UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de uma biblioteca de β -aminoálcoois e aziridinas com
potencial atividade antitumoral**

Miguel de Menezes Vaidergorn

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento de uma biblioteca de β -aminoálcoois e aziridinas com potencial atividade antitumoral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Miguel de Menezes Vaidergorn

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 27/09/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

VAIDERGORN, M.M	Desenvolvimento de uma biblioteca de β-aminoálcoois e aziridinas com potencial atividade antitumoral		MESTRADO FCFRP-USP 2016
--------------------	--	--	-------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Vaidergorn, Miguel de Menezes

Desenvolvimento de uma biblioteca de β -amino álcoois e aziridinas com potencial atividade antitumoral. Ribeirão Preto, 2016.
121 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Emery, Flavio da Silva.

1. Aziridinas. 2. β -amino álcool. 3. Ciclopropanação. 4. Química Medicinal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

VAIDERGORN, Miguel de Menezes

Desenvolvimento de uma biblioteca de β -aminoálcoois e aziridinas com potencial atividade antitumoral

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **José Vaidergorn** e **Consuelo Sampaio Meneses**, por todo o carinho, apoio, dedicação e esforço em mostrar o caminho correto, proporcionando-me sempre o melhor exemplo a ser seguido. A eles, exemplos de integridade, responsabilidade, amor à vida e disposição em auxiliar o próximo, todo o meu amor, respeito e gratidão. Vocês trazem Luz, Paz e Amor à minha vida.

Ao meu irmão, **Jac Emmanuel de Menezes Vaidergorn**, por ser sempre um ouvido amigo e alguém com quem posso contar por toda a vida.

À **Maria Olívia Barboza Zanetti**, por todo o apoio incondicional e incentivo durante todos os momentos, por me trazer a alegria e a certeza nos momentos de desânimo e dúvida e por me motivar a seguir sempre em frente. Você é um exemplo de simplicidade e garra a ser seguido.

Ao **Prof. Dr. Flavio da Silva Emery**, por todo o aprendizado, paciência, amizade e dedicação à ciência e conhecimento demonstrados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flavio da Silva Emery, pela oportunidade de realizar este trabalho e incentivar o meu desenvolvimento profissional e olhar crítico.

Ao Prof. Dr. A. Ganesan, pelas valiosas contribuições.

À Dr. Zumira Aparecida Carneiro, pelo auxílio, instrução e oportunidade de acompanhá-la nos ensaios biológicos.

Aos amigos e colegas do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM), pelos momentos de auxílio, aprendizado, descontração e os bolos trazidos para elevar o ânimo durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao técnico Murilo Helder de Paula, por sempre estar disposto a auxiliar, manter o bem-estar no laboratório e pelas análises de RMN.

À FAPESP, pela bolsa concedida por meio do processo 2014/03812-9 e financiamento dos projetos no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal.

À CAPES e ao CNPQ, pela bolsa concedida e financiamento de projetos no Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de desenvolver o presente trabalho.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi e Rosana dos Santos Florêncio, por toda a ajuda durante este período.

Aos membros da banca do meu exame de qualificação, Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki, Prof. Dr. Gil Valdo José da Silva e Prof. Dr. Marcio Weber Paixão pelas correções e sugestões feitas para a melhoria deste trabalho.

Aos técnicos José Carlos Tomaz, Izabel Cristina Casanova Turatti, Jacqueline Nakau Mendonça Galiote Silva e Vinicius Palaretti, pelas análises realizadas.

A todos os meus professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal, profissional e científico.

“If you thought that science was certain - well, that is just an error on your part”.

Richard Feynman – Prêmio Nobel de Física em 1965

Resumo

VAIDERGORN, M. M. **Desenvolvimento de uma biblioteca de β -aminoálcoois e aziridinas com potencial atividade antitumoral.** 132f 2016. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O anel aziridínico é conhecido desde o final do século XIX e apresenta alta reatividade devido a sua alta energia de ligação e tensão do anel, o que o torna um valioso aliado na síntese orgânica, especialmente em reações com nucleófilos. Estas características também o tornam reativo frente a nucleófilos biológicos, tais como os ácidos nucleicos. Tal fato leva a uma toxicidade celular e pode ser dirigida a substratos específicos, como no caso de quimioterápicos, levando à alquilação de DNA em células tumorais. Este anel pode ser sintetizado a partir de β -aminoálcoois, cuja classe de compostos apresenta conhecidas atividades, presentes em importantes moléculas biologicamente ativas. Diante disto, realizou-se neste trabalho um estudo a partir de um padrão estrutural envolvendo as duas classes mencionadas, aziridinas e β -aminoálcoois, a fim de se identificar uma possível atividade antitumoral frente à enzima LSD1. Para este caso, se explora a similaridade estrutural entre aziridina e ciclopropano, presente na estrutura da tranilcipromina. Além disso, realizou-se o estudo deste padrão estrutural frente a dois outros alvos: células de câncer de mama e o parasita *T.cruzi*, com o intuito de expandir o conhecimento sobre a reatividade de tais compostos sobre estas células. O desenvolvimento desta biblioteca de compostos permitiu uma análise preliminar das relações entre a estrutura química e atividade biológica observada. Neste estudo, foi possível identificar aziridinas com atividade antumoral, mais potentes que cisplatina (IC_{50} abaixo de $40\mu M$). O mecanismo de ação, por sua vez, ainda deverá ser estudado, considerando que os compostos não inibiram LSD1.

Palavras-chave: Aziridina, β -aminoálcool, câncer, química medicinal

Abstract

VAIDERGORN, M. M. **Development of a library of β -amino alcohols and aziridines with potential antitumoral activity.** 132 f. 2016. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The aziridine ring is known since the end of the XIX century and presents high reactivity due to its high strain energy and ring tension, which makes it a valuable ally in organic synthesis, especially with nucleophiles. These characteristics also culminate in reactivity towards biological nucleophiles, such as nucleic acids. This fact leads to cellular toxicity and can be directed to specific sites, which is the case in chemotherapy agents, resulting in DNA alkylation in cancer cells. This ring can be obtained from β -amino alcohols, which also present known activities and are present in important molecules with biological activity. As a result, this work performed a study of a structural pattern involving those two classes mentioned above, targeting a potential antitumoral activity towards the LSD1 enzyme. In this case, it is explored the structural similarity between the aziridine ring and the cyclopropane, present in the tranilcipromine structure. Furthermore, this structural pattern was studied for other two targets: breast cancer cells and the *T.cruzi* parasite, in order to expand the knowledge about the reactivity of those compounds in those biological systems. The development of this library allowed a preliminary analysis between the chemical structure and the observed biological activity. In this project it was possible to identify aziridines with antitumoral activities, showing higher potency than cisplatin (IC_{50} below $40\mu M$). However, the mechanism is yet to be studied, considering that those compounds didn't inhibit the LSD1 enzyme.

Keywords: Aziridine, β -amino alcohol, cancer, medicinal chemistry

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Anel aziridina, ciclopropano, oxirano e tiofeno com suas energias de ligação	1
Figura 2. Exemplo de compostos biologicamente ativos com anéis aziridínicos	2
Figura 3. Mecanismos epigenéticos atuando na cromatina: influência na ativação ou impedimento da transcrição gênica	4
Figura 4. Interação DNA (vermelho) e Histonas (resíduos de lisina e arginina carregados positivamente, em verde)	5
Figura 5. Modificações covalentes em DNA e histonas	6
Figura 6. Mecanismo enzimático da LSD e seu substrato (acima) e mecanismos propostos para a demetilação por hidreto ou transferência de elétrons (abaixo)	8
Figura 7. Esquematização tridimensional da enzima LSD1, com seu Cofator CoRest, domínio catalítico FAD e representação da interação enzima-substrato	9
Figura 8. Mecanismo de inibição da LSD1 pela tranilcipromina	10
Figura 9. Estruturas químicas de alguns inibidores de LSD1 irreversíveis	10
Figura 10. Estruturas dos compostos a serem estudados bem como o intermediário formado	11
Figura 11. Compostos β -aminoálcoois e seus derivados inicialmente sem estereoquímica definida (esquerda) e 2-Fenilaziridinas e seus derivados (direita)	12
Figura 12. Homólogos inferiores da fenelzina, de cadeia (A) e restrição conformacional (B)	19
Figura 13. Planejamento de aziridina com grupamento amino na posição 1	20
Figura 14. Numeração das estruturas dos regioisômeros 4 e 4'	27
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do composto 4e	28
Figura 16. Espectro de massas por IES-EM do composto 4a ou 4'a	29
Figura 17. RMN de ^1H do composto 4a	30
Figura 18. Espectro de ^{13}C e DEPT sobrepostos do composto 4a	31

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do composto 4g e 4'g, respectivamente	32
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de 4g e 4'g	33
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do composto 4k	34
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H referente ao composto 6b	42
Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6b	42
Figura 24. Compostos obtidos durante a etapa de síntese da biblioteca de interesse	47
Figura 25. Síntese de um híbrido entre dois inibidores da LSD1 – tranilcipromina e fenelzina, bem como a estrutura das destas duas moléculas	48
Figura 26. Benzaldeído hidrazona 20, benzilhidrazina 21, benzilamina 3a e 2-feniletilamina 3b	49
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do composto 9a	52
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9a	52
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do composto 9b	53
Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 9b	54
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do composto 10a	57
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do composto 11	58
Figura 33. Espectro de massas por IES-EM com o sinal em 234, referente à tranilcipromina BOC protegida	59
Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do composto 22	60
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do composto 23	61
Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do composto 13	62
Figura 37. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos dos compostos 23 (verde) e 13 (vermelho)	63
Figura 38. Diferença na conformação espacial das 2-fenilaziridinas, b-aminoálcoois e tranilcipromina	64

Lista de esquemas

	Página
Esquema 1. Síntese da aziridina, descrita por Gabriel	1
Esquema 2. Rotas para a obtenção de aziridinas a partir de diversos substratos, adaptado de Watson et al	2
Esquema 3. Rota retrossintética para a obtenção das 2-fenil-aziridinas 6 a partir do estireno 1	15
Esquema 4. Esquema retrossintético de β -aminoálcoois a partir de algumas fontes naturais e sintéticas	15
Esquema 5. Mecanismo reacional “borboleta” da reação de Prilezhaev	16
Esquema 6. Mecanismo reacional da reação de Shi, adaptado de Shi et al	17
Esquema 7. Mecanismo reacional para a epoxidação pela reação de Sharpless	18
Esquema 8. A) Epoxidação via formação de peroximonocarbonato. B) Epoxidação via formação de peroximonocarbonato com a utilização de catalisador metálico	19
Esquema 9. Rota 1: Rota retrossintética mais utilizada para a obtenção do composto 13. Rota 2: Rota alternativa para a obtenção do composto 13	21
Esquema 10. Síntese de epóxido de estireno via reação de Prilezhaev	25
Esquema 11. Síntese dos β -aminoálcoois a partir do óxido de estireno e diversas aminas primárias	25
Esquema 12. Possíveis regioisômeros formados na abertura do epóxido 2a com diferentes aminas	26
Esquema 13. Aminólise do epóxido 2a por anilina com condições brandas e utilização de catalisadores	27
Esquema 14. Síntese do β -aminoálcool 4k, com grupamento bromo (acima) e demais β -aminoálcoois (abaixo)	34
Esquema 15. Esquematização da síntese de aziridina partindo de β -aminoálcoois por substituição da hidroxila por um grupo abandonador mais eficiente	35
Esquema 16. Tentativa de formação de aziridina pela utilização de PPh_3 e Br_2	36
Esquema 17. Tentativa de formação de aziridina por PPh_3 e DIAD	36
Esquema 18. Proposta mecanística para a formação de aziridinas pela utilização de tosilato	37

Esquema 19. Tosilação de 4b e tentativa de ciclização em meio básico para a formação de aziridina	38
Esquema 20. Proposta mecanística para a síntese de aziridina a partir de trifenilfosfina e DIAD catalisada por cloridrato de trietilamina	39
Esquema 21. Metodologia de Wenker para a síntese de aziridinas a partir de β -aminoálcoois	39
Esquema 22. Tentativa de síntese de aziridina por metodologia clássica de Wenker	40
Esquema 23. Estudo de reatividade de 4b frente a diferentes compostos clorados ou sulfoclorados	40
Esquema 24. Possíveis mecanismos de sulfonação e sulfocloração proporcionados pelo ácido clorossulfônico	43
Esquema 25. Síntese de aziridinas a partir de seus β -aminoálcoois correspondentes, por meio da utilização de ácido clorossulfônico ou cloreto de sulfurila seguida da utilização de solução de NaOH	45
Esquema 26. Síntese de um híbrido entre dois inibidores da LSD1 – tranilcipromina e fenelzina, bem como a estrutura das destas duas moléculas	48
Esquema 27. Síntese do benzaldeído hidrazona 20	49
Esquema 28. Síntese da benzilhidrazina 21	49
Esquema 29. Síntese do acetato cinâmico correspondente 9	50
Esquema 30. Mecanismo para a formação do composto 9a e 9b pela utilização de trietilfosfonoacetato e uma base	51
Esquema 31. Mecanismo reacional para a formação da ilida de enxofre e a reação de ciclopropanação de Corey-Chaykovsky	54
Esquema 32. Esquema reacional para a síntese do composto 10a e 10b	55
Esquema 33. Hidrólise do composto 10a e formação do composto 11	57
Esquema 34. Rearranjo de Curtius e proteção por Boc	58
Esquema 35. Síntese do composto <i>trans</i> -2-nitrovinilbenzeno 20	60
Esquema 36. Ciclopropanação do composto 22 para o composto 23	61
Esquema 37. Redução do composto 23 para o composto de interesse 13	62

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1. Tipos de modificações epigenéticas, seus alvos e papel desempenhado na maquinaria celular	4
Tabela 2. Diferentes reagentes utilizados para a síntese de aziridina a partir de 4b	40
Tabela 3. Diferentes condições para síntese e otimização dos compostos 9a e 9b	50
Tabela 4. Diferentes condições para síntese e otimização dos compostos 10a e 10b	55
Tabela 5. Valores referentes aos IC ₅₀ , CC ₅₀ e SI dos compostos utilizados nos ensaios biológicos	68
Tabela 6. Compostos utilizados para o ensaio frente ao parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> , com seus valores de IC ₅₀ , CC ₅₀ e SI	69

Lista de gráficos

	Página
Gráficos 1 a 3. Citotoxicidade dos compostos frente às células da linhagem MCF-10	65
Gráficos 4 a 6. Atividade dos compostos selecionados frente à linhagem das células MCF-7	66
Gráficos 7 a 9. Atividade dos compostos selecionados frente à linhagem de células MDA-MB231	66
Gráficos 10 e 11. Atividade antitripanomicida dos β -aminoálcoois e das aziridinas sintetizadas e sua comparação com a droga controle	69
Gráficos 12 e 13. Citotoxicidade dos β -aminoálcoois e das aziridinas sintetizadas e sua comparação com a droga controle	69
Gráficos 14 e 15. Atividade das aziridinas sintetizadas frente ao parasita <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes períodos de incubação em relação à droga controle	70

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- Boc – Tertbutoxicarbonila
- BZN – Benznidazol
- CC₅₀ – Concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CG/EM – Cromatografia gasosa/espectrometria de massas
- ClSO₃H – Ácido clorossulfônico
- CoRest – Corepressor funcional requerido para a regulação de expressão gênica neuro-específica
- CPRG – Clorofenol red β-D-galactopiranosídeo
- Da – Dalton
- DBU – 1,8-Diazabicycloundec-7-eno
- DCM – Diclorometano
- DEPT – Distortionless enhancement by polarization transfer
- DIAD – Diisopropil azodicaboxilato
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- DPPA – Difenil fosforil azida
- EM/EM – Espectrometria de massas/ espectrometria de massas
- ER – Receptor de estrogênio:
- Et₂O – Éter dietílico
- FAD – Dinucleótido de flavina e adenina
- FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FDA – Food and Drug Administration
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HAT – Histona acetiltransferase
- HCl – Ácido clorídrico
- HDAC – Histona deacetilase
- HDM – Histona demetilase
- HER2 – Receptor de fator de crescimento epitelial humano tipo 2
- Hz – Hertz
- IC₅₀ – Concentração inibitória capaz de inibir 50% da atividade, processo biológico ou população
- IES-EM – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray
- IGF – Interconversão de grupo funcional

iMAO – Inibidor de Monoaminooxidase

JmjC – Jumonji C

Kj – Quilo joule

LSD1 – Lisina demetilase específica

m/z – Relação massa carga

MAO – Monoamino Oxidase

m-CPBA – Ácido m-cloroperbenzóico

MeCN – Acetonitrila

MeOH – Metanol

mM – milimolar

MnSO₄ – Sulfato de manganês

MTT – (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium)

nm – Nanômetro

PBS – Tampão fosfato salino

PPh₃ – Trifenilfosfina

Ppm – Parte por milhão

PR – Receptor de progesterona

RMN – Ressonância magnética nuclear

SI – Índice de seletividade

SO₂Cl₂ – Cloreto de sulfurila

SOCl₂ – Cloreto de tionila

SUMO – Small Ubiquitin-like Modifier

T – Tesla

t.a. – Temperatura ambiente

TBAI – Iodeto de tetrabutylamônio

t-BuOH – Álcool *terc*-butílico

tButONa – Tert-butóxido de sódio

THF – Tetrahydrofurano

TMS – Trimetilsilano

TOF – Time of flight

U – Unidade

δ – Deslocamento químico

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras	iii
Lista de esquemas	v
Lista de tabelas	vii
Lista de gráficos.....	viii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Aziridinas e atividade biológica: uma consequência do seu anel tensionado	1
1.2 – DNA e Histonas: relação genética e epigenética.....	3
1.3 – Alvo molecular: LSD1 - enzima moduladora nos processos epigenéticos e potenciais inibidores	6
2. OBJETIVOS	12
2.1 – Objetivo geral	12
2.2 – Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – Material.....	13
Equipamentos Analíticos.....	13
Equipamentos	14
Solventes e Reagentes	14
Software.....	14
3.2 – Proposta sintética.....	14
Planejamento sintético dos β -aminoálcoois, aziridinas e derivados para avaliação de inibição frente à enzima LSD1.	14
Síntese de análogos híbridos entre inibidores da LSD1 e aziridinas e hidrazinas.....	19
Síntese da tranilcipromina para utilização como padrão de atividade na enzima LSD1	20
Ensaio enzimático e de fluorescência em LSD1	21
Ensaio de atividade antitumoral e citotoxicidade dos compostos.....	22
Ensaio de atividade tripanocida e citotoxicidade dos compostos	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 – Epoxidação do estireno: estudo de reatividade frente a diversos métodos de epoxidação	24
4.2 – Síntese de β -aminoálcoois a partir de epóxidos: um estudo de reatividade frente a aminas alifáticas e de sistemas aromáticos.....	25

4.3 – Síntese de aziridinas a partir de β -aminoálcoois	35
4.3.1 – Abordagens clássicas: grupos de proteção	35
4.3.2 – Ciclização de Mitsunobu: uma abordagem catalisada por cloridrato de trietilamina na presença de trifetilfosfina	38
4.3.3 – Estudo de reatividade frente a compostos clorados e sulfoclorados: Síntese de Wenker e suas modificações	39
4.4 – Busca por análogos estruturais híbridos entre aziridinas e tranilcipromina	47
4.5 – Síntese da tranilcipromina	50
4.5.1 – Rota 1.....	50
4.5.2 – Rota 2.....	59
4.6 – Ensaios biológicos frente à enzima LSD1, parasita T.Cruzi e células de câncer de mama	63
4.6.1 – Ensaio frente à enzima LSD1.	63
4.6.2 – Ensaio frente A duas linhagens de células de câncer de mama.....	64
4.6.3 - Ensaio frente ao parasita T.cruzi	68
5. CONCLUSÃO.....	71
6. SEÇÃO EXPERIMENTAL.....	72
Procedimentos Gerais	72
7. REFERÊNCIAS	80
APÊNDICES	93

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Aziridinas e atividade biológica: uma consequência do seu anel tensionado

O anel aziridina, conhecido também como azaetileno ou etilenoimina, é o menor heterociclo contendo um átomo de nitrogênio. Por ser constituído por três membros, é um anel tensionado, uma vez que os ângulos de ligação presentes são menores que os encontrados em carbono sp^3 (nos chamados orbitais *bend* ou *banana*) e são facilmente clivados por nucleófilos (tais como álcoois, aminas ou organometálicos)¹. Este anel possui energia de ligação próxima ao oxirano e ao ciclopropano (Figura 1)^{2,3,4}. A aziridina foi sintetizada pela primeira vez por Gabriel no final do século XIX, ao se tentar obter vinil-amina por meio da reação intramolecular de 1,2-bromoetilamina, na presença de uma base (Esquema 1)^{1:5}.

calculado (kJ/mol)	113	115	114	79
	Aziridina	Ciclopropano	Oxirano	Tiofeno

Figura 1. Anel aziridina, ciclopropano, oxirano e tiofeno com suas energias de ligação.

Esquema 1. Síntese da aziridina, descrita por Gabriel.

A reatividade característica do anel aziridina torna-o um valioso intermediário químico para a síntese orgânica. Tais anéis são utilizados muitas vezes para a produção de intermediários reativos, como, por exemplo, aqueles contendo caráter radicalar, ou mesmo para gerar produtos de cicloadição. Além disso, as aziridinas são reconhecidas pela capacidade de interagir com bases nitrogenadas, o que leva à sua principal atividade biológica ou toxicidade³. Dentre as moléculas biologicamente ativas com este grupamento funcional, vale mencionar os produtos naturais das classes das mitosanas, azinomicinas, mitiromicinas, azicemicinas e miraziridinas⁶. Ademais, a relação estrutura-atividade entre as aziridinas e atividade antitumoral já se encontra descrita na literatura^{3: 7}, com um arsenal de conhecidos quimioterápicos, tais como as mitomicinas, benzoquinonas com grupamentos aziridínicos (traziquona, diaziquona e carbazilquinona, por exemplo) e mostardas nitrogenadas (Fig. 2)^{1:8}.

Figura 2. Exemplo de compostos biologicamente ativos com anéis aziridínicos.

Há diversas formas de sintetizar aziridinas, que variam em função do material de partida utilizado. É possível utilizar β -aminoálcoois, epóxidos (por reação de Staudinger), alkenos (via formação de sulfato cíclico, reação de Gabriel-Cromwell e via adição de nitrenos), azirinas e iminas para a formação deste heterociclo (Esquema 2)^{3; 7}.

Assim, explorando a reatividade característica das aziridinas e potencial atividade frente a alvos biológicos, foi proposta a utilização de uma biblioteca de compostos com o padrão 2-fenil-1-aziridinas. Tal padrão estrutural foi baseado em estudos de atividade frente à enzima MAO, realizado por Wells⁹. Nesse estudo, as aziridinas foram testadas quanto às suas potenciais atividades biológicas e para mimetizar o anel ciclopropano, que tem papel importante na inibição da MAO e também em mecanismos epigenéticos, como na modulação da atividade da enzima Lisina Demetilase Específica-1 (LSD1). Estas propriedades serão mais bem descritas nas seções a seguir.

1.2 – DNA e Histonas: relação genética e epigenética

A informação genética ou o DNA genômico de uma célula eucariótica está contida na cromatina, encontrando-se na forma de eucromatina ou heterocromatina, com alta e baixa atividade transcricional, respectivamente. A unidade básica da cromatina, denominada nucleossomo, é composta pelo DNA e por dois grupos de moléculas de histona: H2A e H2B; H3 e H4. Tais moléculas apresentam importante função biológica, conferida por sua capacidade de controlar a acessibilidade do DNA para a transcrição celular e a maquinaria de replicação^{10; 11}. Sendo assim, a cromatina é sequenciada com diferentes marcas nas histonas e no próprio DNA, e cada marca representa o resultado do código epigenético da modificação e sistema de regulação¹².

Epigenética, termo cunhado por Conrad Hal Waddington (1905-1975) em 1942, refere-se a eventos que não podiam ser explicados pelos princípios da genética. Waddington define o termo como “o ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, que trazem o fenótipo a ser”^{13; 14}. Atualmente, o termo é aceito para descrever os estados mitóticos e meióticos herdáveis da expressão gênica, sem alteração da sequência primária do DNA¹⁵. Em termos gerais, a epigenética envolve modificações na transcrição e pós-traducionais, que incluem reações de acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitilação em histonas ou DNA (Figura 3 e Tabela 1)¹⁶. Essas alterações podem modificar a estrutura da cromatina ou recrutar determinadas proteínas efetoras que influenciam a expressão genética, replicação e reparo do DNA, bem como condensação e segregação cromossômica¹⁰.

Figura 3. Mecanismos epigenéticos atuando na cromatina: influência na ativação ou impedimento da transcrição gênica. Adaptado de *Basset e Barnett*, 2014¹⁶.

Tabela 1. Tipos de modificações epigenéticas, seus alvos e papel desempenhado na maquinaria celular. Adaptado de *Basset e Barnett*, 2014¹⁶.

Tipo	Modificação	Exemplo	Papel
Acetilação	Lisina	Histona acetiltransferase (HAT) Histona Deacetilase (HDAC)	Transcrição Reparo Replicação Condensação
Metilação	Lisina Arginina	Lisina metiltransferase Lisina demetilase Arginina metiltransferase Arginina demetilase	Transcrição Reparo da transcrição
Fosforilação	Serina Treonina	serina/treonina quinases defosforilação por fosfatase	Transcrição Reparo Condensação
Ubiquitinação	lisina	ubiquitinasas	Transcrição Reparo
SUMOilação	lisina	Proteínas SUMO	Transcrição
ADP ribosilação	glutamato	ADP-ribosiltransferases	Transcrição
Deiminação	arginina	deiminases peptidilarginina	Transcrição
Isomeração de prolina	prolina	prolina isomerase	Transcrição

Em pH fisiológico, observa-se a interação eletrostática entre o DNA carregado negativamente e a histona carregada positivamente (nos resíduos de lisina e arginina), de forma que se obtenha uma estrutura rígida envolvendo ambas as moléculas (Figura 4)¹⁷. Havendo uma perda da carga positiva da porção histona, nota-se uma alteração na

conformação previamente rígida e estável, levando o DNA a adotar uma outra forma no espaço celular, sendo esta mais flexível e estendida, passível de ser transcrita¹⁷.

Figura 4. Interação DNA (vermelho) e Histonas (resíduos de lisina e arginina carregados positivamente, em verde). Adaptado de Vranken e Weiss¹⁷.

Embora o termo epigenética refira-se majoritariamente às mudanças herdáveis, tanto no processo meiótico quanto mitótico¹³, pode-se empregá-lo também para descrever alterações na estrutura da cromatina, independentemente da sequência estrutural primária do DNA, além de ser dinâmico a ponto de atuar de forma importante na regulação da proliferação, diferenciação, motilidade e sobrevivência celular¹⁰. Isto considerado, é possível notar que alterações genéticas e epigenéticas podem induzir, ao longo da vida, diversas mudanças nas estruturas e nas condições de modificações da cromatina, representando um mecanismo poderoso para a expressão genética e estabilidade genômica. As alterações supracitadas podem resultar, por exemplo, no desenvolvimento de neoplasias^{18; 19; 20} e, portanto, fazem da epigenética uma importante área de investigação para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos.

Apesar de intrinsecamente correlacionados à alteração da expressão gênica, estrutura e função celular, há distinções entre os mecanismos que caracterizam o maquinário epigenético como alvo potencial para o planejamento e descoberta de fármacos^{18; 19; 20}. Diferentemente de mutações, os mecanismos epigenéticos são reversíveis, adquiridos de maneira gradual e atuam como uma rede de eventos anormais no controle do ciclo celular²¹. Vale ressaltar que os mecanismos epigenéticos são centrais para o estabelecimento de um padrão pós-transcricional que auxilia a conferir a identidade celular e a sua não-regulação pode causar distúrbios neurológicos e neoplasias.¹¹

De maneira geral, as bases físicas epigenéticas dependem da metilação do DNA e de modificações covalentes em histonas (Figura 5), que em conjunto regulam a expressão gênica. Os mecanismos de regulação podem envolver a alteração da afinidade entre DNA e histonas (por meio da alteração da interação eletrostática), com consequente alteração do estado

transcricional do ácido nucleico (conforme citado anteriormente), ou a ativação ou repressão de transcrição²². Dentre as várias modificações epigenéticas descritas, os marcadores metilados (DNA) e acetilados (histona) são os mais comuns nos diversos tipos de câncer associados a esses eventos epigenéticos²³.

Figura 5. Modificações covalentes em DNA e histonas.

1.3 – Alvo molecular: LSD1 - enzima moduladora nos processos epigenéticos e potenciais inibidores

Uma série de proteínas está envolvida no mecanismo de controle epigenético: 1) enzimas que catalisam a modificação de DNA e histonas (DNA metiltransferases e histonas acetiltransferase); 2) enzimas que removem as modificações de DNA e histonas (histona deacetilase e lisina demetilase); e 3) domínios de proteína que reconhecem e interagem com DNA e histonas modificadas^{24; 25}. Considerando que em muitas patologias, como as neoplasias, estes três tipos de enzimas são superexpressos, a modulação epigenética se tornou

um importante alvo molecular para a busca de novas entidades químicas de interesse biológico.

Dentre os mecanismos descritos acima, a remoção de modificações de DNA e histonas vem recebendo destaque e parece ser uma alternativa promissora para o tratamento de diversas alterações biológicas^{16; 26; 27; 28}. A enzima LSD1 foi a primeira enzima desse tipo descrita, em 2004, por Shi e colaboradores²⁹. Esta enzima realiza, como o próprio nome diz, a demetilação específica de um resíduo de lisina, na posição 4 da histona 3 (H3K4), mas também pode atuar na lisina nas posições 6 e 79 da respectiva histona (H3K6 e H3K79). O trabalho acima citado finalizou o debate sobre a metilação de lisinas ser um marcador epigenético estático ou não, o que abriu um campo totalmente novo para o estudo dos processos envolvidos³⁰. Previamente, imaginava-se que a demetilação ocorria apenas durante a replicação do DNA ou mudanças de histonas¹¹. A partir de então, foram descobertos dois grupos de demetilases de lisinas, sendo a primeira pertencente a LSD1, dentro da superfamília das aminas oxidase FAD-dependentes, e a outra referente ao grupo das proteínas Jumonji C (JmjC)^{30; 31}.

Embora a metilação de lisinas não confira uma alteração de carga da lisina, como ocorre na acetilação, diversos leitores de proteínas reconhecem aminoácidos especificamente metilados¹¹. Visto isto, o entendimento do mecanismo de demetilação tornou-se um passo necessário para o total entendimento deste processo e do que ele acarreta. Apesar de um mecanismo pela transferência de hidreto ser bem aceito, há um segundo mecanismo proposto para a demetilação, partindo-se de uma transferência de elétrons. Ambos os processos culminam na oxidação e formação do íon imínio, que é hidrolisado por água a formaldeído^{11; 32; 33}. Isso ocorre com o auxílio do seu cofator CoREST, uma proteína co-repressora, especificamente atuando na lisina 4 de histonas H3 mono e dimetilada, que então reprime a transcrição (Figura 6)^{34; 35}.

Figura 6. Mecanismo enzimático da LSD e seu substrato (acima)¹¹ e mecanismos propostos para a demetilação por hidreto ou transferência de elétrons (abaixo)³⁶, adaptado de Stavropoulos et al.

O domínio catalítico da LSD1 pertence à família amina oxidase dependente da dinucleótido de flavina e adenina (FAD) – (Figura 7), como descrito anteriormente, sendo homóloga às monoamino oxidases (MAOs). Partindo-se de tal homologia entre as duas famílias enzimáticas, diversas pesquisas foram realizadas para estudar um possível substrato passível de atuar como um alvo molecular. Como resultado de um estudo de *screening* com inibidores de MAO (iMAO), descobriu-se que o antidepressivo *trans*-2-fenilciclopropilamina

(tranilcipromina, parnate®) é também capaz de inibir a LSD1 em quantidades micromolares³⁴;

37.

Figura 7. Esquematização tridimensional da enzima LSD1, com seu Cofator CoRest, domínio catalítico FAD e representação da interação enzima-substrato, adaptado de Yang et al e Stavropoulos et al.

A tranilcipromina foi o primeiro inibidor não hidrazínico da MAO, aprovado pelo FDA, em 1960, para o tratamento da depressão^{38; 39; 40}. Tal fármaco age como um substrato de amina oxidase, cujo mecanismo de inibição envolve a abertura do anel reativo ciclopropano, por meio da geração de espécies radiculares que se ligam covalentemente ao cofator FAD, de forma a inibir irreversivelmente a enzima (Figura 8). Este fármaco, já descrito de longa data, está em fase de testes clínicos como um agente antineoplásico para diversas neoplasias, e pode-se citar, por exemplo, sua aplicação no tratamento de leucemia mielóide aguda, em combinação com o ácido trans-retinóico⁴¹. Entretanto, há duas barreiras a serem superadas para o reposicionamento da tranilcipromina e seus derivados no tratamento antineoplásico. Primeiramente, o nível de inibição da LSD1 pela tranilcipromina é apenas moderado ($IC_{50} \sim 25 \mu M$) e em linhagem de câncer de próstata, a tranilcipromina por si só é ineficiente para

inibição da proliferação celular. Em seguida, desde a descoberta da tranilcipromina como inibidor da MAO, é inevitável a descrição de efeitos colaterais devido à falta de seletividade.

Figura 8. Mecanismo de inibição da LSD1 pela tranilcipromina.

O desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para estas histonas demetilases (HDMs) é de importância crucial para o entendimento do papel das HDMs e para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Alguns inibidores, conforme demonstrados na Figura 9, já foram relatados. Porém, muitos deles possuem baixa seletividade e especificidade, inibindo, assim, outras enzimas. Desta forma, a busca por seletividade foi um ponto chave para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 9. Estruturas químicas de alguns inibidores de LSD1 irreversíveis^{34; 42; 43; 44; 45}.

Sabendo-se que anéis aziridínicos e derivados β -aminoálcoois possuem atividade inibitória frente à MAO e que compostos que atuam na MAO podem atuar também na LSD1,

este trabalho pretendeu desenvolver uma biblioteca de compostos que explore este padrão estrutural também para a busca de novos inibidores da LSD1. Para tal, foi realizado um estudo envolvendo estes compostos aziridínicos, considerando a estratégia de bioisosterismo do anel ciclopropano para o anel aziridínico, e da utilização de β -aminoálcoois, também ativos na MAO, conforme supracitado. No caso da tranilcipromina, o composto ativo possui configuração *trans*, mas como se partiu de compostos racêmicos, utilizou-se a houve mistura racêmica inicialmente (Figura 10)⁴⁶.

Figura 10. Estruturas dos compostos a serem estudados, bem como o intermediário formado.

Por fim, é descrito na literatura casos em que drogas utilizadas primariamente como quimioterápicos, tais como o tamoxifeno e alquil lisofosfolípidios, apresentaram atividade frente a outro alvo: o parasita *T.cruzi*, causador da doença de Chagas. Embora o padrão estrutural das drogas utilizadas seja diferente dos propostos neste trabalho, um *screening* com os compostos propostos foi sugerido, uma vez que há necessidade de busca e desenvolvimento de novas drogas frente a esta doença.^{47; 48; 49}

No cenário atual, a busca por alvos terapêuticos eficazes e seguros é essencial para aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Tal situação, juntamente com o avanço no conhecimento dos mecanismos epigenéticos e suas relações com diversas neoplasias, motivou o desenvolvimento deste estudo. Desta forma, as hipóteses investigadas por este trabalho são: a) Este padrão estrutural mantém o perfil de atividade antitumoral semelhante ao descrito na literatura; b) A mimetização do anel ciclopropano pelo anel aziridínico é eficaz para a inibição da enzima em questão; c) Ao alterar o padrão de substituição dos β -aminoálcoois e aziridinas e seus derivados, é possível alcançar seletividade entre MAO e LSD1 e outros alvos biológicos.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu na síntese e estudo da reatividade de uma biblioteca de β -aminoálcoois, aziridinas e derivados frente à enzima LSD1 e outros potenciais alvos biológicos de interesse.

2.2 – Objetivos específicos

a) Estudo frente à enzima LSD1

Sintetizar uma biblioteca de compostos do tipo β -aminoálcool e 2-fenilaziridinas, visando uma potencial inibição da enzima Lisina Específica Demetilase (LSD1) (Figura 11).

Figura 11. Compostos β -aminoálcoois e seus derivados inicialmente sem estereoquímica definida (esquerda) e 2-Fenilaziridinas e seus derivados (direita).

b) Estudo da potencial atividade destes compostos frente a outros alvos

Estudar a atividade e relação estrutura-atividade dos compostos obtidos a partir de modificações na extensão da cadeia alquílica e inserção de novos grupos funcionais em alvos biológicos de interesse, em especial em células de câncer de mama e *Trypanosoma cruzi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) foram registrados a 300 e 500 MHz em espectrômetro BRUKER® - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (RMN de ^{13}C) foram registrados a 75 e 125 MHz em espectrômetro BRUKER® - Modelo DPX300 e DRX500 Ultra Shield, respectivamente, no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo e em Espectrômetro BRUKER® - Modelo Fourier300 – Ultra Shield®, com magneto de 7,05 T, e Sonda Dual de detecção direta (^1H : 300,83 MHz e ^{13}C : 75,48 MHz) para tubos de 5 mm de diâmetro, com sistema de lock de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de 53,5 Gauss.cm⁻¹) do laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os valores de deslocamento químicos (δ) estão relatados em partes por milhão (ppm), utilizando-se como referência o tetrametilsilano (TMS). As multiplicidades dos sinais estão apresentadas entre parênteses (s=simpleto, d=duplete, t=triplete, q=quarteto, dd=duplo duplete, m=multiplero), os valores de constante de acoplamento (J) são dados em Hertz (Hz) e o número de hidrogênios deduzidos a partir da integral relativa.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho de alta resolução, necessitando de calibração interna, antes de realizar as análises. Usa-se para calibração interna uma solução de NA-TFA a 10mg/mL(TOF). O modelo utilizado foi um ultrOTOFQ - ESI-TOF Mass Spectrometer, de Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA, sob as seguintes condições: Bomba de Infusão, Fluxo 300µl/h. O modo de detecção foi positivo e negativo para as amostras. Também foram obtidos através de CG/EM, modelo QP-2010, Shimatsu, coluna DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) e sistema MS/MS em tandem quadrupolo triplo LC Quattro (Micromass, Manchester, UK) com interface eletrospray-Z (IES) operando nos modos íon positivo e negativo.

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F254-MERCK. Para a visualização dos componentes nas análises em CCD, foi utilizada uma lâmpada ultravioleta (254nm).

EQUIPAMENTOS

A seguir, apresenta-se a descrição dos equipamentos utilizados durante os procedimentos sintéticos, os quais serão detalhados na sessão experimental: Balança analítica Mettler PE 400/ Sartorius BP 121S, medidor de Ponto de fusão: Marconi MA 381, bomba de alto vácuo E2M5 (Edwards), agitador magnético: IKA C-MAG H57, evaporador rotatório com controlador de vácuo: Büchi R-215, hidrogenador PARR Instrument Company INC, número 3911, bomba de alto vácuo: V-700 Büchi.

SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes comerciais foram convenientemente purificados conforme descrito na literatura⁵⁰. Os solventes utilizados na extração e síntese foram adequadamente separados e enviados para o centro de tratamento de resíduos. Os reagentes foram obtidos através da Sigma-Aldrich Brasil, Alfa Aesar, Merck e Synth.

SOFTWARE

As estruturas dos compostos descritos foram editadas usando o ChemBioDraw 13.0® da PerkinElmer Informatics e os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram processados com o MestreNova® V6.0.2.-5475.

3.2 – Proposta sintética

PLANEJAMENTO SINTÉTICO DOS B-AMINOÁLCOOIS, AZIRIDINAS E DERIVADOS PARA AVALIAÇÃO DE INIBIÇÃO FRENTE À ENZIMA LSD1.

Visando o desenvolvimento dos compostos de interesse, foi estabelecida uma rota retrosintética para as aziridinas **6**, que envolve a heterociclicização dos β-aminoálcoois **4** correspondentes, que, por sua vez, são obtidos pela aminólise dos epóxidos **2**, sintetizados via oxidação de estirenos **1** (Esquema 3).

Esquema 3. Rota retrossintética para a obtenção das 2-fenil-aziridinas **6** a partir do estireno **1**.

Além de servirem como intermediários reacionais, os β -aminoálcoois são também interessantes para a composição da biblioteca-alvo, pois tais compostos apresentam atividades biológicas proeminentes, tais como a inibição da enzima MAO⁹. Os compostos desta classe são utilizados também como intermediários na síntese de produtos naturais e como moléculas biologicamente ativas empregadas na indústria farmacêutica (como nos fármacos β -bloqueadores propranolol⁵¹ e pindolol⁵², por exemplo). Esses compostos podem ser obtidos de diversas fontes, tanto naturais (pela redução de aminoácidos ou seus derivados) quanto sintéticas (pela aminólise de epóxidos, aminação de halohidrinas, redução de lactamidas, aminação de β -hidroxicetonas, aminação e redução de α -halo-cetonas)^{53, 54} (Esquema 4). No caso deste estudo, foi utilizada a aminólise de epóxidos, frente a diversas aminas primárias^{9; 50; 51}.

Esquema 4. Esquema retrossintético de β -aminoálcoois a partir de algumas fontes naturais e sintéticas.

Ainda considerando a rota retrossintética proposta (Esquema 3), a obtenção do epóxido **2** é de suma importância, visto que este é o reagente de partida para a biblioteca de interesse. Assim, executou-se uma extensa busca e revisão de literatura para se conhecer os métodos mais comumente utilizados e eficientes para a obtenção deste heterociclo. Alguns destes métodos são clássicos e conhecidos desde o início do século XX, como a reação de Prizelhaev, em 1909, inclusive partindo-se de olefinas, tal como o estireno **1a**. Esta reação utiliza o ácido 3-cloroperbenzóico (m-CPBA) como agente oxidante e se dá a partir de um

mecanismo concertado, envolvendo a formação de ácido m-clorobenzoico como subproduto. Ela ocorre devido à interação de hidrogênio intramolecular do m-CPBA entre o oxigênio da carboxila e o hidrogênio da porção perácido, que leva à formação de residuais positivos e negativos nas regiões mencionadas. A polarização resultante culmina em um átomo de oxigênio eletrofílico, que pode sofrer ataque nucleofílico do alceno, formando, assim, o epóxido desejado sem estereoseletividade pelo mecanismo “borboleta”(Esquema 5)^{52; 53}.

Esquema 5. Mecanismo reacional “borboleta” da reação de Prilezhaev⁵⁴.

Pode-se citar, a título de exemplo, a epoxidação de Shi^{55; 56; 57}, que utiliza Oxone® e um catalisador derivado da frutose para obter uma epoxidação assimétrica de alcenos (Esquema 6). Inicialmente, o catalisador reage com a Oxone®, com consequente adição nucleofílica de um grupo sulfato ao grupo cetônico do catalisador. O intermediário formado, chamado de Intermediário de Criegee, é reativo em meio básico e leva à formação de um dioxirano, que serve como agente oxidante para o substrato, com consequente oxidação, obtendo-se o epóxido correspondente. É interessante notar que, ao se formar o intermediário de Criegee, este pode servir de substrato para reações secundárias durante a síntese^{56; 57}.

Outra reação clássica é a epoxidação de Sharpless⁵⁸, na qual se utiliza como reagente o hidroperóxido de *tert*butila, o tetraisopropóxido de titânio como catalisador e um álcool alílico como substrato para se preparar um 2,3-epoxialcool enantiosseletivo, cuja estereoquímica é resultado da indução promovida pelo dietiltartrato quiral utilizado, podendo ser o (*R,R*), atacando por *Re* ou o (*S,S*), atacando por *Si* (Esquema 7).

Esquema 7. Mecanismo reacional da reação de Sharpless⁵⁸.

Há também a utilização de peróxido de hidrogênio com bases para a formação de um intermediário reativo, conforme descrito por Lane e Burgess^{59; 60} e Yao e Richardson⁶¹. Tal metodologia consiste na utilização do perácido aniônico - peroximonocarbonato (HOOCO_2^-), e consequente oxidação da olefina. Em alguns casos, é possível utilizar o sulfato de manganês como catalisador (Esquema 8).

Esquema 8. A) Epoxidação via formação de peroximonocarbonato. B) Epoxidação via formação de peroximonocarbonato com a utilização de catalisador metálico.

SÍNTESE DE ANÁLOGOS HÍBRIDOS E HOMOLOGOS INFERIORES ENTRE INIBIDORES DA LSD1 E AZIRIDINAS E HIDRAZINAS

Com a finalidade de expandir o espaço químico de moléculas com potencial atividade frente à enzima alvo, optou-se também pela síntese de moléculas com características híbridas entre a tranilcipromina, com seu anel ciclopropano, e a fenelzina, com sua porção hidrazina pela estratégia de homologação de cadeia. Para tal, estudou-se a viabilidade da obtenção de compostos já descritos na literatura, mas sem utilização frente ao alvo desejado. Assim, optou-se pela síntese de A) benzilhidrazina e benzilhidrazona (figura 12) e B) um híbrido cuja estrutura possui uma aziridina ligada ao grupamento amina (Figura 13).

Figura 12. Homólogos inferiores da fenelzina, de cadeia (A) e restrição conformacional (B).

Figura 13. Planejamento de aziridina com grupamento amino na posição 1.

SÍNTESE DA TRANILCIPROMINA PARA UTILIZAÇÃO COMO PADRÃO DE ATIVIDADE NA ENZIMA LSD1

A metodologia inicial planejada para a obtenção da tranilcipromina **13** foi baseada na rota descrita por Burger e Yost⁶² e Csuk, Schabel e Scholz⁶³, e é mostrada na rota 1 do Esquema 10. Esta metodologia é a mais utilizada e descrita na literatura, na qual o composto **13** é obtido pela desproteção do composto Boc- protegido **12**⁶³. Este composto **12** é formado a partir de um rearranjo de Curtius⁶⁴ do ácido **11**, pela utilização de uma azida e álcool tert-butílico. O ácido **11**, por sua vez, provém da hidrólise do ciclopropanocarboxilato **10**, produto da ciclopropanação do acetato cinâmico **9** pela reação de Corey-Chaykovsky⁶⁵. O composto **9**, por fim, é obtido pela reação de Horns-Wadsworth-Emmons entre o benzaldeído **8** e trietilfosfonoacetato^{66; 67; 68; 69}.

Posteriormente, uma segunda metodologia foi planejada a fim de sintetizar a tranilcipromina **13**, representada abaixo como rota 2 (Esquema 9). Tal rota foi planejada para tentar obter o produto de interesse com menor número de etapas e utilização de reagentes menos custosos. Nesta rota, descrita por Wurz e Charette⁷⁰, a tranilcipromina é resultante da redução do composto **17** com HCl e Zinco metálico. Este composto é produto da ciclização do

nitrovinilbenzeno **16**, por meio da reação de Corey-Chaykovsky⁵⁸. Este produto, por sua vez, é obtido a partir do benzaldeído **8** e nitrometano, pela reação de Henry em meio ácido^{71; 72}.

Esquema 9. Rota 1: Rota retrossintética mais utilizada para a obtenção do composto **13**. Rota 2: Rota alternativa para a obtenção do composto **13**.

ENSAIOS ENZIMÁTICOS E DE FLUORESCÊNCIA EM LSD1

A amostra foi preparada em DMSO na concentração de 250mM e então diluída em 50mM de tampão fosfato de potássio pH 7.5 (mistura de monobásico e dibásico na proporção 1:1). 10µL da droga em 5x da concentração desejada foi adicionada ao um poço de GREINER “non binding White plate”, seguido de 30µL de proteína pura his-LSD1 diluída em 50mM de tampão fosfato de potássio em concentração de 0.00461mg/mL e incubado à temperatura ambiente com agitação por 10 minutos. 10µL do substrato peptídeo correspondente aos primeiros 21 aminoácidos da histona 3 dimetiliada na lisina 4 humana ARTK(me2)QTARKSTGGKAPRKQLA foi adicionada na concentração de 150µM e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente com agitação⁶⁴.

Subsequentemente, 50µL de mistura de Amplex® Red/HRP foi adicionado a cada poço reacional e incubado à temperatura ambiente com agitação suave. Após 30 minutos de incubação, terminou-se a reação pela adição de 20µL de Amplex® Red Stop Solution (InVitrogen) em cada poço reacional. A fluorescência foi lida em um leitor “BMG Cell star microplate” com excitação em comprimento de onda de 530nm e emissão em comprimento de onda de 590nm. Os dados brutos foram coletados e analisados com o programa GraphPad Prism. Os resultados foram então expressos como unidades de fluorescência relativa (Relative Fluorescence Unit – RFU) e comparados com 100% da atividade enzimática (LSD1 + substrato sem inibidor)⁶⁴.

ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTITUMORAL E CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Meios de Cultivo Células de Câncer de mama MB- 231, MCF-7, MCF-10A

Para avaliar os efeitos antitumorais dos compostos, utilizou-se o teste MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). O princípio deste método, descrito por Mosman, consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática de oxirredutases das células vivas⁷³. Para o teste, $1,5 \times 10^5$ células de câncer de mama das linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 (atividade antitumoral) ou $1,5 \times 10^5$ linhagem de célula epitelial normal de mama MCF-10 (citotoxicidade) foram semeadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos ligantes e complexos (3,7 a 500 μM) ou cisplatina (3,7 a 500 μM) e incubadas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 24, 48 ou 72 horas. Ao final do período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 μL de MTT (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO) na concentração de 5 mg/mL⁻¹, e após 3 horas de incubação com o MTT, foram acrescentados 50 μL DMSO para dissolver os cristais de azul de formazana. A absorbância foi determinada em 570 nm usando espectrofotômetro de microplaca Stat Fax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL, USA). A porcentagem de viabilidade celular foi determinada a partir da seguinte fórmula: Viabilidade celular (%) = (Absorbância do tratamento)/(Absorbância do controle negativo) x 100. O valor de IC₅₀ (concentração [μM] que inibe 50% o crescimento celular) foi determinada por meio da curva dose-resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

ENSAIOS DE ATIVIDADE TRIPANOCIDA E CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS

Avaliação de atividade tripanocida *in vitro* de compostos

A atividade tripanocida dos compostos e do benznidazol (BZN) frente às formas amastigotas da cepa CL Brener foram avaliadas conforme o protocolo de Buckner⁷⁴. As células da cepa LLCMK₂ ($2,5 \times 10^4$) foram ressuspensas em meio RPMI sem o suplemento phenol red e com 5% de soro fetal bovino, por um período de 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas com a forma tripomastigota ($5,0 \times 10^5$) de *T. cruzi* da cepa CL Brener que expressam o gene de b-galactosidase de *Escherichia coli* (CL Brener) e, após 48 horas, as placas foram lavadas com PBS para remover os parasitas extracelulares. Posteriormente, as

células infectadas foram incubadas com os compostos ou benznidazol, em diluição seriada entre 500 μ M até 3,9 μ M. Após o tempo determinado (48 ou 72 horas) de cultura, 50 μ L do PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e 400 μ M de Chlorophenol Red- β -D-galactoside (CPRG) foram adicionados. As placas foram incubadas a 37°C por 6 horas e a absorbância foi lida em 570nm. O BZN foi usado como um controle positivo e o meio de cultura como controle negativo⁷⁴.

Avaliação da citotoxicidade *in vivo* dos compostos

A viabilidade das células LLCMK₂ foi avaliada pelo ensaio colorimétrico clássico⁷³ com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). Para isso, 2,5x10⁴ células foram incubadas por um período de 24 horas em cultura em placa com 96 poços. Após este período de incubação, os compostos e o BZN foram adicionados (em concentrações de 500 a 3,9 mm em diluição seriada/complexo solubilizado em DMSO) em um volume final de 200 μ L. As células foram incubadas por 72 horas a 37°C. Após a incubação com os compostos, o meio foi removido e foi adicionado um meio contendo 10 μ M de MTT (5,0 mg/mL) diluído em tampão fosfato salino (PBS). O precipitado azul MTT formazan foi então dissolvido em 50 μ L de DMSO e a absorbância foi medida em 570nm em um leitor VARIAN CARY-50 plate reader MPR multiwall. A viabilidade da célula foi expressa como a porcentagem dos valores de absorção em células tratadas comparadas com células padrão não tratadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões apresentados abaixo iniciam-se com o estudo das condições reacionais mais favoráveis para a síntese das 2-fenil-aziridinas, seguido da síntese de análogos híbridos e, por fim, as condições reacionais para a obtenção da tranilcipromina, utilizada como padrão, dado sua atividade conhecida. Todos os métodos utilizados estão descritos detalhadamente na *seção experimental* e os espectros que determinam os compostos são mostrados na *seção Apêndices*, ao final deste trabalho.

4.1 – Epoxidação do estireno: estudo de reatividade frente a diversos métodos de epoxidação

A partir dos métodos conhecidos e descritos previamente, optou-se por estudar inicialmente as condições para a oxidação da olefina **1a**, visando o epóxido **2a**, utilizando H₂O₂ como oxidante, na presença de diferentes concentrações de base para a formação do perácido, solventes (H₂O, DCM, MeCN) e presença de catalisador (MnSO₄)^{59; 60; 61}. Este método foi utilizado dada a sua simplicidade sintética e utilização de reagentes comercialmente disponíveis e menos custosos. Conforme observado por CCD, ao final de todas as reações, não foi possível obter-se o produto desejado. Em todas as tentativas, foram obtidas misturas complexas de produtos, da qual não foi possível observar a formação do produto desejado.

Visto que não houve formação do produto de interesse com a utilização de H₂O₂, o agente oxidante foi alterado para m-CPBA, via reação de Prilezhaev⁵⁴. Assim, foram estudadas as condições reacionais mais favoráveis para a síntese do epóxido **2a**. Foram avaliados tempo de reação, solvente, temperatura do sistema e velocidade de adição do m-CPBA. Após diversas tentativas, foi observado que a condição que resultou em um melhor rendimento (55%) envolveu a utilização de DCM como solvente, com adição lenta de m-CPBA, em um período de 2 a 3 horas, com posterior agitação à temperatura ambiente por mais 1,5 hora (Esquema 10)^{56; 75; 76}. Com este método, foi possível obter **2a**, conforme determinado por RMN de ¹H (Apêndice 1). O baixo rendimento, quando comparado ao da literatura, pode ser consequência da potencial presença de água no solvente, com a formação do respectivo diol originado da hidrólise do epóxido, devido a presença de água.

Esquema 10. Síntese de epóxido de estireno via reação de Prilezhaev⁵⁴.

4.2 – Síntese de β-aminoálcoois a partir de epóxidos: um estudo de reatividade frente a aminas alifáticas e de sistemas aromáticos

Considerando o método escolhido para a síntese de β-aminoálcoois a partir da aminólise de epóxido, foi realizado um estudo de reatividade de epóxidos frente a diversas aminas primárias, sendo aril- ou alquilaminas, com e sem a utilização de catalisadores durante o processo. A síntese da biblioteca de compostos foi iniciada a partir do epóxido de estireno **2a**, obtido anteriormente, frente a 9 aminas comerciais, mostradas no Esquema 11, visando a formação do β-aminoálcool correspondente. Diversas metodologias foram estudadas, com o emprego de solventes como metanol, água, diclorometano ou a ausência de solvente, conforme descrito na literatura^{51; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85}.

Esquema 11. Síntese dos β-aminoálcoois a partir do óxido de estireno e diversas aminas primárias.

Foi observado que a condição reacional mais favorável encontrada para tais aminas envolve a utilização de 1,5 equivalentes da amina em relação ao epóxido, na ausência de solvente ou catalisador, e com adição lenta do epóxido durante 1 hora, seguida de agitação a 220°C, durante 3 horas. Ao se utilizar temperaturas mais brandas ou temperatura ambiente, não foi observada a formação do composto desejado. Foi estudada também a utilização de solventes, principalmente próticos como água ou álcoois, bem como a utilização de

catalisadores, o que levou a uma regioselectividade para a formação do composto com álcool primário, em que a abertura do epóxido se dá no carbono benzílico, ao invés do terminal, o que foi condizente com o descrito na literatura (esquema 12)^{82,83,84}. Isto ocorre porque o par de elétrons do oxigênio do epóxido interage com o solvente ou catalisador, podendo atuar de tal forma que altera a eletrofilicidade do carbono benzílico, tornando-o mais ativado para sofrer o ataque do nucleófilo presente, no caso, a amina⁸⁵.

Conforme observado na literatura, mesmo na ausência de solvente há uma mistura entre os dois compostos, consequência da baixa regioselectividade, mesmo com o carbono terminal mais disponível para sofrer ataque nucleofílico pelas aminas utilizadas (Esquema 13). Ao se resfriar a mistura reacional, é observada a solidificação desta mistura, com coloração amarelada em geral. Isto é notado pelo excesso de amina utilizada, bem como pela presença dos dois β -aminoálcoois formados. Ao realizar a recristalização do sólido com os solventes mais apropriados, são obtidos cristais incolores e óleos amarelados, sendo o primeiro referente ao β -aminoálcool com uma hidroxila ligada a um carbono secundário (**4a-g**), e o segundo, ao β -aminoálcool com a hidroxila ligada a um carbono primário (**4'a-g**). Esta ausência de regioselectividade, independentemente dos métodos, é a principal razão para a obtenção de rendimentos próximos a 50% do regioisômero desejado. Além disso, cabe apontar que o composto **4d** não é descrito na literatura, tendo sido interessante analisar suas potenciais atividades biológicas.

Esquema 12. Possíveis regioisômeros formados na abertura do epóxido **2a** com diferentes aminas. A) Aminólise por ataque no carbono terminal, devido ao menor impedimento estérico. B) Aminólise por ataque no carbono terciário, que leva a um carbocátion mais estável.

A numeração das estruturas **4** e **4'** seguiu também um padrão para que fosse mais fácil discutir a posição da hidroxila e, conseqüentemente, diferenciar os dois regioisômeros,

conforme demonstrado na Figura 14. É possível observar que o carbono quiral é sinalizado com o número 7, enquanto o centro pró-quiral a ele ligado é sinalizado como 8 em ambas as estruturas.

Figura 14. Numeração das estruturas dos regioisômeros **4** e **4'**.

Como observado na tabela do Esquema 11, ao se utilizar aminas aromáticas para a obtenção de β -aminoálcoois, a metodologia empregada anteriormente se mostra ineficaz. Isso ocorre devido à possível degradação a altas temperaturas⁸⁴, aliada a uma menor nucleofilicidade de aminas aromáticas, tais como anilina, impedindo a formação do composto almejado. Com a metodologia empregada, foi obtido apenas um óleo escuro e viscoso, com a formação de múltiplos produtos observados em cromatografia em camada delgada, os quais não condizem com os dados disponíveis em bancos de dados. As análises por espectroscopia de massas indicam que o produto não foi formado. Visto isto, condições mais brandas para a aminólise do epóxido por anilinas foram estudadas, o que levou à utilização de solventes e, eventualmente, catalisadores (Esquema 13).

Esquema 13. Aminólise do epóxido **2a** por anilina com condições brandas e utilização de catalisadores.

Desse modo, foi esperada a obtenção mais seletiva do regioisômero em que há a hidroxila ligada ao carbono 8 na estrutura, conforme a Figura 14. A utilização de catalisadores metálicos, tais como cloreto de lítio (LiCl) ou cloreto de índio, (InCl_3) permite uma regioseletividade que, de acordo com a literatura, pode ser de 7:3 até 9:1, com a abertura no carbono benzílico do epóxido^{80; 81; 82; 83,84}. Ao analisar os dados obtidos das análises espectroscópicas, foi observado que o espectro de massas foi coerente com a abertura do epóxido **2a**, bem como a análise de RMN de ^1H . O espectro deste composto demonstrou a obtenção do composto **4e** com a hidroxila ligada ao carbono 7, diferentemente do regioisômero **4'e** esperado, conforme observado abaixo (Figura 15 e Apêndice 2).

Figura 15. Espectro de RMN de ^1H do composto **4e**.

Porém, como ambos os regioisômeros são passíveis de serem utilizados para a formação de aziridinas, a presença de qualquer um dos compostos já é interessante como intermediário reacional. Para a confirmação efetiva dos compostos de interesse, outras análises são necessárias, tal como discutido a seguir.

Ao analisar os compostos obtidos no espectro de massas por Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (IES-EM), é possível observar a massa dos compostos **4a** (figura 16 e Apêndice 3), **b**, **c**, **d**, **e** e **g** protonados, confirmando a obtenção dos β -aminoálcoois (Apêndices 6, 10, 14, 18 e 19). Deve-se deixar claro que o espectro de massas não é capaz de diferenciar regioisômeros, e que, com essa análise, é apenas possível detectar a presença dos compostos, mesmo que estejam sob mistura.

Figura 16. Espectro de massas por IES-EM do composto **4a** ou **4'a**.

Ao se analisar todos os espectros de RMN de 1H (Apêndices 8, 9, 10, 11 e 12), é possível observar a presença de um duplo duplete na região de 4,5-4,8 ppm, condizente com o hidrogênio diastereotópico da molécula em relação ao carbono quiral (Figura 15 e Apêndice 4). Este é o sinal mais característico da presença de β -aminoálcool com hidroxila ligada ao carbono 7 (Figura 14) e permite confirmar sua regioseletividade, conforme observado no espectro de RMN de 1H do composto **4a** (Figura 17). No outro regioisômero, o duplo duplete também formado está na vizinhança magnética do nitrogênio, ao invés do oxigênio da hidroxila, levando a uma desblindagem menor do próton no espectro. Vistas tais diferenças, é também possível observar os hidrogênios aromáticos na região de 6,50-7,40 ppm, e os hidrogênios da porção alquílica da amina, próximos à região de 1,0-4,0 ppm, com multiplicidades diferentes, de simpletos com aparência de dupletos (devido ao possível acoplamento tipo geminal dos hidrogênios próximo à função amina), a triplete, quintetos ou multipletos. Essas diferentes multiplicidades são observadas devido à vizinhança química ser magneticamente diferente por conta da proximidade do nitrogênio ou do anel aromático presente.

Figura 17. RMN de ^1H do composto **4a**.

Além do espectro de RMN de ^1H , é possível observar nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT (Figura 18) os deslocamentos dos carbonos das moléculas. Nota-se que os carbonos quaternários na região de 130-145 ppm, referentes aos carbonos do anel aromático ligados às porções alquílicas, desaparecem no DEPT, conforme demonstrado no espectro sobreposto de ^{13}C e DEPT do composto **4a**, onde o sinal em verde é referente ao espectro de ^{13}C e o roxo, referente ao DEPT.

Além disso, observa-se a região dos sinais aromáticos entre 120-130 ppm, visíveis como CH no DEPT. Verifica-se também, em todos os espectros, um sinal (CH no DEPT), entre 72-75 ppm, referente ao carbono ligado à hidroxila do β -aminoálcool, o que corresponde ao deslocamento de carbono na vizinhança de oxigênio no espectro de ^{13}C , valores condizentes com os encontrados na literatura^{84; 85}. Por último, todos os sinais encontrados entre 10 e 70 ppm são de metileno - CH_2 (sinal para baixo no espectro de DEPT, em roxo), referentes aos carbonos das cadeias alquílicas do β -aminoálcool, em que os mais desblindados são próximos ao nitrogênio, seguido dos carbonos próximos ao anel benzênico, e os mais blindados são referentes aos carbonos sem grupamentos que desblindam a vizinhança.

Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT sobrepostos do composto **4a**.

A fim de ilustrar a diferença entre os dois regioisômeros do β -aminoálcool, pode-se observar, tanto no espectro de RMN de ^1H (figura 19 e Apêndice 20) quanto no de ^{13}C (figuras 20 e Apêndice 21) do composto **4g** e **4g'**, múltiplos sinais referentes à mistura dos dois regioisômeros. No espectro de RMN de ^1H do composto **4g**, nota-se a presença do sinal típico próximo a 4,9 ppm e sinais próximos a 2,8 ppm, sinalizando quatro hidrogênios próximos ao nitrogênio, além dos quatro hidrogênios da porção alquílica da amina e um tripleto com três hidrogênios na região mais blindada do espectro, indicando a metila terminal.

Percebe-se também o espectro de **4'g**, com duplos dupletos mais blindados, na região de 3,8 ppm, estando, assim, na vizinhança magnética do nitrogênio, que, embora também atue desblindando o hidrogênio, possui um efeito menos pronunciado que o oxigênio. Nota-se também sinais próximos a 3,8 ppm referentes a dois hidrogênios próximos ao oxigênio e dois hidrogênios próximos a 2,6 ppm, indicando os dois hidrogênios próximos ao nitrogênio. Além disso, observam-se os quatro hidrogênios referentes aos CH_2 da porção alquílica e a metila terminal com três hidrogênios, muito semelhantes ao outro regioisômero. Além disso, pode-se observar que a integral dos sinais dos regioisômeros não é equivalente, sendo eles na proporção 10:4, o que mostra a variação na intensidade.

Figura 19. Espectro de RMN de ¹H do composto 4g e 4'g, respectivamente

No espectro de RMN de ¹³C, é possível observar o dobro de sinais esperados, porém com intensidades diferentes, na região de 13 a 70ppm. Nota-se que os carbonos mais blindados, em 14 e 20ppm, são iguais em ambos os regioisômeros, mas os seguintes sinais referentes à porção alquílica já apresentam deslocamentos distintos e facilmente observáveis.

Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C de 4g e 4'g.

Em seguida, optou-se por variar o epóxido para a formação de um β -aminoálcool substituído na posição *para* do anel aromático. Para tal, foi utilizado o 4-bromo epóxido do estireno, proveniente da oxidação do estireno **2b**, em reações com as aminas **3a**, **3b**, **3c** e **3d**, a fim de se obter β -aminoálcoois mais apolares (Esquema 14). A primeira amina utilizada foi a **3b**, para a qual foi adotada a mesma metodologia empregada para os demais β -aminoálcoois com aminas não aromáticas. Após o final de reação, acompanhada por CCD, o *work-up* necessário foi realizado e, após a lavagem com metanol, um sólido amarelado precipitou. Ao ser analisado por IES-EM, o produto esperado se mostrou presente, embora ainda impuro. Devido ao baixo rendimento obtido, foi estudada a otimização da reação, variando o tempo e procedimentos experimentais de purificação. Uma vez purificado, metanol foi adicionado na amostra para transferir o composto e foi observada a precipitação, o que levou ao estabelecimento deste solvente para sua recristalização. Após obtenção com sucesso do composto **4i**, as demais reações foram realizadas, levando aos produtos **4je 4k**, sendo que o primeiro é inédito na literatura e o composto **4k** não apresenta espectro de RMN de ^1H conhecido, mas tendo sido confirmado pela análise espectroscópica realizada após sua purificação (Figura 21, Apêndice 26). É possível verificar nesse espectro o deslocamento característico dos compostos *para*-substituídos. Além disso, há o sinal característico na região próxima a 4,60 ppm, sendo um tripleto aparente (diferentemente dos outros compostos analisados), possivelmente pela resolução utilizada para a aquisição do espectro ou

característica do composto. Os demais sinais são condizentes com sinais encontrados no composto **4a**, uma vez que apresentam a mesma porção da molécula.

Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do composto **4k**.

Esquema 14. Síntese do β -aminoálcool **4k**, com grupamento bromo (acima) e demais β -aminoálcoois (abaixo).

4.3 – Síntese de aziridinas a partir de β -aminoálcoois

4.3.1 – ABORDAGENS CLÁSSICAS: GRUPOS DE PROTEÇÃO

Com o intuito de sintetizar aziridinas a partir de β -aminoálcoois, é necessária uma substituição inicial da hidroxila por grupamentos funcionais com maior caráter abandonador, deixando o carbono mais susceptível ao ataque da respectiva amina. Esta segunda etapa ocorre em meio básico, e a amina atua como nucleófilo intramolecular, o que leva à heterociclicização pretendida, liberando o grupo abandonador (Esquema 15).

X = tosilato, mesilato, haletos, compostos sulfoclorados

Esquema 15. Esquematisação da síntese de aziridina partindo de β -aminoálcoois por substituição da hidroxila por um grupo abandonador mais eficiente.

Como a hidroxila não é um grupo abandonador adequado para essas reações, optou-se pela incorporação de grupamentos clássicos, tais como trifenilfosfina (PPh_3) e cloreto de p-toluenossulfonila (cloreto de tosila). Foram testadas diversas condições reacionais, utilizando-se esses reagentes para a formação do precursor eletrofílico, tais como variações de temperatura, tempo de reação, base envolvida na segunda etapa reacional e solvente.

Dessa forma, foi realizado o estudo reacional com a utilização de PPh_3 na presença de bromo molecular (Esquema 16)^{86; 87}. Como é observado na literatura, durante esta reação ocorre, de forma competitiva, a formação de piperazina correspondente ao β -aminoálcool utilizado, o que compromete o rendimento reacional, e muitas vezes pode, inclusive, ser o produto principal da reação.

Esquema 16. Tentativa de formação de aziridina pela utilização de PPh_3 e Br_2 .

Após o término da reação e manipulação de purificação e isolamento, foram obtidos dois sólidos brancos. Ambos os compostos foram analisados por IES-EM e provaram ser o óxido de trifenilfosfina (Ph_3PO , sinal da massa 278) e o material de partida **4b** (sinal de 242), dentre diversos outros subprodutos com massa molecular maior (Apêndice 29). Ao se refazer a reação, foi possível observar no IES-EM o sinal de 580, referente ao intermediário **5b**.

Em função da formação do intermediário **5b**, foi mantida a utilização de trifenilfosfina. Entretanto, ao invés de bromo molecular, optou-se pelo uso de DIAD (diisopropilazodicarboxilato) como fonte de ativação da trifenilfosfina para formar um intermediário reativo frente ao **4b**, um grupo abandonador mais eficiente no intermediário **5b** e a aziridina (Esquema 17). Ao final desta reação, foi obtida, assim, uma mistura complexa de produtos, sem consumo total do material de partida.

Esquema 17. Tentativa de formação de aziridina por PPh_3 e DIAD.

Sem sucesso com a utilização de PPh_3 , foi estudada outra metodologia, visando a formação do grupo abandonador tosila, em diversas condições descritas a seguir (Esquema 18).

Esquema 18. Proposta mecanística para a formação de aziridinas pela utilização de tosila.

Ao analisar as diversas condições reacionais realizadas, nota-se que foi possível a obtenção do produto tosilaado com total conversão, comprovado pelo espectro de RMN de ^1H (Apêndice 30). A presença dos sinais de hidrogênio de **4b**, somados aos sinais de anel aromático *para*-substituídos, referente ao grupamento tosilato, confirmam a estrutura do intermediário reacional. Porém, é observado que, mesmo ao variar as bases (KOH , K_2CO_3 , e NaOH), o solvente (MeCN , $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$, $\text{MeCN}/\text{tolueno}$ e tolueno), uso de catalisador de transferência de fase (TBAI) e tempo (de 0,5 a 6 horas), não foi possível formar a aziridina desejada **6b** (Esquema 19). A baixa reatividade do grupamento tosilato neste substrato pode ser creditada ao fato de ser este um grupo abandonador menos reativo comparado a outros ésteres sulfônicos, especialmente quando ligados a grupos sacadores de elétrons, tais como os triflatos. Quando o TBAI foi utilizado para estabilizar e solvatar os intermediários, um óleo claro foi formado. Tal óleo foi analisado por IES-EM, indicado a massa referente ao **4b**, bem como um sinal referente à massa de 224 Da, podendo ser tanto a aziridina esperada quanto a simples perda da hidroxila durante a etapa final da reação. Devido à degradação do produto formado, as demais análises não puderam ser realizadas.

Esquema 19. Tosilação de **4b** e tentativa de ciclização em meio básico para a formação de aziridina.

4.3.2 – CICLIZAÇÃO DE MITSUNOBU: UMA ABORDAGEM CATALISADA POR CLORIDRATO DE TRIETILAMINA NA PRESENÇA DE TRIFENILFOSFINA

Conforme previamente descrito, a utilização de trifenilfosfina na presença de DIAD por meio da ciclização de Mitsunobu, leva a uma reação competitiva entre a formação da aziridina e da piperazina correspondente. Entretanto, a síntese pode ser direcionada à aziridina pela adição de quantidades catalíticas ou estequiométricas de cloridrato de trietilamina durante a etapa inicial do processo, conforme descrito por Anderson e Chapman⁸⁸ e Swamy⁸⁹. Assim, a hidroxila do β -aminoálcool ataca o centro fosfônio da trifenilfosfina da betaína, com transferência concomitante do próton do catalisador ao DIAD liberado. Isso evita que o DIAD, com par de elétrons livre, abstraia um hidrogênio de uma amina de outra molécula, ataque o composto com o grupo abandonador, e forme a piperazina (Esquema 20)^{88; 89}. Ao realizar esta síntese, o espectro de massas por IES-EM revelou a presença do reagente e do sinal referente à massa da aziridina, embora este último seja muito pequeno. Entretanto, observou-se que o sinal predominante é de 447 (Apêndice 31), referente à piperazina formada, o que demonstra que em quantidades catalíticas esta metodologia não se mostrou eficaz.

Esquema 20. Proposta mecanística para a síntese de aziridina a partir de trifenilfosfina e DIAD catalisada por cloridrato de trietilamina.

4.3.3 – ESTUDO DE REATIVIDADE FRENTE A COMPOSTOS CLORADOS E SULFOCLORADOS: SÍNTESE DE WENKER E SUAS MODIFICAÇÕES

Dado a ineficácia dos métodos clássicos de substituição de grupos funcionais realizados previamente, optou-se pela por uma metodologia desenvolvida por Wenker et al.⁹⁰, que consiste em adição de ácido sulfúrico, a altas temperaturas, em uma solução de β -aminoálcool, a fim de se gerar um sulfonato e, em seguida, adicionar base, para ocorrer a ciclização (Esquema 21).

Esquema 21. Metodologia de Wenker para a síntese de aziridinas a partir de β -aminoálcoois⁹⁰.

Embora conhecida há muito tempo, esta metodologia apresenta algumas limitações em determinados β -aminoálcoois, acarretando desidratação do álcool ao invés de sua sulfonação³. Mesmo assim, optou-se por mimetizar a metodologia no composto **4c**, mantendo-se as reações por 6 ou 18 horas, em refluxo com H_2SO_4 . A etapa seguinte, envolvendo a adição de base, também foi mantida pelos mesmos tempos reacionais (Esquema 22). Observou-se, pelo

espectro de massas, que não houve a reação desejada, embora o material de partida tenha sido consumido totalmente.

Esquema 22. Tentativa de síntese de aziridina por metodologia clássica de Wenker.

Visto este resultado, buscou-se na literatura modificações na síntese de Wenker, com o intuito de se encontrar reagentes com a mesma finalidade. Reagentes clorados ou sulfoclorados foram as melhores opções descritas^{77; 91; 92; 93; 94; 95}, cuja aplicação neste tipo de síntese havia sido reportada com sucesso. Desta forma, optou-se pela utilização de **4b** com ácido clorossulfônico (ClSO_3H), cloreto de tionila (SOCl_2), cloreto de sulfurila (SO_2Cl_2) e pentacloreto de fosforo (PCl_5) (Esquema 23 e Tabela 2), a fim de se determinar quais métodos são efetivos para a síntese da aziridina.

Esquema 23. Estudo de reatividade de **4b** frente a diferentes compostos clorados ou sulfoclorados.

Tabela 2. Diferentes reagentes utilizados para a síntese de aziridina a partir de **4b**.

Entrada	Reagente	Equivalentes	Solvente	Tempo (h)	Rendimento (%)
1	ClSO_3H	1,3	DCM/ Et_2O	4	0-55 ^a
2	SO_2Cl_2	1,5	DCM/ Et_2O	4	60
3	SOCl_2	2	DCM/ Et_2O	4	0
4	PCl_5	2	DCM/ Et_2O	2	40

^a O tipo de *work-up* utilizado pode degradar o produto. Quando submetido a concentração do solvente, o ácido presente na mistura reacional degrada o produto formado. Quando lavado com éter etílico e álcool isopropílico a 0°C, o precipitado se encontra íntegro.

Iniciou-se, então, o estudo metodológico com o ácido clorossulfônico (Entrada 1), que necessitou um estudo também em seu *work-up*. Após a condição ideal ter sido encontrada, em que há a extração do ácido residual na mistura reacional, foi possível a obtenção do éster e em seguida a aziridina **6b**. Foi possível a confirmação do produto ao analisar o espectro de massas por IES-EM, em que há sinal predominante de 224, e pela análise por RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT. Ademais, conforme descrito na literatura, o produto era um óleo incolor. O baixo rendimento pode ser explicado pela degradação da aziridina durante sua purificação em coluna de sílica, a qual pode reagir com a aziridina, com consequente abertura do anel. Para sanar este problema, foi utilizada uma pequena porcentagem de trietilamina na fase móvel da coluna, a fim de desativá-la, procedimento que minimizou a degradação. Por ser menos acídica, foi testada também a utilização de alumina ao invés de sílica, mas mesmo assim houve degradação, comprometendo o rendimento final da reação.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 22 e Apêndice 33), percebe-se o desaparecimento do duplo duplete na região de 4,8 ppm – sinal este característico de β -aminoálcoois – e o aparecimento de um duplo duplete na região de 2,35 ppm, com constante de acoplamento $J=6,5$ Hz e $J=3,4$ Hz. É notado este deslocamento do sinal devido à ausência do oxigênio e seu efeito de desblindagem no hidrogênio do carbono quiral da molécula. Em seguida, dois dupletos, um em 1,92 ppm com $J=3,4$ Hz, e outro em 1,67 ppm com $J=6,6$ Hz, são observados, indicando serem os hidrogênios do anel aziridina ligados ao carbono não benzílico. Ademais, são notados dois tripletos na região de 2,7-3,0 ppm, relacionados aos hidrogênios da porção alquílica da molécula. Por último, é possível observar os hidrogênios de ambos os anéis aromáticos na região de 7,1 a 7,4 ppm. Analisando o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23), verifica-se um deslocamento para a direita de todos os carbonos do espectro (C mais blindados) em relação ao espectro do **4b**, o que condiz com a literatura.

Figura 22. Espectro de RMN de ^1H referente ao composto **6b**.

Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **6b**.

É sabido que o ácido clorossulfônico tem capacidade de reagir de três maneiras no processo de substituição de hidroxilas, o que dependerá da quantidade estequiométrica utilizada na reação (Esquema 24). Quando se utiliza um equivalente ou leve excesso, é possível que ocorra um ataque direto da hidroxila ao ácido e, assim, formação do éster. Por outro lado, quando há excesso do ácido, pode ocorrer a formação de um anidrido sulfônico e este, por sua vez, interage com a hidroxila, gerando uma clorossulfonação, ao invés de sulfonação. Há uma terceira hipótese, em que o ácido ataca outra molécula de ácido, gerando ácido sulfúrico e cloreto de sulfurila (SO_2Cl_2), e este, por sua vez, interage com a hidroxila. Esta proposta mecanística possibilitou a utilização de cloreto de sulfurila como reagente, uma vez que este último é mais fácil de ser obtido comercialmente e mais estável de se manter.

Esquema 24. Possíveis mecanismos de sulfonação e sulfocloração proporcionados pelo ácido clorossulfônico.

O ácido clorossulfônico é instável e sua importação e transporte são proibidos no Brasil. Devido a isso, foi necessária a utilização dos outros reagentes para confirmar a sua reatividade frente aos β -aminoálcoois cujas aziridinas já haviam sido obtidas, a fim de se confirmar de forma efetiva sua eficácia e eficiência na síntese.

Dessa forma, foi proposto o uso do cloreto de sulfurila como reagente e possível substituinte para o ácido clorossulfônico, seguindo as mesmas condições experimentais. Após a primeira etapa, obteve-se um sólido branco semelhante ao da entrada **2** e este seguiu para a segunda etapa de forma semelhante. Ao final da reação, foi obtido um óleo incolor, levemente amarelado, semelhante à entrada **2**, que foi submetido a purificação por coluna cromatográfica. Ao realizar sua análise espectroscópica, foi observado o produto de interesse, com o aparecimento dos duplos dupletos encontrados na aziridina **6b** e a ausência dos sinais referentes ao composto **4b**.

Em seguida foi testada a reação de ciclização do β -aminoálcool com SOCl_2 , seguindo a mesma metodologia experimental. Ocorreu o consumo total do reagente **4b**, mas um sólido pardo foi formado, que pela análise por CCD se mostrou uma mistura complexa de produtos que não continha a aziridina esperada.

Por fim, optou-se por realizar um estudo sobre a formação de aziridina por cloração, utilizando pentacloreto de fósforo (PCl_5) como reagente. Nesta metodologia, a mistura reacional foi refluxada por 1 hora, seguida de esfriamento e agitação por mais 1 hora. Em seguida, o PCl_5 foi neutralizado com MeOH, enquanto a solução estava imersa em gelo e o solvente foi evaporado. Assim, foi obtido um sólido amarelado, no qual foi adicionado uma solução de NaOH 6,2 M e mantido em refluxo por 2 horas, seguido de imersão em banho de gelo e agitação à temperatura ambiente por mais 2 horas. Finalmente esta solução foi diluída em água e extraída com solvente orgânico adequado (clorofórmio ou diclorometano) e o produto foi purificado. Mais uma vez obteve-se um rendimento baixo e diversos subprodutos.

Estudadas as diversas condições reacionais, foram escolhidos os métodos utilizando ácido clorossulfônico ou cloreto de sulfurila para os demais β -aminoálcoois, uma vez que foram os reagentes que demonstraram melhores rendimentos. Assim, as aziridinas **6a**, **c**, **d** e **e** foram sintetizadas de acordo com a metodologia da entrada **2** (Esquema 25) e confirmadas por meio de análise espectroscópica por RMN de ^1H e ^{13}C (Apêndices 34 a 43).

Esquema 25. Síntese de aziridinas a partir de seus β -aminoálcoois correspondentes, por meio da utilização de ácido clorossulfônico ou cloreto de sulfúria seguida da utilização de solução de NaOH. Condições: 1,5 eq. de ClSO₃H (A) ou SO₂Cl₂ (B) em Et₂O: DCM (2:8), 0°C a t.a.; 4h.

O composto **6a** (Apêndice 34) pode ser observado no espectro de ¹H RMN pelo sinal característico de aziridinas como duplo duplete em 2,45 ppm referente a um hidrogênio, com constante de acoplamento de J=6,5Hz e 3,4 Hz, seguido de dois dupletos em 1,97 e 1,84 ppm, com constantes de acoplamento de 3,3 Hz e 6,5 Hz, respectivamente. Além disso, é possível observar os dois dupletos na região de 3,68 e 3,59 ppm, referente aos dois hidrogênios do CH₂ entre o nitrogênio do anel aziridínico e o anel aromático, os quais possuem um acoplamento J₂ do tipo geminal com constante de acoplamento J=13,7 Hz.

Analisando o composto **6c** pelo espectro de ¹H (Apêndice 35), é possível verificar o sinal característico de aziridinas em 2,30 ppm com constante de acoplamento J=6,5 Hz e 3,3 Hz, seguido dos dois dupletos em 1,91 ppm (J=3,3 Hz) e 1,66 ppm (J=6,6 Hz). Além disso, há um multipletto em 1,95 ppm referente aos hidrogênios ligados ao carbono que não é ligado ao nitrogênio nem ao carbono benzílico da porção alquílica. Esses hidrogênios apresentam tal multiplicidade uma vez que estão ligados a vizinhanças magneticamente distintas (de um lado há hidrogênios desblindados pelo nitrogênio e, de outro, hidrogênios desblindados pela vizinhança do anel benzênico). Em seguida, há sinais em 2,37 ppm e 2,72 ppm, indicando os demais CH₂, embora com sinais não muito distintos, o que também está presente na literatura. Em seguida, ao se analisar os espectros de ¹³C e DEPT (Apêndice 36 e 37), constata-se um notável deslocamento dos sinais em relação ao espectro do composto **4c**, em que há o desaparecimento do sinal próximo a 75 ppm, referente ao carbono ligado à hidroxila, e a manutenção do sinal em 60 ppm, referente ao carbono ligado ao nitrogênio pela cadeia alquílica (pode-se confirmar isso, pois não há alteração no sinal de **4c** e **6c**). É também possível observar o deslocamento para a direita do espectro (blindagem dos carbonos) de todos os outros carbonos que não são aromáticos. No DEPT, nota-se que o único CH (sinal para cima, no espectro) que não está na região dos aromáticos está próximo a 40 ppm, sendo este o carbono quiral da molécula.

O composto sintetizado **6d**, como partiu de um outro composto não descrito na literatura, também é inédito, e as análises por ^1H , ^{13}C e DEPT (Apêndices 38, 39 e 40) foram suficientes para determinar a sua formação. Ao analisar o espectro de RMN de ^1H , é possível observar o duplo duplete característico em 2,31 ppm com $J = 6,5 \text{ Hz}$ e $3,3 \text{ Hz}$ (o que condiz com todos os outros espectros obtidos), bem como os dois dupletos em 1,91 ppm ($J = 3,3 \text{ Hz}$) e 1,67 ppm ($J = 6,5 \text{ Hz}$). Percebe-se também, de forma clara, o tripleto em 2,65 ppm referente aos hidrogênios da cadeia alquílica ligados ao carbono benzílico. Na região de 1,65-1,80 ppm há um multipeto com 4 hidrogênios, referentes aos hidrogênios dos carbonos centrais da cadeia alquílica, pois são dois triplos triplos tripletos ou triplos duplos tripletos, o que no espectro aparece como multipeto, dado sua complexidade magnética. É observado um sinal com dois hidrogênios entre 2,35 e 2,55 ppm como duplos tripletos ou multipletos, referentes aos hidrogênios do carbono ligado ao nitrogênio. Tal complexidade, quando se esperava apenas um tripleto, pode ser referente a um possível acoplamento geminal 2J entre os dois hidrogênios, uma vez que estão ligados a uma região próxima a um átomo eletronegativo.

O composto **6e** sintetizado apresentou os sinais característicos de aziridinas ao ser analisado pelo espectro de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT, juntamente com os sinais de sua cadeia alquílica (Apêndices 41, 42 e 43).

Dessa forma, ao final desta etapa, a biblioteca de compostos foi formada, conforme demonstrado abaixo (Figura 24).

Figura 24. Compostos obtidos durante a etapa de síntese da biblioteca de interesse.

4.4 – Busca por análogos estruturais híbridos entre aziridinas e tranilcipromina

A fim de expandir o espaço químico abordado como potenciais alvos frente à enzima LSD1, foi proposta a utilização da aziridina **19** com um grupamento amino ligado diretamente ao anel (Esquema 26). A aziridina hidrazina 2-fenilaziridina-1-amina, cuja síntese já é descrita na literatura desde 1976 por Muller, Joos, Felix e colaboradores⁹⁶, pode ser considerada um análogo híbrido das moléculas fenelzina e tranilcipromina, uma vez que possui um anel aziridina (porção do análogo proposto da tranilcipromina) e a porção amina da fenelzina (Figura 25), que também apresenta atividade frente ao alvo proposto, bem como seus análogos já estudados⁹⁷.

Figura 25. Síntese de um híbrido entre dois inibidores da LSD1 – tranilcipromina e fenelzina, bem como a estrutura destas moléculas.

Dessa forma, a rota sintética⁹⁶ foi iniciada pela hidrólise do epóxido do estireno **2a**, a fim de se obter o estireno glicol correspondente **17** com 85% de rendimento, o qual apresentou ponto de fusão condizente com o da literatura, entre 64 e 67°C. Este composto foi prontamente submetido à próxima etapa reacional, que consistiu na utilização de cloreto de mesila em piridina a 0°C para formar o estireno glicol dimesilado **18**. Após o *work-up* necessário, o produto foi enviado para análise e se mostrou puro no espectro de RMN de ¹H (Apêndice 44), condizente com a literatura. Em seguida, este composto foi submetido à reação com a hidrazina hidratada, originando o produto de interesse **19**, com 55% de rendimento. Devido à instabilidade deste composto final, o *work-up* foi rapidamente realizado, o solvente extraído e o composto purificado em coluna cromatográfica e prontamente armazenado em freezer (temperatura = -25°C). As pequenas impurezas apresentadas no RMN de ¹H (Apêndice 45) podem ser um reflexo do início da degradação do produto, devido ao tempo em que ficou à temperatura ambiente até ser analisado ou aos traços de subprodutos que permaneceram após a purificação. Entretanto, em razão da sua instabilidade, optou-se por não realizar nova purificação.

Esquema 26. Síntese de um híbrido entre dois inibidores da LSD1 – tranilcipromina e fenelzina, bem como a estrutura das duas moléculas.

Uma vez obtido o composto de interesse, decidiu-se expandir os análogos envolvendo hidrazinas, mas dessa vez sem o anel aziridínico. Desse modo, a síntese de dois compostos foi planejada, sendo eles a benzaldeído hidrazona **20** e a benzilhidrazina **21**. Estes análogos, já descritos na literatura, foram planejados a fim de se estudar a importância da distância entre o

nitrogênio do grupamento amina, hidrazina ou hidrazona e o anel aromático sobre a possível atividade frente ao alvo desejado. Para isso, optou-se, além de sintetizar estes análogos, por utilizar a benzilamina **3a** e feniletilamina **3b**, para efeito de comparação (Figura 26).

Figura 26. Benzaldeído hidrazona **20**, benzilhidrazina **21**, benzilamina **3a** e 2-feniletil-amina **3b**.

O composto **20** foi obtido a partir do benzaldeído **8a** na presença de hidrato de hidrazina em metanol, e refluxado por 2,5 horas (Esquema 27). Após o *work-up* necessário, observou-se o composto em questão como um óleo amarelado que se solidifica a baixas temperaturas (abaixo de 15°C), com rendimento de 70%.

Esquema 27. Síntese do benzaldeído hidrazona **20**.

Sua obtenção foi confirmada pelas análises espectroscópicas e foi condizente com os dados encontrados na literatura⁹⁸.

Em seguida, foi realizada a síntese da benzilhidrazina **21**, pela adição de brometo de benzila a uma solução de hidrato de hidrazina em etanol, com posterior adição de carbonato de potássio (Esquema 28). Após o *work-up* com hidróxido de sódio e extração em MTBE, o produto foi purificado em coluna de sílica tipo flash em colonador automático, obtendo-se assim o composto desejado.

Esquema 28. Síntese da benzilhidrazina **21**.

Confirmou-se a sua obtenção pelas análises espectroscópicas, que também foram condizentes com a literatura⁹⁹.

4.5 – Síntese da tranilcipromina

A fim de se comparar a biblioteca de compostos sintetizados com o fármaco de referência, para os ensaios contra LSD1, foi sintetizada a tranilcipromina, por meio de tentativas envolvendo duas rotas sintéticas, conforme o planejamento sintético mostrado anteriormente (Esquema 9).

4.5.1 – ROTA 1

Etapas 1 – formação do éster cinâmico a partir do aldeído correspondente

O primeiro passo para a síntese da sonda fluorescente deu-se pela síntese do acetato cinâmico correspondente ao aldeído utilizado (Esquema 29).

Esquema 29. Síntese do acetato cinâmico correspondente **9**.

Foram testadas diversas condições reacionais^{66; 67; 68; 69; 100}, a fim de obter aquela considerada ideal e com os melhores rendimentos, conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3. Diferentes condições para síntese e otimização dos compostos **9a** e **9b**.

Solvente	Base	Tempo (h)	Rendimento (%)
DMSO	tButONa	1	40
DMSO	NaH	1	40
THF	tButONa	1	45
THF	NaH	1	30
THF	NaH	3	40
THF	tButONa	3	45
H ₂ O	tButONa	3	45
H ₂ O	DBU/K ₂ CO ₃	3	50
H ₂ O	DBU/K ₂ CO ₃	24	65-80
	DBU	0,5	70

Dessa forma, buscou-se na literatura o procedimento com maior rendimento e menor utilização de reagentes e solventes⁶⁷. A síntese ocorre pela reação de Horner-Wadsworth-Emmons, uma modificação da reação de Wittig, e é largamente utilizada para a síntese de ésteres α,β -insaturados com configuração *E* a partir de aldeídos e cetonas⁶⁷. A reação efetiva-

se pela formação de um carbânion estabilizado de fosfonato e seu ataque frente ao aldeído ou cetona a ser utilizado. Esta reação envolve, inicialmente, a formação e estabilização do enolato, pela utilização de uma base (no caso exemplificado, DBU). Este enolato, uma vez estabilizado, atua como nucleófilo frente ao aldeído (no caso exemplificado, o aldeído **8a**), levando à formação de um intermediário reativo, que sofre interação intramolecular. Essa interação ocorre na forma de um ataque do átomo de oxigênio com carga negativa no átomo de fósforo, levando à formação de um anel de quatro membros, com posterior formação do acrilato desejado e o subproduto de fósforo (Esquema 30).

Esquema 30. Mecanismo para a formação do composto **9a**, pela utilização de trietilfosfonoacetato e uma base.

Conforme ilustrado nos espectros de RMN de ^1H (Figura 27 e Apêndice 46), os produtos dos dois aldeídos foram formados. É possível observar a obtenção do produto **9a** pela presença dos dupletos em 7,69 e 6,44 ppm, ambos com 1 hidrogênio cada, referentes ao sinal da dupla ligação, com padrão de acoplamento *trans* ($J=16\text{Hz}$). Ademais, notam-se os 5 hidrogênios referentes ao anel aromático em 7,53 e 7,39 ppm e os sinais referentes à porção acetil da molécula, com sinais em 4,27 ppm na forma de um quarteto com 2 hidrogênios e um tripleto com 3 hidrogênios na região de 1,34 ppm. Já no espectro de ^{13}C (Figura 28 e Apêndice 47), é possível observar os carbonos referentes à dupla ligação *trans* em 144,58 e 118,33 ppm, os do anel aromático na região de 128 a 134 ppm, o da carboxila em 167,01 ppm e os da porção acetil em 60,50 e 14,53 ppm.

em 8,22 ppm e os 2 hidrogênios da região de 7,60 ppm, mais distantes daquele grupamento funcional. É possível observar também os hidrogênios referentes à dupla ligação com configuração *trans* em 7,63 ppm como um duplete, com constante de acoplamento de 17 Hz, com integral de 1 e outro duplete em 6,49 ppm, com constante de acoplamento de 16 Hz. Essa diferença de 1 Hz entre os dois sinais se dá devido ao espectro de 400 MHz não possuir resolução para distinguir os sinais do duplete em 7,63 ppm da dupla ligação com os hidrogênios aromáticos em 7,60 ppm. Além destes, outros sinais referentes à porção acetil da molécula podem ser notados, em 4,22 ppm, na forma de um quarteto com 2 hidrogênios e um tripleto com 3 hidrogênios na região de 1,28 ppm. No espectro, verifica-se também a presença de sinais com integral 0,04 e seus múltiplos, com a mesma multiplicidade, indicando a presença do isômero *cis*, conforme descrito na literatura. Já no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 30, Apêndice 49), é possível observar os carbonos referentes à dupla ligação *trans* em 148,51 e 122,63 ppm, os do anel aromático na região de 124 a 141 ppm, o da carboxila em 166,00 ppm e os da porção acetil em 60,99 e 14,25 ppm.

Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do composto **9b**.

Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C do composto **9b**.

Etapa 2 – ciclopropanação do acetato cinâmico pela reação de Corey-Chaykovsky

Uma vez obtidos, os produtos **9a** e **9b** foram submetidos à reação de Corey-Chaykovsky, na qual há a formação de uma ílida de enxofre, a partir de iodeto de trimetilsulfoxônio na presença de uma base, em meio anidro e em DMSO. Formada a ílida, esta reage com o substrato, que neste caso são as olefinas, e, assim, formou-se o ciclopropano carboxilato do éster correspondente (Esquema 31).

Esquema 31. Mecanismo reacional para a formação da ílida de enxofre e a reação de ciclopropanação de Corey-Chaykovsky.

Diversas condições reacionais foram estudadas a fim de se obter o produto de interesse (Esquema 32). Foram utilizadas diferentes bases, solventes, temperaturas e tempos de reação, até que se chegou a uma condição na qual o produto pôde ser formado, isolado e caracterizado adequadamente (Tabela 4). Esta reação não apresenta conversão total do reagente (o que foi observado mesmo após a manutenção da reação por períodos mais longos de tempo e com excesso de ilida) e demanda uma purificação laboriosa, uma vez que o acetato cinâmico e o ciclopropano correspondente possuem um $R_f < 0,1$. Isso levou à necessidade de sucessivas colunas cromatográficas em colunador automático, o que, por sua vez, comprometeu o rendimento final da reação.

Esquema 32. Esquema reacional para a síntese do composto **10a** e **10b**.

Tabela 4. Diferentes condições para síntese e otimização dos compostos **10a** e **10b**.

Base e precursor da Ilida (1:1)	Base	Solvente	Tempo	Temperatura	Rendimento	
					9a	9b
1 eq.	NaH	DMSO	1 hora	ambiente	0	0
1 eq.	NaH	DMSO	3 horas	ambiente	0	0
1 eq.	NaH	DMSO	40 minutos/3 horas	ambiente	traços	0
1 eq.	NaH	DMSO	overnight	ambiente	0	0
1 eq.	NaH	DMSO	overnight	55°C	traços	0
1 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	1 hora	55°C	traços	0
1 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	3 horas	55°C	traços	0
2,6 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	3 horas	55°C	traços	0
2,6 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	THF	3 horas	ambiente	0	0
2,6 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	THF	overnight	55°C	0	0
2,6 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	2 horas/3 horas	55°C	20%	0
2,6 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	1 hora/overnight	55°C	35%	0
3 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	2 horas/overnight	55°C	40%	0
3 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	1 hora/overnight	105°C	60%	0
1,3 eq.	tButO ⁻ Na ⁺	DMSO	1 hora/overnight	105°C	60%	0

Em nenhuma das condições utilizadas, a reação de ciclopropanação levou à formação do composto **9b**, mesmo com o substrato inicial tendo sido parcial ou completamente consumido. Isso pode ser um indicativo de que o grupamento nitro no anel aromático pode interferir na reatividade do composto devido a distribuição eletrônica envolvendo o

grupamento nitro no anel aromático, influenciando, assim, na reação, o que impossibilita a formação do ciclopropano em questão. Já em relação ao acetato cinâmico **9a**, sua obtenção foi possível por meio da utilização de excesso de base e precursor da ilida (de 1,3 a 3 equivalentes, na proporção 1:1), em uma solução de DMSO seco e atmosfera de N₂. Além disso, houve necessidade de se manter a mistura de base e reagente de Corey-Chaykovsky por um tempo adequado inicialmente, a fim de se formar a ilida, que, então, reage com o substrato, adicionado por gotejamento (em um período de 1 ou 2 horas, dependendo da quantidade utilizada). Uma vez terminada a adição do substrato, a mistura reacional foi mantida por um período de até 18 horas, no qual se formou o produto de interesse, mas sem conversão total do substrato.

Conforme observado no espectro de RMN de ¹H (Figura 31 e Apêndice 50), o composto de interesse foi formado. Nota-se 5 hidrogênios, apresentados como multipletos, na região de 6,95 a 7,26 ppm, referentes aos hidrogênios do anel aromático. Em seguida, verifica-se a presença do quarteto com 2 hidrogênios em 4,10 ppm e o tripleto com 3 hidrogênios em 1,21 ppm, referentes à porção acetil na molécula. Por fim, é possível observar três duplos duplos dupletos na região entre 2,44 e 1,53 ppm, referentes ao ciclopropano. As constantes de acoplamento dos hidrogênios da porção ciclopropano se apresentam assim devido às diferenças de ambientes químicos ligados a este anel, bem como ao acoplamento o tipo geminal, devido à restrição conformacional do anel nos hidrogênios do CH₂. Esses dois hidrogênios são mais blindados, por não ter influência de outros grupos próximos, e possuem multiplicidade 2. O sinal em 1,83 ppm é referente ao hidrogênio do carbono benzílico e o sinal em 2,44 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono próximo à carboxila, justificando-se, assim, o seu deslocamento para a esquerda do espectro. Porém, ainda há rastros do acetato cinâmico, observados pelos dupletos próximo a 7,7 e 6,4 ppm, um quarteto próximo ao quarteto em 4,10 ppm e um sinal próximo a 1,2 ppm, todos com menor intensidade, mas ainda assim presentes.

Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do composto **10a**.

Etapa três: hidrólise do éster para o ácido 2-fenilciclopropano-1-carboxílico

Uma vez obtido e caracterizado o produto **10a**, este foi submetido a uma hidrólise por hidróxido de lítio em uma solução de THF/ H_2O 1:1 e mantido sob agitação, à temperatura ambiente, até o consumo total do material de partida.⁶⁴ Posteriormente, a mistura reacional foi acidificada com solução aquosa de HCl 1N até pH 3, e foi observada a precipitação de um produto branco, extraído com diclorometano, que foi evaporado, originando assim o ácido **11** (Esquema 33).

Esquema 33. Hidrólise do composto **10a** e formação do composto **11**.

Sua obtenção foi confirmada pelo espectro de RMN de ^1H (Figura 32 e Apêndice 51), no qual se observam os mesmos sinais do espectro anterior referentes aos hidrogênios do anel aromático e do ciclopropano, mas não aos referentes à porção acetil. É possível notar também

os hidrogênios referentes ao acrilato que também sofreu hidrólise, demonstrando que, mesmo após extensas purificações, este composto ainda se mostrou presente.

Figura 32. Espectro de RMN de ^1H do composto **11**.

Etapas quatro: Rearranjo de Curtius e proteção com BOC

Uma vez obtido o ácido **11**, este foi submetido à formação da azida de acila correspondente, pela utilização de DPPA, que foi submetida a um rearranjo de Curtius,⁶⁴ resultando no isocianato, prontamente protegido pelo álcool tert-butílico do meio, levando a formação da tranilcipromina protegida por um grupamento tert-butoxido (Boc) (Esquema 34).

Esquema 34. Rearranjo de Curtius e proteção por Boc.

De acordo com o espectro de massas, há um pico em m/z 234, referente à tranilcipromina protegida por Boc, embora muito impuro (Figura 33 e Apêndice 52). Mesmo assim, o composto foi utilizado desta forma para a etapa de desproteção e formação da tranilcipromina, mas não foi possível obter o produto subsequente.

Figura 33. Espectro de massas por IES-EM com o sinal em 234, referente à tranilcipromina BOC protegida.

4.5.2 – ROTA 2

Com a intenção de diminuir a quantidade de passos reacionais para a síntese da tranilcipromina, foi testada uma metodologia baseada na ciclopropanação do *trans* 2-nitrovinilbenzeno **17**, por meio da reação de Corey Chaykovsky, com posterior redução do grupamento nitro a amina, originando assim a tranilcipromina **13**. O composto **22** foi obtido pela desidratação do produto da reação de Henry, que envolveu o benzaldeído e nitrometano, conforme demonstrado no Esquema 35.

Esquema 35. Síntese do composto *trans*-2-nitrovinilbenzeno **20**.

Foi possível confirmar sua obtenção pelo espectro de RMN de ^1H , no qual há os dois hidrogênios referentes aos CH da porção *trans* da molécula pela constante de acoplamento $J = 13,7$ Hz, na região de 8,03 e 7,61 ppm. Além disso, há os 5 hidrogênios do anel benzênico da molécula, na forma de multipeto, na região entre 7,45 e 7,60 ppm (Figura 34 e Apêndice 53).

Figura 34. Espectro de RMN de ^1H do composto **22**.

Confirmada a estrutura do composto **22**, este foi submetido ao método de ciclopropanação descrito anteriormente e, ao se utilizar o reagente de Corey Chaykovsky na presença de $t\text{BuO}^-\text{Na}^+$, o ciclopropano **23** foi formado (Esquema 37).

Esquema 36. Ciclopropanação do composto 22 para o composto 23.

Pelo espectro de RMN de 1H (Figura 35 e Apêndice 54) é possível verificar a obtenção do composto **23** desejado, dado a presença dos 4 hidrogênios presentes no anel ciclopropano. Estes hidrogênios se apresentam com a multiplicidade de duplos duplos dupletos (apenas o hidrogênio mais blindado se mostrou como duplo tripleto, devido à resolução do aparelho de RMN utilizado), que se assemelham aos espectros descritos na literatura. O duplo duplo duplete mais desblindado, em 4,43 ppm, é referente ao hidrogênio do carbono ligado ao grupamento nitro. O hidrogênio em 3,15 ppm, refere-se ao hidrogênio ligado ao carbono ligado ao anel aromático, enquanto os outros dois hidrogênios, em 2,26 e 1,70 ppm, são os hidrogênios ligados ao CH_2 do anel em questão. Ademais, são observados, na região de 7,12 a 7,40 ppm, os cinco hidrogênios do anel benzênico presente.

Figura 35. Espectro de RMN de 1H do composto **23**.

Uma vez obtido o cicloproano **23**, este foi reduzido com uma solução de HCl 1N e zinco metálico como catalisador, originando o composto **13** de interesse, com 80% de rendimento (Esquema 37).⁷⁰

Esquema 37. Redução do composto **23** para o composto de interesse **13**.

Ao acompanhar a reação por CCD, foi possível observar a formação do produto de interesse, uma vez que ele é mais polar quando comparado ao reagente (R_f próximo a 0). O produto ainda adquire coloração amarelada ao ser revelado em solução de *p*-anisaldeído, o que é característico de aminas e outros nucleófilos neste revelador. Além disso, no espectro de RMN de 1H , há deslocamento dos sinais referentes aos hidrogênios do anel ciclopropano para uma região mais blindada (Figuras 36 e Apêndice 55, e Figura 37 e Apêndice 56). Nota-se que na região de 1,90 ppm existe um sinal como duplo duplo duplete com integral relativa a 3 hidrogênios, sinalizando a região onde os hidrogênios do grupamento amina também se encontram. Há ainda um sinal em 2,57 ppm como duplo duplo duplete com integral referente a um hidrogênio ligado ao CH próximo ao grupamento amina e dois sinais, em 1,07 e 0,99 ppm, correspondentes aos hidrogênios ligados ao CH_2 do anel ciclopropano.

Figura 36. Espectro de RMN de 1H do composto **13**.

Figura 37. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos dos compostos **23** (verde) e **13** (vermelho).

4.6 – Ensaios biológicos frente à enzima LSD1, parasita T.Cruzi e células de câncer de mama.

4.6.1 – ENSAIO FRENTE À ENZIMA LSD1.

Conforme previsto no projeto inicial, os compostos sintetizados foram submetidos a ensaios frente à enzima LSD1, a fim de se testar a potencial atividade desta classe de compostos como alternativa ao composto tranilcipromina e seus derivados, utilizados atualmente. Assim, o ensaio *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita, e observou-se que tanto os β -aminoálcoois quanto as aziridinas não apresentaram atividade frente ao alvo em estudo, mesmo demonstrando atividade frente a enzima MAO, fator que motivou o planejamento inicial. Esse resultado negativo indica que, mesmo que a enzima MAO e a enzima LSD1 possuam similaridade estrutural, o mecanismo de ação envolve uma relação diferente entre o substrato e o ligante. Além disso, a ausência de um grupo amino ligado ao anel pode ter acarretado total perda de atividade, uma vez que o heteroátomo pode ser determinante para tal, dado seu par de elétrons disponível para interagir com o FAD do sítio ativo da enzima e formar um radical, reativo frente a esse mesmo alvo. Outra hipótese para a falta de atividade apresentada das moléculas frente ao alvo inicial é a diferença da conformação espacial encontrada no padrão estrutural das 2-fenil-1-aziridinas quando comparado com a tranilcipromina. Tal fato pode levantar a suspeita de que devido a sua

conformação, a enzima não consegue interagir com a porção ativa da molécula e assim impedir uma interação e potencial atividade. Esta diferença de conformação espacial foi estudada nas aziridinas, exemplificado no composto **6d**, bem com β -aminoálcoois, exemplificado pelo composto **4d**, e tranilcipromina, ao utilizar ferramentas computacionais que simulam suas conformações (software corina e chembiodraw 13.0) (figura 38).

Figura 38. Diferença na conformação espacial da aziridinas **6d**, β -aminoálcool **4d** e tranilcipromina.

4.6.2 – ENSAIO FRENTE A DUAS LINHAGENS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA

Frente aos resultados negativos envolvendo a enzima LSD1, foi estudada a potencial atividade biológica dos compostos sintetizados neste estudo, com enfoque para células de câncer. Assim, o ensaio biológico foi realizado com uma linhagem de células de mama sadia, a fim de se observar a toxicidade dos compostos (linhagem MCF-10), e com duas linhagens de células de adenocarcinoma de mama.

A primeira linhagem, MCF-7, é uma cultura de adenocarcinoma de mama com a presença de receptores de estrogênio (ER positivo) e receptores de progesterona (PR positivo) e ausência de receptores de fatores de crescimento epitelial humano do tipo 2 (HER2 negativo)¹⁰¹. Devido a tais características, esta linhagem de células é sensível à terapia hormonal adjuvante para o câncer de mama. Quando a linhagem é ER e PR negativo, mas HER2 positivo, a utilização de anticorpos monoclonais como monoterapia ou em combinação com quimioterapia tradicional está associada a um benefício clínico significativo. No câncer de mama com superexpressão do receptor HER2, os anticorpos monoclonais mais utilizados são o trastuzumabe e o lapatinibe¹⁰².

A segunda linhagem utilizada, a MDA-MB-231, refere-se ao adenocarcinoma de mama denominada triplo negativo¹⁰³. Esta linhagem é ER negativa, PR negativa e HER2

negativo¹⁰⁴. Essas características tornam este tipo de célula difícil de ser tratada, visto que inviabilizam a utilização dos tratamentos hormonais e de anticorpos monoclonais que atuam em receptores tipo HER2, levando a opções de tratamento mais agressivas e limitadas^{104,105}. O tratamento atual consiste na utilização de paclitaxel com algum derivado de platina (cisplatina ou carboplatina), uma antraciclina (tal como doxorrubicina) e inibidores da angiogênese como adjuvante (tal como o bevacizumab), ainda em estudo clínico, e inibidores da Histona Deacetilase (HDAC)^{105; 106; 107}. Dentre os diversos tipos de câncer de mama, estes estão entre os mais agressivos, com altas taxas metastáticas e de recidiva nos primeiros cinco anos após o tratamento¹⁰⁸.

Escolhidas as linhagens, estas foram incubadas por 24 horas e em seguida expostas aos compostos selecionados por 48 horas. A cisplatina foi utilizada nos ensaios como referência e seus valores de IC₅₀ e CC₅₀ comparados com os da literatura¹⁰⁹. O IC₅₀ é a concentração necessária para inibir 50% de um processo biológico ou população e é empregado na determinação de eficiência de um fármaco, enquanto o CC₅₀ corresponde à concentração citotóxica para 50% deste processo biológico ou população e é utilizado para medir a toxicidade de um fármaco. Conforme observado na tabela 5 e nos gráficos 1 a 9, há diferenças nos valores de IC₅₀ entre as duas linhagens de células, o que se reflete em diferentes índices de seletividade (SI – razão entre CC₅₀ e IC₅₀).

Gráficos 1 a 3. Citotoxicidade dos compostos frente as células da linhagem MCF-10.

Gráficos 4 a 6. Atividade dos compostos selecionados frente a linhagem das células MCF-7.

Gráficos 7 a 9. Atividade dos compostos selecionados frente a linhagem de células MDA-MB231.

Em ambos os casos, os β -aminoálcoois apresentaram, de maneira geral, valores altos para o IC_{50} e para o CC_{50} na linhagem de células saudáveis, demonstrando que não possuem boa atividade frente a estas linhagens, mas que também não possuem citotoxicidade acentuada, comparada com a cisplatina. Entretanto, dentre os β -aminoálcoois, o **4d** e o **4j** se destacaram por apresentar atividade superior à cisplatina em ambas as linhagens, sendo que um deles apresentou um SI superior a 4. Os dois β -aminoálcoois são inéditos e foram sintetizados durante a realização deste trabalho. O composto **4d** e o composto **4j** são estruturalmente semelhantes, salvo a adição de bromo no composto **4j**. Diante disto, foi observada uma possível relação estrutura-atividade, uma vez que o aumento da cadeia alquílica influenciou no IC_{50} e a adição de bromo promoveu uma mudança tanto no IC_{50} quanto no CC_{50} .

Quanto às aziridinas, principal enfoque deste trabalho, notou-se uma diminuição nos valores de CC_{50} , o que reflete uma maior toxicidade desses compostos. Tais valores mais baixos eram esperados, tendo em vista a reatividade do anel aziridínico frente a nucleófilos biológicos e a capacidade de alquilação ou ligação cruzada com ácidos nucleicos. Embora o CC_{50} seja menor, o IC_{50} é sensivelmente menor quando comparado aos seus β -aminoálcoois correspondentes. Além disso, a relação estrutura-atividade, devido ao aumento da cadeia alquílica, fica mais evidente no caso das células da linhagem MDA-MB231, em que os valores de IC_{50} vão de 40,42 a 11,09, o que acarreta um aumento do SI. O composto **6d**, também inédito e sintetizado durante este trabalho, apresenta o maior SI para ambas as linhagens e é superior aos valores correspondentes da cisplatina, chegando a 4,0848 nas células MDA-MB231 e 1,8325 nas células MCF-7 enquanto o da cisplatina é 0,9196 e 1,4561 nas respectivas linhagens.

Por fim, os compostos híbridos **19**, **20** e **21** e a tranilcipromina **13** isolada (sem utilização dos compostos adjuvantes geralmente utilizados), também sintetizada neste trabalho, foram analisados, embora o alvo principal seja a enzima LSD1. No caso desses compostos, não houve atividade considerável frente às linhagens utilizadas, bem como ausência de citotoxicidade comparada à cisplatina, com todos os compostos indicando DL_{50} acima de 200.

Tabela 5. Valores referentes aos IC₅₀, CC₅₀ e SI dos compostos utilizados nos ensaios biológicos.

Composto	IC ₅₀ MCF-7	IC ₅₀ MDA/MB-231	CC ₅₀ MCF-10	SI MCF-7	SI MDA-MB231
Cisplatina	49,26	78,145	71,86	1,4561	0,9196
4a	209,6	225,30	201,60	0,9618	0,8948
4b	318,5	189,60	197,50	0,6201	1,0417
4c	96,4	101,80	195,60	2,0290	1,9214
4d	37,17	50,76	107,30	2,8867	2,1139
4e	236,2	236,90	316,10	1,3383	1,3343
4j	14,48	22,71	58,54	4,0428	2,5777
4k	53,01	73,89	115,60	2,1807	1,5645
4g	279,6	259,40	187,70	0,6713	0,7236
6a	27,83	40,42	40,99	1,4729	1,0141
6b	169,7	19,00	37,57	0,2214	1,9774
6c	24,50	19,98	35,43	1,4461	1,7733
6d	24,72	11,09	45,30	1,8325	4,0848
13	145,1	184,50	221,5	1,5265	1,2005
19	126,8	168,20	211,10	1,6648	1,2551
20	156,6	306,10	316,00	2,0179	1,0323
21	247,6	237,90	300,50	1,2137	1,2631

4.6.3 - ENSAIO FRENTE AO PARASITA T.CRUIZ

Considerando o exposto acima sobre atividade de quimioterápicos em *T.cruzi*, foi realizado um *screening* frente a este parasita com os compostos estudados para se observar uma potencial atividade, além de se examinar a citotoxicidade celular das aziridinas e β -aminoálcoois. Para tal, foi realizado o estudo tanto com células das formas amastigotas e tripomastigotas juntas, quanto com apenas a forma amastigota.

O anel aziridinico presente nos compostos pode sofrer clivagem ao interagir com o parasita ou o meio de cultura, dado a sua reatividade. Essa abertura pode levar a uma potencial atividade ou a sua perda, e, para estudar isso, ensaios com diferentes tempos de exposição foram executados, com 48 e 72 horas. Conforme ilustrado nos gráficos 10 e 11 e na Tabela 6, as aziridinas apresentaram atividade superior aos β -aminoálcoois correspondentes em todos os casos, além de que a introdução de um bromo no anel aromático da porção proveniente do epóxido promoveu um aumento de atividade entre os β -aminoálcoois.

É possível observar que tanto as aziridinas quanto os β -aminoálcoois apresentam um alto CC₅₀, e um baixo índice de seletividade (SI), conforme tabela adiante. O ideal é que o SI seja o maior possível, mas para doenças negligenciadas, tal como o caso da doença de Chagas, um SI acima de 10 já é considerado favorável a um estudo mais aprofundado. Conforme observado, o composto **6b** apresentou o melhor perfil no estudo preliminar, com um SI de 10,28, enquanto o composto **4b** apresentou um SI de apenas 1,76. É possível notar

também que há uma alta citotoxicidade dos compostos nos gráficos 12 e 13, em especial dos β -aminoálcoois, o que inviabiliza estudos sucessivos destes compostos para este alvo.

Gráficos 10 e 11. Atividade antitripanomica dos β -aminoálcoois e das aziridinas sintetizadas e sua comparação com a droga controle.

Gráficos 12 e 13. Citotoxicidade dos β -aminoálcoois e das aziridinas sintetizadas e sua comparação com a droga controle.

Tabela 6. Compostos utilizados para o ensaio frente ao parasita *T.cruzi*, com seus valores de IC_{50} , CC_{50} e SI.

Composto	IC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	SI
4a	179,20	256,10	1,43
4b	119,90	211,30	1,76
4c	114,30	199,40	1,74
4d	34,82	60,09	1,73
4e	126,90	231,00	1,82
4j	18,46	14,64	0,79
4k	50,00	160,10	3,20
6a	31,87	61,58	1,93
6b	16,18	166,40	10,28
6c	16,81	19,30	1,15
6d	19,46	22,36	1,15
Benznidazol	8,62	307,02	35,62

Uma vez observado estes resultados, foram realizados ensaios utilizando apenas as aziridinas **6a**, **6b**, **6c**, **6d** e **6e** e o parasita na forma amastigota com diferentes períodos de exposição, sendo o primeiro em 48 horas e o segundo em 72 horas (Gráficos 14 e 15).

Gráficos 14 e 15. Atividade das aziridinas sintetizadas frente ao parasita *T. cruzi* em diferentes períodos de incubação em relação à droga controle (esquerda – 48 horas e direita – 72 horas).

Nota-se a existência de uma diferença considerável ao se alterar o período de exposição em todas as aziridinas empregadas, bem como na própria droga controle (BZN). Esse resultado traz mais força à hipótese da abertura do anel aziridínico pela acidificação do meio com o tempo. Nesse ensaio, foi possível observar que os compostos **6b**, **6d** e **6e**, no período de 72 horas, apresentam atividade até a concentração mínima de 31,25 µM. Embora não apresentem atividade com concentrações menores, esses dados demonstram uma atividade não descrita desta classe de compostos frente ao parasita, fornecendo um embasamento fundamental para futuros estudos que desejem aprofundar a relação estrutura-atividade.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, foi possível estabelecer uma metodologia na síntese de epóxidos a partir de estirenos, de β -aminoálcoois a partir destes epóxidos e de aziridinas a partir dos β -aminoálcoois correspondentes sob diferentes condições experimentais, além de se otimizar a sua síntese. Em relação aos epóxidos, a metodologia empregada deve ser aprimorada com a finalidade de se obter um rendimento maior das reações, mas esta metodologia permite um aumento na diversidade de epóxidos possíveis, uma vez que os estirenos são comercialmente mais disponíveis e com preço de custo consideravelmente menor em relação aos epóxidos correspondentes, quando existentes.

Ao analisar os β -aminoálcoois, foi possível a construção de uma biblioteca desses compostos a partir de aminas primárias, tanto alquílicas quanto aromáticas, e explorar a introdução de um bromo neste padrão estrutural, o que levou a alteração na atividade biológica nos ensaios *in vitro* realizados. Embora não tenha sido possível direcionar a síntese para o regioisômero desejado pela metodologia empregada, pode-se obter grandes quantidades dos produtos descritos. Além disso, dois β -aminoálcoois não descritos na literatura foram sintetizados, os quais apresentaram considerável atividade biológica frente às células de câncer de mama. Estas alterações estruturais possibilitam o *screening* de novos compostos ao se utilizar outras aminas ou compostos aminados com aminas primárias.

Em relação às aziridinas, após diversas tentativas, foram estabelecidas condições relativamente simples para a sua obtenção. Ademais, uma metodologia em que se substitui o ácido clorossulfônico (dada a dificuldade em se manter, purificar ou mesmo adquirir tal ácido) por um reagente comercialmente mais viável e que se mostrou mais eficaz, o cloreto de sulfurila, foi utilizada e adaptada. Além disso, sintetizou-se uma aziridina não descrita na literatura, derivada de um β -aminoálcool também inédito. Esta aziridina, juntamente com outra da mesma classe, demonstrou a melhor atividade frente ao ensaio com *T.cruzi* e a maior atividade frente às células de câncer de mama, em ambas as linhagens estudadas. Tal descoberta pode levar a novos estudos de relação estrutura-atividade e possibilitar a realização de novas alterações estruturais e o estudo da distância necessária entre os grupos funcionais para que a atividade se mantenha.

Embora a maioria dos compostos β -aminoálcoois e aziridinas formados não sejam inéditos na literatura, eles não haviam sido estudados como substrato frente à enzima LSD1 ou outros alvos epigenéticos específicos, uma vez que as suas maiores aplicações são como intermediários reacionais.

6. Seção experimental

Procedimentos Gerais

Cromatografia Líquida “Clássica”: Realizada em coluna de vidro, empacotada com sílica gel 60 Å (70 – 230 Mesh/Sigma Aldrich Brasil Ltda) e diferentes sistemas eluentes.

Cromatografia Líquida “Flash”: Realizada em coluna de vidro com adaptação para entrada de ar comprimido. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 Å (230-400 Mesh/ Sigma Aldrich Brasil Ltda) para coluna de vidro, e colunas pré-empacotadas com sílica flash de fase normal e reversa (RediSep®). Diferentes sistemas eluentes foram empregados.

Cromatografia Líquida “em colunador automático”. Realizada em colunador automático CombiFlash® Rf+ da Teledyne Isco. A fase estacionária utilizada foi de sílica gel 60 Å (230-400 Mesh/ Sigma Aldrich Brasil Ltda) para coluna de vidro, e colunas pré-empacotadas com sílica flash de fase normal. Diferentes sistemas eluentes foram empregados.

Síntese de 2-feniloxirano (epóxido do estireno – 2a)

A uma solução de **1** (3,5mmol, 402,3μL) em CHCl₃ (20mL) a 0°C foi adicionado m-CPBA (5,3mmol, 1187.8mg) lentamente, durante 3h. Após o termino da adição, a mistura reacional foi deixada em agitação à temperatura ambiente por 1h. Decorrido o tempo, uma solução saturada de NaHCO₃ foi utilizada para lavar a mistura reacional (1x com 30mL) e em seguida lavada novamente com uma solução de NaOH 1M (4x50mL), a fim de extrair o restante de m-CPBA e CPBA. À solução orgânica restante foi adicionado MgSO₄ a fim de secar a solução. Finalmente, o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica com sílica flash (fase móvel hexano – acetato de etila com eluição crescente até a razão 7:3), resultando em um óleo incolor, 231mg (55% de rendimento). **RMN de ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ 7,48 – 7,30 (m, 5H), 3,88 (dd, *J* = 4,0, 2,6 Hz, 1H), 3,17 (dd, *J* = 5,5, 4,1 Hz, 1H), 2,83 (dd, *J* = 5,5, 2,6 Hz, 1H).

Método geral para a obtenção de β -amino álcoois pela aminólise de óxido de estireno (4)

A um balão reacional de fundo redondo acoplado a um condensador, foi adicionado a amina 3a-i (15mmol) e esta foi mantida em aquecimento até que atingisse o refluxo. Uma vez que o sistema estivesse em refluxo, foi adicionado lentamente, no período de 1h, **2a** (10mmol) e a mistura reacional foi mantida a 220°C durante um período de 3h. Após este tempo, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente, a qual se solidificou, com a aparência de um sólido amarelado. A fim de purificar o composto, uma recristalização foi feita, utilizando Hexano/Tolueno na proporção 8:2. Ao fim da recristalização, cristais brancos e um óleo amarelado foram obtidos, referentes aos 2 regioisômeros do β -aminoálcool.

2-(benzilamino)-1-feniletan-1-ol (4a)

Foram obtidos cristais brancos com rendimento de 55%. **IES-**

EM: m/z (m+1) calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NO}^+$: 228,1383; encontrado: 228. **RMN de ^1H (400 MHz, MeOD)** δ 7,39 – 7,16 (m, 10H), 4,77 (dd, J = 8,5, 4,5 Hz, 1H), 3,78 (dt, J = 22,2, 7,7 Hz, 1H), 2,86 – 2,65 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, MeOD)**

δ 144,60; 140,52; 129,56; 129,43; 128,59; 128,31; 127,01; 73,42; 57,44; 54,26.

2-(fenetilamino)-1-feniletan-1-ol (4b)

Foram obtidos cristais brancos, com rendimento de 54%. **IES-**

EM: m/z (m+1) calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{NO}^+$: 242,1539; encontrado 242. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)** δ 7,34 – 7,10

(m, 10H), 4,74 (dd, J = 9.4, 3.4 Hz, 1H), 2,92 – 2,84 (m, 2H), 2,83 – 2,76 (m, 2H), 2,75 – 2,67 (m, 2H). **RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3)** δ 142,11; 142,00; 139,13; 128,80; 128,67; 128,52; 127,72; 126,50; 125,88; 71,21; 56,67; 50,50; 35,74.

1-fenil-2-((3-fenilpropil)amino)etan-1-ol (4c)

Foram obtidos cristais brancos, com rendimento de 42%. **IES-**

EM: m/z(M+1) calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}^+$: 256,1696;

encontrado: 256. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7,42 – 7,00 (m, 10H), 4,66 (dd, $J = 8,5$; 4,5 Hz, 1H), 2,65 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H), 2,62 – 2,50 (m, 4H), 1,73 (dt, $J = 15,1$; 7,5 Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 147,14; 145,69; 131,98; 131,94; 131,14; 129,55; 129,43; 75,86; 60,64; 37,01; 34,86

1-fenil-2-((4fenilbutil)amino)etan-1-ol (4d)

Foi obtido um sólido amarelado, com rendimento de 45%. **IES-EM:** m/z ($m+1$) calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}^+$: 270,1852, encontrado: 270. **RMN de ^1H (300 MHz, MeOD)** δ 7,44 – 6,89 (m, 10H), 4,68 (dd, $J = 7,8$; 5,3 Hz, 1H), 2,69 (dd, $J = 7,9$; 4,8 Hz, 2H), 2,57 (ddd, $J = 14,7$; 10,0; 5,2 Hz, 4H), 1,64 – 1,41 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 142,24; 128,55; 128,50; 128,46; 127,74; 125,93; 77,16; 71,14; 56,73; 49,15; 35,74; 29,01; 28,85.

2-(butilamino)-1-feniletan-1-ol (4g)

Foi obtido um óleo amarelado que ficou parcialmente solidificado com o tempo, com um rendimento de 42%. Como dito anteriormente, este composto está com os 2 regioisômeros e foi adicionado a fim de apontar tal fato. **IES-EM:** m/z ($m+1$) calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}^+$: 194,1539, encontrado: 194. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)** δ 7,36 – 7,12 (m, 5H), 4,92 (dd, $J = 9,8$; 2,9 Hz, 1H), 2,88 (ddd, $J = 5,96$; 11,3; 4,8 Hz, 2H), 2,72 (tdd, $J = 11,9$; 7,8; 4,3 Hz, 2H), 1,28 (dt, $J = 15,0$; 7,4 Hz, 4H), 0,76 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H) e **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)** δ 7,40 – 7,11 (m, 5H), 3,77 (dd, $J = 8,7$; 4,3 Hz, 1H), 3,67 (dd, $J = 11,1$; 4,3 Hz, 1H), 3,59 (dd, $J = 11,0$; 8,9 Hz, 1H), 2,5 – 2,36 (m, 2H), 1,58 – 1,50 (m, 4H), 0,82 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). **RMN de ^{13}C (126 MHz, CDCl_3)** δ 141,70; 128,94; 128,82; 128,52; 128,00; 127,78; 127,45; 125,87; 125,54; 70,55; 65,99; 64,75; 56,35; 48,84; 46,82; 31,49; 30,36; 20,33; 20,22; 13,85; 13,77. Como é possível observar nos dois espectros, há sinais duplicados ligeiramente deslocados, devido à presença dos dois regioisômeros, na proporção 10:4.

1-(4-bromofenil)-2-(fenetilamino)etan-1-ol (4i)

A mesma metodologia foi utilizada, apenas alterando o epóxido de estireno. Ao término da reação, um óleo parcialmente solidificado avermelhado foi obtido. Optou-se pela tentativa de recristalização conforme os compostos anteriores, mas não precipitava nos solventes utilizados. Sendo assim, a purificação foi realizada por meio da cromatografia em coluna flash, na qual se obteve um óleo avermelhado e diversas frações, que ao serem submetidas ao solvente metanol, foram precipitadas e um sólido amarelado foi obtido. Este sólido foi enviado para a análise de espectroscopia de massas e após a confirmação, uma massa referente a 20% de rendimento foi calculada.

IES- EM: m/z ($m+1$) calculado para $C_{16}H_{19}BrNO^+$: 320,0645, encontrado: 320 e 322 (devido aos isótopos do Br).

1-(4-bromofenil)-2-((4-fenilbutil)amino)etan-1-ol (4j)

Foi obtido um sólido branco, com 15% de rendimento. **RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$)** δ 7,64 – 6,97 (m, 14H), 5,08 (dd, $J = 10,0$; 2,5 Hz, 1H), 3,07 – 2,97 (m, 1H), 2,95 – 2,77 (m, 3H), 2,63 (dt, $J = 15,0$; 5,6 Hz, 3H), 1,84 – 1,60 (m, 5H). **RMN de ^{13}C (126 MHz, $CDCl_3$)** δ 141,65; 140,07; 131,74; 128,48; 128,39; 127,58; 126,03; 121,90; 69,44; 55,73; 48,77; 35,43; 28,61; 27,16.

1-(4-bromofenil)-2-(benzilamino)-etan-1-ol (4k)

Foi obtido um sólido amarelo, com 10% de rendimento. **RMN de 1H (400 MHz, DMSO)** δ 7,50 – 7,27 (m, 9H), 4,65 (t, $J = 6,1$ Hz, 1H), 3,73 (d, $J = 2,7$ Hz, 2H), 2,61 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H).

Método geral para a obtenção de β-amino álcoois pela aminólise do epóxido por anilina (**4e**)

À uma solução de **2a** (570μL, 5mmol) em diclorometano (25mL), foi adicionado anilina **3e** (455μL, 5mmol) e InCl_3 (221mg, 1mmol) e manteve-se a reação sob agitação, protegida da luz e a temperatura ambiente, por 18h. Após este tempo, foi observado uma mudança de cor na mistura reacional, ficando levemente amarelada. À esta solução foi adicionada uma solução saturada de NaHCO_3 e a fase orgânica foi extraída com diclorometano (3x50mL), unida ao restante da fase orgânica inicial e seca com MgSO_4 . Ao se evaporar, foi notada a presença de um óleo alaranjado que foi enviado ao IES-EM sem demais purificações a fim de confirmar a obtenção do produto desejado (ao buscar na literatura, observou-se a formação de seu regioisômero).

2-fenil-2-(fenilamino)etan-1-ol (4e**)**

Após a purificação por cromatografia em coluna flash, foi obtido um óleo alaranjado, com rendimento de 70%. **IES- EM:** (m+1) calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{NO}^+$: 214,1226; encontrado: 214. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 7,49 – 6,50 (m, 10H), 4,53 (dd, $J = 6,9$; 4,2 Hz, 1H), 3,95 (dd, $J = 11,1$; 4,2 Hz, 1H), 3,76 (dd, $J = 11,1$; 7,0 Hz, 1H).

Método geral para a obtenção de aziridinas a partir de β-amino álcoois com a utilização de ácido clorossulfônico ou cloreto de sulfurila

À uma solução gelada e em gelo de 4mL de éter etílico e 1mL de diclorometano, foi adicionado **4** (0,5mmol) e este mantido em agitação por 15 minutos. Em seguida, foi

adicionado lentamente a esta solução ácido clorossulfônico ou cloreto de sulfurila (1,3eq), a mistura reacional foi mantida sob agitação, em sistema fechado, por 4h. Decorrido o tempo, foi observado um sólido branco nas paredes do balão reacional, o qual foi lavado em funil de Buchner e Kitassato com éter etílico (3x20mL), álcool isopropílico (3x20mL) e éter etílico novamente (3x20mL). Este sólido, juntamente com o restante no balão, foi adicionado a um balão reacional com uma mistura de água (10mL), tolueno (2mL), o qual foi deixado em agitação por 5 minutos até a adição de uma solução aquosa de NaOH 6,2M (10mL). Esta solução foi mantida em refluxo overnight (14h). Decorrido o tempo, a mistura reacional foi retirada da temperatura e extraída com éter etílico (3x20mL), seca com MgSO₄ e seu solvente extraído, obtendo-se assim um óleo incolor. A fim de se obter o composto puro, uma cromatografia em coluna flash com eluição crescente de solvente (hexano puro até hexano/acetato de etila na proporção 7:3) com adição de trietilamina no solvente para desativar a coluna foi realizada, uma vez que a sílica apresenta caráter ácido que pode interagir e degradar o composto obtido. Ao enviar o produto para as análises espectroscópicas, sua estrutura foi confirmada.

1-fenetil-2-fenilaziridina (6b)

Foi obtido um óleo incolor, com um rendimento de 60%. **IES- EM:**

(m+1) calculado para C₁₆H₁₈N⁺: 224,1434, encontrado:224. **RMN**

de ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,46 – 7,12 (m, 10H), 2,94 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 2,68 (m, J = 11,4; 7,4 Hz, 2H), 2,30 (dd, J = 6,5; 3,4 Hz, 1H), 1,92 (d, J = 3,4 Hz, 1H), 1,67 (d, J = 6,6Hz, 2H). **RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃)** δ 140,28; 140,01; 128,82; 128,32; 128,22; 127,16; 126,17; 126,05; 63,35; 41,42; 37,94; 36,41.

1-benzil-2-fenilaziridina (6a)

Foi obtido um óleo incolor, com rendimento de 55%. **RMN de**

¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 7,50 – 7,15 (m, 10H), 3,72 (d, J = 13,7 Hz, 1H), 3,63 (d, J = 13,8 Hz, 1H), 2,53 (dd, J = 6,5; 3,4 Hz, 1H), 2,01 (d, J = 3,3 Hz, 1H), 1,88 (d, J = 6,5 Hz, 1H).

2-fenil-1-(3-fenilpropil)aziridina (6c)

Foi obtido um óleo incolor, com rendimento de 50%. **RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3)** (300 MHz, CDCl_3) δ 7,36 – 7,13 (m, 10H), 2,76 – 2,70 (m, 2H), 2,54 (dt, $J = 11,6$; 7,2 Hz, 1H), 2,44 – 2,33 (m, 1H), 2,31 (dd, $J = 6,5$; 3,3 Hz, 1H), 1,98 (dd, $J = 15,5$; 7,1 Hz, 2H), 1,91 (d, $J = 3,4$ Hz, 1H), 1,67 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 142,24; 140,45; 128,50; 128,42; 128,40; 126,93; 126,28; 125,87; 61,11; 41,42; 37,88; 33,70, 31,46.

2-fenil-1-(4-fenilbutil)aziridina (6d)

Foi obtido um óleo incolor, com rendimento de 65%. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** (300 MHz, CDCl_3) δ 7,49 – 6,82 (m, 10H), 2,65 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 2,51 (dt, $J = 11,7$; 6,8 Hz, 1H), 2,44 – 2,35 (m, 1H), 2,31 (dd, $J = 6,5$; 3,3 Hz, 1H), 1,90 (d, $J = 3,2$ Hz, 1H), 1,81 – 1,70 (m, 4H), 1,67 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 142,48; 140,45; 128,43; 128,29; 126,81; 126,20; 125,69; 61,61; 41,27; 37,86; 35,87; 29,47; 29,20.

1-butil-2-fenilaziridina (6e)

Foi obtido um óleo amarelado, com 55% de rendimento. **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 7,66 – 6,94 (m, 5H), 2,33 (dt, $J = 7,0$; 5,0 Hz, 1H), 2,31 (dd, $J = 6,4$; 3,1 Hz, 1H), 1,90 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H), 1,67 (d, $J = 6$., Hz, 1H), 1,65 – 1,56 (m, 2H), 1,45 – 1,36 (m, 2H), 0,92 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H).

Método para a obtenção da aziridina 19 hidrazina 2-fenilaziridina-1-amina,

Uma solução de epóxido **2a** (5mmol, 570 μl) em água (30ml) foi mantida a 60°C por 3h. Após o tempo decorrido, a mistura reacional foi extraída em 30ml de éter dietílico e a fração orgânica foi secada em MgSO_4 e em seguida o solvente foi retirado e o sólido branco **17**(586mg, 85% de rendimento) foi obtido. Em seguida, **17** (1mmol, 138mg) foi adicionado por gotejamento à uma solução de piridina e esta mistura foi mantida à 0°C, com posterior adição de cloreto de mesila (2,4mmol, 557 μl). A mistura reacional foi mantida a 0°C por 4 h e em seguida vertida em 10g de gelo, com posterior acidificação do meio com solução de HCl

1N até pH 3. A mistura resultante é filtrada, lavada com água gelada e o sólido obtido foi solubilizado em 20ml de diclorometano. Esta solução foi seca com MgSO_4 pentano gelado foi adicionado, até a precipitação de cristais brancos, com 70% de rendimento. O produto **18** formado (1mmol, 294mg) foi adicionado a uma solução de pentano e hidrato de hidrazina (5 equivalentes) e foi mantido sob agitação, a temperatura ambiente, por 24h. Após este tempo, a mistura reacional foi particionada com diclorometano e a fase orgânica foi extraída e posteriormente removida, o que originou um óleo incolor, com 55% de rendimento.

Foi obtido um óleo incolor, com rendimento de 55%. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 7,49 – 7,18 (m, 7H), 3,49 – 3,46 (m, 1H), 2,63 (dd, $J = 7,8; 4,7$ Hz, 1H), 2,06 (dd, $J = 4,7; 0,7$ Hz, 1H), 2,03 (dd, $J = 7,8; 0,7$ Hz, 1H).

Método para a síntese da benzaldeído hidrazona **20**

A uma solução de hidrato de hidrazina (245,4 μ l, 55mol) em 20ml de metanol foi adicionado **2a** (102 μ l, 1mmol) e esta mistura reacional foi mantida a 70°C por 2,5h. Em seguida, a mistura reacional foi resfriada em água gelada e o composto **20** foi obtido, com 70% de rendimento. **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 7,74 (s, 1H), 7,65 – 7,20 (m, 5H), 5,59 (s, 2H).

Método para a síntese da benzilhidrazina **21**

A uma solução de hidrato de hidrazina (31mmol, 1,52ml) em água foi adicionado brometo de benzila (10mmol, 1,189ml). Esta mistura reacional foi mantida sob agitação por 15 min e em seguida foi adicionado K_2CO_3 (19,2 mmol, 2,66g) e a reação foi monitorada por

CCD. Ao término da reação, foi adicionado NaOH e MTBE e a fase orgânica foi extraída e seca, originando o produto **21** com 75% de rendimento (537mg). **RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3)** δ 7,50 – 7,20 (m, 5H), 3,77 (s, 2H), 2,86 (s, 2 H).

Método 2 para a síntese da tranilcipromina **13**

A uma solução de acetato de amônio (10,3mmol, 800mg) em ácido acético glacial (140mmol, 8ml) foi adicionado 2ml do benzaldeído **2a** (19,6mmol, 2ml) e nitrometano (37mmol, 2ml) e esta mistura reacional foi mantida sob refluxo por 3 h. Após este tempo, a mistura reacional foi colocada em banho de gelo e metanol foi adicionado. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o precipitado resultante foi purificado em coluna cromatográfica do tipo flash (Hexano/acetato de etila, 1:4). O composto **22** foi obtido na forma de cristais amarelados, com rendimento de 70% (1,967g). Este produto foi utilizado como material de partida para a reação de Corey-Chaykovsky. Uma solução de iodeto de 1,5 equivalentes de trimetilsufoxônio (1,5mmol, 330mg) e 1,5 equivalentes de tertbutóxido de sódio (1,5mmol, 144mg) em DMSO foi mantida em atmosfera inerte e a 105°C durante 30 minutos, com posterior adição, durante o período de 1 h, de uma solução de 1 mmol (149,15mg) do composto **22** em DMSO. Esta mistura reacional foi mantida sob estas condições por 18h. Após este tempo, foi adicionado água a esta mistura reacional, com posterior adição de diclorometano e a fase orgânica foi extraída e seca em MgSO_4 , de forma que se obteve um óleo alaranjado que foi submetido a purificação por coluna cromatográfica do tipo flash (hexano/acetato de etila, 1:9). Após a evaporação do solvente, foi obtido um óleo alaranjado, referente ao composto **23**, com 30% de rendimento (49mg). Este composto foi então submetido a uma redução catalisada por zinco e ácido clorídrico. Uma solução do composto **23** (0,6mmol, 100mg) em álcool isopropílico, foi adicionado 10 equivalentes de uma solução de HCl 1M e 20 equivalentes de zinco em pó (801mg), que foi adicionado lentamente e esta mistura reacional foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas. Ao final deste tempo, a reação foi encerrada pela adição de solução saturada de bicarbonato de sódio e esta mistura reacional foi filtrada em celite. O filtrado foi extraído com diclorometano e a fase orgânica foi seca com MgSO_4 . Após a evaporação do solvente, o óleo obtido foi purificado em coluna cromatográfica do tipo flash, desativada pela utilização de 3% de trietilamina na fase móvel, consistida de diclorometano e metanol, na proporção 3:90:7. Foi obtido ao final desta reação um óleo amarelo, com 80% de rendimento (64,8,g).

Preparação de Amplex® Red

O composto reativo Amplex® Red foi obtido in situ para cada poço reacional e os 50µL adicionados foram compostos de:

- 1µL de 10U/mL de peroxidase de raiz-forte reconstituída em tampão reagente (invitrogen)
- 48.5µL de tampão fosfato de potássio 50mM
- 0.5µL de Amplex® Red (invitrogen) previamente reconstituído em DMSO

Preparação da solução Amplex® Red Stop

Um frasco de Amplex® Red Stop (InVitrogen) foi dissolvido em 1.45mL de etanol e foi agitado em um vortex até solubilizar. Em seguida, 1.25mL desta solução foram transferidos para um frasco e diluídos em porções iguais de água deionizada. A solução final foi armazenada em local escuro a 4°C.

7. REFERÊNCIAS

- ¹ RIERA, A.; ROYER, J. **Asymmetric Synthesis of Nitrogen Heterocycles**: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 1: 425 p. 2009.
- ² SWEENEY, J. B. Aziridines: epoxides' ugly cousins? **Chemical Society Reviews**, v. 31, n. 5, p. 247-258, Sep 2002. ISSN 0306-0012. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178159900001 >.
- ³ OSBORN, H. M. I.; SWEENEY, J. The asymmetric synthesis of aziridines. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 8, n. 11, p. 1693-1715, Jun 12 1997. ISSN 0957-4166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XE43300001 >.
- ⁴ BACH, R. D.; DMITRENKO, O. Effect of geminal substitution on the strain energy of dioxiranes. Origin of the low ring strain of dimethyldioxirane. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 3884-3896, May 2002. ISSN 0022-3263. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175915000046 >.
- ⁵ GABRIEL, S. Ueber Vinylamin. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 21, n. 1, p. 1049-1057, 1888. ISSN 1099-0682. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cber.188802101196> >.
- ⁶ ISMAIL, F. M. D.; LEVITSKY, D. O.; DEMBITSKY, V. M. Aziridine alkaloids as potential therapeutic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3373-3387, Sep 2009. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268744700001 >.
- ⁷ WATSON, I. D. G.; YU, L. L.; YUDIN, A. K. Advances in nitrogen transfer reactions involving aziridines. **Accounts of Chemical Research**, v. 39, n. 3, p. 194-206, Mar 2006. ISSN 0001-4842.
- ⁸ DEGENNARO, L.; TRINCERA, P.; LUISI, R. Recent Advances in the Stereoselective Synthesis of Aziridines. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 16, p. 7881-7929, Aug 27 2014. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000340992200004 >.
- ⁹ WELLS, J. N.; SHIRODKA, A. V.; KNEVEL, A. M. AZIRIDINE DERIVATIVES AS POTENTIAL MONOAMINE OXIDASE INHIBITORS. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 195-&, 1966 1966. ISSN 0022-2623. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A19667357800009 >.
- ¹⁰ GANESAN, A. et al. Epigenetic Therapy: Histone Acetylation, DNA Methylation and Anti-Cancer Drug Discovery. **Current Cancer Drug Targets**, v. 9, n. 8, p. 963-981, Dec 2009. ISSN 1568-0096.

- 11 HOJFELDT, J. W.; AGGER, K.; HELIN, K. Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 917-930, Dec 2013. ISSN 1474-1776; 1474-1784.
- 12 KUCK, D. et al. Nanaomycin A Selectively Inhibits DNMT3B and Reactivates Silenced Tumor Suppressor Genes in Human Cancer Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 9, n. 11, p. 3015-3023, Nov 2010. ISSN 1535-7163.
- 13 DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 351-357, Sep 2009. ISSN 1526-8004. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269443800002 >.
- 14 WADDINGTON, C. H. The Basic Ideas of Biology. **Biological Theory**, v. 3, n. 3, p. 238-253, 2008. ISSN 1555-5550. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1162/biot.2008.3.3.238> >.
- 15 BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6-21, Jan 1 2002. ISSN 0890-9369.
- 16 BASSETT, S. A.; BARNETT, M. P. G. The Role of Dietary Histone Deacetylases (HDACs) Inhibitors in Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, n. 10, p. 4273-4301, Oct 2014. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000344360200014 >.
- 17 VAN VRANKEN, D.; WEISS, A. G. **Introduction to Bioorganic Chemistry and Chemical Biology**. Edition: 1st. Garland Science, 2012. ISBN 9780815342144.
- 18 ZIMMERMANN, N. et al. Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels. **Biochemical Journal**, v. 448, p. 93-102, Nov 15 2012. ISSN 0264-6021.
- 19 YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 1, p. 37-50, Jan 2006. ISSN 1474-1776.
- 20 CAREY, N. Epigenetics-an emerging and highly promising source of new drug targets. **Medchemcomm**, v. 3, n. 2, p. 162-166, Feb 2012. ISSN 2040-2503.
- 21 JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 683-692, Feb 23 2007. ISSN 0092-8674.
- 22 SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27-36, Jan 2010. ISSN 0143-3334.
- 23 CLAES, B.; BUYSSCHAERT, I.; LAMBRECHTS, D. Pharmaco-epigenomics: discovering therapeutic approaches and biomarkers for cancer therapy. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 152-160, Jul 2010. ISSN 0018-067X.

- 24 ARROWSMITH, J. A decade of change. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 17-18, Jan 2012. ISSN 1474-1776.
- 25 LU, Q. et al. Perspectives on the Discovery of Small-Molecule Modulators for Epigenetic Processes. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 5, p. 555-571, Jun 2012. ISSN 1087-0571.
- 26 TANG, M. Q. et al. Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. **Current Genomics**, v. 10, n. 5, p. 336-352, Aug 2009. ISSN 1389-2029. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000268923300006 >.
- 27 ZOPF, S. et al. Inhibition of DNA methyltransferase activity and expression by treatment with the pan-deacetylase inhibitor panobinostat in hepatocellular carcinoma cell lines. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2012. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-386> >.
- 28 _____. Differential response of p53 and p21 on HDAC inhibitor-mediated apoptosis in HCT116 colon cancer cells in vitro and in vivo. **Int J Oncol**, v. 31, 2007.
- 29 SHI, Y. et al. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. **Cell**, v. 119, n. 7, p. 941-953, 12/29/ 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404011997> >.
- 30 CULHANE, J. C.; COLE, P. A. LSD1 and the chemistry of histone demethylation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 561-568, Oct 2007. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250806000013 >.
- 31 YANG, M. et al. Structural basis for the inhibition of the LSD1 histone demethylase by the antidepressant trans-2-phenylcyclopropylamine. **Biochemistry**, v. 46, n. 27, p. 8058-8065, Jul 10 2007. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247677700013 >.
- 32 AMENTE, S.; LANIA, L.; MAJELLO, B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. **Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 10, p. 981-986, Oct 2013. ISSN 1874-9399. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000325593700001 >.
- 33 KONG, X. Q. et al. Catalytic Mechanism Investigation of Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1): A Computational Study. **Plos One**, v. 6, n. 9, Sep 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000295941300031 >.
- 34 BENELKEBIR, H. et al. Enantioselective synthesis of tranlycypromine analogues as lysine demethylase (LSD1) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3709-3716, Jun 15 2011. ISSN 0968-0896.

- 35 YANG, M. et al. Structural basis of histone demethylation by LSD1 revealed by suicide inactivation. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 14, n. 6, p. 535-539, Jun 2007. ISSN 1545-9985.
- 36 STAVROPOULOS, P.; BLOBEL, G.; HOELZ, A. Crystal structure and mechanism of human lysine-specific demethylase-1. **Nat Struct Mol Biol**, v. 13, n. 7, p. 626-632, 07//print 2006. ISSN 1545-9993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb1113> >.
- 37 SCHMIDT, D. M. Z.; MCCAFFERTY, D. G. trans-2-Phenylcyclopropylamine Is a Mechanism-Based Inactivator of the Histone Demethylase LSD1†. **Biochemistry**, v. 46, n. 14, p. 4408-4416, 2007/04/01 2007. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/bi0618621> >.
- 38 I.M, W. **Monoamineoxidase inhibitors. Medical ToxicologyMonoamineoxidase inhibitors. Medical Toxicology.** <st1:place w:st="on"><st1:city w:st="on"><Philadelphia, <st1:state w:st="on"><Pennsylvania, <st1:country-region w:st="on"><USA</st1:country-region>>; Ed. Dart, R. C. Lippincott Williams and Wilkins: 823-833 p. 2003.
- 39 LEMERE, F. TRANLYCYPROMINE (PARNATE) A NEW MONOAMINE-OXIDASE INHIBITOR. **American Journal of Psychiatry**, v. 117, n. 3, p. 249-249, 1960 1960. ISSN 0002-953X.
- 40 YANEZ, M. et al. History and Therapeutic Use of MAO-A Inhibitors: A Historical Perspective of MAO-A Inhibitors As Antidepressant Drug. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 20, p. 2275-2282, Oct 2012. ISSN 1568-0266. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314822900011 >.
- 41 SHEN, H.; LAIRD, P. W. In Epigenetic Therapy, Less Is More. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 4, p. 353-354, Apr 6 2012. ISSN 1934-5909.
- 42 LOHSE, B. et al. Inhibitors of histone demethylases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3625-3636, Jun 15 2011. ISSN 0968-0896.
- 43 HOFFMANN, I. et al. The role of histone demethylases in cancer therapy. **Molecular Oncology**, v. 6, n. 6, p. 683-703, Dec 2012. ISSN 1574-7891.
- 44 KUMARASINGHE, I. R.; WOSTER, P. M. Synthesis and Evaluation of Novel Cyclic Peptide Inhibitors of Lysine-Specific Demethylase 1. **Acs Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 1, p. 29-33, Jan 2014. ISSN 1948-5875.
- 45 BINDA, C. et al. Biochemical, Structural, and Biological Evaluation of Tranylcypromine Derivatives as Inhibitors of Histone Demethylases LSD1 and LSD2. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 19, p. 6827-6833, May 19 2010. ISSN 0002-7863.

- 46 PADWA, A.; MURPHREE, S. S. Epoxides and aziridines - A mini review. **Arkivoc**, p. 6-33, 2006 2006. ISSN 1424-6376.
- 47 CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1041-1047, Dec 1996. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996WD03800013 >.
- 48 MIGUEL, D. C. et al. The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi* in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 945-948, Nov 2010. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000284778900021 >.
- 49 KINNAMON, K. E. et al. Activity of anticancer compounds against *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 6, p. 804-806, Jun 1998. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000074491000023 >.
- 50 RODRIGUEZ, J. R.; NAVARRO, A. Opening of epoxides with aromatic amines promoted by indium tribromide: a mild and efficient method for the synthesis of beta-amino alcohols. **Tetrahedron Letters**, v. 45, n. 40, p. 7495-7498, Sep 2004. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000224048200023 >.
- 51 COOTE, S. J. et al. ENANTIOSPECIFIC SYNTHESIS OF (+)-(R)-6,7-DIMETHOXY-2-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLINE FROM (+)-(S)-2-METHYLAMINO-1-PHENYLETHANOL (HALOSTACHINE). **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, n. 12, p. 2223-2228, Dec 1989. ISSN 0300-922X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1989CG30600009 >.
- 52 BEAK, P. et al. Mechanisms and consequences of oxygen transfer reactions. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 2259-2264, Dec 2000. ISSN 0033-4545. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000167818300005 >.
- 53 BARLETT, P. D. **Rec. Chem. Prog. . 11: 47 p. 1950.**
- 54 PRIESCHAJEW, N. Oxydation of the unsaturated connection by means of organic superoxide. **Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 42, p. 4811-4815, 1909 1909. ISSN 0365-9496.
- 55 FROHN, M.; SHI, Y. Chiral ketone-catalyzed asymmetric epoxidation of olefins. **Synthesis-Stuttgart**, n. 14, p. 1979-2000, Dec 2000. ISSN 0039-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166020500001 >.

- 56 HAVARE, N.; PLATTNER, D. A. Oxidative Cleavage and Rearrangement of Aryl Epoxides Using Iodosylbenzene: on Criegee's Trail. **Helvetica Chimica Acta**, v. 95, n. 10, p. 2036-2042, Oct 2012. ISSN 0018-019X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000310321600029 >.
- 57 TU, Y.; WANG, Z. X.; SHI, Y. An efficient asymmetric epoxidation method for trans-olefins mediated by a fructose-derived ketone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 40, p. 9806-9807, Oct 9 1996. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VL58600053 >.
- 58 KATSUKI, T.; SHARPLESS, K. B. THE 1ST PRACTICAL METHOD FOR ASYMMETRIC EPOXIDATION. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 18, p. 5974-5976, 1980 1980. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980KE71000076 >.
- 59 LANE, B. S.; BURGESS, K. A cheap, catalytic, scalable, and environmentally benign method for alkene epoxidations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 12, p. 2933-2934, Mar 28 2001. ISSN 0002-7863.
- 60 LANE, B. S. et al. Manganese-catalyzed epoxidations of alkenes in bicarbonate solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 40, p. 11946-11954, Oct 9 2002. ISSN 0002-7863.
- 61 YAO, H. R.; RICHARDSON, D. E. Epoxidation of alkenes with bicarbonate-activated hydrogen peroxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 13, p. 3220-3221, Apr 5 2000. ISSN 0002-7863.
- 62 BURGER, A.; YOST, W. L. ARYLCYCLOALKYLAMINES .1. 2-PHENYLCYCLOPROPYLAMINE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 70, n. 6, p. 2198-2201, 1948. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1948UB19000062 >.
- 63 CSUK, R.; SCHABEL, M. J.; VONSCHOLZ, Y. Synthesis of the enantiomer of the antidepressant tranylcypromine. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 7, n. 12, p. 3505-3512, Dec 1996. ISSN 0957-4166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VX23500024 >.
- 64 BENELKEBIR, H. et al. Enantioselective synthesis of tranylcypromine analogues as lysine demethylase (LSD1) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 3709-3716, Jun 15 2011. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000291477600012 >.
- 65 CIACCIO, J. A.; AMAN, C. E. "Instant methylide" modification of the Corey-Chaykovsky cyclopropanation reaction. **Synthetic Communications**, v. 36, n. 10, p. 1333-1341, 2006 2006. ISSN 0039-7911. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000236853700002 >.
- 66 ANDO, K.; YAMADA, K. Highly E-selective solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction catalyzed by DBU. **Green Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1143-1146, 2011 2011. ISSN 1463-9262. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000290227800014 >.

- ⁶⁷ _____. Solvent-free Horner-Wadsworth-Emmons reaction using DBU. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 25, p. 3297-3299, Jun 23 2010. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000278673000012 >.
- ⁶⁸ APPEL, R.; LOOS, R.; MAYR, H. Nucleophilicity Parameters for Phosphoryl-Stabilized Carbanions and Phosphorus Ylides: Implications for Wittig and Related Olefination Reactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 2, p. 704-714, Jan 21 2009. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000262521800061 >.
- ⁶⁹ CHOUDARY, B. M. et al. The one-pot Wittig reaction: A facile synthesis of alpha,beta-unsaturated esters and nitriles by using nanocrystalline magnesium oxide. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 14, p. 1977-1985, Sep 2006. ISSN 1615-4150. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240707900026 >.
- ⁷⁰ WURZ, R. P.; CHARETTE, A. B. An expedient and practical method for the synthesis of a diverse series of cyclopropane alpha-amino acids and amines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 4, p. 1262-1269, Feb 20 2004. ISSN 0022-3263. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188955400033 >.
- ⁷¹ ASHOKKUMAR, V.; SIVA, A. Cinchona alkaloid-based chiral catalysts act as highly efficient multifunctional organocatalysts for the asymmetric conjugate addition of malonates to nitroolefins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 13, n. 40, p. 10216-10225, 2015 2015. ISSN 1477-0520. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000362729600017 >.
- ⁷² LIU, J. T.; YAO, C. F. One-pot synthesis of trans-beta-alkylstyrenes. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 35, p. 6147-6150, Aug 27 2001. ISSN 0040-4039. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170532500033 >.
- ⁷³ MOSMANN, T. RAPID COLORIMETRIC ASSAY FOR CELLULAR GROWTH AND SURVIVAL - APPLICATION TO PROLIFERATION AND CYTO-TOXICITY ASSAYS. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RW94600004 >.
- ⁷⁴ BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-2597, Nov 1996. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VQ87000029 >.
- ⁷⁵ SRINIVASAN, R. et al. Epoxidation of olefins at low temperature using m-chloroperbenzoic acid. **Synthetic Communications**, v. 32, n. 12, p. 1853-1858, 2002 2002. ISSN 0039-7911.
- ⁷⁶ FRINGUELLI, F. et al. EPOXIDATION REACTION WITH M-CHLOROPEROXYBENZOIC ACID IN WATER. **Tetrahedron Letters**, v. 30, n. 11, p. 1427-1428, 1989 1989. ISSN 0040-4039.

- 77 WELLS, J. N.; SHIRODKA, A. V.; KNEVEL, A. M. AZIRIDINE DERIVATIVES AS POTENTIAL MONOAMINE OXIDASE INHIBITORS. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 195-196, 1966. ISSN 0022-2623.
- 78 MOREIRA, L. S. A.; PILO-VELOSO, D.; NELSON, D. L. Synthesis of 2-(alkylamino)-1-phenylethane-1-thiosulfuric acids, potential schistosomicides. **Quimica Nova**, v. 23, n. 4, p. 447-452, Jul-Aug 2000. ISSN 0100-4042.
- 79 SCHNUTE, M. E. et al. 2-Aryl-2-hydroxyethylamine substituted 4-oxo-4,7-dihydrothieno 2,3-b pyridines as, broad-spectrum inhibitors of human herpesvirus polymerases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 12, p. 3349-3353, Jun 15 2007. ISSN 0960-894X.
- 80 AZIZI, N.; SAIDI, M. R. Highly chemoselective addition of amines to epoxides in water. **Organic Letters**, v. 7, n. 17, p. 3649-3651, Aug 18 2005. ISSN 1523-7060.
- 81 CHAKRABORTI, A. K.; RUDRAWAR, S.; KONDASKAR, A. Lithium bromide, an inexpensive and efficient catalyst for opening of epoxide rings by amines at room temperature under solvent-free condition. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 17, p. 3597-3600, Aug 27 2004. ISSN 1434-193X.
- 82 REDDY, L. R. et al. An efficient method for the ring opening of epoxides with aromatic amines catalysed by indium trichloride. **New Journal of Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 221-222, 2001 2001. ISSN 1144-0546. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000166711100013 >.
- 83 BONOLLO, S. et al. A green route to beta-amino alcohols via the uncatalyzed aminolysis of 1,2-epoxides by alkyl- and arylamines. **Green Chemistry**, v. 8, n. 11, p. 960-964, 2006 2006. ISSN 1463-9262. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000241588000009 >.
- 84 DESAI, H. et al. Regioselectivity in a highly efficient, microwave-assisted epoxide aminolysis. **Synthesis-Stuttgart**, n. 6, p. 902-910, Mar 2007. ISSN 0039-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245432400013 >.
- 85 NEGRON-SILVA, G. et al. Comparative study of the regioselective synthesis of beta-aminoalcohols under solventless conditions catalyzed by sulfated zirconia and SZ/MCM-41. **Molecules**, v. 12, n. 11, p. 2515-2532, Nov 2007. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252173200008 >.
- 86 OKADA, I.; ICHIMURA, K.; SUDO, R. A NEW SYNTHESIS OF AZIRIDINES FROM BETA-AMINO ALCOHOLS WITH TRIPHENYLPHOSPHINE DIBROMIDE. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 43, n. 4, p. 1185-1186, 1970 1970. ISSN 0009-2673.
- 87 CHAMCHAANG, W.; PINHAS, A. R. THE CONVERSION OF AN AZIRIDINE TO A BETA-LACTAM. **Journal of Organic Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2943-2950, Apr 27 1990. ISSN 0022-3263.

- 88 ANDERSON, J. C.; CHAPMAN, H. A. Regiochemical switching of Mitsunobu cyclisation mode of vicinal diamines with pendant hydroxyl group. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 15, p. 2413-2422, 2007. ISSN 1477-0520. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248121800020 >.
- 89 SWAMY, K. C. K. et al. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 6, p. 2551-2651, Jun 2009. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000266929800010 >.
- 90 WENKER, H. The preparation of ethylene imine from monoethanolamine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 57, p. 2328-2328, Jul-Dec 1935. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188361600366 >.
- 91 OLOFSSON, B.; WIJTMANS, R.; SOMFAI, P. Synthesis of N-H vinylaziridines: a comparative study. **Tetrahedron**, v. 58, n. 30, p. 5979-5982, Jul 22 2002. ISSN 0040-4020.
- 92 LI, X.; CHEN, N.; XU, J. An Improved and Mild Wenker Synthesis of Aziridines. **Synthesis-Stuttgart**, n. 20, p. 3423-3428, Oct 2010. ISSN 0039-7881.
- 93 BUCKLEY, B. R.; PATEL, A. P.; WIJAYANTHA, K. G. U. Observations on the Modified Wenker Synthesis of Aziridines and the Development of a Biphasic System. **Journal of Organic Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 1289-1292, Feb 1 2013. ISSN 0022-3263.
- 94 CRUZ, A.; IRENE PADILLA-MARTINEZ, I.; GARCIA-BAEZ, E. V. An efficient synthesis of aziridines from ephedrine. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 21, n. 8, p. 909-913, Apr 30 2010. ISSN 0957-4166.
- 95 WATSON, I. D. G.; YUDIN, A. K. New insights into the mechanism of palladium-catalyzed allylic amination. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 49, p. 17516-17529, Dec 14 2005. ISSN 0002-7863.
- 96 MULLER, R. K. et al. PREPARATION OF N-AMINOAZIRIDINES - TRANS-1-AMINO-2,3-DIPHENYLAZIRIDINE, 1-AMINO-2-PHENYLAZIRIDINE, AND 1-AMINO-2-PHENYLAZIRIDINIUM ACETATE. **Organic Syntheses**, v. 50-9, p. 56-61, 1988. ISSN 0078-6209. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1988P247400018 >.
- 97 PRUSEVICH, P. et al. A Selective Phenelzine Analogue Inhibitor of Histone Demethylase LSD1. **Acs Chemical Biology**, v. 9, n. 6, p. 1284-1293, Jun 2014. ISSN 1554-8929. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000337870500010 >.
- 98 SHUSTERMAN-HONGER, Y.; BECKER, J. Y. Electrochemical oxidation of organic compounds containing C=N double bonds. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 740, p. 105-113, Mar 2015. ISSN 1572-6657. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000352047400015 >.

- 99 SHANG, Z. H.; CHU, Q. Q.; TAN, S. Metal-Free Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles from N¹-(Arylmethyl)hydrazides or 1-(Arylmethyl)-2-(arylmethylene)hydrazines. **Synthesis-Stuttgart**, v. 47, n. 7, p. 1032-1040, Apr 2015. ISSN 0039-7881. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000351584500016 >.
- 100 BALAMURUGAN, R.; KOTHAPALLI, R. B.; THOTA, G. K. Gold-Catalysed Activation of Epoxides: Application in the Synthesis of Bicyclic Ketals. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 8, p. 1557-1569, Mar 2011. ISSN 1434-193X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000288129100020 >.
- 101 LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Research**, v. 57, n. 15, p. 3071-3078, Aug 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XM81200002 >.
- 102 GATO, E. B. M. **TERAPÊUTICA ONCOLÓGICA PARA ENFERMEIROS E FARMACÊUTICOS**. 4ED.
- 103 WANG, K. et al. Establishment of a bioluminescent MDA-MB-231 cell line for human triple-negative breast cancer research. **Oncology Reports**, v. 27, n. 6, p. 1981-1989, Jun 2012. ISSN 1021-335X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000303783100040 >.
- 104 YANG, L. et al. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. **Oncogene**, v. 30, n. 43, p. 4437-4446, Oct 2011. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000296356500006 >.
- 105 ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 9, p. S73-S81, Jun 2009. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000267527100004 >.
- 106 VON MINCKWITZ, G.; MARTIN, M. Neoadjuvant treatments for triple-negative breast cancer (TNBC). **Annals of Oncology**, v. 23, p. 35-39, Aug 2012. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000309417900007 >.
- 107 SHARMA, P. et al. Efficacy of neoadjuvant carboplatin plus docetaxel in triple negative breast cancer: Combined analysis of two cohorts. **American Association for Cancer Research**, 2016-01-01 00:00:00 2016. Disponível em: < <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/early/2016/06/14/1078-0432.CCR-16-0162.full.pdf> >.
- 108 LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750-2767, Jul 2011. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292413000024 >.

109

POPE, A. J. et al. Issues surrounding standard cytotoxicity testing for assessing activity of non-covalent DNA-binding metallo-drugs. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 11, p. 2772-2774, 2010. ISSN 1477-9226. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000275159100004 > .

APÊNDICES

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H do composto 2a

Apêndice 2. Espectro de RMN de ^1H do composto 4e

Apêndice 3. Espectro de massas por IES-EM do composto 4a ou 4'a.

Apêndice 4. Espectro de RMN de ^1H do composto 4a.

Apêndice 5.

Apêndice 6. Espectro de massas por IES-EM do composto 4b

ACN:agua (1:1) + 0,5 % ac ac
08-05-2014 MV53C MS SCAN 1 (0.027)

16:22:24
Scan ES+
9.73e7

Apêndice 7. Espectro de RMN de ^1H do composto 4b.

Apêndice 8. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4b

Apêndice 9. Espectro de RMN DEPT do composto 4b.

Apêndice 10. Espectro de massas IES-EM do composto 4c.

Apêndice 11. Espectro de RMN de ^1H de 4c.

Apêndice 12. Espectro de RMN de ^{13}C de 4c.

Apêndice 13. Espectro de RMN de DEPT de 4c. **Apêndice 14. Espectro de massas IES-EM do composto 4d.**

Apêndice 15. Espectro de RMN de ^1H do composto 4d.

Apêndice 16. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4d.

Apêndice 17. Espectro de RMN de DEPT do composto 4d.

Apêndice 18. Espectro de massas IES-EM do composto 4e.

Água : Acetonitrila : Ac Acet (100:100:1)
 FLAVIO 2014-08-22 MV65 MS SCAN 1 (0.025)

10:19:29
 Scan ES+
 3.45e7

Apêndice 19. Espectro de massas ESI-MS do composto 4g e 4g'.

Apêndice 20. Espectro de RMN de ^1H do composto 4g, com os dois regioisômeros juntos

Apêndice 21. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4g, com os dois regioisômeros juntos.

Apêndice 22. Espectro de massas IES-EM do composto 4i.

Apêndice 23. Espectro de RMN de ^1H do composto 4j **Apêndice 24. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4j.**

Apêndice 25 Espectro de RMN de DEPT do composto j.

Apêndice 26. Espectro de RMN de ^1H do composto 4k.

Apêndice 27. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 4k. **Apêndice 28. Espectro de RMN de DEPT do composto 4k.**

Apêndice 29. Espectro de massas IES-EM do intermediário 5b. **Apêndice 30. Espectro de RMN de ^1H do composto 4b tosilado.**

Apêndice 31. Espectro de massas IES-EM da piperazina formada.

Apêndice 32. Espectro de RMN de ^1H do composto 6b.

Apêndice 33. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6b

Apêndice 34. Espectro de RMN de ^1H do composto 6a.

Apêndice 35. Espectro de RMN de ^1H do composto 6c.

Apêndice 36. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6c.

Apêndice 37. Espectro de RMN de DEPT do composto 6c.

Apêndice 38. Espectro de RMN de ^1H do composto 6d.

Apêndice 39. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6d. **Apêndice 40. Espectro de RMN de DEPT do composto 6d.**

Apêndice 41. Espectro de RMN de ^1H do composto 6e. Apêndice 42. Espectro de RMN de ^{13}C do composto 6e.

Apêndice 43. Espectro de RMN de DEPT do composto 6e.

Apêndice 44. Espectro de RMN de ¹H do composto 18.

Apêndice 45. Espectro de RMN de ^1H do composto 19. **Apêndice 46. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 9a.**

Apêndice 47. Espectro de RMN de ^{13}C RMN do composto 9a.

Apêndice 48. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 9b.

Apêndice 49. Espectro de RMN de ^{13}C RMN do composto 9b.

Apêndice 50. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 10a.

Apêndice 51. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 11.

Apêndice 52. Espectro de massas por IES-EM com o sinal em 234, referente à tranilcipromina BOC protegida.

Apêndice 53. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 22

Apêndice 54. Espectro de RMN de ^1H RMN do composto 23.

Apêndice 55. Espectro de RMN de ^1H do composto 13.

Apêndice 56. Espectros de RMN de ^1H sobrepostos dos compostos 23 (verde) e 13 (vermelho).