



**Universidade de Brasília
Instituto de Química**

**Design e Síntese de Possíveis Inibidores da Proteína Auxiliar Nef
do Vírus HIV-1**

Carlos Eduardo de Melo Salvador

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Carlos Kleber Zago de Andrade

**Brasília
Agosto/2011**

Dedico este Trabalho aos meus pais, a minha irmã companheira de luta, ao meu mestre da vida Daisaku Ikeda e a todos os meus companheiros da SGI.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus amados pais Antônio Salvador e Maria Odacir de M. Salvador e a minha brilhante irmã, Thais Cristina de Melo Salvador, por todo carinho, apoio e por me proporcionarem realizar o meu sonho de me tornar pesquisador.

Ao meu mestre Dr. Daisaku Ikeda, por sempre confiar em mim e me permitir lutar ao seu lado por um grande ideal, a felicidade de toda humanidade.

Aos meus companheiros da SGI, por nunca permitirem que o desânimo tomasse conta das minhas ações.

Ao Prof. Dr. Carlos Kleber, pela confiança, dedicação, por ser um excelente orientador e exemplo de ser humano, por estar sempre presente e por ter-me acolhido em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Peter Bakuzis, por me ensinar tudo o que eu sei sobre mecanismos de reações orgânicas, por estar sempre disposto a tirar as minhas dúvidas, por ser rigoroso sempre acreditando no meu potencial.

A Prof^a. Dra Otilie Eichler Vercilio, por me ensinar tudo o que eu sei sobre a dinâmica de um laboratório de síntese orgânica, por me ensinar a fazer coluna e por estar sempre disposta a me ajudar no que force preciso.

A Angélica, por ser uma grande irmã, sempre me apoiando e compartilhando as vitórias e as batalhas do dia a dia de um químico orgânico sintético.

A minha família LaQMOS: Andréia, Lucília, Pamela, Taissa, Márcio, Alex, pelo companheirismo e dias animados.

Ao professor Dr. João Batista pelo apoio na realização dos cálculos teóricos e por toda sua paciência.

Ao professor Dr. Enrique Arganaraz, do laboratório de virologia da universidade de Brasília (VIROMOL), por ter me mostrado a importância da proteína viral Nef e por ser um exemplo de pesquisador.

Aos professores do IQ que contribuíram de forma decisiva para a minha formação, Lucília, Inês, Rafael, Wender, Ângelo e Brenno.

E a todos os colegas da pós, pelo companheirismo e amizade.

A CAPES/REUNI pela bolsa e auxílio financeiro.

E a todos os funcionários do IQ, por serem sempre prestativos

RESUMO

Aproximadamente após 25 anos da implantação da terapia anti-retroviral, a pesquisa em HIV/SIDA encontra-se em uma encruzilhada marcada pelo surgimento de novos paradigmas, entre os quais se destacam o aparecimento de variantes resistentes a inibidores presentes no coquetel anti-retroviral; a permanência de reservatórios virais latentes; a presença de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e o alto custo das drogas disponíveis no mercado. Diante deste quadro, a pesquisa de mecanismos básicos de patogêneses, assim como a identificação de novos alvos terapêuticos, volta a desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de novas drogas anti-retrovirais. A diminuição da expressão do receptor CD4 na superfície das células infectadas é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1. A identificação de inibidores desta função de Nef é de grande valia no tratamento da infecção pelo HIV. Para atingir este objetivo, foram sintetizados, com base em cálculos teóricos de modelagem molecular, três compostos (**I**, **15** e **18**) que se demonstraram relevantes para futuros testes farmacológicos como possíveis inibidores da degradação de CD4 pela Nef.

ABSTRACT

Approximately after 25 years of the implantation of the anti-retroviral therapy, the research in HIV, aids is at a crossroad marked for the sprouting of new paradigms: the emergence of variants resistant to protease inhibitors present in the anti-retroviral cocktail; the persistence of latent viral reservoirs, and the presence of collateral toxic effect caused by the treatment and the high cost of the available drugs in the market. Because of this situation, the research of basic mechanisms of pathogenesis and the identification of new therapeutic targets should play a crucial role in the development of new anti-retro viral drugs. Decrease in the expression of receiver CD4 on the surface of the infected cells is one of the most important events during the infection by HIV-1. The identification of inhibitors through function of Nef is very important to the treatment of HIV infection. To achieve this goal, three compounds (I, 15 and 18) were synthesized based on theoretical calculations of molecular modeling, which proved to be relevant for future pharmacological tests as potential inhibitors of the degradation of CD4 by Nef.

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV	Fármacos Anti-Retrovirais
Atpase	Bomba de Próton
AZT	3-Azido-2,3-didesoxitimidina
Crfs	Formas Recombinantes do Vírus HIV
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DIAD	Diisopropilazodicarboxilado
DMAP	<i>N,N</i> -4-dimetilaminopiridina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E.U.A	Estados Unidos da América
FDA	'Food and Drug Administration''
Felv	Retrovírus da Leucemia Felina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hte	Tioesterase Humana
HTLV	Vírus da Leucemia Human
Ime	Iodeto de Metila
ITRN	Inibidores da Transcristase Reversa Análogos De Nucleotídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogo De Nucleosídeos
LTRS	Sequências Repetidas Invertidas De Núcleosídeos
MA	Proteína Matriz
MO	Microondas
Nef	Fator Negativo
PDB	Protein Data Bank
PMA	Forbol Miristato
PNUD	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
Pybop	Benzotriazol-1-il-Oxitripirrolidinofosfonio Hexafluorofosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV	Vírus da Imuno deficiência Símia
SU	Glicoproteínas de Superfície
TARV	Terapia Anti-Retroviral
THF	Tetra Hidrofurano
TLCK	Clorometil Nap-Tosila-L-Lisina Cetona
TM	Proteína Transmembranar
TPCK	Clorometil N-1-P-Tosila-L-Fenilalanina Cetona
TR	Transcriptase Reversa
TsCl	Cloreto de Tosila
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas Sobre HIV/AIDS
Vif	Fator de infectividade

Índice

1 – Introdução	1
1.1 - A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).....	1
1.1.1 - Uma breve reflexão histórica.....	1
1.1.2 - Perspectivas no controle da SIDA.....	4
1.1.3 - Terapias anti-retrovirais e o tratamento da SIDA.....	5
1.2 -Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).	7
1.2.1 – A descoberta.....	7
1.2.2 – Classificação filogenética.....	8
1.2.3 - A Estrutura do Vírus HIV	8
1.2.4 – O ciclo reprodutivo	10
1.3 – O Ciclo de vida do vírus HIV e a importância da proteína auxiliar Nef.	11
1.3.1 – A Proteína auxiliar do vírus HIV: Nef.	11
1.3.2 – A modulação negativa do CD4 mediada por Nef.....	15
1.3.3 - Inibidores de Nef.....	17
2. Objetivos	23
3. Resultados e discussões.....	24
3.1 – Planejamento racional da nova classe de inibidores de HIV-1- Nef.	24
3.2 – Proposta de rota sintética para os análogos A e I	32
3.2.1 - Síntese dos Fragmentos 3 e 4.....	33
3.2.2 – Acoplamento dos fragmentos finais dos compostos A e I.....	40
3.2.3 – Novas propostas de rota sintética para a síntese do composto A.	42
4. Conclusão e perspectivas	52

5. Parte experimental	53
5.1. Reagentes e solventes	53
5.2. Métodos utilizados na purificação e identificação dos produtos	53
5.2.1. Métodos cromatográficos.....	53
5.2.2. Métodos Analíticos.....	53
5.3. Nomenclatura	54
5.4. Procedimentos	54
5.4.1. 1-tosilpiperazina.....	54
5.4.2. 4-hidroxi-1-(4-tosilpiperazil)butan-1-ona.	55
5.4.3. ácido 4-oxi-4-(4-tosilpiperazil)butanoico	56
5.4.4. 4-hidroxi-1-(piperazil)butan-1-ona.....	56
5.4.5. 4-hidroxibutanoato de Sódio.....	57
5.4.6. ácido 4-acetoxibutanoico.	57
5.4.7. acetato de 4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butila.	58
5.4.8. (4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butil)isoindolínico-1,3-diona.....	59
5.4.9. 5-(alilamino)-1,3-dimetiluracila.....	59
5.4.10. 4-tosilpiperazina-1-carbonil cloro.	60
5.4.11. Composto 21.	60
5.4.12. N-alil-N-(1,2,3,6-tetrahydro-1,3-dimetil-2,6-dioxopirimidina-4-yl)-4-tosilpiperazine-1-carboxiamida.	61
5.4.13. 1H-1,2,4-triazol-3-carboxilato de alila.	62
5.4.14. 2-alilisoindolina-1,3-diona.	62
5.4.15. tert-butiyl alilcarbamato.....	63
5.4.16. 4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butil 4H-imidazol-2-carboxilado	63
6 – Bibliografia.....	65
7. Anexos	71

Índice de Figuras

Figura 1: Estimativa feita pelo unaids do número de pessoas vivendo com HIV no mundo, em 2009.	3
Figura 2: Estrutura do AZT.....	5
Figura 3: Representação esquemática da estrutura do vírus HIV.	9
Figura 4: Estrutura genômica do HIV-1.....	9
Figura 5: Ciclo de vida do vírus HIV-1.....	11
Figura 6: Representação da proteína Nef associada à membrana plasmática pelo grupo miristoíla.....	13
Figura 7: Regiões da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 que interagem com diferentes substratos celulares.....	14
Figura 8: Modulação negativa do CD4 por Nef e Vpu.....	16
Figura 9: reagentes de alquilação de peptídeos, tpck (clorometil n-1-p-tosila-l-fenilalanina cetona) e tlck (clorometil nap-tosila-l-lisina cetona).....	20
Figura 10: (1) Ikarugamicina; (2) Nef; (3) complexo de Nef: os resíduos de interesse para a degradação do CD4 da Nef interagindo com a Ikarugamicina...	25
Figura 11: Pequenas moléculas inibidoras de Vif.....	26
Figura 12: Moléculas protótipo para inibidor de Nef.....	27
Figura 13: Estratégia para o desenho de novos inibidores de HIV-1 Nef a partir do protótipo Ikeda 2.....	28

Figura 14: Inibidores de terceira geração da proteína HIV-1 Nef com os seus valores de energia de interação (kcal/mol)	30
Figura 15: 6-amino-1,3-dimetiluracila	45

Índice de Esquemas

Esquema 1: Rota sintética do AZT.....	6
Esquema 2: Rota sintética do antibiótico macrocíclico Ikarugamicina (5).	19
Esquema 3: Segunda geração de prováveis inibidores da proteína HIV-1 Nef. Os valores para a energia de interação (E) foram calculados em kcal/mol.	29
Esquema 4: Proposta retrossintética dos compostos A e I.	33
Esquema 5: Monoacilação seletiva de diaminas simétricas.....	34
Esquema 6: Sulfonação da piperazina (2) a partir do cloreto de tosila (1).	35
Esquema 7: Abertura do anidrido succínico com o composto 3.....	36
Esquema 8: Tentativa de redução do grupo carboxila composto do 6 a álcool. ...	37
Esquema 9: Nova metodologia para a síntese do composto 4.	38
Esquema 10: Acoplamento do fragmento 4 ao 1,2,4-triazol-3-ácido carboxílico (9), etapa final da síntese do possível inibidor da proteína auxiliar do vírus HIV-1 Nef composto I.....	40
Esquema 11: Reação de Mitsunobu para obtenção do composto 2.	41
Esquema 12: Rota sintética para a síntese do composto 15.	43
Esquema 13: Tentativa de reação de S_N2 do composto 10 com o composto 15 para a síntese do composto A.....	44

Esquema 14: Duas propostas de retrosíntese do composto 5-amino-1,3dimetiluracila (10); (A) tentativa de síntese do intermediário a''' a partir da uréia (a') e do ácido propiólico (a''); ^{143,144} (B) tentativa de síntese do intermediário b'' a partir da β-alanina (b'). ¹⁴⁵	45
Esquema 15: Nova proposta retrosintética do composto a e síntese do composto 18.	46
Esquema 16: Tentativa de hidrólise do composto 18.....	47
Esquema 17: Síntese do composto 20.....	47
Esquema 18: Metodologia radicalar proposta para a síntese do composto 26.	48
Esquema 19: Síntese do intermediário 21.	49
Esquema 20: Aplicação da metodologia radicalar.....	50
Esquema 21 : Intermediários para futuros testes metodológicos.....	51

Índice de tabelas

Tabela 1: Resíduos e motivos associados à degradação do CD4 pela Nef.....	24
Tabela 2: Valores de ΔE para a ikarugamicina e os protótipos antagonista de Nef.	27
Tabela 3: Condições experimentais para sulfonação do composto 1	35
Tabela 4: Condições experimentais para a reação de abertura da γ -butirolactona (7) com o composto 3	39
Tabela 5: Métodos para conversão da hidroxila terminal de 4 para posterior reação de S_n2 com o composto 10	42

Índice de Gráfico

Gráfico 1: Valores de Energia de Hidratação (kcal/mol), Log P e Polarizabilidade (Å), para os análogos A, I e a Ikarugamicina.....	32
--	-----------

1 – Introdução

1.1 - A Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

1.1.1 Uma Breve Reflexão Histórica.

Em 1970, Robert Gallo e colaboradores deram início a investigações preliminares sobre a existência de um retro-vírus de origem humana nos Estados Unidos da América (EUA), a partir de estudos de caracterização de polimerases de DNA em células de sangue de pacientes com leucemia.^{1,2} Apesar do consenso nos EUA de que as doenças infecciosas graves estavam limitadas aos "Países de terceiro mundo", com a descoberta das células T do fator de crescimento (interleucina-2) por Doris Morgan, Gallo e colaboradores^{3,4} conseguem isolar pela primeira vez, partindo de células T de paciente com leucemia, o primeiro retrovírus humano, o vírus da leucemia (HTLV).^{5,6} O vírus do HTLV atua nas células T CD4⁺, sendo transmitido de mãe para filho e através do sangue e contato sexual.^{7,8} A caracterização da infecção pelo HTLV foi determinante para a descoberta e caracterização do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), o vírus do HIV.

A partir do ano de 1981, o crescente número de homossexuais acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) nos EUA chamou a atenção dos principais meios de comunicação e da comunidade científica. Os homossexuais contaminados apresentavam profunda imunossupressão, provocada pela diminuição do número de linfócitos T auxiliares (LT-CD4⁺), provocando a ocorrência de infecções oportunistas seguida de um tipo de tumor

¹ Sarnagadharan, M. G.; Sarin, P. S.; Reitz M. S.; Gallo R. C.; *Nature New Biol.* **1972**, 67, 240.

² Sarnagadharan, M. G.; Guroff, R.M.; Gallo, R. C.; *Biochem. Biophys. Acta* **1978**, 516, 419.

³ Collins, S. J.; Gallo, R. C.; Gallagher, R. E.; *Nature* **1977**, 270, 347.

⁴ Morgan, D. A.; Ruscetti, F. W.; Gallo, R. C.; *Science* **1976**, 193, 1007.

⁵ Ruscetti, F. W.; Morgan D. A.; Gallo R. C.; *J. Immuno* **1977**, 119, 131.

⁶ Mier, J. W.; Gallo, R. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, 77, 6134.

⁷ Gallo, R. C.; *J. Hum. Virol.* **2000**, 3, 1.

⁸ Yoshida, M.; *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 475.

de pele denominado sarcoma de Kaposi e linfoma de células B. Nesta mesma época, foram definidos como grupos de risco de contaminação da SIDA os hemofílicos, viciados em heroína, os homossexuais e os haitianos (“quatro H”).^{9,10} A descoberta de que o retrovírus da leucemia felina (FeLV) além de causar leucemia possuía também variantes que provocavam distúrbios imunológicos,^{11,12} e a semelhança dos riscos de infecção pelo HTLV-1,¹³ fez com que Gallo propusesse, em 1983,¹⁴ que a SIDA poderia ser causada por um novo tipo de retrovírus humano.

Após o isolamento do vírus HIV, em 1983 por Gallo e Montagnier,^{14,15} e provas convincentes de que este era o causador da SIDA,^{16,17} inúmeros avanços foram obtidos no entendimento da patogênese do HIV, como a elucidação de vários modos de transmissão do vírus, o sequenciamento do genoma,^{18,19} a caracterização da maioria dos genes e proteínas, o conhecimento das células-alvo principais (T CD4, macrófagos e as células microglial),²⁰ o exame de sangue, o qual possibilitou a monitorização da epidemia causada pela ampla disponibilidade de sangue contaminado,²¹ a descoberta do SIV nos chimpanzés²² e o início da terapia anti retroviral.²³ Estes são avanços que se destacam neste

⁹ Gottlieb, M. S.; Schroff, R.; Schanker, H. M.; Weisman, J. D.; Fan, P. T.; Wolf, R. A.; Saxon, A.; *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 1425.

¹⁰ Friedman-Kien, A. E.; *J. Am. Acad. Dermatol.* **1981**, 5, 468.

¹¹ Wernicke, D.; Trainin, Z.; Ungar-Waron, H.; Essex, M.; *J. Virol.* **1986**, 60, 669.

¹² Kalyanaraman, V. S.; Sarngadharan, M. G.; Robert-Guroff, M.; Miyoshi, I.; Golde, D.; Gallo, R. C.; *Science* **1982**, 218, 571.

¹³ Poesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Reitz, M. S.; Kalyanaraman, V. S.; Gallo, R. C.; *Nature* **1981**, 294, 268.

¹⁴ Gallo, R. C.; Salahuddin, P. S.; Gelmann, E. P.; *Science* **1983**, 220, 865.

¹⁵ Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Gruest, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Montagnier, L.; *Science* **1983**, 220, 868.

¹⁶ Sarngadharan, M. G.; Bruch, L.; Schupbach, J.; Gallo, R. C.; *Science* **1984**, 224, 506.

¹⁷ Wain-Hobson, S.; Vartanian, J. P.; Henry, M.; Chenciner, N.; Cheynier, R.; Delassus, S.; Martins, L. P.; Sala, M.; Nugeyre, M. T.; Guetard, D.; *Science* **1991**, 252, 961.

¹⁸ Sanchez-Pescador, R.; Power, M. D.; Barr, P. J.; Steimer, K. S.; Stempien, M. M.; Brown-Shimer, S. L.; *Science* **1985**, 227, 484.

¹⁹ Wain-Hobson, S.; Sonigo, P.; Danos, O.; Cole, S.; Alizon, M.; *Cell* **1985**, 40, 9.

²⁰ Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G. P.; Martin, S. R.; Huang, Y.; *Nature* **1996**, 381, 667.

²¹ Joyce, C.; Anderson, I.; *New Sci.* **1985**, 105, 3.

²² Chakrabarti, L.; Guyader, M.; Alizon, M.; Tiollais, P.; Sonigo, P.; *Nature* **1987**, 328, 543.

²³ Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7096.

curto período de tempo (1984-1996) e que levaram a expectativas de que o combate a AIDS seria rapidamente resolvido.

Após 27 anos do isolamento do vírus (HIV) da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) pelo pesquisador Robert Gallo nos EUA e Montagnier na França,²⁴ a AIDS é responsável por uma pandemia sem precedentes que desafia as autoridades de saúde pública globais. Segundo o programa conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS), em 2009, cerca de 33,3 milhões de pessoas encontravam-se infectadas pelo vírus HIV em todo o mundo (Figura 1),²⁵ sendo que, deste número, 47% são mulheres, 44,8% são homens e 7,5% são crianças. As mortes provocadas pelo vírus HIV-1, em 2009, ultrapassam o número de 1,8 milhões de pessoas em todo o mundo.²⁶

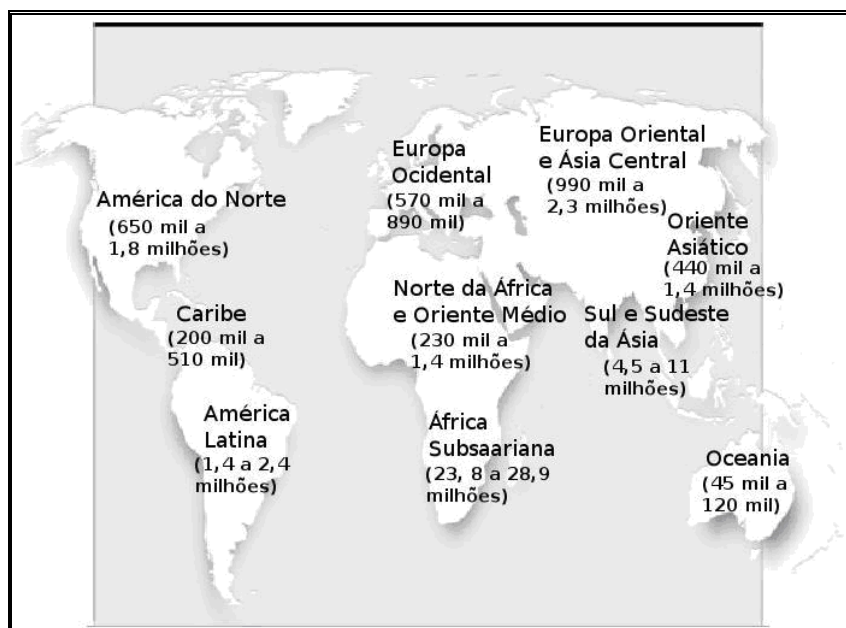


Figura 1: Estimativa feita pelo unaidns do número de pessoas vivendo com HIV no mundo, em 2009.²⁵

Estima-se que 1,9 milhões de pessoas foram infectadas com o vírus do HIV na África sub-sahariana em 2007, trazendo para 22 milhões o número de pessoas

²⁴ Kuby, J.; Immunology, 5th ed., W.H.Freeman and company, New York, 2003.

²⁵ http://www.who.int/data/2009_global_summary.png, acessada em 15 de janeiro 2011.

²⁶ <http://vacinadaaids.wordpress.com/2010/05/24/estimativa-pelo-mundo>, acessada em 15 de janeiro de 2011.

vivendo com o vírus HIV. Dois terços (67%) do total global de 33 milhões de pessoas vivem com o HIV nesta região e três quartos (75%) de todos os mortes por SIDA em 2007 ocorreram ali. Nos países mais afetados, a SIDA vem reduzindo a expectativa de vida em mais de 20 anos da média da população, retardando o crescimento econômico e aumentando a pobreza e a desigualdade social.²⁵

No Brasil, após a disponibilidade universal e gratuita das terapias anti-retrovirais na rede pública ocorrida a partir do ano de 1996, a taxa de mortalidade provocada pela SIDA vem diminuindo significativamente, permitindo assim um aumento da expectativa de vida de vida dos portadores da SIDA e uma diminuição nos índices de internações hospitalares causadas pela ocorrência oportunistas em portadores do vírus HIV.²⁷

1.1.2 Perspectivas no Controle da SIDA.

Nenhuma patologia na história da humanidade provocou uma mobilização política, financeira, e de recursos humanos, como a SIDA. Devido ao grande impacto da SIDA nas comunidades e países mais atingidos e o grande desafio de conter o avanço global da epidemia do vírus HIV, pessoas em todo o mundo tornaram-se menos dispostas a tolerar as desigualdades sociais que atingem grande parte da população mundial. Segundo o filósofo e pacifista Daisaku Ikeda isto vem ocorrendo porque a humanidade enfrenta inúmeros desafios que transcendem as questões de fronteiras nacionais e que o avanço rápido da globalização não nos permite mais achar que a Sida não representa uma questão global, pois, direta ou indiretamente, afeta toda a humanidade.²⁸

De acordo com o Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento (PNUD), no que se refere aos principais objetivos para o desenvolvimento do milênio, até o ano de 2015 a meta é reverter o aumento da epidemia da SIDA por meio de ações concretas que possibilitem um maior acesso aos fármacos antiretrovirais, implementação de programas de prevenção que aumentem a

²⁷ Marins, J. R.; Jamal, L. F.; Chen, S.; Hudes, E. S.; Teixeira, P. R.; *AIDS* **2003**, *17*, 1675.

²⁸ <http://www.bsgi.org.br/Paz2006.pdf>, acessado em 12 de fevereiro de **2011**.

qualidade de vida das mulheres, contribuindo para a prevenção da transmissão do vírus do HIV para os filhos, e inúmeras outras ações focadas na melhoria da saúde sexual e reprodutiva nos países mais afetados pela SIDA.^{25, 26}

1.1.3 - Terapias Anti-retrovirais e o Tratamento da SIDA.

O tratamento da SIDA é baseado no monitoramento da carga viral plasmática e na contagem de células T expressando CD4⁺. Com este monitoramento, pode-se tratar o paciente antes que a imunodeficiência se torne expressiva. Atualmente, os tratamentos existentes são compostos por coquetéis de fármacos que auxiliam na redução da taxa viral, retardando a infecção do HIV e minimizando os danos no sistema imunológico.²⁹ No final da década de 1980, após a aprovação do FDA (Food and Drug administration), o AZT (3-azido-2,3-didesoxitimidina) foi colocado no mercado como o primeiro fármaco a demonstrar resultados concretos no tratamento do HIV-1. O AZT (Figura 2) pertence à classe de fármacos anti-retrovirais que atuam como antagonistas à enzima viral transcriptase reversa. Este fármaco foi sintetizado pela primeira vez por Horwitz, em 1964.³⁰

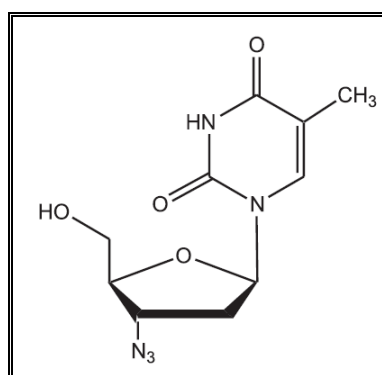
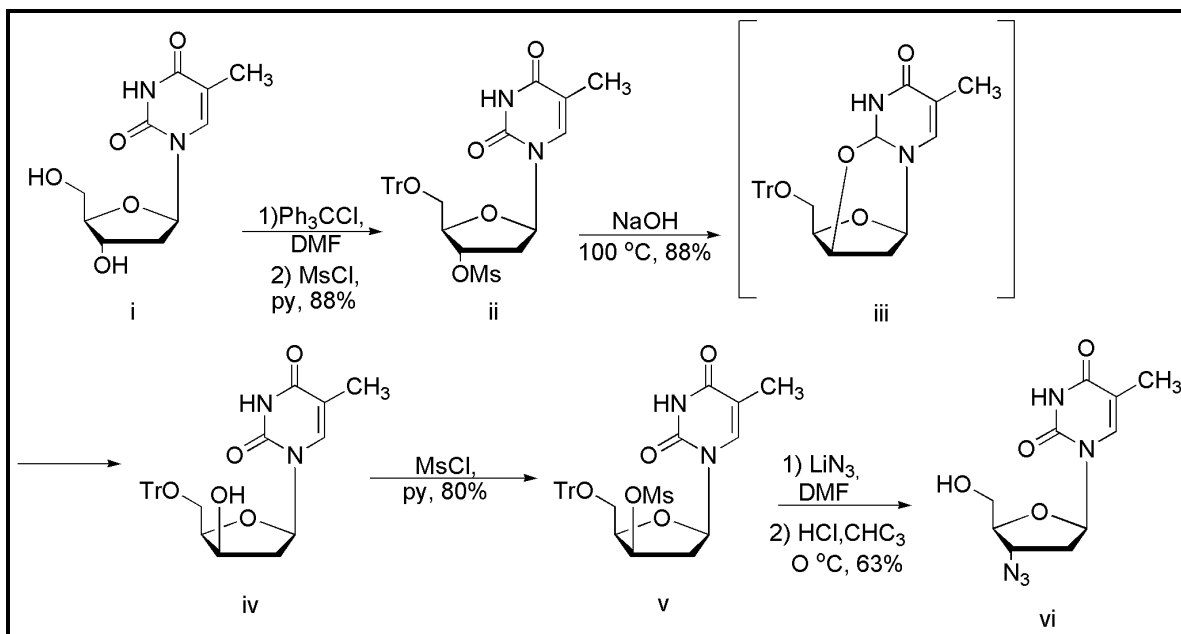


Figura 2: Estrutura do AZT.

²⁹ Cihlar, T.; Ray, A. S.; *Antiviral Res.* **2010**, 85, 39.

³⁰ Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M.; *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 2076.

A rota sintética proposta por Horwitz tem como matéria prima o nucleotídeo Timidina (**i**), sendo realizada em seis etapas com um rendimento global de 30%, tendo como etapa principal a formação do intermediário cíclico **iii** (Esquema 1).³⁰



Esquema 1: Rota sintética do AZT.³⁰

Os fármacos anti-retrovirais (ARV) atuam sobre a ação da enzima viral transcriptase reversa (TR), inibindo uma importante etapa do ciclo de vida do vírus HIV: a tradução do filamento de DNA virótico a partir do RNA viral, por meio da associação dos fármacos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e os fármacos inibidores da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeos (ITRNN). Esta associação se faz necessária devido à resistência do vírus à medicação. As principais consequências do uso da terapia anti-retroviral (TARV) são a redução da evolução da imunodeficiência causada pelo vírus HIV-1 e o aumento da expectativa de vida do paciente infectado.³¹

Devido ao aparecimento de variantes resistentes a inibidores presentes no coquetel anti-retroviral, a permanência de reservatórios virais latentes, a presença

³¹ http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HTM_TB_2004.329_por_chap11.pdf, acessada em 15 de janeiro de 2011.

de efeitos tóxicos colaterais causados pelo tratamento e o alto custo das drogas disponíveis no mercado,^{32,33} a pesquisa de mecanismos básicos de patogêneses, assim como a identificação de novos alvos terapêuticos, volta a desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de novas drogas no tratamento da SIDA.

1.2 - Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

1.2.1 – A Descoberta.

A semelhança filogenética entre os retrovírus causadores da imunodeficiência símia (SIV) encontrados em primatas não-humanos e a intensa disseminação do vírus HIV na África-Subsahariana sugerem que o vírus do HIV tenha sua origem nesta região.^{34,35} A existência de pelo menos 20 diferentes espécies de primatas não-humanos na África-Subsahariana dificultam o conhecimento exato da origem do vírus da SIV. Os primatas africanos são um grande reservatório de lentivírus que podem infectar outras espécies, inclusive os seres humanos.^{33,34} As relações filogenéticas entre cepas do vírus da imunodeficiência HIV-1, HIV-2 e lentivírus de primatas são importantes para esclarecerem a origem da SIDA símia.³⁶ Estas relações demonstram também que o vírus HIV-1, principal causador da epidemia mundial da SIDA, é resultante da transmissão e da mutação de SIV do chimpanzé "*Pan troglodites troglodites*" no organismo humano^{37,38} e que a transmissão e mutação da SIV da espécie de

³² Lama, J.; Mangasarian, A.; Trono, D.; *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 622.

³³ Cortes, M.J.; Wong-Staal, F.; Lama J.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *3*, 1770

³⁴ Hahn, B. G. M.; Shaw, K. M.; Cock.; Sharp, P. M.; *Science* **2000**, *287*, 607.

³⁵ Sharp, P. M.; Robertson, D. L.; Hahn, B. H.; *Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1995**, *349*, 41.

³⁶ Corbet, S.; Muller-Trutwin, M. C.; Versmisse, P.; Delarue, S.; Ayoub, A.; Lewis, J.; Brunak, S.; Martin, P.; Brun-Vezinet, F.; Simon, F.; Barre-Sinoussi, F.; Mauclore, P.; *J. Virol.* **2000**, *74*, 529.

³⁷ Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; *Nature* **1999**, *397*, 436.

³⁸ Hirsh, V. M.; Campbell, B. J.; Bailes, E.; Goeken, R.; Brown, C.; Elkins, W. R.; Axthelm, M.; Murphey-Corb, M.; Sharp P. M.; *J. Virol.* **1999**, *73*, 1036.

macacos “*mangabeys*” para seres humanos são a causa do vírus do HIV-2, menos virulento e pouco disseminado pelo mundo.³⁹

1.2.2 – Classificação Filogenética

O agente causador da SIDA em seres humanos, os vírus HIV do tipo 1 e 2, pertencem ao gênero *Lentivirus* (latim *lentus* = lento) da família *Retroviridae*. Esta família tem como principal característica a presença da enzima transcriptase reversa, também conhecida como DNA – polimerase, que é responsável por sintetizar filamentos de DNA viral, a partir do RNA viral, no momento em que ocorre a infecção da célula.⁴⁰

O vírus HIV-1 é o principal responsável pela pandemia da SIDA em todo o mundo. Sua alta variabilidade genética e elevadas taxas evolutivas,⁴¹ causadas pela infecção de diferentes sistemas imunológicos humanos e o tratamento antiviral, dificultam o seu combate por meio de vacinas. A heterogeneidade genética do vírus HIV-1 é tão elevada que a sua variabilidade genética em um único indivíduo pode ser de até 10%.^{38,42}

1.2.3 - A Estrutura do Vírus HIV

O vírus HIV-1 é constituído basicamente por uma região interna, o capsídeo, o qual é recoberto por um envoltório lipoprotéico externo denominado envelope.⁴³ O envelope se divide em uma camada externa em formas de projeções constituídas pelas glicoproteínas de superfície gp120 (SU) e transmembranar gp41 (TM) e uma camada interna delimitada pela proteína matriz (MA) p17, responsável pela proteção e incorporação do nucleocapsídeo.⁴⁴

³⁹ Courgnaud, V.; Pourrut, X.; Bibollet-Ruche, F.; Mpodì-Ngole, E.; Bourgeois, A.; Delaporte, E.; Peeters, M.; *J. Virol.* **2001**, *75*, 857.

⁴⁰ Frankel, A. D.; Young, J. A.; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.

⁴¹ Tebit, D. M.; Nankya, I.; Arts, E. J.; Gao, Y.; *AIDS Rev.* **2007**, *9*, 75.

⁴² Takebe, Y.; Uenishi, R.; Li, X.; *Adv. Pharmacol.* **2008**, *56*, 1.

⁴³ Frankel, A. D.; Young, J. A.; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.

⁴⁴ Seelamgari, A.; Maddukuri, A.; Berro, R.; de la Fuente, C.; Kehn, K.; Deng, L.; Dadgar, S.; Bottazzi, M. E.; Ghedin, E.; Pumfery, A.; Kashanchi, F.; *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 2388.

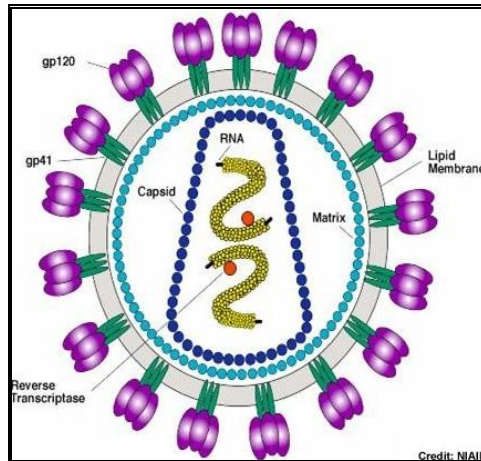


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do vírus HIV.⁴⁵

No interior do capsídeo, encontramos o genoma do vírus HIV-1 (Figura 3) que é composto por dois filamentos idênticos de RNA viral. Cada filamento é constituído por três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), dois regulatórios (*tat* e *ver*), quatro genes acessórios (*nef*, *vpu*, *vpr* e *vif*) e, nas extremidades 3 e 5, seqüências repetidas invertidas (LTRs) (Figura 4).^{45,46}

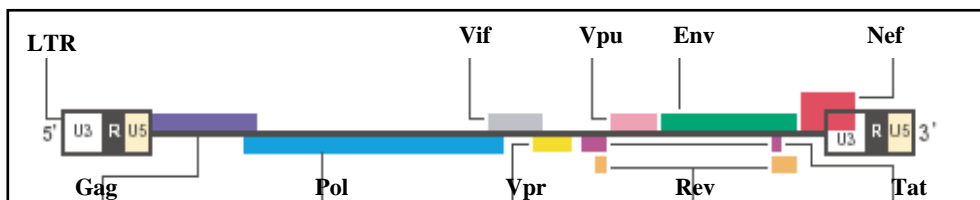


Figura 4: Estrutura genômica do HIV-1.⁴⁶

No capsídeo, encontramos ainda, associadas ao RNA viral, três importantes proteínas, a transcriptase reversa (TR), a integrase (IN) e a protease (PR), que são responsáveis por fornecerem elementos essenciais para as funções enzimáticas do vírus. O vírus HIV-1 codifica seis proteínas adicionais que se

⁴⁵ <http://allaboutim.webs.com/apps/blog/show/6208634-what-is-the-difference-between-hiv-disease-and-aids>, acessado em 27 de fevereiro de 2011.

⁴⁶ Greene, B. W.; Peterlin, B. M.; *Nature Med.* **2002**, *8*, 673.

dividem em duas reguladoras, a Tat e Ver, e quatro proteínas acessórias: nef, vpu, vpr e vif.^{45,46}

1.2.4 – O Ciclo Reprodutivo

A SIDA é provocada pela ação do vírus HIV-1 em células hospedeiras do tipo macrófagos ou linfócitos T. Todas estas células possuem em sua membrana plasmática a presença do receptor glicoproteico CD4. Por meio da interação da glicoproteína viral gp 120 com o CD4, presente na superfície da célula, o vírus do HIV-1, que pertence à família dos retro vírus, é transfectado para o interior da célula onde o seu RNA viral serve como padrão para a transcrição de um filamento de DNA viral.⁴⁷ A transcrição do filamento de DNA viral a partir do RNA virótico é catalisada pela ação da enzima viral transcriptase reversa e por enzimas da célula hospedeira. Após a transcrição, o DNA viral é transportado para o núcleo da célula infectada onde é incorporado ao material genético da célula hospedeira por meio da ação da enzima viral integrase. Após a integração ao DNA da célula hospedeira, o DNA viral é transcrito em RNA mensageiro, que coordena a síntese de proteínas virais, o que posteriormente irá dar origem a um novo vírus capaz de infectar outra célula.⁴⁸ As etapas do ciclo de vida do vírus HIV-1 podem ser visualizadas de uma forma sintética na Figura 5.⁴⁹

⁴⁷ Gomez, C.; Hope, J, T.; *Cell. Microbiol.* **2005**, 7, 621.

⁴⁸ Márques, N.; Sancho, R.; Macho, A.; Moure, A ; Masip, I.; Messenguer, A.; Muñoz, E. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 71, 596.

⁴⁹ Amabis, J.; Marthos, G.; *Fundamentos da Biologia Moderna*, 2ª ed, Moderna: São paulo, 1999, 215.

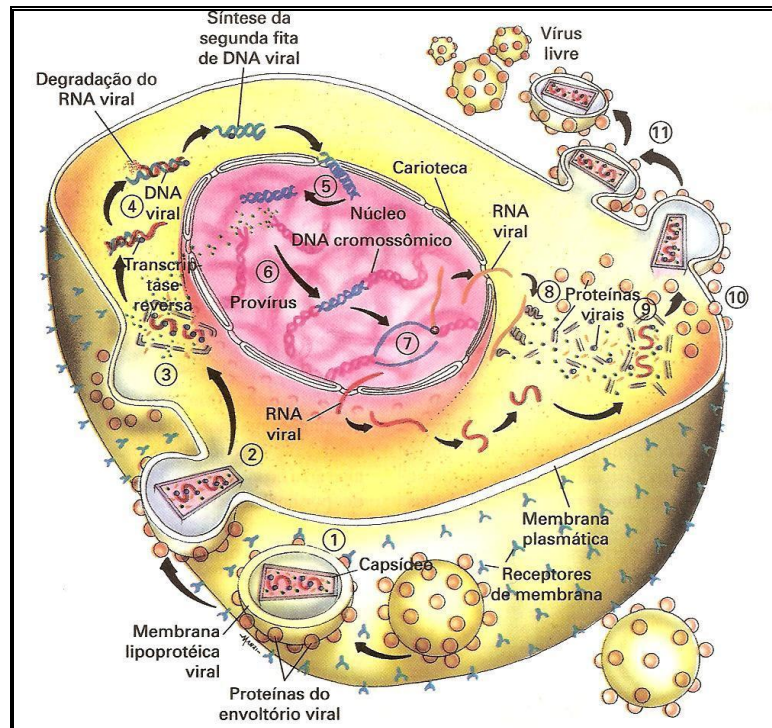


Figura 5: Ciclo de vida do vírus HIV-1.⁵¹

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é seguida por um período aparentemente assintomático que precede uma profunda disfunção do sistema imunológico, o que, por sua vez, leva à ocorrência de diversas doenças infecciosas oportunistas, estado clínico conhecido como SIDA, e que finalmente conduzem o indivíduo à morte.

1.3 – O Ciclo de Vida do Vírus HIV e a Importância da Proteína Auxiliar Nef.

1.3.1 – A Proteína Auxiliar do Vírus HIV: Nef.

A Nef proteína auxiliar do vírus HIV, possui um papel fundamental na progressão da patogênese da SIDA. Esta relevância é apoiada em estudos com pacientes que mesmo após a infecção levaram 10 anos para desenvolverem os sintomas da SIDA. Muitos desses pacientes possuíam um tipo de vírus HIV que

não produzia a proteína Nef.^{50, 51} Outra evidência para o papel da Nef na progressão da doença é fornecida por estudos do vírus SIV em macacos da espécie rhesus, onde a exclusão da Nef reduziu o potencial de patogenicidade do vírus, retardando o início da SIDA. Neste mesmo estudo, os macacos foram infectados com uma cepa do SIV modificada com o códon do gene *nef*, onde foi observado que o quadro da SIDA foi rapidamente estabelecido.⁵² Estudos desenvolvidos com a infecção de ratos com o HIV-1 humano demonstraram que os vírus que foram incapazes de expressar a proteína Nef possuíam uma menor infectibilidade, indicando uma correlação entre a expressão da Nef e a virulência do vírus HIV-1.^{53, 54, 55}

Inúmeras funções atribuídas à proteína auxiliar Nef justificam a sua influência na replicação e no desenvolvimento da SIDA. Dentre estas funções, podemos destacar: o aumento da infectividade do vírion,⁵⁶ a regulação das vias apoptóticas,⁵⁷ a intervenção da produção endógena de células T de sinalização, a ativação de quinases celulares⁵⁸ e a modulação da expressão de moléculas de superfície celular do tipo CD4 e CD8,⁵⁹ CCR5,⁶⁰ CXCR4,⁶¹ MHC-I⁶² e MHC-II [45,46].⁶³ Dentre estas funções, a regulação dos níveis de concentração das moléculas de CD4 na membrana plasmática é a mais determinante para a replicação e patogenicidade do vírus HIV.

⁵⁰ Deacon, N. J.; Tsykin, A.; Solomon, A.; Smith, K.; Ludford-Menting, M.; Hooker, D. J.; McPhee, D. A.; Greenway, A. L.; Ellett, A.; Chatfield, C.; Lawson, V. A.; Crowe, S.; Maerz, A.; Sonza, S.; Learmont, J.; Sullivan, J. S.; Cunningham, A.; Dwyer, D.; Dowton, D.; Mills, J.; *Science* **1995**, *270*, 988.

⁵¹ Oelrichs, R.; Tsykin, A.; Rhodes, D.; Solomon, A.; Ellett, A.; McPhee, D.; Deacon, N.; *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1998**, *4*, 811.

⁵² Kestler, H. W.; Ringler, D. J.; Mori, K.; Panicali, D. L.; Sehgal, P. K.; Daniel, M. D.; Desrosiers, R. C.; (1991) *Cell* **1991**, *65*, 651.

⁵³ Bonyhadi, M. L.; Rabin, L.; Salimi, S.; Brown, D. A.; Kosek, J.; McCune, J. M.; Kaneshima, H.; *Nature* **1993**, *363*, 7282.

⁵⁴ Arora, V. K.; Fredericksen, B. L.; Garcia, J. V.; *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 189.

⁵⁵ Skowronski, J.; Parks, D.; Mariani, R.; *EMBO J.* **1993**, *12*, 703.

⁵⁶ Miller, M. D.; Warmerdam, M. T.; Page, K. A.; Feinberg, M. B.; *J. Virol.* **1995**, *69*, 579.

⁵⁷ Acheampong, E. A.; Parveen, Z.; Muthoga, L. W.; Kalayeh, M.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 4257.

⁵⁸ Yang, P.; Henderson, A. J.; *Virology* **2005**, *336*, 219.

⁵⁹ Stove, V.; Van de Walle, I.; Naessens, E.; Coene, E.; Stove, C.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 11422.

⁶⁰ Michel, N.; Allespach, I.; Venzke, S.; Fackler, O. T.; *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 714.

⁶¹ Hrecka, K.; Swigut, T.; Schindler, M.; Kirchhoff, F.; Skowronski, J.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 10650.

⁶² Roeth, J. F.; Collins, K. L.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *72*, 548.

⁶³ Schindler, M.; Wurfl, S.; Benaroch, P.; Greenough, T. C.; Daniels, R.; Easterbrook, P.; *J. Virol.* **2003**, *77*, 10548.

A tradução do RNAs *nef* dos diferentes tipos de vírus HIV e SIV produzem a proteína Nef. A proteína Nef possui de 27 a 37 kDa e um comprimento de 206 a 210 resíduos de aminoácidos. Em todas as espécies de Nef, independente do tipo de vírus da imunodeficiência, ocorre a fosforilação do grupo mirístico e os seis primeiros resíduos do *N*-terminal da Nef (*N*-miristoilação).⁶⁴ A *N*-miristoilação da Nef permite a fixação da Nef nas membranas celulares (Figura 6), indispensáveis para a realização de todas as funções biológicas da Nef citadas anteriormente e, principalmente, na promoção da modulação negativa do CD4. Para melhorar a capacidade da modulação negativa do CD4 pela Nef, resíduos de serina e treonina são também fosforilados.⁶⁵

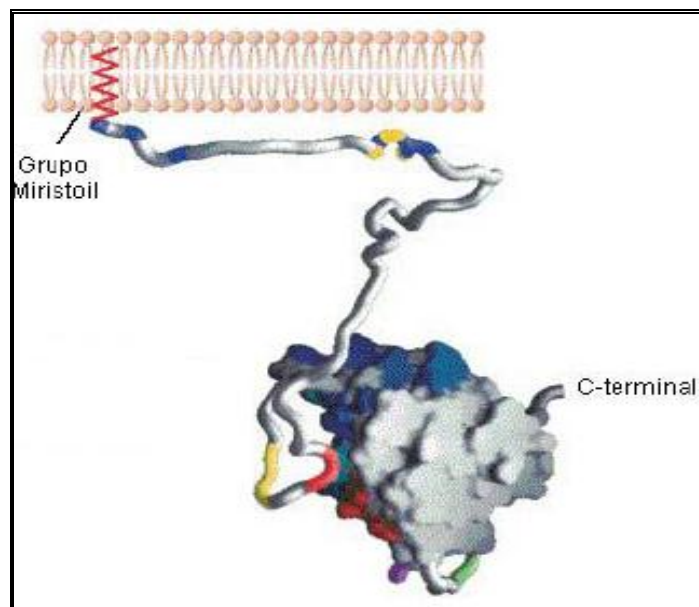


Figura 6: Representação da Proteína Nef associada à membrana plasmática pelo grupo Miristoíla.⁶⁶

A combinação de estudos de cristalografia de raios-X e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) permitiu a elucidação de grande parte da estrutura tridimensional da proteína Nef do vírus HIV.⁶⁷ Estes estudos revelam a existência de várias regiões (Figura 7) importantes para a interação com fatores

⁶⁴ Allan, J. S.; Coligan, J. E.; Lee, T. H.; McLane, M. F.; Kanki, P.J.; *Science* **1985**, *230*, 810.

⁶⁵ Luo, T.; Downing, J. R; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **1997**, *71*, 2535.

⁶⁶ Arold, S. T.; Baur, S.; *J. Bioch.* **2001**, *6*, 356.

⁶⁷ Grzesiek, S.; Bax, A.; Clore, G. M.; Gronenborn, J. S.; Kaufman, J.; *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 340.

celulares do tipo tioesterase: CD4; V1H; proteínas adaptadoras de clatrina, PAK 1, PAK 2, Vav (SH3), Lck (SH3), Hck (SH3); e possivelmente β -Cop (Figura 7). Do resíduo 1 – 80 da proteína Nef, temos a região *N*-terminal flexível, na qual podemos destacar a presença de uma região ácida (resíduos 62 – 65) e um tipo de hélice poliprolina (resíduos 68 – 69). Entre os resíduos 81 – 147 e 181 – 202, encontramos a região *C*-terminal (domínio central) e entre os resíduos 148 – 180 uma região bem exposta e flexível (loop). Nesta região, podemos destacar os motivos dileucina (resíduos 160 – 165) e di-aspártico (resíduos 154 – 155).⁶⁸

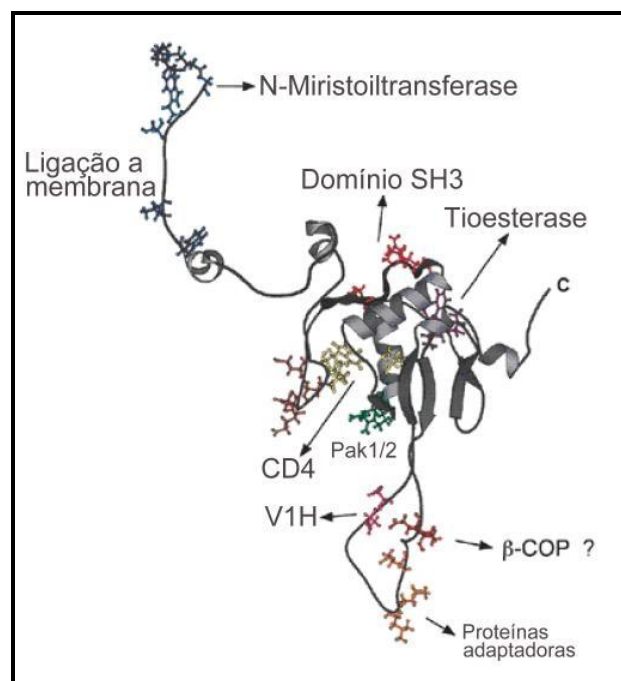


Figura 7: Regiões da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 que interagem com diferentes substratos celulares.⁶⁹

Cálculos demonstram que a superfície total de exposição dos domínios da proteína Nef do vírus HIV-1 é de 17.600 Å. Em comparação com outras proteínas de 206 resíduos, a Nef possui uma área aproximadamente 57% maior de

⁶⁸ Grzesiek, S.; Bax, A.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Tjandra, N.; *Protein Sci.* **1997**, 6, 1248.

⁶⁹ Geyer, M.; Facker, O. T.; Peterlin, B. M.; *EMBO Reports* **2001**, 21, 580.

exposição de seus domínios.⁷⁰ A combinação da elevada área de exposição e domínios flexíveis possibilitam a Nef realizar um grande número de interações com diferentes substratos, o que pode justificar o fato da Nef realizar inúmeras funções importantes para o ciclo de vida do vírus HIV.

1.3.2 – A Modulação Negativa do CD4 Mediada por Nef.

Recentes evidências mostram claramente que a molécula CD4 exerce dois efeitos opostos durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV-1). Na fase inicial, o receptor viral é requerido para a entrada do vírus na célula hospedeira. Entretanto, na fase tardia, o CD4 exerce um potente efeito inibitório em duas importantes etapas do ciclo viral, inibindo a infectividade e a liberação das partículas virais.^{71, 72, 73}

Outros resultados mostraram claramente a relação entre a degradação do receptor viral e o aumento da infectividade e a replicação viral, sugerindo a participação deste fenômeno na patogênese e progressão da infecção.^{74, 75, 76} Mais recentemente, foi demonstrado por Lama⁷⁷ que o seletivo bloqueio da degradação de CD4 mediada pela proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 inibe a infectividade e a replicação viral em células de sangue periférico e a inibição desta função viral pode ser utilizada como uma nova abordagem terapêutica. Nesse contexto, a identificação de inibidores desta função de Nef seria de grande valia no tratamento da infecção pelo HIV.

A diminuição da expressão do receptor CD4 na superfície das células infectadas é um dos mais importantes eventos durante a infecção pelo HIV-1, sendo conservada tanto nos retro-vírus da imunodeficiência humana (HIV-1, HIV-

⁷⁰ Geyer, M.; Peterlin, B. M.; *FEBS Lett.* **2001**, *496*, 91.

⁷¹ Bour, S.; Perrin, C.; Strebel, K.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33800.

⁷² Ross, T. M.; Oran, A.E.; Cullen, B. R.; *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 613.

⁷³ Foster, J. L.; *Virology* **1994**, *201*, 373.

⁷⁴ Mariani, R.; Skowronski, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 5549.

⁷⁵ Lama, J.; *Curr. HIV Res.* **2003**, *10*, 167.

⁷⁶ Pham, H. M.; Argañaraz, E. R.; Groschel, B.; Trono, B.; Lama, J.; *J. Virol.* **2004**, *78*, 13072.

⁷⁷ Argañaraz, E. R.; Schindler, M.; Kirchhoff, F.; Cortes, M. J.; Lama, J.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33912.

2) como na imunodeficiência simiana (SIV).^{73, 74} Três proteínas auxiliares do vírus HIV-1 participam deste fenômeno: Nef, Vpu e Env, sendo a Nef a mais relevante. A Nef aumenta a internalização das moléculas de CD4 expressas na superfície celular, enquanto as proteínas Vpu / Env redirecionam as moléculas de CD4 recém sintetizadas para degradação lisossômica (Figura 8).⁷⁸

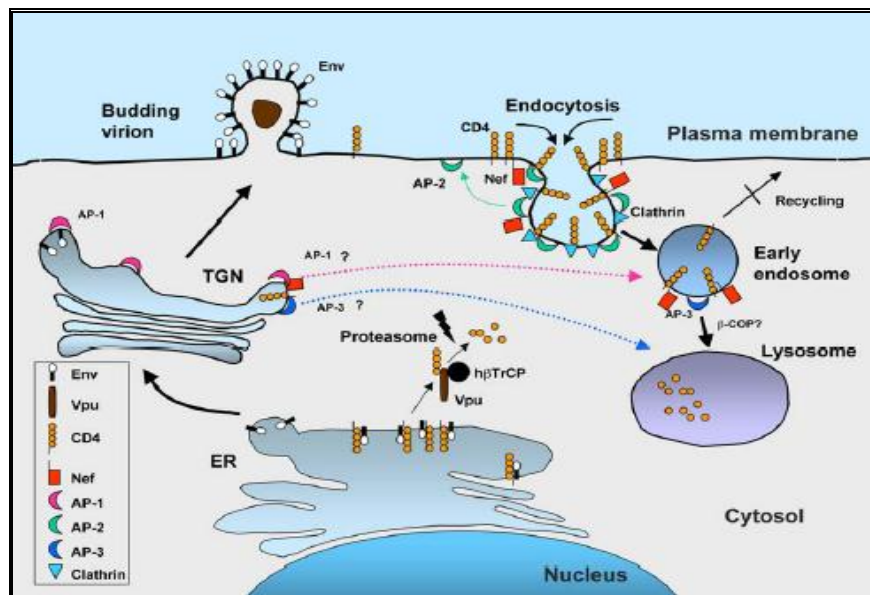


Figura 8: Modulação Negativa do CD4 por Nef e Vpu.⁷⁷

O mecanismo de ação da Nef na modulação negativa do CD4 tem sido estudado extensivamente e, até o momento, acredita-se que a Nef atue na superfície celular como um conector da cauda citoplasmática da molécula CD4 com a proteína clatrina AP-2 pertencente ao complexo adaptador heterotetramérico.^{78, 79, 80} Esta conexão possibilita a formação de vesículas endocíticas contendo o receptor CD4.^{81, 82} Com a finalidade de evitar a reciclagem de CD4 para a superfície celular, uma segunda conexão entre CD4 e a maquinaria de tráfego celular é estabelecida através da Nef, o que permite direcionar o receptor para degradação lisossômica. Foi proposto que, neste último passo, a Nef

⁷⁸ Greenberg, M. E.; *Embo J.* **1997**, 23, 6964.

⁷⁹ Greenberg, M.; *Curr. Biol.* **1998**, 8, 1239.

⁸⁰ Craig, H.M.; Pandori, M.W.; Guatelli, J. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 11229.

⁸¹ Piguet, V.; *Embo J.* **1998**, 17, 2472.

⁸² Crise, B. L.; Rose, J. K.; *J. Virol.* **1990**, 64, 5585.

interagiria com β -COP, uma subunidade da proteína de revestimento COP-1, o principal componente das vesículas não revestidas por clatrina (Figura 8).⁷⁶

Adicionalmente, três outras proteínas celulares, uma tirosina quinase (Hck), uma tioesterase humana II (hTE-II) e uma bomba de prótons (ATPase) vacuolar, também denominada de NBP-1, estão envolvidas na modulação do receptor CD4 mediada por Nef.⁸³ A tioesterase humana (hTE) hidrolisa *in vitro* ligações tioéster de acil-CoA, entretanto, seu papel fisiológico ainda é desconhecido. Estudos sugerem que em todas as linhagens de HIV e SIV, o endereçamento do CD4 para o endossoma pela interação com a Nef é causado pela modificação pós traducional conservada. Experimentos com Nef sem resíduos de lisina mostram que esse tipo de endereçamento torna a proteína viral incapaz de modular CD4, onde o aminoácido K144 de Nef mostrou ser necessário e suficiente para que a modulação ocorra, mesmo com o endereçamento. Esse sítio e as sequências vizinhas a ele (FK144LVP) são conservados entre as seqüências de HIV-1 e SIVcpz. Os mesmos estudos sugerem que o endereçamento do CD4 para o endossoma pela interação com Nef é necessário para a distribuição do complexo CD4-NEF-AP-2, nas vias endocíticas intracelulares (Figura 8).⁷⁶

Mais recentemente, Lama, demonstrou que o seletivo bloqueio da degradação de CD4 mediada por Nef inibe a infectividade e a replicação viral em células de sangue periférico.⁷⁷ Isto se deve ao fato da presença do receptor CD4 na superfície da membrana plasmática viral ser incorporado na partícula viral, no momento da eliminação, o que provavelmente ocorre por associação com a gp120, interferindo na ligação do envelope aos receptores da célula-alvo.⁷⁶

1.3.3 - Inibidores de Nef.

Os avanços no entendimento do mecanismo de ação da Nef na modulação negativa do CD4 localizado na superfície da membrana plasmática observados na literatura sugerem um importante papel da Nef na replicação do vírus HIV e no desenvolvimento da SIDA. A restauração dos níveis de CD4 na superfície de

⁸³ Geleziunas, R., S.; Bour.; M.A. Wainberg, M. A.; *Faseb J.* **1994**, 8, 593.

células infectadas pode inibir a formação de partículas infecciosas do vírus HIV, contribuindo na diminuição da taxa de propagação do vírus. A restauração da concentração dos níveis de CD4 na membrana plasmática das células infectadas retoma algumas funções normais da célula, perdidas pela degradação do CD4 em células T.⁸⁴ A primeira etapa da internalização do CD4 mediada por Nef tem como consequência o surgimento de inúmeras pequenas depressões na membrana plasmática recobertas pela proteína fibrosa clatrina.⁸⁵ Dessa forma, a Nef realiza a ponte entre o CD4 e o maquinário celular da via endocítica para a digestão celular.^{86, 87}

Tomando como base esta proposta mecanística para a modulação negativa do CD4 por Nef, Luo e colaboradores⁸⁸ propuseram que inibidores de endocitose mediada por receptores protéicos poderiam bloquear a primeira etapa de ação da proteína viral Nef e, conseqüentemente, restabelecer o CD4 na membrana plasmática das células infectadas pelo vírus HIV. A fim de obter uma melhor compreensão de como a Nef interage com a via endocítica, eles testaram vários agentes inibidores de diferentes etapas da via endocítica. Porém, a maioria desses agentes inibidores bloqueava a degradação de CD4 em células que expressam a Nef, mas não promoviam a recuperação do CD4 na superfície celular.⁸⁹ Dentre os compostos testados, o antibiótico Ikarugamicina promoveu o aumento da meia vida do CD4 na presença da Nef e a recuperação significativa da expressão do CD4 na superfície das células. O restabelecimento dos níveis de CD4 na membrana plasmática não foi consequência da diminuição dos níveis de Nef expressos pelas células infectadas mas, sim, pela alteração do mecanismo de transporte do CD4 pela via endocítica.⁸⁸

⁸⁴ Benson, R. E.; A. Sanfridson, J. S.; Ottinger, C.; Cullen, B. R.; *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 1566.

⁸⁵ Foti, M. A.; Mangasarian, V.; Piguet, D. P.; Lew, K. H.; Krause, D.; *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 37.

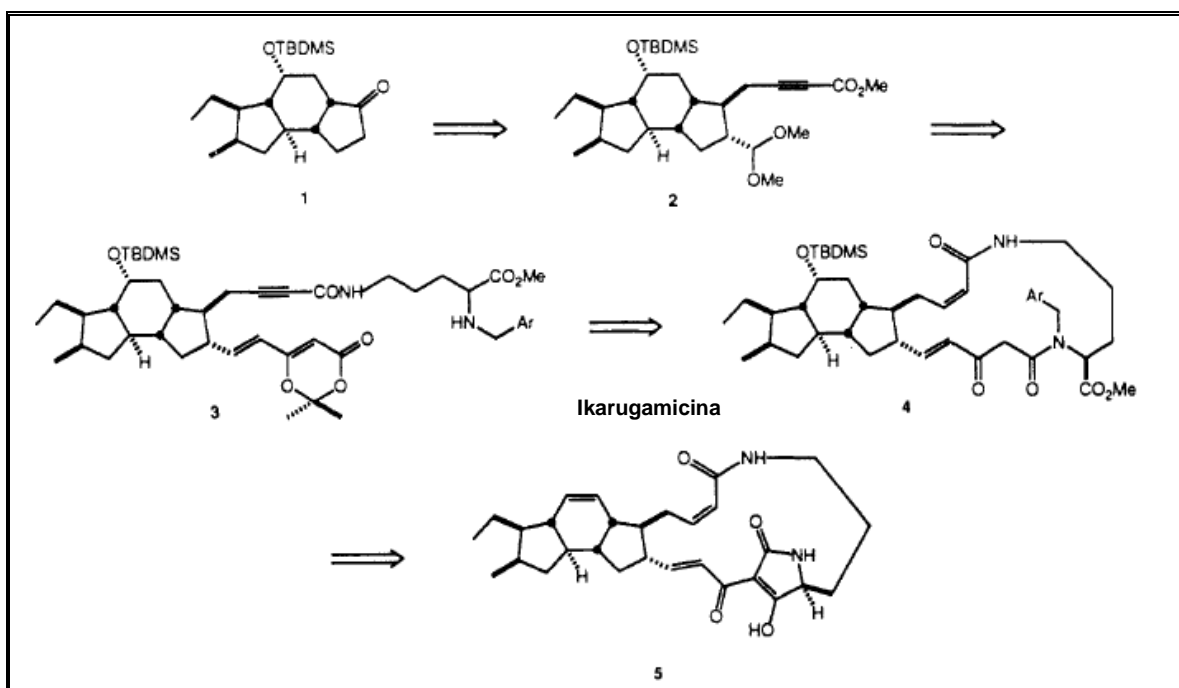
⁸⁶ Lu, X.; Brodsky F. M.; Peterlin. B. M.; *Immunity* **1998**, *8*, 647.

⁸⁷ Piguet, V., Y. L.; Chen, A.; Mangasarian, M.; Foti, J. L.; Carpentier.; *EMBO J.* **1998**, *17*, 2472.

⁸⁸ Luo, T.; Fredericksen, B. L.; Hasumi, T.; Endo, K.; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **2001**, *75*, 2488.

⁸⁹ Luo, T.; Anderson, S. J.; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **1996**, *70*, 1527.

A Ikarugamicina é um membro da família dos antibióticos macrocíclicos e foi isolada em 1972.⁹⁰ A estereoquímica absoluta da Ikarugamicina foi elucidada por Hirata e Ito pela aplicação de degradação química aliada a métodos de espectroscopia.⁹¹ A síntese do Ikarugamicina deve ser estereosseletiva por apresentar nove centros assimétricos e por apresentar olefinas E/Z. Por apresentar uma estrutura complexa, a síntese da Ikarugamicina proporcionou o desenvolvimento de estudos de controle estereoquímico por meio da reação de Diels-Alder.^{92,93} A síntese total da Ikarugamicina foi realizada em muitas etapas devido à complexidade estrutural do antibiótico (Esquema 2).^{94,95}



Esquema 2: Rota sintética do antibiótico macrocíclico Ikarugamicina (5).⁹⁵

⁹⁰ Jomon, k.; Kuroda, Y.; Ajsaka, M.; Sakai, H.; *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 271.

⁹¹ Ito, S.; Hirata, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1813.

⁹² Boeckman, R. K. Jr.; Napier, J. J.; Thomas, E. W.; Sato, R. I.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4152.

⁹³ Boeckman, R. K.; Weidner, J. C. H.; Perni, R. B.; Napier, J. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8036.

⁹⁴ Paquette, L. A.; Macdonald, D.; Anderson, L.; Wright, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8037.

⁹⁵ Paquette, L. A.; MacDonald, D.; Lawrence A. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9292.

Apesar de possuir propriedades inibidoras da função de modulação negativa do CD4 realizada pela Nef, a Ikarugamicina restabelece a taxa de CD4 em células expressando a proteína Nef, e também bloqueia a degradação do CD4 induzido pelo tratamento com acetato de forbol miristato (PMA), podendo conduzir a distúrbios das funções celulares normais e efeitos colaterais indesejados, o que impede a utilização de Ikarugamicina *in vivo*.⁹⁶ Apesar de ser citotóxica, por inibir a modulação do CD4 por PMA e inibir a captação do LDL oxidado,⁸⁸ a Ikarugamicina pode ser utilizada no desenvolvimento de estudos teóricos das características da interação entre o CD4 e a Nef que conduzem à modulação negativa do CD4.

A elucidação da topografia estrutural da proteína Nef do vírus HIV-1 descreve a localização do motivo A56W57L58 como uma importante região para a modulação negativa do CD4 por Nef.^{65,66} Próximo a este motivo, encontramos dois resíduos da proteína cisteína, o Cys206 e o Cys55. A alquilação de um grupo volumoso nestes resíduos próximos ao motivo A56W57L58 pode modificar estruturalmente esta região da proteína viral Nef, importante para a interação com o CD4.^{67,68} Jin e colaboradores⁹⁷ recentemente propuseram que o uso de reagentes de alquilação de peptídeos, TPCK (clorometil *N*-1-*p*-tosila-*L*-fenilalanina cetona) e TLCK (clorometil *N*-1-*p*-tosila-*L*-lisina cetona), pode contribuir para o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores da proteína auxiliar do vírus HIV-1 Nef (Figura 9).

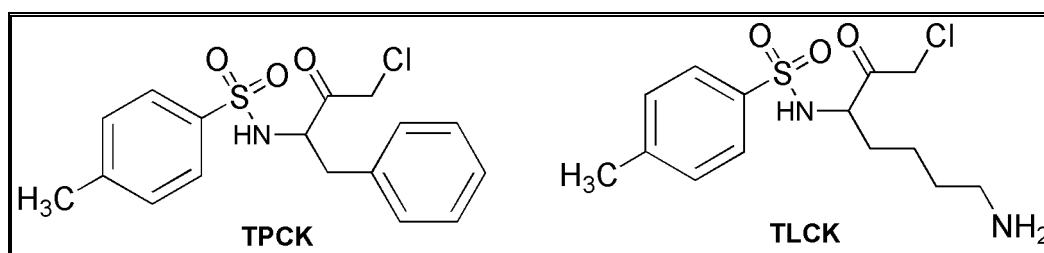


Figura 9: Reagentes de alquilação de peptídeos, TPCK (clorometil *N*-1-*p*-tosila-*L*-fenilalanina cetona) e TLCK (clorometil *N*-1-*p*-tosila-*L*-lisina cetona).⁹⁶

⁹⁶ Greenberg, M.E.; Bronson, S.; Lock, M.; Neuman, M.; Pavlakis, G. N.; *Embo J.* **1997**, *23*, 6964.

⁹⁷ Jin, J. Y.; Zhang, X.; Cai, C. Y.; Burakoff, C. J.; *AIDS Res. Ther.* **2010**, *7*, 26.

Várias evidências comprovam que os reagentes TPCK e TLCK são agentes alquilantes específicos de protease,^{98,99} o que permitiu a Jin e colaboradores,⁹⁵ obterem êxito na mudança estrutural da proteína viral Nef com ligação covalente do TPCK e TLCK, nos resíduos Cys55 e Cys206, nas cadeias laterais da proteína Nef. A modificação conformacional da proteína viral Nef provocada pelo acoplamento dos reagentes TPCK e TLCK reduziu drasticamente a intensidade da interação com o CD4. Os agentes TPCK e TLCK conseguiram alquilar apenas 50% da concentração da Nef em cultura de células T, não inibindo assim a modulação negativa do CD4, já que uma pequena quantidade da proteína viral Nef é suficiente para promover a degradação do CD4. O aumento das concentrações dos agentes alquilantes TPCK e TLCK demonstrou citotoxicidade, o que compromete o teste de atividade contra o vírus HIV-1.⁹⁶

A proteína viral Nef possui uma enorme capacidade de interação com diversos substratos celulares, independente da ação enzimática.^{69,70} A elevada flexibilidade dos domínios e a fraca interação estabelecida por Nef com seus substratos celulares dificultam o desenvolvimento de inibidores eficientes para Nef que não sejam citotóxicos.^{100,101,102,103} Mais recentemente, Breuer e colaboradores¹⁰⁴ propuseram uma estratégia fundamentada na abordagem do conjunto de interações existentes entre a proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 e os diferentes elementos celulares envolvidos na modulação negativa do CD4, denominada “envolvimento da proteína Nef”. Esta estratégia é baseada no estabelecimento de interações simultâneas com diferentes motivos da proteína viral Nef que visam envolver a superfície da Nef interrompendo assim as múltiplas funções da Nef.¹⁰⁵

⁹⁸ Lalou, C. I.; Lederer, F.; *Biochimie* **1993**, *75*, 443.

⁹⁹ Solomon, D. H.; O'Brian, C. A.; Weinstein I. B.; *FEBS Lett.* **1985**, *190*, 342.

¹⁰⁰ Betzi, S.; Restouin, A.; Opi, S.; Arold, S. T.; Parrot, I.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 19256.

¹⁰¹ Olszewski, A.; Sato, K.; Aron, Z. D.; Cohen, F.; Harris, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 14079.

¹⁰² Emert-Sedlak, L.; Kodama, T.; Lerner, E. C.; Dai, W.; Foster, C.; *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 939.

¹⁰³ Dikeakos, J. D.; Atkins, K. M.; Thomas, L.; Emert-Sedlak, L.; Byeon, I. J.; *Mol. Biol. Cell.* **2010**, *21*, 3279.

¹⁰⁴ Breuer, S.; Schievink, I. S.; Schulte, A.; Blankenfeldt, W.; Fackler, O. T.; Geyer, M.; *Plosone* **2011**, *6*, 1.

¹⁰⁵ Fackler, O. T.; Moris, A.; Tibroni, N.; Giese, S. I.; Glass, B.; *Virology* **2006**, *351*, 322.

Com base no conhecimento da relação estrutura-funcional da proteína do vírus HIV-1 Nef,⁶⁹ foram selecionados domínios de interação de substratos celulares, SH3, β 2, CD4, VHS e as sequências de sinal lipídicas N-terminal miristoíla (MGxxxS) e C-terminal farnesila (CVLS) para a síntese de inibidores por envolvimento da proteína viral. Estes elementos foram ligados no meio intracelular em várias combinações, resultando em quatro gerações de proteínas de fusão NI. Estas proteínas de fusão foram projetadas para interagirem simultaneamente com vários sítios de ligação, o que permitiu uma maior afinidade e especificidade com a proteína viral Nef.^{106,107} Desta maneira, foi comprovado que a ação da proteína viral Nef exige diferentes fatores independentes e que a inibição destes fatores anula a infectividade do vírus HIV-1. Apesar da ausência de citotoxicidade, o uso de anti-infecciosos com base na expressão intracelular de proteínas inibidoras NI apresenta limitações farmacocinéticas que impedem a sua exploração terapêutica no combate à infecção pelo vírus HIV.^{108,109}

¹⁰⁶ Arkin, M. R.; Wells, J. A.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 301.

¹⁰⁷ Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W.; *Science* **1996**, 274, 1531.

¹⁰⁸ Yamamoto, T.; Samri, A.; Marcelin, A. G.; Mitsuki, Y. Y.; Vincent, C.; *AIDS* **2009**, 23, 2265.

¹⁰⁹ Christ, F.; Voet, A.; Marchand, A.; Nicolet, S.; Desimmie, B. A.; *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 442.

2. Objetivos

Por meio do conhecimento do mecanismo da primeira etapa de ação da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 na modulação negativa do CD4 serão utilizadas técnicas de modelagem molecular visando uma abordagem direta e indireta no planejamento racional de possíveis moléculas inibidoras da proteína Nef do vírus HIV-1.

Em uma segunda etapa, estabelecer uma metodologia sintética dos compostos que apresentarem ação inibidora da proteína viral Nef, baseada no resultado dos cálculos de modelagem molecular.

E, por último, realizar testes de atividade farmacológica para determinar os níveis de expressão de CD4 na presença de Nef e de seus possíveis antagonistas.

3. Resultados e Discussões.

3.1 – Planejamento Racional da Nova Classe de Inibidores de HIV-1- Nef.

O Protein Data Bank é uma base de dados sobre proteínas com ênfase em dados estruturais. Estes dados estruturais são convertidos em um arquivo de extensão “PDB” que aberto por diferentes softwares gera uma representação tridimensional e interativa da proteína estudada.¹¹⁰ O conhecimento da topografia molecular tridimensional da Nef e a definição de seus sítios catalíticos, responsáveis pela degradação do CD4 (Tabela 1),^{68,69,70} disponibilizados no banco de dados PDB, nos possibilitou a realização de um estudo de interação por homologia entre a proteínal viral Nef, o antibiótico Ikarugamicina e os possíveis inibidores da internalização do CD4 mediada por Nef.

Tabela 1: Resíduos e motivos associados à degradação do CD4 pela Nef.⁷¹

Motivos / Resíduos	Substrato	Função
WL(57,59), G(95,96) L(97), R(106), I(109) e L(110)	CD4	Modulação negativa
Mot.Dileucina(D/E)xxxLL(160-165), DD(174,175) e EE ^{155,156}	AP2 complexo V-ATPase	e Interação entre Nef e AP2
EE(155, 156)	CD4	Endereçamento para o endossoma e lisossoma tardio

Com a colaboração do Professor Dr. João Batista Lopes, do Laboratório de Modelagem Molecular, do Instituto de Química da Universidade de Brasília, a estrutura tridimensional da Ikarugamicina com os seus sítios catalíticos associados à degradação do CD4 por Nef (Tabela 1) foram geradas e otimizadas pelo

¹¹⁰ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.maio> do, acessada em 15 de maio de 2009

programa Cache[®], utilizando o método semi-empírico PM3/Mosaime.¹¹¹ Os métodos semi-empíricos, na aplicação do princípio da mecânica quântica,¹¹² consideram somente os elétrons da camada de valência. Em virtude da complexidade dos sistemas analisados, todos os cálculos realizados neste estudo fizeram o uso do método semi-empírico PM3/Mosaime (Figura 10). Após este tratamento matemático, podemos supor que não ocorreram distorções na estrutura da Ikarugamicina e dos sítios catalíticos para a degradação do CD4 da Nef com a possível formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos, e que não existem átomos não-ligados interagindo em uma mesma região do espaço, a existência destes átomos provocariam repulsão estérica e eletrostática, diminuindo a confiabilidade da análise teórica.

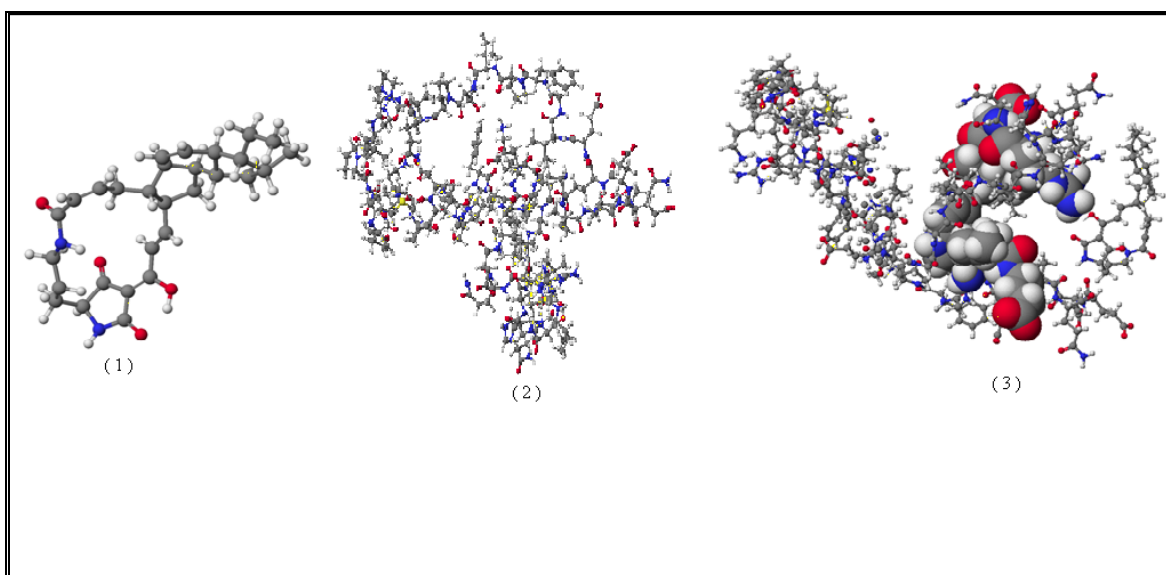


Figura 10: (1) Ikarugamicina; (2) Nef; (3) Complexo de Nef: os resíduos de interesse para a degradação do CD4 da Nef interagindo com a Ikarugamicina

Após a otimização das estruturas 1, 2 e 3 pelo método semi-empírico, (Figura 10) foi realizado o cálculo da variação de energia de interação entre Nef e

¹¹¹ Salvador, C. E. M.; Andrade, C. K. Z.; Martins, J. B. L.; 33^a Reunião Anual da SBQ, 2010.

¹¹² Anna, S.; Carlos, M. R.; *Virtual Quim.* 2009, 1, 49.

a Ikarugamicina. A variação de energia de interação foi calculada com base na equação $\Delta E = E_{cp} - E_{I(EM + ENef)}$, onde E_{cp} corresponde à energia de formação do complexo Nef e E_I consiste na energia de formação de Nef mais a energia de formação dos antagonistas isolados (Figura 10). O valor correspondente ao ΔE de interação entre Ikarugamicina e os resíduos de interesse para a degradação do CD4 por Nef foi de - 4,8374 kcal/mol.

Em função do mecanismo de ação antecipado e pretendido para as novas estruturas antagonistas de Nef e a homologia entre vários domínios de resíduos protéicos das proteínas auxiliares do vírus HIV-1, Vif e Nef, elegeu-se um padrão inicial para o design do candidato líder a inibidor da modulação negativa do CD4 realizada pela Nef, tendo como base as pequenas moléculas inibidoras de Vif representadas na Figura 11.¹¹³

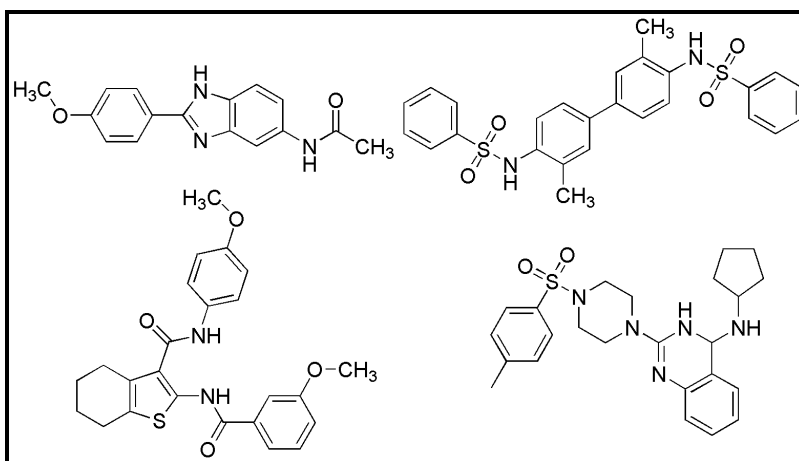


Figura 11: Pequenas moléculas inibidoras de Vif.¹¹²

A princípio, foram desenhados e otimizados quatro compostos (Figura 12). Estes compostos foram denominados Ikeda em homenagem ao grande escritor, filósofo e pacifista Dr. Daisaku Ikeda.²⁷

¹¹³ Nathans, R.; Cao, H.; Sharova, N.; Ali, A.; Sharkey, M.; Stranska, R.; Stevenson, M.; Rana, M. T.; *Nature Biotech.* **2008**, 26, 1187.

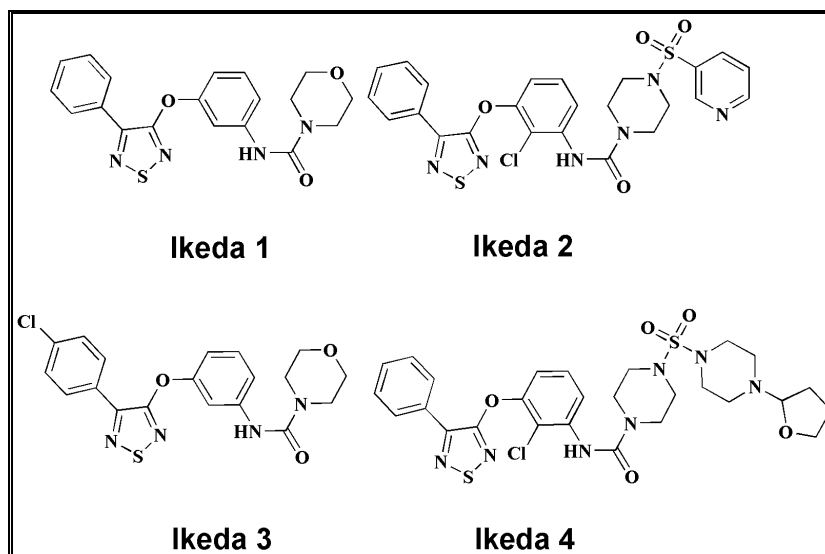


Figura 12: Moléculas protótipo para inibidor de Nef.

Com o intuito de determinar similaridades entre a estrutura química e a atividade biológica por meio da comparação entre a variação de energia de interação entre Nef e a Ikarugamicina, foi realizado o cálculo da energia de interação entre as moléculas Ikeda e a proteína viral Nef (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de ΔE para a Ikarugamicina e os protótipos antagonista de Nef.

Composto	Complexo	Nef	Molécula	ΔE (kcal/mol)
Ikarugamicina	-2536,6781	-2387,8263	-144,0144	-4,8374
Ikeda 1	-2618,1487	-2599,4219	-21,3504	2,6236
Ikeda 2	-2406,5424	-2387,8263	-15,9147	-2,8014
Ikeda 3	-2322,9406	-2387,8263	65,8321	-0,9464
Ikeda 4	-2430,9779	-2387,8263	-44,9847	1,8331

Os valores de energia de interação (Tabela 2) nos permitiram eleger como composto líder a molécula Ikeda 2. O composto **Ikeda 2** demonstrou um valor mais baixo de energia de interação, apresentando um resultado mais próximo ao obtido pela Ikarugamicina. Desta maneira, o composto **Ikeda 2** foi escolhido como protótipo líder. No intuito de otimizar o valor da energia de interação entre a proteína viral Nef e o composto Ikeda 2, foram propostas algumas mudanças estruturais no composto líder. Estas foram idealizadas a partir da estratégia de

simplificação molecular e bioisosterismo clássico.¹¹⁴ O composto líder foi dividido em três regiões: A e C aromáticas; B espaçador (Figura 13).

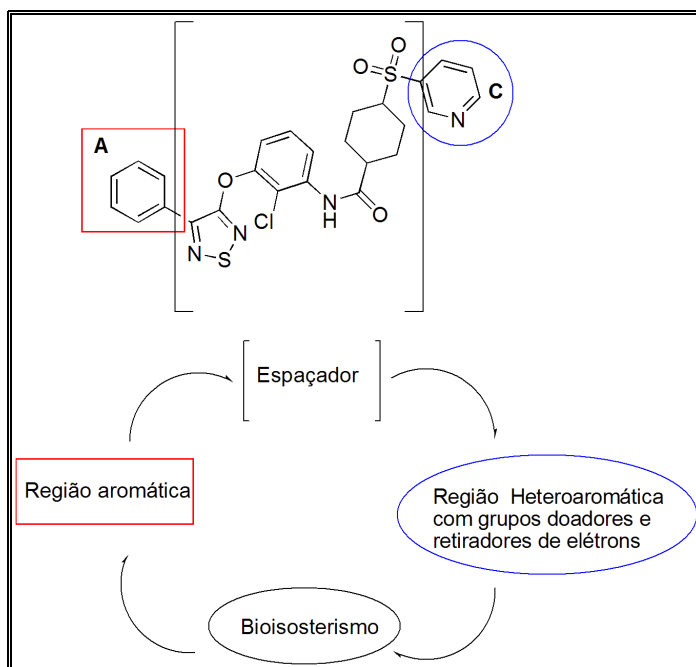
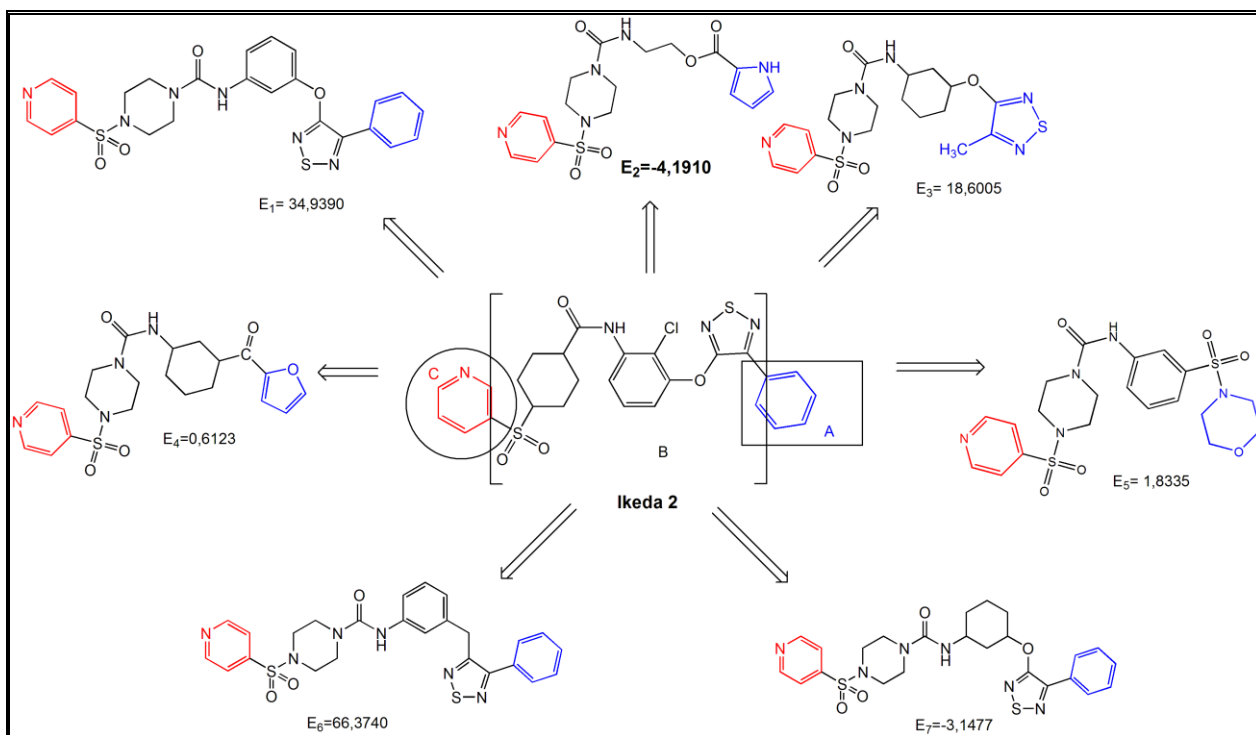


Figura 13: Estratégia para o desenho de novos inibidores de HIV-1 Nef a partir do protótipo Ikeda 2.

Com o uso da estratégia de simplificação molecular e a divisão do composto líder em três regiões (Figura 13), uma série de modificações estruturais foram introduzidas na estrutura do protótipo **Ikeda 2**, dando origem à segunda geração de prováveis inibidores da proteína viral Nef (Esquema 3).

¹¹⁴ Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **2002**, 25, 1172.



Esquema 3: Segunda geração de prováveis inibidores da proteína HIV-1 Nef. Os valores para a energia de interação (E) foram calculados em kcal/mol.

Os análogos propostos a partir do composto líder **Ikeda 2** sofreram mudanças nos fragmentos A e C como a troca dos anéis aromáticos por núcleos isostéricos com diferentes contribuições eletrônicas e a introdução de grupos em C com diferente perfil stereoeletrônico. Dentre os análogos obtidos, o composto **2** apresentou melhor padrão de energia de interação ($\Delta E = -4,1910$ kcal/mol) com a Nef. No análogo **2**, nas regiões A e C, foi introduzido o heteroátomo Nitrogênio, o que provocou o aumento da densidade eletrônica nesta região. Dentre as mudanças sofridas pelo composto, a mais drástica em relação aos demais análogos foi à adição de um espaçador constituído por uma cadeia linear de carbonos entre as regiões A e C. Neste contexto, as trocas por diferentes grupos em A, B e C na estrutura química do análogo **2** podem contribuir na definição de um provável sítio de interação entre a proteína viral Nef e seus possíveis antagonistas. Tomando como modelo o análogo **2**, foi proposta uma nova geração

de moléculas antagonistas de HIV-1 Nef planejadas de forma a otimizar os padrões de energia de interação e conduzir a uma rota sintética linear com poucas etapas (Figura 14).

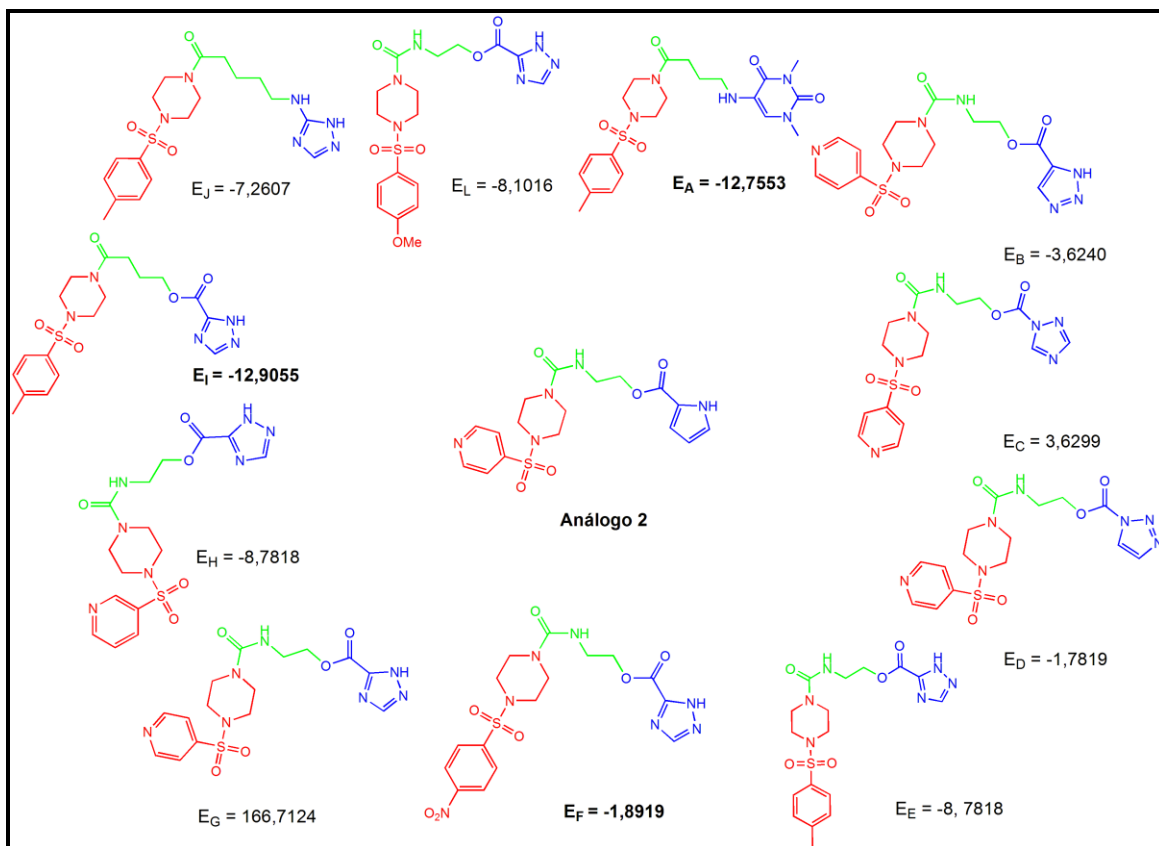


Figura 14: Inibidores de terceira geração da proteína HIV-1 Nef com os seus valores de energia de interação (kcal/mol) .

Os derivados **A** e **I** da terceira geração de inibidores de Nef se destacaram por apresentarem valores elevados para a variação de energia de interação (Figura 14). Estes confirmam a hipótese da importância de um espaçador entre as regiões A e C constituído por uma cadeia linear de carbonos. Com a adição do anel triazólico e da uracila na região C, aumentamos a densidade eletrônica o que demonstra a importância da presença de grupos doadores de elétron, nesta região para o aumento da energia de interação com os resíduos da proteína viral Nef.

Com o intuito de determinar similaridades entre a estrutura química e a atividade biológica entre os dois análogos (**A e I**) e a Ikarugamicina, foi realizada uma análise comparativa com a Ikarugamicina utilizando os métodos da relação quantitativa entre estrutura química e atividade (QSAR). Estes métodos correlacionam as afinidades de ligantes a seus sítios de ligação, seja proteína ou receptor de membrana; a constante de velocidade e outras atividades biológicas com certas características estruturais (análise de Free Wilson); e as propriedades moleculares de grupo ou atômicas, tais como lipofilicidade, polarizabilidade, eletrônicas e estéricas (análise de Hansch) com a atividade farmacocinética desejada.^{115,116}

Foram calculadas algumas propriedades QSAR-3D e estes cálculos foram aplicados através do programa HyperChem[®]. A análise do gráfico 1 demonstra que os análogos **A e I** possuem semelhanças químicas com a Ikarugamicina. Para esta análise, foram calculados o Log P, a energia de hidratação e a polarizabilidade (Gráfico 1).

O Log P determina o melhor perfil de biodisponibilidade das estruturas, quanto maior for os valores de Log P, maior será a tendência das moléculas ultrapassarem as membranas hidrofóbicas. Valores altos de energia de Hidratação determinam a facilidade do transporte dos compostos na fase medicamentosa. A polarizabilidade relaciona a facilidade de interação do composto com o seu alvo terapêutico (farmacodinâmica).^{114,115} Os resultados observados no Gráfico 1 demonstram uma similaridade entre a Ikarugamicina e os análogos de terceira geração **A e I**, o que demonstra que estes compostos são de interesse sintético.

¹¹⁵ Kubinyi, H.; *Drug Discov. Today* **1997**, 11, 457.

¹¹⁶ Kubinyi, H.; *Drug Discov. Today* **1997**, 12, 538.

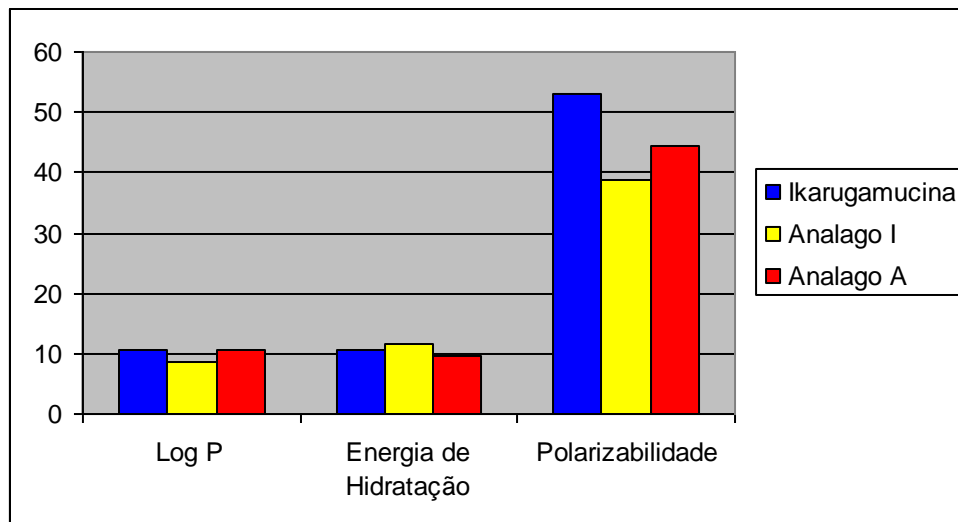
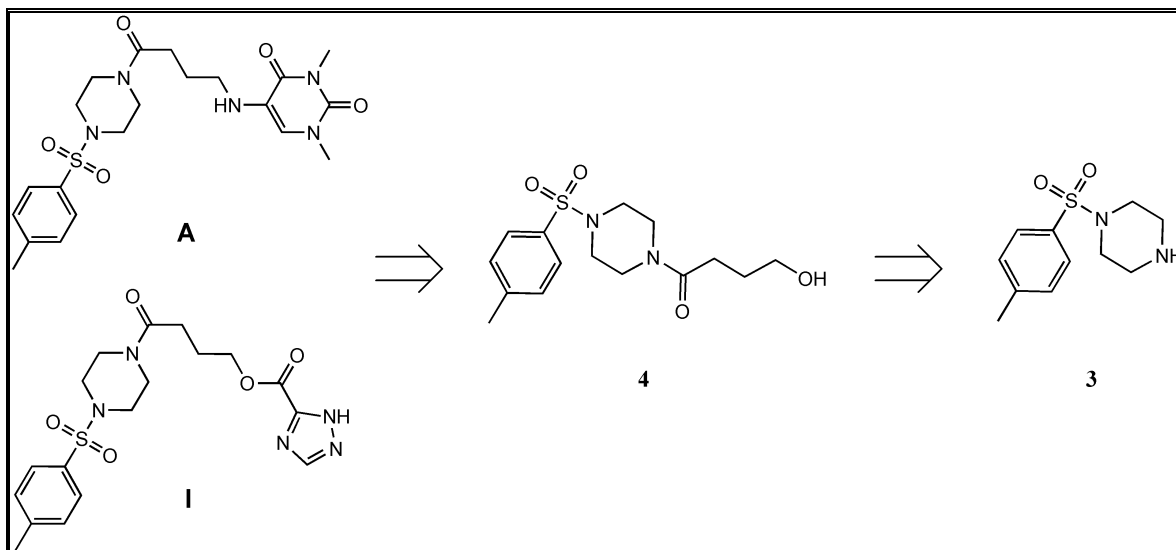


Gráfico 1: Valores de Energia de Hidratação (kcal/mol), Log P e Polarizabilidade (Å), para os análogos **A**, **I** e a Ikarugamicina.

3.2 – Proposta de Rota Sintética Para os Análogos **A** e **I**

Terminada a etapa dos cálculos de modelagem molecular, chegou-se às estruturas dos compostos **A** e **I**, que podem eventualmente apresentar atividade antagonista à modulação negativa do CD4 realizada pela proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1. Fazendo a análise retrossintética dos compostos líderes **A** e **I**, verificou-se inicialmente que estes poderiam ser sintetizados em duas etapas idênticas, variando somente a última etapa da síntese. Dessa forma, a síntese dos compostos **A** e **I** ficou dividida em três etapas: síntese dos fragmentos **3** e **4** o acoplamento dos fragmentos distintos de cada estrutura (Esquema 4).

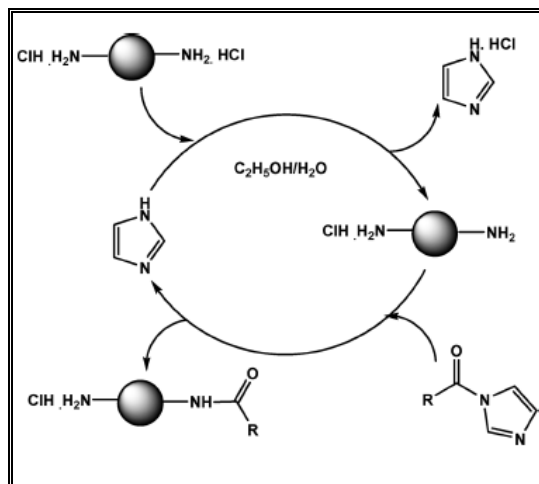


Esquema 4: Proposta retrossintética dos compostos **A** e **I**.

3.2.1 - Síntese dos Fragmentos 3 e 4.

Como consequência da enorme importância da sulfonação e acilação de diaminas simétricas para a síntese de inúmeros fármacos, Kaushik e colaboradores recentemente propuseram um método para a monoacilação de diaminas simétricas.¹¹⁷ Este método consiste na utilização da monotosilação seletiva por meio da reação com tosil imidazol e diaminas, na presença de uma fonte de ácido (Esquema 5).

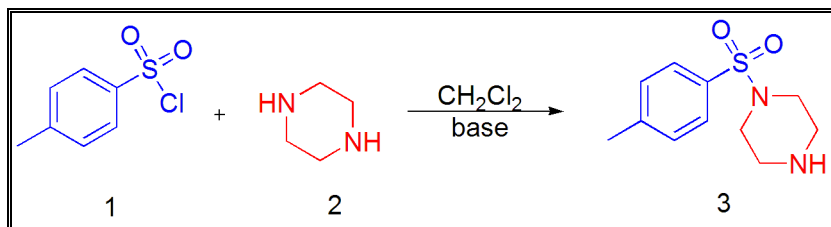
¹¹⁷ Verma, S. K.; Acharya, B. N.; Kaushik M. P.; *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4232.



Esquema 5: Monoacilação seletiva de diaminas simétricas.¹¹⁶

Na primeira etapa do ciclo catalítico (Esquema 5), ocorre a adição de uma quantidade catalítica do imidazol à solução do cloridrato da piperazina, convertendo o dicloridrato de piperazina em monocloridrato. Na segunda etapa, ocorre a reação da piperazina monohidrocloreto com o tosilimidazol, formando a piperazina monotosilada sem a necessidade do uso de um grande excesso da piperazina. A formação seletiva do monohidrocloreto da piperazina e o uso do tosilimidazol são essenciais para a formação de diaminas monotosiladas.¹²⁰

A síntese do fragmento **4** foi iniciada por meio de uma rota sintética realizada pela sulfonação da piperazina (**2**) a partir do cloreto de tosila (**1**) (Esquema 6). Para esta etapa, o maior desafio seria obter como produto majoritário a piperazina monosulfonada (**3**) sem a necessidade da proteção de um de seus nitrogênios, haja vista a possibilidade da obtenção como subproduto da piperazina bisulfonada, tendo como consequência a diminuição do rendimento da reação, comprometendo a rota sintética proposta.



Esquema 6: Sulfonação da piperazina (**2**) a partir do cloreto de tosila (**1**).

Analisando as metodologias de sulfonação de aminas com o composto **1**, o composto **2** foi submetido a diferentes condições experimentais para a formação da piperazina monossulfonada (Tabela 3).^{118, 119, 120}

Tabela 3: Condições experimentais para sulfonação do composto **1**.

Entr.	Condições de reação	Rendimento
1	TsCl (1 eq), Piperazina (2 eq), Et ₃ N (1 eq), CH ₂ Cl ₂ , TA	31 %
2	TsCl (1 eq), Piperazina (5 eq), Et ₃ N (1,5 eq), CH ₂ Cl ₂ , TA	53 %
3	TsCl (1 eq), Piperazina (2 eq), Piridina (1 eq), CH ₂ Cl ₂ , TA	80 %
4	TsCl (1 eq), Piperazina (5 eq), Piridina (1,5 eq), CH ₂ Cl ₂ , TA	97 %

O melhor rendimento para esta etapa foi alcançado ao realizarmos a troca da base, trietilamina pela piridina, e o aumento do número de equivalentes da piperazina. A necessidade do aumento de equivalentes do composto **2** para um melhor rendimento ocorre porque a piperazina monossulfonada é mais solúvel em solvente orgânico polar aprótico do que a piperazina.¹²⁰ Desta maneira, a piperazina monossulfonada reage preferencialmente com o cloreto de tosila formando o produto bisulfonado.¹²¹

¹¹⁸ Vachal, P. et al.; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2550.

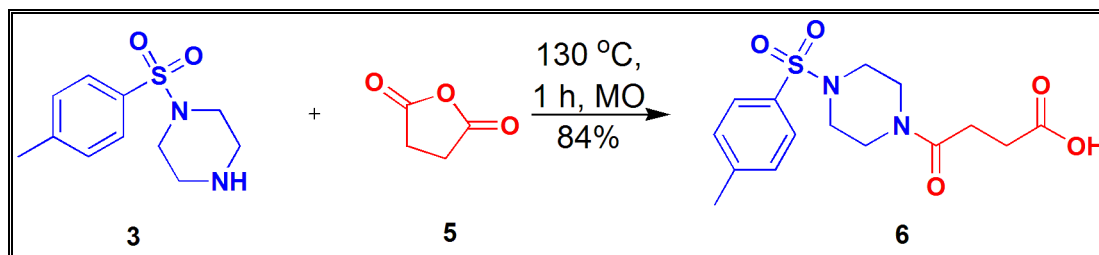
¹¹⁹ Parai, K. M.; Panda, G.; Srivastava, k.; Puri, K. S.; *Méd. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 776.

¹²⁰ Aertgeerts, Kathleen; Brennan, Nancy, K.; Cao, Sheldon, X.; Chang, Edcon; Kiryanov, Andre, A.; Liu, Y.; **2006**, 1041263 (CAN 145:419173)

¹²¹ Wang, E. C; Zhang, Z.; Meanwell, A. N.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7661.

A obtenção do composto **3** foi confirmada por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H , são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque aos dois sinais de multipletos em δ 7,66 – 7,60 (m, 2 H) e 7,36 – 7,30 (m, 2 H) referentes aos hidrogênios aromáticos. Já no RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **3**, com destaque para os 4 sinais δ 143,6 – 127,8, indicativos dos carbonos aromáticos.

Para a síntese do fragmento **4**, foi proposta uma rota sintética baseada na abertura do anidrido succínico pelo fragmento **3** (Esquema 7). A reação de clivagem do anidrido succínico descrita na literatura muitas vezes necessita de condições de refluxo que demandam mais tempo e o uso de catálise por um ácido de Lewis.^{122, 123} Devido às vantagens das reações assistidas por microondas, foi realizada a abertura do anidrido succínico (**5**) com o fragmento **3**. Comprovando a eficiência das reações assistidas por microondas, o composto **6** foi obtido sem o uso de catálise alcalina e solvente, com um rendimento de 84% (Esquema 7).



Esquema 7: Abertura do anidrido succínico com o composto **3**.

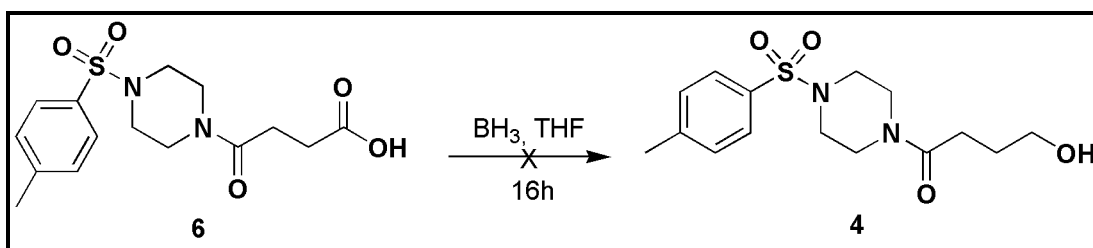
A obtenção do composto **6** foi confirmada pela espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque ao sinal de multipletos em δ 2,65 – 2,48 (m, 4 H), relativos aos 4 hidrogênios vizinhos a carbonila. Já no RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **6**, com destaque para os

¹²² Hou, D. R.; Cheng, H. Y.; Wang, E.; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6094.

¹²³ Cheng, H. Y.; Hou, D. R.; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3000.

sinais δ 177,1 e 169,9, indicativos da formação das carbonilas da função ácida e amida, decorrente da abertura do anidrido acético.

Posteriormente, na tentativa de obtenção do composto **4**, foi realizada sem sucesso a redução do grupo carboxila a álcool do composto **6** (Esquema 8).¹²⁴ O êxito desta metodologia pode ter sido comprometido pela suposta má qualidade do BH_3 disponível em nosso laboratório. A análise do espectro de RMN ^1H revelou a presença da matéria-prima, o que nos conduziu ao teste de uma nova metodologia para a síntese do fragmento **4**.



Esquema 8: Tentativa de redução do grupo carboxila composto do **6** a álcool.

Para esta nova metodologia, inicialmente foi realizada a abertura da γ -butirolactona (**7**) com a piperazina (**2**), à elevada temperatura durante 16 horas.¹²⁵ Estas condições experimentais forneceram o composto **8** com um rendimento de 64% (Esquema 9). Devido à sua alta reatividade e o seu elevado valor como intermediário sintético, a clivagem de lactonas cíclicas é um processo comumente usado em laboratório de síntese de compostos orgânicos e na indústria farmacêutica.^{126, 127} Porém, este tipo de clivagem muitas vezes necessita de condições reacionais drásticas como elevada temperatura e pressão.¹²⁸ Nas condições de temperatura ambiente, o composto **8** foi posteriormente sulfonado,

¹²⁴ Yoon, N. M.; Pak, C. S.; Brown, H. C.; Krishnamurthy, S.; Stocky, T. P.; *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786.

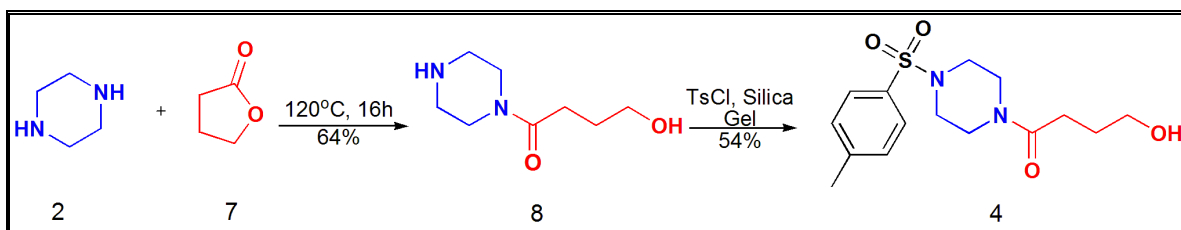
¹²⁵ Ludwig, H. S; **1987**, 477834 (CAN 107:77834)

¹²⁶ Kambur, N. E.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Hedrick, J. L.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5813.

¹²⁷ Krysko, A. A.; Yatsyuk, D. I.; Kabanov, M. V.; Kabanova, A. T.; Karaseva, T. L.; Andronati, S. A.; *Pharma. Chem. J.* **2003**, *37*, 145.

¹²⁸ Matsumoto, K.; Hashimoto, S.; Uchida, T.; Okamoto, T.; Otani, S.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3138.

utilizando uma metodologia simples para a síntese de sulfonamidas através da condensação de aminas com cloreto de tosila, catalisada por sílica gel sem o uso de solventes.¹²⁹ Desta maneira, o composto **4** foi obtido com um rendimento de 54%, eliminando assim a necessidade de uma etapa de redução do composto **6** (Esquema 9).



Esquema 9: Nova metodologia para a síntese do composto **4**.

Para o composto **8**, no espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque ao sinal multiplete em δ 3,65 – 3,35 (m, 6 H), que comprovam a abertura γ -butirolactona (**7**) e a formação da amida. Já a formação do composto **4** foi confirmada pela espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque ao sinal de tripleto em δ 3.73 - 3.55 relativo ao grupo metileno ligado a hidroxila. Já no RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **4**, com destaque para os sinais δ 171,7, indicativos da formação da amida decorrente da abertura da γ -butirolactona (**7**), os sinais do carbono ligado à hidroxila terminal do composto **4** em δ 62,1 e os sinais já descritos na literatura,¹³⁰ em δ 44,8 e 40,8 dos carbonos. Estes sinais δ diferentes dos carbonos vizinhos a amida são justificados pelo fato de a amida apresentar rotação lenta.

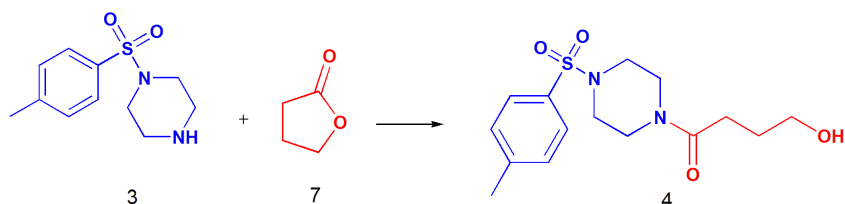
Os rendimentos moderados na síntese do composto **4** nas metodologias anteriormente citadas nos incentivaram a realizar uma nova investigação metodológica. Na tentativa de melhorar o rendimento e diminuir o número de

¹²⁹ Jafarpour, A.; Rezaeifard, A.; Aliabadi, M.; *Appl. Cat. A: Gen.* **2009**, *358*, 49.

¹³⁰ Lalli, C.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, A.; *Synlett*, **2008**, *2*, 189.

etapas para a obtenção do composto **4**, os compostos **3** e **7** foram submetidos a diferentes condições experimentais (Tabela 4).

Tabela 4: Condições experimentais para a reação de abertura da γ -butirolactona (**7**) com o composto **3**.



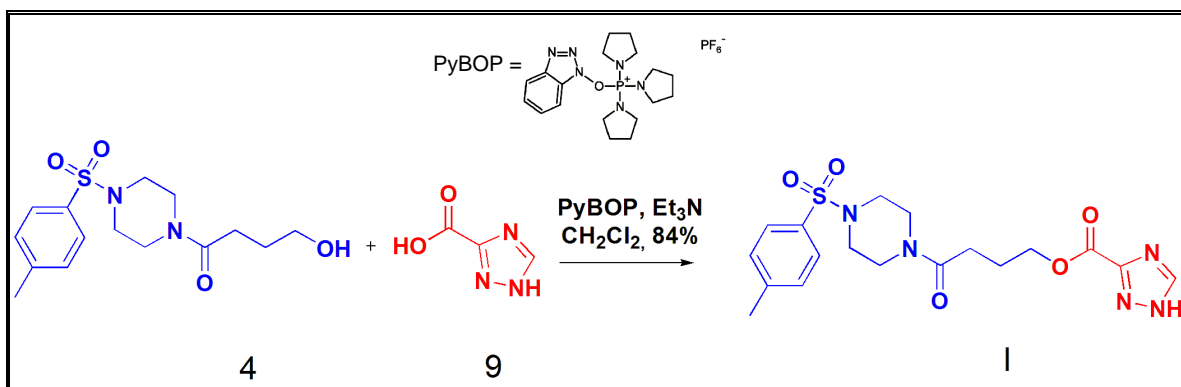
Condições experimentais					
Entrada	Tempo (h)	Temperatura °C	Catalisador	Solventes	Rendimento (%)
1	15	Refluxo	Piridina	Tolueno	0
2	15	Refluxo	Et ₃ N	Metanol	0
3	0,25	Refluxo	Et ₃ N	CH ₂ Cl ₂	0
4	0,5	90/ MO	Et ₃ N	CHCl ₃	0
5	0,5	90/ MO	DMAP	CHCl ₃	0
6	1,5	90/ MO	Et ₃ N	CHCl ₃	0
7	1,5	100/ MO	Et ₃ N	AcOEt	0
8	72	60°C/ Reator (120 atm)	Et ₃ N	CHCl ₃	0
9	1	40/MO	LiCl	CH ₂ Cl ₂	0
10	2	TA	DIBAL-H	THF	0
11	18	130	-	-	73
12	1	130/MO	-	-	79

Dentre as diferentes condições experimentais tais como, troca da base, temperatura de refluxo, troca do solvente, uso de reator de elevada pressão e reator de microondas, as condições experimentais das entradas **11** e **12** apresentaram bons rendimentos (73% e 79%, respectivamente) e menor tempo reacional para a síntese do composto **4** (Tabela 4). Desta forma, a metodologia apresentada no esquema na Tabela **4** supera em rendimento e em número de etapas as metodologias proposta no esquema **9**. Em todas estas metodologias a formação do composto **4** foi confirmada por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C.

3.2.2 - Acoplamento dos Fragmentos Finais dos Compostos A e I.

Composto I

Para a terceira e última etapa da síntese do possível inibidor da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1, o composto **I** foi sintetizado pelo acoplamento do fragmento **4** com o 1,2,4-triazol-3-ácido carboxílico (**9**) (Esquema 10). Alguns agentes acoplantes foram testados, como DCC/DMAP,¹³¹ EDC¹³² e PyBOP.¹³³ Devido a dificuldades de solubilidade do composto **9**, o único agente acoplante a fornecer como produto o composto **I** foi o PYBOP, com um rendimento de 84%.



Esquema 10: Acoplamento do fragmento **4** ao 1,2,4-Triazol-3-ácido carboxílico (**9**), etapa final da síntese do possível inibidor da proteína auxiliar do vírus HIV-1 Nef composto **I**.

A obtenção do composto **I** foi confirmada por espectroscopia de RMN ¹H e ¹³C. No espectro de RMN de ¹H são observados todos os sinais esperados para

¹³¹ Andrade, C. K. Z.; Rocha, R. O.; Vercillo, O. E.; Silva, W. A.; Matos, R. A. F.; *Synlett* **2003**, 15, 2351.

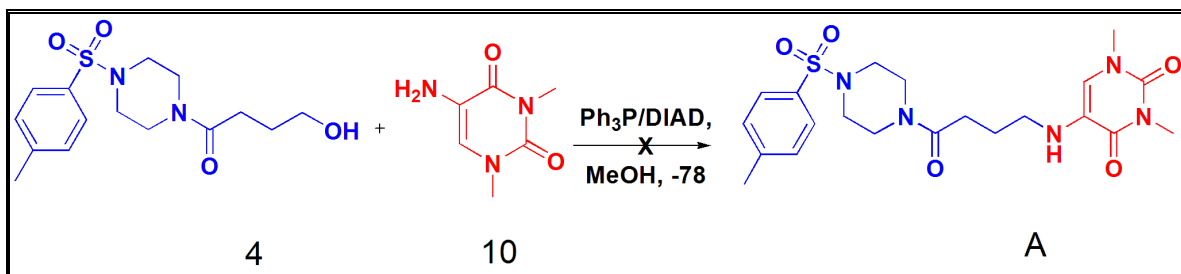
¹³² Muñoz, L.; Bosch M. P.; Rosell, G.; Guerrero A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 420.

¹³³ Coste, J.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 205.

esta substância, com destaque ao sinal do singlete em 8,53 (s,1 H), relativo ao hidrogênio do anel triazólico e o sinal do tripleto em 4,36 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H) relativo aos dois hidrogênios vizinhos a carboxila. No RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto I, com destaque para os sinal em δ 160,5, indicativos da formação do ester decorrente do acoplamento do composto **9** ao composto **4**.

Composto A

Realizada a síntese do composto I, partimos para a síntese do composto A pelo acoplamento do fragmento **4** com a 5-amino-1,3-dimetiluracila (**10**), disponível em nosso laboratório, utilizando a metodologia da reação de Mitsunobu (Esquema 11).¹³⁴ Não foi obtido êxito nesta metodologia. O uso de metanol como solvente pode ter provocado uma competição entre o solvente e o composto **4**, desfavorecendo a formação do composto A. A análise do espectro de RMN ^1H revelou os picos característicos das matérias-primas envolvidas.



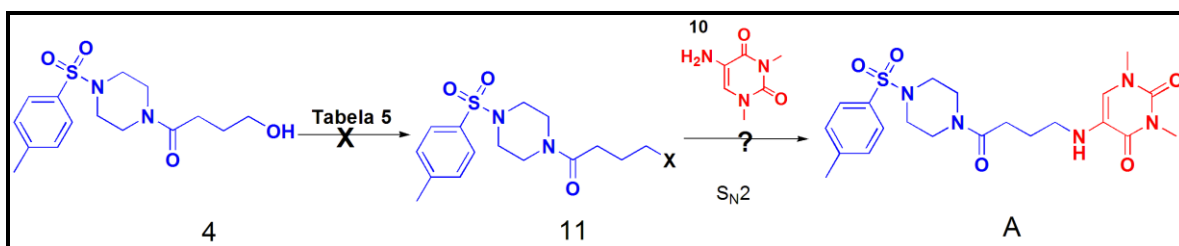
Esquema 11: Reação de Mitsunobu para obtenção do composto **2**.

Devido à falta de êxito na metodologia de Mitsunobu para o acoplamento do fragmento **4** com o composto **10**, foi proposta uma nova metodologia para a

¹³⁴ Kumara Swamy, C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar K. V.P.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551.

síntese do composto **A**, onde o composto **4** foi submetido a diferentes condições experimentais (**Tabela 5**), na tentativa da conversão da hidroxila terminal a um bom grupo abandonador. Após esta conversão, o composto **11** seria utilizado na reação de S_N2 com 5-amino-1,3-dimetiluracila (**4**) (Tabela 5).

Tabela 5: Métodos para conversão da hidroxila terminal do composto **4** em um bom grupo abandonador.



Entrada	Condições de reação
1	MeI, DCC, THF, CH ₂ Cl ₂ , TA
2	CBr ₄ , Ph ₃ P, CH ₂ Cl ₂ , TA
3	TsCl, Piridina, CH ₂ Cl ₂ , TA
4	TsCl, Et ₃ N, DMAP, CH ₂ Cl ₂ , TA

Na Tabela 5, encontram-se os diferentes métodos utilizados para a conversão da hidroxila terminal do composto **4** a um bom grupo abandonador.^{135, 136, 137} Todas as tentativas não obtiveram êxito, recuperando-se a matéria-prima.

3.2.3 – Novas Propostas de Rota Sintética Para a Síntese do Composto **A**.

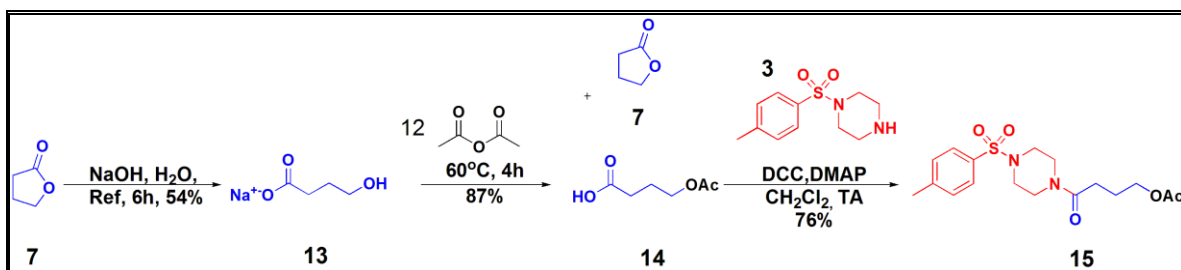
Em decorrência da ineficiência das metodologias realizadas anteriormente para a síntese do composto **A**, foi idealizada uma nova rota sintética partindo da

¹³⁵ Harmata, M.; Hong, X.; Schreiner, P. R.; *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1290.

¹³⁶ Baugman, T. W.; Sworen, C. J.; Wagner, B. K.; *Tetrahedron* **2004**, 60, 10943.

¹³⁷ Kazemi, F.; Massah, A. R.; Javaherian, M.; *Tetrahedron* **2007**, 63, 5083.

preparação do sal da γ -butirolactona (**7**),¹³⁸ da reação deste sal (**13**) com anidrido acético (**12**)¹³⁹ e do acoplamento da piperazina sulfonada (**3**), utilizando como agente acoplante DCC/DMAP, ao composto **14**.¹²⁹ Todas estas etapas foram realizadas com bons rendimentos, obtendo-se assim o composto **15** (Esquema 12).



Esquema 12: Rota sintética para a síntese do composto **15**.

Para o composto **13**, no espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque ao sinal tripleto em δ 3.57 (t, $J = 6.5$ Hz, 2 H), relativo ao CH_2 carbinólico que comprovam a abertura γ -butirolactona (**7**). A formação dos compostos **14** e traços da formação do composto **7** foi confirmada por espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C . No espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para a substância **14**, com destaque ao deslocamento do tripleto anterior para δ 4.09 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H), que comprova a esterificação do álcool primário e os sinais em 4.35 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H) que comprovam a formação do composto **7**.¹⁴⁰ Já no RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **14**, com destaque para o sinal em δ 172.9, da carbonila éster e o sinal em δ 177.95 da formação da carbonila da Lactona.¹⁴¹ A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C revelou os sinais relativos à formação do composto **15**. No espectro de RMN de ^1H , são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque aos dois sinais de multipletos em δ 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H), 7.35 (d, $J = 8.0$ Hz, 2 H), referentes aos

¹³⁸ Shim, J. Y.; Kim, Y.; Lee, E. H.; Lee, Y. T.; Lee, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11551.

¹³⁹ Goto, G.; Okamoto, K.; Okutani, T.; Imada, I.; *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4422.

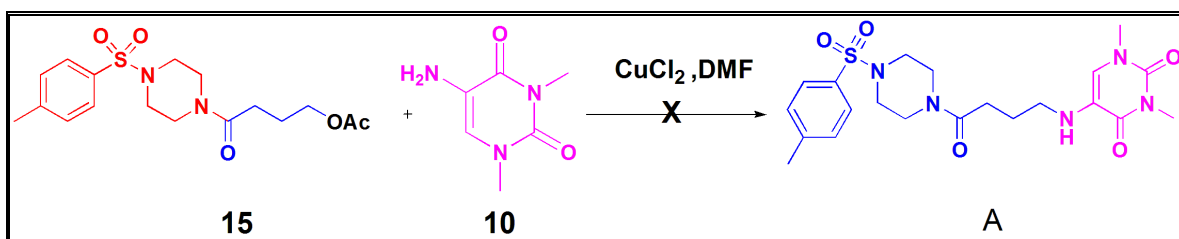
¹⁴⁰ http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/img_disp.cgi?disptype=disp3&imgdir=hsp&, acessado em 8 de agosto de 2011.

¹⁴¹ http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/img_disp.cgi?disptype=disp3&imgdir=cdsp&, acessado em 8 de agosto de 2011.

hidrogênios do anel aromático. No RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **15**, com destaque para os sinais δ 177,1, indicativos de que houve a formação da carbonila da amida.

O composto **15** foi submetido a cálculos teóricos de interação com a proteína viral Nef onde demonstrou ser uma estrutura relevante para a realização dos testes farmacológicos por apresentar $\Delta E = -7,8336$ kcal/mol.

O composto **15** foi utilizado na reação de $\text{S}_{\text{N}}2$ com 5-amino-1,3-dimetiluracila (**10**) (Esquema 13).¹⁴² Não foi obtido êxito nesta reação, recuperando-se a matéria-prima. Este fato nos levou a inferir que o composto **10** disponível em nosso laboratório poderia estar adulterado.



Esquema 13: Tentativa de reação de $\text{S}_{\text{N}}2$ do composto **10** com o composto **15** para a síntese do composto **A**.

Após investigações bibliográficas¹⁴³ e medindo o ponto de fusão do composto **10**, disponível em nosso laboratório, chegamos à conclusão de que este composto na realidade correspondia ao composto 6-amino-1,3-dimetiluracila (Figura 15) e que a substância de interesse (**10**) não está disponível comercialmente. Desta maneira, partimos para a síntese do composto 5-amino-1,3-dimetiluracila.

¹⁴² Yuan, C.; Chang, C.; Axelrod, A.; Dionicio, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5924.

¹⁴³ http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=A52153/BRAND_KEY&F=SPEC, acessada em 23 de novembro de 2010.

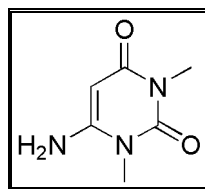
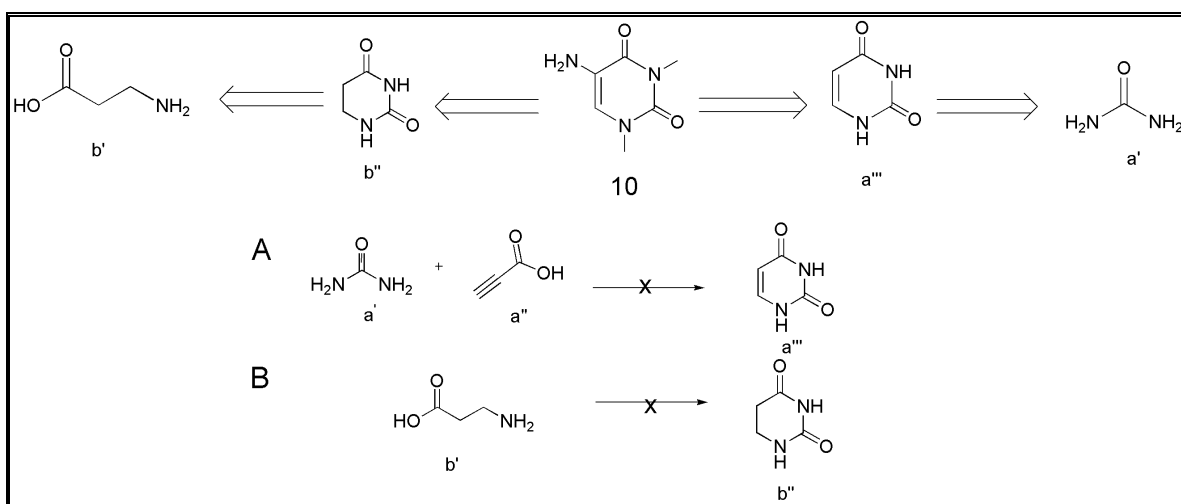


Figura 15: 6-amino-1,3-dimetiluracila.

A partir de duas propostas retrossintéticas encontrada na literatura (Esquema 14) para a síntese da 5-amino-1,3dimetiluracila (**10**), inúmeras tentativas foram realizadas, sem sucesso, para a síntese deste composto.^{144, 145,146} O insucesso destas metodologias testadas pode ser atribuído à má qualidade dos reagentes disponíveis em nosso laboratório.



Esquema 14: Duas propostas de retrossíntese do composto 5-amino-1,3dimetiluracila (**10**); **(A)** Tentativa de síntese do intermediário **a'''** a partir da uréia (**a'**) e do ácido propiônico (**a''**);^{143,144} **(B)** Tentativa de síntese do intermediário **b''** a partir da β-alanina (**b'**).¹⁴⁵

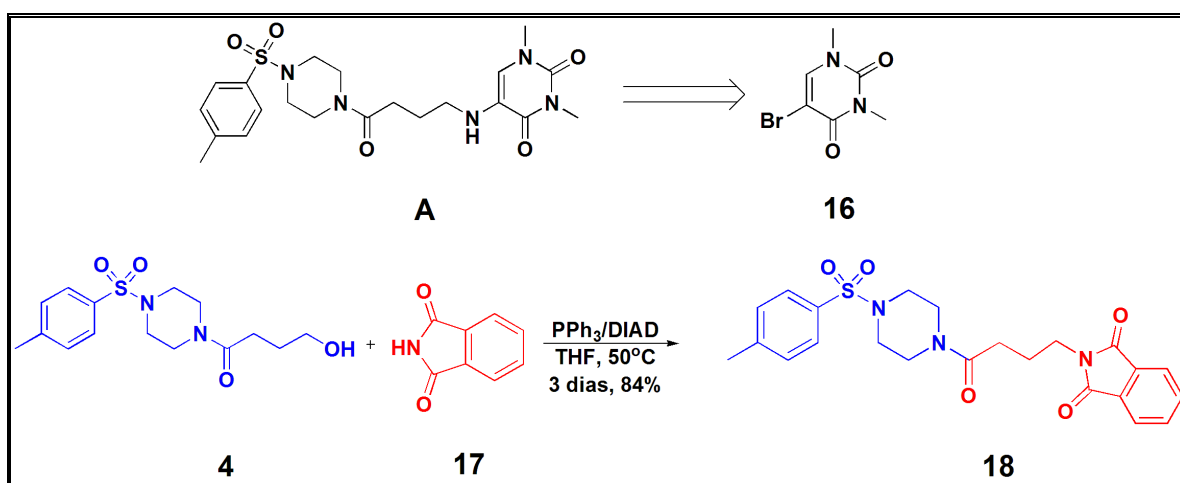
Fazendo uma nova análise retrossintética do composto **A**, a partir da 5-bromo-1,3-dimetiluracila (**16**), foi proposta uma nova rota sintética, partindo do

¹⁴⁴ Majumdar, K. C.; Das, U.; Jama, K. N.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3550.

¹⁴⁵ Robert, J. L.; Pouter C. D.; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1547.

¹⁴⁶ Patching, S. G.; Middleton, A. D.; Henderson, F. J. P.; Herbert, B. R.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2057.

acoplamento do composto **4** com a ftalimida (**17**). Utilizando a metodologia da reação de Mitsunobu,¹⁴⁷ o composto **18** foi obtido com bom rendimento (Esquema 15) e demonstrou ser também, a partir de cálculos teóricos, um potencial inibidor da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1 por apresentar por apresentar $\Delta E = -8,1265$ kcal/mol.

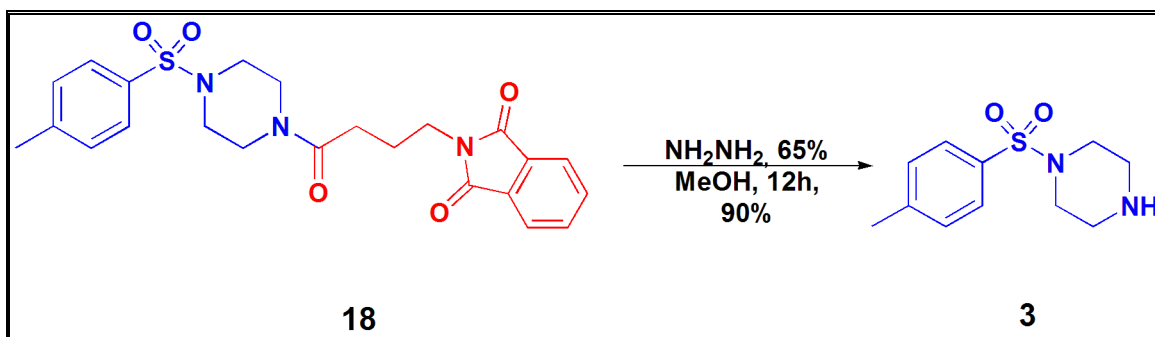


Esquema 15: Nova proposta retrossintética do composto **A** e síntese do composto **18**.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C revelou os sinais relativos à formação do composto **18**. No espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque aos sinais de multipletos em δ 7,77 – 7,64 (m, 4 H), 7,63 – 7,56 (m, 2 H), 7,36 – 7,29 (m, 2 H), referentes aos hidrogênios aromáticos. No RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos do composto **18**, com destaque para o sinal em δ 168,4, relativo às carbonilas da ftalimida.

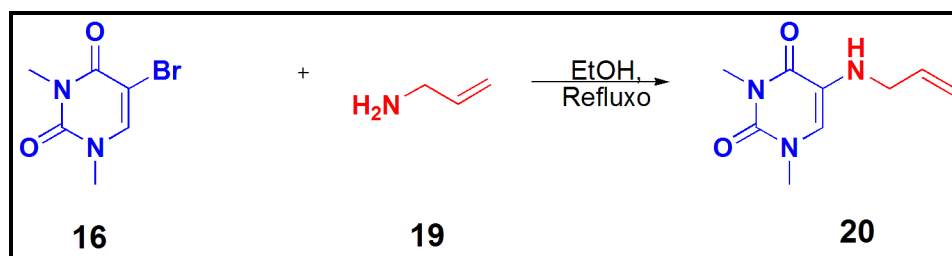
Com o objetivo de se obter um grupo amina terminal a partir do composto **18**, foi realizada a hidrólise do grupo ftalimida a partir de uma solução 65% de hidrazina (Esquema 16). Nesta tentativa, ocorreu a hidrólise do composto **18**, dando origem ao composto **3**, cuja análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{13}C é igual à obtida para este composto anteriormente (Esquema 4).

¹⁴⁷Bellingham, R.; Buswell, A. M.; Choudary, B. M.; Gordon, H, A.; Urquhart.; *Org. Proc. Res.* **2010**, *14*, 254.



Esquema 16: Tentativa de hidrólise do composto **18**.

Após uma breve revisão bibliográfica das reações existentes na literatura com a 5-bromo-1,3-dimetiluracila (**16**), constatou-se a existência de uma metodologia simples para a síntese do composto **20** a partir da reação do composto **16** com a alilamina (**19**) (Esquema 17). Esta metodologia foi realizada com sucesso e o composto **19** foi obtido com 87% de rendimento.^{148, 149, 150}



Esquema 17: Síntese do composto **20**.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C revelou os sinais relativos à formação do composto **20**. No espectro de RMN de ^1H são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque aos sinais de multipletos em δ 5,95 – 5,80 (m, 1 H), 5,31 – 5,15 (m, 2 H), referentes aos hidrogênios olefínicos do composto **20**. No RMN de ^{13}C , são observados todos os sinais característicos

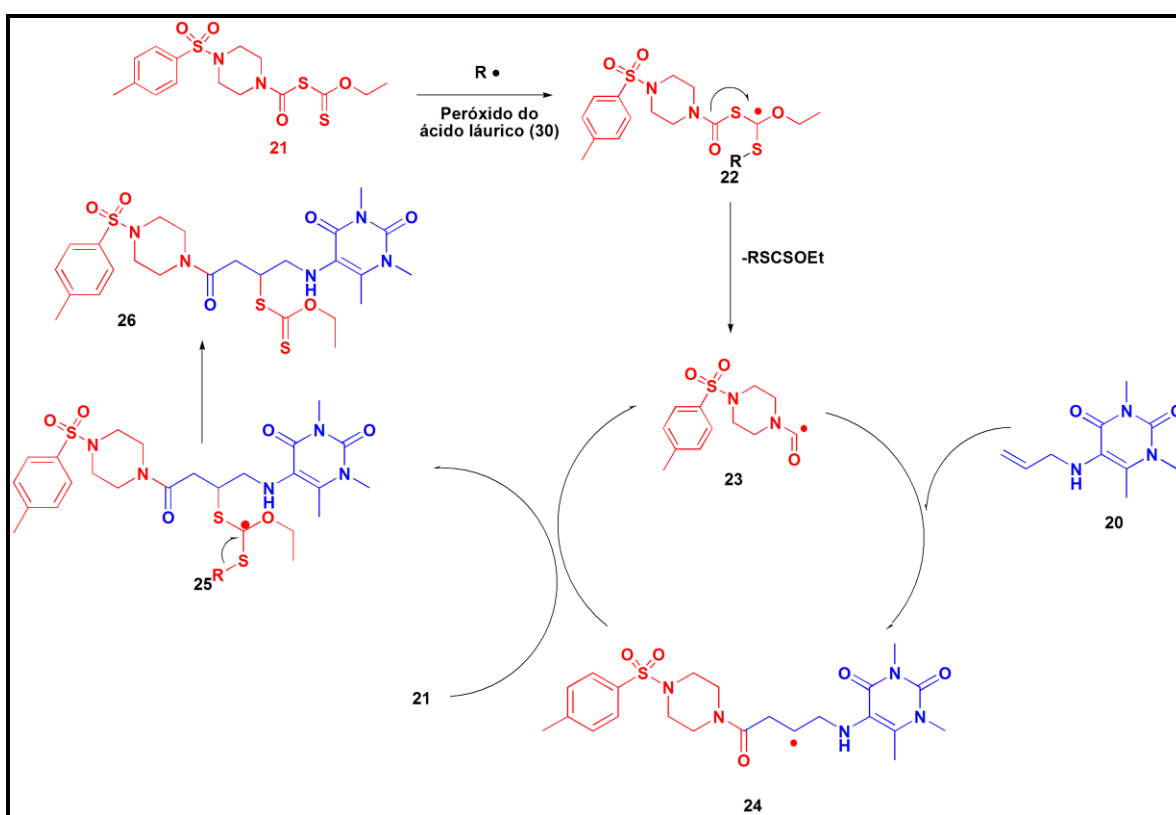
¹⁴⁸ Majumdar, K. C.; Mondal, S.; De, N.; Pal, N.; Sinha, R. K.; Roy, B. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 521.

¹⁴⁹ Majumdar, K. C.; Mondal, S.; *Tetrahedron*, **2009**, 65, 9604.

¹⁵⁰ Majumdar, K. C.; Mondal, S.; Ghosh, D.; Chattopadhyay, B.; *Synthesis* **2010**, 1315.

do composto **20**, com destaque para os sinais em δ 160.4 e 149,3 indicativos das carbonilas do composto **20**.

Após a síntese do composto **20**, foi proposta uma rota sintética utilizando a metodologia eficiente da reação radicalar entre o radical carbamóila (**23**), proveniente da fragmentação térmica do radical **22**, seguida da adição radicalar ao grupo vinila do composto **20** (Esquema 18).^{151, 152, 153} Apartir deste, com uma etapa de redução com hidreto de tributilestanho e AIBN, poderia-se chegar ao composto **A**.¹⁵⁴



Esquema 18: Metodologia radicalar proposta para a síntese do composto **26**.

Inicialmente, foi realizada a síntese do composto **21** por meio da reação rápida do composto **3** com trifosgênio e trietilamina, formando o cloreto de

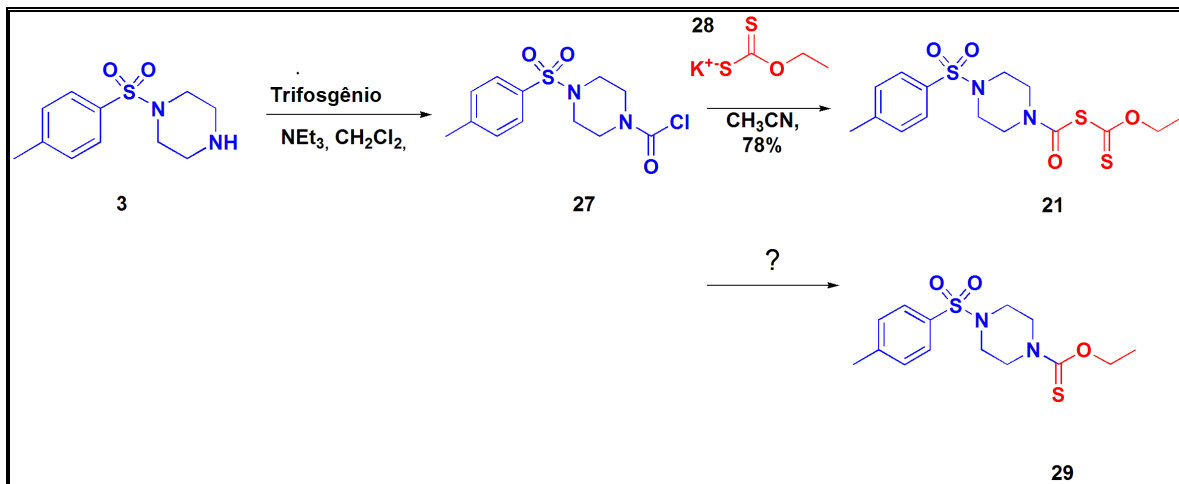
¹⁵¹ Boutillier, P.; Quiclet-Sire, B.; Zafar, N. Z.; Zard, S. Z.; *Tetrahedron: Asym.* **2010**, *21*, 1649.

¹⁵² Quiclet-Sire, B.; Revol, G.; Zard, S. Z.; *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6656.

¹⁵³ López-Valdez, G. L.; Olguin-Urbe, S. O.; Miranda, L. D.; *Tetrahedron L.* **2011**, *67*, 2693.

¹⁵⁴ Keck, G. E; Grier, C. G.; *Synlett* **1999**, 1657.

carbamoíla (**27**).¹⁵⁰ A este intermediário *in situ*, foi adicionado, à temperatura ambiente e atmosfera inerte, O-etil xantato ácido de potássio (**28**), dando origem ao composto 21 (Esquema 19).¹⁵⁰

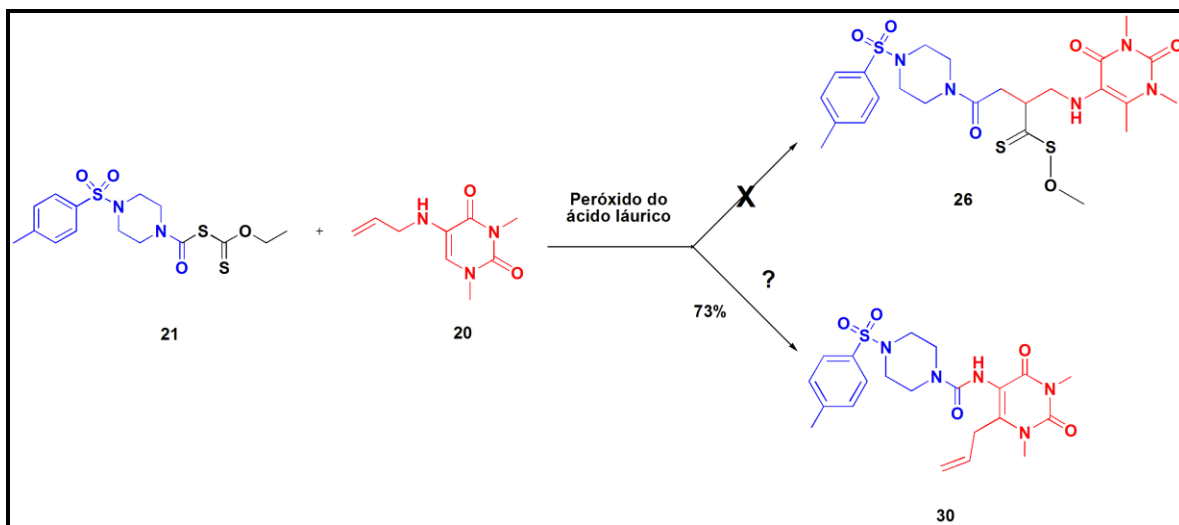


Esquema 19: Síntese do intermediário **21**.

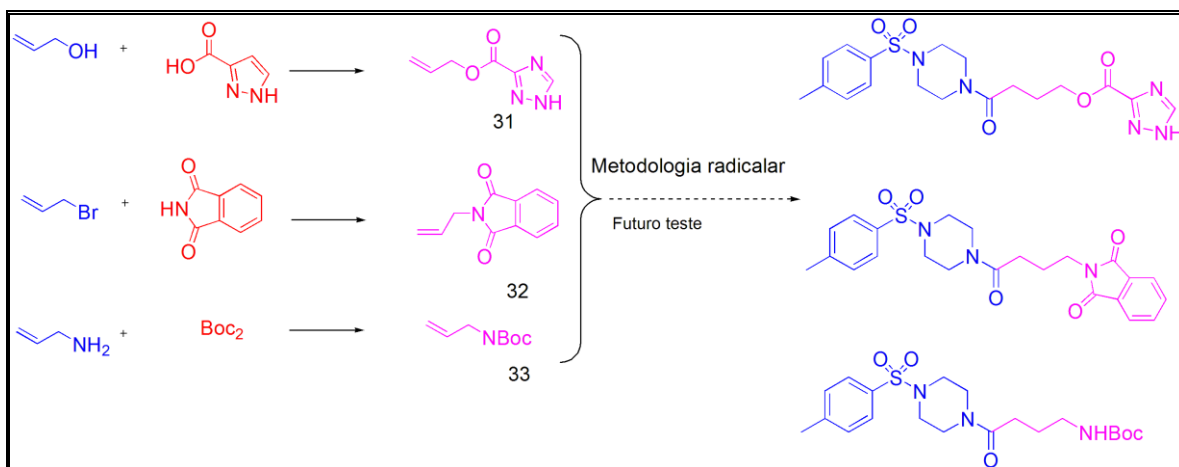
A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C revelou os sinais relativos à formação do composto **21**. No espectro de RMN de ¹H, são observados todos os sinais esperados para esta substância, com destaque aos sinais de multipletos em δ 4,73 – 4,35 (m, 2 H), 3,91 – 3,60 (m, 2 H) e 3,12 - 2,89 (m, 4 H), referentes ao acoplamento do composto **28** ao composto **27**. No RMN de ¹³C, são observados todos os sinais característicos do composto **19**, com destaque para os sinais referentes aos grupos C=S e C=O em δ 204,7, 157,9, respectivamente e a presença de um sinal em δ 187,3, que pode supostamente corresponder a C=S do composto **29**, indicando uma possível mistura de compostos.

Seguindo a metodologia radicalar (**Esquema 18**), foram adicionados 25mol% /h do peróxido do ácido láurico ao composto **21 e 20**, sob atmosfera inerte e durante quatro horas, não se obtendo assim o composto **26** desejado (**Esquema 20**).¹⁵⁰ Provavelmente, por constatarmos a presença dos sinais dos hidrogênios vínilico em δ 5,90 – 5,71 (m, 1 H), 5,19 – 4,99 (m, 2 H) e a presença de um sinal forte em δ 187,3, no espectro de RMN de ¹H do composto formado, nos levou a

propor que a reação do composto **21** com o composto **20** tenha provavelmente formado a amina terciária do composto **30** obtido nesta reação. A definição da estrutura do composto obtido nesta reação será feita posteriormente por meio de métodos analíticos mais conclusivos.



Os intermediários **31**,¹³² **32**¹⁵⁵ e **33**¹⁵⁶ foram sintetizados para futuros testes da metodologia radicalar (**Esquema 21**).



¹⁵⁵ Yan, S. J.; Chien, P. L.; Cheng, C. C.;

¹⁵⁶ Kumar, K. S.; Iqbal, J.; Pal, M.; *Tetrahedron L.* **2009**, *50*, 6244.

Esquema 21 : Intermediários para futuros testes metodológicos.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C revelou os sinais relativos à formação de todos estes intermediários (**32**, **33** e **34**).

4. Conclusão e Perspectivas

Por meio de cálculos teóricos de modelagem molecular foram escolhidos os compostos **A** e **I** como possíveis inibidores da proteína auxiliar Nef do vírus HIV-1.

A preparação do composto **I** foi realizada por meio de uma rota sintética linear com 3 etapas e bons rendimentos. Não foi possível realizar a síntese do composto **A**, devido à ineficiência das metodologias testadas.

Mesmo não obtendo o composto **A**, as diferentes metodologias testadas nos levaram à síntese dos compostos **15** e **18**, que apresentaram ser relevantes para a realização dos testes farmacológicos quando foram submetidos aos cálculos teóricos.

Como perspectiva, outros estudos metodológicos serão realizados para a síntese do composto **A**, **I** e **18**, utilizando a metodologia radicalar descrita anteriormente (Esquema 19). Outros estudos que será realizado com a colaboração do laboratório de virologia da UNB, são os testes farmacológicos de atividade inibidora da proteína viral Nef dos compostos até o momento sintetizados.

5. Parte Experimental

5.1. Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados nas diferentes metodologias sintéticas foram destilados antes do uso e, quando necessário, secos conforme técnicas usuais.¹⁵⁷

As reações assistidas por microondas foram conduzidas utilizando reator de micro-ondas (Discover, CEM Co.).

5.2. Métodos Utilizados na Purificação e Identificação dos Produtos

5.2.1. Métodos Cromatográficos

O acompanhamento das reações foi realizado por meio de cromatofia em camada delgada utilizando placas de cromatofolhas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F₂₅₄, da Merck e reveladas em solução de ácido fosfomolibdico 10% em etanol.

Na purificação dos compostos obtidos, foi utilizada cromatografia de adsorção em coluna (gravidade), cuja fase estacionária foi sílica gel (70-230 mesh) e a fase móvel está descrita nos procedimentos experimentais.

5.2.2. Métodos Analíticos

Os pontos de fusão dos compostos sintetizados foram determinados no aparelho Hoover Thomas, sem correção.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN de ¹H) e de carbono (RMN de ¹³C) foram obtidos no aparelho Varian Mercury Plus 300 MHz, 7,05 T. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm), tendo como referência interna o tetrametilsilano (0,00 ppm para o

¹⁵⁷ Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Purification of Laboratory Chemicals, 3ª ed. Pergamon Press, New York, 1998.

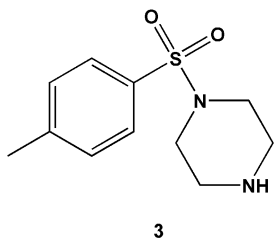
RMN ^1H) e o clorofórmio deuterado (7,26 ppm para o RMN ^1H e 77,0 ppm para o ^{13}C). As multiplicidades das bandas de absorção dos hidrogênios nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete), dd (duplo-duplete), ddd (duplo- duplo-duplete), dt (duplo-triplete), q (quarteto) e qt (quinteto). Os dados espectroscópicos referentes aos espectros de RMN ^1H estão organizados segundo a convenção: δ deslocamento químico (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, número de hidrogênio).

5.3. Nomenclatura

Os nomes dos compostos foram atribuídos segundo o programa ChemDraw Ultra 8.0, que segue as regras da IUPAC.

5.4. Procedimentos

5.4.1. 1-Tosilpiperazina.

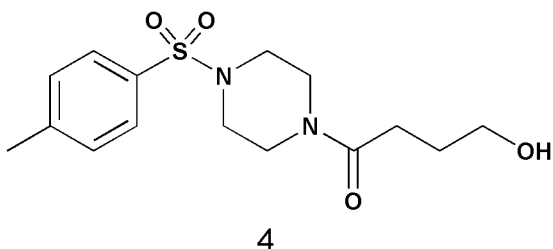


A um balão de 1L sob argônio, contendo uma solução de 3,1 g do cloreto de tosilato (**1**) (15 mmol) em 90 mL de CH_2Cl_2 , foi adicionada uma solução de 6,45 g de piperazina (**2**) (75 mmol) em 300 mL de CH_2Cl_2 e, em seguida, foram adicionados 2,7 mL de piridina. Após 15 h sob agitação à TA, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e então foram adicionados 200 mL de uma solução aquosa de HCl 3N. A fase aquosa foi extraída com éter (3x50 mL) e as fases aquosas combinadas foram alcalinizadas com NaOH até o pH 14. A fase aquosa foi decantada e o sólido branco resultante foi filtrado e a fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3x50 mL). O combinado das fases orgânicas foi seco sobre Na_2SO_4 e filtrado. O solvente foi removido à pressão reduzida, fornecendo 3,79 g de um sólido branco (97% de rendimento). p.f.: 119-120 $^\circ\text{C}$. O produto foi usado na etapa seguinte sem purificação prévia.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,66 – 7,60 (m, 2 H), 7,36 – 7,30 (m, 2 H), 2,99 – 2,88 (m, 8 H), 2,43 (s, 1 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 143,6, 132,3, 129,6, 127,8, 46,8, 45,3, 21,5

5.4.2. 4-hidroxi-1-(4-tosilpiperazil)butan-1-ona.



Procedimento A:

A um tubo de vidro próprio para o uso no reator de micro-ondas (Discover, CEM Co.), contendo 0,40 g (1,66 mmol) do composto **3**, foram adicionados 0,12 mL de γ -butirolactona (**7**) (1,66 mmol). Sob agitação, a mistura reacional foi aquecida a 130 °C no aparelho de microondas por 30min, sob de agitação e aquecimento. Em seguida, foi adicionada a mesma quantidade de γ -butirolactona (1,66 mmol) e o aquecimento foi promovida a mesma temperatura e tempo anteriores. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (MeOH/EtOAc 5%), fornecendo 0,43 g de um óleo viscoso castanho (79% de rendimento).

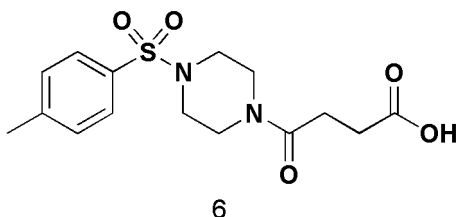
Procedimento B

A um balão de 15 mL foi adicionado 0,140g (0,81mmol) do composto **8**, a 400g de sílica 0,075g (0,41 mmol) do cloreto de tosila (**1**). A mistura foi mantida sobre forte agitação durante 1 hora. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (MeOH/EtOAc 5%), fornecendo 0,07g de um óleo viscoso castanho (54% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,66 – 7,54 (m, 2 H), 7,38 - 7.31 (m, 2 H), 3,73 – 3,55 (m, 6 H), 3,02 – 2,94 (m, 4 H), 2,45 (s, 3 H), 2,41 (t, J = 6.9 Hz, 2 H), 1,87 – 1,78 (m, 2 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 171,7, 144,2, 131,9, 132,2, 129,4, 127,6, 62,1, 46,0, 45,7, 44,8, 40,8, 30,2, 27,3, 21,5$

5.4.3. ácido 4-oxi-4-(4-tosilpiperazil)butanoico .



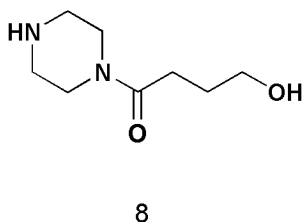
A um tubo de vidro próprio para o uso no reator de micro-ondas (Discover, CEM Co.) contendo 0,20 g (2,0 mmol) do anidrido succínico foram adicionados 0,48 g do composto **3** (2,0 mmol).

Sob agitação a mistura reacional foi aquecida a 130 °C no aparelho de microondas por 1 h. O produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (MeOH/EtOAc 10%), fornecendo 0,57 g de um óleo amarelo viscoso (84% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) $\delta = 7,65 - 7,56$ (m, 2 H), 7,38 – 7,29 (m, 2 H), 3,72 – 3,63 (m, 2 H), 3,59 – 3,49 (m, 2 H), 2,98 (td, $J = 5.1, 12.5$ Hz, 4 H), 2,65 – 2,48 (m, 4 H), 2,43 (s, 3 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) $\delta = 177,1, 169,9, 144,2, 132,0, 129,9, 127,7, 45,8, 44,7, 41,1, 29,0, 27,7, 21,5$

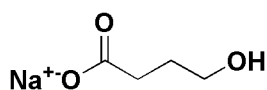
5.4.4. 4-Hidroxi-1-(piperazil)butan-1-ona.



Em um balão de 25 ml foram aquecidos 2,50 g de piperazina (**2**) (29mmol) até a fundição do mesmo. Após a fusão, foram adicionados sob agitação, 2,36 mL da γ -butirolactona (**7**) (30,84 mmol), gota a gota. A mistura reacional foi aquecida durante 6 h a 120 °C. Após este tempo, o produto bruto foi destilado 48-50 °C/3Torr (Kugelrohr), e cristalizado em acetona/ EtOAc, fornecendo 6,06 g de um sólido amarelado (64% de rendimento). p.f.: 98°-101° C.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 3,65 – 3,35 (m, 6 H), 3,00 – 2,72 (m, 4 H), 2,50 – 2,39 (m, 2 H), 1,89 – 1,76 (m, 2 H)

5.4.5. 4-hidroxibutanoato de Sódio.



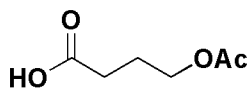
13

A uma solução de 11,2 g de NaOH (0,28 mol) em 20 mL de H_2O , sob refluxo, foram adicionados 20 mL da γ -butirolactona (**7**) (0,28 mol). Após 6 h de aquecimento, a solução foi resfriada em banho de gelo e a água foi evaporada sob pressão reduzida. O produto bruto foi dissolvido em etanol quente, filtrado o resíduo insolúvel em etanol quente, o etanol foi evaporado sob pressão reduzida, e o produto foi recristalizado em éter etílico, fornecendo 19,05 g de um sólido branco (54% de rendimento).

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ = 3,57 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 2,24 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 1,88 – 1,73 (m, 2 H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz) δ = 183,1, 63,2, 35,9, 30,4

5.4.6. ácido 4-acetoxibutanoico.



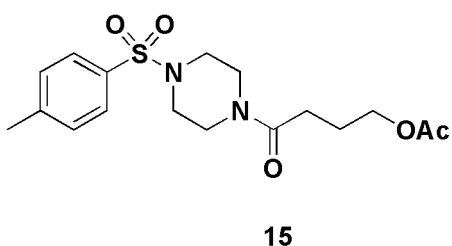
14

A um balão contendo 0,8 g do composto **13** (6,34 mmol) foram adicionados 60 mL de anidrido acético (0,63 mol). A mistura reacional foi agitada por 1 h à 60 °C e o excesso do anidrido acético (**12**) foi evaporado sob pressão reduzida. O produto bruto foi lavado com 50 mL de água e extraído com éter etílico (3 x 10 mL) e os combinados das fases orgânicas foram secos sobre Na_2SO_4 e filtrados. O solvente foi removido à pressão reduzida, fornecendo 0,80 g de um óleo pouco viscoso opaco (87% de rendimento).

^1H RMN (CD_3OD , 300 MHz) δ = 4,09 (t, J = 6.4 Hz, 2 H), 2,37 (t, J = 7,3 Hz, 2 H), 2,02 (s, 3 H), 1,97 – 1,86 (m, 2 H)

^{13}C RMN (CD_3OD , 75 MHz) δ = 176,8, 172,9, 64,2, 34,7, 31,2, 25,2

5.4.7. acetato de 4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butila.

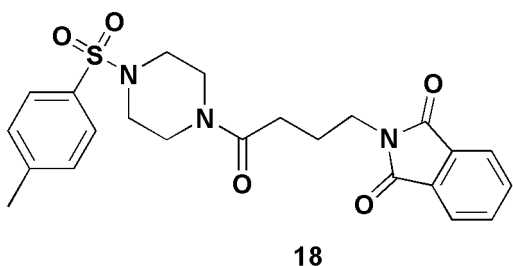


A um balão contendo 0,14 g do composto **14** (1,00 mmol) em 6,0 mL de CH_2Cl_2 , adicionou-se DCC (0,93 mmol), DMAP (0,46 mmol) e por último 0.165 g do composto **3** (0,69 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação durante 18h à TA. Filtrou-se a reação com 10 mL de CH_2Cl_2 sob pressão reduzida e, em seguida, lavou-se o filtrado com bicarbonato de sódio (3 x 10 mL) e com salmoura (3 x 10 mL). O combinado das fases orgânicas foi seco com sulfato de sódio anidro e o produto purificado por cromatografia (10% de AcOEt/Hexano), fornecendo 0,193 g de um óleo transparente (76% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,63 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7,35 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 4,07 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 4,13 – 3,97 (m, 2 H), 3,74 – 3,64 (m, 2 H), 3,59 – 3,48 (m, 2 H), 3,03 – 2,89 (m, 4 H), 2,45 (s, 3 H), 2,36 – 2,25 (m, 2 H), 2,03 – 2,00 (m, 3 H), 1,95 – 1,89 (m, 2 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 172,9, 172,7, 144,2, 132,0, 129,9, 127,7, 45,8, 44,7, 41,1, 29,0, 27,7, 21,5

5.4.8. (4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butil)isoindolínico-1,3-diona

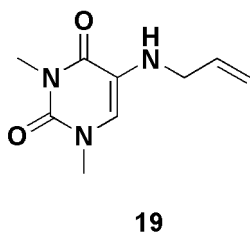


A um balão sob argônio, contendo 0,120 g do composto **4** (0,367 mmol), 0,068 g de tri-fenilfosfina (0,261 mmol) em 3 mL de THF, foram adicionados 0,059 g da ftalimida **17** (0,404 mmol), diluídos em 3,0 mL de THF, gota a gota. Após 10 min, foram adicionados, gota a gota 0,35 mL de DIAD (0,202 mmol). A mistura reacional foi aquecida à 50 °C e levemente agitada durante 2 dias. Após os dois dias o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (2% MeOH/EtOAc), fornecendo 0,136 g de um óleo castanho muito viscoso (84% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,77 – 7,64 (m, 4 H), 7,63 – 7,56 (m, 2 H), 7,36 – 7,29 (m, 2 H), 3,68 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 3,64 – 3,56 (m, 2 H), 3,52 – 3,44 (m, 2 H), 2,93 (td, J = 4.9, 19.2 Hz, 4 H), 2,41 (s, 3 H), 2,27 (t, J = 7.3 Hz, 2 H), 2,01 – 1,90 (m, 3 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 170,0, 168,4, 144,1, 134,0, 132,1, 129,8, 128,6, 128,4, 127,7, 123,1, 46,0, 45,8, 44,7, 40,8, 37,4, 30,1, 23,9, 21,6

5.4.9. -(alilamino)-1,3-dimetiluracila.



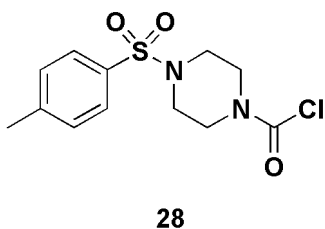
A um balão sob argônio, contendo 0,219 g da 5-bromo-1,3-dimetiluracila (**16**) (1 mmol) em 5 mL de etanol, foram adicionados 0,375 mL de alilamina (**20**) (5 mmol), gota a gota. A mistura reacional foi agitada levemente durante 5h à temperatura de refluxo. Em seguida, o solvente foi evaporado

juntamente com o excesso de alilamina (**20**) sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (2% MeOH/AcOEt), fornecendo 0,169g de um sólido branco (87% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 6,21 (s, 1 H), 5,95 – 5,80 (m, 1 H), 5,31 – 5,15 (m, 2 H), 3,63 – 3,57 (m, 2 H), 3,40 – 3,34 (m, 6 H)

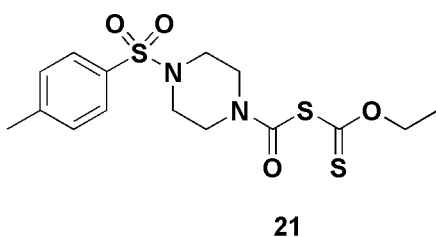
^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 160,4, 149,3, 133,8, 123,8, 116,2, 115,4, 46,3, 36,5, 27,9

5.4.10. 4-tosilpiperazina-1-carbonil cloro.



A um balão sob argônio, contendo 0,240 g do composto **3** (1 mmol) e 0,297g (1 mmol) de trifosgênio em 5 mL de CH_2Cl_2 , foram adicionados 0,47 mL de trietilamina (3,4 mmol) gota a gota. A mistura reacional foi agitada levemente durante 10 min. Após 10 min. , o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto foi usado na etapa seguinte sem purificação prévia.

5.4.11. Composto 21.

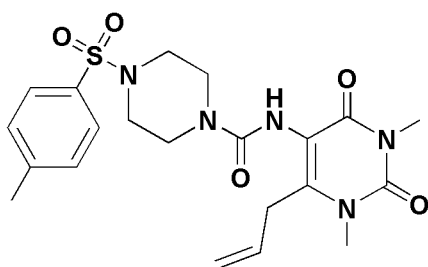


A um balão sob argônio, contendo 0,302 g o produto bruto **27** (1 mmol), em 5 mL de CH_3CN , foram adicionados 0,159 g do composto 4-tosilpiperazina-1-carbonil cloro (**28**) (0,95 mmol). A mistura reacional foi agitada levemente durante 15min, à TA. Em seguida, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (50% hexano/AcOEt), fornecendo 3,302 g de um óleo verde claro.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,70 – 7,57 (m, 2 H), 7,40 – 7,29 (m, 2 H), 4,73 – 4,35 (m, 2 H), 3,91 – 3,60 (m, 2 H), 3,12 – 2,89 (m, 4 H), 2,43 (s, 3 H), 1,52 – 1,18 (m, 3 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 204,7, 157,9, 144,0, 131,6, 129,6, 127,4, 67,5, 48,1, 47,6, 45,2, 44,0, 21,2, 13,9

5.4.12. N-alil-N-(1,2,3,6-tetrahydro-1,3-dimetil-2,6-dioxopirimidina-4-yl)-4-tosilpiperazine-1-carboxamida.



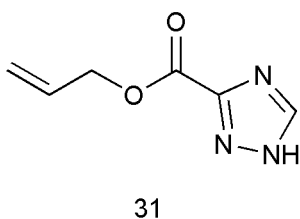
30

A um balão sob argônio, contendo 0,4 g do composto **21** (1,03 mmol), em 10 mL de 1,2-dicloroetano, foram adicionados sob agitação 0,1 g do composto **19** (0,5 mmol) e 0,014 g do peróxido do ácido láurico (0,3 mol/h) em quatro porções de 0,003 g a cada hora, à temperatura de refluxo. Após 4h, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (50% Hexano/AcOEt), fornecendo 0,173 g de um óleo viscoso amarelado (73% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,66 – 7,54 (m, 2 H), 7,38 – 7,25 (m, 2 H), 5,90 – 5,71 (m, 1 H), 5,19 – 4,99 (m, 2 H), 4,52 (d, J = 7.0 Hz, 1 H), 3,91 (d, J = 6.2 Hz, 1 H), 3,45 – 3,24 (m, 8 H), 2,99 – 2,85 (m, 4 H), 2,47 – 2,40 (m, 3 H), 1,82 (br. s., 1 H), 1,45 – 1,11 (m, 1 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 160,6, 150,7, 144,0, 140,9, 133,5, 132,0, 129,7, 127,7, 118,8, 116,9, 52,5, 45,9, 45,4, 37,2, 28,4, 21,5

5.4.13. 1H-1,2,4-triazol-3-carboxilato de alila.

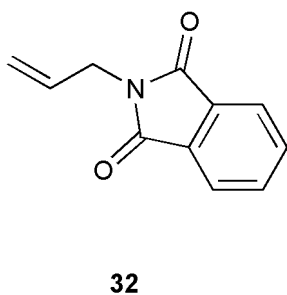


A um balão sob argônio, contendo a suspensão de 0,113 g do composto **9** (1,00 mmol) em 5 mL de acetonitrila, foram adicionados sob agitação 0,24 mL de trietilamina. Após a homogeneização da solução, foram adicionados 0,520 g de Pybop (1 mmol) e 0,1 mL do 1-propenol (1,5 mmol), adicionado gota a gota. A mistura reacional foi agitada levemente durante 2 dias, à TA. Em seguida, o material insolúvel foi filtrado, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (5% MeOH/AcOEt), fornecendo 0,102 g de um óleo pouco viscoso transparente (65% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 8,60 (s, 1 H), 8,76 – 8,35 (m, 1 H), 6,10 – 5,94 (m, 1 H), 5,49 – 5,16 (m, 2 H), 4,87 (td, J = 1,3, 5,7 Hz, 2 H), 5,03 – 4,52 (m, 2 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 160,6, 154,1, 147,0, 132,7, 119,3, 67,3

5.4.14. 2-alilisoindolina-1,3-diona.



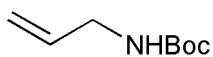
A um balão sob argônio, contendo 1,00 g do sal de potássio da fitalimida (5,45 mmol) em 50 mL de DMF, foram adicionados sob agitação 0,33 mL do 1-bromopropeno (8,17 mmol), gota a gota. A mistura reacional foi agitada levemente durante 5 h a 65 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 50 mL de água. A fase aquosa foi extraída com CH_2Cl_2 (3 x 10 mL) e as fases orgânicas combinadas foram secas com NaSO_4 anidro. Após a filtração, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (2%

MeOH/AcOEt), fornecendo 0,92 g de um sólido branco (91% de rendimento). p.f.: 218-220 °C.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 7,90 – 7,82 (m, 2 H), 7,77 – 7,70 (m, 2 H), 5,90 (td, J = 5,6, 10,2, 17,1 Hz, 1 H), 5,34 – 5,09 (m, 2 H), 4,30 (td, J = 1,5, 5,6 Hz, 2 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 155,6, 134,8, 115,3, 78,9, 42,8, 28,1

5.4.15. tert-butil alilcarbamato.



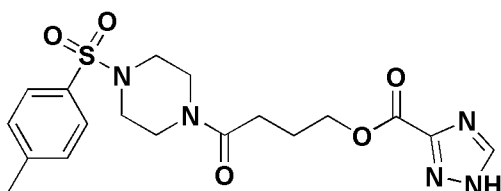
33

A um balão contendo 0,218 g de $(\text{BOc})_2\text{O}$ (1,00 mmol) e Amberlyst-15 (15%, m/m), foram adicionados 0,06 g de alilamina (1,00 mmol). A mistura reacional foi agitada levemente durante 2 min à TA. Após 2 min, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de CH_2Cl_2 . Após a filtração da Amberlyst-15, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo um líquido transparente (98% de rendimento).

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz) δ = 5,91 – 5,76 (m, 1 H), 5,23 – 5,06 (m, 2 H), 5,23 – 5,05 (m, 2 H), 5,05 – 4,95 (m, 1 H), 3,81 – 3,65 (m, 2 H), 1,45 (s, 9 H)

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz) δ = 155,6, 134,8, 115,3, 78,9, 42,8, 28,1

5.4.16. 4-oxo-4-(4-tosilpiperazil)butil 4H-imidazol-2-carboxilado



I

A um balão sob argônio, contendo uma suspensão de 0,05 g do composto **9** (0,44 mmol) em 3 mL de acetonitrila, foram adicionados sob agitação 0,1 ml (1,20 mmol) de trietilamina. Após a homogeneização da

solução, foram adicionados 0,228 g de PyBOP (1,00 mmol) e 0,2g do composto **4** (0,53 mmol) dissolvido em 2 mL de acetonitrila. A mistura reacional foi agitada levemente durante 2 dias, à TA. Após 2 dias, o material insolúvel foi filtrado, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o produto bruto foi purificado por cromatografia em sílica gel (2% MeOH/AcOEt), fornecendo 0,156 g de um sólido branco (84% de rendimento). p.f.: 234°-236°C

¹H RMN (CD₃OD, 300 MHz) δ = 8,53 (s, 1 H), 7,67 – 7,61 (m, 2 H), 7,45 – 7,38 (m, 2 H), 4,36 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 3,67 – 3,61 (m, 4 H), 2,96 (td, *J* = 5,1, 14,9 Hz, 4 H), 2,55 (t, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 2,42 (s, 3 H), 2,01 (quin, *J* = 6,7 Hz, 2 H).

¹³C RMN (CD₃OD, 75 MHz) δ = 172.9, 160.5, 154.0, 147.3, 145.6, 133.6, 130.9, 128.9, 66.1, 47.4, 47.1, 46.0, 42,1, 30,0, 25,2, 21,5.

6 – Bibliografia

1. Sarnagadharan, M. G.; Sarin P. S.; Reitz M. S.; Gallo R. C.; *Nature New Biol.* **1972**, 67, 240.
2. Sarnagadharan, M. G.; Guroff, R.M.; Gallo, R. C.; *Biochem. Biophys Acta* **1978**, 516, 419.
3. Collins, S. J.; Gallo, R. C.; Gallagher, R. E.; *Nature* **1977**, 270, 347.
4. Morgan, D. A.; Ruscetti, F. W.; Gallo, R. C.; *Science* **1976**, 193, 1007.
5. Ruscetti F. W.; Morgan D. A.; Gallo R. C.; *J. Immuno* **1977**, 119, 131.
6. Mier, J. W.; Gallo, R. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1980**, 77, 6134.
7. Gallo, R. C.; *J. Hum. Virol* **2000**, 3,1.
8. Yoshida M.; *Annu. Rev. Immunol.* **2001**, 19, 475.
9. Gottlieb, M. S.; Schroff, R.; Schanker, H. M.; Weisman, J. D.; Fan, P. T.; Wolf, R. A.; Saxon, A.; *N. Engl. J. Med.* **1981**, 305, 1425.
10. Friedman-Kien, A. E.; *J Am Acad Dermatol.* **1981**, 5, 468.
11. Wernicke, D.; Trainin, Z.; Ungar-Waron, H.; Essex, M.; *J. Virol.* **1986**, 60, 669.
12. Kalyanaraman, V. S.; Sarnagadharan, M. G.; Robert-Guroff, M.; Miyoshi, I.; Golde, D.; Gallo, R. C.; *Science* **1982**, 218, 571.
13. Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Reitz, M. S.; Kalyanaraman, V. S.; Gallo, R. C.; *Nature* **1981**, 294, 268.
14. Gallo, R. C.; Salahuddin, P. S.; Gelmann, E. P.; *Science* **1983**, 220, 865.
15. Barre-Sinoussi, F.; Chermann, J. C.; Rey, F.; Nugeyre, M. T.; Chamaret, S.; Guetard, J.; Dauguet, C.; Axler-Blin, C.; Vezinet-Brun, F.; Rouzioux, C.; Montagnier, L.; *Science* **1983**, 220, 868.
16. Sarnagadharan, M. G.; Bruch, L.; Schupbach, J.; Gallo, R. C.; *Science* **1984**, 224, 506.
17. Wain-Hobson, S.; Vartanian, J. P.; Henry, M.; Chenciner, N.; Cheynier, R.; Delassus, S.; Martins, L. P.; Sala, M.; Nugeyre, M. T.; Guetard, D.; *Science* **1991**, 252, 961.
18. Sanchez-Pescador, R.; Power, M. D.; Barr, P. J.; Steimer, K. S.; Stempien, M. M.; Brown-Shimer, S. L.; *Science* **1985**, 227, 484.
19. Wain-Hobson, S.; Sonigo, P.; Danos, O.; Cole, S.; Alizon, M.; *Cell* **1985**, 40, 9.
20. Dragic, T.; Litwin, V.; Allaway, G. P.; Martin, S. R.; Huang, Y.; *Nature* **1996**, 381, 667.
21. Joyce, C.; Anderson, I.; *New Sci.* **1985**, 105, 3.
22. Chakrabarti, L.; Guyader, M.; Alizon, M.; Tiollais, P.; Sonigo, P.; *Nature* **1987**, 328, 543.
23. Mitsuya, H.; Weinhold, K. J.; Furman, P. A.; Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7096.
24. Kubly, J.; *Immunology*, 5th ed., W.H. Freeman and company, New York, 2003.
25. http://www.who.int/data/2009_global_summary.png, acessada em 15 de janeiro 2011.
26. <http://vacinadaaids.wordpress.com/2010/05/24/estimativa-pelo-mundo>, acessada em 15 de janeiro **2011**

27. Marins, J. R.; Jamal, L. F.; Chen, S.; Hudes, E. S.; Teixeira, P. R.; *AIDS*. **2003**, *17*, 1675.
28. <http://www.bsgi.org.br/Paz2006.pdf>, acessado em 12 de fevereiro de **2011**.
29. Cihlar, T.; Ray, A. S.; *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39.
30. Horwitz, J. P.; Chua, J.; Noel, M.; *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 2076.
31. http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_HTM_TB_2004.329_por_chap11.pdf, acessada em 15 de janeiro de 2011
32. Lama, J.; Mangasarian, A.; Trono, D.; *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 622.
33. Cortes, M.J.; Wong-Staal, F.; Lama J.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *3*, 1770
34. Hahn, B. G. M.; Shaw, K. M.; Cock.; Sharp, P. M.; *Science* **2000**, *287*, 607.
35. Sharp, P. M.; Robertson, D. L.; Hahn, B. H.; *Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1995**, *349*, 41.
36. Corbet, S.; Muller-Trutwin, M. C.; Versmisse, P.; Delarue, S.; Ayouba, A.; Lewis, J.; Brunak, S.; Martin, P.; Brun-Vezinet, F.; Simon, F.; Barre-Sinoussi, F.; Mauclore, P.; *J. Virol.* **2000**, *74*, 529.
37. Gao, F.; Bailes, E.; Robertson, D. L.; Chen, Y.; Rodenburg, C. M.; Michael, S. F.; Cummins, L. B.; *Nature*. **1999**, *397*, 436.
38. Hirsh, V. M.; Campbell, B. J.; Bailes, E.; Goeken, R.; Brown, C.; Elkins, W. R.; Axthelm, M.; Murphey-Corb, M.; Sharp P. M.; *J. Virol.* **1999**, *73*, 1036.
39. Courgnaud, V.; Pourrut, X.; Bibollet-Ruche, F.; Mpodi-Ngole, E.; Bourgeois, A.; Delaporte, E.; Peeters, M.; *J. Virol.* **2001**, *75*, 857.
40. Frankel, A. D.; Young, J. A.; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.
41. Tebit, D. M.; Nankya, I.; Arts, E. J.; Gao, Y.; *AIDS Rev.* **2007**, *9*, 75.
42. Takebe, Y.; Uenishi, R.; Li, X.; *Adv. Pharmacol.* **2008**, *56*, 1.
43. Frankel, A. D.; Young, J. A.; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.
44. Seelamgari, A.; Maddukuri, A.; Berro, R.; de la Fuente, C.; Kehn, K.; Deng, L.; Dadgar, S.; Bottazzi, M. E.; Ghedin, E.; Pumfery, A.; Kashanchi, F.; *Front. Biosci.* **2004**, *9*, 2388.
45. <http://allaboutim.webs.com/apps/blog/show/6208634-what-is-the-difference-between-hiv-disease-and-aids>, acessado em 27 de fevereiro de **2011**.
46. Greene, B. W.; Peterlin, B. M.; *Nature Med.* **2002**, *8*, 673.
47. Gomez, C.; Hope, J. T.; *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 621.
48. Márques, N.; Sancho, R.; Macho, A.; Moure, A ; Masip, I.; Messenguer, A.; Muñoz, E. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 596.
49. Amabis, J.; Marthos, G.; *Fundamentos da Biologia Moderna*, 2ª ed, Moderna: São paulo, 1999, 215.
50. Deacon, N. J.; Tsykin, A.; Solomon, A.; Smith, K.; Ludford-Menting, M.; Hooker, D. J.; McPhee, D. A.; Greenway, A. L.; Ellett, A.; Chatfield, C.; Lawson, V. A.; Crowe, S.; Maerz, A.; Sonza, S.; Learmont, J.; Sullivan, J. S.; Cunningham, A.; Dwyer, D.; Downton, D.; Mills, J.; *Science* **1995**, *270*, 988.
51. Oelrichs, R.; Tsykin, A.; Rhodes, D.; Solomon, A.; Ellett, A.; McPhee, D.; Deacon, N.; *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1998**, *4*, 811.
52. Kestler, H. W.; Ringler, D. J.; Mori, K.; Panicali, D. L.; Sehgal, P. K.; Daniel, M. D.; Desrosiers, R. C.; (1991) *Cell* **1991**, *65*, 651.
53. Bonyhadi, M. L.; Rabin, L.; Salimi, S.; Brown, D. A.; Kosek, J.; McCune, J. M.; Kaneshima, H.; *Nature* **1993**, *363*, 7282.

54. Arora, V. K.; Fredericksen, B. L.; Garcia, J. V.; *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 189.
55. Skowronski, J.; Parks, D.; Mariani, R.; *EMBO J.* **1993**, *12*, 703.
56. Miller, M. D.; Warmerdam, M. T.; Page, K. A.; Feinberg, M. B.; *J. Virol.* **1995**, *69*, 579.
57. Acheampong, E. A.; Parveen, Z.; Muthoga, L. W.; Kalayeh, M.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 4257.
58. Yang, P.; Henderson, A. J.; *Virology* **2005**, *336*, 219.
59. Stove, V.; Van de Walle, I.; Naessens, E.; Coene, E.; Stove, C.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 11422.
60. Michel, N.; Allespach, I.; Venzke, S.; Fackler, O. T.; *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 714.
61. Hrecka, K.; Swigut, T.; Schindler, M.; Kirchhoff, F.; Skowronski, J.; *J. Virol.* **2005**, *79*, 10650.
62. Roeth, J. F.; Collins, K. L.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *72*, 548.
63. Schindler, M.; Wurfl, S.; Benaroch, P.; Greenough, T. C.; Daniels, R.; Easterbrook, P.; *J. Virol.* **2003**, *77*, 10548
64. Allan, J. S.; Coligan, J. E.; Lee, T. H.; McLane, M. F.; Kanki, P.J.; *Science.* **1985**, *230*, 810.
65. Luo, T.; Downing, J. R.; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **1997**, *71*, 2535.
66. Arold, S.T.; Baur, S.; *T.Bioch.* **2001**, *6*, 356.
67. Grzesiek, S.; Bax, A.; Clore, G. M.; Gronenborn, J. S.; Kaufman, J.; *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 340.
68. Grzesiek, S.; Bax, A.; Kaufman, J.; Palmer, I.; Tjandra, N.; *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1248.
69. Geyer, M.; Facker, O. T.; Peterlin, B. M.; *EMBO Reports* **2001**, *21*, 580.
70. Geyer, M.; Peterlin, B. M.; *FEBS Lett.* **2001**, *496*, 91.
71. Bour, S.; Perrin, C.; Strebel, K.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33800.
72. Ross, T. M.; Oran, A.E.; Cullen, B. R.; *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 613.
73. Foster, J. L.; *Virology* **1994**, *201*, 373.
74. Mariani, R.; Skowronski, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 5549.
75. Lama, J.; *Curr. HIV Res.* **2003**, *10*, 167.
76. Pham, H. M.; Argañaraz, E. R.; Groschel, B.; Trono, B.; Lama, J.; *J. Virol.* **2004**, *78*, 13072.
77. Argañaraz, E. R.; Schindler, M.; Kirchhoff, F.; Cortes, M. J.; Lama, J.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 33912.
78. Greenberg, M. E.; *Embo J.* **1997**, *23*, 6964.
79. Greenberg, M.; *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 1239.
80. Craig, H.M.; Pandori, M.W.; Guatelli, J. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 11229.
81. Piguet, V.; *Embo J.* **1998**, *17*, 2472.
82. Crise, B. L.; Buonocore.; Rose, J. K.; *J. Virol.* **1990**, *64*, 5585.
83. Geleziunas, R., S.; Bour.; M.A. Wainberg, M. A.; *Faseb J.* **1994**, *8*, 593.
84. Benson, R. E.; A. Sanfridson, J. S.; Ottinger, C.; Cullen, B. R.; *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 1566.
85. Foti, M. A.; Mangasarian, V.; Piguet, D. P.; Lew, K. H.; Krause, D.; *J. Cell Bioll.* **1997**, *139*, 37.
86. Lu, X.; Brodsky F. M.; Peterlin. B. M.; *Immunity* **1998**, *8*, 647.

87. Pigué, V., Y. L.; Chen, A.; Mangasarian, M.; Foti, J. L.; Carpentier.; *EMBO J.* **1998**, *17*, 2472.
88. Luo, T.; Fredericksen, B. L.; Hasumi, T.; Endo, K.; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **2001**, *75*, 2488.
89. Luo, T.; Anderson, S. J.; Garcia, J. V.; *J. Virol.* **1996**, *70*, 1527.
90. Jomon, k.; Kuroda, Y.; Ajisaka, M.; Sakai, H.; *J. Antibioti.* **1972**, *25*, 271..
91. Ito, S.; Hirata, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1813.
92. Boeckman, R. K. Jr.; Napier, J. J.; Thomas, E. W.; Sato, R. I.; *J. Org.Chem.* **1983**, *48*, 4152.
93. Boeckman, R. K.; Weidner, J. C. H.; Perni, R. B.; Napier. J. J.; *J. Am. Chem. SOC.* **1989**, *111*, 8036
94. Paquette, L. A.; Macdonald, D.; Anderson, L.; Wright, J.; *J. Am. Chem. SOC.* **1989**, *11*, 1.
95. Paquette, L. A.; MacDonald, D.; Lawrence A. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9292
96. Greenberg, M.E.; Bronson, S.; Lock, M.; Neuman, M.; Pavlakis, G. N.; *Embo J.* **1997**, *23*, 6964.
97. Jin, J. Y.; Zhang, X.; Cai, C. Y.;¹ Burakoff, C. J.; *AIDS Research and Therapy*, **2010**, *7*, 26.
98. Lalou, C. I.; Lederer, F.; *Biochimie* **1993**, *75*, 443.
99. Solomon, D. H.; O'Brian, C. A.; Weinstein I. B.; *FEBS Lett.* **1985**, *190*, 342.
100. Betzi, S.; Restouin, A.; Opi, S.; Arold, S. T.; Parrot, I.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, *104*, 19256.
101. Olszewski, A.; Sato, K.; Aron, Z. D.; Cohen, F.; Harris, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, *101*, 14079.
102. Emert-Sedlak, L.; Kodama, T.; Lerner, E. C.; Dai, W.; Foster, C.; *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 939.
103. Dikeakos, J. D.; Atkins, K. M.; Thomas, L.; Emert-Sedlak, L.; Byeon, I. J.; *Mol. Biol. Cell.* **2010**, *21*, 3279
104. Breuer, S.; Schievink, I. S.; Schulte, A.; Blankenfeldt, W.; Fackler, O. T.; Geyer, M.; *Plosone* **2011**, *6*, 1.
105. Fackler, O. T.; Moris, A.; Tibroni, N.; Giese, S. I.; Glass, B.; *Virology.* **2006**, *351*, 322.
106. Arkin, M. R.; Wells, J. A.; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 301.
107. Shuker, S. B.; Hajduk, P. J.; Meadows, R. P.; Fesik, S. W.; *Science* **1996**, *274*, 1531.
108. Yamamoto, T.; Samri, A.; Marcelin, A. G.; Mitsuki, Y. Y.; Vincent, C.; *AIDS* **2009**, *23*, 2265.
109. Christ, F.; Voet, A.; Marchand, A.; Nicolet, S.; Desimmie, B. A.; *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 442.
110. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.maio> do, acessada em 15 de maio de 2009.
111. Salvador, C. E. M.; Andrade, C. K. Z.; Martins, J. B. L.; *33ª Reunião Anual da SBQ*, **2010**.
112. Anna, S.; Carlos, M. R.; *Virtual Quim.* **2009**, *1*, 49.
113. Nathans, R.; Cao, H.; Sharova, N.; Ali, A.; Sharkey, M.; Stranska, R.; Stevenson, M.; Rana, M. T.; *Nature Biotech.* **2008**, *26*, 1187.

114. Barreiro, E. J.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1172.
115. Kubinyi, H.; *Drug Discov. Today* **1997**, *11*, 457.
116. Kubinyi, H.; *Drug Discov. Today* **1997**, *12*, 538.
117. Verma, S. K.; Acharya, B. N.; Kaushik M. P.; *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4232.
118. Vachal, P. et al.; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2550.
119. Parai, K. M.; Panda, G.; Srivastava, k.; Puri, K. S.; *Méd. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 776.
120. Aertgeerts, Kathleen; Brennan, Nancy, K.; Cao, Sheldon, X.; Chang, Edcon; Kiryanov, Andre, A.; Liu, Y.; **2006**,1041263 (CAN 145:419173)
121. Wang, E. C.; Zhang, Z.; Meanwell, A. N.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7661.
122. Hou, D. R.; Cheng, H. Y.; Wang, E.; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6094.
123. Cheng, H. Y.; Hou, D. R.; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3000.
124. Yoon, N. M.; Pak, C. S.; Brown, H. C.; Krishnamurthy, S.; Stocky, T. P.; *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2786.
125. Ludwig, H. S; **1987**, 477834 (CAN 107:77834)
126. Kamber, N.; Jeong, W.; Waymouth, R. M.; Pratt, R. C.; Lohmeijer, B. G. G.; Hedrick, J. L.; *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5813.
127. Kryś'ko, A. A.; Yatsyuk, D. I.; Kabanov, M. V.; Kabanova, A. T.; Karaseva, T. L.; Andronati, S. A.; *Pharma. Chem. J.* **2003**, *37*, 145.
128. Matsumoto, K.; Hashimoto, S.; Uchida, T.; Okamoto, T.; Otani, S.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3138.
129. Jafarpour, A.; Rezaeifard, A.; Aliabadi, M.; *Appl. Cat. A: Gen.* **2009**, *358*, 49.
130. Lalli, C.; Trabocchi, A.; Menchi, G.; Guarna, A.; *Synlett*, **2008**, *2*, 189.
131. Andrade, C. K. Z.; Rocha, R. O.; Vercillo, O. E.; Silva, W. A.; Matos, R. A. F.; *Synlett* **2003**, *15*, 2351.
132. Muñoz, L.; Bosch M. P.; Rosell, G. ; Guerrero A.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 420.
133. Coste, J.; *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205.
134. Kumara Swamy, C. K.; Kumar, N. N. B.; Balaraman, E.; Kumar K. V.P.; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551.
135. Harmata, M.; Hong, X.; Schreiner, P. R.; *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1290.
136. Baugman, T. W.; Sworen, C. J.; Wagner, B. K.; *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10943.
137. Kazemi, F.; Massah, A. R.; Javaherian, M.; *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5083.
138. Shim, J. Y.; Kim, Y.; Lee, E. H.; Lee, Y. T.; Lee, H.; *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11551.
139. Goto, G.; Okamoto, K.; Okutani, T.; Imada, I.; *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 4422.
140. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/img_disp.cgi?disptype=disp3&imgdir=hsp & accessed on 8 de agosto de 2011.
141. http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-in/img_disp.cgi?disptype=disp3&imgdir=cdsp & accessed on 8 de agosto de 2011.
142. Yuan, C.; Chang, C.; Axelrod, A.; Dionicio, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *73*, 1290.

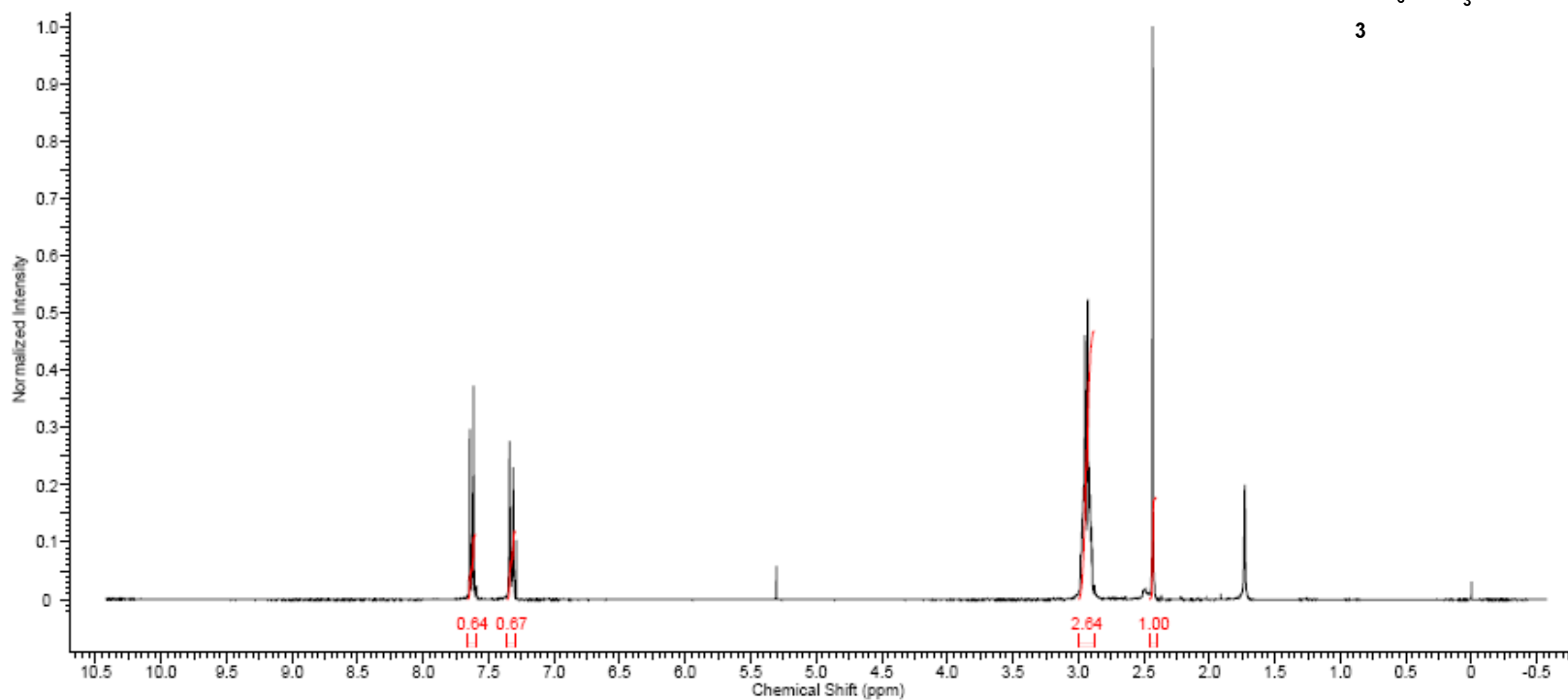
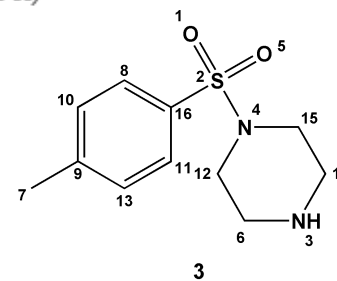
143. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=A52153/BRAND-_KEY&F=SPEC, acessada em 23 de novembro de 2010.
144. Majumdar, K. C.; Das, U.; Jama, K. N.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3550.
145. Robert, L. J.; Pouter C. D.; *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 1547.
146. Patching, G. S.; Middleton, A. D.; Henderson, F. J. P.; Herbert, B. R.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2057.
147. Bellingham, R.; Buswell, A. M.; Choudary, B. M.; Gordon, H, A.; Urquhart.; *Org. Proc. Res.* **2010**, *14*, 254
148. Majumdar, C. K.; Mondal, S.; Ghosh, D.; *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 348.
149. Majumdar, C. K.; Mondal, S.; *Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 9604.
150. Majumdar, C. K.; Mondal, S.; Ghosh, D.; Chattopadhyay, B.; *Synthesis* **2010**, 1315.
151. Boutillier, P.; Quiclet-Sire, B.; Zafar, N. Z.; Zard, S. Z.; *Tetrahedron: Asym.* **2010**, *21*, 1649.
152. Quiclet-Sire, B.; Revol, G.; Zard, S. Z.; *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6656.
153. López-Valdez, G.; Olguin-Urbe, S.; Miranda, L. D.; *Tetrahedron L.* **2011**, *67*, 2693.
154. Keck, E. G.; Grier, C. G.; *Synlett* **1999**, 1657.
155. Yan, S. J.; Chien, P. L.; Cheng, C. C.;
156. Kumar, K. S.; Iqbal, J.; Pal, M.; *Tetrahedron L.* **2009**, *50*, 6244.

Anexos

Composto 3

Formula	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	FW	240.3219
---------	---	----	----------

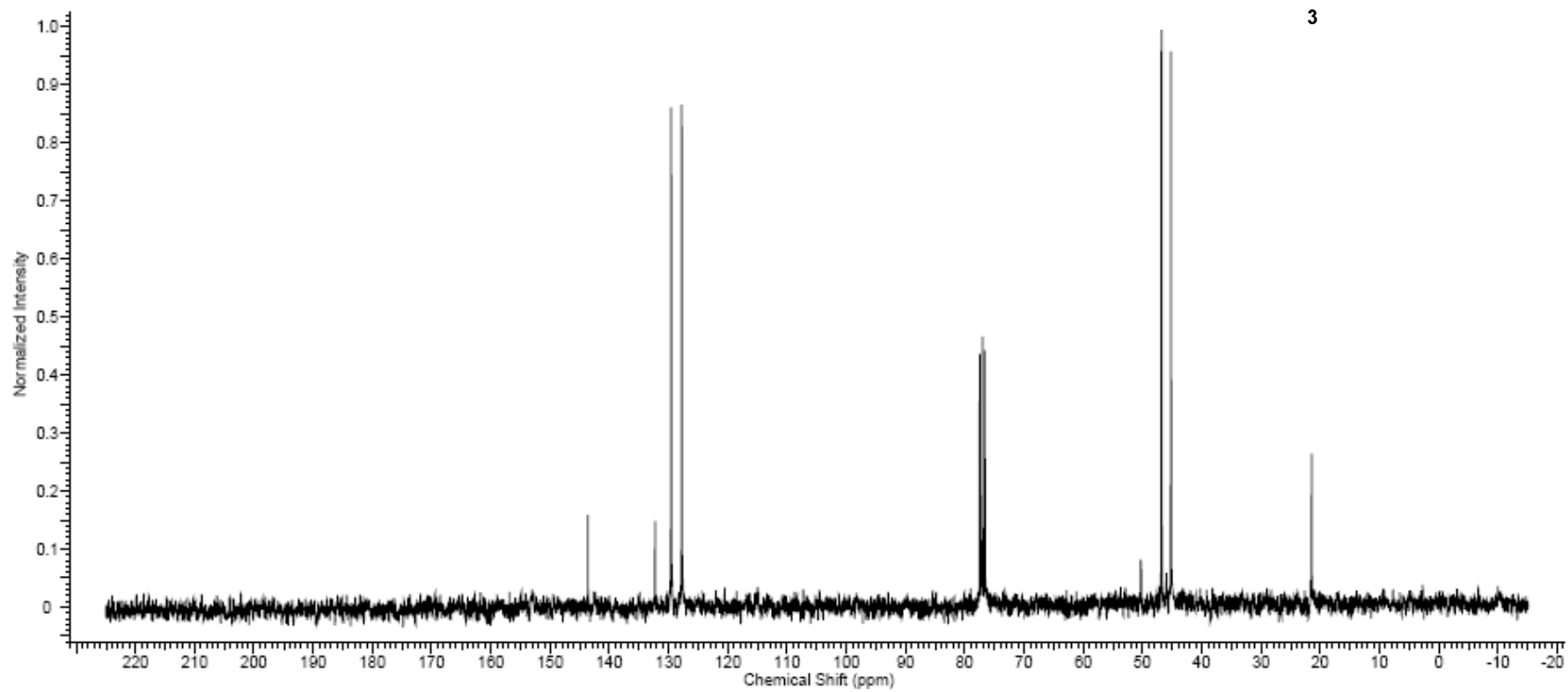
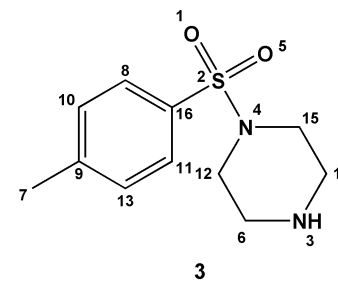
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.66 - 7.60 (m, 2 H), 7.36 - 7.30 (m, 2 H), 2.99 - 2.88 (m, 8 H), 2.43 (s, 1 H)



Composto 3

Formula	C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	FW	240.3219
---------	---	----	----------

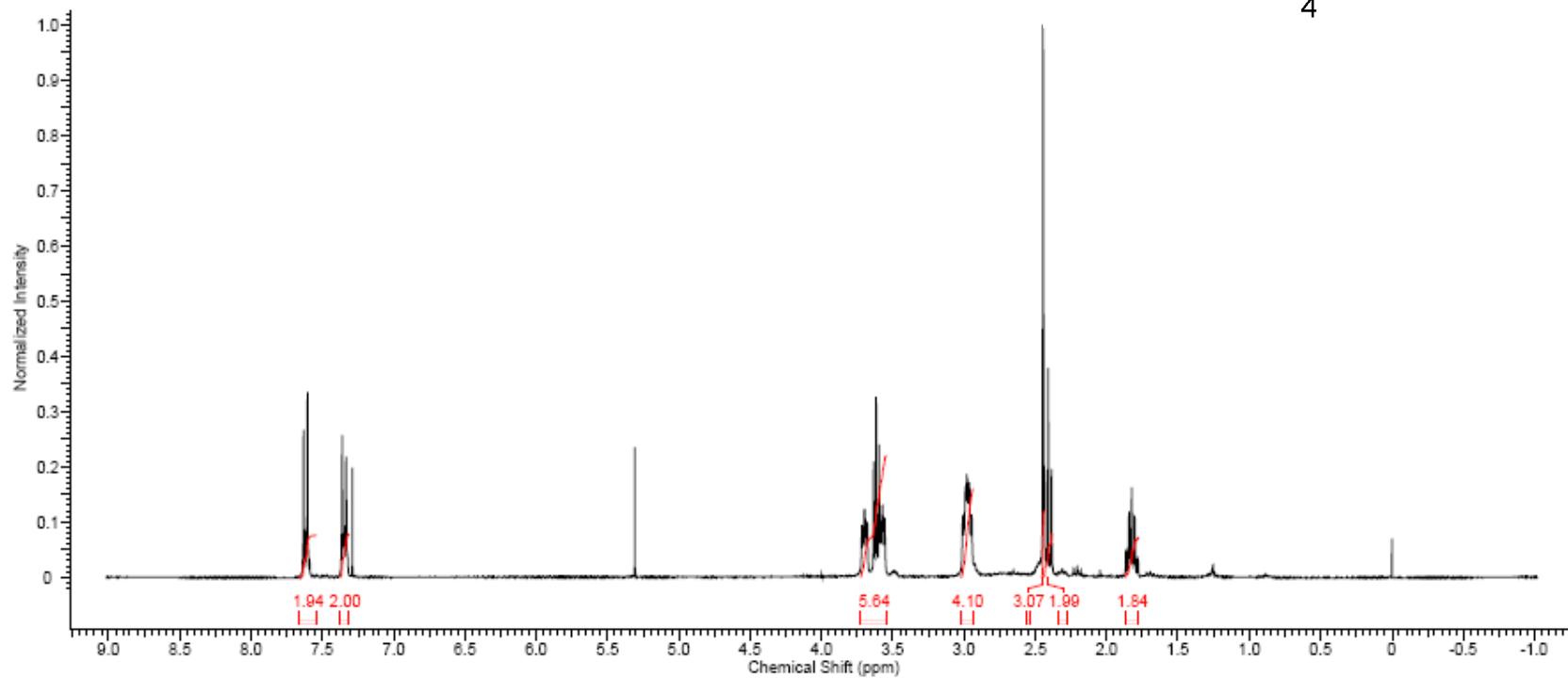
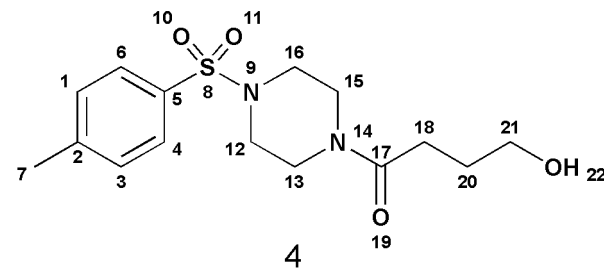
¹³C NMR (75MHz, CHLOROFORM-d) δ = 143.6, 132.3, 129.6, 127.8, 46.8, 45.3, 21.5



Composto 4

Formula C₁₉H₂₂N₂O₃S FW 326.4112

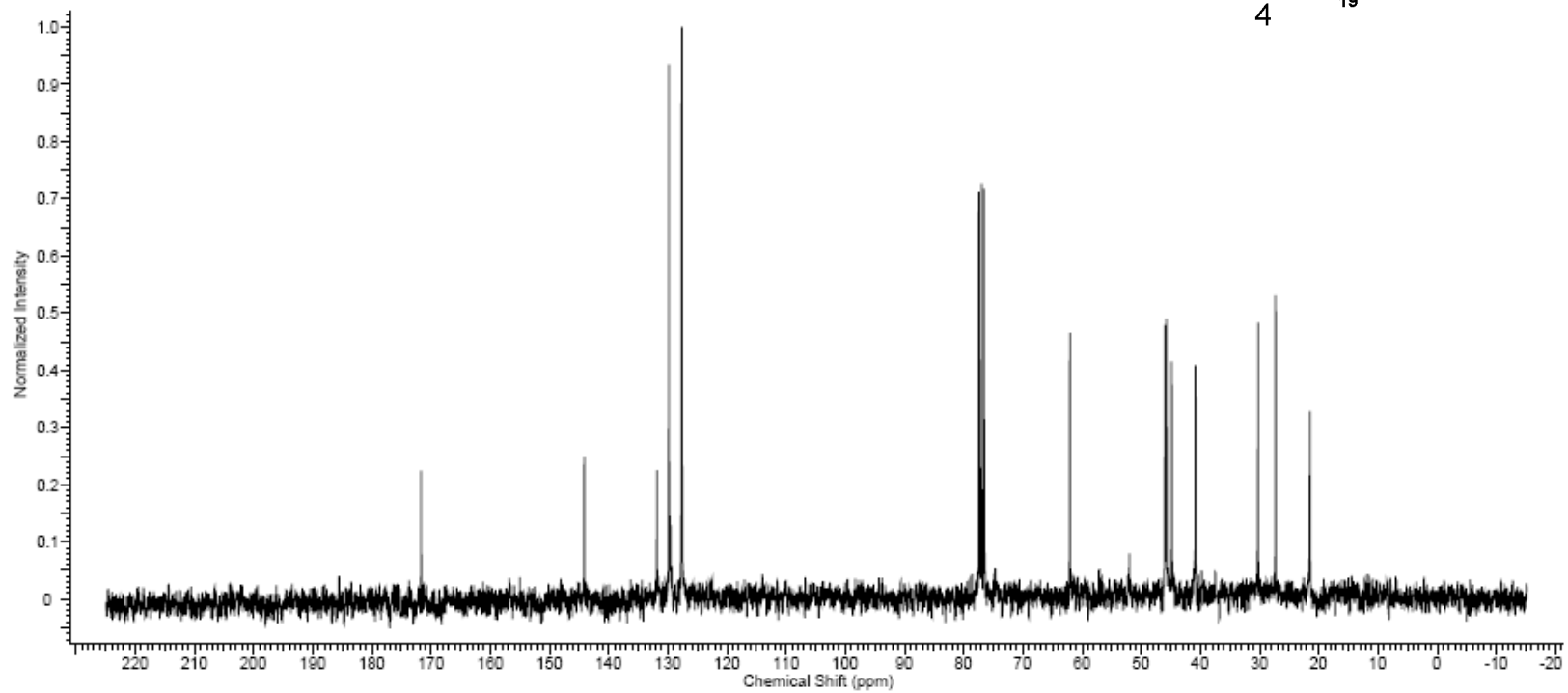
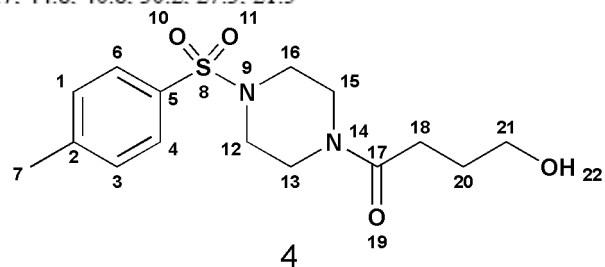
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.66 - 7.54 (m, 2 H), 7.38 - 7.31 (m, 2 H), 3.73 - 3.55 (m, 6 H), 3.02 - 2.94 (m, 4 H), 2.45 (s, 3 H), 2.41 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 1.87 - 1.78 (m, 2 H)



Composto 4

Formula C₁₆H₂₂N₂O₃S FW 326.4112

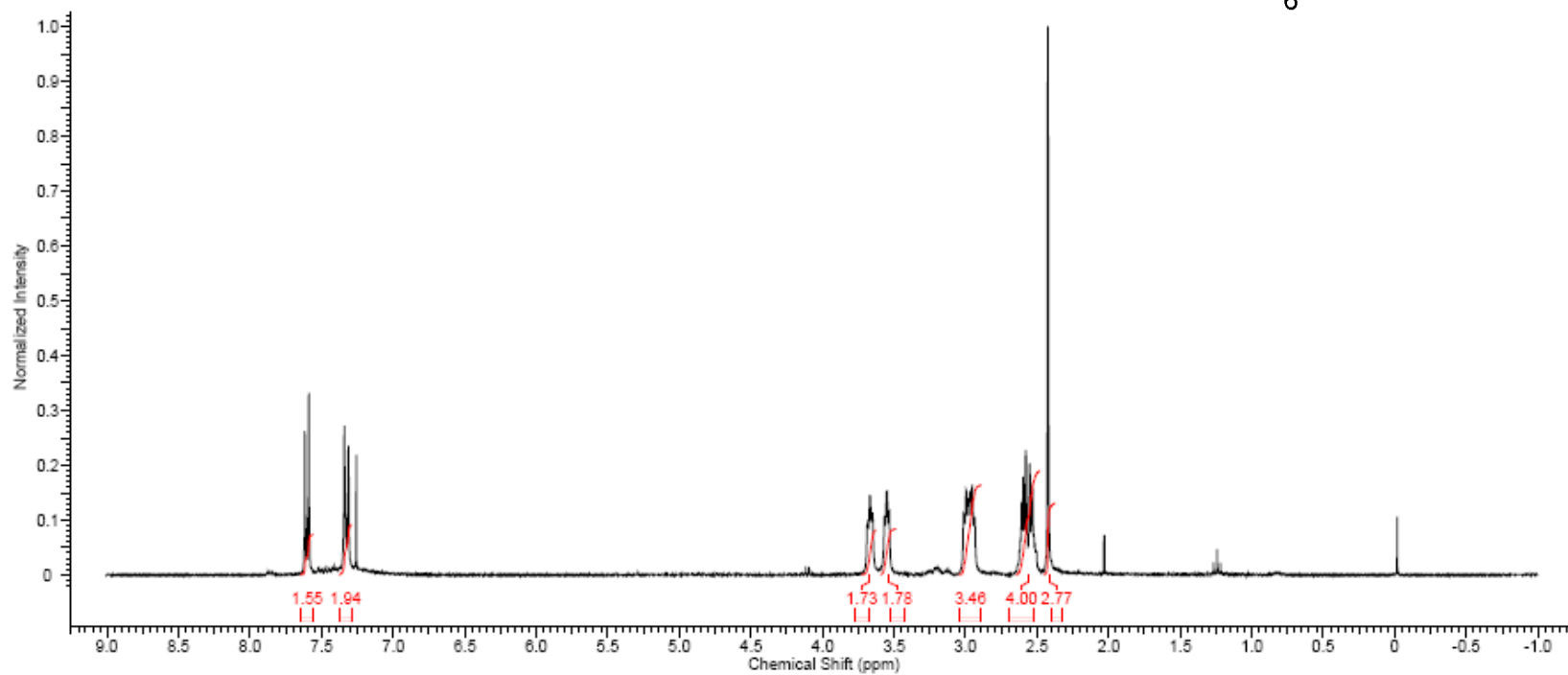
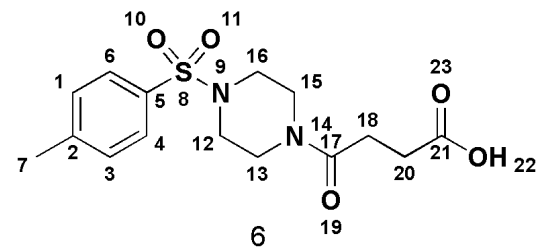
¹³C NMR (75MHz, CHLOROFORM-d) δ = 171.7, 144.2, 131.9, 132.2, 129.4, 127.6, 62.1, 46.0, 45.7, 44.8, 40.8, 30.2, 27.3, 21.5



Composto 6

Formula	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	FW	340.3947
---------	---	----	----------

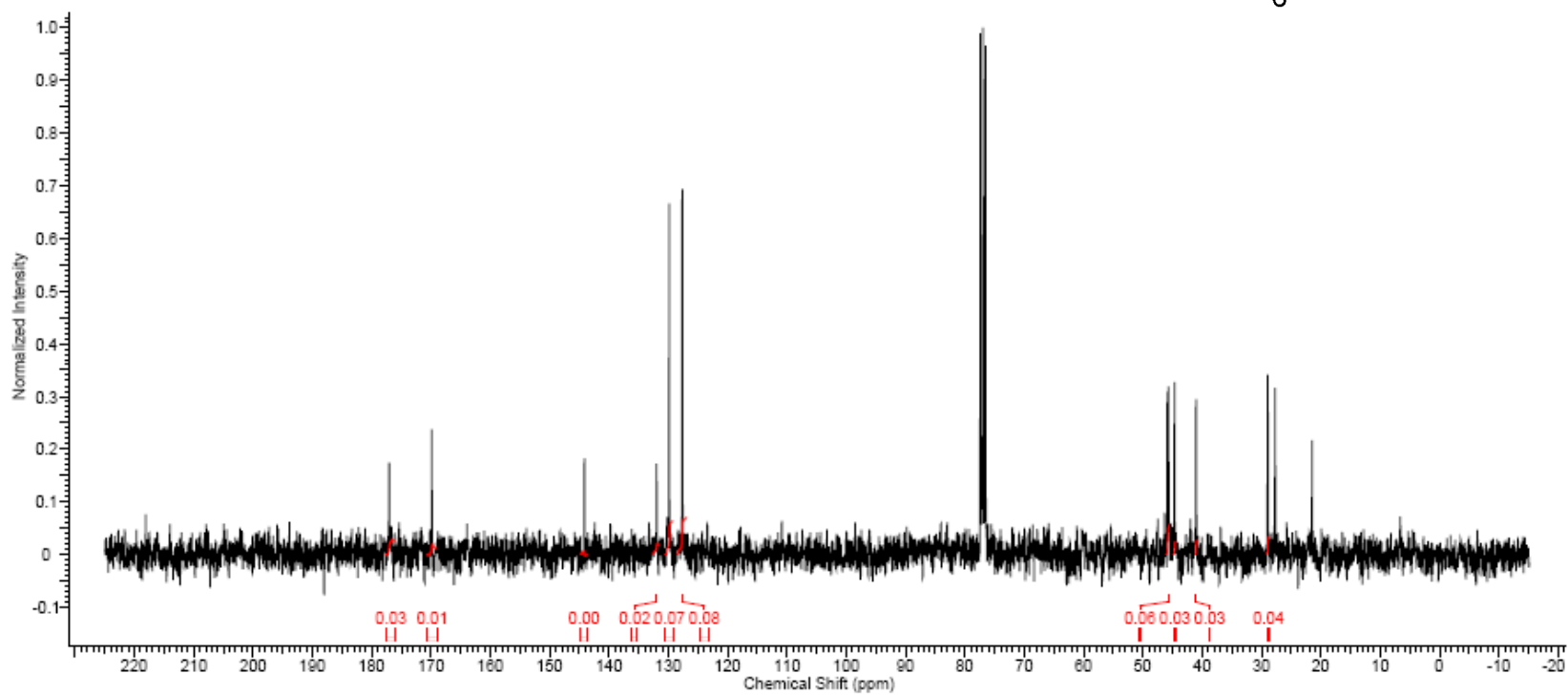
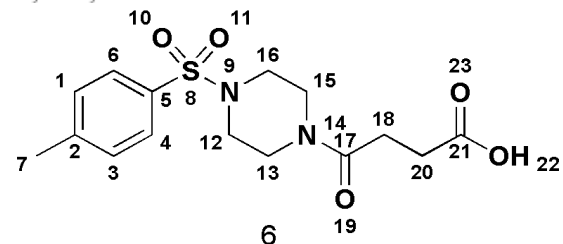
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.65 - 7.56 (m, 2 H), 7.38 - 7.29 (m, 2 H), 3.72 - 3.63 (m, 2 H), 3.59 - 3.49 (m, 2 H), 2.98 (td, J = 5.1, 12.5 Hz, 4 H), 2.65 - 2.48 (m, 4 H), 2.43 (s, 3 H)



Composto 6

Formula C₁₆H₂₀N₂O₄S | FW 340.3947

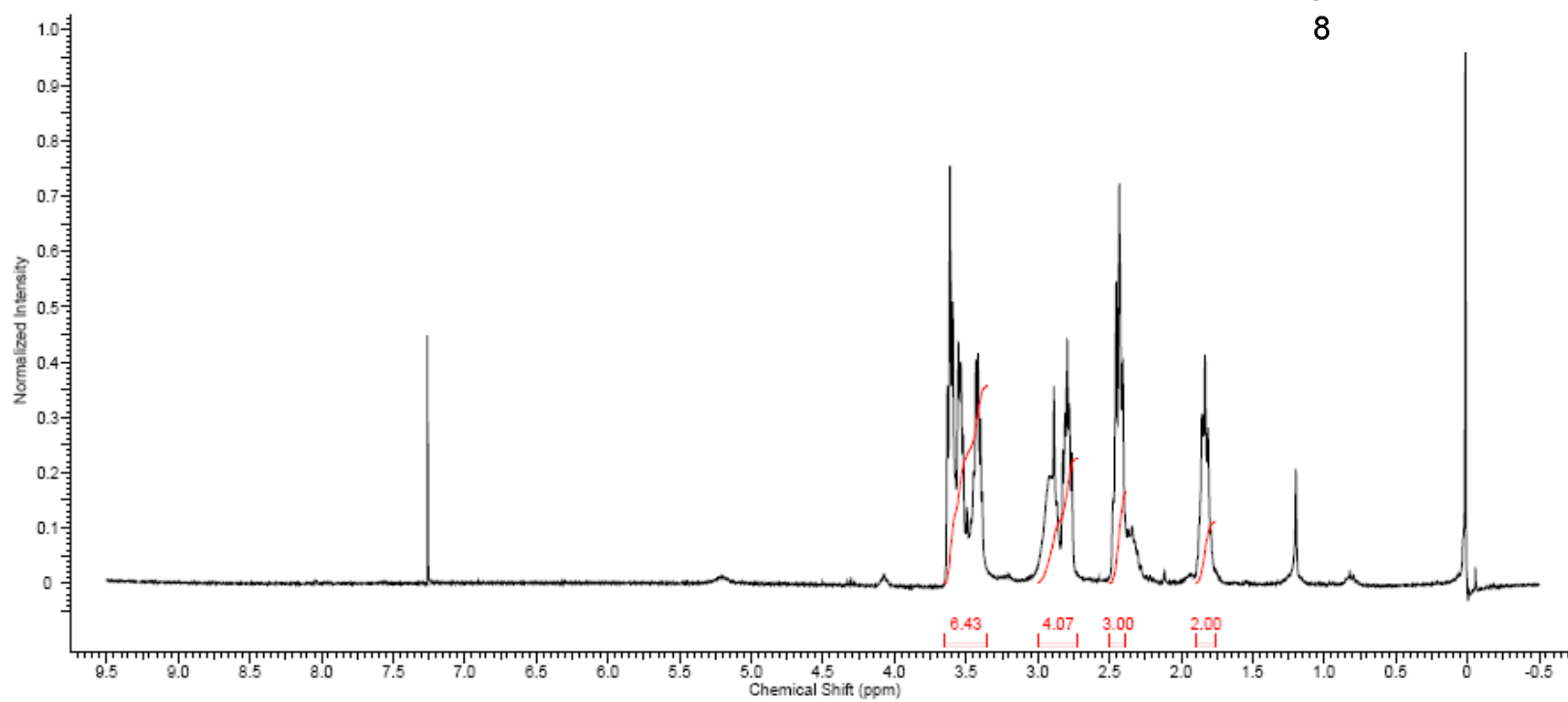
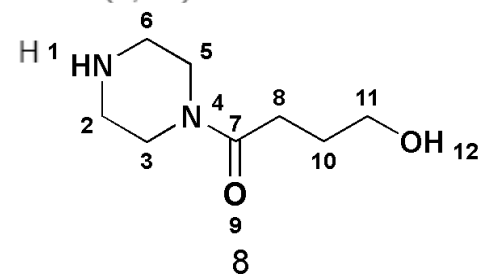
¹³C NMR (75MHz, CHLOROFORM-d) δ = 177.1, 169.9, 144.2, 132.0, 129.9, 127.7, 45.8, 44.7, 41.1, 29.0, 27.7, 21.5



Composto 8

Formula $C_{12}H_{19}NO$ FW 172.2248

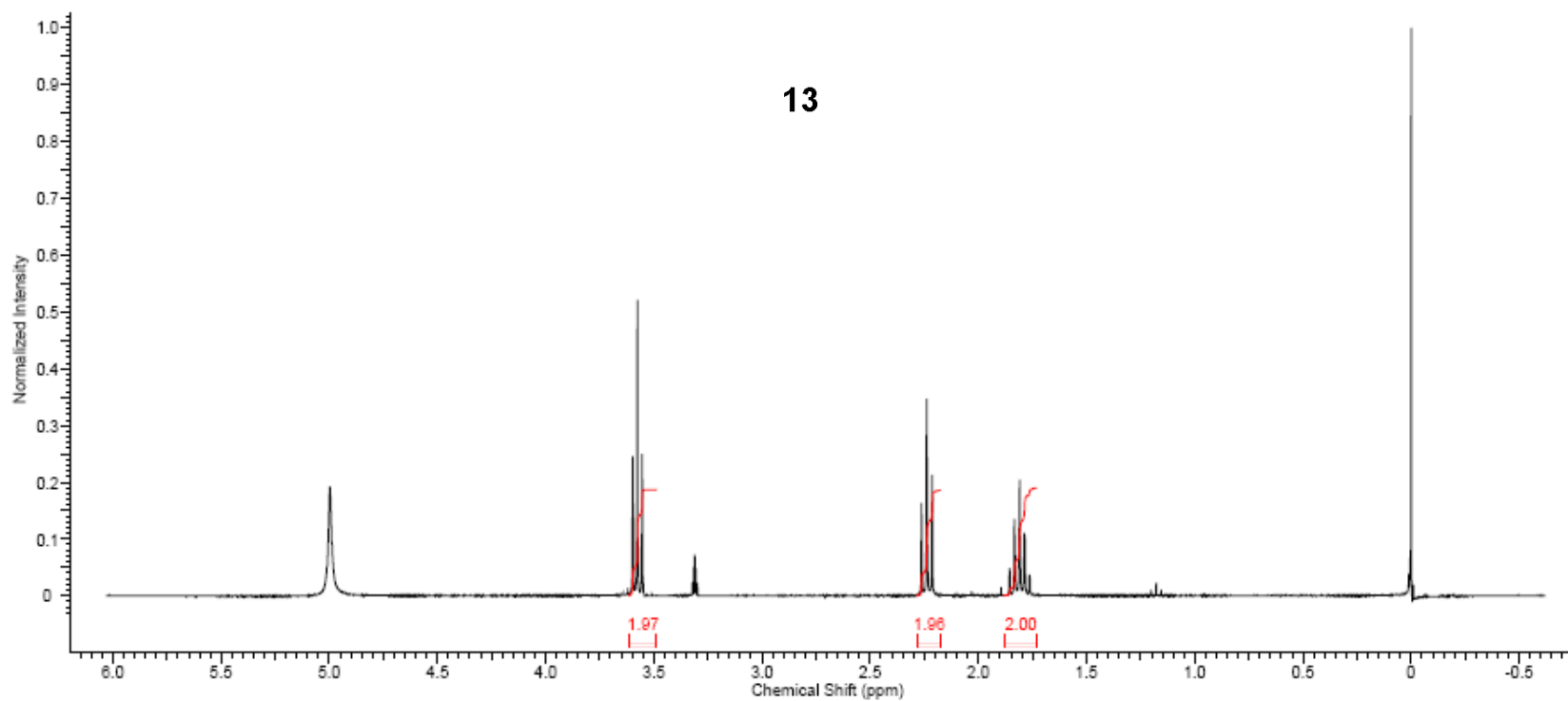
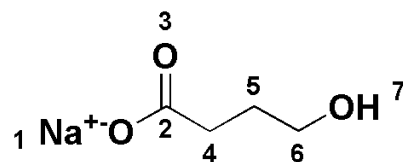
1H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 3.65 - 3.35 (m, 6 H), 3.00 - 2.72 (m, 4 H), 2.50 - 2.39 (m, 2 H), 1.89 - 1.76 (m, 2 H)



Composto 13

Formula $C_4H_7O_2$? FW 87.0972+?

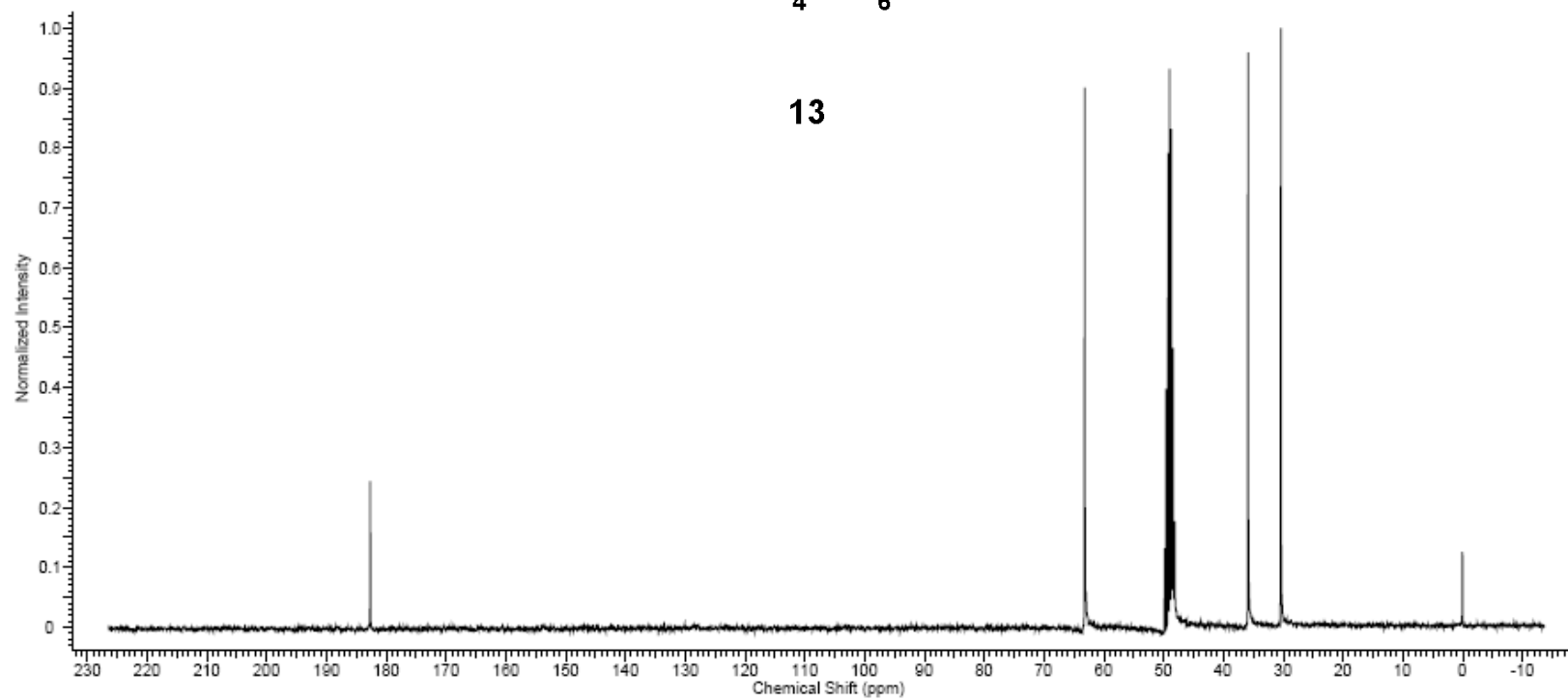
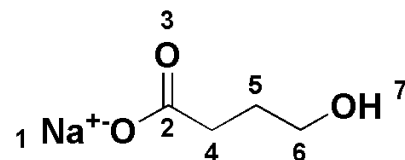
1H NMR (300MHz, METHANOL- d_4) δ = 3.57 (t, J = 6.5 Hz, 2 H), 2.24 (t, J = 7.4 Hz, 2 H), 1.88 - 1.73 (m, 2 H)



Composto 13

Formula $C_4H_7O_2^-$ FW 87.0972+?

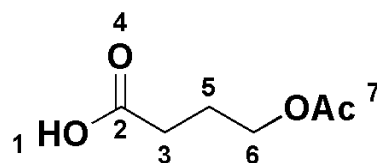
^{13}C NMR (75MHz, METHANOL- d_4) $\delta = 183.1, 63.2, 35.9, 30.4$



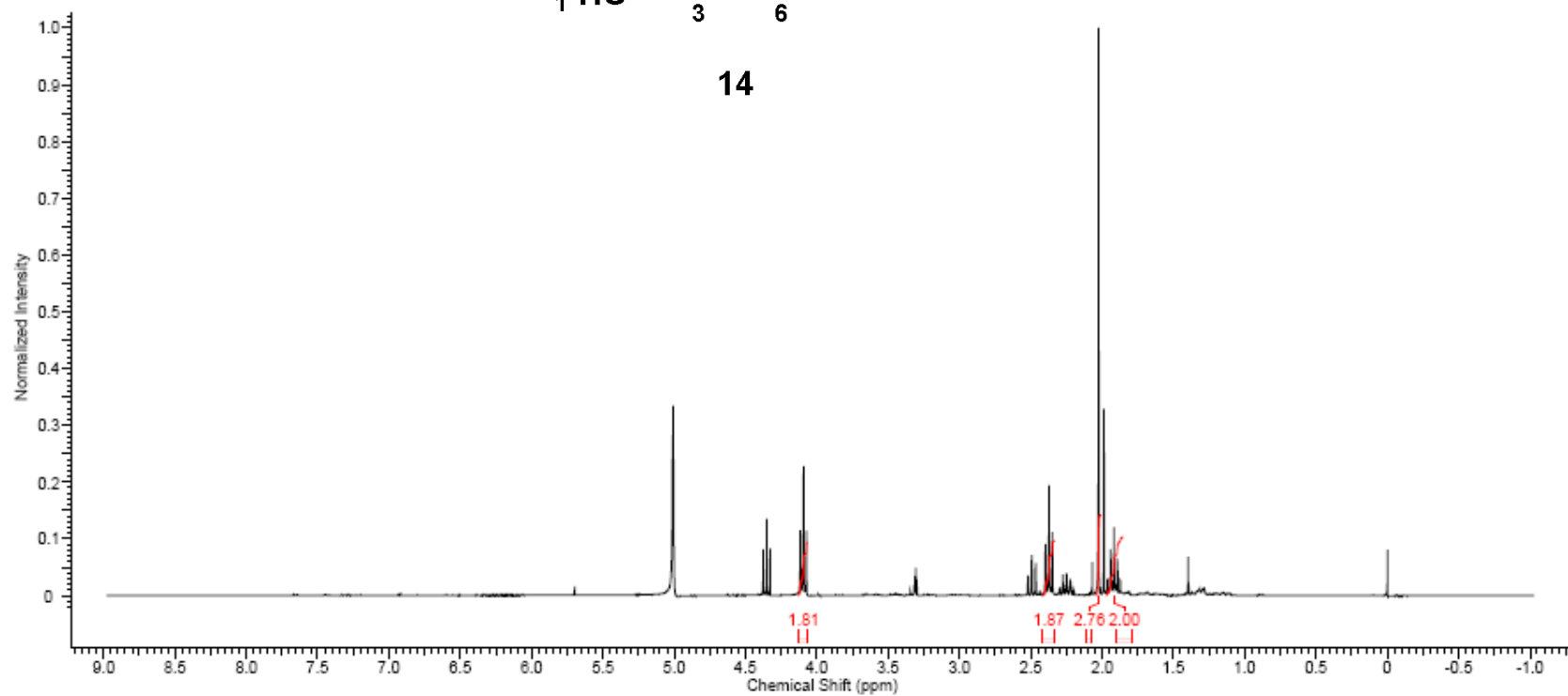
Composto 14

Formula C₆H₁₀O₄ FW 146.1412

¹H NMR (300MHz, METHANOL-d₄) δ = 4.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 2 H), 2.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.02 (s, 3 H), 1.97 - 1.86 (m, 2 H)



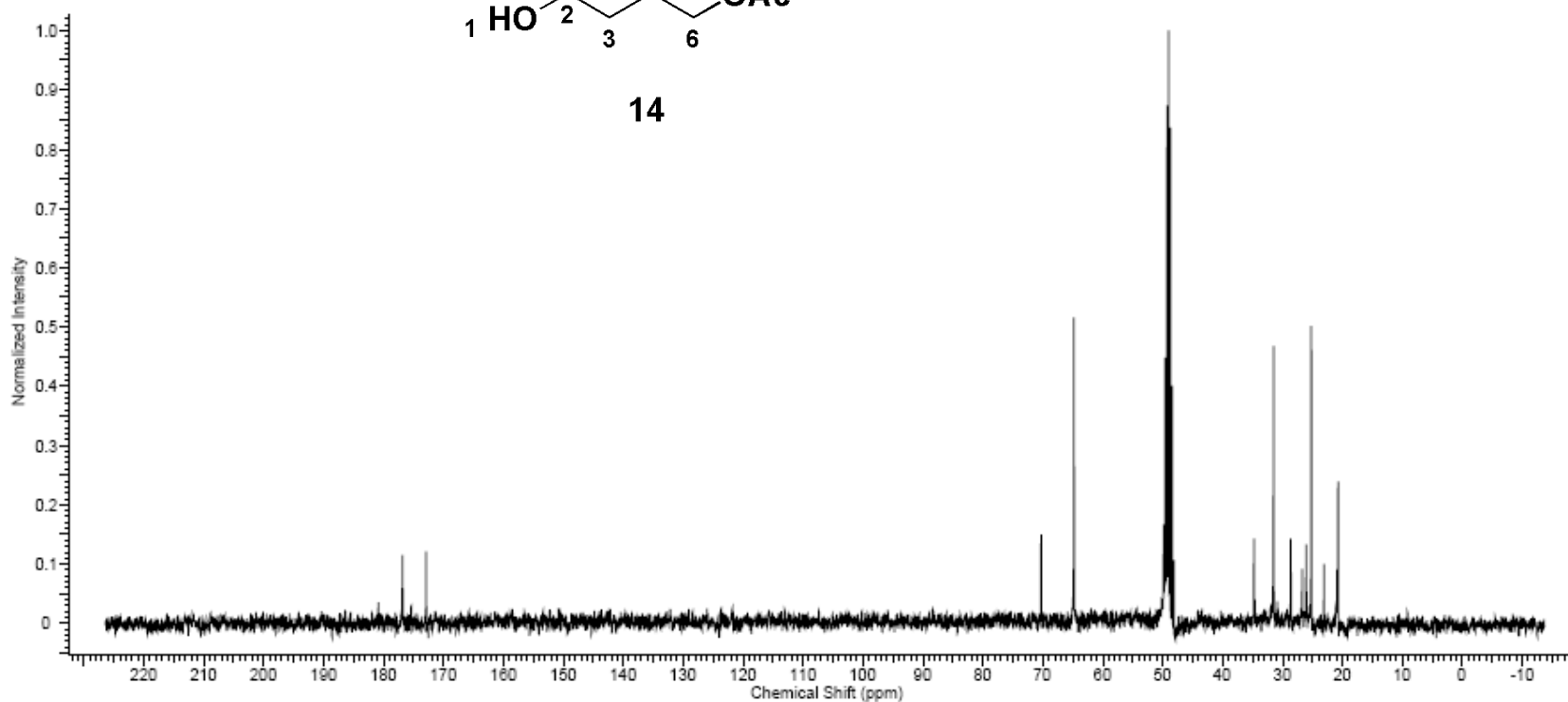
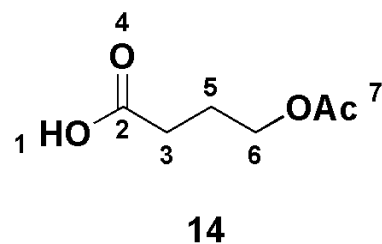
14



Composto 14

Formula $C_7H_{10}O_3$ FW 146.1412

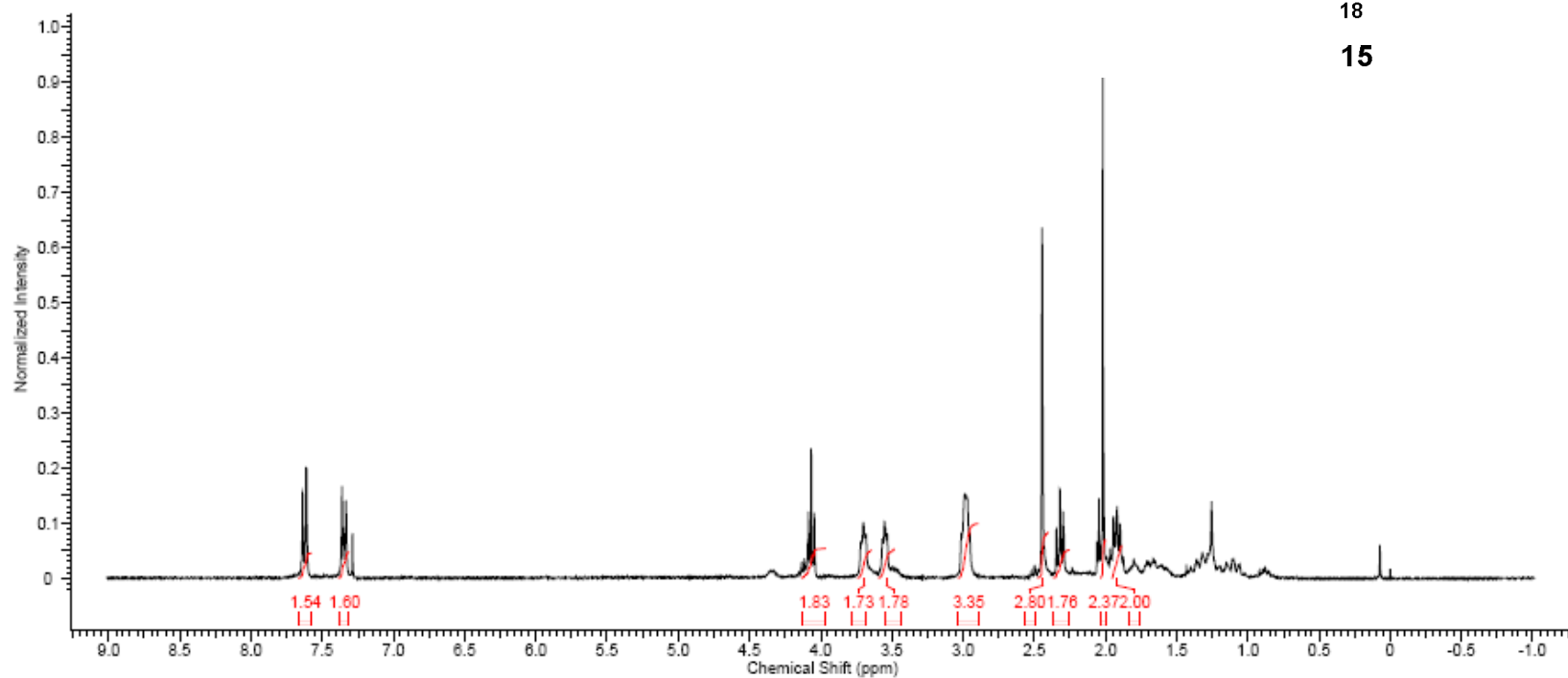
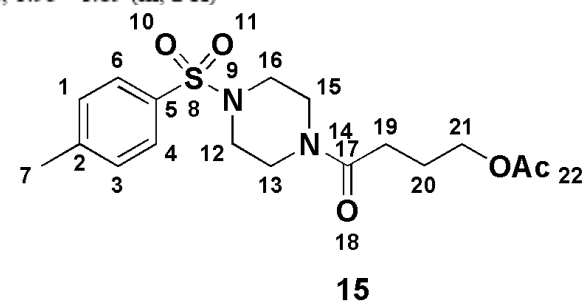
^{13}C NMR (75MHz, METHANOL- d_4) $\delta = 176.8, 172.9, 64.2, 34.7, 31.2, 25.2$



Composto 15

Formula C₁₇H₂₂N₂O₃S FW 368.4478

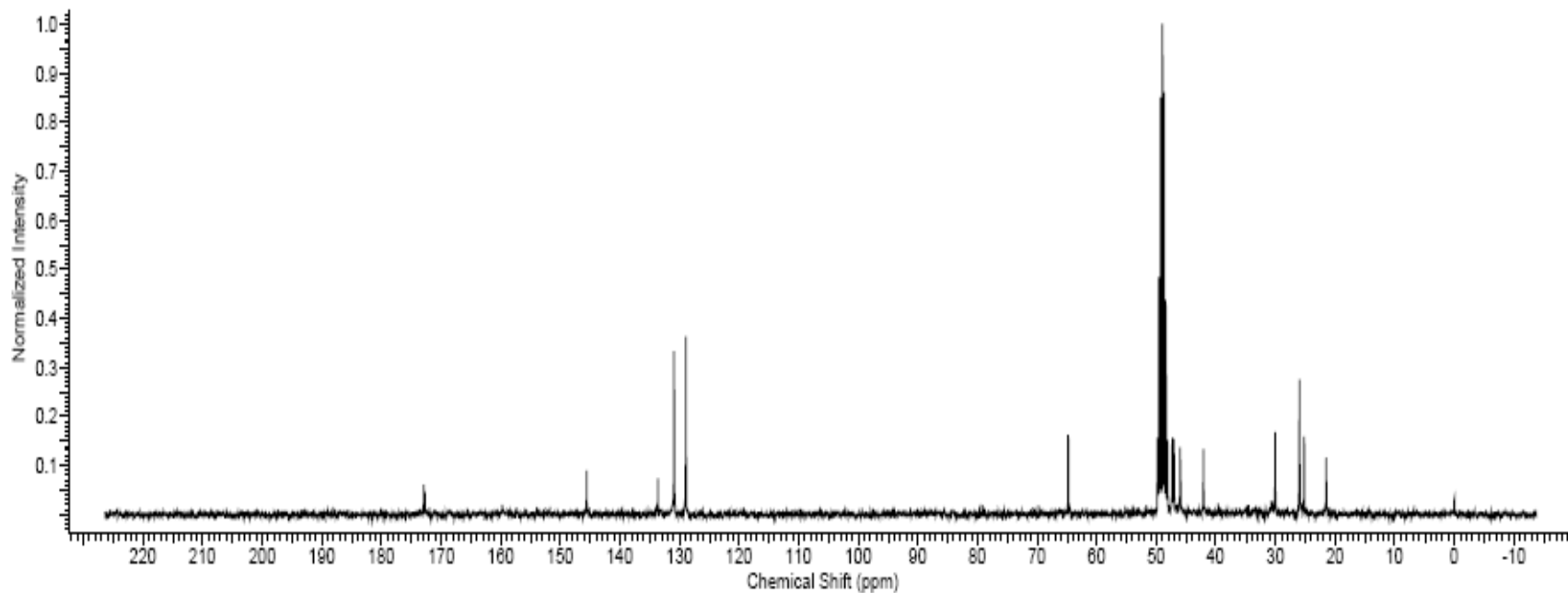
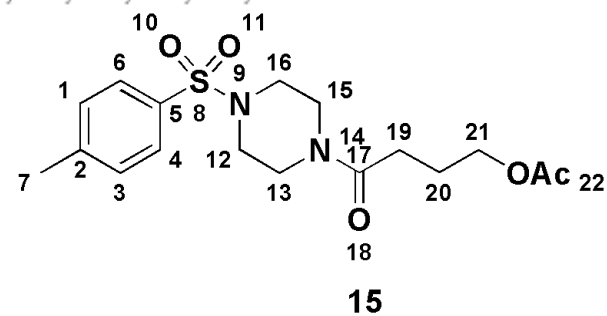
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.63 (d, J = 8.3 Hz, 2 H), 7.35 (d, J = 8.0 Hz, 2 H), 4.07 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 4.13 - 3.97 (m, 2 H), 3.74 - 3.64 (m, 2 H), 3.59 - 3.48 (m, 2 H), 3.03 - 2.89 (m, 4 H), 2.45 (s, 3 H), 2.36 - 2.25 (m, 2 H), 2.03 - 2.00 (m, 3 H), 1.95 - 1.89 (m, 2 H)



Composto 15

Formula	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₃ S	FW	368.4478
---------	---	----	----------

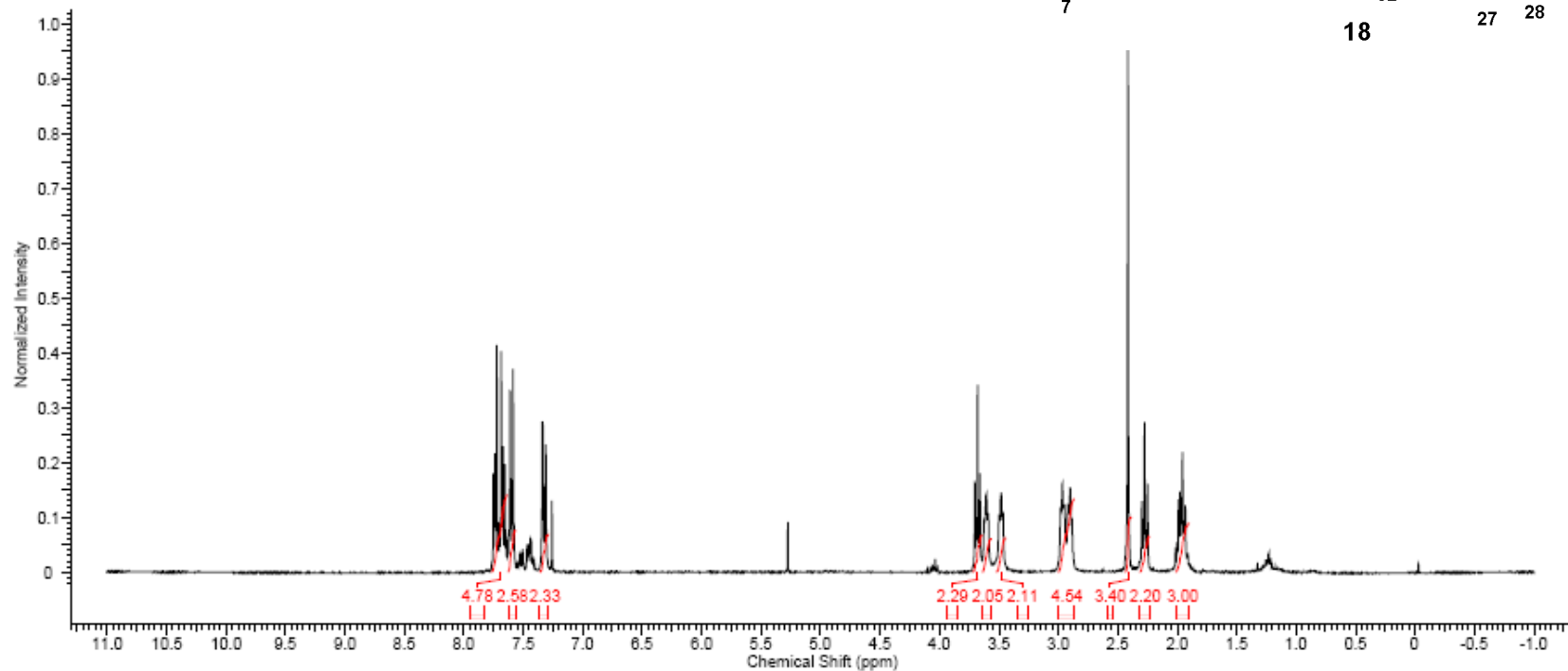
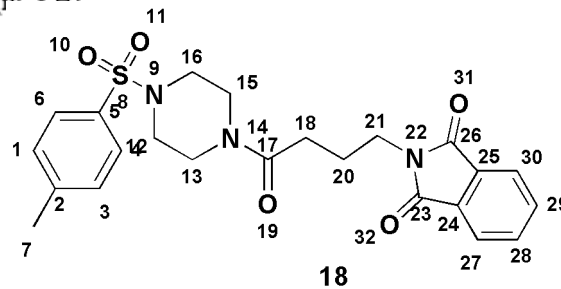
¹³C NMR (75MHz, METHANOL-d₄) δ = 172.9, 172.7, 145.6, 133.6, 130.9, 128.9, 64.8, 47.4, 47.0, 46.0, 42.1, 30.1, 26.0, 25.2, 21.5



Composto 18

Formula	C ₂₉ H ₃₀ N ₂ O ₅ S	FW	455.5267
---------	---	----	----------

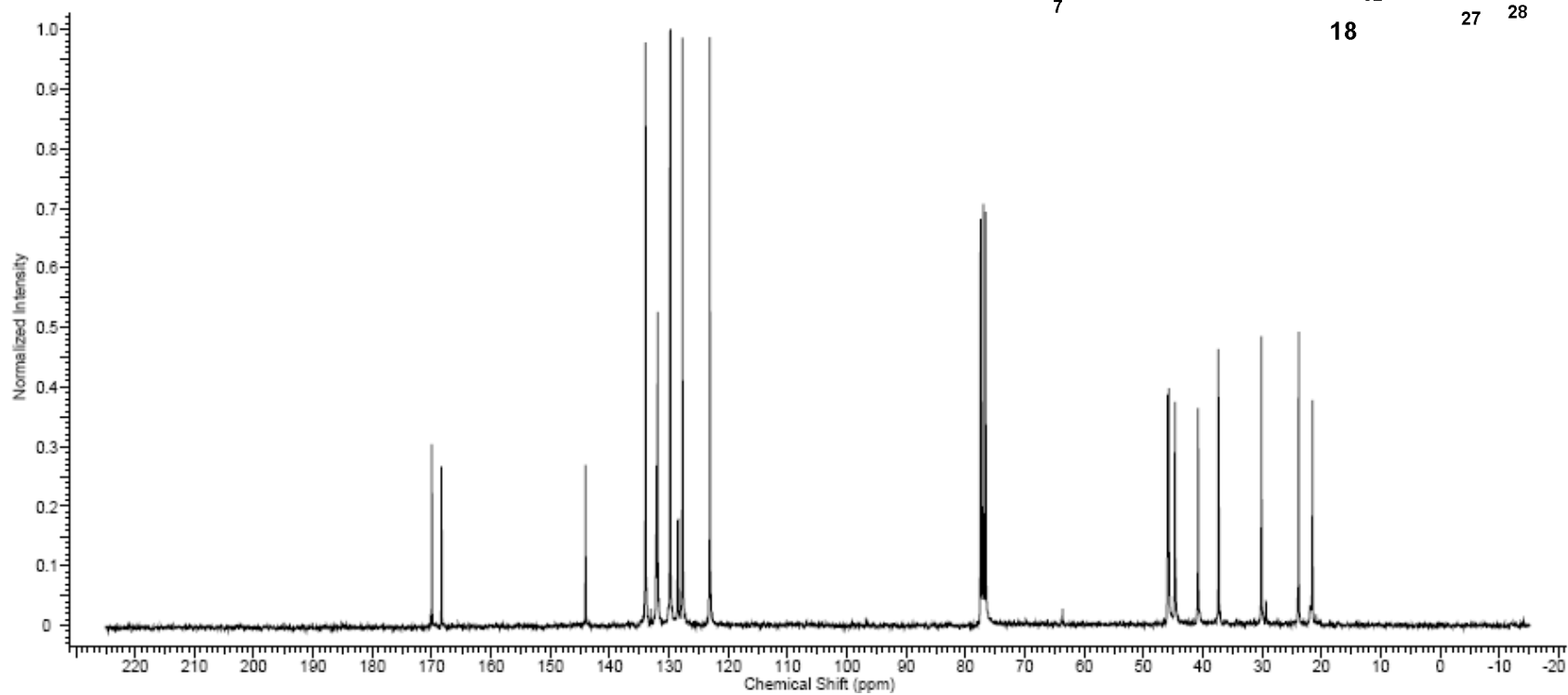
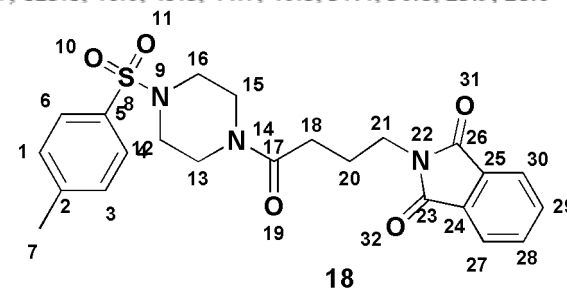
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.77 - 7.64 (m, 4 H), 7.63 - 7.56 (m, 2 H), 7.36 - 7.29 (m, 2 H), 3.68 (t, *J* = 6.5 Hz, 2 H), 3.64 - 3.56 (m, 2 H), 3.52 - 3.44 (m, 2 H), 2.93 (td, *J* = 4.9, 19.2 Hz, 4 H), 2.41 (s, 3 H), 2.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.01 - 1.90 (m, 2 H)



Composto 18

Formula C₂₃H₂₈N₂O₃S FW 455.5267

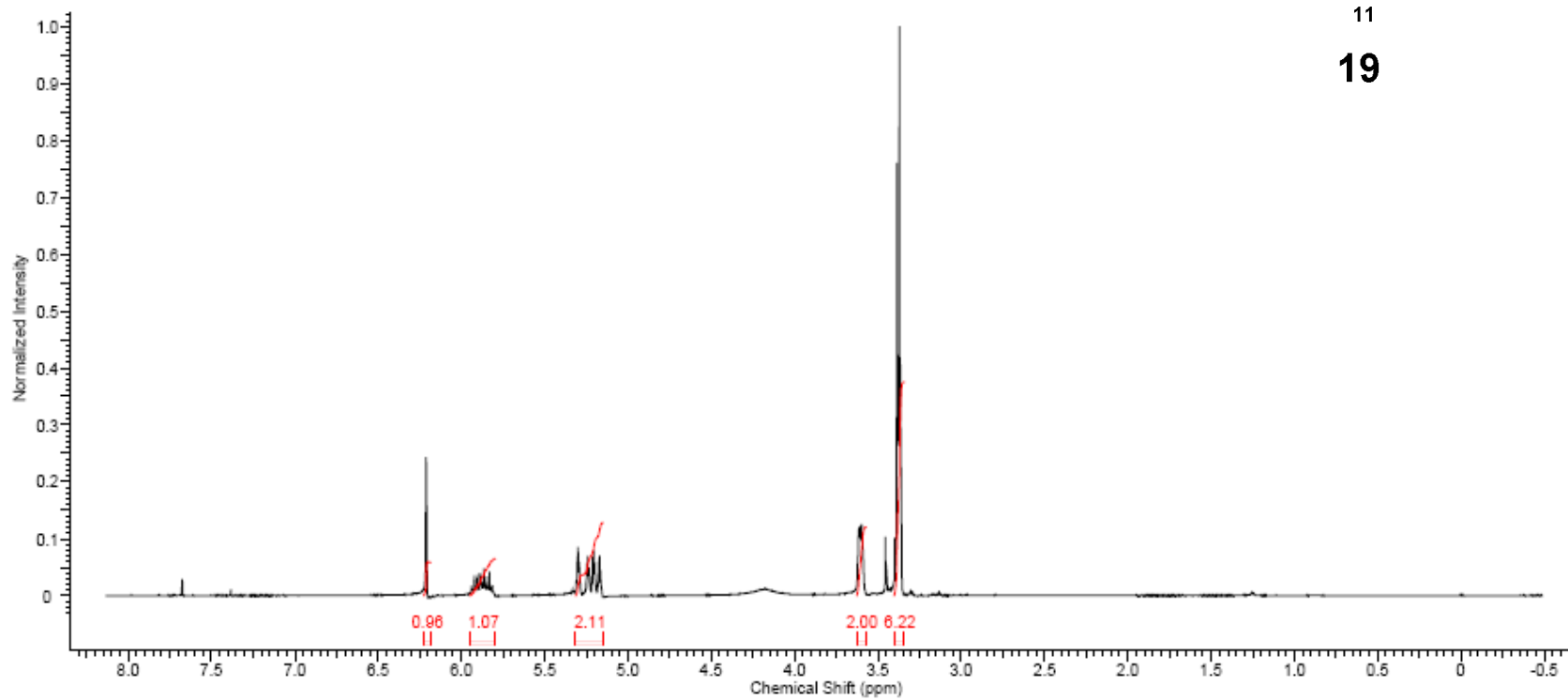
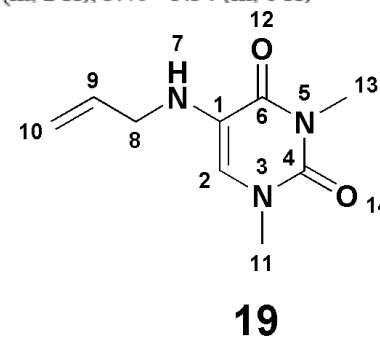
¹³C NMR (75MHz, CHLOROFORM-d) δ = 170.0, 168.4, 144.1, 134.0, 132.1, 129.8, 128.6, 128.4, 127.7, 123.1, 46.0, 45.8, 44.7, 40.8, 37.4, 30.1, 23.9, 21.6



Composto 19

Formula $C_8H_{11}NO_2$ FW 195.2184

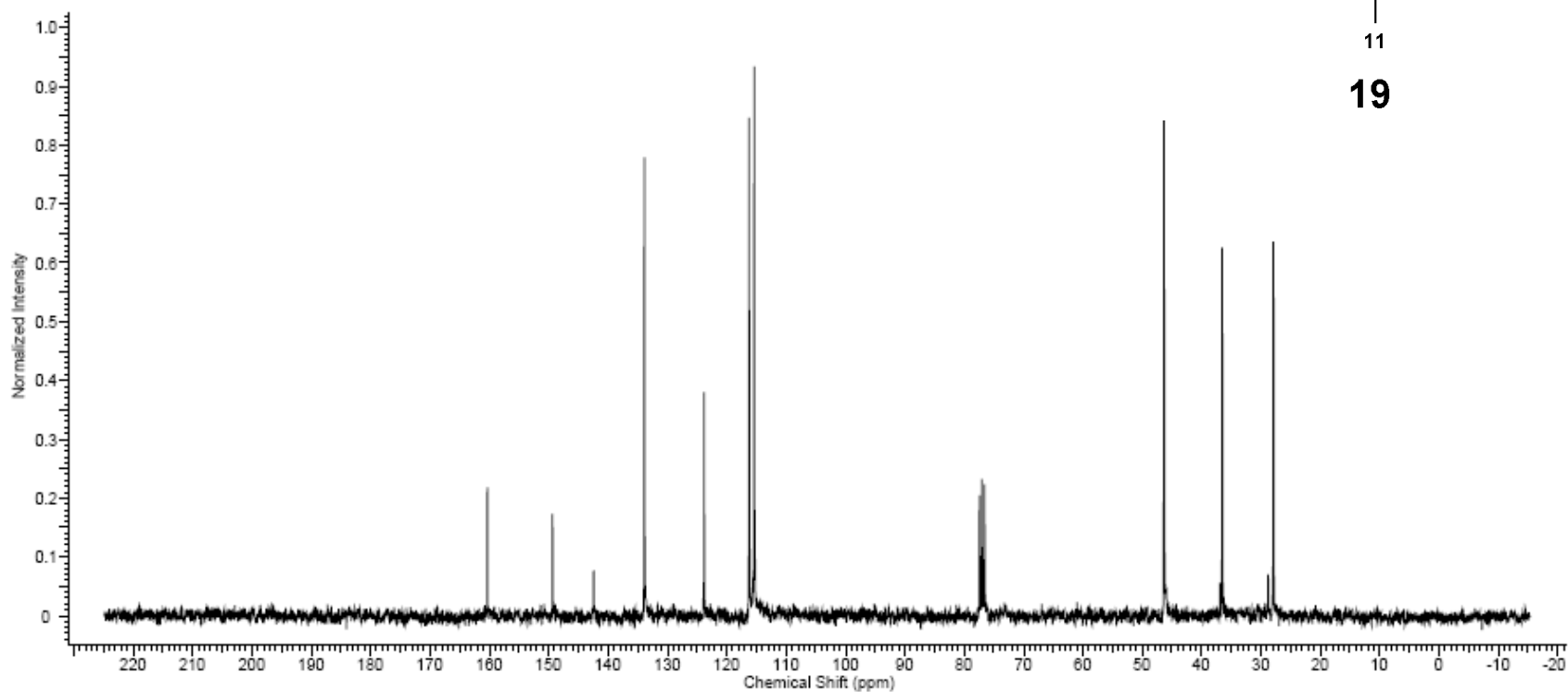
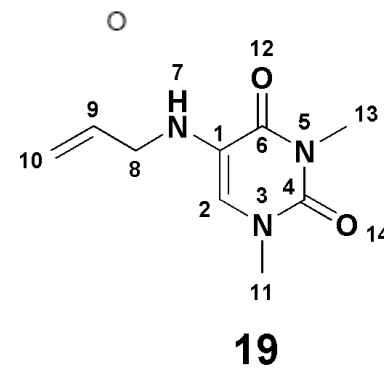
1H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 6.21 (s, 1 H), 5.95 - 5.80 (m, 1 H), 5.31 - 5.15 (m, 2 H), 3.63 - 3.57 (m, 2 H), 3.40 - 3.34 (m, 6 H)



Composto 19

Formula $C_8H_8N_2O_2$ FW 195.2184

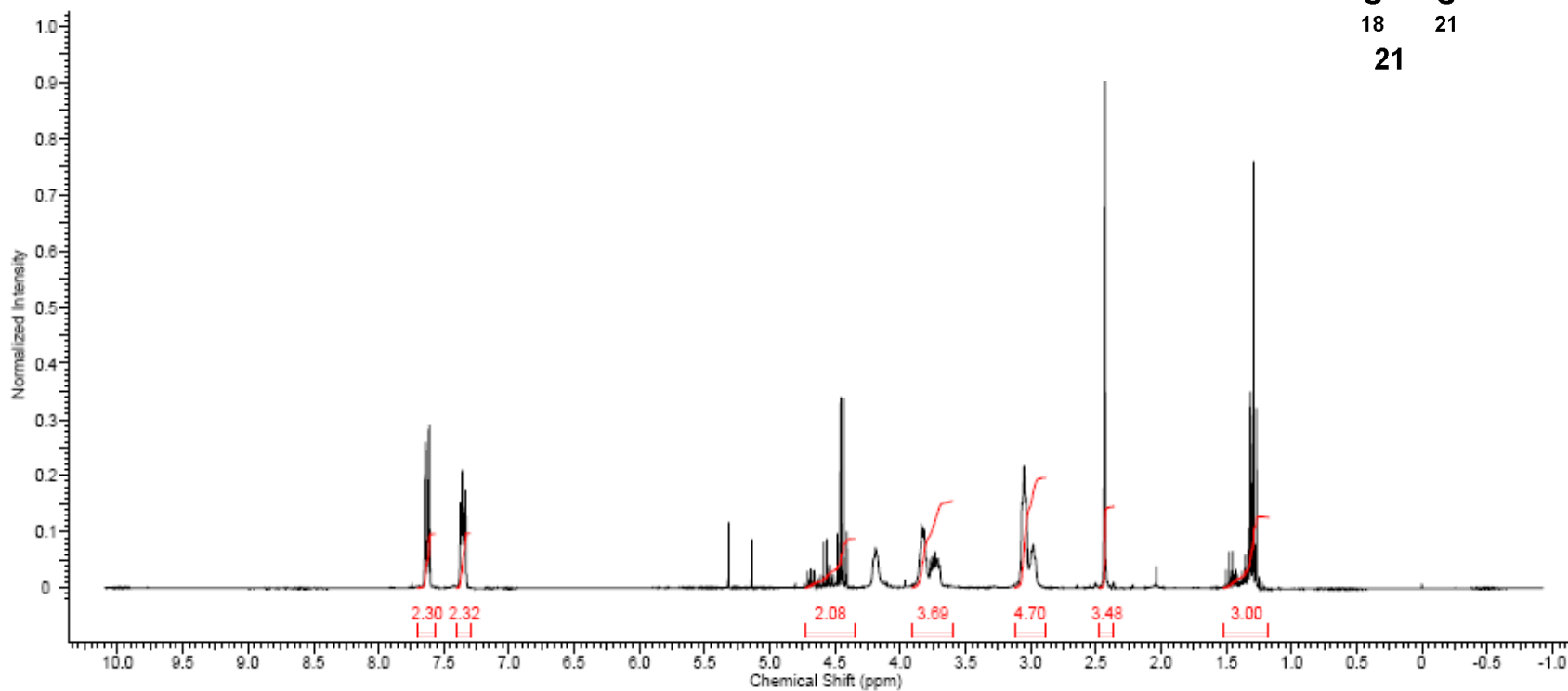
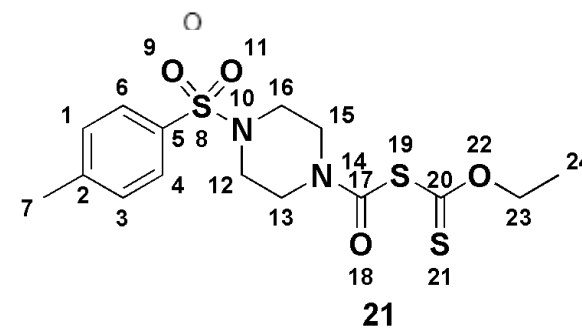
^{13}C NMR (75MHz, CHLOROFORM- d) δ = 160.4, 149.3, 133.8, 123.8, 116.2, 115.4, 46.3, 36.5, 27.9



Composto 21

Formula C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃ S ₂	FW 388.5253
--	-------------

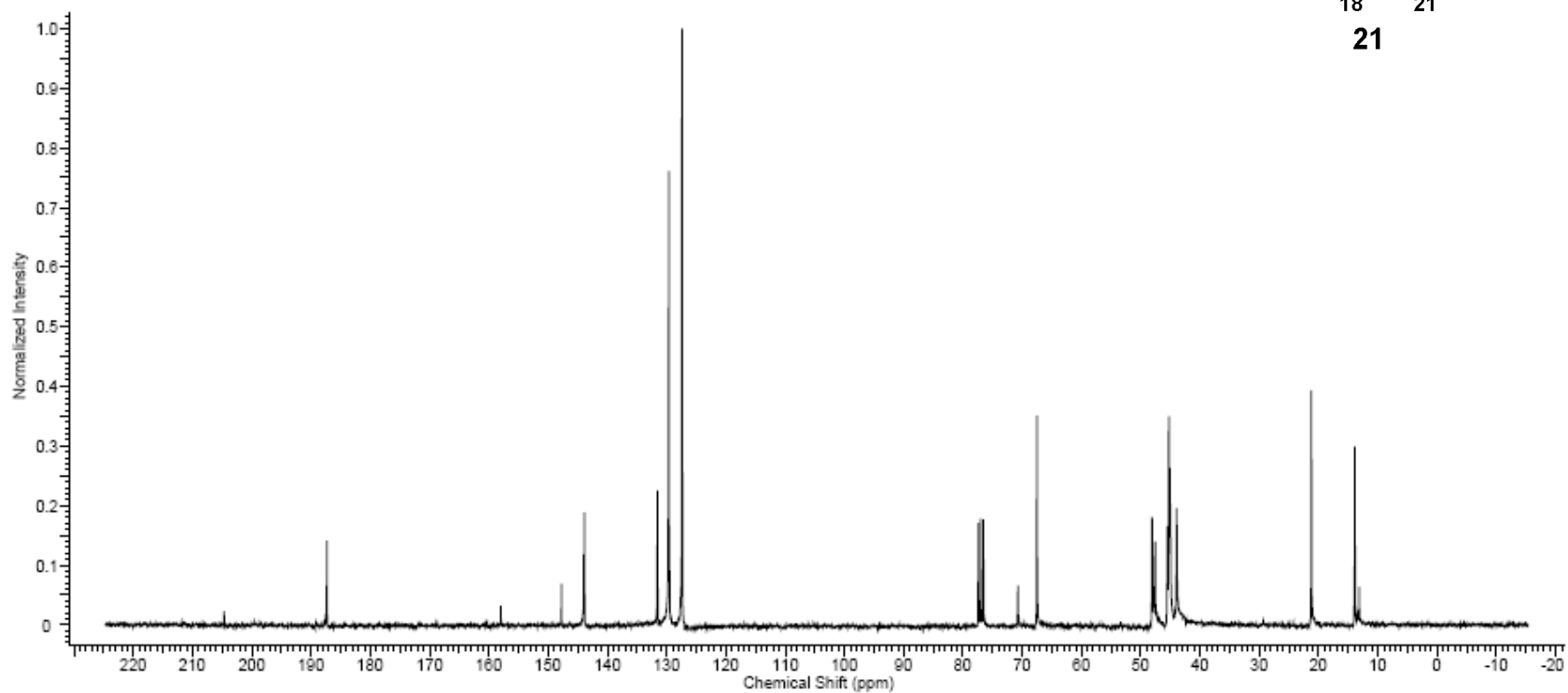
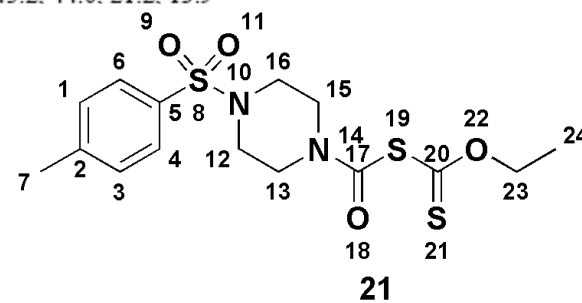
¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.70 - 7.57 (m, 2 H), 7.40 - 7.29 (m, 2 H), 4.73 - 4.35 (m, 2 H), 3.91 - 3.60 (m, 3 H), 3.12 - 2.89 (m, 4 H), 2.43 (s, 3 H), 1.52 - 1.18 (m, 3 H)



Composto 21

Formula C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₃ S	FW 388.5253
---	-------------

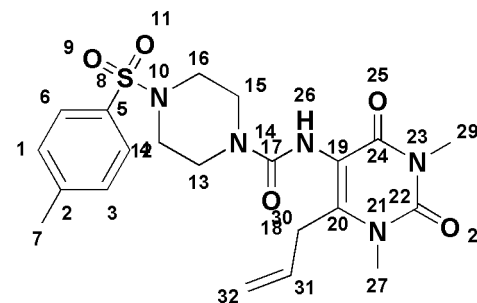
¹³C NMR (75MHz, CHLOROFORM-d) δ = 204.7, 187.3, 144.0, 131.6, 129.6, 127.4, 67.5, 48.1, 47.6, 45.2, 44.0, 21.2, 13.9



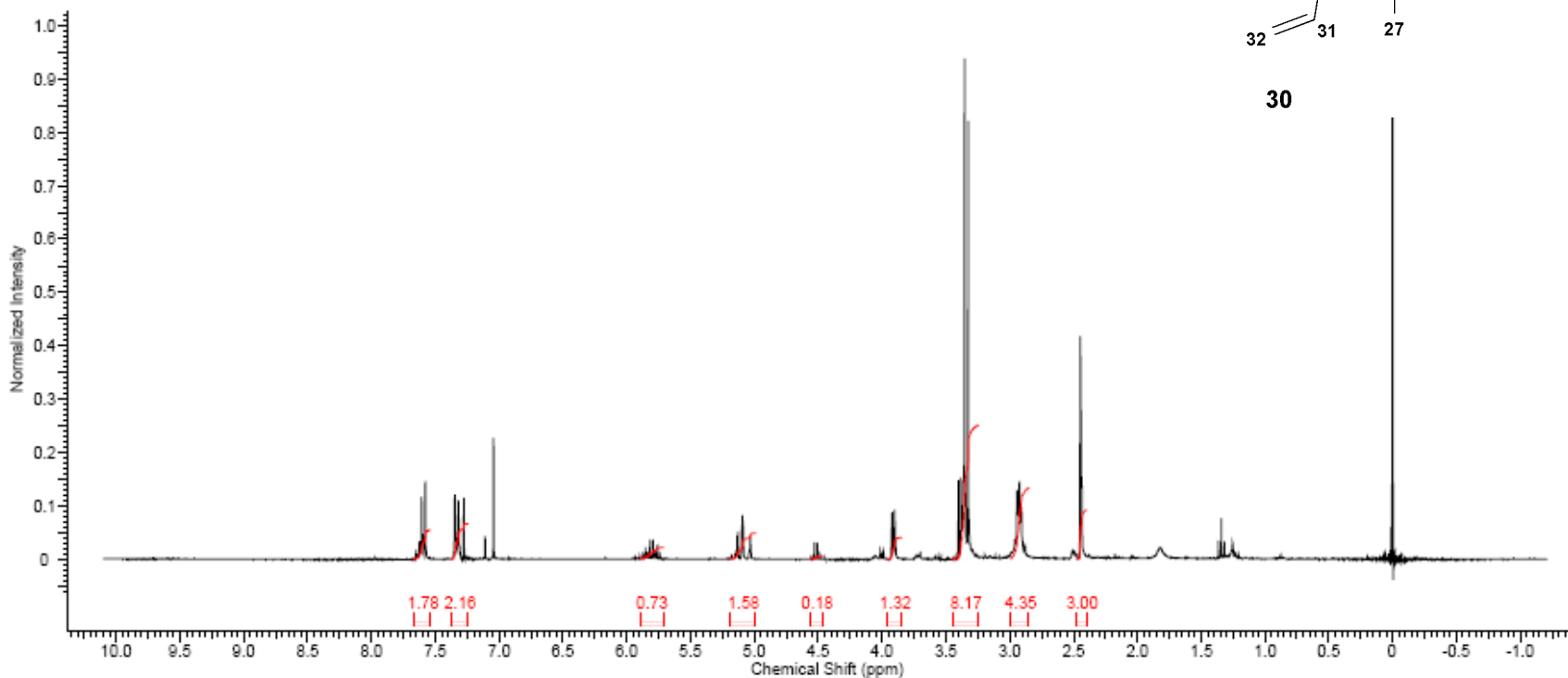
Composto 30

Formula $C_{21}H_{29}N_3O_3S$ FW 461.5348

1H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.66 - 7.54 (m, 2 H), 7.38 - 7.25 (m, 2 H), 5.90 - 5.71 (m, 1 H), 5.19 - 4.99 (m, 2 H), 4.52 (d, J = 7.0 Hz, 1 H), 3.91 (d, J = 6.2 Hz, 1 H), 3.45 - 3.24 (m, 8 H), 2.99 - 2.85 (m, 4 H), 2.47 - 2.40 (m, 3 H)



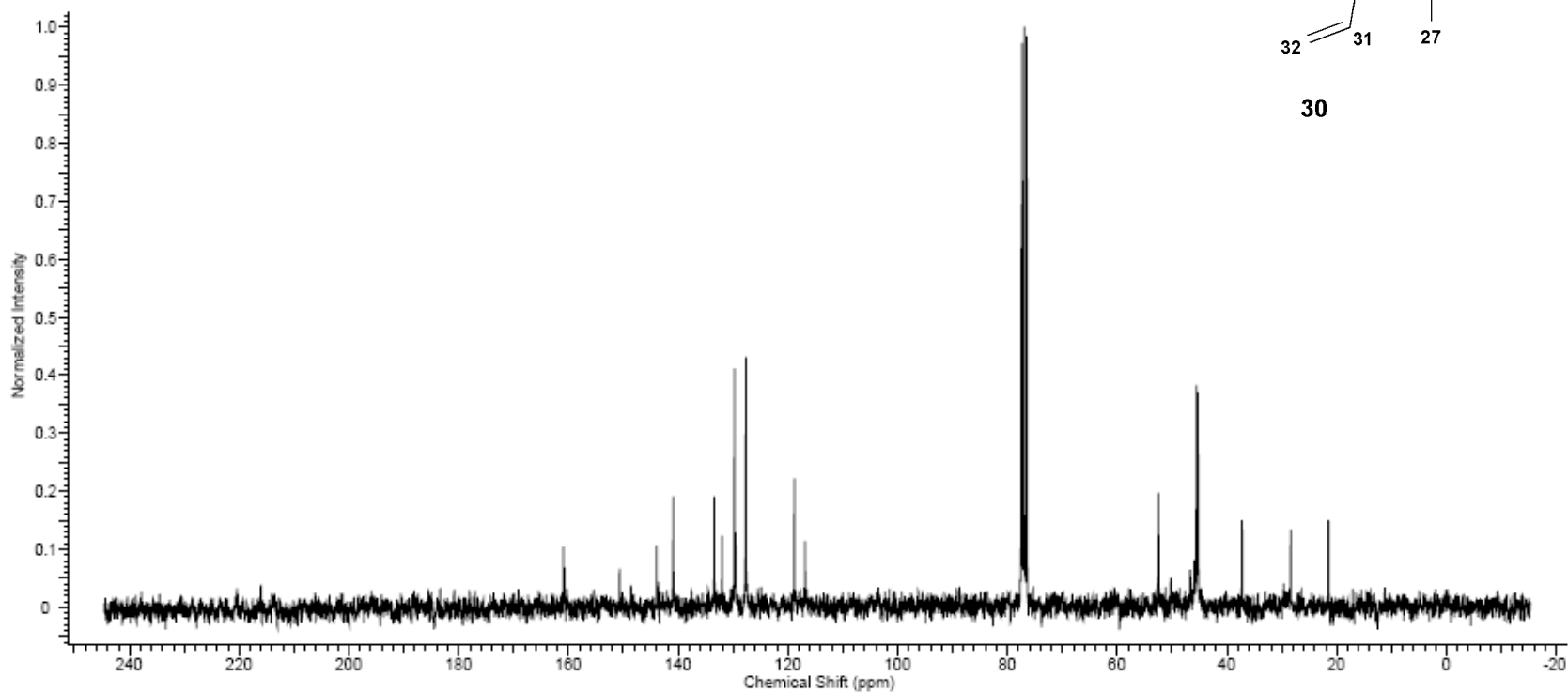
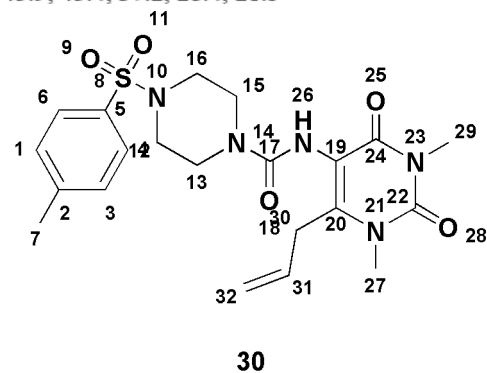
30



Composto 30

Formula C₂₄H₂₈N₄O₃S FW 481.5348

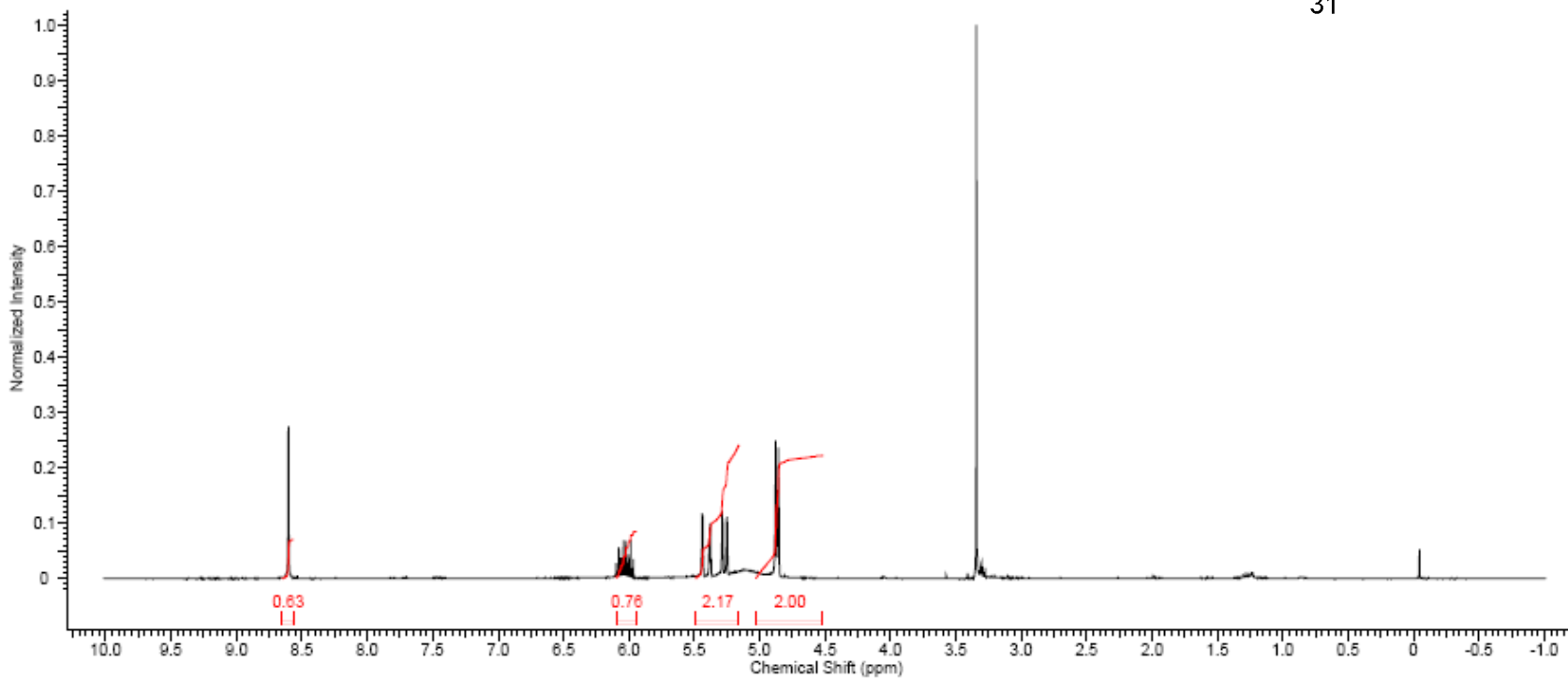
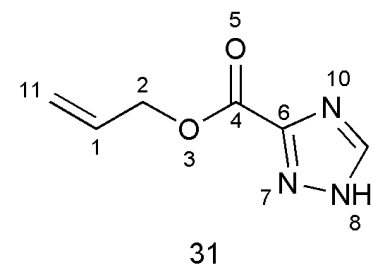
¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ = 160.6, 150.7, 144.0, 140.9, 133.5, 132.0, 129.7, 127.7, 118.8, 116.9, 52.5, 45.9, 45.4, 37.2, 28.4, 21.5



Composto 31

Formula $C_8H_9NO_2$	FW 153.1387
----------------------	-------------

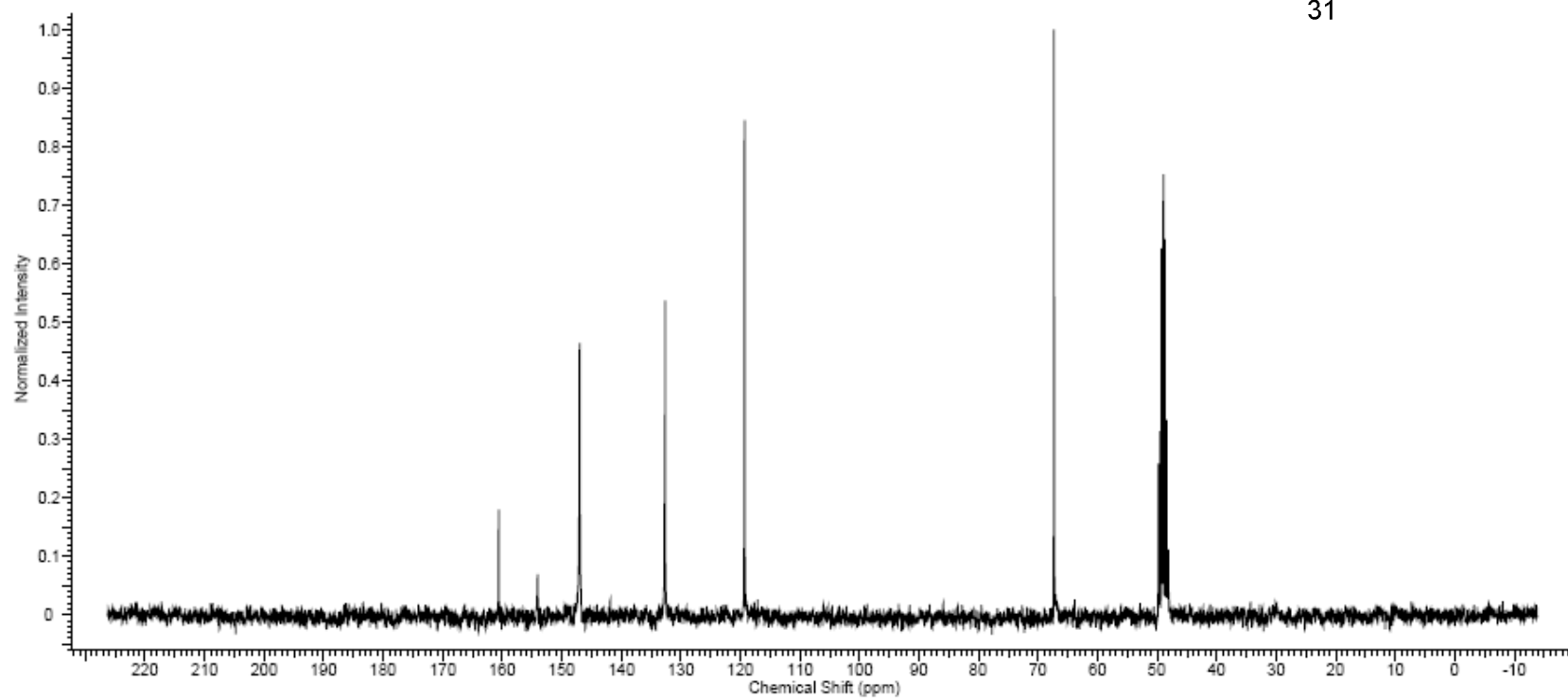
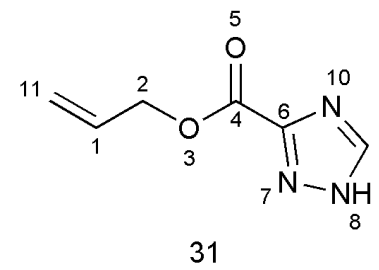
1H NMR (300MHz, METHANOL- d_4) δ = 8.60 (s, 1 H), 8.76 - 8.35 (m, 1 H), 6.10 - 5.94 (m, 1 H), 5.49 - 5.16 (m, 2 H), 4.87 (td, J = 1.3, 5.7 Hz, 2 H), 5.03 - 4.52 (m, 2 H)



Composto 31

Formula $C_8H_7NO_2$	FW 153.1387
----------------------	-------------

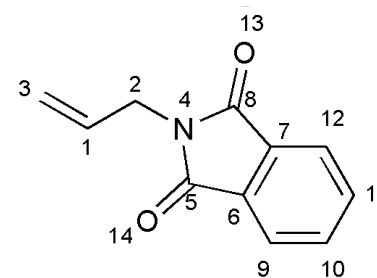
^{13}C NMR (75MHz, METHANOL- d_4) δ = 160.6, 154.1, 147.0, 132.7, 119.3, 67.3



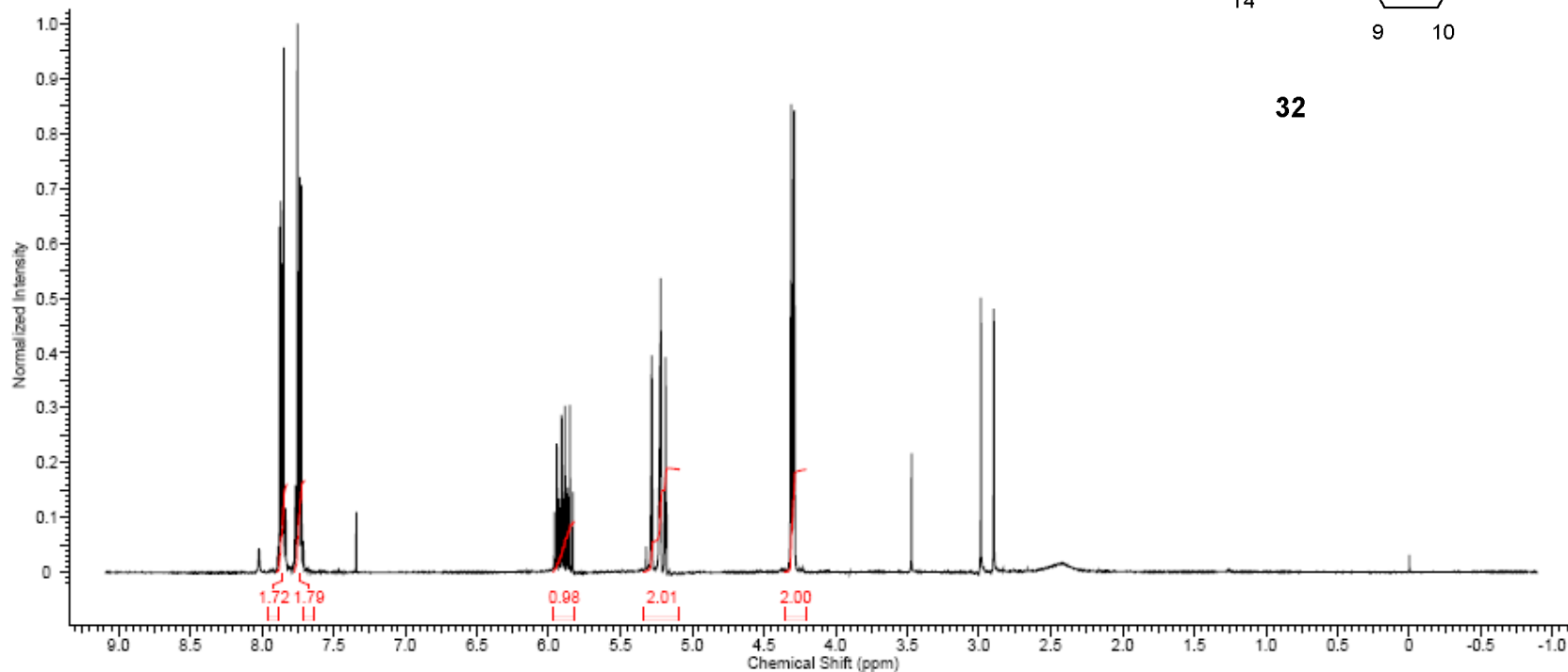
Composto 32

Formula	C ₁₁ H ₉ NO ₂	FW	187.1047
---------	--	----	----------

¹H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 7.90 - 7.82 (m, 2 H), 7.77 - 7.70 (m, 2 H), 5.90 (tdd, J = 5.6, 10.2, 17.1 Hz, 1 H), 5.34 - 5.09 (m, 2 H), 4.30 (td, J = 1.5, 5.6 Hz, 2 H)



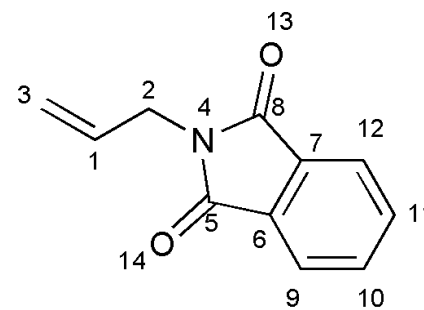
32



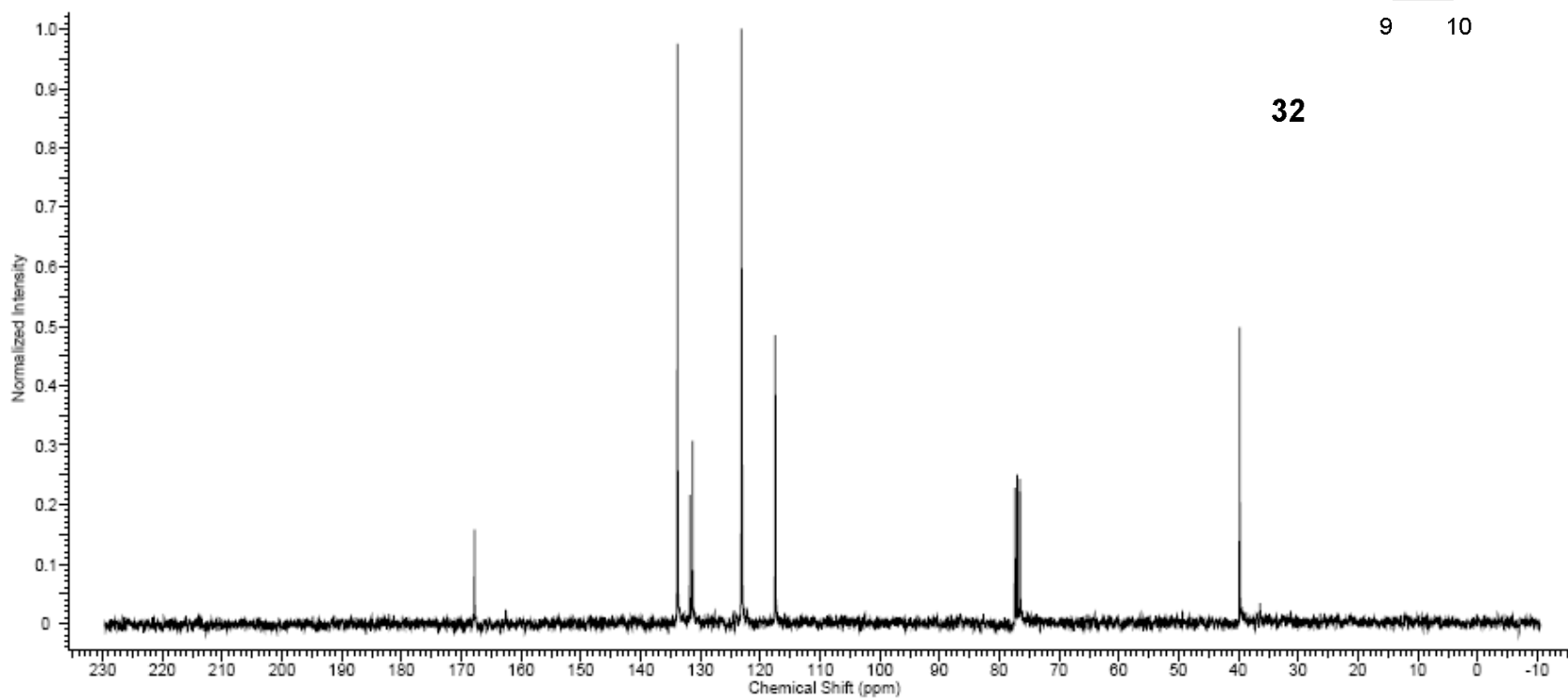
Composto 32

Formula C₁₁H₁₃NO₂ FW 187.1947

¹³C NMR (75MHz, DMSO-d₆) δ = 167.8, 133.8, 131.8, 131.3, 123.1, 117.5, 39.8



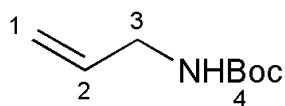
32



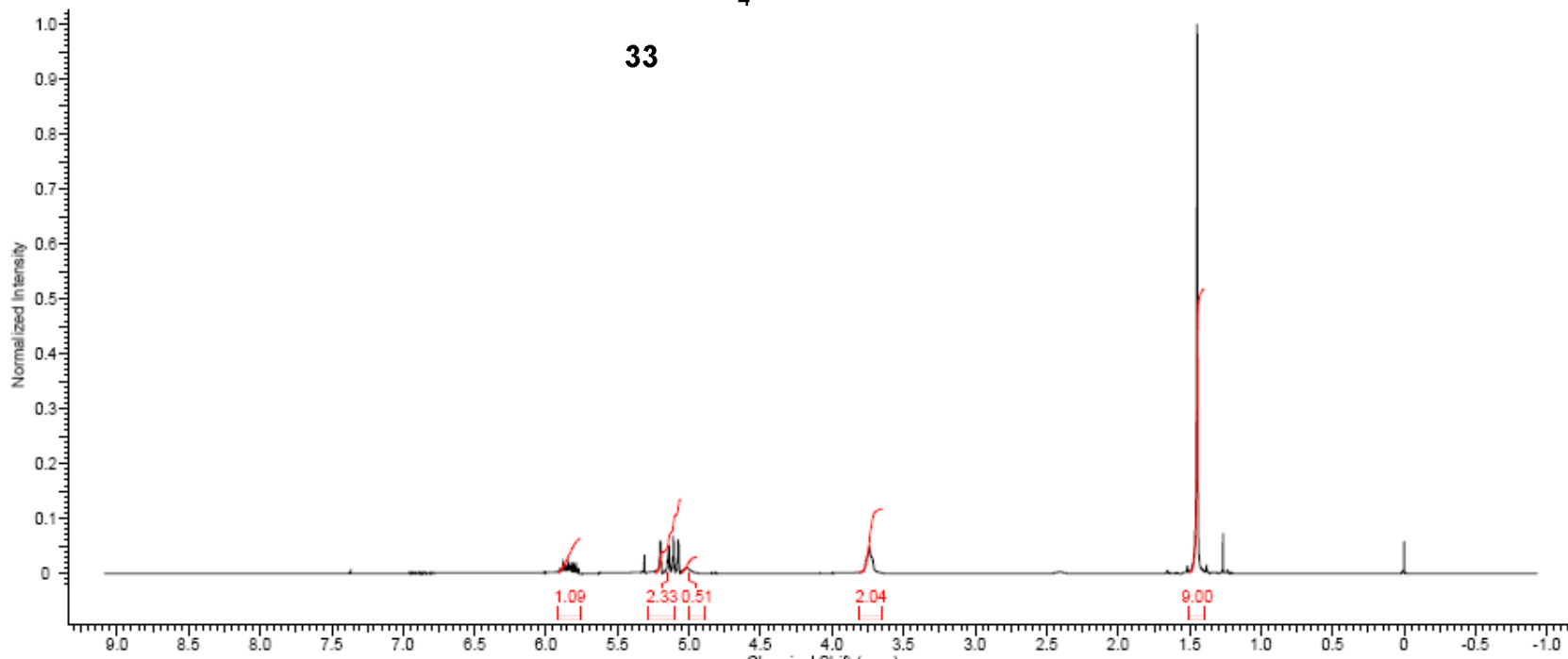
Composto 33

Formula $C_8H_{15}NO_2$	FW 157.2102
-------------------------	-------------

1H NMR (300MHz, CHLOROFORM-d) δ = 5.91 - 5.76 (m, 1 H), 5.23 - 5.06 (m, 2 H), 5.23 - 5.05 (m, 2 H), 5.05 - 4.95 (m, 1 H), 3.81 - 3.65 (m, 2 H), 1.45 (s, 9 H)



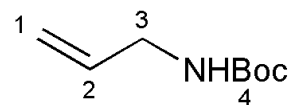
33



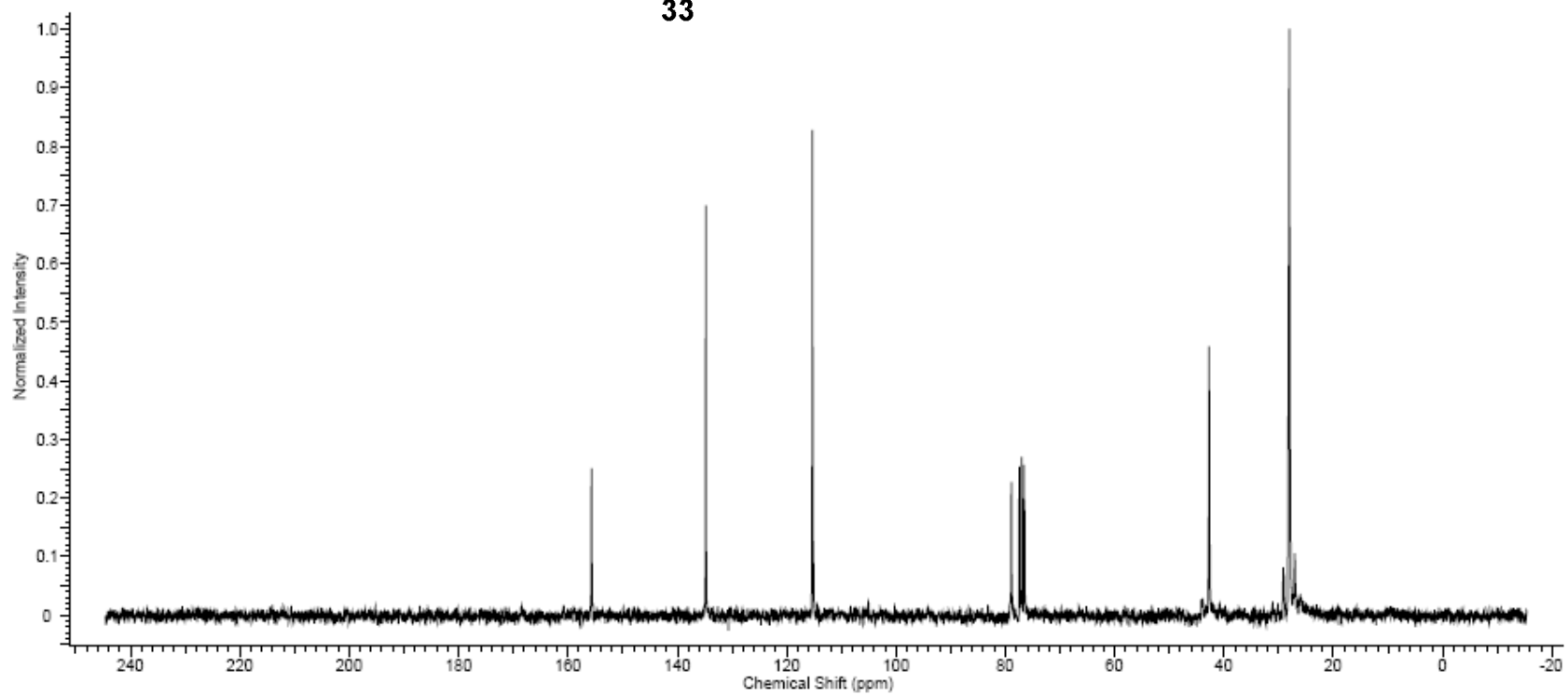
Composto 33

Formula	$C_9H_{15}NO_2$	FW	157.2102
---------	-----------------	----	----------

^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) δ = 155.6, 134.8, 115.3, 78.9, 42.8, 28.1



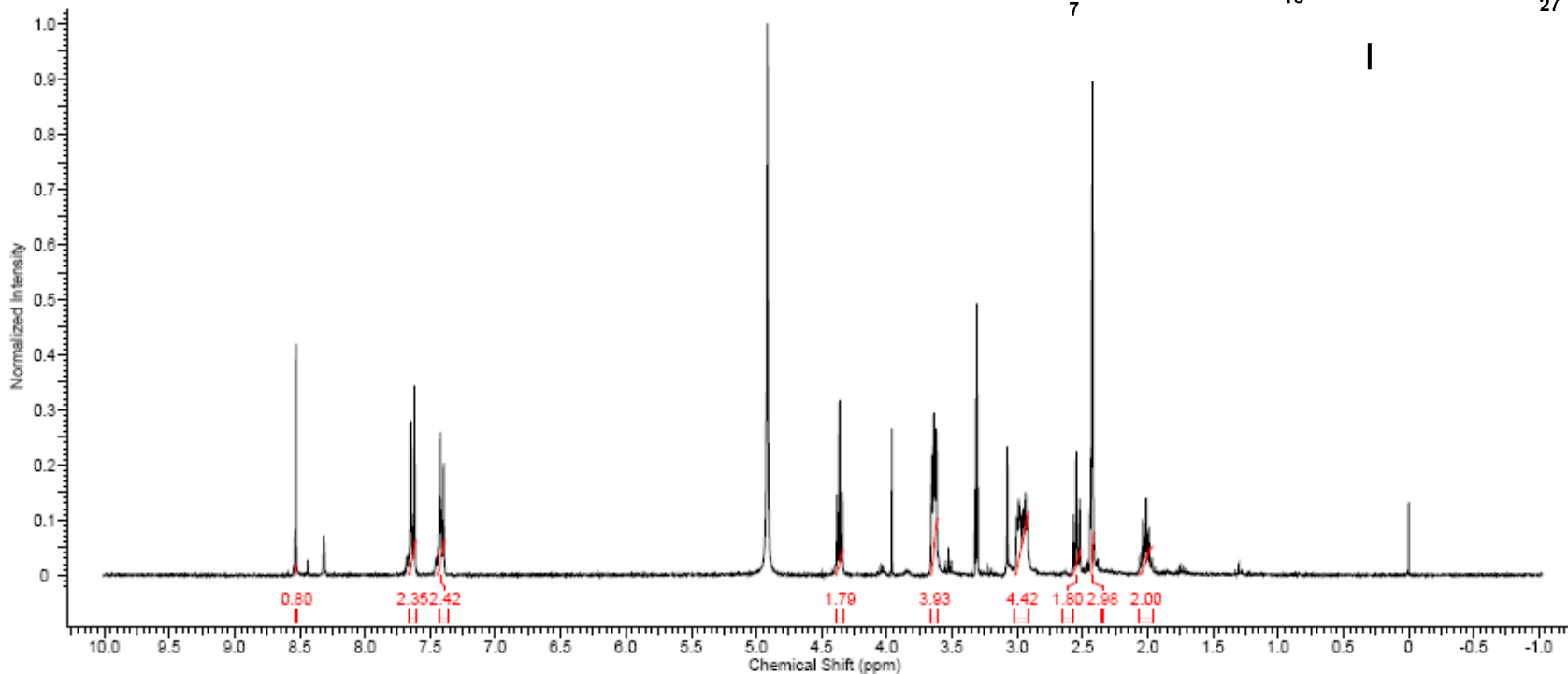
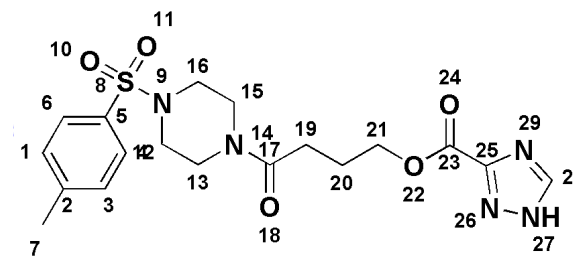
33



Composto I

Formula C₁₉H₂₆N₄O₅S | FW 420.4827

¹H NMR (300MHz, METHANOL-d₄) δ = 8.53 (s, 1 H), 7.67 - 7.61 (m, 2 H), 7.45 - 7.38 (m, 2 H), 4.36 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 3.67 - 3.61 (m, 4 H), 2.96 (td, *J* = 5.1, 14.9 Hz, 4 H), 2.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.42 (s, 3 H), 2.01 (quin, *J* = 6.7 Hz, 2 H)



Composto I

Formula	C ₁₈ H ₂₄ N ₄ O ₅ S	FW	420.4827
---------	---	----	----------

¹³C NMR (75MHz, METHANOL-d₄) δ = 172.9, 160.5, 154.0, 147.3, 145.6, 133.6, 130.9, 128.9, 66.1, 47.4, 47.1, 46.0, 42.1, 30.0, 25.2, 21.5

