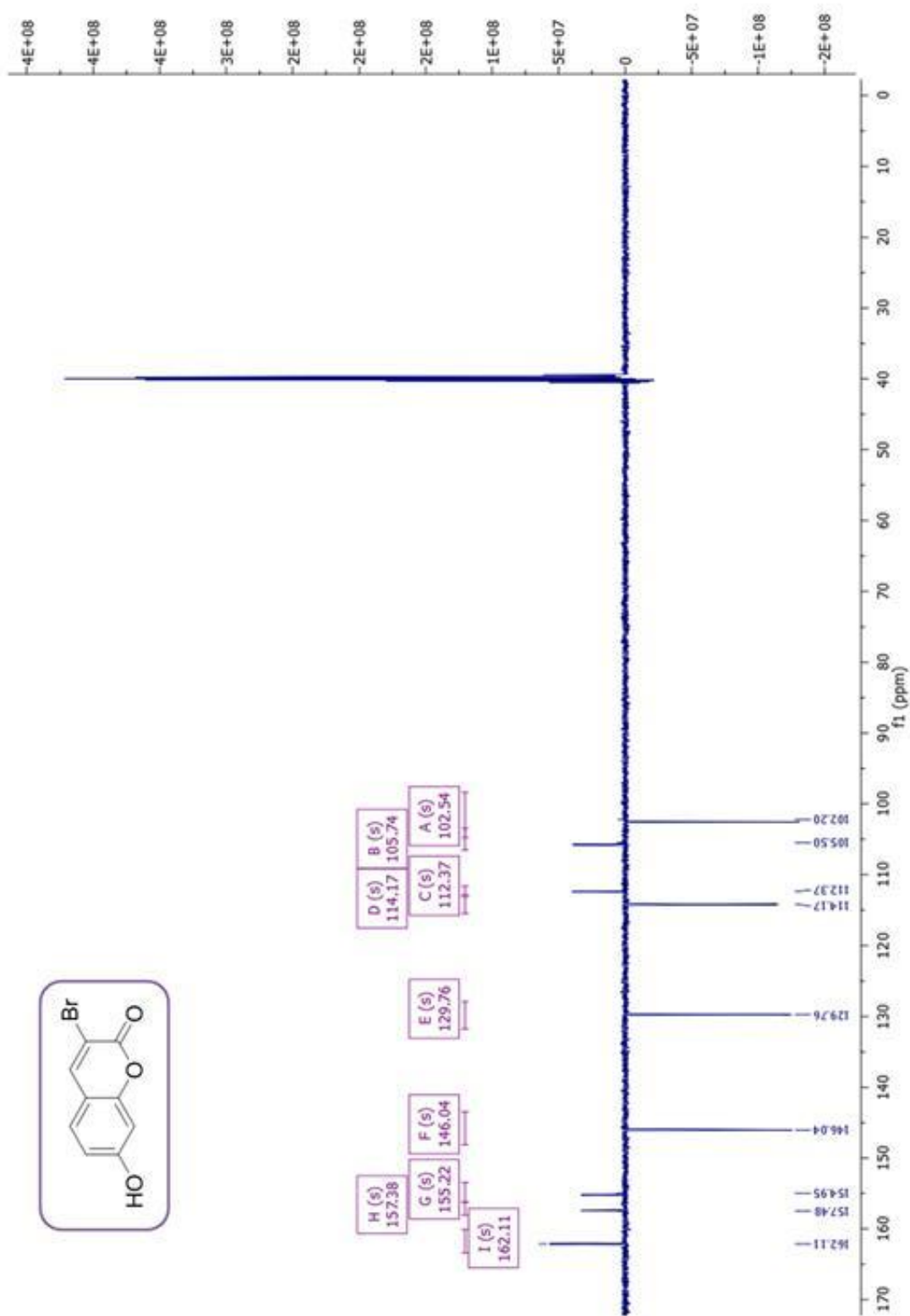
Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C do produto (81a) em DMSO- d_6 à 100 MHz.



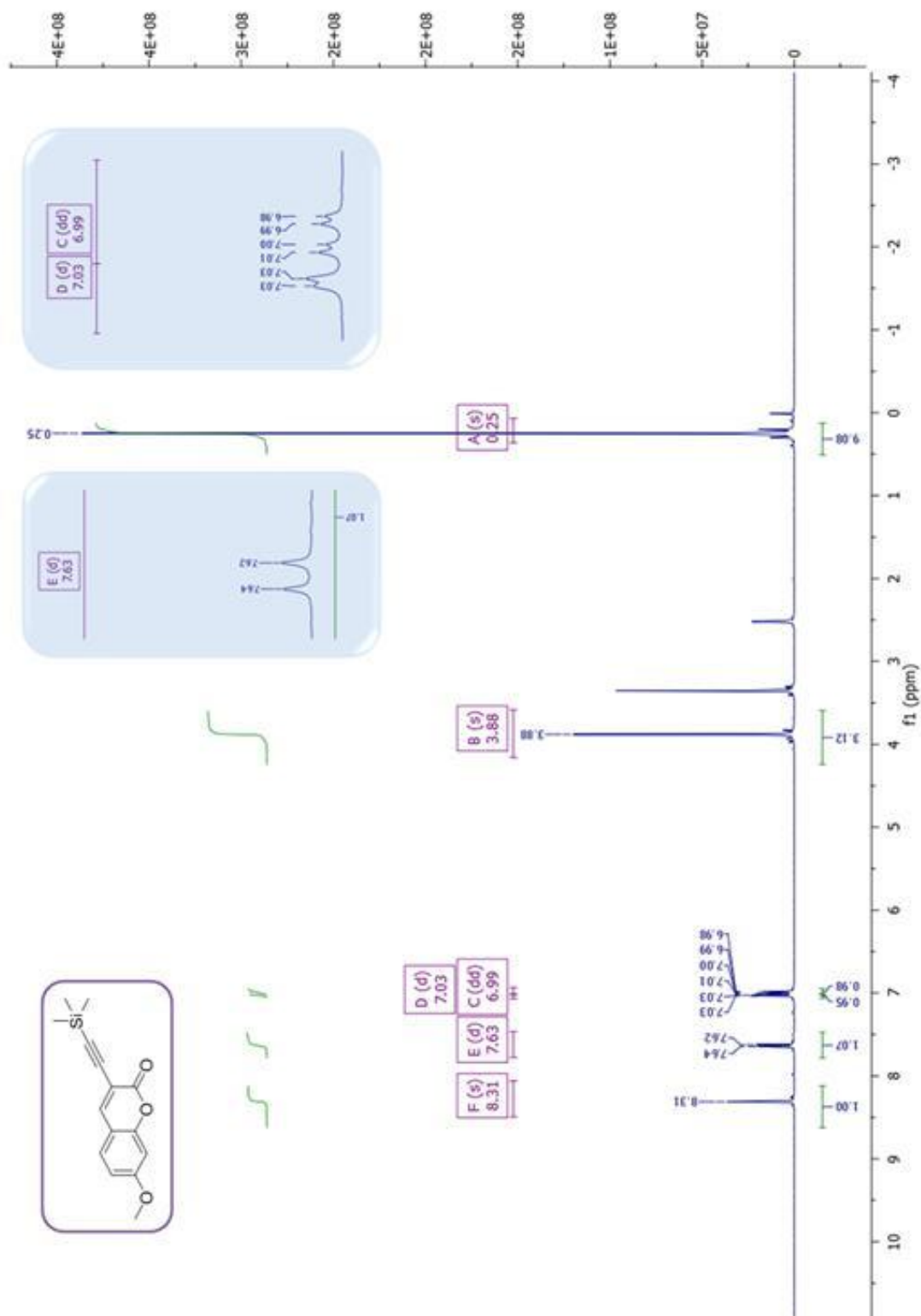
Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do produto (**81b**) com ampliação em 6,74-6,85 ppm e 7,43-7,63 ppm em DMSO- d_6 à 500MHz.



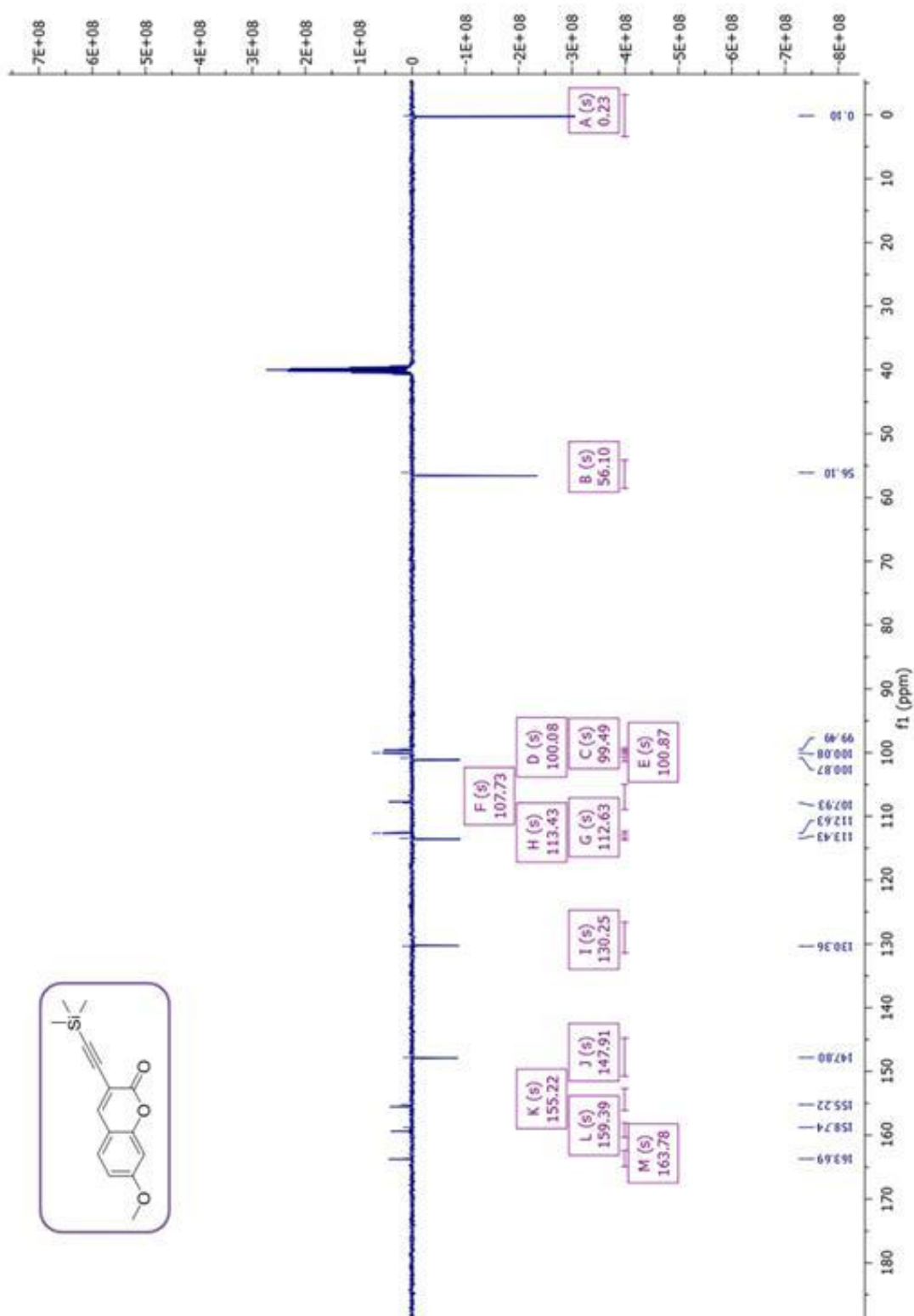
Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**81b**) em DMSO- d_6 à 125MHz.



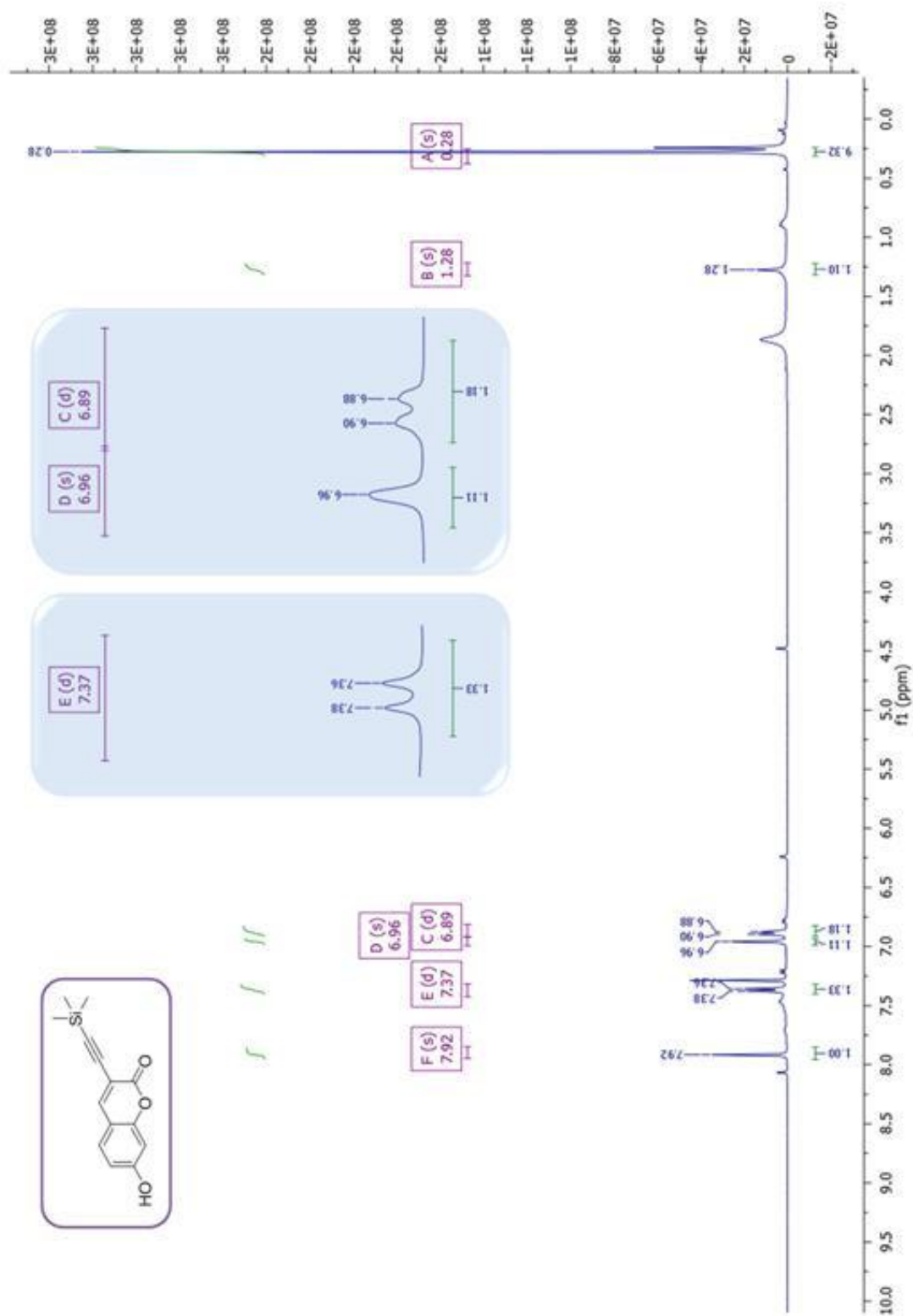
Anexo 9. Espectro de RMN ^1H do produto (**88a**) com ampliação em 6,94-7,06 ppm e 7,59-7,66 ppm em DMSO- d_6 à 400MHz.



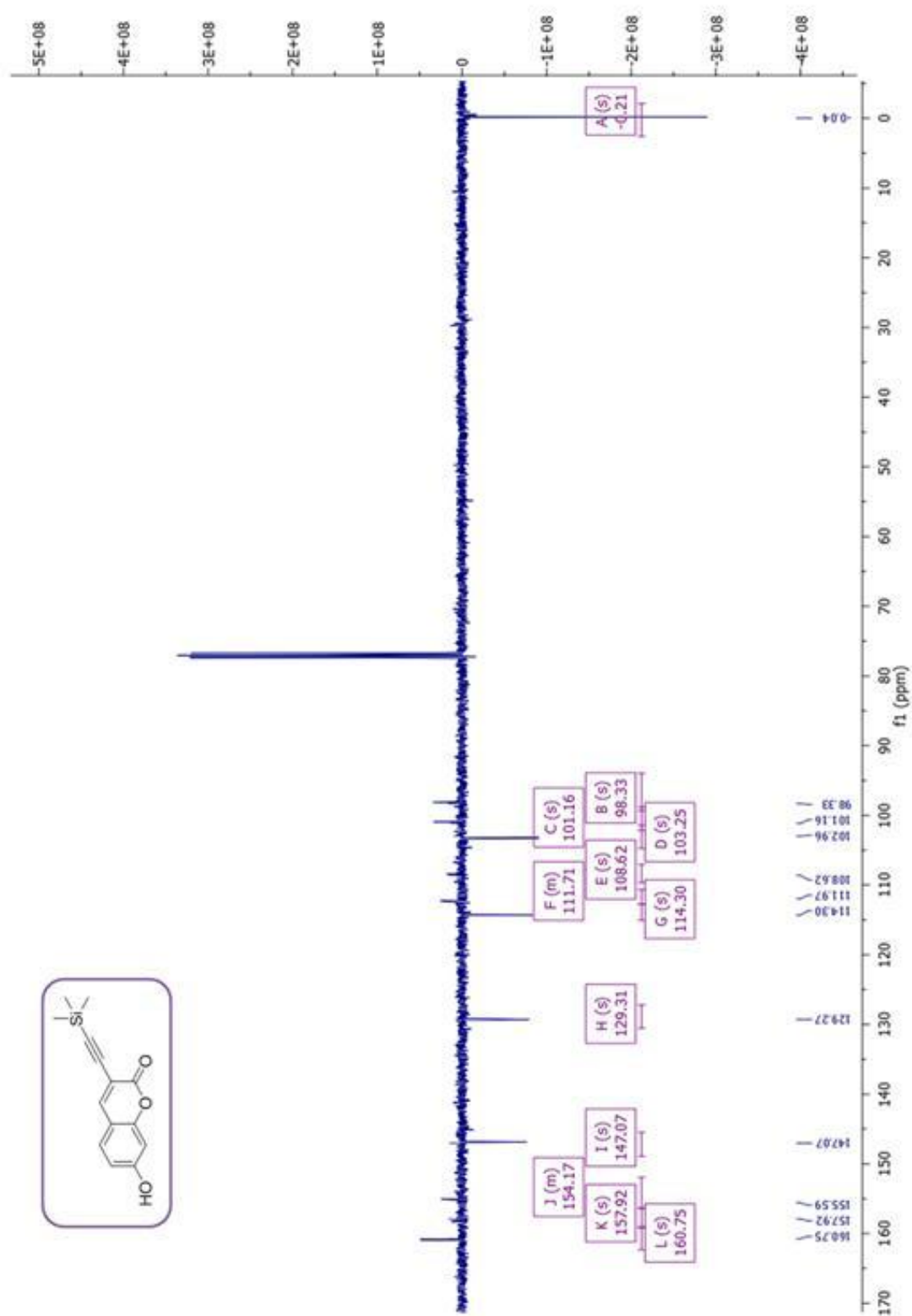
Anexo 10. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**88a**) em DMSO- d_6 à 100 MHz.



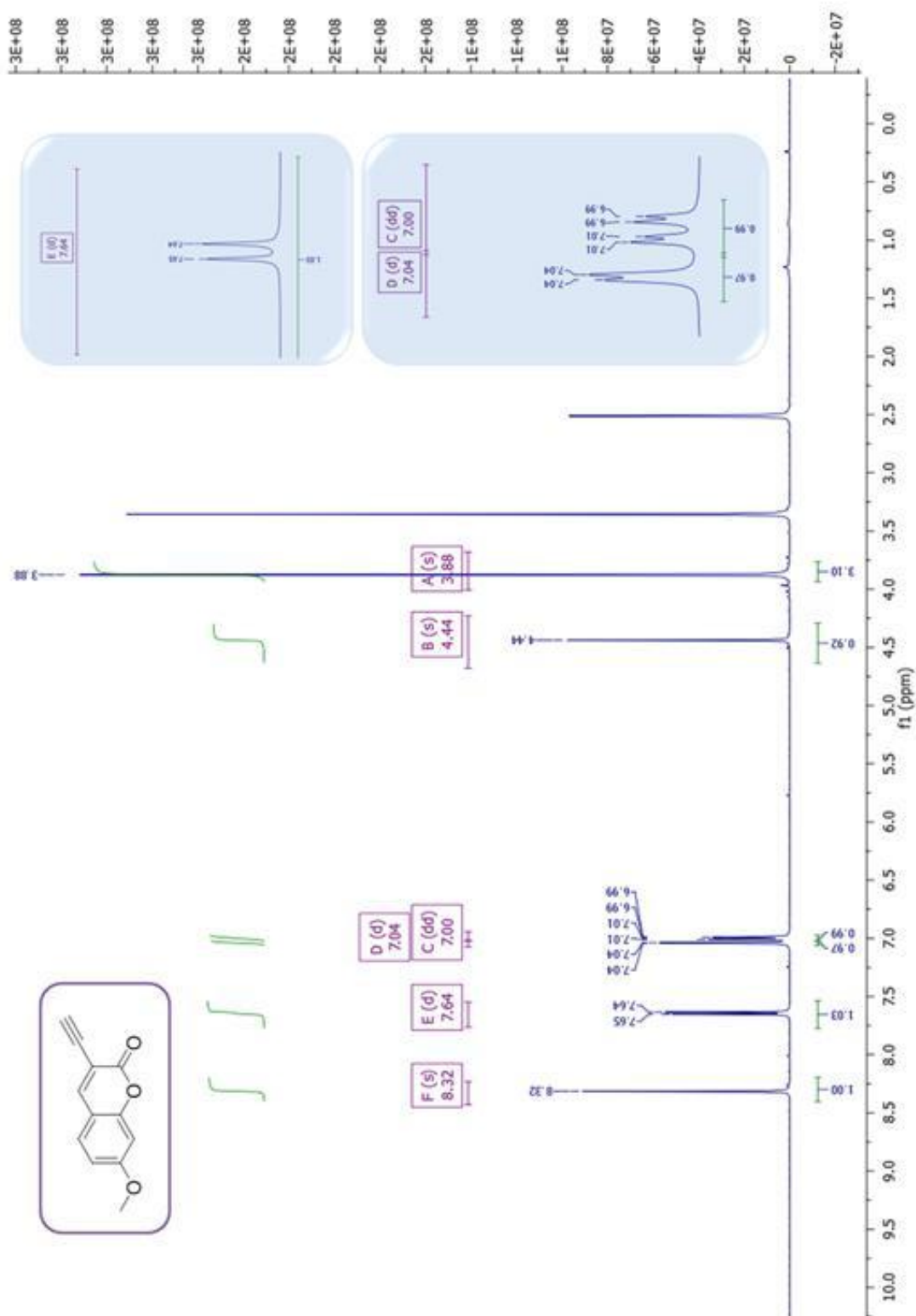
Anexo 11. Espectro de RMN ^1H do produto (**88b**) com ampliação em 6,85- 6,99 ppm e 7,35-7,40 ppm em CDCl_3 à 400MHz.



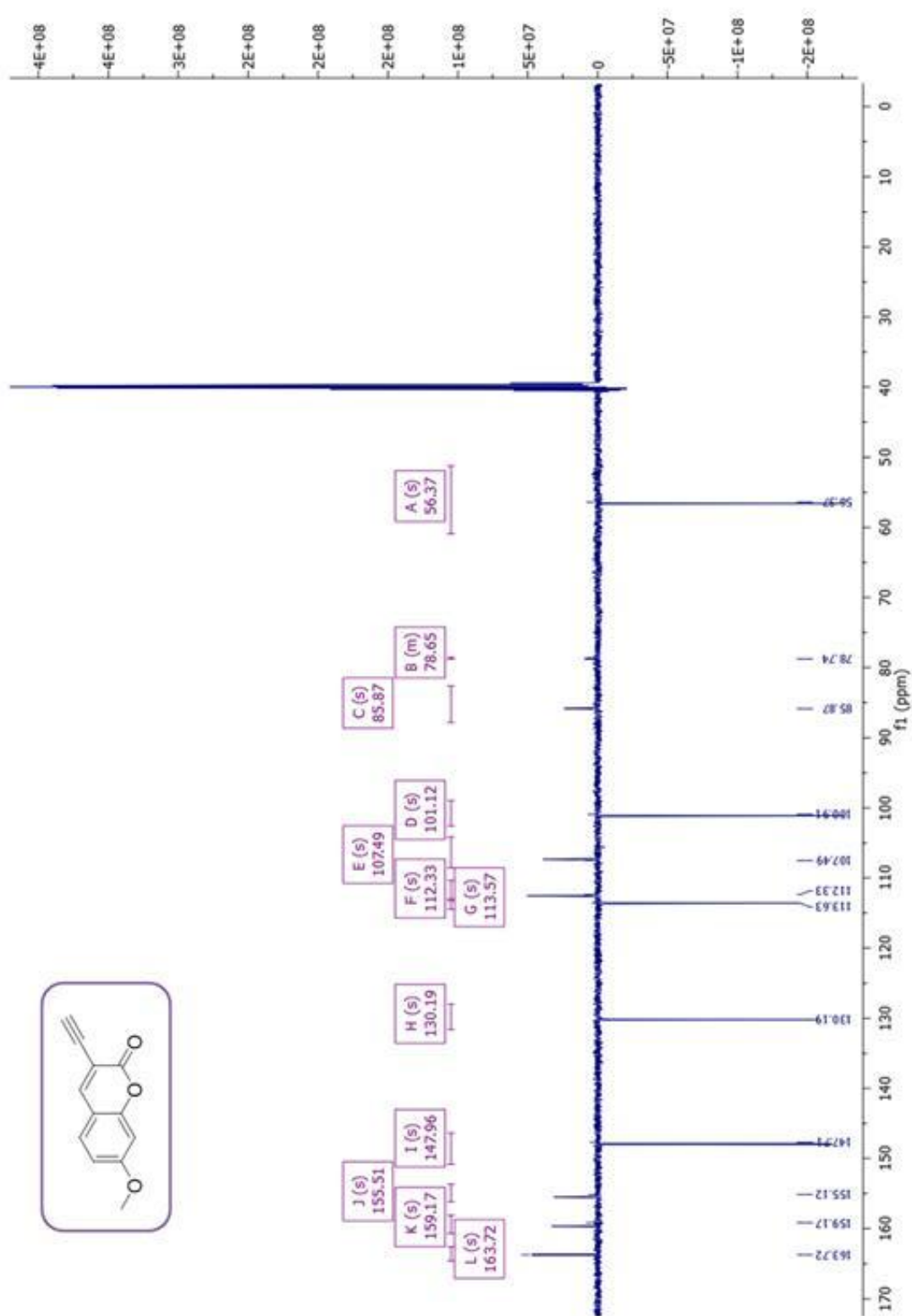
Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C do produto (88b) em CDCl_3 à 100MHz.



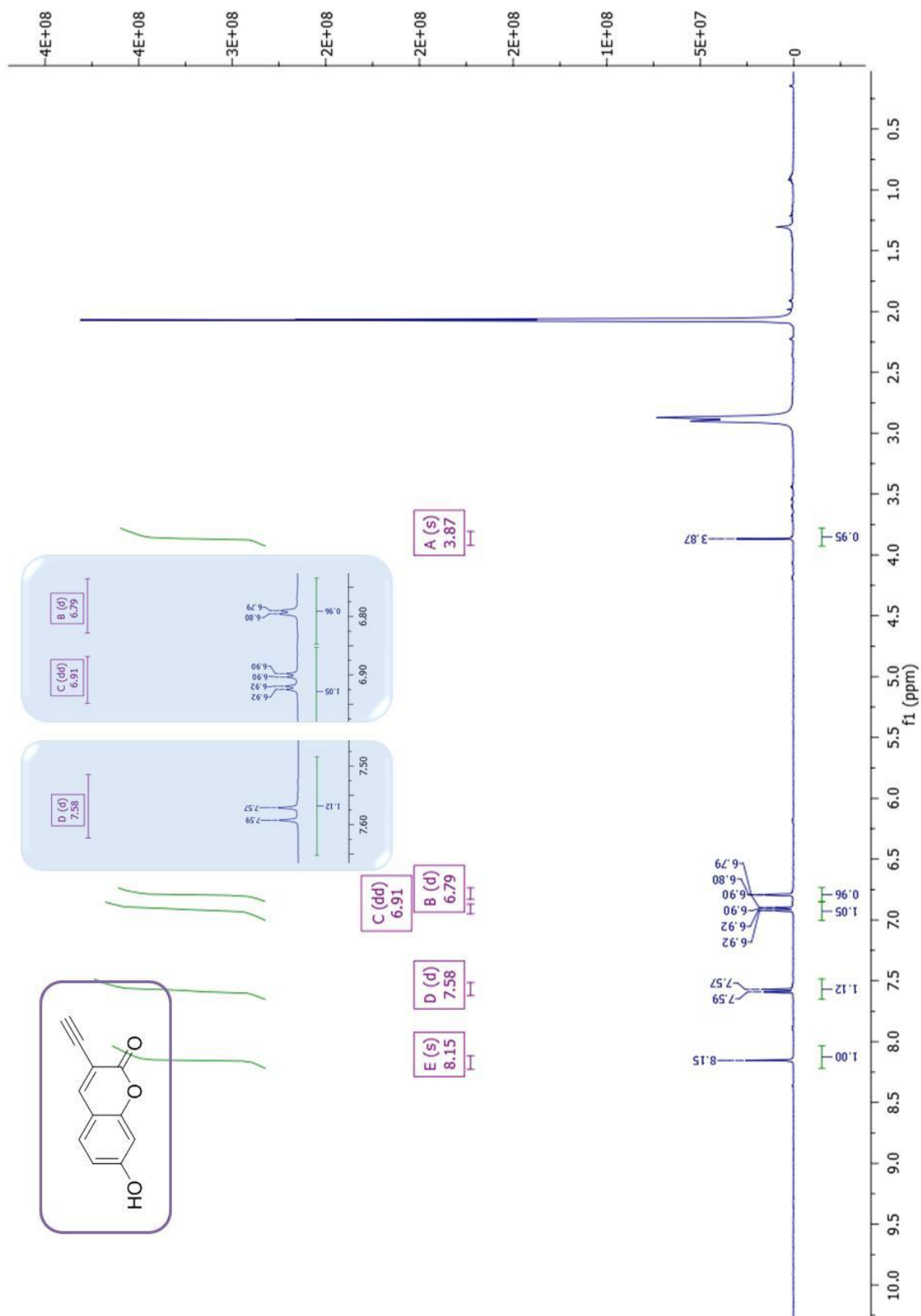
Anexo 13. Espectro de RMN ^1H do produto (80a) com ampliação em 6,98-7,06 e 7,60-7,69 ppm em DMSO à 500MHz.



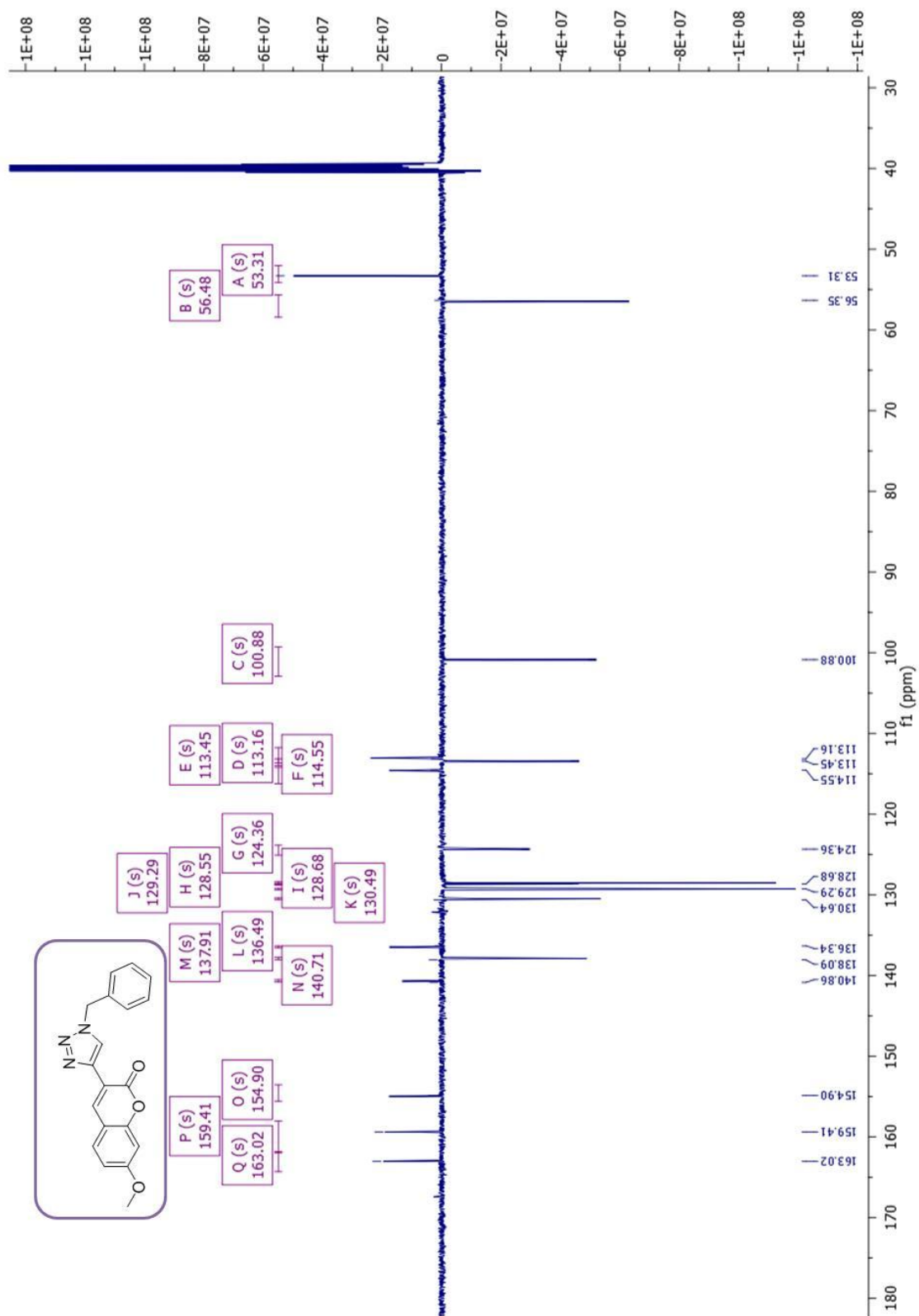
Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C do produto (**80a**) em DMSO- d_6 à 125MHz.



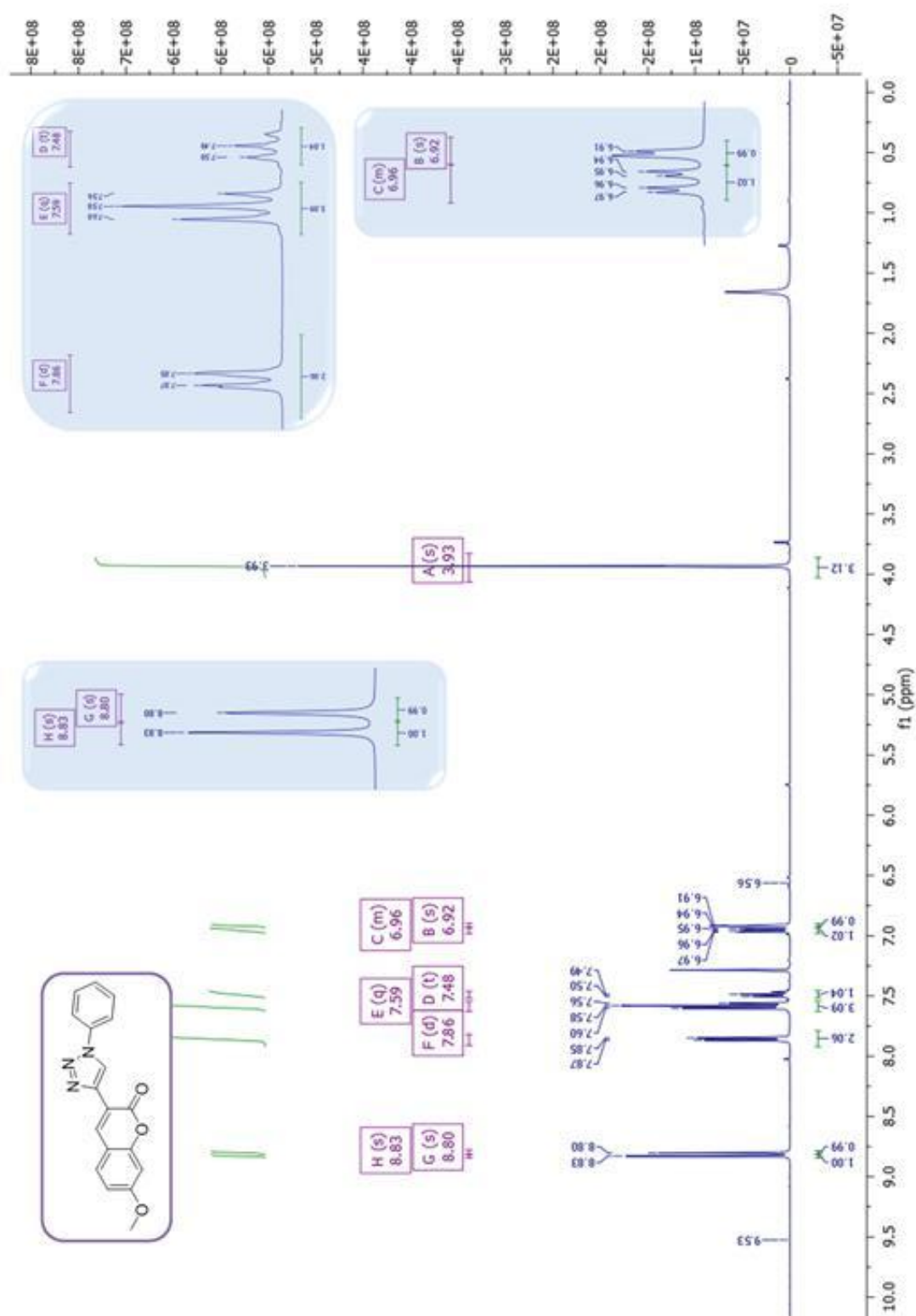
Anexo 15. Espectro de RMN ^1H do produto (**80b**) com ampliação em 8,7-7,4 ppm em CDCl_3 à 500MHz.



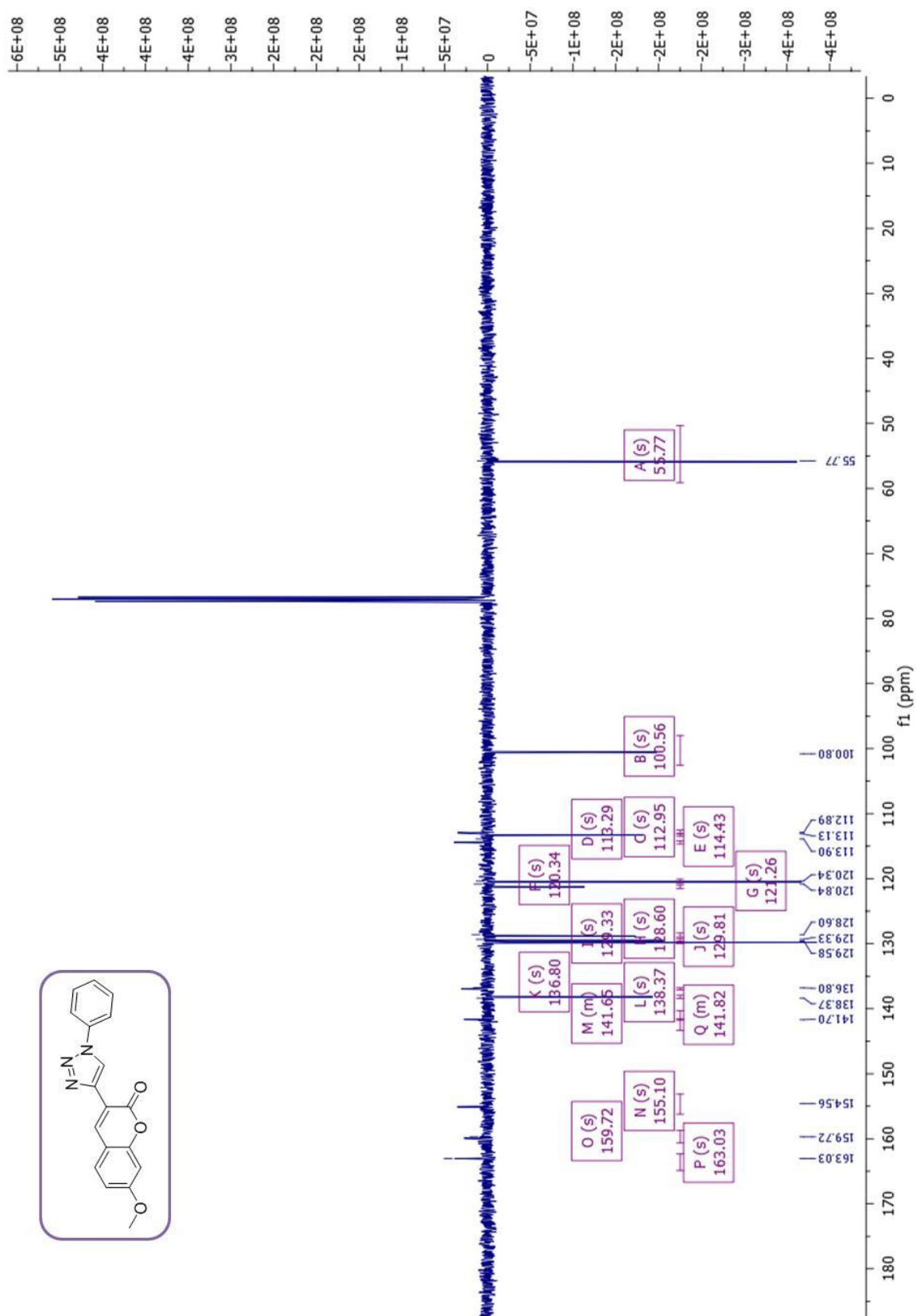
Anexo 17. Espectro de RMN ^{13}C do produto (76a) em DMSO- d_6 à 100MHz.



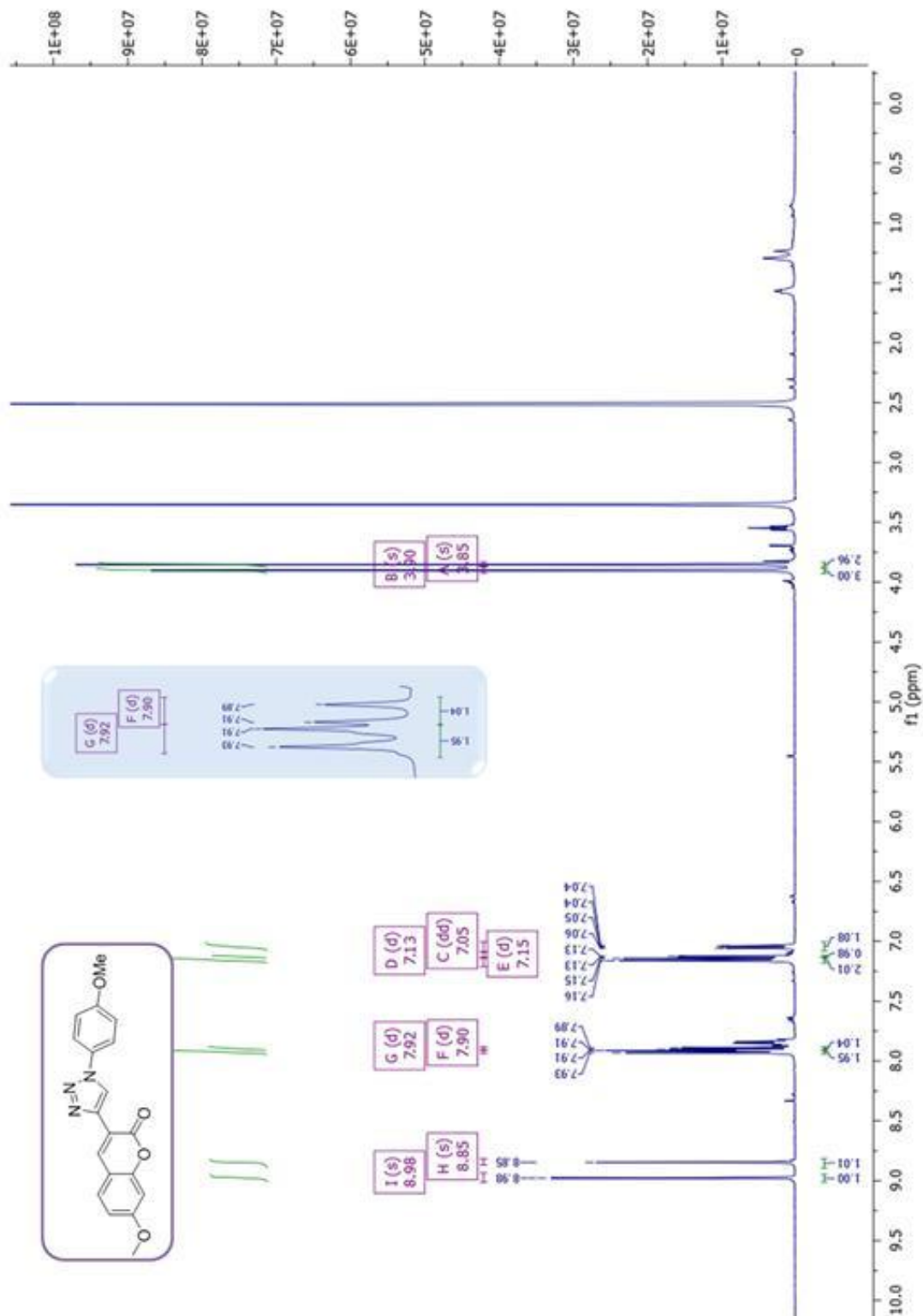
Anexo 18. Espectro de RMN ^1H do produto (**76b**) com ampliação em 7,43-7,91 ppm e 6,90-7,01 ppm em CDCl_3 à 400MHz.



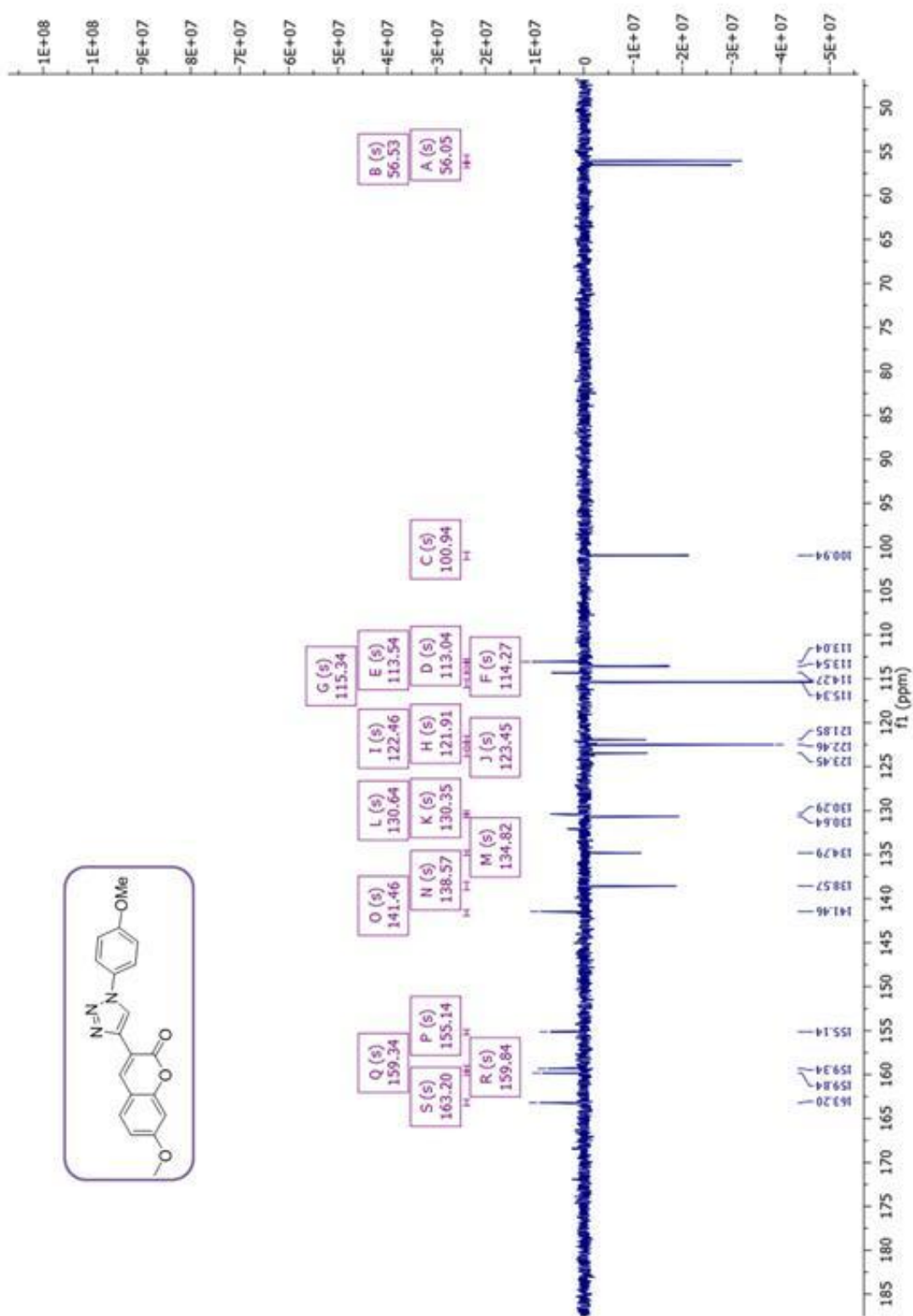
Anexo 19. Espectro de RMN ^{13}C do produto (76b) em CDCl_3 à 100MHz.



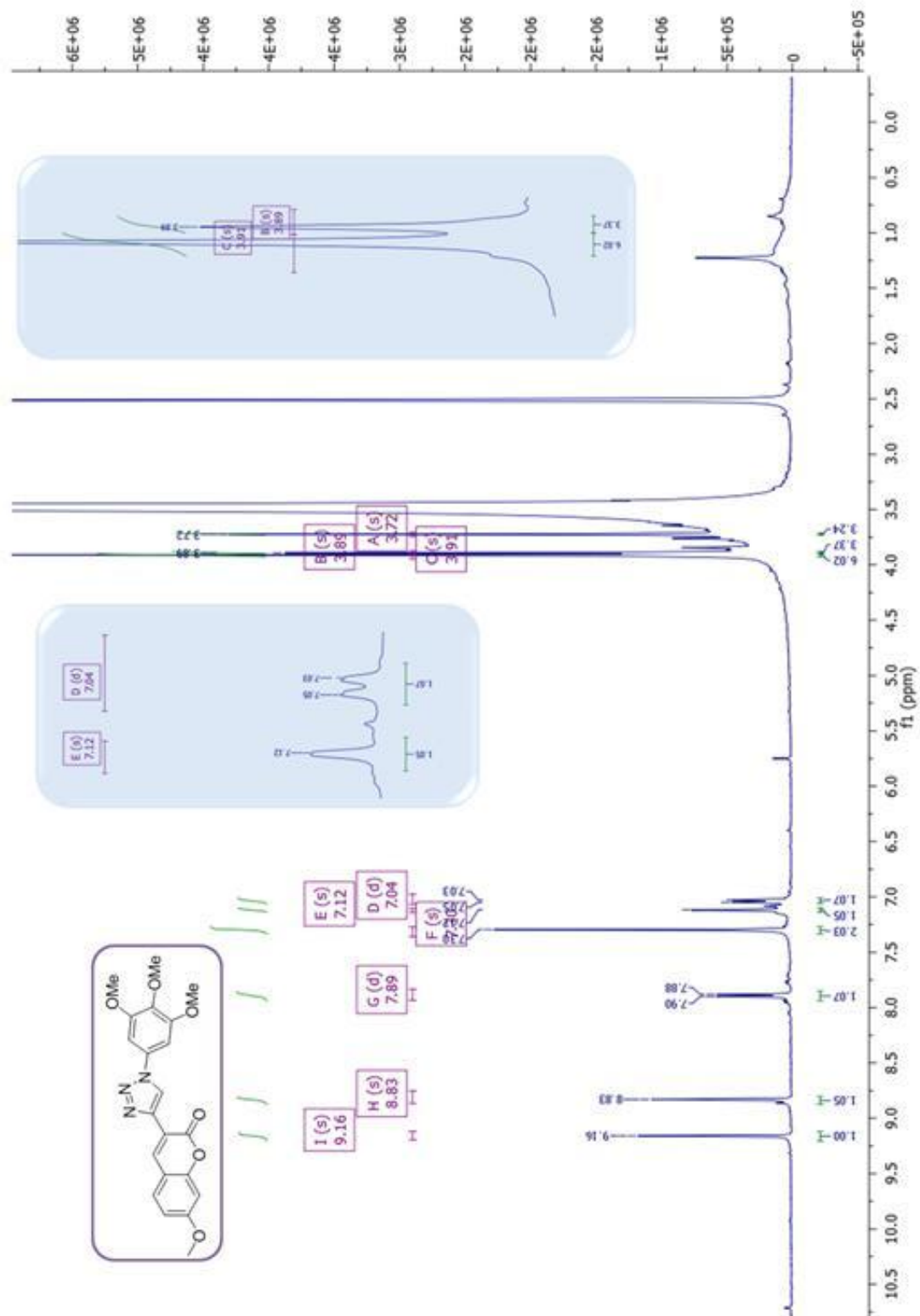
Anexo 20. Espectro de RMN ^1H do produto (**76c**) com ampliação em 7,88-7,65 ppm e 7,01-7,19 ppm em DMSO- d_6 à 500MHz.



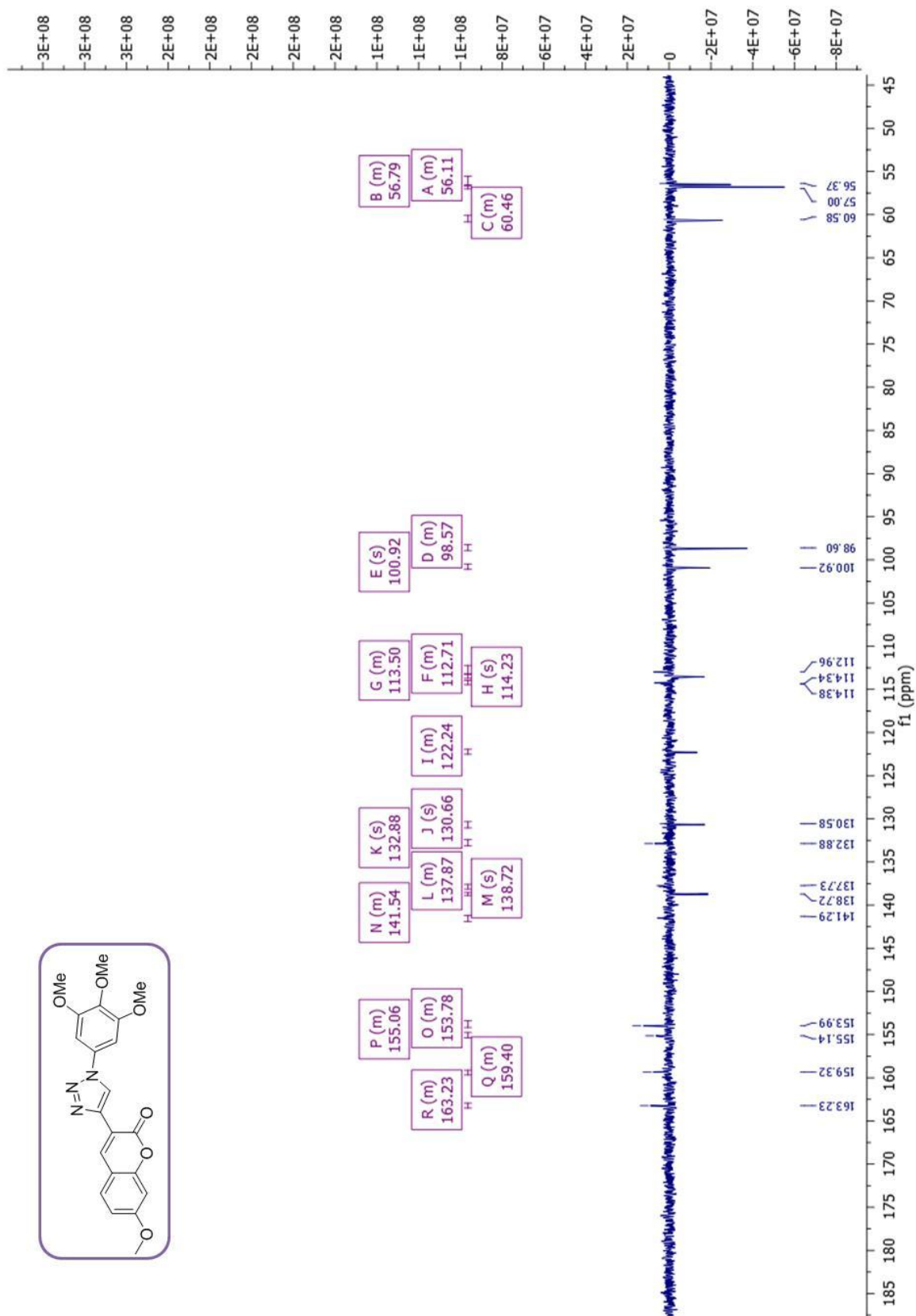
Anexo 21. Espectro de RMN ^{13}C do produto (76c) em DMSO- d_6 à 125MHz.



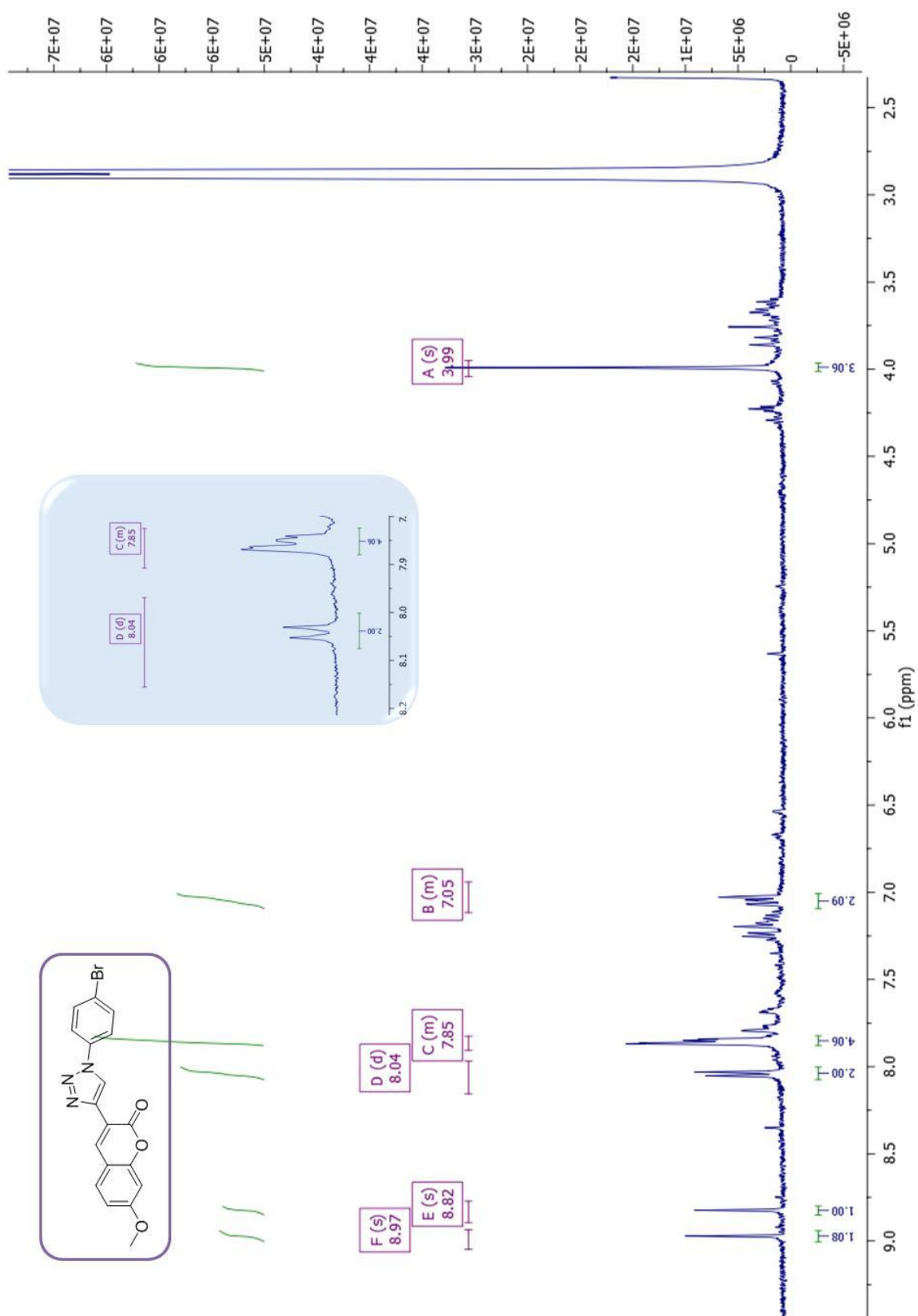
Anexo 22. Espectro de RMN ^1H do produto (76d) com ampliação em 7,02-7,15 ppm e 3,86-3,95 ppm em DMSO- d_6 à 500MHz.



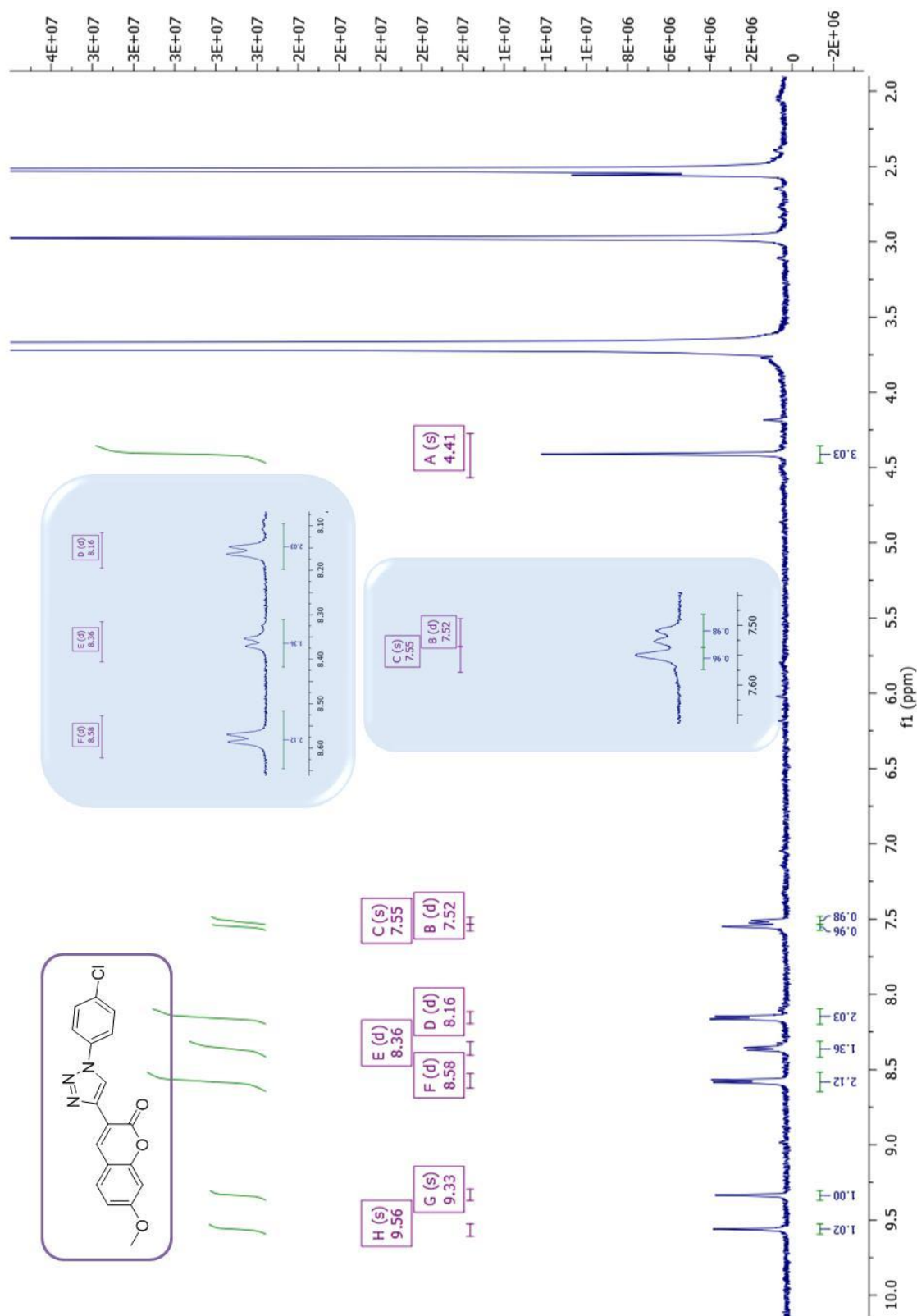
Anexo 23. Espectro de RMN ^{13}C do produto (76d) em DMSO- d_6 à 125MHz.



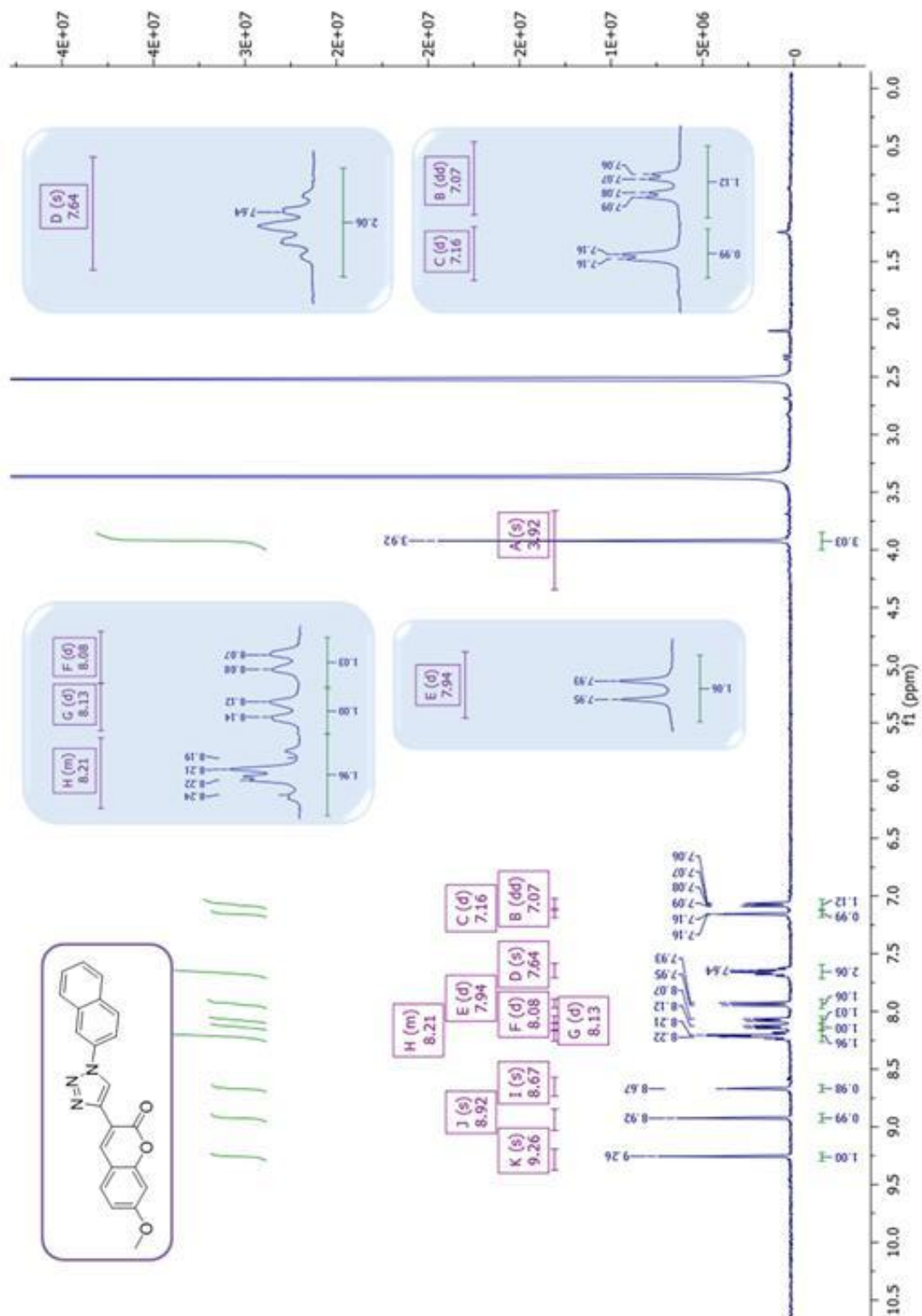
Anexo 24. Espectro de RMN ^1H do produto (76e) com ampliação em 7,80-8,2 ppm em acetona- d_6 à 400MHz.



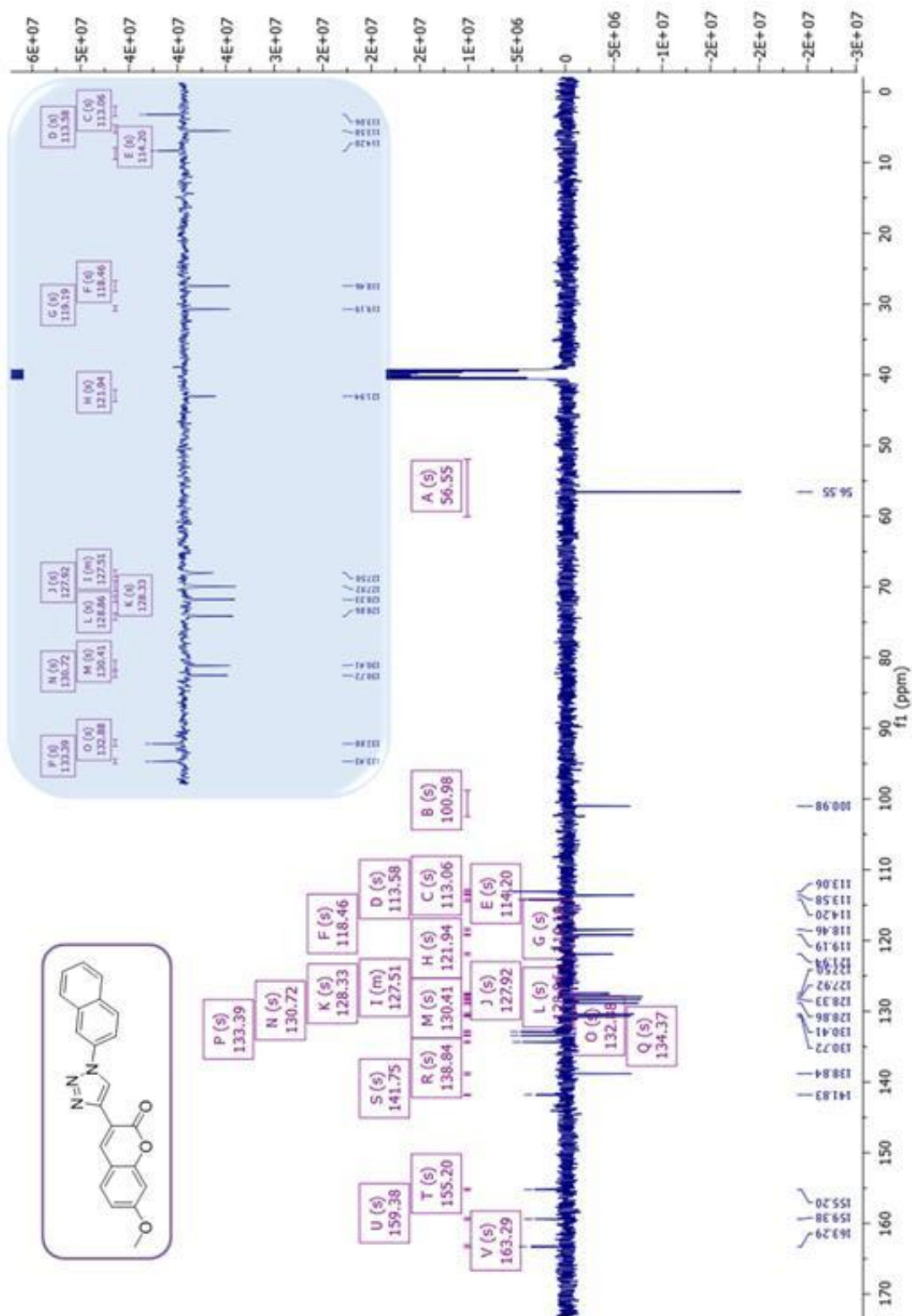
Anexo 25. Espectro de RMN ^1H do produto (**76f**) com ampliação em 7,45-7,65 ppm e 8,10-8,65 ppm em DMSO- d_6 à 500MHz.



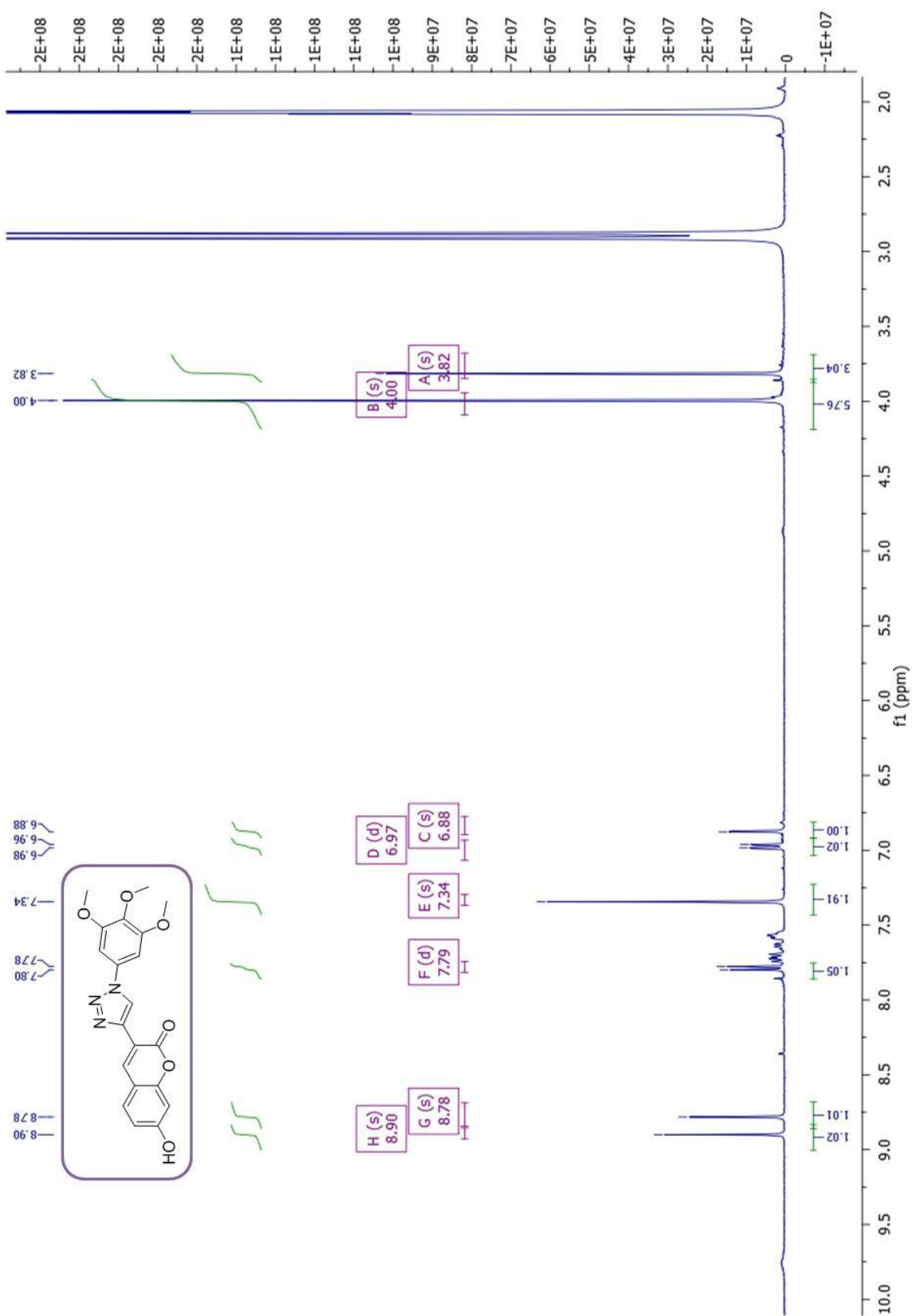
Anexo 26. Espectro de RMN ^1H do produto (**76g**) com ampliação em 8,08-8,24 ppm, 7,62-7,66 ppm e 7,02-7,20 ppm DMSO- d_6 à 400MHz.



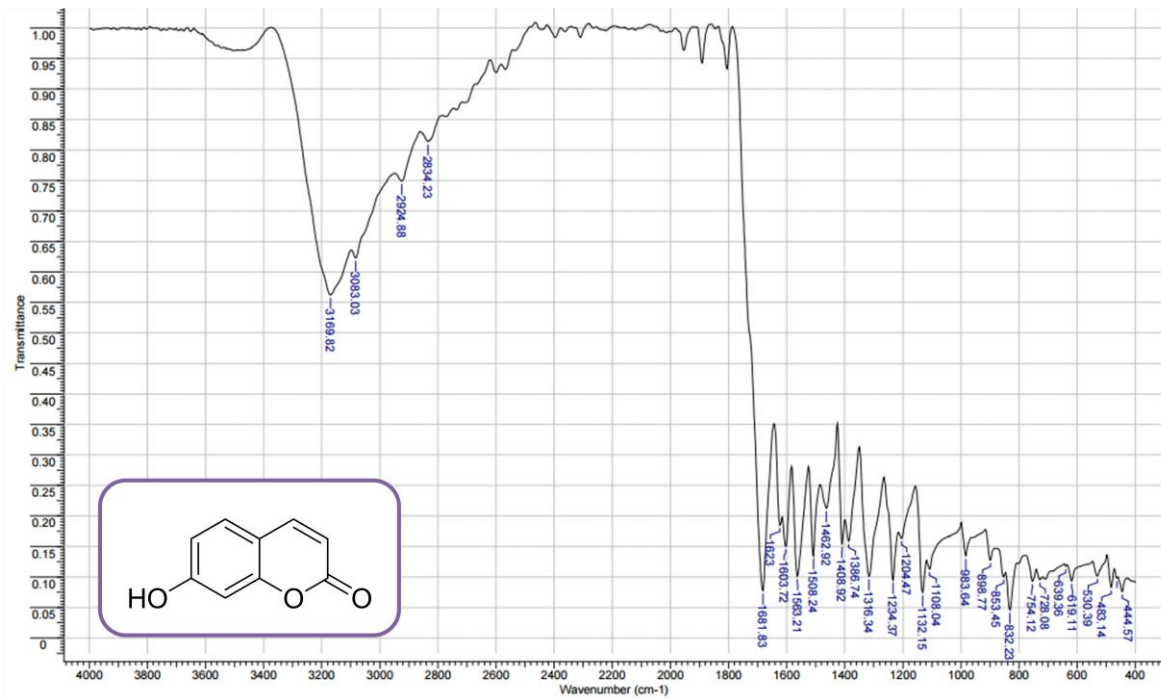
Anexo 27. Espectro de RMN ^{13}C do produto (76g) com ampliação em 112,9-133,45 ppm em DMSO- d_6 à 100MHz.



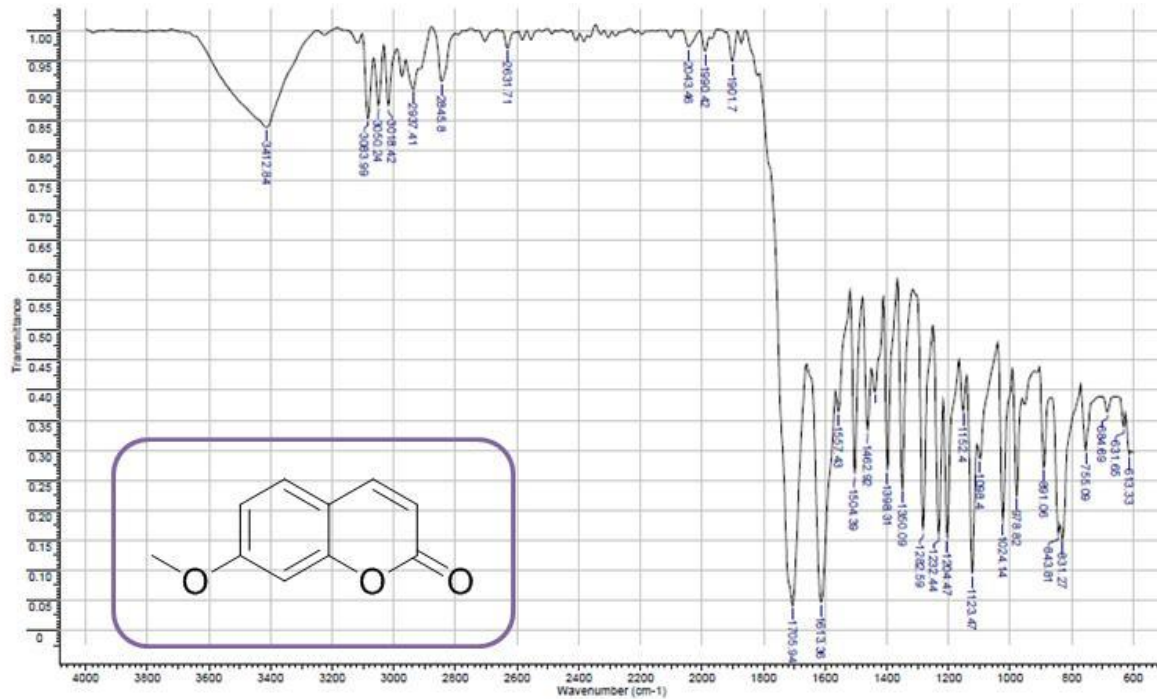
Anexo 28. Espectro de RMN ¹H do produto (77d) em acetone-d₆ à 400MHz.



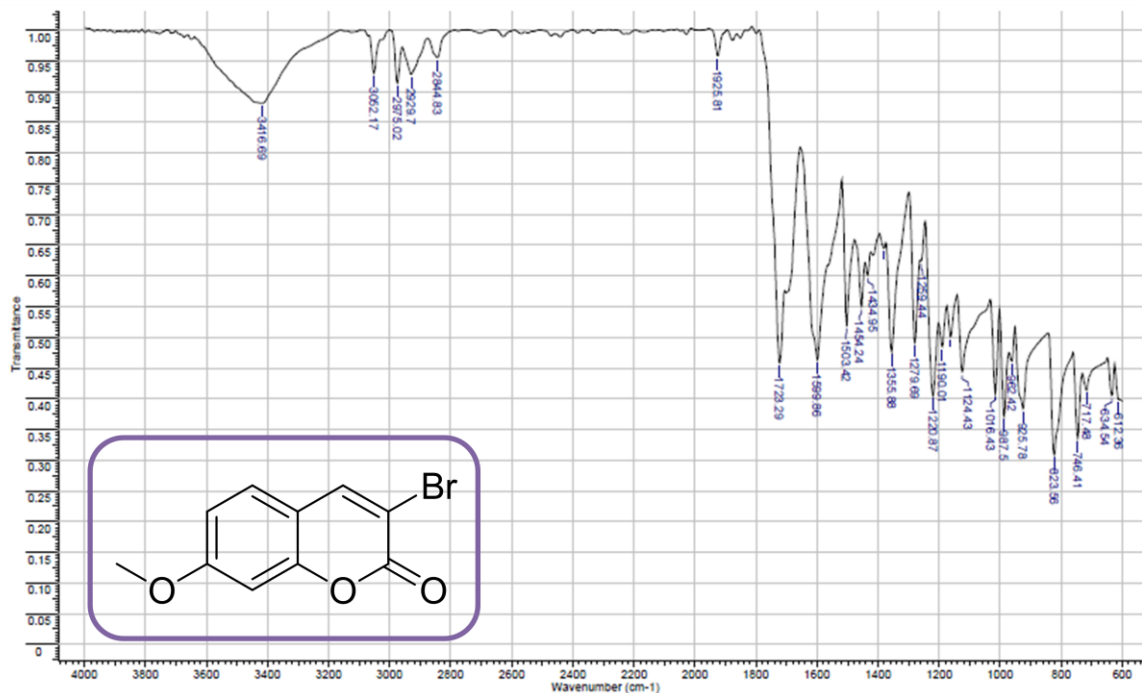
Anexo 29. Espectro de IV do produto (83).



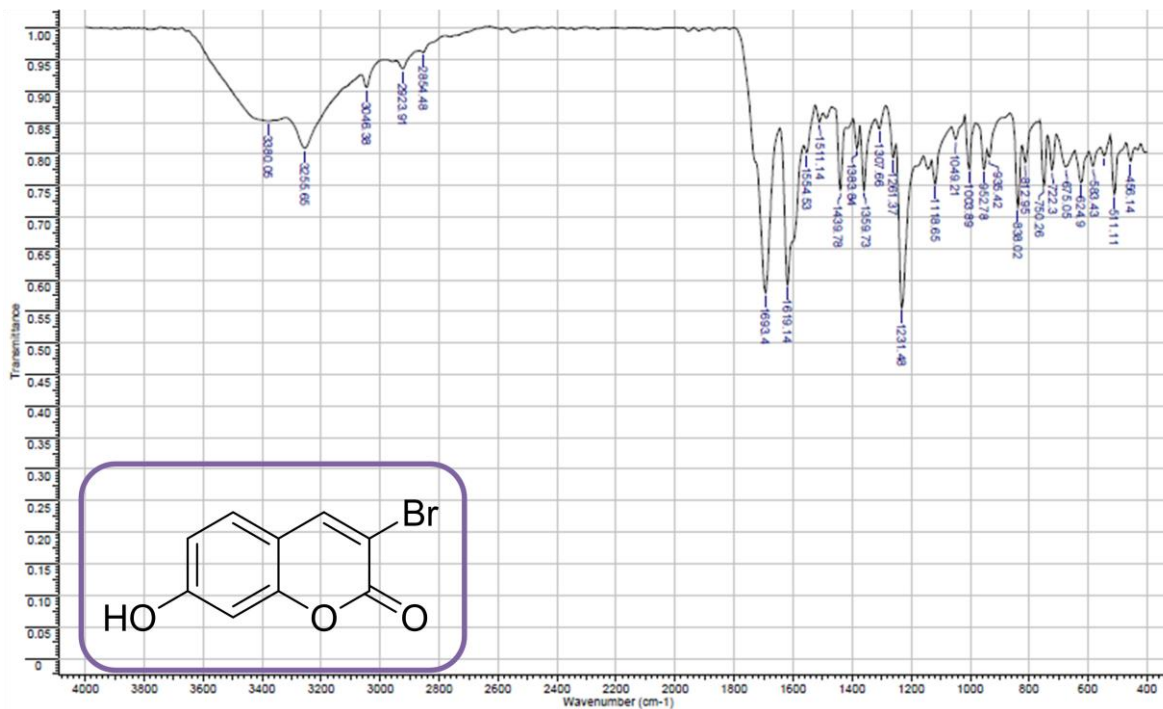
Anexo 30. Espectro de IV do produto (82)



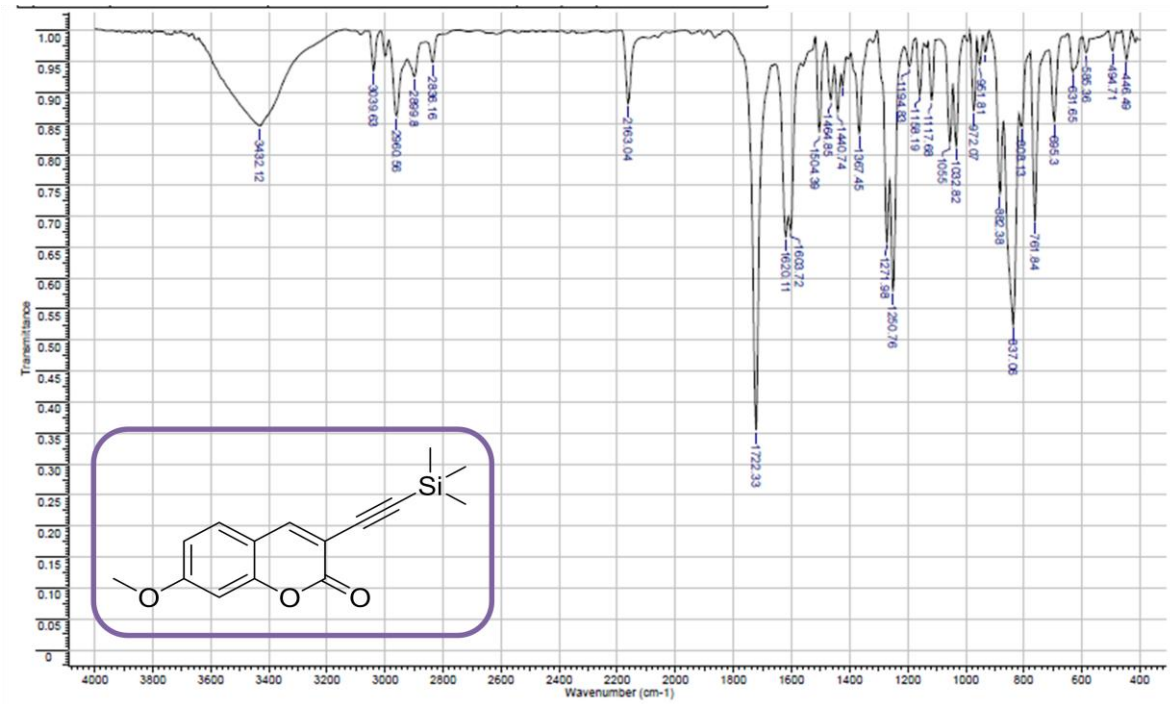
Anexo 31. Espectro de IV do produto (81a)



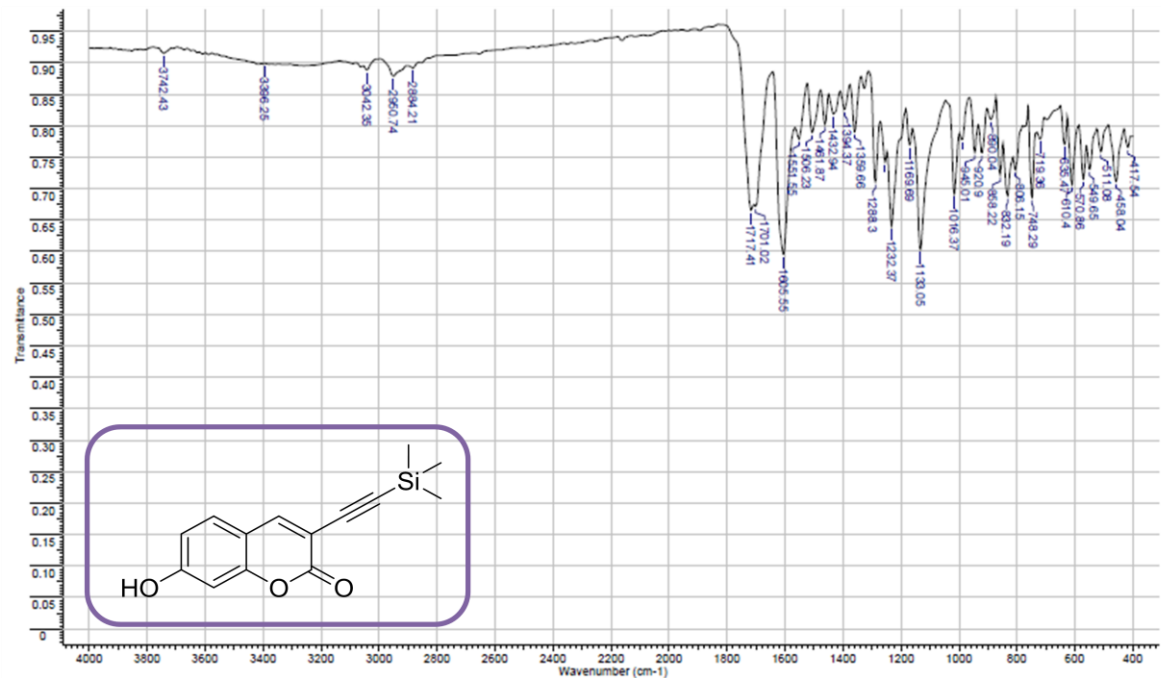
Anexo 32. Espectro de IV do produto (81b).



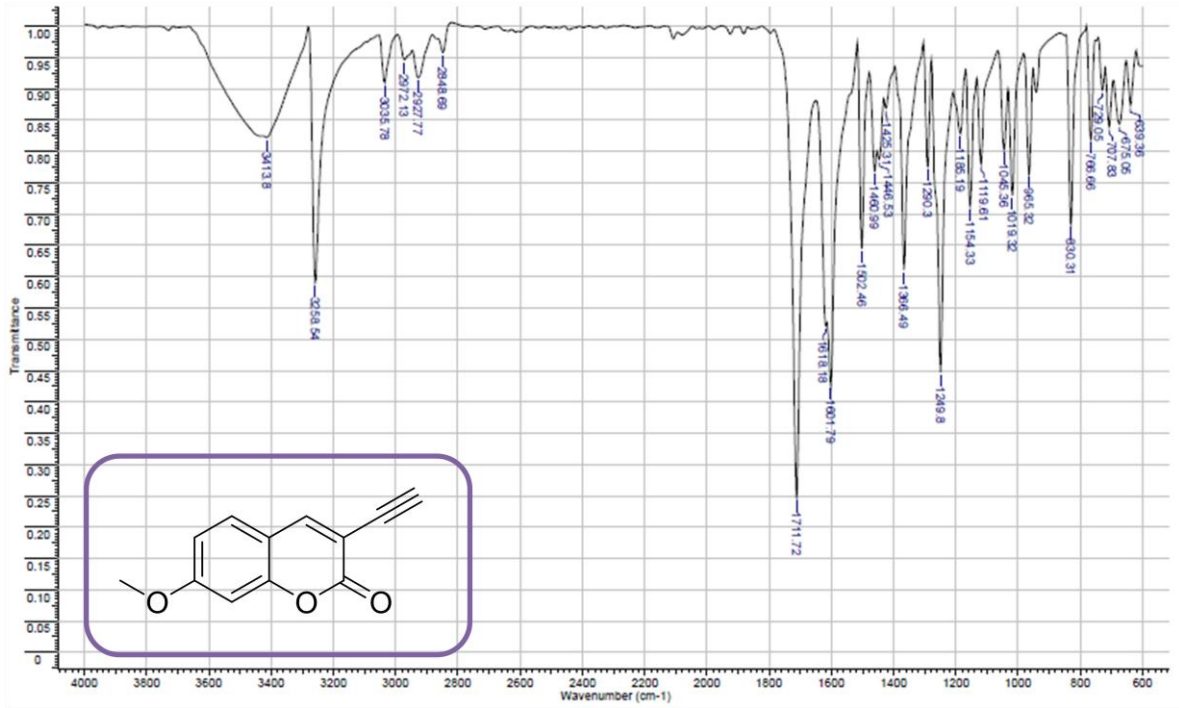
Anexo 33. Espectro de IV do produto (88a)



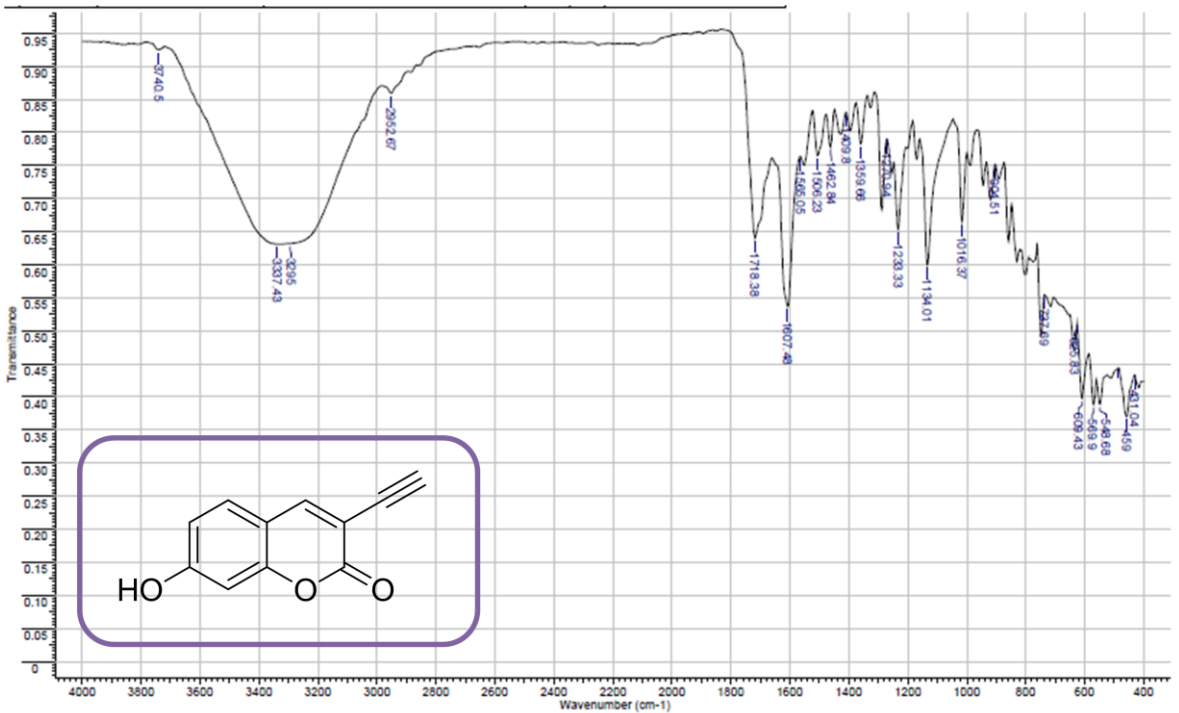
Anexo 34. Espectro de IV do produto (88b)



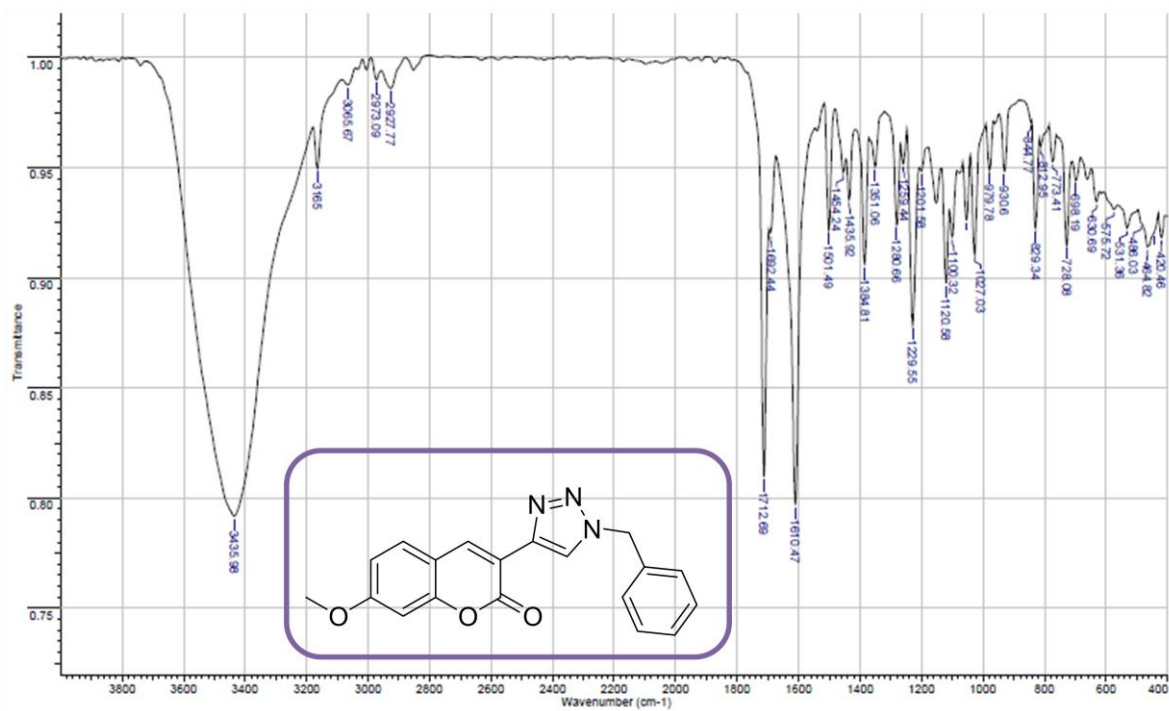
Anexo 35. Espectro de IV do produto (80a)



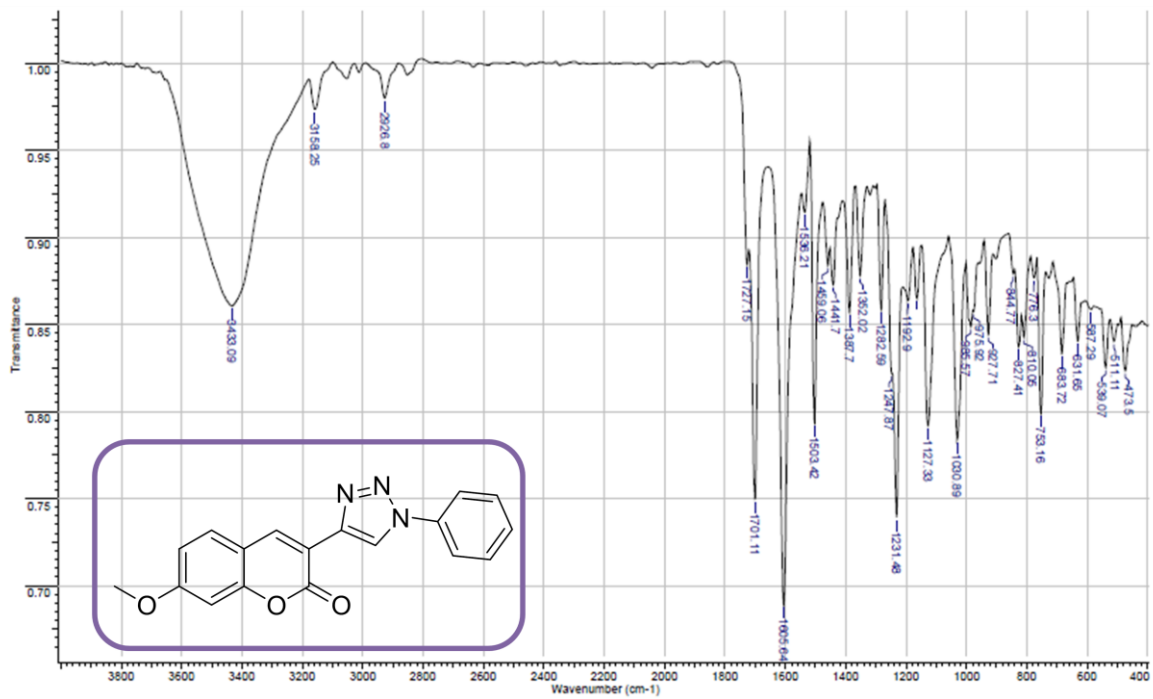
Anexo 36. Espectro de IV do produto (80b)



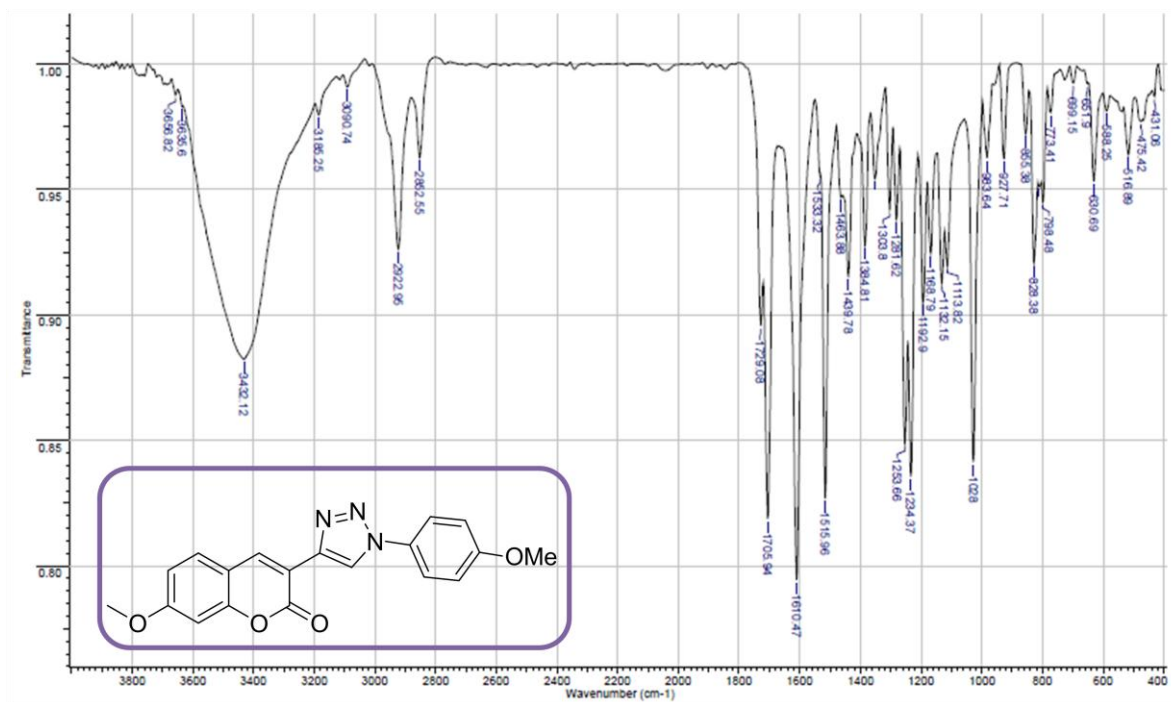
Anexo 37. Espectro de IV do produto (76a)



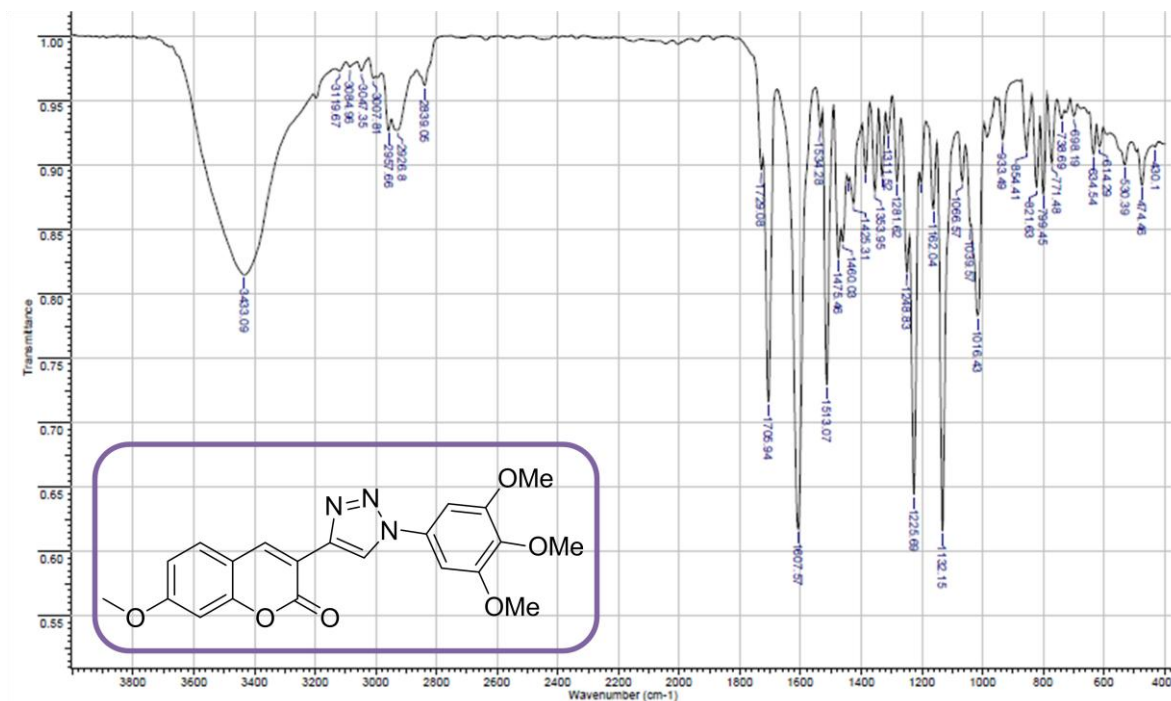
Anexo 38. Espectro de IV do produto (76b)



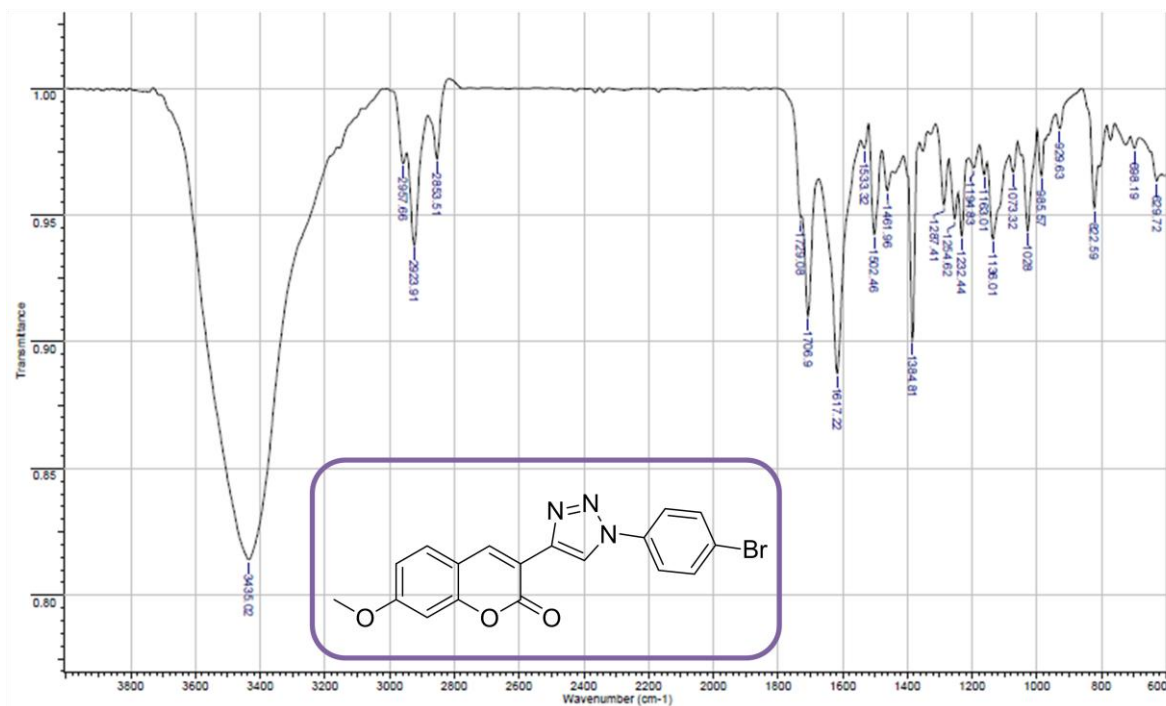
Anexo 39. Espectro de IV do produto (76c)



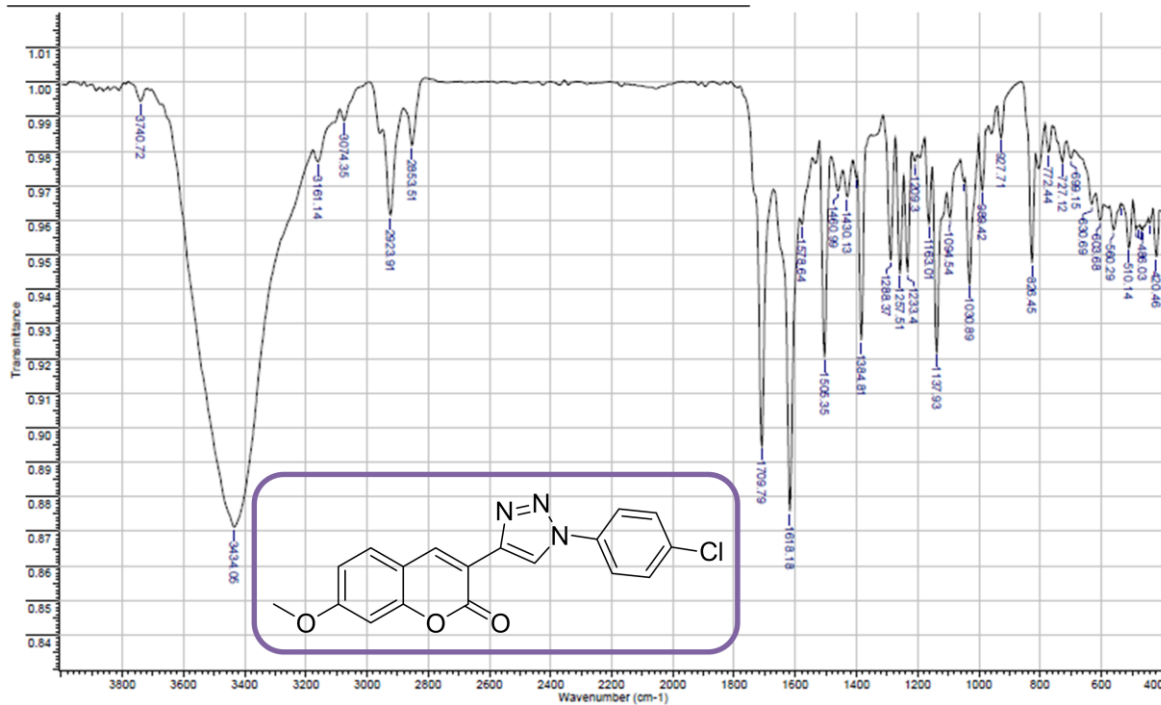
Anexo 40. Espectro de IV do produto (76d)



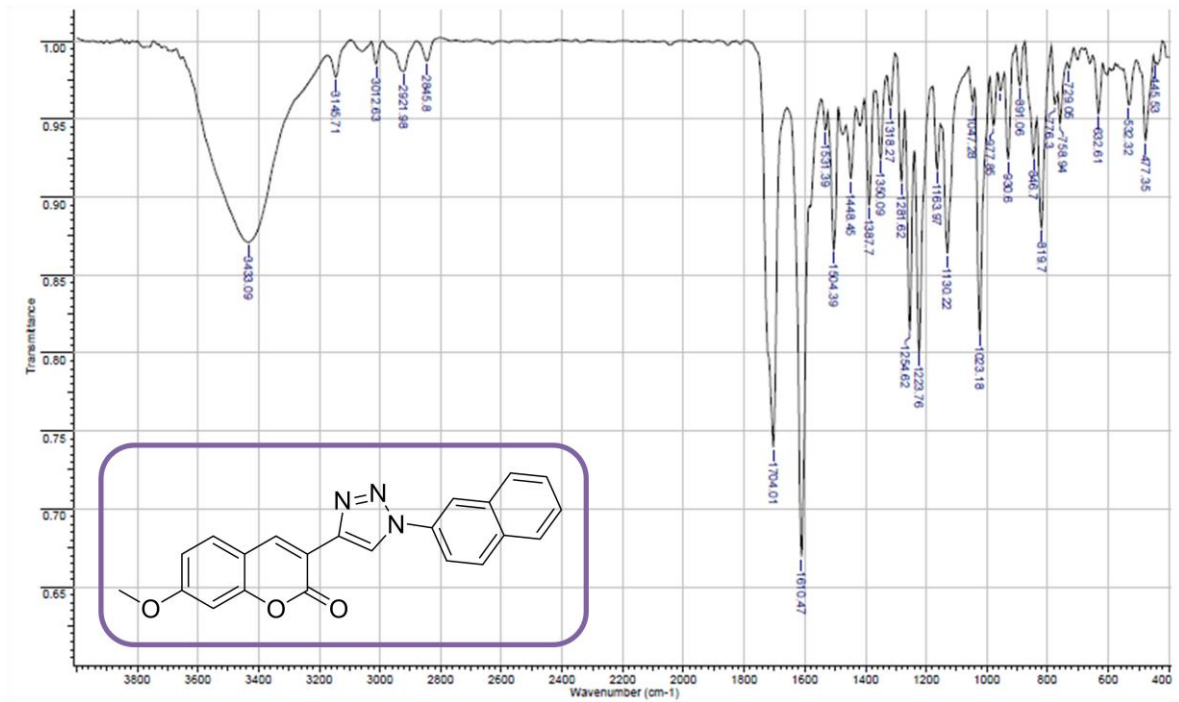
Anexo 41. Espectro de IV do produto (76e)



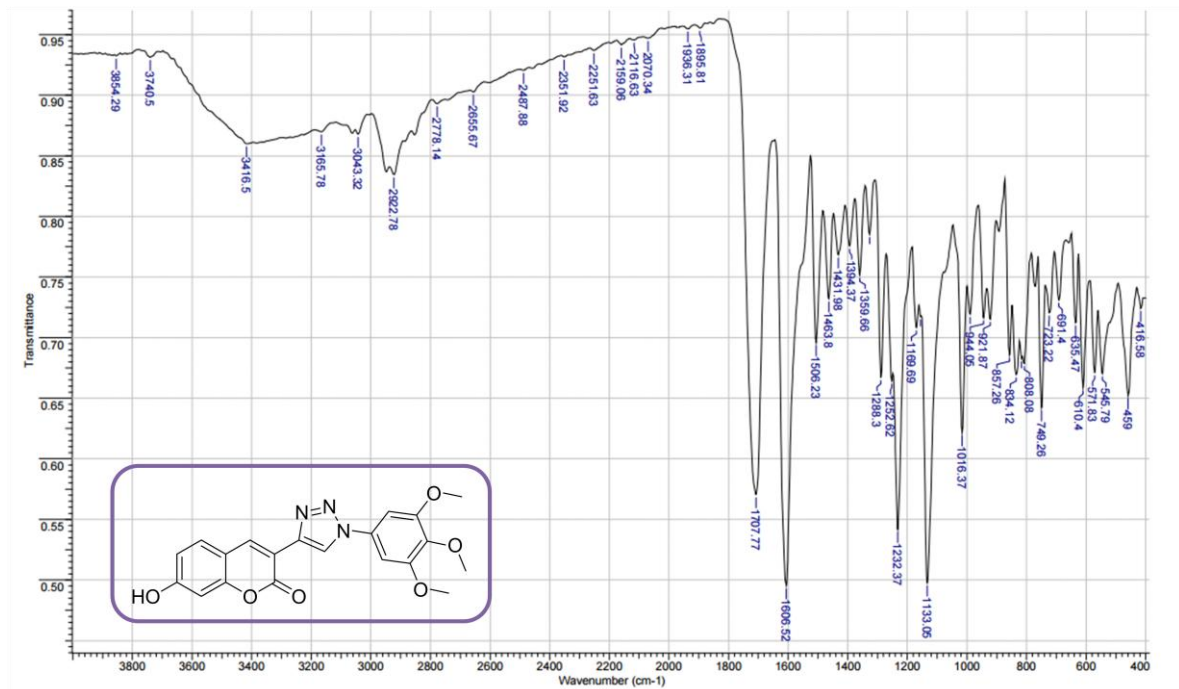
Anexo 42. Espectro de IV do produto (76f)



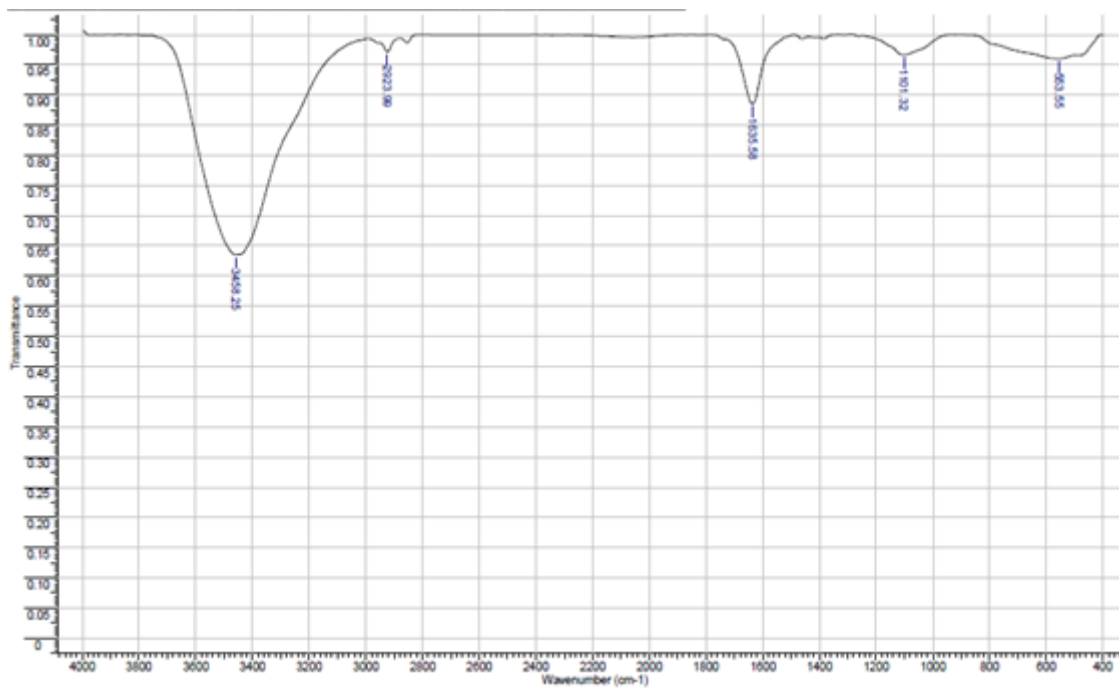
Anexo 43. Espectro de IV do produto (76g)



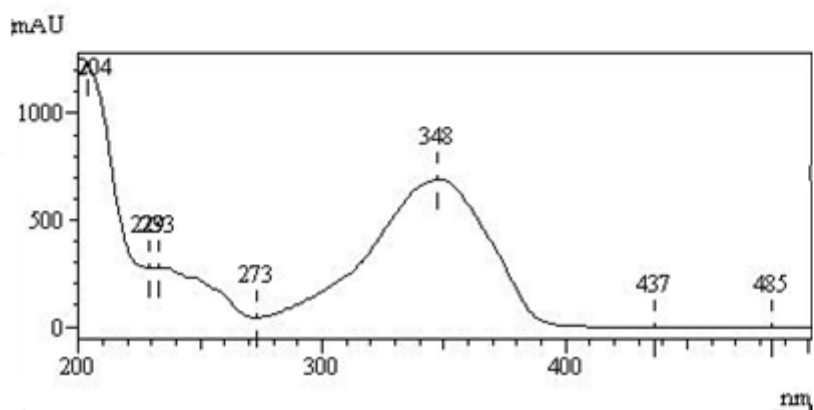
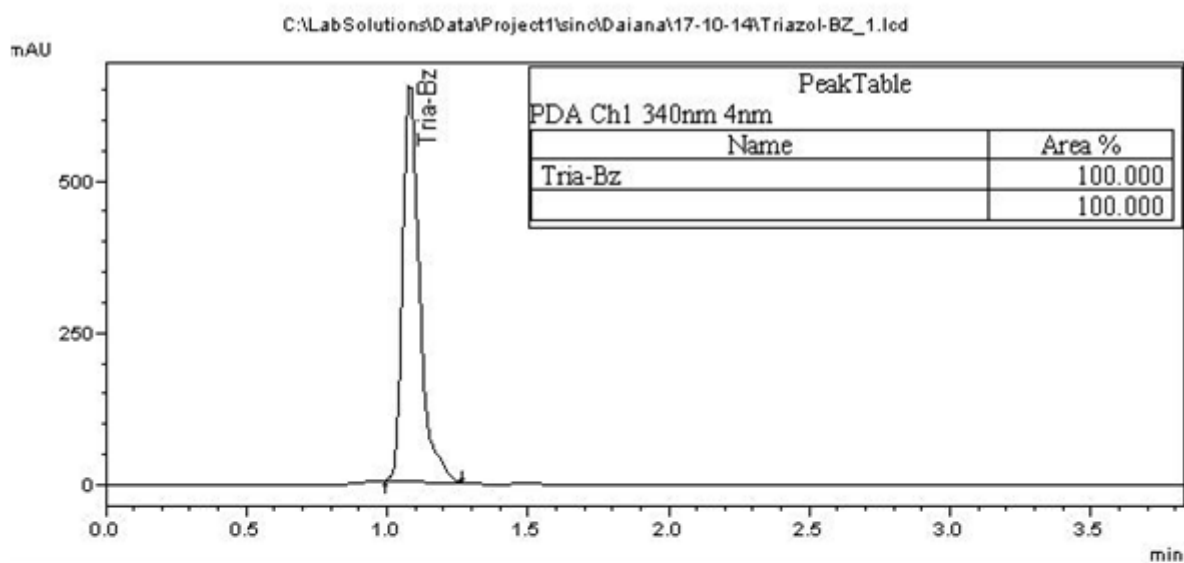
Anexo 44. Espectro de IV do produto (77d)



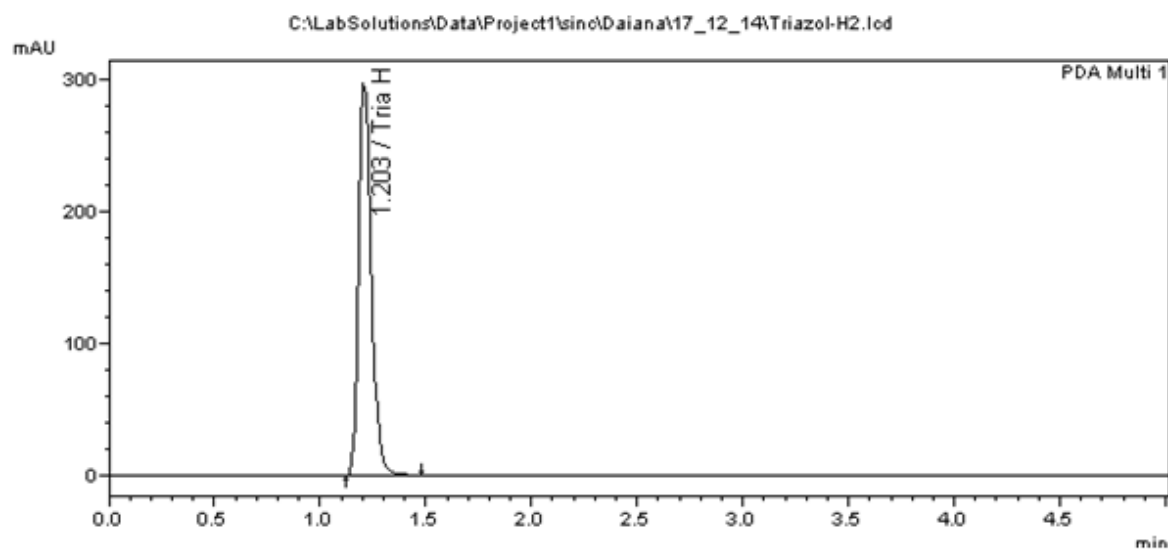
Anexo 45. Espectro de IV do branco



Anexo 46. : Cromatogramas do composto **76a**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



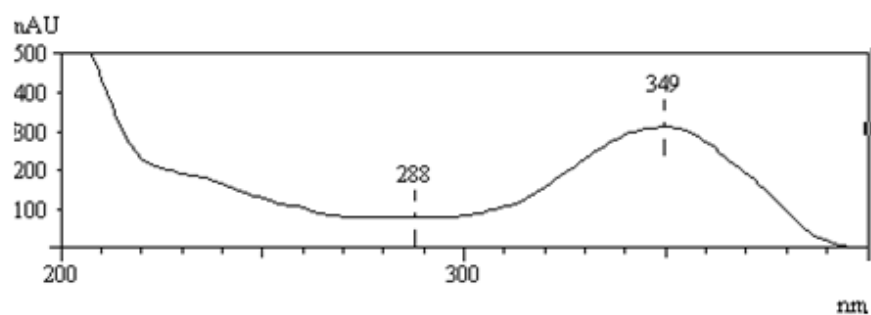
Anexo 47: Cromatogramas do composto **76b**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



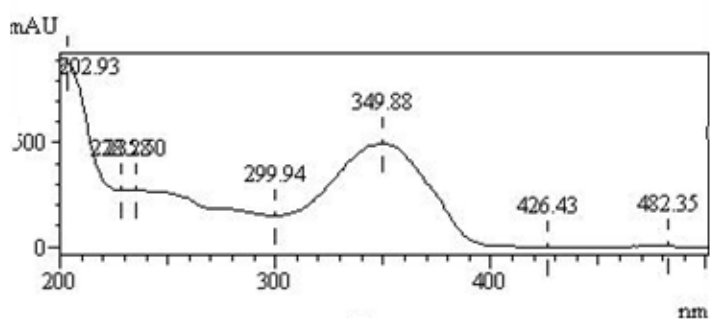
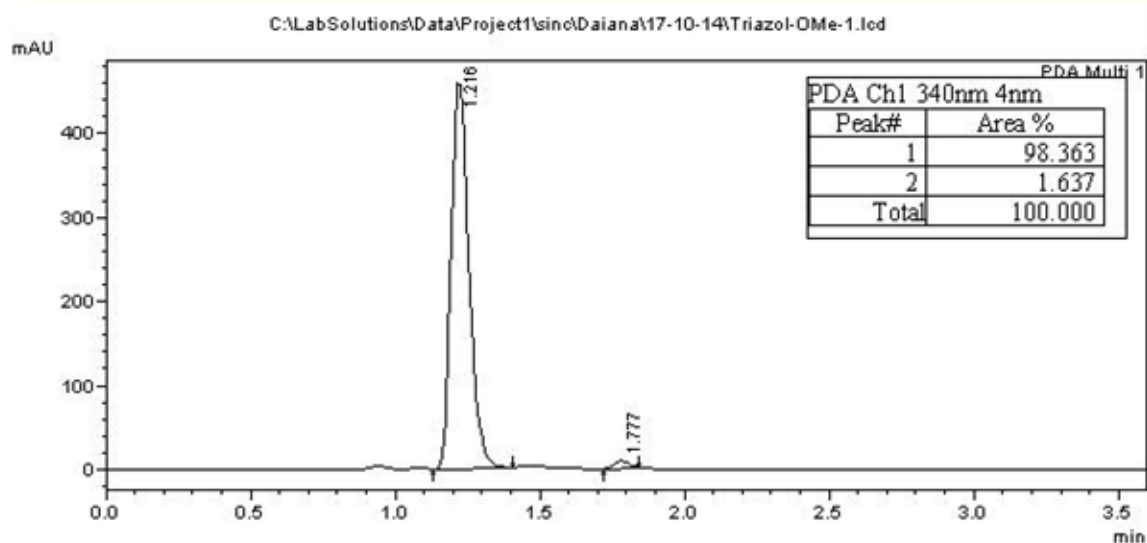
PDA Chl 340nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %
Tria H	1.203	100.000

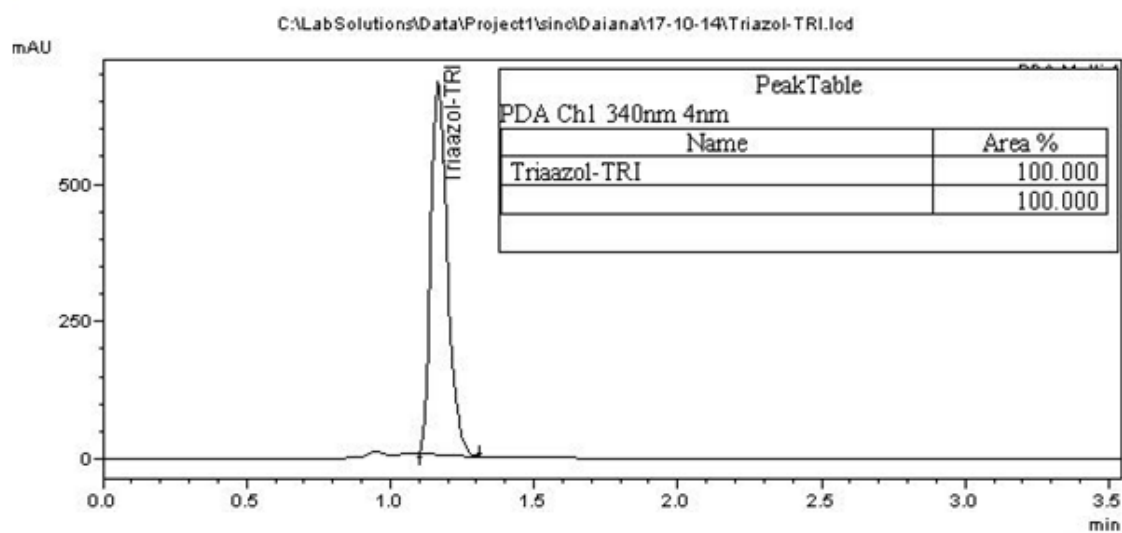
Retention Time : 1.203
Compound Name : Tria H



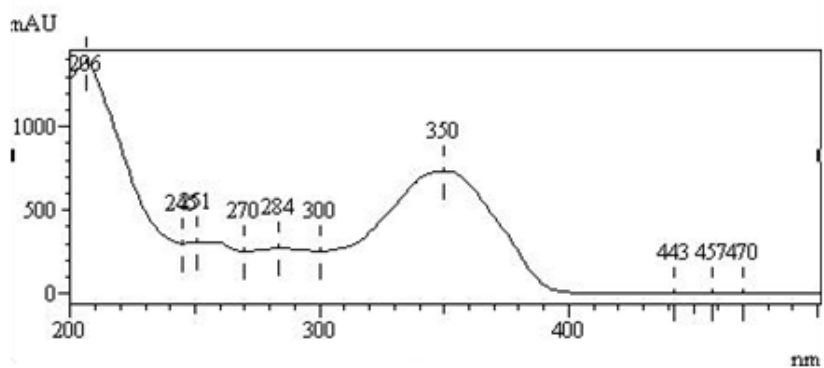
Anexo 48: Cromatogramas do composto **76c**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



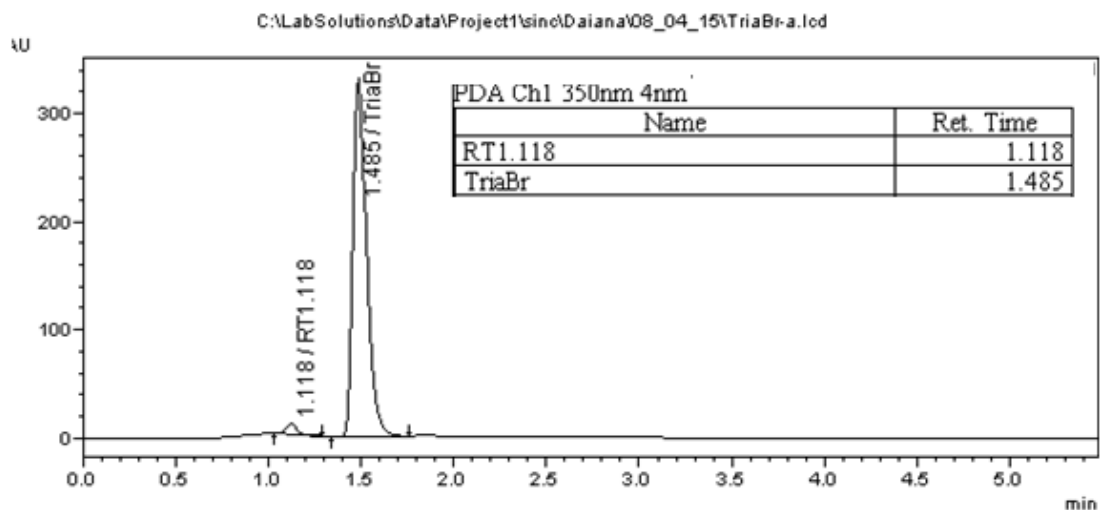
Anexo 49: Cromatogramas do composto **76d**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



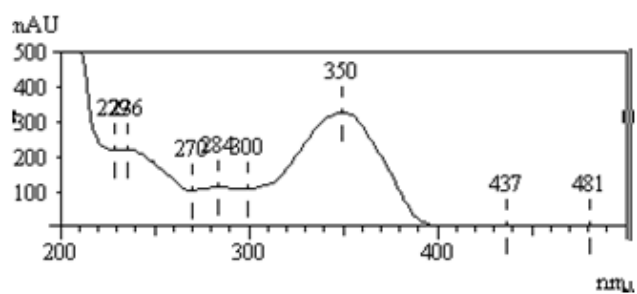
Retention Time : 1.162
Compound Name : Triazol-TRI



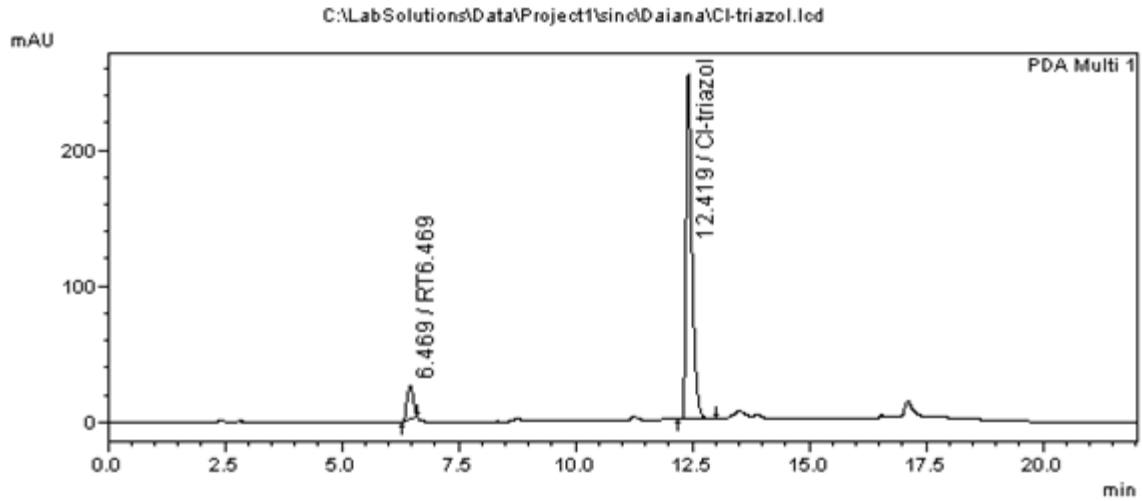
Anexo 50: Cromatogramas do composto **76e**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



Retention Time : 1.485
Compound Name : TriaBr



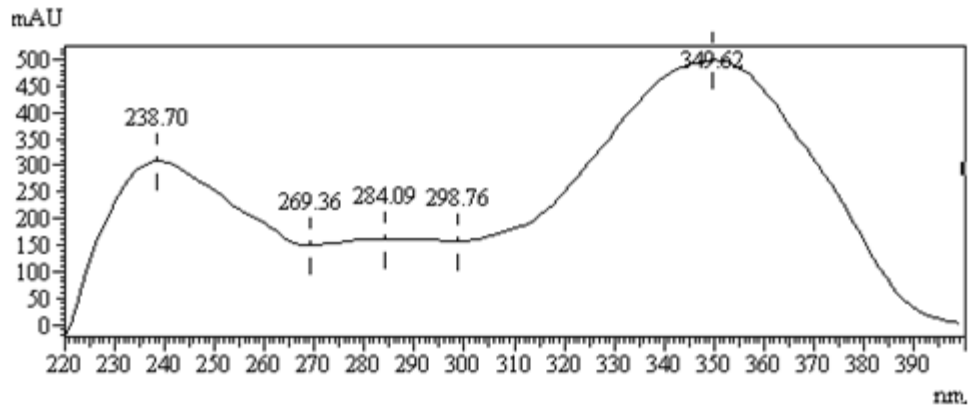
Anexo 51. : Cromatogramas do composto **76f**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



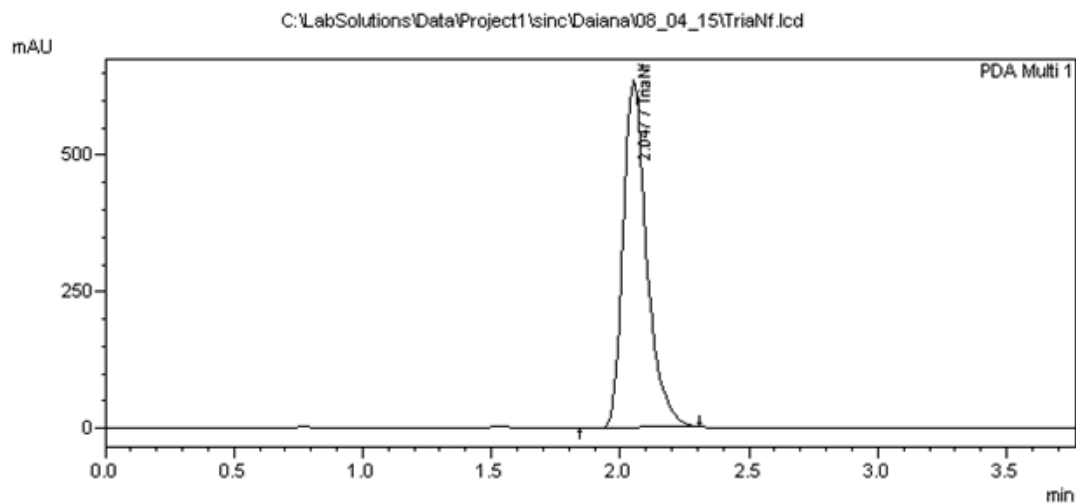
PDA Ch1 320nm 4nm

Name	Ret. Time	Area %
RT6.469	6.469	9.474
Cl-triazol	12.419	90.526

Retention Time : 12.419
Compound Name : Cl-triazol



Anexo 52. : Cromatogramas do composto **76d**. ($\lambda=340$ nm, coluna C-18, eluída com acetonitrila/H₂O 35%).



PeakTable

PDA Ch1 340nm 4nm

Name	Ret. Time
TriaNf	2.047

Retention Time : 2.047
Compound Name : TriaNf

