UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional
Tecnologia em Química e Bioquímica

ALEXANDRE LEAL GURGEL

Estudos sobre a síntese de novos inibidores da InhA
(enoil-acp reductase da *Mycobacterium tuberculosis*)

Versão corrigida da Dissertação, conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
26/07/2017

ALEXANDRE LEAL GURGEL

**Estudos sobre a síntese de novos inibidores da InhA
(enoil-acp reductase da *Mycobacterium tuberculosis*)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências*

Orientador: Prof. Dr. Márcio Henrique Zaim

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

LG979e Leal Gurgel, Alexandre
Estudos sobre a síntese de novos inibidores da
InhA (enoil-acp reductase da Mycobacterium
tuberculosis) / Alexandre Leal Gurgel. - São Paulo,
2017.
115 p.

- Instituto de Química da Universidade de São
Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Henrique Zaim, Marcio

1. 1-H-2-aminoindol. 2. Carbodiimidas. 3.
Arilamidas. 4. Tuberculose. I. T. II. Henrique
Zaim, Marcio, orientador.

“Estudos sobre a síntese de novos inibidores da InhA
(enoil-acp reductase da *Mycobacterium tuberculosis*)”

ALEXANDRE LEAL GURGEL

Dissertação de Mestrado Profissional submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências no Programa: Mestrado Profissional em Tecnologia em Química e Bioquímica.

Aprovado (a) por:

Prof. Dr. Marcio Henrique Zaim
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos
IQ - USP

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Costa Touzarim
BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA

SÃO PAULO
10 de novembro de 2017

Aos meus pais, Benjamim e Jandira,
base de tudo o que sou. Seus
ensinamentos e seu carinho estarão
para sempre em meu coração.

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar, ao Deus Eterno, o Criador de tudo, meu Pai Celestial, aquele que me deu a vida e me encheu de oportunidades.
- Ao meu pai Benjamim, meu maior exemplo de dedicação e honestidade. Adoraria que estivesse aqui. Como sinto a sua falta!
- À minha mãe Jandira, que além de possuir incontáveis qualidades tomou minha tabuada, exigiu minhas lições, me incentivou à educação, fornecendo seu alicerce principal.
- À minha querida esposa Ana Paula, pelo incentivo, compreensão, apoio e suporte, imprescindíveis para o cumprimento da missão, além de revigorar minhas forças.
- Às minhas filhas Luísa e Beatriz, por suportarem a ausência do papai, e sempre me receberem com todo seu amor.
- Ao Dr. Fabrício Vargas, obrigado pelo “start”, pela ajuda, visão e encorajamento.
- Ao meu orientador, Dr. Márcio Henrique Zaim, por me confiar o projeto e pelo conhecimento compartilhado.
- Aos colegas de laboratório que “velaram” meus balões e tiraram os espectros na minha ausência: Juliana, Matheus, Douglas, Rebeca, Charles e Bruno. Vocês são muito legais!
- À Professora Liliana Marzorati, sua alegria e seu ânimo constantes me contagiaram e me fortaleceram ao longo da jornada.
- Aos acionistas e gerentes da Biolab, Dr. Dante Alario Jr, Dr. Claudio Hirai e Rute Chuang, pela parceria e pelas horas liberadas para o cumprimento das disciplinas.
- A meus tios Nivaldo e Ivone, meus primeiros incentivadores à leitura, a meu irmão Adriano, e a todos os demais amigos e parentes que, de alguma maneira, me encorajaram e ajudaram.

A todos vocês, meu “MUITO OBRIGADO”!

“Filho, se você parar de aprender, logo esquecerá o que sabe.”

Provérbios de Salomão 19: 27 (NTLH)

RESUMO

Gurgel, A.L. **Estudos sobre a síntese de novos inibidores da InhA (enoil-acp reductase da *Mycobacterium tuberculosis***. 2017. 115p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Química e Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Ao contrário da percepção da sociedade em geral, a tuberculose ainda é uma das mais graves doenças infecciosas da atualidade, estando à frente da HIV/AIDS como uma das maiores causas de morte por infecção. Apesar de todos os avanços recentes, o aparecimento de cepas multirresistentes não permitiu sua erradicação. Em 2016, a OMS lançou novos alvos rumo à erradicação global da enfermidade (End TB), alvos estes que, no Brasil, foram divulgados no “Plano Nacional pelo Fim da TB”, do Ministério da Saúde. Para que estas metas possam ser atingidas, a pesquisa em busca de novos fármacos, que possam diminuir o tempo de tratamento e seus efeitos adversos, tem papel fundamental.

Modelagem molecular e planejamento racional otimizam a busca das novas drogas potenciais. Assim, modelos de QSAR aliados a metodologias de planejamento de fármacos auxiliados por computador (CADD) foram usados para a proposição das moléculas que se tornaram o alvo da síntese deste trabalho.

Dois procedimentos distintos foram utilizados para sintetizar 1-*H*-2-aminoindol a partir de *orto*-cloronitrobenzeno. Paralelamente, quatro ácidos succinâmicos foram preparados pela reação de anidrido succínico com diferentes aminas. Posteriormente, cada ácido succinâmico deveria ser acoplado ao 1-*H*-2-aminoindol por meio de agentes de acoplamento como as carbodiimidas.

Os resultados obtidos indicam que DCC em diclorometano pode ser eficiente para a síntese dos potenciais novos fármacos.

Palavras-chave: 1-*H*-2-aminoindol, carbodiimidas, arilamidas, ligação amídica, tuberculose

ABSTRACT

Gurgel, A.L. **Studies about the synthesis of novel inhibitors of InhA (enoyl-*acp* reductase from *Mycobacterium tuberculosis***. 2017. 115p. Masters Thesis – Graduate Program in Chemistry and Biochemistry Technology. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Contrary to popular belief, tuberculosis TB is still one of the most serious of infectious diseases today, surpassing AIDS/HIV as one of the major causes of death by infection. In spite of recent advances, the appearance of multi-resistant strains prevents its eradication. In 2016, the OMS launched new goals for global eradication of the disease (End TB), goals that, in Brazil, were disclosed through the “National Plan to End TB,” from the Ministry of Health. In order to reach these goals, studies in search of new anti-mycobacterials that could lessen the treatment time and its adverse effects have a fundamental role.

Molecular modeling and rational planning optimize the search for new potential drugs. Thus, QSAR models in line with computer-aided drug design (CADD) were used for the molecule proposition that became the synthesis target of this work.

Two distinct proceedings were utilized to synthesize 1-*H*-2-aminoindole from the *ortho*-chloronitrobenzene. Simultaneously, four succinamic acids were prepared by the reaction of succinic anhydride with different amines. Posteriorly, each succinamic acid should be coupled with 1-*H*-2-aminoindole by way of coupling agents such as carbodiimides.

The results obtained indicate that DCC in dichloromethane can be efficient for the synthesis of potential new drugs.

Keywords: 1-*H*-2-aminoindole, carbodiimides, arylamides, amide bond, tuberculosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR – Attenuated Total Reflectance (Reflectância Total Atenuada)

BCG – Vacina contra a tuberculose (Bacilo de Calmette-Guérin)

CADD – Computer Aided Drug Design

CBDI – Carbodiimidas

CEMSA – Centro de Espectrometria de Massas Aplicada

DCC – Dicicloexilcarbodiimida

DCM - Diclorometano

DCU – Dicicloexilureia

DFASA - Ácido-4-difenilamina-4-oxo-butanóico

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDC - Cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

ENR – Enoil-acp redutase

ESI – Electrospray ionization

FAS – Fatty acid synthase (Síntese de ácido graxo)

FTIR – Fourier Transform Infrared

HIV/AIDS – Human Immunodeficiency Virus/ Acquired Immuno Deficiency Syndrome

NHS – N-hidroxi-succinimida

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

ODM – Objetivos do Milênio

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde

PCR – técnica de biologia molecular

QSAR – Quantitative Structure-Activity Relationship

RTR-TB – Rede de Teste Rápido para a Tuberculose

SUS – Sistema Único de Saúde

TB – Tuberculose

TB-MDR – Multi Drug Resistent Turbeculosis (Tuberculose multirresistente a antibióticos)

TEBAC – Cloreto de benzil trietilamônio

THF - Tetraidrofurano

TMS – Trimetilsilano

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 A Tuberculose.....	14
1.1.1 No mundo.....	14
1.1.2 No Brasil.....	18
1.2 Planejamento Racional.....	23
2. Objetivo.....	25
3. Materiais e métodos.....	26
3.1 Materiais.....	26
3.1.1 Reagentes.....	26
3.1.2 Solventes.....	26
3.1.3 Equipamentos.....	26
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Preparação do 1- <i>H</i> -2-aminoindol (4).....	28
3.2.1.1 Preparação da 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (1)... 29	
3.2.1.2 Preparação da 2-nitrofenil-acetonitrila (2).....	30
3.2.1.3 Preparação do Cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol (3).....	31
3.2.1.4 Neutralização do cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol (4).....	32
3.2.2 Método alternativo para preparação de cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol (3).....	33
3.2.2.1 Preparação do 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (1)....	34
3.2.2.2 Preparação do 2-amino-3-etoxicarbonilindol (7).....	35
3.2.2.3 Descarboxilação (3).....	36
3.2.3 Preparação dos ácidos succinâmicos (5a-d).....	37
3.2.3.1 Preparação do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a).....	37
3.2.3.2 Preparação do ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b).....	38
3.2.3.3 Preparação do ácido 4-(2-naftalenilamino)-4-oxobutanóico (ácido succinâmico 5c).....	39

3.2.3.4	Preparação do ácido N-metil-N-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d).....	40
3.2.4	Acoplamento com carbodimiidas.....	41
3.2.4.1	Acoplamento do 1- <i>H</i> -2-aminoindol com ácidos succinâmicos utilizando dicicloexilcarbodiimida (DCC).....	41
3.2.4.1.1	Utilizando tetraidrofurano (THF) como solvente.....	41
3.2.4.1.2	Utilizando tetraidrofurano (THF) como solvente.....	42
3.2.4.2	Testes de acoplamento de 1- <i>H</i> -2-aminoindol com ácidos succinâmicos utilizando EDC.....	43
3.2.4.2.1	Acoplamento de ácido N-metil-N-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico com anilina.....	43
3.2.4.2.2	Acoplamento de ácido 4-(2-naftalenilamino)-4-oxobutanóico com anilina utilizando EDC.....	44
3.2.4.3	Acoplamento de cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol com ácidos succinâmicos.....	45
3.2.5	Tentativa de preparação de um ácido succinâmico alternativo (8)....	45
3.2.5.1	Acoplamento de 1- <i>H</i> -2-aminoindol com anidrido succínico	46
3.2.5.2	Acoplamento do cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol com anidrido succínico e adição de ácido-4-difenilamina-4-oxo-butanóico (5a)	46
4.	Resultados e Discussão.....	47
4.1	Questões Gerais.....	47
4.2	Preparação do 1- <i>H</i> -2-aminoindol.....	48
4.2.1	A comparação entre os dois procedimentos.....	49
4.2.1.1	Etapa 1 – De <i>orto</i> -cloronitrobenzeno a nitrofenil cianoacetato de etila.....	50
4.2.1.2	Etapa 2 – Descarboxilação direta versus Redução preliminar com Fe.....	51
4.2.1.3	Etapa 3 – A redução com Sn/HCl versus a descarboxilação com HCl à secura.....	53
4.2.2	Resumo da comparação entre os procedimentos 1 e 2 para a obtenção do cloridrato de 1- <i>H</i> -2-aminoindol.....	54
4.2.3	Obtenção do 1- <i>H</i> -2-aminoindol-base.....	55

4.3	Preparação dos ácidos succinâmicos.....	58
4.4	Acoplamento do 1- <i>H</i> -2-aminoindol com os ácidos succinâmicos na presença de carbodiimidas.....	59
4.4.1	Aspectos gerais.....	59
4.4.2	A formação da ligação amida.....	60
4.4.3	As carbodiimidas como agentes de condensação.....	63
4.4.4	Resultados das tentativas de acoplamento.....	65
5.	Referências.....	66
6.	Apêndice.....	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. A TUBERCULOSE

1.1.1. No mundo

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa transmissível que afeta prioritariamente os pulmões e que, ainda que exista uma vacina eficaz direcionada à população infantil, continua sendo uma das doenças infecciosas mais fatais em todo o mundo, constituindo uma das dez principais causas de morte¹. Sua erradicação está, ainda, longe de ser uma batalha vencida. Como será exposto, contribuem para este quadro a propagação da AIDS e o surgimento de focos de tuberculose resistentes aos medicamentos existentes².

Estima-se que de 2 a 3 bilhões de pessoas estejam infectadas com a doença, e os índices de mortalidade e de incidência de novos casos continuam preocupando a comunidade internacional e as agências de saúde, ainda que, dentre as pessoas infectadas, apenas de 5 a 15% cheguem a desenvolver a doença³. A estimativa de 2015 é de que 1,8 milhões de pessoas tenham morrido em consequência da infecção por TB³. Por isso mesmo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem, sistematicamente, editando relatórios globais e lançando metas de diminuição e erradicação da doença. Em seu último relatório, publicado em 2016, em acordo com a Assembleia Mundial da Saúde realizada em 2014, estabeleceu alvos de redução de 90% na mortalidade por TB e uma redução de 80% na taxa de incidência da doença até 2030, em comparação com 2015³.

No entanto, existem muitos desafios a serem superados até que se alcancem as metas estabelecidas e se possa, finalmente, concentrar os esforços na erradicação total da enfermidade.

Difícilmente as metas serão alcançadas na velocidade desejada antes que se resolvam os problemas referentes ao diagnóstico rápido e às notificações reais, tão dependentes do engajamento dos países em desenvolvimento no que se refere à vigilância e à pesquisa. Em 2015, por exemplo, dos 10,4 milhões de novos casos no mundo estimados pela OMS, apenas 6,1 milhões foram notificados às autoridades oficiais dos países e reportados à Organização. Este hiato é decorrente, essencialmente, de dois fatores: nos países com grande atuação do setor privado no atendimento à população (menos comprometido com o acompanhamento do número exato de diagnósticos de TB feito pelo poder público), tem-se a ocorrência de subnotificação dos casos de TB; já nos países em que a população possui maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde, seja ela decorrente de barreiras geográficas ou financeiras, o problema deriva do subdiagnóstico da doença⁷. É o caso da Índia, que em 2013 registrou aumento de 34% das notificações de novos casos e assim, descobriu-se que a epidemia era maior do que se estimava, e os casos notificados de tuberculose em nível global aumentaram com o acréscimo destas novas notificações. Os citados 10,4 milhões de novos casos em todo o mundo, em 2015, representaram uma taxa de declínio de apenas 1,5% em relação ao ano anterior. Ora, para alcançar os primeiros alvos da Estratégia da OMS para erradicação da TB, esta taxa de declínio deveria ser de 4 a 5% ao ano até 2020³.

Outro dificultador reside no fato do meio de transmissão da doença ser relativamente fácil. A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa antiga causada por

micobactérias do "complexo de *tuberculosis*", incluindo *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, e, principalmente, *Mycobacterium tuberculosis*⁴. Esse bacilo é transmitido em maior escala quando as pessoas que estão doentes com TB pulmonar expulsam as bactérias para o ar, por exemplo, tossindo. O problema se agrava quando o contágio atinge pessoas imunodeficientes, como os portadores de HIV/AIDS: as pessoas que estão coinfetadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e TB são de 21 a 34 vezes mais propensas a ficar doentes com TB⁶. Tanto é assim que, da estimativa de 1,8 milhão de pessoas que morreram em 2015 em decorrência da tuberculose, 0,4 milhão delas estavam coinfetadas com HIV³. Similarmente, o risco de TB ativa é também maior em pessoas que sofrem de outras doenças que prejudicam o sistema imunológico. Tudo isso, além de aumentar consideravelmente as fatalidades, aumenta a já grave resistência da população micobacteriana aos fármacos em uso. A OMS estima que a tuberculose multirresistente aos antibióticos (TB-MDR) tenha afetado 480 mil novas pessoas no ano de 2015, além dos 100 mil casos de tuberculose resistente à rifampicina que necessitaram do mesmo tratamento dado aos pacientes com TB-MDR. Índia, China e Rússia responderam por 45% destes 580.000 casos³.

Não bastassem as características intrínsecas da enfermidade representarem tão grande dificuldade ao seu combate, as medidas que poderiam amenizar seu avanço e reverter o quadro descrito anteriormente ainda estão aquém do esperado. Um exemplo disto é justamente o que ocorre com o financiamento para pesquisa e desenvolvimento relativos à doença. A OMS afirma serem necessários investimentos de aproximadamente 2 bilhões de dólares por ano em investigação e desenvolvimento de medicamentos. Porém, na década de 2005 a 2014, em nenhuma ocasião a verba investida superou 0,7 bilhão anual³. Com isso, o valor necessário para 2016 passou a

ser US\$ 8,3 bilhões, o que significa uma queda de US\$ 2 bilhões e, caso os níveis atuais de financiamento não sejam aumentados, essa lacuna aumentará para US\$ 6 bilhões até 2020⁷. Além disso, o “Fundo Global para a AIDS, Malária e Tuberculose”, responsável por cerca de 75% do financiamento da pesquisa da TB nos países de baixa e média renda, tem recebido suas verbas com certa predileção pelas duas primeiras patologias (AIDS e Malária), em detrimento da última (TB). Ou seja, o financiamento internacional de doadores para a tuberculose está muito aquém das contribuições dos doadores para o HIV e para a malária, apesar da tuberculose ter sido responsável por mais óbitos que o HIV e a malária no ano de 2015, por exemplo. Os dados mais recentes do sistema de relatórios de credores da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) mostram doações de US\$ 5,4 bilhões para o HIV/AIDS, US\$ 1,7 bilhão para a malária e apenas US\$ 0,7 bilhão para a tuberculose em 2014. Este valor é insuficiente, uma vez que o custo por paciente tratado está geralmente na faixa de US\$ 100-1.000 em casos de tuberculose suscetível a drogas, e US\$ 2.000-20.000 para TB-MDR.³

A crise de detecção e tratamento da TB-MDR também continua. Em 2015, das cerca de 580.000 pessoas recentemente elegíveis para o tratamento TB-MDR, apenas 125.000 (20%) foram inscritas.³

Finalmente, há que se ressaltar, mesmo em meio a todo este quadro negativo descrito acima, que alguns resultados positivos começaram a aparecer. Entre o ano 2000 e 2015, por exemplo, a taxa de morte por tuberculose diminuiu 22%. Além disto, novos testes de diagnóstico rápido foram desenvolvidos e novos fármacos estão em fase final de testes. Adicionalmente, é cada vez mais forte a monitorização global da tuberculose.

Em relação à vacinação, a BCG (bacilo Calmette-Guérin, nome dado em homenagem aos cientistas Albert Calmette e Camille Guérin, que conseguiram isolar uma cepa do bacilo da tuberculose em 1908) deve ser aplicada à criança assim que ela nasce ou, no máximo, antes que ela complete 5 anos de vida. Oferece proteção contra as formas mais graves da doença na infância, como a tuberculose miliar e a meníngea, não impedindo, no entanto, o adoecimento em outras fases da vida⁸. A vacinação BCG deve ser fornecida como parte dos programas nacionais de imunização infantil de acordo com a epidemiologia de TB de um país. Em 2015, 163 países informaram fornecer a vacinação BCG como uma parte padrão destes programas; 102 relataram cobertura acima de 90%.

1.1.2. No Brasil

No Brasil, a despeito dos recentes resultados positivos obtidos, a tuberculose ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais, possuindo relação direta com a pobreza e a exclusão social². Segundo dados da OMS referentes ao ano de 2015, 80% dos casos de tuberculose reportados no mundo se concentraram em 22 países, dentre os quais o Brasil ocupa a 20ª posição quanto à carga da doença e a 19ª no que se refere à coinfeção TB-HIV⁹. A cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,5 mil mortes em decorrência da doença². Ela é a quarta causa de morte dentre as doenças infecciosas e a doença que mais mata os soropositivos. No entanto, a tuberculose tem cura e o tratamento é gratuito e disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Segundo o Ministério da Saúde, a população mais vulnerável à tuberculose é a dos moradores de rua (devido às condições de vida e às dificuldades de acesso aos

serviços de saúde), cujo risco de infecção é 56 vezes maior que na população geral. Em seguida, estão as pessoas com HIV/AIDS e a população carcerária, ambas com risco 28 vezes maior; e os indígenas, com risco três vezes maior¹⁰. A título de exemplo, em 2016, dentre as pessoas com diagnóstico confirmado de tuberculose, 9,4% apresentaram coinfeção por HIV¹¹.

De 2004 a 2014, o Brasil reduziu em 22,8% a incidência de casos novos de tuberculose e em 20,7% a taxa de mortalidade pela doença. Em 2014, a incidência da doença no Brasil foi de 33,5 casos por 100 mil habitantes, contra 43,4/100 mil em 2004. O número de casos novos teve redução de 12,5%, passando de 77.694, em 2004, para 67.966 casos novos registrados em 2014. A taxa de mortalidade de 2013 foi de 2,3 óbitos por 100 mil habitantes, abaixo dos 2,9 óbitos por 100 mil habitantes registrados em 2003¹². Considerando o período de 2007 a 2016, o coeficiente de incidência da doença apresentou uma variação média anual de -1,7% e passou de 37,90/100 mil habitantes, em 2007, para 32,4/100 mil habitantes, em 2016. A redução da incidência nestes 10 anos foi de 14,1%. A meta até 2035 é ter a incidência menor que 10/100 mil habitantes¹³. A descentralização do tratamento para a Atenção Básica pode ser apontada como uma das causas da redução nos índices da doença. Após atingir as metas dos Objetivos do Milênio (ODM) de combate à tuberculose com três anos de antecedência, o Ministério da Saúde assumiu o compromisso de reduzir em 95% os óbitos e em 90% o coeficiente de incidência da doença até 2035¹³. Recentemente, em 29/06/2017, foi lançado o “Plano Nacional pelo Fim da Tuberculose”, ratificando a meta de chegar a menos de 10 casos por 100 mil habitantes até o ano de 2035. Além disso, o País quer reduzir o coeficiente de mortalidade para menos de 1 óbito por 100 mil habitantes. Para tanto, o Plano Nacional está baseado em três pilares:

- prevenção e cuidado integrado centrado no paciente (o que possibilita melhorias no diagnóstico precoce, tratamento adequado e intensificação da prevenção);
- desenvolvimento de políticas arrojadas e sistema de apoio;
- intensificação da pesquisa e inovação¹¹.

Como mencionado, a descentralização do tratamento para a Atenção Básica teve papel fundamental na redução nos índices da doença no país. Como o SUS disponibiliza gratuitamente o tratamento contra a tuberculose, qualquer pessoa que apresente tosse, com ou sem catarro, por mais de três semanas (principal sintoma da tuberculose), pode procurar uma unidade de saúde a fim de fazer o diagnóstico. Isto porque em 2014, o Ministério da Saúde implantou no País a Rede de Teste Rápido para Tuberculose (RTR-TB), que utiliza a técnica de biologia molecular PCR em tempo real. Assim, na unidade de saúde, o paciente com suspeita de TB será submetido a um teste rápido, o “Gene Xpert”, que detecta a presença do bacilo causador da doença em apenas duas horas e identifica se há resistência ao antibiótico rifampicina, usado no tratamento. Este recurso está disponível em 94 municípios do País, englobando todos os estados e o Distrito Federal. Os testes foram distribuídos em cidades consideradas estratégicas para o controle da TB, já que, somadas, concentram 60% dos casos novos do País. Dentre esses municípios estão todas as capitais e aqueles com mais de 130 casos novos de tuberculose. Dentre as capitais, as mais acometidas pela doença estão Porto Alegre, Cuiabá, Recife e Manaus, com mais de 90 casos por 100 mil habitantes¹².

O Ministério da Saúde investiu R\$ 15 milhões na implantação do teste no SUS em 2015. Ao todo, foram distribuídas 160 máquinas, com capacidade de realizar, juntas, 640 mil testes por ano¹³. Além disso, os recursos foram destinados à aquisição de testes, máquinas (computadores de última geração com leitor de código de barras) e

ao treinamento dos profissionais de saúde. A nova tecnologia, testada inicialmente nas cidades de Manaus (AM) e Rio de Janeiro (RJ), proporcionou aumento da taxa de detecção e de satisfação dos usuários e profissionais de saúde.

Com relação aos esforços para incrementar os recursos destinados à pesquisa da TB no Brasil, cabe mencionar a constituição da “Frente Parlamentar de Tuberculose das Américas”, em 15/03/2016, por ocasião do Dia Mundial da Tuberculose. Esta Frente, formada por Deputados do Brasil, Bolívia, México, Nicarágua, Peru e Uruguai, tem como objetivo trabalhar no novo marco da nova estratégia mundial “Fim da Tuberculose” e no Plano de Ação para a Prevenção e Controle da Tuberculose, 2016-2019, da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, que atua como escritório regional da OMS nas Américas). Adicionalmente, ela deve trabalhar estreitamente com os governos e a sociedade civil para que se destinem recursos financeiros suficientes para atividades que ponham fim à doença. Dentre suas propostas de ação junto aos legisladores dos países participantes, cabe destacar o fortalecimento de programas de prevenção à doença, sua detecção precoce e a implementação de novas técnicas de diagnóstico e pesquisa¹⁴.

Apesar de todo o avanço obtido no Brasil em relação ao diagnóstico da doença, isto não é suficiente para que um paciente atinja a cura. Para tanto, é necessário que ele realize o tratamento durante seis meses, sem interrupção. O principal obstáculo técnico para a eliminação da tuberculose como um problema de saúde pública no Brasil, é justamente o abandono do tratamento, o qual, por um lado, pode ser atribuído à sua longa duração (seis meses) e/ou aos efeitos adversos provocados pelos medicamentos; por outro, em relação às populações mais vulneráveis mencionadas anteriormente, o abandono pode ser atribuído à dificuldade de acesso ao diagnóstico e

ao tratamento compartimentado das patologias, negligenciando a presença de coinfeções¹⁵. Mesmo com a retomada do tratamento após seu abandono, os casos de retratamento da tuberculose apresentam risco maior de desenvolvimento de resistência aos fármacos¹⁶

Não por acaso a campanha de alerta em relação à tuberculose, lançada pelo Ministério da Saúde em 2017 (“Todos contra a Tuberculose”), teve como principal objetivo sensibilizar a população sobre a importância de aderir ao tratamento contra a doença e, essencialmente, completá-lo¹³.

Por fim, diante de todo esse quadro, em manifestação recente (março/2017), a OMS reforçou a necessidade fundamental de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos capazes de enfrentar a tuberculose multidroga resistente, afirmando que há consenso acerca da posição prioritária que a TB ocupa no contexto de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos¹⁷, que é exatamente o que se pretende com o presente trabalho.

1.2. PLANEJAMENTO RACIONAL

A necessidade da diminuição dos trágicos números e, por fim, a erradicação da TB em todo o mundo, obriga a comunidade científica a se empenhar com urgência na tarefa de desenvolvimento de novos fármacos. Busca-se um agente potencialmente superior e extremamente seletivo. Tais sucessos permitiriam uma adequação das doses e consequente diminuição do tempo de tratamento o que diminuiria os efeitos adversos e aumentaria a taxa de adesão. Inúmeros avanços em cascata seriam logo percebidos. Com maior adesão ao tratamento, maior seria a taxa de cura, diminuição do aparecimento de novas cepas resistentes, menor o número de mortes, e então a tão sonhada erradicação.

As ferramentas mais modernas para o desenvolvimento dos novos fármacos se baseiam em um planejamento racional de novas moléculas. Esse processo parte de conhecimentos prévios dos processos bioquímicos que envolvem a enfermidade e a base química dos fármacos já utilizados no tratamento. A partir desse conhecimento, propõem-se moléculas teoricamente mais ativas que as drogas atuais.

O desenho racional desses novos medicamentos contra a tuberculose envolve, por exemplo, alvos relacionados com as vias bioquímicas metabólicas específicas que ocorrem durante a biossíntese da parede celular, especialmente aqueles que estão envolvidos na síntese de ácidos graxos do sistema FAS (Fatty acid synthase). O sistema FAS-II é uma diferença importante entre a bioquímica dos mamíferos e das micobactérias. A proteína transportadora enoil-acp redutase (ENR) é a enzima chave desse sistema, responsável pela etapa de elongação de ácidos micólicos, que são os componentes principais da parede celular do *M. Tuberculosis*^{18, 19}.

O planejamento, efetuado para a proposição do presente trabalho, utilizou a metodologia de desenho de drogas assistido por computador (CADD) para um conjunto de quarenta e seis derivados pirrolidina carboxamida²⁰, que foram anteriormente relatados como potenciais inibidores da ENR de *M. tuberculosis* (chamada InhA)²¹. A atividade inibidora contra a InhA foi dada na forma de valores de IC₅₀ (uM). Com análise de dinâmica molecular, propriedades moleculares de natureza distinta (estrutural, eletrônica, estérico, topológico, termodinâmica, hidrofóbica), e diferentes métodos e programas computacionais, utilizou-se de QSAR multivariada²² para gerar o melhor modelo de predição. Além disso, uma outra classe química (arilamidas), que não estava estruturalmente relacionada com as pirrolidina carboxamidas, mas apresentava o mesmo modo de ligação à InhA, foi empregado para investigar a capacidade de previsão do modelo QSAR selecionado. O modelo QSAR previu que 79 % das arilamidas se ajustam e podem ser consideradas como um ponto de partida adequado para a geração de novas entidades químicas potencialmente ativas contra InhA.

Na verdade, os resultados de QSAR gerados para o conjunto inicial de carboxamidas pirrolidínicas foram, de fato, aplicados à proposição de novas estruturas químicas como protótipos e para o cálculo dos seus valores de atividade inibitória. Além disso, uma biblioteca química teórica de inibidores InhA poderá ser gerada e também otimizada por meio do modelo QSAR final.

2. OBJETIVO

O objetivo principal do trabalho foi propor rotas sintéticas para as arilamidas selecionadas a partir do trabalho de planejamento racional e que obtiveram ótimos valores teóricos de IC₅₀.

Esquema 1: Estruturas das moléculas alvo deste projeto

Posteriormente, cada uma deverá ser testada em sua toxicidade aguda e atividade biológica. Bons resultados levarão à possibilidade de testes *in vivo*. O objetivo mais otimista como resultado desta proposta seria a descoberta de um novo conjunto de potenciais candidatos a novos fármacos anti-TB, em especial para tipos resistentes de linhagens de *M. tuberculosis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes de origem comercial: *orto*-cloro-nitrobenzeno (Fluka), cianoacetato de etila, terc-butóxido de potássio, ferro, estanho, anidrido succínico, anilina, naftilamina, difenilamina, N-metil-9-antracenometilamina, ácido acético, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, carbonato de potássio, bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de trietilbenzilamônio, sulfato de sódio e pentóxido de fósforo.

3.1.2. Solventes

Terc-butanol, dimetilsulfóxido, etanol, diclorometano, tetraidrofurano, tolueno, hexano, acetato de etila, ciclohexano, clorofórmio, clorofórmio-d, dimetilsulfóxido-d6. Tais solventes foram utilizados sem prévia purificação.

3.1.3. Equipamentos

As análises foram realizadas nos seguintes equipamentos:

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C – Varian Inova 300 MHz, utilizando-se tubos de 5,0 mm. (Central Analítica do IQ-USP)

Infravermelho: Agilent Cary 630 FTIR com módulo de ATR (Biolab Sanus)

Espectrômetro de Massas: QTrap 5500 – ABSciex (Biolab Sanus)

3.2. Métodos

As moléculas alvo diferem, em sua estrutura, pelas aminas substituídas. Têm, em comum, o grupo aminoindol e a parte central formada pelo grupo a ele ligado. Assim, numa primeira etapa, sintetizou-se o 1-*H*-2-aminoindol (**4**). Paralelamente, partiu-se da reação das diferentes aminas com anidrido succínico para a formação dos respectivos ácidos succinâmicos (**5a-d**). Em um terceiro momento, fez-se a tentativa de acoplamento do 1-*H*-2-aminoindol (**4**) com os ácidos succinâmicos (**5a-d**) utilizando-se derivados de carbodiimidas como agentes de condensação para a obtenção dos produtos (**6a-d**).

3.2.1. Preparação do 1-*H*-2-amino-indol (**4**).

O 1-*H*-2-aminoindol (**4**) foi sintetizado utilizando-se os procedimentos de Stazi et al²³ e Matsumoto et al²⁴. Stazi partiu de *orto*-cloronitrobenzeno para produzir 2-nitrofenil acetonitrila (**2**) em duas etapas. Matsumoto partiu da 2-nitrofenilacetonitrila (**2**), reduzindo-a a cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (**3**) utilizando estanho como agente redutor em apenas uma etapa, e neutralizando-o em seguida com hidróxido de sódio.

Esquema 3: Preparação de 1-*H*-2-aminoindol pelo método de Stazi-Matsumoto

Alternativamente, o procedimento utilizado por Muller²⁵ foi utilizado para fins de comparação.

Esquema 4: Preparação de 1-*H*-2-aminoindol pelo método de Muller

3.2.1.1. Preparação da 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (**1**) **Esquema 5:** Preparação do intermediário (**1**) pelo método de Stazi

13,2 g (105 mmol) de carbonato de potássio e 84,0 mg (0,3 mmol) de cloreto de benzil trietilamônio (TEBAC) foram adicionados a uma solução de 5,36 g de *orto*-cloronitrobenzeno (34 mmol) e 3,92 g de cianoacetato de etila (35 mmol) em 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) sob nitrogênio. Então, aqueceu-se a mistura a 90°C, sob agitação, por 12 horas. Resfriou-se à temperatura ambiente e adicionaram-se 44,4 mL de acetato de etila. Verteu-se, lentamente, o produto da reação sobre 88,8 mL de ácido clorídrico aquoso (6 mol/L) com resfriamento externo com banho de gelo. Separaram-se as fases e a fase aquosa foi lavada com 66 mL de acetato de etila. As porções orgânicas foram reunidas e lavadas com 60 mL de água. Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado e o óleo castanho resultante rendeu 7,95 g (100,0%).

FTIR (puro, nm): 2985, 2253, 1744, 1526, 1346, 1249, 1214, 1096, 1020, 855, 788; Q1MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ = 235; MS/MS m/z 235, 189, 164, 146, 120, 108, 92, 90; RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, TMS) = 1,33 (t, 3H, J = 7,1 Hz), 4,31 (q, 2H, J = 7,1 Hz), 5,67 (s, 1H), 7,64 (m, 1H), 7,78(dd, 2H, J_1 = 4,9 Hz, J_2 = 1,0 Hz), 8,24 (dt, 1H); RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm) = 13,81, 41,26, 63,84, 114,43, 125,19, 126,04, 130,60, 131,47, 134,49, 147,27, 163,49. Ver Anexos 1 a 5. Resultado de acordo com literatura²³.

3.2.1.2. Preparação da 2-nitrofenil-acetonitrila

Esquema 6: Preparação do intermediário (2) pelo método de Stazi

Uma solução supersaturada de cloreto de sódio (4,5 mL) e DMSO (18,2 mL) foram adicionados a 7,95 g (34 mmol) do composto (1). A mistura foi aquecida a 120 °C por 7 horas. Resfriou-se à temperatura ambiente e diluiu-se com 91 mL de acetato de etila e 23 mL de água. A fase orgânica foi lavada com água (2 x 23 mL) e com salmoura (23 mL). O solvente foi evaporado, resultando em 6,23 g de sólido marrom. Este foi recristalizado de solução de acetato de etila:ciclohexano (27:45,5mL) para render 3,20 g (20 mmol) de um sólido amarelo claro. Rendimento 58%.

FTIR (puro, nm): 2981, 2946, 2859, 2249, 1611, 1579, 1521, 1411, 1341, 1187, 793, 734; RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 4,35 (s, 2H), 7,66 (m, 1H), 7,73 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz), 7,83 (td, 1H, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz), 8,16 (dd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz); RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 22,71, 116,33, 125,79, 129,62, 131,10, 134,4. Ver Anexos 6 a 8. Resultados de acordo com literatura²³

3.2.1.3. Preparação do Cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (3)

(3)

Esquema 7: Preparação de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

22,5 mL de ácido clorídrico foram adicionados, lentamente, a uma mistura de 4 g (25 mmol) de 2-nitrofenilacetoneitrila, 5 g de estanho, em 50 mL de etanol. Após adição completa, deixou-se em agitação à temperatura ambiente por 8 horas. Reduziu-se o volume até 15 mL e resfriou-se em banho de gelo. Filtrou-se um sólido amarelo claro, que pesou 5,02 g de produto bruto.

FTIR (puro, nm): 3359, 3277, 3215, 3155, 1675, 1622, 1461, 1366, 756; espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 4,17 (s, 2H), 7,12 (t, 1H), 7,18 (m, 1H), 7,30 (m, 1H), 7,40 (m, 1H), 9,84 (s, 1H), 10,08 (s, 1H), 12,27 (s, br, 1H); espectro de RMN de ¹³C (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 36,41, 112,19, 124,14, 125,06, 126,97, 128,44, 143,19, 171,52. Ver Anexos 9 a 11. Resultados de acordo com literatura²⁵.

3.2.1.4. Neutralização do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

Esquema 8: Preparação de 1-*H*-2-aminoindol base

1,00 g de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol bruto foi dissolvido em 10 mL de água fria e filtrado. Ao filtrado amarelo adicionaram-se 2,9 mL de NaOH 30%. O precipitado branco foi filtrado e seco em dessecador sobre pentóxido de fósforo e protegido da luz. Rendimento 0,204 g (26%).

FTIR (puro, nm): 3213, 3116, 2947, 1674, 1612, 1460, 1388, 1268, 1180, 1051, 741; espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 5,22 (s, 1H), 6,79-6,95 (m, 2H), 7,05-7,19 (m, 2H); espectro de RMN de ¹³C DEPT 135 (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) 73,91, 106,69, 116,67, 116,76, 119,18. Ver Anexos 12 a 15. Resultados de acordo com literatura²⁴

3.2.2. Método Alternativo para preparação de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

Outro procedimento testado para preparar 1-*H*-2-aminoindol foi a rota utilizada por Muller et al²⁵.

Esquema 9: Preparação de Cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol pelo método de Muller

3.2.2.1. Preparação do 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (**1**) **Esquema 10:** Preparação de 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (**1**) pelo método Muller

7,44 g (8,9 mmol) de terc-butóxido de potássio e 7,89 g (69,8 mmol) de cianoacetato de etila foram adicionados a 54,4 mL de terc-butanol e agitados por 30 minutos a 20°C. Então, adicionou-se uma solução de 5,05 g (32 mmol) de *orto*-cloronitrobenzeno em 12 mL de terc-butanol, pré-aquecida a 60°C. Após adição, a mistura foi levada a refluxo por 10 horas. Resfriou-se a mistura a 20°C e o pH foi ajustado para 3 com HCl 2 mol/L. Evaporou-se o solvente, e o resíduo foi tratado com 100 mL de diclorometano e 50 mL de água. Separadas as fases, a fase orgânica foi lavada com 3 porções de 20 mL de bicarbonato de sódio aquoso e seca com sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e o produto bruto purificado em coluna cromatográfica de sílica gel utilizando-se hexano:acetato de etila 3:1 como eluente. Massa obtida = 3,57g (15,3 mmol). Rendimento (48%).

FTIR (puro, cm^{-1}): 1738, 1692, 1583, 1170. Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, TMS) = 1,33 (t, 3H, $J = 7,1$ Hz), 4,31 (q, 2H, $J = 7,1$ Hz), 5,67 (s, 1H), 7,65 (m, 1H), 7,77 (dd, 1H, $J_1 = 4,9$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz), 8,23 (dt, 1H). Ver Anexos 16 a 17. Resultados de acordo com literatura^{23,25}.

3.2.2.2. Preparação do 2-amino-3-etoxicarbonilindol (7)

Esquema 11: Preparação de 2-amino-3-etoxicarbonilindol (7)

3,20 g (13,7 mmol) de 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila obtidos no item anterior foram dissolvidos em 48 mL de ácido acético glacial e aquecidos a 100°C. Adicionaram-se 2,45 g de Fe em pequenas porções e sob intensa agitação. A mistura foi levada a refluxo por 45 minutos. Ao resfriar, a 20°C, o sal de Fe foi filtrado sob sucção. O ácido acético foi evaporado e o produto tratado com diclorometano, água, e bicarbonato de sódio aquoso. A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. Foram obtidos 2,07g (10,1 mmol). Rendimento 74%. Após purificação em coluna de sílica, utilizando hexano:acetato de etila 1:1, como eluente. Massa obtida = 0,42g (2,06 mmol). Rendimento 15%.

3.2.2.3. Descarboxilação

Esquema 12: Preparação de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (**3**) pelo método de Muller

A 2,00 g do produto obtido no item anterior, adicionaram-se 27 mL de HCl concentrado e aqueceu-se até secar. O produto, de cor escura, foi recristalizado em uma mistura de éter:etanol 1:1 e filtrado. Massa obtida=0,25g. Rendimento 15%.

3.2.3. Preparação dos ácidos succinâmicos (**5a-d**)

Esquema 13: Esquema geral de preparação dos ácidos succinâmicos

3.2.3.1. Preparação do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico **5a**).

Esquema 14: Preparação de ácido succinâmico (**5a**)

3,381 g (20 mmol) de difenilamina e 2,021 g (20 mmol) de anidrido succínico foram dissolvidos em 40 mL de tolueno. Levou-se a refluxo por 8 horas. Deixou-se a solução resfriar à temperatura ambiente e o produto cristalizou como um sólido branco. Após recristalização em tolueno, o sólido foi filtrado e seco em dessecador em presença de sílica a vácuo e a massa obtida foi de 3,17g. Rendimento 59%

FTIR (puro, nm): 3047, 2975, 2922, 2652, 2582, 1712, 1664, 1588, 1489, 1410, 1371, 1249, 1163, 919, 764. Q1MS (ESI⁻): m/z [M-H]⁻ = 268; MS/MS m/z 268, 168, 99, 55; espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 2.42 (ddd, 4H, J₁ = 21.3, 10.2, 3.4 Hz), 7.38 (m, 10H), 12.12 (s, br, 1H); espectro de RMN de ¹³C (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 29.58, 30.29, 127.42, 129.75, 143.30, 171.42, 174.20. Ver Anexos 18 a 22.

3.2.3.2. Preparação do ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico **5b**):

Esquema 15: Preparação do ácido succinâmico (**5b**)

1,941 g (21 mmol) de anilina e 2,003 g (20 mmol) de anidrido succínico foram dissolvidos em 10 mL de tolueno. Levou-se a refluxo por 2 horas. Deixou-se a solução resfriar à temperatura ambiente, e o produto cristalizou como um sólido branco. Após recristalização em acetato de etila, o sólido foi filtrado e seco em dessecador em presença de sílica a vácuo e a massa obtida foi de 1,66g. Rendimento 41%

FTIR (puro, nm): 3311, 3053, 2932, 1692, 1662, 1600, 1541, 1417, 1328, 1221, 1186, 905, 739, 691. Q1MS (ESI-): m/z [M-H]⁻ = 192; MS/MS m/z 192, 174, 148, 99, 92, 55; espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 2,48-2,54 (m, 4H), 7,00 (m, 1H), 7,26 (m, 2H), 7,56 (m, 2H), 9,94 (s, 1H), 12,13 (s, 1H); espectro de RMN de ¹³C (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) = 29,22, 31,46, 119,31, 123,34, 129,11, 139,73, 170,49, 174,27. Ver Anexos 23 a 27. Resultados conforme literatura²⁶.

3.2.3.3. Preparação do ácido 4-(2-naftalenilamino)-4-oxobutanóico (ácido succinâmico **5c**)

Esquema 16: Preparação do ácido succinâmico (**5c**)

2,646 g (20 mmol) de 2-naftilamina e 2,00 g (20 mmol) de anidrido succínico foram dissolvidos em 40 mL de tolueno. Levou-se a refluxo por 8 horas. Deixou-se a solução resfriar à temperatura ambiente e o produto cristalizou como um sólido branco. Após recristalização em etanol, o sólido foi filtrado e seco em dessecador na presença de sílica a vácuo e a massa obtida foi de 1,94 g. Rendimento 40%

FTIR (puro, cm^{-1}): 3298, 3002, 2928, 1689, 1654, 1582, 1522, 1416, 1371, 1312, 1279, 1189, 914, 817, 739. Q1MS (ESI⁻): m/z $[\text{M}-\text{H}]^- = 242$; MS/MS m/z 242, 224, 198, 142, 99, 59, 55; espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 2,62 (dd, 4H, $J_1 = 14,8$ e $J_2 = 5,5$ Hz), 7,43 (ddd, 14,8, 13,7 e 6,8 Hz, 2H), 7,59 (dd, $J = 8,9$ e 2,0 Hz, 1H), 7,83 (dd, 3H, $J_1 = 15,3$, $J_2 = 8,3$ Hz), 8,33 (s, 1H), 10,19 (s, 1H), 12,18 (s, 1H); espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 29,26, 31,56, 115,28, 120,27, 124,87, 126,81, 127,67, 127,87, 128,75, 130,03, 133,91, 137,31, 170,85, 174,33. Ver Anexos 28 a 32.

3.2.3.4. Preparação do ácido N-metil-N-(9-metil-antracênil)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico **5d**)

Esquema 17: Preparação do ácido succinâmico (**5d**)

5,03 g (23 mmol) de N-metil-9-antracenometilamina e 2,44 g (24 mmol) de anidrido succínico foram dissolvidos em 120 mL de tolueno. Levou-se a refluxo por 10 horas. Deixou-se a solução resfriar à temperatura ambiente e o produto cristalizou como um sólido branco. Após recristalização em etanol, o produto foi filtrado e seco em dessecador a vácuo e a massa obtida foi de 3,79g. Rendimento 59%.

FTIR (puro, cm^{-1}): 3025, 2928, 1727, 1602, 1487, 1409, 1392, 1239, 1169, 1118, 864, 836, 729. Q1MS (ESI): m/z $[\text{M}+\text{H}]^+ = 320$; MS/MS m/z 320, 220, 99; espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 2,48-2,55 (m, 7H), 5,57 (s, 2H), 7,52-7,57 (m, 4H), 8,10 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 8,39 (d, 2H, $J = 8,3$ Hz), 8,63 (s, 1H), 12,12 (s, 1H); espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) = 28,49, 29,21, 29,60, 32,78, 124,74, 125,64, 127,00, 128,38, 128,85, 129,53, 131,28, 131,38, 171,26, 174,05, 174,44. Ver Anexos 33 a 37.

3.2.4. Acoplamento com carbodiimidas

3.2.4.1. Acoplamento do 1-*H*-2-aminoindol com ácidos succinâmicos utilizando dicicloexilcarbodiimida (DCC)

Esquema 18: Acoplamento com ácidos succinâmicos para formação dos produtos (6a-d)

3.2.4.1.1. Utilizando tetraidrofurano (THF) como solvente

Esquema 19: Preparação de (6a) por acoplamento em THF

269 mg (1 mmol) de ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (5a) e 110 mg (0,5 mmol) de dicicloexilcarbodiimida (DCC) foram dissolvidos em 5 mL de THF sob atmosfera de N₂. Após 30 minutos, adicionaram-se lentamente 130 mg (1 mmol) de 1-*H*-2-aminoindol (4) dissolvidos em 5 mL de THF. Após 5 horas, a dicicloexilureia (DCU) formado foi filtrado e o solvente evaporado, resultando em um produto roxo escuro de massa 213 mg. O produto foi aplicado em uma placa preparativa de sílica e eluído com um mistura de CHCl₃:MeOH (5:2). As 5 manchas isoladas foram analisadas por RMN de ¹H e nenhum dos espectros revelou formação do produto esperado (ausência de sinais na região de 2,6 ppm).

3.2.4.1.2. Utilizando diclorometano como solvente

Esquema 20: Preparação de (6a) por acoplamento em CH_2Cl_2

269 mg (1 mmol) de ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (5a) e 310 mg (1,5 mmol) de DCC foram dissolvidos em 4 mL de CH_2Cl_2 sob atmosfera de N_2 . Após 30 minutos de agitação, adicionaram-se lentamente 130 mg (1 mmol) de 1-*H*-2-aminoindol dissolvidos em 4 mL de CH_2Cl_2 . Após 5 horas, o DCU formado foi filtrado e o solvente evaporado, resultando em um produto bruto escuro de massa 323 mg. O produto foi aplicado em uma placa preparativa de sílica e foi eluído com um mistura de hexano:acetato de etila 3:1. As 3 manchas foram extraídas e analisadas por RMN de ^1H . A mancha 1 apresentou sinais, no espectro de RMN de ^1H em regiões esperadas para o produto. Além disso, a sobreposição de seu espectro de RMN de ^1H revela alterações nos sinais dos prótons dos carbonos alifáticos do ácido e dos prótons aromáticos do 1-*H*-2-aminoindol. O mais significativo, no entanto, é a ausência do sinal do próton carboxílico. Ver Anexos 38 e 39.

3.2.4.2. Testes de acoplamento de 1-*H*-2-aminoindol (**4**) com ácidos succinâmicos (**5a-d**) utilizando cloridrato de 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil) carbodiimida (EDC)

3.2.4.2.1. Acoplamento de ácido *N*-metil-*N*-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico (**5d**) com anilina

Esquema 21: Tentativa de acoplamento de **5d** utilizando EDC em CH₂Cl₂

Ácido *N*-metil-*N*-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico (307 mg, 0,96 mmol) e EDC (238,6 mg, 1,25 mmol) foram dissolvidos em de DCM (6 mL). Após 60 minutos de agitação, adicionou-se anilina (102,7 mg, 1,10 mmol) dissolvida em DCM (6 mL). Após 24h, a solução foi lavada com 10 mL de água. Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado, resultando 260 mg de produto. O espectro de RMN de ¹H apresentou diferenças no deslocamento dos prótons alifáticos e ausência do próton carboxílico, indicando a formação do produto desejado. Ver Anexos 40 e 41.

3.2.4.2.2. Acoplamento de ácido 4-(2-naftalenilamino)-4-oxo-butanóico com anilina utilizando EDC

Esquema 22: Tentativa de acoplamento de **5c** utilizando EDC em CH₂Cl₂

Ácido 4-(2-naftalenilamino)-4-oxobutanóico (200 mg 0,82 mmol) e EDC (189 mg, 0,99 mmol) foram dissolvidos em DCM (10 mL). Após 60 minutos de agitação, adicionou-se anilina (76 mg, 0,82 mmol) dissolvida em 5 mL de DCM. Após 24h, a solução foi lavada com 10 mL de água. Após secagem com sulfato de sódio anidro, o solvente foi evaporado resultando 260 mg de produto. A mistura reacional foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa utilizando hexano:acetato de etila 3:10 como eluente. O espectro de RMN de ¹H apresentou diferenças no deslocamento dos prótons alifáticos e ausência do próton carboxílico, indicando a formação do produto desejado. No entanto, notou-se a presença de sinais não esperados que carecem de melhor investigação. Ver Anexos 42 e 43.

3.2.4.3. Acoplamento de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol com ácidos succinâmicos

Esquema 23: Tentativa de acoplamento utilizando DCC em CH_2Cl_2

Ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (5a) (150mg, 0,56mmol) e DCC (120 mg, 0,58 mmol) foram dissolvidos em DCM (8,5mL). Após 30 minutos de agitação, adicionou-se lentamente cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (74 mg, 0,44 mmol) dissolvidos em DCM (3,5 mL). Em seguida, adicionou-se de K_2CO_3 (74 mg, 0,54 mmol) lentamente ao meio reacional. Reação incompleta.

3.2.5. Tentativa de preparação de um ácido succinâmico alternativo (8)

Esquema 24: Tentativa alternativa de acoplamento por (8)

3.2.5.1. Acoplamento do 1-*H*-2-aminoindol com anidrido succínico **Esquema 25:** Preparação de (8)

1-*H*-2-aminoindol (132 mg, 1,00 mmol) e anidrido succínico (100 mg, 1,00 mmol) foram dissolvidos em tolueno (10 mL) e aquecidos a refluxo por 7 horas. Após resfriamento à temperatura ambiente, formou-se um sólido, que foi filtrado e seco em dessecador sobre sílica. O espectro de RMN de ^1H se mostrou inconclusivo já que, além da ausência do sinal em 5,22 ppm, apresentou excesso de anidrido succínico.

3.2.5.2. Acoplamento do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol com anidrido succínico **Esquema 26:** Tentativa de Preparação de (8) a partir de (3)

Cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (200 mg, 1,19 mmol) e anidrido succínico (100 mg, 1,00 mmol) foram dissolvidos em tolueno (10 mL). Em seguida, adicionou-se trietilamina (0,14 mL) à mistura que foi aquecida a refluxo. Após 4 horas, resfriou-se à temperatura ambiente e o sólido formado (282 mg) foi filtrado e seco em dessecador sobre sílica.

4. Resultados e Discussão

4.1. Questões Gerais

Após efetuar-se a pesquisa bibliográfica inicial para o desenvolvimento de um projeto, é comum a descoberta de vários caminhos para sua realização. Dependendo do tempo e dos recursos disponíveis, a redução para o menor número de possibilidades torna-se algo obrigatório.

A escolha de um entre dois ou mais procedimentos visa otimizar os recursos, tanto no que se refere aos materiais e reagentes necessários, como também à disponibilidade de tempo, de mão-de-obra e de estrutura física para fins de execução e análise.

O destino final do produto alvo também colabora na difícil tarefa de escolha de uma rota sintética. Um procedimento que ofereça os melhores rendimentos pode ser o mais adequado no caso de o produto final ter garantias de um alto potencial econômico. Em outros casos, o principal objetivo poderá ser apenas de obtenção do produto com alto grau de pureza, como por exemplo, para que testes de atividade biológica que indiquem sua importância medicinal ou farmacológica. Neste caso, a melhoria da rota sintética para produção industrial pode ser deixada para um estudo posterior. Ainda, no caso de o produto final ser destinado ao consumo humano, e estar sob regulação sanitária, o uso de solventes muito tóxicos pode tornar um procedimento preterível em relação a outro de perspectiva mais compatível com os preceitos da “Química Verde”.

Sem fomento de órgãos de incentivos à pesquisa, contando apenas com a inestimável colaboração do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e da Biolab Sanus Farmacêutica, o trabalho realizado prezou por redução de custos e tempo.

Sendo assim, a obtenção de 1-*H*-2-aminoindol foi considerada por apenas duas vias, ambas partindo da substituição nucleofílica de *orto*-cloronitrobenzeno por cianoacetato de etila. Ambas as rotas foram testadas e comparadas.

Quanto à Preparação dos ácidos succinâmicos (**5a-d**), não houve dificuldades. Todas as aminas de partida reagiram completamente com o anidrido succínico em tolueno em temperatura de refluxo, não sendo observados subprodutos.

Para as reações de acoplamento por carbodiimidas, por sua vez, inúmeros testes foram feitos com o intuito de obter e purificar o produto. Comparações não puderam ser feitas, pois ainda não foi possível obter nenhum dos produtos (**6a-d**) de forma isolada.

A seguir, passaremos a discorrer sobre cada uma das etapas da rota global, apresentando os resultados e as dificuldades encontradas.

4.2. Preparação do 1-*H*-2-aminoindol

Foram testados e comparados dois procedimentos. Ambos partem de *orto*-cloronitrobenzeno. No primeiro desses procedimentos, após a reação com cianoacetato de etila para produzir (**1**), preparou-se a nitrofenilacetoneitrila (**2**) por descarboxilação para, finalmente, por redução com Sn em solução de HCl, produzir o cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol. No segundo procedimento, fez-se a substituição nucleofílica aromática com cianoacetato de etila com procedimento diferente do primeiro. A segunda etapa foi submeter (**1**) à redução com Fe em ácido acético para produzir (**7**) e, a seguir, à descarboxilação em HCl concentrado para produzir o cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol (**3**).

4.2.1. A comparação entre os dois procedimentos:

Esquema 27: Procedimento geral de Stazi e Matsumoto **Esquema 28:** Procedimento geral de Muller (alternativo)

4.2.1.1. Etapa 1 - De *orto*-cloronitrobenzeno a nitrofenil cianoacetato de etila

Os dois procedimentos são semelhantes na primeira etapa. Ambos partem de *orto*-cloronitrobenzeno e cianoacetato de etila para produzirem o mesmo intermediário, o 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (**1**). Diferem pela base utilizada para abstrair o próton α -carbonílico e pelo fato do procedimento 1 utilizar um catalisador de transferência de fase (TEBAC).

Em termos de resultados, porém, o procedimento 1 apresenta grande vantagem no que se refere ao tratamento do produto reacional: não necessita que se faça acerto de pH, tampouco purificação em coluna. O espectro de RMN de ^1H do produto bruto apresentou os sinais característicos do descrito na literatura²³, com poucos sinais residuais de prótons alifáticos provenientes de acetato de etila e/ou cianoacetato de etila.

Em contrapartida, utilizando-se o procedimento 2, e mesmo purificando o produto em coluna de sílica, o que reduz seu rendimento consideravelmente, não se obteve um produto de maior pureza, quando comparado ao obtido pelo procedimento 1.

4.2.1.2. Etapa 2 - Descarboxilação direta *versus* Redução preliminar com Fe

A etapa 2 do procedimento 1, a descarboxilação em DMSO (reação de Krapcho), após recristalização do sólido marrom produzido, levou à obtenção de um sólido amarelo claro. Os espectros de ressonância revelaram o produto puro e o espectro de FTIR apresentou coeficiente de similaridade superior a 0,9 em relação a uma amostra comercial (Figura 1). O coeficiente foi obtido através do software Resolutions Pro (Agilent Technologies).

Figura 1: Comparação entre os espectros de FTIR da 2-nitrofenilacetoniitrila obtida e a comercial

A reação foi repetida algumas vezes e, em algumas destas repetições, obteve-se um produto oleoso no lugar de um sólido marrom. Para corrigir esse problema, alterou-se o procedimento com o acréscimo de uma lavagem a mais com água antes da lavagem final com salmoura. Isso foi feito para garantir a total retirada do DMSO que poderia dificultar a cristalização do produto.

A segunda etapa do procedimento 2 indica a redução com ferro antes da reação de descarboxilação. Além da difícil e demorada retirada de ácido acético por destilação a vácuo, necessária nessa etapa, ela também, não apresenta um bom rendimento.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 2) do produto bruto da segunda etapa do procedimento 2 revelou que a reação não havia sido completa. Foi possível observar os sinais do material de partida (2-nitrofenilcianoacetato de etila), bem como de um subproduto. A presença de sinais em 10,88 ppm, característicos de amina, especialmente sugeria ter ocorrido a redução do grupo nitro com formação de amina, mas sem o fechamento do anel. O sinal em 5,32 ppm, atribuível a um hidrogênio ligado a carbono α -carbonílico, também poderia reforçar esta hipótese, além de serem observados quartetos e tripletos alifáticos das regiões de 4,3 ppm e 1,5 ppm, como esperados para os grupos etila de diferentes compostos, um dos quais seria o 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (**1**).

Figura 2: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) do produto da etapa 2 rota alternativa

4.2.1.3. Etapa 3 – A redução com Sn/HCl *versus* a descarboxilação com HCl à secura

O procedimento 1 finaliza a Preparação do 1-*H*-2-aminoindol com a redução do grupo nitro com estanho e HCl em etanol. O procedimento é simples e fácil, especialmente por ser realizado em um solvente bem mais fácil de ser retirado quando comparado ao ácido acético, utilizado na redução com ferro (procedimento 2).

Embora o cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol formado ainda contivesse impurezas inorgânicas de cloreto de estanho, tanto seu espectro FTIR como o de RMN de ^1H permitiram sua caracterização como sendo o produto esperado. Diferentemente, a terceira etapa do procedimento alternativo (descarboxilação com HCl à secura) não conduziu a produto possível de ser caracterizado. O produto formado, em especial após a secura, apresentou cor preta. Como a retirada do ácido clorídrico exigiu temperatura muito alta, agressiva ao produto, uma possível degradação e/ou oxidação do produto não permitiu obter um produto cujo espectro de RMN de ^1H fosse o esperado. Este se apresentou sem os sinais indicados pela literatura²⁵.

4.2.2. Conclusão sobre a comparação entre os procedimentos 1 e 2 para a obtenção do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol.

Em síntese, em todas as 3 etapas, o procedimento 1 se apresentou mais vantajoso em relação ao procedimento 2 e, dentre os fatores mais importantes, estão o melhor rendimento das primeiras etapas e a obtenção de um produto final com maior grau de pureza.

Esquema 29: Resumo da comparação entre os procedimentos 1 (de Stazi e Matsumoto) e 2 (Muller)

4.2.3. Obtenção do 1-*H*-2-aminoindol-base.

Como o acoplamento com os ácidos succinâmicos por meio de agentes de condensação requer que o nitrogênio da amina seja um bom nucleófilo, fez-se necessário neutralizar o cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol transformando-o na sua forma de base livre. Para tanto, seguiu-se o procedimento proposto por Matsumoto²⁴. Antes, porém, de apresentar os resultados desta etapa, faz-se necessário discorrer sobre alguns detalhes experimentais que, por estarem pouco claros ou descritos de forma ambígua, na literatura, dificultaram a realização do trabalho.

De fato, a tarefa de sintetizar uma molécula não inédita pode levar a alguns dissabores, especialmente ao atribuir crédito a um procedimento descrito na literatura e, na tentativa de reproduzi-lo, falhar na sua correta interpretação e/ou na sua tradução. Certo é que, por vezes, os autores falham na escrita. E para que a discussão aqui relatada não entre em um vai-e-volta, no qual o que reproduz acusa o procedimento mal escrito e o que escreveu acusa o executor de interpretá-lo mal (ou de não saber interpretar/traduzir), segue o relato da dificuldade encontrada em uma etapa da síntese.

Após a redução da nitrofenilacetonitrila com estanho para obtenção de cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol, lê-se no procedimento proposto por Matsumoto o seguinte: “*after cooling with an ice bath, tin salt (28g) was collected by filtration and dissolved in cold water (280 ml). After filtration, 30% sodium hydroxide solution (80 ml) was added to the yellow filtrate.*”

Este procedimento foi executado erroneamente algumas vezes da seguinte maneira: depois de resfriar em banho de gelo e obter um precipitado, este foi filtrado. Acreditava-se que este sólido era cloreto de estanho, já que o texto assim o descrevia (*tin salt*). Ao filtrado, que era amarelo, adicionou-se a quantidade indicada de base. O

sólido produzido foi filtrado, seco e enviado para caracterização. De fato, neste sólido havia o esperado 1-*H*-2-aminoindol, mas em pequena quantidade frente à massa total.

Os principais fatores que induziram ao erro foram:

1) Da leitura de que o sal de estanho foi coletado por filtração (*tin salt was collected by filtration*), deduziu-se que este sólido se tratava de produto inorgânico, e não do produto orgânico esperado.

2) Como o filtrado era amarelo, tudo indicava que a ele deveria ser adicionada a base (*30% sodium hydroxide solution was added to the yellow filtrate*).

3) Pela análise de FTIR resultou nas bandas indicadas por Matsumoto.

A percepção de que algo estava errado veio com o registro do espectro de RMN de ^1H , inconclusivo e sem apresentar sinais claros. No entanto, a princípio, acreditou-se que impurezas de estanho, de fato, poderiam deixar o espectro com aparência ruim, em consequência de efeito paramagnético. Neste momento, ainda não suspeitávamos de que não era o primeiro filtrado, o alcoólico, o que devia ser neutralizado, já que sua aparência, fortemente amarela, encaixava-se perfeitamente à descrição de Matsumoto. O entendimento que o filtrado a ser neutralizado era o segundo, o aquoso (bem menos amarelo) só viria mais tarde, quando da correta compreensão do texto. Adicionalmente, um teste de análise termogravimétrica indicava resíduo de SnO de até 40% mesmo após 800°C , o que levou à realização de inúmeras tentativas frustradas de purificação e recristalização do então considerado cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol.

Estas últimas evidências nos levaram a revisar o procedimento descrito por Matsumoto²⁴. Mesmo porque, desde o princípio, realizar a dissolução do sal de estanho não parecia algo condizente com o tratamento dado a um descarte. Afinal, se ele fosse, de fato, cloreto de estanho, porque dissolvê-lo em água?

A nova compreensão adotada foi de que o sal de estanho indicado por Matsumoto significava, na verdade, o cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol com impurezas de cloreto de estanho e que a dissolução em água seria o tratamento adequado para separá-los.

Verificou-se, assim, ser essa a real intenção dos pesquisadores Matsumoto et al e a interpretação correta do texto que foi reescrita neste trabalho, conforme os itens 3.2.1.3 e 3.2.1.4 e segundo o qual foi possível obter o 1-*H*-2-aminoindol base como esperado, com espectros de IR e de RMN de ^1H condizentes com sua estrutura.

Cabe ressaltar que o 1-*H*-2-aminoindol base, isento de óxido de estanho, solidifica-se branco, mas em pouco tempo adquire coloração escura, mesmo em dessecador e protegido de luz.

4.3. Preparação dos ácidos succinâmicos

Para cada amina de partida selecionada, há apenas uma possibilidade de ataque nucleofílico, já que contém, cada uma delas, apenas um nitrogênio. O anidrido succínico, apresenta dois carbonos eletrofílicos porém, ao receber o ataque com a abertura do anel, a segunda carboxila passa a ser menos eletrofílica do que a do anidrido residual, ainda presente no meio reacional.

Esquema 31: Mecanismo da reação entre amina e anidrido succínico

Sendo assim, em nenhum dos casos se verificou a formação de uma diamida.

O excesso de anidrido succínico foi retirado por recristalização. Para cada ácido succinâmico foram testados os seguintes solventes de recristalização: acetato de etila, tolueno, etanol e acetona. O melhor resultado para cada um desses testes está mostrado abaixo:

Ácido Succinâmico	Solvente
5a	Tolueno
5b	Acetato de Etila
5c	Etanol
5d	Etanol

Tabela 1: Melhor solvente para recristalização dos ácidos succinâmicos **5a-d**

4.4. Acoplamento do 1-*H*-2-aminoindol com os ácidos succinâmicos na presença de carbodiimidas

4.4.1 Aspectos gerais

Inúmeros fármacos apresentam o grupo funcional amida. Nada tão surpreendente, já que mais que 25% das drogas conhecidas contém essa funcionalidade.

Figura 2: Alguns fármacos que contém a função amida

Esse grupo funcional também é encontrado em diversas substâncias essenciais à vida, em especial nas proteínas, macromoléculas formadas por aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas.

A ligação C-N, além de apresentar grande estabilidade, proporciona maior solubilidade em meios biológicos já que apresenta sítios para a formação de ligações de hidrogênio. Isso explicaria a alta incidência desses grupos em fármacos e sua importância em aumentar a atividade biológica²⁷.

Figura 3: Interação, por ligações de H, entre moléculas de amida

4.4.2. A formação da ligação amida

Amidas podem ser sintetizadas por condensação entre um ácido carboxílico e uma amina.

Diferentemente da condensação entre um ácido carboxílico e álcool, a união entre o ácido e a amina configura uma reação de neutralização. Antes da formação da ligação entre o nitrogênio e o carbono do grupo carboxila, há a formação do sal, termodinamicamente mais estável. Para vencer essa barreira e deslocar o equilíbrio para a formação da amida, é exigida uma temperatura acima de 180°C o que, em muitos casos, compromete a estabilidade do produto desejado²⁸.

Esquema 32: Equilíbrio entre amina e ácido carboxílico

O uso de catalisadores e peneiras moleculares consegue diminuir um pouco a temperatura necessária para a formação da ligação amídica. Catalisadores como ZrCl_4 e seus derivados levaram a ótimos resultados, aumentando o rendimento na formação da amida em tolueno a 110°C , quando comparado ao obtido nas mesmas condições, sem o uso de catalisadores²⁹.

Peneiras moleculares de 3 e 4 Å foram usadas para produzir amidas em temperaturas da ordem de 140°C a 160°C , embora com tempos de reação de até 22 horas²⁹. A escolha de solventes, o uso de microondas, a análise das evidências experimentais e computacionais para o estudo da natureza da interação entre o ácido e a amina além da retirada da água para o deslocamento do equilíbrio também são objetos de estudo de muitos grupos interessados na síntese de amidas.

Para que fosse possível atingir o objetivo de ligar o nitrogênio ao carbono da carboxila, sem utilizar condições drásticas, novas estratégias foram desenvolvidas.

A mais conhecida estratégia nos é apresentada já nos primeiros contatos com a química orgânica de curso superior. Quase todos os livros-texto de orgânica básica apresentam síntese de amidas pela formação inicial de um cloreto de acila para, em seguida, fazê-lo reagir com a amina.

Essa reação, por exemplo, foi utilizada em 1901 para a obtenção de um dipeptídeo Gly-Gly. Fischer³⁰ utilizou cloreto de tionila e pentacloreto de fósforo na formação do cloreto de ácido, para, na rápida reação com aminas, formar a amida desejada. O fundamento do mecanismo dessa reação é substituir o grupo hidroxila por um melhor grupo de partida. O desenvolvimento de reagentes que cumpram esse papel é o aspecto central para formação da ligação amida em condições brandas.

Esse raciocínio e estratégia têm sido utilizados cada vez mais, especialmente quando o produto é termosensível. Dentre esses casos, a síntese de proteínas se beneficia abundantemente dos então chamados agentes de acoplamento/condensação.

Desde a síntese de Fischer³⁰ em 1901, centenas de agentes de acoplamento têm sido sintetizados e testados: carbodiimidas, sais de fosfônio, imônio, urônio, imínio, benzotriazóis, geradores de haletos de ácido, triazinas, pentafluorofenóis são algumas das classes de agentes de acoplamento para formação de amidas.

Esquema 33: Diferentes agentes de acoplamento

Como concluem Valeur e Bradley³⁰, a escolha do melhor agente de acoplamento pode se tornar algo trabalhoso devido ao grande número de agentes de condensação existentes e por não haver muitos estudos comparativos. Apesar disso, tal esforço pode ser muito útil para algo complexo como a síntese de proteínas. No entanto, para as sínteses de ordem geral, como no caso de um fármaco, agentes mais simples podem

ser os mais indicados, em função de sua larga disponibilidade comercial. Levando em conta este aspecto, neste trabalho, priorizou-se o uso das carbodiimidas mais comuns.

4.4.3. As carbodiimidas como agentes de condensação para a formação de amidas

Khorana (1953)³¹ foi um dos primeiros a apresentar um *review* sobre carbodiimidas como um agente de acoplamento entre ácidos carboxílicos e aminas. Já na metade do século passado, o uso desses reagentes era disseminado pelos laboratórios de pesquisa em síntese orgânica ao redor do globo.

Sheehan³² utilizou carbodiimidas para um extenso trabalho em síntese de peptídeos. Esse pesquisador foi um dos maiores responsáveis pelo desenvolvimento da penicilina sintética e é reconhecido também pelo desenvolvimento das reações de formação de amidas por carbodiimidas³³.

Carbodiimidas também são utilizadas em bioconjugação em meios aquosos. Tal processo, que envolve a união de duas ou mais moléculas garantindo na molécula final as propriedades das matrizes, ganhou grande importância ao utilizar biomoléculas conjugadas no desenvolvimento de métodos para diagnóstico³⁴.

Recentemente, carbodiimidas têm ganhado novas aplicações. Chen³⁵ et al utilizaram EDC/NHS e outras carbodiimidas para aumentar o grau de reticulação em colágenos, como resultado de sua alta reatividade com os grupos carboxila, Singh et al utilizaram carbodiimidas para melhorar a estabilidade estrutural da ligação resina/dentina³⁶, Yamada na síntese de polímeros superresistentes³⁷, e Tarfah no desenvolvimento de síntese de proteínas³⁸. O mecanismo pelo qual se acredita que esses agentes facilitam a reação de amidação está apresentado no esquema 34.

Esquema 34: Mecanismo do acoplamento entre um ácido carboxílico e uma amina assistido por DCC

Tal mecanismo não é unanimidade. Nakajima e Ikada³⁹ mostraram que, especialmente ao se tratar de carbodiimidas solúveis em água, fatores como *pH* e o uso de excesso de agente condensante podem levar a diferentes resultados, indicando que o mecanismo da reação pode sofrer alteração em função de tais fatores.

4.4.4. Resultados das tentativas de acoplamento

Problemas de interpretação podem ser corrigidos e, apesar dos percalços descritos no item 4.2.3, para a preparação do 1-*H*-2-aminoindol, a síntese desejada pôde ser reproduzida com segurança. Diferentemente, a escolha correta de agentes de condensação e a melhor condição para realizar o acoplamento do 1-*H*-2-aminoindol com os ácidos succinâmicos se mostraram tarefas bem mais complexas.

Como já explicitado no item 4.4.2, apesar de inúmeros agentes de acoplamento estarem à disposição, apenas carbodiimidas foram utilizadas, mais especificamente, DCC e EDC.

A condição que em experiências preliminares realizadas para o acoplamento de ácido benzoico com anilina, utilizando-se EDC, não pôde ser extrapolada para a formação das amidas desejadas, pois os ácidos succinâmicos não são solúveis em diclorometano como o ácido benzoico o é. A utilização de DCC apresentou outras dificuldades principalmente com relação à formação de subprodutos.

Mesmo quando se tentou inverter a estratégia de acoplamento, fazendo reagir o 1-*H*-2-aminoindol com anidrido succínico para, a seguir, efetuar o acoplamento do produto com as aminas escolhidas, não obtivemos sucesso. Acompanhamento da reação por espectrometria de massas indicou grande quantidade de amida dissubstituída.

5. Conclusão

Pode-se dizer que as sínteses dos intermediários aminoindol e ácidos succinâmicos foram bem estabelecidas. Já o acoplamento com carbodiimidas foram dificultadas pela grande quantidade de subprodutos formados quando o aminoindol base se solubiliza. Assim, diante das dificuldades encontradas na etapa de acoplamento, conclui-se que a investigação do conjunto de condições experimentais ideais para tal reação requer um longo estudo, o que extrapolaria o tempo disponível para a realização do presente trabalho.

Como tais dificuldades giram em torno da instabilidade do aminoindol base, sugere-se as tentativas com as reações clássicas de cloração dos ácidos succinâmicos, mais estáveis, para posterior reação com aminoindol.

6. Referências

- [1] <https://www.dn.pt/sociedade/interior/amp/mais-de-10-milhoes-de-novos-casos-de-tuberculose-surgiram-em-2015-5440065.html>, acessado em 04/07/2017.
- [2] <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/tuberculose>, acessado em 04/07/2017.
- [3] Global Tuberculosis Control: WHO Report 2016, World Health Organization, Switzerland, 2016. ISBN 978 92 4 156539 4. www.who.int/tb, acessado em 04/07/2017.
- [4] Wolinsky, E. Tuberculosis. In Cecil Textbook of Medicine, 19th edition; Wyngaarden, J. B., Smith, L. H., Jr., Bennett, J.C., Eds.; W. B. Saunders Company: Philadelphia, PA, 1992; vol2, pp 1733-1742.
- [5] Sensi P., Grass I. G. G. Antimycobacterial Agents. In Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, 5th edition; Burger A., Wolff M. E., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1996; vol. 2, pp 575-635.
- [6] Nunn P., Williams B., Floyd K., Dye C., Elzinga G., Raviglione M. *Tuberculosis control in the era of HIV*. Nat Ver Immunol; 5: 819-826, **2005**.
- [7] https://saudeamanha.fiocruz.br/oms-lanca-relatorio-global-sobre-tuberculose-2016/#.WW-T4IVv_YU, acessado em 04/07/2017.
- [8] <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/l2-tuberculose/11942-vacinacao-tuberculose>; <http://blog.saude.mg.gov.br/tag/bcg/>, acessado em 04/07/2017.
- [9] <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/24/Plano-Nacional-Tuberculose.pdf>, acessado em 04/07/2017.
- [10] <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/743-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/tuberculose/l2-tuberculose/11941-viajantes-tuberculose>, acessado em 04/07/2017.
- [11] <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/06/governo-lanca-plano-nacional-pelo-fim-da-tuberculose>, acessado em 04/07/2017.
- [12] <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/17137-taxa-de-mortalidade-por-tuberculose-cai-20-7-em-10-anos>, acessado em 04/07/2017.

- [13] <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/03/campanha-destaca-importancia-do-tratamento-para-tuberculose>, acessado em 04/07/2017.
- [14] http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5032:frent-e-parlamentar-de-tuberculose-das-americas-e-lancada-no-brasil&Itemid=812, acessado em 04/07/2017.
- [15] http://agenciaaids.com.br/home/artigos/artigo_detalhe/383, acessado em 04/07/2017.
- [16] <http://igovsp.net/spuksaude/wp-content/uploads/2017/03/2016-009-Tuberculose-001.pdf>, acessado em 04/07/2017.
- [17] http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5359:oms-enfatiza-necessidade-urgente-de-pesquisa-e-desenvolvimento-para-ameaca-da-tuberculose-multidroga-resistente&Itemid=812, acessado em 04/07/2017.
- [18] Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I. *An Aproach for the rational design of new antituberculosis agents*. Curr. Drug Targets; 2, 427-437, **2001**.
- [19] Pasqualoto, K. F. M.; Ferreira, E. I., Santos-Filho, O. A., Hopfinger, A. J. *Rational design of new antituberculosis agents: receptor-independent four-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of a set of isoniazide derivatives*. J. Med. Chem.; 47: 3755-3764, **2004**.
- [20] Silva, B. A. V. G. *Application of CADD (Computer-Aided Drug Design) methods to a set of pyrrolidine carboxamides: pharmacophore mapping and rational design of novel leads as potencial antituberculosis agents*. Dissertação de mestrado defendida em 7 de março de 2012. 176 páginas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. **2011**.
- [21] He, X., Alian, A., Stroud, R., Moltellano, P. R. O., *Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from Mycobacterium tuberculosis*. J. Med. Chem., 49: 6308-6323, **2006**.
- [22] Ferreira, M. M. C., *Multivariate QSAR*. J. Braz. Chem. Soc.; 13: 742-753, **2002**.
- [23] Stazi, F.; Maton, W.; Castoldi, D.; Westerduin, P.; Curcuruto, O.; Bacchi, S. *Efficient Methods for the Synthesis of arylacetonitriles*. Synthesis, 19, 3332-3338, **2010**.

- [24] Matsumoto, T.; Yoshida, D.; Tomita, H. *Synthesis and mutagenic activity of alkyl derivatives of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45 (9), 2031-2035, **1981**.
- [25] Muller, U., Eckenberg, P., Grutzmann, R., Bischoff, H., Denzer, D., Wohlfeil, S., Lohmer, S., Nielsch, U., Kolkhof, P.; *Pyrimido[1,2-A]Infoles*, US006114341A.
- [26] Brunton, S., Jones, K., *The synthesis and reactions of some N-acyl-N-aryliminium ions*. *Arkivoc*, 3, 292-303, **2000**
- [27] Jordan, A.M.; Roughley, S.; *Drug discovery chemistry: a primer for the non-specialist*, *Drug. Discov. Today*, 14, 731-744, **2009**.
- [28] Montalbetti, C.A.G.N.; Falque, V.; *Amide bond formation and peptide coupling*, *Tetrahedron*, 61, 10827-10852, **2005**.
- [29] Allen, C. L., Chhatwal, A. R., Williams, J. M. J.; *Direct amide formation from unactivated carboxylic acids and amines*, *Chem. Commun.*, 48, 666–668, **2012**.
- [30] Valeur, E.; Bradley, M.; *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*. *Chem. Soc. Rev.*, 38, 606–631, **2009**.
- [31] Khorana, H. G., *The chemistry of carbodiimides*. *Chem. Rev.*, 145-157, **1953**.
- [32] Sheehan, J.C., Hlavka, J.J., *The use of water-soluble and basic carbodiimides in peptide synthesis*. *J. Org. Chem.*, 21, 439-441, **1956**.
- [33] <http://news.mit.edu/1992/sheehan-0401>, acessado em 13/07/2017.
- [34] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2nd edition, USA, Elsevier, (2008).
- [35] Chen, Yi-ning; Dan, Nian-hua; Dan, W.; *Gongcheng Journal*; General Review, 25, 16-22, **2015**.
- [36] Singh, P.; Nagpal, R.; Singh, U. P.; Manuja, N. *Effect of carbodiimide on the structural stability of resin/dentin interface*. *Journal of conservative dentistry*, 19, 501-509, **2016**
- [37] Yamada, Shinya; Sakata, Kouichi, *Polybutylene terephthalate resin composition having heat shock resistance property* May 4, WO 2017073629 A1. **2017**

- [38] Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. *Recent development in peptide coupling reagentes*, *Journal of Saudi Chemical Society* 16, 97–116, **2012**.
- [39] Nakajima, N.; Ikada, Y., *Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media*, *Bioconjugate Chem.*, 6, 123-130, **1995**

6. APÊNDICE
(ESPECTROS DE FTIR, MASSA, RMN DE ^1H E ^{13}C)

Anexo 1: Espectro de FTIR (puro, cm⁻¹) do 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila

Anexo 2: Q1MS (full scan) do 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila ($m/z=235$)

Anexo 3: Espectro MS/MS (Product ion) do 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila ($m/z=235$)

Anexo 4: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, TMS) de 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila

Anexo 5: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, CDCl_3 , δ em ppm, TMS) de 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila

Anexo 6: Espectro de FTIR (puro, nm) de 2-nitrofenil-acetonitrila

Anexo 7: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) de 2-nitrofenil-acetonitrila

Anexo 8: Espectro de RMN de ^{13}C de 2-nitrofenilacetoni-trila

Anexo 9: Espectro FTIR (puro, nm) do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

Anexo 10: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

Anexo 11: Espectro de RMN de ^{13}C do cloridrato de 1-*H*-2-aminoindol

Anexo 12: Espectro FTIR do 1-*H*-2-aminoindol base

Anexo 13: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) do 1-*H*-2-aminoindol base

Anexo 14: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 de 1-*H*-2-aminoindol base

Anexo 15: Espectro de RMN de ^{13}C de 1-*H*-2-aminoindol base (aproximado)

Anexo 16: Espectro FTIR (puro, cm⁻¹) 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (Método alternativo)

Anexo 17: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ em ppm, TMS) de 2-(2-nitrofenil)-2-cianoacetato de etila (Método alternativo)

Anexo 18: Espectro FTIR (puro, nm) de ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a)

Anexo 19: Espectro Q1MS (full scan) do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a)

Anexo 20: Espectro MS/MS do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a)

Anexo 21: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a)

Anexo 22: Espectro de RMN de ^{13}C do ácido 4-difenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5a)

Anexo 23: Espectro FTIR (puro, nm) de ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Anexo 24: Espectro Q1MS (full scan) ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Anexo 25: Espectro MS/MS do ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Anexo 27: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do ácido 4-anilina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Anexo 28: Espectro FTIR (puro, nm) de ácido 4-naftalenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5c)

Anexo 29: Espectro Q1MS (full scan) ácido 4-naftalenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5c)

Anexo 30: Espectro MS/MS ácido 4-naftalenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5c)

Anexo 31: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do ácido 4-naftalenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5c)

Anexo 32: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) do ácido 4-naftalenilamina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5b)

Anexo 33: Espectro FTIR (puro, nm) de ácido N-metil-N-(9-metil-antraenil)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d)

Anexo 34: Espectro Q1MS (full scan) ácido N-metil-N-(9-metil-antraceni)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d)

Anexo 35: Espectro MS/MS (Product ion) do ácido N-metil-N-(9-metil-antraceni)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d)

Anexo 36: Espectro de RMN de ¹H (300 MHz, DMSO d₆, δ em ppm) do ácido N-metil-N-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d)

Anexo 37: Espectro de RMN de ^{13}C (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do ácido N-metil-N-(9-metil-antracenil)amina-4-oxo-butanóico (ácido succinâmico 5d)

Anexo 38: Espectro de RMN ^1H (300 MHz, DMSO-d_6 , δ em ppm) do produto do teste de acoplamento de (4) com (5^a) em CH_2Cl_2 sob atmosfera N_2

Anexo 39: Comparação dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) de (4) acima, (5a) no meio e o produto do teste de acoplamento e (4) com (5a) em CH_2Cl_2 sob atmosfera N_2 abaixo

Anexo 40: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ em ppm) do produto do teste de acoplamento entre (5d) e anilina com EDC em CH_2Cl_2

Anexo 41: Comparação dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ em ppm) de (5d) acima com o produto do teste de acoplamento entre (5d) e anilina com EDC em CH_2Cl_2 abaixo

Anexo 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ em ppm) do produto do teste de acoplamento entre (5c) e anilina com EDC em CH_2Cl_2

Anexo 43: Comparação dos espectros de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO d_6 , δ em ppm) de (5c) acima com o produto do teste de acoplamento entre (5c) e anilina com EDC em CH_2Cl_2 abaixo

Anexo 44: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, $\text{DMSO } d_6$, δ em ppm) do produto da reação entre (4) e anidrido succínico em tolueno

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Alexandre Leal Gugel
São Paulo, 14 de abril de 1972to:

2. EDUCAÇÃO

ENSINO MÉDIO
E.E.P.S.G. Conselheiro Crispiniano, Guarulhos, 1989

ENSINO SUPERIOR
Bacharelado em Química
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
1996

Licenciatura em Química
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
2006

PÓS GRADUAÇÃO
Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo
2017

3. OCUPAÇÃO

EMPRESA: Biolab Sanus Farmacêutica
Período: Setembro/2003 a atual
Cargo: Analista de Desenvolvimento