



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Síntese e Estudo *In Silico* de Análogos de 2,3-Diidro-1*H*-1,5-Benzodiazepinas como Potenciais Antifúngicos e Antioxidantes

Elizeu Cordeiro Caiana

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa – PB – Brasil

Dezembro/2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Síntese e Estudo *In Silico* de Análogos de 2,3-Diidro-1*H*-1,5-Benzodiazepinas como Potenciais Antifúngicos e Antioxidantes

Elizeu Cordeiro Caiana*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: **Prof^a. Dr^a. Neide Queiroz**

*Bolsista: **Capes**

João Pessoa – PB – Brasil

Dezembro/2021

C133s Caiana, Elizeu Cordeiro.

Síntese e estudo in silico de análogos de
2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepinas como potenciais
antifúngicos e antioxidantes / Elizeu Cordeiro Caiana.

- João Pessoa, 2021.

148 f. : il.

Orientação: Neide Queiroz.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

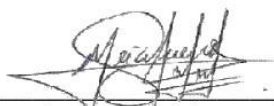
1. Química orgânica. 2. Atividades biológicas. 3.
1,5-benzodiazepinas. 4. Esporotricose. 5. Catálise
heterogênea. 6. Reações de ciclocondensação. I.
Queiroz, Neide. II. Título.

UFPB/BC

CDU 547(043)

Síntese e Estudo *In Silico* de Análogos de 2,3-Diídrido-1H-1,5-Benzodiazepinas como Potenciais Antifúngicos e Antioxidantes.

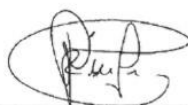
Tese de Doutorado apresentada pelo aluno Elizeu Cordeiro Caiana e aprovada pela banca examinadora em 10 de dezembro de 2021.



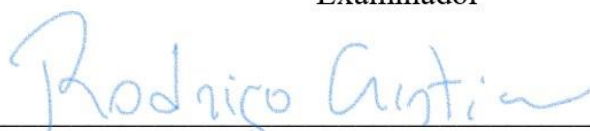
Prof. Dra. Neide Queiroz
Departamento de Química – CCEN/UFPB
Orientadora/Presidente



Profa. Dra. Angela Malheiros
ECS/UNIVALI/Itajaí-SC
Examinadora



Prof. Dr. Paulo César de Jesus
Departamento de Química – FURB/Blumenau-SC
Examinador



Prof. Dr. Rodrigo Cristiano
Departamento de Química – CCEN/UFPB
Examinador



Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira
CCA/UFPB Areia-PB
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo Webconferência em 10/12/2021, digitalizadas e certificadas pelo Profa. Dra. Neide Queiroz (SIAPE 1665390).

*Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, que
acreditaram e estiveram ao meu lado em
todos os momentos, dedico.*

*Pois dele, por ele e para ele são todas as
coisas. A ele seja a glória para sempre!*

Amém.

Romanos 11:36

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado, pelos momentos de alegria com que tem me abençoado e por me ajudar a levantar e a continuar diante dos momentos difíceis.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos, pelo apoio e paciência.

À minha namorada Isabel, por sua paciência e por sempre acreditar e me apoiar, principalmente nos momentos mais difíceis. Muito obrigado por tudo! Te amo!

À minha orientadora, prof.^a Dr.^a Neide Queiroz, por me aceitar como seu orientando, por todo apoio, paciência e pelo aprendizado adquirido ao longo da realização deste trabalho.

À prof.^a Dr.^a Antônia Lúcia de Souza, pelo apoio e pelos ensinamentos ao longo desses anos.

À prof.^a Dr.^a Gabriela Fehn Fiss, pelos ensinamentos adquiridos durante o doutorado e por colaborar com a aquisição do ácido trifluoroacético, usado como catalisador homogêneo na síntese dos compostos almejados neste trabalho de tese.

À prof.^a Dr.^a Juliana Alves Vale, pelo aprendizado ao longo do doutorado, pelas contribuições no exame de qualificação e por se dispor em colaborar com os catalisadores heterogêneos para a realização de parte deste trabalho de tese.

Ao prof. Dr. Cláudio Gabriel Lima Junior, pelos ensinamentos adquiridos ao longo do curso de doutorado e por permitir pacientemente a realização dos experimentos em reator de micro-ondas no LASOM-PB (DQ-UFPB).

Ao prof. Dr. Rodrigo Cristiano, pelas contribuições no exame de qualificação do doutorado.

À colega de doutorado Nathália Kellyne Silva Marinho Falcão, então aluna de doutorado da prof.^a Dr.^a Juliana Alves Vale (LASOB-DQ-UFPB), por toda disponibilidade e empenho em colaborar com a síntese dos catalisadores heterogêneos utilizados neste trabalho de tese.

Ao pesquisador Me. Bruno Oliveira de Veras, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, pela realização dos ensaios de atividade antioxidante e antifúngica.

Aos colegas de laboratório Laís Chantelle, Ana Rita e Alex de Meireles Neris por me ajudarem com a realização dos espectros de infravermelho.

Aos colegas de doutorado Maísa Cavalcanti, Aleff Cruz e Girlyanderson Araújo que me ajudaram a realizar os experimentos em reator de micro-ondas.

Aos companheiros de laboratório do NPE-LACOM Franklin, Clebson, Romário, Túlio, Dayene, Sanierle, Elaine, Aleir, Érica, Bianca e todos aqueles que fizeram parte da minha trajetória no laboratório. Muito obrigado a todos pela companhia e convivência agradável durante o período que compartilhamos o ambiente de trabalho.

Aos colegas Marcelo, Evandro e Lucas, do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises da UFPB (LMCA-UFPB), pelos espectros de massas e pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

Ao PPGQ-UFPB por tornar possível a realização do curso de doutorado.

E à Capes pela bolsa concedida.

RESUMO

As benzodiazepinas são compostos N-heterocíclicos de sete membros que dispõem de uma estrutura versátil, de fácil preparação e com grande potencial farmacológico. Neste sentido, no presente trabalho foi descrita a síntese de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas para posterior avaliação em ensaios *in vitro* de atividade antioxidante e atividade antifúngica, bem como em ensaios *in silico* para a investigação do potencial clínico dos compostos. Dentre os análogos sintetizados, os compostos **Bdz2**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'**, **Bdz7** e **Bdz8/8'** são inéditos. Em uma etapa inicial, foram encontradas as condições ótimas para a síntese das benzodiazepinas em reação catalisada pelo ácido trifluoroacético, as quais permitiram a obtenção dos compostos derivados de acetofenonas substituídas ($R_2 = 3\text{-OH}$, 4-OH e 4-Cl-3-NO_2) em rendimentos bons a excelentes (87 a 95 %). As melhores condições reacionais foram atribuídas aos solventes polares próticos (MeOH, EtOH) à temperatura ambiente. Todos os compostos foram caracterizados por IV-FT, RMN ^1H e ^{13}C , EM e ponto de fusão. Em uma etapa posterior, ao investigar o uso de catalisadores heterogêneos a base de NPMs do tipo *core@shell*, observou-se um desempenho inferior ao apresentado pela síntese via catálise homogênea, tendo sido alcançado um rendimento máximo de apenas 31 % para a benzodiazepina clássica **Bdz1** em reação realizada sob aquecimento em reator de micro-ondas a 120 °C. Na avaliação da atividade antioxidante, os melhores resultados foram apresentados pelos derivados hidroxilados **Bdz3** ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = 4\text{-OH}$) e **Bdz6/6'** ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = 4\text{-OH}$), que no ensaio de CAT exibiram atividade antioxidante superior aos padrões BHT e ácido ascórbico. Na avaliação da atividade antifúngica, realizada de forma inaugural para as espécies de fungos do gênero *Sporothrix*, os compostos hidroxilados apresentaram melhor desempenho, com destaque para a mistura dos regioisômeros inéditos **Bdz6/6'**, contendo o grupo metila em R_1 , com valores de CIM e CFM que indicaram ação inibitória superior a do fármaco de referência fluconazol. A partir da realização do estudo *in silico* foi observado que todos os compostos apresentaram melhor biodisponibilidade oral e menor toxicidade que o antifúngico comercial itraconazol, e os compostos hidroxilados apresentaram o melhor perfil de solubilidade aquosa e permeabilidade celular. De forma geral, com base nos resultados dos ensaios *in vitro* e *in silico*, **Bdz6/6'** mostrou ser um novo candidato a antifúngico em potencial, administrado por via oral.

Palavras-chave: Atividades biológicas, 1,5-benzodiazepinas, esporotricose, catálise heterogênea, reações de ciclocondensação.

ABSTRACT

Benzodiazepines are seven-membered N-heterocyclic compounds that have a versatile structure, easy preparation and great pharmacological potential. In this sense, the present work describes the synthesis of 2,3-dihydro-1*H*-1,5-benzodiazepines for further evaluation in *in vitro* assays of antioxidant activity and antifungal activity, as well as *in silico* assays to investigate the clinical potential of the compounds. Among the synthesized analogues, the compounds **Bdz2**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'**, **Bdz7** and **Bdz8/8'** are new. In an initial step, the optimal conditions for the synthesis of benzodiazepines in a reaction catalyzed by trifluoroacetic acid were found, which allowed the obtainment of compounds derived from substituted acetophenones ($R_2 = 3\text{-OH}$, 4-OH and 4-Cl-3-NO_2) in good to excellent yields (87 to 95%). The best reaction conditions were assigned to polar protic solvents (MeOH, EtOH) at room temperature. All compounds were characterized by FT-IR, ^1H and ^{13}C NMR, MS and melting point. In a later stage, when investigating the use of heterogeneous catalysts based on core@shell NPMs, a performance inferior to that presented by the synthesis via homogeneous catalysis was observed, having reached a maximum yield of only 31% for the classic benzodiazepine **Bdz1** in reaction carried out under heating in a microwave reactor at 120 °C. In the evaluation of antioxidant activity, the best results were presented by the hydroxylated derivatives **Bdz3** ($R_1 = \text{H}$; $R_2 = 4\text{-OH}$) and **Bdz6/6'** ($R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = 4\text{-OH}$), which in the CAT assay showed activity antioxidant superior to BHT and ascorbic acid standards. In the evaluation of antifungal activity, carried out in the first place for fungal species of the genus *Sporothrix*, the hydroxylated compounds showed better performance, with emphasis on the mixture of unprecedented regioisomers **Bdz6/6'**, containing the methyl group in R_1 , with MIC values and CFM, which indicated an inhibitory action superior to that of the reference drug fluconazole. From the *in silico* study it was observed that all compounds had better oral bioavailability and lower toxicity than the commercial antifungal itraconazole, and the hydroxylated compounds had the best aqueous solubility and cell permeability profile. Overall, based on the results of *in vitro* and *in silico* assays, **Bdz6/6'** proved to be a potential new antifungal candidate, administered orally.

Keywords: Biological activities, 1,5-benzodiazepines, sporotrichosis, heterogeneous catalysis, cyclocondensation reactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas das benzodiazepinas mais simples.....	27
Figura 2: Estruturas associadas aos psicoterápicos clordiazepóxido (1), meprobamato (2) e barbitúricos (3), em que R ₁ e R ₂ podem ser grupos alquil ou aril	28
Figura 3: Estruturas químicas do diazepam (4) (Valium®) e do nitrazepam (5) (Mogadon®)	29
Figura 4: Estruturas químicas das benzodiazepinas 3-hidroxiadas: (6) oxazepam (Serax®) e (7) lorazepam (Ativan®)	29
Figura 5: Estruturas de alguns dos derivados benzodiazepínicos mais importantes.....	30
Figura 6: Exemplos de derivados benzodiazepínicos com atividades anti-inflamatória, anti-HIV e analgésica.....	40
Figura 7: Hidroxi-benzodiazepina com atividade antioxidante e anti-inflamatória proposta por Neochoritis et al. (2010)	42
Figura 8: Derivados de 2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepinas com potencial atividade antioxidante propostos por Singla et al. (2012).....	42
Figura 9: Derivado benzodiazepínico com potencial atividade antioxidante, obtido a partir da combinação do lorazepam com o Trolox, proposto por Theodosios-Nobelos et al. (2019).....	43
Figura 10: Derivado de 1,5-benzodiazepina com potencial atividade antioxidante proposto por Bhagat et al. (2019)	43
Figura 11: Derivado 1,5-benzodiazepínico com potencial atividade antioxidante proposto por Brahmbhatt et al. (2020).....	44
Figura 12: A) Cultura de <i>Sporothrix schenckii</i> ; B) Imagem microscópica de cultura de <i>Sporothrix schenckii</i> em meio Ágar Sabouraud Dextrose; C) Lesões ulcerativas provocadas por esporotricose linfocutânea. Adaptado de Carrasco-Zuber et al. (2016) e Mahajan (2014).....	45
Figura 13: Derivados de 1,5-benzodiazepinas com atividade antifúngica sintetizadas por An et al. (2016).....	46

Figura 14: Derivados homodiméricos de 1,5-benzodiazepinas com atividade antifúngica sintetizados por Jaafar et al. (2019)	47
Figura 15: Derivado benzodiazepínico com atividade antifúngica sintetizado por Verma et al. (2019)	47
Figura 16: Espectro de infravermelho (KBr) do composto Bdz1	58
Figura 17: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Bdz1	59
Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de Bdz1	60
Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Bdz1	61
Figura 20: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz1	61
Figura 21: Representação dos dois regioisômeros benzodiazepínicos formados mediante uso da diamina assimétrica 4-metil-o-fenilenodiamina	62
Figura 22: Espectro de infravermelho (KBr) do intermediário A9	68
Figura 23: Espectro de infravermelho (KBr) dos intermediários A10 e A10'	69
Figura 24: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de A9	70
Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de A9	71
Figura 26: Mínimos conformacionais para os regioisômeros A10 ($E = 6,7417 \text{ kcal/mol}$) e A10' ($E = 7,2250 \text{ kcal/mol}$). O cálculo das energias conformacionais foi realizado pelo método MM2	72
Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de A10 + A10'	73
Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO-d_6) de A10 + A10'	74
Figura 29: Espectro de massas de alta resolução do intermediário A9	75
Figura 30: Espectro de massas de alta resolução da mistura dos isômeros A10 e A10'	75

Figura 31: Representação esquemática simplificada da estrutura dos catalisadores heterogêneos ácidos utilizados, classificados como catalisadores suportados sobre estruturas core@shell magnéticas funcionalizadas83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepina (Bdz1) para o estudo de otimização das condições reacionais realizado em diferentes solventes (3 mL) e temperaturas após 15 h de reação ^a	56
Tabela 2: Rendimentos isolados das 1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas Bdz1-6/6' preparadas usando metanol e etanol como solventes e ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador à temperatura ambiente ^a	64
Tabela 3: Rendimentos isolados das 1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas Bdz7-10 preparadas usando etanol como solvente e ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador ^a	66
Tabela 4: Principais dados espectroscópicos de RMN ¹ H e RMN ¹³ C das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas	77
Tabela 5: Principais dados espectroscópicos de IV-FT, EM e pontos de fusão (PF) das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas	81
Tabela 6: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepina (Bdz1) para o teste de atividade catalítica dos catalisadores Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-M (M = Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Co ²⁺ , Cr ³⁺ , Tb ³⁺ e Eu ³⁺) na reação de ciclocondensação entre <i>o</i> -fenilenodiamina e acetofenona em etanol	84
Tabela 7: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepina (Bdz1) para o teste de atividade catalítica dos catalisadores Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-M (M = Tb ³⁺ , Eu ³⁺) em reações sob aquecimento em micro-ondas.....	86
Tabela 8: Atividade antioxidante (CI ₅₀) das benzodiazepinas Bdz1-6/6'	88
Tabela 9: Atividade antimicrobiana dos compostos alvo Bdz1-6/6' expressa em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), com valores em µmol/L	90
Tabela 10: Parâmetros físico-químicos do estudo <i>in silico</i> ADME para a determinação da biodisponibilidade oral dos compostos sintetizados.....	92
Tabela 11: Predição <i>in silico</i> da toxicidade dos compostos sintetizados	94

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Estratégia sintética para a obtenção dos derivados de 1,5-benzodiazepinas usando o ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador em reações livres de solvente.....	32
Esquema 2: Estratégia sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas em reações livres de solvente usando ácido oxálico como catalisador	32
Esquema 3: Rota sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas a partir de reações multicomponente em pote único catalisadas pelo ácido 2,6-piridinocarboxílico.....	33
Esquema 4: Estratégia sintética para a obtenção de 1,5-benzodiazepinas em reações sob irradiação de micro-ondas (MO) usando ácido acético como catalisador.....	33
Esquema 5: Estratégia sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas a partir de reações entre <i>o</i> -fenilenodiaminas e alcinos usando (2-bifenil)Cy ₂ PAuNTf ₂ como catalisador	34
Esquema 6: Estratégia sintética para o preparo de 2- <i>aril</i> -3-acetil-2,4-diidro-1 <i>H</i> -5 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas a partir de reações multicomponente em pote único catalisadas pelo ácido de Lewis CeCl ₃ ·7H ₂ O.....	34
Esquema 7: Estratégias sintéticas para a obtenção de 1,5-benzodiazepinas utilizando GO (óxido de grafite) como catalisador. CRLS: condições reacionais livres de solvente.....	36
Esquema 8: Estratégia sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas-4-substituídas utilizando poliborato sulfatado como catalisador reciclável	36
Esquema 9: Estratégia sintética para a obtenção de derivados de 1,5-benzodiazepinas utilizando NPMs de Fe ₃ O ₄ como catalisador	37
Esquema 10: Estratégia sintética para o preparo de derivados 1,5-benzodiazepínicos utilizando nano-γ-Fe ₂ O ₃ -SO ₃ H como nanocatalisador	38
Esquema 11: Uso de Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Tb ³⁺ como catalisador na síntese de <i>N</i> -acilhidrazonas	39
Esquema 12: Proposta geral para a síntese dos dez derivados benzodiazepínicos almejados (Bdz1-10)	54

Esquema 13: Mecanismo proposto para a síntese de 1,5-benzodiazepinas em reação de ciclocondensação entre <i>o</i> -fenilenodiaminas e acetofenonas catalisada por organoácido. Adaptado de Amoozadeh et al. (2015), Climent et al. (2009), Jamatia, Saha, Pal (2014) e Zhao et al. (2014).....	55
Esquema 14: Síntese da 2',4'-diidroxiacetofenona.....	65
Esquema 15: Mecanismo proposto para a reação de obtenção da 2',4'-diidroxiacetofenona	65
Esquema 16: Mecanismo proposto para a formação do intermediário monoimínico A , envolvido na reação de formação das benzodiazepinas. Adaptado de Zelenin et al. (1998) e Timofeeva et al. (2017)	67

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de infravermelho (KBr) da 2',4'-diidroxiacetofenona.....	124
Espectro 2: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona.....	124
Espectro 3: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona	125
Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona.....	125
Espectro 5: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz1	126
Espectro 6: Espectro de RMN ^1H (400MHz, CDCl_3) de Bdz1	126
Espectro 7: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) de Bdz1	127
Espectro 8: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) de Bdz1	127
Espectro 9: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz1	128
Espectro 10: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz2	128
Espectro 11: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Bdz2	129
Espectro 12: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Bdz2	129
Espectro 13: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz2	130
Espectro 14: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz3	130
Espectro 15: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de Bdz3	131
Espectro 16: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de Bdz3	131
Espectro 17: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz3	132
Espectro 18: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz4 e Bdz 4'	132
Espectro 19: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de Bdz4 + Bdz4'	133
Espectro 20: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de Bdz4 + Bdz4'	133

Espectro 21: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de Bdz4 + Bdz4'	134
Espectro 22: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz4 e Bdz4'	134
Espectro 23: Espectro 22: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz5 e Bdz5'	135
Espectro 24: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Bdz5 + Bdz5'	135
Espectro 25: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de Bdz5 + Bdz5'	136
Espectro 26: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz5 e Bdz5'	136
Espectro 27: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz6 e Bdz6'	137
Espectro 28: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) de Bdz6 + Bdz6'	137
Espectro 29: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO-d_6) de Bdz6 + Bdz6'	138
Espectro 30: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de Bdz6 e Bdz6'	138
Espectro 31: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz7	139
Espectro 32: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Bdz7	139
Espectro 33: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de Bdz7	140
Espectro 34: Razão isotópica do espectro de massas de baixa resolução de Bdz7	140
Espectro 35: Espectro de infravermelho (KBr) de Bdz8 e Bdz8'	141
Espectro 36: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de Bdz8 + Bdz8'	141
Espectro 37: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de Bdz8 + Bdz8'	142
Espectro 38: Razão isotópica do espectro de massas de baixa resolução de Bdz8 e Bdz8' .	142
Espectro 39: Espectro de infravermelho (KBr) de A9	143
Espectro 40: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6) de A9	143
Espectro 41: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de A9	144

Espectro 42: Espectro de massas de alta resolução de A9	144
Espectro 43: Espectro de infravermelho (KBr) de A10 e A10'	145
Espectro 44: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de A10 + A10'	145
Espectro 45: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de A10 + A10'	146
Espectro 46: Espectro de massas de alta resolução de A10 e A10'	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido Ascórbico
ABS	Porcentagem de absorção intestinal humana
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AcOEt	Acetato de etila
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
BHT	Hidroxitolueno Butilado
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
cLog P	Lipofilicidade
CI ₅₀	Concentração efetiva do composto para eliminar 50 % da concentração inicial de radicais livres
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
δ	Deslocamento químico em ppm
d	duplete
dd	duplete de duplete
ddd	duplete de duplete de duplete
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EM	Espectrometria de massas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por Eletrospray
EtOH	Etanol
FLU	Fluconazol
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABA _A	Receptor do ácido γ-aminobutírico
GO	Óxido de grafite

HRMS	Espectro de Massas de Alta Resolução
ITCZ	Itraconazol
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Log S	Solubilidade aquosa
m	multiplete
mg	miligrama
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrila
MHz	Mega-hertz
MM	Massa Molar
MO	Micro-ondas
m/z	Razão massa carga
NC	Não Converteu
nHBA	Número de aceptores de ligação de hidrogênio
nHBD	Número de doadores de ligação de hidrogênio
NPMs	Nanopartículas Magnéticas
nRB	Número de ligações rotacionáveis
NT	Não Testado
PF	Ponto de fusão
MM	Massa molecular
ppm	Partes por milhão
Py	Piridil
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	simpleto
sl	simpleto largo
SNC	Sistema Nervoso Central
t.a	temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TPSA	Área de superfície polar topológica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1	BENZODIAZEPINAS	27
2.2	SÍNTESE DE 1,5-BENZODIAZEPINAS	30
2.2.1	Síntese via Catálise Homogênea	31
2.2.2	Síntese via Catálise Heterogênea	34
2.3	BENZODIAZEPINAS E SEUS ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....	39
2.3.1	Compostos Antioxidantes	40
2.3.2	Compostos Antifúngicos	44
2.4	ESTUDO <i>IN SILICO</i> DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS – ADMET	48
3	OBJETIVOS	51
3.1	OBJETIVO GERAL	51
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	PARTE SINTÉTICA.....	53
4.1.1	Otimização das condições reacionais e síntese de 2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas a partir de reações catalisadas por ácido trifluoroacético (TFA)	53
4.1.2	Investigação do uso de catalisadores heterogêneos magnéticos do tipo <i>core@shell</i> na síntese de 2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas em reações assistidas por micro-ondas	82
4.2	ENSAIOS COLORIMÉTRICOS E BIOLÓGICOS	87
4.2.1	Atividade Antioxidante	87
4.2.2	Atividade Antifúngica	89
4.2.3	Estudo <i>In Silico</i> ADMET	91
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5.1	CONCLUSÕES.....	96
5.2	PERSPECTIVAS	97
6	PARTE EXPERIMENTAL.....	99

6.1	MATERIAIS E MÉTODOS	99
6.1.1	Procedimento para a síntese da 2',4'-diidroxiacetofenona	100
6.1.2	Procedimento para a síntese das 2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas Bdz1-8/8' e das monoiminas A9 e A10/10'	100
6.1.3	Procedimento para as reações com o catalisador heterogêneo Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Tb ³⁺ sob aquecimento em micro-ondas na síntese das 2,3-diidro-1 <i>H</i> -1,5-benzodiazepinas Bdz1-3	101
6.1.4	Avaliação da Atividade Antioxidante	110
6.1.4.1	Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)	110
6.1.4.2	Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)).....	110
6.1.4.3	Capacidade Antioxidante Total (CAT)	111
6.1.5	Avaliação da Atividade Antifúngica	111
6.1.5.1	Micro-organismos Testados	112
6.1.5.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	112
6.1.6	Estudo <i>In Silico</i>	112
6.1.7	Análise Estatística	113
	REFERÊNCIAS	115
	ESPECTROS	124
	ANEXO	148

Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas representam uma séria ameaça à saúde humana, principalmente para os indivíduos imunocomprometidos, como pacientes submetidos a transplantes de órgãos, tratamentos quimioterápicos antineoplásicos e pacientes com AIDS. Estes microrganismos, assim como as bactérias, estão sujeitos a desenvolver resistência a ação inibitória dos medicamentos, tornando o tratamento pouco efetivo. Dessa forma, é de grande importância o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (FISHER et al., 2018; NICOLA et al., 2019).

Dentre as principais infecções fúngicas inclui-se a esporotricose, que corresponde a micose subcutânea com maior predominância em regiões de clima tropical e subtropical, sendo causada por espécies patogênicas de fungos termodimórficos do complexo *Sporothrix schenckii* (CARRASCO-ZUBER et al., 2016; MAHAJAN, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2014). Os agentes antifúngicos convencionalmente utilizados no tratamento das diferentes manifestações da esporotricose são o itraconazol, a anfotericina B e o iodeto de potássio. Entretanto, estes fármacos têm apresentado várias desvantagens quanto as suas aplicações clínicas, tais como ocorrência de efeitos colaterais graves e desenvolvimento de resistência ao medicamento (CARRASCO-ZUBER et al., 2016; MAHAJAN, 2014; SHARKEY-MATHIS et al., 1993). Em virtude disso, observa-se a necessidade por novos fármacos mais eficazes no tratamento da esporotricose.

Neste sentido, o extenso potencial biológico associado aos núcleos heterocíclicos tem impulsionado contínuas pesquisas e investimentos, em especial, por parte da indústria farmacêutica, visando o desenvolvimento de novos fármacos aliado ao emprego de metodologias mais eficientes e menos agressivas ao meio ambiente. Em termos numéricos, pode-se destacar o investimento aproximado de 83 bilhões de dólares na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos realizado no ano de 2019 apenas entre os membros de uma associação da indústria farmacêutica do mercado norte americano (PHRMA, 2020)

Como principais constituintes das moléculas bioativas, os compostos N-heterocíclicos apresentam diversas aplicações industriais, sintéticas e medicinais. Diante disso, inúmeros grupos de pesquisa ao redor do mundo têm se dedicado a síntese e bioavaliação de novos heterocíclicos nitrogenados, principalmente, para fins terapêuticos (HERAVI; ZADSIRJAN, 2020).

As benzodiazepinas, N-heterocíclicos de sete membros, destacam-se como uma importante classe de compostos biologicamente ativos. Em particular, as 1,4- e 1,5-

benzodiazepinas têm atraído grande atenção dos pesquisadores devido ao amplo potencial estrutural e farmacológico associado, sendo consideradas estruturas privilegiadas no desenvolvimento de novas drogas (MAZIMBA; MOLEFE, 2015; YIN; WANG, 2016). Estes derivados, já bem reconhecidos comercialmente como importantes agentes psicoterapêuticos, têm demonstrado, em estudos mais recentes, diversas outras atividades biológicas, dentre as quais antimicrobiana (AN et al., 2016), anti-inflamatória (ISHWAR BHAT K, 2016), antioxidante (NEOCHORITIS et al., 2010), analgésica (FRUSCELLA et al., 2001), anticâncer (CHEN et al., 2014), anti-helmíntica (SINGH et al., 2013), leishmanicida (THI et al., 2009), antimalarial (INSUASTY et al., 2015), antiviral (NYANGUILE et al., 2008) e anti-HIV (CHANDER et al., 2017). Adicionalmente, estes compostos também encontram grande utilidade como intermediários valiosos para a obtenção de outros heterocíclicos de anéis fundidos (MADHAV; RAJITHA, 2008).

As estratégias sintéticas normalmente empregadas na síntese das 1*H*-1,5-benzodiazepinas, em específico, consistem em reações de ciclocondensação de 1,2-diaminobenzeno com cetonas, compostos carbonílicos α,β -insaturados ou β -halocetonas, na presença de um catalisador ácido. Entretanto, muitas dessas metodologias possuem desvantagens relacionadas a geração de vários subprodutos, condições reacionais drásticas, rendimentos não satisfatórios, processos trabalhosos e tempos de reação longos (JAMATIA; SAHA; PAL, 2014).

Para contornar os inconvenientes dos processos químicos, em busca de metodologias mais eficientes, bem como menos prejudiciais ao meio ambiente, tem-se a possibilidade do uso de reagentes alternativos e diferentes catalisadores ácidos. Neste sentido, o emprego de ácidos orgânicos e de nanopartículas magnéticas (NPMs) em sistemas catalíticos homogêneos e heterogêneos, respectivamente, vêm sendo muito explorados. Dentre os catalisadores heterogêneos tem se destacado aqueles à base de nanopartículas magnéticas (NPMs), pois possuem grande superfície de contato e possibilitam alta eficiência catalítica, permitindo a realização de reações seletivas em altos rendimentos, além de possibilitarem a fácil reciclagem do material catalisador mediante separação com auxílio de um ímã (ZHANG; YANG; GUAN, 2019).

Adicionalmente, em alguns protocolos para a síntese de derivados benzodiazepínicos, também têm sido descrito o uso de técnicas mais sofisticadas como micro-ondas (AMOOZADEH et al., 2015) e ultrassom (CHATTERJEE et al., 2009) com o objetivo de se alcançar maiores rendimentos em tempos de reação reduzidos.

Diante do que foi explanado, este trabalho tem como proposta a síntese de derivados de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas a partir da investigação de reações realizadas sob catálise homogênea e sob catálise heterogênea entre *o*-fenilenodiaminas e acetofenonas substituídas, para posterior avaliação em ensaios *in vitro* de atividade antioxidante e de atividade antifúngica contra espécies fungos do gênero *Sporothrix*, além de ensaios *in silico* para a determinação da biodisponibilidade oral e da toxicidade dos compostos preparados.

Capítulo 2

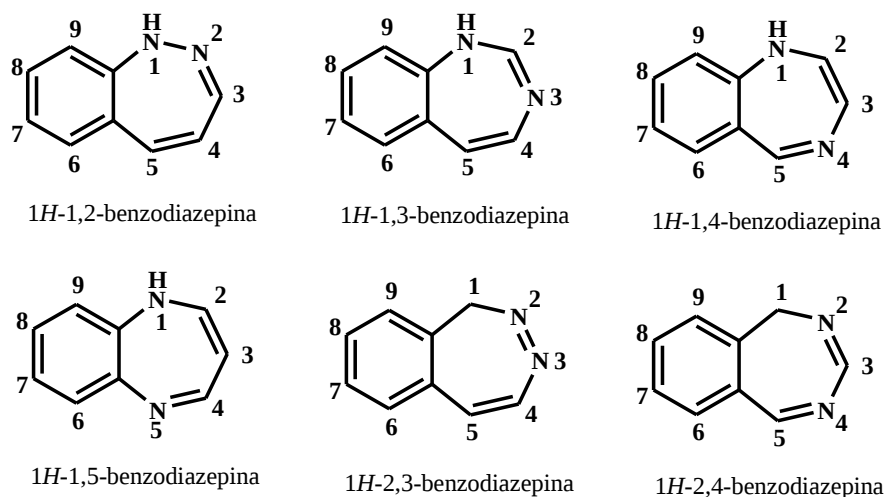
Fundamentação Teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BENZODIAZEPINAS

As benzodiazepinas são compostos heterocíclicos que possuem uma estrutura caracterizada pela presença de um anel benzênico fundido com um anel de sete membros contendo dois átomos de nitrogênio (AASTHA et al., 2013). Dependendo da posição relativa dos átomos de nitrogênio no núcleo heterocíclico, as benzodiazepinas são classificadas como 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 2,3 e 2,4-benzodiazepinas, conforme **Figura 1**.

Figura 1: Estruturas das benzodiazepinas mais simples

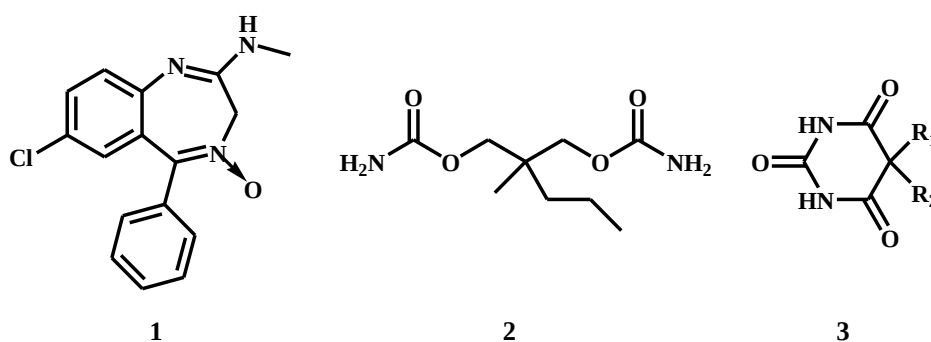


Em cada classe existem diferentes formas isoméricas possíveis, dependendo da posição do átomo de “hidrogênio extra”, o qual é identificado como 1H, 2H, 3H, etc. Para as diidro e tetratraidrobenzodiazepinas a numeração estrutural é realizada de modo que os “hidrogênios extras” recebam o menor número possível (ARCHER; STERNBACH, 1968). Dentre todos os derivados, as 1,4- e 1,5-benzodiazepinas se destacam, sendo as mais conhecidas e amplamente estudadas, devido às suas extensas propriedades farmacológicas.

A descoberta destes compostos ocorreu em meados do século 20, sendo motivada pela busca por novos tranquilizantes para o tratamento eficaz de distúrbios mentais graves, como esquizofrenia e transtornos maníaco-depressivos. A primeira benzodiazepina foi obtida em 1955, nos laboratórios da Hoffman-La Roche, quando o cientista Leo H. Sternbach e colaboradores sintetizaram casualmente o clordiazepóxido (**1**), **Figura 2**, ao trabalharem com

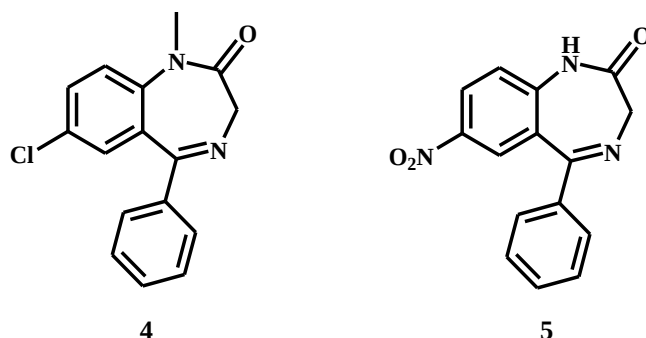
uma série de corantes químicos do tipo 3-óxido-quinazolonas. Após estudos preliminares, observou-se que o novo composto apresentava propriedades ansiolíticas, hipnóticas e sedativas superiores às dos psicoterápicos antecessores, o meprobamato (2) e os barbitúricos (3), além de possuir uma boa margem de segurança entre a dosagem terapêutica e a toxicidade. Diante disso, em 1960, após os ensaios farmacológicos, o clordiazepóxido passou a ser comercializado como medicamento sob o nome comercial *Librium*[®] (ÁLAMO GONZÁLEZ; LÓPEZ MUÑOZ, 2007; MAZIMBA; MOLEFE, 2015).

Figura 2: Estruturas associadas aos psicoterápicos clordiazepóxido (1), meprobamato (2) e barbitúricos (3), em que R₁ e R₂ podem ser grupos alquil ou aril



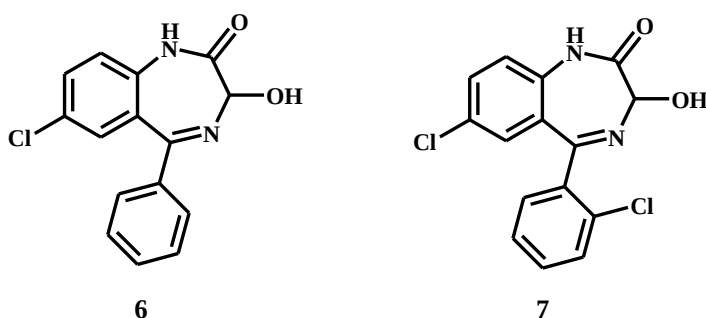
Nos anos seguintes à síntese do *N*-óxido de 1,4-benzodiazepina (clordiazepóxido), observou-se uma intensificação significativa nas investigações científicas sobre este composto, de modo que muitos pesquisadores passaram a sintetizar estruturas análogas, com o objetivo de encontrar compostos bioativos mais eficientes e menos tóxicos (SCHOFIELD, 1973). Dando continuidade aos estudos, Sternbach sintetizou o diazepam (4), **Figura 3**, análogo sem o grupo *N*-óxido, e posteriormente, o nitrazepam (5), **Figura 3**, análogo com um grupo nitro em vez de um átomo de cloro na posição sete e nenhuma substituição em N-1. Estas modificações levaram ao aumento significativo da atividade e a diminuição ou manutenção da toxicidade (ÁLAMO GONZÁLEZ; LÓPEZ MUÑOZ, 2007; GREENBLATT; SHADER, 1974).

Figura 3: Estruturas químicas do diazepam (4) (Valium®) e do nitrazepam (5) (Mogadon®)



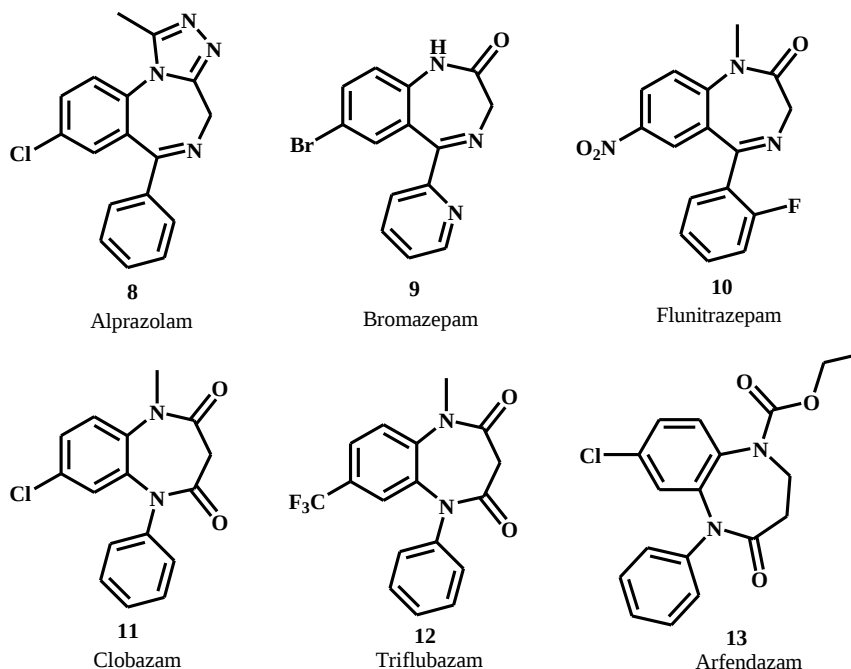
Ao trabalharem com derivados 3-hidroxilados, pesquisadores dos laboratórios Wyeth sintetizaram o oxazepam (6), **Figura 4**, que apresentou uma atividade intermediária entre o clordiazepóxido (1) e o diazepam (4), porém uma toxicidade inferior a ambos, o que foi atribuído à presença do grupo hidroxila. Posteriormente, ao adicionar um substituinte 2'-cloro no oxazepam houve um aumento na potencialidade farmacológica e obteve-se o lorazepam (7), **Figura 4** (GREENBLATT; SHADER, 1974).

Figura 4: Estruturas químicas das benzodiazepinas 3-hidroxiladas: (6) oxazepam (Serax®) e (7) lorazepam (Ativan®)



Diante das inúmeras possibilidades de modificação estrutural apresentada pelo núcleo benzodiazepínico, vários outros derivados foram sintetizados e viabilizados clinicamente, ao longo dos anos, pela La Roche e outros laboratórios farmacêuticos. Dentre estes compostos, alguns exemplos, além dos anteriormente citados, são ilustrados na **Figura 5**.

Figura 5: Estruturas de alguns dos derivados benzodiazepínicos mais importantes



Na década de 1970, após o sucesso clínico dos primeiros derivados, o consumo das benzodiazepinas aumentou consideravelmente, enquanto que o dos barbitúricos e do meprobamato se tornou cada vez menor, de modo que hoje as benzodiazepinas são as drogas psicoativas mais consumidas no mundo. Somente nos Estados Unidos, anualmente, estima-se mais de cem milhões de prescrições médicas para esses compostos, o que equivale a mais de 800 toneladas (SINGH et al., 2016).

Em virtude da importância de destaque das 1,5-benzodiazepinas, juntamente com as 1,4-, muitos trabalhos têm se dedicado ao desenvolvimento de novas metodologias para a obtenção de seus derivados, visando a otimização do rendimento e do tempo reacional de maneira simples e sustentável.

2.2 SÍNTESE DE 1,5-BENZODIAZEPINAS

As estratégias sintéticas tradicionalmente empregadas para o preparo de derivados 1,5-benzodiazepínicos baseiam-se em reações de ciclocondensação via catálise ácida de *o*-fenilenodiaminas com compostos carbonílicos, em sua maioria, cetonas ou chalconas. Algumas reações com reagentes alternativos também têm sido propostas. Estes protocolos têm relatado o uso de vários sistemas catalíticos como ácidos de Lewis, organoácidos, catalisadores heterogêneos bifuncionais, ácidos suportados em superfície sólida e catalisadores diversos.

Metodologias em diferentes temperaturas, uso de aquecimento em micro-ondas, bem como em condições livres de solvente e em fase sólida também têm sido propostas (SINGH et al., 2016).

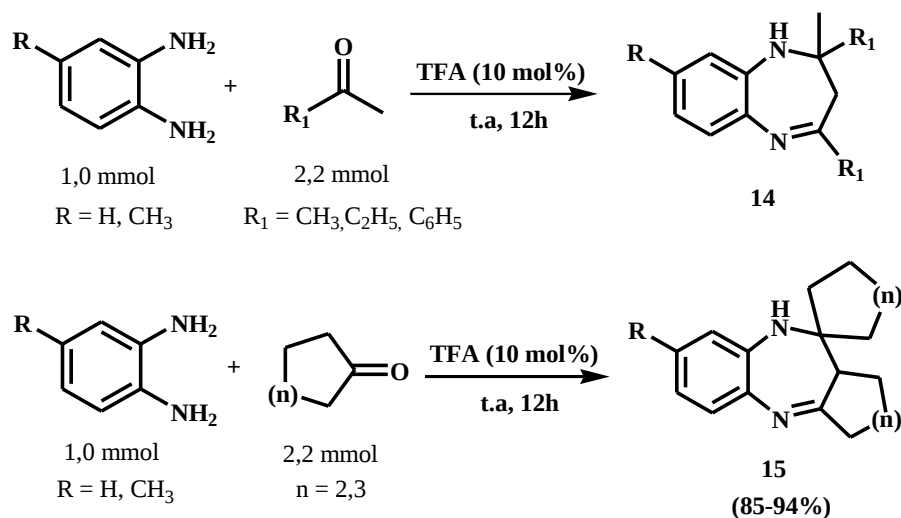
Em geral, a grande maioria dos estudos têm se dedicado principalmente à avaliação do catalisador ácido a ser empregado, tendo em vista a ampla gama de sistemas catalíticos que podem ser explorados para se alcançar reações mais rápidas, econômicas, seletivas e com rendimentos elevados. Dependendo da fase reacional associada ao catalisador e reagentes, o sistema catalítico pode ser homogêneo (catalisador e reagentes na mesma fase) ou heterogêneo (catalisador e reagentes em fases diferentes) (KAZEMI; GHOBADI; MIRZAIE, 2018).

2.2.1 Síntese via Catálise Homogênea

Na catálise homogênea, o catalisador, solúvel no meio reacional, encontra-se mais acessível às espécies reagentes, conduzindo, normalmente, a uma maior atividade catalítica, bem como a alta seletividade (químio, regio e enantiosseletividade), maiores rendimentos, possibilidade de utilização de condições reacionais mais brandas (temperatura ambiente, por exemplo), dentre outros fatores (DALPOZZO, 2015; KAZEMI; GHOBADI; MIRZAIE, 2018).

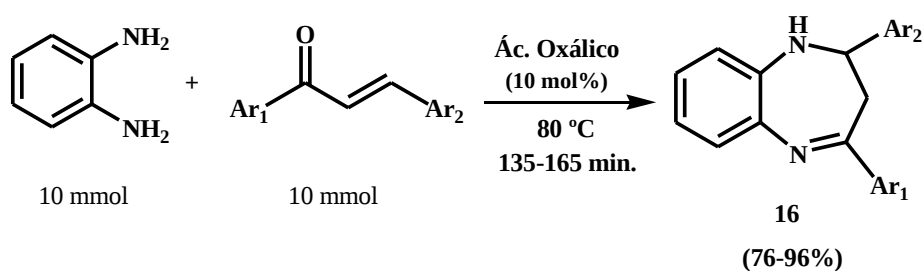
No âmbito da química verde, por exemplo, muitos trabalhos têm investigado o uso de organoácidos para o desenvolvimento de protocolos sustentáveis. Neste sentido, Zhao et al. (2014) descreveram uma atraente metodologia para a síntese de derivados de 1,5-benzodiazepinas utilizando o ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador na reação de ciclocondensação de *o*-fenilenodiaminas com cetonas cíclicas, alifáticas e aromáticas (**Esquema 1**). Esta estratégia permitiu a obtenção dos produtos correspondentes em altos rendimentos (85-94%) à temperatura ambiente sob condições livres de solvente, sendo as cetonas líquidas utilizadas também responsáveis pela solubilização no meio reacional (ZHAO et al., 2014).

Esquema 1: Estratégia sintética para a obtenção dos derivados de 1,5-benzodiazepinas usando o ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador em reações livres de solvente



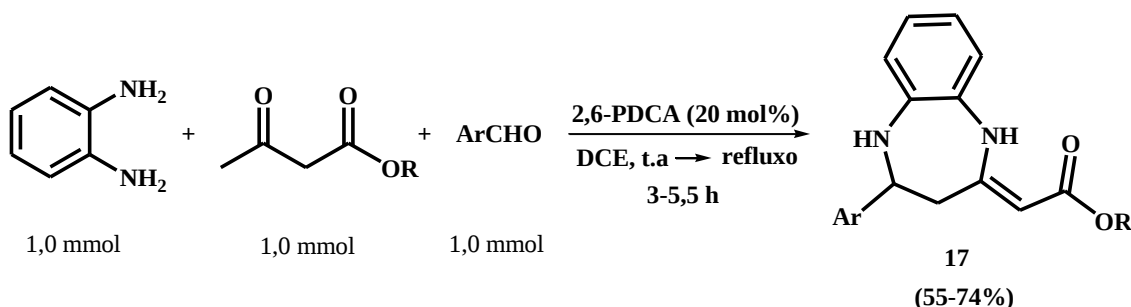
Sarkate e colaboradores (2013) sintetizaram uma série de derivados benzodiazepínicos em rendimentos de 76-96 % a partir de reações de ciclocondensação, sem uso de solvente, entre a *o*-fenilenodiamina e chalconas contendo grupos doadores (-OH, -OMe, -CH₃) e retiradores (-NO₂, -Br) de elétrons em suas porções aromáticas, utilizando ácido oxálico como catalisador e aquecimento a 80 °C (**Esquema 2**) (SARKATE et al., 2013).

Esquema 2: Estratégia sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas em reações livres de solvente usando ácido oxálico como catalisador



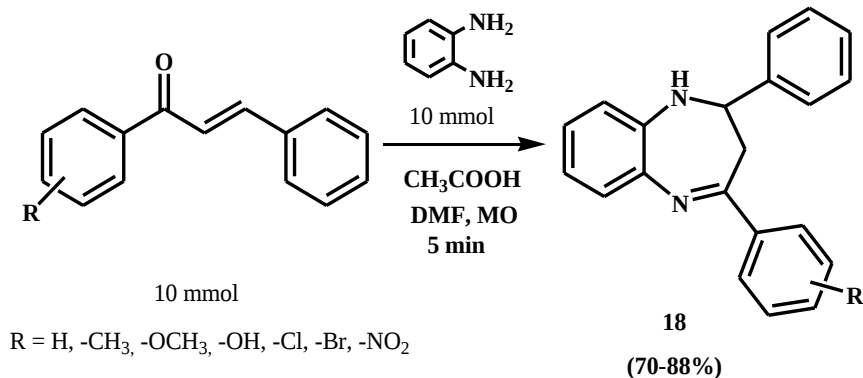
Já no trabalho realizado por Lal e colaboradores (2013) foi proposta a síntese regioseletiva de 1,5-benzodiazepinas, em rendimentos moderados a bons (55-74 %), a partir de uma rota alternativa, **Esquema 3**, baseada na reação multicomponente em pote único (one-pot) entre *o*-fenilenodiamina, β -cetoésteres e aldeídos aromáticos, utilizando o ácido 2,6-piridinodicarboxílico (2,6-PDCA, 20 mol %) como catalisador e 1,2-dicloroetano (DCE) como solvente, inicialmente à temperatura ambiente com posterior aquecimento até a temperatura de refluxo (LAL et al., 2013).

Esquema 3: Rota sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas a partir de reações multicomponente em pote único catalisadas pelo ácido 2,6-piridinocarboxílico



Ao avaliarem o emprego de aquecimento em micro-onda no preparo de 1,5-benzodiazepinas, Bhatia et al. (2008) realizaram a síntese de derivados em bons rendimentos (70-88 %), em apenas 5 minutos, a partir da reação de chalconas substituídas com 1,2-diaminobenzeno em DMF usando ácido acético glacial como catalisador (**Esquema 4**) (BHATIA et al., 2008).

Esquema 4: Estratégia sintética para a obtenção de 1,5-benzodiazepinas em reações sob irradiação de micro-ondas (MO) usando ácido acético como catalisador



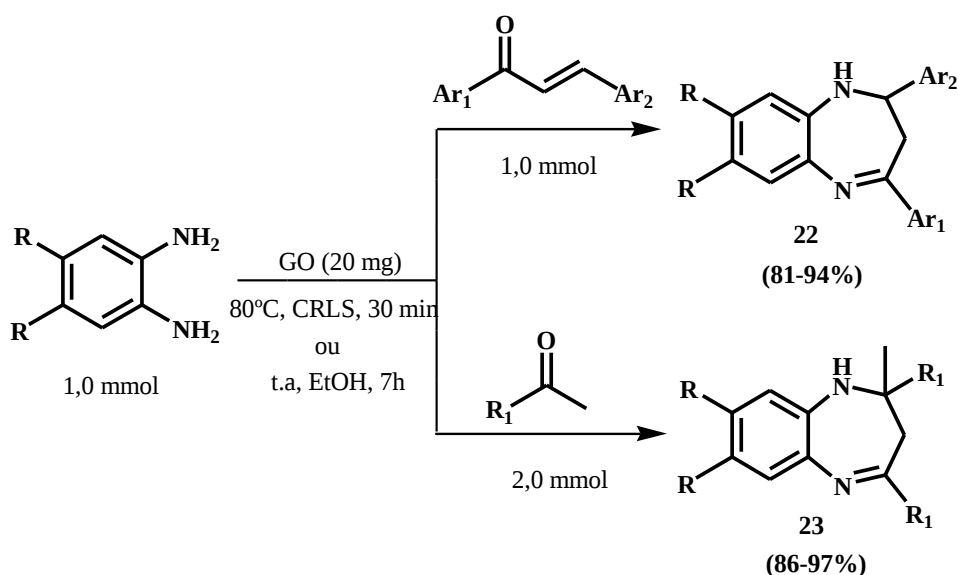
Em 2012 Qian e colaboradores relataram a síntese direta de 1,5-benzodiazepinas a partir da reação de hidroaminação/ciclização de *o*-fenilenodiaminas e alcinos substituídos empregando um catalisador a base de Au (I), (2-bifenil)Cy₂PAuNTf₂ (5 mol %), em condições homogêneas, clorofórmio como solvente e aquecimento a 60 °C (**Esquema 5**). Os produtos foram obtidos em rendimentos moderados a excelentes (46-97 %), sendo observada a formação de regioisômeros para as reações realizadas com as diaminas assimétricas (QIAN et al., 2012).

reação para posteriormente ser reutilizado por vários ciclos reacionais, possibilitando alcançar metodologias sintéticas mais compatíveis com a química verde, bem como mais econômicas e práticas, o que é de grande importância para a produção em escala industrial (KAZEMI; GHOBADI; MIRZAIE, 2018; ZHANG; YANG; GUAN, 2019).

O uso de sistemas heterogeneizados, baseados normalmente em catalisadores sólidos que contêm moléculas ativas (catalisadores homogêneos) imobilizadas em material sólido mesoporoso (como sílica, alumina e polímeros orgânicos, por exemplo), e mais recentemente a exploração de nanocatalisadores a base de nanopartículas de C, metais, óxidos metálicos, dentre outros materiais, contendo uma maior área superficial com sítios catalíticos ativos, têm permitido o desenvolvimento de metodologias mais atraentes que aliam as vantagens da catálise homogênea (alta atividade, seletividade, maiores rendimentos, etc.) às vantagens da catálise heterogênea (fácil recuperação do catalisador, estabilidade térmica e reciclabilidade) (DALPOZZO, 2015; KAZEMI; GHOBADI; MIRZAIE, 2018; ZHANG; YANG; GUAN, 2019).

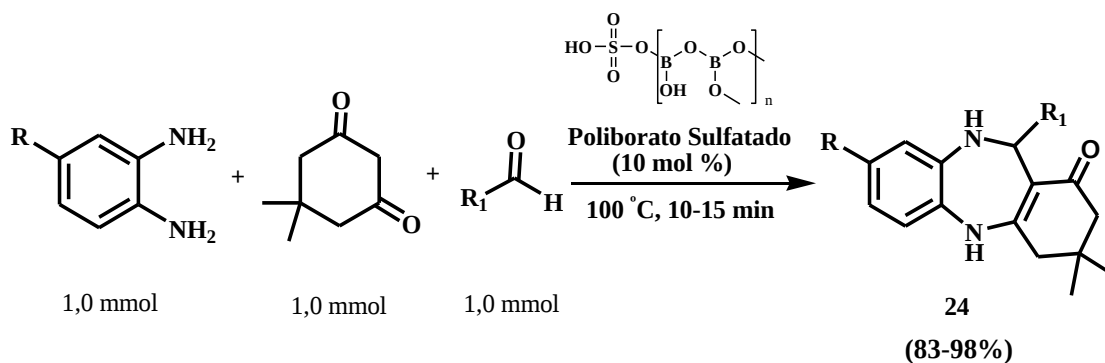
Neste sentido, Jamatia et al. (2013) propuseram a utilização de nanoestruturas de óxido de grafite como sistema catalítico, livre de metal e contendo vários grupos funcionais (-C=O, -OH, -COOH, -O-) responsáveis por suas propriedades ácida e oxidante, no desenvolvimento de uma metodologia versátil para a síntese de 1,5-benzodiazepinas a partir de cetonas e chalconas em reações de ciclocondensação com 1,2-diaminobenzenos. Após um estudo prévio de otimização das condições reacionais foi estabelecido o protocolo (**Esquema 7**). Como resultado, conseguiram obter os derivados benzodiazepínicos em rendimentos bons a excelentes (81-97 %) tanto à temperatura ambiente em etanol como em condições de aquecimento (80 °C) sem o uso de solvente. Destacando a importância econômica e ambiental do método, a reutilização do catalisador também foi avaliada, mediante recuperação por centrifugação, de modo que este não mostrou perda significativa de sua capacidade catalítica após nove ciclos consecutivos (JAMATIA et al., 2013).

Esquema 7: Estratégias sintéticas para a obtenção de 1,5-benzodiazepinas utilizando GO (óxido de grafite) como catalisador. CRLS: condições reacionais livres de solvente

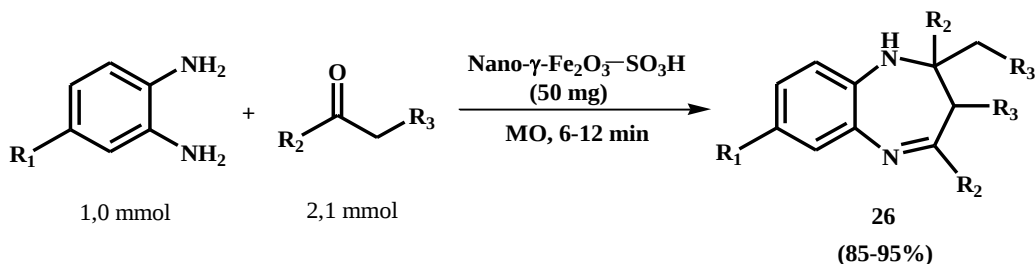


Indalkar e colaboradores (2017) realizaram a síntese de uma série de 1,5-benzodiazepinas 4-substituídas utilizando o poliborato sulfatado como catalisador reciclável em reações multicomponentes a 100 °C, sem o uso de solvente, entre *o*-fenilenodiaminas, dimedona e aldeídos alifáticos, alicíclicos, aromáticos e heterocíclicos (**Esquema 8**). Os produtos almejados foram obtidos em rendimentos elevados (83-98 %) após curtos tempos de reação (10-15 minutos). O catalisador foi recuperado após ser dissolvido em água e separado da mistura reacional por filtração e posterior evaporação em evaporador rotatório, podendo ser reutilizado sem perda significativa de sua eficiência catalítica por quatro ciclos de reação (INDALKAR; PATIL; CHATURBHUIJ, 2017).

Esquema 8: Estratégia sintética para o preparo de 1,5-benzodiazepinas-4-substituídas utilizando poliborato sulfatado como catalisador reciclável



Esquema 10: Estratégia sintética para o preparo de derivados 1,5-benzodiazepínicos utilizando nano- $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-SO}_3\text{H}$ como nanocatalisador



O uso de nanopartículas magnéticas (NPMs) como catalisador ou como suporte sólido para a heterogeneização de catalisadores homogêneos tem recebido grande notoriedade dentre os sistemas catalíticos que vêm sendo desenvolvidos para as mais variadas reações orgânicas. Estes catalisadores são facilmente dispersos no meio reacional e possuem elevada área superficial, com interação entre espécies reagentes e sítios catalíticos semelhante à catálise homogênea, além de apresentarem a atrativa vantagem de recuperação por simples separação magnética para posterior reutilização. Vale ressaltar que as NPMs geralmente utilizadas como suporte apresentam natureza atóxica e são altamente recicláveis, permitindo o desenvolvimento de metodologias sustentáveis com baixo custo (DALPOZZO, 2015; KARIMI; MANSOURI; MIRZAEI, 2015; KAZEMI; GHOBADI; MIRZAEI, 2018).

As NPMs admitem modificações em sua superfície, conferindo ampla versatilidade estrutural aos nanocatalisadores magnéticos. Dentre as estruturas utilizadas, destacam-se as constituídas por um núcleo de nanopartícula magnética revestido por materiais variados (como sílica, carbono, polímeros, surfactantes, dentre outros), sendo conhecidas como estruturas *core@shell*. Este revestimento confere tanto proteção ao núcleo como facilita o ancoramento de vários sítios catalíticos (moléculas, complexos metálicos, etc.), mediante funcionalização, proporcionando um ganho significativo em atividade catalítica para as NPMs (DALPOZZO, 2015; KARIMI; MANSOURI; MIRZAEI, 2015; ZHANG; YANG; GUAN, 2019).

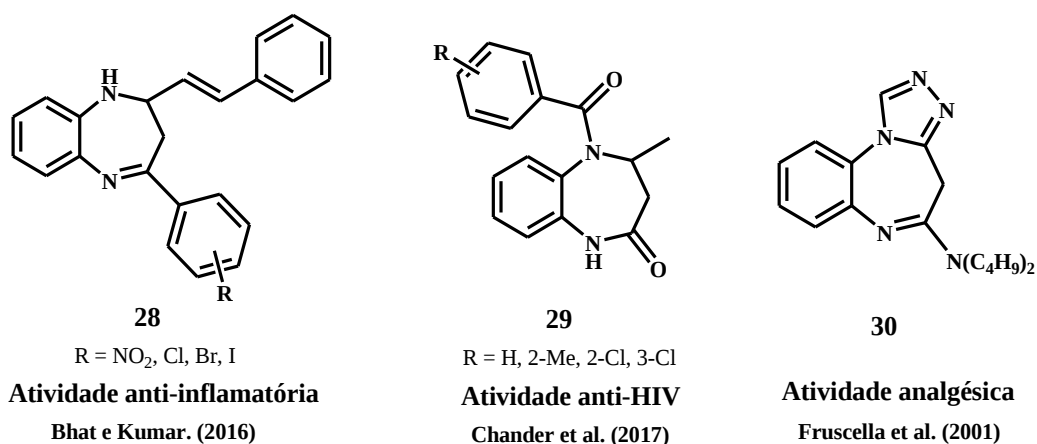
Os sistemas catalíticos heterogêneos que contêm catalisadores suportados sobre estruturas a base de NPMs do tipo *core@shell* funcionalizadas têm como vantagens a maior estabilidade do suporte magnético e do sítio catalítico, apresentando excelentes resultados em várias reações (KARIMI; MANSOURI; MIRZAEI, 2015; ZHANG; YANG; GUAN, 2019).

Dentre os trabalhos sobre a aplicação de novos catalisadores dessa classe, reportados na literatura, o trabalho de De Resende Filho et al. (2019), do grupo da professora Dr.^a Juliana Alves Vale (LASOB-DQ-UFPB), relatou a síntese de derivados de N-acilhidrazonas utilizando íons lantanídeos como catalisadores ácidos suportados em estrutura *core@shell*, mediante

hipnóticos (CHWEH; LIN; SWINYARD, 1984). Entretanto, além destes usos, também são empregados como antidepressivos (KRAPCHO; TURK, 1966), anticonvulsivos (NARAYANA et al., 2006), relaxantes musculares (RICHARDS; WHITTLE; BUCHBINDER, 2012), em condições de esquizofrenia, histeria e comportamentos compulsivos (MERZ, 1990), dentre outras complicações neurológicas. Recentemente, tem sido relatado que estes compostos também são potenciais agentes antioxidantes (BHAGAT et al., 2019; BRAHMBHATT et al., 2020; NEOCHORITIS et al., 2010; SINGLA et al., 2012; THEODOSIS-NOBELOS et al., 2019), anti-inflamatórios (ISHWAR BHAT K, 2016), antimicrobianos (AN et al., 2016), anti-helmínticos (SINGH et al., 2013), analgésicos (FRUSCELLA et al., 2001), anticancerígenos (CHEN et al., 2014), leishmanicidas (THI et al., 2009), antimalariais (INSUASTY et al., 2015), antivirais (NYANGUILE et al., 2008) e anti-HIV (CHANDER et al., 2017).

Tendo em vista as importantes propriedades farmacológicas investigadas em estudos recentes, como por exemplo as dos derivados apresentados na **Figura 6**, constata-se que as benzodiazepinas possuem um amplo espectro terapêutico a ser explorado, além das já consolidadas aplicações como agentes psicotrópicos.

Figura 6: Exemplos de derivados benzodiazepínicos com atividades anti-inflamatória, anti-HIV e analgésica



2.3.1 Compostos Antioxidantes

Os antioxidantes são responsáveis por inibir a oxidação e essenciais para a manutenção do equilíbrio redox no organismo. São conhecidos como “sequestrantes de radicais livres”, sendo os radicais livres pró-oxidantes altamente reativos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e compõem, em nível biológico, principalmente a maioria das espécies

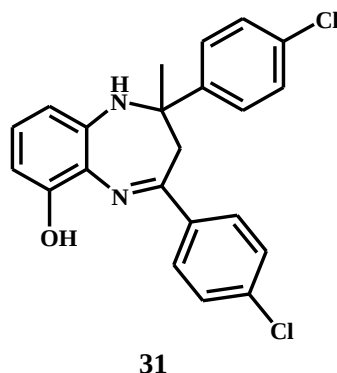
reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), como por exemplo: ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), radical peroxila ($RO_2^{\bullet}$), radical alcóxila ($RO^{\bullet}$), radical óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), radical dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\bullet}$), dentre outros. Os compostos não radicalares que integram EROs e ERNs são agentes oxidantes, em geral, facilmente convertidos em radicais livres (LOBO et al., 2010; NEHA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2007).

A produção de radicais livres ocorre naturalmente durante os processos metabólicos nos sistemas biológicos (origem endógena), bem como em decorrência de estados patológicos ou ainda devido à fatores exógenos (exposição a poluentes ambientais, radiação solar em excesso, tabagismo, uso de medicamentos, dieta inadequada, etc.). Quando presentes em concentrações baixas e moderadas, os radicais livres são fundamentais para os diversos eventos fisiológicos inerentes à vida. Entretanto, quando estão em excesso no organismo, devido à baixa concentração de antioxidantes endógenos e/ou ao aumento na formação de EROs e/ou ERNs, ocorre um desequilíbrio conhecido como estresse oxidativo (LOBO et al., 2010; NEHA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2007).

O estresse oxidativo é capaz de conduzir a sérios danos celulares, uma vez que os radicais livres podem reagir com seus constituintes macromoleculares (lipídios, proteínas, DNA, etc.), contribuindo para o desenvolvimento de várias patologias como doenças inflamatórias, cardíacas, hepáticas, câncer, catarata, artrite, Alzheimer, Parkinson e várias outras doenças. Desse modo, em condições mais graves, torna-se indispensável o uso de suplementos e/ou medicamentos antioxidantes (LOBO et al., 2010; NEHA et al., 2019; VASCONCELOS et al., 2007).

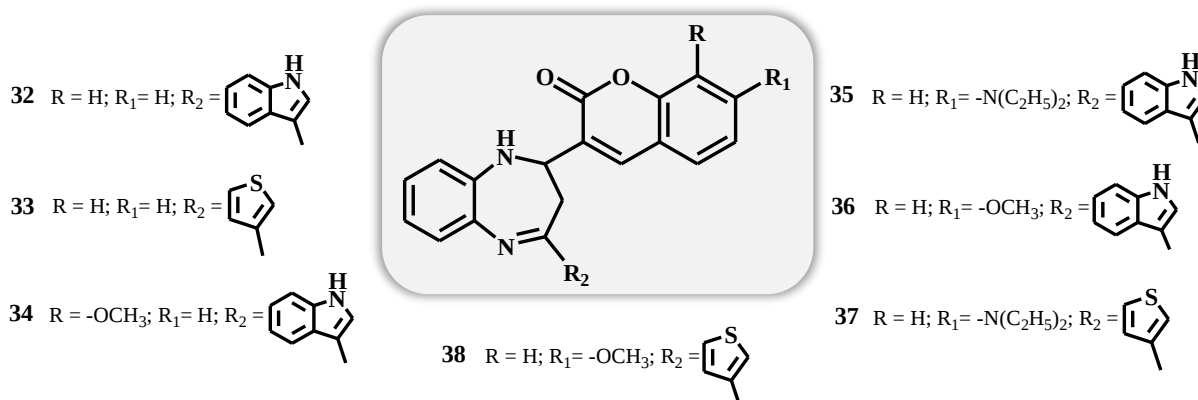
Neste sentido, Neochoritis e colaboradores (2010) avaliaram o potencial antioxidante de hidroxibenzodiazepinas e observaram que um dos derivados (**Figura 7**) apresentou atividade inibitória da peroxidação lipídica ($CI_{50} = 2,5 \mu M$) significativamente superior ao antioxidante de referência Trolox ($CI_{50} = 68 \mu M$). Posteriormente, em um ensaio *in vivo*, este composto foi testado como possível agente anti-inflamatório e apresentou uma atividade moderada ao reduzir 35% do edema em patas de ratos, enquanto o fármaco de referência indometacina reduziu em 47% (NEOCHORITIS et al., 2010).

Figura 7: Hidroxibenzodiazepina com atividade antioxidante e anti-inflamatória proposta por Neochoritis et al. (2010)



Singla et al. (2012) sintetizaram uma série de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas, **Figura 8**, e verificaram que todas apresentaram considerável atividade antioxidante, em especial o derivado **38**, com um grupo metoxila na porção cromen-2-ona e um anel tiofenil na posição quatro, que apresentou uma capacidade de sequestro de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) significativamente superior aos outros derivados, com CI_{50} menor que 15 $\mu\text{g/mL}$ (SINGLA et al., 2012).

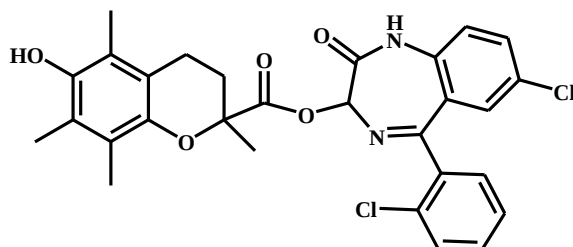
Figura 8: Derivados de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas com potencial atividade antioxidante propostos por Singla et al. (2012)



Já Theodosios-Nobelos e colaboradores (2019) prepararam análogos de 1,5-benzodiazepinas a partir da combinação de antioxidantes, bem como de anti-inflamatórios não esteroidais, com o lorazepam (**7**, **Figura 4**), e observaram que um dos compostos (**Figura 9**), resultante da combinação com o antioxidante de referência Trolox, exibiu atividade inibitória da peroxidação lipídica ($CI_{50} = 2,5 \mu\text{M}$) cerca de dez vezes superior ao Trolox em sua forma não combinada ($CI_{50} = 25 \mu\text{M}$), além de apresentar forte interação com o radical DPPH (91 %),

equivalente ao padrão também usado no ensaio anterior (92 %) (THEODOSIS-NOBELOS et al., 2019).

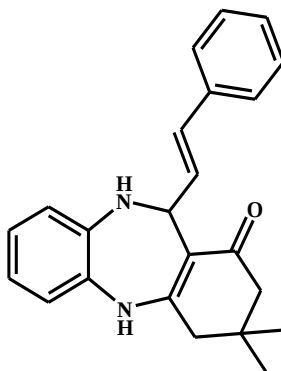
Figura 9: Derivado benzodiazepínico com potencial atividade antioxidante, obtido a partir da combinação do lorazepam com o Trolox, proposto por Theodosis-Nobelos et al. (2019)



39

Bhagat et al. (2019), ao avaliarem o potencial antioxidante de uma série de 1,5-benzodiazepinas, preparadas a partir da *o*-fenilenodiamina, dimedona e vários aldeídos, observaram que sete compostos exibiram resultados muito satisfatórios, em escala nanomolar, no ensaio de sequestro de radicais livres DPPH, com destaque para o derivado **40**, **Figura 10**, que apresentou CI_{50} de 76 nM (BHAGAT et al., 2019).

Figura 10: Derivado de 1,5-benzodiazepina com potencial atividade antioxidante proposto por Bhagat et al. (2019)

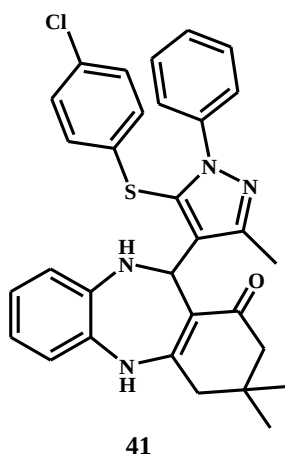


40

Ao adotar uma estratégia sintética similar, Brahmabhatt e colaboradores (2020) sintetizaram uma série inédita de 1,5-benzodiazepinas a partir de reações multicomponentes entre uma variedade de 3-metil-1-fenil-pirazol-4-carbaldeídos 5-substituídos com diferentes diaminas aromáticas e dicetonas cíclicas, e avaliaram seu potencial antioxidante pelo método FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Dentre os compostos obtidos, alguns apresentaram significativa atividade antioxidante, com destaque para o composto **41** (**Figura**

11) que demonstrou maior capacidade antioxidante em reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), com valor FRAP de 468,04 mM de ácido ascórbico/100 g de composto (BRAHMBHATT et al., 2020).

Figura 11: Derivado 1,5-benzodiazepínico com potencial atividade antioxidante proposto por Brahmbhatt et al. (2020)



2.3.2 Compostos Antifúngicos

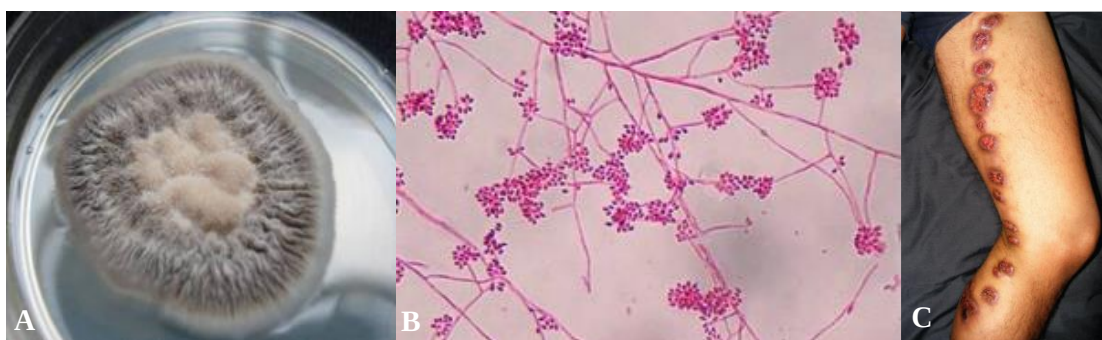
Nas últimas décadas, têm ocorrido um crescimento preocupante no número de casos de infecções fúngicas (micoses) graves ao redor do mundo, apresentando alta taxa de mortalidade global, superior à da malária e câncer de mama e comparável à da tuberculose e HIV. Em geral, as infecções mais graves são do tipo oportunistas, acometendo principalmente pessoas com sistema imunológico debilitado (pacientes transplantados, sob tratamentos quimioterápicos, portadores da AIDS, diabéticos, etc.), provocando lesões cutâneas, subcutâneas e/ou sistêmicas (mais profundas) com evolução rápida e maior possibilidade de levar o paciente a óbito (FISHER et al., 2018; ZHAO et al., 2019).

Tal situação é agravada pelo fato de haver poucas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, sendo os antifúngicos comumente adotados para uso clínico divididos em quatro classes: polienos (e.g. anfotericina B e nistatina), azóis (e.g. fluconazol, itraconazol e voriconazol), equinocandinas (e.g. caspofungina e micafungina) e análogos de pirimidinas (e.g. 5-fluorocitosina) (FISHER et al., 2018; NICOLA et al., 2019). Somado a isso, esses medicamentos geralmente possuem uma ou mais limitações que implicam em tratamentos pouco eficientes, tais como desenvolvimento de resistência medicamentosa

pelo microrganismo, alta toxicidade, baixa biodisponibilidade, espectro antifúngico restrito, dentre outras desvantagens (BROWN et al., 2012).

Um caso particular, de significativa relevância, dentre as infecções fúngicas oportunistas é a esporotricose. Esta micose é causada por fungos patogênicos do gênero *Sporothrix* (**Figura 12**), que apresentam caráter dimórfico, e são comumente encontrados no solo e em ambientes ricos em matéria orgânica (vegetação em geral) de regiões de clima tropical e subtropical. Assim, afeta com maior frequência indivíduos mais suscetíveis ao contato com farpas e espinhos (como agricultores, jardineiros, lavradores, etc.), bem como pessoas sujeitas à arranhadura e mordedura de gatos infectados, uma vez que os felinos domésticos estão entre os principais hospedeiros deste patógeno (CARRASCO-ZUBER et al., 2016; MAHAJAN, 2014; MCCARTY; PAPPAS, 2014).

Figura 12: A) Cultura de *Sporothrix schenckii*; B) Imagem microscópica de cultura de *Sporothrix schenckii* em meio Ágar Sabouraud Dextrose; C) Lesões ulcerativas provocadas por esporotricose linfocutânea. Adaptado de Carrasco-Zuber et al. (2016) e Mahajan (2014)

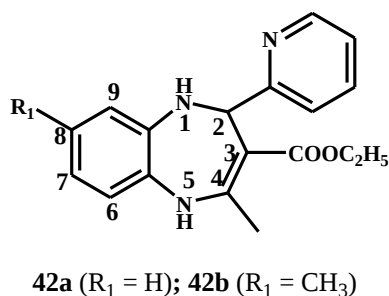


Para superar o problema atual alarmante relacionado às infecções fúngicas é imprescindível a busca por novos agentes antifúngicos, menos tóxicos e mais eficientes, baseados em outras classes de compostos, bem como o desenvolvimento de novos protocolos terapêuticos.

Em vista de tal necessidade, estudos têm sido realizados para investigar o potencial antifúngico de compostos benzodiazepínicos e têm relatado, por exemplo, que a incorporação de grupo éster em diferentes posições do núcleo benzodiazepínico leva à melhora de suas propriedades antimicrobianas, sendo este efeito atribuído a alta lipofilicidade desse substituinte que aumenta a penetração dos compostos nas membranas celulares (ARYA; DANDIA, 2008; WANG; LI; AN, 2015). Outro substituinte já bem conhecido por sua importância nas atividades biológicas (atividade antimicrobiana, antiviral, anti-HIV, etc.) de diversas moléculas é o grupo piridil (Py). Desse modo, An et al. (2016) avaliaram o potencial antifúngico de uma série de

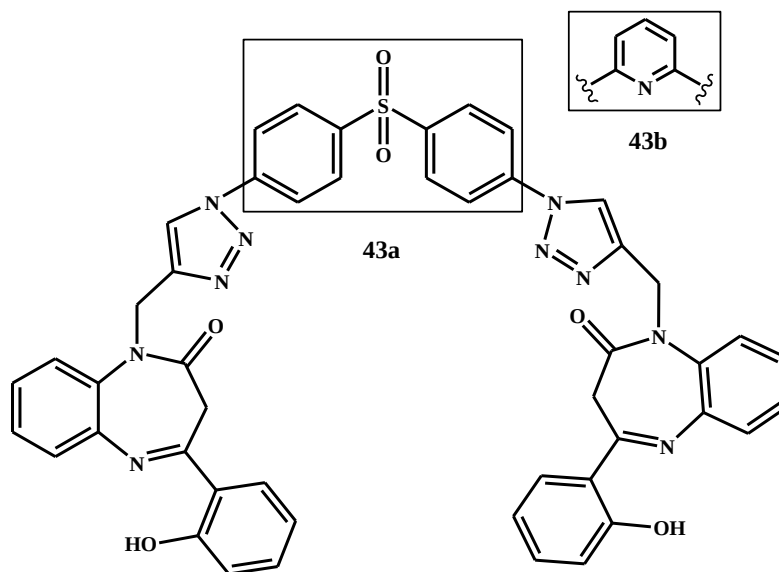
derivados de 1,5-benzodiazepinas, contendo um grupo éster e um grupo piridil (ou fenil), contra *Cryptococcus neoformans*, isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans*. Observaram que a presença da porção piridina proporciona compostos com melhores resultados de atividade antifúngica (**Figura 13**). Adicionalmente, verificaram que a presença do grupo –COOC₂H₅ na posição 3 é essencial para a manutenção da atividade biológica, que é potencializada pela presença da metila em R₁. Dessa forma, obtiveram dois derivados (**42a** e **42b**) com valores de concentração inibitória mínima (CIM) na faixa de 30-36 µg/mL, o que representa atividade antifúngica 3-4 vezes superior à do fármaco de referência fluconazol (CIM > 128 µg/mL) (AN et al., 2016).

Figura 13: Derivados de 1,5-benzodiazepinas com atividade antifúngica sintetizadas por An et al. (2016)



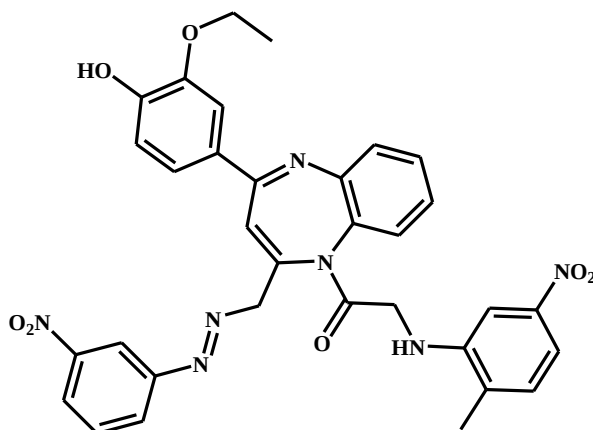
Partindo de uma outra proposta sintética, Jaafar e colaboradores (2019) prepararam uma série inédita de derivados homodiméricos de 1,5-benzodiazepinas contendo porções de triazol, onde diferentes espaçadores foram empregados como ligantes das unidades farmacofóricas constituídas por um híbrido do tipo 1,2,3-triazol-1,5-benzodiazepin-2-ona. Posteriormente, ao avaliarem o potencial antifúngico destes novos compostos contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida keusei*, observaram, de maneira geral, que todos os derivados apresentaram ação fungicida, com destaque para dois deles (**43a** e **43b**), **Figura 14**, que exibiram elevada atividade antifúngica contra todas as espécies de fungos (CIM = 62,5-125 µg/mL), significativamente superior à da droga de referência anfotericina B (CIM = 500 µg/mL) (JAAFAR et al., 2019).

Figura 14: Derivados homodiméricos de 1,5-benzodiazepinas com atividade antifúngica sintetizados por Jaafar et al. (2019)



Já Verma et al. (2019) sintetizaram análogos de 1,5-benzodiazepinas 1,2,4-substituídas e, ao realizarem um estudo de atividade antifúngica contra duas importantes espécies de fungos patogênicos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*), observaram que todos exibiram ação fungicida significativa, tendo o composto **44** (**Figura 15**) como o melhor antifúngico da série investigada, com valor da potência de CIM ($\text{pCIM} = \log(1/\text{CIM})$) igual a 1,71 $\mu\text{M/mL}$ frente ao pCIM de 2,64 $\mu\text{M/mL}$ do fluconazol, antifúngico usado como padrão (VERMA et al., 2019).

Figura 15: Derivado benzodiazepínico com atividade antifúngica sintetizado por Verma et al. (2019)



44

2.4 ESTUDO *IN SILICO* DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS – ADMET

O desenvolvimento de um novo fármaco envolve uma série de ensaios que atestam que uma dada substância, natural ou sintética, apresenta os requisitos necessários para atuar como agente terapêutico. Com o avanço das tecnologias computacionais ao longo dos anos, a indústria farmacêutica tem aperfeiçoado as metodologias de triagem e adotado cada vez mais o uso de modelos virtuais (*in silico*), em etapas iniciais, para a comprovação da atividade biológica e a investigação da viabilidade clínica de um composto protótipo (ZHENG et al., 2018).

O fato da substância apresentar elevada atividade não é suficiente para que ela seja considerada um bom candidato a fármaco, pois além disso é necessário que ela possua baixa toxicidade, lipofilicidade suficiente para transpor as membranas biológicas (como a do trato gastrointestinal, entre outras) e solubilidade aquosa satisfatória para que possa ser carregada pela corrente sanguínea até o alvo (JORGENSEN; DUFFY, 2002; LIPINSKI, 2004). Desse modo, a etapa pré-clínica, relacionada ao desenvolvimento de novos fármacos, envolve estudos farmacodinâmicos (ação da substância no organismo), farmacocinéticos (ação do organismo sobre o composto) e toxicológicos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* (BARREIRO; FRAGA, 2015; YU; ADEDOYIN, 2003).

Dentre os estudos realizados na etapa pré-clínica, a avaliação *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) tem sido muito empregada pela indústria farmacêutica, pois permite a realização de uma abordagem eficiente e ampla com significativa economia de tempo e investimento financeiro. Assim, evita-se gastos desnecessários com ensaios biológicos de compostos com grande probabilidade de problemas futuros associados aos perfis ADMET, os quais são responsáveis por cerca de 50 % das causas de descarte de novos candidatos durante o processo de P&D de fármacos (YAN, 2018; ZHENG et al., 2018).

O *screening* virtual para a predição do perfil de biodisponibilidade oral e da toxicidade (ADMET) é realizado a partir de ferramentas computacionais que utilizam bancos de dados formados por uma gama de propriedades físico-químicas e características estruturais adquiridas mediante uma série de observações experimentais de um grande número de compostos aprovados e reprovados como fármacos (ZHENG et al., 2018). Desse modo, programas online de acesso livre como Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e Osiris® Property Explorer (<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) têm sido

amplamente usados, uma vez que permitem estimar tais parâmetros com um bom grau de confiabilidade (FERREIRA et al., 2015).

Para uma avaliação eficiente do perfil ADMET de um fármaco utiliza-se, principalmente, os parâmetros associados à “Regra dos 5 de Lipinski” (LIPINSKI et al., 1997). De acordo com essa regra, para se alcançar uma biodisponibilidade oral desejável para um fármaco devem ser atendidas as seguintes características físico-químicas:

- Massa molecular menor ou igual a 500 Da;
- Lipofilicidade (cLog P) menor ou igual a 5;
- Número de doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 (expresso como a soma de OH e NH na molécula);
- Número de aceptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 (expresso como a soma de átomos de O e N).

A partir de estudos adicionais, realizados por diferentes grupos de pesquisa, outros importantes descritores passaram a ser considerados na avaliação da biodisponibilidade. Dentre eles, tem-se a solubilidade aquosa (Log S, entre -1 e -5), a área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês, *topological polar surface area*), a qual permite avaliar tanto a absorção intestinal como a hematoencefálica e deve ser menor ou igual a $140 \text{ \AA}^2$, e o número de ligações rotacionáveis (nRB, do inglês, *number rotatable bonds*), menor ou igual a 10, que indica a flexibilidade necessária para se alcançar boa permeabilidade e absorção (JORGENSEN; DUFFY, 2002; VEBER et al., 2002).

A toxicidade, fator essencial para aprovação de um fármaco, é estimada no programa Osiris[®] através de uma abordagem de similaridade estrutural baseada na comparação de características estruturais dos compostos avaliados com um banco de dados de fragmentos de substâncias com efeitos tóxicos comprovados (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances – RTECS), uma vez que os efeitos adversos e a toxicidade de um composto está diretamente relacionado à sua estrutura química.

Diante do exposto, os estudos *in silico* ADMET são uma opção viável e promissora para a avaliação de novas moléculas candidatas a fármaco quanto aos perfis de biodisponibilidade oral e toxicidade. Além disso, são importantes ferramentas que auxiliam na adequação estrutural para a obtenção de compostos com maior potencial para se tornarem fármacos.

Capítulo 3

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar análogos de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas a partir de acetofenonas substituídas para, posteriormente, avaliar suas potencialidades como agentes antioxidantes e antifúngicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar e otimizar as condições de reação para a obtenção das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas.
- Sintetizar análogos de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas a partir dos intermediários nucleofílicos (1,2-diaminobenzeno e 4-metil-1,2-diaminobenzeno) e das acetofenonas substituídas (3'-hidroxiacetofenona, 4'-hidroxiacetofenona, 2',4'-diidroxiacetofenona e 4-cloro-3-nitroacetofenona);
- Caracterizar os compostos sintetizados por métodos espectroscópicos de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), espectrometria de massas e ponto de fusão;
- Avaliar o potencial biológico das 1,5-benzodiazepinas sintetizadas através de ensaios *in vitro* de atividade antioxidante e de atividade antifúngica contra cepas do gênero *sporothrix*.
- Investigar a aplicação inédita de catalisadores heterogêneos contendo sítios metálicos ácidos a base de nanopartículas magnéticas (NPMs) do tipo *core@shell* funcionalizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-M}$ ($\text{M} = \text{Mn}^{2+}$, Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Tb^{3+} e Eu^{3+})) em reações assistidas por micro-ondas na síntese dos derivados benzodiazepínicos almejados.
- Avaliar o potencial clínico dos derivados benzodiazepínicos sintetizados através da determinação teórica das suas propriedades farmacocinéticas ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção) e de toxicidade em estudo *in silico*.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, em uma primeira etapa, serão descritas as otimizações necessárias para a síntese das 1,5-benzodiazepinas de interesse, obtidas a partir de reações entre acetofenonas substituídas e diaminas aromáticas, tendo como catalisador o ácido trifluoroacético (TFA), em uma adaptação da metodologia adotada por ZHAO et al. (2014). Também serão apresentados e discutidos os dados espectroscópicos e físicos que permitiram a elucidação estrutural dos compostos preparados.

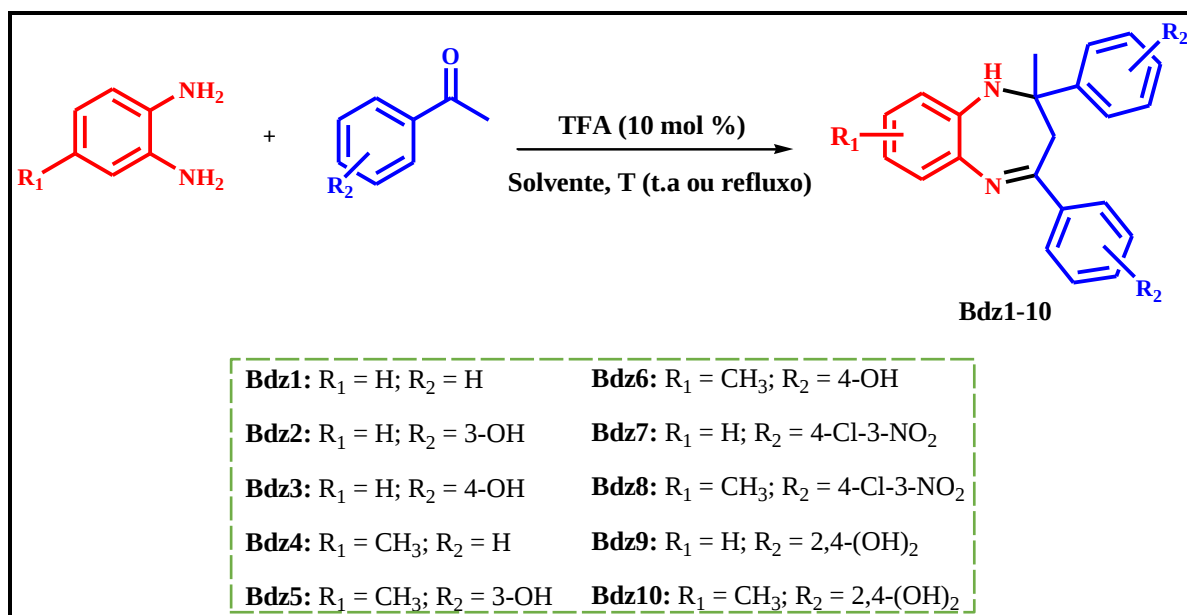
Em uma segunda etapa, será abordada a avaliação do uso de catalisadores heterogêneos magnéticos do tipo *core@shell* (obtidos em parceria com o grupo da professora Dr.^a Juliana Alves Vale, do Laboratório de Síntese Orgânica e Biocatálise (LASOB-DQ-UFPB), a partir do trabalho de tese de sua aluna de doutorado Nathália Kellyne S. M. Falcão) em reações assistidas por micro-ondas para a síntese das moléculas alvo.

Posteriormente, em uma terceira e última etapa, serão apresentados os resultados dos testes de atividade antioxidante e atividade antifúngica, além de um estudo teórico referente à investigação da biodisponibilidade oral e toxicidade dos produtos sintetizados.

4.1 PARTE SINTÉTICA

4.1.1 Otimização das condições reacionais e síntese de 2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepinas a partir de reações catalisadas por ácido trifluoroacético (TFA)

Para este trabalho, foram propostos dez derivados benzodiazepínicos (**Bdz1-10**), **Esquema 12**. A preparação dos produtos de interesse foi realizada com base em uma adaptação da estratégia sintética reportada por Zhao e colaboradores (ZHAO et al., 2014). Apesar desta metodologia, baseada na reação de ciclocondensação entre *o*-fenilenodiaminas e acetofenonas, via catálise ácida, ser realizada em condições amenas (à temperatura ambiente e livre de solvente), a sua aplicação limita-se apenas às reações com cetonas líquidas, que desempenham tanto o papel de reagente quanto o de solvente na reação.

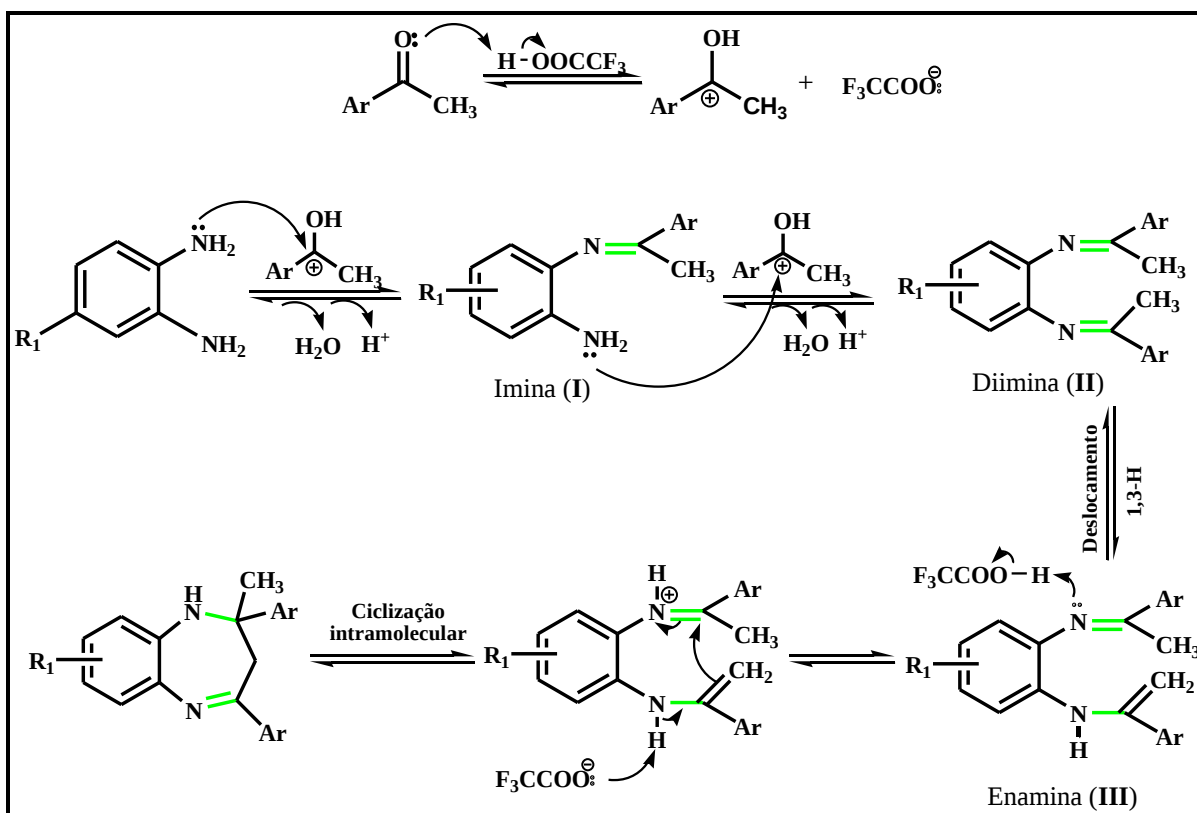
Esquema 12: Proposta geral para a síntese dos dez derivados benzodiazepínicos almejados (**Bdz1-10**)

Com base na literatura (AMOOZADEH et al., 2015; CLIMENT et al., 2009; JAMATIA; SAHA; PAL, 2014; ZHAO et al., 2014), sabe-se que o mecanismo para essa reação envolve a formação de um intermediário monoimínico, como observado por Climent e colaboradores (2009) em um estudo cinético.

Desse modo, o mecanismo proposto para a reação de formação das 1,5-benzodiazepinas almejadas está apresentado no **Esquema 13**. Em um primeiro momento, na presença do organoácido, a carbonila protonada da acetofenona sofre o ataque nucleofílico da *o*-fenilenodiamina resultando no intermediário imina (**I**). Em seguida, o outro grupo amina ataca uma segunda molécula de acetofenona ativada levando a formação do intermediário diimina (**II**). Então, mediante ação do ácido de brønsted presente em quantidade catalítica, ocorre um deslocamento 1,3 do átomo de hidrogênio do grupo metila para formar o tautômero enamina (**III**), o qual cicliza após duas etapas ácido-base fornecendo o anel de sete membros das 1,5-benzodiazepinas.

Para as reações realizadas com a diamina assimétrica será obtida uma mistura de regioisômeros como produto final, uma vez que o tautômero enamina pode ser formado em qualquer uma das porções iminas do intermediário diimina (**II**), como será discutido mais adiante.

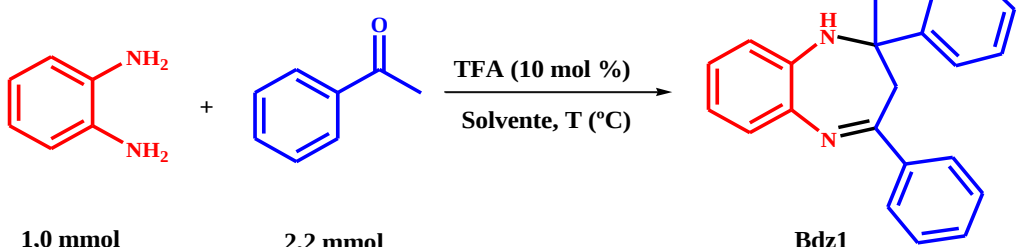
Esquema 13: Mecanismo proposto para a síntese de 1,5-benzodiazepinas em reação de ciclocondensação entre *o*-fenilenodiaminas e acetofenonas catalisada por organoácido. Adaptado de Amoozadeh et al. (2015), Climent et al. (2009), Jamatia, Saha, Pal (2014) e Zhao et al. (2014)



Tendo em vista que os compostos alvo são majoritariamente derivados de cetonas sólidas, observou-se a necessidade de utilização de solvente na reação. Assim, um conjunto de reações similares, baseadas na síntese da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepina (**Bdz1**), foram realizadas para investigar o efeito de diferentes solventes e temperaturas no rendimento do produto desejado, **Tabela 1**, com o intuito de identificar as condições experimentais ótimas para promover, de maneira eficiente e generalizada, a síntese de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas utilizando o ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador. Os solventes avaliados foram: metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetonitrila (MeCN), dimetilformamida (DMF) e dimetilsulfóxido (DMSO). Todos foram submetidos a reações à temperatura ambiente e em temperaturas de refluxo.

Em um primeiro momento, foi definido o tempo de reação para o estudo de otimização pretendido, a partir da síntese de **Bdz1** em etanol à temperatura ambiente. Como resultado deste teste inicial, o rendimento máximo do produto desejado (78 %) foi atingido após 15 h de experimento, de modo que este foi estabelecido como o tempo reacional para todos os ensaios.

Tabela 1: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepina (**Bdz1**) para o estudo de otimização das condições reacionais realizado em diferentes solventes (3 mL) e temperaturas após 15 h de reação^a

				
Entrada	Solvente	Temperature (°C)	Tempo (h)	Rendimento ^b (%)
1	MeOH	t.a	15	85
2	MeOH	Refluxo (65)	15	54
3	EtOH	t.a	15	78
4	EtOH	Refluxo (78)	15	51
5	CH ₃ CN	t.a	15	45
6	CH ₃ CN	Refluxo (82)	15	36
7	DMF	t.a	15	29
8	DMF	Refluxo (100)	15	NC
9	DMSO	t.a	15	17
10	DMSO	Refluxo (100)	15	NC

^aReações usando *o*-fenilenodiamina (0,33 mol/L), acetofenona (0,73 mol/L) e TFA (10 mol % - em relação à diamina aromática). ^bRendimento isolado. t.a: temperatura ambiente. NC: não converteu.

A partir da otimização das condições reacionais, foi observado que ambos os fatores investigados, solvente e temperatura, desempenham importante papel no rendimento de **Bdz1**. Como pode ser observado na **Tabela 1** (entrada 1), a reação realizada em metanol e temperatura ambiente proporcionou o rendimento máximo de 85 %. Todas as reações realizadas à temperatura ambiente levaram a formação do produto desejado e apresentaram rendimentos superiores às realizadas em altas temperaturas. Isto pode estar relacionado ao fato de que em temperaturas elevadas (refluxo) é favorecida a ocorrência de reações paralelas, resultando na

formação de coprodutos (observados em CCD) e, conseqüentemente, na redução significativa do rendimento.

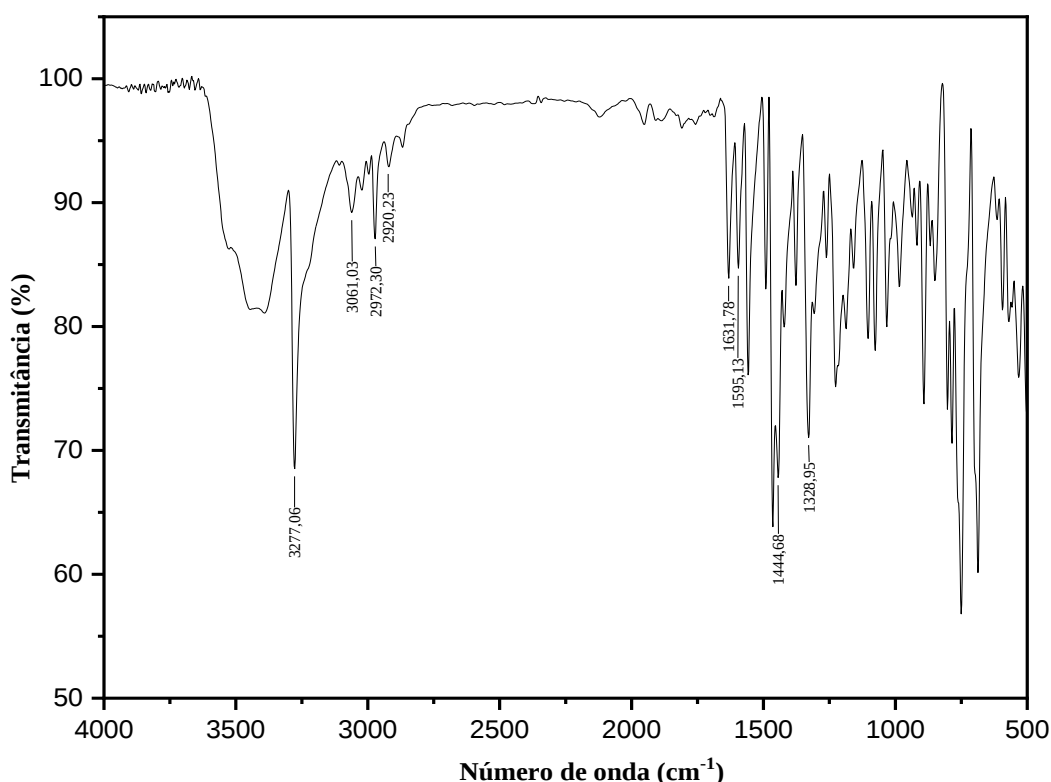
Quanto a influência do solvente, observou-se que as reações realizadas tanto em metanol como em etanol (**Tabela 1**, entradas 1 e 3) proporcionaram rendimentos significativamente maiores do produto **Bdz1**. Já os demais solventes, em especial a dimetilformamida e o dimetilsulfóxido, levaram a baixos rendimentos, onde para as reações realizadas sob refluxo a 100 °C não foi observada a formação do produto de interesse (**Table 1**, entradas 8 e 10). O melhor desempenho dos solventes polares próticos (MeOH e EtOH) pode estar associado ao fato destes solventes conferirem, através de ligações de hidrogênio, maior estabilidade à base conjugada de TFA (melhora da atividade catalítica) e ao estado de transição da etapa lenta da reação, levando, assim, ao aumento do rendimento em relação aos solventes polares apróticos (MeCN, DMF e DMSO).

O solvente e a temperatura se mostraram, portanto, fundamentais para a formação de **Bdz1**. O progresso das reações foi acompanhado por cromatografia em camada delgada (CCD), na qual foi possível identificar a formação de um produto mais apolar do que as espécies reagentes. Em uma etapa final, para a precipitação do composto formado, a mistura reacional foi vertida em banho de gelo e basificada com solução de amônia a 5 % (m/v). O precipitado obtido foi, então, filtrado em um sistema de filtração a vácuo, no qual foi lavado com água gelada até pH neutro e, em seguida, seco à temperatura ambiente. Devido a confirmação, via CCD, da presença de material de partida após a filtração, fez-se necessária a purificação do composto sintetizado utilizando a técnica de cromatografia em coluna do tipo “*flash*” fazendo uso de diferentes misturas de hexano/acetato de etila, como fase móvel, e um pressurizador utilizado em nebulizadores comuns.

Após ser isolada, a benzodiazepina **Bdz1** foi caracterizada por métodos espectroscópicos de infravermelho (IV-FT), ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C) e espectrometria de massas (EM). A elucidação estrutural do produto obtido foi realizada, inicialmente, por espectroscopia na região do infravermelho, a fim de se observar a presença de grupos característicos da benzodiazepina esperada. Dessa forma, a partir da análise do espectro IV, **Figura 16**, confirmou-se a presença da banda de absorção relativa ao estiramento N-H de aminas secundárias em 3277 cm^{-1} . A presença do estiramento C=N, da porção imínica, foi constatada pela banda de absorção em 1632 cm^{-1} . A ligação C-N foi revelada pela banda de absorção em 1329 cm^{-1} . Os carbonos sp^2 de aromáticos foram confirmados pela banda de estiramento C-H em 3061 cm^{-1} e pelas bandas de estiramento C=C de aromáticos entre 1595 e 1445 cm^{-1} . Os carbonos sp^3 dos grupos metila e metileno foram identificados pelas bandas de

estiramento C-H em 2972 e 2920 cm^{-1} . Por fim, não foi verificada a presença da banda de carbonila da acetofenona nem das bandas de N-H de aminas primárias, entretanto, foi observada a presença de uma banda larga entre 3630 e 3300 cm^{-1} , possivelmente associada ao estiramento O-H de água residual. Todas as bandas destacadas encontram-se embasadas e consistentes com a literatura (AMOOZADEH et al., 2015; ZHAO et al., 2014).

Figura 16: Espectro de infravermelho (KBr) do composto **Bdz1**

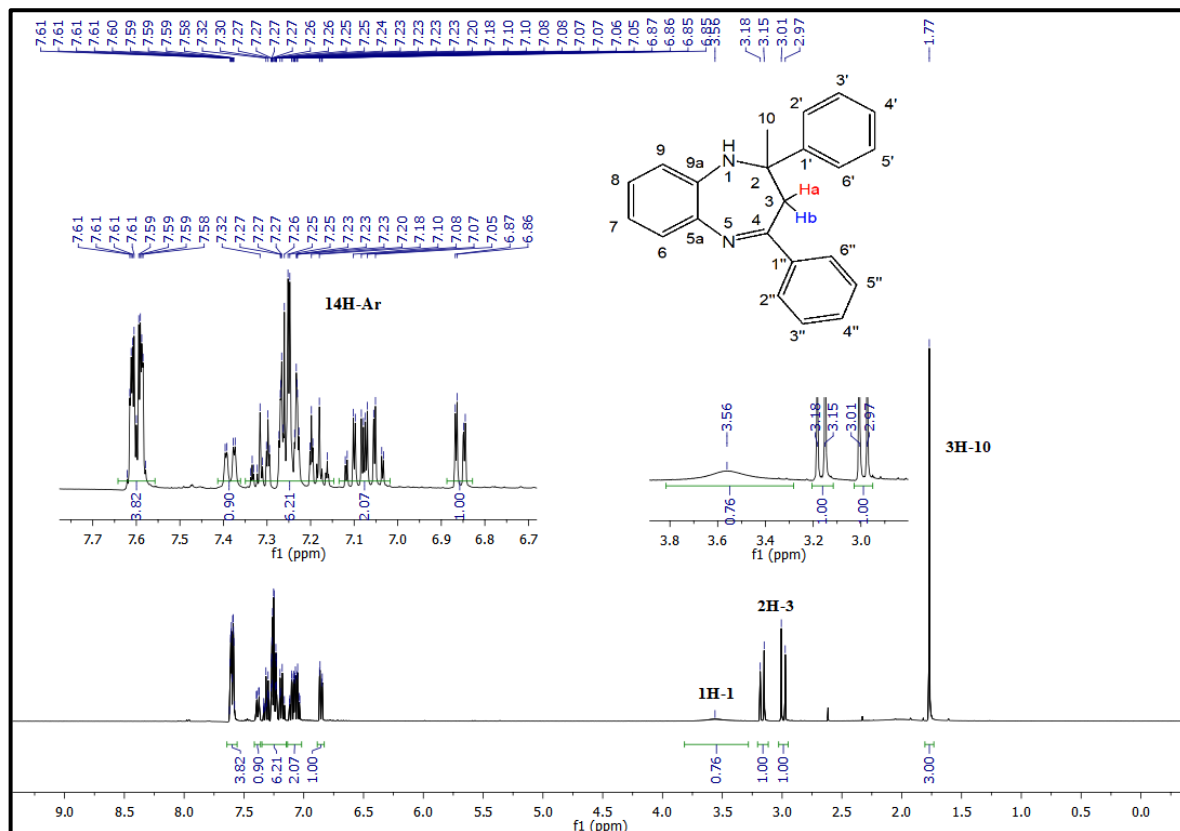


O espectro de RMN ^1H da benzodiazepina **Bdz1**, **Figura 17**, revelou um simpleto em 1,77 ppm referente aos hidrogênios metílicos (H-10), dois dupletos em 2,99 e 3,17 ppm (ambos com constantes de acoplamento $^2J = 13,2$ Hz) correspondentes aos hidrogênios metilênicos (H_a-3 e H_b-3) do heterocíclico, além do simpleto largo em 3,56 ppm referente ao hidrogênio da porção amínica (H-1), indicando a formação do núcleo benzodiazepínico. Na faixa de deslocamento químico entre 6,86-7,63 ppm foi revelado conjunto de multipletos e dupletos característicos dos hidrogênios aromáticos. É importante ressaltar que todos os sinais observados estão em concordância com a literatura (AMOOZADEH et al., 2015; QIAN et al., 2012; ZHAO et al., 2014).

Ao observar a estrutura de **Bdz1**, nota-se que a diferenciação dos sinais dos hidrogênios metilênicos H_a e H_b ocorre devido à diastereotopidade dos mesmos, uma vez que

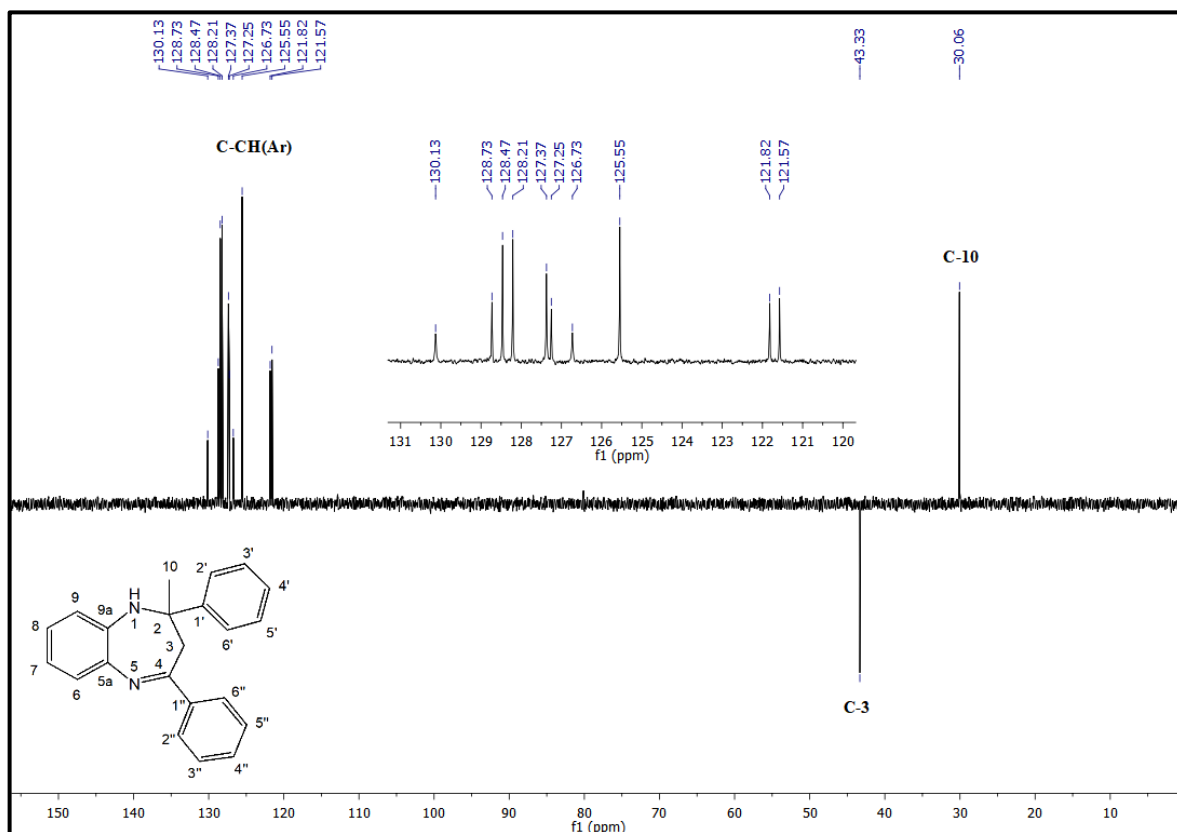
o CH₂ na posição 3 se encontra diretamente ligado ao carbono assimétrico C-2, de modo que estes hidrogênios não são quimicamente equivalentes e, portanto, realizam acoplamento entre si e apresentam deslocamentos químicos (δ) diferentes.

Figura 17: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **Bdz1**



Contribuindo com os dados espectrais já discutidos, o espectro de RMN ¹³C (DEPT-135), **Figura 18**, possibilitou a distinção dos carbonos dos grupos CH₃, CH₂ e CH característicos de **Bdz1**, de modo que foram observados os sinais em 30,06 e 43,33 ppm, correspondentes aos carbonos metílico (C-10) e metilênico (C-3), respectivamente, bem como os sinais entre 121 e 131 ppm, referentes aos carbonos de CH aromáticos. Tendo em vista a simetria das porções aromáticas em C-2 e C-4, observa-se que os sinais dos carbonos equivalentes (C-2',C-6'/C-3',C-5'/C-2'',C-6''/C-3'',C-5'') possuem o mesmo deslocamento químico, de modo que apesar do composto possuir um total de quatorze carbonos de CH aromáticos apenas dez sinais são observados no espectro.

Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de **Bdz1**



Ao analisar o espectro de RMN ^{13}C completo, **Figura 19**, eliminando os sinais revelados no DEPT-135, foram identificados os principais sinais característicos da formação do núcleo benzodiazepínico esperado, os quais possuem deslocamentos químicos de 73,89 ppm e 168,24 ppm e correspondem, respectivamente, aos carbonos quaternários das ligações $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-N}$ (C-2) e $\text{C}=\text{N}$ (C-4), indicando, em conjunto com os demais sinais, a obtenção do produto desejado. A observação de apenas três sinais (138,3 ppm, 139,3 ppm e 147,6 ppm) para os quatro carbonos quaternários aromáticos (5a, 9a, 1', 1'') pode estar relacionada à metodologia e/ou tempo de aquisição do espectro, tendo em vista que carbonos deste tipo são de difícil identificação (sinal de baixa intensidade) e exigem mais do equipamento para possível identificação.

Somado às informações espectrais já apresentadas, o espectro de massas de alta resolução, **Figura 20**, forneceu um pico referente ao íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z igual a 313,17, confirmando assim a formação da benzodiazepina de interesse **Bdz1** ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2$).

Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **Bdz1**

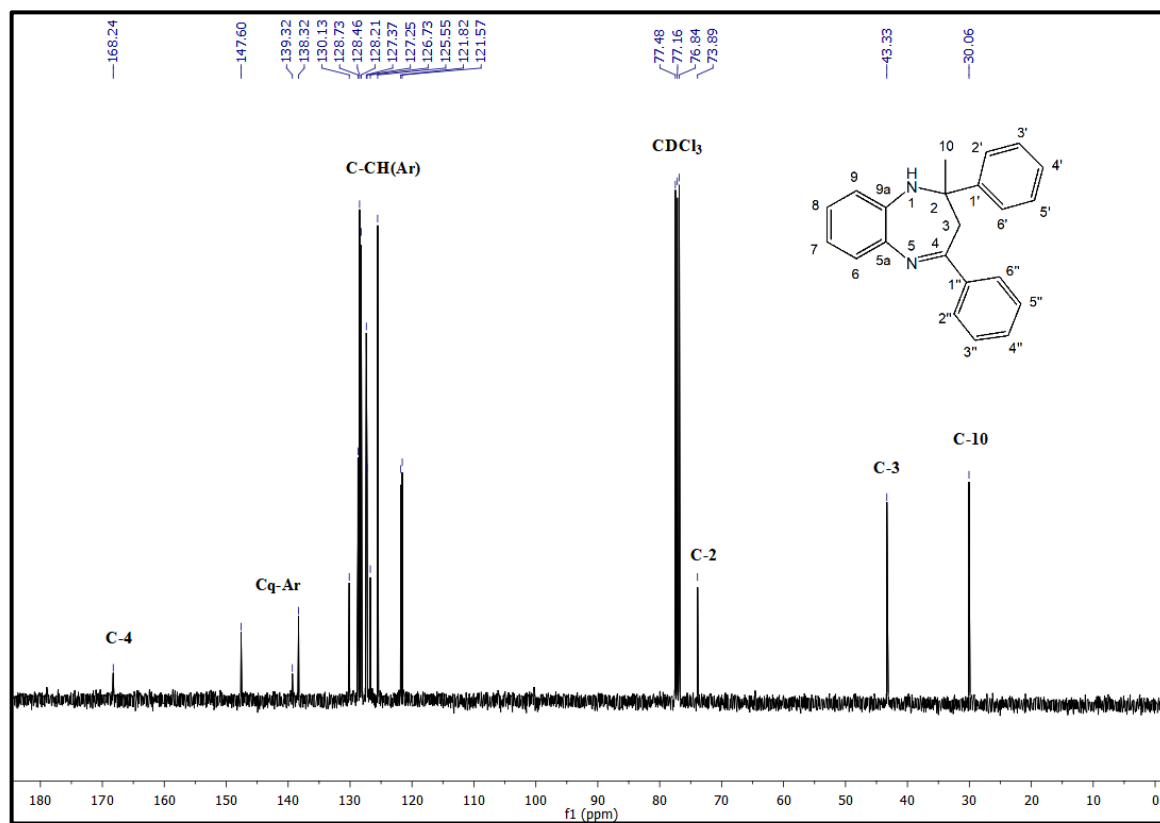
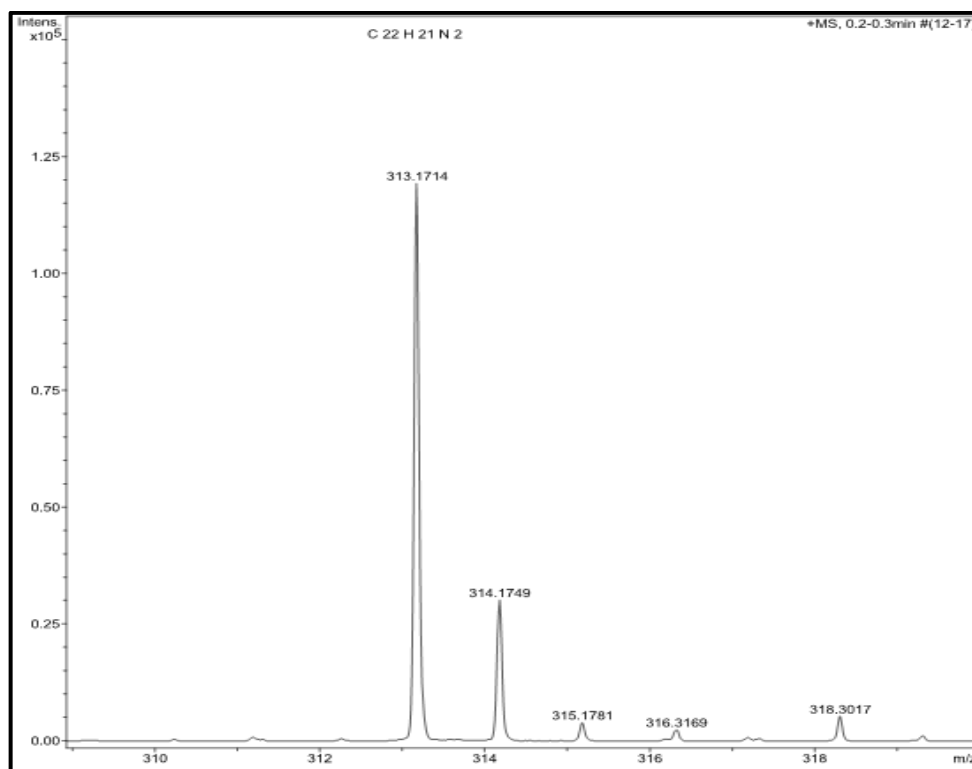


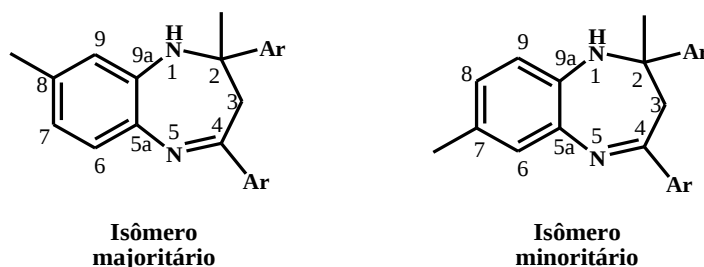
Figura 20: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz1**



Com o intuito de avaliar o desempenho do metanol e do etanol, à temperatura ambiente, em um processo mais geral, decidimos empregar os dois modelos de reação previamente na síntese das benzodiazepinas **Bdz2-6** usando como materiais de partida o 1,2-diaminobenzeno, 4-metil-1,2-diaminobenzeno, acetofenona e 3- e 4-hidroxiacetofenonas.

Através da análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos derivados preparados a partir da diamina assimétrica 4-metil-1,2-diaminobenzeno, observou-se a presença de sinais duplicados em ambos os espectros, indicando a formação de uma mistura de dois regioisômeros em cada reação, assim como relatado nos trabalhos de Insuasty e Abonia (INSUASTY; ABONIA, 1993) e Qian e colaboradores (QIAN et al., 2012). Estes estudos apontam que o isômero majoritário da mistura é o que contém o grupo metila em C-8, localizado na posição *para* ao grupo imina, e o isômero minoritário é o que contém a metila em C-7, posicionado em *meta* em relação a imina do núcleo diazepínico, como representado na **Figura 21**. A proporção dos regioisômeros em cada mistura foi calculada com base na integração dos sinais de RMN ^1H .

Figura 21: Representação dos dois regioisômeros benzodiazepínicos formados mediante uso da diamina assimétrica 4-metil-*o*-fenilenodiamina

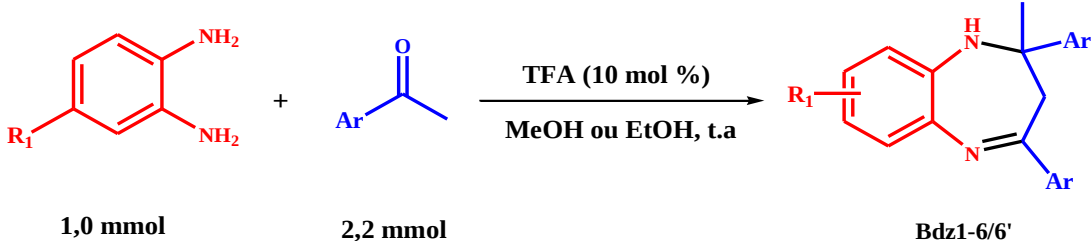
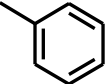
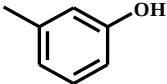
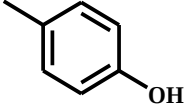
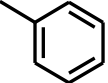
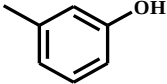
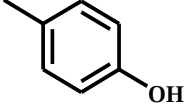


A partir dos resultados apresentados na **Tabela 2**, mais adiante, observamos que ambas as propostas sintéticas conduziram a obtenção dos derivados pretendidos em rendimentos bons à excelentes. Vale destacar que as hidroxibenzodiazepinas **Bdz2** e as obtidas como misturas de regioisômeros **Bdz5/5'** e **Bdz6/6'** são inéditas, não havendo na literatura, até onde sabemos, relatos anteriores acerca destes compostos. Nota-se que os compostos hidroxilados foram obtidos em altos rendimentos, sem diferenças significativas quanto ao solvente empregado. Com o grupo hidroxila na acetofenona de partida foi observado um aumento de até 16 % no rendimento de reação, sendo alcançados rendimentos excelentes para as novas benzodiazepinas hidroxiladas (**Bdz2**, **Bdz5/5'** e **Bdz6/6'**), na faixa de 91-95 %. Entretanto, observamos que com o uso do metanol todas as reações se processaram mais rapidamente do que as realizadas em etanol.

Para os produtos obtidos como mistura de regioisômeros, pode-se observar que a mistura de isômeros **Bdz4/4'** foi preparada em rendimento bom a moderado (86 %-MeOH, 79 %-EtOH) e baixa regiosseletividade (**Bdz4:Bdz4'** = 60:40). Já o par de regioisômeros **Bdz5/5'** alcançou alto rendimento para ambos os solventes utilizados (92 %-MeOH, 95 %-EtOH), porém baixa regiosseletividade (**Bdz5:Bdz5'** = 65:35). Entretanto, para os produtos regioisoméricos **Bdz6:Bdz6'**, obtidos a partir da 4-hidroxiacetofenona, foram observados elevados rendimentos (91 %-MeOH, 91 %-EtOH) e alta regiosseletividade (**Bdz6:Bdz6'** = 80:20).

Com relação ao efeito dos substituintes nos materiais de partida, vale destacar que, em geral, os derivados hidroxilados obtidos a partir da *m*-hidroxiacetofenona atingiram rendimentos percentuais ligeiramente superiores e em menores tempos de reação do que os derivados obtidos a partir da *p*-hidroxiacetofenona. Isto provavelmente está relacionado ao fato do grupo hidroxila provocar uma maior redução da eletrofilicidade da carbonila quando ocupa a posição *para*, o que é acarretado pela maior deslocalização de elétrons para o sítio eletrofílico, que se torna, portanto, menos reativo diante de um ataque nucleofílico. Já a presença do grupo metila na *o*-fenilenodiamina de partida proporcionou reações com rendimentos similares às realizadas a partir da diamina não metilada, indicando que o substituinte alquila, por ser um grupo elétron-doador fraco, não provocou aumento da nucleofilicidade da diamina e, portanto, não influenciou no desempenho da reação de ciclocondensação catalisada por TFA.

Tabela 2: Rendimentos isolados das 1*H*-1,5-benzodiazepinas **Bdz1-6/6'** preparadas usando metanol e etanol como solventes e ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador à temperatura ambiente^a

						
	1,0 mmol	2,2 mmol	Bdz1-6/6'			
Composto	R ₁	Ar	MeOH		EtOH	
			Tempo (h)	Rend. ^b (%)	Tempo (h)	Rend. ^b (%)
Bdz1	H		12	85	15	78
Bdz2	H		16	91	17	92
Bdz3	H		19	91	21	90
Bdz4+Bdz4' (60:40)	CH ₃		12	86	14	79
Bdz5+Bdz5' (65:35)	CH ₃		15	92	16	95
Bdz6+Bdz6' (80:20)	CH ₃		18	91	19	91

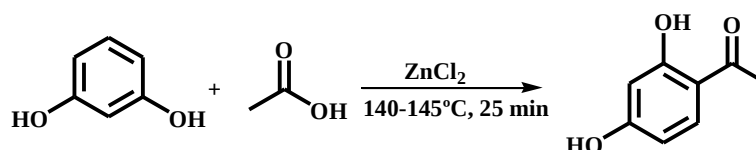
^aReações usando *o*-fenilenodiaminas (0,33 mol/L), acetofenonas (0,73 mol/L) e TFA (10 mol % - em relação à diamina aromática). ^bRendimento isolado.

Uma vez que ambos os solventes proporcionaram resultados similares no preparo dos derivados hidroxilados à temperatura ambiente, optamos por empregar o etanol na síntese das demais benzodiazepinas (**Bdz7-10**) propostas para o trabalho, tendo em vista o seu caráter sustentável e facilidade operacional.

Vale destacar, que dentre as acetofenonas utilizadas como substratos eletrofílicos na síntese dos compostos de interesse, apenas a 2',4'-diidroxiacetofenona não foi adquirida

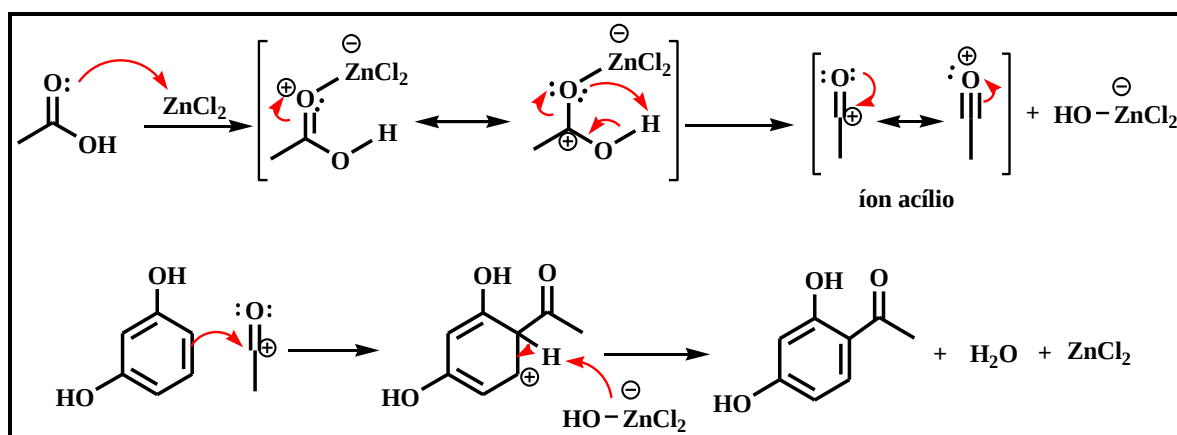
comercialmente, de modo que foi preparada a partir da acetilação do resorcinol com ácido acético sob ação catalítica do cloreto de zinco, **Esquema 14**, seguindo a metodologia de Braibrante (2015). Após uma etapa final de recristalização em solução de HCl a 10 % (m/v), o produto foi obtido com 60 % de rendimento. O composto foi caracterizado por IV, RMN ^1H , RMN ^{13}C e ponto de fusão, cujos os dados se encontram sumarizados no capítulo 6 e os espectros no capítulo 7.

Esquema 14: Síntese da 2',4'-diidroxiacetofenona



O mecanismo da reação pode ser visto no **Esquema 15**. A primeira etapa do mecanismo é a formação do íon acílio, C_2O^+ , eletrófilo gerado pela mistura de ácido acético com ZnCl_2 . Na segunda etapa, um par de elétrons π do anel aromático do resorcinol ataca o íon acílio, gerando um intermediário carbocátion não aromático. Através da abstração de um próton a aromaticidade é restabelecida, resultando na formação da 2',4'-diidroxiacetofenona.

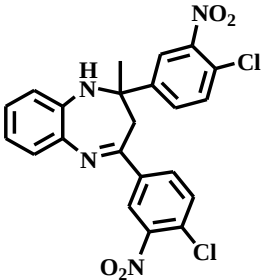
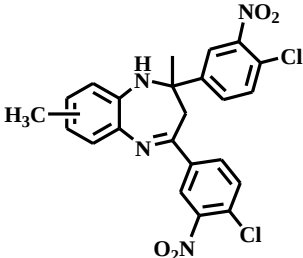
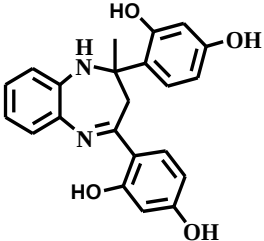
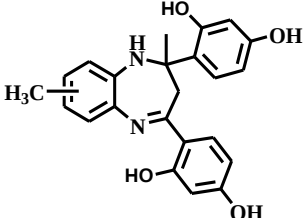
Esquema 15: Mecanismo proposto para a reação de obtenção da 2',4'-diidroxiacetofenona



Dispondo das acetofenonas de partida, foram realizadas as reações em etanol para a síntese do restante dos derivados heterocíclicos de interesse. Ao analisar os resultados sumarizados na **Tabela 3**, podemos observar que as benzodiazepinas inéditas **Bdz7** e **Bdz8/8'**, preparadas a partir da 4-cloro-3-nitroacetofenona e purificadas por cromatografia em coluna, foram obtidas em bons rendimentos após 16 h, com valores de 89 e 87 %, respectivamente. A

presença da metila na diamina de partida novamente levou a formação da mistura de regioisômeros **Bdz8** + **Bdz8'**, entretanto não promoveu melhora da nucleofilicidade da diamina, de modo que **Bdz7** e os produtos regioisoméricos **Bdz8/8'** apresentaram desempenhos similares diante do modelo reacional baseado no uso do etanol como solvente.

Tabela 3: Rendimentos isolados das 1*H*-1,5-benzodiazepinas **Bdz7-10** preparadas usando etanol como solvente e ácido trifluoroacético (TFA) como catalisador^a

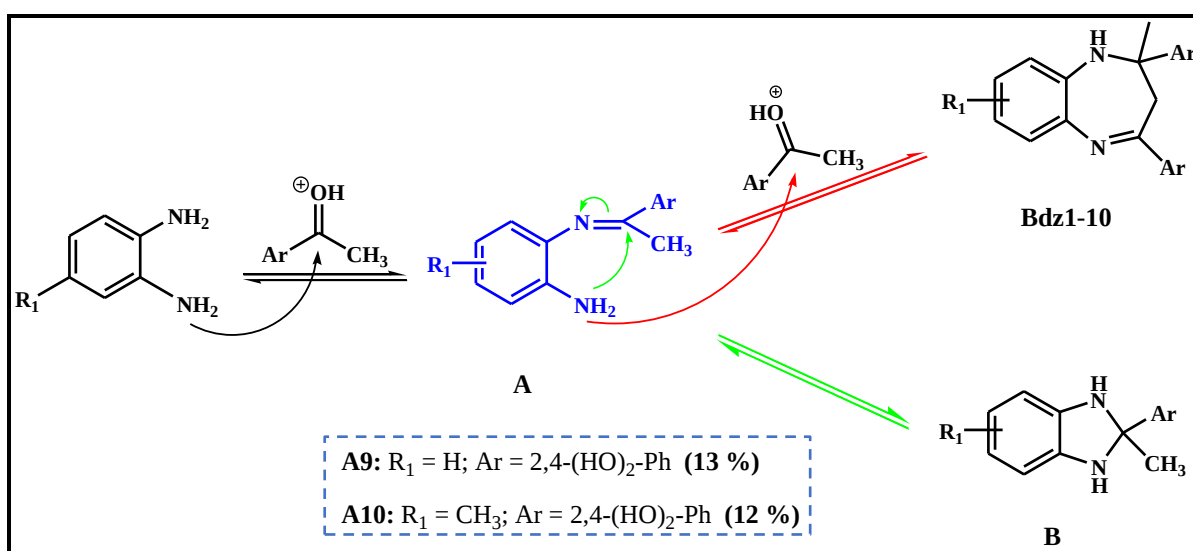
Composto	Solvente	Tempo (h)	Rend. (%) ^b
Bdz7 	EtOH	16	89
Bdz8+Bdz8' (58:42) 	EtOH	16	87
Bdz9 	EtOH	72	NC
Bdz10+Bdz10' 	EtOH	72	NC

^aReações usando *o*-fenilenodiaminas (0,33 mol/L), acetofenonas (0,73 mol/L) e TFA (10 mol % - em relação à diamina aromática). ^bRendimento isolado. NC: não converteu.

O insucesso na obtenção das benzodiazepinas hidroxiladas **Bdz9** e **Bdz10/10'**, provavelmente, está relacionado à presença dos grupos hidroxila nas posições *orto* e *para* da

acetofenona de partida, os quais promovem significativa redução da eletrofilicidade da carbonila por deslocalização de elétrons, tornando o carbono eletrofílico pouco suscetível ao ataque do nucleófilo, tendo em vista o caráter elétron-doador do grupo -OH. Entretanto, através do acompanhamento de ambas as reações por CCD, durante o período de 72 h, observou-se a formação de um único produto em cada caso, que após serem isolados por cromatografia em coluna (SiO₂, hexano/ AcOEt, em diferentes proporções) foram caracterizados por IV-FT, RMN ¹H, RMN ¹³C, espectrometria de massas de alta resolução e ponto de fusão. Ao analisar os seus dados espectroscópicos, observamos que os compostos obtidos correspondem aos respectivos intermediários monoimínicos **A9** e **A10/10'**, que são formados inicialmente em uma etapa de adição nucleofílica do mecanismo de reação das benzodiazepinas almejadas, e não aos possíveis diidrobenzoimidazóis **B** correspondentes (formados após a ciclização das monoiminas **A**), como descrito no mecanismo apresentado no **Esquema 16** e proposto nos trabalhos de Zelenin e colaboradores (1998) e Timofeeva et al. (2017).

Esquema 16: Mecanismo proposto para a formação do intermediário monoimínico **A**, envolvido na reação de formação das benzodiazepinas. Adaptado de Zelenin et al. (1998) e Timofeeva et al. (2017)



Na caracterização dos intermediários **A9** e **A10/10'** foi possível confirmar, em seus espectros de infravermelho, **Figuras 22 e 23**, a presença das bandas de absorção entre 3248 e 3318 cm⁻¹ relativas ao estiramento N-H de aminas primárias, bem como a banda de absorção atribuída ao estiramento da ligação C=N entre 1622 e 1624 cm⁻¹, da porção imínica formada, e a ausência da banda correspondente à carbonila (C=O) da acetofenona de partida. A porção fenólica em **A9** e **A10/10'** foi confirmada pela presença da banda estiramento O-H em 3165 e

3161 cm^{-1} em conjunto com a absorção referente ao estiramento C-O em 1242 e 1256 cm^{-1} , respectivamente. Os estiramentos das ligações C-N apresentaram absorções entre 1323 e 1362 cm^{-1} . O estiramento da ligação $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$ dos anéis aromáticos apresentou absorção entre 3007 e 3013 cm^{-1} . O estiramento da ligação $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ apresentou bandas de absorção que variaram entre 2858 e 2968 cm^{-1} . As absorções referentes ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{C}$ de aromáticos variaram entre 1460 e 1599 cm^{-1} .

Figura 22: Espectro de infravermelho (KBr) do intermediário **A9**

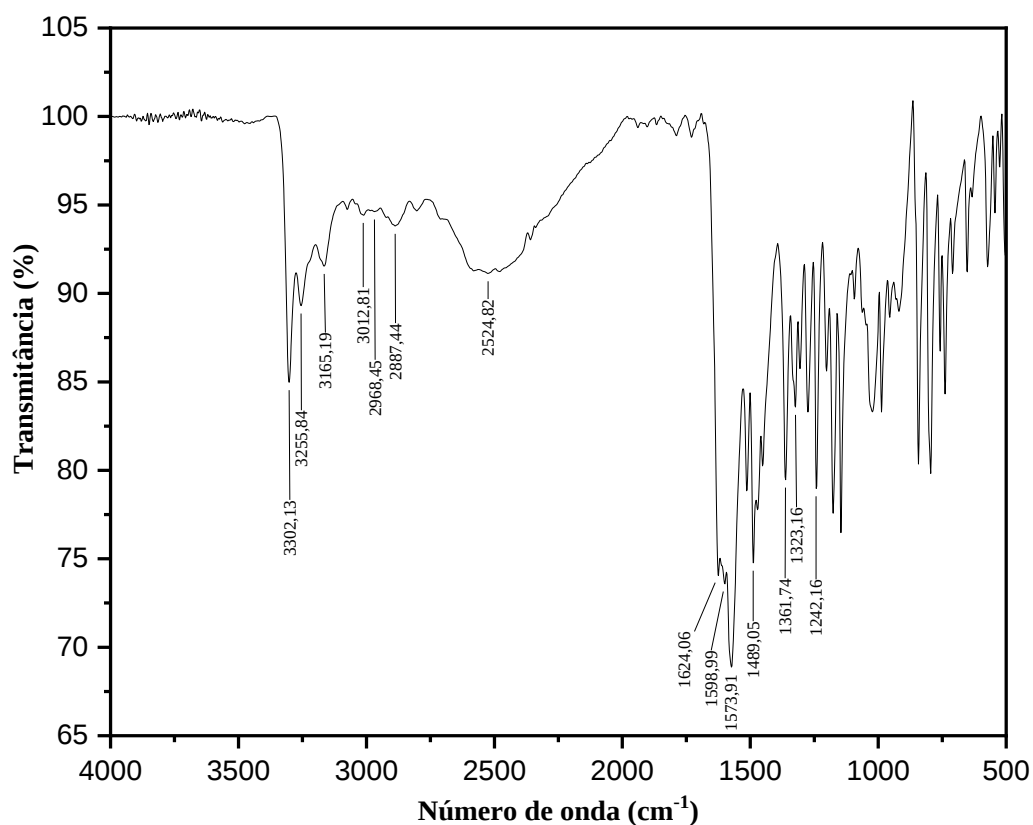
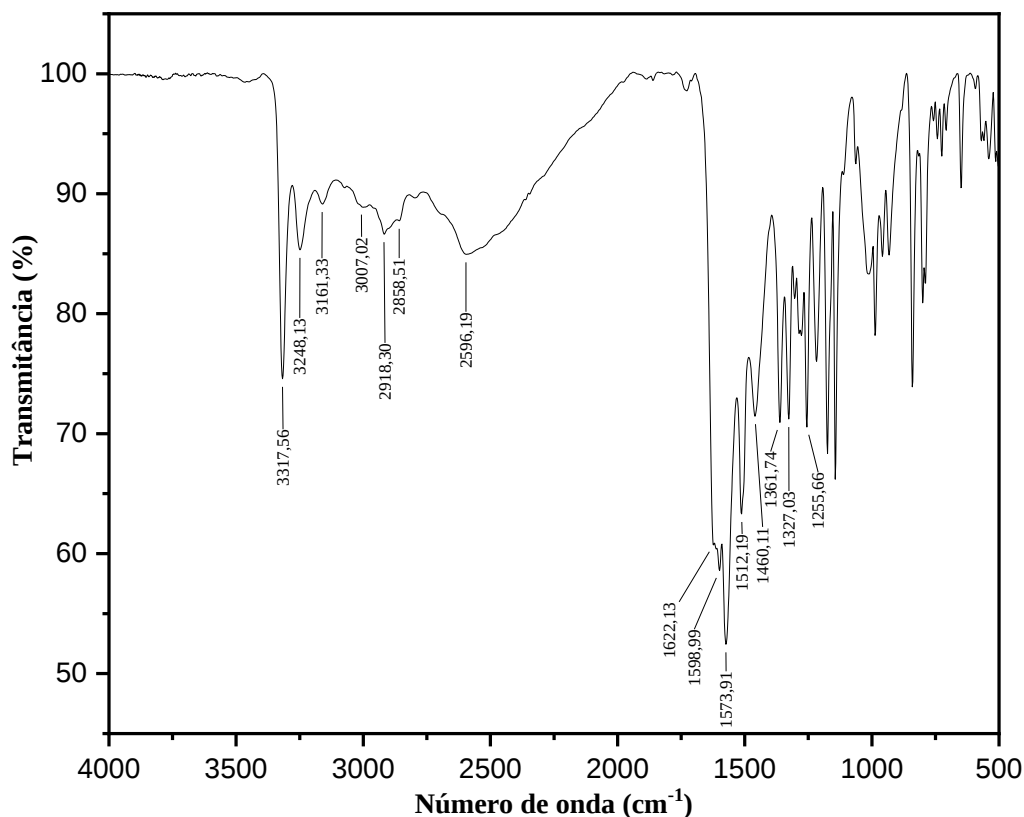


Figura 23: Espectro de infravermelho (KBr) dos intermediários **A10** e **A10'**



O espectro de RMN ^1H do intermediário **A9**, **Figura 24**, revelou um simpleto largo na faixa de 4,68 ppm referente aos dois hidrogênios do grupo amino (NH_2) *orto* ao grupo imina formado. Adicionalmente, foram identificados os sinais referentes aos sete hidrogênios aromáticos esperados para o composto **A9** na faixa de deslocamento químico entre 6,24-7,55 ppm. O duplete revelado em 6,24 ppm é referente ao hidrogênio mais blindado H-3' ($^4J = 2,5$ Hz), que se encontra *orto* às duas hidroxilas da porção fenólica e realiza acoplamento em *meta* com H-5' ($^4J = 2,5$ Hz). Este hidrogênio, por sua vez, se apresenta como um duplete de duplete em 6,32 ppm com uma constante de acoplamento a três ligações ($^3J_{\text{orto}}$) igual a 8,8 Hz, o que confirma que H-5' também se acopla em *orto* com o hidrogênio mais desblindado H-6' ($^3J_{\text{orto}} = 8,8$ Hz), identificado como um duplete em 7,55 ppm. Já o hidrogênio H-6, que se encontra *orto* ao grupo amino e *meta* ao grupo imina, se apresentou como o hidrogênio mais blindado da parte anilínica da molécula através de um duplete de duplete de duplete (ddd) em 6,58 ppm, atribuição confirmada a partir de seus acoplamentos *orto* com H-5 ($^3J = 7,3$ Hz) e H-7 ($^3J = 7,7$ Hz), e do seu acoplamento a quatro ligações com H-4 ($^4J_{\text{meta}} = 1,3$ Hz). O hidrogênio H-7 também realiza acoplamento em *meta* com H-5, de modo que se apresenta como um duplete de duplete em 6,65 ppm. Já H-5, além dos acoplamentos já citados, também se acopla com H-4

($^3J = 8,0$ Hz), de modo que se apresenta como um duplete de duplete de duplete em 6,90 ppm. O hidrogênio H-4 é encontrado como um duplete em 6,75 ppm. O simpleto em 2,22 ppm é atribuído aos hidrogênios H-8 da metila ligada ao grupo imina. Os hidrogênios mais desblindados das hidroxilas da porção fenólica foram observados como dois simpletos, um em 9,99 ppm e outro em 15,35 ppm.

No espectro de RMN ^{13}C de **A9**, **Figura 25**, foi identificado um sinal de carbono quaternário com o maior deslocamento químico, em 172,4 ppm, característico do carbono C-1 do grupo imina, além dos sinais na faixa de 102-164 ppm correspondentes aos doze carbonos aromáticos e do sinal em 16,7 ppm atribuído ao carbono metílico C-8.

Figura 24: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de **A9**

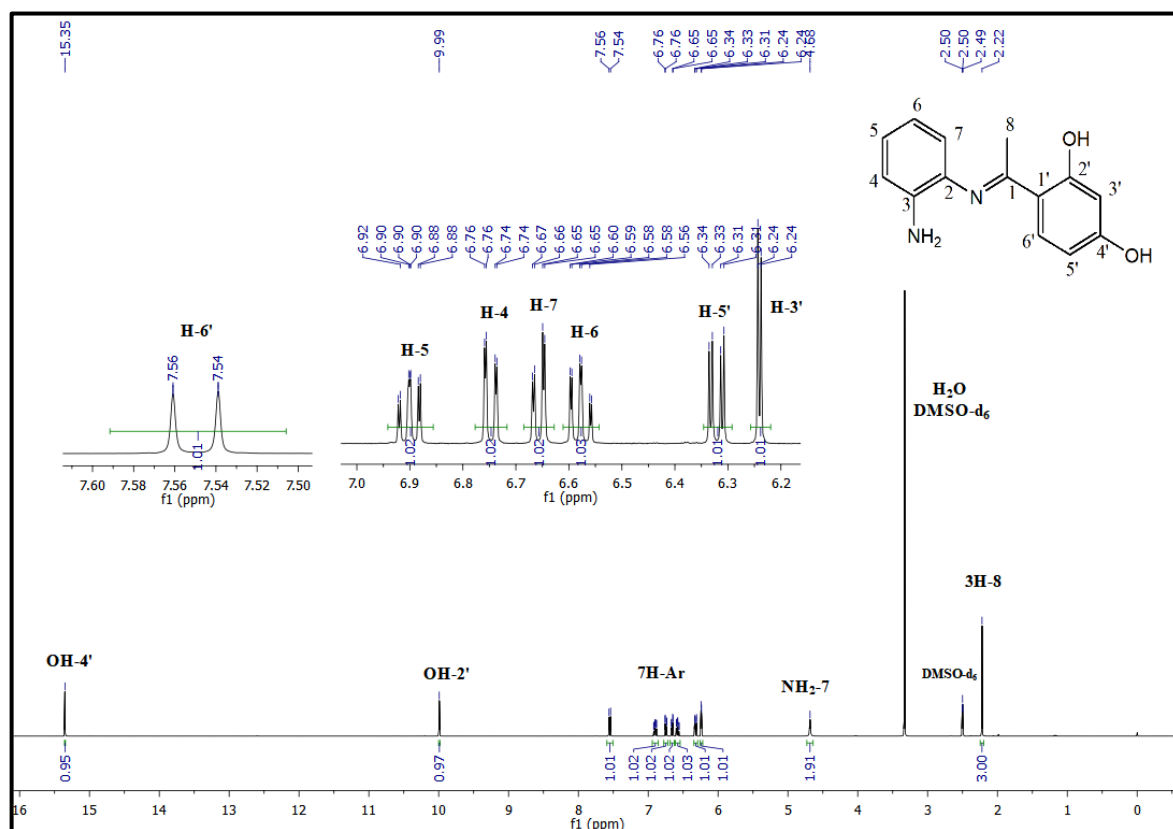
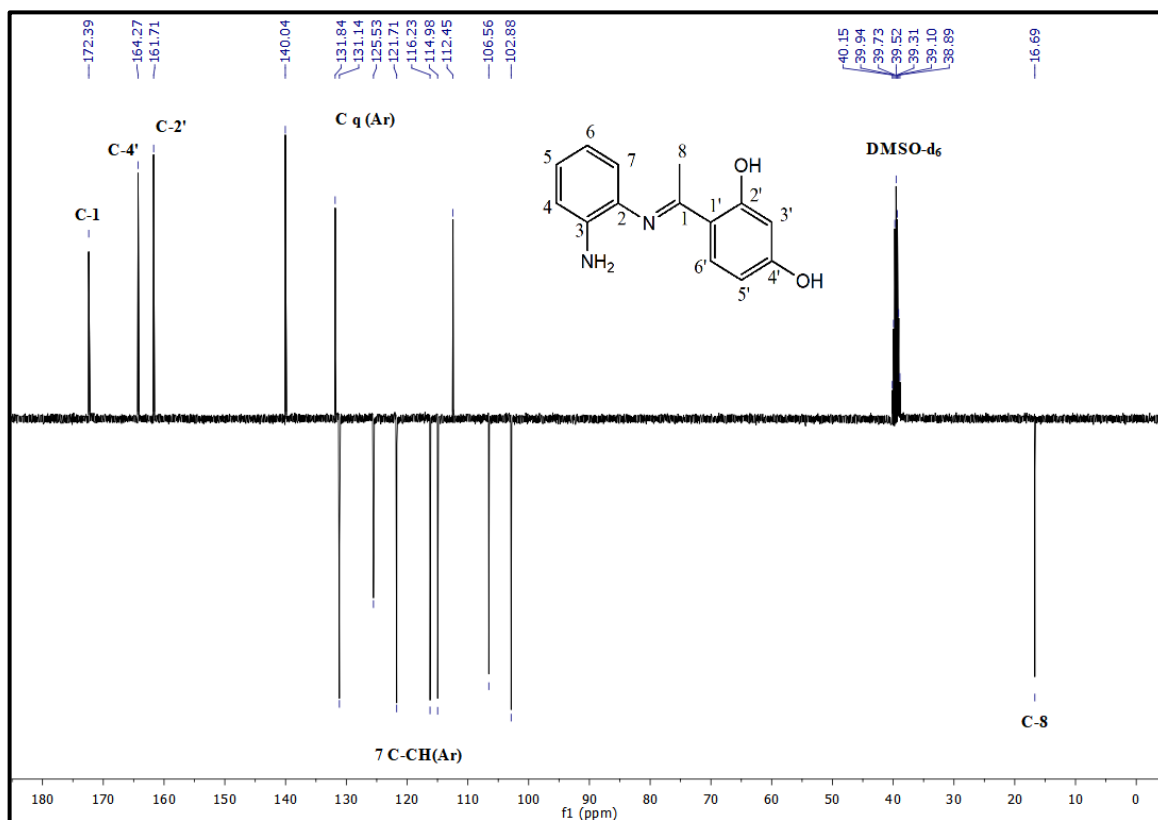


Figura 25: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO-d_6) de **A9**

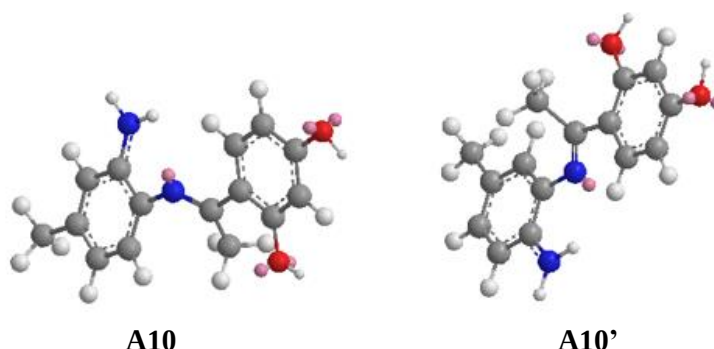


Pela análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do intermediário monoimínico **A10**, percebemos que na realidade ocorreu o isolamento de uma mistura de regioisômeros (**A10/10'**), uma vez que os sinais se encontram duplicados em ambos os espectros e a diamina assimétrica de partida (4-metil-*o*-fenilenodiamina) possibilita um ataque nucleofílico tanto pelo nitrogênio do grupo amino *para* à metila como pelo nitrogênio do grupo amino *meta* à metila.

Não foi possível realizar a separação dos isômeros por coluna cromatográfica, pois apresentam polaridades muito similares e seus tempos de retenção em coluna são muito próximos.

Diante disso, para auxiliar na identificação do isômero majoritário mais provável na mistura, optou-se por realizar um estudo teórico de otimização de suas geometrias por meio do método MM2, de modo a se estimar qual regioisômero possui o mínimo conformacional de menor energia. De acordo com os mínimos conformacionais apresentados na **Figura 26**, observa-se, para o nível de cálculo empregado, que o isômero **A10**, com a metila posicionada em *para* ao grupo imina formado, é mais estável ($E = 6,7417$ kcal/mol) que o isômero **A10'** ($E = 7,2250$ kcal/mol), que possui a metila na posição *meta* ao grupo imina, sugerindo, portanto, que **A10** é o regioisômero majoritário na mistura isolada.

Figura 26: Mínimos conformacionais para os regioisômeros **A10** ($E = 6,7417$ kcal/mol) e **A10'** ($E = 7,2250$ kcal/mol). O cálculo das energias conformacionais foi realizado pelo método MM2

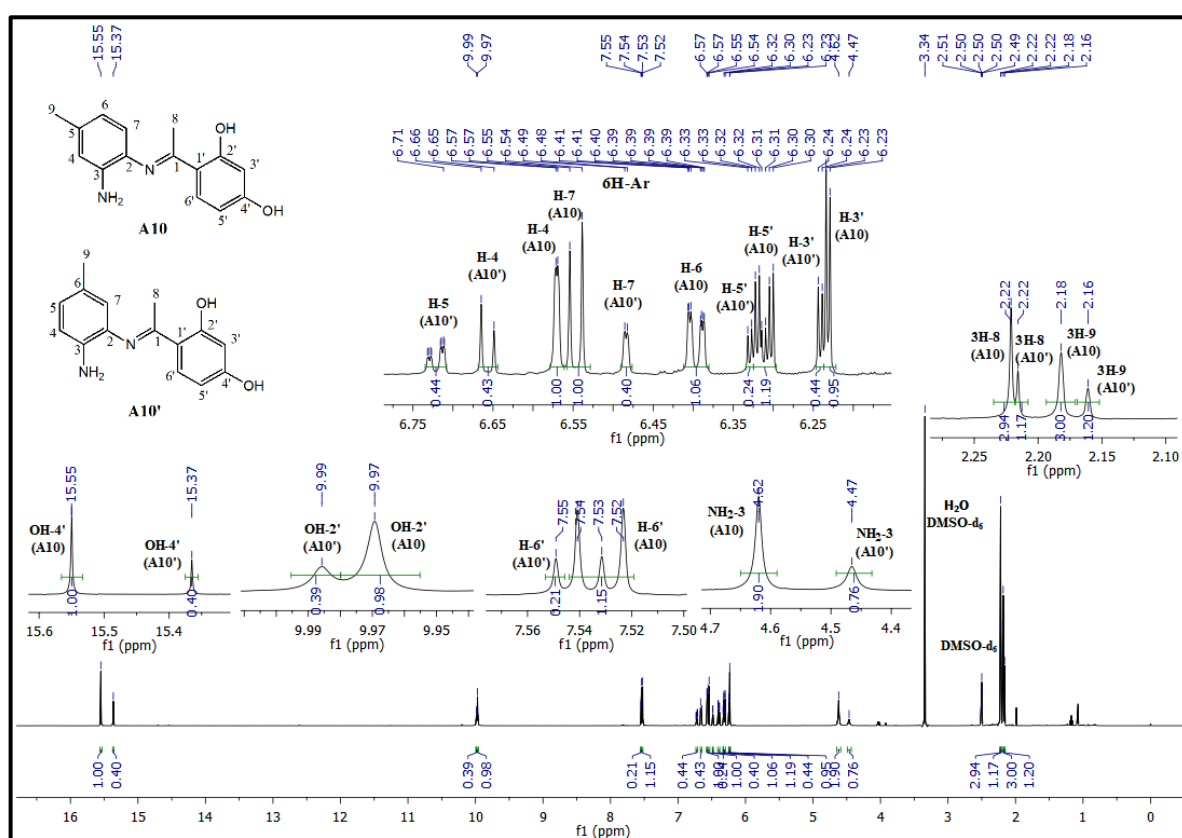


Ao analisar o espectro de RMN ^1H de **A10** e **A10'**, **Figura 27**, observa-se que os sinais se encontram duplicados e indicam que os isômeros estão presentes na mistura em uma proporção de 71:29 (**A10**:**A10'**). Para o isômero **A10**, provável majoritário na mistura, há um simpleto em 2,18 ppm correspondente aos hidrogênios metílicos do anel aromático e outro simpleto mais deslocado, em 2,22 ppm, atribuído aos hidrogênios mais desblindados da metila ligada ao grupo imina formado. Os dois hidrogênios do grupo amino, que não sofreu adição ao reagente carbonílico de partida, foram identificados pelo simpleto largo para dois hidrogênios em 4,62 ppm. Na faixa de deslocamento químico entre 6,23-7,53 ppm, foi observado um padrão de sinais consistentes com os seis hidrogênios do isômero principal, similar ao encontrado para o intermediário **A9**, entretanto nota-se que para **A10** os hidrogênios estão mais blindados. Desse modo, em 6,23 ppm foi confirmado o duplete referente ao hidrogênio aromático mais blindado H-3' da porção fenólica, seguido pelo duplete de duplete em 6,31 ppm de H-5', o qual acopla com H-6' com uma constante de acoplamento a três ligações igual a 8,8 Hz. O hidrogênio mais desblindado H-6', *orto* ao grupo imina, aparece como um duplete em 7,53 ppm. Na porção anilínica, H-6 é observado como um duplete de duplete de duplete em 6,39 ppm. Em 6,55 ppm é identificado um duplete referente à H-7. O duplete com deslocamento químico de 6,57 ppm é atribuído ao hidrogênio H-4 que se acopla a quatro ligações ($^4J = 1,8$ Hz) com H-6. Os hidrogênios mais desblindados das hidroxilas da porção fenólica foram observados como dois simpletos, um em de 9,97 ppm e outro em 15,55 ppm.

Em concordância com o previsto pelo estudo teórico, o espectro de RMN ^1H do isômero minoritário também foi consistente com a estrutura do regioisômero **A10'**. Em geral, os seus hidrogênios aromáticos se apresentaram mais desblindados (maiores valores de δ) que os hidrogênios de **A10**. Os hidrogênios metílicos apareceram como simpletos em 2,16 ppm e 2,22 ppm. Os dois hidrogênios do grupo amino (NH_2) foram revelados como um simpleto em

4,47 ppm e os hidrogênios dos grupos hidroxila como um simpleto em 9,99 ppm (OH-2') e outro simpleto em 15,37 ppm (OH-4'). Os sinais referentes aos seis hidrogênios aromáticos do isômero minoritário foram revelados entre 6,24 e 7,54 ppm, tendo como principais alterações espectrais o aparecimento de um duplete de duplete de duplete mais deslocado, em 6,72 ppm, referente à H-5 *para* ao grupo imina, bem como os seus respectivos acoplamentos com H-4 ($^3J = 8,0$ Hz), que é revelado como um duplete em 6,65 ppm, e com H-7 ($^4J = 1,6$ Hz), que é revelado como um duplete em 6,48 ppm.

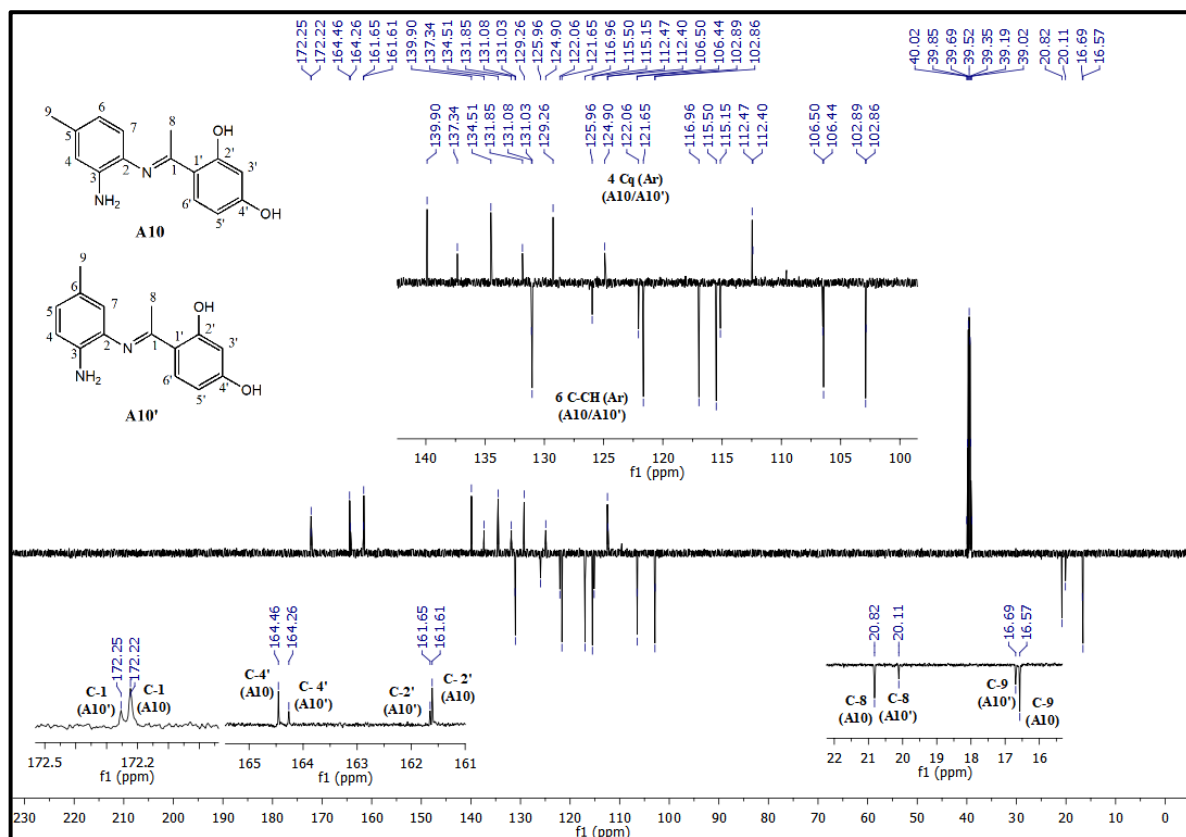
Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de **A10** + **A10'**



No espectro de RMN ^{13}C , **Figura 28**, os sinais de ambos os isômeros apresentaram, de modo geral, deslocamentos químicos similares, sendo observada uma maior diferença para alguns carbonos quaternários revelados entre 124-140 ppm. Os carbonos metílicos, C-8 e C-9, foram revelados entre 20-21 ppm e 16-17 ppm, respectivamente. Os seis carbonos sp^2 de ligações C-H das porções aromáticas foram observados na faixa de deslocamento químico entre 102-131 ppm. C-2' e C-4' foram revelados entre 161-162 ppm e 164-165 ppm, respectivamente. Já o carbono mais desblindado C-1 do grupo imina formado, foi revelado em 172,22 ppm para o isômero majoritário **A10** e em 172,25 ppm para o isômero minoritário **A10'**.

Os quatro carbonos quaternários restantes (C-1', C-2, C-3 e C-5/C-6) foram identificados entre 112-140 ppm.

Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de **A10** + **A10'**



Posteriormente, a partir de análise por espectrometria de massas de alta resolução, foi possível confirmar a formação dos intermediários investigados. Os espectros foram adquiridos com ionização por eletrospray (ESI), no modo de íon positivo, por injeção direta de amostra. O pico correspondente ao íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z igual a 243,11, observado no espectro da **Figura 29**, constata a formação do intermediário **A9** ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$). O pico do íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z igual a 257,13, revelado no espectro da **Figura 30**, comprova a formação do intermediário monoimínico metilado, associado aos regioisômeros **A10** e **A10'** ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$). Vale destacar que na literatura não há relatos acerca dos intermediários **A10** e **A10'**, de modo que são compostos inéditos.

Figura 29: Espectro de massas de alta resolução do intermediário **A9**

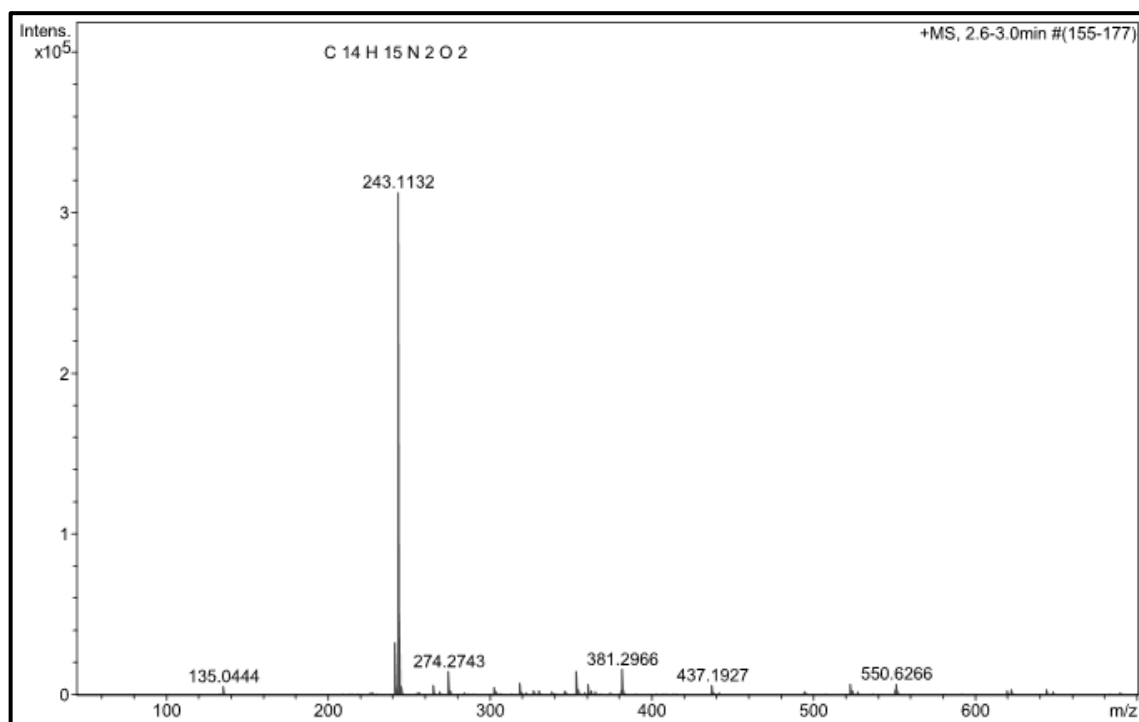
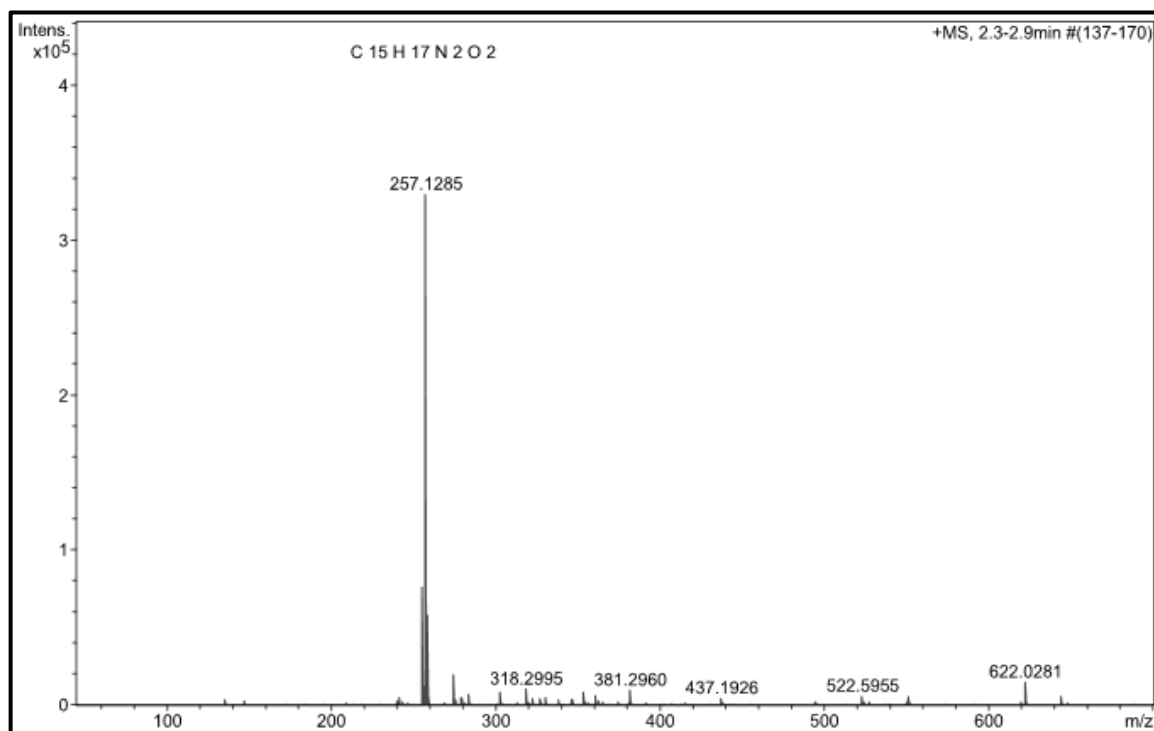


Figura 30: Espectro de massas de alta resolução da mistura dos isômeros **A10** e **A10'**



As estruturas das 1,5-benzodiazepinas **Bdz2-8** e dos regioisômeros correspondentes, para as reações realizadas com 4-metil-*o*-fenilenodiamina, foram confirmadas mediante

caracterização por técnicas espectroscópicas de IV-FT, RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrometria de massas, além da determinação de seus respectivos pontos de fusão. Assim como o composto **Bdz1**, os compostos **Bdz3** e **Bdz4/4'** foram confirmados de acordo com a literatura. Os derivados **Bdz2**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'**, **Bdz7/7'** e **Bdz8/8'** são inéditos e tiveram suas estruturas elucidadas através de comparações com as estruturas das benzodiazepinas já conhecidas, exploradas neste trabalho, além de outros análogos presentes na literatura (AMOOZADEH et al., 2015; JAMATIA; SAHA; PAL, 2014; QIAN et al., 2012; ZHAO et al., 2014). A seguir, destacaremos alguns sinais característicos que comprovam a formação destes produtos de interesse.

A confirmação estrutural das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas almejadas a partir dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C se deu, de forma geral, pela observação de sinais característicos do núcleo benzodiazepínico, apresentados na **Tabela 4**. Nos espectros de ^1H foram identificados três importantes sinais: dois dupletos, cada um para um hidrogênio, em reação de campo alto, na faixa de deslocamento químico (δ) de 2,75-3,70 ppm, associados aos hidrogênios diastereotópicos ($\text{H}_\text{a-3}$ e $\text{H}_\text{b-3}$) do carbono metilênico, e um simpleto largo (sl) para um hidrogênio, entre 3,56 e 6,13 ppm, correspondente ao próton do grupo NH da amina secundária formada. Já nos espectros de ^{13}C foi possível observar três sinais característicos que os compostos desejados apresentam: um sinal na faixa de 41,7-43,6 ppm referente ao carbono do grupo metileno (C-3), um sinal entre 69,7 e 73,9 ppm correspondente ao carbono assimétrico de $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-N}$ (C-2) e um sinal em maior deslocamento químico, na faixa de 160,7-168,2 ppm, atribuído ao carbono C-4, mais desblindado, da porção imínica ($\text{C}=\text{N}$) formada.

Para os compostos **Bdz4/4'**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'** e **Bdz8/8'**, formados como misturas de regioisômeros em decorrência do uso da diamina assimétrica metilada (4-metil-*o*-fenilenodiamina) como nucleófilo de partida, observou-se que os seus espectros de RMN ^1H , em geral, apresentaram dois dupletos com significativa sobreposição para um mesmo hidrogênio diastereotópico (o mais blindado), sendo o duplete mais intenso referente ao isômero majoritário e o menos intenso referente ao isômero minoritário. Entretanto, para a mistura de isômeros **Bdz6 + Bdz6'** foi observado no espectro de ^1H que o isômero majoritário **Bdz6** apresentou um sinal completamente sobreposto ao sinal do isômero minoritário **Bdz6'** para este hidrogênio diastereotópico, de modo que o mesmo foi identificado como um único duplete em 2,75 ppm ($J = 13,4 \text{ Hz}$) para ambos os compostos. Vale ressaltar, que também houve maior complexidade de sinais para a região dos hidrogênios aromáticos, principalmente, para os compostos apresentados como misturas de isômeros, onde foram observadas sobreposições de dupletos e dupletos de dupletos de difícil identificação.

No espectro de RMN ^{13}C de **Bdz4** + **Bdz4'** foi observado apenas um sinal tanto para o carbono assimétrico C-2, em 73,0 ppm, como para o carbono imínico C-4, em 167,2 ppm, para ambos os isômeros. Entretanto, vários outros sinais apareceram duplicados, dentre os quais o carbono característico C-3 (metilênico), que para o regioisômero majoritário **Bdz4** foi revelado em 43,6 ppm e para o regioisômero minoritário **Bdz4'** foi revelado em 43,2 ppm. Já o espectro de ^{13}C da mistura **Bdz6** + **Bdz6'** apresentou apenas um sinal, em 42,3 ppm, para o carbono C-3 dos dois regioisômeros, e os demais sinais principais apareceram duplicados, de modo que para **Bdz6** os carbonos C-2 e C-4 foram revelados em 71,0 e 164,7 ppm, respectivamente, e para **Bdz6'** os mesmos apareceram em 72,3 e 165,9 ppm.

As amostras não foram submetidas a análises de RMN 2D, para melhor atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C , devido ao difícil acesso a esse tipo de análise.

Tabela 4: Principais dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Continua)

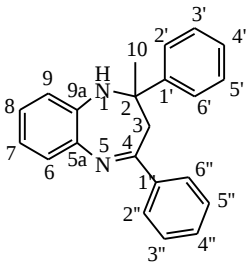
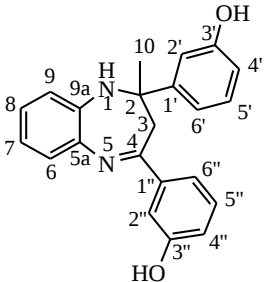
Entrada	Produto	RMN ^1H (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)
1	 Bdz1	2.99 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz, CH_2), 3.17 (d, 1H, $J = 13.2$ Hz, CH_2), 3.56 (sl, 1H, NH)	43.3 (C-3), 73.9 (C-2), 168.2 (C-4)
2	 Bdz2	2.83 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH_2), 3.14 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH_2), 5.60 (sl, 1H, NH)	42.6 (C-3), 71.2 (C-2), 165.4 (C-4)

Tabela 4: Principais dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Continuação)

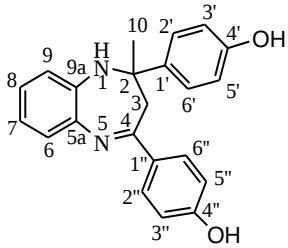
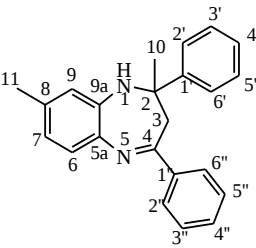
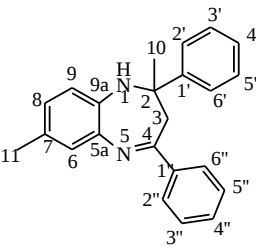
Entrada	Produto	RMN ^1H (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)
3	 Bd3	2.79 (d, 1H, J = 13.4 Hz, CH_2), 3.04 (d, 1H, J = 13.3 Hz, CH_2), 5.31 (sl, 1H, NH)	42.1 (C-3), 71.8 (C-2), 165.6 (C-4)
4	 Bd4 +  Bd4'	Bd4 majoritário (60 %): 2.99 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 3.22 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 3.63 (sl, 1H, NH) Bd4' minoritário (40 %): 2.97 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 3.15 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 3.63 (sl, 1H, NH)	Bd4 majoritário: 43.6 (C-3), 73.0 (C-2), 167.2 (C-4) Bd4' minoritário: 43.2 (C-3), 73.0 (C-2), 167.2 (C-4)

Tabela 4: Principais dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Continuação)

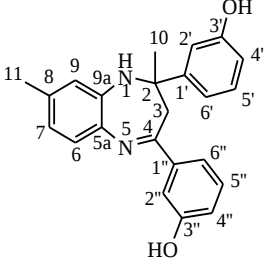
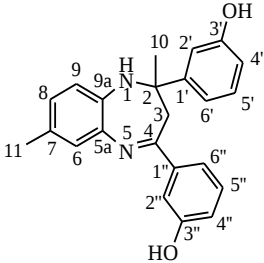
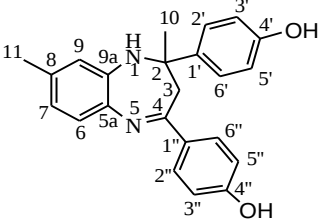
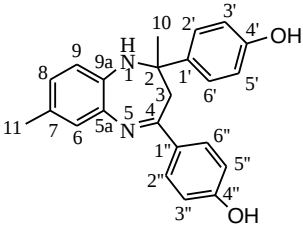
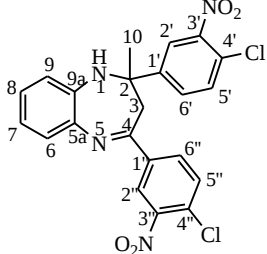
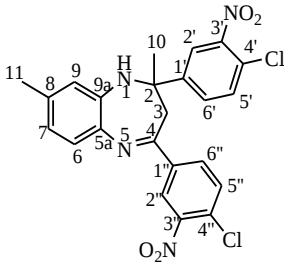
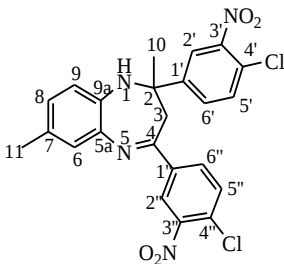
Entrada	Produto	RMN ^1H (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)
5	 Bdz5	Bdz5 majoritário (65 %): 2.79 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH_2), 3.17 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH_2), 5.58 (sl, 1H, NH)	Bdz5 majoritário: 42.8 (C-3), 70.3 (C-2), 164.3 (C-4)
	+  Bdz5'	Bdz5' minoritário (35 %): 2.81 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 3.04 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 5.34 (sl, 1H, NH)	Bdz5' minoritário: 42.4 (C-3), 72.0 (C-2), 165.9 (C-4)
6	 Bdz6	Bdz6 majoritário (80 %): 2.75 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 3.06 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 5.26 (sl, 1H, NH)	Bdz6 majoritário: 42.3 (C-3), 71.0 (C-2), 164.7 (C-4)
	+  Bdz6'	Bdz6' minoritário (20 %): 2.75 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 2.95 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH_2), 5.05 (sl, 1H, NH)	Bdz6' minoritário: 42.3 (C-3), 72.3 (C-2), 165.9 (C-4)

Tabela 4: Principais dados espectroscópicos de RMN ^1H e RMN ^{13}C das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Conclusão)

Entrada	Produto	RMN ^1H (δ ppm)	RMN ^{13}C (δ ppm)
7	 Bd7	2.85 (d, 1H, J = 14.0 Hz, CH_2), 3.67 (d, 1H, J = 14.0 Hz, CH_2), 6.13 (sl, 1H, NH)	41.9 (C-3), 70.7 (C-2), 162.1 (C-4)
8	 Bd8	Bd8 majoritário (58 %): 2.80 (d, 1H, J = 14.1 Hz, CH_2), 3.70 (d, 1H, J = 14.1 Hz, CH_2), 6.12 (s, 1H, NH)	Bd8 majoritário: 42.1 (C-3), 69.7 (C-2), 160.7 (C-4)
	 Bd8'	Bd8' minoritário (42 %): 2.84 (d, 1H, J = 13.9 Hz, CH_2), 3.56 (d, 1H, J = 13.9 Hz, CH_2), 5.88 (s, 1H, NH)	Bd8' minoritário: 41.70 (C-3), 71.37 (C-2), 162.37 (C-4)

De maneira complementar, a caracterização dos compostos sintetizados por técnicas espectroscópicas de infravermelho, espectrometria de massas e por ponto de fusão, permitiu a confirmação estrutural dos produtos obtidos. Todos os derivados benzodiazepínicos sintetizados apresentaram-se como sólidos amarelados ou alaranjados e tiveram seus pontos de fusão determinados. Os principais dados espectroscópicos de IV-FT, EM e pontos de fusão estão sumarizados na **Tabela 5**.

A partir da análise dos espectros de infravermelho, foi possível identificar, além da ausência da banda de absorção do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) da acetofenona de partida, duas absorções características das benzodiazepinas de interesse: uma banda de absorção referente ao

estiramento N-H de aminas secundárias, que se apresentou entre 3277 e 3364 cm^{-1} , e uma banda de absorção de estiramento C=N da porção imínica formada, que variou de 1603-1632 cm^{-1} .

Dentre os compostos sintetizados, apenas **Bdz7** e **Bdz8/8'** foram analisados por espectrometria de massas de baixa resolução, em decorrência de manutenção do equipamento de massas alta resolução. Os espectros obtidos para estes derivados apresentaram picos dos respectivos íons moleculares $[\text{M}^+]$ em valores condizentes com os produtos almejados, como mostrado na **Tabela 5**. Os demais compostos foram analisados por espectrometria de massas de alta resolução e os espectros adquiridos forneceram picos de íon molecular protonado $[\text{M}+\text{H}]^+$ dentro dos valores permitidos, confirmando a formação das benzodiazepinas de interesse.

As informações espectroscópicas detalhadas das caracterizações das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas sintetizadas estão descritas no capítulo 6 e os espectros no capítulo 7.

Tabela 5: Principais dados espectroscópicos de IV-FT, EM e pontos de fusão (PF) das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Continua)

Composto	FM	MM (g/mol)	IV-FT (cm^{-1})	EM (m/z)	PF ($^{\circ}\text{C}$)
Bdz1	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2$	312,41	3277 (N-H), 1632 (C=N)	313,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$	104-107
Bdz2	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	344,41	3335 (N-H), 1605 (C=N)	345,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$	136-139
Bdz3	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	344,41	3341 (N-H), 1612 (C=N)	345,16 $[\text{M}+\text{H}]^+$	205-208
Bdz4/ Bdz4'	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2$	326,43	3281 (N-H), 1612 (C=N)	327,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	96-98
Bdz5/ Bdz5'	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$	358,43	3325 (N-H), 1603 (C=N)	359,18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	143-146
Bdz6/ Bdz6'	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$	358,43	3335 (N-H), 1611 (C=N)	359,17 $[\text{M}+\text{H}]^+$	214-216

Tabela 5: Principais dados espectroscópicos de IV-FT, EM e pontos de fusão (PF) das 1,5-denzodiazepinas sintetizadas

(Conclusão)					
Composto	FM	MM (g/mol)	IV-FT (cm ⁻¹)	EM (m/z)	PF (°C)
Bdz7	C ₂₂ H ₁₆ Cl ₂ N ₄ O ₄	471,29	3364 (N-H), 1603 (C=N)	471,01 [M ⁺]	173-175
Bdz8/ Bdz8'	C ₂₃ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄	485,32	3350 (N-H), 1614 (C=N)	485,03 [M ⁺]	164-167

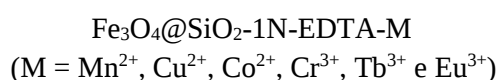
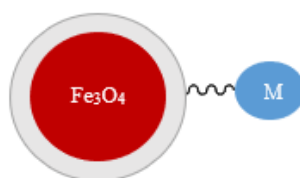
4.1.2 Investigação do uso de catalisadores heterogêneos magnéticos do tipo *core@shell* na síntese de 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas em reações assistidas por micro-ondas

Tendo em vista que as reações performadas via catálise homogênea com ácido trifluoroacético (TFA) demandaram várias horas para o preparo dos derivados benzodiazepínicos almejados no presente trabalho de tese, optamos por realizar uma investigação metodológica empregando catalisadores heterogêneos a base de nanopartículas magnéticas (NPMs) do tipo *core@shell* funcionalizadas, em busca de alcançar menores tempos de reação, bem como maiores rendimentos e alta seletividade, uma vez que catalisadores deste tipo apresentam grande área superficial, possibilitando excelente interação entre os reagentes e o sítio catalítico, de maneira similar aos catalisadores homogêneos. Adicionalmente, possuem a vantagem de poder ser reutilizados em mais de um ciclo reacional, sendo facilmente separados com o uso de um ímã externo, evitando a necessidade de filtração ou de outro procedimento de separação, o que possibilita a redução de resíduos e o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e sustentáveis (ZHANG; YANG; GUAN, 2019). Todos os catalisadores utilizados neste estudo foram adquiridos em colaboração com o grupo da professora Dr.^a Juliana Alves Vale.

A estrutura dos catalisadores utilizados, à base de NPM's contendo sítios ácidos, é composta por um núcleo magnético de Fe₃O₄ revestido com sílica (Fe₃O₄@SiO₂ – matriz *core@shell*) funcionalizado com o grupo 3-aminopropiltrimetoxissilano, o qual está ligado ao EDTA, que por sua vez encontra-se complexado com íons de metais de transição (Mn²⁺, Cu²⁺,

Co^{2+} e Cr^{3+}) ou íons de metais de terras raras (Tb^{3+} e Eu^{3+}). Na **Figura 31** tem-se uma representação simplificada da estrutura destes catalisadores.

Figura 31: Representação esquemática simplificada da estrutura dos catalisadores heterogêneos ácidos utilizados, classificados como catalisadores suportados sobre estruturas core@shell magnéticas funcionalizadas

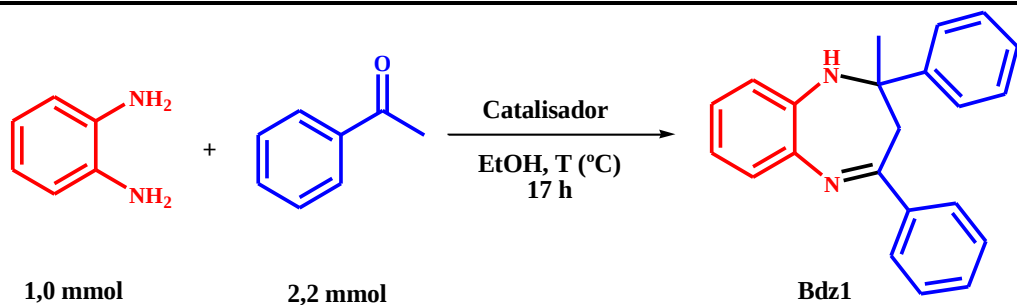


Em um primeiro momento, os catalisadores com diferentes sítios metálicos ácidos foram testados para a determinação de qual deles apresenta melhor desempenho na reação de ciclocondensação realizada entre *o*-fenilenodiamina (1,0 mmol) e acetofenona (2,2 mmol) para a síntese da benzodiazepina clássica 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepina (**Bdz1**).

As reações preliminares foram realizadas em diferentes temperaturas tendo como solvente o etanol, o qual foi escolhido com base nos resultados reportados por Jamatia e colaboradores (2014) sobre o efeito de solvente em reações similares catalisadas por nanopartículas de Fe_3O_4 . Todas as reações foram acompanhadas por CCD e os resultados estão apresentados na **Tabela 6**.

A quantidade ótima de catalisador a ser utilizada nas reações foi estimada inicialmente a partir de reações com $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$, tendo em vista que o íon Tb^{3+} , assim como os íons lantanídeos em geral, está associado a alta eficiência catalítica, sendo considerados excelentes ácidos de Lewis, em virtude de apresentarem alto grau de coordenação e elevada oxofilicidade. Como resultado, a melhor eficiência catalítica foi alcançada a partir da adição de 30 mg de catalisador, **Tabela 6** (entradas 2, 13 e 14), de modo que esta quantidade foi utilizada em todas as demais reações do estudo.

Tabela 6: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (**Bdz1**) para o teste de atividade catalítica dos catalisadores Fe₃O₄@SiO₂-1N-EDTA-M (M = Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Tb³⁺ e Eu³⁺) na reação de ciclocondensação entre *o*-fenilenodiamina e acetofenona em etanol

			
Entrada	Catalisador (quantidade em mg)	Temperatura (°C)	Rendimento (%) ^a
1	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Tb ³⁺ (30 mg)	t.a	NC
2	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Tb ³⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	24
3	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Eu ³⁺ (30 mg)	t.a	NC
4	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Eu ³⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	21
5	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Cr ³⁺ (30 mg)	t.a	NC
6	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Cr ³⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	NC
7	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Mn ²⁺ (30 mg)	t.a	NC
8	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Mn ²⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	NC
9	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Co ²⁺ (30 mg)	t.a	NC
10	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Co ²⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	NC
11	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Cu ²⁺ (30 mg)	t.a	NC
12	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA-Cu ²⁺ (30 mg)	Refluxo (78)	NC
13	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA- Tb ³⁺ (20 mg)	Refluxo (78)	NC
14	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -1N-EDTA- Tb ³⁺ (35 mg)	Refluxo (78)	24

^aRendimento isolado. NC: não converteu.

A partir dos resultados obtidos nos testes preliminares de atividade catalítica, **Tabela 6**, observamos que os catalisadores contendo íons de terras raras Tb³⁺ e Eu³⁺ foram os únicos

que conduziram para a formação do produto esperado, porém em baixos rendimentos (24 e 21 %, respectivamente) e somente após 17 horas de reação. Paralelamente, apenas as reações realizadas sob refluxo (78 °C), **Tabela 6** (entradas 2, 4 e 14), levaram a formação de **Bdz1**.

Como alternativa para otimizar o tempo e o rendimento dessas reações, resolvemos realizar uma série de testes fazendo uso de aquecimento em reator de micro-ondas específico para síntese orgânica, devido ao fato desta técnica possibilitar um aquecimento mais homogêneo e eficiente da mistura reacional, bem como em temperaturas superiores ao ponto de ebulição do solvente empregado, em virtude do alto controle dos parâmetros reacionais a que está associado, de modo a promover, na maioria das vezes, a redução de longos tempos de reação para poucos minutos em excelentes rendimentos.

Desse modo, realizamos uma etapa complementar de testes avaliando o desempenho dos dois melhores catalisadores avaliados na etapa anterior, a base de Tb^{3+} e Eu^{3+} , para reações em etanol sob aquecimento em reator de micro-ondas em três temperaturas (80, 100 e 120 °C). Todas as reações foram acompanhadas por CCD ao longo do período de 60 minutos, tempo escolhido por ser considerado limite para reações assistidas por micro-ondas, tendo em vista o elevado consumo energético requerido pelo equipamento, além do fato de não terem sido observadas alterações de conversão significativas por análise CCD após 40 minutos de reação.

Mediante a observação dos resultados apresentados na **Tabela 7**, nota-se que para ambos os catalisadores o aumento da temperatura de 80 °C para 120 °C favoreceu a atividade catalítica, entretanto não houve ganho significativo em termos de rendimento em relação às reações realizadas sob aquecimento convencional na etapa anterior, que foi de 7 % para o catalisador $Fe_3O_4@SiO_2-1N-EDTA-Tb^{3+}$ e de 4 % para $Fe_3O_4@SiO_2-1N-EDTA-Eu^{3+}$, considerando os rendimentos das reações realizadas em micro-ondas a 120 °C (**Tabela 7**, entradas 3 e 6).

Com o intuito de avaliar o efeito do etanol na atividade catalítica dos catalisadores em questão, para a reação de síntese da benzodiazepina **Bdz1**, resolveu-se realizar a reação assistida por micro-ondas na temperatura ótima (120 °C) em duas condições: uma utilizando acetonitrila (MeCN) como solvente e outra em meio reacional livre de solvente. De acordo com os resultados obtidos, **Tabela 7** (entradas 7 e 8), ambas as condições não favoreceram à obtenção do produto desejado frente ao uso do etanol.

Tabela 7: Rendimentos isolados da 2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (**Bdz1**) para o teste de atividade catalítica dos catalisadores $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-M}$ ($\text{M} = \text{Tb}^{3+}, \text{Eu}^{3+}$) em reações sob aquecimento em micro-ondas

Entrada	Catalisador (quantidade em mg)	Solvente	T (°C)	Rend.(%) ^a
1	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	80	20
2	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	100	27
3	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	120	31
4	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Eu}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	80	15
5	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Eu}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	100	23
6	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Eu}^{3+}$ (30 mg)	EtOH	120	25
7	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ (30 mg)	MeCN	120	NC
8	$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ (30 mg)	-----	120	12

^aRendimento isolado. NC: não converteu.

Ao empregar o catalisador $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$, nas condições otimizadas, para o preparo das benzodiazepinas hidroxiladas **Bdz2** e **Bdz3** foram alcançados rendimentos de 42 e 40 %, respectivamente, após purificação por cromatografia em coluna (SiO_2 , hexano/ AcOEt , em diferentes proporções).

Os resultados encontrados para o estudo realizado com os catalisadores heterogêneos $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-M}$ ($\text{M} = \text{Mn}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Tb}^{3+}$ e Eu^{3+}) sugerem a necessidade de realização de outros testes investigativos, como por exemplo, a avaliação da atividade catalítica em meio reacional contendo diferentes misturas de solventes polares próticos, bem como a avaliação de diluições, em busca da possibilidade de se encontrar uma melhor

concentração para a realização das reações de ciclocondensação para o preparo dos derivados benzodiazepínicos, tendo em vista que o meio reacional mais diluído reduz a possibilidade de reação entre os intermediários reativos formados e as espécies reagentes, favorecendo a reação intramolecular para a formação do anel heterocíclico benzodiazepínico.

4.2 ENSAIOS COLORIMÉTRICOS E BIOLÓGICOS

4.2.1 Atividade Antioxidante

Tendo em vista o potencial das benzodiazepinas sintetizadas em atuarem como espécies doadoras de radicais hidrogênio (a partir dos grupos NH e OH) para a redução da quantidade de radicais livres em processos de estresse oxidativo, nocivos ao organismo, foi proposta a avaliação da atividade antioxidante dos derivados preparados. Em virtude de alguns compostos terem sido sintetizados e caracterizados somente após a flexibilização das restrições adotadas durante a pandemia da Covid-19, este estudo consistiu na determinação do potencial antioxidante apenas dos compostos **Bdz1-3** e aqueles isolados como misturas dos regioisômeros **Bdz4/4'**, **Bdz5/5'** e **Bdz6/6'**, através da realização de ensaios *in vitro* para diferentes metodologias, que se baseiam em diferentes mecanismos de reação.

Neste trabalho de tese, a atividade antioxidante das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas sintetizadas foi avaliada através dos métodos espectrofotométricos de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) e a partir da determinação da capacidade antioxidante total (CAT) pelo método do fosfomolibdênio. Para os ensaios foram utilizados os padrões Trolox, hidroxitolueno butilado (BHT) e ácido ascórbico (AA). Os métodos empregados estão descritos no capítulo 6 e os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 8**, expressos em termos de CI_{50} (concentração efetiva do composto, em $\mu\text{g/mL}$ e mmol/L , para eliminar 50 % da concentração inicial de radicais livres).

De maneira geral, dentre os derivados benzodiazepínicos avaliados neste estudo, observou-se, de acordo com os resultados obtidos (**Tabela 8**), que **Bdz3** e a mistura dos regioisômeros **Bdz6/6'** se mostraram mais eficientes no sequestro de radicais livres, apresentando menores valores de CI_{50} para os ensaios espectrofotométricos realizados. Vale destacar que os compostos **Bdz6/6'**, isolados como mistura de regioisômeros, não foram reportados na literatura até a realização do presente trabalho de tese. Nos ensaios DPPH e

ABTS os derivados *p*-hidroxilados apresentaram atividade antioxidante inferior aos padrões Trolox e BHT, porém no ensaio CAT exibiram valores de CI_{50} de 1,70 mmol/L (**Bdz3**) e 1,38 mmol/L (**Bdz6/6'**) conferindo uma atividade antioxidante superior aos padrões BHT (CI_{50} = 3,50 mmol/L) e ácido ascórbico (CI_{50} = 2,84 mmol/L).

Tabela 8: Atividade antioxidante (CI_{50}) das benzodiazepinas **Bdz1-6/6'**

Composto	CI_{50}					
	DPPH		ABTS		CAT	
	$\mu\text{g/mL}$	mmol/L	$\mu\text{g/mL}$	mmol/L	$\mu\text{g/mL}$	mmol/L
Bdz1	4961,0 $\pm$ 0,03	15,88	9812,3 $\pm$ 0,05	31,41	1625,34 $\pm$ 0,01	5,20
Bdz2	1700,0 $\pm$ 0,04	4,94	3628,1 $\pm$ 0,23	10,53	1132,19 $\pm$ 0,02	3,29
Bdz3	604,2 $\pm$ 0,17	1,75	1248,6 $\pm$ 0,19	3,63	586,28 $\pm$ 0,03	1,70
Bdz4+Bdz4'	4776,0 $\pm$ 0,01	14,63	9239,2 $\pm$ 0,13	28,30	1425,91 $\pm$ 0,02	4,37
Bdz5+Bdz5'	1598,3 $\pm$ 0,23	4,46	3123,5 $\pm$ 0,93	8,71	968,21 $\pm$ 0,30	2,70
Bdz6+Bdz6'	411,0 $\pm$ 0,38	1,15	928,9 $\pm$ 0,02	2,59	495,14 $\pm$ 0,24	1,38
Trolox	47,04 $\pm$ 0,03	0,19	214,3 $\pm$ 0,05	0,86	NT	NT
BHT	157,32 $\pm$ 0,02	0,71	327,42 $\pm$ 0,23	1,49	772,14 $\pm$ 0,11	3,50
AA	NT	NT	NT	NT	500,00 $\pm$ 0,05	2,84

Valores descritos como média $\pm$ desvio padrão (n = 3). DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS: radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico); CAT: capacidade antioxidante total; Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico; BHT: hidroxitolueno butilado; AA: ácido ascórbico; NT – não testado.

Os resultados encontrados indicaram claramente a influência da presença e posição do grupo hidroxila na atividade antioxidante das benzodiazepinas avaliadas. A partir dos valores de CI_{50} , pode-se observar que os derivados hidroxilados (**Bdz3** e **Bdz6/6'**) que possuem o grupo OH na posição *para* promoveram uma melhor doação do radical hidrogênio ($H^{\bullet}$), de modo que foram mais eficientes no sequestro de radicais livres. A menor eficiência das benzodiazepinas com o grupo hidroxila na posição *meta* (**Bdz2** e **Bdz5/5'**), dentre as hidroxiladas, sugere que seus radicais gerados após a doação de $H^{\bullet}$ são menos estáveis, devido à menor contribuição de suas estruturas de ressonância. De maneira análoga, o significativo aumento na atividade

antioxidante devido a presença das hidroxilas está associado a maior facilidade de formação do radical fenoxila (menos reativo) após a clivagem da ligação O-H (hidrogênio mais ácido) em comparação com o radical proveniente da clivagem da ligação N-H presente no núcleo diazepínico. Paralelamente, a presença da metila (grupo elétron-doador fraco) na porção aromática do núcleo benzodiazepínico se mostrou favorável à atividade antioxidante, de modo que proporcionou uma maior eficiência no sequestro de radicais livres para a mistura dos regioisômeros **Bdz6/6'** em comparação com o composto não metilado **Bdz3**.

4.2.2 Atividade Antifúngica

Diante dos resultados animadores acerca do potencial antimicrobiano de análogos de 1,5-benzodiazepinas reportados na literatura (AN et al., 2016; RAVI et al., 2007; WANG; LI; AN, 2015), resolvemos avaliar, neste trabalho de tese, a atividade antifúngica *in vitro* dos derivados benzodiazepínicos **Bdz1-3** e aqueles isolados como misturas dos regioisômeros **Bdz4/4'**, **Bdz5/5'** e **Bdz6/6'** contra quatro cepas de duas importantes espécies patogênicas do gênero *Sporothrix*, de acordo com o protocolo CLSI M60 (2018). Vale destacar que este é um estudo inaugural sobre a atividade antifúngica de benzodiazepinas contra cepas do gênero *Sporothrix*.

O método de microdiluição em caldo foi utilizado para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e o método de difusão em ágar por poço para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos alvo, sendo o fluconazol (FLU) usado como droga de referência. Os resultados das atividades antifúngicas *in vitro* estão sumarizados na **Tabela 9**.

Ao analisar os resultados obtidos, observa-se que a mistura dos regioisômeros **Bdz6/6'** apresentou elevada atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, superior aos demais compostos e à droga de referência fluconazol, com valores de CIM na faixa de 45 a 89 µmol/L e valores de CFM na faixa de 89 a 179 µmol/L.

Tabela 9: Atividade antimicrobiana dos compostos alvo **Bdz1-6/6'** expressa em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), com valores em $\mu\text{mol/L}$

Composto	<i>S. bras. (I)</i>		<i>S. bras. (II)</i>		<i>S. bras. (III)</i>		<i>S. schenckii</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Bdz1	410	819	410	819	410	819	3278	6555
Bdz2	372	743	372	743	372	743	1487	2973
Bdz3	186	372	186	372	186	372	743	1487
Bdz4+Bdz4'	196	392	196	392	392	784	3137	6274
Bdz5+Bdz5'	357	714	714	1428	179	357	357	714
Bdz6+Bdz6'	45	89	45	89	45	89	89	179
FLU	52	104	104	209	52	104	209	418

Abreviações: *S. bras. (I)*, *Sporothrix brasiliensis* (UFPE121); *S. bras. (II)*, *Sporothrix brasiliensis* (UFPE145); *S. bras. (III)*, *Sporothrix brasiliensis* (UFPE230); *S. schenckii*, *Sporothrix schenckii* (UFPE289); FLU: Fluconazol.

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 9**, observa-se ainda que a atividade antifúngica se mostrou dependente da estrutura das benzodiazepinas avaliadas. As atividades dos derivados metilados (**Bdz4/4'**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'**), em geral, foram superiores às atividades de seus correspondentes não metilados (**Bdz1**, **Bdz2**, **Bdz3**), com destaque para a mistura de isômeros **Bdz6/6'** que apresentou ação inibitória (CIM de 45-89 $\mu\text{mol/L}$) significativamente superior ao seu análogo não metilado **Bdz3** (CIM de 186-743 $\mu\text{mol/L}$), contra todas as cepas de fungos testadas. Contribuindo para a atividade antifúngica a presença do grupo hidroxila promoveu a potencialização da ação fungicida em relação aos derivados não hidroxilados **Bdz1** e **Bdz4/4'**. Embora a mistura de isômeros *m*-hidroxilados **Bdz5/5'** tenha apresentado baixa ação inibitória contra as cepas *S. bras. (I)* e *S. bras. (II)*, ao observar os seus valores de CIM e CFM contra as cepas *S. bras. (III)* e *S. schenckii* nota-se o efeito positivo dos grupos CH_3 e OH na melhora da ação inibitória das benzodiazepinas sintetizadas. Vale destacar que dentre as cepas avaliadas, os melhores resultados foram obtidos para as cepas da espécie *Sporothrix brasiliensis*.

O aumento da atividade antifúngica observado para as benzodiazepinas metiladas, provavelmente, está associado ao aumento da lipofilicidade promovido pela presença do grupo metila na porção aromática do núcleo benzodiazepínico, o que confere maior permeabilidade

na membrana celular do fungo possibilitando uma ação inibitória mais efetiva para estes compostos. Com relação ao efeito do grupo hidroxila, a melhora da ação fungicida pode estar relacionada ao aumento das interações de hidrogênio com o meio aquoso no interior das células fúngicas proporcionado pelas hidroxilas, o que aumenta a eficiência do agente contra o fungo.

4.2.3 Estudo *In Silico* ADMET

Para que um composto seja considerado um novo candidato a fármaco é essencial a avaliação dos parâmetros físico-químicos associados às suas propriedades farmacocinéticas ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção), além da toxicidade (YAN, 2018). Neste sentido, em um primeiro momento, todos os compostos sintetizados foram submetidos a um estudo *in silico*, utilizando os programas de acesso livre Osiris Property Explorer e Molinspiration, para a determinação teórica dos parâmetros indicadores da biodisponibilidade oral. Foram avaliados os parâmetros de Lipinski, bem como a solubilidade aquosa (Log S), o número de ligações rotacionáveis (nRB), a área de superfície polar topológica (TPSA) e o percentual de absorção intestinal humana (ABS).

Os resultados obtidos a partir da abordagem teórica (**Tabela 10**) indicaram que todos os derivados benzodiazepínicos (**Bdz1-8/8'**), bem como os intermediários monoimínicos **A9** e **A10/10'**, possuem, de acordo com os parâmetros de Lipinski, características moleculares que satisfazem o perfil desejável para um fármaco administrado por via oral, uma vez que atendem a todos os requisitos estabelecidos pela regra dos cinco, a qual aponta que para um fármaco apresentar boa permeabilidade nas membranas biológicas e boa absorção intestinal ele deve possuir massa molecular ($MM \leq 500$ Da, lipofilicidade (coeficiente de partição octanol/água calculado – $cLog P$) ≤ 5 , número de doadores de ligação de hidrogênio (nHBD, do inglês, *number hydrogen bond donors*) ≤ 5 e número de aceptores de ligação de hidrogênio (nHBA, do inglês, *number hydrogen bond acceptors*) ≤ 10 (LIPINSKI et al., 1997).

Tabela 10: Parâmetros físico-químicos do estudo *in silico* ADME para a determinação da biodisponibilidade oral dos compostos sintetizados

Comp.	Parâmetros de Lipinski				nV	Log S ^b	nRB ^b	TPSA ^b	ABS(%)
	MM ^a	nHBD ^a	nHBA ^a	cLog P ^b					
Bdz1	312.42	1	2	4,50	0	-5,20	2	24,39	100
Bdz2	344.41	3	4	3,81	0	-4,61	2	64,85	86,63
Bdz3	344.41	3	4	3,81	0	-4,61	2	64,85	86,63
Bdz4/4'	326.44	1	2	4,85	0	-5,55	2	24,39	100
Bdz5/5'	358.44	3	4	4,15	0	-4,95	2	64,85	86,63
Bdz6/6'	358.44	3	4	4,15	0	-4,95	2	64,85	86,63
Bdz7	471,30	1	8	3,87	0	-7,59	4	116,04	68,97
Bdz8/8'	485,32	1	8	4,21	0	-7,94	4	116,04	68,97
A9	242,28	4	4	1,60	0	-3,00	2	78,84	81,80
A10/10'	256,31	4	4	1,95	0	-3,35	2	78,84	81,80
ITCZ	705.65	0	12	5,15	3	-7,30	11	100,70	74,26

^aMolinspiration; ^bOsiris Property Explorer; MM: massa molecular ≤ 500 Da; nHBD: número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 ; nHBA: número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; cLog P: lipofilicidade (coeficiente de partição octanol-água calculado) ≤ 5 ; nV: número de violações < 2 ; Log S: solubilidade aquosa (entre -1 e -5); nRB: número de ligações rotacionáveis ≤ 10 ; TPSA: área de superfície polar topológica $\leq 140 \text{ \AA}^2$; ABS (%): percentual de absorção intestinal humana (ABS (%) = $109 - 0.345 \times \text{TPSA}$) (> 80 % alta; < 25 % baixa); ITCZ: itraconazol.

Corroborando para o perfil de biodisponibilidade oral dos compostos sintetizados, observa-se, de acordo com os valores de Log S obtidos, que a presença do grupo hidroxila proporcionou o aumento da solubilidade aquosa, de modo que apenas os compostos hidroxilados **Bdz2**, **Bdz3**, **Bdz5/5'**, **Bdz6/6'**, **A9** e **A10/10'** apresentaram solubilidade aquosa (-3,00 a -4,95) dentro da faixa de referência (-1 a -5), a qual abrange a maioria dos medicamentos comercializados (85 %) e reflete o equilíbrio entre a polaridade e a hidrofobicidade necessárias para garantir solubilidade aquosa e permeabilidade celular aceitáveis (JORGENSEN; DUFFY, 2002). O número de ligações rotacionáveis (nRB), também avaliado, variou de 2 a 4, o que está dentro da faixa de referência (≤ 10), indicando que os

produtos obtidos possuem flexibilidade adequada para promover boa permeabilidade e absorção (LIPINSKI, 2004). Com relação a área de superfície polar topolgia (TPSA), importante indicador da absorção intestinal humana, foi observado que os compostos exibiram valores entre 24,39 e 116,04 Å², estando todos dentro do limite aceitável (≤ 140 Å²) (VEBER et al., 2002). A partir dos valores teóricos de TPSA foram calculados os percentuais de absorção (ABS), cujos valores indicaram absorção intestinal alta tanto para as benzodiazepinas **Bdz1-6/6'** como para os intermediários **A9** e **A10/10'** (ABS > 80 %), e absorção moderada para as benzodiazepinas **Bdz7** e **Bdz8/8'** (ABS = 68,97 %), as quais contêm os grupos nitro e cloro como substituintes.

Ao comparar os resultados apresentados pelos compostos preparados com os resultados do antifúngico comercial itraconazol (ITCZ), fármaco de primeira escolha no tratamento da esporotricose, foi observado que as benzodiazepinas e os intermediários monoimínicos sintetizados apresentam perfil de solubilidade e permeabilidade significativamente superior, uma vez que a partir dos dados mostrados na **Tabela 10** nota-se que o itraconazol viola vários requisitos relacionados à biodisponibilidade oral. Dentre eles, três requisitos associados aos parâmetros de Lipinski, os quais são a massa molecular (MM) maior que 500 Da, número de aceptores de ligação de hidrogênio (nHBA) maior que 10 e lipofilicidade (cLog P) maior que 5. Além das três violações à regra dos cinco de Lipinski foi observada baixa solubilidade aquosa (Log S = -7.30) e elevado número de ligações rotacionáveis (> 10). O valor teórico de TPSA (100.70 Å²) ficou dentro da faixa de referência, no entanto indicou absorção intestinal moderada para ITCZ (ABS = 74,26 %).

Em uma segunda etapa, os compostos foram submetidos a uma avaliação teórica de toxicidade no programa Osiris Property Explorer, onde foram avaliados os riscos de efeito mutagênico, tumorigênico, irritante e na reprodução humana. Os resultados obtidos, sumarizados na **Tabela 11**, indicaram risco alto de efeito na reprodução humana para os compostos **Bdz1** e **Bdz4/4'**. Para os compostos *p*-hidroxilados **Bdz3** e **Bdz6/6'** foram revelados alertas de risco alto de efeito irritante e moderado de efeito na reprodução humana, atribuindo tal resultado ao fragmento fenólico. Entretanto, de maneira conflitante, não foi gerado nenhum alerta de risco associado à porção fenólica para os compostos *m*-hidroxilados **Bdz2** e **Bdz5/5'**. Para o intermediário monoimínico **A10** foi indicado risco moderado de efeito mutagênico e alto de efeito tumorigênico. Já para o seu regioisômero **A10'** foi revelado risco alto de efeito mutagênico e risco moderado de efeito tumorigênico. Os demais compostos não apresentaram nenhum alerta de toxicidade. Ao realizar a avaliação teórica do perfil de toxicidade do itraconazol, observamos que o fármaco apresentou dois alertas de risco alto, para os efeitos

mutagênico e tumorigênico, demonstrando, portanto, maior grau de toxicidade que os compostos sintetizados, os quais apresentaram apenas um alerta de risco alto. É importante destacar que a predição teórica da toxicidade de cada composto é realizada com base em uma análise comparativa com um banco de dados de fragmentos de moléculas com toxicidade já conhecida, de modo que o resultado é um indicativo de que o composto apresente um possível efeito tóxico, porém tal predição está sujeita a resultados falso positivo e falso negativo.

Tabela 11: Predição *in silico* da toxicidade dos compostos sintetizados

Composto	Risco de efeito mutagênico	Risco de efeito tumorigênico	Risco de efeito irritante	Risco de efeito na reprodução
Bdz1	0	0	0	2
Bdz2	0	0	0	0
Bdz3	0	0	2	1
Bdz4/4'	0	0	0	2
Bdz5/5'	0	0	0	0
Bdz6/6'	0	0	2	1
Bdz7	0	0	0	0
Bdz8/8'	0	0	0	0
A9	0	0	0	0
A10	1	2	0	0
A10'	2	1	0	0
ITCZ	2	2	0	0

Legenda: nenhum risco: 0; risco moderado: 1; risco alto: 2.

De forma geral, os resultados obtidos no estudo *in silico* revelam que os compostos sintetizados possuem grande potencial para possível uso terapêutico ou para o desenvolvimento de outros candidatos a fármaco.

Capítulo 5

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONCLUSÕES

Levando em consideração os objetivos traçados para este trabalho e os resultados apresentados, podemos concluir que:

- A reação de ciclocondensação entre acetofenonas e *o*-fenilenodiaminas via catálise homogênea, realizada em metanol ou etanol à temperatura ambiente, mostrou ser um bom método para o preparo dos compostos derivados de acetofenonas mais reativas, tendo permitido a obtenção de cinco novas 1,5-benzodiazepinas, de maneira simples, em rendimentos bons a excelentes (87 a 95 %). Já as reações com o eletrófilo menos reativo (2',4'-diidroxiacetofenona) não conduziram à formação das 1,5-benzodiazepinas almejadas, mas sim dos intermediários monoimínicos **A9** e **A10/10'**. A partir dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foi observado que os produtos oriundos da diamina assimétrica (4-metil-*o*-fenilenodiamina) foram obtidos como misturas de regioisômeros;
- O uso de catalisadores heterogêneos à base de NPMs do tipo *core@shell* não foi favorável à síntese das 1,5-benzodiazepinas em relação à catálise homogênea. O melhor desempenho foi apresentado pelo catalisador $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$, entretanto o rendimento máximo observado para o composto **Bdz1** foi de apenas 31 %, em reação sob aquecimento em reator de micro-ondas a 120 °C utilizando etanol como solvente;
- As benzodiazepinas hidroxiladas apresentaram os melhores resultados de atividade antioxidante, em especial os derivados *p*-hidroxilados **Bdz3** e **Bdz6/6'**. Apesar do desempenho moderado nos ensaios DPPH e ABTS, estes compostos exibiram atividade antioxidante significativa no ensaio de capacidade antioxidante total (CAT), superior aos padrões BHT e ácido ascórbico;
- Os compostos contendo os grupos metila e hidroxila exibiram maior ação inibitória contra espécies de fungos do gênero *Sporothrix* nos ensaios *in vitro*, com destaque para

a mistura dos regioisômeros inéditos **Bdz6/6'** que apresentou elevada atividade antifúngica contra todas as cepas testadas, superior à droga de referência fluconazol;

- No estudo *in silico*, os derivados hidroxilados (**Bdz2**, **Bdz3**, **Bdz5/5'**, **Bdz 6/6'**, **A9** e **A10/10'**) atenderam a todos os requisitos de biodisponibilidade oral pretendidos para uso clínico, apresentando melhor perfil de solubilidade aquosa e permeabilidade celular, bem como menor toxicidade, que o antifúngico itraconazol. Desse modo, considerando os resultados dos ensaios de atividade antifúngica, a mistura de regioisômeros **Bdz6/6'** apresentou-se como um potencial candidato a fármaco para uso terapêutico contra fungos do gênero *Sporothrix*.

5.2 PERSPECTIVAS

- Submeter os compostos **Bdz7**, **Bdz8/8'**, **A9** e **A10/10'** a estudos de atividade antifúngica contra espécies do gênero *Sporothrix* e, para os mais ativos, realizar ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*;
- Submeter os compostos **Bdz7**, **Bdz8/8'**, **A9** e **A10/10'** a estudos de atividade antioxidante, bem como realizar ensaios de toxicidade para os mais ativos;
- Realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* de toxicidade dos compostos **Bdz3**, **Bdz6/6'**;
- Sintetizar novas 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas que atendam aos requisitos de biodisponibilidade oral desejáveis, contendo outros grupos substituintes, para estudos *in vitro* e *in vivo* de atividade antioxidante e antifúngica, bem como ensaios de toxicidade;
- Realizar novos testes para a investigação e possível otimização da atividade catalítica dos catalisadores heterogêneos Fe₃O₄@SiO₂-1N-EDTA-M (M = Mn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Tb³⁺ e Eu³⁺) em reações de ciclocondensação assistidas por micro-ondas para síntese de benzodiazepinas;

Capítulo 6

Parte Experimental

6 PARTE EXPERIMENTAL

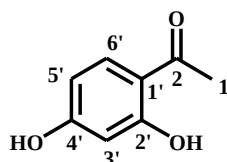
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Os solventes e reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais contendo grau PA ou espectroscópico. Os que não apresentavam qualidade adequada, quando necessário, foram purificados. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de alumínio suportadas em sílica gel 60 F254. A eluição foi realizada com diferentes misturas de hexano/AcOEt e a detecção se procedeu com lâmpada de ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. A purificação por cromatografia em coluna, quando necessária, foi realizada utilizando sílica gel 70-230 mesh.

Os espectros de Infravermelho foram obtidos com espectrofotômetro Shimadzu modelo IR Prestige-21, com as seguintes condições de análise: Região 4000 - 400 cm^{-1} ; Resolução: 4 cm^{-1} ; N° acumulações: 20; Modo: transmitância; Preparo da amostra dispersa em KBr (grau de pureza espectroscópico) na proporção 1:100 mg para confecção de pastilhas de 1,2 cm de diâmetro. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C foram adquiridos com os espectrômetros Varian VNMRs 500 (500 MHz) ou Bruker Ascend 400 (400 MHz), usando CDCl_3 ou DMSO-d_6 como solventes. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno, sendo os deslocamentos químicos (δ) reportados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os desdobramentos dos sinais em RMN ^1H foram indicados como simpleto (s), simpleto largo (sl), duplete (d), duplete de duplete (dd), duplete de duplete de duplete (ddd) e multiplete (m). Os espectros de massas (MS) de alta e baixa resolução foram obtidos a partir dos espectrômetros micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics) e Amazon X (Bruker Daltonics), respectivamente, com ionização por eletrospray (ESI), operando em modo de íon positivo. As análises (m/z 50-1000) foram feitas por injeção direta de amostra (180 $\mu\text{L}/\text{min}$) com temperatura de nebulização de 180 $^\circ\text{C}$. Para as reações realizadas sob aquecimento em micro-ondas, foi utilizado um reator de micro-ondas CEM modelo Discover-System com temperatura monitorada por sensor de infravermelho. Os pontos de fusão foram obtidos em aparelho digital Fisatom modelo 431D.

6.1.1 Procedimento para a síntese da 2',4'-diidroxiacetofenona

Em um balão de 25 mL foi adicionado ácido acético (0,160 mL, 2,8 mmol) e cloreto de zinco (0,136 g, 1 mmol) previamente seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura abaixo de 140 °C até dissolução completa do sólido. Lentamente foi adicionado o 1,3-diidroxibenzeno (0,126 g, 1 mmol). Em seguida, após atingir 140-145°C, a mistura foi mantida sob agitação magnética ocasional por 25 minutos. Posteriormente, foram acrescentados, cuidadosamente, 1,25 mL de água e 1,25 mL de ácido clorídrico concentrado. Logo após a mistura reacional foi resfriada em banho de gelo. Os cristais formados foram filtrados em funil de Buchner e lavados com HCl 6 M resfriado. A recristalização foi realizada em solução de HCl 10 % (m/v), para posterior caracterização por IV-FT, RMN ¹H, RMN ¹³C e ponto de fusão.



Aspecto físico: Sólido amarelo alaranjado.

Ponto de fusão: 142-145 °C.

Rendimento: 60 %.

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3300 (OH), 3084 (CH, Ar), 2997 e 2924 (C(sp³)-H), 1628 (C=O), 1607 e 1441 (C=C), 1205 (C-O). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** 12.60 (s, 1H, OH), 10.62 (s, 1H, OH), 7.75 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-6'), 6.37 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.3 Hz, H-5'), 6.24 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, H-3'), 2.51 (s, 3H, CH₃). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆):** 203.2 (C-2), 165.3 (C-4'), 164.7 (C-2'), 134.2 (C-1'), 113.3 (C-6'), 108.6 (C-5'), 102.8 (C-3'), 26.8 (C-1).

6.1.2 Procedimento para a síntese das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas Bdz1-8/8' e das monoiminas A9 e A10/10'

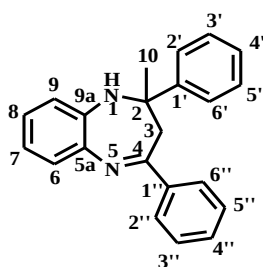
Em um balão de 25 mL foram adicionados 1,0 mmol de 1,2-diaminobenzeno (ou 4-metil-1,2-diaminobenzeno), 2,2 mmol da acetofenona de interesse e 3,0 mL de etanol. A mistura foi deixada sob agitação até completa dissolução das espécies reagentes. Em seguida, adicionou-se 0,1 mmol de ácido trifluoroacético (TFA-10 mmol %) e a mistura reacional foi

mantida sob agitação à temperatura ambiente até tempo apropriado. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), usando diferentes misturas de hexano/AcOEt como eluente. Após o término, indicado por CCD, a mistura reacional foi vertida em banho de gelo e basificada com solução de amônia a 5 % (m/v). O precipitado formado foi filtrado a vácuo, lavado com água gelada até pH neutro e, então, seco à temperatura ambiente. Por fim, quando necessário, após acompanhamento por CCD, o sólido obtido foi purificado por cromatografia em coluna (SiO_2) utilizando misturas de hexano/AcOEt como fase móvel, em diferentes proporções.

6.1.3 Procedimento para as reações com o catalisador heterogêneo $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-1N-EDTA-Tb}^{3+}$ sob aquecimento em micro-ondas na síntese das 2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepinas Bdz1-3

Em um tubo de vidro de 10 mL, específico para reator micro-ondas, foram adicionados 1,2-diaminobenzeno (1,0 mmol, 0,1081 g), acetofenona correspondente (2,2 mmol), etanol (3,0 mL) e 30 mg do catalisador, juntamente com um agitador magnético. A reação foi realizada sob irradiação de micro-ondas na temperatura desejada a 120 °C (monitorada por sensor de infravermelho) no tempo de 60 minutos, sob a condição de vaso fechado. O progresso da reação foi acompanhado por CCD. Após o término, a mistura reacional foi deixada em repouso à temperatura ambiente para esfriar e, em seguida, com o auxílio de um ímã, o catalisador magnético foi separado da mistura, realizando lavagem com etanol. O produto da reação foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório e purificado por cromatografia em coluna (SiO_2 , hexano/ AcOEt). O catalisador foi lavado com etanol anidro e seco à temperatura ambiente.

2-metil-2,4-difenil-2,3-diidro-1*H*-1,5-benzodiazepina (Bdz1):



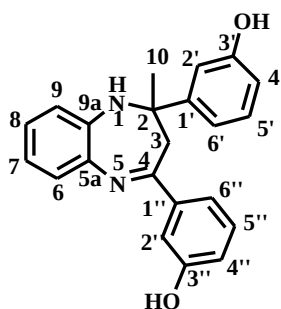
Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 104-107 °C (lit.: 107-108 °C) (REDDY et al., 2007).

Rendimento: 85 % (MeOH), 78 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm^{-1}): 3277 (NH), 3061 (CH, Ar), 2972 e 2920 ($\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$), 1632 ($\text{C}=\text{N}$), 1595 e 1445 ($\text{C}=\text{C}$), 1329 (C-N). **RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):** δ 7.57-7.63 (m, 4H, Ph-H), 7.38 (dd, 1H, J 7.5, 1.7 Hz, Ar-H), 7.15-7.35 (m, 6H, Ph-H), 7.02-7.14 (m, 2H, Ar-H), 6.86 (dd, 1H, J 7.6, 1.5 Hz, Ar-H), 3.56 (sl, 1H, NH), 3.17 (d, 1H, J 13.2 Hz, CH_2), 2.99 (d, 1H, J 13.2 Hz, CH_2), 1.77 (s, 3H, CH_3). **RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):** δ 168.2 (C-4), 147.6 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 138.3 (C_{Ar}), 130.1 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 128.2 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 126.7 (C_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 121.8 (C_{Ar}), 121.6 (C_{Ar}), 73.9 (C-2), 43.3 (C-3), 30.1 (C-10). **HRMS:** m/z calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 313.1699, encontrado: 313.1714.

2-metil-2,4-bis(3-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz2):



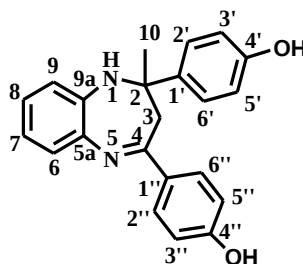
Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 136-139 °C.

Rendimento: 92 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm^{-1}): 3335 (NH), 3242 (OH), 3055 (CH, Ar), 2963 e 2916 ($\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$), 1605 ($\text{C}=\text{N}$), 1582 e 1454 ($\text{C}=\text{C}$), 1323 (C-N), 1254 (C-O). **RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** δ 9.36 (s, 1H, OH), 9.16 (s, 1H, OH), 7.28 (s, 1H, PhHOH), 6.92-7.13 (m, 8H, 7PhHOH e 1H, Ar-H), 6.82-6.88 (m, 1H, Ar-H), 6.72-6.78 (m, 1H, Ar-H), 6.53 (dd, 1H, J 7.9, 2.3 Hz, Ar-H), 5.60 (sl, 1H, NH), 3.14 (d, 1H, J 13.6 Hz, CH_2), 2.83 (d, 1H, J 13.6 Hz, CH_2), 1.59 (s, 3H, CH_3). **RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$):** 165.4 (C-4), 157.0 (C_{Ar}), 156.8 (C_{Ar}), 149.9 (C_{Ar}), 140.9 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 138.1 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 126.0 (C_{Ar}), 121.0 (C_{Ar}), 119.5 (C_{Ar}), 118.1 (C_{Ar}), 116.8 (C_{Ar}), 116.1 (C_{Ar}), 113.3 (C_{Ar}), 113.1 (C_{Ar}), 112.8 (C_{Ar}), 71.2 (C-2), 42.6 (C-3), 30.6 (C-10). **HRMS:** m/z calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 345.1598, encontrado: 345.1601.

2-metil-2,4-bis(4-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz3):



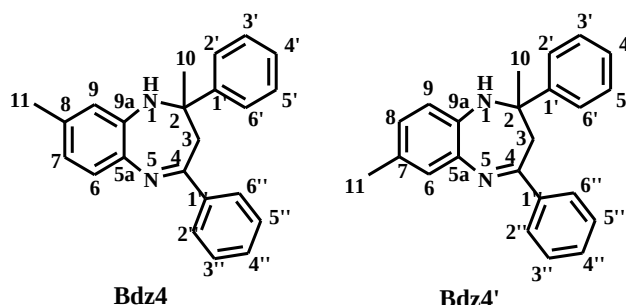
Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 205-208 °C (lit.: 218-220 °C) (AMOOZADEH et al., 2015).

Rendimento: 90 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm^{-1}): 3341 (NH), 3181 (OH), 3030 (CH, Ar), 2968 e 2924 ($\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$), 1612 ($\text{C}=\text{N}$), 1599 e 1454 ($\text{C}=\text{C}$), 1331 ($\text{C}-\text{N}$), 1240 ($\text{C}-\text{O}$). **RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** δ 9.74 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, OH), 7.59 (d, 2H, J 8.8 Hz, PhHOH), 7.36 (d, 2H, J 8.8 Hz, PhHOH), 7.06 (d, 1H, J 7.2 Hz, Ar-H), 6.93-6.99 (m, 2H, Ar-H), 6.82-6.87 (m, 1H, Ar-H), 6.66 (d, 2H, J 8.8 Hz, PhHOH), 6.61 (d, 2H, J 8.8 Hz, PhHOH), 5.31 (sl, 1H, NH), 3.04 (d, 1H, J 13.3 Hz, CH_2), 2.79 (d, 1H, J 13.4 Hz, CH_2), 1.58 (s, 3H, CH_3). **RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):** 165.6 ($\text{C}-4$), 159.0 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 138.9 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.0 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 125.3 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 119.8 (C_{Ar}), 114.7 (C_{Ar}), 114.4 (C_{Ar}), 71.8 ($\text{C}-2$), 42.1 ($\text{C}-3$), 30.4 ($\text{C}-10$). **HRMS:** m/z calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 345.1598, encontrado: 345.1575.

2,8-dimetil-2,4-difenil-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina + 2,7-dimetil-2,4-difenil-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz4 + Bdz4'):



Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 96-98 °C (lit.: 90-92 °C) (AMOOZADEH et al., 2015).

Rendimento (Bdz4 + Bdz4'–60:40): 86 % (MeOH), 79 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm^{-1}): 3281 (NH), 3055 (CH, Ar), 2968 e 2916 ($\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$), 1612 ($\text{C}=\text{N}$), 1570 e 1445 ($\text{C}=\text{C}$), 1329 (C-N).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3):

Bdz4: δ 7.64 – 7.53 (m, 4H, Ph-H), 7.35 – 7.14 (m, 7H, 6Ph-H and 1Ar-H), 6.86 (ddd, 1H, J = 8.0, 1.8, 0.6 Hz, Ar-H), 6.68 (d, 1H, J = 0.9 Hz, Ar-H), 3.63 (sl, 1H, NH), 3.22 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 2.99 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 2.35 (s, 3H, ArCH_3), 1.77 (s, 3H, CH_3).

Bdz4': δ 7.64 – 7.53 (m, 4H, Ph-H), 7.35 – 7.14 (m, 7H, 6Ph-H and 1Ar-H), 6.93 (dd, 1H, J = 8.0, 1.6 Hz, Ar-H), 6.78 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Ar-H), 3.63 (sl, 1H, NH), 3.15 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 2.97 (d, 1H, J = 13.1 Hz, CH_2), 2.35 (s, 3H, ArCH_3), 1.75 (s, 3H, CH_3).

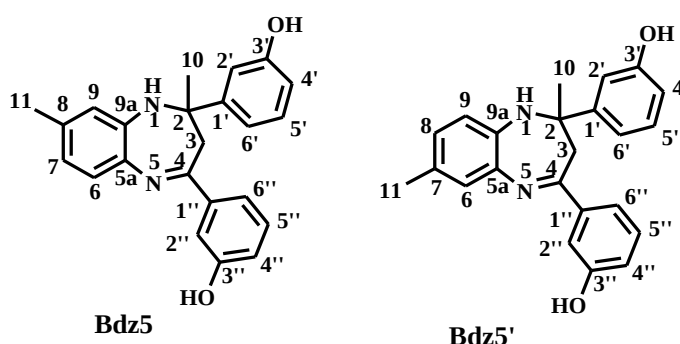
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):

Bdz4: δ 167.2 (C-4), 147.7 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 129.9 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 125.5 (C_{Ar}), 121.6 (C_{Ar}), 121.0 (C_{Ar}), 117.9 (C_{Ar}), 73.0 (C-2), 43.6 (C-3), 30.2 (C-10), 21.2 (C-11).

Bdz4': δ 167.2 (C-4), 147.7 (C_{Ar}), 139.6 (C_{Ar}), 138.2 (C_{Ar}), 137.3 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.4 (C_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 127.2 (C_{Ar}), 125.5 (C_{Ar}), 122.5 (C_{Ar}), 121.0 (C_{Ar}), 117.9 (C_{Ar}), 73.0 (C-2), 43.2 (C-3), 29.9 (C-10), 20.8 (C-11).

HRMS: m/z calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 327.1856, encontrado: 327.1837.

2,8-dimetil-2,4-bis(3-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina + 2,7-dimetil-2,4-bis(3-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz5 + Bdz5'):



Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 143-146 °C.

Rendimento (Bdz5 + Bdz5'–65:35): 95 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm^{-1}): 3325 (NH), 3250 (OH), 3040 (CH, Ar), 2963 e 2914 ($\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$), 1603 ($\text{C}=\text{N}$), 1582 e 1452 ($\text{C}=\text{C}$), 1323 (C-N), 1254 (C-O).

RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):

Bdz5: δ 9.34 (s, 1H, OH), 9.17 (s, 1H, OH), 7.29 – 7.24 (m, 1H, PhHOH), 7.10 – 6.89 (m, 6H, PhHOH), 6.85 – 6.81 (m, 1H, PhHOH), 6.77 – 6.71 (m, 1H, Ar-H), 6.65 (dd, 1H, $J = 8.0, 1.5$ Hz, Ar-H), 6.55 – 6.50 (m, 1H, Ar-H), 5.58 (sl, 1H, NH), 3.17 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH₂), 2.79 (d, 1H, $J = 13.6$ Hz, CH₂), 2.25 (s, 3H, ArCH₃), 1.58 (s, 3H, CH₃).

Bdz5': δ 9.38 (s, 1H, OH), 9.17 (s, 1H, OH), 7.29 – 7.24 (m, 1H, PhHOH), 7.10 – 6.89 (m, 7H, 6PhHOH e 1Ar-H), 6.85 – 6.81 (m, 1H, PhHOH), 6.77 – 6.71 (m, 1H, Ar-H), 6.55 – 6.50 (m, 1H, Ar-H), 5.34 (sl, 1H, NH), 3.04 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH₂), 2.81 (d, 1H, $J = 13.4$ Hz, CH₂), 2.24 (s, 3H, ArCH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃).

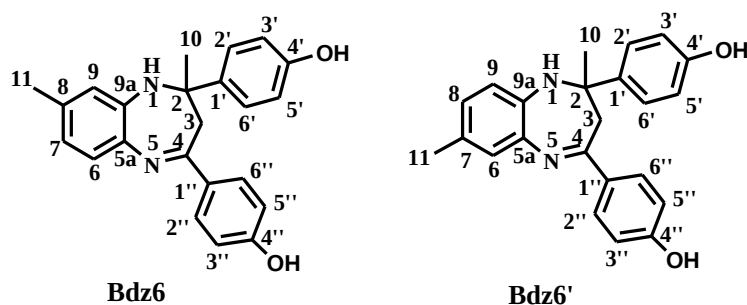
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):

Bdz5: δ 164.3 (C-4), 157.0 (C_{Ar}), 156.8 (C_{Ar}), 149.9 (C_{Ar}), 141.1 (C_{Ar}), 139.5 (C_{Ar}), 135.4 (C_{Ar}), 135.3 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 126.7 (C_{Ar}), 120.9 (C_{Ar}), 118.0 (C_{Ar}), 116.6 (C_{Ar}), 116.1 (C_{Ar}), 113.2 (C_{Ar}), 113.1 (C_{Ar}), 112.9 (C_{Ar}), 70.3 (C-2), 42.8 (C-3), 30.7 (C-10), 20.8 (C-11).

Bdz5': δ 165.9 (C-4), 157.0 (C_{Ar}), 156.9 (C_{Ar}), 150.0 (C_{Ar}), 140.8 (C_{Ar}), 138.9 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 129.2 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 121.3 (C_{Ar}), 120.2 (C_{Ar}), 118.2 (C_{Ar}), 116.9 (C_{Ar}), 116.1 (C_{Ar}), 113.3 (C_{Ar}), 112.8 (C_{Ar}), 72.02 (C-2), 42.4 (C-3), 30.4 (C-10), 20.2 (C-11).

HRMS: m/z calculado para C₂₃H₂₃N₂O₂ [M+H]⁺: 359.1754, encontrado: 359.1758.

2,8-dimetil-2,4-bis(4-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina + 2,7-dimetil-2,4-bis(4-hidroxifenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz6 + Bdz6'):



Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 214-216 °C.

Rendimento (Bdz6 + Bdz6'–80:20): 91 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3335 (NH), 3227 (OH), 3030 (CH, Ar), 2961 e 2922 (C(sp³)-H), 1611 (C=N), 1589 e 1447 (C=C), 1329 (C-N), 1246 (C-O).

RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):

Bdz6: δ 9.70 (s, 1H, OH), 9.13 (s, 1H, OH), 7.56 (d, 2H, J = 8.8 Hz, PhHOH), 7.34 (d, 2H, J = 8.7 Hz, PhHOH), 6.95 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Ar-H), 6.77 (d, 1H, J = 1.1 Hz, Ar-H), 6.67 – 6.58 (m, 5H, 4PhHOH e 1Ar-H), 5.26 (sl, 1H, NH), 3.06 (d, 1H, J = 13.4 Hz, CH₂), 2.75 (d, 1H, J = 13.4 Hz, CH₂), 2.23 (s, 3H, ArCH₃), 1.57 (s, 3H, CH₃).

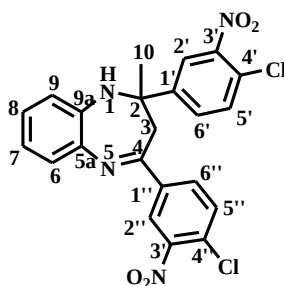
Bdz6': δ 9.74 (s, 1H, OH), 9.14 (s, 1H, OH), 7.58 (d, 2H, J = 8.8 Hz, PhHOH), 7.38 (d, 2H, J = 8.7 Hz, PhHOH), 6.88 (d, 1H, J = 1.4 Hz, Ar-H), 6.86 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 6.67 – 6.58 (m, 5H, 4PhHOH e 1Ar-H), 5.05 (sl, 1H, NH), 2.95 (d, 1H, J = 13.4 Hz, CH₂), 2.75 (d, 1H, J = 13.4 Hz, CH₂), 2.23 (s, 3H, ArCH₃), 1.55 (s, 3H, CH₃).

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

Bdz6: δ 164.7 (C-4), 158.8 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 139.3 (C_{Ar}), 138.8 (C_{Ar}), 136.6 (C_{Ar}), 134.4 (C_{Ar}), 130.7 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 128.3 (C_{Ar}), 126.6 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 120.6 (C_{Ar}), 114.6 (C_{Ar}), 114.4 (C_{Ar}), 71.0 (C-2), 42.3 (C-3), 30.5 (C-10), 20.7 (C-11).

Bdz6': δ 166.0 (C-4), 159.0 (C_{Ar}), 155.6 (C_{Ar}), 140.0 (C_{Ar}), 139.0 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 130.4 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.7 (C_{Ar}), 128.6 (C_{Ar}), 126.5 (C_{Ar}), 121.2 (C_{Ar}), 120.6 (C_{Ar}), 114.7 (C_{Ar}), 114.4, 72.3 (C-2), 42.3 (C-3), 30.5 (C-10), 20.2 (C-11).

HRMS: m/z calculado para C₂₃H₂₃N₂O₂ [M+H]⁺: 359.1754, encontrado: 359.1749.

2-metil-2,4-bis(4-cloro-3-nitrofenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz7):

Aspecto físico: Sólido amarelo.

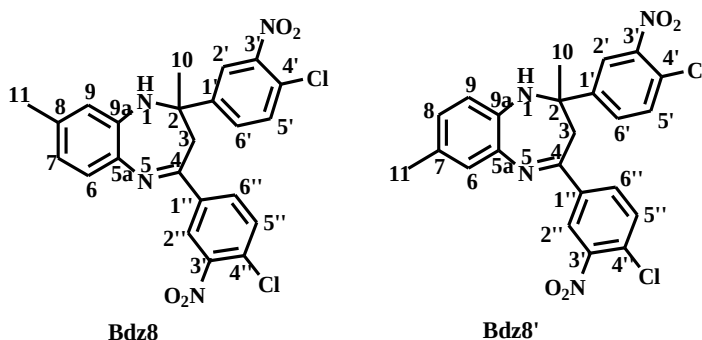
Ponto de fusão: 173-175 °C.

Rendimento: 89 % (EtOH)

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3364 (NH), 3082 (CH, Ar), 2974 e 2930 (C(sp³)-H), 1603 (C=N), 1557 e 1472 (C=C), 1530 e 1348 (N=O), 1049 (C-Cl, Ar). **RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 8.17 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H-2''), 8.12 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H2'), 8.01 (dd, 1H, J = 8.6, 2.2 Hz, H-6''), 7.75 (dd, 1H, J = 8.5, 2.3 Hz, H-6'), 7.68 (d, 1H, J = 8.6 Hz, H-5''), 7.58 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H-5'), 7.18 (dd, 1H, J = 7.8, 1.4 Hz, Ar-H), 7.12 – 7.04 (m, 2H, Ar-H), 6.90 – 6.85 (m, 1H, Ar-H),

6.13 (sl, 1H, NH), 3.67 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, CH₂), 2.85 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz, CH₂), 1.72 (s, 1H, CH₃). **RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):** δ 162.1 (C-4), 148.6 (C_{Ar}), 147.4 (C_{Ar}), 147.0 (C_{Ar}), 139.1 (C_{Ar}), 139.0 (C_{Ar}), 136.3 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.0 (C_{Ar}), 129.8 (C_{Ar}), 127.3 (C_{Ar}), 125.9 (C_{Ar}), 123.4 (C_{Ar}), 123.0 (C_{Ar}), 122.9 (C_{Ar}), 120.5 (C_{Ar}), 119.6 (C_{Ar}), 70.7 (C-2), 41.9 (C-3), 30.1 (C-10). **MS:** m/z para [M⁺]: 471.01.

2,8-dimetil-2,4-bis(4-cloro-3-nitrofenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina + 2,7-dimetil-2,4-bis(4-cloro-3-nitrofenil)-2,3-diidro-1H-1,5-benzodiazepina (Bdz8 + Bdz8'):



Aspecto físico: Sólido alaranjado.

Ponto de fusão: 164-167 °C.

Rendimento (Bdz8 + Bdz8'–52:48): 87 % (EtOH).

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3350 (NH), 3078 (CH, Ar), 2970 e 2920 (C(sp³)-H), 1614 (C=N), 1558 e 1475 (C=C), 1530 e 1352 (N=O), 1051 (C-Cl, Ar).

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆):

Bdz8: δ 8.15 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-2''), 8.08 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 7.99 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-6''), 7.71 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.3$ Hz, H-6'), 7.67 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-5''), 7.57 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.07 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 6.87 (d, 1H, $J = 1.0$ Hz, Ar-H), 6.68 (ddd, 1H, $J = 8.0, 1.8, 0.5$ Hz, Ar-H), 6.12 (sl, 1H, NH), 3.70 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz, CH₂), 2.80 (d, 1H, $J = 14.1$ Hz, CH₂), 2.26 (s, 3H, ArCH₃), 1.71 (s, 3H, CH₃).

Bdz8': δ 8.17 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H-2''), 8.14 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 8.01 (dd, 1H, $J = 8.6, 2.2$ Hz, H-6''), 7.79 (dd, 1H, $J = 8.5, 2.3$ Hz, H-6'), 7.69 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H-5''), 7.59 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 7.00 (d, 1H, $J = 1.4$ Hz, Ar-H), 6.96 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Ar-H), 6.91 (ddd, 1H, $J = 8.1, 2.0, 0.5$ Hz, Ar-H), 5.88 (sl, 1H, NH), 3.56 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz, CH₂), 2.84 (d, 1H, $J = 13.9$ Hz, CH₂), 2.24 (s, 3H, ArCH₃), 1.68 (s, 3H, CH₃).

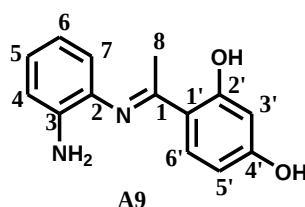
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):

Bdz8: δ 160.7 (C-4), 148.7 (C_{Ar}), 147.0 (C_{Ar}), 139.4 (C_{Ar}), 138.9 (C_{Ar}), 136.8 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 131.0 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 125.6 (C_{Ar}), 123.2 (C_{Ar}), 1223.0 (C_{Ar}), 122.8 (C_{Ar}), 120.8 (C_{Ar}), 120.3 (C_{Ar}), 69.7 (C-2), 42.1 (C-3), 30.2 (C-10), 20.8 (C-11).

Bdz8': δ 162.8 (C-4), 148.8 (C_{Ar}), 147.4 (C_{Ar}), 139.1 (C_{Ar}), 137.0 (C_{Ar}), 136.4 (C_{Ar}), 133.6 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 131.4 (C_{Ar}), 131.3 (C_{Ar}), 129.4 (C_{Ar}), 128.8 (C_{Ar}), 128.1 (C_{Ar}), 125.9 (C_{Ar}), 123.4 (C_{Ar}), 123.0 (C_{Ar}), 122.9 (C_{Ar}), 120.4 (C_{Ar}), 71.37 (C-2), 41.7 (C-3), 29.8 (C-10), 20.0 (C-11).

MS: m/z para [M⁺]: 485.03.

Intermediário 4-[1-[(2-aminofenil)imino]etil]-1,3-Benzenodiol (A9):



Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 187-189 °C.

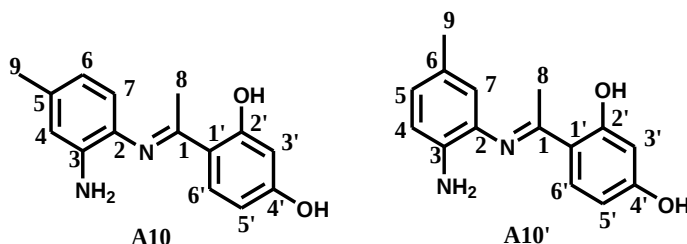
Rendimento: 13 %.

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3302 e 3256 (NH), 3165 (OH), 3013 (CH, Ar), 2968 e 2887 (C(sp³)-H), 1624 (C=N), 1599 e 1489 (C=C), 1362 (C-N), 1242 (C-O). **RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 15.35 (s, 1H, OH), 9.99 (s, 1H, OH), 7.55 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H-6'), 6.90 (ddd, 1H, J = 8.0, J = 7.3, 1.6 Hz, H-5), 6.75 (dd, 1H, J = 8.0, 1.3 Hz, H-4), 6.65 (dd, 1H, J = 7.7, 1.6 Hz, H-7), 6.58 (ddd, J = 7.7, J = 7.3, 1.3 Hz, H-6), 6.32 (dd, 1H, J = 8.8, 2.5 Hz, H-5'), 6.24 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-3'), 4.68 (sl, 2H, NH₂), 2.22 (s, 3H, CH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆): δ 172.39 (C-1), 164.27 (C_{Ar}), 161.71 (C_{Ar}), 140.04 (C_{Ar}), 131.84 (C_{Ar}), 131.14 (C_{Ar}), 125.53 (C_{Ar}), 121.71 (C_{Ar}), 116.23 (C_{Ar}), 114.98 (C_{Ar}), 112.45 (C_{Ar}), 106.56 (C_{Ar}), 102.88 (C_{Ar}), 16.69 (C-8).

HRMS: m/z calculado para C₁₄H₁₅N₂O₂ [M+H]⁺: 243.1128, encontrado: 243.1132.

Intermediários 4-[1-[(2-amino-4-metilfenil)imino]etil]-1,3-Benzenodiol + 4-[1-[(2-amino-5-metilfenil)imino]etil]-1,3-Benzenodiol (A10 + A10'):



Aspecto físico: Sólido amarelo.

Ponto de fusão: 201-204 °C.

Rendimento (A10 + A10'–71:29): 12 % (EtOH)

IV-FT (KBr, cm⁻¹): 3318 e 3248 (NH), 3161 (OH), 3007 (CH, Ar), 2918 e 2858 (C(sp³)-H), 1622 (C=N), 1599 e 1460 (C=C), 1362 (C-N), 1256 (C-O).

RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):

A10: δ 15.55 (s, 1H, OH), 9.97 (s, 1H, OH), 7.53 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-6'), 6.57 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H-4), 6.55 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H-7), 6.39 (ddd, 1H, *J* = 7.8, 1.8, 0.6 Hz, H-6), 6.31 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H-5'), 6.23 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-3'), 4.62 (s, 2H, NH₂), 2.22 (s, 1H, CH₃), 2.18 (s, 1H, ArCH₃).

A10': δ 15.37 (s, 1H, OH), 9.99 (s, 1H, OH), 7.54 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, H-6'), 6.72 (ddd, 1H, *J* = 8.0, 1.6, 0.6 Hz, H-5), 6.65 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H-4), 6.48 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz, H-7), 6.32 (dd, 1H, *J* = 8.8, 2.5 Hz, H-5'), 6.24 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H-3'), 4.47 (s, 2H, NH₂), 2.22 (s, 3H, CH₃), 2.16 (s, 3H, ArCH₃).

RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆):

A10: δ 172.2 (C-1), 164.5 (C_{Ar}), 161.6 (C_{Ar}), 139.9 (C_{Ar}), 134.5 (C_{Ar}), 131.0 (C_{Ar}), 129.3 (C_{Ar}), 121.6 (C_{Ar}), 117.0 (C_{Ar}), 115.5 (C_{Ar}), 112.5 (C_{Ar}), 106.4 (C_{Ar}), 102.89 (C_{Ar}), 20.82 (C-9), 16.57 (C-8).

A10': δ 172.2 (C-1), 164.3 (C_{Ar}), 161.6 (C_{Ar}), 137.34 (C_{Ar}), 131.8 (C_{Ar}), 131.1 (C_{Ar}), 126.0 (C_{Ar}), 124.9 (C_{Ar}), 122.1 (C_{Ar}), 115.2 (C_{Ar}), 112.4 (C_{Ar}), 106.5 (C_{Ar}), 102.86 (C_{Ar}), 20.11 (C-9), 16.69 (C-8).

HRMS: *m/z* calculado para C₁₅H₁₇N₂O₂ [M+H]⁺: 257.1285, encontrado: 257.1285.

6.1.4 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, em colaboração com o pesquisador Me. Bruno Oliveira de Veras.

6.1.4.1 Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil)

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos pelo método do sequestro de radical livre foi medida por meio de doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH[•] (KOSE et al., 2010). Sucessivas diluições de uma solução de reserva de DPPH metanólica (200 µmol/L) foram realizadas para obter uma absorbância UV-VIS entre 0,6-0,7 a 517 nm, de modo a obter-se uma solução de trabalho. Diferentes concentrações do composto teste (40 µL) foram misturadas com a solução de DPPH (250 µL) e após 30 min de incubação, ao abrigo da luz, as absorbâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda mencionado acima. As medidas foram feitas em triplicatas e as atividades de inibição foram calculadas com base na porcentagem de DPPH removido. Um análogo da vitamina E (Trolox[®]) e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como padrões. A solução de DPPH sem o composto teste serve como controle. A porcentagem da atividade de eliminação de radicais DPPH foi calculada utilizando a **equação 1**:

$$\text{Atividade de eliminação de radicais DPPH (\%)} = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

onde A_C é a absorbância do controle (todos os reagentes exceto o composto teste) e A_S é a absorbância do composto teste. O CI_{50} de DPPH foi calculado com base na regressão linear da porcentagem de DPPH remanescente contra a concentração do composto teste.

6.1.4.2 Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

Atividade antioxidante dos compostos pelo o ensaio ABTS, baseou-se na geração do radical catiônico cromóforo obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita por RE et al. (1999). Todas as medidas foram realizadas em triplicata e as atividades de inibição foram calculadas a partir da

porcentagem de ABTS removido. Um análogo da vitamina E (Trolox®) e o hidroxitolueno butilado (BHT) foram usados como padrões. A porcentagem da atividade de eliminação de radicais ABTS foi calculada a partir da **equação 2**:

$$\text{Atividade de eliminação de radicais ABTS (\%)} = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100 \quad \text{(Equação 2)}$$

onde A_C é a absorbância do controle (todos os reagentes exceto o composto teste) e A_S é a absorbância do composto teste. O CI_{50} de ABTS foi calculado com base na regressão linear da porcentagem de ABTS remanescente contra a concentração do composto teste.

6.1.4.3 Capacidade Antioxidante Total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) dos compostos foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio (c et al., 2011). Os ensaios consistiram na redução do Mo^{6+} para Mo^{5+} pelo composto, levando a formação de um complexo esverdeado fosfato/ Mo^{5+} em pH ácido. Para tanto, aos compostos foi adicionado ácido sulfúrico 0,6 mol/L, fosfato de sódio 28 mmol/L e molibdato de amônio 4 mmol/L. As misturas foram incubadas a 100 °C por 90 min. A absorbância de cada solução foi lida a 695 nm contra um branco. Para o branco a amostra foi substituída por metanol. Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico e o BHT. A porcentagem de capacidade antioxidante total (CAT) foi calculada de acordo com a **equação 3**:

$$\text{Capacidade antioxidante total (\%)} = [(A_C - A_S) / A_C] \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

onde A_C é a absorbância do controle (todos os reagentes exceto o composto teste) e A_S é a absorbância do composto teste. O CI_{50} de CAT foi calculado com base na regressão linear da atividade contra a concentração do composto teste.

6.1.5 Avaliação da Atividade Antifúngica

Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco em colaboração com o pesquisador Me. Bruno Oliveira de Veras.

6.1.5.1 Micro-organismos Testados

Para os ensaios de atividade antifúngica foram testadas quatro cepas de duas espécies do gênero *Sporothrix*: *Sporothrix brasiliensis* (UFPE121); *Sporothrix brasiliensis* (UFPE145); *Sporothrix brasiliensis* (UFPE230); *Sporothrix schenckii* (UFPE289). Os micro-organismos foram fornecidos pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

6.1.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O ensaio de suscetibilidade à microdiluição em caldo seguiu o protocolo CLSI M60 (2018). Foram utilizadas placas de fundo plano de 96 poços para realizar este ensaio. Os compostos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. Os compostos, a 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg/mL foram adicionados em meio RPM-1640 (tamponado com MOPs) adicionando suspensão de levedura, aproximadamente 5×10^2 UFC/mL. As amostras foram incubadas a 30 °C por 24 h. A solução de resazurina (0,01 %) foi usada como indicador na visualização da mudança de cor: qualquer mudança na cor de púrpura para rosa foi registrada como crescimento de levedura. A menor concentração, na qual não houve mudança de cor, foi tomada como CIM. Posteriormente, 10 µL de cada poço foram semeados em placas contendo meio de ágar Sabouraud Dextrose e incubados por 24 h a 30 °C para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). O fluconazol foi usado com droga de referência. Cada ensaio nesta experiência foi realizado em triplicata.

6.1.6 Estudo *In Silico*

O estudo computacional das propriedades ADME e de toxicidade dos compostos sintetizados foi realizado utilizando os programas online de acesso livre Molinspiration e Osiris Property Explorer. Dentre os parâmetros físico-químicos calculados e avaliados estão incluídos os parâmetros de Lipinski (peso molecular – PM, lipofilicidade – cLog P, número de doadores de ligação de hidrogênio – nHBD e número de aceptores de ligação de hidrogênio – nHBA), além da solubilidade aquosa (Log S), número de ligações rotacionáveis (nRB), área de

superfície polar topológica (TPSA) e o percentual de absorção intestinal (ABS), o qual foi estimado de acordo com a **equação 4** (ZHAO et al., 2002):

$$\text{ABS (\%)} = 109 - 0345 \times \text{TPSA} \quad \textbf{(Equação 4)}$$

6.1.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão de três determinações independentes. A análise estatística foi realizada com o GraphPad Prism[®] versão 5.0. Os dados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste post hoc de Tukey ($p \leq 0,05$).

Capítulo 7

Referências

REFERÊNCIAS

AASTHA, P. et al. 1, 5 Benzodiazepines : Overview of Properties and Synthetic Aspects. **Res. J. Chem. Sci.**, v. 3, n. 7, p. 90–103, 2013.

ÁLAMO GONZÁLEZ, C.; LÓPEZ MUÑOZ, F. **Historia de la psicofarmacología**. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2007.

AMOOZADEH, A. et al. Microwave-Assisted, solvent free preparation of 1,5-benzodiazepine derivatives using nanomagnetic-supported sulfonic acid as a recyclable and heterogeneous catalyst. **Journal of Chemical Research**, v. 39, n. 12, p. 694–697, 2015.

AN, Y. et al. Efficient Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Series of 1,5-Benzodiazepine Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 88, n. 1, p. 110–121, 2016.

ARCHER, G. A.; STERNBACH, L. H. THE CHEMISTRY OF BENZODIAZEPINES. **Chemical Reviews**, v. 68, n. 6, p. 744–784, 1968.

ARYA, K.; DANDIA, A. The expedient synthesis of 1,5-benzothiazepines as a family of cytotoxic drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 1, p. 114–119, 1 jan. 2008.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares para ação dos fármacos**. 3ª ed. Porto Alegre: [s.n.].

BHAGAT, K. et al. Microwave-assisted synthesis of 11-substituted-3,3-dimethyl-2,3,4,5,10,11-hexahydrodibenzo[b,e][1,4]diazepin-1-one derivatives catalysed by silica supported fluoroboric acid as potent antioxidant and anxiolytic agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 28, n. 12, p. 2200–2217, 2019.

BHATIA, M. S. et al. Synthesis, screening and QSAR studies of 2,4-disubstituted 1,5-benzodiazepine derivatives. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 147–152, 2008.

BRAHMBHATT, G. C. et al. New pyrazolyl-dibenzo[b,e][1,4]diazepinones: room temperature one-pot synthesis and biological evaluation. **Molecular Diversity**, v. 24, n. 2, p. 355–357, 2020.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

CARRASCO-ZUBER, J. E. et al. Cutaneous Involvement in the Deep Mycoses: A Literature Review. Part I—Subcutaneous Mycoses. **Actas Dermo-Sifiliograficas**, v. 107, n. 10, p. 806–815, 2016.

CHANDER, S. et al. Synthesis and study of anti-HIV-1 RT activity of 5-benzoyl-4-methyl-1,3,4,5-tetrahydro-2H-1,5-benzodiazepin-2-one derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 72, p. 74–79, 2017.

CHATTERJEE, N. R. et al. An Ultrasonically Assisted Solvent-free Synthesis of Some 1,5-Benzodiazepine Derivatives Possessing Significant Anti-anxiety Action Using Silica Gel as a Catalyst. v. 7, n. 2, p. 805–813, 2009.

CHEN, Y. et al. Discovery of novel 1,5-benzodiazepine-2,4-dione derivatives as potential anticancer agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 16, p. 3948–3951, 2014.

CHWEH, A. Y.; LIN, Y. B.; SWINYARD, E. A. Hypnotic action of benzodiazepines: a possible mechanism. **Life sciences**, v. 34, n. 18, p. 1763–8, 30 abr. 1984.

CLIMENT, M. J. et al. Multisite solid catalyst for cascade reactions: The direct synthesis of benzodiazepines from nitro compounds. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 35, p. 8834–8841, 2009.

COSTA, L. S. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 6, p. 952–966, 2011.

DALPOZZO, R. Magnetic nanoparticle supports for asymmetric catalysts. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 3671–3686, 6 jul. 2015.

DE RESENDE FILHO, J. B. M. et al. Lanthanide-EDTA complexes covalently bonded on Fe₃O₄@SiO₂ magnetic nanoparticles promote the green, stereoselective synthesis of: N-Acylhydrazones. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 36, p. 14257–14269, 2019.

FERREIRA, L. G. et al. **Molecular docking and structure-based drug design strategies**. [s.l.: s.n.], v. 20

FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 2018.

FRUSCELLA, P. et al. 1,5-Benzodiazepine tricyclic derivatives exerting anti-inflammatory effects in mice by inhibiting interleukin-6 and prostaglandin E₂ production. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 5, p. 445–451, 2001.

GREENBLATT, D. J.; SHADER, R. I. **Benzodiazepines in clinical practice**. New York: Raven Press, 1974.

HARA, T.; KAYAMA, Y.; ITOH, K.; MORI, T.; FUJIMORI, H.; SUNAMI, T. . H. Y. .; ISHIMOTO, S. **Benzodiazepine derivatives and pharmaceutical compositions containing said derivatives** 169, , 2 nov. 1976. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US4169150A/en>>. Acesso em: 9 nov. 2018

HERAVI, M. M.; ZADSIRJAN, V. Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. **RSC Advances**, v. 10, n. 72, p. 44247–44311, 2020.

INDALKAR, K. S.; PATIL, M. S.; CHATURBHUIJ, G. U. An efficient, environmentally benign, and solvent-free protocol for the synthesis of 4-substituted 1,5-benzodiazepines catalyzed by reusable sulfated polyborate. **Tetrahedron Letters**, v. 58, n. 48, p. 4496–4502, 2017.

INSUASTY, B. et al. An efficient synthesis of new caffeine-based chalcones, pyrazolines and pyrazolo[3,4- b][1,4]diazepines as potential antimalarial, antitrypanosomal and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 93, p. 401–413, 2015.

INSUASTY, B.; ABONIA, R. Cyclocondensation of 1,2-Diamino-4methylbenzeno and p-Substituted Acetophenones. **J. heterocyclic Chem.**, v. 30, n. 229, p. 229–231, 1993.

ISHWAR BHAT K, A. K. Synthesis and Anti-inflammatory Activity of Some Novel 1,5 Benzodiazepine Derivatives. v. 4, n. 9, p. 63–66, 2016.

JAAFAR, Z. et al. Design and microwave-assisted synthesis of dimers of 1,5-benzodiazepine-1,2,3-triazole hybrids bearing alkyl/aryl spacers and their biological assessment. **Journal of Molecular Structure**, v. 1195, p. 689–701, 2019.

JAMATIA, R. et al. Graphite oxide: a metal free highly efficient carbocatalyst for the synthesis

of 1,5-benzodiazepines under room temperature and solvent free heating conditions. **Green Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 1–12, 2013.

JAMATIA, R.; SAHA, M.; PAL, A. K. An efficient facile and one-pot synthesis of benzodiazepines and chemoselective 1,2-disubstituted benzimidazoles using a magnetically retrievable Fe₃O₄ nanocatalyst under solvent free conditions. **RSC Advances**, v. 4, n. 25, p. 12826–12833, 2014.

JORGENSEN, W. L.; DUFFY, E. M. Prediction of drug solubility from structure. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 3, p. 355–366, 2002.

JUNIOR, J. B. H.; MICH., P. 1,2,4,5-tetrahydropyrrolo(3,2,1-jk)(1,4)benzodiazepin-7(6H)-ones and 1,2,4,5-tetrahydropyrrolo(1,2,3-ef)(2,5)benzodiazepin-6(7H)-ones. 21 jun. 1974.

KARIMI, B.; MANSOURI, F.; MIRZAEI, H. M. Recent Applications of Magnetically Recoverable Nanocatalysts in C-C and C-X Coupling Reactions. **ChemCatChem**, v. 7, n. 12, p. 1736–1789, 2015.

KAZEMI, M.; GHOBADI, M.; MIRZAEI, A. Based on cobalt ferrite nanoparticles (CoFe₂O₄ MNPs) as catalyst and support: Magnetically recoverable nano-catalysts in organic synthesis. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 43–68, 2018.

KOSE, E. O. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of endemic ferula lycia boiss. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 17, p. 1698–1703, 2010.

KRAPCHO, J.; TURK, C. F. Substituted 2,3-Dihydro-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one and Related Compounds. II. A New Class of Antidepressants¹. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 191–195, mar. 1966.

LAL, M. et al. 2,6-Pyridinedicarboxylic acid as organocatalyst for the synthesis of 1,5-benzodiazepines through one-pot reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 32, p. 4264–4272, 2013.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1–3, p. 3–25, 1997.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, jul. 2010.

MADHAV, J. V.; RAJITHA, B. Expeditious Synthesis of Thiadiazolo Benzodiazepines Under Conventional Method and Microwave Irradiation. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**, v. 183, n. 12, p. 2984–2989, 2008.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, 2014.

MAZIMBA, O.; MOLEFE, T. C. S. 1, 5-Benzodiazepines : A Review Update. **International Journal of Chemical Studies**, v. 3, n. 3, p. 46–52, 2015.

MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. The Evolving Epidemiology of Sporotrichosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, n. 4, p. 255–261, 2014.

MERZ, W. Use of imidazobenzodiazepines for psychotic disorders, 13 jan. 1990. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US4914095A/en?q=Merz%2C+W.-Use+of+imidazobenzodiazepines+for+psychotic+disorders-US+Patent+1990%2C+4%2C914%2C095.>>. Acesso em: 9 nov. 2018

Molinspiration: Calculation of molecular properties and bioactivity score. , [s.d.]. Disponível em: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>>. Acesso em: 8 maio. 2020

NARAYANA, B. et al. Synthesis of some new substituted triazolo [4,3-a][1,4] benzodiazepine derivatives as potent anticonvulsants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 3, p. 417–422, mar. 2006.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 178, p. 687–704, 2019.

NEOCHORITIS, C. G. et al. 1,5-Benzoxazepines Vs 1,5-Benzodiazepines. One-Pot Microwave-Assisted Synthesis and Evaluation for Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation Inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 8409–8420, 2010.

NICOLA, A. M. et al. Antifungal drugs: New insights in research & development. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 195, p. 21–38, 2019.

NYANGUILE, O. et al. 1,5-Benzodiazepines, a novel class of hepatitis C virus polymerase nonnucleoside inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 12, p. 4420–4431, 2008.

Osiris Property Explorer. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em: 8 maio. 2020.

PHRMA. **2020 PhRMA Annual Membership Survey**. Washington, DC 20004: [s.n.]. Disponível em: <<https://phrma.org/research-and-development/2020-phrma-annual-membership-survey>>. Acesso em: 15 set. 2021.

QIAN, J. et al. Gold (I)-Catalyzed Synthesis of 1, 5-Benzodiazepines Directly from o-Phenylenediamines and Alkynes. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 9, p. 4484–4490, 2012.

RAVI, V. et al. Synthesis of some 1,5-benzodiazepine derivatives as a new class of antimicrobial agents. **Asian Journal of Chemistry**, v. 19, n. 7, p. 5435–5442, 2007.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, K. S. et al. Zirconium (IV) chloride-catalyzed synthesis of 1 , 5-benzodiazepine derivatives. **Can. J. Chem.**, v. 188, n. Iv, p. 184–188, 2007.

RICHARDS, B. L.; WHITTLE, S. L.; BUCHBINDER, R. Muscle relaxants for pain management in rheumatoid arthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 1, p. CD008922, 18 jan. 2012.

SARKATE, A. P. et al. SOLVENT FREE OXALIC ACID CATALYZED SYNTHESIS OF 1,5-BENZODIAZEPINES ANIKET. **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 58, n. 4, p. 2200–2203, 2013.

SCHOFIELD, K. **Heterocyclic compounds**. London ;Baltimore: Butterworths, 1973.

SHARKEY-MATHIS, P. K. et al. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. **The American Journal of Medicine**, v. 95, n. 3, p. 279–285, 1993.

SINGH, R. et al. Microwave-Assisted , Solvent Free and Parallel Synthesis of Some Newer 2,4-Disubstituted 1,5-Benzodiazepines of Biological Interest. **International Journal of Pharmaceutical and Drug Reasearch**, v. 5, n. 3, p. 88–95, 2013.

SINGH, R. K. et al. Current development in multicomponent catalytic synthesis of 1,5-benzodiazepines : A systematic review. **Iranian Journal Of Catalyst**, v. 6, n. September, p. 1–22, 2016.

SINGLA, R. K. et al. An Efficient Synthesis of 1 , 5-Benzodiazepine Derivatives Catalyzed by Potassium Aluminium Sulfate Dodecahydrate & Evaluation of Their Antioxidant Activity. **Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 3, p. 279–285, 2012.

THEODOSIS-NOBELOS, P. et al. Active anti-inflammatory and hypolipidemic derivatives of lorazepam. **Molecules**, v. 24, n. 18, 2019.

THI, M. D. D. et al. Metabolism of two new benzodiazepine-type anti-leishmanial agents in rat hepatocytes and hepatic microsomes and their interaction with glutathione in macrophages. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 61, n. 3, p. 399–406, 2009.

TIMOFEEVA, M. N. et al. Metal-organic frameworks as efficient catalytic systems for the synthesis of 1,5-benzodiazepines from 1,2-phenylenediamine and ketones. **Journal of Catalysis**, v. 354, p. 128–137, 2017.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VERMA, D. et al. Synthesis, antimicrobial, anticancer and QSAR studies of 1-[4-(substituted phenyl)-2-(substituted phenyl azomethyl)-benzo[b]-[1,4]diazepin-1-yl]-2-substituted phenylaminoethanones. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 2882–2896, 2019.

WANG, L.-Z.; LI, X.-Q.; AN, Y.-S. 1,5-Benzodiazepine derivatives as potential antimicrobial agents: design, synthesis, biological evaluation, and structure–activity relationships. **Org. Biomol. Chem.**, v. 13, n. 19, p. 5497–5509, 2015.

YAN, A. Prediction of ADME Properties. In: **Applied Chemoinformatics**. [s.l.] Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018. p. 333–357.

YIN, L.; WANG, L. Chemo-/regio-selective synthesis of 2-aryl-3-acetyl-2,4-dihydro-1H-5H-1,5-benzodiazepines using Lewis acid, $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 52, p. 5935–5940, 2016.

YU, H.; ADEDOYIN, A. ADME-Tox in drug discovery: Integration of experimental and computational technologies. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 18, p. 852–861, 2003.

ZELENIN, K. N.; UKRAINTSEV, I. V; ALEKSEEV, V. V. Intermediates in the Reaction of o-Phenylenediamine with Carbonyl Compounds and their Subsequent Conversions. **Chemistry of heterocyclic Compounds**, v. 34, n. 3, p. 363–367, 1998.

ZHANG, Q.; YANG, X.; GUAN, J. Applications of Magnetic Nanomaterials in Heterogeneous Catalysis. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 8, p. 4681–4697, 2019.

ZHAO, L. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of L-amino alcohol derivatives as broad-spectrum antifungal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 177, p. 374–385, 2019.

ZHAO, Y. et al. Investigation of various organocatalysts for improved and efficient one pot synthesis of 2,3-dihydro-1H-1,5-benzodiazepines under solvent-free condition. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 5116–5120, 2014.

ZHAO, Y. H. et al. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 10, p. 1446–1457, 2002.

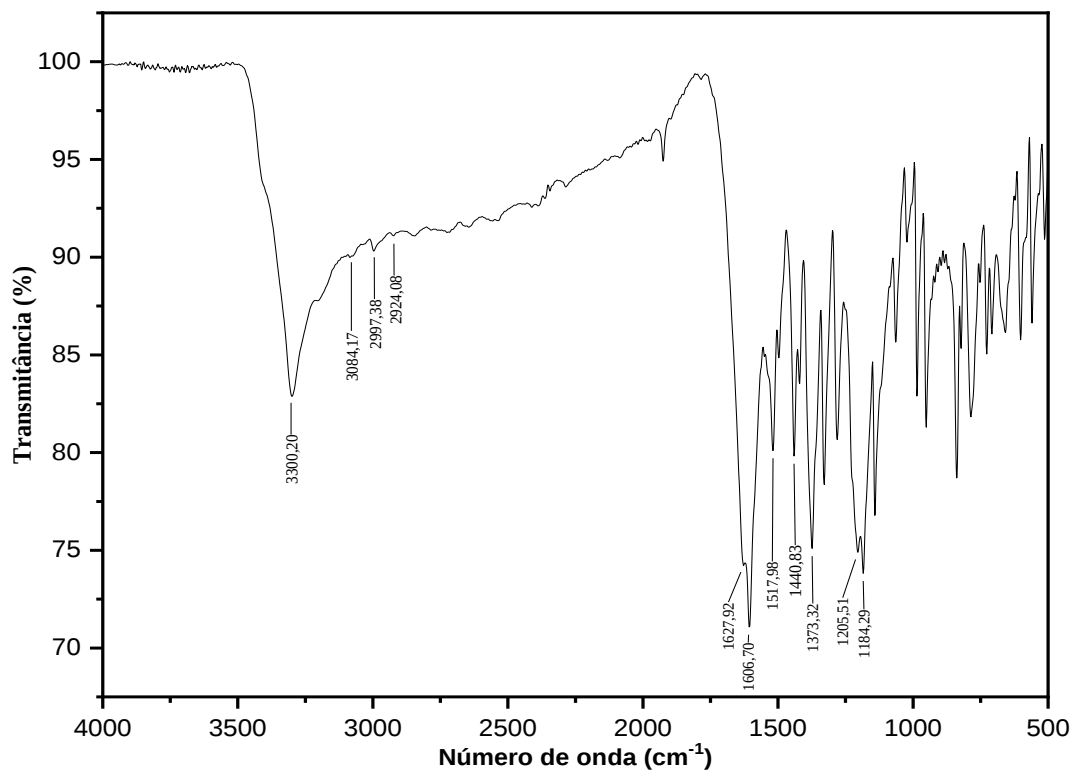
ZHENG, M. et al. Computational chemical biology and drug design: Facilitating protein structure, function, and modulation studies. **Medicinal Research Reviews**, v. 38, n. 3, p. 914–950, 2018.

Capítulo 8

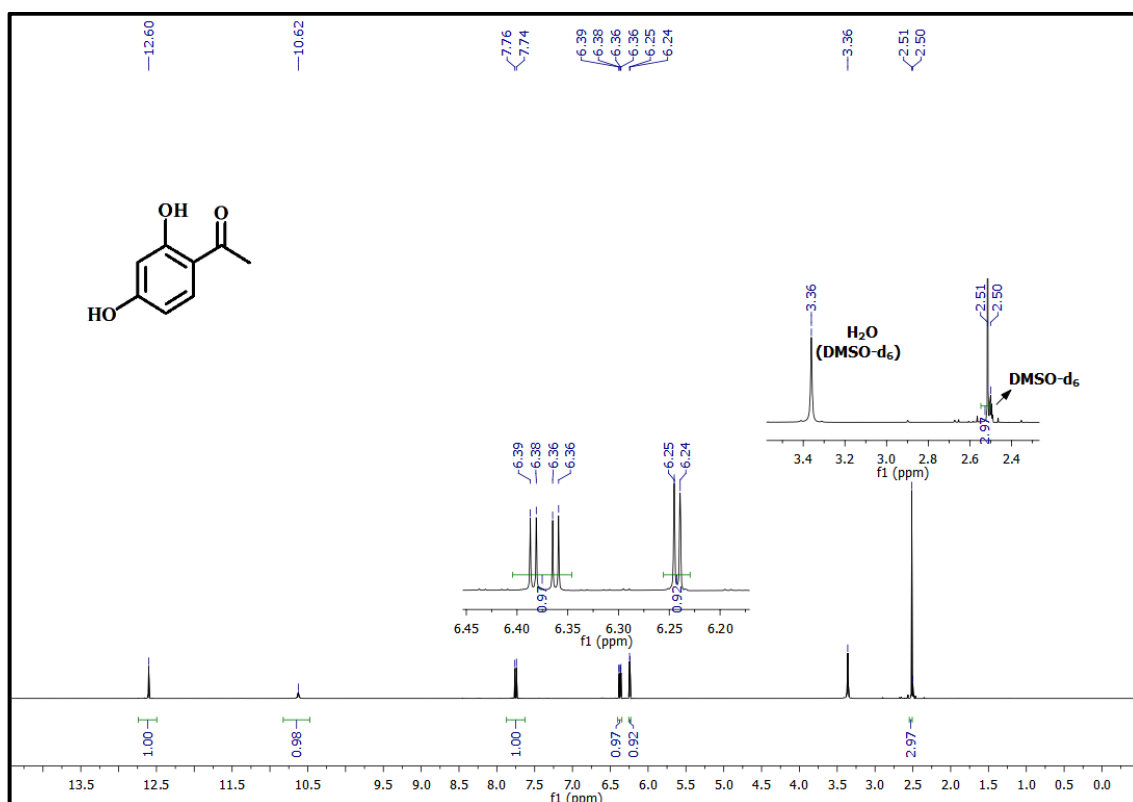
Espectros

ESPECTROS

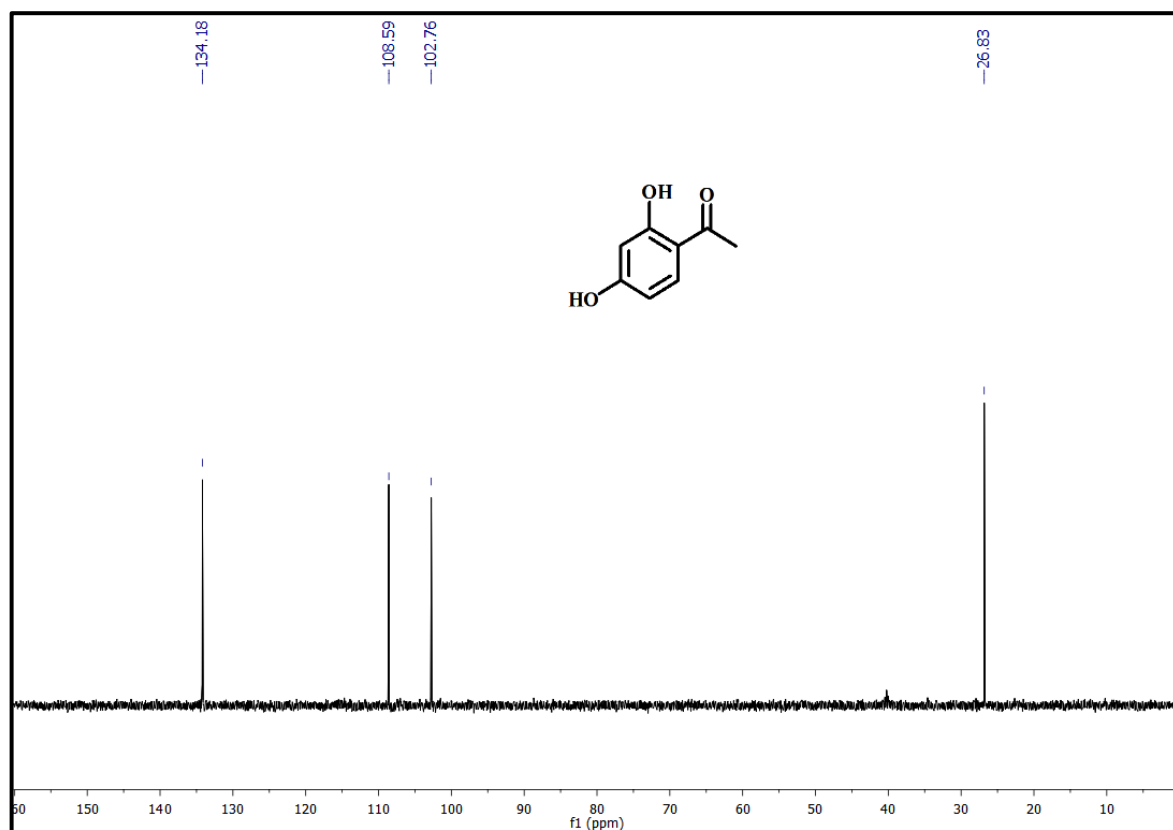
Espectro 1: Espectro de infravermelho (KBr) da 2',4'-diidroxiacetofenona



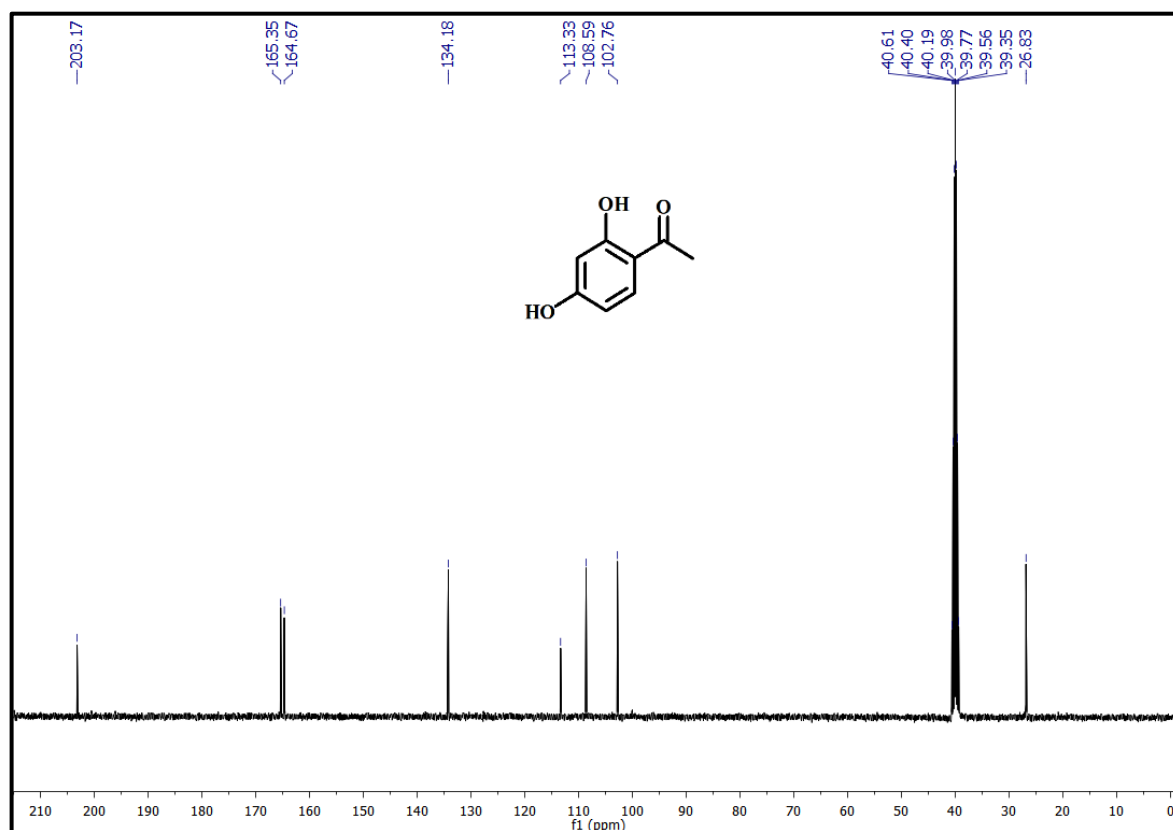
Espectro 2: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona

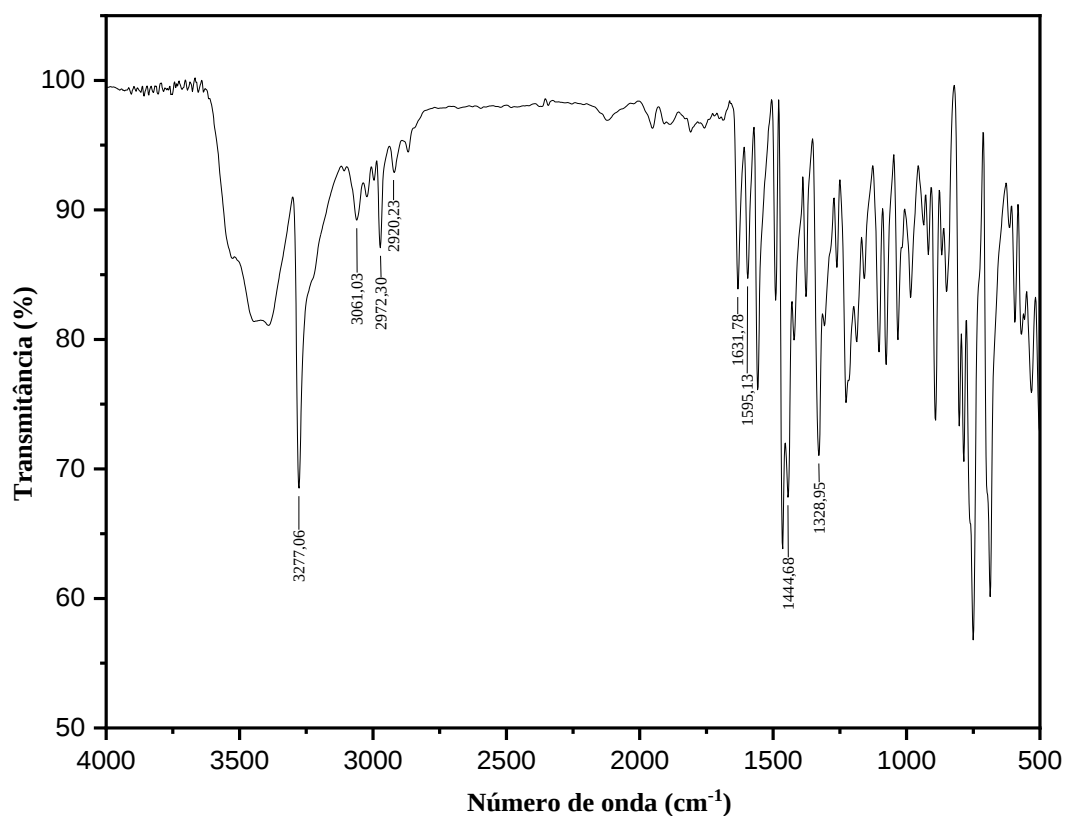
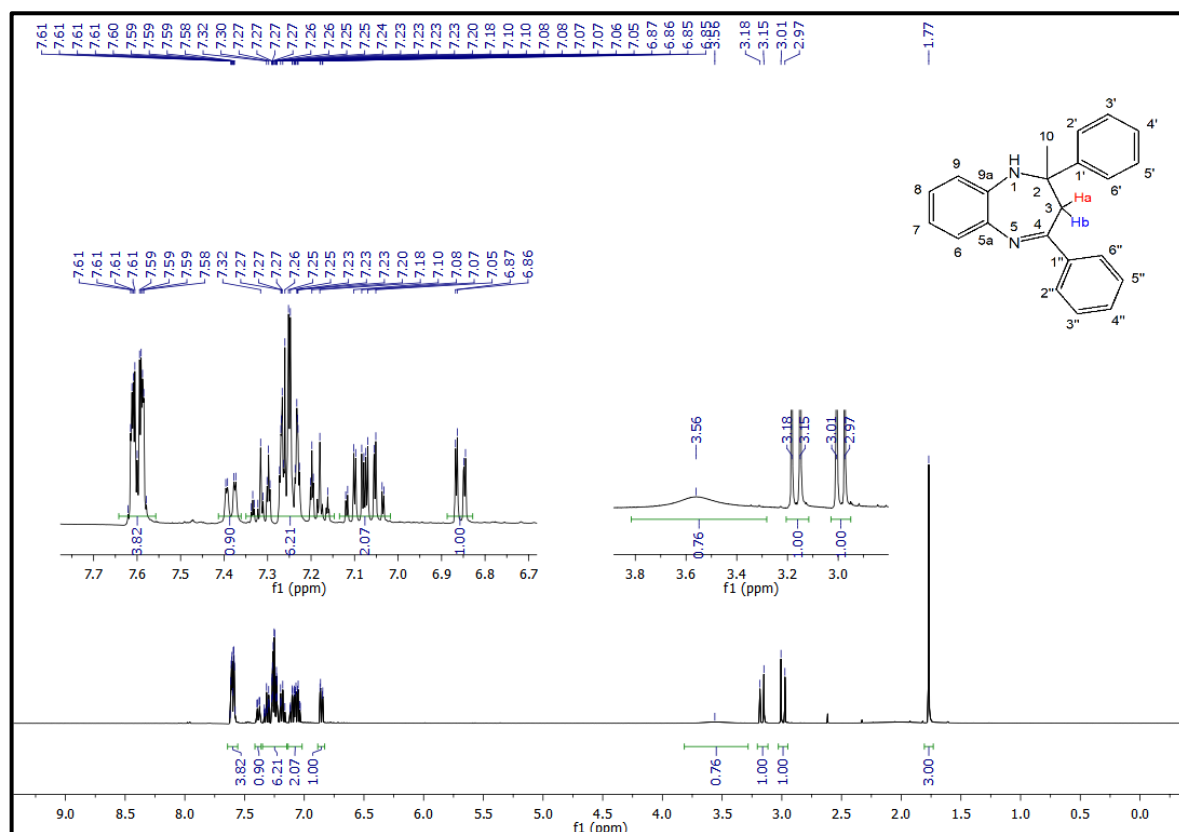


Espectro 3: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona

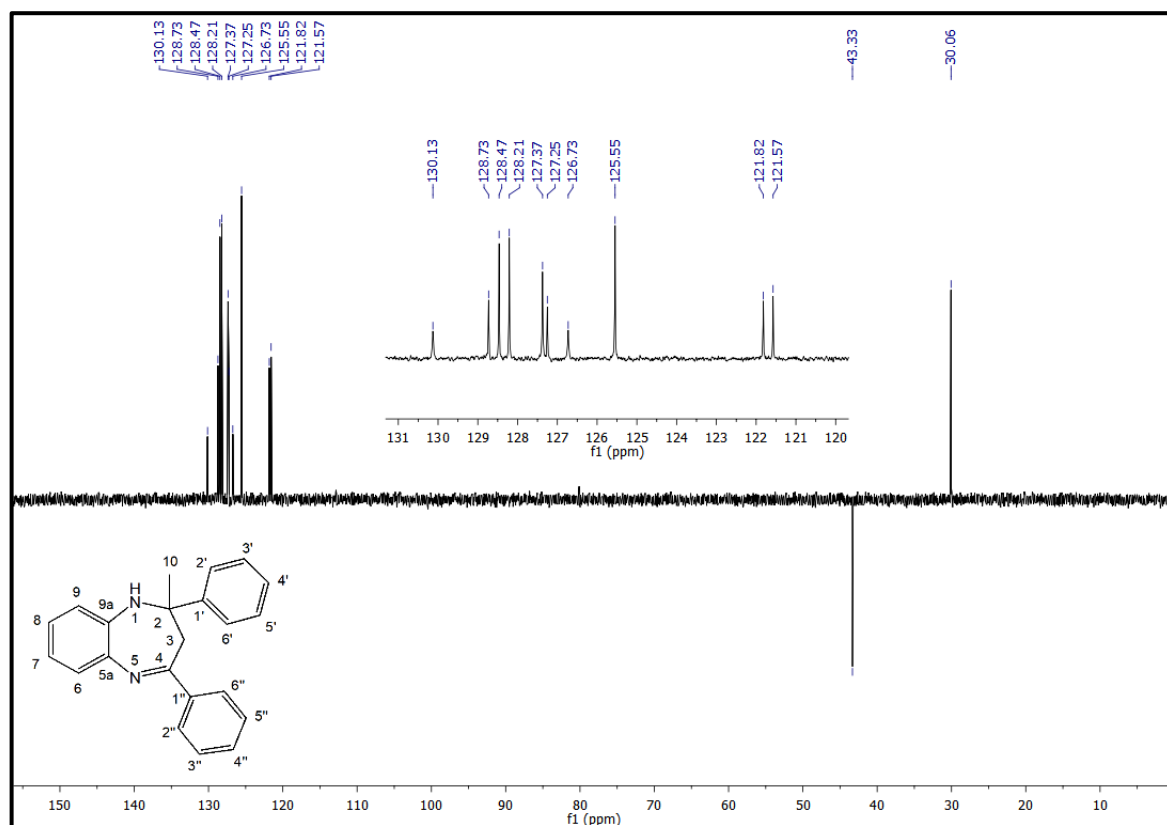


Espectro 4: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, DMSO- d_6) da 2',4'-diidroxiacetofenona

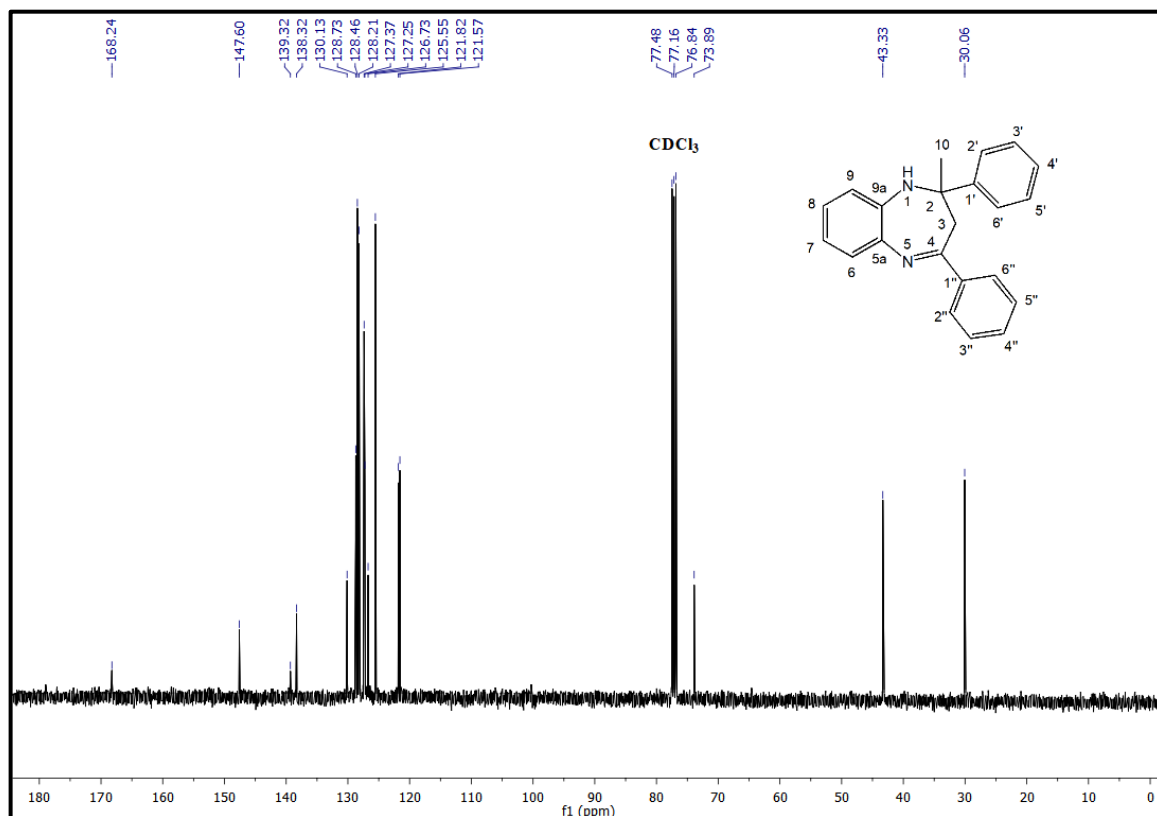


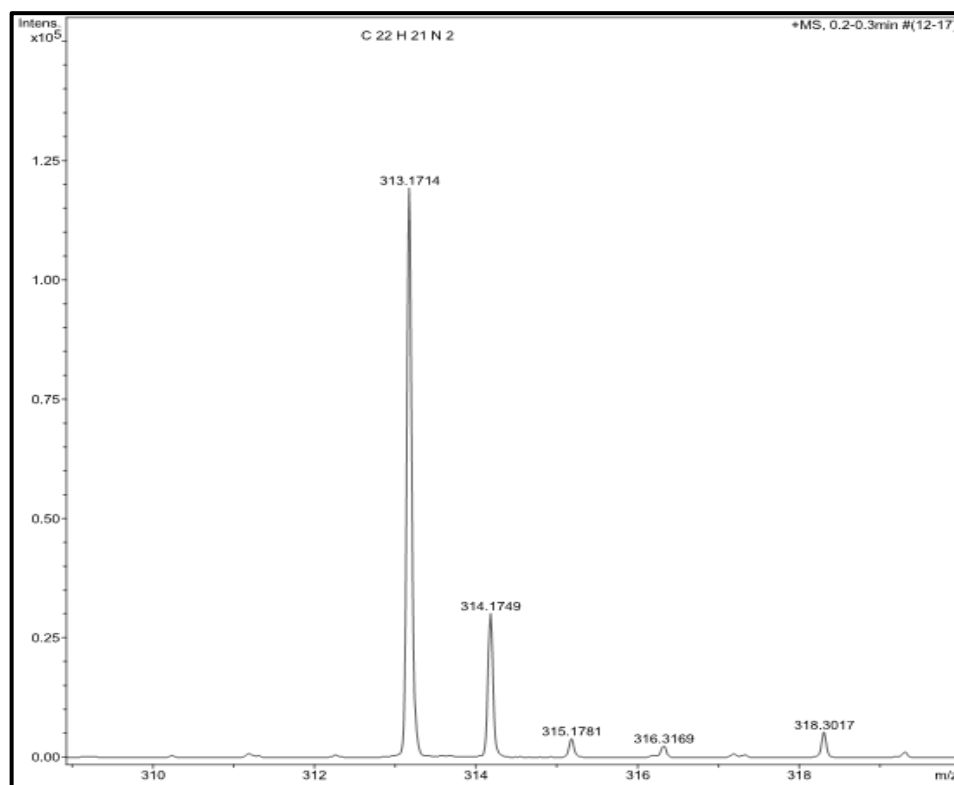
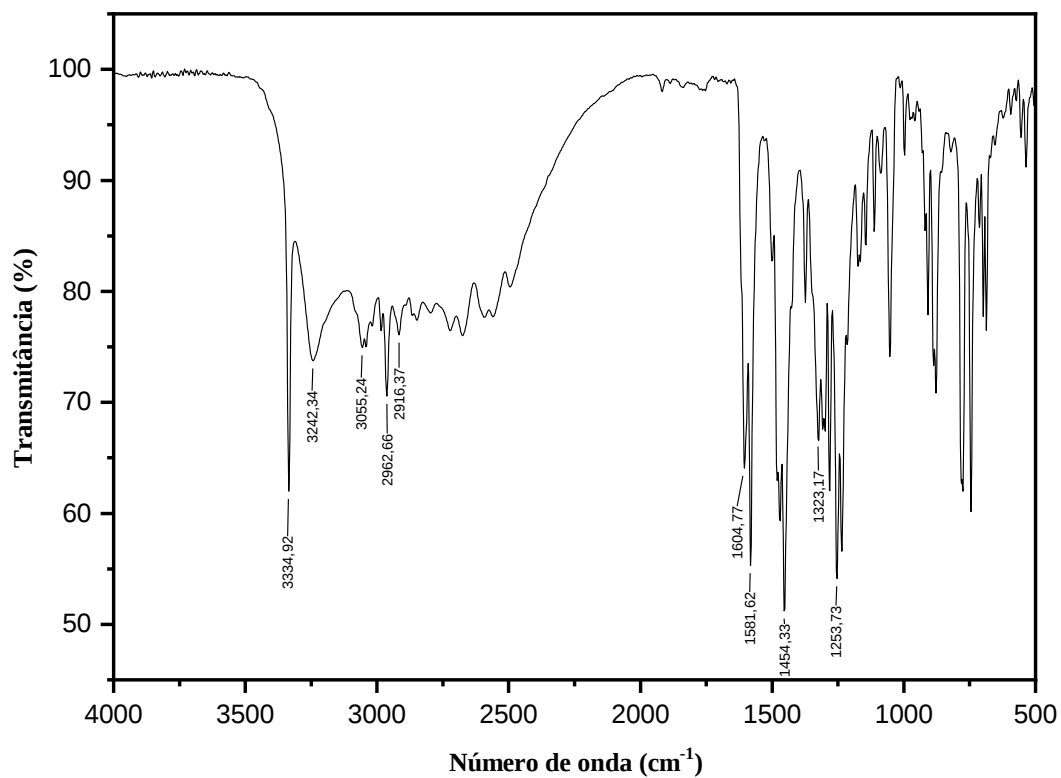
Espectro 5: Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz1****Espectro 6:** Espectro de RMN ¹H (400MHz, CDCl₃) de **Bdz1**

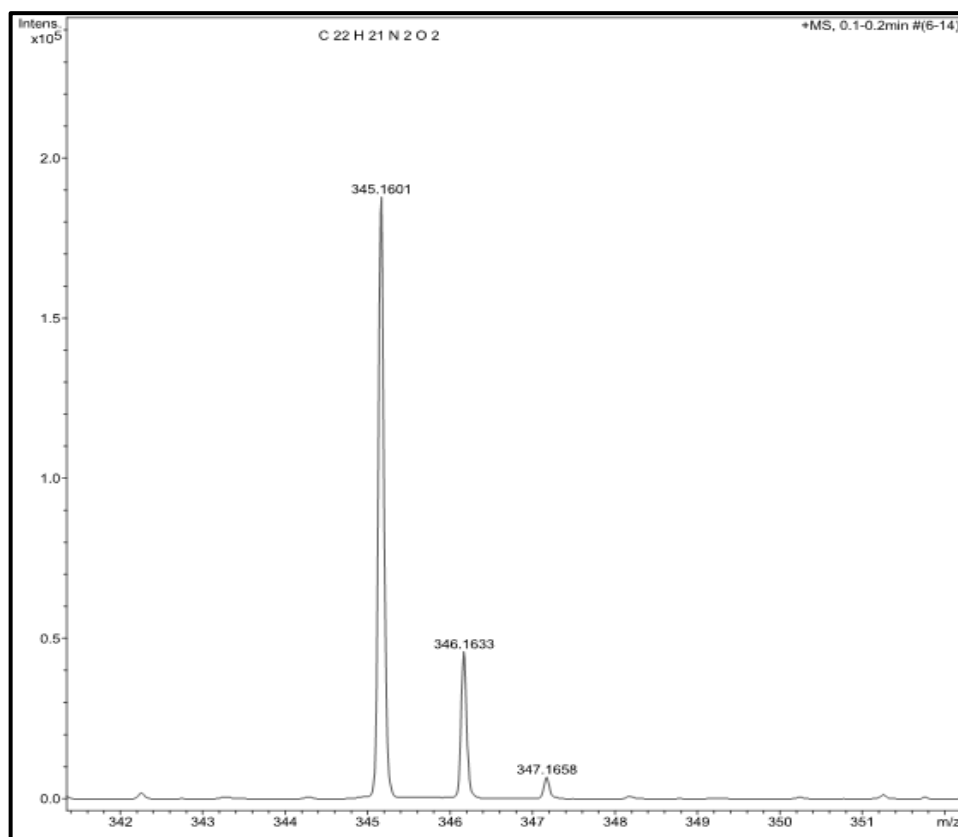
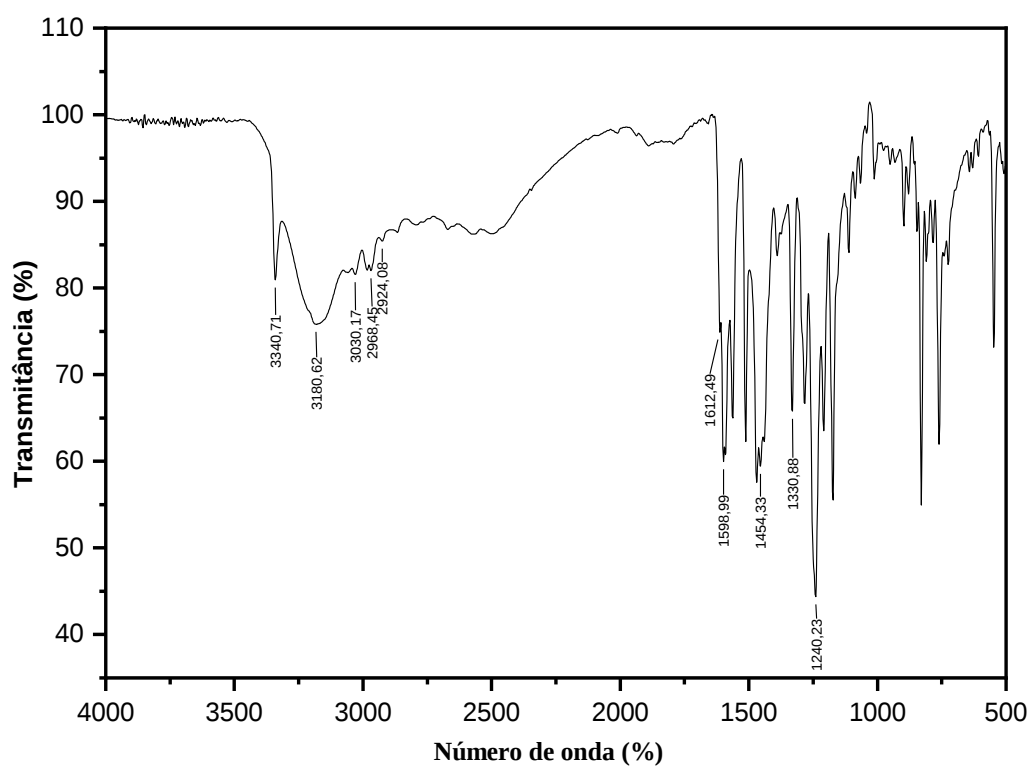
Espectro 7: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100MHz, CDCl_3) de **Bdz1**

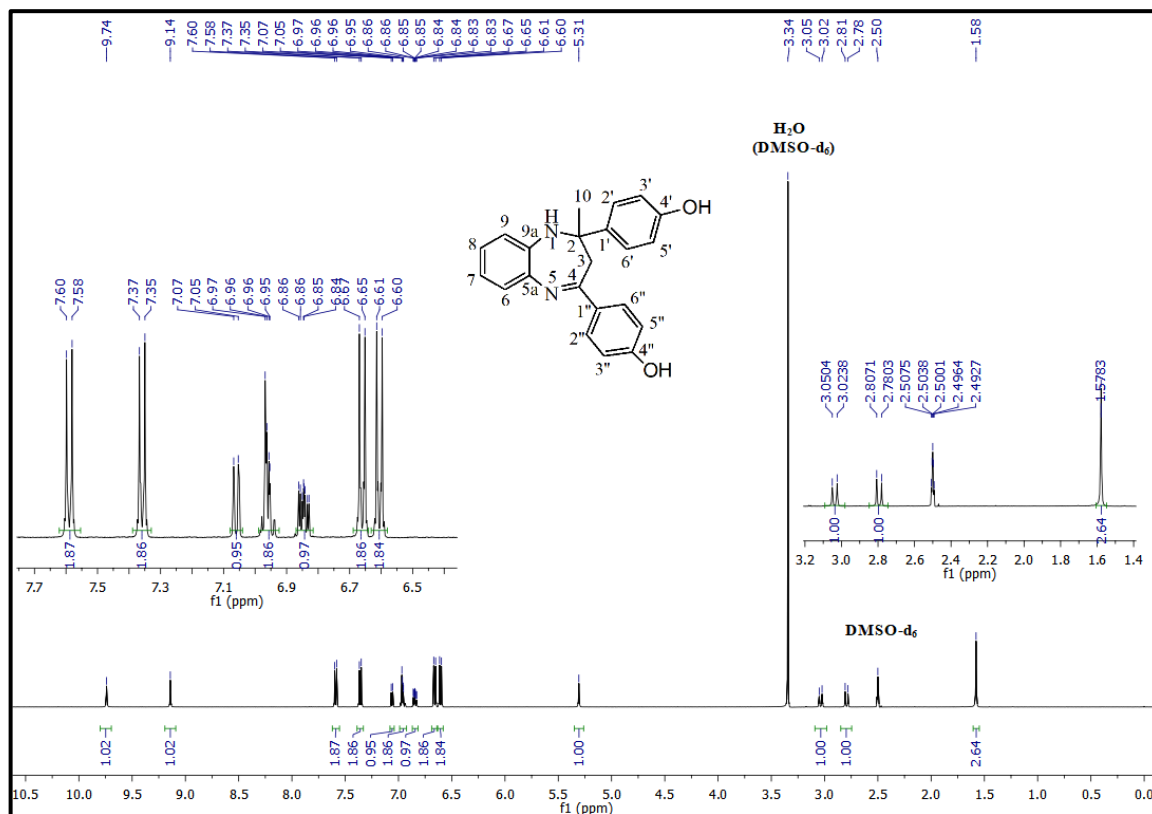
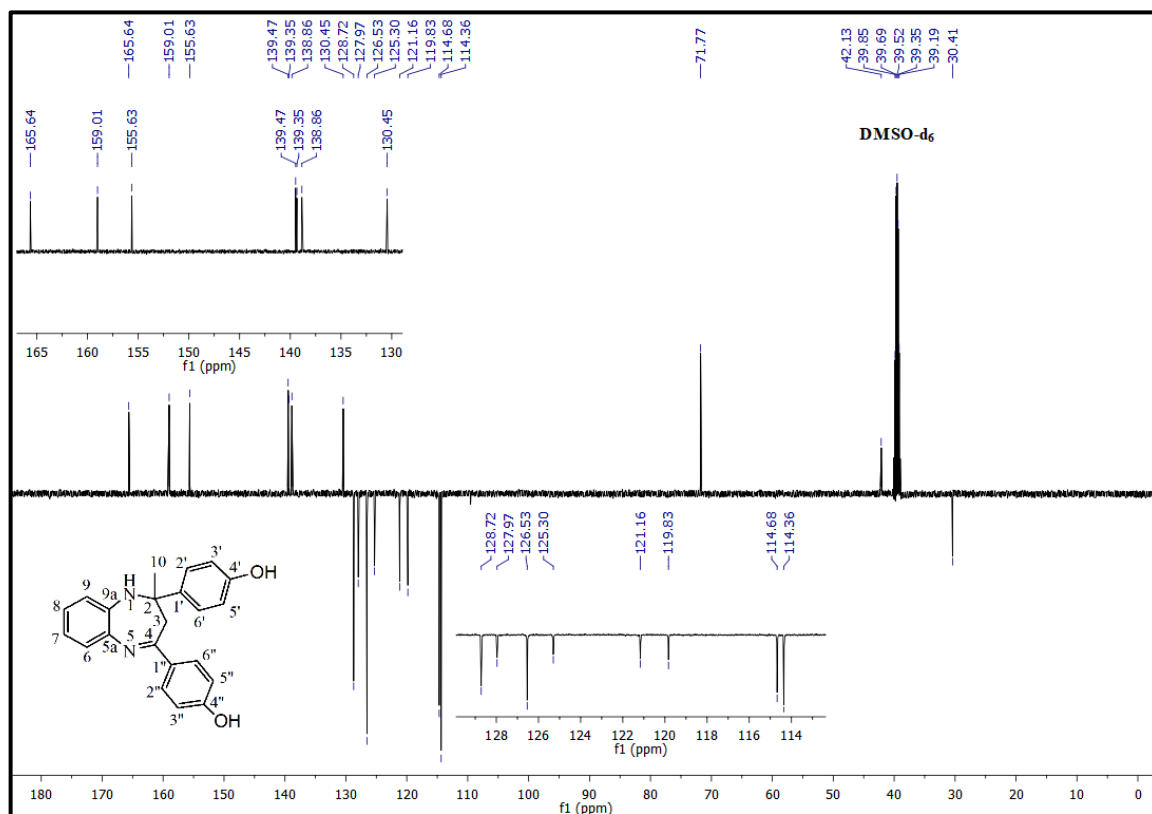


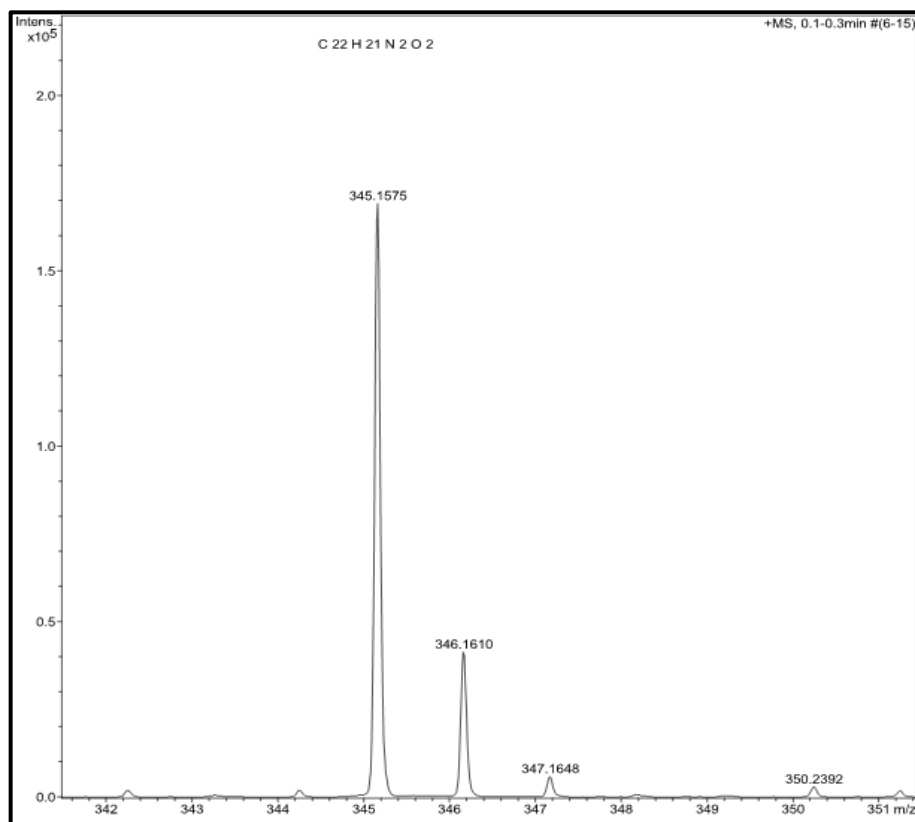
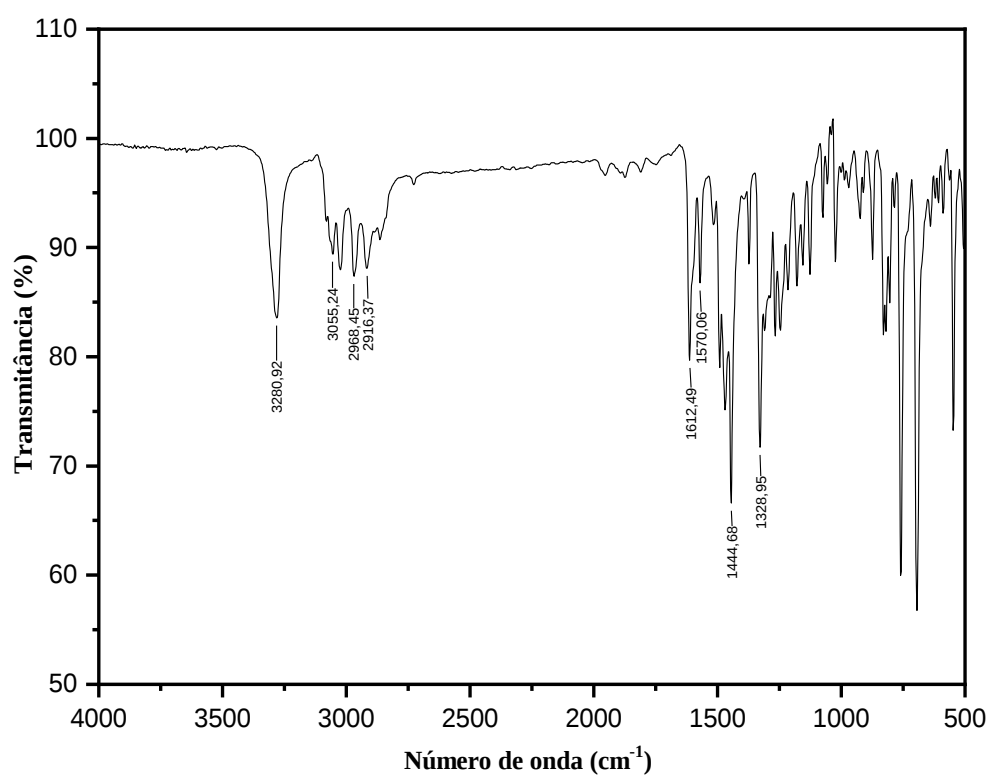
Espectro 8: Espectro de RMN ^{13}C (100MHz, CDCl_3) de **Bdz1**

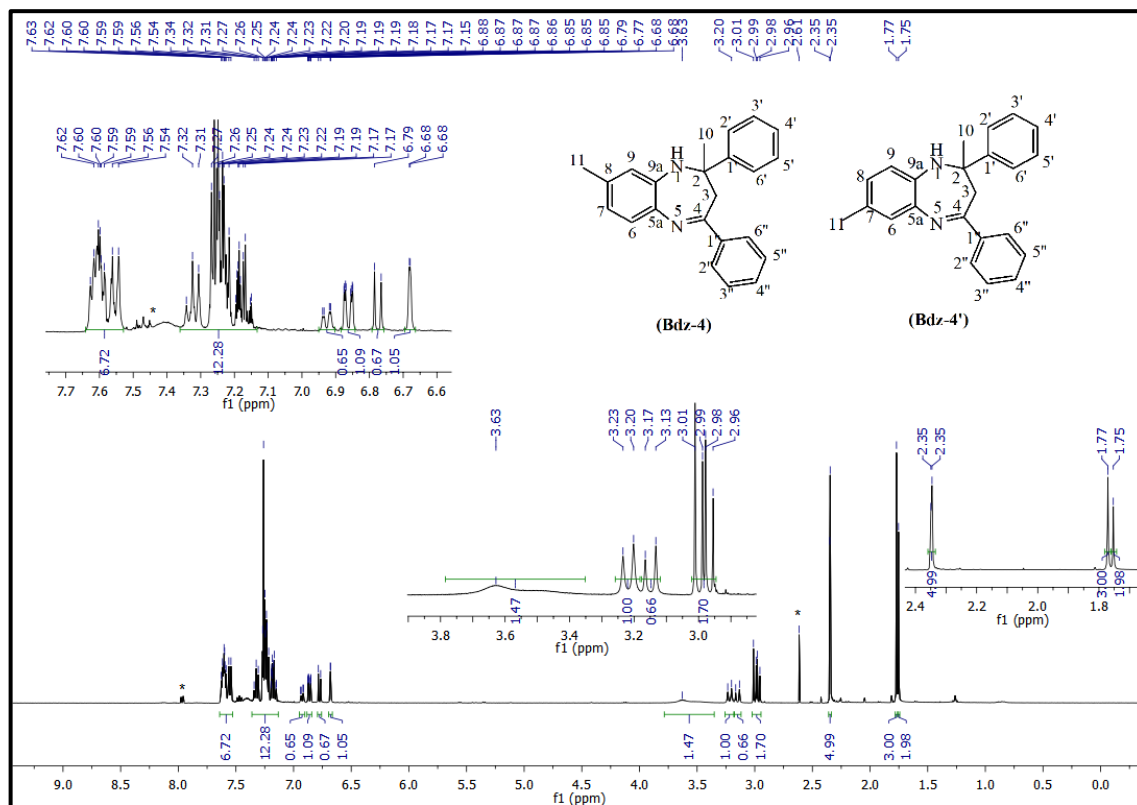


Espectro 9: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz1****Espectro 10:** Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz2**

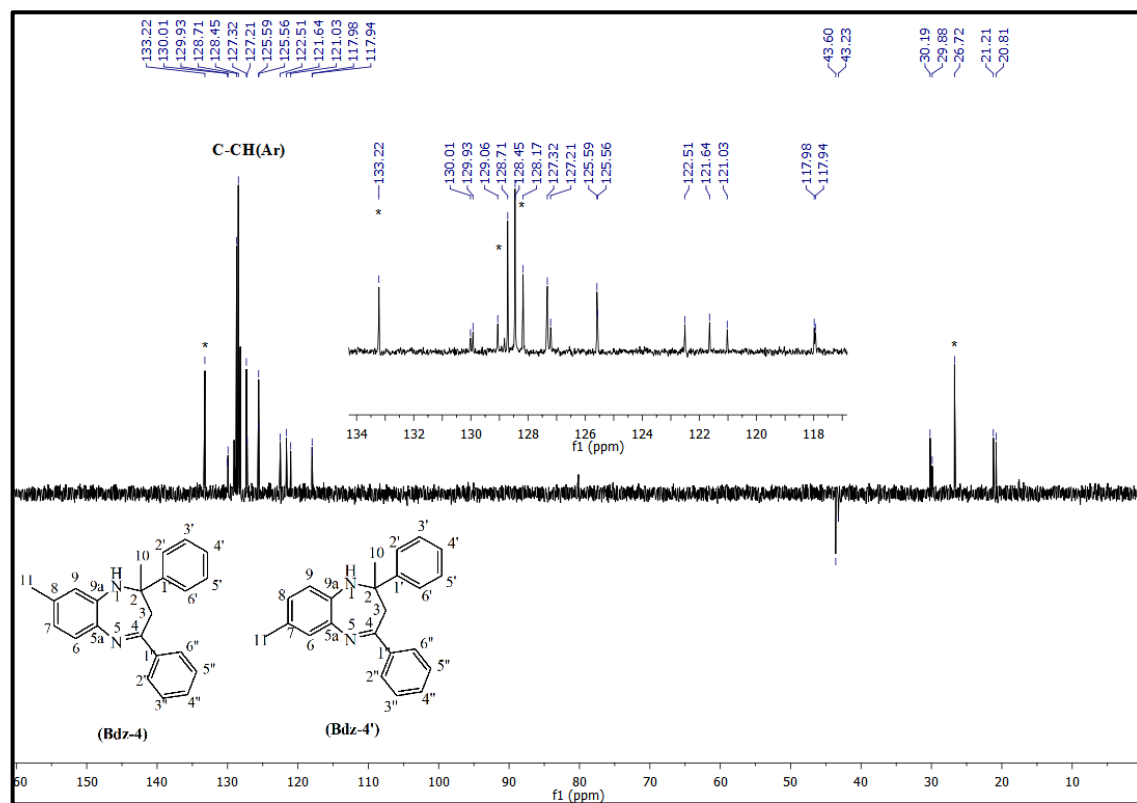
Espectro 13: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz2****Espectro 14:** Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz3**

Espectro 15: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz3****Espectro 16:** Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz3**

Espectro 17: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz3****Espectro 18:** Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz4** e **Bdz 4'**

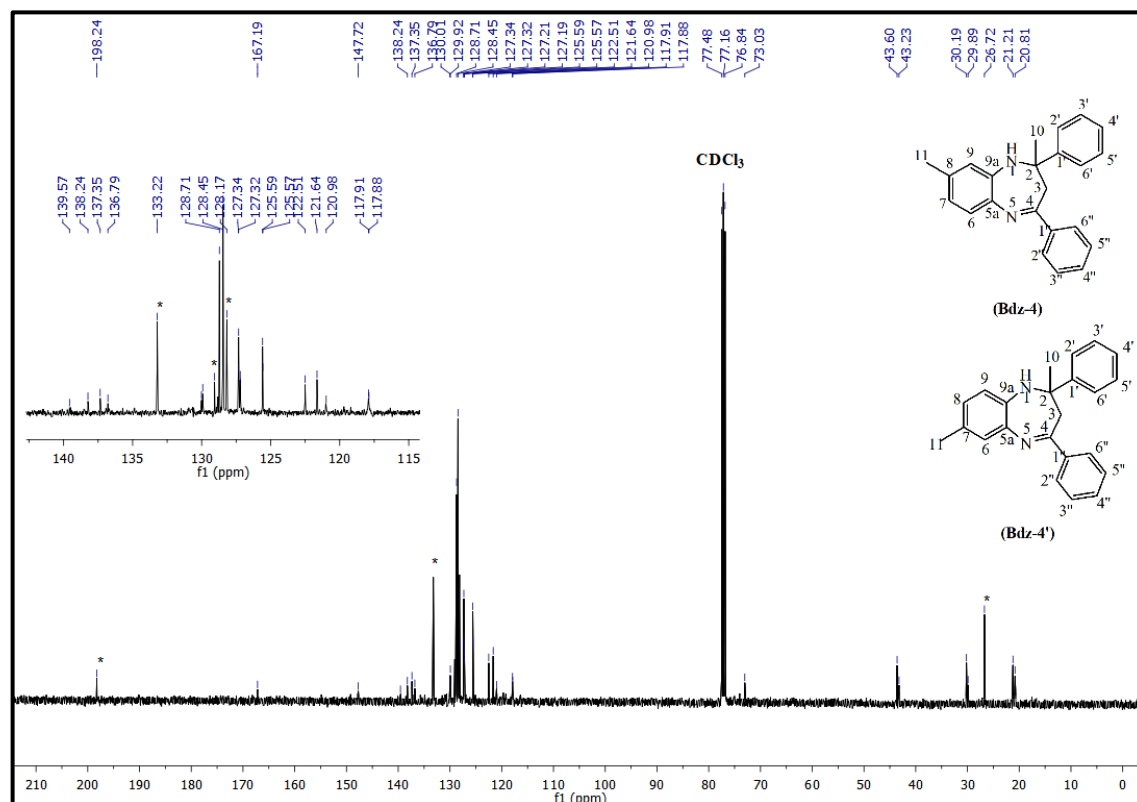
Espectro 19: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **Bdz4** + **Bdz4'**

*sinais de impureza da acetofenona de partida após coluna cromatográfica (possui R_f muito próximo de **Bdz4/4'**).

Espectro 20: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135 (100 MHz, CDCl_3) de **Bdz4** + **Bdz4'**

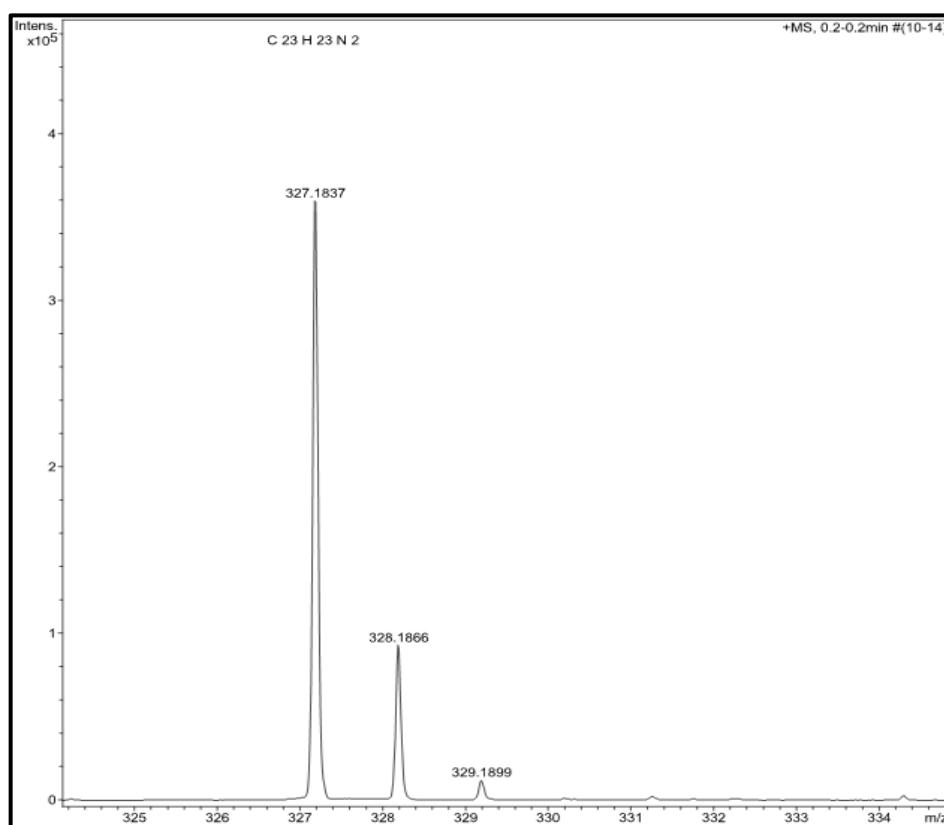
*sinais de impureza da acetofenona de partida após coluna cromatográfica (possui R_f muito próximo de **Bdz4/4'**).

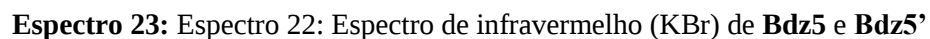
Espectro 21: Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de **Bdz4** + **Bdz4'**



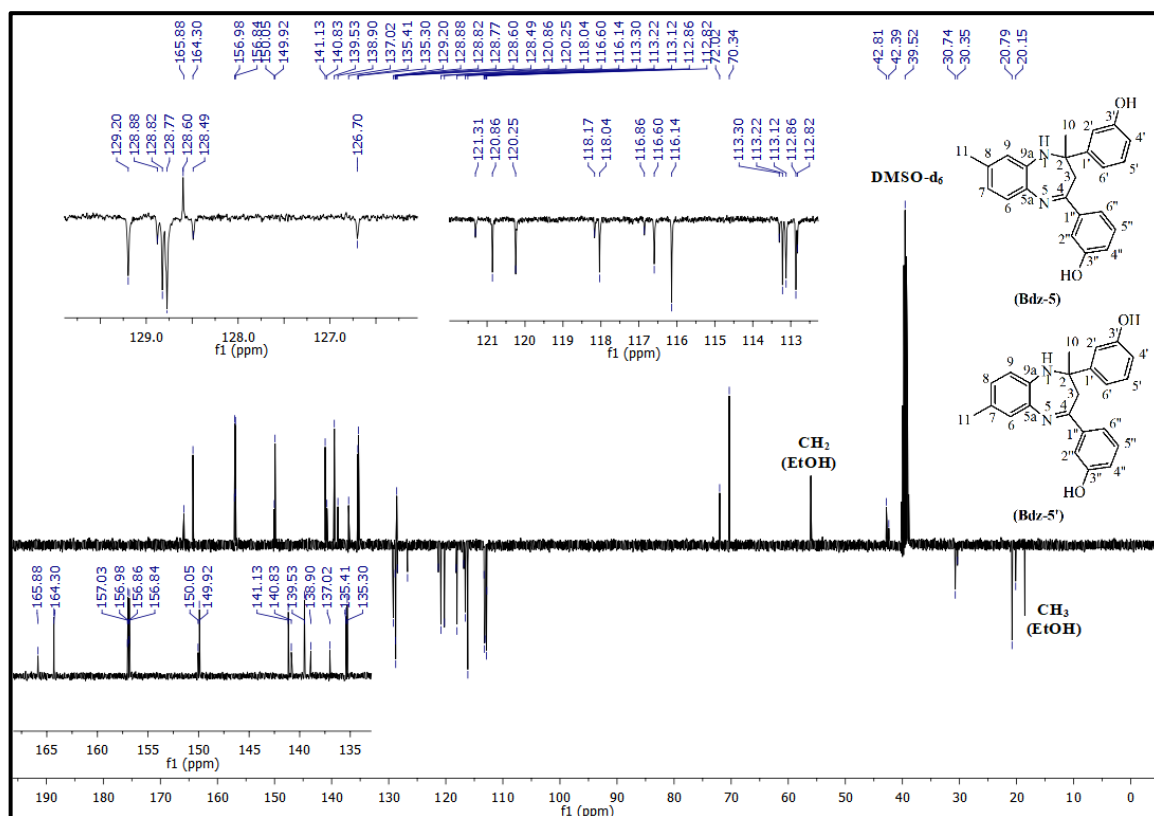
*sinais de impureza da acetofenona de partida após coluna cromatográfica (possui R_f muito próximo de **Bdz4/4'**).

Espectro 22: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz4** e **Bdz4'**

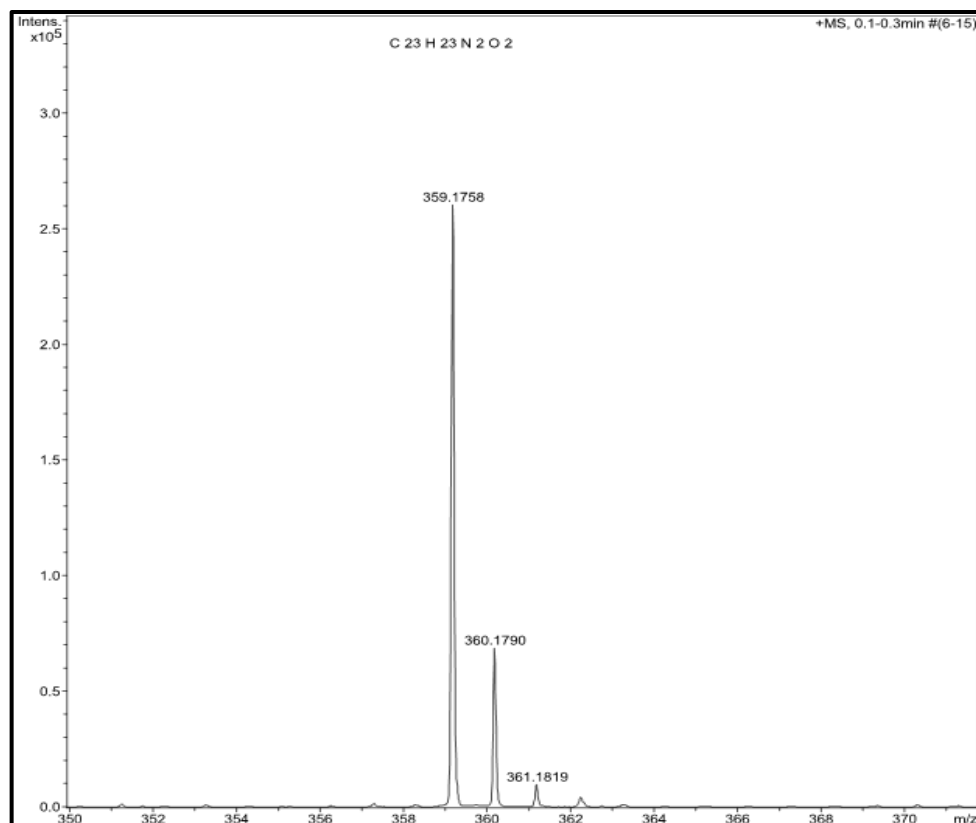


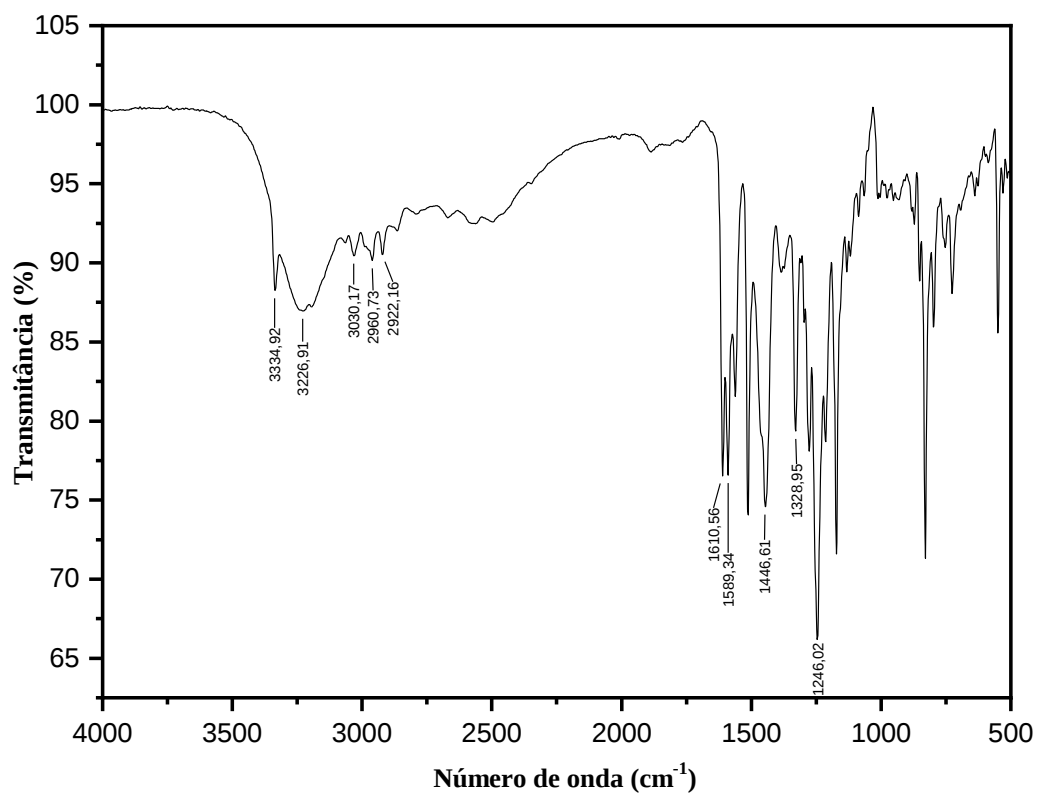
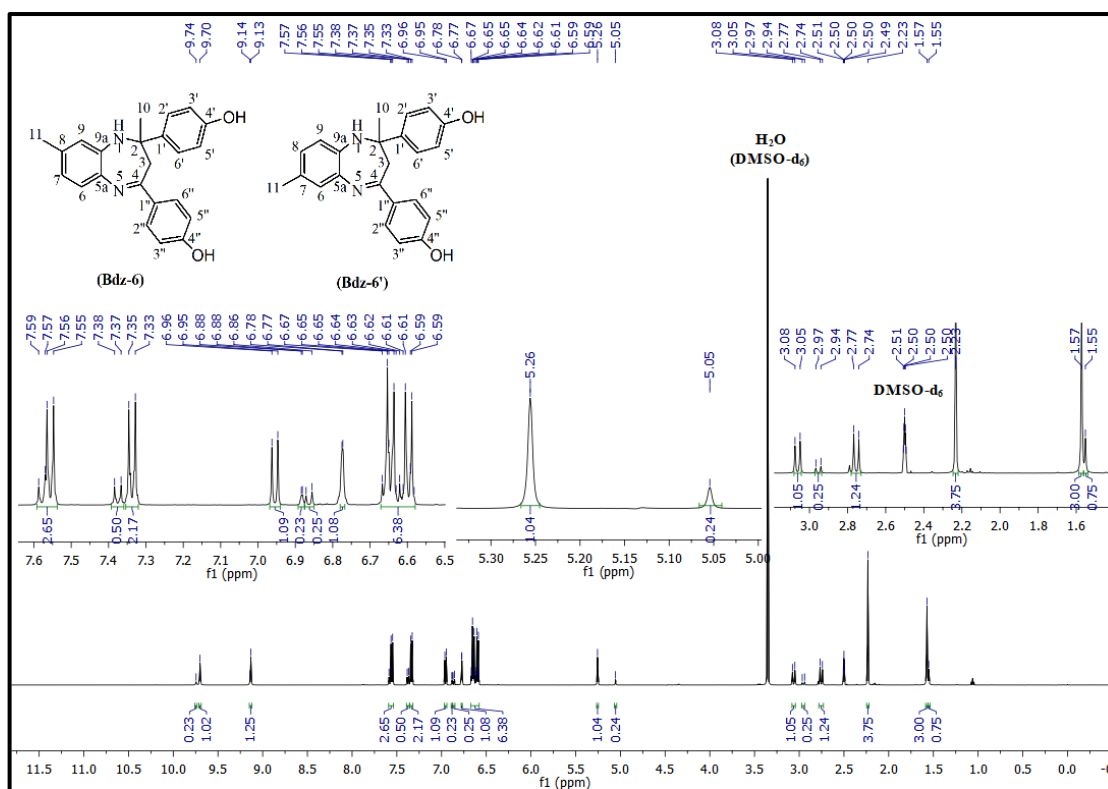


Espectro 25: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz5** + **Bdz5'**

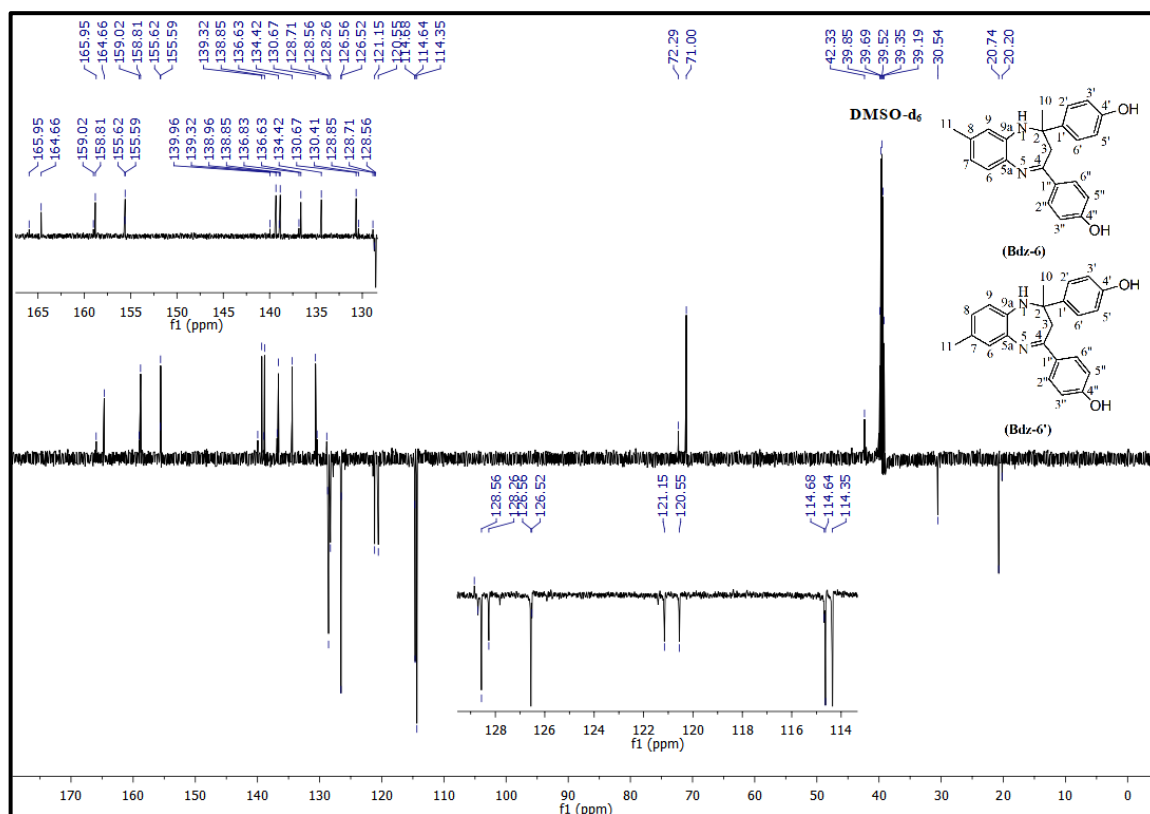


Espectro 26: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz5** e **Bdz5'**

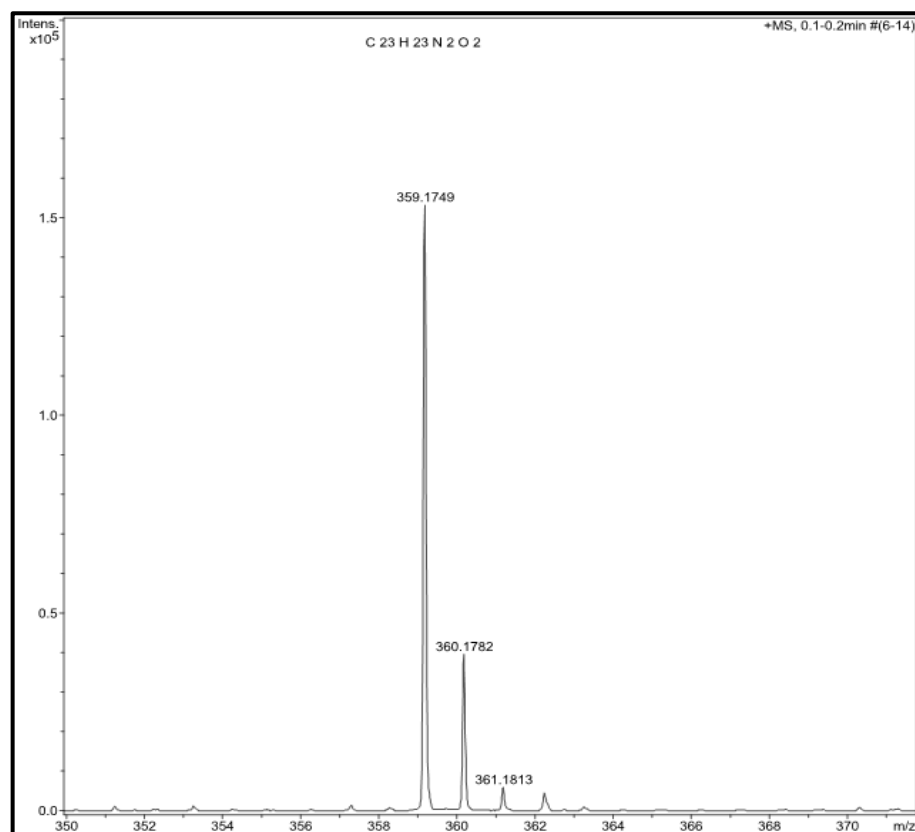


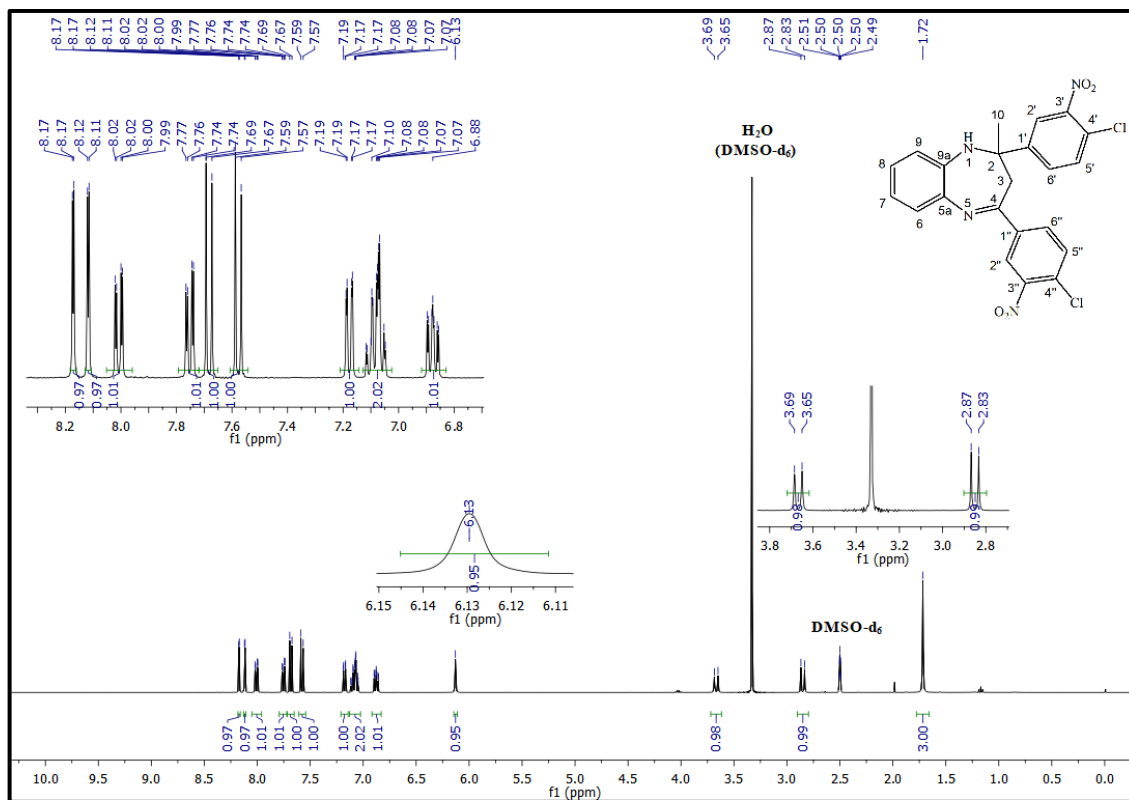
Espectro 27: Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz6** e **Bdz6'****Espectro 28:** Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de **Bdz6** + **Bdz6'**

Espectro 29: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz6** + **Bdz6'**

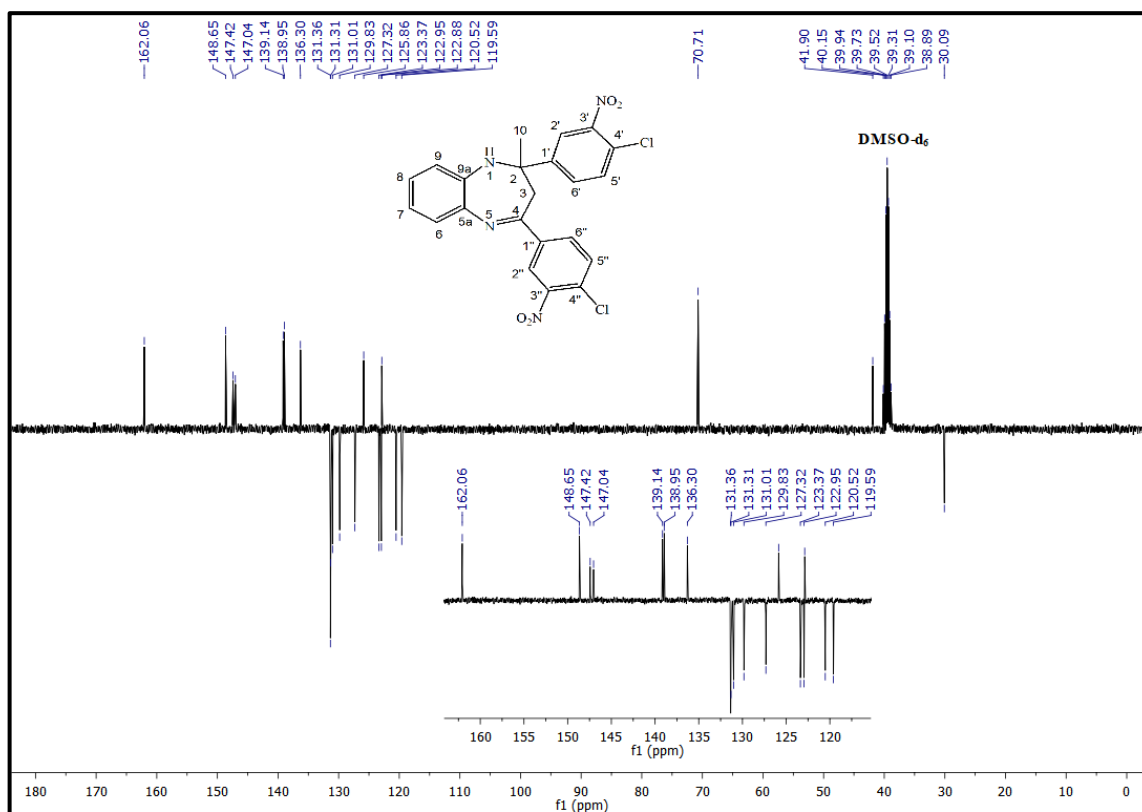


Espectro 30: Razão isotópica do espectro de massas de alta resolução de **Bdz6** e **Bdz6'**

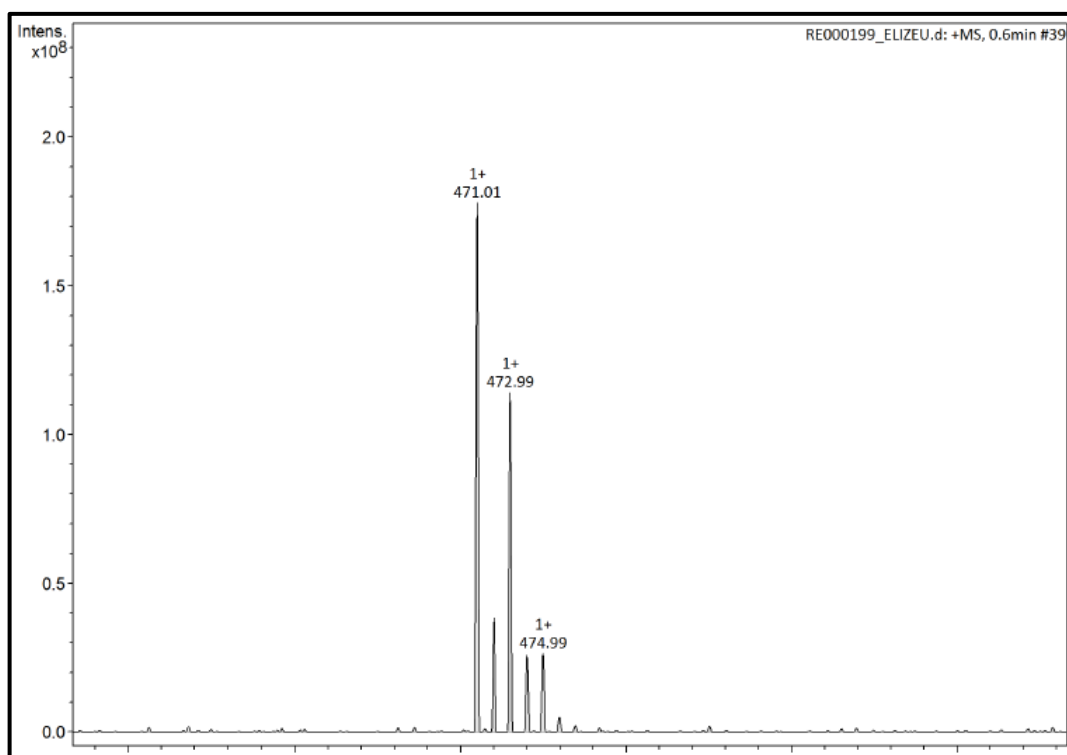




Espectro 33: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz7**

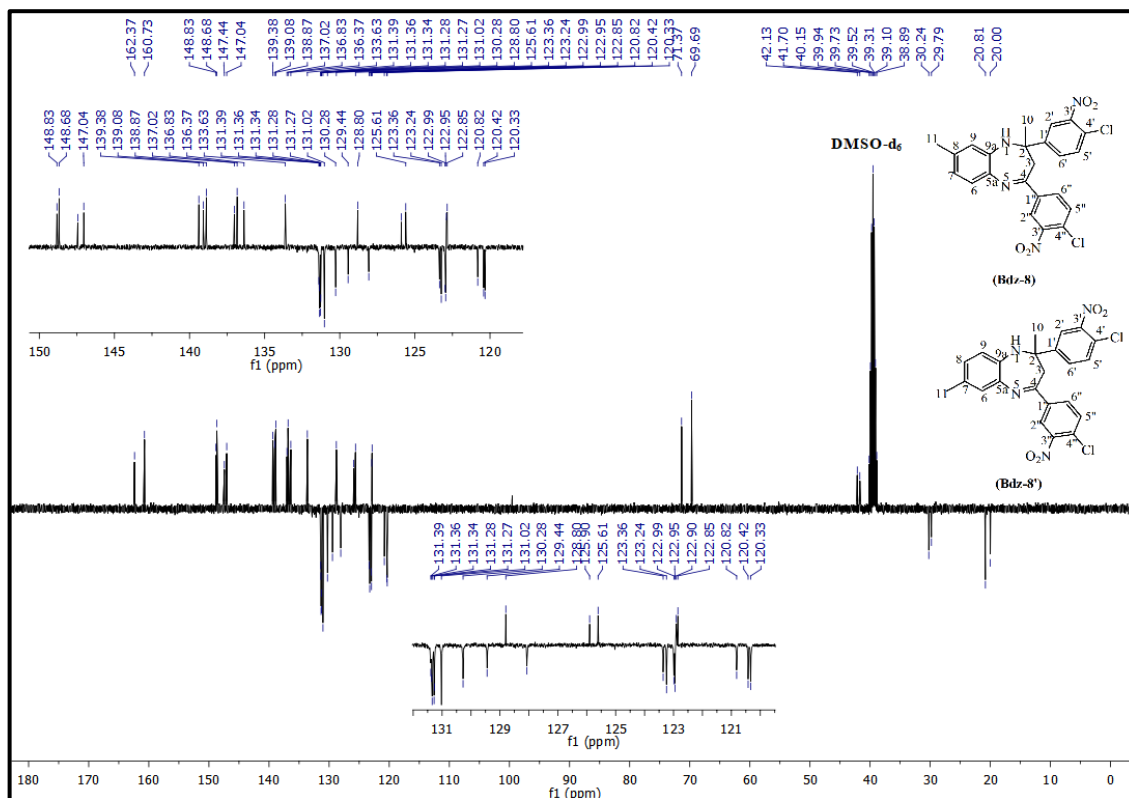


Espectro 34: Razão isotópica do espectro de massas de baixa resolução de **Bdz7**

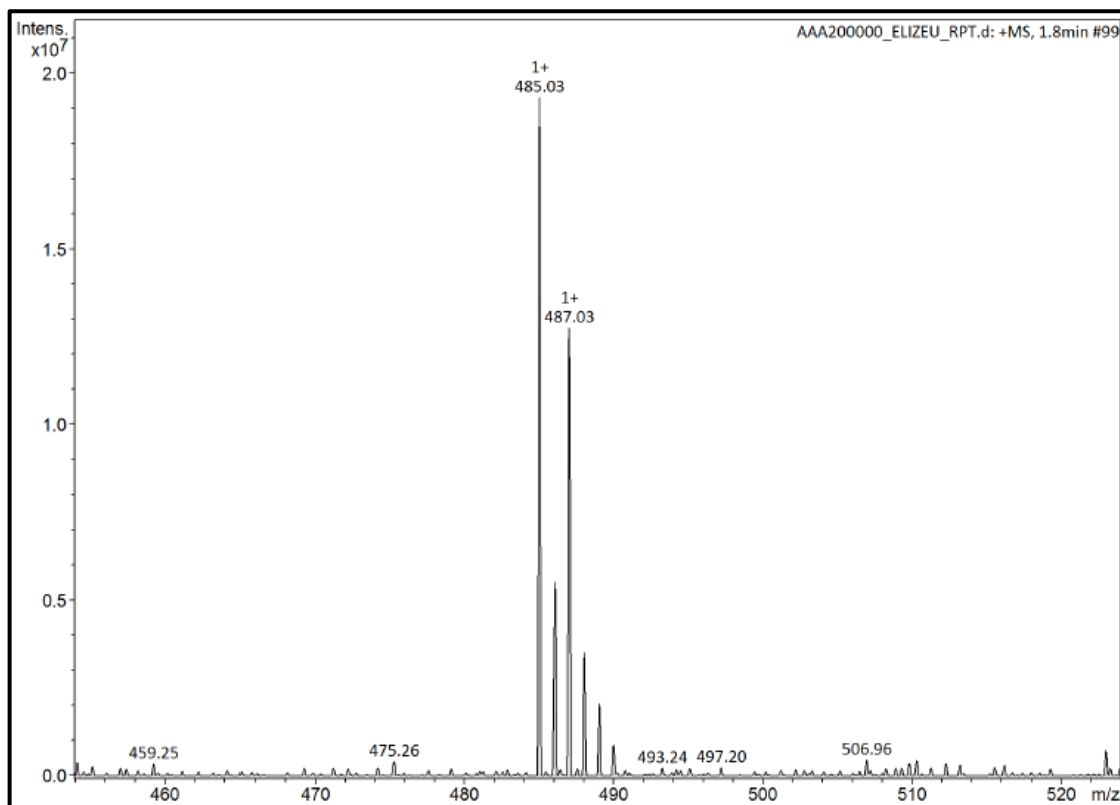


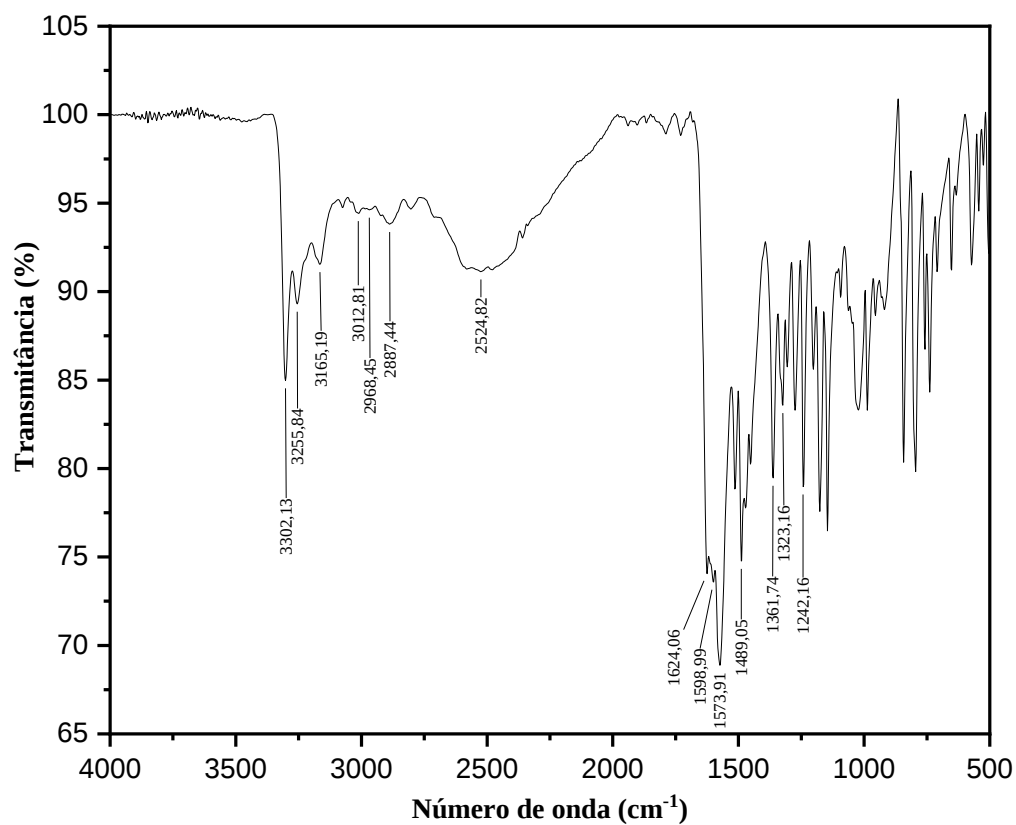
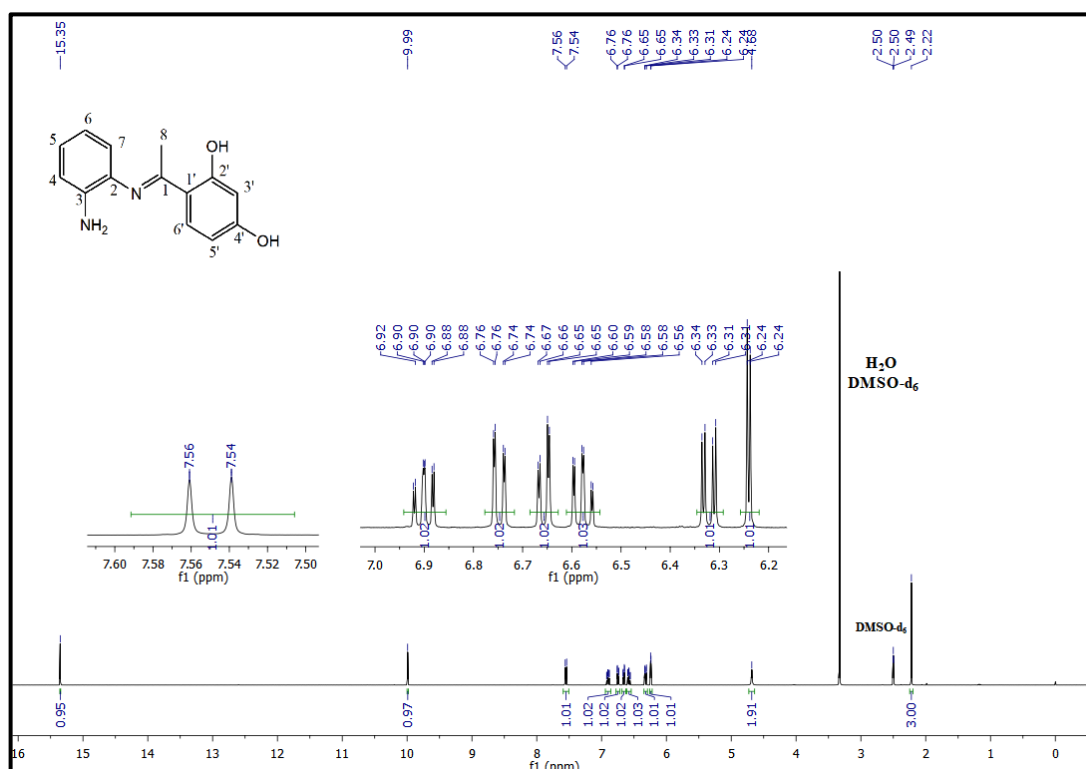
Espectro 35: Espectro de infravermelho (KBr) de **Bdz8** e **Bdz8'**

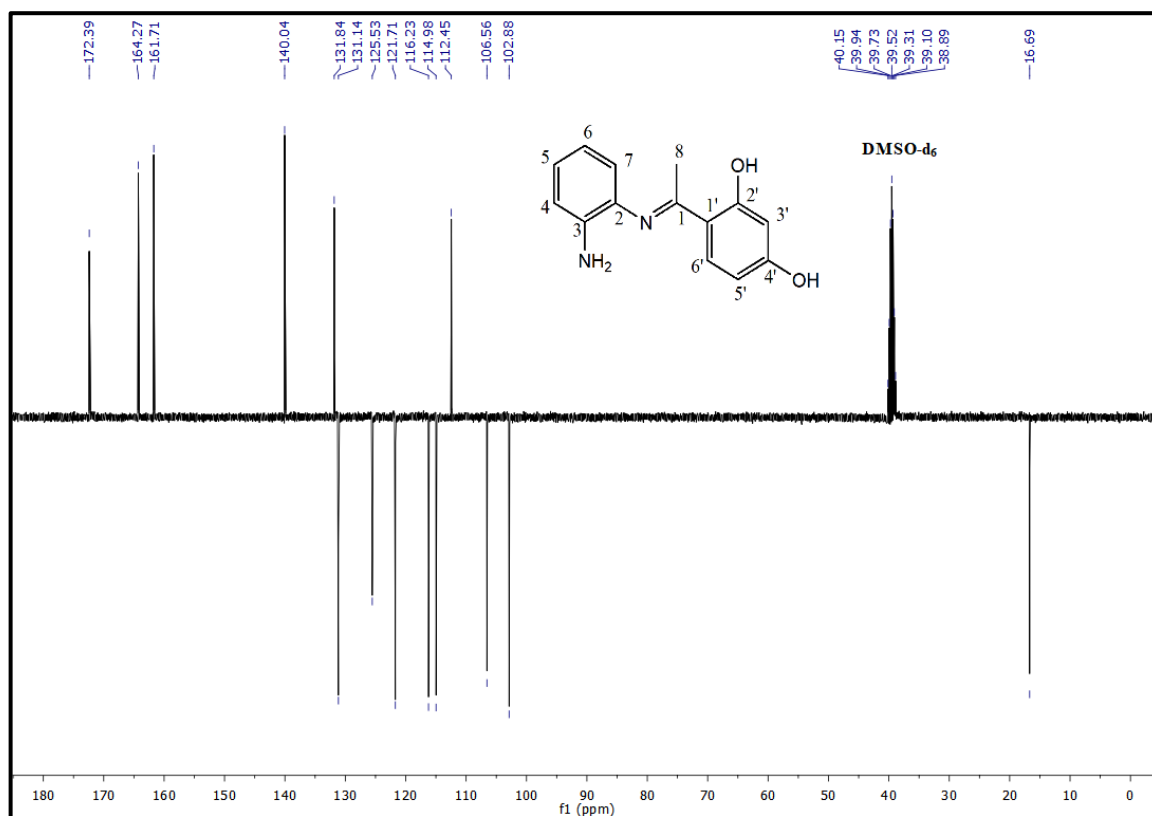
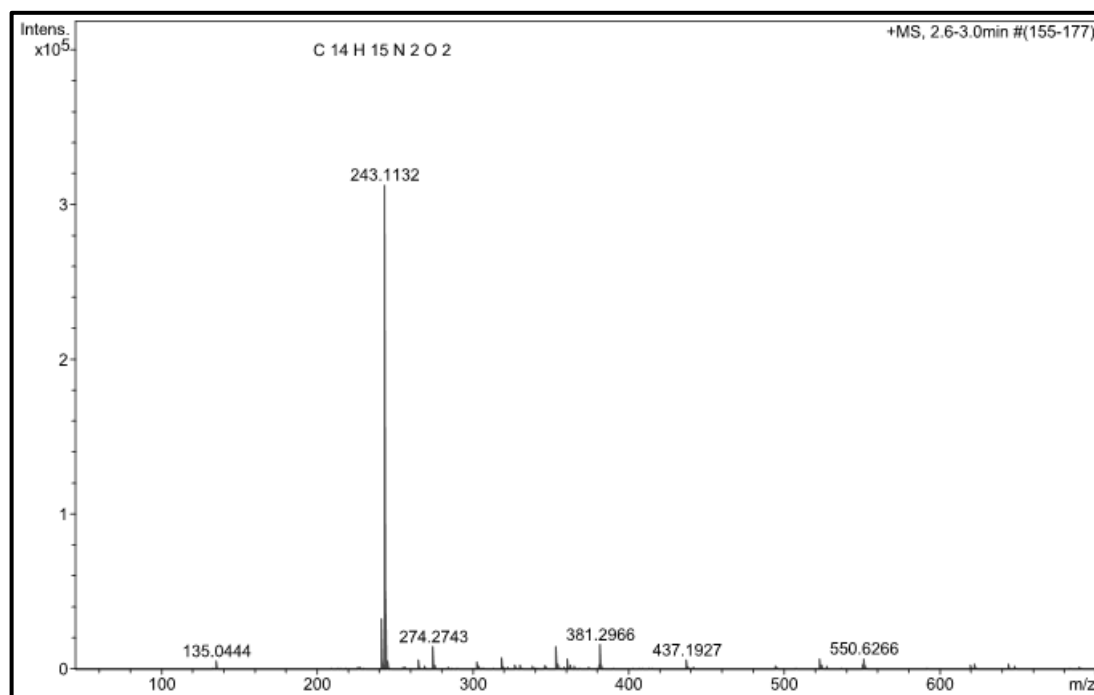
Espectro 37: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de **Bdz8** + **Bdz8'**

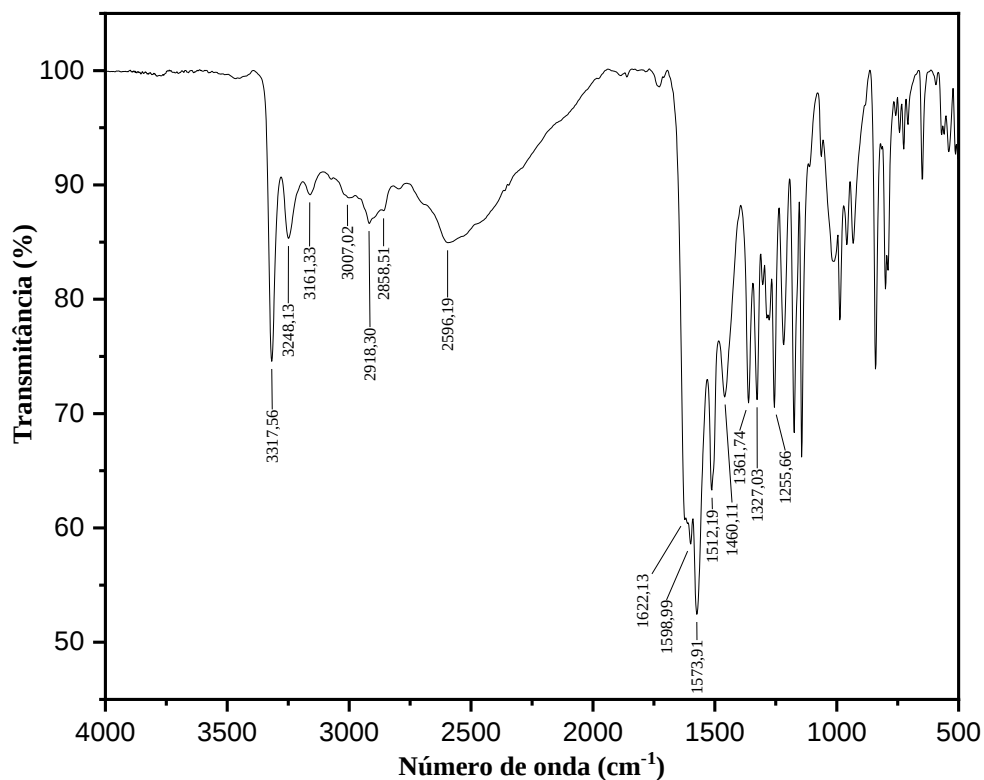
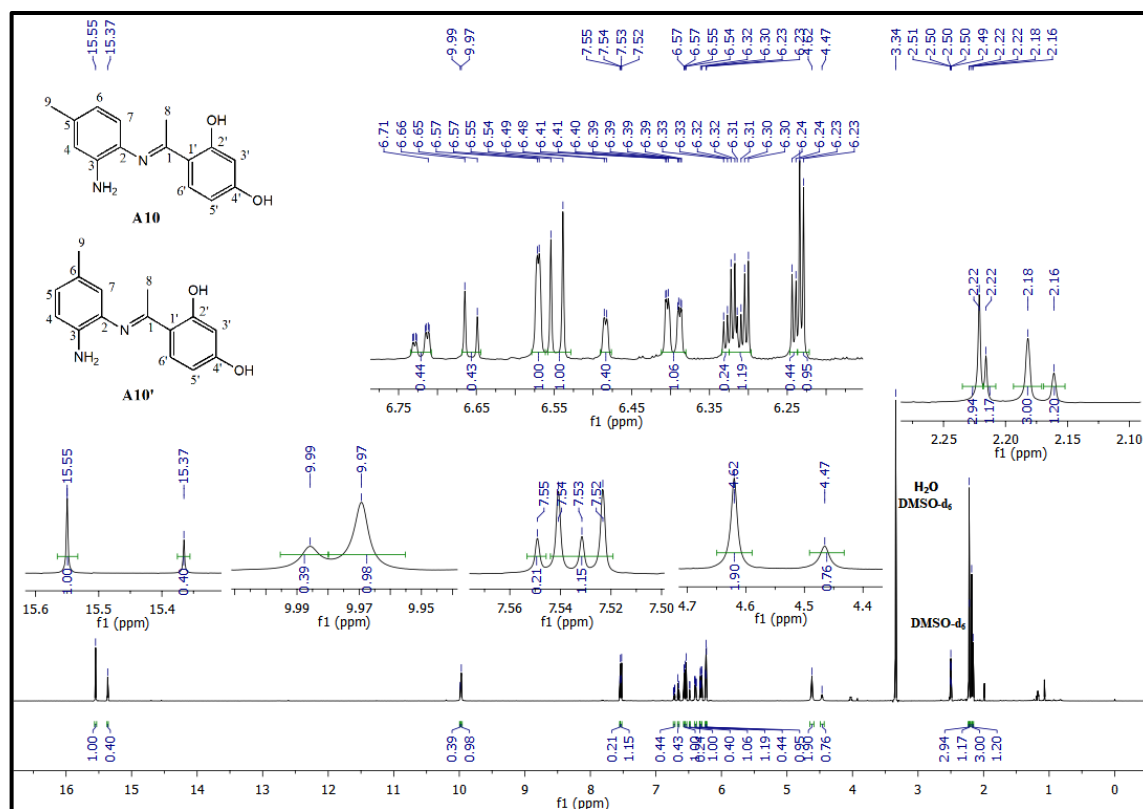


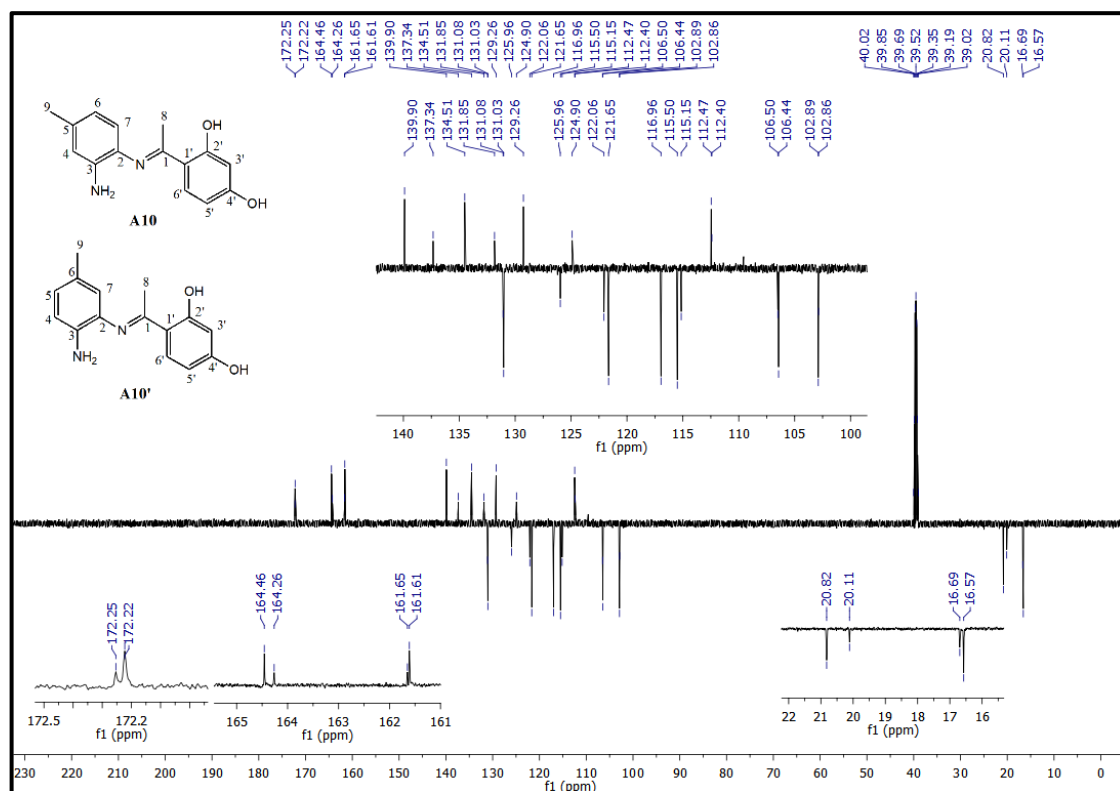
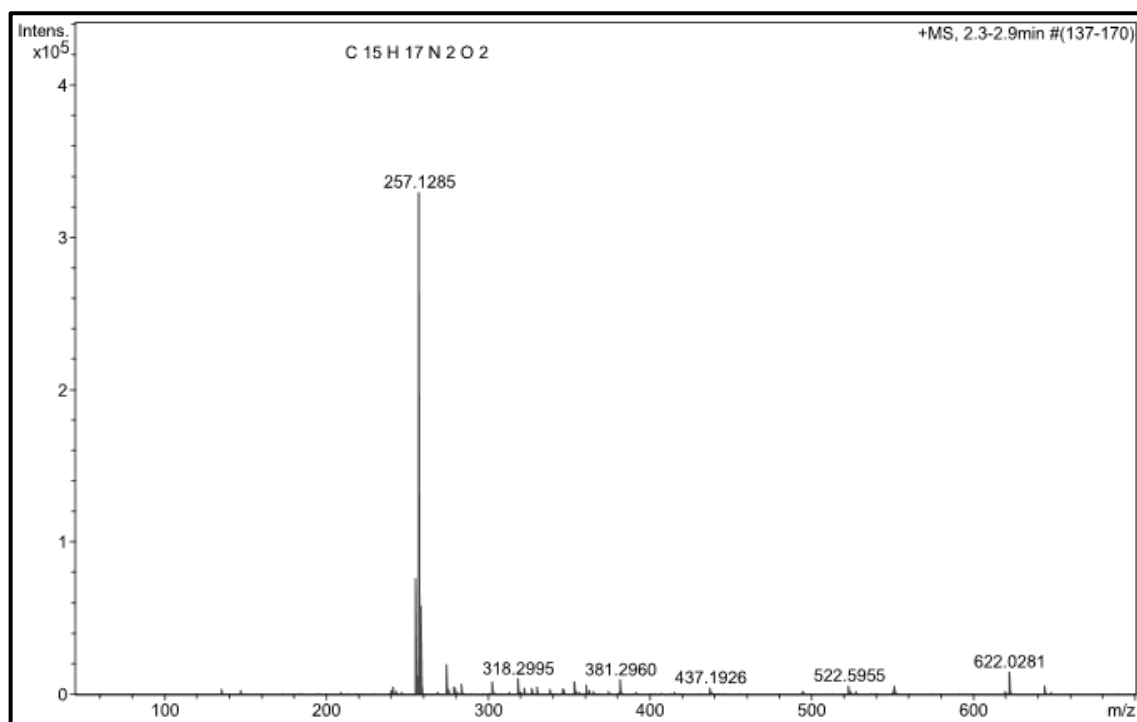
Espectro 38: Razão isotópica do espectro de massas de baixa resolução de **Bdz8** e **Bdz8'**



Espectro 39: Espectro de infravermelho (KBr) de **A9****Espectro 40:** Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) de **A9**

Espectro 41: Espectro de RMN ^{13}C -APT (100 MHz, DMSO- d_6) de **A9****Espectro 42:** Espectro de massas de alta resolução de **A9**

Espectro 43: Espectro de infravermelho (KBr) de **A10** e **A10'****Espectro 44:** Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) de **A10** + **A10'**

Espectro 45: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de A10 + A10'**Espectro 46:** Espectro de massas de alta resolução de A10 e A10'

Capítulo 8

Anexo

ANEXO: PUBLICAÇÃO GERADA A PARTIR DO TRABALHO DE TESE

Article

<https://doi.org/10.21577/0105-5283.20200217>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-12, 2020
Printed in Brazil - ©2020 Sociedade Brasileira de Química



Synthesis of Hydroxybenzodiazepines with Potential Antioxidant and Antifungal Action

Elizeu C. Caiana,^a Bruno O. de Veras,^b Antônio L. de Souza^a and Neide Queiroz^{a,*}

^aDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

^bDepartamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife-PE, Brazil

Benzodiazepines derivatives are nitrogen heterocyclic compounds that have various industrial, synthetic, and medicinal applications. Therefore, its potential fully justifies every effort towards the improvement of new, selective, and competent production of these heterocyclic compounds. The novelty of this study encompasses the synthesis of new hydroxylated analogs of 1,5-benzodiazepine together with the evaluation of their biological potential as antioxidants and antifungal candidates. Additionally, the reported antifungal activity against fungi of the *Sporothrix schenckii* complex inaugurates an unprecedented property for this class of compounds. The results of biological activities assays suggest that the novel 2,7-dimethyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-1H-1,5-benzodiazepine possesses a high antifungal activity against all fungal strains evaluated of the *Sporothrix* genus and outstanding total antioxidant capacity. Besides, *in silico* studies have evidenced that the hydroxylated derivatives have the best aqueous solubility and cell permeability profile, which makes them superior in comparison with the commercial antifungal itraconazole, a drug commonly used in the treatment of sporotrichosis.

Keywords: biological activities, solvent effect, ADME properties, *Sporothrix*

Introduction

The heterocyclic compounds are an essential class of molecules with a wide spectrum of pharmacological properties. It includes 1,4- and 1,5-benzodiazepines, which are of fundamental importance due to having a broad structural and pharmacological potential.^{1,2} Some examples of benzodiazepines commercially available as psychotherapeutic agents over the years by pharmaceutical laboratories are illustrated in Figure 1.

In addition to the well-established applications of benzodiazepines, other pharmacological activities include antimicrobial,^{3,4} anti-inflammatory,^{5,6} antioxidant,^{6,8,11} analgesic,^{7,12} anticancer,^{13,14} anthelmintic,¹⁴ leishmanicidal,¹⁵ antimalarial,¹⁶ antiviral¹⁷ and anti-HIV (human immunodeficiency virus).¹⁸ Furthermore, these compounds have found great use as intermediates in obtaining other fused ring heterocycles.¹⁹

It is known that the structural versatility of N-heterocyclic compounds allows the potentiation of the pharmacological properties of drugs or drug candidates. Therefore, incorporation of polar (e.g., hydroxyl) and non-polar (e.g., alkyl) groups enables the optimization of physical-

chemical parameters of the molecule, such as lipophilicity, solubility, number of donors and acceptors of hydrogen bonding and others, resulting in increased interactions with biomacromolecules and, therefore, in the intensification of biological activity.^{20,21} Consequently, this class continues to be explored in order to obtain new leading molecules for drug development that are more efficient for the treatment of the most varied diseases.

Previous work^{3,22,23} regarding the synthesis of 1,5-benzodiazepines is via cyclocondensation reactions of 1,2-diaminobenzene with ketones or α,β -unsaturated carbonyl compounds, making use of different catalysts. In the field of green chemistry, many studies²⁴ have investigated the use of organic acids, for the development of sustainable protocols. In some of them, the use of techniques such as microwaves^{25,26} and ultrasound²⁷ have also been described to achieve higher yields in shorter reaction times.

About the antioxidant activity of benzodiazepines, in general, it has been more evident in those containing a phenolic hydroxyl group in its structure, as for example, 6-hydroxy-2-methyl-2,4-bis(4-chlorophenyl)-2,3-dihydro-1H-1,5-benzodiazepine.¹⁰ The conjugated π systems favor hydrogen transfer of hydroxyl group due stabilization of the formed radical.²⁸ So, these molecules act as antioxidant

*e-mail: neide@quimica.ufpb.br