

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA

**PLANEJAMENTO POR MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE DE
INIBIDORES POTENCIAIS DE SERINO PROTEASES**

**Belo Horizonte
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANA CAROLINA DE OLIVEIRA

**PLANEJAMENTO POR MODELAGEM MOLECULAR E SÍNTESE DE
INIBIDORES POTENCIAIS DE SERINO PROTEASES**

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Alves

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Horta Álvares Silva

Belo Horizonte
2009

AGRADECIMENTOS

Aos professores Ricardo José Alves e Thais Horta Álvares Silva, pelo apoio e incentivo que tornaram o sonho dessa dissertação uma realidade.

A minha mãe, minha grande amiga e incentivadora.

Ao Otávio, amor, amigo e companheiro.

A Rute, pela amizade e pelo exemplo de competência e amor à pesquisa.

A Dani, pelo companheirismo e pelo auxílio no meu retorno ao laboratório.

A Thais Santos de Castro (ICB/UFMG), pelo seu empenho na realização dos testes enzimáticos.

Aos professores Amintas Fabiano de Souza Figueiredo e Marcelo Matos Santoro, pela colaboração.

Ao professor Basílio, pelos ensinamentos.

As meninas do laboratório: Cristal, Fernanda, Roxanne, Sarah, Tarciana e Janaína, pelo carinho e amizade.

Aos demais colegas de laboratório, pela convivência.

A Lavina e à Raquel, pela dedicação ao laboratório.

A Capes, pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Modelagem Molecular	18
1.1.1 <u>AutoDock</u>	19
1.1.2 Outros programas empregados nos experimentos de <i>docking</i>	22
1.2 Serino Proteases	23
1.2.1 <u>A Estrutura das serino proteases do tipo quimiotripsina</u>	23
1.2.2 <u>Os sítios de reconhecimento dos substratos</u>	25
1.2.3 <u>O mecanismo catalítico das serino proteases</u>	26
1.2.4 <u>Serino proteases como alvos de interesse farmacológico</u>	29
1.3 Síntese de amidinas	37
2 OBJETIVO	40
3 PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1 Modelagem Molecular	43
3.2 Síntese	44
3.2.1 <u>Materiais e Métodos</u>	44
3.2.2 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-propanol (16) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-propanol (22)</u>	46
3.2.3 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxipropano (17) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxipropano (23)</u>	47
3.2.4 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-azidopropano (18) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-azidopropano (24)</u>	51
3.2.5 <u>Síntese das aminas 19 e 25</u>	54
3.2.6 <u>Síntese das amidas 12, 14, 20 e 26</u>	58
3.2.7 <u>Síntese das amidinas 2, 7 e 8</u>	66
3.2.8 <u>Produtos secundários obtidos nas síntese de 2, 7 e 8</u>	73
3.2.9 <u>Tentativa de síntese de N-(4-nitrofenol)-4-amidinobenzamidina (1)</u>	79
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.1 Estudos de modelagem molecular por <i>docking</i>	81

4.1.2 <u>Resultados dos estudos de ancoragem molecular (<i>docking</i>) dos ligantes cristalográficos construídos com a β-tripsina bovina</u>	82
4.1.3 <u>Resultados dos estudos de modelagem molecular (<i>docking</i>) dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com a β-tripsina bovina</u>	92
4.1.4 <u>Discussão dos resultados dos estudos de modelagem molecular</u>	113
4.1.5 <u>Análise teórica dos parâmetros físico-químicos relacionados à “Regra dos Cinco” de Lipinski</u>	115
4.2 Síntese	116
4.2.1 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-propanol (16) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-propanol (22)</u>	118
4.2.2 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxipropano (17) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxipropano (23)</u>	119
4.2.3 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-azidopropano (18) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-azidopropano (24)</u>	122
4.2.4 <u>1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-aminopropano (19) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-aminopropano (25)</u>	124
4.2.5 <u>N-(4-nitrofenil)-4-cianobenzamida (12), N-benzil-4-cianobenzamida (14), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (20) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (26)</u>	124
4.2.6 <u>N-bezil-4-amidinobenzamida (2), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (7) e 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (8)</u>	129
4.2.7 <u>Produtos secundários obtidos nas síntese de 2, 7 e 8</u>	134
4.2.7 <u>Tentativa de síntese de N-(4-nitrofenil)-4-cianobenzamidina (1)</u>	135
5 CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138
APÊNDICE A	145

LISTA DE FIGURAS

1	Representação esquemática da tríade catalítica das serino proteases.	24
2	Representação da fenda oxianion	25
3	Representação do sítio ativo da tripsina e da trombina.	26
4	O mecanismo catalítico das serino proteases.	28
5	Via intrínseca e extrínseca para o início da coagulação sanguínea e a interação com o sistema calicreína-cininas	30
6	Estrutura química da bivalirudina	31
7	Estrutura química de inibidores diretos de trombina.	32
8	Estrutura química dos inibidores de Fator Xa.	34
9	Estrutura química do Boceprevir	36
10	Ligantes propostos para os estudos de modelagem molecular	41
11	Sobreposição do BAPNA ao ligante 8 e estrutura química do BAPNA	42
12	Estruturas químicas dos ligantes cristalográficos.	83
13	Superposição dos ligantes cristalográficos construídos aos ligantes cristalográficos.	86
14	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído BPOd e a enzima.	87
15	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído BX3d e a enzima.	88
16	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído DX9d e a enzima.	89
17	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído FD1d e a enzima.	90
18	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído MELd e a enzima.	91
19	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído IGNd e a enzima.	92
20	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 1 e a enzima e superposição do ligante 1 ao ligante cristalográfico FD1	99

/continua.

LISTA DE FIGURAS (continuação)

21	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 2 e a enzima e superposição do ligante 2 ao ligante cristalográfico FD1.	100
22	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 3 e a enzima e superposição do ligante 3 ao ligante cristalográfico MEL.	101
23	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 4 e a enzima e superposição do ligante 4 ao ligante cristalográfico FD1.	102
24	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 5 e a enzima e superposição do ligante 5 ao ligante cristalográfico FD1.	104
25	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 6 e a enzima e superposição do ligante 6 ao ligante cristalográfico DX9.	105
26	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 7 e a enzima e superposição do ligante 7 ao ligante cristalográfico MEL.	106
27	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 8 e a enzima e superposição do ligante 8 ao ligante cristalográfico FD1.	107
28	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 9 e a enzima e superposição do ligante 9 ao ligante cristalográfico BPO.	108
29	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 10 e a enzima e superposição do ligante 10 ao ligante cristalográfico MEL.	109
30	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 12 e a enzima e superposição do ligante 12 ao ligante cristalográfico MEL.	110
31	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 14 e a enzima e superposição do ligante 14 ao ligante cristalográfico DX9.	111
32	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 20 e a enzima e superposição do ligante 20 ao ligante cristalográfico DX9.	112
33	Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 26 e a enzima e superposição do ligante 26 ao ligante cristalográfico DX9.	113
34	Ligante 8 no sítio da tripsina bovina (entrada PDB 1K1I).	114
35	Esquema para a síntese dos derivados 1 e 2.	117
36	Esquema para a síntese do derivado 7 .	117
37	Esquema para a síntese do derivado 8 .	118

/continua.

LISTA DE FIGURAS (conclusão)

38 Mecanismo proposto para a formação de 16 e 22.	119
39 Mecanismo proposto para a formação do cloreto de 4-cianobenzoíla.	125
40 Mecanismo geral proposto para a formação dos derivados amidinos e dos respectivos ésteres metílicos.	130

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A

A.1	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 17	145
A.2	Mapa de contornos COSY (400MHz, CDCl_3) de 17	146
A.3	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de 17	147
A.4	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl_3) de 17	148
A.5	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 17	149
A.6	Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl_3) de 17	150
A.7	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 23	151
A.8	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de 23	152
A.9	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl_3) de 23	153
A.10	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 23	154
A.11	Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl_3) de 23	155
A.12	Espectro no IV (ATR) de 18	156
A.13	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 18	157
A.14	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de 18	158
A.15	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl_3) de 18	159
A.16	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 18	160
A.17	Espectro no IV (ATR) 24	161
A.18	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 24	162
A.19	Seção expandida na região de $\delta 7,78-7,07$ do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 18	163
A.20	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de 24	164
A.21	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl_3) de 24	165
A.22	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 24	166
A.23	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, DMSO-d_6) de 19	167
A.24	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, DMSO-d_6) de 19	168
A.25	Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d_6) de 19	169
A.26	Espectro de RMN de ^1H (200MHz, DMSO-d_6) de 25	170
A.27	Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, DMSO-d_6) de 25	171

/continua.

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (continuação)

A.28	Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 25	172
A.29	Espectro no IV (ATR) de 12	173
A.30	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 12	174
A.31	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 12	175
A.32	Espectro no IV (ATR) de 14	176
A.33	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 14	177
A.34	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 14	178
A.35	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 14	179
A.36	Espectro no IV (ATR) de 20	180
A.37	Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) de 20	181
A.38	Seção expandida na região de δ8,2-6,8 do espectro de RMN de ¹H(400MHz,CDCl₃) de 20	182
A.39	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 20	183
A.40	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 20	184
A.41	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl₃) de 20	185
A.42	Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl₃) de 20	186
A.43	Espectro no IV (ATR) de 26	187
A.44	Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) de 26	188
A.45	Espectro de RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 26	189
A.46	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 26	190
A.47	Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl₃) de 26	191
A.48	Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl₃) de 26	192
A.49	Espectro no IV (ATR) de 2	193
A.50	Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 2	194
A.51	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 2	195
A.52	Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 2	196
A.53	Espectro no IV (ATR) de 7	197
A.54	Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 7	198

/continua.

LISTA DE FIGURAS DO APÊNDICE A (conclusão)

A.55	Mapa de contornos COSY (400MHz, DMSO-d₆) de 7	199
A.56	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 7	200
A.57	Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 7	201
A.58	Mapa de contornos HMQC (400MHz, DMSO-d₆) de 7	202
A.59	Mapa de contornos HMBC (400MHz, DMSO-d₆) de 7	203
A.60	Espectro no IV (ATR) de 8	204
A.61	Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 8	205
A.62	Mapa de contornos COSY (400MHz, DMSO-d₆) de 8	206
A.63	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 8	207
A.64	Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 8	208
A.65	Mapa de contornos HMQC (400MHz, DMSO-d₆) de 8	209
A.66	Mapa de contornos HMBC (400MHz, DMSO-d₆) de 8	210
A.67	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 27	211
A.68	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 27	212
A.69	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 27	213
A.70	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 28	214
A.71	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 28	215
A.72	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 28	216
A.73	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 29	217
A.74	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 29	218
A.75	Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 29	219
A.76	Espectro de RMN de ¹H (200MHz, DMSO-d₆) da <i>p</i>-nitroanilina	220
A.77	Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) da <i>p</i>-nitroanilina	221

LISTA DE TABELAS

1 Taxas de sucesso da onze funções <i>scoring</i> avaliadas sob diferentes critérios de rmsd	21
2 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 17	48
3 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 17	49
4 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 23	50
5 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 23	50
6 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 18	52
7 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 18	52
8 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 24	53
9 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 24	53
10 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 19	55
11 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 100MHz) de 19	56
12 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 200MHz) de 25	57
13 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 25	57
14 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 200MHz) de 12	59
15 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 12	60
16 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 200MHz) de 14	61
17 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 14	61
18 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 20	63
19 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 20	64
20 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3, 400MHz) de 26	65
21 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3, 50MHz) de 26	66
22 Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO-d_6, 400MHz) de 2	68
23 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 50MHz) de 2	69
24 Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO-d_6, 400MHz) de 7	70
25 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 100MHz) de 7	71
26 Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO-d_6, 400MHz) de 8	72
27 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6, 100MHz) de 8	73

/continua.

LISTA DE TABELAS (conclusão)

28 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de 27	74
29 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 27	75
30 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de 28	76
31 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 28	77
32 Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de 29	78
33 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 29	79
34 Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 200MHz) da <i>p</i> -nitroanilina	80
35 Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 , 50MHz) da <i>p</i> -nitroanilina	80
36 Resultados do <i>docking</i> dos ligantes cristalográficos construídos com a β -tripsina bovina	85
37 Resultados do <i>docking</i> dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com as estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina.	93
38 Valores de LogP, Peso Molecular e de números de aceptores e doadores de ligação de H dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26.	116

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Å	Angstrom
Asp.	Aspartato
°C	Graus Celsius
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCS	Cromatografia em Coluna de Sílica
δ	deslocamento químico (RMN)
Cys	Cisteína
d	duplete
dd	duplete duplo
dt	duplete triplo
DMSO	Dimetilsulfóxido
FF	Faixa de Fusão
FM	Fórmula Molecular
Gly.	Glicina
Hys.	Histina
IV	Infravermelho
J	constante de acoplamento escalar <i>spin nuclear-spin nuclear</i>
Leu.	Leucina
m	multiplete
MM	Massa Molar
$\bar{\nu}$	número de onda
ν	deformação axial
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rmsd	<i>root mean square deviation</i>
s	simpleto
sl	simpleto largo

/continua

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (conclusão)

t	tripleto
THF	Tetrahidrofurano
Thr.	Treonina
Trp.	Triptofano
Val.	Valina
v/v	volume por volume

RESUMO

Serino proteases são uma classe de enzimas de grande importância terapêutica. Seu papel em processos biológicos críticos como digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise e resposta imune tornam-nas um promissor alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Com o objetivo de se sintetizar potenciais inibidores de serino proteases um conjunto de dez moléculas foi submetido a um estudo de modelagem molecular (*docking*), empregando-se o programa AutoDock 3.0.5, com o fim de se determinar a afinidade e o modo de interação entre a β -tripsina e os potenciais ligantes. A β -tripsina foi escolhida para o presente trabalho por ser considerada um modelo de estudo na classe das serino proteases.

Dentre os ligantes submetidos ao *docking* quatro foram selecionados para síntese. Os compostos 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (**7**) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (**8**) apresentaram maiores valores de pK_i do que os demais compostos e por isso foram escolhidos para síntese. *N*-(4-nitrofenil)-4-amidinobenzamida (**1**) e *N*-benzil-4-amidinobenzamida (**2**) foram aqueles com os menores valores de pK_i e sua escolha para síntese foi baseada na necessidade de se validar o método computacional empregado.

Os ligantes **2**, **7** e **8** foram obtidos com sucesso e serão submetidos a ensaios enzimáticos nos laboratórios de colaboradores do presente projeto (professores Amintas Fabiano de Souza Figueiredo e Marcelo Matos Santoro). As tentativas de síntese de **1** levaram à recuperação do material de partida ou a um produto de hidrólise de **1**, a *p*-nitroanilina.

ABSTRACT

Serine proteases are a class of enzymes of great therapeutic importance. Their role in critical biological processes like digestion, blood coagulation, fibrinolysis and immune response make them promising targets for the development of new drugs.

Aiming at the synthesis of potential serine protease inhibitors a set of ten molecules was subjected to a molecular modeling study (docking) using the AutoDock 3.0.5 program. The goal of this study was to determine the binding affinity and modes of binding of the potential inhibitors to β -trypsin. β -trypsin was chosen for the present work because it is considered a model for the study of serine proteases.

Among the compounds subjected to docking four were selected for synthesis. Compounds 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propane (**7**) and 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propane (**8**) were chosen because of their higher affinity as expressed by their higher pKi values as compared to the other compounds. *N*-(4-nitrofenil)-4-amidinobenzamide (**1**) and *N*-benzil-4-amidinobenzamide (**2**) were those with the lower pKi values and they were selected for synthesis for method validation reasons.

The compounds **2**, **7** and **8** were obtained successfully and they will be evaluated in enzymatic assays to be carried out in the laboratory of collaborators of the present project (professor Amintas Fabiano de Souza and professor Marcelo Matos Santoro). The attempts to synthesize **1** resulted in starting material recovery or in the isolation of p-nitroaniline, a hydrolysis product.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Modelagem Molecular

Os sítios ativos das proteínas exibem uma alta seletividade no reconhecimento de pequenas moléculas. Isto tem sido explorado pelos químicos medicinais na busca por novos fármacos, que ativem ou bloqueiem determinada via bioquímica e, em consequência, exerçam um efeito farmacológico. Os métodos computacionais utilizados na química medicinal buscam auxiliar o desenho de moléculas de interesse terapêutico, explicando e prevendo as interações entre o ligante e a macromolécula alvo (WANG *et al.*, 2003; TERAMOTO *et al.*, 2007).

No método da ancoragem molecular (*docking*) tenta-se prever a estrutura do complexo intermolecular formado entre duas ou mais moléculas (por exemplo, ligante-enzima, ligante-receptor). A estrutura dos complexos formados entre a macromolécula biológica e o ligante fornece informações importantes sobre o modo de interação e sobre as potenciais interações que ocorrem no sítio ativo. A compreensão detalhada das interações essenciais para o reconhecimento de um ligante pela molécula alvo pode ser útil em termos de relação estrutura-atividade e auxiliar na busca por novos fármacos. Os candidatos a fármaco são encontrados utilizando-se um programa de *docking* que busque identificar a conformação do ligante no alvo biológico (THOMSEN, 2003; ERICKSON *et al.*, 2004).

O número de substâncias com potencial ação farmacológica cresce exponencialmente. Diante desse quadro os estudos de *docking* são vistos como filtros que selecionam os compostos com atividade biológica mais promissora e assim reduzem tempo e custos de pesquisas. Com isso a abordagem do *docking* tem sido usada como uma ferramenta útil na descoberta, otimização e no desenho racional de fármacos (MAGALHÃES *et al.*, 2004).

Em um experimento de ancoragem molecular dois processos estão envolvidos: o *docking* e o *scoring*. O *docking* gera as várias conformações possíveis para o ligante no sítio ativo, utilizando métodos de amostragem conformacional como o algoritmo genético ou a simulação de Monte Carlo. As funções *scoring* avaliam a afinidade entre o ligante e a proteína. Essas funções são importantes porque as conformações finais são selecionadas de acordo com a afinidade (TERAMOTO *et al.*, 2007).

É reconhecido que a maior fraqueza dos programas de *docking* atuais não está nos métodos de amostragem, e sim nas funções *scoring*. Esforços consideráveis têm sido empreendidos para o desenvolvimento de métodos computacionais capazes de prever corretamente as interações entre uma proteína e o ligante (WANG *et al.*, 2003; COUPEZ *et al.*, 2006). As limitações das funções *scoring* podem ser relacionadas à falta de flexibilidade da proteína, ao tratamento inadequado da solvatação e a natureza simplista das funções de energia empregadas (TERAMOTO *et al.*, 2007).

Existem atualmente muitas abordagens e diferentes softwares para o *docking*. Alguns amplamente utilizados são AUTODOCK (MORRIS *et al.*, 1998), o FlexX (RAREY *et al.* 1996) e o GOLD (JONES *et al.*, 1997).

1.1.1 AutoDock

O AutoDock 3.0.5 realiza o *docking* automático de um ligante flexível com o sítio de uma macromolécula rígida (MORRIS *et al.*, 1998). O programa utiliza o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) como método de busca conformacional. Os algoritmos genéticos são inspirados na teoria evolucionária de Darwin. Cada busca consiste na geração de uma população de indivíduos na qual cada indivíduo representa uma possível solução para o problema do *docking*, que é a posição do ligante em relação à proteína. Assim, cada conformação do ligante é representada por um cromossomo, constituído por genes que representam os graus de liberdade translacional, orientacional e conformacional. Esses indivíduos são avaliados pela

energia de interação do complexo macromolecular proteína-ligante e pela energia intramolecular do ligante. A seleção dos indivíduos que irão se reproduzir leva em conta esses parâmetros de energia e, na seqüência, mutações e *crossovers* poderão ocorrer para gerar novos indivíduos (MAGALHÃES *et al.*, 2004; THOMSEN, 2003). Usualmente múltiplas corridas empregando o LGA são realizadas em cada experimento de *docking*. Cada corrida fornece uma solução, ou seja, um modo de interação previsto. Ao final do experimento do *docking*, o AutoDock agrupa as diferentes soluções em *clusters*, de acordo com a similaridade entre as diferentes conformações geradas e ordena os *clusters* de acordo com a menor energia representativa daquele conjunto.

No AutoDock, a energia de dock (E_{dock}) para um dado ligante é expressa como o somatório das interações intermoleculares entre o complexo e a energia estérica interna do ligante. Assim:

$$E_{\text{dock}} = E_{\text{vdw}} + E_{\text{lig-H}} + E_{\text{eletrostática}} + E_{\text{interna}} + E_{\text{solvação}}$$

O campo de força inclui três termos de energia de interação. São eles:

E_{vdw} = termo de repulsão/dispersão de Lennard-Jones 12-6;

$E_{\text{lig-H}}$ = termo de ligações de hidrogênio;

$E_{\text{eletrostática}}$ = potencial eletrostático Coulombico.

A restrição dos graus de liberdade conformacional do ligante no complexo contribui para a diminuição da entropia e esse parâmetro também é considerado no cálculo da energia livre de interação (E_{interna}). O último termo baseia-se na estimativa da energia de dessolvatação ($E_{\text{solvação}}$) (MORRIS *et al.*, 1998).

As funções de energia empregadas no AutoDock são capazes de discriminar entre soluções “boas” e soluções “ruins”, tornando a simulação do *docking* bem sucedida (THOMSEN, 2003).

Em um estudo conduzido por WANG e colaboradores onze funções populares de *scoring* foram examinadas no *docking* com cem complexos proteína-ligante. O objetivo desse estudo foi determinar a habilidade dessas funções em reproduzir as estruturas enzima-ligante e a afinidade de ligação, observadas experimentalmente (WANG *et al.*, 2003).

O método empregado para estimar a precisão do *docking* baseia-se na proximidade entre a conformação da solução de menor energia ou do cluster mais populoso, obtida no *docking*, e aquela observada experimentalmente no complexo enzima-ligante obtida por cristalografia. Uma solução é considerada bem sucedida se o rmsd (*root mean square deviation*) é menor ou igual a 2 Å.

Na Tabela 1 são listadas as taxas de sucesso obtidas no estudo de WANG e colaboradores.

Tabela 1- Taxas de sucesso do *docking*, empregando-se onze diferentes funções *scoring*, avaliadas sob diferentes critérios de rmsd (WANG *et al.*, 2003).

Função Scoring	Taxa de sucesso(%)				
	rmsd \leq 1,0Å	rmsd \leq 1,5Å	rmsd \leq 2,0Å	rmsd \leq 2,5Å	rmsd \leq 3,0Å
Cerius2/PLP	63	69	76	79	80
SYBYL/F-Score	56	66	74	77	77
Cerius2/LigScore	64	68	74	75	76
DrugScore	63	68	72	74	74
Cerius2/LUDI	43	55	67	67	67
X-Score	37	54	66	66	74
AutoDock	34	52	62	62	72
Cerius2/PMF	40	46	52	52	57
SYBYL/G-Score	24	32	42	42	56
SYBYL/ChemScore	12	26	35	35	40
SYBYL/D-Score	8	16	26	26	41

De acordo com os resultados expressos na Tabela 1 o AutoDock apresenta uma taxa de sucesso de 62%, se considerarmos o rmsd menor ou igual a 2 Å.

Todavia essa observação não se repetiu quando o *scoring* foi avaliado. Das onze funções examinadas somente quatro (X-score, DrugScore, PLP e G-Score) foram capazes de apresentar valores de energia livre calculados próximos dos obtidos experimentalmente (WANG *et al.*, 2003).

A incapacidade de prever precisamente a afinidade de ligação entre um ligante e uma proteína é o maior problema atual do *docking*.

1.1.2 Outros programas empregados nos experimentos de *docking*

O FlexX é um programa que realiza o *docking* de ligantes orgânicos e sítios ativos de proteínas. Em uma primeira fase, uma base pré-selecionada ou um fragmento do ligante, considerado rígido e independente do resto do ligante é ancorado no sítio ativo. O algoritmo empregado pelo FlexX objetiva encontrar posições para o fragmento do ligante no sítio ativo, de modo a alcançar o maior número possível de interações com a enzima. Na segunda fase, o ligante é reconstruído partindo-se de posicionamentos alternativos do fragmento base. (RAREY *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com o FlexX demonstram que as simplificações no modelo são razoáveis e que os maiores problemas observados foram a ausência de um modo apropriado de considerar o papel da água na formação do complexo e os valores de energia livre calculados, que desviam substancialmente daqueles observados experimentalmente (CROSS, 2005).

O **GOLD** (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) é um programa de *docking* que utiliza o algoritmo genético (GA) para explorar a flexibilidade de um ligante frente a uma proteína, parcialmente flexível na vizinhança de seu sítio ativo (JONES *et al.*, 1997).

Uma função *scoring* é utilizada para ordenar as soluções encontradas para os ligantes. Essa função compreende um termo para ligações de hidrogênio, um termo

que é capaz de descrever a contribuição hidrofóbica para a energia de ligação e um termo derivado das funções empíricas da mecânica molecular que estima a energia interna do ligante (JONES *et al.*, 1997).

1.2 Serino Proteases

Serino proteases são enzimas proteolíticas caracterizadas pela presença de um resíduo de serina ativo essencial à atividade catalítica. As serino proteases são uma família de enzimas amplamente estudadas devido ao seu envolvimento em inúmeros processos biológicos críticos como digestão, coagulação sanguínea, fibrinólise e resposta imune. A importância biológica dessa classe de enzimas as tornam alvos para intervenção terapêutica, assim como para a elucidação de vias bioquímicas (STOOP *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 2008).

A família das serino proteases é subdividida em quatro subclasses: quimiotripsinas, subtisilinas, carboxipeptidase Y e protease Clp (DODSON *et al.*, 1998).

1.2.1 A Estrutura das serino proteases do tipo quimiotripsina

O sítio ativo das enzimas da família quimiotripsina/tripsina possui uma tríade catalítica formada pelos resíduos Asp102, Ser195 e Hys57 (Figura 1). Esse conjunto de aminoácidos foi identificado na estrutura da quimiotripsina por David Blow em 1967. A tríade catalítica é parte de uma extensa rede de ligações de hidrogênio e por isso também é chamada de sistema de dispersão de cargas (BLOW, 1997).

Os resíduos da tríade localizam-se na entrada do bolso de ligação do substrato. O N_2 do resíduo Hys57 está posicionado de modo favorável a aceitar um próton do OH da Ser195, durante o ataque nucleofílico à carbonila do substrato. O grupo Asp102, carregado negativamente, serve para estabilizar a carga positiva formada sobre o resíduo de Hys57, fazendo uma ligação de hidrogênio com o N_1 da Hys57. Esse sistema de dispersão de cargas torna o átomo de oxigênio da Ser195 um

poderoso nucleófilo e permite a hidrólise da ligação peptídica (PERONA *et al.*, 1995). Na Figura 1 estão ilustradas as ligações de hidrogênio da tríade catalítica.

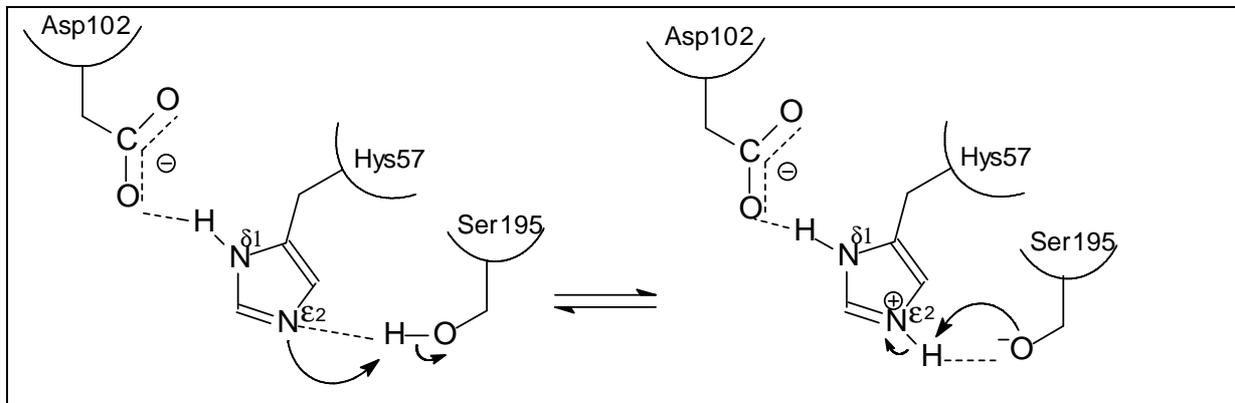


Figura 1 - Representação esquemática da tríade catalítica das serino proteases.

Outra característica observada no sítio ativo das serino proteases é a presença de um sítio de ligação ou fenda oxianion, formada pelos resíduos Gly193 e Ser195. O ataque nucleofílico do oxigênio da Ser195 ao carbono carbonílico da ligação peptídica muda a geometria ao redor desse carbono de trigonal plana para tetraédrica. O intermediário tetraédrico carregado negativamente é instável. Os grupos NH dos resíduos Gly193 e Ser195 são capazes de estabilizar esse intermediário através da formação de ligações de hidrogênio (Figura 2) (PERONA *et al.*, 1995; SCHMIDT *et al.*, 2008).

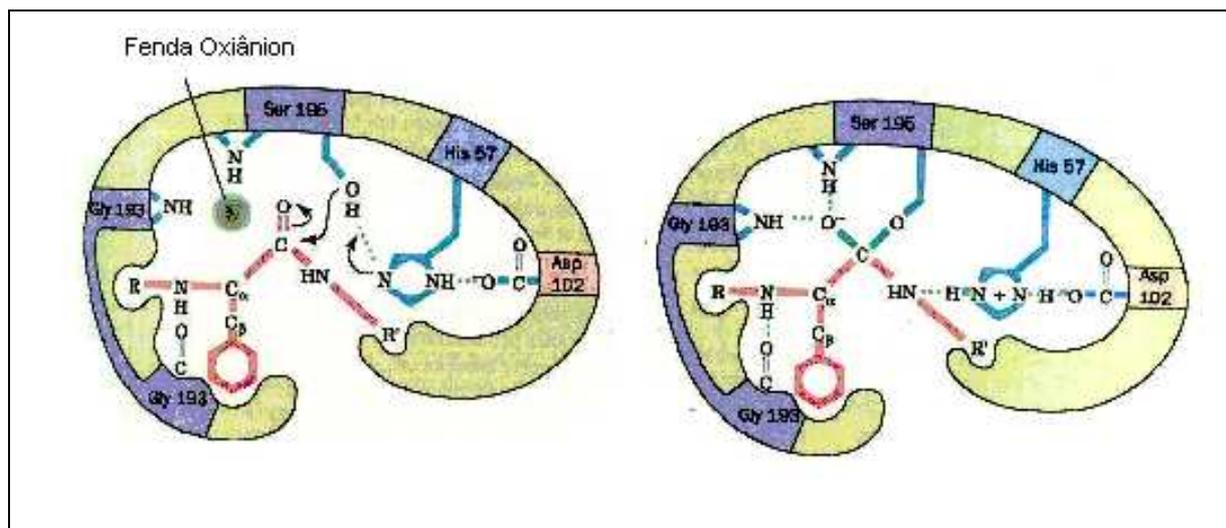


Figura 2 - Representação da fenda oxianion (VOET, 1995)

Enzimas proteolíticas são usualmente biossintetizadas como precursores inativos conhecidos como zimogênios. É claro compreender isso em se tratando de enzimas digestivas, que poderiam destruir o próprio tecido que as sintetizou se fossem secretadas na sua forma ativa. As serino proteases auto clivam-se entre resíduos específicos para se tornarem ativas (HEDSTROM, 2002).

1.2.2 Os sítios de reconhecimento dos substratos

Os aminoácidos dos substratos das serino proteases são designados a partir do grupo amino terminal ao grupo carboxílico como $P_n, \dots, P_3, P_2, P_1, P_1', P_2', P_3', \dots, P_n'$, sendo que a clivagem da ligação peptídica ocorre entre os resíduos P_1 e P_1' . Os sítios de ligação correspondentes na enzima são designados como $S_n, \dots, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots, S_n'$ (SCHMIDT *et al.*, 2008).

A especificidade das serino proteases está geralmente relacionada com as interações que ocorrem entre P_1 - S_1 . O sítio S_1 é um bolso adjacente ao resíduo de Ser195, formado pelos resíduos 189-192, 214-216, 224-228. A especificidade é determinada pelos resíduos localizados nas posições 189, 216 e 226 (PERONA *et al.*, 1995; HEDSTROM, 2002). Assim, em proteases do tipo tripsina um resíduo de

Asp189, carregado negativamente, localiza-se no fundo do bolso S1 e é capaz de formar ligações de hidrogênio com os grupos guanidínicos ou amino do P1 da arginina ou lisina, respectivamente.

Os sítios S2-S3 das serino proteases apresentam pouca especificidade em relação ao substrato. O sítio S2 é um bolso raso formado por resíduos hidrofóbicos, como His57 e Leu99. A especificidade desse sítio relaciona-se a hidrofobicidade da cadeia lateral de P2.

Na Figura 3 está representado o sítio ativo da tripsina comparando-o ao da trombina, outra serino protease de grande importância biológica e de interesse farmacológico.

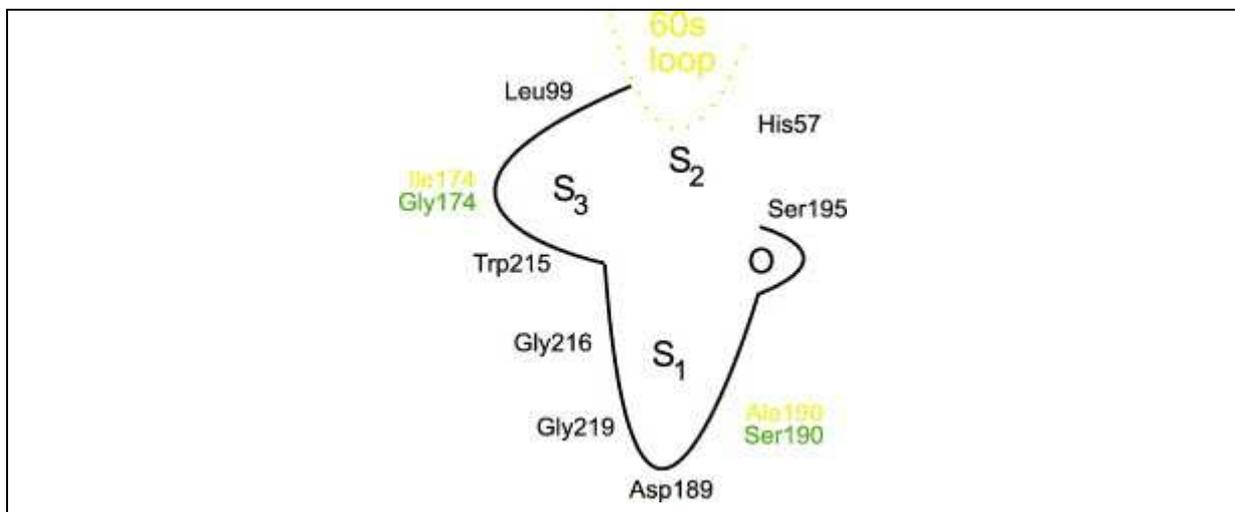


Figura 3 - Representação do sítio ativo da tripsina e da trombina. Os resíduos representados em verde são originais no sítio da tripsina, os em amarelo da trombina e os resíduos em preto estão presentes nos sítios das duas enzimas. O alça 60s está presente apenas no sítio ativo da trombina.

1.2.3 O mecanismo catalítico das serino proteases

A ampla homologia dos resíduos que compõem o sítio ativo das serino proteases indica que o mecanismo catalítico dessas enzimas é comum a todos os representantes dessa família. Com base em dados químicos e estruturais

descobertos nos últimos anos o mecanismo catalítico representado na Figura 4 foi formulado para as serino proteases, do tipo quimiotripsina (HEDSTROM, 2002).

Após a ligação do substrato à enzima para formar o complexo de Michaelis o oxigênio do resíduo Ser195 ataca nucleofilicamente a carbonila da ligação peptídica e forma o intermediário tetraédrico. O anel imidazólico da Hys57 capta o próton liberado, formando um íon imidazólico. Esse processo é auxiliado pelo resíduo Asp102, que forma uma ligação de hidrogênio com a Hys57 e estabiliza a carga positiva sobre esse resíduo. O intermediário tetraédrico é clivado em um intermediário acil-enzima. O grupo abandonador NHR é liberado e substituído por uma molécula de água. Com o ataque nucleofílico da água ao complexo acil-enzima ocorre a formação de um novo intermediário tetraédrico. Finalmente o segundo intermediário tetraédrico é clivado e ocorre a liberação do produto da catálise e recuperação da enzima.

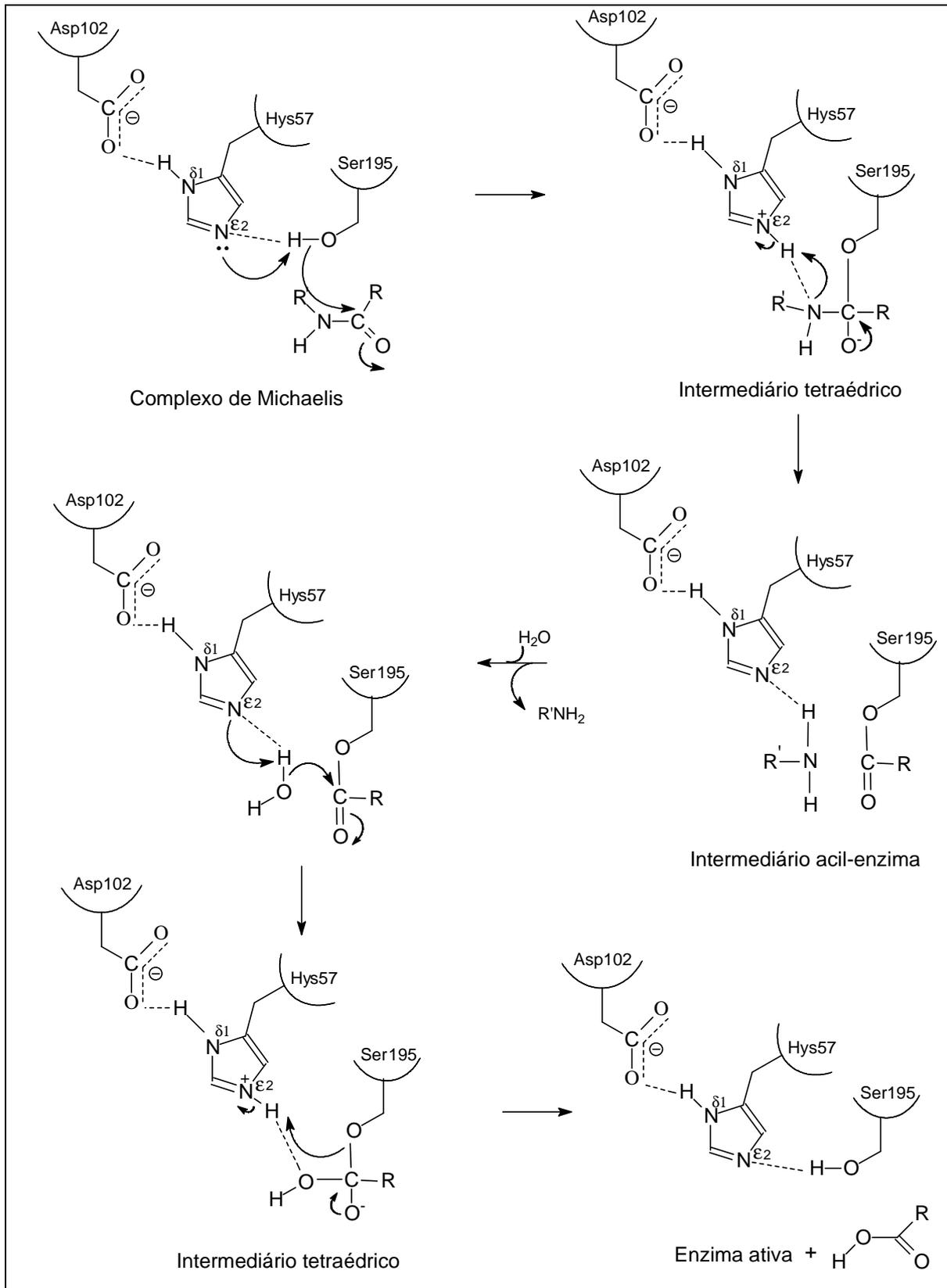


Figura 4 - O mecanismo catalítico das serino proteases.

1.2.4 Serino proteases como alvos de interesse farmacológico

As serino proteases representam uma classe de enzimas de grande importância terapêutica. Elas estão envolvidas em diversos processos biológicos importantes e são amplamente distribuídas, o que as torna um alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos.

Atualmente dispõem-se de inibidores de serino proteases que atuam em doenças tromboembólicas, como anticoagulantes. A trombina é uma serino protease que tem recebido ampla atenção como um promissor alvo para novos anticoagulantes (MARYANOFF, 2004; BAUER, 2006; MARKWARDT *et al.*, 1968). Ela desempenha um papel central como pró-coagulante, convertendo fibrinogênio em fibrina e ativando outros fatores de coagulação como o Fator V, Fator VIII, Fator XI e Fator XII. A trombina também age como um agonista plaquetário potente, recrutando plaquetas para o local de injúria vascular (WEITZ, 2007). A trombina é uma escolha lógica de um alvo biológico para a síntese de novos anticoagulantes orais. Sua inibição não somente atenua a formação de fibrinogênio como também bloqueia o *feedback* positivo mediado por ela (MARYANOFF, 2004; BAUER, 2006).

Na Figura 5 estão ilustradas a via intrínseca e extrínseca para o início da coagulação.

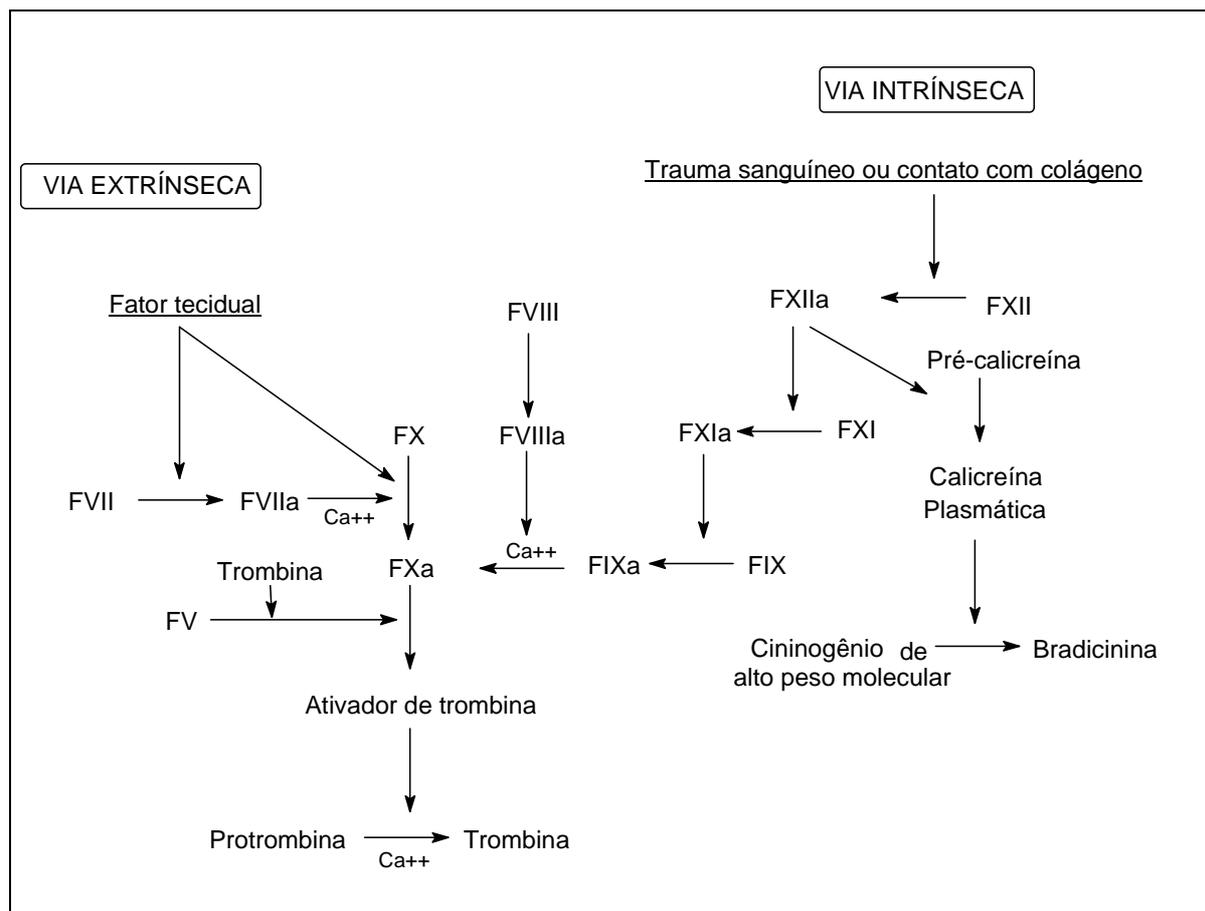


Figura 5 - Via intrínseca e extrínseca para o início da coagulação sanguínea e a interação com o sistema caliceína-cininas (GUYTON *et al.*, 1997).

Os fármacos da primeira geração de inibidores diretos da trombina (IDT) não possuem biodisponibilidade oral. O protótipo dessa classe de anticoagulantes é a hirudina, uma proteína composta de 65 aminoácidos e um potente inibidor irreversível da trombina. Embora a hirudina tenha apresentado efeitos clínicos satisfatórios (diminuição da incidência de morte relacionada a eventos cardiovasculares, diminuição da ocorrência de novos infartos do miocárdio e de angina refratária) o aumento do tempo de sangramento e os riscos de hemorragia levaram a conclusão de que ela possuía um índice terapêutico estreito e, portanto baixa segurança (BATES *et al.*, 1998)

A bivalirudina é um análogo sintético da hirudina que inibe a trombina reversivelmente (Figura 6). Estudos clínicos comparativos entre a bivalirudina e a

heparina apontaram para a maior eficácia clínica do inibidor de trombina (redução da taxa de morte e de infartos do miocárdio) e menor ocorrência de grandes sangramentos. (ANTMAN *et al.*, 2002; STONE *et al.*, 2006).

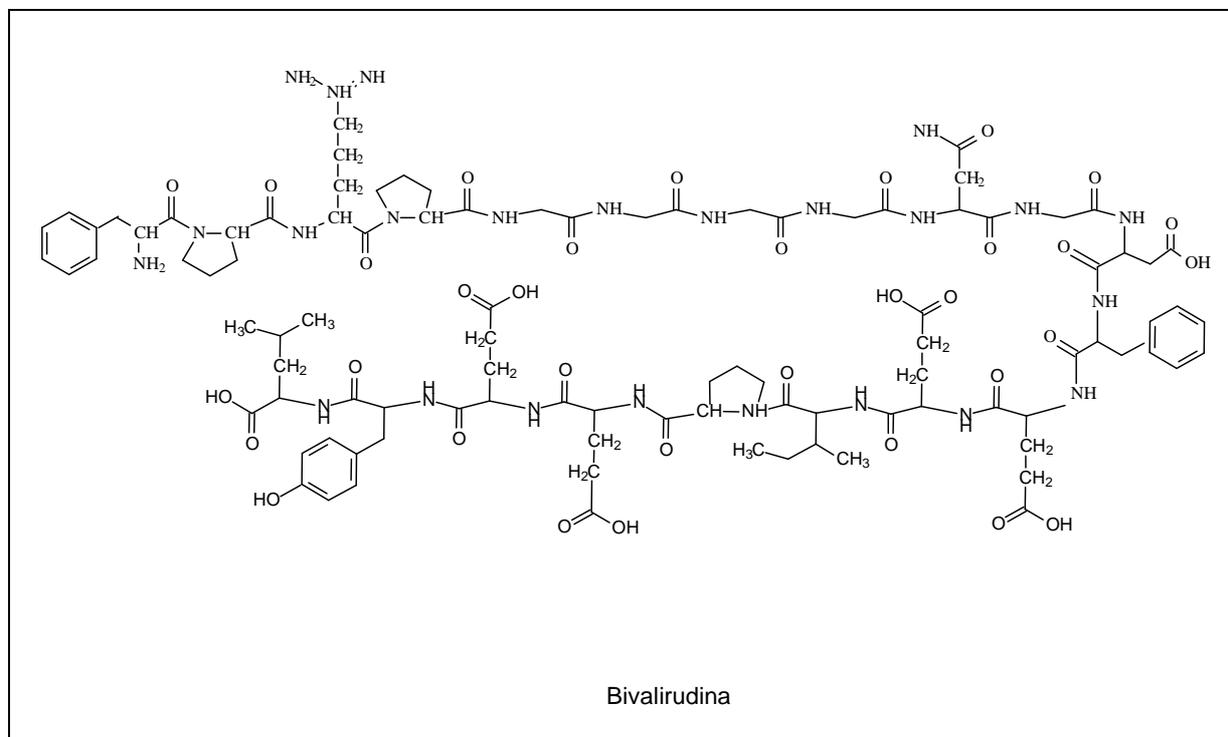


Figura 6 - Estrutura química da bivalirudina.

O sucesso obtido com a bivalirudina proporcionou o desenvolvimento de novos inibidores diretos de trombina (IDT) biodisponíveis oralmente. O primeiro fármaco dessa classe foi o ximelagatran, um pró-fármaco de um IDT, o melagatran (Figura 7). Estudos clínicos demonstraram a eficácia do ximelagatran na prevenção de tromboembolismo venoso recorrente e sua segurança em relação à ocorrência de grandes sangramentos (SCHULMAN *et al.*, 2003). Mais tarde novos estudos relacionaram o uso do ximelagatran à ocorrência de hepatotoxicidade, o que levou à retirada do fármaco do mercado farmacêutico. Contudo, os resultados apresentados demonstram claramente que a inibição da trombina pode ser segura e eficaz, pelo menos sob a perspectiva da incidência de sangramentos graves.

Etóxilato de dabigatran é um inibidor direto de trombina, biodisponível oralmente, que se encontra sob investigação para avaliação de sua eficácia no tratamento de distúrbios tromboembólicos arteriais e venosos. Ele é um pró-farmaco, convertido *in vivo* em dabigatran ativo (Figura 7). O dabigatran liga-se direta e especificamente à trombina (ERIKSSON *et al.*, 2007).

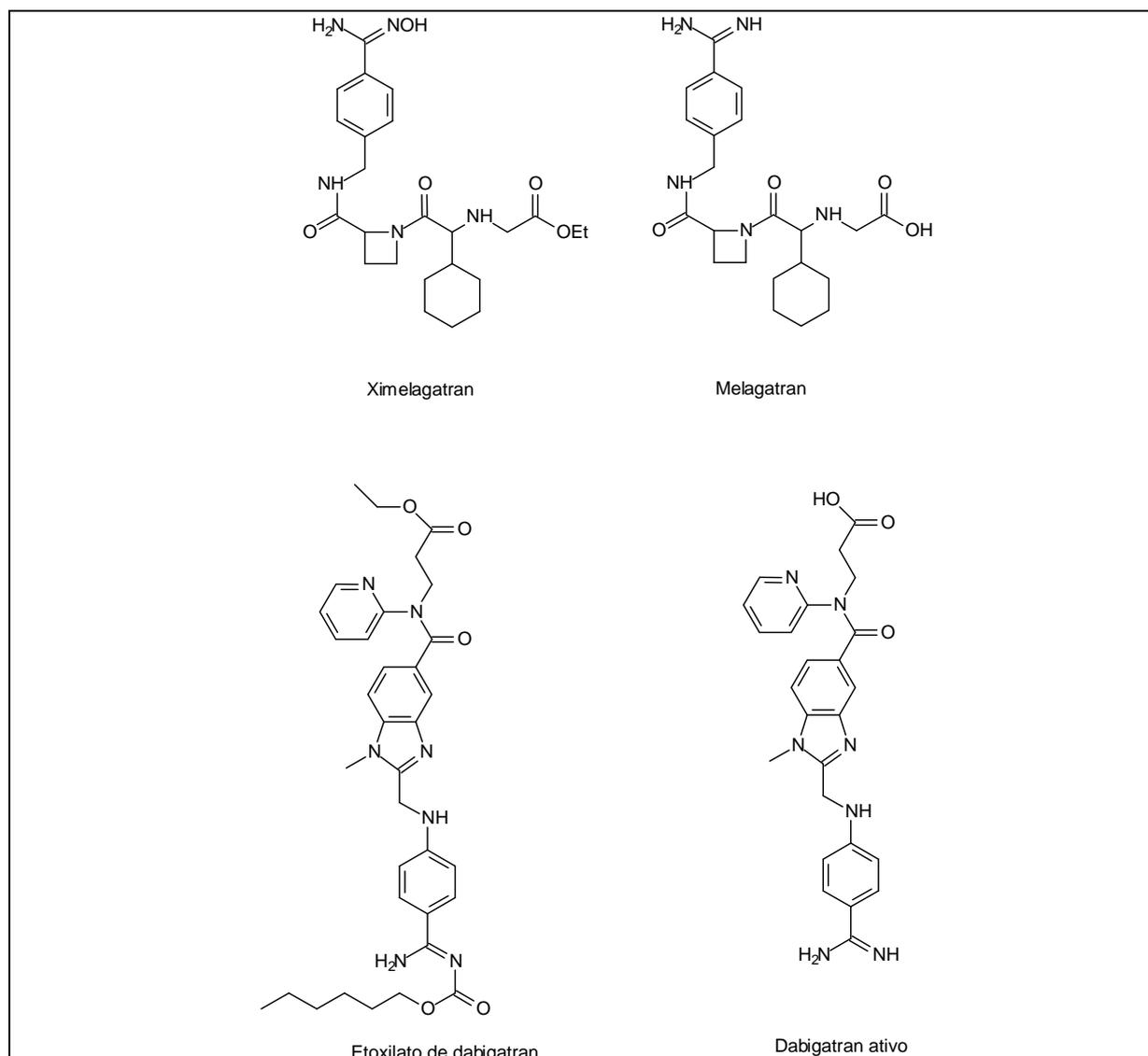


Figura 7 - Estrutura química de inibidores diretos de trombina.

O Fator Xa é uma serino protease do tipo quimiotripsina que também está envolvida na cascata de coagulação. Ele atua na junção das vias intrínseca e extrínseca e é

responsável pela conversão do zimogênio protrombina na sua forma ativa, trombina (SAGI *et al.*, 2003) (Figura 5). Portanto, trata-se de um alvo potencial para a síntese de novos fármacos antitromboembólicos. Estudos prévios têm demonstrado que os inibidores de Fator Xa têm menos propensão a causar sangramentos graves e, por isso, ele seria um melhor alvo antitrombótico do que a trombina (CORTE *et al.*, 2008; LIEBESCHUETZ *et al.*, 2002). A ocorrência de sangramentos associada ao uso de inibidores de Fator Xa é menor porque eles atuam especificamente sobre o sistema de coagulação plasmática, sem afetar as funções plaquetárias (SATO *et al.*, 1998).

O Fondaparinux é o primeiro inibidor seletivo de Fator Xa aprovado pelo FDA, para uso na prevenção e tratamento de tromboembolismo venoso recorrente (Figura 8) (JANIN *et al.*, 2008; TURPIE, 2008). Trata-se de um pentassacarídeo que se liga forte e exclusivamente a um único alvo no plasma, a antitrombina. A ligação é não covalente e reversível e induz uma mudança na conformação da antitrombina que aumenta a sua afinidade pelo Fator Xa. A ligação da antitrombina ao Fator Xa promove uma nova mudança conformacional que causa a liberação do fondaparinux de seu sítio de ligação e assim o inibidor torna-se livre para se ligar a outras moléculas de antitrombina e reiniciar o ciclo. O complexo antitrombina-Fator Xa é então eliminado do organismo (TURPIE, 2008).

O apixaban é um novo inibidor reversível e potente de Fator Xa e em contraste com o fondaparinux é administrado oralmente e tem um mecanismo de ação direto (LASSEN *et al.*, 2007).

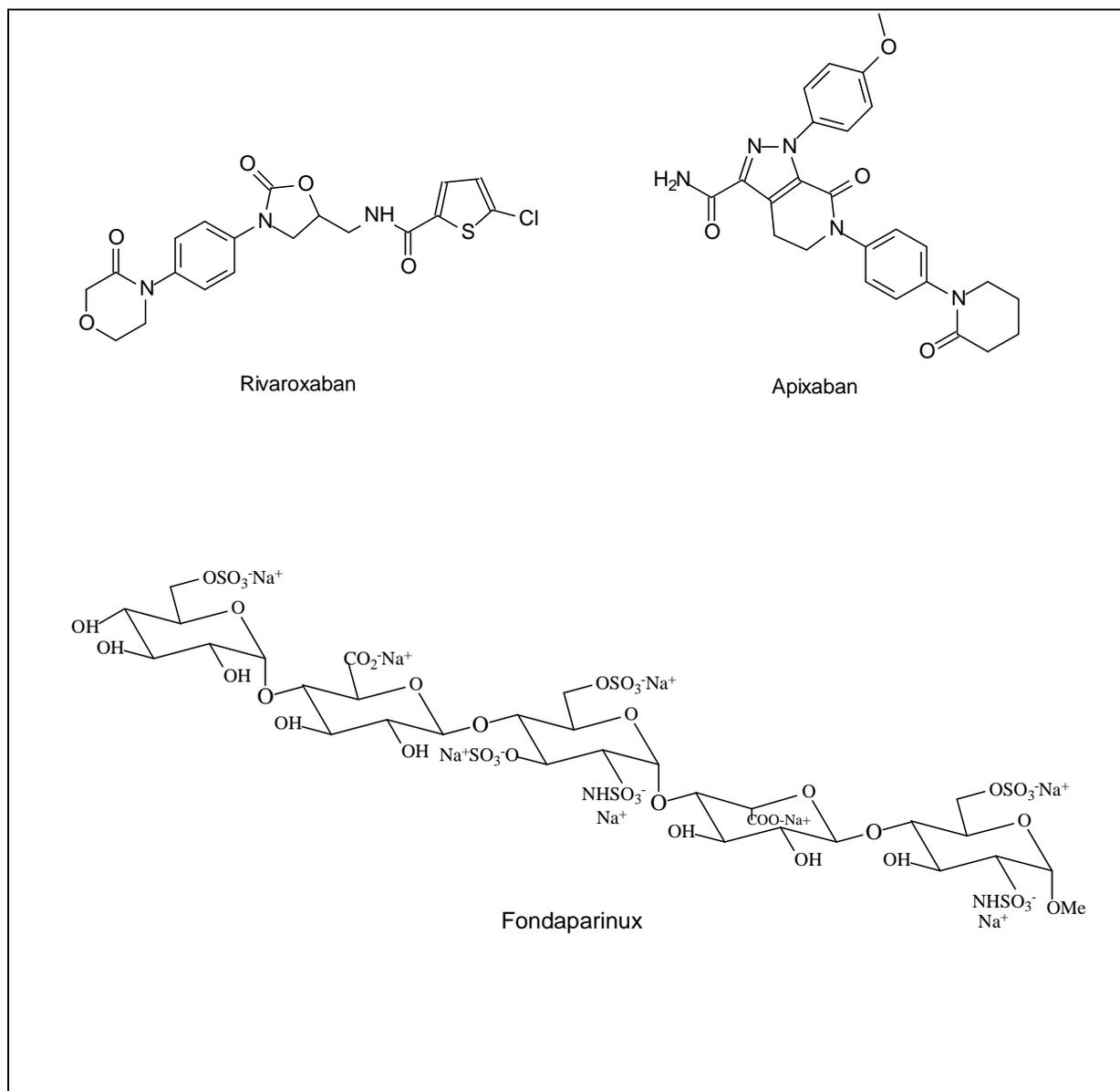


Figura 8 - Estrutura química dos inibidores de Fator Xa.

As caliceínas são um grupo de serino proteases com diversas funções. Elas são divididas em dois subgrupos: caliceínas plasmáticas e caliceínas teciduais. Os dois tipos variam quanto ao peso molecular, especificidade de substrato e funções fisiológicas (TANG *et al.*, 2005).

A caliceína plasmática é uma serino protease que desempenha muitas funções importantes, incluindo modulação da pressão sanguínea, ativação do complemento

e mediação e manutenção de respostas inflamatórias (TANG *et al.*, 2005). A calicreína plasmática desempenha um papel central na via de coagulação intrínseca (GRIFFIN *et al.*, 1976). Ela é predominantemente secretada pelos hepatócitos, como uma molécula inativa, chamada pré-calicreína. O contato do plasma com uma superfície carregada negativamente leva à auto ativação do Fator XII à Fator XIIa, à ativação da pré-calicreína a calicreína e à clivagem do cininogênio de auto peso molecular em bradicina. A ativação do fator XII não está relacionado apenas à cascata de coagulação intrínseca e à produção de cininas, mas também à ativação da via complemento (GRIFFIN *et al.*, 1976). Assim, a calicreína plasmática relaciona-se com muitas funções fisiológicas importantes, como regulação da pressão sanguínea (controla a liberação de bradicina, um potente vasodilatador), ativação do complemento e mediação de respostas inflamatórias.

Inibidores de calicreína plasmática são fármacos potenciais para o tratamento de algumas doenças, como o angioedema hereditário (HAE). A ausência do inibidor fisiológico de calicreína plasmática, chamado C1INH, resulta na liberação de bradicinina e no aumento da permeabilidade vascular, que leva ao angioedema. A aprotinina é um inibidor de serino protease com afinidade por calicreína plasmática e plasmina (MOREAU *et al.*, 2005). A inibição da calicreína plasmática, responsável pela liberação de bradicinina, pode levar a diminuição da liberação de bradicina durante uma crise de HAE.

A família das calicreínas tissulares possui atualmente 15 membros identificados (TANG *et al.*, 2005). Evidências crescentes apontam para o papel dessas calicreínas no desenvolvimento de tumores (XUAN *et al.*, 2008; BORGONO *et al.*, 2004). As proteases da matrix extra celular (MEC) regulam e modificam diretamente o micro ambiente tumoral e influenciam indiretamente o crescimento e a apoptose do tumor, na angiogênese, na invasão e na metástase, através da clivagem da matrix extra celular. O fator ativador de plasminogênio (uPA), o receptor de uPA e o plasminogênio têm sido relacionados a proteólise do câncer. Contudo, outras serino

proteases, pertencentes à família das calicreínas tissulares, parecem também estarem envolvidas com a progressão de tumores (BORGONO *et al.*, 2004).

A produção de algumas calicreínas tissulares é desregulada em células cancerosas, especialmente em adenocarcinomas. Inibidores específicos dessas enzimas proteolíticas inibem a degradação extracelular, o que por sua vez, impede a invasão de células tumorais, o desenvolvimento e a progressão de tumores e são uma perspectiva na busca por novos fármacos anti-tumorais (XUAN *et al.*, 2008).

Outra serino protease alvo de interesse farmacológico é a protease NS3 do vírus da hepatite C (HCV). Inibidores da replicação do vírus HCV, cujo alvo é essa enzima, estão em desenvolvimento (McCOWN *et al.*, 2008). O vírus da hepatite C sintetiza uma poliproteína inativa com cerca de 3.000 aminoácidos. A clivagem autocatalítica desta poliproteína leva a proteínas funcionais e estruturais ativas, indispensáveis ao ciclo de vida viral. A inibição da protease NS3 parece impedir a maturação e a produção de novos vírus. A HCV NS3 é uma serino protease que cliva ligações entre os resíduos Cys-Ser, com auxílio de um co-fator NS4. Inibidores contendo um grupo eletrofílico, como uma α -cetoamida, ligam-se reversivelmente ao resíduo de serina, no sítio ativo, e inibem a clivagem da poliproteína. O Boceprevir é um composto que atualmente encontra-se em estudos de Fase Clínica III, e parece ser eficaz em humanos (Figura 9) (VENKATRAMAM *et al.*, 2008).

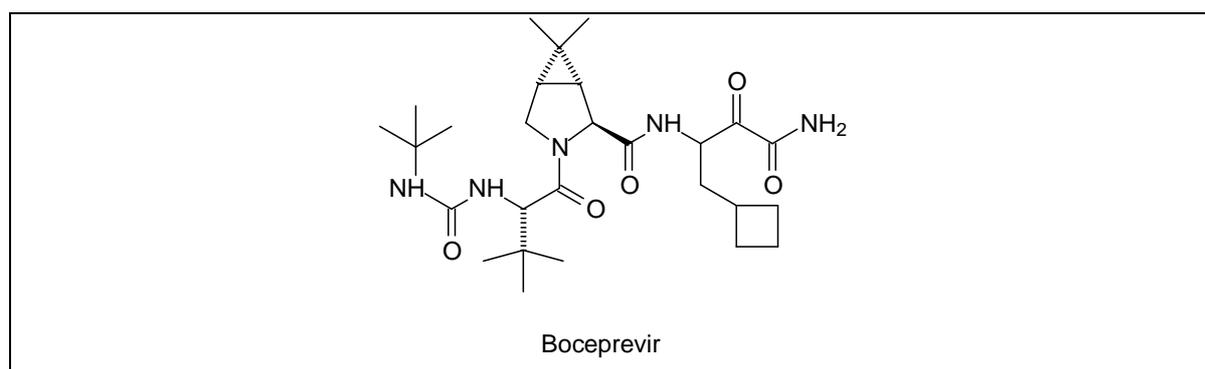


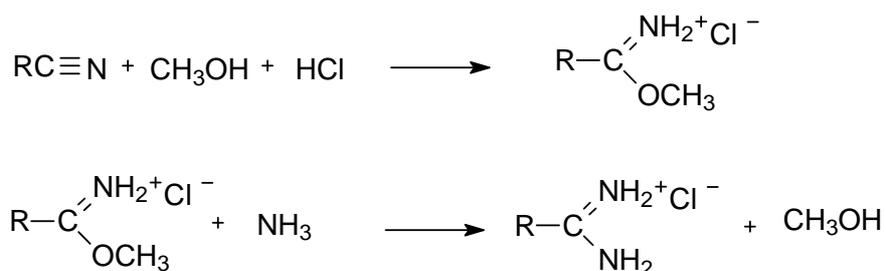
Figura 9 - Estrutura química do Boceprevir

A triptase é uma serino protease do tipo tripsina que constitui 20-25% do total de proteínas armazenadas em mastócitos humanos. Essas enzimas são armazenadas na sua forma ativa e estão envolvidas em processos inflamatórios mediados por mastócitos. Há evidências de que a triptase liberada na degranulação mastocítica é capaz de ativar certas populações de mastócitos, amplificando o sistema envolvido em doenças alérgicas (HE *et al.*, 1998). O importante papel da triptase na patologia da inflamação de vias aéreas tem sido demonstrado, assim como o potencial benefício de inibidores de triptase na terapia da asma (OH *et al.*, 2002)

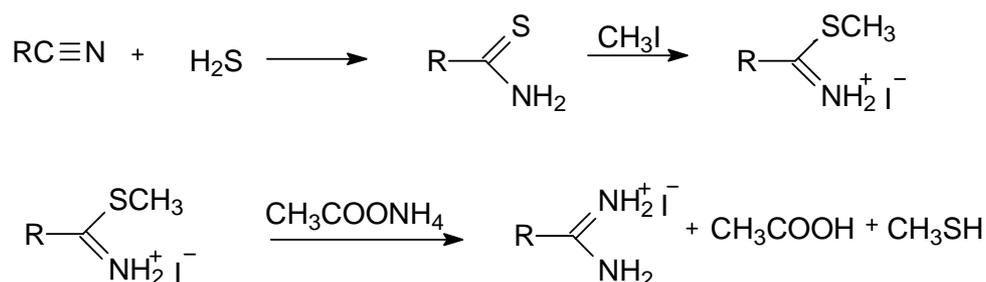
1.3 Síntese de Amidinas

Considerando-se a importância dessa classe de substâncias como inibidores de serino proteases, conforme observado na estrutura de diversos compostos apresentados na seção anterior, a seguir serão descritos os principais métodos de preparação de amidinas.

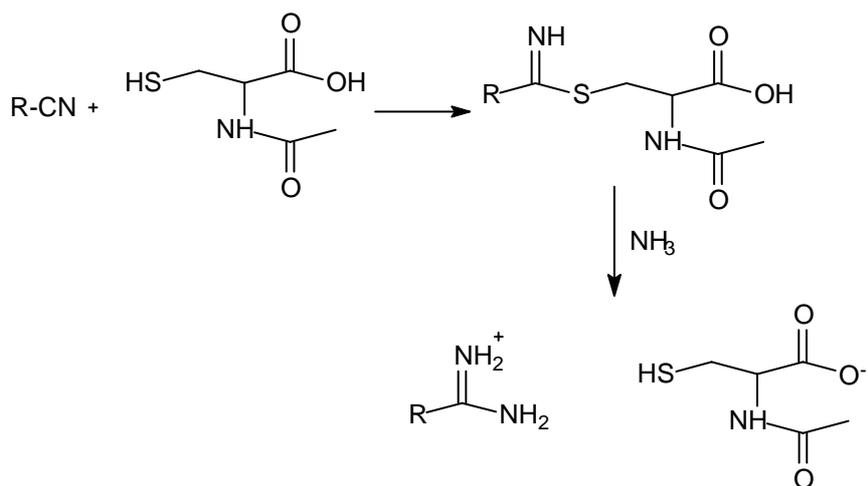
As amidinas são compostos básicos, usualmente preparadas a partir de derivados nitrila. Pinner descreveu a obtenção de amidinas, a partir de nitrilas, via éster imídico em 1877, e seu método ainda é o mais prático e útil na síntese de amidinas (SHRINNER *et al.*, 1944). Segundo essa técnica a nitrila é dissolvida ou suspensa em um álcool anidro e a mistura reacional é tratada com excesso de cloreto de hidrogênio. Essa etapa leva à obtenção do éster imídico. O intermediário obtido é solubilizado em álcool e submetido à reação com amônia, para obtenção da amidina (DABAK, 2002).



Outro método descrito para a obtenção de amidinas, a partir de derivados nitrila, é por meio de tioimidatos como intermediários. Sulfeto de hidrogênio é borbulhado em uma solução do precursor nitrila em piridina e trietilamina. Essa etapa leva à obtenção de uma tioamida que é dissolvida em uma mistura de acetona/iodometano e aquecida. O tioimidato formado após esse processo é dissolvido em metanol e submetido à reação com acetato de amônio, para obtenção da amidina (TANAKA *et al.*, 1997).



Lange e colaboradores descreveram um método para obtenção de amidinas que emprega a *N*-acetilcisteína como catalisador (LANGE *et al.*, 1999). Na primeira etapa a *N*-acetilcisteína reage com a nitrila, formando um intermediário imino-tioéster. A reação desse intermediário com a amônia leva a formação da amidina e a liberação do catalisador.



Os melhores resultados são obtidos com nitrilas heteroaromáticas, alifáticas ou aromáticas deficientes de elétrons. O produto da reação é obtido sob a forma de acetilcisteinato amidínico. (LANGE *et al.*, 1999).

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Com base no exposto anteriormente e no interesse de nosso grupo no planejamento e síntese de inibidores enzimáticos com potencial interesse farmacológico, objetivou-se no presente trabalho o planejamento por modelagem molecular e a síntese de inibidores potenciais de serino proteases. Os fatores que motivaram a escolha dessa classe de enzimas foram a sua importância como alvo terapêutico, a disponibilidade de dados cristalográficos no *Protein Data Bank*, o que possibilitou os estudos de modelagem molecular, e a possibilidade da realização de ensaios enzimáticos realizados por colaboradores do presente projeto (professores Amintas Fabiano de Souza Figueiredo e Marcelo Matos Santoro).

O trabalho foi dividido em duas partes:

- estudo de dez ligantes, inibidores potenciais de serino proteases (Figura 10) por modelagem molecular, utilizando a β -tripsina bovina como modelo de estudo;
- síntese das substâncias mais promissoras oriundas do estudo de planejamento.

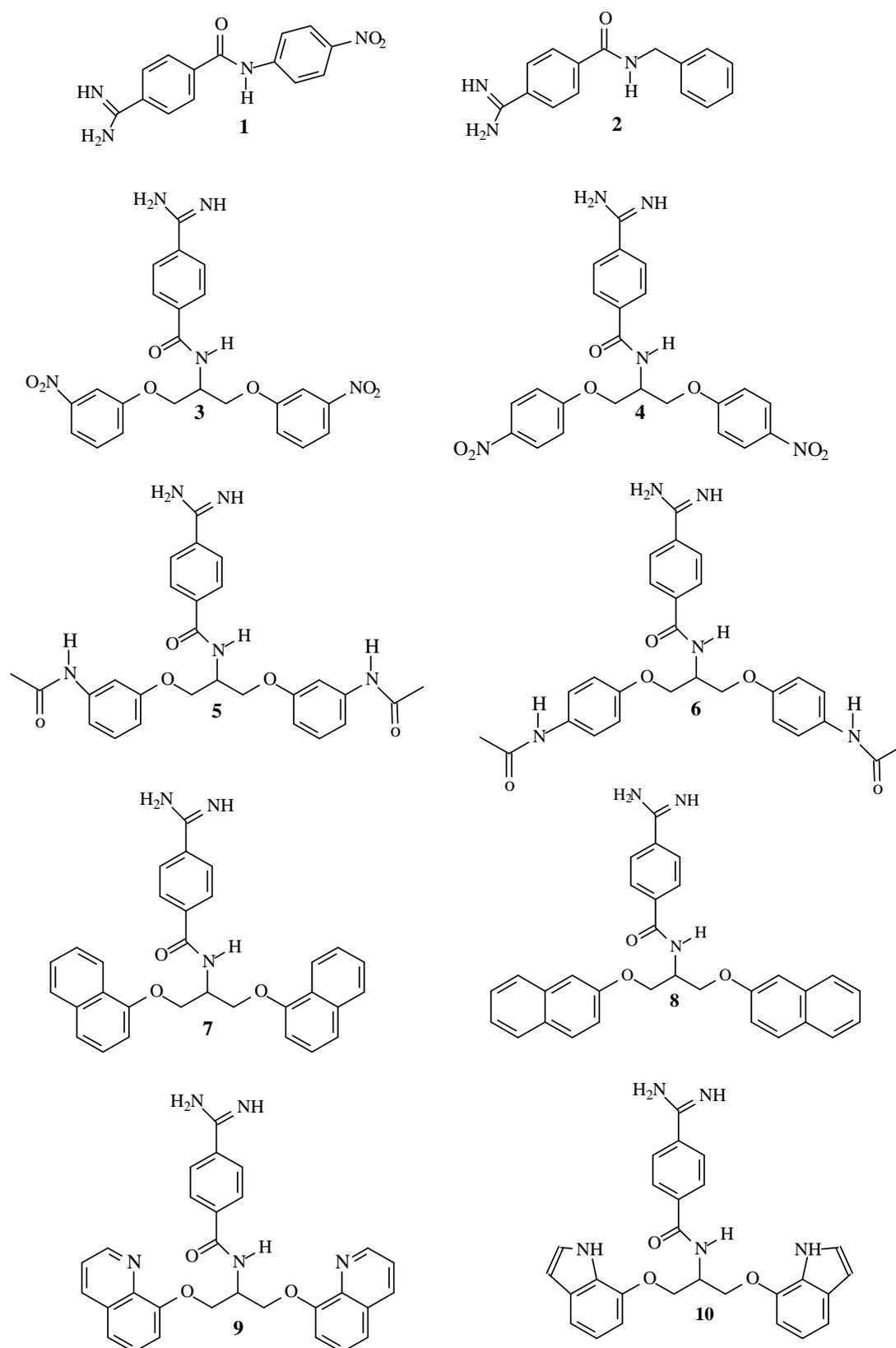


Figura 10 - Ligantes construídos para os estudos de superposição molecular (*docking*).

A estrutura química desses ligantes foi planejada usando como protótipo a substância representada pela estrutura B, na Figura 11. Este composto é um substrato seletivo da β -tripsina, constituído por três resíduos de aminoácidos, L-arginina, D-valina e L-leucina. A L-arginina protonada possui uma densidade de carga positiva concentrada sobre os átomos de nitrogênio guanidínicos, capazes de interagir com a β -tripsina através do grupo carboxilato do resíduo de aspartato. Os outros dois aminoácidos, D-valina e L-leucina, possuem grupos hidrofóbicos, em sua estrutura, que preenchem os bolsos da enzima, aumentando sua afinidade pelo substrato. A superposição da solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida nos experimentos *docking* da substância representada pela estrutura B com o ligante **8** ilustra o planejamento desse e dos demais ligantes em relação ao substrato e pode ser vista na Figura 11.

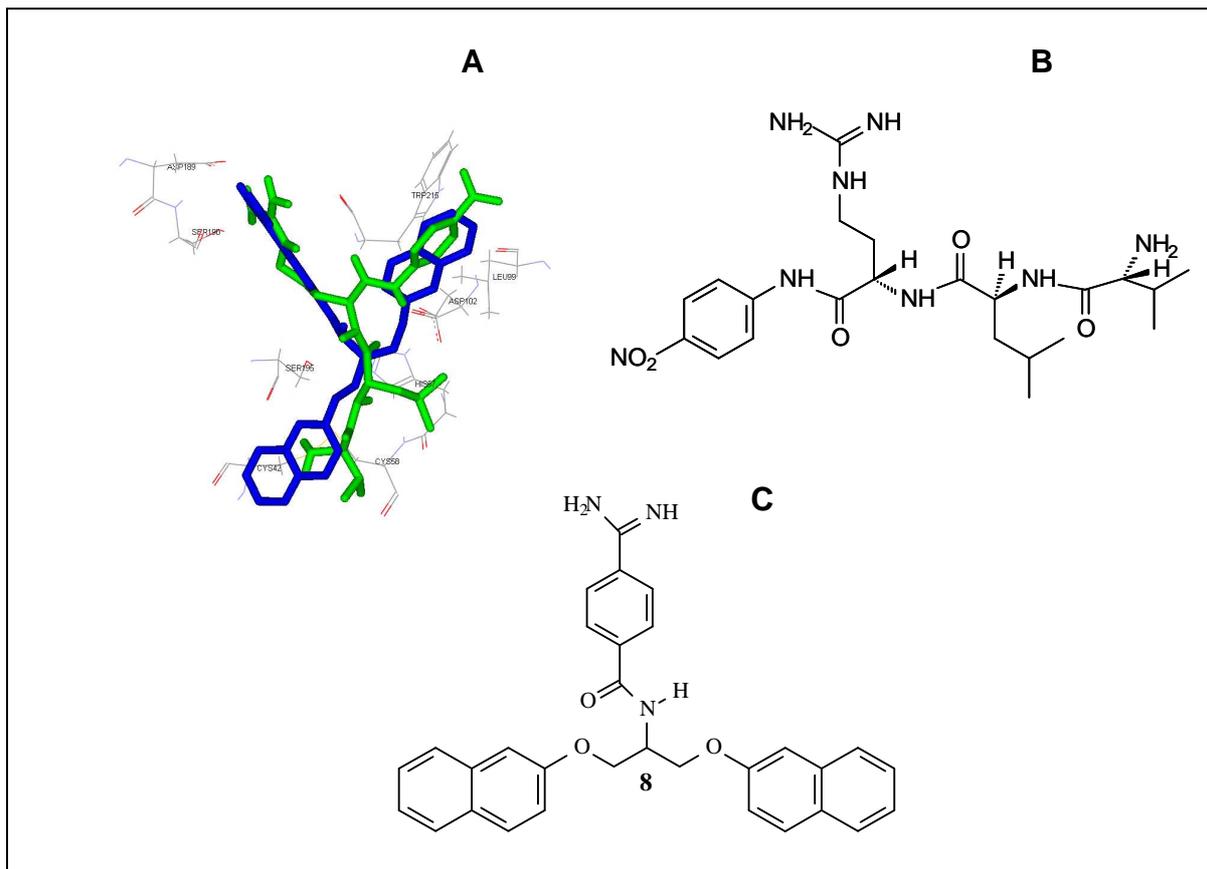


Figura 11 - Sobreposição da *N*-benzoilarginina p-nitroanilida ao ligante **8** (A); estrutura química do substrato da β -tripsina (B); estrutura química de **8** (C)

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Modelagem Molecular

Os estudos de ancoragem molécula (*docking*) foram realizados utilizando-se o programa AutoDock 3.0.5 (MORRIS *et al.*, 1998). Seis estruturas cristalográficas da tripsina bovina foram selecionadas do *Protein Data Bank* (entradas no PDB 1EB2, 1MTU, 1MTW, 1K1O, 1K1P e 1K1I). Os critérios empregados para seleção dessas enzimas foram a resolução do complexo cristalográfico de até 2.2 Å e diversidade estrutural dos ligantes, o que provavelmente proporciona maior variedade conformacional no sítio ativo da enzima, permitindo maiores possibilidades para a análise das interações enzima-ligante. Os mapas de grade de potencial (*grid*) foram calculados usando-se o programa AutoGrid. Para cada arquivo PDB o ligante e todas as moléculas de água foram retiradas (com exceção da enzima 1K1O, na qual uma molécula de água, H₂O901, foi mantida no *grid*). Foram adicionados os hidrogênios polares e as cargas Kollman foram calculadas. O espaçamento entre os pontos do *grid* utilizado foi de 0,375 Å. Para os cálculos do AutoGrid os potenciais para as ligações de hidrogênio com os heteroátomos O, N e S foram usados. As estruturas dos ligantes foram desenhadas e otimizadas utilizando-se o HyperChem (Método semi-empírico, campo de força PM3 e gradiente de convergência de 0.01 Kcal/mol Å). Os grupos ácidos e básicos foram considerados ionizados. Para selecionar as ligações rotacionáveis e não rotacionáveis foi utilizado o programa AutoDock Tools. Os grupos carboxilato, nitro, amidino e amida tiveram suas ligações marcadas como não-rodáveis. Para os cálculos de *docking* envolvendo os ligantes cristalográficos foram utilizados como parâmetros o máximo de 3,0x10⁶ avaliações de energia e 200 corridas de algoritmo genético Lamarckiano. Para os cálculos envolvendo os demais ligantes os parâmetros empregados foram máximo de 3,0x10⁶ avaliações de energia e 100 corridas de algoritmo genético Lamarckiano. O RMS estipulado foi de 2 Å. Autodock 3.0.5 tem se mostrado preditivo na reprodução dos modos de ligação observados experimentalmente, utilizando uma equação expandida para calcular a energia livre de ligação (ΔG), e adicionando termos

entrópicas às tradicionais equações da mecânica molecular. O campo de força inclui parâmetros para dispersão/repulsão, ligações de hidrogênio, ligações eletrostáticas e os desvios dos termos geométricos covalentes. A parte entrópica inclui termos que calculam as rotações internas congeladas, assim como os efeitos de dessolvatação e os hidrofóbicos. A constante de inibição K_i , é calculada usando a equação: $\Delta G = RT \ln K_i$, onde R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T a temperatura absoluta, estipulada como sendo a temperatura ambiente (298,15 K) (MORRIS, *et al.*, 1998). Em todos os cálculos utilizou-se um microcomputador Pentium 4.0 GHz e o sistema operacional Linux.

O coeficiente de partição dos compostos submetidos aos estudos de modelagem molecular foi calculado utilizando-se o HyperChem, que usa parâmetros atômicos derivados por Ghose, Pritchett e Crippen (GHOSE *et al.*, 1987).

3.2 Síntese

3.2.1 Materiais e Métodos

Os solventes utilizados foram previamente tratados seguindo procedimentos específicos:

- metanol – tratado com magnésio ativado pelo iodo sob refluxo e destilado. No texto é referido como metanol anidro (ARMAREGO *et al.*, 1996);
- piridina – acondicionada previamente com pelets de hidróxido de potássio e destilada. No texto é referida como piridina anidra (ARMAREGO *et al.*, 1996);
- tetrahidrofurano (THF) – tratado com sódio metálico e benzofenona (indicador) e destilado imediatamente antes do uso. No texto é referido como THF anidro (ARMAREGO *et al.*, 1996).

Os demais solventes foram utilizados sem prévia purificação e/ou destilação.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se sílica-gel 60 G MERCK[®], sobre lâmina de vidro. Os reveladores utilizados foram: solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v e solução etanólica de ninhidrina a 0,3% p/v.

Para cromatografia em coluna utilizou-se sílica-gel 60, 0,063 a 0,200 mm da MERCK[®].

Os espectros de ressonância magnética nuclear de 1D e 2D foram obtidos em espectrômetro BRUCKER Avance DPX 200 e espectrômetro BRUCKER Avance DRX 400, no Departamento de Química, ICEX, UFMG, utilizando-se como padrão interno tetrametilsilano.

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro com transformada de Fourier – Perkin-Elmer, modelo Spectrum One, do Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

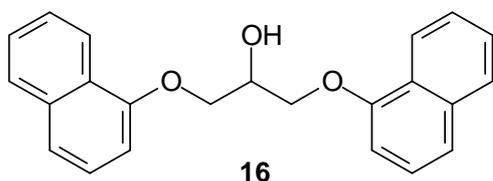
As faixas de fusão foram medidas em aparelho Microquímica MQAPF 301 Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG e não foram corrigidas.

Para todas as substâncias obtidas foram determinados os pontos de fusão e foram obtidos os espectros no IV e de RMN de ¹H e de ¹³C. Quando se fez necessário para a atribuição dos sinais de RMN e para as substâncias inéditas foram obtidos espectros de RMN bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC). Para a atribuição das bandas no IV e dos sinais de RMN utilizaram-se como referência Silverstein e colaboradores, Pretsch e colaboradores e Gil e colaboradores (SILVERSTEIN *et al.*, 2007; PRETSCH *et al.*, 1989; GIL *et al.*, 1987).

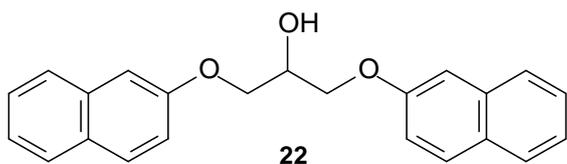
3.2.2 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-propanol (16) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-propanol (22)

Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram dissolvidos 5,0 g de α -naftol (34,7 mmol) em 45 mL de etanol. A essa solução foram adicionados 2,0 g (36,3 mmol) de KOH, previamente solubilizados em 7 mL de água destilada. O balão foi fechado com um septo de borracha e o sistema foi mantido sob agitação magnética por 10 minutos. A seguir adicionou-se, gota a gota, 0,9 mL de epíclorodrina (11,5 mmol) e a mistura reagente foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 48 horas. Após esse tempo o etanol foi destilado e a fase aquosa restante foi extraída com 4 x 50 mL de éter etílico gelado. A fase orgânica etérea foi extraída com solução de NaOH 3 mol/L, até remoção do α -naftol, e com água destilada até pH próximo de sete. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado. Foram obtidos 3,79 g de um óleo escuro, que correspondem a 63 % de rendimento bruto. O produto obtido nessa reação foi utilizado na etapa seguinte, sem prévia purificação.

Para síntese de **22** seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, partindo-se de 5,0g (34,7 mmol) de β -naftol. A proporção dos demais reagentes foi a mesma descrita para a síntese de **16**. Foram obtidos 5,72 g de um sólido de cor amarela, correspondente a 57 % de rendimento. O produto obtido nessa reação foi utilizado na etapa seguinte sem prévia purificação.

FM: C₂₃H₂₀O₃

MM: 344 g/mol

FM: C₂₃H₂₀O₃

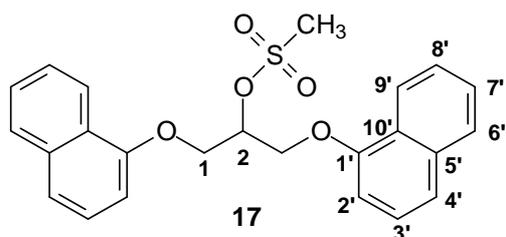
MM: 344 g/mol

3.2.3 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxiproprano (17) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxiproprano (23)

Sob agitação magnética e banho de gelo foram dissolvidos 3,80 g (11,05 mmol) de 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-propanol (**16**) em 15 mL de piridina anidra e foram adicionados, gota a gota, 3,5 mL (45 mmol) de cloreto de mesila. O sistema foi vedado com um septo de borracha e mantido sob agitação magnética por cerca de 6 horas. Após esse tempo o balão foi levado ao freezer, onde permaneceu até que se completassem 48 horas do início da reação. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 8:2; revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v). Adicionou-se gelo pilado e HCl concentrado, ao balão. Atritou-se com um bastão de vidro até a formação de um sólido amarelo que foi filtrado a vácuo. Esse sólido foi purificado por CCS (hexano/acetato de etila 9:1) e foram obtidos 2,84 g de um sólido branco que correspondem a 61 % de rendimento.

O mesmo procedimento foi seguido para obtenção do derivado **23** partindo-se de 3,62 g (10,52 mmol) de **22**, 3,5 mL (45 mmol) de cloreto de mesila e 10 mL de piridina anidra. A reação foi elaborada após 24 horas acrescentando-se gelo pilado e HCl concentrado. Contudo não houve a precipitação do produto. Uma massa oleosa se formou e foi extraída com 4 x 50 mL CHCl₃. Em seguida, a fase orgânica foi extraída com 3 x 50 mL de água destilada e secada com sulfato de sódio anidro. O solvente foi filtrado e eliminado em evaporador rotatório. Obteve-se um óleo amarelo, que foi submetido a purificação por CCS (hexano/acetato de etila 9:1). Foram obtidos 3,15 g de um sólido branco correspondente a 71 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de **17** estão descritos nas Tabelas 2 e 3 e os dados dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de **23** nas Tabelas 4 e 5.

FM: C₂₄H₂₂O₅S

MM: 422 g/mol

FF: 101,1-101,4°C

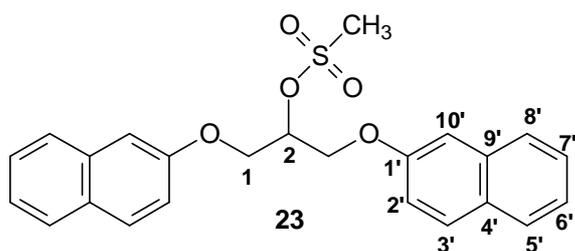
IV de **17** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3054 (v C-H arom); 2943 (v_{as} C-H alif.); 2880 (v_s C-H alif.); 1597, 1579 (v C=C arom.); 1508, 1465, 1450 (def.ang.ass. C-H alif.); 1343 (v_{as} SO₂); 1266, 1239 (v C-O); 1170 (v_s SO₂ est.sim.)

Tabela 2 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz) de 17 (Figura A.1, p.145)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,27-8,25	m	2H	H-9'
7,82-7,80	m	2H	H-6'
7,50-7,47	m	6H	H-4', H-7' e H-8'
7,37	t ($J_{3',2'} 7,6$; $J_{3',4'} 7,6$)	2H	H-3'
6,86	d ($J_{2',3'} 7,6$)	2H	H-2'
5,63-5,59	m	1H	H-2
4,64-4,55	m	4H	H-1
3,12	s	3H	CH ₃

Tabela 3 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de **17 (Figura A.3, p.147)**

δ	Atribuição
153,4	C-1'
134,5	C-5'
127,6	C-6'
126,6	C-8'
125,6	C-3' e C-7'
125,2	C-10'
121,5	C-9'
121,3	C-4'
105,0	C-2'
77,8	C-2
67,2	C-1
38,6	<u>C</u> H ₃

FM: $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{S}$

MM: 422 g/mol

FF: 82,7-84 °C

IV de **23** ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3055 (ν C-H arom.); 2939 (ν_{as} C-H alif.); 1627, 1599 (ν C=C arom.); 1509, 1471, 1456 (def.ang.ass. C-H alif.); 1345 (ν_{as} SO_2); 1215 (ν C-O); 1170 (ν_{s} SO_2 .)

Tabela 4 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de 23 (Figura A.7, p.151)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
7,77-7,71	m	6H	H-3', H-5' e H-8'
7,44	dt ($J_{7',8'} = J_{7',6'} = 7,6$; $J_{7',5'} = 1,2$)	2H	H-7'
7,35	dt ($J_{6',7'} = J_{6',5'} = 7,6$; $J_{6',8'} = 0,8$)	2H	H-6'
7,19	d ($J_{10',2'} = 2,4$)	2H	H-10'
7,15	dd ($J_{2',3'} = 8,8$; $J_{2',10'} = 2,4$)	2H	H-2'
5,36	m	1H	H-2
4,49-4,43	m	4H	H-1
3,17	s	3H	CH_3

Tabela 5 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 23 (Figura A.8, p.152)

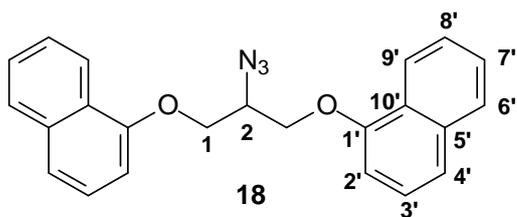
δ	Atribuição
155,6	C-1'
134,2	C-9'
129,7	C-3', C-5' ou C-8'
129,2	C-4'
127,6	C-3', C-5' ou C-8'
126,8	C-3', C-5' ou C-8'
126,6	C-7'
124,1	C-6'
118,2	C-2'
106,9	C-10'
78,0	C-2
66,8	C-1
38,4	CH_3

3.2.4 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-azidopropano (18) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-azidopropano (24)

Em um balão de fundo redondo, adaptado a um condensador, foram colocados 2,85 g (6,75 mmol) do derivado mesilado **17**, 10 mL de *N*-metilpirrolidona e 4,40 g (67,7 mmol) de NaN_3 . A mistura reagente foi mantida sob agitação e aquecimento a 80° C por 72 h. A reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 8:2; revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico). A *N*-metilpirrolidona foi evaporada e o resíduo foi solubilizado em éter etílico e água destilada, e transferido para um funil de separação. A mistura foi extraída com 4 x 25 mL de éter etílico e a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e filtrada. Eliminou-se o solvente em rotavapor e o produto bruto obtido foi recristalizado em uma mistura de álcool isopropílico, acetona e água destilada. Foram obtidos 1,83 g de um sólido amarelado, que correspondem a 73 % de rendimento.

Para obtenção do derivado azido **24** partiu-se de 0,8 g (1,90 mmol) do derivado mesilado **23**, 1,30 g (20 mmol) de NaN_3 e 3 mL de *N*-metilpirrolidona. A mistura reagente foi mantida sob agitação magnética e aquecimento a 80° C por 120 h. Seguiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente para a elaboração. Obteve-se um sólido amarelo que foi recristalizado em álcool isopropílico. Foram obtidos 423 mg de um sólido branco que correspondem a 60 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **18** estão descritos nas Tabelas 6 e 7 e os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **24** nas Tabelas 8 e 9.

MM: C₂₃H₁₉O₂N₃

FM: 369 g/Mol

FF: 61,2-62,9 °C

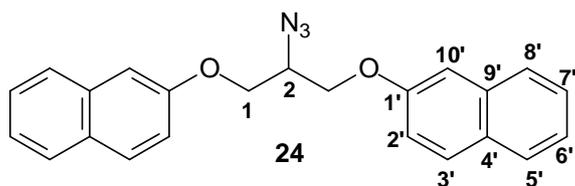
IV de **18** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3056 (v C-H arom.), 2933 (v_{as} C-H alif.); 2879 (v_s C-H alif.); 2137, 2094 (v_{as} N≡N); 1627, 1594, 1577 (v C=C arom.); 1508, 1455, 1440 (def.ang.ass. C-H alif.); 1267, 1238 (v C-O).

Tabela 6 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz) de 18 (Figura A.13, p.157)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,33-8,26	m	2H	H-9'
7,81-7,79	m	2H	H-6'
7,51-7,46	m	6H	H-4', H-7' e H-8'
7,36	t ($J_{3',2'} 7,6; J_{3',4'} 7,6$)	2H	H-3'
6,83	d ($J_{2',3'} 7,6$)	2H	H-2'
4,45-4,49	m	5H	H-1 e H-2

Tabela 7 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50MHz) de 18 (Figura A.14, p.158)

δ	Atribuição
153,7	C-1'
134,5	C-5'
127,5	C-6'
126,5	C-8'
125,6	C-3' e C-7'
125,5	C-10'
121,8	C-9'
121,1	C-4'
104,8	C-2'
67,7	C-1
59,9	C-2

MM: C₂₃H₁₉O₂N₃

FM: 369 g/mol

FF: 79,0-79,2°C

IV de **24** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3058 (v C-H arom.); 2927 (v_{as} C-H alif.); 2873 (v_s C-H alif.); 2141, 2083 (v_{as} N≡N) 1626, 1598 (v C=C arom.); 1512, 1450 (def.ang.ass. C-H alif.); 1217 (v C-O).

Tabela 8 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz) de **24 (Figura A.18, p.162)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
7,78-7,71	m	6H	H-3', H-5' e H-8'
7,44	ddd ($J_{\text{orto}}=6,8;$ $J_{\text{orto}}=7,0; J_{7',5'}=1,2$)	2H	H-7'
7,35	ddd ($J_{\text{orto}}=7,2;$ $J_{\text{orto}}=6,8; J_{6',8'}=1,2$)	2H	H-6'
7,25-7,18	m	3H	H-2' e H-10'
4,42-4,26	m	5H	H-1 e H-2

Tabela 9 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50MHz) de **24 (Figura A.20, p.164)**

δ	Atribuição
156,1	C-1'
134,3	C-9'
129,7	C-3', C-5' ou C-8'
129,3	C-4'
127,7	C-3', C-5' ou C-8'
126,8	C-3', C-5' ou C-8'
126,5	C-7'
124,0	C-6'
118,5	C-2'
107,0	C-10'
67,5	C-1
59,4	C-2

3.2.5 Síntese das aminas 19 e 25

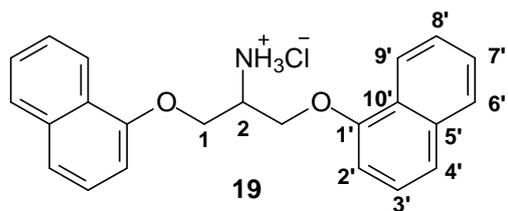
Método Geral

Em um balão de fundo redondo dissolveu-se o derivado azido **18** ou **24** em quantidade suficiente de THF Merck®. A essa solução adicionou-se o paládio/carvão (aproximadamente 10% da massa de material de partida utilizada) e vedou-se o balão com um septo de borracha. A mistura foi mantida sob um fluxo de N₂ (g), por cerca de 20 minutos. Em seguida, a atmosfera de nitrogênio foi substituída por atmosfera de hidrogênio, utilizando-se um balão de borracha contendo hidrogênio. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v e solução etanólica de ninhidrina 0,3% p/v) até o consumo de todo o material de partida. A suspensão foi filtrada para remoção do catalisador e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. O resíduo obtido foi dissolvido em metanol e acrescentou-se gelo pilado ao balão. Adicionou-se HCl concentrado, gota a gota, sobre essa solução. A massa semi-sólida formada foi triturada com bastão de vidro até a obtenção do produto sólido.

3.2.5.1 Cloridrato de 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-aminopropano (19)

O derivado **19** foi preparado de acordo com o procedimento descrito no Método Geral, partindo-se de 1,0 g (2,7 mmol) do derivado azido **18**, 7 mL de THF Merck® e 100 mg de paládio/carvão. A atmosfera de hidrogênio foi mantida por cerca de 4 horas. O sólido obtido após elaboração foi filtrado a vácuo e lavado com acetona. Foram obtidos 600 mg de **19** na forma de um sólido branco, que correspondem a 64 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de **19** estão descritos nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

FM: C₂₃H₂₂O₂ Cl

MM: 365,5 g/mol

FF (decomposição): 209,0-213,1 °C

IV de **19** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3052 (ν N-H de NH₃⁺); 2885 (ν_{as} C-H alif.) 1597, 1579 (ν C=C arom.); 1508, 1459 (def.ang.ass. C-H alif.); 1238 (ν C-O).

Tabela 10 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz) de **19 (Figura A.23, p.167)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
9,05	sl	3H	NH ₃
8,55	d (<i>J</i> _{9',8'} 8,4)	2H	H-9'
7,89	d (<i>J</i> _{6',7'} 8,0)	2H	H-6'
7,57-7,50	m	6H	H-4', H-7' e H-8'
7,44	t (<i>J</i> _{3',2'} = <i>J</i> _{3',4'} =7,6)	2H	H-3'
7,06	d (<i>J</i> _{2',3'} 7,6)	2H	H-2'
4,70-4,62	m	4H	H-1
4,29	sl	1H	H-2

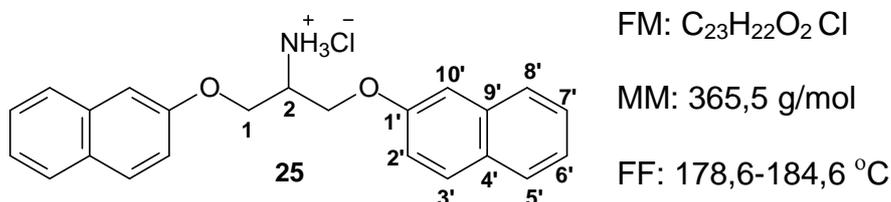
Tabela 11 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) de **19 (Figura A.24, p.168)**

δ	Atribuição
153,7	C-1'
134,4	C-5'
127,7	C-7'
126,5	C-8'
125,7	C-3' e C-6'
125,2	C-10'
122,8	C-9'
121,2	C-4'
105,8	C-2'
66,0	C-1
49,8	C-2

3.2.5.2 Cloridrato de 1,3-Bis(2-naftiloxi)-2-aminopropano (25)

Para a síntese da amina **25** foram utilizados 700 mg (1,9 mmol) do derivado azido **24**, 5 mL de THF Merck® e 100 mg de paládio/carvão. A atmosfera de hidrogênio foi mantida por cerca de 3 horas. A reação foi elaborada conforme descrito no Método Geral. Foram obtidos 570 mg de **25** na forma de um sólido branco (87 % de rendimento).

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **25** estão descritos nas Tabelas 12 e 13, respectivamente



IV de **25** ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3053 (ν N-H de NH_3^+); 2874 (ν_{as} C-H alif.) 1628, 1599 (ν C=C arom.); 1509, 1462 (def.ang.ass. C-H alif.); 1216 (ν C-O).

Tabela 12 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de **25 (Figura A.26, p.170)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,91	s	3H	NH_3
7,89-7,83	m	6H	H-3', H-5' e H-8'
7,51-7,25	m	8H	H-2', H-6', H-7' e H-10'
4,52-4,44	m	4H	H-1
4,09-4,07	m	1H	H-2

Tabela 13 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de **25 (Figura A.27, p.171)**

δ	Atribuição
155,6	C-1'
134,1	C-9'
129,4	C-3', C-5' ou C-8'
128,7	C-4'
127,5	C-3', C-5' ou C-8'
126,8	C-3', C-5' ou C-8'
126,5	C-7'
123,9	C-6'
118,6	C-2'
107,1	C-10'
65,1	C-1
49,2	C-2

3.2.6 Síntese das amidas 12, 14, 20 e 26

Método Geral

Para síntese do cloreto de ácido foram adicionados a um balão de fundo redondo adaptado a um condensador contendo um tubo de cloreto de cálcio, ácido 4-cianobenzóico, clorofórmio e cloreto de tionila (32 equivalentes). A mistura reagente foi aquecida a refluxo, e mantida sob agitação magnética, durante 4 horas. Ao término do tempo estabelecido a mistura reagente foi concentrada em evaporador rotatório, até *secura*. O produto bruto obtido nessa reação foi utilizado na etapa seguinte, sem prévia purificação.

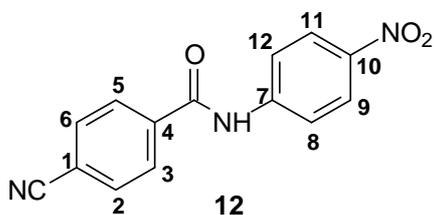
Uma vez obtido o cloreto de ácido adicionou-se a um balão de fundo redondo o derivado amino correspondente e THF Merck®, em quantidade suficiente para solubilizá-lo. Sob banho de gelo foram adicionados, na seqüência, trietilamina e uma solução do cloreto de ácido em THF. O balão foi vedado com um tubo de cloreto de cálcio e a mistura reagente foi submetida a agitação magnética, em banho de gelo. A evolução da reação foi acompanhada por CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; reveladores: solução etanólica de ácido sulfúrico 15%v/v e solução etanólica de ninhidrina 0,3%p/v). Após o consumo do material de partida, o solvente foi destilado em evaporador rotatório e o resíduo obtido foi dissolvido em CHCl_3 e transferido para um funil de separação. A fase orgânica foi extraída com 3 x 50mL KOH 1 mol/L, 3 x 50mL HCl 1mol/L e água destilada até pH 7. A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório. O produto obtido foi purificado por recristalização em acetona e éter de petróleo.

3.2.6.1 N-(4-nitrofenil)-4-cianobenzamida (12)

A amida **12** foi preparada utilizando-se 1,0 g (7,25 mmol) de *p*-nitroanilina, 25 mL de THF Merck®, 1,2 mL (8,67 mmol) de trietilamina e 1,6 g (9,67 mmol) de cloreto de 4-cianobenzoíla. Durante a elaboração observou-se a formação de uma emulsão

persistente, no funil de separação, que foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório. Obteve-se um resíduo ao qual acrescentou-se água destilada. A massa semi-sólida formada foi triturada com um bastão de vidro, até a formação de um sólido amarelo. Foram obtidos 1,5 g do derivado **12** na forma de um sólido amarelo que correspondem a 82,0% de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **12** estão descritos nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.



FM: $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{O}_3\text{N}_3$

MM: 267 g/mol

FF: 257,5-259,4 $^{\circ}\text{C}$

IV de **12** ($\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$): 3330 (v N-H); 3099, 3061 (v C-H arom.); 2225 (v C \equiv N); 1683 (v C=O est.); 1610, 1593 (v C=C arom. cond.); 1500 (v C=C arom.), 1408 (def.ang.ass. C-H alif.).

Tabela 14 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de **12 (Figura A.30, p.174)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
11,02	s	1H	<u>NH</u>
8,65-7,60	m	8H	H-2, H-3, H-5, H-6, H-8, H-9, H-11 e H-12

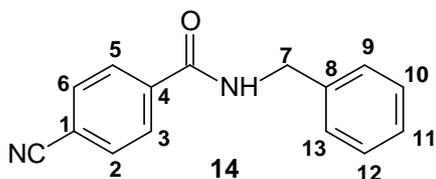
Tabela 15 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de **12 (Figura A.31, p.175)**

δ	Atribuição
164,9	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
145,0	C-10
142,7	C-7
138,1	C-4
133,3	C-2 e C-6
129,6	C-3 e C-5
125,6	C-9 e C-11
120,8	C-8 e C-12
118,2	$\underline{\text{C}}\equiv\text{N}$
114,4	C-1

3.2.6.2 N-benzil-4-cianobenzamida (14)

A amida **14** foi preparada utilizando-se 1,02 mL (9,33 mmol) da N-benzilamina, 10 mL de THF Merck®, 1,6 mL (11,6 mmol) de trietilamina e 2,0 g de cloreto de ácido (12,0 mmol). Obteve-se 1,69 g de **14** na forma de um sólido branco que correspondem a 80,5% de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **14** estão descritos nas Tabelas 16 e 17, respectivamente

FM: $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$

MM: 236 g/mol

FF: 147,7-148,7 °C

FF Lit.: (BAY *et al.*, 1955) 150-151 °C

IV de **14** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3312 (v N-H.); 3087 (v C-H arom.); 2233 (v C≡N); 1643 (v C=O amida); 1548 (v C=C arom. cond.); 1495 (v C=C arom.), 1450, 1422 (def.ang.assm. C-H alif.).

Tabela 16 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 200MHz) de **14 (Figura A.33, p.177)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
7,86	d ($J_{5',6'} = J_{3',2'} = 8,1$)	2H	H-3 e H-5
7,65	d ($J_{6',5'} = J_{2',3'} = 8,1$)	2H	H-2 e H-6
7,32	s	5H	H-9, H-10, H-11, H-12 e H-13
6,98	sl	1H	NH
4,60	d ($J_{7',NH} 5,5$)	2H	H-7

Tabela 17 - Dados dos espectros de RMN de ¹³C (CDCl₃, 50MHz) de **14 (Figura A.34, p.178)**

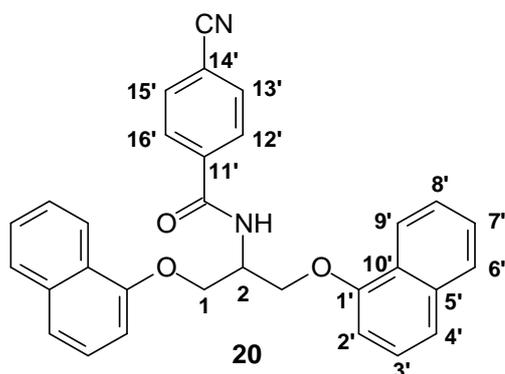
δ	Atribuição
165,6	C=O
138,1	C-8 ou C-4
137,5	C-4 ou C-8
132,2	C-2 e C-6
128,7	C-3 e C-5
127,7	C-9, C-10, C-11, C-12 e C-13
117,9	C≡N
114,9	C-1
44,1	C-7

3.2.6.3 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (20)

A amida **20** foi preparada utilizando-se 145 mg (0,42 mmol) do derivado **19**, 5 mL de THF Merck® e 0,15 mL (1,08 mmol) de trietilamina. Após o acréscimo da trietilamina observou-se completa solubilização do material de partida. Em seguida, 90 mg (0,54

mmol) do cloreto de ácido foram previamente dissolvidos em THF Merck® e essa solução foi adicionada, gota a gota, à solução contendo **19** na forma de base livre. Após purificação por recristalização em acetona/éter de petróleo foram obtidos 100 mg do derivado **20**, na forma de um sólido branco, que correspondem a 50 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **20** estão descritos nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.



FM: $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{N}_2$

MM: 472g/mol

FF: 88,8-89,6 °C

IV de **20** ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3296 (ν N-H); 3056 (ν C-H arom.); 2229 (ν $\text{C}\equiv\text{N}$); 1636 (ν C=O amida); 1578, 1548 (ν C=C arom. cond.); 1508 (ν C=C arom.), 1457, 1402 (def.ang.ass C-H alif.).

Tabela 18 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 400MHz) de 20 (Figura A.37, p.181)

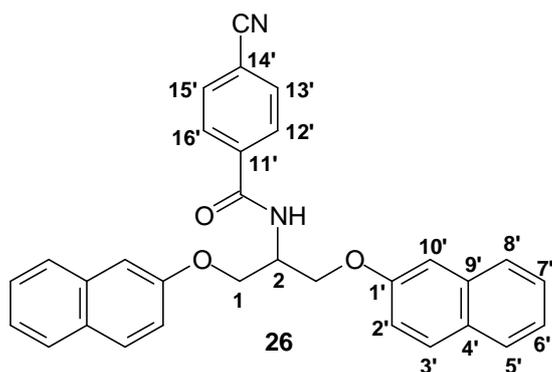
δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,21	d ($J_{9',8'} 8,0$)	2H	H-9'
7,83	d ($J_{12',13'} = J_{16',15'} = 8,4$)	2H	H-12' e H-16'
7,79	d ($J_{6',7'} 8,0$)	2H	H-6'
7,61	d ($J_{13',12'} = J_{15',16'} = 8,4$)	2H	H-13' e H-15'
7,50-7,33	m	6H	H-'4, H-8' e H-7'
7,35	t ($J_{3',2'} = J_{3',4'} = 7,6$)	2H	H-3'
6,97	d ($J_{\text{NH},2} 8,0$)	1H	<u>NH</u>
6,90	d ($J_{2',3'} 7,6$)	2H	H-2'
5,18-5,14	m	1H	H-2
4,61	dd ($J_{1a,2} = 1a',2' = 4,8$; $J_{1a,1a'} = 9,6$)	2H	H-1a/H-1a'
4,52	dd ($J_{1b,2} = 1b',2' = 5,2$; $J_{1b,1b'} = 9,6$)	2H	H-1b/H-1b'

Tabela 19 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de **20 (Figura A.39, p.183)**

δ	Atribuição
165,8	$\text{C}=\text{O}$
153,8	C-1'
137,8	C-11'
134,4	C-5'
132,4	C-13' e C-15'
127,7	C-6', C-12' e C-16'
126,5	C-8'
125,8	C-3'
125,5	C-7'
125,3	C-10'
121,4	C-9'
121,1	C-4'
117,8	$\text{C}\equiv\text{N}$
115,2	C-14'
105,8	C-2'
66,0	C-1
49,8	C-2

3.2.6.4 1,3-Bis(2-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (26)

De acordo com o Método Geral, 195 mg (0,57 mmol) do derivado **25** foram suspensos em 5 mL de THF Merck®. Sob banho de gelo e agitação adicionou-se gota a gota 0,1 mL (0,72 mmol) de trietilamina. Observou-se a completa dissolução do material de partida. Em seguida, uma solução do cloreto de ácido (415 mg; 2,50 mmol) em THF Merck® foi adicionada, gota a gota, ao balão contendo a amina. Obteve-se um produto sólido que foi recristalizado em acetona e éter de petróleo. Foram obtidos 183 mg do derivado **26** na forma de um sólido branco, que correspondem a 68 % de rendimento. Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **26** estão descritos nas Tabelas 20e 21, respectivamente

FM: C₃₁H₂₄O₃N₂

MM: 472g/mol

FF: 86,6-87,5 °C

IV de **26** ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3275 (v N-H); 3059 (v C-H arom.); 2933 (v_{as} C-H alif.); 2230 (v C≡N); 1628 (v C=O amida); 1599 (v C=C arom. cond.); 1510 (v C=C arom.), 1461 (de.ang.ass.C-H alif.).

Tabela 20 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 400MHz) de **26** (Figura A.44, p.188)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
7,89	d($J_{12',13'} = J_{16',15'} = 8,0$)	2H	H-12' e H-16'
7,77-7,70	m	8H	H-3, H-5', H-8', H-13'e H15'
7,43	t($J_{7',6'} = J_{7',8'} = 7,6$)	2H	H-7'
7,34	t($J_{6',7'} = J_{6',5'} = 7,6$)	2H	H-6'
7,24	d ($J_{10',2'} 2,4$)	2H	H-10'
7,17	dd ($J_{2',3'} 9,0; J_{2',10'} 2,4$)	2H	H-2'
6,83	d ($J_{2, NH} 8,0$)	1H	<u>NH</u>
5,00	sL	1H	H-2
4,54-4,51	m	2H	H-1a/H-1a'
4,42-4,38	m	2H	H-1b/H-1b'

Tabela 21 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 26 (Figura A.45, p.189)

δ	Atribuição
165,8	$\text{C}=\text{O}$
156,0	C-1'
137,8	C-11'
134,3	C-9'
132,4	C-13' e C-15'
129,6	C-3', C-5' ou C-8'
129,2	C-4
127,7	C-3', C-5' ou C-8'
127,6	C-12' e C-16'
126,8	C-3', C-5' ou C-8'
126,5	C-7'
124,0	C-6'
118,3	C-2'
117,9	$\text{C}\equiv\text{N}$
115,3	C-14'
107,1	C-10'
65,9	C-1
48,8	C-2

3.2.7 Síntese das amidinas 2, 7 e 8

Método Geral

1ª Parte: síntese de metoximinas

Para a síntese das amidinas **2**, **7** e **8**, uma cuba de vidro, hermeticamente fechada, foi utilizada para produzir um ambiente seco e saturado de vapor de cloreto de hidrogênio.

Nessa cuba de vidro, foram colocados sílica azul e frascos de vidro de 20 mL, contendo solução de HCl 37%. Em um balão de fundo redondo de 15 mL foram colocados **14**, **20** ou **26** e metanol anidro. Os derivados **20** e **26** eram insolúveis em metanol e foram pré solubilizados em THF anidro. O balão contendo a solução foi transferido para a cuba. A cuba foi vedada e o sistema foi mantido sob agitação magnética por 72 horas. Ao término desse tempo foi realizada CCD (eluente: hexano/acetato de etila 7:3; revelador: solução etanólica de ácido sulfúrico 15% v/v) na qual se observou uma mancha na base da placa, atribuída à metoximina. O balão foi retirado da cuba, vedado com uma rolha de borracha e submetido a fluxo de N₂ (g), por cerca de 30 minutos, para remoção do excesso de vapor de cloreto de hidrogênio.

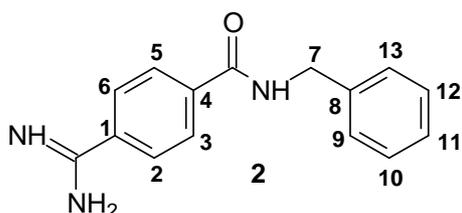
2ª Parte: síntese de amidinas

Um sistema para geração de vapor de amônia foi montado e a mistura reagente contendo a metoximina foi transferida para esse sistema. Em um balão de fundo redondo de 250 mL foram colocados 130 mL de hidróxido de amônio. Esse balão foi conectado ao balão contendo a metoximina. Entre as conexões foram colocados tubos contendo KOH sólido, para secar o vapor de amônia. O balão contendo o hidróxido de amônio foi aquecido a 60 °C, enquanto o balão contendo a metoximina foi resfriado em banho de gelo, sob agitação magnética. O sistema foi mantido nessas condições por cerca de 5 horas. Ao término desse tempo o balão de reação foi vedado com uma rolha de borracha e mantido sob agitação magnética à temperatura ambiente por mais 20 horas, aproximadamente. Para a elaboração da reação os solventes foram removidos em evaporador rotatório e ao resíduo acrescentou-se água destilada. Na preparação das amidinas **2** e **7** houve a precipitação de um sólido, que foi recolhido por filtração à vácuo e purificado, posteriormente. A amidina **8** não precipitou e sua elaboração é descrita à seguir.

3.2.7.1 *N*-benzil-4-amidinobenzamida (**2**)

Para a síntese do derivado **2** foram utilizados 110 mg (0,47 mmol) do derivado **14** e 7 mL de metanol anidro. A mistura reagente foi submetida aos procedimentos descritos anteriormente no Método Geral. O sólido obtido ao final da elaboração foi lavado com acetona. Foram obtidos 30 mg da amidina **2** que correspondem à 25 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **2** estão descritos nas Tabelas 22 e 23, respectivamente.



FM: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{ON}_3$

MM: 253 g/mol

FF: 257,8-258,2 °C

IV de **2** ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3364, 3307, 3168(v N-H); 3046 (v C-H arom.); 2926 (v C-H alif.); 1660, 1635 (v C=Oamida); 1541 (v C=C arom.); 1413(def.ang.ass. C-H alif.); 1295 (v C-O).

Tabela 22 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de **2 (Figura A.50, p.194)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
9,16	t ($J_{\text{NH},7}$ 6,0)	1H	NH_{amida}
8,08	sl	1H	NH
7,96	s	4H	H-2, H-3, H-5 e H-6
7,48	sl	1H	NH
7,34-7,33	m	5H	H-9, H-10, H-12 e H- 13
7,27-7,23	m	1H	H-11
4,50	d ($J_{\text{NH},7}$ 6,0)	2H	H-7

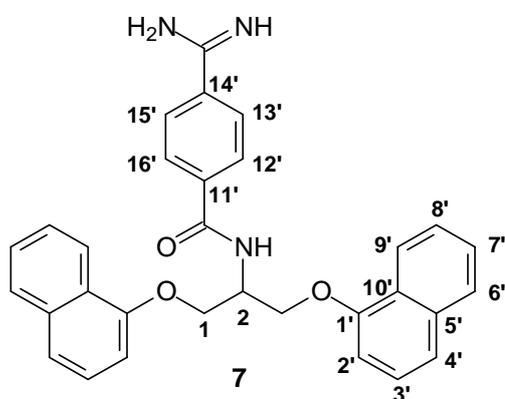
Tabela 23 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) de **2 (Figura A.51,p.195)**

δ	Atribuição
167,2	$\underline{\text{C}}=\text{O}$ ou $\text{C}_{\text{amidínico}}$
165,9	$\underline{\text{C}}=\text{O}$ ou $\text{C}_{\text{amidínico}}$
139,4	C-8
136,5	C-4 e C-1
128,2	C-2 e C-6
127,4	C-3 e C-5 ou C-9 e C-13 ou C-10 e C-12
127,2	C-3 e C-5 ou C-9 e C-13 ou C-10 e C-12
127,1	C-3 e C-5 ou C-9 e C-13 ou C-10 e C-12
126,7	C-11
42,6	C-7

3.2.7.2 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (7)

O derivado **7** foi preparado utilizando-se 100 mg (0,21 mmol) de **20**, 7 mL de metanol e 3 mL de THF anidros. Ao final da elaboração houve a formação de um sólido que foi filtrado a vácuo e purificado por CCS (hexano/acetato de etila 8:2; acetato de etila 100%). Foram obtidos 23,3 mg do derivado **7**, que correspondem a 22 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **7** estão descritos nas Tabelas 24 e 25, respectivamente



FM: $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_3$

MM: 489 g/mol

FF: 180,5-184,0°C

IV de **7** ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3370, 3275, 3186 (ν N-H est.); 3052 (ν C-H arom.); 2925 (ν_{as} C-H alif.); 2873 (ν_{s} C-H alif.); 1643 (ν C=O est.); 1542 (ν C=C arom.); 1394 (def.ang.ass. C-H alif.); 1238 (ν C-O)..

Tabela 24 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de **7 (Figura A.54, p.198)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
9,0	d ($J_{\text{NH},2}$ 8,0)	1H	NH_{amida}
8,27	d ($J_{9,8}$ 8,4)	2H	H-9'
8,07	sl	1H	$\text{NH}_{\text{amidina}}$
7,99-7,95	m	4H	H-12', H-13', H-15' e H-16'
7,85	d ($J_{7,6'}$ 8,0)	2H	H-6'
7,53-7,41	m	10H	H-3', H-4', H-7', H-8' e NH_2
7,08	d ($J_{2,3}$ 7,2)	2H	H-2'
5,11-5,07	m	1H	H-2
4,56	d ($J_{1,2}$ 5,6)	4H	H-1

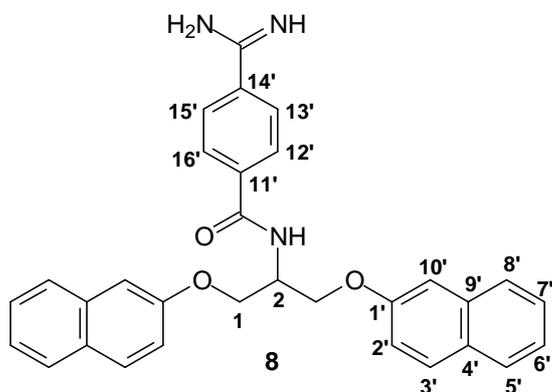
Tabela 25 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) de **7 (Figura A.56,p.200)**

δ	Atribuição
167,1	$\underline{\text{C}}$ amidina
166,3	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
153,8	C-1'
136,7	C-11'ou C-14'
136,6	C-11'ou C-14'
133,9	C-5'
127,4	C-12' e C-16'ou C-13' e C-15'
127,3	C-12' e C-16'ou C-13' e C-15'
126,5	C-8'
126,2	C-6'
125,3	C-3 e C-7'
124,9	C-10'
121,7	C-9'
120,2	C-4'
105,8	C-2'
66,0	C-1
49,8	C-2

3.2.7.3 1,3-Bis(2-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (8)

Para a síntese de **8** partiu-se de 175 mg (0,37 mmol) do derivado **25**, 10 mL de THF e 5 mL de metanol anidros. Após a elaboração obteve-se um resíduo ao qual foi acrescentado água destilada. Contudo não houve a formação do produto sólido, como esperado. Então, a fase aquosa foi extraída com 3 x 25 mL de CHCl_3 e a fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro. Após filtração o solvente foi removido em evaporador rotatório e observou-se a formação de um sólido amarronzado. Esse sólido foi submetido a purificação por CCS (hexano/acetato de etila 8:2 v/v; acetato de etila 100%). Foram obtidos 90 mg de **8** na forma de um sólido marrom claro que correspondem a 49 % de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **8** estão descritos nas Tabelas 26 e 27, respectivamente.



FM: $\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{O}_3\text{N}_3$

MM: 489 g/mol

FF: 166,2-169,7 °C

IV de **8** ($\bar{\nu} \text{ cm}^{-1}$): 3371, 3288, 3184(v N-H); 3057 (v C-H arom. est.); 2925 (ν_{as} C-H alif.); 1651, 1627 (v C=O amida); 1599 (v C=C arom. cond.); 1510 (v C=C arom.), 1390 (def.ang.ass. C-H alif.); 1213 (v C-O).

Tabela 26 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400MHz) de **8** (Figura A.61, p.205)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,87	d ($J_{\text{NH},2}$ 7,6)	1H	NH_{amida}
8,06	sl	1H	$\text{NH}_{\text{amidina}}$
7,99-7,92	m	8H	H-12', H-13', H-15' e H-16'
7,82-7,77	m	6H	H-3', H-5' e H-8'
7,45-7,42	m	6H	H-7', H-10' e NH_2
7,20	dd ($J_{2',3'}$ 9,0; $J_{2',10'}$ 2,4)	2H	H-2'
4,82	m	1H	H-2
4,48-4,44	m	2H	H-1a/H-1a'
4,41-4,37	m	2H	H-1b/H-1b'

Tabela 27 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 100MHz) de **8 (Figura A.63, p.207)**

δ	Atribuição
167,1	$\underline{\text{C}}$ amidina
166,1	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
156,1	C-1'
136,6	C-11' ou C-14'
136,3	C-11' ou C-14'
134,2	C-9'
129,3	C-3', C-5' ou C-8'
128,5	C-4'
127,5	C-3', C-5' ou C-8'
127,4	C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
127,3	C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
126,6	C-3', C-5' ou C-8'
126,3	C-7'
123,6	C-6'
118,6	C-2'
107,0	C-10'
66,7	C-1
48,9	C-2

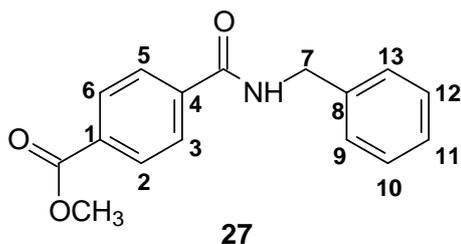
3.2.8 Produtos secundários obtidos nas síntese de **2, **7** e **8**: *N*-benzil-4-(metoxicarbonil)benzamida (**27**), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-metoxicarbonil)benzoil]amino}propano (**28**) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-metoxicarbonil)benzoil]amino}propano (**29**)**

As reações para a obtenção das amidinas **2**, **7** e **8** levaram a formação de um subproduto, o éster metílico, conforme discutido na página 130.

Os ésteres **28** e **29** foram obtidos durante a reação para obtenção das amidinas **7** e **8**, respectivamente e foram isolados e purificados por CCS (hexano/acetato de etila 8:2 v/v; acetato de etila 100%). O éster **27** foi obtido durante a reação para obtenção

da amidina **2**. O produto bruto da reação foi submetido a recristalização com acetona para obtenção da amidina pura. A água de filtração da recristalização foi concentrada em evaporador rotatório e o bruto obtido foi recristalizado em acetona e hexano, para obtenção do éster metílico puro.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de **27**, **28** e **29** estão descritos nas Tabelas 28-33.



FM: $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}$

MM: 268 g/mol

FF: 145,9- 149,3 °C

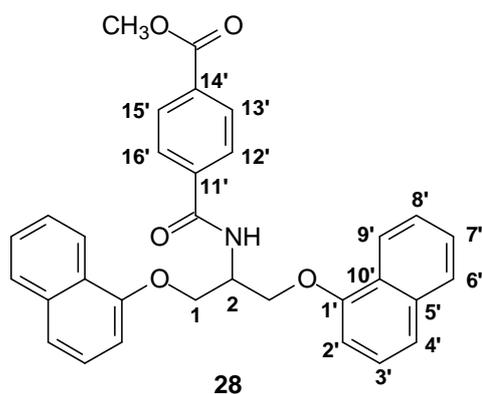
IV ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3362(v N-H); 3032 (v C-H arom. est.); 2951 (ν_{as} C-H alif.); 1714 (v C=O éster); 1633 (v C=O amida); 1593 (v C=C arom. cond.); 1548 (v C=C arom.), 1278 (v C-O).

Tabela 28 – Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de **27 (Figura A.67, p.211)**

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,07	d ($J_{3 \text{ e } 5, 2 \text{ e } 6}$ 8,2)	2H	H-2 e H-6
7,83	d ($J_{3 \text{ e } 5, 2 \text{ e } 6}$ 8,2)	2H	H-3 e H-5
7,35-7,26	m	5H	H-9, H-10, H-11, H-12 e H-13
6,62	sl	1H	<u>N</u> H
04,64	d ($J_{7, \text{NH}}$ 5,6)	2H	H-7
3,92	s	3H	<u>C</u> H ₃

Tabela 29 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 27 (Figura A.68, p.212)

δ	Atribuição
166,5	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
166,2	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
138,2	C-4 ou C-8
137,8	C-4 ou C-8
132,7	C-1
129,8	C-2 e C-6 ou C-3 e C-5
128,8	C-2 e C-6 ou C-3 e C-5
127,9	C-9 e C-13 ou C-10 e C-12 ou C-11
127,7	C-9 e C-13 ou C-10 e C-12 ou C-11
127,0	C-9 e C-13 ou C-10 e C-12 ou C-11
52,4	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
44,2	C-7

FM: $\text{C}_{32}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{N}$

MM: 504 g/mol

FF: 160,3– 164,4 °C

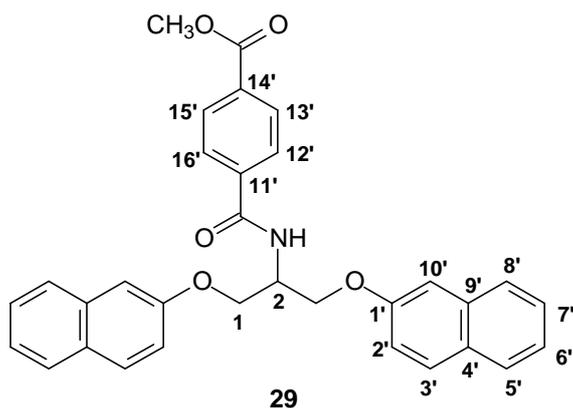
IV ($\bar{\nu}$ cm^{-1}): 2922 (ν N-H); 2853 (ν C-H arom. est.); 1720 (ν C=O éster); 1630 (ν C=O amida); 1579 (ν C=C arom. cond.); 1533 (ν C=C arom.), 1392 (def.ang.ass. C-H alif.); 1268 (ν C-O).

Tabela 30: Dados dos espectros de RMN de ^1H (CDCl_3 , 200MHz) de 28 (Figura A.70, p.214)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,24	d ($J_{9',8'}$ 6,7)	2H	H-9'
8,07	d ($J_{12',13'}$ e $16',15'$ 8,4)	2H	H-13' e H-15'
7,88-7,78	m	4	H-6', H-12' e H-16'
7,52-7,41	m	8H	H-3', H-4', H-8' e H-7'
6,95	d ($J_{2',3'}$ 7,0)	2H	H-2'
5,19	m	1H	H-2
4,69-4,51	m	4H	H-1
3,92	s	3H	CH_3

Tabela 31 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de 28 (Figura A.71, p.215)

δ	Atribuição
166,6	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
166,1	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
153,8	C-1'
137,8	C-11' ou C-14'
134,5	C-11' ou C-14'
133,0	C-5'
129,9	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
127,6	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
127,1	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
126,5	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
125,8	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
125,5	C-3',C-6', C-7', C-8', C-12' e C-16 ou C-13' e C-15'
125,4	C-10'
121,4	C-9'
121,1	C-4
105,2	C-2'
66,6	C-1
52,4	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
48,9	C-2

FM: C₃₂H₂₇O₅N

MM: 504 g/mol

FF: 112,8- 117,1 °C

IV ($\bar{\nu}$ cm⁻¹): 3288(v N-H); 2926 (v C-H arom. est.); 1719 (v C=O éster); 1630 (v C=O amida); 1573 (v C=C arom. cond.); 1532 (v C=C arom.), 1391 (def.ang.ass. C-H alif.); 1283 (v C-O).

Tabela 32 - Dados dos espectros de RMN de ¹H (CDCl₃, 200MHz) de 29 (Figura A.73, p.217)

δ	Multiplicidade (J/Hz)	Integral	Atribuição
8,10	d($J_{12',13'e16',15'}$ 8,0)	2H	H-13' e H-15'
7,88	d($J_{12',13'e16',15'}$ 8,0)	2H	H-12' e H-16'
7,76-72	m	6H	H-3', H-5' e H-8'
7,47-7,20	m	8H	H-2', H-6, H-7' e H-10'
6,84	dd ($J_{2',3'}$ 7,8)	1H	<u>NH</u>
5,01	sl	1H	H-2
4,55-4,40	m	4H	H-2
3,93	s	3H	<u>CH</u> ₃

Tabela 33 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50MHz) de **29 (Figura A.74, p.218)**

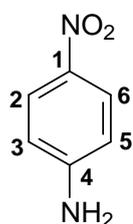
δ	Atribuição
166,6	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
166,2	$\underline{\text{C}}=\text{O}$
156,1	C-1'
137,9	C-11' ou C-14'
134,4	C-9'
133,0	C-11' ou C-14'
129,9	C-3', C-5' ou C-8' ou C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
129,6	C-3', C-5' ou C-8' ou C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
129,2	C-4'
127,6	C-3', C-5' ou C-8' ou C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
127,1	C-3', C-5' ou C-8' ou C-12' e C-16' ou C-13' e C-15'
126,8	C-3', C-5' ou C-8'
126,5	C-7'
123,9	C-6'
118,4	C-2'
107,2	C-10'
65,9	C-1
52,4	$\underline{\text{C}}\text{H}_3$
48,7	C-2

3.2.9 Tentativa de síntese de *N*-(4-nitrofenil)-4-amidinobenzamida (1)

Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram colocados 7 mL de metanol anidro e em pedaço de sódio metálico de cerca de 1 cm³. Vedou-se o balão com uma rolha de borracha e após a completa reação do sódio o sistema foi submetido a fluxo de N₂ (g) por aproximadamente dez minutos. Abriu-se novamente o balão e adicionou-se 100 mg (0,40 mmol) do derivado **12**. O balão foi fechado e submetido a novo fluxo de N₂ (g), que foi interrompido após cerca de cinco minutos. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 72 horas e ao término desse tempo foram

adicionados ao balão de reação 50 mg (0,93 mmol) de cloreto de amônio. O balão foi adaptado a um condensador de refluxo e a mistura reagente foi aquecida, sob refluxo, e agitada por mais quatro horas. O solvente foi removido em evaporador rotatório e ao resíduo obtido acrescentou-se água destilada. Observou-se a formação de um sólido amarelo, que foi recolhido por filtração. Esse produto foi analisado por RMN e identificado como sendo a da *p*-nitroanilina, indicando que houve hidrólise da amida durante a reação. Foram obtidos 30 mg de *p*-nitroanilina, que correspondem a 58% de rendimento.

Os dados dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C da *p*-nitroanilina estão descritos nas Tabelas 34 e 35, respectivamente



FM: $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$

MM: 138 g/mol

Tabela 34 - Dados dos espectros de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 200MHz) da *p*-nitroanilina (Figura A.76, p.220)

δ	Multiplicidade	Integral	Atribuição
7,94	d ($J_{2',3'}$ 8,2)	2H	H-2 e H-6
6,71	s	2H	NH ₂
6,59	d ($J_{5',6'}$ 8,2)	2H	H-3 e H-5

Tabela 35 - Dados dos espectros de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , 50MHz) da *p*-nitroanilina (Figura A.77, p.221)

<i>p</i> -nitroanilina	
δ	Atribuição
156,0	C-1
135,9	C-4
126,7	C-3 e C-5
112,7	C-2 e C-6

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos de modelagem molecular por *docking*

Os estudos de ancoragem molecular foram realizados utilizando-se o programa AutoDock 3.0.5 (MORRIS *et al.*, 1998). Um conjunto de dez ligantes (Figura 11) foi submetido aos estudos de modelagem molecular com seis estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina, selecionadas no *Protein Data Bank* (entradas no PDB 1EB2, 1K1O, 1K1I, 1K1P, 1MTW e 1MTU). O objetivo desse estudo foi determinar a afinidade e o modo de interação entre a β -tripsina e os potenciais ligantes através da análise da estrutura do complexo intermolecular enzima-ligante, das potenciais interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre a proteína alvo e o ligante e dos valores de energia livre estimados pelos experimentos de *docking*. Além disso, a compreensão detalhada das interações entre a proteína e os compostos estudados fornece informações úteis em termos da relação estrutura-atividade (SAR) e possibilita o desenho e a otimização de novos compostos (ERICKSON *et al.*, 2003)

Nos cálculos de ancoragem molecular, realizados pelo AutoDock 3.0.5, a enzima é considerada uma estrutura rígida, enquanto o ligante é flexível e possui graus de liberdade translacional, rotacional e conformacional. As diferentes conformações do ligante produzidas pelo programa são baseadas no algoritmo genético Lamarckiano (LGA) (THOMSEN *et al.*, 2003).

Os programas que utilizam o *docking* flexível, dentre eles o AutoDock, são capazes de prever a estrutura do complexo proteína-ligante com razoável precisão e rapidez. Usualmente as estruturas previstas nos estudos de modelagem molecular reproduzem ou se assemelham às aquelas observadas na cristalografia (SPYRAKIS *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2003). Durante o *docking* diferentes conformações do ligante, produzidas pelo método de amostragem do algoritmo genético, são posicionadas no sítio ativo enzimático. No entanto, esse é apenas o primeiro passo em um estudo de ancoragem molecular. O *scoring* é a ferramenta responsável por

avaliar a afinidade entre o ligante e a proteína, influenciando diretamente na seleção das conformações finais do ligante. Os programas de modelagem molecular disponíveis atualmente têm uma limitação nessa função (TERAMOTO *et al.*, 2006). Estabelecer parâmetros para os cálculos que minimizem os desvios de *scoring* é um desafio atual para a modelagem molecular.

A única maneira de se determinar a precisão do modo de ligação do ligante à enzima previsto pelo *docking* é comparando o resultado do cálculo à estrutura de cristalografia de raio-x (ERICKSON *et al.*, 2003). Estudos posteriores de cristalografia de raio-x envolvendo a β -tripsina e os potenciais ligantes aqui propostos poderão validar o método computacional empregado.

A β -tripsina foi escolhida para o presente trabalho por ser considerada um modelo de estudo na classe das serino proteases (PEREIRA *et al.*, 2005). Seu sítio ativo apresenta elevada similaridade ao de outras enzimas da mesma classe, alvos de interesse biológico.

Seis estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina foram selecionadas no *Protein Data Bank*. A comparação dos resultados do *docking* entre os seis arquivos PDB da β -tripsina bovina possibilitou aferir a reprodutividade do método e verificar com quais resíduos da proteína os ligantes mais interagirem e um maior número de interações dos ligantes com a enzima puderam ser observadas.

4.1.2 Resultados dos estudos de ancoragem molecular (*docking*) dos ligantes cristalográficos construídos com a β -tripsina bovina

Os ligantes cristalográficos presentes no complexo com a β -tripsina bovina (Figura 12) foram construídos e otimizados utilizando-se o programa HyperChem. Nos experimentos de *docking* entre a enzima e o ligante cristalográfico construído utilizou-se o programa AutoDock 3.0.5 (MORRIS *et al.*, 1998). A comparação entre a posição dos ligantes cristalográficos com as mesmas estruturas após o experimento

de *docking* mostrou a adequada superposição dos ligantes no sítio ativo da tripsina, sugerindo que os parâmetros utilizados para os cálculos no presente estudo estão ajustados e são convergentes.

Os valores de pK_i e de energia livre obtidos através dos cálculos de *docking* para os ligantes cristalográficos construídos estão descritos na Tabela 36, além do número de agrupamentos (*clusters*) e o número de conformações do *cluster* mais populoso observados para cada ligante.

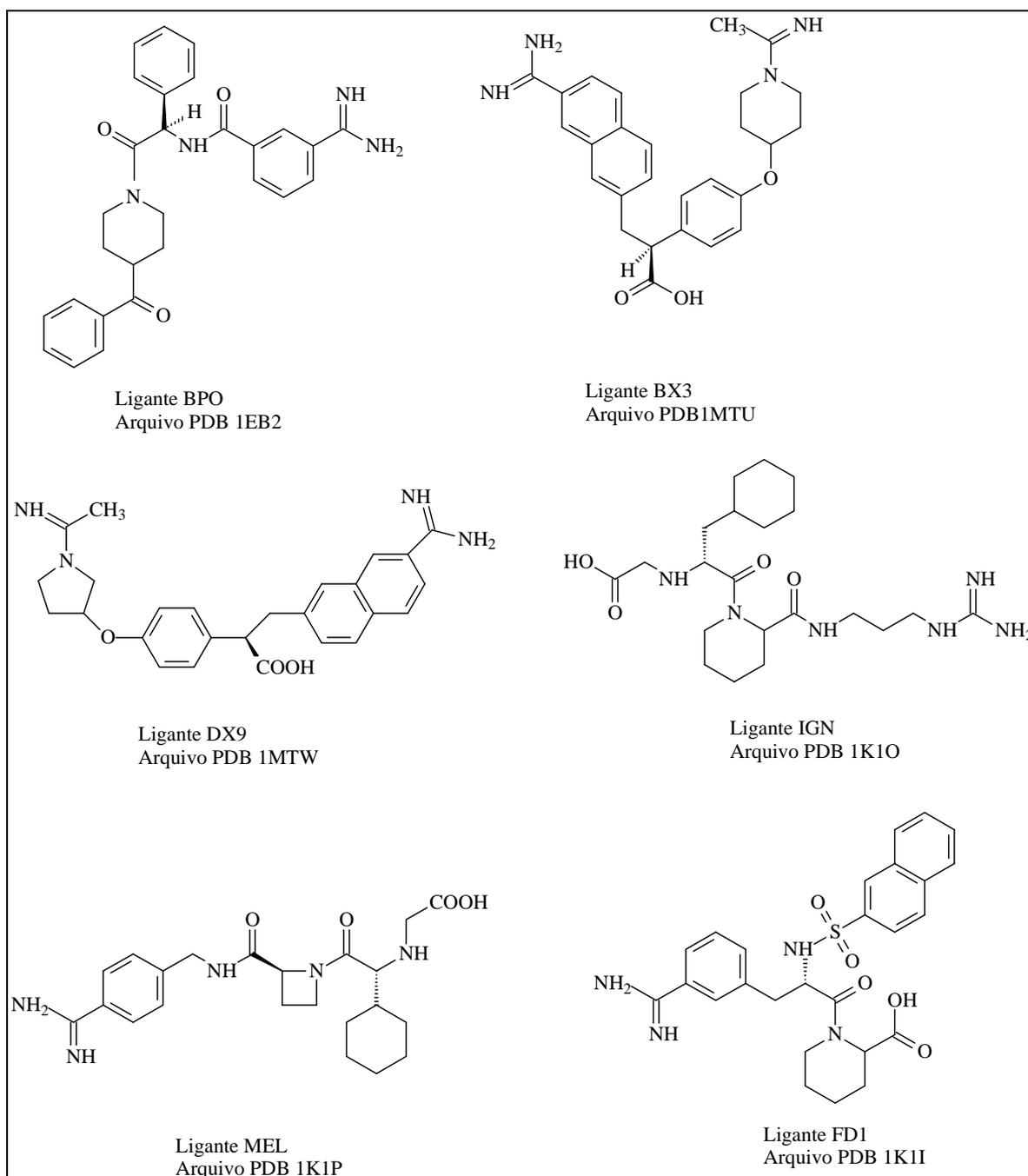


Figura 12 - Estruturas químicas dos ligantes cristalográficos.

Tabela 36 - Resultados do *docking* dos ligantes cristalográficos construídos com a β -tripsina bovina.

Ligante Cristalográfico	Código PDB da β -tripsina bovina	N _c	N _{cc}	ΔG_{free}	pK _i calculado	pK _i literatura
BPO	1EB2	21	64	-11,67	8,56	6,00 (LIEBESCHU-ETZ <i>et al.</i> , 2002)
BX3	1MTU	34	63	-14,35	10,52	-
DX9	1MTW	50	49	-12,44	9,12	6,20 (LIEBESCHU-ETZ <i>et al.</i> , 2002)
IGN	1K1O	32	19	-9,97	7,31	6,17 (ADANG <i>et al.</i> , 19988)
MEL	1K1P	32	55	-11,4	8,36	8,44 (GUSTAFSSON <i>et al.</i> , 2000)
FD1	1K1I	67	23	-10,9	7,40	6,7 (DULLWEBER <i>et al.</i> , 2001)

N_c* = Número de *clusters*; N_{cc}** = Número de conformações no *clusters* principal.

Todos os ligantes cristalográficos construídos superpuseram-se adequadamente ao ligante cristalográfico, no sítio ativo enzimático. Uma boa correlação entre os valores de pK_i calculados e os observados experimentalmente foi encontrada. O ligante BX3 construído posicionou o grupo naftilamidino no bolso S1 da β -tripsina de maneira diferente ao observado na cristalografia. A análise do complexo enzima-inibidor resultante do *docking* com BX3 mostrou esse ligante ocupando uma posição mais profunda no bolso hidrofílico (Figura 13). Contudo as interações entre os átomos de nitrogênio amidínicos e os resíduos Asp189, Gly216 e Ser190 foram mantidas.

O resultado dos experimentos de *docking* com os ligantes cristalográficos construídos demonstra que o posicionamento da cadeia lateral foi compatível ao observado para os ligantes cristalográficos. As cadeias laterais, contendo grupos apolares, se direcionaram para os bolsos hidrofóbicos da enzima, principalmente o bolso S3/S4. O ligante FD1 construído foi o único a inverter a posição das cadeias laterais, em relação ao cristalográfico. No complexo cristalográfico observa-se que o grupo naftilssulfonil está localizado em um ponto da β -tripsina, fora dos bolsos

hidrofóbicos e o anel alifático C-terminal ocupa o bolso S2, quase paralelamente ao grupo naftil e ao anel imidazólico da Hys57. No resultado do *docking* com o ligante FD1 construído o anel aromático do grupo naftilssulfonil aproximou-se do bolso S2, perpendicularmente ao anel aromático da Hys57. Na Figura 13 está ilustrada a superposição dos ligantes cristalográficos aos ligantes construídos.

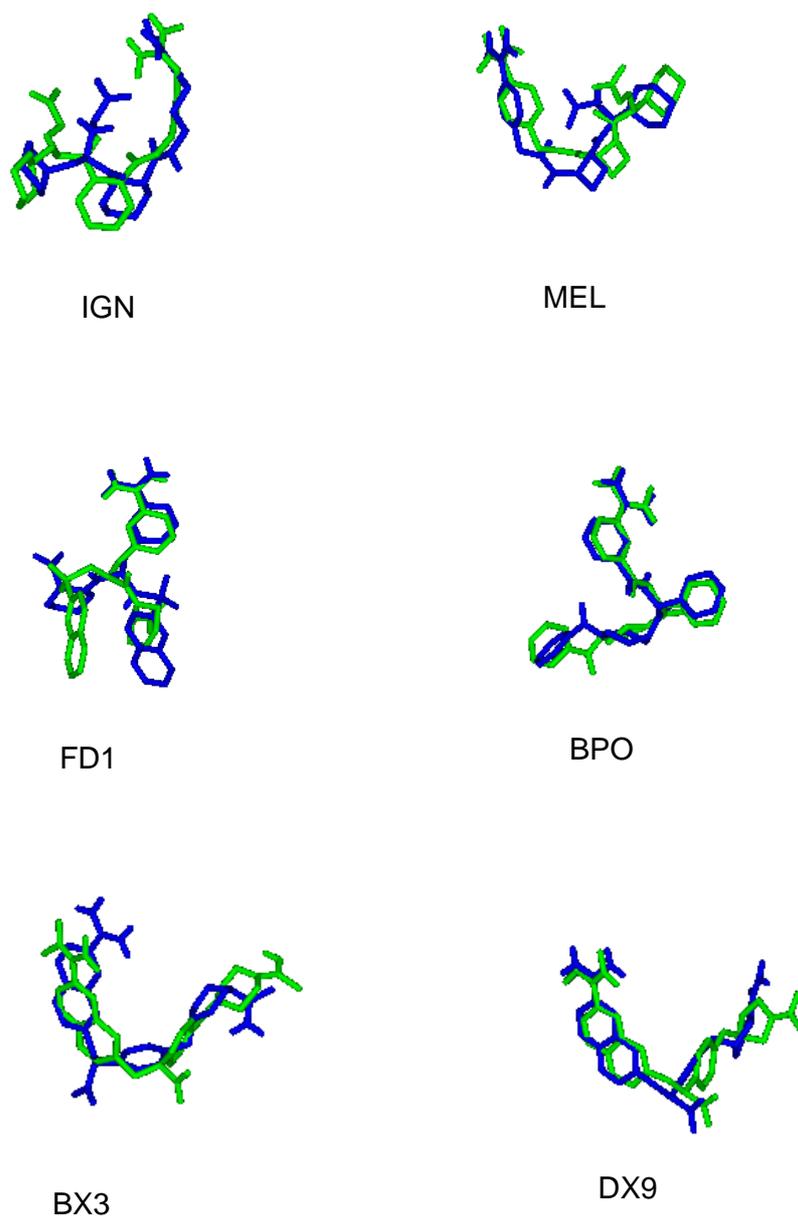


Figura 13 - Superposição dos ligantes cristalográficos construídos (azul) aos ligantes cristalográficos (verde).

4.1.2.1 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (BPOd) com a β -tripsina bovina (PDB 1EB2) (LIEBESCHUETZ et al., 2002)

Para a análise dos resultados do experimento de *docking* realizados com o ligante BPO construído utilizou-se a solução de menor energia do segundo *cluster* mais populoso, por ser a que apresentou a melhor superposição ao ligante cristalográfico. Os resultados obtidos no experimento de *docking* mostraram a reprodutibilidade das interações hidrofílicas e hidrofóbicas observadas na cristalografia (LIEBESCHUETZ et al., 2002). A aproximação entre o grupo benzoil do ligante e o resíduo Leu99 pôde ser observada, viabilizando uma interação hidrofóbica nesse ponto da enzima. As interações do tipo hidrofílicas estão representadas esquematicamente na Figura 14.

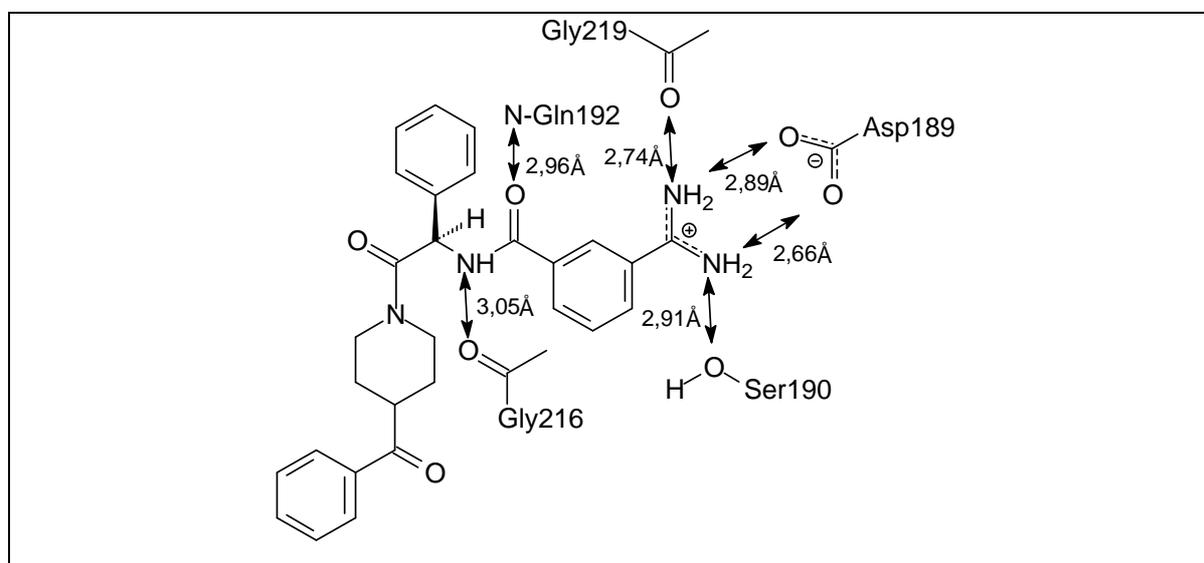


Figura 14 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído BPOd e a enzima (as distâncias foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.2.2 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (BX3d) com a β -tripsina bovina (PDB 1MTU) (STUBBS et al, 1995)

A solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida nos experimentos de *docking* com o ligante BX3 construído superpôs-se adequadamente ao ligante cristalográfico. A análise da estrutura do complexo enzima-ligante permitiu observar

que o anel fenílico do ligante está posicionado perpendicularmente ao seu grupo naftaleno e paralelamente ao Trp215, da cadeia lateral da enzima, assim como observado na cristalografia (STUBBS *et al*, 1995). O anel ciclohexano aproximou-se do resíduo de Trp215, no bolso S4, viabilizando uma interação hidrofóbica. A Figura 15 representa esquematicamente as potenciais interações hidrofílicas observadas entre o ligante BX3 construído e a tripsina.

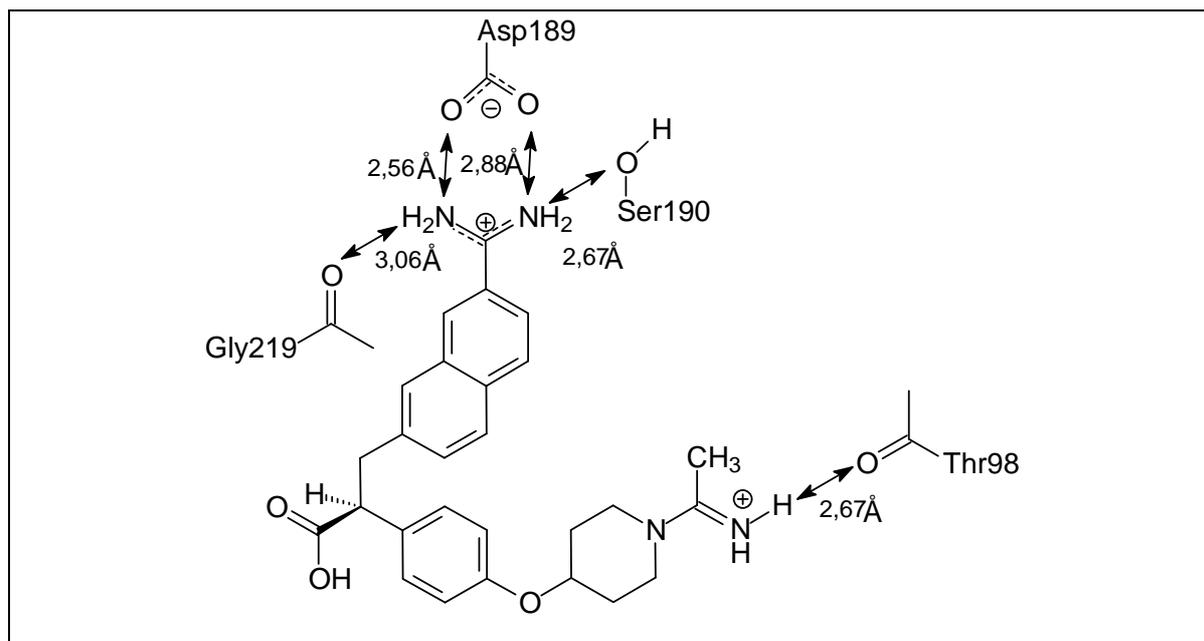


Figura 15 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído BX3d e a enzima (as distâncias foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.2.3 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (DX9d) com a β -tripsina bovina (PDB 1MTW) (STUBBS *et al*, 1995)

Para a solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida nos experimentos de *docking* com o ligante DX9 construído foi observado o posicionamento do anel pirrolidínico próximo ao resíduo hidrofóbico Trp215, no bolso S4 da enzima.

As interações hidrofílicas potenciais observadas no complexo enzima-ligante estão representadas na Figura 16.

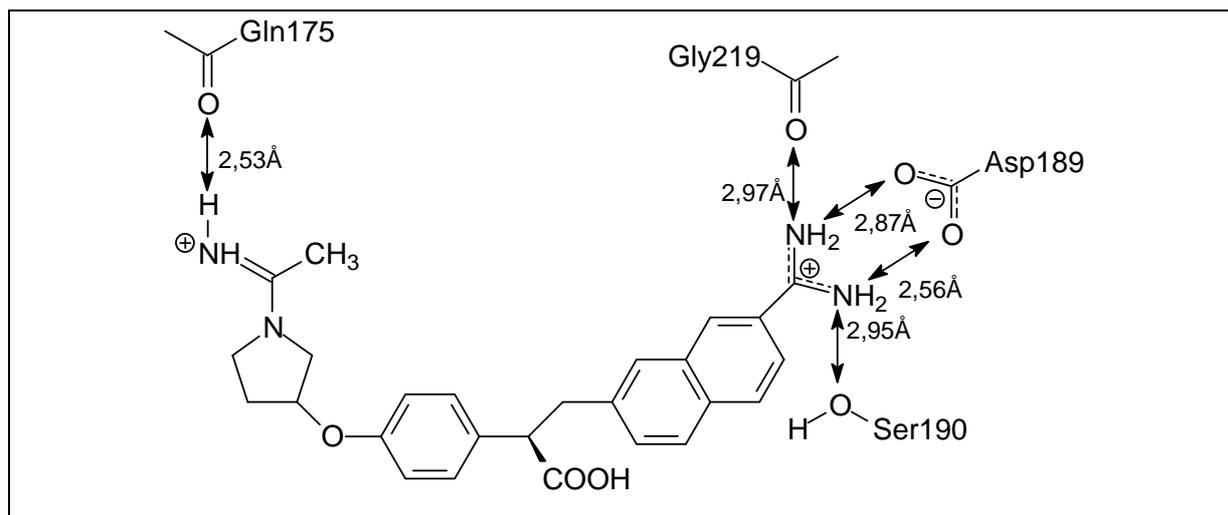


Figura 16 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído DX9d e a enzima (as distâncias das ligações foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.2.4 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (FD1d) com a β -tripsina bovina (PDB 1K1I) (DULLWEBER *et al.*, 2001)

A análise do complexo formado entre solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida nos experimentos de *docking* do ligante FD1 construído e a β -tripsina demonstra potenciais interações hidrofílicas, compatíveis às descritas na literatura (DULLWEBER *et al.*, 2001). Essas interações estão representadas na Figura 17.

Foi observada a superposição adequada do grupo benzamídico, no bolso S1, ao mesmo grupo do ligante cristalográfico. Contudo, fora desse bolso houve uma inversão no posicionamento das cadeias laterais dos ligantes.

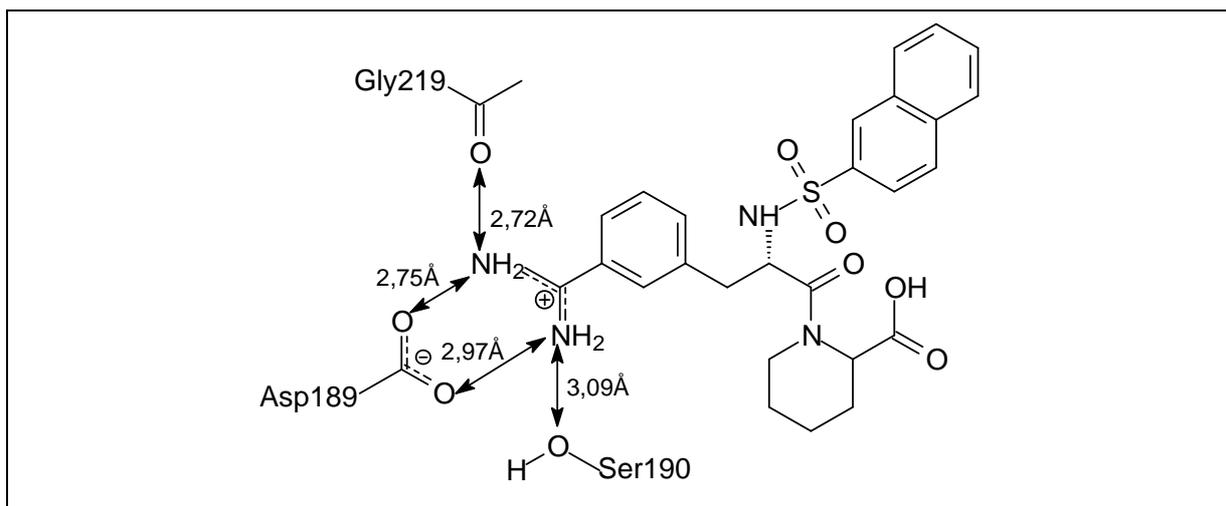


Figura 17 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído FD1d e a enzima (as distâncias das ligações foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.2.5 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (MELd) com a β -tripsina bovina (PDB 1K1P) (DULLWEBER *et al.*, 2001)

A solução de menor energia do segundo *cluster* mais populoso obtida nos experimento de *docking* do ligante MEL foi a que apresentou a melhor superposição ao ligante cristalográfico. O anel azetidino está localizado no bolso S2, quase perpendicular ao anel imidazólico da Hys57. Uma interação descrita na literatura que não foi observada é a ligação de hidrogênio entre um dos átomos de oxigênio do grupo carboxilato e o resíduo Gly219.

As potenciais interações hidrofílicas do ligante MEL com a β -tripsina estão representadas na Figura 18.

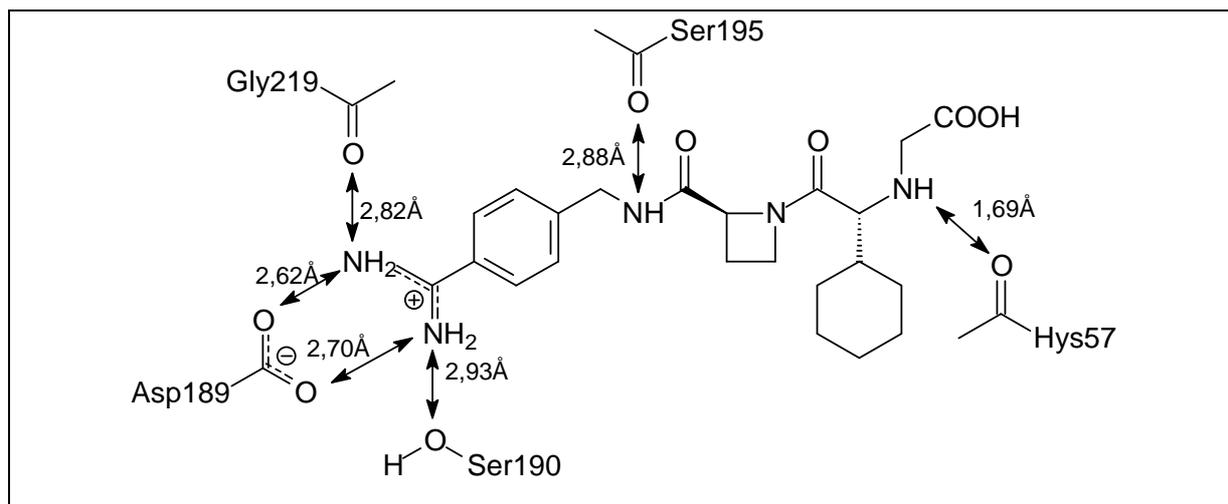


Figura 18 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído MELd e a enzima (as distâncias das ligações foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.2.6 Estudo do docking do ligante cristalográfico construído (IGNd) com a β -tripsina bovina (PDB 1K1O) (DULLWEBER *et al.*, 2001)

A solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida nos experimentos de *docking* do ligante IGN construído foi a que apresentou a melhor superposição ao ligante cristalográfico.

No experimento de *docking* realizado com o ligante IGN uma molécula de água de hidratação (H₂O 901) foi mantida no sítio enzimático. Estudos comparativos realizados com o sítio ativo hidratado e não hidratado revelaram que a presença dessa molécula de água favorece a superposição do ligante construído ao cristalográfico.

Na cristalografia de raio-x do ligante IGN com a β -tripsina observa-se a interação de apenas um dos átomos de nitrogênio guanidínicos com o grupo carboxilato do Asp189. Esse comportamento foi reproduzido no experimento de *docking* com o ligante IGN construído. O valor de pKi igual à 7,31 foi o menor calculado para os ligantes cristalográficos construídos, o que pode ser explicado pela ausência dessa interação no bolso S1.

A potencial ligação de hidrogênio entre o ligante cristalográfico construído e o resíduo Ser190 não foi observada na cristalografia de raio-x (DULLWEBER *et al.*, 2001). Todas as demais interações hidrofílicas observadas são compatíveis às descritas na literatura e estão representadas na Figura 19.

O anel piperidínico posicionou-se no bolso S2, perpendicular ao anel imidazólico da Hys57 e o anel fenílico no bolso S3/S4, perpendicular ao resíduo Trp215.

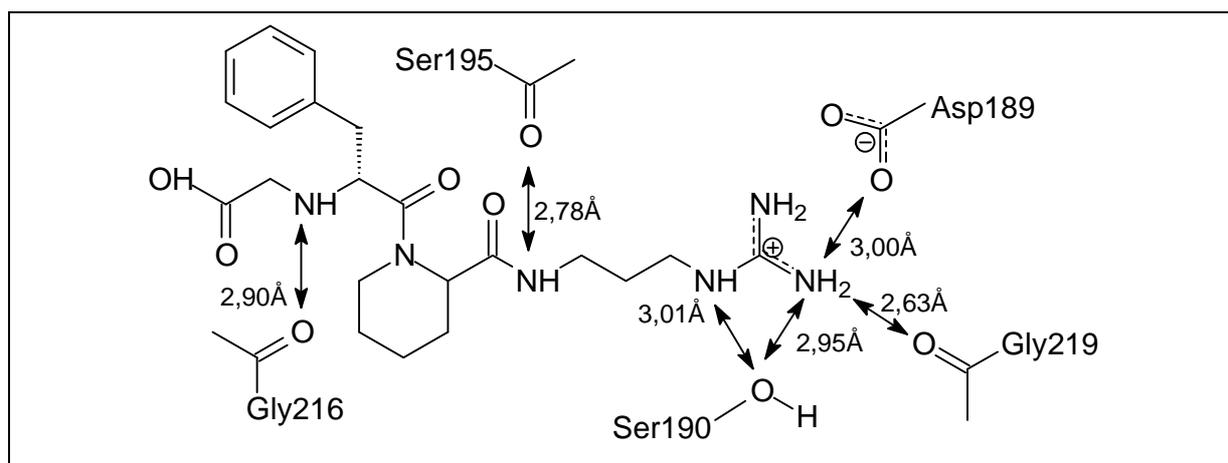


Figura 19 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante cristalográfico construído IGNd e a enzima (as distâncias das ligações foram medidas entre os heteroátomos).

4.1.3 Resultados dos estudos de modelagem molecular (*docking*) dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com a β -tripsina bovina

Os potenciais inibidores propostos neste trabalho (Figura 10) foram submetidos aos estudos de *docking* com a β -tripsina bovina, utilizando-se as seis estruturas cristalográficas dessa enzima, selecionadas no *Protein Data Bank*. Suas estruturas químicas também foram desenhadas e otimizadas no HyperChem, previamente.

Os intermediários **12**, **14**, **20** e **26**, também, foram submetidos aos experimentos de *docking*. Estudos anteriores, desenvolvidos por Sheng-Lian Lee e colaboradores demonstraram que a tripsina possui afinidade por derivados cianobenzoil substituídos na posição *meta* (LEE *et al.*, 1997).

A rota de síntese proposta nesse trabalho (Figuras 35, 36 e 37) para a obtenção dos derivados benzamidínicos prevê a síntese de uma amida *p*-cianosubstituída. Com base nisso propôs-se o estudo de *docking* desses intermediários, a sua síntese e o teste de sua atividade enzimática.

Na Tabela 37 estão resumidos os valores de pK_i e energia livre dos potenciais ligantes obtidos através dos cálculos de *docking*. Nela também estão detalhados o número de *clusters* e o número de conformações do *cluster* mais populoso observados para cada ligante.

Tabela 37 - Resultados do *docking* dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com as estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina.

Ligante	Entrada PDB	N_c^*	N_{cc}^{**}	ΔG	pK_i	Ligante	Entrada PDB	N_c^*	N_{cc}^{**}	ΔG	pK_i
1	1K1I	01	100	-7,96	5,84	2	1K1I	01	100	-9,5	6,97
	1K1O	03	50	-7,08	5,20		1K1O	02	98	-9,41	6,90
	1K1P	01	100	-7,51	5,51		1K1P	02	98	-9,17	6,72
	1MTU	01	100	-7,62	5,60		1MTU	01	100	-9,45	6,93
	1MTW	01	100	-7,52	5,52		1MTW	01	100	-9,34	6,85
	1EB2	01	100	-7,53	5,52		1EB2	01	100	-9,48	6,95
	Média				$5,53 \pm 0,21$		Média				$6,89 \pm 0,09$

Tabela 37 - Resultados do *docking* dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com as estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina (continuação).

Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i	Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i
3	1K1I	23	23	-8,31	6,87	4	1K1I	25	30	-9,64	7,07
	1K1O	34	20	-8,71	6,39		1K1O	25	20	-8,51	6,32
	1K1P	17	36	-10,97	8,04		1K1P	10	52	-10,81	7,92
	1MTU	16	40	-10,47	7,67		1MTU	08	52	-10,34	7,58
	1MTW	16	40	-10,47	7,67		1MTW	08	52	-10,31	7,56
	1EB2	26	21	-10,58	7,75		1EB2	22	37	-10,35	7,58
	Média				7,40± 0,63		Média				7,34± 0,57
5	1K1I	37	21	-10,96	8,03	6	1K1I	31	15	-10,06	7,38
	1K1O	27	16	-9,75	7,15		1K1O	24	23	-10,08	7,92
	1K1P	24	21	-11,23	8,23		1K1P	12	58	-11,53	8,45
	1MTU	10	33	-10,92	8,00		1MTU	19	32	-11,25	8,25
	1MTW	16	35	-11,14	8,17		1MTW	15	35	-11,58	8,49
	1EB2	26	19	-10,68	7,83		1EB2	15	39	-11,05	8,10
	Média				7,90± 0,40		Média				8,10 ± 0,41

Tabela 37 - Resultados do *docking* dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com as estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina (continuação).

Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i	Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i
7	1K1I	12	40	-10,82	7,93	8	1K1I	15	28	-11,86	8,70
	1K1O	19	47	-11,97	8,77		1K1O	28	18	-12,34	9,04
	1K1P	11	68	-12,99	9,52		1K1P	12	62	-13,61	9,98
	1MTU	18	63	-12,72	9,32		1MTU	19	56	-13,40	9,82
	1MTW	11	83	-12,46	9,13		1MTW	12	53	-12,81	9,39
	1EB2	10	74	-12,29	9,01		1EB2	13	48	-12,59	9,23
	Média				8,95± 0,56		Média				9,36 ± 0,48
9	1K1I	27	12	-11,18	8,20	10	1K1I	16	36	-10,95	8,03
	1K1O	33	12	-9,78	7,17		1K1O	20	48	-10,06	7,37
	1K1P	23	45	-12,11	8,88		1K1P	08	40	-12,27	9,00
	1MTU	20	59	-12,44	9,12		1MTU	16	36	-10,95	8,03
	1MTW	26	33	-11,60	8,50		1MTW	25	34	-11,82	8,67
	1EB2	25	27	-12,35	9,05		1EB2	13	48	-10,85	7,95
	Média				8,49± 0,73		Média				8,18 ± 0,58

Tabela 37 - Resultados do *docking* dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26 com as estruturas cristalográficas da β -tripsina bovina (conclusão).

Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i	Ligante	Entrada PDB	N _c [*]	N _{cc} ^{**}	ΔG	pK _i
12	1K1I	03	95	-6,7	4,91	14	1K1I	03	84	-7,09	5,20
	1K1O	01	100	-6,46	4,74		1K1O	03	84	-7,09	5,20
	1K1P	01	100	-6,17	4,53		1K1P	03	84	-7,09	5,20
	1MTU	03	68	-6,77	4,96		1MTU	03	70	-6,99	5,13
	1MTW	04	51	-6,97	5,12		1MTW	03	76	-6,93	5,08
	1EB2	03	92	-6,65	4,88		1EB2	01	96	-7,46	5,47
	Média				4,86±0,2		Média				5,21±0,14
20	1K1I	18	23	-10,88	7,98	26	1K1I	27	20	-9,97	7,30
	1K1O	27	10	-9,69	7,10		1K1O	34	12	-10,79	7,90
	1K1P	21	27	-10,32	7,56		1K1P	19	25	-10,59	7,76
	1MTU	19	45	-10,50	7,70		1MTU	22	30	-10,70	7,84
	1MTW	22	31	-9,92	7,27		1MTW	22	26	-9,90	7,26
	1EB2	17	25	-9,91	7,26		1EB2	22	10	-11,25	8,24
	Média				7,48±0,33		Média				7,72±0,38

N_c^{*} = Número de *clusters*; N_{cc}^{**} = Número de conformações no *clusters* principal.

A superposição do anel benzamidínico dos ligantes **1-10** com as moléculas cristalografadas foi adequada. Os ligantes posicionaram-se corretamente no bolso S1, aproximando os nitrogênios amidínicos do grupo carboxilato do resíduo Asp189. As exceções foram o ligante **3** quando o *docking* foi realizado com a entrada PDB 1K1O e os ligantes **2** e **5** com as entradas PDB 1K1I. Todos os resultados mostraram a proximidade entre a benzamidina e a Gly219 e na maioria dos resultados esse grupo também estava próximo do resíduo Ser190. Todos os ligantes posicionaram-se no sítio de modo a aproximar a amida presente em sua estrutura do resíduo Ser195 da tríade catalítica.

Os resultados do *docking* com os derivados **12**, **14**, **20** e **26** mostraram o posicionamento do grupo cianobenzoil no bolso S1 da β -tripsina, buscando interações hidrofílicas com os resíduos que compõem essa parte do sítio ativo enzimático. Todavia a análise das soluções obtidas nos experimentos de *docking* permitiu verificar, em alguns casos, que embora o grupo cianobenzoil fosse capaz de se direcionar para o sítio hidrofílico as distâncias entre os heteroátomos doadores/aceptores de prótons inviabilizavam a formação de interações entre o inibidor e a enzima. Também se observou que nos experimentos de *docking* entre o ligante **14** e a entrada PDB 1EB2 e entre o ligante **26** e as entradas PDB 1EB2 e 1K1I nenhuma das soluções de menor energia dos *clusters* mais populosos foi capaz de posicionar o grupo cianobenzoil no bolso S1.

Ressalta-se que a interação descrita na literatura entre o átomo de nitrogênio do grupo ciano e o grupo NH do resíduo Gly219 foi substituída pela interação com a carbonila desse mesmo resíduo, o que é compatível com a mudança de orientação do grupo ciano no anel aromático (os ligantes cristalografados por Lee e colaboradores possuíam o grupo ciano na posição *meta*).

Conforme esperado não se observou a interação entre o nitrogênio do grupo ciano e o resíduo Asp189.

4.1.3.1 Ligante 1

O ligante **1** foi submetido aos experimentos de *docking* com as seis entradas da β -tripsina bovina selecionadas no *Protein Data Bank*. Todas as soluções de menor energia do *cluster* mais populoso obtidas nos experimentos de *docking* de **1** mostraram o posicionamento do grupo benzamídino no bolso S1 da enzima, próximo ao Asp189.

Quando os experimentos de *docking* foram realizados com a entrada PDB 1MTU não foram observadas interações potenciais com os resíduos Gly219 e Ser195. Em nenhuma das soluções obtidas nos experimentos de *docking* de **1** o grupo nitro do ligante apresentou potenciais interações com a enzima.

Todas as ligações de **1** foram consideradas ligações não-rotacionáveis, devido as possibilidades de ressonância, e essa rigidez limitou a interação do ligante com a enzima. Em nenhum dos experimentos realizados observou-se interação do ligante com os bolsos hidrofóbicos S2 e S3/S4. No experimento do *docking* realizado com as entradas PDB 1K1I, 1EB2 e 1K1O observou-se que o anel nitrobenzeno estava posicionado perpendicularmente ao anel imidazólico da Hys57,

As potenciais interações hidrofílicas de **1** com a β -tripsina estão representadas Figura 20.

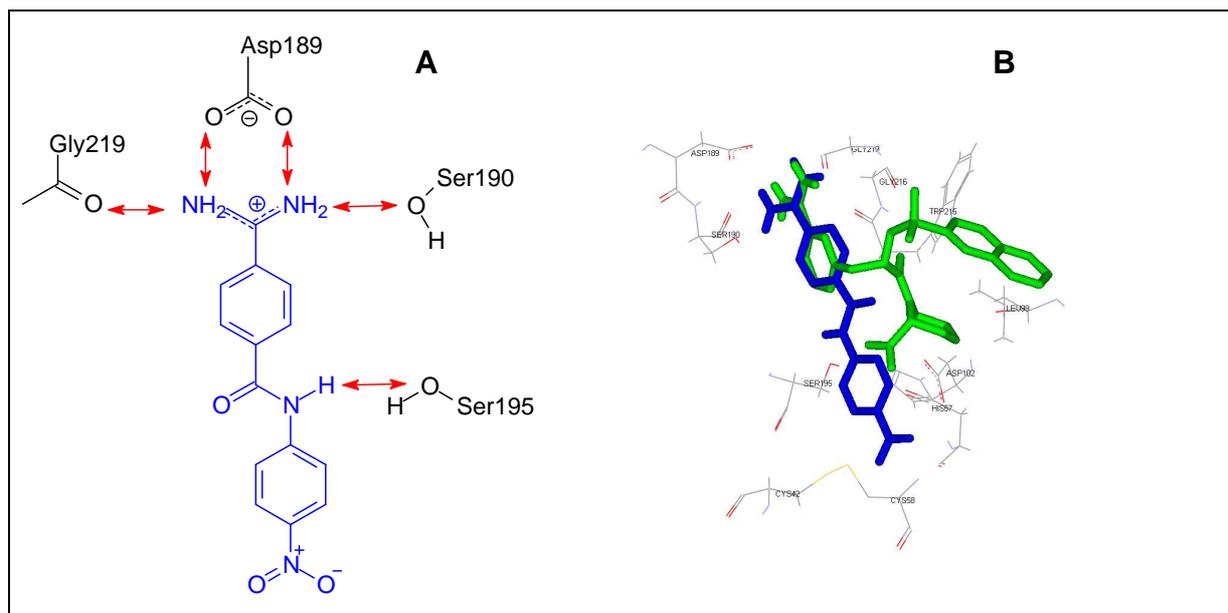


Figura 20 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 1 e a enzima (A) e superposição do ligante 1 ao ligante cristalográfico FD1 (B).

4.1.3.2 Ligante 2

As principais interações observadas nos complexos formados entre as soluções de menor energia do *cluster* mais populoso obtidas nos experimentos de *docking* de **2** e a β -tripsina bovina estão representadas na Figura 21.

Duas ligações, no grupo benzila, foram consideradas rodáveis o que permitiu o melhor posicionamento desse grupo dentro do sítio ativo enzimático e a maior interação com a tripsina. Essa observação pode explicar o melhor valor de pKi calculado para **2** em relação ao valor de pKi calculado para **1**.

Nos experimentos de *docking* realizados com as entradas PDB 1K1I e 1EB2 o anel benzílico voltou-se para o bolso S2 da tripsina, perpendicularmente ao anel imidazólico da Hys57. Nos demais resultados esse grupo assumiu uma nova posição, afastada do bolso S2.

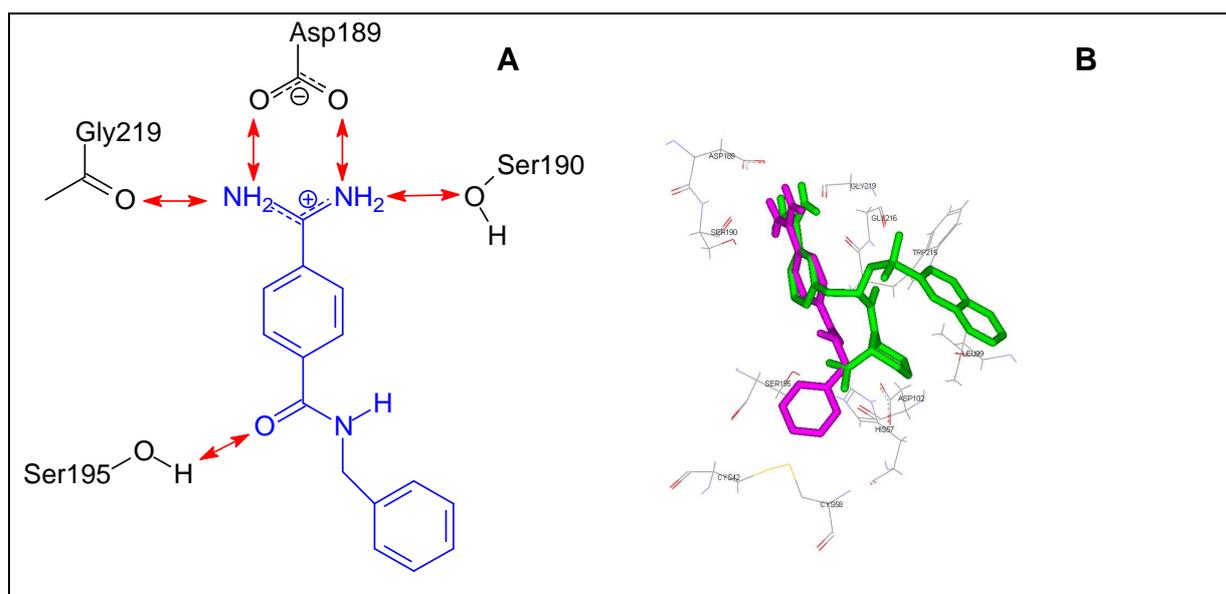


Figura 21 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 2 e a enzima (A) e superposição do ligante 2 ao ligante cristalográfico FD1 (B).

4.1.3.3 Ligante 3

As soluções obtidas nos experimentos de *docking* com o ligante **3** apresentaram seu adequado posicionamento no sítio ativo da tripsina, favorável a formação de ligações hidrofílicas e hidrofóbicas. As interações potenciais estão representadas na Figura 22.

Quando o experimento do *docking* foi realizado com a entrada PDB 1K1I observou-se a aproximação de apenas um dos átomos de nitrogênio benzamidínico do grupo carboxilato do Asp189. O valor de pKi calculado igual à 6,87 foi o segundo menor obtido para **3** o que parece estar relacionado a perda dessa interação no bolso S1.

A solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida no *docking* com as entradas PDB 1MTU e 1K1P posicionou os átomos de oxigênio da cadeia lateral do ligante próximo aos resíduos Ser195 e Hys57. Quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1K1O, 1EB2 e 1MTW houve aproximação apenas da Ser195.

Em todos os resultados do *docking* do ligante **3** observou-se o posicionamento de um dos anéis aromáticos de **3** em um bolso cisteínico (Cys42 e Cys58), perpendicularmente ao anel da Hys57. O outro anel voltou-se na direção do bolso hidrofóbico S3/S4, contudo como a cadeia lateral não é suficientemente longa ele não consegue se aproximar do Trp215. Esse anel permanece próximo ao resíduo hidrofóbico Leu99, em posição adequada para uma interação

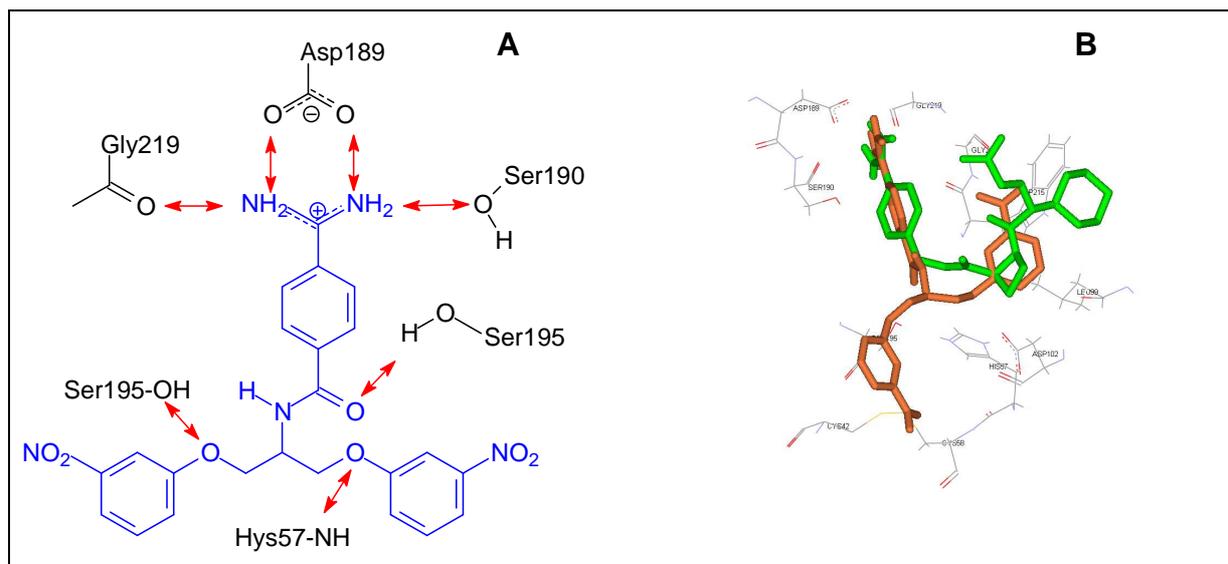


Figura 22 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante **3** e a enzima (A) e superposição do ligante **3** ao ligante cristalográfico MEL (B).

4.1.3.4 Ligante 4

As soluções do ligante **4** obtidas nos experimentos de *docking* revelaram o seu posicionamento favorável no sítio da tripsina. Na Figura 23 estão ilustradas as potenciais interações observadas no experimento.

A interação entre **4** e o resíduo Ser190, no bolso S1 da enzima, só foi observada quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1K10 e 1K11.

Quando os resultados do *docking* do ligante **4** são comparados aos de **3** nota-se que a mudança de posição do grupo nitro no anel aromático, de *meta* para *para*,

suprimiu a potencial ligação de hidrogênio entre esse grupo e a Gly216NH. Contudo o valor médio de pK_i calculado para **4** é igual a 7,34 e para **3** igual a 7,40, sugerindo que a ausência dessa ligação não afetou significativamente a interação com a enzima.

Nas soluções de menor energia do segundo *cluster* mais populoso de **4** obtidas do *docking* com as entradas PDB 1K1I e 1K1O um dos átomos de oxigênio da cadeia lateral do ligante aproximou-se do resíduo Ser195. Quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1MTU e 1MTW a aproximação ocorreu com o resíduo Hys57.

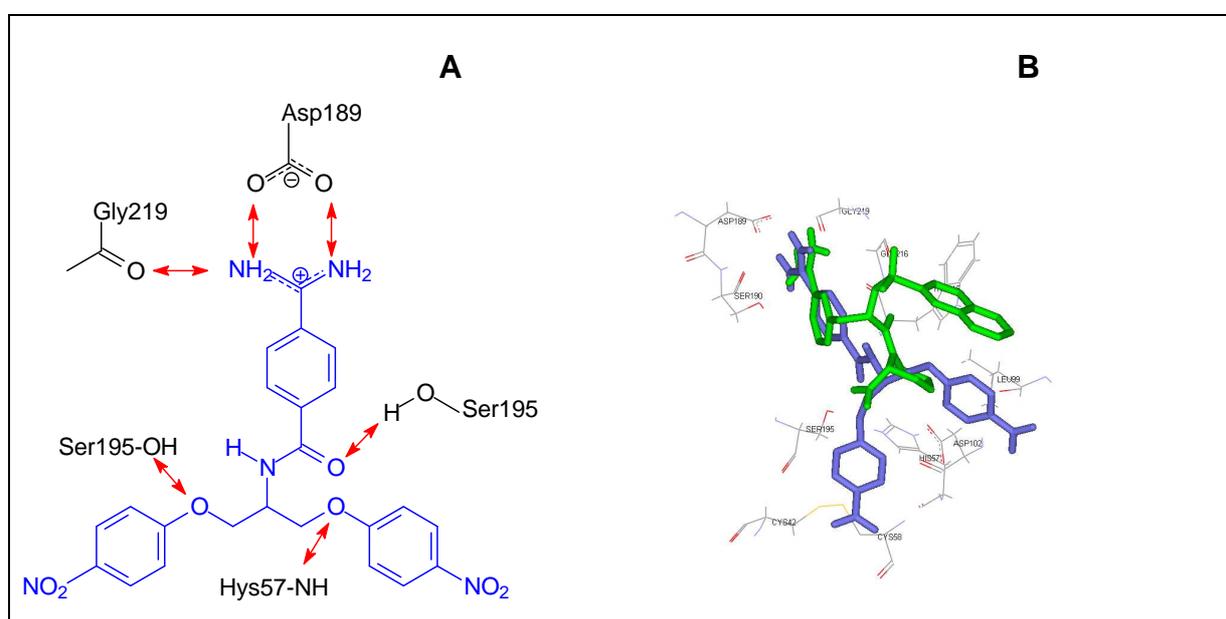


Figura 23 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante **4** e a enzima (A) e superposição do ligante **4** ao ligante cristalográfico FD1 (B).

4.1.3.5 Ligante 5

A análise das soluções de menor energia dos *clusters* mais populosos obtidas nos experimentos de *docking* do ligante **5** apontam para as potenciais interações hidrofílicas descritas na Figura 24.

A aproximação entre o ligante e o resíduo Ser190 foi observada somente quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1K1I, 1K1P e 1K1O.

Observa-se a aproximação entre a carbonila da amida do ligante e o resíduo Ser195. A única exceção foi vista no *docking* com a entrada PDB 1K1O. O resultado do *docking* com essa entrada também foi o único no qual a benzamidina não se encontra em uma posição adequada para a formação da ligação de hidrogênio bidentada, com o Asp189. O valor médio de pKi calculado nesse experimento é igual a 7,15 e foi o menor observado, em relação aos valores de pKi observados nos experimentos com as demais entradas no PDB.

A solução de menor energia do *cluster* mais populoso de **5** obtida no *docking* com a entrada PDB 1K1I mostrou a viabilidade de uma ligação de hidrogênio entre o grupo NH do acetamido e o resíduo Hys57. No *docking* de **5** com a entrada PDB 1K1O também foi observada a aproximação favorável entre o grupo NH do acetamido e o resíduo Thr98.

Um dos anéis aromáticos do ligante posicionou-se em um bolso cisteínico e o outro anel na direção dos bolsos S3/S4, mas a falta de uma cadeia lateral mais longa dificulta a aproximação desse anel do resíduo de Trp215. O anel aromático do ligante consegue aproximar-se apenas dos resíduos Hys57 e Leu99. A exceção foi o *docking* realizado com a entrada PDB 1K1O. Nesse caso um dos anéis aromáticos mantém-se próximo à ponte de dissulfeto enquanto o outro anel consegue se posicionar perpendicularmente ao anel do Trp215.

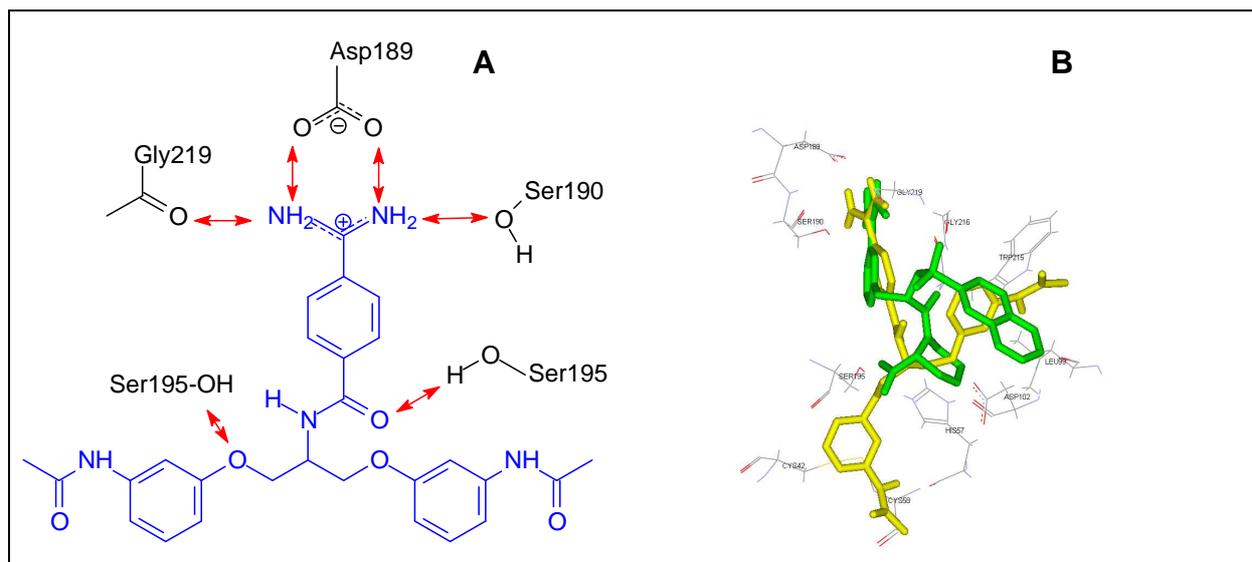


Figura 24 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 5 e a enzima (A) e superposição do ligante 5 ao ligante cristalográfico FD1 (B).

4.1.3.6 Ligante 6

A análise do *docking* do ligante **6** permitiu observar a aproximação do grupo benzamido dos resíduos Asp189, Gly219 e Ser195. Essas e as demais interações consideradas viáveis estão representadas na Figura 25.

Interações entre o grupo acetamido do ligante e a enzima foram observadas nas soluções obtidas no *docking* de **6** com as entradas PDB 1K1I (através do resíduo Hys57), 1MTW e 1K1P (através do resíduo Gly216).

Um dos anéis aromáticos do ligante encontra-se próximo à ponte dissulfeto Cys42-Cys58 e o outro está voltado na direção do bolso hidrofóbico S3/S4. Quando o *docking* foi realizado utilizando-se as entradas PDB 1K1I e 1EB2 observou-se a aproximação de um dos anéis aromáticos do ligante do resíduo Trp215.

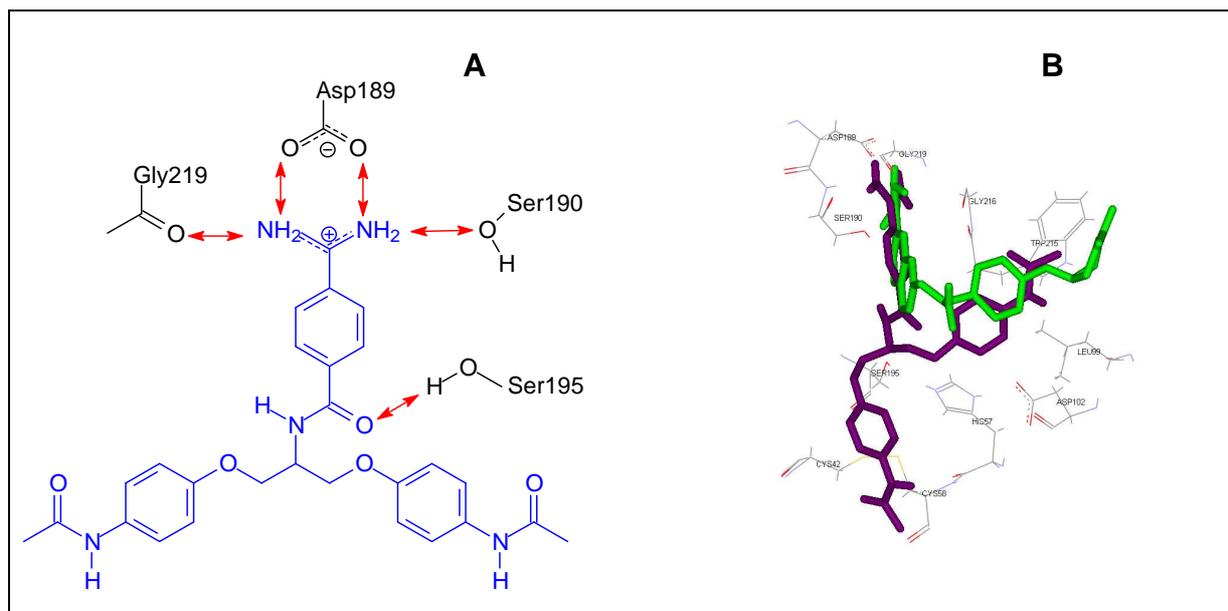


Figura 25 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 6 e a enzima (A) e superposição do ligante 6 ao ligante cristalográfico DX9 (B).

4.1.3.7 Ligante 7

Em todos os experimentos de *docking* com o ligante 7 observou-se a proximidade entre os átomos de nitrogênio da benzamidina e os resíduos Asp189 e Gly219. A interação entre o ligante e o resíduo Ser190 foi observada no *docking* com a entrada PDB 1K1I. Os experimentos de *docking* realizados com as entradas PDB 1K1I e 1EB2 mostraram o posicionamento de um dos anéis aromáticos no bolso cisteínico, perpendicular ao anel da Hys57, e o outro no bolso S3/S4 da enzima, paralelamente ao Trp215. Quando o experimento foi realizado com as entradas PDB 1K1O, 1K1P, 1MTU e 1MTW o ligante manteve um dos anéis aromáticos próximo à ponte dissulfeto, contudo o outro anel aromático foi deslocado do bolso S3/S4 para um ponto entre o anel imidazólico da Hys57 e o grupo t-butil da Leu99.

Na Figura 26 estão ilustradas as potenciais interações hidrofílicas observados no *docking* do ligante 7 com a β -tripsina bovina.

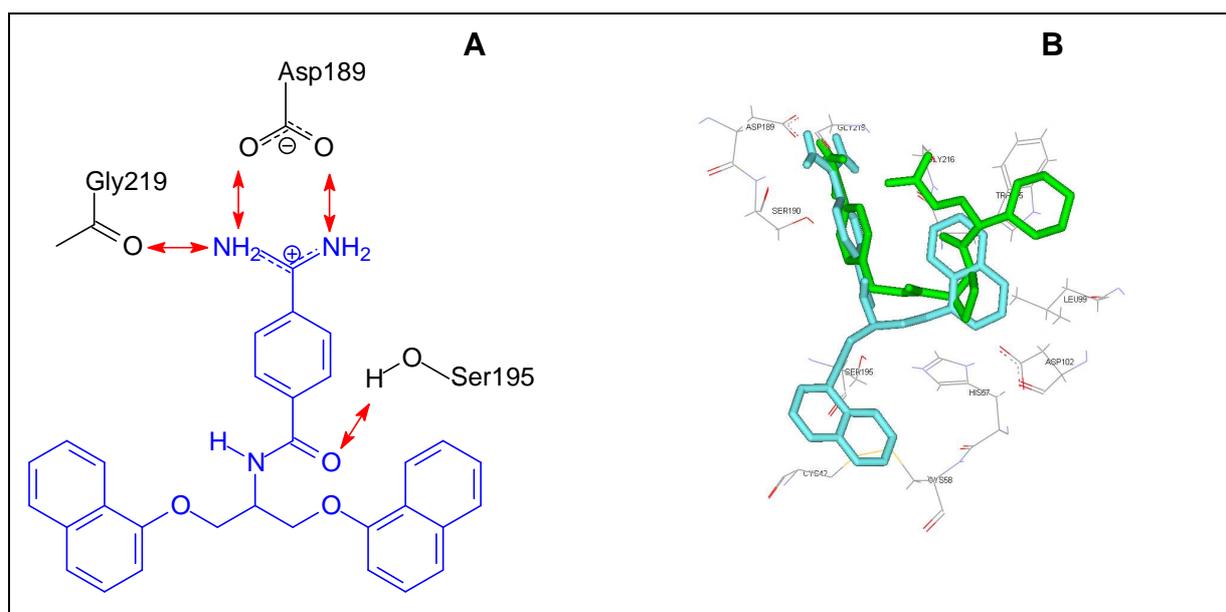


Figura 26 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 7 e a enzima (A) e superposição do ligante 7 ao ligante cristalográfico MEL (B).

4.1.3.8 Ligante 8

As análises dos resultados obtidos nos experimentos de *docking* do ligante **8** mostraram a aproximação da benzamidina dos resíduos Asp189, Gly219 e Ser190, conforme representado na Figura 27. A interação do ligante com o resíduo Ser190 da enzima não foi observada somente quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1K1P e 1MTW

A aproximação de um dos anéis aromáticos do ligante do bolso S3/S4 foi observada quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1EB2, 1K1O e 1MTW. Nos demais resultados o anel aromático do ligante afasta-se desse bolso e posiciona-se entre os resíduos de Hys57 e Leu99. A posição do outro anel aromático no bolso cisteínico é mantida.

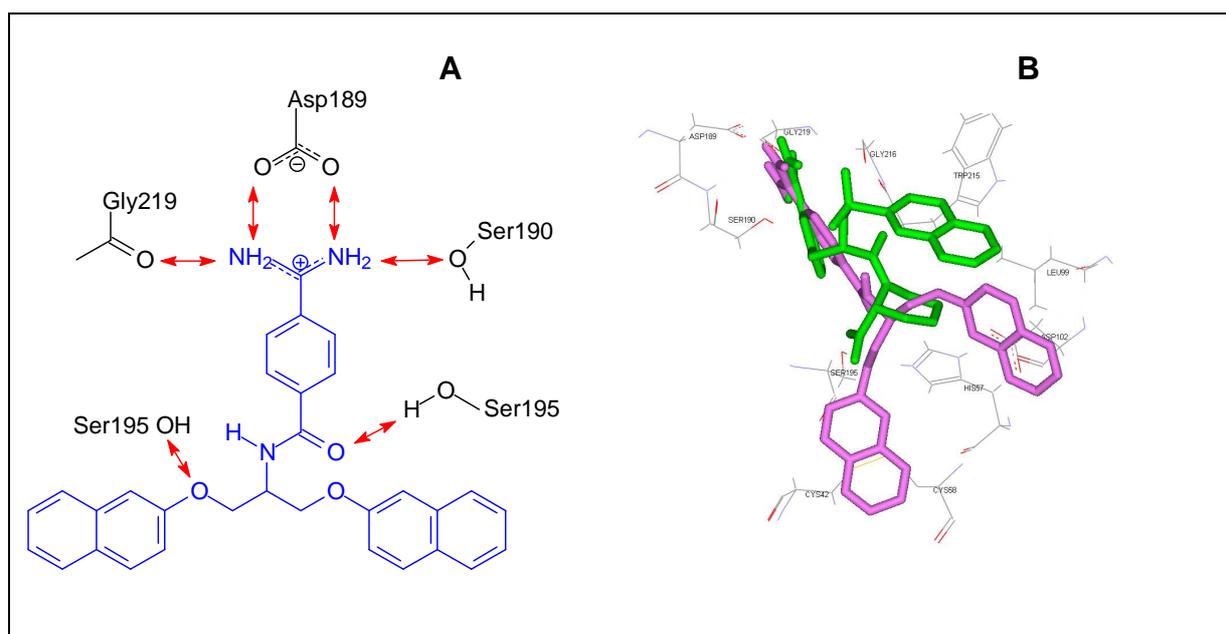


Figura 27 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 8 e a enzima (A) e superposição do ligante 8 ao ligante cristalográfico FD1 (B).

4.1.3.9 Ligante 9

Os átomos de nitrogênio terminais da benzamidina do ligante **9** posicionaram-se próximos aos resíduos Asp189 e Gly219. A exceção foi o experimento realizado com a entrada PDB 1K11, na qual somente um dos nitrogênios terminais da benzamidina apresentou uma interação potencial com o Asp189. Essa observação parece explicar o menor valor de pK_i calculado no experimento de *docking* com essa entrada. A aproximação entre a benzamidina e o resíduo Ser190 só foi observada quando os experimentos de *docking* foram realizados com as entradas PDB 1K11 e 1K10. Não foram observadas potenciais interações do tipo hidrofílicas entre o heteroátomo do anel quinolínico e a enzima, sugerindo que a presença do átomo de nitrogênio nessa posição não é importante para a interação do ligante com a enzima. As potenciais interações hidrofílicas observadas no experimento do *docking* estão representadas na Figura 28.

O ligante **9** conseguiu posicionar um de seus anéis aromáticos no bolso S3/S4 apenas quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1EB2 e 1MTW. Nos

demais casos somente uma aproximação do resíduo Leu99, foi observada. A interação hidrofóbica com a ponte cisteína foi mantida.

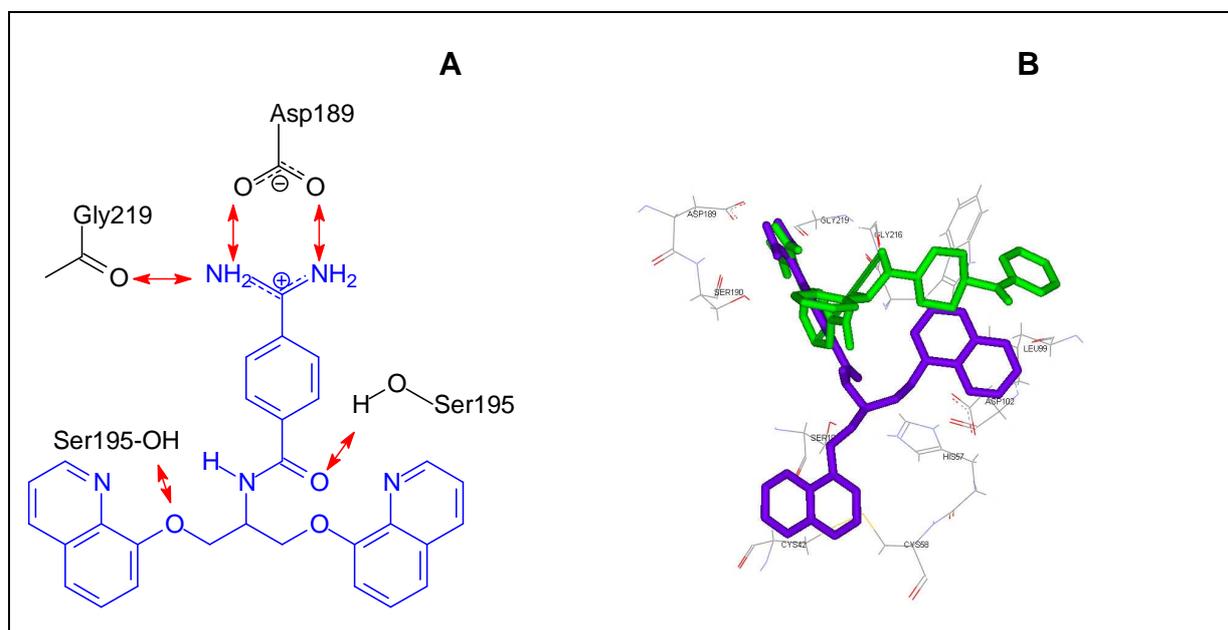


Figura 28 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 9 e a enzima (A) e superposição do ligante 9 ao ligante cristalográfico BPO (B).

4.1.3.10 Ligante 10

As potenciais interações observados entre o ligante **10** e a tripsina estão representadas na Figura 29. A aproximação do ligante do resíduo Ser190 foi observada apenas quando o experimento de *docking* foi realizado com as entradas PDB 1K1I e 1K1O. Interações entre os átomos de oxigênio da cadeia lateral e os resíduos Ser195 e Hys57 também mostraram-se viáveis.

Quando o *docking* foi realizado com as entradas PDB 1MTU e 1K1O, a solução de menor energia do *cluster* mais populoso obtida apresentou uma interação entre o átomo de nitrogênio indólico e o resíduo Gly193. No experimento realizado com a entrada PDB 1K1P essa mesma interação foi observada com o resíduo Hys57. Finalmente no *docking* com a entrada PDB 1K1I a potencial interação ocorre com o resíduo Gly192.

Em nenhuma das soluções apresentadas pelo *docking* o ligante **10** conseguiu uma boa aproximação do bolso S3/S4. Contudo a interação de um de seus anéis aromáticos com o bolso cisteínico foi mantida.

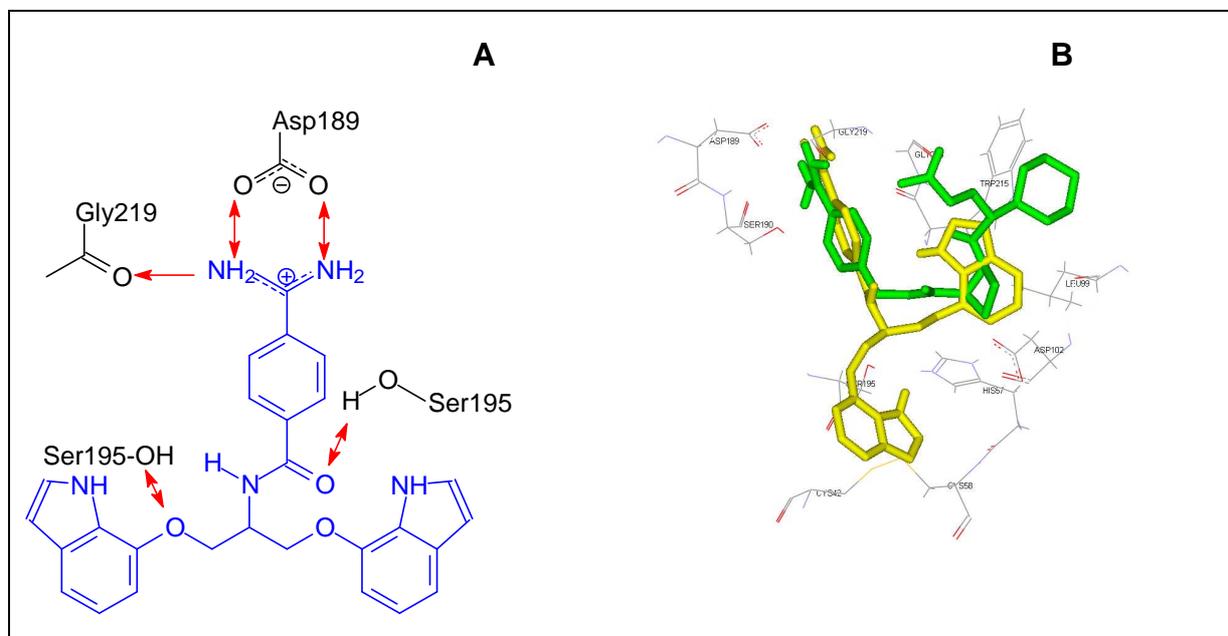


Figura 29 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante **10** e a enzima (A) e superposição do ligante **10** ao ligante cristalográfico MEL (B).

4.1.3.11 Ligante 12

De maneira análoga ao observado para **1** o ligante **12** também não é capaz de preencher os bolsos hidrofóbicos da tripsina, estabelecendo apenas interações do tipo hidrofílicas no sítio ativo enzimático. Essas potenciais interações foram observadas principalmente com os resíduos Gly216 e Ser190. Uma interação entre o grupo amida de **12** e o resíduo Gly193 foi observada quando o experimento do *docking* foi realizado com as entradas PDB 1MTW, 1EB2, 1MTU e 1K1I. Na Figura 30 estão representadas essas interações.

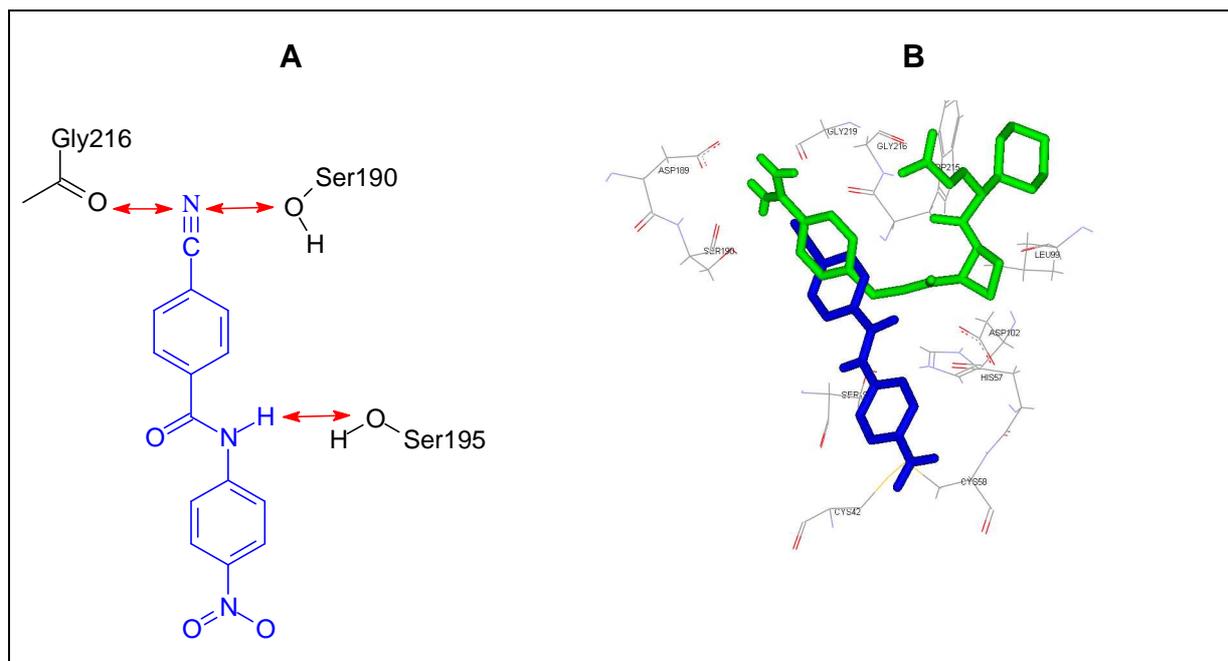


Figura 30 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante **12** e a enzima (A) e superposição do ligante **12** ao ligante cristalográfico MEL (B).

4.1.3.12 Ligante 14

O resultado dos experimentos de *docking* do ligante **14** com a β -tripsina reproduziu o comportamento observado anteriormente para **2**. A introdução na molécula de duas ligações rodáveis permitiram ao ligante posicionar o anel aromático próximo aos resíduos hidrofóbicos no sítio ativo enzimático e parece ter aumentado sua interação com a enzima. O valor de pKi calculado para **14** é maior do que o pKi calculado para **12**, o que pode reforçar essa observação.

As interações entre o grupo ciano de **14** e a enzima alternaram-se entre a Gly219 ou a Ser190, de acordo com a entrada PDB utilizada no *docking*. A potencial interação com o resíduo Ser195 foi formada entre o grupo NH do ligante e o grupo OH da serina.

Na Figura 31 estão ilustradas as potenciais interações observadas entre o ligante **14** e a β -tripsina, no experimento de *docking*.

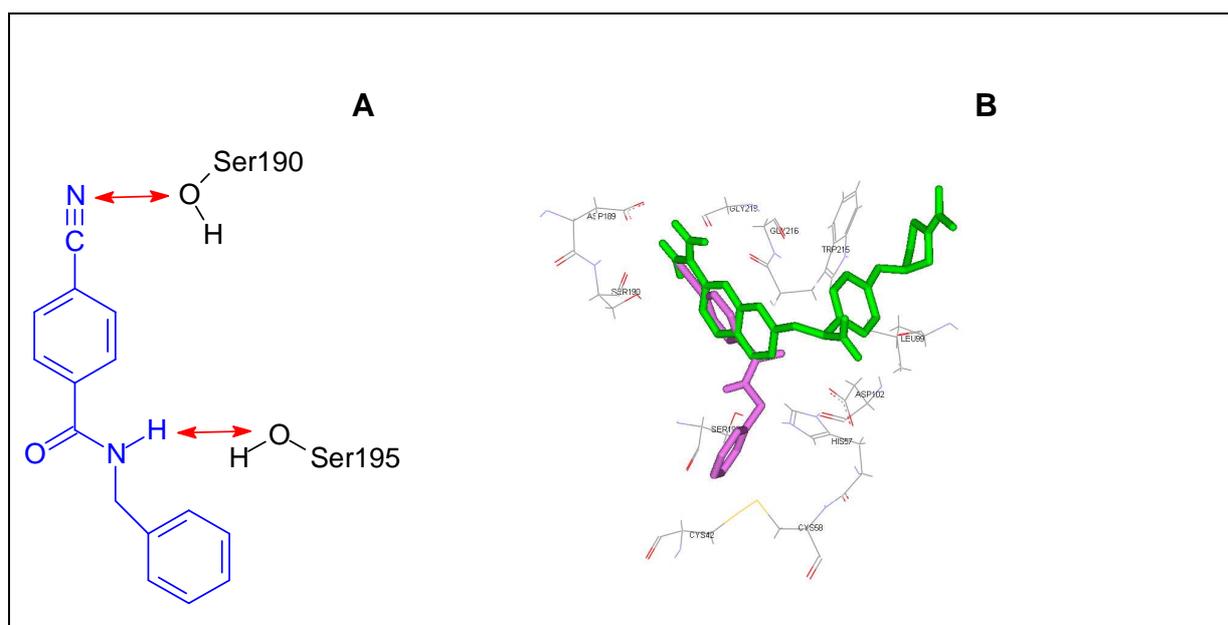


Figura 31 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 14 e a enzima (A) e superposição do ligante 14 ao ligante cristalográfico DX9 (B).

4.1.3.13 Ligante 20

Os resultados do *docking* com **20** mostraram que o grupo ciano do ligante é capaz de formar ligações hidrofílicas com a enzima através dos resíduos Gly219 ou Ser190, de acordo com a entrada PDB empregada no experimento. As cadeias laterais posicionaram-se na direção dos bolsos hidrofóbicos da enzima, próximas à ponte dissulfeto e ao resíduo Leu99. No *docking* com as entradas PDB 1K1I, 1K1O e 1EB2 o ligante posicionou-se no sítio ativo enzimático de modo a favorecer a aproximação de apenas uma das cadeias laterais do bolso hidrofóbico da tripsina.

Na Figura 32 estão ilustradas as potenciais interações observadas entre o ligante **20** e a β -tripsina, no experimento de *docking*.

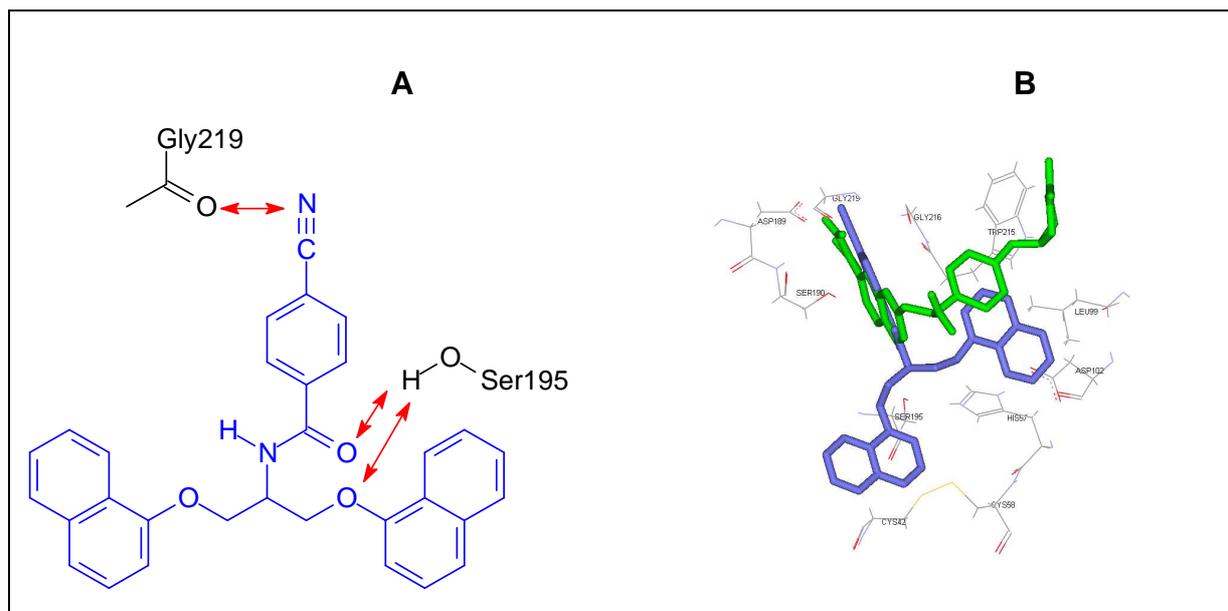


Figura 32 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 20 e a enzima (A) e superposição do ligante 20 ao ligante cristalográfico DX9 (B).

4.1.3.14 Ligante 26

Quando o experimento do *docking* foi realizado com as entradas PDB 1EB2 e 1K1I o grupo cianobenzoil foi direcionado para fora do bolso S1 da tripsina. Nos demais experimentos foi possível observar a aproximação desse grupo dos resíduos Gly219 ou Ser190. As cadeias laterais de **26** foram posicionadas nos bolsos hidrofóbicos da enzima, próximas à ponte dissulfeto e ao resíduo Leu99.

Na Figura 33 estão ilustradas as potenciais interações observadas entre o ligante **26** e a β -tripsina, no experimento de *docking*.

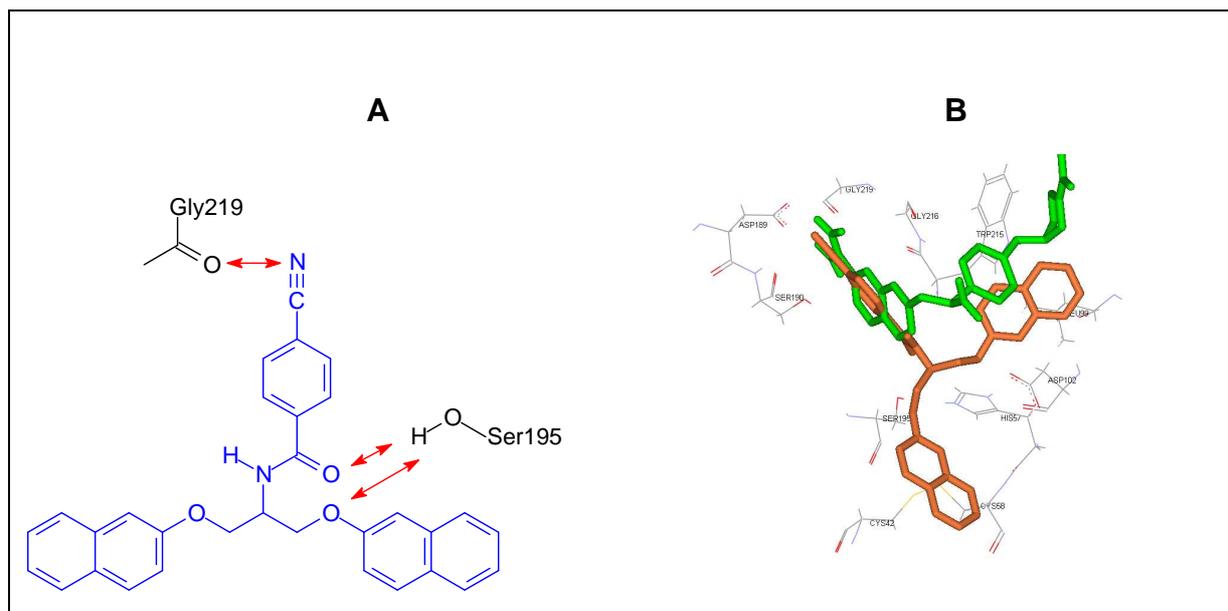


Figura 33 - Representação esquemática das potenciais interações hidrofílicas entre o ligante 26 e a enzima (A) e superposição do ligante 26 ao ligante cristalográfico DX9 (B).

4.1.4 Discussão dos resultados dos estudos de modelagem molecular

Os ligantes que possuem apenas uma cadeia lateral, **1** e **2**, apresentaram os maiores valores médios de energia livre, calculados pelo *docking*. A interação pobre entre esses ligantes e a tripsina parece justificar os valores encontrados. Os ligantes com duas cadeias laterais, **3-10**, interagem melhor com a enzima, preenchendo os bolsos hidrofóbicos e diminuindo a entropia do sistema. Os valores de energia livre e de pKi calculados pelo *docking* para esses ligantes foram os melhores quando comparados aos demais. Os ligantes com cadeias laterais contendo grupos volumosos, **7-10**, foram os que apresentaram os menores valores de energia livre de interação. Dentre eles destacam-se **7** e **8**, com valores médios de energia livre calculados igual à -12,20 e -12,77, respectivamente. A introdução de um heteroátomo no anel aromático parece não influenciar a interação do ligante com a enzima. Essa hipótese relaciona-se ao fato dos ligantes **9** e **10** apresentarem valores médios de pKi menores que os de **7** e **8**.

A substituição do grupo amidino pelo grupo ciano diminuiu diretamente a afinidade da enzima pelo substrato, o que pode ser confirmado pelos valores de pKi obtidos

nos cálculos com os ligantes **12**, **14**, **20** e **26**. A ausência da interação bidentada dos hidrogênios amidínicos com o Asp189 parece ser a principal causa da perda de afinidade desses compostos, observada no *docking*. A interação da nitrila com a Gly219 ou com a Ser190 parece não compensar a perda da ligação com o grupo carboxilato do resíduo de Aspartato. Dentre os derivados nitrila aqueles que apresentaram melhor interação com a tripsina, expressa pelo maior valor de pK_i , foram os ligantes **20** e **26**, analogamente ao observado para os compostos benzamidínicos.

Na Figura 34 está ilustrada a superposição do ligante **8** ao ligante cristalográfico FD1. As cadeias laterais da β -tripsina estão ilustradas em verde e os principais aminoácidos que interagem com os ligantes foram destacados em amarelo.



Figura 34 - Ligante **8** (rosa) no sítio da tripsina bovina (entrada PDB 1K1I). O ligante cristalográfico está representado de azul .

4.1.5 Análise teórica dos parâmetros físico-químicos relacionados à “Regra dos Cinco” de Lipinski

Os parâmetros da “Regra dos Cinco” (LIPINSKI *et al.*, 1997) dos ligantes propostos nesse trabalho também foram calculados com o objetivo de se prever possíveis problemas de baixa permeabilidade e pobre absorção, *in vivo*.

A estimativa dos parâmetros que determinam a solubilidade e a permeabilidade de uma substância *in vivo* podem ser usados como uma ferramenta complementar no desenvolvimento de novos fármacos. As baixas permeabilidade e solubilidade de uma substância podem levar a problemas de absorção e biodisponibilidade oral de um futuro fármaco.

Segundo Lipinski, problemas de absorção são mais comuns em compostos que apresentam dois ou mais dos seguintes critérios:

- mais que cinco grupos doadores de ligação de hidrogênio, em sua estrutura
- mais que dez grupos aceptores de ligação de hidrogênio, em sua estrutura
- peso molecular maior que 500
- coeficiente de Partição (LogP) maior que 5.

A “Regra dos Cinco” recebeu esse nome porque os parâmetros avaliados estão limitados ao número cinco ou a múltiplos de cinco.

Os resultados desses parâmetros obtidos para os ligantes aqui propostos estão detalhados na Tabela 38.

Como pode-se verificar somente os compostos **5-8**, **20** e **26** infringiram um dos critérios da “Regra dos Cinco”. Mas, em concordância com Lipinski, somente se dois ou mais parâmetros estiverem fora do que determina a regra é que a substância poderá apresentar uma baixa absorção.

Muito interessante é o resultado obtido para os ligantes **9** e **10**. O resultado do *docking* realizado com esses ligantes demonstrou que o átomo de nitrogênio presente no anel heterocíclico não aumentava a afinidade pela enzima, contudo esse átomo parece ter sido responsável pela melhora dos parâmetros de coeficiente de partição desses compostos.

Tabela 38 - Valores de LogP, Peso Molecular e de números de aceptores e doadores de ligação de H dos ligantes 1-10, 12, 14, 20 e 26.

Ligante	Log P	OH+NH (doadores de ligação de.H)	Peso Molecular	N+O (aceptores de ligação de H)
1	1,78	3	285,28	3
2	2,09	3	254,31	1
3	3,53	3	480,46	7
4	3,53	3	480,46	7
5	1,32	5	504,57	5
6	1,32	5	504,57	5
7	5,63	3	490,58	3
8	5,63	3	490,58	3
9	4,73	3	492,56	5
10	3,17	3	468,53	5
12	2,80	1	267,24	4
14	2,94	1	236,27	2
20	6,47	1	472,54	4
26	6,47	1	472,54	4

4.2 Síntese

Dentre os ligantes submetidos aos estudos de *docking*, **7** e **8** apresentaram os melhores valores de energia livre e *pKi* (Tabela 37). Com base nesses parâmetros e na discussão anterior, essas moléculas foram selecionadas para síntese e estudo da

sua atividade enzimática frente a β -tripsina bovina. Para validação do método computacional **1** e **2** também foram selecionadas.

O plano de síntese proposto para **1** e **2** está representado na Figura 35. O plano de síntese de **7** e **8** está representado na Figura 36 e 37, respectivamente.

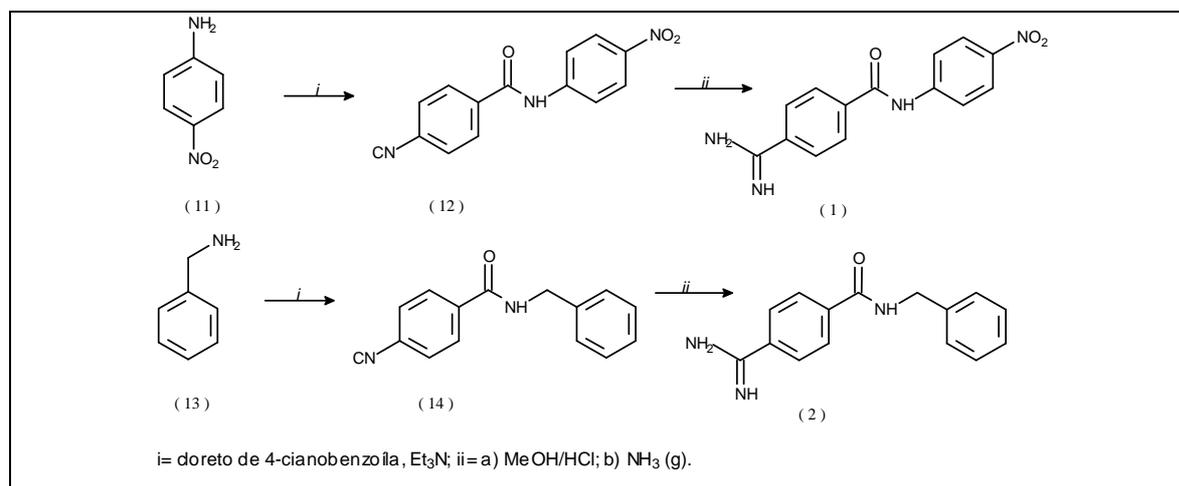


Figura 35 - Esquema proposto para a síntese do derivados 1 e 2.

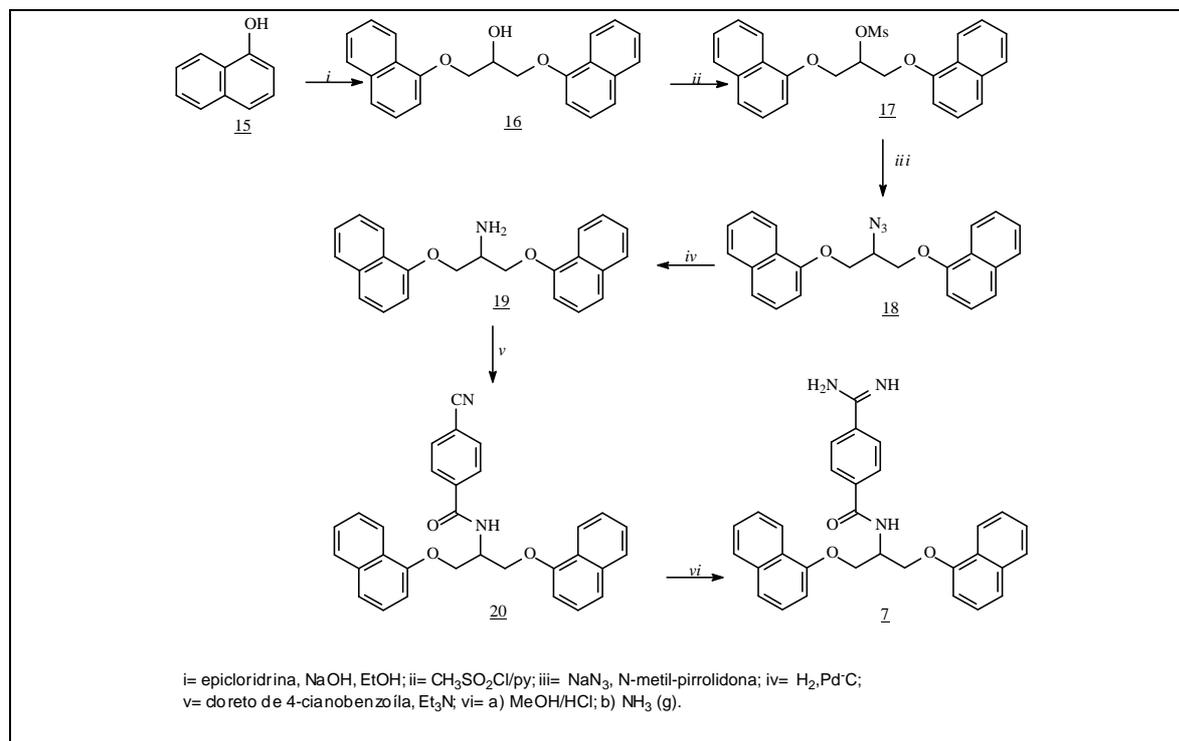


Figura 36 - Esquema proposto para a síntese do derivado 7 .

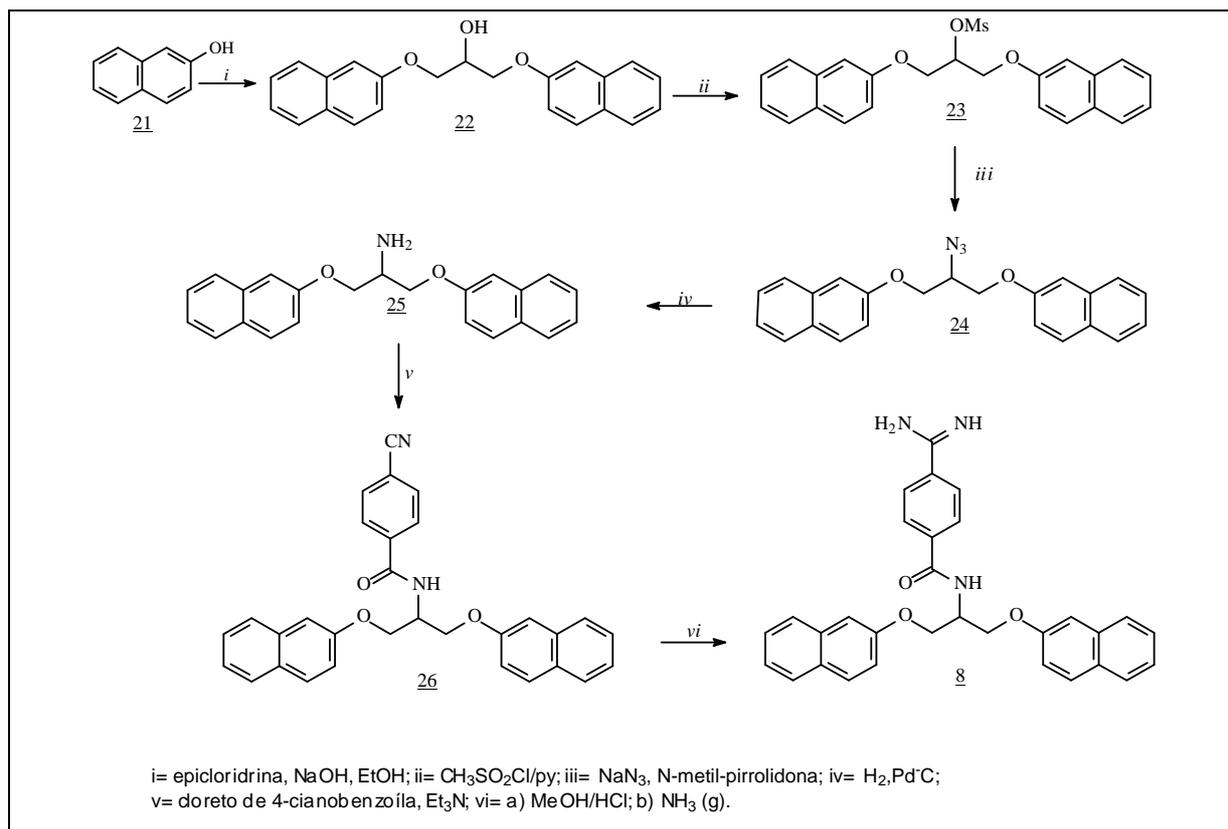


Figura 37 - Esquema proposto para a síntese do derivado 8 .

4.2.1 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-propanol (16) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-propanol (22)

Os derivados **16** e **22** foram obtidos por reação do respectivo fenol (α - naftol ou β - naftol) com a epicloridrina, na presença de KOH (KAISER *et al.*, 1977).

O ataque nucleofílico do fenóxido à epicloridrina leva a formação da oxirana I. A abertura do anel e a formação dos derivados **16** e **22** ocorre à partir de um novo ataque do íon naftilóxido à I (SLOBODANKA. *et al.*, 1992).

A abertura de epóxidos é uma reação tipo S_N2, na qual o grupo abandonador é um íon alcóxido RO⁻. A tensão no anel de três membros torna esses compostos instáveis e a reação que leva a abertura do anel e a restauração do ângulo tetraédrico de 109° é favorecida.

O mecanismo proposto para essa reação está representado na Figura 38.

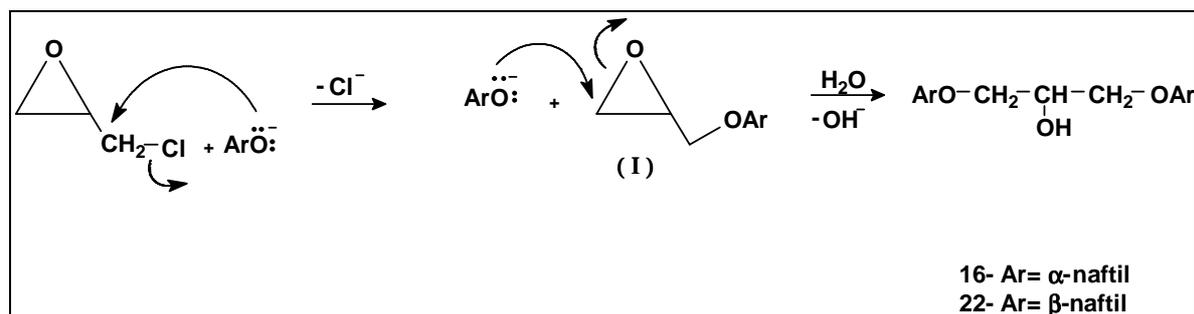


Figura 38 - Mecanismo proposto para a formação de 16 e 22 (SLOBODANKA. *et al.*, 1992).

Os produtos obtidos nessa reação foram utilizados na etapa seguinte sem prévia purificação.

4.2.2 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxiproprano (17) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-metanossulfoniloxiproprano (23)

Os derivados **16** e **22** foram submetidos a reação de mesilação utilizando-se cloreto de metanossulfonila em piridina. A mesilação do grupo hidroxila tem como objetivo convertê-la em um bom grupo abandonador. Essa etapa é essencial para a continuação da rota, que prevê a introdução de um grupo azido, nessa posição.

Os derivados **17** e **23** foram obtidos com 61% e 71% de rendimento, respectivamente.

No espectro no infravermelho de **17** não se observa a banda referente ao estiramento da ligação O-H, indicando a ocorrência da mesilação, conforme planejado. Dentre as bandas observadas no espectro no infravermelho destacam-se aquelas referentes à deformação axial de C=C de aromático (1597 e 1579 cm^{-1}), à deformação axial assimétrica de SO_2 (1343 cm^{-1}) e a deformação simétrica de SO_2 (1170 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **17** (Figura A.1) observa-se um multipletto em δ 5,63-5,69, com integral de um hidrogênio, referente a H-2, um multipletto em δ 4,64-4,55, com integral de quatro hidrogênios, atribuído a H-1 e um simpleto em δ 3,12, com integral de três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos.

Na região de aromáticos observa-se um dupletto em δ 6,86, com integral de dois hidrogênios, referente a H-2'. Essa atribuição é compatível com o fato da posição *orto* de fenóis ser a mais protegida, devido à blindagem exercida pela densidade eletrônica nessa posição. Os sinais referentes aos hidrogênios H-3' e H-4' foram atribuídos graças à análise do mapa de contornos homonuclear (COSY) (Figura A.2). O ponto de partida foi o sinal referente ao hidrogênio H-2'. Pôde-se então identificar, por meio da mancha de H-2'x H-3', que o triplete localizado em δ 7,37 refere-se ao hidrogênio H-3'. A mancha de correlação observada entre H-3'x H-4' permitiu identificar que o sinal referente a H-4' encontra-se sobreposto ao multipletto em δ 7,50-7,47. A atribuição dos demais sinais observados no espectro de ^1H só pôde ser feita após análise do mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura A.6)

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT 135 de **17** (Figuras A.3 e A.4) permitiu a atribuição dos seguintes sinais: em δ 77,8 sinal do C-2, em δ 67,2 sinal do C-1 e em δ 38,6 sinal do carbono metílico. Três carbonos *ipso* foram identificados e atribuídos, de acordo com os valores de deslocamentos químicos tabelados: em δ 153,4 sinal do C-1', em δ 134,5 sinal do C-5' e em δ 125,2 sinal do C-10'. Dentre os carbonos hidrogenados, o carbono C-6' (δ 127,6) é o mais desprotegido e sua atribuição baseou-se no valor de deslocamento químico previsto em tabela. Correlação observada no HMQC entre o C-6' e o multipletto em δ 7,82-7,80 permitiu atribuí-lo ao hidrogênio H-6'.

A observação direta das manchas de correlação do mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura A.5) permitiu atribuir os seguintes sinais: em δ 105,0 sinal do C-2', e em δ 125,6 sinal do C-3'. O sinal referente a C-4' (δ 121,3) pôde ser

atribuído através da mancha de correlação observada no HMQC com o multipletto de H-4' e com base no deslocamento químico previsto para esse carbono, em tabela.

Utilizando-se o mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura A.6), no qual há manchas de correlação entre hidrogênios e carbonos distanciados por três ligações foi possível identificar o sinal referente ao hidrogênio H-9' (multipletto em δ 8,27-8,25) através da mancha de correlação C-1'x H-9'. O sinal do carbono de C-9' (δ 121,5) foi atribuído graças a observação direta da mancha de correlação no HMQC.

Por exclusão, os sinais dos hidrogênios referentes a H-7' e H-8' encontram-se sobrepostos à H-4', no multipletto em δ 7,50-7,47.

A atribuição inequívoca do sinal de C-8' (δ 126,6) baseou-se em uma mancha de correlação observada no HMBC entre C-8'x H-9'. Por exclusão o sinal de C-7' encontra-se em δ 125,6, sobreposto ao C-3'.

No espectro no infravermelho de **23** observam-se, entre outras bandas, aquelas referentes à deformação axial de C=C de aromático (1627 e 1599 cm^{-1}), à deformação axial assimétrica de SO_2 (1345 cm^{-1}) e a deformação simétrica de SO_2 (1170 cm^{-1}). Não há presença de banda referente ao estiramento da ligação O-H.

No espectro de RMN de ^1H de **23** (Figura A.7) os seguintes sinais foram identificados: um multipletto em δ 5,36, com integral de um hidrogênio, correspondente a H-2, um multipletto em δ 4,49-4,43, com integral de quatro hidrogênios, correspondente a H-1 e um simpleto em δ 3,17, com integral de três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos.

O ponto de partida para a atribuição dos hidrogênios aromáticos foram os sinais mais protegidos: um dupletto em δ 7,19, com integral de dois hidrogênios, correspondente a H-10' e um dupletto duplo em δ 7,15, com integral de dois hidrogênios, referente a H-2'. Os hidrogênios *orto* do fenol estão blindados devido à

maior densidade eletrônica. Observa-se no espectro de RMN de ^1H de **23** a presença de dois dupletos triplos em $\delta 7,44$ e em $\delta 7,35$, com integral de dois hidrogênios cada, correspondentes a H-6' e H-7', não sendo possível diferenciá-los. Essa atribuição é compatível com a multiplicidade esperada para os hidrogênios H-6' e H-7'. Por exclusão, determinou-se que os hidrogênios referentes à H-3', H-5' e H-8' estão sobrepostos no multiplete em $\delta 7,77-7,71$, cuja integral é de seis hidrogênios.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C , auxiliada pelo espectro de DEPT 135 (Figuras A.8 e A.9), permitiu a atribuição dos sinais dos seguintes carbonos: em 78,0, sinal referente a C-2, em $\delta 66,8$, sinal referente a C-1 e em $\delta 38,4$ sinal referente ao carbono metílico. Três carbonos *ipso* foram identificados com deslocamentos químicos de 155,6 ppm, 134,2 ppm e 129,2 ppm. Levando-se em conta que, de acordo com valores tabelados, carbono ligado à OR é desprotegido de cerca de 27,5 ppm, considerou-se que o sinal de carbono *ipso* mais distante do TMS refere-se a C-1'.

Utilizando-se o mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura A.11), foi possível identificar o sinal do C-4' ($\delta 129,2$) ao se observar uma mancha de correlação com o duplete duplo referente a H-2'. Por exclusão, o carbono *ipso* em $\delta 134,2$ corresponde ao C-9'. Essa atribuição é compatível com a observação de uma mancha de correlação no HMBC entre C-9'x H-3' e C-9'x H-5'.

A atribuição inequívoca dos sinais referentes aos hidrogênios H-6' e H-7' foi feita com base nas correlações observadas no HMBC entre C-9' e o duplete triplo mais desprotegido, atribuído a H-7' e entre C-4' e o sinal mais próximo do TMS, atribuído a H-6'.

Os demais sinais observados no espectro de ^{13}C de **23** foram atribuídos graças ao mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura A.10). Observação direta das manchas de correlação permitiu atribuir os seguintes sinais: C-7' em $\delta 126,6$; C-6' em $\delta 124,1$, C-2' em $\delta 118,2$ e C-10' em 106,9. Os sinais referentes aos C-3', C-5' e C-8' não puderam ser atribuídos.

4.2.3 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-azidopropano (18) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-azidopropano (24)

O grupo mesila de **17** e **23** foi substituído pelo grupo azido na síntese de **18** e **24**. Para isso os derivados **17** e **23** foram submetidos a reação, via S_N2 , com azida de sódio, utilizando-se *N*-metilpirrolidona, como solvente, durante 72 e 120 h, respectivamente. A mistura reacional foi mantida sob aquecimento (80° - 90° C) e agitação magnética. As placas de CCD feitas ao longo das reações mostraram que apesar das altas temperaturas e do tempo prolongado uma parte do material de partida continuava sem reagir. Apesar disso os derivados **18** e **24** foram obtidos com sucesso, com rendimentos de 73,8% e 60,4%, respectivamente.

No espectro no infravermelho de **18** (Figura A.12) observam-se, além de outras bandas, aquelas referentes à deformação axial do grupo azido (2094 cm^{-1} e 2137 cm^{-1}), indicando que ocorreu a substituição do grupo mesila.

No espectro de RMN de ^1H de **18** (Figura A.13) observa-se na região de $\delta 4,49$ - $4,45$ um multipeto, com integral de cinco hidrogênios, correspondente a H-1 e H-2. No mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura A.16) observam-se as manchas de correlação entre o multipeto atribuído a H-1 e H-2 e os carbonos C-1 e C-2, confirmando que houve a sobreposição dos sinais desses hidrogênios.

A ocorrência da substituição do grupo mesila é reforçada pela ausência do sinal referente ao carbono metílico no espectro de RMN de ^{13}C de **18** (Figura A.14).

No espectro no infravermelho de **24** (Figura A.17) destaca-se a presença das bandas referentes à deformação axial do grupo azido (2094 cm^{-1} e 2137 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **24** (Figura A.18) os hidrogênios H-1 e H-2 encontram-se sobrepostos em um multipeto em $\delta 4,42$ - $4,26$, cuja integral é de cinco

hidrogênios. Observam-se no HMQC as correlações entre o multiplete e os carbonos C-1 e C-2.

Não se observa no espectro de RMN de ^{13}C de **24** (Figura A.20) o sinal referente ao carbono metílico, do grupo mesila.

4.2.4 1,3-Bis(1-naftiloxi)-2-aminopropano (19) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-aminopropano (25)

O grupo azido dos derivados **18** e **24** foi reduzido a amino, por reação de hidrogenação catalítica, na presença de paládio/carvão, como agente catalisador. O derivado amino foi precipitado, durante a elaboração, com HCl 37% e H_2O destilada, na forma de cloridrato. A reação foi limpa e eficiente produzindo os derivados **19** e **25** com 64,7% e 87,7% de rendimento, respectivamente.

No espectro no infravermelho de **19** observa-se, além de outras bandas, aquela referente à deformação axial do grupo NH_3^+ (3053 cm^{-1}), compatível com os valores tabelados de sais das aminas primárias.

No espectro de RMN de ^1H de **19** (Figura A.23) observa-se um simpleto largo em δ 9,04, com integral de três hidrogênios, correspondente aos hidrogênios do grupo NH_3^+ .

A análise do espectro no infravermelho de **25** permitiu atribuir a banda de deformação axial do grupo NH_3^+ (3053 cm^{-1}), confirmando a redução do grupo azido a amino.

Na análise do espectro de RMN de ^1H de **25** (Figura A.26) observa-se um simpleto largo em δ 8,91 relativo a três hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo NH_3^+ .

4.2.5 N-(4-nitrofenil)-4-cianobenzamida (12), N-benzil-4-cianobenzamida (14), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (20) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-cianobenzoil)amino]propano (26)

Para a síntese das amidas **12**, **14**, **20** e **26** primeiramente preparou-se o cloreto de 4-cianobenzoíla. O ácido 4-cianobenzóico foi aquecido com o cloreto de tionila, sob refluxo e agitação magnética. Clorofórmio foi usado como solvente. O mecanismo proposto para essa reação está representado na Figura 39.

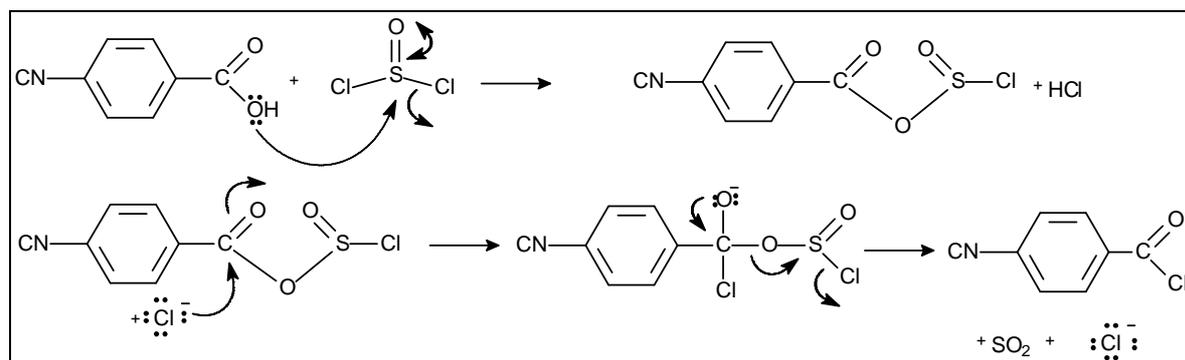


Figura 39 - Mecanismo proposto para a formação do cloreto de 4-cianobenzoíla (SOLOMONS *et al.*, 2006).

Após quatro horas o solvente e o excesso de reagente foram removidos em evaporador rotatório e o sólido obtido foi submetido a análise espectrométrica no infravermelho. O espectro no IV do cloreto de ácido caracteriza-se pela ausência de bandas de estiramento da ligação OH, nas regiões acima de 3000 cm⁻¹, e pela presença de uma banda em 1739 cm⁻¹, referente ao estiramento C=O da carbonila de cloreto de ácido.

Uma vez preparado o cloreto de ácido, as aminas precursoras foram adicionadas a um balão de fundo redondo, junto com THF Merck®. O cloridrato das aminas **19** e **25** mantiveram-se insolúveis inicialmente. Contudo, à medida que a trietilamina foi sendo adicionada, houve completa solubilização do material. Em seguida, uma solução do cloreto de ácido em THF foi gotejada sobre a solução da amina. Todos os procedimentos foram feitos em banho de gelo. Ao final da reação a mistura foi

concentrada à secura. Os produtos brutos obtidos nessa etapa foram purificados por recristalização em acetona/éter de petróleo, e os rendimentos foram de 80,5% para **14**, 50,1% para **20** e 68,3% para **26**. O derivado **12** precipitou puro, durante a elaboração e não foi necessário submetê-lo a processo de purificação. Seu rendimento foi de 82,0%.

No espectro no infravermelho de **12** (Figura A.29) observam-se, além de outras bandas, aquelas atribuídas à deformação axial da ligação N-H (3330 cm^{-1}), à deformação axial de C≡N (2225 cm^{-1}) e à deformação axial de C=O (1683 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **12** (Figura A.30) os seguintes sinais foram atribuídos: um multiplete em $\delta 8,65\text{-}7,60$, com integral de oito hidrogênios, que foi atribuído aos hidrogênios aromáticos de **12** e um simpleto largo em $\delta 11,02$, referente ao hidrogênio do grupo NH.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C , (Figura A.31), permitiu atribuir seis carbonos *ipso*, de acordo com os valores de deslocamentos químicos tabelados: em $\delta 164,9$ o sinal do carbono carbonílico, em $\delta 145,0$ o sinal de C-10, em $\delta 142,7$ o sinal de C-7, em $\delta 138,1$ o sinal de C-4, em $\delta 118,2$ sinal do carbono do grupo ciano e em $\delta 114,4$ o sinal de C-1. Carbono *orto* a grupo ciano é desprotegido em cerca de 3,6 ppm, o que permiti atribuir o sinal em $\delta 133,3$ aos carbonos C-2 e C-6. A atribuição do sinal em $\delta 129,6$ aos carbonos C-3 e C-5 é perfeitamente compatível com o efeito exercido pelos substituintes sobre esses átomos. Da mesma maneira, o sinal em $\delta 125,6$ pôde ser atribuído aos carbonos C-9 e C-11 devido ao efeito exercido pelo grupo nitro sobre a posição *orto*, que a protege em cerca de 5,3 ppm. A atribuição do sinal em $\delta 120,8$ aos carbonos C-8 e C-12 também baseou-se nos valores de deslocamentos químicos tabelados.

O espectro no infravermelho de **14** (Figura A.32) apresenta além de outras bandas aquelas referentes à deformação axial da ligação N-H (3312 cm^{-1}), à deformação axial de C≡N (2233 cm^{-1}) e à deformação axial de C=O (1643 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **14** (Figura A.33) observa-se um padrão dos sinais mais distantes do TMS típico de anel aromático *para* substituído. O duplete em $\delta 7,86$ foi atribuído a H-3 e H-5 e o duplete em $\delta 7,65$ refere-se a H-2 e H-6. Essa atribuição baseou-se nos valores de deslocamentos químicos previstos teoricamente, pelo programa ACD[®]. O multiplete em $\delta 7,32$, com integral de cinco hidrogênios, corresponde aos hidrogênios do anel aromático monossustituído. O sinal referente ao hidrogênio do grupo NH foi atribuído ao simpleto largo em $\delta 6,98$. Na região de hidrogênios alifáticos observa-se um duplete em $\delta 4,60$, referente aos hidrogênios de H-7.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C de **14** e do subespectro DEPT 135 (Figuras A.34 e A.35) permitiu observar a presença de cinco sinais referentes a carbono *ipso* identificados como: carbono carbonílico ($\delta 165,6$), C-1 ($\delta 114,9$) e carbono do grupo ciano ($\delta 117,9$). Os sinais referentes aos carbonos *ipso* C-4 e C-8 ($\delta 138,1$ e $\delta 137,5$) não puderam ser diferenciados devido a proximidade do deslocamento químico. Os sinais desses carbonos foram considerados intercambiáveis. A atribuição dos sinais dos carbonos hidrogenados baseou-se nos valores de deslocamento químicos tabelados e na influência dos substituintes sobre esses átomos. Assim, foi possível atribuir os seguintes sinais: em $\delta 132,3$ sinal de C-2 e C-6, em $\delta 128,7$ sinal de C-3 e C-5 e em $\delta 127,7$ o sinal referente aos carbonos do anel aromático monossustituído.

No espectro no infravermelho do derivado **20** (Figura A.36) destacam-se as bandas referentes à deformação axial da ligação N-H (3296 cm^{-1}), à deformação axial de $\text{C}\equiv\text{N}$ (2229 cm^{-1}) e à deformação axial de carbonila de amida (1636 cm^{-1}).

No espectro de RMN de ^1H de **20** (Figura A.37) observa-se a presença de dois dupletos em $\delta 7,83$ e em $\delta 7,61$, com integral de dois hidrogênios cada, e cuja constante de acoplamento é de $8,4\text{ Hz}$. A ausência desses sinais no espectro de ^1H de **19** permitiu afirmar que eles correspondem aos hidrogênios aromáticos do anel *p*-ciano substituído.

Comparando-se os espectros de RMN de ^{13}C e de DEPT 135 de **20** (Figuras A.39 e A.40) ao de seu precursor observa-se a presença de apenas cinco sinais de carbono há mais que no espectro de **19**, dentre os quais quatro foram identificados como carbonos *ipso*. O sinal referente ao carbono carbonílico (δ 165,8) e ao carbono do grupo ciano (δ 117,8) foram atribuídos segundo os valores de deslocamentos químicos tabelados. Carbono ligado a grupo ciano é protegido em de cerca de 16 ppm, o que é compatível com a atribuição do sinal em δ 115,2 a C-14'. Por exclusão o sinal em δ 137,8 foi atribuído a C-11'. A atribuição do sinal em δ 132,4 aos carbonos C-13' e C-15' foi feita com base nos valores tabelados, que prevêm a desproteção do sinal de carbono *orto* à ciano em 3,6 ppm. O sinal de C-12' e de C-16' (δ 127,7) pode ser atribuído graças a correlação observada no HMQC (Figura A.41) com o duplete em δ 7,83. Esse sinal encontra-se sobreposto ao de C-6' e por isso não foi possível fazer a sua atribuição inicialmente. As correlações observadas no HMBC (Figura A.42) entre o carbono carbonílico e o duplete referente a H-12' e H-16' e entre o carbono do grupo ciano e o duplete referente a H-13' e H-15' confirmam a atribuição inequívoca desses sinais. A ausência de correlações no HMQC (Figura A.41) com o duplete em δ 6,97 permitiu atribuí-lo ao sinal do hidrogênio do grupo NH.

No espectro no infravermelho de **26** (Figura A.43) observa-se, além de outras bandas, aquela referente à deformação axial da ligação N-H (3275 cm^{-1}), à deformação axial de $\text{C}\equiv\text{N}$ (2230 cm^{-1}) e a banda I de amida correspondente à deformação axial de $\text{C}=\text{O}$ (1628 cm^{-1}).

A comparação do espectro de RMN de ^1H de **26** (Figura A.44) com o de seu precursor permitiu verificar a presença de um multiplete relativo a oito hidrogênios aromáticos (contra seis hidrogênios aromáticos no multiplete do espectro de **25**) e um duplete em δ 7,89, com integral de dois hidrogênios, indicando a introdução de um anel aromático *p*-substituído na estrutura de **26**.

A análise do espectro de RMN ^{13}C e de DEPT 135 de **26** (Figuras A.45 e A.46) permitiu identificar a presença de seis sinais de carbonos aromáticos, ausentes no

espectro de **25**, e que correspondem a C-11' (δ 137,8), a C-13' e C-15' (δ 132,4), a C-12' e C-16' (δ 127,6) e a C-14' (δ 115,3), além dos sinais referentes ao carbono carbonílico (δ 165,6) e ao carbono do grupo ciano (δ 117,9). A atribuição desses sinais foi feita com base nos valores de deslocamentos químicos tabelados.

Correlação direta entre os carbonos C-12' e C-16' observada no mapa de contornos heteronuclear HMQC (Figura A.47) permitiu atribuir o duplete em δ 7,89 à H-12' e H-16'. Assim pode-se afirmar que o sinal referente aos hidrogênios H-13' e H-15' encontra-se sobreposto ao multiplete em δ 7,77-7,70. As correlações observadas no HMBC (Figura A.48) entre o carbono carbonílico e o duplete referente a H-12' e H-16' e entre o carbono do grupo ciano e o multiplete confirmam a atribuição inequívoca desses sinais.

O duplete em δ 6,85 foi atribuído ao hidrogênio do grupo N-H devido a ausência de correlações entre esse sinal e outro átomo de carbono, no HMQC (Figura A.47). O mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura A.48) apresenta uma mancha de correlação entre esse duplete e o carbono carbonílico.

4.2.6 N-benzil-4-amidinobenzamida (2), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (7) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-amidinobenzoil)amino]propano (8)

Os derivados amidino foram preparados utilizando-se o método de Pinner (BAY and GISVOLD., 1955). Embora tenha sido descrito pela primeira vez em 1877 esse método ainda é considerado o mais prático e útil para se obter amidinas à partir de nitrilas. Nessa técnica a nitrila é dissolvida ou suspensa em um álcool anidro e tratada com cloreto de hidrogênio, formando o éster imídico intermediário.

Esse éster imídico é então submetido a reação com amônia, levando à formação da amidina. Nas reações descritas neste trabalho utilizou-se metanol anidro e o cloreto de hidrogênio foi produzido *in situ*, pela volatilização do ácido clorídrico 37%.

O intermediário metoximina produzido durante a obtenção da amidina é extremamente reativo e a presença de umidade pode levar à formação de um éster metílico indesejado, conforme mostrado na Figura 40.

A formação do éster metílico foi observada nas reações para obtenção das amidinas e esse subproduto foi isolado e caracterizado. Os derivados **2**, **7** e **8** foram obtidos com rendimentos de 25,4%, 22,4% e 49,7%, respectivamente. Os baixos rendimentos podem ser explicados pela dificuldade em se manter um ambiente anidro adequado, e conseqüente formação do derivado éster.

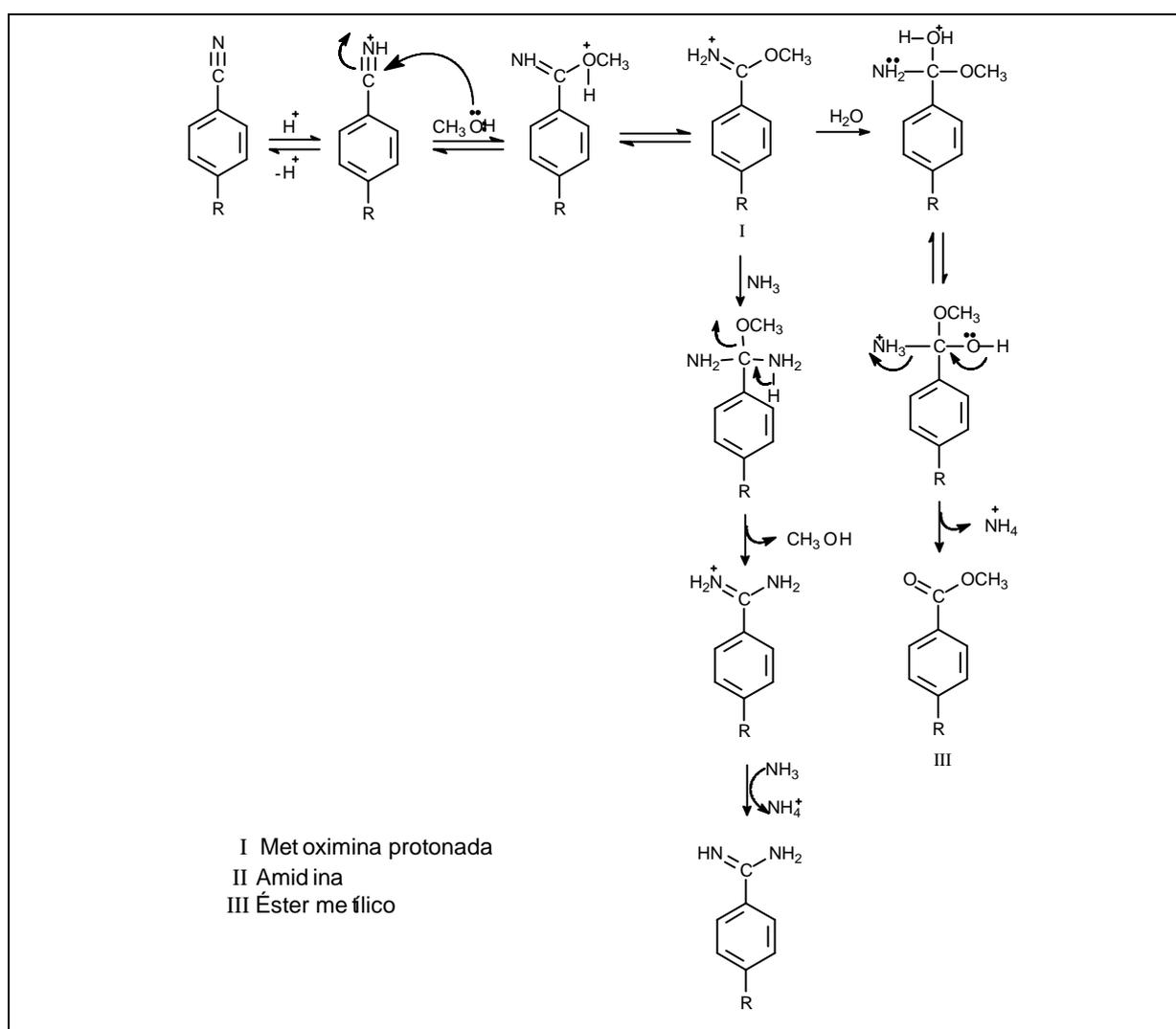


Figura 40 - Mecanismo geral proposto para a formação dos derivados amidinos e dos respectivos ésteres metílicos.

No espectro no infravermelho de **2** (Figura A.49) observam-se três bandas referentes à deformação axial de NH (3364 cm^{-1} , 3307 cm^{-1} , 3168 cm^{-1}), o que é compatível com a estrutura da amidina **2**, além da banda de deformação axial de C=O (1660 cm^{-1}) e da banda de deformação axial C=N (1635 cm^{-1}). Não se observa a banda referente ao estiramento da ligação C≡N, indicando o consumo de todo material de partida. A banda referente ao estiramento de ligação C=O de éster também não está presente no IV de **2**, indicando que a purificação da amidina e a separação do subproduto éster metílico foi eficiente.

No espectro de RMN de ^1H de **2** (Figura A.50) observa-se um tripleto em $\delta 9,16$, com integral de um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio do grupo NH. Essa atribuição baseou-se na multiplicidade desse sinal, compatível com o acoplamento de NH com os dois hidrogênios metilênicos e com os valores iguais das constantes de acoplamento observadas para o tripleto e para o duplete referente a H-7. Comparando-se o espectro de ^1H de **2** ao de seu precursor observa-se a presença de dois simpletos largos em $\delta 8,08$ e em $\delta 7,48$ e de um multiplete em $\delta 7,27-7,23$, com integral de um hidrogênio cada, atribuídos aos hidrogênios amidínicos.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C de **2** (Figura A.51) permitiu observar a presença de quatro carbonos *ipso*. A proximidade entre o carbono amidínico e do carbono carbonílico dificulta a atribuição inequívoca desses sinais e eles foram considerados intercambiáveis ($\delta 167,2$ e $\delta 165,6$). A atribuição de C-8 foi feita com base nos valores de deslocamento químico tabelados. Por exclusão o sinal em $\delta 136,5$ foi atribuído aos carbonos C-1 e C-4. Não se observa no espectro de ^{13}C de **2** sinal referente ao carbono do grupo ciano.

A análise do espectro no infravermelho de **7** (Figura A.53) permite observar além de outras bandas aquelas referentes à deformação axial da ligação N-H (3370 cm^{-1} , 3275 cm^{-1} e 3186 cm^{-1}), à deformação axial da ligação C=O (1643 cm^{-1}) e à deformação axial da ligação C=N (1621 cm^{-1}), compatíveis com a estrutura do derivado **7**.

A análise do espectro de RMN de ^1H de **7** (Figura A.54) permitiu atribuir os seguintes sinais: um duplete em δ 8,27, com integral de dois hidrogênios, referente a H-9', um duplete em δ 7,85, com integral de dois hidrogênios, referente a H-6', um duplete em δ 7,08, com integral de dois hidrogênios, referente a H-2', um multiplete em δ 5,11-5,07, referente a H-2 e um duplete em δ 4,56, correspondente a H-1.

A presença de uma mancha no espectro de correlação homonuclear COSY (Figura A.55) entre H-2'x H-3' permitiu inferir que o sinal referente a H-3' encontra-se sobreposto ao multiplete em δ 7,53-7,41, junto com os sinais de H-4', H-7' e H-8'. O sinal do hidrogênio do grupo NH da amida foi atribuído ao duplete em δ 9,0, graças a presença de uma mancha de correlação no COSY entre esse sinal e o multiplete referente a C-2. Comparando-se o espectro de ^1H de **20** ao de **7** observa-se a presença de um simpleto largo em δ 8,07, com integral de um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio amidínico. A atribuição dos demais sinais só foi possível com auxílio dos espectros de HMQC e HMBC.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C auxiliada pelo subespectro DEPT 135 (Figuras A.56 e A.57) tornou possível observar a presença de sete carbonos *ipso*, o que é compatível com a estrutura de **7**. Três desses sinais já haviam sido atribuídos anteriormente e referem-se a C-1' (δ 153,8), a C-5' (δ 133,9) e C-10' (δ 125,2). O sinal referente ao carbono carbonílico (δ 166,3) foi atribuído graças a correlação observada no mapa de contornos heteronuclear HMBC (Figura A.59) com o duplete do grupo NH da amida. Assim, o sinal em δ 167,1 pode ser atribuído ao carbono amidínico. Outros dois sinais de carbono *ipso* identificados no espectro de ^{13}C de **7** foram aqueles localizados em δ 136,7 e δ 136,6, referentes aos carbonos C-11' e C-14'. Não foi possível atribuir inequivocamente esses sinais, devido a sua proximidade, contudo é importante ressaltar que a mudança de substituinte no anel aromático alterou significativamente o sinal de C-14', tornando-o mais desprotegido.

Em relação aos carbonos hidrogenados é possível observar, comparando-se o espectro de ^{13}C de **7** ao de seu precursor, que o sinal dos carbonos C-13' e C-15'

tornou-se mais protegido. Contudo não é possível diferenciá-lo do sinal dos carbonos C-12' e C-16', que também se encontram muito próximos.

A observação direta das manchas de correlação no HMQC (Figura A.58) permitiu atribuir o sinal de H-13' e H-15', sobreposto ao sinal de H-12' e H-16' em um multiplete em δ 7,99-7,95. Por exclusão, concluiu-se que o sinal referente aos hidrogênios do grupo NH₂ encontram-se sobrepostos ao multiplete em δ 7,53-7,41.

O espectro no infravermelho de **8** (Figura A.60) apresenta três bandas referentes à deformação axial da ligação N-H (3371 cm⁻¹, 3288 cm⁻¹, 3184 cm⁻¹), além das bandas correspondentes à deformação axial de C=O (1651 cm⁻¹) e à deformação axial da ligação C=N (1627 cm⁻¹). Não se observa a banda de estiramento C≡N, indicando que todo o material de partida foi consumido.

No espectro de RMN de ¹H de **8** (Figura A.61) observa-se um duplete em δ 8,87 correspondente ao hidrogênio do grupo N-H da amida. Essa atribuição foi feita com base na correlação observada no mapa de contornos homonuclear COSY (Figura A.62) com o quinteto referente a H-2. Comparando-se o espectro de ¹H de **8** com o de seu precursor distinguiu-se a presença de um simpleto largo em δ 8,06, com integral de um hidrogênio, que foi atribuído ao hidrogênio do grupo N-H da amidina. A ausência de correlações no HMQC (Figura A.65) entre esse simpleto e outro átomo de carbono permitiu confirmar essa atribuição. A integral de quatro hidrogênios referentes ao multiplete em δ 7,99-7,92 aponta para a sobreposição do sinal dos hidrogênios H-13' e H-15' ao sinal de H-12' e H-16'. Por correlação direta no HMQC observa-se que o sinal referente ao H-10' encontra-se sobreposto ao do H-7', no multiplete em δ 7,45-7,42. Por exclusão, foi possível atribuir o sinal dos hidrogênios do grupo NH₂ sobrepostos a esse mesmo multiplete.

No espectro de RMN de ¹³C de **8** (Figura A.63) não se observa o sinal correspondente ao carbono do grupo ciano. Dois carbonos *ipso* foram observados em δ 136,6 e δ 136,3, não sendo possível diferenciá-los entre C-11' e C-14'. Contudo,

ao se comparar o deslocamento químico de C-14' no espectro de **26** (δ 115,3) ao observado no de **8** pode-se constatar que esse carbono foi deslocado para uma região mais desprotegida, indicando a troca do substituinte nessa posição, conforme planejado. O sinal correspondente ao carbono carbonílico é observado em δ 166,1, vizinho ao sinal atribuído ao carbono amidínico (δ 167,1). A atribuição desses sinais foi feita com base nos valores de deslocamentos químicos tabelados e na correlação observada no HMBC (Figura A.66) entre o carbono carbonílico e o duplete do grupo NH ($^2J_{CH}$). O sinal atribuído a C-13' e C-15' (δ 132,4) no espectro do derivado **26** não é observado no espectro de **8**, indicando que a mudança do substituinte teve efeito direto sobre o deslocamento químico dos carbonos em *orto*. Comparando-se o espectro de ^{13}C de **8** ao de seu precursor observa-se a presença de um sinal a mais de carbono hidrogenado próximo a região de 127ppm, indicando o deslocamento dos sinais de C-13' e C-15' para essa região. A proximidade entre os três sinais observados nessa região do espectro (δ 127,5, δ 127,4 e δ 127,3) dificulta a sua atribuição inequívoca.

4.2.7 Produtos secundários obtidos nas síntese de 2, 7 e 8: N-benzil-4-(metoxicarbonil)benzamida (27), 1,3-bis(1-naftiloxi)-2-[(4-metoxicarbonil)benzoil]amino}propano (28) e 1,3-bis(2-naftiloxi)-2-[(4-metoxicarbonil)benzoil]amino}propano (29)

Conforme discutido, anteriormente, as reações para obtenção das amidinas levam a formação de um sub-produto, um éster metílico, por reação da metoximina intermediária com água. Apesar das tentativas de se manter o meio reacional livre de umidade e assim evitar a formação desse sub-produto indesejado, em todas as reações ocorreu formação dos ésteres. Esses compostos foram isolados, purificados e devidamente caracterizados.

No espectro de RMN de ^1H de **27** (Figura A.67) observa-se um simpleto, em δ 3,92, com integral de três hidrogênios, referentes aos hidrogênios metílicos.

A obtenção desse subproduto foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT 135 (Figuras A.68 e A.69), que possibilitou a atribuição do sinal em $\delta 52,4$, referente ao carbono metílico, e de dois sinais de carbono carbonílico ($\delta 166,5$ e $\delta 166,2$).

O espectro de RMN de ^1H de **28** (Figura A.70) apresenta, além de outros sinais, um simpleto em $\delta 3,92$, com integral de três hidrogênios, referente aos hidrogênios metílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A.71) observam-se dois sinais referentes a carbono carbonílico ($\delta 166,6$ e $\delta 166,1$), o que confirma a obtenção de um derivado éster. Um sinal em $\delta 52,4$ foi atribuído ao carbono metílico.

No espectro de RMN de ^1H de **29** (Figura A.73) observa-se um simpleto em $\delta 3,93$, correspondente aos hidrogênios metílicos.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura A.74) observa-se, além de outros sinais, dois sinais referentes a carbono carbonílico ($\delta 166,6$ e $\delta 166,2$) e um sinal em $\delta 52,4$, atribuído ao carbono metílico.

4.2.8 Tentativa de síntese de N-(4-nitrofenil)-4-cianobenzamida (1)

Para obtenção do derivado **1** empregou-se, inicialmente o método descrito por Pinner (BAY *et al.*, 1955). A baixa solubilidade da p-nitroanilina em solventes orgânicos dificultou a execução da técnica e exigiu que diferentes solventes fossem testados na tentativa de se estabelecer uma condição adequada para a obtenção de **1**. Na Tabela 39 são especificadas as diferentes condições empregadas na tentativa de obtenção da amidina **1**.

Tabela 39 - Condições empregadas na tentativa de obtenção de 1, pelo método de Pinner.

Condição	Massa de 12 utilizada	Volume de CH ₃ OH	Solvente
1	100mg (0,37mmol)	7mL (0,17 mol)	-
2	100mg (0,37mmol)	5mL (0,13 mol)	3 mL THF anidro
3	100mg (0,37mmol)	3mL (0,074 mol)	2,5 mL de DMF anidra
4	100mg (0,37mmol)	3mL (0,074 mol)	3 mL de DMSO

O material de partida permaneceu insolúvel quando metanol e THF foram utilizados como solvente. Quando se utilizou DMSO ou DMF observou-se a solubilização do derivado **12**, inicialmente. Contudo, ao se borbular o cloreto de hidrogênio ocorreu a precipitação do material de partida. Em todas as tentativas realizadas obteve-se apenas a nitrila **12** recuperada.

A tentativa de obtenção do derivado **1** por catálise básica foi então realizada. Nesse método sódio metálico é dissolvido em metanol anidro para formação de metóxido de sódio. O ataque do metóxido ao carbono eletrofílico do grupo nitrila leva à obtenção da metoximina intermediária. Esta é tratada com cloreto de amônio para gerar a amidina.

A análise do espectro de RMN de ¹H do produto obtido nessa reação permitiu identificá-lo como sendo o produto de hidrólise de **12**, a *p*-nitroanilina. No espectro de RMN de ¹H (Figura A.76) observa-se a presença de um duplete em δ7,94 (*J* 8,2Hz), com integral de dois hidrogênios, atribuídos aos hidrogênios *orto* ao grupo nitro (H-2 e H-6), um simpleto em δ6,72 atribuído aos hidrogênios do grupo amino e um duplete em δ6,59 (*J* 8,2Hz), atribuído aos hidrogênios *orto* ao grupo amino (H-3 e H-5)

No espectro de RMN de ¹³C (Figura A.77) observam-se os seguintes sinais: em δ156,0 o sinal de C-4, em δ135,9 o sinal de C-1, em δ126,7 o sinal de C-2 e C-6 e em δ112,7 o sinal de C-3 e C-5. A atribuição desses sinais foi feita com base nos valores de deslocamentos químicos tabelados encontrados para a *p*-nitroanilina.

CONCLUSÃO

Neste trabalho realizou-se o estudo por modelagem molecular de um conjunto de dez potenciais inibidores de serino proteases. A partir dos resultados obtidos com o *docking* concluiu-se que os compostos **7** e **8** possuíam maior afinidade pela tripsina bovina, enzima que foi usada como modelo nesse estudo.

A partir disso foi proposta a síntese de **7** e **8**. Os compostos **1** e **2** também foram escolhidos para síntese por serem aqueles que apresentaram os menores valores de pK_i , no estudo de *docking*. Sua escolha foi baseada na necessidade de se validar o método computacional empregado.

Ao longo da síntese foram obtidos quinze compostos, sendo dez inéditos (as benzamidas **7** e **8** e os intermediários **17- 20** e **23- 26**)

As benzamidas **2**, **7** e **8** foram obtidas com sucesso, empregando-se o método descrito por Pinner, com rendimentos de 25,4%, 22,4% e 49,7%, respectivamente. As tentativas de síntese da amidina **1** levaram à recuperação do material de partida ou ao seu produto de hidrólise, a *p*-nitroanilina.

As benzamidas **2**, **7** e **8** estão sendo submetidos a testes de atividade enzimática, frente à β -tripsina bovina, pela aluna de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do ICB-UFMG, Thais Santos de Castro, no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, sob a orientação do Prof. Marcelo Matos Santoro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADANG, A. E. P.; LUCAS, H.; MAN, A. P. A.; ENGH, R. A.; GROOTENHUIS, P. D. J. Novel acyl guanidine containing trombin inhibitors with reduced basicity at the P1 moiety. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 1998, 8, 3603-3608.

ANTMAN, E. M.; McCABE, C. H.; BRAUNWALD, E. Bivalirudin as a replacement for unfractionated heparin in unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: Observations from the TIMI 8 trial. **American Heart Journal**. 2002, 143, 229-234.

ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. **Purification of laboratory chemicals**. 4. ed. Boston: Butterworth Heinemann. 1996, 529p.

BATES, S. M.; WEITZ, J. I. Direct Thrombin Inhibitors for Treatment of Arterial Thrombosis: Potential Differences Between Bivalirudin and Hirudin. **The American Journal of Cardiology**. 1998, 82, 12P-18P.

BAUER, K. A. New Anticoagulants: Anti IIa vs Anti Xa—Is One Better? **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. 2006, 21(1), 67-72.

BAY, P. G.; OLE, G. The Synthesis of Some 4-Carbobenzoxy-3-alkoxy Benzamidine Hydrochlorides and Other Amidines. **Journal of the American Pharmacists Association**. 1955, 44, 585-591.

BLOW, D. M. The tortuous story of Asp...His...Ser: Structural analysis of α -chymotrypsin. **Trends in Biochemical Sciences**. 1997, 22, 405-408.

BORGOÑO, C. A.; DIAMANDIS, E.P. The Emerging Roles Of Human Tissue Kallikreins In Cancer. **Nature**. 2004, 4, 876-890.

CHOSE, A.R.; PRITCHETT, A.; CRIPPEN, G.M.; Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: Modeling hydrophobic interactions. **Journal of Computational Chemistry**. 1987, 9 (1), 80-90.

CROSS, S. S. J. Improved FlexX docking using FlexX-determined base fragment placement. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2005, 45, 993-1001.

CORTE, J. R.; FANG, T.; PINTO, D. J. P.; HAN, W.; HU, Z.; JIANG, X.; LI, Y. L.; GAUUAN, J. F.; HADDEN, M.; ORTON, D.; RENDINA, A. R.; LUETTGEN, J. M.; WONG, P. C.; HE, K.;

MORRIN, P. E.; CHANG, C. H.; CHENEY, D. L.; KNABB, R. M.; WEXLER, R. R.; LAMA, P. Y. S. Structure-activity relationships of anthranilamide-based factor Xa inhibitors containing piperidinone and pyridinone P4 moieties. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 2008, 18, 2845-2849.

COUPEZ, B.; LEWIS, R. A. Docking and Scoring-Theoretically Easy, Practically Impossible? **Current Medicinal Chemistry**. 2006, 13, 2995-3003.

DABAK, K. Synthesis and protection of some amidines. **Turkish Journal of Chemistry**. 2002, 26, 547-550.

DODSON, G.; WLODAWR, A. Catalytic triads and their relatives. **Trends in Biochemical Sciences**. 1998, 23, 347-352.

DULLWEBER, F.; STUBBS, M. T.; MUSIL, D.; STURZEBECKER, J.; KLEBE, G. Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. **Journal of Molecular Biology**. 2001, 313, 593-614.

ERICKSON, J. A.; JALAIE, M.; ROBERTSON, D. H.; LEWIS, R. A.; VIETH, M. Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2004, 47, 45-55.

ERIKSSON, B. I.; DAHL, O. E.; ROSENCHER, N.; KURTH, A. A.; VAN DIJK, C. N.; FROSTICK, S. P.; PRINS, M. H.; HETTIARACHCHI, R.; HANTEL, S.; SCHNEE, J.; BÜLLER, H. R. Dabigatran etexilate versus enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip replacement: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. **Lancet**. 2007, 370, 349-356.

GIL, V. M. S.; GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear- fundamentos, métodos e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1003p.

GRIFFIN, J. H.; COCHRANE, C. G. Mechanisms for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**. 1976, 76, 2554-2558.

GUSTAFSSON, D.; NYSTRÖM, J. E.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K. J.; UNGELL, A. L.; SÖRENSEN, H.; NÅGÅRD, S.; ABRAHAMSSON, A.; BYLUND, R. The Direct Thrombin Inhibitor Melagatran and Its Oral Prodrug H 376/95: Intestinal Absorption Properties, Biochemical and Pharmacodynamic Effects. **Trombosis Research**. 2007, 101, 171-181.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014p.

JANIN, S.; MENEVEAU, N.; MAHEMUTI, A.; DESCOSTES-GENON, V.; DUTHEIL, J.; CHOPARD, R.; SERONDE, M. F.; SCHIELE, F.; BERNARD, Y.; BASSAND, J. P. Safety and efficacy of fondaparinux as an adjunctive treatment to thrombolysis in patients with high and intermediate risk pulmonary embolism. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**. 2008.

JONES, G.; WILLET, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. **Journal of Molecular Biology**. 1997, 267, 727-748.

HE, S.; GAÇA, M. D. A.; WALLS, A. F. A Role for Tryptase in the Activation of Human Mast Cells: Modulation of Histamine Release by Tryptase and Inhibitors of Tryptase. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**. 1998, 286, 289-297.

HEDSTROM, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. **Chemical Reviews**. 2002, 102, 4501-4523.

KAISER, C.; JEN, T.; GARVEY, E.; BOWEN, W. D. Adrenergic Agents. 4. Substituted Phenoxypropanolamine Derivatives as Potential β -Adrenergic Agonists. **Journal of Medicinal Chemistry**. 1977, 20 (5), 687-689.

LANGE, U. E. W.; SCHAFFER, B.; BAUCKE, D.; BUSCHMAN, E.; MACK, H. A new mild methods for the synthesis of amidines. **Tetrahedron Letters**. 1999, 40, 7067-7071.

LASSEN, M. R.; DAVIDSON, B. L.; GALLUS, A.; PINEO, G.; ANSELL, J.; DEITCHMAN, D. The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 2007, 5, 2368-2375.

LEE, S. L.; ALEXANDER, R. S.; SMALLWOOD, A.; TRIEVEL, R.; MERSINGER, L.; WEBER, P. C.; KETTNER, C. New Inhibitors of Thrombin and Other Trypsin-like Proteases: Hydrogen Bonding of an Aromatic Cyano Group with a Backbone Amide of the P1 Binding Site Replaces Binding of a Basic Side Chain. **Biochemistry**. 1997, 36, 13180-13186.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advance Drug Delivery Reviews**. 1997, 23, 3-25.

LIEBESCHUETZ, J.; JONES, S. D.; MORGAN, P. J.; MURRAY, C. W.; RIMMER, A. D.; ROSCOE, J. M. E.; WASZKOWYCZ, P. M. W.; WYLIE, W. A.; MARTIN, Y. H.; MARLER, J.; BRADY, L.; WILKINSON, K. PRO_SELECT: Combining Structure-Based Drug Design and Array-Based Chemistry for Rapid Lead Discovery. 2. The Development of a Series of Highly Potent and Selective Factor Xa Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2002, 45, 1221-1232.

MAGALHÃES, C. S.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. E. A genetic algorithm for the ligand-protein docking problem. **Genetics and Molecular Biology**. 2004, 27, 605-610.

MARKWARDT, F.; LANDMAN, H.; WALSMAN, P. Comparative studies on the inhibition of trypsin, plasmin and trombin by derivatives of benzylamine and benzamidine. **European Journal of Biochemistry**. 1968, 6, 502-506.

MARYANOFF, B.. Inhibitors of Serine Proteases as Potential Therapeutic Agents: The Road from Thrombin to Trypsin to Cathepsin G. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2004, 47, 769-787.

McCOWN, M. F.; RAJYAGURU, S.; LE POGAM, S.; ALI, S.; JIANG, W. R.; KANG, H.; SYMONS, J.; CAMMACK, N.; NAJERA, I. The Hepatitis C Virus Replicon Presents a Higher Barrier to Resistance to Nucleoside Analogs than to Nonnucleoside Polymerase or Protease Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008, 25, 1604-1612.

MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N. J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The Kallikrein-Kinin System: Current and Future Pharmacological Targets. **Journal of Pharmacological Sciences**. 2005, 99, 6-38.

MORRIS, G. M., GOODSSELL, D. S., HALLIDAY, R. S., HUEY, R.; HART, W. E., BELEW, R. K., OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**. 1998, 19, 1639-1662.

OH, S. W.; PAE, C. I.; LEE, D.K.; JONES, F.; CHIANG, G. K. S.; KIM, H. O.; MOON, S. H.; CAO, B.; OGBU, C.; JEONG, K. W.; KOZU, G.; NAKANISHI, H.; KAHN, M.; CHI, E. Y.; HENDERSON, W. R. Tryptase Inhibition Blocks Airway Inflammation in a Mouse Asthma Model. **The Journal of Immunology**. 2002, 168, 1992-2000.

PEREIRA M. T.; SILVA-ALVES, J. M.; MARTINS-JOSE, A.; LOPES, L. C. D.; SANTORO, M. M. Thermodynamic evaluation and modeling of proton and water exchange associated with benzamidine and berenil binding to β -trypsin. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**. 2005, 38, 1593-1601.

PERONA, J. J.; CRAIK, C.S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**. 1995, 4, 337-360.

PRETSCH, E.; CLERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1989.

RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, GERHARD. A Fast Flexible Docking Method using an Incremental Construction Algorithm. **Journal of Molecular Biology**. 1996, 261, 470-489.

SAGI, K.; NAKAGAWA, T.; YAMANASHI, M.; MAKINO, S.; TAKAHASHI, M.; TAKAYANAGI, M.; TAKENAKA, K.; SUZUKI, N.; OONO, S.; KATAOKA, N.; ISHIKAWA, K.; SHIMA, S.; FUKUDA, Y.; KAYAHARA, T.; TAKEHANA, S.; SHIMA, Y.; TASHIRO, K.; YAMAMOTO, H.; YOSHIMOTO, R.; IWATA, S.; TSUJI, T.; SAKURAI, K.; SHOJI, M. Rational Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Novel Factor Xa Inhibitors: (2-Substituted-4-amidinophenyl)pyruvic and -propionic Acids. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2003, 46, 1845-1857.

SATO, K.; TANIUCHI, Y.; KAWASAKI, T.; HIRAYAMA, F.; KOSHIO, H.; MATSUMOTO, Y.; LIZUMI, Y. Comparison of the anticoagulant and antithrombotic effects of YM-75466, a novel orally-active factor Xa inhibitor, and warfarin in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**. 1998, 2, 191-7.

SCHMIDT, A. E.; SUN, M.; OGAWA, T.; BAJAJ, S. P.; GAILANI, D. Functional Role of Residue 193 (Chymotrypsin Numbering) in Serine Proteases: Influence of Side Chain Length and β -Branching on the Catalytic Activity of Blood Coagulation Factor Xa. **Biochemistry**. 2008, 47, 1326, 1335.

SCHULMAN, S.; WÄHLANDER, K.; LUNDSTRÖM, T.; CLASON, S. B.; ERIKSSON, H. Secondary Prevention of Venous Thromboembolism with the Oral Direct Thrombin Inhibitor Ximelagatran. **The New England Journal of Medicine**. 2003, 349, 1713-21.

SHRINNER, R.L.; NEUMANN, F.W. The chemistry of the amidines. 1944.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2007. 490p.

SLOBODANKA, S. J.; MISIC-VUKOVIC, M. M. ; DJOKOVIC, D. D.; BAJIC, D. S. Phase-transfer catalysis in the alkylation reaction of α -naphthol with epichlorohydrin. **Journal of Molecular Catalysis**. 1992, 73, 9-16.

SOLOMONS, T. W. C.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2005-2006.

SPYRAKIS, F.; AMADASI, A.; FORNABAIO, M.; ABRAHAM, D. J.; MOZZARELLI, A.; KELLOGG, G. E.; COZZINI, P. The consequences of scoring docked ligand conformations using free energy correlations. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 2007, 42, 921-933.

STONE, G. W.; MCLAURIN, B. T.; COX, D. A.; BERTRAND, M. E., LINCOFF, A. M.; MOSES, J. W.; WHITE, H. D; POCOCK, S. J.; WARE, J.; FEIT, F.; COLOMBO, A.; AYLWARD, P. E.; CEQUIER, A. R.; DARIUS, H.; DESMET, W.; EBRAHIMI, R.; HAMON, M.; RASMUSSEN, L. H.; RUPPRECHT, H. J.; HOEKSTRA, J.; MEHRAN, R.; OHMAN, M. Bivalirudin for Patients with Acute Coronary Syndromes. **The New England Journal of Medicine**. 2006, 355, 2203-16.

STOOP, A. A.; CRAIK, CS. Engineering of a macromolecular scaffold to develop specific protease inhibitors. **Nature Biotechnology**. 2003, 21(9), 1063-1068.

STUBBS, M. T., HUBER, R., BODE, W. Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. **FEBS Lett**. 1995, 375, 103-107.

TANAKA, A.; SAKAI, H.; ISHIKAWA, T.; AOKI, T.; MOTOYAMA, Y.; TAKASUGI, H. Design, synthesis and evaluation of orally active fibrinogen inhibitors. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 1997, 7, 521-526.

TANG, J., YU, C. L., WILLIAMS, S. R., SPRINGMAN, E., JEFFERY, D., SPRENGELER, P. A., ESTEVEZ, A., SAMPANG, J., SHRADER, W., SPENCER, J., YOUNG, W., McGRATH, M., KATZ, B. A. Expression, Crystallization, and Three-dimensional Structure of the Catalytic Domain of Human Plasma Kallikrein. **Journal of Biological Chemistry**. 2005, 280, 41077-41089.

TERAMOTO, R.; FURUKUNISHI, H. Supervised Consensus Scoring for Docking and Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**. 2007, 47, 526-534.

THOMSEN, R. Flexible ligand docking using evolutionary algorithms: investigating the effects of variation operators and local search hybrids. **Biosystems**. 2003, 72, 57-73.

TURPIE, A. G. G. Selective factor Xa inhibition with fondaparinux: from concept to clinical benefit. **European Heart Journal**. 2008, 10, C1-C7.

VENKATRAMAN, S.; WU, W.; PRONGAY, A.; GIRIJAVALLABHAN, V.; NJOROGE, F. G.

Potent inhibitors of HCV-NS3 protease derived from boronic acids. **Biorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 2008.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2 ed. Ontario: John Wiley and Sons. 1995.1359 p.

WANG, R.; LU, Y.; WANG, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2003, 46(12), 2287-303.

WEITZ, J. I. Factor Xa or thrombin: Is thrombin a better target? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**.2007, 5, 65–67.

XUAN, Q.; YANG, X.; MO, L.; HUANG, F.; PANG, Y.; QIN, M.; CHEN, Z.; HE, M.; WANG, Q.; MO, Z. Expression of the Serine Protease Kallikrein 7 and Its Inhibitor Antileukoprotease Is Decreased in Prostate Cancer. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. 2008, 132, 1796-1801.

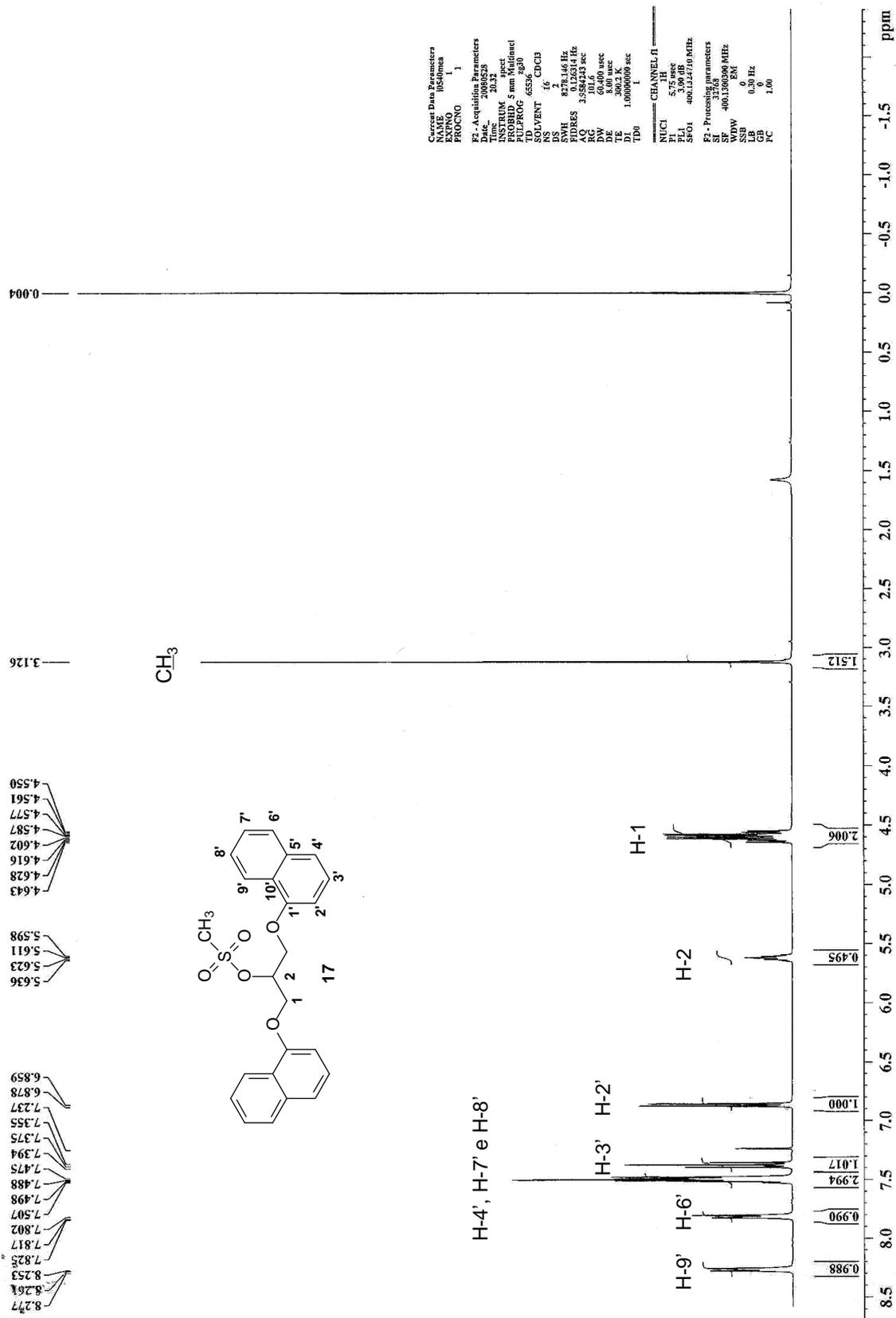


Figura A.1: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) de 17

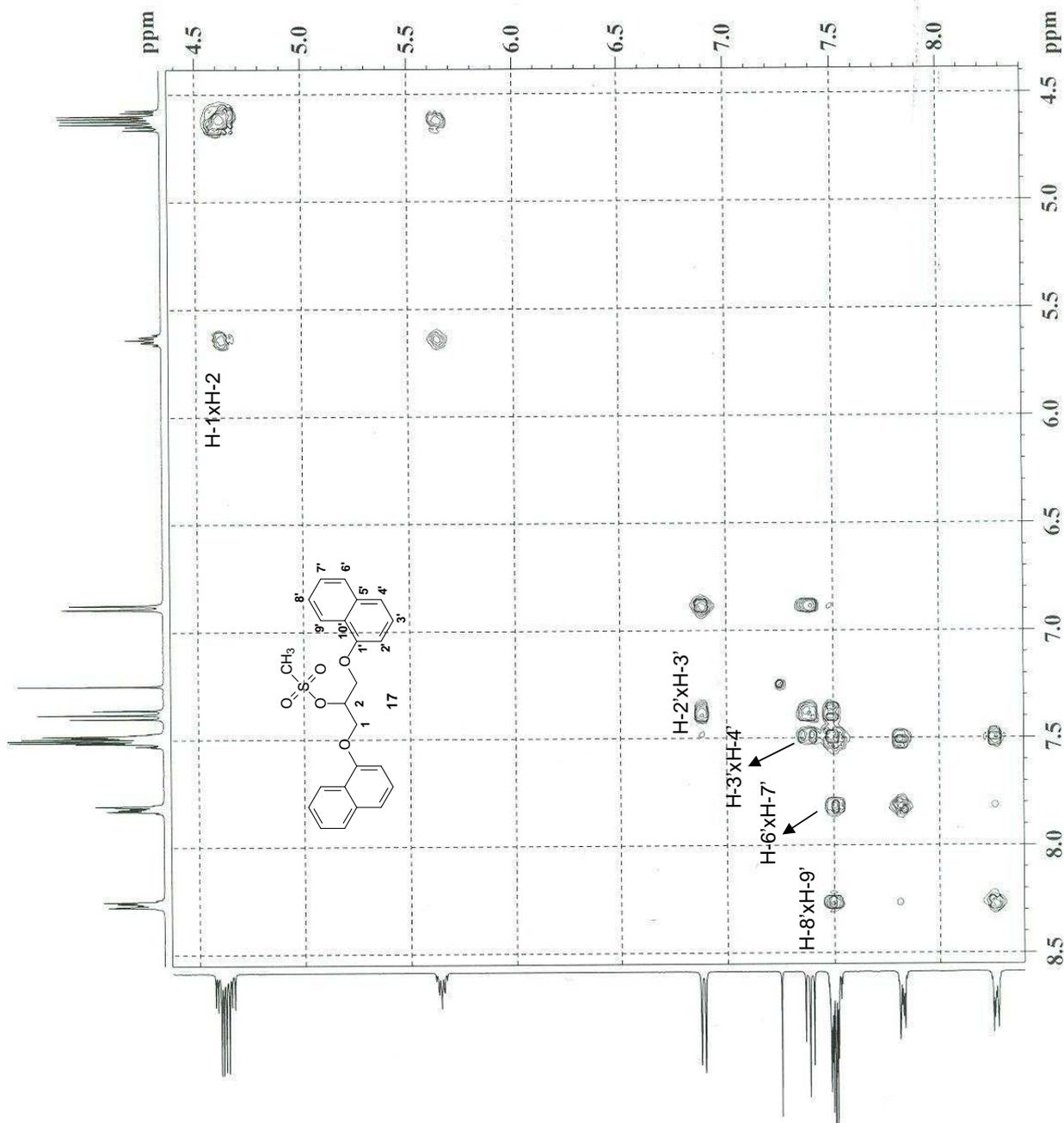


Figura A.2 Mapa de contornos COSY (400MHz, CDCl₃) de 17

```

Current Data Parameters
NAME      r0540MEA
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080503
Time      22.26
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         3072
DS         0
SWH        12562.814 Hz
FIDRES     0.383387 Hz
AQ         1.3042164 sec
RG         4096
DM         39.800 usec
DE         7.50 usec
TE         0.0 K
D1         2.00000000 sec
d11        0.03000000 sec
MCREST     0.00000000 sec
MCMARK     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       50.3282440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      70.00 usec
PL2        -2.00 dB
PL12       13.92 dB
PL13       120.00 dB
SFO2       200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         50.3227332 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

1D NMR plot parameters
CX         20.00 cm
CY         12.00 cm
F1P        164.668 ppm
F1         8266.52 Hz
F2P        -0.151 ppm
F2         -7.59 Hz
PNUC1M     6.24092 ppm/cm
HZCM       414.70663 Hz/cm
    
```

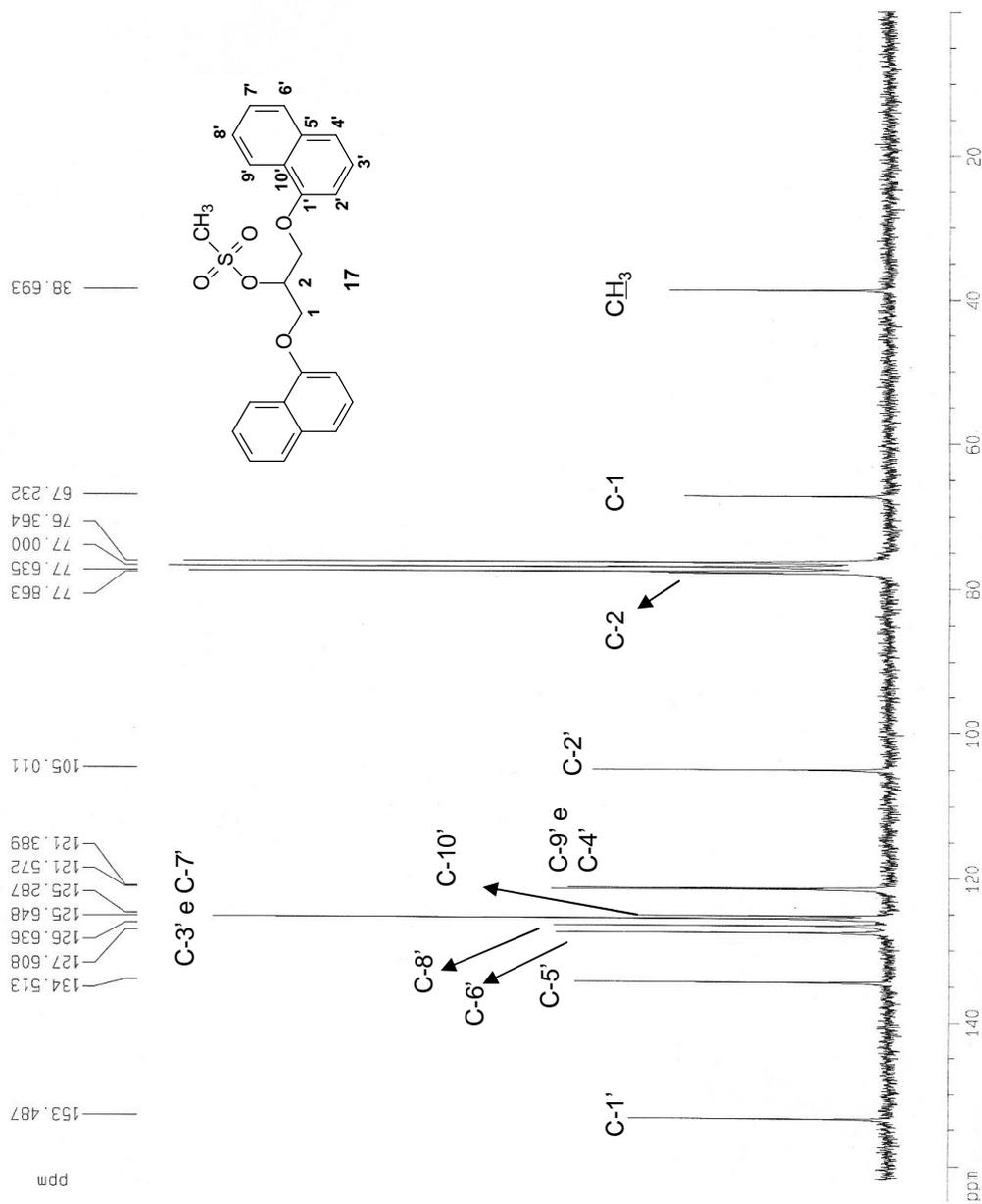


Figura A.3: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 17

```

Current Data Parameters
NAME      r0500MKA
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080923
Time     23:26
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Mu1.1.1
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        1024
DS        0
SFO1     11990.407 Hz
FIDRES   0.385918 Hz
AQ        1.3664956 sec
RG        0.0000000
DW        41.700 usec
DE        7.50 usec
TE        0.0 K
CNS12    145.0000000
D1        3.0000000 sec
d2        0.0034828 sec
d42       0.0002000 sec
DELTA    0.0001273 sec
XCFREST  0.0000000 sec
XCHIRK   0.01560000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1      13C
P1        10.00 usec
P2        20.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1     50.3277408 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
P3        11.20 usec
P4        22.40 usec
PCPD2    70.00 usec
PL2       -2.00 dB
PL12     13.92 dB
SFO2     200.1368005 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        50.3227331 MHz
MWDW     EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        6.00 cm
F1P       133.910 ppm
F1        67.3874 Hz
F2P       -0.536 ppm
F2        -26.88 Hz
PPMCM    6.72232 ppm/cm
HZCM     338.28571 Hz/cm
    
```

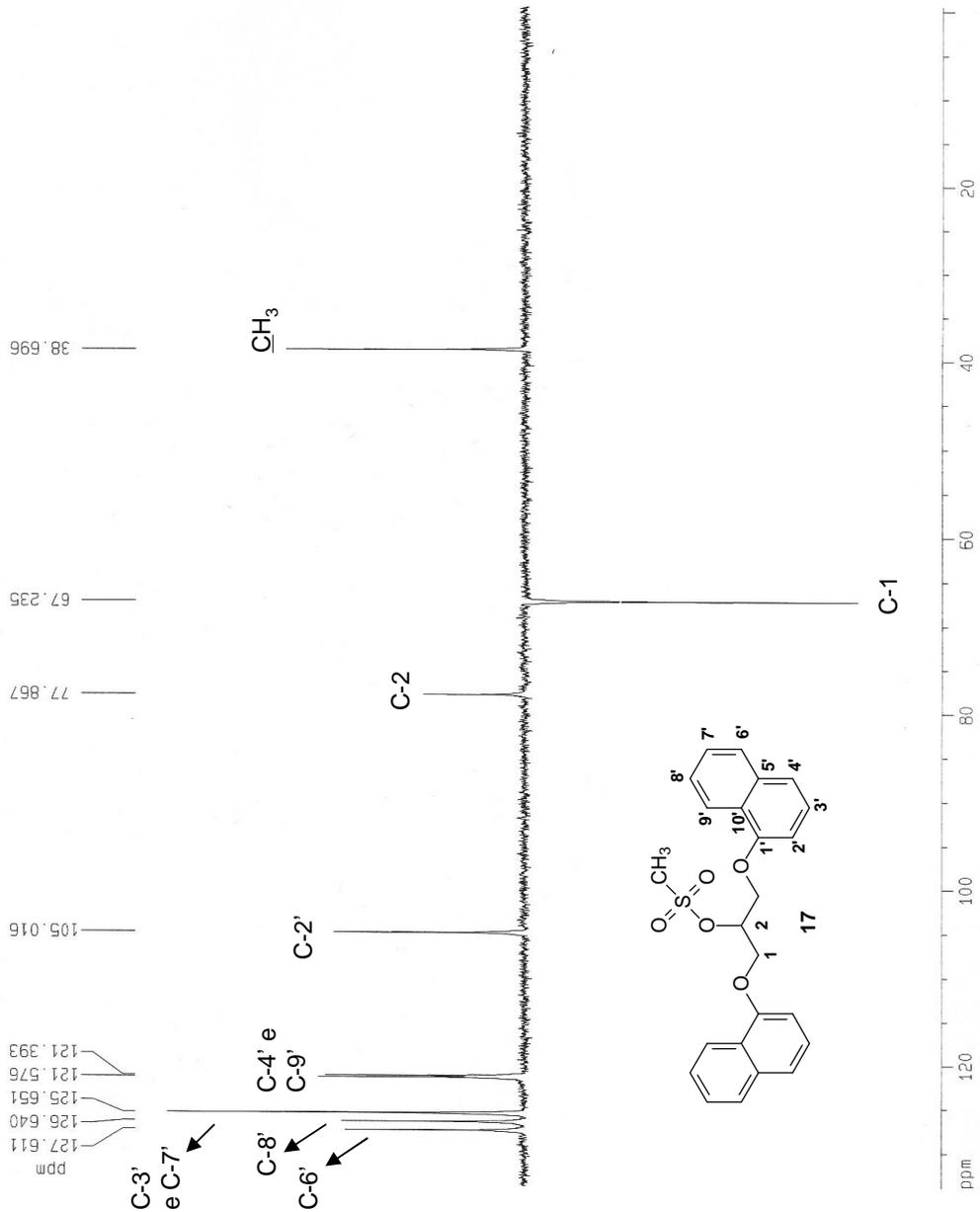


Figura A.4: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 17

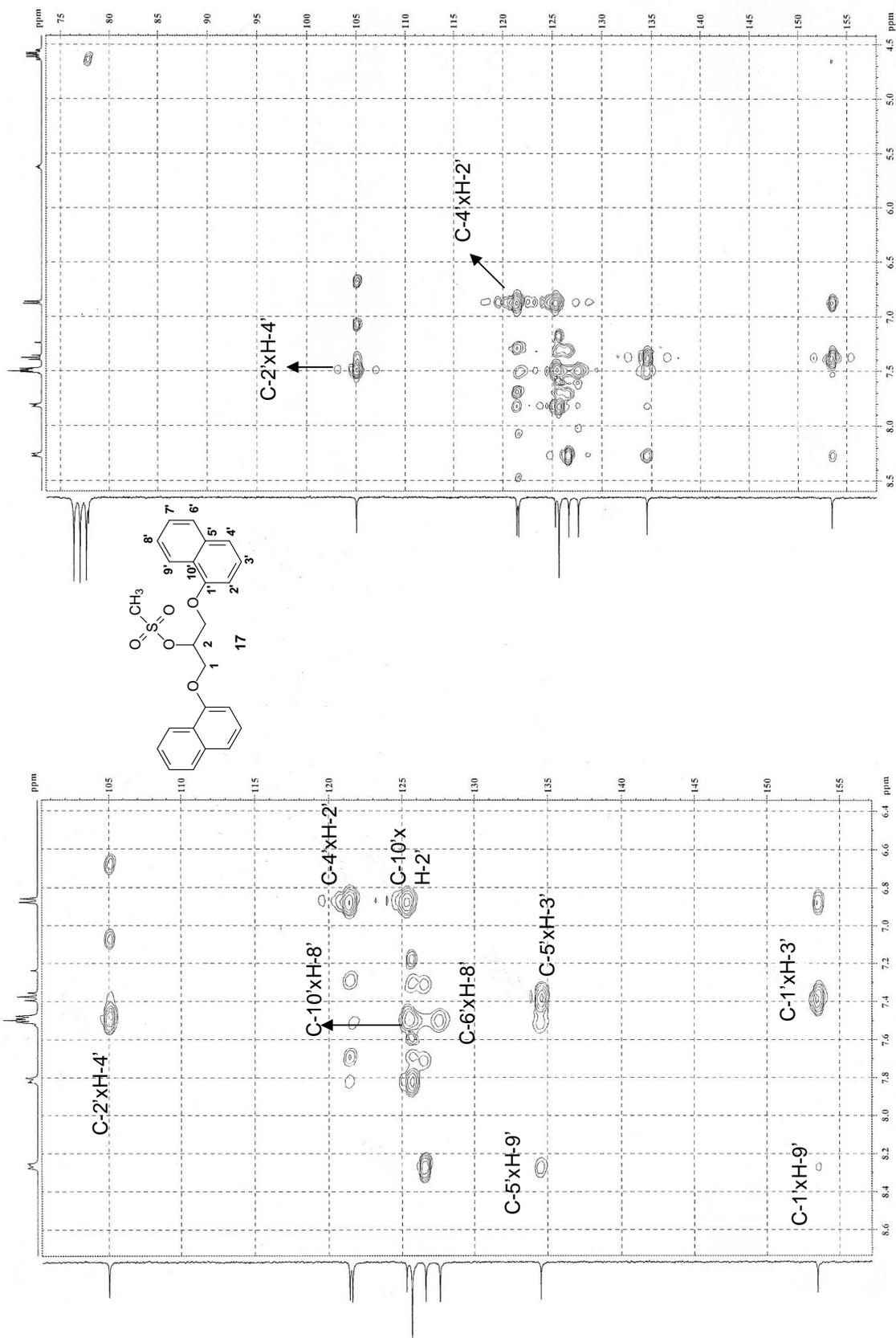


Figura A.6: Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl₃) de 17

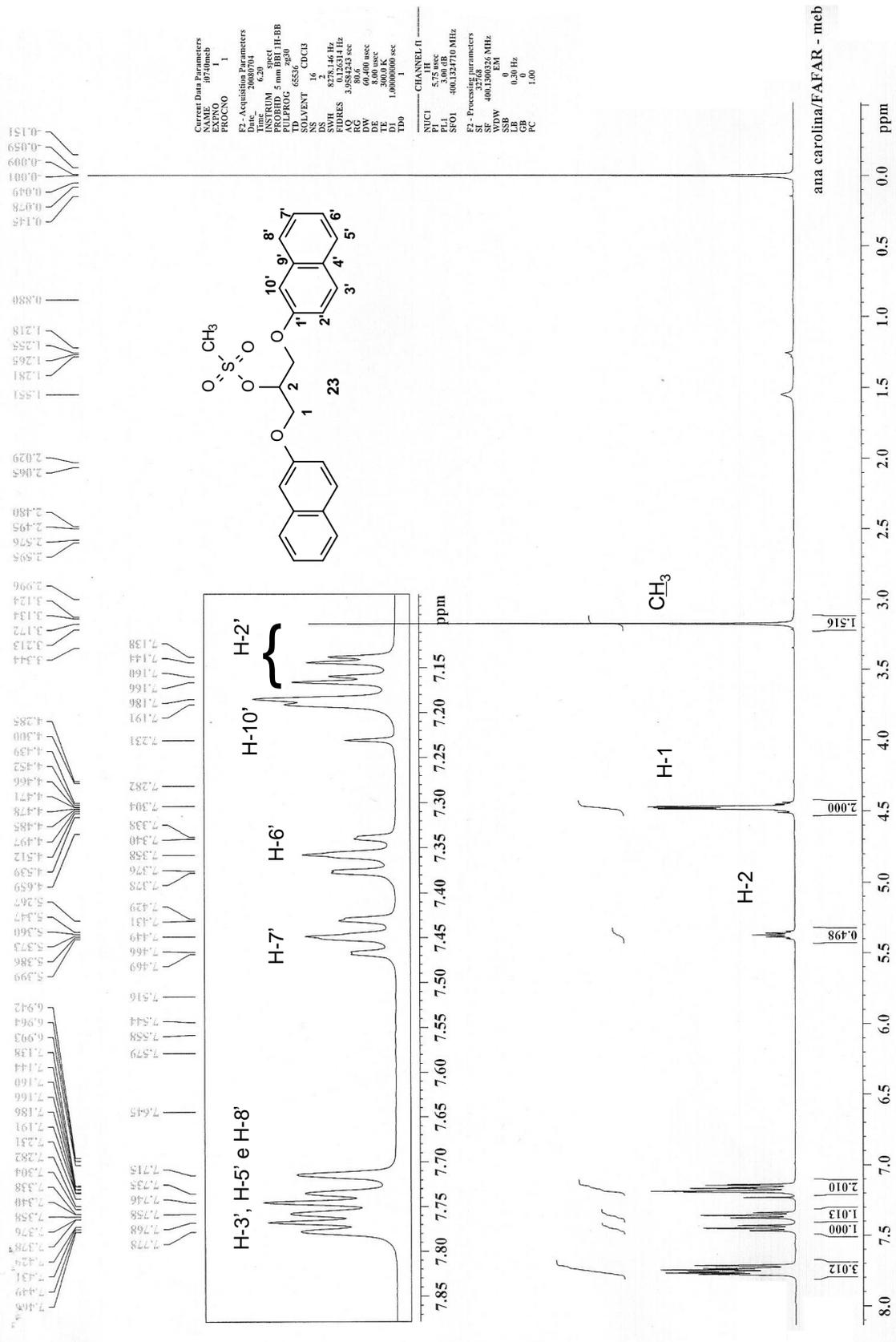


Figura A.7: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) de 23

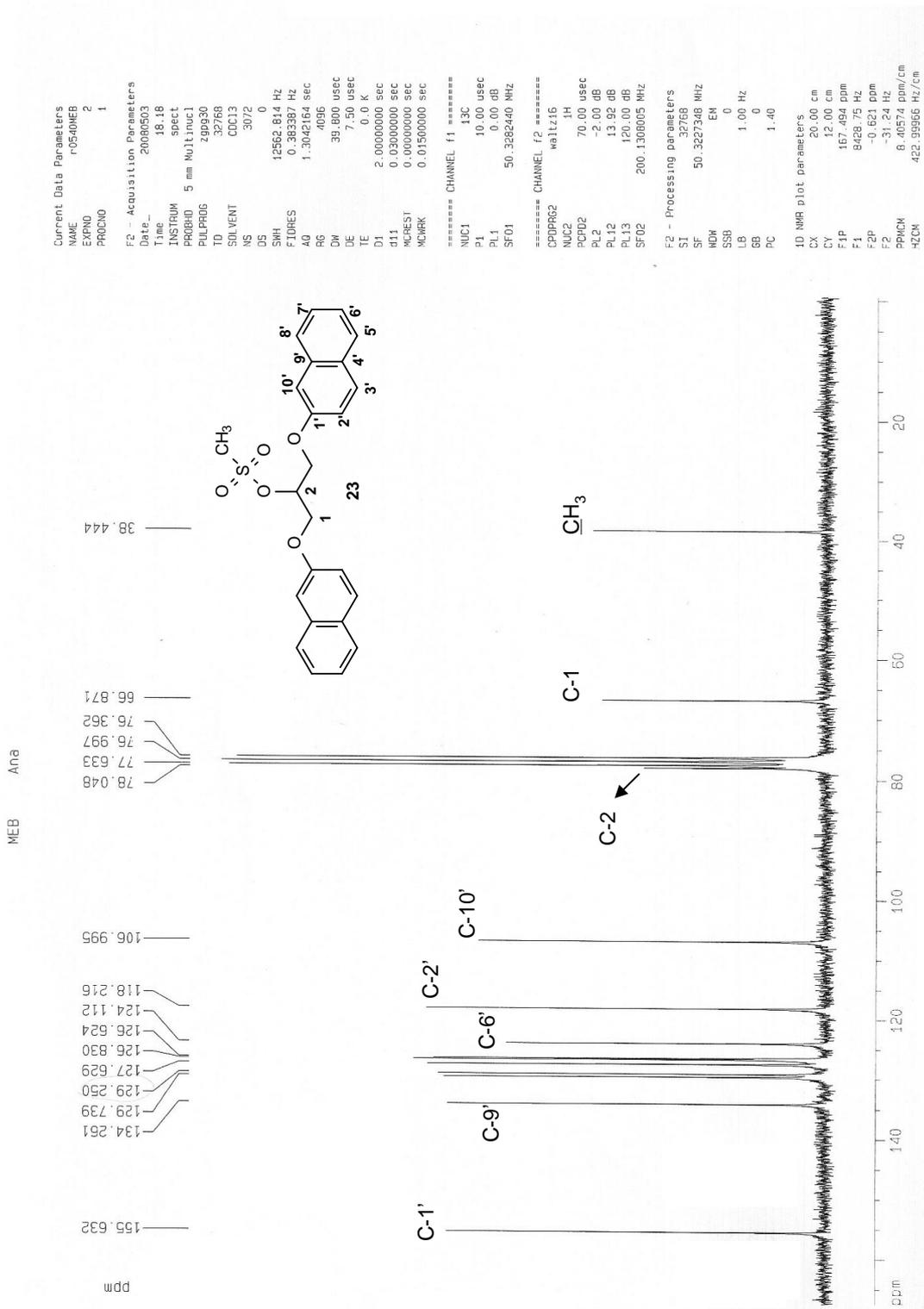


Figura A.8: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 23

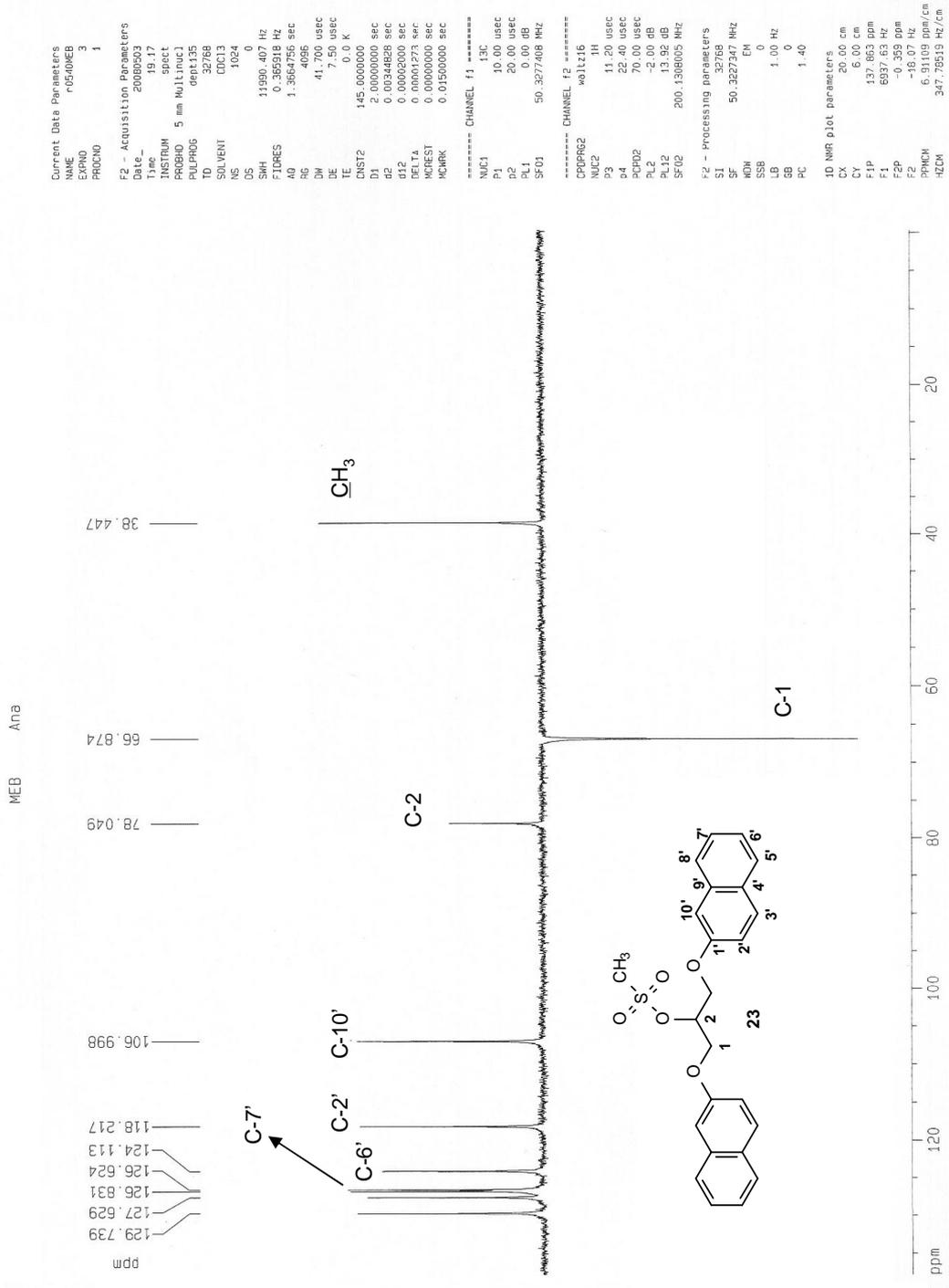


Figura A.9: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 23

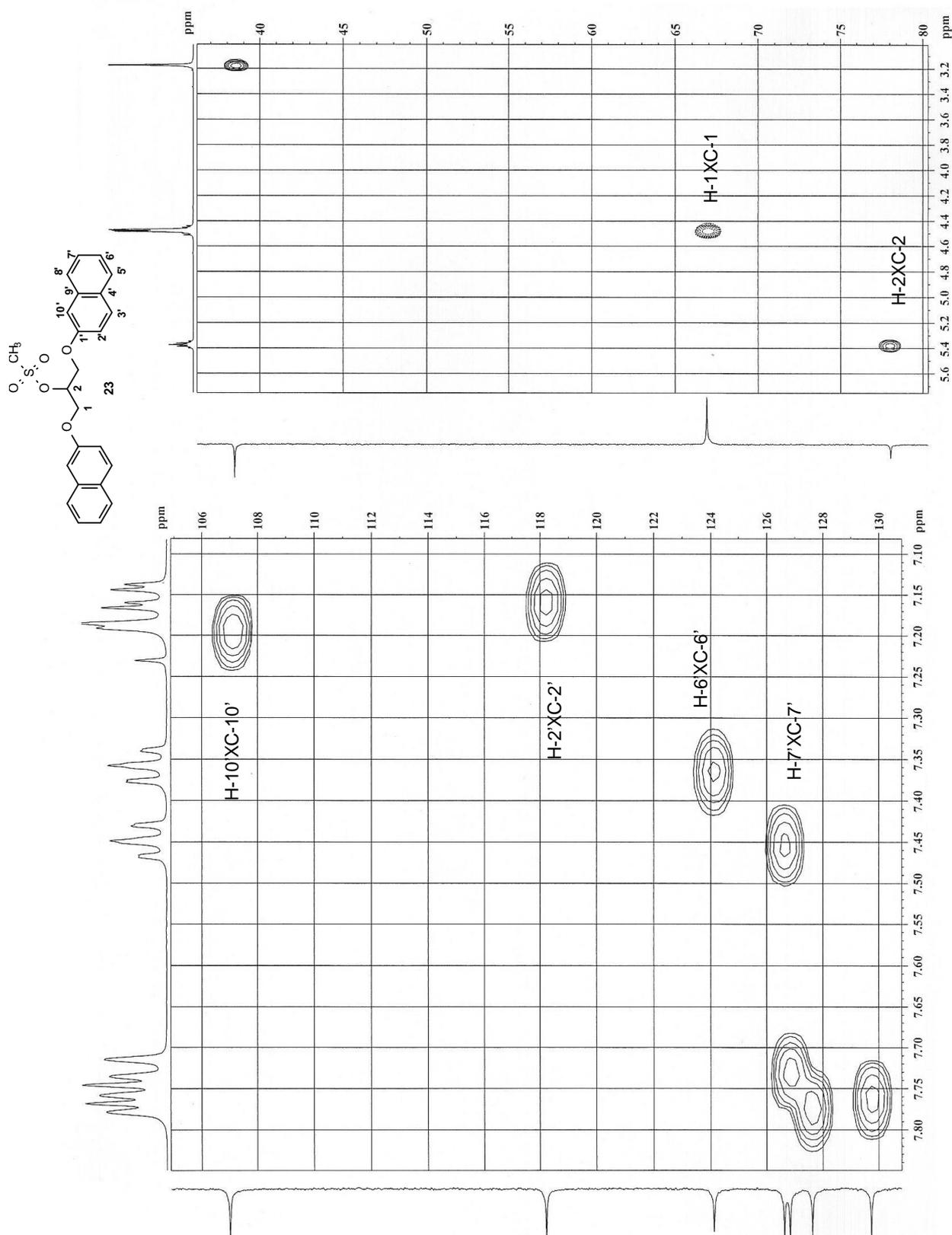


Figura A.10: Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 23

ana carouina/FAFAK - med

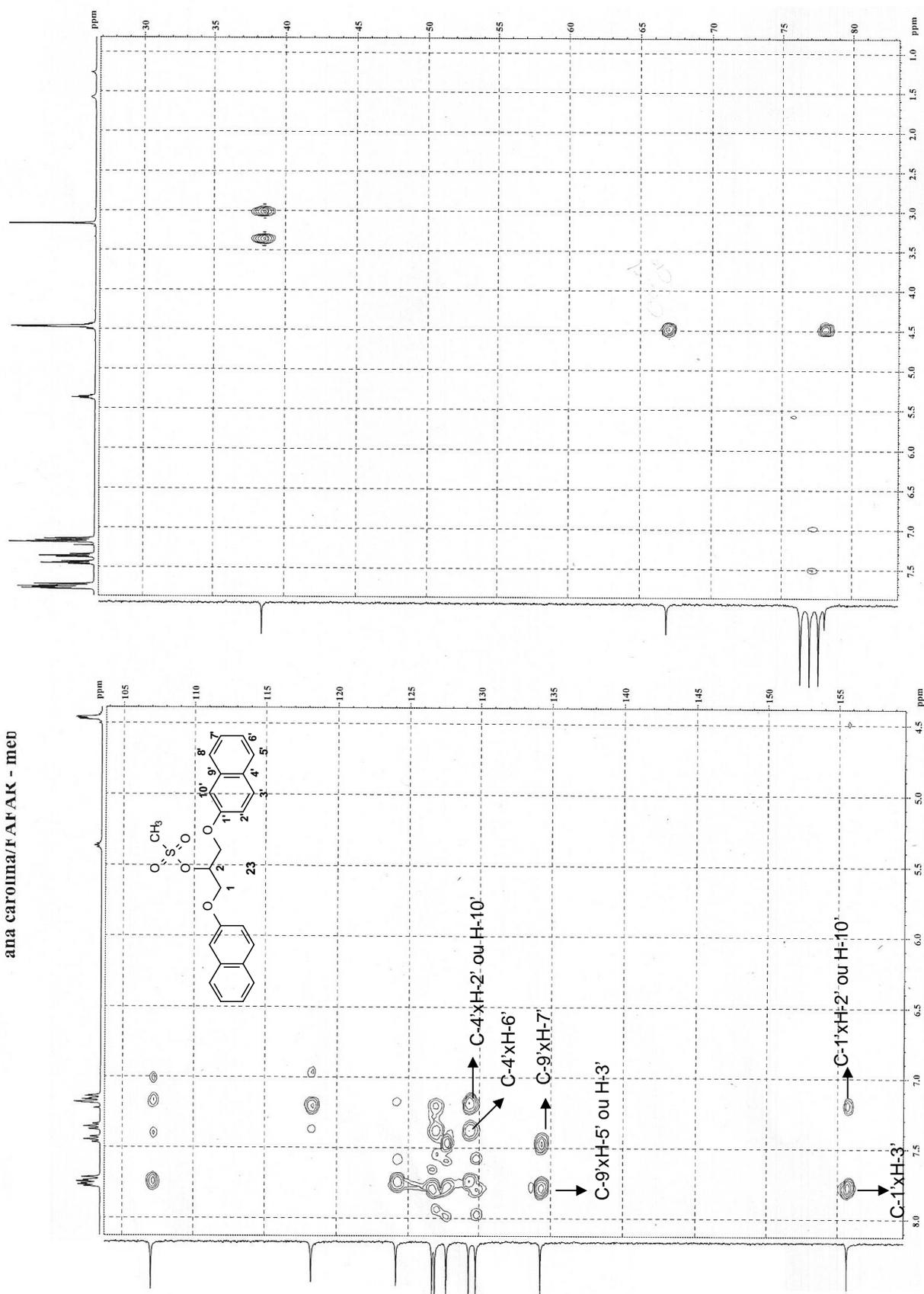


Figura A.11: Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl₃) de 23

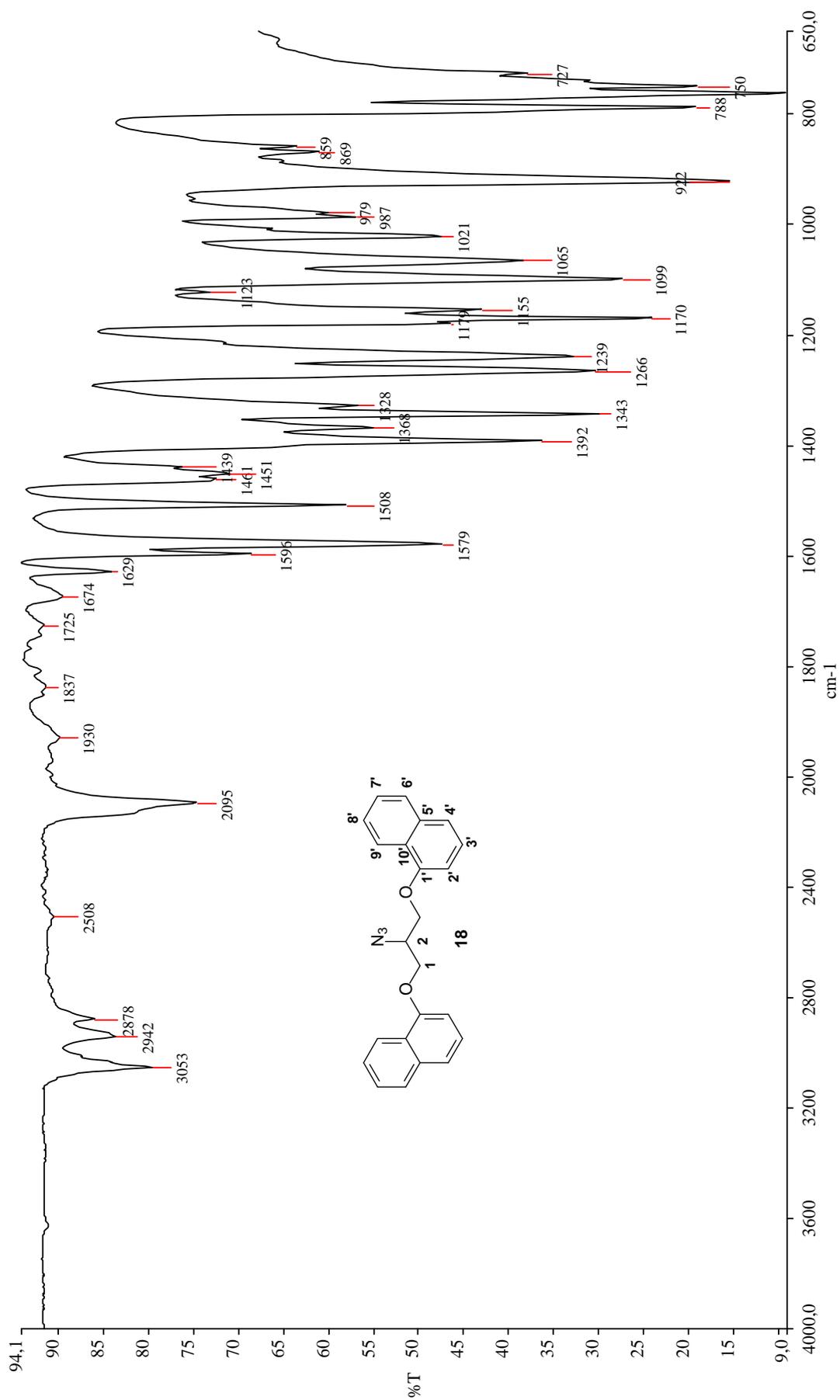


Figura A.12: Espectro no IV (ATR) de 18


```

Current Data Parameters
NAME      r0540A2A
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080303
Time      14.09
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         3072
DS         0
SMH        12562.814 Hz
FIDRES     0.393387 Hz
AQ         1.3042164 sec
RG          4096
DM         39.800 usec
DE         7.50 usec
TE         0.0 K
D1         2.0000000 sec
d11        0.0300000 sec
MCREST     0.0000000 sec
MCWRRK     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       50.3262440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2    waltz16
NUC2       1H
PCPD2      70.00 usec
PL2        -2.00 dB
PL12       13.92 dB
PL13       120.00 dB
SFO2       200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         50.3227332 MHz
WDW        EN
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

1D NMR plot parameters
CX         20.00 cm
CY         12.00 cm
F1P        169.502 ppm
F1         8529.82 Hz
F2P        -0.371 ppm
F2         -18.65 Hz
PPMCH      8.49354 ppm/cm
HZCM       427.42322 Hz/cm
    
```

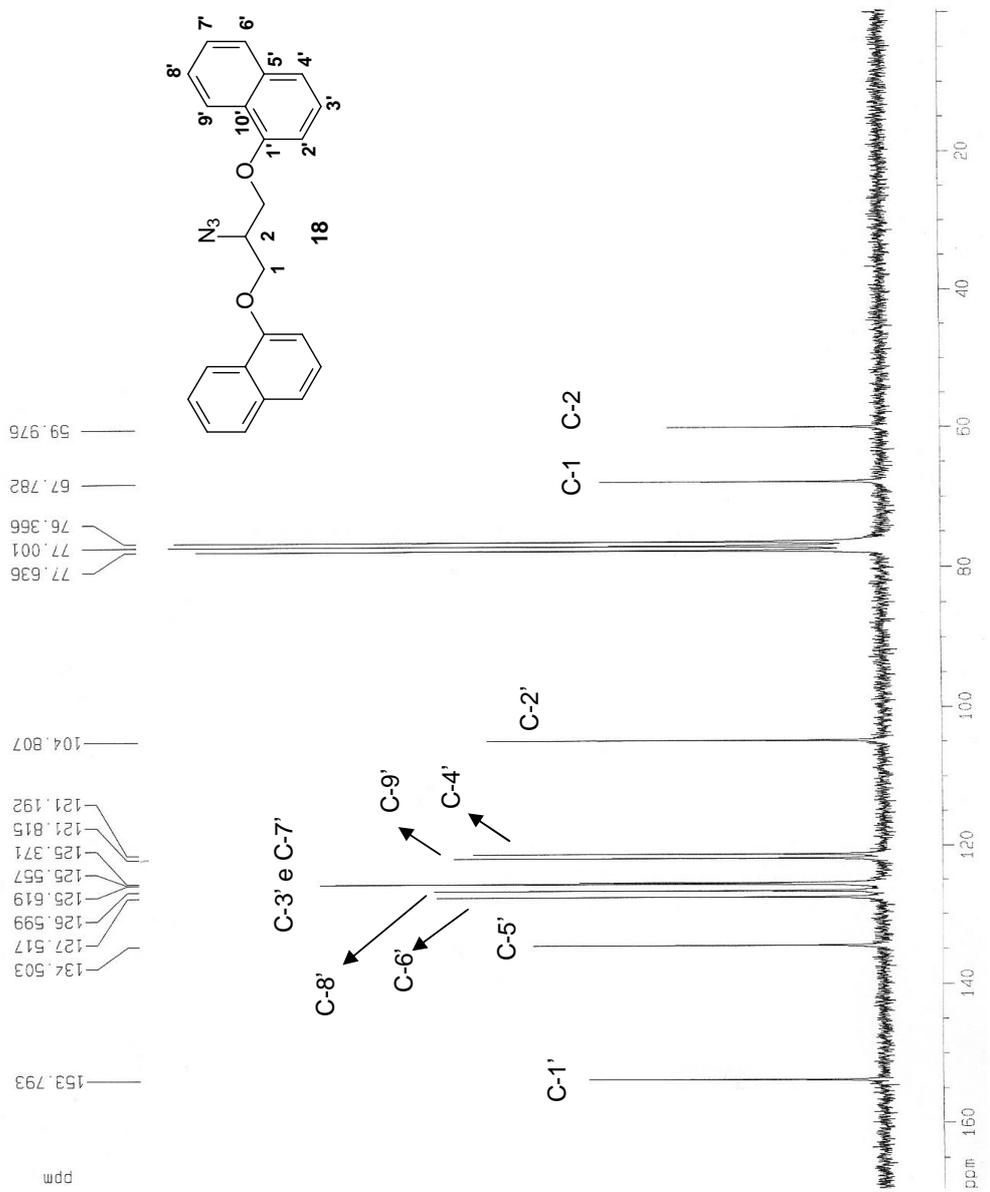


Figura A.14: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 18

```

Current Data Parameters
NAME          r0500AZA
EXPNO         3
PROCNO        1

F2 - Acquisition Parameters
Date_         20080503
Time          15:09
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm Multis1
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS           1024
DS            0
SWH           11990.407 Hz
FIDRES        0.365910 Hz
AQ            1.360736 sec
RG            4096
DE            41.700 usec
TE            7.50 usec
TE           0.1 K
DST12         145.0000000
S1            3
P1            2.0000000 sec
P2            0.00344828 sec
d12           0.0000000 sec
DELTA         0.0004273 sec
WCBEST        0.0000000 sec
WCHRRK        0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1          13C
P1            10.00 usec
PL1           0.00 dB
SFO1          50.327408 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2       waltz16
NUC2          1H
P2            11.20 usec
PL2           22.40 usec
PCPD2         70.00 usec
PL2           -2.00 dB
SFO2          200.1360005 MHz

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            50.327337 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40

1D NMR plot parameters
CX            20.00 cm
CY            6.00 cm
F1P           134.317 ppm
F1            6759.21 Hz
F2P           -1.388 ppm
F2            -69.84 Hz
PPHMC         6.78525 ppm/cm
AZDN          341.45221 Hz/cm
    
```

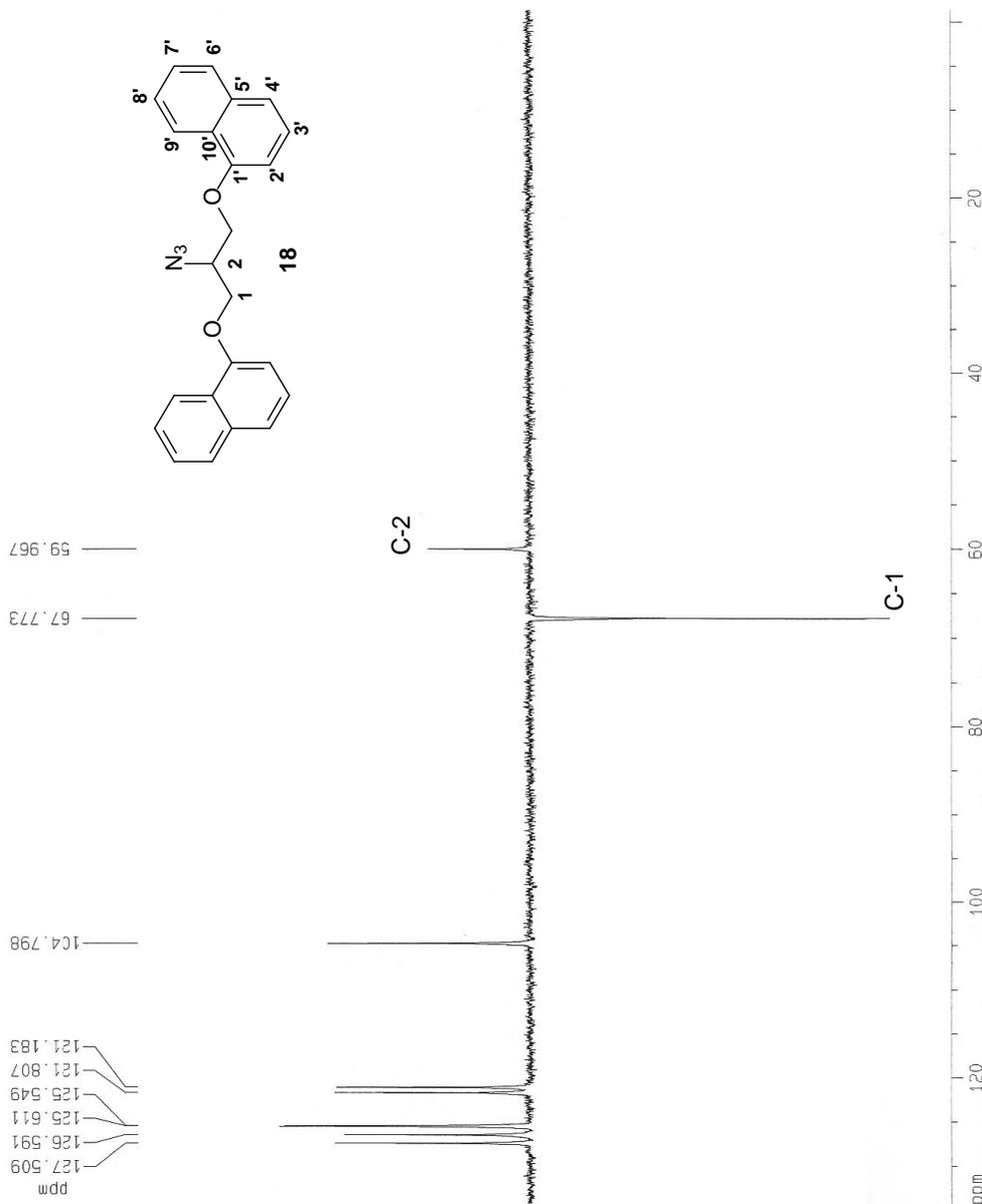
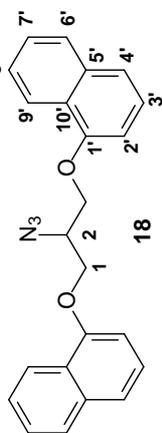


Figura A.15: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 18

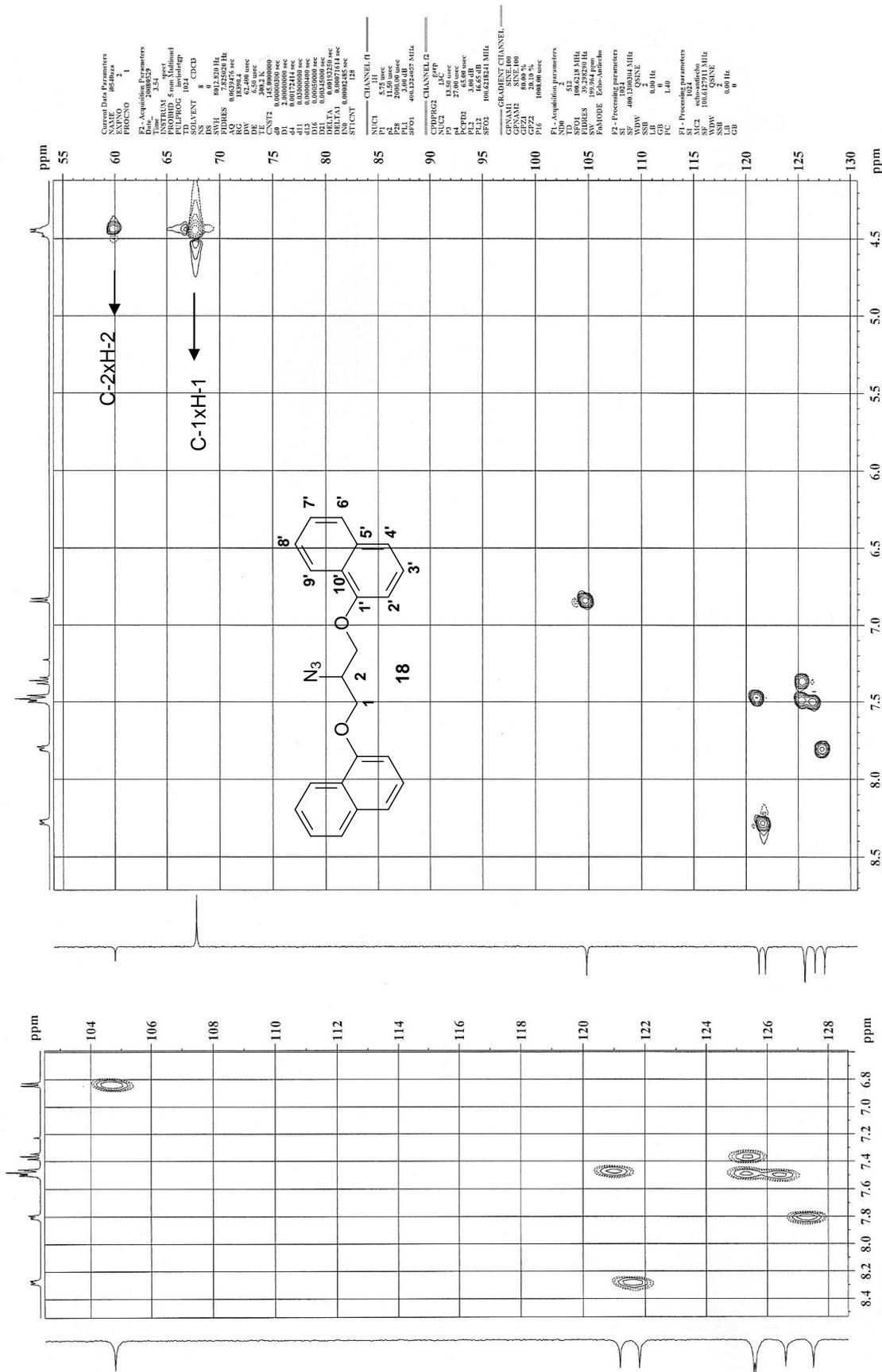


Figura A. 16: Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl₃) de 18

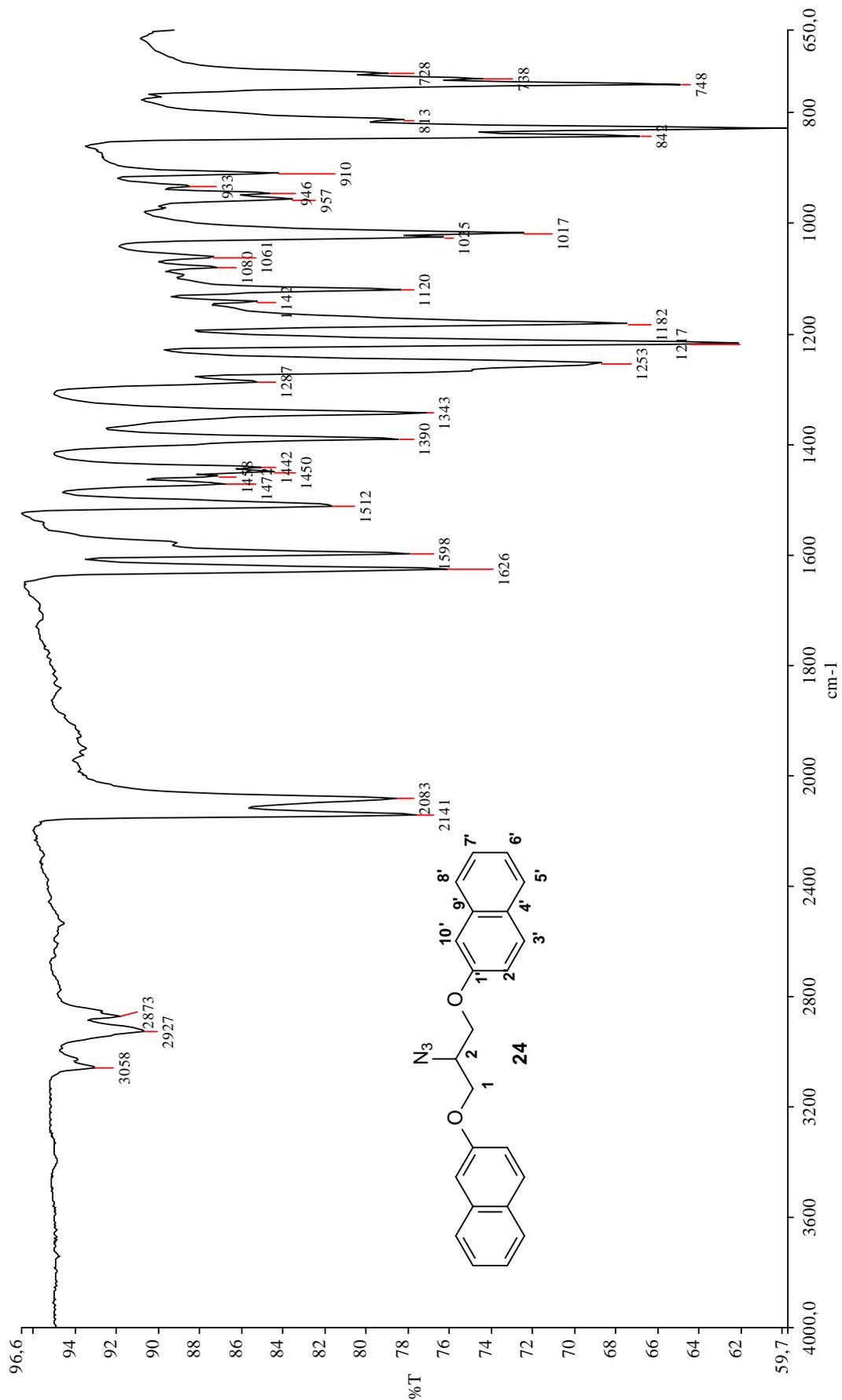


Figura A.17: Espectro no IV (ATR) 24

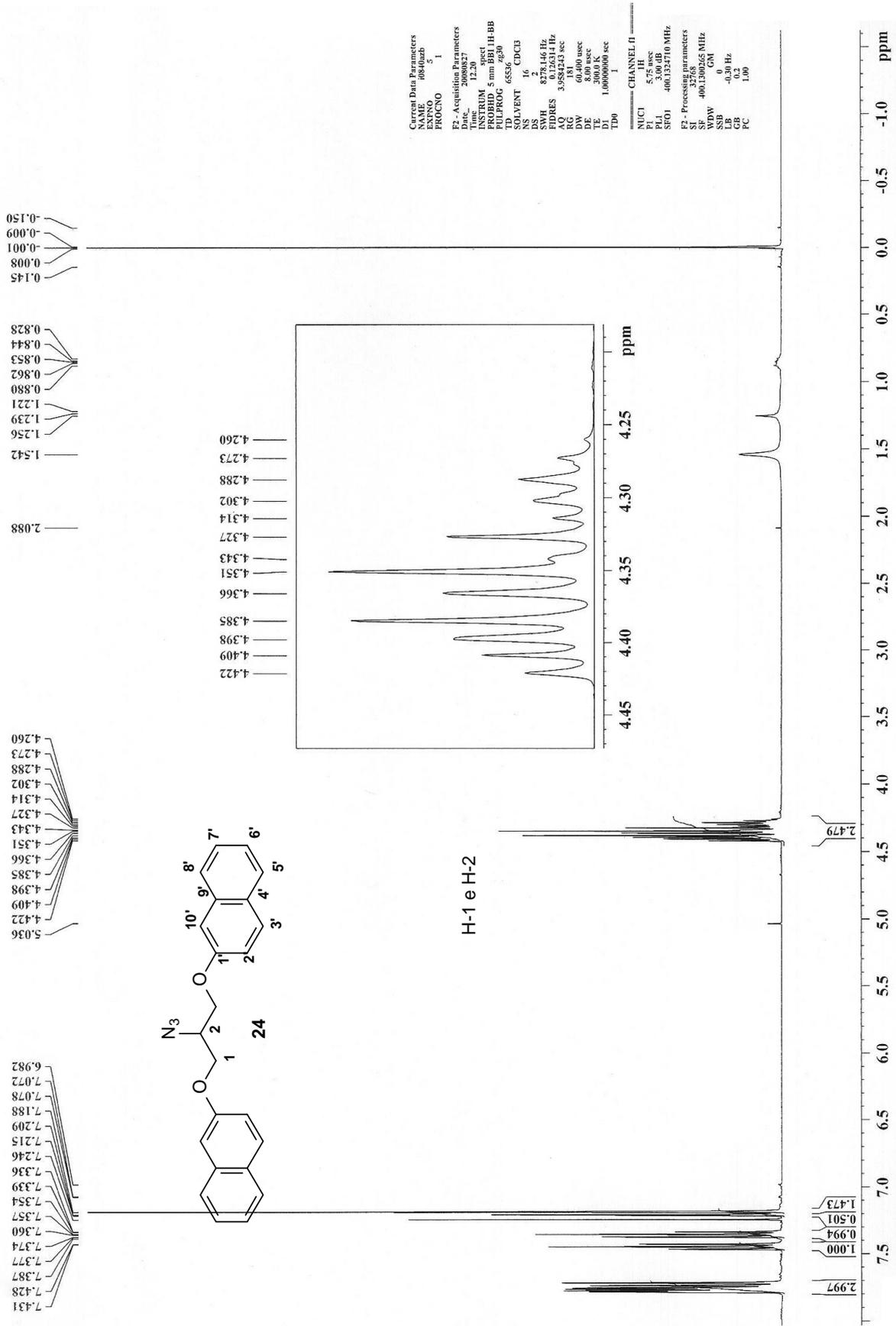


Figura A.18: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) de 24

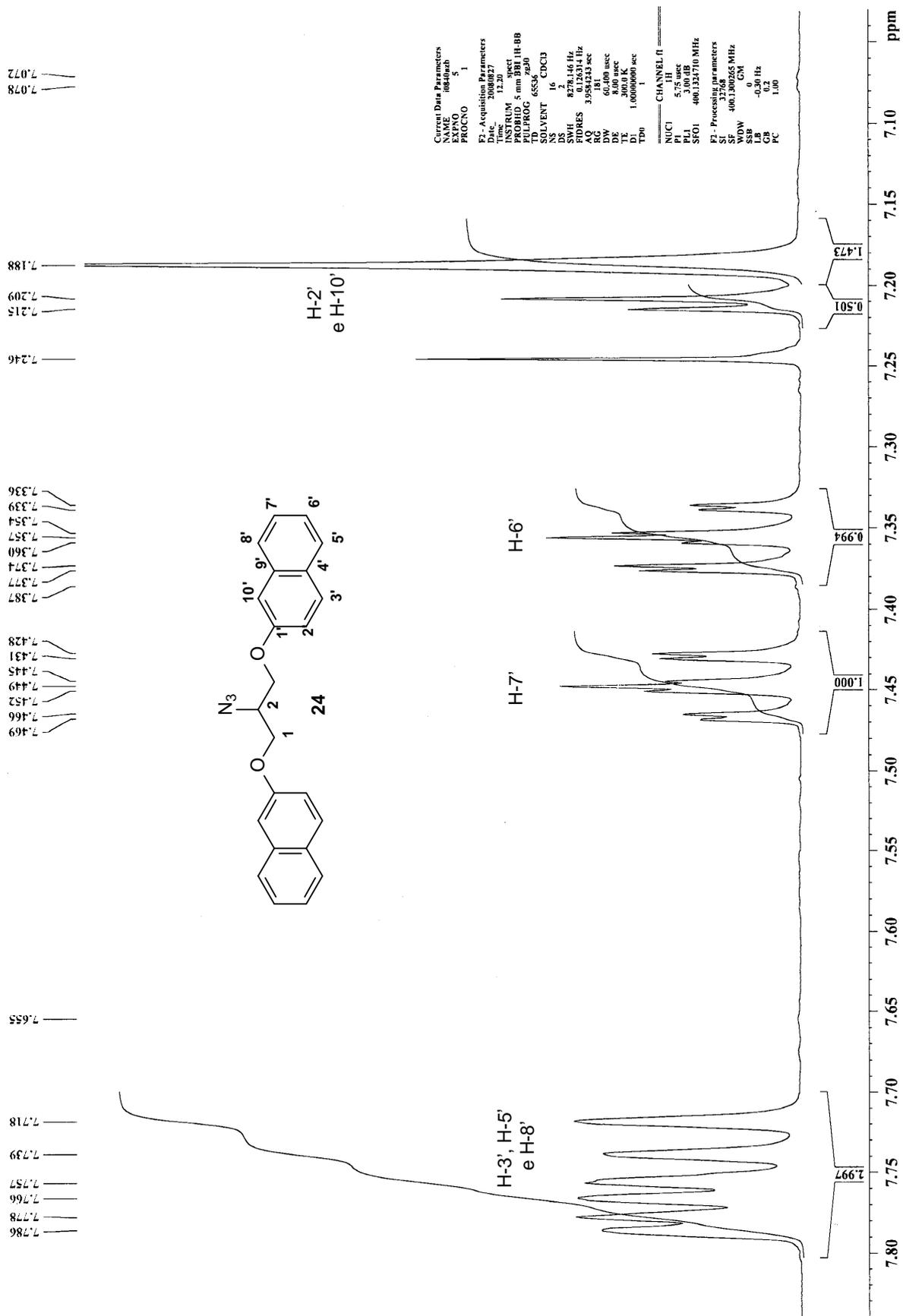


Figura A.19: Seção expandida na região de δ 7,78-7,07 do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 18

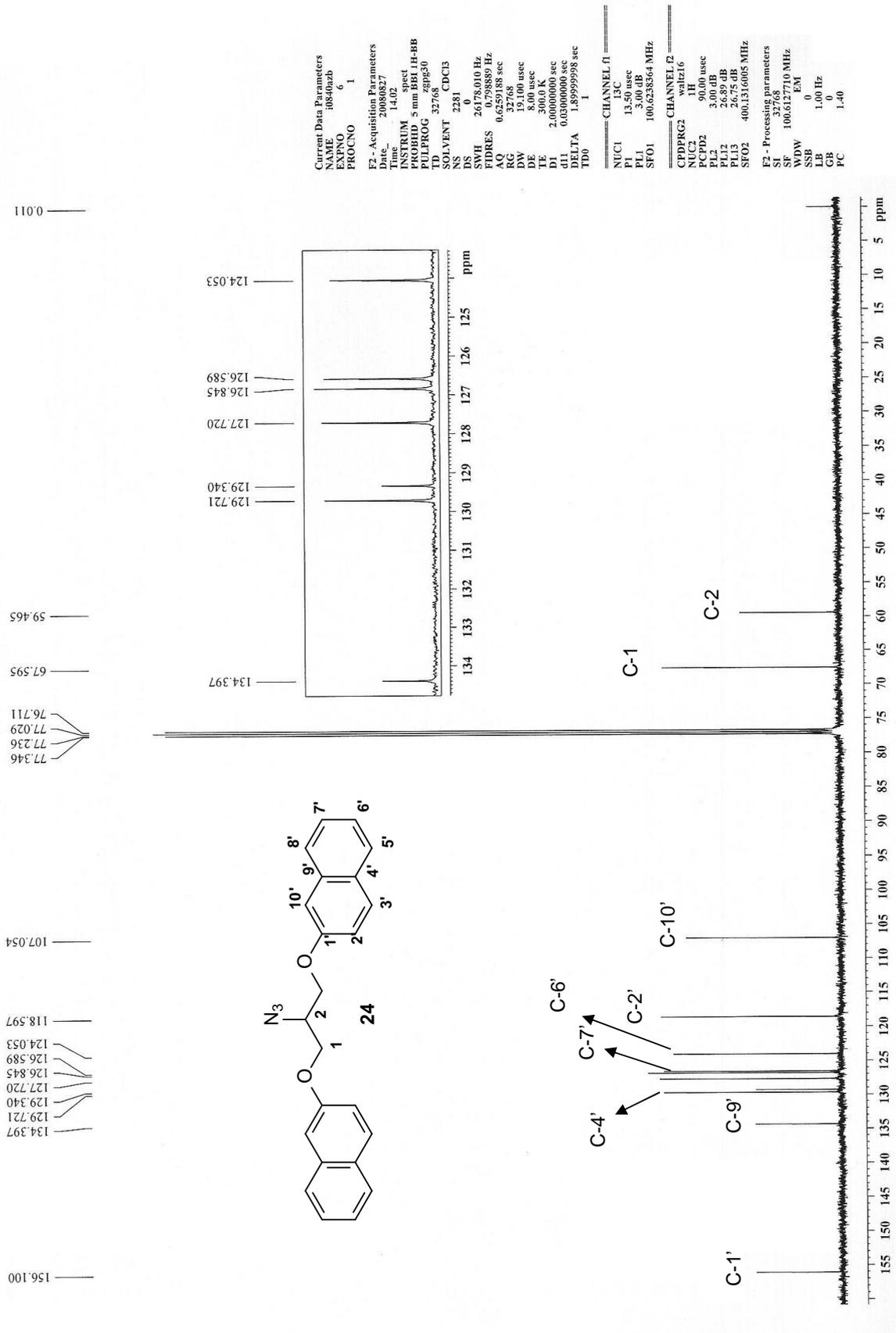


Figura A.20: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 24

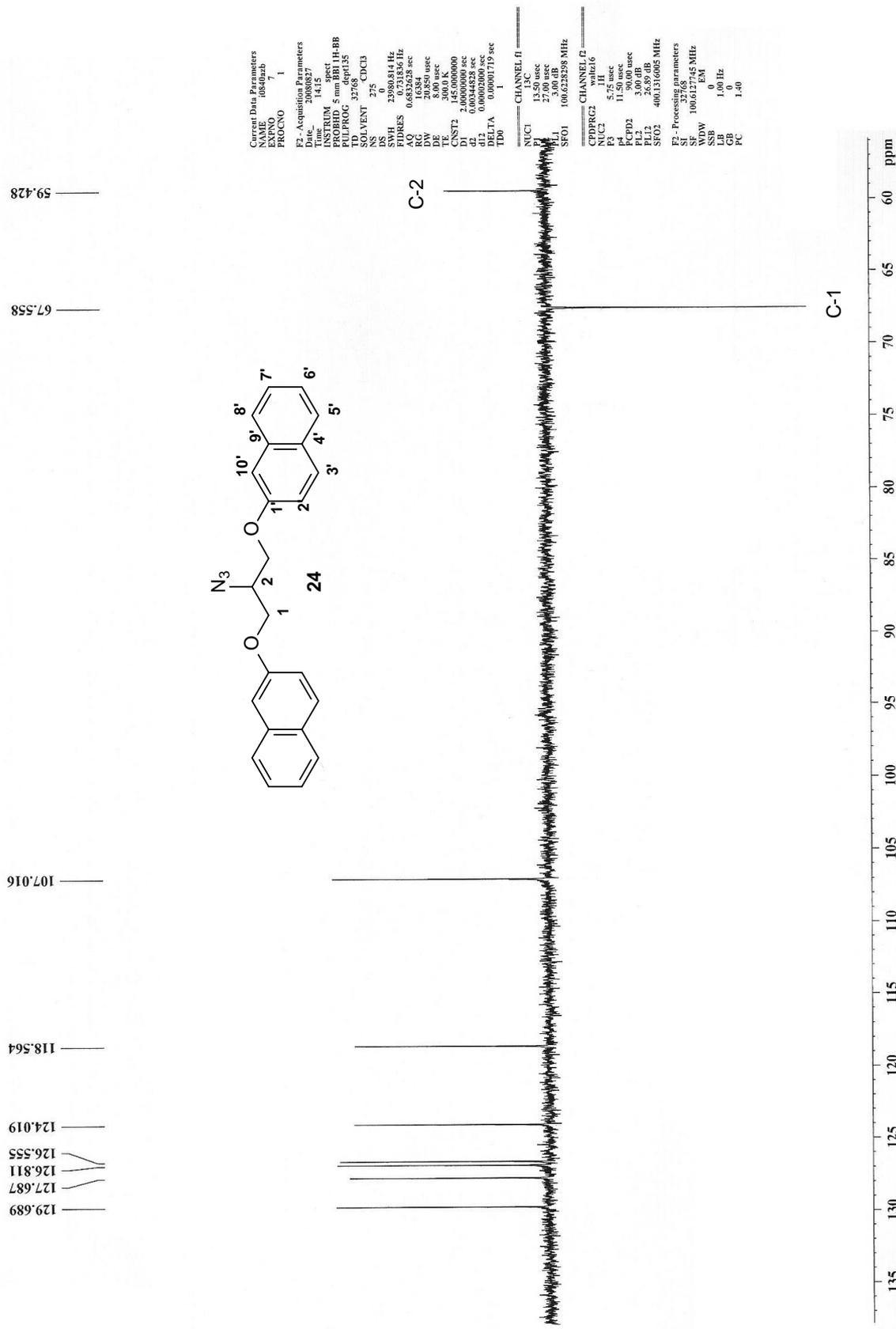


Figura A.21: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 24

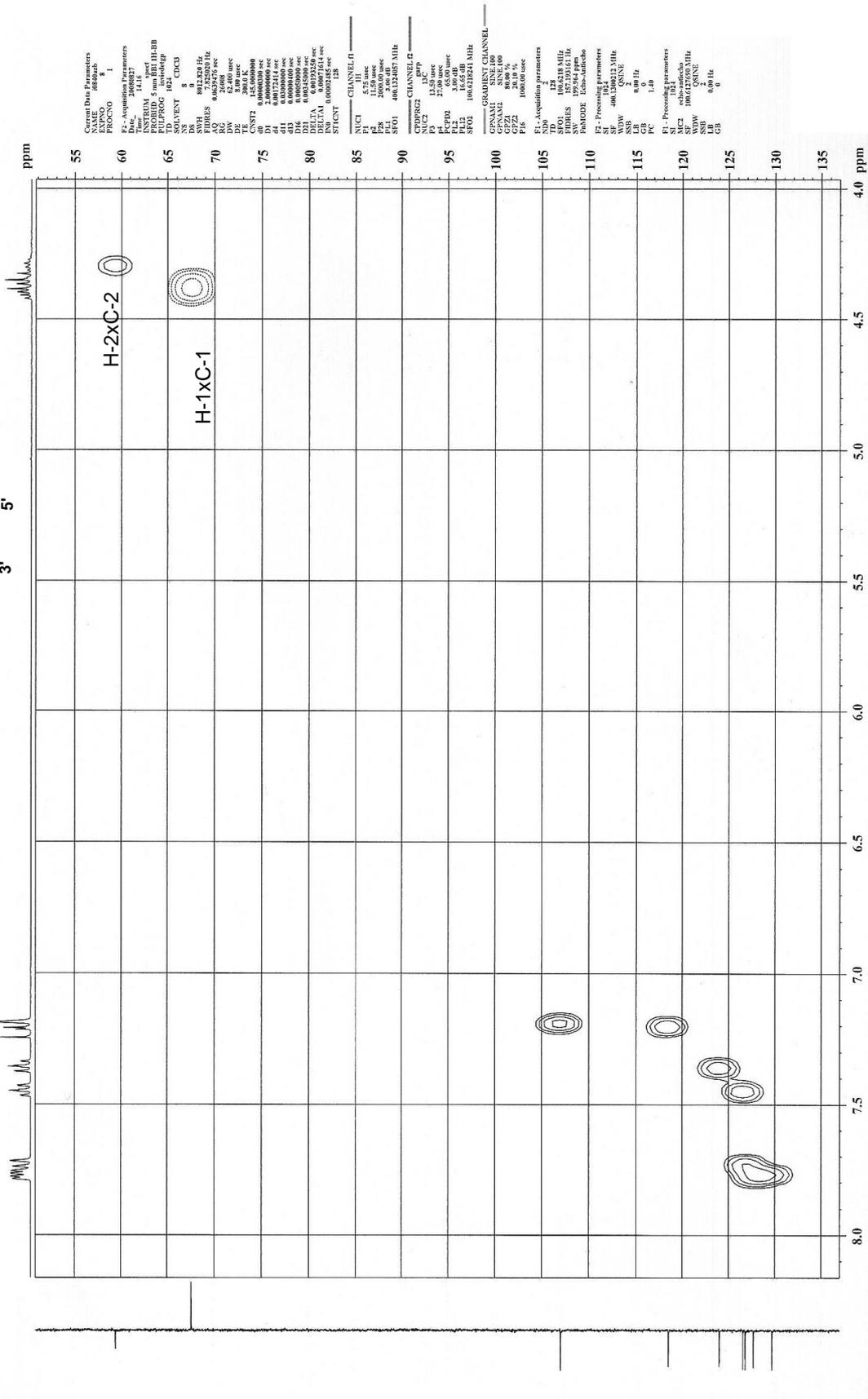
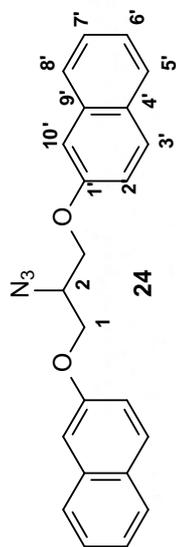


Figura A.22: Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl₃) de 24

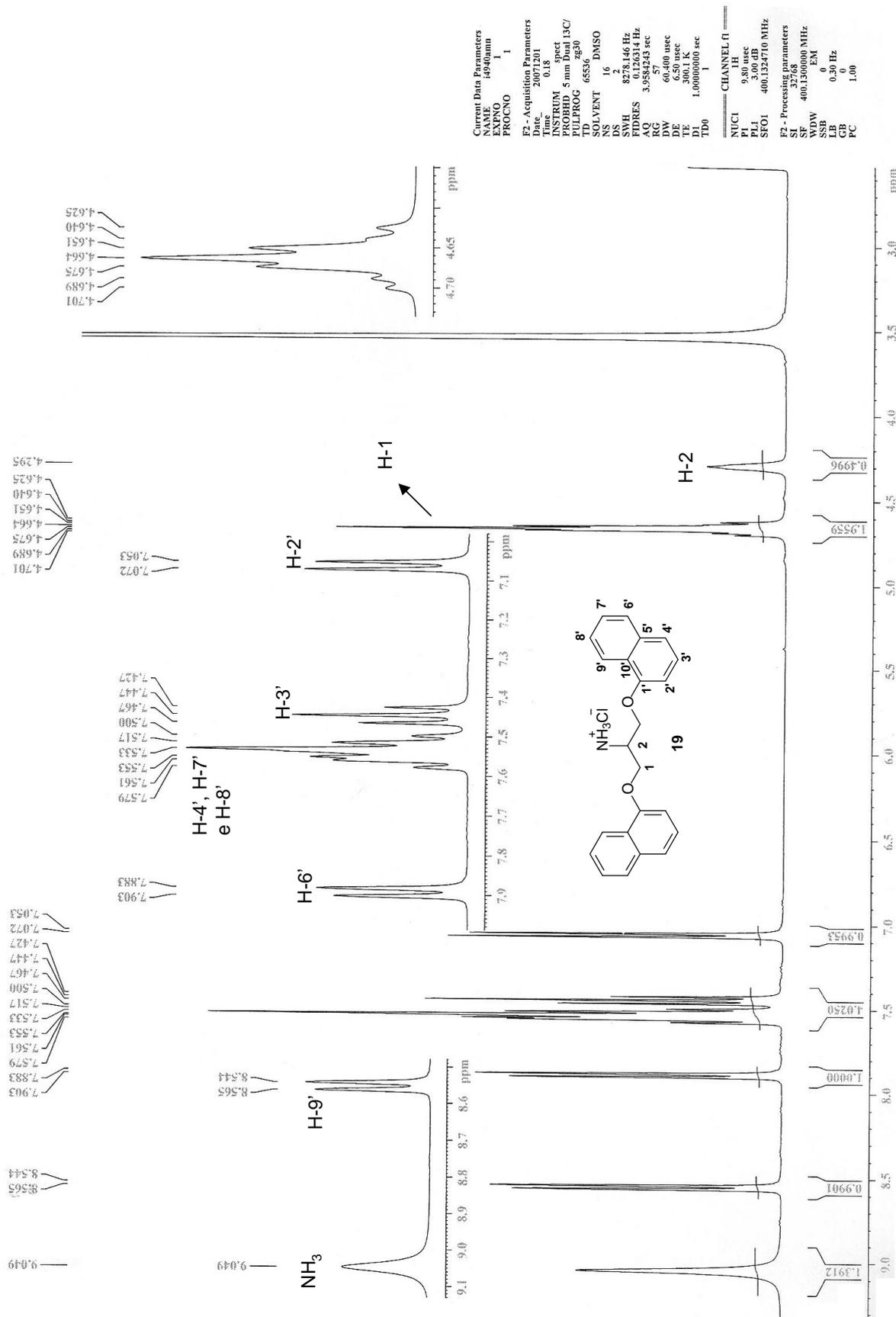


Figura A.23: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 19

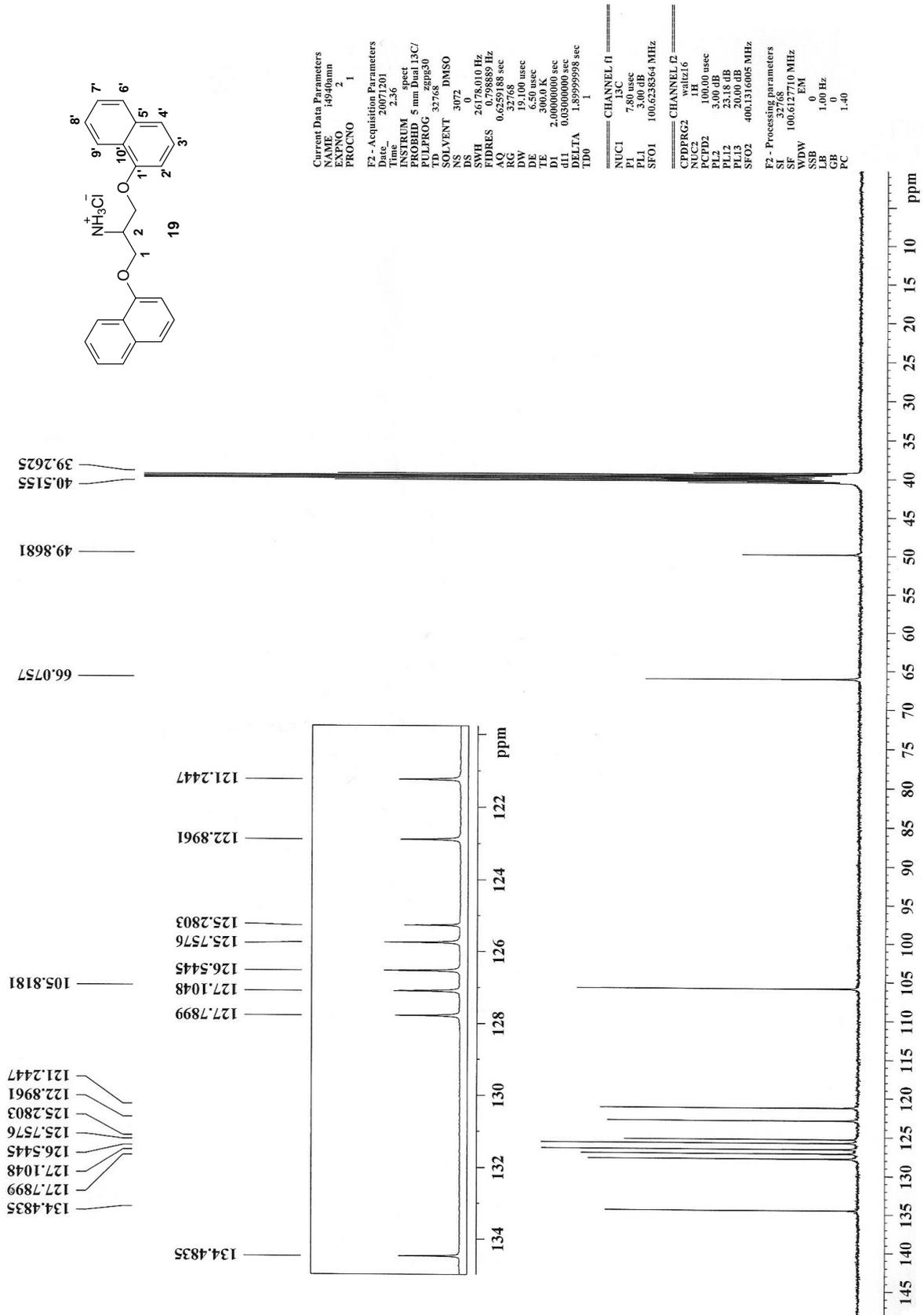


Figura A.24: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 19

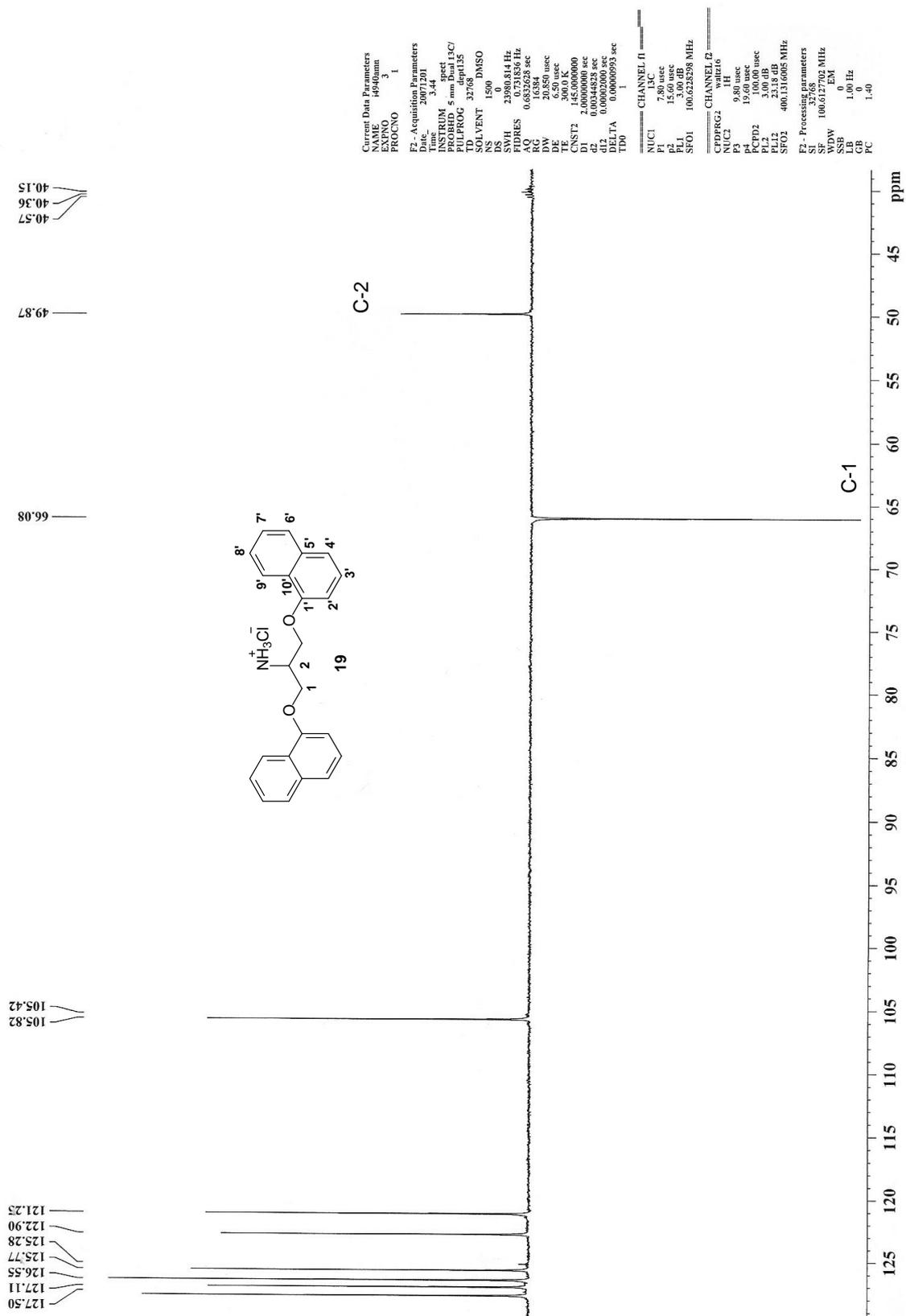
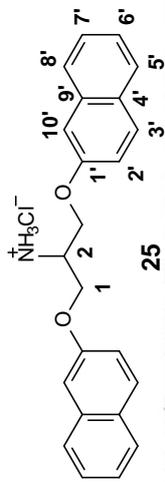


Figura A.25: Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 19



Current Data Parameters
 NAME r0540AMB
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080530
 Time 17.25
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 4139.073 Hz
 FIDRES 0.063157 Hz
 AQ 7.9167986 sec
 RG 228.1
 DW 120.800 usec
 DE 7.50 usec
 TE 0.0 K
 D1 1.00000000 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCWPK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 11.20 usec
 PL1 -2.00 dB
 SF01 200.1312359 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 200.1299995 MHz
 NDM EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00

ID NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 10.00 cm
 F1P 11.549 ppm
 F1 2311.21 Hz
 F2P -0.322 ppm
 F2 -64.39 Hz
 PPMCM 0.69351 ppm/cm
 HZCM 118.77974 Hz/cm

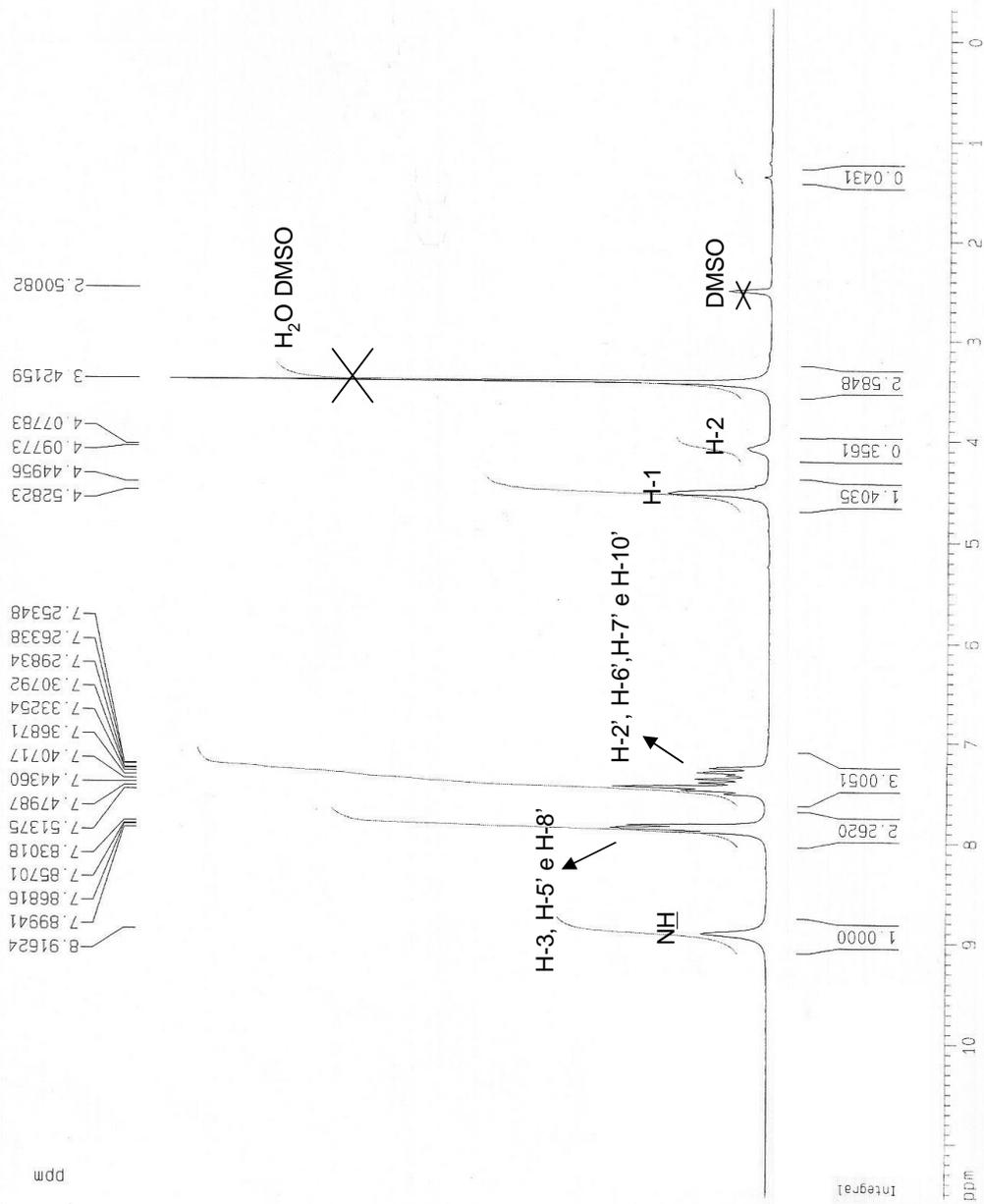


Figura A.26: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, DMSO-d₆) de 25

Current Data Parameters
 NAME r0540ANB
 EXPNO 2
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080529
 Time 10.50
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinucl
 PULPROG zgpg30
 TO 32768
 SOLVENT DMSO
 NS 1215
 DS 0
 SWH 12562.814 Hz
 FIDRES 0.363387 Hz
 AQ 1.3042164 sec
 RG 4096
 DM 39.800 usec
 DE 7.50 usec
 TE 0.0 K
 D1 2.0000000 sec
 d11 0.0300000 sec
 MCHST 0.0000000 sec
 MCHRK 0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PL1 0.00 dB
 SF01 50.3282440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 PCPD2 70.00 usec
 PL2 -2.00 dB
 PL12 13.92 dB
 PL13 120.00 dB
 SF02 200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 50.3227516 MHz
 WDM EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 12.00 cm
 F1 166.698 ppm
 F2 8089.34 Hz
 F2P -0.735 ppm
 F2R -37.00 Hz
 PRGM 8.47166 ppm/cm
 HZCM 426.31729 Hz/cm

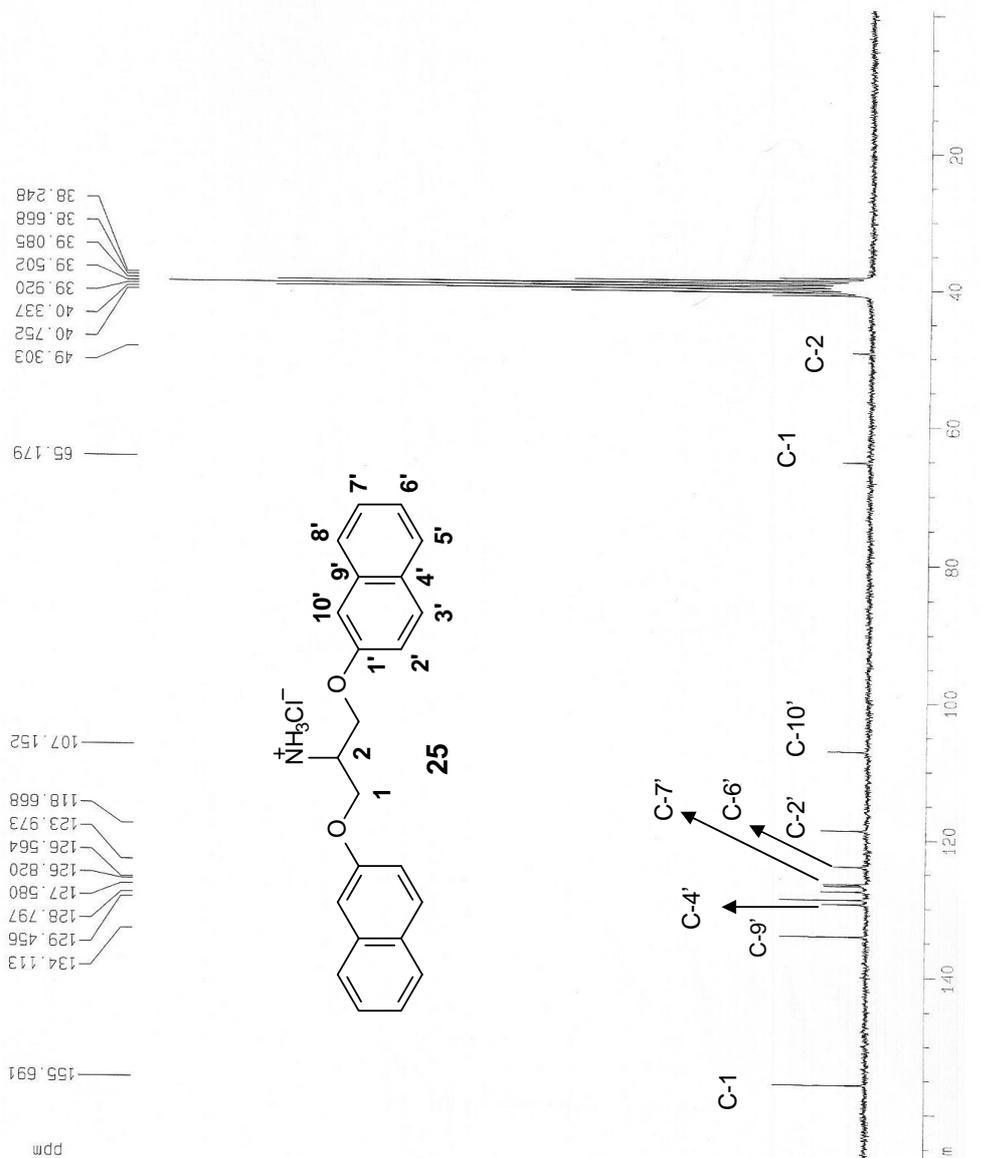


Figura A.27: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 25

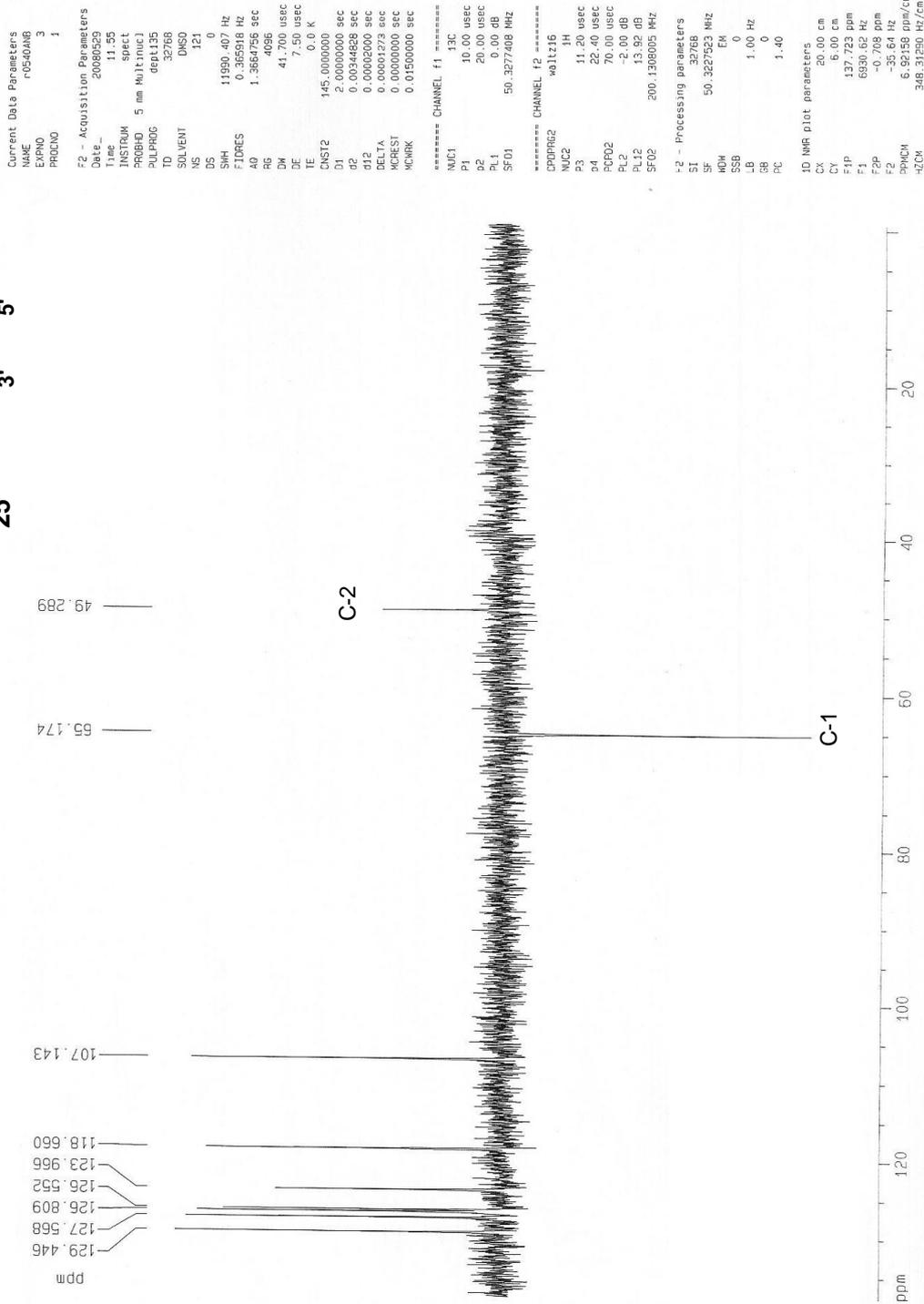
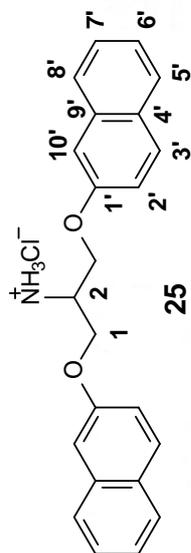


Figura A.28: Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 25

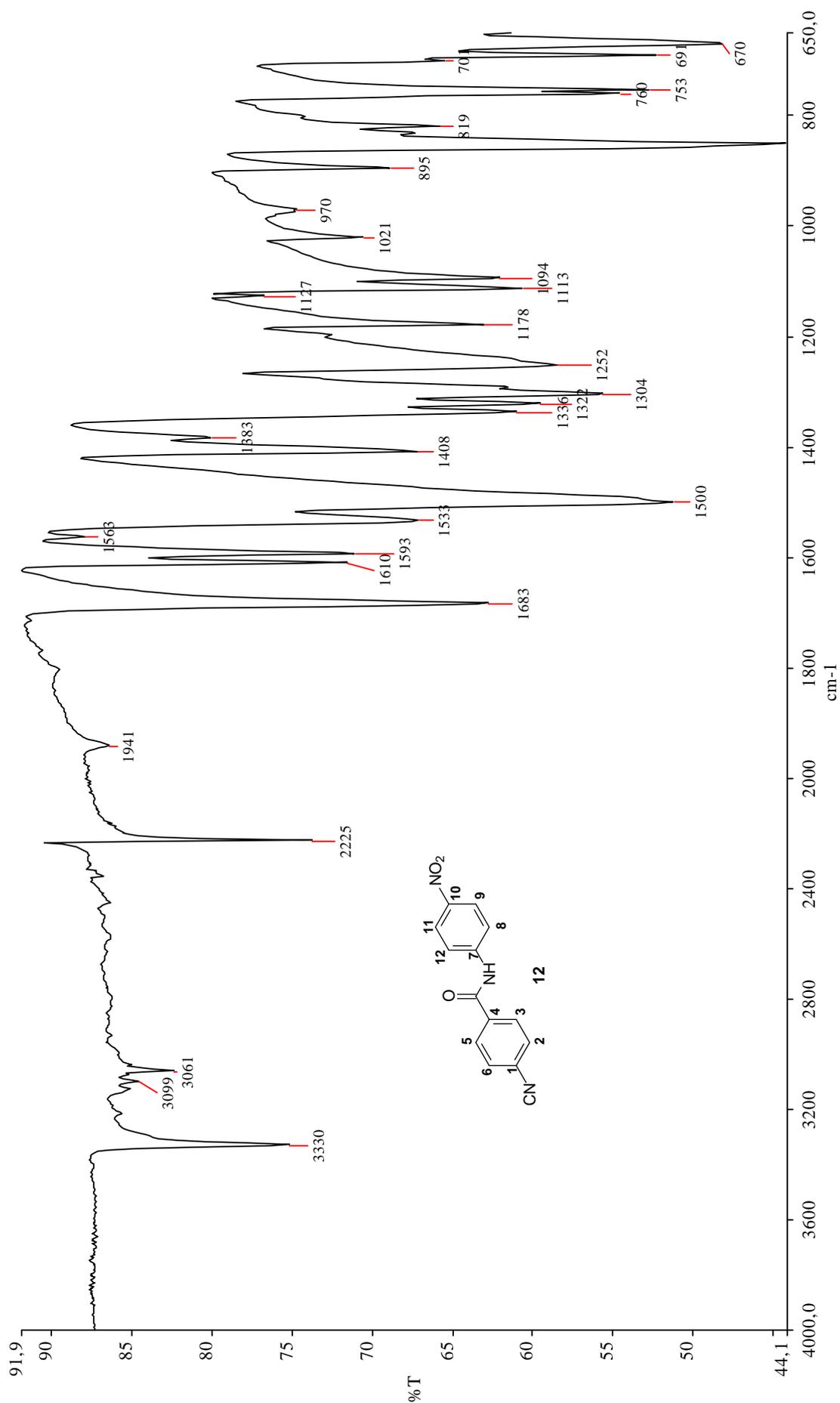


Figura A.29: Espectro no IV (ATR) de 12

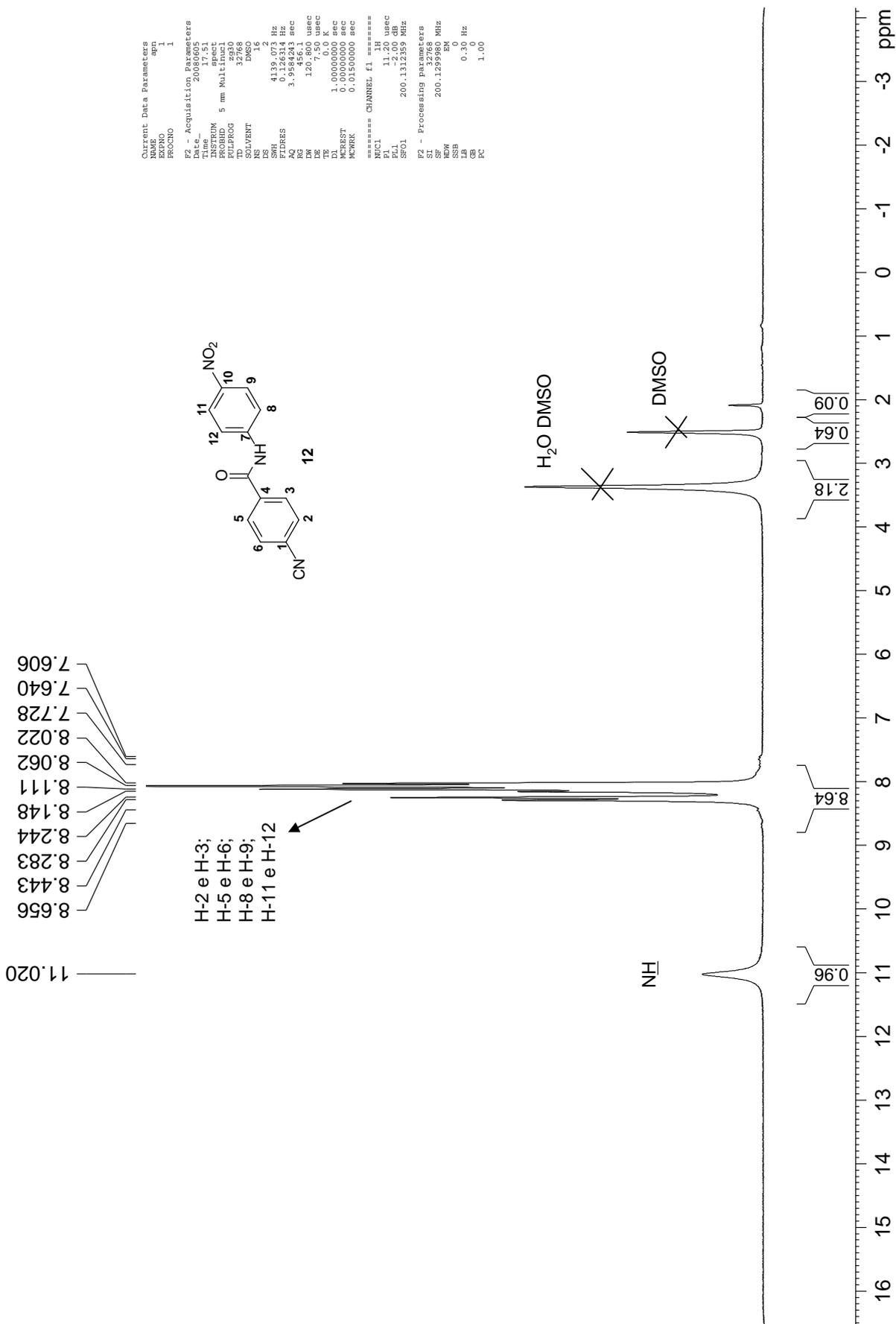


Figura A.30: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, DMSO-d₆) de 12

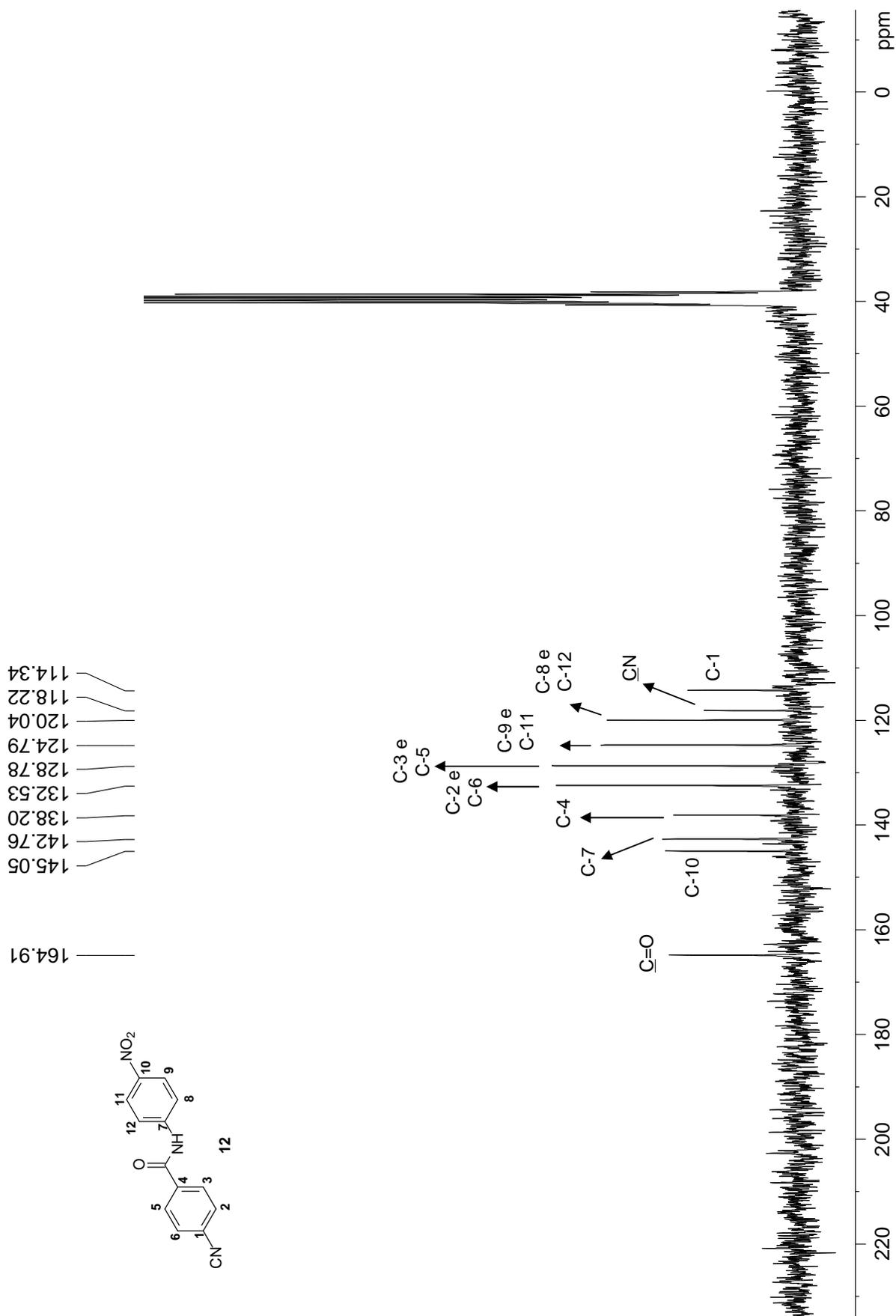


Figura A.31: Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, DMSO-d_6) de 12

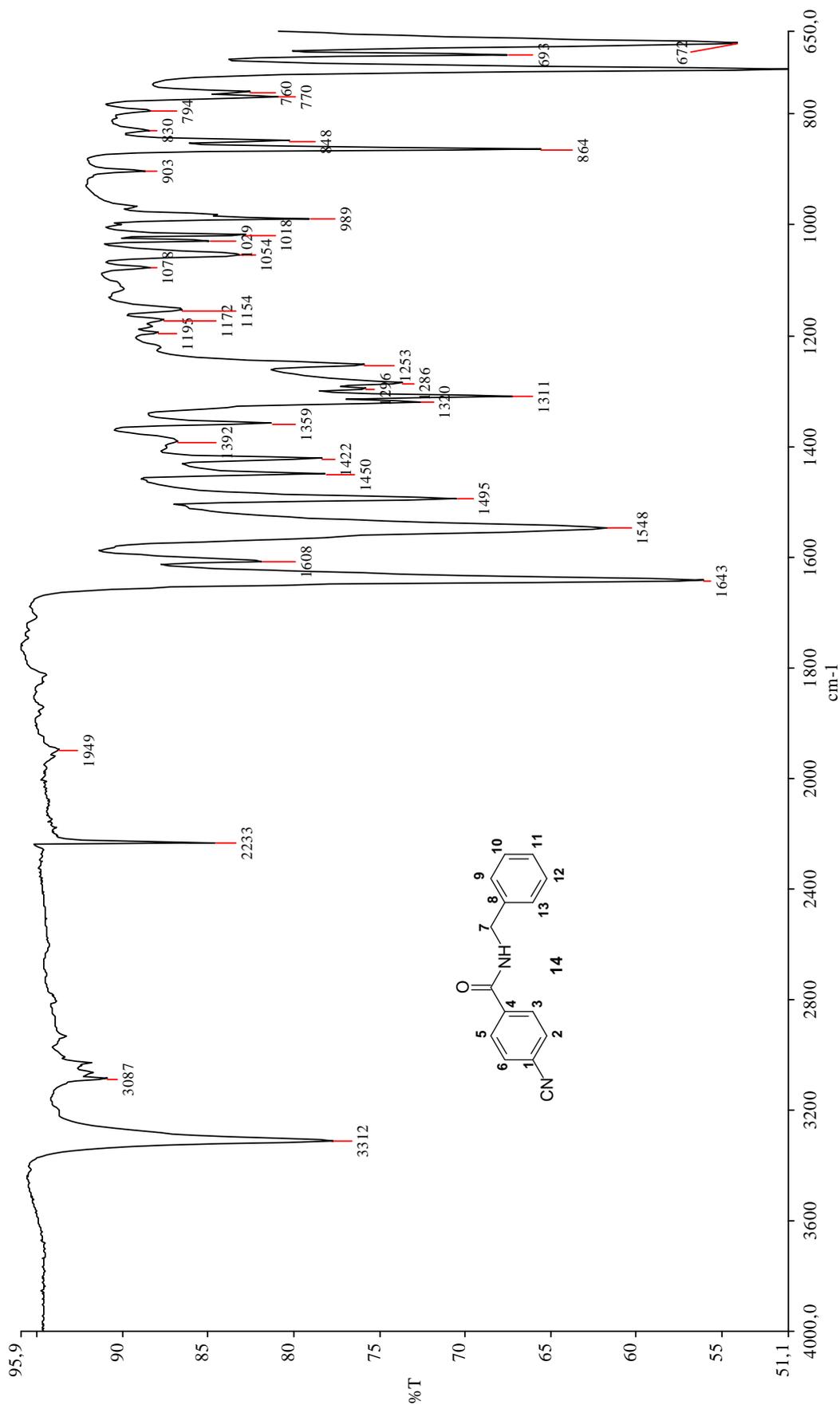


Figura A.32: Espectro no IV (ATR) de 14

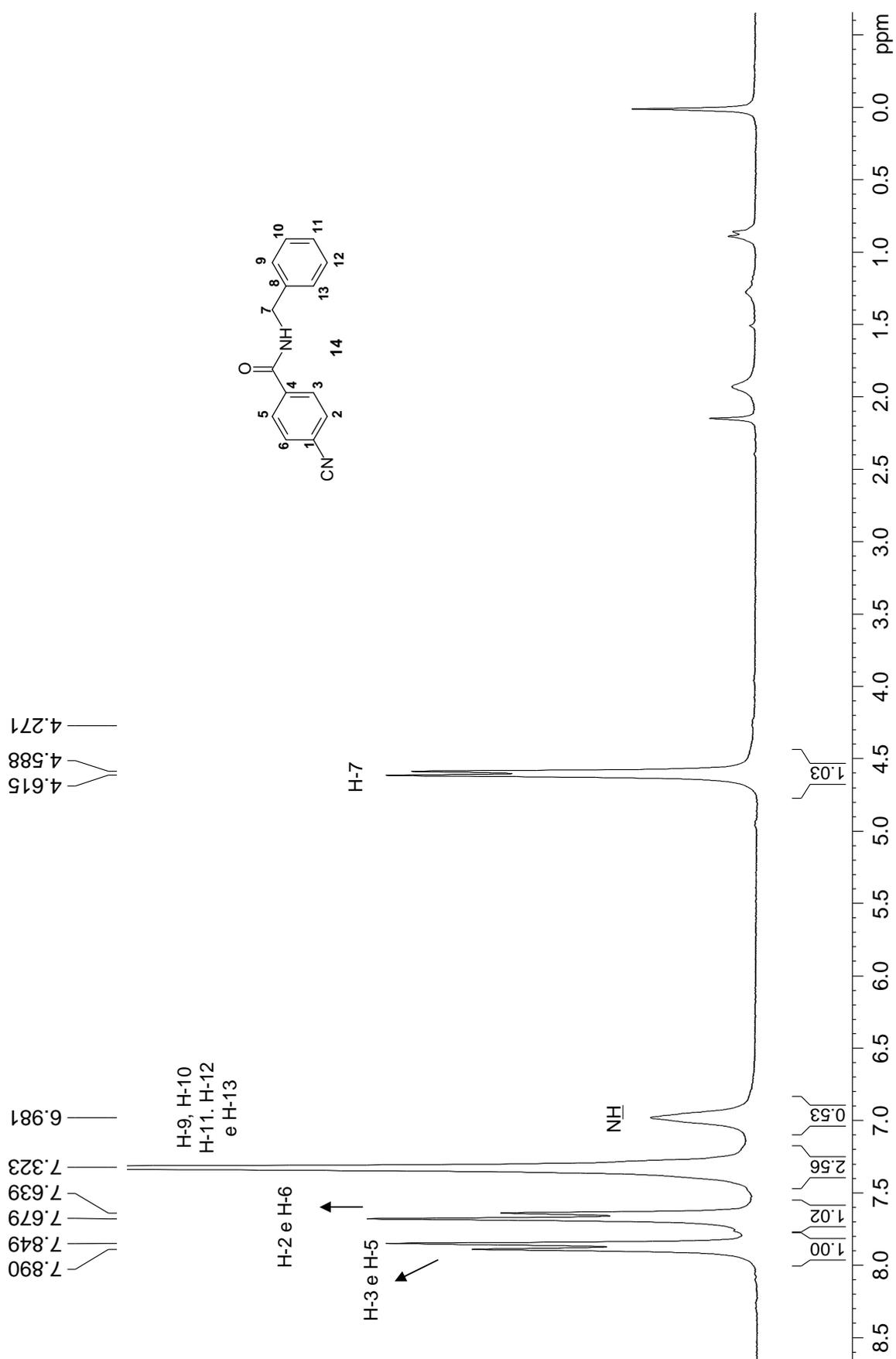


Figura A.33: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 14

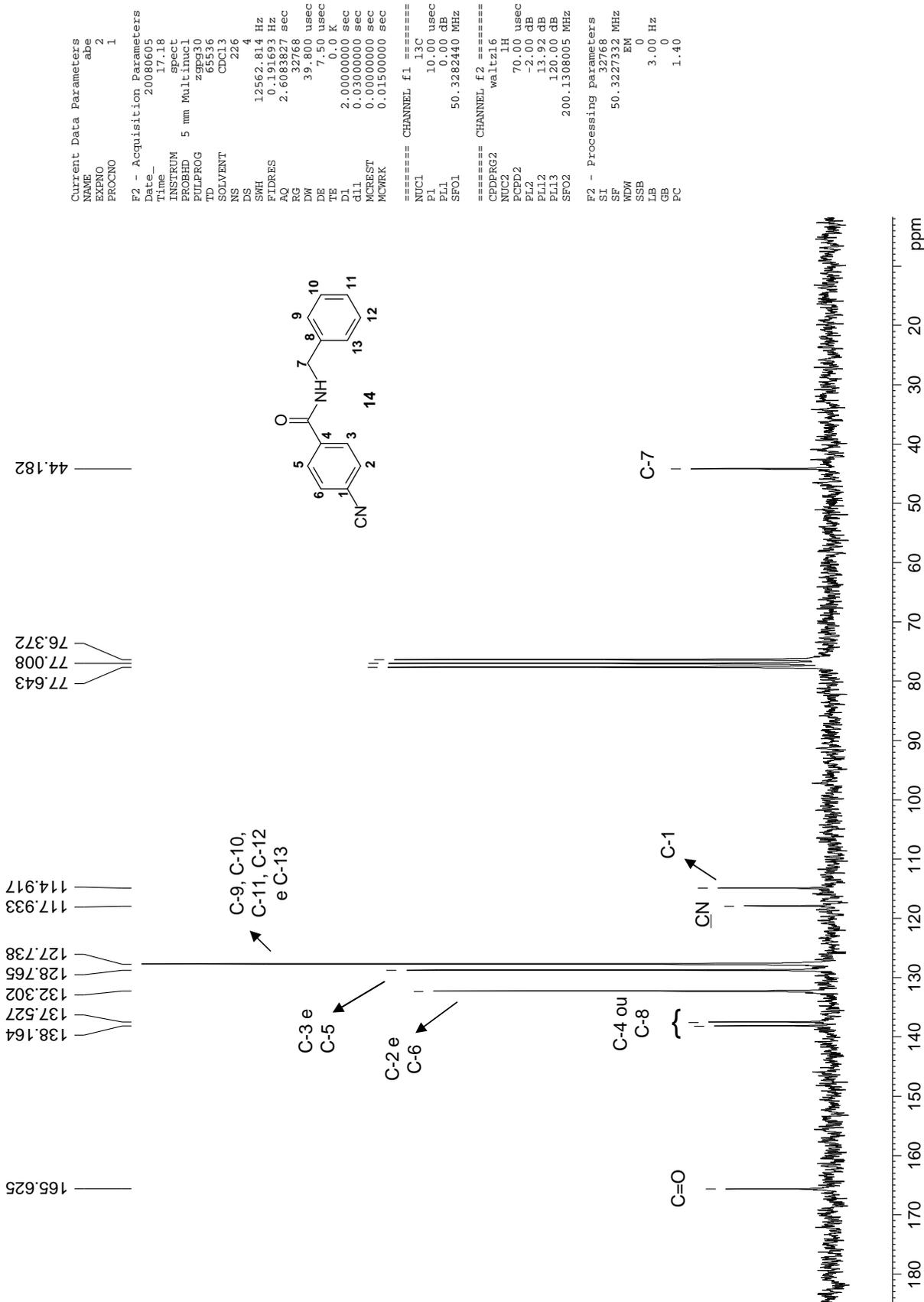


Figura A.34: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 14

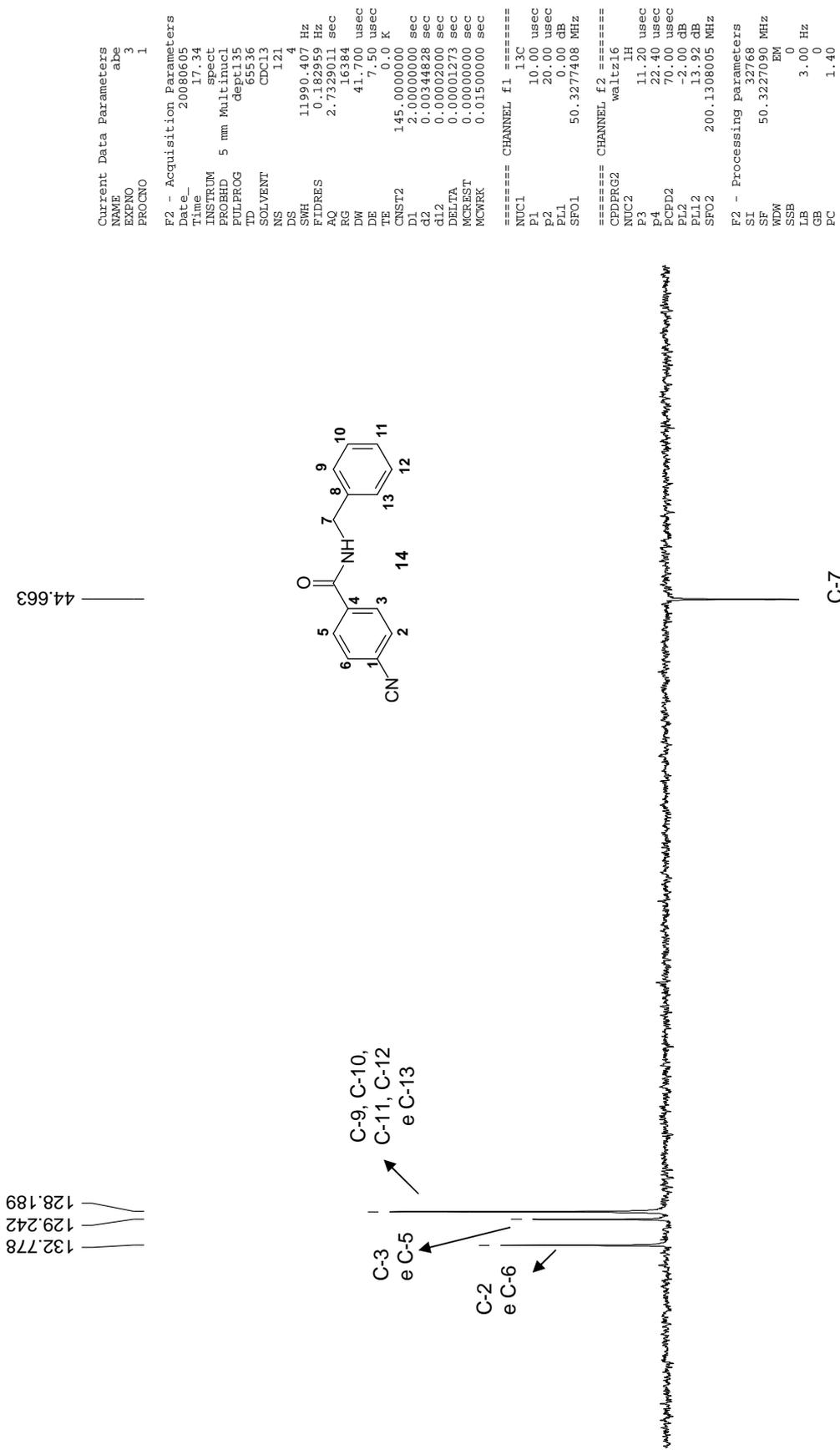


Figura A.35: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 14

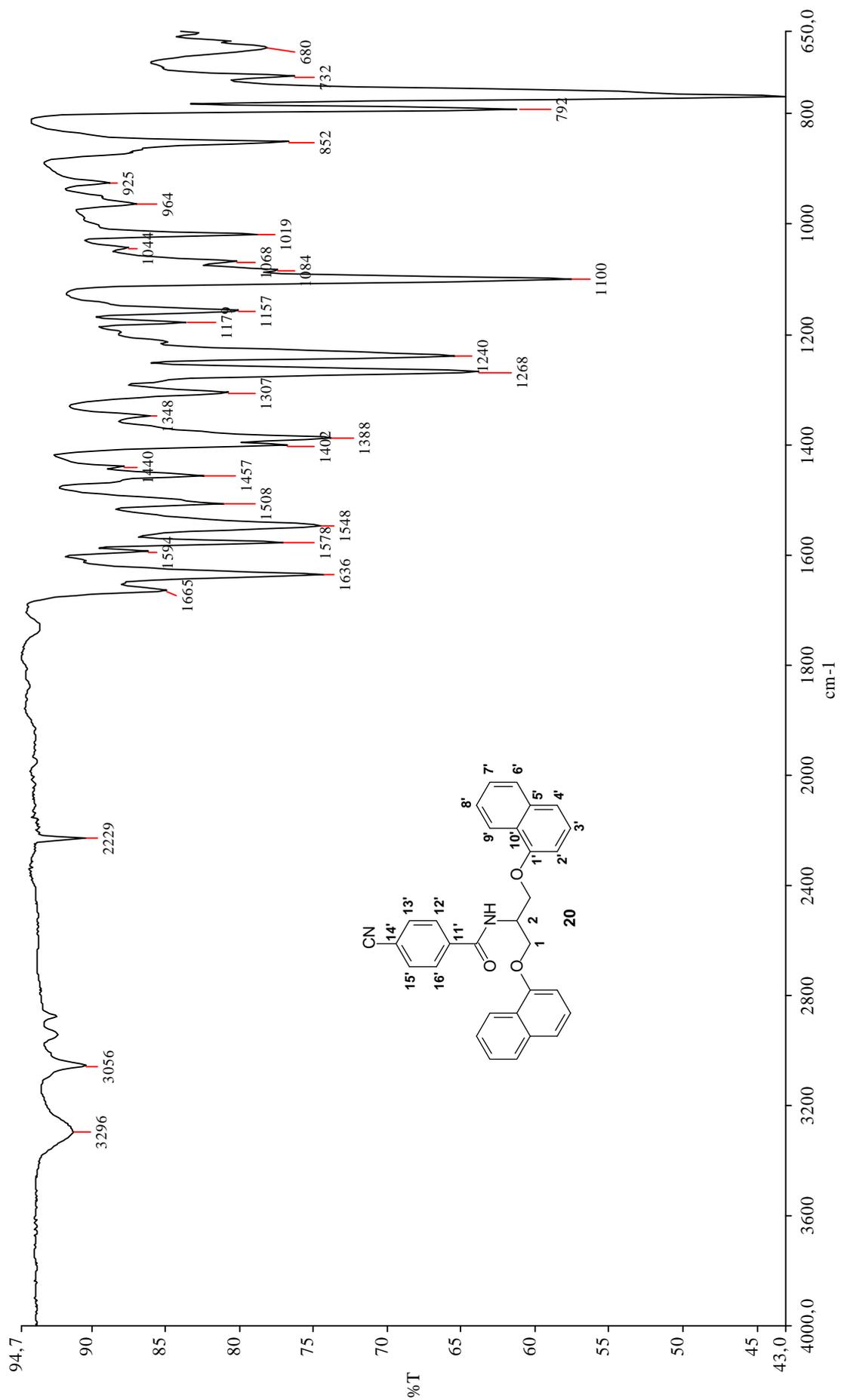


Figura A.36: Espectro no IV (ATR) de 20

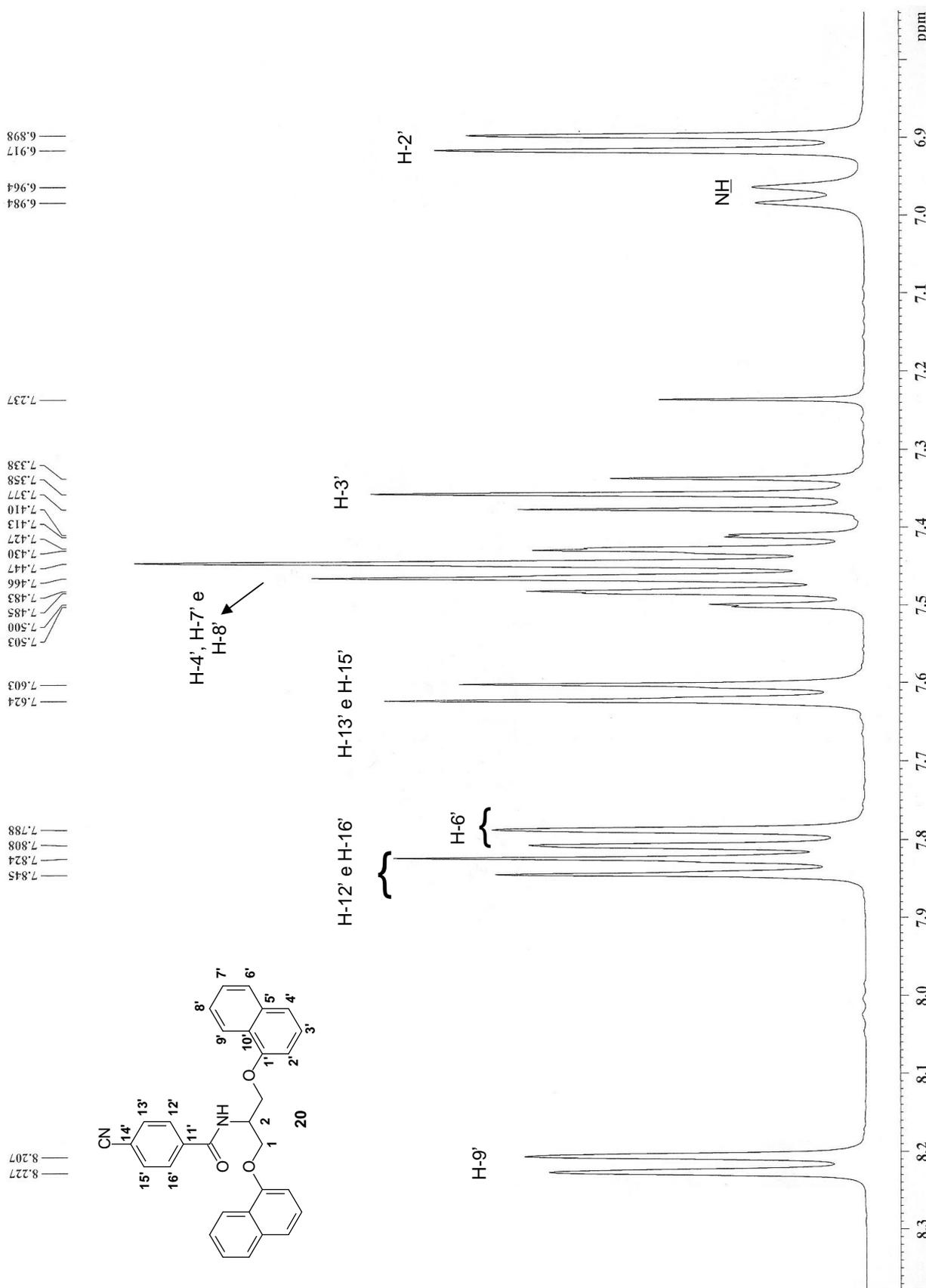


Figura A.38: Seção expandida na região de δ 8,2-6,8 do espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) de 20

```

Current Data Parameters
NAME      r05-40AMB
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20080529
Time      9.02
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Multinucl
PULPROG   zgpg30
TD         32768
SOLVENT   CDCl3
NS         1489
DS         0
SWH        12562.814 Hz
FIDRES     0.383387 Hz
AQ         1.3042164 sec
RG         4096
DE         39.800 usec
TE         7.50 usec
D1         2.0000000 sec
d11        0.0300000 sec
MCREST     0.0000000 sec
MCMARK     0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       13C
p1         10.00 usec
PL1        0.00 dB
SF01       50.3282440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPOPRG2    waltz16
NUC2        1H
PCPD2      70.00 usec
PL2        -2.00 dB
PL12       13.92 dB
PL13       120.00 dB
SF02       200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         50.3282309 MHz
WDW        EN
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40

ID NMR pilot parameters
CX         20.00 cm
CY         12.00 cm
F1P        172.186 ppm
F1         8664.86 Hz
F2P        -2.302 ppm
F2         -115.84 Hz
PPMCM      8.72439 ppm/cm
HZCM       439.03503 Hz/cm
    
```

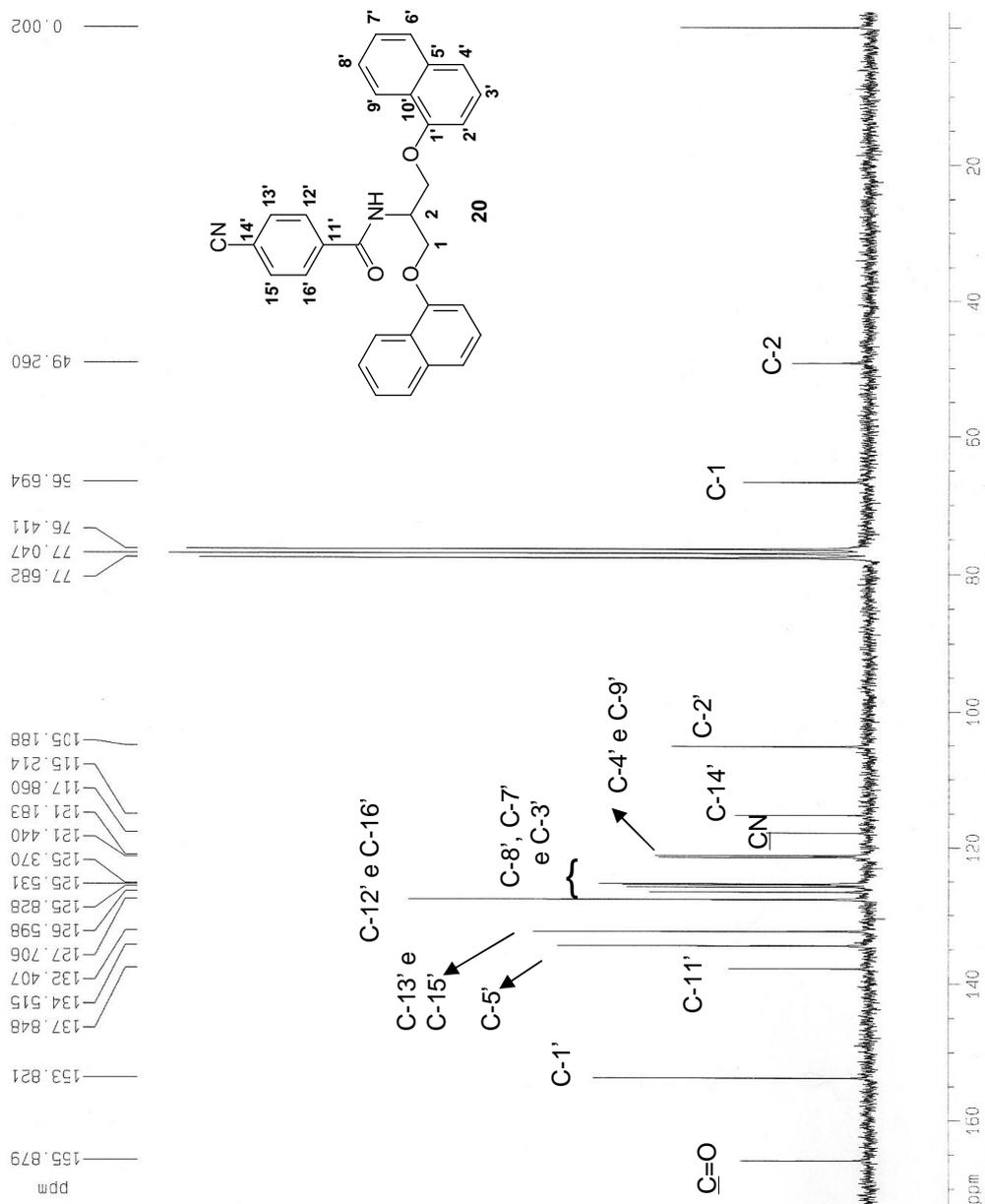
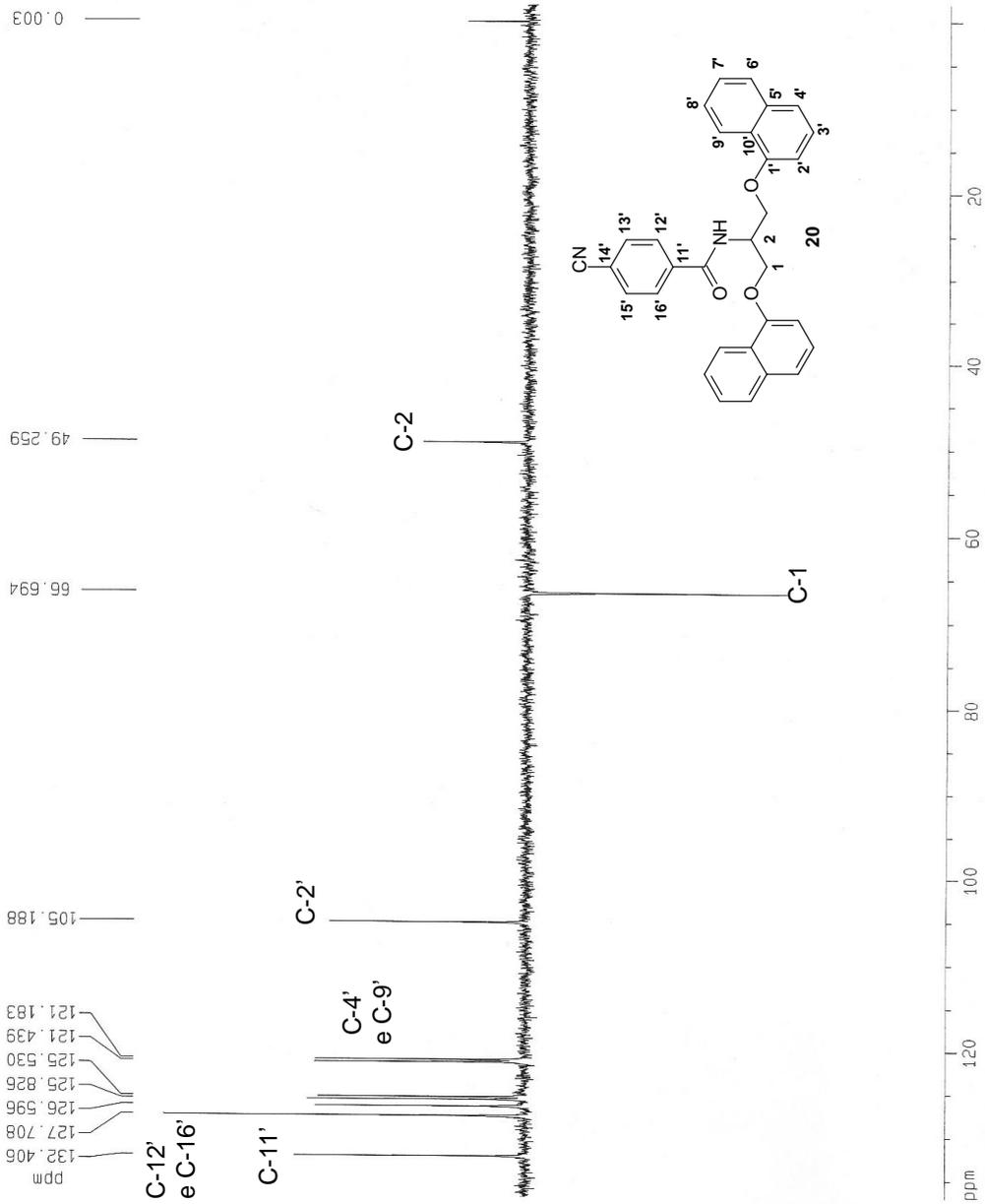


Figura A.39: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 20

AMB Ana



```

Current Data Parameters
NAME      r05540AMB
EXPNO    3
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20080529
Time     10.31
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG  dept135
TD        32768
SOLVENT  DMSO
NS        256
DS        0
SWH       11990.407 Hz
FIDRES   0.365918 Hz
AQ        1.3664756 sec
RG        4096
DE        41.700 usec
TE        7.50 usec
TE        0.0 K
CNST2    145.0000000
D1        2.0000000 sec
d2        0.00344828 sec
d12       0.0002000 sec
DELTA    0.0001973 sec
MGREST   0.0000000 sec
MCURK    0.0150000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        10.00 usec
p2        20.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      50.3277408 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
P3        11.20 usec
p4        22.40 usec
PCPD2    70.00 usec
PL2       -2.00 dB
PL12     13.92 dB
SFO2     200.1306005 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        50.3277310 MHz
AQ        0
MDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        6.00 cm
F1        137.037 ppm
F2        6699.12 Hz
F2P       -1.963 ppm
F2PCH     -98.81 Hz
PPMCH    6.95304 ppm/cm
HZCH     349.89618 Hz/cm
    
```

Figura A.40: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 20

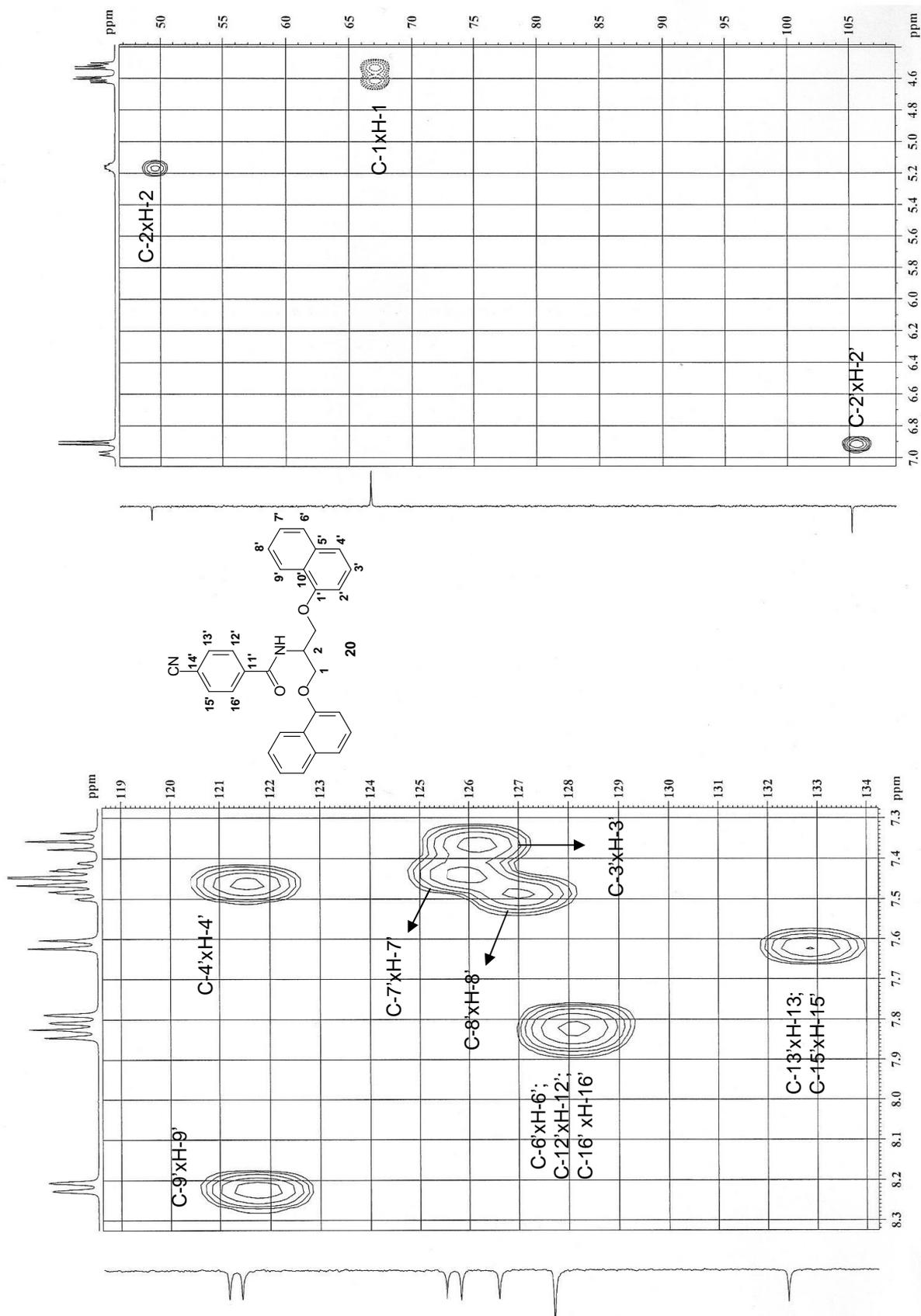


Figura A.41: Mapa de contornos HMQC (400MHz, CDCl_3) de 20

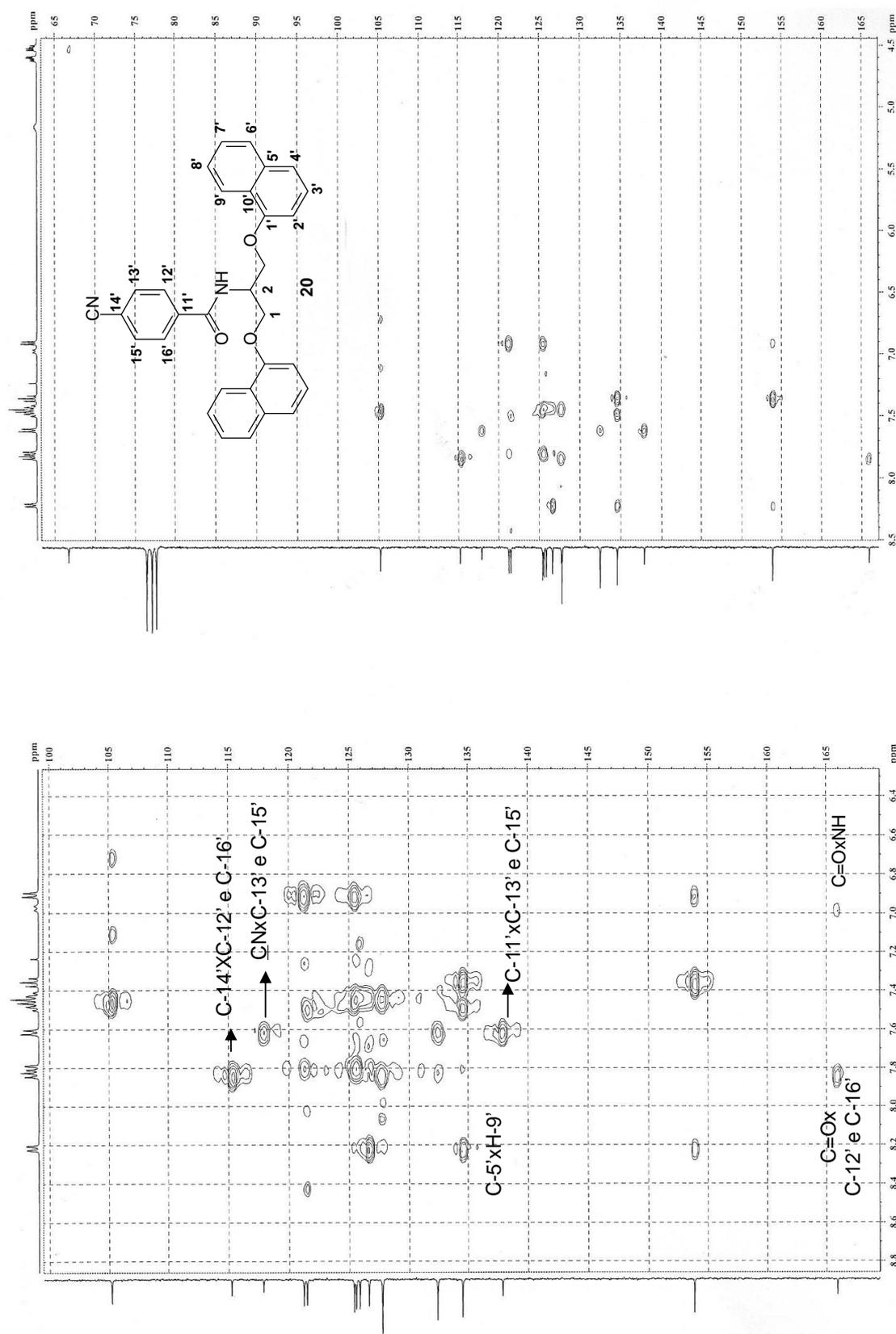


Figura A.42: Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl_3) de 20

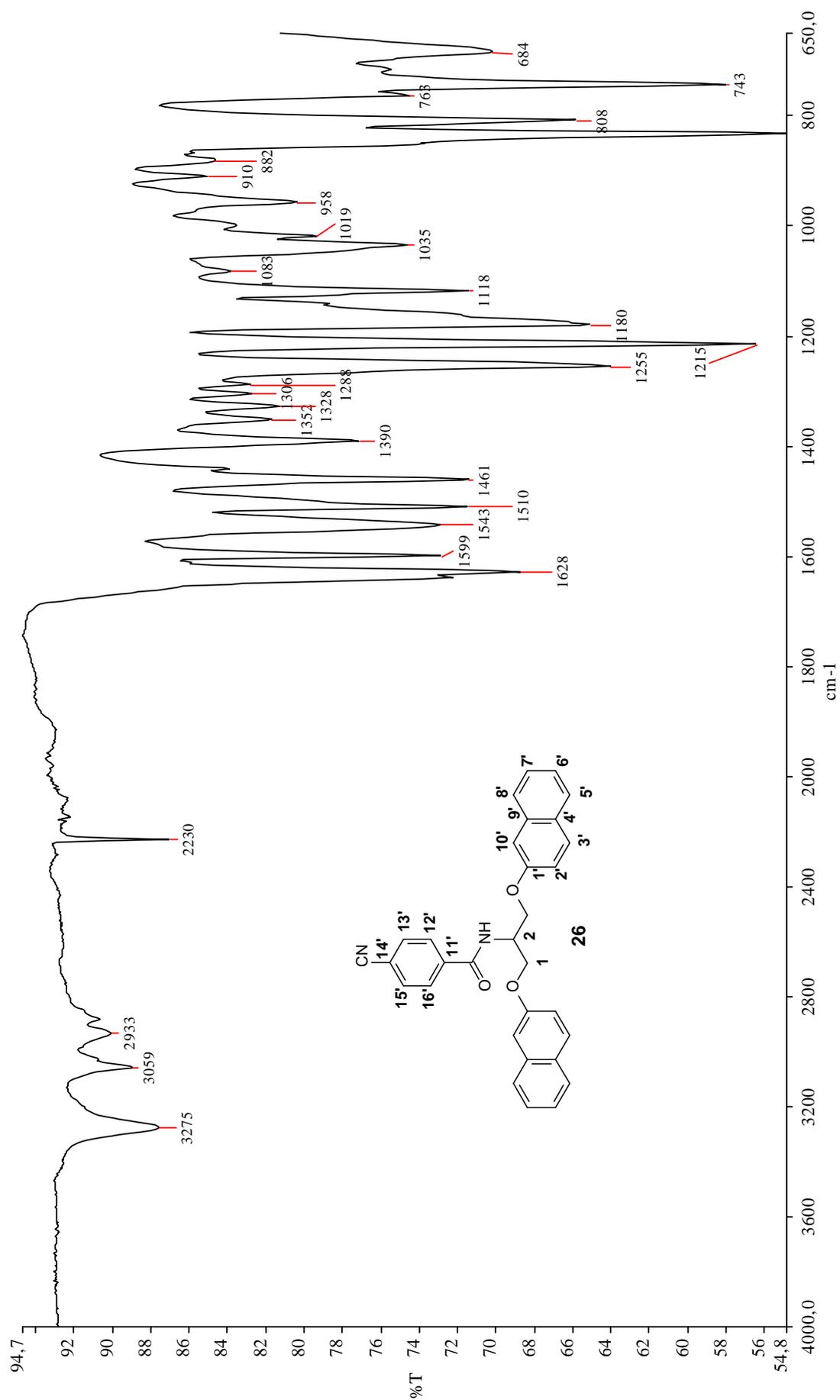


Figura A.43: Espectro no IV (ATR) de 26


```

Current Data Parameters
NAME      C0540ANA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20090504
Time     2.35
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm Multicore1
PULPROG zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       3072
DS       0
SWH      12562.814 Hz
FIDRES   0.383387 Hz
AQ       1.3042164 sec
RG       4096
DM       39.800 usec
DE       7.50 usec
TE       0.0 K
d1       2.0000000 sec
d11      0.0300000 sec
MCREST   0.0000000 sec
MCWRRK   0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        10.00 usec
PL1       0.00 dB
SFO1      50.3282440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2      1H
P2        70.00 usec
PL2       -2.00 dB
PL12      13.92 dB
PL13      120.00 dB
SFO2      200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        50.327309 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        12.00 cm
F1P       171.326 ppm
F1        8631.65 Hz
F2P       -2.083 ppm
F2        -104.82 Hz
PRCMX    B 650.44 ppm/cm
          436.82331 Hz/cm
    
```

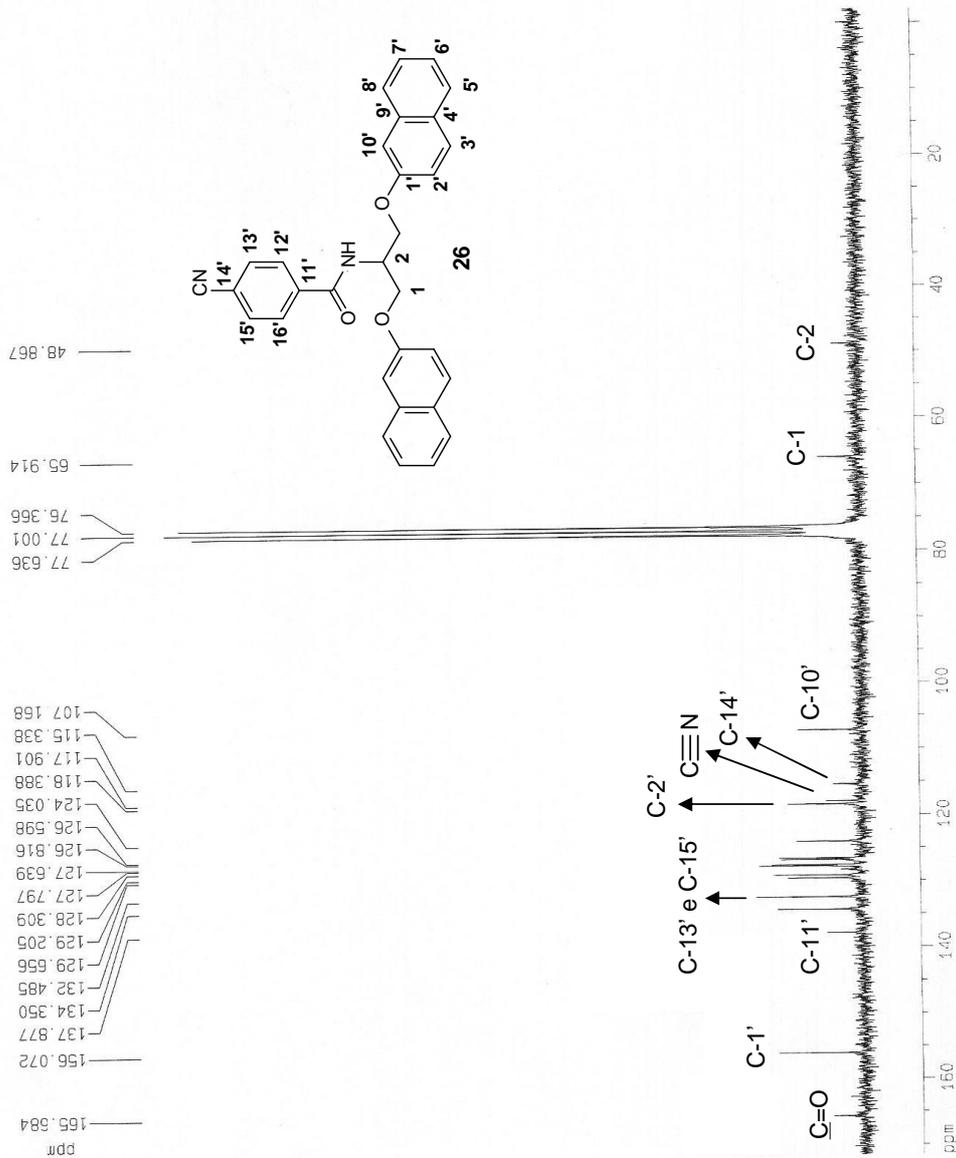


Figura A.45: Espectro de RMN ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 26

Current Data Parameters
 NAME r05540ANA
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20080504
 Time 3:35

INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinuc1
 PULPROG dept135
 TD 32768
 SOLVENT CDCl3
 NS 1024
 DS 0
 SWH 11990.407 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 4096
 DW 41.700 usec
 DE 7.50 usec
 TE 0.0 K
 CNST2 145.000000
 D1 2.00000000 sec
 d2 0.00344828 sec
 d12 0.00020000 sec
 DELTA 0.0001273 sec
 MCREST 0.00000000 sec
 MCMRK 0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PL1 0.00 dB
 SF01 50.3277408 MHz

===== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P3 11.20 usec
 PL2 22.40 usec
 PL3 70.00 usec
 PL4 -2.00 dB
 PL5 13.52 dB
 SF02 200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 50.3227313 MHz
 WDM EN
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 CY 6.00 cm
 F1P 144.432 ppm
 F1 7268.23 Hz
 F2P -0.711 ppm
 F2 7.25717 ppm/cm
 PPMCM 365.20081 Hz/cm

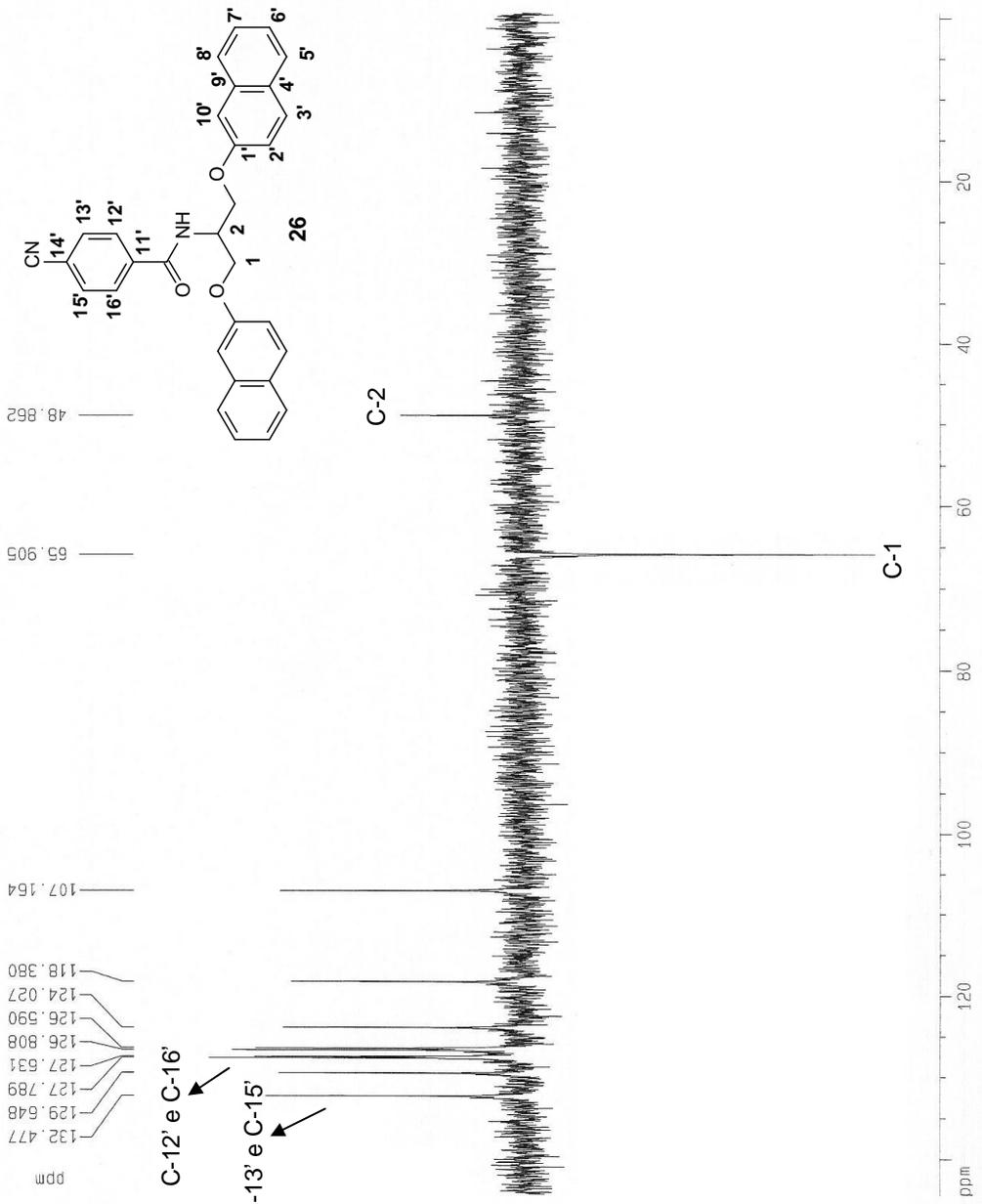


Figura A.46: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 26

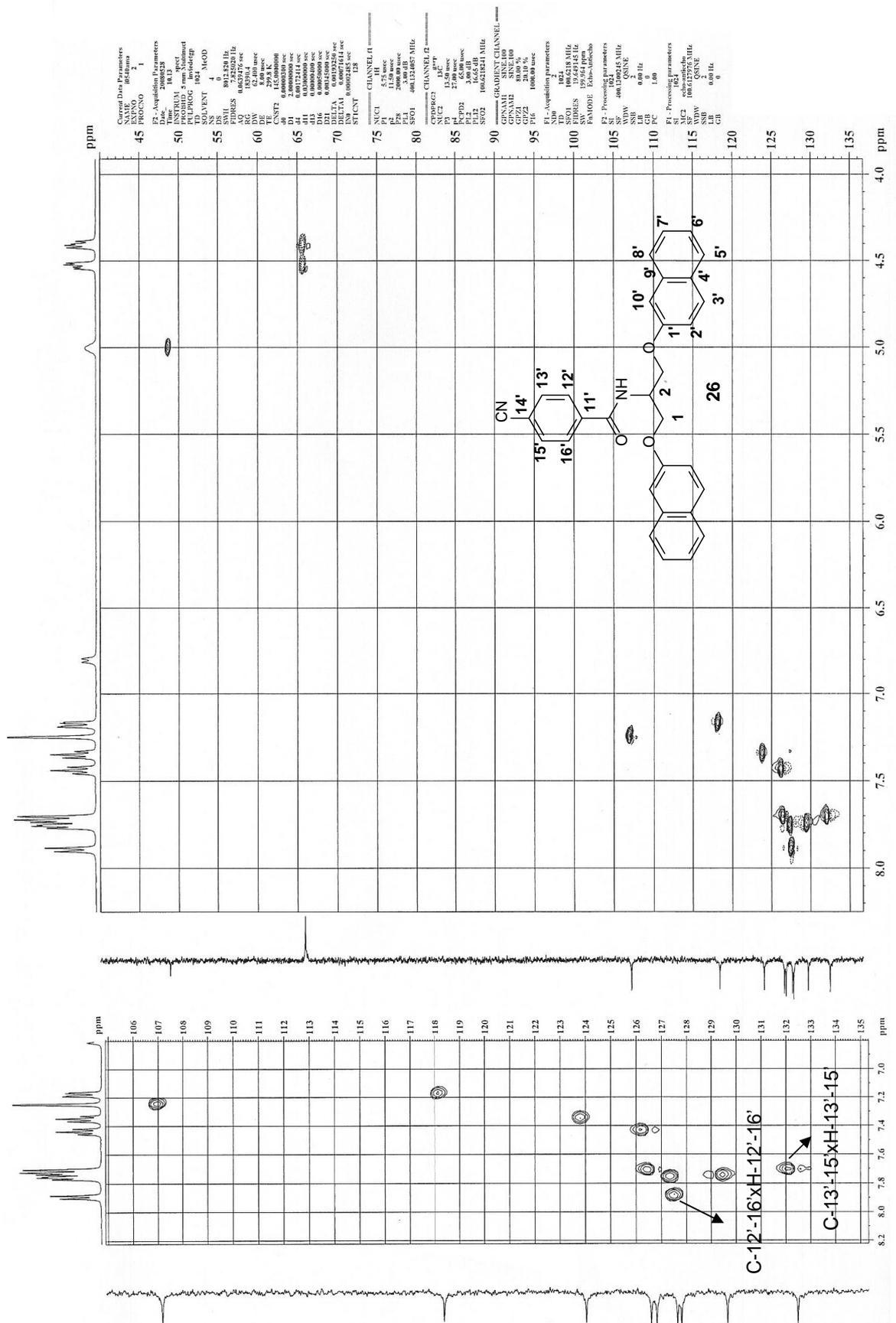


Figura A.47: Mapa de contornos HMBC (400MHz, CDCl₃) de 26

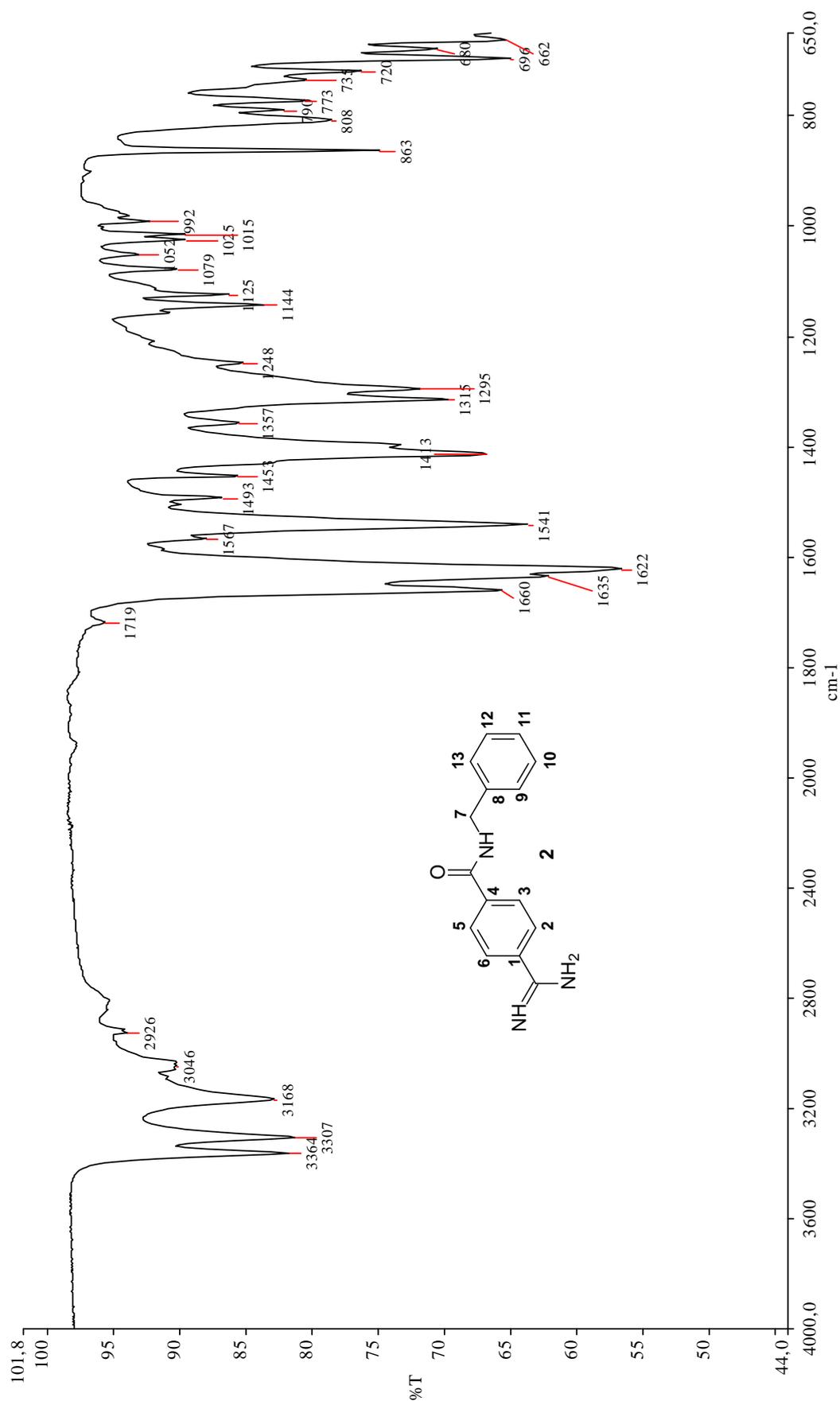


Figura A.49: Espectro no IV (ATR) de 2

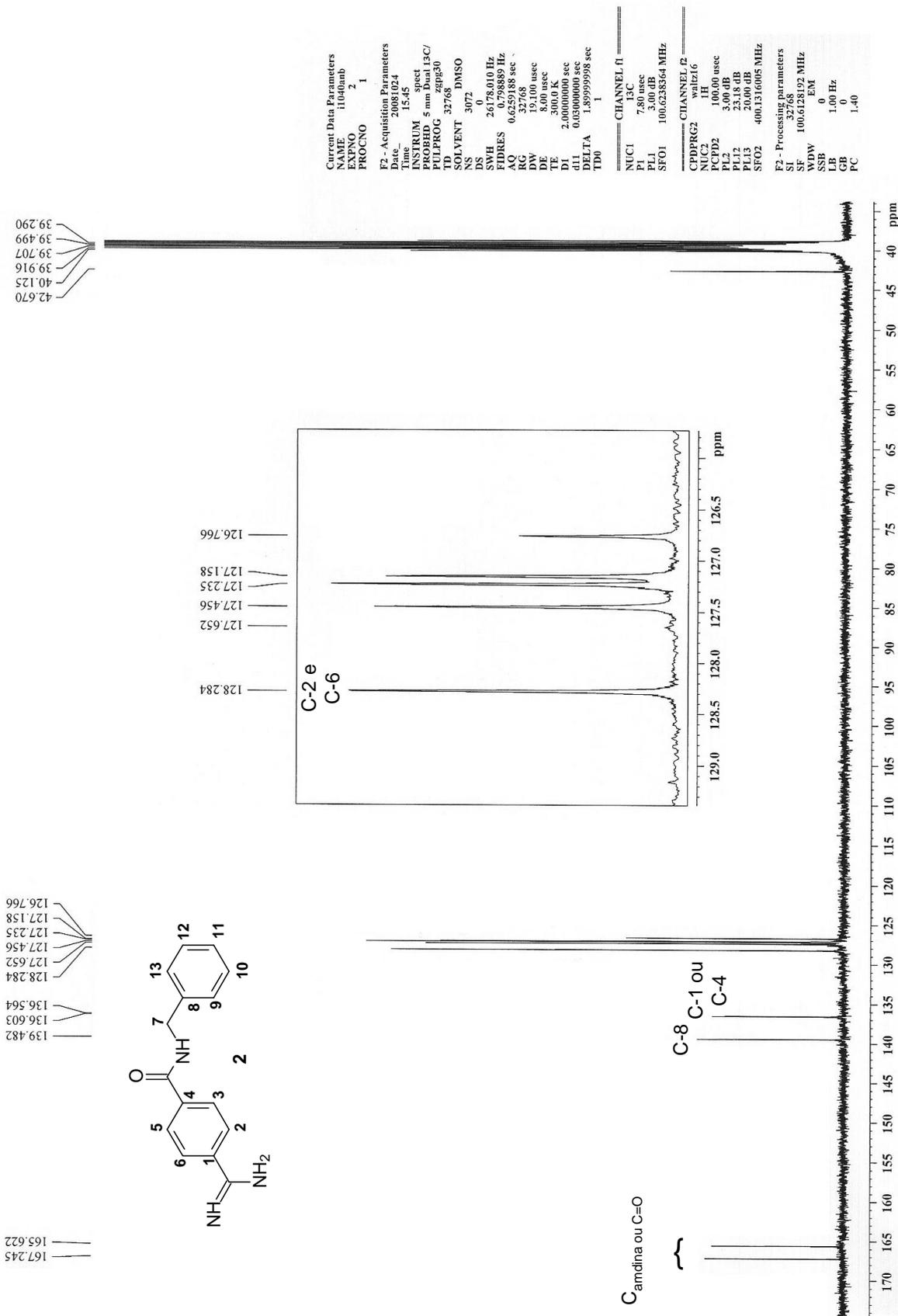


Figura A.51: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 2

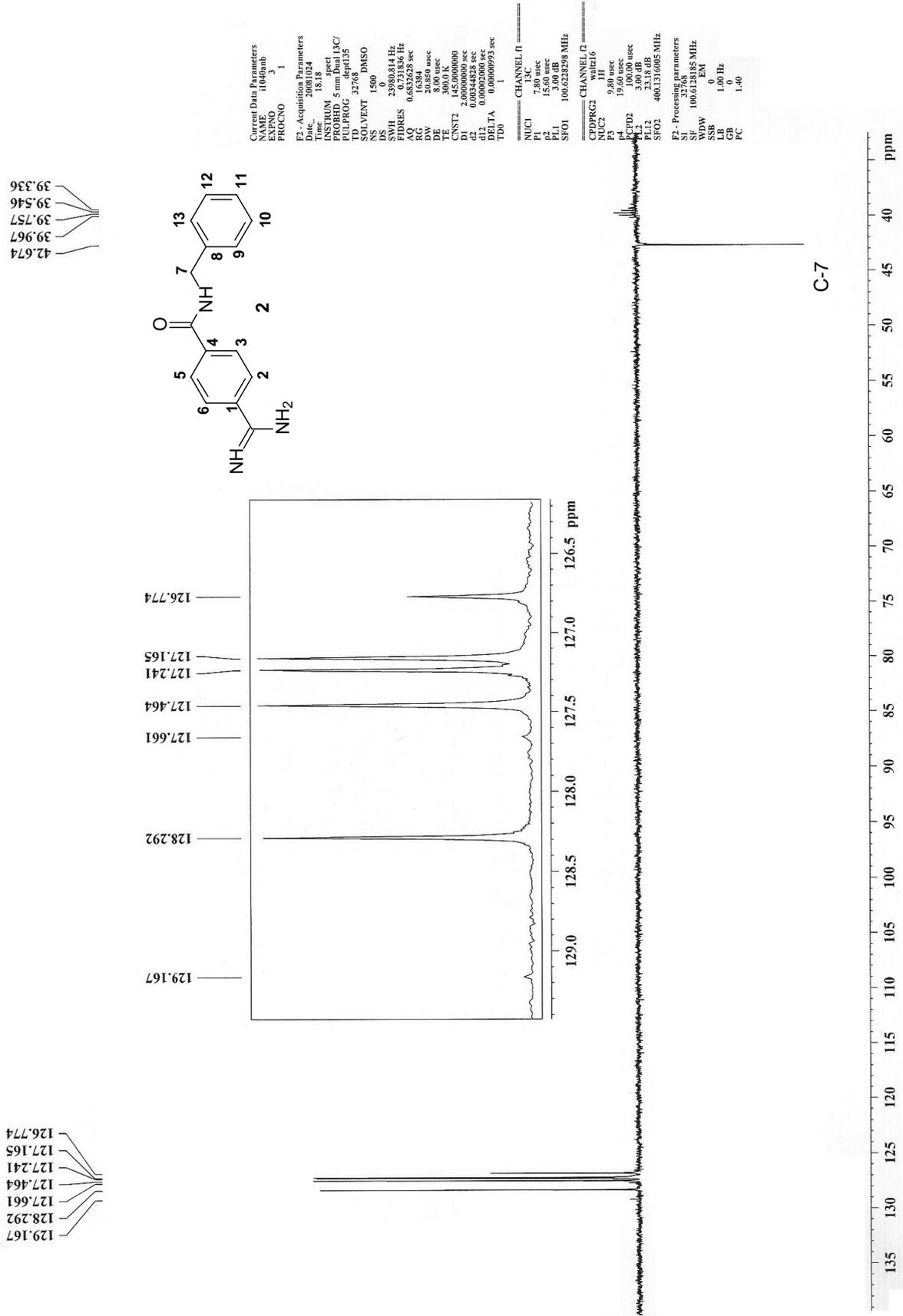


Figura A.52: Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆ de 2)

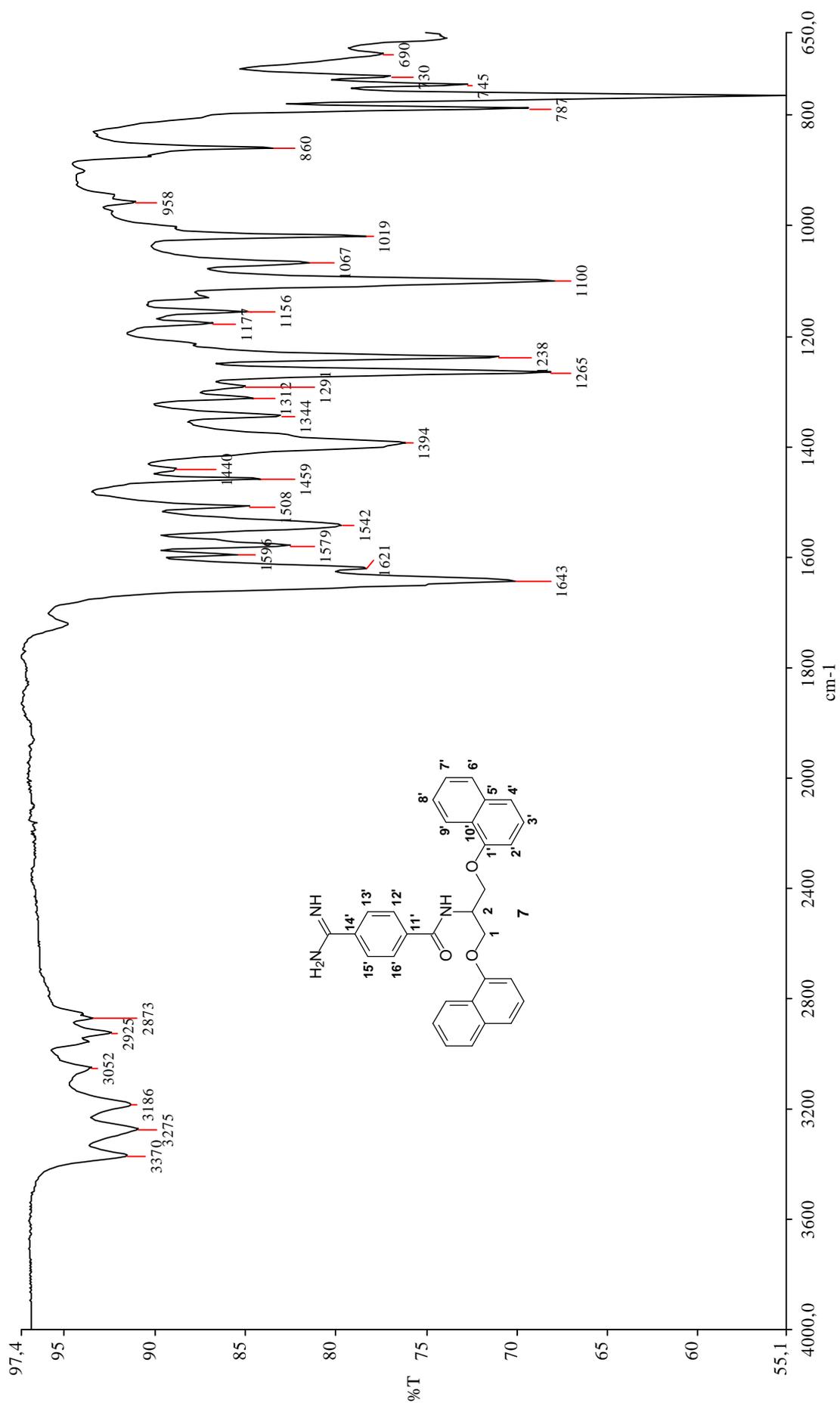


Figura A.53: Espectro no IV (ATR) de 7

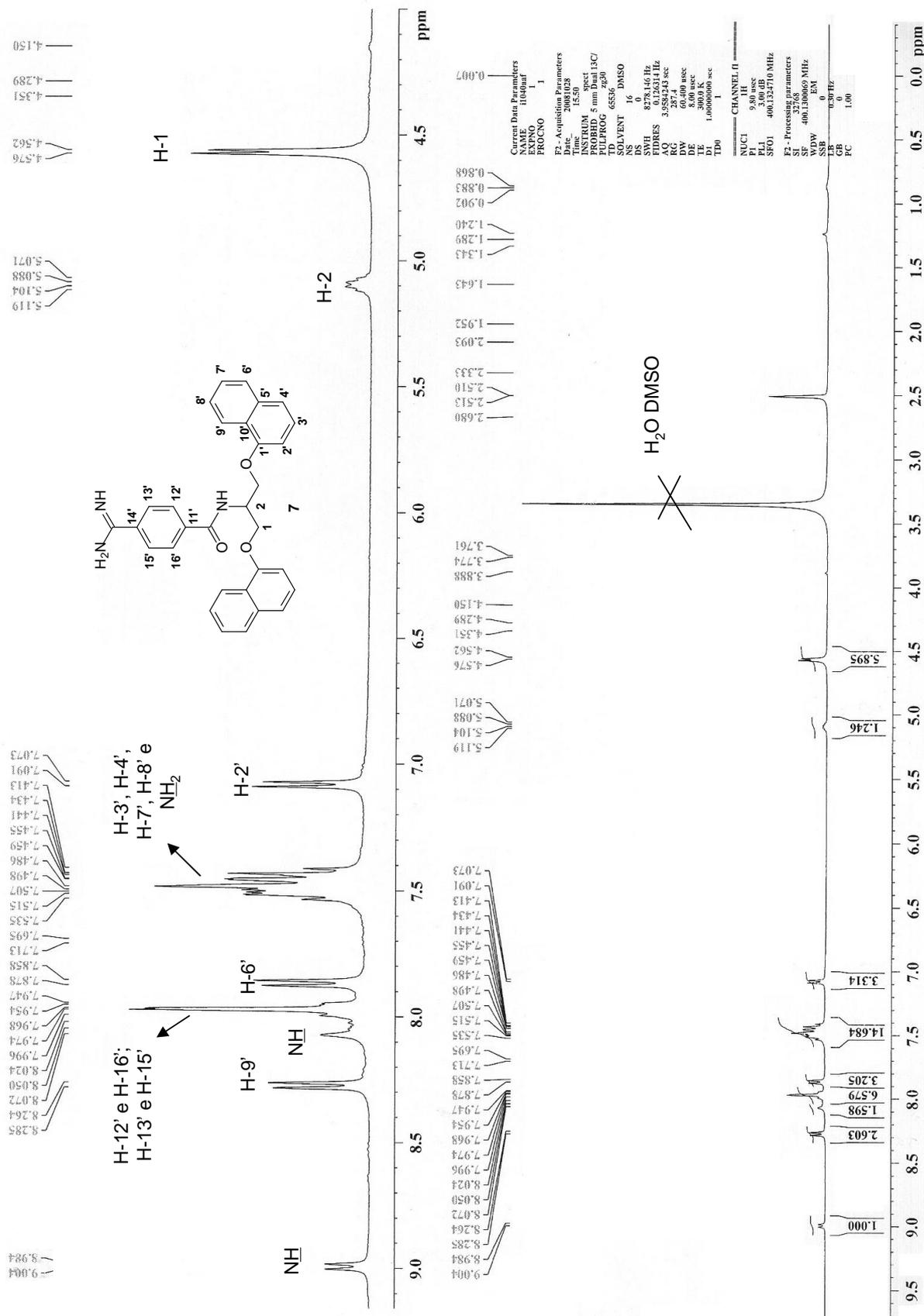
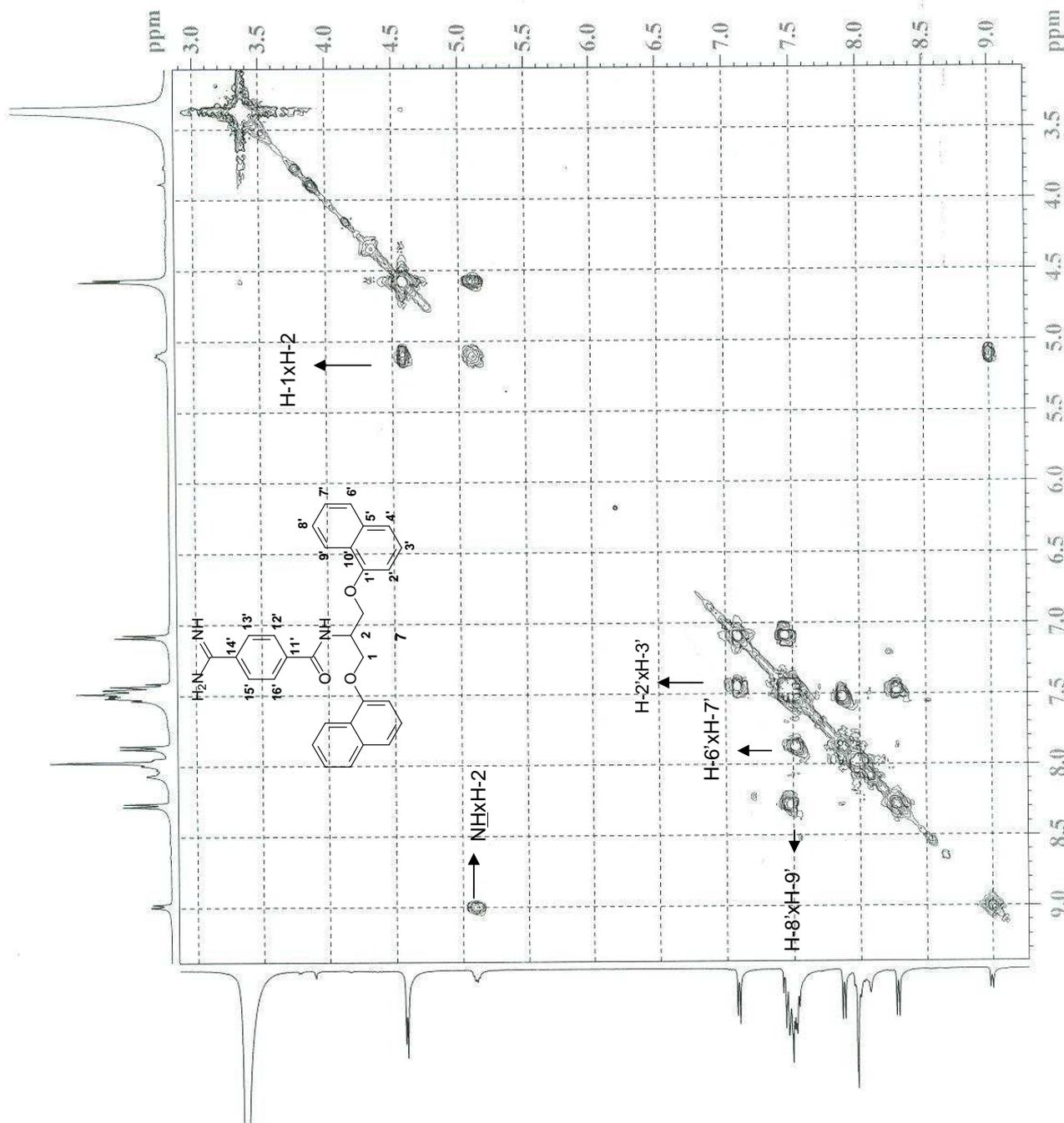


Figura A.54: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 7



Current Data Parameters
 NAME i1140aaf
 EXPNO 5
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20081106
 Time 7.30
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG essygpqf
 TD 2048
 SOLVENT DMSO
 NS 1
 DS 2

SWH 5341.880 Hz
 FIDRES 2.608340 Hz
 AQ 0.1917428 sec
 RG 287.4
 DW 93.600 usec
 DE 8.00 usec
 TE 300.1 K
 d0 0.00000300 sec
 d1 1.48689198 sec
 d13 0.00000400 sec
 D16 0.00050000 sec
 IN0 0.00018720 sec

CHANNEL f1
 NUC1 1H
 P0 550 usec
 PL1 3.00 dB
 SFO1 400.1324057 MHz

GRADIENT CHANNEL
 GPNAM1 SINE.100
 GPNAM2 SINE.100
 GPZ1 10.00 %
 GPZ2 10.00 %
 P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
 ND0 1
 TD 256
 SFO1 400.1324 MHz
 FIDRES 20.866720 Hz
 SW 13.350 ppm
 FbMODE QF

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.1300000 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 400.1300000 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

Figura A.55: Mapa de contornos COSY (400MHz, DMSO-d6) de 7

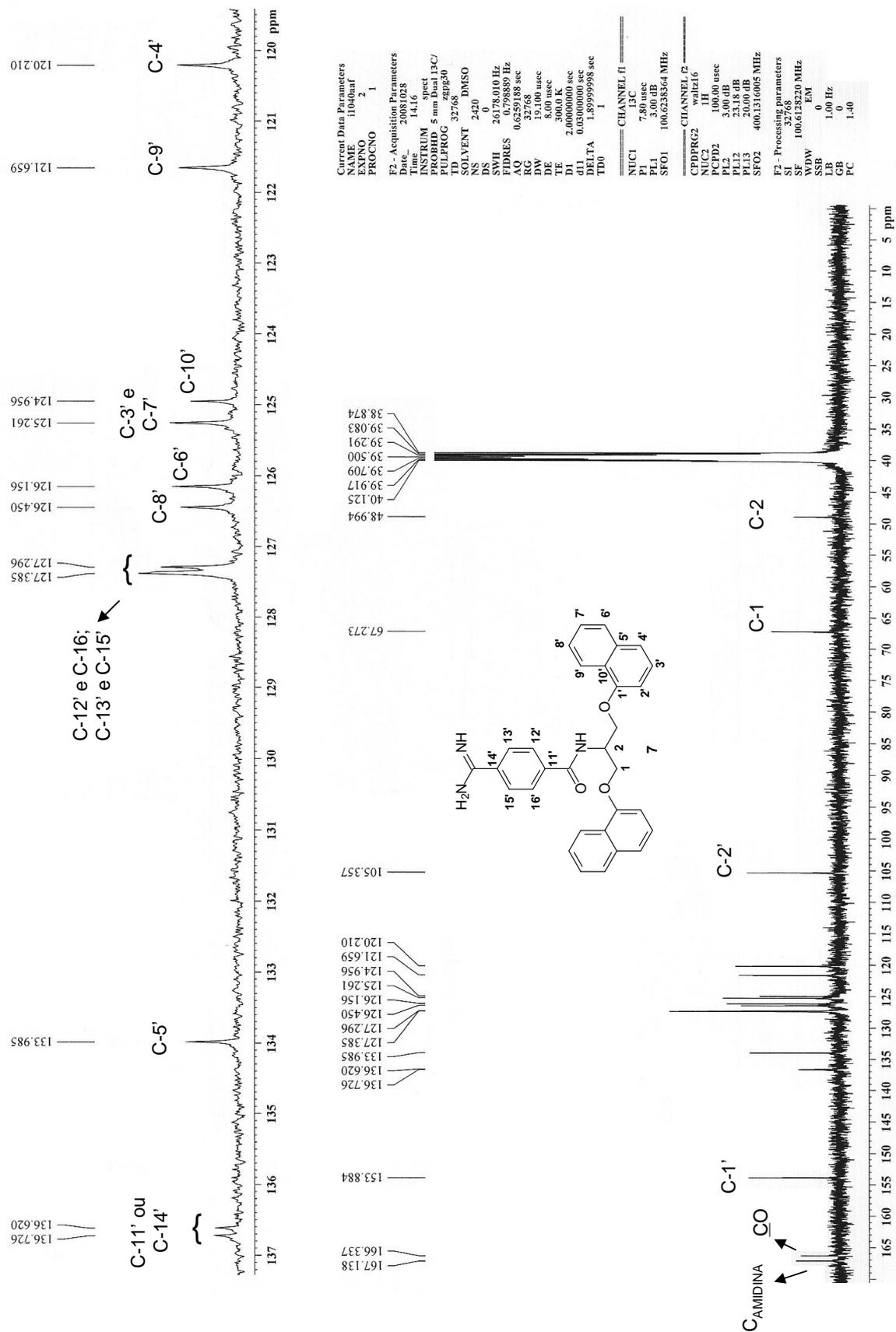


Figura A.56: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) de 7

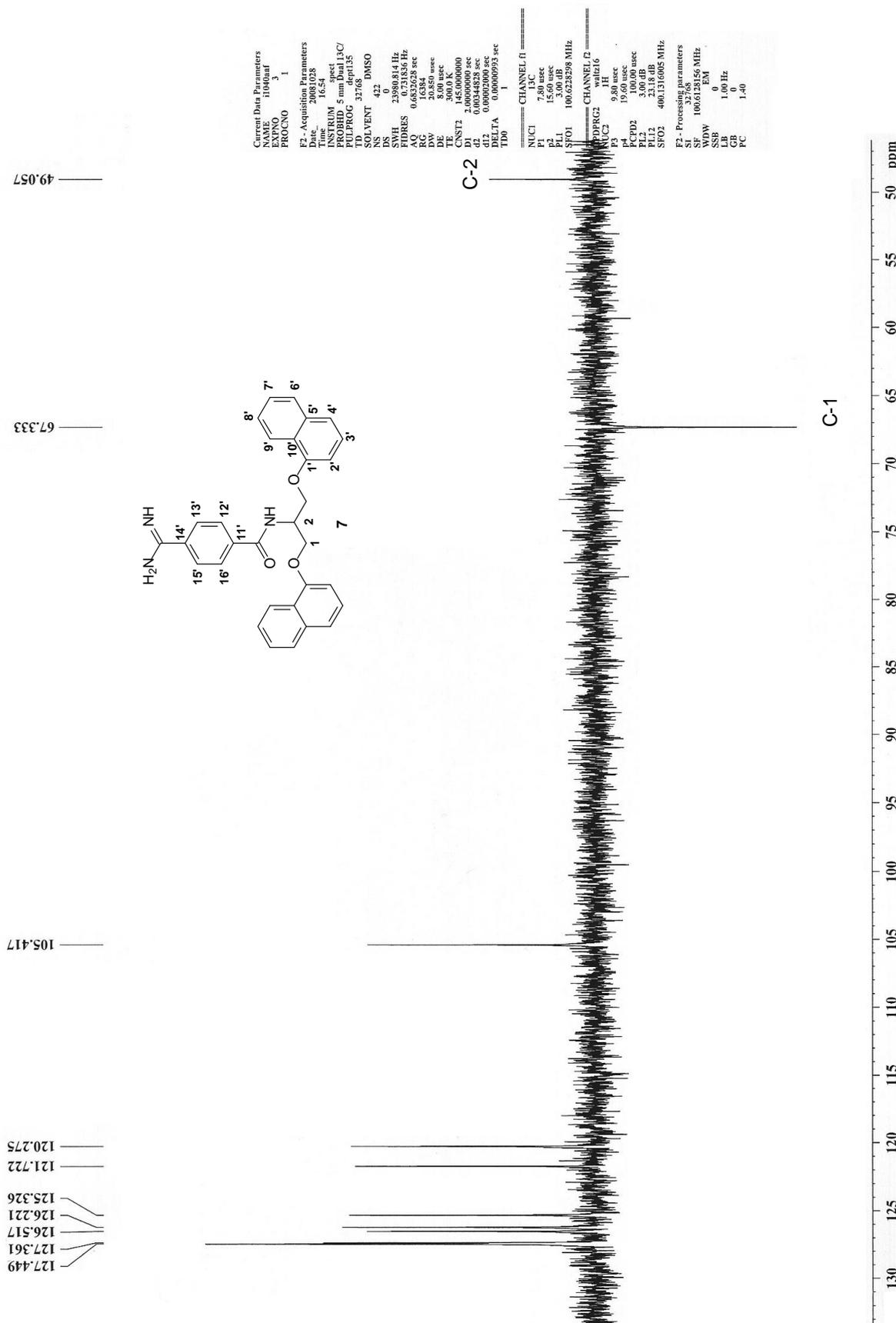


Figura A.57: Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 7

anacrolina/FAFAR - aaf

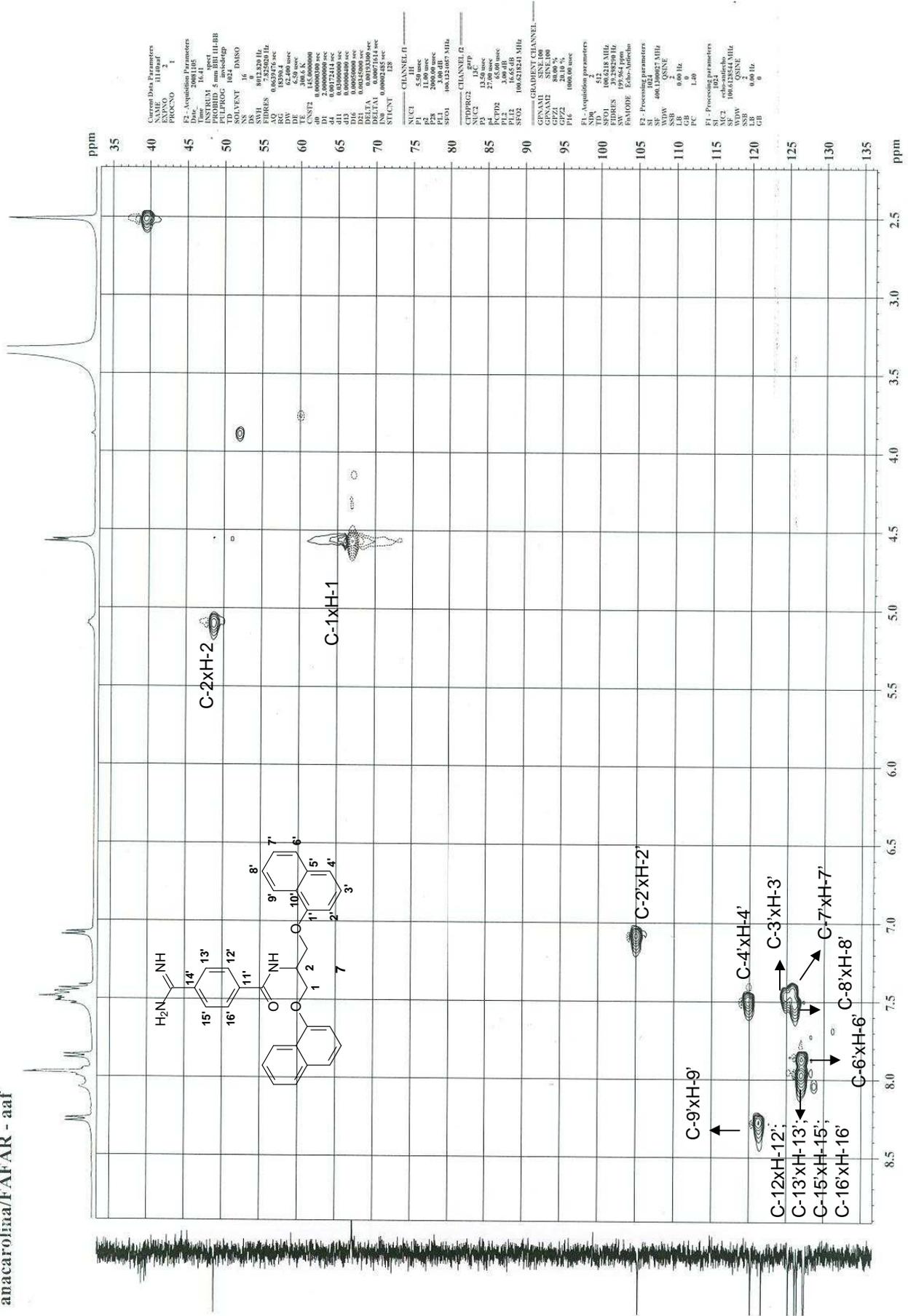


Figura A.58: Mapa de contornos HMQC (400MHz, DMSO-d6) de 7

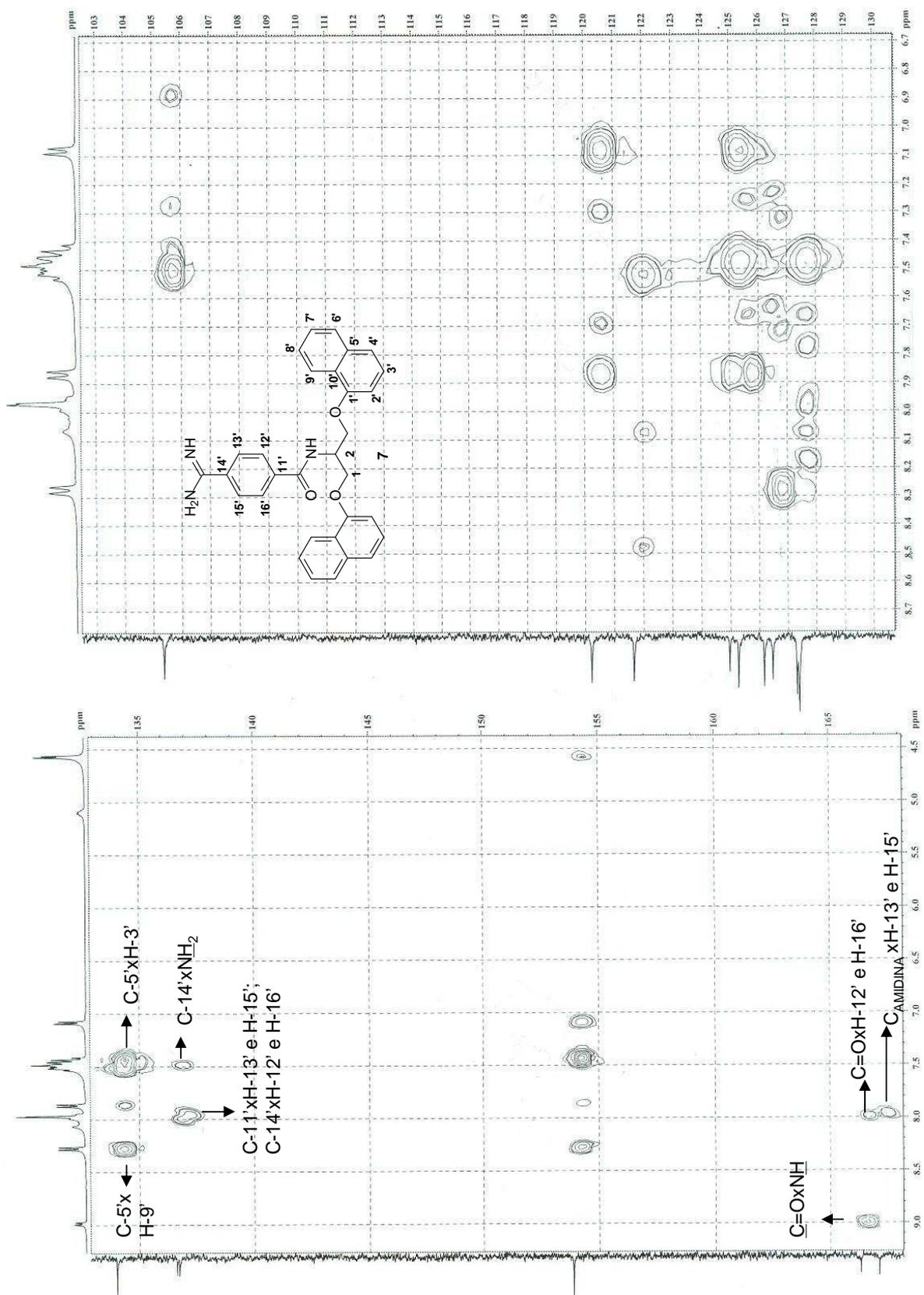


Figura A.59: Mapa de contornos HMBC (400MHz, DMSO-d6) de 7

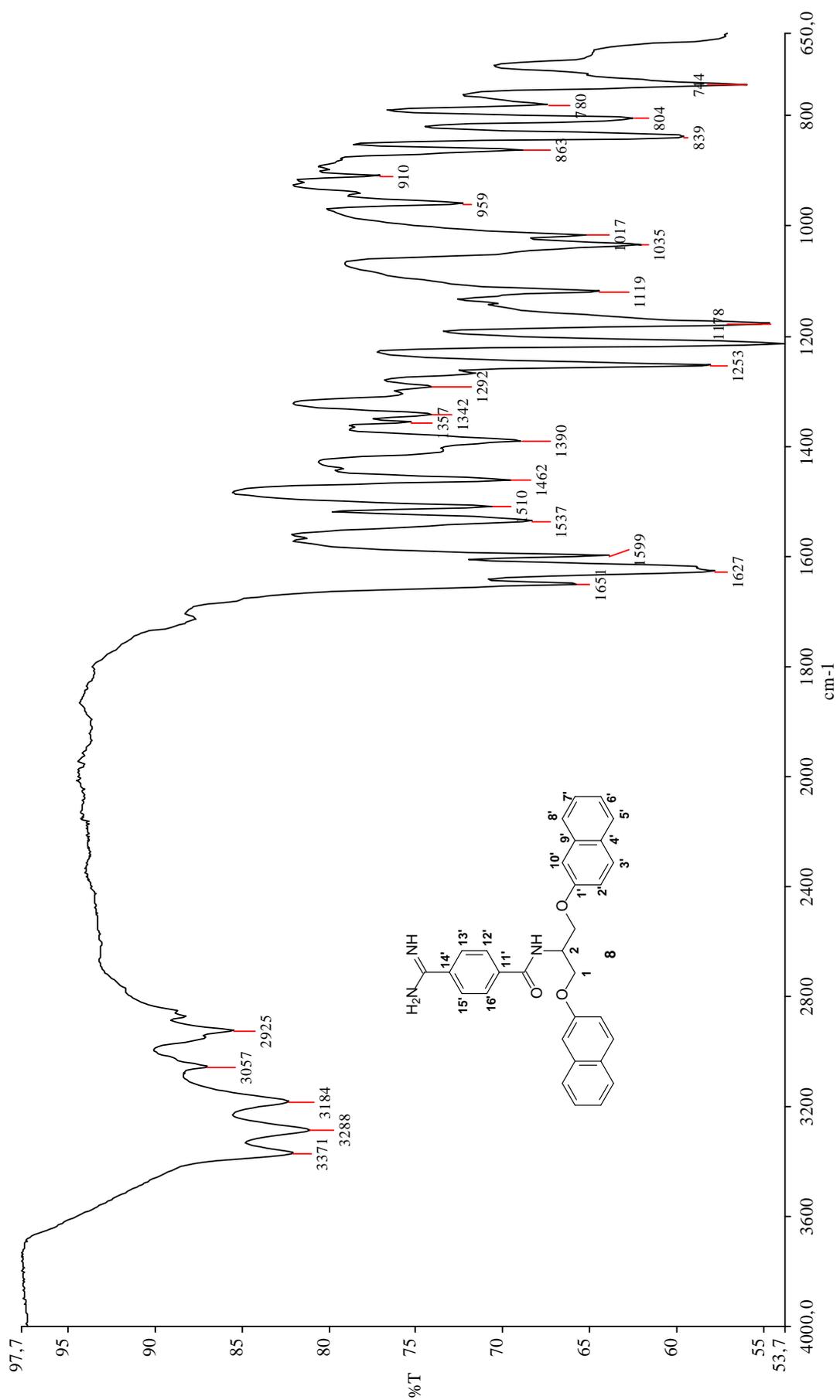


Figura A.60: Espectro no IV (ATR) de 8

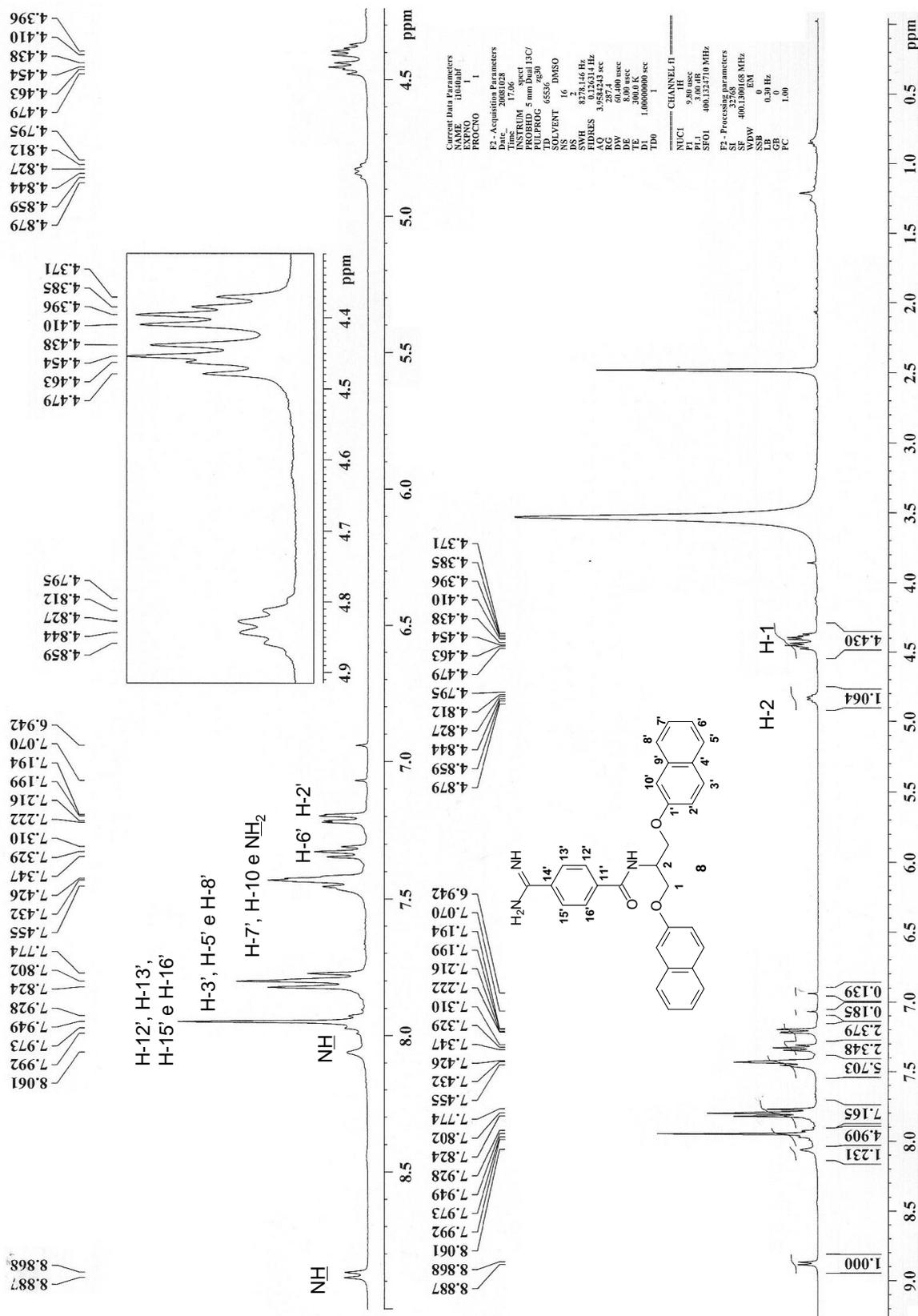


Figura A.61: Espectro de RMN de ¹H (400MHz, DMSO-d₆) de 8

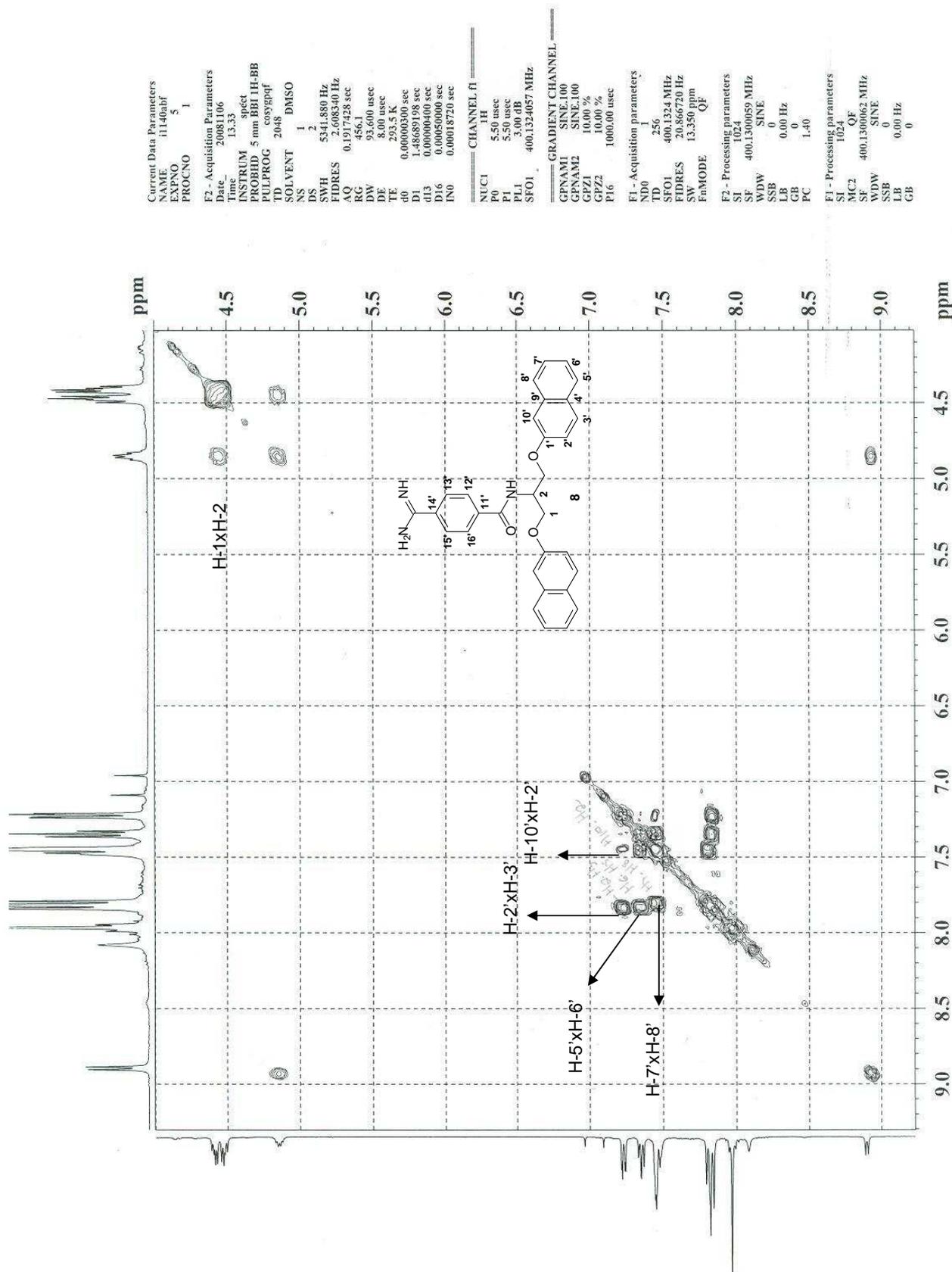


Figura A.62: Mapa de contornos COSY (400MHz, DMSO-d6) de 8

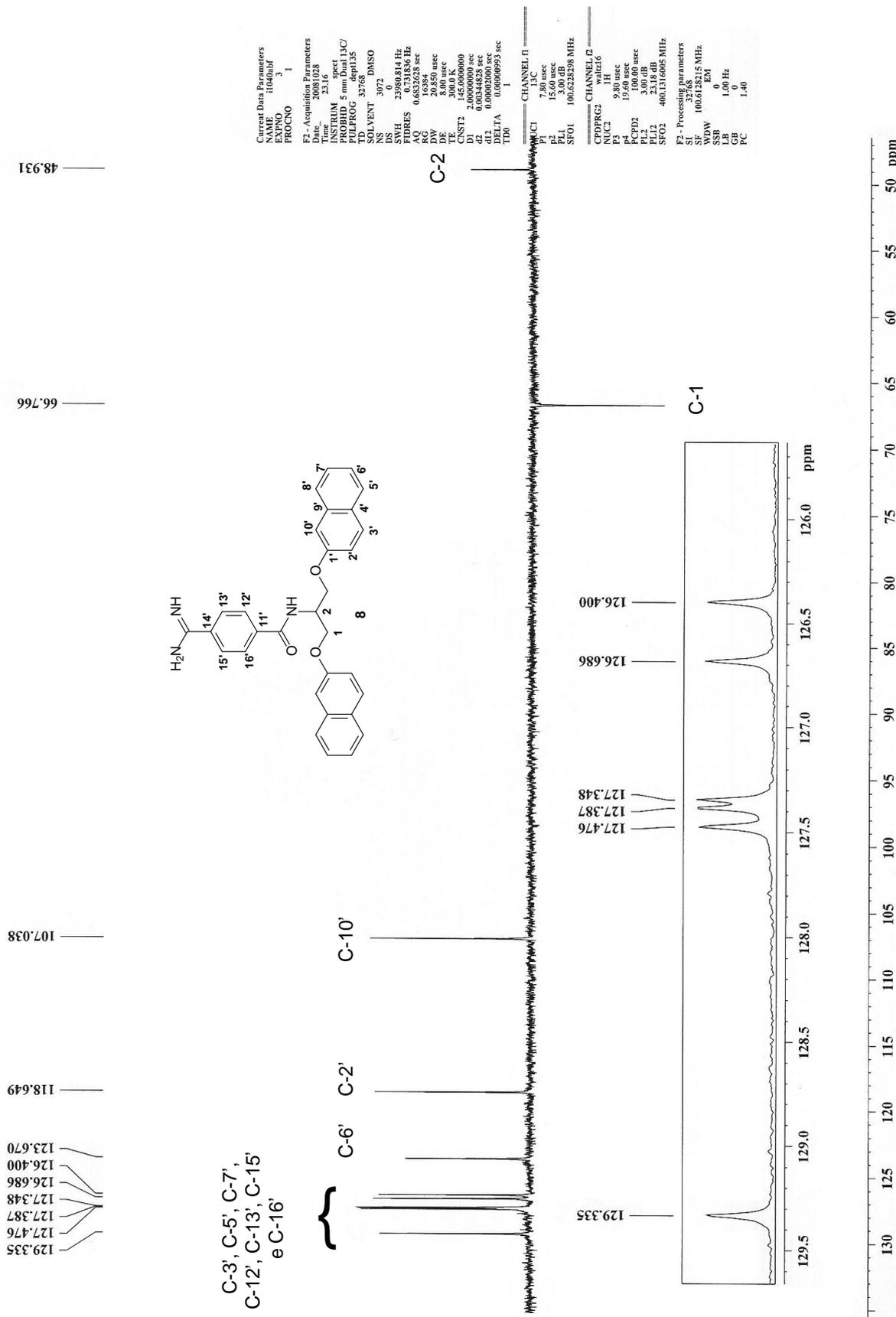


Figura A.64: Subespectro DEPT 135 (50MHz, DMSO-d₆) de 8

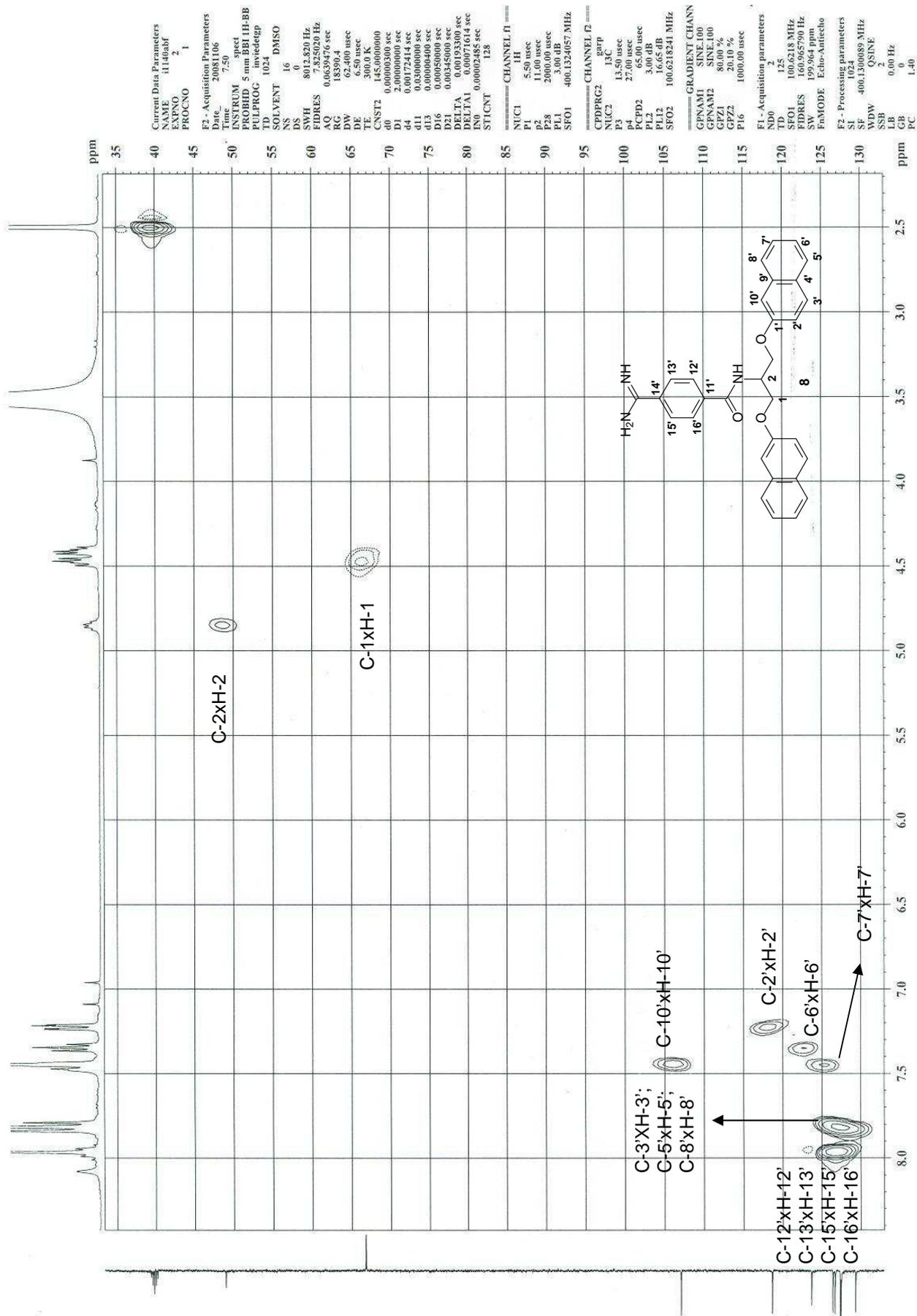


Figura A.65: Mapa de contornos HMQC (400MHz, DMSO-d6) de 8

eNB Ana Carolina

```

Current Data Parameters
NAME      r1040enb
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20081013
Time     12.10
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinucl
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        16
DS        2
SWH       4139.073 Hz
FIDRES   0.063157 Hz
AQ        7.9167986 sec
RG        574.7
DW        120.800 usec
DE        7.50 usec
TE        0.0 K
D1        1.00000000 sec
MCREST   0.00000000 sec
MCWRK    0.01500000 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        11.20 usec
PL1       -2.00 dB
SF01      200.1312359 MHz

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        200.1300013 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00

1D NMR plot parameters
CX        20.00 cm
CY        10.00 cm
F1P       8.700 ppm
F1        1741.05 Hz
F2P       -0.440 ppm
F2        -88.01 Hz
PPMCH    0.45697 ppm/cm
HZCM     91.45312 Hz/cm
    
```

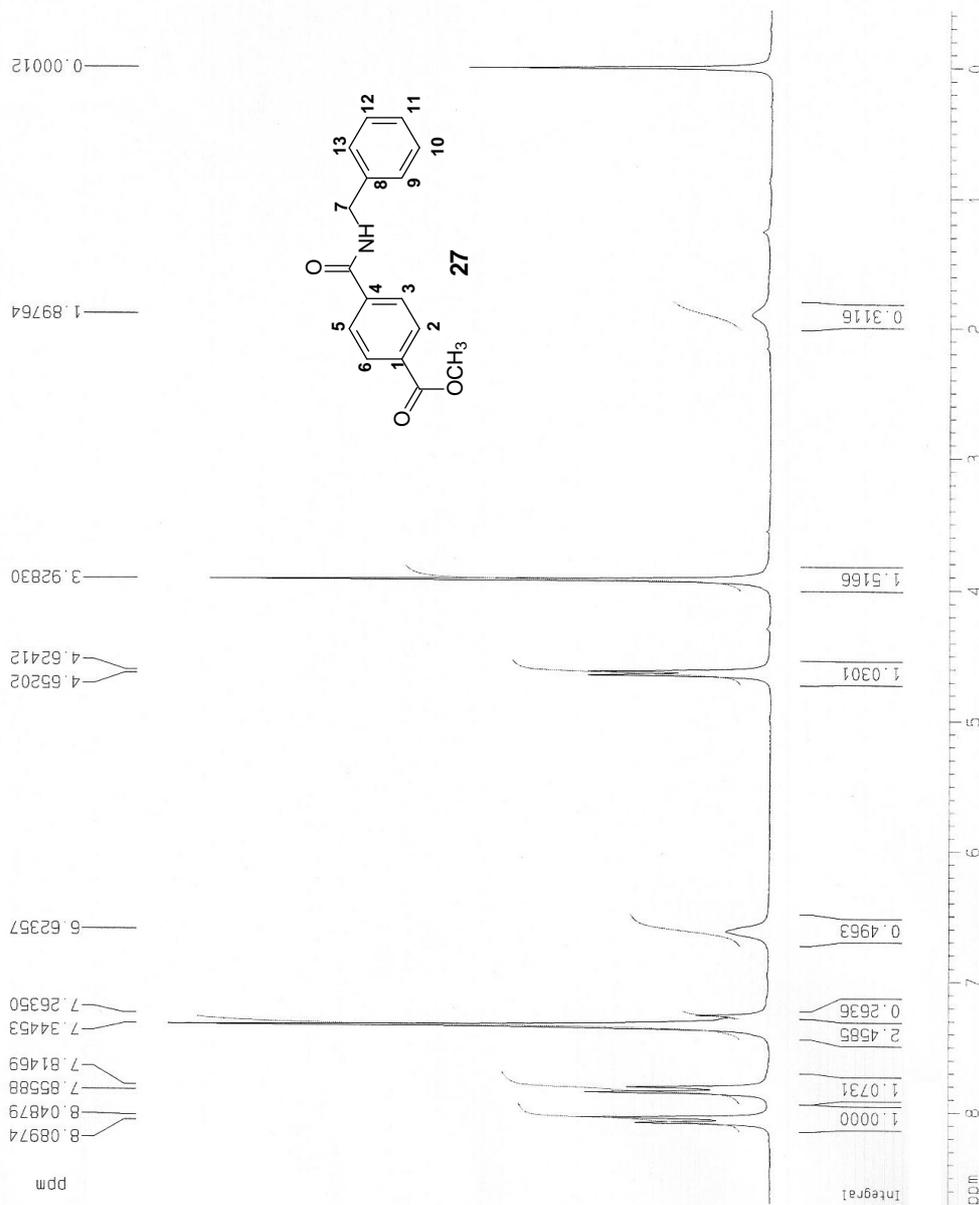


Figura A.67: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 27

eNB Ana Carolina

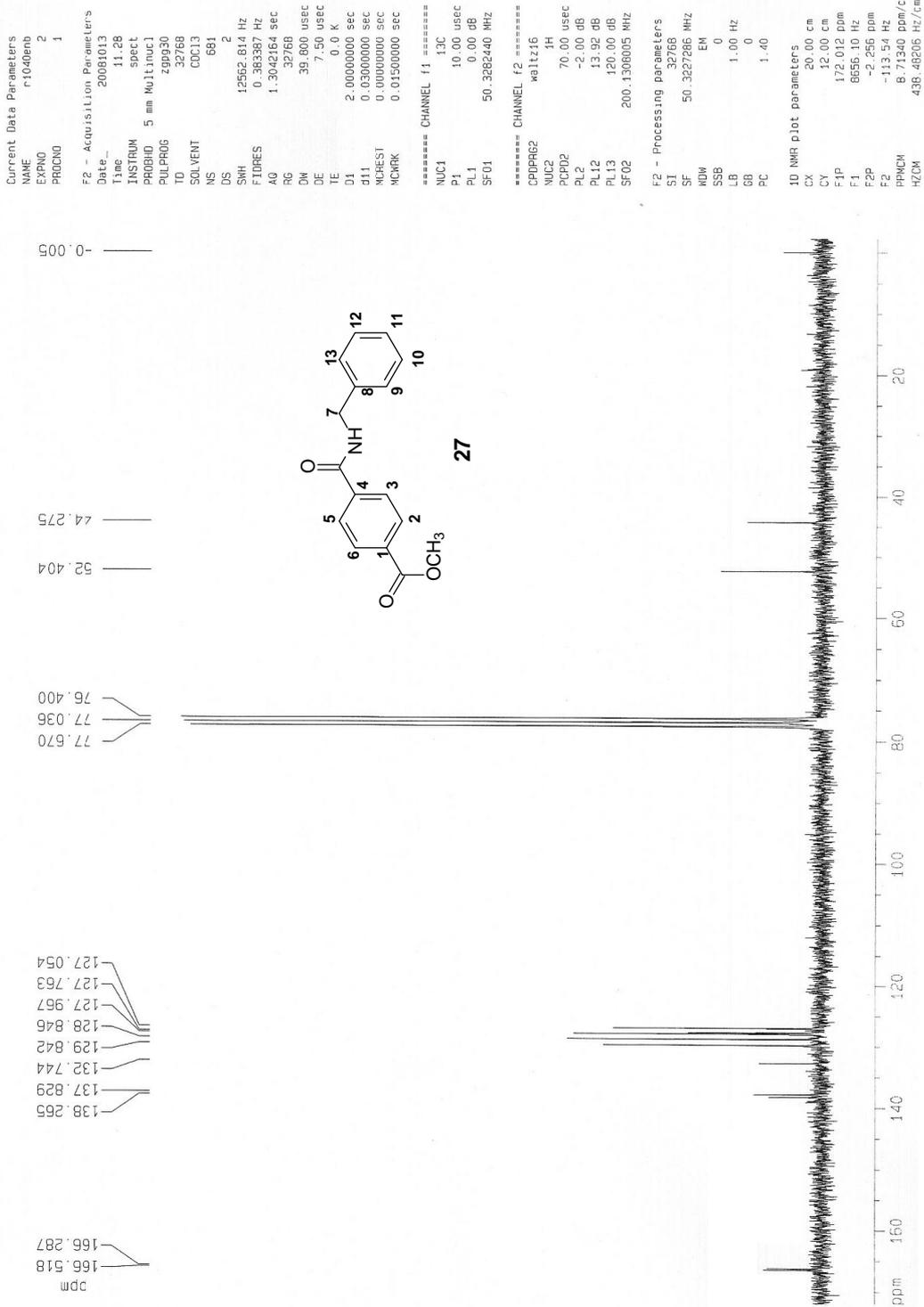


Figura A.68: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 27

eNB Ana Carolina

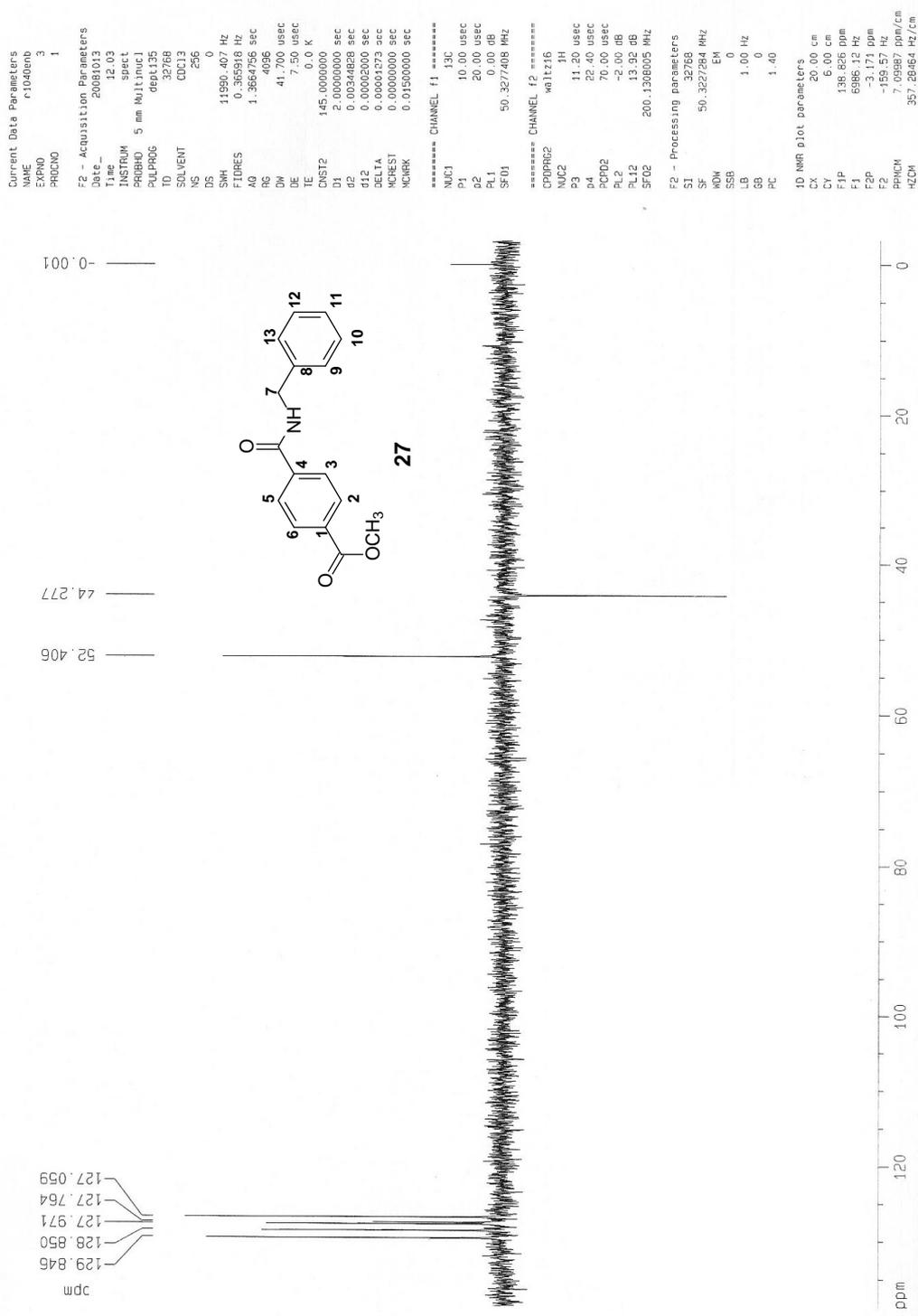


Figura A.69: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 27

eSA Ana Carolina

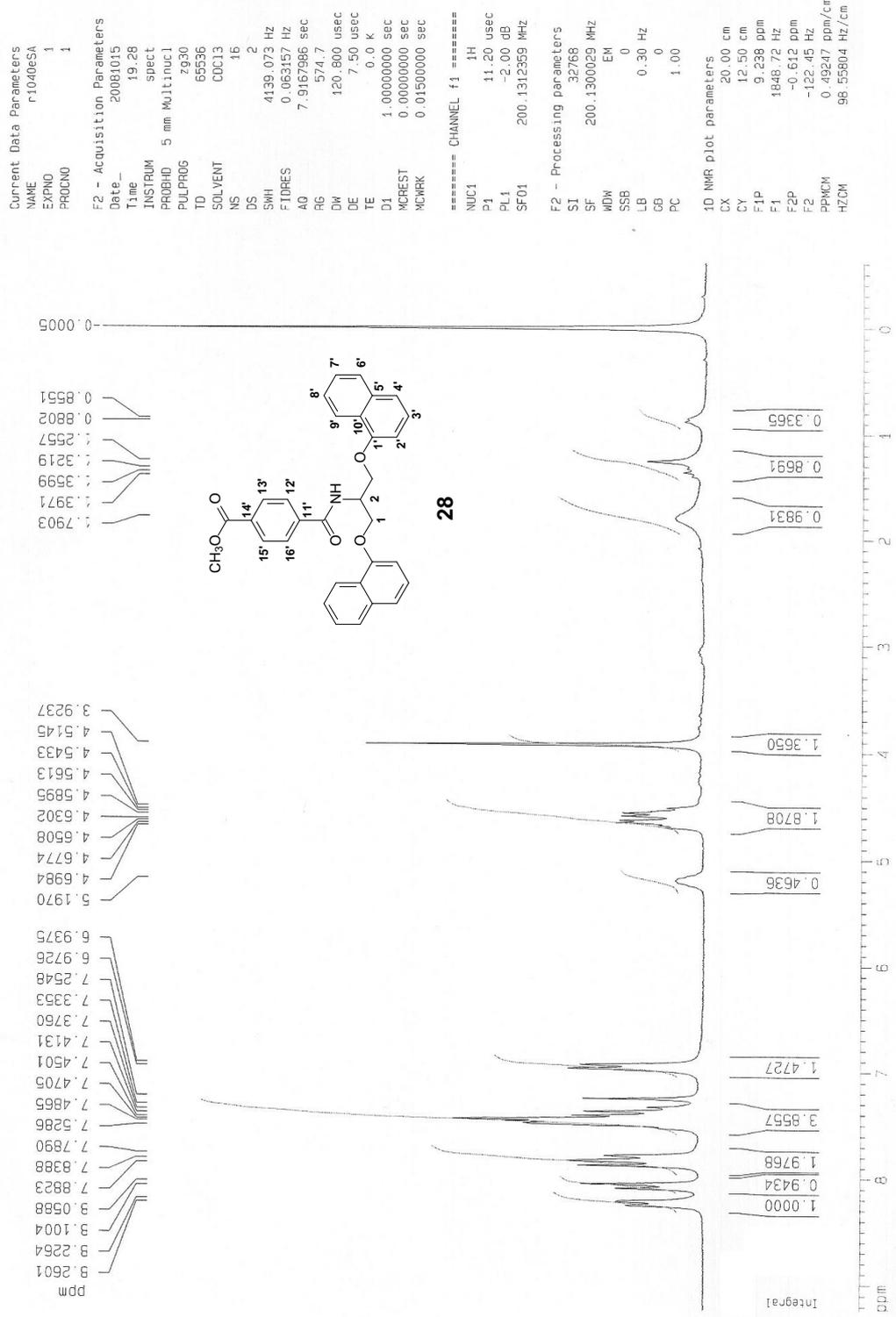


Figura A.70: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 28

eSA Ana Carolina

```

Current Data Parameters
NAME      F1D0eSA
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20081016
Time     4.58
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm Multinuc1
PULPROG  zgpg30
TD       32768
SOLVENT  CDCl3
NS       10240
DS       2
SWH      12562.814 Hz
FIDRES   0.383387 Hz
AQ       1.3042164 sec
RG       32768
DM       39.800 usec
DE       7.50 usec
TE       0.0 K
d11      2.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
d11      0.00000000 sec
d11      0.00000000 sec
d11      0.01500000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PL1      0.00 dB
SFO1     50.3262440 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
PCPD2    70.00 usec
PL2      -2.00 dB
PL12     13.92 dB
PL13     120.00 dB
SFO2     200.1308005 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       50.3227290 MHz
WDW      EN
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40

1D NMR plot parameters
CX       20.00 cm
CT       40.00 cm
F1P      172.444 ppm
F1       8677.84 Hz
F2P      -2.703 ppm
F2       -136.04 Hz
PPHMC    8.75735 ppm/cm
HZCM     440.69379 Hz/cm
    
```

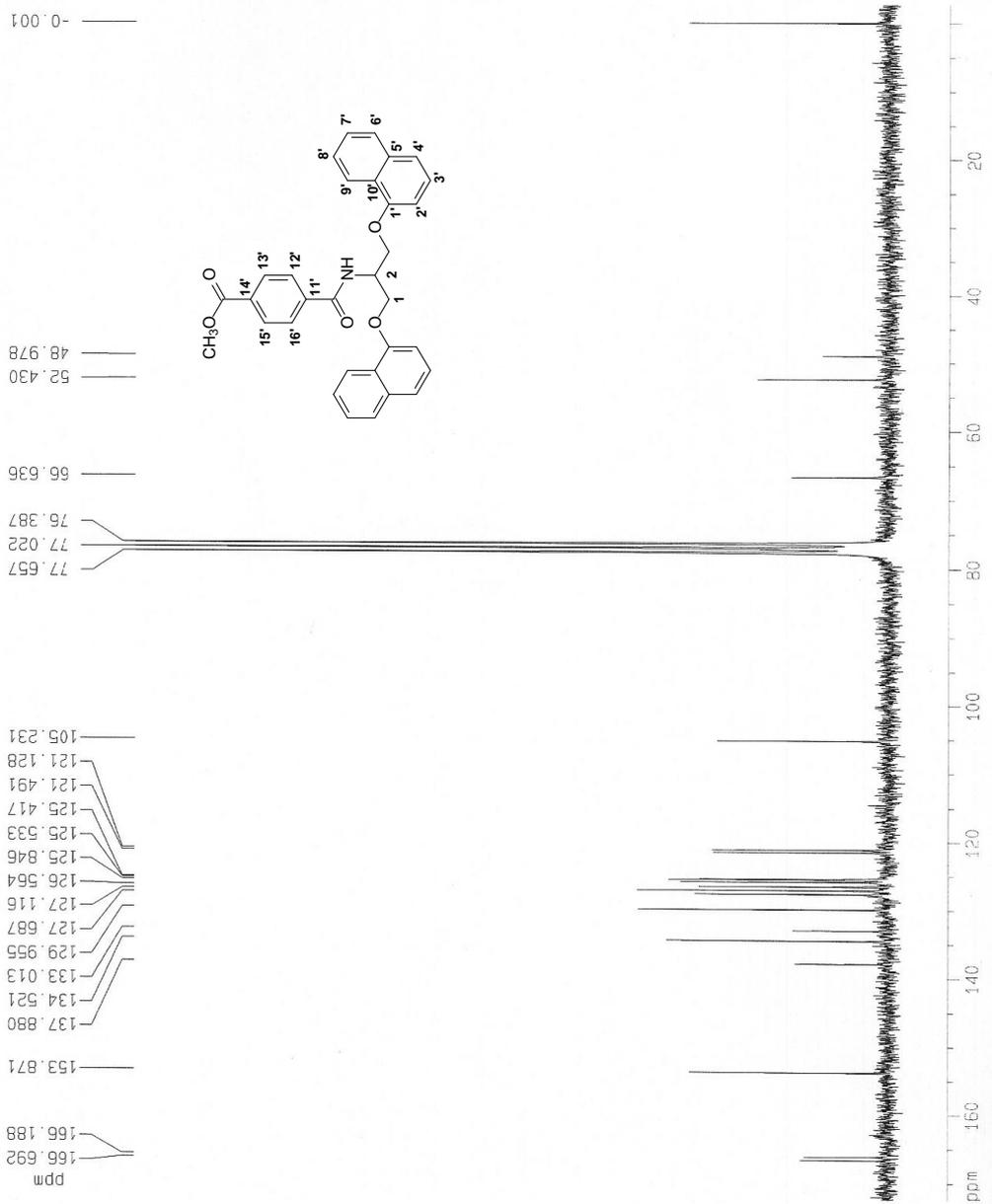


Figura A.71: Espectro de RMN de ^{13}C (50MHz, CDCl_3) de 28

eSA Ana Carolina

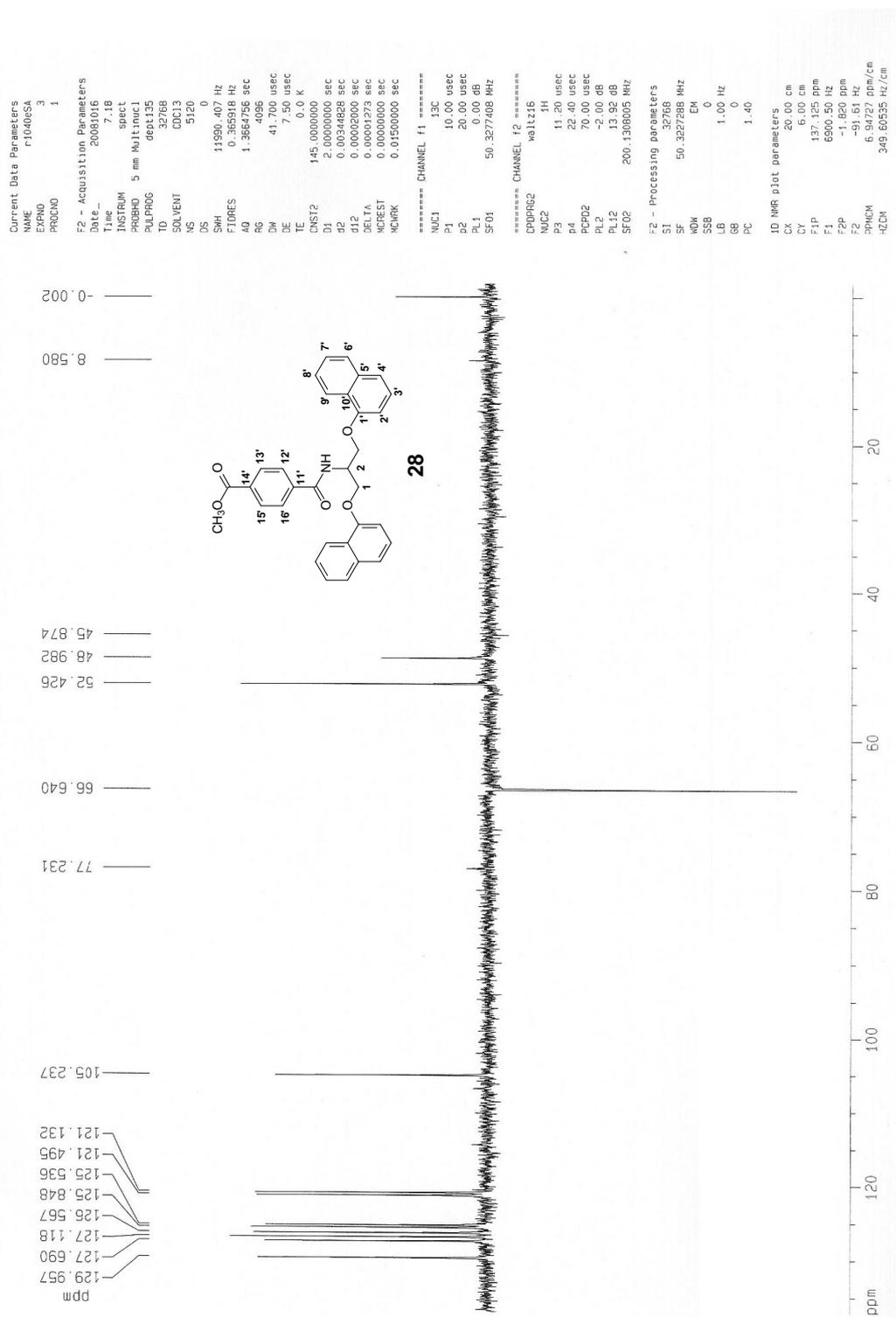


Figura A.72: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 28

eSB Ana Carolina

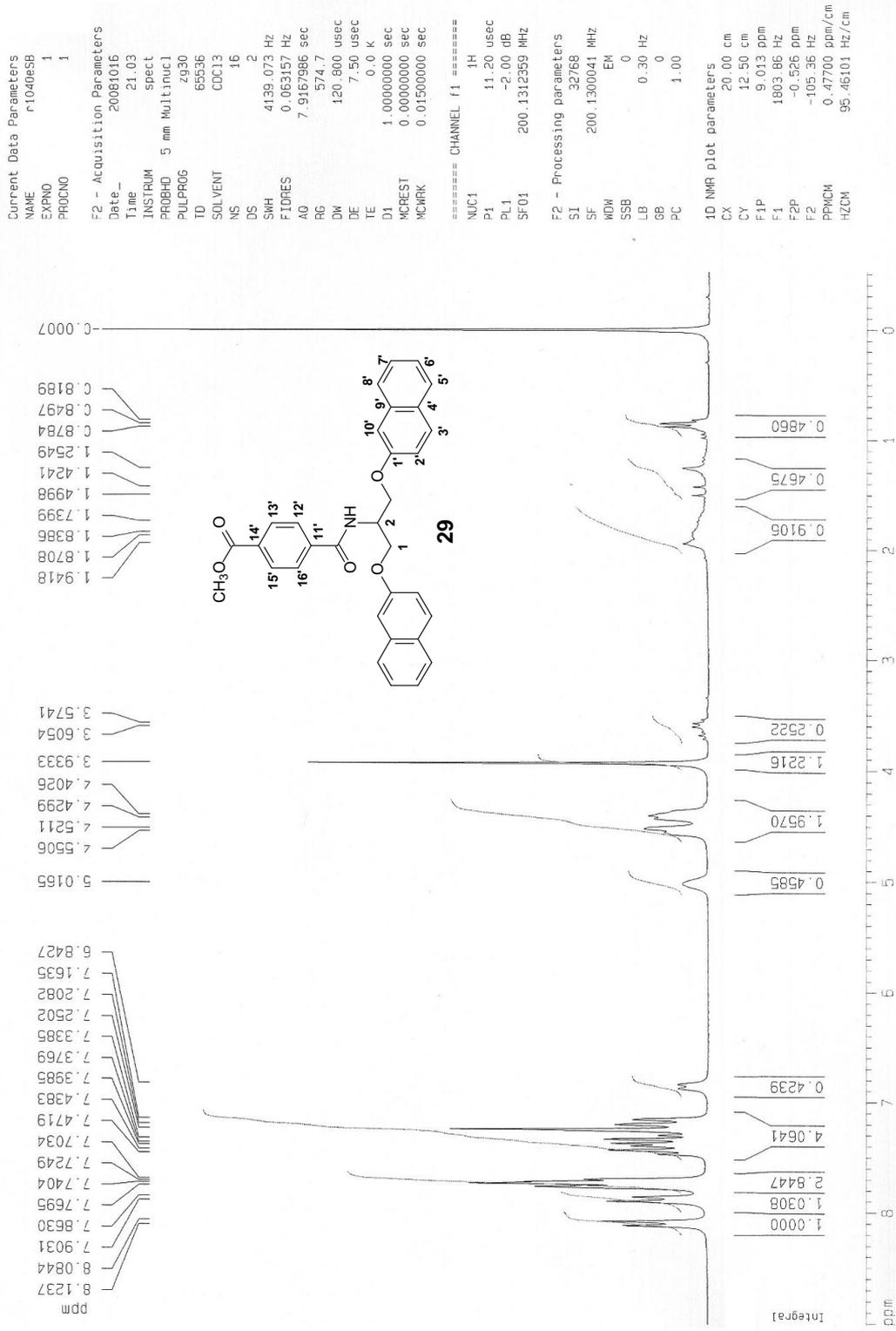


Figura A.73: Espectro de RMN de ¹H (200MHz, CDCl₃) de 29

eSB Ana Carolina

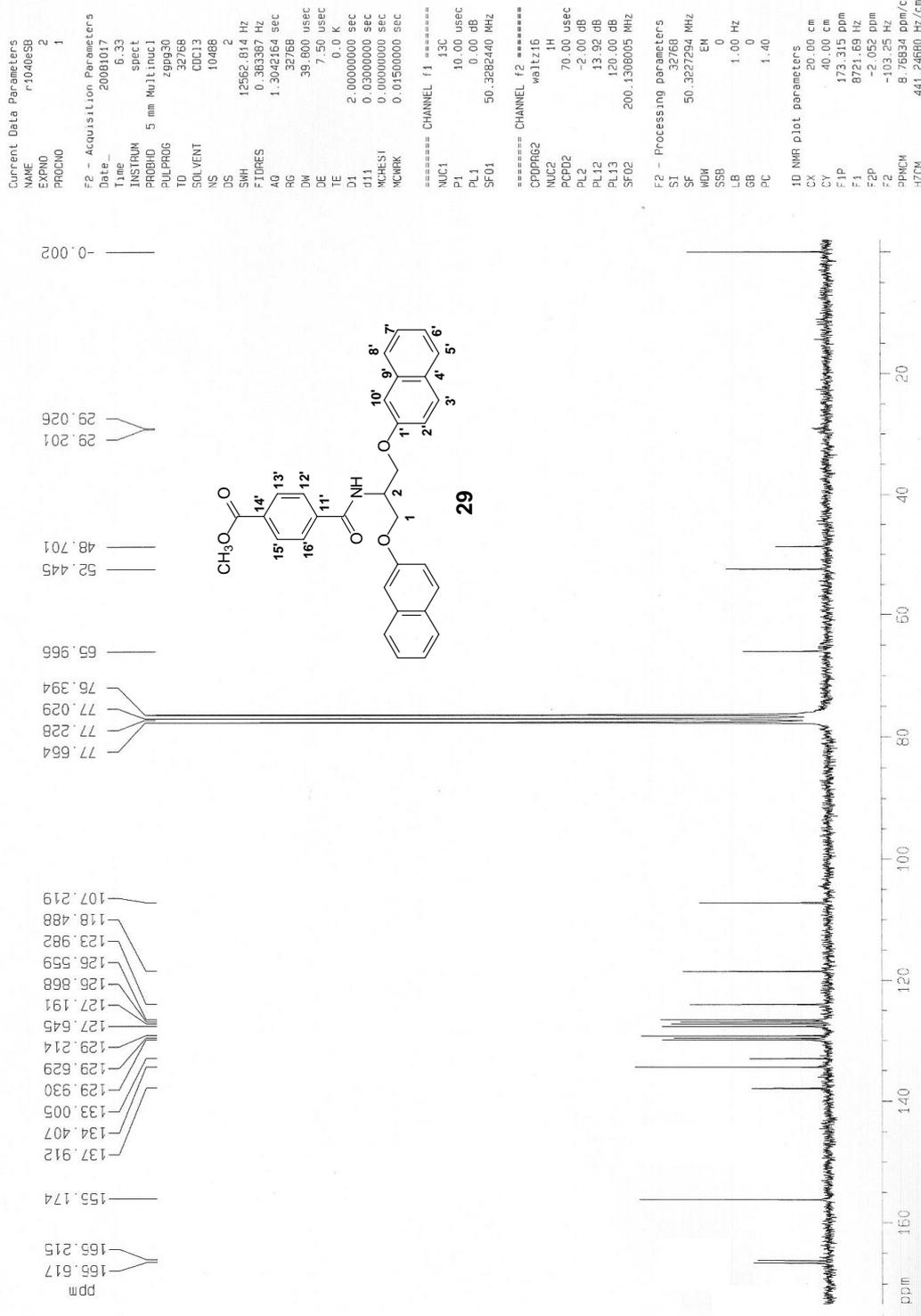


Figura A.74: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, CDCl₃) de 29

eSB Ana Carolina

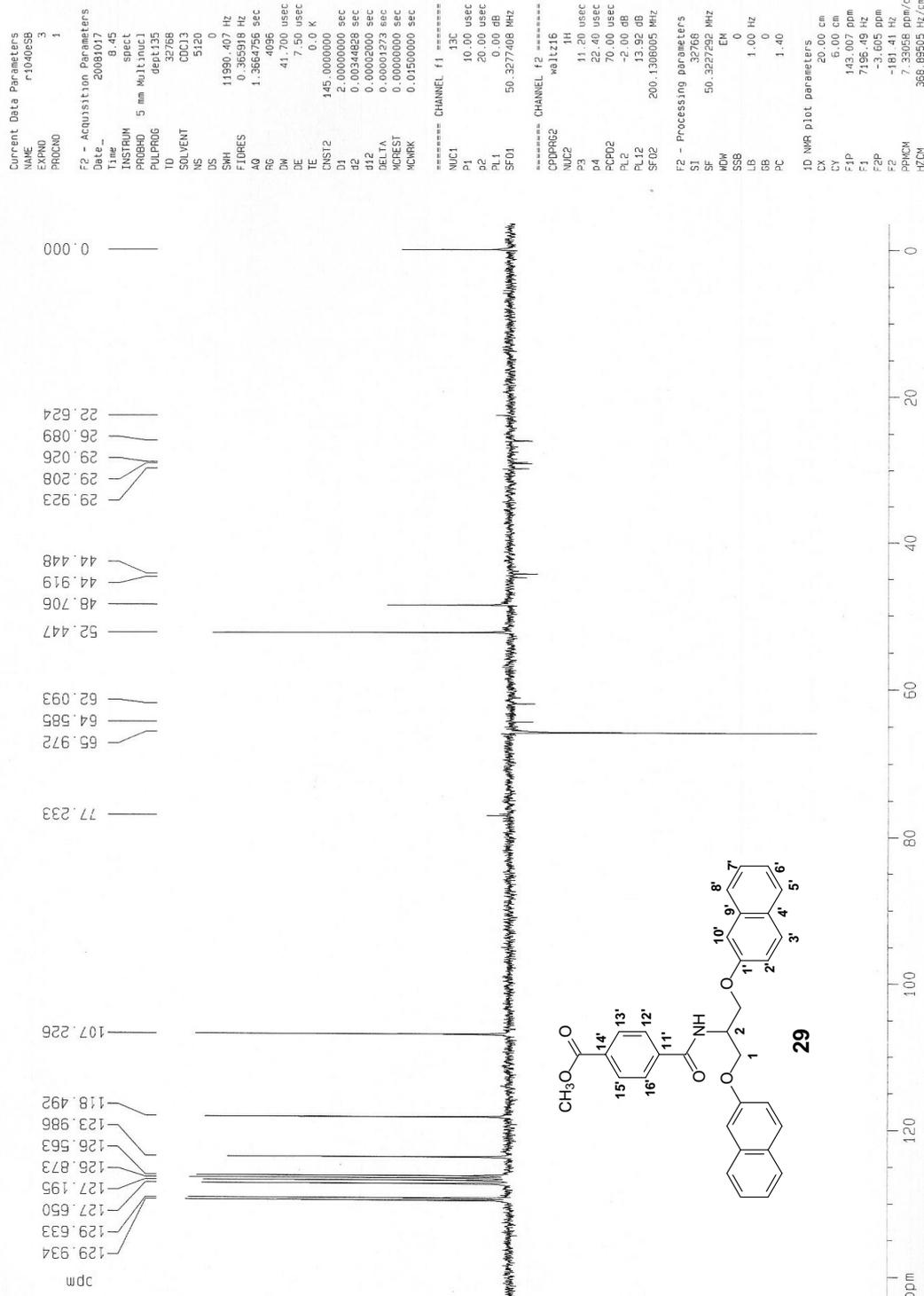


Figura A.75: Subespectro DEPT 135 (50MHz, CDCl₃) de 29

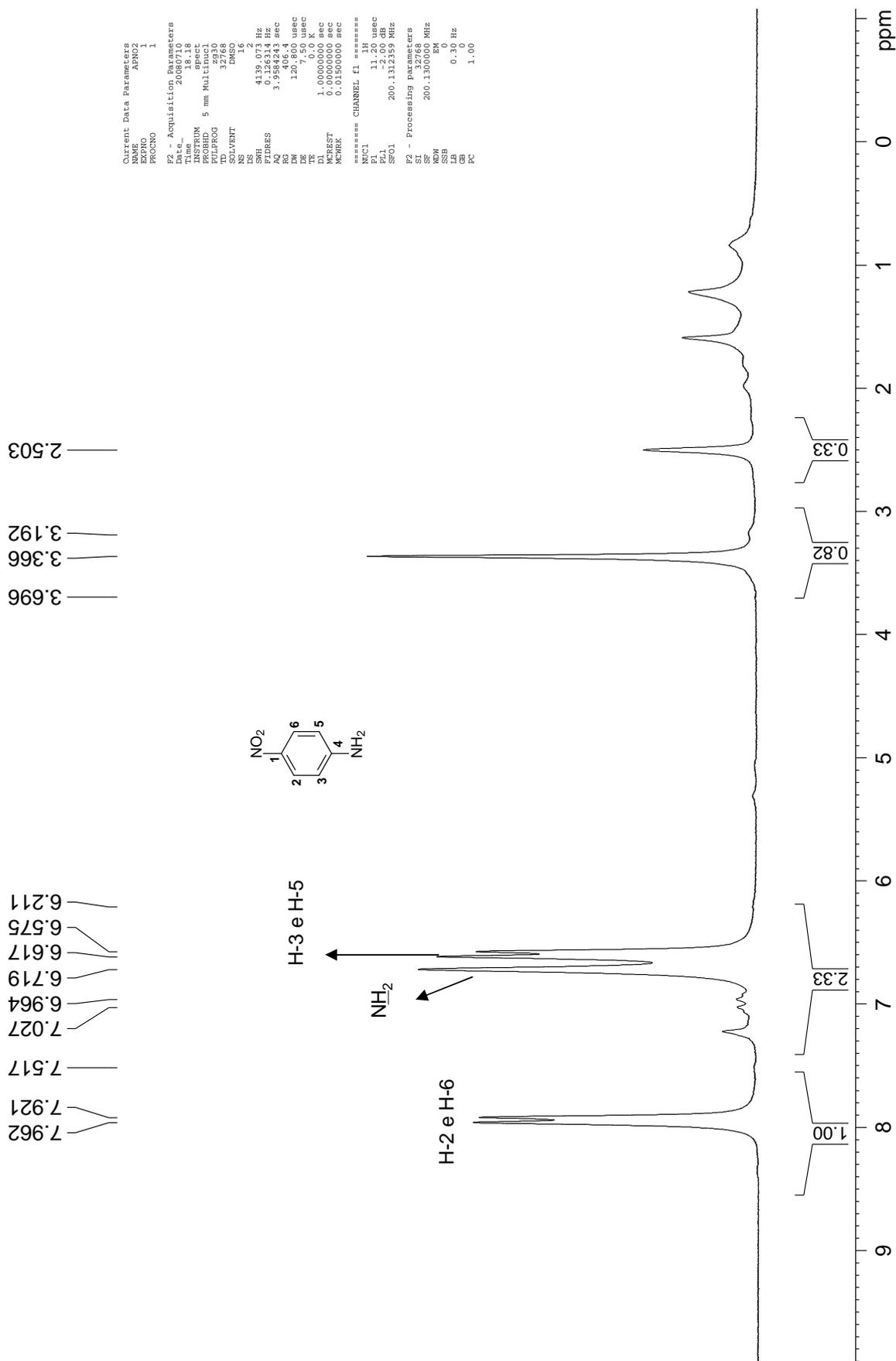


Figura A.76: Espectro de RMN de 1H (200MHz, DMSO-d₆) da p-nitroanilina

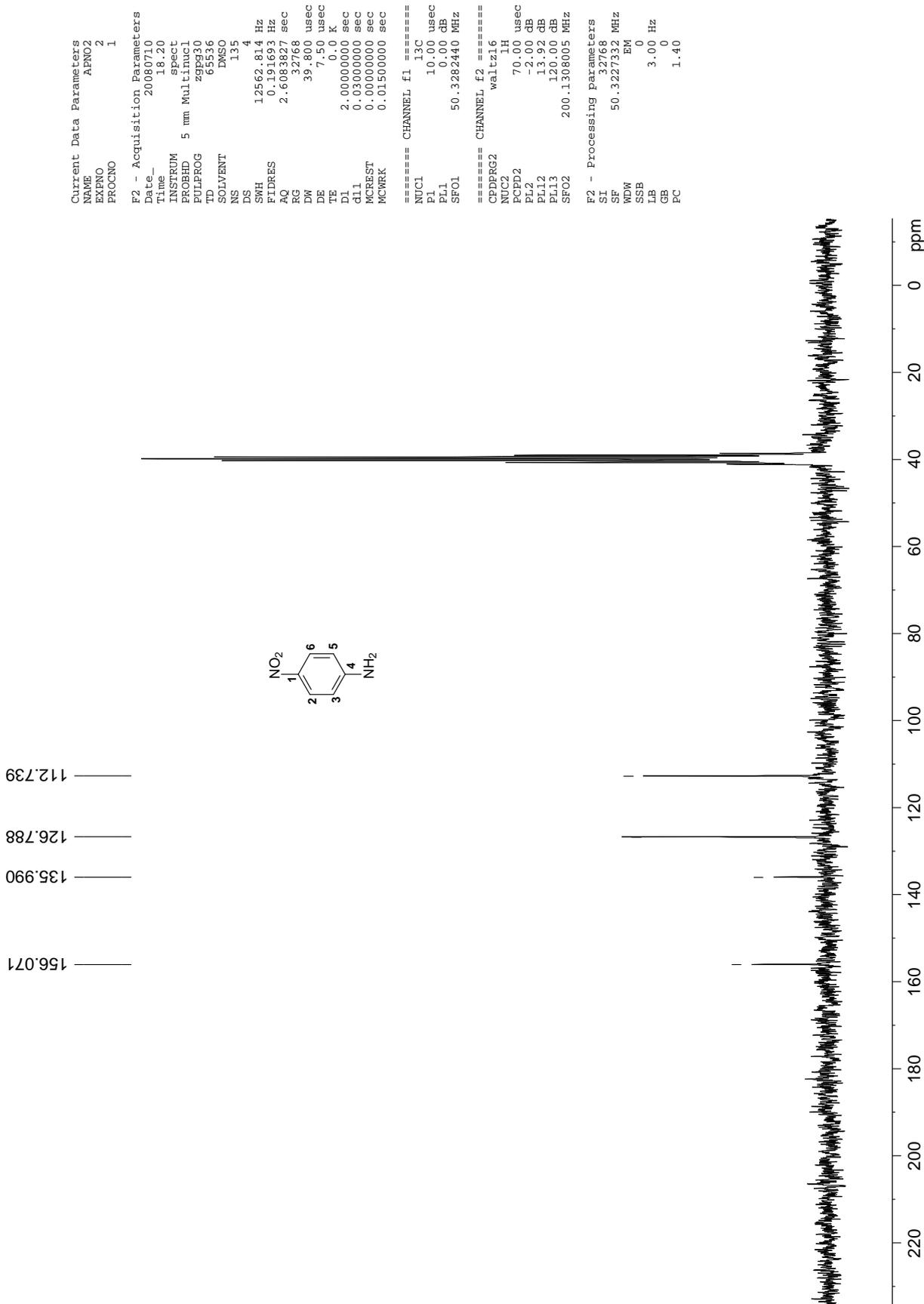


Figura A.77: Espectro de RMN de ¹³C (50MHz, DMSO-d₆) da p-nitroanilina

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)