

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**Otimização de novos inibidores da di-idrofolato
redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (mtDHFR):
Docking molecular, síntese, avaliação da inibição
enzimática e da atividade antimicobacteriana**

Alfredo Danilo Ferreira de Souza

Dissertação para obtenção do
Título de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Otimização de novos inibidores da di-idrofolato redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*mtDHFR*): *Docking* molecular, síntese, avaliação da inibição enzimática e da atividade antimicobacteriana

Alfredo Danilo Ferreira de Souza

VERSÃO ORIGINAL

Dissertação para obtenção do
Título de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Parise Filho

São Paulo

2018

Alfredo Danilo Ferreira de Souza

Otimização de novos inibidores da di-idrofolato redutase de
Mycobacterium tuberculosis (*mtDHFR*): *Docking* molecular,
síntese, avaliação da inibição enzimática e da atividade
antimicobacteriana

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr.
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S719o Souza, Alfredo Danilo Ferreira de Souza
Otimização de novos inibidores da di-idrofolato redutase de Mycobacterium tuberculosis (mtDHFR): Docking molecular, síntese, avaliação da inibição enzimática e da atividade antimicobacteriana / Alfredo Danilo Ferreira de Souza Souza. - São Paulo, 2018.
126 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Parise Filho, Roberto Parise Filho

1. Química Farmacêutica. 2. Tuberculose. 3. mtDHFR. 4. Otimização de fragmentos. 5. Bioisosterismo. I. T. II. Parise Filho, Roberto Parise Filho, orientador.

Dedicatória

Dedico este trabalho, primeiramente, a minha família: aos meus pais José Alfredo e Maria e meus irmãos Bárbara, Bruna e Anderson. Estes que, apesar de tudo, sempre me apoiaram e incentivaram nas horas mais difíceis.

Dedico também a todos amigos que estiveram ao meu lado durante esse momento da minha vida.

Agradecimentos

Ao departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver este projeto. Às agências CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador, Roberto Parise Filho, que me deu essa excelente oportunidade de aprender mais sobre a área que tanto gosto. Também sou grato por ele ter visto potencial em mim, até nos momentos em que eu me sentia perdido e frustrado. Sou grato pelos ensinamentos, broncas, recomendações e avaliações sempre rigorosas. Com certeza levarei seu exemplo profissional comigo, sobretudo em sala de aula, ao longo da minha vida como professor.

Ao Prof. Márcio Bertacine Dias e seu aluno João Ribeiro, pela parceria e trocas de ideias ao longo de toda a realização do trabalho.

Aos meus pais, pelo investimento financeiro e emocional ao longo de todos esses anos. Sou grato às minhas irmãs Bárbara e Bruna por me apoiarem e me ouvirem, sempre que precisei. Ao meu irmão Anderson pelo o exemplo, desde cedo, da carreira acadêmica.

Aos meus colegas do LAPESSB, pelos ensinamentos, broncas, sugestões, brincadeiras e momentos inesquecíveis

Aos meus colegas do LAPEN, vizinhos que sempre nos ajudaram e dividiram tudo que podiam conosco.

Aos meus colegas do LITEC, com os quais sempre criamos uma rede de apoio e ajuda. Sobretudo, sou eternamente grato por tudo que Elys e Fernando me proporcionaram durante esse período.

Agradecimento especial ao Gláucio Monteiro, pela paciência em realizar e me ensinar sobre os ensaios enzimáticos.

A todos os meus amigos e de todos os mais diversos lugares. Obrigado por me apoiarem e serem solícitos durante esse processo.

ATIVIDADES ACADÊMICAS

Eventos:

- Organização da Escola de Inverno: Pesquisa e Inovação em Fármacos e Medicamentos. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP (26 a 29 de julho de 2016);
- Apresentação de pôster na XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Universidade de São Paulo, SP (26 a 30 de setembro de 2016);
- Apresentação de pôster na XXII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Universidade de São Paulo, SP (25 a 29 de setembro de 2017);
- Apresentação de pôster na XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Universidade de São Paulo, SP (22 a 26 de outubro de 2018);

Prêmios:

- 1º lugar apresentação de pôsteres, categoria mestrado, na XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia. Universidade de São Paulo, SP (22 a 26 de outubro de 2018);

Co-autoria em artigos científicos:

CUNHA, M. R.; TAVARES, M. T.; CARVALHO, C. F.; PEREIRA, G. J. V.; SOUZA, A. D. F.; SILVA, N. A. T. F.; FERREIRA, F. F., PARISE FILHO, R. Environmentally Safe Condition for the Synthesis of Aryl and Alkyl Sulfonyl Hydrazones via One-Pot Reaction. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1899-1905, 2016.

Resumo

A tuberculose (TB) é considerada uma das principais doenças infecciosas e apresenta fatores críticos como a relação com o HIV/AIDS, tratamento longo e a resistência a múltiplos fármacos. A enzima di-hidrofolato redutase das micobactérias (*mtDHFR*) é um alvo pouco explorado e apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos contra TB. Estudos preliminares obtiveram fragmentos com baixa afinidade à *mtDHFR*, entretanto com potencial para otimização. Com isso, o fragmento foi usado como protótipo para a proposição de 22 análogos. Os compostos foram planejados utilizando informações sobre ligantes e a estrutura tridimensional de *mtDHFR*, além do biososterismo como estratégia norteadora. Os ensaios de *docking* molecular com a *mtDHFR* revelaram que os análogos propostos tiveram escores interessantes e, além disso, a inserção de substituintes demonstrou favorecer a ligação à enzima, o que corroborou o planejamento. Com isso, sintetizou-se 22 análogos planejados e o protótipo MB872, por meio de protocolos de alquilação, hidrólise e cicloadição 1,3 dipolar para os compostos com anéis triazol e tetrazol. Os compostos foram obtidos com rendimentos de bom a ótimo (60 ~ 90%) e suas estruturas foram elucidadas por RMN ^1H e ^{13}C . Os resultados do ensaio de inibição enzimática corroboraram com os dados de *docking*, uma vez que a presença do grupo carboxílico revelou ser importante para a atividade. Além disso, alguns dos compostos revelaram atividades interessantes, entre 8 a 40 μM , sendo que o mais ativo apresentou IC_{50} de 7 μM . Ensaio de cinética enzimática com o análogo mais ativo indicou uma inibição não competitiva com o substrato natural da enzima, uma vez que os valores de K_m se mantiveram constantes, enquanto V_{max} decaiu (0,22 μM e 0,43 – 0,34 $\Delta\text{FU}/\text{min}$, respectivamente). Os análogos sintetizados foram mandados para ensaio *in vitro* para avaliar a atividade frente a micobactéria.

Palavras-Chaves: Química Farmacêutica, Tuberculose, *mtDHFR*, otimização de fragmentos, biososterismo.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an important infectious disease and presents critical factors such as the relationship with HIV / AIDS, long treatment and resistance to multiple drugs. The enzyme dihydrofolate reductase from mycobacteria (*mtDHFR*) is a poorly explored and presents great potential to be a target for new drugs against TB. Preliminary studies have obtained fragments with low affinity to *mtDHFR*, but with potential to become lead compounds. Therefore, the fragment was used as a prototype for 22 analogues proposed in this work. The compounds were designed using bioisosterism, information about ligands and the three-dimensional structure of *mtDHFR*. Molecular docking assays with *mtDHFR* revealed satisfactory scores for analogues. Furthermore, the insertion of substituents seemed to increase the affinity with the enzyme. Thereby, twenty two analogues and prototype were synthesized using alkylation, hydrolysis and 1,3-dipolar cycloaddition methods. The compounds were obtained in good yields (60 ~ 90%) and their structures were elucidated with ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The enzymatic affinity assay corroborates docking results, because the presence of carboxyl group showed to be important for the activity. Furthermore, some of the compounds revealed interesting activities, ranging 8 to 40 μM . The most active showed IC_{50} of 7 μM and enzyme kinetics assays indicated noncompetitive inhibition with natural enzyme substrate. The synthesized analogs were sent for in vitro assay to assess mycobacteria activity.

Keywords: Pharmaceutical Chemistry, Tuberculosis, *mtDHFR*, fragments optimization, bioisosterism.

Lista de abreviaturas

- ACN** – Acetonitrila
- AIDS** – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
- ASP** - *Astex Statistical Potential*
- CADD** - *Computer-aided drug design* (Planejamento de fármacos auxiliado por computador)
- CCD** – Cromatografia em Camada Delgada
- CDCI₃** – Clorofórmio deuterado
- CLAE** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CYG** – Cicloguanila
- DHF** - Ácido di-idrofólico
- DHFR** – Di-idrofolato Redutase
- DMSO-*d*₆** – Dimetilsulfóxido deuterado
- hDHFR** – Di-idrofolato Redutase de humano
- HIV** – *Humanan Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- IC₅₀** - *half maximal Inhibitory Concentration* (concentração inibitória 50 %)
- K_m**- Constante de Michaelis
- LBDD** - *Ligand-Based Drug Design* (Planejamento de fármacos com base no ligante)
- MDR** – *Multidrug Resistance* (Resistência à Múltiplos Fármacos)
- MDR-TB** - *Multidrug Resistance Tuberculosis* (Tuberculose Resistente à Múltiplos Fármacos)
- MIC** – *Minimum inhibitory concentration* (Concentração mínima inibitória)
- MIC₉₀** - *Minimum inhibitory concentration* (Concentração mínima inibitória 90%)
- MMFF** - *Merck Molecular Force Field* (Campo de força molecular Merck)
- MTB** – *Mycobacterium tuberculosis*
- mtDHFR** – Di-idrofolato Redutase de *Mycobacterium tuberculosis*
- NADPH** - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
- OMS** – Organização Mundial da Saúde
- PM6** - *Parametric Method 6* (método paramétrico 6)
- ppm** – Partes por milhão
- PYR** – Pirimetamina
- QSAR** - *Quantitative Structure Activity Relationship* (Relação quantitativa entre estrutura e atividade)
- RMN** – Ressonância Magnética Nuclear
- RMSD** - *Root-mean-square deviation* (Desvio quadrático médio)

saDHFR - Di-idrofolato redutase de *Staphylococcus aureus*

SBDD - *Structure-Based Drug Design* (Planejamento de fármacos com base na estrutura do alvo)

SHMT - Serina hidroximetiltransferase

SN₂ – Substituição Nucleofílica Bimolecular

TB – Tuberculose

THF – Ácido tetraidrofólico

TMP – Trimetoprima

TS – Timidilate Sintase

UV – Ultravioleta

VS – *Virtual screening*

V_{max} – Velocidade máxima de atividade da enzima

δ_C – Deslocamento químico de carbono

δ_H – Deslocamento químico de hidrogênio

ΔT_m – Variação da temperatura de *melting* de proteínas

η - Rendimento

λ – Comprimento de onda

Índice de figuras

Figura 1: Taxa de incidência de TB (todas as formas) para cada 100 mil habitantes em 2016 (WHO, 2017).....	16
Figura 2: Ciclo patogênico do <i>M. tuberculosis</i> (Adaptado de Cambier, Falkow e Ramakrishnan, 2014).....	17
Figura 3: Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da TB	18
Figura 4: Via biossintética para o ácido fólico. DHFR: Di-idrofolato redutase; NADPH: Nicotinamida adenosina fosfato; SHMT: Serina hidroximetiltransferase; dRP: Desoxirribose monofostato (Kompis et al., 2005).	20
Figura 5: Estrutura tridimensional da <i>mtDHFR</i> com os elementos da estrutura secundária identificados. Cadeias β destacadas em azul e α -hélices em lilás. β A, β B, β C, β D, β E, β F e β H: Sete cadeias paralelas que constituem a folha β central. β G: Única cadeia antiparalela pertencente à folha β central. α B, α C, α E e α F: Quatro α -hélices que envolvem a folha β central (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).	20
Figura 6: (A) Bolso formado pelos resíduos Arg60 e Phe31 na <i>mtDHFR</i> (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). (B) Resíduo de Ile60 no lugar da Arg60 na <i>hDHFR</i> (PDB: 5HPB).	21
Figura 7: Estruturas químicas de alguns inibidores de <i>mtDHFR</i> . (17) Derivado de glicerol mais ativo e seletivo contra <i>mtDHFR</i> (El-Hamamsy et al., 2007); (18) Tripeptídeo (WYY) mais promissor obtido na triagem de inibidores de <i>mtDHFR</i> (Kumar et al., 2010); (19) Derivado 2,4-diamino-triazínico com maior atividade (Tawari et al., 2015).	22
Figura 8: Fragmentos obtidos no screening por <i>Thermal Shift</i> , sugerindo a afinidade pela <i>mtDHFR</i>	23
Figura 9: Distâncias (em Å) entre 20 e alguns aminoácidos de interesse.	24
Figura 10: Organograma das técnicas de planejamento de fármacos auxiliado por computador.....	25
Figura 11: Estruturas químicas e MIC ₉₀ dos compostos do estudo de Yang e colaboradores (2013).....	26
Figura 12: Estruturas químicas e MIC dos compostos de Karabanovich e colaboradores (2016).....	27
Figura 13: Fluxograma de trabalho proposto no projeto.	29
Figura 14: Estruturas químicas dos 22 compostos propostos, divididos em três porções.	30
Figura 15: Visualização do bolso da <i>mtDHFR</i> complexado ao fragmento MB872. A: Bolso mais restrito com a presença das moléculas de água; B: Bolso maior na ausência das moléculas de água. Vermelho: átomos de oxigênio; Branco: átomos de carbono; Azul escuro: átomos de nitrogênio. Azul claro: átomos de carbono do MB872 (Estruturas cristalográficas, não publicadas, obtidas em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).	32
Figura 16: Interação de alguns compostos e distâncias (em Å) com resíduos do bolso da <i>mtDHFR</i> . A: Análogo 38 e as interações encontradas para a melhor solução (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). B: Cocrystal do complexo formado entre a <i>mtDHFR</i> e a CYG, destacando a	

interação com o resíduo Ile94 (PDB: 4KNE). C : Cocrystal do complexo formado entre a <i>mtDHFR</i> e a TMP, destacando as interações com os resíduos Ile5 e Ile94 (PDB: 1DG5).	34
Figura 17: A : Cocrystal da enzima <i>mtDHFR</i> com o fragmento 20 (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). B : Melhor pose, obtida no ensaio de docking para o análogo 34	34
Figura 18 : Melhores poses, obtidas em docking e sobrepostas, para os análogos 39 (branco), 40 (violeta), 41 (azul claro) e o protótipo 20 (verde) (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).	35
Figura 19 : Sobreposição das melhores poses obtidas para o docking com análogos substituídos nas posições orto, para e meta. Distâncias (em Å) das interações com o backbone do resíduo Ile94 e com uma molécula de água estrutural. Branco: Análogo 38 . Laranja: Análogo 38 com a carboxila em orto. Verde: Análogo 38 com a carboxila em para. (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).	36
Figura 20 : Representação esquemática das sínteses realizadas. Reagentes e condições: (i) K ₂ CO ₃ /acetona/refluxo/16 h; (ii) KOH/THF/HCl/t.a./12 h; (iii) ascorbato/CuI/t.a./12 h/ 3-azidabenzato de metila. (iv) Pd/H ₂ /MeOH/EtOH/t.a./4 h; (v) NaNO ₂ /HCl/CuCN/NaCN/t.a./2 h; (vi) NaN ₃ /NH ₄ Cl/DMF/refluxo/16 h.	38
Figura 21 : Mecanismo proposto para a síntese Williamson de éteres (Clayden et al., 2012).	38
Figura 22 : Representação esquemática da estabilização do carbono do centro da reação.....	40
Figura 23 : Mecanismo proposto para a hidrólise alcalina dos ésteres (Clayden et al, 2012).	40
Figura 24 : Mecanismo proposto para a síntese de anel triazol via cicloadição 1,3-dipolar (Wei et al., 2016).	41
Figura 25 : Mecanismo proposto para a síntese de anel tetrazol via cicloadição 1,3-dipolar (Clayden et al, 2012).	42
Figura 27 : Espectro de RMN ¹³ C, em CDCl ₃ , do composto 25	43
Figura 28 : Espectro de RMN ¹ H em DMSO-d ₆ do composto 20	44
Figura 29 : Espectro de RMN ¹³ C em DMSO-d ₆ do composto 20	44
Figura 30 : Espectro de RMN ¹ H, em Metanol-d ₄ , do composto 44	45
Figura 31 : Espectro de RMN ¹³ C, em DMSO-d ₆ , do composto 46	45
Figura 32 : Gráfico velocidade e concentração de substrato (DHF) na presença de diferentes concentrações do composto 39	49

Índice de tabelas

Tabela 1: Estruturas químicas dos análogos propostos e as médias aritméticas dos escores obtidos.....	33
Tabela 2: Média aritmética dos escores obtidos para cada grupo (9 análogos orto, 9 análogos meta e 9 análogos para).....	35
Tabela 3: Resultados de caracterização e pureza dos análogos propostos.....	39
Tabela 4: IC ₅₀ dos compostos sintetizados e da TMP.....	47
Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos no teste de competição entre DHF e o composto 39	49
Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos no teste de competição entre cofator e o composto 39	49

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Tuberculose: considerações gerais.....	15
1.2	Di-idrofolato Redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (mtDHFR)	19
1.3	Planejamento de Fármacos	24
2	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	28
3	PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Estudos <i>in silico</i>	31
4.2	Síntese e caracterização dos compostos.....	37
4.3	Ensaio de inibição enzimática	46
4.4	Ensaio mecanístico da inibição enzimática	48
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	50
6	PARTE EXPERIMENTAL	51
6.1	Materiais, reagentes e solventes.....	51
6.2	Métodos	51
6.2.1	Métodos <i>in silico</i>	51
6.2.2	Métodos analíticos.....	52
6.2.3	Método ensaio enzimático	53
6.2.4	Métodos sintéticos	53
6.2.4.1	Alquilação com carbonato de potássio	53
6.2.4.2	Redução do grupo nitro	57
6.2.4.3	Síntese dos triazóis	58
6.2.4.3.1	Síntese dos reagentes.....	58
6.2.4.3.2	Cicloadição	59
6.2.4.4	Hidrólise dos ésteres	60
6.2.4.5	Síntese do tetrazol.....	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
	Anexo I.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: considerações gerais

A tuberculose (TB) é considerada uma das principais doenças infecciosas, na qual as micobactérias, especialmente o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), acometem principalmente o tecido pulmonar, causando extensas lesões. Atualmente, a TB faz parte das “três grandes doenças”, juntamente à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e a malária. Essas doenças apresentam alguns aspectos de doenças negligenciadas, entretanto elas não estão presentes na lista oficial de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS). A ausência na relação da OMS é justificada com o fato de se observar extensos esforços para o combate dessas três doenças, como programas de prevenção e grandes investimentos em pesquisas. No ano de 2014, por exemplo, HIV/AIDS tiveram um investimento de 5,4 milhões de dólares, enquanto que malária e TB tiveram 1,7 e 0,7 milhões de dólares, respectivamente. Contudo, a TB ainda exerce forte pressão sobre a saúde pública mundial, uma vez que, entre os anos de 2012 e 2016, foi a principal causa de óbitos entre as doenças infecciosas, ganhando de HIV/AIDS (Canuto *et al.*, 2015; WHO, 2017).

A OMS calcula que 1/3 da população mundial esteja infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2016, estimou-se uma incidência de 10,4 milhões de casos de TB (Figura 1) e ainda no mesmo ano, houve a notificação de 1,7 milhões de óbitos em decorrência da doença (WHO, 2017). Os índices de mortalidade são expressivos nos países de baixa renda, uma vez que estes representam 95% do total de óbitos em todo o mundo (Fogel, 2015). No Brasil, a situação também é alarmante, uma vez que a estimativa de mortalidade para 2016 foi de 7 mil casos. Outro fator importante é o Brasil estar entre os 30 países que, somados, representam 86% dos casos de TB no mundo (WHO, 2017).

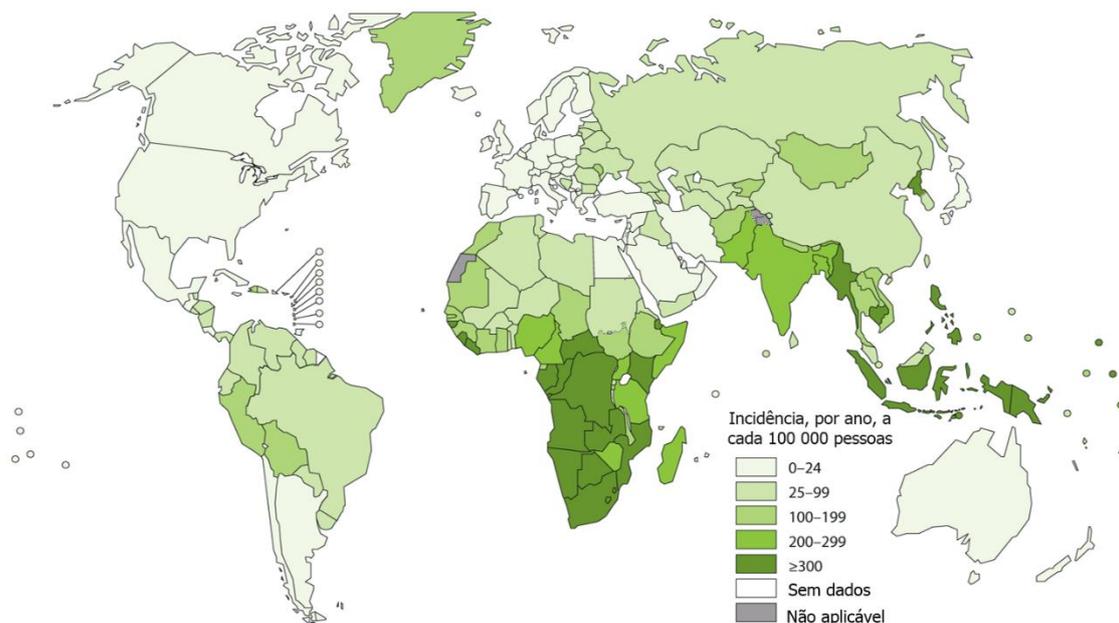


Figura 1: Taxa de incidência de TB (todas as formas) para cada 100 mil habitantes em 2016 (WHO, 2017).

Outro ponto problemático da tuberculose é o aspecto sinérgico que há com HIV, o qual causa a AIDS. Essa interação com a HIV/AIDS aumenta a morbidade e mortalidade da TB e isso se torna evidente ao observar que em 2016 22% dos óbitos por TB eram portadores de HIV. A relação entre os casos de TB e HIV/AIDS é fundamentada no fato de que o indivíduo HIV positivo possui 50% de chance de progredir da forma latente para a forma ativa da TB, enquanto que um indivíduo não infectado pelo vírus apresenta apenas 10% de chance de progressão da doença (Pinto e Carvalho, 2014; WHO, 2014; WHO, 2017).

No que tange à fisiopatologia da tuberculose pulmonar (85% dos casos de TB), a infecção inicia-se quando pequenas partículas aerossol contendo bacilos viáveis, expelidas por um indivíduo com a forma ativa da doença, são depositadas nos pulmões de um novo hospedeiro (Figura 2). Ao chegar aos pulmões, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos alveolares, o que resulta na liberação de citocinas e quimiocinas regulatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1- α e IL-1- β). A apresentação dos antígenos dos bacilos pelos macrófagos e as citocinas liberadas estimulam o recrutamento de mais leucócitos envolvidos com processos inflamatórios. As quimiocinas CXC (L1, L2 e L5) e CCR2 modulam o recrutamento de neutrófilos e macrófagos, respectivamente, enquanto que o TNF- α , IL-12 e CXC (cognato) promovem a migração de células dendríticas, o que resulta na imunidade adaptativa (Cambier *et al.*, 2014; Dorhoi e Kaufmann, 2015; Fogel, 2015).

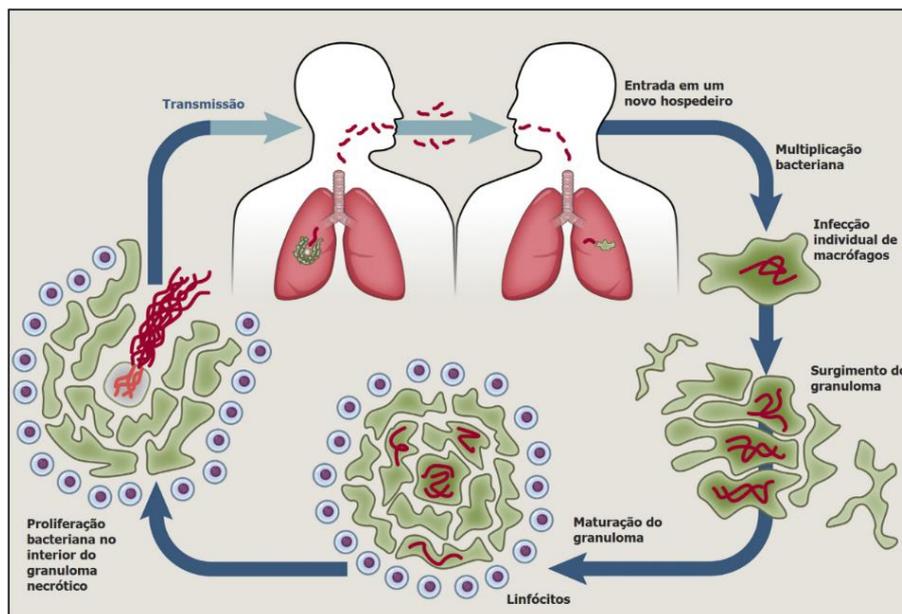


Figura 2: Ciclo patogênico do *M. tuberculosis* (Adaptado de Cambier, Falkow e Ramakrishnan, 2014).

Além da citocinas e quimiocinas, a presença do MTB estimula a produção de metaloproteinasas, as quais alteram o microambiente pulmonar. A união da ação dessas enzimas com o processo imunológico culmina no surgimento do granuloma, o qual é marca característica da TB (Dartois, 2014; Dorhoi e Kaufmann, 2015).

O granuloma pode evoluir para uma necrose caseosa (do latim, *caseum* = queijo), que recebe este nome por sua forma lembrar-se à do queijo. Esse núcleo necrótico favorece a proliferação do MTB e, com o extravasamento desse líquido, haverá a liberação de bacilos para novas infecções (Cambier *et al.*, 2014; Dartois, 2014; Majeed *et al.*, 2015).

Nos casos em que o sistema imune gera uma resposta eficaz contra o patógeno, a tuberculose é classificada como latente. Esse estado de dormência dos bacilos é decorrente do controle de sua proliferação pelos macrófagos e formação do granuloma. Todavia, mesmo havendo um estado de latência da micobactéria, há o risco de 5 a 10% dos casos evoluírem para a forma ativa, evidenciando um problema ainda maior na erradicação da tuberculose (Dutta e Karakousis, 2014).

Adicionalmente, também há os casos de tuberculose extrapulmonar (10 % dos casos de TB), nos quais os bacilos se instalam em outros órgãos além dos pulmões. Esses casos comumente ocorrem em pacientes em coinfeção com HIV/AIDS, visto a vulnerabilidade imunológica. Dentre os outros órgãos infectados pelos bacilos (pleura, gânglios linfáticos, abdômen, trato geniturinário, pele, articulações, ossos e meninges), o sistema musculoesquelético representa a maioria dos casos, destacando-se a coluna vertebral (Doença de Pott) (Garg e Somvanshi, 2011; Dunn e Bem Husien, 2018).

Atualmente, o tratamento da TB consiste na utilização de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol por dois meses e em seguida rifampicina e isoniazida por mais quatro meses (Figura 3). Por mais que seja uma combinação eficaz, a longa duração desse protocolo é diretamente responsável pela baixa adesão do paciente ao tratamento, o que pode levar aos quadros de resistência (Zumla *et al.*, 2014).

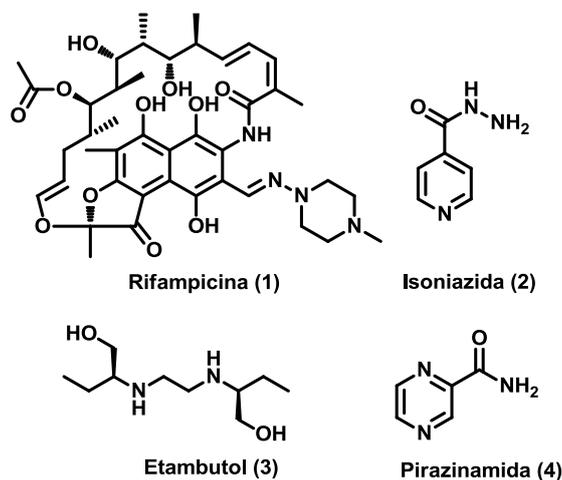


Figura 3: Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da TB

A resistência é considerada um dos principais agravantes da TB, uma vez que em 2016 foram estimados 600 mil casos de TB resistente aos fármacos usados no tratamento (WHO, 2017). Atualmente, a questão evoluiu para os casos de resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *multidrug resistance*), a qual é caracterizada pela falta de eficácia dos dois mais importantes fármacos, isoniazida e rifampicina. Nos casos de MDR-TB, o tratamento passa a se basear nos fármacos de segunda linha (fluoroquinolonas e aminoglicosídeos), entretanto, essas substâncias são mais tóxicas, onerosas e menos eficazes. Adicionalmente à resistência, o controle da TB também enfrenta a falta de uma vacina eficaz e os diagnósticos feitos de modo tardio (Fogel, 2015; Fonseca *et al.*, 2015).

A combinação dessas questões resulta na necessidade de novos tratamentos e fármacos, visto que o protocolo de tratamento atual é o preconizado há mais de 20 anos. O fato de que os fármacos empregados no atual protocolo foram descobertos há mais de 50 anos também representa uma importante questão, isto é, a inserção de novas substâncias pode gerar uma resposta mais eficaz e com menor tempo de tratamento (Hawn *et al.*, 2014).

Haja vista a necessidade de novos fármacos, a obtenção de alvos inéditos apresenta um desafio nesse processo. Nesse contexto, os estudos de genômica e proteômica do MTB desempenham um papel importante na obtenção de novos alvos

proteicos potencialmente interessantes (Ehebauer e Wilmanns, 2011; Zumla *et al.*, 2014).

Um dos alvos proteicos que recentemente tem despertado interesse é a enzima di-idrofolato redutase (DHFR) (EC 1.5.1.3), visto que um estudo randomizado demonstrou que a combinação de sulfametoxazol e trimetoprima (TMP), o qual inibe DHFR de protozoários e bactérias, diminui a mortalidade e morbidade de pacientes com coinfeção TB e HIV/AIDS (Wiktor *et al.*, 1999). Adicionalmente, não há nenhum fármaco na terapêutica que atue na DHFR do *Mycobacterium tuberculosis* (*mtDHFR*) e, além disso, explorar as diferenças existentes entre as isoformas dos humanos e do MTB pode originar um inibidor com maior seletividade (Kompis *et al.*, 2005).

1.2 Di-idrofolato Redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (*mtDHFR*)

A DHFR é uma enzima essencial no metabolismo do folato de seres eucariontes e procariontes, como o *Mycobacterium tuberculosis*. Sua ação consiste na catálise da reação de redução do ácido fólico para ácido di-idrofólico (DHF), que posteriormente também será reduzido para ácido tetraidrofólico (THF), por meio da mesma enzima e do cofator nicotinamida adenosina fosfato (NADPH) (Figura 4). O THF, por sua vez, sofrerá a ação da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), a qual faz uma metilação ao seu substrato mediante a conversão do aminoácido serina em glicina. O ácido *N,N*-metilenotetraidrofólico formado na metilação transferirá o carbono proveniente da serina para o ácido uridílico, por meio da enzima timidilato sintase (TS). Essa reação resulta na formação do ácido timidílico, o qual será incorporado na molécula de DNA (Kompis *et al.*, 2005; Czekster *et al.*, 2011).

A inibição da *mtDHFR* representa um importante mecanismo de ação contra a TB, visto que a interrupção da redução do DHF ocasiona a diminuição da concentração intracelular de THF, que por sua vez limitará a produção do ácido timidílico. A falta desse nucleotídeo resulta em um impedimento da síntese de DNA e, com isso, há uma anomalia no metabolismo celular do MTB que pode levar à morte da bactéria (White *et al.*, 2004).

Estruturalmente, a *mtDHFR* consiste em uma folha β central, composta por sete cadeias paralelas e uma antiparalela, rodeada por quatro α hélices (Li *et al.*, 2000) (Figura 5). Comparando-se a estrutura das isoformas existentes, evidencia-se que há 74% de diferenças entre a estrutura primária da DHFR humana (*hDHFR*) e a *mtDHFR*. Além disso, a enzima bacteriana possui maior atividade em meio mais ácido (0,015 $\mu\text{mol}/\text{min}$ em pH 5), enquanto a humana atua mais satisfatoriamente em pH ligeiramente alcalino (0,012 $\mu\text{mol}/\text{min}$ em pH 9) (White *et al.*, 2004).

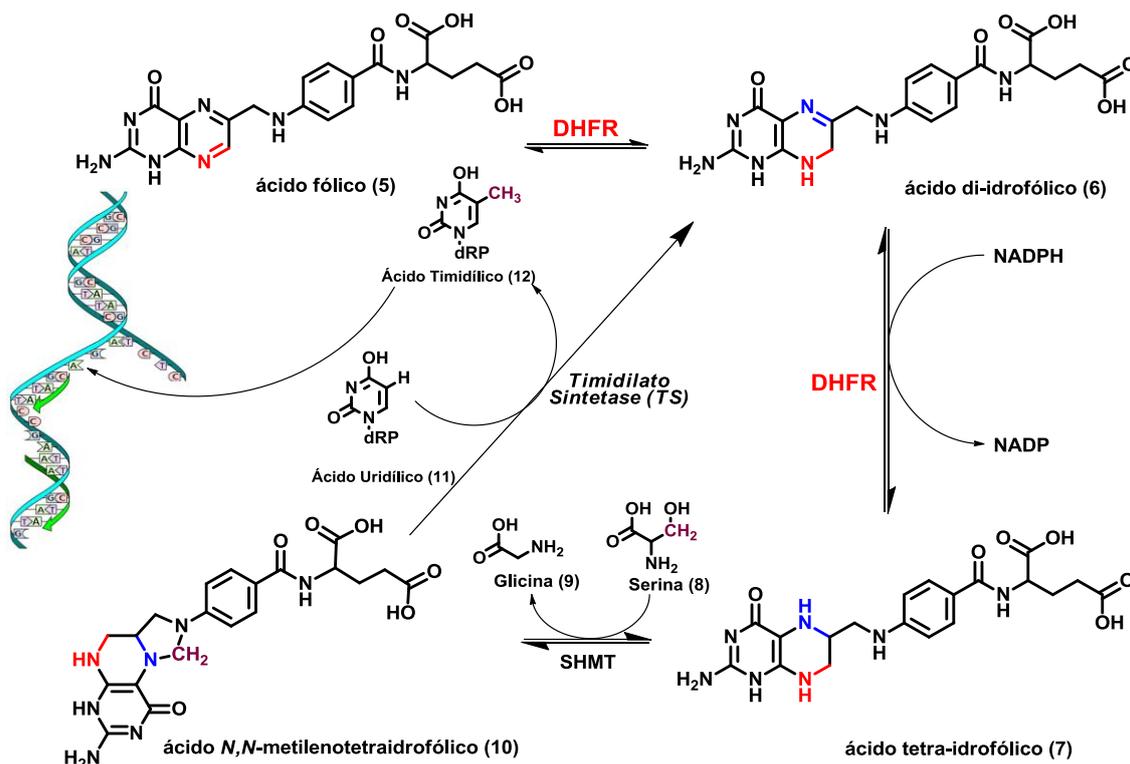


Figura 4: Via biossintética para o ácido fólico. DHFR: Di-idrofolato redutase; NADPH: Nicotinamida adenosina fosfato; SHMT: Serina hidroximetiltransferase; dRP: Desoxirribose monofostato (Kompis *et al.*, 2005).

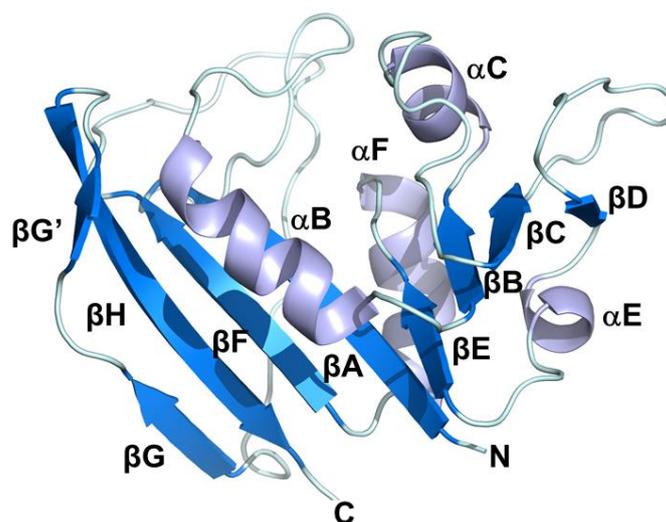


Figura 5: Estrutura tridimensional da mtDHFR com os elementos da estrutura secundária identificados. Cadeias β destacadas em azul e α -hélices em lilás. βA , βB , βC , βD , βE , βF e βH : Sete cadeias paralelas que constituem a folha β central. βG : Única cadeia antiparalela pertencente à folha β central. αB , αC , αE e αF : Quatro α -hélices que envolvem a folha β central (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

Embora a sequência primária da *mt*DHFR seja consideravelmente diferente da *h*DHFR, o sítio ativo das duas isoformas apresenta semelhanças, visto que nessa região há uma similaridade de 55% entre as sequências primárias da enzima humana e da micobacteriana. Entretanto, o estudo do cocrystal da *mt*DHFR com alguns inibidores revelou a presença de uma molécula de glicerol interagindo com os resíduos hidrofílicos Trp22, Asp27 e Gln28 do sítio ativo, o que mostra uma importante diferença com a isoforma humana, a qual possui resíduos mais hidrofóbicos nessa região (Leu22, Pro26 e Phe31) (Li *et al.*, 2000). Ademais, estudos preliminares e não publicados demonstraram como os resíduos Arg60 e Phe31 da *mt*DHFR formam um novo bolso não existente na isoforma humana, uma vez que nessa enzima o resíduo de arginina é substituído por uma isoleucina (Figura 6). Essa substituição resulta na perda de uma possível interação iônica, uma vez que o resíduo de isoleucina não sofre protonação como a arginina. Diferenças entre as enzimas revelam uma possível estratégia para o planejamento de inibidores com maior seletividade, por meio de inserção de grupos que interajam apenas com os resíduos do bolso presente na isoforma micobacteriana.

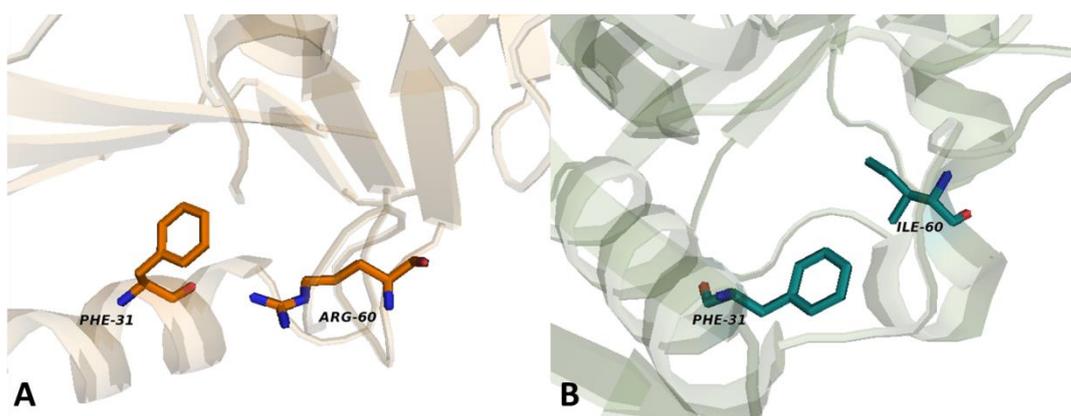


Figura 6: (A) Bolso formado pelos resíduos Arg60 e Phe31 na *mt*DHFR (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). (B) Resíduo de Ile60 no lugar da Arg60 na *h*DHFR (PDB: 5HPB).

Algumas substâncias apresentam ligeira atividade inibitória contra *mt*DHFR, tais como cicloguanila (CYG), Trimetoprima (TMP), pirimetamina (PYR) e WR99210 (Figura 7). Entretanto, nenhuma delas é utilizada no tratamento da TB e apresentam problemas como falta de seletividade e intolerância gastrointestinal (Then, 2004).

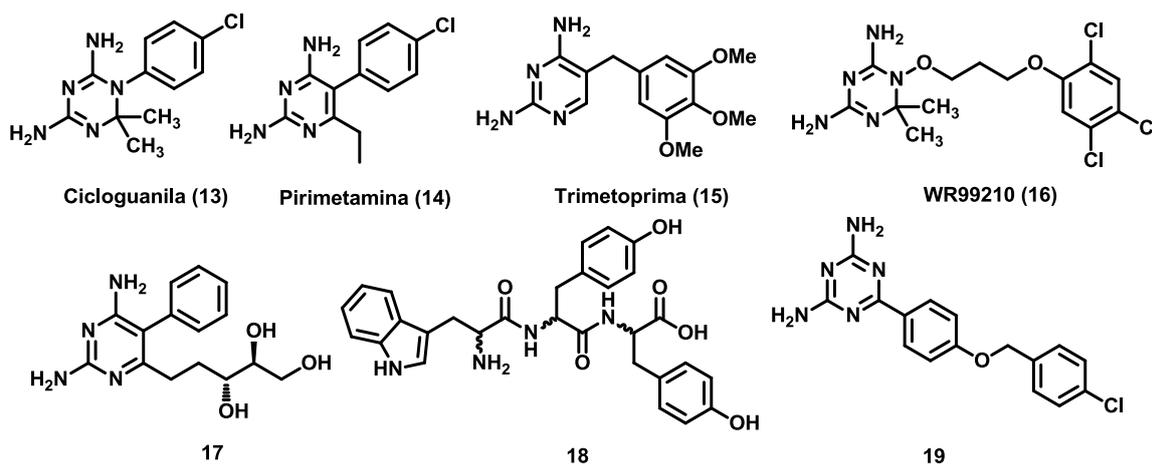


Figura 7: Estruturas químicas de alguns inibidores de *mtDHFR*. (17) Derivado de glicerol mais ativo e seletivo contra *mtDHFR* (El-Hamamsy *et al.*, 2007); (18) Tripeptídeo (WYY) mais promissor obtido na triagem de inibidores de *mtDHFR* (Kumar *et al.*, 2010); (19) Derivado 2,4-diamino-triazínico com maior atividade (Tawari *et al.*, 2015).

A baixa afinidade da CYG, TMP e PYR pela *mtDHFR* pôde ser justificada pelo estudo de Dias e colaboradores (2014). O trabalho demonstrou, pela primeira vez, a existência de duas conformações da *mtDHFR*: uma aberta e outra fechada e ativa cataliticamente. Na forma ativa, o resíduo de Tyr100 interage com o NADPH, ocasionando a projeção da porção ribose-nicotinamida para fora do sítio ativo. Essa alteração justifica a baixa afinidade desses inibidores pela a enzima, uma vez que esses compostos necessitam da ribose-nicotinamida no interior do sítio ativo para realizar interações π -stacking. A comprovação dessa hipótese se deu ao observar o aumento da afinidade da CYG, TMP e PYR por uma forma mutada da *mtDHFR*, a qual teve a Tyr100 substituída por Phe100 (Dias *et al.*, 2014).

Desde o trabalho de Li e colaboradores (2000), estudos vêm sendo publicados com novas substâncias atuando na *mtDHFR*. Baseado no bolso formado entre o glicerol e os resíduos hidrofílicos da *mtDHFR*, El-Hamamsy e colaboradores (2007) propuseram análogos à 15 com grupos que mimetizam o glicerol. Esse planejamento resultou no composto 17, o qual apresentou interessante atividade e seletividade contra a *mtDHFR*. Esse resultado foi inferido ao observar a inibição do crescimento de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mutada com o gene para a expressão da *mtDHFR*. A seletividade foi indicada pela baixa inibição do crescimento do fungo mutado com o gene que expressa a isoforma humana da enzima. Outro estudo avaliou uma série de pequenos peptídeos como possíveis compostos-líderes, obtendo-se o composto 18 como o mais promissor (*mtDHFR* $K_d = 1,78 \cdot 10^{-9}$; *hDHFR* $K_d = 2,09 \cdot 10^{-7}$) (Kumar *et al.*, 2010). Mais recentemente, Tawari e colaboradores (2015) obtiveram o composto 19, a

partir de análogos com diferentes substituintes ao anel 2,4-diamino-triazínico, o qual apresentou interessante atividade e seletividade para a *mt*DHFR ($IC_{50} = 5,1 \mu M \pm 0,195$).

Estudos prévios, e não publicados, evidenciaram alguns fragmentos, oriundos de *screening* por *Thermal Shift*¹, com interessante afinidade pela *mt*DHFR. A triagem foi realizada com uma biblioteca de 1250 fragmentos, os quais atendem à “regra dos três”². Destacaram-se os compostos que causaram um deslocamento da temperatura de *melting* (ΔT_m) acima de 1 °C. Comumente, o aumento do ΔT_m em 1 °C indica compostos com boa afinidade ao alvo (Matulis *et al.*, 2005). Com isso, o fragmento MB872 (**20**) (Figura 8) destacou-se por apresentarem um aumento satisfatório do ΔT_m .

Ensaio revelaram uma baixa afinidade do MB872 (**20**) pela isoforma humana e micobacteriana da DHFR (K_d de 500 μM *mt*DHFR). A baixa afinidade de fragmentos é esperada por apresentarem reduzidos pontos de interação (Price *et al.*, 2017), entretanto podem ser utilizados como protótipos para otimização.

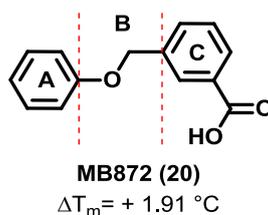


Figura 8: Fragmentos obtidos no *screening* por *Thermal Shift*, sugerindo a afinidade pela *mt*DHFR.

A cocristalografia do MB872 (**20**) com o *mt*DHFR revelou importantes informações sobre o modo como o fragmento interage com sítio ativo da enzima. Na figura 9, é possível observar que o anel **A** está em um bolso formado pelos resíduos Tyr100, Ser49 e Ile94 (*backbone*). Dessa forma, a inserção de grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio nesse anel pode resultar em uma maior interação com o bolso, além da possibilidade de estabelecer uma interação π *stacking* com Phe31 (Figura 9). Por outro lado, a região **B** revelou estar inserida em um bolso hidrofóbico formado pelos resíduos de Leu50, Pro51, Val54 e Leu57. Por fim, foi observado que a

¹ Método que quantifica a variação de temperatura de desnaturação proteica (ΔT_m) frente a diferentes condições. Comumente é empregado para detectar ligantes que aumentam a ΔT_m . Quanto maior for a interação com a proteína, maior será a variação da temperatura de desnaturação (Koshland, 1958; Scott *et al.*, 2012).

² Variação da “Regra dos Cinco de Lipinski”, a qual determina valores específicos de descritores físico-químicos para fragmentos, sendo estes: massa molecular menor que 300 Da, menos de 3 grupos doadores ou receptores de ligação de hidrogênio e cLogP menor ou igual a 3 (Joseph-Mccarthy *et al.*, 2014).

carboxila do anel **C** realiza uma interação iônica com o resíduo da Arg60, mimetizando a porção glutamato do metotrexato (Figura 9).

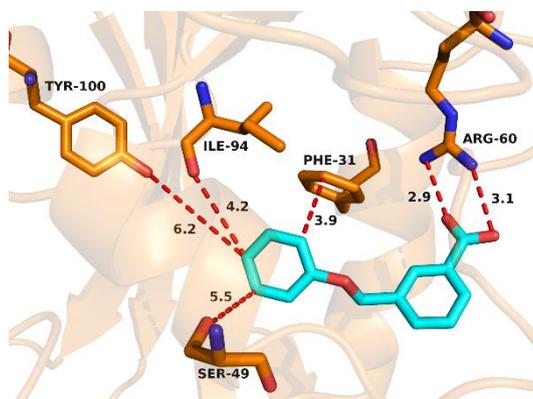


Figura 9: Distâncias (em Å) entre **20** e alguns aminoácidos de interesse.

Os dados cristalográficos, a maior afinidade pela a *mt*DHFR em relação à isoforma humana e a síntese pouco complexa faz do fragmento MB872 um bom protótipo a ser otimizado, para potencialmente obter-se um candidato à fármaco inibidor da *mt*DHFR.

1.3 Planejamento de Fármacos

Com a contínua pressão que as doenças exercem na saúde pública, a obtenção de novos fármacos representa uma importante demanda. Entretanto, esse processo de descobrimento apresenta muitos desafios, tais como longo tempo, custos e a integração de conhecimentos de múltiplas áreas das ciências farmacêuticas. Para tanto, é necessário um conjunto de abordagens multidisciplinares que unidas fundamentam o planejamento racional de fármacos (Mandal, Moudgil e Mandal, 2009).

O planejamento racional de fármacos pode ser dividido em duas abordagens, a primeira consiste na utilização do conhecimento acerca da estrutura tridimensional do alvo (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*), enquanto que a segunda utilizada informações sobre ligantes com atividade previamente conhecida (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*). Em ambos os casos, o uso de *softwares* da área pode auxiliar no planejamento, caracterizando o denominado planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês *Computer-aided drug design*) (Figura 10) (Vangrevelinghe e Rudisser, 2007; Wang *et al.*, 2015).

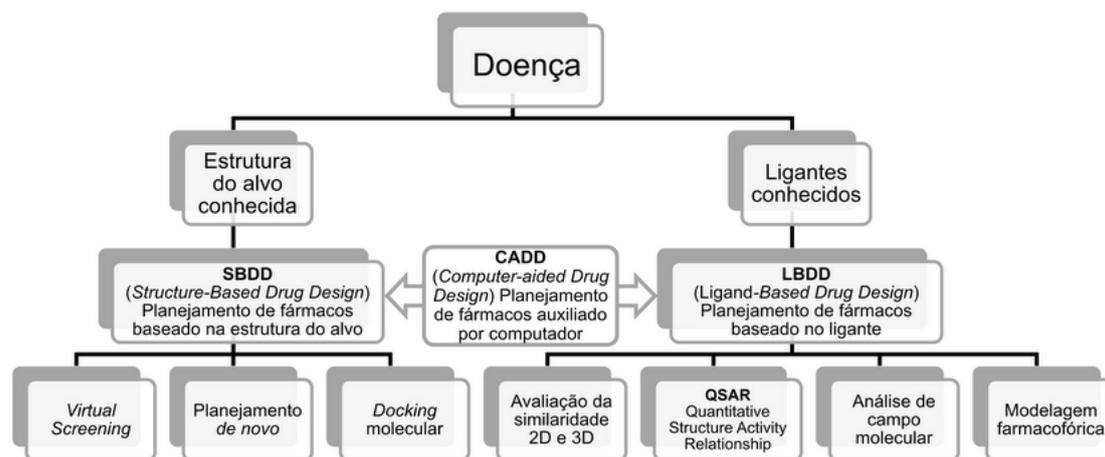


Figura 10: Organograma das técnicas de planejamento de fármacos auxiliado por computador.

SBDD é uma das abordagens mais eficientes na obtenção de novos fármacos, uma vez que se fundamenta no conhecimento das bases moleculares da doença e utiliza a informação acerca do alvo biológico para a proposição de possíveis ligantes (Lionta *et al.*, 2014). Os dados do alvo possibilitam inferir uma série de informações que corroboram no planejamento, tais como o volume máximo do ligante, locais de interação e padrões estruturais necessários para maior afinidade. A abordagem por SBDD: o planejamento *de novo*, o *docking* molecular, também conhecido como ancoramento molecular e o *virtual screening* (VS) (Ou-Yang *et al.*, 2012; Lionta *et al.*, 2014).

No planejamento *de novo* utilizam-se *softwares* e a estrutura do alvo bioquímico para a proposição de porções moleculares que potencialmente interajam com o sítio da proteína. Geralmente esses fragmentos são unidos ou expandidos, gerando possíveis ligantes. Com isso, os compostos obtidos são usados como referência para encontrar em quimiotecas substâncias com semelhanças estruturais (Wang *et al.*, 2015).

No estudo de *docking*, ou ancoramento molecular, há a predição das possíveis posições dos ligantes no interior do sítio do alvo proteico, com o propósito de gerar uma classificação dessa interação. Para tanto, fatores como a escolha e o tamanho do local de interação, bem como o tipo de pontuação representam um importante ponto do estudo. Com as informações obtidas no ancoramento a proposição e a síntese de novos compostos tornam-se mais direcionada (Ferreira *et al.*, 2015). Ainda nesse contexto, o VS consiste em uma técnica de triagem, na qual se utiliza dos cálculos de *docking* para a detecção de ligantes com afinidade ao alvo (Kalyaanamoorth e Chen, 2011).

De maneira antagônica, o LBDD apresenta-se como uma abordagem aplicada quando não há o conhecimento da estrutura tridimensional do alvo bioquímico. Nesse âmbito, novos compostos são propostos com base na estrutura de ligantes previamente conhecidos e ativos. Essas novas substâncias são obtidas por meio de modificações

moleculares baseadas em similaridades físico-químicas, que podem resultar em compostos mais ativos. Dentre as ferramentas utilizadas no LBDD, pode-se destacar o estudo da relação quantitativa entre a estrutura do ligante e a atividade biológica (QSAR, do inglês *Quantitative Structure Activity Relationship*), modelagem farmacofórica, análise do campo molecular e a avaliação de similaridade 2D e 3D (Acharya *et al.*, 2011; Ou-Yang *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015).

Quando há informações tanto da estrutura do alvo quanto de ligantes, a atuação sinérgica de SBDD e LBDD pode ser aplicada, o que representa uma forte estratégia para aumentar a possibilidade de sucesso na obtenção de novos compostos com atividade biológica. A combinação das duas abordagens resulta em um acúmulo considerável de informações para o planejamento de fármacos, tais como a união do conhecimento estrutural do sítio ativo com a estrutura de ligantes previamente ativos na mesma região (Keserű e Makara, 2006; Lionta *et al.*, 2014).

Durante a realização de um planejamento racional por SBDD e LBDD, a utilização das estratégias de modificações moleculares é fundamental para a obtenção de novos compostos. Para tanto, comumente empregam-se o bioisosterismo, hibridação molecular, simplificação molecular e a variação da posição e dos grupos substituintes de sistemas anelares (Patrick, 2008).

O bioisosterismo é definido como substâncias estruturalmente relacionadas que apresentam propriedades biológicas similares ou antagônicas. Para a obtenção dessas novas estruturas análogas, utiliza-se da substituição de grupamentos isósteros, sendo que essas trocas podem ser consideradas clássicas ou não clássicas (Lima e Barreiro, 2005). Yang e colaboradores (2013) verificaram que a substituição bioisostérica do anel 1,3,4-oxatiazol-2-ona pelo 3H-1,2,4-ditiazol-3-ona resultou em um aumento da atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis*, obtendo compostos promissores para o tratamento da tuberculose (Figura 11).

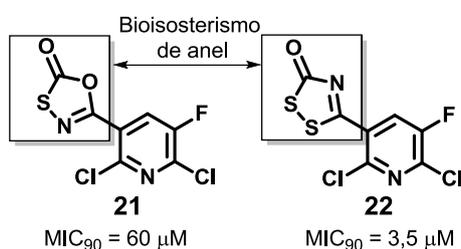


Figura 11: Estruturas químicas e MIC_{90} dos compostos do estudo de Yang e colaboradores (2013).

Outra abordagem da modificação molecular é a variação e/ou troca de substituintes em sistemas anelares. Essas substituições podem alterar a afinidade e a natureza do efeito farmacológico, uma vez que essas alterações modificam vários

parâmetros dos fármacos, como o coeficiente de partição, a densidade eletrônica, o ambiente estérico, a farmacocinética, e o modo como as interações ocorrem no sítio do alvo (Patrick, 2008; Wermuth, 2008). Karabanovich e colaboradores (2016) avaliaram a atividade inibitória de vários compostos contra *Mycobacterium tuberculosis* e foi possível estabelecer como a troca de substituintes em anéis pode alterar a atividade. Um exemplo disso foi a maior atividade inibitória de um composto com uma metoxila em *para* (**23**), em relação ao análogo com o cloro na mesma posição (**24**) (Figura 12). Desta forma, a utilização dessa abordagem é capaz de gerar compostos com características mais desejáveis tanto para a interação com o alvo, quanto para propriedades físico-químicas (Patrick, 2008; Wermuth, 2008).

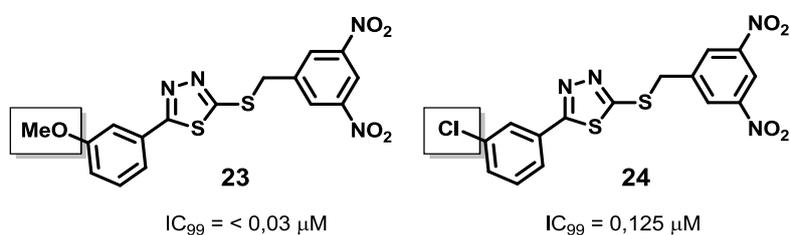


Figura 12: Estruturas químicas e IC_{99} dos compostos de Karabanovich e colaboradores (2016).

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

A busca por novos fármacos contra TB é algo de grande interesse, uma vez que os dados epidemiológicos, o longo tratamento (que implica em baixa adesão), juntamente à MDR e a coinfeção com HIV/AIDS fazem da doença uma das grandes preocupações de saúde pública no mundo (Fogel, 2015).

Como atualmente não há nenhum inibidor da *mtDHFR* na terapêutica, esse campo mostra-se bastante oportuno e pouco explorado, logo, o aprimoramento de compostos que apresentam ligeira afinidade à *mtDHFR* é uma forte estratégia. Para tanto, o uso da ação sinérgica das abordagens SBDD e LBDD representa uma racionalidade que pode gerar de maneiras mais eficientes novos compostos com perfil farmacológico adequado.

Face ao exposto, o trabalho teve como objetivo central, a utilização de bioisosterismo, variações das posições e dos grupos substituintes e informações acerca de ligantes e da estrutura tridimensional da *mtDHFR* para propor e sintetizar análogos ao fragmento previamente obtido por triagem. Com isso, os seguintes objetivos específicos foram atingidos:

- I. Realizar *docking* molecular das substâncias planejadas, sobre a enzima *mtDHFR*, e avaliar os perfis de interação, para assim elencar os análogos mais promissores;
- II. Sintetizar os análogos que apresentarem melhor perfil de interação nos estudos teóricos de ancoramento com a *mtDHFR*;
- III. Realizar os ensaios *in vitro* de inibição enzimática, sobre a *mtDHFR*, dos análogos sintetizados;
- IV. Realizar ensaios *in vitro* de cinética enzimática, para proposição do mecanismo da inibição enzimática
- V. Realizar ensaios *in vitro* de atividade microbiológica para aqueles análogos que apresentarem melhor perfil de atividade nos ensaios enzimáticos.

3 PLANEJAMENTO DAS SÉRIES PROPOSTAS

Como o fragmento MB872 apresenta ligeira afinidade e maior seletividade pela *mtDHFR*, além de uma obtenção sintética mais simples, ele foi escolhido como protótipo para otimização. Para tanto, o trabalho foi dividido em quatro etapas, a saber: **I Docking** molecular; **II Síntese dos análogos**; **III Ensaios de inibição enzimática**; **IV Ensaios de cinética enzimática**; **V Ensaios de atividade antimicrobacteriana**. Inicialmente foi realizado o *docking* molecular com os análogos ao fragmento sobre à *mtDHFR*, para avaliar os perfis de interação com o alvo e com isso direcionar os procedimentos sintéticos. Em seguida as substâncias mais promissoras reveladas nos estudos de *docking* foram sintetizadas, para posteriormente terem sua atividade microbiológica e inibição enzimática mensuradas. Desta forma, os dados obtidos ao longo da pesquisa poderão ser utilizados para a proposição de novas estruturas (Figura 13).

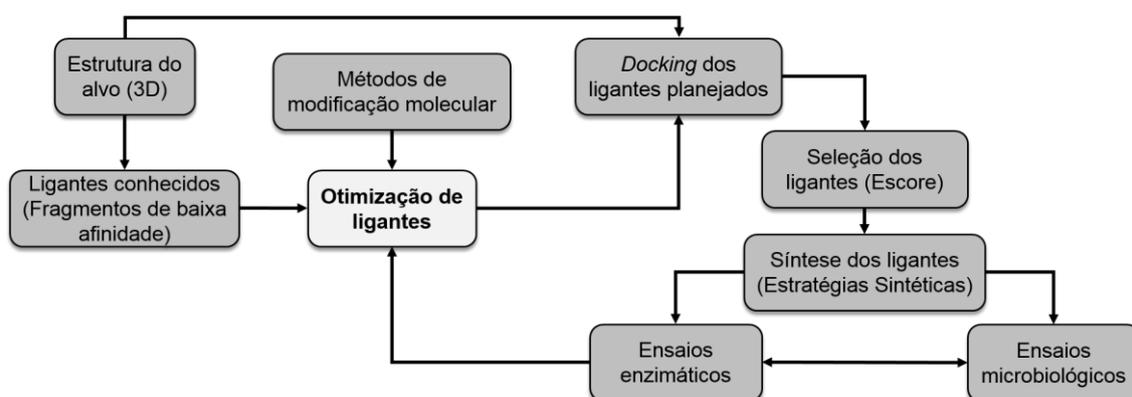


Figura 13: Fluxograma de trabalho proposto no projeto.

Para a proposição de análogos ao fragmento MB872 foram empregadas variações das posições e dos grupos substituintes dos sistemas anelares, substituições bioisostéricas e dados obtidos na cocristalização com *mtDHFR*. Com o intuito de organizar as séries propostas, a estrutura do MB872 foi dividida em três porções: **A**, **B** e **C** (Figura 14).

Para as proposições na porção **A**, utilizou-se da informação de que o anel está próximo a resíduos potencialmente receptores e doadores de ligação de hidrogênio (Tyr100, Ser49 e com o oxigênio do *backbone* da Ile94). Portanto, foram propostos substituintes que possam realizar esse tipo de interação. Além de avaliar as possíveis ligações de hidrogênio, a inserção desses grupos também poderá revelar os efeitos desses substituintes ao anel. Esse conjunto de modificações origina a série I de compostos a serem sintetizados.

Inicialmente, as modificações propostas para a porção **B** baseiam-se no bioisosterismo (troca do carbono metilênico por nitrogênio, enxofre e oxigênio) e retroisosterismo (mudança na posição entre o carbono metilênico e o oxigênio). Adicionalmente, foi proposta a inserção de um terceiro anel, dado que a análise do cocrystal revelou uma cavidade que, possivelmente, comporte moléculas maiores.

A série III, que apresenta modificações na porção **C**, inicia-se com a proposição de estruturas com variação da posição do grupamento carboxila e substituição do grupo ácido pelo éster metílico. A presença da porção éster e a variação da posição do grupo carboxílico também foram propostos para alguns análogos da série I e II. Ademais, essa região possivelmente faz uma interação íon-íon com o resíduo da Arg60, portanto, foi proposto a substituição do grupo carboxílico pelo anel tetrazólico, o qual é um bioisótero ácido.

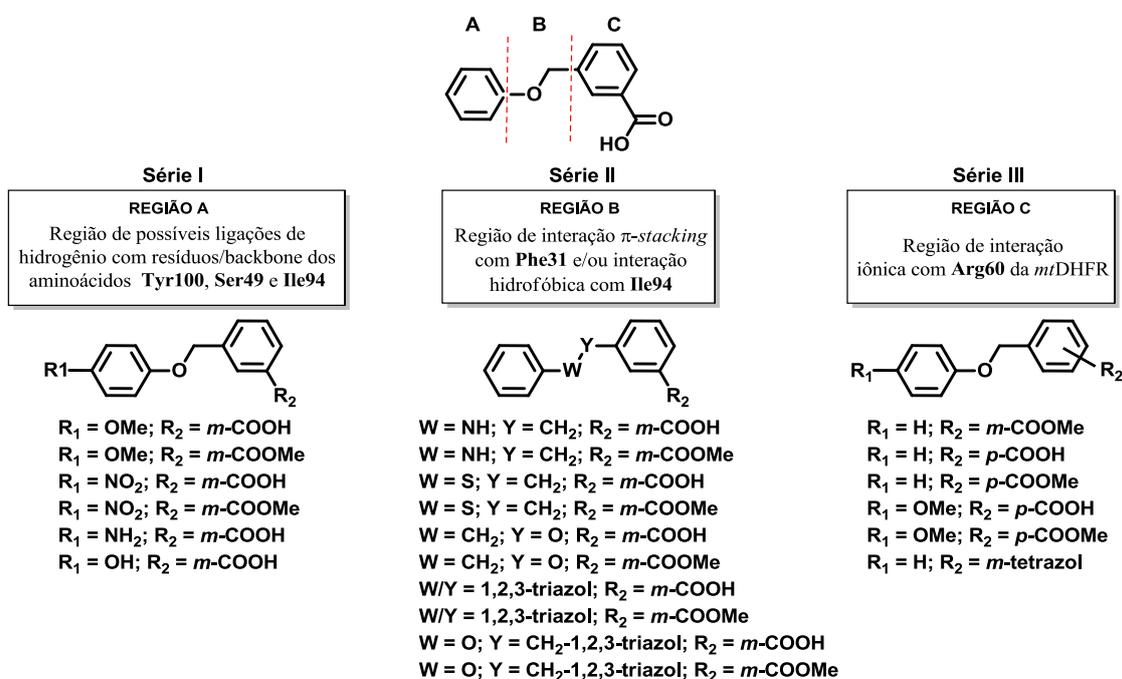


Figura 14: Estruturas químicas dos 22 compostos propostos, divididos em três porções.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos *in silico*

Utilizando o fragmento MB872 como protótipo foram planejados 22 análogos. Com o intuito de delinear os mais promissores e, com isso, orientar a síntese, foi realizado o *docking* dos compostos propostos frente à *mtDHFR*. O cocrystal utilizado foi fornecido em parceria com o Prof. Dr. Márcio V. B. Dias.

Os ensaios de *docking* foram empregados com o intuito de guiar o planejamento e a síntese dos compostos. Por mais que estudos mais aprofundados sejam mais indicados, tais como dinâmica molecular, o emprego do *docking* para a delimitação da síntese pode ser suficiente, uma vez que fornece indícios de pontos de interação com o bolso (De Ruyck *et al.*, 2016)

Para a escolha do protocolo de *docking* e sua validação foram feitos *redockings* do fragmento MB872 na *mtDHFR*. O método de *redocking* que apresentou o melhor valor de RMSD (*root-mean-square deviation*) (1,2 Å) utilizou a função de escore “ChemScore”, o carbono zeta do resíduo Phe31 (CZ-Phe31) como centro, raio de 10 Å a partir do centroide e velocidade lenta para o algoritmo genético. A presença das moléculas de água cocrystalizadas durante o *redocking* mostrou-se importante, uma vez que o mesmo método sem essas moléculas resultou em um RMSD de 2,4 Å. O NADPH também foi mantido durante o processo, uma vez que Dias e colaboradores (2014) demonstraram como a porção ribose nicotinamida pode ser importante na interação dos compostos. Após a seleção do melhor método, o *redocking* foi feito em sextuplicata e todas as simulações apresentaram RMSD abaixo de 2,0 Å, com média aritmética igual a 1,2 Å. Esta média de RMSD é adequada e permite a validação do método, uma vez que as variáveis escolhidas foram capazes de gerar um método que reproduz o dado experimental do cocrystal.

A presença das moléculas cocrystalizadas nas simulações de *docking* se mostrou importante, uma vez que gerou o menor RMSD. Roberts e colaboradores (2008) demonstraram como a água pode influenciar nos resultados do RMSD, revelando que essas moléculas cocrystalizadas podem, além de intermediar interações com resíduos, promover determinadas conformações mais favoráveis por meio do efeito estérico. Dessa forma, observa-se que o bolso da *mtDHFR* torna-se maior na ausência das moléculas de água (Figura 15) e isso pode justificar os elevados valores de RMSD nos testes realizados sem a presença de moléculas de água.

O tipo de escore selecionado (ChemScore) é uma função empírica, baseada em um banco de dados de complexos proteína-ligante. A função considera a variação

de energia livre quando há a interação da micromolécula com a macromolécula (Eldridge *et al.*, 1997; Baxter *et al.*, 1998). Em estudos que comparam as funções de *docking*, ChemScore tem apresentado bons valores, sendo destacada como umas das melhores para ensaios de *docking* (Li *et al.*, 2014).

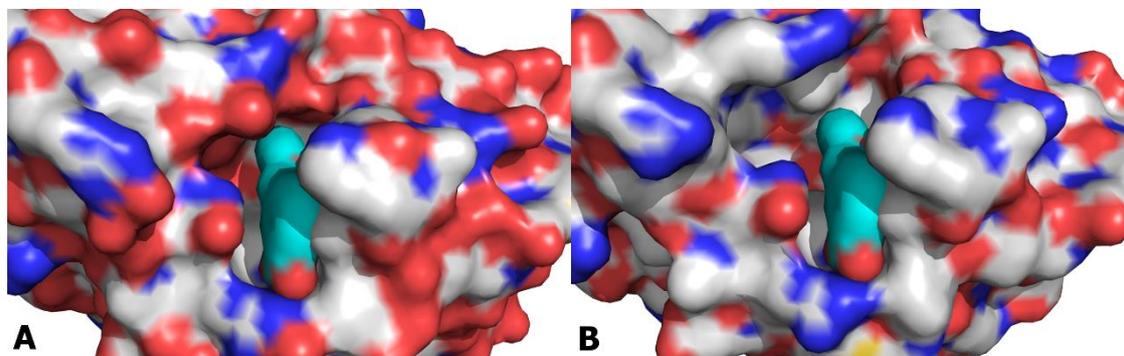
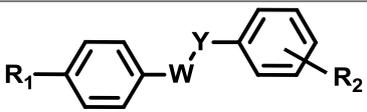


Figura 15: Visualização do bolso da *mtDHFR* complexado ao fragmento MB872. **A:** Bolso mais restrito com a presença das moléculas de água; **B:** Bolso maior na ausência das moléculas de água. Vermelho: átomos de oxigênio; Branco: átomos de carbono; Azul escuro: átomos de nitrogênio. Azul claro: átomos de carbono do MB872 (Estruturas cristalográficas, não publicadas, obtidas em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

Os ensaios de *docking* foram realizados com os 22 compostos propostos. Também foi empregado o protótipo MB872, o qual teve seus dados cocrystalográficos utilizados para a proposição dos análogos. A pontuação analisada foi a média aritmética, das melhores poses de cada composto, das sextuplicatas (Tabela 1).

Ao observar os análogos com modificações no anel **A**, é possível inferir que a inserção de grupos doadores/aceptores de interação de hidrogênio pode representar uma importante estratégia para otimização do protótipo. Isso pode ser evidenciado tanto pelos altos valores de escores obtidos para os compostos modificados nessa região (**38** e **36**), quanto pelas soluções observadas no processamento do *docking*, que revelam importantes interações com resíduos do bolso catalítico. Um exemplo disso é o análogo **38**, o qual apresentou uma ligação de hidrogênio entre o grupo amino do anel **A** e o *backbone* do resíduo de Ile94, Ile5 e uma molécula de água estrutural (Figura 16A). Essa mesma interação é observada em cocrystalos da *mtDHFR* disponíveis da literatura, os quais revelam a TMP e CYG interagindo com os resíduos de Ile94 e Ile5 (Figura 16B e 16C). Portanto, essa interação demonstrada no ensaio de *docking* pode indicar um ganho de afinidade, uma vez que esses inibidores possuem um valor de K_d (μM), experimental, de 1,43 (TMP) e 1,26 (CYG) frente à *mtDHFR* (Dias *et al.*, 2014).

Tabela 1: Estruturas químicas dos análogos propostos e as médias aritméticas dos escores obtidos.



Composto	R ₁	W	Y	R ₂	Média de Escores (ChemScore)
25	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	27,21
26	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	26,06
27	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	27,14
28	H	NH ₂	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	27,50
29	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	28,76
30	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOMe	27,52
31	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	28,30
32	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	26,79
33	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOMe	27,04
34	H	O	CH ₂ -1,2,3-triazol	<i>m</i> -COOMe	29,69
20 ^a	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	29,39
35	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	26,58
36	OH	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	28,20
37	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	27,80
38	NH ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	31,87
39	H	NH ₂	CH ₂	<i>m</i> -COOH	29,43
40	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOH	31,25
41	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOH	29,49
42	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	27,60
43	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	25,88
44	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOH	30,66
45	H	O	CH ₂ -1,2,3-triazol	<i>m</i> -COOH	29,12
46	H	O	CH ₂	<i>m</i> -tetrazol	25,93

^a Protótipo MB872

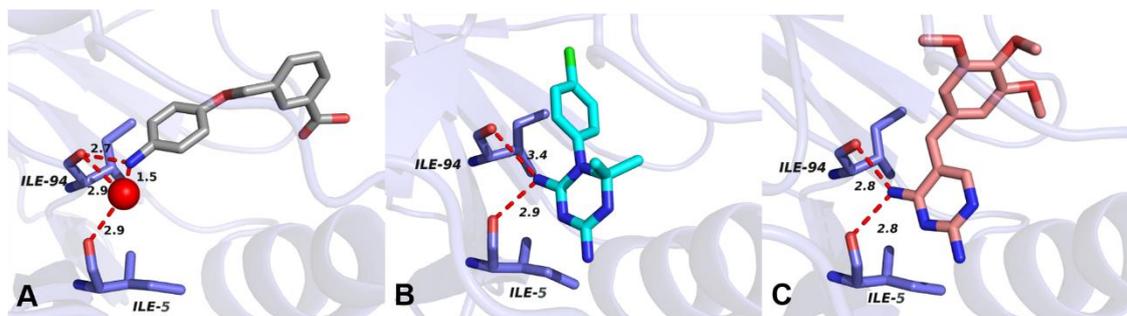


Figura 16: Interação de alguns compostos e distâncias (em Å) com resíduos do bolso da *mtDHFR*. **A:** Análogo **38** e as interações encontradas para a melhor solução (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). **B:** Cocrystal do complexo formado entre a *mtDHFR* e a CYG, destacando a interação com o resíduo Ile94 (PDB: 4KNE). **C:** Cocrystal do complexo formado entre a *mtDHFR* e a TMP, destacando as interações com os resíduos Ile5 e Ile94 (PDB: 1DG5).

No caso dos análogos com alterações na região **B**, a análise das poses obtidas revelou que a presença de um grupo espaçante e/ou um terceiro anel nessa região pode ser interessante (Compostos **34**, **44** e **45**). Esse resultado pode ser atribuído à existência de um bolso hidrofóbico formado pelos resíduos Phe31, Ile94, Leu50, Pro51, Val54, e Leu57. A análise do cocrystal de MB872 com *mtDHFR* e da melhor pose do composto **34** demonstra que esse bolso hidrofóbico pode acomodar pelo menos três anéis (Figura 17). Ainda na região **B**, é possível observar que os bioisómero e retroisómeros **39**, **40** e **41** apresentaram uma pontuação próxima a do protótipo **20**. Com a análise das poses é possível verificar que esses três análogos tiveram suas melhores conformações próximas a do protótipo (Figura 18).

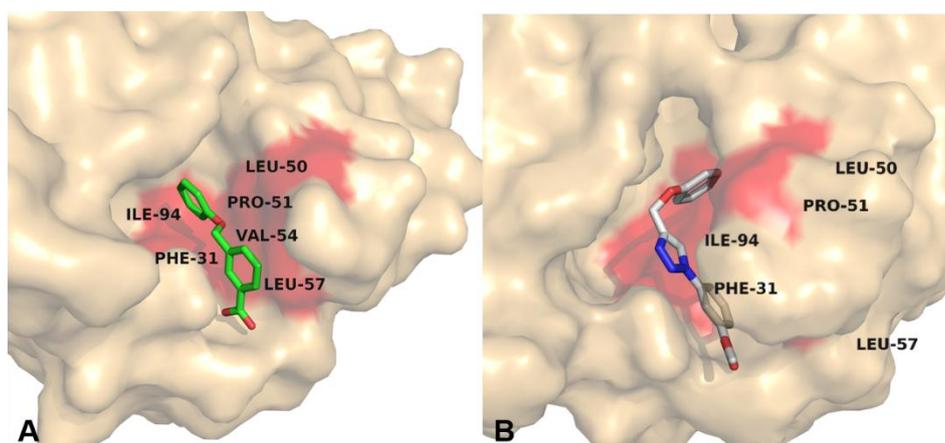


Figura 17: **A:** Cocrystal da enzima *mtDHFR* com o fragmento **20** (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias). **B:** Melhor pose, obtida no ensaio de *docking* para o análogo **34**

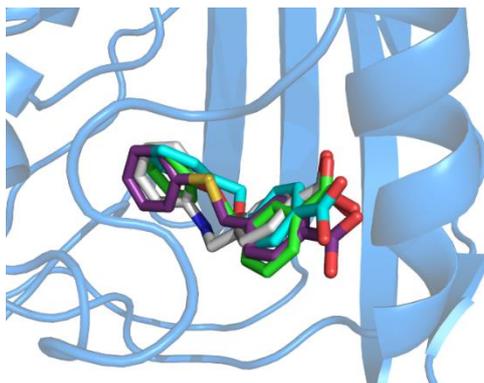


Figura 18: Melhores poses, obtidas em *docking* e sobrepostas, para os análogos **39** (branco), **40** (violeta), **41** (azul claro) e o protótipo **20** (verde) (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

Para os análogos com as modificações na região **C** a presença do grupo carboxílico demonstrou ser fundamental. Isso pôde ser sugerido a partir da obtenção de baixos valores de escore para os compostos com função éster nessa região. No entanto, esse resultado era esperado, uma vez que a interação íon-íon com o resíduo de Arg60 é um dos principais pontos de contato tanto do protótipo (**20**). Além disso, a importância do grupo carboxílico foi reforçada com o resultado obtido para o composto **46**, uma vez que esse análogo, com anel tetrazólico substituindo a carboxila, apresentou baixa pontuação. Os compostos com éster foram propostos devido ao fato de que estruturas mais lipofílicas tendem a possuir melhor perfil de permeação através da membrana do MTB (Sarathy *et al.*, 2012).

Para melhor analisar o possível efeito da posição do grupo carboxílico, o *docking* também foi feito com análogos de **35**, **36**, **37**, **38**, **39**, **40**, **41**, **44** e **46**, possuindo a carboxila nas posições *orto* e *para*. Desta forma, foi possível comparar a média dos escores para cada grupo de 9 compostos (Tabela 2).

Tabela 2: Média aritmética dos escores obtidos para cada grupo (9 análogos *orto*, 9 análogos *meta* e 9 análogos *para*).

Posição dos grupos	Média dos escores dos 9 análogos
Grupo Carboxílico em <i>meta</i>	29,06
Grupo Carboxílico em <i>para</i>	27,49
Grupo Carboxílico em <i>orto</i>	26,71

A análise das poses dos compostos com melhores pontuações de cada grupo pôde indicar a provável razão das diferenças entre as pontuações. A região **C** dos três análogos interage de forma similar com o *backbone* do resíduo de Ile94 e a água

estrutural (Figura 19), portanto, a diferença observada pode ser atribuída à interação com os resíduos de Arg32 e Arg60 (Figura 20). O análogo com o grupo carboxílico em *meta* revelou interações, com os resíduos de arginina, apresentando distâncias mais favoráveis (Torshin *et al.*, 2002). Por outro lado, os análogos substituídos em *orto* e *para* apresentaram essas mesmas interações com distâncias maiores, diminuindo a pontuação no ensaio de *docking*.

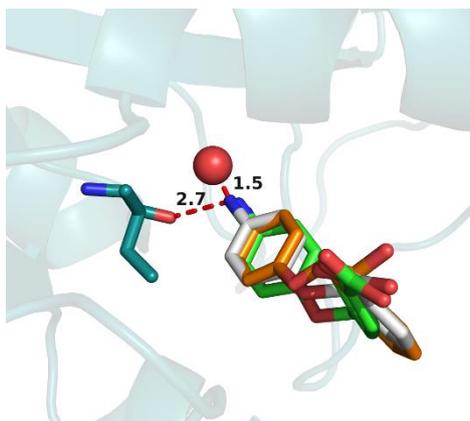


Figura 19: Sobreposição das melhores poses obtidas para o *docking* com análogos substituídos nas posições *orto*, *para* e *meta*. Distâncias (em Å) das interações com o *backbone* do resíduo Ile94 e com uma molécula de água estrutural. Branco: Análogo **38**. Laranja: Análogo **38** com a carboxila em *orto*. Verde: Análogo **38** com a carboxila em *para*. (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

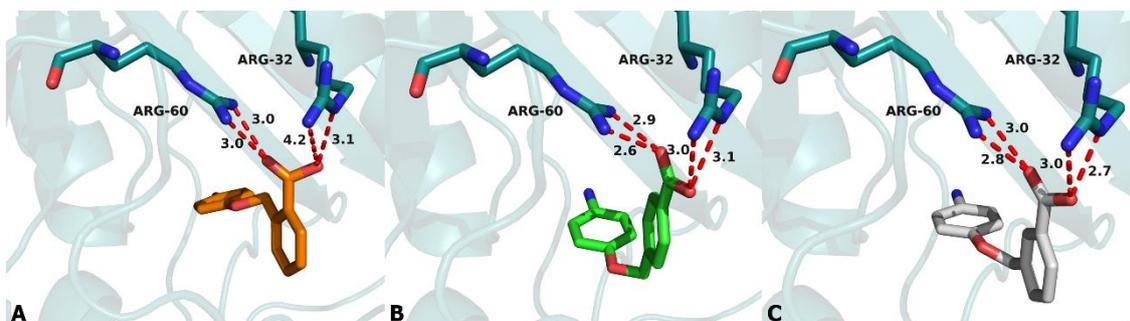


Figura 20: Melhores poses obtidas para o *docking* com análogos substituídos nas posições *orto*, *para* e *meta*. Distâncias (em Å) das interações com os resíduos de Arg32 e Arg60. **A:** Análogo **38** com a carboxila em *orto*; **B:** Análogo **38** com a carboxila em *para*; **C:** Análogo **38**. (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

Além das distâncias apropriadas, a melhor solução para o análogo *meta* também revelou que os ângulos formados entre o átomo ligado ao hidrogênio, o próprio hidrogênio e o aceptor da ligação de hidrogênio assumem valores mais próximos aos

descritos na literatura como ideal para esse tipo de interação, sendo este acima de 150° (Bissantz *et al.*, 2010) (Figura 21).

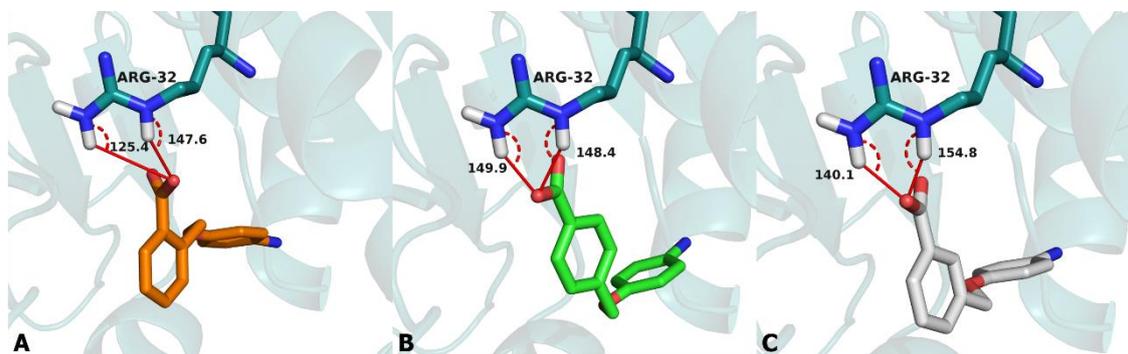


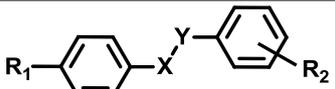
Figura 20: Melhores poses obtidas para o *docking* com análogos substituídos nas posições *orto*, *para* e *meta*. Distâncias (em Å) das interações com os resíduos de Arg32 e Arg60. **A:** Análogo **38** com a carboxila em *orto*; **B:** Análogo **38** com a carboxila em *para*; **C:** Análogo **38** c. (Estrutura cristalográfica, não publicada, obtida em parceria com Prof. Dr. Márcio V. B. Dias).

A análise dos ensaios de *docking* revelou como os análogos com substituintes no anel **A** podem ser priorizados na síntese, visto que foi observado que esses grupos podem adicionar mais um ponto de interação com o bolso. Ademais, os análogos com o grupo carboxílico em *para* também podem ser testados, uma vez que, mesmo com resultados inferiores, apresentaram escores e poses semelhantes aos *meta* substituídos.

4.2 Síntese e caracterização dos compostos

Baseando-se nos resultados obtidos nos ensaios de *docking* e na viabilidade sintética, a síntese de alguns análogos com substituintes no anel **A** foi priorizada. Além disso, decidiu-se também obter alguns compostos com o grupo carboxílico na posição *para*, uma vez que estes apresentaram pontuação próxima nos ensaios *in silico*. Por fim, a síntese também englobou alguns análogos com modificações bioisostéricas na região **B**. Para tanto, aplicou-se métodos de alquilação, hidrólise básica de grupos ésteres, redução de grupo nitro, substituição nucleofílica aromática e cicloadição (Figura 21).

Foram sintetizados 23 compostos (22 planejados e o protótipo **20**) (Tabela 3) e 4 intermediários (disponível em Parte experimental).

Tabela 3: Resultados de caracterização e pureza dos análogos propostos.


$$\text{R}_1\text{-C}_6\text{H}_4\text{-X-Y-C}_6\text{H}_4\text{-R}_2$$

Composto	R ₁	X	Y	R ₂	Aspecto físico	η (%)	CLAE t (min)
20 ^a	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido branco	84	t = 11,5 p > 99 %
25	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	Líquido amarelado	70	t = 12,9 p > 97 %
26	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	Sólido branco	70	t = 12,7 p > 98 %
27	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	Sólido amarelado	74	t = 12,7 p > 98 %
28	H	NH ₂	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	Líquido amarelado	60	N/D
29	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	Líquido amarelado	77	t = 13,2 p > 96 %
30	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOMe	Sólido amarelado	73	t = 13,1 p > 96 %
31	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	Sólido branco	92	t = 12,9 p > 99 %
32	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	Sólido branco	84	t = 13,0 p > 98 %
33	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOMe	Sólido amarelo	30	t = 12,4 p > 97 %
34	H	OCH ₂ -1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOMe	Sólido amarelado	80	t = 12,1 p > 98 %
35	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido branco	77	t = 11,4 p > 98 %
36	OH	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido amarelado	30	t = 9,9 p > 96 %
37	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido amarelado	70	t = 11,4 p > 98 %
38	NH ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido preto	30	N/D
39	H	NH ₂	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido amarelado	64	t = 11,3 p > 98 %
40	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOH	Sólido branco	70	t = 11,8 p > 98 %
41	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOH	Sólido amarelado	80	t = 11,5 p > 98 %
42	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	Sólido branco	68	t = 11,6 p > 99 %
43	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	Sólido branco	83	t = 10,2 p > 99 %
44	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOH	Sólido amarelo	90	t = 11,2 p > 98 %
45	H	OCH ₂ -1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOH	Sólido amarelado	98	t = 10,9 p > 99 %
46	H	O	CH ₂	<i>m</i> -tetrazol	Sólido amarelado	4	t = 11,2 p > 99 %

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **t:** Tempo de retenção com sistema eluente inicialmente com ÁGUA 100 % e ACN 0,1% TFA alcançando 100% em 10 minutos. **p:** pureza N/D: Não determinado.^a Protótipo MB872.

No caso dos compostos propostos, a hidroxila fenólica dos reagentes é um ácido fraco ($pK_a \approx 10$), portanto o carbonato de potássio é suficientemente forte para a desprotonação (pK_a 10,25), que conseqüentemente aumenta a nucleofilicidade dos reagentes. O eletrófilo, por sua vez, é um derivado de brometo de benzila, o que reforça a hipótese da reação ocorrer via substituição nucleofílica bimolecular (S_N2). Isso é possível porque o carbono do centro da reação no estado de transição tem sua deficiência de elétrons estabilizada pelo o sistema π do benzeno adjacente. Essa estabilização é conferida pela conjugação dos orbitais π que aumentam a densidade eletrônica do carbono que sofreu o ataque nucleofílico (Clayden *et al.*, 2012) (Figura 22).

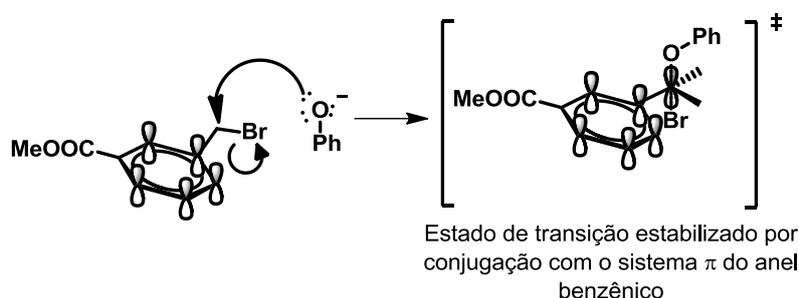


Figura 22: Representação esquemática da estabilização do carbono do centro da reação.

A hidrólise dos ésteres seguiu o método descrito por Manos-Turvey e colaboradores (2015). Os rendimentos alcançados para a síntese desses compostos (entre 70 e 80 %) foram ligeiramente menores do que aqueles descritos por Manos-Turvey (entre 90 e 100 %). A hidrólise ocorreu em meio alcalino e, nessas condições, o carbono carbonílico sofre um ataque nucleofílico do ânion hidróxido, gerando um intermediário tetraédrico instável. A estabilidade será alcançada por meio da eliminação do substituinte alcóxi, o qual, geralmente, é um bom grupo abandonador. O ânion alcóxi poderá abstrair o hidrogênio da carboxila gerada, fornecendo o álcool correspondente (Figura 23).

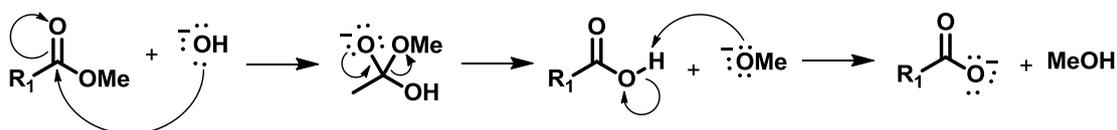


Figura 23: Mecanismo proposto para a hidrólise alcalina dos ésteres (Clayden *et al.*, 2012).

Ao final da reação, uma solução ácida é adicionada para os compostos assumirem a forma molecular e, com isso, tornarem-se menos solúveis no meio aquoso e precipitarem. Em geral, esse procedimento ocorreu de modo satisfatório, porém a

síntese do composto **39** apresentou um rendimento ligeiramente abaixo dos demais análogos. Esse resultado pode ser atribuído ao fato do análogo em questão possuir característica anfótera, ou seja, comporta-se como ácido e base. Essa característica da substância resulta no menor rendimento da precipitação com adição de solução ácida. Isso ocorre devido à protonação do nitrogênio em meio ácido, a qual pode tornar o composto mais solúvel em água. Diante dessa dificuldade, optou-se por alterar o pH utilizando um potenciômetro, de maneira a se alcançar um pH mais próximo possível do qual o composto estará, majoritariamente, na forma molecular (pH 4,0 calculado Marvin[®]), logo, menos solúvel em água.

A obtenção dos análogos com os anéis triazol e tetrazol baseou-se no método descrito por Wang e colaboradores (2012) e Vorona e colaboradores (2014), respectivamente. Esses protocolos descrevem uma cicloadição, a qual ocorre entre um grupo 1,3-dipolar e outro de dois átomos que tenha afinidade pelo o dipolo (diapolarófilo), resultando no anel de cinco membros correspondente aos grupos que estão reagindo. Tanto para a obtenção do triazol, quanto para tetrazol, o 1,3-dipolo é uma azida, enquanto que o diapolarófilo é um alcino para o triazol (Figura 24) e uma nitrila para o tetrazol (Figura 25). Ainda sobre a síntese do triazol, é importante ressaltar que o íon Cu^{+1} é empregado como catalisador, porém pode sofrer oxidação gerando o Cu^{+2} . Para tanto, emprega-se o ascorbato de sódio, o qual é capaz de reduzir o Cu^{+2} e manter as quantidades necessárias de Cu^{+1} (Clayden *et al*, 2012; Wei *et al.*, 2016).

O rendimento para a síntese do composto **46** poderia ser melhorado com a utilização de micro-ondas, uma vez que há relatos na literatura do emprego dessa técnica (Vorona *et al.*, 2014).

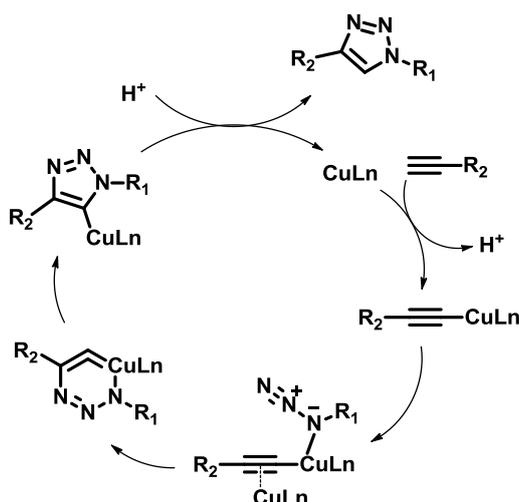


Figura 24: Mecanismo proposto para a síntese de anel triazol via cicloadição 1,3-dipolar (Wei *et al.*, 2016).

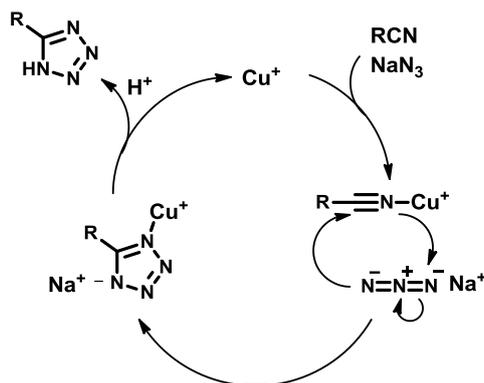


Figura 25: Mecanismo proposto para a síntese de anel tetrazol via cicloadição 1,3-dipolar (Clayden *et al*, 2012).

As análises dos cromatogramas obtidos nos ensaios de CLAE (Anexo I) revelaram pureza acima de 95% para os compostos testados. Esse dado foi obtido ao comparar a área da curva formada pelo pico de absorvância do composto com os demais picos gerados por contaminantes da amostra. Com esse grau de pureza, os compostos puderam ser encaminhados para os ensaios enzimáticos e microbiológicos.

Quanto à caracterização dos análogos obtidos por síntese, o espectro de RMN de ^1H do composto **25** (Figura 26) pode exemplificar confirmação da obtenção dos compostos alquilados.

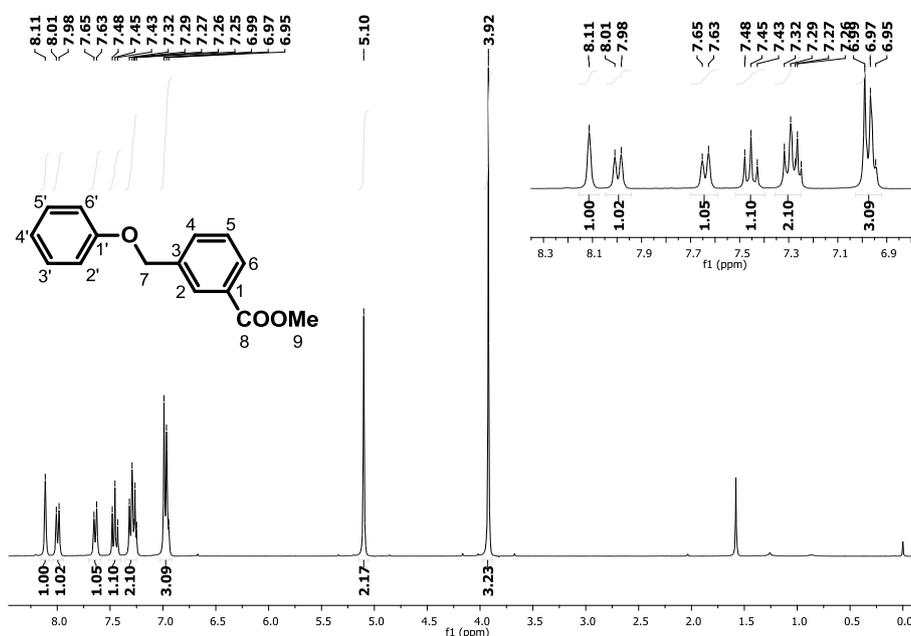


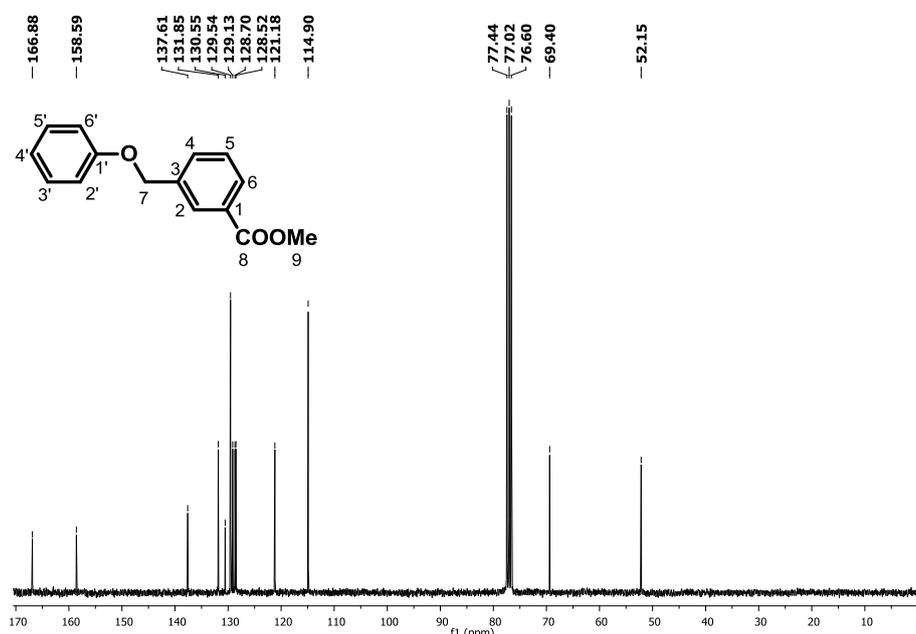
Figura 26: Espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , do composto **25**.

O principal deslocamento químico que evidencia a formação do produto **25** é o 5,10 ppm (H7), o qual é esperado para hidrogênios ligados a carbonos vizinhos a

oxigênios. Esse valor também é muito elevado para ser atribuído ao reagente, uma vez que os hidrogênios do carbono metilênico do 3-bromometil benzoato de metila apresentam deslocamento 4,5 (Manos-Turvey *et al.*, 2015). O δ_H em 3,92 ppm (H9) indica a presença dos hidrogênios metílicos do éster, enquanto que os sinais entre 8,11 e 6,95 ppm (H5-3, H6-2, H5'-3' e H6'-2') mostram os hidrogênios aromáticos.

No espectro de ^{13}C (Figura 27), o carbono metilênico ligado ao oxigênio (C7) também é evidenciado, uma vez que é possível observar um deslocamento químico em 69,4 ppm, típico de carbonos ligados a átomos com alta eletronegatividade. O sinal do carbono carbonílico (C8) está presente em δ_C 166,8 ppm, enquanto que o do carbono da metila está em 52,1 ppm (C9). Os sinais dos anéis benzênicos estão na faixa de 158,6 a 115,0 ppm (C5-3, C6-2, C5'-3' e C6'-2'). Os demais espectros dos compostos obtidos por alquilação se encontram no Anexo I.

O espectro de RMN 1H do composto **20** (Figura 28) exemplifica como a hidrólise dos ésteres pode ser confirmada. A ausência do deslocamento químico dos hidrogênios da metila do éster ($\delta_H \sim 3,9$ ppm) e a presença de um sinal na região de 12 ppm (H9) indicam que ocorreu a troca da função éster pelo ácido carboxílico. O espectro de RMN de ^{13}C de **20** (Figura 29) corrobora a confirmação da obtenção do composto carboxilado, uma vez que não há o δ_C do carbono da metila do éster (~ 52 ppm). Os demais espectros dos compostos obtidos por hidrólise se encontram no Anexo I.



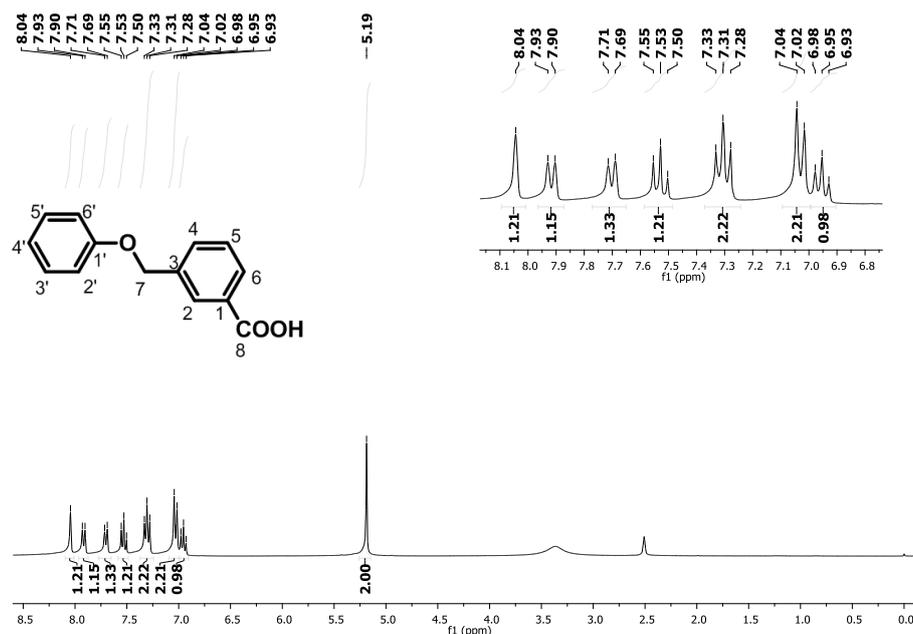


Figura 278: Espectro de RMN ^1H em DMSO- d_6 do composto 20.

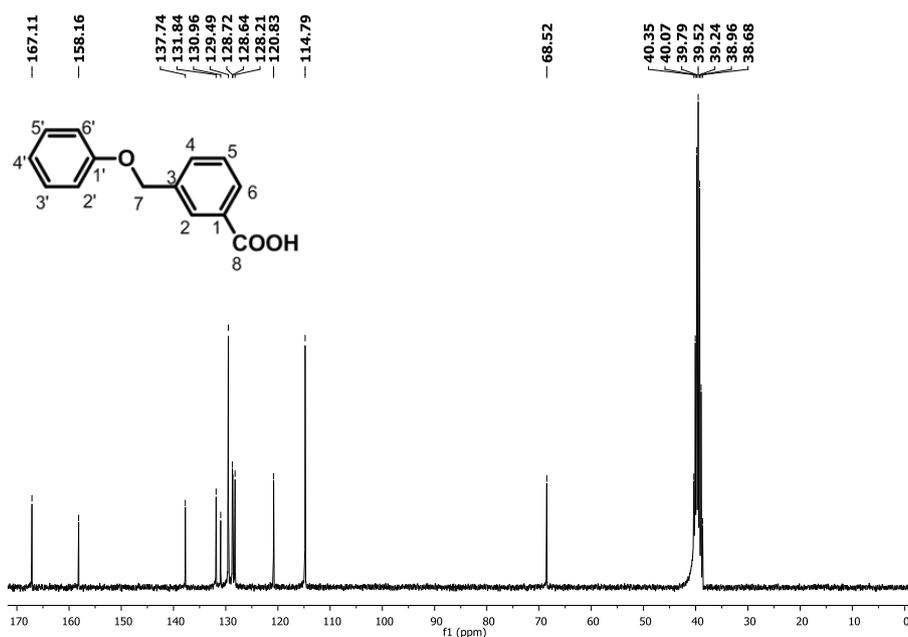


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C em DMSO- d_6 do composto 20.

Na análise dos espectros de RMN ^1H dos compostos com anel triazólico (**33**, **34**, **44** e **45**) é possível concluir a obtenção dos produtos esperados por meio do sinal atribuído ao hidrogênio do anel triazólico. No espectro do composto **44** (Figura 30), por exemplo, esse hidrogênio possui um deslocamento de 8,80 ppm e está condizente com o reportado por Srvanathi e colaboradores (2018). Os outros sinais seguem o padrão dos demais análogos. Os demais espectros dos compostos triazólicos se encontram no Anexo I.

O composto **46** teve sua formação confirmada por meio do sinal do carbono do anel tetrazol, o qual foi de 157,5 ppm (Figura 31). É esperado que esse valor seja elevado, uma vez que o átomo de carbono está em um anel com ressonância e ligado a um átomo eletronegativo. Outro fator que confirma a conversão da nitrila em tetrazol é o fato do δ_C da nitrila do reagente possuir um valor de 117,9 (Exner, O. *et al.*, 1989), ou seja, abaixo do encontrado no espectro. Por fim, a obtenção de **46** também é confirmada pelo espectro de massas, o qual está disponível no Anexo I.

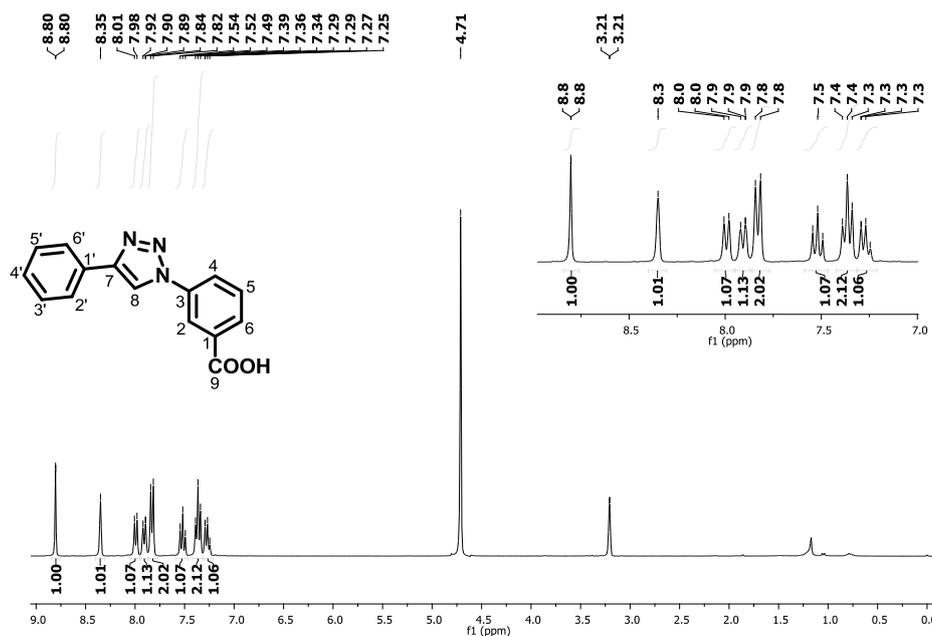


Figura 29: Espectro de RMN ^1H , em Metanol- d_4 , do composto **44**.

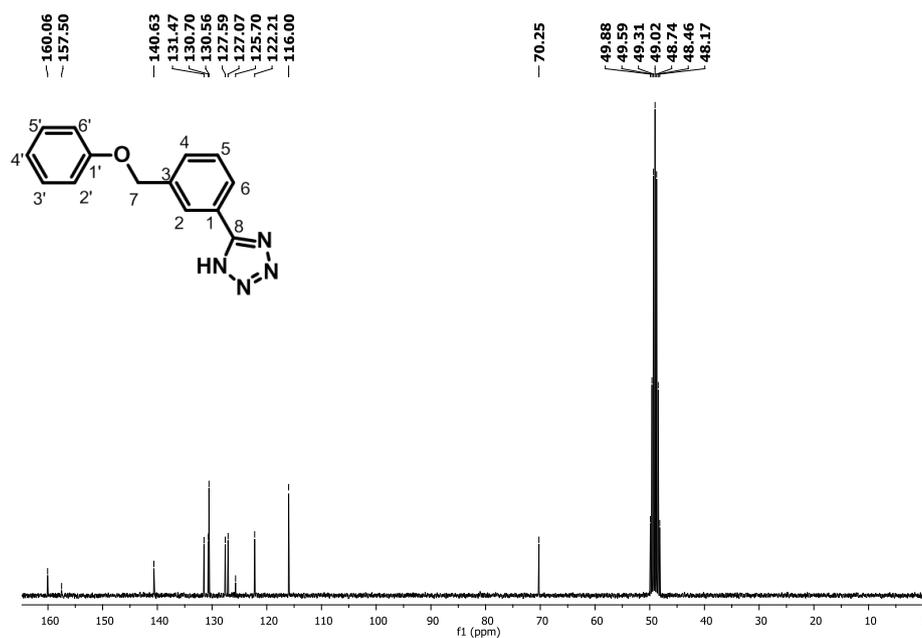


Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C , em DMSO- d_6 , do composto **46**.

4.3 Ensaio de inibição enzimática

O ensaio de inibição enzimática foi realizado com os compostos obtidos na síntese, por meio da detecção da fluorescência emitida pelos substratos da enzima *mtDHFR* quando excitados a 340 nm. É possível mensurar a atividade porque o produto da ação enzimática (NADP⁺) não emite fluorescência, logo, com a enzima funcionando haverá uma diminuição dessa emissão (Rimet *et al.*, 1987; Aiso *et al.*, 1999). O IC₅₀ da TMP foi obtido juntamente ao dos compostos sintetizados, com o intuito de ser usado como um controle positivo do ensaio. O valor obtido (91 µM) foi condizente com o descrito na literatura (88 µM) (Li *et al.*, 2000).

A maioria dos compostos ensaiados é encontrada como sendo significativamente ativa contra *mtDHFR* (Tabela 4). TMP e **20** foram usados como controle positivo e inibiram a *mtDHFR* com 91 ± 0,16 µM e 15 ± 0,058 µM, respectivamente. Dois dos compostos testados apresentaram atividade superior ao protótipo **20** e doze deles (**27**, **28**, **29**, **32**, **34**, **35**, **36**, **37**, **39**, **42**, **43** e **45**) foram melhores que a TMP.

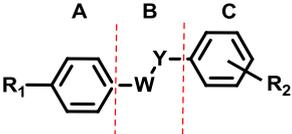
O composto **39** apresentou uma excelente atividade, acima do protótipo e TMP. Interessantemente, relocar o grupo oxigênio do composto **20** pelo bioisómero clássico NH resultou em um composto potente **39**, que foi 2 vezes mais ativo que o primeiro com uma IC₅₀ de 7 ± 0,13 µM. A análise de todas as poses do análogo **39** nos estudos de *docking* não revelou nenhum ponto de ligação de hidrogênio entre o grupo amino e o bolso da enzima. A região em que essa porção encaixa é hidrofóbica, com resíduos de Phe31, Ile94, Leu50, Pro51, Val54, e Leu57. Entretanto, o composto pode estar interagindo de outra maneira, não detectada nos estudos de *docking*.

Em relação aos análogos com modificações na região **A**, os estudos de SAR indicam que quando o grupo hidroxila (**36**) é substituído por nitro, **37**, a atividade aumenta em 1,5 vezes, o que pode ser devido à diminuição na densidade eletrônica do anel aromático através de um efeito de retirada de ressonância do grupo nitro. Como pode ser visualizado, um grupo metoxi doador de elétrons, **35** (119 ± 4,8%) também não conseguiu melhorar a potência. Surpreendentemente, outro padrão de atividade é obtido quando o grupo metoxi está associado à posição *para* do grupo carboxílico em R₂, **43** (31 ± 0.1%). Estes resultados reforçam o indício de que substituintes em R₁ podem estabelecer mais pontos de interação com o bolso da enzima.

Com base nos dados obtidos para os compostos com modificações na região **B**, verifica-se que a inserção do anel triazol (**34** e **45**) gerou melhoria significativa na atividade dos compostos (81 ± 0,11% e 8 ± 0,26%, respectivamente). Os ensaios de *docking* indicaram que o bolso da enzima comportaria a inserção de mais um anel, ou

até mesmo de um espaçante, e com isso aumentaria os pontos de interação. Dentre os bioisósteros (**39**, **40** e **41**) apenas o análogo **39** apresentou valores superiores ao do protótipo.

Tabela 4: IC₅₀ dos compostos sintetizados e da TMP.



Composto	R ₁	W	Y	R ₂	IC ₅₀ (μM) ± SD	R ²
20^a	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	15 ±0,058	0,97
25	H	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	504 ±0,013	0,95
26	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	242 ±0,08	0,91
27	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	35 ±0,23	0,93
28	H	NH	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	55 ±0,003	0,87
29	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOMe	76 ±0,01	0,99
30	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOMe	577 ±0,06	0,96
31	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	152 ±0,10	0,91
32	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOMe	26 ±0,16	0,85
33	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOMe	ND ^b	-
34	H	O	CH ₂ -1,2,3-triazol	<i>m</i> -COOMe	81 ±0,11	0,88
35	OMe	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	44 ±0,41	0,91
36	OH	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	36 ±0,12	0,91
37	NO ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	23 ±0,13	0,95
38	NH ₂	O	CH ₂	<i>m</i> -COOH	ND ^c	-
39	H	NH	CH ₂	<i>m</i> -COOH	7 ±0,13	0,94
40	H	S	CH ₂	<i>m</i> -COOH	128 ±0,11	0,89
41	H	CH ₂	O	<i>m</i> -COOH	230 ±0,09	0,95
42	H	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	51 ±0,18	0,87
43	OMe	O	CH ₂	<i>p</i> -COOH	31 ±0,1	0,92
44	H	1,2,3-triazol		<i>m</i> -COOH	ND ^b	-
45	H	O	CH ₂ -1,2,3-triazol	<i>m</i> -COOH	8 ±0,26	0,95
46	H	O	CH ₂	<i>m</i> -tetrazol	454 ±0,15	0,88
TMP					91 ±0,16	0,96

^a Protótipo MB872. ^b Emitiu fluorescência no mesmo comprimento de onda usado no ensaio.

^c Não apresenta estabilidade necessária para ensaios

Analisando os compostos com modificações na região **C**, é notório observar que comparado ao protótipo **20**, o análogo **43**, que apresenta grupo carboxílico (R_2) na posição *para*, apresentou ainda valor relevante de inibição enzimática ($31 \pm 0.13 \mu\text{M}$, respectivamente), indicando que explorar novos análogos *para* substituídos pode ser estratégia interessante. Entretanto, a baixa atividade do composto **46** ($454 \pm 0.15 \mu\text{M}$) indica que a inserção do grupo bioisotérico tetrazol não satisfaz requisitos de interação com a enzima. Ademais, os compostos com o grupo carboxílico livre apresentaram, em maioria, maior atividade em relação aos análogos com o grupo éster. Isso provavelmente ocorre em decorrência do grupo carboxílico ser um ponto adicional de interação iônica que melhora a afinidade dos compostos pela enzima.

4.4 Ensaio mecanístico da inibição enzimática

Ensaio de cinética enzimática foram realizados para a avaliação do mecanismo pelo qual o composto **39** inibe a enzima *mtDHFR*. Para isso, a constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima da enzima (V_{max}) foram determinados, uma vez que as análises desses dados indicam se a inibição ocorre de maneira competitiva ou não competitiva. Em virtude da *mtDHFR* possuir dois bolsos potencialmente ocupados por inibidor, os ensaios foram feitos para o substrato (DHF) e o cofator (NADPH). Em um caso de inibição competitiva, o aumento da concentração de inibidor não altera o V_{max} , porém o K_m é alterado, uma vez que a enzima estará com o bolso ocupado e precisará de mais substrato para alcançar a velocidade máxima. Entretanto, para uma inibição não competitiva, o V_{max} é reduzido em decorrência da perda de atividade da enzima e o K_m permanece igual, dado que o inibidor não altera a capacidade da enzima se ligar ao substrato (Copeland, 2013).

Os resultados do ensaio com variação da concentração de substrato e inibidor indicam que o composto **39** é um inibidor não competitivo com o DHF, uma vez que o K_m permaneceu constante ($0,22 \pm 0,04$) e a V_{max} variou (Tabela 5) (Figura 32). Isso indica que **39** pode atuar na forma livre da enzima, causando a modificação do sítio ativo ou interagindo com o complexo enzima+substrato, gerando perda de alguma interação importante entre o DHF e o bolso catalítico (Balbaa *et al.*, 2012).

Para verificar se o análogo **39** estaria atuando no espaço ocupado pelo cofator, os parâmetros cinéticos também foram obtidos com a variação da concentração do NADPH e do inibidor. Os resultados indicam que o composto **39** não altera a interação do cofator e a enzima, uma vez que os parâmetros se mantiveram inalterados mesmo com o aumento da concentração de inibidor (Tabela 6). Esse dado corrobora a ideia de

que **39** interage com a forma livre da enzima ou com o complexo enzima+substrato de maneira independente do sítio ocupado pelo NADPH.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos no teste de competição entre DHF e o composto **39**.

Concentração de 39 e DHF (μM)	DHF	
	K_m ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)	V_{max} ($\Delta\text{FU}/\text{min} \pm \text{SD}$)
Sem inibidor	$0,22 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,02$
3	$0,22 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,01$
1	$0,22 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,02$
0,3	$0,22 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,02$

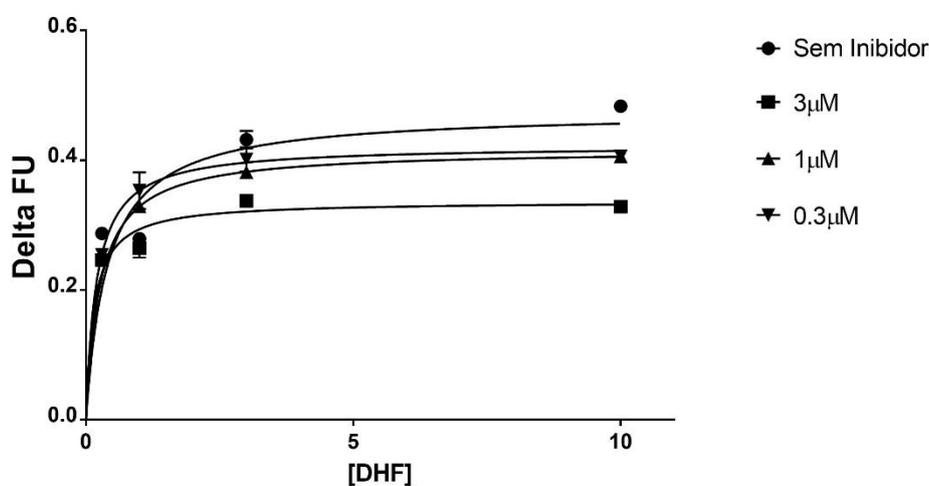


Figura 312: Gráfico velocidade e concentração de substrato (DHF) na presença de diferentes concentrações do composto **39**.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos no teste de competição entre cofator e o composto **39**.

Concentração de 39 e NADPH (μM)	NADPH	
	K_m ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$)	V_{max} ($\Delta\text{FU}/\text{min} \pm \text{SD}$)
Sem inibidor	$1,13 \pm 0,26$	$0,17 \pm 0,01$
10	$1,13 \pm 0,26$	$0,17 \pm 0,01$
0,3	$1,13 \pm 0,26$	$0,17 \pm 0,01$
0,01	$1,13 \pm 0,26$	$0,17 \pm 0,01$

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Utilizando-se estratégias de modificação molecular e análise do cocristal do protótipo **20** e a mtDHFR, foram propostos 22 análogos, dos quais 6 foram elencados como melhores do que o protótipo nos ensaios de *docking*. Ademais, os estudos *in silico* mostraram que a presença do grupo carboxílico é importante para a interação com o bolso da enzima e que essa porção na posição *para* também pode gerar análogos interessantes.

Foram obtidos 22 compostos e o protótipo **20** com pureza acima de 95%. Para tanto, empregou-se método de alquilação com o uso de carbonato de potássio e partindo-se do reagente com a função éster. Esse procedimento mostrou-se eficaz por gerar bons rendimentos (50 – 93%). Para a obtenção do grupo carboxílico desprotegido foi empregada solução de hidróxido de potássio, o qual também gerou bons rendimentos. Além das alquilações e hidrólises, foi empregado métodos de cicloadição para a obtenção dos heterociclos triazol e tetrazol.

O ensaio enzimático corroborou a hipótese levantada com os estudos de *docking* de que a inserção de grupos doadores/aceptores de ligação de hidrogênio resultaria em compostos com melhor atividade. Além disso, o uso da estratégia de bioisosterismo para o planejamento resultou no análogo com melhor atividade (**39**) (7 μ M) dentre os compostos. Por fim, foi possível determinar que a inibição do composto **39** ocorre de maneira não competitiva com o substrato da enzima (DHF).

Os compostos foram enviados para avaliação da atividade *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Esses ensaios estão sendo realizados em parceria com o Prof. Dr. Fernando R. Pavan da UNESP Araraquara. O método aplicado utiliza a redução da resazurina como indicador de sobrevivência celular do *M. tuberculosis* (Palomino *et al.*, 2002).

A partir dos dados obtidos até o momento, o trabalho poderia ter como perspectivas a síntese de novos análogos planejados com base nas novas informações obtidas. Além disso, estudos cristalográficos com os compostos já sintetizados poderiam revelar como e onde os compostos interagem com o bolso da mtDHFR, esclarecendo a inibição não competitiva.

6 PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Materiais, reagentes e solventes

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas vidrarias e equipamentos comumente empregados em laboratório de síntese orgânica. Os solventes empregados foram obtidos comercialmente das empresas Synth[®], Merck[®] e Sigma Aldrich[®]. Reagentes obtidos comercialmente da empresa Sigma Aldrich[®]:

- 4-bromometil benzoato de metila;
- 3-bromometil benzoato de metila;
- 4-nitrofenol;
- Fenol;
- Anilina;
- 4-metoxifenol;

6.2 Métodos

6.2.1 Métodos *in silico*

Os análogos propostos foram desenhados e tiveram suas estruturas minimizadas energeticamente por meio de mecânica molecular, utilizando o campo de força MMFF (*Merck Molecular Force Field*) (Halgren, 1996), no programa Spartan'14. As estruturas foram reotimizadas com minimização de energia e cálculo de cargas utilizando o método semiempírico PM6 (Stewart, 2007), também no programa Spartan'14.

Para determinar o método mais adequado para as simulações de *docking* com os análogos propostos e a *mtDHFR*, foi empregado *redockings*, utilizando o cocristal fornecido em parceria com o Prof. Dr. Márcio V. Bertacine Dias. O cocristal utilizado é da *mtDHFR* complexada ao fragmento MB872.

Nos *redockings* do fragmento MB872, foram testadas todas as funções de escore presentes no programa GOLD, versão 5.4 (ASP, ChemPLP, GoldScore, ChemScore); variou-se o átomo centroide do sítio de interação, o tamanho do raio do sítio de interação (8, 10 e 12) e a presença de moléculas de água. O método escolhido foi aquele que apresentou o menor valor de raiz do desvio quadrático médio, ou RMSD, entre a estrutura do fragmento MB872 desenhada no programa Spartan'14 (teórica) e a cristalografada.

A validação do método ocorreu por meio da obtenção do menor valor de RMSD possível, indicando que os parâmetros estabelecidos geram dados próximos aos obtidos experimentalmente.

Os análogos planejados foram ancorados em sextuplicata na *m*DHFR, extraída do cocristal fornecido em parceria. Utilizou-se o método selecionado pelo *redocking*, sendo este: função de escore ChemScore; o carbono zeta do resíduo Phe31 (CZ-Phe31) como centro do sítio; um raio de 10 Å a partir do centroide; velocidade de busca do algoritmo genético lenta e presença de moléculas de água cocristalizadas.

6.2.2 Métodos analíticos

Para a cromatografia de camada delgada (CCD) se utilizou cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica GF₂₅₄ (Merck), as quais foram reveladas com irradiação de luz UV de λ 254 nm e soluções de ninidrina, cloreto férrico, ácido fosfomolibdico e molibdato. Na cromatografia em coluna, foi empregada colunas de vidro preenchidas com sílica gel poro de 60 Å (Sigma-Aldrich®).

Na determinação da pureza dos compostos sintetizados foi aplicada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual empregou-se o cromatógrafo Shimadzu Proeminence com coluna analítica C-18 da marca Gemini® (5 μ , 150 x 4,6 mm). A detecção foi conduzida por ultravioleta (UV) em 254 nm. Para o sistema eluente empregou-se água deionizada (solvente A) e uma solução de acetonitrila com 0,1 % de ácido trifluoracético (Solvente B). A fase móvel inicia com 100 % do solvente A e em 10 minutos passou a 100 % do solvente B. O tempo total de corrida foi de 20 minutos e o volume de injeção foi 20 μ L.

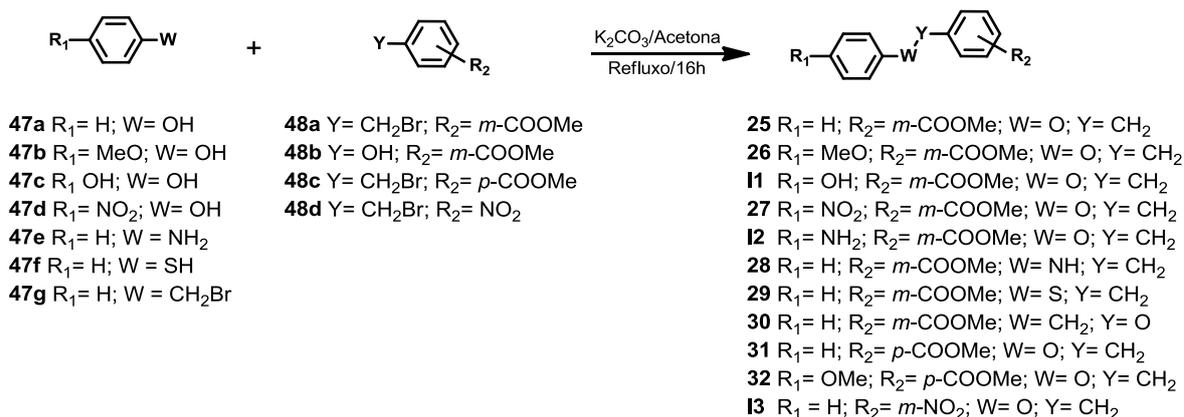
Para a caracterização estrutural, foram utilizadas análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear para os núcleos de ¹³C e ¹H. O equipamento usado é um espectrômetro Brucker®, modelo Advanced DPX-300 (FCF-USP), operando a 300 MHz para os núcleos de hidrogênio e 75 MHz para carbono. Para esse experimento, se dissolveu os compostos em clorofórmio e dimetil-sulfóxido deuterados (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm). As abreviações utilizadas para a multiplicidade são: singlete (s), sl (singlete largo), duplete (d), tripleto (t) e multiplete (m). A constante de acoplamento (*J*) é dada em Hertz (Hz).

6.2.3 Método ensaio enzimático

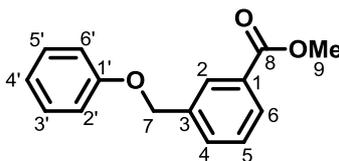
A enzima utilizada no ensaio (*mt*DHFR) foi a cedida em parceria pelo Prof. Dr. Márcio V. B. Dias. O fluorímetro usado é um TECAN Infinite 200 Pro. As concentrações empregadas foram 0,09 μ M para a enzima, 5 μ M de substrato (DHF), 10 μ M de cofator (NADPH) e tampão de fosfato de sódio a 50 mM. Para determinar o IC₅₀ foram testadas 6 concentrações (em DMSO) dos compostos (30 mM, 10 mM, 3 mM, 1 mM, 0,3 mM e 0,01mM). Para a determinação dos parâmetros cinéticos foram usadas concentração de 3 μ M, 1 μ M e 0,3 μ M de DHF e inibidor e 10 μ M, 0,3 μ M e 0,01 μ M de NADPH e inibidor. Os IC₅₀ e os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando regressão não-linear no software Graphpad prims versão 7.

6.2.4 Métodos sintéticos

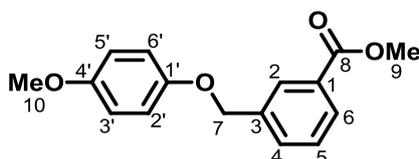
6.2.4.1 Alquilação com carbonato de potássio



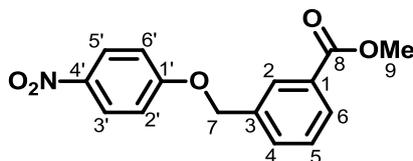
O 4-bromometil benzoato de metila ou 3-bromometil benzoato de metila (1 mmol, 229 mg) foi dissolvido em acetona (5 mL/ mmol) e depois adicionou-se o K₂CO₃ (3 eq, 3 mmol, 414,6 mg). O composto a ser alquilado (**47a-g**) (1,2 eq.) foi adicionado na mistura em agitação magnética e a reação mantida em refluxo por 16 horas. Ao final da reação (confirmado por CCD), o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura foi solubilizada em AcOEt e posteriormente lavada com água deionizada (3 x 10 ml). A fase orgânica foi seca com MgSO₄, filtrada e, por conseguinte, o solvente foi retirado sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por meio de coluna cromatográfica flash, utilizando sistema eluente hexano/AcOEt com proporção de 7:3 (Manos-Turvey *et al*, 2015).



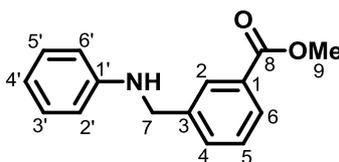
3-Fenoximetil-benzoato de metila (25). Produto obtido como um líquido amarelado em 74 % (538 mg). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,11 (s, 1H, H2), 8,00 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,64 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H4), 7,45 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5), 7,29 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,98 (m, 3H, H2'-H4'-H6') 5,10 (s, 2H, H7), 3,92 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,9 (C8), 158,6 (C1'), 137,6 (C3), 131,8 (C4), 130,5 (C6), 129,5 (C5'-C3'), 129,1 (C1), 128,7 (C2), 128,5 (C5), 121,2 (C4'), 114,9 (C6'-C2'), 69,4 (C7), 52,1 (C9).



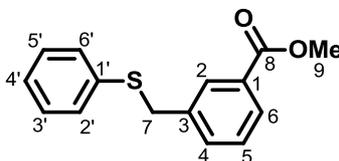
3-((4-metoxifenoxi)metil) benzoato de metila (26). Produto obtido como um sólido branco em 70 % (571,2 mg). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,09 (s, 1H, H2), 7,99 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H6), 7,62 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4), 7,44 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H5), 6,90 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, H5'-H3') 6,83 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H6'-H2'), 5,04 (s, 2H, H7), 3,92 (s, 3H, H9), 3,76 (s, 3H, H10). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,9 (C8), 154,2 (C4'), 152,7 (C1'), 137,8 (C3), 131,8 (C4), 130,5 (C6), 129,1 (C1), 128,6 (C2), 128,5 (C5), 115,9 (C6'-C2'), 114,7 (C5'-C3'), 70,2 (C7), 55,7 (C10), 52,1 (C9).



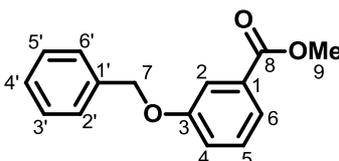
3-((4-nitrofenoxi)metil) benzoato de metila (27). Produto obtido como um sólido amarelado em 74 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,21 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, H5'-H3'), 8,11 (s, 1H, H2), 8,04 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,63 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4), 7,49 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5) 7,04 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, H6'-H2'), 5,20 (s, 2H, H7), 3,94 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,6 (C8), 163,4 (C1'), 141,9 (C4'), 136,0 (C3), 131,8 (C1), 130,8 (C4), 129,6 (C6), 128,9 (C2), 128,3 (C5), 128,6 (C5') 126,0 (C3'), 114,9 (C6'-C2'), 70,1 (C7) 52,2 (C9).



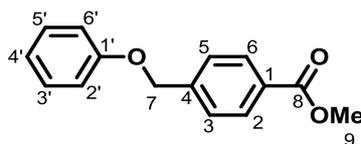
3-((fenilamino)metil) benzoato de metila (28). Produto obtido como líquido amarelado em 60 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,04 (s, 1H, H2) 7,93 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H6), 7,55 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4), 7,38 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5), 7,15 (t, $J = 7,9$ Hz 2H, H5'-H3'), 6,71 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4'), 6,60 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, H6'-H2') 4,66 (s, 1H, NH), 4,35 (s, 2H, H7), 3,89 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167,0 (C8), 147,9 (C1'), 140,1 (C3), 131,9 (C4), 130,6 (C6), 129,3 (C3'-C5'), 128,8 (C1), 128,7 (C2), 128,5 (C5), 117,8 (C4'), 113,0 (C6'-C2'), 48,0 (C7), 52,1 (C9).



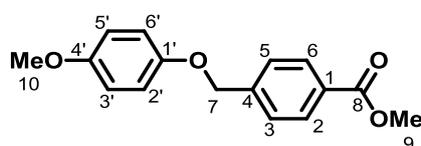
3-((feniltio)metil) benzoato de metila (29). Produto obtido como líquido amarelado em 77 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 7,96$ (s, 1H, H2), 7,90 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,45 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H4), 7,38 – 7,14 (m, 5H), 4,13 (s, 2H, H7) 3,89 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,8 (C8), 138,1 (C1'), 135,7 (C3), 133,3 (C4), 130,4 (C6), 130,3 (C3'-C5'), 130,0 (C1), 128,9 (C2), 128,5 (C5), 128,8 (C4'), 126,7 (C6'-C2'), 52,1 (C9), 38,9 (C7),



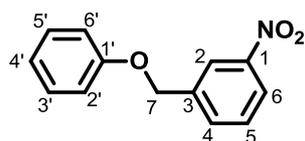
3-benziloxi-benzoato de metila (30). Produto obtido como um sólido branco em 73 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,66 (s, 1H, H2), 7,64 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H, H6), 7,47 – 7,29 (m, 6H) 7,19 – 7,14 (m, 2H) 5,10 (s, 2H, H7), 3,91 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,9 (C8), 158,8 (C3), 136,6 (C1'), 131,5 (C1), 129,4 (C5), 128,6 (C5'-C3'), 128,1 (C1), 127,5 (C6'-C2'), 122,3 (C4), 120,3 (C6), 115,2 (C2), 70,2 (C7), 52,1 (C9).



4-benziloxi-benzoato de metila (31). Produto obtido como um sólido marrom em 92 % (222,9 mg). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,05 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H6-H2), 7,50 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H5-H3), 7,29 (t, $J = 6,0$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,95-6,99 (m, 3H, H6'-H2'-H4'), 5,13 (s, 2H, H7), 3,92 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,9 (C8), 158,5 (C1'), 142,4 (C4), 129,9 (C6-C2), 129,6 (C5-C3), 127,0 (C5'-C3'), 121,3 (C4'), 114,9 (C6'-C2'), 69,3 (C7), 52,1 (C9).

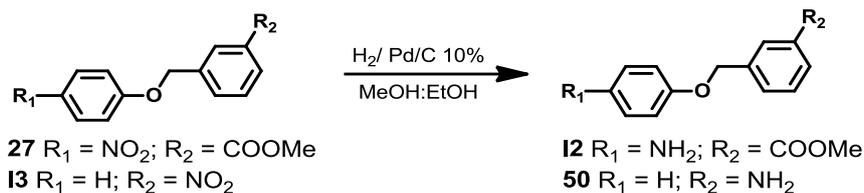


4-((4-metoxifenoxi)metil) benzoato de metila (32). Produto obtido como um sólido marrom em 84 % (250,5 mg). RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,04 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H6-H2), 7,49 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, H5-H3), 6,90 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,83 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, H6'-H2'), 5,08 (s, 2H, H7), 3,92 (s, 3H, H9), 3,76 (s, 3H, H10). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 166,9 (C8), 154,2 (C4'), 152,7 (C1'), 142,6 (C4), 129,8 (C5-C3), 127,0 (C6-C2), 115,9 (C6'-C2'), 114,7 (C5'-C3'), 70,1 (C7), 55,7 (C10), 52,1 (C9). Faixa de fusão: 116,3° - 118,0° C

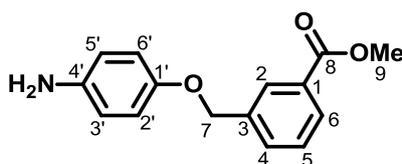


1-nitro-3-(Fenoximetil) benzeno (I3). Produto obtido como um líquido amarelo em 73 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,32 (s, 1H, H2), 8,17 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H6), 7,77 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4), 7,56 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H5), 7,31 (t, $J = 8,0$ Hz, 2H, H5'-H3'), 7,02 - 6,97 (m, 3H, H2'-H4'-H6') 5,15 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 158,2 (C1'), 148,5 (C1), 139,7 (C3), 133,10 (C4), 129,7 (C5'-C3'), 129,6 (C5), 122,8 (C6), 122,1 (C2), 121,6 (C4'), 114,9 (C6'-C2'), 68,2 (C7).

6.2.4.2 Redução do grupo nitro



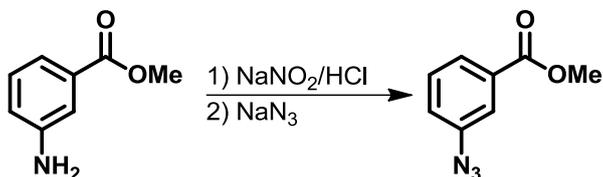
Os compostos **27** e **13** (2,9 mmol) foram dissolvidos em uma solução EtOH/MeOH (1:1) e em seguida adicionou-se Pd/C (10 mol%). A reação foi mantida sob agitação, temperatura ambiente e à atmosfera de H₂ até o consumo do reagente (constatado por CCD). Ao final, o meio reacional foi filtrado em Celite® 545, solvente evaporado à pressão reduzida, seguida de extração com AcOEt, com posterior lavagem com água (3X 50 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio e evaporada sob pressão reduzida. O produto foi purificado com coluna cromatográfica *flash*, utilizando sistema eluente hexano:AcOEt:Et₃N (46:50:4) (Adaptado de Zhou *et al.*, 2016)



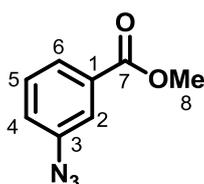
3-((4-aminofenoxi)metil) benzoato de metila (50). Produto obtido como um líquido vermelho em 70 % (571,2 mg). RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,09 (s, 1H, H₂), 7,98 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H, H₆), 7,61 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H₄), 7,43 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H, H₅), 6,80 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, H_{5'}-H_{3'}) 6,65 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, H_{6'}-H_{2'}), 5,01 (s, 2H, H₇), 3,91 (s, 3H, H₉). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166,9 (C₈), 151,7 (C_{4'}), 140,5 (C_{1'}), 138,1 (C₃), 131,9 (C₄), 130,4 (C₆), 129,0 (C₁), 128,6 (C₂), 128,5 (C₅), 116,4 (C_{6'}-C_{2'}), 116,2 (C_{5'}-C_{3'}), 70,3 (C₇), 52,1 (C₉).

6.2.4.3 Síntese dos triazóis

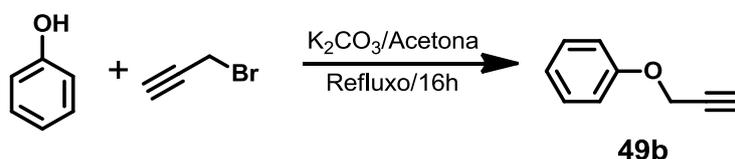
6.2.4.3.1 Síntese dos reagentes



O 3-amino-benzoato de metila foi dissolvido em água, com posterior acidificação (a 0° C) utilizando solução aquosa de HCl 5% (v/v). Em seguida, foi adicionado uma solução de NaNO₂ (2,5 eq) gota a gota e a mistura foi mantida sob agitação. Após 30 minutos de reação, a NaN₃ (1,6 eq.) foi adicionada lentamente. Ao final da reação (cessa a formação de bolhas), o produto foi extraído com AcOEt. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida (Kutonova, K. V. *et al.*, 2013).

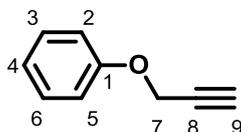


3-azida-benzoato de metila. Produto obtido como líquido incolor 95 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,85 – 7,76 (m, 1H, H6) 7,74 – 7,61 (m, 1H, H2), 7,42 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H, H5), 7,21 – 7,18 (m, 1H, H4), 3,93 (s, 3H, H8). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 166,2 (C7), 140,6 (C3), 131,9 (C5), 129,8 (C1), 126,0 (C4), 123,4 (C6), 120,0 (C2), 52,3 (C8).



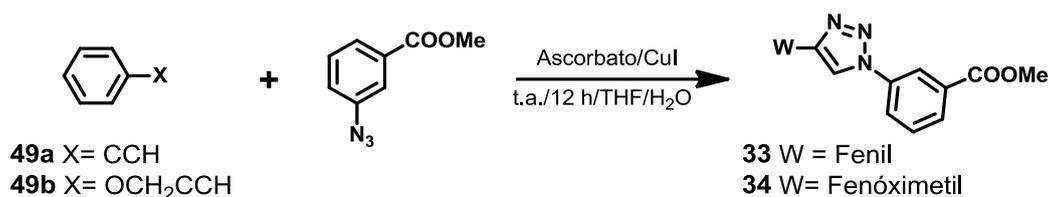
O brometo de propargila (80% em tolueno) (1mmol, 229 mg) foi dissolvido em acetona (5 mL/ mmol) e depois adicionou-se o K₂CO₃ (3 eq, 3 mmol, 414,6 mg). O fenol (1,2 eq.) foi adicionado na mistura em agitação magnética e a reação mantida em refluxo por 16 horas. Ao final da reação (confirmado por CCD), o solvente foi removido sob pressão reduzida e a mistura foi solubilizada em AcOEt e posteriormente lavada com água deionizada (3 x 10 ml). A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄, filtrada e, por

consequente, o solvente foi retirado sob pressão reduzida. O produto foi purificado por meio de coluna cromatográfica flash (Manos-Turvey *et al*, 2015).

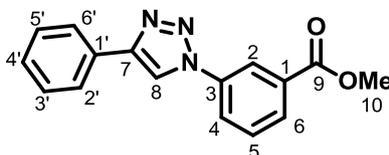


(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (49b). Produto obtido como líquido amarelado 91 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,33 – 7,27 (m, 2H, H3-H6) 7,01 – 7.61 (m, 3H, H2-H5-H4), 4,68 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H, H7), 2,50 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H, H9) . RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157,6 (C1), 129,5 (C3-C6), 121,6 (C4), 114,9 (C2-C5), 78,7 (C8), 75,4 (C9), 55,8 (C7).

6.2.4.3.2 Cicloadição

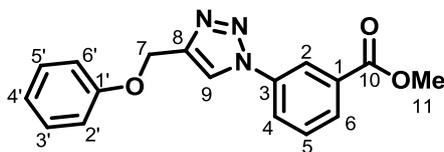


Suspendeu-se os reagentes em uma mistura de THF/ H_2O ou *terc*-ButOH/ H_2O e em seguida adicionou-se o CuI (1,1 eq.) e o ascorbato de sódio (0,5 eq.). A reação foi mantida sob agitação rigorosa e sob proteção da luz por 12 horas. Ao final, o meio reacional foi filtrado em Celite[®] 545, evaporou-se o solvente à pressão reduzida e a mistura foi extraída com AcOEt e água (1:1). Os produtos foram purificados usando coluna cromatográfica *flash* com fases móveis constituídas de hexano e AcOEt (adaptado de Wang, X. *et al.*, 2012).



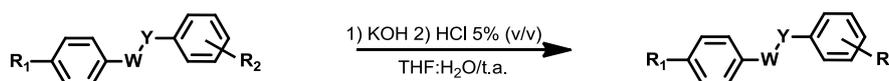
3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzoato de metila (33). Produto obtido como um sólido amarelo em 30 %. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,40 (s, 1H, H8), 8,27 (s, 1H, H2) 8,12 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, H6), 8,09 (d, $J = 7,0$ Hz, 1H, H4), 7,91 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, H6'-H3'), 7,63 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H5) 7,46 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, H5'-H3') 7,37 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4') 3,98 (s, 3H, H9). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165,8 (C9), 148,7 (C7), 137,2

(C3), 131,9 (C1), 130,1 (C1'), 129,6 (C5), 128,9 (C3'-C5'), 128,6 (C4'), 125,9 (C2'-C6'), 124,7 (C4), 121,0 (C8), 117,5 (C2), 52,6 (C10).



3-(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) benzoato de metila (34). Produto obtido como um sólido amarelado em 80 %. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,35 (s, 1H, H9), 8,13 – 8,10 (m, 2H, H2-H6) 8,02 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, H4), 8,09 (d, *J* = 7,0 Hz, 1H, H4), 7,61 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H5), 7,31 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H, H5'-H3') 7,04 – 6,96 (m, 3H, H6'-H2'-H4') 5,31 (s, 2H, H7) 3,96 (s, 3H, H11). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165,7 (C10), 158,2 (C1), 145,4 (C8), 137,2 (C3), 132,0 (C1), 130,0 (C5), 129,6 (C3'-C5'), 129,7 (C6) 124,8 (C4), 121,4 (C2), 121,2 (C4'), 120,8 (C9), 114,8 (C2'-C6'), 62,0 (C7), 52,5 (C11).

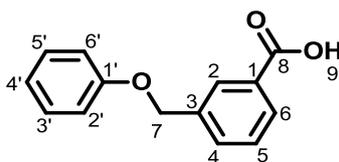
6.2.4.4 Hidrólise dos ésteres



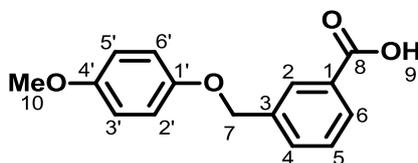
25 R₁ = H; R₂ = *m*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 26 R₁ = MeO; R₂ = *m*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 11 R₁ = OH; R₂ = *m*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 27 R₁ = NO₂; R₂ = *m*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 12 R₁ = NH₂; R₂ = *m*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 28 R₁ = H; R₂ = *m*-COOMe; W = NH; Y = CH₂
 29 R₁ = H; R₂ = *m*-COOMe; W = S; Y = CH₂
 30 R₁ = H; R₂ = *m*-COOMe; W = CH₂; Y = O
 31 R₁ = H; R₂ = *p*-COOMe; W = O; Y = CH₂
 32 R₁ = OMe; R₂ = *p*-COOMe; W = O; Y = CH₂

20 R₁ = H; R₂ = *m*-COOH; W = O; Y = CH₂
 35 R₁ = MeO; R₂ = *m*-COOH; W = O; Y = CH₂
 36 R₁ = OH; R₂ = *m*-COOH; W = O; Y = CH₂
 37 R₁ = NO₂; R₂ = *m*-COOH; W = O; Y = CH₂
 38 R₁ = NH₂; R₂ = *m*-COOH; W = O; Y = CH₂
 39 R₁ = H; R₂ = *m*-COOH; W = NH; Y = CH₂
 40 R₁ = H; R₂ = *m*-COOH; W = S; Y = CH₂
 41 R₁ = H; R₂ = *m*-COOH; W = CH₂; Y = O
 42 R₁ = H; R₂ = *p*-COOH; W = O; Y = CH₂
 43 R₁ = OMe; R₂ = *p*-COOH; W = O; Y = CH₂

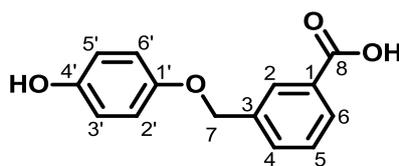
Os ésteres metílicos (1 eq, 1 mmol) foram dissolvidos em THF e água (2 mL/mmol) com posterior adição de uma solução 2 mol/L de KOH (3 eq, 3 mmol, 1,5 ml de solução). A mistura foi mantida sob agitação magnética e à temperatura ambiente. Após o consumo do reagente (confirmado por CCD), o THF foi removido sob pressão reduzida e a mistura foi acidificada com uma solução de HCl (5% v/v), até alcançar pH 2,0. O precipitado foi filtrado e recolhido. Os produtos foram purificados por meio de coluna cromatográfica *flash*, utilizando sistema eluente DCM/MeOH com proporção de 9:1 (Manos-Turvey *et al*, 2015).



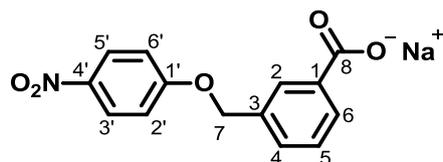
Ácido 3-fenoximetil benzóico (20). Produto obtido como sólido branco em 84 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8,04 (s, 1H, H2), 7,92 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,70 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H4), 7,53 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5), 7,31 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H, H5'-H3'), 7,03 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H2'-H6') 6,95 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4'), 5,18 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167,1 (C8), 158,2 (C1'), 137,7 (C3), 131,8 (C1), 131,0 (C4), 129,4 (C5'-C3'), 128,7 (C6), 128,6 (C2), 128,2 (C5), 120,8 (C4'), 114,8 (C6'-C2'), 68,5 (C7).



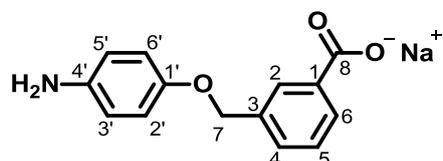
Ácido 3-((4-metoxifenoxi)metil) benzóico (35). Produto obtido como sólido branco em 77 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 8,02 (s, 1H, H2), 7,90 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,67 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H4), 7,51 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H5) 6,96 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,86 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, H6'-H2'), 5,12 (s, 2H, H7), 3,69 (s, 3H, H10). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167,2 (C8), 153,6 (C4'), 152,1 (C1'), 137,9 (C3), 131,7 (C1), 131,0 (C4), 128,6 (C6), 128,5 (C2), 128,1 (C5), 115,8 (C6'-C2'), 114,6 (C5'-C3'), 69,1 (C7), 55,3 (C10).



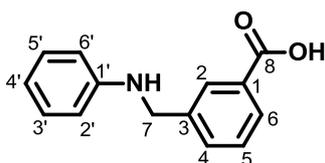
Ácido 3-((4-hidroxifenoxi)metil) benzóico (36). Produto obtido como sólido amarelado em 30 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{Metanol-}d_4$) δ (ppm): 8,10 (s, 1H, H2), 7,98 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H6), 7,67 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4), 7,49 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, H5) 6,86 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H6'-H2'), 6,73 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, H5'-H3'), 5,06 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{Metanol-}d_4$) δ (ppm): 169,9 (C8), 153,4 (C4'), 152,7 (C1'), 139,7 (C3), 132,42 (C1), 132,9 (C4), 130,0 (C6), 129,7 (C2), 129,6 (C5), 117,2 (C6'-C2'), 116,9 (C5'-C3'), 71,4 (C7)



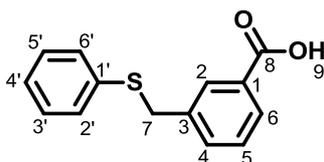
Ácido 3-((4-nitrofenoxi)metil) benzóico (37). Produto obtido como sólido amarelado em 70%. RMN ^1H (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 7,99 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, $\text{H}5'-\text{H}3'$), 7,89 (s, 1H, H2), 7,81 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H6), 7,45 (t, $J = 6,5$ Hz, 1H, H5), 7,39 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H4), 6,94 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H, $\text{H}6'-\text{H}2'$), 5,10 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, D_2O) δ (ppm): 174,9 (C8), 163,3 (C1'), 141,1 (C4'), 136,9 (C3), 135,7 (C1), 130,3 (C4), 128,9 (C6), 128,7 (C2), 128,3 (C5), 126,7 (C5'-C3'), 115,1 (C6'-C2'), 70,4 (C7).



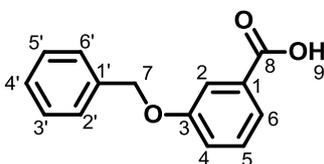
Ácido 3-((4-aminofenoxi)metil) benzóico (38). Produto obtido como sólido preto em 30%. RMN ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 8,06 (s, 1H, H2), 7,94 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H6), 7,55 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, H4), 7,41 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, H5), 6,93 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, $\text{H}6'-\text{H}2'$), 6,73 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, $\text{H}5'-\text{H}3'$), 5,04 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 173,1 (C8), 153,7 (C1'), 141,8 (C4'), 139,2 (C3), 136,6 (C1), 129,8 (C4), 129,6 (C6), 129,1 (C2), 118,3 (C6'-C2'), 117,2 (C5'-C3'), 71,7 (C7).



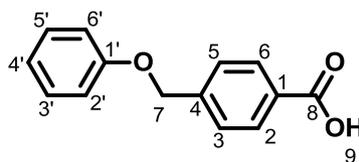
Ácido 3-((fenilamino)metil) benzóico (39). Produto obtido como sólido amarelado em 64 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7,93 (s, 1H, H2) 7,83 (d, $J = 6,2$ Hz, 1H, H6), 7,41 – 7,38 (m, 2H, H4-H5), 7,06 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, $\text{H}5'-\text{H}3'$), 6,65 (d, $J = 7,9$ Hz 2H, $\text{H}6'-\text{H}2'$), 6,58 (t, $J = 7,1$ Hz, 1H, H4'), 6,60 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, $\text{H}6'-\text{H}2'$) 4,72 (s, 2H, H7) 4,54 (s, 1H, NH). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 166,5 (C8), 148,1 (C1'), 139,1 (C3), 130,2 (C4), 128,9 (C3'-C5'), 128,3 (C6), 127,8 (C1), 127,5 (C2), 128,5 (C5), 116,3 (C4'), 112,5 (C6'-C2'), 48,6 (C7).



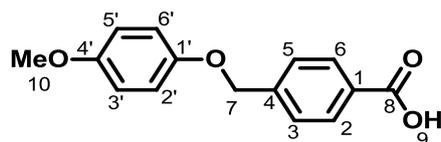
Ácido 3-((feniltio)metil) benzóico (40). Produto obtido como sólido branco em 70 %. NMR ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7,95 (s, 1H, H2), 7,81 (d, J = 7,7 Hz, 1H, H6), 7,58 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H4), 7,41 (t, J = 7,7 Hz, 1H, H5), 7,34 (d, J = 7,1 Hz, 2H, H6'-H2'), 7,29 (t, J = 7,5 Hz, 2H, H5'-H3'), 7,18 (t, J = 7,0 Hz, 1H, H4'), 4,32 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167,0 (C8), 147,9 (C1'), 140,1 (C3), 131,9 (C4), 130,6 (C6), 129,3 (C3'-C5'), 128,8 (C1), 128,7 (C2), 128,5 (C5), 117,8 (C4'), 113,0 (C6'-C2'), 48,0 (C7), 52,1 (C9).



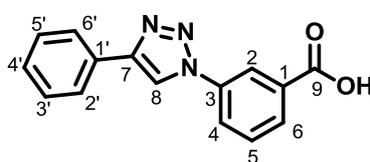
3-benziloxi-benzoato de metila (41). Produto obtido como um sólido amarelado em 80 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 13,0 (s, 1H, H9), 7,60 – 7,29 (m, 9H), 5,21 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 167,0 (C8), 158,3 (C3), 136,8 (C1'), 132,2 (C1), 129,7 (C5), 128,4 (C5'-C3'), 127,8 (C1), 127,6 (C6'-C2'), 121,8 (C4), 119,7 (C6), 114,9 (C2), 69,3 (C7)



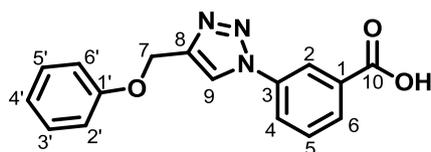
Ácido 4-fenoximetil benzóico (42). Produto obtido como sólido branco em 68 %. RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 12,93 (s, 1H, H9), 7,97 (d, J = 7,7 Hz, 2H, H6-H2), 7,57 (d, J = 7,7 Hz, 2H, H5-H3), 7,30 (t, J = 7,9 Hz, 1H, H5'-H3'), 7,02 (d, J = 7,9 Hz, 2H, H6'-H2'), 6,95 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H4'), 5,19 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm): 167,1 (C8), 158,1 (C1'), 142,2 (C4), 130,1 (C6-C2), 129,5 (C5-C3), 127,3 (C5'-C3'), 120,9 (C4'), 114,8 (C6'-C2'), 68,5 (C7).



Ácido 4-((4-metoxifenoxi)metil) benzóico (43). Produto obtido como sólido branco em 83 %. RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7,96 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H6-H2), 7,54 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H5-H3), 6,95 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,86 (d, $J = 9,0$ Hz, 2H, H6'-H2'), 5,13 (s, 2H, H7), 3,69 (s, 3H, H10). RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 167,1 (C8), 153,6 (C4'), 152,1 (C1'), 142,4 (C4), 130,2 (C5-C3), 127,2 (C6-C2), 115,8 (C6'-C2'), 114,6 (C5'-C3'), 69,1 (C7), 55,3 (C10).

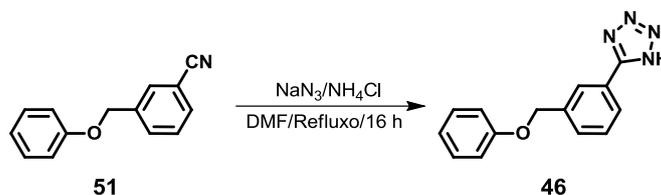


Ácido 3-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzóico (44). Produto obtido como um sólido amarelo em 90 %. RMN ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 8,80 (s, 1H, H8), 8,35 (s, 1H, H2) 7,99 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H6), 7,91 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, H4), 7,83 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H, H6'-H3'), 7,52 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H5) 7,36 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, H5'-H3') 7,27 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4'). RMN ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 172,3 (C9), 149,7 (C7), 140,0 (C3), 138,2 (C1), 131,5 (C1'), 130,8 (C5), 130,6 (C4'), 130,0 (C3'-C5'), 129,6 (C4), 126,8 (C2'-C6'), 123,6 (C8), 122,2 (C2)

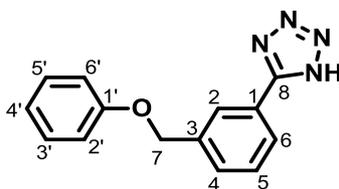


Ácido 3-(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzóico (45). Produto obtido como um sólido amarelado em 98 %. RMN ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 8,63 (s, 1H, H9), 8,40 (s, 1H, H2) 8,10 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, H6), 7,95 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H4), 7,61 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, H5), 7,31 (t, $J = 7,4$ Hz, 2H, H5'-H3') 7,06 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H6'-H2'), 6,97 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4'), 5,27 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 172,5 (C10), 159,8 (C1), 146,1 (C8), 140,1 (C3), 138,1 (C1), 130,8 (C5), 130,6 (C3'-C5'), 123,7 (C2), 123,6 (C4'), 122,8 (C9), 116,0 (C2'-C6'), 62,4 (C7).

6.2.4.5 Síntese do tetrazol



O intermediário **51** foi dissolvido em DMF (4 ml/mmol) com posterior adição de NaN_3 (1,2 eq.) e NH_4Cl (1,2 eq.). A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 16 horas. Depois de resfriar, água foi adicionada para que em seguida fosse feita a lavagem com AcOEt. Ao final, o pH da fase aquosa foi ajustado para 1 com adição de solução aquosa de HCl 5% (v/v) e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água (Vorona *et al.*, 2014).



5-(3-(fenoximetil)fenil)-1H-tetrazol (46). Produto obtido como sólido amarelado em 5 %. RMN ^1H (300 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 8,03 (s, 1H, H2), 7,87 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, H6), 7,56 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, H4), 7,49 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, H5), 7,18 (t, $J = 7,9$ Hz, 2H, H5'-H3'), 6,62 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H, H2'-H6') 6,84 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, H4'), 5,07 (s, 2H, H7). RMN ^{13}C (75 MHz, Metanol- d_4) δ (ppm): 160,1 (C1'), 157,5 (C8), 140,6 (C3), 131,0 (C4), 130,7 (C6), 130,6 (C5'-C3'), 127,6 (C5), 127,1 (C4), 125,7 (C1), 122,2 (C4'), 116,0 (C6'-C2') 70,2 (C7). ESI HRMS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}$: $[\text{M} + \text{H}]^+$, m/z 253,1084. Encontrado 253,1094.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, C.; COOP, A.; MACKEERELL, A. D. Jr. Recent advances in ligand-based drug design: relevance and utility of the conformationally sampled pharmacophore approach. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n. 1, p. 10, 2011.

AISO, K., NOZAKI, T., SHIMODA, M., KOKUE, E. Assay of dihydrofolate reductase activity by monitoring tetrahydrofolate using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Biochemistry**, v. 272, n. 2, p. 143-148, 1999.

BALBAA, M.; EL ASHRY, E. S. H. Enzyme inhibitors as therapeutic tools. **Biochemistry and Physiology**, v. 1, p. 1-8, 2012.

BAXTER, C. A.; MURRAY, C. W.; CLARK, D. E.; WESTHEAD, D. R.; ELDRIDGE, M. D. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 33, n. 3, p. 367-382, 1998.

BISSANTZ, C.; KUHN, B.; STAHL, M. A medicinal chemist's guide to molecular interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5061-5084, 2010.

CAMBIER, C.; FALKOW, S.; RAMAKRISHNAN, L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 159, n. 7, p. 1497-1509, 2014.

CANUTO, G. A.; DA CRUZ, P. L.; FACCIO A. T.; KLASSEN, A.; TAVARES, M. F. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**, v. 36, n. 18, p. 2336-2347, 2015.

CLAYDEN, G.; WARREN, W., GREEVES, N.; WOTHERS, P. **Organic Chemistry**, 2012: Oxford University Press 2 ed. p. 340

COPELAND, R. A. **Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists**, 2013. John Wiley & Sons. p 49.

CZEKSTER, C. M.; VANDEMEULEBROUCKE, A.; BLANCHARD, J. S. Two parallel pathways in the kinetic sequence of the dihydrofolate reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 50, n. 32, p. 7045-7056, 2011.

DARTOIS, V. The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 159-167, 2014.

DIAS, M. V. B.; TYRAKIS, P.; DOMINGUES, R. R.; PAES LEME, A. F.; BLUNDELL, T. L. *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals two conformational states and a possible low affinity mechanism to antifolate drugs. **Structure**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 2014.

DE RUYCK, J.; BRYLSBAERT, G.; BLOSSEY, R.; LENSINK, M. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 9, p. 1, 2016.

DORHOI, A.; KAUFMANN, S. H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. **Seminars in Immunopathology**, Springer. p.1-14, 2015.

DUNN, R. N.; BEN HUSIEN, M. Spinal tuberculosis: review of current management. **Bone Joint Journal**, v. 100, n. 4, p. 425-431, 2018.

DUTTA, N. K.; KARAKOUSIS, P. C. Latent tuberculosis infection: myths, models, and molecular mechanisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 343-371, 2014.

EHEBAUER, M. T.; WILMANN, M. The progress made in determining the *Mycobacterium tuberculosis* structural proteome. **Proteomics**, v. 11, n. 15, p. 3128-3133, 2011.

EL-HAMAMSY, M. H.; SMITH, A. W.; THOMPSON, A. S.; THREADGILL, M. D. Structure-based design, synthesis and preliminary evaluation of selective inhibitors of dihydrofolate reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 13, p. 4552-4576, 2007.

ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 11, n. 5, p. 425-445, 1997.

EXNER, O.; BUDĚŠÍNSKÝ, M. Correlation of carbon-13 substituent-induced chemical shifts revisited: Meta-and para-substituted benzonitriles. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 27-36, 1989.

FERGUSSON, K. M.; HIRD, M. The dramatic influence of the location of bend and of lateral fluoro substitution on the mesomorphic properties of angular chiral esters based on a 1,3-disubstituted benzene ring. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 15, p. 3069-3078, 2010.

FERREIRA, L. G.; DOS SANTOS, R. N.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 527-531, 2015.

FONSECA, J.; KNIGHT, G.; MCHUGH, T. The complex evolution of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 32, p. 94-100, 2015.

GARG, R. K.; SOMVANSHI, D. S. Spinal tuberculosis: A review. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 34, n. 5, p. 440-454, 2011.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HANSCH, C.; HATHAWAY, B. A.; GUO, Z.; SELASSIE, C. D.; DIETRICH, S. W.; BLANEY, J. M.; LANGRIDGE, R.; VOLZ, K. W.; KAUFMAN, B. T. Crystallography, quantitative structure-activity relationships, (QSAR) and molecular graphics in a comparative analysis of the inhibition of dihydrofolate reductase from chicken liver and *Lactobacillus casei* by 4,6-diamino-1,2-dihydro-2,2-dimethyl-1-(substituted-phenyl)-s-triazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 129-143, 1984.

HAWN, T. R.; DAY, T. A.; SCRIBA, T. J.; HATHERILL, M.; HANEKOM, W. A.; EVANS, T. G.; CHURCHYARD, G. J.; KUBLIN, J. G.; BEKKER, L. G.; SELF, S. G. Tuberculosis

vaccines and prevention of infection. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 650-671, 2014.

JOSEPH-MCCARTHY, D.; CAMPBELL, A. J.; KERN, G.; MOUSTAKAS, D. Fragment-based lead discovery and design. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 3, p. 693-704, 2014.

KARABANOVICH, G.; ZEMANOVÁ, J.; SMUTNÝ, T.; SZÉKELY, R.; ŠARKAN, M.; CENTÁROVÁ, I.; VOCAT, A.; PÁVKOVÁ, I.; ČONKA, P.; NĚMEČEK, J.; STOLARÍKOVÁ, J.; VEJSOVÁ, M.; VÁVROVÁ, K.; KLIMEŠOVÁ, V.; HRABÁLEK, A.; PÁVEK, P.; COLE, S. T.; MIKUŠOVÁ, K.; ROH, J. Development of 3,5-dinitrobenzylsulfanyl-1,3,4-oxadiazoles and thiadiazoles as selective antitubercular agents active against replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2362-2380, 2016.

KESERŮ, G. M.; MAKARA, G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15, p. 741-748, 2006.

KOMPIS, I. M.; ISLAM, K.; THEN, R. L. DNA and RNA synthesis: antifolates. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 593-620, 2005.

KOSHLAND, D. E. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98-104, 1958.

KUMAR, M.; VIJAYAKRISHNAN, R.; RAO, G. S. In silico structure-based design of a novel class of potent and selective small peptide inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* Dihydrofolate reductase, a potential target for anti-TB drug discovery. **Molecular Diversity**, v. 14, n. 3, p. 595-604, 2010.

KUTONOVA, K. V., TRUSOVA, M. E., POSTNIKOV, P. S., FILIMONOV, V. D., PARELLO, J. A simple and effective synthesis of aryl azides via arenediazonium tosylates. **Synthesis**, v. 45, n. 19, p. 2706-2710, 2013.

LI, R.; SIRAWARAPORN, R.; CHITNUMSUB, P.; SIRAWARAPORN, W.; WOODEN, J.; ATHAPPILLY, F.; TURLEY, S.; HOL W. G. Three-dimensional structure of *M.*

tuberculosis dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 2, p. 307-323, 2000.

LI, Y.; LI, H.; LIU, Z.; WANG, R. Comparative assessment of scoring functions on an updated benchmark: 2. Evaluation methods and general results. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 6, p. 1717-1736, 2014.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

LIONTA, E.; SPYROU, G.; VASSILATI, D. K.; CURNIA, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery: Principles, applications and recent advances. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1923, 2014.

MAJEED, S.; AHMAD, M.; SHARMA, S. Dual Role of Inflammation in Prognosis and Prevention of Tuberculosis. **J Clin Cell Immunol**, v. 5, n. 298, p. 2, 2015.

MATULIS, D.; KRANZ, J. K.; SALEMME, R.; TODD, M. J. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. **Biochemistry**, v. 44, n. 13, p. 5258-5266, 2005.

OU-YANG, S. S.; LU, J. Y.; KONG, X. Q.; LIANG, Z. J.; LUO, C.; JIANG, H. Computational drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 9, p. 1131-1140, 2012.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PINTO, C. M.; CARVALHO, A. R. New findings on the dynamics of HIV and TB coinfection models. **Applied Mathematics and Computation**, v. 242, p. 36-46, 2014.

PRICE, A. J.; HOWARD, S.; CONS, B. D. Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets. **Essays in biochemistry**, v. 61, n. 5, p. 475-484, 2017.

RIMET, O., CHAUVET, M., BRIAND, B., BRIAND, B. A novel fluorometric assay for quantitative analysis of dihydrofolate reductase activity in biological samples. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 14, n. 6, p. 335-342, 1987.

ROBERTS, B. C.; MANCERA, R. L. Ligand-protein *docking* with water molecules. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 2, p. 397-408, 2008.

SARATHY, J. P.; DARTOIS, V.; LEE, E. J. D. The role of transport mechanisms in Mycobacterium tuberculosis drug resistance and tolerance. **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 11, p. 1210-1235, 2012.

SCOTT, D. E.; COYNE, A. G.; HUDSON, S. A.; ABELL, C. Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. **Biochemistry**, v. 51, n. 25, p. 4990-5003, 2012.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**, v. 13, n. 12, p. 1173-1213, 2007.

SRAVANTHI, K.; SNEHALATHA, P.; SUBHASHINI, N. J. P. Microwave Assisted Green Synthesis of Pyrazole, 1, 2, 3-Triazole Based Novel Benzohydrazones and Their Antibacterial Activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 55, n. 2, p. 508-516, 2018.

TAWARI, N. R.; BAG, S.; RAJU, A.; LELE, A. C.; BAIRWA, R.; RAY, M. K.; RAJAN, M. G.; NAWALE, L. U.; SARKAR, D.; DEGANI, M. S. Rational drug design, synthesis and biological evaluation of dihydrofolate reductase inhibitors as antituberculosis agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 979-988, 2015.

THEN, R. Antimicrobial dihydrofolate reductase inhibitors-achievements and future options: review. **Journal of Chemotherapy**, v. 16, n. 1, p. 3-12, 2004.

TORSHIN, I. Y.; WEBER, I. T.; HARRISON, R. W. Geometric criteria of hydrogen bonds in proteins and identification of bifurcated hydrogen bonds. **Protein Engineering**, v. 15, n. 5, p. 359-363, 2002.

VANGREVELINGHE, E.; RUDISSLER, S. Computational approaches for fragment optimization. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 3, n. 1, p. 69-83, 2007.

VORONA, S., ARTAMONOVA, T., ZEVATSKII, Y., MYZNIKOV, L. An improved protocol for the preparation of 5-substituted tetrazoles from organic thiocyanates and nitriles. **Synthesis**, v. 46, n. 06, p. 781-786, 2014.

WANG, L.; TSAI, H.; LIN, H. Novel supramolecular side-chain banana-shaped liquid crystalline polymers containing covalent-and hydrogen-bonded bent cores. **Macromolecules**, v. 43, n. 3, p. 1277-1288, 2010.

WANG, T.; WU, M. B.; CHEN, Z. J.; CHEN, H.; LIN, J. P.; YANG, L. R. Fragment-Based Drug Discovery and Molecular *Docking* in Drug Design. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 11-25, 2015.

WANG, X., LI, P., ZHANG, Q., BORAH, P., WONG, J. D., CHAN, X. X., RAKESH, G., LI, Y., ZHAO, Y.. Significant gas uptake enhancement by post-exchange of zinc (ii) with copper (ii) within a metal–organic framework. **Chemical Communications**, v. 48, n. 83, p. 10286-10288, 2012.

WEI, F.; WANG, W.; MA, Y.; TUNG, C.; XU, Z. Regioselective synthesis of multisubstituted 1, 2, 3-triazoles: moving beyond the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. **Chemical Communications**, v. 52, n. 99, p. 14188-14199, 2016.

WHITE, E. L.; ROSS, L. J.; CUNNINGHAM, A.; ESCUYER, V. Cloning, expression, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, n. 1, p. 101-105, 2004.

WIKTOR, S. Z.; SASSAN-MOROKRO, M.; GRANT, A. D.; ABOUYA, L.; KARON, J. M.; MAURICE, C.; DJOMAND, G.; ACKAH, A.; DOMOUA, K.; KADIO, A.; YAPI, A.; COMBE, P.; TOSSOU, O.; ROELS, T. H.; LACKRITZ, E. M.; COULIBALY, D.; DE COCK, K. M.; COULIBALY, I. M.; GREENBERG, A. E. Efficacy of trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1-infected patients with tuberculosis in Abidjan, Cote d'Ivoire: a randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 353, n. 9163, p. 1469-1475, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2014**. World Health Organization, 2014.

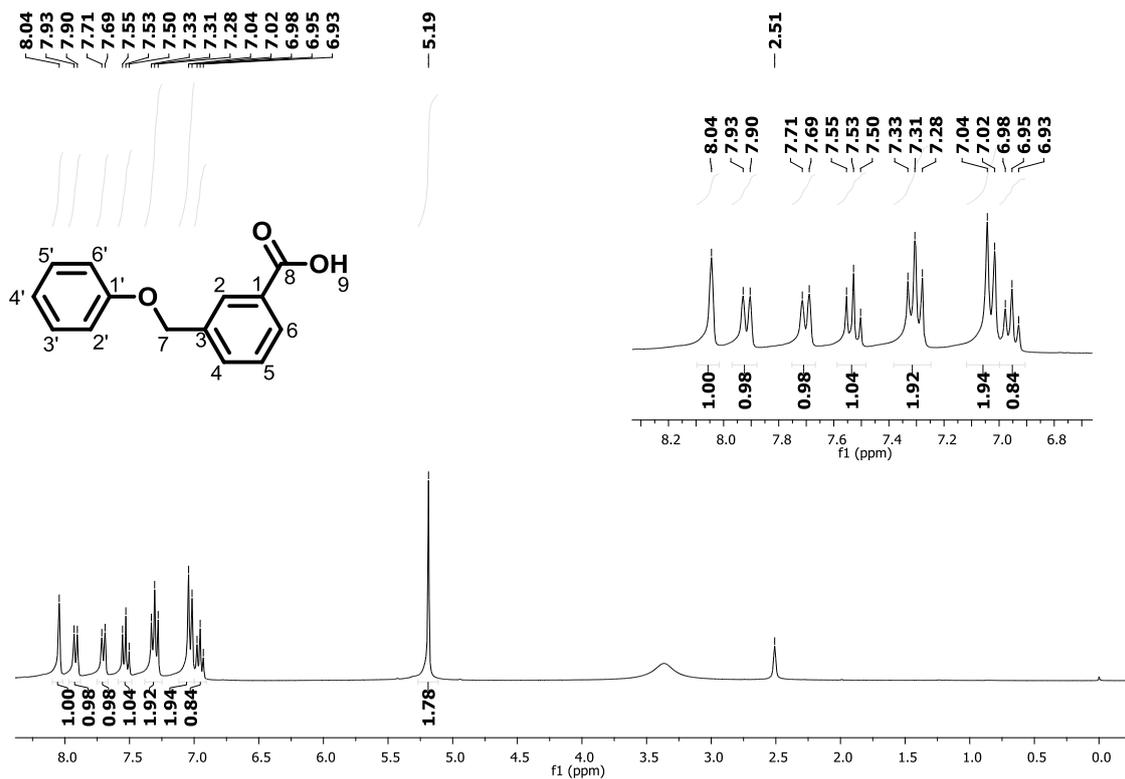
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global tuberculosis report 2017**. World Health Organization, 2016.

YANG, J.; PI, W.; XIONG, L.; ANG, W.; YANG, T.; HE, J.; LIU, Y.; CHANG, Y.; YE, W.; WANG, Z.; LUO, Y.; WEI, Y. 3H-1,2,4-dithiazol-3-one compounds as novel potential affordable antitubercular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 5, p. 1424-1427, 2013.

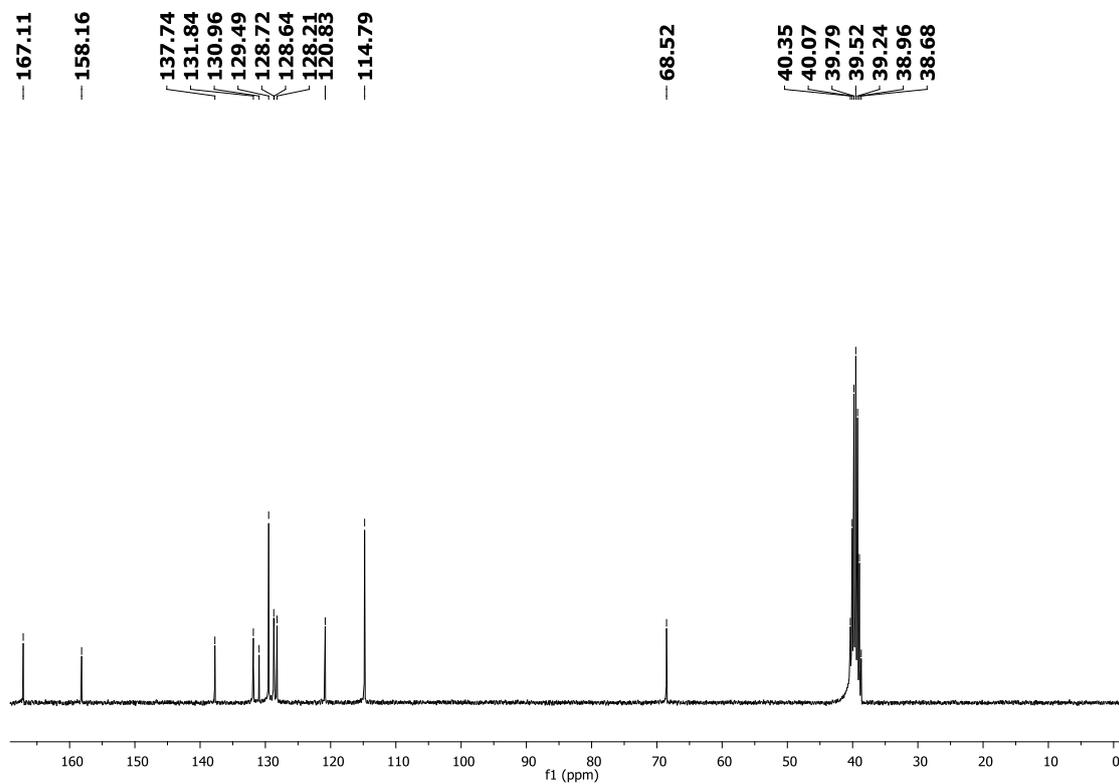
ZUMLA, A. I.; GILLESPIE, S. H.; HOELSCHER, M.; PHILIPS, P. P.; COLE, S. T.; ABUBAKAR, I.; MCHUGH, T. D.; SCHITO, M.; MAEURER, M.; NUNN, A. J. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 327-340, 2014.

ZHOU, W., LI, S., LU, W., YUAN, J., XU, Y., LI, H., HUANG, J., ZHAO, Z. Isoindole-1, 3-dione derivatives as RSK2 inhibitors: synthesis, molecular docking simulation and SAR analysis. **MedChemComm**, v. 7, n. 2, p. 292-296, 2016.

ANEXO I
Espectros de RMN ^1H e ^{13}C
Cromatogramas de CLAE



Spectro de RMN ^1H do composto 20 (DMSO- d_6)



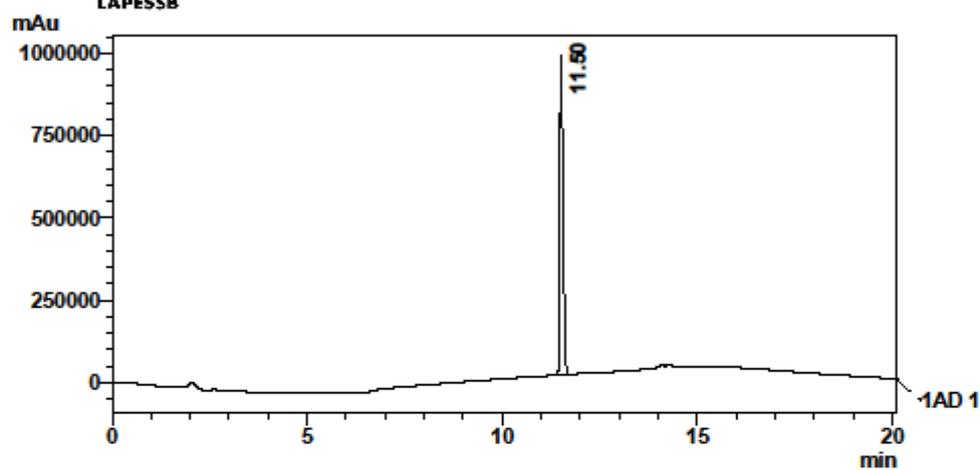
Spectro de RMN ^{13}C do composto 20 (DMSO- d_6)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-MB872Na
 Vial: 1
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

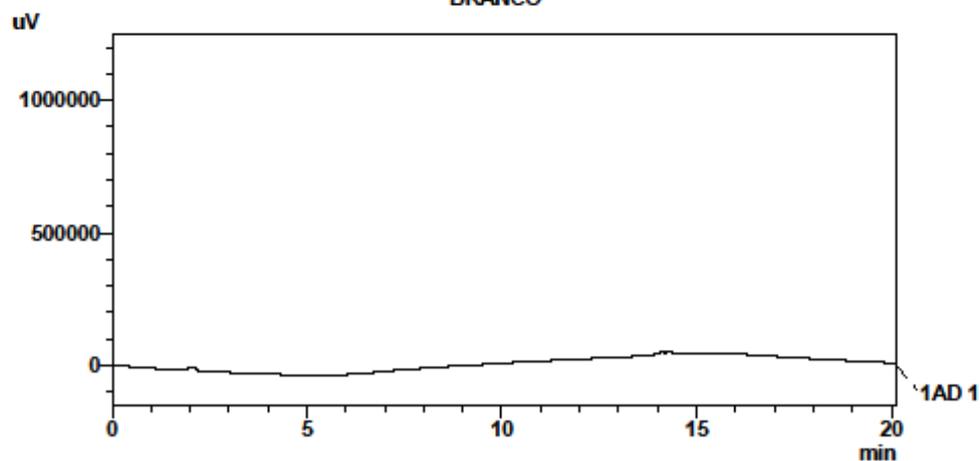


PeakTable

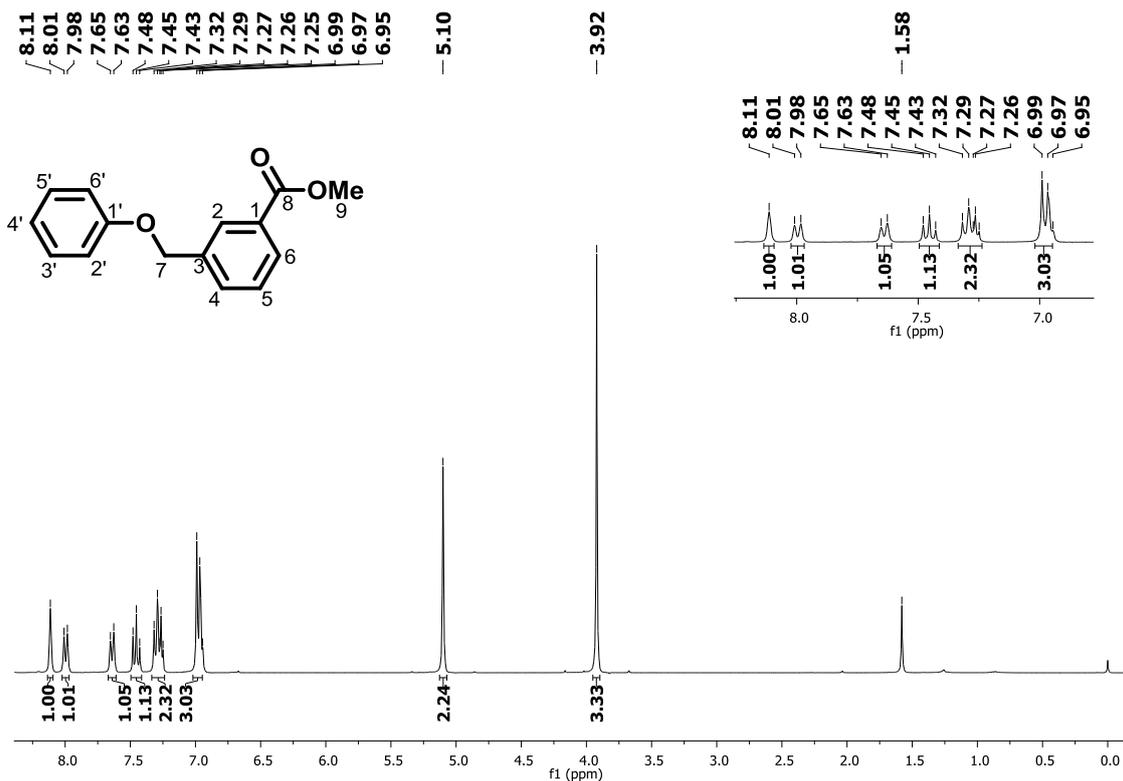
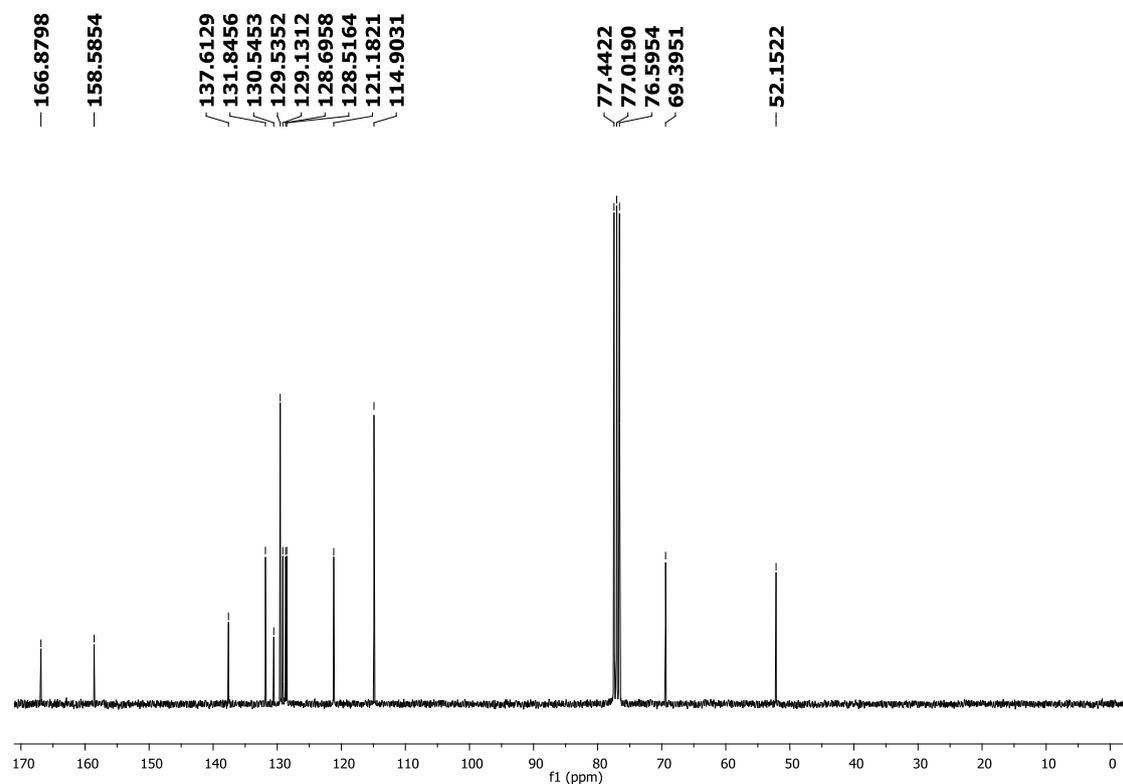
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.501	5463050	972125	0.091	1.655	100.000	100.000
Total		5463050	972125			100.000	

BRANCO



1 AD 1 / 254nm

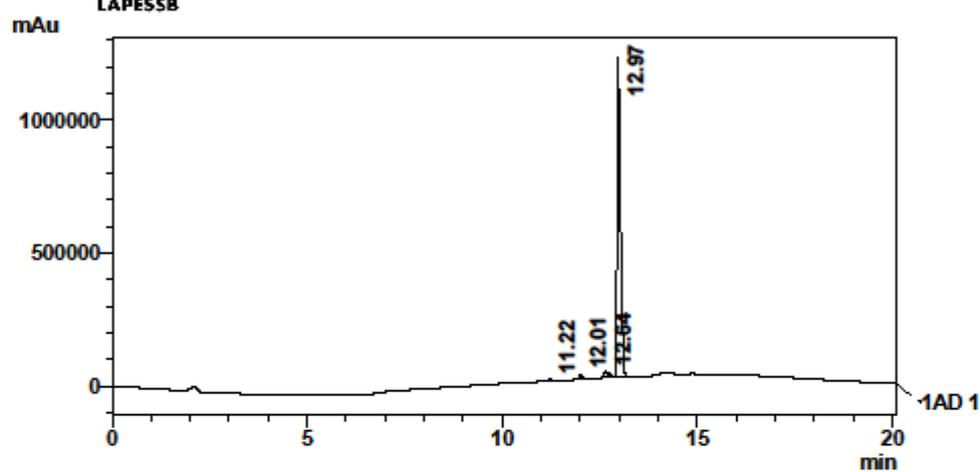
Espectro de RMN ^1H do composto 25 (CDCl_3)Espectro de RMN ^{13}C do composto 25 (CDCl_3)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



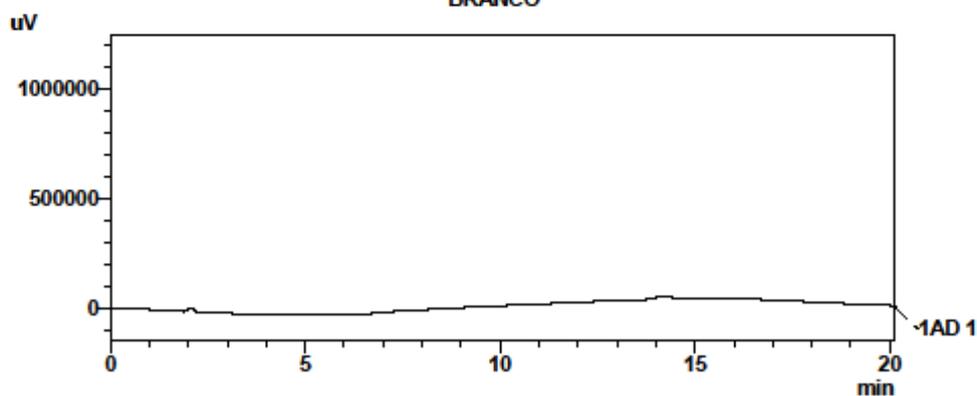
Date: 16/7/2018
 Sample: M-MB872P
 Vial: 3
 Injection Volume: 20
 Batch: batch 16-07-18.lcb



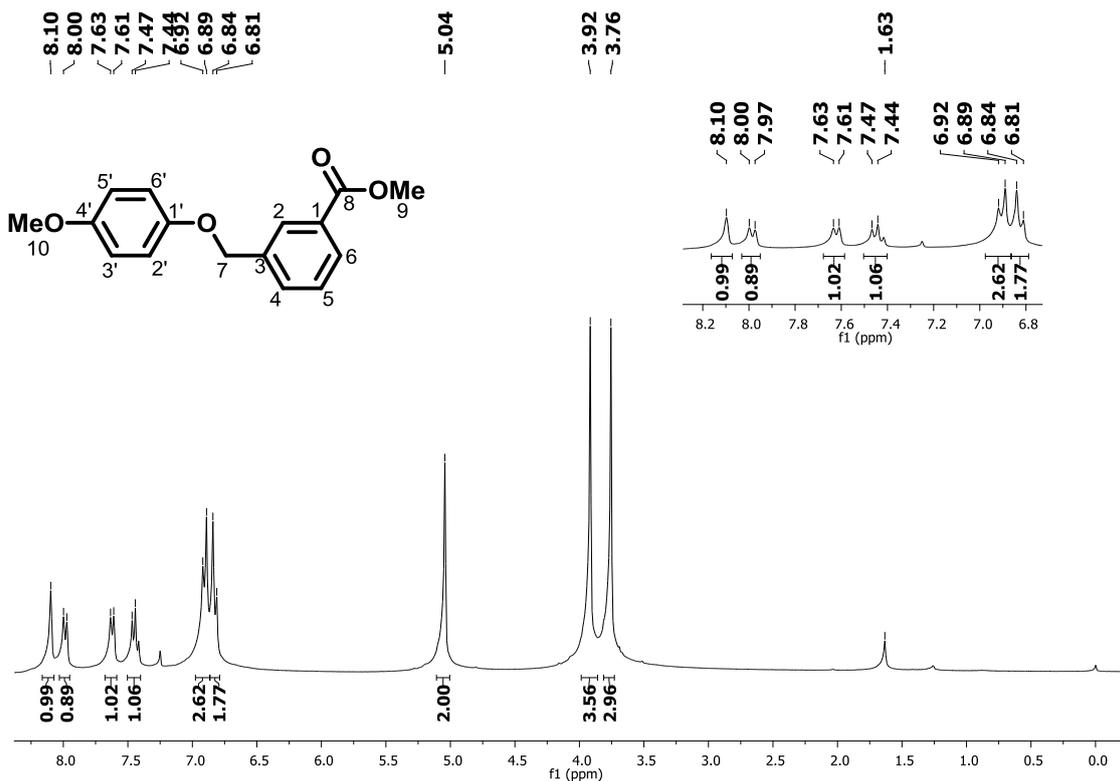
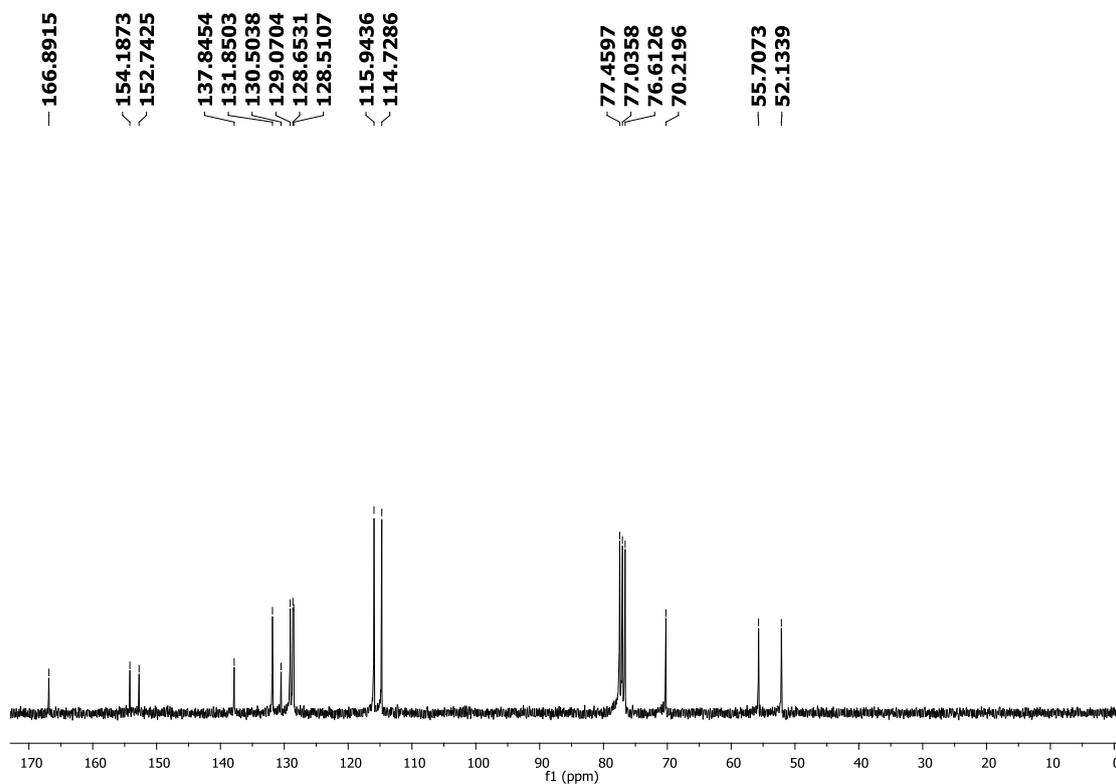
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.220	45711	6521	0.090	1.716	0.630	0.630
2	12.005	95768	17782	0.089	1.581	1.320	1.320
3	12.642	161877	22131	0.079	2.469	2.232	2.232
4	12.968	6950358	1200556	0.089	1.785	95.818	95.818
Total		7253714	1246990			100.000	

BRANCO



1 AD 1 / 254nm

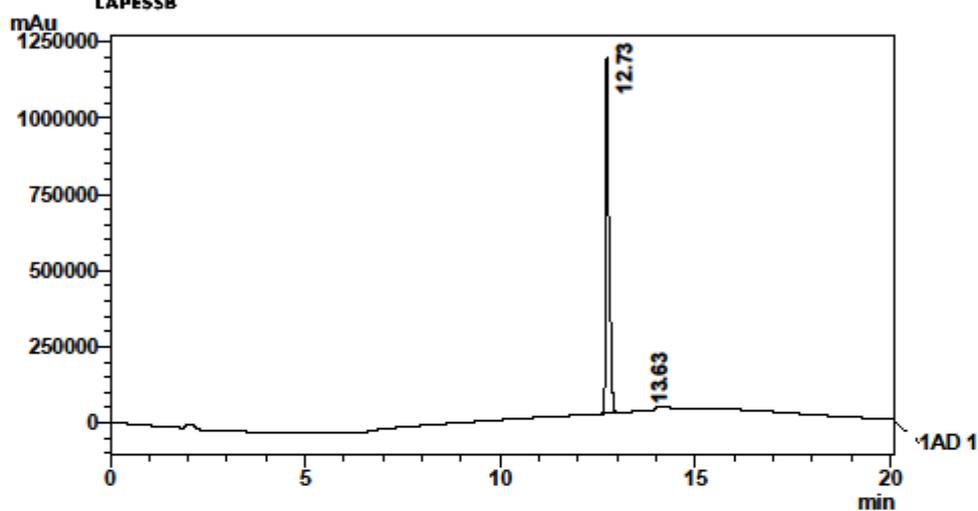
Espectro de RMN ^1H do composto 26 (CDCl_3)Espectro de RMN ^{13}C do composto 26 (CDCl_3)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS10P
 Vial: 3
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

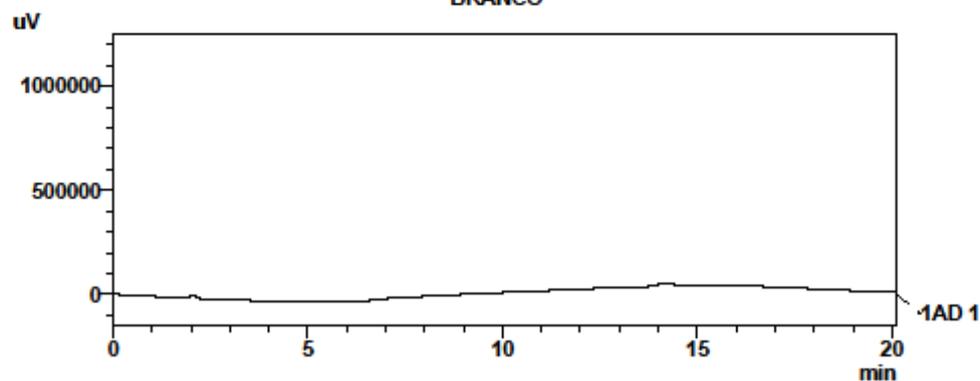


1 AD1 / 254nm

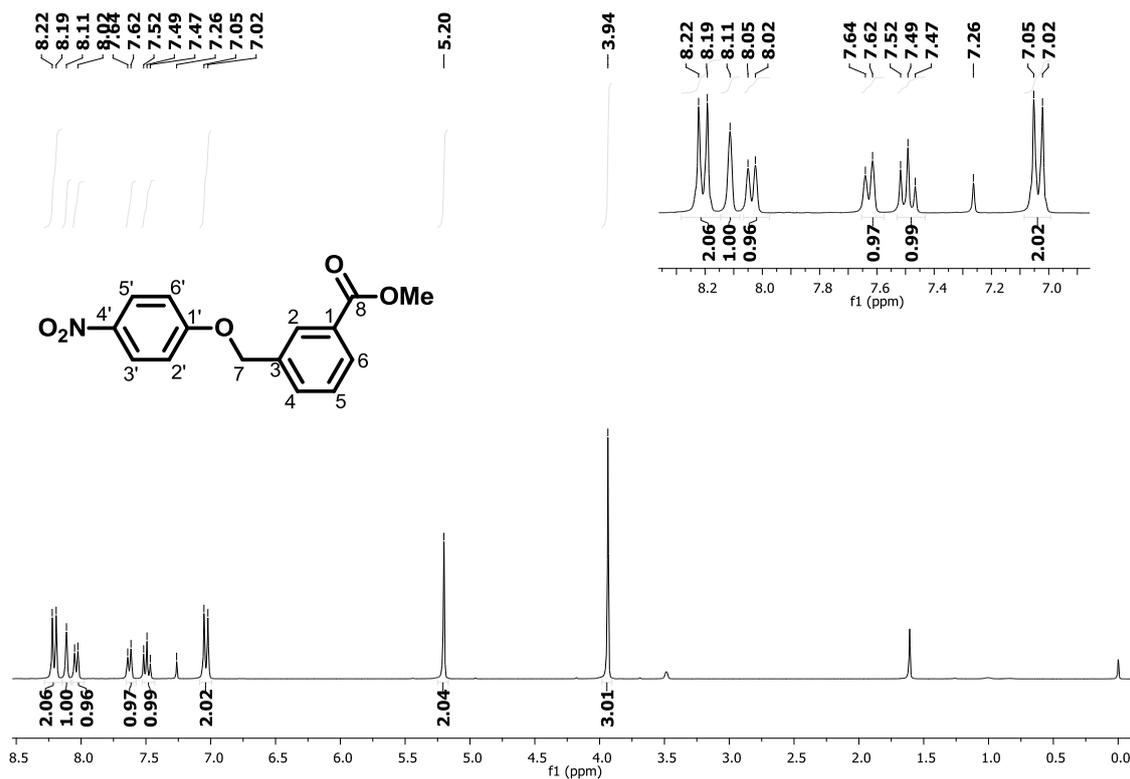
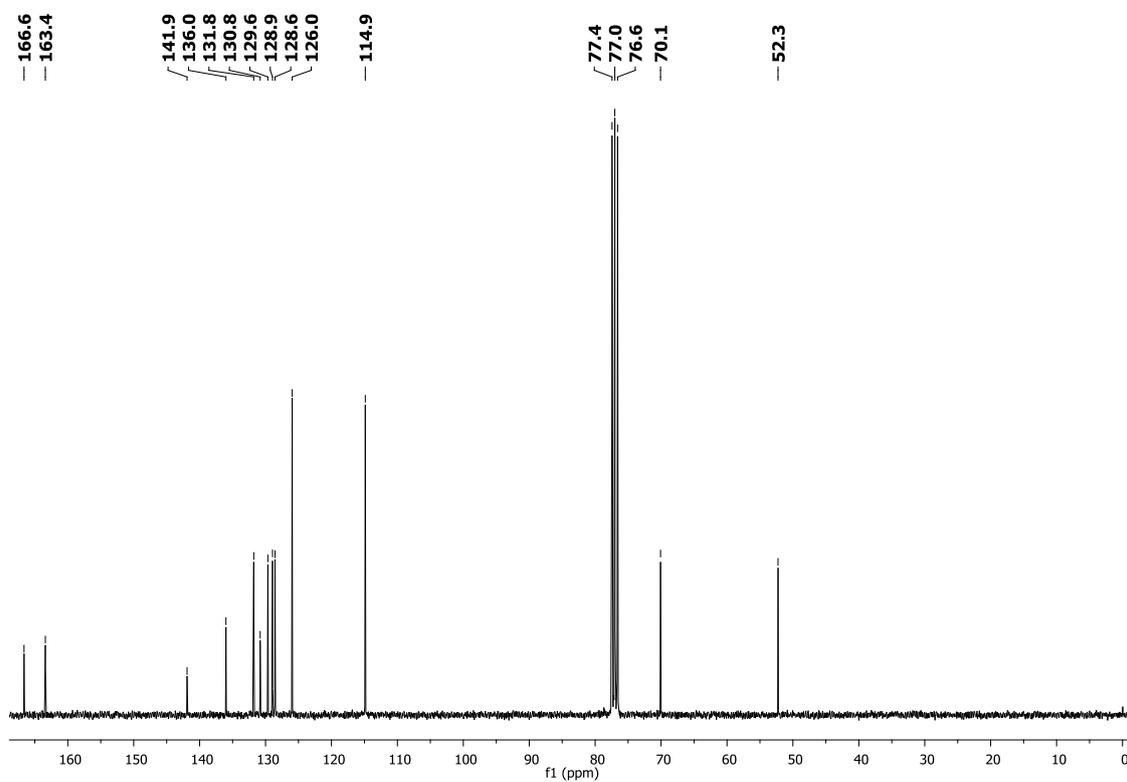
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	12.726	6872475	1169088	0.085	2.007	99.807	99.807
2	13.632	13263	3057	0.063	1.495	0.193	0.193
Total		6885738	1172146			100.000	

BRANCO



1 AD1 / 254nm

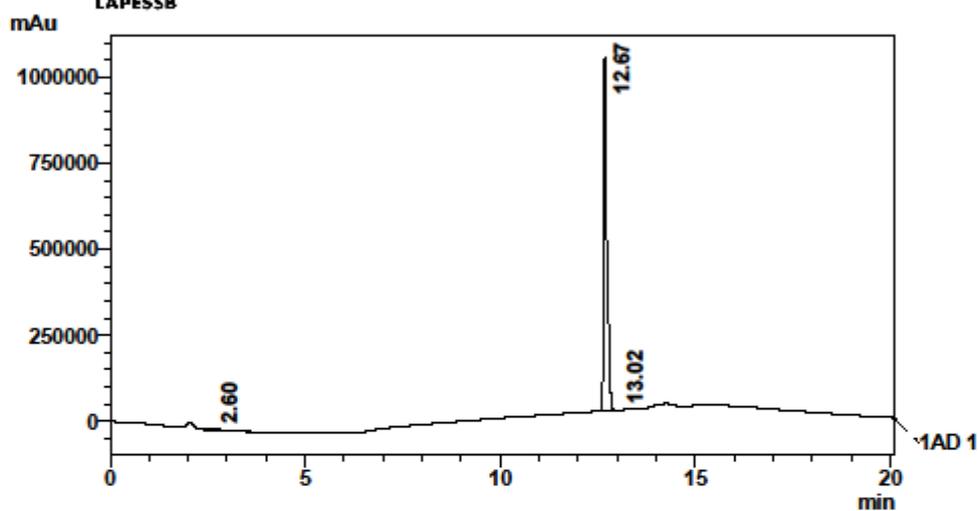
Espectro de RMN ¹H do composto 27 (CDCl₃)Espectro de RMN ¹³C do composto 27 (CDCl₃)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS12P
 Vial: 10
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

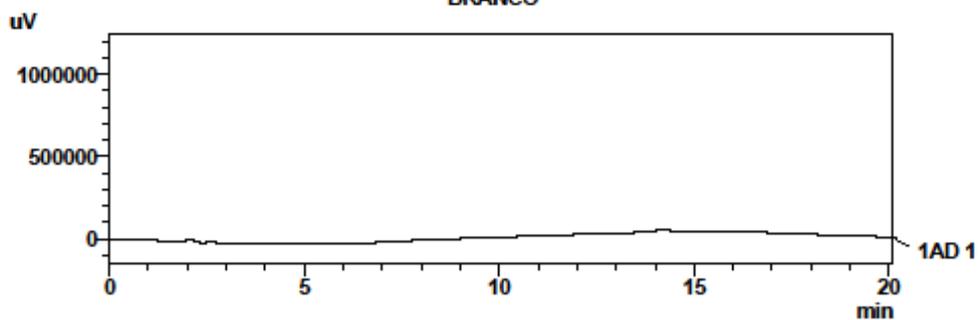


1 AD1 / 254nm

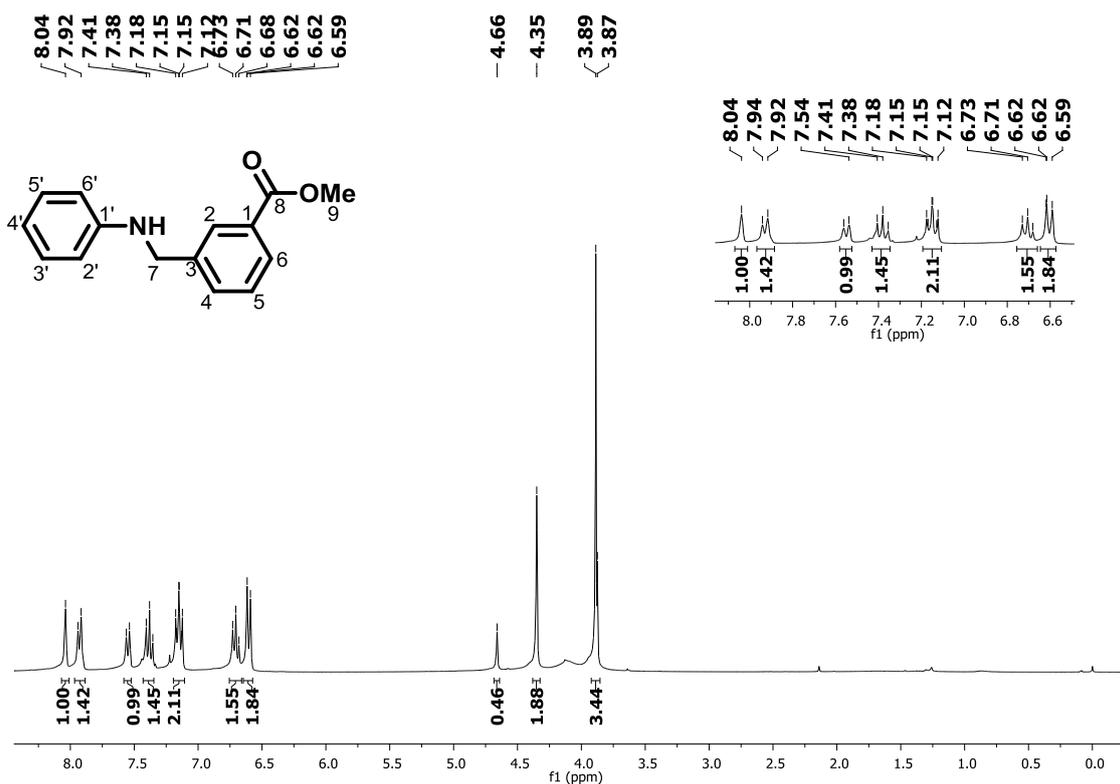
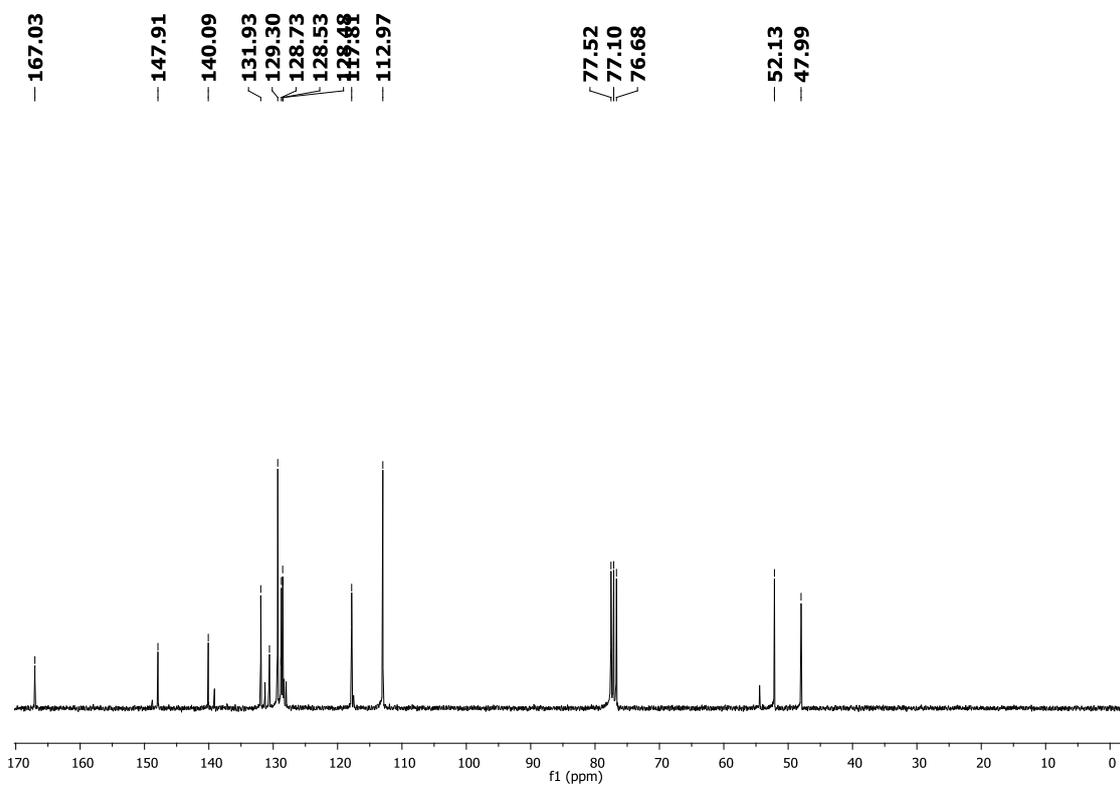
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	2.602	77475	2211	0.561	3.107	1.320	1.320
2	12.673	5789017	1027851	0.076	2.004	98.625	98.625
3	13.017	3258	750	0.062	0.000	0.056	0.056
Total		5869750	1030812			100.000	

BRANCO



1 AD1 / 254nm

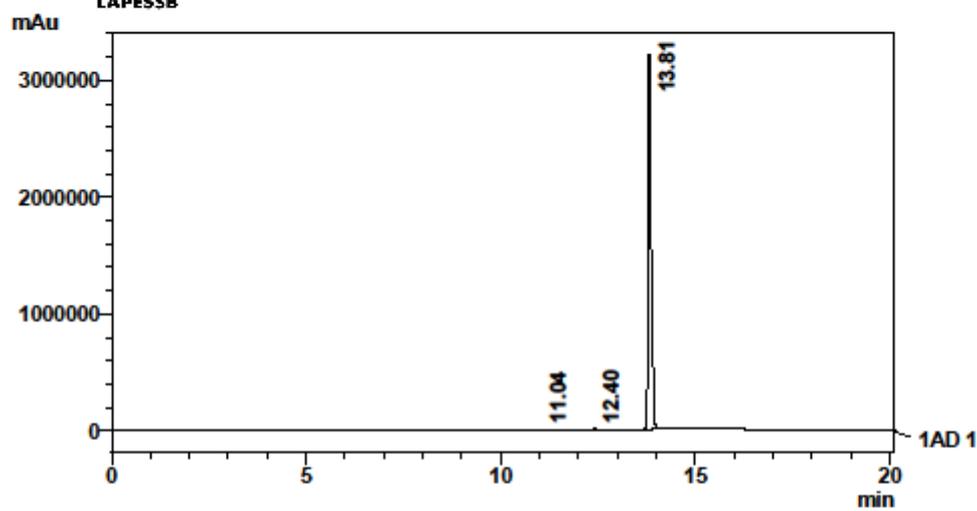
Espectro de RMN ^1H do composto 28 (CDCl_3)Espectro de RMN ^{13}C do composto 28 (CDCl_3)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 5/9/2018
 Sample: M-ADS20P
 Vial: 11
 Injection Volume: 20
 Batch: batch 16-07-18.Icb

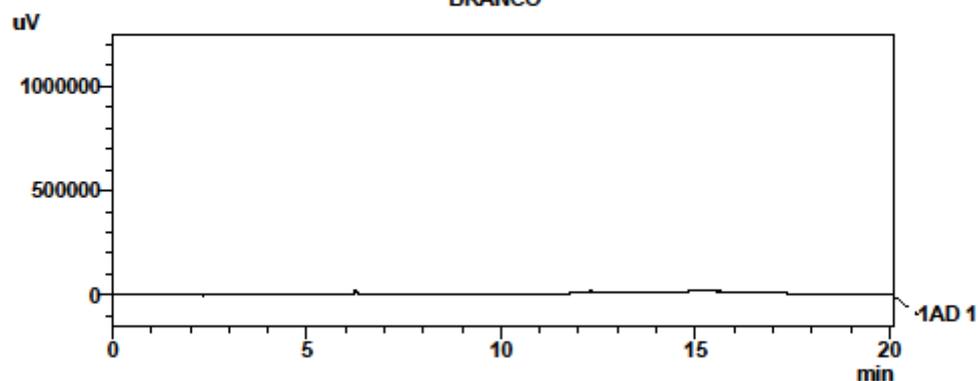


1 AD1 / 254nm

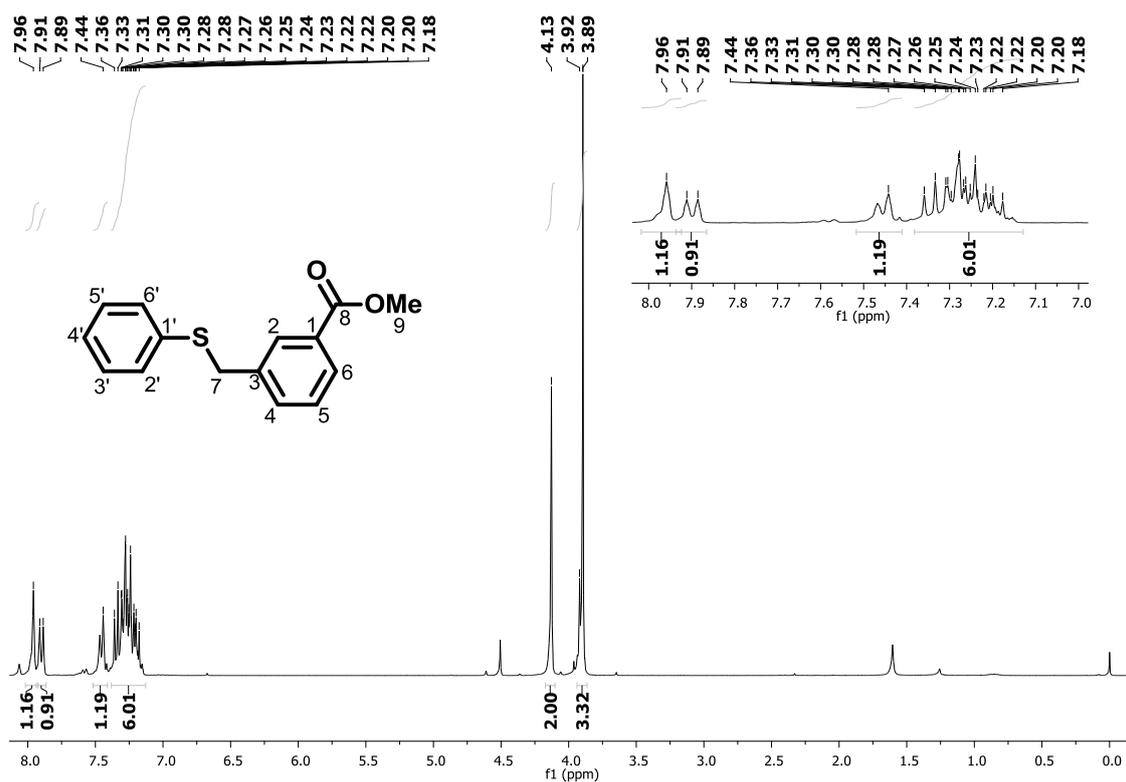
PeakTable

Ch1							
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.037	23079	6220	0.058	1.313	0.131	0.131
2	12.396	43005	5858	0.122	1.554	0.244	0.244
3	13.812	17582065	3207007	0.080	1.731	99.626	99.626
Total		17648149	3219084			100.000	

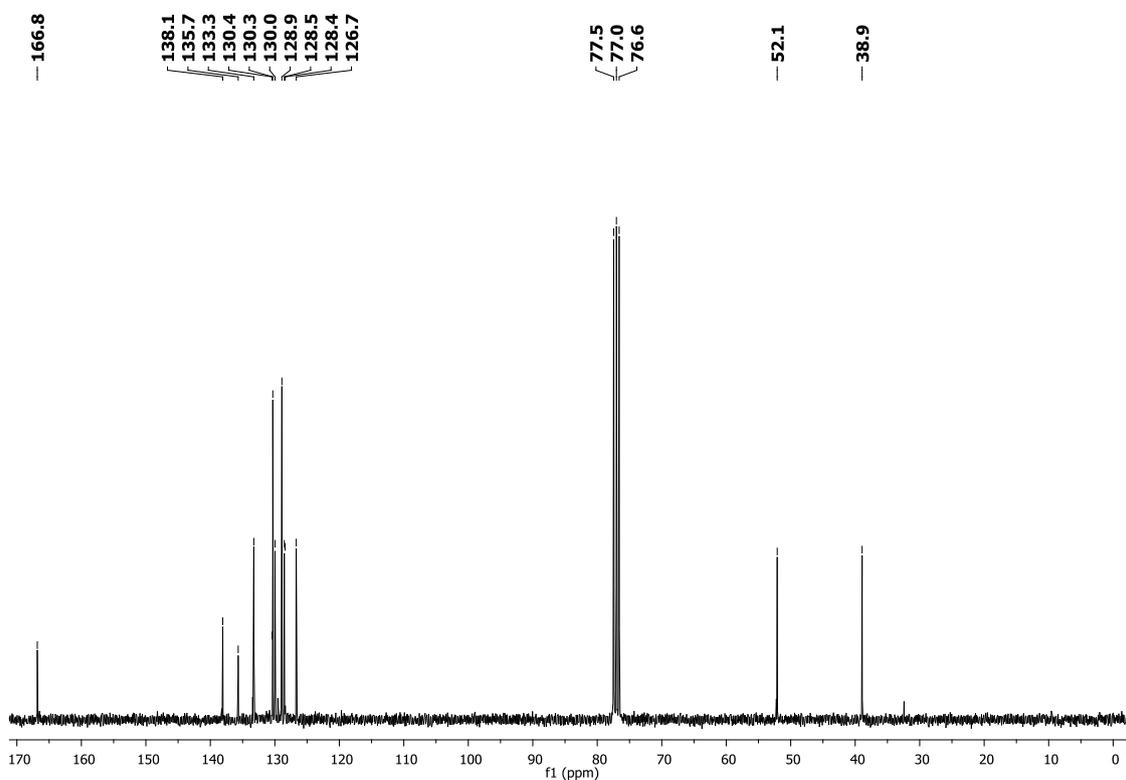
BRANCO



1 AD1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 29 (CDCl₃)



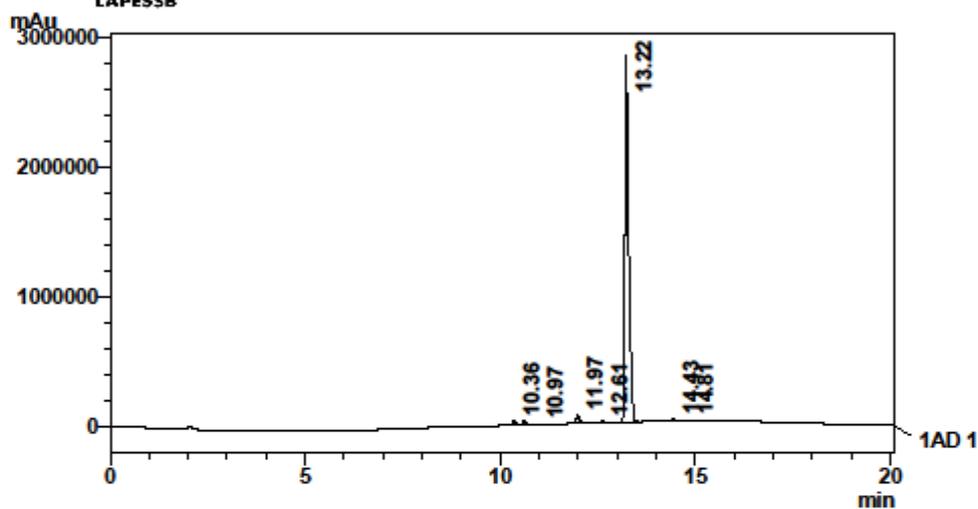
Espectro de RMN ¹³C do composto 29 (CDCl₃)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS21P
 Vial: 2
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



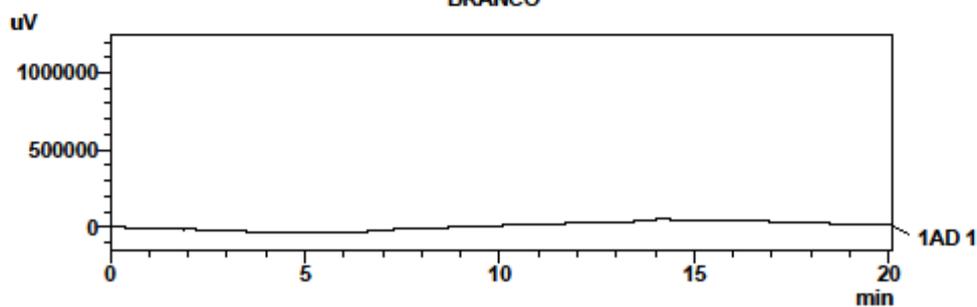
1 AD1 / 254nm

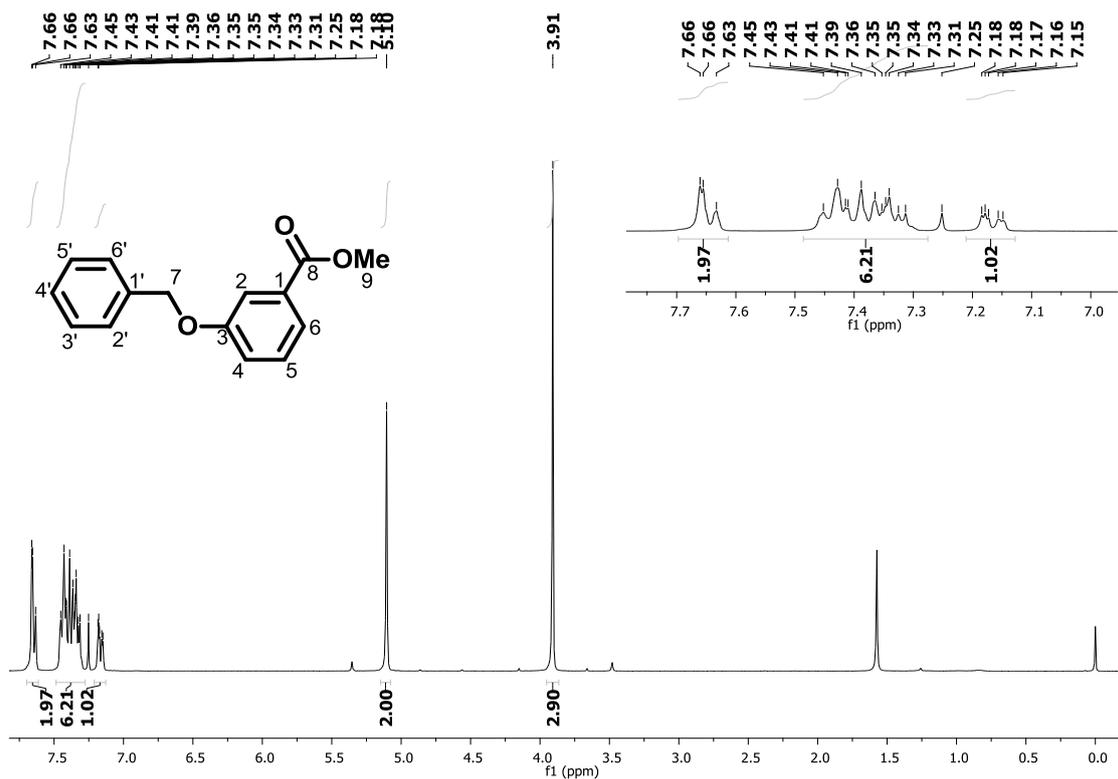
PeakTable

Ch1

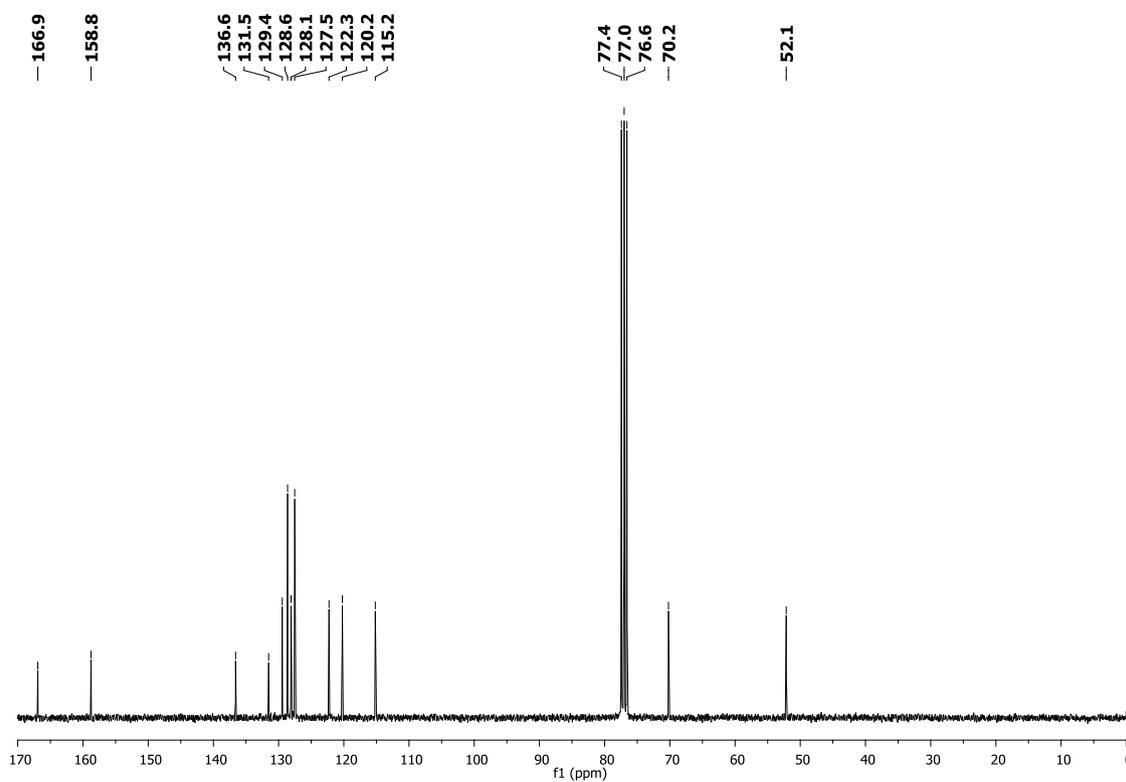
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	10.355	382153	33100	0.099	1.344	1.984	1.984
2	10.965	163	-10	0.000	0.000	0.001	0.001
3	11.972	389498	67058	0.093	1.738	2.022	2.022
4	12.610	71116	12355	0.085	1.857	0.369	0.369
5	13.222	18351607	2828272	0.095	2.039	95.265	95.265
6	14.433	57922	12152	0.065	2.262	0.301	0.301
7	14.811	11210	3535	0.052	1.257	0.058	0.058
Total		19263670	2956462			100.000	

BRANCO





Espectro de RMN ¹H do composto 30 (CDCl₃)



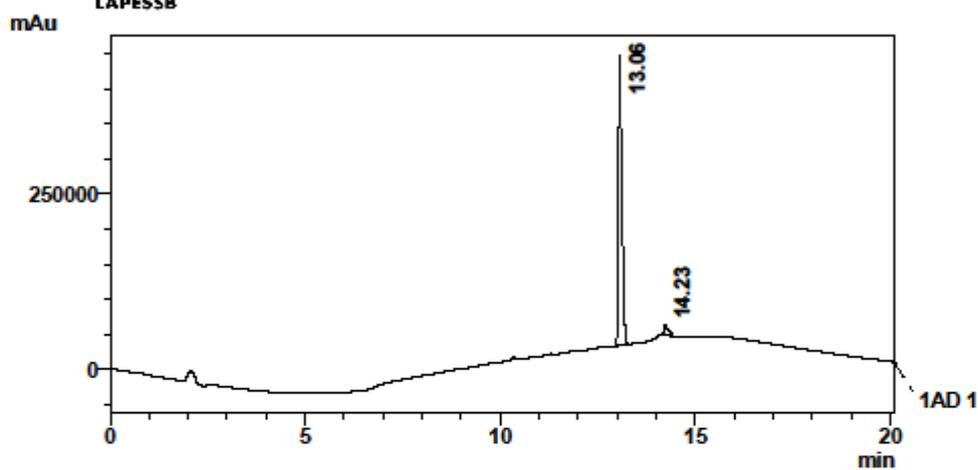
Espectro de RMN ¹³C do composto 30 (CDCl₃)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 17/7/2018
 Sample: M-ADS24P
 Vial: 5
 Injection Volume: 20
 Batch: batch 16-07-18.lcb

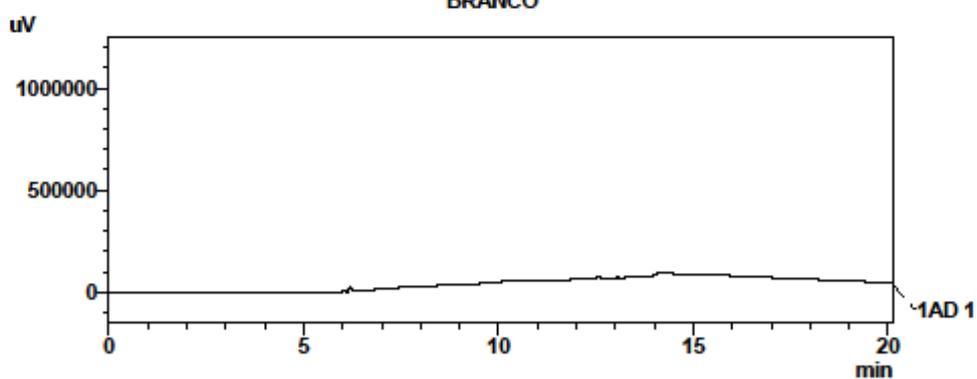


1 AD 1 / 254nm

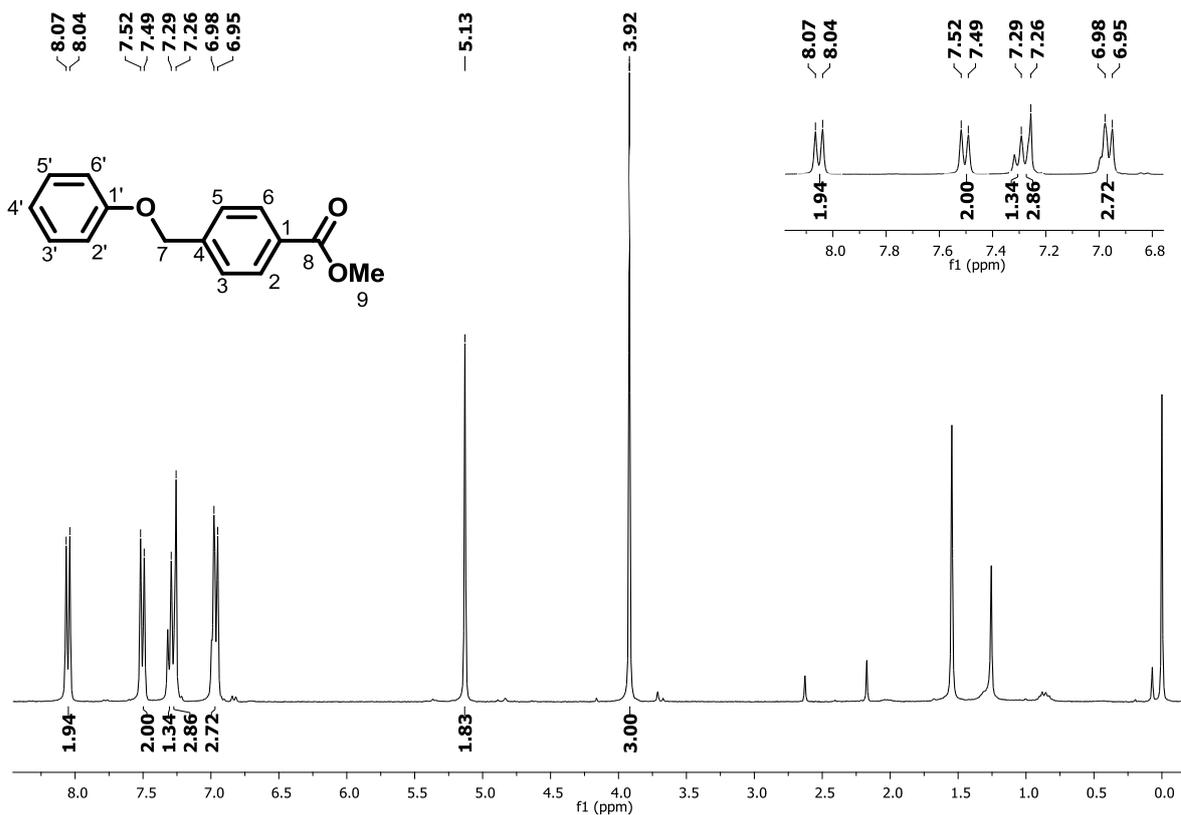
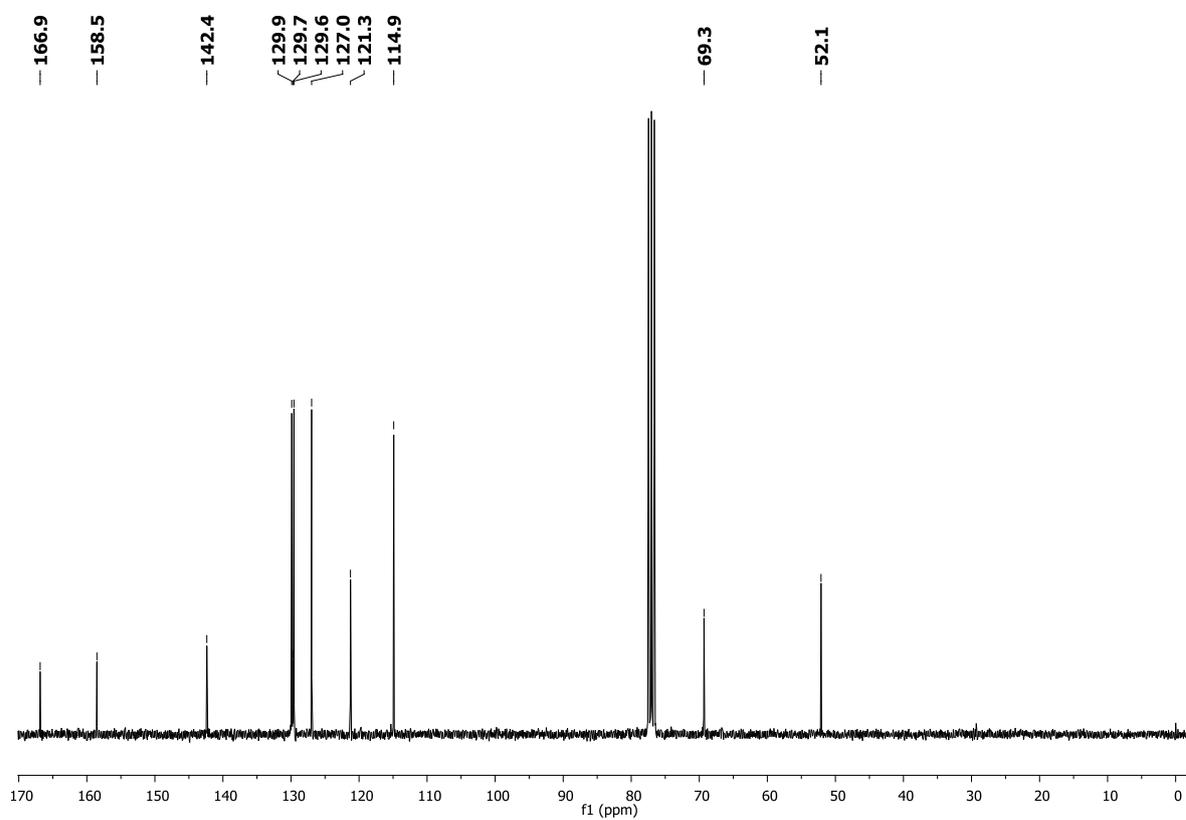
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	13.056	2468059	414238	0.091	1.759	95.962	95.962
2	14.226	103863	14655	0.096	2.395	4.038	4.038
Total		2571922	428894			100.000	

BRANCO



1 AD 1 / 254nm

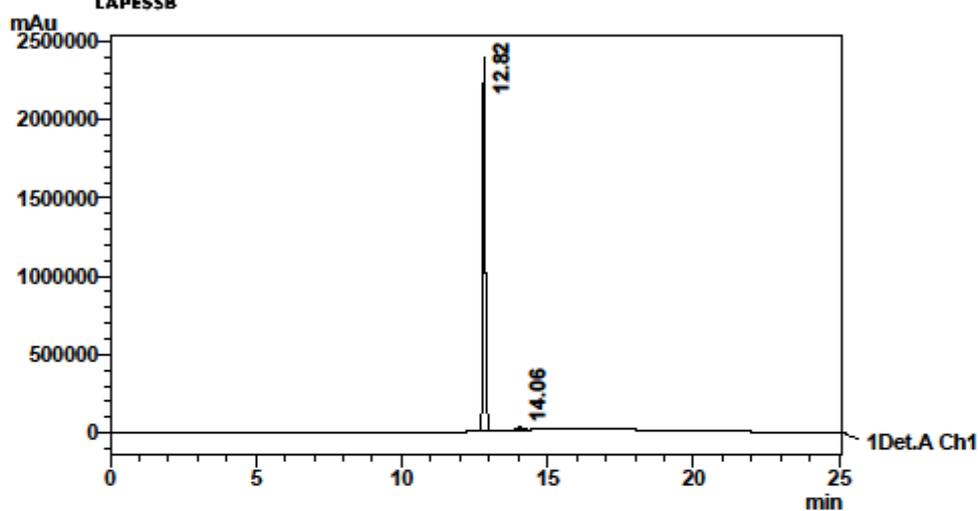
Espectro de RMN ^1H do composto 31 (CDCl_3)Espectro de RMN ^{13}C do composto 31 (CDCl_3)

LAPES SB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 13/4/2017
 Sample: MB872P 13-04-17
 Vial: 40
 Injection Volume: 15
 Batch:



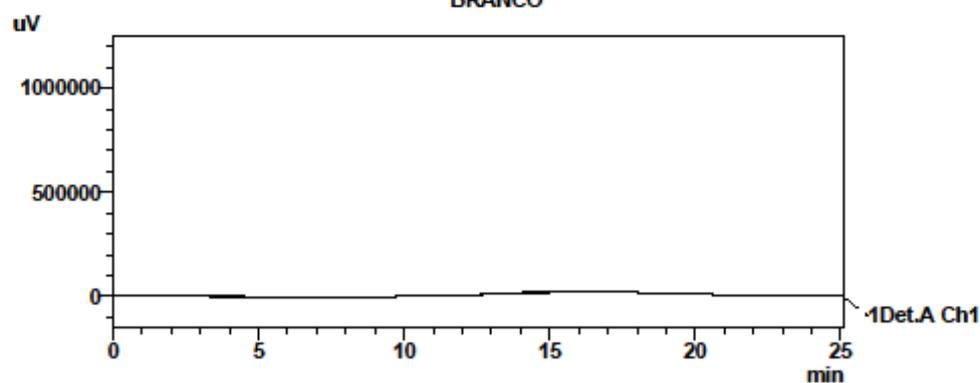
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

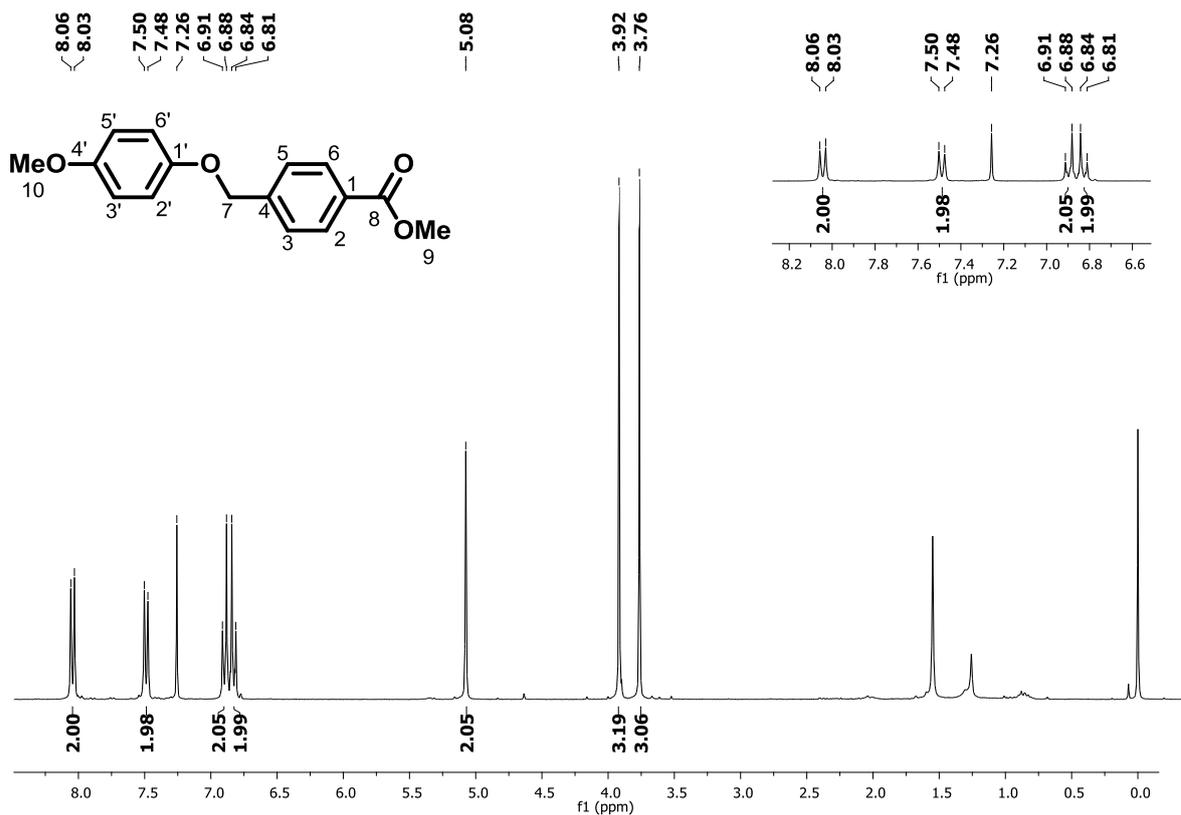
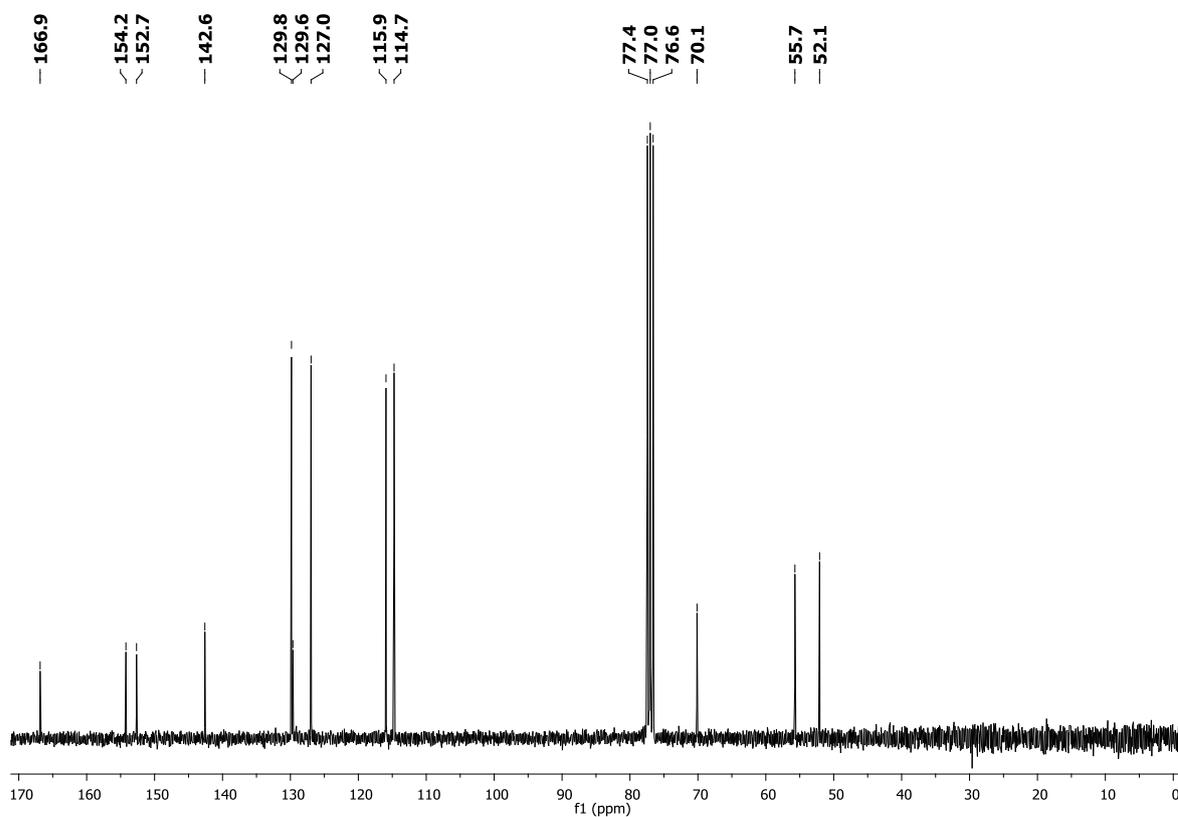
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	12.816	14199543	2390155	0.091	1.302	99.037	99.037
2	14.057	138105	19635	0.085	2.063	0.963	0.963
Total		14337649	2409790			100.000	

BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm

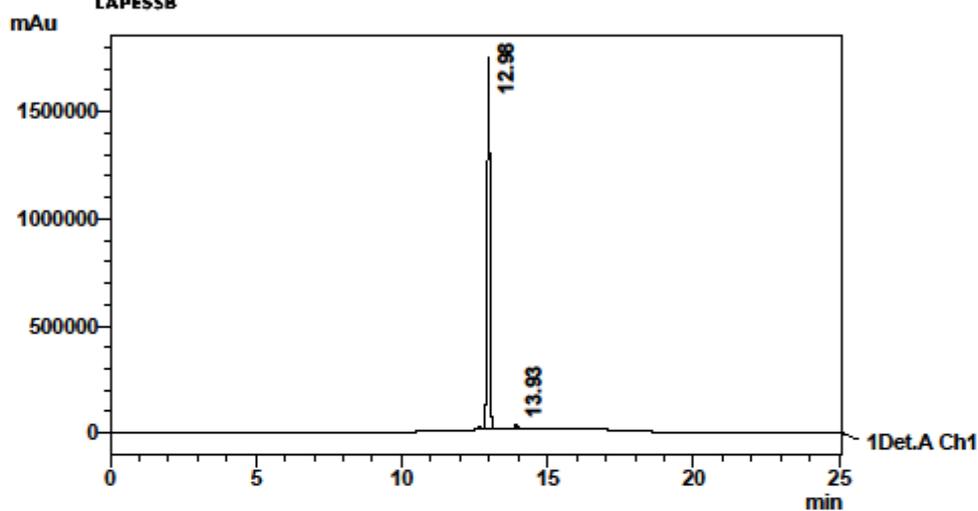
Espectro de RMN ¹H do composto 32 (CDCl₃)Espectro de RMN ¹³C do composto 32 (CDCl₃)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 15/5/2017
 Sample: ADS10P 15_05_17
 Vial: 10
 Injection Volume: 20
 Batch:



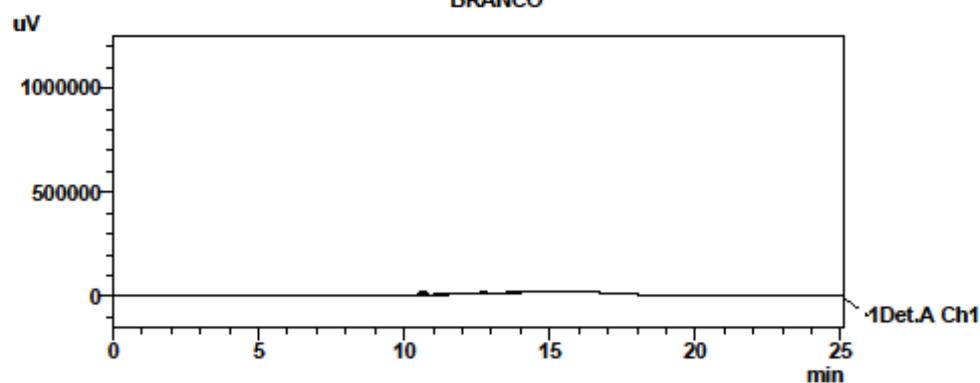
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

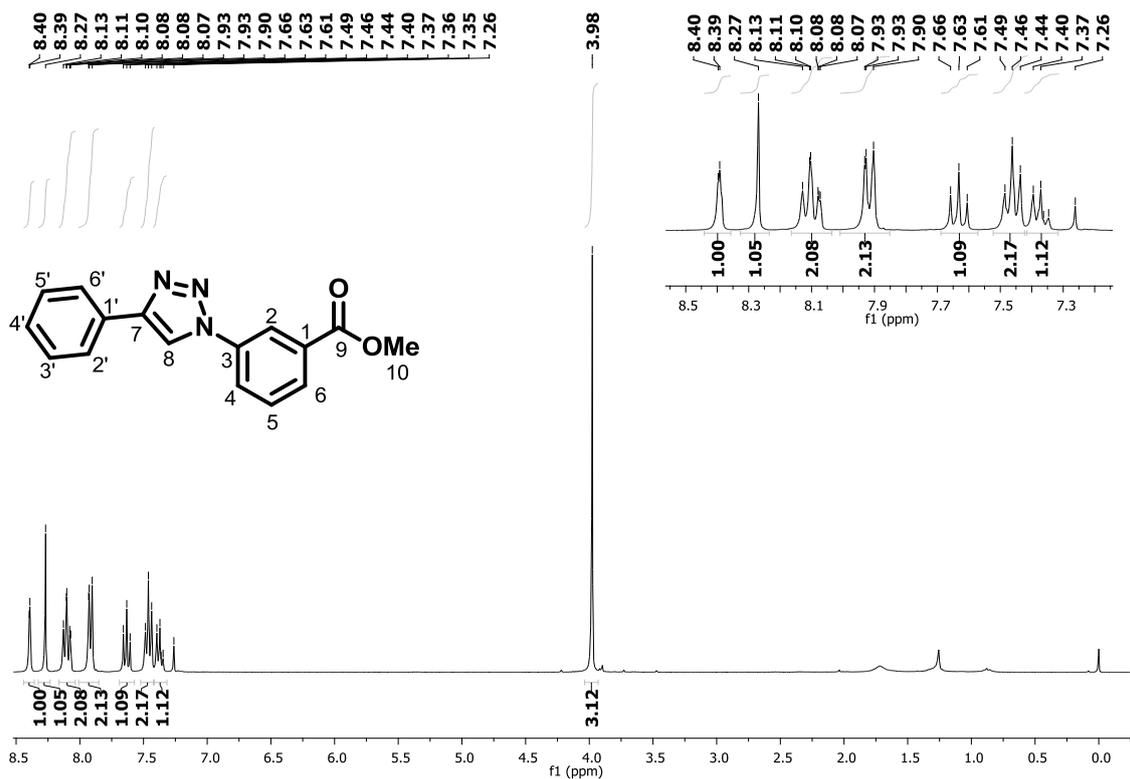
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	12.980	11333246	1736289	0.105	0.943	98.410	98.410
2	13.928	183084	23572	0.110	1.349	1.590	1.590
Total		11516331	1759861			100.000	

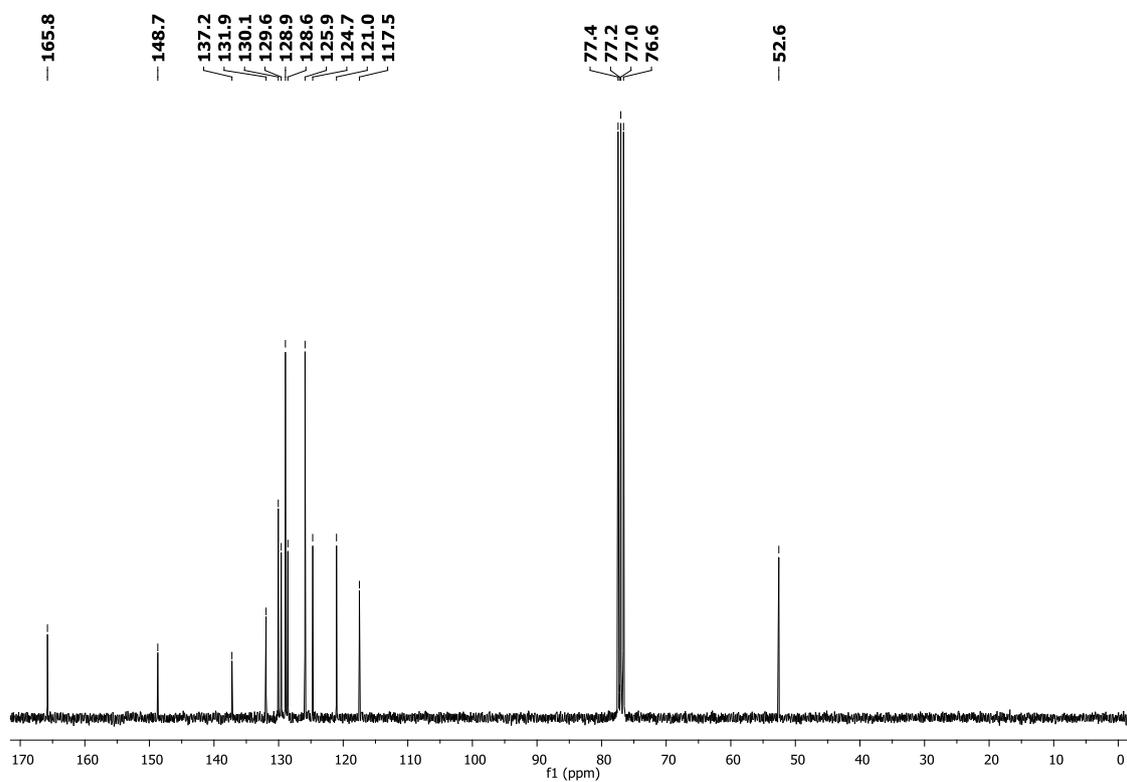
BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 33 (CDCl₃)



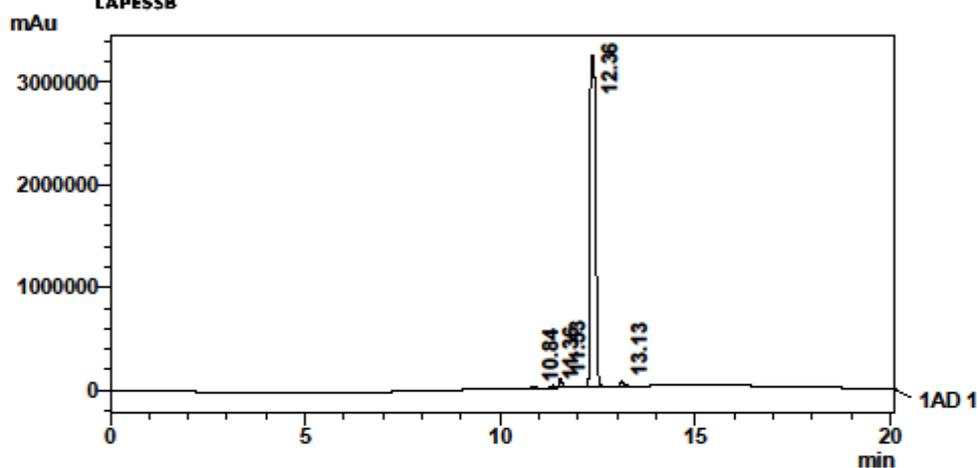
Espectro de RMN ¹³C do composto 33 (CDCl₃)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 27/6/2018
 Sample: M-ADS29P
 Vial: 18
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



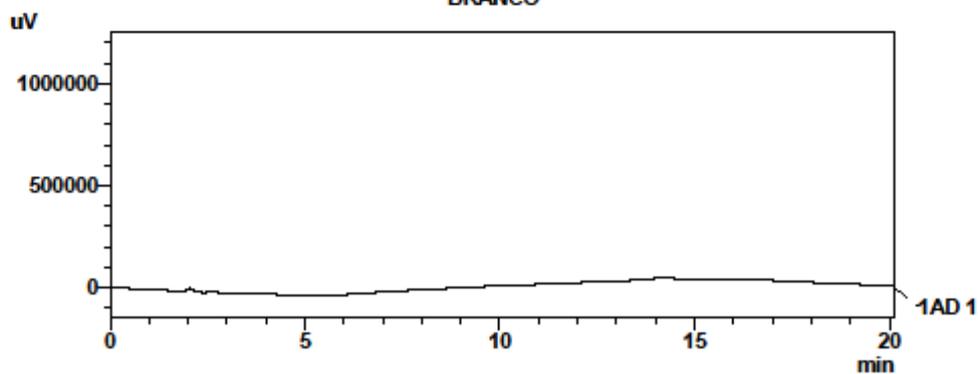
1 AD1 / 254nm

PeakTable

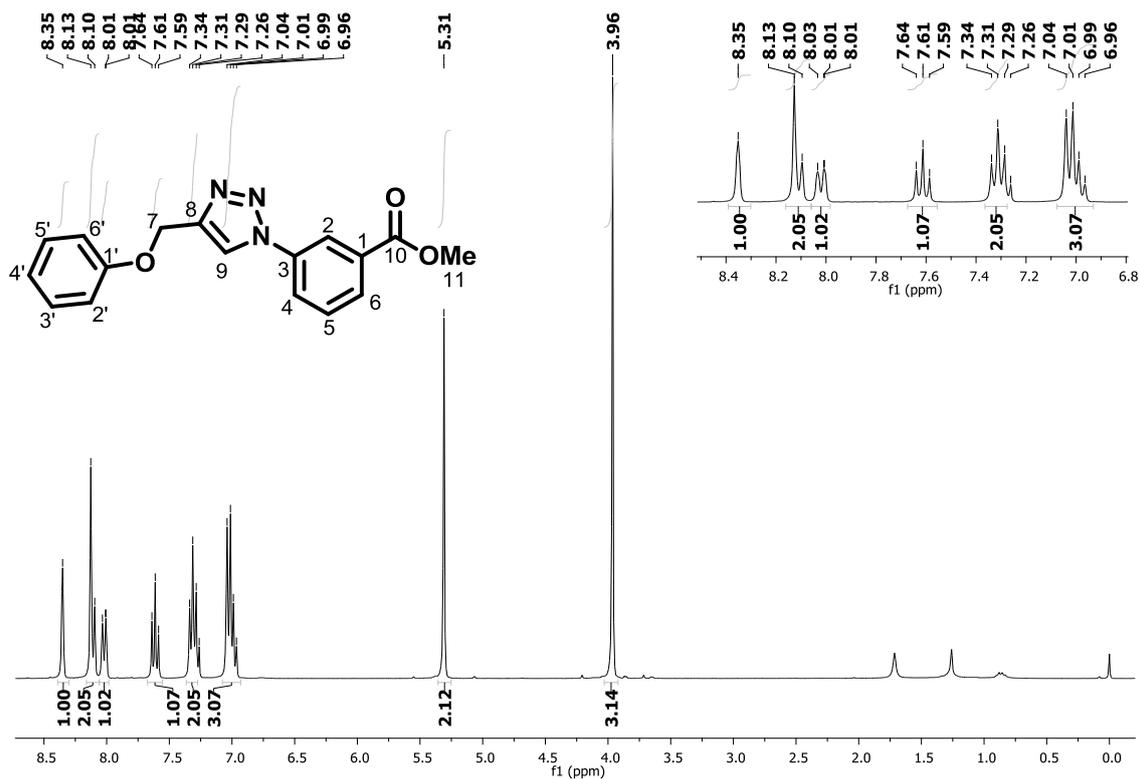
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution Factor	Area %	Conc. %
1	10.836	89399	13714	0.103	1.511	0.272	0.272
2	11.364	120480	20566	0.097	0.000	0.367	0.367
3	11.535	539728	89168	0.094	0.000	1.645	1.645
4	12.358	31770694	3237037	0.161	1.463	96.819	96.819
5	13.126	294184	52557	0.068	2.154	0.897	0.897
Total		32814485	3413042			100.000	

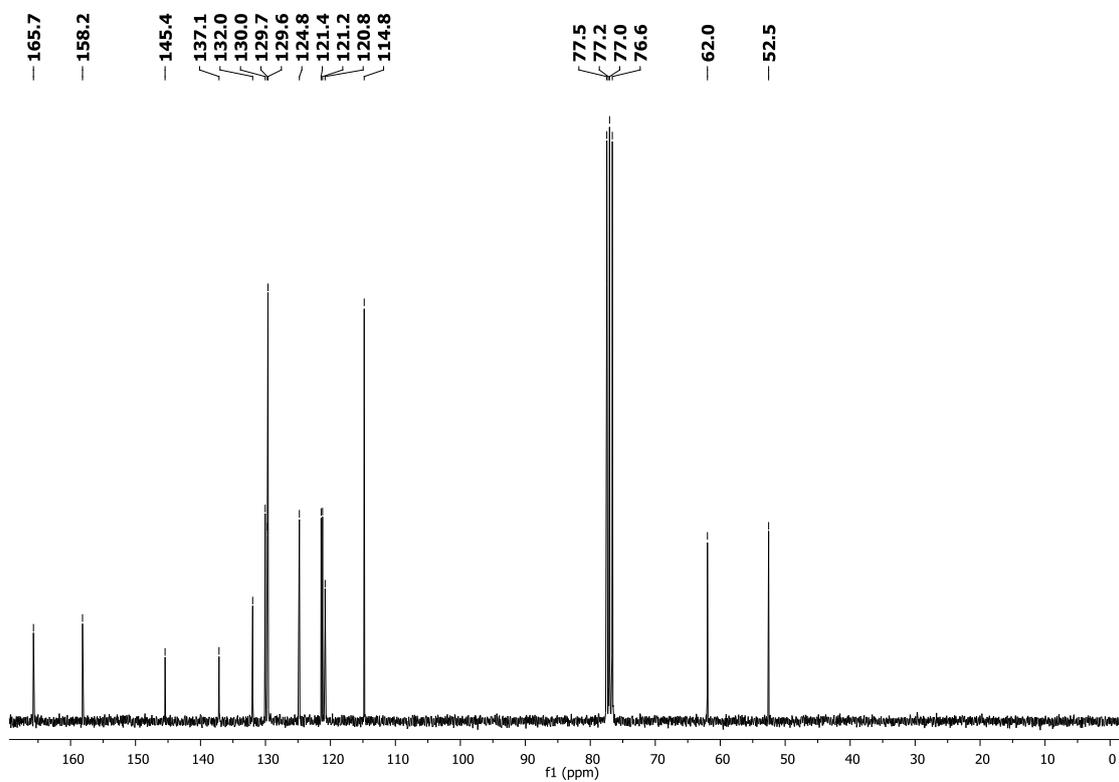
BRANCO



1 AD1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 34 (CDCl₃)



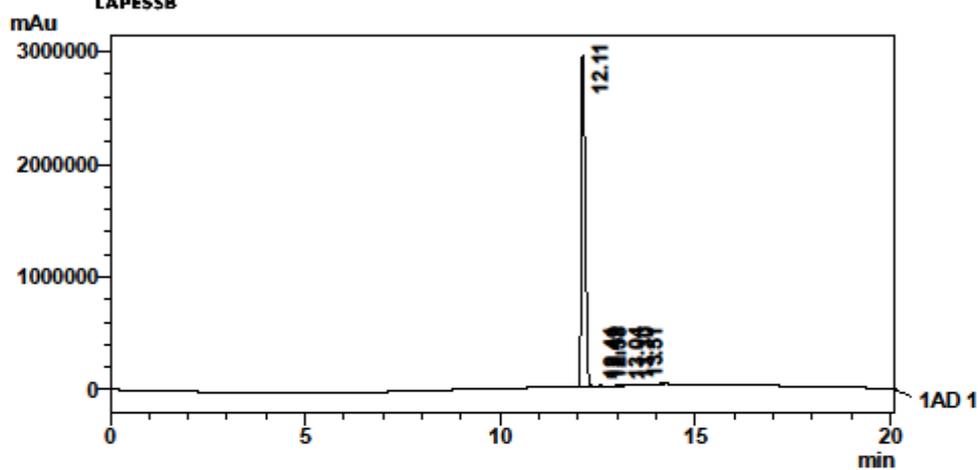
Espectro de RMN ¹³C do composto 34 (CDCl₃)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS100P
 Vial: 5
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

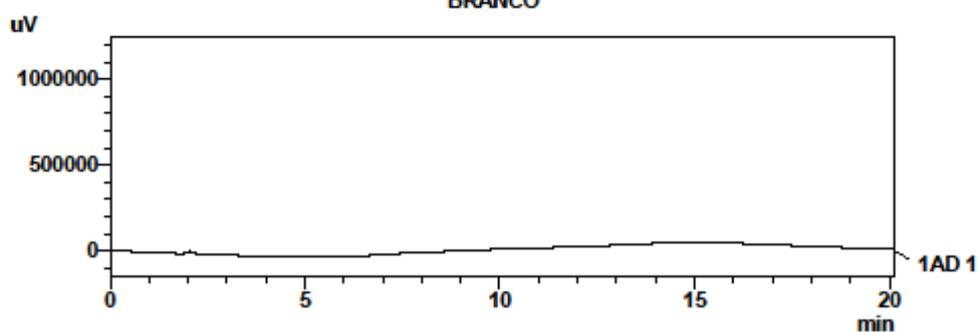


PeakTable

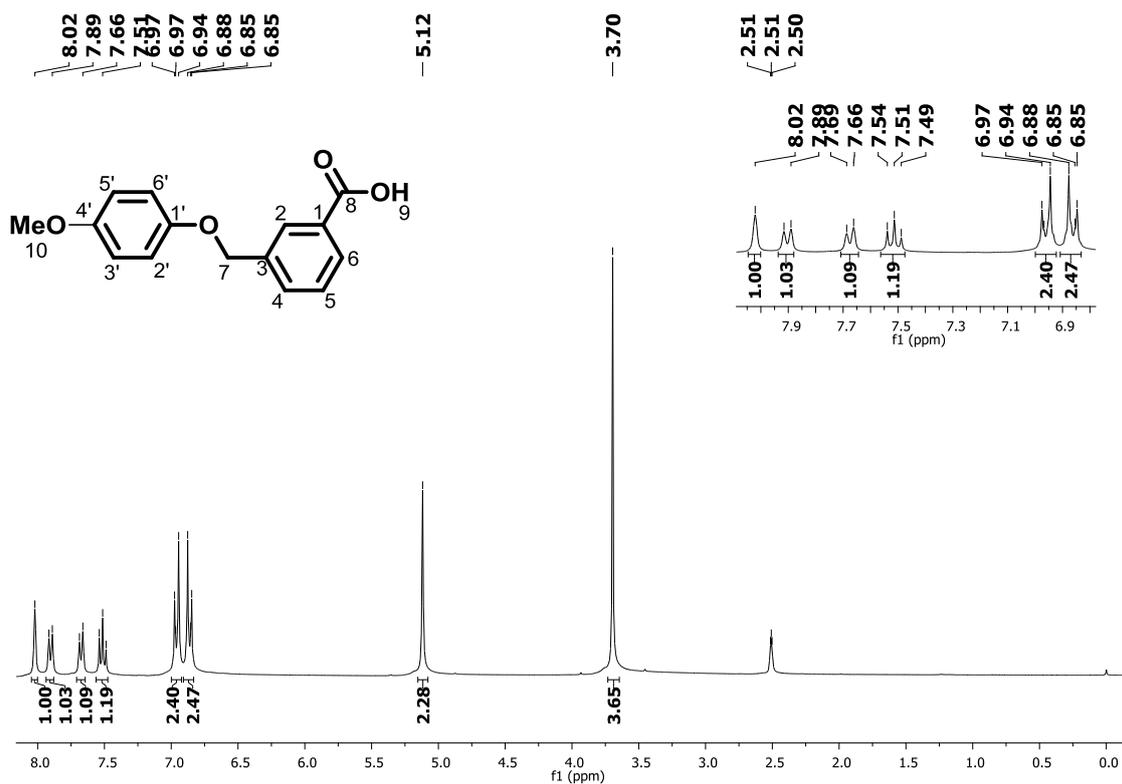
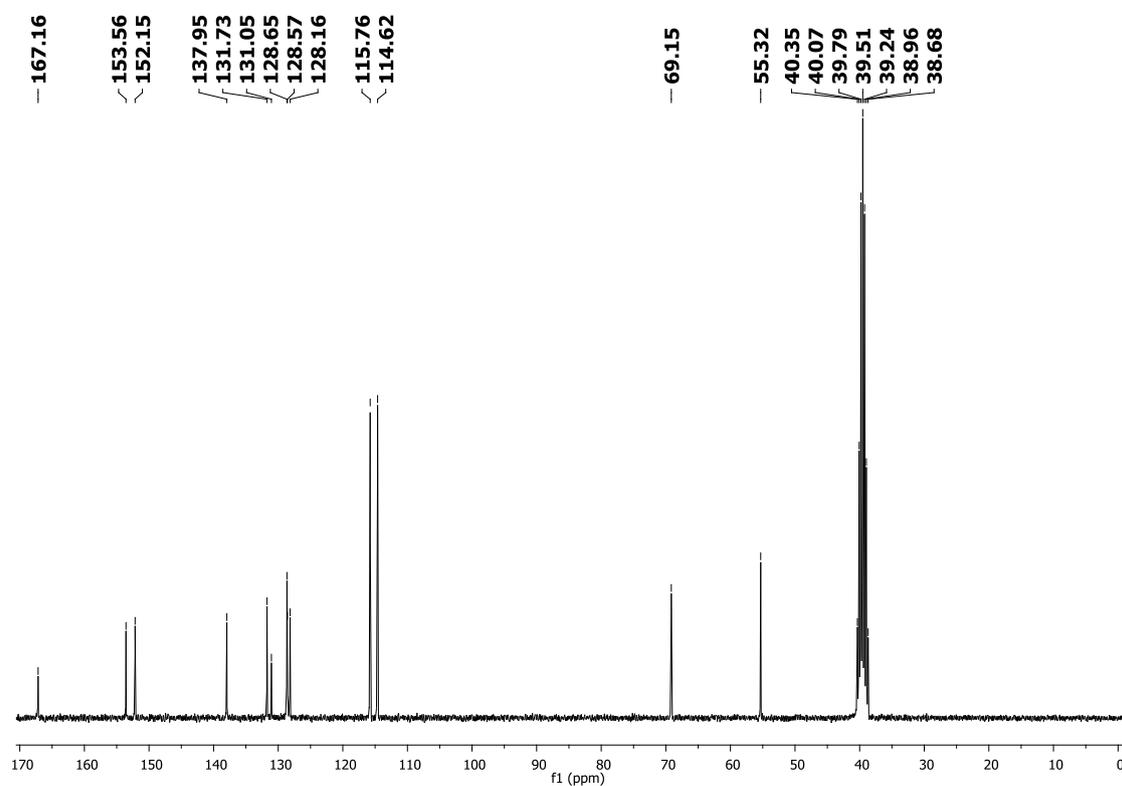
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Failing Factor	Area %	Conc. %
1	12.109	20569663	2945692	0.115	1.621	99.489	99.489
2	12.409	7542	2233	0.056	0.000	0.036	0.036
3	12.487	5630	1618	0.000	0.000	0.027	0.027
4	12.582	16511	3540	0.066	0.000	0.080	0.080
5	13.036	3451	754	0.067	0.000	0.017	0.017
6	13.296	19048	4205	0.068	0.000	0.092	0.092
7	13.505	53542	8924	0.067	0.000	0.259	0.259
Total		20675386	2966966			100.000	

BRANCO



1 AD 1 / 254mm

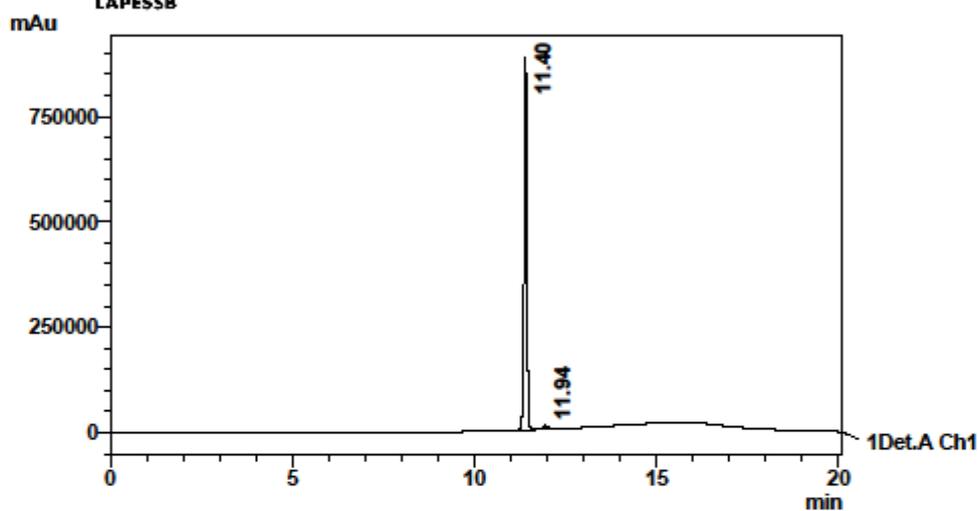
Espectro de RMN ^1H do composto 35 ($\text{DMSO-}d_6$)Espectro de RMN ^{13}C do composto 35 ($\text{DMSO-}d_6$)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 22/11/2017
 Sample: M-ADS10Na 22.11.17
 Vial: 30
 Injection Volume: 40
 Batch:



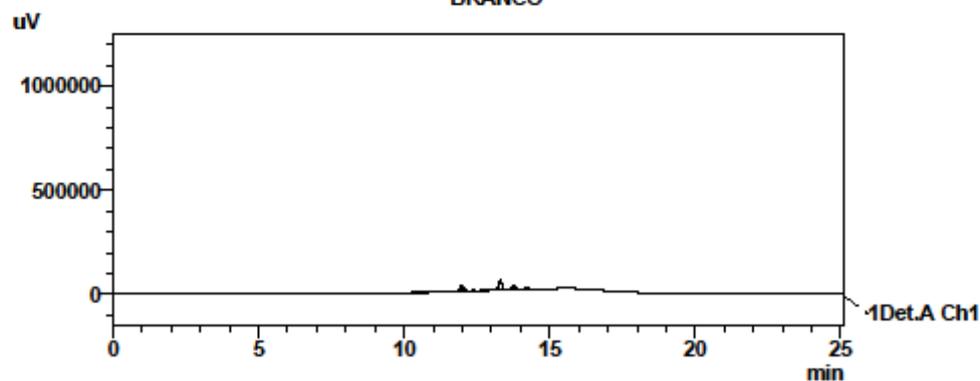
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

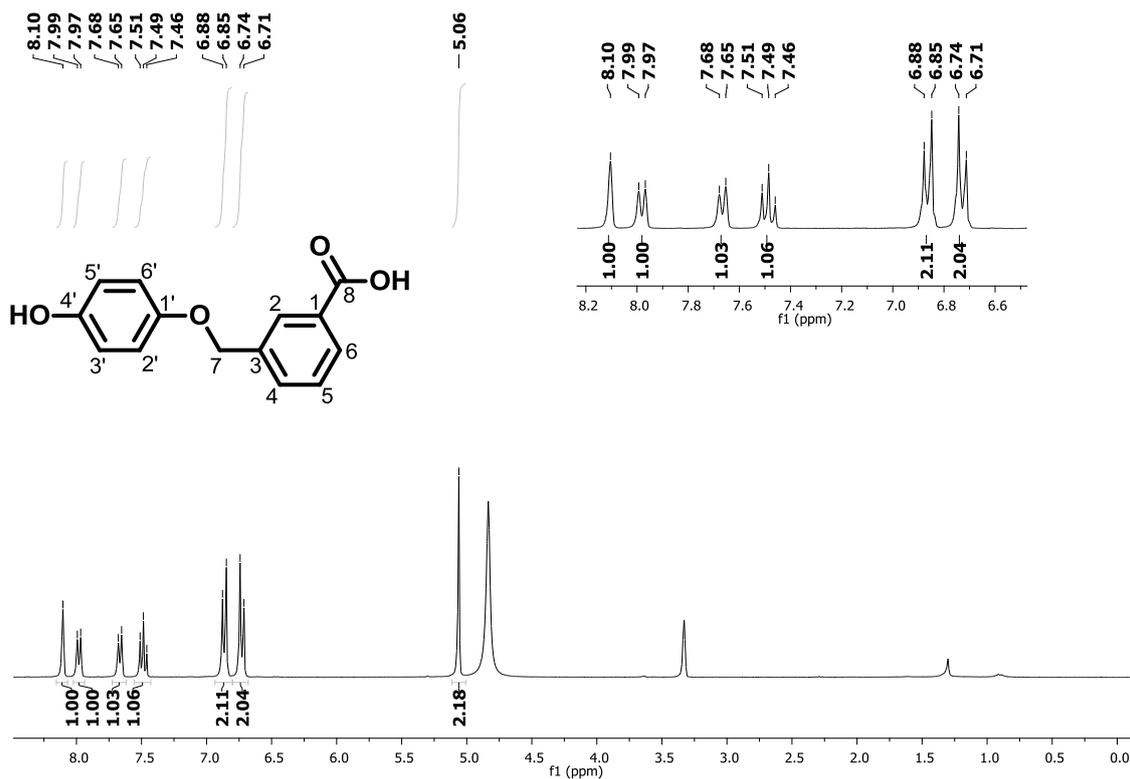
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	11.401	4618126	884441	0.079	1.062	98.635	98.635
2	11.937	63915	7685	0.151	1.749	1.365	1.365
Total		4682041	892126			100.000	

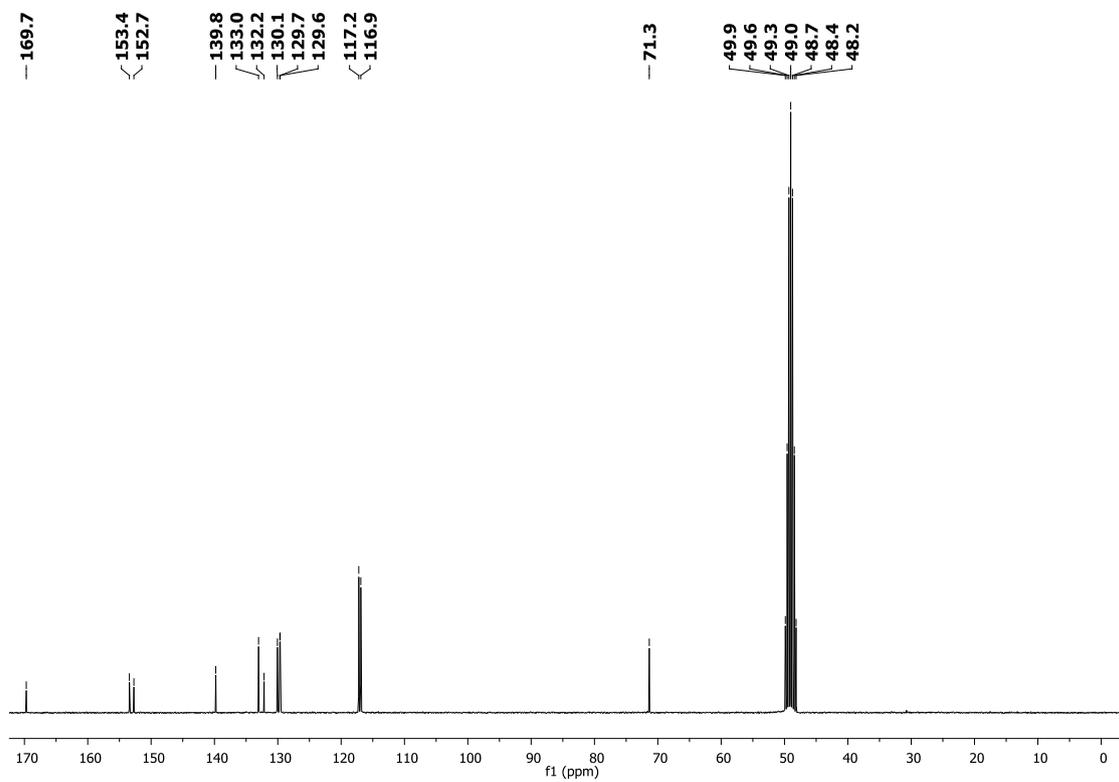
BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 36 (Metanol-*d*₄)



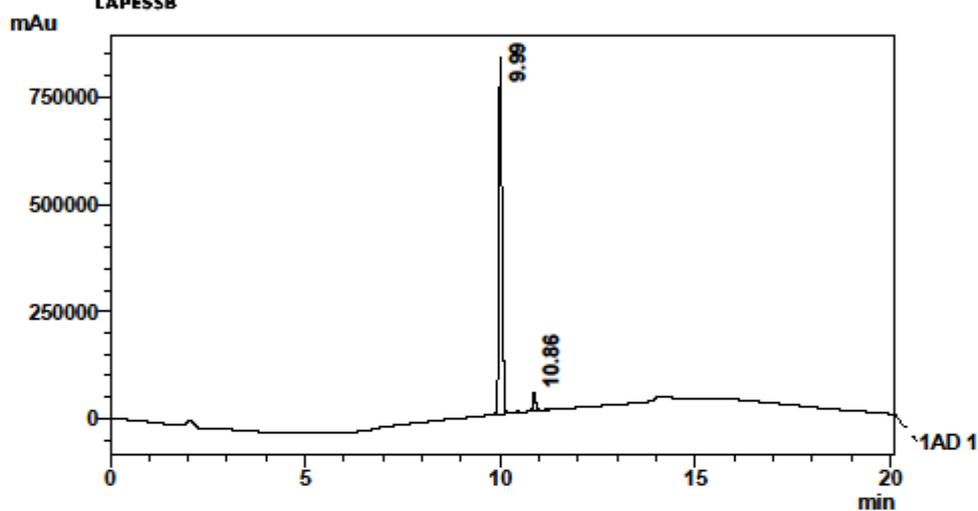
Espectro de RMN ¹³C do composto 36 (Metanol-*d*₄)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS11
 Vial: 8
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

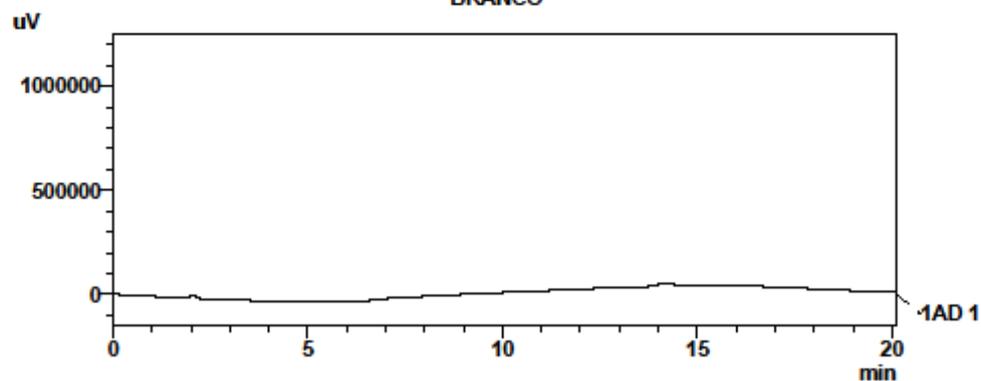


1 AD1 / 254nm

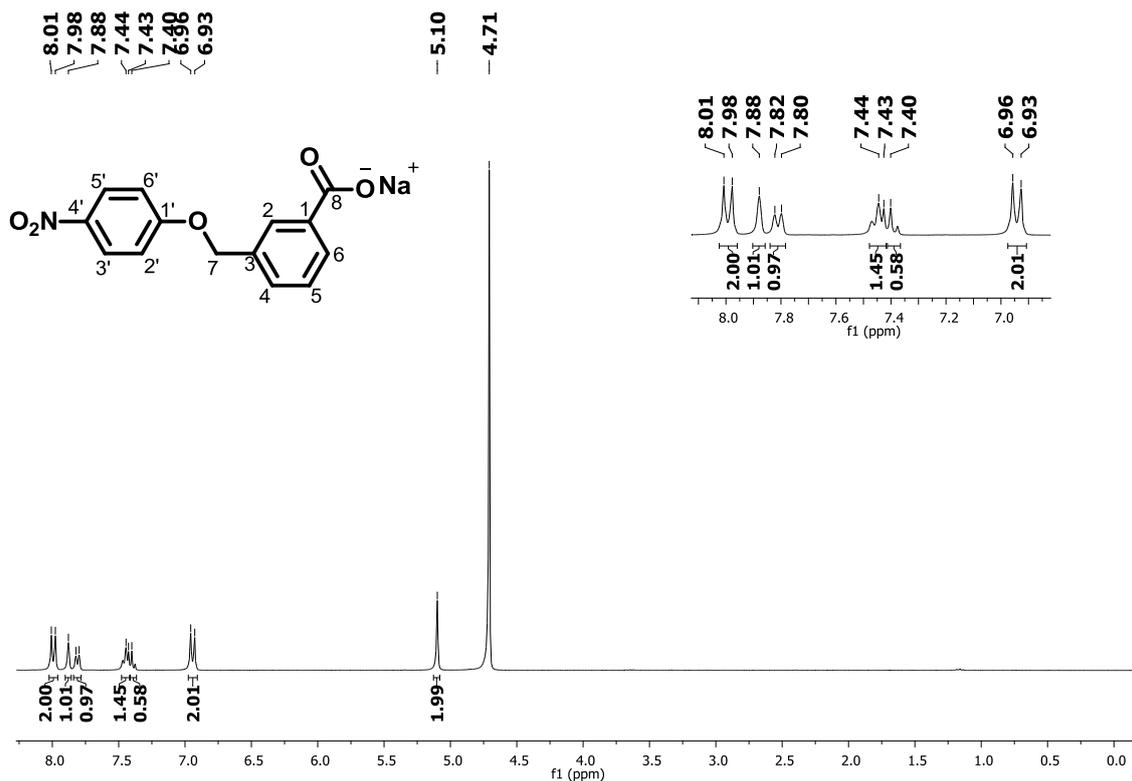
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	9.993	4683904	834038	0.088	1.360	95.676	95.676
2	10.859	211683	40176	0.085	1.774	4.324	4.324
Total		4895586	874214			100.000	

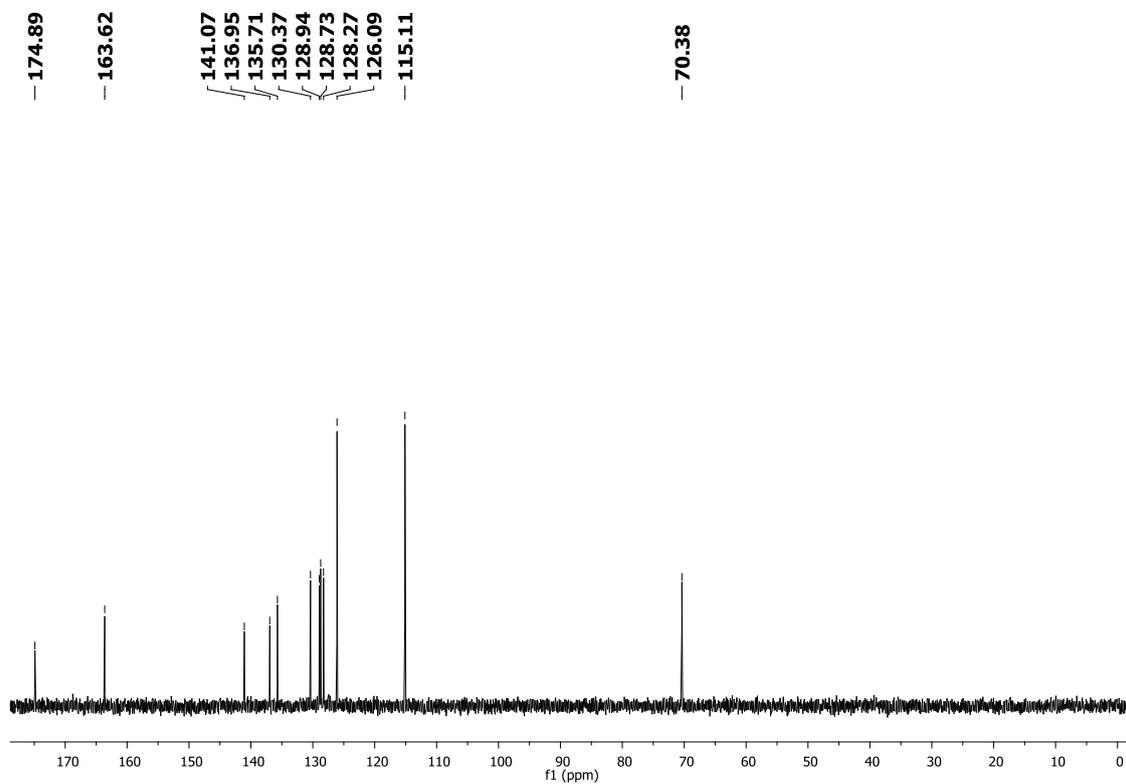
BRANCO



1 AD1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 37 (D₂O)



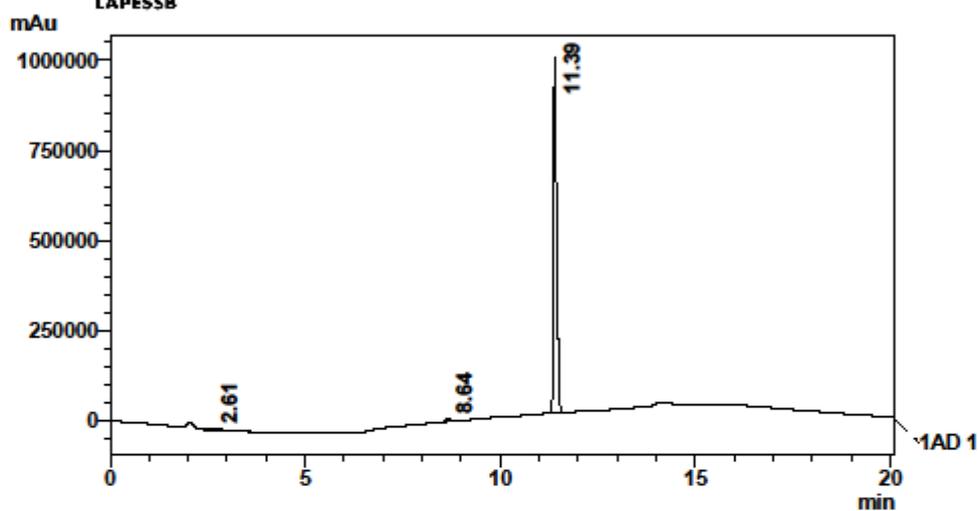
Espectro de RMN ¹³C do composto 37 (D₂O)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 27/6/2018
 Sample: M-ADS12
 Vial: 13
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



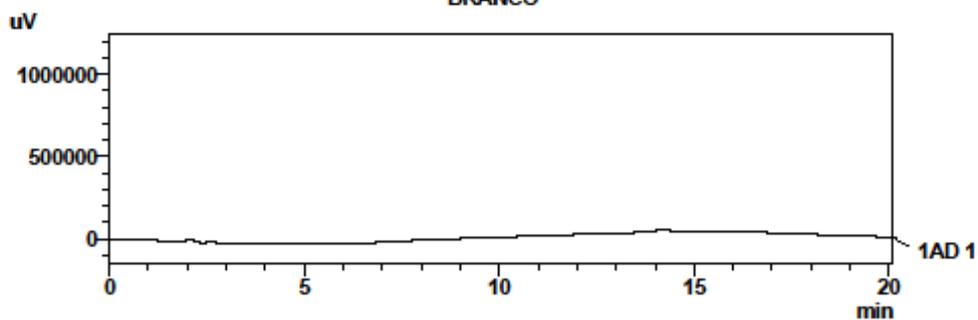
1 AD1 / 254nm

PeakTable

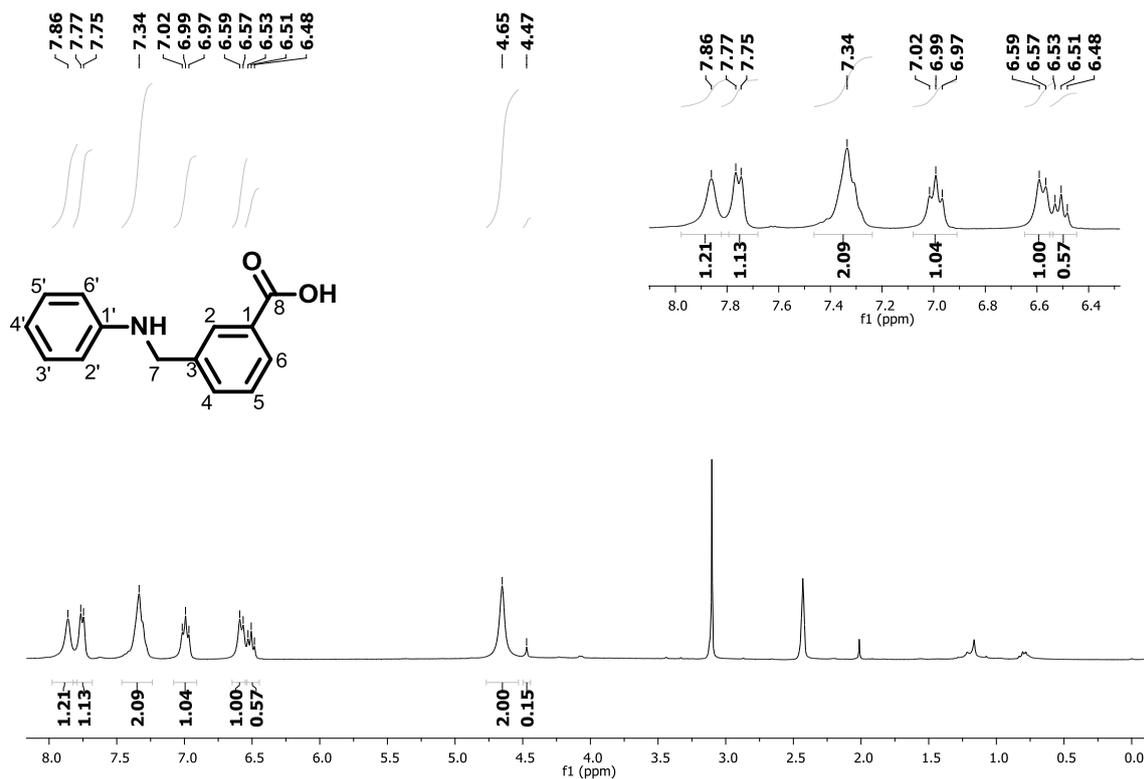
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Skewing Factor	Area %	Conc. %
1	2.614	77194	2241	0.548	3.032	1.393	0.000
2	8.637	68657	7468	0.152	1.209	1.239	1.257
3	11.388	5394282	986908	0.089	1.772	97.367	98.743
Total		5540133	996617			100.000	

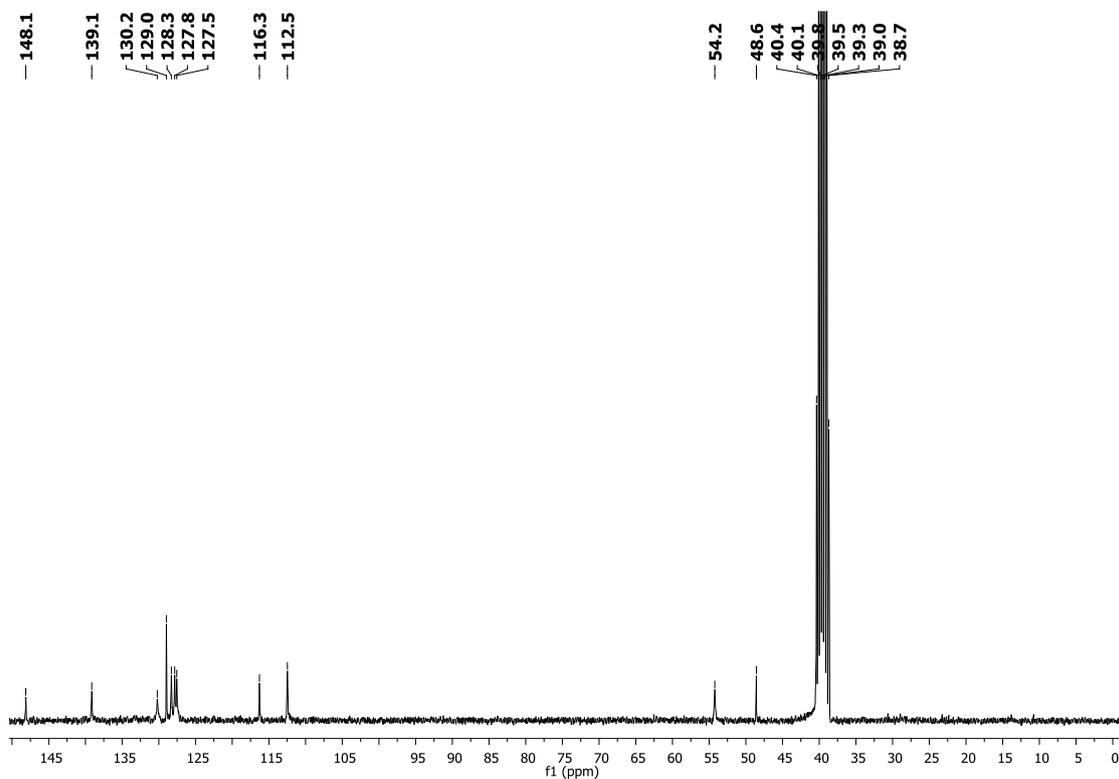
BRANCO



1 AD1 / 254nm



Espectro de RMN ^1H do composto 39 (DMSO- d_6)



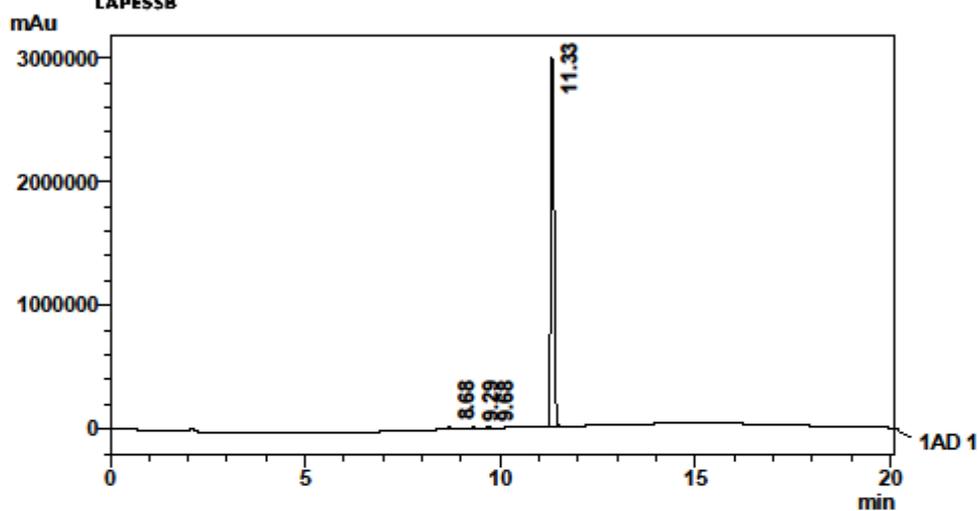
Espectro de RMN ^{13}C do composto 39 (DMSO- d_6)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 16/7/2018
 Sample: M-ADS20
 Vial: 2
 Injection Volume: 20
 Batch: batch 16-07-18.lcb



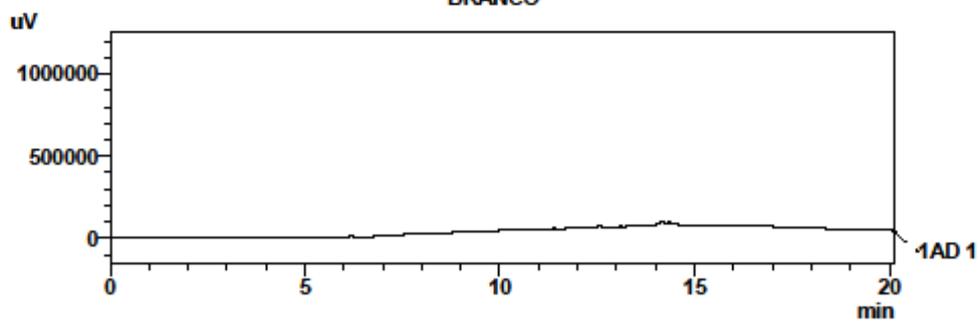
1 AD1 / 254nm

PeakTable

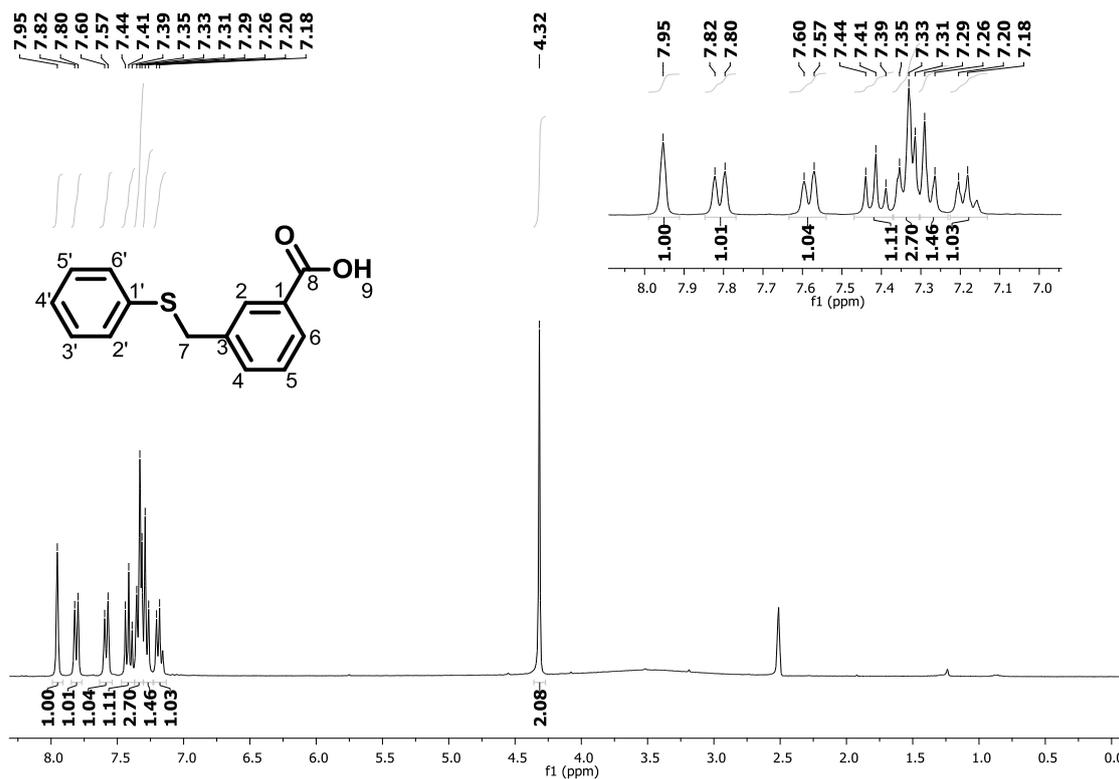
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Symmetry Factor	Area %	Conc. %
1	8.684	151706	22477	0.106	1.126	0.859	0.859
2	9.293	56142	11562	0.077	1.153	0.318	0.318
3	9.676	49616	9768	0.080	1.261	0.281	0.281
4	11.326	17403160	2987390	0.096	1.399	98.542	98.542
Total		17660623	3031197			100.000	

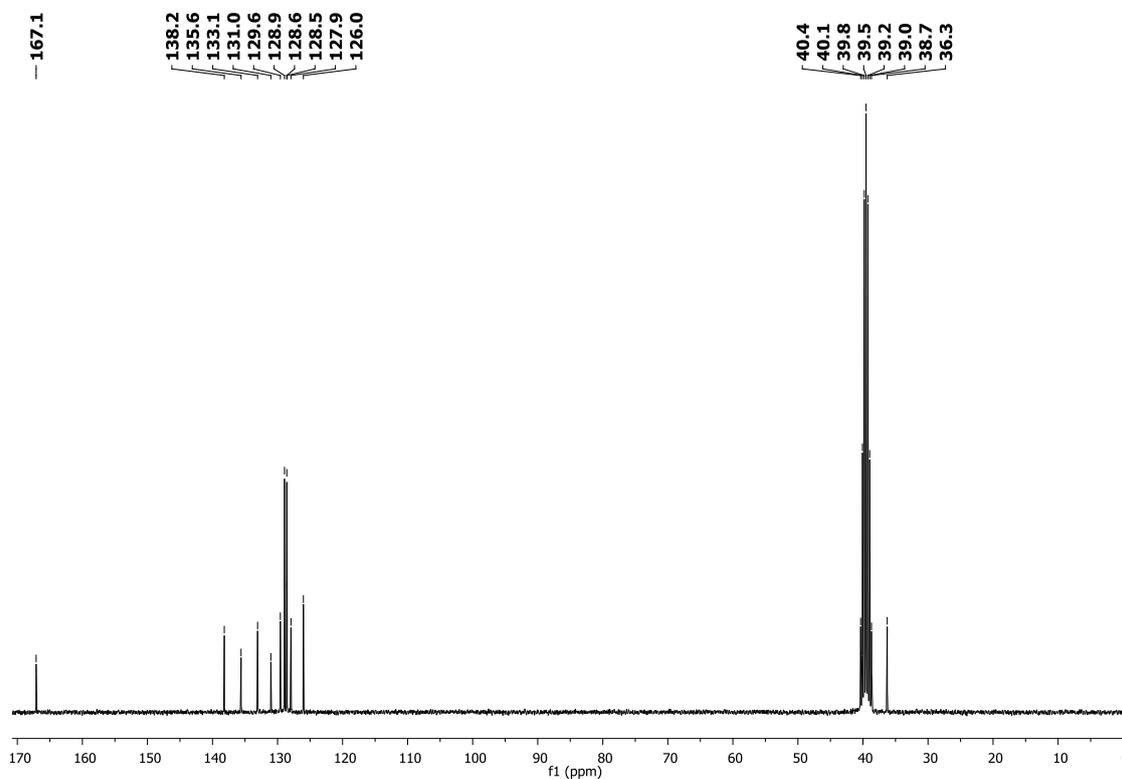
BRANCO



1 AD1 / 254nm



Espectro de RMN ^1H do composto 40 (DMSO- d_6)



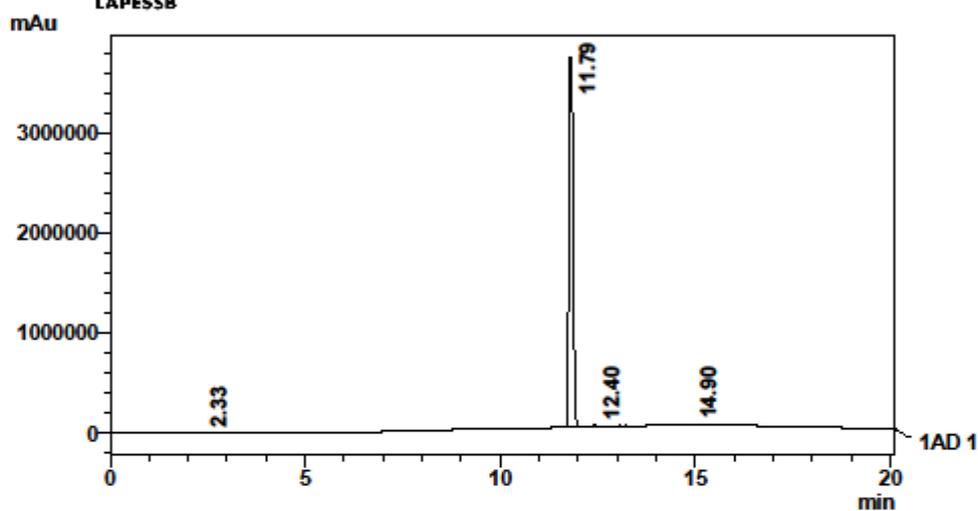
Espectro de RMN ^{13}C do composto 40 (DMSO- d_6)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS21
 Vial: 0
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



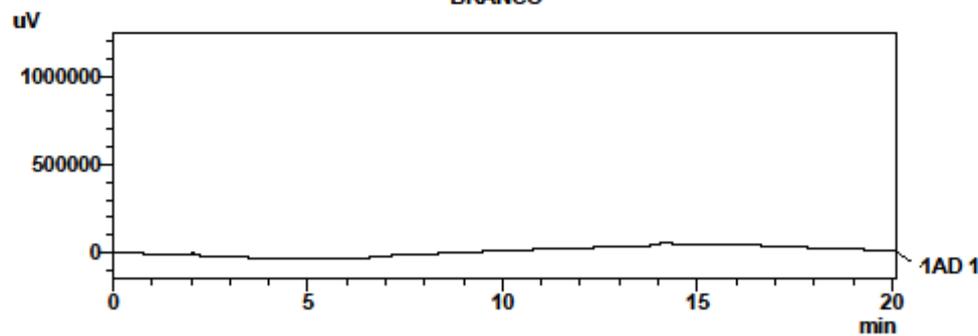
1 AD1 / 254nm

PeakTable

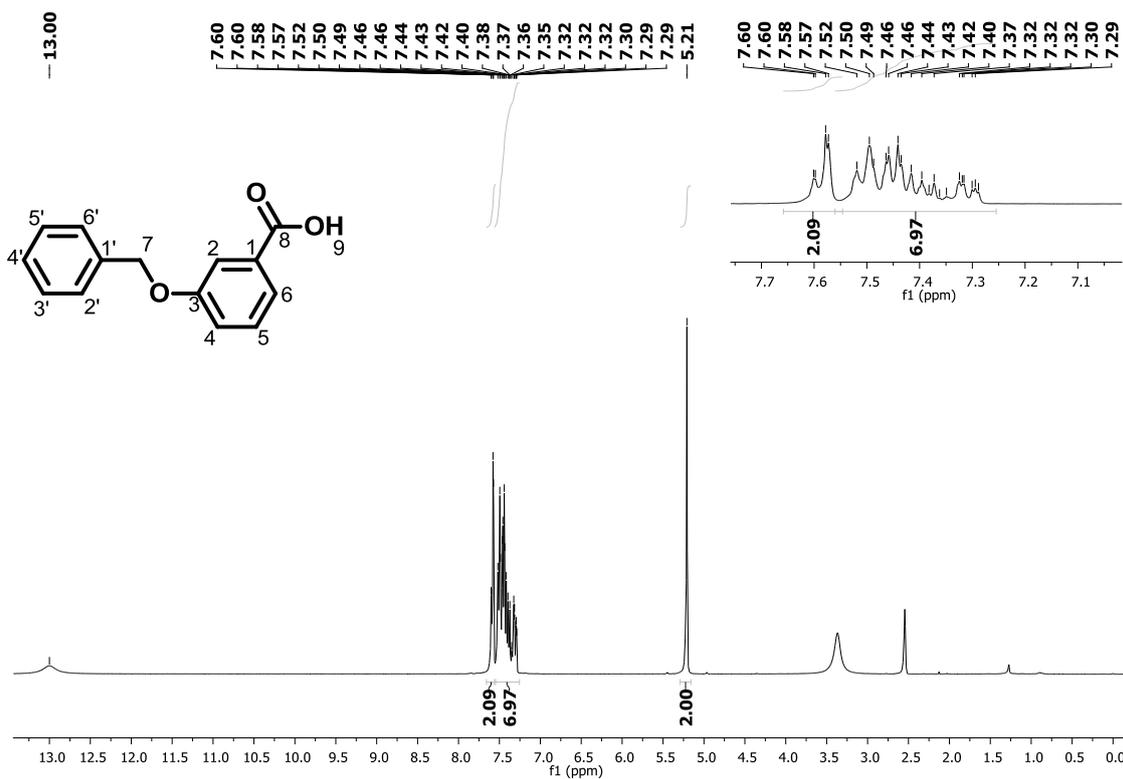
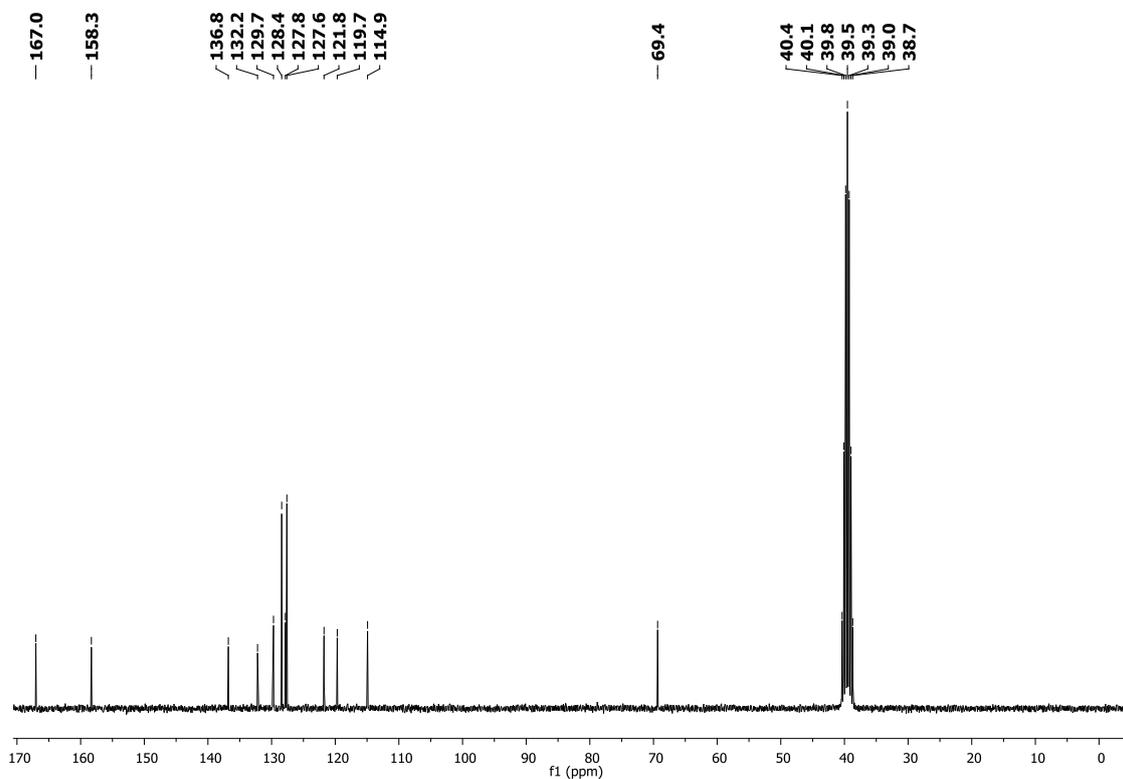
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	2.329	9528	3919	0.039	1.274	0.034	0.034
2	11.793	27596089	3699085	0.121	1.578	99.698	99.698
3	12.405	49995	9566	0.080	1.675	0.181	0.181
4	14.895	24103	4596	0.063	0.831	0.087	0.087
Total		27670744	3747467			100.000	

BRANCO



1 AD1 / 254nm

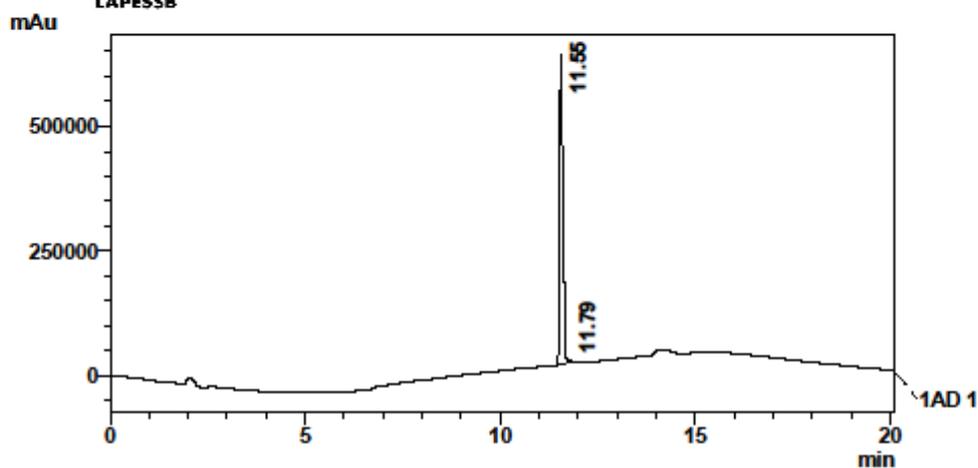
Espectro de RMN ^1H do composto 41 (DMSO- d_6)Espectro de RMN ^{13}C do composto 41 (DMSO- d_6)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS24
 Vial: 4
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb

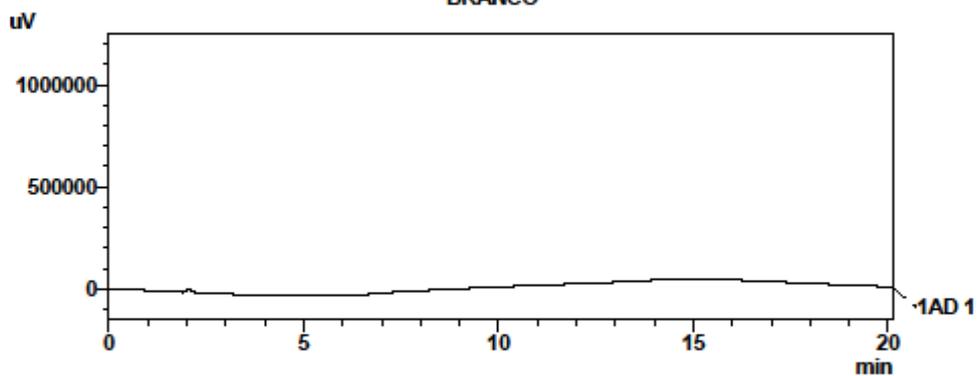


1 AD 1 / 254nm

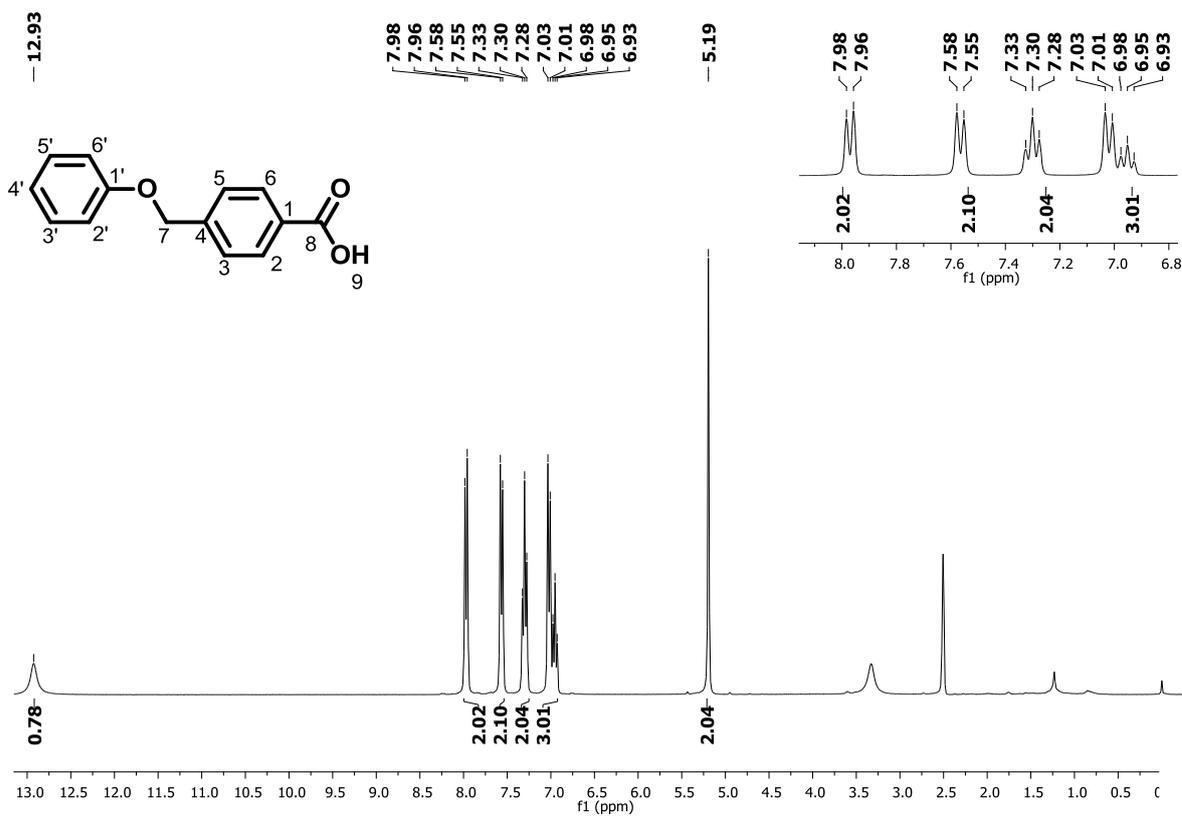
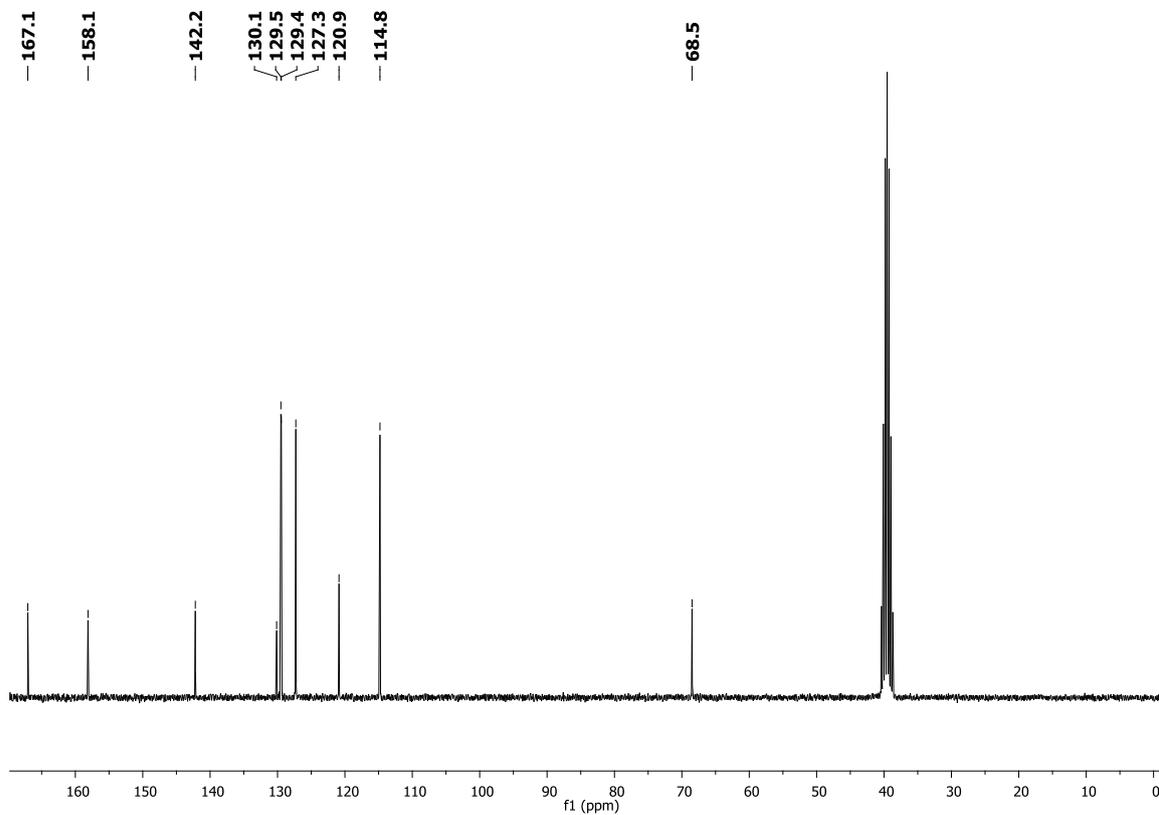
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.553	3587946	622245	0.094	1.744	99.032	99.032
2	11.794	35088	7297	0.078	1.794	0.968	0.968
Total		3623034	629541			100.000	

BRANCO



1 AD 1 / 254nm

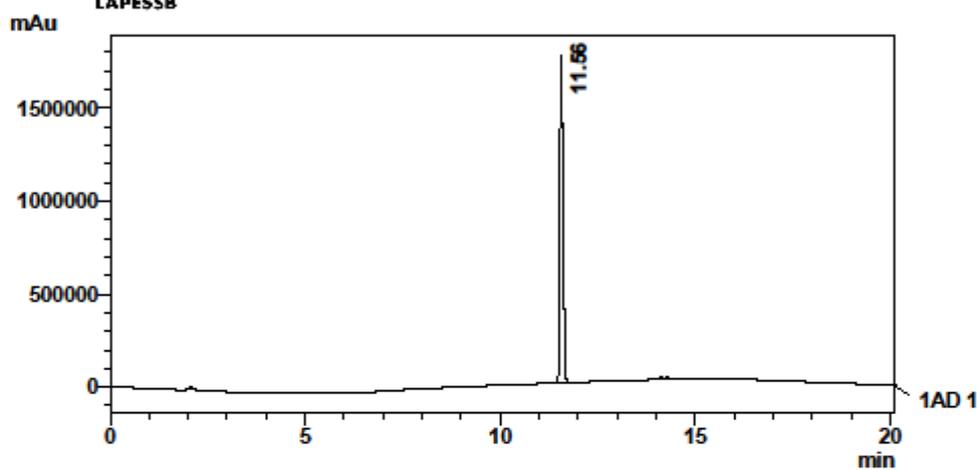
Espectro de RMN ¹H do composto 42 (DMSO-d₆)Espectro de RMN ¹³C do composto 42 (DMSO-d₆)

LAPES SB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra

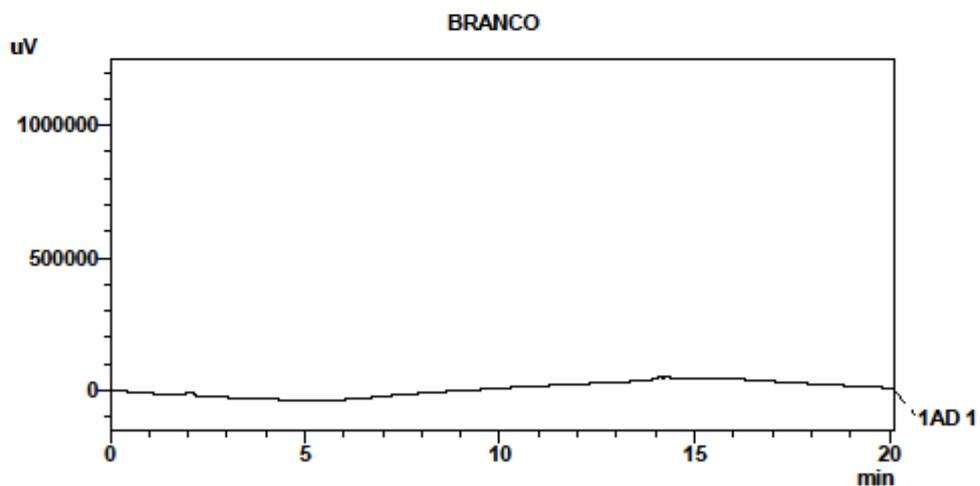


Date: 17/7/2018
 Sample: MB872K
 Vial: 4
 Injection Volume: 20
 Batch: batch 16-07-18.lcb

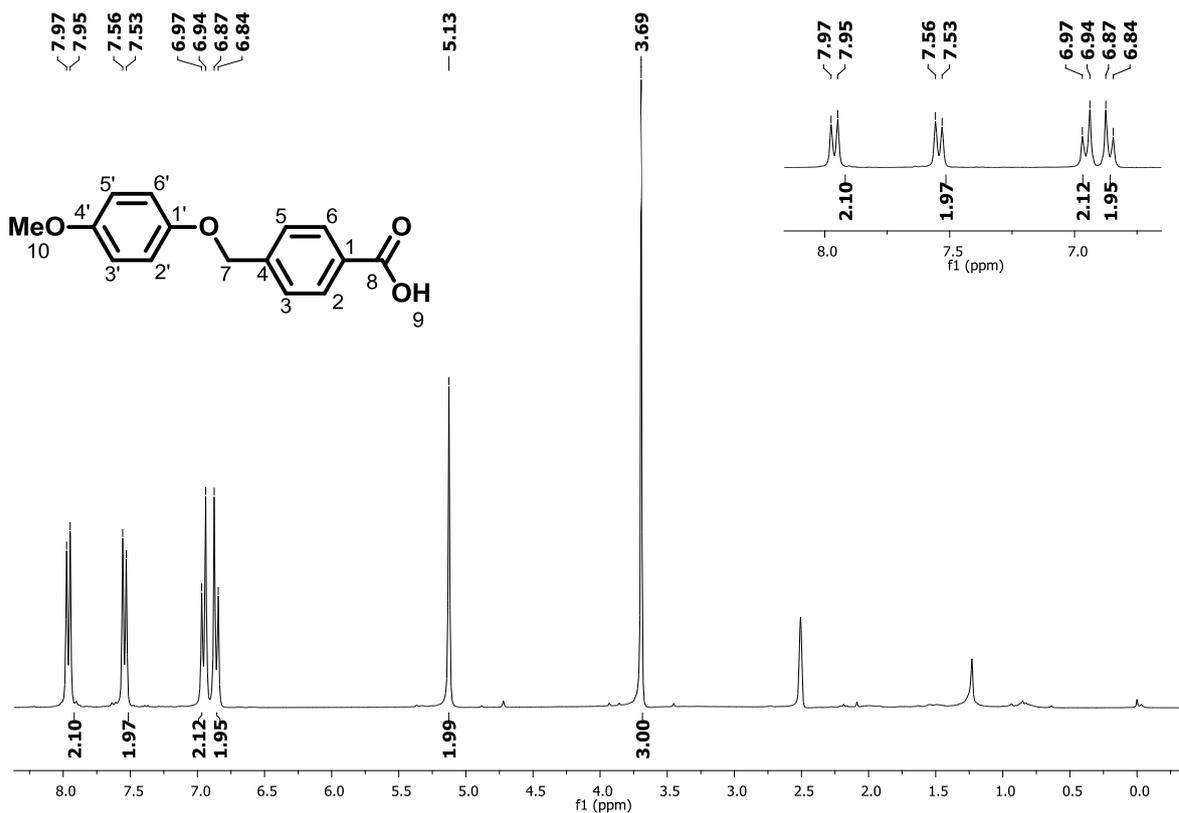
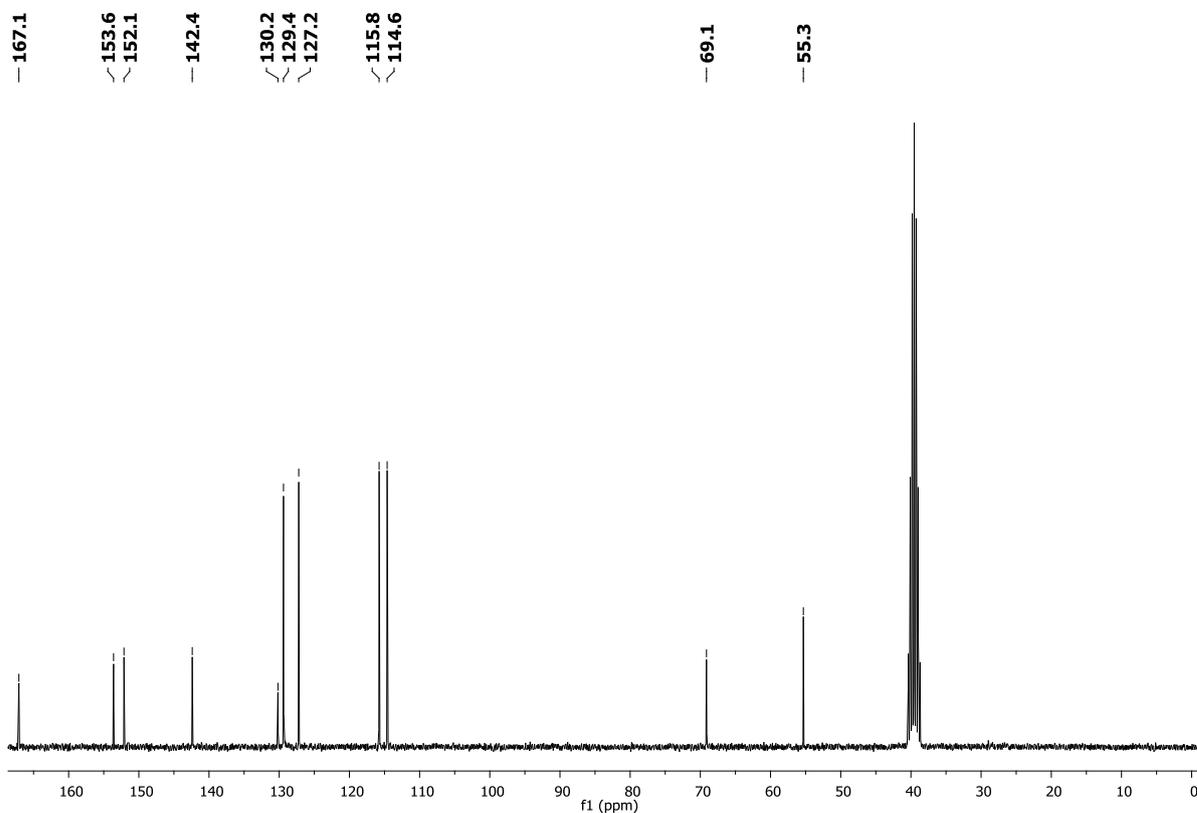


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	11.561	9944240	1763678	0.092	1.507	100.000	100.000
Total		9944240	1763678			100.000	



1 AD 1 / 254nm

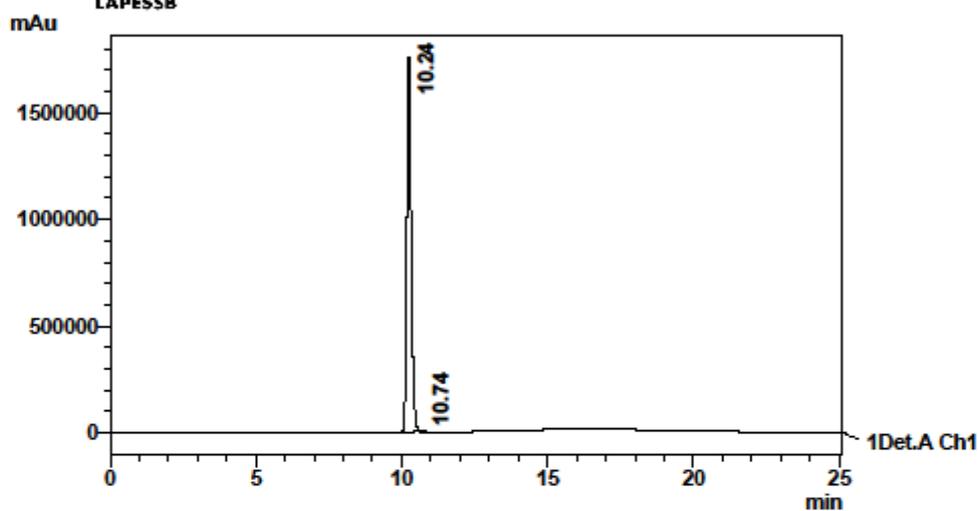
Espectro de RMN ¹H do composto 43 (DMSO-*d*₆)Espectro de RMN ¹³C do composto 43 (DMSO-*d*₆)

LAPESB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 20/10/2016
 Sample: ADS10 20-10-16
 Vial: 30
 Injection Volume: 20
 Batch:



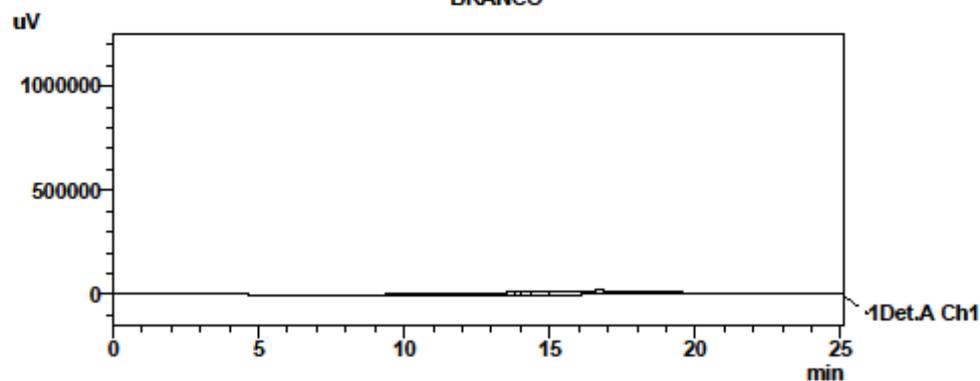
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

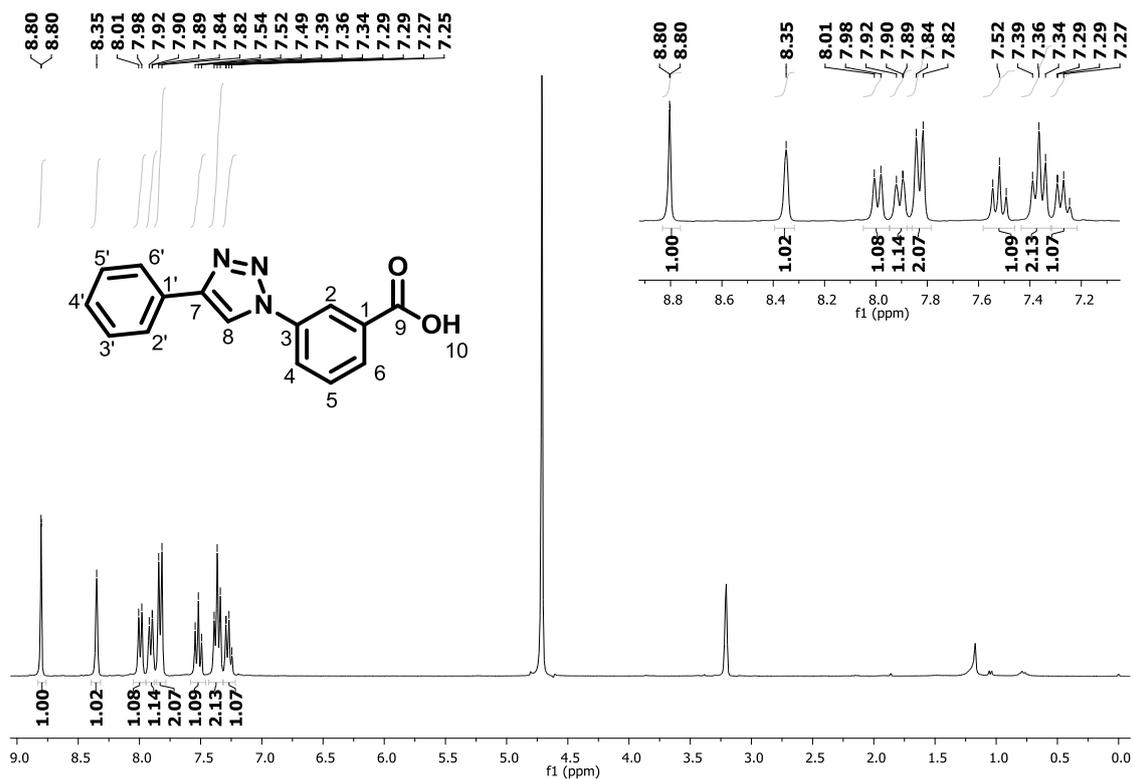
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Resolution	Area %	Conc. %
1	10.237	18423279	1759053	0.158	1.280	99.892	99.892
2	10.737	19924	5031	0.100	1.152	0.108	0.108
Total		18443203	1764084			100.000	

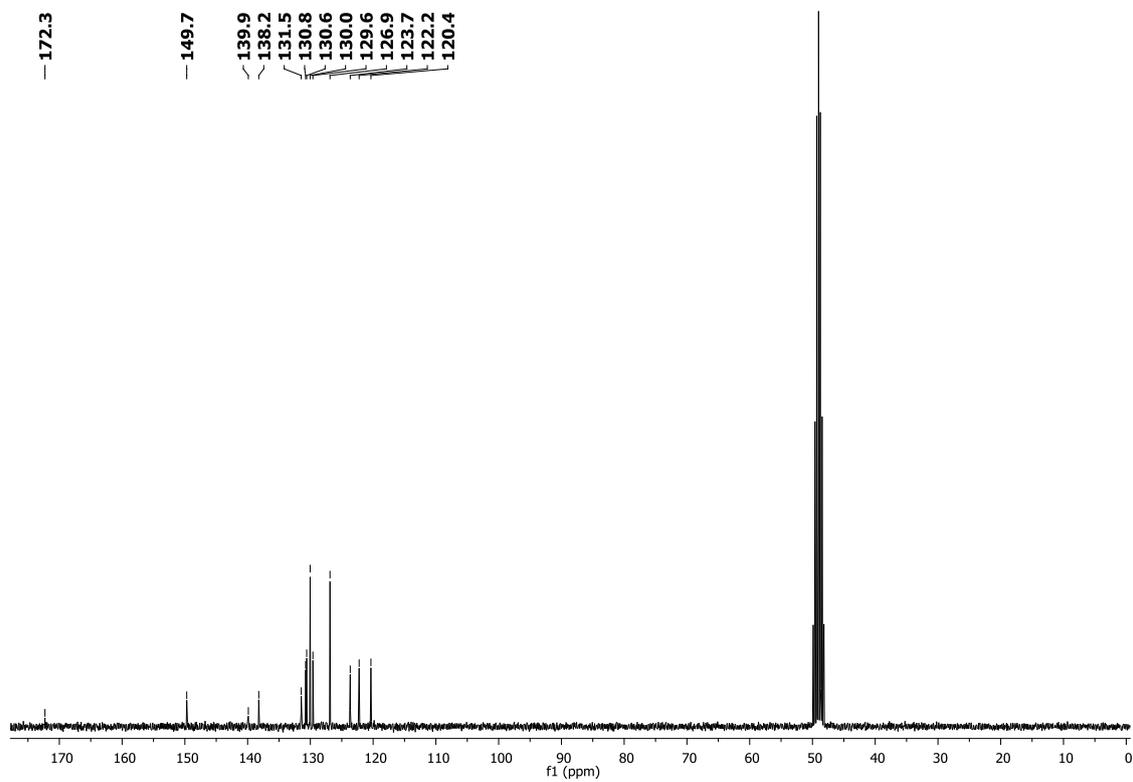
BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm



Espectro de RMN ^1H do composto 44 (Metanol- d_4)



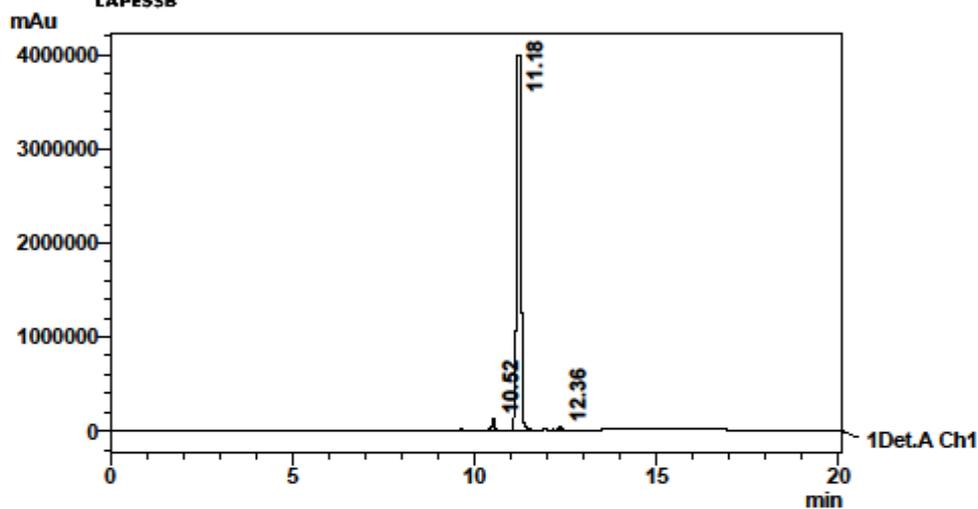
Espectro de RMN ^{13}C do composto 44 (Metanol- d_4)

LAPES SB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 22/11/2017
 Sample: M-ADS29Na 22.11.17
 Vial: 30
 Injection Volume: 40
 Batch:



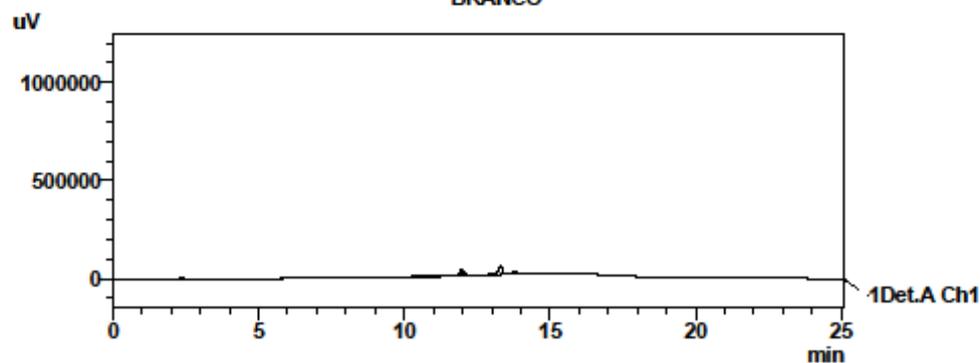
1 Det.A Ch1 / 254nm

PeakTable

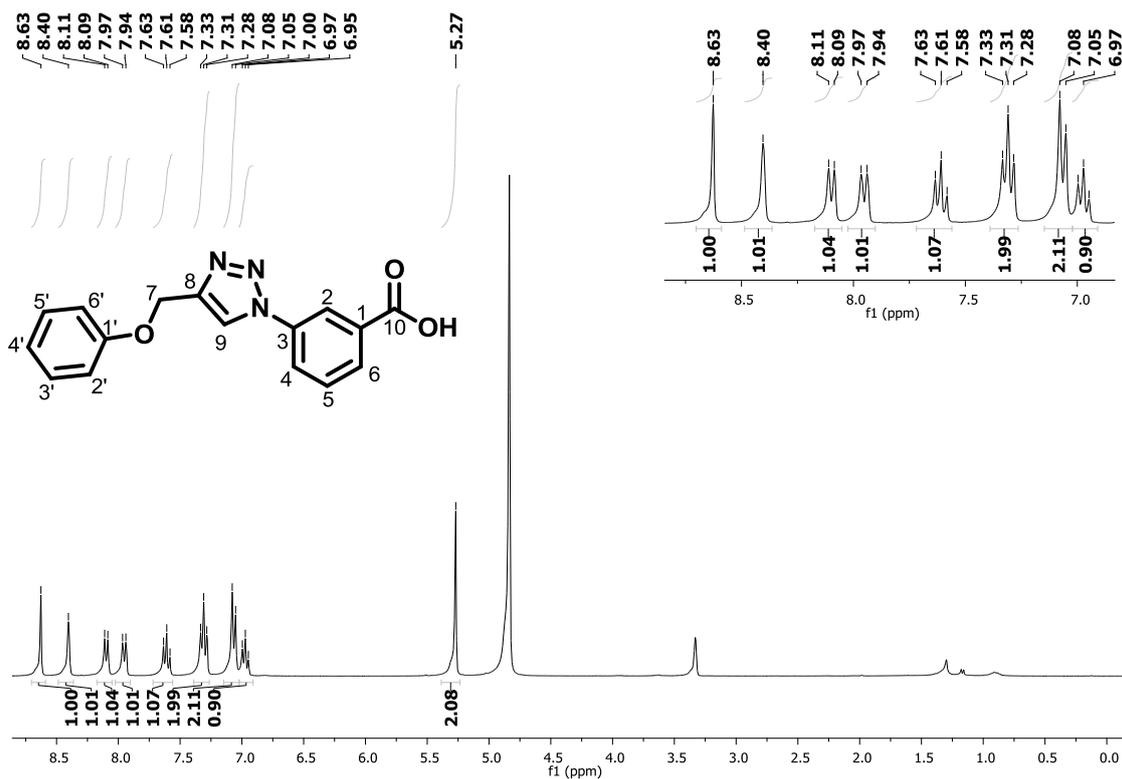
Detector A Ch1 254nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Asymmetry Factor	Area %	Conc. %
1	10.519	637036	122329	0.075	0.847	1.636	1.636
2	11.175	38149521	3991018	0.147	1.585	97.959	97.959
3	12.362	157942	31832	0.077	1.156	0.406	0.406
Total		38944498	4145179			100.000	

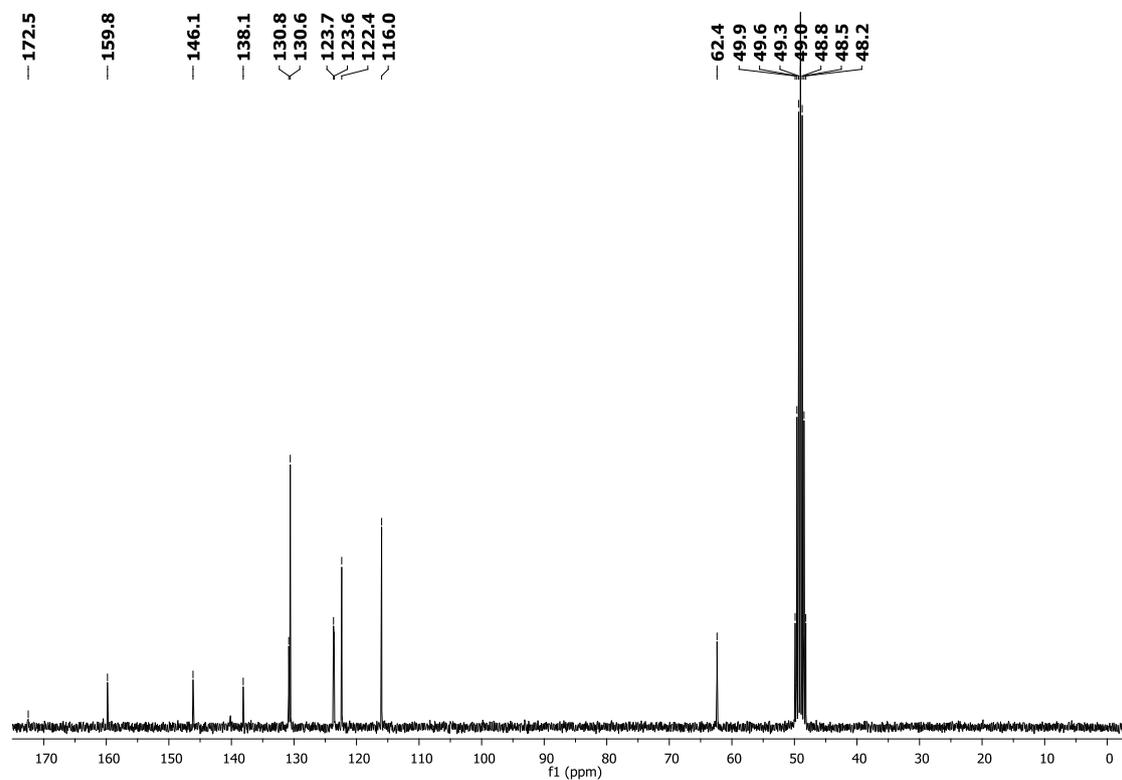
BRANCO



1 Det.A Ch1 / 254nm



Espectro de RMN ¹H do composto 45 (Metanol-*d*₄)



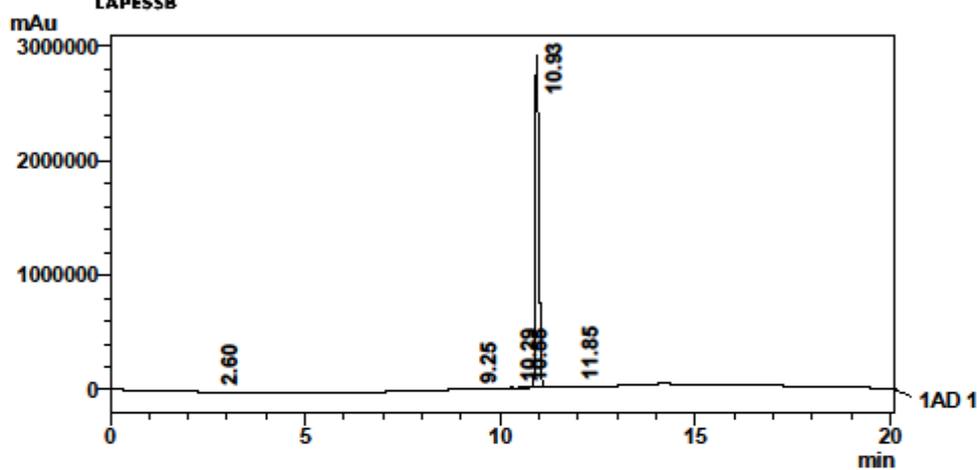
Espectro de RMN ¹³C do composto 45 (Metanol-*d*₄)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



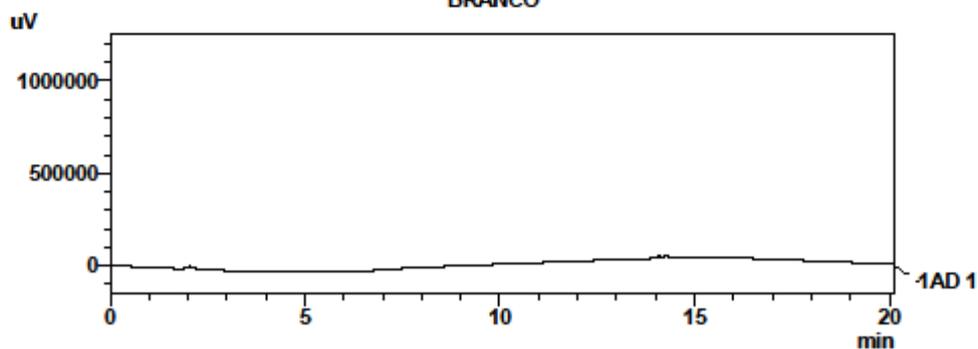
Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS100Na
 Vial: 9
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



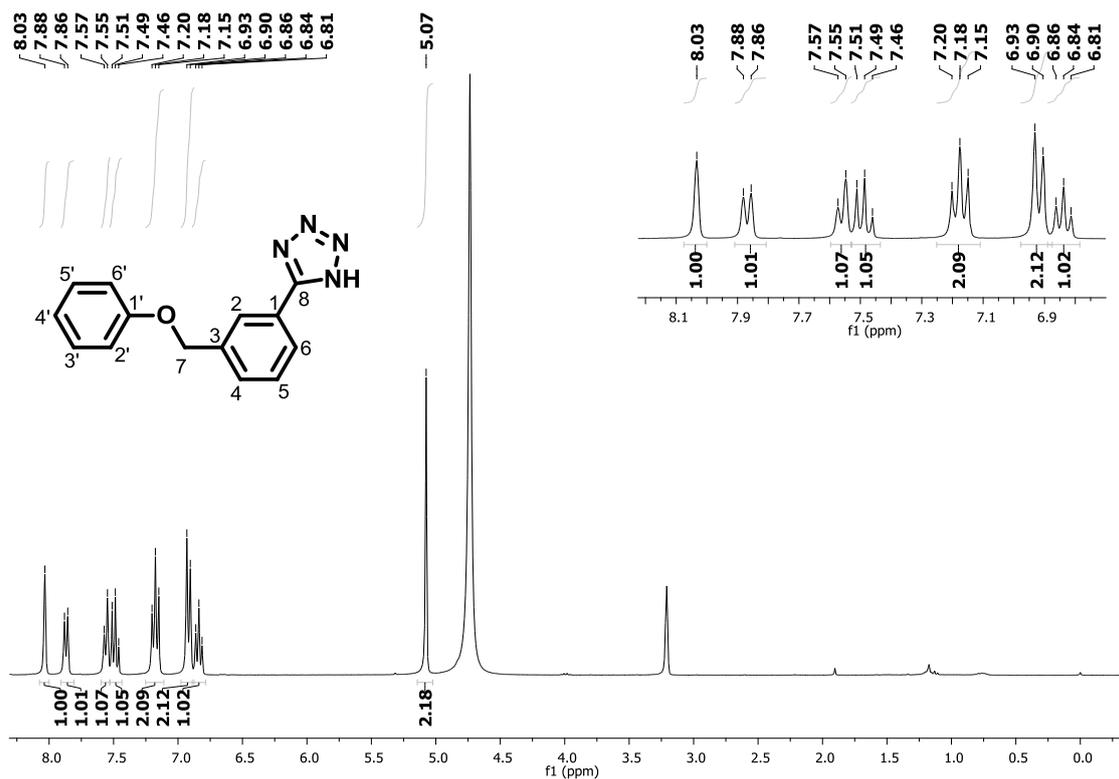
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	2.604	79765	2261	0.563	3.254	0.420	0.420
2	9.250	18766	3019	0.095	0.000	0.099	0.099
3	10.285	57265	3114	0.123	0.000	0.301	0.301
4	10.552	62398	6624	0.152	0.000	0.328	0.328
5	10.935	18746754	2908465	0.106	1.499	98.684	98.684
6	11.854	31867	7486	0.062	1.471	0.168	0.168
Total		18996815	2930969			100.000	

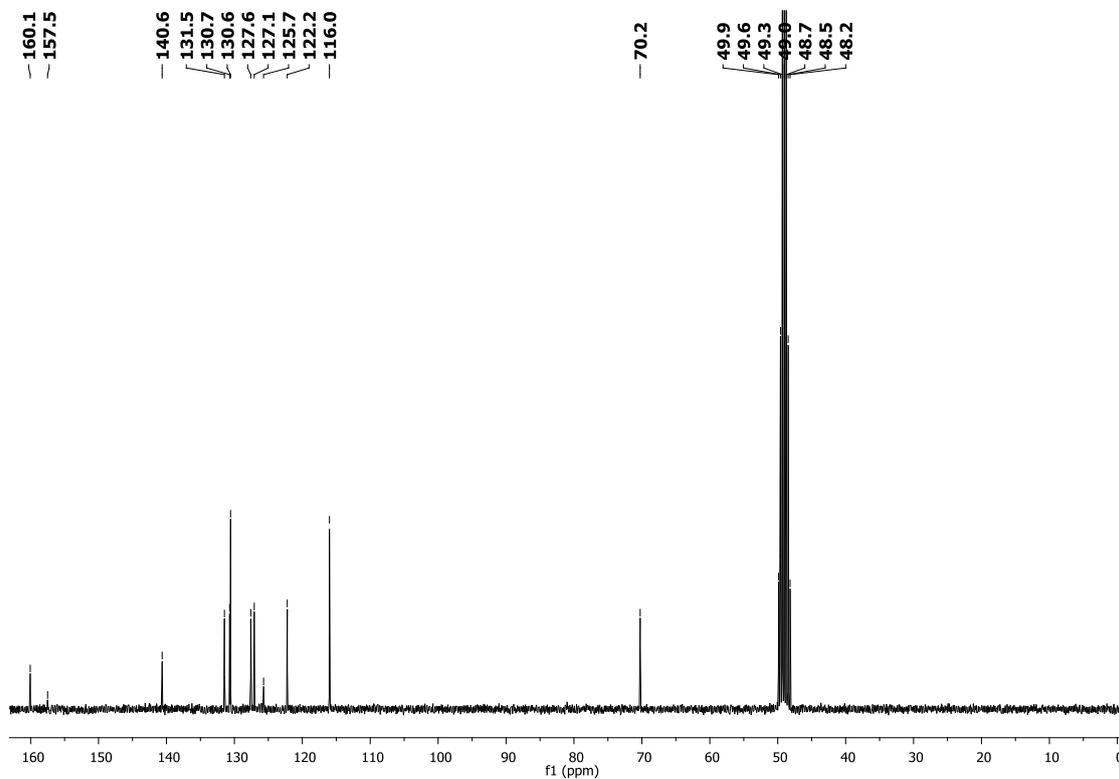
BRANCO



1 AD1/254nm



Espectro de RMN ^1H do composto 46 (Metanol- d_4)



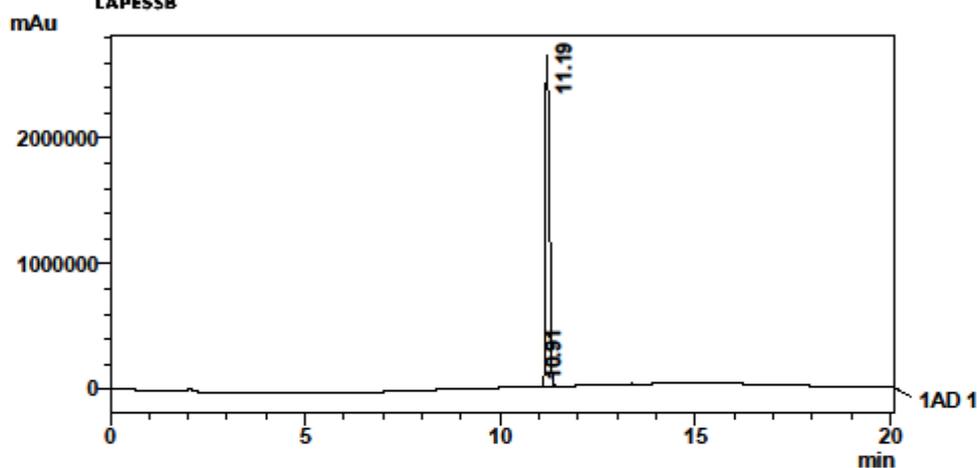
Espectro de RMN ^{13}C do composto 46 (Metanol- d_4)

LAPESSB
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CENTRAL ANALÍTICA

Informações da Amostra



Date: 26/6/2018
 Sample: M-ADS33
 Vial: 7
 Injection Volume: 20
 Batch: batch.lcb



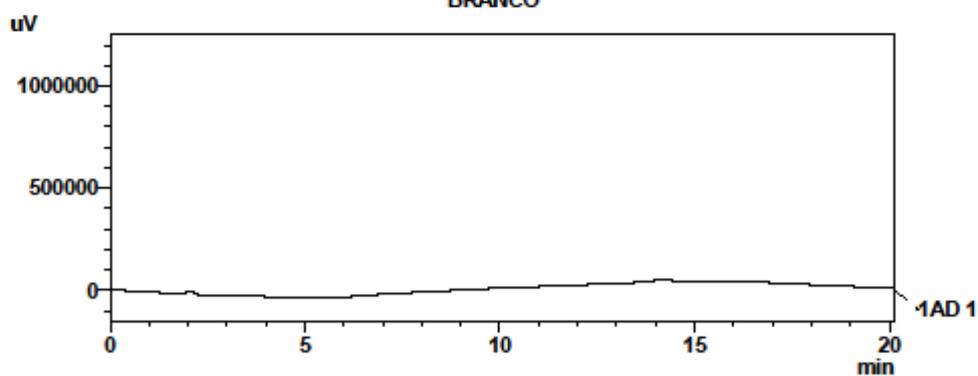
1 AD1/254nm

PeakTable

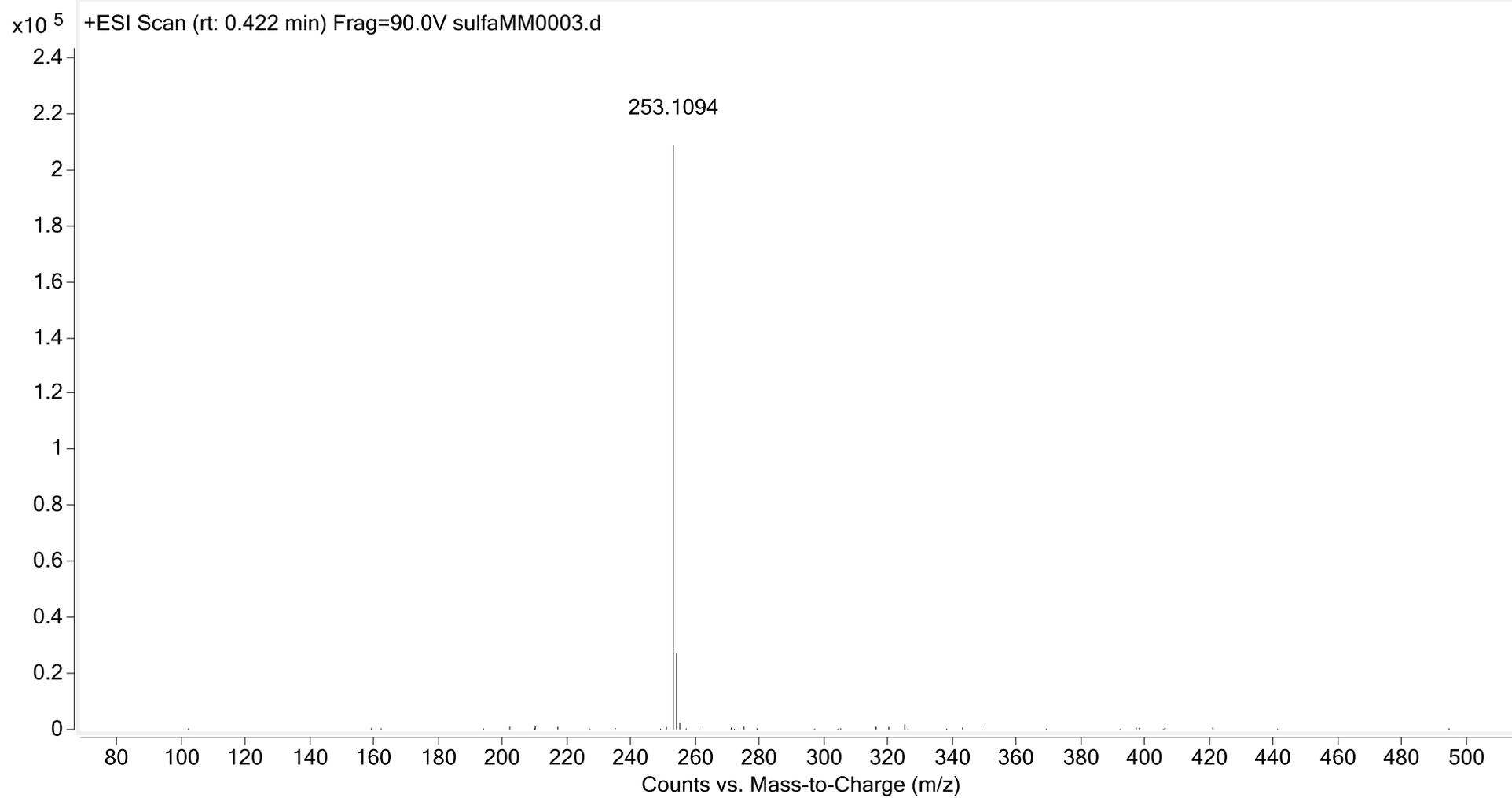
Ch1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Width at 50% Height	Tailing Factor	Area %	Conc. %
1	10.906	29555	3629	0.134	0.000	0.158	0.158
2	11.192	18718891	2643454	0.119	1.560	99.842	99.842
Total		18748446	2647083			100.000	

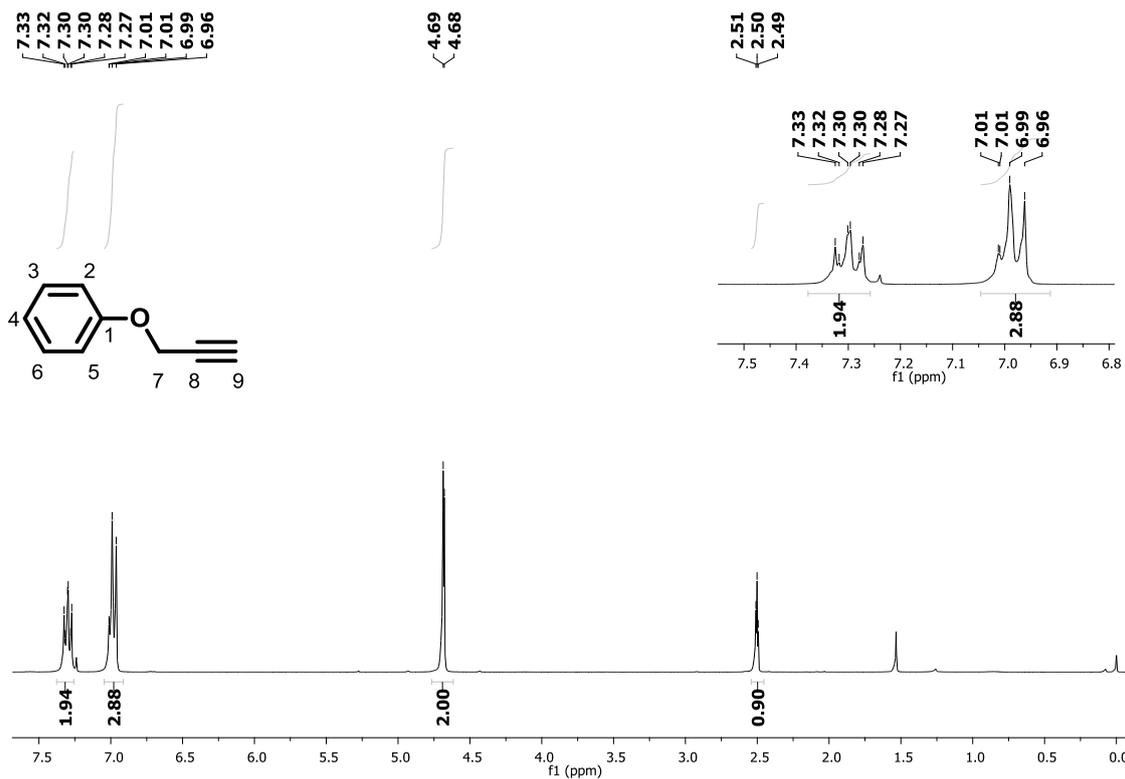
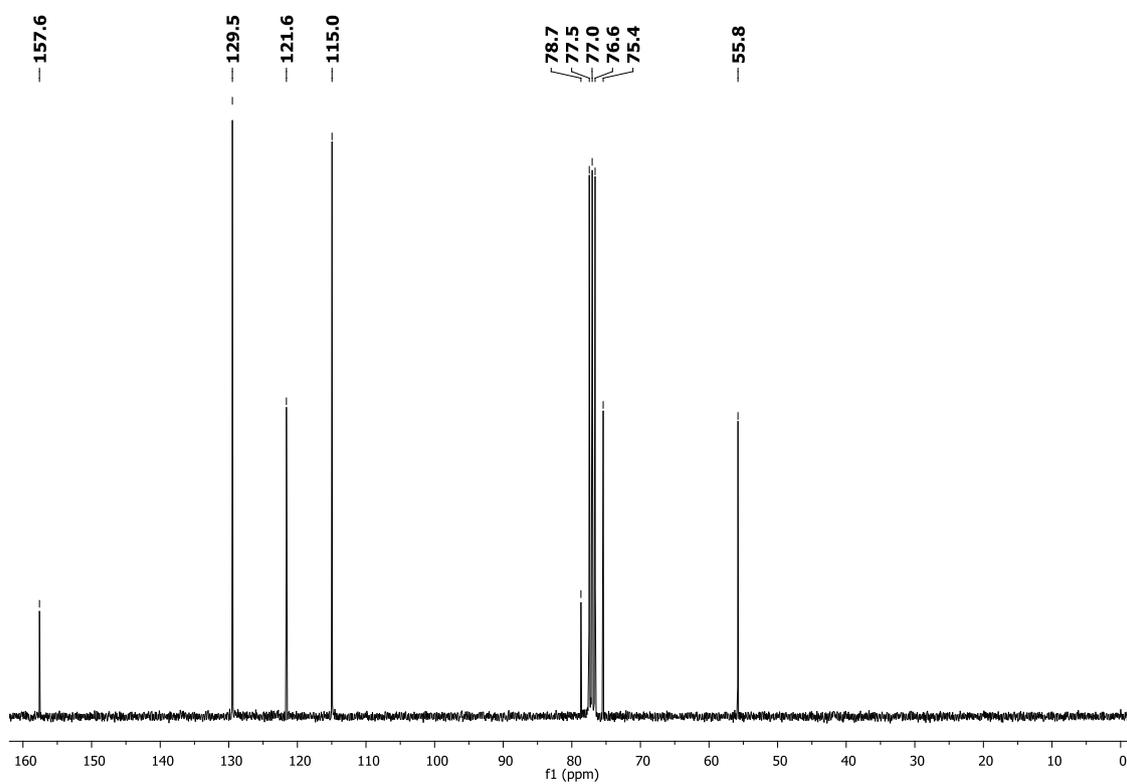
BRANCO

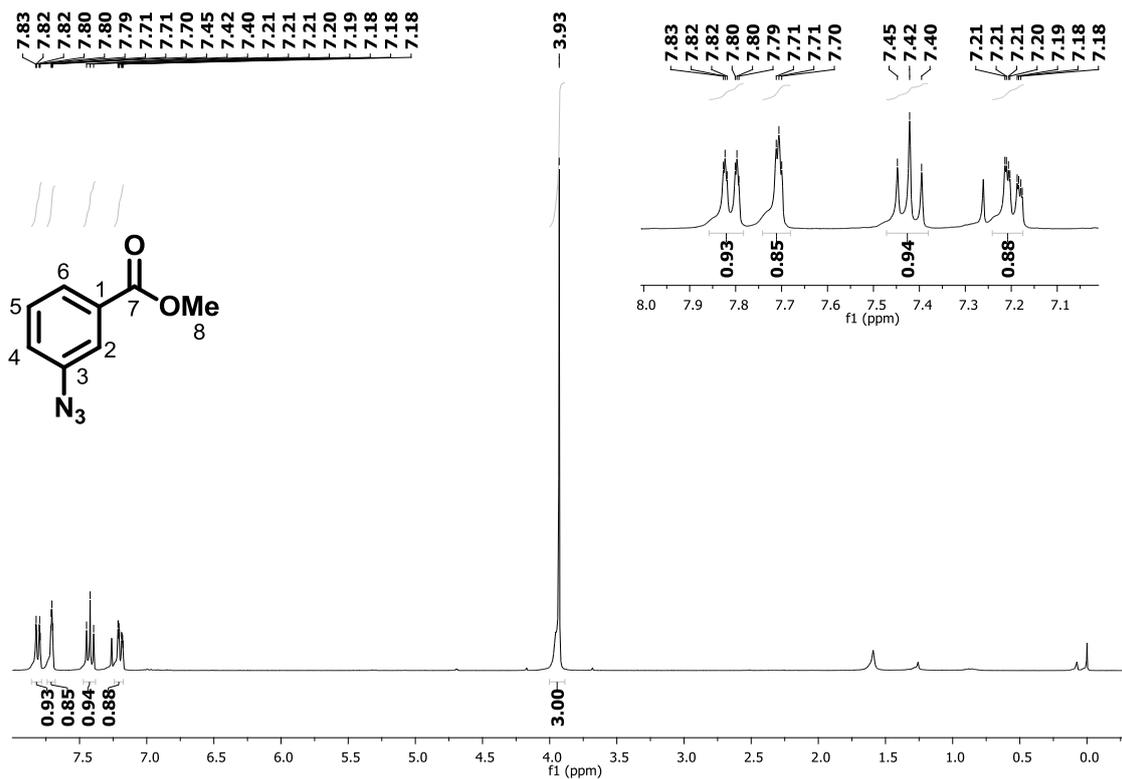


1 AD1/254nm

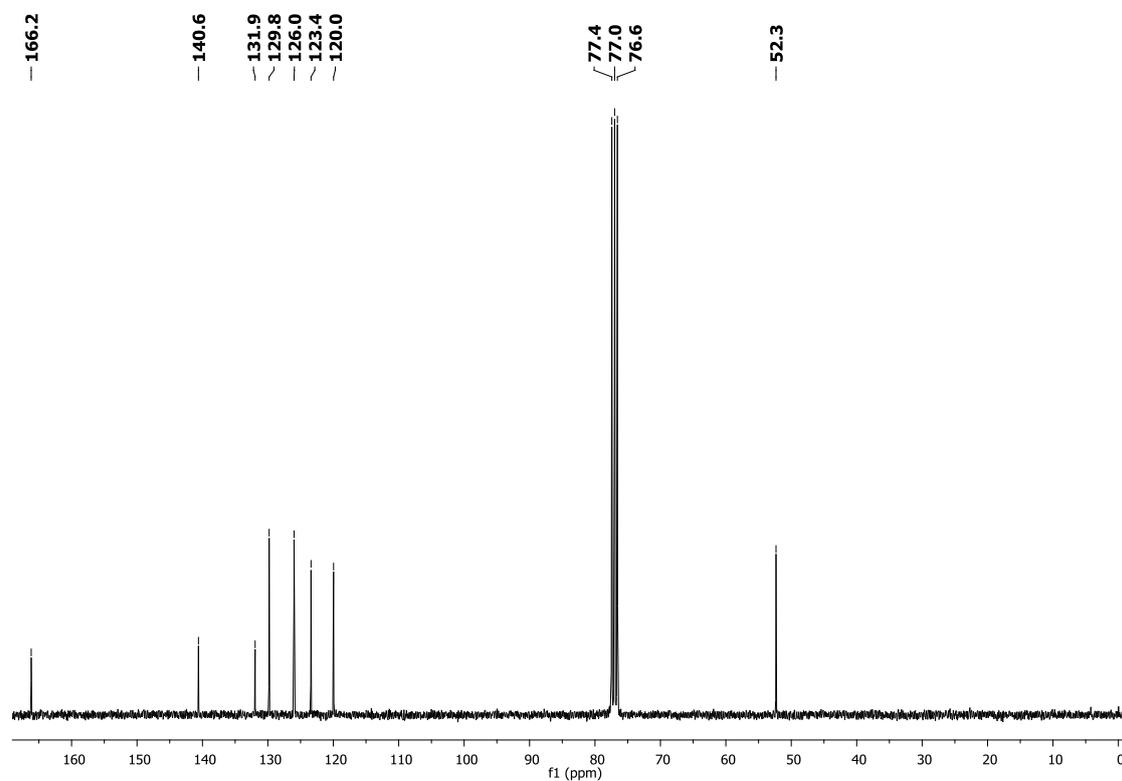


Espectro de Massas do composto 46

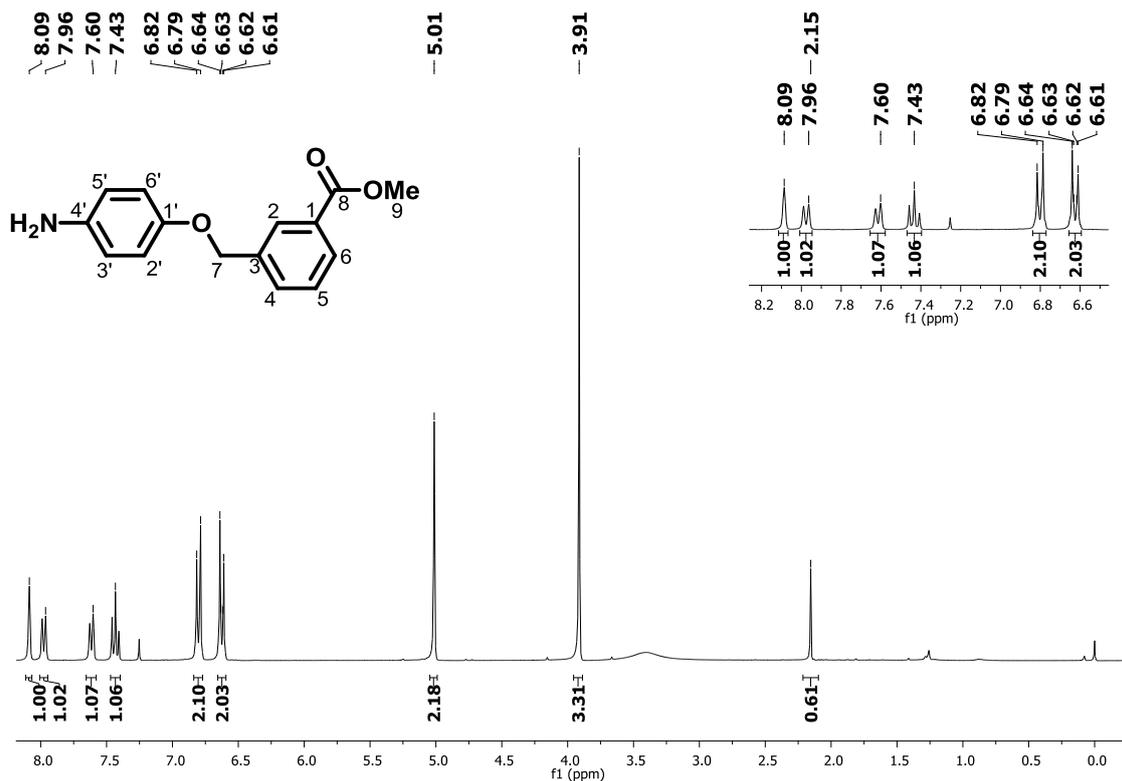
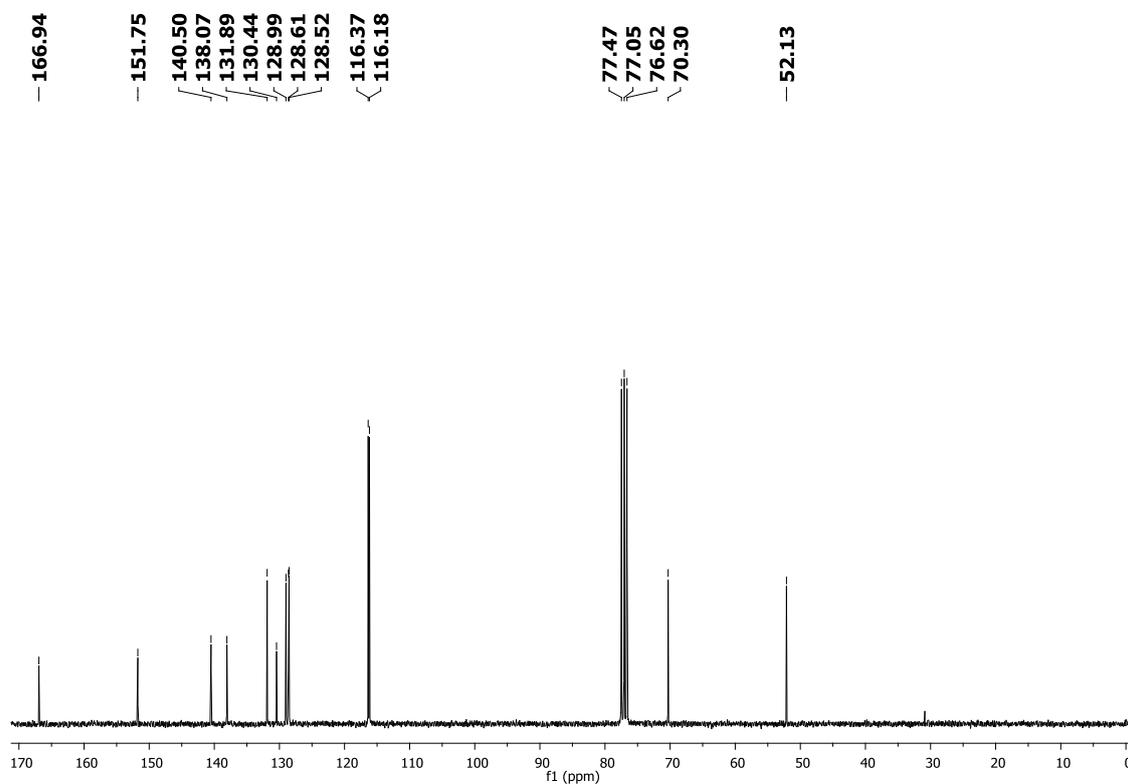
Espectro de RMN ^1H do composto 49bEspectro de RMN ^{13}C do composto 49b

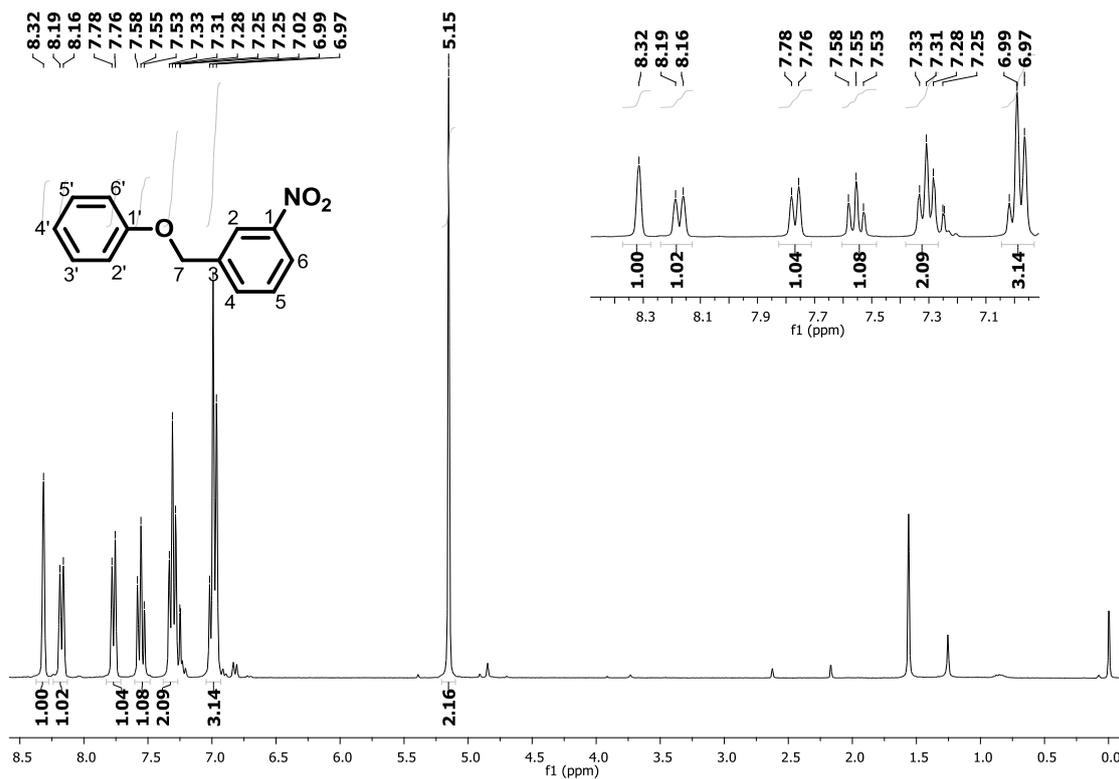
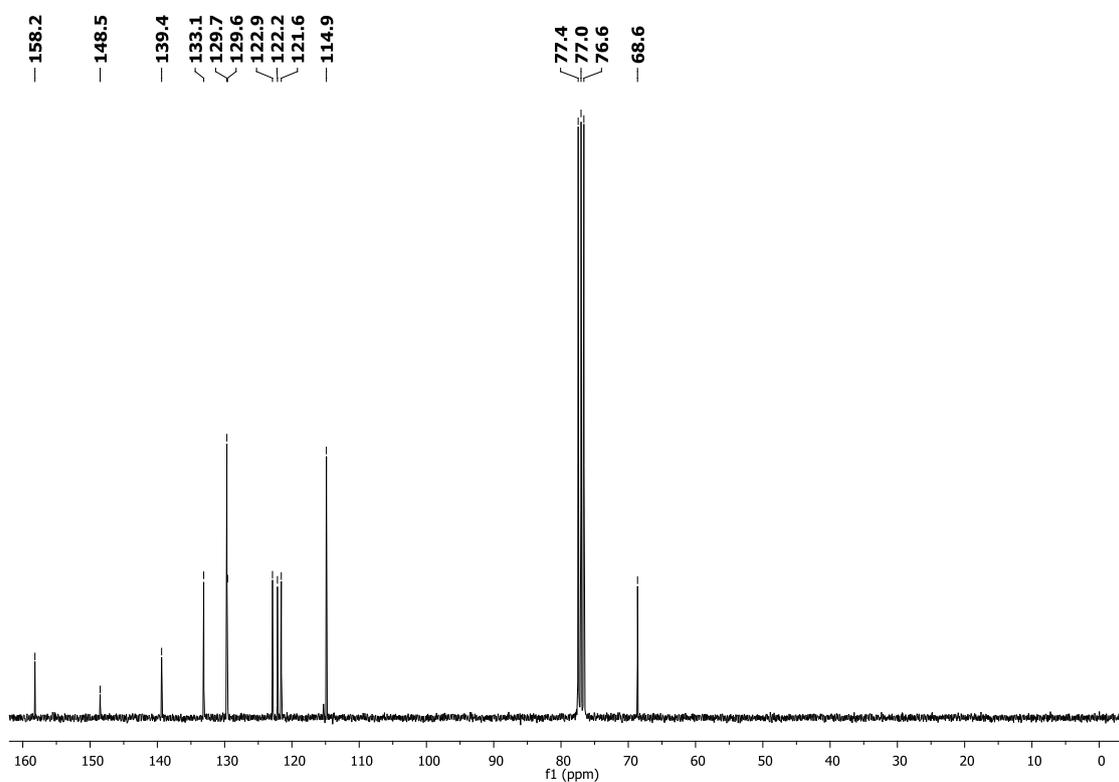


Espectro de RMN ^1H do 3-azida-benzoato de metila (CDCl_3)



Espectro de RMN ^{13}C do composto 3-azida-benzoato de metila (CDCl_3)

Espectro de RMN ^1H do composto I2 (CDCl₃)Espectro de RMN ^{13}C do composto I2 (CDCl₃)

Espectro de RMN ^1H do composto I3 (CDCl_3)Espectro de RMN ^{13}C do composto I3 (CDCl_3)



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9542703/1 - Alfredo Danilo Ferreira de Souza

Email: alfredosouza@usp.br
Data de Nascimento: 21/02/1990
Cédula de Identidade: RG - 478459725 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmaceutica Bioquimica - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - São Paulo - Brasil - 2015

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 01/02/2016
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2016
Data Limite para o Depósito: 29/11/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Roberto Parise Filho - 01/02/2016 até o presente. Email: roberto.parise@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/02/2016
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 01/08/2018 até 29/11/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 24/03/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/02/2016
Prorrogação em 27/07/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 27/07/2018

Impresso em: 05/11/2018 02:36:47



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9542703/1 - Alfredo Danilo Ferreira de Souza

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5734-7/4	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	16/02/2016	30/05/2016	90	6	92	B	N	Concluída
FBF5704-6/4	Análise Espectrométrica de Fármacos	02/03/2016	14/06/2016	150	10	78	A	N	Concluída
FBF5777-3/6	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	10/03/2016	30/06/2016	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5826-1/1	Relação entre Estrutura Química e Atividade Biológica	09/08/2016	31/10/2016	120	8	93	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 27/07/2018

Impresso em: 05/11/2018 02:36:47