

ANA PAULA MARTINS DE SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIVIRAL DE
DERIVADOS DO SRPIN 340 CONTENDO FRAGMENTOS 1,2,3-
TRIAZÓLICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S729s
2021 Souza, Ana Paula Martins de, 1988-
Síntese e avaliação das atividades citotóxica e antiviral de
derivados do SRPIN 340 contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos /
Ana Paula Martins de Souza. – Viçosa, MG, 2021.
414 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Serina proteinase - Inibidores. 2. 1,2,3-triazol.
3. Agentes antivirais. 4. Agentes antineoplásicos.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 572.76

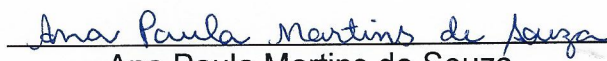
ANA PAULA MARTINS DE SOUZA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIVIRAL DE
DERIVADOS DO SRPIN 340 CONTENDO FRAGMENTOS 1,2,3-
TRIAZÓLICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de abril de 2021.

Assentimento:



Ana Paula Martins de Souza
Autora



Róbson Ricardo Teixeira
Orientador

***Dedico essa tese primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, por
sempre guiarem meus passos
Aos meus pais José Francisco e Maria do Carmo pelo amor
incondicional e pelo exemplo de força e coragem
A minha irmã Valéria pela cumplicidade e amizade que temos
E ao meu esposo Dionísio por todo amor, incentivo,
companheirismo, cuidado e paciência.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus simplesmente por tudo, porque sem Ele eu nada seria.

A Nossa Senhora por estar sempre me abençoando e protegendo.

Aos meus pais José Francisco e Maria do Carmo por caminharem comigo e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

A minha irmã Valéria por todo amor, carinho, cumplicidade e amizade que temos.

Ao meu esposo Dionísio pela paciência, amor, incentivo, cuidado e companheirismo ao longo de todos esses anos juntos.

A minha filha Clara, que embora ainda esteja no meu ventre, já se tornou o centro do meu mundo, fazendo minha vida mais doce e completa.

Aos meus sobrinhos e afilhados João Vítor, Alice e Manuela por alegrarem os meus dias.

Ao professor Róbson Ricardo Teixeira, pela atenção, apoio, incentivo e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Por ter me acolhido e compartilhado sua experiência, profissionalismo e motivação ao longo destes anos.

A minha amiga-irmã Poliana, pelo apoio e carinho, por compartilharmos alegrias, tristezas e confidências e sempre poder contar com você. Sou grata a Deus por te colocar no meu caminho.

A minha amiga-irmã Francielle por estar sempre comigo, nos divertindo e apoiando nos momentos alegres e difíceis. Sou muito feliz por ter sua amizade.

A minha amiga-irmã Betânia por estar sempre comigo, provando que a distância não importa quando a amizade é sincera. Sou muito feliz por ter você na minha vida.

A minha amiga-irmã Giovanna por estar sempre comigo, apoiando, compartilhando alegrias e tristezas e fazendo minha vida ser mais feliz.

A minha amiga Roberta, pela ajuda nos momentos que precisei e por compartilharmos situações felizes e de descontração dentro e fora do laboratório.

Ao meu amigo Marcus, pela ajuda no laboratório, por compartilhar comigo seus conhecimentos e também alegrias e tristezas.

Aos amigos Wagner, Luíza, Sara, Samira, Fabíola, João, Michelle, Ângela, Gabriel Jacomini, Alex, Sarah, Anna Luísa, Amanda, Walysson, Camila, Gabriel Castro, Nathália Albuíni, Anderson e Kariny pelo trabalho em equipe, amizade, por sempre estarem à disposição nos momentos em que eu precisei e pelos momentos de descontração, brincadeiras e leveza dentro do laboratório. E às meninas do grupo “friends”, pela ajuda em determinados momentos e por compartilharmos muita descontração e alegria.

Aos demais colegas do grupo “*orgânica é bão demais*” e do Laboratório 428 pela companhia e por compartilharem experiências profissionais e pessoais.

Aos Técnico-administrativos José Luiz Pereira, Cristiane Isaac, Márcio Alvarenga, Wagner Pereira, ao professor Sérgio Fernandes e aos colegas Isabel Miranda e Lucas Santos pelas análises que ajudaram na elucidação e identificação dos compostos sintetizados nesse trabalho e também ao José Valdemir, Lucas Coelho, Ricardo Natalino, Ricardo Martins, Shirley Reis e Viviane Molica pela ajuda nos momentos de necessidade.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida.

Aos professores da banca examinadora, que prontamente aceitaram participar da finalização desta pesquisa.

Aos familiares pelas orações e por terem contribuído, mesmo de forma indireta, para a realização desse trabalho.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Ana Paula Martins de Souza, filha de José Francisco de Souza e Maria do Carmo Martins de Souza, nasceu em 28 de junho de 1988, em Ponte Nova, Minas Gerais.

Em 2002, concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Padre Benevenuto, em Jequeri - MG. Em 2005, concluiu o ensino médio na Escola Estadual Doutor Raimundo Alves Torres em Viçosa – MG.

Em 2009, ingressou no curso de Bacharelado em Química pela Universidade Federal de Viçosa, onde diplomou-se em 2014.

Em 2014, ingressou no curso de Mestrado em Agroquímica na Universidade federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em julho de 2016.

RESUMO

SOUZA, Ana Paula Martins de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2021. **Síntese e avaliação das atividades citotóxica e antiviral de derivados do SRPIN 340 contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos.** Orientador: Róbson Ricardo Teixeira.

A substância (*N*-[2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]isonicotinamida), também conhecida como SRPIN 340, é um inibidor das cinases SRPK1 e SRPK2. Este composto e seus análogos foram descritos na literatura como substâncias que apresentam importantes bioatividades como, por exemplo, antiviral, antimetastática, citotóxica e inibitória do transporte de elétrons fotossintético. A estrutura química do SRPIN 340 possui três regiões que podem ser quimicamente modificadas. Isso resulta em um aumento da diversidade de moléculas que podem ser obtidas tendo esta estrutura como fonte de inspiração e, com isso, são aumentadas as chances de descoberta de novos compostos bioativos. Os compostos 1,2,3-triazólicos constituem uma classe de substâncias heterocíclicas que também apresentam diferentes atividades biológicas. O presente trabalho teve por objetivo sintetizar uma série de derivados do SRPIN 340 contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos e avaliar bioatividades destes compostos. Para a síntese dos compostos foram empregadas reações substituição nucleofílica aromática, reações de alquilação via catálise de transferência de fases, reação de cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida orgânica catalisada por Cu(I) (reação CuAAC, também conhecida como reação “click”), reações de redução e reações de acilação. Os compostos sintetizados foram caracterizados via espectroscopia no IV e de RMN de ¹H e de ¹³C. Uma vez sintetizados, os compostos derivados do SRPIN 340 com fragmentos triazólicos e os intermediários envolvidos nas suas sínteses foram submetidos a ensaios de avaliação antiviral e de seus efeitos frente a células de glioblastoma. A avaliação da atividade antiviral contra os vírus Zika, Chikungunya e Oropouche mostrou que nenhum dos derivados foi ativo contra os vírus Zika e Chikungunya. No entanto, o composto 4-((benziloxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol (**3b**) foi o mais ativo contra o vírus Oropouche, apresentando uma concentração efetiva (CE₅₀) de 162,64 ± 11,18 μmol L⁻¹ e índice de seletividade de 2,35. Com respeito à avaliação citotóxica contra células de tumor cerebral glioblastoma U87, o composto 2-(4-(((4-

fluorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (**4h**) foi o mais ativo em termos de redução de viabilidade celular, provocando uma redução de cerca de 55%. Por outro lado, os compostos *N*-(2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (**5a**), *N*-(2-(4-((4-bromobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (**5c**), *N*-(2-(4-((4-clorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (**5d**), *N*-(2-(4-((4-metilbenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (**5i**) e *N*-(2-(4-((4-iodofenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (**5j**), aumentaram a viabilidade celular em aproximadamente 200%. Isso sugere que tais compostos podem futuramente serem usados como agentes de cicatrização.

Palavras-chave: SRPIN 340. 1,2,3-triazol. Antiviral. Citotóxica.

ABSTRACT

SOUZA, Ana Paula Martins de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2021. **Synthesis and evaluation of the cytotoxic and antiviral activities of SRPIN 340 derivatives with 1,2,3-triazole fragments.** Adviser: Róbson Ricardo Teixeira.

The (*N*-[2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl] isonicotinamide), also known as SRPIN 340, is an inhibitor of SRPK1 and SRPK2 kinases. Reports in the literature have described the antiviral, antimetastatic, and cytotoxic activities as well as their effects on photosynthetic electron transport. The chemical structure of SRPIN 340 has three regions that can be chemically modified. This is an interesting feature since it increases the diversity of molecules that can be obtained using this structure as a source of inspiration and, with this, the chances of discovering new bioactive compounds. The 1,2,3-triazoles are a class of heterocyclic substances that also have a wide spectrum of biological activities. The present work aimed to synthesize a series of SRPIN 340 derivatives containing 1,2,3-triazole fragments and to evaluate bioactivities of these compounds. In this context, the synthetic route used to prepare the derivatives utilized aromatic nucleophilic substitution reactions, alkylation reactions via phase transfer catalysis, the copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC reaction, also known as “click” reaction), reduction reactions, and acylation reactions. The synthesized compounds were characterized via IR and NMR (^1H and ^{13}C) spectroscopic techniques. Once prepared, the SRPIN 340 derivatives and intermediates involved in their synthesis were submitted to antiviral and cytotoxicity evaluation. The evaluation of antiviral activity against the Zika, Chikungunya, and Oropouche viruses showed that none of the compounds were active against the Zika and Chikungunya viruses. On the contrary, compound 4-((benzyloxy) methyl)-1-(2-nitro-4-(trifluoromethyl))phenyl)-1*H*-1,2,3-triazole (**3b**) was the most active against the Oropouche virus, with an effective concentration (EC_{50}) of $162.64 \pm 11.18 \mu\text{mol L}^{-1}$ and a selectivity index of 2.35. Regarding the cytotoxicity evaluation against brain tumor cells glioblastoma U87, the compound 2-(4-(((4-fluorobenzyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl) aniline (**4h**) was the most effective in reducing cell viability (approximately 55% of reduction). The compounds *N*-(2-(4-(phenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl) phenyl) isonicotinamide (**5a**), *N*-(2-(4-(((4-

bromobenzyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide (**5c**), *N*-(2-(4-(((4-chlorobenzyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide (**5d**), *N*-(2-(4-(((4-methylbenzyl)oxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide (**5i**) and *N*-(2-(4-((4-iodophenoxy)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl) isonicotinamide (**5j**) were the ones that most increased cell viability by almost 200%. This suggests that such compounds may be useful as wound healing agents.

Keywords: SRPIN 340. 1,2,3-triazole. Antiviral. Cytotoxic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura química do SRPIN 340.....	20
Figura 1.2 – Estrutura geral dos compostos sintetizados neste trabalho. A porção destacada em vermelho é derivada do SRPIN 340; o anel 1,2,3-triazol está em azul; o anel benzênico contendo diferentes substituintes está destacado em verde.....	24
Figura 2.1 – Heterociclos azoicos.....	29
Figura 2.2 – Exemplos de compostos triazólicos com atividade biológica. O anel 1,2,3-triazol é destacado em azul nas estruturas das substâncias.....	30
Figura 2.3 – Compostos bioativos que possuem a função amida em suas estruturas. O grupamento amida está destacado em azul nas estruturas dos compostos.....	34
Figura 2.4 – Estrutura do SRPIN 340 e regiões I, II e III que podem ser modificadas para a obtenção de novos compostos potencialmente bioativos...	94
Figura 2.5 – Estruturas dos compostos i , ii e iii , estruturalmente similares ao SRPIN 340 e que apresentaram os melhores resultados quando avaliados contra diferentes linhagens de células de leucemia (SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2017).....	94
Figura 2.6 – Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1	102
Figura 2.7 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 1	103
Figura 2.8 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 1	104
Figura 2.9 – Valores descritos para constantes de acoplamento ^{19}F - ^{13}C	105
Figura 2.10 – Estruturas dos alquinos sintetizados via CTF.....	107
Figura 2.11 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 2a	109
Figura 2.12 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 2a	110
Figura 2.13 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 2a	111
Figura 2.14 – Estruturas dos nitrocompostos triazólicos sintetizados.....	114
Figura 2.15 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 3a	118
Figura 2.16 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 3a	119
Figura 2.17 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 3a	120
Figura 2.18 – Unidade assimétrica do composto 3a . Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos da	

unidade assimétrica do composto 3a é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.16 e 2.17.....	121
Figura 2.19 - a) Empacotamento 2x2 do composto 3a vista ao longo do eixo <i>b</i> ; b) interação O3...H6-C6 observada ao longo do eixo <i>c</i> ; c) empilhamento ao longo do eixo <i>b</i> . O tracejado em azul indica a interação do átomo de flúor com o centróide calculado para o anel benzênico contendo o grupo trifluorometila...	122
Figura 2.20 – Estruturas das aminas triazólicas sintetizadas.....	124
Figura 2.21 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 4a	126
Figura 2.22 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 4a .	127
Figura 2.23 – Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) do composto 4a .	128
Figura 2.24 – Unidade assimétrica do composto 4a . Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos das unidades assimétricas mostrada para o composto 4a é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.22 e 2.23.....	129
Figura 2.25 - Os empacotamentos são 2x2 com os motivos destacados em amarelo. a) empacotamento na perspectiva de <i>a</i> ; b) empacotamento na perspectiva de <i>c</i> ; c) empacotamento na perspectiva de <i>b</i> ; d) a cada conjunto de interações foi atribuído uma cor que serve para a avaliação das imagens mostradas em e e em f.....	131
Figura 2.26 – Estruturas das amidas triazólicas 5a-5j sintetizadas.....	132
Figura 2.27 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 5a	135
Figura 2.28 – Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 5a	136
Figura 2.29 – Espectro de RMN de ¹ H (100 MHz, CDCl ₃) do composto 5a	137
Figura 2.30 – Valores para constantes de acoplamento de átomos de hidrogênios de anel piridínico.....	138
Figura 2.31 - Unidade assimétrica do composto 5a . Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos da unidade assimétrica do composto 3a é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.28 e 2.29.....	138

Figura 2.32 - a) empacotamento 2x2, com o motivo destacado em laranja. Detalhe dos sítions (b) $R_2^2(14)$ e (c) $R_2^2(8)$ e $R_2^1(7)$ formados no empacotamento cristalino do composto 5a . d) Principais interações responsáveis pelo empacotamento lamelar projetado em a). e) Justaposição entre as moléculas de 5a através de interações C-H... π e N-H...O.....	140
Figura 2.33 – Estruturas das amidas triazólicas 5k-5t derivadas do SRPIN 340. Os compostos 5o , 5p e 5q não foram obtidos.....	142
Figura 2.34 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto 5k	146
Figura 2.35 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto 5k	147
Figura 2.36 – Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto 5k	148
Figura 3.1 - Controle de células: células não infectadas e não tratadas. Controle de vírus: células infectadas com ZIKV ou CHIKV e não tratadas. ZIKV – tratamento com 3a : células infectadas com ZIKV e tratadas com o composto 3a . ZIKV – tratamento com 4f : células infectadas com ZIKV e tratadas com o composto 4f . CHIKV – tratamento com 3h : células infectadas com CHIKV e tratadas com o composto 3h . CHIKV – tratamento com 4a : células infectadas com CHIKV e tratadas com o composto 4a . Aumento: 200x.....	164
Figura 3.2 – Estrutura do composto triazólico 3b com atividade antiviral contra o vírus Oropouche.....	166
Figura 3.3 - Controle de células: células não infectadas e não tratadas. Controle de vírus: células infectadas com OROV e não tratadas. OROV – tratamento com 3B : células infectadas com OROV e tratadas com o composto 3B na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aumento 200x.....	167
Figura 4.1 – Estimativas de novos casos de câncer em homens e mulheres para o triênio 2020-2022.....	172
Figura 4.2 – Estrutura da temozolomida (TMZ).....	173
Figura 4.3 – Estrutura do composto 4h que mais significativamente reduziu o metabolismo celular em células de glioblastoma U87.....	177
Figura 4.4 – Estruturas das tiosemicarbazonas ativas contra células de tumores cerebrais e de mama.....	178
Figura 4.5 – Compostos da série 4a-4j que mais induziram o metabolismo celular do glioblastoma U87.....	179
Figura 4.6 – Amidas triazólicas que mais induziram o metabolismo celular do glioblastoma U87.....	181

Figura 4.7 – Substâncias sintetizadas por DE SOUZA (2020) que aumentaram o metabolismo celular contra contra células de glioblastoma U87.....182

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1 – Reação entre um alquino e uma azida catalisada por Cu(I).....	39
Esquema 2.2 – Primeiro plano sintético pensado para a produção de derivados do SRPIN 340 com anéis triazólicos. Ar corresponde a diferentes aromáticos. S _N Ar refere-se à reação de substituição nucleofílica aromática.....	96
Esquema 2.3 – Métodos A , B , C e D testados para síntese do 2-nitro-4-(trifluorometil)fenol (I).....	97
Esquema 2.4 – Metodologias E e F testadas para síntese do 2-nitro-1-(prop-2-in-1-iloxi)-4-(trifluorometil)benzeno (II).....	98
Esquema 2.5 - Segundo plano sintético para a produção de derivados do SRPIN 340 com anéis triazólicos. Ar corresponde a diferentes grupos aromáticos e S _N Ar corresponde à reação substituição nucleofílica aromática.....	99
Esquema 2.6 – Síntese da azida 1 por meio da reação de substituição nucleofílica aromática (S _N Ar) entre o composto disponível comercialmente 1-fluoro-2-nitro 4-trifluorometilbenzeno e azida de sódio.....	100
Esquema 2.7 – Mecanismo da reação de formação da azida 1 . As formas canônicas resultantes da deslocalização de elétrons no complexo de Meisenheimer também são apresentadas.....	100
Esquema 2.8 – Métodos G e H testados para a síntese do (prop-2-in-1-iloxi)benzeno (2a).....	105
Esquema 2.9 - Proposta de mecanismo para CTF sugerido por MAKOSZA & WAWRZYNIOWICZ (1969) e LIMA, 2018.....	107
Esquema 2.10 – Ciclo catalítico envolvido nas reações CuAAC tomando-se como exemplo a formação do composto 3a	115
Esquema 2.11 – Métodos I , J e K testados para a síntese da 2-(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4a).....	123
Esquema 2.12 – Mecanismo proposto para a formação de amidas por meio da reação entre um ácido carboxílico (representado por R ¹ -COOH) e uma amina (representado por R ² -NH ₂) promovida por TBTU.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 2b-2j	39
Tabela 2.2 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 3b-3j	48
Tabela 2.3 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 4b-4j	59
Tabela 2.4 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 5b-5j	70
Tabela 2.5 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 5i-5t	83
Tabela 2.6 - Dados cristalográficos e refinamento estrutural dos compostos 3a, 4a, 5a	92
Tabela 2.7 - Distâncias interatômicas (Å) e ângulos interatômicos (°) para as estruturas dos compostos 3a, 4a, 5a	93
Tabela 2.8 – Experimentos realizados para escolha do melhor solvente a ser utilizado nas reações click entre o composto 1 e diferentes alquinos terminais. A reação entre a azida 1 e o alquino terminal 2a foi escolhida para a condução dos experimentos.....	112
Tabela 3.1 – Valores de CC ₅₀ para os compostos 3a-3j, 4a-4j e 5a-5j obtidos por meio do ensaio de avaliação de citotoxicidade.....	163
Tabela 3.2 – Valores de Concentração Efetiva para 50% das células (CE ₅₀) e Índice de Seletividade (IS) para o composto 3b	166
Tabela 4.1 – Efeito dos compostos sintetizados 3a-3j, 4a-4j e 5a-5j no metabolismo celular de células de glioblastoma U87.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS

CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
CCD	Cromatografia em camada delgada
d	Dupleto
d _{ap}	Dupleto aparente
dd	Duplo dupleto
ddt _{ap}	Duplo duplo tripleto aparente
DMSO- <i>d</i> 6	Dimetilsulfóxido deuterado
δ	Deslocamento químico
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
MHz	Megahertz
m	Multiplete
$\bar{\nu}$	Número de onda
P.A.	Para análise
ppm	Partes por milhão
R _f	Fator de retenção
ATR	Reflectância Total Atenuada
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
s _{ap}	Simpleto aparente
t _{ap}	Tripleto aparente
T _f	Temperatura de fusão
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: APRESENTAÇÃO	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	23
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO 2: SÍNTESE DE DERIVADOS DO SRPIN 340 COM FRAGMENTOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS	29
2.1. INTRODUÇÃO.....	29
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.2.1. Generalidades Metodológicas.....	34
2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS.....	35
2.3.1. Síntese da 1-azido-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (1).....	36
2.3.2. Síntese dos alquinos terminais 2a-2j.....	37
2.3.3. Síntese dos nitrocompostos triazólicos 3a-3j.....	46
2.3.4. Síntese das anilinas triazólicas 4a-4j.....	56
2.3.5. Síntese das amidas 5a-5j.....	67
2.3.6. Síntese das amidas 5k-5t.....	80
2.4. INVESTIGAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS 3a, 4a E 5a POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL (DRXM).....	90
2.4.1. Dados cristalográficos.....	91
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
2.6. CONCLUSÕES.....	149
2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS AMIDAS TRIAZÓLICAS DERIVADAS DO SRPIN 340 (E DOS INTERMEDIÁRIOS ENVOLVIDOS EM SUAS SÍNTESES) CONTRA OS VÍRUS CHIKUNGUNYA, ZIKA E OROPOUCHE	158
3.1. INTRODUÇÃO.....	158
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	160
3.2.1. Células e Vírus.....	160
3.2.2. Ensaio de Avaliação de Citotoxicidade.....	161
3.2.3. Ensaio de avaliação de atividade antiviral global.....	162
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	162
3.4. CONCLUSÃO.....	167

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	167
CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA U87 DAS AMIDAS TRIAZÓLICAS DERIVADAS DO SRPIN 340 E DOS INTERMEDIÁRIOS ENVOLVIDOS EM SUAS SÍNTESES.....	171
4.1. INTRODUÇÃO.....	171
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	174
4.2.1. Linhagem e cultivo celular.....	174
4.2.2. Solubilização dos compostos.....	174
4.2.3. Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT.....	175
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	175
4.4. CONCLUSÃO.....	182
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	183
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	186
ANEXO I – ESPECTROS.....	187
ANEXO II – PUBLICAÇÕES.....	314

CAPÍTULO 1

APRESENTAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

A *N*-[2-(piperidin-1-il)-5-(trifluorometil)fenil]isonicotinamida (Figura 1.1) é uma substância química comumente conhecida como SRPIN 340. Ela pode ser sintetizada por meio de uma rota que abrange três etapas, a saber: substituição nucleofílica aromática, redução e acilação, mas também pode ser obtida comercialmente.

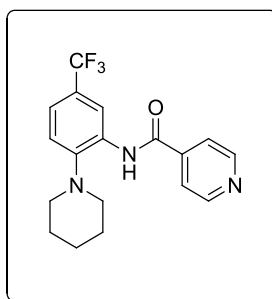


Figura 1.1 – Estrutura química do SRPIN 340.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O SRPIN 340 é conhecido, do ponto de vista de atividade biológica, como um inibidor de SRPKs (SRPK 1 e SRPK 2) (SIQUEIRA *et. al.*, 2017). SRPKs são proteínas cinases ricas em serina/arginina que estão envolvidas em variadas atividades celulares, como por exemplo, catalisar a fosforilação das proteínas SR (PATEL *et. al.*, 2018). As proteínas SR são proteínas de ligação ao RNA. Elas compartilham uma ou duas porções de reconhecimento de RNA e um domínio SR rico em serina/arginina. Essas proteínas desempenham papel importante no processamento do RNA eucariótico, principalmente no processamento de pré-mRNA (HAGIWARA *et. al.*, 2006).

A primeira atividade biológica descrita para o SRPIN 340 foi como inibidor da atividade das cinases SRPKs do vírus HIV. Demonstrou-se que a replicação do vírus HIV é dependente destas cinases e que a inibição delas resultam em inibição da replicação viral (HAGIWARA *et. al.*, 2006). Outra investigação conduzida por FUKUHARA e colaboradores (2006) descreve a mesma atividade

para o SRPIN 340, além de inibir a função das SRPKs, promove a degradação da proteína SRp75 que também é importante na replicação do vírus HIV.

Outros relatos a respeito da atividade antiviral do SRPIN 340 e de seus análogos foram reportados. Segundo Karakama e colaboradores (2010) e Anwar e colaboradores (2011), o SRPIN 340 e derivados inibiram a infecção e replicação do vírus da hepatite C (HCV), vírus Sindbis, vírus da síndrome respiratória aguda grave, assim como também apresentaram atividade contra os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV).

Atualmente a humanidade vem enfrentando uma pandemia mundial da *Coronavirus disease 2019* (COVID-19), uma doença causada pelo vírus denominado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda 2), mais conhecido como SARS-CoV-2 ou novo coronavírus (LI *et. al.*, 2020; LI *et. al.*, 2020). Desde o primeiro caso da doença registrado em Novembro de 2019, já foram registrados, até o dia 09 de Abril de 2021, 133.552.774 casos confirmados de COVID-19 e um total de 2.894.295 óbitos (WHO Coronavirus (COVID-19) DASHBOARD, 2021p). Diante deste grave cenário pandêmico, teve início uma corrida para obtenção de vacinas e de medicamentos para o tratamento da COVID-19. Este fato resultou na descoberta de imunizantes contra a doença (KOIRALA *et. al.*, 2020). Além disso, diversos compostos vem sendo avaliados como antivirais para o tratamento da COVID-19 (CHEN *et. al.*, 2020; RIVA *et. al.*, 2020), dentre o eles o SRPIN 340. Um estudo *in vitro* realizado por Heaton e colaboradores (2020), mostrou que o SRPIN 340 foi ativo contra o SARS-COV-2, inibindo as proteínas cinases SRPK 1 e 2, que são fundamentais na replicação do novo coronavírus.

Embora o SRPIN 340 tenha sido descrito pela primeira vez como um agente antiviral, estudos envolvendo outras possíveis atividades biológicas ligadas a esta substância vem sendo realizados.

Nesse sentido, o SRPIN 340 e alguns de seus derivados apresentaram efeito citotóxico seletivo contra linhagens de células de leucemias linfóide e mielóide agindo na inibição das proteínas cinases SRPKs (SIQUEIRA, *et. al.*, 2015; SIQUEIRA, *et. al.*, 2017). Também apresentaram efeito antimetastático *in vitro* frente a células de melanoma, diminuindo a migração, invasão, adesão e formação de colônias. Em experimentos *in vivo*, também apresentaram atividade

antimetastática, sem sinais aparentes de citotoxicidade para as células normais após o tratamento (MOREIRA *et. al.*, 2018).

O SRPIN 340 também foi avaliado quanto à sua atividade contra a doença Degeneração Vascular Relacionada à Idade (DMRI-neovascular) (DONG *et. al.*, 2013). A DMRI, na sua forma neovascular, é caracterizada por um crescimento de vasos sanguíneos no espaço sub-retiniano, denominado membrana neovascular sub-retiniana (MNSR) ou neovascularização de coroide (NVC) (DONG *et. al.*, 2013; AMARO *et. al.*, 2011). O crescimento de novos vasos sanguíneos leva ao acúmulo de sangue ou lipídeos no espaço sub-retiniano causando a perda da visão central em pacientes acima de cinquenta anos de idade (RODRIGUES *et. al.*, 2006). O processo de formação de novos vasos sanguíneos é conhecido como angiogênese, que é um fenômeno complexo no qual participam um número variado de moléculas que estimulam ou inibem a formação dos novos vasos. O VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) é uma das moléculas pró-angiogênicas mais importantes já identificadas e por isso, tem-se tornado alvo para drogas antiangiogênicas na terapia da DMRI-neovascular (DAMICO, 2007). Segundo os autores deste trabalho, o SRPIN 340 foi capaz de suprimir a expressão do VEGF e com isso atenuar a formação da MNSR. Eles sugerem que esse composto pode ser usado como um possível novo fármaco no tratamento dessa doença.

Em um trabalho recente, o SRPIN 340 foi submetido à estudos para avaliar seu efeito cardioprotetor em miócitos ventriculares de ratos neonatos (HUANG *et. al.*, 2019). Os resultados desse estudo mostraram que, (i) os cardiomiócitos (que foram submetidos à estresse oxidativo induzido por H₂O₂) foram significativamente protegidos pelo SRPIN 340 da morte celular induzida por H₂O₂ e apoptose; (ii) o SRPIN 340 inibe as SRPK 1 e SRPK 2 gerando efeitos benéficos contra o estresse oxidativo através da ativação da sinalização de AKT, que é uma enzima conhecida como enzima cinase B (proteína quinase serina/treonina). A AKT atua como um regulador essencial do crescimento e sobrevivência dos cardiomiócitos; (iii), os autores confirmaram o efeito protetor do SRPIN 340 em corações de ratos perfundidos por lesões I/R (Isquemia/Reperfusão), uma vez que ele preserva a função e previne lesões como por exemplo, infarto.

Do ponto de vista agroquímico, o SRPIN 340 e análogos foram avaliados quanto aos seus efeitos sobre o transporte fotossintético de elétrons (TEIXEIRA *et. al.*, 2017). De acordo com os resultados, vinte análogos do SRPIN 340 foram capazes de interferir na cadeia de transporte de elétrons fotossintético e os compostos mais ativos apresentaram IC₅₀ na faixa de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Segundo os autores, esses compostos se mostram promissores para o desenvolvimento de novos princípios ativos para o controle de plantas daninhas.

Em função das diferentes bioatividades apresentadas, o SRPIN 340 tem atraído a atenção de diversos grupos de pesquisa, incluindo o GSPCB – Grupo de Pesquisa e Síntese de Compostos Bioativos – do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Este grupo de pesquisa também tem conduzido pesquisas voltadas para a síntese e avaliação de substâncias que apresentam fragmentos 1,2,3-triazólicos. Conforme será apresentado com mais detalhes no Capítulo 2, os 1,2,3-triazóis possuem diferentes bioatividades (DHEER *et. al.*, 2017; LESSA, 2021), tais como antiviral, citotóxica, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, dentre outras, e importantes características físico-químicas que os tornam atrativos para a pesquisa e desenvolvimento de substâncias bioativas.

1.2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Uma variedade de substâncias já foi sintetizada ao longo dos anos como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de muitas doenças.

Uma dessas doenças é o câncer e a descoberta precoce do mesmo, seja em qualquer parte do corpo, favorece o tratamento e algumas vezes a cura acontece de uma forma menos traumática para o paciente. Infelizmente, fatores como resistência das células aos medicamentos utilizados no tratamento do câncer e efeitos colaterais agressivos destes fármacos, fazem do câncer uma doença de tratamento complexo na maioria dos casos. Outras doenças, no entanto, são causadas por vírus que podem deixar sequelas irreparáveis e até mesmo causar a morte de um grande número de pessoas. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de novas substâncias mais eficazes com atividade anticâncer e antiviral é uma constante necessidade.

Diante das diferentes atividades apresentadas pelo SRPIN 340 e seus análogos, dentre elas antiviral e efeitos contra linhagens de células cancerígenas, assim como também dos compostos triazólicos (assunto abordado no Capítulo 2), este trabalho teve como objetivo sintetizar derivados do SRPIN 340 contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos e submetê-los a ensaios biológicos utilizando linhagens de células de glioblastoma humano bem como avaliar seus efeitos antivirais frente a Flavivirus, Alphavirus e Orthobunyavirus. Os compostos sintetizados apresentam a fórmula geral mostrada na Figura 1.2. A porção da molécula mostrada em vermelho é derivada do SRPIN 340 e a porção em azul corresponde ao fragmento 1,2,3-triazol.

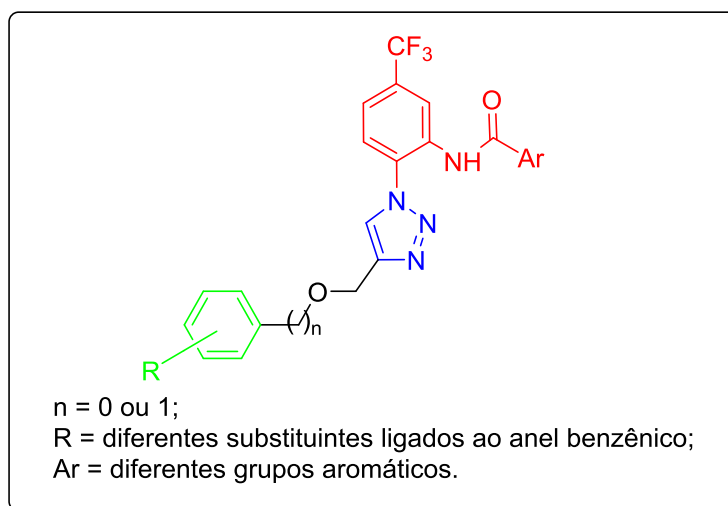


Figura 1.2 – Estrutura geral dos compostos sintetizados neste trabalho. A porção destacada em vermelho é derivada do SRPIN 340; o anel 1,2,3-triazol está em azul; o anel benzênico contendo diferentes substituintes está destacado em verde.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

No planejamento da síntese destes derivados do SRPIN 340, buscou-se variar o padrão de substituição dos grupos ligados ao anel benzênico, destacado em verde na Figura 1.2, de modo a avaliar a influência destes substituintes nas atividades testadas, bem como variar o grupo n.

1.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARO, M. H.; AMARO, F. A. H.; ROLLER, A. B.; MOTTA, C. T.; MOTTA, M. M. S. Tratamento da degeneração macular relacionada à idade com neovascularização de coróide extrafoveal. Análise de uma série de casos e revisão de literatura. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 70, n. 4, p. 261-267, 2011.
- ANWAR, A.; HOSOYA, T.; LEONG, K. M.; ONOGI, H.; OKUNO, Y.; HIRAMATSU, T.; KOYAMA, H.; SUZUKI, M.; HAGIWARA, M.; BLANCO, M. A. G. The kinase inhibitor SFV785 dislocates dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. *Plos One*, v. 6, n. 8, 2011.
- CHEN, S.; LIU, P.; LUO, H., B. Special Column: Research on Emerging COVID-19 (Target, Mechanism, and Therapeutics). *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 10, 2020.
- DAMICO, F. M. Angiogênese e doenças da retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 70, n. 3, p. 547-553, 2007.
- DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 30-74, 2017.
- DONG, Z.; NODA, K.; KANDA, A.; FUKUHARA, J.; ANDO, R.; MURATA, M.; SAITO, W.; HAGIWARA, M.; ISHIDA, S. Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. *Molecular Vision*, v. 19, p. 536-543, 2013.
- FUKUHARA, T.; HOSOYA, T.; SHIMIZU, S.; SUMI, K. OSHIRO, T.; YOSHINAKA, Y.; SUZUKI, M.; YAMAMOTO, N.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A.; HAGIWARA, M. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 30, p. 11329-11333, 2006.
- HAGIWARA M, FUKUHARA T, SUZUKI M, HOSOYA T. Method of regulating phosphorylation of sr protein and antiviral agents comprising sr protein activity regulator as the active ingredient. European patent application. WO 2005/063293. 18 Oct 2006.
- HEATON, B. E., TRIMARCO, J. D., HAMELE, C. E., HARDING, A. T., TATA, A., ZHU, X., TATA, P. R., SMITH, C. M., HEATON, N. S. SRSF protein kinases 1

and 2 are essential host factors for human coronaviruses including SARS-CoV-2. *BioRxiv*, 2020.

- HUANG, J.; ZHOU, Y.; XUE, X.; JIANG, L.; DU, J.; CUI, Y.; ZHAO, H. SRPIN340 protects heart muscle from oxidative damage via SRPK1/2 inhibition-mediated AKT activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 510, p. 97-103, 2019.
- KARAKAMA, Y.; SAKAMOTO, N.; ITSUI, Y.; NAKAGAWA, M.; FUJITA, M. T.; SAKURAI, Y. N.; KAKINUMA, S.; OOOKA, M.; AZUMA, S.; TSUCHIYA, K.; ONOGI, H.; HAGIWARA, M.; WATANABE, M. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 8, p. 3179-3186, 2010.
- KOIRALA, A.; JOO, Y. J.; KHATAMI, A.; CHIU, C.; BRITTON, F. N. Vaccines for COVID-19: the current state of play. *Paediatric Respiratory Reviews*, v.35, p. 43-49, 2020.
- LESSA, R. C. S. Núcleos 1,2,3-Triazólicos como uma Versátil Ferramenta para a Obtenção de Novos Compostos Bioativos: uma Visão Geral. *Revista Virtual Química*, v. 13, n. 1, p. 74-89, 2021.
- LI, J. Y.; YOU, Z.; WANG, Q.; ZHOU, Z. J.; QIU, Y.; LUO, R.; GE, X. Y. The epidemic of 2019-novel-coronavirus (2019-nCoV) pneumonia and insights for emerging infectious diseases in the future. *Microbes and Infection*, v. 22, p. 80-85, 2020.
- LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, K. S. M.; LAU, E. H. Y.; WONG, J. Y.; XING, X.; XIANG, N.; WU, Y.; LI, C.; CHEN, Q.; LI, D.; LIU, T.; ZHAO, J.; LIU, M.; TU, W.; CHEN, C.; JIN, L.; YANG, R.; WANG, Q.; ZHOU, S.; WANG, R.; LIU, H.; LUO, Y.; LIU, Y.; SHAO, G.; LI, H.; TAO, Z.; YANG, Y.; DENG, Z.; LIU, B.; MA, Z.; ZHANG, Y.; SHI, G.; LAM, T. T. Y.; WU, J. T.; GAO, G. F.; COWLING, B. J.; YANG, B.; LEUNG, G. M.; FENG, Z.; N. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1199-1207, 2020.
- MOREIRA, G. A.; LIMA, G. D. A.; SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; ADJANOHOUN, A. L. M.; SANTOS, V. C.; BARBOSA, E. A. A.; LOTERIO, R. K.; PAIVA, J. C.; GONÇALVES, V. H. S.; VIOL, L. C. S.; SILVA, E. A. M.;

- JÚNIOR, A. S.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. R. L.; NEVES, M. M.; FERREIRA, R. S.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 356, p. 214-223, 2018.
- PATEL, M.; SACHIDANANDAN, M.; ADNAN, M. Serine arginine protein kinase 1 (SRPK1): a moonlighting protein with theranostic ability in cancer prevention. *Molecular Biology Reports*, 2018.
- RIVA, L.; YUAN, S.; YIN, X.; SANCHO, L. M.; MATSUNAGA, N.; PACHE, L.; MUEHLBACHER, S. B.; DE JESUS, P. D.; TERIETE, P.; HULL, M. V.; CHANG, M. W.; CHAN, J. F. W.; CAO, J.; POON, V. K. M.; HERBERT, K. M.; CHENG, K.; NGUYEN, T. T. H.; RUBANOV, A.; PU, Y.; NGUYEN, C.; CHOI, A.; RATHNASINGHE, R.; SCHOTSAERT, M.; MIORIN, L.; DEJOSEZ, M.; ZWAKA, T. P.; SIT, K. Y.; SOBRIDO, L. M.; LIU, W. C.; WHITE, K. M.; CHAPMAN, M. E.; LENDY, E. K.; GLYNNE, R. J.; ALBRECHT, R.; RUPPIN, E.; MESECAR, A. D.; JOHNSON, J. R.; BENNER, C.; SUN, R.; SCHULTZ, P. G.; SU, A. I.; SASTRE, A. G.; CHATTERJEE, A. K.; YUEN, K. Y.; CHANDA, S. K. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*, v. 586, p. 113-119, 2020.
- RODRIGUES, E. B.; ROSSI, E. E.; JUNIOR, A. G.; MEYER, C. H.; HO, A. C. Tratamento da forma neovascular de degeneração macular relacionada à idade com drogas antiangiogênicas. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v. 69, n. 5, p. 756-765, 2006.
- SIQUEIRA, R. P.; BARBOSA, E. A. A.; PALÊTO, M. D.; RIGHETTO, G. L.; SERAPHIM, T. V.; SALGADO, R. L.; FERREIRA, J. G.; BARROS, M. V. A.; OLIVEIRA, L. L.; LARANJEIRA, A. B. A.; ALMEIDA, M. R.; JUNIOR, A. S.; FIETTO, J. L. R.; KOBARG, J.; OLIVEIRA, E. B.; TEIXEIRA, R. R.; BORGES, J. C.; YUNES, J. A.; BRESSAN, G. C. Potential antileukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by n-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (srpin340). *Plos One*, 2015.
- SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; BARBOSA, E. A. A.; ONOFRE, T. S.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; JUNIOR, A. S.; OLIVEIRA, L.L.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. R. L.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C.

Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 134, p. 97-109, 2017.

TEIXEIRA, R. R.; BARROS, M. V. A.; BRESSAN, G. C.; SIQUEIRA, R. P.; SANTOS, F. S.; BERTAZZINI, M.; KIRALJ, R.; FERREIRAE, M. M. C.; FORLANI, G. Synthesis, theoretical studies, and effect on the photosynthetic electron transport of trifluoromethyl arylamides. *Pest Management Science*, v. 73, p. 2360-2371, 2017.

WHO CORONAVIRUS (COVID-19) DASHBORD. Disponivel em: < <https://covid19.who.int/> >. Acesso em: 9 abr. 2021.

CAPÍTULO 2

SÍNTESE DE DERIVADOS DO SRPIN 340 CONTENDO FRAGMENTOS 1,2,3-TRIAZÓLICOS

2.1. INTRODUÇÃO

Azóis são compostos heterocíclicos aromáticos que possuem um ou mais átomos de nitrogênio em um anel de cinco membros. Quando outro heteroátomo está presente, como enxofre ou oxigênio, eles são chamados de tiazol ou oxazol, respectivamente. (DEOBALD, 2010; NETTO *et. al.*, 2008; MELO *et. al.*, 2006). A Figura 2.1 mostra as estruturas de membros dessa classe de heterociclos.

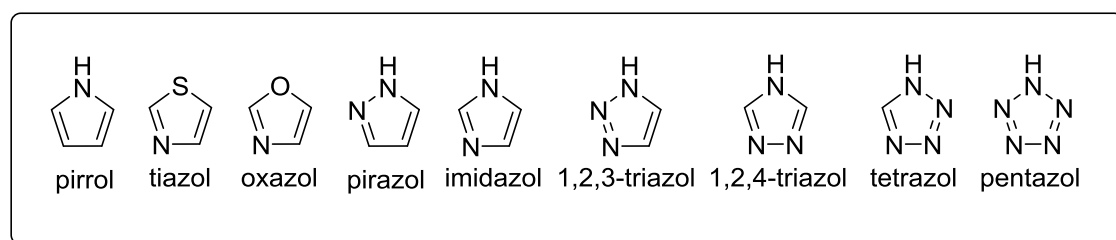


Figura 2.1 – Heterociclos azoicos.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Dentre eles, o 1,2,3-triazol é o heterociclo que, nas últimas décadas, mais tem despertado a atenção de químicos e pesquisadores Das mais diferentes áreas. Isto está relacionado, em parte, às suas várias aplicações, pois eles podem ser utilizados como, por exemplo, agroquímicos e fármacos (TOTOBENZAZARA & BURKE, 2015; DEOBALD, 2010). Estas substâncias apresentam três átomos de nitrogênio vicinais, possuem seis elétrons π , possuem baixa massa molecular e são estáveis (NOURAIE *et. al.*, 2019; CANDUZINI, 2012).

Os compostos triazólicos (não somente os 1,2,3-triazóis), apresentam várias atividades biológicas, como antiviligo (NIU *et. al.*, 2019), antituberculose (FERNANDES *et. al.*, 2019), contra doença de Alzheimer (DIAS *et. al.*, 2018), antineoplásica, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, anestésica local,

anticonvulsivante, antimalárica, anti-HIV (IRFAN *et. al.*, 2015), citotóxica, antiprotozoária, antifúngica e tripanocida (FREITAS, 2014). O anel 1,2,3-triazol é o grupo farmacofórico em diversos compostos, sendo, portanto, o responsável pela atividade biológica observada (DIAS *et. al.*, 2018; WHITING *et. al.*, 2006). Eles apresentam aplicações em diferentes áreas podendo, por exemplo, atuar também como inibidores de corrosão em aço (FERNANDES *et. al.*, 2019). Como exemplos de compostos bioativos, na Figura 2.2 estão representados três compostos triazólicos que apresentam atividade leishmanicida (TEIXEIRA *et. al.*, 2018) e atividade antivitaligo (NIU *et. al.*, 2019).

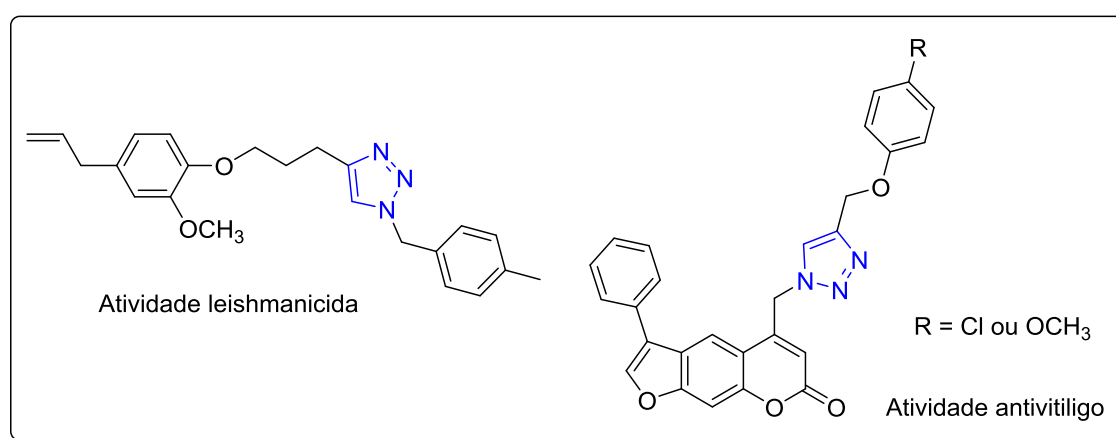


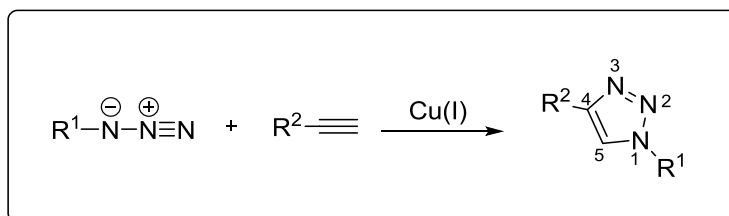
Figura 2.2 – Exemplos de compostos triazólicos com atividade biológica. O anel 1,2,3-triazol é destacado em azul nas estruturas das substâncias.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A origem dos 1,2,3-triazóis é exclusivamente sintética, não sendo descritos relatos da obtenção desta classe de substâncias a partir de fontes naturais. A metodologia mais usada no preparo deles é a cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen entre um alcino terminal (dipolarófilo) e uma azida orgânica (dipolo). Essa reação, no entanto, só ocorre em elevadas temperaturas na ausência de catalisador, forma mistura de regioisômeros, é lenta e apresenta baixos rendimentos (SINGH *et. al.*, 2016; FREITAS *et. al.*, 2011). Essas limitações motivaram a busca por melhores condições para o preparo de 1,2,3-triazóis, resultando na descoberta do papel benéfico do cobre como catalisador no processo de cicloadição 1,3-dipolar.

A reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre para o preparo de 1,2,3-triazóis foi relatada independentemente pelos grupos de Meldal na

Dinamarca e Sharpless nos Estados Unidos. Eles mostraram que a reação de alquinos terminais e azidas orgânicas catalisada por Cu(I) é acelerada por um fator de 10^7 vezes em relação ao processo não catalisado. Além disso, no processo catalisado há formação exclusiva dos 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos (Esquema 2.1) (HEIN & FOKIN, 2010).



Esquema 2.1 – Reação entre um alquino e uma azida catalisada por Cu(I).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Essa reação está inserida dentro do conceito de química “click” e é denominada de reação CuAAC (Reação de cicloadição (C) entre um alquino (A) e uma azida (A), catalisada por cobre (Cu)). Por se tratar de um dos melhores exemplos de reação “click”, a reação CuAAC é normalmente descrita na literatura como reação “click”.

O conceito de química “click” foi introduzido em 1999 por Barry Sharpless e desde então se tornou muito popular devido ao grande número de publicações (HEIN *et. al.*, 2008). Segundo Sharpless, essas reações devem apresentar as seguintes características (NOURAIE *et. al.*, 2019; TABACARU *et. al.*, 2016):

- ser de amplo escopo;
- fornecer rendimentos elevados, gerar subprodutos inofensivos e que possam ser removidos por métodos não cromatográficos;
- ser estereoespecífica, mas não necessariamente enantiosseletiva;
- ser de fácil execução e deve ser também insensível ao oxigênio e à água;
- os substratos e reagentes devem ser prontamente disponíveis;
- não utilizar solvente ou utilizar um que seja ambientalmente benigno e facilmente removido;
- os produtos devem ser isolados de maneira simples e devem ser estáveis sob condições fisiológicas.

A reação CuAAC (reação “click”) é de fácil execução e não é afetada por fatores estéricos nem eletrônicos dos grupos ligados à azida e ao alquino, sendo

desnecessária, por exemplo, a utilização da química de proteção de grupos funcionais (HEIN & FOKIN, 2010).

Os solventes mais utilizados nos processos CuAAC são a água, tetraidrofurano, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, metanol, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, piridina, tolueno, acetonitrila, dioxano, álcool *tert*-butílico, etanol e acetona (LIANG & ASTRUC, 2011). Eles podem ser utilizados puros ou como misturas, mas a decisão definitiva sobre o tipo de solvente a ser usado deve levar em consideração as propriedades dos reagentes e a fonte de cobre que estará envolvida. Por isso, em alguns casos, há a necessidade de se fazer um estudo prévio com vários solventes (FREITAS *et. al.*, 2011).

O uso da água como solvente seja puro ou em mistura com outro solvente, recebe uma atenção especial pois é ambientalmente benigna, universal, dissolve sais inorgânicos de Cu(II) e o ascorbato de sódio (agente redutor comumente empregado em reações CuAAC). Além disso, a água estabiliza o complexo acetilato de cobre gerado no processo e tem a capacidade de absorver o calor gerado nestas reações. Apesar da água dissolver alguns componentes, de forma geral, não há necessidade deles estarem dissolvidos no meio reacional, desde que a agitação da mistura seja suficientemente vigorosa (HEIN & FOKIN, 2010; FREITAS *et. al.*, 2011).

Diferentes fontes de cobre podem ser utilizadas na reação CuAAC. Sais de cobre (I), como iodeto, brometo, cloreto e acetato são empregados com frequência, assim como também, complexos como $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{PF}_6$ e $[\text{Cu}(\text{CH}_3\text{CN})_4]\text{OTf}$. Mas os mais usados são os sais de cobre(II), como por exemplo o sulfato de cobre pentaidratado que é normalmente utilizado na presença de um agente redutor, uma vez que a espécie cataliticamente ativa nas reações CuAAC é o Cu(I) (FREITAS *et. al.*, 2011).

O ascorbato de sódio é tipicamente usado como agente redutor, mas outros compostos, como a hidrazina e a tris-(2-carboxietil)fosfina, também são empregados para a mesma finalidade. No entanto, esses agentes podem reduzir o Cu(II) a Cu(0) e para isso ser evitado é necessário usar uma proporção adequada de agente redutor para catalisador e/ou adicionar um estabilizador de cobre como tris-(hidroxipropiltriazolilmetil)amina (HEIN *et. al.*, 2008).

Cumpramos ressaltar que as reações “click” desempenham papel importante na química medicinal, na bioconjugação, na química de materiais, na química

supramolecular e podem ser aplicadas em diversas outras áreas (MALKOWSKI *et. al.*, 2017).

Assim como os triazóis, as amidas são uma classe importante de compostos orgânicos. (CHAPARRO *et. al.*, 2020; LIU & REBROV, 2021). Elas são amplamente utilizadas no preparo de plásticos, lubrificantes, detergentes (CHEN *et. al.*, 2020), nylon, hidrogéis, sedas artificiais, catalisadores suportados, materiais biocompatíveis para o crescimento celular (FIGUEIREDO *et. al.*, 2016), polímeros, adesivos (IRVING *et. al.*, 2020), pigmentos, agroquímicos, produtos fotográficos e farmacêuticos (CHAPARRO *et. al.*, 2020). Elas também apresentam papel relevante no contexto da biologia e bioquímica uma vez que o grupamento amida faz parte da composição de proteínas e peptídeos (IRVING *et. al.*, 2020).

Dentre as transformações mais utilizadas na química medicinal, as reações de formação de amidas ocupam o primeiro lugar, compreendendo 16% de todas as reações, em comparação com a formação de heterociclos (7,4%), arilação (6,3%), alquilação (5,3%) e aminação redutiva (5,3%) (BROWN & BOSTROM, 2015). O grupamento amida encontra-se presente nas estruturas de 2/3 dos candidatos a medicamentos e estão presentes em 25% dos produtos farmacêuticos disponíveis atualmente no mercado (FIGUEIREDO, *et. al.*, 2016). A Figura 2.3, pg. 34, apresenta alguns compostos bioativos que possuem a função amida em suas estruturas (PATEU *et. al.*, 2020).

No que tange às estratégias sintéticas para formação de amidas, ao longo dos anos vários métodos foram descritos, mas classicamente as reações envolvem a junção entre aminas e ácidos carboxílicos ou derivados como por exemplo, haletos de acila, necessitando as vezes de catalisadores e reagentes de acoplamento (LIAO *et. al.*, 2020). Neste trabalho serão abordados dois métodos na síntese das amidas, um utilizando o cloreto de benzoíla, um derivado do ácido benzoico, e o outro utilizando o ácido benzoico e um agente de acoplamento (TBTU).

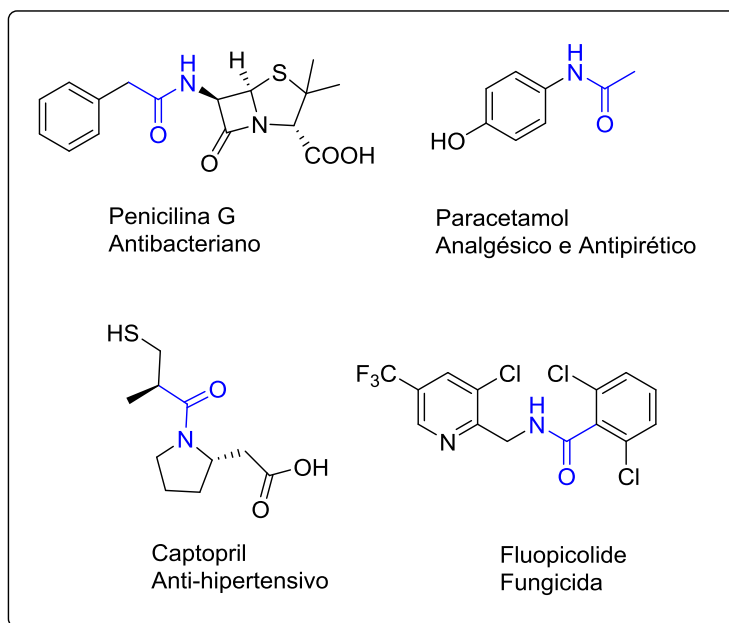


Figura 2.3 – Compostos bioativos que possuem a função amida em suas estruturas. O grupamento amida está destacado em azul nas estruturas dos compostos.

Fonte:Elaborada pelo próprio autor.

Conforme previamente discutido, tanto o SRPIN 340, que apresenta a função amida em sua estrutura, quanto compostos contendo anéis triazólicos, apresentam importantes bioatividades. Além disso, a porção 1,2,3-triazol é, em muitas substâncias, o grupo farmacofórico. Assim, decidiu-se sintetizar compostos que apresentem a estrutura geral mostrada na Figura 1.2, pg. 24 e, em um passo subsequente, explorar potenciais bioatividades desses compostos. Dentro deste contexto, este capítulo trata da síntese de amidas contendo o fragmento 1,2,3-triazol. Será discutida a síntese de intermediários assim como também a síntese das amidas finais análogas ao SRPIN 340.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Generalidades Metodológicas

Os reagentes utilizados para a síntese dos compostos foram de grau P.A.

As substâncias 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno, fenol, 3-bromoprop-1-ino (brometo de propargila), brometo de tetrabutilamônio, cloreto de benzoíla, cloridrato do cloreto de isonicotinoíla, 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-

1,1,3,3- tetrafluoroborato de tetrametilamínio (TBTU), 4-iodofenol, eugenol, guaiacol, vanilina, álcool benzílico, álcool 4-bromobenzílico, álcool 4-clorobenzílico, álcool 4-fluorobenzílico, álcool 4-metilbenzílico, ácido benzoico, cloreto de sódio, sulfato de cobre pentaidratado, ascorbato de sódio, azida de sódio, celite[®] 545 e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) e utilizados sem prévia purificação. Cloreto de sódio, sulfato de sódio anidro, carbonato de potássio, hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio, cloreto de estanho diidratado, acetona, clorofórmio, álcool *tert*-butílico, trietilamina e éter etílico foram obtidos da F Maia Indústria de Produtos Químicos e Científicos Ltda (Cotia, São Paulo, Brasil). Dimetilsulfóxido, hexano, diclorometano, acetato de etila, dimetilformamida, metanol, etanol, tolueno foram adquiridos da Êxodo Científica (Sumaré, São Paulo, Brasil), sendo hexano, acetato de etila e diclorometano utilizados após destilação.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel impregnadas sobre alumínio. Após a eluição, as placas de CCD foram observadas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$), não sendo realizada revelação por agentes químicos.

As separações em coluna cromatográfica foram realizadas utilizando-se sílica-gel (70-230 mesh), como fase estacionária.

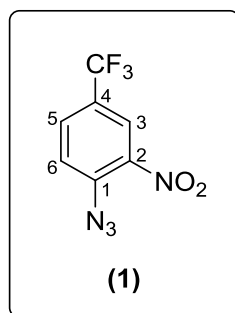
Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos empregando-se a técnica reflectância total atenuada (ATR) em equipamento Varian 660 com acessório GladiATr.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H , 300 MHz e 400 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C , 75 MHz e 100 MHz) foram obtidos em dois espectrômetros, VARIAN MERCURY 300 e RMN Bruker AVANCE-III 400 Nanobay. Foram utilizados como solventes clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) deuterados. As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz).

As temperaturas de fusão foram determinadas em aparelho MQAPF-302 e não foram corrigidas.

2.3. PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS

2.3.1. Síntese da 1-azido-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (1)¹



A um balão de fundo redondo (50 mL) contendo 10,0 mL de dimetilsulfóxido e azida de sódio (1,12 g, 17,2 mmol), foi adicionado o 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (0,901 g, 4,31 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. Terminada a reação (quatro horas), foram adicionados 20,0 mL de água gelada à reação. A mistura resultante foi extraída com diclorometano (3 x 30,00 mL) e os extratos orgânicos combinados. A fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (8:1 v/v) e a azida **1** foi obtida com 94% (0,937 g, 4,04 mmol) de rendimento.

Característica: óleo amarelo.

CCD: $R_f = 0,50$ (hexano-acetato de etila 8:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3098, 2121, 1605, 1538, 1315, 1125, 828, 702. O espectro é apresentado na Figura 2.6 (pg. 102).

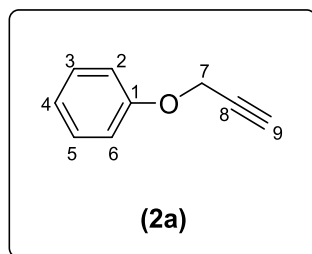
RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ : 7,47 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-6); 7,86 (d, 1H, $J = 8,7$ Hz, H-5); 8,20 (s, 1H, H-3). O espectro é apresentado na Figura 2.7 (pg. 103).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ : 121,5 (C-6); 122,6 (q, $^1J_{C-F} = 270,8$ Hz, CF₃)*; 123,7 (q, $^3J_{C-F} = 4,0$ Hz, C-3); 127,3 (q, $^2J_{C-F} = 35,2$ Hz, C-4); 130,5 (q, $^3J_{C-F} = 3,5$ Hz, C-5); 138,4 (C-1); 140,3 (C-2). O quarteto esperado para o sinal do carbono do grupo -CF₃, devido ao acoplamento ¹⁹F-¹³C, não se mostrou completamente resolvido. Foram observadas duas raias do quarteto. No entanto, foi possível calcular o deslocamento químico bem como a constante de acoplamento do sinal. O espectro é apresentado na Figura 2.8 (pg. 104).

¹ De modo geral, a numeração das estruturas de todos os compostos sintetizados não corresponde àquela recomendada pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

2.3.2. Síntese dos alquinos terminais 2a-2j

(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (2a)



A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados fenol (2,15 g, 22,8 mmol), brometo de tetrabutilamônio (0,735 g, 2,28 mmol), 10,0 mL de solução de hidróxido de sódio 35% (m/v) e 10,0 mL de tolueno. A mistura foi resfriada em banho de gelo e mantida sob agitação magnética durante uma hora. Em seguida foi adicionado brometo de propargila (2,40 mL, 27,4 mmol). A mistura de reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente por mais quatro horas. Após esse período, seu volume foi reduzido em evaporador rotativo e adicionou-se a ela 10,0 mL de solução saturada de cloreto de sódio. A mistura foi transferida para um funil de separação e posteriormente extraída com éter etílico (3 x 30,00 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **2a** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-clorofórmio (20:13 v/v) e obtido com 76% (2,29 g, 17,4 mmol) de rendimento.

Característica: óleo amarelo.

CCD: $R_f = 0,73$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3291, 3098, 3065, 3042, 2924, 2871, 2121, 1597, 1493, 1211, 1036, 750, 687, 635, 594. O espectro é apresentado na Figura 2.11 (pg. 109).

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,53 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-9); 4,71 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-7); 6,98-7,05 (m, 3H, H-2/H-6/H-4); 7,29-7,36 (m, 2H, H-3/H-5). O espectro é apresentado na Figura 2.12 (pg. 110).

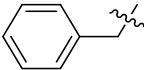
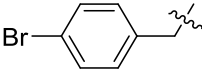
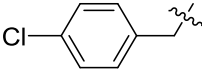
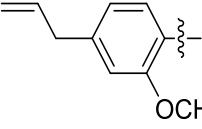
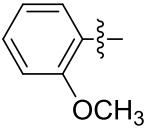
RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,7 (C-7); 75,4 (C-9); 78,6 (C-8); 114,8 (C-2/C-6); 121,5 (C-4); 129,4 (C-3/C-5); 157,5 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 2.13 (pg. 111).

Os compostos **2b-2j** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **2a**. Na Tabela 2.1, pg. 39 estão apresentadas informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **2b-2j**. Os compostos **2e** e **2f** foram purificados utilizando como eluente hexano-acetato de etila (6:1 v/v) e o composto **2g** foi purificado usando como eluente hexano-acetato de etila (2:1 v/v). Os demais compostos foram purificados utilizando hexano-clorofórmio (20:13 v/v).

Tabela 2.1 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **2b-2j**

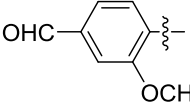
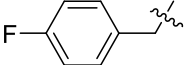
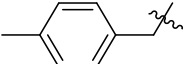
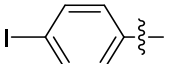
$$\text{Ar-OH} + \text{Br-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-CH}_3 \xrightarrow[\text{NaOH 35% (m/v), tolueno}]{(\text{Bu})_4\text{NBr}} \text{Ar-O-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-CH}_3$$

(2b-2j)

Composto	R	Massa de Ar-OH (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Massa de (Bu) ₄ NBr (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Volume de brometo de propargila (mL)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
2b		2,00/18,0	0,580/1,80	1,93	4	1,83/12,5	68
2c		3,00/16,0	0,532/1,60	1,70	4	3,16/14,0	87
2d		3,00/21,0	0,698/2,10	2,20	4	3,20/17,7	84
2e		2,50/15,0	0,483/1,50	1,60	3	2,63/13,0	85
2f		2,50/20,0	0,645/2,00	2,14	2,5	2,68/16,5	82

Os volumes da solução de NaOH 35% (m/v) e tolueno utilizados nas reações foram de 10,0 mL cada.

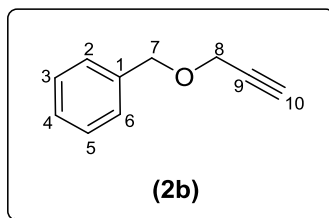
Tabela 2.1 – Continuação

Composto	R	Massa de Ar-OH (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Massa de (Bu) ₄ NBr (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Volume de brometo de propargila (mL)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
2g		2,50/16,0	0,516/1,60	1,70	4	2,25/11,8	72
2h		2,50/20,0	0,645/2,00	2,10	4	2,74/16,7	84
2i		2,50/20,0	0,645/2,00	2,10	4	2,59/16,2	79
2j		2,00/9,10	0,293/0,910	0,970	4	0,877/3,39	37

Os volumes da solução de NaOH 35% (m/v) e tolueno utilizados nas reações foram de 10,0 mL cada.

As estruturas dos compostos **2b-2j** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (2b)



Característica: óleo amarelo.

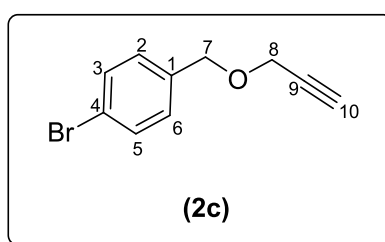
CCD: $R_f = 0,55$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3291, 3087, 3065, 3031, 2946, 2890, 2853, 2158, 1497, 1452, 1356, 1073, 739, 694, 631. O espectro é apresentado na Figura 1, pg 188 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,45 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 4,16 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-8); 4,60 (s, 2H, H-7); 7,28-7,35 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6). O espectro é apresentado na Figura 2, pg. 189 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 57,0 (C-8); 71,5 (C-7); 74,6 (C-10); 79,7 (C-9); 127,9 (C-4); 128,1 (C-2/C-6); 128,4 (C-3/C-5); 137,3 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 3, pg. 190 do anexo.

1-bromo-4-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (2c)



Característica: óleo amarelo.

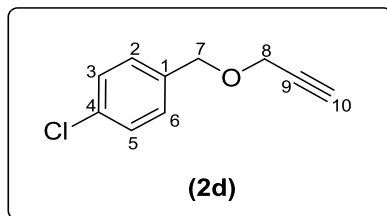
CCD: $R_f = 0,59$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3295, 3046, 2946, 2894, 2853, 2117, 1594, 1486, 1066, 1010, 798, 631, 479. O espectro é apresentado na Figura 4, pg. 191 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,47 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 4,16 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-8); 4,55 (s, 2H, H-7); 7,22 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6); 7,47 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5). O espectro é apresentado na Figura 5, pg. 192 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 57,4 (C-8); 70,9 (C-7); 75,1 (C-10); 79,5 (C-9); 121,9 (C-4); 129,8 (C-2/C-6); 131,7 (C-3/C-5); 136,5 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 6, pg. 193 do anexo.

1-cloro-4-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (2d)



Característica: óleo amarelo.

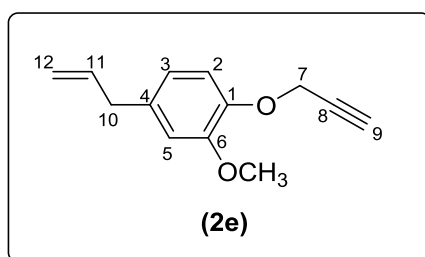
CCD: $R_f = 0,58$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3299, 3035, 2946, 2898, 2857, 2117, 1601, 1493, 1352, 1081, 1014, 802, 631. O espectro é apresentado na Figura 7, pg. 194 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,47 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 4,16 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-8); 4,56 (s, 2H, H-7); 7,29-7,35 (m, 4H, H-2/H-3/H-5/H-6). O espectro é apresentado na Figura 8, pg. 195 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 57,3 (C-8); 70,8 (C-7); 75,1 (C-10); 79,6 (C-9); 128,7 (C-3/C-5); 129,5 (C-2/C-6); 133,8 (C-1); 135,9 (C-4). O espectro é apresentado na Figura 9, pg. 196 do anexo.

4-alil-2-metoxi-1-(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (2e)



Característica: óleo amarelo.

CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 6:1 v/v).

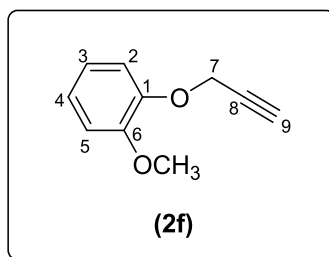
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3288, 3080, 3002, 2935, 2909, 2868, 2121, 1638, 1594, 1508, 1255, 1214, 1136, 1021, 635. O espectro é apresentado na Figura 10, pg. 197 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,51 (t, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-9); 3,37 (d, 2H, $J = 4,4$ Hz, H-10); 3,88 (s, 3H, OCH_3); 4,75 (m, 2H, H-7); 5,08-5,13 (m, 2H, H-12);

5,96 (dd_{tap}, 1H, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 6,4$ Hz, $J_3 = 4,4$ Hz, H-11); 6,74-6,77 (m, 2H, H-3/H-5); 6,99 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-2). O espectro é apresentado na Figura 11, pg. 198 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 39,8 (C-10); 55,8 (OCH_3); 56,9 (C-7); 75,6 (C-9); 78,8 (C-8); 112,3 (C-5); 114,8 (C-2); 115,7 (C-12); 120,3 (C-3); 134,2 (C-4); 137,5 (C-11); 145,1 (C-1); 149,7 (C-6). O espectro é apresentado na Figura 12, pg. 199 do anexo.

1-metoxi-2-(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (2f)



Característica: óleo amarelo.

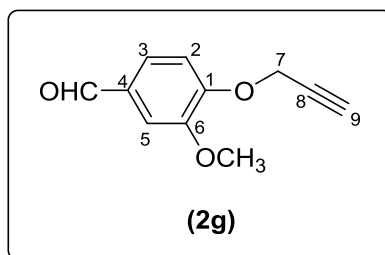
CCD: $R_f = 0,68$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3284, 3065, 3002, 2935, 2835, 2121, 1594, 1501, 1456, 1244, 1122, 1018, 739. O espectro é apresentado na Figura 13, pg. 200 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,52 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-9); 3,89 (s, 3H, OCH_3); 4,78 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-7); 6,92-6,96 (m, 2H, H-3/H-5); 6,99-7,03 (m, 1H, H-4); 7,06-7,09 (m, 1H, H-2). O espectro é apresentado na Figura 14, pg. 201 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 55,8 (OCH_3); 56,8 (C-7); 75,6 (C-9); 78,7 (C-8); 112,0 (C-5); 114,7 (C-2); 120,7 (C-4); 122,3 (C-3); 146,8 (C-1); 149,8 (C-6). O espectro é apresentado na Figura 15, pg. 202 do anexo.

3-metoxi-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzaldeído (2g)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,58$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

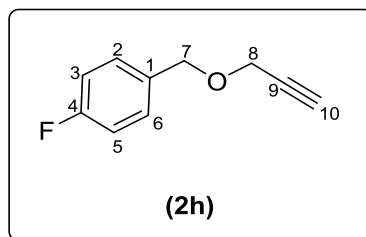
Tf = 88,2-89,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3247, 3080, 2983, 2117, 1690, 1586, 1512, 1267, 1122, 780. O espectro é apresentado na Figura 16, pg. 203 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,58 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-9); 3,95 (s, 3H, OCH_3); 4,87 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-7); 7,16 (d, 1H, $J = 7,2$ Hz, H-2); 7,45 (dd, 1H, $J_1 = 7,2$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3); 7,48 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5); 9,88 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 17, pg. 204 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 56,0 (OCH_3); 56,6 (C-7); 76,6 (C-9); 77,5 (C-8); 109,6 (C-2); 112,7 (C-5); 126,1 (C-3); 131,0 (C-4); 150,1 (C-6); 152,1 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 18, pg. 205 do anexo.

1-fluoro-4-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (2h)



Característica: óleo amarelo.

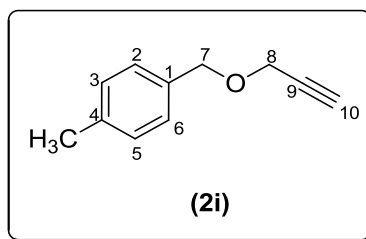
CCD: $R_f = 0,58$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3299, 3076, 3042, 2949, 2857, 2117, 1605, 1512, 1352, 1222, 1077, 824, 635, 490. O espectro é apresentado na Figura 19, pg. 206 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,50 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 4,19 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-8); 4,60 (s, 2H, H-7); 7,06 (t_{ap} , 2H, $J = 8,6$ Hz, H-3/H-5); 7,34-7,38 (m, 2H, H-2/H-6). O espectro é apresentado na Figura 20, pg. 207 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 57,0 (C-8); 70,8 (C-7); 74,7 (C-10); 79,5 (C-9); 115,3 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz, C-3/C-5); 129,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz, C-2/C-6); 133,1 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-1); 162,5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244,0$ Hz, C-4). O espectro é apresentado na Figura 21, pg. 208 do anexo.

1-metil-4-((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (2i)



Característica: óleo amarelo.

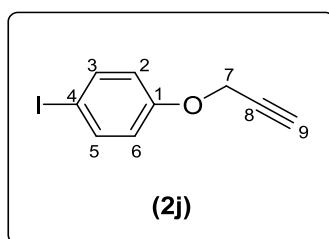
CCD: $R_f = 0,58$ (hexano-clorofórmio 20:13 v/v).

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3291, 3050, 3024, 2946, 2920, 2860, 2117, 1616, 1516, 1445, 1352, 1077, 802, 635. O espectro é apresentado na Figura 22, pg. 209 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,39 (s, 3H, CH_3); 2,49 (t_{ap}, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-10); 4,19 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-8); 4,61 (s, 2H, H-7); 7,20 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-3/H-5); 7,29 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-2/H-6). O espectro é apresentado na Figura 23, pg. 210 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 21,1 (C-CH_3); 56,8 (C-8); 71,4 (C-7); 74,5 (C-10); 79,8 (C-9); 128,2 (C-3/C-5); 129,1 (C-2/C-6); 134,2 (C-4); 137,6 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 24, pg. 211 do anexo.

1-iodo-4-(prop-2-in-1-iloxi)benzeno (2j)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,78$ (hexano-acetato de etila 2:1 v/v).

Tf = 42,5 - 42,6 °C.

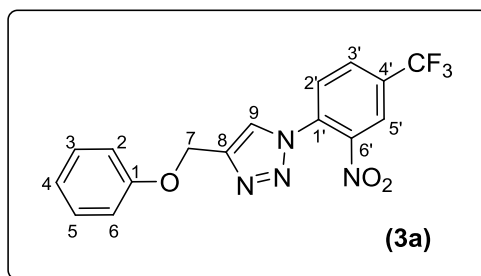
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3273, 3098, 3072, 2912, 2864, 2128, 1571, 1482, 1452, 1374, 1222, 1021, 821, 665, 501. O espectro é apresentado na Figura 25, pg. 212 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,55 (t, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-9); 4,69 (d, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-7); 6,79 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-2/H-6); 7,61 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-3/H-5). O espectro é apresentado na Figura 26, pg. 213 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 55,8 (C-7); 75,8 (C-9); 78,0 (C-8); 83,9 (C-4); 117,3 (C-2/C-6); 138,2 (C-3/C-5); 157,4 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 27, pg. 214 do anexo.

2.3.3. Síntese dos nitrocompostos triazólicos 3a-3j

1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol (3a)



A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados (prop-2-in-1-iloxi)benzeno (**2a**) (0,400 g, 3,03 mmol), 1-azido-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (**1**) (0,703 g, 3,03 mmol), 7,00 mL de álcool *t*-butílico, 7,00 mL de água e ascorbato de sódio (0,239 g, 1,21 mmol). Em seguida, adicionou-se sulfato de cobre pentaidratado (0,151 g, 0,610 mmol). A mistura de reação foi mantida sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Após o término da reação (quatro horas) evidenciado por CCD, a mistura foi extraída com acetato de etila (4 x 30,00 mL). Os extratos orgânicos foram combinados e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de carbonato de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada por filtração a vácuo e concentrada sob pressão reduzida. O composto **3a** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v) e obtido com 70% (0,771 g, 2,12 mmol) de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

Tf = 134,8 - 135,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3087, 2920, 1631, 1538, 1319, 1237, 1118, 750. O espectro é apresentado na Figura 2.15 (pg. 118).

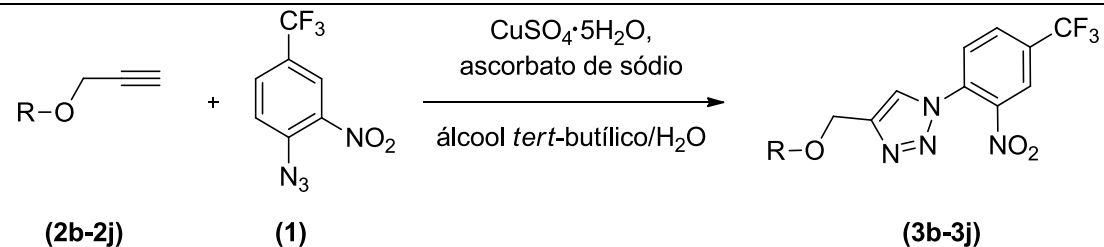
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,32 (s, 2H, H-7); 6,98-7,04 (m, 3H, H-2/H-6/H-4); 7,29-7,36 (m, 2H, H-3/H-5); 7,83 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 7,97 (s, 1H, H-9);

8,06 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3'); 8,33 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 2.16 (pg. 119).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 61,7 (C-7); 114,7 (C-2/C-6); 121,5 (C-4/C-9); 123,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 123,9 (C-1'); 128,5 (C-2'); 129,6 (C-3/C-5); 130,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 133,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 36,4$ Hz, C-4'); 145,6 (C-6'/C-8); 157,9 (C-1). O quarteto referente ao carbono do grupo CF_3 não foi observado. O espectro é apresentado na Figura 2.17 (pg. 120).

Os compostos **3b-3j** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **3a**. Na Tabela 2.2, pg. 48 estão apresentadas informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **3b-3j**. O composto **3g** foi purificado utilizando como eluente hexano-acetato de etila-diclorometano (3:1:3 v/v). Os demais compostos foram purificados com hexano-acetato de etila-metanol (10:3:1 v/v).

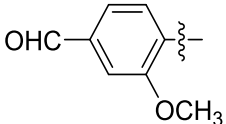
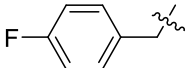
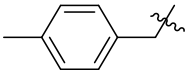
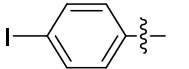
Tabela 2.2 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **3b-3j**



Composto	R	Massa de alquino (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de azida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de ascorbato de sódio (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de CuSO ₄ ·5H ₂ O (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
3b		0,450/3,08 (2b)	0,714/3,08	0,243/1,23	0,154/0,616	4	0,885/2,34	76
3c		0,500/2,22 (2c)	0,515/2,22	0,174/0,888	0,109/0,444	4	0,772/1,69	76
3d		0,400/2,21 (2d)	0,512/2,21	0,175/0,884	0,110/0,442	4	0,728/1,76	80
3e		0,500/2,47 (2e)	0,573/2,47	0,195/0,988	0,123/0,494	3	0,747/1,72	70
3f		0,450/2,77 (2f)	0,643/2,77	0,219/1,11	0,138/0,554	4	0,846/2,14	77

Os volumes de álcool *tert*-butílico e água utilizados nas reações foram de 8,00 mL cada.

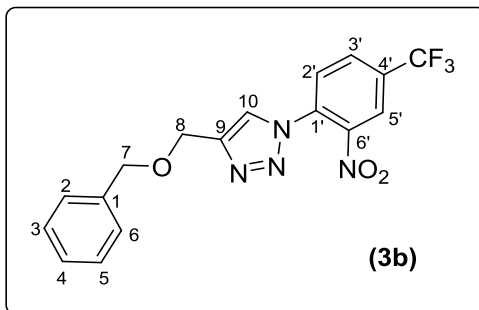
Tabela 2.2 – Continuação

Composto	R	Massa de alquino (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de azida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de ascorbato de sódio (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de CuSO ₄ ·5H ₂ O (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
3g		0,450/2,37 (2g)	0,550/2,37	0,187/0,948	0,118/0,474	4	0,950/2,25	95
3h		0,450/2,74 (2h)	0,636/2,74	0,216/1,09	0,137/0,548	4	0,903/2,28	83
3i		0,410/2,55 (2i)	0,592/2,55	0,201/1,02	0,127/0,510	3	0,804/2,05	80
3j		0,550/2,13 (2j)	0,494/2,13	0,168/0,852	0,106/0,426	4	0,615/1,25	59

Os volumes de álcool *tert*-butílico e água utilizados nas reações foram de 8,00 mL cada.

As estruturas dos compostos **3b-3j** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

4-((benziloxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol (3b)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

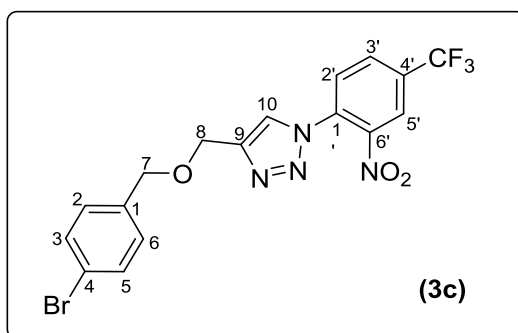
Tf = 86,3 – 87,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3117, 3098, 3076, 2898, 2861, 1627, 1545, 1356, 1322, 1129, 1070, 754, 698. O espectro é apresentado na Figura 28, pg. 215 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,65 (s, 2H, H-7); 4,78 (s, 2H, H-8); 7,28-7,39 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6); 7,80 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 7,89 (s, 1H, H-10); 8,04 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-3'); 8,31 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 29, pg. 216 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,9 (C-7); 122,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,6$ Hz, CF_3); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-5'); 123,8 (C-10); 127,9 (C-2'); 128,0 (C-2/C-6); 128,4 (C-4); 128,5 (C-3/C-5); 130,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-3'); 132,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 34,7$ Hz, C-4'); 137,5 (C-9/C-1'); 144,1 (C-1); 146,6 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 30, pg. 217 do anexo.

4-(((4-bromobenzil)oxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol (3c)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

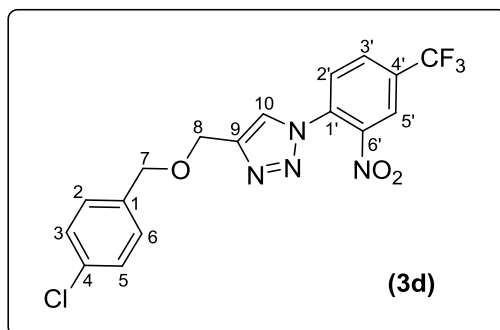
Tf = 90,0 – 91,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3158, 3076, 2912, 2853, 1627, 1545, 1322, 1177, 1096, 1007, 806, 471. O espectro é apresentado na Figura 31, pg. 218 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,59 (s, 2H, H-7); 4,77 (s, 2H, H-8); 7,25 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6); 7,48 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5); 7,81 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-2'); 7,89 (s, 1H, H-10); 8,05 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, H-3'); 8,32 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 32, pg. 219 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 71,9 (C-7); 121,8 (C-4); 122,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272,0$ Hz, CF_3); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-5'); 123,9 (C-10); 128,5 (C-2'); 129,6 (C-2/C-6); 130,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-3'); 131,6 (C-3/C-5); 132,7 (C-9); 133,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,0$ Hz, C-4'); 136,6 (C-1'); 144,1 (C-1); 146,3 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 33, pg. 220 do anexo.

4-(((4-clorobenzil)oxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol (3d)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,48$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

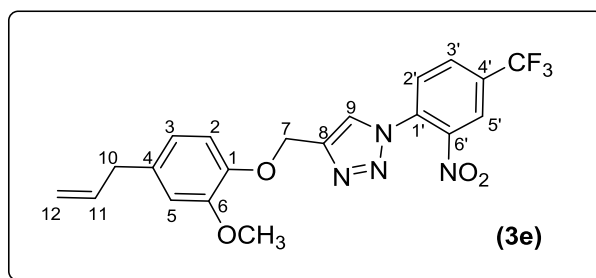
Tf = 89,9 – 91,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3147, 3080, 3054, 2942, 2909, 2875, 1631, 1549, 1322, 1140, 1073, 843. O espectro é apresentado na Figura 34, pg. 221 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,64 (s, 2H, H-7); 4,80 (s, 2H, H-8); 7,31-7,36 (m, 4H, H-2/H-3/H-5/H-6); 7,83 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 7,91 (s, 1H, H-10); 8,08 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 8,35 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 35, pg. 222 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 71,9 (C-7); 122,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 273,0$ Hz, CF_3); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 123,8 (C-10); 128,4 (C-2'); 128,6 (C-3/C-5); 129,3 (C-2/C-6) 130,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-3'); 132,7 (C-9), 133,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,0$ Hz, C-4'); 133,7 (C-1'), 136,0 (C-4); 144,1 (C-1); 146,3 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 36, pg. 223 do anexo.

4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol (3e)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

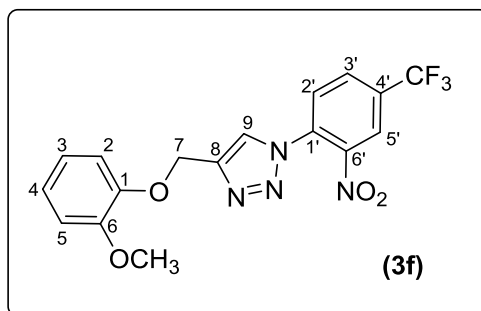
Tf = 123,2 – 123,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3113, 3091, 3057, 2972, 2938, 2912, 2883, 2842, 1631, 1586, 1538, 1512, 1322, 1259, 1133, 999, 854. O espectro é apresentado na Figura 37, pg. 224 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,36 (d, 2H, $J = 6,8$ Hz, H-10); 3,88 (s, 3H, OCH_3); 5,08-5,13 (m, 2H, H-12); 5,37 (s, 2H, H-7); 5,98 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,4$ Hz, $J_3 = 6,8$ Hz, H-11); 6,74-6,77 (m, 2H, H-3/H-5); 7,00 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-2); 7,84 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-2'); 8,02 (s, 1H, H-9); 8,06 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-3'); 8,34 (s, 1H, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 38, pg. 225 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 39,8 (C-10); 55,8 (OCH_3); 63,4 (C-7); 112,5 (C-5); 115,1 (C-2); 115,8 (C-12); 120,6 (C-9); 123,1 (q_{ap}, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 123,7 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 290,0$ Hz, CF_3); 124,1 (C-3); 128,4 (C-2'); 130,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 132,5 (C-1'); 133,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 40,0$ Hz, C-4'); 134,4 (C-4); 137,4 (C-11); 144,1 (C-6'); 145,7 (C-8); 145,8 (C-1); 149,7 (C-6). O espectro é apresentado na Figura 39, pg. 226 do anexo.

**4-((2-metoxifenoxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol
(3f)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,24$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

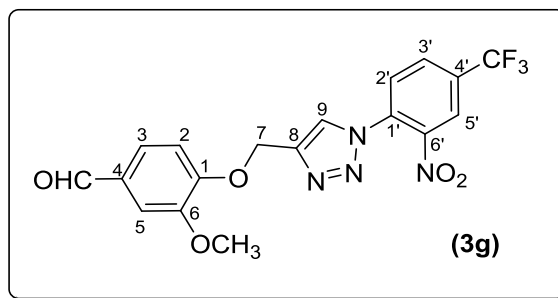
Tf = 127,2 – 127,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3135, 3102, 3087, 3028, 2964, 2946, 2916, 2886, 2846, 1631, 1594, 1541, 1504, 1452, 1319, 1252, 1118, 1007, 728. O espectro é apresentado na Figura 40, pg. 227 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,89 (s, 3H, OCH_3); 5,40 (s, 2H, H-7); 6,92-6,96 (m, 2H, H-3/H5); 6,99-7,03 (m, 1H, H-4); 7,07-7,10 (m, 1H, H-2); 7,83 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 8,03 (s, 1H, H-9); 8,07 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-3'); 8,34 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 41, pg. 228 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 55,8 (OCH_3); 63,1 (C-7); 112,0 (C-5); 114,9 (C-2); 121,0 (C-4); 122,4 (C-9); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-5'); 123,7 (CF_3); 124,1 (C-3); 128,4 (C-2'); 130,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-3'); 132,7 (C-1'); 133,2 (C-4'); 144,1 (C-6'); 145,7 (C-8), 147,4 (C-1); 149,8 (C-6). Os quartetos esperados para o grupo CF_3 e para o carbono C-4', devido ao acoplamento ^{19}F - ^{13}C , não se mostraram completamente resolvidos. Foi observada apenas um raia do quarteto para cada sinal. O espectro é apresentado na Figura 42, pg. 229 do anexo.

3-metoxi-4-((1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)benzaldeído (3g)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-acetato de etila-diclorometano 3:1:3 v/v).

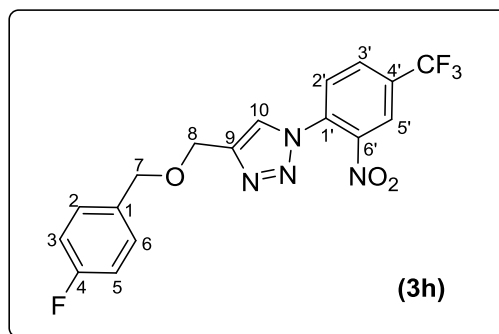
Tf = 182,1 – 183,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3143, 3109, 3076, 2957, 2924, 2860, 1690, 1586, 1538, 1504, 1463, 1322, 1267, 1125, 995, 728, 561. O espectro é apresentado na Figura 43, pg. 230 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,96 (s, 3H, OCH_3); 5,50 (s, 2H, H-7); 7,25 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-2); 7,45-7,51 (m, 2H, H-3/H5); 7,85 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-2'); 8,06 (s, 1H, H-9); 8,09 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 8,36 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'); 9,89 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 44, pg. 231 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 56,0 (OCH_3); 65,3 (C-7); 109,4 (C-5); 112,8 (C-2); 123,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 123,4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 124,5 (C-9); 126,6 (C-2'); 128,6 (C-3); 130,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-3'); 130,9 (C-1'); 132,5 (C-8); 133,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 136,4 (C-4); 144,5 (C-6'); 150,0 (C-1); 152,7 (C-6); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 45, pg. 232 do anexo.

4-(((4-fluorobenzil)oxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol (3h)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

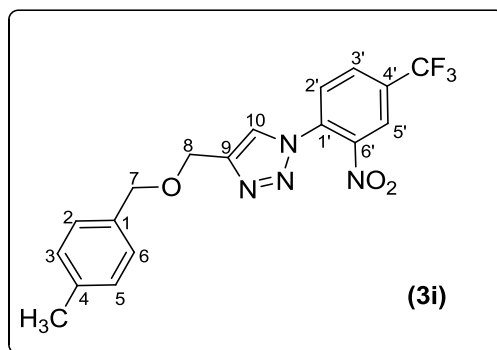
Tf = 55,1 – 56,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3147, 3083, 3050, 2964, 2901, 2871, 1631, 1601, 1553, 1512, 1322, 1140, 1073, 917, 694, 498. O espectro é apresentado na Figura 46, pg. 233 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,64 (s, 2H, H-7); 4,80 (s, 2H, H-8); 7,07 (t_{ap}, 2H, $J = 8,6$ Hz, H-3/H-5); 7,35-7,40 (m, 2H, H-2/H-6); 7,84 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 7,91 (s, 1H, H-10); 8,08 (dd, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H-3'); 8,35 (d_{ap}, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 47, pg. 234 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,2 (C-8); 72,0 (C-7); 115,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz, C-3/C-5); 120,8 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,5$ Hz, CF_3); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 123,8 (C-10); 128,4 (C-2'); 129,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,0$ Hz, C-2/C-6); 130,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-3'); 132,7 (C-1'), 133,2 (C-1); 144,1 (C-6'); 146,4 (C-9); 162,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 245,0$ Hz, C-4). O sinal (quarteto) do carbono C-4' não foi observado. O espectro é apresentado na Figura 48, pg. 235 do anexo.

4-(((4-metilbenzil)oxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol (3i)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,38$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

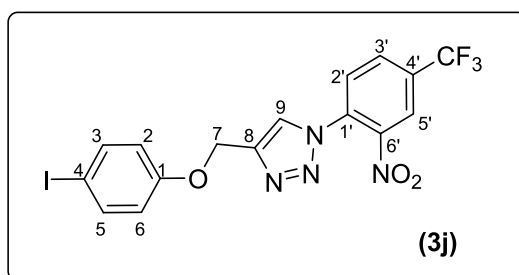
Tf = 129,7 – 130,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3147, 3083, 3054, 2901, 2871, 1631, 1553, 1519, 1322, 1138, 843, 642, 486. O espectro é apresentado na Figura 49, pg. 236 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 2,37 (s, 3H, CH_3); 4,64 (s, 2H, H-7); 4,75 (s, 2H, H-8); 7,19 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-3/H-5); 7,29 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2/H-6); 7,83 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-2'); 7,89 (s, 1H, H-10); 8,07 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 8,34 (d_{ap}, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 50, pg. 237 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 21,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 63,2 (C-8); 72,7 (C-7); 122,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$); 123,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 123,7 (C-10); 128,1 (C-3/C-5); 128,4 (C-2'); 129,2 (C-2/C-6); 130,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 132,7 (C-1'); 132,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 134,4 (C-1), 137,7 (C-4); 144,1 (C-6'); 146,7 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 51, pg. 238 do anexo.

4-((4-iodofenoxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol (3j)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,60$ (hexano-acetato de etila-metanol 10:3:1 v/v).

Tf = 150,3 – 151,1 °C.

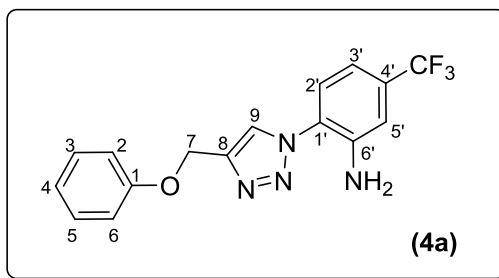
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3150, 3080, 3065, 2924, 2871, 1631, 1545, 1486, 1460, 1319, 1237, 1136, 1021, 832, 702, 505. O espectro é apresentado na Figura 52, pg. 239 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,30 (s, 2H, H-7); 6,82 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-2/H-6); 7,61 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-3/H-5); 7,85 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 7,96 (s, 1H, H-9); 8,09 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 8,36 (d_{ap}, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 53, pg. 240 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 61,8 (C-7); 83,8 (C-4), 117,2 (C-2/C-6); 122,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272,0$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{F}_3$); 123,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 124,8 (C-9); 128,5 (C-2'); 130,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-3'); 132,6 (C-1'); 133,2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 35,0$ Hz, C-4'); 138,4 (C-3/C-5); 144,1 (C-6'); 145,0 (C-8); 157,8 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 54, pg. 241 do anexo.

2.3.4. Síntese das anilinas triazólicas 4a-4j

2-(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4a)



A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados 1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol (**3a**) (0,100 g, 0,280 mmol), cloreto de estanho diidratado (0,632 g, 2,80 mmol) e 5,00 mL de etanol. A mistura foi agitada e aquecida a 80 °C, sob refluxo, por duas horas. Após o término da reação, evidenciado por CCD, a mistura de reação foi neutralizada com bicarbonato de sódio em pó até pH 7,0. Após a neutralização, a mistura foi filtrada por meio de celite® 545 e o etanol foi removido em evaporador rotativo. Posteriormente, adicionou-se água destilada e a mistura obtida foi extraída com acetato de etila (3 x 40,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **4a** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (3:1 v/v) e obtido com 75% (0,0690 g, 0,210 mmol) de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,40$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

Tf = 142,6 – 143,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3451, 3343, 3150, 3057, 2920, 2868, 1623, 1601, 1586, 1334, 1225, 1029, 876, 758, 516. O espectro é apresentado na Figura 2.21 (pg. 126).

RMN de ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 5,13 (s, 2H, H-7); 5,86 (s, 2H, NH₂); 6,85-6,90 (m, 2H, H-3'/H-5'); 6,99 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2/H-6); 7,18-7,26 (m, 3H, H-3/H-5/H-4); 7,39 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, H-2'); 8,56 (s, 1H, H-9). O espectro é apresentado na Figura 2.22 (pg. 127).

RMN de ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 61,6 (C-7); 112,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz, C-5'); 113,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz, C-3'); 115,4 (C-2/C-6); 121,6 (C-4); 124,6 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF₃); 124,8 (C-1'); 126,2 (C-2'); 127,2 (C-9); 130,2 (C-3/C-5); 131,1 (q,

$^2J_{C-F} = 31,3$ Hz, C-4'); 143,7 (C-6'); 143,8 (C-8); 158,8 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 2.23 (pg. 128).

Os compostos **4b-4j** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **4a**. Na Tabela 2.3, pg. 59 estão apresentadas informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **4b-4j**. O composto **4e** foi purificado utilizando como eluente hexano-acetato de etila (2:1 v/v) e os compostos **4g** e **4i** foram purificados com hexano-acetato de etila (1:1 v/v). Os demais compostos foram purificados com hexano-acetato de etila (3:1 v/v).

Tabela 2.3 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **4b-4j**

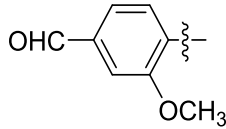
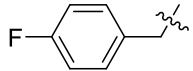
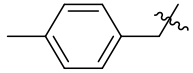
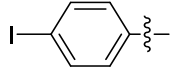
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 etanol, 80 °C

(3b-3j) **(4b-4j)**

Composto	R	Massa de nitrocomposto (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de SnCl ₂ ·2H ₂ O (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
4b		0,600/1,59 (3b)	3,59/15,9	2	0,480/1,38	87
4c		0,600/1,31 (3c)	2,96/13,1	2	0,469/1,09	84
4d		0,830/2,01 (3d)	4,54/20,1	2	0,597/1,56	83
4e		0,930/2,14 (3e)	4,83/21,4	2	0,787/1,95	91
4f		1,10/2,80 (3f)	6,32/28,0	2	0,930/2,55	92

O volume de etanol utilizado em todas as reações foi 25,0 mL.

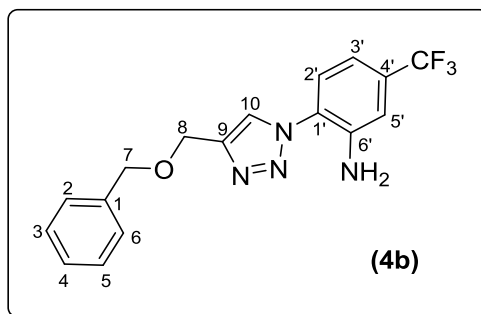
Tabela 2.3 – Continuação

Composto	R	Massa do nitrocomposto (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de SnCl ₂ ·2H ₂ O (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (horas)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
4g		0,802/1,90 (3g)	4,29/19,0	2	0,653/1,66	88
4h		0,680/1,70 (3h)	3,84/17,0	2	0,583/1,59	93
4i		0,600/1,53 (3i)	3,39/15,3	2	0,525/1,45	95
4j		0,800/1,63 (3j)	3,68/16,3	2	0,593/1,29	79

O volume de etanol utilizado em todas as reações foi 25,0 mL.

As estruturas dos compostos **4b-4j** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

2-(4-((benziloxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4b)



Característica: sólido laranja.

CCD: $R_f = 0,33$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

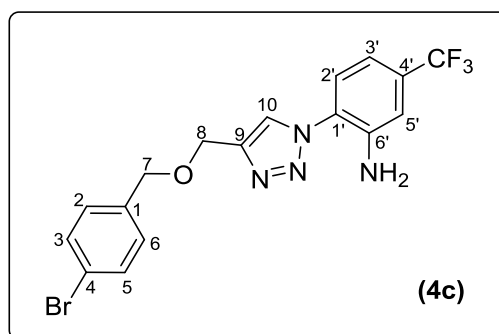
Tf = 100,1 – 100,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3466, 3366, 3132, 3090, 3037, 2895, 2862, 1621, 1518, 1449, 1267, 1116, 739. O espectro é apresentado na Figura 55, pg. 242 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,70 (s, 2H, H-7); 4,81 (s, 2H, H-8); 4,96 (s, 2H, NH_2); 7,07 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, H-3'); 7,15 (d_{ap}, 1H, $J = 1,2$ Hz, H-5'); 7,32-7,35 (m, 2H, H-2/H-6); 7,37-7,43 (m, 4H, H-2'/H-3/H-5/H-4); 7,90 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura 56, pg. 243 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,5 (C-8); 72,9 (C-7); 114,4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,3$ Hz, C-5'); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,3$ Hz, C-3'); 122,9 (C-10); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 180,6$ Hz, CF_3); 124,3 (C-2'); 124,8 (C-1'); 127,9 (C-4/C-2/C-6); 128,5 (C-3/C-5); 132,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 21,6$ Hz, C-4'); 137,6 (C-1); 141,0 (C-9); 145,6 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 57, pg. 244 do anexo.

2-(4-(((4-bromobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4c)



Característica: sólido amarelo claro.

CCD: $R_f = 0,32$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

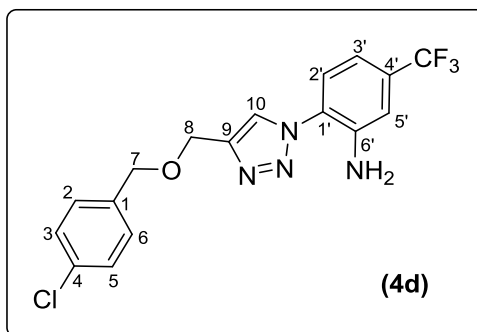
Tf = 97,6 – 97,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3459, 3351, 3213, 3143, 3087, 3050, 2953, 2909, 2868, 1631, 1586, 1456, 1352, 1270, 1163, 1118, 1070, 802, 654, 516. O espectro é apresentado na Figura 58, pg. 245 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,57 (s, 2H, H-7); 4,72 (s, 2H, H-8); 4,90 (s, 2H, NH_2); 7,00 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 7,08 (d_{ap}, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'); 7,19-7,25 (m, 3H, H-2/H-6/H-2'); 7,44 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5); 7,82 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura 59, pg. 246 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,6 (C-8); 72,1 (C-7); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-5'); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-3'); 121,8 (C-4); 123,0 (C-10); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 124,3 (C-2'); 124,8 (C-1'); 129,5 (C-2/C-6); 131,6 (C-3/C-5); 132,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 31,3$ Hz, C-4'); 136,6 (C-1); 141,0 (C-9); 145,3 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 60, pg. 247 do anexo.

2-(4-(((4-clorobenzil)oxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4d)



Característica: sólido amarelo claro.

CCD: $R_f = 0,23$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

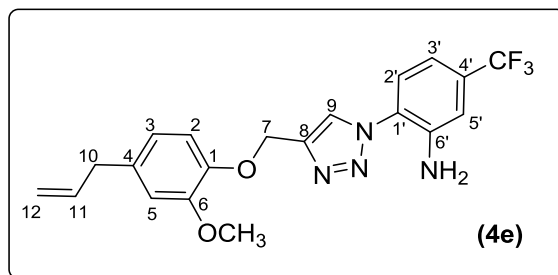
Tf = 95,8 – 96,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3459, 3347, 3213, 3139, 3087, 3050, 2961, 2909, 2868, 1631, 1590, 1519, 1449, 1348, 1274, 1122, 1070, 802, 471. O espectro é apresentado na Figura 61, pg. 248 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,59 (s, 2H, H-7); 4,72 (s, 2H, H-8); 4,88 (s, 2H, NH_2); 7,00 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 7,08 (d_{ap}, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-5'); 7,24-7,29 (m, 5H, H-2/H-3/H-5/H-6/H-2'); 7,76 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura 62, pg. 249 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,6 (C-8); 72,0 (C-7); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-3'); 122,9 (C-10); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 124,3 (C-2'); 124,8 (C-1'); 128,7 (C-3/C-5); 129,2 (C-2/C-6); 132,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,3$ Hz, C-4'); 133,7 (C-4); 136,1 (C-1); 141,0 (C-9); 145,3 (C-6'). O espectro é apresentado na Figura 63, pg. 250 do anexo.

2-(4-((4-*alil*-2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4e)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,25$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

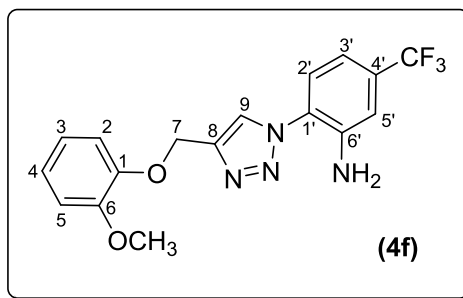
Tf = 144,5 – 144,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3403, 3336, 3221, 3165, 3072, 3002, 2957, 2909, 2879, 2834, 1653, 1590, 1512, 1341, 1229, 1122, 802, 494. O espectro é apresentado na Figura 64, pg. 251 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,37 (d, 2H, $J = 4,4$ Hz, H-10); 3,89 (s, 3H, OCH_3); 4,96 (s, 2H, NH_2); 5,08-5,13 (m, 2H, H-12); 5,37 (s, 2H, H-7); 5,98 (ddt_{ap}, 1H, $J_1 = 11,2$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 4,4$ Hz, H-11); 6,74-6,78 (m, 2H, H-3/H-5); 7,02 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz, H-2); 7,06 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-2'); 7,14 (s, 1H, H-5'); 7,33 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-3'); 8,00 (s, 1H, H-9). O espectro é apresentado na Figura 65, pg. 252 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 39,8 (C-10); 55,8 (OCH_3); 63,3 (C-7); 112,4 (C-5); 114,4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz, C-5'); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz, C-3'); 114,6 (C-2); 115,8 (C-12); 120,5 (C-9); 123,3 (C-3); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 180,6$ Hz, CF_3); 124,3 (C-2'); 124,7 (C-1'); 132,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 21,6$ Hz, C-4'); 134,2 (C-4); 137,4 (C-11); 144,0 (C-6'); 144,8 (C-8); 145,8 (C-1); 149,6 (C-6). O espectro é apresentado na Figura 66, pg. 253 do anexo.

2-(4-((2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4f)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,23$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

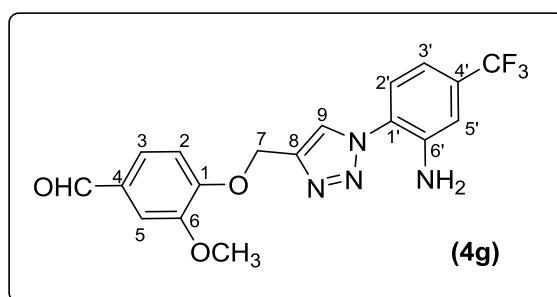
Tf = 175,0 – 175,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3459, 3369, 3228, 3161, 3076, 3013, 2942, 2875, 1634, 1590, 1504, 1456, 1334, 1244, 1177, 1118, 1018, 806, 743, 498. O espectro é apresentado na Figura 67, pg. 254 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,90 (s, 3H, OCH_3); 4,95 (s, 2H, NH_2); 5,40 (s, 2H, H-7); 6,92-6,96 (m, 2H, H-3/H5); 6,99-7,02 (m, 1H, H-4); 7,06-7,08 (m, 1H, H-2); 7,11 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 5,5$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-3'); 7,14 (d_{ap}, 1H, $J = 1,6$ Hz, C-5'); 7,34 (d, 1H, $J = 5,5$ Hz, H-2'); 8,02 (s, 1H, H-9). O espectro é apresentado na Figura 68, pg. 255 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 55,8 (OCH_3); 63,1 (C-7); 111,9 (C-5); 114,4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-5'); 114,5 (C-2); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,0$ Hz, C-3'); 120,9 (C-9); 122,2 (C-2'); 123,4 (C-4); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 180,3$ Hz, CF_3); 124,4 (C-3); 124,7 (C-1'); 132,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 21,6$ Hz, C-4'); 141,6 (C-6'); 144,6 (C-8); 147,5 (C-1); 149,7 (C-6). O espectro é apresentado na Figura 69, pg. 256 do anexo.

4-((1-(2-amino-4-(trifluorometil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metoxi)-3-metoxibenzaldeído (4g)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,53$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

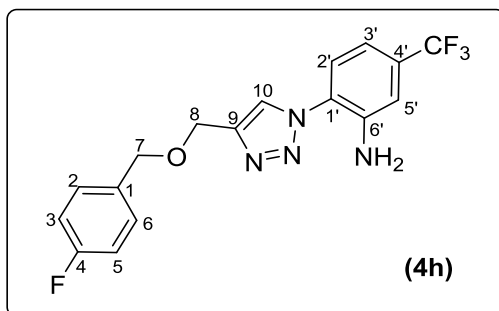
Tf = 159,6 – 160,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3432, 3343, 3228, 3158, 3087, 2964, 2924, 2879, 2831, 1720, 1694, 1638, 1590, 1512, 1456, 1341, 1263, 1110, 1021, 806, 486. O espectro é apresentado na Figura 70, pg. 257 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 3,96 (s, 3H, OCH_3); 4,97 (s, 2H, NH_2); 5,48 (s, 2H, H-7); 7,07 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-2); 7,16 (d_{ap} , 1H, $J = 1,3$ Hz, H-5'); 7,28 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-5); 7,34 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz, H-2'); 7,46-7,47 (m, 1H, H-3); 7,49 (dd, 1H, $J_1 = 5,4$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, H-3'); 8,05 (s, 1H, H-9); 9,89 (s, 1H, CHO). O espectro é apresentado na Figura 71, pg. 258 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 56,0 (OCH_3); 62,7 (C-7); 109,4 (C-5); 112,5 (C-2); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz, C-5'); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,0$ Hz, C-3'); 123,4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 180,6$ Hz, CF_3); 123,6 (C-9); 124,2 (C-2'); 124,6 (C-1'); 126,6 (C-3); 130,8 (C-4); 132,2 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 22,0$ Hz, C-4'); 141,0 (C-6'); 143,5 (C-8); 149,9 (C-6); 152,8 (C-1); 190,8 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 72, pg. 259 do anexo.

2-(4-(((4-fluorobenzil)oxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4h)



Característica: sólido laranja.

CCD: $R_f = 0,23$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

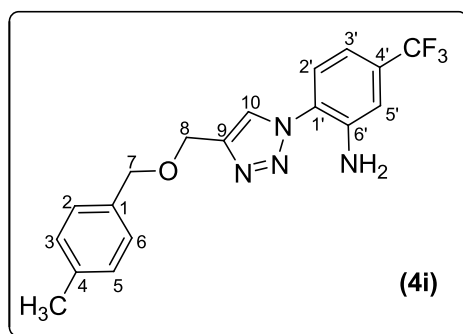
Tf = 63,2 – 63,8 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3459, 3347, 3213, 3132, 3087, 2957, 2920, 2868, 1631, 1597, 1512, 1452, 1348, 1270, 1226, 826, 483. O espectro é apresentado na Figura 73, pg. 260 do anexo.

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4,66 (s, 2H, H-7); 4,79 (s, 2H, H-8); 4,97 (s, 2H, NH_2); 7,05-7,09 (m, 3H, H-3/H-5/H-3'); 7,15 (d_{ap} , 1H, $J = 1,2$ Hz, H-5'); 7,34 (d, 1H, $J = 5,6$ Hz, H-2'); 7,36-7,40 (m, 2H, H-2/H-6); 7,91 (s, 1H, H-10). O espectro é apresentado na Figura 74, pg. 261 do anexo.

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,1 (C-7); 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz, C-5'); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,5$ Hz, C-3'); 115,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 14,0$ Hz, C-3/C-5); 122,9 (C-10); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 180,6$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$); 124,3 (C-2'); 124,8 (C-1'); 129,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 6,0$ Hz, C-2/C-6); 132,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 21,6$ Hz, C-4'); 133,3 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-1); 141,0 (C-6'); 145,4 (C-9); 162,5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 163,0$ Hz, C-4). O espectro é apresentado na Figura 75, pg. 262 do anexo.

2-(4-(((4-metilbenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4i)



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,36$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

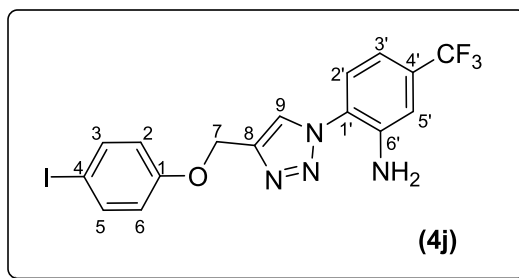
Tf = 128,7 – 129,0 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\text{max}}$: 3462, 3362, 3139, 3091, 3054, 2927, 2890, 2853, 1616, 1601, 1516, 1449, 1337, 1114, 806, 479. O espectro é apresentado na Figura 76, pg. 263 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,35 (s, 3H, $\underline{\text{CH}}_3$); 4,63 (s, 2H, H-7); 4,76 (d, 2H, $J = 0,6$ Hz, H-8); 4,94 (s, 2H, $\underline{\text{NH}}_2$); 7,03 (dd_{ap}, 1H, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, H-3'); 7,11 (d_{ap}, 2H, $J = 2,4$ Hz, H-5'); 7,17 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, H-3/H-5); 7,25-7,31 (m, 3H, H-2/H-6/H-2'); 7,86 (t, 1H, $J = 0,6$ Hz, H-10). O espectro é apresentado na Figura 77, pg. 264 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,1 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$); 63,3 (C-8); 72,8 (C-7); 114,4 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'/C-3'); 122,9 (C-10); 123,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$); 124,3 (C-2'); 124,7 (C-1'); 128,1 (C-3/C-5); 129,1 (C-2/C-6); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,5$ Hz, C-4'); 134,5 (C-1), 137,7 (C-4); 141,0 (C-6'); 145,6 (C-9). O espectro é apresentado na Figura 78, pg. 265 do anexo.

2-(4-((4-iodofenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (4j)



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,43$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

Tf = 135,2 – 135,5 °C.

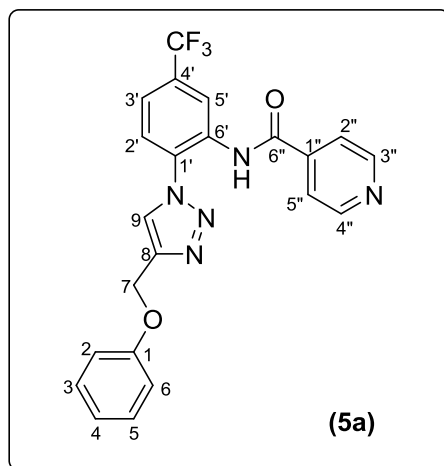
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3470, 3381, 3314, 3232, 3083, 3054, 2938, 2879, 1634, 1582, 1519, 1486, 1452, 1337, 1233, 1129, 999, 813, 501. O espectro é apresentado na Figura 79, pg. 266 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,94 (s, 2H, NH_2); 5,26 (d, 2H, $J = 0,6$ Hz, H-7); 6,80 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-2/H-6); 7,05 (dd_{ap}, 2H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, H-3'); 7,13 (d_{ap}, 1H, $J = 2,4$ Hz, H-5'); 7,32 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-2'); 7,58 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, H-3/H-5); 7,95 (t, 1H, $J = 0,6$ Hz, H-9). O espectro é apresentado na Figura 80, pg. 267 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 61,8 (C-7); 83,7 (C-4), 114,5 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,0$ Hz, C-5'); 114,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 2,0$ Hz, C-3'); 117,1 (C-2/C-6); 123,2 (C-9); 123,4 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,2$ Hz, CF_3); 124,3 (C-2'); 124,6 (C-1'); 132,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 138,4 (C-3/C-5); 141,0 (C-6'); 144,0 (C-8); 157,9 (C-1). O espectro é apresentado na Figura 81, pg. 268 do anexo.

2.3.5. Síntese das amidas 5a-5j

***N*-(2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5a)**



A um balão de fundo redondo (50 mL) foram adicionados cloridrato do cloreto de isonicotinoíla (0,0890 g, 0,500 mmol), trietilamina (0,200 mL, 1,25 mmol), 5,00 mL de diclorometano anidro e 2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (**4a**) (0,0830 g, 0,250 mmol). A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por oito dias. Após o término da reação, evidenciado por CDD, adicionou-se água destilada e a mistura foi transferida para um funil de separação e extraída com diclorometano (4 x 30,0 mL). Os extratos orgânicos foram reunidos e a fase orgânica resultante foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O composto **5a** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila (1:1 v/v) e obtido com 39% (0,043 g, 0,098 mmol) de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,63$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

Tf = 175,0 – 175,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3269, 3158, 3120, 3061, 3035, 2961, 2931, 1668, 1601, 1545, 1501, 1334, 1233, 743. O espectro é apresentado na Figura 2.27 (pg. 135).

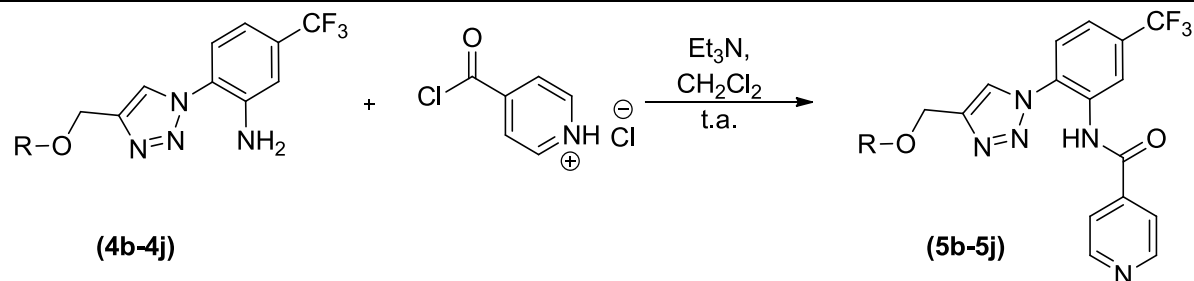
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 5,37 (s, 2H, H-7); 7,03-7,06 (m, 3H, H-2/H-6/H-4); 7,33-7,37 (m, 2H, H-3/H-5); 7,58-7,64 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-2''/H-5''); 8,18 (s, 1H, H-9); 8,88 (dd, 2H, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''); 9,16 (s, 1H, H-5'); 11,15 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 2.28 (pg. 136).

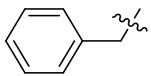
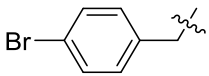
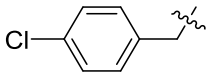
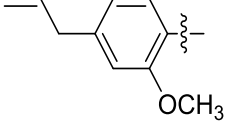
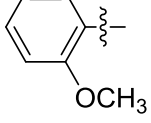
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 61,7 (C-7); 114,7 (C-2/C-6); 120,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-5'); 120,8 (C-2'); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,6$ Hz, C-3'); 121,8 (C-9); 122,6 (C-

4); 123,4 (C-2''/C-5''); 129,7 (C-3/C-5); 130,8 (C-1'); 131,6 (C-6'); 140,6 (C-1''); 145,6 (C-8); 151,0 (C-3''/C-4''); 157,8 (C-1); 163,6 (C-6''). Os sinais (quartetos) do grupo $\underline{C}F_3$ e do carbono C-4' não foram observados. O espectro é apresentado na Figura 2.29 (pg. 137).

Os compostos **5b-5j** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **5a**. Na Tabela 2.4, pg. 70 estão apresentadas informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **5b-5j**. O composto **5g** foi purificado utilizando como eluente acetato de etila. Os demais compostos foram purificados com hexano-acetato de etila (1:1 v/v).

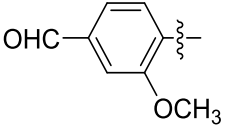
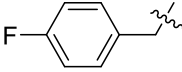
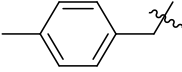
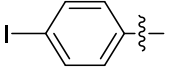
Tabela 2.4 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **5b-5j**



Composto	R	Massa da anilina (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de cloreto de acila (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Volume de Et ₃ N (mL)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (dias)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
5b		0,160/0,450 (4b)	0,168/0,942	0,310/2,25	10	0,107/0,236	51
5c		0,150/0,350 (4c)	0,132/0,740	0,242/1,75	7	0,095/0,178	51
5d		0,150/0,390 (4d)	0,146/0,819	0,270/1,95	7	0,150/0,307	79
5e		0,150/0,370 (4e)	0,278/1,56	0,300/1,85	8	0,151/0,296	80
5f		0,150/0,410 (4f)	0,307/1,72	0,280/2,05	8	0,075/0,159	40

O volume de diclorometano utilizado em todas as reações foi de 5,00 mL.

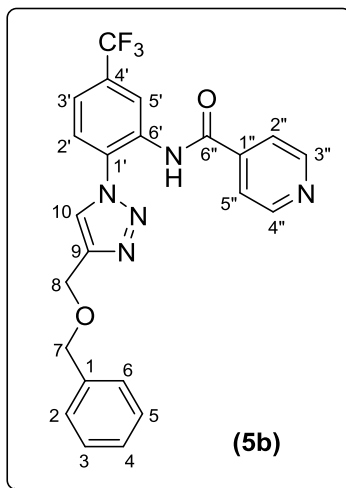
Tabela 2.4 – Continuação

Composto	R	Massa de anilina (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de cloreto de acila (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de Et ₃ N (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Tempo de reação (dias)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
5g		0,150/0,380 (4g)	0,284/1,59	0,260/1,90	10	0,087/0,174	46
5h		0,150/0,400 (4h)	0,300/1,68	0,280/2,00	10	0,134/0,284	69
5i		0,150/0,410 (4i)	0,307/1,72	0,280/2,05	8	0,129/0,276	67
5j		0,150/0,320 (4j)	0,240/1,34	0,220/1,60	8	0,117/0,207	64

O volume de diclorometano utilizado em todas as reações foi de 5,00 mL.

As estruturas dos compostos **5b-5j** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

***N*-(2-(4-((benziloxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5b)**



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,39$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

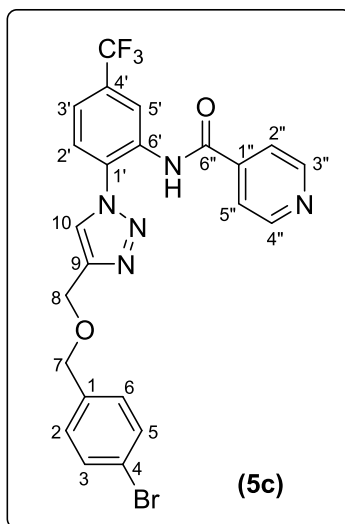
Tf = 114,3 – 115,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3251, 3132, 3083, 3057, 2976, 2927, 2875, 2809, 1701, 1608, 1556, 1437, 1334, 1129, 743, 672, 498. O espectro é apresentado na Figura 82, pg. 269 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,68 (s, 2H, H-7); 4,79 (d_{ap} , 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,29-7,39 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6); 7,55 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,78 (dd, 2H, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H-2''/H-5''); 8,06 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 8,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H-3''/H-4''); 9,12 (s, 1H, H-5'); 11,17 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 83, pg. 270 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 73,2 (C-7); 120,8 (C-2'); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,1$ Hz, CF_3); 121,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,6 (C-10); 123,2 (C-2''/C-5''); 127,9 (C-2/C-6); 128,0 (C-4); 128,1 (C-1'); 128,5 (C-3/C-5); 131,5 (C-6'); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,2$ Hz, C-4'); 137,2 (C-1); 140,6 (C-1''); 146,5 (C-9); 151,0 (C-3''/C-4''); 163,6 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 84, pg. 271 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-bromobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5c)**



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,36$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

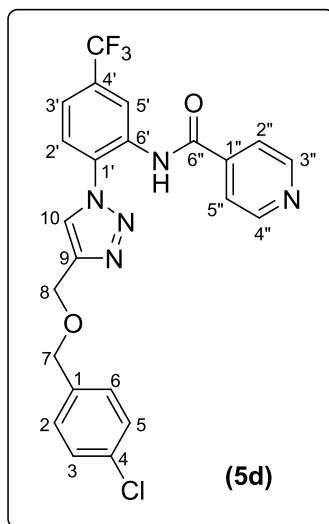
Tf = 149,6 – 150,2 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3262, 3158, 3087, 3039, 2953, 2916, 2864, 1657, 1594, 1556, 1504, 1330, 1118, 1051, 847, 598. O espectro é apresentado na Figura 85, pg. 272 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,63 (s, 2H, H-7); 4,79 (s, 2H, H-8); 7,24 (dap, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2/H-6); 7,48 (dap, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-3/H-5); 7,55-7,56 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,77 (dd, 2H, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, H-2''/H-5''); 8,06 (tap, 1H, $J = 0,8$ Hz, H-10); 8,83 (dd, 2H, $J_1 = 4,6$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, H-3''/H-4''); 9,11 (s, 1H, H-5'); 11,15 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 86, pg. 273 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,4 (C-7); 120,7 (C-2'); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 121,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-3'); 121,9 (C-4); 122,5 (C-10); 123,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,2$ Hz, CF_3); 123,2 (C-2''/C-5''); 128,1 (C-1'); 129,5 (C-2/C-6); 131,5 (C-6'); 131,6 (C-3/C-5); 132,1 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 136,3 (C-1); 140,5 (C-1''); 146,2 (C-9); 151,0 (C-3''/C-4''); 163,6 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 87, pg. 274 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-clorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5d)**



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

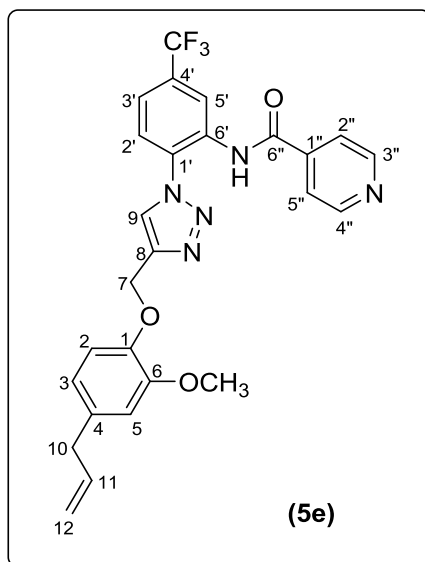
Tf = 142,0 – 142,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3254, 3158, 3094, 3039, 2949, 2912, 2864, 1657, 1597, 1556, 1504, 1326, 1177, 1118, 1047, 843, 598. O espectro é apresentado na Figura 88, pg. 275 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,64 (s, 2H, H-7); 4,78 (d, 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,28-7,34 (m, 4H, H-2/H-3/H-5/H-6); 7,55-7,56 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,77 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-2''/H-5''); 8,07 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 8,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-3''/H-4''); 9,11 (s, 1H, H-5'); 11,15 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 89, pg. 276 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,5 (C-8); 72,4 (C-7); 120,8 (C-2'); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,5 (C-10); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 123,3 (C-2''/C-5''); 128,1 (C-1'); 128,7 (C-3/C-5); 129,2 (C-2/C-6); 131,5 (C-6'); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 133,9 (C-4); 135,8 (C-1); 140,6 (C-1''); 146,3 (C-9); 151,0 (C-3''/C-4''); 163,6 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 90, pg. 277 do anexo.

***N*-(2-(4-((4-alil-2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5e)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

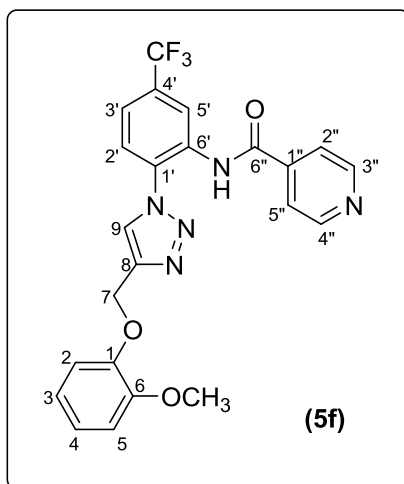
Tf = 122,5 – 123,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3265, 3132, 3083, 2938, 2912, 2879, 1701, 1597, 1512, 1441, 1337, 1226, 828, 676, 479. O espectro é apresentado na Figura 91, pg. 278 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,33 (dt, 2H, $J_1 = 6,6$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, H-10); 3,85 (s, 3H, OCH_3); 5,04-5,11 (m, 2H, H-12); 5,36 (d_{ap} , 2H, $J = 0,7$ Hz, H-7); 5,93 (dd_{tap} , 1H, $J_1 = 16,8$ Hz, $J_2 = 10,2$ Hz, $J_3 = 6,6$ Hz, H-11); 6,69-6,75 (m, 2H, H-3/H-5); 6,97 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, H-2), 7,55-7,56 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,77 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-2''/H-5''); 8,19 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-9); 8,83 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''); 9,11 (s, 1H, H-5'); 11,12 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 92, pg. 279 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 39,8 (C-10); 55,8 (OCH_3); 63,2 (C-7); 112,5 (C-5); 114,8 (C-2); 115,9 (C-12); 120,6 (C-9); 120,7 (C-2'); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 121,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,6 (C-3); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 123,7 (C-2''/C-5''); 128,2 (C-1'); 131,6 (C-6'); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,5$ Hz, C-4'); 134,6 (C-4); 137,3 (C-11); 140,6 (C-1''); 145,6 (C-8); 145,8 (C-1); 149,7 (C-6); 151,1 (C-3''/C-4''); 163,7 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 93, pg. 280 do anexo.

***N*-(2-(4-((2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5f)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,37$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

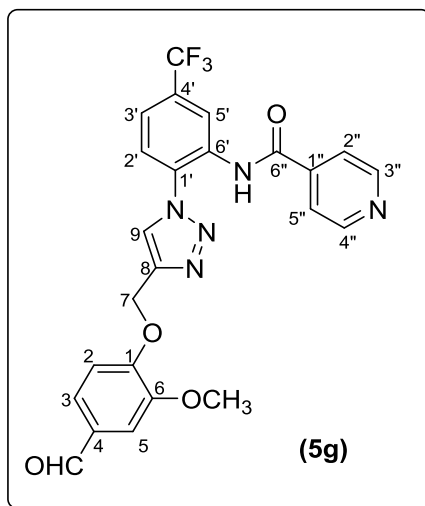
Tf = 155,3 – 155,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3258, 3135, 3083, 2994, 2946, 2883, 1701, 1594, 1571, 1556, 1504, 1437, 1122, 1021, 735, 479. O espectro é apresentado na Figura 94, pg. 281 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,86 (s, 3H, OCH_3); 5,38 (d_{ap} , 2H, $J = 0,7$ Hz, H-7); 6,87-7,07 (m, 4H, H-2/H-3/H-4/H-5); 7,55-7,56 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,76 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-2''/H-5''); 8,19 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-9); 8,83 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''); 9,11 (s, 1H, H-5'); 11,10 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 95, pg. 282 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,8 (OCH_3); 63,0 (C-7); 112,0 (C-5); 114,7 (C-2); 120,7 (C-2'); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-5'); 120,9 (C-9); 121,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,5$ Hz, C-3'); 122,6 (C-4); 122,7 (C-3); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 123,7 (C-2''/C-5''); 128,1 (C-1'); 131,6 (C-6'); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 140,6 (C-1''); 145,7 (C-8); 147,3 (C-1); 149,8 (C-6); 151,1 (C-3''/C-4''); 163,7 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 96, pg. 283 do anexo.

***N*-(2-(4-((4-formil-2-metoxifenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5g)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,57$ (acetato de etila).

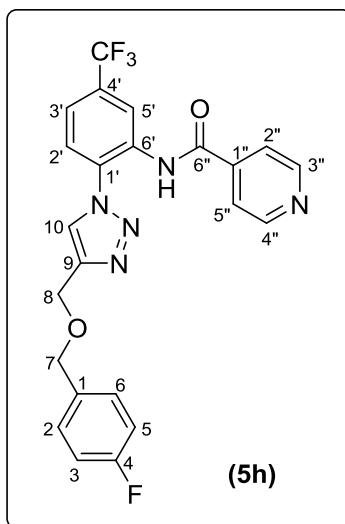
Tf = 237,4 – 237,9 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3281, 3147, 3110, 3073, 2984, 2950, 2884, 1659, 1680, 1587, 1550, 1501, 1438, 1342, 1264, 1119, 1000, 840, 673, 472. O espectro é apresentado na Figura 97, pg. 284 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,74 (s, 3H, OCH_3); 5,29 (s, 2H, H-7); 7,34-7,35 (m, 2H, H-2'/H-2); 7,44 (dd, 1H, $J_1 = 8,3$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, H-3'); 7,63 (dd, 2H, $J_1 = 4,5$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, H-2''/H-5''); 7,85-7,94 (m, 1H, H-3); 8,12 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-5); 8,68 (dd_{ap}, 3H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''/H-5'); 8,71 (s, 1H, H-9); 9,78 (s, 1H, CHO). O sinal do hidrogênio NH não foi observado. O espectro é apresentado na Figura 98, pg. 285 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 55,9 (OCH_3); 61,8 (C-7); 110,3 (C-5); 113,0 (C-2); 121,9 (C-2'); 123,8 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 124,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 125,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-3'); 126,2 (C-2''/C-5''); 126,3 (C-3); 127,5 (C-9); 130,4 (C-6'); 130,5 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,5$ Hz, C-4'); 132,2 (C-1'); 135,1 (C-4); 141,0 (C-1''); 143,0 (C-8); 149,7 (C-6); 150,7 (C-3''/C-4''); 153,1 (C-1); 164,9 (C-6''); 192,0 (CHO). O espectro é apresentado na Figura 99, pg. 286 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-fluorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5h)**



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,44$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

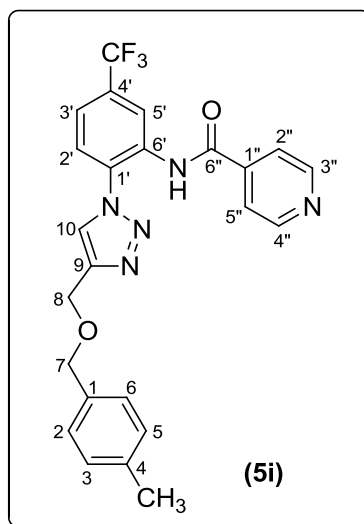
Tf = 116,2 – 116,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3262, 3158, 3128, 3087, 3042, 2961, 2916, 2871, 1657, 1601, 1556, 1504, 1326, 1111, 839, 754, 572. O espectro é apresentado na Figura 100, pg. 287 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,64 (s, 2H, H-7); 4,78 (d_{ap} , 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,04 (t_{ap} , 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3/H-5); 7,31-7,38 (m, 2H, H-2/H-6); 7,55-7,56 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,77 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-2''/H-5''); 8,07 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 8,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, H-3''/H-4''); 9,11 (s, 1H, H-5'); 11,12 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 101, pg. 288 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,5 (C-7); 115,5 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,8$ Hz, C-3/C-5); 120,8 (C-2'); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,5 (C-10); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 123,3 (C-2''/C-5''); 128,1 (C-1'); 129,8 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz, C-2/C-6); 131,6 (C-6'); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 133,1 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 4,5$ Hz, C-1); 140,6 (C-1''); 146,3 (C-9); 151,0 (C-3''/C-4''); 162,5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 245,3$ Hz, C-4); 163,3 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 102, pg. 289 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-metilbenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5i)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,51$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

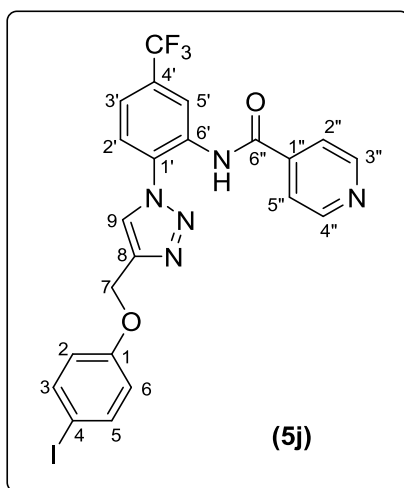
Tf = 151,0 – 151,4 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3251, 3132, 3087, 3057, 2998, 2927, 2860, 1697, 1608, 1556, 1512, 1437, 1341, 1170, 802, 672, 483. O espectro é apresentado na Figura 103, pg. 290 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 2,34 (s, 3H, CH_3); 4,64 (s, 2H, H-7); 4,77 (d_{ap} , 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,16 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz, H-3/H-5); 7,26 (d_{ap} , 2H, $J = 8,0$ Hz, H-2/H-6); 7,54-7,55 (m, 2H, H-2'/H-3'); 7,77 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-2''/H-5''); 8,04 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 8,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''); 9,12 (s, 1H, H-5'); 11,18 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 104, pg. 291 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 21,1 (CH_3); 63,2 (C-8); 73,1 (C-7); 120,7 (C-2'); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 121,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,4 (C-10); 123,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 123,2 (C-2''/C-5''); 128,1 (C-2/C-6/C-1'); 129,2 (C-3/C-5); 131,5 (C-6'); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 134,2 (C-1); 137,9 (C-4); 140,6 (C-1''); 146,6 (C-9); 151,0 (C-3''/C-4''); 163,6 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 105, pg. 292 do anexo.

***N*-(2-(4-((4-iodofenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)isonicotinamida (5j)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,563$ (hexano-acetato de etila 1:1 v/v).

Tf = 212,7 – 213,0 °C.

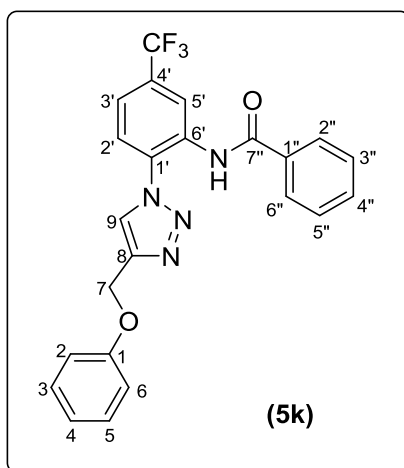
IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3262, 3158, 3117, 3050, 2946, 2886, 1668, 1597, 1538, 1486, 1326, 1233, 1114, 995, 821, 687, 509. O espectro é apresentado na Figura 106, pg. 293 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ : 7,36 (s, 2H, H-7); 9,03 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, H-2/H-6); 9,72 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, H-3/H-5); 9,85 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-2''/H-5''); 10,34 (dd, 1H, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, H-3'); 10,12 (d, 1H, $J = 8,8$ Hz, H-2'); 10,36 (d, 1H, $J = 2,1$ Hz, H-5'); 10,93 (dd, 3H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, H-3''/H-4''/H-9); 12,88 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 107, pg. 294 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ : 63,5 (C-7); 86,2 (C-4); 120,1 (C-2/C-6); 124,1 (C-2'); 126,0 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 1226,6 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 127,2 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 128,2 (C-2''/C-5''); 129,5 (C-9); 132,4 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,3$ Hz, C-4'); 134,4 (C-1'); 137,1 (C-6'); 140,6 (C-3/C-5); 143,2 (C-1''); 145,6 (C-8); 152,9 (C-3''/C-4''); 160,4 (C-1); 166,9 (C-6''). O espectro é apresentado na Figura 108, pg. 295 do anexo.

2.3.6. Síntese das amidas 5k-5t

***N*-(2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5k)**



A um balão de fundo redondo (100 mL) foram adicionados ácido benzóico (0,082 g, 0,675 mmol), TBTU (0,217 g, 0,675 mmol), trietilamina (0,09 mL, 0,675 mmol) e 5,00 mL de acetato de etila. A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Posteriormente foi adicionado o composto 2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (**4a**) (0,150 g, 0,450 mmol) e o sistema foi mantido nas mesmas condições por 8 dias. Após o término da reação, evidenciado por CDD, 30 mL de água destilada foram adicionados à mistura e esta foi transferida para um funil de separação. A fase orgânica foi separada, lavada com solução saturada de carbonato de sódio, seca com sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O composto **5k** foi purificado por coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano-acetato de etila-clorofórmio (4:1:1 v/v) e obtido com 17% (0,033 g, 0,075 mmol) de rendimento.

Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,57$ (hexano-acetato de etila-clorofórmio 4:1:1 v/v).

Tf = 167,2 – 167,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3273, 3150, 3109, 3072, 2964, 2924, 2849, 1731, 1660, 1601, 1534, 1497, 1330, 1259, 1170, 1014, 790, 683, 509. O espectro é apresentado na Figura 2.34 (pg. 146).

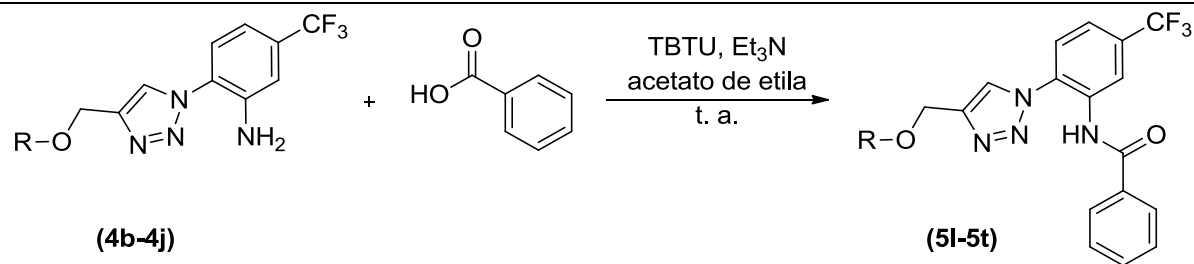
RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,34 (d, 2H, $J = 0,8$ Hz, H-7); 6,98- 7,04 (m, 3H, H-2/H-6/H-4); 7,29-7,35 (m, 2H, H-3/H-5); 7,49-7,61 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,93-7,97 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,11 (t, 1H, $J = 0,8$ Hz, H-9); 9,14 (d_{ap} ,

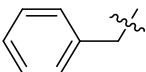


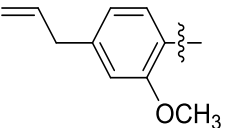
1H, $J = 1,5$ Hz, H-5'); 10,82 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 2.35 (pg. 147).

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 61,7 (C-7); 114,7 (C-2/C-6); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 121,7 (C-2'); 122,8 (C-9); 123,5 (C-4); 125,0 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,5$ Hz, $\underline{\text{CF}}_3$); 127,2 (C-2''/C-6''); 128,1 (C-1'); 129, (C-3''/C-5''); 129,6 (C-3/C-5); 131,9 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 132,4 (C-6'); 132,5 (C-4''); 133,5 (C-1''); 145,4 (C-8); 157,9 (C-1); 165,5 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 2.36 (pg. 148).

Os compostos **5l-5t** foram sintetizados empregando-se a mesma metodologia descrita para o preparo do composto **5k**. Na Tabela 2.5, pg. 83 estão apresentadas informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos **5l-5t**. Os compostos foram purificados utilizando como eluente hexano-acetato de etila-clorofórmio (4:1:1 v/v).

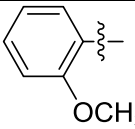
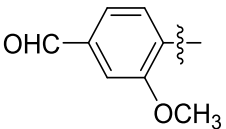
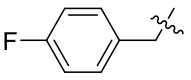
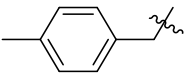

Tabela 2.5 – Informações relativas às reações realizadas para o preparo dos compostos 5I-5t



Composto	R	Massa de anilina (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de ácido benzóico (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de TBTU (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Volume de Et ₃ N (mL)	Tempo de reação (dias)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
5I		0,150/0,430 (4b)	0,079/0,645	0,207/0,645	0,0900/ 0,645	8	0,071/0,157	36
5m		0,150/0,350 (4c)	0,065/0,525	0,169/0,525	0,073/ 0,525	8	0,068/0,128	36
5n		0,150/0,390 (4d)	0,072/0,585	0,189/0,585	0,080/ 0,585	8	0,098/0,201	51
5o		0,150/0,370 (4e)	0,068/0,560	0,180/0,560	0,078/ 0,560	8	-	-

O volume de acetato de etila utilizado em todas as reações foi de 5,00 mL.

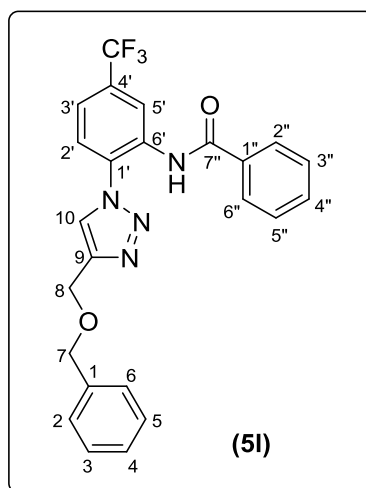
Tabela 2.5 – Continuação

Composto	R	Massa de anilina (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de ácido benzóico (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Massa de TBTU (g)/Quantidade de matéria (mmol)	Volume de ET ₃ N (mL)	Tempo de reação (dias)	Massa de produto obtida (g)/ Quantidade de matéria (mmol)	Rendimento (%)
5p		0,150/0,410 (4f)	0,075/0,615	0,197/0,615	0,085/ 0,615	8	-	-
5q		0,150/0,380 (4g)	0,069/0,570	0,183/0,570	0,079/ 0,570	8	-	-
5r		0,150/0,400 (4h)	0,073/0,600	0,193/0,600	0,084/ 0,600	8	0,043/ 0,0914	22
5s		0,150/0,410 (4i)	0,076/0,620	0,199/0,620	0,086/ 0,620	8	0,013/ 0,0279	7
5t		0,150/0,320 (4j)	0,059/0,480	0,154/0,480	0,067/ 0,480	8	0,020/ 0,0354	11

O volume de acetato de etila utilizado em todas as reações foi de 5,00 mL.

As estruturas dos compostos **5l-5t** são suportadas pelos dados apresentados a seguir.

***N*-(2-(4-((benziloxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5l)**



Característica: sólido amarelo.

CCD: $R_f = 0,41$ (hexano-acetato de etila-clorofórmio 4:1:1 v/v).

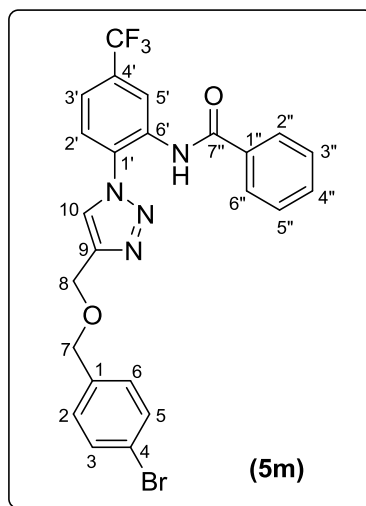
Tf = 133,1 – 133,6 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3259, 3147, 3109, 3069, 2961, 2916, 2864, 1697, 1653, 1601, 1538, 1452, 1326, 1125, 1044, 821, 694, 501. O espectro é apresentado na Figura 109, pg. 296 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,68 (s, 2H, H-7); 4,80 (d, 2H, $J = 0,6$ Hz, H-8); 7,29- 7,39 (m, 5H, H-2/H-3/H-4/H-5/H-6); 7,47-7,55 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,93-7,96 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,03 (t, 1H, $J = 0,6$ Hz, H-10); 9,13 (s, 1H, H-5'); 10,86 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 110, pg. 297 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 73,1 (C-7); 120,8 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,0$ Hz, C-5'); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,7 (C-2'); 123,3 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 123,4 (C-10); 127,3 (C-2''/C-6''); 127,9 (C-2/C-6); 128,0 (C-4); 128,2 (C-1'); 128,4 (C-4''); 128,5 (C-3/C-5); 129,0 (C-3''/C-5''); 130,1 (C-6'); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz, C-4'); 133,6 (C-1''); 137,3 (C-1); 146,3 (C-9); 165,6 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 111, pg. 298 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-bromobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5m)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,30$ (hexano-acetato de etila-clorofórmio 4:1:1 v/v).

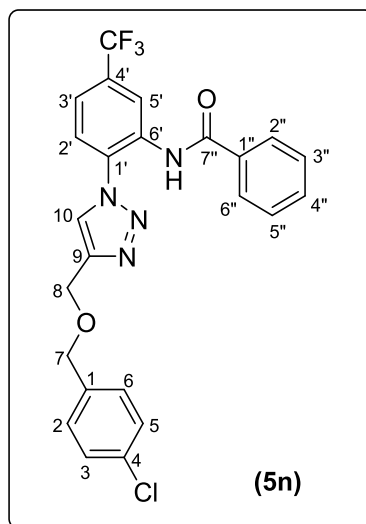
Tf = 120,2 – 121,3 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3273, 3161, 3087, 3061, 2968, 2916, 2871, 1697, 1653, 1579, 1504, 1482, 1326, 1117, 1111, 873, 709, 598. O espectro é apresentado na Figura 112, pg. 299 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,62 (s, 2H, H-7); 4,78 (d, 2H, $J = 0,8$ Hz, H-8); 7,22- 7,26 (m, 2H, H-2/H-6); 7,45-7,57 (m, 7H, H-3/H-5/H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,92-7,95 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,03 (t, 1H, $J = 0,8$ Hz, H-10); 9,12 (s, 1H, H-5'); 10,83 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 113, pg. 300 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,3 (C-7); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 121,9 (C-4); 122,8 (C-2'); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz, CF_3); 123,4 (C-10); 127,2 (C-2''/C-6''); 128,2 (C-1'); 128,4 (C-4''); 129,0 (C-3''/C-5''); 129,5 (C-2/C-6); 130,1 (C-6'); 131,6 (C-3/C-5); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 30,8$ Hz, C-4'); 133,4 (C-1''); 136,3 (C-1); 146,0 (C-9); 165,6 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 114, pg. 301 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-clorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5n)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,28$ (hexano-acetato de etila-clorofórmio 4:1:1 v/v).

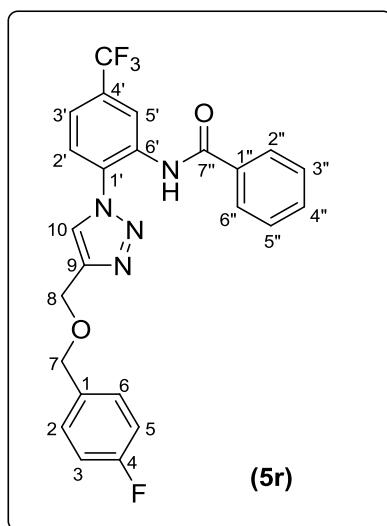
Tf = 123,4 – 124,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3273, 3161, 3124, 3091, 3061, 2968, 2916, 2875, 1653, 1579, 1504, 1486, 1326, 1177, 1111, 1073, 832, 717. O espectro é apresentado na Figura 115, pg. 302 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,63 (s, 2H, H-7); 4,78 (d, 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,29- 7,34 (m, 4H, H-2/H-3/H-5/H-6); 7,47-7,59 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,92-7,95 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,03 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 9,11 (s, 1H, H-5'); 10,82 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 116, pg. 303 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,2 (C-7); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,1 (C-2'); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 123,4 (C-10); 127,2 (C-2''/C-6''); 128,2 (C-1'); 128,7 (C-3/C-5); 129,0 (C-3''/C-5''); 129,2 (C-2/C-6); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,5$ Hz, C-4'); 132,3 (C-1''); 132,5 (C-4''); 133,4 (C-6'); 133,8 (C-4); 135,8 (C-1); 146,0 (C-9); 165,6 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 117, pg. 304 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-fluorobenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5r)**



Característica: sólido laranja.

CCD: $R_f = 0,66$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

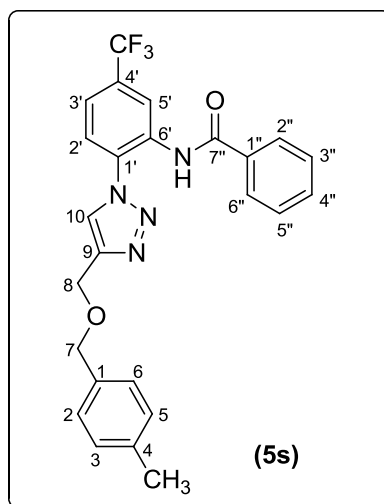
Tf = 91,8 – 92,7 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3251, 3143, 3106, 3069, 2968, 2938, 2857, 1694, 1653, 1605, 1504, 1419, 1326, 1222, 1122, 1040, 824, 709, 568. O espectro é apresentado na Figura 118, pg. 305 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 4,62 (s, 2H, H-7); 4,78 (d, 2H, $J = 0,7$ Hz, H-8); 7,03 (t_{ap} , 2H, $J = 8,7$ Hz, H-3/H-5), 7,45- 7,59 (m, 7H, H-2/H-6/H-2'/ H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,92-7,95 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,04 (t, 1H, $J = 0,7$ Hz, H-10); 9,11 (s, 1H, H-5'); 10,84 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 119, pg. 306 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 63,4 (C-8); 72,3 (C-7); 115,4 (d, $^2J_{\text{C-F}} = 21,0$ Hz, C-3/C-5); 120,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-5'); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,4$ Hz, C-3'); 122,8 (C-2'); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 271,3$ Hz, CF_3); 123,4 (C-10); 127,2 (C-2''/C-6''); 128,2 (C-1'); 128,4 (C-4''); 129,0 (C-3''/C-5''); 129,7 (d, $^3J_{\text{C-F}} = 8,3$ Hz, C-2/C-6); 131,8 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 132,3 (C-1''); 133,1 (d, $^4J_{\text{C-F}} = 3,0$ Hz, C-1); 137,0 (C-6'); 146,0 (C-9); 162,5 (d, $^1J_{\text{C-F}} = 244,5$ Hz, C-4); 165,6 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 120, pg. 307 do anexo.

***N*-(2-(4-(((4-metilbenzil)oxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5s)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,49$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

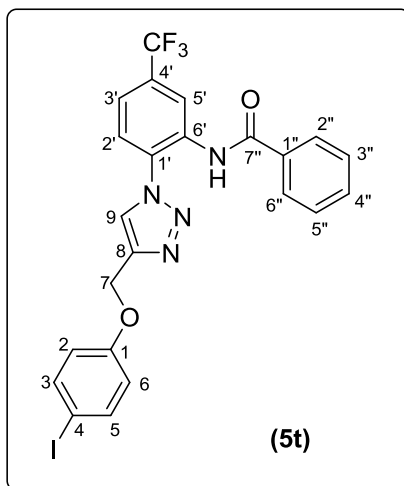
Tf = 141,9 – 142,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3265, 3158, 3087, 2968, 2927, 2860, 1731, 1653, 1619, 1579, 1490, 1330, 1116, 1114, 876, 691. O espectro é apresentado na Figura 121, pg. 308 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 3,26 (s, 3H, CH_3); 5,55 (s, 2H, H-7); 5,70 (s, 2H, H-8); 8,08 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-3/H-5), 8,18 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, H-2/H-6); 8,40-8,47 (m, 5H, H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 8,86 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, H-2''/H-6''); 8,92 (s, 1H, H-10); 10,06 (s, 1H, H-5'); 11,79 (s, 1H, NH). O espectro é apresentado na Figura 122, pg. 309 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 22,0 (CH_3); 64,2 (C-8); 74,0 (C-7); 121,7 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,1$ Hz, C-5'); 121,9 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 123,6 (C-2'); 124,1 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 270,0$ Hz, CF_3); 124,2 (C-10); 128,2 (C-2/C-6); 129,0 (C-2''/C-6''); 129,3 (C-1'); 129,9 (C-3''/C-5''); 130,1 (C-3/C-5); 132,7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,5$ Hz, C-4'); 133,2 (C-6'); 133,4 (C-4''); 134,4 (C-1''); 135,2 (C-1); 138,7 (C-4); 147,3 (C-9); 166,4 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 123, pg. 310 do anexo.

***N*-(2-(4-((4-iodofenoxi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (5t)**



Característica: sólido branco.

CCD: $R_f = 0,56$ (hexano-acetato de etila 3:1 v/v).

Tf = 176,9 – 177,5 °C.

IV (ATR) $\bar{\nu}_{\max}$: 3247, 3165, 3094, 3057, 2927, 2890, 2853, 1653, 1582, 1504, 1482, 1326, 1233, 1114, 995, 691, 509. O espectro é apresentado na Figura 124, pg. 311 do anexo.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ : 5,28 (s, 2H, H-7); 6,78 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, H-2/H-6); 7,48-7,60 (m, 7H, H-3/H-5/H-2'/H-3'/H-3''/H-4''/H-5''); 7,91-7,94 (m, 2H, H-2''/H-6''); 8,10 (s, 1H, H-9); 9,12 (s, 1H, H-5'). O espectro é apresentado na Figura 125, pg. 312 do anexo.

RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ : 61,7 (C-7); 83,9 (C-4); 117,0 (C-2/C-6); 121,0 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 4,1$ Hz, C-5'); 121,1 (q, $^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz, C-3'); 122,9 (C-2''); 123,2 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 275,1$ Hz, CF_3); 123,6 (C-9); 127,2 (C-2''/C-6''); 128,1 (C-1'); 129,0 (C-3''/C-5''); 132,0 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 33,3$ Hz, C-4'); 132,3 (C-6'); 132,6 (C-4''); 133,4 (C-1''); 138,4 (C-3/C-5); 144,8 (C-8); 157,8 (C-1); 165,5 (C-7''). O espectro é apresentado na Figura 126, pg. 313 do anexo.

2.4. INVESTIGAÇÃO DAS ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS 3a, 4a E 5a POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X DE MONOCRISTAL (DRXM)

Os cristais foram selecionados para o experimento de DRXM e tiveram seus parâmetros de cela unitária determinados. Após indexação das celas unitárias usando o conjunto de programas HKL Denzo-Scalepack (OTWINOWSKI & MINOR, 1997), a configuração angular do difratômetro Kappa-CCD (Enraf-Nonius®), equipado com uma câmera CCD (*Charge-Coupled*

Device) de 95 mm como detector e geometria angular k , foi calculada assumindo liberdade dos eixos f e w , com o eixo k fixo, usando o programa COLLECT. Uma vez determinada a estratégia de coleta, os dados completos de DRXM foram coletados à temperatura ambiente (298 K) após exposição à radiação $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) monocromada por grafite e gerada a 60 kV e 33 mA. Não foi aplicada correção por absorção aos dados devido ao baixo coeficiente de absorção das amostras, desprovidas de metais. Após a coleta dos dados completos, as reflexões foram indexadas, integradas e corrigidas por fatores de escala físicos e geométricos, e cristalográficos, devido às equivalências por simetria. Para estes propósitos, o programa HKL Denzo-Scalepack foi utilizado (OTWINOWSKI & MINOR, 1997).

Os dados tratados de difração de raios X foram analisados como segue: resolução da estrutura cristalina através dos métodos diretos de recuperação de fase com o programa SHELXS-97 (SHELDRICK, 2008); refinamento dessa estrutura pelo método dos mínimos quadrados de matriz completa utilizando o quadrado dos fatores de estrutura com o programa SHELXL-97 (SHELDRICK, 2008). Os programas utilizados na resolução e refinamento da estrutura foram acessados por meio da interface de programas de cristalografia WinGX (FARRUGIA, 1999). Posições fixas e parâmetros térmicos isotrópicos fixos [$U_{iso}(\text{H}) = 1,2U_{eq}(\text{C}, \text{N})$] foram adotados para os átomos de hidrogênio acompanhando as posições dos carbonos e nitrogênios aos quais foram ligados.

2.4.1. Dados cristalográficos

Nas Tabelas 2.6, pg. 92 e 2.7, pg. 93, estão apresentados os dados cristalográficos correspondentes aos compostos **3a**, **4a** e **5a**.

Tabela 2.6 - Dados cristalográficos e refinamento estrutural dos compostos **3a**, **4a**, **5a**.

Composto		3a	4a	5a
Fórmula mínima		C ₁₆ H ₁₁ F ₃ N ₄ O ₃	C ₁₆ H ₁₃ F ₃ N ₄ O	C ₂₂ H ₁₆ F ₃ N ₅ O ₂
Massa molar da fórmula mínima (g/mol)		364.29	334.30	439.40
Sistema cristalino		monoclínico	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial		P 2(1)/c	P 21/c	P 21/n
<i>Z</i> / <i>Z'</i>		4/0	4/0	4/0
Dimensões da cela unitária	<i>a</i> (Å)	20.155(7)	17.555(13)	4.9738(15)
	<i>b</i> (Å)	5.5306(15)	11.708(8)	21.948(9)
	<i>c</i> (Å)	14.913(5)	7.542(4)	17.966(6)
	α (°)	90	90	90
	β (°)	107.381(15)	94.08(2)	91.401(16)
	γ (°)	90	90	90
Volume da célula unitária (Å ³)		1586.4(9)	1546.2(18)	1960.7(12)
Densidade calculada (mg/m ³)		1.525	1.436	1.488
Coeficiente de absorção μ (mm ⁻¹)		0.131	0.118	0.118
Intervalo θ para coleta de dados (°)		2.118 to 25.194	2.092 to 24.611	2.175 to 25.552
Intervalos dos índices	<i>h</i>	-24 to 24	-20 to 20	-5 to 6
	<i>k</i>	-5 to 6	-13 to 13	-16 to 26
	<i>l</i>	-16 to 17	-8 to 6	-21 to 21
Reflexões coletadas		6318	8808	7503
Reflexões independentes		2857	2612	3650
Reflexões únicas com $I > 2\sigma(I)$		2043	1607	1739
Fator de simetria (R_{int})		0.0374	0.0553	0.0703
Completeza para $\theta = 25^\circ$ (%)		98.8	98.5	95.0
<i>F</i> (000)		744.0	688.0	904.0
Parâmetros refinados		236	217	290
Concordância sobre F^2		1.042	1.435	0.956
Índice residual para $I > 2\sigma(I)$		0.0529	0.1195	0.0629
$wR2$ para todos os dados		0.1601	0.3996	0.1796
$\Delta\rho_{m\acute{a}x}/\Delta\rho_{m\acute{i}n}$ (e/Å ³)		0.4/-0.4	0.9/-0.8	0.4/-0.3

Tabela 2.7 - Distâncias interatômicas (Å) e ângulos interatômicos (°) para as estruturas dos compostos **3a**, **4a**, **5a**.

Composto	D-H...A (Å)	D-H (Å)	H...A (Å)	D...A (Å)	D-H...A (°)
3a	C8-H8...N3	0.93	2.52	3.345(3)	148
	C6-H6...O3	0.93	2.69	3.341(4)	128
	C8-H8...O1	0,93	2.76	2.862(3)	87
	C4...N2		3.14		
4a	N4-H4B...N2	0.86	2.32	2.873(6)	122
	N4-H4B...N3	0.86	2.47	3.075(7)	128
	C7-H7...F2	0.93	2.58	3.451(12)	155
	N4-H4A...O1	0.86	2.66	3.407(6)	147
	N4-H4A...C11	0.86	2.69	3.442(7)	146
	C16-H16...N2	0.93	2.72	3.606(7)	160
	C6-H6...C3	0.93	2.90	3.710(8)	147
	N3...N4		3.08	3.075(7)	
5a	N4-H4...O2	0.86	2.01	2.860(4)	169
	C6-H6...N5	0.93	2.60	3.479(5)	158
	C16-H16...N3	0.93	2.63	3.512(5)	159
	C8-H8...N5	0.93	2.68	3.496(5)	146
	C22-H22...O1	0.93	2.70	3.599(5)	163
	C10-H10B...C15	0.97	2.88	3.805(6)	161
	C14-H14...C20	0.93	3.13	4.033(7)	164
	C20-H20...C14	0.93	3.23	4.033(7)	146

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O SRPIN 340 possui três regiões onde alterações estruturais podem ser buscadas visando à obtenção de novas substâncias bioativas (Figura 2.4, pag. 94).

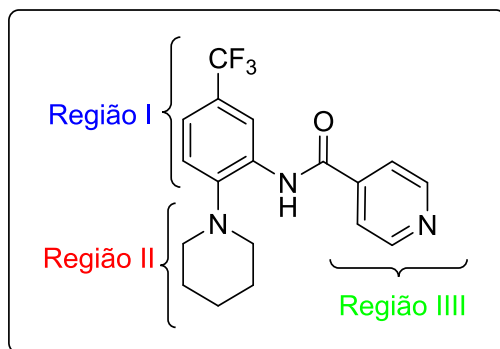


Figura 2.4 – Estrutura do SRPIN 340 e regiões I, II e III que podem ser modificadas para a obtenção de novos compostos potencialmente bioativos.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Em investigações realizadas pelo Grupo de Síntese e Pesquisa de Compostos Bioativos (GSPCB), uma série de vinte e dois compostos estruturalmente similares ao SRPIN 340 foi sintetizada, apresentando modificações estruturais nas regiões II e III. Os compostos obtidos foram avaliados com respeito a seus efeitos contra diferentes linhagens de células leucêmicas. Observou-se que a potência dos compostos depende dos grupos presentes nas regiões II e III. Em particular, encontrou-se que os compostos mais ativos em termos de seus efeitos contra as linhagens de células leucêmicas (IC_{50} variando entre 6 e $35,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram aqueles que apresentaram como característica estrutural comum a presença do grupo *p*-bromo benzilamino na região II (Figura 2.5). As amidas **i**, **ii** e **iii**, de modo geral, foram mais ativas do que o SRPIN340 (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

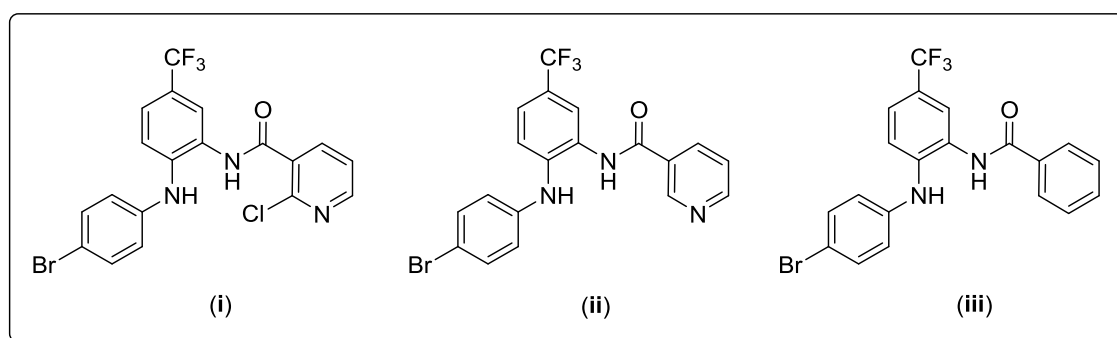


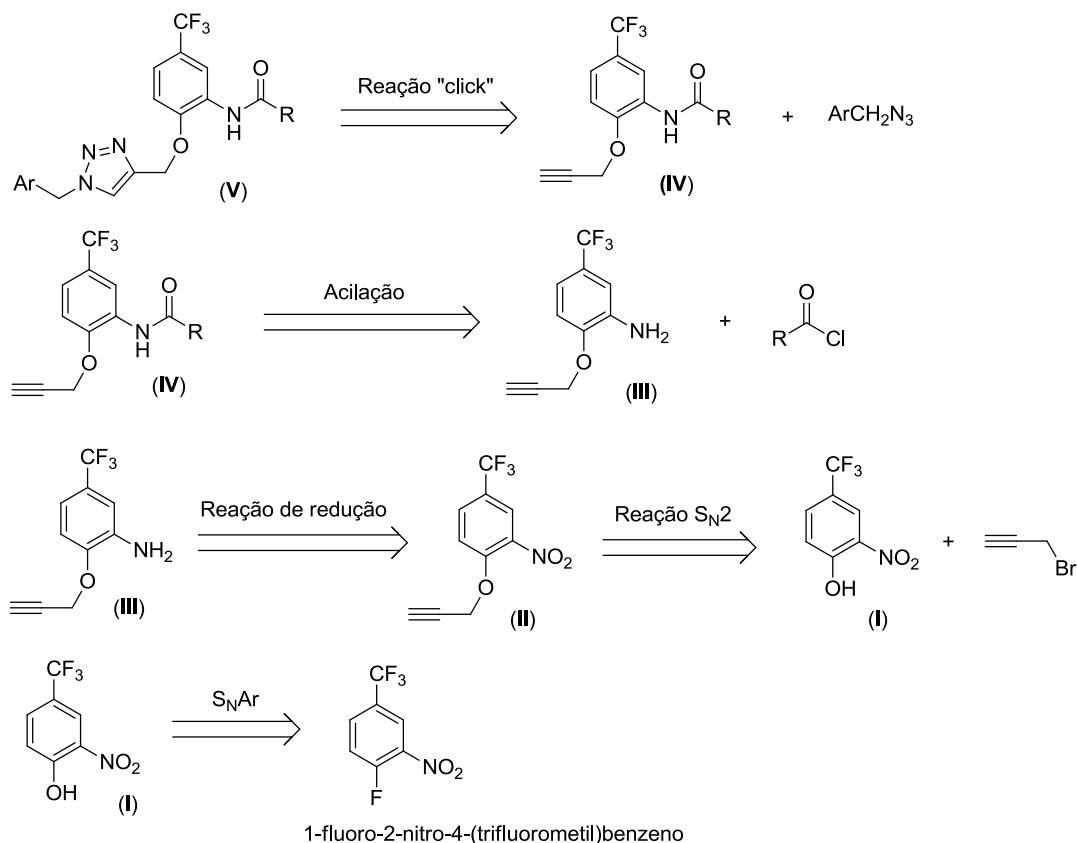
Figura 2.5 – Estruturas dos compostos **i**, **ii** e **iii**, estruturalmente similares ao SRPIN 340 e que apresentaram os melhores resultados quando avaliados contra diferentes linhagens de células de leucemia (SIQUEIRA *et al.*, 2017).

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A mesma série de vinte e dois compostos similares ao SRPIN 340 mencionada anteriormente também foi avaliada com respeito aos seus efeitos sobre o transporte de elétrons da fotossíntese (TEIXEIRA *et al.*, 2017). Interessantemente, os compostos mais ativos e que foram capazes de inibir o transporte de elétrons fotossintético como avaliado *in vitro* corresponderam aos derivados **i** e **iii** (Figura 2.5 pg. 94), que apresentaram valores de IC₅₀ próximos de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os compostos **i** e **iii** também foram mais ativos que o próprio SRPIN 340 no que tange ao efeito sobre o transporte de elétrons da fotossíntese. Os resultados descritos mostram que o SRPIN 340 é uma substância interessante e que modificações em sua estrutura podem resultar em compostos com melhoria de bioatividades.

No GSPCB, pesquisas vêm sendo desenvolvidas explorando o potencial bioativo de compostos contendo fragmentos 1,2,3-triazólicos. Neste contexto, têm sido reportadas investigações descrevendo efeitos leishmanicida, citotóxicos, antiviral, fotoprotetor e antimetastático de compostos contendo a funcionalidade 1,2,3-triazol (TEIXEIRA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2019; TEIXEIRA *et al.*, 2018, GAZOLLA *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019; MOREIRA *et al.*, 2018). Deste modo, vislumbrou-se que a preparação de compostos inspirados no SRPIN 340 contendo fragmentos triazólicos poderia resultar em substâncias bioativas. Serão descritos a seguir o planejamento da síntese de amidas inspiradas no SRPIN 340 contendo o grupo 1,2,3-triazol bem como as transformações que foram utilizadas para a obtenção destes compostos.

O plano sintético inicialmente pensado para a síntese dos derivados do SRPIN 340 com anéis triazólicos é mostrado no Esquema 2.2, pg. 96. Desde modo, a obtenção dos derivados seria feita empregando como material de partida o composto disponível comercialmente 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno. Além de reações de acilação, substituição nucleofílica bimolecular (S_N2), redução e substituição nucleofílica aromática (S_NAr), planejou-se a utilização da reação “click”, entre alquinos terminais e azidas aromáticas como a etapa chave da rota sintética.

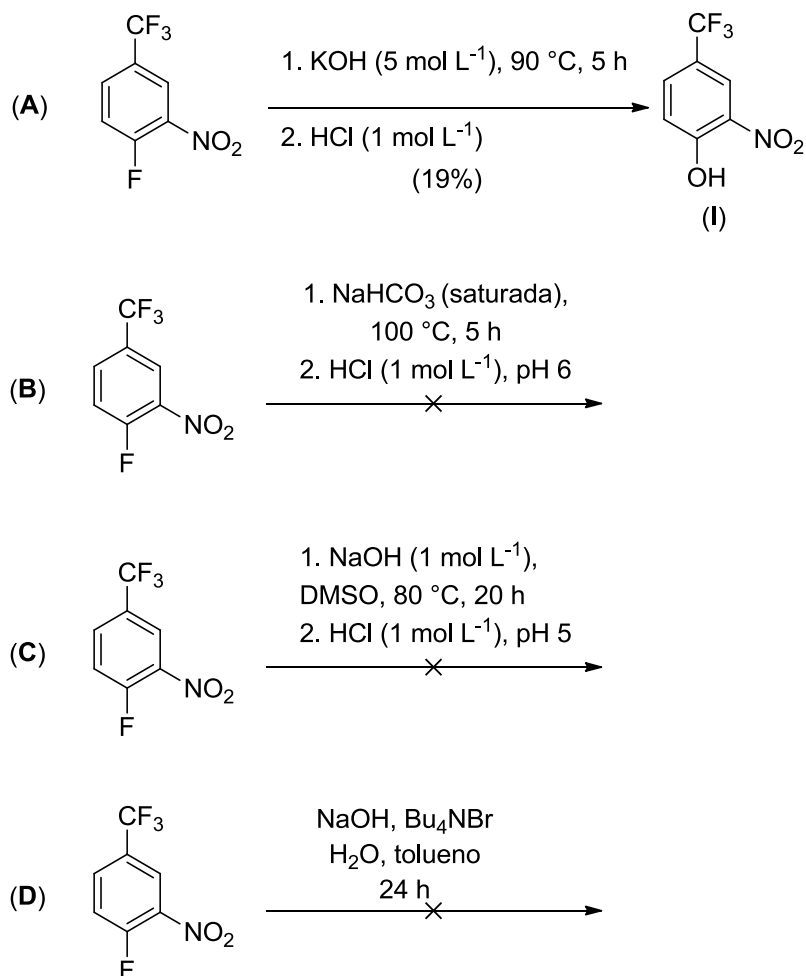


Esquema 2.2 – Primeiro plano retrossintético pensado para a produção de derivados do SRPIN 340 com anéis triazólicos. Ar corresponde a diferentes aromáticos. S_NAr refere-se à reação de substituição nucleofílica aromática.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com o plano retrossintético, o material de partida 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno seria convertido no fenol **I** via reação de substituição nucleofílica aromática conduzida em meio básico. A conversão do fenol no alquino **II** seria possível por meio de uma reação S_N2 entre **I** e brometo de propargila. A redução do grupo nitro do alquino **II** resultaria na amina **III** que, por sua vez, sofreria processos de acilação com cloretos de acila resultando em **IV**. Por fim, reações click entre **IV** e diferentes azidas aromáticas levariam à formação dos derivados do SRPIN 340 com grupos triazólicos **V**.

Na tentativa de implementar o plano mostrado no Esquema 2.2, buscou-se sintetizar o composto 2-nitro-4-(trifluorometil)fenol (**I**) via reação de substituição nucleofílica aromática em condições básicas. Neste sentido, algumas metodologias foram testadas para a síntese de **I**, conforme mostrado no Esquema 2.3, pg. 97 (CHAFFEE, *et. al.*, 2010; CHU, *et. al.*, 2012).

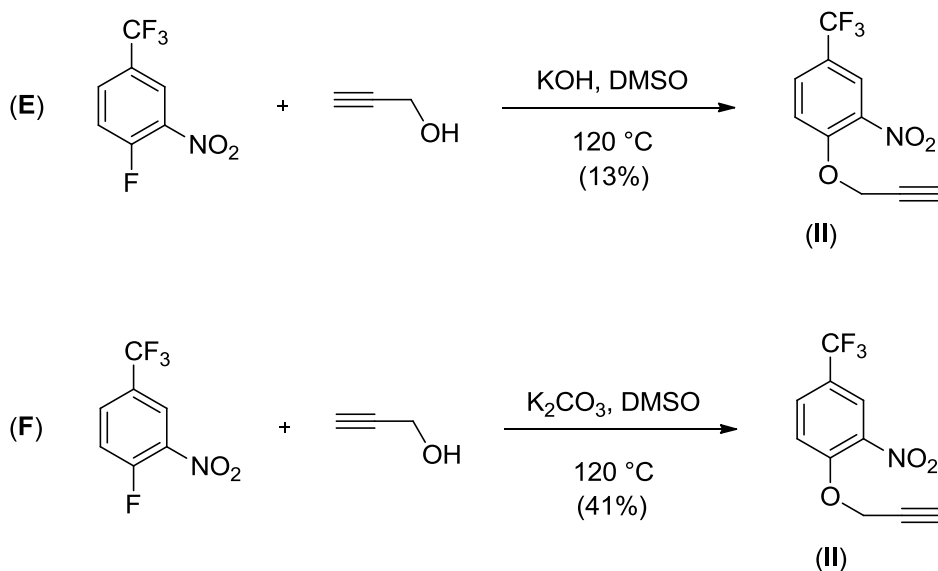


Esquema 2.3 – Métodos **A**, **B**, **C** e **D** testados para síntese do 2-nitro-4-(trifluorometil)fenol (**I**).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com o Esquema 2.3, apenas a reação **A** forneceu o produto fenólico, mas com rendimento de apenas 19%. Nas outras reações não houve formação do produto desejado. Devido a esse baixo rendimento para a primeira etapa de uma rota sintética, a proposta de sintetizar o fenol **I** foi abandonada.

De acordo com a análise retrossintética mostrado no Esquema 2.2 pg. 96, a obtenção dos derivados do SRPIN 340 contendo anéis triazólicos requereria o alquino **II**. Cogitou-se obter diretamente este composto via reação do 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno com álcool propargílico. Neste sentido, duas reações foram realizadas (Esquema 2.4, pg. 98) segundo metodologia descrita por CANO e colaboradores (2011).

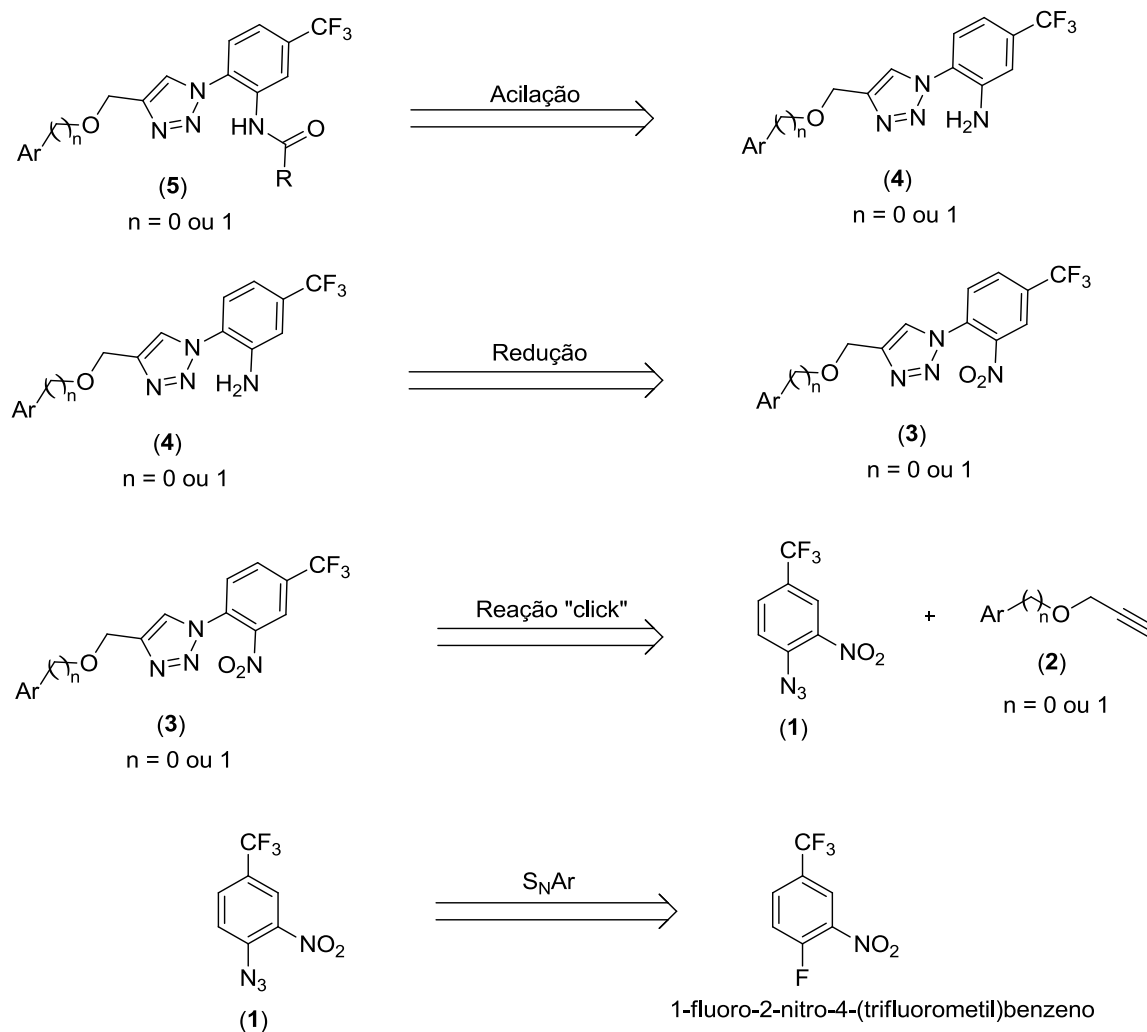


Esquema 2.4 – Metodologias **E** e **F** testadas para síntese do 2-nitro-1-(prop-2-in-1-iloxi)-4-(trifluorometil)benzeno (**II**).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Conforme pode ser observado no Esquema 2.4, o alquino **II** foi obtido e houve uma melhoria no rendimento, de 13% na reação **E** para 41% na reação **F**, com a mudança da base (de KOH para K_2CO_3). Ainda assim, esse rendimento não era satisfatório para uma reação que seria a primeira etapa de uma rota sintética que teria mais quatro etapas seguintes.

Diante do exposto, uma nova abordagem foi pensada para o preparo dos compostos triazólicos derivados do SRPIN 340, conforme mostrado no Esquema 2.5, pg. 99.



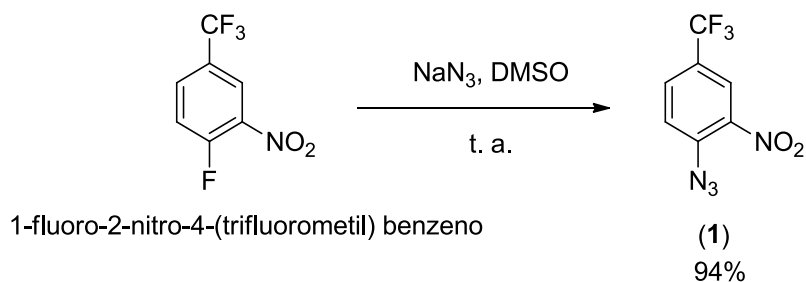
Esquema 2.5 - Segundo plano retróssintético para a produção de derivados do SRPIN 340 com anéis triazólicos. Ar corresponde a diferentes grupos aromáticos e $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ corresponde à reação substituição nucleofílica aromática.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

De acordo com este segundo plano retróssintético, a reação de substituição nucleofílica aromática ($\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$) seria novamente utilizada, mas desta vez com o propósito de obter a azida **1**. Esta, por sua vez, seria convertida nos derivados triazólicos de estrutura geral **3** por intermédio de reações “click” com diferentes alcinos terminais de estrutura geral **2**. A redução dos 1,2,3-triazóis **3**, seguida de acilação resultaria nos derivados do SRPIN 340 de estrutura geral **5**.

A preparação do composto **1** via substituição nucleofílica aromática se mostrou bem sucedida. Conforme mostrado no Esquema 2.6, pg. 100, o tratamento do 1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometil)benzeno (**1**) com azida de sódio em DMSO, baseado na metodologia descrita por BORGATI e colaboradores

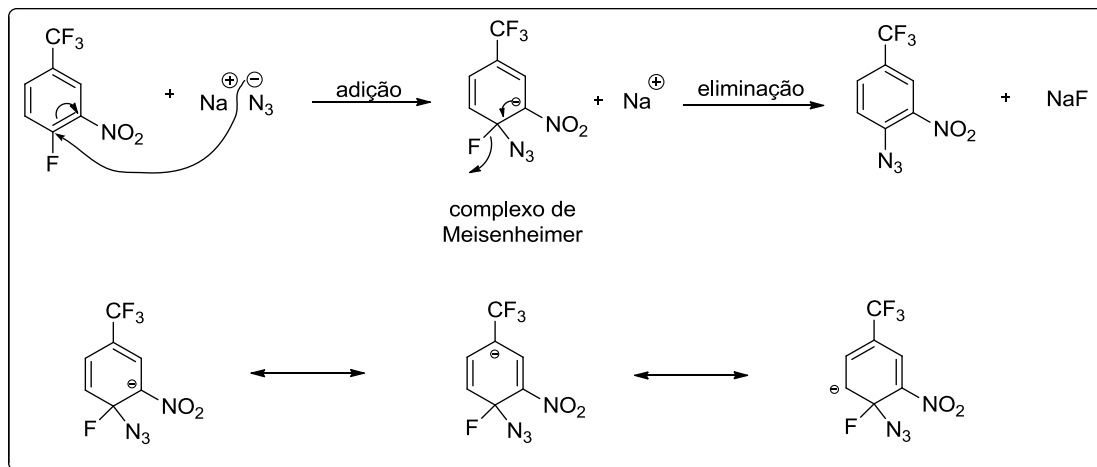
(2011), resultou na obtenção da azida aromática **1** com 94% de rendimento após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel.



Esquema 2.6 – Síntese da azida **1** por meio da reação de substituição nucleofílica aromática (S_NAr) entre o composto disponível comercialmente 1-fluoro-2-nitro 4-trifluorometilbenzeno e azida de sódio.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

O Esquema 2.7 mostra as etapas do mecanismo envolvido na formação da azida **1**. A reação é favorecida, uma vez que a carga negativa presente no intermediário formado, o complexo de Meisenheimer, é estabilizada pelos grupos retiradores de elétrons NO_2 e CF_3 (BRUICE, 2016).



Esquema 2.7 – Mecanismo da reação de formação da azida **1**. As formas canônicas resultantes da deslocalização de elétrons no complexo de Meisenheimer também são apresentadas.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Inicialmente ocorre a adição do nucleófilo (N_3^-) ao anel aromático formando um carbânion intermediário, o complexo de Meisenheimer.

Posteriormente, com a restituição da aromaticidade, ocorre a eliminação do ânion fluoreto e a formação o composto **1**.

Em termos de caracterização do composto **1**, no seu espectro no infravermelho (Figura 2.6, pg. 102), podem ser observadas bandas em 3098 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de ligação C-H para carbonos com hibridização sp^2 . A banda intensa em 2121 cm^{-1} relaciona-se ao estiramento da ligação tripla entre átomos de nitrogênio, indicando a formação da azida. A banda em 1605 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C=C. As bandas em 1538 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo nitro e a banda em 1125 cm^{-1} ao estiramento da ligação C-F (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **1** (Figura 2.7, pg. 103), o duplete observado em $\delta_{\text{H}} 7,47$ e integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 8,7\text{ Hz}$) foi atribuído ao hidrogênio H-6. Outro duplete em $\delta_{\text{H}} 7,86$ e integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 8,7\text{ Hz}$) foi relacionado ao hidrogênio H-5. O simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 8,20$ e integrado para um átomo de hidrogênio refere-se ao átomo H-3. Os valores das constantes de acoplamento estão em concordância com a literatura, uma vez que estão dentro da faixa de valores típicos para acoplamentos de hidrogênios em posição *orto* ($J_{\text{orto}} = 7\text{-}10\text{ Hz}$) (PAVIA *et. al.*, 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **1** (Figura 2.8, pg. 104), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. Os sinais em $\delta_{\text{C}} 121,5$, $138,4$ e $140,3$ foram atribuídos aos carbonos C-6, C-1 e C-2, respectivamente. Os demais sinais correspondem aos carbonos que fazem acoplamento com os átomos de flúor do grupo trifluorometila (CF_3). Em $\delta_{\text{C}} 122,6$, encontra-se o sinal do grupo CF_3 e embora o quarteto completo não tenha sido observado, o valor da constante de acoplamento, $^1J_{\text{C-F}} = 270,8\text{ Hz}$, pôde ser calculado. O quarteto em $\delta_{\text{C}} 123,7$ foi atribuído ao carbono C-3 ($^3J_{\text{C-F}} = 4,0\text{ Hz}$). Já em $\delta_{\text{C}} 127,3$ encontra-se o quarteto referente ao carbono C-4 ($^2J_{\text{C-F}} = 35,3\text{ Hz}$) e em $\delta_{\text{C}} 130,5$, observa-se o quarteto atribuído ao carbono C-5 ($^3J_{\text{C-F}} = 3,5\text{ Hz}$).

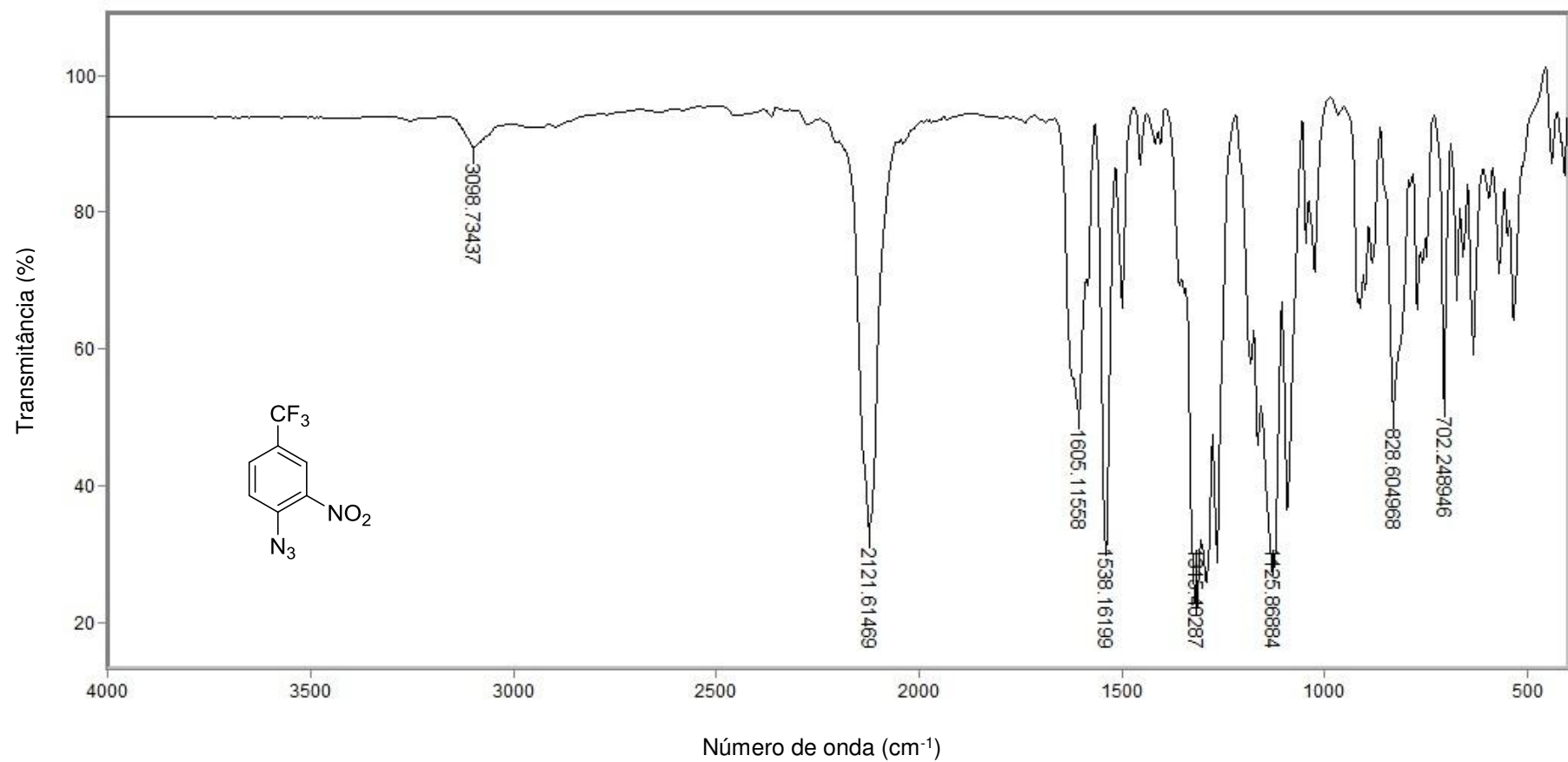


Figura 2.6 – Espectro no infravermelho (ATR) do composto 1.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

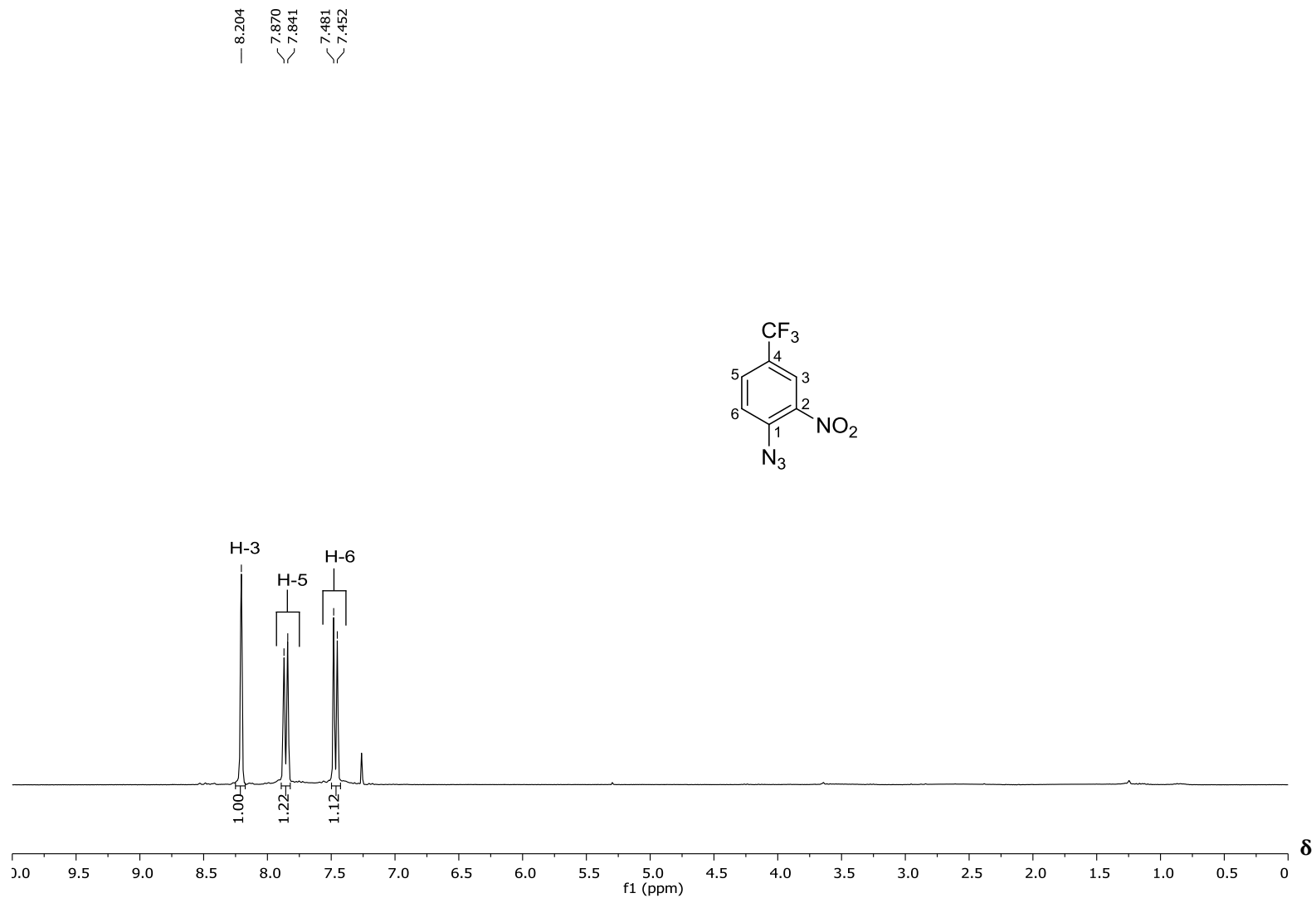


Figura 2.7 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto 1.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

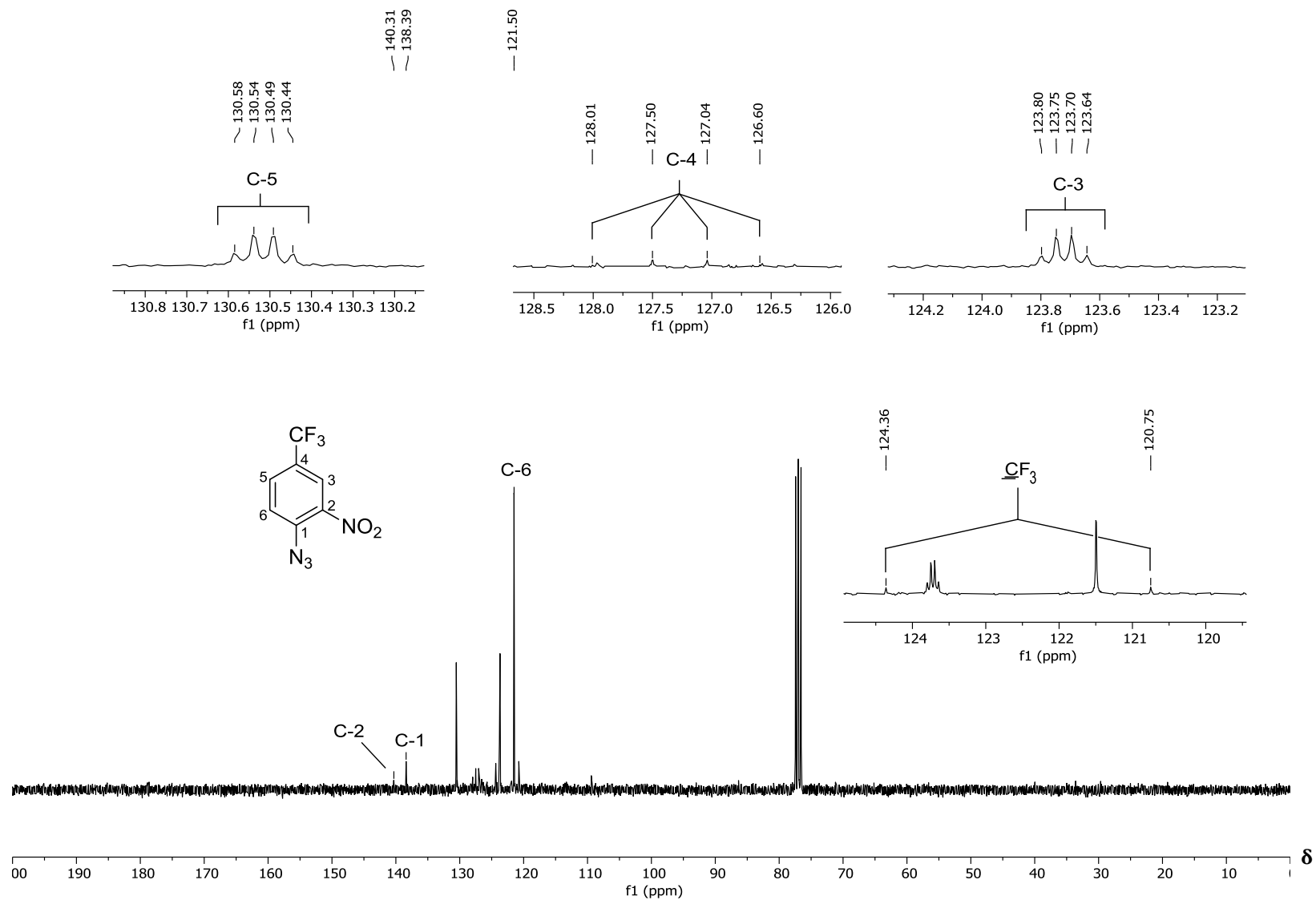


Figura 2.8 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto 1.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

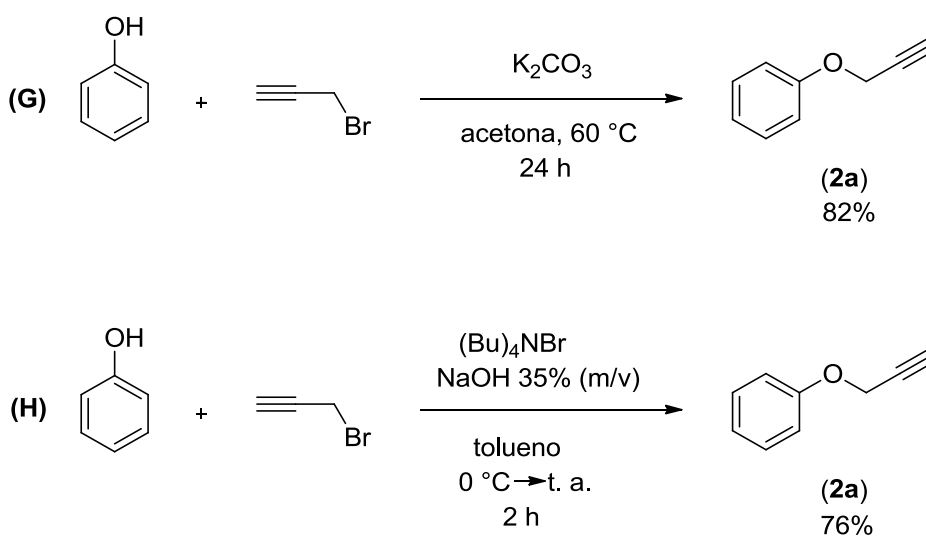
Salienta-se que os valores das constantes de acoplamento ^{19}F - ^{13}C calculadas a partir dos espectros de RMN de ^{13}C estão próximos aos valores das constantes reportadas na literatura para este tipo de acoplamento (Figura 2.9) (PRETSCH *et. al.*, 1989).

	J (Hz)
a	(a) 271,7
b	(b) 32,3
c	(c) 3,9
d	(d) 1,3
e	(e) ~0

Figura 2.9 – Valores descritos para constantes de acoplamento ^{19}F - ^{13}C .

Fonte: Reproduzida a partir de PRETSCH *et. al.*, 1989, p. C245.

Conforme mostrado no plano sintético (Esquema 2.5 pg. 99), os nitrocompostos contendo anéis triazólicos de estrutura geral **3** seriam obtidos via reação “click” entre a azida **1** e diferentes alquinos terminais. Assim, procedeu-se à síntese dos alquinos de estrutura geral **2**. O primeiro destes alquinos sintetizados correspondeu ao (prop-2-in-1-iloxi)benzeno (**2a**). Para sua síntese, dois métodos foram testados (Esquema 2.7), um utilizando acetona em refluxo (**G**) (PEREIRA, 2016) e o outro utilizando catálise de transferência de fase (**H**) (LIMA, 2018).



Esquema 2.8 – Métodos **G** e **H** testados para a síntese do (prop-2-in-1-iloxi)benzeno (**2a**).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

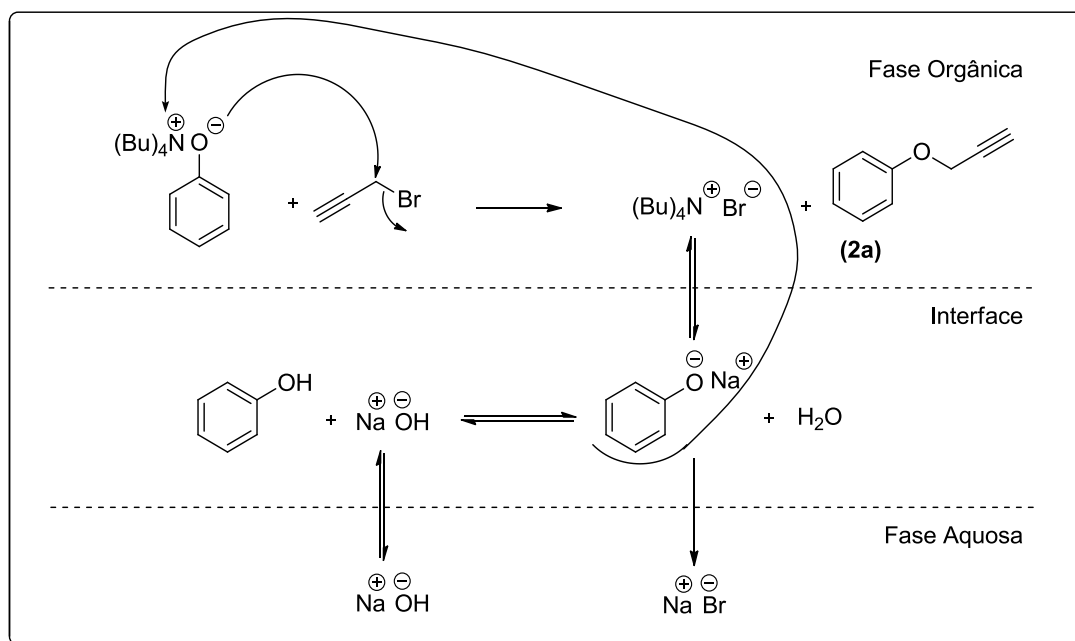
Como pode ser observado no Esquema 2.8, pg. 105, a primeira reação **G** forneceu o alquino **2a** com 82% de rendimento após vinte e quatro horas de reação. O segundo experimento **H** forneceu o mesmo produto com um rendimento de 76% após duas horas de reação. Apesar do menor rendimento, mas sinteticamente útil de 76%, este foi o método escolhido para a síntese dos demais alquinos terminais. Critérios como tempo de reação e economia de energia e de água, foram fundamentais para a escolha desta metodologia.

A catálise de transferência de fase (CTF) se tornou um método popular e bastante aplicado em síntese orgânica. Foi introduzido no final dos anos 1960 e desde então tem sido muito útil promovendo reações em sistemas imiscíveis de duas fases (SCHETTIN *et. al.*, 2018). A CTF não requerer o uso de solventes anidros, fornece produtos com altos rendimentos e com elevado grau de pureza, não requer o uso de altas temperaturas, possui baixo custo e poder ser utilizada para os mais diversos tipos de reações, inclusive na síntese orgânica assimétrica (PATEL *et. al.*, 2018).

São várias as substâncias que podem atuar como catalisadores nos processos CTF, como por exemplo, sais de amônio quaternários, sais de fosfônio quaternários, poliéteres macrocíclicos (éteres de coroa e criptandos), polímeros, dentre outros (LUCCHESI & MARZORATI, 2000).

Na presente investigação, o catalisador utilizado na síntese dos alquinos terminais foi o brometo de tetrabutilamônio, $(\text{Bu})_4\text{NBr}$. Os sais de amônio quaternários são os catalisadores mais utilizados e convenientes uma vez que possuem eficiência elevada, apresentam baixo custo e são relativamente estáveis (SCHETTIN *et. al.*, 2018; PATEL *et. al.*, 2018).

Do ponto de vista mecanístico, uma proposta é apresentada no Esquema 2.9, pg. 107, e nela inicialmente ocorre a desprotonação do fenol pela base hidróxido de sódio formando o fenóxido de sódio. Posteriormente ocorre uma troca iônica entre esse fenóxido e o brometo de tetrabutilamônio, formando o fenóxido de amônio quaternário na interface do sistema. Este, por sua vez, transfere-se para a fase orgânica, reage com o brometo de propargila fornecendo o alquino **2a** com concomitante regeneração do catalisador (MAKOSZA & WAWRZYNIOWICZ (1969); LIMA, 2018).



Esquema 2.9 - Proposta de mecanismo para CTF sugerido por MAKOSZA & WAWRZYNIOWICZ (1969) e LIMA, 2018.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Lançando mão da CTF, uma série de alquinos foi sintetizada com rendimentos que variaram de 37% a 87% (Figura 2.10).

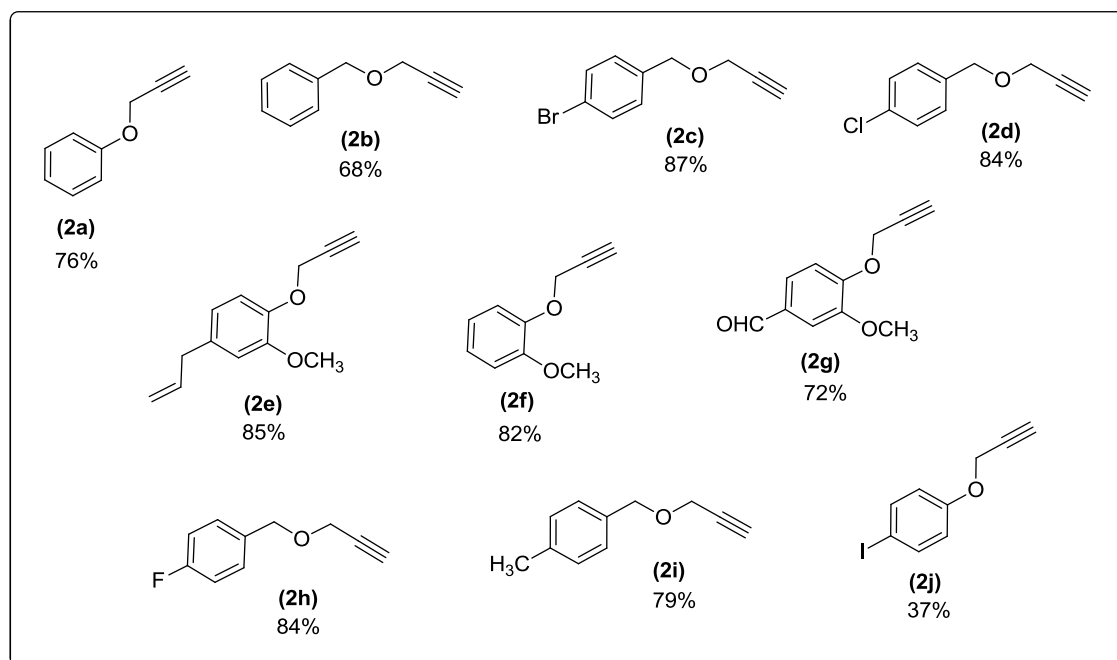


Figura 2.10 – Estruturas dos alquinos sintetizados via CTF.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Uma vez sintetizado, o alquino **2a** foi caracterizado por espectroscopia no IV e de RMN. No espectro no infravermelho do composto **2a** (Figura 2.11, pg.109), observa-se uma banda em 3291 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp . Em 3098 , 3065 , 3042 cm^{-1} , há bandas de estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^2 e em 2924 e 2871 cm^{-1} , bandas referentes aos estiramentos da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . A banda em 2121 cm^{-1} é devida ao estiramento da ligação tripla carbono-carbono e as bandas em 1597 e 1493 cm^{-1} , foram atribuídas aos estiramentos da ligação C=C (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **2a** (Figura 2.12, pg. 110), o tripleto observado em $\delta_{\text{H}} 2,53$ e integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 2,4\text{ Hz}$) foi atribuído ao hidrogênio acetilênico H-9. O duplete em $\delta_{\text{H}} 4,71$ e integrado para dois átomos de hidrogênio ($J = 2,4\text{ Hz}$) relaciona-se ao hidrogênio H-7. O multiplete observado em $\delta_{\text{H}} 6,98-7,05$ e integrado para três átomos de hidrogênio corresponde aos hidrogênios H-2, H-6 e H-4. O outro multiplete em $\delta_{\text{H}} 7,29-7,36$, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5. Os valores das constantes de acoplamento estão em acordo com a literatura, uma vez que seus valores estão dentro da faixa de valores típica para acoplamentos de hidrogênios acetilênicos com hidrogênios α característicos em alquinos terminais ($^4J = 2-3\text{ Hz}$) (PAVIA *et. al.*, 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **2a** (Figura 2.13, pg. 111), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. O sinal em $\delta_{\text{C}} 55,7$ foi atribuído ao carbono C-7, enquanto que os sinais em $\delta_{\text{C}} 75,4$ e $78,6$ foram atribuídos aos carbonos da tripla ligação C-9 e C-8, respectivamente. Os demais sinais foram atribuídos aos outros carbonos que constituem o anel aromático, sendo, portanto, o sinal em $\delta_{\text{C}} 114,8$ relacionado aos carbonos C-2 e C-6; em $\delta_{\text{C}} 121,5$ o sinal correspondente a C-4; em $\delta_{\text{C}} 129,4$ o sinal dos carbonos C-3 e C-5; e por fim, o sinal em $\delta_{\text{C}} 157,5$ atribuído ao carbono C-1 (PRETSCH *et. al.*, 1989).

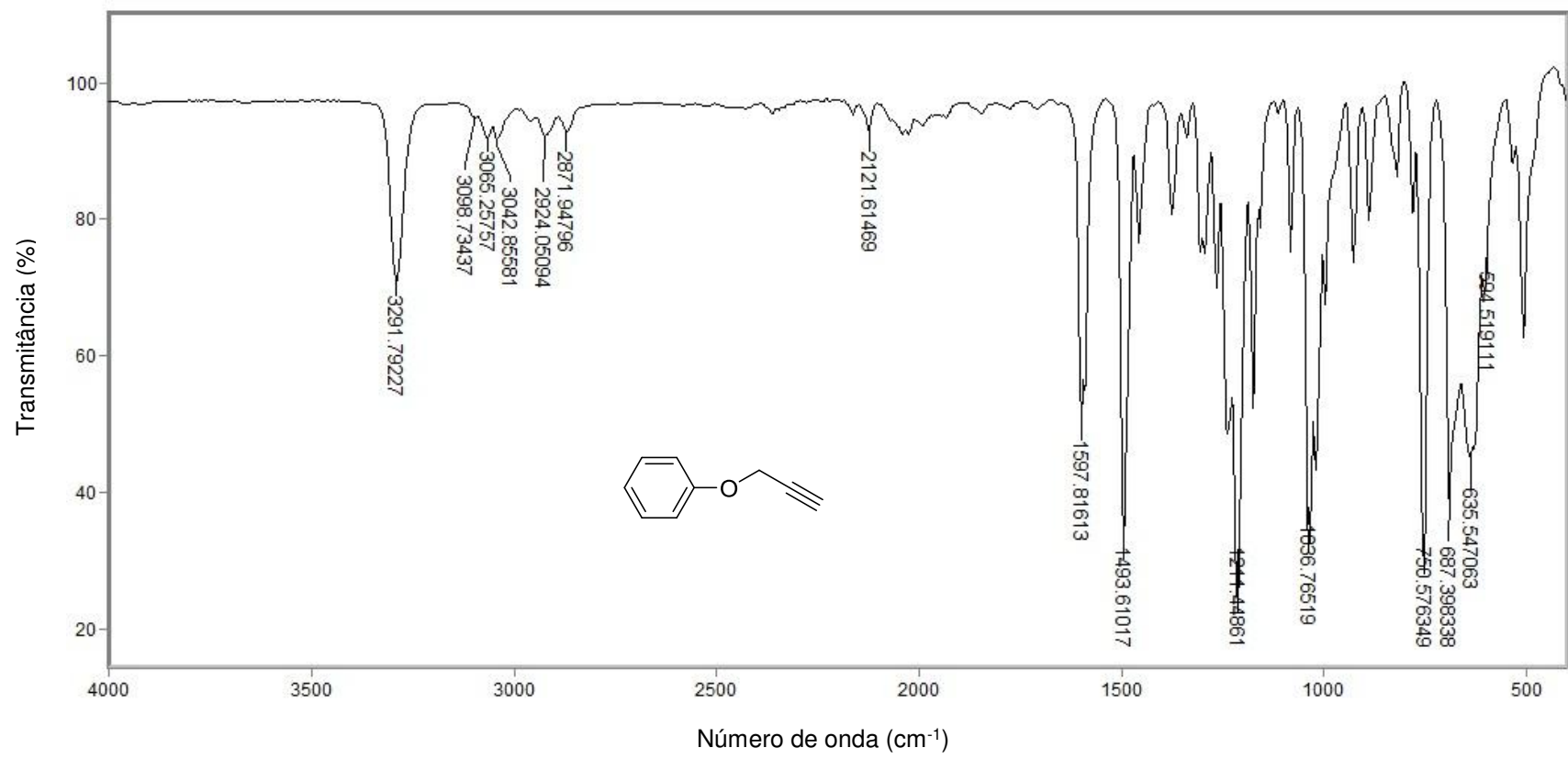


Figura 2.11 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

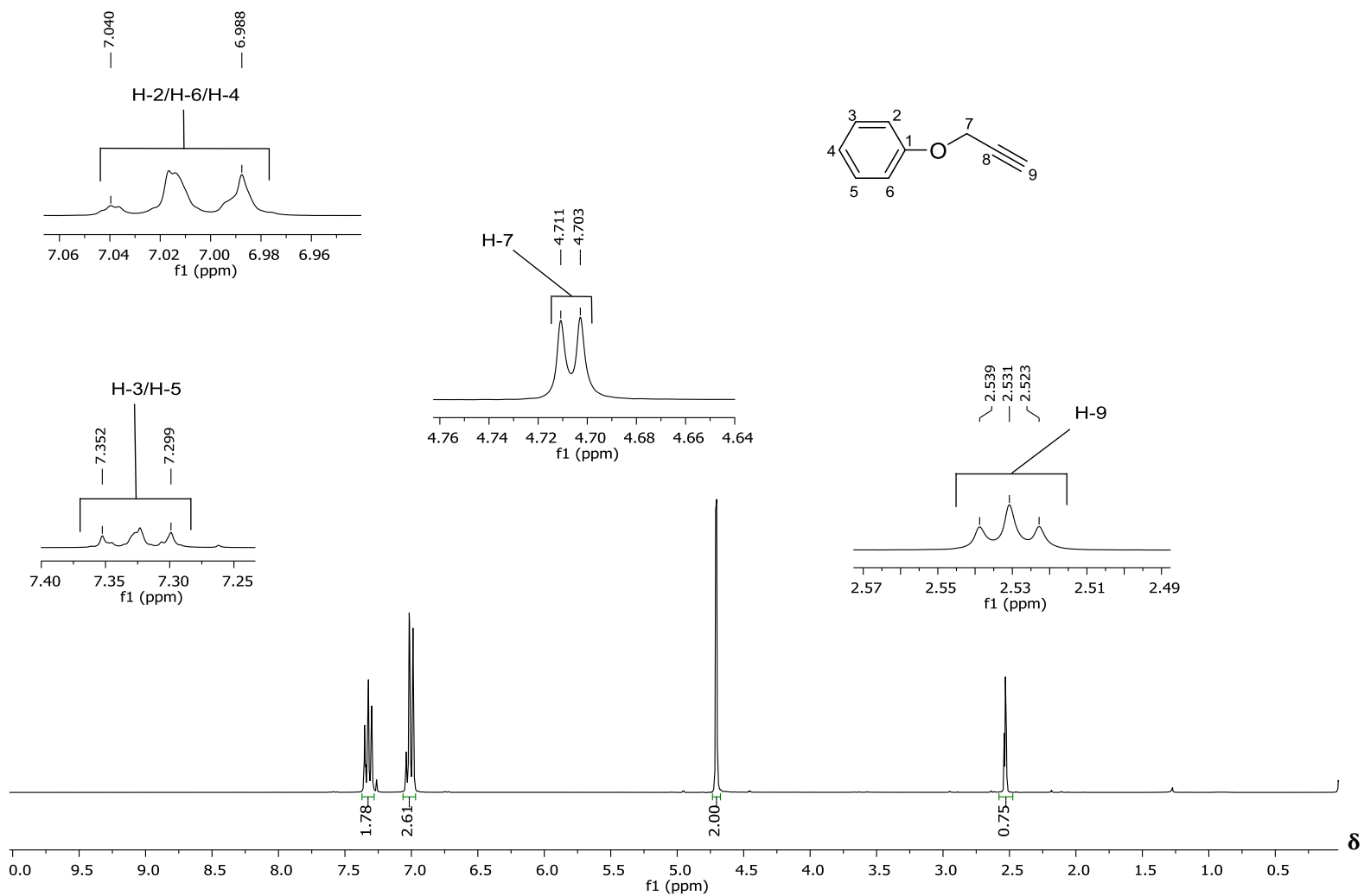


Figura 2.12 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **2a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

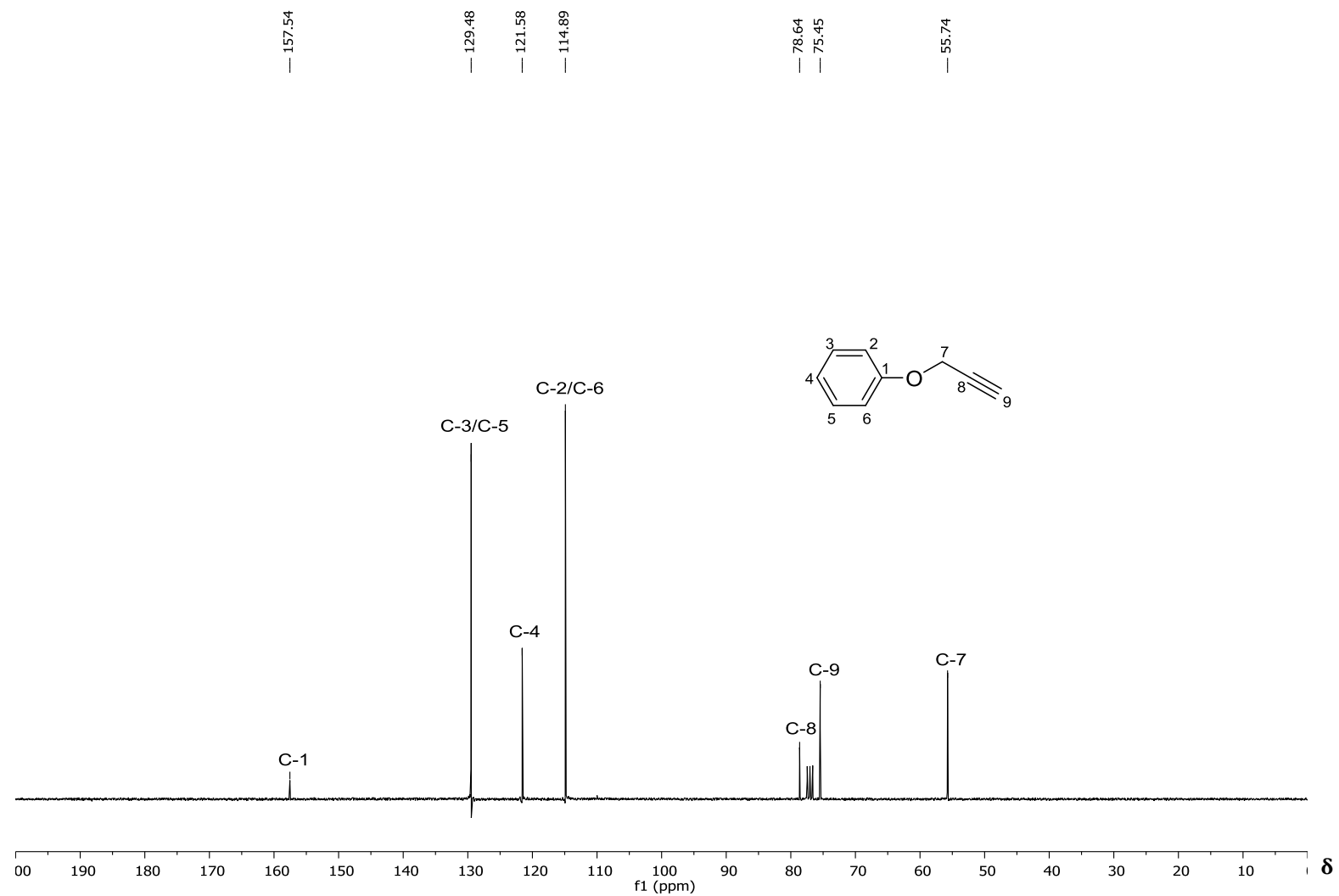
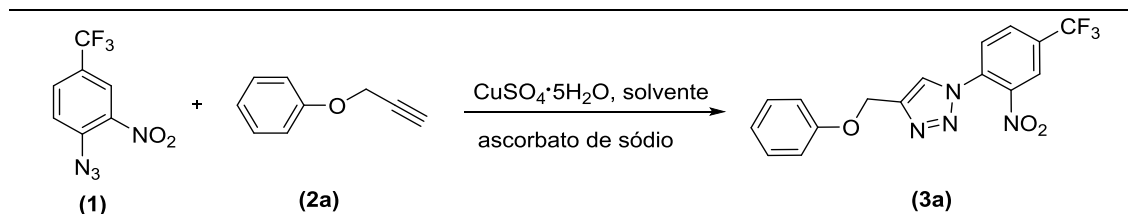


Figura 2.13 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **2a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A próxima etapa do plano sintético (Esquema 2.5, pg. 99) corresponde à reação click entre a azida **1** e alquinos terminais **2** para a preparação de nitrocompostos triazólicos **3**. Neste sentido, foram realizados experimentos para escolha do melhor solvente para a realização das reações click. A reação entre a azida **1** e o alquino **2a** para a formação do composto 1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol (**3a**) foi escolhida para esta finalidade. Os resultados obtidos na condução destes experimentos são apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Experimentos realizados para escolha do melhor solvente a ser utilizado nas reações click entre o composto **1** e diferentes alquinos terminais. A reação entre a azida **1** e o alquino terminal **2a** foi escolhida para a condução dos experimentos.



Experimento*	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	Diclorometano	96 h	9
2	Álcool <i>tert</i> -butílico	4 h	64
3	Etanol	1,5 h	62
4	Dimetilformamida	0,5 h	62

*As reações foram realizadas empregando 0,378 mmol da azida, 0,378 mmol do alquino, 0,151 mmol de ascorbato de sódio, 0,0760 mmol de sulfato de cobre pentaidratado, 2,0 mL de água e 2,0 mL do solvente.

Na primeira reação “click” realizada para obter o composto **3a** foi utilizado o solvente diclorometano. Como pode ser observado na Tabela 2.8, após 96 horas de reação, incluindo 1,5 h de aquecimento da reação à temperatura de 38 °C, o produto **3a** foi obtido com apenas 9% de rendimento.

Diante deste resultado, houve a necessidade de se testar outros solventes buscando aumentar o rendimento e diminuir o tempo da reação. Os solventes álcool *tert*-butílico, etanol e dimetilformamida são comumente empregados em reações “click” (FREITAS *et al.*, 2011) e foram escolhidos para serem utilizados em subseqüente experimentos. O álcool *tert*-butílico e o etanol foram os

solventes utilizados nos primeiros estudos desenvolvidos por Sharpless e colaboradores a respeito da reação “click” (FREITAS *et. al.*, 2011).

De acordo com a Tabela 2.8, pg. 112, de maneira geral houve uma melhoria tanto com respeito ao tempo bem como com respeito ao rendimento das reações. Como pode ser visto, o solvente que proporcionou o menor tempo (0,5 h) e um rendimento útil de 62%, foi a dimetilformamida. Logo, este foi o solvente escolhido para ser utilizado nas reações “click” subsequentes. Porém, com o aumento da escala da reação para obtenção de maior quantidade de produto (partindo de 1,65 mmol do alquino **2a** e 1,65 mmol da azida **1**), houve uma queda no rendimento de 62% para 46%. Observou-se que o tempo de reação foi o mesmo (0,5 h).

A fim de verificar se esta situação seria particular para a síntese de **3a**, uma outra reação entre a azida **1** e o alquino ((prop-2-in-1-iloxi)metil)benzeno (**2b**) foi realizada para obter o composto 4-((benziloxi)metil)-1-(2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol (**3b**). Utilizou-se 1,65 mmol de **1** e **1,65** mmol de **2b**, sendo obtido um de apenas 3% para **3b**. Uma repetição da mesma forneceu um novo rendimento de apenas 14%. Mais uma vez observou-se que o tempo de reação foi de meia hora. Portanto, a dimetilformamida não seria mais o solvente adequado para as reações “click”.

Novas reações foram realizadas utilizando o segundo solvente que forneceu os melhores resultados, neste caso o etanol. De acordo com a Tabela 2.8, pg. 112, a reação para obter **3a** em menor escala (partindo de 0,378 mmol da azida e do alquino), teve um tempo de duração de 1,5 h com um rendimento de 62%. Em maior escala, a reação durou duas horas e proporcionou um rendimento de 40%. A reação para obter o composto **3b** também durou duas horas e forneceu um rendimento de 45%. Portanto, houve também uma queda no rendimento para obtenção de **3a** (de 62% para 40%) e apesar de ter havido uma melhoria no rendimento de **3b** (de 14%, em relação ao outro solvente testado, para 45%), ainda seria importante encontrar um solvente que favorecesse todas as reações.

O último solvente testado, o álcool *tert*-butílico, havia fornecido um rendimento de 64% para **3a** com um tempo de reação de quatro horas (Tabela 2.8, pg. 112). Nos testes em maior escala, com o mesmo tempo de reação (quatro horas), houve um aumento de rendimento considerável para as reações

de preparação de **3a** e **3b**. O composto **3a** foi obtido com 70% de rendimento e o **3b** com 76% de rendimento. Apesar do tempo de reação ter aumentado em relação ao solvente dimetilformamida (de meia hora para quatro horas), o aumento do rendimento foi mais significativo e fundamental para escolher este solvente para dar continuidade à síntese dos demais nitrocompostos triazólicos por meio de reações “click”

Cabe ressaltar que não foi necessário otimizar as outras condições de reação, como por exemplo, a quantidade de reagentes.

Portanto, com a definição do solvente (álcool *tert*-butílico), uma série de nitrocompostos triazólicos **3a-3j** foi sintetizada com rendimentos que variaram de 59% a 95% (Figura 2.14).

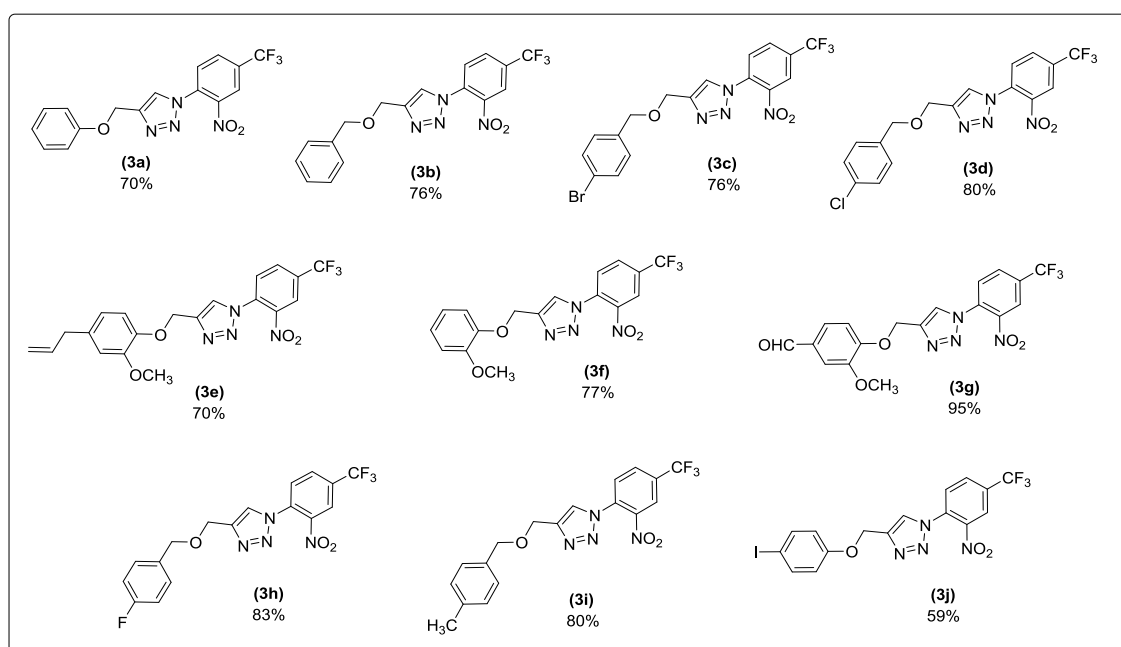
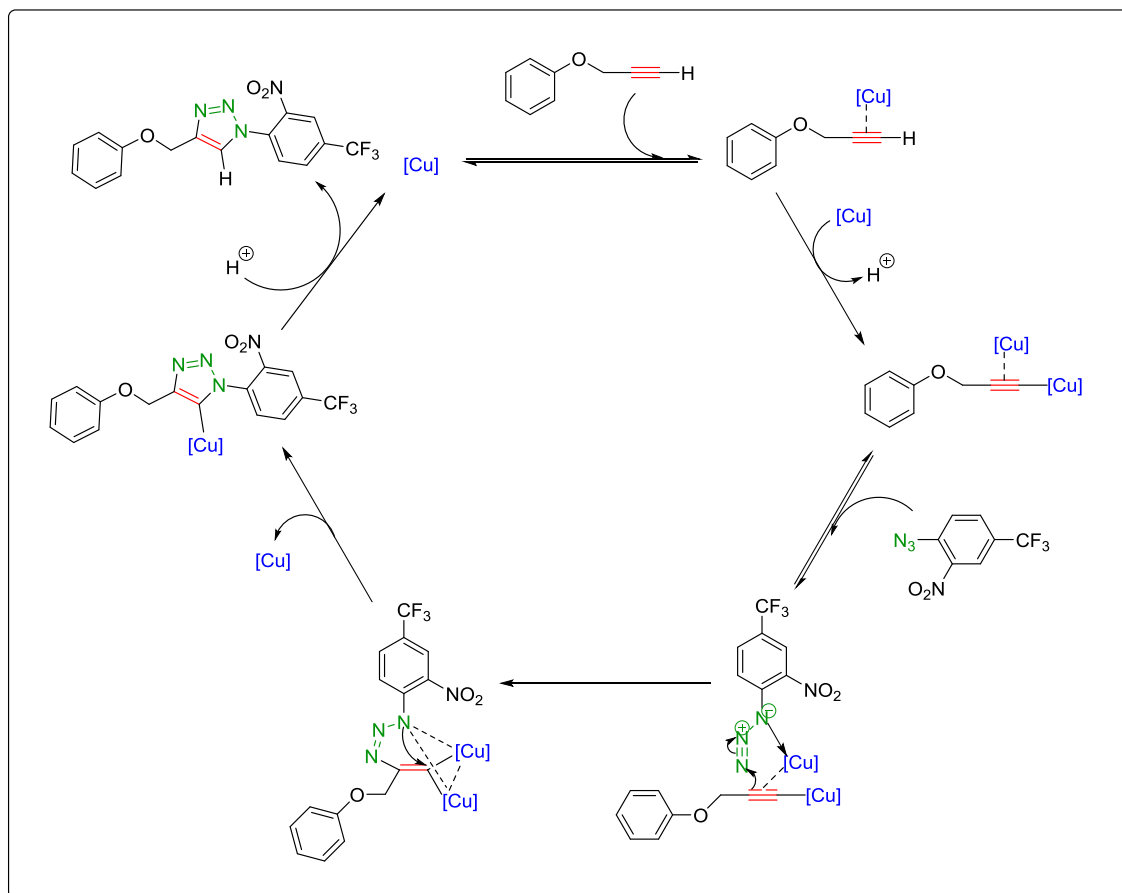


Figura 2.14 – Estruturas dos nitrocompostos triazólicos sintetizados.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A proposição de mecanismos de reações catalisadas por cobre é um processo desafiador. A capacidade que o cobre tem de formar complexos polinucleares, a facilidade de trocar ligantes e o rápido equilíbrio existente entre as espécies de cobre no meio reacional são alguns dos problemas enfrentados quando se busca propor mecanismos de reações catalisadas por este metal (FREITAS *et. al.*, 2011). No entanto, existem propostas atualmente aceitas que facilitam o entendimento dessas reações, como é o caso da reação CuAAC.

O mecanismo da reação CuAAC foi proposto por Worrel e colaboradores (2013) e se dá por meio de um ciclo catalítico que compreende várias etapas, como pode ser visto no Esquema 2.10 com respeito à formação do composto **3a**.



Esquema 2.10 – Ciclo catalítico envolvido nas reações CuAAC tomando-se como exemplo a formação do composto **3a**.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na primeira etapa do ciclo ocorre uma coordenação entre o alquino terminal e uma espécie de Cu(I). A formação deste complexo favorece a desprotonação do alquino em meio aquoso, uma vez que o valor do pK_a do hidrogênio ligado ao carbono terminal do alquino se reduz de aproximadamente 25 para 9,8. Esta desprotonação possibilita uma nova coordenação com uma segunda espécie de Cu(I), gerando o complexo acetileno de cobre. Na próxima etapa, esse acetileno de cobre forma um complexo com a azida denominado de azida-acetileno. Neste intermediário, o cobre tem um efeito sinérgico, tornando o nitrogênio terminal da azida mais eletrofílico e o carbono β -vinilidênico do alquino

mais nucleofílico, favorecendo a formação de um novo intermediário chamado metalociclo. Essa etapa é a que define a regioseletividade da reação, por ser endotérmica, com energia de ativação de 15 Kcal mol^{-1} , que é menor do que a energia da ativação para a reação não catalisada, 26 Kcal mol^{-1} . Na etapa seguinte, ocorre uma contração do anel causada por uma associação transanular do par de elétrons não ligante do nitrogênio da azida com o orbital antiligante do carbono ligado aos átomos de cobre, formando a triazolila de cobre, e com isso ocorre a formação de uma ligação efetiva entre este nitrogênio e este carbono. Na última etapa do ciclo catalítico, tem-se a protonação da triazolila de cobre com a formação do produto 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído e a regeneração do catalisador (GAZOLLA, 2015).

Uma vez sintetizado, procedeu-se à caracterização do composto **3a**. No espectro no infravermelho do composto **3a** (Figura 2.15, pg. 118), não são mais observadas as bandas em 2121 cm^{-1} (referente ao estiramento do grupo azida, Figura 2.6, pg. 102), 3291 cm^{-1} (estiramento da ligação C-H de alquino terminal, Figura 2.11, pg. 109) e 2121 (estiramento da ligação C=C, Figura 2.11, pg. 109). Observam-se as bandas em 3087 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^2 e 2920 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . A banda em 1631 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=C. Já as bandas 1538 cm^{-1} e 1319 cm^{-1} foram relacionadas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo nitro e a aquela em 1118 cm^{-1} refere-se ao estiramento da ligação C-F (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **3a** (Figura 2.16, pg. 119), não mais se observa o sinal correspondente ao hidrogênio do alquino terminal (Figura 2.12, pg. 110). O simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 5,32$ e integrado para dois átomos de hidrogênio foi atribuído ao hidrogênio H-7. O multiplete em $\delta_{\text{H}} 6,98-7,04$, integrado para três átomos de hidrogênio, refere-se aos hidrogênios H-2, H-6 e H-4. O outro multiplete observado em $\delta_{\text{H}} 7,29-7,35$, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios H-3 e H-5. O duplete em $\delta_{\text{H}} 7,83$ e integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 8,4 \text{ Hz}$) foi atribuído ao hidrogênio H-2'. O simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 7,97$ e integrado para um átomo de hidrogênio corresponde ao hidrogênio H-9. O duplo duplete em $\delta_{\text{H}} 8,06$, integrado para um átomo de hidrogênio ($J_1 = 8,4 \text{ Hz}$ e $J_2 = 1,4 \text{ Hz}$), foi atribuído ao hidrogênio H-3'. O duplete observado em $\delta_{\text{H}} 8,33$, integrado para um átomo de hidrogênio ($J =$

1,4 Hz), refere-se ao hidrogênio H-5'. O duplo duplete descrito acima, mostra o acoplamento em *orto* do hidrogênio H-3' com o hidrogênio H-2' e o acoplamento em *meta* com o hidrogênio H-5'. Os valores das constantes de acoplamento estão em acordo com a literatura, uma vez que seus valores estão dentro da faixa de valores típica para acoplamentos de hidrogênios em posição *orto* e *meta* ($J_{orto} = 7-10$ Hz e $J_{meta} = 1-3$ Hz) (PRETSCH *et. al.*, 1989; PAVIA *et. al.*, 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **3a** (Figura 2.17, pg. 120), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. O sinal em δ_c 61,7 foi atribuído ao carbono C-7 e o sinal em δ_c 114,8 foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6. Em δ_c 121,5 encontra-se o sinal referente aos carbonos C-4 e C-9 que. Em δ_c 123,2, observa-se o quarteto atribuído ao carbono C-5' ($^3J_{C-F} = 3,8$ Hz); em δ_c 123,9 encontra-se o sinal do carbono C-1'; em δ_c 128,5, o sinal do carbono C-2' e em δ_c 129,6, o sinal dos carbonos C-3 e C-5. O sinal do quarteto referente ao carbono C-3' ($^3J_{C-F} = 3,8$ Hz) aparece em δ_c 130,6 e o sinal do quarteto referente ao carbono C-4' ($^2J_{C-F} = 28,5$ Hz) aparece em δ_c 133,1. O sinal para C-4' não se mostrou totalmente resolvido. Porém, foi possível determinar a constante de acoplamento bem como o deslocamento químico para este sinal. Mais uma vez nota-se que as constantes de acoplamento estão próximas dos valores das constantes descritas na literatura para este tipo de acoplamento entre ^{19}F - ^{13}C (Figura 2.5, pg. 65) (PRETSCH *et. al.*, 1989). Em δ_c 145,6 observa-se o sinal atribuído aos carbonos C-6' e C-8 e em δ_c 157,9 encontra-se o sinal do carbono C-1. O sinal referente ao grupo CF_3 (um quarteto devido ao acoplamento ^{19}F - ^{13}C) não foi observado. Os valores das constantes de acoplamento ^{19}F - ^{13}C calculadas a partir dos espectros de RMN de ^{13}C estão próximos aos valores das constantes reportadas na literatura para este tipo de acoplamento (Figura 2.9, pg. 105) (PRETSCH *et. al.*, 1989).

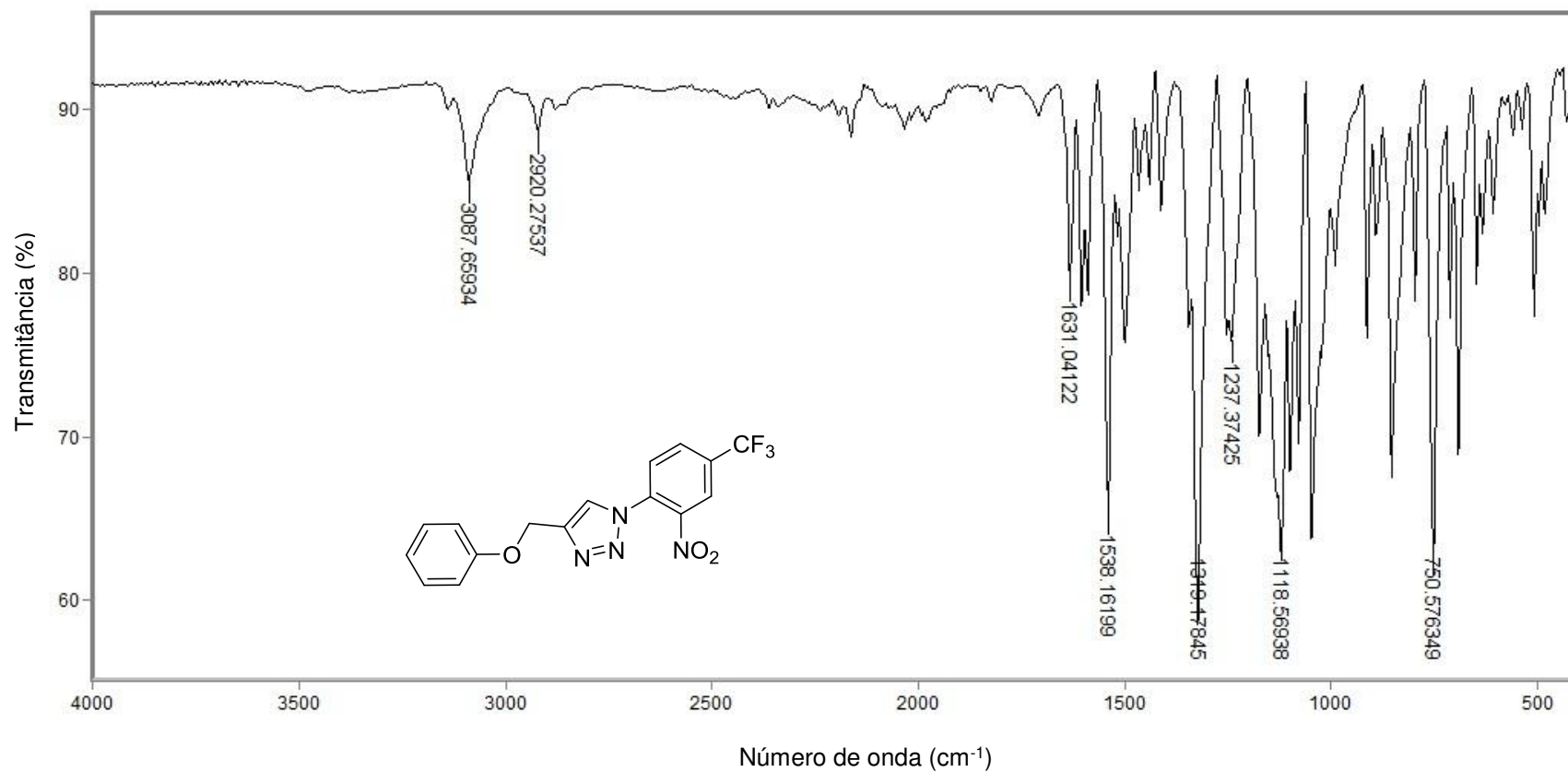


Figura 2.15 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

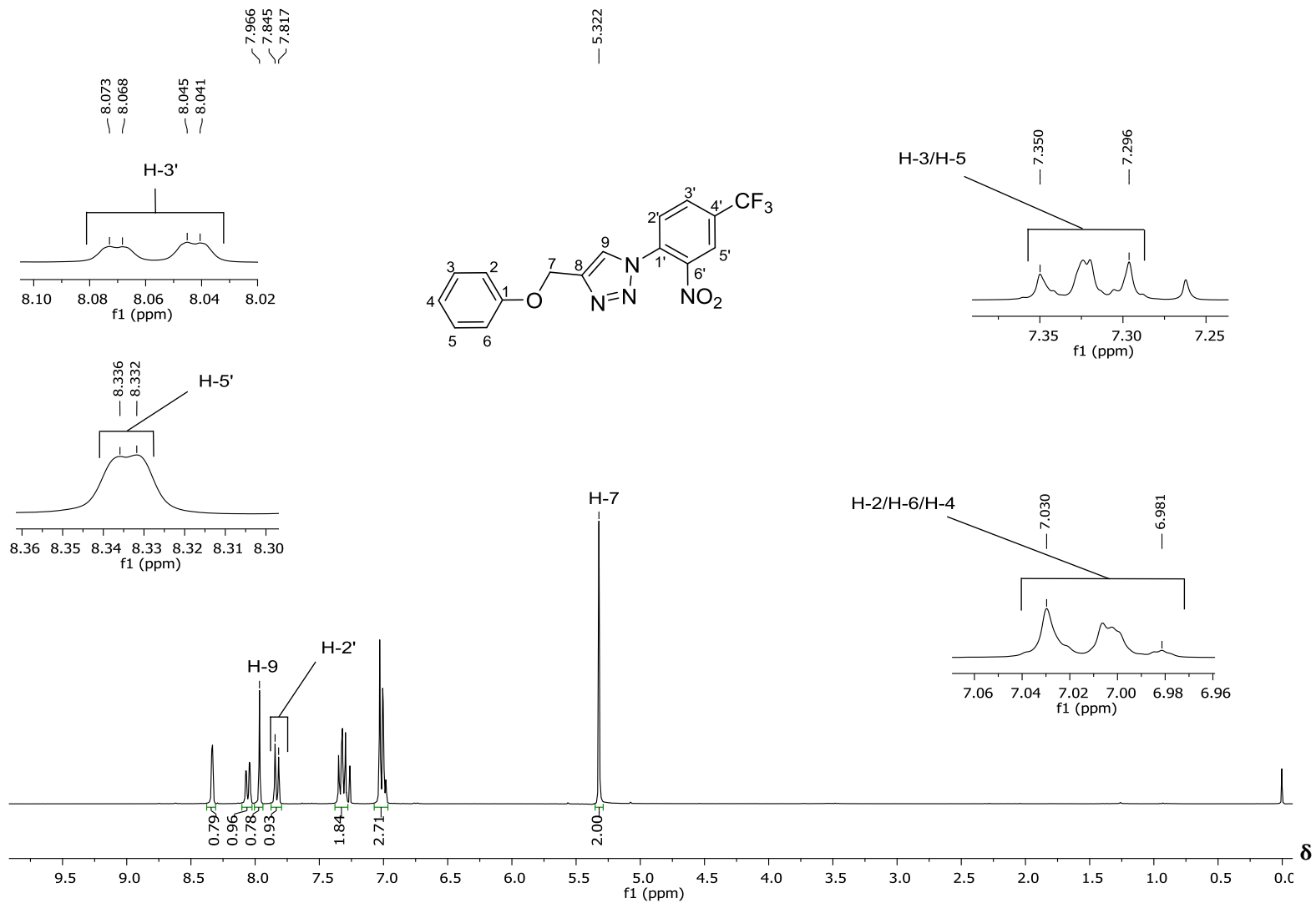


Figura 2.16 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **3a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

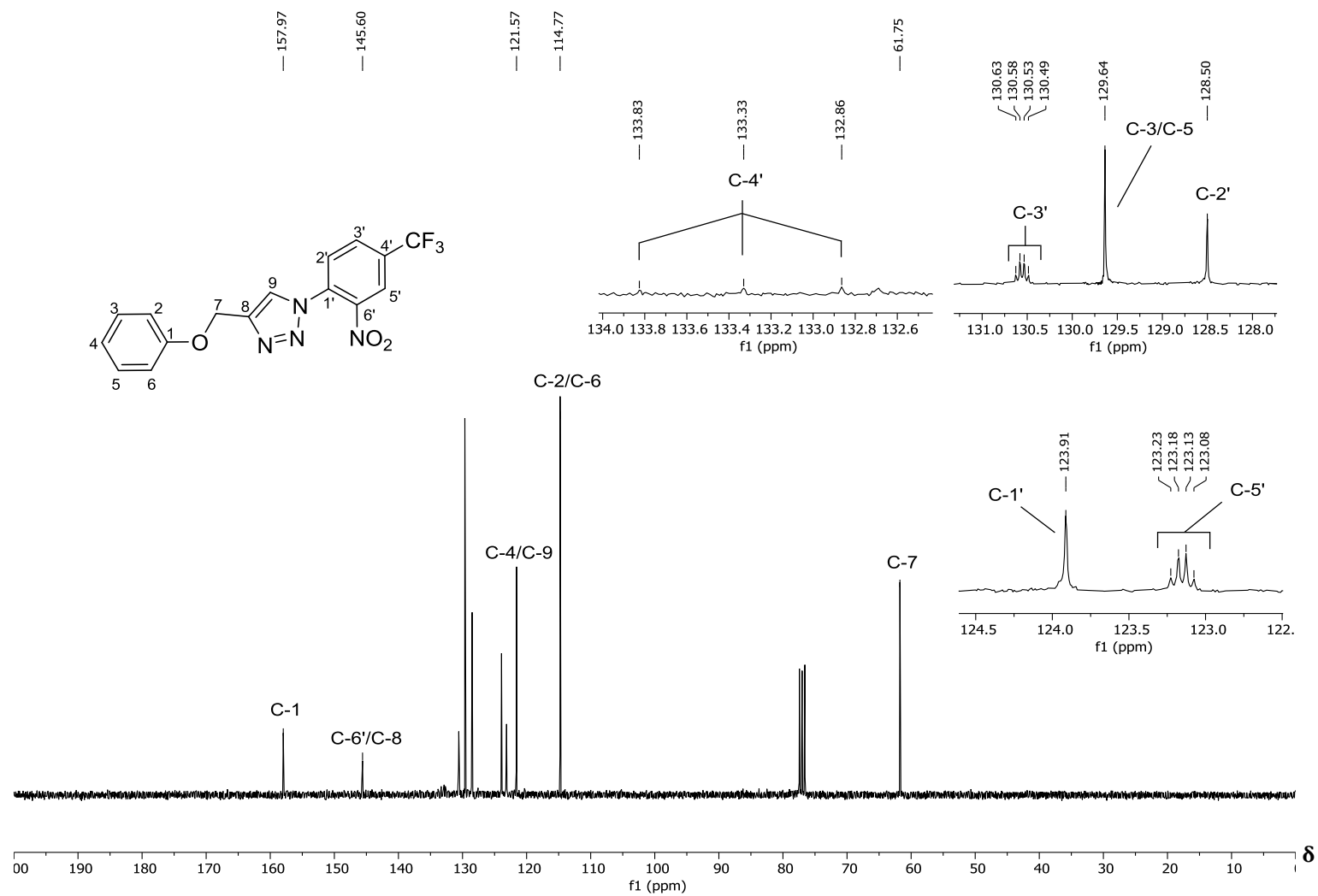


Figura 2.17 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **3a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Além da confirmação da estrutura de **3a** por meio das espectroscopias no infravermelho e de RMN, o composto **3a** teve sua estrutura também confirmada por meio da difração de raios X de monocristal (DRXM). Na Figura 2.18 encontra-se apresentada a unidade assimétrica de **3a**.

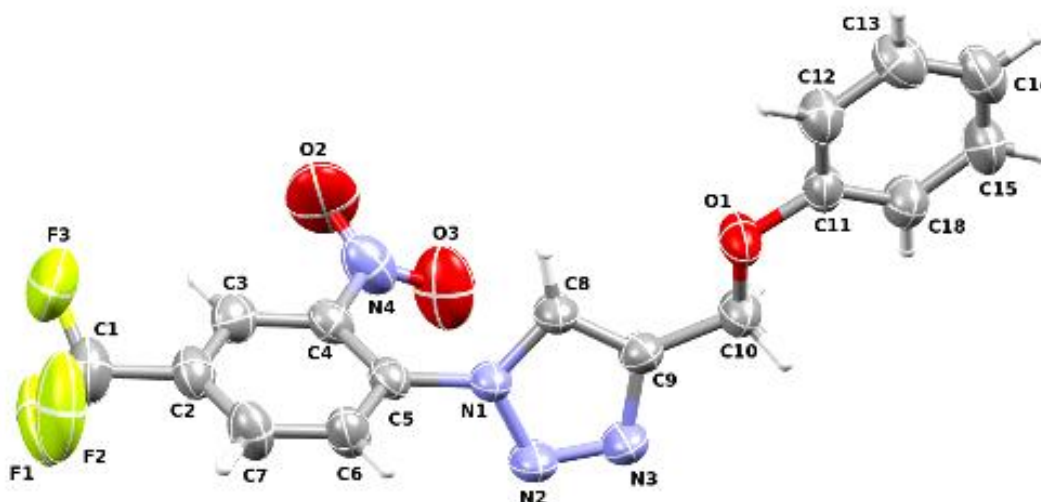


Figura 2.18 – Unidade assimétrica do composto **3a**. Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos da unidade assimétrica do composto **3a** é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.16 e 2.17.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O composto **3a** foi resolvido no grupo espacial $P2_1/c$. Na Figura 2.19 c, pg. 122, observa-se que o anel triazólico de uma molécula de **3a** interage com o anel triazólico e o anel benzênico de uma segunda molécula por meio das interações $N2 \cdots C4$ e a interação de hidrogênio não clássica $H8 \cdots N3$. Ademais, observa-se que um centroide calculado para o anel benzênico com o grupo trifluorometila possui uma distância de 3,50 Å para um átomo de flúor do grupo CF_3 localizado em uma molécula seguinte. Todas estas interações propagam-se em uma cadeia ao longo do eixo cristalográfico b e conduzem a um empilhamento com os anéis benzênicos contendo o grupo trifluorometila

sobrepostos em camadas obliquamente e os anéis triazóis compondo uma rede plana (Figura 2.19 c). Conforme pode ser observado na Figura 2.19 c, o empacotamento cristalino resulta em uma torção entre o anel triazólico e o anel benzênico contendo o grupo trifluorometila (N2-N1-C5-C6, ângulo de torção igual a $71,1 (3)^\circ$). Isso revela que a deslocalização eletrônica entre o anel triazólico e o anel benzênico contendo o grupo trifluorometila é pouco efetiva. O composto **3a** empacota-se ao longo do eixo *c*, por meio de ligações hidrogênio não clássicas entre o oxigênio do grupo nitro e um hidrogênio também do anel benzênico contendo o grupo trifluorometila (O3...H6-C6) (Figura 2.19 b). Ao longo do eixo *a*, nenhuma interação importante é observada.

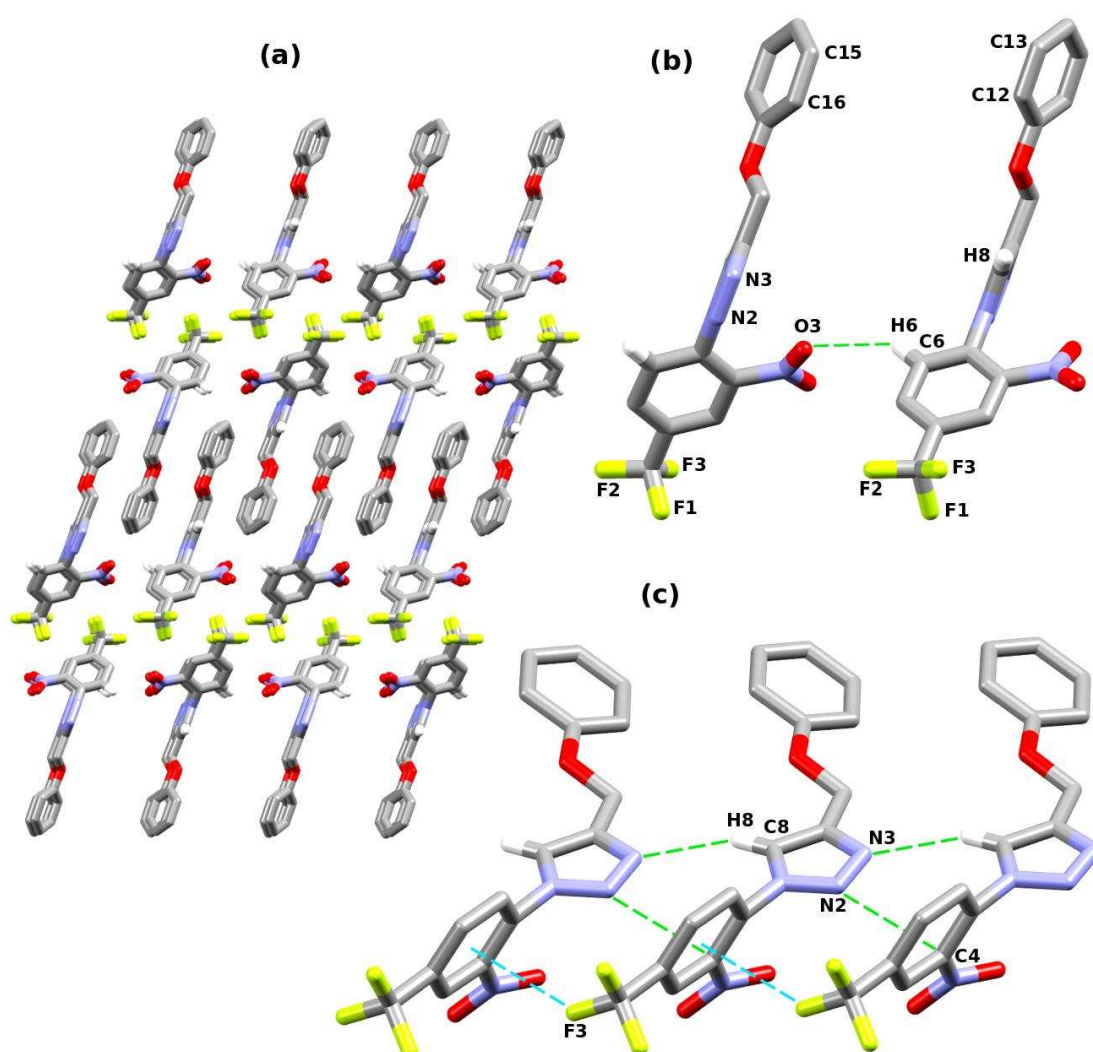
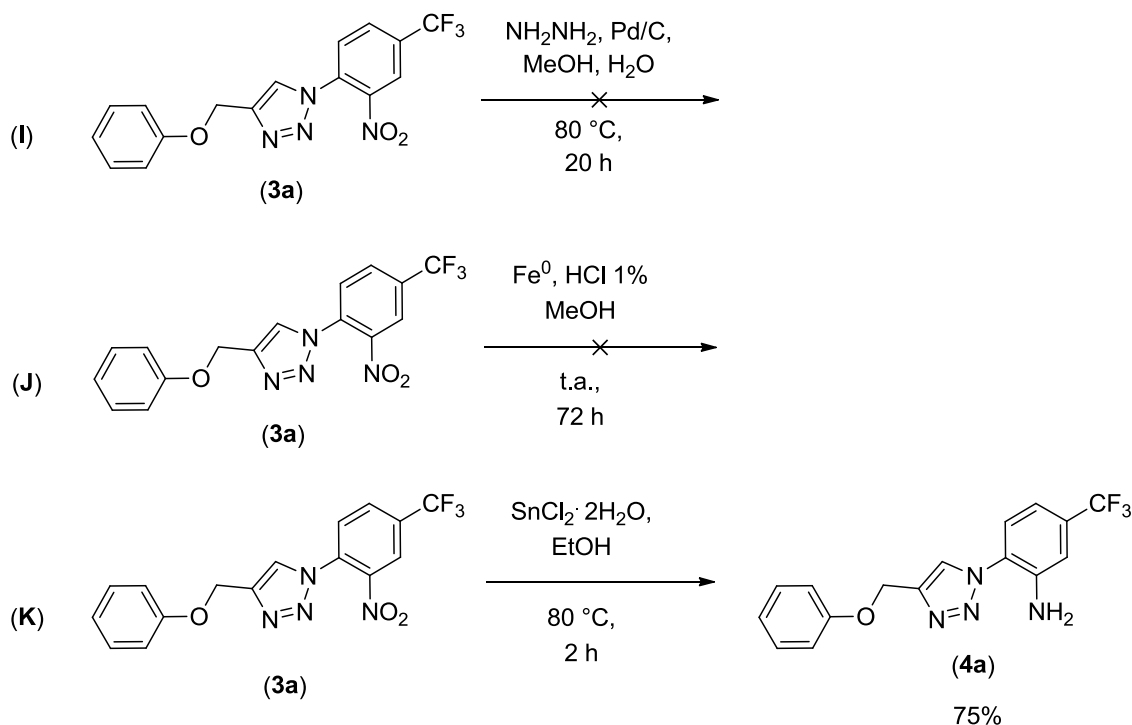


Figura 2.19 - a) Empacotamento 2x2 do composto **3a** vista ao longo do eixo *b*; b) interação O3...H6-C6 observada ao longo do eixo *c*; c) empilhamento ao longo

do eixo *b*. O tracejado em azul indica a interação do átomo de flúor com o centróide calculado para o anel benzênico contendo o grupo trifluorometila.

Retornando ao plano sintético apresentado no Esquema 2.5, pg. 99, a próxima etapa da rota corresponde à preparação das aminas aromáticas **4a-4j** a partir dos nitrocompostos triazólicos **3a-3j**. Para realizar a redução do grupo nitro ao grupo amino, algumas metodologias foram testadas. Esses testes foram realizados utilizando-se o composto **3a** como material de partida (GAMBLE *et. al.*, 2007; ENTWISTLE *et. al.*, 1977; UPADHYAYA *et. al.*, 2013) (Esquema 2.11).



Esquema 2.11 – Métodos **I**, **J** e **K** testados para a síntese da 2-(4-(fenoximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)anilina (**4a**).

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como pode ser observado no Esquema 2.11, nos dois primeiros métodos não houve a formação do produto mesmo após 20 h (método **I**) e 72 h (método **J**) de reação. Já no terceiro método o produto **4a** foi obtido com 75% de rendimento após duas horas de reação. Portanto, este foi o método escolhido (UPADHYAYA *et. al.*, 2013) para ser utilizado nas demais reações de redução

do grupo nitro. Com esse método, uma série de aminas foi sintetizada com rendimentos que variaram de 75 a 95% (Figura 2.20, pg. 124).

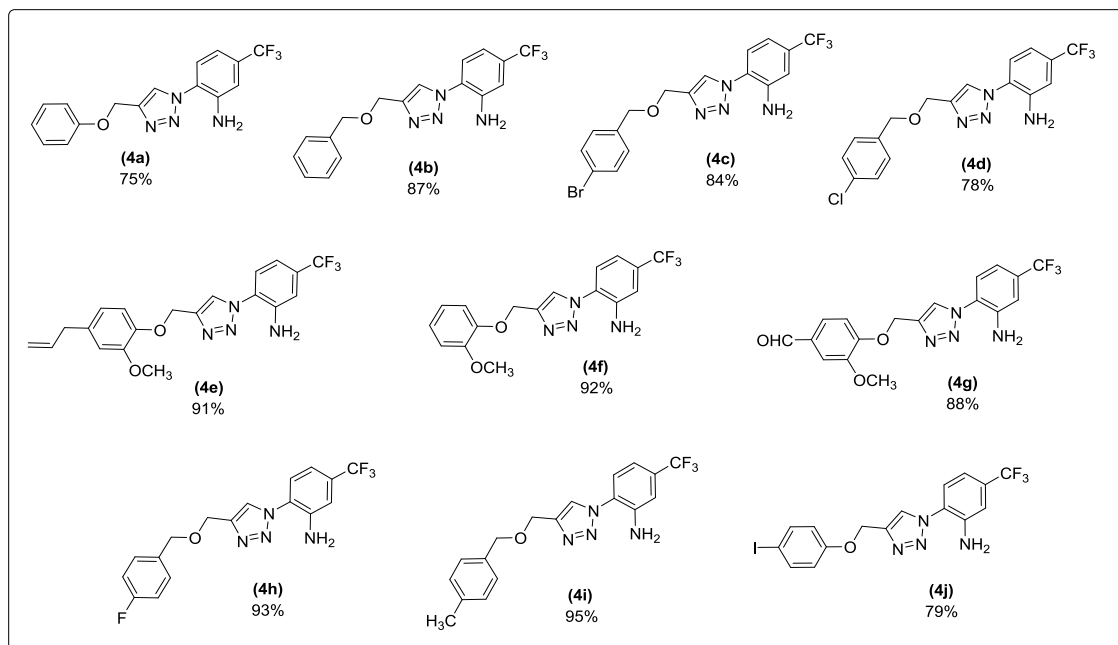


Figura 2.20 – Estruturas das aminas triazólicas sintetizadas.

No que tange à caracterização de **4a**, no seu espectro no infravermelho (Figura 2.21, pg.126), observam-se bandas em 3451 e 3343 cm^{-1} referentes aos estiramentos assimétricos e simétricos da ligação N-H, confirmando a presença do grupo NH₂. Não são mais observadas no espectro da Figura 2.21 as bandas intensas referentes aos estiramentos simétricos e assimétricos do grupo nitro. Em 3150 e 3057 cm^{-1} observam-se bandas de estiramento de ligação C-H de carbono com hibridização sp^2 ; em 2920 e 2868 cm^{-1} , bandas referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . As bandas em 1623, 1601 e 1586 cm^{-1} estão sobrepostas e são referentes ao estiramento da ligação C=C e deformação angular da ligação N-H. A banda em 1334 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-F (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ¹H do composto **4a** (Figura 2.22, pg. 127), o simpleto observado em δ_{H} 5,13 e integrado para dois átomos de hidrogênio, é referente aos átomos de hidrogênio H-7. O aparecimento do simpleto em δ_{H} 5,86, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios do grupo NH₂ provando a formação do composto de interesse. O multiplete em δ_{H} 6,86-6,89, integrado para dois átomos de hidrogênio, foi associado aos hidrogênios H-3' e H-5'. O duplete em δ_{H} 6,99 e integrado para dois átomos de hidrogênio (*J*

= 8,0 Hz) corresponde aos hidrogênios H-2 e H-6. O outro multiplete observado em δ_{H} 7,19-7,25, integrado para três átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios H-3, H-5 e H-4. O duplete observado em δ_{H} 7,39, integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 8,4$ Hz), foi relacionado ao hidrogênio H-2'. O simpleto em δ_{H} 8,56 e integrado para um átomo de hidrogênio, é referente ao hidrogênio H-9. Mais uma vez pode ser observado que as constantes de acoplamento de hidrogênios em posição *orto* estão em acordo com a literatura (PAVIA *et. al.*, 2010).

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **4a** (Figura 2.23, pg. 128), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. O sinal em δ_{C} 61,5 foi atribuído ao carbono C-7. Em δ_{C} 112,7 encontra-se o quarteto atribuído ao carbono C-5' ($^3J_{\text{C-F}} = 3,3$ Hz) e em δ_{C} 113,7 o sinal do quarteto referente ao carbono C-3' ($^3J_{\text{C-F}} = 3,7$ Hz). Em δ_{C} 115,3 aparece o sinal dos carbonos C-2 e C-6. Em δ_{C} 121,6, o sinal do carbono C-4 e em δ_{C} 124,8 está o quarteto referente ao carbono do grupo CF_3 ($^1J_{\text{C-F}} = 271,0$ Hz). O sinal dos carbonos C-1', C-2' e C-9, aparecem em δ_{C} 124,8, 126,2 e 127,2, respectivamente. Em δ_{C} 130,2 observa-se o sinal atribuído aos carbonos C-3 e C-5, em δ_{C} 131,1, está o quarteto do carbono C-4' ($^2J_{\text{C-F}} = 31,3$ Hz). Os sinais em δ_{C} 143,7, 143,8 e 158,8 foram atribuídos aos carbonos C-6', C-8 e C1, respectivamente. Deve ser notado que os sinais referentes a C-6' e C-8 puderam ser observados no espectro de **4a**, enquanto que no espectro de RMN de C^{13} de **3a** (Figura 2.17, pg. 120) eles foram observados completamente sobrepostos. Mesmo comentário se aplica aos átomos C-4 e C-9. Os valores das constantes de acoplamento ^{19}F - ^{13}C calculadas a partir dos espectros de RMN de ^{13}C estão próximos aos valores das constantes reportadas na literatura para este tipo de acoplamento (Figura 2,9, pg. 105) (PRETSCH *et. al.*, 1989).

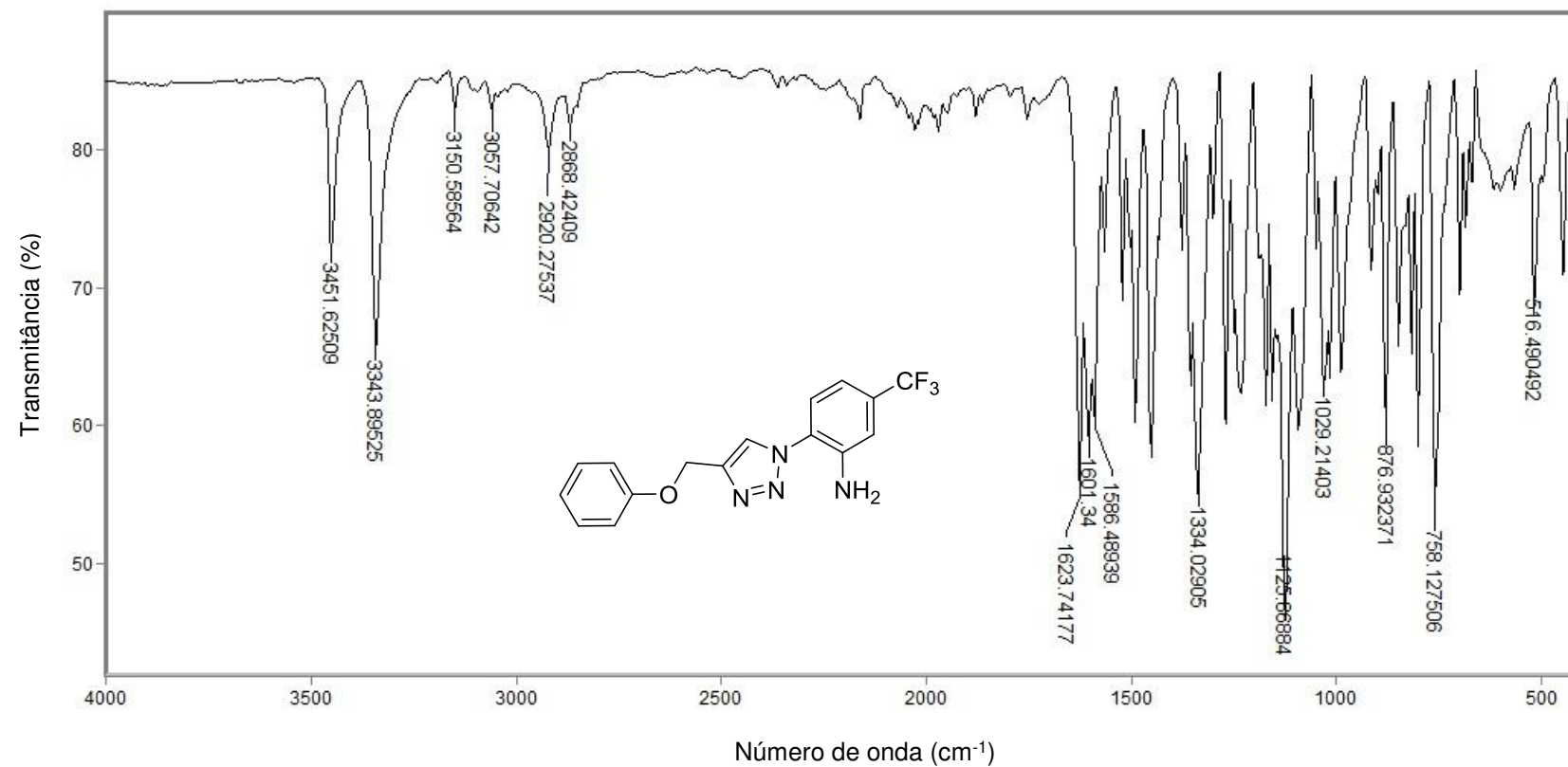


Figura 2.21 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

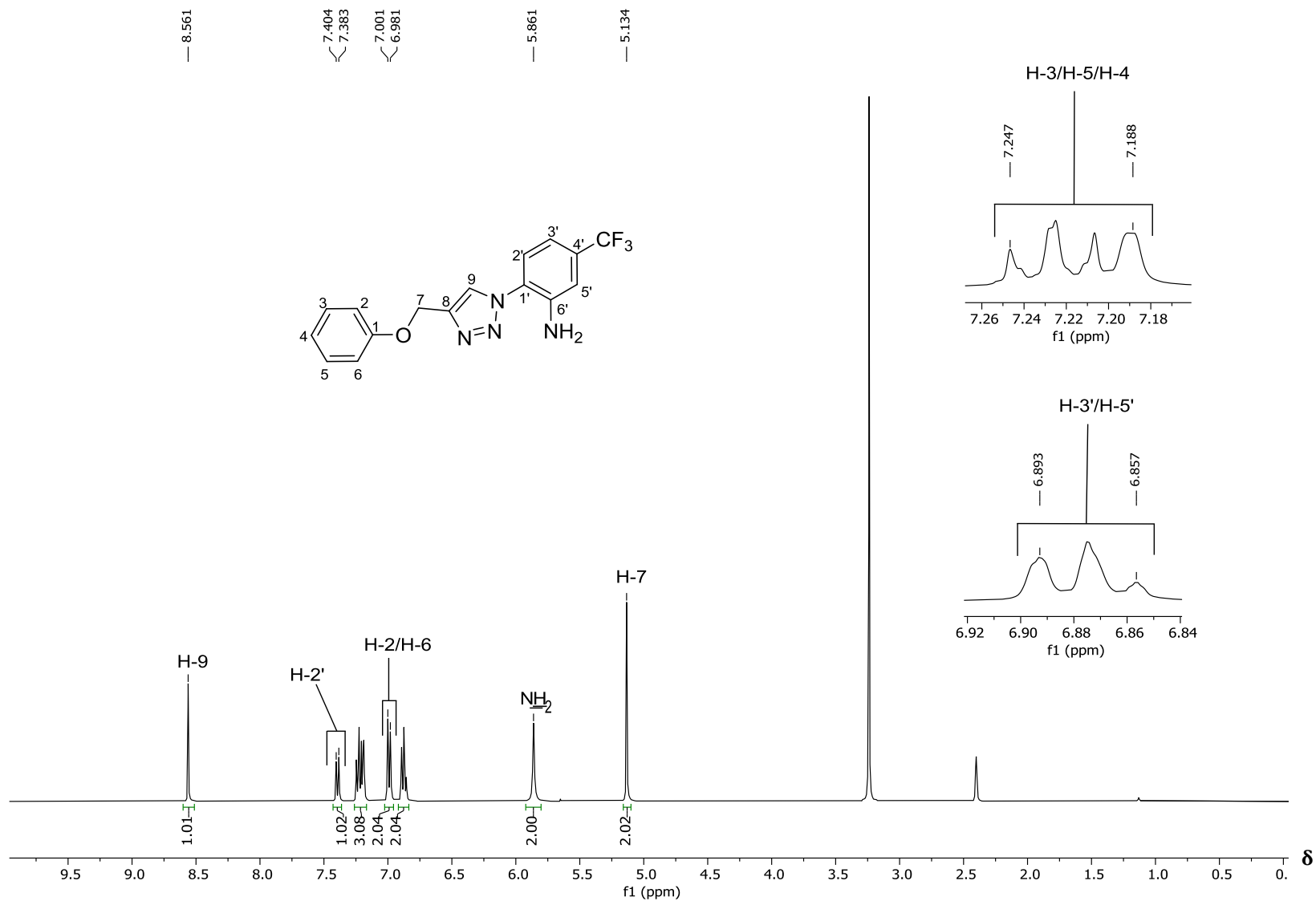


Figura 2.22 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

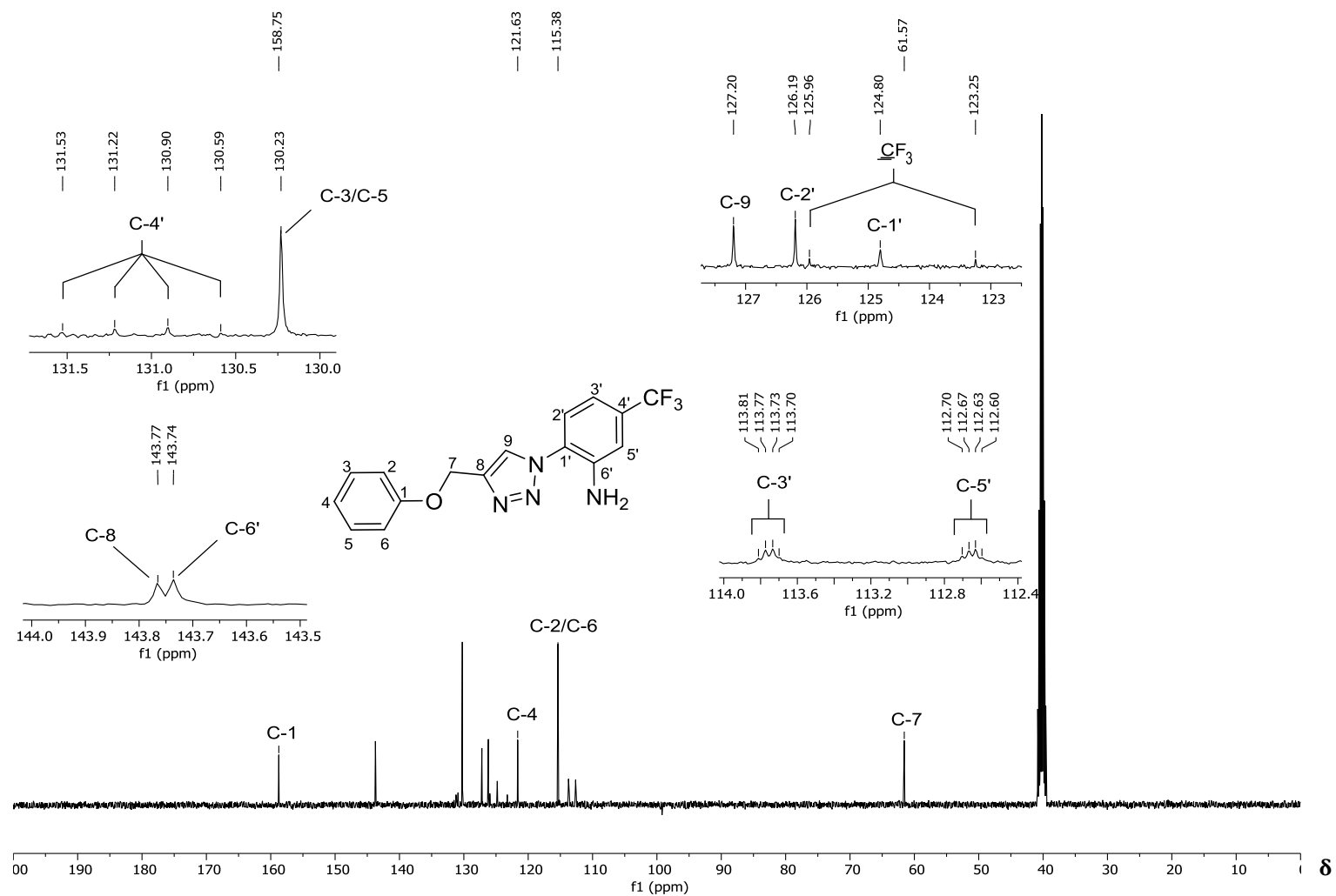


Figura 2.23 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **4a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Assim como o composto **3a**, o composto **4a** também teve sua estrutura investigada e confirmada por difração de raios X. Na Figura 2.24 está representada a unidade assimétrica de **4a**.

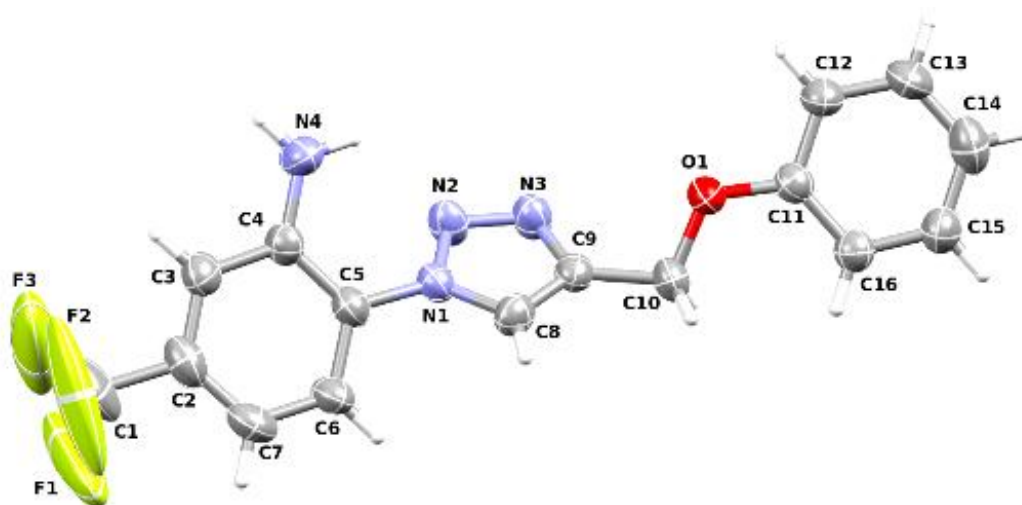


Figura 2.24 – Unidade assimétrica do composto **4a**. Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos das unidades assimétricas mostrada para o composto **4a** é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.22 e 2.23.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O composto **4a** foi resolvido para o grupo espacial $P2_1c$. Na anilina **4a** há ligações de hidrogênio intramoleculares entre o grupamento amino e o triazol, gerando um sinton S(6) (N4-H4B...N2, Figura 2.25 d, pg. 131). De forma bifurcada, H4b também liga-se ao átomo N3 do triazol de uma molécula vizinha (N4-H4B...N3, Figura 2.25 d). Essas duas ligações de hidrogênio clássicas, formam juntas, um padrão sintônico $R_2^4(6)$ e dando também um padrão dimérico às duas moléculas envolvidas (Figura 2.25 d). O átomo N2 bifurca-se em outra interação de hidrogênio não clássica com H16 (C16-H16...N2, Figura 2.25 d). Estas interações conduzem a uma cadeia sanfonada lateralmente ao longo da direção do eixo *b*. Vistas tanto sob o eixo *a* quanto o *c*, revela-se o padrão zigue-zague (Figura 2.25 a e Figura 2.25 b respectivamente). Na Figura 2.25 d são observadas duas interações de hidrogênio: uma entre o grupamento amino e o átomo de oxigênio da função éter (N4-H4A...O1) e outra não clássica bifurcada

de H4A, para o carbono C11, vizinho de O1. Estas interações formam um sinton $R_1^2(3)$ e conduzem a uma cadeia de padrão sanfonado também ao longo de *b*. A junção dos dois padrões sanfonados, formados por C16-H16...N2 e o sinton $R_1^2(3)$, vistos sob o eixo *a*, compõem um único padrão de losangos consecutivos; compondo uma extensa rede ao longo dos eixos *b* e *c* (Figura 2.25 e). Quando se expande a rede, para incluir as moléculas que realizam o padrão sintonico $R_2^4(6)$, novas moléculas acabam por se situar dentro de cada interstício, aumentando a densidade da mesma e gerando interstícios menores.

Um último padrão a ser observado é constituído por um par de interações fracas entre C6-H6...C3 e C7-H7...F2, respectivamente. Estas ligações geram um padrão também em ziguezague, visto do eixo *a*, só que se desenvolve ao longo de *c* (Figura 2.25 f). Visto ao longo do eixo *b*, observa-se um empilhamento uniforme (Figura 2.25 c). Somando esta cadeia com os outros dois padrões sanfonados identificados exhibe-se automaticamente o padrão sintonico $R_2^4(6)$.

Cumprе ressaltar que Netto e colaboradores (2008) descrevem que Broder e co-autores (2002) definiram sintonos supramoleculares “como uma combinação de grupos doadores e aceitadores complementares que se reconhecem entre si ao nível molecular e são capazes de gerar interações supramoleculares reprodutíveis e bem definidas no estado sólido.”

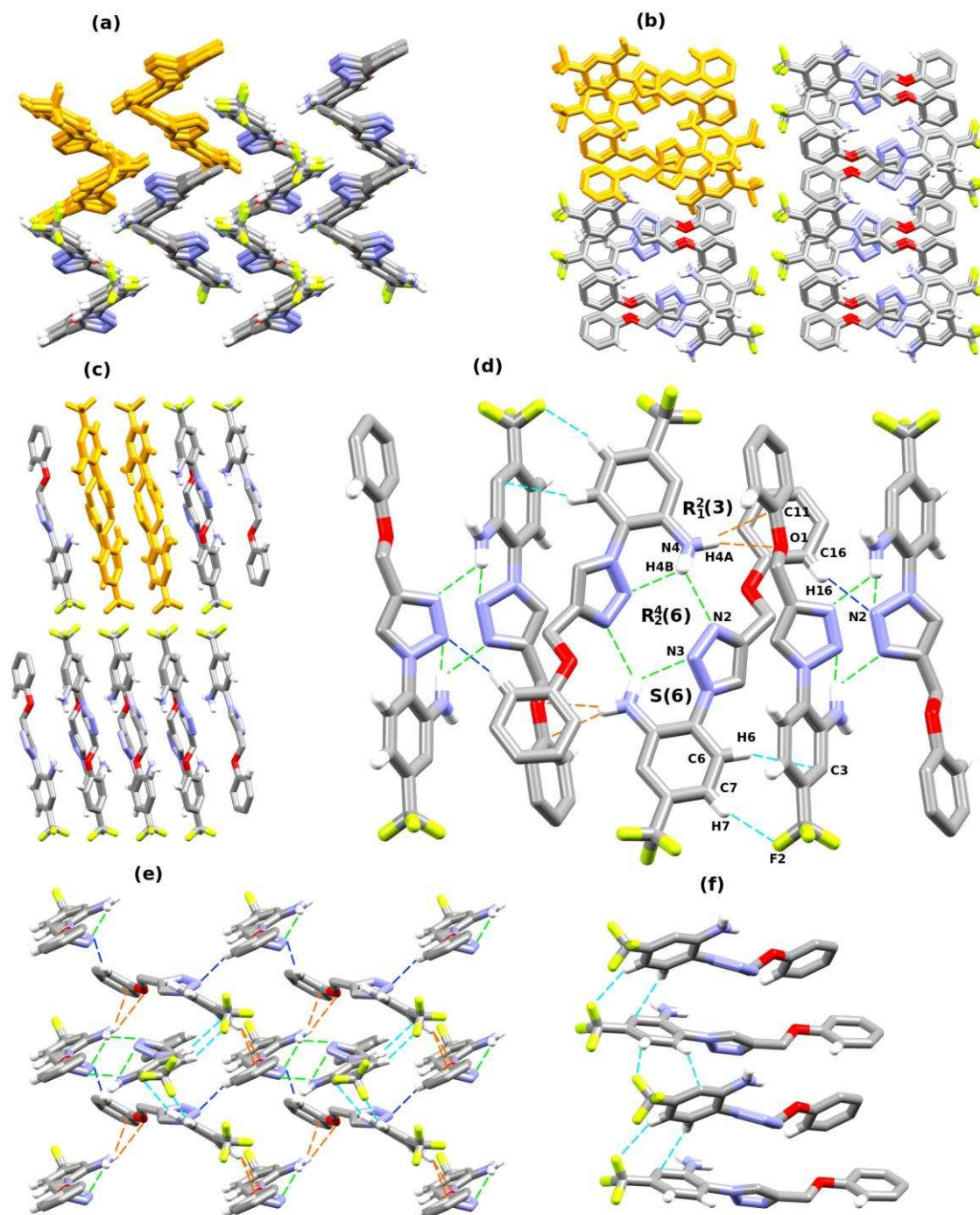


Figura 2.25 - Os empacotamentos são 2x2 com os motivos destacados em amarelo. a) empacotamento na perspectiva de *a*; b) empacotamento na perspectiva de *c*; c) empacotamento na perspectiva de *b*; d) a cada conjunto de interações foi atribuído uma cor que serve para a avaliação das imagens mostradas em e e em f.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

A última etapa do plano sintético mostrado no Esquema 2.5, pg. 99 corresponde à formação das amidas triazólicas **5a-5j**. Estas foram preparadas por meio do processo de acilação entre as aminas **4a-4j** e o cloridrato do cloreto de isonicotinoíla (BARROS, 2014).

Os compostos **5a-5j** (Figura 2.26) foram obtidos com rendimentos que variaram de 39 a 80%, mas com longos tempos de reação (Tabela 2.4, pg. 70). No momento que este trabalho está sendo redigido, não há uma racionalização para os longos tempos de reação envolvidos na preparação dos derivados **5a-5j**. Tentativas de elevar os rendimentos e diminuir os tempos de reação foram infrutíferas e investigações futuras fazem-se necessárias para melhoria tanto do tempo bem como dos rendimentos das reações envolvidas na preparação de **5a-5j**.

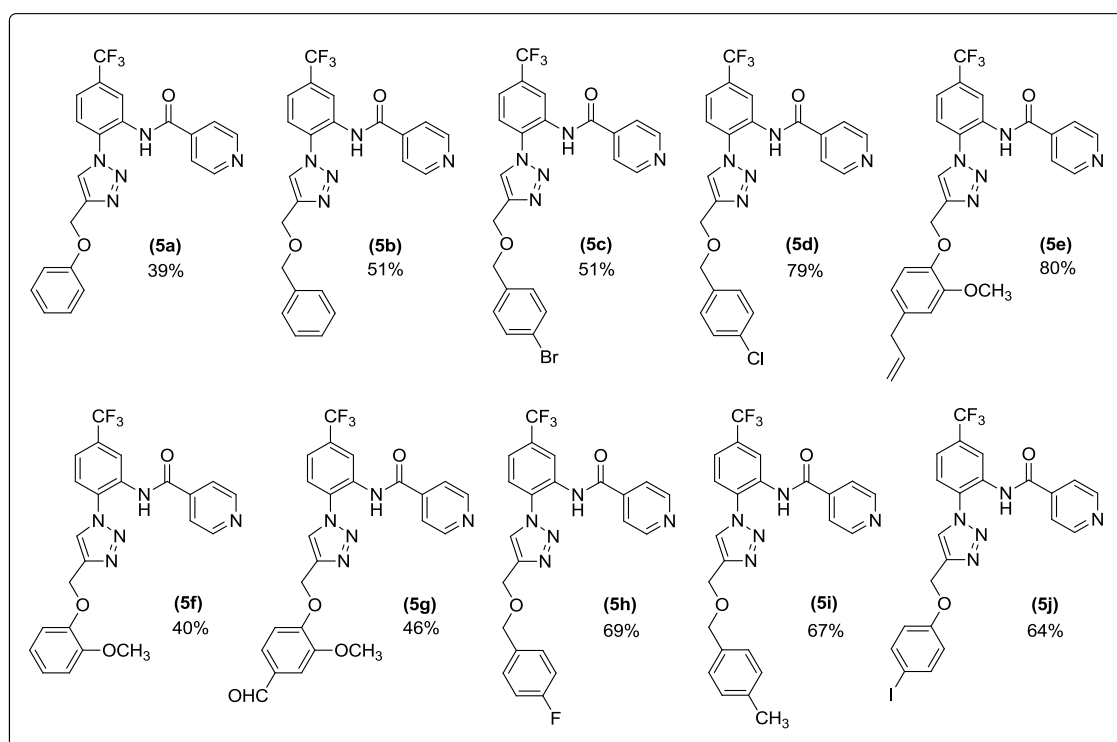


Figura 2.26 – Estruturas das amidas triazólicas **5a-5j** sintetizadas.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Com respeito a estes compostos, escolheu-se como exemplo a substância **5a** para uma descrição pormenorizada de seu processo de caracterização. No espectro no infravermelho do composto **5a** (Figura 2.27, pg. 135), as bandas referentes ao grupo amina apresentadas no espectro de **4a**

(Figura 2.21, pg. 126) não mais são observadas. Percebe-se uma banda em 3269 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H de amida *N*-substituída. Em 3158 , 3120 , 3061 e 3035 cm^{-1} observam-se bandas de estiramento de ligação C-H de carbono com hibridização sp^2 e em 2961 e 2931 cm^{-1} bandas referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . A banda atribuída ao estiramento do grupo carbonila da função amida aparece em 1668 cm^{-1} . A presença desta banda no espectro, juntamente com a banda em 3269 cm^{-1} , confirma a formação do composto **5a**. As bandas em 1601 , 1545 e 1501 cm^{-1} se encontram sobrepostas e são referentes ao estiramento da ligação C=C e deformação angular da ligação N-H. A banda em 1334 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-F (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **5a** (Figura 2.28, pg. 136), o simpleto observado em $\delta_{\text{H}} 5,37$ e integrado para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído aos hidrogênios H-7. Não mais se observa o sinal referente ao grupo $-\text{NH}_2$, conforme observado no espectro de **4a** (Figura 2.22, pg. 127). O multipletto observado em $\delta_{\text{H}} 7,02\text{-}7,07$, integrado para três átomos de hidrogênio, refere-se aos hidrogênios H-2, H-6 e H-4. Mais dois multipletos aparecem em $\delta_{\text{H}} 7,32\text{-}7,38$ e $\delta_{\text{H}} 7,58\text{-}7,64$, integrados para dois átomos de hidrogênio cada um e correspondem aos hidrogênios H-3/H-5, e H-2'/H-3', respectivamente. Em $\delta_{\text{H}} 7,82$ encontra-se um duplo dupletto integrado para dois átomos de hidrogênio ($J_1 = 4,5\text{ Hz}$ e $J_2 = 1,7\text{ Hz}$), referente aos hidrogênios H-2'' e H-5''. O próximo sinal em $\delta_{\text{H}} 8,18$, integrado para um átomo de hidrogênio, é um simpleto e refere-se ao hidrogênio H-9. O outro duplo dupletto que aparece em $\delta_{\text{H}} 8,88$ é semelhante ao que se observa em $\delta_{\text{H}} 7,82$, apresentando os mesmos valores de constantes de acoplamento e refere-se aos hidrogênios H-3''/H-4''. Os dois últimos simpletos observados em $\delta_{\text{H}} 9,16$ e $\delta_{\text{H}} 11,15$, são integrados para um átomo de hidrogênio cada e correspondem aos hidrogênios H-5' e NH , respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C do composto **5a** (Figura 2.29, pg. 137), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. O sinal em $\delta_{\text{C}} 61,7$ foi atribuído ao carbono C-7 e aquele em $\delta_{\text{C}} 114,7$ foi relacionado aos carbonos C-2 e C-6. Em $\delta_{\text{C}} 120,7$ encontra-se o quarteto atribuído ao carbono C-5' ($^3J_{\text{C-F}} = 3,6\text{ Hz}$) e em $\delta_{\text{C}} 120,9$ o sinal do quarteto referente ao carbono C-3' ($^3J_{\text{C-F}} = 3,6\text{ Hz}$). Os sinais desses quartetos não estão bem resolvidos, ainda assim foi possível calcular os deslocamentos químicos

como também as constantes de acoplamento. Em δ_c 120,8 está o sinal do carbono C-2'. Os sinais dos carbonos C-9 e C-4 aparecem em δ_c 121,8 e δ_c 122,6, respectivamente. Em δ_c 123,4 aparece o sinal relativo aos carbonos C-2'' e C-5'', enquanto que em δ_c 129,7 observa-se o sinal dos carbonos C-3 e C-5. Os sinais dos carbonos C-1', C-6', C-1'' e C-8 são observados em δ_c 130,8, δ_c 131,6, δ_c 140,6 e δ_c 145,6, nessa ordem. Já os sinais dos outros carbonos presentes no anel piridínico C-3'' e C-4'', são observados em δ_c 151,0. Os sinais dos carbonos C-1 e C-6'' aparecem em δ_c 157,8 e δ_c 163,6. Os sinais (quartetos) do grupo $\underline{C}F_3$ e do carbono C-4' não foram observados. Os valores das constantes de acoplamento $^{19}F-^{13}C$ calculadas a partir dos espectros de RMN de ^{13}C estão próximos aos valores das constantes reportadas na literatura para este tipo de acoplamento (Figura 2.9, pg. 105) (PRETSCH *et. al.*, 1989).

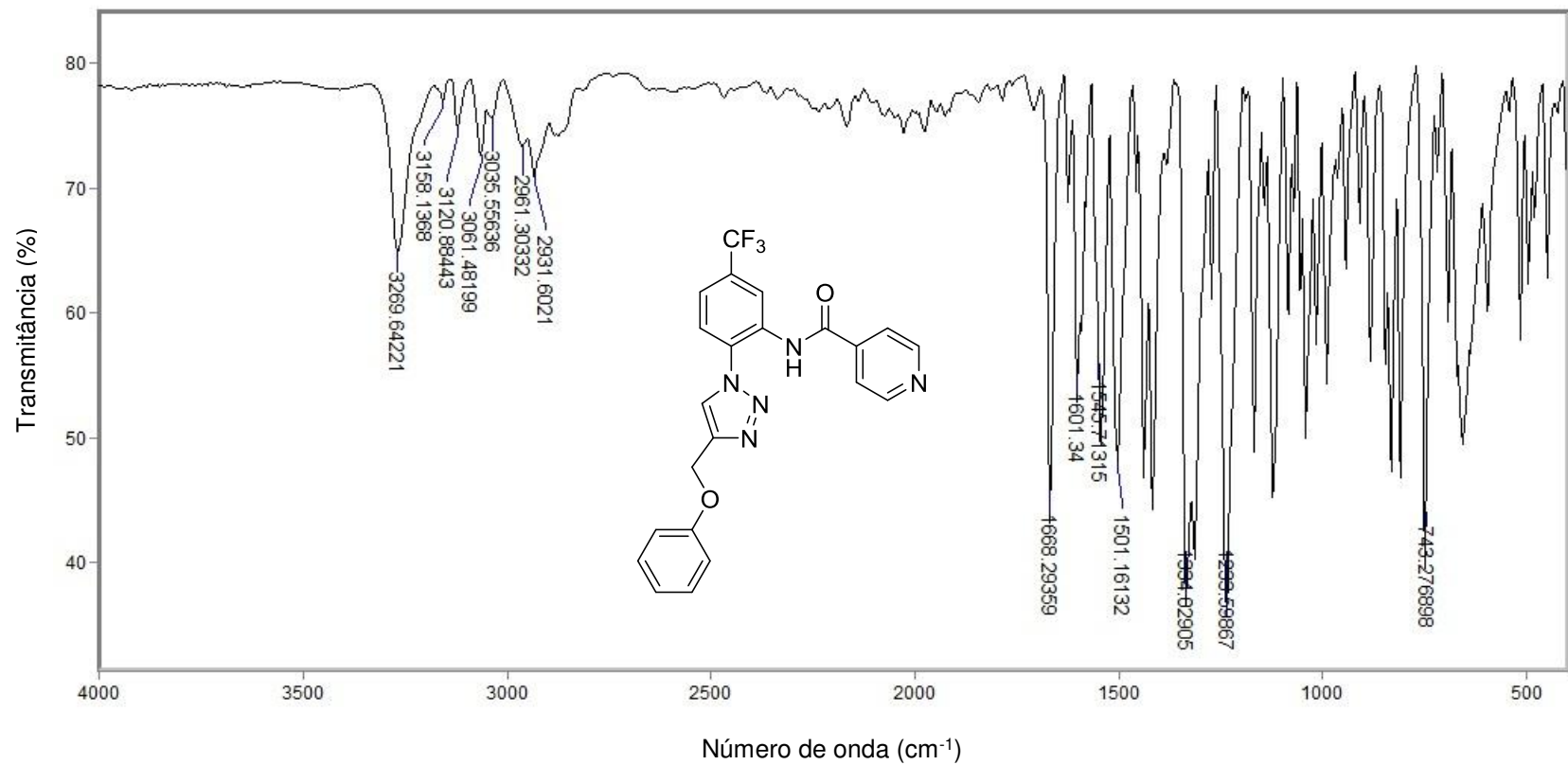


Figura 2.27 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

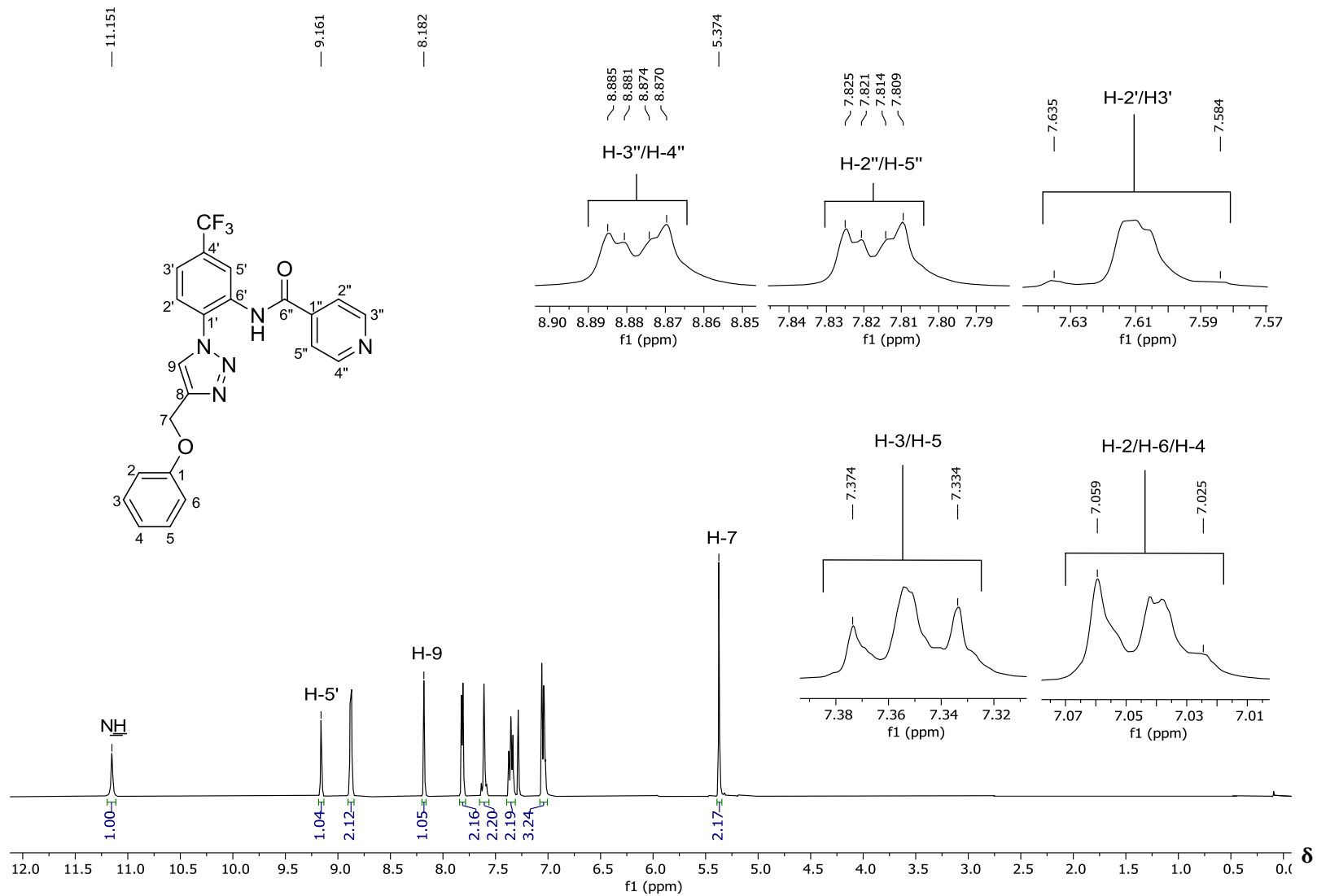


Figura 2.28 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **5a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

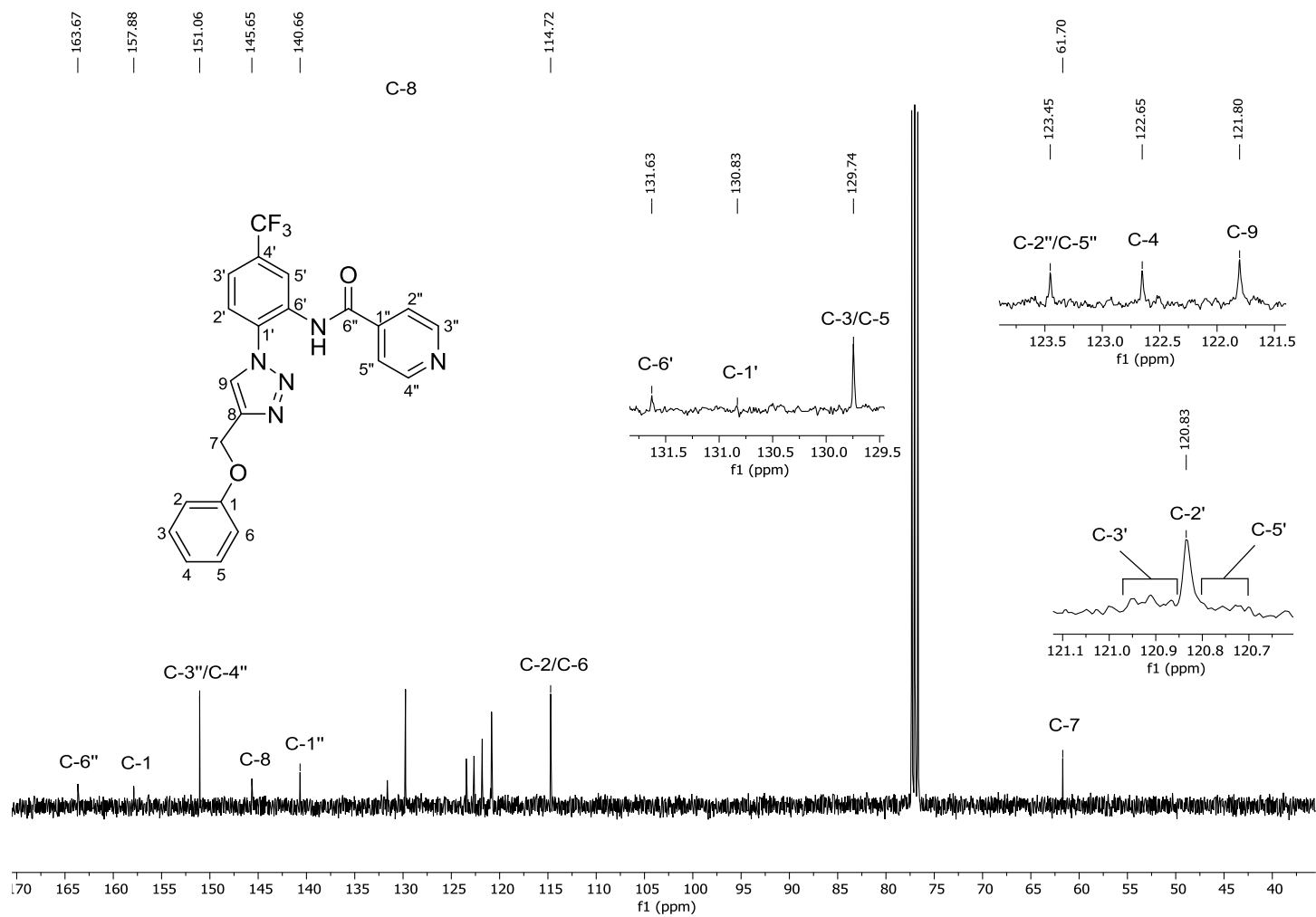


Figura 2.29 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **5a**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Ainda sobre os dados de RMN de ^1H do composto **5a**, salienta-se que as constantes de acoplamento observadas para os hidrogênios do anel piridínico estão em acordo com a literatura (Figura 2.29) (PRETSCH *et al.*, 1989; PAVIA *et al.*, 2010).

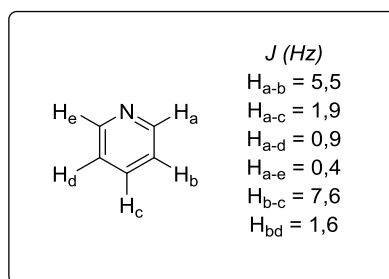


Figura 2.30 – Valores para constantes de acoplamento de átomos de hidrogênios de anel piridínico.

Fonte: Reproduzida a partir de PRETSCH *et al.*, 1989, p. H275.

Na Figura 2.31 encontra-se representado a unidade assimétrica do composto **5a**, cuja estrutura também foi confirmada por difração de raio X de monocristal.

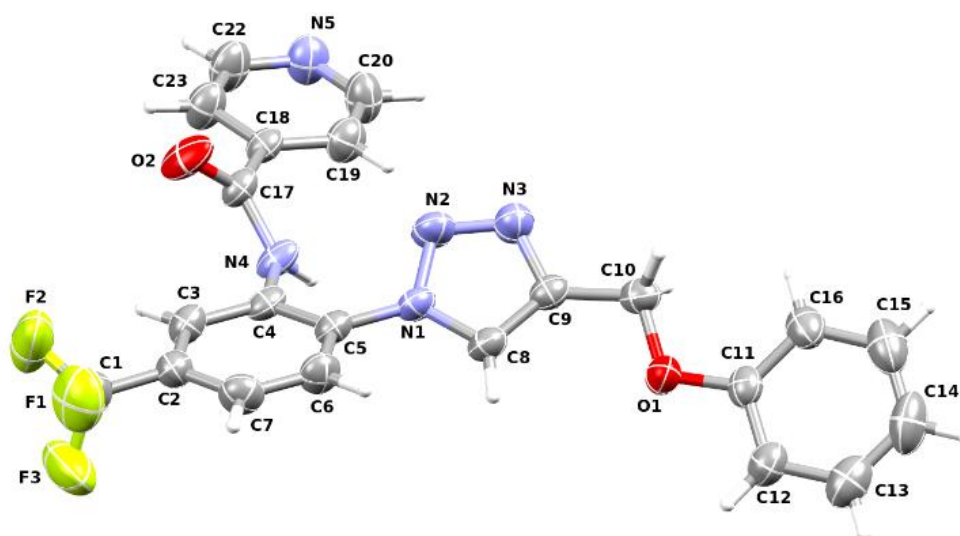


Figura 2.31 - Unidade assimétrica do composto **5a**. Átomos não hidrogenóides são representados por elipsóides a uma probabilidade de 50%. Átomos de hidrogênio são representados por esferas de raio arbitrário. Os átomos de carbono possuem cor cinza, os de hidrogênio branca, os de flúor amarela, os de nitrogênio azul e os de oxigênio cor vermelha. A numeração dos átomos da unidade assimétrica do composto **3a** é diferente daquela mostrada nas Figuras 2.28 e 2.29.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

O composto **5a** foi resolvida no grupo espacial $P2_1/n$. Na Figura 2.32 a, pg. 140, é mostrado o empacotamento 2x2 na perspectiva do eixo cristalográfico *a*. Para esta substância, são observados dois síntons adjacentes $R_2^2(8)$ e $R_2^1(7)$ (Figura 2.32 c), composto por ligações de hidrogênio não clássicas C22-H22...O1 e C8-H8...N5 para o sínton $R_2^2(8)$ e C6-H6...N5 e C8-H8...N5 para o outro sínton. Estes dois síntons envolvem uma grande estrutura molecular ao redor de um anel piridínico e gera uma cadeia plana ao longo do eixo cristalográfico *b*. Um grande sínton também pode ser observado, $R_2^2(14)$, formado pela ligação C16-H16...N3, que gera um padrão dimérico (Figura 2.32 b). Este sínton contribui para conectar acima e abaixo, as camadas formadas pelos síntons $R_2^2(8)$ e $R_2^1(7)$ (Figura 2.32 d).

Observa-se também uma ligação de hidrogênio clássica entre a porção amida da molécula (N4-H4...O2), que forma um sínton $C_1^1(4)$ do tipo cadeia (Figura 2.32 e). Uma característica interessante deste sínton é que ele mantém um aspecto bastante linear na cadeia de moléculas por ele formada e cria uma torção acentuada da amida em relação aos planos aromáticos adjacentes. Esta cadeia percorre no sentido do eixo *a*. Ademais, ela também mantém um aspecto lamelar oblíquo, abrindo espaço para outras interações típicas, como a interação entre H10B e os elétrons π do grupo fenila (distância entre H10B e o respectivo centroide é 2.72 Å) da porção éter de **5a** (Figura 2.32 e).

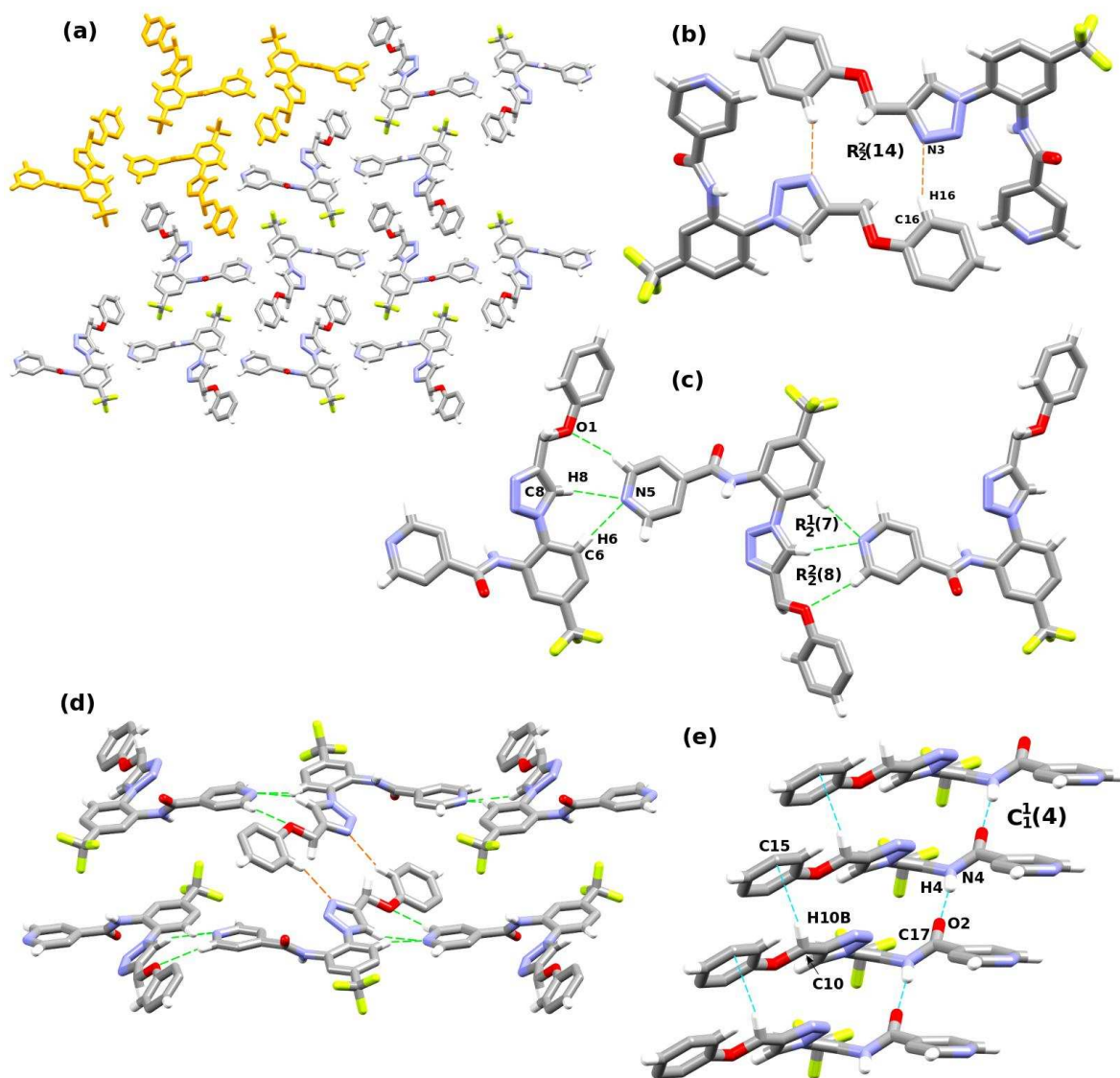


Figura 2.32 - a) empacotamento 2x2, com o motivo destacado em laranja. Detalhe dos sintonos (b) $R_2^2(14)$ e (c) $R_2^2(8)$ e $R_2^1(7)$ formados no empacotamento cristalino do composto **5a**. d) Principais interações responsáveis pelo empacotamento lamelar projetado em a). e) Justaposição entre as moléculas de **5a** através de interações C-H... π e N-H...O.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Em trabalhos desenvolvidos no GSPCB com relação à síntese e avaliação de bioatividades de derivados do SRPIN 340 (SIQUEIRA *et. al.*, 2017; TEIXEIRA *et. al.*, 2017), observou-se que alterações promovidas na região III do SPRIN 340 (Figura 2.4 pg. 94) resultaram em compostos com diferentes perfis de bioatividades. Dentro deste contexto, buscou-se a síntese de amidas com

fragmentos triazólicos, mas apresentando um grupo fenila ligado ao grupo carbonila da função amida. Esta modificação foi planejada com o intuito de se comparar as atividades dos derivados triazólicos do SRPIN 340 apresentando um anel pirídínico ligado à porção amida versus as bioatividades daqueles contendo um grupo fenila ligado à esta porção. Assim como as amidas triazólicas **5a-5j** foram sintetizadas por meio da acilação das aminas **4a-4j** utilizando o cloridrato do cloreto de isonicotinoíla, as amidas **5k-5t** também poderiam, em princípio, serem sintetizadas utilizando a mesma metodologia, mas empregando o cloreto de benzoíla no processo de acilação. Utilizando a amina **4a** como material de partida para a reação com o cloreto de benzoíla, notou-se que mesmo após sete dias de reação não houve formação do produto desejado. Em uma tentativa de promover a reação, foi adicionado à mistura de reação o agente de acoplamento DMAP, mas ainda assim não houve mudança na reação e essa metodologia foi abandonada para a síntese da nova série de amidas com fragmentos triazólicos.

Outra metodologia que foi testada correspondeu ao processo de acilação entre ácidos carboxílicos e aminas com a utilização do agente de acoplamento TBTU. A escolha dessa metodologia foi baseada nos bons resultados alcançados para a síntese de derivados do SRPIN 340 em outro trabalho desenvolvido no GSPCB intitulado *Effect of the topical administration of N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide compound in a murine subcutaneous melanoma model* (vide anexo pg. 386) e publicado em 2020. Neste trabalho houve uma melhora considerável no rendimento de algumas reações nas etapas de acilação de preparação de análogos ao SRPIN 340, quando se utilizou o TBTU.

Empregando ácido benzoico, a amina **4a** e TBTU, buscou-se encontrar condições satisfatórias para o preparo da nova série de amidas triazólicas derivadas do SRPIN 340. Inicialmente, conduziu-se a reação à temperatura ambiente empregando-se quantidades equimolares ácido benzoico e TBTU (0,675 mmol de cada um dos reagentes) e 0,450 mmol da amina **4a**. Nestas condições, mesmo após 8 dias de monitoramento da reação observou-se que não houve completo consumo dos reagentes e a amida *N*-(2-(4-(fenoximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-5-(trifluorometil)fenil)benzamida (**5k**) foi obtida com modestos 17% de rendimento após purificação em coluna de sílica gel. Uma nova tentativa

foi realizada para elevar o rendimento; desta vez utilizou-se excesso de TBTU (8 equivalentes molares). Após vinte e seis horas de reação a temperatura ambiente e sem progresso considerável da reação, elevou-se a temperatura do sistema para 60 °C, deixando a reação sob agitação magnética nesta temperatura por 2 horas. Não houve alteração significativa em termos de progressão da reação comparativamente à temperatura ambiente. O aquecimento foi removido e deixou-se a reação sob agitação à temperatura ambiente por 8 dias. Após purificação em coluna cromatográfica de sílica gel, obteve-se a substância **5k** com somente 15% rendimento. Embora não tenha sido um método satisfatório para obtenção do composto **5k** e considerando limitações orçamentárias que inviabilizaram a aquisição de outros reagentes para avaliação de outras metodologias de acilação, decidiu-se prosseguir com o preparo da nova série de amidas buscando-se acoplar as aminas **4b-4j** ao ácido benzóico na presença de TBTU. Na Figura 2.33 estão apresentadas as estruturas das amidas triazólicas obtidas e os correspondentes rendimentos. Salienta-se, porém, que não se obteve sucesso na preparação das amidas **5o**, **5p** e **5q** a partir das aminas **4e**, **4f** e **4g** (Tabela 2.3 pg. 59), respectivamente.

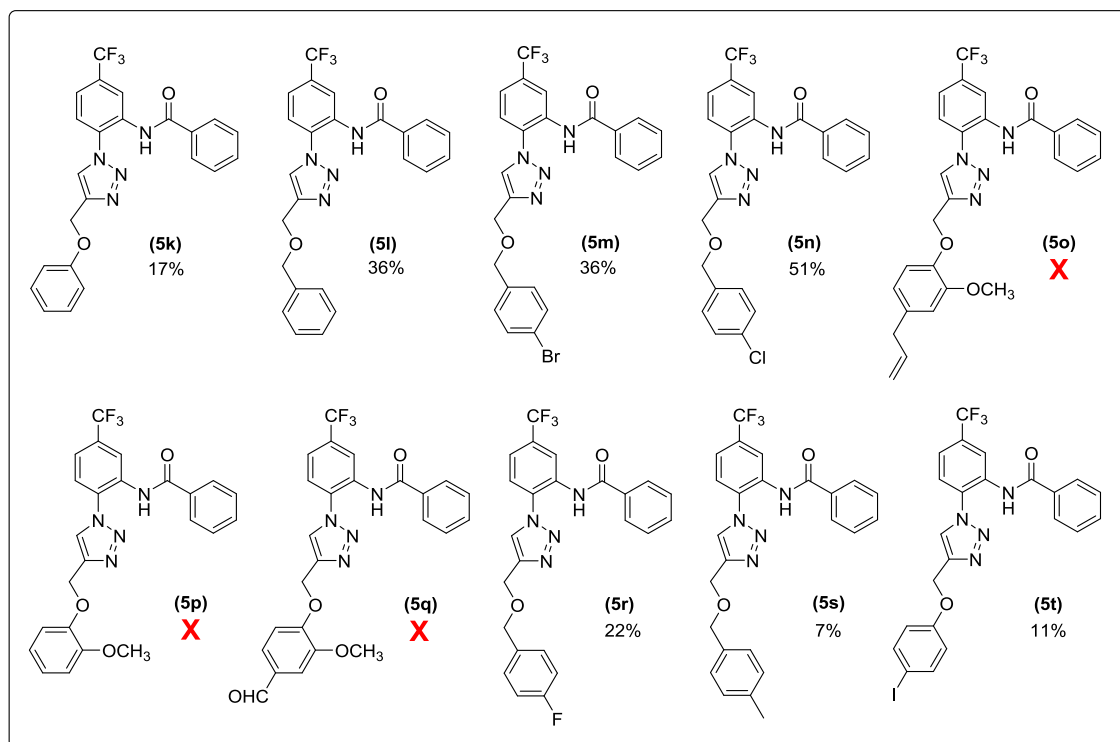


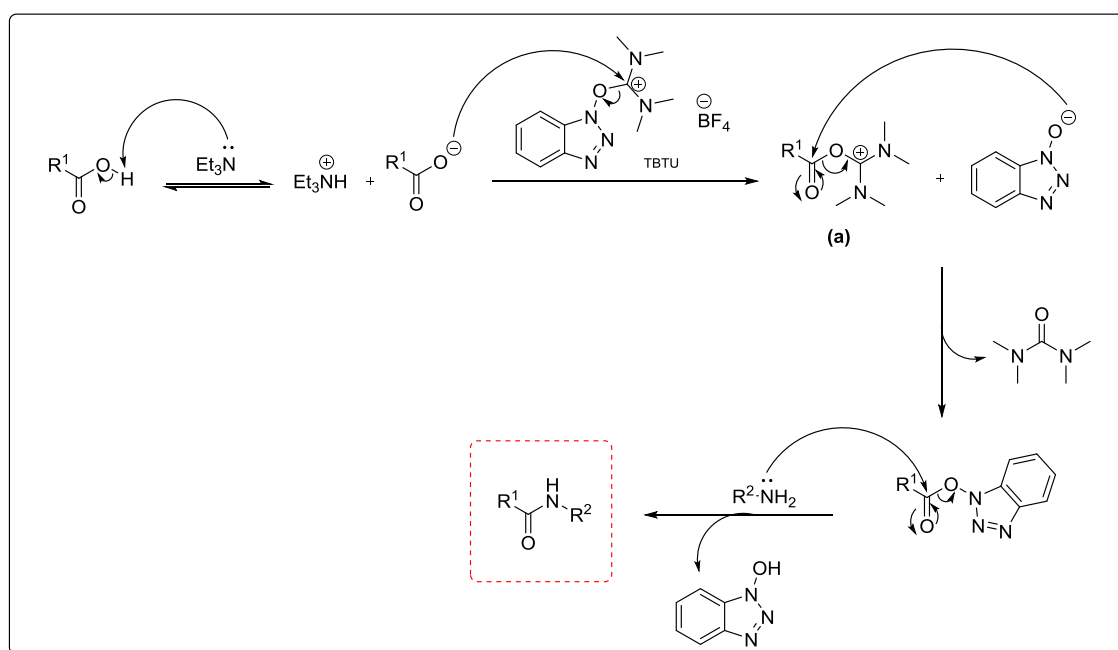
Figura 2.33 – Estruturas das amidas triazólicas **5k-5t** derivadas do SRPIN 340.

Os compostos **5o**, **5p** e **5q** não foram obtidos.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Os compostos **5k-5n** e **5r-5t** sintetizados (Figura 2.33, pg. 142) não foram submetidos aos ensaios de avaliação de bioatividades, como realizado para as amidas **5a-5j** (Tabela 2.4, pg. 70) e para os intermediários **3a-3j** (Tabela 2.2, pg. 48) e **4a-4j** (Tabela 2.3, pg. 59). Além de quantidades reduzidas das amidas **5k-5n** e **5r-5t** obtidas após purificação por cromatografia em coluna de sílica gel, as substâncias apresentaram contaminações. Essas contaminações foram observadas nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (espectros apresentados nos anexos a partir da pg. 296), e em alguns casos, prejudicaram (mas não impediram) a interpretação dos sinais nos espectros de RMN de ^{13}C .

Uma proposta de mecanismo para a reação envolvida na formação de amidas via acoplamento de um ácido carboxílico e uma amina promovida por TBTU está apresentada no Esquema 2.12 (DIAS, 2014; VALEUR & BRADLEY, 2009).



Esquema 2.12 – Mecanismo proposto para a formação de amidas por meio da reação entre um ácido carboxílico (representado por $\text{R}^1\text{-COOH}$) e uma amina (representado por $\text{R}^2\text{-NH}_2$) promovida por TBTU.

Fonte: Elaborado pela próprio autor.

Inicialmente ocorre a desprotonação do ácido carboxílico pela base (Et_3N) e o íon carboxilato formado ataca o carbono ligado ao oxigênio do TBTU. O

intermediário (**a**), por sua vez, reage com o óxido de benzotriazol originando o correspondente éster de benzotriazolila e tetrametiluréia como subprodutos. Posteriormente, ocorre a reação de substituição nucleofílica acíclica da amina com o éster levando à formação da amida.

O TBTU foi desenvolvido em 1989 por Knorr e colaboradores (RAMASAMY & AVERETT, 1999) e desde então tem sido amplamente utilizado em reações para a formação de ligações carbono-nitrogênio, principalmente na síntese de peptídeos (WOTCZANSKI & LISOWSKI, 2018; BALALAIE *et. al.*, 2007). Também tem sido utilizado em reações de esterificação (BALALAIE *et. al.*, 2008), na síntese e/ou em etapas de sínteses totais de diversas amidas (GEETHA *et. al.*, 2019; STEINMEYER & WAGENKNECHT, 2018; ANTONOPLIS *et. al.*, 2018, RADIX *et. al.*, 2018; SALEH *et. al.*, 2017), assim como também em reações para a formação de núcleos azólicos (LUKIN *et. al.*, 2018).

Mesmo com o baixo rendimento nas reações e com os problemas de contaminação, os compostos sintetizados nesta série foram caracterizados e no que diz respeito à caracterização do composto **5k**, no seu espectro no infravermelho (Figura 2.34, pg. 146), assim como no espectro do composto **5a** (Figura 2.27, pg. 135), não são observadas as bandas referentes ao grupo amina provenientes de **4a** (Figura 2.21, pg. 126), e sim a banda referente ao estiramento da ligação N-H de amida *N*-substituída em 3273 cm^{-1} . Em 3150 , 3109 e 3072 cm^{-1} , observam-se bandas de estiramento de ligação C-H de carbono com hibridização sp^2 e em 2964 , 2924 e 2849 cm^{-1} , bandas de estiramento de ligação C-H de carbono com hibridização sp^3 . A banda em 1660 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=O de amida, confirmando a formação do composto. Em 1601 , 1534 , 1497 cm^{-1} encontram-se bandas sobrepostas referentes aos estiramentos de ligação dupla carbono-carbono e deformação angular da ligação N-H. A banda em 1330 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C-F (BARBOSA, 2008).

No espectro de RMN de ^1H do composto **5k** (Figura 2.35, pg. 147), o duplete observado em $\delta_{\text{H}} 5,34$, integrado para dois átomos de hidrogênio ($J = 0,8\text{ Hz}$), refere-se aos hidrogênios H-7. Esse sinal (duplete) indica o acoplamento dos hidrogênios H-7 com o hidrogênio H-9 presente no anel triazólico. Em $\delta_{\text{H}} 6,98\text{-}7,04$, encontra-se um multiplete que integra para três átomos de hidrogênio e refere-se aos hidrogênios H-2, H-6 e H-4. Três outros multipletos são

observados em δ_{H} 7,29-7,35, δ_{H} 7,49-7,61 e δ_{H} 7,93-7,97, integrados para 2 átomos (H-3 e H-5), 5 átomos (H-2', H-3', H-3'', H-4'' e H-5'') e 2 átomos (H-2'' e H-6''), respectivamente. Em δ_{H} 8,11 observa-se um tripleto integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 0,8$ Hz) que foi atribuído ao hidrogênio H-9. A presença desse tripleto com o mesmo valor de J confirma o acoplamento entre os hidrogênios H-7 e o hidrogênio ligado ao anel triazólico H-9. Esse valor para a constante acoplamento ($J = 0,8$ Hz) é característico quando ocorre o acoplamento alílico de longo alcance com o hidrogênio no carbono da ligação dupla distante (${}^4J \approx 0-3$ Hz) (PAVIA *et. al.*, 2010). O duplete aparente observado em δ_{H} 9,14, integrado para um átomo de hidrogênio ($J = 1,5$ Hz), foi atribuído ao hidrogênio H-5'. E por fim, o simpleto em δ_{H} 10,82 integrado para um átomo de hidrogênio, foi atribuído ao hidrogênio NH , o que confirma a formação do composto.

No espectro de RMN de ${}^{13}\text{C}$ do composto **5k** (Figura 2.36, pg. 148), observa-se que o número de sinais está compatível com a estrutura do composto. O sinal em δ_{C} 61,7 foi atribuído ao carbono C-7 e o sinal observado em δ_{C} 114,7 foi atribuído aos carbonos C-2 e C-6. Em δ_{C} 120,9 encontra-se o quarteto atribuído ao carbono C-5' (${}^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz) e em δ_{C} 121,0 o sinal do quarteto referente ao carbono C-3' (${}^3J_{\text{C-F}} = 3,8$ Hz). Os sinais desses quartetos apresentam-se quase sobrepostos, mas ainda assim foi possível calcular os deslocamentos químicos bem como os valores das constantes de acoplamento ${}^{13}\text{C}$ - ${}^{19}\text{F}$. Em δ_{C} 121,7 encontra-se o sinal do carbono C-2'. Os sinais dos carbonos C-9 e C-4 aparecem em δ_{C} 122,8 e δ_{C} 123,5, respectivamente. Em δ_{C} 125,0 encontra-se o quarteto (não completamente resolvido) referente ao carbono do grupo CF_3 (${}^1J_{\text{C-F}} = 271,5$ Hz) e em δ_{C} 127,2 aparece o sinal dos carbonos C-2'' e C-6''. Em δ_{C} 128,1, observa-se o sinal do carbono C-1' e em δ_{C} 129,0 o sinal referente aos carbonos C-3'' e C-5''. O sinal dos carbonos C-3 e C-5 é observado em δ_{C} 129,6. Em δ_{C} 131,9 nota-se o quarteto referente ao carbono C-4' (${}^2J_{\text{C-F}} = 33,0$ Hz). Já os sinais dos carbonos C-6', C-4'', C-1'', C-8, C-1 e C-7'' são observados, respectivamente, em δ_{C} 132,4, δ_{C} 132,5, δ_{C} 133,5, δ_{C} 145,4, δ_{C} 157,9 e δ_{C} 165,5. Os valores das constantes de acoplamento ${}^{19}\text{F}$ - ${}^{13}\text{C}$ calculadas a partir dos espectros de RMN de ${}^{13}\text{C}$ estão próximos aos valores das constantes reportadas na literatura para este tipo de acoplamento (Figura 2.9, pg. 105) (PRETSCH *et. al.*, 1989).

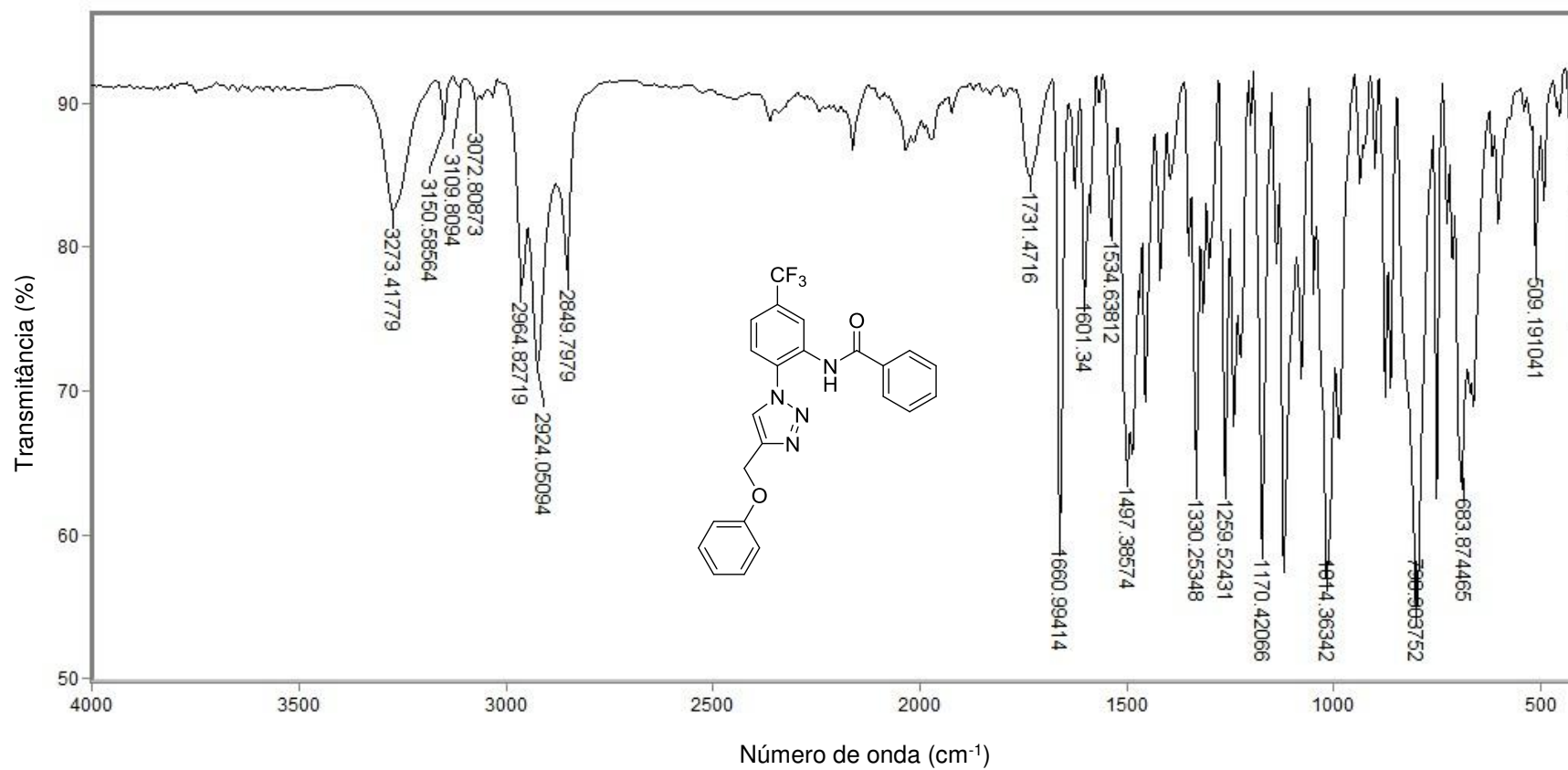


Figura 2.34 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5k**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

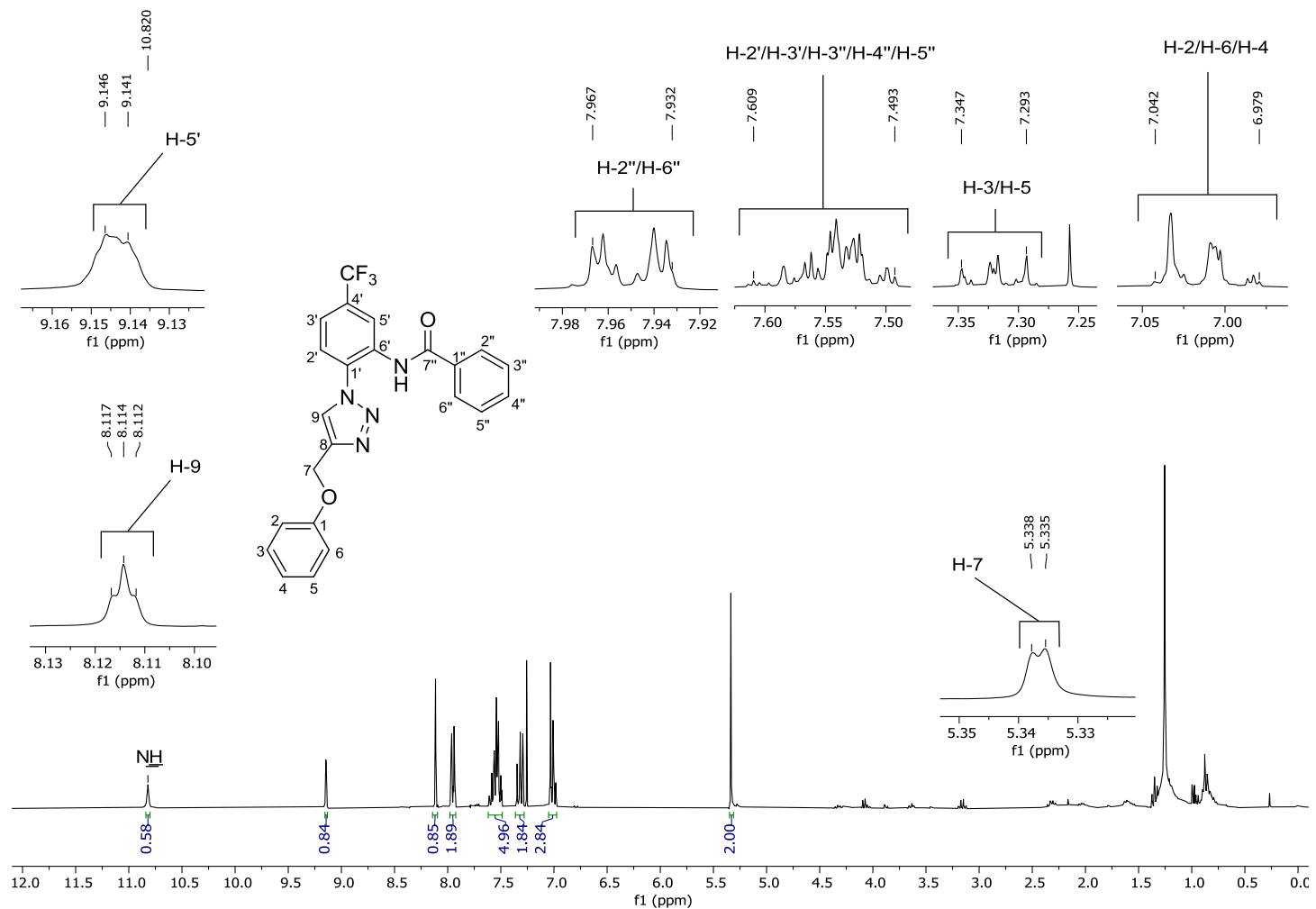


Figura 2.35 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5k**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

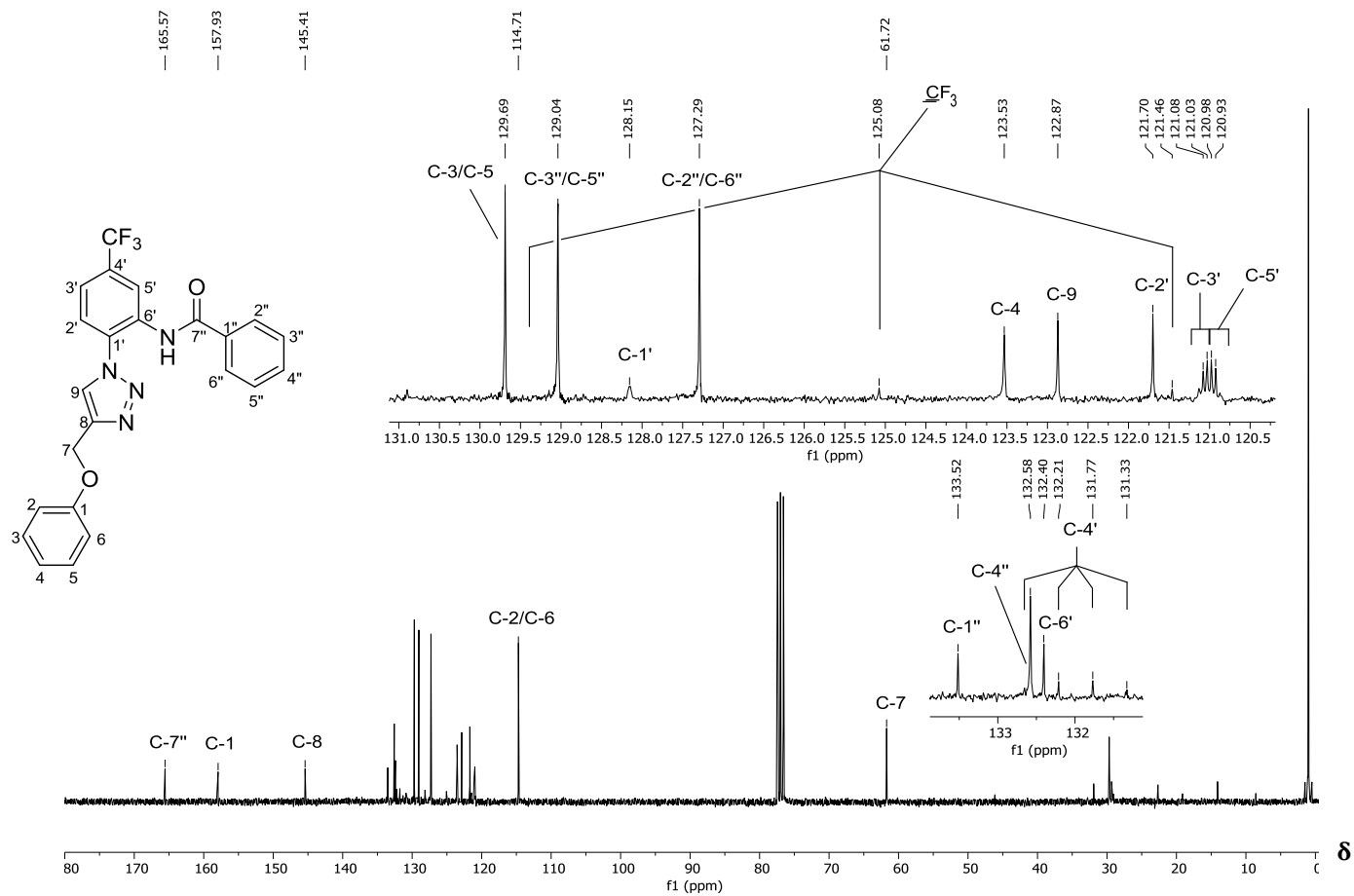


Figura 2.36 – Espectro de RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5k**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

2.6. CONCLUSÕES

Neste capítulo foram descritas as sínteses uma azida orgânica, dez alquinos terminais, dez nitrocompostos triazólicos, dez aminas triazólicas e dezessete amidas triazólicas derivadas do SRPIN 340. Salienta-se que os nitrocompostos, as 10 aminas e as amidas são substâncias inéditas. As sínteses dessas substâncias foram, de modo geral, satisfatórias e apresentaram rendimentos, em sua maioria, sinteticamente úteis. Foi possível caracterizar e confirmar as estruturas de todos os compostos obtidos pelas técnicas espectroscópicas no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C . Além disso, as estruturas dos compostos **3a**, **4a** e **5a** foram investigadas por meio da difração de raios X de monocristal. Os compostos **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j**, foram submetidos a testes antivirais e citotóxicos contra os vírus Chikungunya, Zika e Oropouche bem como contra a linhagem celular de câncer Glioblastoma U87. Os resultados destes testes serão apresentados em capítulos subsequentes. Os compostos **5k-5n** e **5r-5t** não foram submetidos a ensaios de avaliação de bioatividades devido à baixa quantidade de massa obtida e também devido à problemas de contaminação.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONOPLIS, A.; ZANG, X.; HUTTNER, M. A.; CHONG, K.; LEE, Y. B.; CO, J. Y.; AMIEVA, M.; KLINE, K.; WENDER, P. A.; CEGELSKI, L. A dual function antibiotic-transporter conjugate exhibits superior activity in sterilizing MRSA biofilms and killing persister cells. *Journal of the American Chemical Society*, 2018.
- BALALAIE, S.; MAHDIDOUST, M.; NAJAFABADI, R. E. 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate as an efficient coupling reagent for the amidation and phenylhydrazation of carboxylic acids at room temperature. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 4, n. 3, p. 364-369, 2007.
- BARBOSA, Luiz Cláudio de Almeida. Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: Editora UFV, 2008.
- BARROS. Marcus Vinícius de Andrade. Síntese e avaliação da atividade citotóxica e do efeito sobre o transporte fotossintético de elétrons de trifluorometil-

- arilamidas. 2014. 214f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- BORGATI, T. F.; ALVES, R. B.; TIXEIRA, R. R., DE FREITAS, R. P.; PERGIGÃO, T. G.; DA SILVA, S. F.; DOS SANTOS, A. A.; BASTIDAS, A. J. Synthesis and phytotoxic activity of 1,2,3-triazole derivatives. *Journal of the Brazilian Society*, v. 24, p. 953-961, 2013.
- BRODER, C. K.; DAVIDSON, M. G.; FORSYTH, V. T.; HOWARD, J. A. K.; LAMB, S.; MASON, S. A. On the Reliability of C–H···O Interactions in Crystal Engineering: Synthesis and Structure of Two Hydrogen Bonded Phosphonium Bis(aryloxide) Salts. *Crystal Growth & Design*, v. 2, n. 3, p. 163–169, 2002.
- BROWN, D. G.; BOSTRÖM, J. Analysis of Past and Present Synthetic Methodologies on Medicinal Chemistry: Where Have All the New Reactions Gone? *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 59, p. 4443-4458, 2016.
- BRUICE, Paula Yurkanis. Química Orgânica. 4. ed. São Paulo: Pearson, 2006.
- CANDUZINI, Hugo Antonio. Síntese e funcionalização de 1,2,3-triazóis via reação de cicloadição [3+2] de azidas e acetilenos terminais. 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- CANO, R.; RAMON, D. J.; YUS, M. Transition-metal-free O-, S-, and N-arylation of alcohols, thiols, amides, amines, and related heterocycles. *Journal of Organic Chemistry*, v. 76, p. 654–660, 2011.
- CHAPARRO, S.; ROJAS, H. A.; CASTILLO, J. C.; PORTILLA, J.; ROMANELLI, G. P.; PINEDA, A.; ELSHARIF, A. M.; MARTINEZ, J. J.; LUQUE, R. Solventless Amide Synthesis Catalyzed by Biogenic CaCO₃ Materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. v. 8, p. 13139-13146, 2020.
- CHEN, J.; XIA, Y.; LEE, S. Transamidation for the Synthesis of Primary Amides at Room Temperature. *Organic Letters*, v. 22, n. 9, p. 3504-3508, 2020.
- DEOBALD, Anna Maria. Síntese de arilazidas e 1,2,3-triazóis 1,4-dissubstituídos contendo calcogênios. 2010. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Curso de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.

- DIAS. Ana Rita. Metodologias de síntese de novo tensoativos derivados de aminoácidos. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade do Porto. Portugal.
- DIAS, M. C. F.; GULARTE, T. Q.; TEIXEIRA, R. R.; SANTOS, J. A. N.; PILAU, E. J.; MENDES, T. A. O.; DEMUNER, A. J.; SANTOS, M. H. Synthesis of 1,2,3-triazole derivatives of 4,4'-dihydroxybenzophenone and evaluation of their elastase inhibitory activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2018.
- ENTWISTLE, I. D.; JACKSON, A. E.; JOHNSTONE, R. A. W.; TELFORD, R. P. Reduction of Nitro-compounds. *Journal of the chemical society*, 1977.
- FARRUGIA, L. J. WinGX swite for small-molecule single-crystal crystallography. *Journal of Applied Crystallography*, v. 32, p.837-838, 1999.
- FERNANDES, C. M.; ALVAREZ, L. X.; SANTOS, N. S.; BARRIOS, A. C. B.; PONZIO, E. A. Green synthesis of 1-benzyl-4-phenyl-1H-1,2,3-triazole, its application as corrosion inhibitor for mild steel in acidic medium and new approach of classical electrochemical analyses. *Corrosion Science*, 2019.
- FIGUEIREDO, R. M.; SUPPO, J. S.; CAMPAGNE, J. M. Nonclassical Routes for Amide Bond Formation. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 19, p. 12029–12122, 2016.
- FREITAS, L. B. O.; RUELA, F. A.; PEREIRA, G. R.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quimica Nova*, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.
- FREITAS. Luiza Baptista de Oliveira. Síntese de 1,2,3-triazóis com potencial atividade biológica e como precursores de carbenos mesoiônicos N-heterocíclicos. 2014. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Química) – Curso de Pós-Guarduação em Química. Universidade federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- FU, X.; LIAO, Y.; GLEIN, C. R.; JAMISON, M.; HAYES, K.; ZAPORSKI, J.; YANG, Z. Direct Synthesis of Amides from Amines and Carboxylic Acids under Hydrothermal Conditions. *ACS Earth and Space Chemistry*, v. 4, p. 722-729, 2020.

- GAMBLE, A. B.; GARNER, J.; GORDON, C. P.; O'CONNOR, S. M. J.; KELLER, P. A. Aryl Nitro Reduction with Iron Powder or Stannous Chloride under Ultrasonic Irradiation. *Synthetic Communications*, v. 37, p. 2777–2786, 2007.
- Gazolla. Poliana A. R. Síntese e avaliação das atividades citotóxica e leishmanicida de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. 2015. 260f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- GAZOLLA, P. A. R.; TEIXEIRAA, R. R.; SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; BRESSAN, G. C. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. *Química Nova*, v. 41, n. 5, p. 497-506, 2018.
- GEETHA, D. V.; AL-OSTOOT, F. H.; MOHAMMED, Y. H. E.; SRIDHAR, M. A.; KHANUM, S. A.; LOKANATH, N. K. Synthesis, elucidation, hirshfeld surface phenyl]-benzamide. *Journal of Molecular Structure*, v. 1178, p. 384-393, 2019.
- HEIN, C. D.; LIU, X. M.; WANG, D. Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*, v. 25, n. 10, p. 2216–2230, 2008.
- HEIN, J. E.; FOKIN, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews*, v.39, n. 4, p.1302–1315, 2010.
- IRVING, C. D.; FLOREANCIG, J. T.; LAULHE, S. Amide Synthesis through the In Situ Generation of Chloro- and Imido-Phosphonium Salts. *ACS Omega*, v. 5, n. 25, p. 15734-15745, 2020.
- LIANG, L.; ASTRUC, D. The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 255, p. 2933–2945, 2011.
- LIMA, A. M. A.; TEIXEIRAA, R. R.; SILVA, B. F.; SIQUEIRA, R. P.; SILVA, I. E. P.; SANTOS, E. G.; FERNANDES, M. C.; GONÇALVES, V. H. S.; BRESSAN, G. C.; MENDES, T. A. O.; PAULA, S. O.; COSTA, A. V.; SANTOS, M. H. Síntese e avaliação das atividades fotoprotetora, citotóxica e antiviral contra o zika vírus

- de derivados triazólicos da benzofenona. *Química Nova*, v. 42, n. 5, p. 473-484, 2019.
- LIMA, Ângela Maria Almeida. Síntese de derivados da benzofenona contendo o núcleo 1,2,3-triazólico e avaliação de suas atividades citotóxica, leishmanicida e fotoprotetora. 2018. 295 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Curso de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- LIMA, G. D. A.; RODRIGUES, M. P.; MENDES, T. A. O.; MOREIRA, G. A.; SIQUEIRA, R. P.; SILVA, A. M.; VAZ, B. G.; FIETTO, J. R. L.; BRESSAN, G. C.; NEVES, M. M.; TEIXEIRA, R. R. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. *Toxicology in Vitro*, v. 53, p. 1-9, 2018.
- LUKIN, A.; KALINCHENKOVA, N.; VEDEKHINA, T.; ZHURILO, N.; KRASAVIN, M. Diversity-oriented synthesis of N,N-dimethylamino-substituted azoles employing TBTU. *Tetrahedron Letters*, v. 59, p. 2732-2735, 2018.
- LUCCHESI, A. M.; MARZORATI, L. Catálise de transferencia de fase. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 641-652, 2000.
- LIU, Y.; REBROV, E. V. Direct Amide Synthesis over Composite Magnetic Catalysts in a Continuous Flow Reactor. *Catalysts*, v. 11, n. 146, 2021.
- MAKOSZA, M.; WAWRZYNIEWICZ, M. Reactions of organic anions. Catalytic method preparation of dichlorocyclopropane derivatives in aqueous medium. *Tetrahedron Letters*, v. 53, p. 4659-4662, 1969.
- MALKOWSKI, S. N.; DISHUCK, C. F.; LAMANILAO, G. G.; EMBRY, C. P.; GRUBB, C. S.; CAFIERO, M.; PETERSON, L. W. Design, modeling and synthesis of 1,2,3-triazole-linked nucleoside-amino acid conjugates as potential antibacterial agents. *Molecules*, v. 22, n. 1682, 2017.
- MELO, J. O. F. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.
- MOHAMMAD, I.; BABITA, A.; UMESH, Y.; SHABANA, I. K.; NIKHAT, M.; CONSTANTIN, G. D.; MOHAMMAD, A. Synthesis, QSAR and anticandidal evaluation of 1,2,3-triazoles derived from naturally bioactive scaffolds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 93, p. 246-254, 2015.

- MOREIRA, G. A.; LIMA, G. D. A.; SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; ADJANOHOON, A. L. M.; SANTOS, V. C.; BARBOSA, E. A. A.; LOTERIO, R. K.; PAIVA, J. C.; GONÇALVES, V. H. S.; VIOL, L. C. S.; SILVA, E. A. M.; JÚNIOR, A. S.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. R. L.; NEVES, M. M.; FERREIRA, R. S.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 356, p. 214-223, 2018.
- NETTO, A. V. G.; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p. 1208-1217, 2008.
- NIU, C.; LU, X.; AISA, H. A. Preparation of novel 1,2,3-triazole furocoumarin derivatives via click chemistry and their anti-vitiligo activity. *RSC Advances*, v. 9, p. 1671–1678, 2019.
- NOURAI, P.; DEHAGHI, S. M.; FOROUMADI, A. Coumarin-1,2,3-triazole hybrid derivatives: Green synthesis and DFT calculations. *Synthetic Communications*, 2019.
- OLIVEIRA, A. S.; GAZOLLA, P. A. R.; OLIVEIRA, A. F. C. S.; PEREIRA, W. L.; VIOL, L. C. S.; MAIA, A. F. S.; SANTOS, E. G.; SILVA, I. E. P.; MENDES, T. A. O.; SILVA, A. M.; DIAS, R. S.; SILVA, C. C.; POLÊTO, M. D.; TEIXEIRA, R. R.; PAULA, S. O. Discovery of novel West Nile Virus protease inhibitor based on isobenzonafuranone and triazolic derivatives of eugenol and indan-1,3-dione scaffolds. *Plos One*, v. 14, n. 9, 2019.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: CARTER JUNIOR, C. W.; SWEET, R. M. (Eds). *Methods in Enzymology: Macromolecular Crystallography*. New York. *Academic Press*. v. 276. Parte A, p. 307-326, 1997.
- PATEL, K. P.; GAYAKWAD, E. M.; SHANKARLING, G. S. Graphene Oxide as a Metal-free Carbocatalyst for Direct Amide Synthesis from Carboxylic Acid and Amine Under Solvent-Free Reaction Condition. *ChemistrySelect*, v. 5, p. 8295 – 8300, 2020.
- PATEL, N.; SOOD, R.; BHARATAM, P. V. NL_2^+ systems as new-generation phase-transfer catalysts. *Chemical Reviews*, v. 118, p. 8770-8785, 2018.

- PAVIA, Donald L et al. Introdução a espectroscopia. 4^a ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2010.
- PEREIRA, Wagner Luiz. Síntese de isobenzofuranonas e indan-1,3-dionas: aspectos estruturais e avaliação das atividades citotóxica, leishmanicida e inibitória da protease ns2b-ns3 do west nile virus (wnv). 2016. 244 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Curso de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- PRETSCH, Erno et al. Tables of spectral data for structure determination of organic compounds. 2^a ed. Berlin: Springer-Verlag, 1989.
- RADIX, S. JORDHEIM, A. D.; ROCHEBLAVE, L.; N'DIGO, S.; PRIGNON, A. L.; COMMUN, C.; MICHALET, S.; FRANCA, M. G. D.; MULARONI, A.; WALCHSHOFER, N. N,N'-disubstituted cinnamide derivatives potentiate ciprofloxacin activity against overexpressing NorA efflux pump *Staphylococcus aureus* 1199B strains. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 150, p. 900-907, 2018.
- RAMASAMY, K. S.; AVERETT, D. O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU): A new reagent for the cleavage of tetrahydropyranyl, silyl and 4,4'-dimethoxytrityl ethers. *Synlett*, n. 6, P. 709-712, 1999.
- SALEH, S.; AL-TIMARI, U.; AL-FAHDAWI, A.; EL-KHATATNEH, N.; CHANDRA; MAHENDRA, M.; AL-GHORBANI; M. Synthesis, Characterization and Molecular Docking of Novel Quinoline and Pyridine Derivatives. *Oriental Journal of Chemistry*, v. 33, n. 6, p. 2713-2719, 2017.
- SCHETTIN, R.; SICIGNANO, M.; RICCARDIS, F.; IZZO, I.; SALA, G. D. Macrocyclic hosts in asymmetric phase-transfer catalyzed reactions. *Synthesis*, v. 50, p. 4777–4795, 2018.
- SHELDRIK, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallography, section A: Foundations of Crystallography*, v. 64, p.112-122, 2008.
- SINGH, M. S.; CHOWDHURY, S.; KOLEY, S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. *Tetrahedron*, v. 72, p. 5257-5283, 2016.

- SIQUEIRA, R. P.; BARROS, M. V. A.; BARBOSA, E. A. A.; ONOFRE, T. S.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; JÚNIOR, A. S.; OLIVEIRA, L.L.; ALMEIDA, M. R.; FIETTO, J. R. L.; TEIXEIRA, R. R.; BRESSAN, G. C. Trifluoromethyl arylamides with antileukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 134, p. 97-109, 2017.
- STARKS, C. M. Phase-Transfer Catalysis. I. Heterogeneous reactions involving anion transfer by quaternary ammonium and phosphonium salts. *Journal of the American Chemical Society*, v.19, p. 195-199, 1971.
- STEINMEYER, J.; WAGENKNECHT, H. A. Synthesis of DNA modified with boronic acid: compatibility to copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Bioconjugate Chemistry*, v. 29, n. 2, p. 431-436, 2018.
- STUART C. CHAFFEE. Heteroaryl – substituted alkyne compounds as protein kinase inhibitors, their preparation, pharmaceutical compositions, and use in therapy. U.S. 7776869. 17 Aug 2010.
- TABACARU, A.; FURDUI, B.; GHINEA, I. O.; CARAC, G.; DINICA, R. M. Recent advances in click chemistry reactions mediated by transition metal based systems. *Inorganica Chimica Acta*, 2016.
- TEIXEIRA, R. R.; BARROS, M. V. A.; BRESSAN, G. C.; SIQUEIRA, R. P.; SANTOS, F. S.; BERTAZZINI, M.; KIRALJ, R.; FERREIRAE, M. M. C.; FORLANI, G. Synthesis, theoretical studies, and effect on the photosynthetic electron transport of trifluoromethyl arylamides. *Pest Management Science*, v. 73, p. 2360-2371, 2017.
- TEIXEIRA, R. R.; GAZOLLA, P. A. R.; SILVA, A. M.; BORSODI, M. P. G.; BERGMANN, B. R.; FERREIRA, R. S.; VAZ, B. G.; VASCONCELOS, G. A.; LIMA, W. P. Synthesis and leishmanicidal activity of eugenol derivatives bearing 1,2,3-triazole functionalities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 146, p. 274-286, 2018.
- TEIXEIRA, R. R.; SILVA, A. M.; SIQUEIRA, R. P.; GONÇALVES, V. H. S.; PEREIRA, H. S.; FERREIRA, R. S.; COSTA, A. V.; MELO, E. B.; PAULA, F. R.; FERREIRA, M. M. C.; BRESSAN, G. C. Synthesis of Nerol Derivatives Containing a 1,2,3-Triazole Moiety and Evaluation of Their Activities against

- Cancer Cell Lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, n. 3, p. 541-561, 2019.
- TOTOBENAZARA, J.; BURKE, A. J. New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications. *Tetrahedron Letters*, v. 56, p. 2853–2859, 2015.
- UPADHYAYA, K.; AJAY, A.; MAHAR, R. PANDEY, R.; KUMAR, B.; SHUKLA, S. K.; TRIPATHI, R. P. A strategy to fused triazoloquinoline and related nucleoside analogues. *Tetrahedron*, v. 69, p. 8547-8558, 2013.
- VALEUR, E.; BRADLEY, M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagentes. *Chemical Society Reviews*, v. 38, p. 606-631, 2009.
- WHITING, M.; TRIPP, J. C.; LIN, Y. C.; LINDSTROM, W.; OLSON, A. J.; ELDER, J. H.; SHARPLESS, K. N.; FOKIN, V. V. Click SAR profiling of new inhibitors of HIV 1 protease enabled by the Cu(I)-cat syn 1,2,3-triazole. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, p. 7697-7710, 2006.
- WORRELL, B. T.; MALIK, J. A.; FOKIN, V. V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science*, v. 340, p. 457-460, 2013.
- WOTCZANSKI, G.; LISOWSKI, M. A general method for preparation of *N*-Boc-protected or *N*-Fmoc-protected α,β -didehydropeptide building blocks and their use in the solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, v. 3091, 2018.
- XIN-JIE CHU. Spiro[indole-3,6'-pyrrolo[1,2-C]imidazole]diones as inhibitors of MDM2 – p53 interations and their preparation and use for the treatment of cancer. Pat. Appl. Publ. U.S. 20120071499. 22 Mar 2012.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS AMIDAS TRIAZÓLICAS DERIVADAS DO SRPIN 340 (E DOS INTERMEDIÁRIOS ENVOLVIDOS EM SUAS SÍNTESES) CONTRA OS VÍRUS CHIKUNGUNYA, ZIKA E OROPOUCHE

3.1. INTRODUÇÃO

Os vírus transmitidos por artrópodes são denominados arbovírus. Eles representam um importante problema de saúde pública mundial, principalmente em países tropicais. Vários surtos de doenças causadas por arbovírus foram relatados na última década com milhões de pessoas afetadas (SOUZA *et. al.*, 2021). Os arbovírus que recebem maior destaque são os que pertencem às famílias Flaviviridae (DENV (Dengue), ZIKV (Zika), YFV (Febre Amarela), SLEV (vírus da encefalite de Saint Louis), WNV (vírus Oeste do Nilo), Rocio, Cacipacore, Ilheus, Bussuquara e vírus Iguape), Togaviridae (MAYV (vírus Mayaro), CHIKV (Chikungunya) e vírus da encefalite equina oriental) e Peribunyaviridae (OROV (vírus Oropouche) (ARGONDIZZO *et. al.*, 2021).

Dentre os vírus citados, o *Zika virus* (ZIKV) foi isolado em Uganda em 1947 e por muitos anos ficou restrito a países africanos e asiáticos, tendo poucas infecções humanas relatadas (HASSAN *et. al.*, 2019). Ele foi detectado no Brasil pela primeira vez em abril de 2015 (FIOCRUZ, 2021) e desde então se tornou um problema de saúde pública. O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, família Flaviviridae, e embora sua infecção seja assintomática na maioria dos casos, ela pode resultar em distúrbios neurológicos debilitantes, incluindo a síndrome de Guillain-Barré em adultos e microcefalia (e até óbitos) em recém-nascidos com infecção pré-natal (CHOWDHURY *et. al.*, 2020). A síndrome de Guillain-Barré (GBS) é uma doença autoimune que debilita funções do sistema nervoso periférico (HASSAN *et. al.*, 2019). Além desses sintomas, dores de cabeça, febre

leve, artralgia, mialgia e erupções cutâneas também foram relatadas (HASSAN *et. al.*, 2019).

O *Chikungunya virus* (CHIKV) foi descoberto no continente africano há mais de 60 anos (LIU *et. al.*, 2017) e foi identificado no Brasil pela primeira vez em 2014 (FIOCRUZ, 2021). Ele pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, e causa febre moderada, podendo resultar em inflamações musculoesqueléticas avançando para poliartralgia em longo prazo (CHOWDHURY *et. al.*, 2020). O diagnóstico dessas doenças é dificultado uma vez que possuem semelhanças em algumas de suas manifestações e isso ainda é agravado pelo fato de compartilharem as mesmas áreas endêmicas (KUTSUNA *et. al.*, 2016).

Esses vírus possuem algumas características semelhantes, como a genética, possuindo RNA de fita simples de sentido positivo e tamanhos de genomas aproximadamente equivalentes (HITAKARUN *et. al.*, 2020). Também são transmitidos pelos mesmos vetores através da picada de mosquitos infectados *Aedes ssp* (LIU *et. al.*, 2017). Outras vias de transmissão também já foram relatadas para o vírus Zika, como a transmissão vertical e por vias sexuais, no qual observou-se ZIKV persistindo nas secreções vaginais e sêmen por meses (HASSAN *et. al.*, 2019).

Outro vírus que tem despertado a atenção nos últimos anos é o *Oropouche orthobunyavirus* (OROV). Ele foi descrito em humanos pela primeira vez em 1955, em Trinidad e Tobago, e no Brasil foi isolado pela primeira vez em 1960, em Belém, estado do Pará, de um animal silvestre, a preguiça-de-garganta-pálida (FONSECA *et. al.*, 2020). Os estados mais afetados no Brasil são Pará, Amapá, Rondônia, Maranhão, Acre, Amazonas, Minas Gerais, Mato Grosso e Tocantins (GUTIERREZ *et. al.*, 2020).

OROV pertence à família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e faz parte do sorogrupo Simbu (WISE *et. al.*, 2020; AMORIM, *et. al.*, 2020). Ele causa a febre de Oropouche, doença autolimitada e leve, mas em casos raros infecta o sistema nervoso central e causa meningite (WISE *et. al.*, 2020). Outros sintomas foram relatados como vômito (FONSECA *et. al.*, 2020), cefaleia, mialgia, artralgia, fotofobia, exantema e poliúria (AMORIM, *et. al.*, 2020). Diferentemente dos vírus Zika e Chikungunya, OROV possui um genoma de RNA de fita simples de sentido negativo (WISE *et. al.*, 2020).

Sugere-se que o vírus Oropouche possui dois ciclos de transmissão distintos. Na transmissão silvestre, mamíferos selvagens, como preguiças e primatas, servem de hospedeiros para o vírus que é transmitido por vetores comumente encontrados em áreas rurais (*Aedes serratus* e *Coquillettidia venezuelensis*). Na transmissão urbana, OROV é transmitido entre pessoas por meio da picada do mosquito *Culicoides paraenses* e pode ser agravada pela intervenção humana desmedida em áreas florestais (GUTIERREZ *et. al.*, 2020).

O crescimento da população humana, as mudanças climáticas, a urbanização, as viagens internacionais e o comércio, contribuem para a ampla disseminação dos vírus (LIU *et. al.*, 2017), e como ainda não existem vacinas ou medicamentos capazes de combatê-los, a única medida de prevenção visa acabar com os mosquitos vetores, mantendo as casas limpas e eliminando possíveis criadouros (FIOCRUZ, 2021). Isso exige uma reeducação sanitária mais acentuada e um trabalho em conjunto de toda a população, o que muitas vezes não é fácil de ser atingido.

Diante disso, a ciência tenta contribuir com a busca de medicamentos que sejam capazes de combater esses vírus e proporcionar melhor qualidade de vida para o ser humano. Este capítulo, portanto, trata do ensaio de avaliação de atividade antiviral dos compostos triazólicos sintetizados neste trabalho, os intermediários **3a-3j** e **4a-4j**, bem como as amidas triazolicas derivados SRPIN 340 **5a-5j**, contra os vírus Zika, Chikungunya e Oropouche.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de avaliação da atividade antiviral dos nitrocompostos **3a-3j**, das aminas **4a-4j** e das amidas triazólicas **5a-5j** foi realizado em colaboração com a doutoranda Ariane Coelho Ferraz e com a professora Cintia Lopes de Brito Magalhães do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.2.1. Células e Vírus

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas células de linhagem contínua de rim de macaco verde africano, Vero (ATCC CCL-81). Estas células foram

cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 100 µg/mL estreptomicina, 100 U/mL penicilina potássica e 2,5 µg/mL anfotericina B. As culturas foram mantidas em estufa de atmosfera umidificada, a 5% de CO₂ e 37 °C, sendo repicadas três vezes por semana. As amostras virais utilizadas nos experimentos foram ZIKV cepa PE243/15 isolado de paciente com febre Zika sem complicações, CHIKV cepa S27-african (protótipo africano) isolado de um paciente febril e vírus Oropouche cepa BeAn19991 isolado de preguiça (*Bradypus tridactylus*). Todos os vírus já se encontravam crescidos e titulados previamente no LBTM/UFOP e foram mantidos em freezer -80 °C até o momento de uso.

3.2.2. Ensaio de Avaliação de Citotoxicidade

A fim de avaliar se os compostos sintetizados interferiam na viabilidade celular, inicialmente estes foram submetidos ao ensaio de avaliação de citotoxicidade, no qual é possível conhecer a concentração citotóxica capaz de inibir a viabilidade celular das células em 50% (CC₅₀). Células Vero foram distribuídas em microplacas de 96 poços (5×10⁴ células/poço) previamente. Em seguida, 100 µL/poço de meio DMEM completo com 2,5% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µL/poço de diferentes concentrações dos compostos (1000 – 15,6 µmol/L) foram adicionados às células, em triplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e, após a remoção do meio de cultura, foram adicionados 20 µL da solução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (1 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação a 37 °C por 90 minutos. Por fim, 100 µL/poço do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para que os cristais de formazan formados pela metabolização do MTT fossem dissolvidos. A viabilidade celular foi medida de forma indireta, uma vez que somente células viáveis são capazes de metabolizar o MTT (amarelo) a formazan (roxo). Dessa forma, a absorbância foi medida espectrofotometricamente a $\lambda = 490$ nm. A toxicidade celular foi expressa em termos da CC₅₀, em que a conversão da absorbância em porcentagem de células viáveis foi calculada como descrito na equação (1). A partir dos valores

encontrados, realizou-se análise de regressão usando o *software* Excel para determinação dos valores de CC_{50} .

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{(B \times 100)}{A} \quad (1)$$

em que **A** e **B** são as absorbâncias a 490 nm das cavidades com células não tratadas (**A**) e células tratadas (**B**), respectivamente (FERRAZ, 2018).

3.2.3. Ensaio de avaliação de atividade antiviral global

A partir dos valores da CC_{50} , os diferentes compostos foram testados quanto à atividade antiviral frente aos arbovírus ZIKV, CHIKV e OROV. Da mesma forma que no ensaio de citotoxicidade, células Vero foram distribuídas em microplacas de 96 poços (5×10^4 células/poço) previamente. O meio foi removido e 100 μ L das diluições dos compostos candidatos foram adicionados às células, em triplicatas, juntamente com 100 μ L de suspensão viral, sendo ZIKV, CHIKV ou OROV (moi 1). Células não tratadas e não infectadas, assim como células infectadas e não tratadas foram mantidas como controles. Após 48 horas da infecção (hpi), o experimento foi revelado, utilizando a mesma técnica do MTT. A concentração eficaz com 50% de efeito antiviral, ou seja, concentração efetiva/protetiva para 50% das células infectadas (CE_{50}) foi expressa como a concentração que gerou a proteção de 50% das células infectadas, também calculada por meio de análise de regressão pelo *software* Excel, no qual a porcentagem de células viáveis foi determinada como descrito na equação (2).

$$\% \text{ células viáveis} = \left(\frac{A-B}{C-B} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde **A**, **B** e **C** representam as absorbâncias a 490 nm das cavidades nas quais estão presentes células tratadas e infectadas (**A**), não tratadas e infectadas (**B**) e não tratadas e não infectadas (**C**), respectivamente (FERRAZ, 2018).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos avaliados foram diluídos (sem precipitado) em DMSO puro a uma concentração de 50 mmol L⁻¹ (solução estoque), em triplicata, duas vezes independentes. A Tabela 3.1 (pg. 163) apresenta os valores da CC₅₀ obtidos no ensaio de citotoxicidade em células Vero.

Tabela 3.1 – Valores de CC₅₀ para os compostos **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j** obtidos por meio do ensaio de avaliação de citotoxicidade

COMPOSTO*	CONCENTRAÇÃO 50% (μmol L⁻¹) (CC₅₀)	CITOTÓXICA
3a	>500	
3b	382,28 ± 35,41	
3c	70,83 ± 31,78	
3d	105,40 ± 5,09	
3e	373,55 ± 50,59	
3f	459,72 ± 190,81	
3g	959,63 ± 9,87	
3h	189,00 ± 16,39	
3i	574,05 ± 52,80	
3j	840,38 ± 7,12	
4a	733,58 ± 11,81	
4b	984,45 ± 91,40	
4c	45,22 ± 2,25	
4d	48,57 ± 9,30	
4e	>250	
4f	149,89 ± 85,39	
4g	>125	
4h	145,26 ± 2,79	
4i	678,29 ± 32,58	
4j	230,70 ± 96,86	
5a	211,99 ± 5,14	
5b	>500	
5c	498,83 ± 123,91	
5d	>500	
5e	>500	

5f	>200
5g	>500
5h	>500
5i	>500
5j	94,80 ± 20,28

*Os compostos **3a**, **4e**, **4g**, **5b**, **5d**, **5e**, **5f**, **5g**, **5h** e **5i** em concentrações acima da informada na tabela precipitaram e impediram a leitura da absorbância real, tendo o fundo dos poços ficado branco/turvo. Além disso, a primeira concentração em que não houve precipitado do composto, a viabilidade celular foi maior que 50%.

A partir das concentrações informadas na Tabela 3.1, pg. 163, foram realizados os ensaios de avaliação de atividade antiviral contra os vírus Chikungunya, Zika e Oropouche. Embora a classe de compostos triazólicos assim como o SRPIN 340 e análogos (Capítulo 1, pg. 20 e Capítulo 2, pg. 29), tenham um histórico de apresentarem atividade antiviral, nenhum dos compostos sintetizados, **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j** apresentou atividade contra os vírus Zika e Chikungunya, sendo as condições em que houve tratamento tendo ficado iguais ao controle de vírus (células infectadas e não tratadas). O controle de células (células não infectadas e não tratadas) se encontrava viável, o que validou o resultado dos ensaios. A Figura 3.1, apresenta fotografias de algumas das condições de tratamento para demonstrar os resultados obtidos, sendo que para todos os outros compostos o mesmo aspecto de morte celular foi observado.

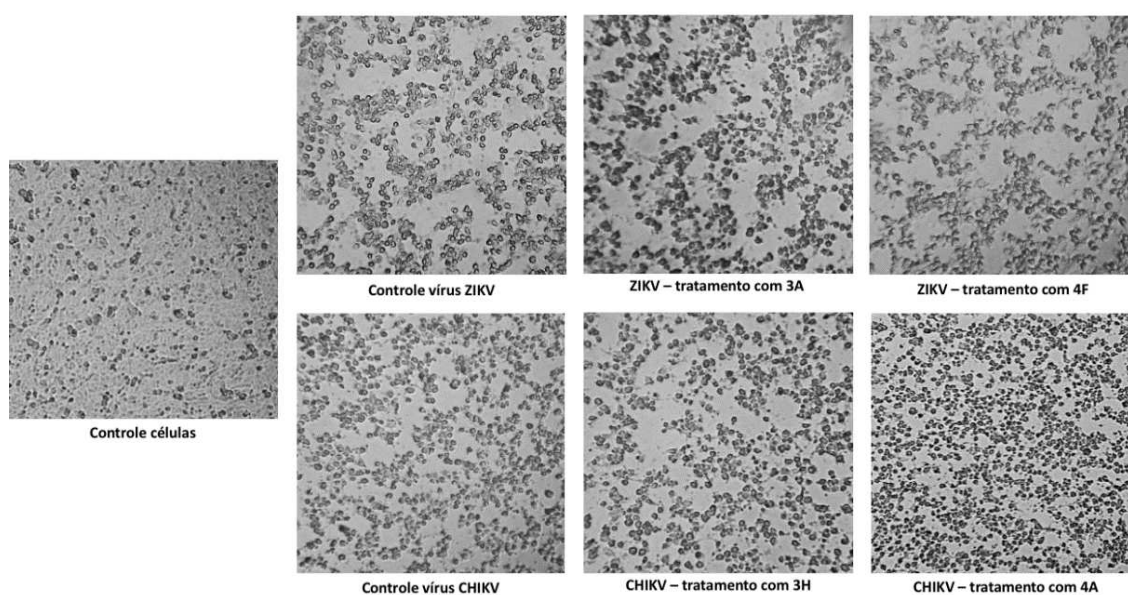


Figura 3.1 - Controle de células: células não infectadas e não tratadas. Controle de vírus: células infectadas com ZIKV ou CHIKV e não tratadas. ZIKV – tratamento com **3a**: células infectadas com ZIKV e tratadas com o composto **3a**. ZIKV – tratamento com **4f**: células infectadas com ZIKV e tratadas com o composto **4f**. CHIKV – tratamento com **3h**: células infectadas com CHIKV e tratadas com o composto **3h**. CHIKV – tratamento com **4a**: células infectadas com CHIKV e tratadas com o composto **4a**. Aumento: 200x.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. As fotografias foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

Com respeito ao vírus Oropouche (OROV), dois compostos, **3b** e **3j**, aumentaram a viabilidade celular das células infectadas após o tratamento. Contudo, o composto **3j** não ultrapassou 30% de viabilidade celular na maioria dos ensaios, sendo muito baixa sua ação e não considerada significativa pela literatura. Já o composto **3b** (Figura 3.2, pg. 166), apresentou atividade inibitória eficiente contra OROV, mas não houve uma concentração testada em que a viabilidade celular chegasse a 100%, isso pode ser devido ao valor da concentração efetiva, CE_{50} de $162,64 \pm 11,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 3.2, pg.) que está próximo ao valor da concentração citotóxica, CC_{50} ($382,28 \pm 35,41 \mu\text{mol L}^{-1}$), ou seja, a concentração inibitória está próxima da concentração citotóxica.

Para os compostos que apresentam atividade antiviral é possível calcular o índice de seletividade (IS), que representa a janela entre a citotoxicidade e a

atividade antiviral, e pode ser calculado pela razão entre CC_{50} e CE_{50} (Tabela 3.2, pg. 166). De modo geral, valores altos de IS indicam uma baixa toxicidade em relação às concentrações que mostram uma boa atividade antiviral, além de indicar um intervalo importante de concentrações que acentuam o efeito antiviral com mínima toxicidade. Valores baixos de IS, no entanto, indicam que há uma toxicidade importante para as concentrações que refletem uma atividade antiviral eficaz (PASQUEREAU *et. al.*, 2021). O valor de IS de 2,35 para o composto **3b**, indica, portanto, que embora haja uma boa atividade antiviral contra o vírus Oropouche, a toxicidade para as células deve ser considerada.

Tabela 3.2 – Valores de Concentração Efetiva para 50% das células (CE_{50}) e Índice de Seletividade (IS) para o composto **3b**

Concentração Efetiva 50 % (CE_{50})				
Composto	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média \pm SD
3b	179,62	159,91	148,99	162,64 \pm 11,18 μ M
Índice de Seletividade (IS)				
3b	2,35			

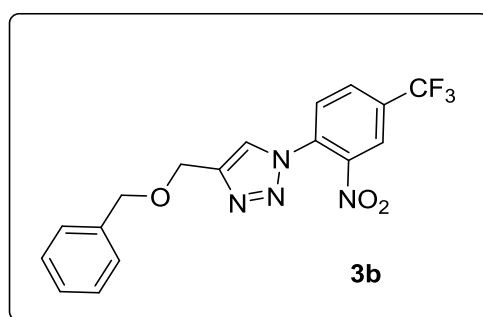


Figura 3.2 – Estrutura do composto triazólico **3b** com atividade antiviral contra o vírus Oropouche.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Considerando a estrutura do composto **3b**, o que o difere dos demais compostos da sua série **3a-3j**, é a presença de um grupo $-CH_2$ a mais (ligado à um dos anéis aromáticos), em comparação aos compostos **3a**, **3e**, **3f**, **3g** e **3j** que não possuem. Em relação à substância **3a**, especificamente, essa é a única diferença entre eles, sugerindo que a presença deste grupo foi fundamental para a atividade observada. Quanto aos demais compostos da série, embora contenham o grupo $-CH_2$ em questão, **3b** não apresenta nenhum grupo substituinte ligado à esse mesmo anel citado, apontando para o fato de que grupos doadores ou retiradores de elétrons e suas posições dentro da molécula, não interferiram na atividade contra o vírus. Além desses fatores, quando se compara **3b** com os outros compostos avaliados, **4a-4j** e **5a-5j**, a principal diferença está na presença do grupo nitro ($-NO_2$) na molécula. O grupo nitro apresenta um grande espectro de ação em compostos bioativos (anti-hipertensivos, anticoagulantes, antiinflamatórios, antibacterianos, dentre outros), sendo denominado *parasitóforo* (DE SOUZA, 2016; PETRI, 2015). Provavelmente esse grupo, associado aos outros fatores já mencionados, forneceu uma resposta positiva na atividade contra OROV, e isso se confirma com a comparação direta com os compostos **4b** e **5b**, derivados de **3b**, que não possuem o grupo $-NO_2$ e não apresentaram a mesma atividade.

A Figura 3.3, apresenta fotografias das condições de tratamento para demonstrar os resultados obtidos.

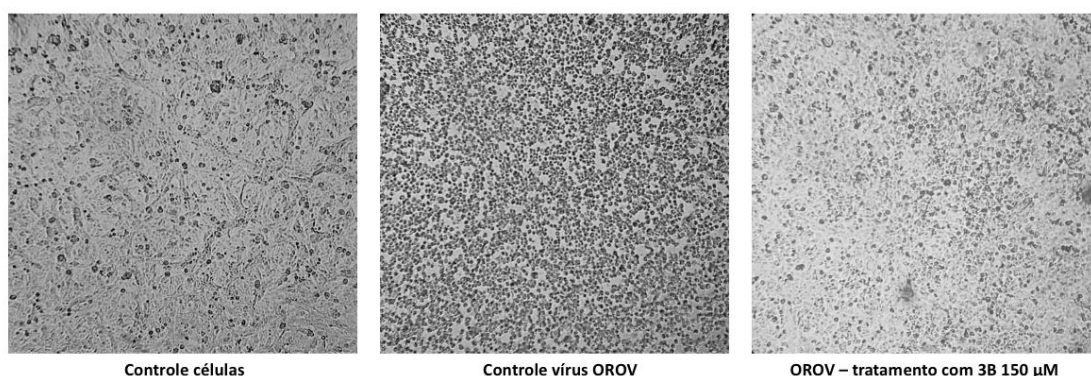


Figura 3.3 - Controle de células: células não infectadas e não tratadas. Controle de vírus: células infectadas com OROV e não tratadas. OROV – tratamento com 3B: células infectadas com OROV e tratadas com o composto 3B na concentração de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. Aumento 200x.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor. As fotografias foram gentilmente fornecidas pelo Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos (LBTM) da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.4. CONCLUSÃO

Das séries de substâncias sintetizadas neste trabalho (**3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j**), apenas o nitrocomposto intermediário triazólico **3b** apresentou atividade antiviral contra o vírus Oropouche (OROV) com uma concentração efetiva (CE_{50}) de $162,64 \pm 11,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ e índice de seletividade (IS) de 2,35. E embora os compostos sintetizados não tenham apresentado atividade contra os vírus Chikungunya e Zika, testes futuros contra outras espécies virais ainda poderão apresentar atividades promissoras para os compostos. Mudanças nas estruturas das moléculas, como a presença de outros grupos funcionais e em posições diferentes, podem potencializar e/ou mudar significativamente os resultados e fornecer novas perspectivas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGONDISO, A. P. C., SILVA, D., MISSAILIDIS, S. Application of aptamer based assays to the diagnosis of arboviruses important for public health in Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n.1, p. 159, 2021.
- AMORIM, M. R., PONTELLI, M. C., SOUZA, G. F., MURARO, S. P., TEIXEIRA, D. A. T., FORATO, J., SANTOS, K. B., BARBOSA, N. S., MARTINI, M. C., PARISE, P. L., VIEIRA, A., MILANEZ, G. P., SILVA, L. L. P., LALWANI, P. J., FARIAS, A. S., VINOLO, M. A. R., COSTA, R. S., ARRUDA, E., MODENA, J. L. P. Oropouche virus infects, persists and induces IFN response in human peripheral blood mononuclear cells as identified by RNA primeflow™ and qrt-PCR assays. *Viruses*, v. 12, n. 7, 2020.
- CHOWDHURY, A., MODAHL, C. M., TAN, S. T., XIANG, B. W. W., MISSE, D., VIAL, T., KINI, R. M., POMPON, J. F. JNK pathway restricts DENV2, ZIKV and CHIKV infection by activating complement and apoptosis in mosquito salivary glands. *Plos Pathogens*, v.16, n. 8, 2020.
- DE SOUZA. Ana Paula Martins. Síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas e avaliação das atividades antiviral, citotóxica e leishmanicida. 2016. 169 f.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Curso de Pós Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

FERRAZ, Ariane Coelho. Prospecção de atividade antiviral contra o *Mayaro virus* em compostos isolados de raízes de *Maytenus imbricata* (celastraceae). 2018. 381 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de São João del-Rei. Divinópolis.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos. Ministério da Saúde. Disponível em <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/chikungunya-sintomas-transmissao-e-prevencao>>. Acesso em: 03 mar. 2021.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos. Ministério da Saúde. Disponível em <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/zika-sintomas-transmissao-e-prevencao>>. Acesso em: 03 mar. 2021.

FONSECA, L. M. S., CARVALHO, R. H., BANDEIRA, A. C., SARDI, S. I., CAMPOS, G. S. Oropouche virus detection in febrile patients' saliva and urine samples in Salvador, Bahia, Brazil. *Japanese Journal of Infectious Disease*, v. 73, p. 164–165, 2020.

GUTIERREZ, B., WISE, E. L., PULLAN, S. T., LOGUE, C. H., BOWDEN, T. A., ESCALERA-ZAMUDIO, M., TRUEBA, G., NUNES, M. R. T., FARIA, N. R., PYBUS, O. G. Evolutionary dynamics of Oropouche virus in South America. *Journal of Virology*, v. 94, n. 5, 2020.

HASSAN, A. O., DMITRIEV, I. P., KASHENTSEVA, E. A., ZHAO, H., BROUGH, D. E., FREMONT, D.H., CURIEL, D. T., DIAMOND, M. S. A Gorilla Adenovirus-Based Vaccine against Zika Virus Induces Durable Immunity and Confers Protection in Pregnancy. *Cell Reports*, v. 28, p. 2634–2646, 2019.

HITAKARUN, A., KHONGWICHIT, S., WIKAN, N., ROYTRAKUL, S., YOKSAN, S., RAJAKAM, S., DAVIDSON, A. D., SMITH, D. R. Evaluation of the antiviral activity of orlistat (tetrahydrolipstatin) against dengue virus, Japanese encephalitis virus, Zika virus and chikungunya vírus. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1499, 2020.

- KUTSUNA S., KATO, Y., NAKAYAMA, E., TANIGUCHI, S., TAKASAKI, T., YAMAMOTO, K., TAKESHITA, N., HAYAKAWA, N., KANAGAWA, S., OHMAGARI, N. A case of consecutive infection with Zika virus and Chikungunya virus in Bora Bora, French Polynesia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 23, n. 2, p.114-116, 2016.
- LIU, S. Q., LI, X., DENG, C. L., YUAN, Z. M., ZHANG, B. Development and evaluation of one-step multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus. *Journal of Medical Virology*, v. 90, p.389–396, 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- PASQUEREAU, S., NEHME, Z., AHMAD, S. H., DAOUAD, F., ASSCHE, J. V., WALLET, C., SCHWARTZ, C., ROHR, O., BIZOT, S. M., HERBEIN, G. Resveratrol Inhibits HCoV-229E and SARS-CoV-2 Coronavirus Replication In Vitro. *Viruses*, v. 13, n. 2, p.354, 2021.
- PETRI, Simone Carolina Soares. Efeitos de derivados nitro heterocíclicos sintéticos sobre formas promastigotas e amastigotas intracelular de *Leishmania (Leishmania) infantum*. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Medicina. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- SOUZA, G. A. P., ROCHA, R. P., GONÇALVES, R. L., FERREIRA, C. S., SILVA, B. M., CASTRO, R. F. G., RODRIGUES, J. F. V., JÚNIOR, J. C. V. V., MALAQUIAS, L. C. C., ABRAHÃO, J. S., COELHO, L. F. L. Nanoparticles as vaccines to prevent arbovirus infection: a long road ahead. *Pathogens*, v.10, n.1, p. 36, 2021.
- WISE, E. L., MARQUEZ, S., MELLORS, J., PAZ, V., ATKINSON, B., GUTIERREZ, B., ZAPATA, S., COLOMA, J., PYBUS, O. G., JACKSON, S. K., TRUEBA, G., FEJER, G., LOGUE, C. H., PULLAN, S. T. Oropouche virus cases identified in Ecuador using an optimised qRT-PCR informed by metagenomic sequencing. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 1, 2020.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA CONTRA CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA U87 DAS AMIDAS TRIAZÓLICAS DERIVADAS SRPIN 340 E DOS INTERMEDIÁRIOS ENVOLVIDOS EM SUAS SÍNTESES

4.1. INTRODUÇÃO

O câncer é um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial, correspondendo à segunda maior causa de mortes no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, e é responsável, anualmente, pela morte de dez milhões de pessoas, o que representa uma em cada seis mortes (OUR WORLD IN DATA, 2021; FERLAY *et. al.*, 2019).

A incidência e a mortalidade por câncer têm aumentado, em parte pelo envelhecimento e pelo crescimento populacional, e também devido a fatores socioeconômicos. Para cada ano do triênio 2020-2022 estima-se que, no Brasil, ocorrerão 625 mil novos casos de câncer (ESTIMATIVA 2020, 2019). A Figura 4.1, pg. 172, indica a incidência dos principais tipos de câncer entre homens e mulheres para este triênio. A maior incidência será de câncer de próstata nos homens, 29,2%, e de câncer de mama nas mulheres 29,7% (ONCOGUIA, 2021).



Figura 4.1 – Estimativas de novos casos de câncer em homens e mulheres para o triênio 2020-2022.

Fonte: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-brasil/1705/1/>

A definição geral de câncer está relacionada a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que acometem tecidos e órgãos (ABC DO CÂNCER, 2020). Ele pode se desenvolver em qualquer parte do corpo e ainda espalhar-se para outras regiões, causando a formação de novos tumores em um processo denominado de metástase (ONCOGUIA, 2021).

Vários tipos de câncer já foram identificados e descritos na literatura. Os gliomas são definidos como tumores que se desenvolvem a partir de células glia - astrócitos, olidendrócitos e ependimária - que são células de suporte do cérebro, que protegem, nutrem e dão suporte aos neurônios (LOUIS *et. al.*, 2016). Os tumores podem ser distinguidos entre astrocitomas ou glioblastomas, oligodendrogliomas e ependimonas, dependendo do tipo celular nos quais se originaram (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021).

Dentre eles, o glioblastoma (GB) recebe uma atenção maior por ser o mais agressivo, letal e recorrente, sendo classificado como de grau IV pela Organização Mundial da Saúde - OMS (OROZCO *et. al.*, 2020). Ele pode surgir em pessoas de qualquer idade, mas a incidência maior é observada em pacientes de 55 a 65 anos. O prognóstico para as pessoas com esse tumor é

ruim, apresentando tempo médio de sobrevivência de apenas 12 a 15 meses (SHAABANI, *et. al.*, 2020). As estratégias terapêuticas normalmente utilizadas envolvem cirurgia combinada com quimioterapia e radioterapia, e ainda assim as taxas de sobrevida e cura são muito baixas devido aos fatores de recorrência, resistência aos medicamentos e aos efeitos colaterais relacionados às medicações (SHEN *et. al.*, 2021).

Além dos efeitos colaterais mais comuns (queda de cabelos, vômitos, tonteadas etc) causados pelo tratamento quimioterápico, efeitos negativos na medula óssea, no trato gastrointestinal, no músculo esquelético, no miocárdio e no sistema fisiológico, foram observados em pacientes em tratamento do glioblastoma (EMSEN *et. al.*, 2019). O medicamento geralmente utilizado para combater o glioblastoma é a temozolomida (TMZ), apresentada na Figura 4.2. A TMZ funciona como um agente precursor, se transformando *in vivo* no princípio ativo 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC). O MTIC é que apresenta a atividade antitumoral, funcionando como agente alquilante (NAJMAN & GADELHA, 2002). Quando a TMZ começou a ser utilizada, uma melhora de sobrevida dos pacientes foi observada, mas ao longo do tempo a resistência surgiu e ainda não existe outro tratamento padrão para a reincidência (BERNARDO *et. al.*, 2020).

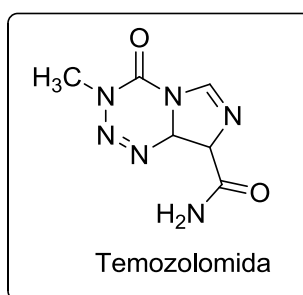


Figura 4.2 – Estrutura da temozolomida (TMZ).

Fonte:Elaborada pelo próprio autor.

Conforme descrito no Capítulo 1, o SRPIN 340 é um inibidor eficiente de SRPKs (SRPK 1 e SRPK 2), que são proteínas cinases ricas em serina/arginina. Elas estão envolvidas em variadas atividades celulares e sua superexpressão e desregulação demonstram efeitos inadequados que se relacionam com a proliferação celular em diversos tipos de cânceres. Chang e colaboradores

(2015) relataram que a superexpressão da proteína SRPK 1 também está ligada à proliferação dos gliomas, inclusive de glioblastomas.

Este fato demonstra o interesse do presente estudo em avaliar as possíveis atividades das substâncias derivadas do SRPIN 340 sintetizadas, assim como também dos compostos intermediários. Sempre será necessário aprofundar a busca por novos medicamentos que sejam mais eficientes e que diminuam ou eliminem os efeitos colaterais no tratamento quimioterápico de qualquer tipo de tumor. Em termos dos gliomas, a pesquisa por novos quimioterápicos é de relevância em função do limitado número de terapias e baixa eficiência terapêutica para o tratamento destes tipos de tumores. Diante do exposto, neste capítulo descreve-se a avaliação dos compostos sintetizados, os intermediários **3a-3j** e **4a-4j**, assim como as amidas triazólicas derivadas do SRPIN 340 **5a-5j**, contra células U87 de glioblastoma.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de avaliação da atividade antitumoral dos nitrocompostos **3a-3j**, das aminas **4a-4j** e amidas triazólicas **5a-5j** foi realizado em colaboração com a doutoranda Iára Mariana Lellis Ribeiro, com o professor Laser Antonio Machado de Oliveira e com a professora Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira do Laboratório de Neurobiologia e Biomateriais (LNBio) da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2.1. Linhagem e cultivo celular

A linhagem celular de glioblastoma humano utilizada neste ensaio foi a U87MG, e as células foram mantidas em meio de manutenção - DMEM (*high glucose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Para a realização dos experimentos, as células foram plaqueadas a uma densidade de 1,5x10⁴ células por poço, em placa de 96 poços.

4.2.2. Solubilização dos compostos

Os compostos **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j** foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 20% em água estéril para o preparo de uma solução estoque de 5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir desta, foram preparadas soluções nas concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de manutenção DMEM (LIMA *et. al.*, 2018; RIBEIRO *et. al.*, 2020; TEIXEIRA *et. al.*, 2020).

4.2.3. Avaliação do metabolismo celular pelo método MTT

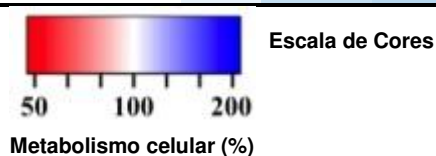
O metabolismo celular foi determinado com o MTT ((3-(4,5 dimetiliazol-2-il) -2,5 brometo de difeniltetrazólio; Sigma). As células U87MG foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços e mantidas por 24 h em estufa a 37 °C, em atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por meio contendo os compostos em diferentes concentrações (50, 100 e 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Os compostos **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j** foram diluídos em DMEM com 10% de SFB em 0,4% v/v de DMSO. Após 24, 48 e 72 h de cultura (LIMA *et. al.*, 2018), MTT (5 mg mL⁻¹;) foi adicionado a cada poço e incubado *overnight* a 37 °C. A solução de MTT foi então removida e 100 μL de DMSO foi adicionado por poço para solubilizar os cristais de formazan. Após 1 h, a leitura da absorbância foi medida no comprimento de onda de 530 nm em leitor de microplacas (VICTOR™ X3 da marca PerkinElmer). Os resultados foram normalizados considerando as culturas tratadas com 0,4% v/v de DMSO (controle). O metabolismo foi considerado 100% para o controle e os resultados submetidos às análises estatísticas pelo teste One-way ANOVA ($p \leq 0.05$) seguido pelo pós-teste de Tukey utilizando-se o Software GraphPadPrism, versão 5.0.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de glioblastoma U87 foram tratadas com as concentrações indicadas de cada composto (Tabela 4.1, pg. 176) por 24, 48 ou 72 h. Foi considerado o metabolismo celular de 100% das células no tratamento controle. A porcentagem de células viáveis é expressa como a média de seis experimentos independentes.

Tabela 4.1 – Efeito dos compostos sintetizados **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j** no metabolismo celular de células de glioblastoma U87

Composto [] $\mu\text{mol/L}$	24h			48h			72h		
	50	100	150	50	100	150	50	100	150
3a	94.5	92.4	89.9	97.3	93.1	89.5	85.5	84.6	79.5
3b	93.9	93.8	94.8	89.3	87.1	88.5	75.4	74.1	86.1
3c	100.8	97.5	90.3	88.1	84.2	84.6	89.3	106.3	86.9
3d	94.6	95.6	92.1	87.5	83.4	79.0	82.3	74.7	75.9
3e	93.3	91.8	100.8	85.8	90.0	101.3	91.5	89.8	95.1
3f	91.1	89.2	87.6	90.2	91.9	83.3	90.9	87.5	83.5
3g	90.1	89.5	96.9	83.2	80.4	80.1	88.8	87.7	86.6
3h	97.8	92.6	85.9	101.7	99.0	101.5	91.0	89.1	90.7
3i	87.4	90.2	90.5	97.3	97.7	96.9	91.2	87.0	86.9
3j	91.5	93.1	90.1	82.7	84.1	81.4	81.1	87.7	104.6
4a	96.7	93.0	89.6	80.3	83.5	81.4	100.9	109.0	111.1
4b	91.6	89.4	89.3	77.5	79.4	78.3	88.2	82.3	83.8
4c	93.8	96.9	96.8	91.2	94.7	88.2	95.2	77.6	89.3
4d	88.5	85.1	83.3	87.7	78.4	80.4	89.4	94.4	90.9
4e	92.6	97.9	100.9	108.1	150.5	146.0	166.6	145.5	178.2
4f	81.7	83.7	84.9	127.4	186.3	184.9	115.5	120.9	121.7
4g	94.0	115.2	120.5	161.3	196.8	193.3	113.7	138.5	141.7
4h	98.3	96.9	83.5	104.6	104.2	85.9	84.4	58.3	55.6
4i	77.3	80.8	76.7	91.2	98.1	103.5	88.3	87.8	85.3
4j	76.4	80.1	86.4	101.5	92.4	99.2	108.4	116.5	129.2
5a	83.5	89.3	81.0	180.2	175.9	133.5	125.0	111.4	99.7
5b	84.1	85.5	87.5	89.6	82.3	85.0	76.3	77.7	81.2
5c	101.1	117.1	128.5	173.4	189.4	195.6	100.4	140.7	138.4
5d	107.9	112.8	114.6	192.6	195.5	196.4	127.3	140.4	135.5
5e	91.4	102.3	112.1	89.5	124.2	130.4	105.7	110.7	115.3
5f	103.0	101.5	116.0	126.6	165.3	158.8	114.5	125.5	122.7
5g	112.3	108.0	114.9	123.6	129.9	135.2	118.8	131.6	135.0
5h	98.0	96.1	86.7	89.3	83.9	91.4	95.0	85.0	82.0
5i	102.1	116.9	122.5	153.3	177.3	180.0	161.0	161.7	154.6
5j	108.8	122.7	127.2	176.4	163.4	168.5	134.0	154.6	167.0



A escala de cores utilizada na Tabela 4.1, pg. 176, indica como os compostos atuaram no metabolismo celular. Quanto mais próximo da cor azul, maior é o metabolismo celular e quanto mais próximo da cor vermelha, menor é o metabolismo.

De maneira geral, observa-se (Tabela 4.1, pg. 176) que na série de compostos **3a-3j**, nenhuma das substâncias foram tóxicas para as células do glioblastoma U87 em nenhuma das concentrações testadas independente do tempo em que houve o tratamento. No entanto, pode-se destacar, de acordo com a escala de cores, que o composto **3b**, após 72 h de tratamento, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, teve um efeito mais pronunciado no metabolismo celular em relação aos demais compostos. O mesmo efeito se observa para o composto **3d**, no mesmo tempo de tratamento, mas nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os dois compostos tem em comum o fato de o efeito mais pronunciado ocorrer após 72 h de tratamento e na concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (cerca de 30% de redução do metabolismo celular). Também é importante destacar que não houve aumento significativo no metabolismo celular em relação ao controle de nenhum dos compostos da série em questão.

Na série de compostos **4a-4j** é possível observar um comportamento diferente em relação à série precursora **3a-3j**. Imediatamente nota-se, pela intensidade da cor mais vermelha, que o composto **4h** (Figura 4.3) foi capaz de reduzir o metabolismo celular de modo significativo, uma toxicidade bem expressiva (aproximadamente 45%) contra as células U87, após 72 h de tratamento nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

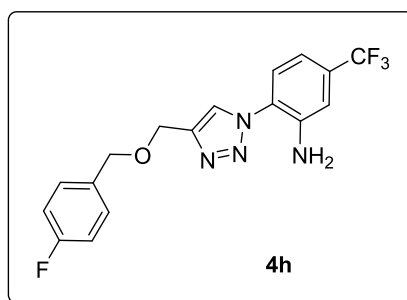


Figura 4.3 – Estrutura do composto **4h** que mais significativamente reduziu o metabolismo celular em células de glioblastoma U87.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Analisando a estrutura química do composto triazólico **4h** (Figura 4.3, pg. 177), observa-se que a única diferença entre ele e seu precursor **3h** é a presença do grupo -NH_2 ao invés do grupo -NO_2 . O grupo amino provavelmente foi o que mais influenciou nessa mudança de comportamento das moléculas frente à sua atividade contra as células do glioblastoma.

A presença de átomos de halogênios nas moléculas também são de fundamental importância quando se trata de compostos bioativos. Um estudo feito por SOARES (2013), mostra o efeito citotóxico de tiosemicarbazonas (Figura 4.4) frente às células de tumores cerebrais T98-G e U87 e células MCF-7 de câncer de mama. Segundo o estudo, os compostos mais potentes contra todos os tipos celulares analisados (com IC_{50} abaixo de $5,00 \text{ nmol.L}^{-1}$) foram os que apresentaram átomos de flúor e cloro na molécula.

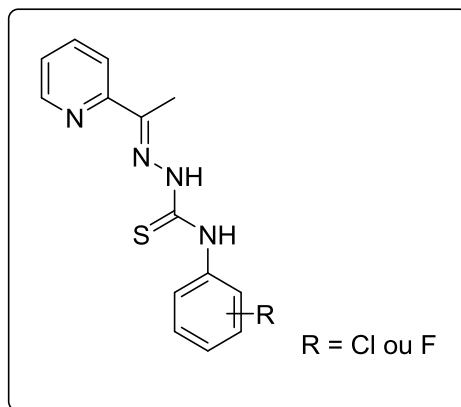


Figura 4.4 – Estruturas das tiosemicarbazonas ativas contra células de tumores cerebrais e de mama.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Embora só a presença do átomo de flúor no composto **3h** não tenha influenciado diretamente a mudança de atividade em relação ao composto **4h**, acredita-se que essa mudança possa ter sido potencializada devido à presença dos dois grupos, -NH_2 e -F , na molécula. O efeito dessa junção do grupo amino com halogênios pode ser corroborada pela análise das outras substâncias da série **4a-4j**, uma vez que a maioria dos compostos que apresentaram um efeito citotóxico mais pronunciado (embora menores do que **4h**), com uma redução no metabolismo celular ao redor de 25%, contém átomos de halogênio (Cl, Br e I) em suas estruturas assim como também o grupo amino (compostos **4c**, **4d** e **4j**).

Outra característica importante que pode ser extraída dessa série de compostos **4a-4j** e que a diferencia da sua série precursora **3a-3j**, é o efeito mais pronunciado do metabolismo celular que ultrapassa 100% do metabolismo das células de controle, direcionados para a escala de cores em azul. De acordo com BARROS (2019), um dos motivos que justificaria esse aumento superior à 100%, pode ser devido à indução de proliferação celular. O composto que mais se destacou foi o **4g**, seguido pelos compostos **4f** e **4e** (Figura 4.5), com um metabolismo celular em torno de 195% nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 48 h de tratamento. O composto **4f** indicou um metabolismo em torno de 185% também nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 48h de tratamento e o composto **4e** indicou um metabolismo maior, de 178,2%, na concentração de 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 72 h de tratamento. Estes compostos citados anteriormente, assim como também os compostos **4a** e **4j**, de maneira geral, foram capazes de aumentar o metabolismo celular em relação ao controle também em outras concentrações e tempos de tratamentos diferentes, mas foram efeitos menos expressivos.

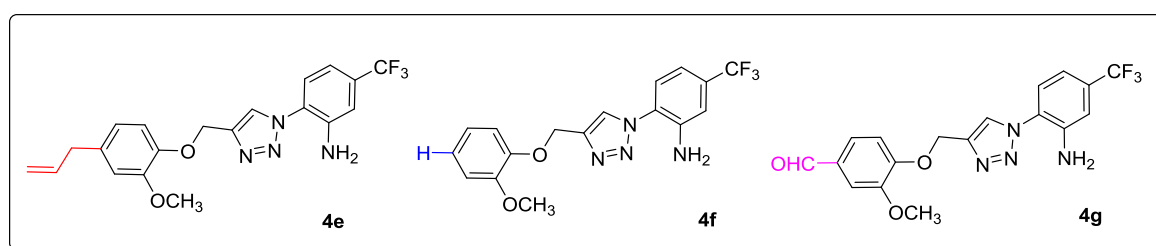


Figura 4.5 – Compostos da série **4a-4j** que mais induziram o metabolismo celular do glioblastoma U87.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Embora não tenha havido um padrão de comportamento no metabolismo celular com respeito à natureza química das moléculas, curiosamente, os compostos **4e**, **4f** e **4g**, são derivados do eugenol, guaiacol e vanilina respectivamente, que são todas substâncias que podem ser extraídas de fontes naturais. A únicas diferenças entre eles são as porções coloridas, um grupo alquila, hidrogênio e aldeído, destacadas em suas estruturas na Figura 4.5, sugerindo que, além do grupo amino, o grupo metoxila, pode ter influenciado no aumento do metabolismo celular em relação aos compostos que não apresentam o grupo $-\text{OCH}_3$.

A princípio, esse aumento no metabolismo celular não é bem-vindo quando o interesse está voltado para a toxicidade que os compostos podem ter contra as células tumorais. No entanto, indicar o crescimento das células, pode ser vantajoso quando se considera processos benéficos como, por exemplo, o de cicatrização de feridas.

A cicatrização de feridas consiste em uma sucessão de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que se concretize o processo de reconstituição dos tecidos. O mecanismo de cicatrização pode ser dividido em três estágios. No primeiro, denominado estágio inflamatório, ocorre a lesão do tecido, no segundo estágio, o proliferativo, de forma simplificada, é onde ocorre os processos de proliferação celular e o terceiro estágio, chamado de remodelação, trata da tentativa de recuperação da estrutura normal do tecido lesionado (CAMPOS *et. al.*, 2007; GONZALEZ *et. al.*, 2016).

Sugere-se que a participação de substâncias que induzem o metabolismo celular estejam envolvidas no segundo estágio do processo de cicatrização, promovendo o crescimento celular para acelerar a reconstituição dos tecidos danificados. Salienta-se que o fato dos compostos aumentarem o metabolismo de células malignas, não significa que apresentarão o mesmo efeito com células normais, no entanto, estudos mais aprofundados orientados nesse sentido, podem ser promissores no desenvolvimento de formulações farmacêuticas para acelerar o processo de cicatrização de feridas.

Analisando a última série de compostos apresentada na Tabela 4.1, pg. 176 , **5a-5j**, que corresponde às amidas triazólicas derivadas do SRPIN 340, observa-se que apenas o composto **5b**, apresentou uma toxicidade mais pronunciada se comparada aos demais compostos, levando à redução no metabolismo celular de aproximadamente 25%, nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ após 72 h de tratamento. Um comportamento semelhante foi observado para o composto **3b**, que também é seu precursor.

Considerando o aumento no metabolismo celular causado pelos compostos dessa série **5a-5j**, destaca-se o composto **5d**, seguido pelos compostos **5c**, **5a**, **5i** e **5j** (Figura 4.6, pg. 181). Para todos estes compostos, as alterações mais significativas ocorreram após 48 h de tratamento. O composto **5d** foi o mais expressivo, com o metabolismo superior à 190% para todas as concentrações testadas. Já o composto **5c**, apresentou um metabolismo maior

do que 190% apenas na concentração de 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Nas demais concentrações o metabolismo foi de 173,4% para 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 189,4 % para 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, que também devem ser consideradas. As substâncias **5a**, **5i** e **5j**, embora menos expressivas que **5d** e **5c**, foram capazes de aumentar o metabolismo em mais de 175% nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para **5a**, de 100 e 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para **5i** e de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para **5j**.

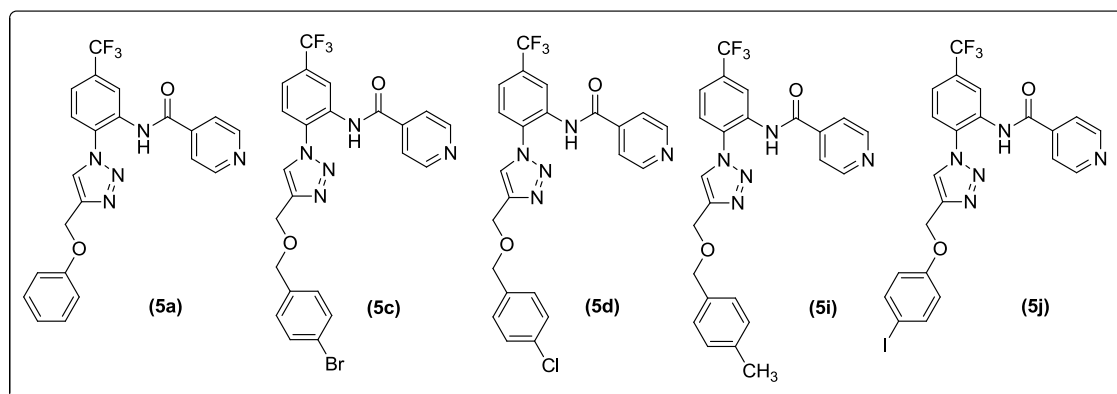


Figura 4.6 – Amidas triazólicas que mais induziram o metabolismo celular do glioblastoma U87.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Mais uma vez não se observa um padrão relacionando as estruturas químicas das moléculas apresentadas na Figura 4.6, entre si, nem entre seus precursores, no que tange ao aumento no metabolismo. Entretanto, nota-se que os compostos **5d** e **5c**, que mais aumentaram o metabolismo celular, apresentam átomos de halogênio, Cl e Br respectivamente, em suas estruturas.

No trabalho realizado por DE SOUZA (2020), no qual foi reportada a síntese de outros derivados inspirados no SRPIN 340 e também contendo o núcleo 1,2,3-triazol, um resultado semelhante foi obtido em relação ao aumento do metabolismo celular que alguns compostos apresentaram frente às células de glioblastoma U87. As substâncias em questão (Figura 4.7, pg. 182) foram capazes de aumentar o metabolismo celular em quase 200% na concentração de 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

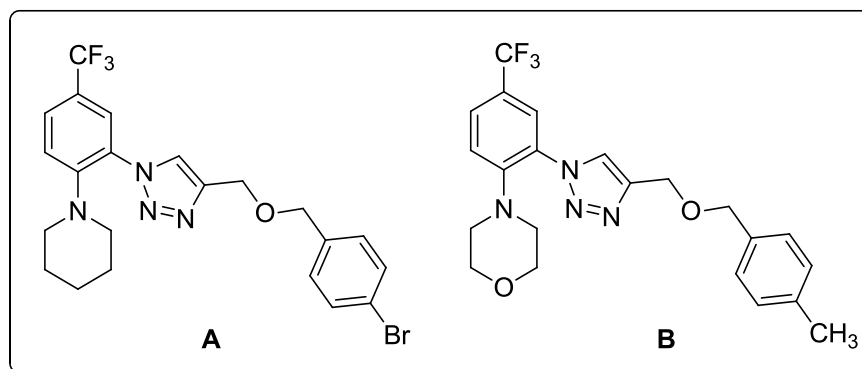


Figura 4.7 – Substâncias sintetizadas por DE SOUSA (2020) que aumentaram o metabolismo celular contra células de glioblastoma U87.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Uma comparação poder feita entre as estruturas dos compostos **A** e **B** (Figura 4.7) sintetizados por DE SOUSA (2020) e os compostos obtidos na presente investigação. Inicialmente observa-se que o composto **5c** (Figura 4.6, pg. 181), contém o átomo de bromo em sua estrutura assim como o composto **A**, além de ter aumentado o metabolismo em quase 200% (195,6%) na mesma concentração de $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ que o composto **A**. O composto **5i** por sua vez, apresentado também na Figura 4.6, pg. 181, contém o grupo metila da mesma forma que o composto **B** e embora não tenha aumentado o metabolismo celular na mesma magnitude que **B**, suas semelhanças estruturais devem ser ressaltadas.

Da mesma forma que os compostos **4e**, **4f** e **4g**, pertencentes à série **4a-4j**, foram sugeridos para testes futuros para analisar um possível efeito cicatrizante devido às suas capacidades de aumentarem o metabolismo celular, os compostos **5a**, **5c**, **5d**, **5i** e **5j** também podem ser testados para a mesma finalidade e se tornarem futuros agentes de cicatrização.

4.4. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados apresentados, observou-se que das séries de compostos sintetizadas, **3a-3j**, **4a-4j** e **5a-5j**, apenas o composto **4h**, foi capaz de reduzir mais significativamente (cerca de 45%) o metabolismo celular das células U87 de glioblastoma. Já os compostos **4e**, **4f**, **4g**, **5a**, **5c**, **5d**, **5i** e **5j** foram capazes de aumentar o metabolismo destas células, com efeitos

variando entre 170 e 196%, sugerindo estudos mais aprofundados a respeito do potencial que podem apresentar frente a testes sobre cicatrização de feridas. Embora os resultados para células de glioblastoma não tenham sido muito promissores em relação à citotoxicidade, estudos com outros tipos de células tumorais podem ser mais eficientes, além de que mudanças estruturais nas moléculas podem fornecer resultados diferentes e apresentar novas perspectivas.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABC DO CÂNCER. Abordagens básicas para o controle do câncer. Ministério da Saúde – INCA. Rio de Janeiro, 112p, 2020.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/brain-spinal-cord-tumors-adults/about/what-are-brain-spinal-tumors.html>>. Acesso em: 24 mar. 2021.

BARROS. Marcus Vinícius de Andrade. Derivados 1,2,3-triazólicos da ftalimida e trifluorometilaril amidas: sínteses e avaliações de atividades citotóxica, fungicida e contra microalgas e cianobactérias. 2019. 351 f. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

BERNARDO, P. S., GUIMARÃES, G. H. C., FARIA, F. C. C., LONGO, G. M. C., LOPES, G. P. F., NETTO, C. D., COSTA, P. R. R., MAIA, R. C. LQB – 118 compound inhibits migration and induces cell death in glioblastoma cells. *Oncology Reports*, v. 43, p. 346-357, 2020.

CAMPOS, A. C. L., BRANCO, A. B., GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CHANG, Y., WU, O., TIAN, T., LI, L., GUO, X., FENG, Z., ZHOU, J., ZHANG, L., ZHOU, S., FENG, G., HAN, F., YANG, J., HUANG, F. The influence of SRPK1 on glioma apoptosis, metastasis, and angiogenesis through the PI3K/Akt signaling pathway under normoxia. *Tumor Biology*, v. 36, n. 8, p. 6083-6093, 2015.

DE SOUZA. Sara Maria Ribeiro. Síntese de novos 1,2,3-triazóis inspirados no SRPIN 340 e avaliação de atividades antiparasitária e antitumoral. 2020. 335 f.

Tese (Doutorado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

EMSEN, B., OZDEMIR, O., ENGIN, T., TOGAR, B., CAVUSOGLU, S., TURKEZ, H. Inhibition of growth of U87MG human glioblastoma cells by *Usnea longissima* Ach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n.3, 2019.

ESTIMATIVA 2020. Incidência de câncer no Brasil – INCA. Rio de Janeiro, 120 p., 2019.

FERLAY, J.; COLOMBET, M.; SOERJOMATARAM, I.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M.; PIÑEROS, ZNAOR, A.; BRAY, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

GONZALEZ, A. C. O., ANDRADE, Z. A., COSTA, T. F., MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

LIMA, G. D. A., RODRIGUES, M. P., MENDES, T. A. O., MOREIRA, G. A., SIQUEIRA, R. P., SILVA, A. M., VAZ, B. G., FIETTO, J. R. L., BRESSAN, G. C., NEVES, M. M., TEIXEIRA, R. R. Synthesis and antimetastatic activity evaluation of cinnamic acid derivatives containing 1,2,3-triazolic portions. *Toxicology in Vitro*, v. 53, p. 1-9, 2018.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W. K.; OHGAKI, H.; WIESTER, O. D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*, v. 131, n. 6, p. 803-820, 2016.

NAJMAN, H., GADELHA, M. I. P. Temozolamida. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, n. 3, p. 439-445, 2002.

ONCOGUIA. Instituto. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estimativas-no-brasil/1705/1/>>, <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

OROZCO, M., VALDEZ, R. A., RAMOS, L., CABEZA, M., SEGOVIA, J., ROMANO, M. C. Dutasteride combined with androgen receptor antagonists

inhibit glioblastoma U87 cell metabolism, proliferation, and invasion capacity: Androgen regulation. *Steroids*, v. 164, 2020.

OUR WORLD IN DATA. Disponível em <<https://ourworldindata.org/cancer>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

TEIXEIRA, A. R., TEIXEIRA, R. R., RIBEIRO, I. M. L., PEREIRA, W. L., MANHABOSCO, T. M., BRITO, A. C. F., OLIVEIRA, L. A. M., NOGUEIRA, K. O. P. C. Association of electroanalytical and spectrophotometric methods to evaluate the antioxidant activity of isobenzofuranone in primary cultures of hippocampal neurons. *Toxicology In Vitro*. 2020.

RIBEIRO, I. M. L., PEREIRA, W. L., NOGUEIRA, L. B., OLIVEIRA, L. A. M., TEIXEIRA, R. R., NOGUEIRA, K. O. P. C. Neuroprotective effect of isobenzofuranones on hydrogen peroxide-mediated redox imbalance in primary cultures of hippocampal neurons. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 63, 2020.

SHAABANI, M., MOUSAVI, S. H., AZIZI, M., JAFARI, A. A. Cytotoxic and apoptogenic effects of *Dracocephalum kotschy* Boiss., extracts against human glioblastoma U87 cells. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 10, n. 6, p. 594-603, 2020.

SHEN, Y., CHEN, Y., HUANG, Y., ZENG, X., HUANG, L., DIAO, X., CHEN, S., CHEN, X. An *in vitro* study on the antitumor effect of sonodynamic therapy using sinoporphyrin sodium on human glioblastoma cells. *Ultrasonics*, v. 110, 2021.

SOARES. Marcella Araugio. Avaliação da potencial aplicação de derivados de 2-acetilpiridina N4 fenil tiossemicarbazonas em terapia e diagnóstico oncológico. 2013. 162 f. Tese (Doutorado Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

No presente trabalho foram sintetizados no total quarenta e oito compostos, sendo uma azida, dez alquinos terminais, dez nitrocompostos triazólicos, dez aminas triazólicas e dezessete derivados do SRPIN 340 contendo o fragmento 1,2,3-triazol. Dentre eles, trinta e sete são substâncias inéditas e tiveram suas estruturas confirmadas por meio das espectroscopias no IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C . No preparo dos compostos foram empregadas reações substituição nucleofílica aromática, reações de alquilação via catálise de transferência de fases, reações CuAAC, reações de redução e reações de acilação, fornecendo rendimentos sinteticamente úteis. Os testes para avaliação antiviral dos compostos mostrou que nenhuma das substâncias testadas foram ativas contra os vírus Zika e Chikungunya e que apenas o composto **3b** foi mais ativo contra o vírus Oropouche, apresentando uma concentração efetiva (EC_{50}) de $162,64 \pm 11,18 \mu\text{mol L}^{-1}$ e índice de seletividade de 2,35. Com respeito à avaliação citotóxica contra células de tumor cerebral glioblastoma U87, dos compostos testados, o composto **4h** foi o que mais induziu uma toxicidade expressiva de cerca de 55%. Já os compostos **5a**, **5c**, **5d**, **5i** e **5j**, foram os que mais aumentaram o metabolismo celular em quase 200%. Como perspectivas, sugere-se que os todos compostos sejam avaliados contra outros tipos de vírus e células cancerígenas, e que os compostos que promoveram o aumento no metabolismo celular no teste contra células de glioblastoma U87 sejam testados para avaliação de seus potenciais como agentes cicatrizantes. A mudança nas estruturas químicas das moléculas, com adição e/ou substituição de novos grupos e em posições diferentes, pode ser uma estratégia para melhorar os resultados obtidos. Além disso, necessita-se encontrar melhores condições para condução dos processos de acilação.

ANEXOS I – ESPECTROS

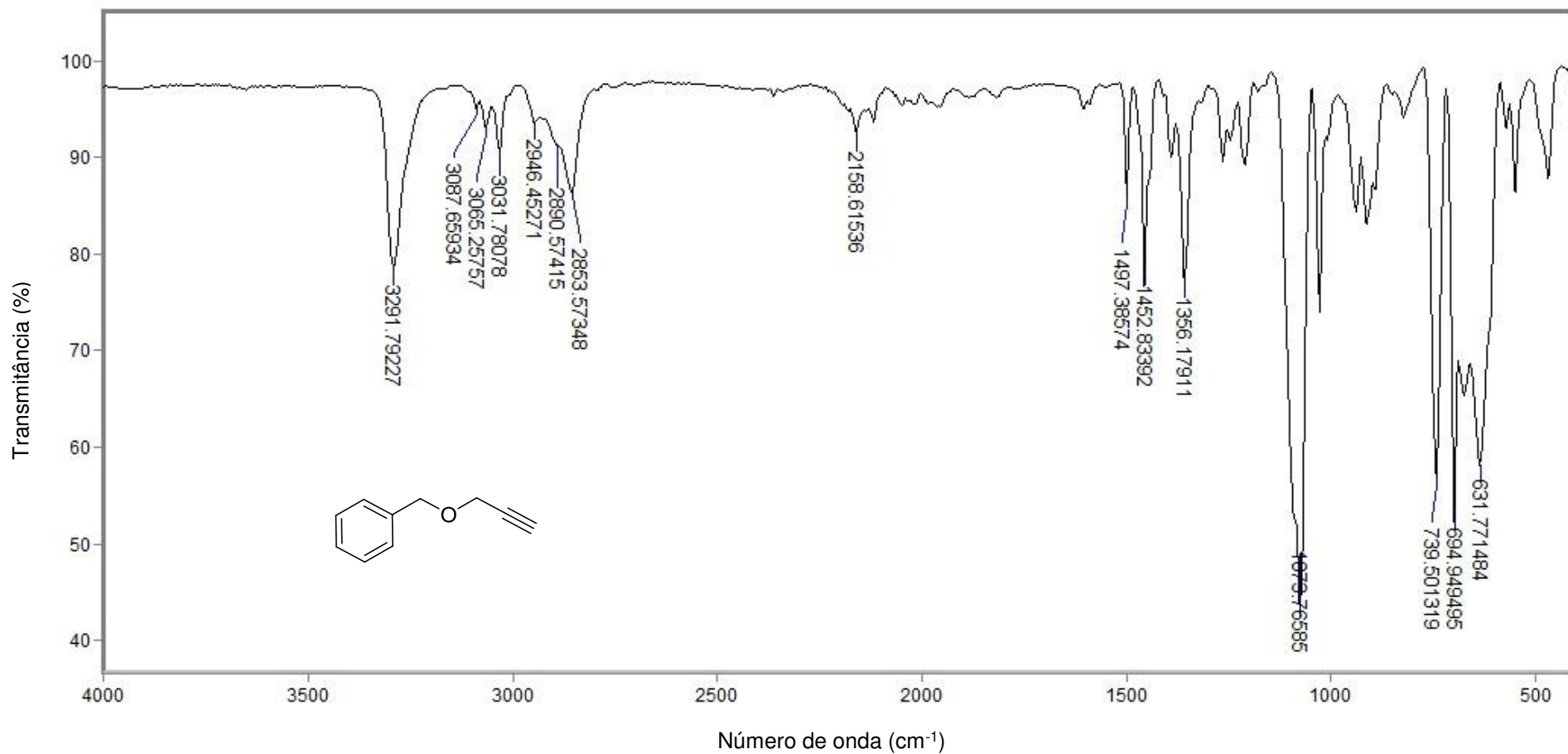


Figura 1 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

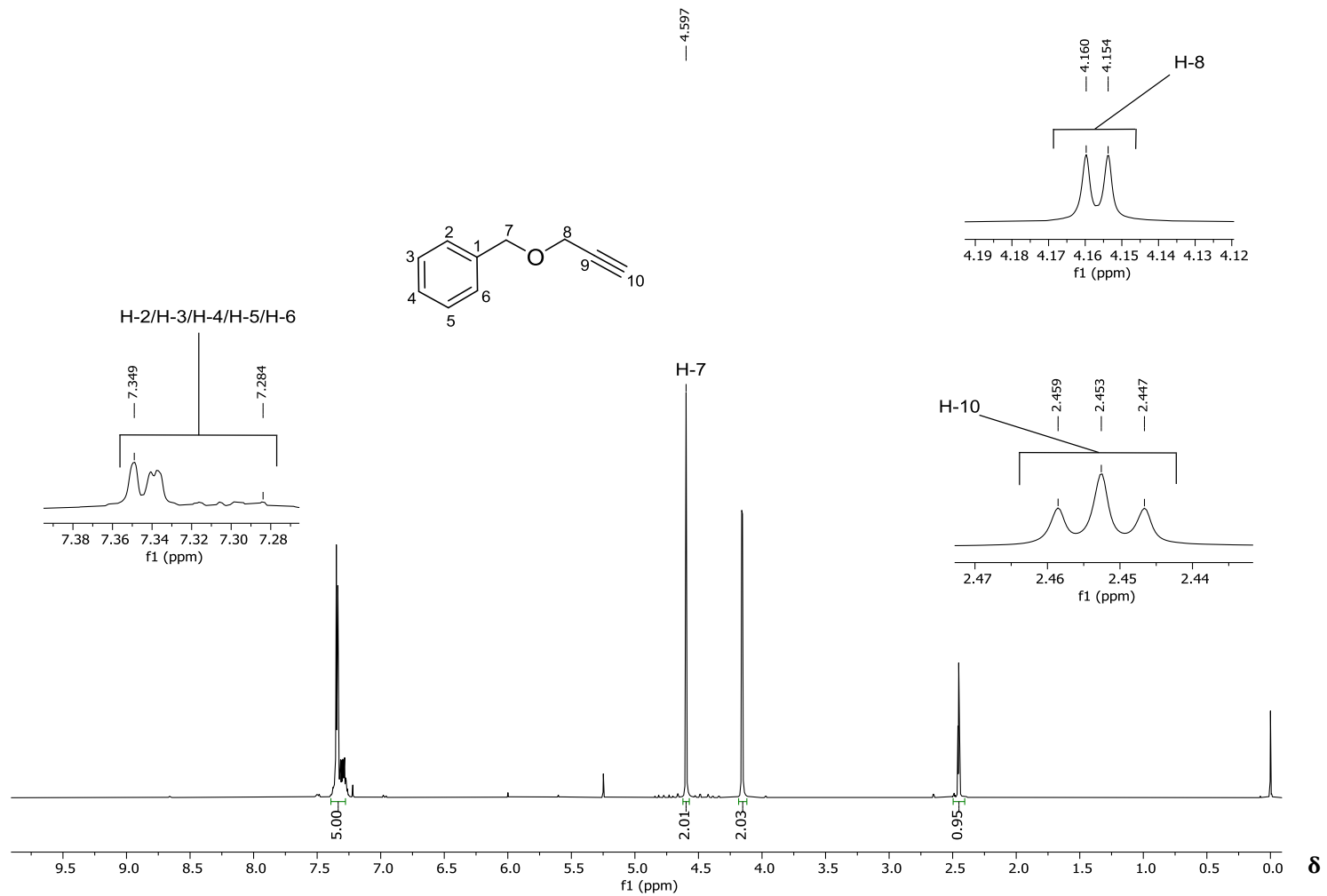


Figura 2 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **2b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

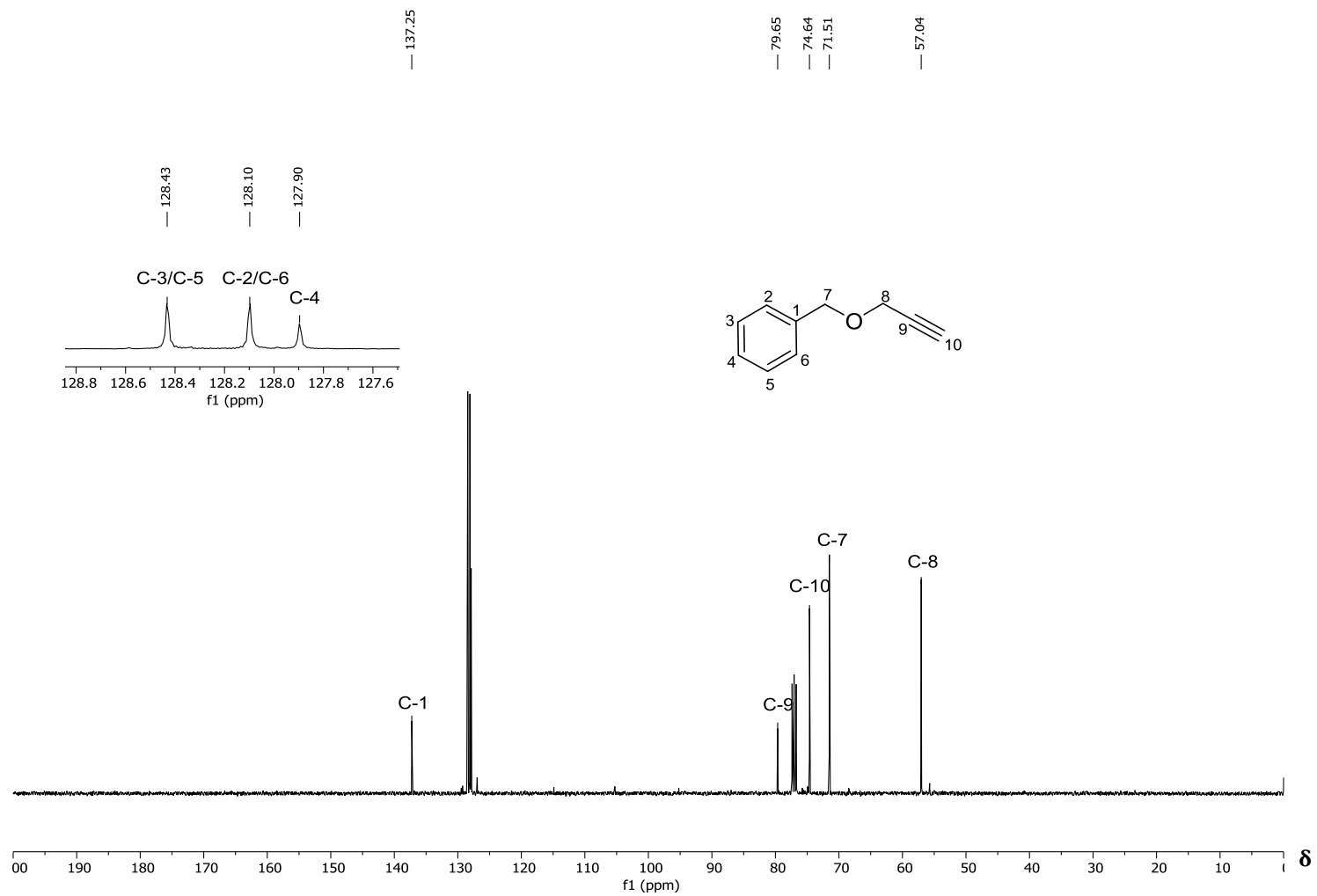


Figura 3 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

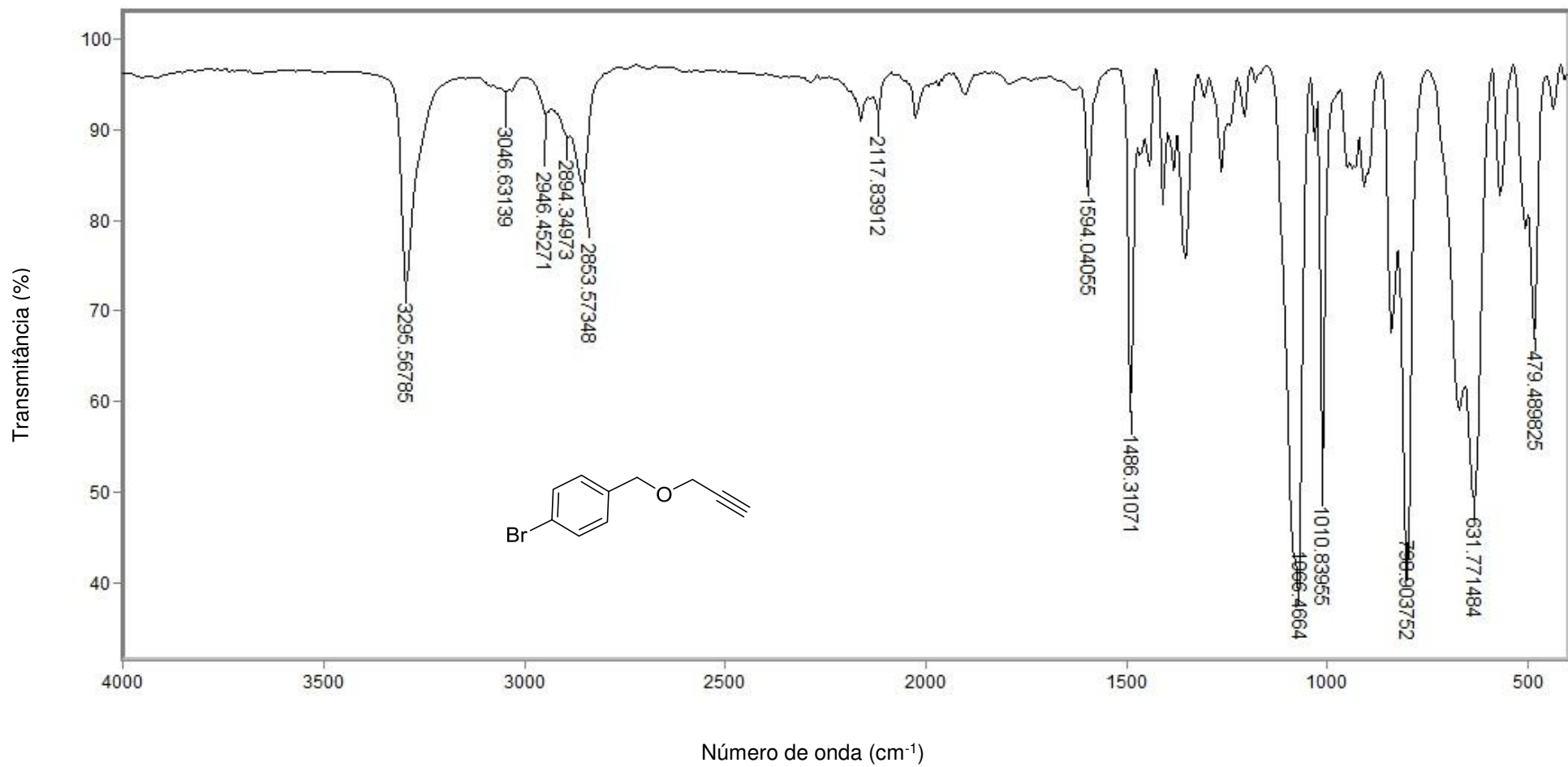


Figura 4 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

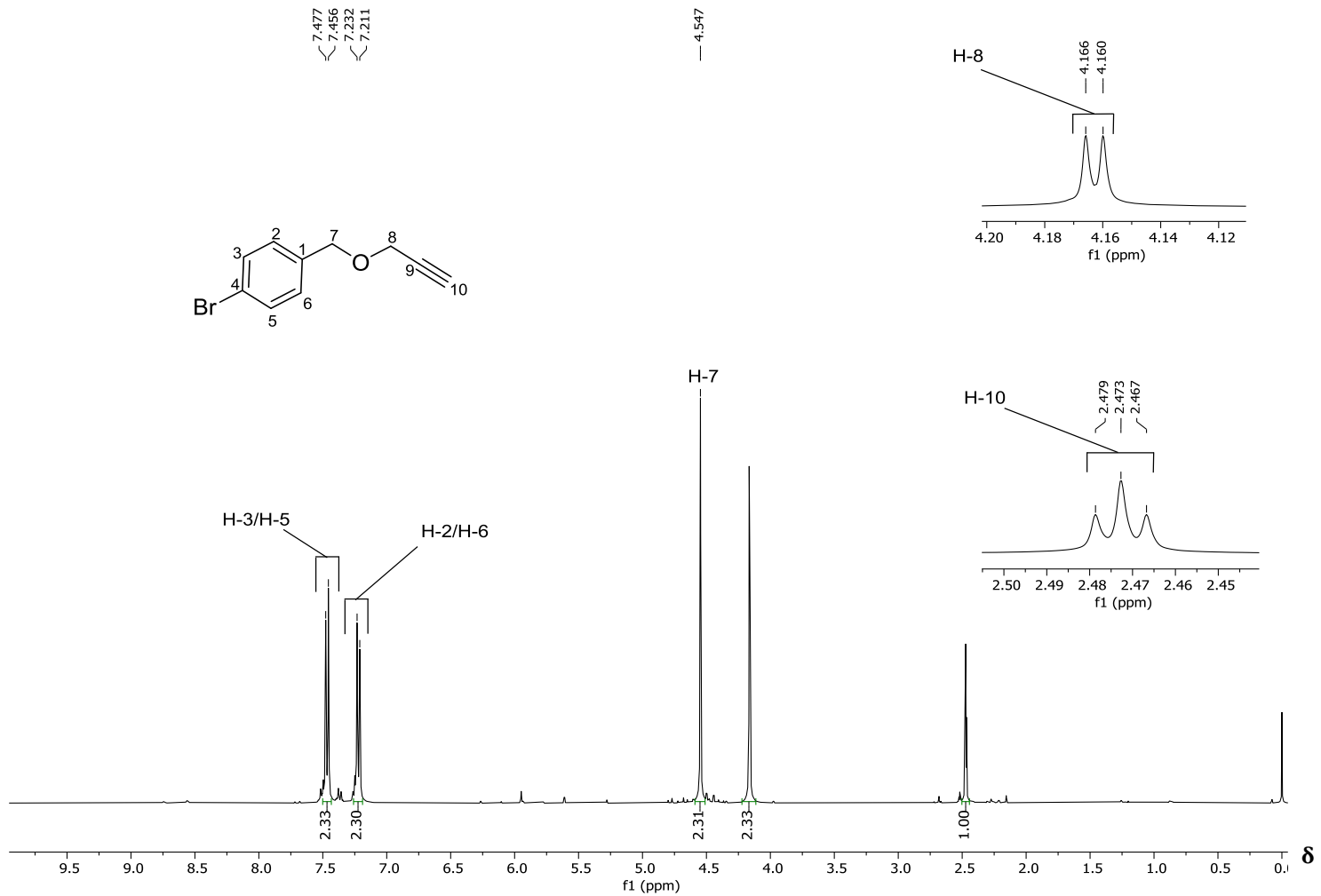


Figura 5 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **2c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

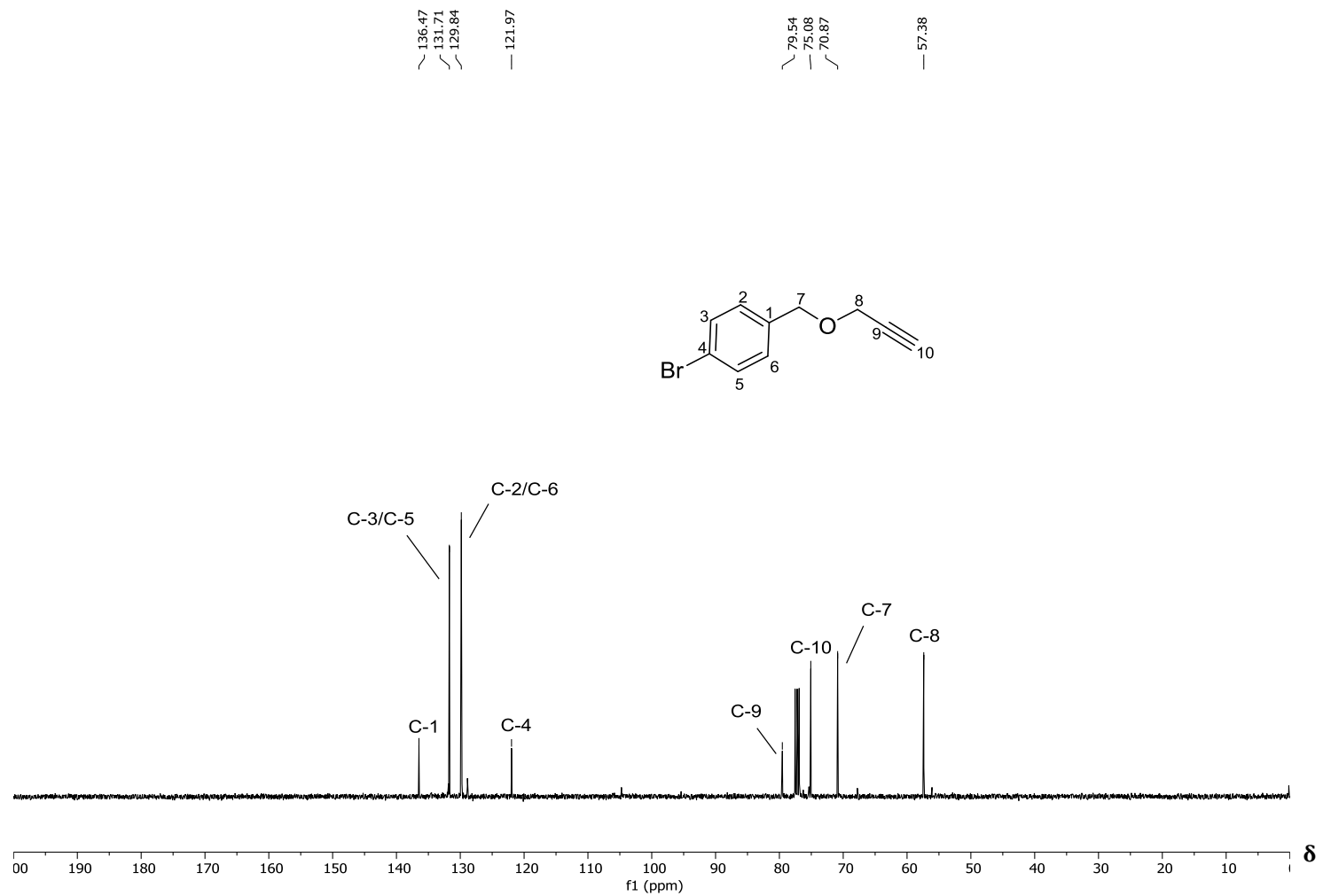


Figura 6 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

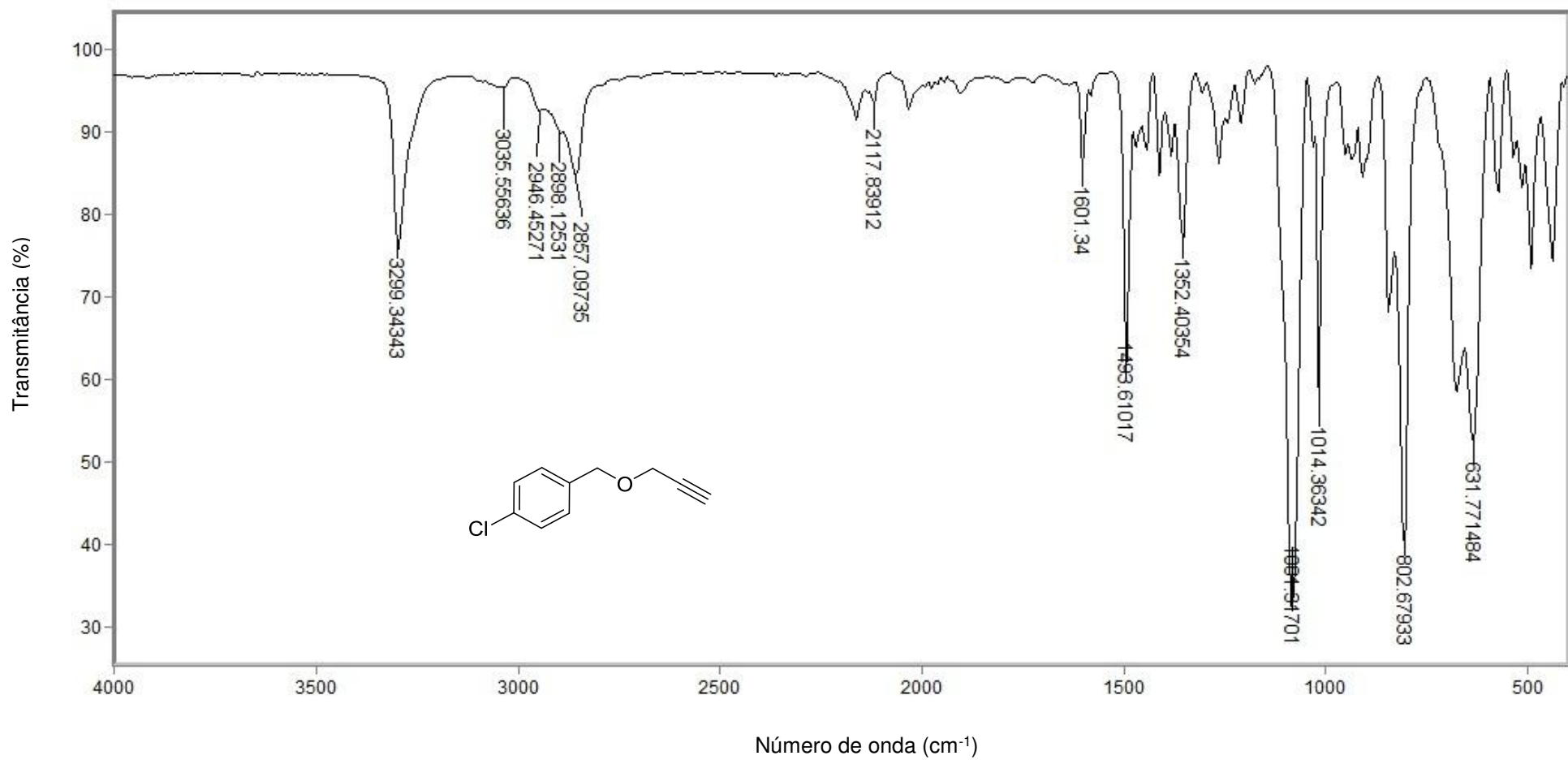


Figura 7 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

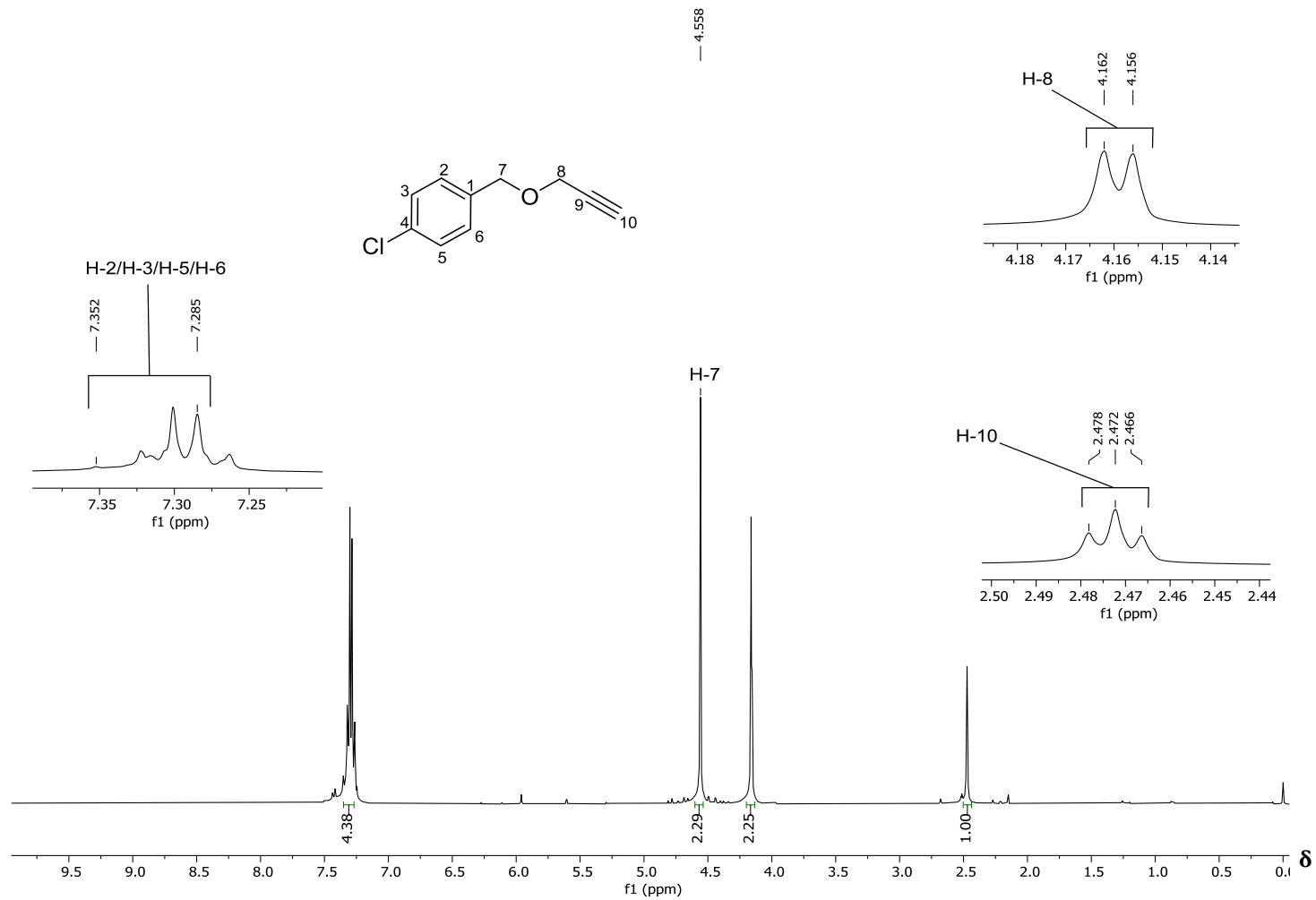


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **2d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

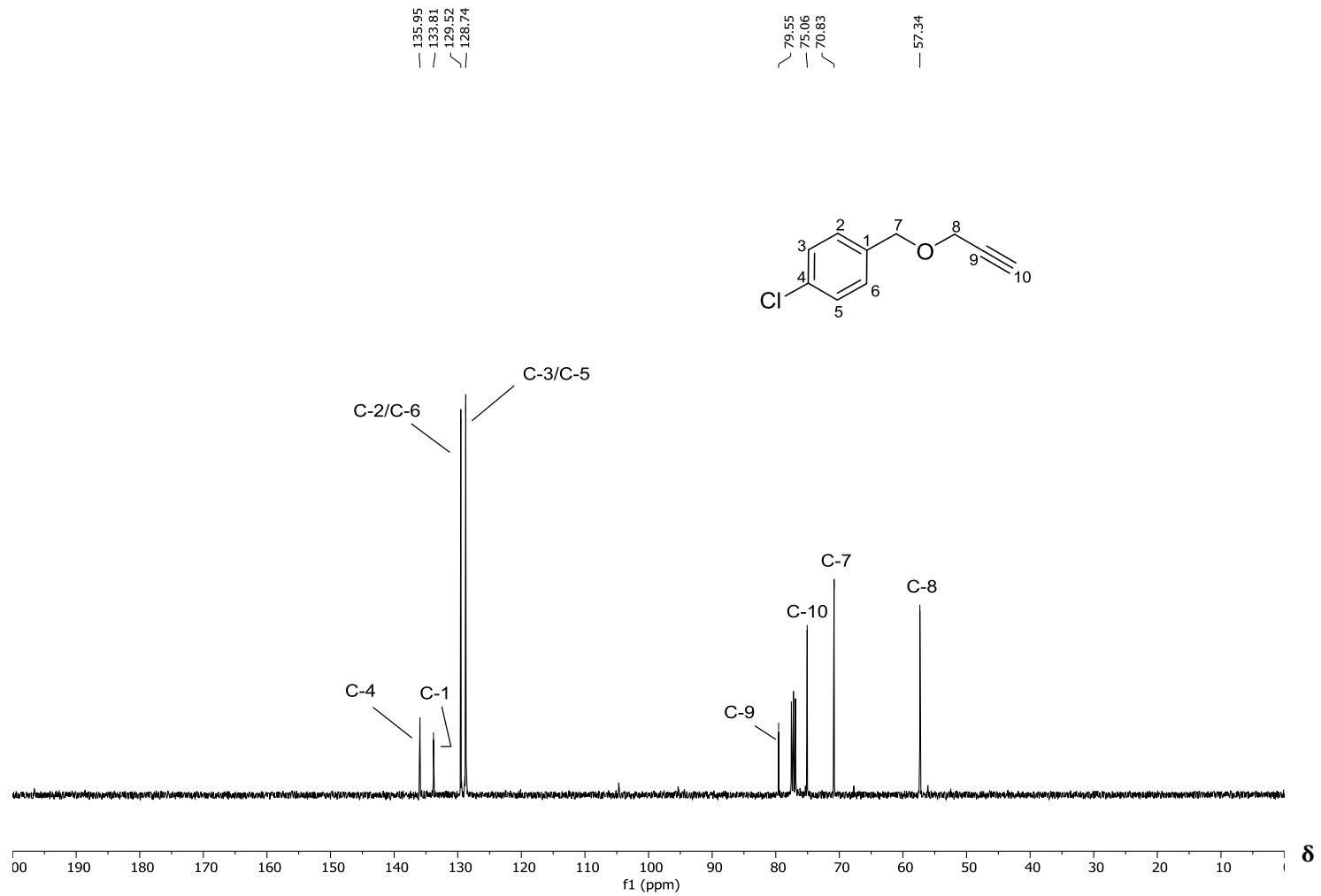


Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

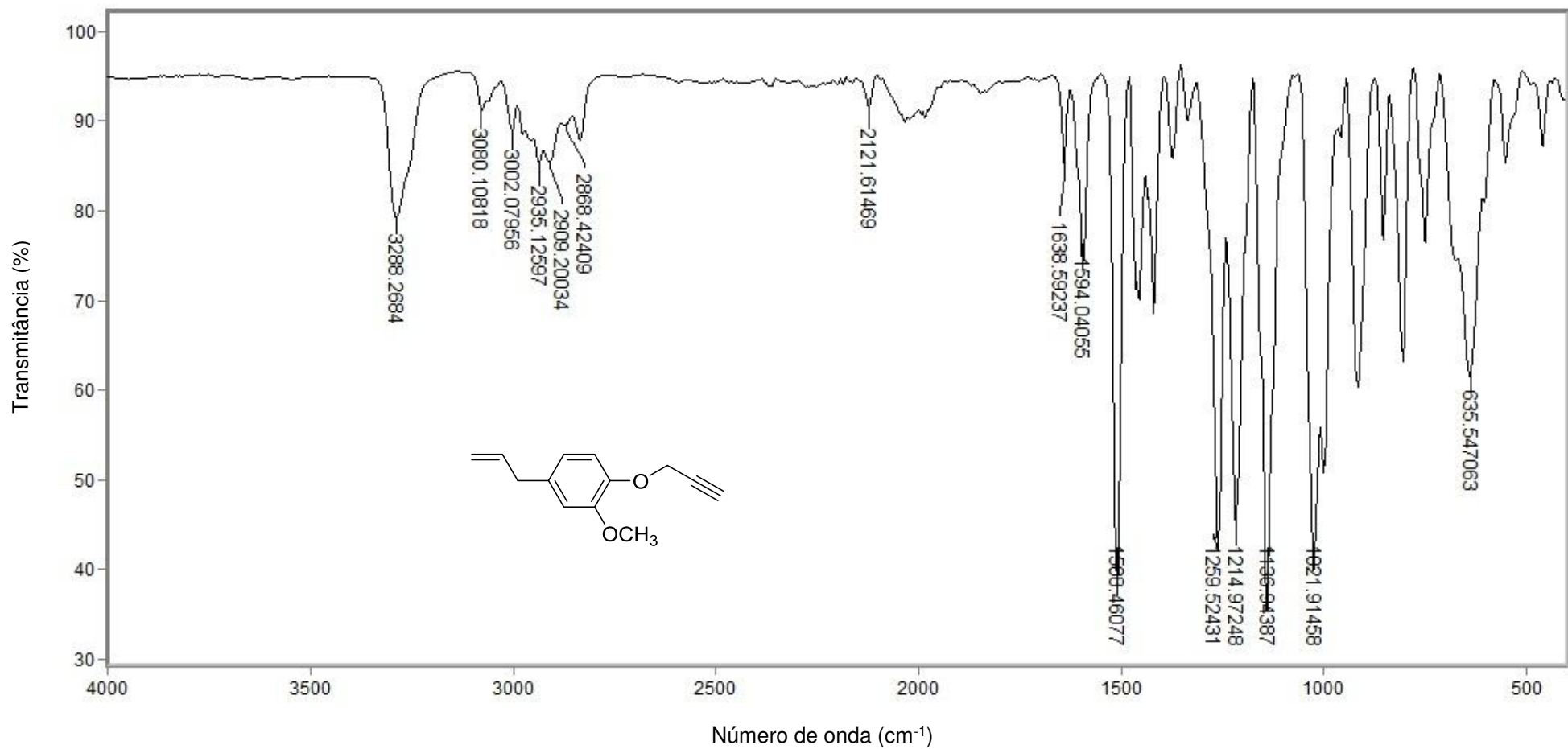


Figura 10 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

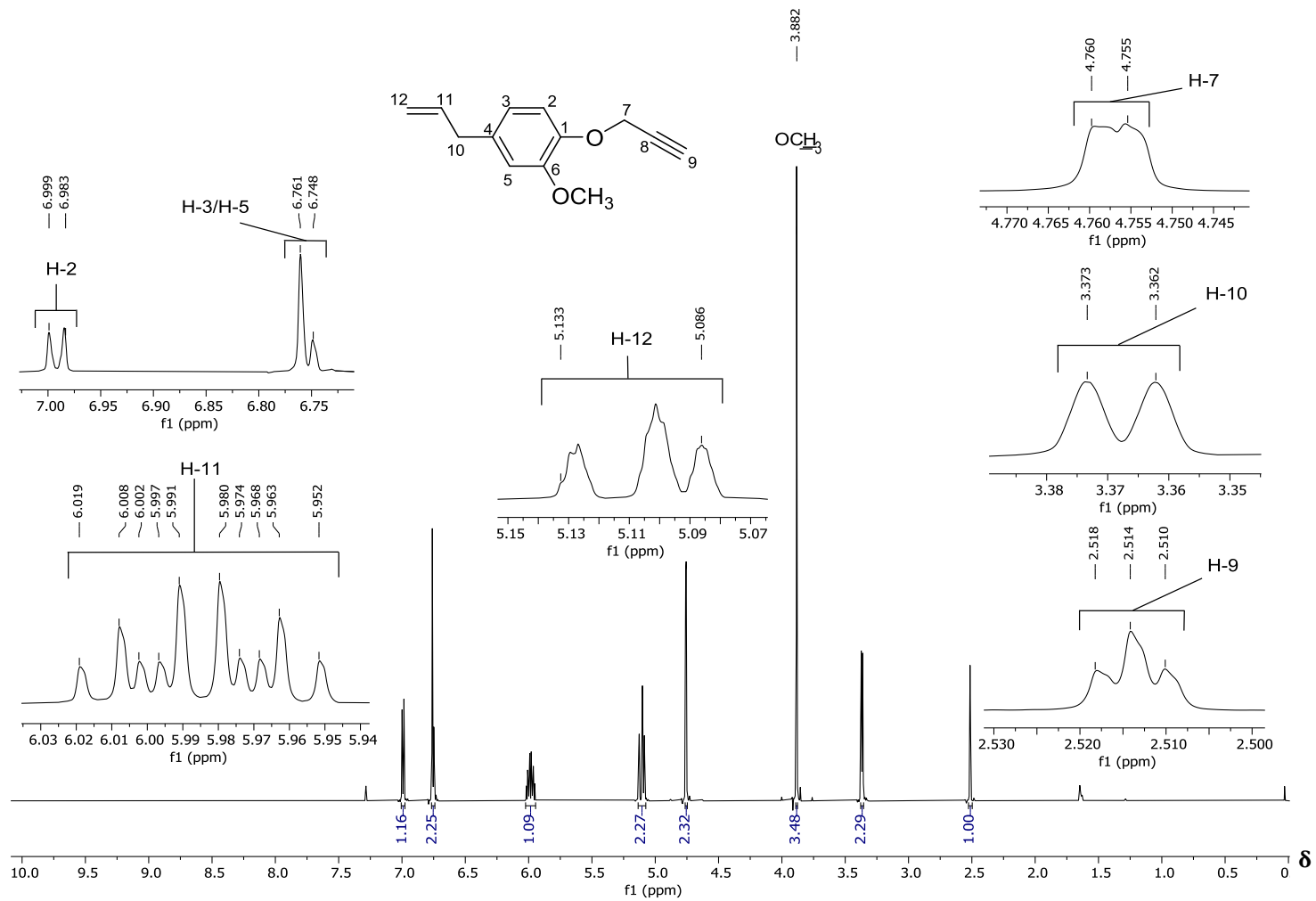


Figura 11 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

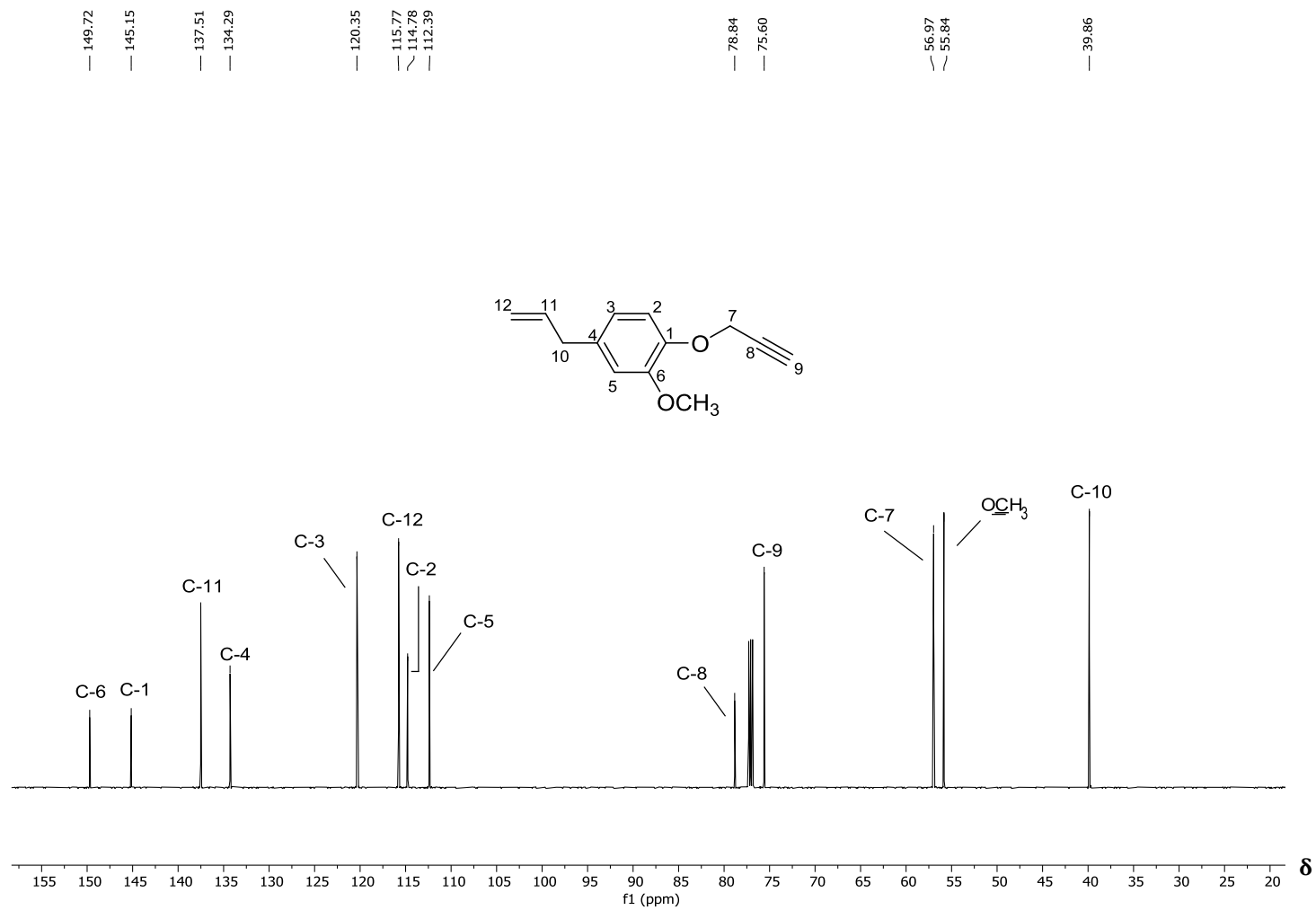


Figura 12 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **2e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

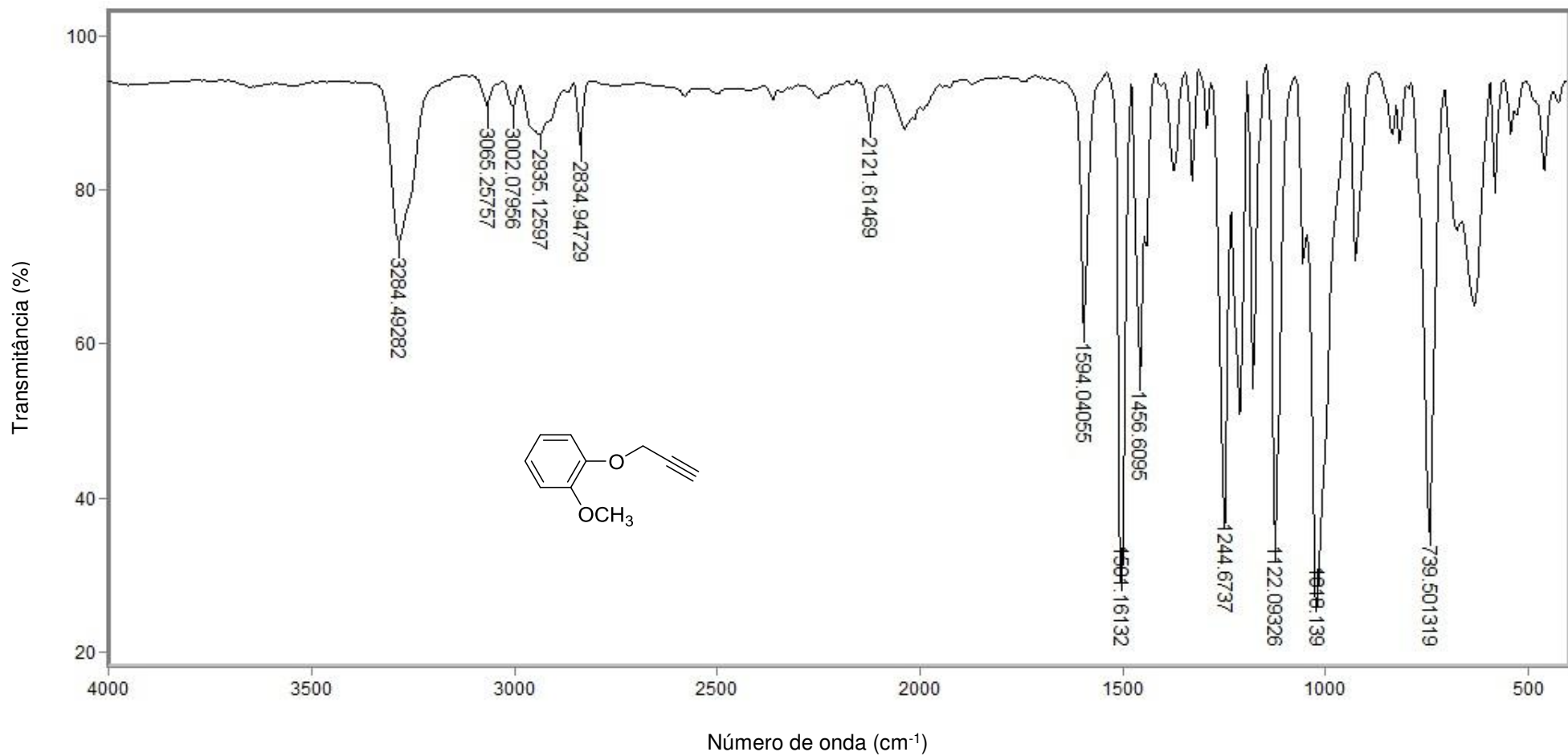


Figura 13 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

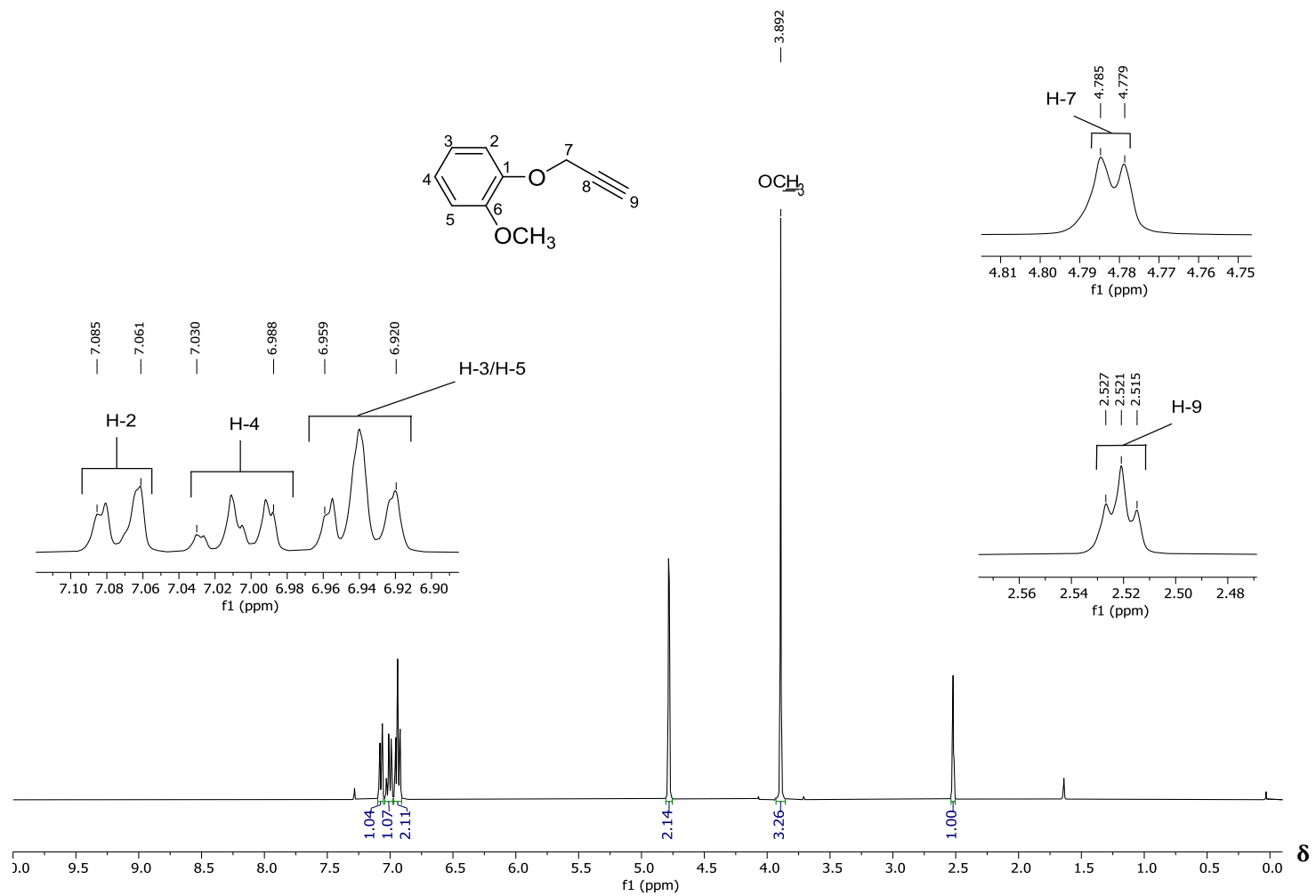


Figura 14 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

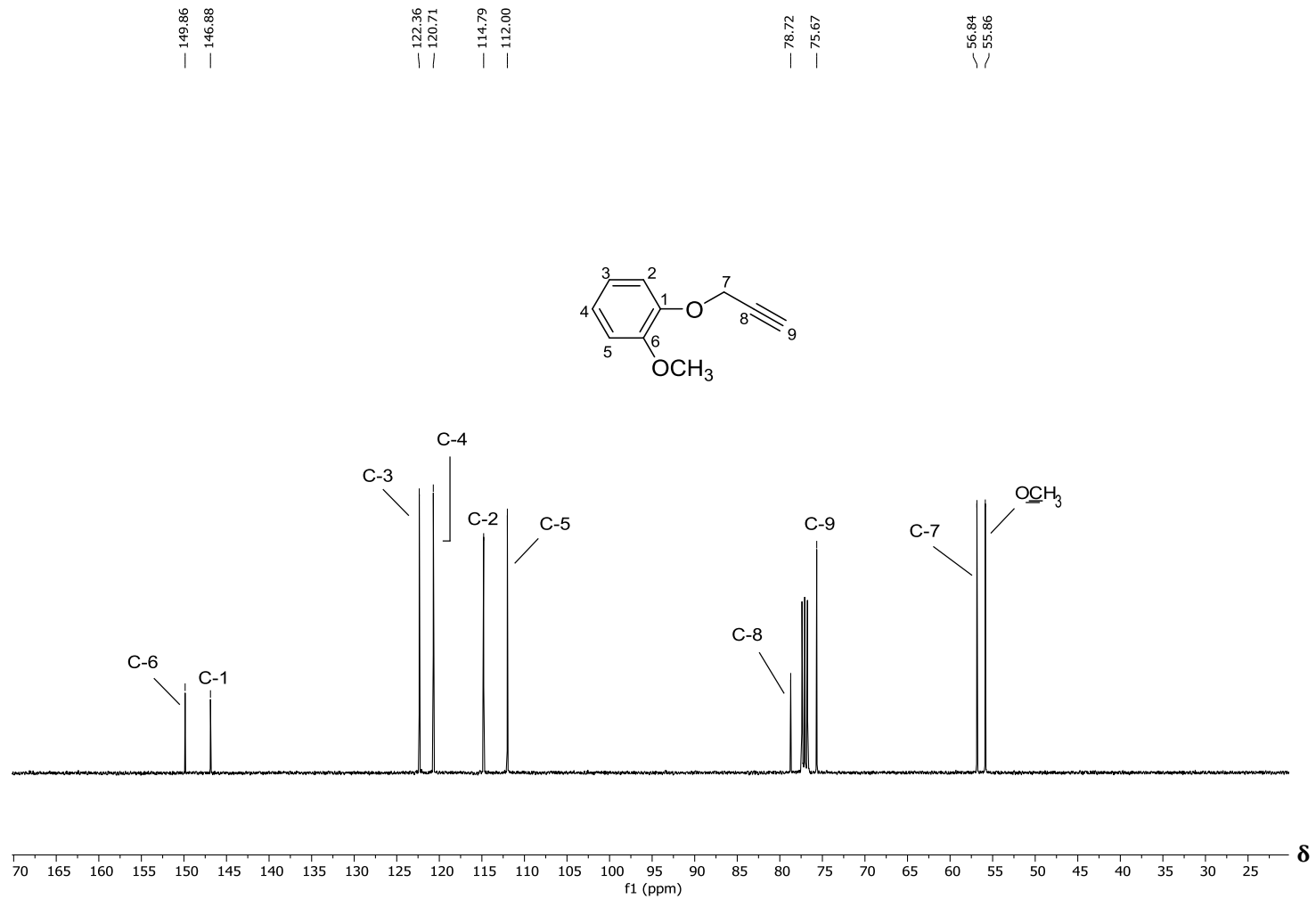


Figura 15 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **2f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

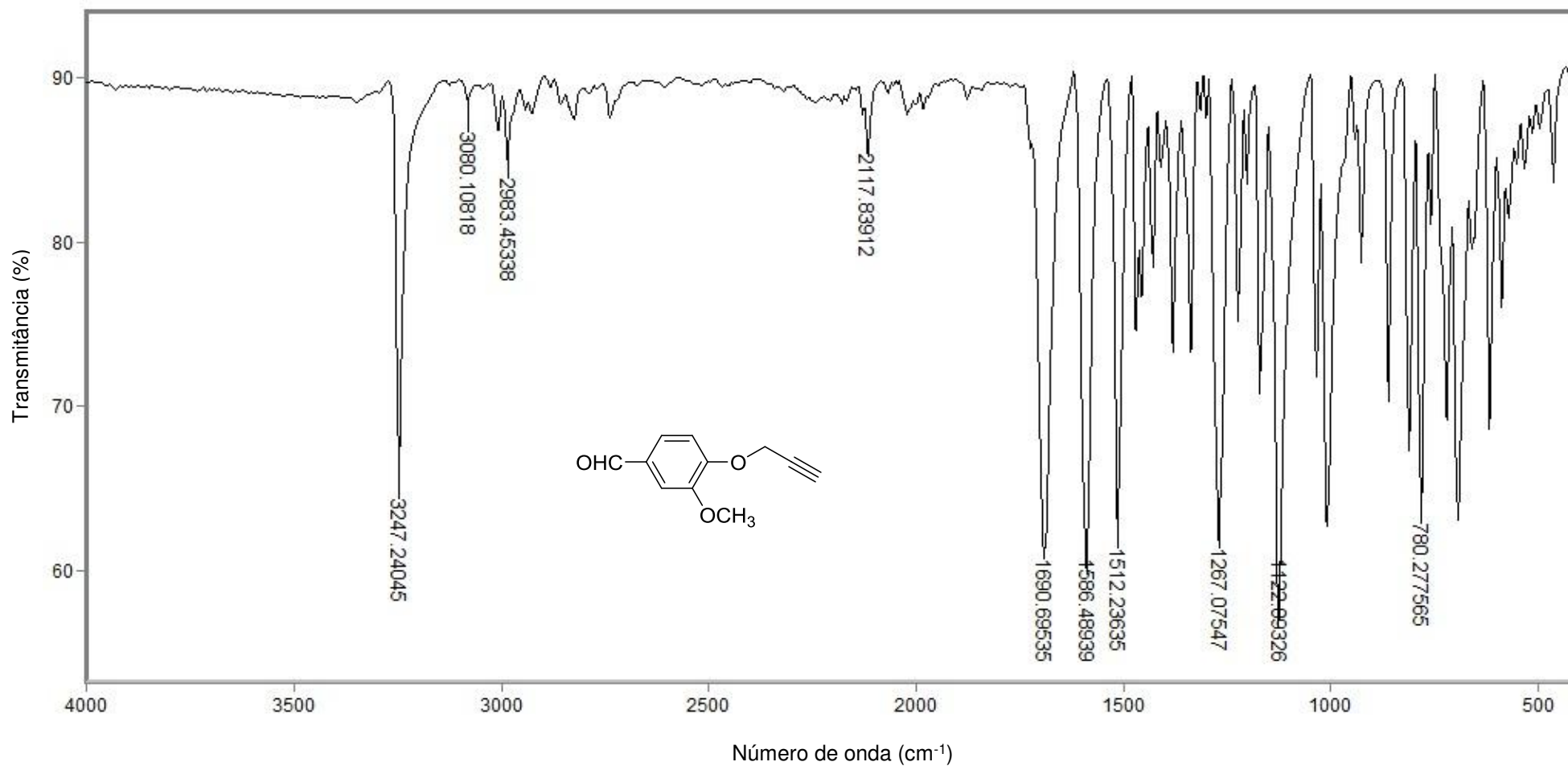


Figura 16 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

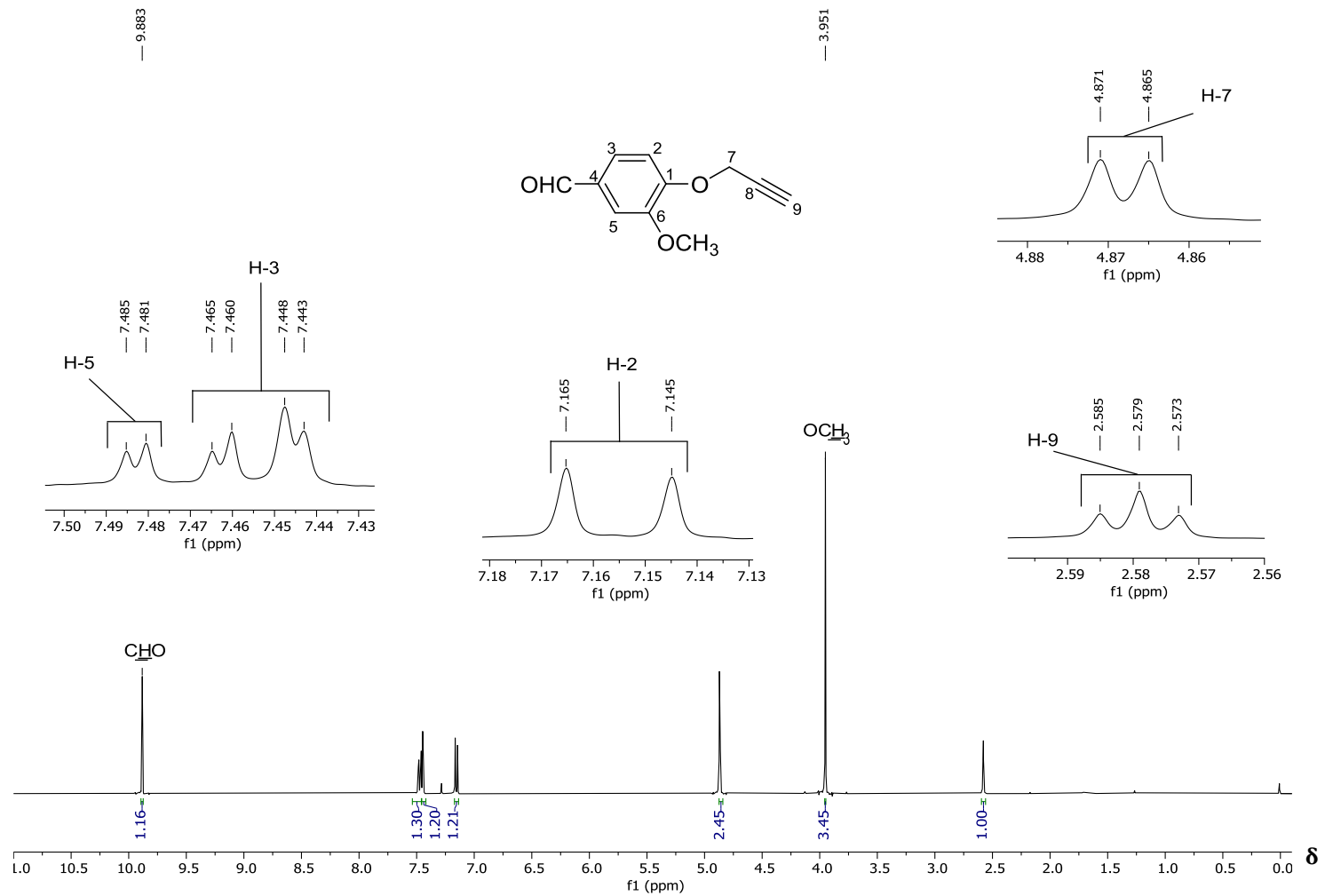


Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **2g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

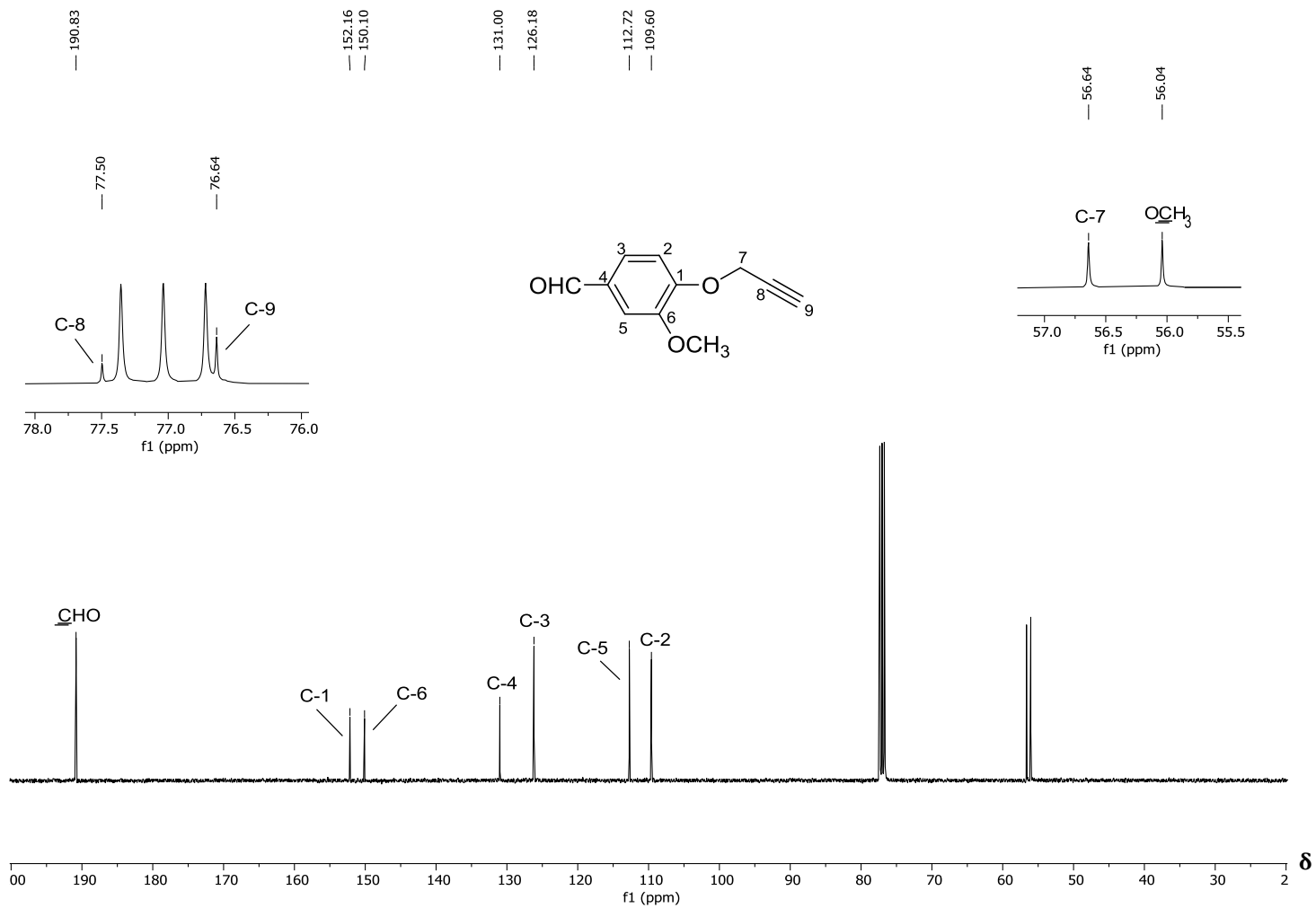


Figura 18 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

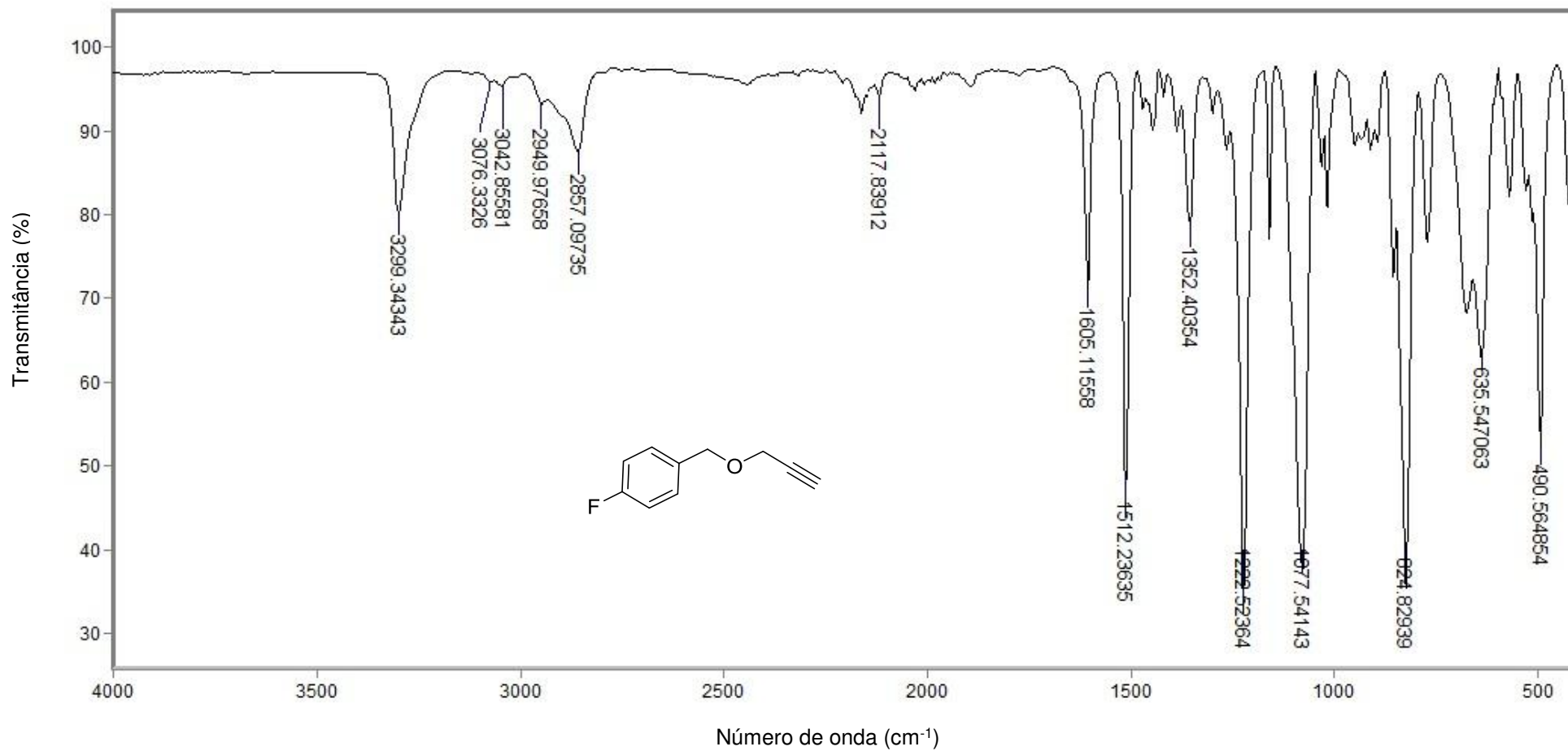


Figura 19 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

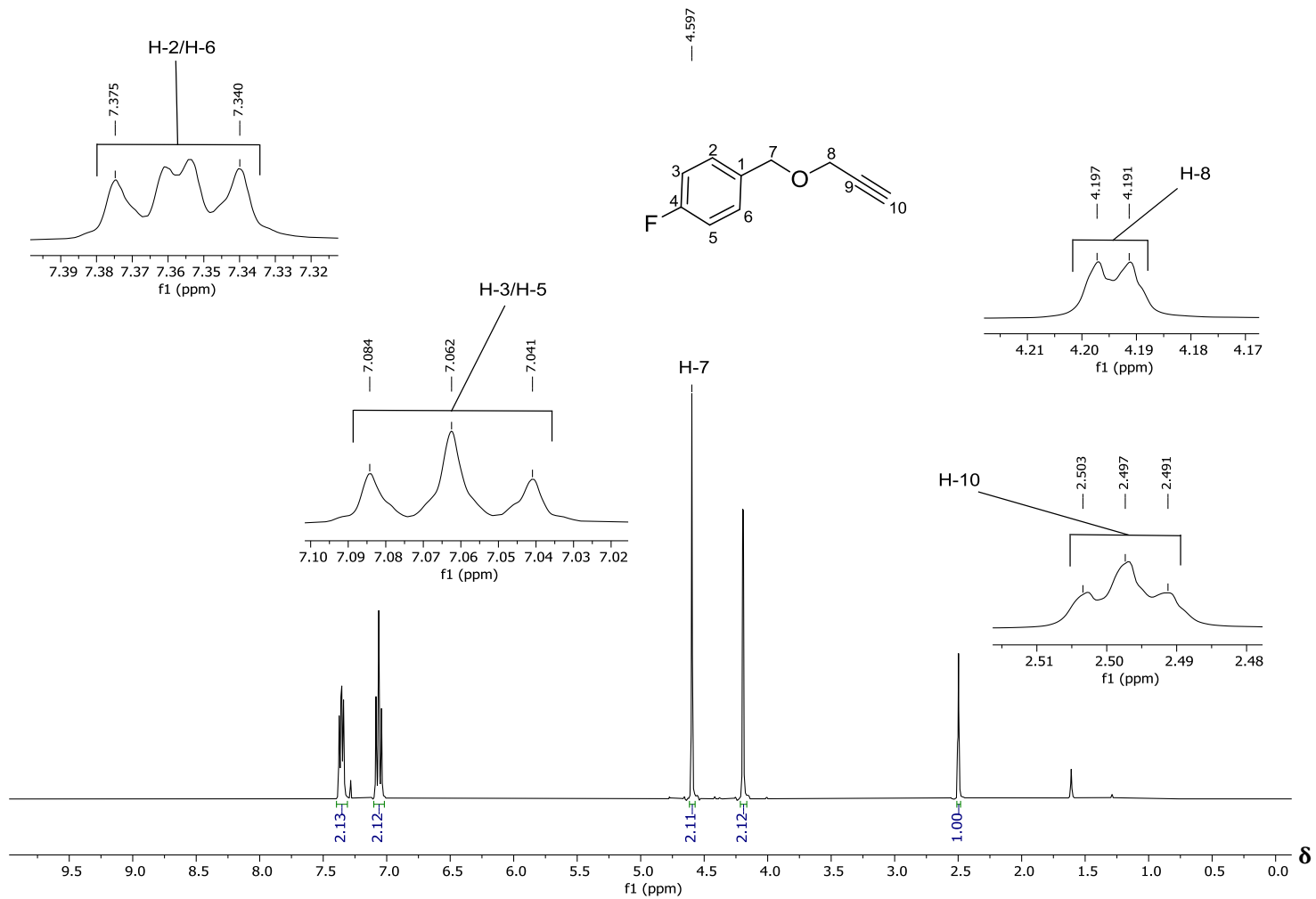


Figura 20 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

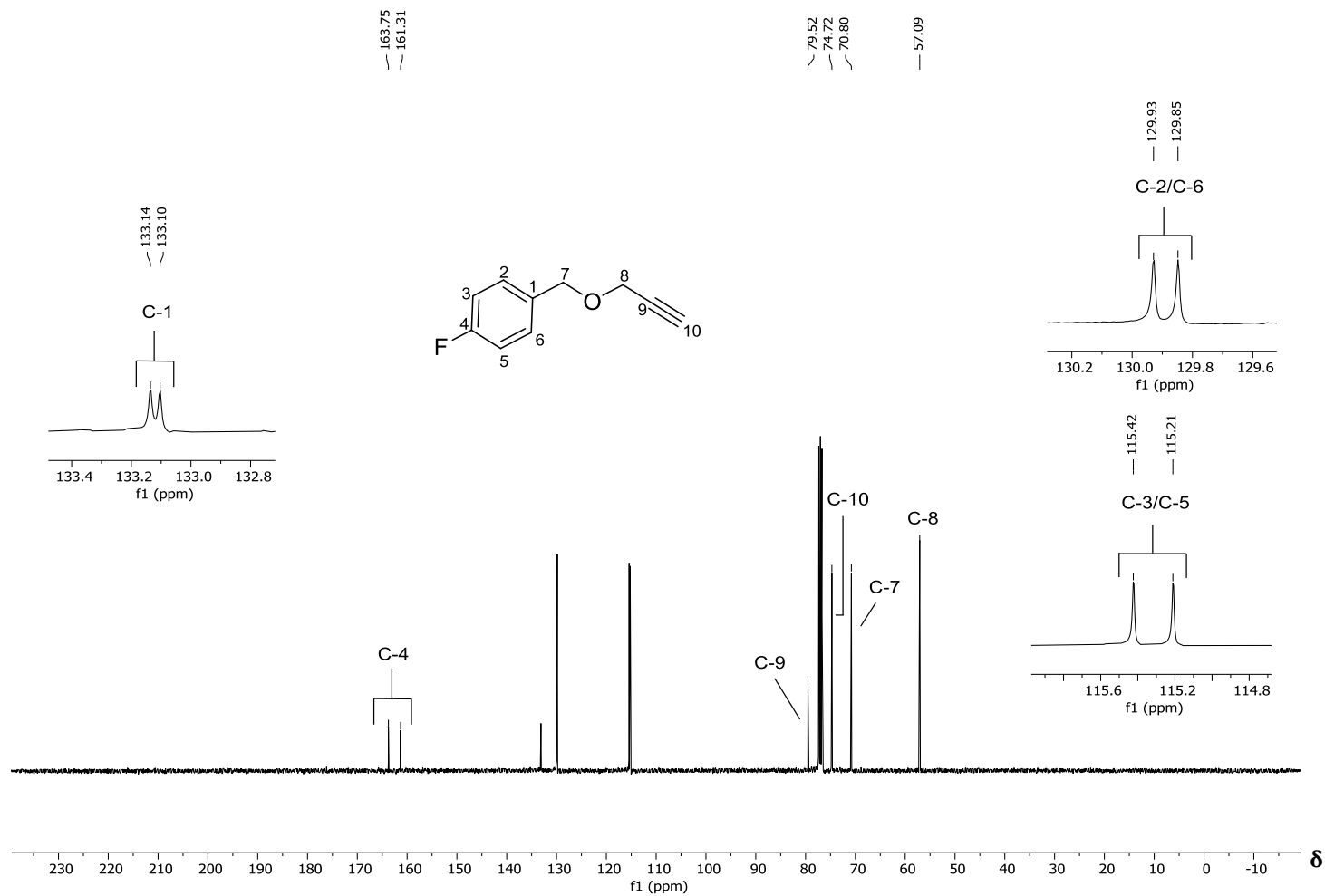


Figura 21 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

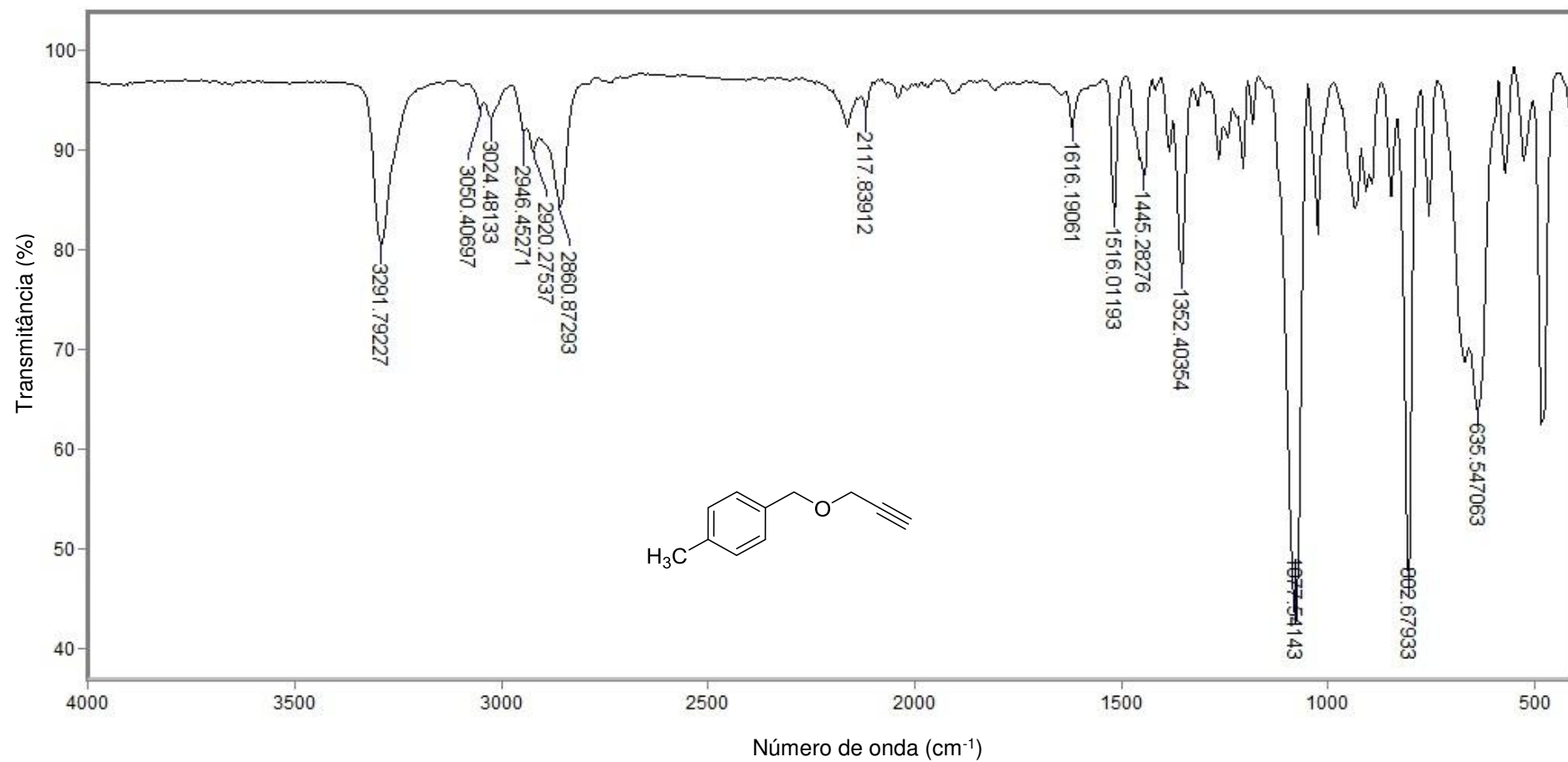


Figura 22 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

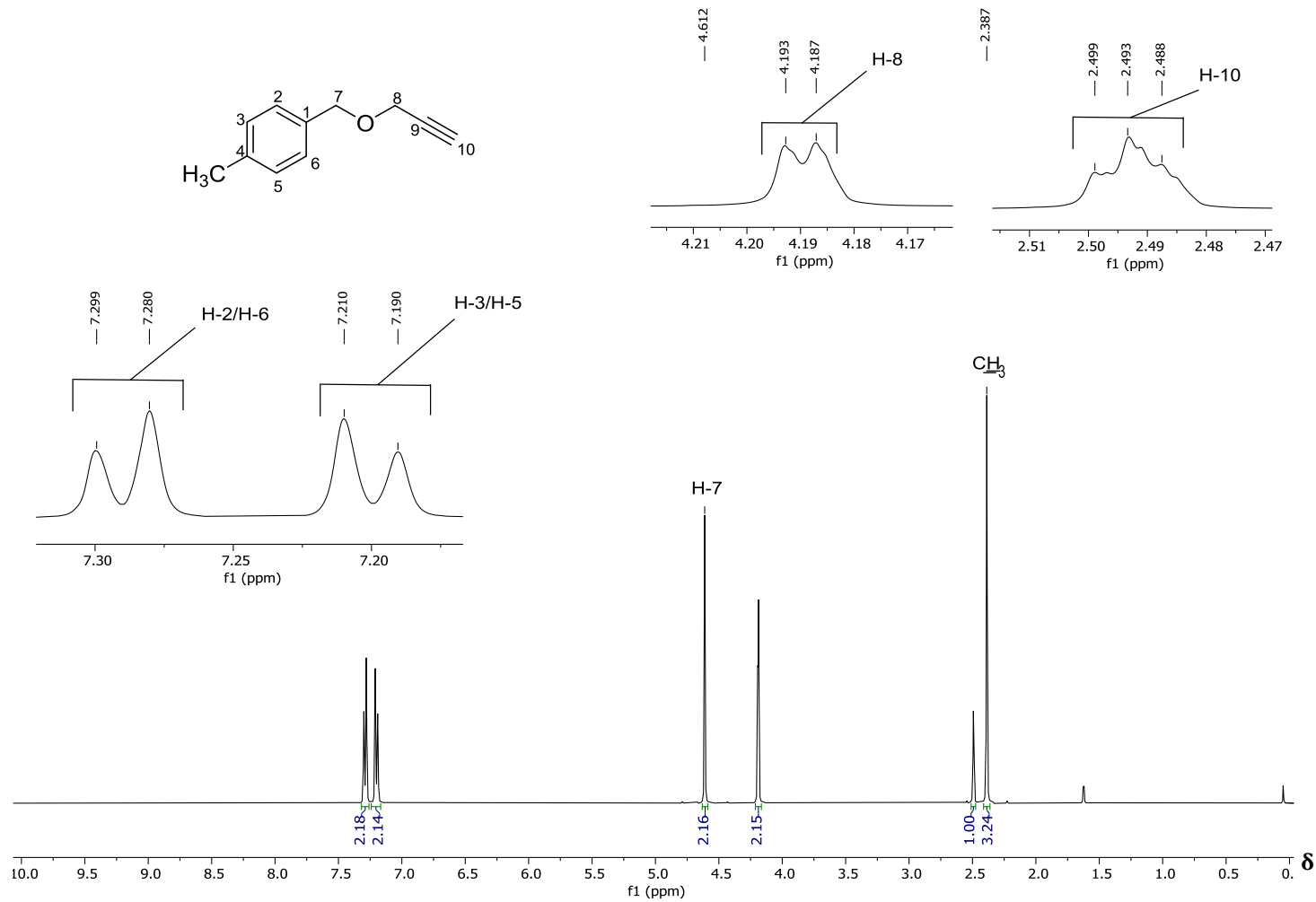


Figura 23 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

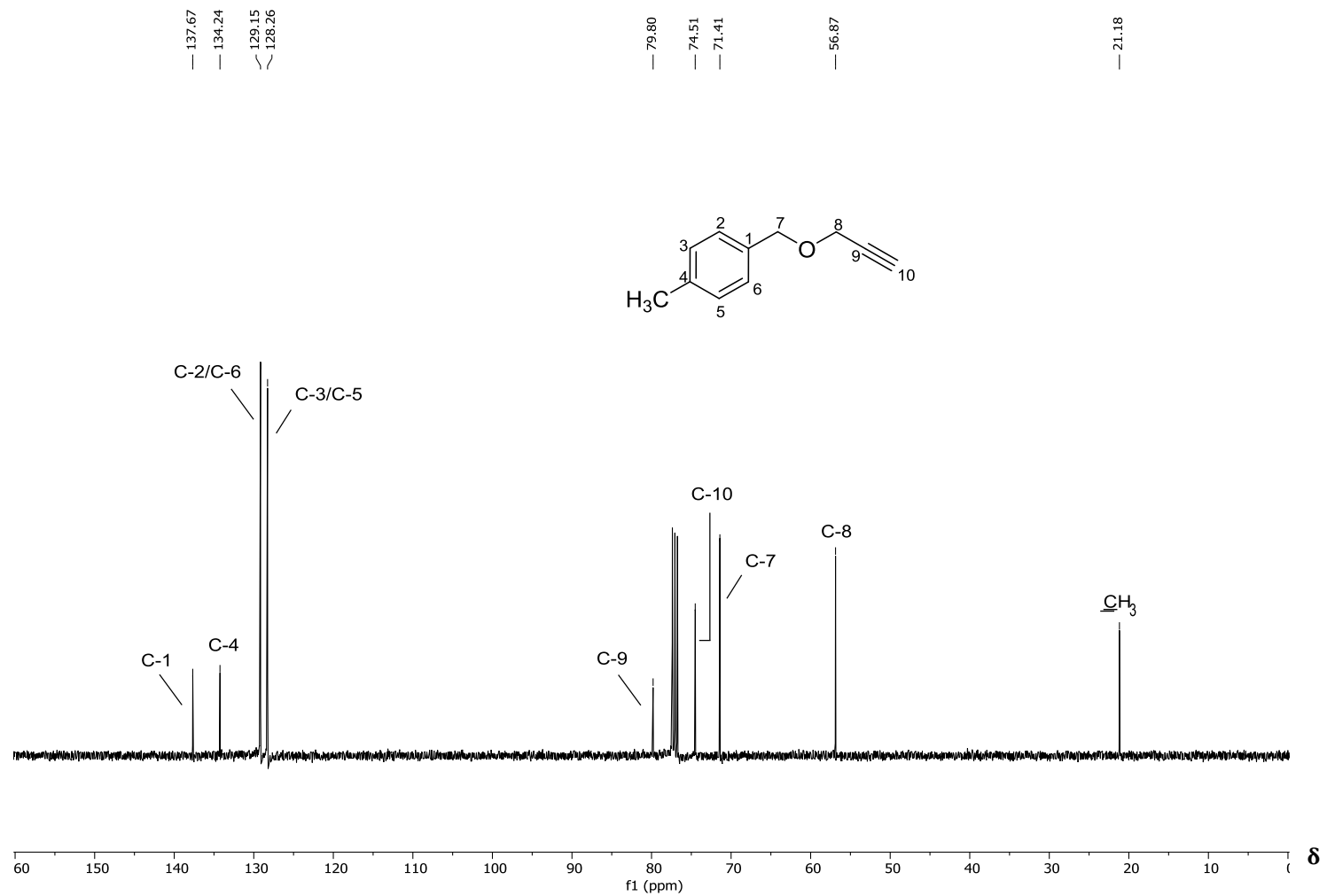


Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **2i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

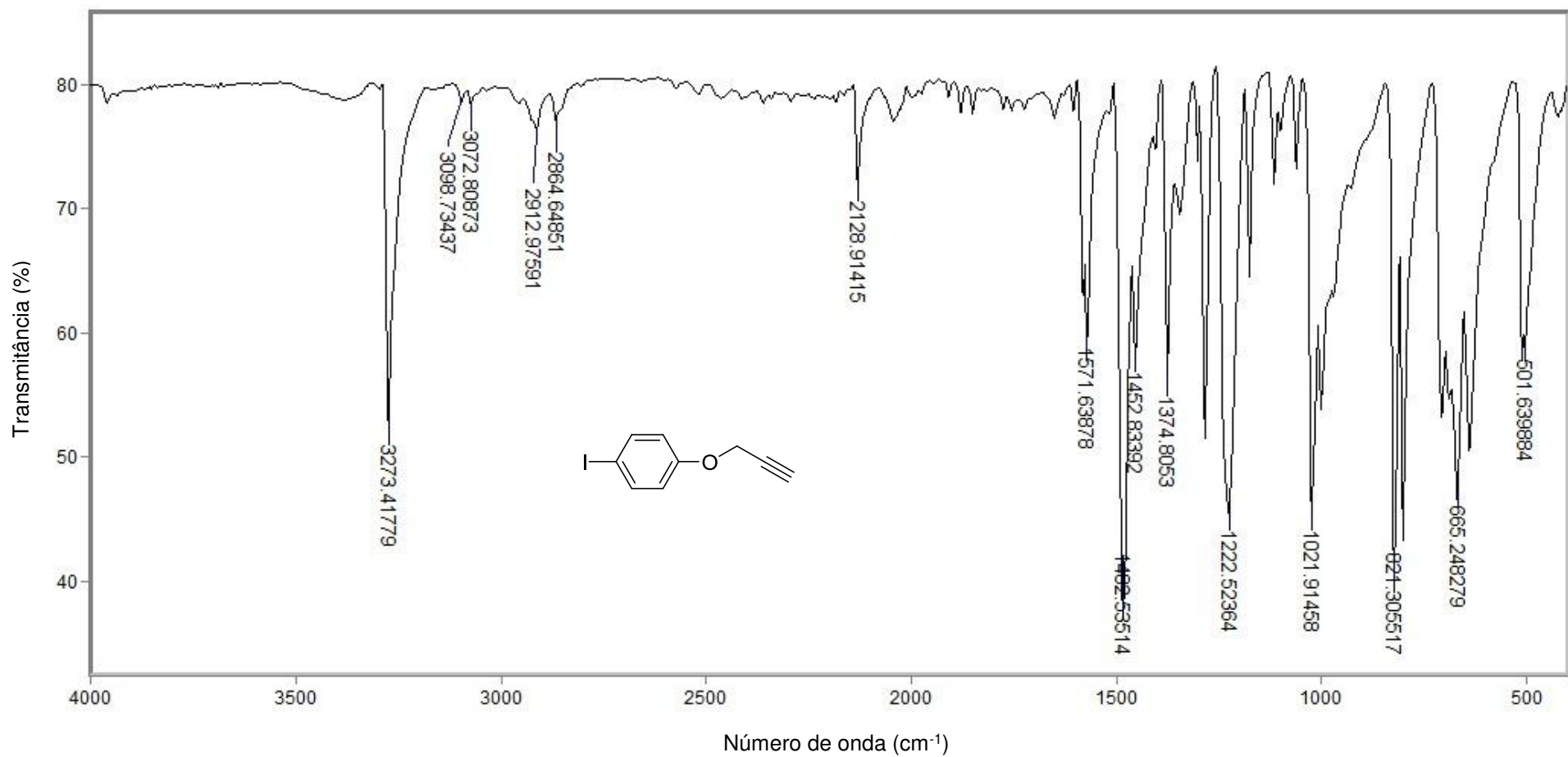


Figura 25 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **2j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

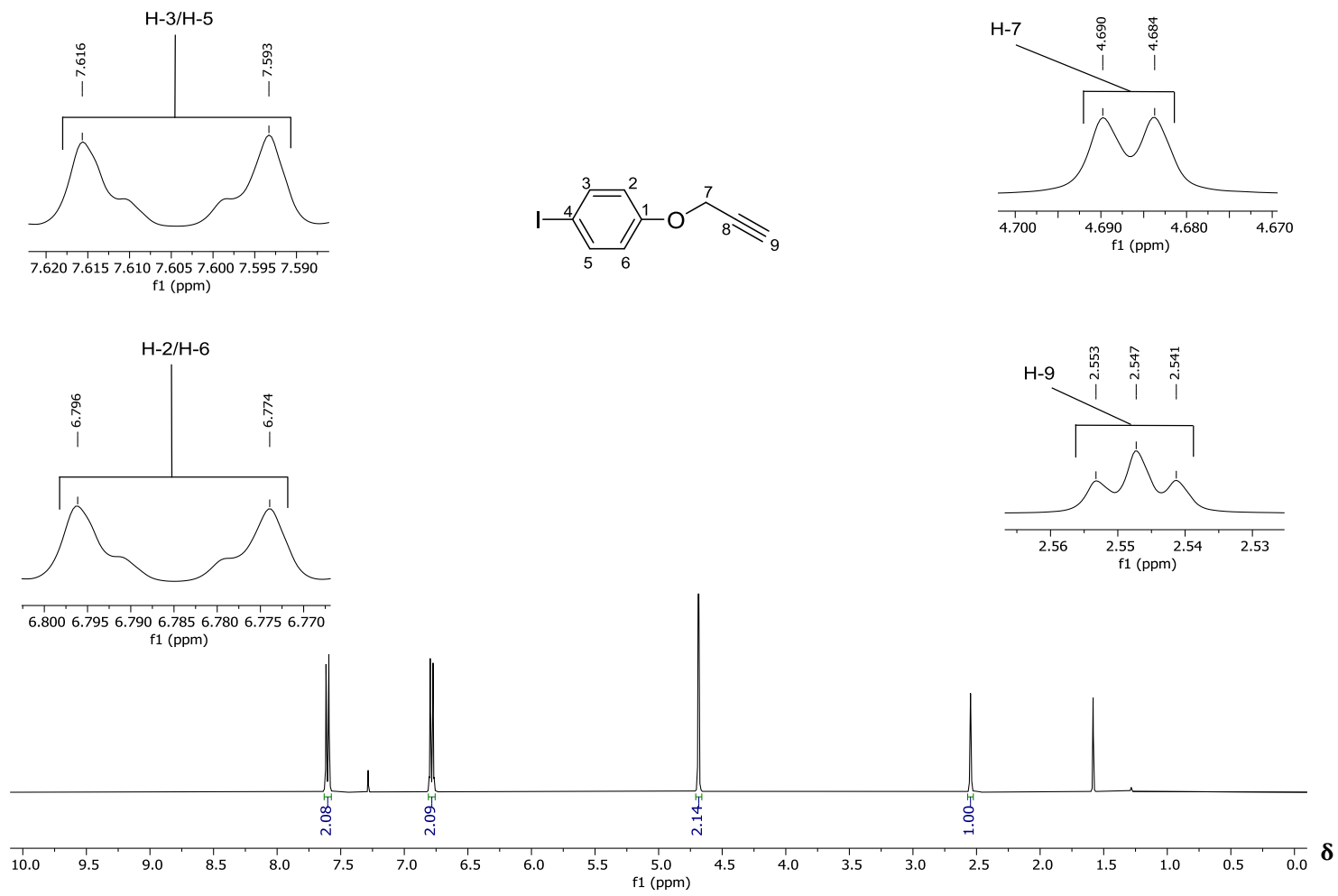


Figura 26 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **2j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

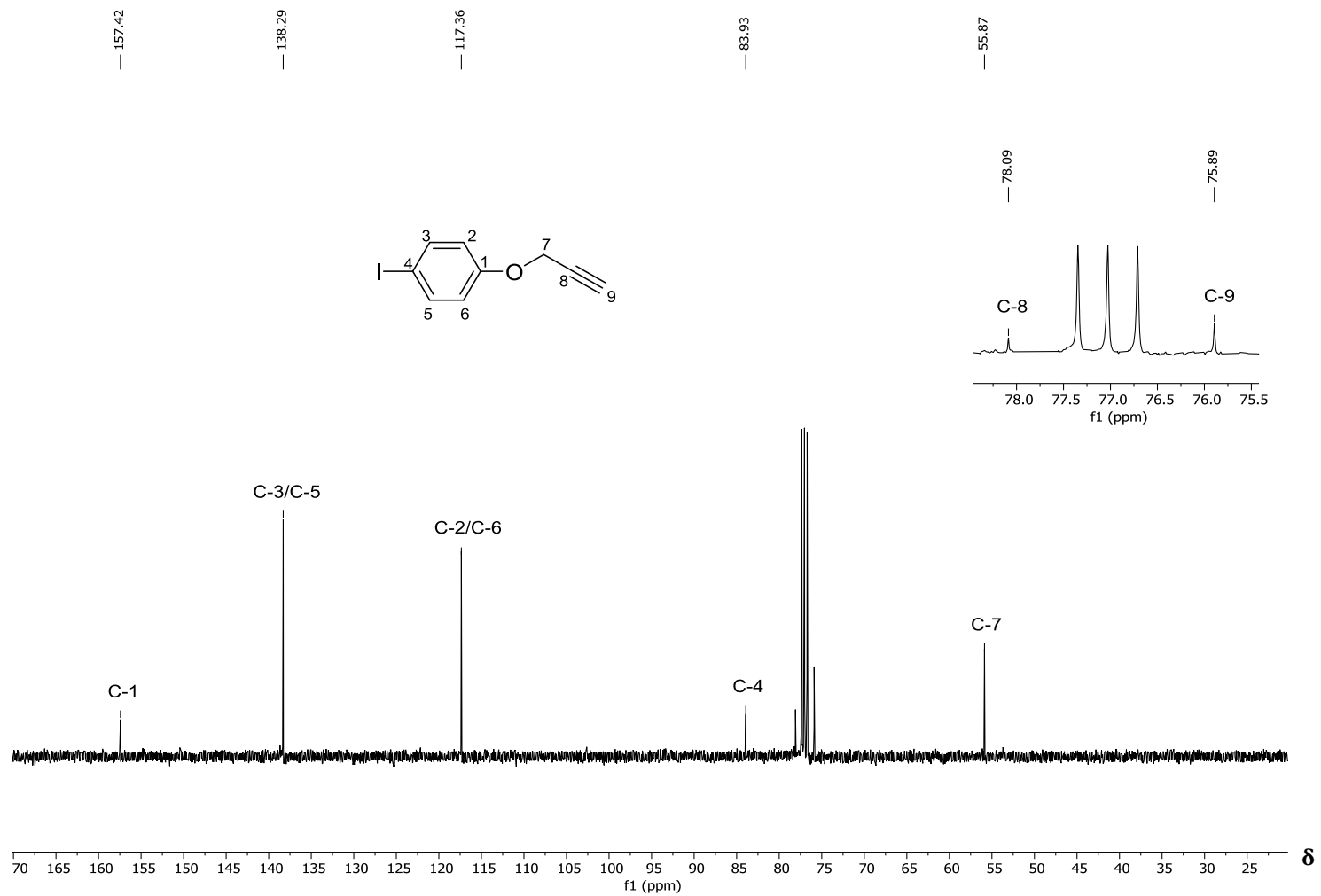


Figura 27 - Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **2j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

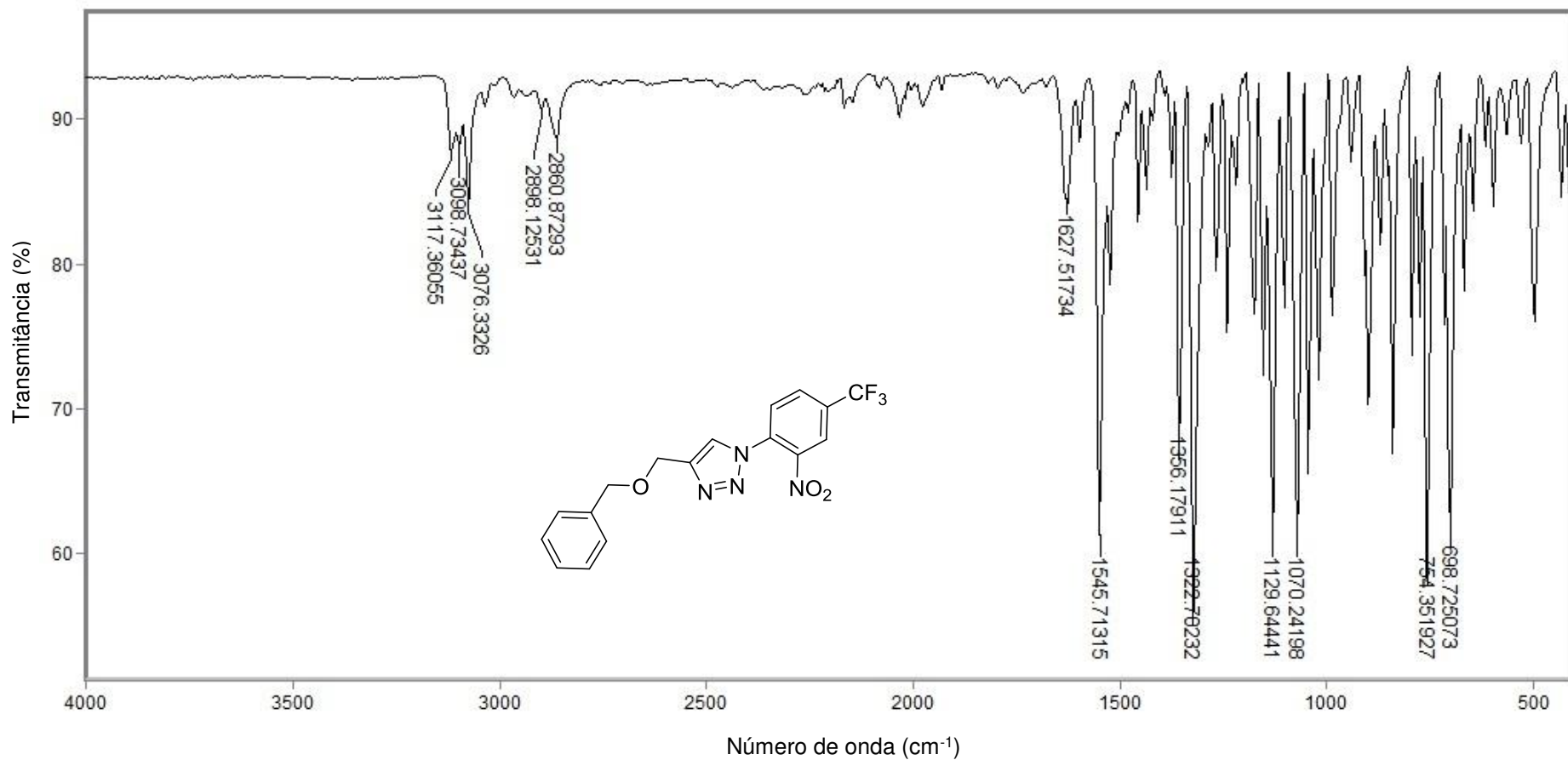


Figura 28 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

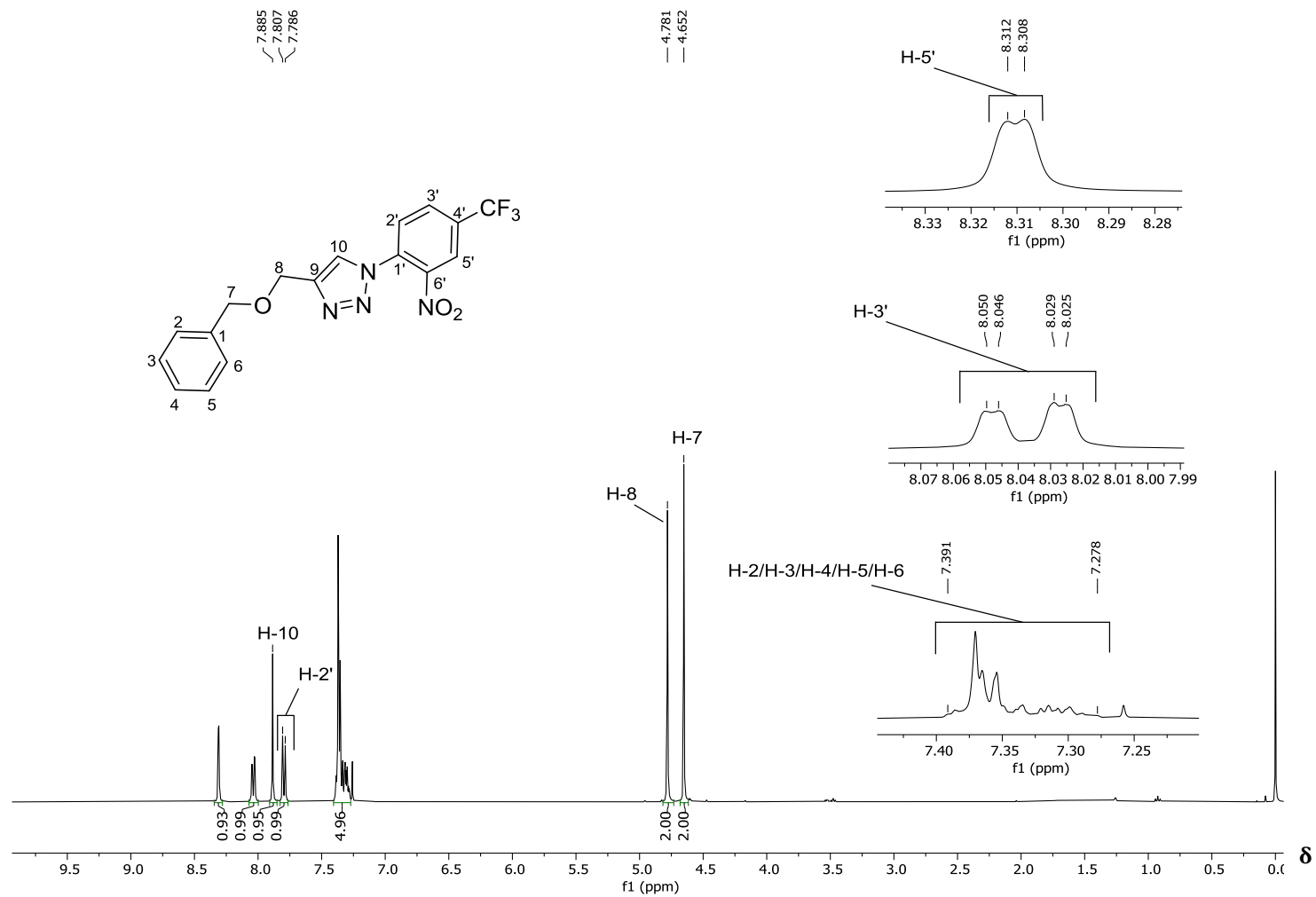


Figura 29 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

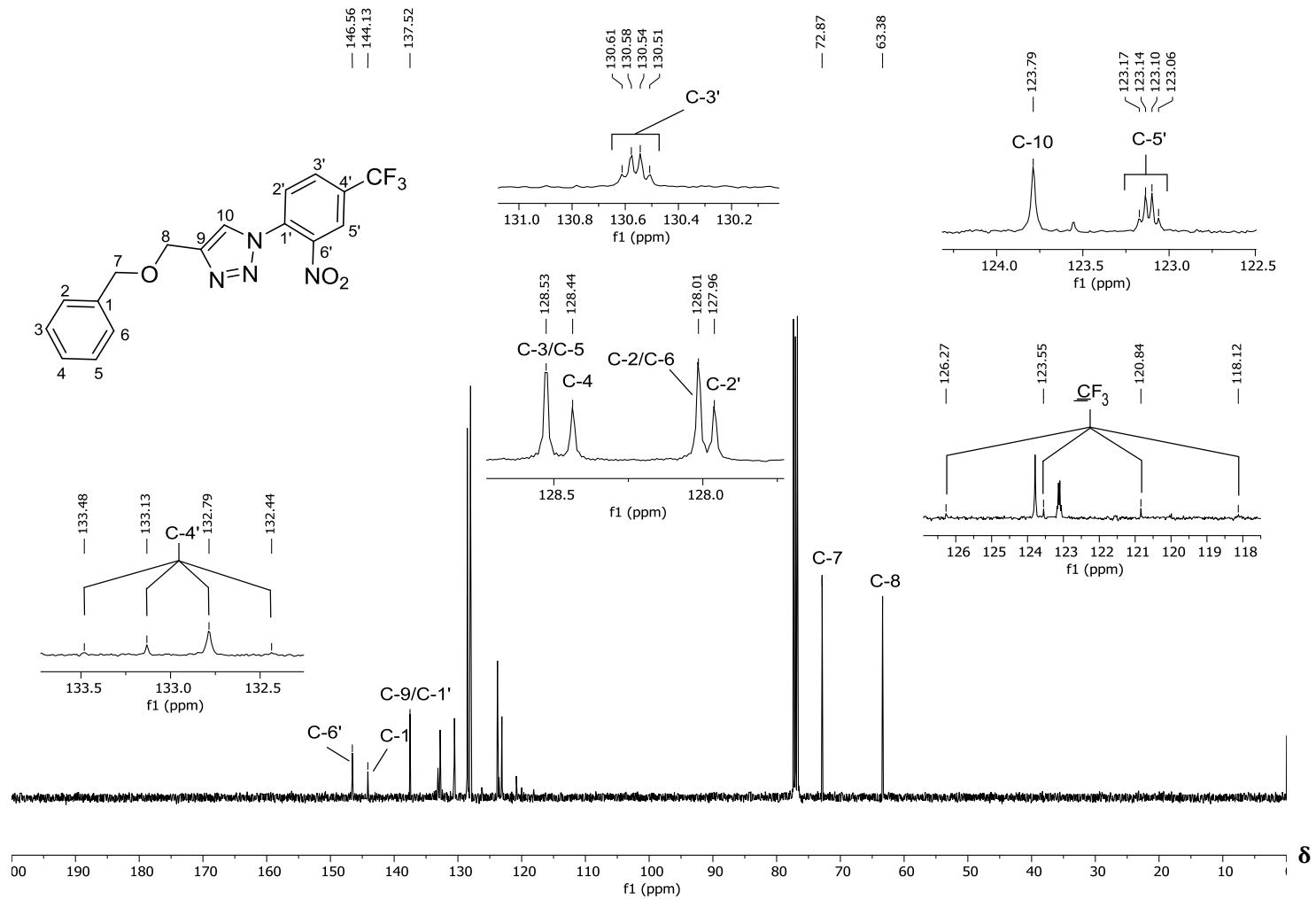


Figura 30 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **3b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

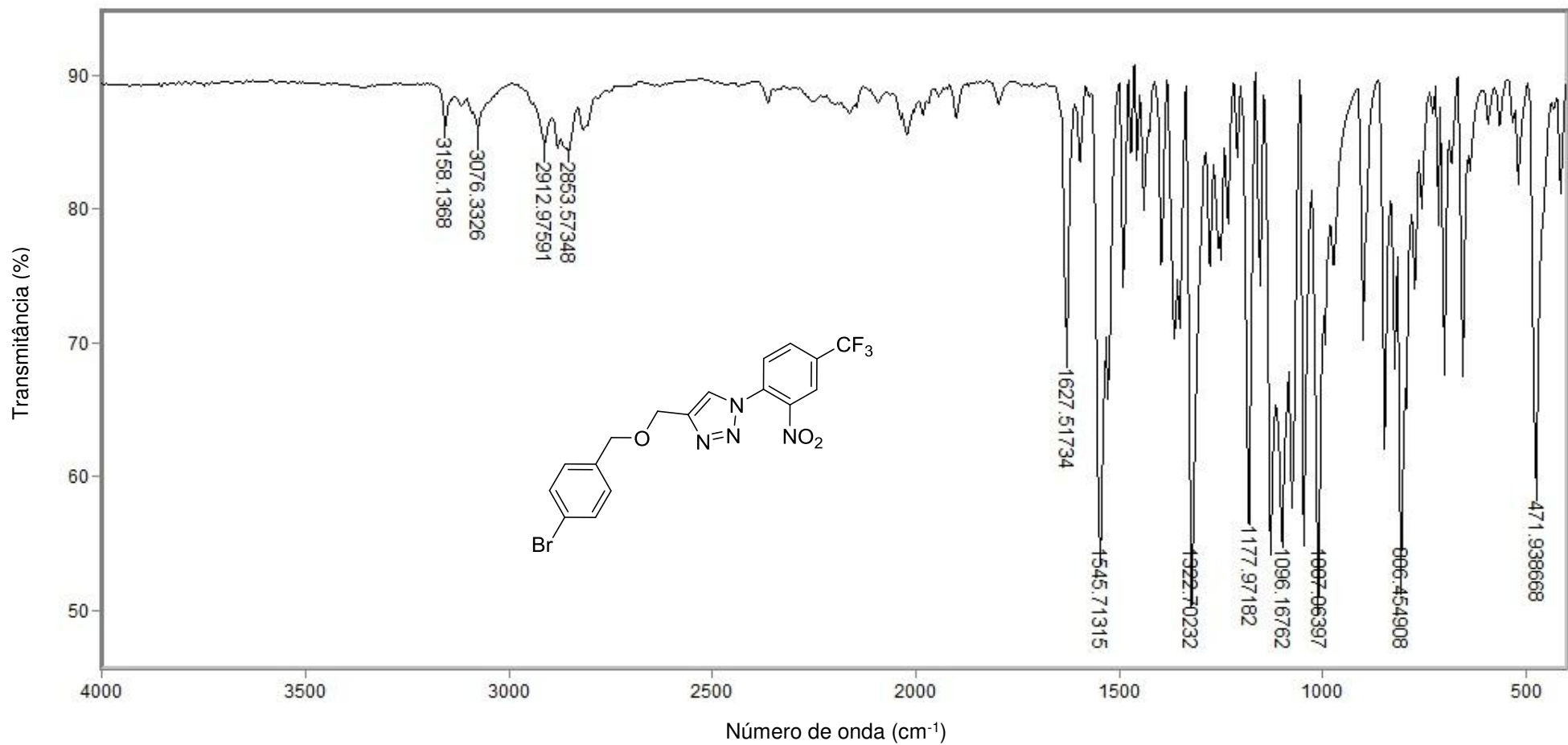


Figura 31 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

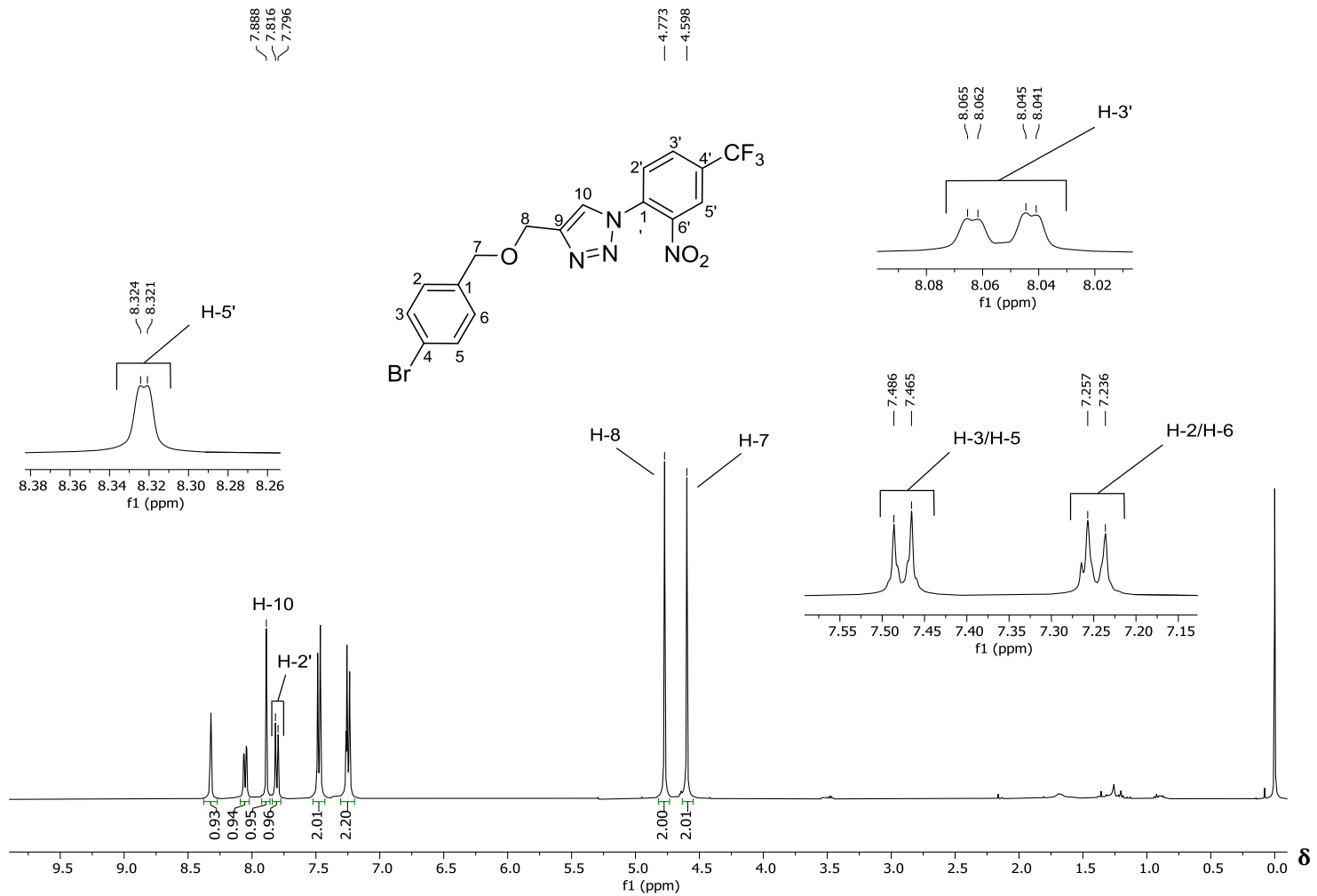


Figura 32 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **3c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

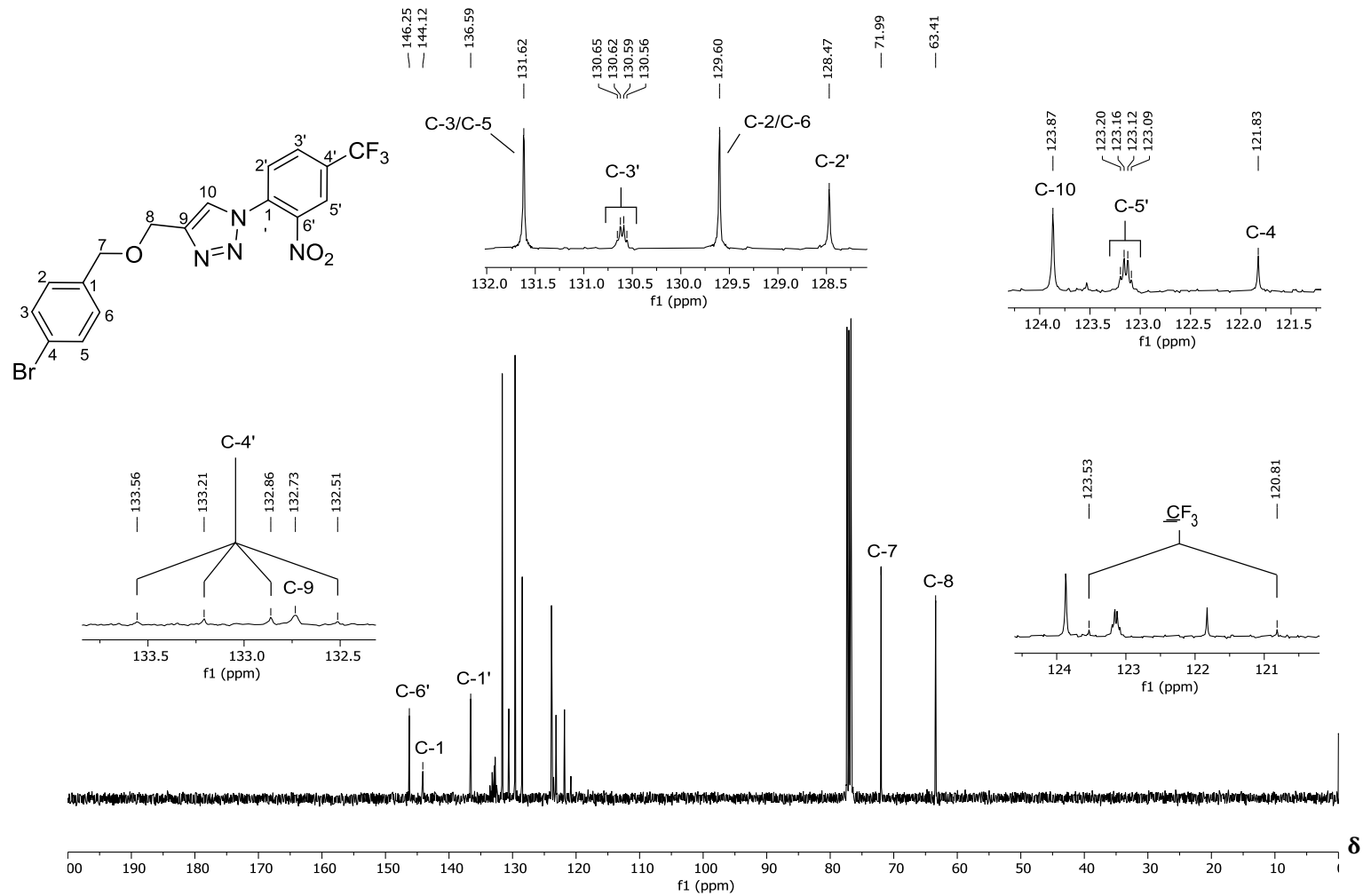


Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

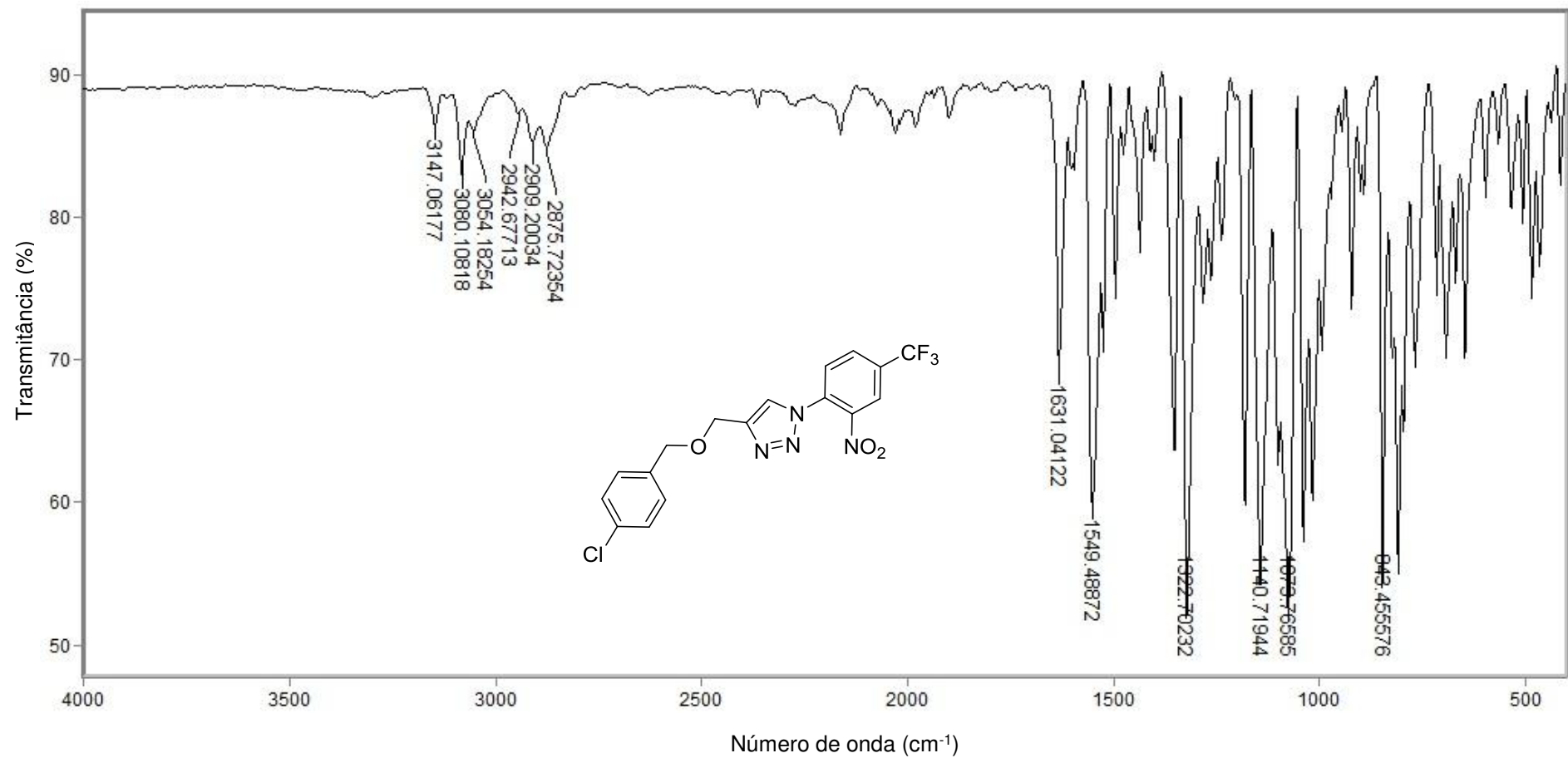


Figura 34 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

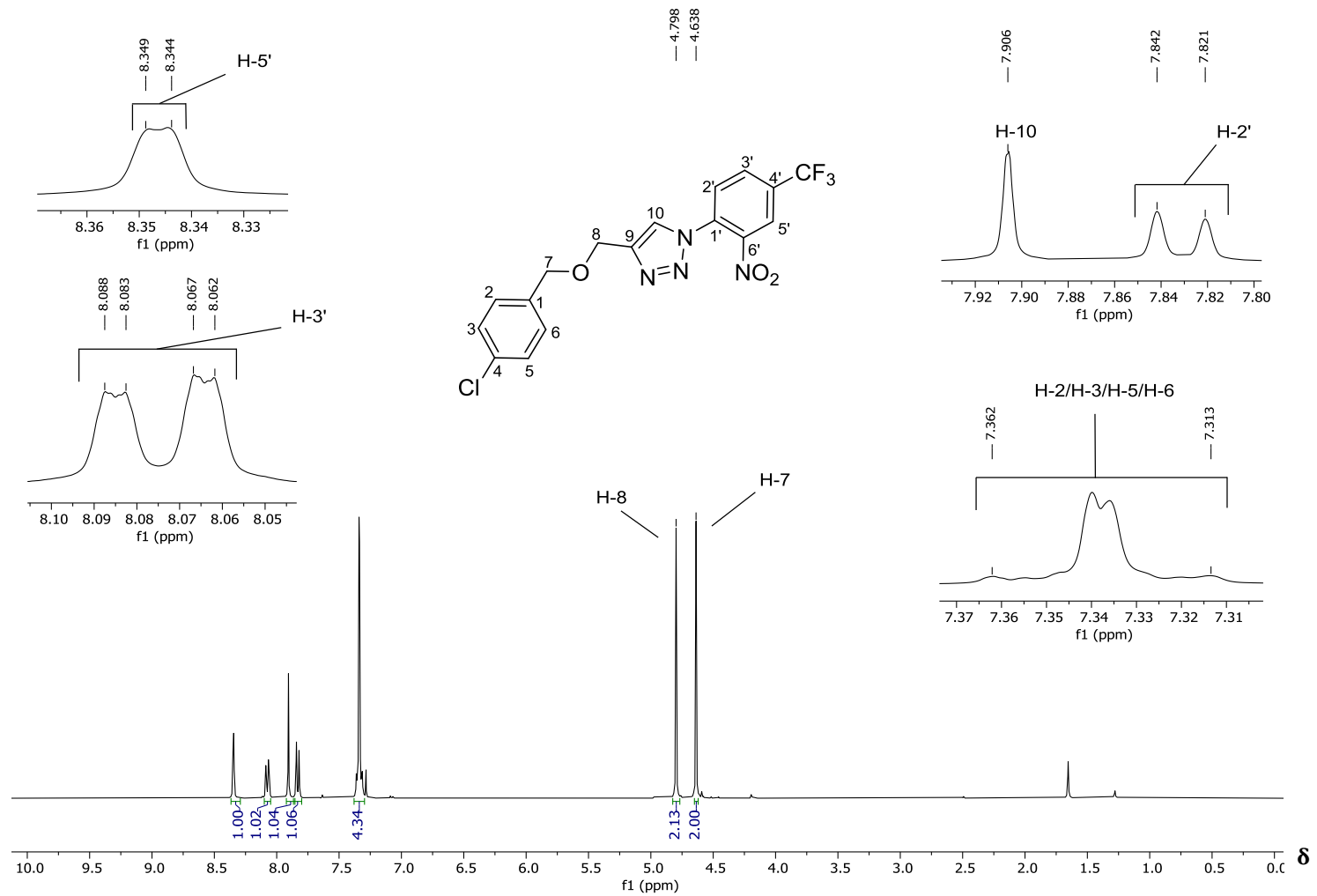


Figura 35 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

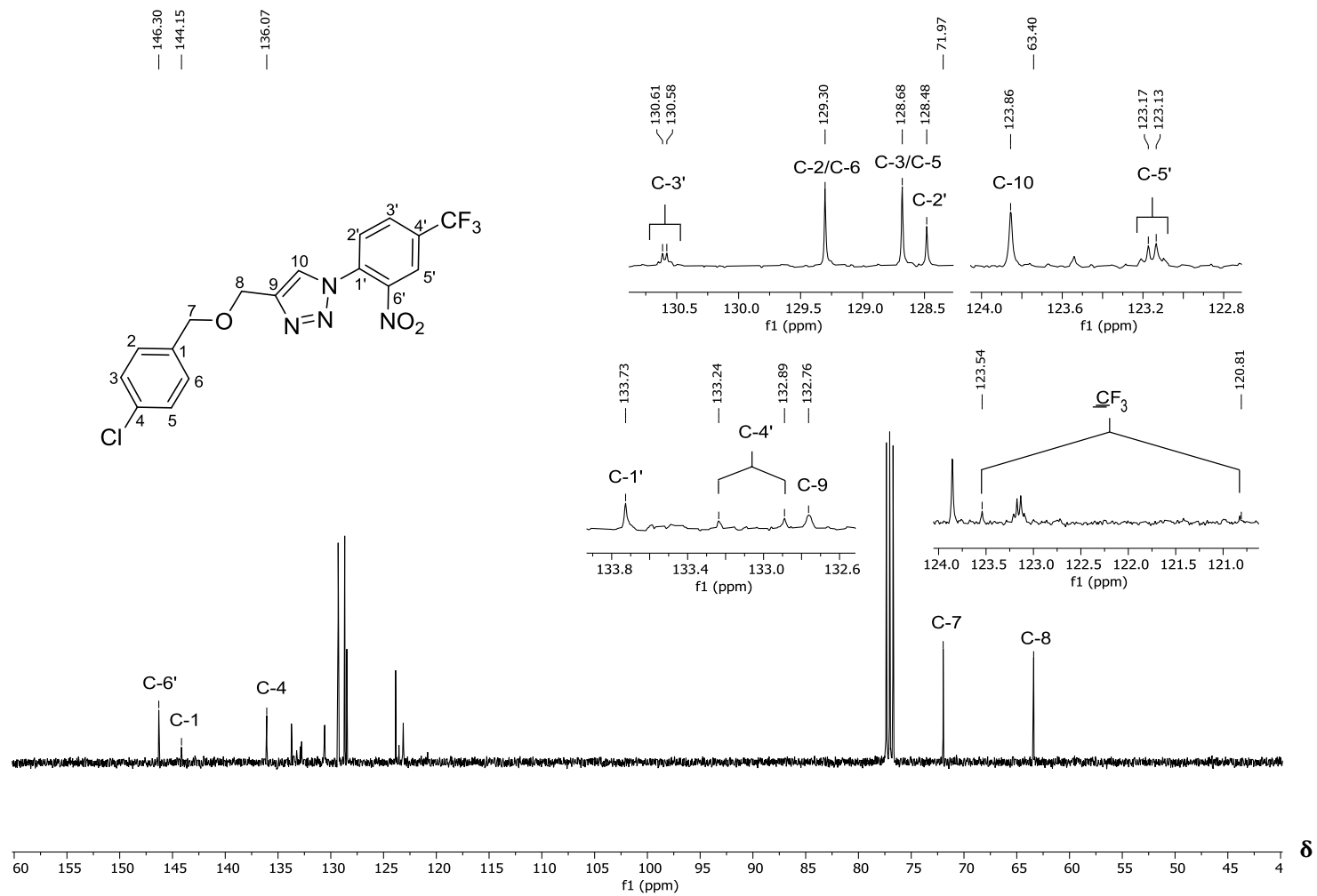


Figura 36 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **3d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

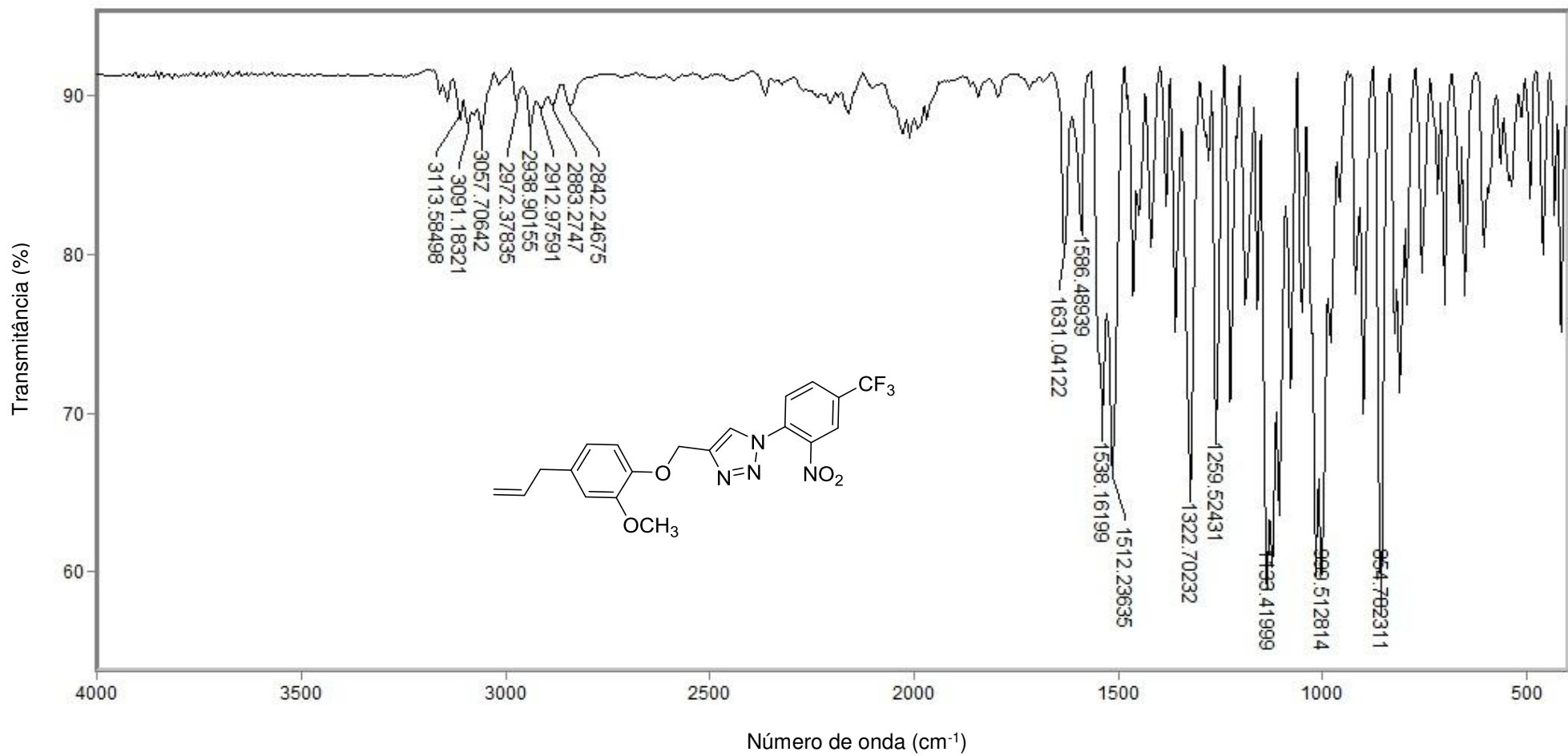


Figura 37 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

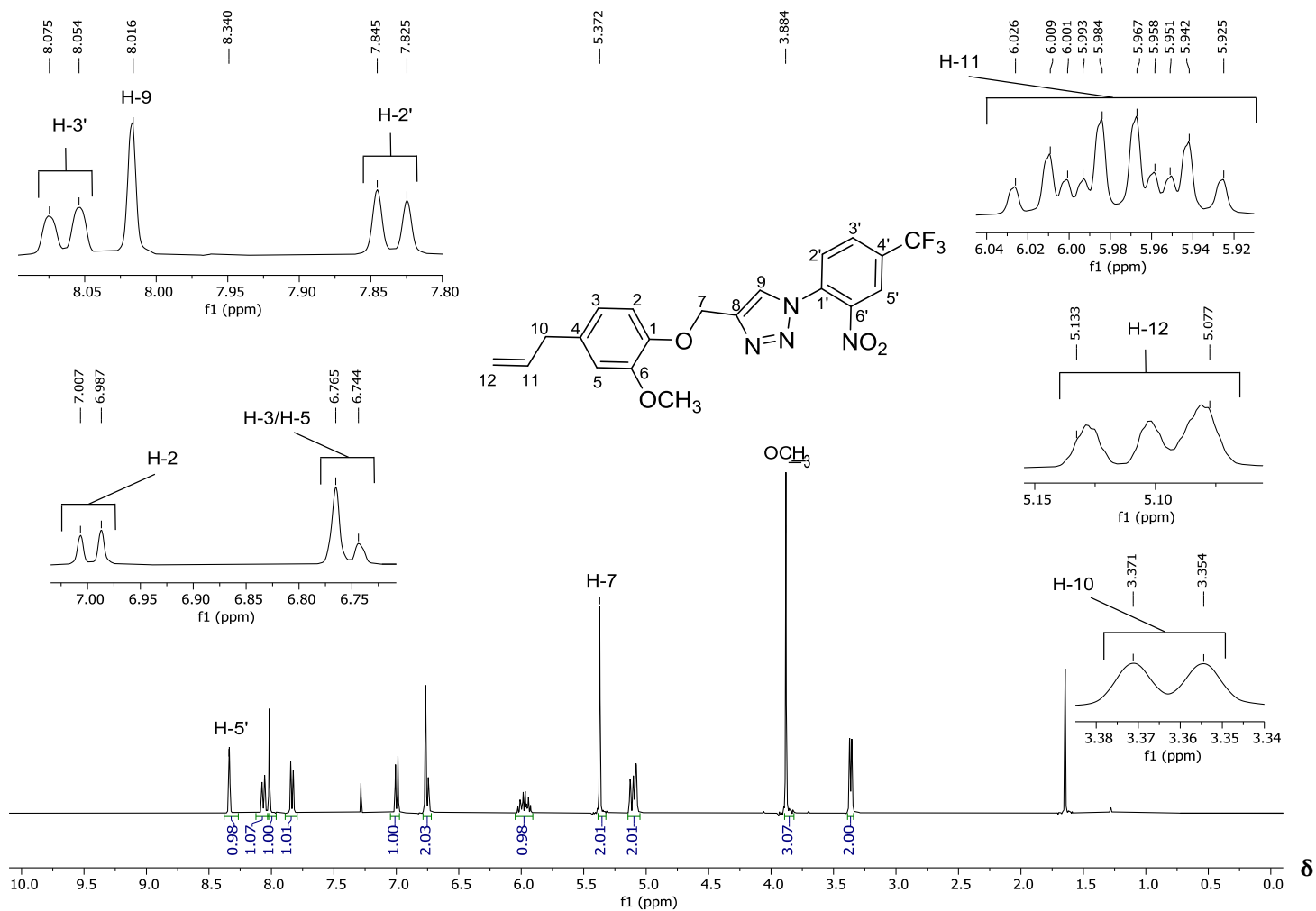


Figura 38 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

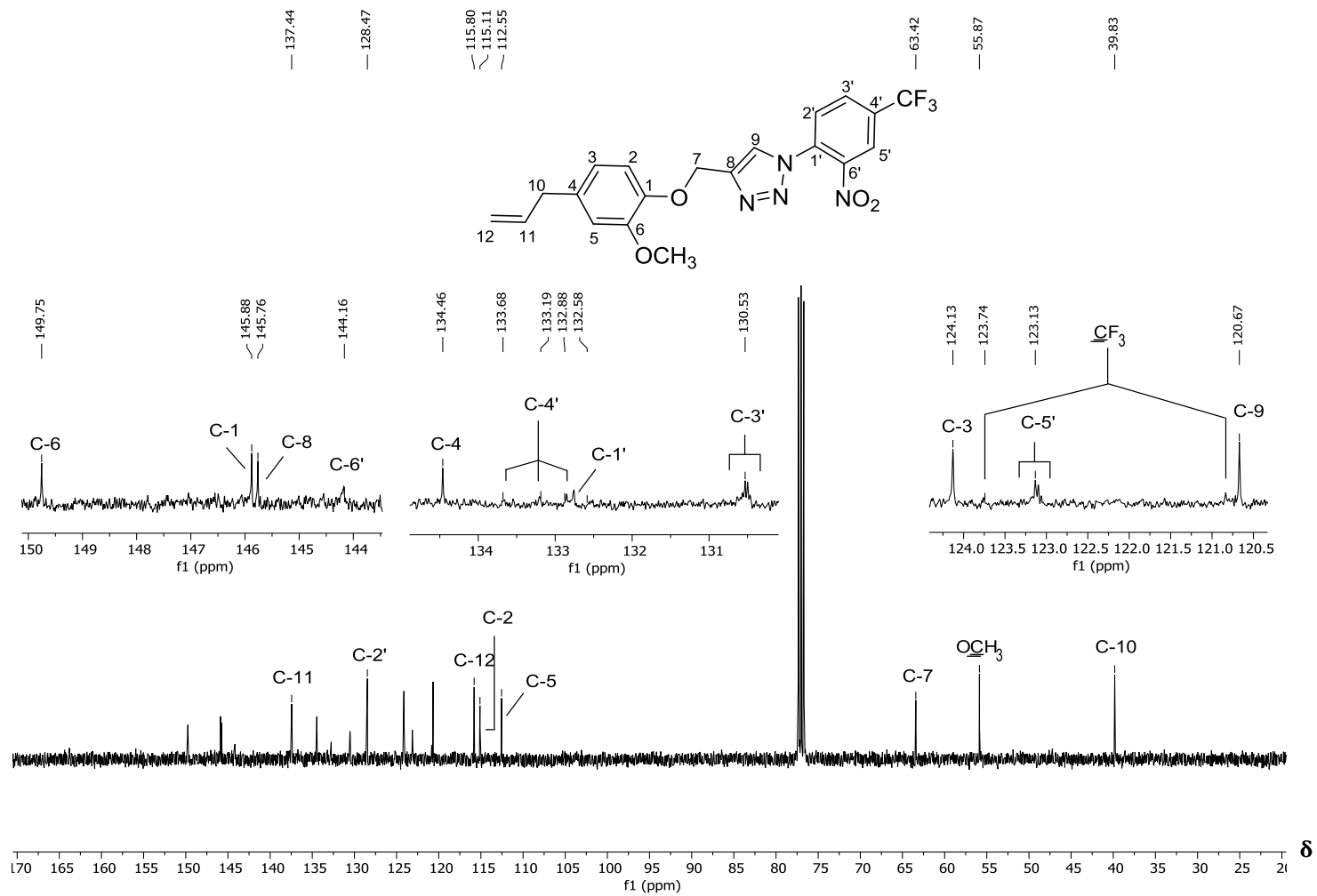


Figura 39 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

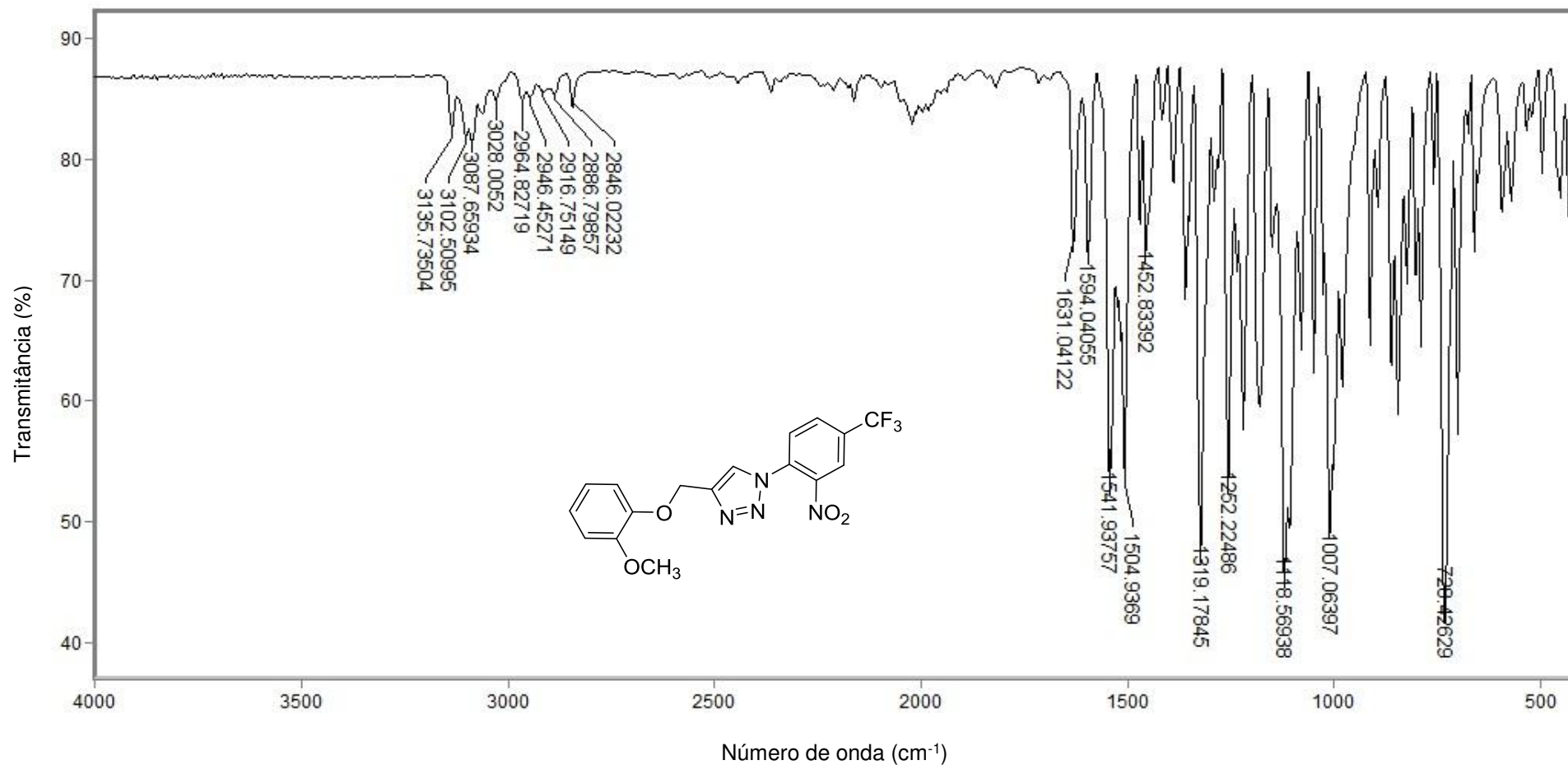


Figura 40 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

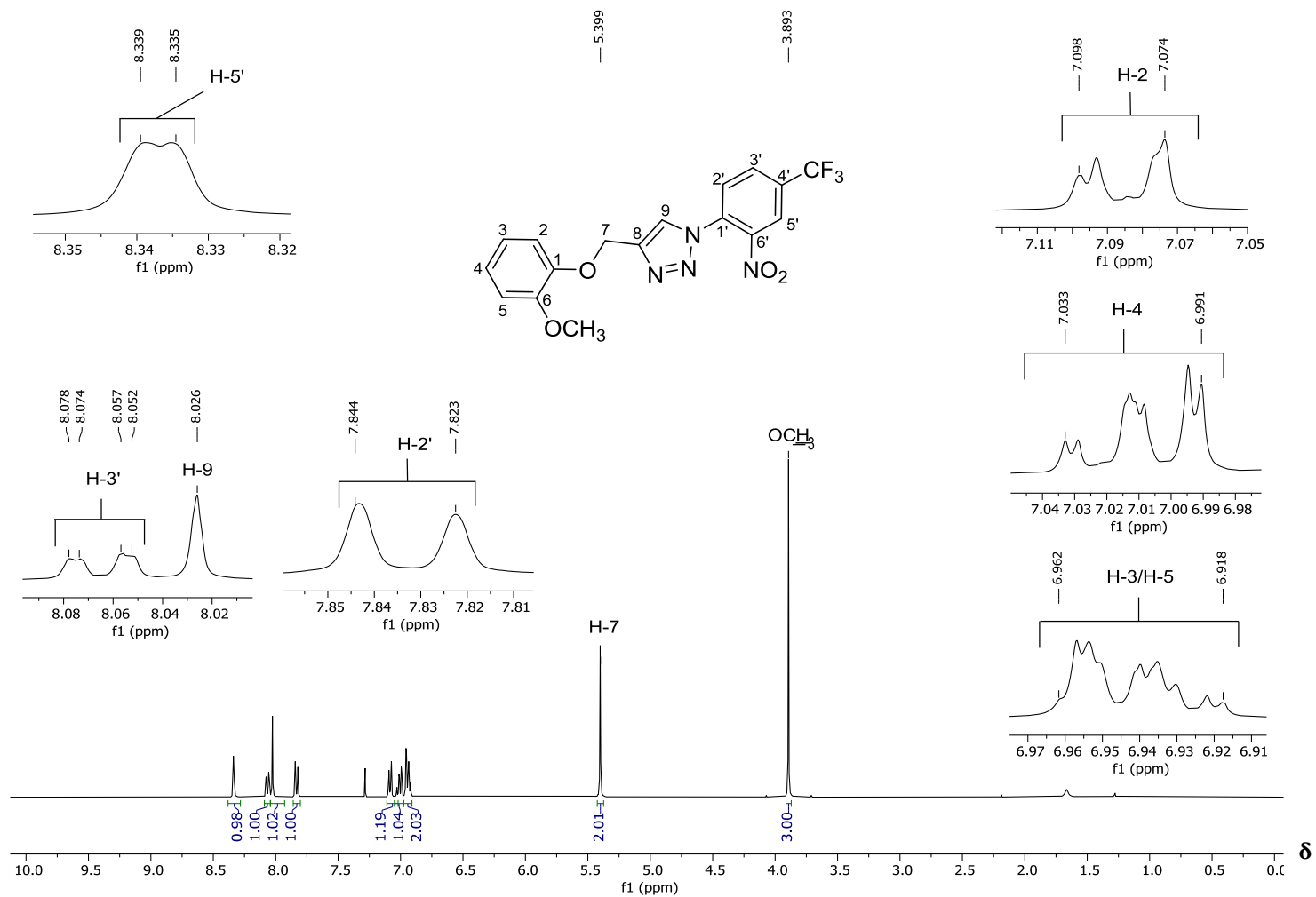


Figura 41 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

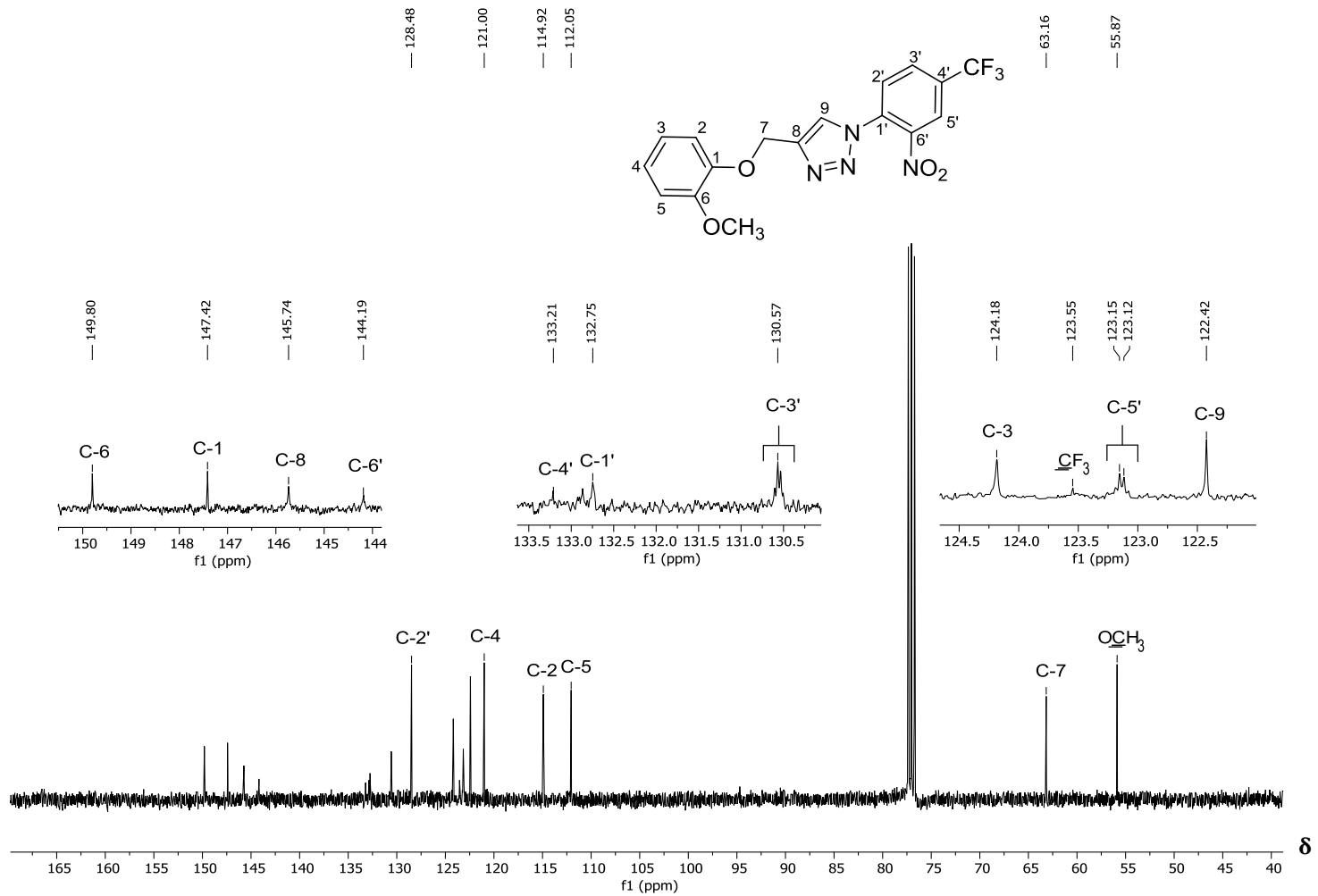


Figura 42 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **3f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

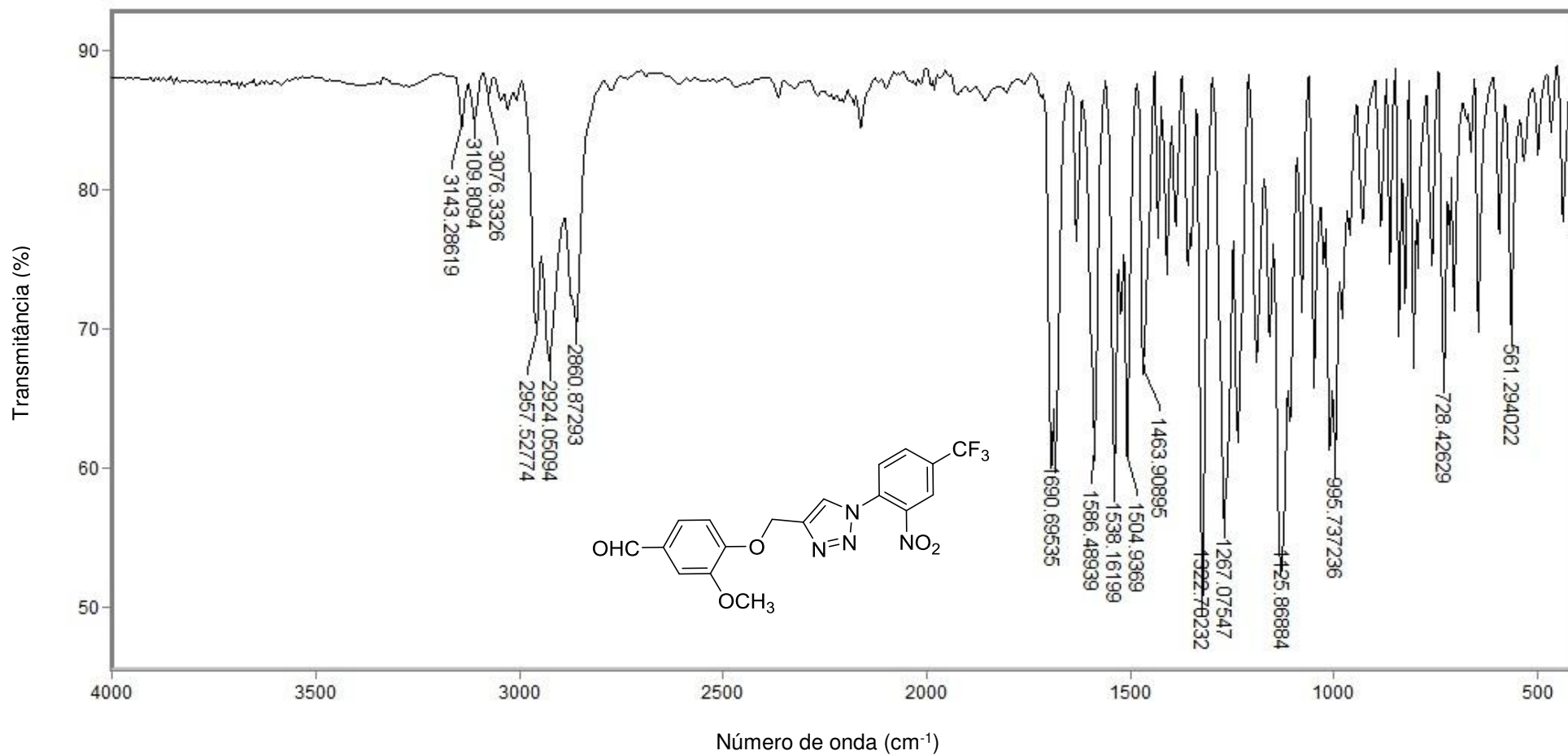


Figura 43 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

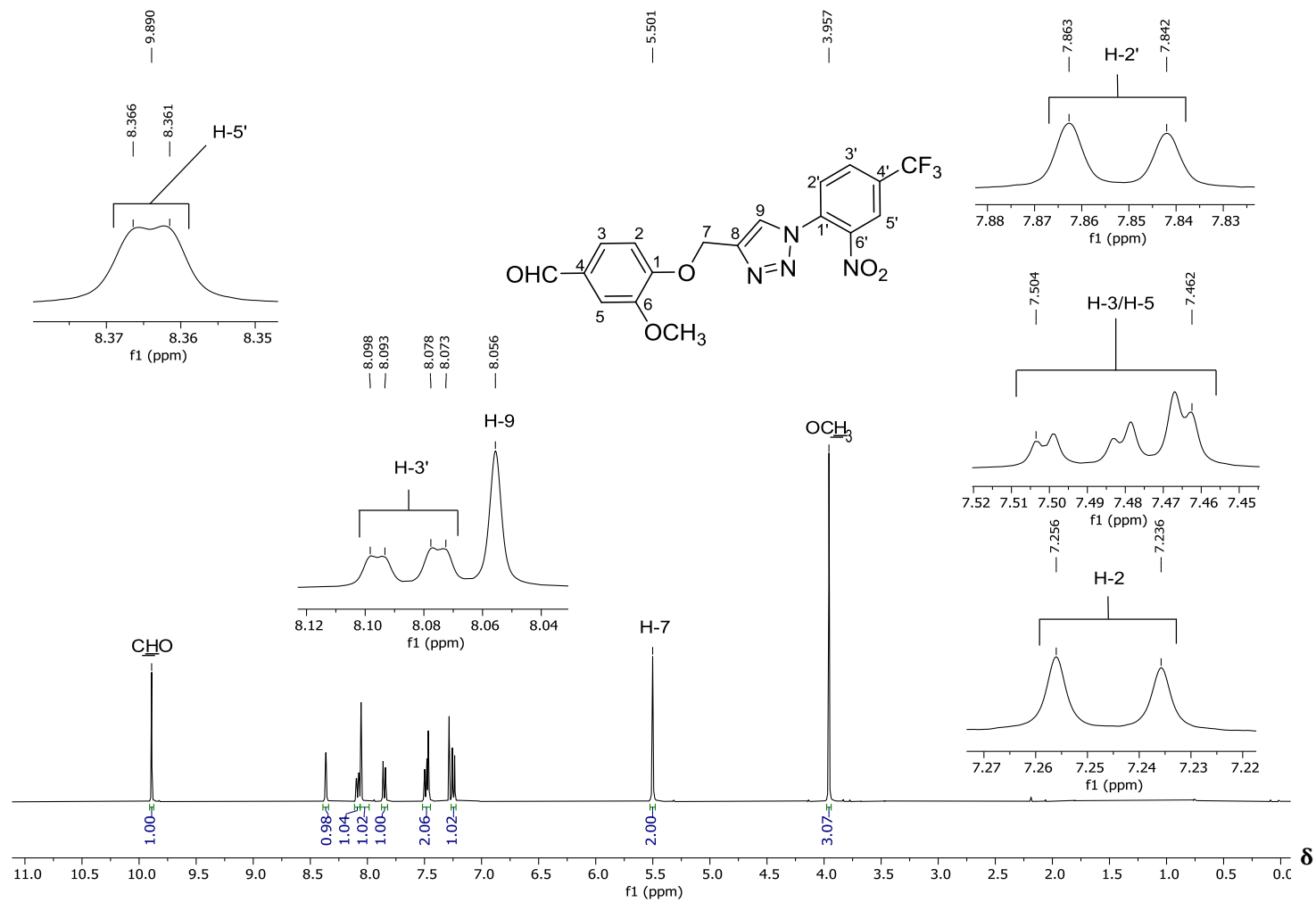


Figura 44 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

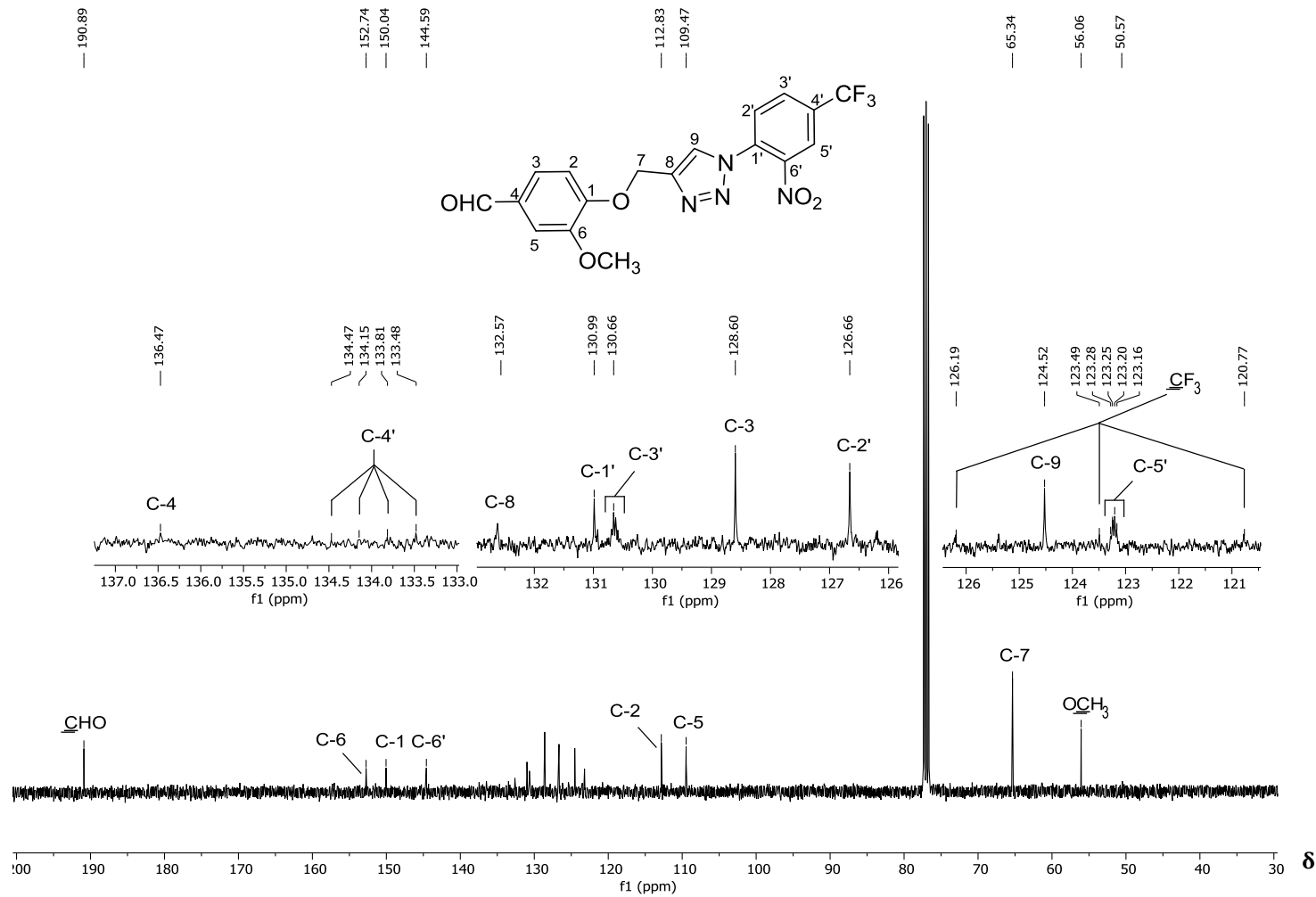


Figura 45 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **3g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

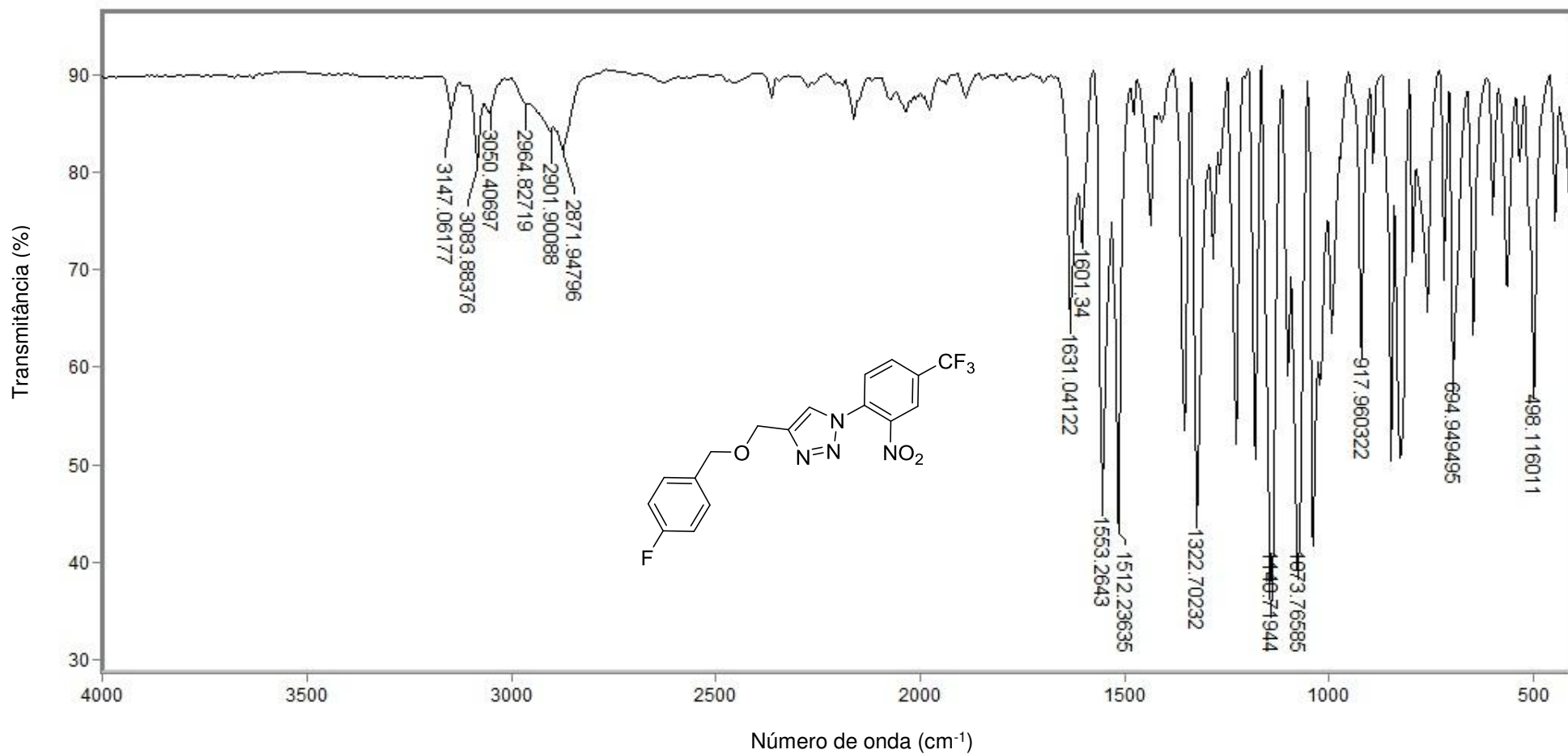


Figura 46 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

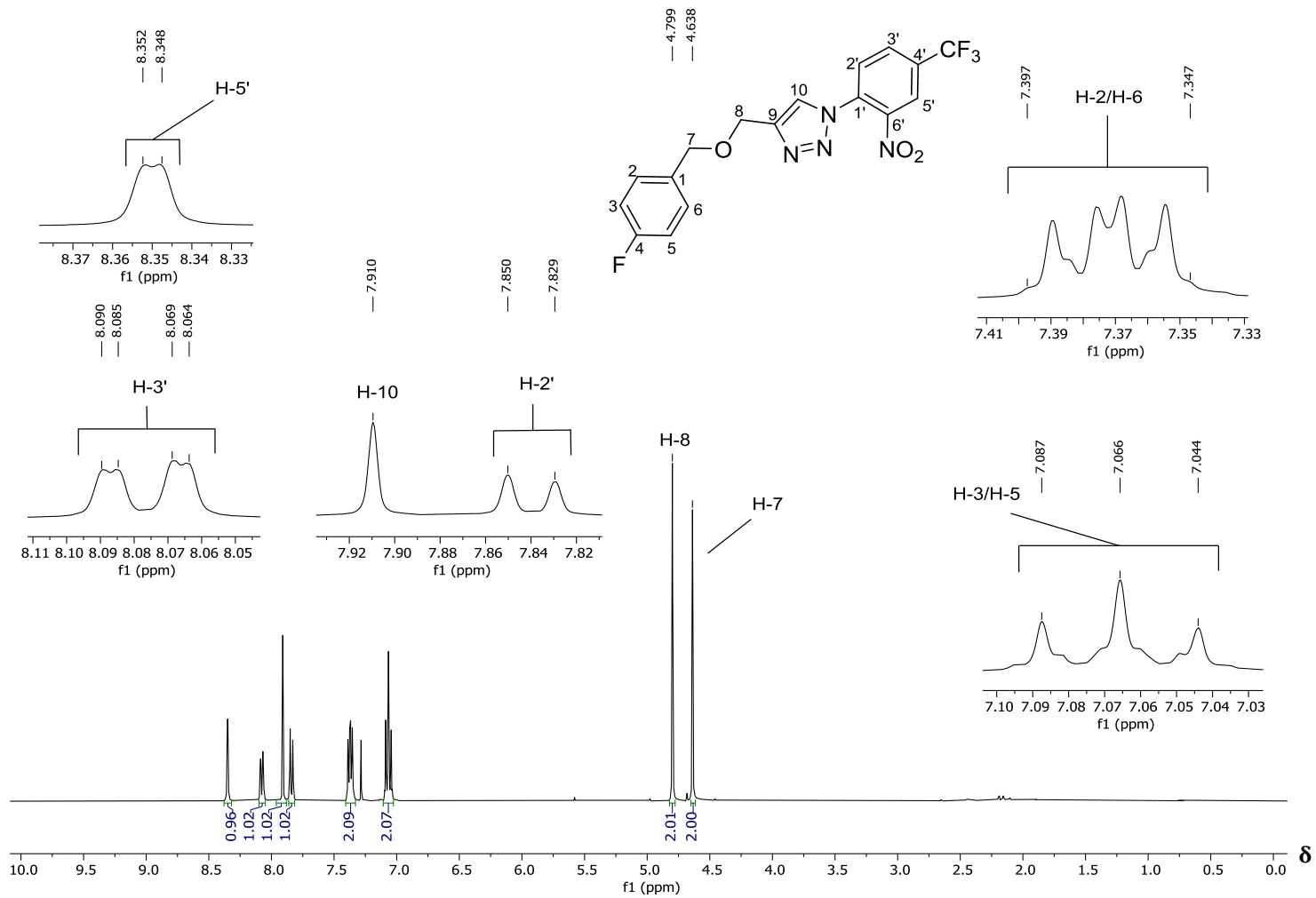


Figura 47 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

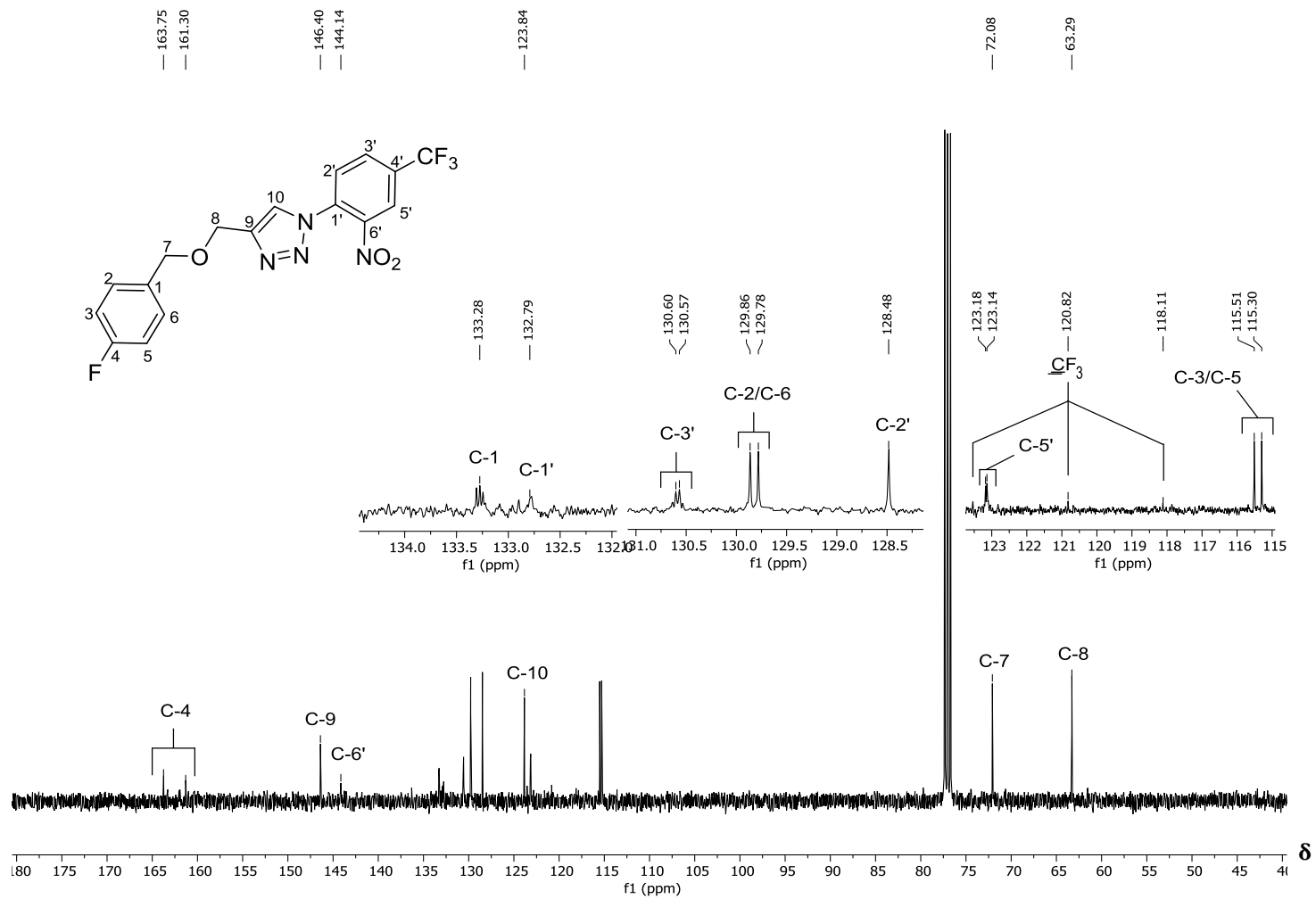


Figura 48 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

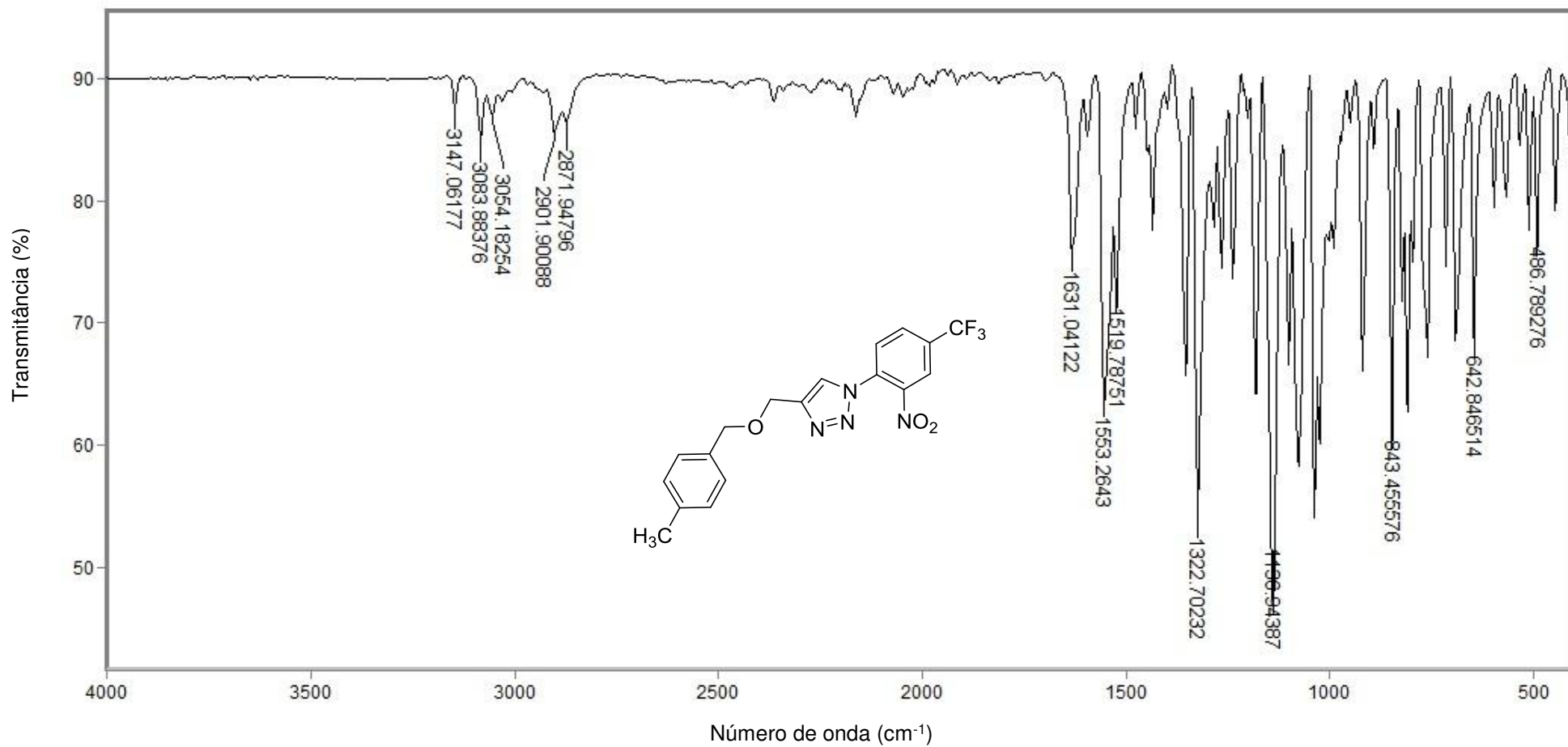


Figura 49 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

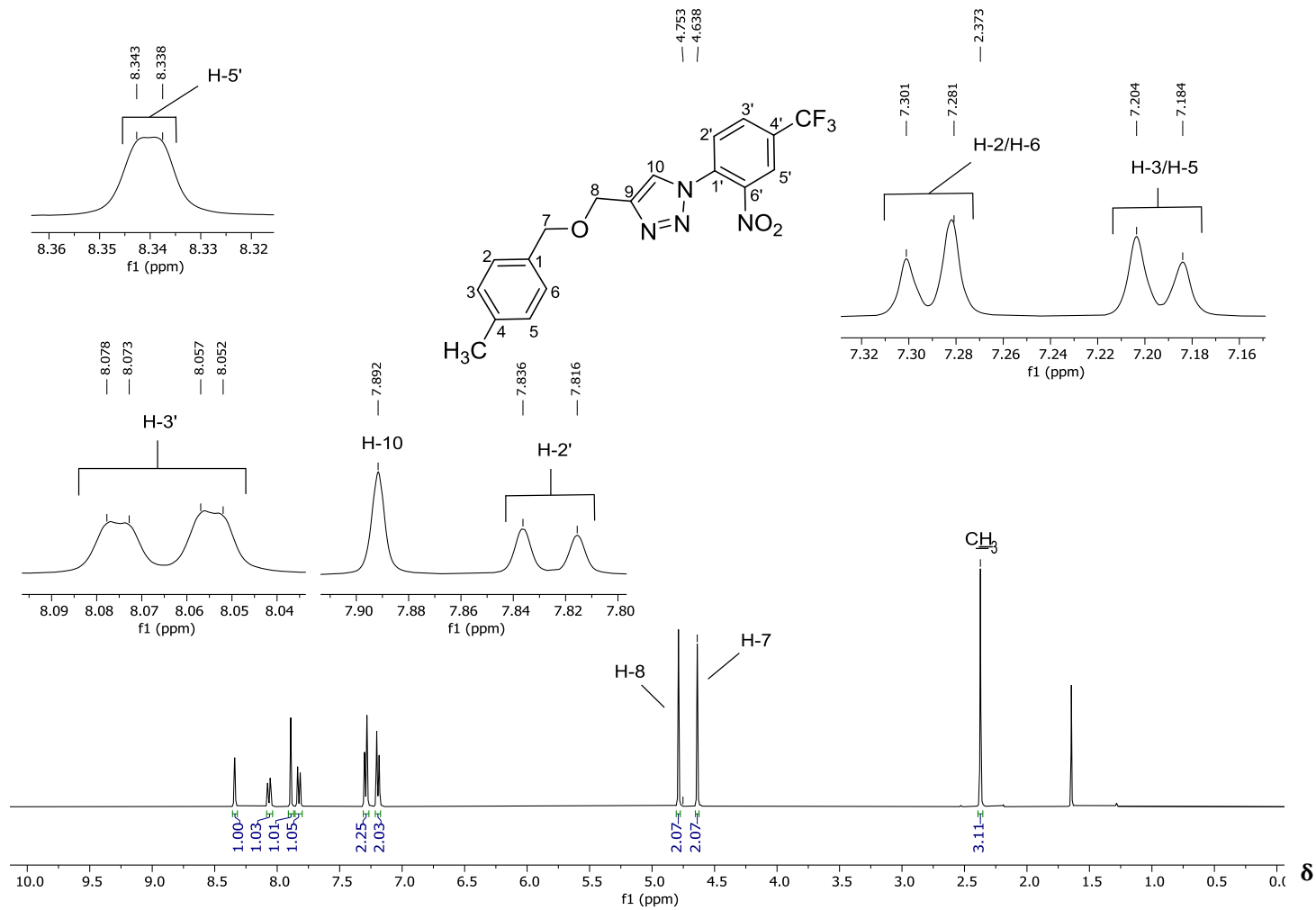


Figura 50 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

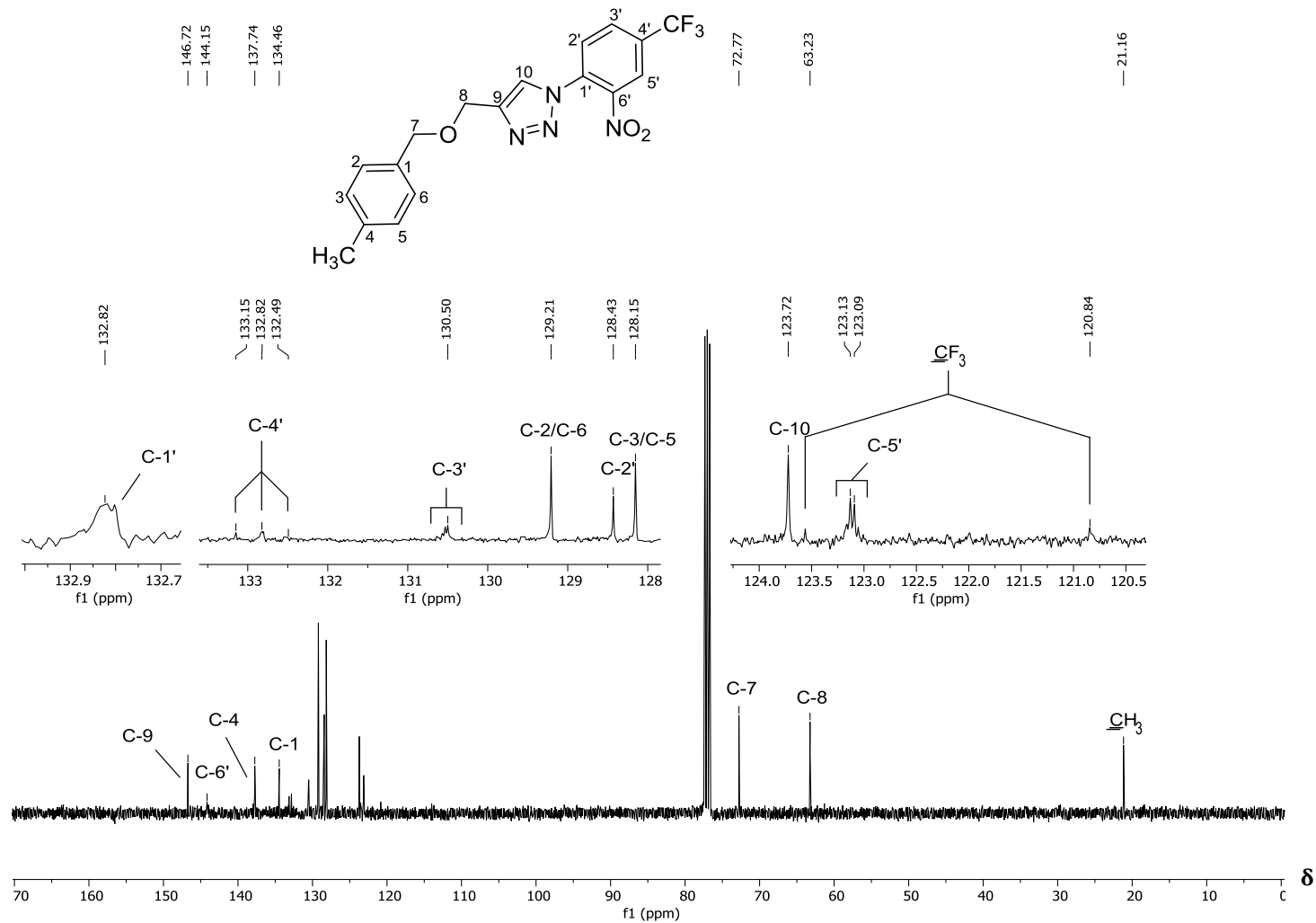


Figura 51 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **3i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

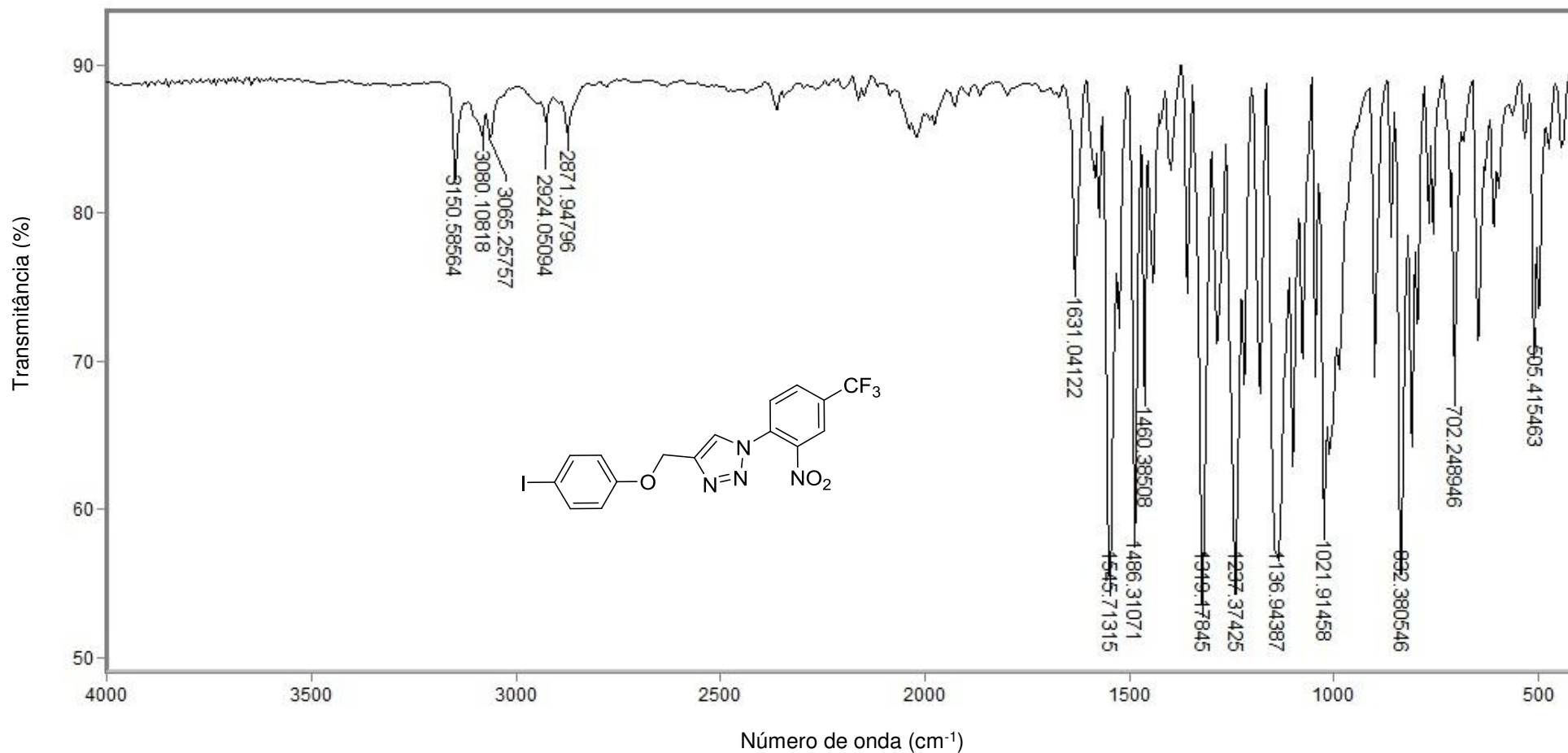


Figura 52 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **3j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

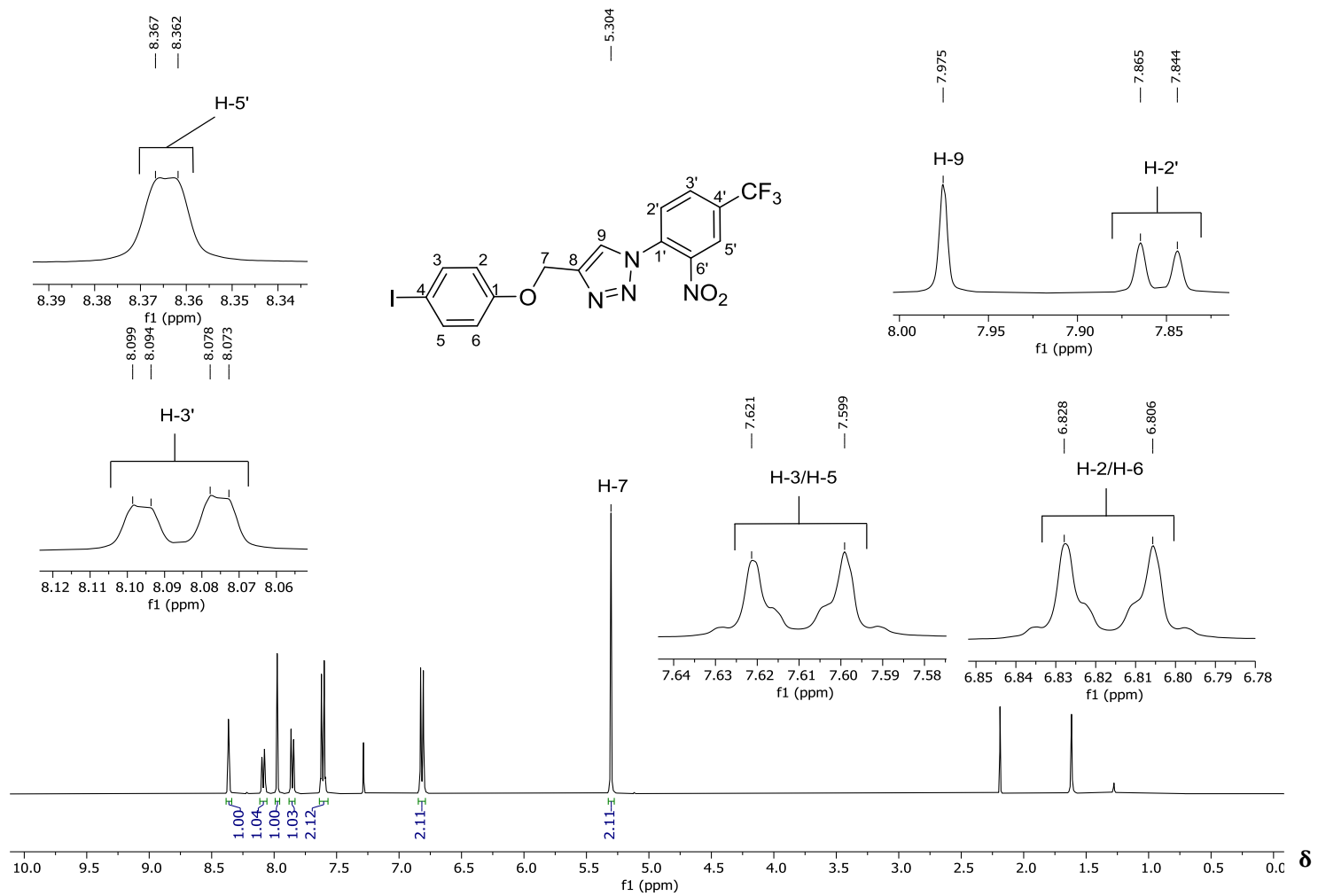


Figura 53 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **3j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

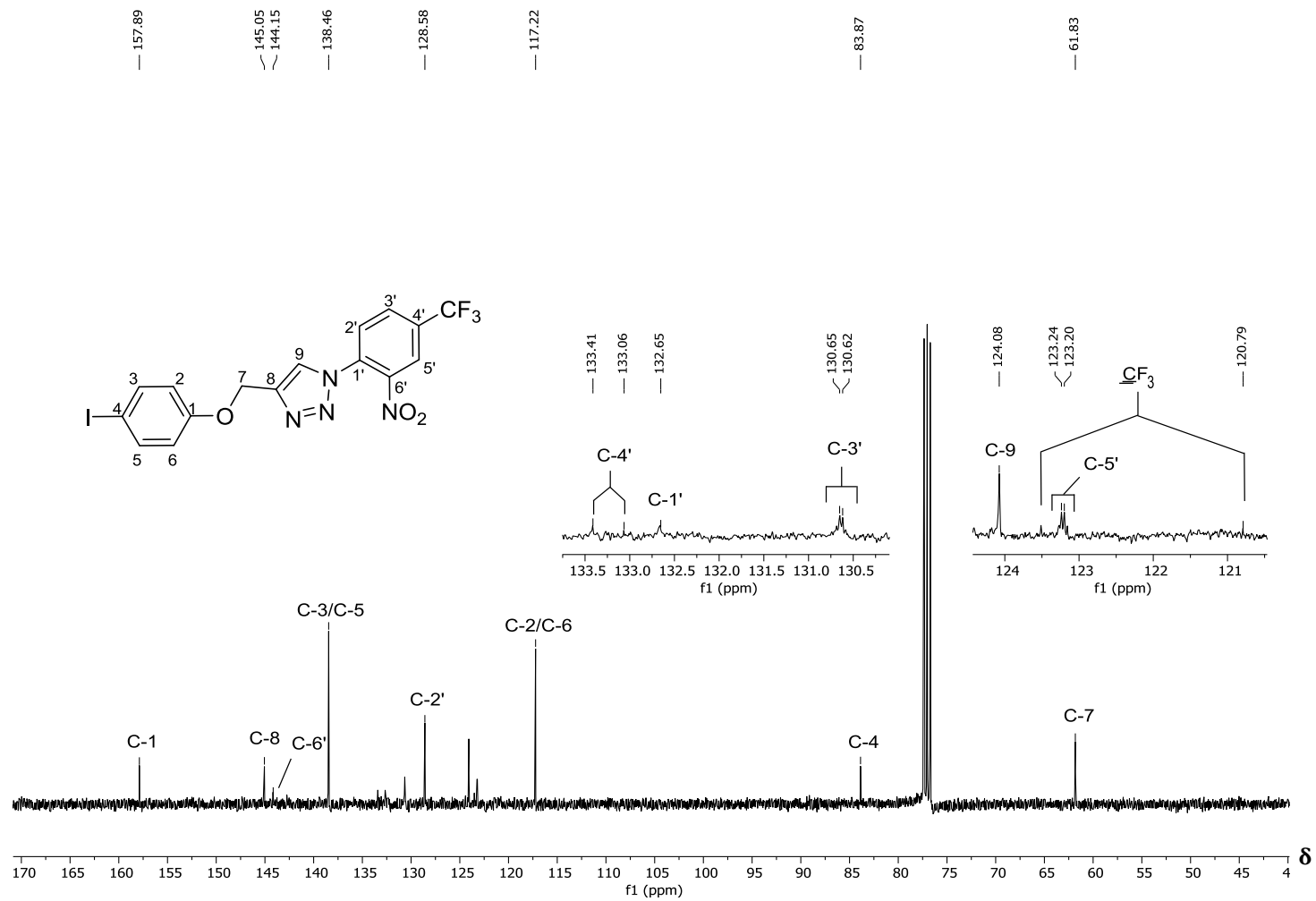


Figura 54 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **3j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

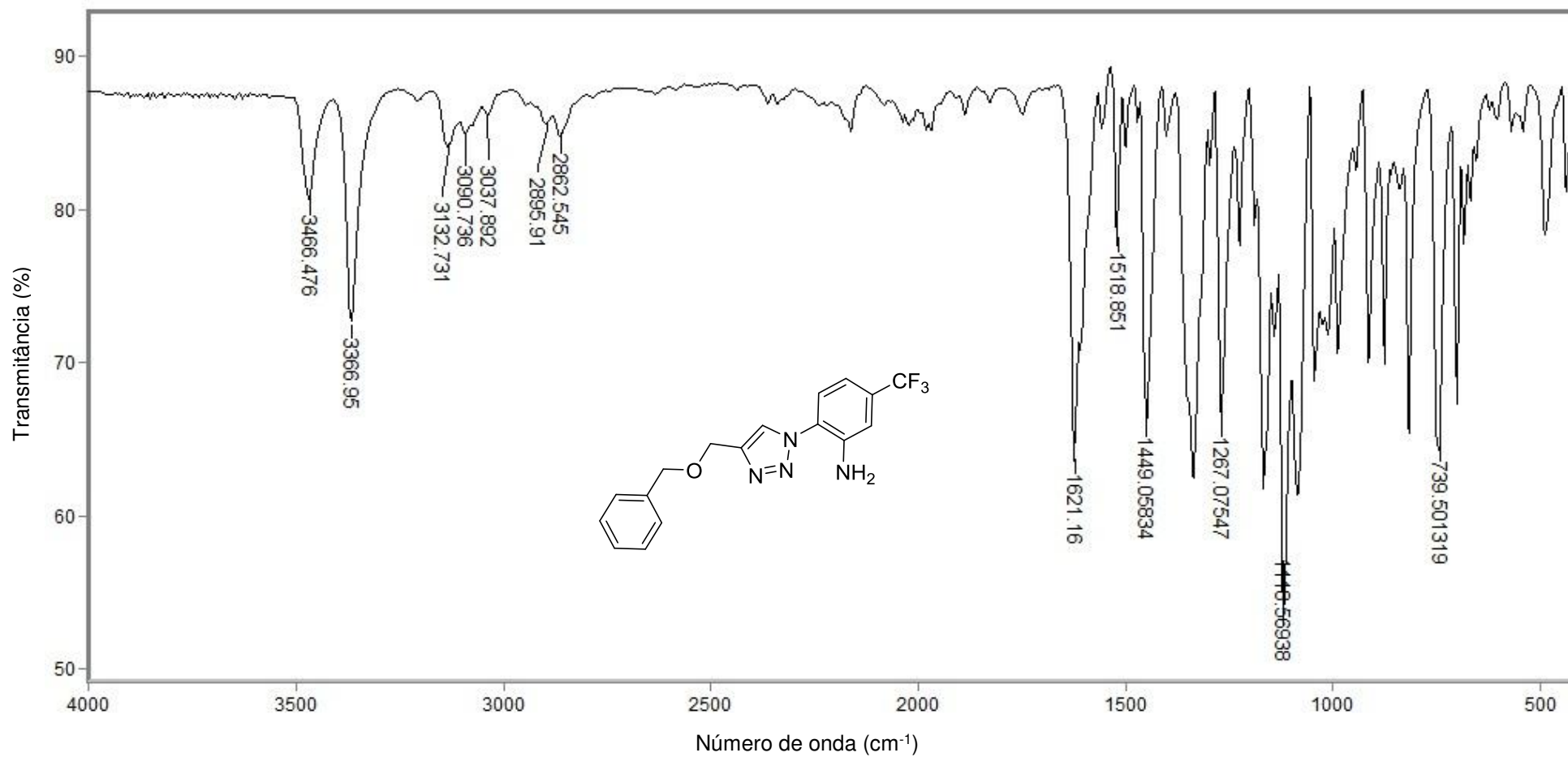


Figura 55 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

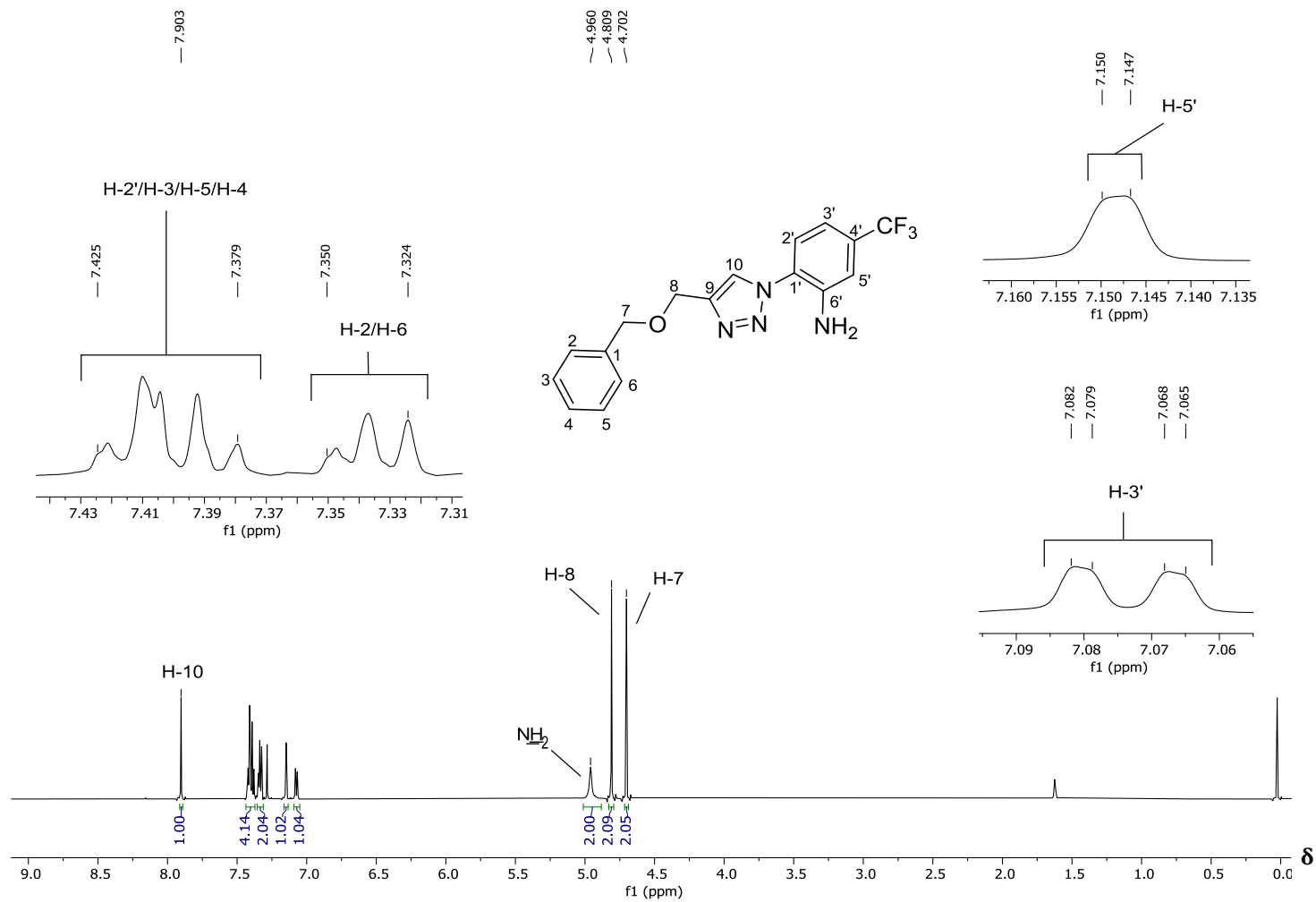


Figura 56 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

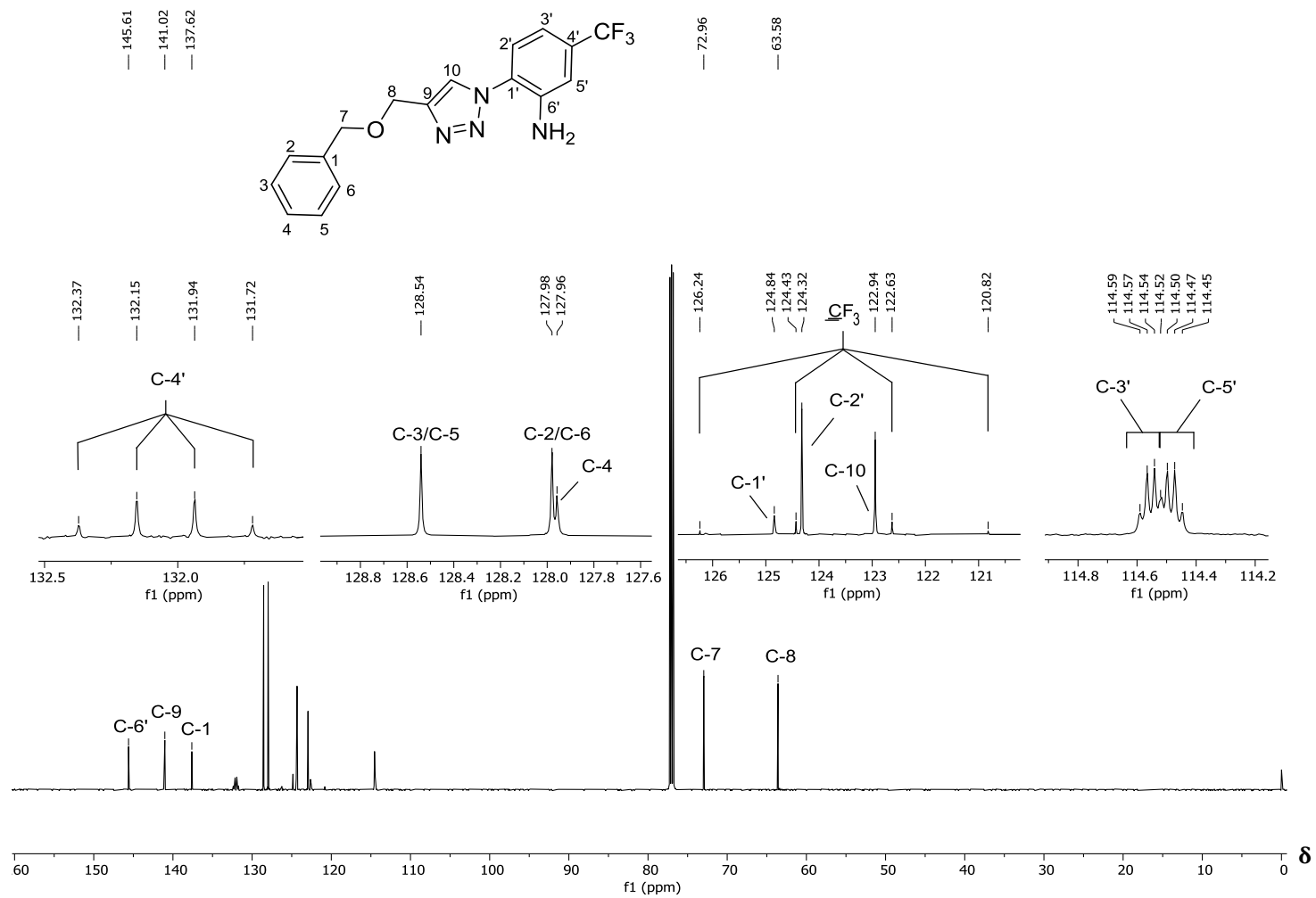


Figura 57 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

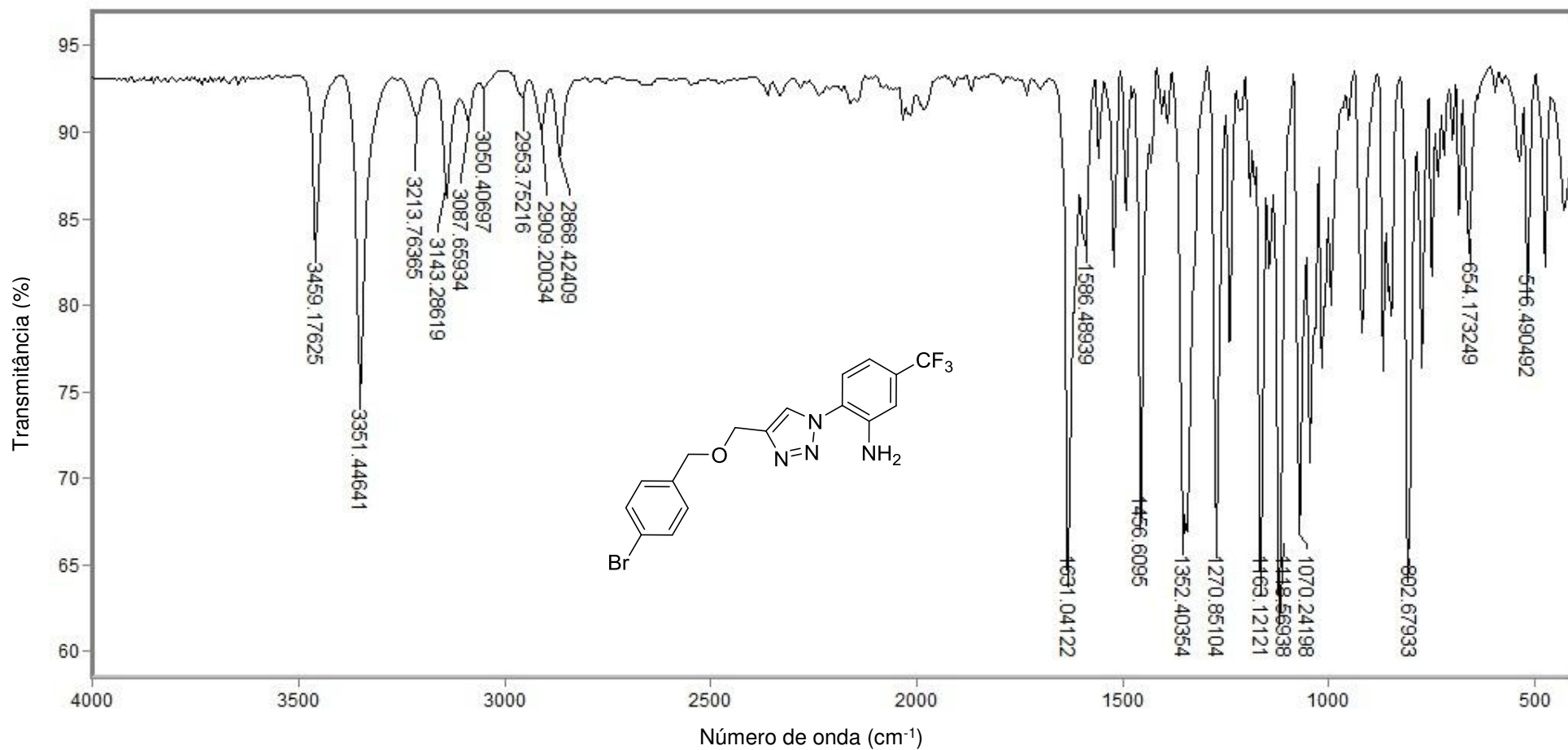


Figura 58 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

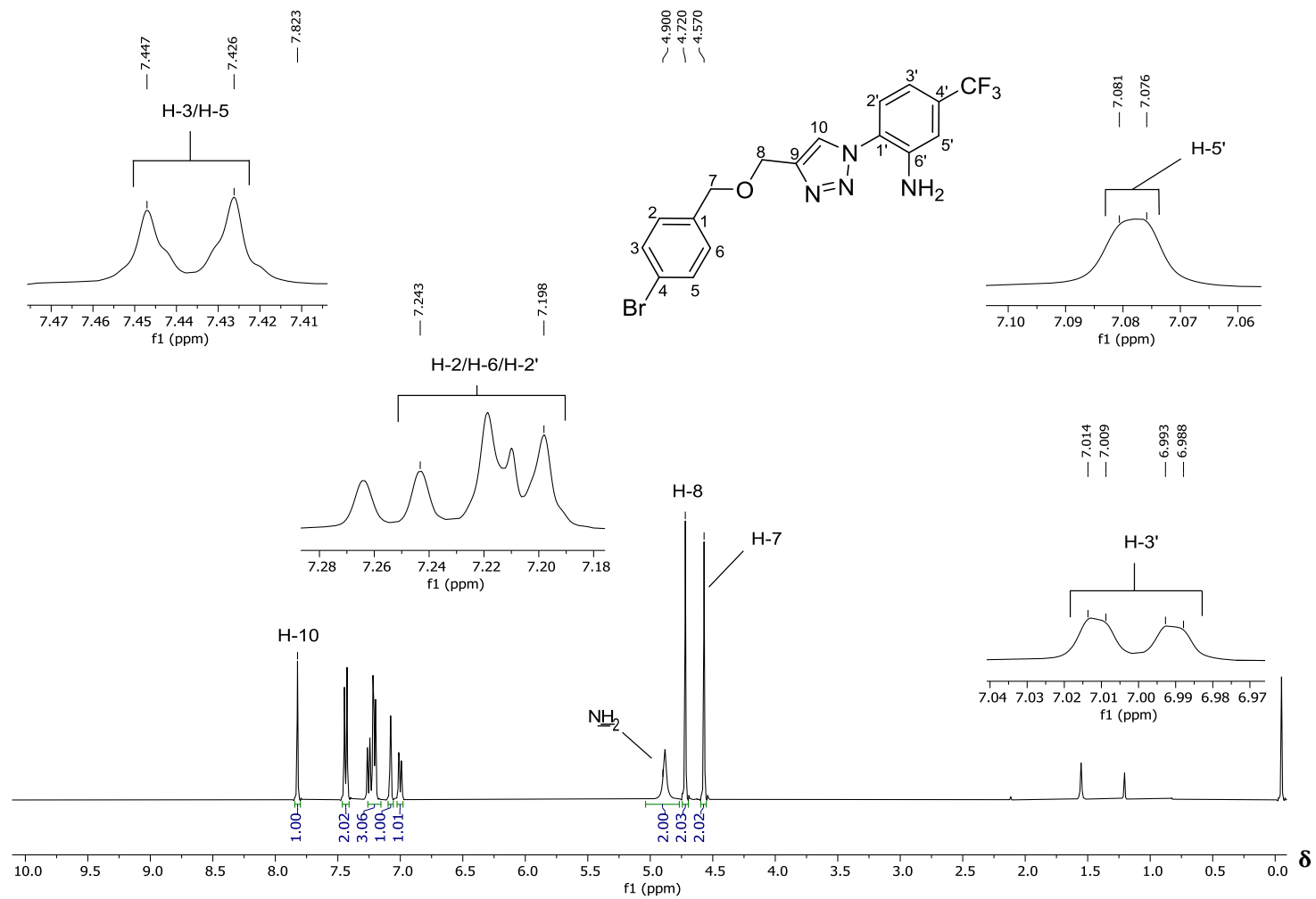


Figura 59 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

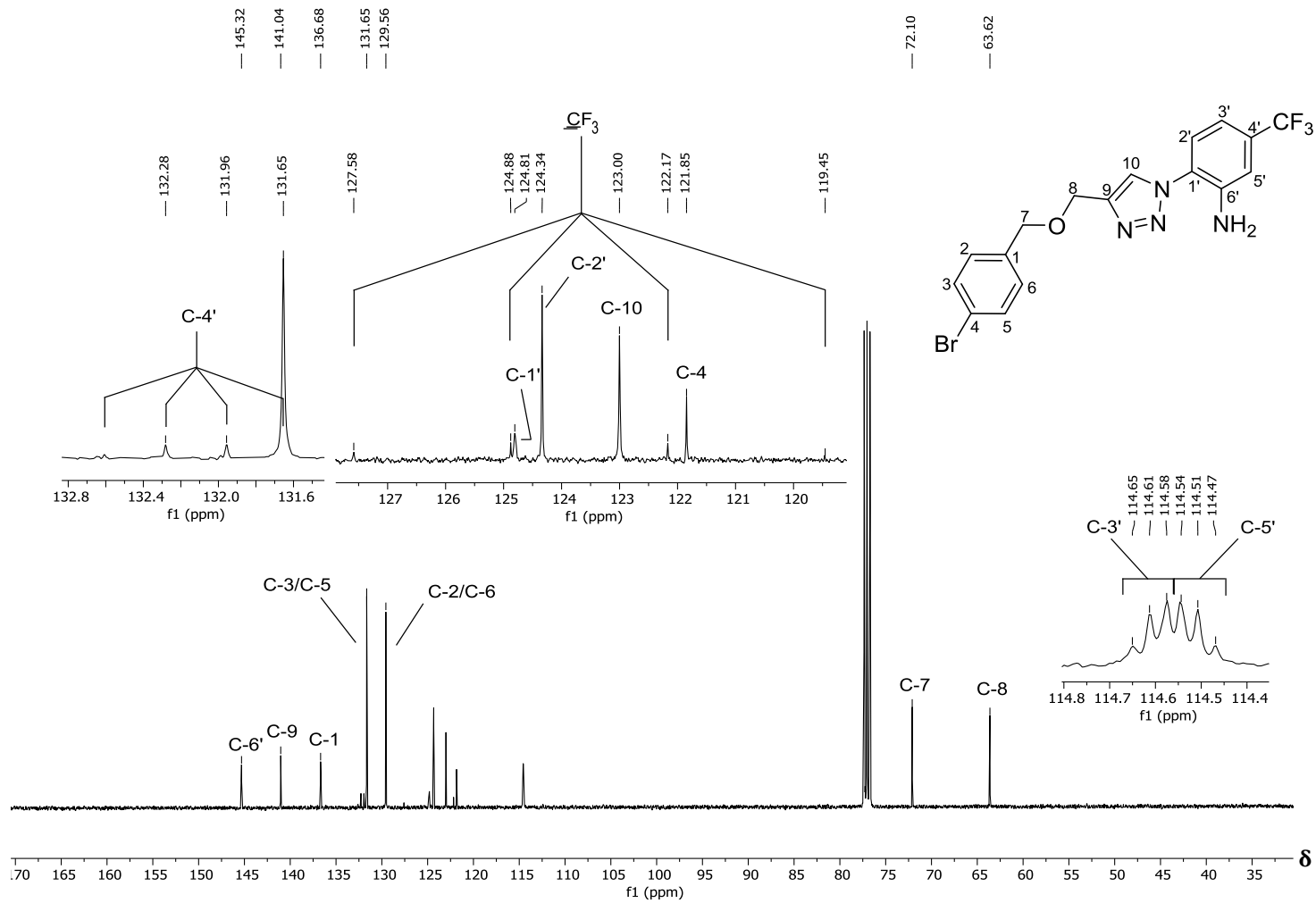


Figura 60 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **4c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

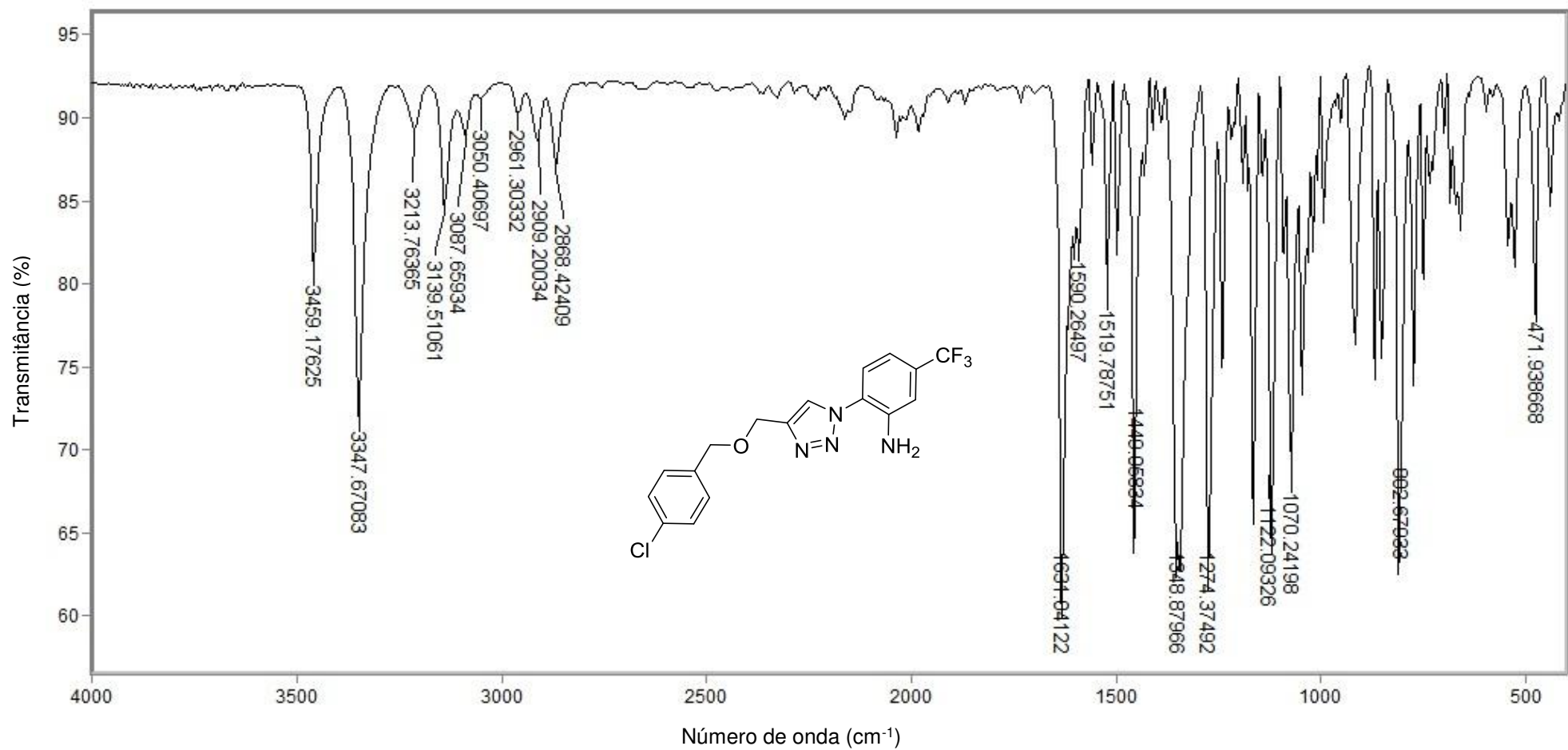


Figura 61 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

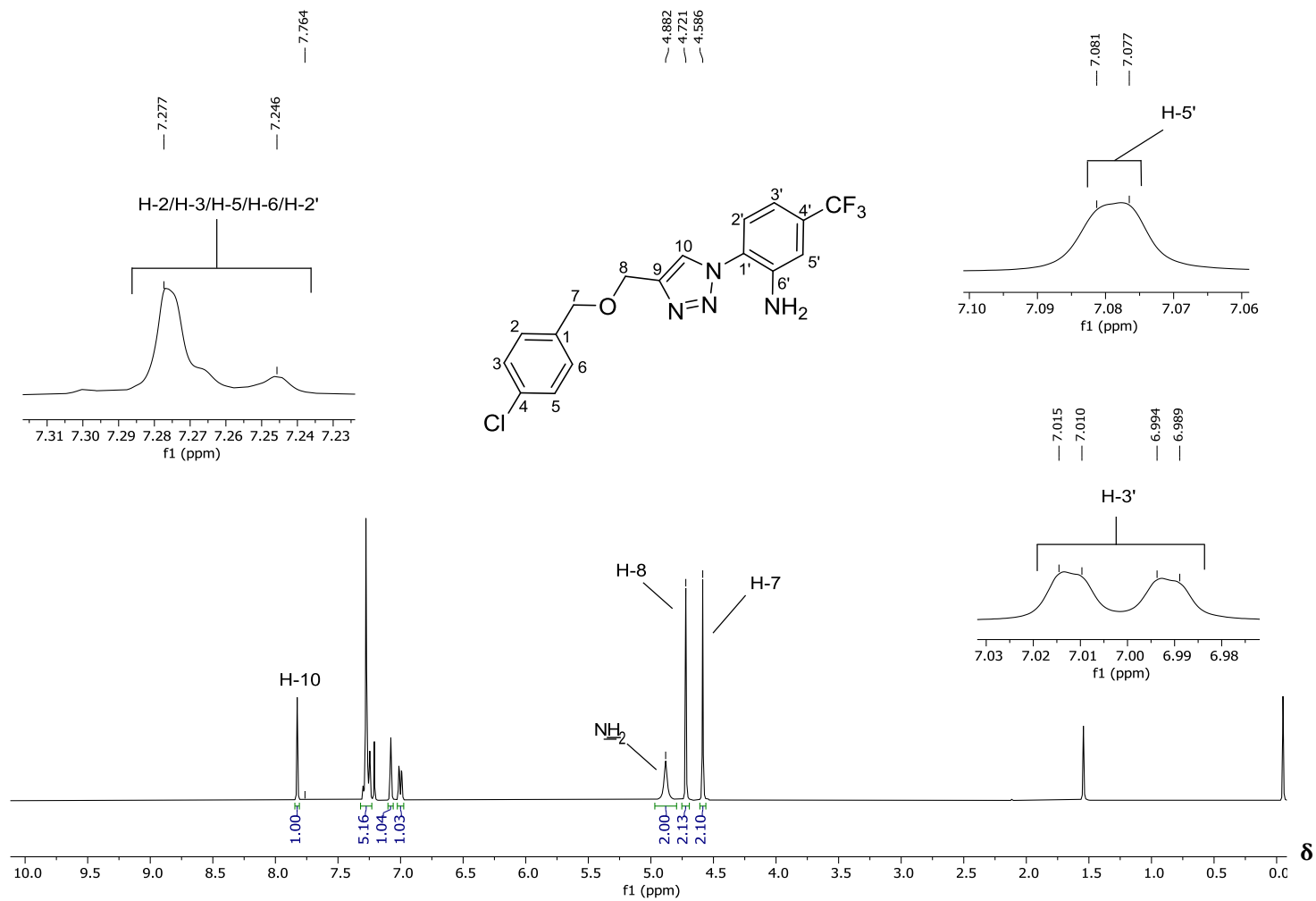


Figura 62 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

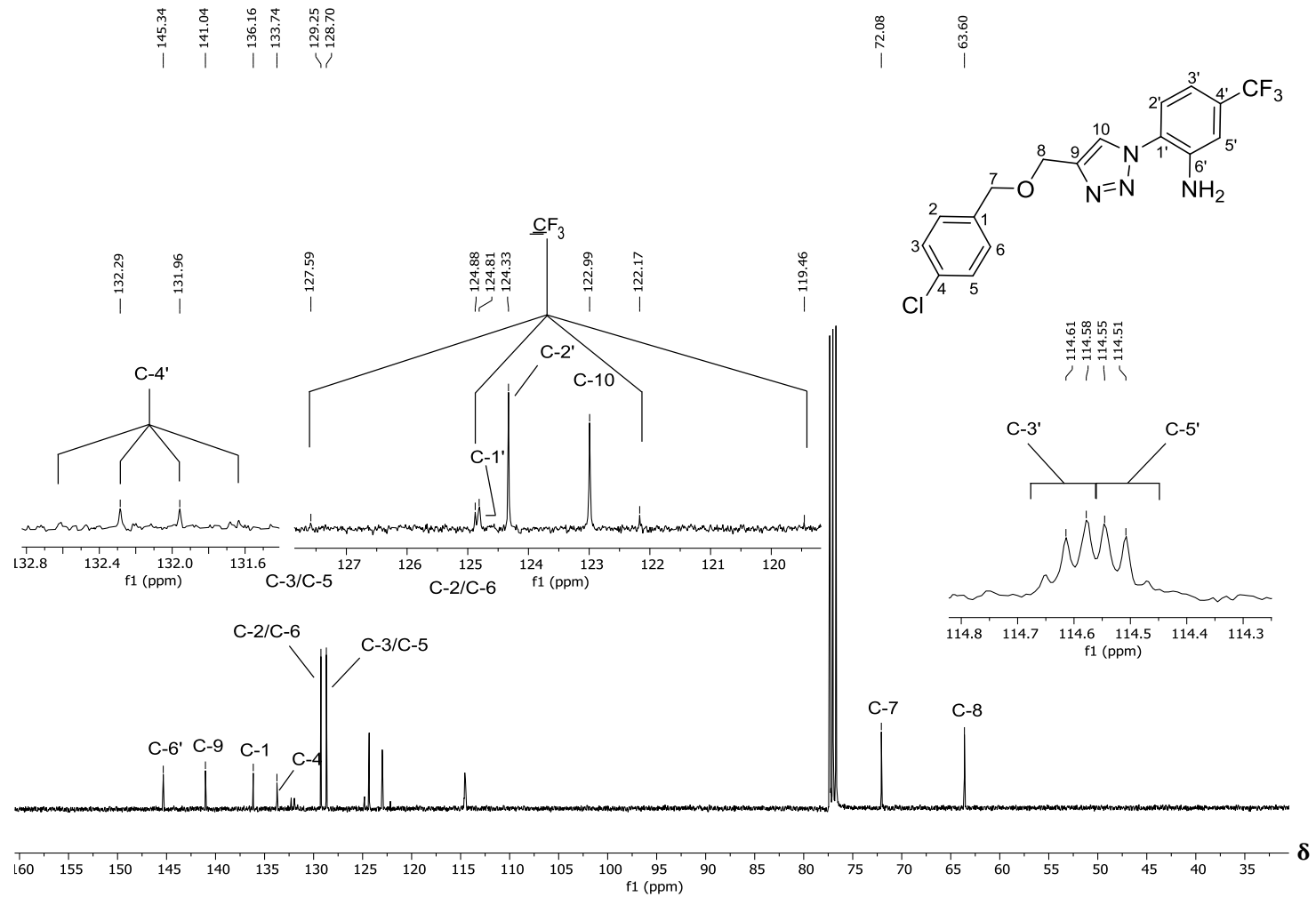


Figura 63 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

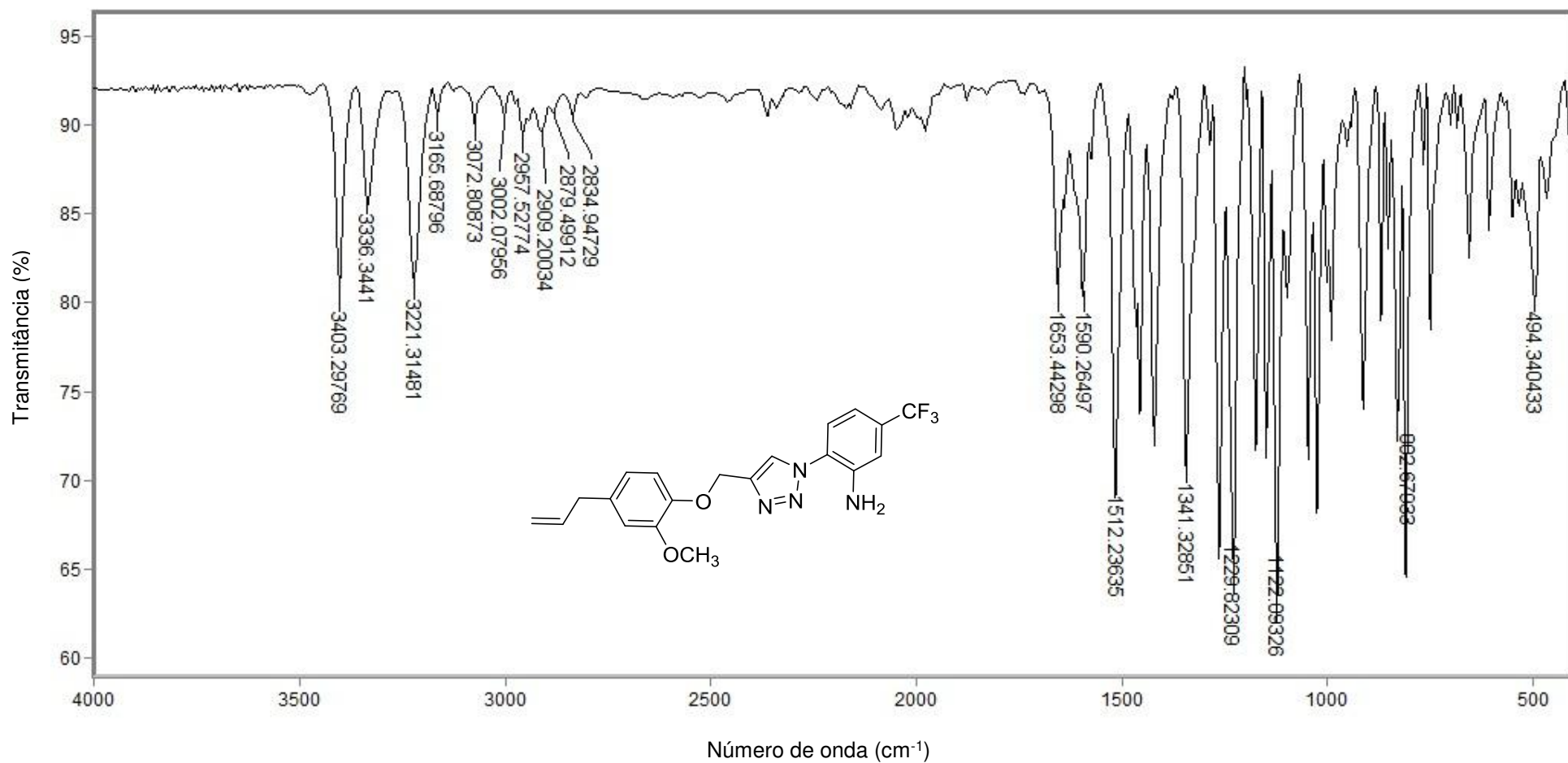


Figura 64 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

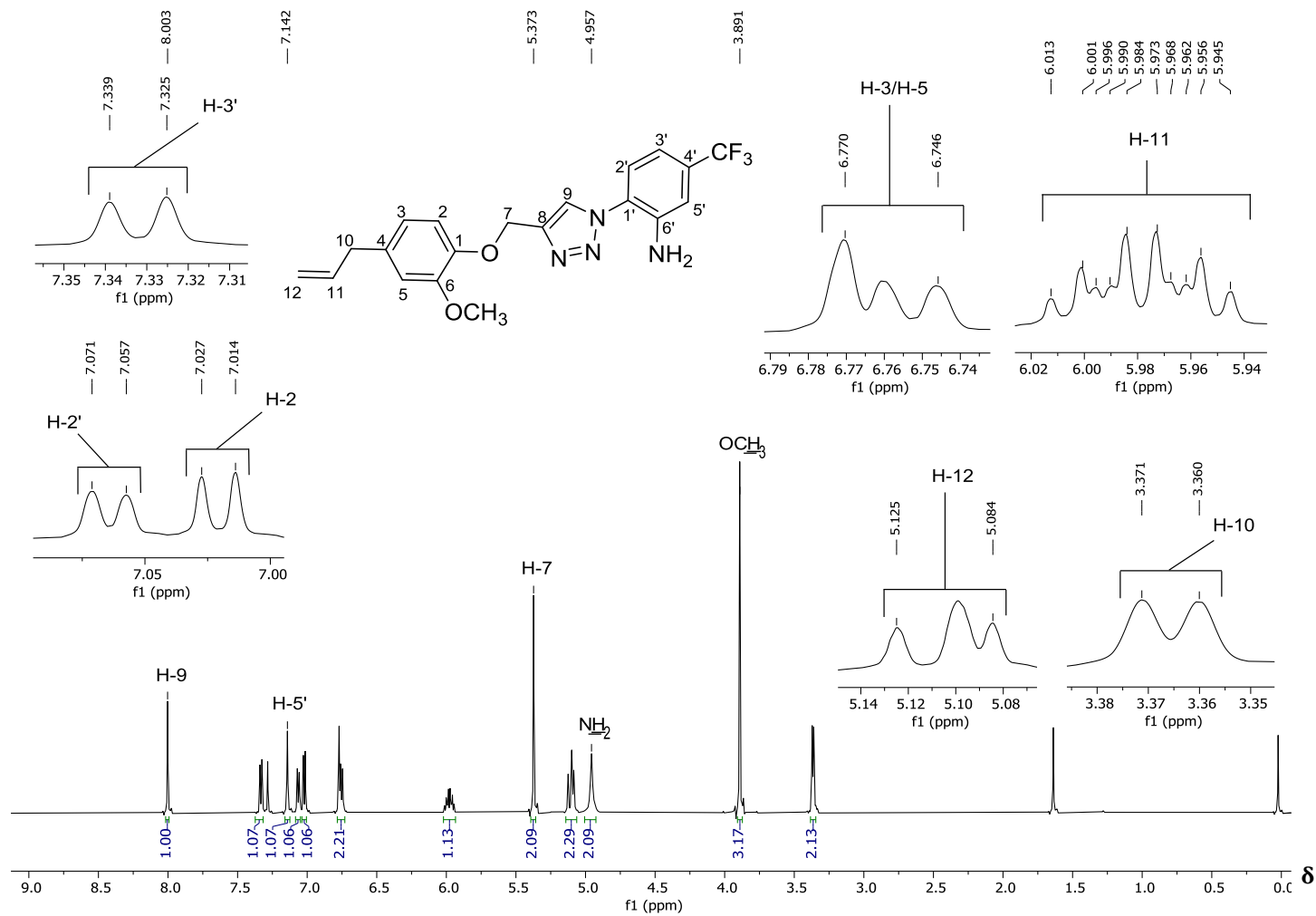


Figura 65 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

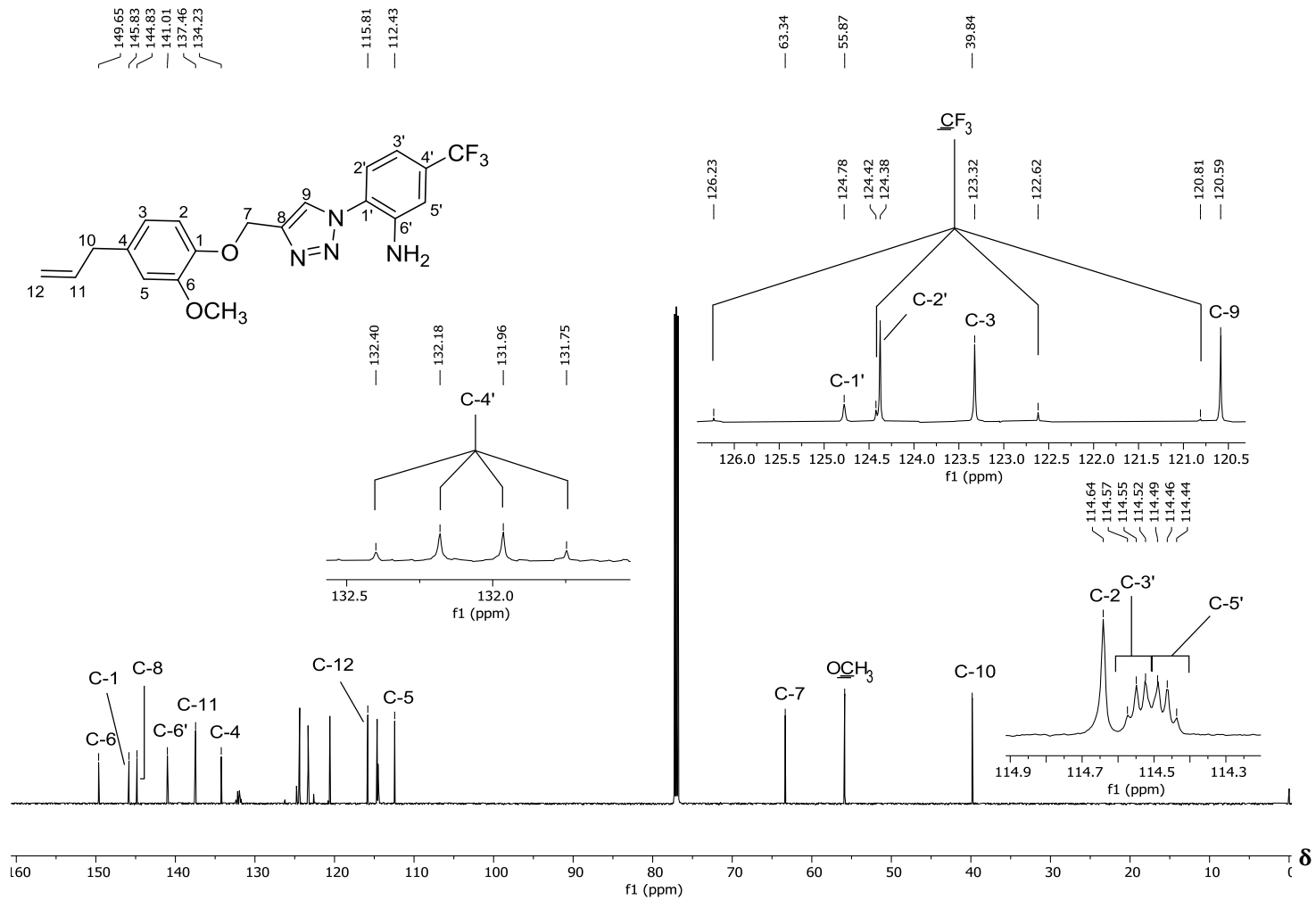


Figura 66 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

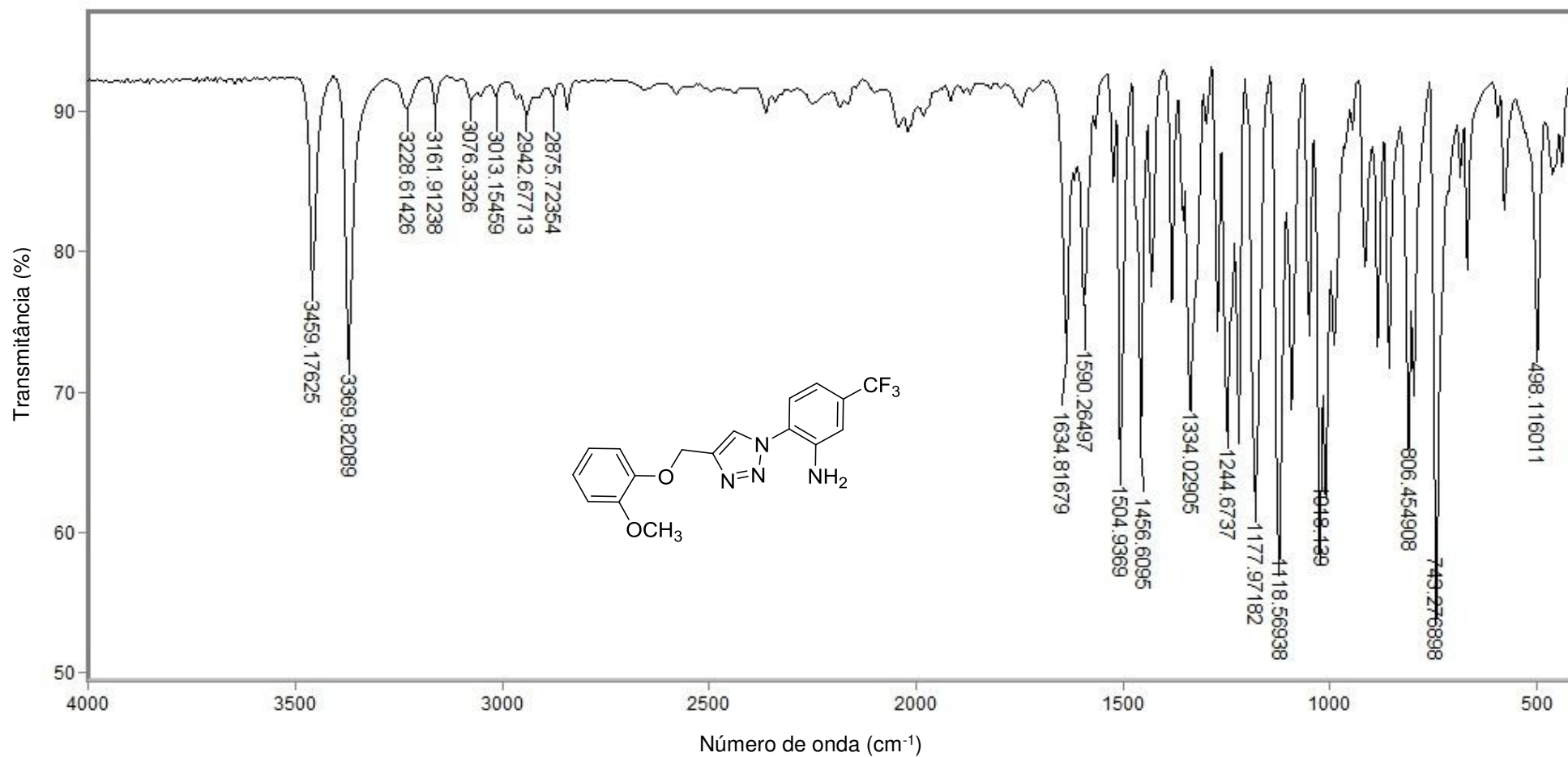


Figura 67 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

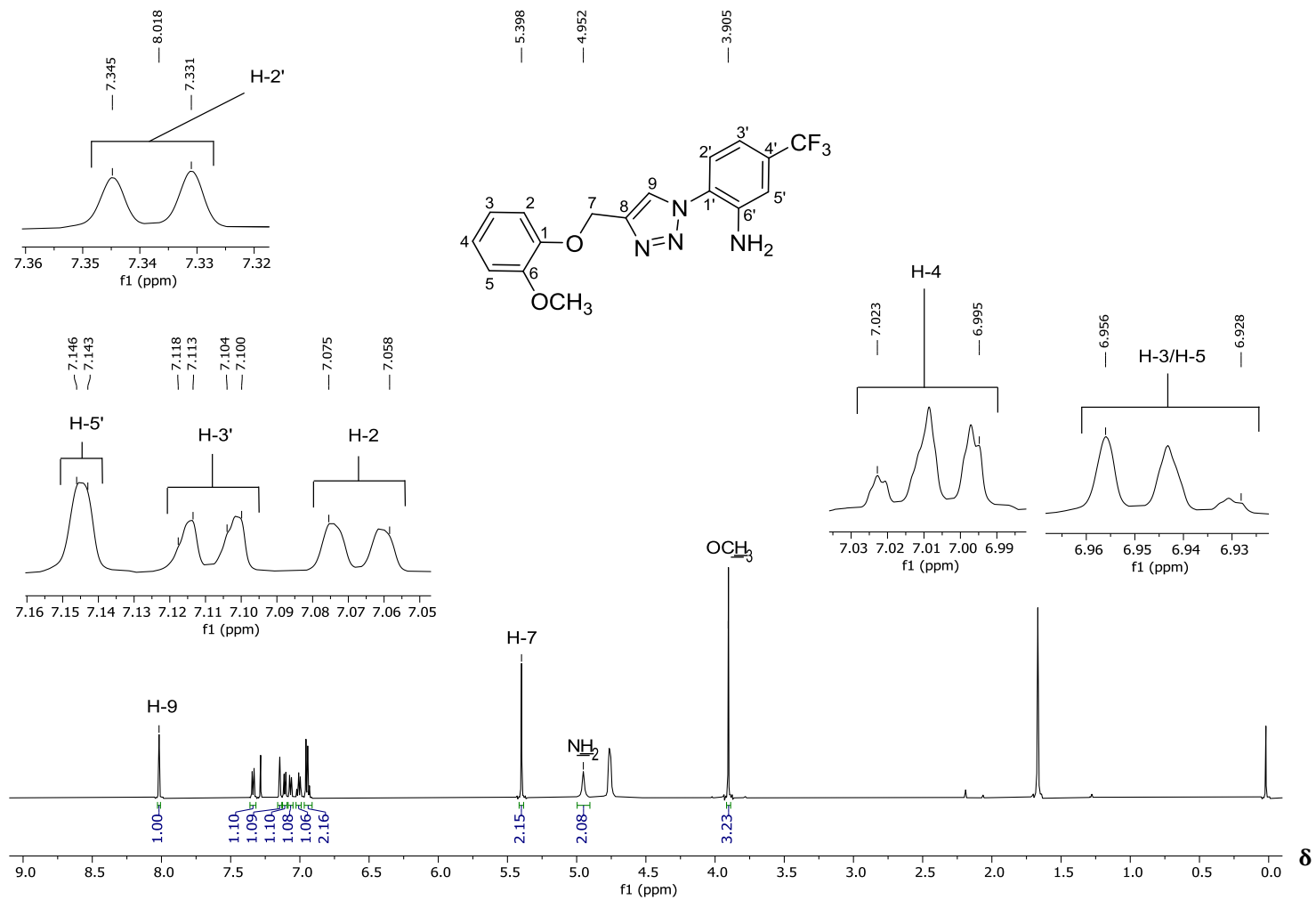


Figura 68 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

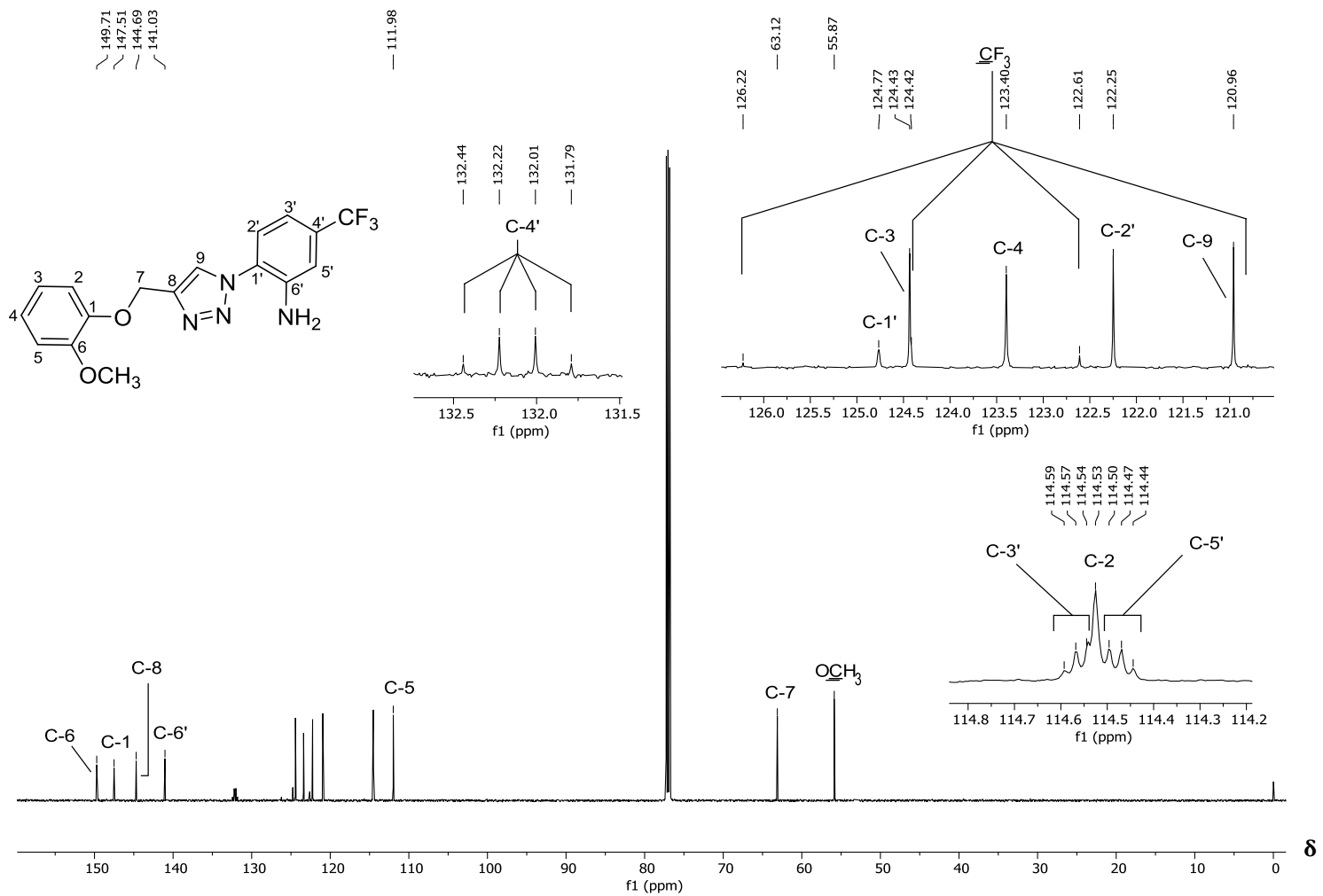


Figura 69 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

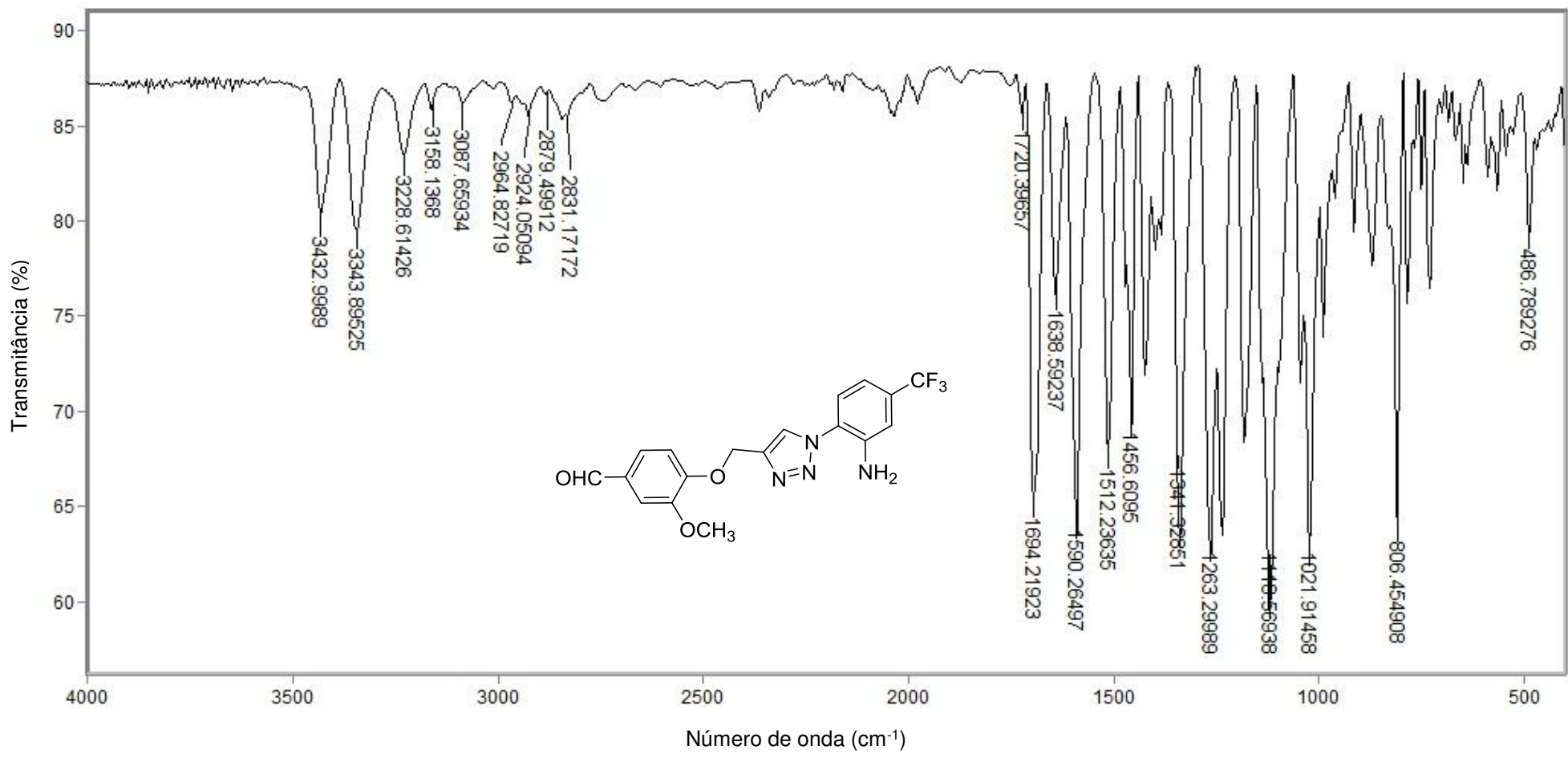


Figura 70 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

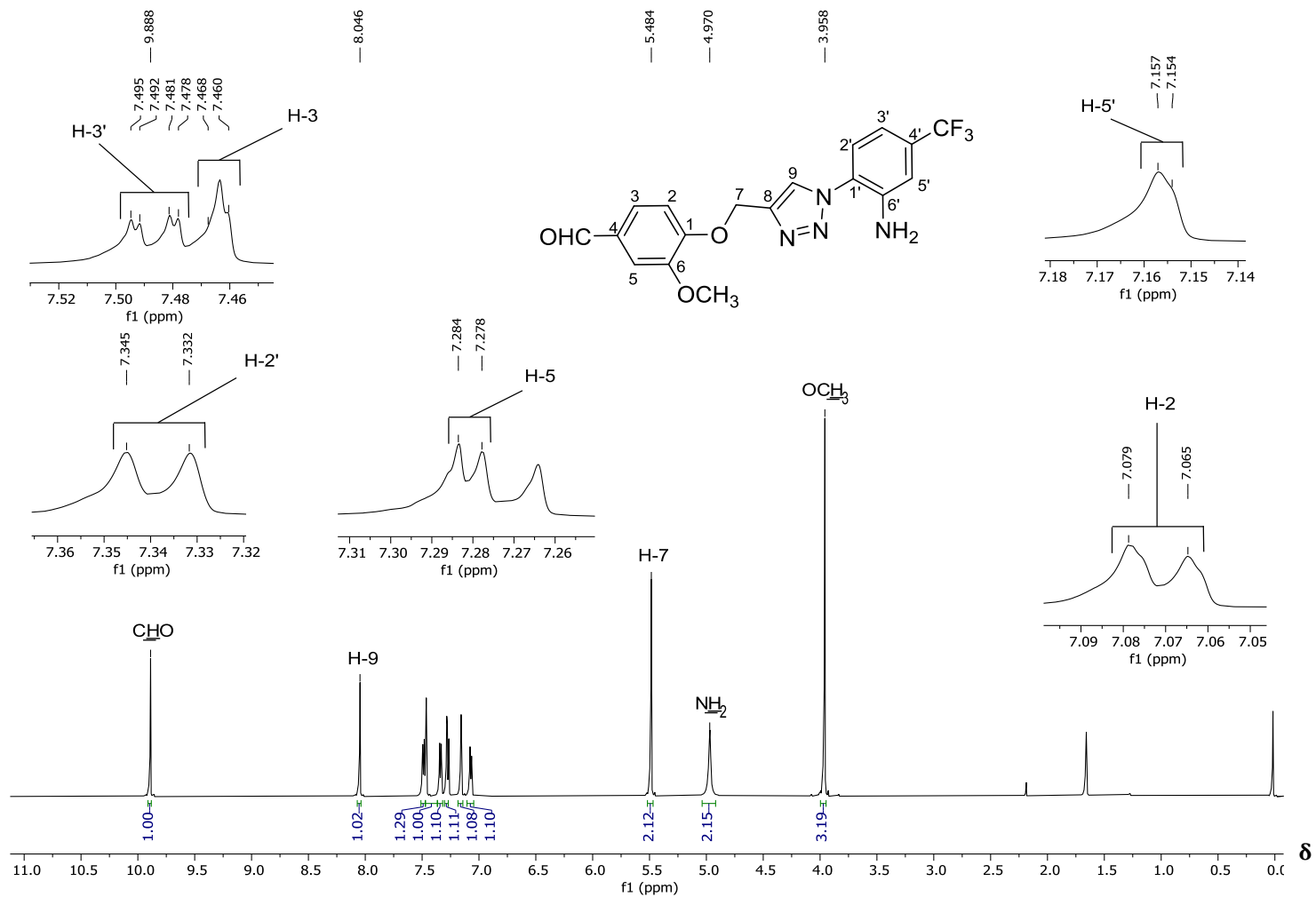


Figura 71 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **4g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

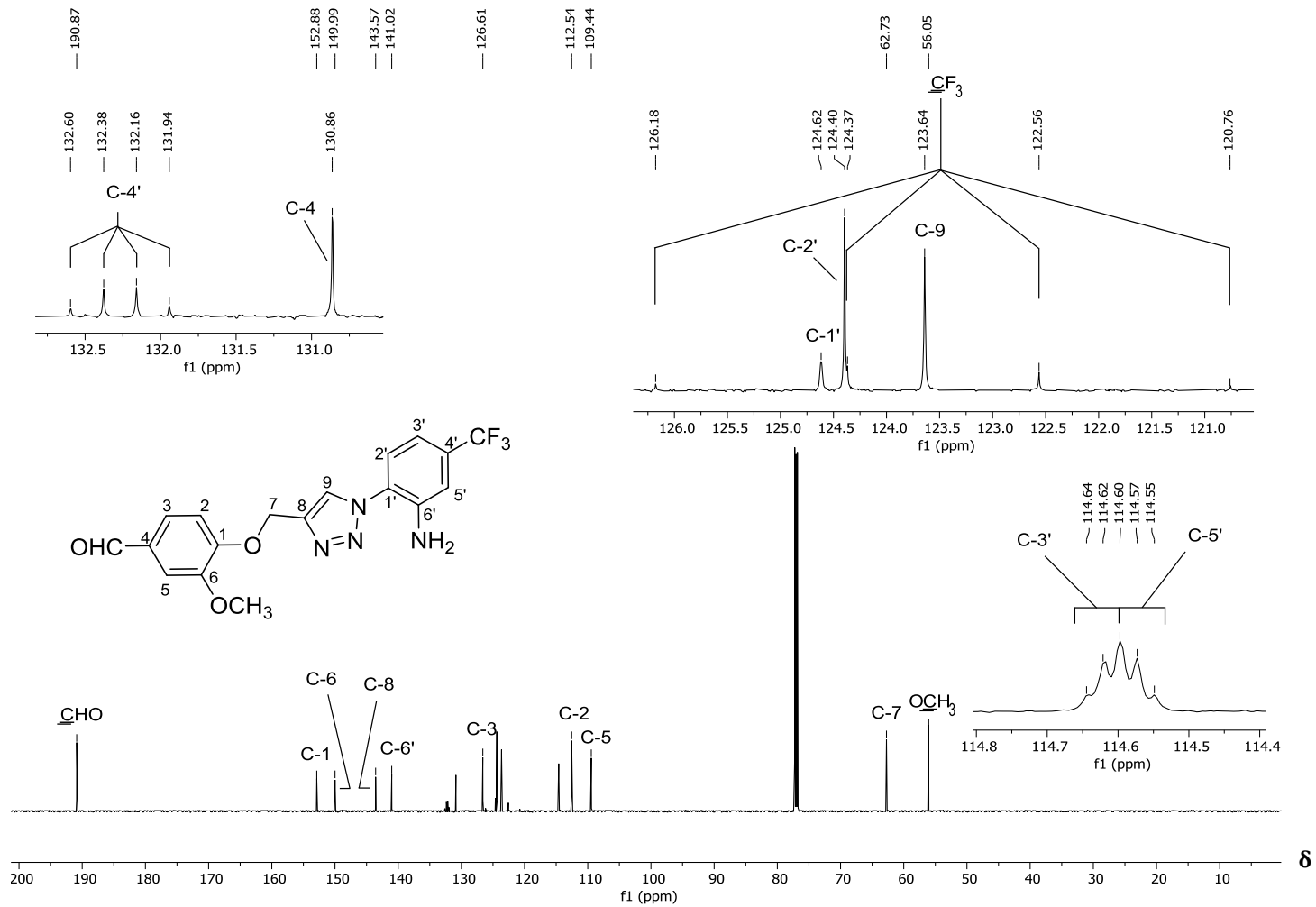


Figura 72 – Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

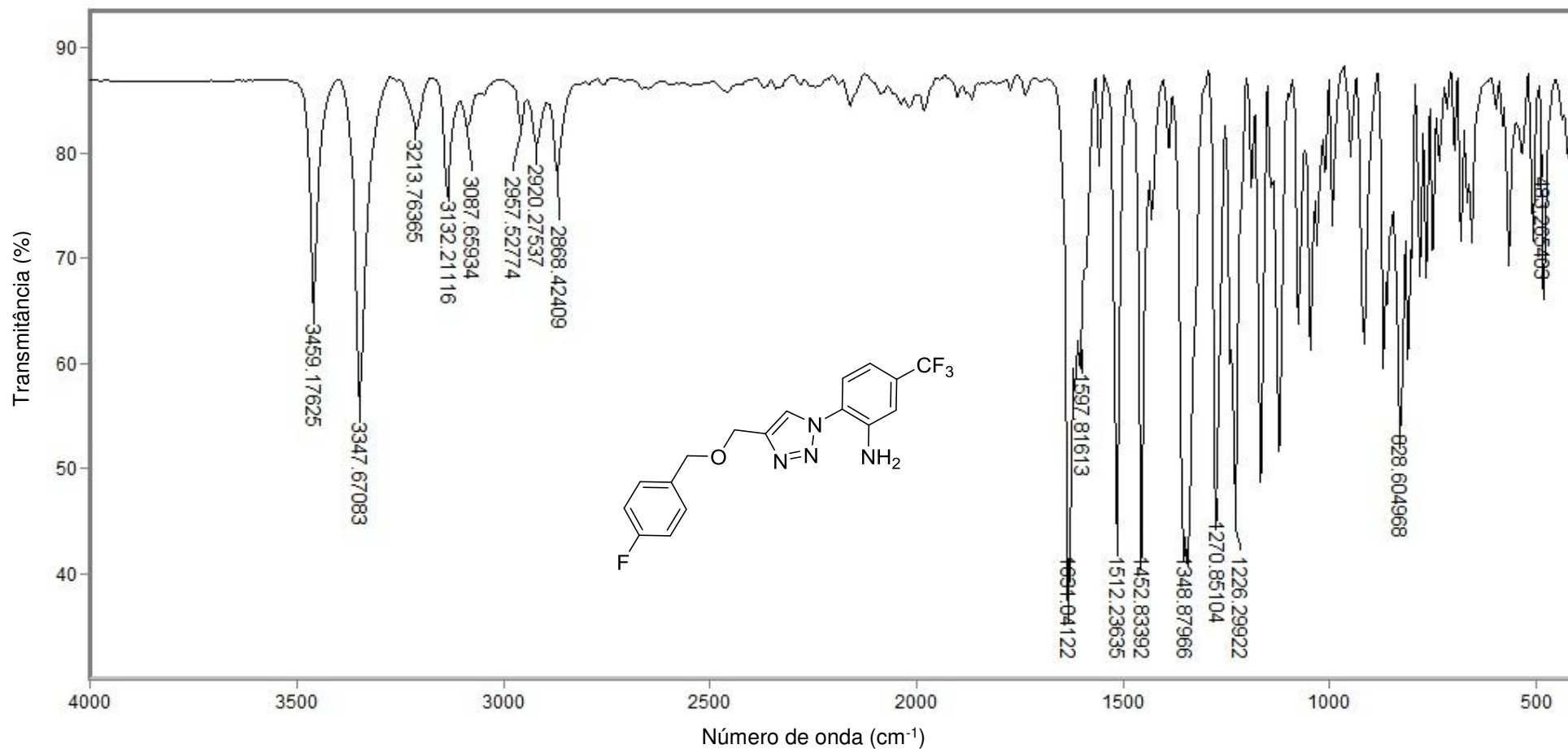


Figura 73 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

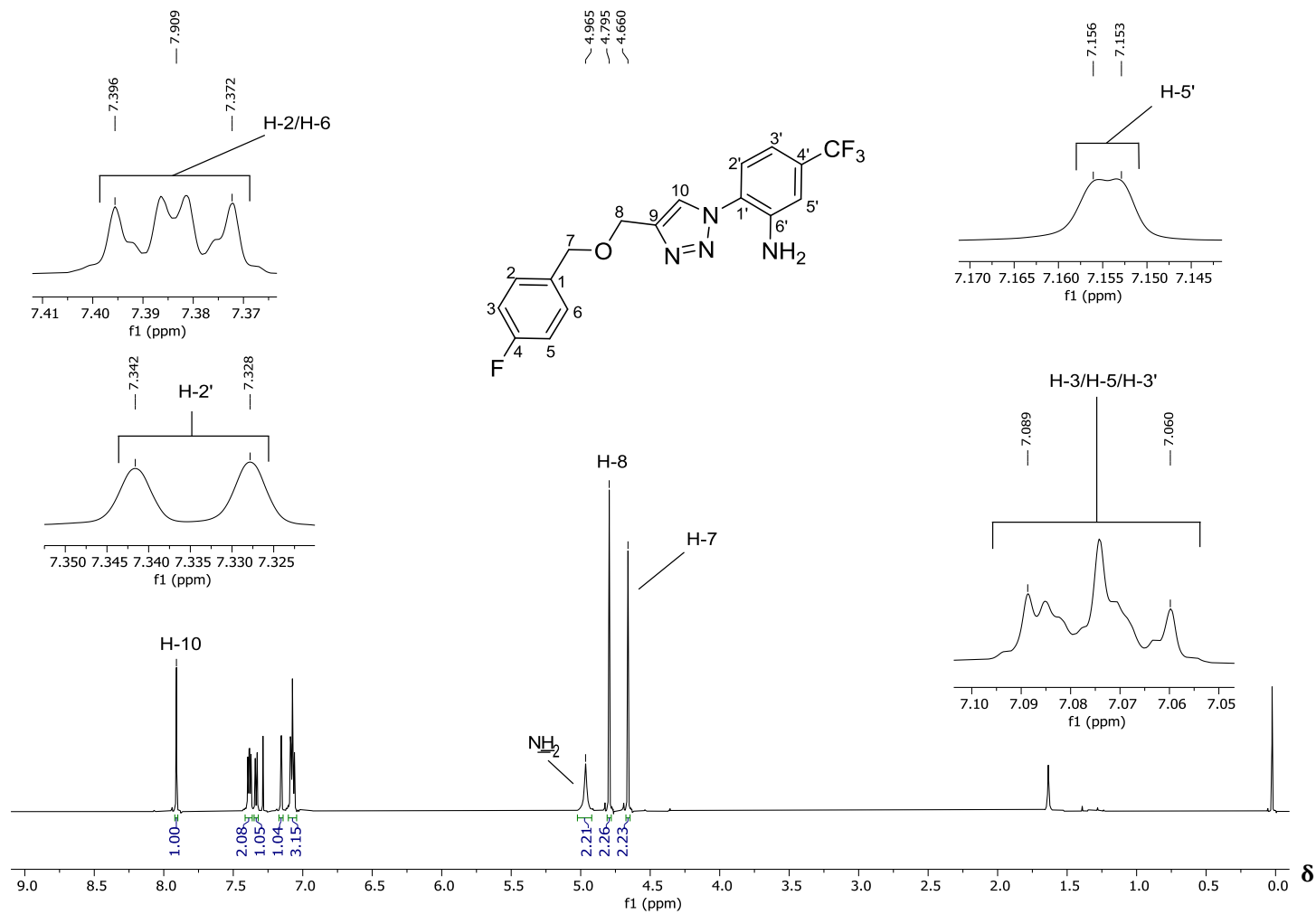


Figura 74 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **4h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

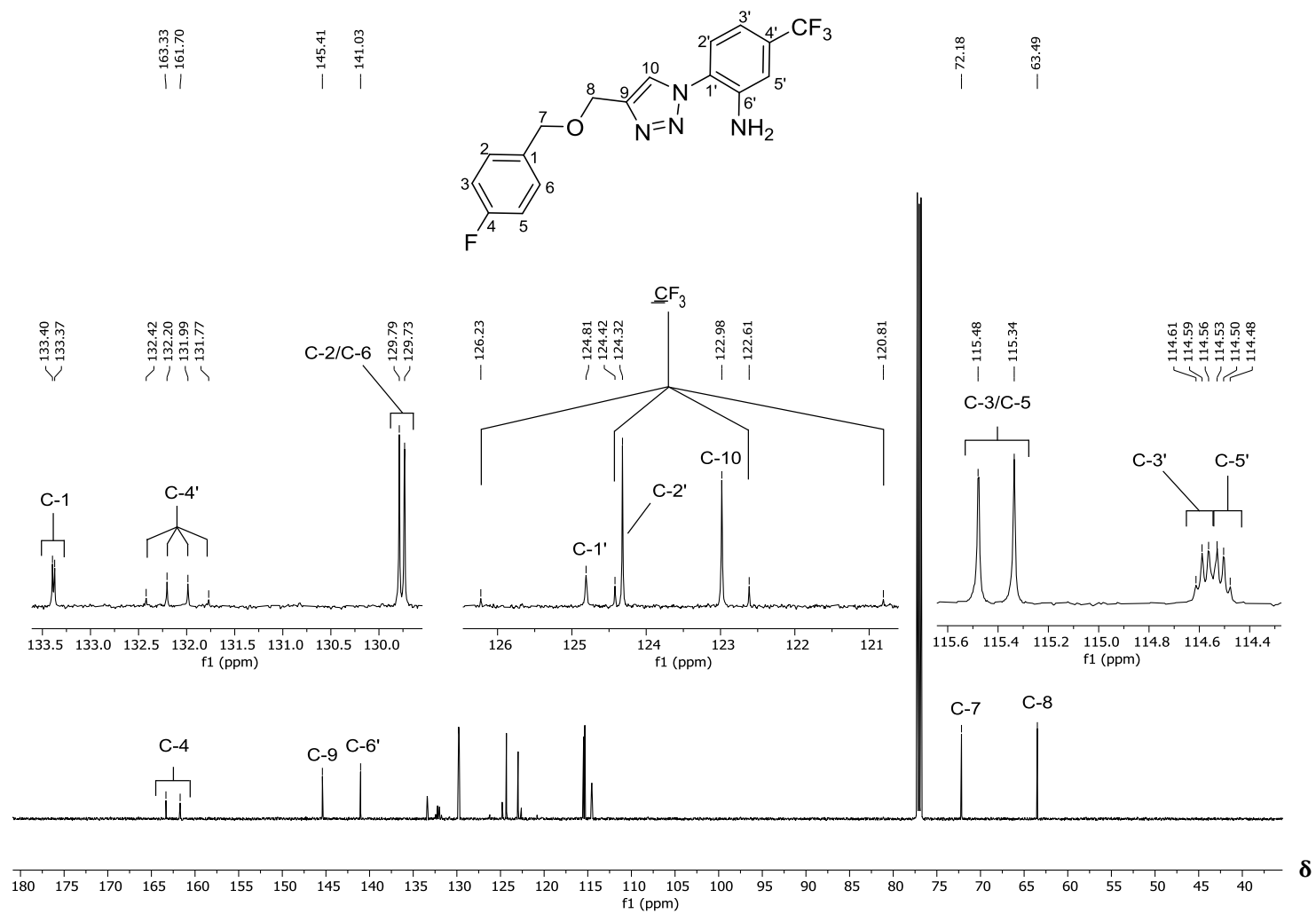


Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto **4h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

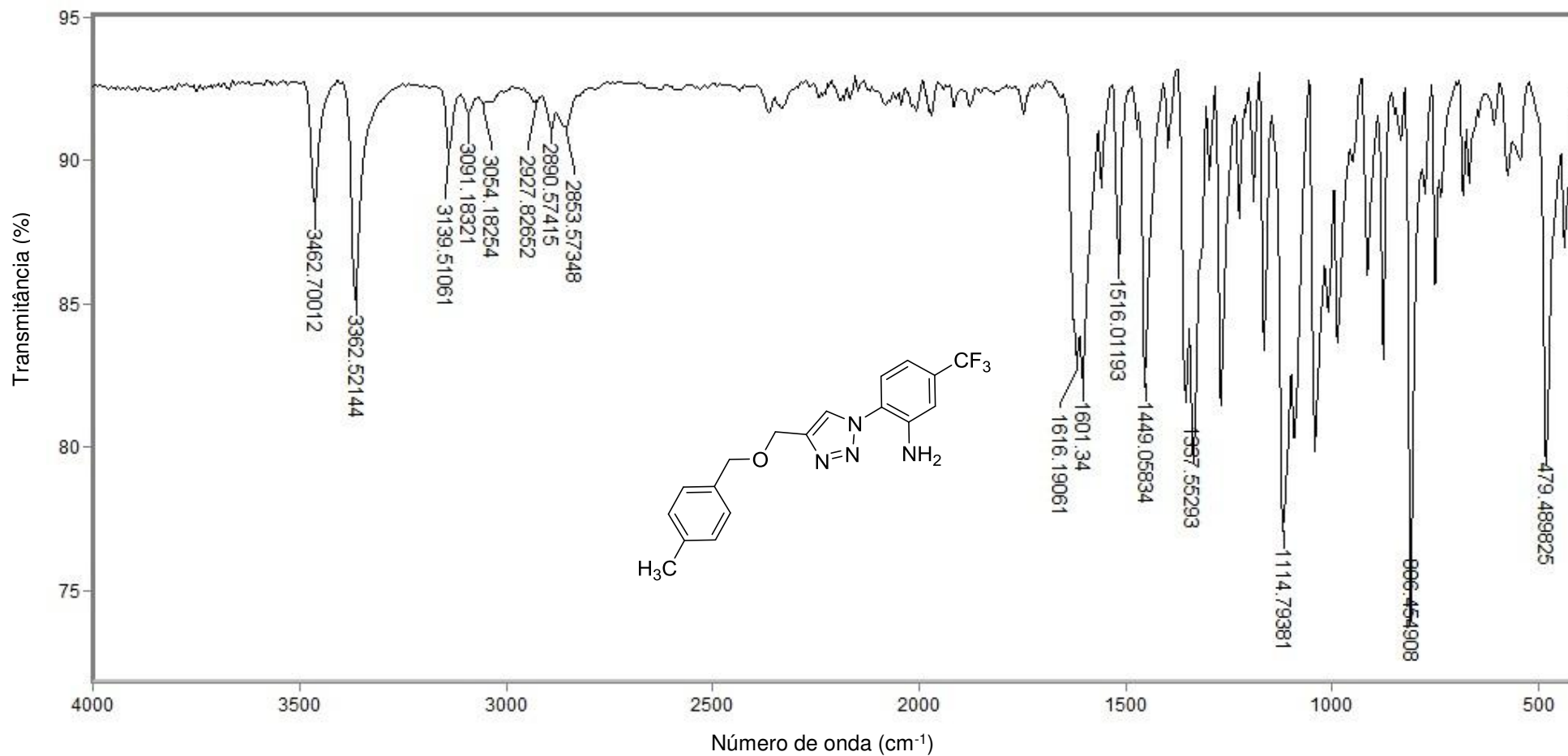


Figura 76 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

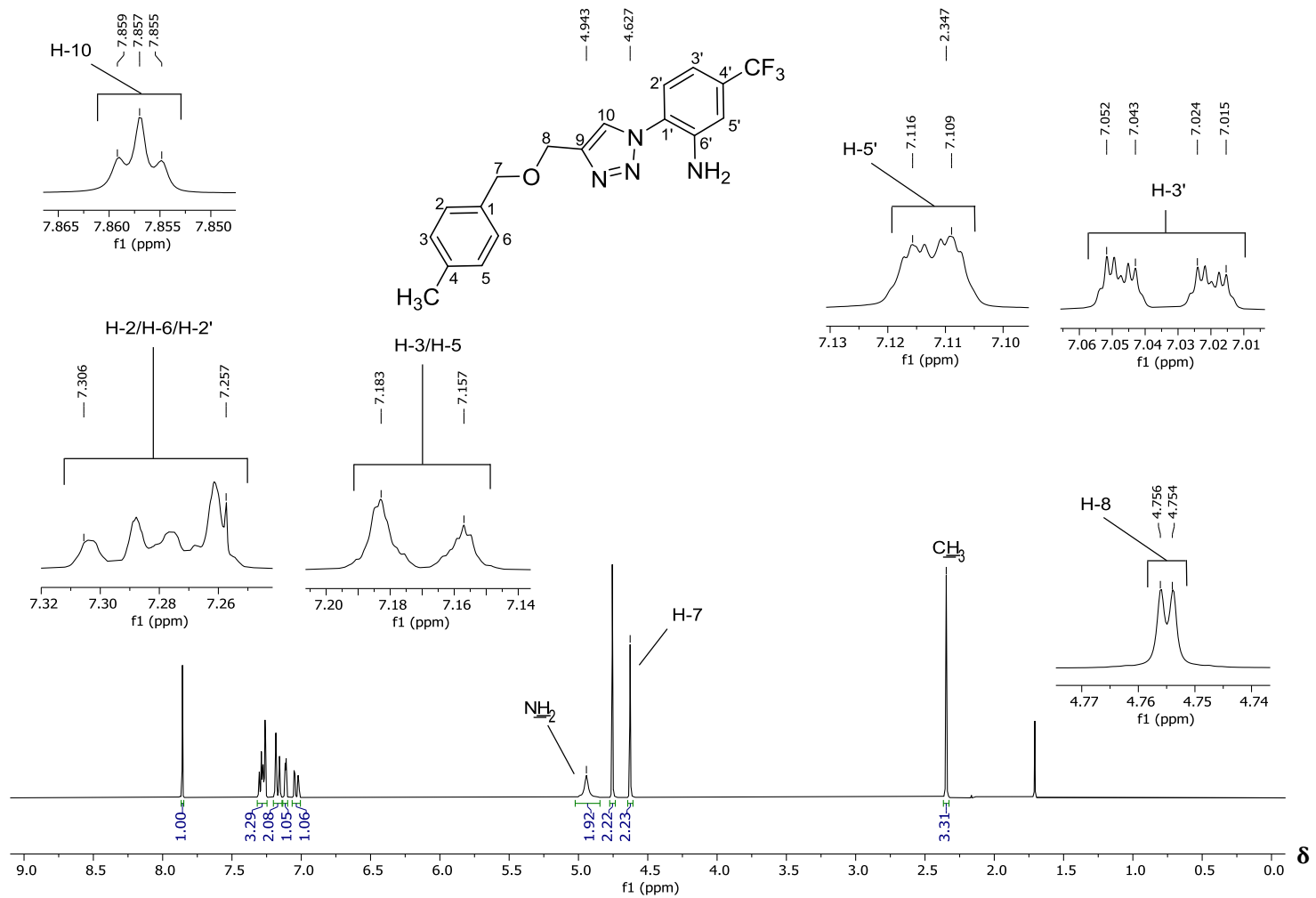


Figura 77 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **4i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

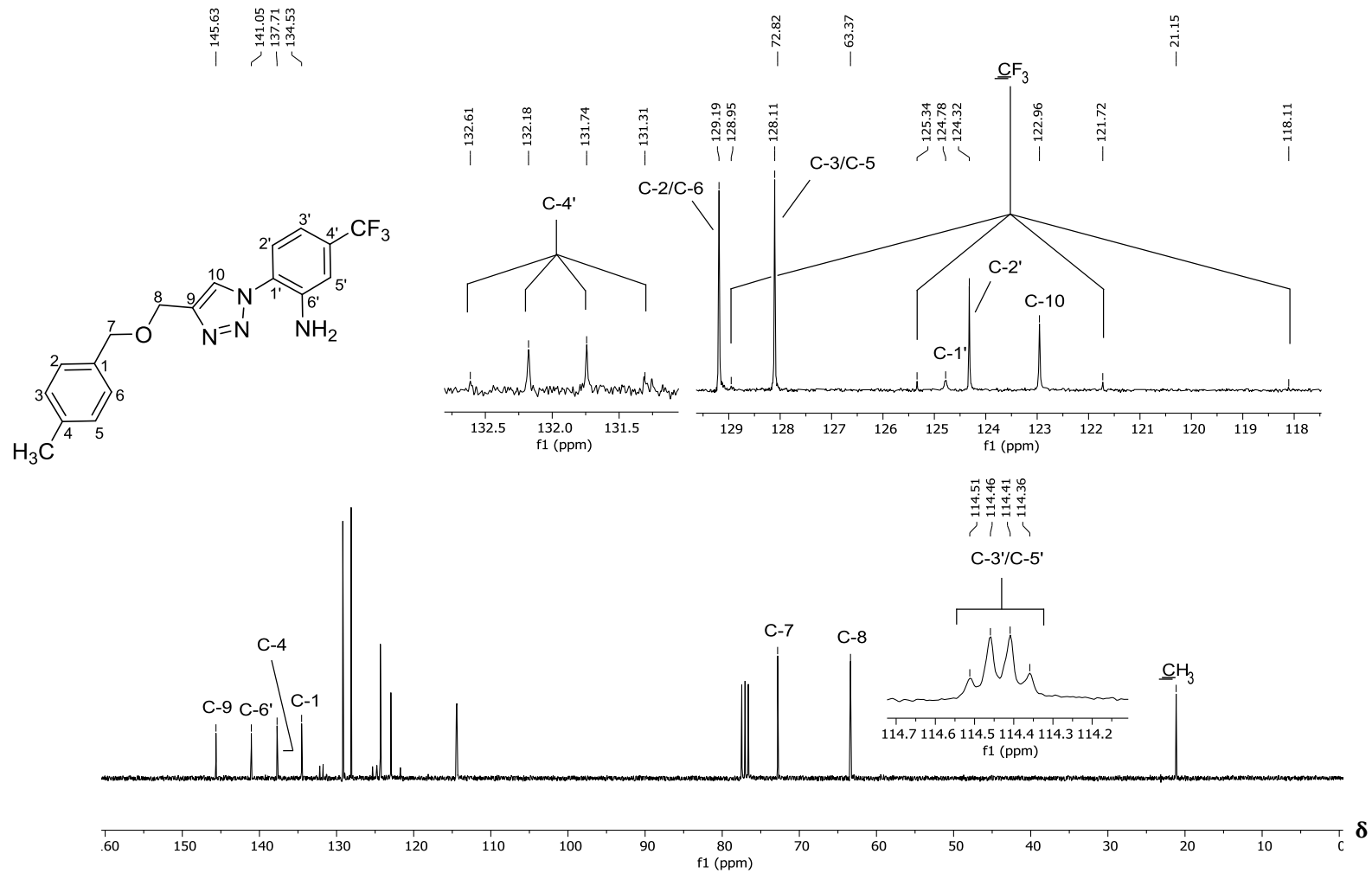


Figura 78 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

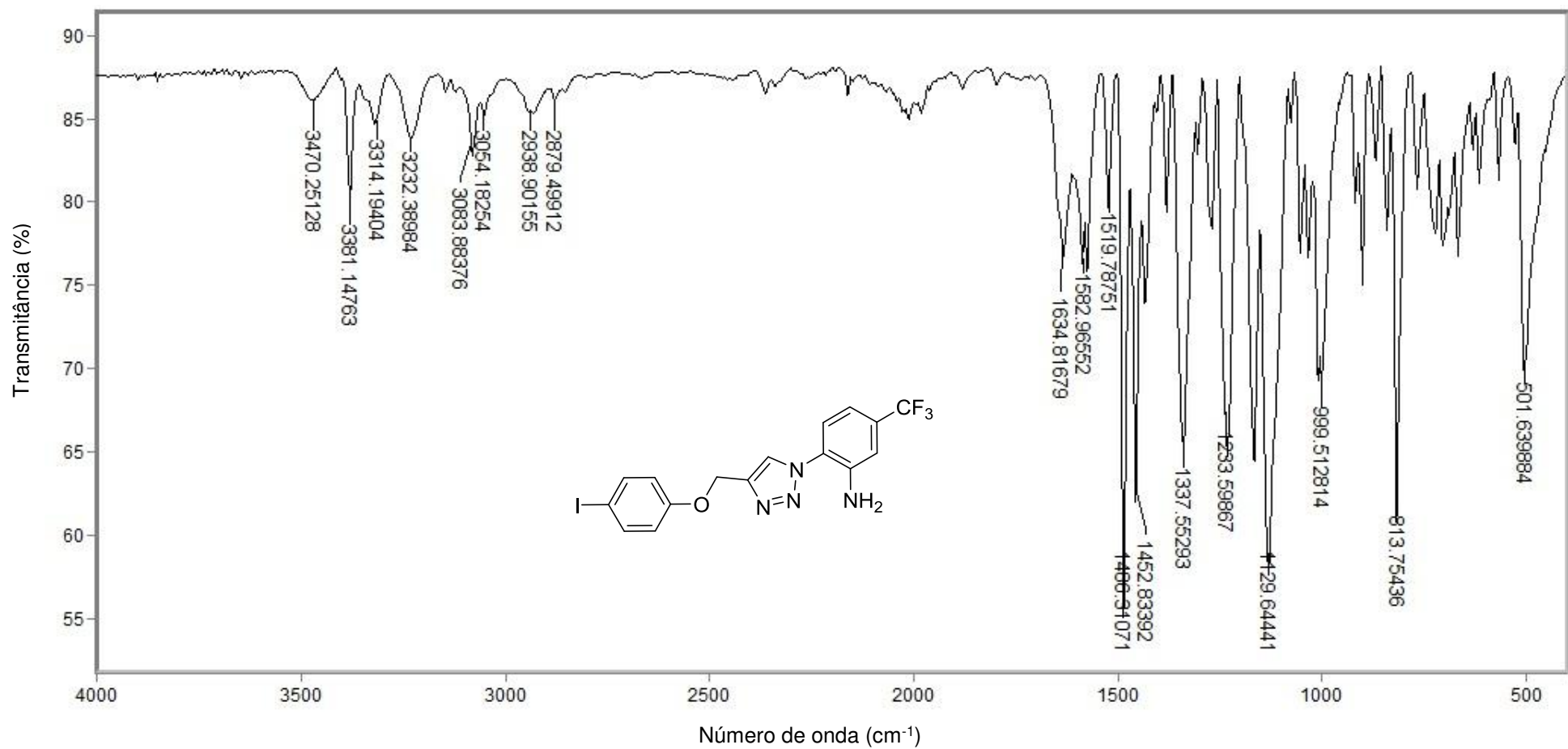


Figura 79 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **4j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

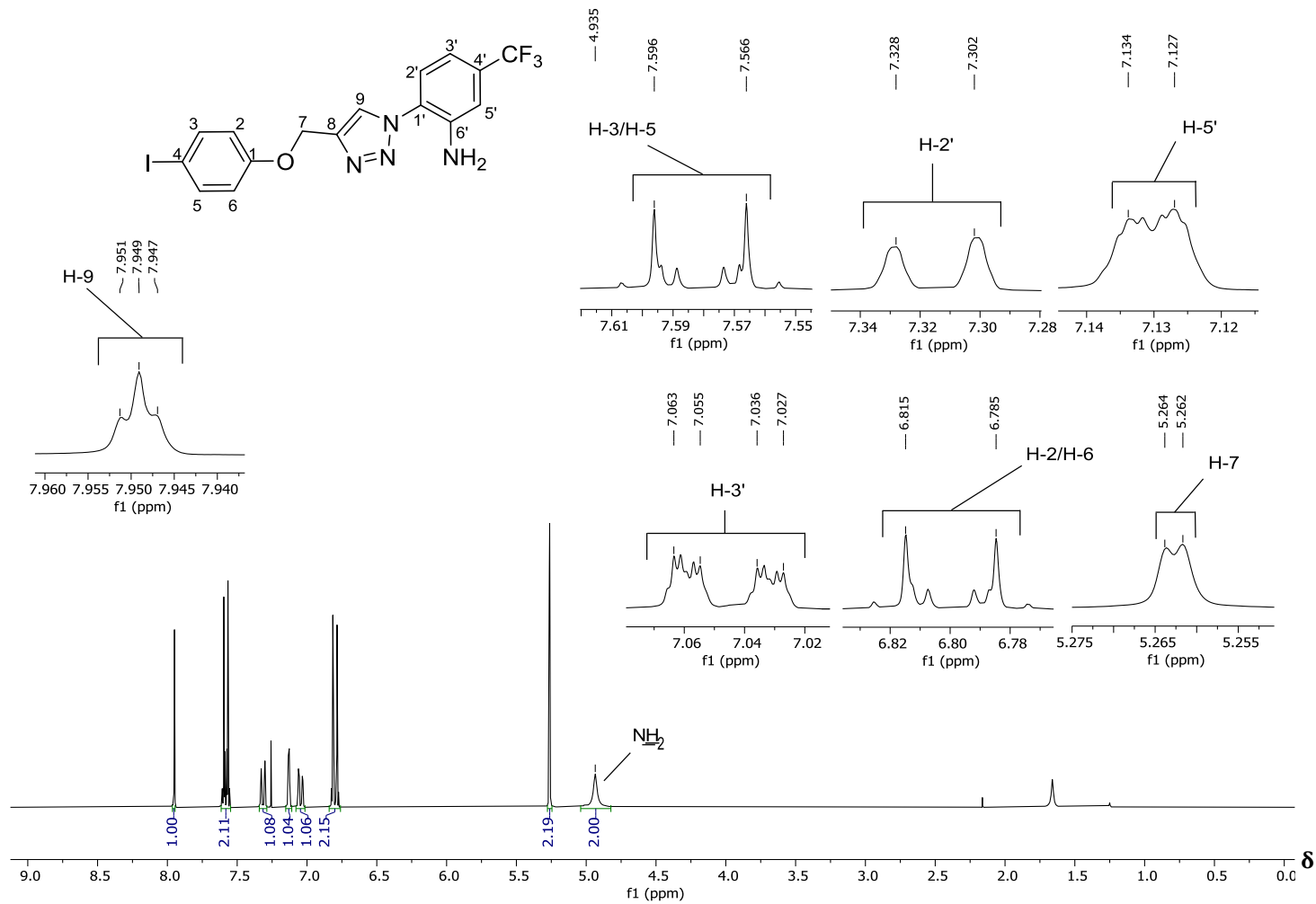


Figura 80 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **4j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

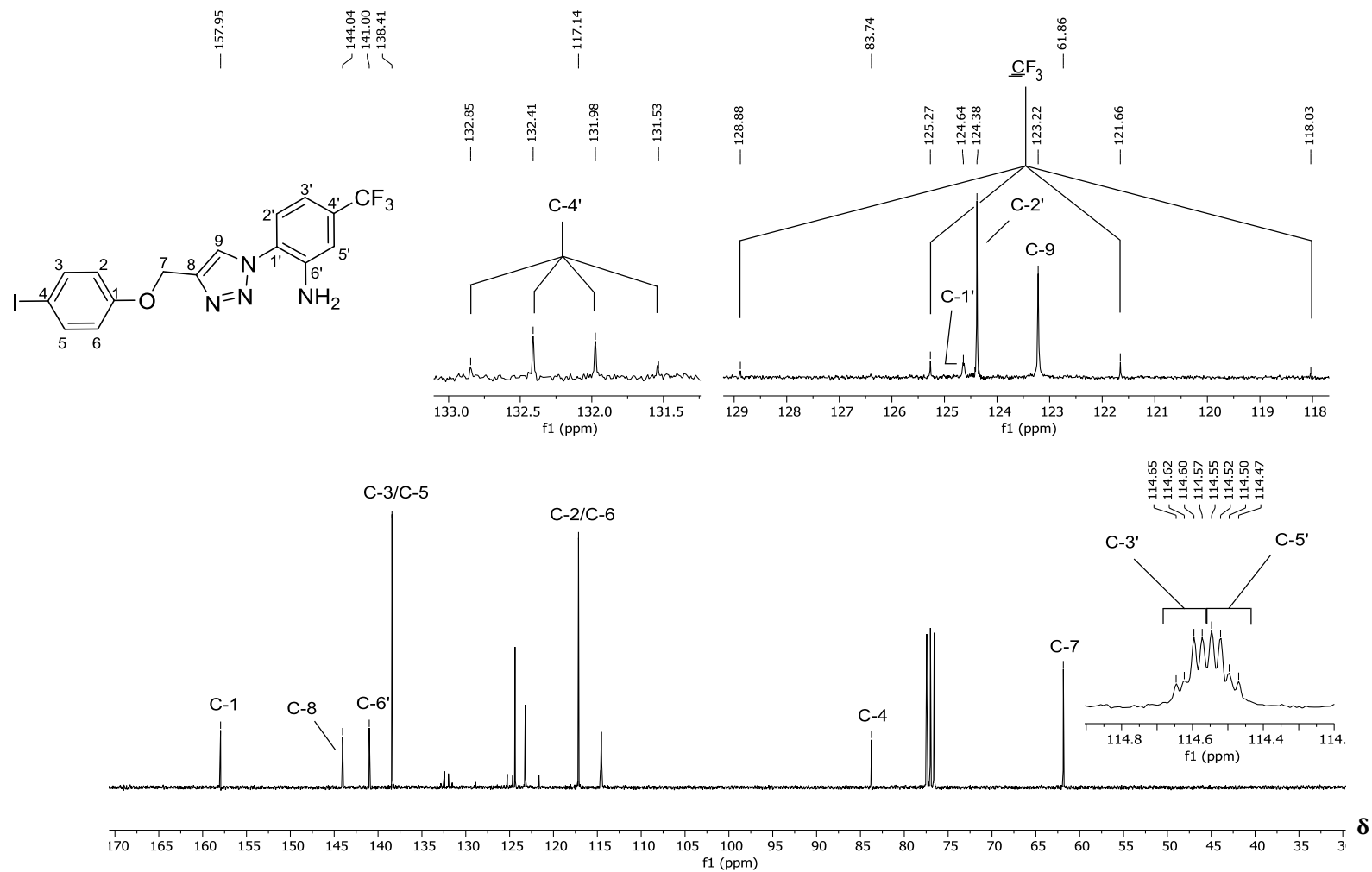


Figura 81 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **4j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

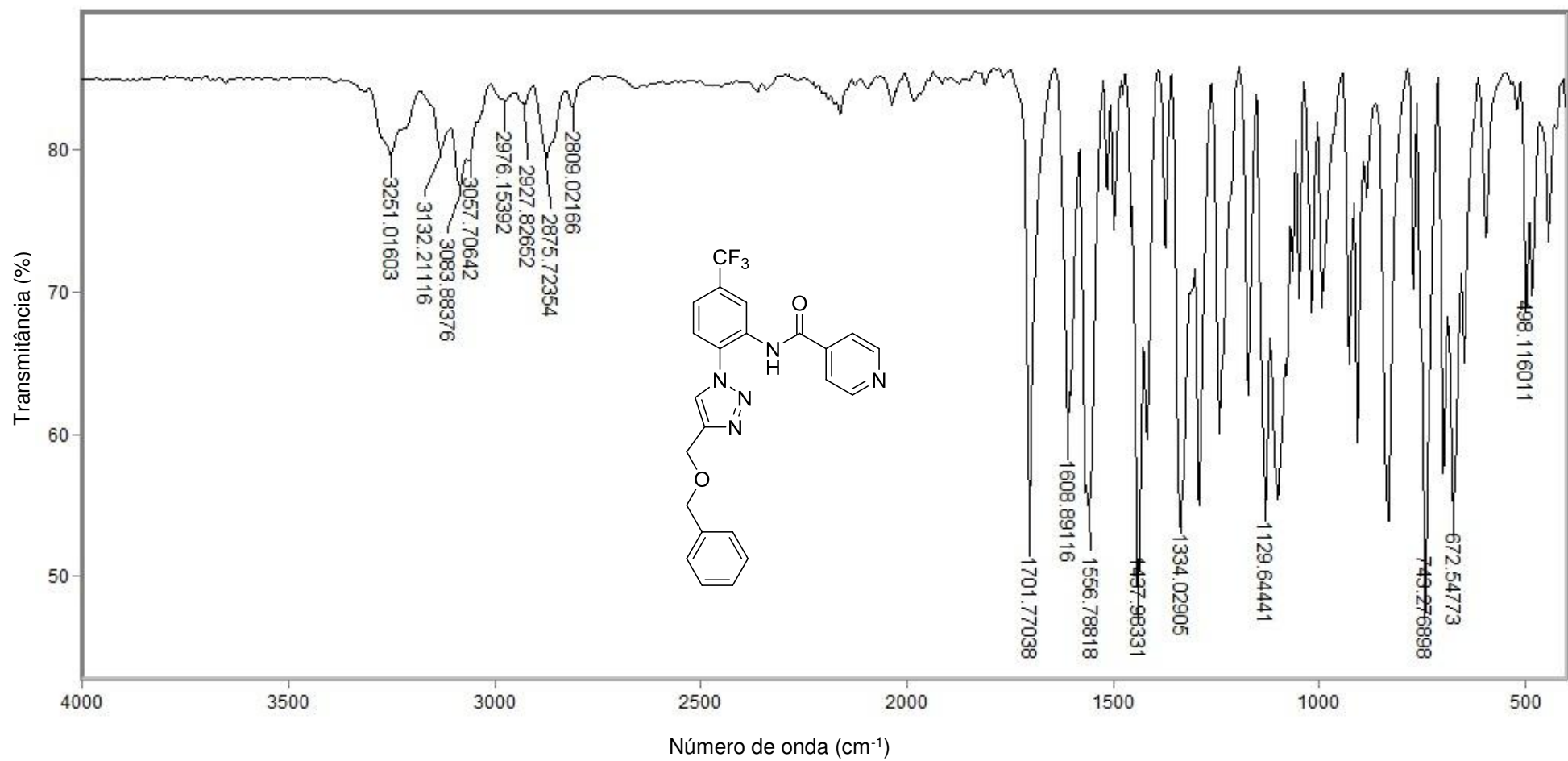


Figura 82 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

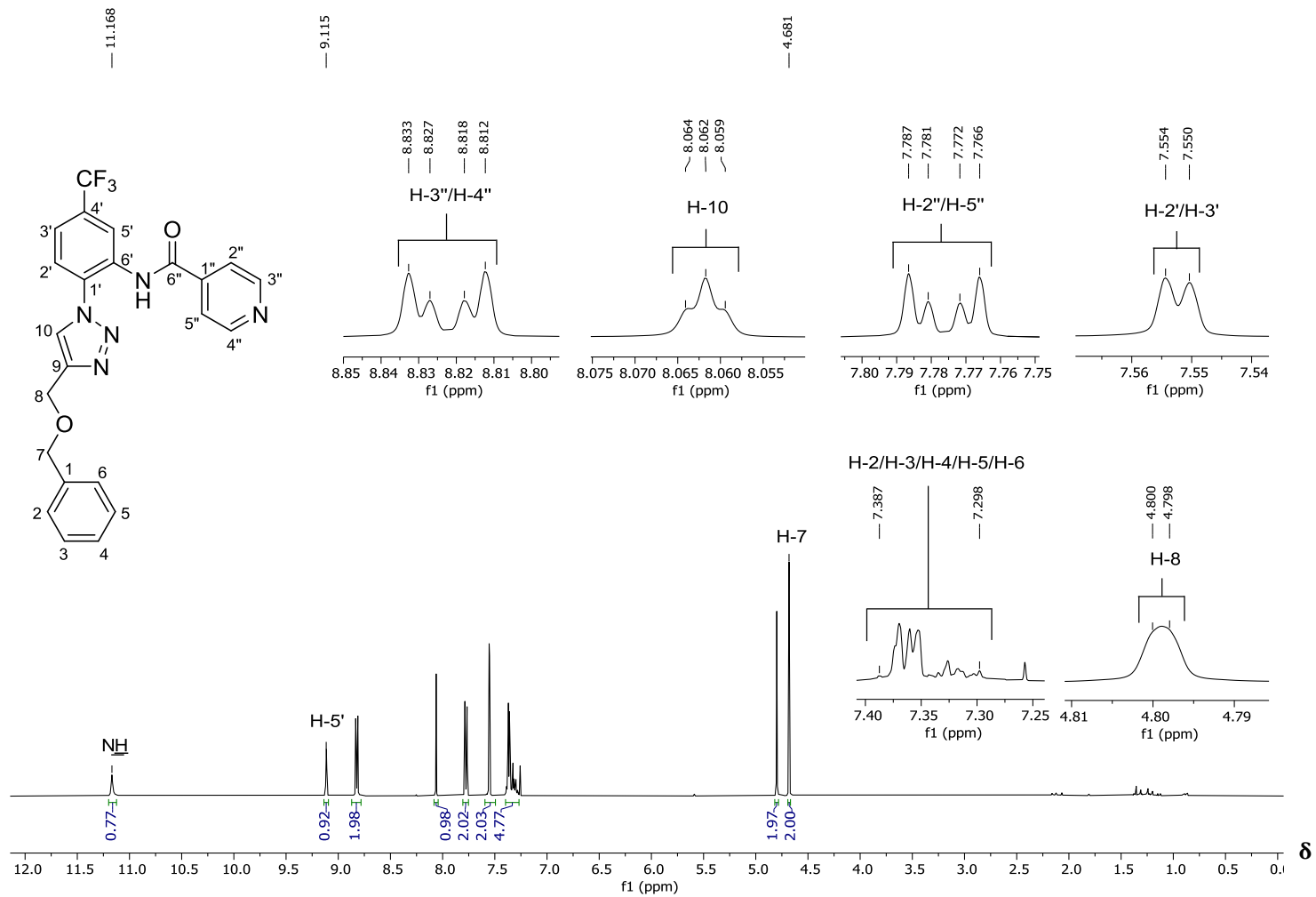


Figura 83 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

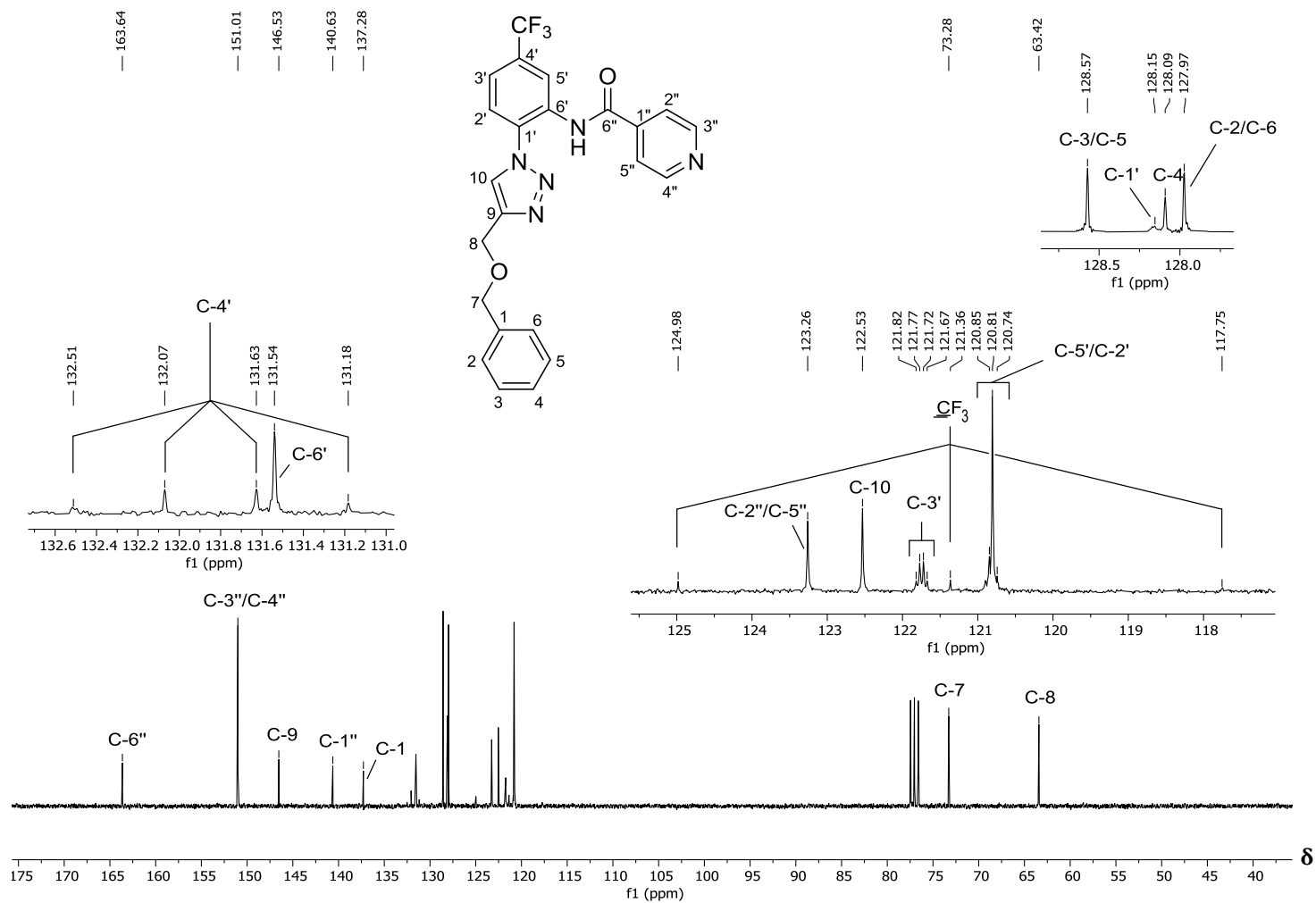


Figura 84 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5b**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

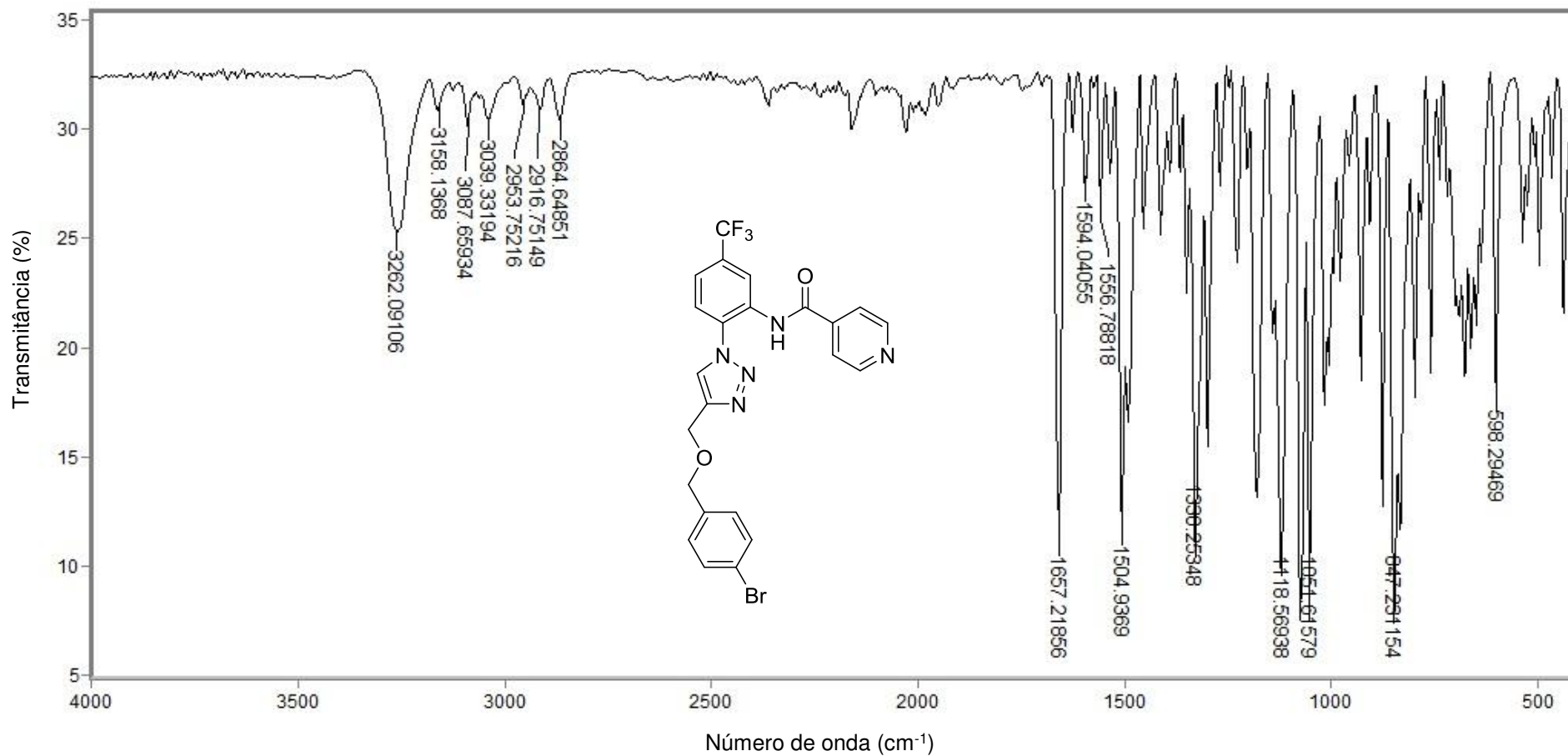


Figura 85 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

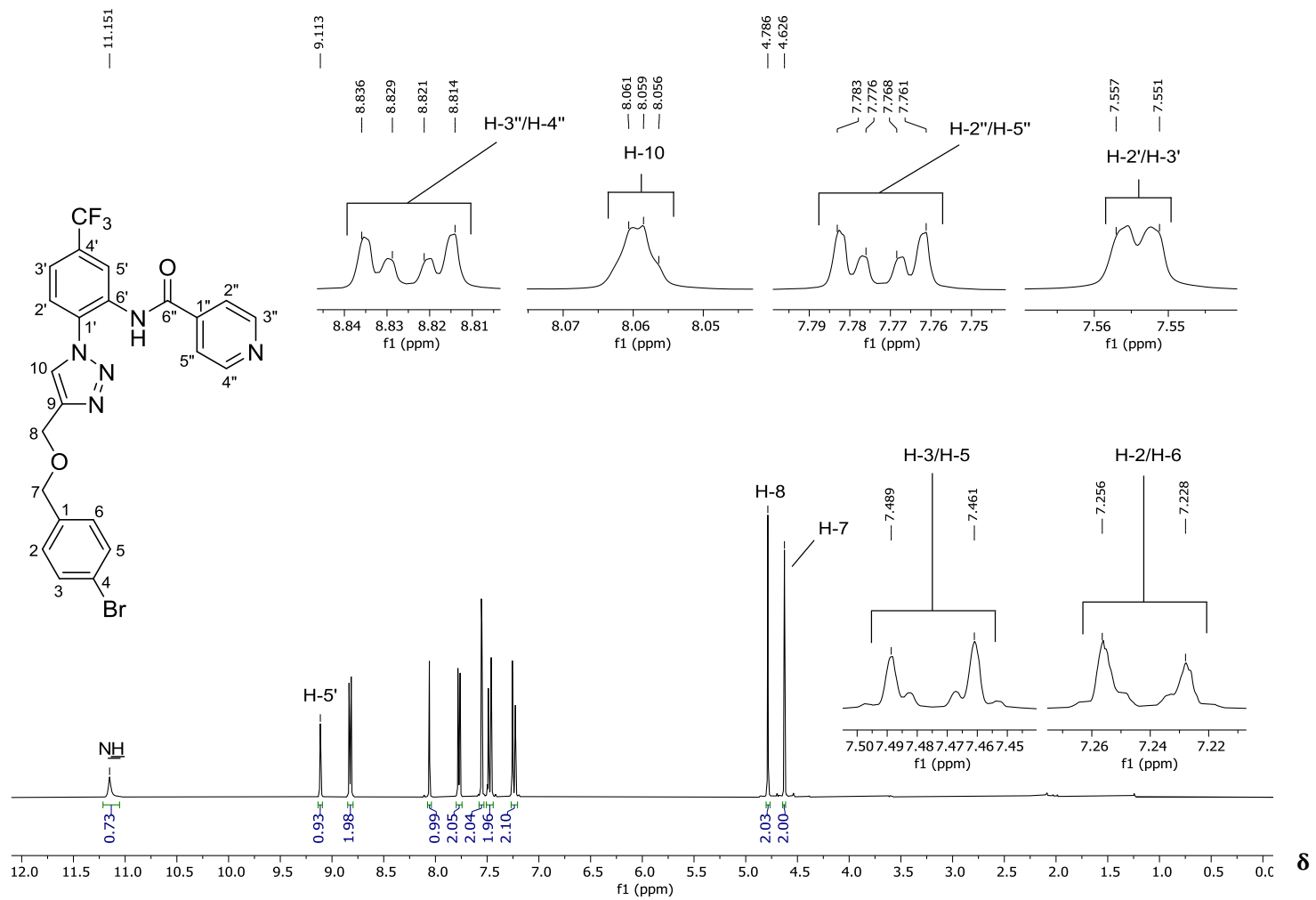


Figura 86 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

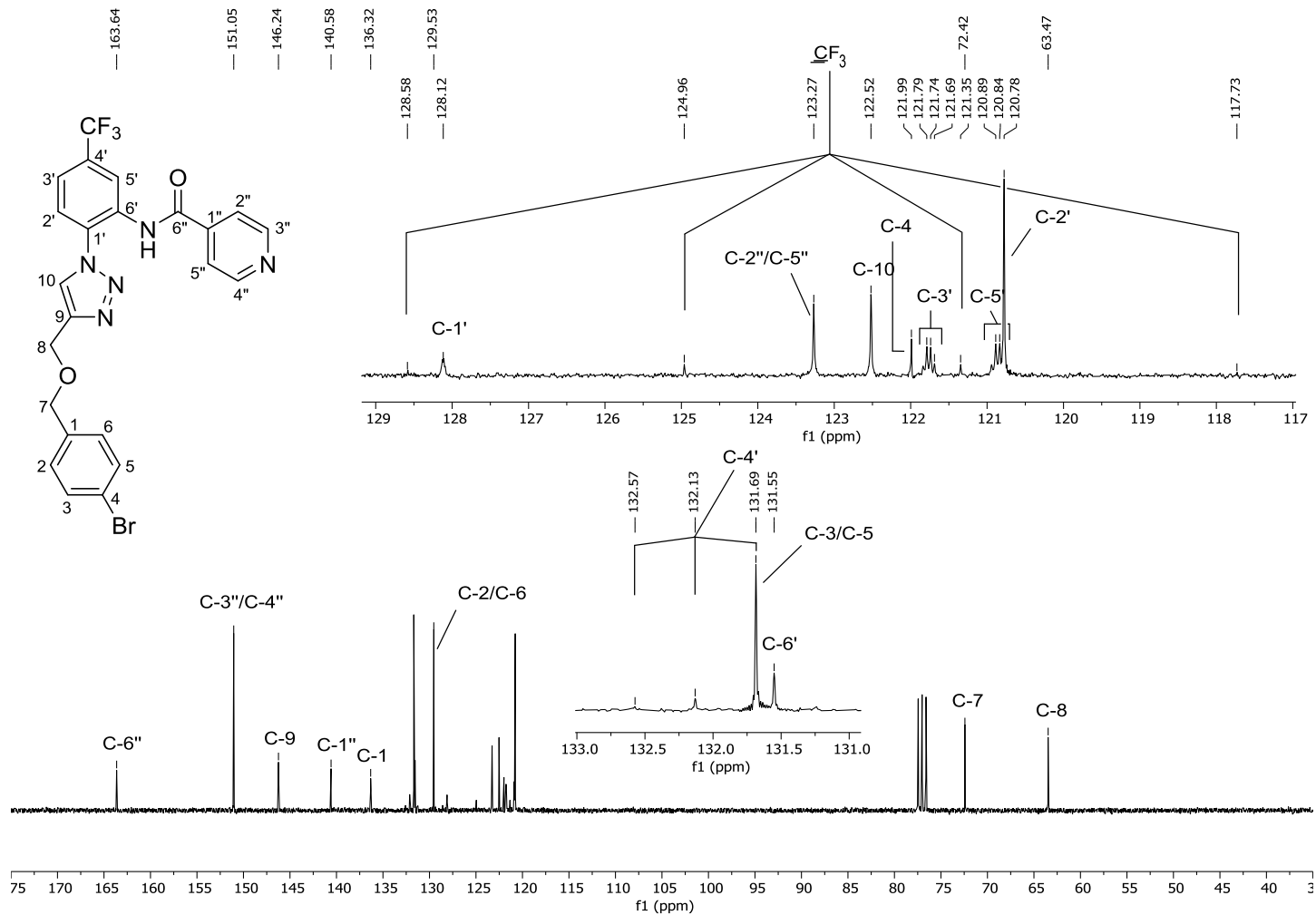


Figura 87 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5c**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

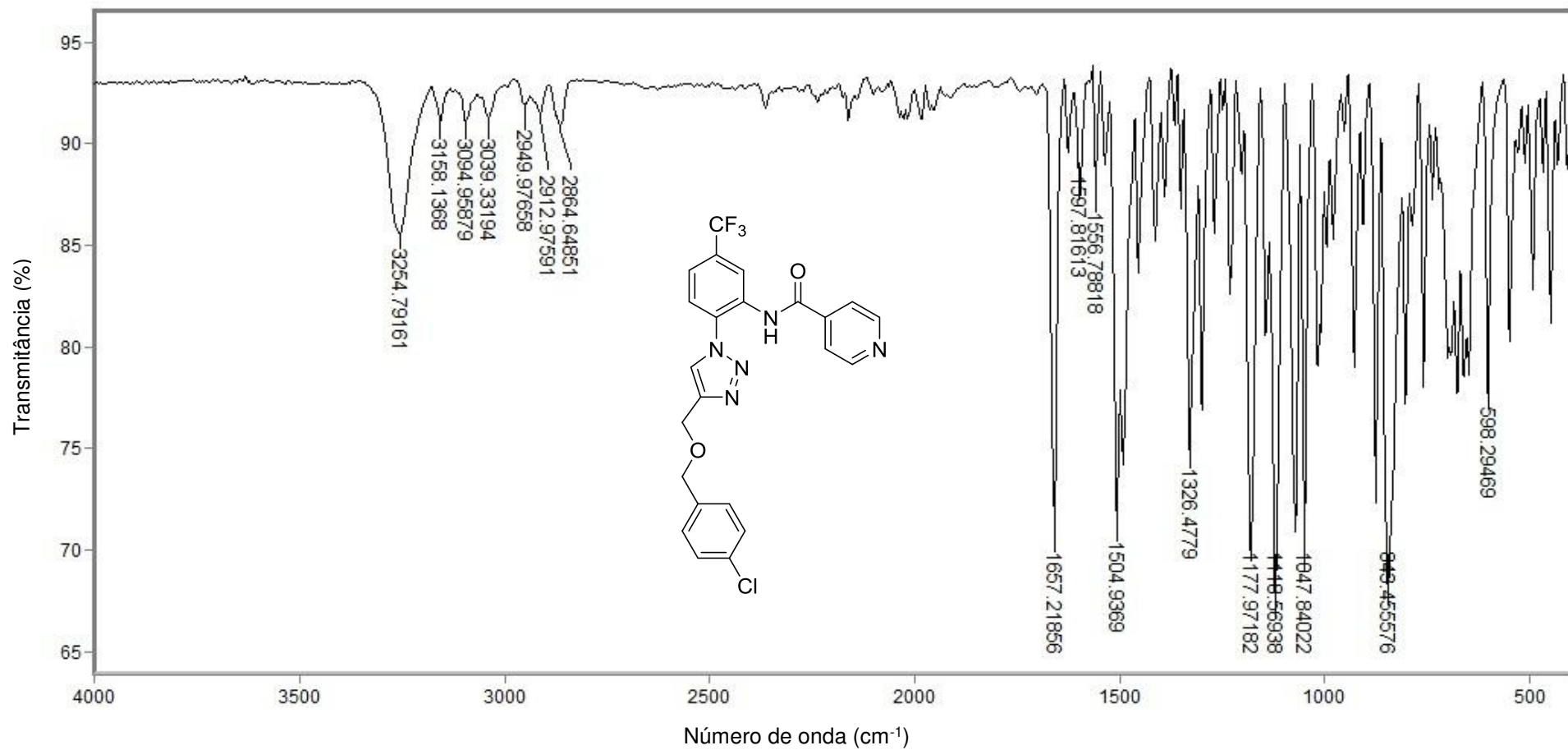


Figura 88 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

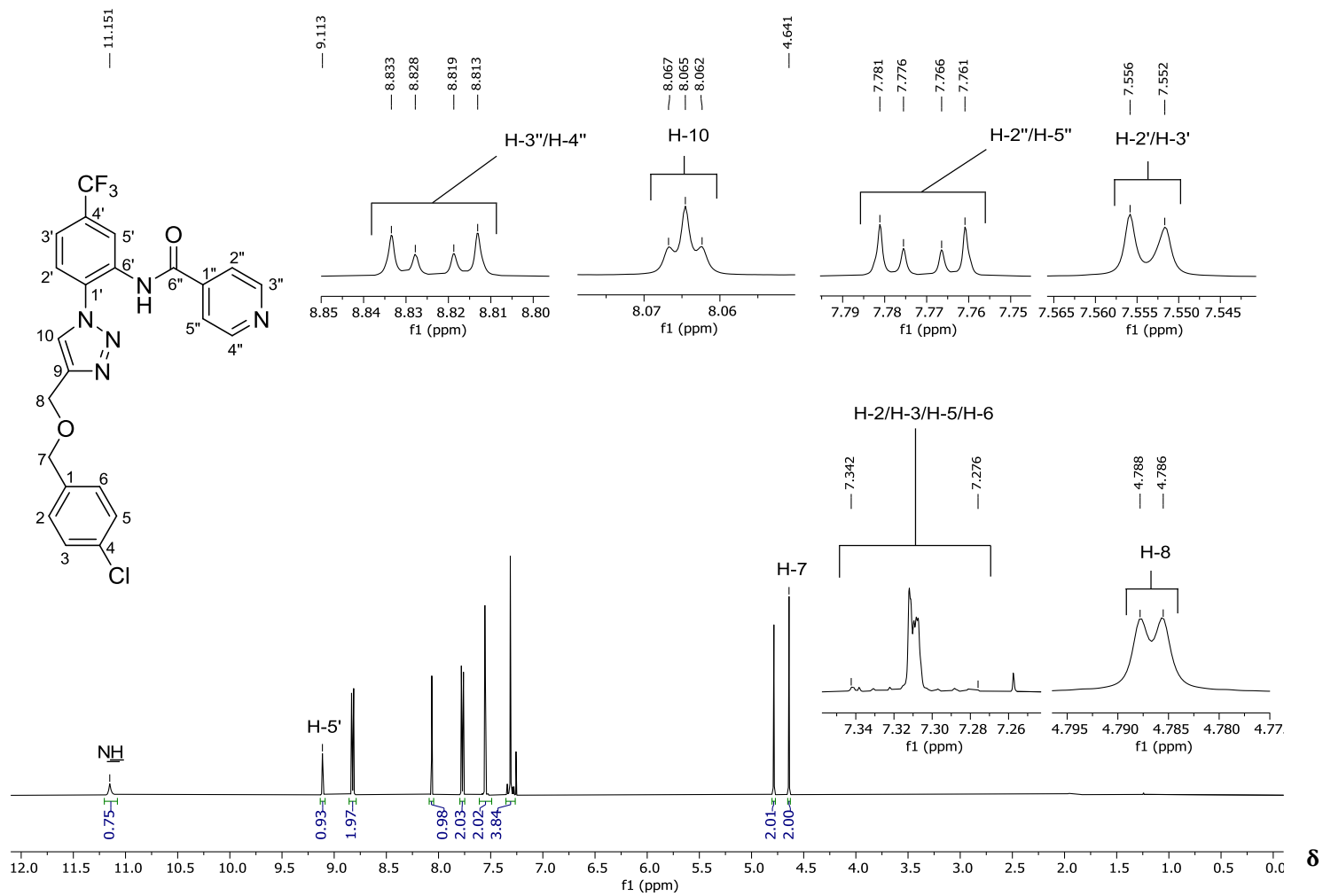


Figura 89 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

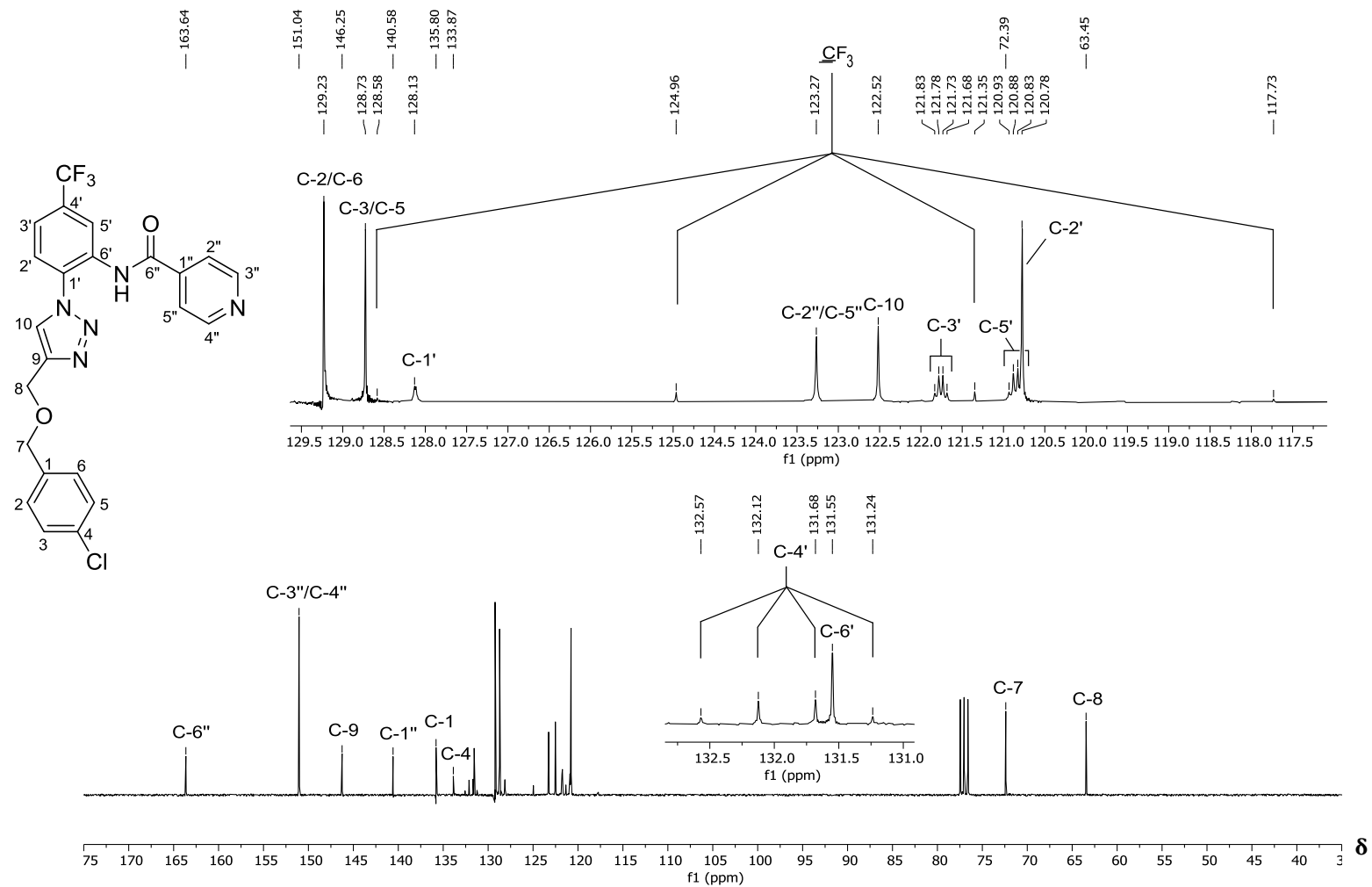


Figura 90 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5d**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

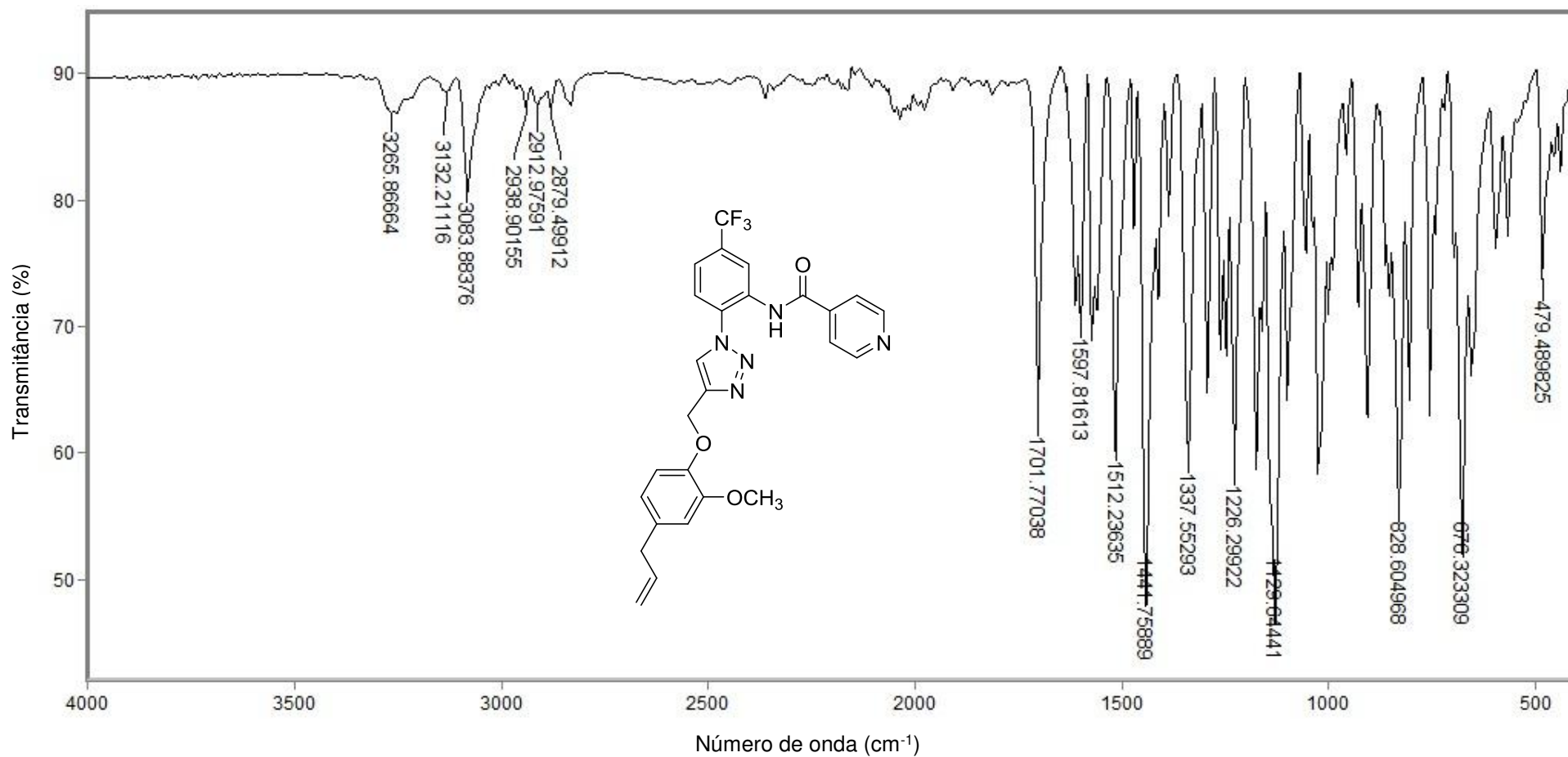


Figura 91 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

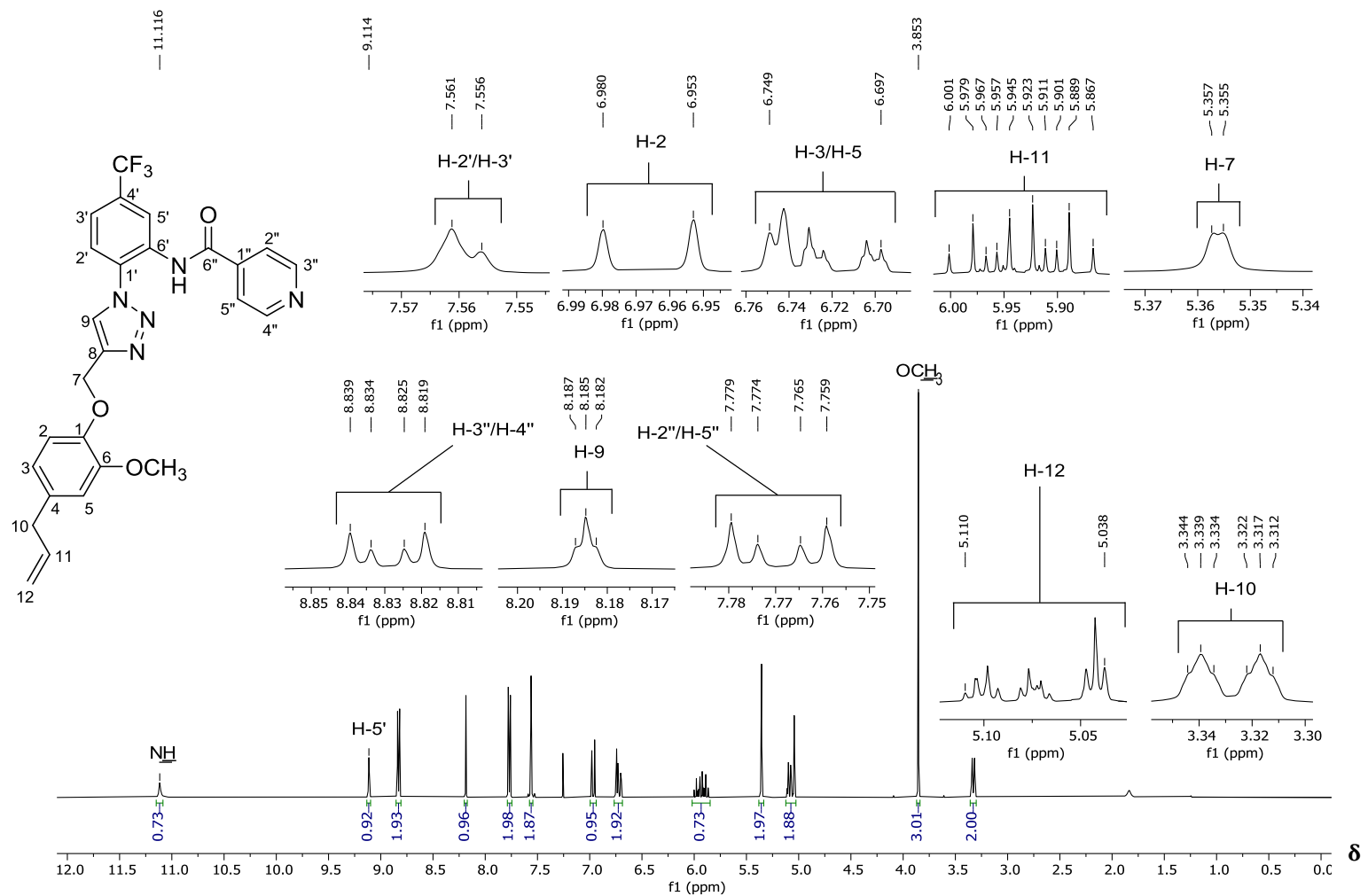


Figura 92 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

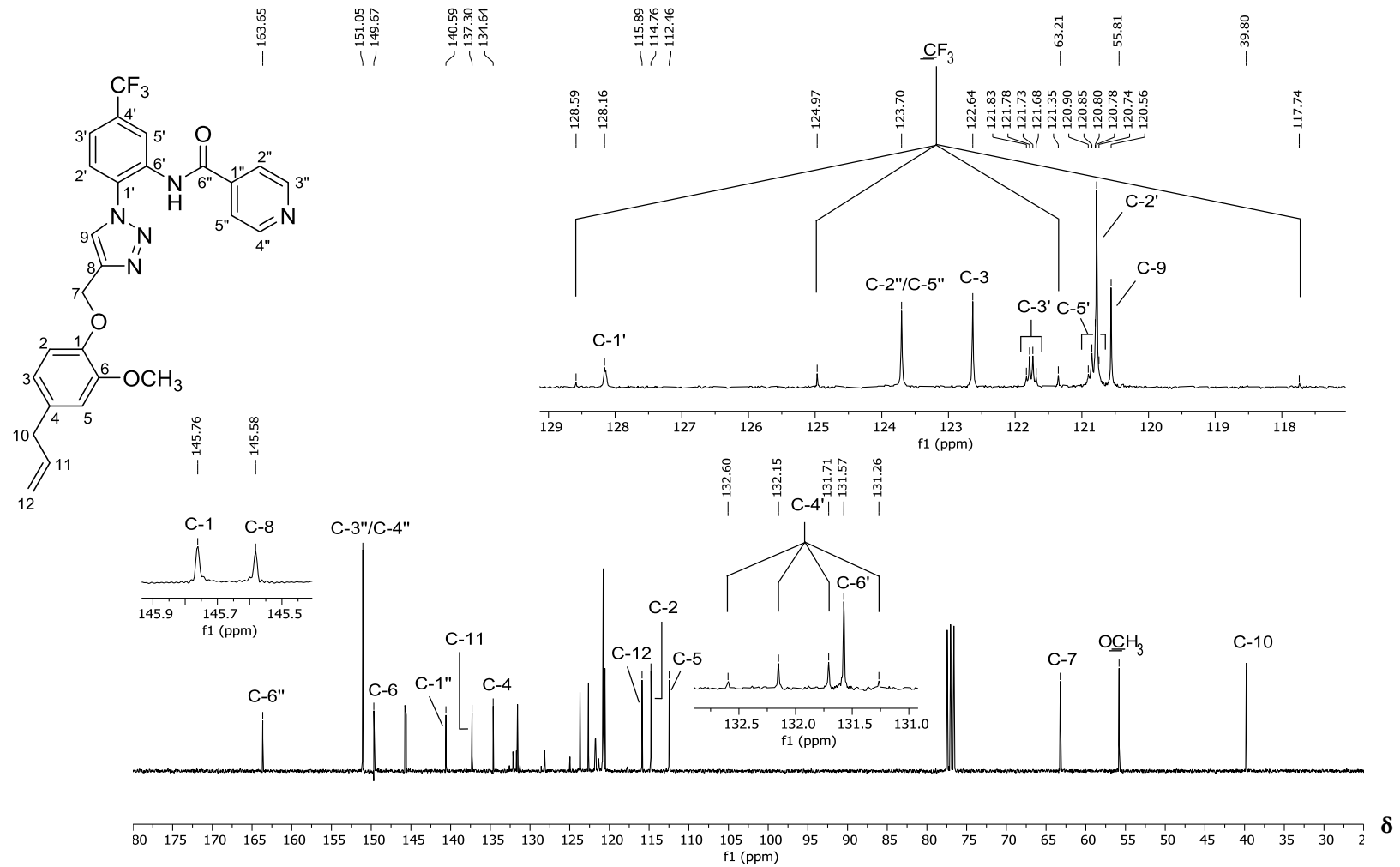


Figura 93 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5e**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

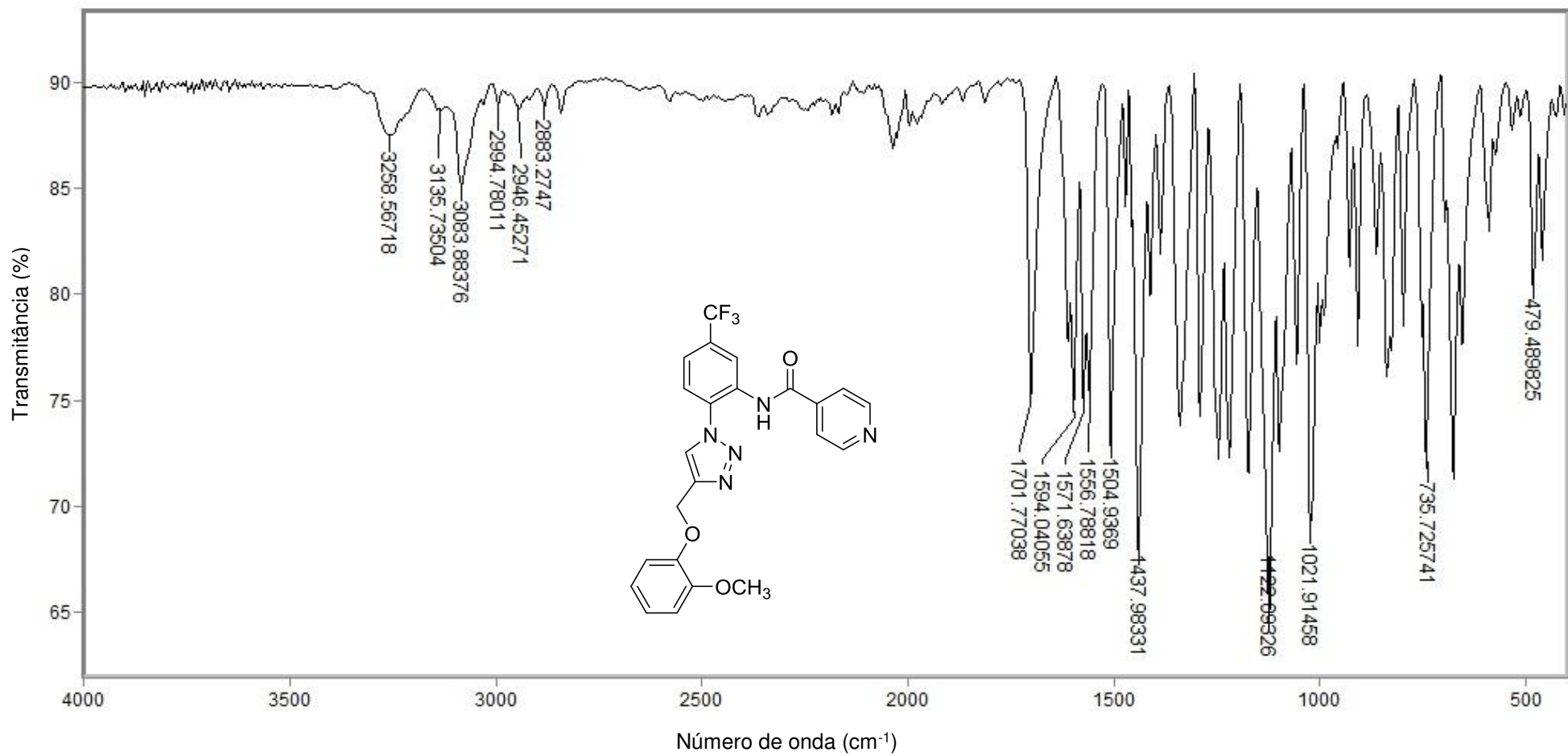


Figura 94 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

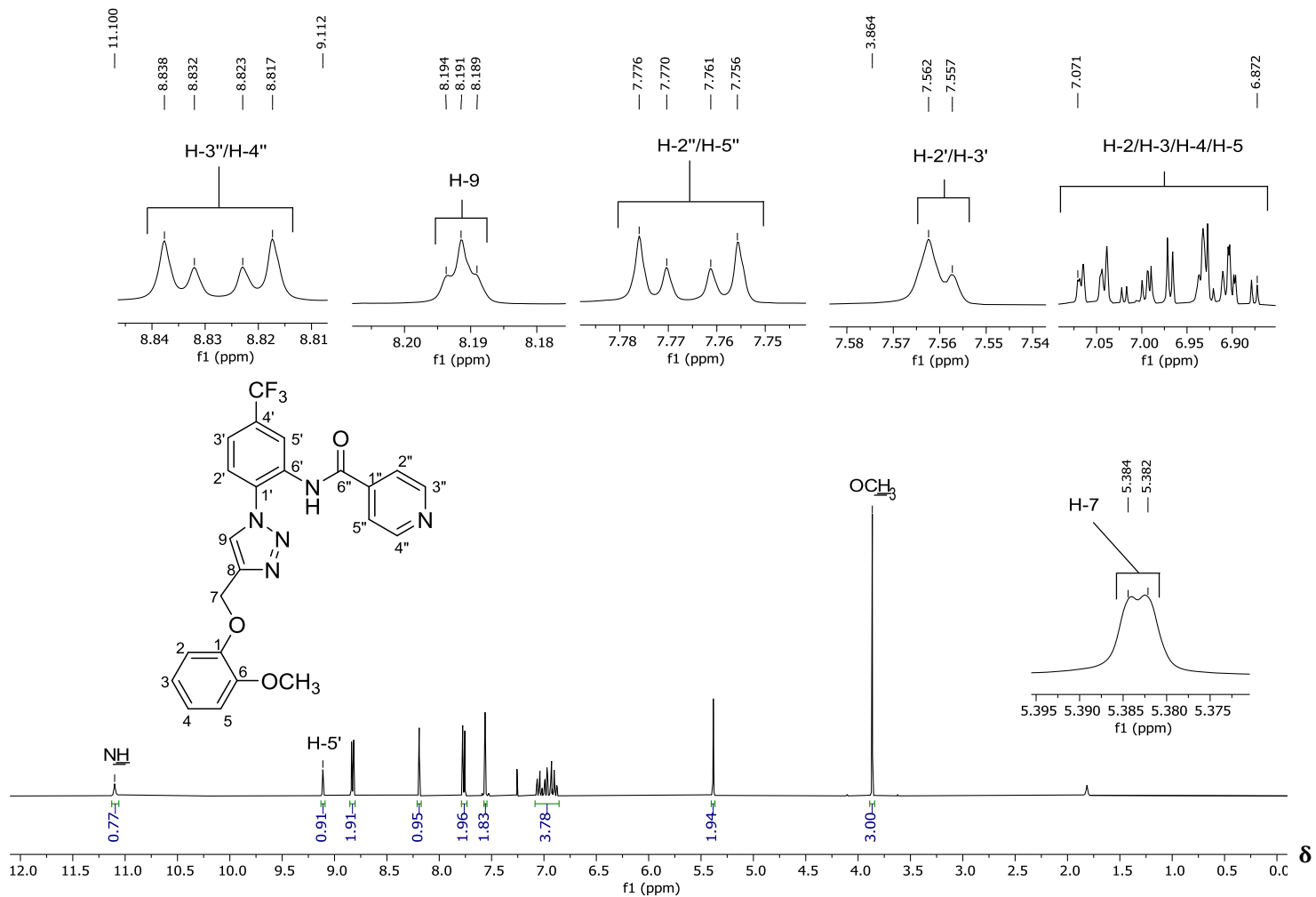


Figura 95 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

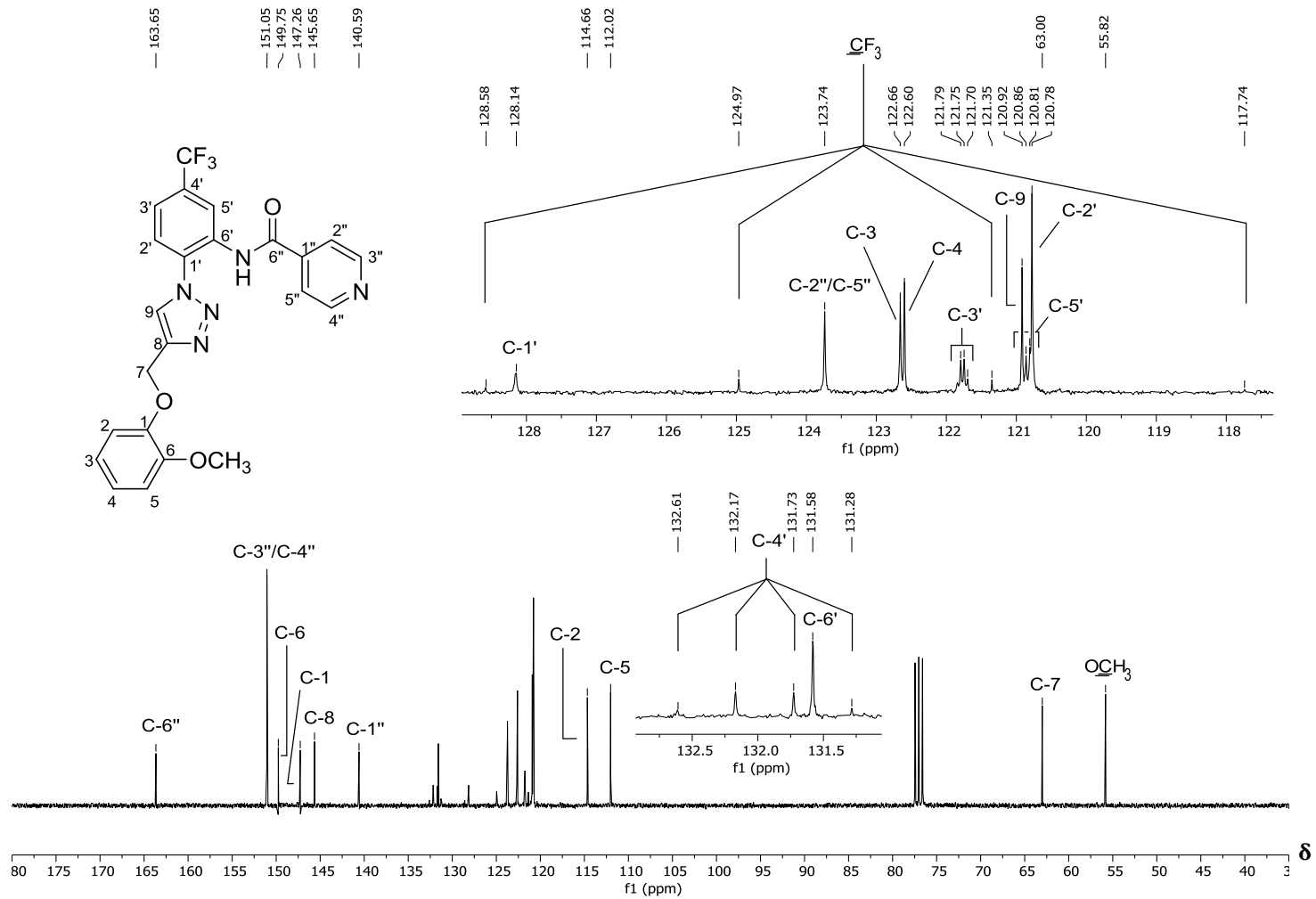


Figura 96 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5f**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

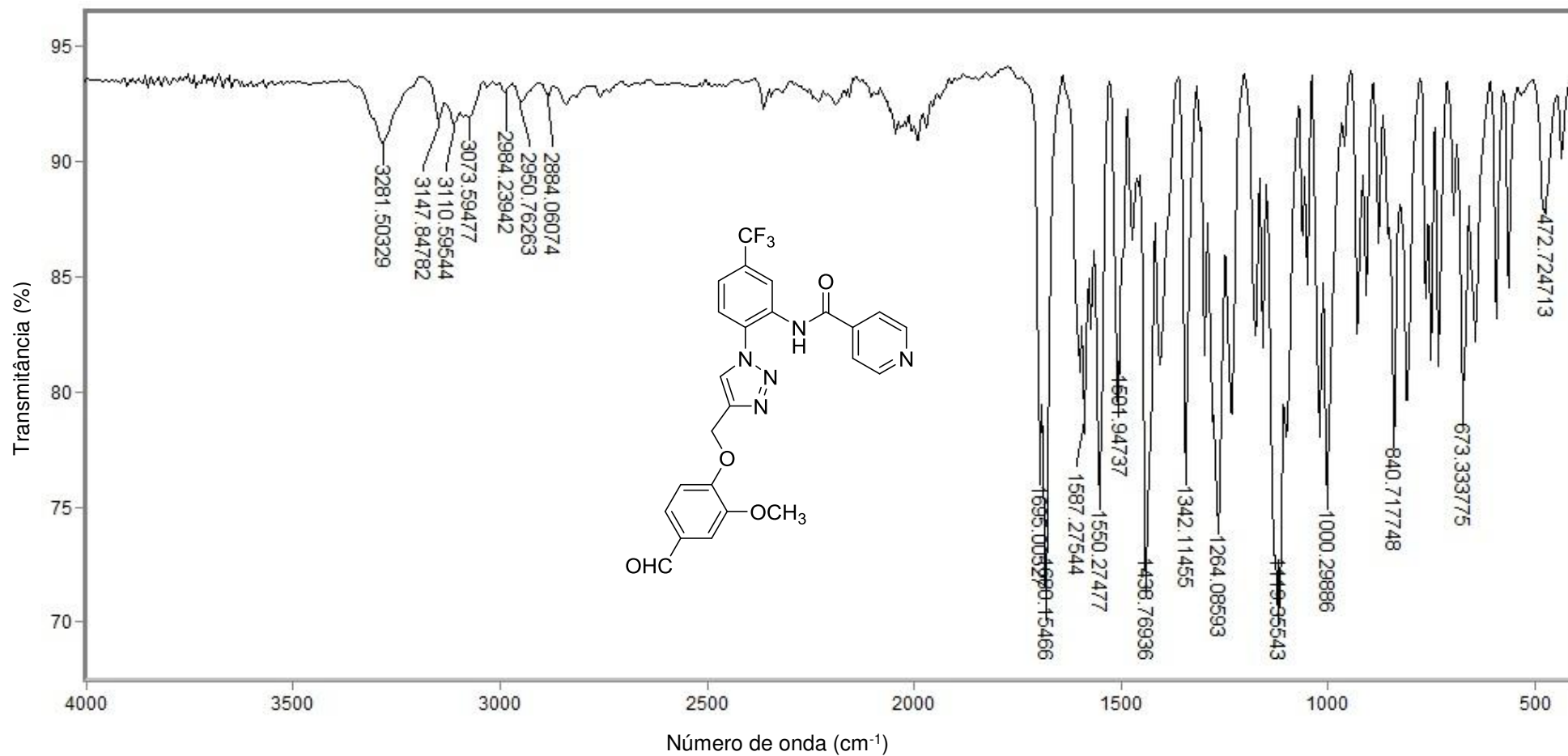


Figura 97 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

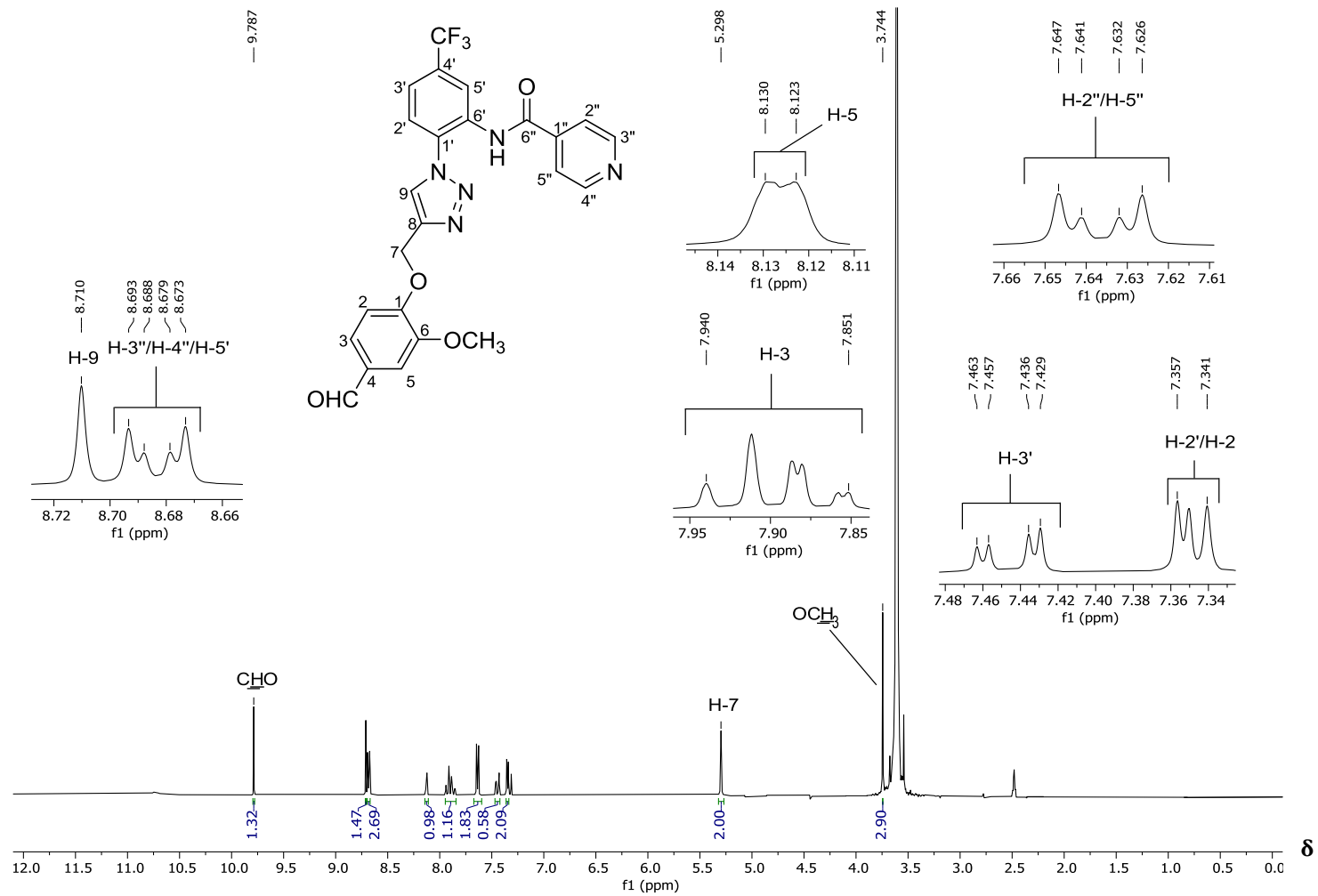


Figura 98 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **5g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

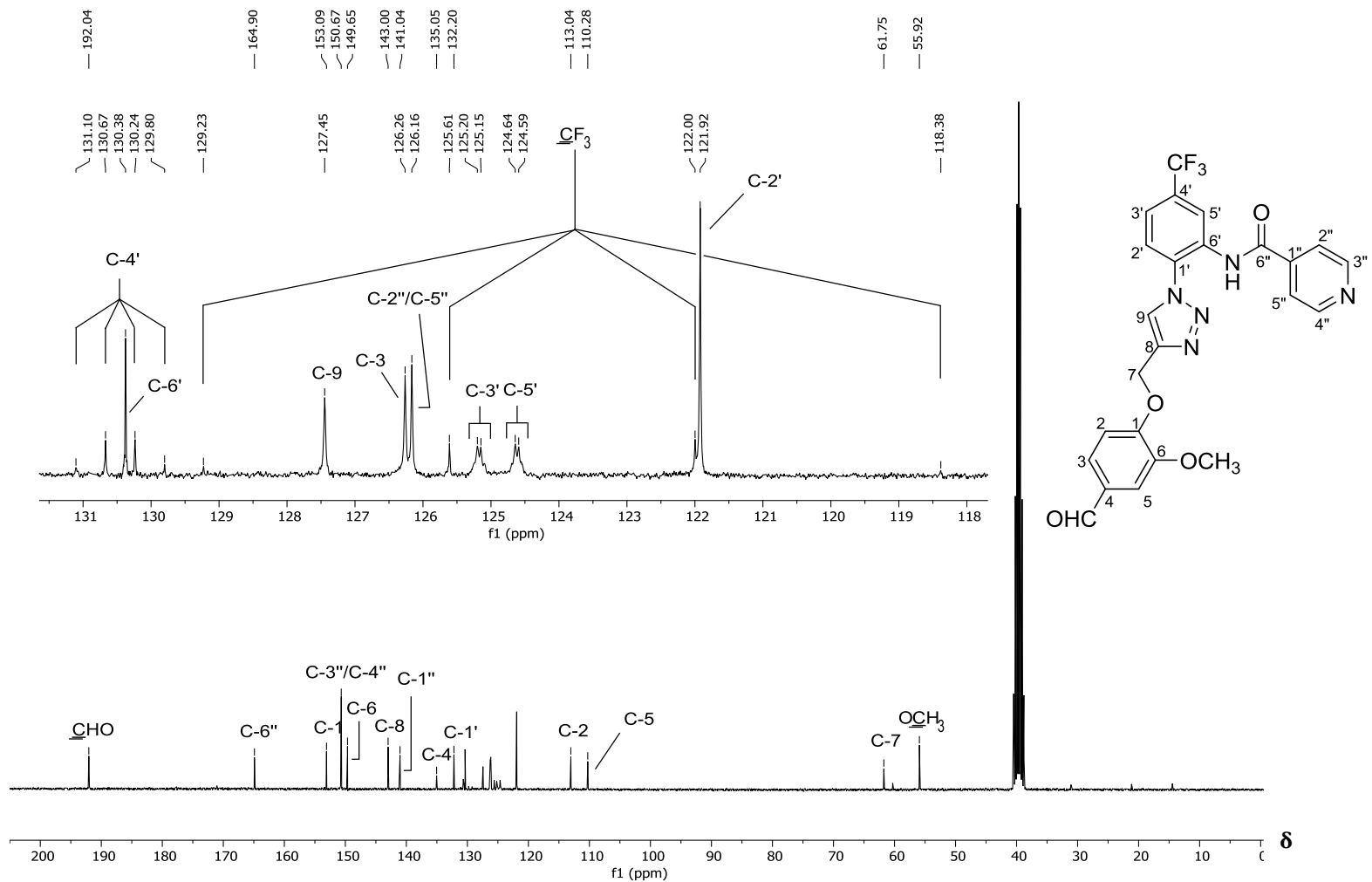


Figura 99 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) do composto **5g**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

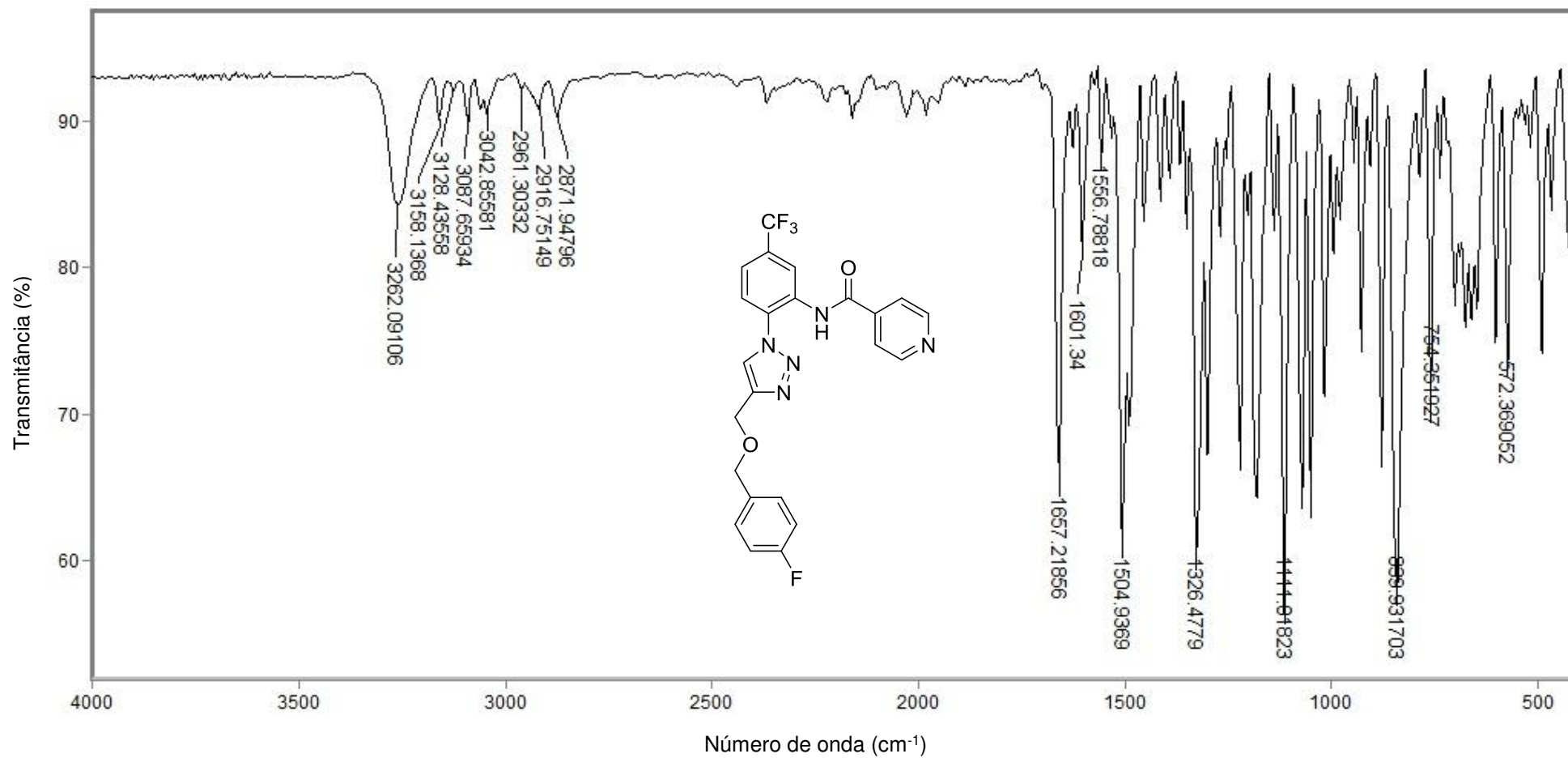


Figura 100 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

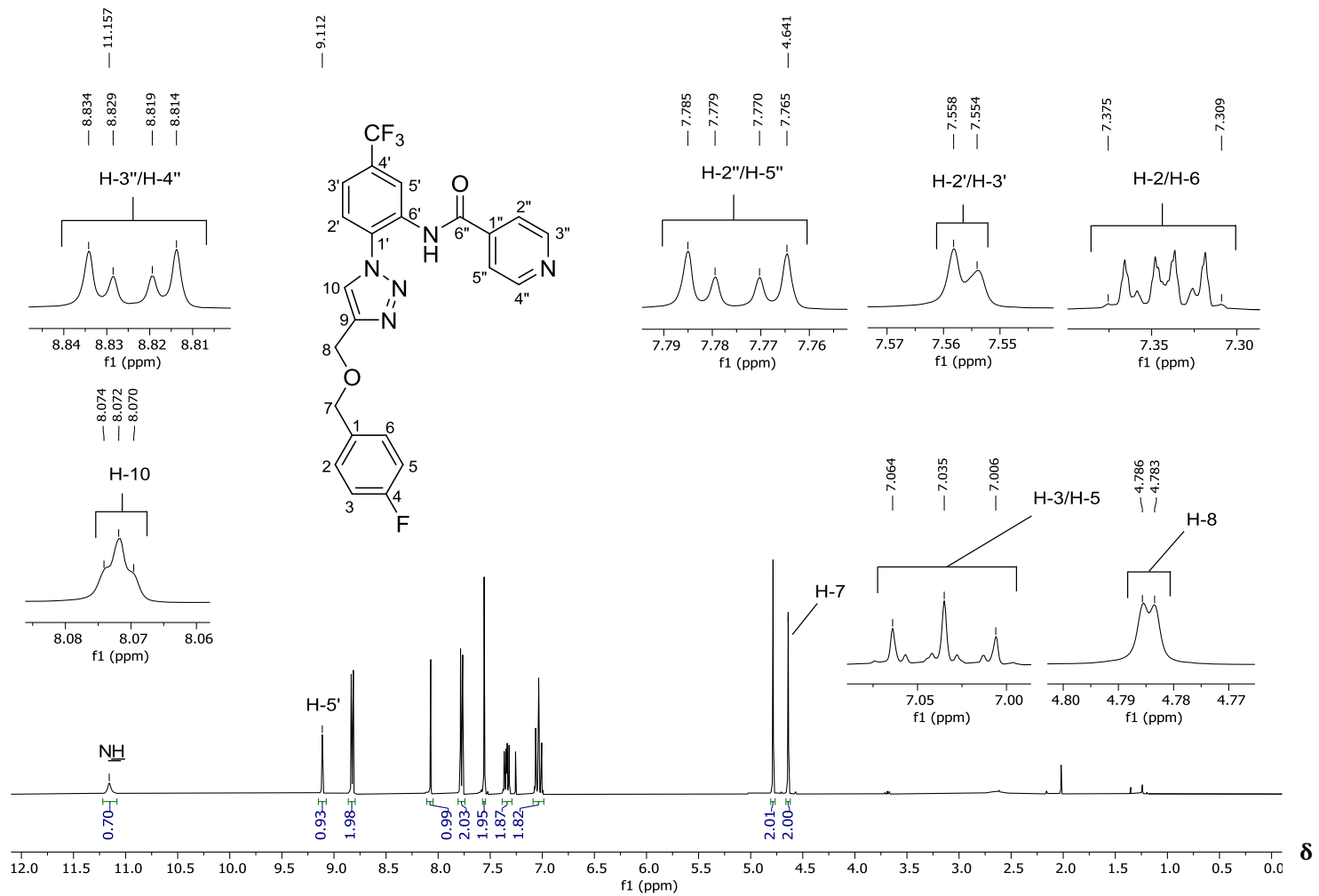


Figura 101 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

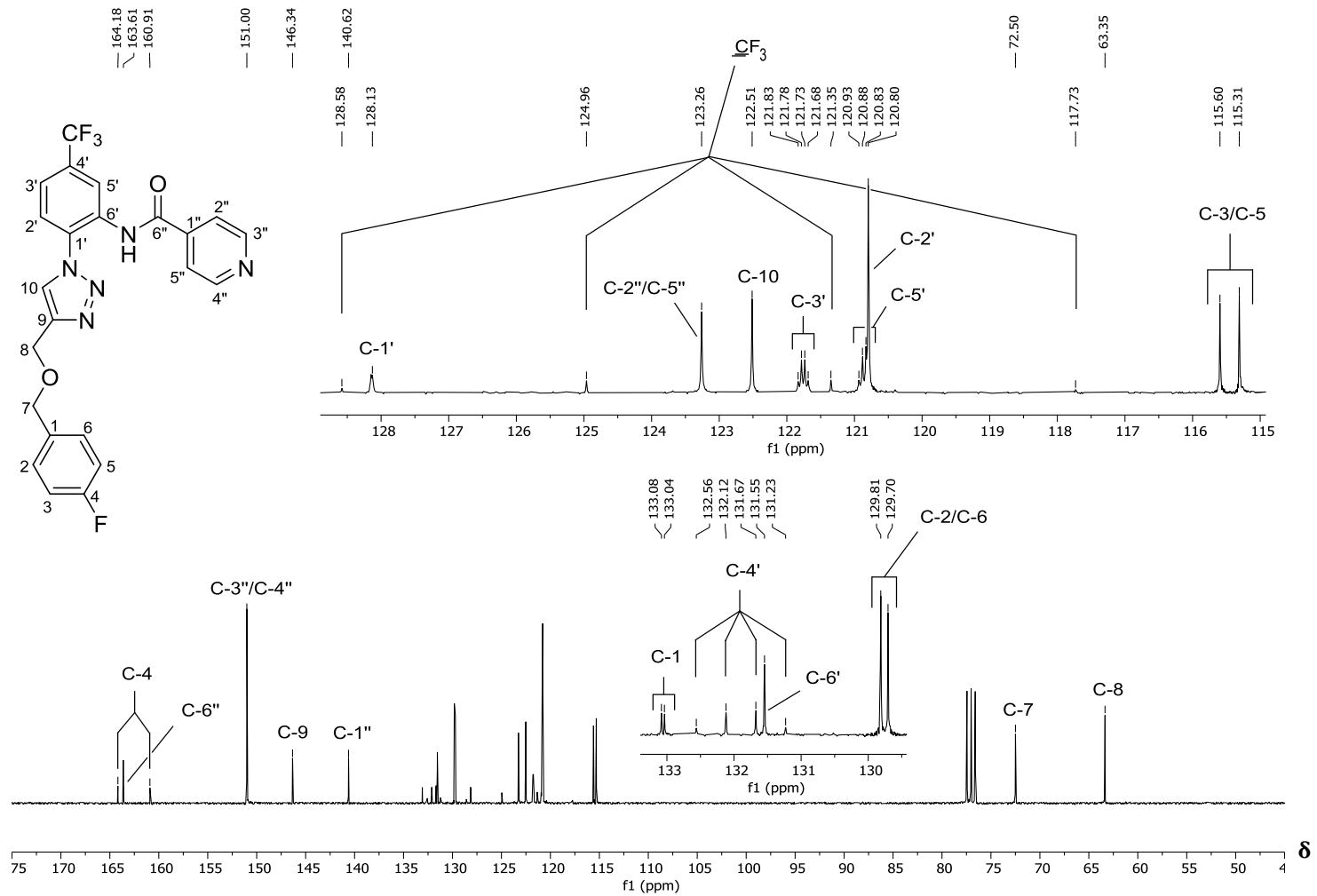


Figura 102 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5h**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

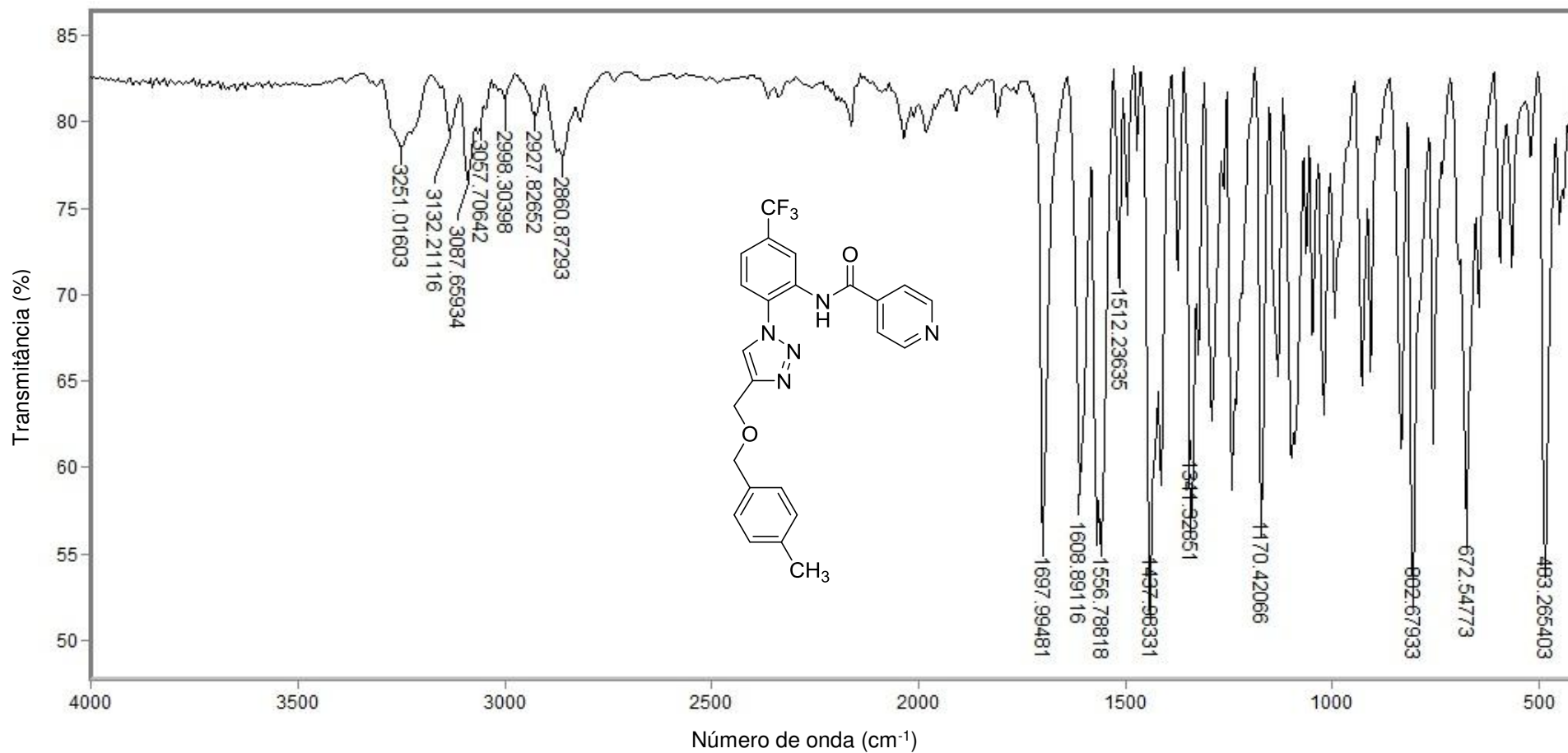


Figura 103 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

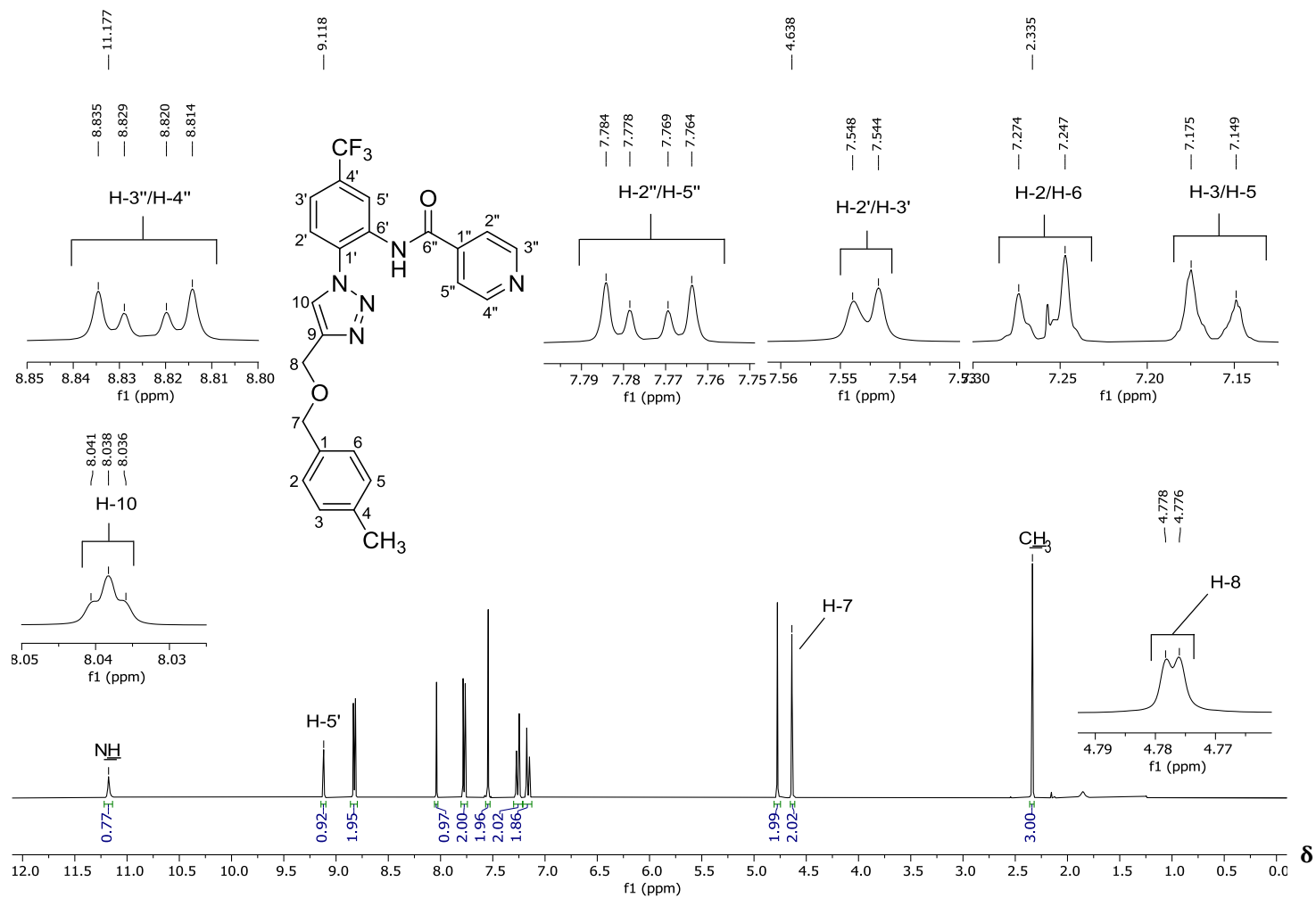


Figura 104 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

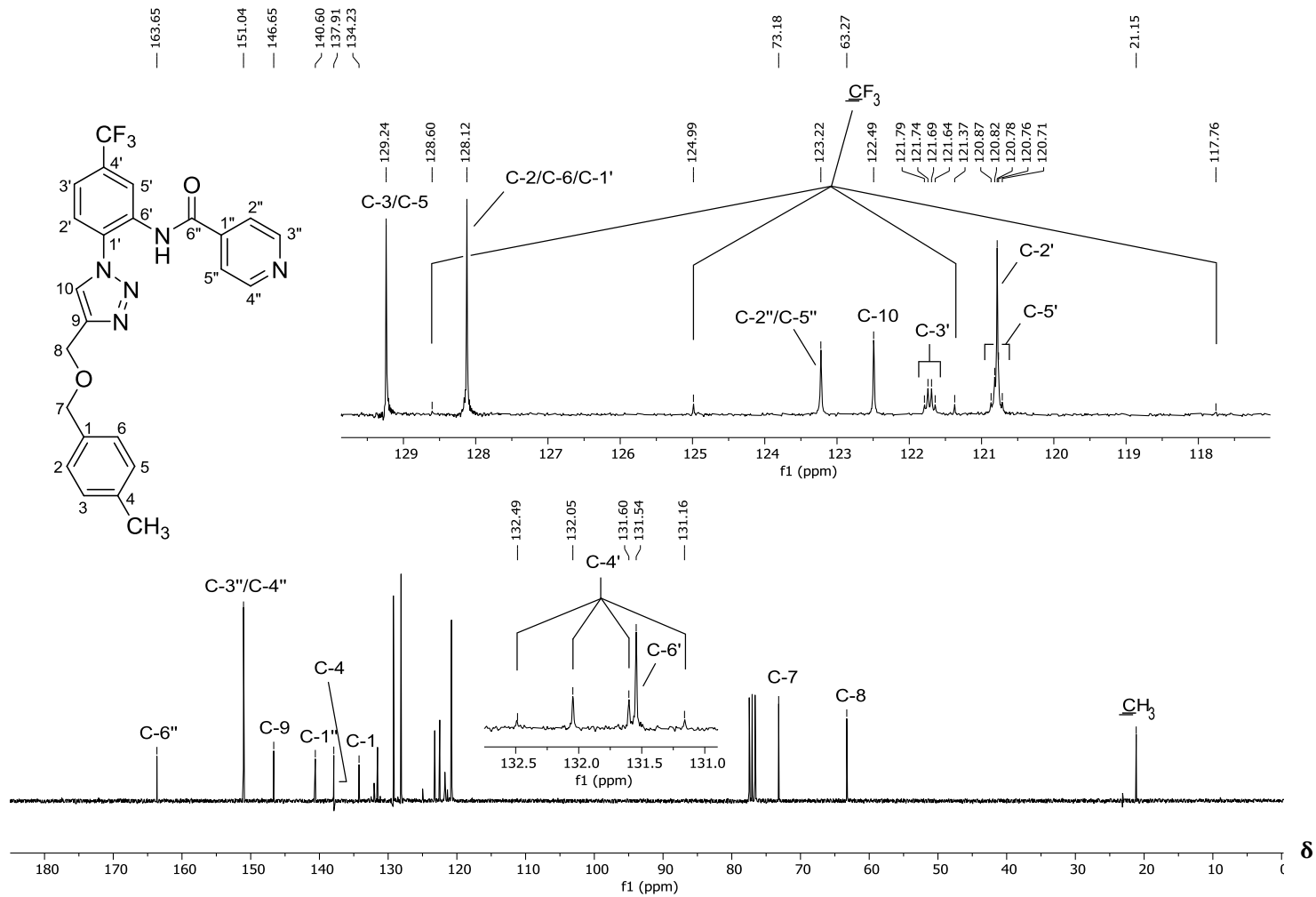


Figura 105 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5i**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

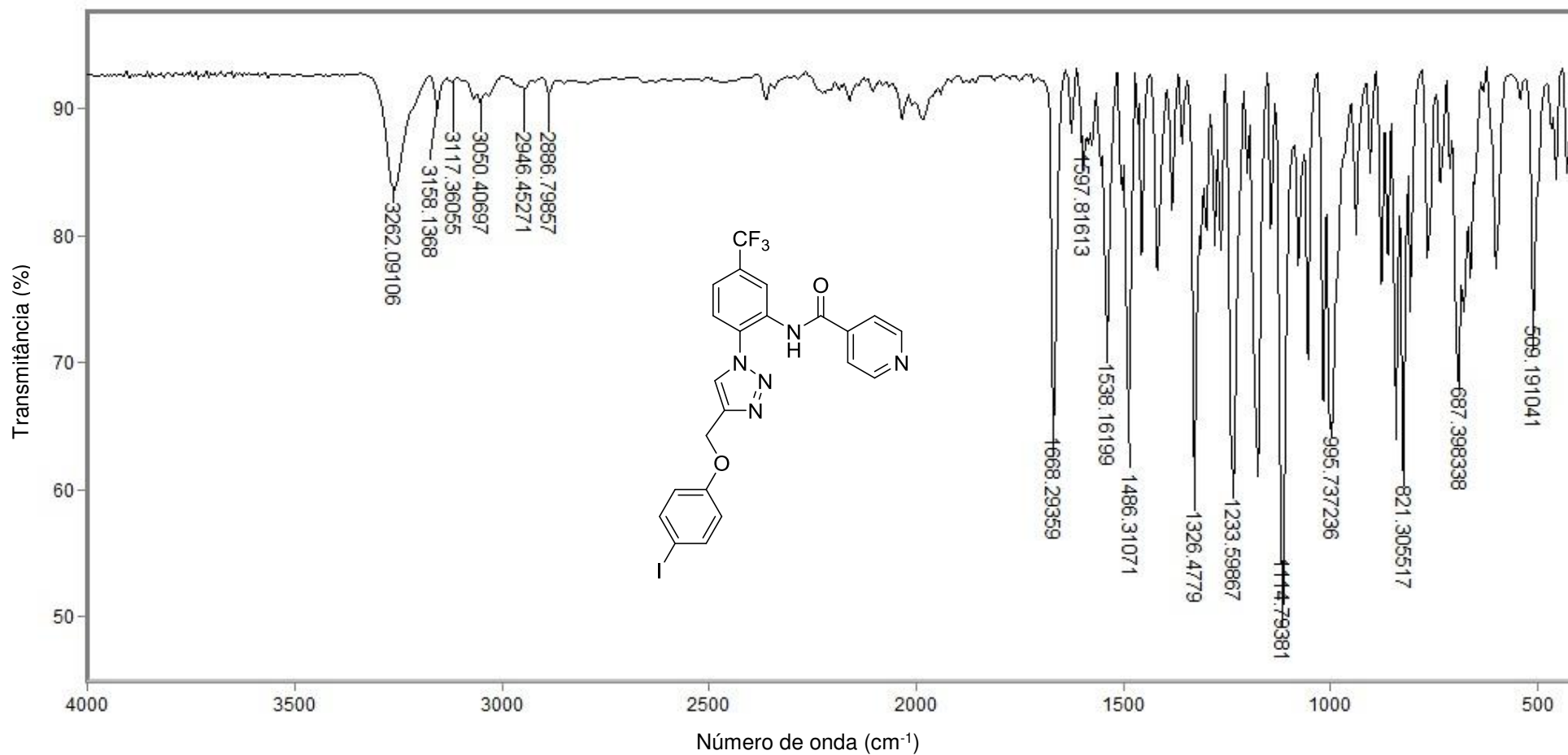


Figura 106 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

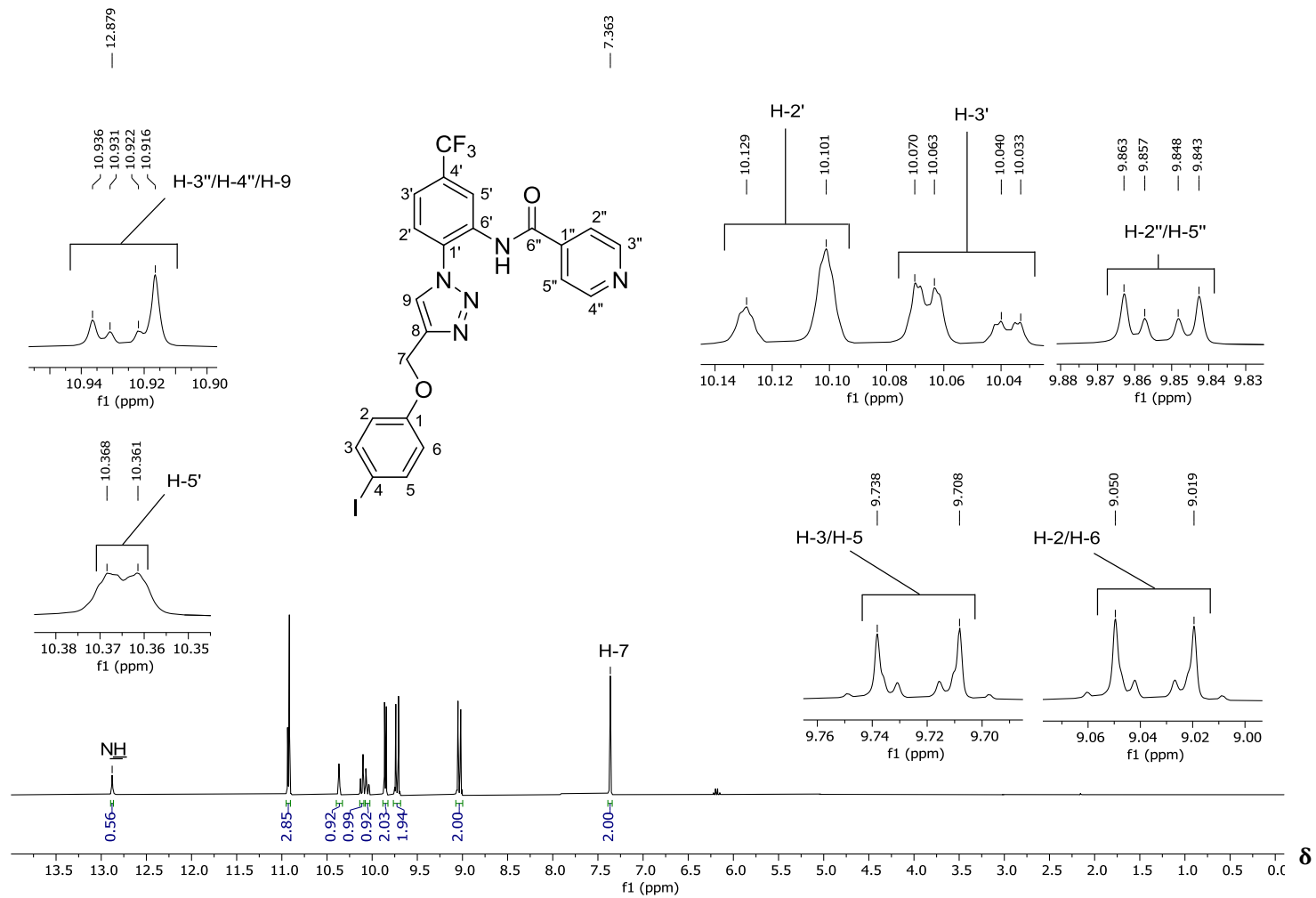


Figura 107 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **5j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

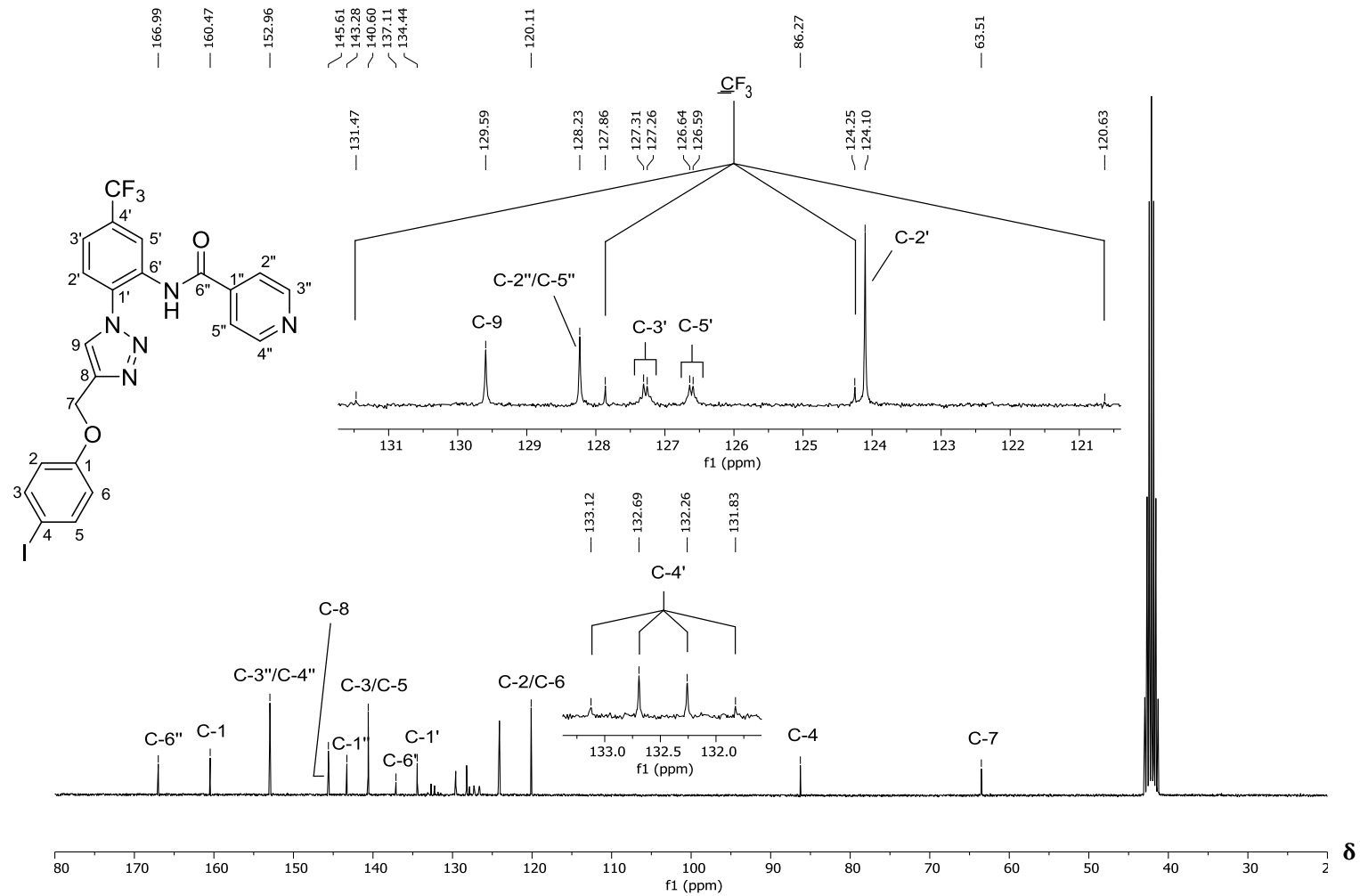


Figura 108 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆) do composto **5j**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

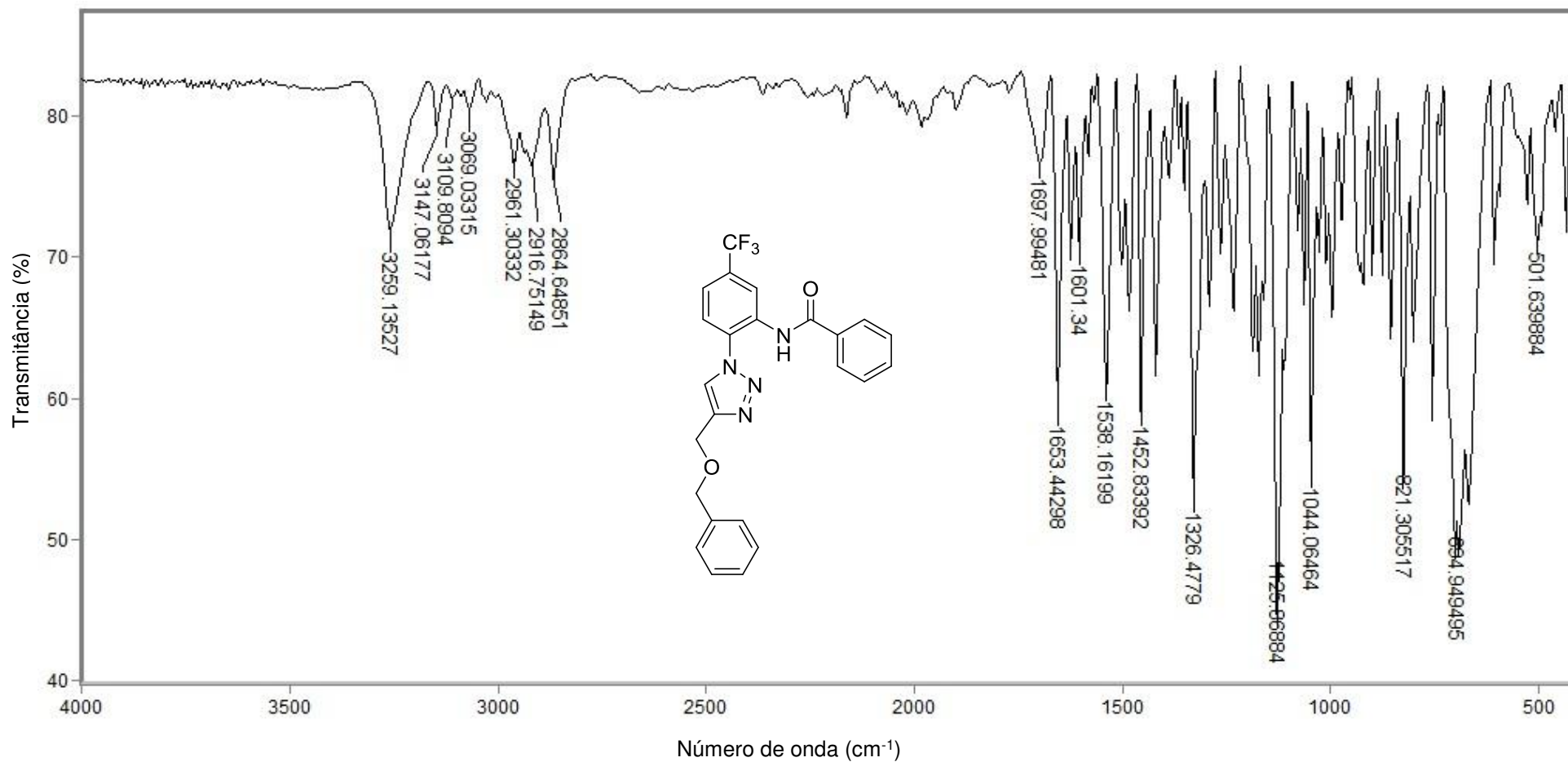


Figura 109 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **51**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

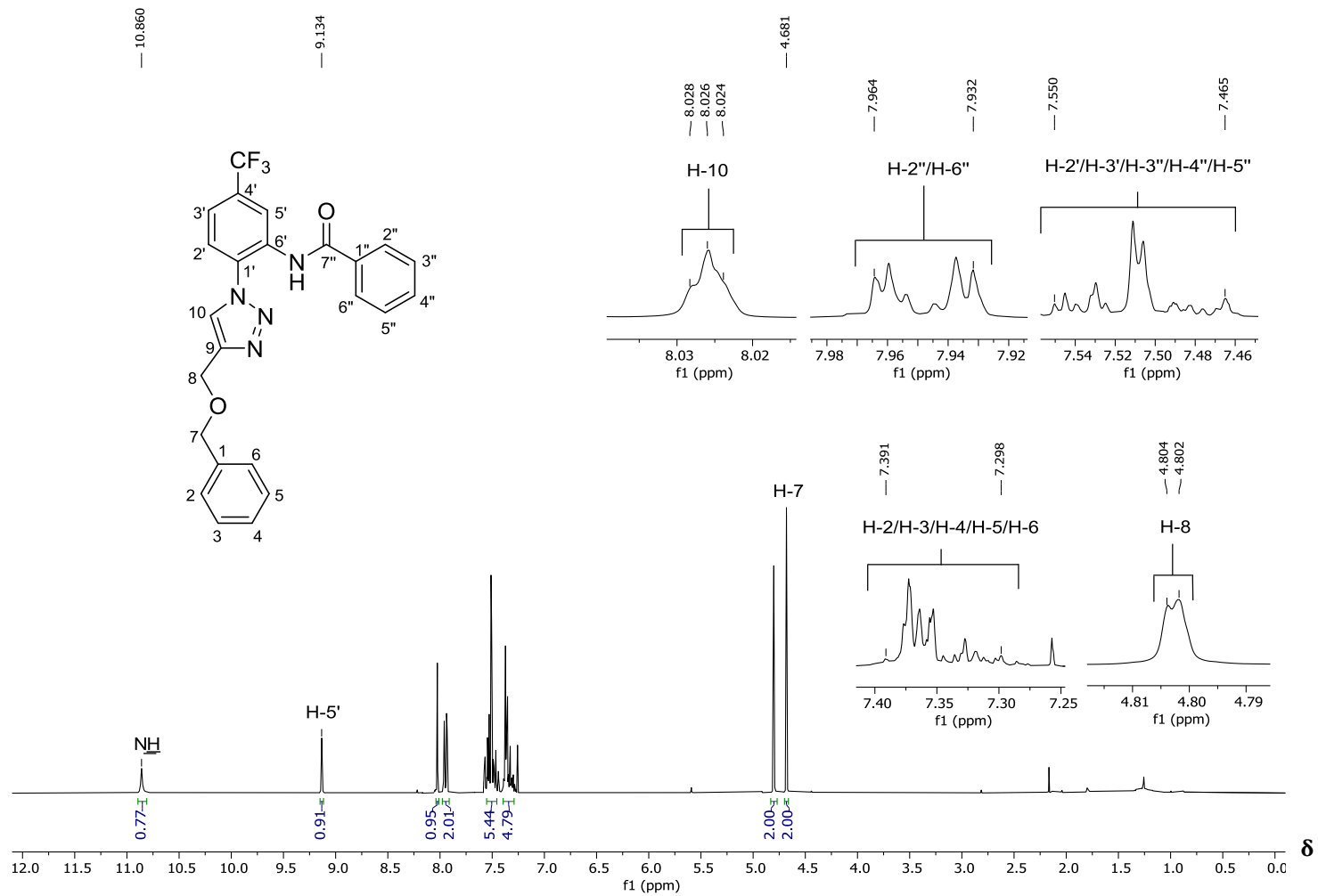


Figura 110 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5I**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

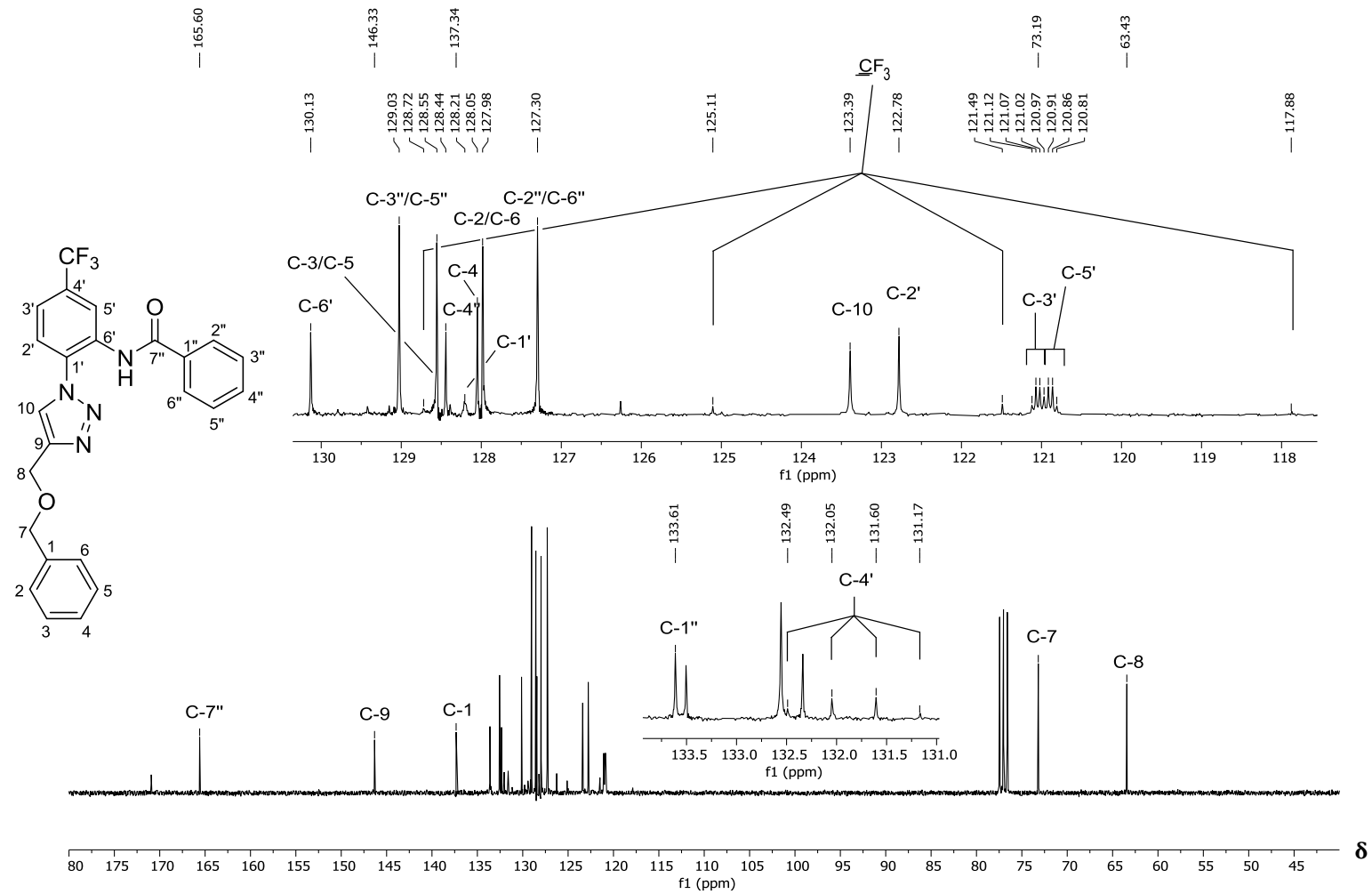


Figura 111 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5I**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

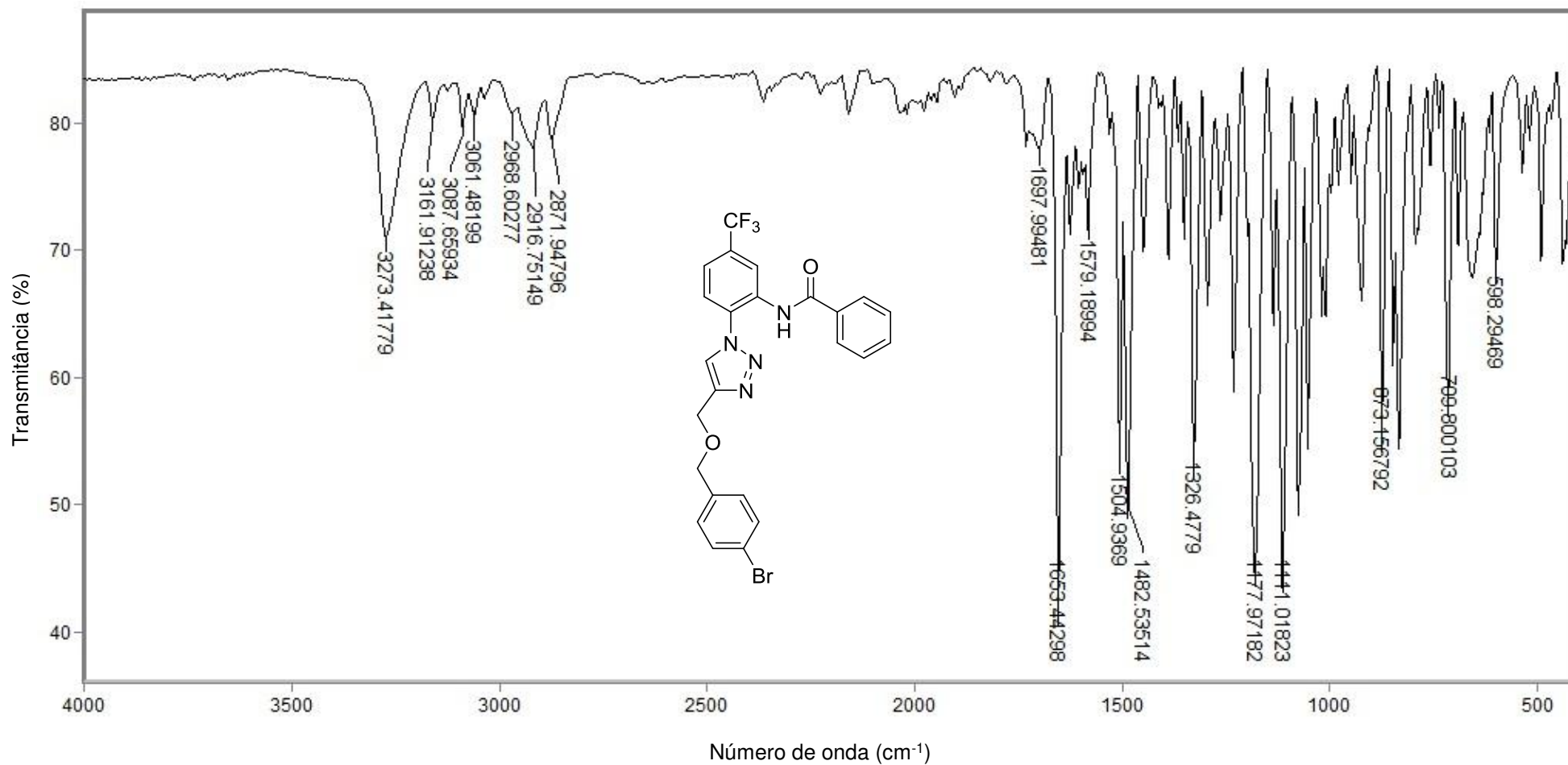


Figura 112 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5m**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

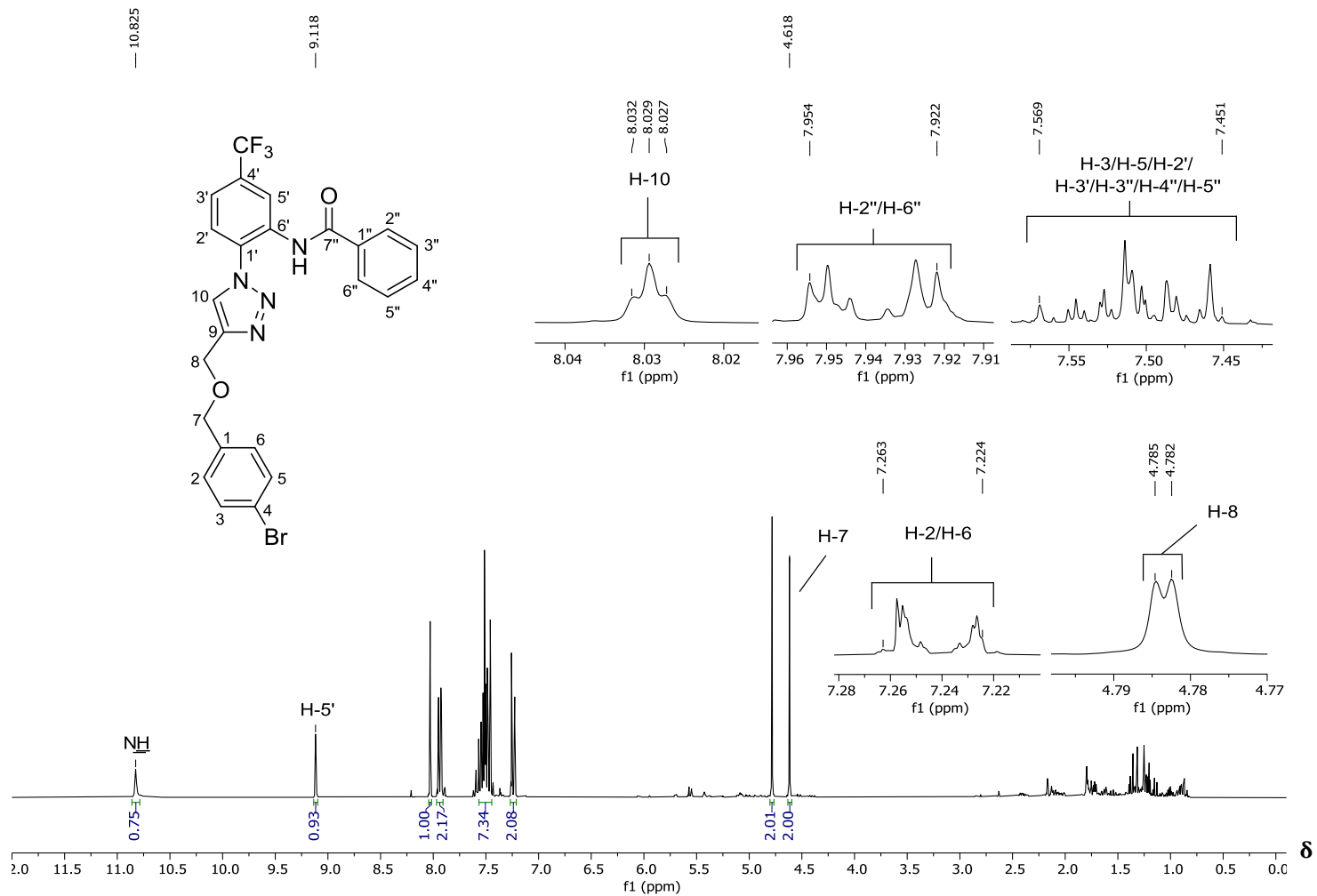


Figura 113 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5m**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

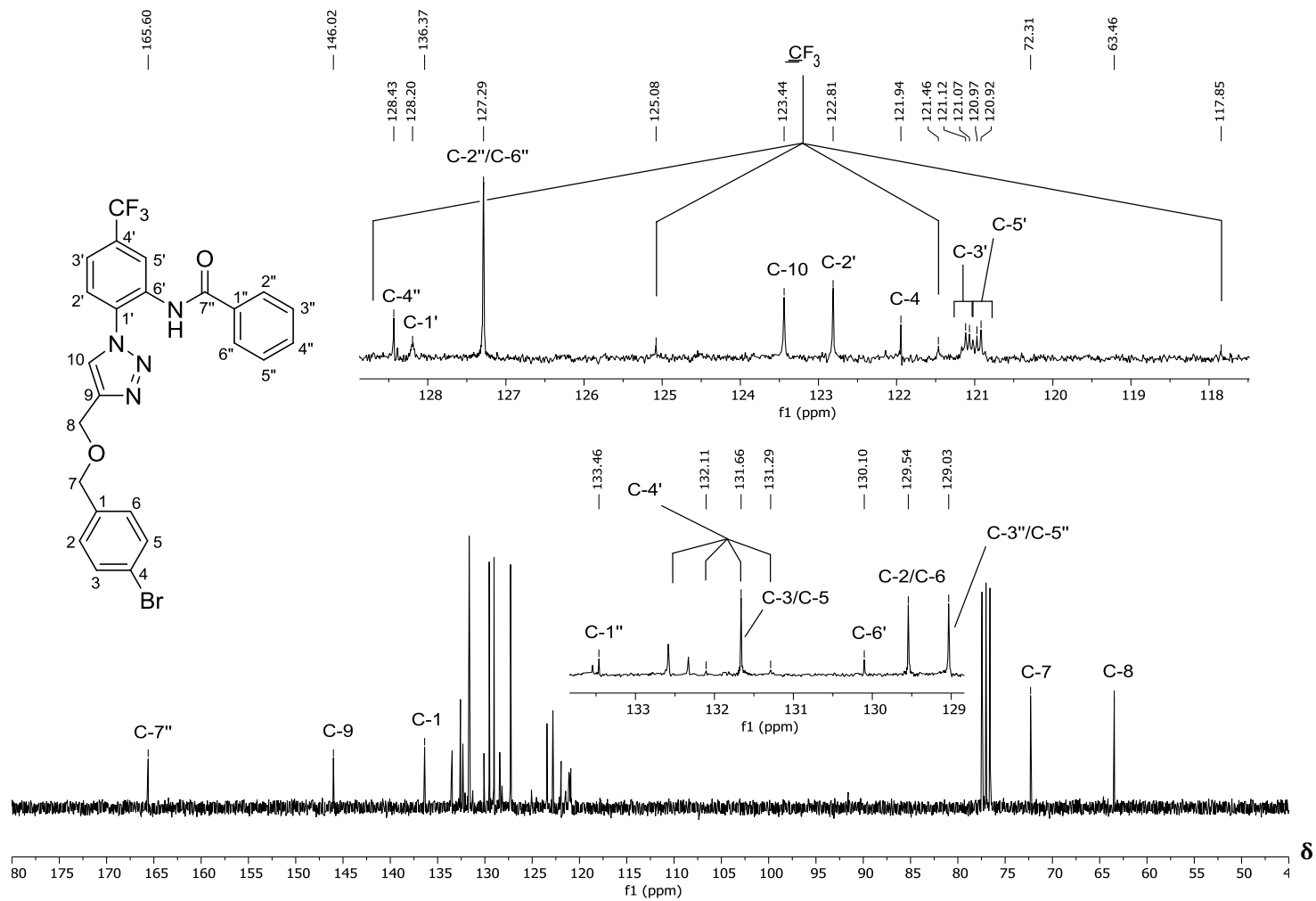


Figura 114 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5m**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

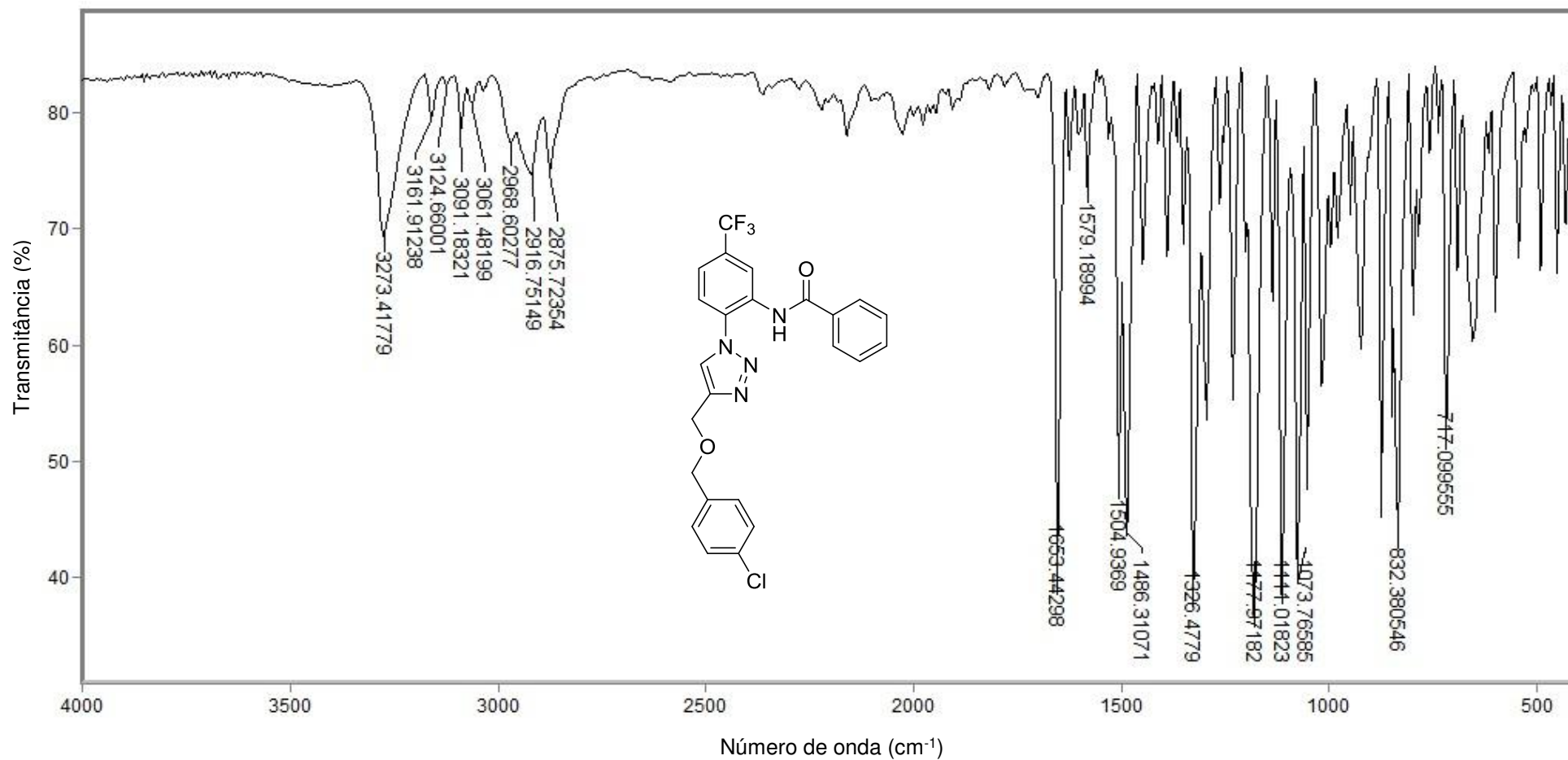


Figura 115 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5n**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

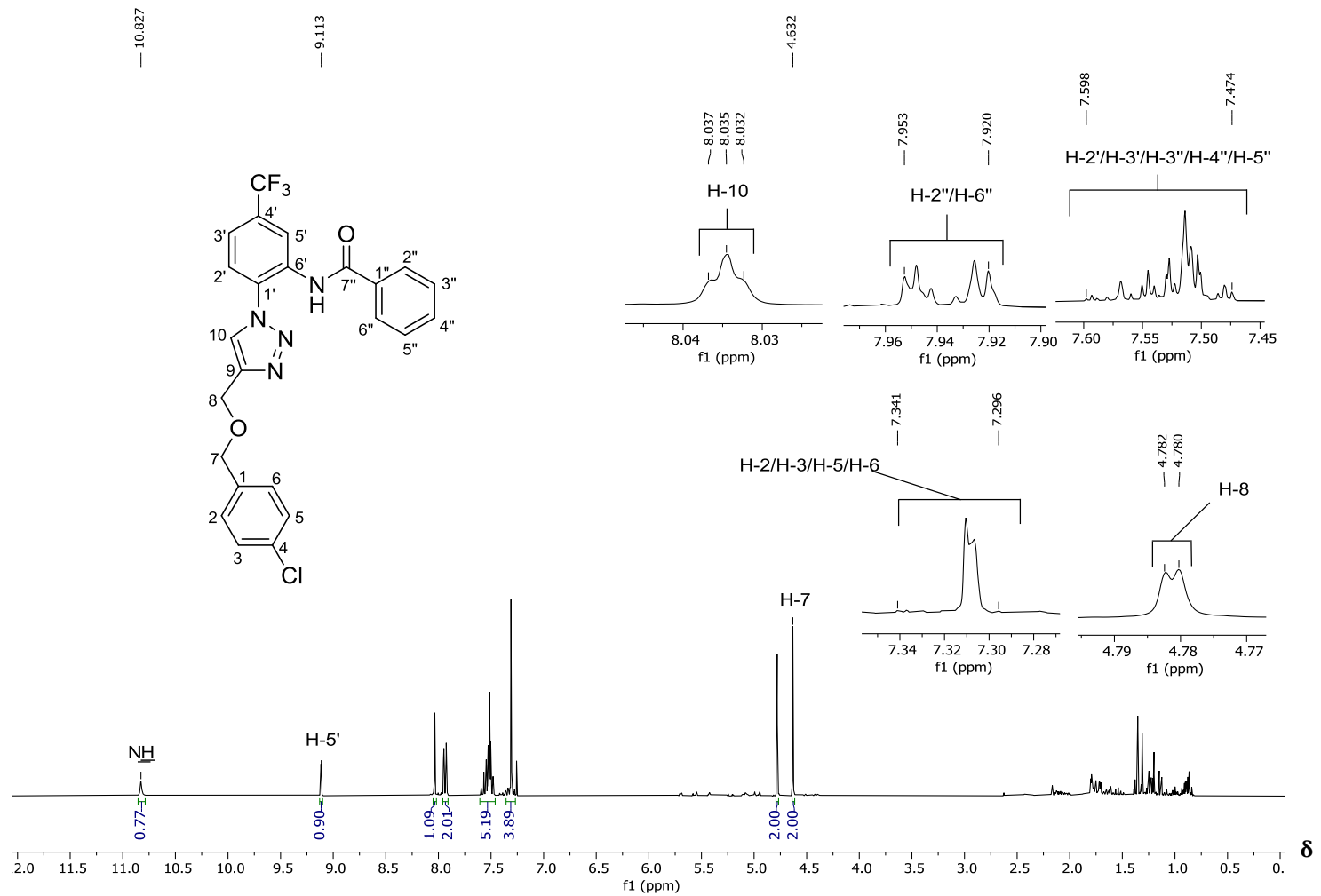


Figura 116 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5n**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

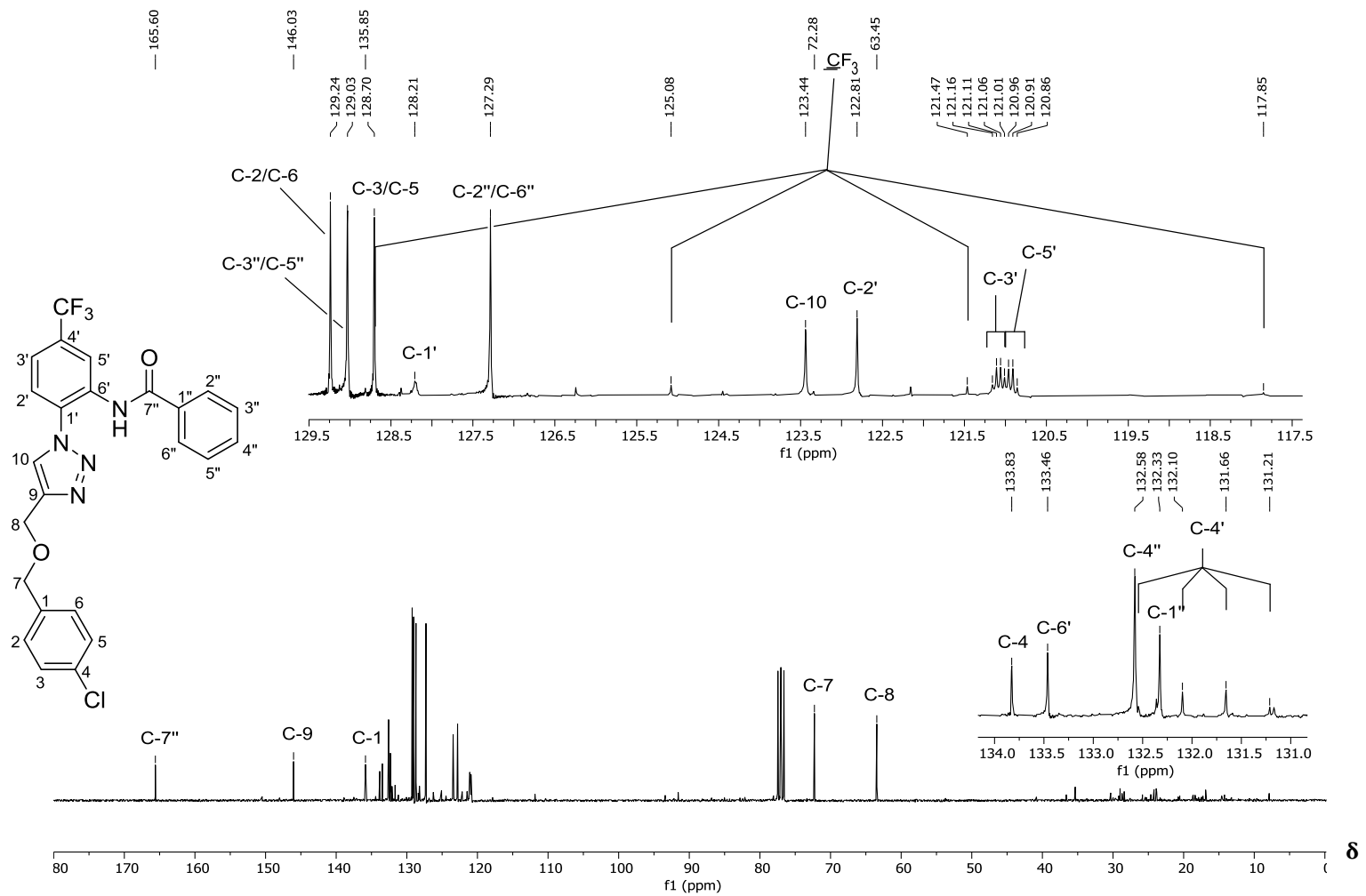


Figura 117 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5n**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

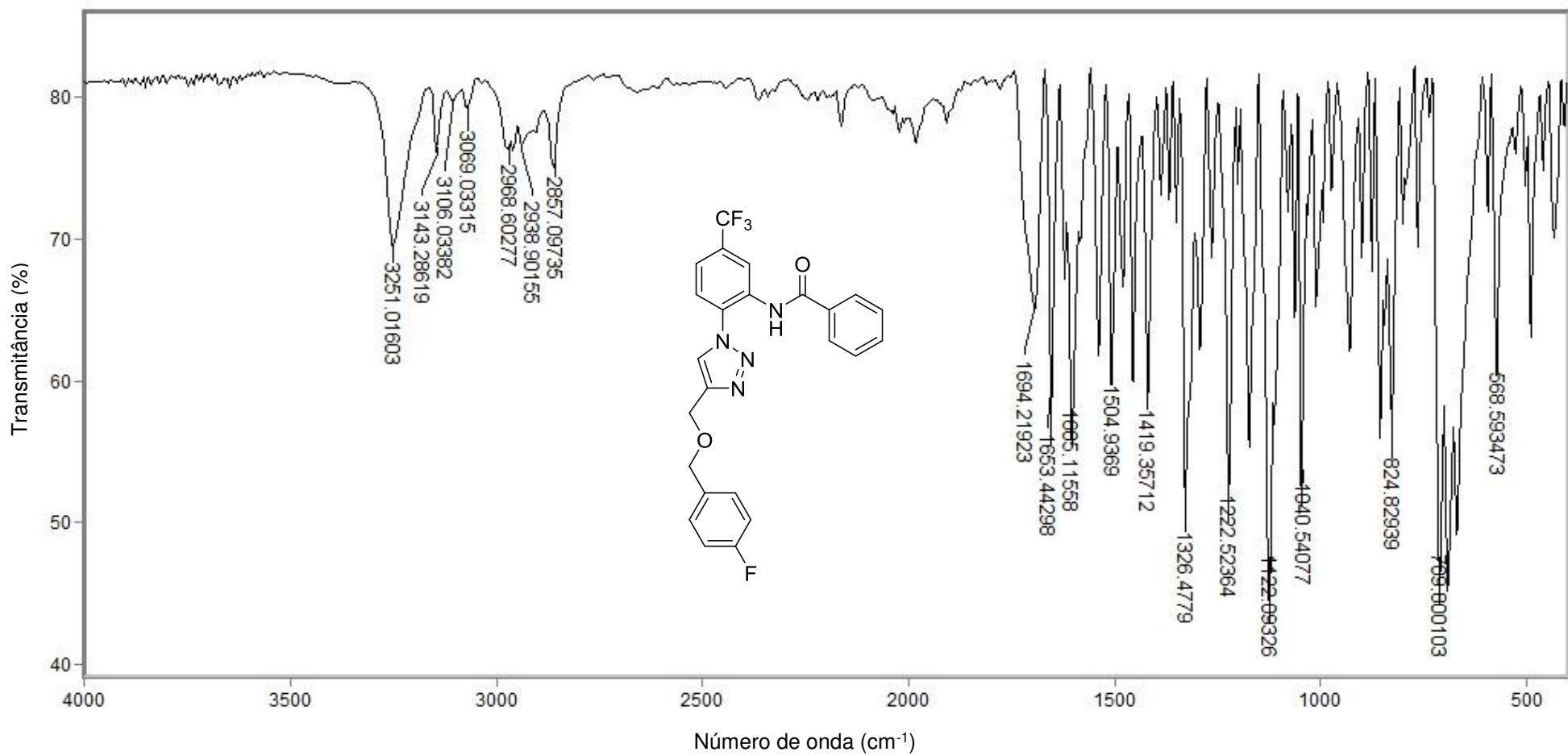


Figura 118 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5r**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

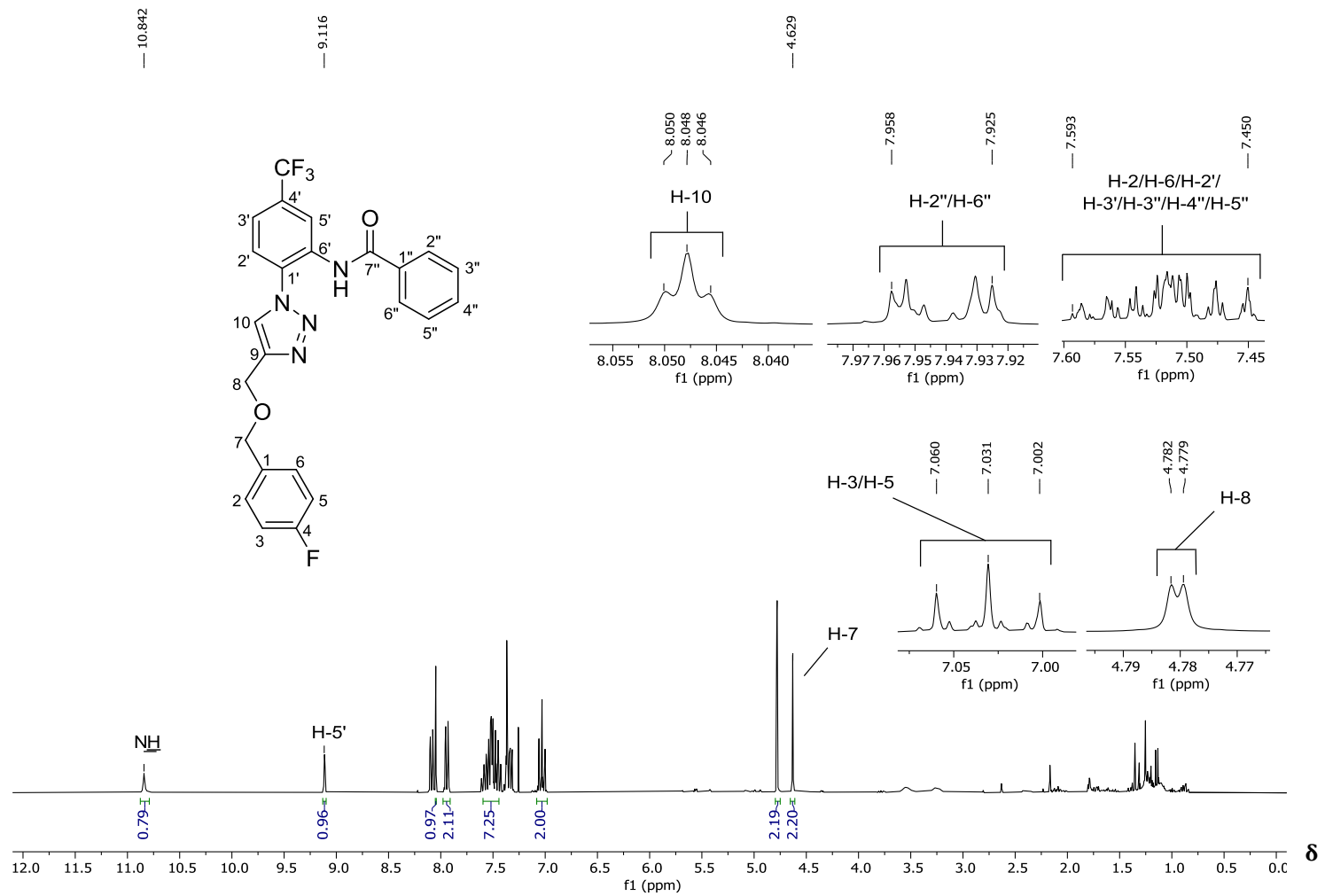


Figura 119 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5r**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

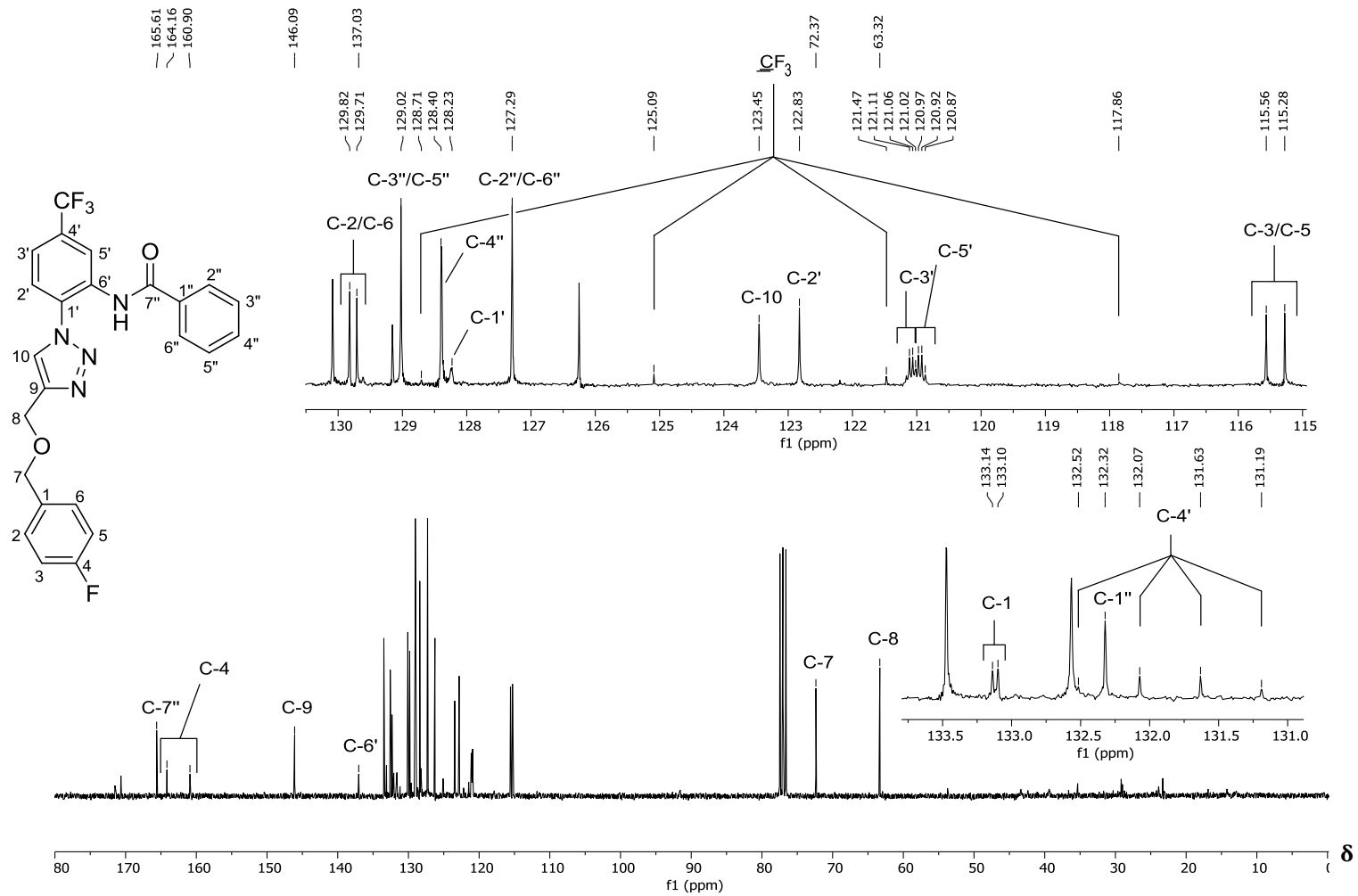


Figura 120 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5r**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

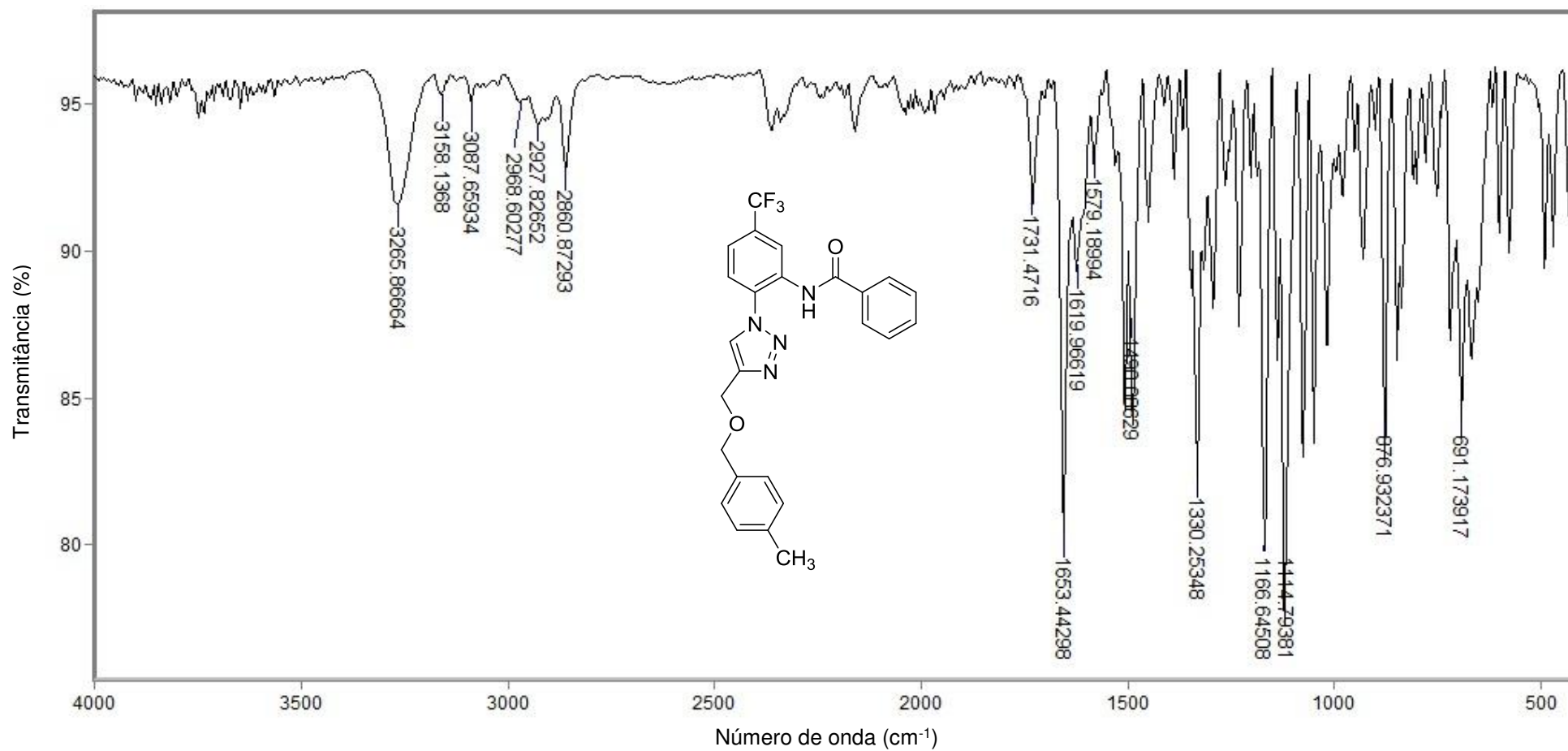


Figura 121 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5s**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

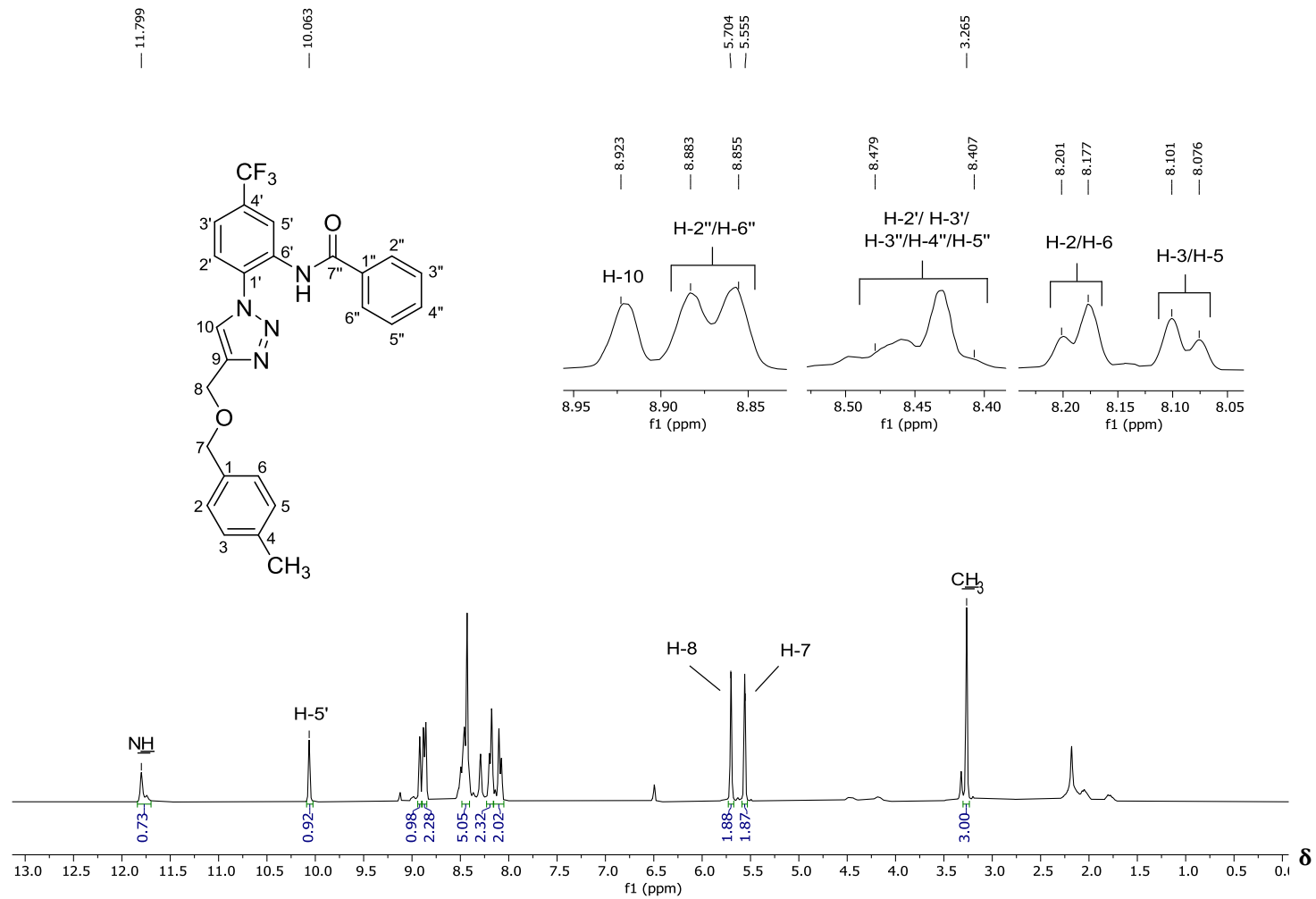


Figura 122 – Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃) do composto **5s**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

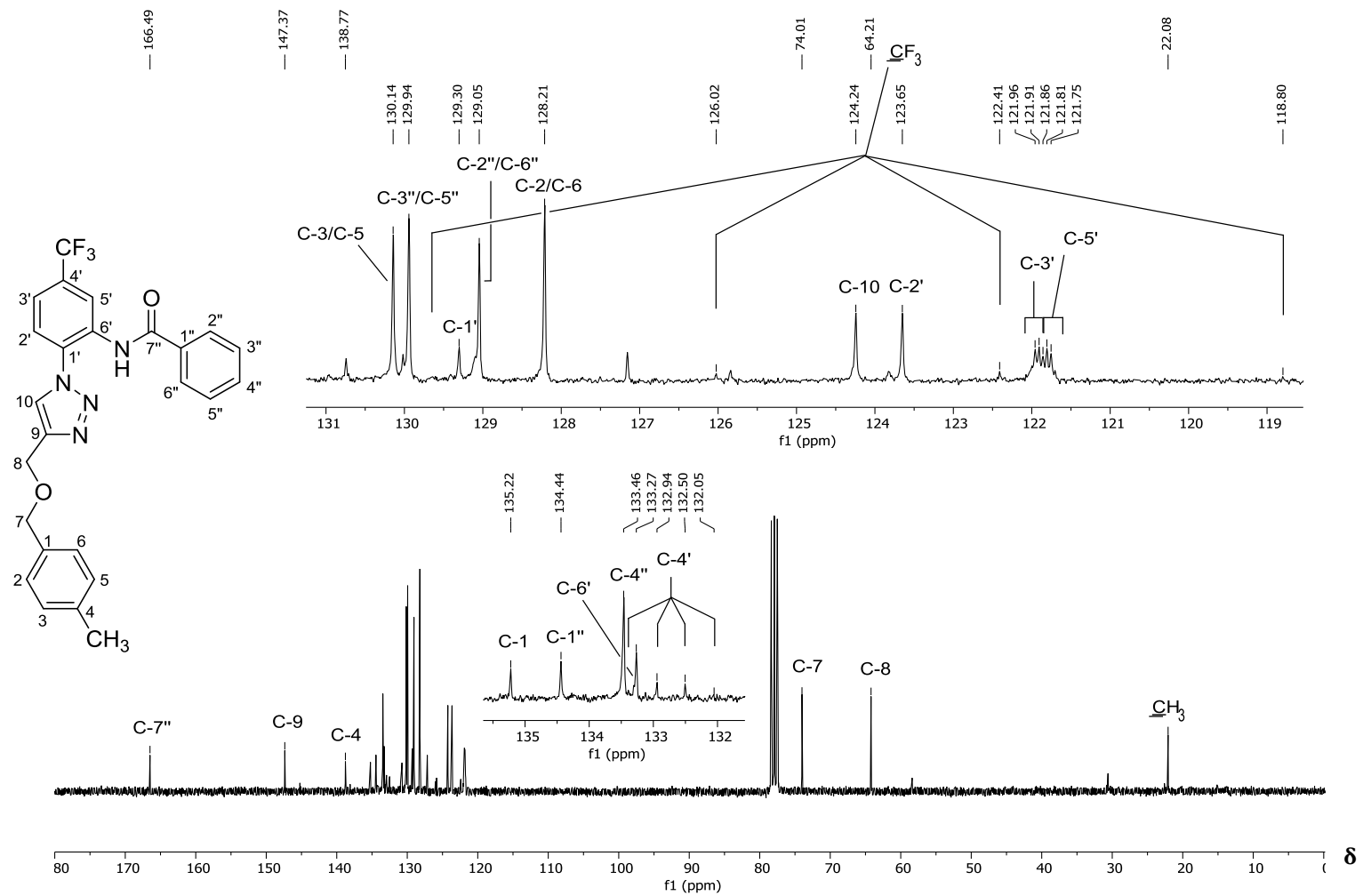


Figura 123 – Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do composto **5s**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

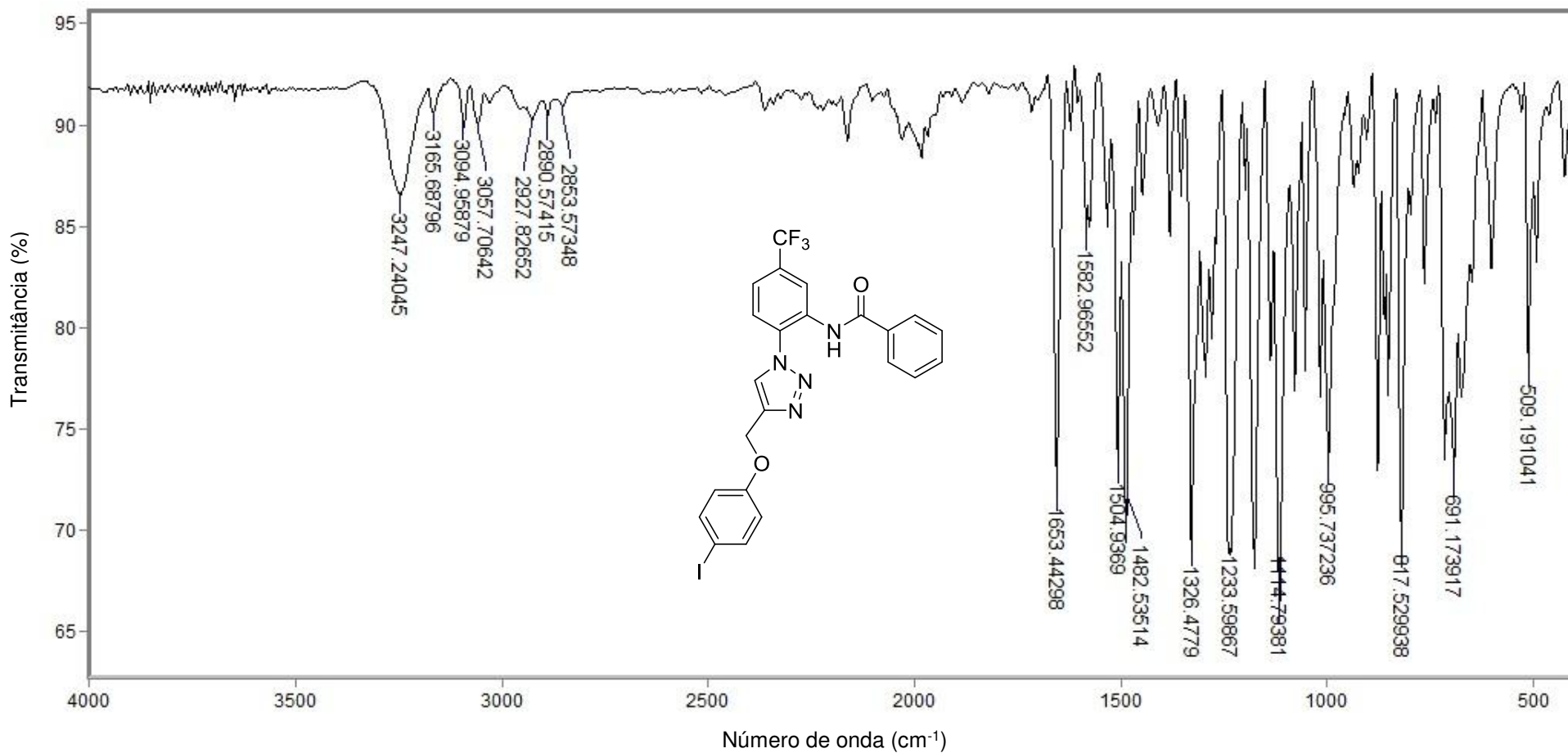


Figura 124 - Espectro no infravermelho (ATR) do composto **5t**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

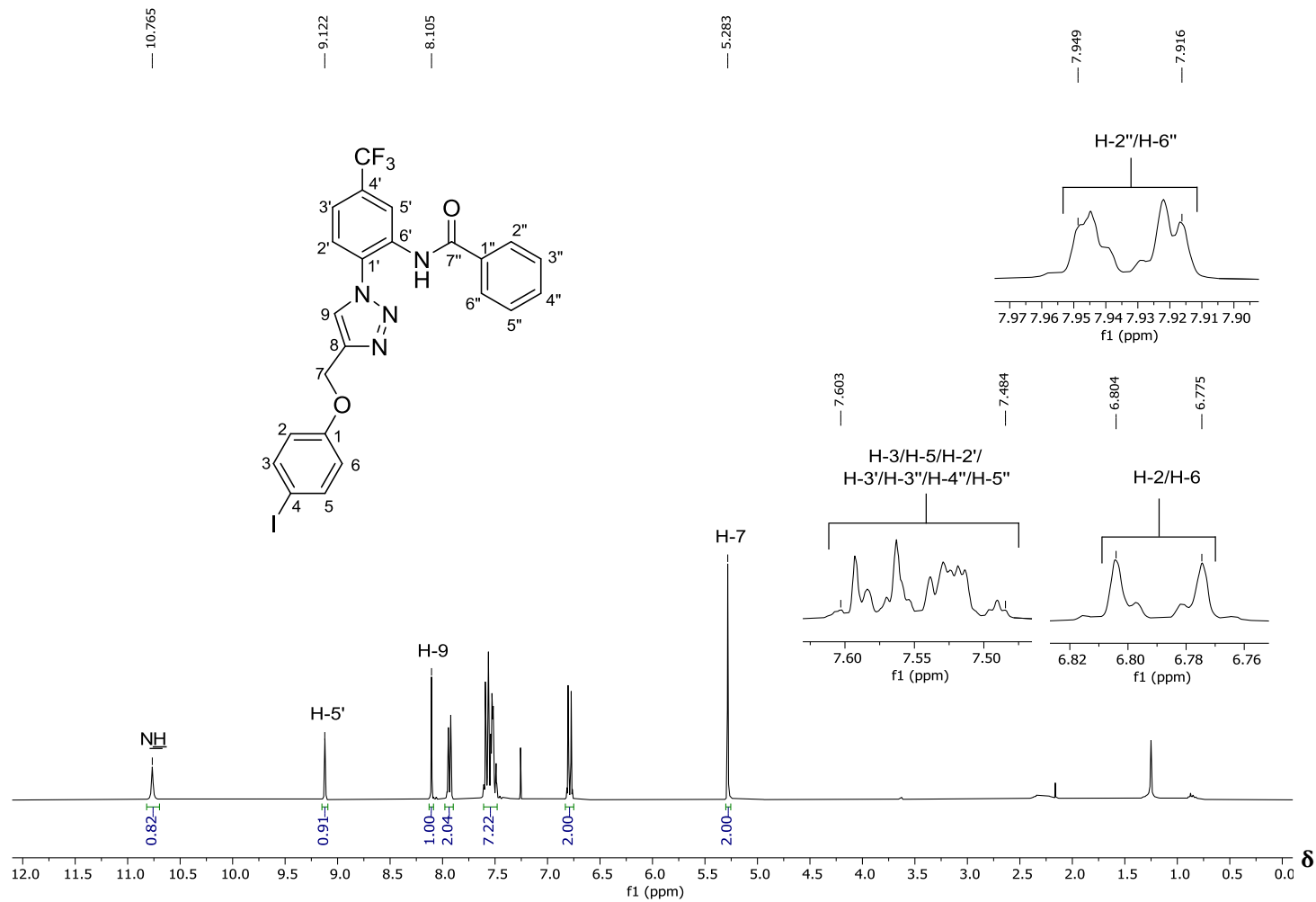


Figura 125 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto **5t**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

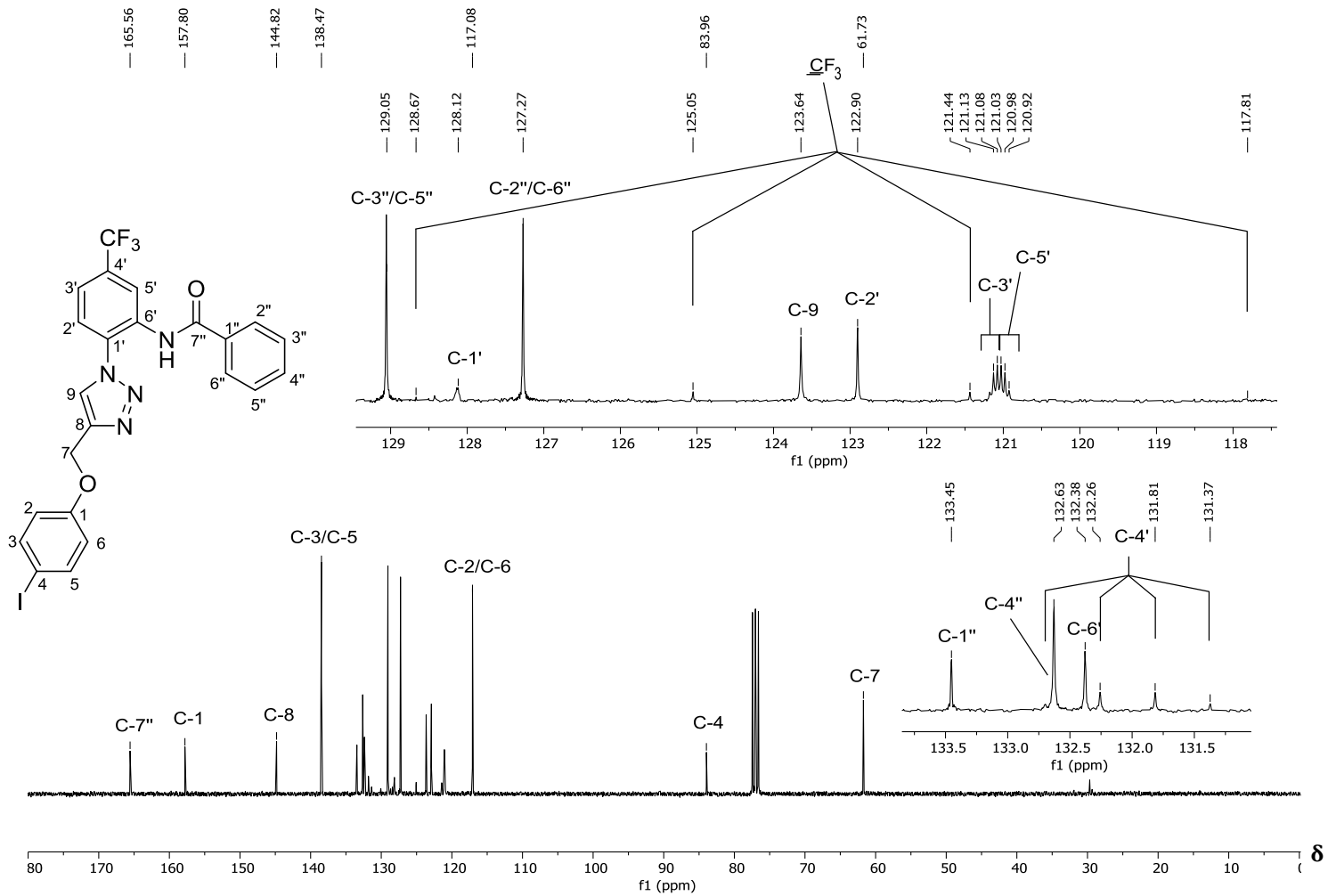


Figura 126 – Espectro de RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) do composto **5t**.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

ANEXO II - PUBLICAÇÕES

Review

Potential Antivirals: Natural Products Targeting Replication Enzymes of Dengue and Chikungunya Viruses

Ana Flávia Costa da Silveira Oliveira ^{1,2}, Róbson Ricardo Teixeira ^{3,*}, André Silva de Oliveira ^{1,2}, Ana Paula Martins de Souza ³, Milene Lopes da Silva ³ and Sérgio Oliveira de Paula ^{1,*}

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil; ana.oliveira@ifnmg.edu.br (A.F.C.d.S.O.); andre.oliveira@ifnmg.edu.br (A.S.d.O.)

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas, 39900-000 Almenara, MG, Brazil

³ Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900 Viçosa, MG, Brazil; anapaulamartins20@hotmail.com (A.P.M.d.S.); milenelopesdasilva@yahoo.com.br (M.L.d.S.)

* Correspondence: robsonr.teixeira@ufv.br (R.R.T.); depaula@ufv.br (S.O.d.P.);

Tel.: +55-31-3899-3209 (R.R.T.); +55-31-3899-2589 (S.O.d.P.)

Academic Editor: Thomas J. Schmidt

Received: 20 December 2016; Accepted: 17 March 2017; Published: 22 March 2017

Abstract: Dengue virus (DENV) and chikungunya virus (CHIKV) are reemerging arboviruses that are transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus. During the last several decades, these viruses have been responsible for millions of cases of infection and thousands of deaths worldwide. Therefore, several investigations were conducted over the past few years to find antiviral compounds for the treatment of DENV and CHIKV infections. One attractive strategy is the screening of compounds that target enzymes involved in the replication of both DENV and CHIKV. In this review, we describe advances in the evaluation of natural products targeting the enzymes involved in the replication of these viruses.

Keywords: dengue; chikungunya; virus enzymes; antiviral; natural products

1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTDs) compose a group of infections that primarily affects the world's poorest populations; they continue to be the leading cause of morbidity and mortality among the poorest people in developing countries [1–4]. NTDs affect more than one billion individuals who have inadequate access to safe water, sanitation and appropriate housing. The NTDs are caused by helminths, protozoa and tropical bacteria. Because of their link to poverty in developing countries, diseases caused by several arboviruses, including dengue virus (DENV) and chikungunya virus (CHIKV), should be considered NTDs [3].

CHIKV is a mosquito-transmitted alphavirus that belongs to the *Togaviridae* family [5]. It is a reemerging arbovirus that is responsible for chikungunya fever (CHIKF), severe joint pain and rash [6]. CHIKF was first described in 1952 after an outbreak along the borders of Tanzania (former Tanganyika) and Mozambique. This alphavirus is transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus, including *A. aegypti*, *A. furcifer* and *A. albopictus* [6,7]. In 2006, CHIKV was responsible for an epidemic of unprecedented magnitude in the Indian Ocean, stressing the need for new therapeutic approaches. Since that time, researchers have acquired a better understanding of CHIKV biology, which should lead to the identification of new, active molecules against this reemerging pathogen [8].

DENV, like CHIKV, is a reemerging arbovirus. Within the last two decades, it has become the most important and frequently transmitted arbovirus worldwide [9]. The incidence of DENV has increased approximately 30-fold over the past 50 years. Approximately 50–100 million new infections are estimated to occur annually in more than 100 endemic countries, and further spread has been

documented to areas that were previously unaffected. Each year, hundreds of thousands of serious cases of infection arise, which result in approximately 20,000 deaths; additionally, 264 disability-adjusted life years per million inhabitants per year are lost, with an estimated cost for outpatient cases and hospitalizations ranging from US\$514–1394. The actual numbers are probably much worse, since the underreporting of DENV cases has been documented [9–13]. This disease comprises four viral serotypes (DENV 1–4), and its spectrum ranges from asymptomatic infection to dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. Moreover, DENV infection may lead to death. All four serotypes of DENV are transmitted to humans by *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes [14–16].

Considering the severity of these diseases, several investigations have been conducted during the past few years to identify antiviral compounds with which to treat them. The development of antiviral therapies remains a high priority for the World Health Organization (WHO).

2. Natural Products as a Source of Pharmaceuticals

Several approaches have been used for drug discovery [17], including the use of natural products, which can be explored for the research and development of new pharmaceuticals. Several drugs for treating a variety of diseases have been discovered via the screening of natural compounds obtained from animals, microorganisms, marine organisms and plants. Such drugs include natural products, semi-synthetic analogs derived from active natural products and entirely synthetic compounds designed using natural products as models. Since the early days of drug discovery, chemical constituents isolated from natural sources have been explored as a source of novel therapeutics. Statistically, about 50% of new chemical entities are obtained from either natural products or natural product analogs [18–21].

Several plants have been shown to possess anti-DENV and anti-CHIKV activities. According to a WHO factsheet, 80% of the population of certain Asian and African countries depends on traditional medicines for primary healthcare due to economic and geographic constraints [16,22–25]. Because of their few (or unknown) adverse effects, the global use of medicinal plants or herbal-based medicines is steadily growing. Even though a number of plants is known for their anti-DENV and anti-CHIKV activities, few investigations have been published on the isolation (identification) and evaluation of compounds from plants with anti-DENV and anti-CHIKV activities [16].

In this review, we describe advances in the evaluation of natural products targeting the enzymes involved in the replication of DENV and CHIKV. Most of the compounds described below are natural products isolated from plant species. However, examples of substances isolated from other natural sources are also presented. Investigations of plant extracts that possess antiviral activities are also discussed. In addition, the results of *in silico* studies are also highlighted.

3. Structural Biology of DENV

DENV particles are about 50 nm in diameter. The DENV RNA genome of 10,723 nucleotides encodes an uninterrupted open reading frame, which directs the synthesis of the polyprotein precursor NH₂-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-COOH, where C is the capsid protein, M is a membrane-associated protein, E is the envelope protein and NS1-NS5 are nonstructural proteins [25–27].

Proteins NS3 and NS5 are integral components of the viral replication complex and are involved in viral RNA genome synthesis, methylation of the 5' cap of the viral genome and polyprotein processing, among other activities [19].

3.1. NS3

NS3 is a multifunctional enzyme, which acts as a protease for polyprotein processing, an RNA triphosphatase for capping nascent viral RNA and a helicase, along with cofactor NS2B, for unwinding the double-stranded, replicative form of RNA [28]. NS3 is sufficiently conserved within the four DENV serotypes [28]. Dissecting its structural and functional domains is thus critical to improving the understanding of the flavivirus life cycle and assisting in the design of effective antiviral drugs. Furthermore, the conservation of domain structures across the Flaviviridae family suggests conservation of functions [22,26].

The NS3 protease is required for the production of mature viruses and plays a key role in maintaining infectivity. This enzyme mediates the cleavage of polyproteins into functional proteins that are required for viral propagation. The dimeric protease NS2B-NS3 is responsible for protein processing at the junctions of NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A and NS4B/NS5, as well as internal DENV sites within C, 2A, NS3 and NS4A, thus making the nonstructural NS2B-NS3 protease an ideal target for drug design against DENV infection [29–31].

The helicase domain of NS3 has seven structural motifs that are reminiscent of superfamily 2 helicases. It has three subdomains with significant sequence identity and structural similarity to other flavivirus helicases. Subdomains I and II are also structurally similar to the corresponding domains in the hepatitis C virus, suggesting a common mechanism of action [26,32–34].

The combined activities of the polynucleotide-stimulated helicase and nucleoside triphosphatase (NTPase) regions in the C-terminal domain are required for both melting secondary structures prior to the initiation of RNA synthesis and unwinding RNA duplexes; these actions occur by either separating double-stranded RNA intermediates that are formed during viral RNA synthesis or removing proteins bound to viral RNA using a translocase function. DENV with impaired helicase activity loses its ability to replicate, demonstrating the importance of the NS3 helicase domain in the viral life cycle. For this reason, inhibitors or modulators of these enzymes are of great interest as therapeutic agents [26,35–37].

3.2. NS5

NS5 is the largest (104 kDa) and most conserved protein in DENV. Specifically, residues 320–368 are strictly conserved among the flaviviruses. These residues have also been implicated in the interaction between NS5 and NS3 [38,39]. The important role of NS5 in DENV replication makes these proteins interesting targets for virus inhibition [26]. Similar to NS3, NS5 possesses two major activities, an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp; residues 320–900) at its C-terminal end and a methyltransferase (MTase; residues 1–296) at its N-terminal end [26,40]. The NS5 MTase is a surface polyprotein that is essential for the attachment of the virus to the host cell. Thus, the ligand-bound crystal structure of the N-terminal domain of the NS5 MTase has become a crucial tool for current drug discovery efforts. The crystal structure of the RdRp shows an active site with two zinc ion-binding motifs, which are ideal targets for designing novel RdRp inhibitors [4,41,42].

The NS5 RdRp plays a vital role in the replication of viral RNA. Following viral entry and translation of the viral genome, the NS5 RdRp performs *de novo* RNA synthesis, generating negative-sense RNA from the positive-sense viral RNA template. The latter then serves as a template for the synthesis of more positive-sense RNA strands, which are either used for protein translation or packaged into infectious virions [43–45].

The flavivirus MTase catalyzes two very distinct methylation reactions, but there is only a single binding site for the methyl donor. It is likely that the RNA substrate repositions itself after the first reaction so that the second reaction can proceed [45,46].

Natural compounds that display inhibitory effects against DENV enzymes are described below. The evaluation of a compound's activity against viral enzymes can be investigated in two ways. First, the effect of a substance can be assessed directly on the enzyme (enzymatic assay). Second, the evaluation can be carried out in replicon cell lines (which are unable to produce infectious particles, but are capable of RNA replication) using a virus strain (post-treatment assay). For the post-treatment assay, host cells are initially infected with viruses, which can attach to and enter the cell. Then, the viruses that did not attach to the host cells are removed. Finally, the compound under investigation is added. An observation of virus inhibition indicates that the compound acts on the virus replication process, which involves several enzymes. The compound is thus assumed to act on one or more viral enzymes. Molecular docking is another important approach that has been used to investigate inhibitors of viral enzymes. The results from molecular docking experiments and *in vitro* analyses help streamline the screening processes.

3.3. Direct Inhibitory Activities of Natural Compounds against DENV Enzymes

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. Kulturpfl (Br) is a member of the ginger family. A phytochemical investigation of yellow rhizomes of this species from Thailand led to the isolation of six compounds, which are shown in Figure 1.

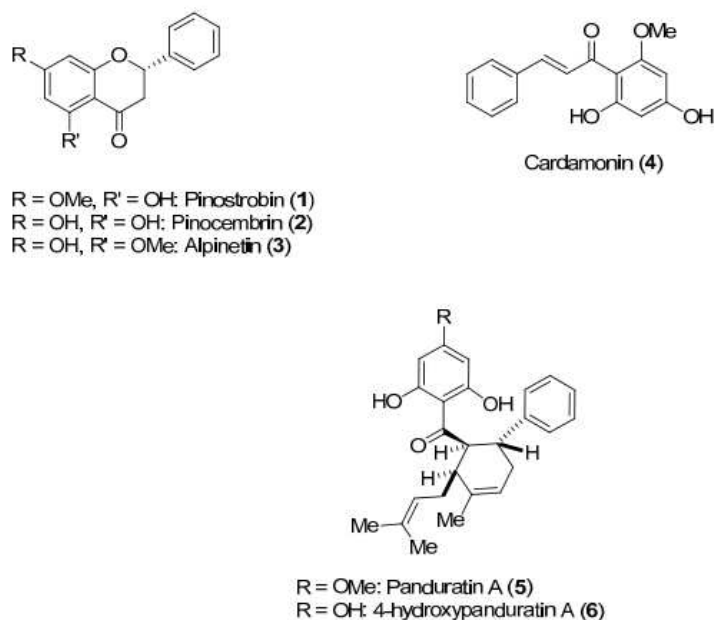
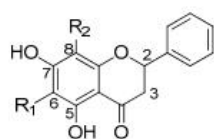


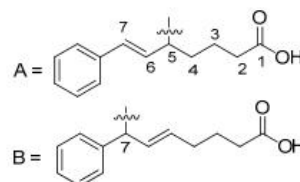
Figure 1. Natural products isolated from the rhizomes of *B. rotunda* (L.).

These compounds were assayed against the DENV-2 NS3 protease [47]. The enzymatic assays were carried out using the fluorogenic peptide Boc-Gly-Arg-Arg-MCA, which is an active substrate of the DENV-2 NS3 protease. Initially, the activities of the six compounds against NS3 were evaluated at three different concentrations (120, 240 and 400 ppm); all compounds inhibited NS3 protease activity in a concentration-dependent manner. The most active compounds were 5 and 6. The activities of these compounds were further evaluated at 40, 80 and 160 ppm. The inhibitory activity of Compound 5 ranged from 27.1% (40 ppm)–99.8% (400 ppm), whereas the inhibitory activity of Compound 6 ranged from 52.0% (40 ppm)–99.8% (400 ppm). Individually, Compounds 2 and 4 were found to have low inhibitory activity. However, when these flavones were combined, an increase in inhibitory activity was noticed (synergistic effect). Kinetic studies carried out with Compounds 1, 4, 5 and 6 resulted in the determination of their K_i values (345 for 1; 377 for 4; 25 for 5; and 21 for 6). Compounds 1 and 4 appeared to function via a noncompetitive mechanism, whereas Compounds 5 and 6 displayed competitive inhibition [47].

Litaudon and co-workers biologically screened 1350 ethyl acetate extracts obtained from various parts of 650 New Caledonian plants. The extracts were screened at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ in a DENV polymerase assay using the RdRp domain of DENV-2 NS5. A second screen of 320 active extracts at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ was then performed, which resulted in the selection of 49 extracts exhibiting enzymatic inhibition of at least 80%. An extract from the bark of *Cryptocarya chartacea* displayed significant enzymatic inhibitory activity (90% at 10 $\mu\text{g/mL}$) and was subsequently selected for fractionation. Flavonoids 7–17 (Figure 2) were isolated from this extract [48].



Pinocembrin R₁=R₂=H (7)
 Chartaceone A R₁=A, R₂=H (8)
 Chartaceone A1 2R, 5R (9)
 Chartaceone A2 2R, 5S (10)
 Chartaceone A3 2S, 5R (11)
 Chartaceone A4 2S, 5S (12)
 Chartaceone B R₁=B, R₂=H (13)
 Chartaceone C R₁=R₂=B (14)
 Chartaceone D R₁=B, R₂=A (15)
 Chartaceone E R₁=A, R₂=B (16)
 Chartaceone E R₁=R₂=A (17)



Compound	Polymerase Activity Inhibition ^a	Cytotoxicity ^b
7	Not active	0
8	14.8 ± 2.4	3.2
9	15.3 ± 1.4	0
10	9.0 ± 3.5	11
11	27.0 ± 6.5	0
12	7.4 ± 2.2	6
13	72.5 ± 15.3	0
14	4.2 ± 0.1	0
15	1.8 ± 1.2	0
16	2.9 ± 0.3	0
17	2.4 ± 0.3	0

^a IC₅₀ (μM) values are the mean values ± SD (n = 3); ^b % of inhibition at 10 μg/mL.

Figure 2. Chemical constituents isolated from the bark of *Cryptocarya chartacea*.

As can be seen in Figure 2, flavonoids 8–17 inhibited the DENV NS5 RdRp, with IC₅₀ values ranging from 1.8 μM (Compound 15)–72.5 μM (Compound 13). Pinocembrin (7) was found to be inactive against the DENV-2 NS5 RdRp, suggesting that the aliphatic portion of the chartaceone structure plays an important role in the inhibition of the polymerase. In this investigation, the authors also evaluated the effects of the isolated compounds on nasopharyngeal carcinoma cells. No compounds were found to be toxic to this cell line at a concentration of 10 μg/mL [48].

The investigation of the ethyl acetate extracts of the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*, a rare endemic plant from New Caledonia, resulted in the isolation of a series of very complex, oxygenated diterpenoids, which included Compounds 18–20. These compounds were screened against the DENV NS5 RdRp (Figure 3).

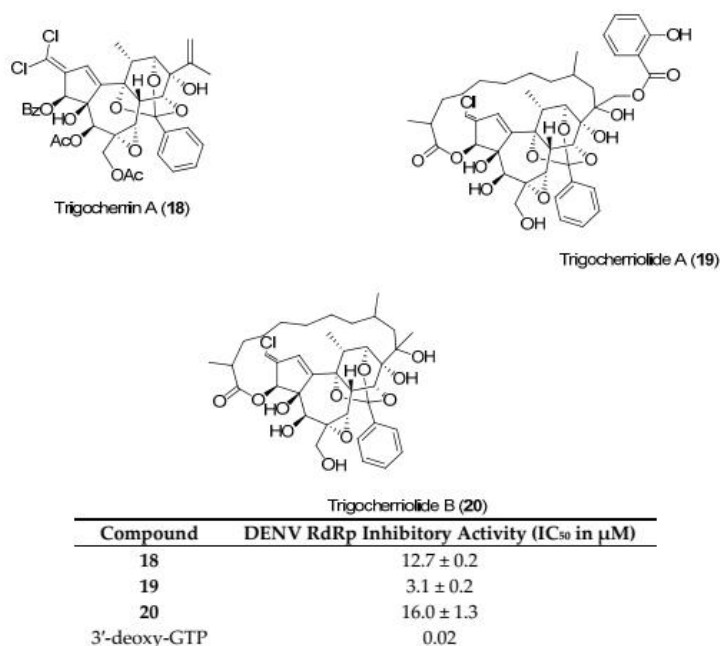


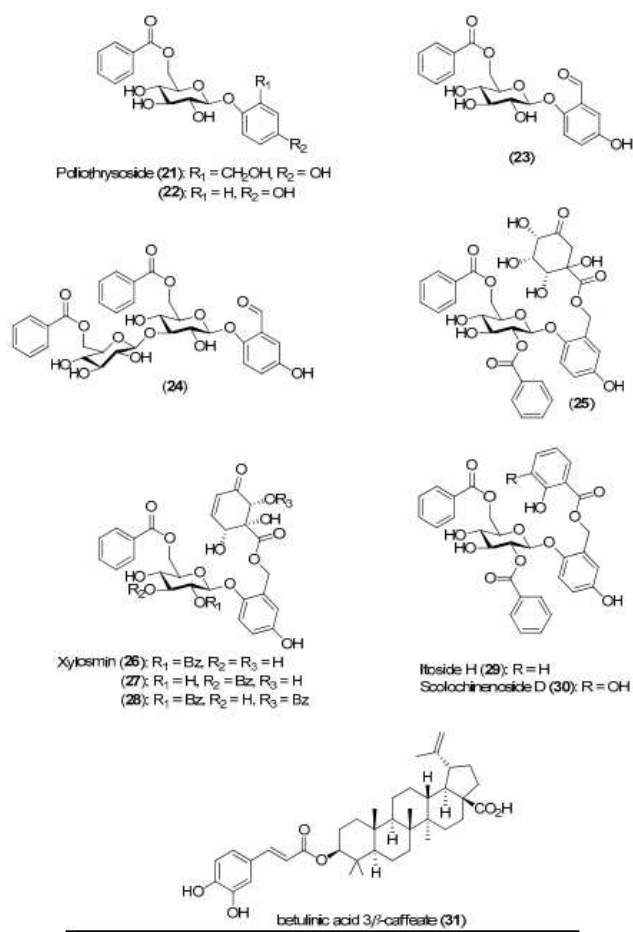
Figure 3. Diterpenoids from *T. cherrieri* and their antiviral effects against the dengue virus (DENV) NS5 RdRp.

Compounds **18–20** were capable of inhibiting the DENV NS5 RdRp. Compound **19** was the most potent (IC₅₀ = 3.1 μM), with an inhibitory activity more than 150-times lower than 3-deoxy-Guanosine Triphosphate (3'-deoxy-GTP) (0.02 μM), which was used as the reference compound [49].

To identify new inhibitors of the DENV-2 NS5 RdRp, Litaudon and co-workers screened 820 ethyl acetate extracts from different parts of 400 plants collected in Madagascar. The bark extract of *Flacourtia ramontchi* was selected for fractionation, because of its pronounced effect on the DENV-2 NS5 RdRp. The compounds shown in Figure 4 were isolated from this extract and fully characterized [50]. The data displayed in Figure 4 reveal that among the isolated phenolic glycosides **21–31**, Compounds **22**, **27** and **30** were the most active. The cinnamic acid derivative Compound **31** showed significant inhibitory activity, although its activity is about four-times lower than the positive control. However, no structure-activity relationships could be established for any of these compounds.

Anacolosa pervilleana is a Madagascan plant whose leaves, bark and young shoots are used in traditional medicines for the treatment of schistosomiasis, syphilis and general weakness. Four acetylenic carboxylic acids (Compounds **32–35**), two triterpenes (Compounds **36** and **37**) and one aromatic compound (Compound **38**) were isolated from the leaf ethyl acetate extract of this species (Figure 5) [51].

The acetylenic acids were found to be the most active compounds, inhibiting the DENV NS5 RdRp with approximately the same efficacy. The observed IC₅₀ values (<3 μM) were about 100-times lower than the reference compound, 3'-deoxy-GTP [51].



Compound	Polymerase Inhibition (IC_{50} in μM)
21	>50
22	9.3 ± 2.8
23	71.1 ± 1.2
24	23.8 ± 2.7
25	35.5 ± 3.8
26	24.3 ± 3.4
27	13.4 ± 1.9
28	39.8 ± 1.6
29	37.8 ± 3.6
30	9.5 ± 5.0
31	0.85 ± 0.10
3'-deoxy-GTP	0.02

Figure 4. Natural compounds isolated from the ethyl acetate bark extract of *F. ramontchi* and their inhibitory effects on the DENV-2 NS5 RdRp.

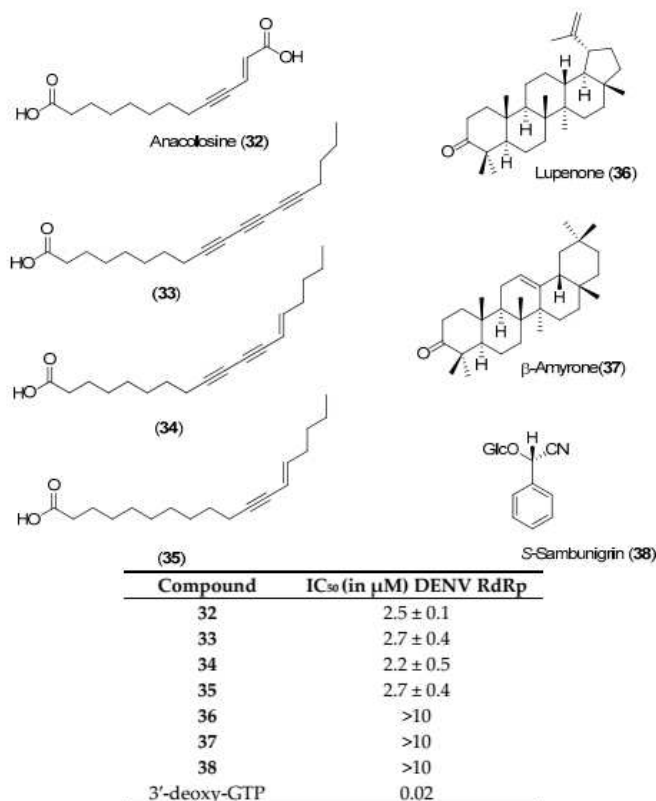


Figure 5. Structures of Compounds 32–38 and their antiviral activities.

3.4. Direct Inhibitory Activities of Plant Extracts against DENV Enzymes

The medicinal plants *Vernonia cinerea*, *Hemigraphis reptans*, *Hedyotis auricularia*, *Laurentia longiflora*, *Tridax procumbens* and *Senna angustifolia* were used to evaluate their abilities to inhibit the DENV NS3 protease. The highest inhibitory effects were observed for the ethanolic extract of *S. angustifolia* leaves, the methanolic extract of *V. cinerea* leaves and the ethanolic extract of *T. procumbens* stems (IC₅₀ values: 30.1 \pm 3.4, 23.7 \pm 4.1 and 25.6 \pm 3.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). The most active extracts were also tested in vitro against DENV-2-infected Vero cells, which were able to maintain a normal morphology without cytopathic effects. The percent viral inhibition of the extracts of *V. cinerea* (80.6% \pm 6.1%) and *T. procumbens* (64.0% \pm 9.4%) was significantly higher than that of *S. angustifolia* extract (26.3% \pm 3.8%), as measured by a plaque-forming assay and RT-qPCR [52]. The authors of this investigation did not analyze which compounds were responsible for the observed activities.

3.5. Indirect Inhibitory Activities of Compounds and Extracts against DENV Enzymes

The plant *Houttuynia cordata* is a popular vegetable consumed in the northern and eastern regions of Thailand. Its aqueous extract was evaluated for inhibitory activity against DENV-2 within the 10–100-mg/mL concentration range. Both pre- and post-incubation of HepG2 cells with *H. cordata* extract resulted in a significant reduction in intracellular DENV-2 RNA production, correlating with a decrease in DENV-2 protein expression. The extract directly inhibited intracellular viral RNA

replication, with an effective concentration (EC_{50}) of 0.8 mg/mL. Within the 10–40-mg/mL concentration range, the *H. cordata* extract also exhibited a protective effect on virion release from infected LLC-MK2 cells (Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells). The reduction in RNA production and decrease in DENV-2 protein expression suggest the inhibition of viral enzymatic activity by the aqueous extract. High-performance liquid chromatography of the aqueous extract revealed that hyperoside (Compound 39) (Figure 6) is the major component of the extract, suggesting that this flavonoid plays an important role in DENV-2 inhibition. The aqueous extract had no toxic effects on human blood cells [53].

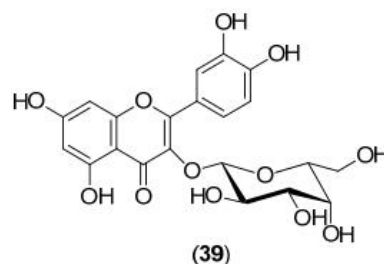
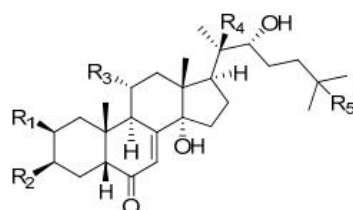


Figure 6. Structure of hyperoside (Compound 39), the major component of the *H. cordata* extract.

The fractionation of the ethanolic extract of *Zoanthus* spp. (sea anemone) collected in Taiwan resulted in the isolation of 14 ecdysones; the inhibitory activities of these compounds against DENV-2 were evaluated. Among the isolated ecdysonoids, Compounds 40–43 were the most potent. The results shown in Figure 7 suggest that ajugasterone C (Compound 42) is equipotent to 2'-C-methylcytidine (positive control), with a better Selective Index (SI). In addition, the most active ecdysone, Compound 42, was also tested against other DENV serotypes. Ecdysone 42 was found to be active against all DENV serotypes, with the following EC_{50} values: DENV-1 ($15.70 \pm 2.36 \mu\text{M}$), DENV-3 ($9.48 \pm 0.24 \mu\text{M}$) and DENV-4 ($12.15 \pm 1.22 \mu\text{M}$) with a high CC_{50} (the 50% cytotoxic concentration). After analyses of both the structure-activity relationship and molecular docking, the authors proposed that ecdysone 42 impairs DENV RNA replication by blocking the viral polymerase channel [54].



(40) Zoanthone A: $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$, $R_5=OAc$

(41) Viticosterone E: $R_1=R_2=OH$, $R_3=H$, $R_4=OH$, $R_5=OAc$

(42) Ajugasterone C: $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$, $R_5=H$

(43) Turkestone: $R_1=R_2=R_3=R_4=OH$, $R_5=OH$

Compound	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	SI (CC_{50}/EC_{50})
40	19.61 ± 2.46	>700	>36.7
41	39.76 ± 2.14	>700	>17.6
42	10.05 ± 2.37	>700	>69.7
43	38.15 ± 2.40	>700	>18.3
2'-C-methylcytidine	11.20 ± 0.3	94.75 ± 4.15	>8.5

Figure 7. Structures of ecdysones 40–43.

β -Carbolines are widespread plant and animal alkaloids that possess important biological activities [55]. Quintana and co-workers evaluated the effects of natural and synthetic β -carbolines; they found that the natural product harmol (Compound **44**) and its synthetic derivative 9-*N*-methylharmine (Compound **45**) were the most potent alkaloids, with inhibitory activities against DENV-2 and SI values of 56.2 and 61.3, respectively (Figure 8). Vero cells were infected with DENV at a multiplicity of infection (MOI) of 1 or 0.1 PFU/cell. At 48 h post-infection, the cells were lysed; and the supernatants were harvested; virus yields were quantified by plaque assay. The results indicate that the compounds likely act via viral enzyme inhibition. Harmol (Compound **44**) and 9-*N*-methylharmine (Compound **45**) were also found to possess inhibitory effects against DENV-1, DENV-3 and DENV-4, albeit with lower efficiencies than against DENV-2 [56].

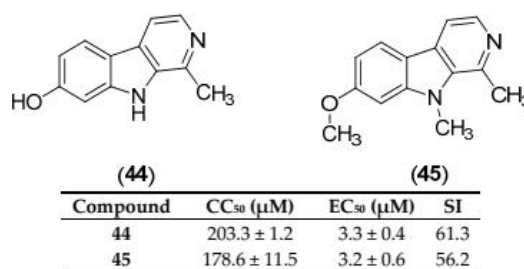


Figure 8. β -Carbolines harmol (Compound **44**) and its synthetic derivative 9-*N*-methylharmine (Compound **45**).

3.6. *In Silico* Investigations of DENV Enzyme Inhibitors

Galiano and co-authors conducted an *in silico* study to identify new inhibitors of the NS5 RdRp in the four DENV serotypes. They used a chemical library of 372,792 non-nucleotide compounds to perform molecular docking experiments at the binding site of the RNA template tunnel of the polymerase. After the screening process was completed, 39 compounds were identified as leading DENV RdRp inhibitor candidates. The selected compounds had a highly negative free energy variation (ΔG) when docked to the binding site of the RNA template tunnel in the four DENV serotypes. In addition, the majority of the selected compounds had favorable druggability and optimal ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties [57]. Among the 39 selected compounds, 10 (Compounds **46–55** in Figure 9) were natural products.

Recently, Power and Setzer reported an *in silico* investigation of natural products as potential antiviral agents against DENV protease (NS2B-NS3pro), helicase (NS3 helicase), MTase, RdRp and the virus envelope. A total of 2194 plant-derived natural products were docked. The compound set was composed of 290 alkaloids (68 indole alkaloids, 153 isoquinoline alkaloids, 5 quinoline alkaloids, 13 piperidine alkaloids, 14 steroidal alkaloids and 37 miscellaneous alkaloids), 678 terpenoids (47 monoterpenoids, 169 sesquiterpenoids, 265 diterpenoids, 81 steroids and 96 triterpenoids), 20 auronones, 81 chalcones, 349 flavonoids, 120 isoflavonoids, 74 lignans, 58 stilbenoids, 169 miscellaneous polyphenolic compounds, 100 coumarins, 28 xanthenes, 67 quinones and 160 miscellaneous natural compounds. Polyphenolic compounds, flavonoids, chalcones and other phenolics were identified as the most strongly docking ligands for DENV protein targets [58], as shown in Figure 10 for selected ligands **56–59** for DENV NS2B-NS3.

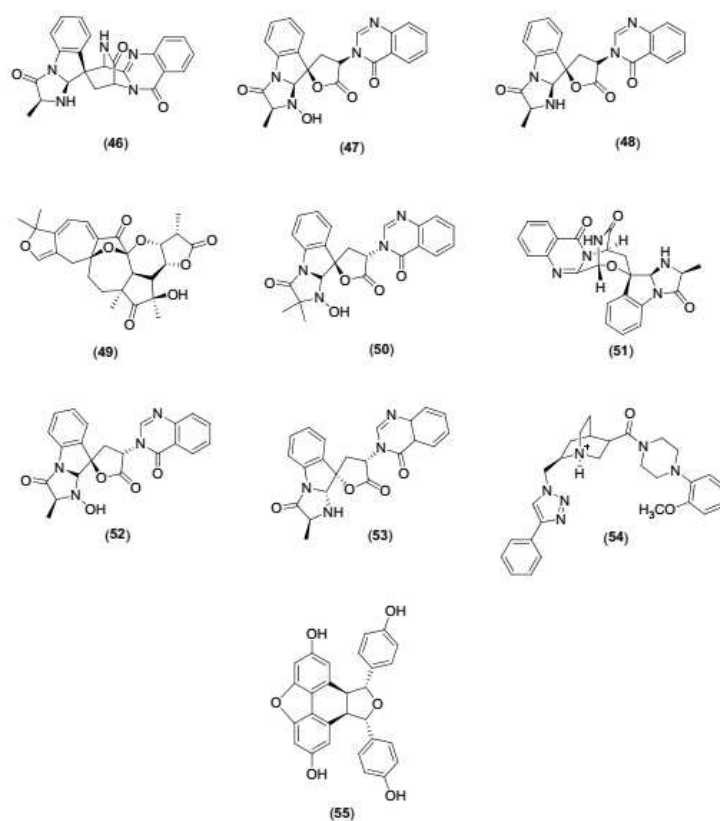


Figure 9. Structures of natural products 46–55 selected as leading candidate DENV RdRp inhibitors by Galiano and co-authors [57].

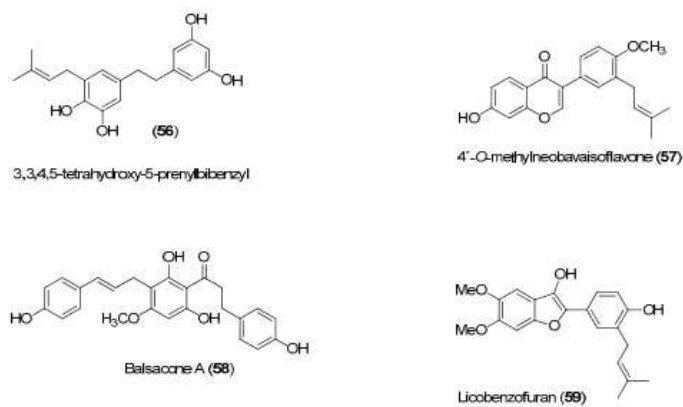


Figure 10. Identified compounds by Power and Setzer [58] as strongly docking ligands for DENV protein targets.

4. Structural Biology of CHIKV

The genome of CHIKV is a positive-sense, single-stranded RNA (ssRNA) genome, consisting of two open reading frames: The 5' end encodes nonstructural proteases necessary for the formation of viral replicase complexes, and the 3' end encodes structural proteins necessary for receptor binding and cell membrane fusion [4]. Alphaviruses have a positive-sense ssRNA genome that is approximately 11 kb in length and encodes nine proteins. Four nonstructural proteins (nsP1–nsP4) are encoded by the 5' end of the genome. The 3' end of the genome encodes a polyprotein precursor containing three structural proteins: PE2 (the precursor of E3 and E2), E1 and the capsid protein (C) [59].

The nonstructural proteins nsP1, nsP2 and nsP4 possess enzymatic activities. They are involved in viral RNA genome synthesis, methylation of the 5' cap of the viral genome and protein processing, among other activities [59].

4.1. nsP1

CHIKV nsP1 is a palmitoylated protein, consisting of 535 amino acids. The N-terminal region of nsP1 is responsible for the MTase and guanylyltransferase activities involved in capping and methylation of the newly-formed viral genomic and subgenomic RNAs. Recently, this protein was reported to play a crucial role in the downregulation of bone marrow stromal antigen-2 (BST-2), suggesting that nsP1 would be a potential target of BST-2-mediated therapeutics targeting CHIKV [7,59]. Elimination of nsP1 abolishes CHIKV replication. nsP1 genes are highly conserved in CHIKV strains and are important for virus proliferation in host cells. Therefore, nsP1 represents a rational target for antiviral therapies [60].

4.2. nsP2

The nonstructural protein nsP2 possesses numerous enzymatic activities and functional roles. This viral protein consists of an N-terminal domain with RNase and NTPase activities and a protease domain and an MTase-like region of unknown function at its C-terminus. In addition to its role as a cofactor of the viral polymerase complex, nsP2 is a virulence factor [4].

Similar to DENV NS3, CHIKV nsP2 cleaves viral polyproteins into four nonstructural proteins via the thiol protease complex at its C-terminus. The proteolytic activity of nsP2 plays an important role in the cleavage of nonstructural polyproteins, which are critical for viral replication. On the other hand, the RNA triphosphatase activity essential for RNA capping is found in the N-terminus of nsP2. The recently-solved crystal structure of CHIKV nsP2 might function as a crucial starting point for the development of novel antivirals targeting CHIKV [4,7,61,62]. The complete nucleotide sequence of the CHIKV genome revealed that nsP2 is the largest nonstructural protein: 798 amino acids long with a large, net positive charge [63].

4.3. nsP4

CHIKV nsP4 is an RdRp that is believed to participate in protein unfolding in the host cell, which helps replicate genomic RNA via a negative-strand RNA. CHIKV nsP4 also helps transcribe the 26S subgenomic mRNA, which encodes structural proteins [64,65].

Mature CHIKV nsP2 has been found to interact with both nsP1 and nsP4. Newly-synthesized simple strand RNAs may then be capped by nsP2 (RNA triphosphatase activity) and nsP1 (MTase and guanylyltransferase activities), suggesting that the interactions between nsP1, nsP2 and nsP4 are indispensable, as observed in a study of CHIKV nsPs [66,67]. Based on the crucial role of the CHIKV enzymes in viral replication, nsP1, nsP2 and nsP4 are important antiviral drug targets.

4.4. Direct Inhibitory Activities of Compounds against CHIKV Enzymes

Lucas-Hourani and collaborators [8] conducted a phenotypic assay to identify CHIKV inhibitors that target nsP2 [8]. In their investigation, the inhibitory activities of 3040 compounds, at a final concentration of 10 µg/mL (average concentration of 30 ± 13 µM), were tested; the natural compound derivative **60**, shown in Figure 11, partially blocks nsP2 activity. This compound was then tested for

its potential impact on CHIKV replication in vitro: HEK-293T cells were infected with CHIKV-Luc (MOI = 0.2) in the presence of the compound at 7.75, 15.5 or 31 μM (5, 10 or 20 $\mu\text{g/mL}$, respectively). A 50% reduction in *Renilla* luciferase activity was observed in the presence of Compound 60 at 31 μM (the IC_{50} value), thus demonstrating a weak, but statistically-significant inhibition of viral replication [8].

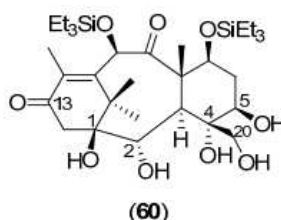


Figure 11. Structure of Compound 60.

4.5. Indirect Inhibitory Activities of Compounds and Extracts against CHICKV Enzymes

The diterpenoids shown in Figure 3 were not evaluated against a specific CHIKV enzyme; however, all of them inhibited virus replication in the post-treatment assay of Vero cells, as seen in Table 1. Even though a specific target was not identified, the inhibitory effects suggest that enzymes involved in replication were affected. From the data presented in Table 1, the selective indices for Compounds 18, 19 and 20 correspond to 23, 2.4 and 2.7, respectively. Compounds 18–20 were found to be more potent than chloroquine, which was used as a positive control [49].

Table 1. Antiviral activities of Compounds 18–20 against chikungunya virus (CHIKV) replication.

Compound	EC_{50} (in μM) CHIKV	CC_{50} (in μM) Vero Cells
18	1.5 ± 0.6	35 ± 8
19	1.9 ± 0.6	4.6 ± 0.8
20	3.9 ± 1.0	10.5 ± 0.1
Chloroquine	11.0 ± 2.1	100 ± 25

Using a cell-based bioassay, the natural products shown in Figure 5 were also evaluated for inhibitory activities against CHIKV. Although Compounds 33–35 had antiviral effects (Table 2), no selectivity was observed. On the contrary, terpenes 36 ($\text{EC}_{50} = 77 \mu\text{M}$) and 37 ($\text{EC}_{50} = 86 \mu\text{M}$) presented lower, but selective activity against CHIKV (an SI of about three) [51].

Table 2. Effects of Compounds 32–38 on CHIKV and Vero cells.

Compound	EC_{50} (in μM) CHIKV	CC_{50} (in μM) Vero Cells
32	>420	>420
33	>30	30
34	>23	23
35	>30	30
36	77 ± 26	>235
37	86 ± 9	>235
38	>426	>426
Chloroquine	11 ± 7	ND

The flavonoids shown in Figure 12 were investigated for their inhibitory activities against CHIKV. qRT-PCR, immunofluorescence assay and western blot analyses all indicated that baicalein (Compound 61), fisetin (Compound 62) and quercetagenin (Compound 63) affect CHIKV RNA production and viral protein expression, with IC_{50} values of 1.89 $\mu\text{g/mL}$ (6.99 μM), 8.44 $\mu\text{g/mL}$

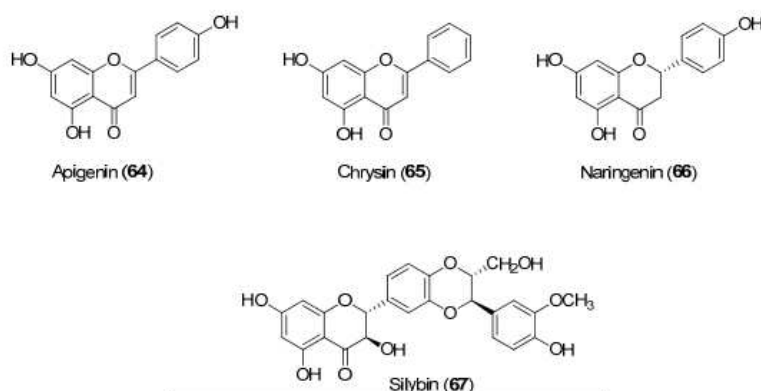
(29.5 μM) and 13.85 $\mu\text{g/mL}$ (43.52 μM), respectively, and minimal cytotoxicity. These data provide the first evidence of the intracellular anti-CHIKV activities of these compounds [68].



Figure 12. Structures of flavonoids 61–63.

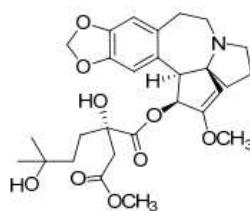
The CHIKV replicon cell line, BHK-CHIKV-NCT, was validated and used for screening 356 compounds, including 123 natural compounds and 233 clinically-approved drugs and other pharmaceutical compounds. After a 48-h exposure of the cell line to the compounds at a concentration of 50 μM , cellular EGFP appeared red, as the endpoint of the primary screen. The limit of the screen was set at a greater than 75% reduction of the EGFP signal, and the antiviral activities of all active compounds were confirmed in a second experiment that examined both EGFP and *Rluc* marker levels. The dose-dependent suppression of marker genes in the replicon vector after the 48-h exposure was observed for natural compounds apigenin (Compound 64), chrysin (Compound 65), naringenin (Compound 66) and silybin (Compound 67). The IC_{50} values for EGFP and *Rluc* are shown in Figure 13. All compounds showed low cytotoxicity with CC_{50} values greater than 200 μM , except for naringenin (Compound 85), which had a CC_{50} value of 122.1 μM [69].

Harringtonine (Compound 68) (Figure 14), a cephalotaxine alkaloid, potentially inhibited CHIKV infection ($\text{EC}_{50} = 0.24 \mu\text{M}$), with minimal cytotoxicity (cell viability >90%). Harringtonine treatment resulted in a significant dose-dependent reduction in both negative- and positive-sense RNAs in both CHIKV strains, suggesting that it inhibited a phase in the CHIKV replication cycle that occurs before RNA production. Additionally, results also suggest that this alkaloid may inhibit CHIKV protein production, leading to a decrease in infectious virus titers [70].



Compound	EGFP (in μM)	Rluc (in μM)
64	22.5	28.3
65	46.8	50.2
66	25.8	30.0
67	71.1	59.8

Figure 13. Structures of flavonoids 64 and 67.



Harringtonine (68)

Figure 14. The alkaloid harringtonine (Compound 68).

Inhibitory activities of the aqueous, aqueous-ethanolic and ethanolic extracts of the roots of *Decalepis hamiltonii* and the leaves of *Vitex negundo* and *Hyptis suaveolens* were assessed against two strains (Asian and East Central South African lineages) of CHIKV in a post-treatment assay. Both the *V. negundo* ethanolic extract and the *H. suaveolens* aqueous-ethanolic extract were found to effectively inhibit the Asian strain, with both exhibiting 50% virus inhibition at a concentration of 15.62 µg/mL. The selectivity index of *H. suaveolens* (16) was higher than that of *V. negundo* (2) against the Asian CHIKV strain. No extracts were able to inhibit the East Central South African CHIKV strain, presumably because of the higher virulence and replicative features of the East Central South African strain compared to the Asian strain [71].

4.6. In Silico Investigations of CHIKV Enzyme Inhibitors

Setzer and collaborators conducted a molecular docking investigation to identify alphavirus protease inhibitors from natural compounds [72]. The inhibitory activities of 2174 natural substances were screened against several proteases, including nsP2 CHIKV. Several compounds presented notable docking energies and selectivities when screened against CHIKV nsP2, including the alkaloids 2,3-dihydrosarsalignone (Compound 69) and sarachine (Compound 70) (Figure 15). Both compounds occupy the same position in their lowest-energy docked position with the CHIKV protease.

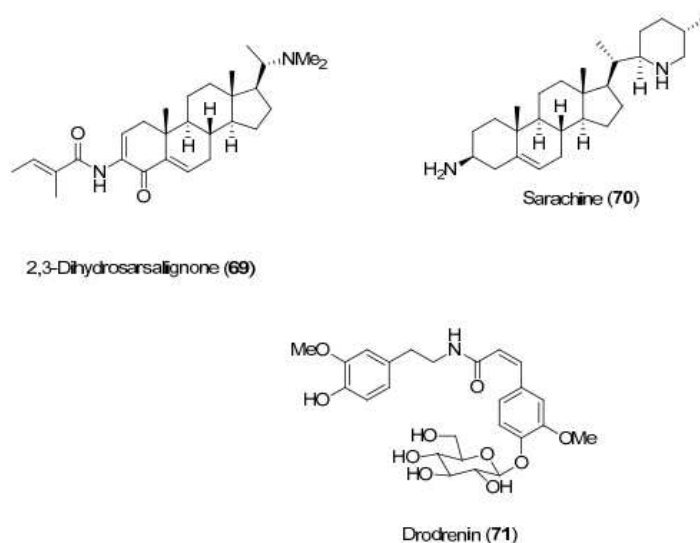


Figure 15. Structures of Compounds 69–71, which were selective for the CHIKV nsP2 protease [72].

The amide glucoside drodrenin (Compound 71) was also selective for the CHIKV nsP2 protease; the glucose moiety of drodrenin occupies a position near the active site (close to amino acids Cys¹⁰¹³ and His¹⁰⁸³).

5. Concluding Remarks

The exploitation of the natural product pool has afforded compounds and extracts that present important inhibitory effects on enzymes involved in DENV and CHIKV replication and protein expression. This is an important approach since inhibition of these enzymes can disrupt the virus life cycle. Most of the studies herein described were conducted in vitro using enzymatic assays [8,47–52] or viral strain/replicon on cells evaluating replication, inhibition and/or protein expression [49,51–54,56,68–71]. Three studies were conducted utilizing the in silico docking approach [57,58,72]. In vivo investigations of the described compounds and extracts were not reported. Most of the described enzymatic assays were carried out on DENV enzymes, and just one used CHIKV enzyme [8]. For CHIKV, assays performed on cells with a viral strain are one important option. Further investigations with heterologous expression of CHIKV enzymes for antiviral analyses are necessary so that a more profound evaluation of compounds against viral enzymes could be accomplished. In order to obtain a deeper understanding of the potential of the described natural products and extracts as antivirals for DENV and CHIKV, it is essential to carry out detailed in vitro and in vivo studies. It is important to mention that subsequent clinical trials are necessary, since efficiency in vitro is indicative, but it does not represent a guarantee of a good clinical trial. Considering the natural compounds described in this review, it is noticed that flavonoids are the ones that have been more extensively investigated.

Most of the investigations described in this review were performed with natural products from plant extracts. However, other sources of natural products, such as animals, microorganisms and marine organisms, should be explored towards the discovery of antivirals against DENV and CHIKV. It is also important to mention the fact that structures of natural compounds can be optimized, in terms of biological activities, via synthetic transformations. Thus, the compounds described in this review might be useful as starting points for synthetic endeavors towards the synthesis of more potent compounds against DENV and CHIKV. Finally, it is noticed from this review that, to date, there are few reports on the effect of natural products on dengue and chikungunya viral enzymes. In other words, the natural product pool is relatively unexplored in this regard. Considering the vast array of compounds available from nature, it is possible to anticipate that more investigations in this field will be described in the near future.

Acknowledgments: We are grateful to FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), CNPq, and CAPES. The funders had no role in the study design, data collection, analysis, decision to publish or preparation of this manuscript.

Author Contributions: The authors, A.F.C.d.S.O., R.R.T., A.S.d.O., A.P.M.d.S., M.L.d.S. and S.O.d.P., contributed equally to the preparation of this review.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Neglected tropical diseases: Becoming less neglected. *Lancet* **2014**, *383*, 1269.
2. Hotez, P.J.; Molyneux, D.H.; Fenwick, A.; Ottesen, E.; Ehrlich, S.S.; Sachs, J.D. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e102.
3. LaBeaud, A.D. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e247.
4. Bhakat, S.; Karubiu, W.; Jayaprakash, V.; Soliman, M.E.S. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 677–702.

5. Schuffenecker, I.; Iteman, I.; Michault, A.; Murri, S.; Frangeul, L.; Vaney, M.C.; Lavenir, L.; Pardigon, N.; Reynes, J.M.; Pettinelli, F.; et al. Genome microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e263.
6. Bhakat, S.; Soliman, M.E.S. Chikungunya virus (CHIKV) inhibitors from natural sources: A medicinal chemistry perspective. *J. Nat. Med.* **2015**, *69*, 451–462.
7. Rashad, A.A.; Mahalingam, S.; Keller, P.A. Chikungunya virus: Emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1147–1166.
8. Lucas-Hourani, M.; Lupan, A.; Desprès, P.; Thoret, S.; Pamlard, O.; Dubois, J.; Guillou, C.; Tangy, F.; Vidalain, P.O.; Munier-Lehmann, H. A Phenotypic Assay to Identify Chikungunya Virus Inhibitors Targeting the Nonstructural Protein nsP2. *J. Biomol. Scr.* **2013**, *18*, 172–179.
9. World Health Organization (WHO). *Global Strategy for Dengue Prevention and Control, 2012–2020*; WHO: Geneva, Switzerland, 2012.
10. Gubler, D.J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop. Med. Health* **2011**, *39*, 3–11.
11. Dengue, Countries or Areas at Risk, 2011. Available online: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_DengueTransmission_ITHRiskMap.png (accessed on 30 May 2016).
12. Gibbons, R.V.; Vaughn, D.W. Dengue: An escalating problem. *BMJ* **2002**, *324*, 1563–1566.
13. Murray, N.E.A.; Quam, M.B.; Wilder-Smith, A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clin. Epidemiol.* **2013**, *5*, 299–309.
14. Gubler, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 480–496.
15. Wright, P.F.; Durbin, A.P.; Whitehead, S.S.; Ikizler, M.R.; Henderson, S.; Blaney, J.E.; Thumar, B.; Ankras, S.; Rock, M.T.; McKinney, B.A.; et al. Phase I trial of the dengue virus type 4 vaccine candidate rDEN4[Delta]30–4995 in healthy adult volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *81*, 834–841.
16. Teixeira, R.R.; Pereira, W.L.; Oliveira, A.F.C.S.; Silva, A.M.; Oliveira, A.S.; Silva, M.L.; Silva, C.C.; Paula, S.O. Natural Products as Source of Potential Dengue Antivirals. *Molecules* **2014**, *19*, 8151–8176.
17. Nielsch, U.; Fuhrmann, U.; Jaroch, S. (Eds.) *New Approaches to Drug Discovery*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; p. 341.
18. Fros, J.J.; Liu, W.J.; Prow, N.A.; Geertsema, C.; Ligtenberg, M.; Vanlandingham, D.L.; Schnettler, E.; Vlak, J.M.; Suhrbier, A.; Khromykh, A.A.; et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. *J. Virol.* **2010**, *84*, 10877–10887.
19. Koehn, F.E.; Carter, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 206–220.
20. Li, J.W.; Vederas, J.C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* **2009**, *325*, 161–165.
21. Molinari, G. Natural products in drug discovery: Present status and perspectives. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, *655*, 13–27.
22. Kudi, A.C.; Myint, S.H. Antiviral activity of some Nigerian medicinal plants extracts. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *68*, 289–294.
23. Traditional Medicine. Available online: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/) (accessed on 2 February 2014).
24. Betancur-Galvis, L.A.; Saez, J.; Granados, H.; Slazar, A.; Ossa, J.E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 531–535.
25. Chambers, T.J.; Hahn, C.S.; Galler, R.; Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 649–688.
26. Oliveira, A.S.; Silva, M.L.; Oliveira, A.F.C.; Silva, C.C.; Teixeira, R.R.; Paula, S.O. NS3 and NS5 Proteins: Important Targets for Anti-Dengue Drug Design. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 1759–1769.
27. Tay, M.Y.; Saw, W.G.; Zhao, Y.; Chan, K.W.; Singh, D.; Chong, Y.; Forwood, J.K.; Ooi, E.E.; Grüber, G.; Lescar, J.; et al. The C-terminal 50 amino acid residues of dengue NS3 protein are important for NS3-NS5 interaction and viral replication. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 2379–2394.
28. Lorenz, I.C.; Allison, S.L.; Heinz, F.X.; Helenius, A. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins pM and E in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **2002**, *76*, 5480–5491.

29. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E.A.; et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 125–148.
30. Holmes, E.C.; Burch, S.S. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 74–77.
31. Pugachev, K.V.; Guirakhoo, F.; Trent, D.W.; Monath, T.P. Traditional and novel approaches to flavivirus vaccines. *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 567–582.
32. Timiri, A.K.; Sinha, B.N.; Jayaprakash, V. Progress and prospects on DENV protease inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *19*, 125–143.
33. Gorbalenya, A.E.; Koonin, E.V. Helicases: Amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 419–429.
34. Luo, D.; Xu, T.; Hunke, C.; Grüber, G.; Vasudevan, S.G.; Lescar, J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J. Virol.* **2008**, *82*, 173–183.
35. Xu, T.; Sampath, A.; Chao, A.; Wen, D.; Nanao, M.; Chene, P.; Vasudevan, S.G.; Lescar, J. Structure of the Dengue virus helicase/nucleoside triphosphatase catalytic domain at a resolution of 2.4 Å. *J. Virol.* **2005**, *79*, 10278–10288.
36. Sampath, A.; Padmanabhan, R. Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Res.* **2009**, *81*, 6–15.
37. Matusan, A.E.; Pryor, M.J.; Davidson, A.D.; Wright, P.J. Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: Effects on enzyme activity and virus replication. *J. Virol.* **2001**, *75*, 9633–9643.
38. Kapoor, M.; Zhang, L.; Ramachandra, M.; Kusukawa, J.; Ebner, K.E.; Padmanabhan, R. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19100–19106.
39. Johansson, M.; Brooks, A.J.; Jans, D.A.; Vasudevan, S.G. A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin-beta and the viral helicase, NS3. *J. Gen. Virol.* **2001**, *82*, 735–745.
40. Eglhoff, M.P.; Benarroch, D.; Selisko, B.; Romette, J.L.; Canard, B. An RNA cap (nucleoside-2'-O)-methyltransferase in the flavivirus RNA polymerase NS5: Crystal structure and functional characterization. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2757–2768.
41. Junaid, M.; Angsuthanasombat, C.; Wikberg, J.E.; Ali, N.; Katzenmeier, G. Modulation of enzymatic activity of dengue virus nonstructural protein NS3 nucleoside triphosphatase/helicase by poly(U). *Biochemistry (Mosc.)* **2013**, *78*, 925–932.
42. Eglhoff, M.P.; Decroly, E.; Malet, H.; Selisko, B.; Benarroch, D.; Ferron, F.; Canard, B. Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J. Mol. Biol.* **2007**, *21*, 723–736.
43. Yap, T.L.; Xu, T.; Chen, Y.L.; Malet, H.; Eglhoff, M.P.; Canard, B.; Vasudevan, S.G.; Lescar, J. Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J. Virol.* **2007**, *81*, 4753–4765.
44. Caillet-Saguy, C.; Lim, S.P.; Shi, P.Y.; Lescar, J.; Bressanelli, S. Polymerases of hepatitis C viruses and flaviviruses: Structural and mechanistic insights and drug development. *Antiviral Res.* **2014**, *105*, 8–16.
45. Selisko, B.; Wang, C.; Harris, E.; Canard, B. Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *9*, 74–83.
46. Lim, S.P.; Noble, C.G.; Shi, P.Y. The dengue virus NS5 protein as a target for drug discovery. *Antiviral Res.* **2015**, *119*, 57–67.
47. Kiat, T.S.; Phippen, R.; Yusof, R.; Ibrahim, H.; Khalid, N.; Rahman, N.A. Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3337–3340.
48. Allard, P.-M.; Dau, E.T.H.; Eydoux, C.; Guillemont, J.-C.; Dumontet, V.; Poullain, C.; Canard, B.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Alkylated flavanones from the bark of *Cryptocarya chartacea* as dengue virus NS5 polymerase inhibitors. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2446–2453.
49. Allard, P.-M.; Leyssen, P.; Martin, M.-T.; Bourjot, M.; Dumontet, V.; Eydoux, C.; Guillemont, J.-C.; Cannard, B.; Poullain, C.; Guéritte, F.; et al. Antiviral chlorinated daphnane diterpenoid orthoesters from the bark and wood of *Trigonostemon cherrieri*. *Phytochemistry* **2012**, *84*, 160–168.

50. Bourjot, M.; Leyssen, P.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Flacourtosides A-F, phenolic glycosides isolated from *Flacourtia ramontchi*. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 752–758.
51. Bourjot, M.; Leyssen, P.; Eydoux, C.; Guillemot, J.-C.; Canard, B.; Rasoanaivo, P.; Guéritte, F.; Litaudon, M. Chemical constituents of *Anacolosia pervilleana* and their antiviral activities. *Fittoterapia* **2012**, *83*, 1076–1080.
52. Rothan, H.A.; Zulqarnain, M.; Ammar, Y.A.; Tan, E.C.; Rahman, N.A.; Yusof, R. Screening of antiviral activities in medicinal plants extracts against dengue virus using dengue NS2B-NS3 protease assay. *Trop. Biomed.* **2014**, *31*, 286–296.
53. Leardkamolkarn, V.; Sirigulpanit, W.; Phurimsak, C.; Kumkate, S.; Himakoun, L.; Sripanidkulchai, B. The inhibitory actions of *Houttuynia cordata* aqueous extract on dengue virus and dengue-infected cells. *J. Food Biochem.* **2012**, *36*, 86–92.
54. Cheng, Y.-B.; Lee, J.-C.; Lo, I.-W.; Chen, S.-R.; Hu, H.-C.; Wu, Y.-H.; Wu, Y.-C.; Chang, F.-R. Ecdysones from *Zoanthus* spp. with inhibitory activity against dengue virus 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2344–2348.
55. Peduto, A.; Filosa, R.; de Caprariis, P.; de Feo, V.; Li, S.; Wang, P.; de Martino, L. 1-methoxy-canthin-6-one and related β -carboline: From natural compound to synthesis and biological activities. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; Volume 38, pp. 81–104.
56. Quintana, V.M.; Piccini, L.E.; Panozzo Zénere, J.D.; Damonte, E.B.; Ponce, M.A.; Castilla, V. Antiviral activity of natural and synthetic β -carbolines against dengue virus. *Antiviral Res.* **2016**, *134*, 26–33.
57. Galiano, V.; Garcia-Valtananen, P.; Micol, V.; Encinar, J.A. Looking for inhibitors of the dengue virus NS5 RNA-dependent RNA-polymerase using a molecular docking approach. *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 3163–3181.
58. Powers, C.N.; Setzer, W.N. An In-Silico investigation of phytochemicals as antiviral agents against dengue fever. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2016**, *19*, 516–536.
59. Porta, J.; Prasad, V.M.; Wang, C.I.; Akahata, W.; Ng, L.F.P.; Rossmann, M.G. Structural Studies of Chikungunya Virus-like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. *J. Virol.* **2016**, *90*, 1169–1177.
60. Wyles, D.L. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy. *J. Infect. Dis.* **2013**, *207*, S33–S39.
61. Parashar, D.; Paingankar, M.S.; Kumar, S.; Gokhale, M.D.; Sudeep, A.B.; Shinde, S.B.; Arankalle, V.A. Administration of E2 and NS1 siRNAs inhibit chikungunya virus replication in vitro and protects mice infected with the virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2405.
62. Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D.A. Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules. *J. Phys. Chem.* **2000**, *104*, 3712–3720.
63. Pastorino, B.A.; Peyrefitte, C.N.; Almeras, L.; Grandadam, M.; Rolland, D.; Tolou, H.J.; Bessaud, M. Expression and biochemical characterization of nsP2 cysteine protease of Chikungunya virus. *Virus Res.* **2008**, *131*, 293–298.
64. Khan, A.H.; Morita, K.; Parquet, M.D.; Mdel, C.; Hasebe, F.; Mathenge, E.G.; Igarashi, A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J. Gen. Virol.* **2002**, *83*, 3075–3084.
65. Kumar, S.; Mamidi, P.; Kumar, A.; Basantray, I.; Bramha, U.; Dixit, A.; Maiti, P.K.; Singh, S.; Suryawanshi, A.R.; Chattopadhyay, S.; et al. Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of chikungunya virus: Potential use in basic research. *Arch. Virol.* **2015**, *160*, 2749–2761.
66. Karpe, Y.A.; Pingale, K.D.; Kanade, G.D. Activities of proteasome and m-calpain are essential for Chikungunya virus replication. *Virus Genes* **2016**, doi:10.1007/s11262-016-1355-5.
67. Sreejith, R.; Rana, J.; Dudha, N.; Kumar, K.; Gabrani, R.; Sharma, S.K.; Gupta, A.; Vrati, S.; Chaudhary, V.K.; Gupta, S. Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins. *Virus Res.* **2012**, *169*, 231–236.
68. Lani, R.; Hassandarvish, P.; Shu, M.-H.; Phoon, W.H.; Chu, J.J. H.; Higgs, S.; Vanlandingham, D.; Bakar, S.A.; Zandi, K. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. *Antiviral Res.* **2016**, *133*, 50–61.
69. Pohjala, L.; Utt, A.; Varjak, M.; Lulla, A.; Merits, A.; Ahola, T.; Tammela, P. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28923.
70. Kaur, P.; Thiruchelvan, M.; Lee, R.C.H.; Chen, K.C.; Ng, M.L.; Chu, J.J.H. Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 155–167.

71. Kothandan, S.; Swaminathan, R. Evaluation in vitro antiviral activity of *Vitex Negundo* L., *Hyptis suaveolens* (L.) poit., *Decalepis hamiltonii* Wight & Arn., to Chikungunya virus. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, *4* (Suppl. 1), S111–S115.
72. Byler, K.G.; Collins, J.T.; Ogungbe, I.V.; Setzer, W.N. Alphavirus protease inhibitors from natural sources: A homology modeling and molecular docking investigation. *Comp. Biol. Biochem.* **2016**, *64*, 163–184.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Research paper

Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease



Ana Flávia C. da S. Oliveira^{a, b, 1}, Ana Paula M. de Souza^{c, 1}, André S. de Oliveira^{a, b, 1}, Milene L. da Silva^c, Fabrício M. de Oliveira^d, Edjon G. Santos^a, Ítalo Esposti P. da Silva^a, Rafaela S. Ferreira^e, Filipe S. Villela^e, Felipe T. Martins^f, Daniel H.S. Leal^g, Boniek G. Vaz^f, Róbson R. Teixeira^{c, **}, Sergio O. de Paula^{a, *}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900, Viçosa, Brazil^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Norte de Minas, 39101-000, Diamantina, Brazil^c Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900, Viçosa, Brazil^d Instituto Federal de Minas Gerais (IFMG), Campus Ouro Branco Rua Afonso Sardinha, 90, 36420-000, Ouro Branco, Brazil^e Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, 31270901, Belo Horizonte, Brazil^f Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Av. Esperança, S/N, Campus Samambaia, 74690-970, Goiânia, Brazil^g Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, Rodovia BR 101 Norte, Km 60, Bairro Litorâneo, 29932-900, ão Mateus, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2017

Received in revised form

2 February 2018

Accepted 10 February 2018

Available online 22 February 2018

Keywords:

Antiviral agents

West Nile Virus

Indan-1,3-dione

Knoevenagel condensation

ABSTRACT

A simple and efficient Knoevenagel procedure for the synthesis of 2-arylidene indan-1,3-diones is herein reported. These compounds were prepared via ZrOCl₂·8H₂O catalyzed reactions of indan-1,3-dione with several aromatic aldehydes and using water as the solvent. The 2-arylidene indan-1,3-diones were obtained with 53%–95% yield within 10–45 min. The synthesized compounds were evaluated as inhibitors of the NS2B-NS3 protease of West Nile Virus (WNV). It was found that hydroxylated derivatives impaired enzyme activity with varying degrees of effectiveness. The most active hydroxylated derivatives, namely 2-(4-hydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**14**) and 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**17**), were characterized as noncompetitive enzymes inhibitors, with IC₅₀ values of 11 μmol L⁻¹ and 3 μmol L⁻¹, respectively. Docking and electrostatic potential surfaces investigations provided insight on the possible binding mode of the most active compounds within an allosteric site. © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The formation of carbon-carbon bonds (single, double and triple) is one of the most important aspects in organic chemistry. Several methodologies have been developed to achieve the formation of these bonds, and the Knoevenagel condensation is a synthetically useful carbon-carbon forming transformation [1–3]. This reaction involves condensation between activated methylene- and carbonyl-containing compounds. The Knoevenagel reaction

has been explored in organic synthesis for the preparation of several classes of compounds, such as coumarines which are important intermediates in the synthesis of pharmaceuticals, cosmetics, and perfumes [4,5]. In addition, this reaction has been used in the total synthesis of natural compounds such as the illudalane sesquiterpene illudinine [6]. Typically, the Knoevenagel condensation is carried out in the presence of weak bases such as ethylenediamine, piperidine or ammonium salts. Over the years, several modifications of this reaction have been reported, including the use of Lewis acids [7].

Zirconyl chloride is a Lewis acid that has drawn much attention of organic chemists because of its water stability, low toxicity, and commercial availability. As a consequence, this oxysalt has been applied in several organic transformations such as oxidation of alcohols [8], esterification of carboxylic acids [9], synthesis of 2-aryloxazolines and bis-oxazolines [10], preparation of enamines

* Corresponding author. Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900, Viçosa, Brazil.

** Corresponding author. Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, S/N, 36570-900, Viçosa Brazil.

E-mail addresses: robsonr.teixeira@ufv.br (R.R. Teixeira), depaula@ufv.br (S.O. de Paula).

¹ These authors contributed equally.

and enamino esters [11], among others [11–22]. As can be noticed, Zirconyl chloride is a useful catalyst that can be utilized in a variety of transformations, such as the Knoevenagel methodology presented in this investigation which resulted in the discovery of indan-1,3-dione derivatives endowed with Flavivirus protease inhibitory activity.

The Flavivirus genus encompasses a group of enveloped RNA arthropod-borne viruses (arboviruses) responsible for important human and animal diseases caused by virus like Yellow Fever Virus (YFV), Zika Virus (ZIKV), Dengue Virus (DENV), West Nile Virus (WNV), Japanese Encephalitis Virus (JEV), Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV), and Kyasanur Forest Disease Virus (KFDV) [23].

WNV infection represents a serious burden to human and animal health because of the virus capability to cause unforeseen and large epidemics. Cases of WNV infection were limited to European, Asian and African countries until 1999, when the virus reached the Western Hemisphere [24,25]. Within three years, the virus spread to Canada and Mexico, followed by animal and human cases in Central and South America [26–28].

WNV is an enveloped virus whose genome consists of a single-stranded RNA with positive polarity and approximately 11 kb. It contains a single open reading frame encoding a precursor polyprotein, which is processed by viral and host proteases, giving rise to three structural proteins, namely capsidial protein (C), envelope glycoprotein (E) and pre-membrane/membrane protein (prM/M). The RNA also encodes seven non-structural proteins, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5, which are involved in the replicative cycle of the virus [29].

Viral protease is responsible for the cleavage of some sites, including NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5. It also cleaves the signal sequences at the C-prM position and the NS4A-NS4B, within NS2A, and within the NS3 itself [30,31].

Viral enzymes are important targets for therapeutic intervention and they have been explored towards the development of antiviral drugs [31–33]. As a consequence, research groups have identified reversible and irreversible inhibitors for Flavivirus proteases [34–38].

Within this context, we report herein a simple and efficient zirconium catalyzed Knoevenagel procedure for the synthesis of 2-arylidene-indan-1,3-diones. The synthesized compounds were evaluated as inhibitors of the NS2B-NS3 protease of West Nile Virus (WNV) and the results are discussed. This investigation was conducted in order to assess the possibility of using these derivatives as antiviral for the treatment of diseases caused by Flaviviridae viruses. It was found that the hydroxylated derivatives impaired enzyme

activity with varying degrees of effectiveness. Docking and electrostatic potential surfaces investigations provided insights about the way the most active compounds act by inhibiting the activity of this enzyme.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis of 2-arylidene-indan-1,3-diones

The reaction of indan-1,3-dione and 4-chlorobenzaldehyde was chosen as the model reaction for optimization of the catalytic system and reaction conditions. All the reactions were performed in air and the results are shown in Table 1.

We started the optimization process running a solvent free reaction at 85 °C, using 1 mmol of each reagent, 4 mol% of $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, and oil bath conventional heating. After 70 min, the 4-chlorobenzylidene indan-1,3-dione (**1**) was obtained with 33% yield after recrystallization (Entry 1). Increasing the amount of 4-chlorobenzaldehyde (1.2 mmol, Entry 2) did not improve the yield. Compound **1** was obtained with 36% yield when the reaction was conducted under microwave irradiation and in the absence of solvent (Entry 3). When water was used as solvent, the yield of the reaction was substantially increased (Entries 4 and 5) compared to the reactions performed in the absence of solvents. For the sake of simplicity, we decided to continue the optimization process employing conventional heating, despite the shorter reaction time under microwave irradiation. Decreasing reaction temperature (Entries 6 and 7) resulted in longer reaction times albeit with better yields compared to the reaction condition of Entry 4. By reducing the catalyst loading to 2 mol%, compound **1** was obtained in 84% yield after 110 min (Entry 8). Doubling the amount of catalyst to 8 mol% (Entry 9), the reaction time was reduced and the yield was about the same compared to reaction of Entry 4; however, the reaction work up was troublesome. To verify the impact of the zirconium catalyst, we also run the reaction in its absence (Entry 10). As expected, the reaction time was substantially increased and the product was obtained only with 27% yield, reinforcing the importance of the catalytic effect of $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$.

Since reaction conditions of entry 4 afforded compound **1** with synthetically useful yield, simple workup and shorter period of time (compared to other reactions herein conducted with conventional heating), they were after applied in order to investigate the scope of the zirconium catalyzed Knoevenagel reaction to prepare 2-arylidene indan-1,3-diones. Fifteen compounds were synthesized (Scheme 1) and obtained in synthetically useful yields

Table 1
Knoevenagel condensation reactions of 4-chlorobenzaldehyde and indan-1,3-dione under different conditions.



Entry	Heating source	Reagent ratio (in mmol)	Catalyst loading (mol%)	Solvent	Temperature (°C)	Reaction time (min)	Yield (%)
1	Oil bath	1:1	4	free	85	70	33
2	Oil bath	1:1.2	4	free	85	90	31
3	MW	1:1	4	free	85	30	36
4	Oil bath	1:1	4	water	85	65	68
5	MW	1:1	4	water	85	30	70
6	Oil bath	1:1	4	water	40	120	86
7	Oil bath	1:1	4	water	r.t.	480	83
8	Oil bath	1:1	2	water	85	110	84
9	Oil bath	1:1	8	water	85	30	66
10	Oil bath	1:1	–	water	85	420	27

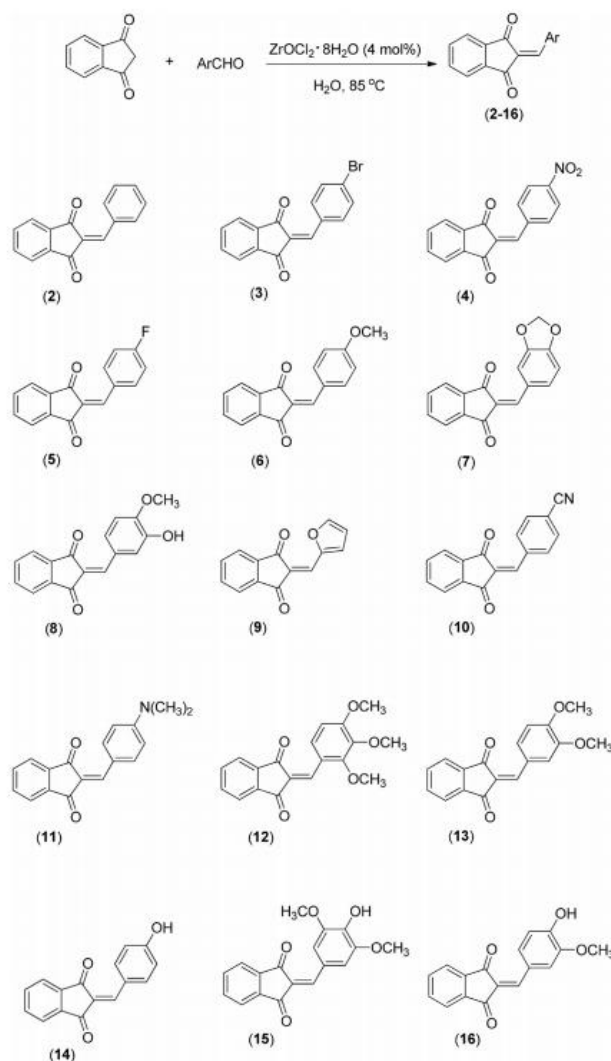
MW = microwave irradiation; r.t. = room temperature.

(53%–95%) within 10–45 min (see Table 1S in the Supporting Information). These indan-1,3-dione derivatives comprised compounds containing electron-donating and electron withdrawing groups attached to the aromatic ring of arylidene portion. A heterocyclic derivative (compound **9**) was also prepared. It should be mentioned that interesting heterocycle scaffolds can be accessed from compounds containing active methylene moieties via condensation of them with aromatic aldehydes as described, for

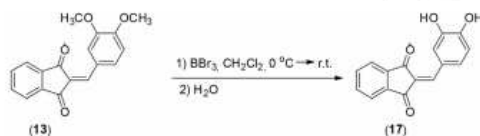
instance, by Elmuradov and co-workers [39].

The derivative 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione (**17**) was prepared, in 58% yield, via dimethylation of compound **13** using BBr_3 (Scheme 2).

The identities of substances **1–17** were confirmed by IR and NMR spectroscopy as well as mass spectrometry. In the IR spectrum, two bands, one observed within 1709–1731 cm^{-1} and the other within 1655–1688 cm^{-1} range, were attributed to the



Scheme 1. Structures of indan-1,3-diones 2–16.



Scheme 2. Preparation of compound 17.

carbonyl groups. Two signals at approximately 190 ppm in the ^{13}C NMR spectra confirmed the presence of the carbonyl groups in the structures of compounds 1–17. The substitution patterns of the aromatic rings in the arylidene portions were compatible with the ^1H NMR spectra.

We were able to obtain a monocrystal of compound 15. Considering that X-ray information can be useful in terms of structure activity-relationship, we have also determined its crystal structure. A summary of crystal data collect and processing is presented in the Supporting Information (Table 2s). Compound 15 has crystallized in the centrosymmetric monoclinic space group $P2_1/c$ with just one molecule in the asymmetric unit (Fig. 1), which is almost planar (root mean square deviation of all non-hydrogen atoms is 0.0532 Å, with the largest atom deviation from the least-square plane of 0.202(5) Å for C18).

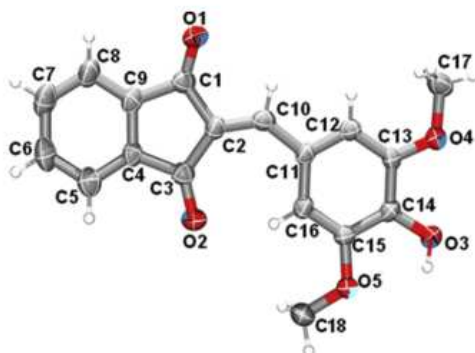


Fig. 1. 30% ellipsoid plot for non-hydrogen atoms of compound 15 in its crystal structure. Hydrogens were drawn as arbitrary radius spheres. Atom labeling scheme is arbitrary.

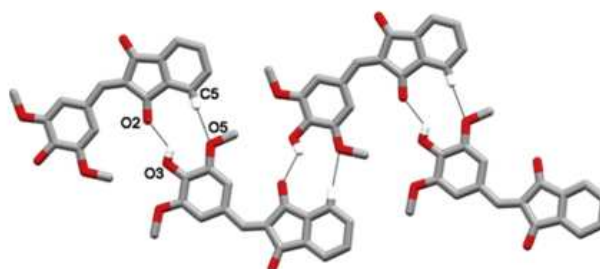


Fig. 2. One-dimensional chain found in the crystal packing of compound 15. Just the hydrogen bonding (black lines) donor and acceptor atoms were labeled only once.

The crystal packing of 15 is mainly stabilized through the formation of one-dimensional chains assembled with 2₁-axis symmetry related molecules along the crystallographic axis *b*. In these chains, there is one classical intermolecular hydrogen bond between the hydroxyl group (donor) and one carbonyl oxygen (acceptor), besides one non-classical hydrogen bond involving a CH aromatic moiety (donor) and one methoxy oxygen (acceptor) (Fig. 2).

2.2. Biological activity assays and computational analyses

The evaluation of the inhibitory effect of compounds 1–17 on NS2B-NS3 WNV enzyme was carried out via a fluorogenic substrate assay. Initially, the enzyme was incubated for 30 min with the compounds under evaluation. Subsequently, reactions were initiated with the addition of the substrate pERTKRAMC. Among the evaluated indan-1,3-dione derivatives, compounds 14 and 17 showed inhibitory behavior, with reduction of 41% and 100% of the enzymatic activity, respectively, at the concentration of $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Fig. 3). These compounds present, as a common structural feature, a hydroxyl group at the *para* position of the aromatic ring of the arylidene moiety. Moreover, compound 17, which displayed the best inhibitory response, possesses an additional hydroxyl group at the *meta* position. Previous investigations conducted with HIV protease have demonstrated that hydroxyl groups would be important for inhibiting the replication of this virus. Effective HIV protease inhibitors had a hydroxyl group that replaced the water molecule from the catalytic active-center. In this case, the hydroxyl

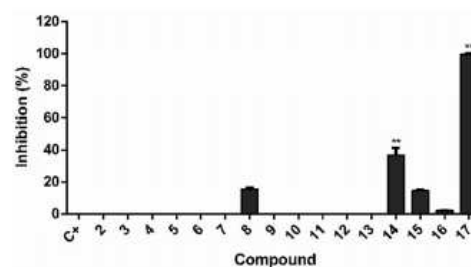


Fig. 3. Antiviral screening for WNV protease: seventeen indan-1,3-dione derivatives were evaluated in at the concentration of $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ against WNV NS2-NS3 protease. *p* value < 0.0001. ** indicates statistical significance. The assays were conducted in triplicated on three isolated experiments.

group established hydrogen bonding with catalytically active aspartates [40]. Tomlinson and Watowich demonstrated the involvement of the hydroxyl group in DENV protease inhibition. Significant interactions occurred between hydroxyl groups of inhibitors with preserved residues that constitute the catalytic triad (His⁵¹, Asp⁷⁵, Ser¹³⁵) of the protease [41].

In order to obtain the inhibitory concentration of the compounds that reduces activity by 50% (IC₅₀), enzymatic inhibition of the NS2-NB3 WNV protease was evaluated under varying concentrations of the most active compounds **14** and **17**. Both these indan-1,3-dione derivatives showed dose-response inhibition with IC₅₀ values of 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively.

With the aim of verifying the possible mechanism of inhibition by these compounds, enzyme kinetic assays were conducted under varying substrate concentrations and three concentrations of each compound (2, 4 and 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Compounds **14** and **17** promoted a significant decrease in the maximum enzymatic velocity without changes in K_M values as depicted in Fig. 4. The Lineweaver-Burk plot presented lines intersecting on the x-axis for both compounds. K_i values were 12.31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1.25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for **14** and **17**, respectively. This inhibition profile suggests a noncompetitive inhibition mode of action, in which the inhibitor and the substrate can bind simultaneously to an enzyme molecule.

To propose likely binding modes for compounds **14** and **17**, we turned to molecular docking calculations. Other investigations have already identified noncompetitive inhibitors for the Flavivirus proteases, with inhibitor binding to allosteric sites with low K_i and IC₅₀ values [42–46]. Taking into account the noncompetitive mode of inhibition, the possible binding site region was defined by

analogy with an allosteric site previously characterized for the homologous Dengue virus type 2 protease [45,47]. Docking studies were performed with the Induced Fit methodology of Glide [48,49], therefore accounting for protein flexibility in the presence of ligands. A consistent binding mode was proposed for both compounds, in which ligand orientation and complex stability seem to be guided by several hydrogen bond interactions (Fig. 5, Table 2). The *para*-hydroxyl group is predicted to interact with residues Trp89 and Ile147, while one of the carbonyl groups interacts with Gln167. The *meta*-hydroxyl group, present only in **17**, hydrogen bonds to Gly124. These results provide a possible explanation for the importance of *meta* and *para* phenyl hydroxyl groups for effective inhibition of NS2-NB3 WNV protease, in agreement with the SAR data here reported.

Considering that only two compounds (**14** and **17**) showed activity against WNV NS2-NS3 protease and based on the hypothesis that this activity could be due, in part, to the presence of the hydroxyl groups (acting as, for example, H-bond forming groups), we decided to investigate the role of such groups through some computational calculations. These two compounds are not the only ones with H-bond forming groups attached to the phenyl ring of arylidene portion. Compounds **4**, **5**, **8**, **10**, **15** and **16**, for example, also contain small H-bond forming groups attached to the phenyl ring (nitro-, fluoro-, hydroxi-, cyano-, hidroxi- and hidroxi-groups, respectively). Besides that, compounds **6**, **12** and **13** are only methoxy-substituted, while compound **11** is a dimethylamino-compound. Therefore, all of these groups could be H-bond forming. However, the bulky substituents in **6** and **11** to **13** could hinder these compounds from interacting with the active site of WNV

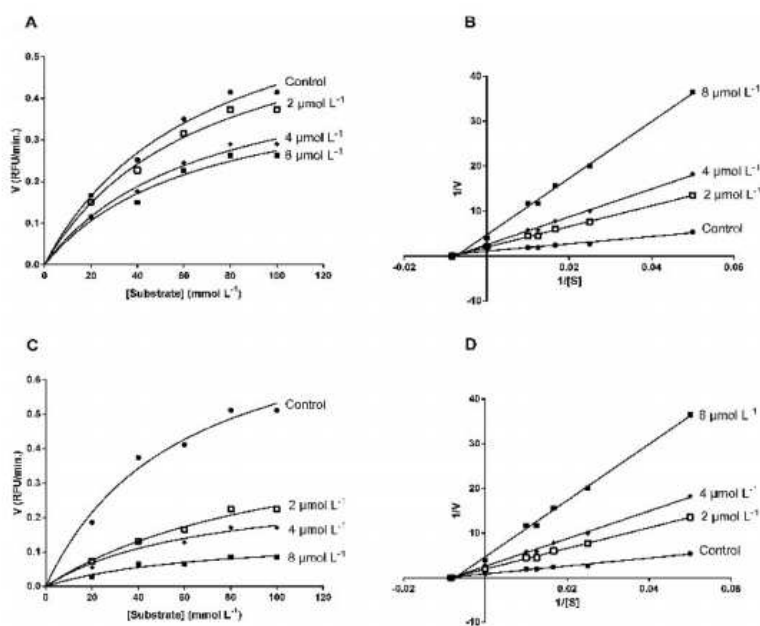


Fig. 4. Enzymatic kinetics of WNV NS2-NB3 protease in the presence of compounds **14** and **17**. In A and C are shown the Michaelis-Menten plots for compounds **14** and **17**, respectively. In B and D are presented the Lineweaver-Burk plots for compounds **14** and **17**, respectively.

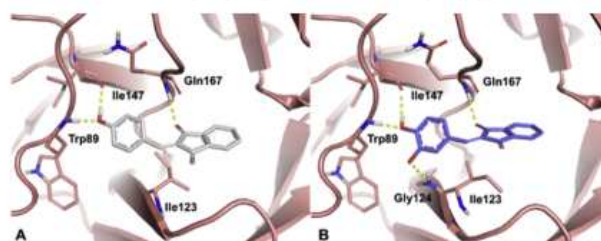


Fig. 5. Docking predicted binding modes for compounds **14** (A) and **17** (B) to WNV protease. The protease is shown as cartoon, with residues involved in hydrogen bonds (Trp89, Gly124, Ile147 and Gln169) and the central residue in the grid (Ile123) highlighted as sticks and colored by atom. Hydrogen bonds are highlighted as yellow dashes. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 2
Predicted hydrogen bond interactions between WNV protease and compounds **14** and **17**.

Ligand atom	Compound	Interacting residue and atom	Distance(Å) ^a
p-OH	14	Ile147, backbone carbonyl	2.8
p-OH	17	Trp89, backbone NH	3.2
p-OH	14	Trp89, backbone NH	2.8
p-OH	17	Gln167, backbone NH	2.9
Indandione carbonyl	14	Gln167, backbone NH	3.2
m-OH	17	Gly124, backbone NH	3.1
m-OH	17	Gly124, backbone NH	3.1

^a Distances between donor and acceptor atoms.

NS2-NS3 protease. Since compounds **8**, **15** and **16** were considerably less active than **14** and **17** (probably due to steric effects of the methyl groups) and all the remaining compounds showed no activity, we decided to treat the compounds **2** (unsubstituted; included only for comparison), **4**, **5**, **8**, **10** and **14** to **17** with computational methods.

Considering that the crystal structure of compound **15** exhibits a periplanar relation between the indan-1,3-dione and arylidene moieties, we performed a conformational analysis around the torsion between these ring systems (the C2-C10-C11-C12 dihedral angle in Fig. 1). Calculations were performed based on two methods: gas phase and water implicit solvation. For both methods, we used DFT functional B3LYP and basis set 6-31G(d,p) for compounds **14**, **15** and **17**. The resulting calculations showed the same periplanar relation between the indan-1,3-dione and arylidene groups as the most stable conformations (torsions very close to zero or 180°). For computational simplicity reasons, the remaining calculations were performed exclusively in gas phase.

Compounds **2**, **4**, **5**, **8**, **10** and **14** to **17** were fully optimized in gas phase from periplanar conformations at the B3LYP/6-31G(d,p) level. Molecular electrostatic potential (MEP) surfaces were generated for all the resulting optimized geometries, as shown in Fig. 6. We can see from these calculations that, for all compounds, both carbonyl groups show local negative electrostatic potentials. However, important differences are observed regarding positive electrostatic potentials. For compounds **2**, **5** and **10**, weak positive potentials are well spread over the surfaces. For the nitrocompound **4**, the positive potentials are mainly over the indan-1,3-dione system. Compounds **4**, **5** and **10** show also negative potentials over the nitro, fluoro and cyano functional groups. Finally, active compounds **8** and **14** to **17** show positive potentials over the hydrogens of hydroxyl groups. In compounds **8**, **15** and **16**, steric effects of methoxy groups could hinder better interactions with target macromolecules. Thus, compounds **14** and **17**, the most bioactives of the tested set, are the only ones to exhibit positive potentials and

with no hindrance. The values of the potentials for these two molecules, higher than the other ones, indicates that the electrostatic interactions between each of them and target macromolecules would be more efficient than the other compounds [49,50].

In the present investigation, the most bioactive compounds **14** and **17**, along with compounds **8**, **15** and **16** (which showed negligible inhibitory effect), are the only phenolic ones. This observation strengthens the hypothesis that this functional group represents an important structural feature for protease inhibition by indan-1,3-diones.

It should be mentioned that derivatives of indan-1,3-diones presenting antiviral activity for Human Papillomavirus (HPV) [50–52], Human Immunodeficiency Virus (HIV) [53] and Hepatitis C Virus (HCV) [54] have been described. Concerning HIV and HCV, the effects of the indan-1,3-dione derivatives occurred in viral replication, against HIV integrase and HCV protease. HCV is also a member of the Flaviviridae family.

The effect of compounds **14** and **17** was also assessed against Vero cell line. It was noticed that Vero cells morphology and viability were unaffected by treatment with compounds. The cytotoxicity concentration of the compounds that reduces cell viability by 50% (CC₅₀) corresponded to 89,72 μmol L⁻¹ and 267,60 μmol L⁻¹ for **14** and **17** respectively, demonstrating the high inhibitory potential of these derivatives. Lyu, Rhim and Park evaluated the cytotoxicity of flavonoids on Vero cells and they considered as low cytotoxic compounds those presenting CC₅₀ > 50 μmol L⁻¹, which indicates that the compounds did not affect the growth of Vero cells [55].

To prove the potential antiviral efficacy of compounds **14** and **17**, we tested these active indan-1,3-diones in cellular assays against all serotypes of dengue virus, which are members of Flaviviridae family. The virucidal assay was conducted by prior incubation of the virus with the evaluated compounds. After incubation, the mixture containing the virus and the compound under evaluation was added to the VERO cell line for a period to allow viral adsorption

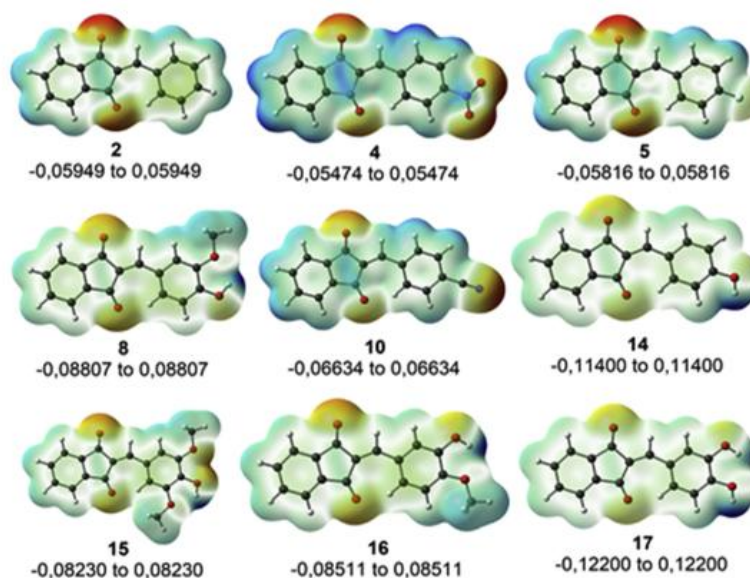


Fig. 6. MEP surfaces mapped from total electron density for compounds 2, 4, 5, 8, 10 and 14 to 17. Electrostatic potentials are displayed on a 0.002 a.u. isodensity surface. The limits of electrostatic potentials for each molecule are under surfaces. Potential increases in the following order: red (most negative) → orange → yellow → green → blue (most positive). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

and internalization. Subsequently, the mixture was replaced by a semi solid medium and the development of lysis plates on VERO cells was verified. This assay was conducted using different concentrations of compounds against DENV-1-4 viruses. The concentration of test compounds that inhibited 50% of viral infection (EC_{50}) was obtained by nonlinear regression, leading to the calculation of the Selectivity Index (SI). These values are summarized in Table 3S. Compound 14, despite having antiviral activity, did not present relevant SI values, whereas for compound 17 high SI values were observed, 34, 13, 147 and 9 DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 viruses, respectively. The results indicate that the compounds have significant antiviral efficacy and are promising antiviral candidates.

3. Conclusions

It was herein described the preparation of a series of 2-arylidene indan-1,3-diones via zirconium catalyzed Knoevenagel condensation. From our point of view, the reported methodology presents the following advantages: i) it does not require the use of toxic solvents; ii) the catalyst is easy to handle, is commercially available, and presents low cost; iii) the reactions are simple to run, affords compounds in synthetically useful yields, and can be conducted in an open-air flask. Biological assays revealed that among the prepared compounds, two of them (compounds 14 and 17) display inhibitory activity against the NS2B-NS3 WNV protease, without any cytotoxic effect on Vero cells. The viral protease utilized in the biological assays is a very important enzyme for *Flaviviral* replication. Based on data herein described, it is clear that the compounds are non-competitive inhibitors with low IC_{50} and K_i values. To the best of our knowledge, this is the first report describing anti-WNV

activity of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives. The potential antiviral efficacy of these compounds was demonstrated by virucidal assay against the four serotypes of dengue virus, a *Flaviviridae* family member like WNV.

4. Experimental section

4.1. Reagents

All reagents were purchased from commercial sources (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, US and Vetec - Rio de Janeiro, Brazil) and were employed as received. Solvents were procured from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil) and were used as received. The 1H (300 MHz) and ^{13}C NMR (75 MHz) spectra were recorded on a Varian Mercury 300 instrument ((Varian, Palo Alto, California, US) 300), using $CDCl_3$ and $DMSO-d_6$ as solvents. Hydrogen nuclear magnetic resonance (NMR) data are presented as follows: chemical shift (δ) in ppm, number of hydrogen atoms, multiplicity, J values in Hertz (Hz). Multiplicities are shown as the following abbreviations: s (singlet), d (doublet), dap (apparent doublet), tap (apparent triplet), ddap (apparent double of a doublet) m (multiplet). Infrared spectra (IR) were obtained employing the equipment Agilent 660-IR (Santa Clara, California) with accessory GladiATR. High resolution mass spectra were recorded on a Q-Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The spectra were acquired using the following conditions. Ionization source: Electron spray (+) and (-); Spray voltage: 3.5 kV; Capillary temperature: 275 °C; Sheath gas: 5 (arbitrary units); Auxiliary gas: 0 (arbitrary units). For the mass spectrometry analyses, the samples were prepared as follows: a mass of 1 mg of the compound to be analyzed was dissolved in 1 mL of acetonitrile. Then, the solution was diluted with 1 mL of

methanol so that the final concentration corresponded to 1 ppm. The resulting solution was directly injected in the Q-Exacte equipment at 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. The spectra were recorded in full MS mode. Melting points are uncorrected and were determined using MQAPP-301 melting point apparatus (Microquímica, Rio de Janeiro, Brazil). Low resolution mass spectra were obtained on a SHIMADZU GCMS-QP5050A instrument (Kyoto, Japan) by direct injection using the following temperature program: 40 °C min⁻¹ until temperature reaches 60 °C, and then 80 °C min⁻¹ until temperature reaches 300 °C; the detector temperature was 280 °C. Analytical thin layer chromatography analyses were carried out on TLC plates recovered with 60GF254 silica gel. Single-crystal X-ray diffraction data for compound 15 were acquired using a Bruker-AXS Kappa Duo diffractometer with an APEX II CCD detector. MoK α radiation from an I μ S micro-source with multilayer optics was employed. After diffraction images collect and treatment, the crystallographic softwares were used as follows: SHELXS-97 [56] for structure solving, SHELXL-97 [56] for structure refinement, ORTEP-3 [57] and MERCURY [58] for structure analysis and preparation of artworks. Hydroxyl hydrogen followed a riding model for its coordinates and isotropic atomic displacement parameter, as well as all other CH hydrogens, even though it was firstly identified from the difference Fourier electron density map. Crystal structure of compound 15 was deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center (see Table S2 for deposit number).

4.2. Synthesis

4.2.1. Synthesis of 2-(4-chlorobenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (1)

In a typical procedure, a round-bottomed flask (10 mL) was charged with indan-1,3-dione (150 mg, 1 mmol), 4-chlorobenzaldehyde (143 mg, 1 mmol), ZrOCl $_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (12 mg, 4 mol%) and 3.00 mL of distilled water. The reaction mixture was heated to 85 °C and kept under magnetic stirring for 65 min. The progress of reaction was monitored by TLC analysis. After the completion of the reaction, the mixture was vacuum filtered and the residue washed with ice-cold ethanol. Compound 1 was obtained as a yellow solid in 68% yield (182 mg, 0.677 mmol) after recrystallization from dichloromethane-ethanol (1:1 v/v). Structure of 1 is supported by the following data.

Mp 176.3–177.8 °C. IR (ATR): 3092, 3061, 1725, 1685, 1573, 1072, 733, 427 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 7.47 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.81–7.83 (3H, m), 7.99–8.01 (2H, m), 8.41 (2H, d, J = 8.4 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 123.39, 123.41, 129.1, 129.4, 131.5, 135.3, 135.5, 139.5, 140.1, 142.5, 145.1, 188.9, 189.9. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{16}$ H $_{10}$ ClO $_2$, 269.03693; found: 269.03619.

4.2.2. Synthesis of derivatives 2–16

A similar procedure to that described for the preparation of 1 was utilized to synthesize compounds 2–16. The structures of them are supported by the following data.

4.2.3. 2-Benzylidene-1H-indene-1,3(2H)-dione (2)

Yellow solid, Mp 150.6–150.8 °C. IR (ATR): 3066, 3026, 1726, 1681, 1609, 1584, 1564, 732, 683 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 7.48–7.58 (3H, m), 7.78–7.84 (2H, m), 7.89 (1H, s), 7.98–8.04 (2H, m), 8.44–8.46 (2H, m). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 123.3, 123.4, 128.8, 129.2, 133.1, 133.2, 134.1, 135.1, 135.3, 140.0, 142.5, 146.9, 188.9, 190.2. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{16}$ H $_{11}$ O $_2$, 235.07590; found: 235.07530.

4.2.4. 2-(4-bromobenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (3)

Yellow solid, Mp 169.7–170.3 °C. IR (ATR): 3088, 3055, 1725, 1685, 1574, 1069, 504 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 7.63 (2H, d,

J = 8.7 Hz), 7.79 (1H, s), 7.81–7.83 (2H, m), 7.99–8.02 (2H, m), 8.32 (2H, d, J = 8.7 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 123.41, 123.43, 128.3, 129.6, 131.9, 132.1, 135.4, 135.5, 140.1, 142.5, 145.2, 188.9, 189.9. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{16}$ H $_{10}$ BrO $_2$, 312.98642; found: 312.98538.

4.2.5. 2-(4-nitrobenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (4)

Yellow solid, Mp 233.1–233.6 °C. IR (ATR): 3109, 3076, 1732, 1688, 1566, 1514, 1345, 857 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d $_6$) δ : 7.93 (1H, s), 7.96–8.04 (4H, m), 8.33 (2H, d, J = 9.0 Hz), 8.58 (2H, d, J = 9.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d $_6$) δ : 123.79, 123.86, 132.9, 134.6, 136.7, 136.8, 138.9, 140.2, 142.0, 142.6, 149.3, 188.6, 189.2. MS m/z (%): 279 ([M⁺], 43), 262 (76), 249 (7) 232 (100), 221 (6), 205 (17), 193 (6), 176 (63), 165 (19), 151 (24), 126 (5), 104 (41), 88 (22), 76 (56), 63 (12), 50 (55).

4.2.6. 2-(4-fluorobenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (5)

Yellow solid, Mp 181.7 °C. IR (ATR): 3073, 3039, 1729, 1689, 1578, 1199, 834 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 7.18 (2H, t_{app}, J = 8.7 Hz), 7.79 (1H, s), 7.80–7.83 (2H, m), 7.96–8.03 (2H, m), 8.52 (2H, dd_{app}, J_1 = 8.7 Hz, J_2 = 5.6 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 116.1 (d, $^2J_{C-F}$ = 21.8 Hz), 123.32, 123.34, 128.6, 129.6 (d, $^4J_{C-F}$ = 3.0 Hz), 135.3, 135.4, 136.9 (d, $^3J_{C-F}$ = 9.0 Hz), 140.0, 142.4, 145.4, 165.6 (d, $^1J_{C-F}$ = 255.8 Hz), 189.1, 190.1. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{16}$ H $_{10}$ FO $_2$, 253.06648; found: 253.06578.

4.2.7. 2-(4-methoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (6)

Yellow solid, Mp 155.3–156.8 °C. IR (ATR): 3093, 3043, 2981, 1718, 1681, 1247, 1268, 1177, 1020, 1511, 833, 730 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 3.90 (3H, s), 7.00 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.76–7.80 (2H, m), 7.83 (1H, s), 7.93–8.00 (2H, m), 8.53 (2H, d, J = 9.0 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 55.6, 114.4, 123.0, 126.4, 126.5, 134.8, 135.0, 137.1, 139.9, 142.3, 146.8, 164.0, 189.4, 190.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{17}$ H $_{13}$ O $_3$, 265.08647; found: 265.08572.

4.2.8. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (7)

Yellow solid, Mp 207.1–207.8 °C. IR (ATR): 3099, 3075, 2908, 1715, 1673, 1562, 1276, 929, 724 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 6.09 (2H, s), 6.93 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.77–7.82 (4H, m), 7.94–8.00 (2H, m), 8.51 (1H, d, J = 1.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 102.1, 108.6, 112.8, 123.13, 123.10, 126.8, 128.1, 132.9, 134.9, 135.1, 139.9, 142.4, 146.9, 148.1, 152.4, 189.3, 190.6. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{17}$ H $_{11}$ O $_4$, 279.06573; found: 279.1590.

4.2.9. 2-(4-Hydroxy-3-methoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (8)

Yellow solid, Mp 215.6–216.4 °C. IR (ATR): 3535–3316 (broad band), 3085, 2974, 1719, 1679, 1572, 1278, 1255, 1154, 1017, 731 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d $_6$) δ : 3.90 (3H, s), 6.93 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.72 (1H, s), 7.86–7.94 (5H, m), 8.68 (1H, d, J = 1.8 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d $_6$) δ : 56.1, 116.1, 117.2, 123.1, 123.2, 125.4, 125.5, 132.1, 135.8, 135.9, 139.6142.1, 147.3, 147.8, 153.7, 189.6, 190.4. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{17}$ H $_{13}$ O $_4$, 281.08138; found: 281.08072.

4.2.10. 2-(Furan-2-ylmethylene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (9)

Yellow solid, Mp 202.1–203.4 °C. IR (ATR): 3138, 3099, 1725, 1681, 1585, 1462, 1346, 1158, 733 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl $_3$) δ : 6.68–6.80 (1H, m), 7.75–7.81 (4H, m), 7.95–7.98 (2H, m), 8.54–8.61 (1H, m). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl $_3$) δ : 114.6, 122.9, 123.1, 124.8, 129.3, 134.9, 135.1, 140.4, 142.3, 149.0, 151.4, 188.9, 190.1. HRMS (M + H⁺): Calculated for C $_{14}$ H $_9$ O $_3$, 225.05517; found: 225.05455.

4.2.11. 4-((1,3-Dioxo-1H-inden-2(3H)-ylidene)methyl)benzotriazole (10)

Yellow solid, Mp 233.6–235.2 °C. IR (ATR): 3099, 3053, 2226, 1726, 1684, 1586, 842, 730 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.88 (1H, s), 7.95–8.06 (6H, m), 8.53 (2H, d, *J* = 8.4 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 114.4, 118.8, 123.7, 123.8, 132.4, 132.7, 133.9, 136.6, 136.7, 137.2, 140.1, 142.5, 142.7, 188.6, 189.2. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₀NO₂, 260.07115; found: 260.07053.

4.2.12. 2-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (11)

Red solid, Mp 180.1–181.5 °C. IR (ATR): 3080, 3032, 2927, 1709, 1665, 1613, 1555, 1518, 1330, 1186, 815, 722 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.11 (6H, s), 6.71 (2H, d, *J* = 9.1 Hz), 7.67–7.71 (2H, m), 7.75 (1H, s), 7.87–7.94 (2H, m), 8.50 (2H, d, *J* = 9.1 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 40.0, 111.3, 121.9, 122.4, 122.9, 134.0, 134.3, 137.9, 139.8, 142.2, 147.5, 153.9, 189.9, 191.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₈H₁₆NO₂, 278.11810; found: 278.11746.

4.2.13. 2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (12)

Orange solid, Mp 185.4–185.6 °C. IR (ATR): 3099, 3002, 2972, 2936, 1715, 1678, 1561, 1499, 1307, 1240, 1223, 1128, 732 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.98 (3H, s), 3.99 (6H, s), 7.78–7.81 (3H, m), 7.95 (2H, s), 7.97–7.99 (2H, m). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 56.3, 61.0, 112.0, 123.1, 123.2, 127.7, 128.4, 135.0, 135.2, 139.8, 142.4, 143.0, 147.3, 152.8, 189.4, 190.4. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₉H₁₇O₅, 325.10760; found: 325.10675.

4.2.14. 2-(3,4-dimethoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (13)

Yellow solid, Mp 205.0–205.4 °C. IR (ATR): 3088, 3010, 2972, 1712, 1671, 1565, 1505, 1271, 1247, 1141, 1019, 736 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 3.97 (3H, s), 4.07 (3H, s), 6.95 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.71–7.83 (4H, m), 7.95–7.99 (2H, m), 8.83 (1H, d, *J* = 1.5 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 56.1, 110.6, 115.5, 122.9, 123.0, 126.4, 126.9, 131.3, 134.8, 135.0, 139.8, 142.3, 147.4, 148.8, 153.9, 189.7, 190.7. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₈H₁₅O₄, 295.09703; found: 295.09650.

4.2.15. 2-(4-hydroxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (14)

Yellow solid, Mp 235.8–236.0 °C. IR (ATR): 3059, 1715, 1655, 1547, 1505, 1204, 737 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.92 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.72 (1H, s), 7.86–7.92 (4H, m), 8.50 (2H, d, *J* = 8.7 Hz), 10.86 (1H, s). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 116.4, 123.1, 123.2, 125.0, 125.6, 135.8, 135.9, 138.0, 139.6, 142.0, 146.7, 163.7, 189.4, 190.4. HRMS (M-H⁻): Calculated for C₁₆H₉O₃, 249.05517; found: 249.05568.

4.2.16. 2-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (15)

Orange solid, Mp 222.4–223.1 °C. IR (ATR): 3545–3197 (broad band), 3093, 3010, 2941, 1712, 1667, 1565, 1503, 1318, 1227, 1083, 732 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.88 (6H, s), 7.74 (1H, s), 7.85–7.93 (4H, m), 8.13 (2H, s). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ: 56.5, 113.2, 123.1, 123.2, 124.2, 125.7, 135.8, 135.9, 139.6, 142.2, 143.1, 147.8, 147.9, 189.7, 190.4. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₈H₁₅O₅, 311.09195; found: 311.09131.

4.2.17. 2-(3-Hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (16)

Yellow solid, Mp 219.0–219.2 °C. IR (ATR): 3546–3288, 3072, 2989, 1718, 1681, 1574, 1498, 1276, 1219, 1137, 734 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.89 (3H, s), 7.09 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.67 (1H, s), 7.87–7.95 (5H, m), 8.28 (1H, d, *J* = 1.9 Hz). ¹³C NMR

(75 MHz, DMSO-d₆) δ: 56.3, 112.2, 120.3, 123.2, 126.4, 126.6, 130.0, 135.9, 136.1, 139.7, 142.2, 146.7, 146.9, 153.7, 189.3, 190.3. HRMS (M + H⁺): Calculated for C₁₇H₁₃O₄, 281.08138; found: 281.08052.

4.2.18. Synthesis of 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-1H-indene-1,3(2H)-dione (17)

To a bitubulated round bottomed flask (150 mL), under a nitrogen atmosphere, it was added compound **13** (200 mg, 0.679 mmol) along with 5.0 mL of anhydrous dichloromethane. The resulting mixture was kept under magnetic stirring and cooled in an ice bath for 40 min. Then, 2.7 mL of 1.00 mol L⁻¹ solution of BBr₃ in dichloromethane was added dropwise. After the addition, the reaction mixture was kept under stirring for 24 h at room temperature. Subsequently, 10.0 mL of distilled water were added and a brown precipitate formed. The resulting mixture was transferred to a separatory funnel and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (3 × 30.0 mL). The organic extracts were combined, and the resulting organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. Compound **17** was obtained as a yellow solid after washing with dichloromethane and acetone in 58% yield (105 mg, 0.394 mmol).

Mp 238.0–239.4 °C. IR (ATR): 3492–3109, 3093, 3039, 1720, 1666, 1555, 1384, 1182, 730 cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 6.89 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.64 (1H, s), 7.83 (1H, dd, *J*₁ = 8.1 Hz, *J*₂ = 1.8 Hz), 7.86–7.94 (4H, m), 8.32 (1H, d, *J* = 1.8 Hz). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 116.2, 121.0, 123.1, 125.2, 125.5, 130.7, 135.7, 135.9, 139.6, 142.1, 145.7, 147.3, 153.0, 189.4, 190.5. HRMS (M-H⁻): Calculated for C₁₆H₉O₄, 265.05008; found: 265.05060.

4.3. Biological assays

4.3.1. Evaluation of the activity of compounds 1–17 against WNV NS2B-NS3 protease

Recombinant WNV NS2B-NS3 protease (catalog number SE-2907, already purified and activated) and fluorescent substrate pERTKR-AMC (catalog number ES013) were purchased from (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Compounds **1–17** were dissolved in pure DMSO; solutions were then diluted in buffer to obtain working solutions with a final concentration of DMSO of 1% v/v. A volume of 50 μL of the purified protease (final concentration of 1 ng μL⁻¹) diluted in buffer (50 mmol L⁻¹ Tris, 30% (v/v) glycerol, pH 9.5) was incubated with 50 μL of DMSO solution of each indan-1,3-dione derivative (final concentration of 16 μmol L⁻¹) in a 96-well black plate for 30 min at 21–22 °C. After this time, the assay was initiated by addition of 50 μL of the substrate (40 mmol L⁻¹ - initial concentration). A solution containing buffer and DMSO was used as negative control on the same plate. The blank contained 50 μL buffer and 100 μL of the substrate. The fluorescence intensity was continuously recorded on a wavelength of excitation of 360 nm and an emission wavelength of 460 nm using SpectraMax[®] M5 reader (Molecular Devices). Compounds, which effectively inhibit the enzyme were selected for further biological assays. Analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Software) and GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). The assays were conducted in triplicate on three isolated experiments and the statistical analyses were conducted by utilizing the multiple comparisons of one-way ANOVA.

4.3.2. Determination of IC₅₀ values

The inhibitory enzymatic activity of compounds **14** and **17**, the most active ones against the WNV NS2-NS3 protease, were evaluated at eight different concentrations (66 μmol L⁻¹–0.5 μmol L⁻¹) using the protease assay as described above. Fluorescence was measured in triplicate wells at intervals of 30 s for 5 min in three independent experiments. IC₅₀ values were calculated using

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.), using the four-parameter nonlinear regression analysis (Hill slope method).

4.3.3. Determination of K_i values

Three different concentrations (2, 4 and $8 \mu\text{mol L}^{-1}$) of inhibitors **14** and **17** and five different concentrations of substrate pERTKR-AMC (20, 40, 60, 80, 100 nmol L^{-1}) were tested in the *in vitro* against WNV protease ($37.04 \text{ nmol L}^{-1}$ protein, $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). Fluorescence was measured in triplicate wells at an interval of 30 s. The velocity values (RFU/minute) were then calculated for each substrate/inhibitor pair. K_i values were calculated with GraphPad Prism software 6 (GraphPad Software Inc.) with non-linear regression at competitive inhibition mode of enzyme-kinetics.

4.3.4. Cytotoxicity assay

The cytotoxicity of compounds **14** and **17** was assessed using MTT assay [59]. VERO cells (5×10^4 cells) were seeded in 96-well plates. Each well contained $100 \mu\text{L}$ of each compound solution at different concentrations (1000, 250, 125, 63, 32, 17, 8 and $4 \mu\text{mol L}^{-1}$). The compounds were diluted in MEM medium with 2% FBS and 1% DMSO. After 24 h of incubation at 37°C , $100 \mu\text{L}$ of a MTT solution (5%) was added to the wells. After 4 h at 37°C , the MTT solution was removed and $100 \mu\text{L}$ of DMSO was added to solubilize the formazan. Absorbance was measured at 550 nm using a microplate reader (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer – ThermoFisher®). The data were analyzed and CC_{50} was determined using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.).

4.3.5. Virucidal assay

VERO cells (8×10^5 cells per well) were seeded in 24-well plates. $100 \mu\text{L}$ of viral suspension (50–100 PFU) were incubated with $100 \mu\text{L}$ of varying concentrations of the tested compounds (3, 6, 12, 25, 50 and $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) and incubated at 37°C for 1 h. The medium was aspirated from the plates and $100 \mu\text{L}$ of the mixture containing the virus and the compound mixture was added to the cell monolayer. The plates were incubated for 1 h under shaking for a better viral distribution. After this time, the viral suspension mixed at the various concentrations of the evaluated compound was aspirated and $1500 \mu\text{L}$ of a 3% CMC solution in DMEM (twice concentrated) medium supplemented with 2% FBS and 1% PSA was added to each well. Plates were incubated for 5–6 days. After this period, the medium was removed and the cells fixed by adding formaldehyde 20% for 30 min at 37°C and stained by adding 2 to 3 drops of 5% violet crystal dye for 40 min at room temperature on a mechanical stirrer. After this time, the dye was aspirated and the plates were placed to dry at room temperature and quantified by visualization of lysis plates. The data were analyzed and EC_{50} was determined using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.). With the value of CC_{50} and EC_{50} in hands, it was possible to calculate the value of the selectivity index (SI), which corresponds to the ratio $\text{CC}_{50}/\text{EC}_{50}$.

4.4. Computational analyses

4.4.1. Conformational analyses, optimizations and electrostatic potential calculations

Molecules were prepared in the program GaussView 5.0.8 [60]. Conformational analyses and geometries optimizations were performed with the software Gaussian 09 W [61]. Implicit solvation calculations were run using the IEF-PCM model. Total electron density and molecular electrostatic potential surfaces were generated from Gaussian outputs with GaussView.

4.4.2. Docking studies

Ligands were prepared in the program Ligprep [62] employing

the OPLS_2005 force field, with protonation states predicted with Epik at $\text{pH } 9.5 \pm 2.0$. The West Nile virus protease NS2B-NS3 PDB code 2FP7 [63], chosen as the receptor, was prepared with the Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2015-3: Schrödinger Suite 2015-3 Protein Preparation Wizard; Epik version 3.3, Schrödinger, version 6.8) [64], with removal of all waters and addition of hydrogens based on PROPKA calculations at $\text{pH } 9.5$. Docking calculations were performed with the software Glide (Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-4: Glide, version 6.8) [48], employing the Induced Fit docking methodology [49] and Glide SP. The grid was centered in the amino acid Isoleucine 123, and had 12 Å dimensions. All residues within 5 Å from Ile123 were considered as flexible. Docking results were ranked based on their docking score and the top ranking poses for each compound were analyzed with the software PyMOL [65].

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. AFCO and ASO were responsible for all *in vitro* assays with WNV protease with the assistance of EGS and IEPS under the supervision of SOP. APMS performed the synthesis of the compounds with the assistance of MLS under the supervision of RRT. RSF and FTM performed the docking studies. DHSL conducted the molecular electrostatic potential analysis. BGV was responsible for the acquisition of high resolution mass spectra. FTM performed the acquisition and interpretation of crystallographic data.

Funding sources

This work was supported by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Foundation for Supporting Research in the state of Minas Gerais (FAPEMIG) and by the National Program for Academic Cooperation (PROCAD) of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES/Brazil.

Acknowledgment

D. H. S. Leal would like to thank the Computational Chemistry Group from Universidade Federal de Lavras for the use of softwares (Gaussian and GaussView) and computers in this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.037>.

References

- [1] E. Knoevenagel, Ueber eine Darstellungsweise der Glutarsäure, *Chem. Ber.* (1894) 2345–2346.
- [2] E. Knoevenagel, Condensation von Makondiiure mit Aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine, *Ber. deut. chem. Gesell.* (1898) 2596–2619.
- [3] L. Kürti, B. Czákó, Strategic Application of Named Reactions in Organic Synthesis, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005.
- [4] N. Yu, J.M. Aramini, M.W. Mergemann, Z. Huang, Reactions of salicylaldehydes with alkyl cyanoacetates on the surface of solid catalysts: syntheses of 4H-chromene derivatives, *Tetrahedron Lett.* (2000) 6993–6996.
- [5] F. Bigi, L. Chesini, R. Maggi, G. Sartori, Montmorillonite KSF as an inorganic, water stable, and reusable catalyst for the Knoevenagel synthesis of coumarin-3-carboxylic acids, *J. Org. Chem.* 64 (1999) 1033–1035.
- [6] A.E. Morrison, T.T. Hoang, M. Birepinte, G.B. Dudley, Synthesis of illudininone from dimedone, *Org. Lett.* 19 (2017) 858–861.
- [7] Y. Ogiwara, K. Takahashi, T. Kitazawa, N. Sakai, Indium(III)-catalyzed Knoevenagel condensation of aldehydes and activated methylenes using acetic anhydride as a promoter, *J. Org. Chem.* 80 (2015) 3101–3110.
- [8] F. Shirini, M.A. Zolfigol, E. Mollaraizi, 53KBrO₃ZrClO₂ · 8H₂O: an efficient

- reagent system for the oxidation of alcohols, *Synth. Commun.* 35 (2005) 1541–1545.
- [9] M. Nakayama, A. Sato, K. Ishihara, H. Yamamoto, Water-Tolerant and reusable catalysts for direct ester condensation between equimolar amounts of carboxylic acids and alcohols, *Adv. Synth. Catal.* 346 (2004) 1275–1279.
- [10] I. Mohammadpoor-Baltork, A.R. Khosropour, S.F. Hojati, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ as an environmentally friendly and recyclable catalyst for the chemoselective synthesis of 2-aryloxazolines and bis-oxazolines under thermal conditions and microwave irradiation, *Catal. Commun.* 8 (2007) 200–204.
- [11] Z.-H. Zhang, T.-S. Li, J.-J. Li, Synthesis of enamines and enamine esters catalyzed by $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$, *Catal. Commun.* 8 (2007) 1615–1620.
- [12] M. Shi, S.-C. Cui, W.-P. Yin, Highly efficient catalytic nitration of phenolic compounds by nitric acid with a recoverable and reusable Zr or Hf oxychloride complex and KSF, *Eur. J. Org. Chem.* (2005) 2349–2384.
- [13] R. Ghosh, S. Maiti, A. Chakraborty, Facile catalyzed acylation of alcohols, phenols, amines and thiols based on $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ and acetyl chloride in solution and in solvent-free conditions, *Tetrahedron Lett.* 46 (2005) 147–151.
- [14] R. Ghosh, S. Maiti, A. Chakraborty, S. Chakraborty, A.K. Mukherjee, *Tetrahedron* 62 (2006) 4059–4064.
- [15] H.B. Sun, R. Hua, Y. Yin, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$: an efficient, cheap and reusable catalyst for the esterification of acrylic acid and other carboxylic acids with equimolar amounts of alcohols, *Molecules* 11 (2006) 263–271.
- [16] H. Firouzabadi, N. Iranpoor, M. Jafarpour, A. Ghaderi, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ as a highly efficient and the moisture tolerant Lewis acid catalyst for Michael addition of amines and indoles to α , β -unsaturated ketones under solvent-free conditions, *J. Mol. Catal.* 252 (2006) 150–155.
- [17] M.M. Hashemi, B. Eftekhari-Sis, A. Abdollahifar, B. Khalil, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ on montmorillonite K10 accelerated conjugate addition of amines to α , β -unsaturated alkenes under solvent-free conditions, *Tetrahedron* 62 (2006) 672–677.
- [18] B. Eftekhari-Sis, A. Abdollahifar, M.M. Hashemi, M. Zirk, Stereoselective synthesis of β -amino ketones via direct Mannich-type reactions, catalyzed with $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ under solvent-free conditions, *Eur. J. Org. Chem.* (2006) 5152–5157.
- [19] J.C. Rodríguez-Domínguez, D. Bernardi, G. Kirsch, $ZrCl_4$ or $ZrOCl_2$ under neat conditions: optimized green alternatives for the Biginelli reaction, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 5777–5780.
- [20] I. Mohammadpoor-Baltork, A.R. Khosropour, S.F. Hojati, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ as an efficient, environmentally friendly and reusable catalyst for synthesis of benzoxazoles, benzothiazoles, benzimidazoles and oxazol[4,5-b]pyridines under solvent-free conditions, *Catal. Commun.* 8 (2007) 1865–1870.
- [21] Y. Wu, L.-N. He, Y. Du, J.-Q. Wang, C.-X. Miao, W. Li, Zirconyl chloride: an efficient recyclable catalyst for synthesis of 5-aryl-2-oxazolindiones from aziridines and CO₂ under solvent-free conditions, *Tetrahedron* 65 (2009) 6204–6210.
- [22] B. Karami, M. Kiani, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O/SiO_2$: an efficient and recyclable catalyst for the preparation of coumarin derivatives by Pechmann condensation reaction, *Catal. Commun.* 14 (2011) 62–67.
- [23] M.A. Martín-Acebes, A. Vazquez-Calvo, J.C. Saiz, Lipids and flaviviruses, present and future perspectives for the control of dengue, Zika, and West Nile viruses, *Prog. Lipid Res.* 64 (2016) 123–137.
- [24] A. Chaskopoulou, C.I. Dovas, S.C. Chaintoutis, J. Kashefi, P. Koehler, M. Papanastassopoulou, Detection and early warning of West Nile Virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13 (2013) 723–732.
- [25] A. Chaskopoulou, G. L'Ambert, D. Petric, R. Bellini, M. Zgomba, T.A. Groen, L. Marrama, D.J. Bicout, Ecology of West Nile virus across four European countries: review of weather profiles, vector population dynamics and vector control response, *Parasit Vectors* 9 (2016) 482.
- [26] M.A. Morales, M. Barrandeguy, C. Fabbri, J.B. Garcia, A. Vissani, K. Trono, G. Gutierrez, S. Pigretti, H. Menchaca, N. Garrido, N. Taylor, F. Fernandez, S. Levis, D. Enria, West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006, *Emerg. Infect. Dis.* 12 (2006) 1559–1561.
- [27] B.K. Kleinschmidt-DeMasters, J.D. Beckham, West Nile virus encephalitis 16 Years later, *Brain Pathol.* 25 (2015) 625–633.
- [28] T. Omnetto, E.L. Durigon, J. de Araujo, R. Aprelon, D.M. de Aguiar, G.T. Cavalcante, R.M. Melo, J.E. Levi, S.M. de Azevedo Junior, M.V. Pety, I.S. Neto, P. Serafini, E. Villalobos, E.M. Cunha, C. Lara Mdo, A.F. Nava, M.S. Nardi, R. Hurtado, R. Rodrigues, A.L. Sherer, F. Sherer Jde, M.P. Gerardi, M.M. de Seixas, C. Peterka, S. Bandeira Ddo, J. Pradel, N. Vachieri, M.B. Labruna, L.M. de Camargo, R. Lanciotti, T. Lefrancois, West Nile virus surveillance, Brazil, 2008–2010, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107 (2013) 723–730.
- [29] S.M. Costa, A.S. Azevedo, M.V. Paes, F.S. Sarges, M.S. Freire, A.M. Alves, DNA vaccines against dengue virus based on the ns1 gene: the influence of different signal sequences on the protein expression and its correlation to the immune response elicited in mice, *Virology* 358 (2007) 413–423.
- [30] K.F. Teo, P.J. Wright, Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2, *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2) (1997) 337–341.
- [31] A.S. Oliveira, M.L. Silva, A.F.C.S. Oliveira, C.C. Silva, R.R. Teixeira, S.O.D. Paula, NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1759–1769.
- [32] S.P. Lim, Q.Y. Wang, C.G. Noble, Y.L. Chen, H. Dong, B. Zou, F. Yokokawa, S. Nilar, P. Smith, D. Beer, J. Lescar, P.Y. Shi, Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects, *Antiviral Res.* 100 (2013) 500–519.
- [33] D. Luo, S.G. Vasudevan, J. Lescar, The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development, *Antiviral Res.* 118 (2015) 148–158.
- [34] A. Bastos Lima, M.A. Behnam, Y. El Sherif, C. Nitsche, S.M. Vechi, C.D. Klein, Dual inhibitors of the dengue and West Nile virus NS2B-NS3 proteases: synthesis, biological evaluation and docking studies of novel peptide-hybrids, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 5748–5755.
- [35] M.Z. Hamunamy, C. Haase, M. Hamunami, R. Hilgenfeld, T. Steinmetzer, Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease, *ChemMedChem* 8 (2013) 231–241.
- [36] M.A. Behnam, C. Nitsche, V. Boldescu, C.D. Klein, The medicinal chemistry of dengue virus, *J. Med. Chem.* 59 (2016) 5622–5649.
- [37] A.K. Timiri, B.M. Sinha, V. Jayaprakash, Progress and prospects on DENV protease inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 117 (2016) 125–143.
- [38] L.F. Weigel, C. Nitsche, D. Graf, R. Bartenschlager, C.D. Klein, Phenylalanine and phenylglycine analogues as arginine mimetics in dengue protease inhibitors, *J. Med. Chem.* 58 (2015) 7719–7733.
- [39] B. Elmurov, K.A. Bozovov, R.V. Okmanov, R.V. Tashkhodjaev, K.M. Shakhidoyatov, 2-Methyl-4-oxo-6,7,8,9-tetrahydro-thieno[2',3':4,5]pyrimidino-[1,2-a]pyridine-3-carboxylic acid, *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online* 67 (2011) 0824.
- [40] H. Petrokova, J. Duskova, J. Dohnalek, T. Skalova, E. Vondrackova-Buchtelova, M. Soucek, J. Konvalinka, J. Brynda, M. Fabry, J. Sedlacek, J. Hasek, Role of hydroxyl group and R/S configuration of isostere in binding properties of HIV-1 protease inhibitors, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 4451–4461.
- [41] S.M. Tomlinson, S.J. Watowich, Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors, *Antiviral Res.* 93 (2012) 245–252.
- [42] H. Wu, S. Bock, M. Smitko, T. Berger, T. Weidner, S. Holloway, M. Kanitz, W.E. Diederich, H. Steuber, C. Walter, D. Hofmann, B. Weissbrich, R. Spannaus, E.G. Azosta, R. Bartenschlager, B. Engels, T. Schirmeister, J. Boden, Novel dengue virus NS2B/NS3 protease inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 1100–1109.
- [43] L.R. de Sousa, H. Wu, L. Nebo, J.B. Fernandes, M.F. da Silva, W. Kiefer, M. Kanitz, J. Boden, W.E. Diederich, T. Schirmeister, P.C. Vieira, Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 466–470.
- [44] C.H. Heh, R. Othman, M.J. Buckle, Y. Shariffuddin, R. Yusof, N.A. Rahman, Rational discovery of dengue type 2 non-competitive inhibitors, *Chem. Biol. Drug Des.* 82 (2013) 1–11.
- [45] R. Othman, T.S. Kiat, N. Khalid, R. Yusof, E.I. Newhouse, J.S. Newhouse, M. Alam, N.A. Rahman, Docking of noncompetitive inhibitors into dengue virus type 2 protease: understanding the interactions with allosteric binding sites, *J. Chem. Inf. Model.* 48 (2008) 1582–1591.
- [46] S. Sidique, S.A. Shiryayev, B.I. Ratnikov, A. Herath, Y. Su, A.Y. Strongin, N.D. Cosford, Structure-activity relationship and improved hydrolytic stability of pyrazole derivatives that are allosteric inhibitors of West Nile Virus NS2B-NS3 proteinase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2008) 5773–5777.
- [47] M. Yildiz, S. Ghosh, J.A. Bell, W. Sherman, J.A. Hardy, Allosteric inhibition of the NS2B-NS3 protease from dengue virus, *ACS Chem. Biol.* 8 (2013) 2744–2752.
- [48] R.A. Friesner, J.J. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Kleic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shetty, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749.
- [49] W. Sherman, T. Day, M.P. Jacobson, R.A. Friesner, R. Farid, Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 534–553.
- [50] N. Goudreau, D.R. Cameron, R. Deziel, B. Hache, A. Jakalian, E. Malenfant, J. Naud, W.W. Ogilvie, J. O'Meara, P.W. White, C. Yoakim, Optimization and determination of the absolute configuration of a series of potent inhibitors of human papillomavirus type-11 E1-E2 protein-protein interaction: a combined medicinal chemistry, NMR and computational chemistry approach, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 2690–2700.
- [51] W. Davidson, G.A. McGibbon, P.W. White, C. Yoakim, J.L. Hopkins, I. Guse, D.M. Hamby, L. Frego, W.W. Ogilvie, P. Lavallee, J. Archambault, Characterization of the binding site for inhibitors of the HPV11 E1-E2 protein interaction on the E2 transactivation domain by photoaffinity labeling and mass spectrometry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2095–2102.
- [52] C. Yoakim, W.W. Ogilvie, N. Goudreau, J. Naud, B. Hache, J.A. O'Meara, M.G. Cordingley, J. Archambault, P.W. White, Discovery of the first series of inhibitors of human papillomavirus type 11: inhibition of the assembly of the E1-E2-Origin DNA complex, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 2539–2541.
- [53] M. Artico, R. Di Santo, R. Costi, E. Novellino, G. Greco, S. Massa, E. Tramontano, M.E. Marongiu, A. De Montis, P. La Colla, Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 3948–3960.
- [54] Y. Liu, A. Saidivar, J. Bess, L. Solomon, C.M. Chen, R. Tripathi, L. Barrett, P.L. Richardson, A. Molla, W. Kohlbrenner, W. Kati, Investigating the origin of the slow-binding inhibition of HCV NS3 serine protease by a novel substrate based inhibitor, *Biochemistry* 42 (2003) 8862–8869.
- [55] S.Y. Lyu, J.Y. Rhim, W.B. Park, Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro, *Arch. Pharm. Res.* 28 (2005) 1293–1301.
- [56] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008)

- 112–122.
- [57] L.J. Farrugia, WinGX and ORTEP for windows: an update, *J. Appl. Crystallogr.* 45 (2012) 849–854.
- [58] C.F. Macrae, I.J. Bruno, J.A. Chisholm, P.R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P.A. Wood, Mercury CSD 2.0: new features for the visualization and investigation of crystal structures, *J. Appl. Crystallogr.* 41 (2008) 466–470.
- [59] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [60] GaussView, in: R. Dennington, T. Keith, J. Millam (Eds.), Semichem Inc, Shawnee Mission, 2009.
- [61] Gaussian09, in: M.J. Frisch, C.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. Montgomery, J.A., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox (Eds.), Gaussian, Inc, Wallingford, 2016.
- [62] S.R. LigPrep, in, Schrödinger, LLC, New York, 2015.
- [63] P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S.P. Lim, Z. Yin, T.H. Keller, S.G. Vasudevan, U. Hommel, Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13 (2006) 372–373.
- [64] G.M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 27 (2013) 221–234.
- [65] T.P.M.G. System, in, Schrödinger, LLC, New York, 2015.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 067503 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25944455000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Órgão Público

Endereço: Campus UFV, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, sala 04.

Cidade: Vicosá

Estado: MG

CEP: 36570-900

País: Brasil

Telefone: (31) 3899 1421

Fax: (31) 3899 2148

Email: propriedadeintelectual@ufv.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Depositante 2 de 3

Nome ou Razão Social: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MINAS GERAIS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 10626896000172
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Órgão Público
Endereço: Av. Professor Mário Werneck, nº 2.590, Buritis
Cidade: Belo Horizonte
Estado: MG
CEP: 30575-180
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

Depositante 3 de 3

Nome ou Razão Social: INSTITUTO FEDERAL DO NORTE DE MINAS GERAIS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 10727655000110
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Órgão Público
Endereço: Rua Professor Monteiro Fonseca, 216, Vila Brasília
Cidade: Montes Claros
Estado: MG
CEP: 39400-149
País: BRASIL
Telefone:
Fax:
Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DE COMPOSTOS SINTÉTICOS HIDROXILADOS DERIVADOS DA INDAN-1,3-DIONA COMO ANTIVIRAIS E COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Resumo: A presente invenção refere-se ao uso de dois derivados sintéticos hidroxilados da indan-1,3-diona e de composições farmacêuticas contendo tais compostos para o tratamento de infecções causadas pelos vírus West Nile (WNV), Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) e abrange o campo da química medicinal.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 7**Nome:** RÓBSON RICARDO TEIXEIRA**CPF:** 72345888687**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Cláudio Manuel, 471, Bairro Inconfidência**Cidade:** Viçosa**Estado:** MG**CEP:** 36576-298**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 993 084417**Fax:****Email:** robsonr.teixeira@ufv.br**Inventor 2 de 7****Nome:** SÉRGIO OLIVEIRA DE PAULA**CPF:** 96443227620**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua A, 37, Residencial Monte Verde**Cidade:** Viçosa**Estado:** MG**CEP:** 36570-430**País:** BRASIL**Telefone:** (31) 992 053259**Fax:****Email:** depaula@ufv.br**Inventor 3 de 7****PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Nome: ANA PAULA MARTINS DE SOUZA

CPF: 01604123664

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Jacob Lopes de Castro, 601, apto 102, Bairro Nova Era

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36574-192

País: BRASIL

Telefone: (31) 996 228266

Fax:

Email: anapaulamartins20@hotmail.com

Inventor 4 de 7

Nome: MILENE LOPES DA SILVA

CPF: 08931484666

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Servidor das demais carreiras da administração pública direta, autárquica e fundacional

Endereço: Rua Ervália, 37, Ap. 303, Bairro João Braz da Costa Val

Cidade: Viçosa

Estado: MG

CEP: 36576-174

País: BRASIL

Telefone: (31) 985 330663

Fax:

Email: milenelopesdasilva@yahoo.com.br

Inventor 5 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Nome: ANA FLÁVIA COSTA DA SILVEIRA OLIVEIRA

CPF: 07766867630

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Olavo dos Reis, 190, Guinda

Cidade: Diamantina

Estado: MG

CEP: 39103-000

País: BRASIL

Telefone: (38) 998 369531

Fax:

Email: ana.oliveira@ifnmg.edu.br

Inventor 6 de 7

Nome: ANDRÉ SILVA DE OLIVEIRA

CPF: 97906190653

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Olavo dos Reis, 190, Guinda

Cidade: Diamantina

Estado: MG

CEP: 39103-000

País: BRASIL

Telefone: (38) 999 204705

Fax:

Email: andre.oliveira@ifnmg.edu.br

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925

Nome: FABRICIO MARQUES DE OLIVEIRA

CPF: 05208286661

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielca: Professor do ensino superior

Endereço: Avenida Edmundo José Vieira, 814, casa 1, B. Soledade

Cidade: Ouro Branco

Estado: MG

CEP: 36420-000

País: BRASIL

Telefone: (32) 984 268358

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante Pag GRU Deposito Pt.pdf
Procuração	Procuração e DOU Dr. Afonso.pdf
Procuração	Procuração IFMG.pdf
Procuração	Procuração IFNMG.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Desenho	Desenhos.pdf
Resumo	Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 03/09/2018 às 11:38, Petição 870180124925



Advances in
**CHEMISTRY
RESEARCH**

VOLUME 59

James C. Taylor
Editor

NOVA

*Chapter 6***BIS-AZIDES**

***Róbson R. Teixeira^{1,*}, PhD,
Deborah Campos Tomaz¹, MD,
Sara Maria Ribeiro de Sousa¹, MD,
Ana Paula Martins de Souza¹, MD,
Michelle Peixoto Rodrigues¹, MD,
Alex Ramos de Aguiar¹, PhD,
Adilson Vidal Costa², PhD,
Fabiola Suelen dos Santos³, MD
and Rossimíriam Pereira de Freitas³, PhD***

¹Chemistry Department, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,
Minas Gerais State, Brazil

² Physics and Chemistry Department, Universidade Federal do Espírito
Santo, Alegre, Espírito Santo State, Brazil

³Chemistry Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas
Gerais State, Brazil

* Corresponding Author's Email: robsonr.teixeira@ufv.br.

ABSTRACT

Organic azides are an important and versatile class of chemical compounds. They present industrial, academic, and biological applications. In addition, they can be obtained from a variety of synthetic methods. The present book chapter will focus specifically on bis-azides, *i.e.*, organic compounds presenting two azido (-N_3) groups in their structures. The utility of them is going to be covered in synthetic group transformation, polymer chemistry, in the preparation of bioactive compounds, in click chemistry, and in the synthesis of cross-linked DNA.

Keywords: Azides, Organic Azides, Bis-Azides

INTRODUCTION

Organic azides are an important and versatile class of chemical compounds [1]. They present industrial applications [2], are biologically active substances [3], and have great synthetic utility in conjunction with their easy accessibility via several synthetic routes [3-5].

The history of organic azides goes back to 1864 when the German chemist Peter Griss, who first prepared the diazonium salts [6, 7], obtained aryl azides from the reaction of arenediazonium perbromides with ammonia [8]. Later on, Theodor Curtius found that the treatment of benzoyl hydrazine with nitrous acid afforded benzoyl azide. Alkaline hydrolysis of benzoyl azide gave sodium azide which, in turn, by acidification resulted in the formation of hydrazoic acid (HN_3). In Curtius' laboratory, a procedure was also developed for the preparation of alkyl azides via the treatment of alkyl iodides with AgN_3 . He also discovered that the reaction of benzoyl azide with hot ethanol gave rise to *N*-phenylcarbamate [8]. The conversion of acyl azides to the corresponding carbamates is known as The Curtius Rearrangement and it is one step involved in the general method that converts carboxylic acids to amines [9]. Since these initial studies, azides have attracted the attention of several researchers.

The present book chapter will focus specifically on bis-azides, *i.e.*, organic compounds presenting two azido ($-N_3$) groups in their structures. It is going to be covered the utility of them in polymer chemistry, synthetic group transformation, in the preparation of bioactive compounds, in click chemistry, and in the synthesis of cross-linked DNA. It is not our intention to make an exhaustive description of all aspects related to bis-azides.

FUNCTIONAL INTERCONVERSION EMPLOYING BIS-AZIDES

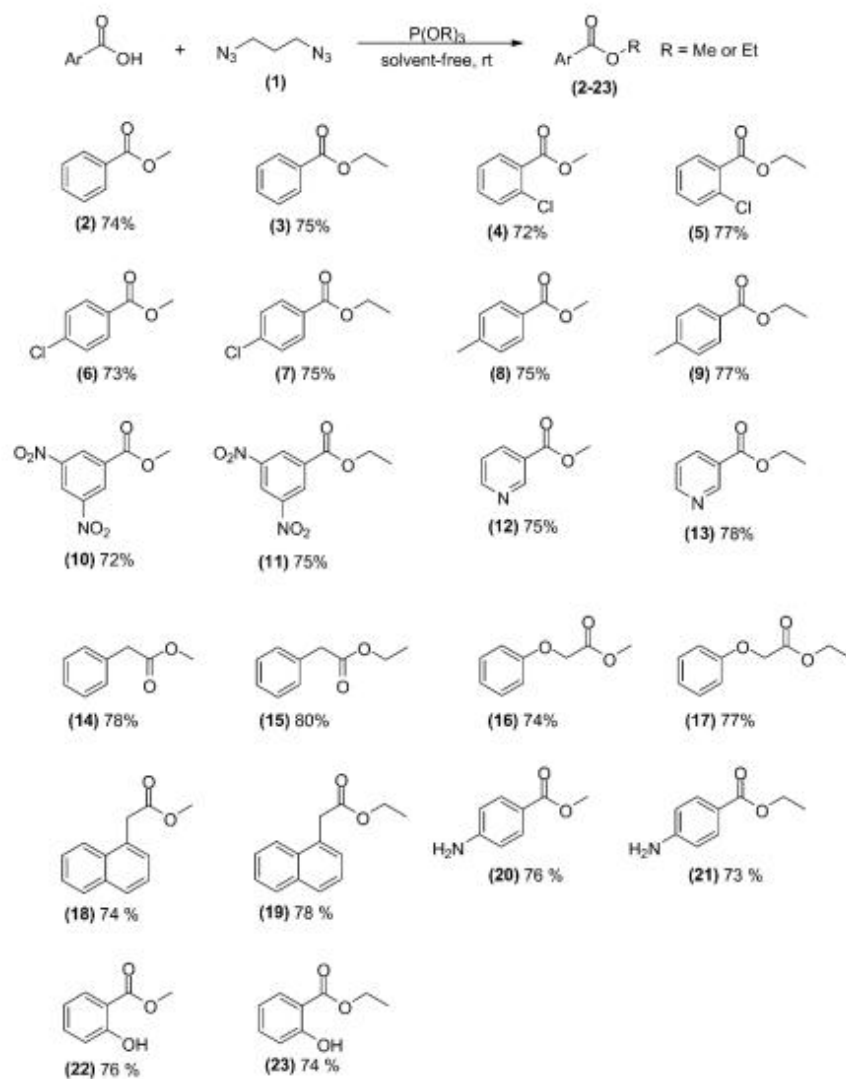
The esterification is an important process in organic chemistry. Esters can be prepared using mineral acids, a variety of activating agents, and several catalysts [10]. Ponnuswam and co-authors found that the combination of bis-azides with trialkyl phosphites or triphenyl phosphine is an alternative method for the preparation of esters [11]. Thus, treatment of carboxylic acids with 1,3-diazidopropane (1) in the presence of triethyl phosphite or trimethyl phosphite afforded methyl or ethyl esters (2-23) in good yields (Scheme 1). Reactions were carried out at room temperature and under solvent free condition.

The proposed mechanism for this reaction is depicted in Scheme 2 [11].

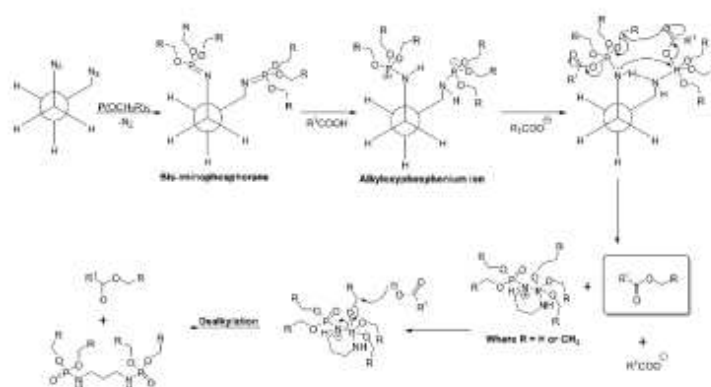
The inconvenience of the aforementioned method is that the phosphites must be prepared before running the esterification. Considering this, it was hypothesized that the trialkylphosphites could be replaced by triphenylphosphine. In fact, the reaction of bis-azide (1) with carboxylic acids in the presence of triphenylphosphine and an alcohol afforded esters with good yields, as shown in Scheme 3.

The proposed mechanism for the formation of esters (24)-(36) is presented in Scheme 4 [11].

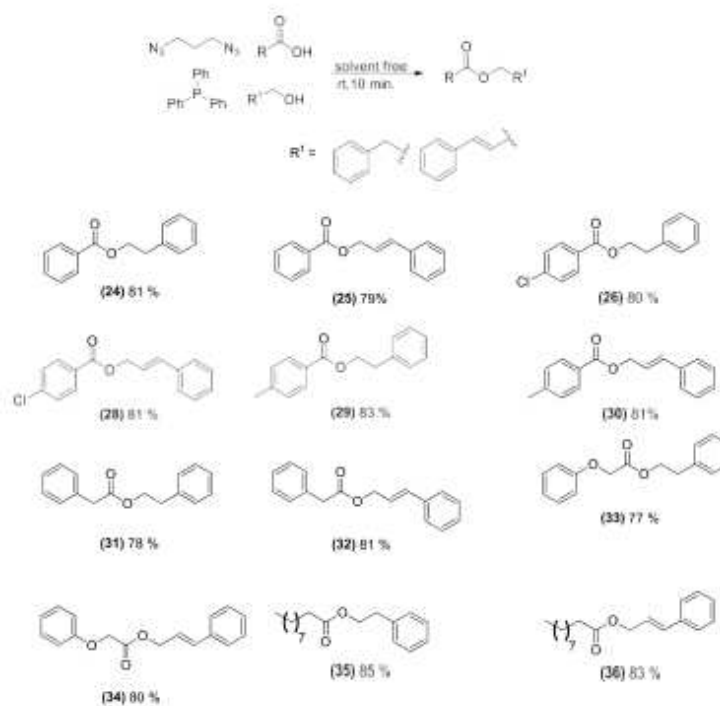
The chemistry of 3,3-diazidoenones (38) has been recently investigated [12]. These compounds can be prepared from the corresponding 3,3-dichlorovinyl ketones (37) which, in turn, can be made from 1,1-dichloroethene and acyl chlorides (Scheme 5).

214 *R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.*

Scheme 1. Preparation of esters from bis-azide (1) and trimethyl or triethyl phosphites. Reaction conditions: 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol), trimethyl phosphite/triethyl phosphite (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol) were stirred at room temperature for 20 min.

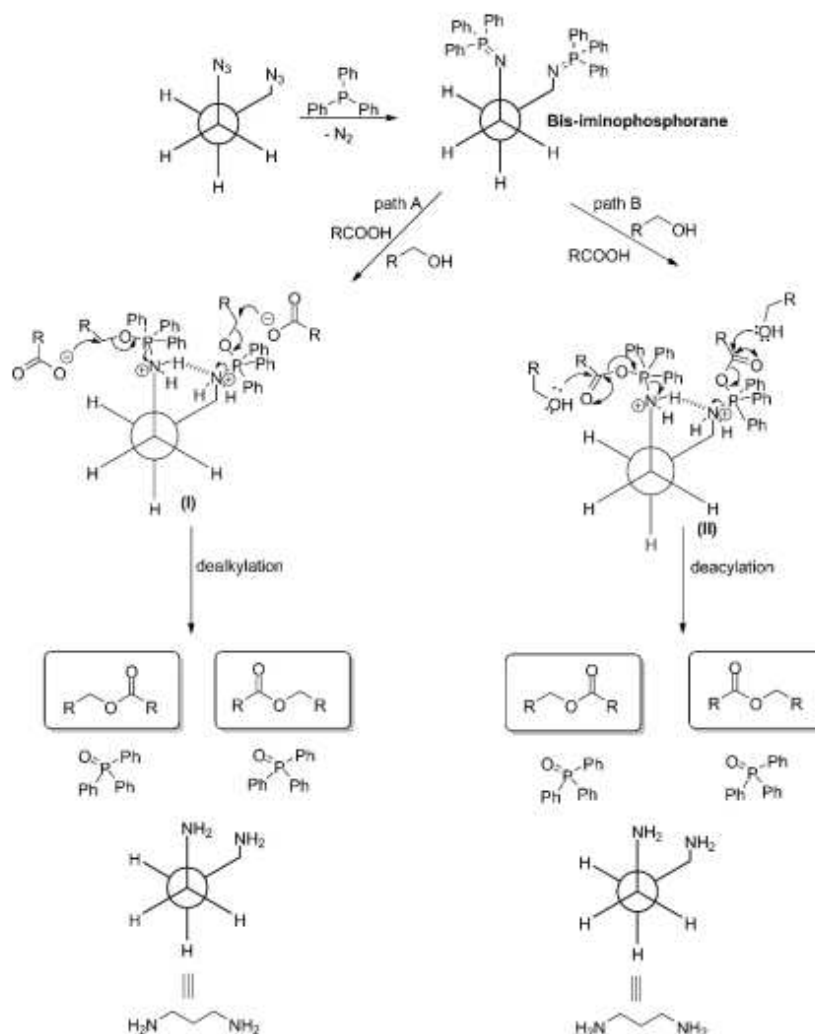


Scheme 2. Proposed mechanism for the esterification using trialkylphosphites.

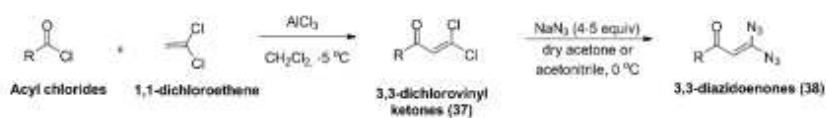


Scheme 3. Preparation of esters (24)-(36). Reaction conditions: To a mixture of triphenylphosphine (1.0 mmol), 2-phenylethanol/cinnamyl alcohol (1.0 mmol) and carboxylic acid (1.0 mmol), 1,3-diazidopropane (1) (0.5 mmol) was added slowly in a drop wise manner (to avoid accumulation of azide) and the mixture was stirred at room temperature for 10 min.

216 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.



Scheme 4. Proposed mechanism of the formation of esters from azides using triphenylphosphine.



Scheme 5. Preparation of 3,3-diazoenones (38).

The formation of 3,3-diazidoenones (38) was evidenced by NMR spectroscopy. It was found that these compounds can undergo cyclization to afford azido isoxazoles (39). This process can be understood considering the nucleophilic attack of carbonyl oxygen on the nitrogen atom accompanied by N_2 release. For dichlorovinyl ketones with aromatic portions, the azidoisoxazoles were obtained in yields ranging from 52%-62%. (Table 1). The reactions were carried out at room temperature in acetonitrile. The fastest conversion of (37d) was associated with the presence of the electron withdrawing group ($-NO_2$) in the aromatic ring [12].

The conversion of 3,3-diazidovinyl ketones in azidoisoxazoles were also performed in ionic liquids. This was done in order to find more environmentally friendly alternatives to the traditional organic solvents. As can be seen in Table 2, the azidoisoxazoles were obtained in good yields and the best ones were prepared running the reactions in $[emin]^+[OTf]^-$.

The formation of azidoisoxazoles from dichlorovinyl ketones with aliphatic portions was also investigated and the results are depicted in Table 3.

Table 1. Formation of azidoisoxazoles (39a-d)

Starting ketone	Ar	Time for the conversion of (37a-d) to (38a-d), h	Yield of (39) (%)
37a	4-Br-C ₆ H ₄	2.5 (38a)	62 (39a)
37b	4-Cl-C ₆ H ₄	3.0 (38b)	56 (39b)
37c	Ph	4.0 (38c)	52 (39c)
37d	3-NO ₂ -C ₆ H ₄	1.5 (38d)	61 (39d)

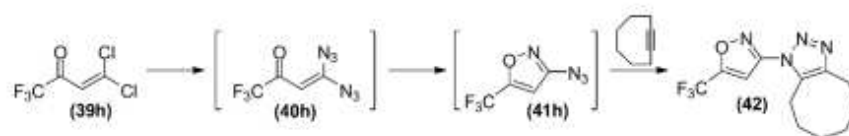
Table 2. Formation of azidoisoxazoles in ionic liquids

Compound	Yield of compounds (39a-c)			
	[bmin] ⁺ [BF ₄] ⁻	[emin] ⁺ [OTf] ⁻	[hmin] ⁺ [PF ₃ (C ₂ F ₅) ₃] ⁻	[bmpyrr] ⁺ [PF ₃ (C ₂ F ₅) ₃] ⁻
39a	70	74	62	57
39b	67	74	63	58
39c	65	75	N/A	N/A

Table 3. Preparation of azidoisoxazoles (41e-h)

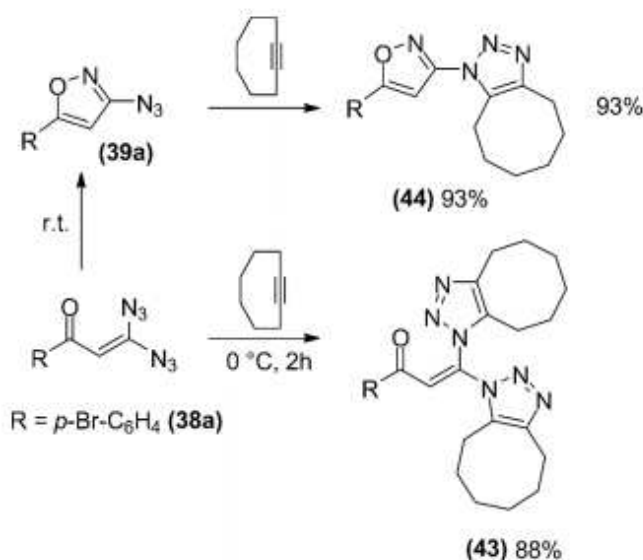
Starting ketone	R	Time for the conversion of (40) to (41), h	Yield of (41) (%)
37e	CH ₃ CH ₂ CH ₂	36.0 (40e)	30 (41e)
37f	CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂	40.0 (40f)	36 (41f)
38g	(CH ₃) ₂ CBr	1.5 (40g)	36 (41g)
39h	CF ₃	1.0 (40h)	40 (41h)

The yields of the azidoisoxazoles (41e-h) were lower compared to the compounds (39a-d). This fact was ascribed to side reaction to form oligomeric products. It is likely that enolization of the ketones is responsible for this behavior. Another possibility is the high volatility of compounds (41e-h) that have low molecular weight. This fact made the isolation of azidoisoxazoles (41e-h) in pure form a difficulty task. In fact, it was not possible to isolate compound (41h) with good purity. Its formation was confirmed by trapping the azidoisoxazole, via strain promoted alkyne-azide cycloaddition (SPAAC) [13, 14], with cyclooctyne resulting in the formation of adduct (42) (Scheme 6).



Scheme 6. Trapping reaction of compound (41h) with cyclooctyne.

The 3,3-diazidoenones can also react with cyclooctyne to afford 1,2,3-triazoles as exemplified in Scheme 7 for the reaction of divinyl ketone (38a) resulting in the bis-1,2,3-triazole (43) in 88% yield. When the reaction was warmed to promote the conversion of (38a) in azidoisoxazole (39a), subsequent addition of cyclooctyne resulted in the formation of (44) in 93% yield [12].

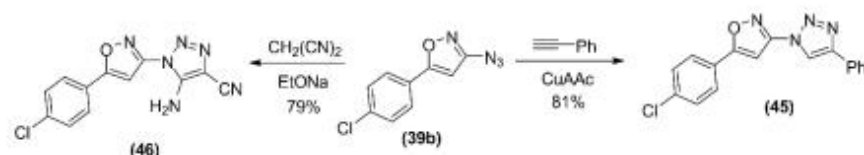


Scheme 7. Preparation of 1,2,3-triazoles from 3,3-diazidoenone (38a).

The azidoisoxazoles are synthetically useful compounds. They can be converted in 1,2,3-triazoles via CuAAC reactions (vide infra for a more detailed discussion regarding this reaction) as exemplified in Scheme 8 for the conversion of (39b) in compound (45). Compound (39b) was also

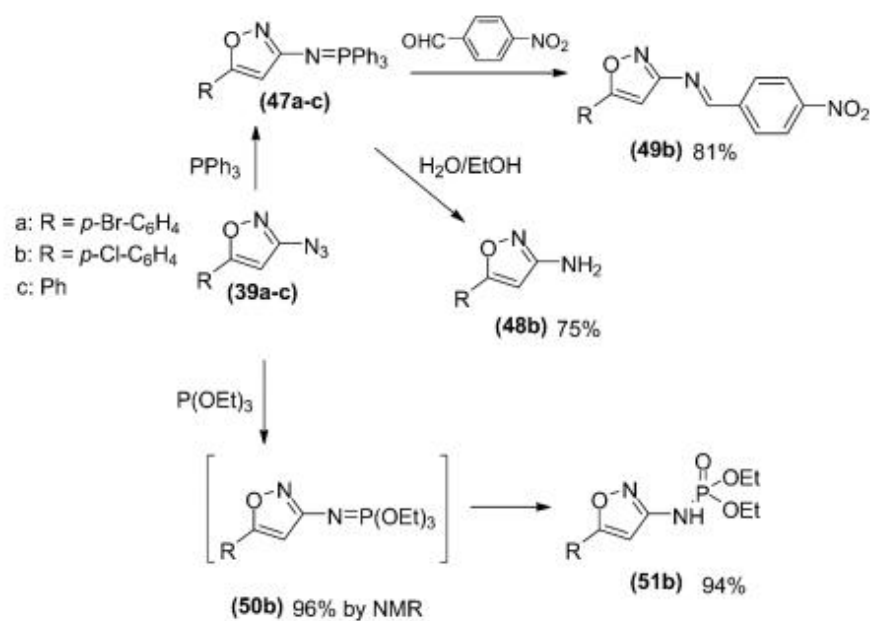
220 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.

converted in 1,4,5-tribustituted-1,2,3-triazole (46) by reacting it with malodinitrile and sodium etoxide.



Scheme 8. Conversion of isoxazole (39b) into compounds (45) and (46).

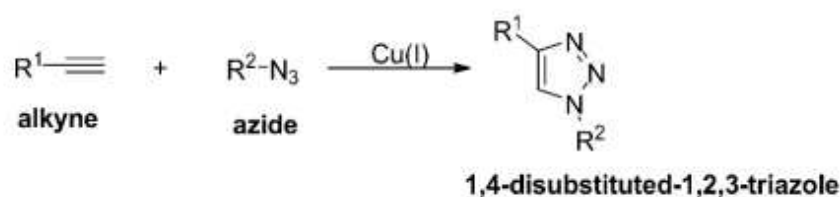
To further demonstrate their synthetic utility, azidoisoxazoles (39a-c) were converted in the phosphorous and nitrogen derivatives shown in Scheme 9.



Scheme 9. Conversion of azidoisoxazoles in nitrogen and phosphorus derivatives.

BIS-AZIDES AND CUAAC REACTION

Azides have been widely used in the Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC), also known as click reaction [15-18]. In this transformation, an alkyne and an azide react to afford 1,4-disubstituted-1,2,3-triazole derivatives. The process is catalyzed by copper(I) species (Scheme 10).



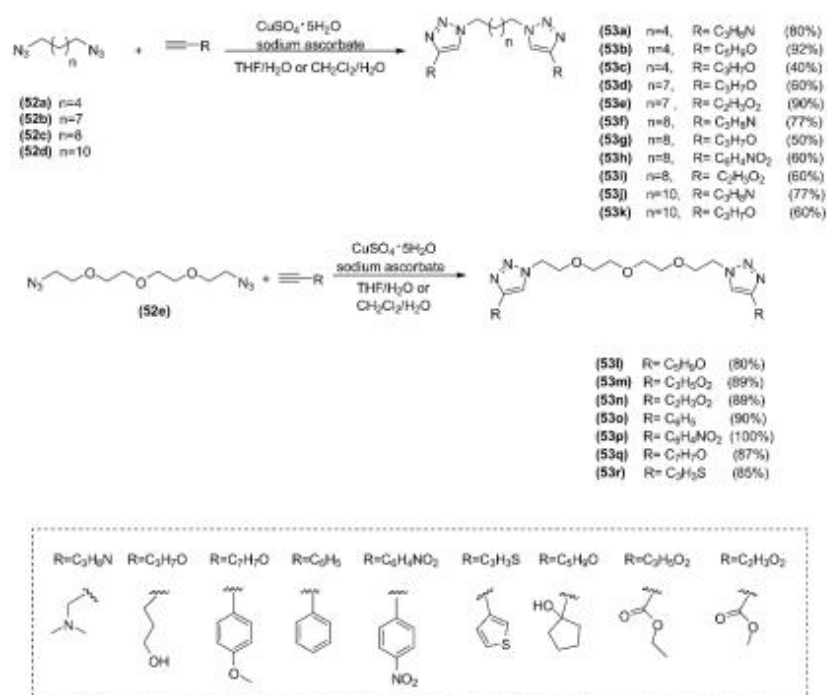
Scheme 10. General scheme of the CuAAC reaction.

This important transformation has found applications in the preparation of pharmaceuticals, agrochemicals, in material science, in carbohydrate chemistry, among others [19-28].

As expected, bis-azides can be engaged in CuAAC chemistry. The review by Abu-Orabi [29] shows several examples of the use of bis-azides in click chemistry.

More recently, Freitas and co-workers [30] synthesized a series of novel symmetric 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles via double CuAAC from aliphatic bis-azides (52a-d) and a tetraethylene glycol bis-azide derivative (52e). The eighteen derivatives (53a-53r) were obtained with good to excellent yields (Scheme 11) and had their cytotoxicity evaluated *in vitro* against human breast adenocarcinoma (MDA-MB 231) and ovarian adenocarcinoma (TOV-21G).

222 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.



Scheme 11. Synthesis of symmetrical 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles (53a-53r).

The MTT cytotoxic assay revealed that the most active compounds were (53j) and (53q). The latter was more active against MDA-MB 231 cell line compared to the standard drug doxorubicin (used as positive control). It is important to mention that both compounds exhibited better selectivity index than the positive control (Table 4). The Selectivity Index (SI) of cytotoxicity was calculated based on the IC₅₀ values obtained for each compound as follows:

$$SI = IC_{50} Y / IC_{50} X,$$

where IC₅₀ X is the IC₅₀ value obtained for the MDA-MB 231 and TOV- 21G cell lines and IC₅₀ Y is the IC₅₀ value obtained for WI-26VA4, the human non-tumor cell line used as a reference.

Table 4. Results of the cytotoxicity evaluation of compounds (53j) and (53q) against MDA-MB231 (human breast adenocarcinoma), TOV-21G (ovarian adenocarcinoma), and WI-26VA (non-tumor human cell line)

Compound	IC ₅₀ (μmol L ⁻¹) ± SD			Selective Index (SI)	
	MDA-MB 231	TOV-21G	WI-26VA	MDA-MB 231	TOV-21G
53j	28.83 ± 14.20	7.29 ± 3.63	69.36 ± 15.76	2.41	9.51
53q	5.07 ± 1.75	31.64 ± 9.40	24.03 ± 6.78	4.74	0.76
Doxorubicine	7.22 ± 0.77	3.68 ± 2.78	1.67 ± 1.73	0.23	0.45

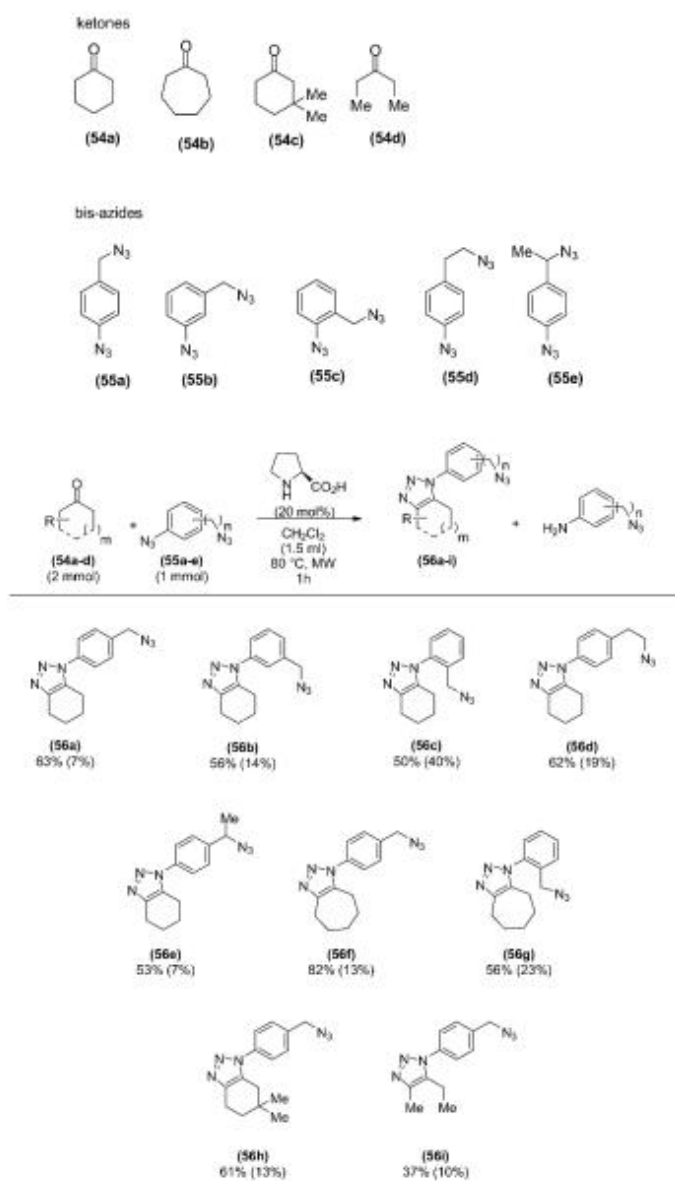
IC₅₀ = the compound concentration that reduced cell viability by 50%.

SD = standard deviation.

These compounds induced apoptosis in both tested cell lines, as assessed by BrdU assay. The findings suggested that these structurally simple compounds may be promising prototypes for antitumoral agents.

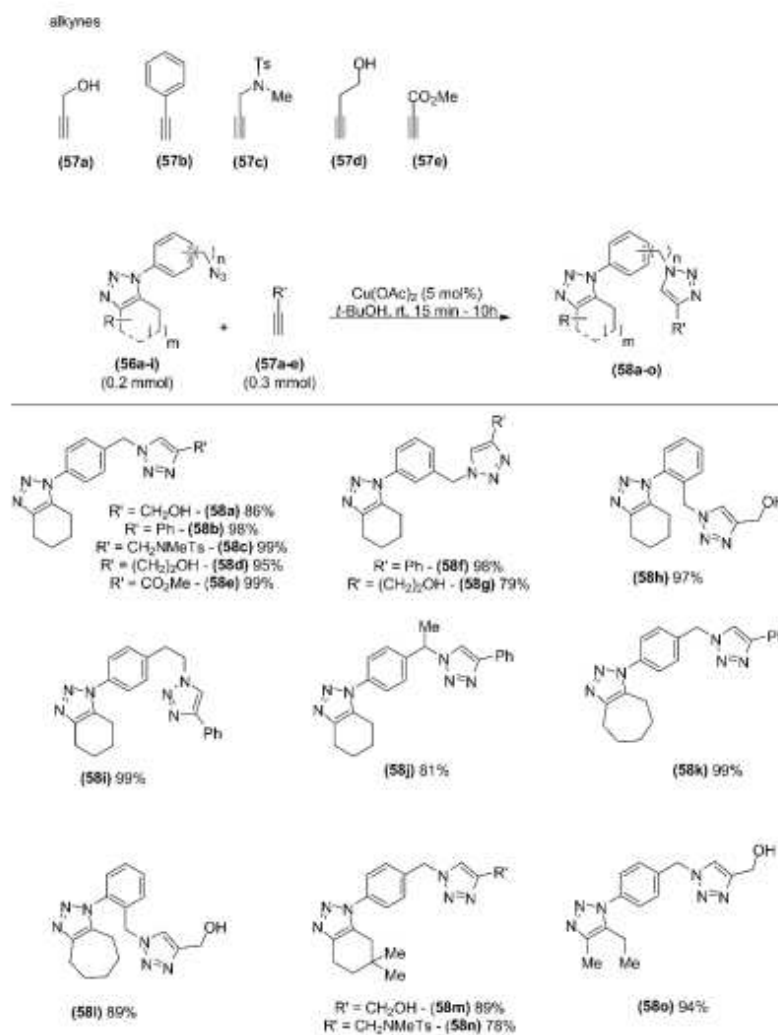
The synthetic strategy used for the preparation of compounds (53a-53r) has also been recently utilized by other researchers [31].

The synthesis of unsymmetrical bis-triazoles via organoclick-click sequence was examined by Bressy and co-workers [32]. The organoclick step combined a ketone and an unsymmetrical bis-azide in the presence of proline as the organocatalyst as shown in Scheme 12. This approach afforded the monotriazoles in moderate to good yields. It was noticed the formation of azidoanilines resulting from a selective reduction of the aromatic azide function and the obtained yields for them are shown between parentheses in Scheme 12.

224 *R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.*

Scheme 12. Organoclick step of the organoclick-click sequence reported by Bressy and co-workers [32].

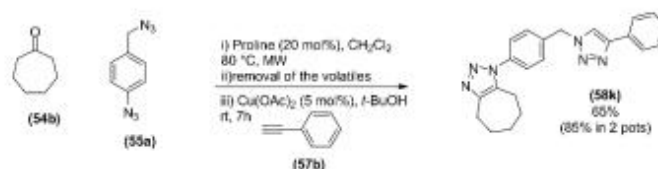
With the compounds (56a-i) in hands, they were submitted to CuAAC reaction (click chemistry) with different alkynes giving rise to the bis-triazoles (Scheme 13).



Scheme 13. Click step of the organoclick-click sequence reported by Bressy and co-workers [32].

226 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.

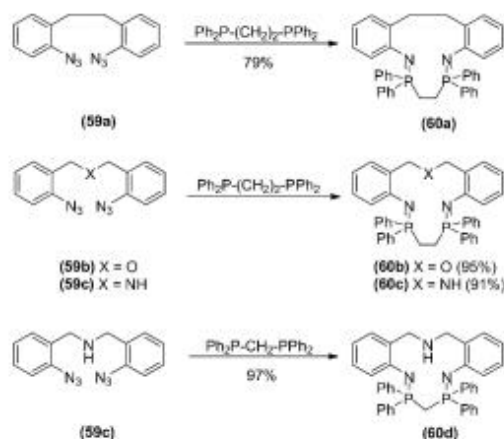
A one-pot procedure was also developed. In this case, the monoazide intermediate was not isolated (Scheme 14).



Scheme 14. One pot procedure for the preparation of bis-1,2,3-triazoles.

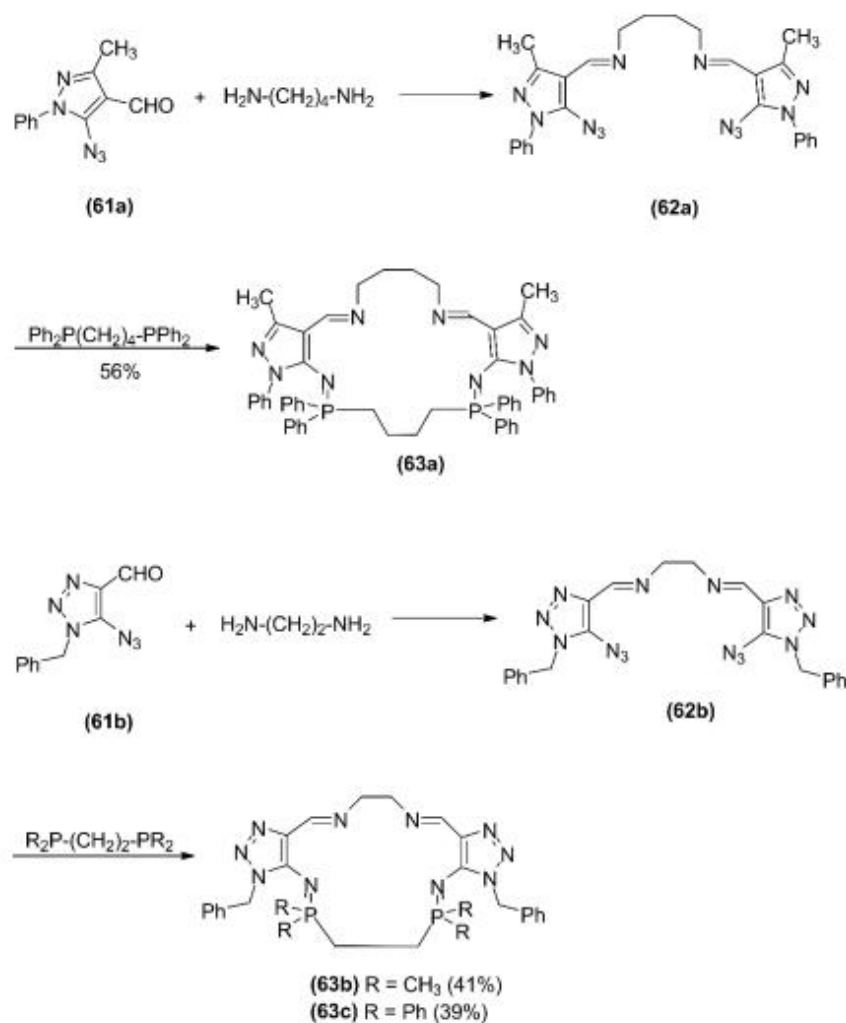
SYNTHESIS OF FUNCTIONALIZED MACROCYCLES

Macrocycles bis-iminophosphoranes can be efficiently synthesized via Staundinger reaction between bis-azides and bis-phosphines as shown in Scheme 15 [33]. Thus, the bis-azide (59a) was converted in cyclic compound (60a) in 79% yield. The incorporation of heteroatoms in the chain connecting the aromatic rings did not decrease the yield of the cyclic products (preparation of compounds 60b-60d).



Scheme 15. Synthesis of functionalized macrocycles by means of reaction of bis-azides and bis-phosphines [33].

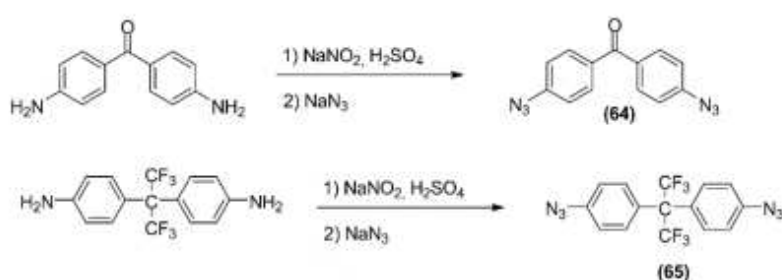
Variations of this reaction were developed (Scheme 16). Starting from aldehydes (61a-b), the imines (62a-b) were obtained and treated with bisphosphines affording the macrocycles (63a-c) with moderate yields.



Scheme 16. Synthesis of macrocycles (63a-c) via imine formation followed by Staudinger reaction [33].

USE OF BIS-AZIDES IN POLYMER CHEMISTRY

Poly(1-trimethylsilyl-1-propyne) [PTMSP] is a high free volume glassy polymer and presents extraordinary gas permeability. Cross-linkable films of PTMSP were obtained from toluene solutions composed of PTMSP and either 4,4-diazidobenzophenone (64) or 4,4'-(hexafluoroisopropylidene)diphenyl azide (65). The preparation of these bis-azides was accomplished via diazotization followed by treatment of the diazonium salt with sodium azide as shown in Scheme 17.



Scheme 17. Synthesis of bis-azides (64) and (65).

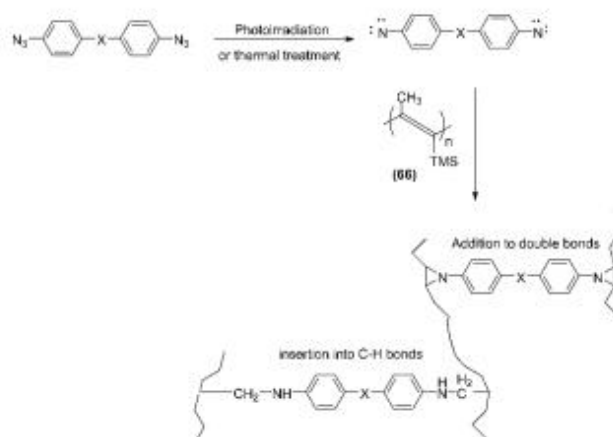
The films were cross-linked via UV-irradiation at room temperature or thermal annealing at 180 °C. The formation of the films can be understood considering that photoirradiation or thermal treatment of azides leads to the loss of nitrogen and the formation of nitrene. This, in turn, can add to double bonds of PTMSP (66) to give aziridines or insert into C-H bonds to give amines (Scheme 18).

The cross-linked films were tested for the N₂ and O₂ gas permeability. It was found that the cross-linked polymers were less permeable than PTMSP (66) [34].

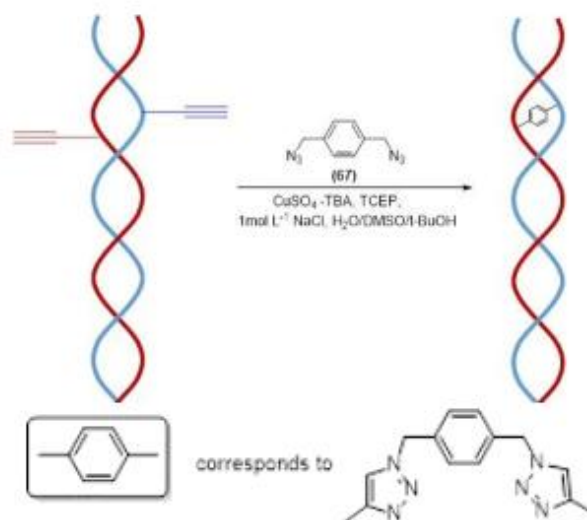
PREPARATION OF CROSS-LINKED DNA

In this last section, it is pointed out that heterodimeric interstrand cross-linked DNA was obtained by Xiong and Seella [35]. Their approach

involved a double-click reaction between preformed oligonucleotide duplexes and the bis azide (67) (Scheme 19).

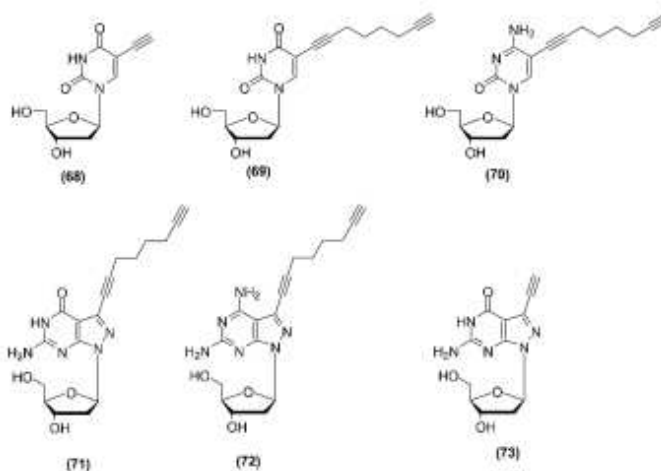


Scheme 18. Formation of the cross-linked PTMSP films.



Scheme 19. Construction of heterodimeric interstrand cross-linked DNA via double-click reaction.

230 *R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.*



Scheme 20. Alkynylated nucleotides utilized in the preparation of oligonucleotide duplexes.

The structures of alkyne-modified nucleotides (68-73), used in the preparation of oligonucleotide duplexes, which were utilized in the double click-reaction, are shown in Scheme 20.

It was found that the stability of cross-linked DNA depends on the linker length and the site of modification. It was worth to mention that cross-linked DNA may be helpful in cancer therapy [36].

CONCLUDING REMARKS

This book chapter covered several reports showing the utility of bis-azides. The usefulness of this class of compounds was demonstrated in functional group interconversion, in polymer chemistry, in the preparation of macrocycles, and in the formation of biomolecules. So far, the bis-azides have been mainly applied in the CuAAC reaction (also known as click chemistry). There are other reports in the literature related to the use of bis-azides. However, as previously mentioned, it was not our intention to make an exhaustive discussion concerning bis-azides. Finally, it is possible to

anticipate that many other applications of this class of versatile compounds will be described in the future.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests.

ACKNOWLEDGMENT

One of us (RRT) are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

REFERENCES

- [1] Bräse, S., Banert, K. (Eds). (2010). *Organiz azides: Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 507 pages.
- [2] Haase, J. (2010). Large scale and usage of azides. *In: Organiz azides – Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, 29-52.
- [3] Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., & Zimmermann. (2005). Organic azides: an exploding diversity of a unique class of compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 5188-5240.
- [4] Scriven, E. F. & Turnbull, K. (1988). Azides: Their preparation and synthetic uses. *Chemical Reviews*, 88, 297-368.
- [5] Tanimoto, H. & Kakiuchi, K. Recent applications and developments of organic azides in total synthesis of natural products. *Natural Product Communications*, 8, 1021-1034.
- [6] Heines, S. V. (1958). Peter Griess – Discoverer of diazo compounds. *Journal of Chemical Education*, 35, 187-191.

232 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.

- [7] Yates, E. & Yates, A. (2016). Johann Peter Griess FRS (1829-88): Victorian brewer and synthetic dye chemist. *Notes and Records*, 70, 65-81.
- [8] Huisgen, R. & München. (2010). Foreword. In: *Organic azides – Synthesis and applications*. John Wiley & Sons Ltd, United Kingdom, xiii-xv.
- [9] Kürti, L. & Czako, B. (2005). *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 116-117.
- [10] Otera, J. & Nishikido, J. (2010). *Esterification: Methods, reactions, and applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Second Edition, Germany.
- [11] Dinesh, M., Archana, S., Ranganathan, R., Sathishkumar, M. & Ponnuswamy, A. (2015). Bis-azide-triphenylphosphine as a reagent for esterification at room temperature. *Tetrahedron*, 56, 6975-6979.
- [12] Lempert, P. S., Smolyar, I. V., Khrustalev, V. N., Roznyatovsky, V. A., Popov, A. V., Kobelevskaya, V. A., Rozentsveig, I. B. & Nenajdenko, V. G. (2019). 3,3-diazidoenones – new types of highly reactive bis-azides. Preparation and synthetic transformations. *Organic Chemistry Frontiers*, 6, 335-341.
- [13] Wittig, G. & Krebs, A. (1961). Zur existenz niedergliedriger cycloalene, I [For the existence of lower-link cycloalenes, I.]. *Chemische Berichte*, 94, 3260-3275.
- [14] Sletten, E. M. & BERTOZZI, C. R. (2013). From mechanism to mouse: A tale of two bioorthogonal reactions. *Accounts of Chemical Research*, 44, 666-676.
- [15] Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2004-2021.
- [16] Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3] triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of terminal alkynes to azides. *Journal of Organic Chemistry*, 67, 3057-3064.

- [17] Meldal, M. & Tornøe. (2008). Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical Reviews*, 106, 2952-3015.
- [18] de Oliveira Freitas, L. B., Ruela, F. A., Pereira, G. R., Alves, R. B. & Freitas, R. P. (2011). The "click" reaction in the synthesis of 1,2,3-triazoles: Chemical aspects and applications. *Química Nova*, 34, 1791-1804.
- [19] Dheer, D., Singh, V. & Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. *Bioorganic Chemistry*, 71, 30-54.
- [20] Tron, G. C., Pirali, T., Billington, R. A., Canonico, P. L., Sorba, G. & Genazzani, A. (2007). Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Medicinal Research Reviews*, 28, 278-308.
- [21] Meghani, N. M., Amin, H. H. & Lee, B. -J. (2017). Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discovery Today*, 22, 1604-1619
- [22] Borgati, T. F., Alves, R. B., Teixeira, R. R., Freitas, R. P., Perdigão, T. G., da Silva, S. F., dos Santos, A. A. & Bastidas, A. J. O. (2013). Synthesis and phytotoxicity activity of 1,2,3-triazole derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 953-961.
- [23] Xi, W., Scott, T. F., Klaxin, C. J. & Bowman, C. (2017). Click chemistry in materials science. *Advanced Functional Materials*, 24, 2572-2590.
- [24] Kushwaha, D., Dwivedi, P., Kuanar, S. K. & Tiwari, V. K. (2013). Click reaction in carbohydrate chemistry: Recent developments and future perspective. *Current Organic Synthesis*, 2013, 90-135.
- [25] Liang, L. & Astruc, D. (2011). The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255, 2933-2945.
- [26] Tăbăcaru, A., Furdui, B., Ghinea, I. O., Cârâc, G. & Dinică, R. M. (2017). Recente advances in click chemistry reactions mediated by transition metal based systems. *Inorganica Chimica Acta*, 455, 329-349.

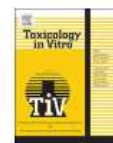
234 R. R. Teixeira, D. Campos Tomaz, S. M. Ribeiro de Sousa et al.

- [27] Moses, J. E. & Moorhouse, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemistry Society Reviews*, 36, 1249-1262.
- [28] Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8, 1128-1137.
- [29] Abu-Orbai, S. T. (2002). 1,3-dipolar cycloaddition reactions of substituted benzyl azides with acetylenic compounds. *Molecules*, 7, 302-314.
- [30] Reis, W. J., Moreira, P. O. L., Alves, R. B., Oliveira, H. H. M., Silva, L. M., Varotti, F. P., Freitas, R. P. (2018). Novel symmetrical 1,4-disubstituted-bis-1,2,3-triazoles: Synthesis by double CuAAC and cytotoxicity evaluation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18, 1475-1482.
- [31] Düğcdü, E., Ünlüer, D., Çelik, F., Sancak, K., Karaoğlu, S. A. & Özel, A. (2016). 1,2,3-bis-triazole derivatives via 'click chemistry' and their biological evaluation. *Molecules*, 21, 659, doi: 10.3390/molecules21050659].
- [32] Belkheira, M., El Abed, D., Pons, J. -M. & Bressy, C. (2018). Chemoselective organoclick-click sequence. *Synthesis*, 50, 4254-4262.
- [33] Molina, P., Arques, M. A. A., Sánchez-Andrada, P., Vidal A. & Vinader, M. V. (1997). Na eficiente preparation of macrocycles containing two tetra-coordinate phosphorus atoms. *Journal of Organometallic Chemistry*, 529, 121-125.
- [34] Jia, J. & Baker, G. L. (1998). Cross-linking of poly[1-(trimethylsilyl)-1-propyne] membranes using bis (aryl azides). *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 36, 959-968.
- [35] Xiong, H. & Seela, F. (2012). Cross-linked DNA: Site-selective "click" ligation in duplexes with bis-azides and stability changes caused by internal cross-links. *Bioconjugate Chemistry*, 23, 1230-1243.
- [36] Carrette, L. L., Gyssels, E., De Laet, N. & Madder, A. (2016). Furan oxidation based cross-linking: a new approach for the study and targeting nucleic acid and protein interactions. *Chemical Communication*, 28, 1539-1554.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvit

Combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells



Raoni Pais Siqueira^{a,*}, Mônica Maria Magalhães Caetano^a, Luciana Ângelo de Souza^b,
 Patrícia Maria Siqueira dos Passos^c, Natália Borges Simaroli^c,
 Marcus Vinícius de Andrade Barros^d, Ana Paula Martins de Souza^d, Leandro Licursi de Oliveira^b,
 Abelardo Silva-Júnior^e, Juliana Lopes Rangel Fietto^a, Róbson Ricardo Teixeira^d,
 Felipe Roberti Teixeira^c, Gustavo Costa Bressan^{a,*}

^a Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Viçosa, MG, Brazil

^b Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, MG, Brazil

^c Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brazil

^d Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química, Viçosa, MG, Brazil

^e Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Viçosa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords

Lymphoblastic leukemia
 SRPK inhibitor
 SRPN340
 AKT inhibitor
 GSK-699603
 Jurkat

ABSTRACT

The serine/arginine protein kinases respond to the EGFR-PI3K-AKT signaling module in the context of pre-mRNA alternative splicing regulation. These enzymes (notably SRPK1 and SRPK2) have been found dysregulated in a variety of cancers, which suggests them as promising drug targets in oncology. SRPK2 has been related to leukemia cells proliferation and found preferentially overexpressed in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). Previously, synergistic combination between vincristine and SRPK inhibitors has been observed in leukemia cells *in vitro*. Herein we sought to evaluate the *in vitro* combinatory effects of inhibiting SRPK and multiple other kinase targets from the EGFR pathway in T-ALL, a hematological malignancy with a still poor prognosis. We found that the combined SRPK and AKT pharmacological inhibition is synergistic in Jurkat, CCRF-CEM, and TALL-1 (all T-ALL) but not in HL60, an acute myelogenous leukemia cell lineage. Combined treatments also impaired SR proteins phosphorylation in accordance with an improved suppression of SRPK activity. Furthermore, the synergism of treatments seemed associated with apoptosis triggering, as revealed by flow cytometry analyses. Taken together, these results suggest the therapeutic potential of the combined SRPK and AKT pharmacological inhibition against T-ALL.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological cancer frequently associated with poor prognosis and survival rate in adults (Terwilliger and Abdul-Hay, 2017; Xiao et al., 2018). In children, ALL treatment failure is mostly due to relapse, which occurs in approximately 15% - 20% of patients (Locatelli et al., 2012). Therefore, ALL treatment options remain limited, which justifies the search for novel strategies aiming at an improved cure rate and the prevention of disease relapse.

Abnormal activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling contributes to the pathogenesis of several cancers, including the development and progression of different leukemia

subtypes (Banerjee et al., 2016; Kern et al., 2015; Wee and Wang, 2017). Signals mediated by EGFR can activate downstream pro-oncogenic signaling pathways, such as RAS-RAF-MEK-ERK and PI3K-AKT-mTOR (Wee and Wang, 2017). Thus, EGFR signaling has proved to be an attractive target for inhibiting leukemia cell spread.

Serine/arginine protein kinases (SRPK) are involved in pre-mRNA alternative splicing regulation in the context of the EGFR-PI3K-AKT signaling pathway (Zhou et al., 2012). Upon AKT activation, SRPK translocate to the nucleus, where they can regulate splicing by phosphorylating SR proteins (Jang et al., 2009; Zhou et al., 2012). SRPK have been frequently found overexpressed in a number of cancers, including leukemia (Hishizawa et al., 2005; Jang et al., 2008; Salesse et al., 2004; Siqueira et al., 2015), suggesting these kinases as emerging

* Corresponding authors.

E-mail addresses: raoni.siqueira1@gmail.com (R.P. Siqueira), gustavo.bressan@ufv.br (G.C. Bressan).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104777>

Received 23 October 2019; Received in revised form 13 January 2020; Accepted 17 January 2020

Available online 18 January 2020

0887-2333/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

targets in oncology (Lee and Abdel-Wahab, 2016; Lin, 2018). Although the mechanisms of overexpression in tumors are unknown, the oncogenic role of SRPK has been related to their capabilities to change the splicing pattern of genes such as VEGF, Rac1b, and MEK2 (MAP2K2) in favor of the tumorigenic process (Gammons et al., 2014; Goncalves et al., 2014; Hayes et al., 2007). In leukemia cells, the overexpression of SRPK2 has been correlated to increased cell proliferation through enhanced cyclin A1 transcription (Jang et al., 2008). More recently, a study based on CRISPR dropout screen identified SRPK1 as an epigenetic regulator of BRD4, a gene involved in the expression of Myc and other oncogenes related to hematologic cancers (Tzelepis et al., 2016).

Significant efforts have been made to identify small molecules capable of inhibiting SRPK cellular activity (Batson et al., 2017; Fukuhara et al., 2006; Gammons et al., 2013; Hatcher et al., 2018; Moreira et al., 2018; Morooka et al., 2015; Siqueira et al., 2017). The *N*-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide, also known as SRPIN340, was the first compound identified to target both SRPK1/SRRK2. Since then, its activity has been extensively demonstrated in a number of *in vitro* and *in vivo* disease models, such as retinal angiogenesis (Amin et al., 2011; Dong et al., 2013), melanoma (Gammons et al., 2014; Moreira et al., 2018) and leukemia (Siqueira et al., 2015, 2017).

Previous studies have reported that SRPK1 siRNA targeting enhances the sensitivity of tumor cells to gemcitabine and/or cisplatin (Hayes et al., 2007). Similarly, we have demonstrated the synergism of SRPK pharmacological inhibitors and the chemotherapeutic agent vincristine in leukemia cells (Siqueira et al., 2017). Then, considering the intricate role of EGFR and its downstream signaling elements in leukemia, which include SRPK, the present work investigates the potential synergistic action of SRPIN340 and other inhibitors targeting EGFR downstream kinases in T-ALL cells *in vitro* (Fig. 1).

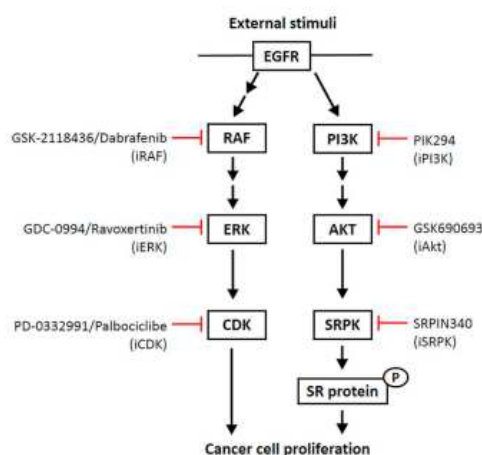


Fig. 1. Schematic view of downstream EGFR signaling elements and the inhibitors used in this study. EGFR, epidermal growth factor receptor; RAF, a serine/threonine-specific protein kinase (rapidly accelerated fibrosarcoma); GSK-2118436 (Dabrafenib, BRAF inhibitor); ERK, extracellular signal-regulated kinases; GDC-0994 (Ravoxertinib, ERK1/2 inhibitor); CDK, cyclin-dependent kinase; PD-0332991 (Palbociclib, CDK4/6 inhibitor); PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PIK294 (PI3K inhibitor); AKT, a serine/threonine protein kinase; GSK690693 (pan-AKT inhibitor); SRPK, serine/arginine-rich protein kinase; SRPIN340, SRPK1/2 inhibitor). In order to make the text more understandable, the inhibitors were abbreviated as iRAF, iERK, iCDK, iPI3K, iAkt, and iSRPK.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and culture

The human leukemic cell lines Jurkat, CCRF-CEM, TALL-1 (T-cell acute lymphoblastic leukemia - T-ALL) and HL60 (acute myelogenous leucemia - AML), murine fibroblast NIH3T3, rat cardiomyoblasts H9c2, and African green monkey kidney VERO cells were used in this study. Jurkat, CCRF-CEM, TALL-1, and HL60 were kindly provided by Dr. José Andrés Yunes (Centro Infantil Boldrini, Campinas, São Paulo, Brazil). NIH3T3 was kindly provided by Dr. Anésia Aparecida dos Santos (Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil). H9c2 and VERO were kindly provided by Dr. Vanessa Carla Furtado Mosqueira (Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil). The cells were cultured in RPMI-1640 or DMEM medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, LGC Biotecnologia) and 3 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Sigma), at 37 °C, under humidified and 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Drug compounds

GDC-0994 (Ravoxertinib/iERK) and GSK-2118436 (Dabrafenib/iRAF) were purchased from MedChem Express. PD-0332991 (Palbociclib/iCDK), GSK-690693 (iAkt), and PIK-294 (iPI3K) were purchased from Sigma-Aldrich. Compound *N*-(2-(piperidin-1-yl)-5-trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340/iSRPK) was synthesized as previously published (Fukuhara et al., 2006; Siqueira et al., 2015). All compounds for *in vitro* use were reconstituted in DMSO, at 10 mM.

2.3. Cell viability by MTT assay

Jurkat, CCRF-CEM, TALL-1 and HL60 cells were seeded in a 96-well plate (7×10^4 cells/well, 100 µL/well) containing complete RPMI medium and NIH3T3, H9c2, and VERO cells were seeded in a 96-well plate (10^4 cells/well, 100 µL/well) containing complete DMEM medium. The cells were incubated at 37 °C for 24 h prior to treatments. Different concentrations of iSRPK, iERK, iRAF, iCDK, iAkt, and iPI3K were added alone or in concomitant combinations (iSRPK + inhibitor) for 48 h. Then, the cells were incubated with 5 mg/mL of MTT (Sigma) for 3 h, the plates were centrifuged and the medium was replaced by 100 µL DMSO (Sigma). Absorbance was recorded at 545 nm using a microplate reader (SpectraMax M5, Molecular Devices).

2.4. The combination index (CI)

Dose-effect analysis of the combined treatments were carried out using the Chou-Talalay method (Chou, 2010). Cells were seeded in a 96-well plate 24 h prior to treatment. In the following day, cells were treated with iSRPK, iERK, iRAF, iCDK, iAkt, and iPI3K alone or in concomitant combinations iSRPK + inhibitor in a combination rate of 1:1 at concentrations ranging from 2.5 to 80 µM. After 48 h of incubation, MTT assay was performed as described in the previously section (2.3 Cell viability by MTT assay). The type of interaction between the compounds was determined by combination index (CI), using the CompuSyn software. The synergistic effect is characterized by $CI < 0.9$; the additive effect, by $0.9 < CI < 1.0$; and the antagonistic effect, by $CI > 1.0$.

2.5. Western blotting

2×10^6 Jurkat cells were treated with iSRPK in combination with each one of these inhibitors: iRAF, iERK, and iAkt [10 µM], for 24 h. After treatment, cell lysates were prepared in PBS containing 1% (v/v) NP40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, protease and phosphatase inhibitors

(Sigma), and 10 mM Tris (pH 7.4) at a concentration of 2×10^7 cells/mL in lysis buffer, as described in our previous works (Siqueira et al., 2015, 2017). Briefly, the samples were incubated on ice for 10 min, sonicated, and centrifuged for 10 min at 15000 \times g. The proteins were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare), blocked for 2 h in PBS containing 3% bovine serum albumin, incubated with primary antibody, and then incubated for 2 h with secondary antibody. The following primary antibodies were used: mouse anti-SRPK1 (BD Biosciences), mouse anti-SRPK2 (BD Biosciences), rabbit anti-phospho AKT/rabbit anti-AKT (Cell signaling), mouse anti-phospho ERK/mouse anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-phospho GSK3 β /mouse anti-GSK3 β , mouse anti-GAPDH (Invitrogen), and mouse anti-phospho SR proteins mAb1H4 (Invitrogen). The secondary antibodies used were anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-conjugated (Sigma). Then, the proteins were visualized, using Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare), under a digital scanner ChemiDoc Image System (Bio-Rad).

2.6. Apoptosis and cell cycle analysis by flow cytometry

Jurkat cells were seeded on 96-well plate at density of 7×10^4 cells per well and treated with only iSRPK or in combination, with iAKT [10 μ M] for 24 h. DMSO (0.4% v/v) was used as vehicle control. For apoptosis analysis, the cells were labeled by using Annexin V/FITC apoptosis detection kit I (BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol. For cell cycle analysis, the cells were fixed in 70% ethanol, washed in PBS and incubated for 30 min in PBS containing propidium iodide (50 μ g/mL, Sigma) and RNase A (0.2 mg/mL, Invitrogen). The samples were analyzed by flow cytometry (FACS Verse, BD Bioscience).

2.7. Statistical analysis

All numeric data were derived from at least three independent experiments and are presented as means \pm standard deviation. The analyses were performed using Microsoft Excel (Microsoft Office Software), GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.) and ImageJ software systems. The statistical analyses were done by paired Student's *t*-tests. **P* < .05 or ***P* < .01 was considered significant.

3. Results

3.1. Cytotoxic effect of drug combinations

We began by testing the effect of iSRPK individually or in combination with several other kinase inhibitors (Fig. 1) on the viability of the non-tumor cells NIH3T3, H9c2, and VERO. These lineages were only sensitive to the iCDK compound individually or in combination at 20 μ M (Supplementary Fig. 1). Moreover, only higher concentrations (80 μ M) of iSRPK/iRAF, iSRPK/iPI3K, and iSRPK/iAKT combinations were synergistic over these non-tumor cells. Therefore, as the concentrations of 10 μ M and 20 μ M selectively affected the tumor by most of inhibitors (except iCDK at 20 μ M), they were chosen to interrogate the leukemia lineages Jurkat, CCRF-CEM, TALL-1, and HL60.

The results showed that SRPIN340 alone was barely active at both concentrations used (Fig. 2), in accordance to what has been previously described (Moreira et al., 2018). In Jurkat, the combinations iSRPK/iRAF, iSRPK/iERK, and iSRPK/iAKT decreased cell viability if compared with the individual treatments and controls (Fig. 2A). Among these combinations, the most notable effect was observed for iSRPK/iAKT treatments, which decreased Jurkat viability by approximately 45% and 63%, at 10 and 20 μ M respectively (Fig. 2A). iSRPK/iAKT treatments also decreased CCRF-CEM and TALL-1 viability considerably (Fig. 2B and C). iSRPK/iRAF and iSRPK/iERK treatments in CCRF-CEM (Fig. 2B) and iSRPK/iCDK and iSRPK/iERK treatments in TALL-1

(Fig. 2C) also indicated synergism in at least one concentration evaluated. Instead, none of the combinations resulted in an evident decrease in HL60 viability compared to the individual treatments (Fig. 2D).

To further determine if the combination treatments had synergistic effects, we calculated the combination index (CI) by using the CompuSyn software according to the Chou-Talalay equation (Chou, 2010). For Jurkat cells, the CI values were < 0.9 for the treatment with iSRPK/iERK and iSRPK/iAKT, which indicates synergistic action (Table 1). CI values also indicated synergism of iSRPK/iRAF and iSRPK/iAKT combinations over CCRF-CEM and iSRPK/iRAF, iSRPK/iERK, iSRPK/iCDK, and iSRPK/iAKT combinations over TALL-1. The calculated CI values for all combinations over HL60 were > 1.0, which indicates antagonism. Thus, we have selected iSRPK/iRAF, iSRPK/iERK, and iSRPK/iAKT for further analysis, since these combinations were synergistic in at least one T-ALL cell line.

3.2. Activity of EGFR pathway downstream elements

To analyze the effects of the inhibitors used individually or in combination, we carried out western blotting analysis of treated cell lysates with specific antibodies to targets of EGFR-RAF-ERK and EGFR-PI3K-AKT signaling pathways (Fig. 3A). The iRAF and iERK inhibitors increased ERK phosphorylation in individual treatments (Fig. 3, lanes 3 and 4), whereas iSRPK/iRAF and iSRPK/iERK combined treatments reversed this phenomena by reducing the phospho-ERK signal in comparison to the individual ones (Fig. 3, lanes 1 and 2). In turn, AKT phosphorylation was increased in both iAKT or iAKT/iSRPK treatments (Fig. 3, lanes 3 and 4). Instead, GSK3 β phosphorylation was decreased in iAKT and iAKT/iSRPK treatments, as expected (Fig. 3, lanes 5 and 6). A concentration-dependent feedback resulting in increased AKT phosphorylation has been usually observed for GSK690693 and other AKT inhibitors (Dumble et al., 2014; Levy et al., 2009). Therefore, these observations are consistent with the expected response of downstream effectors upon the inhibition of the upstream targets.

We also examined whether the combinations affect the phosphorylation status of SR proteins and SRPK1/2 expression in Jurkat cells. As shown in Fig. 3B and C, the combination iSRPK/iAKT clearly decreased the phospho-signal of SRSF4, SRSF5, and SRPF6 splicing factors. SRSF5 phospho-signal was also decreased by iSRPK/iRAF treatments. In addition, treatments containing the AKT inhibitor seem to decrease the expression level of SRPK1 and SRPK2. These data indicate that the treatments impaired SRPK activity in Jurkat cells, as expected.

3.3. Flow cytometry analyses

In subsequent assays, propidium iodide (PI) and annexin-V staining, followed by flow cytometry analyses, were performed to better investigate the effects of iSRPK/iAKT combined treatments in Jurkat cells. At the concentration used, the compounds alone or in combination were ineffective in significantly altering G0/G1, S, and G2/M cell populations (Fig. 4A). On the other hand a clear increase in sub-G0/G1 population was observed (from 5.45% in control group to 24.8% in iSRPK/iAKT group), which is consistent with an increment of cell apoptosis. As this analysis is not robust enough to explain all apoptosis events in a cell population, Annexin-V staining was approached. The percentage of Annexin-V positive cells (apoptosis) was not altered (4.0%) when iSRPK was used alone at the evaluated concentration but was significantly increased by the combined iSRPK/iAKT treatment (50.6%) (Fig. 4B). Considering that iAKT treatment increased the percentage of Annexin-V positive cell to 30.6%, these data clearly demonstrate the synergistic action of the combined compounds in increasing Jurkat cell apoptosis *in vitro*.

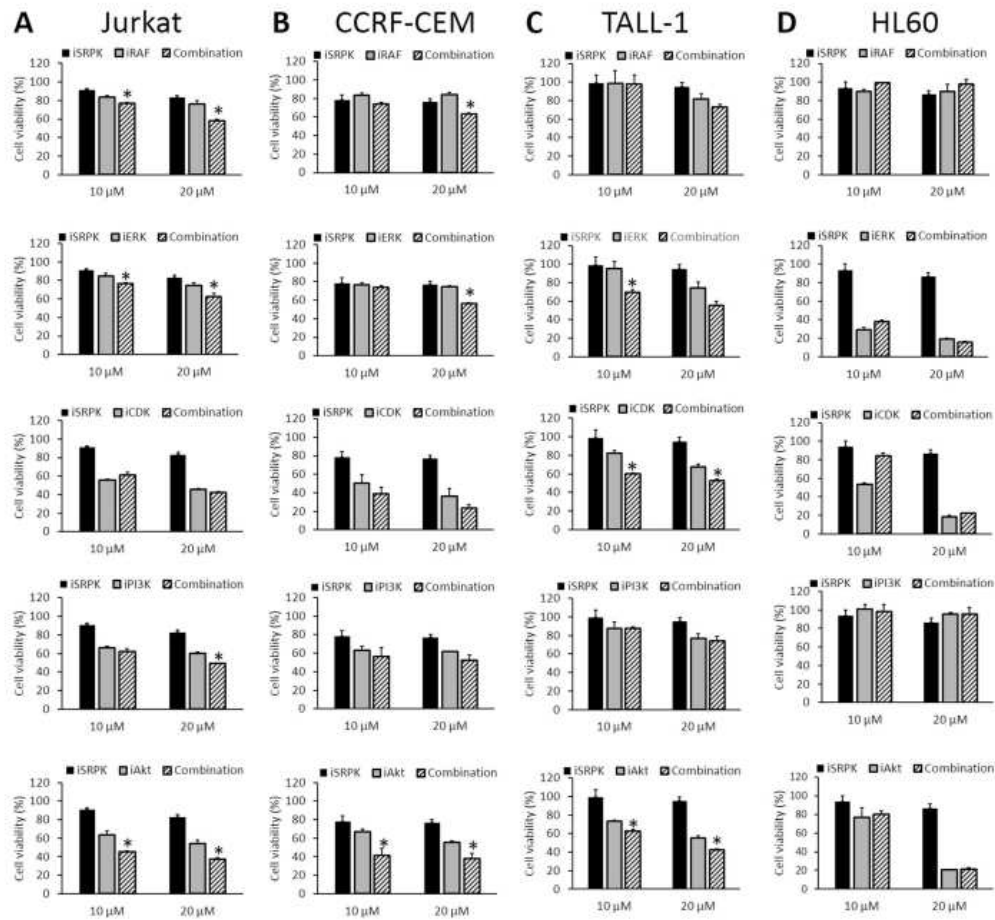


Fig. 2. Combined effect of treatments targeting the SRPK and EGFR pathway in leukemia cells. Jurkat (A), CCRF-CEM (B), TALL-1 (C), and HL60 (D) were treated with the indicated combination of inhibitors for 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. It was considered 100% the viability of the cells in the control treatment (vehicle-DMSO) and the percentage of viable cells in each treatment was calculated relative to the vehicle. The values are expressed as the means \pm standard deviation of three independent experiments (t-tests, * $P < .05$).

Table 1

CI values of combination treatments. The combination index (CI) values were calculated using the CompuSyn software according to the Chou-Talalay equation (Chou, 2010).

Combination	Cell line			
	Jurkat	CCRF-CEM	TALL-1	HL60
ISRPK + IRAF	0.96	0.75	0.85	> 1.0
ISRPK + IERK	0.82	0.96	0.72	> 1.0
ISRPK + ICDE	> 1.0	0.90	0.63	> 1.0
ISRPK + IPI3K	> 1.0	0.90	0.95	> 1.0
ISRPK + IAkt	0.46	0.50	0.65	> 1.0

Synergistic (CI < 0.9); Additive (0.9 < CI < 1.0); Antagonistic (CI > 1.0).

4. Discussion

There is a general consensus in oncology that anti-cancer drug cocktails are more successful in controlling disease progress and preventing relapse in comparison to treatments with single agents (Lu et al., 2017; Mokhtari et al., 2017). Thus, the establishment of efficacious combined therapies are potentially interesting for obtaining better clinical outcomes. Since previous studies have shown that small molecules or siRNA suppression of SRPK could increase the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic agents (Hayes et al., 2007; Siqueira et al., 2017), we wondered whether the inhibition of SRPK in combination with other targets downstream in the EGFR signaling could impact leukemic cells. We then selected the SRPK1/2 dual inhibitor SRPIN340 (Fukuhara et al., 2006) and five other kinase inhibitors

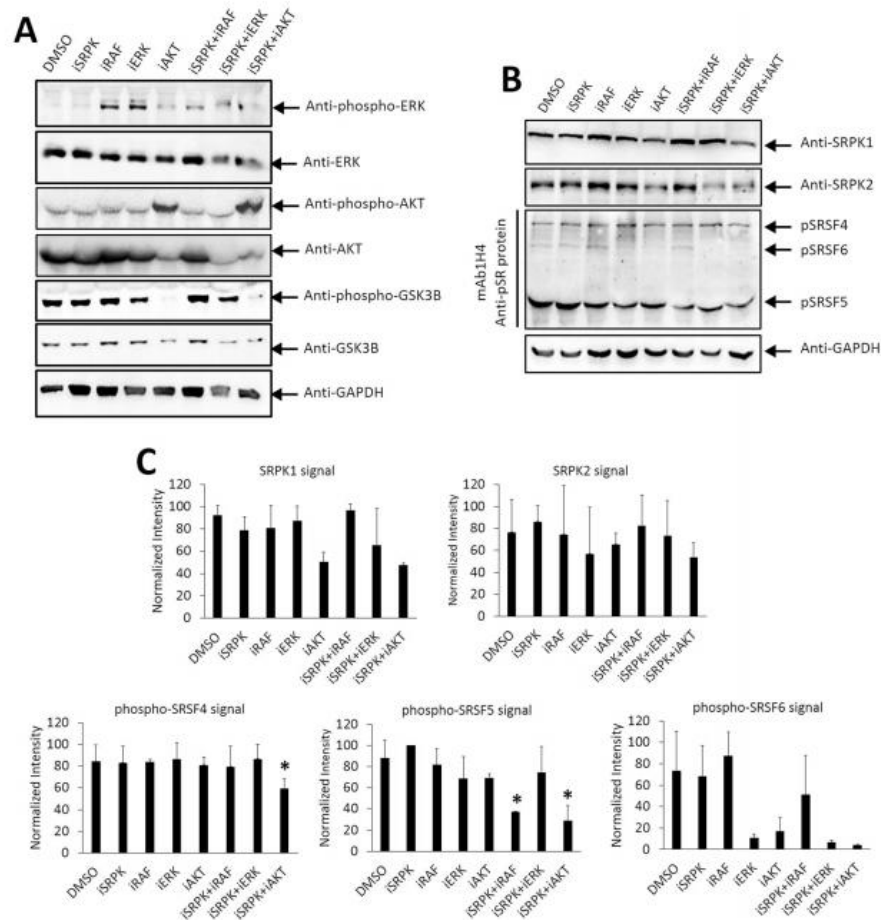


Fig. 3. Effect of treatments on EGFR pathway downstream elements. Jurkat cells were treated with 10 μ M of the indicated inhibitor, either isolated or in combination, for 24 h. (A) The cell lysate of each treatment was subjected to western blotting analysis using the indicated antibodies. (B) SR protein phosphorylation was detected using mAb1H4, which recognizes phosphorylated serine-arginine epitopes in multiple SR factors (Mahiet and Swanson, 2016; Zahler et al., 1992). The blots were re-probed with anti-GAPDH, used as an endogenous control. (C) Band intensities were normalized to the GAPDH signal, used to control the amount of protein in each analysis. Densitometry was performed using the ImageJ software. The values are expressed as the means \pm standard deviation (*t*-tests, **P* < .05). One representative experiment of three is shown for each analysis.

already approved for clinical use or under clinical investigation (Fig. 1).

In previous studies, SRPIN340 presented cytotoxic effect on leukemic cell lines with differential expression levels of SRPK1 and SRPK2 (Siqueira et al., 2015). In the present investigation, Jurkat, CCRF-CEM, and TALL-1 cells (high SRPK expression) were synergistically affected by the iSRPK/iAKT combination, while HL60 cells (low SRPK expression) remained unaffected (Fig. 2 and Table 1). Although the difference in SRPK expression is obviously insufficient to explain the observed treatment outcomes, this apparent correlation is at least intriguing and deserves consideration in other studies. Despite the well-known low potency and poor bioavailability of SRPIN340 (Gammons et al., 2014), the data obtained here collectively highlights the relevance of

pharmacologically inhibiting SRPK in combination with AKT in T-ALL and possibly other cancer types.

The selected treatments were able to inhibit the intended targets in EGFR signaling, as revealed by western blotting experiments (Fig. 3A-C). Additionally, these results may generate some mechanistic insights for the iSRPK/iAKT synergistic effect. For instance, the combined treatments decreased the phospho-signal of SRSF5 (Fig. 3), a SR protein known to be activated by PI3K-Akt-mTOR to favor the expression of cancer-related spliced isoforms (Siegfried et al., 2013). Considering that SRSF5 can be also activated by SRPK in the context of PI3K-AKT activation (Zhou et al., 2012), the inhibition of AKT and SRPK can impair SRSF5 activation from AKT-activated mTOR and SRPK. Another

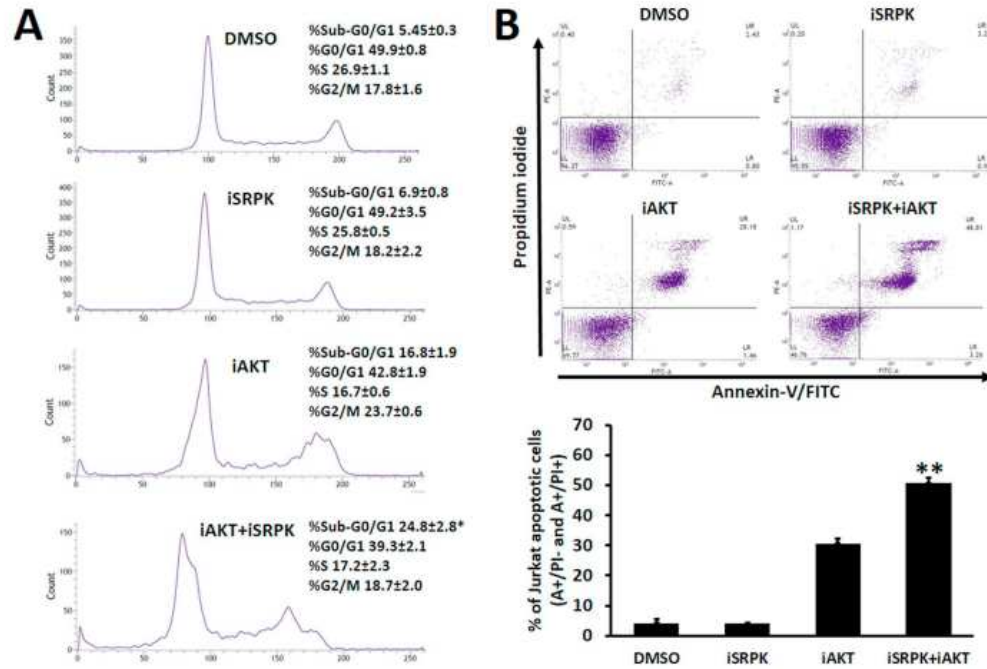


Fig. 4. The effect treatments on Jurkat cell death and cell cycle. Jurkat cells were treated with 10 μ M of the indicated inhibitors isolated or in combination, for 24 h. Cell cycle (A) was evaluated using propidium iodide (PI) labels, and cell death (B) was evaluated using annexin-V/FITC and propidium iodide (PI) labels, followed by flow cytometry analysis. One representative experiment is shown. Numerical data represent the means \pm standard deviation from triplicate experiments. t-tests, * $P < .05$ and ** $P < .01$.

potential mechanism might rely on the unexpected suppressive effect of iAKT on SRPK expression, which may contribute to potentializing the pharmacological inhibition of SRPK (Fig. 3). This finding seems to be in accordance with the well-known role of increased PI3K-AKT activity in T-ALL due to PTEN mutation (Gutierrez et al., 2009; Zuurber et al., 2012). Certainly, all these speculations make sense in the context of the obtained data but also surely deserve further functional clarification in future studies.

It was herein demonstrated that apoptosis was greatly increased in Jurkat cells when SRPK and AKT were inhibited in combination at 10 μ M (Fig. 4). Considering that SRPK2 knock down renders G1 arrest in K562 leukemia cells (Jang et al., 2008), we could not discard this effect if a higher dose of SRPIN340 were used or a more potent SRPK inhibitor were approached. In fact, further studies should be performed to obtain a more detailed view of the iSRPK/iAKT synergistic action.

In summary, we evaluated the effects of combined treatments between pharmacological inhibitors of SRPK and other kinases downstream from EGFR activation on leukemia cells. Cytotoxicity assays showed that some combinations were synergistic against the lymphoid leukemia cell lines, and the iSRPK/iAKT combination was found to be the most relevant. The iSRPK/iAKT also decreased the hyperphosphorylation of SR proteins and other expected targets downstream from the EGFR pathway. Furthermore, synergism was associated to apoptosis triggering. Considered together, our data suggest that a combination of SRPK-AKT inhibition can be synergistic and considered in further studies involving T-ALL and potentially other cancer types.

Acknowledgments and funding sources

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 420648/2016-0), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) (grants CEX-APQ-01287/14, CBB-APQ-02556-15 and RED-00140-16) and in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. RPS held a CNPq post-doctoral fellowship (Bolsista de Pós-doutorado Júnior do CNPq) and now holds a CAPES post-doctoral fellowship (Bolsista INCT-Nanofarma/CAPES). The authors are also thankful to the Núcleo de Microscopia e Microanálise (Universidade Federal de Viçosa) for supporting flow cytometry analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104777>.

References

- Amin, E.M., Oltean, S., Hua, J., Gammons, M.V.R., Hamdollah-Zadeh, M., Welsh, G.I., Cheung, M.K., Ni, L., Kase, S., Rennel, E.S., Symonds, K.E., Nowak, D.G., Royer-Pokora, B., Saleem, M.A., Hagiwara, M., Schumacher, V.A., Harper, S.J., Hinton, D.R., Bates, D.O., Ladomery, M.R., 2011. WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. *Cancer Cell* 20, 768–780. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.016>.
- Banerjee, K., Das, S., Sarkar, A., Chatterjee, M., Biswas, J., Choudhuri, S.K., 2016. A copper chelate induces apoptosis and overcomes multidrug resistance in T-cell acute lymphoblastic leukemia through redox imbalance and inhibition of EGFR/PI3K/Akt expression. *Biomed. Pharmacother.* 84, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.056>.
- Batson, J., Toop, H.D., Redondo, C., Babaci-Jadidi, R., Chaikuad, A., Wearmouth, S.F., Gibbons, B., Allen, C., Tallant, C., Zhang, J., Du, C., Hancox, J.C., Hawtrey, T., Da Rocha, J., Griffith, R., Knapp, S., Bates, D.O., Morris, J.C., 2017. Development of potent, selective SRPK1 inhibitors as potential topical therapeutics for neovascular eye disease. *ACS Chem. Biol.* 12, 825–832. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01048>.
- Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>.
- Dong, Z.Y., Noda, K., Kanda, A., Fukuhara, J., Ando, R., Murata, M., Saito, W., Hagiwara, M., Ishida, S., 2013. Specific inhibition of serine/arginine-rich protein kinase attenuates choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* 19, 536–543.
- Dumble, M., Crouthamel, M.C., Zhang, S.Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D.J., Minihorn, E.A., Seefeld, M.A., Rouse, M.B., Rabindran, S.K., Heerding, D.A., Kumar, R., 2014. Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100880>.
- Fukuhara, T., Hosoya, T., Shimizu, S., Sumi, K., Oshiro, T., Yoshinaka, Y., Sasaki, M., Yamamoto, N., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., Hagiwara, M., 2006. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11329–11333. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604616103>.
- Gammons, M.V., Fedorov, O., Ivson, D., Du, C., Clark, T., Hopkins, C., Hagiwara, M., Dick, A.D., Cox, R., Harper, S.J., Hancox, J.C., Knapp, S., Bates, D.O., 2013. Topical antiangiogenic SRPK1 inhibitors reduce choroidal neovascularization in rodent models of exudative AMD. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 6052–6062. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12422>.
- Gammons, M.V., Lucas, R., Dean, R., Coupland, S.E., Oltean, S., Bates, D.O., 2014. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* 111, 477–485. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.342>.
- Goncalves, V., Henriques, A., Pereira, J., Neves Costa, A., Moyer, M.P., Moita, L.F., Gama-Carvalho, M., Matos, P., Jordan, P., 2014. Phosphorylation of SRSF1 by SRPK1 regulates alternative splicing of tumor-related Rac1b in colorectal cells. *RNA* 20, 474–482. <https://doi.org/10.1261/rna.041376.113>.
- Gutiérrez, A., Sando, T., Greblinaite, R., Carracedo, A., Salmena, L., Ahn, Y., Dahlberg, S., Neuberg, D., Moreau, L.A., Winter, S.S., Larson, R., Zhang, J., Protosopov, A., Chin, L., Pandolfi, P.P., Silverman, L.B., Hunter, S.P., Sallan, S.E., Look, A.T., 2009. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 114, 647–650. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206722>.
- Hatcher, J.M., Wu, G., Zeng, C., Zhu, J., Meng, F., Patel, S., Wang, W., Ficarro, S.B., Leggett, A.L., Powell, C.E., Marto, J.A., Zhang, K., Ki Ngo, J.C., Fu, X.D., Zhang, T., Gray, N.S., 2018. SRPKIN-1: a covalent SRPK1/2 inhibitor that potently converts VEGF from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoform. *Cell Chem. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.01.013>.
- Hayes, G.M., Carrigan, P.E., Miller, L.J., 2007. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res.* 67, 2072–2080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2969>.
- Hishizawa, M., Imada, K., Sakai, T., Ueda, M., Hori, T., Uchiyama, T., 2005. Serological identification of adult T-cell leukaemia-associated antigens. *Br. J. Haematol.* 130, 382–390. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05619.x>.
- Jang, S.W., Yang, S.J., Ehlén, A., Dong, S., Khoury, H., Chen, J., Persson, J.L., Ye, K., 2008. Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating actin and regulating cyclin A1. *Cancer Res.* 68, 4559–4570. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0021>.
- Jang, S.W., Liu, X., Fu, H., Rees, H., Yepes, M., Levy, A., Ye, K., 2009. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 mediates cell cycle and cell death in neurons. *J. Biol. Chem.* 284, 24512–24525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.026237>.
- Kern, D., Regl, G., Hofbauer, S.W., Altenhofer, P., Achatz, G., Dlugosz, A., Schneider, H., Greil, R., Hartmann, T.N., Aberg, F., 2015. Hedgehog/GLI and PI3K signaling in the initiation and maintenance of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 34, 5341–5351. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.450>.
- Lee, S.C.W., Abdel-Wahab, O., 2016. Therapeutic targeting of splicing in cancer. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/nm.4165>.
- Levy, D.S., Kahana, J.A., Kumar, R., 2009. AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 113, 1723–1729. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137737>.
- Lin, J.C., 2018. Therapeutic applications of targeted alternative splicing to cancer treatment. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19010075>.
- Locatelli, F., Schrappe, M., Bernardo, M.E., Rutella, S., 2012. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-265884>.
- Lu, D., Chen, E., Wu, H., Lu, T., Xu, R., Ding, J., 2017. Anticancer drug combinations, how far we can go through? *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 17, 21–28.
- Mahiet, C., Swanson, C.M., 2016. Control of HIV-1 gene expression by SR proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1417 LP–1425. <https://doi.org/10.1042/BST20160113>.
- Mokhtari, R.B., Homayouni, T.S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., Yeger, H., 2017. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 8. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16723>.
- Moreira, G.A., de Lima, G.D.A., Siqueira, R.P., de Barros, M.V.A., Adjanohou, A.L.M., Santos, V.C., de Barbosa, É.A.A., Loterio, R.K., de Faiva, J.C., Goncalves, V.H.S., de Viôl, L.C.S., de Marques-da-Silva, E.A., Júnior, A.S., Almeida, M.R., Fietto, J.L.R., Machado-Neves, M., Ferreira, R.S., Teixeira, R.R., Bressan, G.C., 2018. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 356, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.08.012>.
- Morooka, S., Hoshina, M., Kii, I., Okabe, T., Kojima, H., Inoue, N., Okuno, Y., Denawa, M., Yoshida, S., Fukuhara, J., Niinomiya, K., Ikura, T., Furuya, T., Nagano, T., Noda, K., Ishida, S., Hosoya, T., Ito, N., Yoshimura, N., Hagiwara, M., 2015. Identification of a dual inhibitor of SRPK1 and CK2 that attenuates pathological angiogenesis of macular degeneration in mice. *Mol. Pharmacol.* 88, 316–325. <https://doi.org/10.1124/mol.114.097345>.
- Salesse, S., Dylla, S.J., Verfaillie, C.M., 2004. p210BCR/ABL-induced alteration of pre-mRNA splicing in primary human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* 18, 727–733. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403310>.
- Siegrfried, Z., Bonomi, S., Ghigna, C., Karni, R., 2013. Regulation of the Ras-MAFK and PI3K-mTOR signalling pathways by alternative splicing in cancer. *Int. J. Cell Biol.* 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/568931>.
- Siqueira, R.P., Barbosa, É.A., Polito, M.D., Righetto, G.L., Seraphim, T.V., Salgado, R.L., Ferreira, J.G., De Andrade Barros, M.V., De Oliveira, L.L., Laranjeira, A.B.A., Almeida, M.R., Júnior, A.S., Fietto, J.L.R., Kobarg, J., De Oliveira, E.B., Teixeira, R.R., Borges, J.C., Yunes, J.A., Bressan, G.C., 2015. Potential anti-leukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(Trifluoromethyl) phenyl) isonicotinamide (SRP340). *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134882>.
- Siqueira, R.P., Barros, M.V.D.A., Barbosa, É.D.A.A., Onofre, T.S., Goncalves, V.H.S., Pereira, H.S., Silva Júnior, A., de Oliveira, L.L., Almeida, M.R., Fietto, J.L.R., Teixeira, R.R., Bressan, G.C., 2017. Trifluoromethyl arylamides with anti-leukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *Eur. J. Med. Chem.* 134. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.078>.
- Terwilliger, T., Abdul-Hay, M., 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 7, e577. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>.
- Tzelepis, K., Koike-Yusa, H., De Braekeleer, E., Li, Y., Metzkapian, E., Dovey, O.M., Mupo, A., Grinkevich, V., Li, M., Mazan, M., Gozdecka, M., Ohnishi, S., Cooper, J., Patel, M., McKerrill, T., Chen, B., Domingues, A.F., Gallipoli, P., Teichmann, S., Foustighi, H., McDermott, U., Saez-Rodriguez, J., Huntly, B.J.P., Iorio, F., Pina, C., Vassiliou, G.S., Yusa, K., 2016. A CRISPR dropout screen identifies genetic vulnerabilities and therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Cell Rep.* 17, 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.079>.
- Wee, P., Wang, Z., 2017. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>.
- Xiao, X., Ye, X., Xu, C., Huang, J., 2018. Successful alternative treatment for relapsed adult acute lymphoblastic leukemia with dendritic cells-cytokine-induced killer cells combined with a rituximab-based regimen. *Oncol. Targets Ther.* 11, 7555–7558.
- Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A., Roth, M.B., 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev.* 6, 837–847. <https://doi.org/10.1101/gad.6.5.837>.
- Zhou, Z., Qiu, J., Liu, W., Zhou, Y., Plocinik, R.M., Li, H., Hu, Q., Ghosh, G., Adams, J.A., Rosenfeld, M.G., Fu, X.D., 2012. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Mol. Cell* 47, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.014>.
- Zuurber, L., Petricoin, E.F., Vuorhard, M.J., Calvert, V., Kooi, C., Bujijs-Gladines, J.G.C.A.M., Smits, W.K., Sonneveld, E., Veerman, A.J.P., Kamps, W.A., Horstmann, M., Pieters, R., Meijerink, J.F.P., 2012. The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 97, 1405–1413. <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.059030>.

Effect of the topical administration of N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide compound in a murine subcutaneous melanoma model

Juliana Alves do Vale^a, Ana Paula Martins de Souza^b, Graziela Domingues Almeida Lima^a, Victor Hugo Sousa Gonçalves^c, Gabriela Alves Moreira^c, Marcus Vinicius de Andrade Barros^b, Wagner Luiz Pereira^b, Nara Clara Lazaroni e Merchid^a, Juliana Lopes Rangel Fietto^c, Gustavo Costa Bressan^c, Róbson Ricardo Teixeira^b and Mariana Machado-Neves^a

Conventional treatments for metastatic melanomas are still ineffective and generate numerous side effects, justifying the search for new therapies. The antimetastatic effect of the named N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide (SRVIC30) compound has been previously demonstrated in murine melanoma. Herein, we aimed to evaluate its effect when topically administered in a murine subcutaneous melanoma model. For that, mice C57BL/6 were injected subcutaneously with 2×10^5 B16-F10 cells. Topical treatment began when tumors became visible on animal's back. Therefore, tumor volume was measured three times a week until it reaches 12 mm³ approximately. At this point, 40 mg oil-in-water cream (Lanette) without (control mice; $n=10$) or with SRVIC30 compound (SRVIC30 group; $n=10$ animals) were spread daily over the tumor external surface using a small brush for 14 days. The treatments increased the percentage of peroxidase antioxidant enzyme and dead cells via caspase-3 activation, with a

consequent deposit of collagen fibers in the tumors. In addition, the skin of treated animals showed the presence of inflammatory infiltrate. Finally, SRVIC30 did not show signs of toxicity. Thus, we concluded that the topic administration of SRVIC30 was able to influence crucial anticancer processes such as tumor cells apoptosis and surrounding microenvironment. *Anti-Cancer Drugs* 31: 718–727 Copyright © 2020 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Anti-Cancer Drugs 2020, 31:718–727

Keywords: antitumor, melanoma, protein kinases, serine/arginine-rich, SRVIC30, treatment

^aDepartamento de Biologia Geral, ^bDepartamento de Química and ^cDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG, Brazil

Correspondence to Mariana Machado-Neves, Federal University of Viçosa, Av. P.H. Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa 36570-900, Minas Gerais, Brazil Tel: +55 31 3899 3360; fax: +55 31 3899 2549/+55 31 3899 3209; e-mail: mariana.mneves@ufv.br

Received 4 February 2020 Revised form accepted 9 April 2020

Introduction

Cutaneous melanoma is considered the most aggressive form of skin cancer. Besides its great potential of metastasis, melanoma cell lines are usually refractory to commonly used anticancer drugs, which dramatically increases the number of patient deaths [1–3]. Over the past decades, surgical resection of early tumors represented the unique therapeutic option. Chemotherapy, in turn, has been used in the treatment of advanced-stage melanoma [3,4]. Notwithstanding, both treatments may not be effective on tumor stem cells that trigger an important mechanism of resistance and, in the end, act as a major barrier to complete cure of patients [2,3,5]. Besides classical chemotherapy, immuno and targeted therapies are currently available and these new treatments have improved the clinical outcome of a significant proportion of patients. Still, there are patients that do not respond, as

well as those that relapse [3]. Therefore, there would still be an important gap to be studied with the use of these new compounds. For that reason, it is imperative for the development of alternative strategies with enhanced safety and efficacy to overcome this challenge [6].

In this sense, antitumor treatments acting directly on specific target molecules are very promising [7]. Particularly, members of the serine/arginine protein kinases family (SRPK) may be considered important targets due to their overexpression in various types of cancers, including cutaneous melanoma [8–10]. The enzymes SRPK1 and SRPK2 regulate the activity of the splicing factors from the serine/arginine-rich proteins (SR proteins) family via phosphorylation of their RS domains [11]. Once SRPKs are part of the cellular splicing machinery, the dysregulation of this process contributes to the development of cancer and other diseases [8,9,11,12]. Therefore,

pharmacological inhibition of SRPK has been considered an important strategy in terms of cancer therapy [8,13].

Specifically, the compound N-(2-(piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)isonicotinamide (SRPIN340) has been selected as a specific inhibitor of SRPK1 and 2 [14,15]. Although SRPIN340 has poor pharmacological properties, its activity against different tumor types reinforces the therapeutic potential of the pharmacologic inhibition of SRPK [8,13,16,17]. In this light, our group recently has selected the compound N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide (SRVIC30), an analog from SRPIN340, as able to impair SRPK intracellular activity and to possess antileukemia and antimetastatic melanoma activity in-vitro and in-vivo assays [13,17]. *In vivo*, the SRVIC30 showed no toxicity to mice inoculated with B16-F10 cells in the caudal vein and no alteration in their clinical signs and body conditions. Moreover, the intraperitoneal administration of the compound was able to reduce the number of tumor nodules in lung tissues in a murine model of metastatic melanoma [13].

In this framework, the present study aimed to evaluate the effect of the topical administration of SRVIC30 in a murine cutaneous melanoma model *in vivo* focusing on morphological and immunofluorescence approaches. Our findings suggest that SRVIC30 can affect the tumor cells and their surrounding microenvironment when topically administered. This can shed new light on its potential for eradicating remaining cells in combination with tumor excision and chemotherapy and for the topical treatment on primary melanomas

Material and methods

Compound

The compound N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide (SRVIC30) was synthesized and characterized as described in our previous study [17]. It was added in 1 g oil-in-water cream (Lanette, BASF, Ludwigshafen, Germany), a commercial ointment ideal for preparation of creams, at the concentration of 50 mg. This concentration was determined according to the amount of imiquimod present in creams (5%) widely used to treat superficial basal cell carcinoma.

Tumor cell line and cell culture

B16-F10 melanoma cell line was kindly provided by Prof. Anésia Aparecida dos Santos (Department of General Biology, UFV, Viçosa, MG, Brazil). Those cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (LGC Biotecnologia), 100 g/mL streptomycin, and 100 units/mL penicillin at pH 7.2 at 37°C under 5% CO₂ atmosphere.

Animals

Twenty male C57BL/6 mice (7–8 weeks old) were provided by the Central Animal Facility of the Center of the

Biological and Health Sciences of UFV. The animals were housed individually in polypropylene cages, under controlled temperature (21°C) and 12:12 h light/dark cycles. All animals received free access to rat chow (Nuvilab) and drinking water *ad libitum*. The experimental procedures were conducted in agreement with the ethical principles in animal research adopted by the Ethics Committee of Animal use of UFV (ECAU protocol 41/2016).

Experimental design

After 2 weeks of acclimatization, mice had a small area of their back depilated, and 2×10^5 B16-F10 cells were injected subcutaneously 24 h later. The cell number used herein was determined in previous experiments from our research group (unpublished data). Topical treatment began when tumors became visible on animal's back. For that, tumor volume was measured three times a week until it reaches 12 mm³ approximately [18, modified]. At this point, 40 mg oil-in-water cream (Lanette) without (control mice; $n=10$) or with SRVIC30 compound (SRVIC30 group; $n=10$ animals) were spread daily over the tumor external surface using a small brush for 14 days. The amount of cream used was based on the IC₅₀ of SRVIC30 [13] and the methodology described by Rodrigues *et al.* [18] with modifications. Accordingly, 2 mg of SRVIC30 was used daily in tumor treatment. Body weight and tumor volumes (*V*) were measured three times a week during the experimental treatment. The tumor volume was obtained using the formula V (volume) = $0.52 \times D1^2 \times D2$, where D1 and D2 are short and long tumor diameters, respectively [19]. Clinical signs were also analyzed.

Euthanasia, tissue collection, and biometric analysis

On the 15th day of the experiment, mice were weighed and euthanized by deep anesthesia using ketamine hydrochloride (150 mg/kg/ip) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg/ip). The lung, liver, spleen, and kidney were removed and weighed. Particularly, fragments of liver were collected and fixed for histological analysis in order to evaluate hepatic tissue damages. Moreover, a fragment of peritumoral skin was removed along with the tumor. First, the peritumoral skin was sectioned and fixed for histological analysis, and then the tumor was weighted. The relative weight of organs/tumor was calculated by the ratio between their absolute weight/body weight $\times 100$. Finally, two fragments per tumor were assessed under light and epifluorescence microscopy. One fragment was fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, at room temperature during 24 h for histological and stereological analyses. The other fragment, in turn, was fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 during 2 h for immunofluorescence analysis.

Determination of serum hepatic biomarkers

Blood samples collected during euthanasia by cardiac puncture were centrifuged at 2000g for 15 min, and the

serum was stored at -20°C . Quantification of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) was assessed using colorimetric kits (Bioclin Laboratories, Belo Horizonte, MG, Brazil) suitable for the BS-200E equipment (Bioclin Laboratories) in accordance with the manufacturer's instructions.

Histological processing and stereological analysis

Fragments from the peritumoral skin and tumor were dehydrated in crescent ethanol series for embedding in paraffin. Sections with a thickness of $4\ \mu\text{m}$ were obtained using a rotary microtome (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, Germany). While some histological sections were stained with hematoxylin/eosin and toluidine blue for evaluating tissue architecture and its organization, other sections were stained with PicroSirius Red to evaluate the presence of collagen fibers. Tissues were then analyzed qualitatively under light microscope (Olympus BX-50, Tokyo, Japan).

For stereological analysis, digital images from tumor tissue sections were obtained using a light microscope (Olympus BX-53) connected to a digital camera (Olympus DP73) and analyzed with the Image-Pro Plus[®] 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) software. The volumetric proportion was obtained by counting 5000 points, per animal, projected onto 10 histological fields of tumor tissue at $200\times$ magnification. Coincident points over the tumor components were recorded: tumor cells, dead cells, mitotic figures (it means mitotic cells showing visible chromosomes under light microscopy), blood vessels, inflammatory infiltrate, melanin, and connective tissue. The volume of each component was calculated using the following formula: $V = \text{PP}/\text{PT} \times 100$, where PP is the number of points located on the interest structure and PT is the total number of points in the histological area [20].

Assessment of cell viability

Other histological sections of tumor and peritumoral skin were used for staining with 0.02% acridine orange (green) and 1% propidium iodide (red) for evaluating cell viability. Acridine orange is a dye that stains both viable and nonviable cells, whereas propidium iodide stains only cells that lost their membrane integrity [21]. Viable cells display a green nucleus with round intact structure. In contrast, nonviable cells exhibit yellow to orange coloration depending on the degree of loss of membrane integrity due to co-staining with propidium iodide. Slides were mounted with glycerin and analyzed qualitatively under epifluorescence microscope (EVOS) (Life Technologies, Carlsbad, Canada) using the GFP LED CUBE and RFP LED CUBE filters [17,22].

Analysis of apoptosis and antioxidant enzyme by immunofluorescence

After 2 h of fixation, tumor fragments were washed in 0.1M sodium phosphate buffer, pH 7.2, plus 1% Tween-20 (PBST) for 2 h. Thereafter, the samples were

incubated with primary antibodies diluted in PBST: (1) anticlaved caspase-3 (1:500; Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, Massachusetts, USA) and (2) antiperoxidase (1:800; Cell Signaling Technology, Inc.) for 24 h at 4°C . The samples were then washed in PBS (for 10 min each) and incubated with antirabbit IgG-TRITC conjugated (1:500; Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) for 24 h at 4°C . Finally, samples were washed in PBS, dehydrated in crescent ethanol series, and embedding in 2-hydroxyethyl methacrylate (Historesin, Leica, Nussloch, Germany). Sections with a thickness of $10\ \mu\text{m}$ were obtained as previously described, and stained with 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1:500; Biotium, Inc., Hayward, California, USA) for 30 min. The samples were washed, mounted on Mowiol (Sigma), and analyzed under epifluorescence microscope (EVOS) using GFP LED CUBE and RFP LED CUBE filters. Ten histological fields of tumor sections per animal were used for counting cells labeled with both primary antibodies previously described. Likewise, negative controls in which the primary antibody was omitted were included in immunofluorescence studies.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6.0 statistical software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). All data were tested for normality with the D'Agostino-Pearson Test, and accordingly submitted to unpaired t-test (parametric data) or Mann-Whitney (nonparametric data). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Results were expressed as mean \pm SEM.

Results

Evaluation of toxicological parameters

During the experimental period, no altered clinical signs were observed in all mice, excepting the presence of tumor on their back. Topical administration of SRVIC30 did not affect negatively the body weight of animals after 14 days of treatment, as well as the weights of the lung, liver, spleen, and kidney compared to control mice ($P > 0.05$; Table 1). In the case of the liver, its functional biochemical markers and histology were assessed in order to verify possible damages to liver functions and tissue, respectively (Fig. 1a and b). Based on that, no difference was observed between groups for serum AST and ALT (Fig. 1a; $P > 0.05$). Furthermore, the liver histology showed normal tissue architecture in animals from both groups. Overall, the tissue presented hepatocyte cords composed of mono and binucleated cells interspersed with sinusoid capillaries, besides lobular center vein (Fig. 1b).

SRVIC30 increased inflammatory infiltrate in the peritumoral skin

In SRVIC30-treated mice skin, inflammatory infiltrate was observed in the epidermis and dermis, including

areas with pyknotic cells (dead cells) that, in the end, altered the normal structure of the skin tissue (Fig. 2). On the other hand, the skin of control animals presented normal tissue architecture, exhibiting a stratified squamous keratinized epithelium (epidermis) supported by connective tissue with hair follicles (dermis).

Table 1 Biometric parameters of C57BL/6 mice inoculated with 2×10^5 B16-F10 murine melanoma cells subcutaneously into the back, and topically treated with a SRVIC30-containing cream (SRVIC30) and cream without SRVIC30 (control) daily for 14 days

	Control (n=10)	SRVIC30 (n=10)
Initial body weight (g)	20.47 ± 0.49	21.74 ± 0.47
Final body weight (g)	21.63 ± 0.50	23.17 ± 0.30
Lung (g)	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01
Lung (g/100g)	0.88 ± 0.04	0.81 ± 0.04
Liver (g)	1.08 ± 0.04	1.14 ± 0.03
Liver (g/100g)	4.98 ± 0.11	4.91 ± 0.14
Spleen (g)	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00
Spleen (g/100g)	0.25 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Kidneys (g)	0.28 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Kidneys (g/100g)	1.30 ± 0.02	0.46 ± 0.03

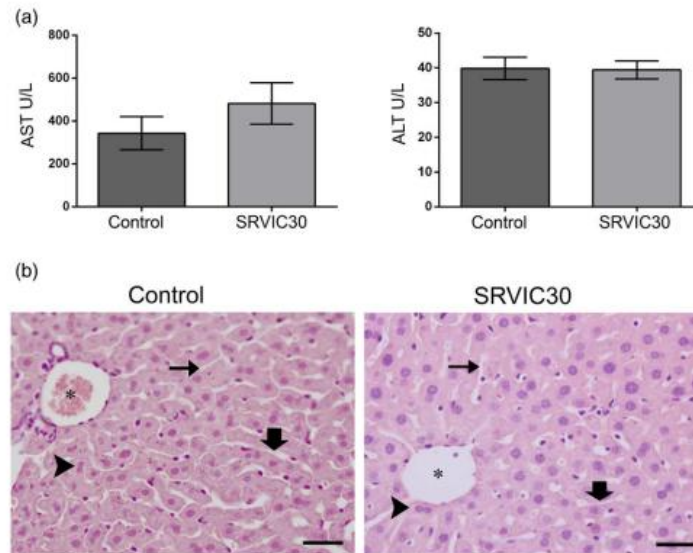
Values are expressed as mean ± SEM. $P > 0.05$ by unpaired *t*-test.
SRVIC30, N-(2-(4-bromophenylamino)-5-(trifluoromethyl)phenyl)nicotinamide.

SRVIC30 increased the percentage of dead cell via caspase-3 and peroxidase positive cells in the tumor from treated animals

Overall, B16-F10 cells at 2×10^5 cells/mice were able to develop melanoma in all animals. Although we observed a reduction of tumor size in animals treated with SRVIC30 in relation to control mice, the tumor's weight and volume did not differ between groups (data not shown). Specifically, we observed a slight reduction in their volume in SRVIC30-treated animals from day 7.

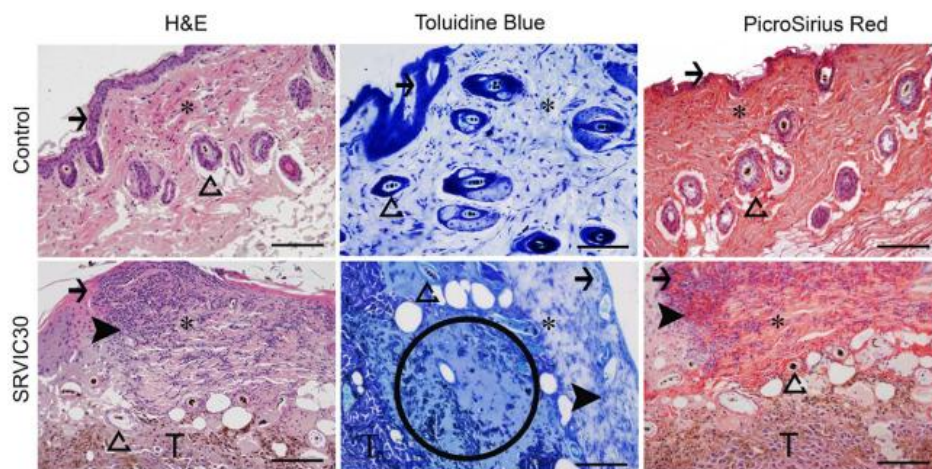
Tumors from control and SRVIC30-treated mice exhibited neoplastic cells interspersed by blood vessels, large amounts of melanin (Fig. 3a), and cells in mitosis (data not shown). In addition, collagen fibers were observed surrounding blood vessels in its tissue from animals of both groups. Differently to control animals, tumors from SRVIC30-treated mice presented collagen fibers also bypassing neoplastic cells (Fig. 3a). Nevertheless, the proportion of connective tissue, as well as blood vessel, mitotic cells, melanin, and inflammatory infiltrate did not differ between groups ($P > 0.05$; Fig. 3b). Furthermore, SRVIC30-treated tumors had an increase in the

Fig. 1



Biochemical serum markers of liver damage and hepatic histology from C57BL/6 mice topically treated with SRVIC30-containing cream (SRVIC30) and cream without SRVIC30 (control) daily for 14 days (a) Data are expressed as mean ± SEM. $P > 0.05$ by unpaired *t*-test. (b) Hepatic tissues showing normal tissue architecture, with hepatocyte cords (arrow) interspersed with sinusoid capillaries (fine arrow), lobular center vein (asterisk), and the presence of binucleated hepatocytes (arrow head). Hematoxylin and eosin. Scale bar: 20 μ m. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase.

Fig. 2



Histological sections of skin from control and SRVIC30-treated C57BL/6 mice, analyzed under light microscopy. The skin sections show the epidermis (fine arrow) with stratified epithelium, and the dermis (*) composed of hair follicle (triangle) surrounded by connective tissue. Skin sections of SRVIC30-treated mice showed areas of inflammatory infiltrate (arrow heads) and dead cells (circle) near the tumor (T), altering the architecture of these layers. Hematoxylin-eosin, toluidine blue, and picrosirius red. Scale bars: 100 μ m.

percentage of dead cells compared to tumors in their controls ($P < 0.05$; Fig. 3b). This fact was confirmed when we assessed the cell viability by acridine orange staining (Fig. 4). In this case, the intensity of red labeling in neoplastic cells was greater in SRVIC30-treated animals than control animals. Moreover, the number of caspase-3-labeled cells in SRVIC30-treated animals increased compared to control mice ($P < 0.05$; Fig. 5a). Additionally, tumors treated with SRVIC30 presented an increased number of peroxidase-positive cells in relation to tumors treated with Lanette cream only ($P < 0.05$; Fig. 5b).

Discussion

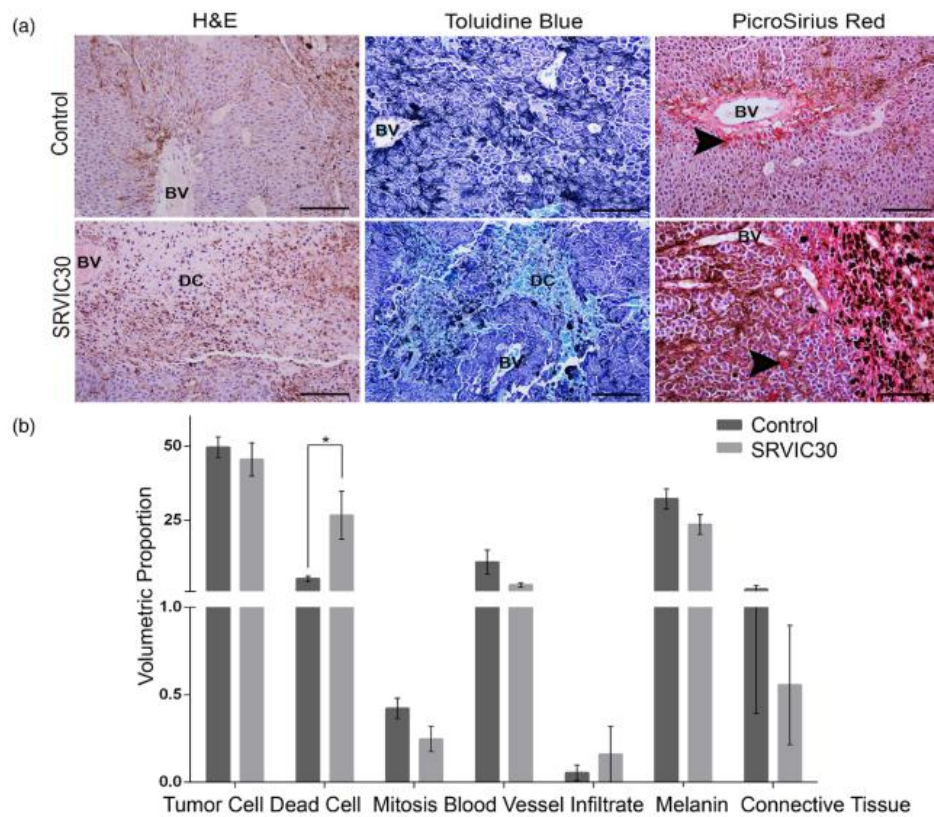
The present study was undertaken to evaluate the effect of SRVIC30 compound used topically in the treatment of melanoma in C57BL/6 mice. Our findings showed that this compound was able to increase the cell death of neoplastic cells in treated animals, with a redistribution of collagen fibers inside the tumor. Those alterations, in turn, were not reflected in the tumor weight and volume, as well as in the stereology of other tissue components. Ultimately, SRVIC30-treated mice did not present clinical alterations evidencing systematic toxicity as hepatic disorders.

The SRVIC30 compound has previously shown promising activity against metastatic behavior of B16-F10 cells *in vitro*, based on migration, invasion, adhesion, and colony formation assays. It was also efficient in reducing the

occurrence of lung nodules in induced-lung metastasis [13]. Based on the findings, authors concluded that this SRPIN340 analogue presented greater cytotoxicity than the original molecule [13], being capable to inhibit cellular activities of melanoma and leukemia cell lines [13,17]. In the current *in-vivo* study, the compound increased the cell death event in B16-F10 melanoma cells, which are considered one of the most aggressive cell lines [23]. The cell death event was primarily identified herein by the great percentage of pyknotic cells in tumor tissues of SRVIC30-treated animals. Indeed, these cells exhibited chromatin condensation that is the most characteristic feature of apoptosis [24]. Additionally, they were positively labeled by propidium iodide, which indicates a loss of membrane integrity in neoplastic cells [21]. In accordance with our findings, cell death involved apoptosis through caspase-3 activation. This enzyme is an important effector protein of the cellular apoptosis pathway [24]. Likewise, the apoptotic process has been also observed in leukemic cells after exposure of them to SRPIN340 and its analogues [16,17].

One of the most striking features observed in the present investigation was the great production of peroxidase in tumors treated with SRVIC30 compound. Peroxidase is an enzyme that catalyzes the breakdown of hydrogen peroxide and is part of the antioxidant enzyme defense system of the cell. These antioxidants molecules act against free radicals to prevent their damaging effects

Fig. 3

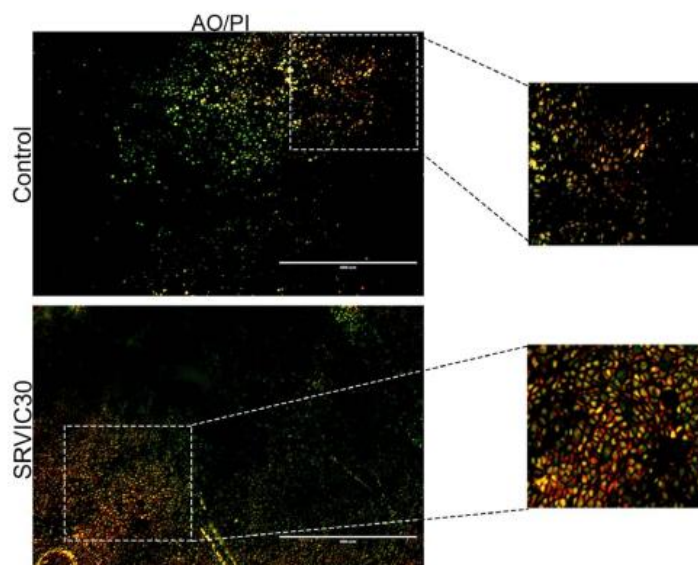


Effect of SRVIC30 on B16-F10 murine melanoma in C57BL/6 mice. (a) Tumor tissue sections showing neoplastic cells, melanin, blood vessels (BV), dead cell (DC), connective tissue with collagen fibers (arrow heads). Hematoxylin-eosin, toluidine blue and picrosirius red. Scale bars: 100 μ m. (b) Histomorphometry in tumor tissue of control and SRVIC30-treated C57BL/6 mice. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by unpaired *t*-test.

to macromolecules and finally in body tissues [25,26]. The free radicals overproduction disrupts the tissue homeostasis leading to apoptosis [27]. This mechanism is exactly caused by some antitumor compounds during melanoma treatment [28–31]. It is known that reactive oxygen species (ROS) increase can directly cause damage to nuclear and mitochondrial DNA activating the cell death program. Basically, the intrinsic pathways of cell death rely on the increase of the mitochondrial outer membrane permeability that causes mitochondria-to-cytosol release of apoptogenic proteins such as Cytochrome-c. This, in turn, triggers cell death in either a caspase-dependent or independent manner

[32]. Herein, we observed increased caspase-3-immunolabeled cells, corroborating with the idea that apoptosis occurred by the caspase-dependent pathway. Therefore, we suggest that apoptosis was caused by topical treatment with SRVIC30 compound through the induction of oxidative stress. How exactly this finding is related to inhibited SRPK pathways or due to immunological system activity are unknown and should be better investigated in future studies. Nevertheless, the privation of tumor promoters events in order to equalize the balance for apoptotic signaling induced by free radicals can be new therapeutic strategies for cancer treatment [33].

Fig. 4



Histological sections of tumor from control and SRVIC30-treated C57BL/6 mice using topically oil-in-water cream (Lanette). Tumor cells were stained with fluorochrome dyes acridine orange (green) and propidium iodide (red). In these figures is possible to observe viable cells labeled in green, and nonviable cells labeled in orange/red. Insertion represents a zoom of the nonviable cells area. Scale bars: 400 μ m.

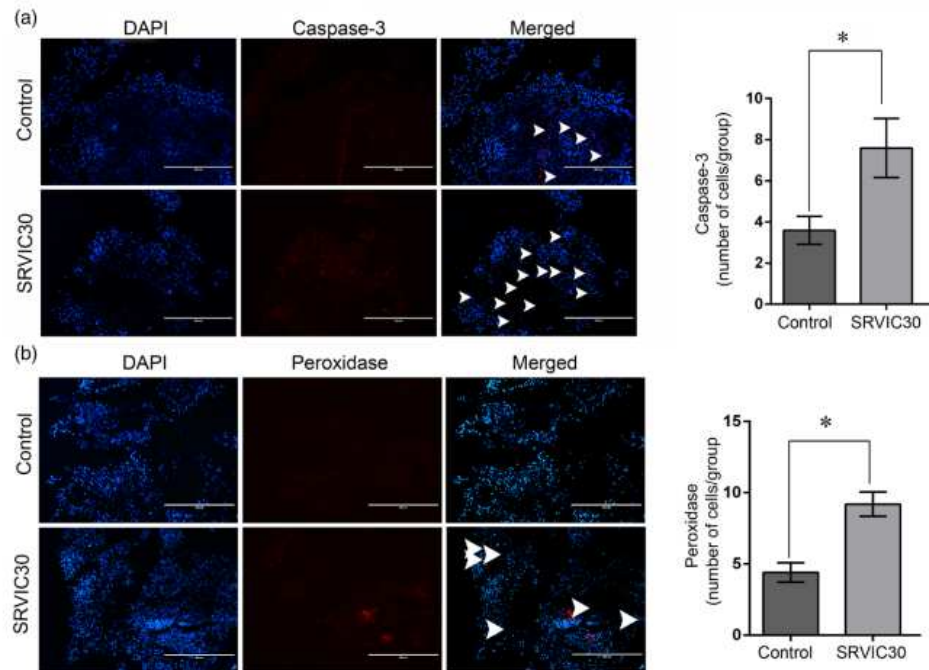
Furthermore, SRVIC30-treated animals presented inflammatory infiltrate in their skin and high proportion of inflammatory infiltrate in their tumor, although the latter was not significant when compared to control animals. However, this finding may have an important biological context, because ROS generation has been recently linked to inflammatory processes [33–35]. It is known that free radicals are commonly produced by cells involved in the host defense response, such as polymorphonuclear neutrophils, besides melanoma cells [33]. The recruitment, priming, and activation of those leukocytes are apparently related to ROS production, culminating with an increase of vascular permeability and dysfunction [34]. Therefore, we suggest that ROS overproduction in animals treated with SRVIC30 was intensified by the local immune response, and the increased peroxidase production was a response to this imbalance [27].

In light of the foregoing, the opening of interendothelial junctions and the promotion of inflammatory cells migration across the endothelial barrier may lead to tissue injury [32]. This injury is often associated with remodeling tissue that includes the production of collagen fibers. In this study, collagen fibers were found in great amount surrounding blood vessels, as observed in control and

SRVIC30-treated mice. Nonetheless, in the latter group, those fibers were observed surrounding tumor cells in SRVIC30-treated animals. This component of the connective tissue is produced by fibroblast cells present either in the skin tissue or in the tumor microenvironment under physiological conditions and in response to injuries [36]. Taken it to account, our findings may indicate that the presence of collagen fibers, especially bypassing tumor cells, may be a response of the SRVIC30 treatment associating necrosis with apoptosis occurrence. Indeed, the alternative to apoptotic cell death is necrosis, which is a degradative process that occurs after cell death and involves an inflammatory process with tissue remodeling [24]. Necrosis can be induced and proceeded in a regular manner like apoptosis, although in a caspase-independent fashion [37].

Nevertheless, no significant effect on tumor growth was observed, which suggests that either the topical treatment is effective on primary melanomas or that treatment administration could be better optimized to achieve the aimed clinical goals. However, some factors may have influenced these findings, such as the treatment duration and the SRVIC30 concentration. The fourteen-day treatment was also used by Figueiredo

Fig. 5



Representative micrography of positive cells for caspase-3 or peroxidase in tumor of C57BL/6 mice topically treated SRVIC30-containing cream (SRVIC30) and cream without SRVIC30 (control) daily for 14 days. (a) The cell nuclei were labeled with DAPI (blue), while arrow heads indicated cells immunolabelled for caspase-3 (red), next to graphical representation of the caspase-3 positive cell count. Scale bars: 400 μ m. Mean \pm SEM, * P < 0.05. (b) The cell nuclei were labeled with DAPI (blue), while the arrow heads indicated cells immunolabelled for peroxidase (red), next to graphical representation of the peroxidase positive cell count. Scale bars: 400 μ m. Data are expressed as mean \pm SEM. * P < 0.05 by unpaired t -test.

et al. [19] testing the efficacy of C36L1 and SC36 peptides in a metastatic and subcutaneous melanoma model. Similarly to those authors [19], this time was enough to avoid tumor ulceration and prevent that the tumor volume reached 3000 mm³, when the health of the animals deteriorate. Therefore, a longer experiment is impossible due to ethical reason. Furthermore, the concentration of SRVIC30 used herein was established according to the IC₅₀ of SRVIC30 [13]. Once there was no toxicity effect observed, it would be recommended that other concentrations are tested. Nonetheless, SRVIC30 showed low solubility, which made it difficult its solubilization in higher concentrations. Therefore, preparations must be developed to increase the solubility of the compound. Still, even at low doses and less treatment time, SRVIC30 showed anticancer effects.

The future of melanoma therapy is either to develop new drugs or to improve the use of those readily available [3]. Additionally, one of the great challenges of surgeries and chemotherapies is the tumor resection, as remaining cells may proliferate and form a new tumor after those therapeutic methods [2,3,5]. In this study, our results describe an important use for SRVIC30 as a topical drug against murine melanoma model. Besides the absence of toxicity signs after treatment with SRVIC30, its topical application displayed antitumor activity *in vivo*, modifying the tumor microenvironment and promoting proapoptotic events. Finally, SRVIC30 may be considered a promising antitumor compound for the melanoma treatment, mostly when used for eradicating remaining cells in combination with tumor excision and chemotherapy.

Acknowledgements

We thank the Dr. Gustavo Ferreira Martins and Dr. Kenner Fernandes Morais for the provision of antibodies and support with immunofluorescence techniques. The authors also thank CNPq, FAPEMIG, and CAPES for the fellowships provided for the students and researchers involved in this work.

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [master fellowship to JAV], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Grant number 485011/2012-3 and 420648/2016-0 to G.C.B., 431330/2018-2 to G.D.A.L., and 420077/2018-9 to M.M.-N.), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG; Grant number APQ-01637-13, APQ-02556-15, and RED-00140-16 to G.C.B. and APQ-02514-16 to MMN). The funders had no involvement in the study design, collection, analysis or interpretation of data, writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted (Ethic Committee in Animal Use – ECAU/UFV, registration number 41/2016). This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interests.

References

- Karimkhani C, Green AC, Nijsten T, Weinstock MA, Dellavalle RP, Naghavi M, Fitzmaurice C. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. *B J Dermatol* 2017; 177:134–140.
- Shaffer SM, Dunagin MC, Torborg SR, Torre EA, Emert B, Krepler C, et al. Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 2017; 546:431–435.
- Mattia G, Puglisi R, Ascione B, Malomi W, Carè A, Matarrese P. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis* 2018; 9:112.
- Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for melanoma. *Cancer Treat Res* 2016; 167:209–229.
- Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:275–284.
- Baharara J, Amini E, Nikdel N, Salek-Abdollahi F. The cytotoxicity of dacarbazine potentiated by sea cucumber saponin in resistant B16F10 melanoma cells through apoptosis induction. *Avicenna J Med Biotechnol* 2016; 8:112–119.
- Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep* 2008; 9:1087–1093.
- Gammons MV, Lucas R, Dean R, Coupland SE, Oltean S, Bates DO. Targeting SRPK1 to control VEGF-mediated tumour angiogenesis in metastatic melanoma. *Br J Cancer* 2014; 111:477–485.
- Hayes GM, Carrigan PE, Miller LJ. Serine-arginine protein kinase 1 overexpression is associated with tumorigenic imbalance in mitogen-activated protein kinase pathways in breast, colonic, and pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 2007; 67:2072–2080.
- Gout S, Brambilla E, Boudria A, Drissi R, Lantuejoul S, Gazzeri S, Eymin B. Abnormal expression of the pre-mRNA splicing regulators SRSF1, SRSF2, SRPK1 and SRPK2 in non small cell lung carcinoma. *PLoS One* 2012; 7:e46539.
- Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Niehimura-Sakurai Y, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3179–3186.
- Hong Y, Chan CB, Kwon IS, Li X, Song M, Lee HP, et al. SRPK2 phosphorylates tau and mediates the cognitive defects in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2012; 32:17262–17272.
- Moreira GA, Lima GDA, Siqueira RP, Barros MVA, Adjanohoun ALM, Santos VC, et al. Antimetastatic effect of the pharmacological inhibition of serine/arginine-rich protein kinases (SRPK) in murine melanoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2018; 356:214–223.
- Fukuhara T, Hosoya T, Shimizu S, Sumi K, Oshiro T, Yoshinaka Y, et al. Utilization of host SR protein kinases and RNA-splicing machinery during viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11329–11333.
- Hagiwara M, Fukuhara T, Suzuki M, Hosoya T. Method for controlling protein phosphorylation, and antiviral agents whose active ingredients comprise agents that control SR protein activity. *United States Patent*. US7569536 B2 US 2009; 7,569,536 B2.
- Siqueira RP, Barbosa Éde A, Polito MD, Righetto GL, Seraphim TV, Salgado RL, et al. Potential anti-leukemia effect and structural analyses of SRPK inhibition by N-(2-(Piperidin-1-yl)-5-(trifluoromethyl)Phenyl)isonicotinamide (SRPIN340). *PLoS One* 2015; 10:e0134882.
- Siqueira RP, Barros MVA, Barbosa ÉAA, Onofre TS, Gonçalves VHS, Pereira HS, et al. Trifluoromethyl arylamides with anti-leukemia effect and intracellular inhibitory activity over serine/arginine-rich protein kinases (SRPKs). *Eur J Med Chem* 2017; 134:97–109.
- Rodrigues EG, Dobroff AS, Cavarsan CF, Paschoalin T, Nimrichter L, Mortara RA, et al. Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. *Neoplasia* 2008; 10:61–68.
- Figueiredo CR, Matsuo AL, Azevedo RA, Massaoka MH, Girola N, Polonelli L, Travassos LR. A novel microtubule de-stabilizing complementarity-determining region C36L1 peptide displays antitumor activity against melanoma *in vitro* and *in vivo*. *Sci Rep* 2015; 5:14310.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Ann Acad Bras Cienc* 2003; 75:469–486.
- Giri BR, Roy B. *Cysticercus fasciolaris* infection induced oxidative stress and apoptosis in rat liver: a strategy for host-parasite cross talk. *Parasitol Res* 2016; 115:2617–2624.
- Lima GDA, Sertorio MN, Souza ACF, Menezes TP, Mouro VGS, Gonçalves NM, et al. Fertility in male rats: disentangling adverse effects of arsenic compounds. *Reprod Toxicol* 2018; 78:130–140.
- Anekar RA, Ascioia JJ, Lopez-Rivera E, Flores KV, Izadmehr S, Elkhali R, et al. Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens. *Cell Death Dis* 2012; 3:e420.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2017; 35:495–516.
- Lei XG, Zhu JH, Cheng WH, Bao Y, Ho YS, Reddi AR, et al. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: basic mechanisms and health implications. *Physiol Rev* 2016; 96:307–364.
- Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddleston SE, Zhao Z, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* 2015; 527:186–191.
- Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016; 1863:2977–2992.
- Xiong B, Chen S, Zhu P, Huang M, Gao W, Zhu R, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel thiazolyl substituted bis-pyrazole oxime derivatives with potent antitumor activities by selectively inducing apoptosis and ROS in cancer cells. *Med Chem* 2019; 17:743–754.
- Zheng A, Li H, Wang X, Feng Z, Xu J, Cao K, et al. Anticancer effect of a curcumin derivative B63: ROS production and mitochondrial dysfunction. *Curr Cancer Drug Targets* 2018; 14:156–166.
- Wóiniak A, Drewa G, Wóiniak B, Schachtschabel DO, Miła-Kerzenkowska C, Drewa T, et al. The effect of antitumor drugs on oxidative stress in B16 and S91 melanoma cells *in vitro*. *Med Sci Monit* 2005; 11:BR22–BR29.
- Ling YH, Liebes L, Zou Y, Perez-Soler R. Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic response to Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in human H460 non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278:33714–33723.

- 32 Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* 2014; 20:1126–1167.
- 33 Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; 44:479–496.
- 34 Kar S, Kavdia M. Local oxidative and nitrosative stress increases in the microcirculation during leukocytes-endothelial cell interactions. *PLoS One* 2012; 7:e38912.
- 35 Leick M, Azcutia V, Newton G, Luscinaskas FW. Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res* 2014; 355:647–656.
- 36 Hirata E, Sharai E. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; 7:a026781.
- 37 Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol Cancer* 2015; 14:48.



Synthesis, biological activity, and four-dimensional quantitative structure–activity analysis of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *Daphnia magna*

M.C. Andrezza Costa , M. Miguel Castro Ferreira , R.R. Teixeira , A.P. Martins de Souza , A. Ramos de Aguiar , D. R. da Silva , C.M. Jonsson & S.C.N. Queiroz

To cite this article: M.C. Andrezza Costa , M. Miguel Castro Ferreira , R.R. Teixeira , A.P. Martins de Souza , A. Ramos de Aguiar , D. R. da Silva , C.M. Jonsson & S.C.N. Queiroz (2021) Synthesis, biological activity, and four-dimensional quantitative structure–activity analysis of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *Daphnia magna* , SAR and QSAR in Environmental Research, 32:2, 133-150, DOI: [10.1080/1062936X.2020.1866070](https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1866070)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1866070>

View supplementary material [↗](#)

Published online: 19 Feb 2021.

Submit your article to this journal [↗](#)

View related articles [↗](#)

View Crossmark data [↗](#)



Synthesis, biological activity, and four-dimensional quantitative structure–activity analysis of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *Daphnia magna*

M.C. Andrezza Costa ^a, M. Miguel Castro Ferreira ^a, R.R. Teixeira ^b, A.P. Martins de Souza^b, A. Ramos de Aguiar^b, D. R. da Silva^c, C.M. Jonsson ^d and S.C.N. Queiroz ^d

^aTheoretical and Applied Chemometrics Laboratory (LQTA), Institute of Chemistry, University of Campinas-Unicamp, Campinas, Brazil; ^bDepartment of Chemistry, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brazil;

^cDepartment of Chemistry Engineering, ESAMC Campinas – Engenharia Química, Campinas, Brazil;

^dLaboratory of Ecotoxicology and Biosafety, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brazil

ABSTRACT

A series of 18 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives was synthesized and tested against *Daphnia magna* to assess the environmental toxicity of these compounds. Aiming to investigate the toxicity mechanism for this series of compounds, a four-dimensional quantitative structure–activity analysis (4D-QSAR) was performed through the partial least square regression (PLS). The best PLS model was built with two factors and the selected field descriptors, of Coulomb (C) and Lennard-Jones (L) nature, describing 77.43% of variance and presenting the following statistics: $r^2 = 0.89$; $SEC = 0.30$; $Q^2 = 0.81$; $SEV = 0.36$. According to the literature, the bioactivity of α,β -unsaturated ketones, a functionality present in the series of compounds under investigation, is related to the conjugated double bond with the carbonyl group. The presence of a positive Coulomb descriptor nearby the carbonyl moieties, obtained as a result of the regression model, indicates that these polar groups are also related to the toxicity on *D. magna*. From the PLS regression model, the toxicity EC_{50} -48 h values increases with the positive Coulomb descriptor and diminishes with the negative Lennard-Jones descriptors. It could be concluded that the presence of small polar groups in the aromatic ring of the arylidene moiety tends to increase the toxicity, while bulkier apolar substituents lead to a decrease of the toxicity.

ARTICLE HISTORY

Received 2 November 2020
Accepted 15 December 2020


KEYWORDS

Indan-1,3-dione; 2-arylidene-1,3-dione; 4D-QSAR; PLS; molecular dynamics; *Daphnia magna*

Introduction

The bicyclic aromatic β -diketone indan-1,3-dione and its derivatives are widely applied for the production of dyes, semiconductors, heterocycles, and pharmaceuticals [1]. Among the indan-1,3-dione derivatives, several of them present important biological activities, such as anticancer, anticoagulant, anti-inflammatory, and antimicrobial [2]. Our research group has been interested in the biological activities of indan-1,3-dione derivatives. Within this context, we synthesized a series of indan-1,3-dione derivatives bearing

CONTACT M.C. Andrezza Costa  mariaca@unicamp.br

 Supplementary data for this article can be accessed at: <https://doi.org/10.1080/1062936X.2020.1866070>

© 2021 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

arylidene functionalities and evaluated them as inhibitors of the NS2B-NS3 protease of West Nile Virus (WNV). The compounds 2-(4-hydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione ($IC_{50} = 11 \mu\text{mol L}^{-1}$) and 2-(3,4-dihydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione ($IC_{50} = 3 \mu\text{mol L}^{-1}$) were the most active and characterized as non-competitive enzymes inhibitors [3].

Daphnia magna is commonly used as a test organism in ecotoxicology and it is accepted in several countries to establish quality criteria to determine permissible concentrations of pollutants, limits of impurity in water from natural effluents, and the efficacy of a good sanitation method [4]. Aquatic organisms are important targets, as they are exposed via wastewater residues over their whole life. Once inside the organism, the pollutant may promote a variety of effects, ranging from cellular impairment to lethality [5].

Therefore, toxicity tests with *D. magna* and other microcrustaceans have been used as important tools in the prediction of adverse effects in quantitative structure–activity analysis (QSAR) studies. For instance, Ha et al. [6] built a QSAR model for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using the acute toxicity data from *D. magna* and the amphipoda *Hyalella azteca*. Ferreira [7] modelled the photo-induced toxicity of freshwater organism *D. magna* using electronic descriptors calculated for PAHs. Khan et al. [8] concluded that, in general, the models indicate that the toxicity of biocides increases with lipophilicity and decreases with polarity, branching, and unsaturation. According to Perales et al. [9] there is a correlation between the lipophilicity of glycerol ethers and the increase of the toxic effect in a *D. magna* biomodel. Also, the length and the number of the alkyl substituents are highly related with the toxicity. Considering the premises and aim to contribute to the knowledge about the toxicity profile of indan-1,3-dione derivatives [10–15], in the present investigation a series of 18 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives was tested against *D. magna* to assess the environmental toxicity of these compounds. A four-dimensional quantitative structure–activity analysis (4D-QSAR) was performed through partial least square regression (PLS), principal components analysis (PCA), and hierarchical cluster analysis (HCA).

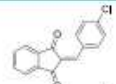
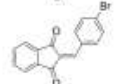
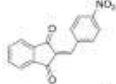
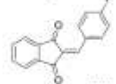
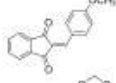
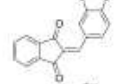
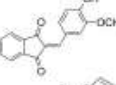
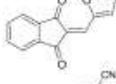
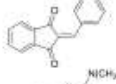
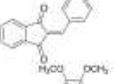
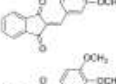

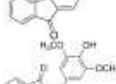
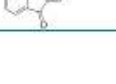
Methodology

Synthesis of indan-1,3-dione derivatives

The compounds #1, #3–16 (Table 1) herein investigated were synthesized as previously reported [3]. Briefly, a round-bottomed flask (10 mL) was charged with indan-1,3-dione (1 mmol), aldehyde (1 mmol), $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ (4 mol%) and 3.00 mL of distilled water. The reaction mixture was heated to 85°C and kept under magnetic stirring. The progress of reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC) analysis. After the completion of the reaction, the mixture was vacuum filtered and the residue washed with ice-cold ethanol.

Besides, compounds #18 and 19 (Table 1) were prepared, to be used in the present investigation, via the same procedure described above. Spectroscopic data that confirm the structure of compounds #18 and 19 are available in the Supplementary Information (Figures S1–S8). It should be noted that compound #17 was prepared via reaction of compound #13 with BBr_3 as previously described [3].

Table 1. Structures and biological effects of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives on *Daphnia magna*.

^a Compound	Structure	^b EC ₅₀ -48h (μmol L ⁻¹) / ^c pEC ₅₀
1. 2-(4-chlorobenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		21.4 / 4.67
2. 2-(4-bromobenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		15.8 / 4.80
3. 2-(4-nitrobenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		21.9 / 4.66
4. 2-(4-fluorobenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		63.1 / 4.20
5. 2-(4-methoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		109.6 / 3.96
6. 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		245.5 / 3.61
7. 2-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		117.5 / 3.93
8. 2-(furan-2-ylmethylene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		134.9 / 3.87
9. 4-((1,3-dioxo-1 <i>H</i> -inden-2(3 <i>H</i>)-ylidene)methyl)benzotrile		102.3 / 3.99
10. 2-(4-(dimethylamino)benzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		204.2 / 3.69
11. 2-(3,4,5-trimethoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		371.5 / 3.43
12. 2-(3,4-dimethoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		1.74 / 5.76
13. 2-(4-hydroxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		33.1 / 4.48
14. 2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		0.87 / 6.06

(Continued)

Table 1. (Continued).

^a Compound	Structure	^b EC ₅₀ -48h (μmol L ⁻¹) / ^c pEC ₅₀
15. 2-(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		2.04 / 5.69
16. 2-(3,4-dihydroxybenzylideno)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		1.82 / 5.74
17. 2-(2-hydroxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		3.63 / 5.44
18. 2-(3-hydroxybenzylidene)-1 <i>H</i> -indene-1,3(2 <i>H</i>)-dione		9.33 / 5.03

^aNumbers of the compounds #1, 3–17 are the same ones as previously reported [3]; compounds #18 and 19 were synthesized to be used in the present investigation. ^bThe average effective concentration causing effect (immobility) evaluated in 50% of the organisms during the test period of 48 h (EC₅₀-48 h); ^cpEC₅₀ means – log EC₅₀.

Bioassays with *D. magna*

A stock solution of each compound (#1, 3–19, Table 1) in dichloromethane at the concentration of 1000 μg mL⁻¹ was prepared. Then, an appropriate volume of this solution was taken and the solvent was evaporated to dryness. The residue was dissolved in 100 μL of dimethyl sulphoxide (DMSO) solution that was prepared by the addition of 1 mL of DMSO in 20 mL of reconstituted water prepared according with Dantzger et al. [16]. The volume was made up to 18 mL with reconstituted culture water to generate the test solutions presenting the following concentrations: 1.0, 3.2, 10.0, 32.0 and 100.0 mg L⁻¹. Newborn *D. magna* was separated from a colony cultivated in reconstituted water, maintained at controlled room temperature (20 ± 2°C; ~1.000 lux), and fed with the microalga *Raphidocelis subcapitata* in suspension. Neonates were exposed to the test solutions placed on multiwell polystyrene plates containing eight organisms per well (5 mL), in triplicate. The organisms were also exposed to a control solution free from the test material and containing the same concentration of DMSO. At the end of the assay, the percentage of mortality was calculated for each concentration after 48 h and the data were submitted for statistical analysis using the module 'Probit Analysis' of the Statgraphics Plus software, 5.1 (Manugistics Group Inc. 2011) [17]. In this way, it was calculated the effective concentration causing effect (immobility) in 50% of the organisms (EC₅₀-48 h).

Geometry optimization of indan-1,3-dione derivatives

The three-dimensional geometries of the 2-arylidene indan-1,3-diones (Table 1) were prepared based on the crystallographic data from compounds #1 (2-(4-chlorobenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) and #15 (2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) found in the Cambridge Structural Database (CSD) [18], entries XICLIH [19] and XICLED [20], respectively. The geometries of these two compounds were, subsequently, optimized by DFT/B3LYP method, with the def2-TZVPP basis set [21], using Gaussian 9.0 [22]. This triple zeta valence basis set is a high-quality Gaussian

basis set optimized for atoms from H to Rn and it was chosen mainly due to the presence of bromine in one of the studied compounds (Table 1).

Starting from the optimized geometries of compounds #1 and 15, the three-dimensional geometries of all other derivatives were built with GaussView 3.0 software [23], by changing or adding the substituents R¹, R², R³ and R⁴ (Figure 1 and Table 1). The conformational search of each substituent was performed with the PM3 semiempirical method using the keyword *scan* from Gaussian 9.0 [22] (Figure 1). To determine the local minima, the axes *a*, *b*, *c* and *d* depicted in Figure 1 were rotated with 15 degrees increment. The most stable conformation (global minimum) is not necessarily the biologically active conformation. Sometimes, the global minimum is stabilized by intramolecular interactions that can be not favourable to an interaction binder-receptor. Based on this argument, stable conformations visually presenting few intramolecular interactions were chosen. Then, the selected local minimum of each compound was optimized by DFT/B3LYP method as described above.

4D-QSAR analysis

The LQTA-QSAR approach [24] was chosen for the 4D-QSAR analysis. It is based on the generation of a conformational ensemble profile (CEP) of each compound, obtained from molecular dynamics simulation, instead of considering a single conformation. In this way, conformational freedom is incorporated into the 3D-QSAR models. This conformational freedom would be the fourth dimension.

As the first step on 4D descriptors calculations by this methodology, the optimized molecular geometries were submitted to molecular dynamics (MD) simulations with GROMACS-4.6.5 [25] computational package through the LQTA-QSAR software [24]. An explicit aqueous medium was considered. Each compound was placed in a cubic box with a minimum distance of 10 Å from the molecule to the edge of the box, which was then filled with water molecules. Atomic positions were optimized using the steepest descent and

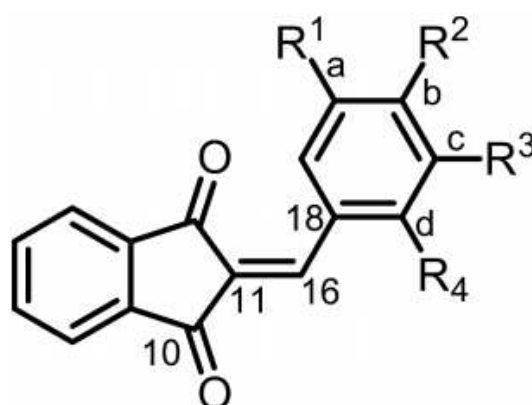


Figure 1. Basic structure of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives. The numbering of atoms indicated in this figure is the same as that from GaussView program.

conjugate gradient algorithm with 50 N of maximum force applied to the atoms, as convergence criterion. The system was heated following the scheme: 50, 100, 200, and 350 K for 10 ps simulation time performed in 2 fs step size. Then, the system was cooled to 300 K and simulated for 500 ps. The conformations obtained from each compound were recorded every 10 ps for 500 ps and then, they were organized in *.gro files for construction of the CEP.

In the second step, the resulting conformations from MD simulations were aligned by the atoms 10, 11, 16 and 18 (Figure 1) in order to build the CEP with all conformations of all compounds (Supplementary Information, Figure S9). After that, a virtual cubic grid was built, large enough to contain the CEP of all molecules, whose dimensions were $17 \times 14 \times 13$ Å. Next, in the third and last step, LQTAgrid module from LQTA-QSAR program [24] was used to calculate the field descriptors, selecting the fragment NH_3^+ that mimics the amino-terminal portion of peptides, as probe. Atomic charges from electrostatic potentials using a grid-based method (ChelpG) were obtained with Gaussian 9.0 during the optimization of the geometries to be used in the calculation of interaction energies. Each point of the grid, with 1 Å resolution, was explored by the probe and 7560 descriptors were generated. The field descriptors are the contributions of electrostatic and van der Waals energies (Coulomb and Lennard-Jones potentials) obtained by the interaction between the probe NH_3^+ in each point of the virtual grid and the atoms in CEP, according to Equations (1) and (2), respectively.

$$E_C = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (1)$$

$$E_{LJ} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left[\frac{C_{ij}^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_{ij}^6}{r_{ij}^6} \right] \rightarrow \begin{cases} C_{ij}^{12} = (C_{ii}^{12} \times C_{jj}^{12})^{1/2} \\ C_{ij}^6 = (C_{ii}^6 \times C_{jj}^6)^{1/2} \end{cases} \quad (2)$$

In Equations (1) and (2), q_i is the charge of the i th atom from CEP, q_j is the charge of the probe, ϵ_0 is vacuum permittivity; $C_{ii}^{(12)}$, $C_{ii}^{(6)}$, $C_{jj}^{(12)}$ and $C_{jj}^{(6)}$ are parameters adapted from the ffG43a1 Gromos force field [24] for atoms in CEP and probe, respectively; n indicates the number of conformations aligned in CEP, and r_{ij} is the distance between the j probe and the i th atom of CEP. In both equations the energies are divided by n in order to take an average of the energies calculated for all conformations of the ligands (CEP) in each grid point [24].

Descriptors extraction

Descriptors related to probe positions far from molecular conformations were eliminated by the variance cut-off in which descriptors with variance below 0.02 were excluded, as indicated by Kubinyi [26]. The resulting descriptors were then filtered by the use of a correlation coefficient cut-off, where those presenting Pearson correlation coefficient with **y** (biological activity) lower than 0.3 were eliminated. The next step was to eliminate descriptors with poor distribution profiles with respect to **y** using the digital filter, Comparative Distribution Detection Algorithm (CDDA). According to Barbosa and Ferreira [27], CDDA provides a way to quantify how similarly distributed is **y** and a given descriptor, aiding the removal of those not well distributed. At the end of these

procedures, the field descriptors were drastically reduced from 7560 to 24, from which 16 were Coulomb (C) and 8 were Lennard-Jones (LJ) descriptors.

PLS regression

The remaining descriptors were organized in a matrix \mathbf{X} and correlated with the corresponding $-\log EC_{50}$ values (EC_{50} in mol L⁻¹) arranged in a column vector \mathbf{y} , through the QSAR modelling software [28].

After autoscaling the data, the Ordered Predictors Selection Algorithm [29] was applied for further selection of descriptors. The idea of this method is to obtain a vector that contains information about the location of the best variables for prediction. The columns of matrix \mathbf{X} are reordered so that the most important descriptors are placed in the first columns. Then, PLS regressions are built successively in order to find the best model. The number of factors is determined by leave-one-out cross-validation method (LOO). At the end, only four descriptors were selected.

In this work, the applicability domain is defined by the leverage and the studentized residuals. By analysing the plot of leverage vs. studentized residuals (Supplementary Information, Figure S10), the presence of outliers was not observed. All compounds presented studentized residuals between the critical values [30,31] of 2.0 and -2.0. Although compounds #13 and 15 presented the values of leverage somewhat large, they are the most active derivatives and were not removed from the data set.

The final regression models quality were assessed by analysing the coefficient of multiple determination (r^2), standard error of calibration (SEC), cross-validated correlation coefficient (Q^2), and standard error of cross-validation (SEV).

y-Randomization test [31,32] was applied to investigate the presence of chance correlation between the dependent variable and descriptors, i.e. descriptors which are statistically well correlated to \mathbf{y} although in reality not related to the problem under investigation. For this test, only the vector \mathbf{y} is randomized, \mathbf{y}_{rand} , while the matrix \mathbf{X} is left untouched. New parallel models were developed with the values of the original descriptors kept untouched and the values of the dependent variable, \mathbf{y} , permuted between the compounds. In this work, 60 randomization runs were carried out. It is expected that the statistical parameters from the randomized models (Q_{yrand}^2 and r_{yrand}^2) should be significantly lower than those obtained for non-randomized data (r^2 and Q_{LOO}^2). Another approach to judge whether the real model is characterized by chance correlation, is based on the absolute value of Pearson's correlation coefficient, $r(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{rand})$, between the original vector \mathbf{y} and randomized vector \mathbf{y}_{rand} . Two y-randomization plots, $r(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{rand})$ vs. Q^2 and $r(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{rand})$ vs. r^2 , were drawn for all randomized and real models. Two linear equations of $r(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{rand})$ vs. Q^2 and $r(\mathbf{y}, \mathbf{y}_{rand})$ versus r^2 were obtained. It has been recommended that for a model free of chance correlation, the intercepts are $a_Q < 0.05$ and $a_R < 0.3$ [32].

To test the robustness of the model, leave- N -out (LNO) cross-validation was performed. In this test, \mathbf{X} and \mathbf{y} are simultaneously randomized and divided into blocks of N samples. Then, each block is excluded once and a new model is built on the reduced data set. LNO was repeated 60 times, for N varying from 1 to 5; the average of Q_{LNO}^2 , with its standard deviation, were calculated to each value of N . The critical N is the maximum value for

which Q^2_{LNO} is still stable and high. For a good model, the average of Q^2_{LNO} should stay close to Q^2_{LNO} , with small variations at all values for N up to the critical N . By our experience, two standard deviations should not be greater than 0.1 ($Q^2_{LNO} \pm 0.05$) for $N = 2, 3$, etc., including the critical value of N .

PCA and HCA

In order to evaluate the descriptors capability to discriminate the compounds into different activity classes, PCA and HCA were applied to the autoscaled selected field descriptors using the Pirouette® 4.5 software.

Results and discussion

Preparation of derivatives

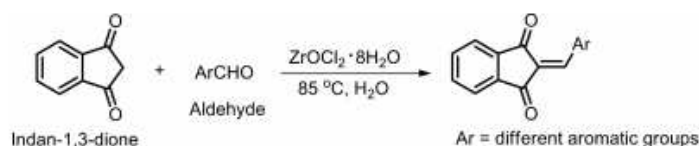
As previously reported [3], the 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives #1, 3–16, 18, and 19 herein investigated were prepared via the zirconium catalysed condensation reactions between indan-1,3-dione and different aldehydes (Scheme 1).

The structures of the obtained compounds #1, 3–16, 18, and 19 are shown in Table 1 and they were prepared with yields ranging from 64% to 95%. It should be mentioned that compound #17 was obtained via demethylation of compound #13 with BBr_3 . Most of the compounds shown in Table 1 were reported in our previous work [3]. The compounds #18 and 19 were prepared to be used in the present study.

QSAR model discussion

The best PLS regression model for 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *D. magna* was built with two factors and the selected descriptors (Figure 2) describing 77.43% of variance. The model presented statistics (Table 2) that satisfies the minimal requirements for QSAR studies ($r^2 > 0.6$ and $Q^2_{LOO} > 0.5$) [31,32]. The selected molecular field descriptors are of both Coulomb (C) and Lennard-Jones (L) nature.

The y -randomization graphs A–C (Figure 3) obtained from 60 randomizations show that the model is free of chance correlation. According to Eriksson et al. [33], the intercepts for r^2 vs. $r(\mathbf{y}_{rand}, \mathbf{y})$ and Q^2 vs. $r(\mathbf{y}_{rand}, \mathbf{y})$ y -randomization plots in graphs A and B of Figure 3, must be lower than 0.3 and 0.05, respectively. The values found were 0.10 and -0.77 , respectively. Besides that, Q^2 and r^2 for randomized \mathbf{y} (graph C in Figure 3) were below



Scheme 1. Reaction involved in the preparation of the compounds #1, 3–16, 18, and 19 herein investigated.

0.25 and 0.45, respectively, confirming that the randomized models were of poor quality, as expected.

LNO cross-validation (graph D in Figure 3) was repeated 60 times leaving one to five compounds out from the training sets once at a time for PLS models of the derivatives tested against *D. magna*. The average Q^2_{LNO} values are close to the value of Q^2_{LOO} and the standard deviations for each N values are small, indicating that the QSAR model is robust.

The total set of the studied compounds is small enough (18 compounds) to select an external test set, in order to assess the predictive ability of the model. Nevertheless, the external performance of the model can be described by the result obtained for the five-fold cross-validation (Figure 3(d)). The residues and calculated relative error (Supplementary Information, Table S1), the respective mean relative error (RE) and the Q^2_{LNO} ($N = 5$) value in Table 2, indicated that the final model can be used for an approximate prediction of new compounds.

Descriptor discussion for regression model

From the autoscaled regression coefficients signals in Equation (3), the biological toxicity on *D. Magna* is positively correlated to the Coulomb descriptor C1324, so that pEC_{50} increases when this electrostatic interaction increases. At the same time, pEC_{50} diminishes with the increasing of van der Waals interactions, since pEC_{50} is negatively correlated to the Lennard-Jones descriptors L1290, L1764, and L3690.

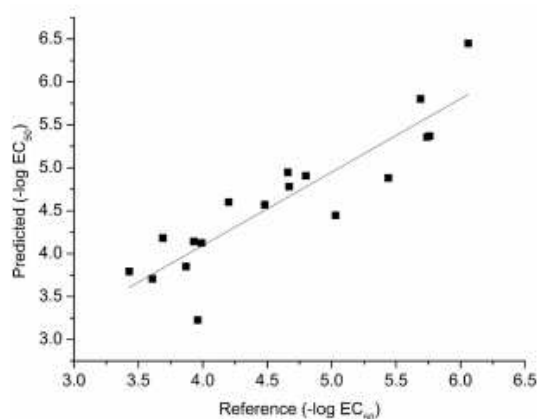


Figure 2. Plot of reference versus predicted values for 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *D. magna*.

Table 2. Parameters for evaluation and validation of the best PLS model obtained.

^a N	^b F	^c Descriptors	^d Variance (%)	^e r^2	^f Q^2	^g SEC	^h SEV	ⁱ RE (%)	^j Q^2_{LNO} ($N = 5$)
18	2	C1324, L1290, L1764, L3690	77.43	0.89	0.81	0.30	0.36	4.95	0.79

^aNumber of compounds; ^bnumber of factors; ^cmolecular field descriptors of Coulomb (C) and Lennard-Jones (L) nature; ^dtotal variance percent; ^ecoefficient of multiple determination; ^fcross-validated correlation coefficient; ^gstandard error of calibration; ^hstandard error of cross-validation; ⁱmean relative error; ^jfive-fold cross-validated correlation coefficient.

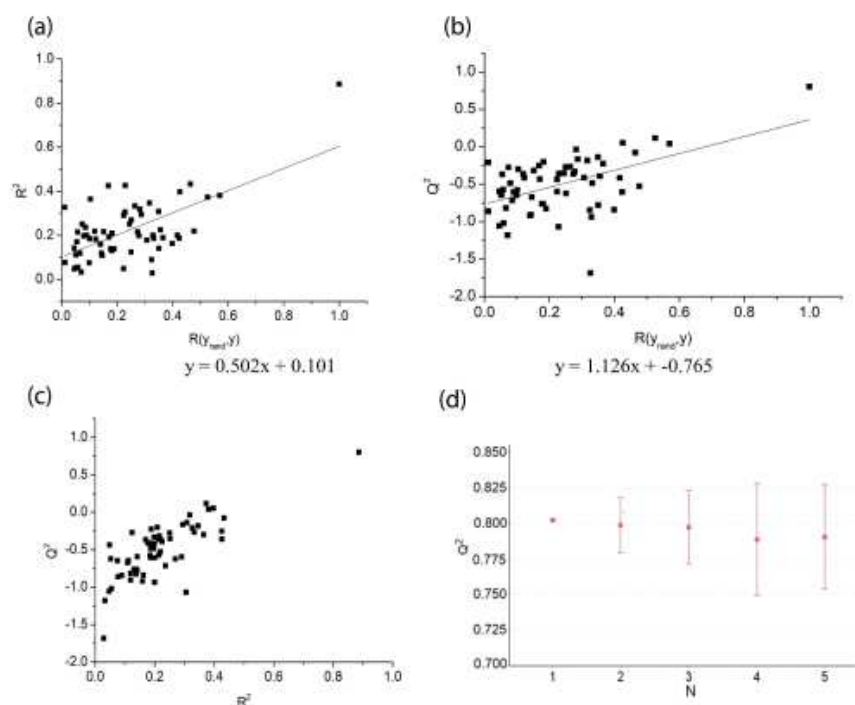


Figure 3. Plots of y-randomization test (60 repetitions) for PLS model of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *D. magna*, where $r(y_{rand}, y)$ means $r(pEC_{50randomized}, pEC_{50})$. (a) r^2 versus $r(y_{rand}, y)$; (b) Q^2 versus $r(y_{rand}, y)$; (c) Q^2 versus R^2 , where Q^2 is the coefficient of determination for LOO cross-validation. (d) LNO cross-validation ($N = 1$ to 5) for 60 repetitions.

$$pEC_{50} = 0.30 \times C1324 - 0.27 \times L1290 - 0.28 \times L1764 - 0.52 \times L3690 \quad (3)$$

The signals of the coefficients for the correlation between pEC_{50} and the descriptors were also investigated, in order to evaluate the consistency of the model [34]. From the coincidence of the signals for the regression coefficients in the model (Equation (3)) and the signals of correlation coefficients between each respective descriptor and pEC_{50} ($+0.68 \times C1324$; $-0.64 \times L1290$; $-0.64 \times L1764$; $-0.62 \times L3690$), this model proved to be self-consistent.

The location of the field descriptors used to build the PLS model can be visualized in Figure 4(a), where $-$ and $+$ are the signals of the regression coefficients in the model. To represent the relative positions of the descriptors to the 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives, the most active compound #15 was chosen. The negative Lennard-Jones (L) descriptor $-L3690$ is located close to the ring where substitutions were made, at approximately 8.0, 5.0 and 6.0 Å away from R^1 , R^2 and R^3 substituents, respectively. Nearby the aromatic ring of indan-1,3-dione moiety, there are two other negative Lennard-Jones descriptors, namely $-L1290$ and $-L1764$. The negative signals mean that great van der Waals interactions on these positions are unfavourable for toxicity on *D. magna*. On the

other hand, the positive Coulomb descriptor +C1324 is located close to R¹ and the indandione carbonyl groups (especially, one of them at approximately 3.0 Å of distance), indicating that the toxicity is favoured by electrostatic interactions in the vicinities of these positions.

According to the literature [15,35,36], the bioactivity of α,β -unsaturated ketones is related to the conjugated double bond with the carbonyl group (–CO–CH=CH–), as removal of the enone group in chalcones renders them inactive [15,35]. The conjugated double bond with the carbonyl group is a well-known toxicophore for aquatic organisms with an established mechanism of toxic action [37–39]. This α,β -unsaturated ketone functionality is also present in the series of 2-arylidene indan-1,3-diones under investigation. The presence of the positive Coulomb descriptor +C1324 nearby the carbonyl moieties, obtained as a result of the regression model, indicates that these polar groups are also related to the toxicity effects on *D. magna*, confirming previous studies [37–39].

Besides that, comparing the structures and pEC₅₀ of compounds #18, 19 and 14 (Table 1), one can observe the decrease in the value of toxicity with the increase in the distance from hydroxyl group to the positive Coulomb descriptor. Even though the C1324 descriptor is close to R¹ (Figure 4(a)) and the hydroxyl group is substituted in the R³ position (*meta*) for compound #19, a rotation of the aromatic ring brought the substituent in R³ closer to the descriptor, as can be seen in Figure 4(b). The same idea can be applied to the *ortho* positions. Compound #18, which presents a hydroxyl group at *ortho* position, is the most toxic among the three structures, with EC₅₀ = 3.63 $\mu\text{mol L}^{-1}$, whereas #14 with hydroxyl at *para* position presents the least value of toxicity (EC₅₀ = 33.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$). The experimental results show that the derivatives' toxicity on *D. magna* increases when the hydroxyl substituent changes from *para* to *meta* or *ortho* positions. This observation can be explained by the PLS regression model (Equation (3)), once these *ortho/meta* positions are closer to the positive Coulomb descriptor +C1324 than the *para* position (Figure 4(b)). The same reasoning could be used to explain the variation in toxicity of compounds #8 (low toxicity, hydroxyl group in a *para*-like position with respect to the exocyclic double bond) and #16 (high toxicity, hydroxyl group in a *meta*-like position). Nevertheless, noticing the figures of compounds after the MD calculations (Figure 4(c)), one can see that the hydroxyl group in #16 stayed away from the Coulomb descriptor, as well as the methoxy group (–OCH₃) in #8. Despite the rotation of aromatic ring, observed in some conformations of CEP for these compounds, it was not sufficient to approximate the polar groups in *meta*-like positions (R³) to the descriptor. Instead, it was observed that the polar methoxy group in *para*-like position (compound #16) is approximately 6.0 Å away from the positive Coulomb descriptor, while for compound #8, the polar hydroxyl group, also in a *para*-like position, is about 8.0 Å away. The same occurs with the compound #13 of high toxicity (6.4 Å), despite the presence of the two methoxy groups at *meta*-like (R³) and *para*-like (R²) positions. Although in this series of compounds methoxy was considered to be a bulky substituent compared with hydroxyl, its polarity and proximity to the Coulomb descriptor seems to confer activity to compounds when they are displaced from initial position of R² nearby the Lennard-Jones descriptor, –3690, to closer of Coulomb descriptor.

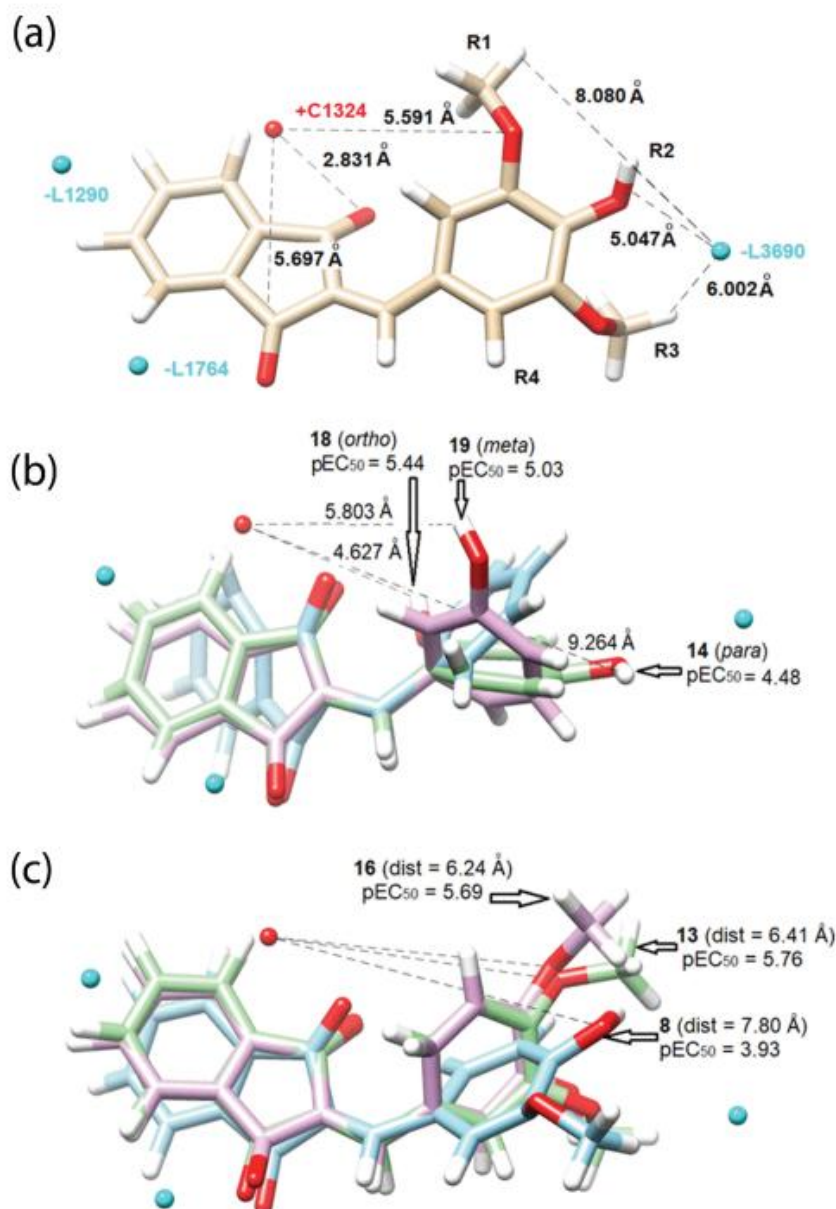


Figure 4. (a) Compound #15 and 4D descriptors used to build the PLS models for 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives tested against *Daphnia magna*. C and L are the Coulomb and Lennard-Jones descriptors, and – and + are the signals of the regression coefficients in the model. (b) Compounds #18, 19 and 14, with –OH in *ortho*, *meta* and *para* positions, respectively, and the 4D descriptors. It is observed that pEC_{50} decreases as the distance from –OH to descriptor +C1324 increases. (c) Compounds #13 and 16 (high toxicities), with polar groups nearby Coulomb descriptor, and #8 (low toxicity) with polar group away from the Coulomb descriptor.

Considering other compounds from this series, for example #12 and 15, or the pair #16 and 17 (Table 1), it is observed that the toxicity of these derivatives on *D. magna* is favoured by the substitution of the methoxy by hydroxyl group at R² (Figure 4(a)). According to the PLS regression model (Equation (3)), bulky apolar groups at R² are unfavourable to the toxicity, since the value of toxicity diminishes with the Lennard-Jones descriptor -L3690, located close to R². Small polar groups like hydroxyl tend to increase the toxicity. A bulkier substituent, like methoxy, decreases the toxicity probably due to steric hindrance.

This regression model is coherent with the literature and gives some direction about the action mode of these derivatives on *D. magna*. Based on these observations and in the results of the PLS regression model, it can be concluded that in general, for this series, additional small polar groups in the *ortho* position of the aromatic ring of the arylidene moiety favour the toxicity, whereas bulky apolar moieties in the *para* position, that could cause steric hindrance, are unfavourable. In addition, the closer the polar groups are to the positive Coulomb descriptor, the greater the toxicity.

PCA and HCA

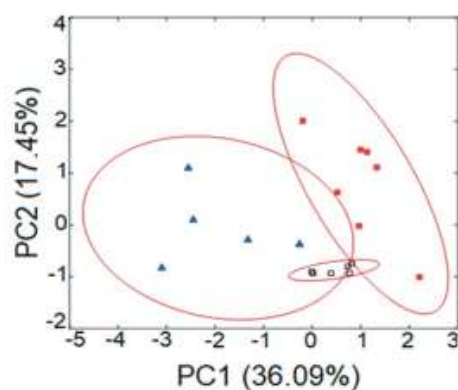
In order to investigate the capability of the selected field descriptors to discriminate the compounds in high or low toxicity, PCA and HCA were applied to the autoscaled selected descriptors. The PCA scores plot shows a tendency to discriminate the compounds into two groups in PC1 (Figure 5(a) and Supplementary Information, Figure S11). The five most active (high toxicity) compounds, #13, 15, 16, 17 and 18, with the values of EC₅₀ ranging between 0.87 and 3.63 μmol L⁻¹, are displayed on the left side of the graph and present negative scores in PC1. The seven least active (low toxicity), #6, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 with values of EC₅₀ higher than 100.00 μmol L⁻¹, are on the right side of the graph and present positive scores, or close to zero, in PC1. Compounds #1, 3, 4, 5, 14 and 19 are moderately active and are located on the bottom (negative scores in PC2) and centre of the graph, with respect to PC1.

The three descriptors located close to the indan-1,3-dione moiety (C1324, L1290 and L1764) present similar values for the loadings in PC1 (Equation (4)), indicating that all of them contribute equally to discriminate the compounds with higher from those with lower toxicities (Figure 5(b)). The Coulomb descriptor C1324, with high negative loading in PC1, is related to the electrostatic interactions nearby the carbonyl group and the *ortho* position of the aromatic ring where substitutions are made, highlighting the importance of the polar groups in this region of the derivatives. The Lennard-Jones descriptor L3690 is located close to the R2 substituent and it is the most important descriptor in PC2, accounting for the discrimination of the moderately active compounds.

$$PC1 = -0.59 \times C1324 + 0.59 \times L1290 + 0.52 \times L1764 + 0.17 \times L3690 \quad (4)$$

$$PC2 = 0.18 \times C1324 - 0.27 \times L1290 + 0.20 \times L1764 + 0.92 \times L3690 \quad (5)$$

(a)



(b)

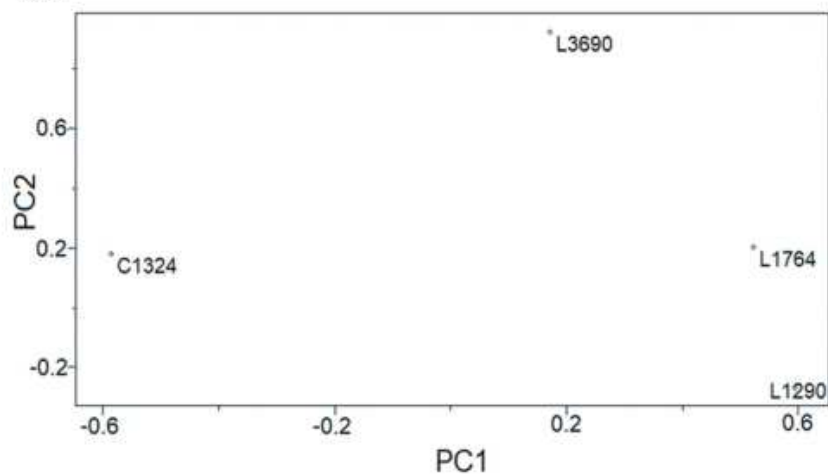


Figure 5. PC1 versus PC2 (a) scores including the 95% confidence ellipse for each cluster and (b) loadings plots of the 2-arylene indan-1,3-dione derivatives tested against *Daphnia magna*. The most toxic compounds are represented by the symbols ▲; the molecules presenting low and moderate toxicity are represented by the symbols ■ and □, respectively.

The HCA was able to discriminate the compounds into three classes of toxicity, with only one mistake (Figure 6). Group C is formed by all of the five most toxic compounds, whereas groups B are composed by six among the seven least toxic ones. Although compound #9 presented low toxicity, it was grouped with the six compounds presenting moderate toxicity, in group A.

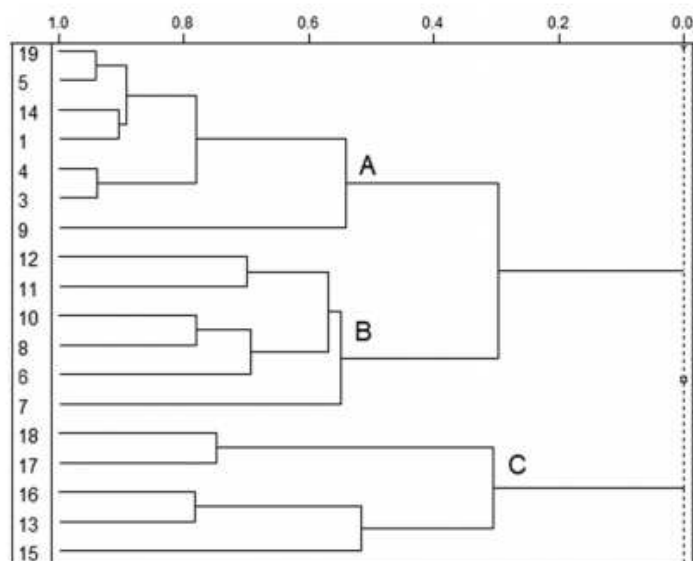


Figure 6. Hierarchical cluster analysis, where the group A is mainly composed by the moderately toxic compounds, B by the least toxic and C by all the most toxic.

Conclusions

The field descriptors generated and selected by the 4D-QSAR analysis were efficient to extract information about the local and type of substituents that can increase toxicity, through the analysis of PLS regression model, besides being useful to discriminate the compounds between more toxic and less toxic, using the PCA and HCA methods.

The 4D-QSAR analysis performed also provided some insight about the action mode of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives on *D. magna* receptors and it is in accordance with the literature regarding the importance of carbonyl groups of indan-1,3-dione structure for biological activity.

Acknowledgements

Authors acknowledge the Brazilian governmental agencies, CNPq and CAPES, for financial support.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

M.C. Andrezza Costa  <http://orcid.org/0000-0003-3102-3371>

M. Miguel Castro Ferreira  <http://orcid.org/0000-0001-5677-0299>

R.R. Teixeira  <http://orcid.org/0000-0003-3181-1108>
 C.M. Jonsson  <http://orcid.org/0000-0002-7630-2131>
 S.C.N. Queiroz  <http://orcid.org/0000-0002-1725-183X>

References

- [1] K. Singh, *Applications of indan-1,3-dione in heterocyclic chemistry*, *Curr. Org. Synth.* 13 (2016), pp. 385–407. doi:10.2174/1570179412666150817222851.
- [2] R. Pluskota and M. Koba, *Indandione and its derivatives - Chemical compounds with high biological potential*, *Mini-Rev. Org. Chem.* 18 (2018), pp. 1321–1330. doi:10.2174/1389557518666180330101809.
- [3] A.F.C.S. Oliveira, A.P.M. Souza, A.S. de Oliveira, M.L. da Silva, F.M. de Oliveira, E.G. Santos, I.E.P. da Silva, R.S. Ferreira, F.S. Villela, F.T. Martins, D.H.S. Leal, B.G. Vaz, R.R. Teixeira, and S.O. de Paula, *Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1,3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease*, *Eur. J. Med. Chem.* 149 (2018), pp. 98–109. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.037.
- [4] V.K. Tyagi, A.K. Chopra, N.C. Durgapal, and A. Kumar, *Evaluation of Daphnia magna as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant*, *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 11 (2007), pp. 61–67.
- [5] M. Wagil, A. Białk-Bielińska, A. Puckowski, K. Wychodnik, J. Maszkowska, E. Mulkiewicz, J. Kumirska, P. Stepnowski, and S. Stolte, *Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms*, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015), pp. 2566–2573. doi:10.1007/s11356-014-3497-0.
- [6] H. Ha, K. Park, G. Kang, and S. Lee, *QSAR study using acute toxicity of Daphnia magna and Hyalella azteca through exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*, *Ecotoxicology* 28 (2019), pp. 333–342. doi:10.1007/s10646-019-02025-1.
- [7] M.M.C. Ferreira, *Polycyclic aromatic hydrocarbons: A QSPR study*, *Chemosphere* 44 (2001), pp. 125–146. doi:10.1016/S0045-6535(00)00275-7.
- [8] K. Khan, P.M. Khan, G. Lavado, C. Valsecchi, J. Pasqualini, D. Baderna, M. Marzo, A. Lombardo, K. Roy, and E. Benfenati, *QSAR modeling of Daphnia magna and fish toxicities of biocides using 2D descriptors*, *Chemosphere* 229 (2019), pp. 8–17. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.04.204.
- [9] E. Perales, J.J. Garcia, E. Pires, L. Aldea, L. Lomba, and B. Giner, *Ecotoxicity and QSAR studies of glycerol ethers in Daphnia magna*, *Chemosphere* 183 (2017), pp. 277–285. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.107.
- [10] A.R. Murthy, S.D. Wyrick, and I.H. Hall, *Hypolipidemic activity of indan-1,3-dione derivatives in rodents*, *J. Med. Chem.* 28 (1985), pp. 1591–1596. doi:10.1021/jm00149a008.
- [11] S.D. Karakotov, V.V. Shapilova, A.L. Chimishkyan, and L.Y. Kozenasheva, *Synthetic methods, anticoagulation activity and toxicity of 2-acyl substituted derivatives of indane-1,3-dione*, *ChemInform* 36 (2005). doi:10.1002/chin.200518241.
- [12] K. Mitka, P. Kowalski, D. Pawelec, and Z. Majka, *Synthesis of novel indane-1,3-dione derivatives and their biological evaluation as anticoagulant agents*, *Croat. Chem. Acta* 82 (2009), pp. 613–618.
- [13] A.G. da Silva and M.N. Ramos, *A multivariate statistical analysis of the quantitative structure-activity relationships (QSAR) of 2-(substituted phenyl)indan-1,3-diones with hypolipidemic activity*, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012), pp. 1747–1755. doi:10.1590/S0103-50532012005000040.
- [14] M. Jeyachandran and P. Ramesh, *Synthesis, antimicrobial, and anticoagulant activities of 2-(arylsulfonyl)indan-1,3-diones*, *Org. Chem. Int.* 2011 (2011), pp. Article ID 360810. doi:10.1155/2011/360810.
- [15] O. Kouzi, E. Pontiki, and D. Hadipavlou-Litina, *2-Arylidene-1-indandiones as pleiotropic agents with antioxidant and inhibitory enzymes activities*, *Molecules* 24 (2019), pp. 4411. doi:10.3390/molecules24234411.
- [16] D.D. Dantzger, M. Dantzger, C.M. Jonsson, and H. Aoyama, *In vitro effects of agriculture pollutants on microcrustacean and fish acid phosphatases*, *Water Air Soil Pollut.* 228 (2017), pp. 391. doi:10.1007/s11270-017-3570-7.

- [17] Manugistics Group Inc., *STATGRAPHICS® Plus Version 5.1*, Rockville, MD, USA, 2011.
- [18] Cambridge Crystallographic Data Centre, *Cambridge Structural Database Software Version 5.29-2007 + 1 Update*, Cambridge Crystallographic Data Centre, UK, 2007.
- [19] Available at <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/search?id=doi:10.5517/ccdc.csd.cc1lsgc6&sid=DataCite> accessed October, 2020.
- [20] Available at <https://www.ccdc.cam.ac.uk/structures/search?id=doi:10.5517/ccdc.csd.cc1lsgb5&sid=DataCite> accessed October, 2020.
- [21] F. Weigend and R. Ahlrich, *Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7 (2005), pp. 3297–3305. doi:10.1039/b508541a
- [22] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery Jr., T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, J.B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, and J.A. Pople, *Gaussian 09 (Revision A.02)*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [23] A.B. Nielsen and A.J. Holder, *GaussView 3.0*, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2000-2003.
- [24] J.P.A. Martins, E.G. Barbosa, K.F.M. Pasqualato, and M.M.C. Ferreira, *LQTA-QSAR: A new 4D-QSAR methodology*, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009), pp. 1428–1436. doi:10.1021/ci900014f.
- [25] E. Lindahl, B. Hess, and D. van der Spoel, *GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis*, *J. Mol. Mod.* 7 (2001), pp. 306–317. doi:10.1007/s008940100045.
- [26] H. Kubinyi, *QSAR and 3D QSAR in drug design Part 1: Methodology*, *Drug Discov. Today* 2 (1997), pp. 457–467. doi:10.1016/S1359-6446(97)01079-9.
- [27] E.G. Barbosa and M.M.C. Ferreira, *Digital filters for molecular interaction field descriptors*, *Mol. Inf.* 31 (2012), pp. 75–84. doi:10.1002/minf.201000181.
- [28] J.P.A. Martins and M.M.C. Ferreira, *QSAR modeling: A new open source computational package to generate and validate QSAR models*, *Quim. Nova.* 36 (2013), pp. 554–560. doi:10.1590/S0100-40422013000400013.
- [29] R.F. Teófilo, J.P.A. Martins, and M.M.C. Ferreira, *Sorting variables by using informative vectors as a strategy for feature selection in multivariate regression*, *J. Chemom.* 23 (2009), pp. 32–48. doi:10.1002/cem.1192.
- [30] M.M.C. Ferreira, *Multivariate QSAR*, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002), pp. 742–753. doi:10.1590/S0103-50532002000600004.
- [31] OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 69, OECD, *guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] models*, Paris, 2007, Available at <http://www.oecd.org/dataoecd/55/35/38130292.pdf>. Accessed October, 2020.
- [32] R. Kiralj and M.M.C. Ferreira, *Basic validation procedures for regression models in QSAR and QSPR studies: Theory and application*, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009), pp. 770–787. doi:10.1590/S0103-50532009000400021.
- [33] L. Eriksson, J. Jaworska, A.P. Worth, M.T. Cronin, P.R.M. McDowell, and P. Gramatica, *Methods for reliability and uncertainty assessment and for applicability evaluations of classification- and regression-based QSAR*, *Environ. Health Persp.* 111 (2003), pp. 1361–1375. doi:10.1289/ehp.5758.
- [34] R. Kiralj and M.M.C. Ferreira, *Is your QSAR/QSPR descriptor real or trash?* *J. Chemom.* 24 (2010), pp. 681–693. doi:10.1002/cem.1331.
- [35] S. Verma, A.K. Srivastava, and O.P. Pandey, *A review on chalcones synthesis and their biological activity*, *Pharma. Tutor.* 6 (2018), pp. 22–39. doi:10.29161/PT.v6.i2.2018.22.

- [36] H.N. Pati, U. Das, E.D. Clercq, J. Balzarini, and J.R. Dimmock, *Molecular modifications of 2-arylidene-1-indanones leading to increased cytotoxic potencies*, *J. Enz. Inh. Med. Chem.* 22 (2007), pp. 37–42. doi:10.1080/14756360600958057.
- [37] P.C. von der Ohe, R. Kühne, R.-U. Ebert, R. Altenburger, M. Liess, and G. Schüürmann, *Structural Alertss - A new classification model to discriminate excess toxicity from narcotic effect levels of organic compounds in the acute daphnid assay*, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005), pp. 536–555. doi:10.1021/tx0497954.
- [38] S.J. Enoch, C.M. Ellison, T.W. Schultz, and M.T.D. Cronin, *A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent protein binding relevant to toxicity*, *Crit. Rev. Toxicol.* 41 (2011), pp. 783–802. doi:10.3109/10408444.2011.598141.
- [39] M. Matveieva, M.T.D. Cronin, and P. Polishchuk, *Interpretation of QSAR models: Mining structural patterns taking into account molecular context*, *Mol. Inf.* 38 (2019), pp. 1800084. doi:10.1002/minf.201800084.